(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0007603
(43) 공개일자 2025년01월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C07K 16/28* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
*A61P 37/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C07K 16/2818* (2013.01)
*A61P 37/06* (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7039407
(22) 출원일자(국제) 2023년04월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년11월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/066258
(87) 국제공개번호 WO 2023/212611
국제공개일자 2023년11월02일
(30) 우선권주장
63/335,623 2022년04월27일 미국(US)

(71) 출원인
**아납티스바이오, 아이엔씨.**
미국 캘리포니아 92121 샌디에고 워터리지 서클 10770 스위트 210
(72) 발명자
**달 마틴 에드워드**
미국 캘리포니아 92121 샌디에고 워터리지 서클 10770 스위트 210
**팜리 스티븐**
미국 캘리포니아 92121 샌디에고 워터리지 서클 10770 스위트 210
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**리앤목특허법인**

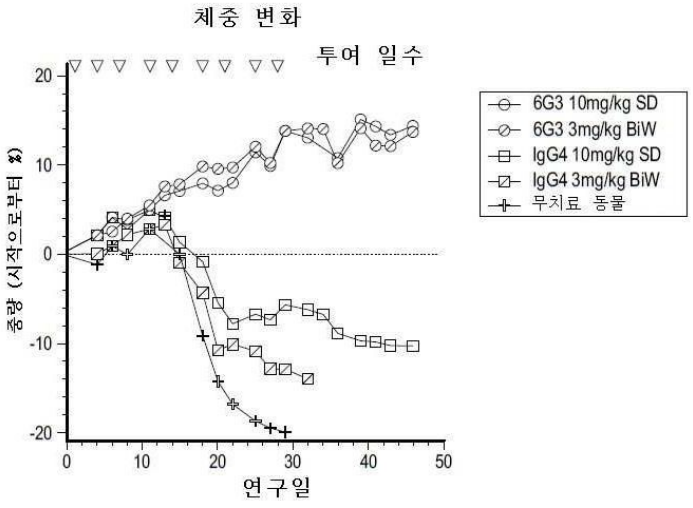
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **B 및 T 림프구 감쇠제(BTLA) 조절제 및 이를 사용하는 방법**

## *(57) 요 약*

BTLA-결합제 및 상기 결합제의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드, 그리고 BTLA 작용제에 반응하는 장애 또는 질환(예: 자가면역 또는 염증성 질환)을 치료하기 위해 상기 BTLA-결합제를 사용하는 방법.

## *대 표 도*



(52) CPC특허분류
*A61K 2039/505* (2013.01)
*A61K 2039/54* (2013.01)
*A61K 2039/545* (2013.01)
*C07K 2317/565* (2013.01)
*C07K 2317/92* (2013.01)
(72) 발명자
**리줄 폴**
미국 캘리포니아 92121 샌디에고 워터리지 서클 10770 스위트 210
**헤어 에릭**
미국 캘리포니아 92121 샌디에고 워터리지 서클 10770 스위트 210

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

면역 반응을 억제하기 위한, 자가면역 또는 염증성 질환 또는 상태의 치료를 위한 BTLA-결합제로서,

(i) 상기 BTLA-결합제는 매주 최소 7mg의 IV 용량으로 투여되고;

(ii) 상기 BTLA-결합제는 매주 최소 20mg의 SC 용량으로 투여되고;

(iii) 상기 BTLA-결합제는 30일에 한 번을 초과하지 않게 최소 150mg의 단일 IV 용량으로 투여되고; 또는

(iv) 상기 BTLA-결합제는 30일에 한 번을 초과하지 않게 최소 300mg의 단일 피하 용량으로 투여되고;

상기 BTLA-결합제는 면역글로불린 중쇄 가변 영역 및 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하고:

상기 면역글로불린 중쇄 가변 영역은

(a) $X^1SX^2MN$(서열번호 195)을 포함하는 CDRH1,

여기서 $X^1$은 N 또는 T이고, $X^2$는 W, F, H, G, P, R, K, D, S, L, V, N, 또는 Y이고,

(b) $RIYPX^1GX^2X^3DTNYX^4GKFK$(서열번호 196)를 포함하는 CDRH2, 및

여기서:

$X^1$은 없거나 A이고;

$X^2$는 D, Y, Q, G, L, F, H, S, P, R, 또는 T이고;

$X^3$는 G, Y, A, F, S, D, V, T, E, K, 또는 R이고;

$X^4$는 N, V, Q, R, A, F, Y, S, G, P, 또는 T이고;

(c) $X^1SGTFX^2X^3GNYX^4X^5YFDV$(서열번호 197)를 포함하는 CDRH3을 포함하고,

여기서:

$X^1$은 K 또는 R이고;

$X^2$는 N 또는 D이고;

$X^3$은 D, S, F, Y, F, V, S, G, T, R, I, L, 또는 E이고;

$X^4$는 R 또는 H이고;

$X^5$는 W, R, F, L, N, Y, P, I, V, A, S, G, R, 또는 K;

또는 서열번호 43-156 중 어느 하나의 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR; 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

상기 면역글로불린 경쇄 가변 영역은

(a) $RX^1SENIYX^2X^3LA$(서열번호 198)를 포함하는 CDRL1,

여기서

$X^1$은 A 또는 V이고;

$X^2$는 S 또는 N이고;

$X^3$는 H, N 또는 Y이고;

(b) $X^1AX^2NLAX^3$(서열번호 199)을 포함하는 CDRL2,

여기서

$X^1$은 A 또는 N이고;

$X^2$는 T 또는 K이고;

$X^3$는 N, L, Q, G, F, V, K, S, R, T, H, 또는 P이고;

(c) $QX^1FX^2GPPLT$(서열번호 200)를 포함하는 CDRL3을 포함하고,

여기서

$X^1$은 L 또는 H이고;

$X^2$는 W, F, Y, P, N, V, K, M, L, G 또는 S;

또는 서열번호 157-192 중 어느 하나의 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR; 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

또는 표 3에 명시된 BTLA-결합제.

**청구항 2**

청구항 1에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드는 다음 서열을 포함하는 것인 BTLA-결합제:

$QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYX^1FSX^2SX^3MNWVRQAPGQGLEWMGRIYPX^4GX^5X^6DTNYX^7GKFKGRVTITADKX^8TX^9TAYMELX^{10}SLRSEX^{11}TAV$
$X^{12}YX^{13}CAX^{14}SGTFX^{15}X^{16}GNYX^{17}X^{18}YFDVWGKGTTVTVSSA$(서열번호 193), 여기서

$X^1$은 A 또는 V이고;

$X^2$는 N 또는 T이고;

$X^3$은 W, F, H, G, P, R, K, D, S, L, V, N, 또는 Y이고;

$X^4$가 없거나 A이고;

$X^5$는 D, Y, Q, G, L, F, H, S, P, R, 또는 T이고;

$X^6$은 G, Y, A, F, S, D, V, T, E, K, 또는 R이고;

$X^7$은 N, V, Q, R, A, F, Y, S, G, P, 또는 T이고;

$X^8$은 S 또는 F이고;

$X^9$는 S, T, 또는 N이고;

$X^{10}$은 S 또는 R이고;

$X^{11}$은 D 또는 V이고;

$X^{12}$가 없거나 Y이고;

$X^{13}$은 Y 또는 F이고;

$X^{14}$는 K 또는 R이고;

$X^{15}$는 N 또는 D이고;

$X^{16}$은 D, S, F, Y, F, V, S, G, T, R, I, L, 또는 E이고;

$X^{17}$은 R 또는 H이고;

$X^{18}$은 W, R, F, L, N, Y, P, I, V, A, S, G, R, 또는 K인 것인 BTLA-결합제.

**청구항 3**

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드는 서열번호 43-156 중 하나, 또는 적어도 이의 CDRs; 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 BTLA-결합제.

**청구항 4**

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드는 다음 서열을 포함하는 것인 BTLA-결합제:

$X^{1}$IQ$X^{2}$TQSPSSLSASVGDRVTITCR$X^{3}$SENIY$X^{4}$$X^{5}$LAWYQQK$X^{6}$GKAPKLLIY$X^{7}$A$X^{8}$NLA$X^{9}$GVPSRFSGSGSGTD$X^{10}$TLTISSLQPEDFATYYCQ$X^{11}$F$X^{12}$GPPLTFGGGTKVEIKR(서열번호 194), 여기서

$X^{1}$은 A 또는 D이고;

$X^{2}$는 L 또는 M이고;

$X^{3}$는 A 또는 V이고;

$X^{4}$는 S 또는 N이고;

$X^{5}$는 H, N, 또는 Y이고;

$X^{6}$은 P 또는 Q이고;

$X^{7}$은 A 또는 N이고;

$X^{8}$은 T 또는 K이고;

$X^{9}$는 N, L, Q, G, F, V, K, S, R, T, H, 또는 P이고;

$X^{10}$은 F 또는 Y이고;

$X^{11}$은 L 또는 H이고;

$X^{12}$는 W, F, Y, P, N, V, K, M, L, G, S임.

**청구항 5**

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드는 서열번호 157-192 중 하나, 또는 적어도 이의 CDRs; 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 BTLA-결합제.

**청구항 6**

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 것인 BTLA-결합제:

(a) 서열번호 201을 포함하는 CDRH1;

(b) 서열번호 202를 포함하는 CDRH2;

(c) 서열번호 203을 포함하는 CDRH3;

(d) 서열번호 204를 포함하는 CDRL1;

(e) 서열번호 205를 포함하는 CDRL2; 및

(f) 서열번호 206을 포함하는 CDRL3.

**청구항 7**

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 144의 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDRs; 및 서열번호 174의 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDRs을 포함하거나; 또는 서열번호 144와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 면역글로불린 중쇄 가변 영역 및 서열번호 174의 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 BTLA-결합제.

**청구항 8**

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환이 류마티스 관절염, 이식편 대 숙주병, 건선, 또는 염증성 장 질환인 것인 BTLA-결합제.

**청구항 9**

인간 개체에서 BTLA 신호전달을 조절하는 방법으로서, 상기 방법은 포유류에 BTLA-결합제를 투여하는 것을 포함하며, 여기서:

(i) 상기 BTLA-결합제는 매주 최소 7mg의 IV 용량으로 투여되고;

(ii) 상기 BTLA-결합제는 매주 최소 20mg의 SC 용량으로 투여되고;

(iii) 상기 BTLA-결합제는 30일에 한 번을 초과하지 않게 최소 150mg의 단일 IV 용량으로 투여되고;

(ii) 상기 BTLA-결합제는 30일에 한 번을 초과하지 않게 최소 300mg의 단일 피하 용량으로 투여되고;

여기서 BTLA-결합제는 면역글로불린 중쇄 가변 영역 및 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하고:

상기 면역글로불린 중쇄 가변 영역은:

(d) $X^1SX^2MN$(서열번호 195)을 포함하는 CDRH1, 여기서 $X^1$은 N 또는 T이고, $X^2$는 W, F, H, G, P, R, K, D, S, L, V, N, 또는 Y이고

(e) $RIYPX^1GX^2X^3DTNYX^4GKFK$(서열번호 196)를 포함하는 CDRH2, 및

여기서:

$X^1$이 없거나 A이고;

$X^2$는 D, Y, Q, G, L, F, H, S, P, R, 또는 T이고;

$X^3$는 G, Y, A, F, S, D, V, T, E, K, 또는 R이고;

$X^4$는 N, V, Q, R, A, F, Y, S, G, P, 또는 T이고;

(f) $X^1SGTFX^2X^3GNYX^4X^5YFDV$(서열번호 197)를 포함하는 CDRH3을 포함하고,

여기서:

$X^1$은 K 또는 R이고;

$X^2$는 N 또는 D이고;

$X^3$은 D, S, F, Y, F, V, S, G, T, R, I, L, 또는 E이고;

$X^4$는 R 또는 H이고;

$X^5$는 W, R, F, L, N, Y, P, I, V, A, S, G, R, 또는 K이고;

또는 서열번호 43-156 중 어느 하나의 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR을 포함하거나; 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

및

상기 면역글로불린 경쇄 가변 영역은:

(b) $RX^1SENIYX^2X^3LA$(서열번호 198)를 포함하는 CDRL1, 여기서

$X^1$은 A 또는 V이고;

$X^2$는 S 또는 N이고;

$X^3$는 H, N, 또는 Y이고;

(b) $X^1AX^2NLAX^3$(서열번호 199)을 포함하는 CDRL2, 및

여기서

$X^1$은 A 또는 N이고;

$X^2$는 T 또는 K이고;

$X^3$는 N, L, Q, G, F, V, K, S, R, T, H, 또는 P이고;

(c) $QX^1FX^2GPPLT$(서열번호 200)를 포함하는 CDRL3을 포함하고,

여기서

$X^1$은 L 또는 H이고;

$X^2$는 W, F, Y, P, N, V, K, M, L, G 또는 S이고;

또는 서열번호 157-192 중 어느 하나의 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDRs; 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

또는 표 3에 명시된 BTLA-결합제.

**청구항 10**

청구항 9에 있어서, 상기 포유류는 BTLA 조절에 반응하는 장애를 가지고 있으며, 그 장애가 치료되는 것인 방법.

**청구항 11**

청구항 10에 있어서, 상기 장애는 자가면역 질환 또는 염증성 질환인 것인 방법.

**청구항 12**

청구항 10 또는 청구항 11에 있어서, 상기 질환이 류마티스 관절염, 이식편 대 숙주병, 건선, 또는 염증성 장 질환인 것인 방법.

**청구항 13**

청구항 9 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드는 다음 서열을 포함하는 것인 방법:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYX$^{1}$FSX$^{2}$SX$^{3}$MNWVRQAPGQGLEWMGRIYPX$^{4}$GX$^{5}$X$^{6}$DTNYX$^{7}$GKFKGRVTITADKX$^{8}$TX$^{9}$TAYMELX$^{10}$SLRSEX$^{11}$TAV
X$^{12}$YX$^{13}$CAX$^{14}$SGTFX$^{15}$X$^{16}$GNYX$^{17}$X$^{18}$YFDVWGKGTTVTVSSA(서열번호 193), 여기서

X$^{1}$은 A 또는 V이고;

X$^{2}$는 N 또는 T이고;

X$^{3}$은 W, F, H, G, P, R, K, D, S, L, V, N, 또는 Y이고;

X$^{4}$가 없거나 A이고;

X$^{5}$는 D, Y, Q, G, L, F, H, S, P, R, 또는 T이고;

X$^{6}$은 G, Y, A, F, S, D, V, T, E, K, 또는 R이고;

X$^{7}$은 N, V, Q, R, A, F, Y, S, G, P, 또는 T이고;

X$^{8}$은 S 또는 F이고;

X$^{9}$는 S, T, 또는 N이고;

X$^{10}$은 S 또는 R이고;

X$^{11}$은 D 또는 V이고;

X$^{12}$가 없거나 Y이고;

X$^{13}$은 Y 또는 F이고;

X$^{14}$는 K 또는 R이고;

X$^{15}$는 N 또는 D이고;

X$^{16}$은 D, S, F, Y, F, V, S, G, T, R, I, L, 또는 E이고;

X$^{17}$은 R 또는 H이고;

X$^{18}$은 W, R, F, L, N, Y, P, I, V, A, S, G, R, 또는 K인 것인 방법.

**청구항 14**

청구항 9 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드는 서열번호 43-156 중 하나, 또는 적어도 이의 CDRs; 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

**청구항 15**

청구항 9 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드는 다음 서열을 포함하는 것인 방법:

X$^{1}$IQX$^{2}$TQSPSSLSASVGDRVTITCRX$^{3}$SENIYX$^{4}$X$^{5}$LAWYQQKX$^{6}$GKAPKLLIYX$^{7}$AX$^{8}$NLAX$^{9}$GVPSRFSGSGSGTDX$^{10}$TLTISSLQPEDFATYYCQX$^{11}$FX$^{12}$

GPPLTFGGGTKVEIKR(서열번호 194), 여기서

$X^1$은 A 또는 D이고;

$X^2$는 L 또는 M이고;

$X^3$는 A 또는 V이고;

$X^4$는 S 또는 N이고;

$X^5$는 H, N, 또는 Y이고;

$X^6$은 P 또는 Q이고;

$X^7$은 A 또는 N이고;

$X^8$은 T 또는 K이고;

$X^9$는 N, L, Q, G, F, V, K, S, R, T, H, 또는 P이고;

$X^{10}$은 F 또는 Y이고;

$X^{11}$은 L 또는 H이고;

$X^{12}$는 W, F, Y, P, N, V, K, M, L, G, S임.

**청구항 16**

청구항 9 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드가 서열번호 157-192 중 어느 하나, 또는 적어도 이의 CDRs; 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

**청구항 17**

청구항 9 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 BTLA-결합제는 다음을 포함하는 방법:

(a) 서열번호 201을 포함하는 CDRH1;

(b) 서열번호 202를 포함하는 CDRH2;

(c) 서열번호 203을 포함하는 CDRH3;

(d) 서열번호 204를 포함하는 CDRL1;

(e) 서열번호 205를 포함하는 CDRL2; 및

(f) 서열번호 206을 포함하는 CDRL3.

**청구항 18**

청구항 9 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 BTLA-결합제는 서열번호 144의 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDRs; 및 서열번호 174의 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDRs을 포함하거나; 또는 서열번호 144와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 174의 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

**청구항 19**

BTLA-결합제로 치료를 위한 개체를 선택하는 방법으로서, 개체의 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직 샘플에서 가용성 BTLA(sBTLA)를 검출하는 단계; 및 그 개체의 샘플에서 sBTLA 농도가 동일한 유형의 정상적이고 질환이 없는 개체의 sBTLA 수준보다 낮을 경우 치료를 위해 그 개체를 선택하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 20**

청구항 19에 있어서, 상기 방법은 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직 샘플 내 sBTLA 농도를 참조 sBTLA 농도와 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 21**

청구항 20의 방법에서, 상기 참조 sBTLA 농도는 동일한 유형의 다른 정상적이고 질환이 없는 개체의 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직 내 sBTLA 농도이거나, 그러한 개체 집단의 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직 내 sBTLA 농도의 통계적 분석에 의해 확립된 참조 sBTLA 농도인 것인 방법.

**청구항 22**

청구항 19 내지 청구항 21 중 어느 한 항에 있어서, 개체에게 BTLA-결합제를 투여하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 23**

청구항 22에 있어서, 상기 BTLA-결합제는 서열번호 144의 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDRs; 및 서열번호 174의 면역글로불린 중쇄 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDRs을 포함하거나; 서열번호 144와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 174와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 BTLA-결합제.

**청구항 24**

청구항 19 내지 청구항 23 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체가 자가면역 또는 염증성 질환을 가지고 있는 것인 방법.

**청구항 25**

청구항 24에 있어서, 상기 질환은 류마티스 관절염, 이식편 대 숙주병, 건선, 또는 염증성 장 질환인 것인 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 특허 출원은 2022년 4월 27일에 출원된 미국 가특허 출원 제63/335,623호에 대한 우선권을 주장하며, 해당 출원의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 전자적으로 제출된 자료의 참조에 의한 통합

[0004] 본 명세서에는 동시에 제출된 컴퓨터 판독 가능 뉴클레오티드/아미노산 서열 목록이 전체적으로 참고로 포함되어 있으며 다음과 같이 식별된다: 2023년 4월 12일자 "767170.XML"이라는 이름의 339,641바이트 XML 파일 1개.

### *배 경 기 술*

[0005] T 림프구는 T 세포 수용체(TCR) 결합과 공동 자극 분자에서 나오는 양성 신호의 조합에 의해 네이브(naive) 상태로부터 활성화된다. 반대로, 공동 억제 분자는 양성 공동 자극 신호를 상쇄하기 위해 음성 신호를 전달함으로써 T 세포 활동을 조절하는 데 중요한 역할을 한다. 공동억제 분자는 자기 면역 관용을 유지하고 감염 및 염증과 같은 면역 손상을 해결한 후 활성화된 T 세포를 조절하는 체크포인트 역할을 한다.

[0006] CD28은 T 세포의 주요 공동 자극 분자로, 항원 제시 세포(APC) 표면의 리간드 B7.1이나 B7.2와 결합하면 세포 내 신호를 전달해 TCR과 동시에 작용해 T 세포의 증식과 분화를 강화시킨다. 동일한 리간드가 T 세포에 대한 공동 억제 분자인 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA-4)에 결합하면 T 세포의 증식과 효과기 기능이 억제된다(Chambers et al., Ann. Rev. Immunol., 19:565-594, 2001; Egen et al., Nature Immunol., 3:611-618,

2002). 마찬가지로, PD-L1을 발현하는 세포가 T 세포의 공동 억제 분자인 PD-1과 결합하면 T 세포의 증식과 효과기 기능이 억제된다(Carter et al. Eur J Immunol., 32:634-43, 2002).

[0007] 음성 체크포인트 신호의 기능 장애는 일반적으로 자가반응성 B 및 T 림프구를 제어하는 억제 신호를 방해하여 만성 염증 상태에 공헌할 수 있다. 자가면역 장애가 있는 환자의 경우, 면역 체계는 신체의 정상 조직을 마치 이물질인 것처럼 반응하고, 자가 항원에 대한 내성이 깨진 활성화된 T 세포와 B 세포가 조직에 침투할 수 있다. 결과적으로, 자가면역 T 및 B 림프구는 염증과 조직 손상을 매개한다. B 및 T 림프구 감쇠제(BTLA), 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA-4), 및 PD-1과 같은 공동 억제 분자를 발현하는 림프구는 일반적으로 해당 리간드를 발현하는 조직 내의 다른 면역 세포나 비면역 세포에 의해 억제된다.

[0008] 공동 억제 분자를 녹아웃하거나 공동 억제 상호작용을 약리적으로 차단하면 억제적 브레이크가 해소되고 종양 특이적 T 세포 집단의 확장을 유도하여 그들로 하여금 다양한 암 동물 모델에서 종양 세포를 공격하고 사멸시키도록 하는 것으로 나타났다. BTLA 녹아웃된 마우스는 실험적 자가면역성 뇌척수염에 대한 민감도가 증가했다(Watanabe et al., Nat. Immunol., 4:670-679, 2003). 반대로, 마우스 BTLA를 표적으로 하는 작용제 항체는 T 세포 활성을 억제하는 것으로 나타났으며 이식편 대 숙주병(GvHD)의 마우스 모델에서 효능이 입증되었다(Albring et al., J. Exp. Med., 207: 2551-2559, 2010).

[0009] BTLA의 리간드는 헤르페스 바이러스 진입 매개체(HVEM, Herpes virus entry mediator)로, 종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 14(TNFRSF14)로도 알려져 있다. HVEM은 또한 두 가지 분비형 성장 인자인 림포톡신 알파와 LIGHT를 결합하는 양성 공동 자극 분자이며, 단순포진 바이러스(HSV)가 세포로 진입하는 데에도 사용된다. 종양 세포나 다른 면역 세포 상에 발현된 HVEM에 의한 T 세포의 BTLA 결합은 음성적 억제 신호를 초래한다. BTLA에 결합하여 작용시키는 항-BTLA 항체는 기본(native) 리간드 HVEM이 전달하는 것과 유사한 직접적인 음성 신호를 유도할 수 있으므로, 자가면역 및 염증성 질환에서 자가반응성 T 세포와 B 세포 반응을 억제할 수 있다. 게다가, 자연적인 HVEM-BTLA 상호작용을 방해하지 않고 BTLA와 결합하는 작용제 항체는 자연적인 공동억제 신호를 증강시킬 수 있다.

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0010] 따라서 BTLA를 결합하고 면역 체크포인트 신호를 조절할 수 있는 약제가 필요하다.

### *과제의 해결 수단*

[0011] 발명의 간략한 요약

[0012] 본 명세서에는 BTLA 신호 전달을 조절하거나, 면역 반응을 억제하거나, 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하는 방법에 사용하기 위한 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 BTLA-결합제가 제공된다.

[0013] 또한, 이하의 자세한 설명에 의해 알 수 있듯이, 관련된 조성물 및 방법도 제공된다.

### *도면의 간단한 설명*

[0014] 도 1은 인간 BTLA와 시노몰구스 원숭이 BTLA 세포외 영역에 대한 6G3 항체의 표면 플라스몬 공명 결합 동역학 결과를 나타낸다.

도 2는 인간 BTLA 및 시노몰구스 원숭이 BTLA 세포외 영역에 대한 6G3 항체의 Kinetic Exclusion Assay 결합 동역학 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3은 인간 BTLA 및시노몰구스 원숭이 BTLA로 안정적으로 형질감염된 293c18 세포에 6G3 항체가 결합한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 6G3 항체가 정상 공여자 인간 말초혈액 $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, 및 $CD20^+$ B 세포에 결합한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5a는 6G3 항체가 정상적인 시노몰구스 원숭이 말초혈액 $CD3^+$ T 세포에 결합한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5b는 6G3 항체가 정상적인 시노몰구스 원숭이 말초혈액 $CD20^+$ B 세포에 결합한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5c는 참조 항-BTLA 항체가 정상적인 시노몰구스 원숭이 말초혈액 $CD3^+$ 및 $CD3^-$ 세포에 결합한 결과를 나타내는 유세포 분석 도트 플롯이다.

도 5d는 6G3 항체가 정상적인 시노몰구스 원숭이 말초혈액 $CD3^+$ 및 $CD3^-$ 세포에 결합한 결과를 나타내는 유세포 분석 도트 플롯이다.

도 6은 경쟁 검정 결과를 나타낸 그래프로, 인간 BTLA로 안정적으로 형질감염된 293c18 세포에 결합을 두고 항-BTLA 항체가 HVEM-Fc 및 미리 형성된 HVEM-Fc/삼량체 LIGHT 복합체와 경쟁하는 능력을 보여준다.

도 7a는 인간 BTLA 세포외 도메인(검정색)의 결정 구조에 대한 리본 모델 그림으로, 인간 HVEM 세포외 결합 도메인(회색)의 결정 구조에 대한 공간 채우기 모델과 도킹된 것이다. 이 모델은 6G3 항체에 의해 결합된 인간 BTLA의 펩티드를 매핑하는 수소-중수소 교환 실험의 결과를 보여준다.

도 7b는 인간 BTLA 세포외 도메인(검정색)의 결정 구조에 대한 리본 모델 그림으로, 인간 HVEM 세포외 결합 도메인(회색)의 결정 구조에 대한 공간 채우기 모델과 도킹된 것이다. 이 분자는 도 7a에 표시된 분자의 관점에 비하여 30° 회전되었으며, 참조 항-BTLA 길항제 항체에 의해 결합된 인간 BTLA의 펩티드를 매핑하는 수소-중수소 교환 실험의 결과를 나타낸다.

도 8은 BTLA와 HVEM이 동일한 세포에서 발현될 때 LIGHT로 유도되는 HVEM 신호를 측정하는 HVEM-NF-κB HEK 293 루시퍼라제 리포터 검정에서 6G3 항체의 억제 활성을 나타내는 그래프이다.

도 9a는 형질감염된 293c18 세포 표면에서 BTLA와 HVEM의 결합을 측정하는 형광 공명 에너지 전달 검정의 결과를 나타내는 그래프로, 이는 항-BTLA 항체가 동일한 세포 표면에서 BTLA와 HVEM의 결합과 경쟁하는 능력을 보여준다.

도 9b는 형질감염된 293c18 세포의 표면에서 BTLA와 HVEM의 결합을 측정하는 형광 공명 에너지 전달 검정의 결과를 나타내는 그래프로, 형광 공여체 항-BTLA 항체가 항-HVEM 수용체 항체와 함께 에너지 전달 신호를 생성하는 능력을 보여준다.

도 10은 BTLA와 HVEM이 서로 다른 세포에서 발현될 때 BTLA로 유도된 HVEM 신호를 측정하는 HVEM-NF-κB HEK 293 루시퍼라제 리포터 검정에서 6G3 항체의 부분적 억제 활성을 나타내는 그래프이다.

도 11은 SHP2 모집 PathHunter Jurkat BTLA 신호 전달 검정에 가용성 항체로서 첨가된 6G3 항체의 작용제 활성을 나타내는 그래프이다.

도 12는 SHP2 모집 PathHunter Jurkat BTLA 신호 전달 검정에서 항-BTLA 항체의 저해 활성을 나타내는 그래프인데, 여기서 BTLA 신호 전달은 형질감염된 U-2 OS 세포주에서 HVEM에 의해 유도되었다.

도 13은 FcγR 결합을 제공하기 위해 FcγRIa를 형질감염시킨 U-2 OS 세포를 첨가하여 SHP2 모집 PathHunter Jurkat BTLA 신호 전달 검정에서 6G3 항체의 작용제 활성을 나타내는 그래프이다.

도 14a는 본 발명의 구체예에 따라, 여기에 기술된 이식편 대 숙주병 연구를 위한 이종 NSG/Hu-PBMC 마우스 모델의 개략도이다.

도 14b는 본 발명의 구체예에 따라, 여기에 기술된 NSG/Hu-PBMC 이식편 대 숙주병 연구의 타임라인, 투여 일정, 및 모델 그룹을 보여주는 개략도이다.

도 14c는 6G3 항체 1mg/kg, 3mg/kg, 또는 10mg/kg을 주 2회 투여한 동물 그룹의 NSG/Hu-PBMC 이식편 대 숙주병 연구에서 전반적 생존율 결과를 나타낸 그래프이다.

도 15는 6G3 항체를 주 2회 1, 3, 10mg/kg(IP)으로 투여한 후 GvHD의 인간화 쥐과 모델에서 투여 그룹당 인간 sBTLA의 개별 농도와 평균(SD) 농도를 보여주는 플롯이다. 연구 중간 시점에 심장 출혈을 통해 혈장 샘플을 수집했다.

도 16은 6G3 IgG4를 투여한 후, 시노몰구스 원숭이에서 투여 그룹별 cyno sBTLA의 평균(SD) 혈청 농도를 보여주는 플롯이다. 모든 동물에게 6G3 IgG4를 단일 용량으로 정맥(IV) 또는 피하(SC)로 투여하였고, 모든 군의 모든 동물로부터 투여 전, 투여 후 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336, 504, 672, 및 840시간에 혈액 샘플을

채취했다.

도 17은 6G3 IgG4를 투여한 후 시노몰구스 원숭이에서 투여 그룹별 cyno sBTLA의 평균(SD) 혈청 농도를 보여주는 플롯이다. 모든 동물에게 6G3 IgG4를 1일차, 8일차, 및 15일차에 정맥 주사 또는 피하 주사로 매주 투여했으며 모든 그룹의 모든 동물로부터 1일차, 8일차, 및 15일차에 혈액 샘플을 채취했다: 투여 전, 투여 후 3시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간.

도 18은 6G3 IgG4를 투여한 후 시노몰구스 원숭이에서 투여 그룹당 6G3 IgG4의 평균(SD) 혈청 농도(μg/ml)를 보여주는 플롯이다. 모든 동물에게 6G3 IgG4를 1일차, 8일차, 및 15일차에 정맥 주사 또는 피하 주사로 매주 투여했으며 모든 그룹의 모든 동물로부터 1일차, 8일차, 및 15일에 혈액 샘플을 채취했다: 투여 전, 투여 후 3시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간.

도 19는 6G3 IgG4, 이소타입 대조군, 또는 CTLA-4-Ig 대조군을 투여한 후 시노몰구스 원숭이에서 투여 그룹당 다양한 데이터를 보여주는 4개의 플롯이다. 첫 번째 플롯은 투여 그룹당 BTLA 발현(MFI)을 보여준다. 두 번째 플롯은 투여 그룹당 BTLA+ T 세포 백분율을 보여준다. 세 번째 플롯은 투여 그룹당 혈액 μl 당 인간 T세포 수를 보여준다. 네 번째 플롯은 투여 그룹당 CD25 양성 백분율을 보여준다.

도 20은 6G3 IgG4를 투여한 후 시노몰구스 원숭이에서 투여 그룹당 T 세포와 B 세포의 수용체 점유율과 BTLA 표면 발현을 보여주는 4개의 플롯이다. 모든 동물에게 1일차, 8일차, 및 15일차에 6G3 IgG4 또는 대조군을 매주 정맥 주사 또는 피하 주사로 투여했다. 첫 번째 플롯은 T 세포에서 자유 수용체의 기준선으로부터 백분율 변화를 보여준다. 두 번째 플롯은 T 세포에서 BTLA 발현의 기준선으로부터 백분율 변화를 보여준다. 세 번째 플롯은 B 세포에서 자유 수용체의 기준선으로부터의 백분율 변화를 보여준다. 네 번째 플롯은 B 세포에서 BTLA 발현의 기준선으로부터 변화한 백분율을 보여준다.

도 21a는 건강한 대조군과 아토피성 피부염 기증자의 두 히스토그램을 6G3 IgG4로 처리한 CD3+ T 세포에 이소타입 대조군의 히스토그램을 중첩하여 표현한 것이다.

도 21b는 건강한 대조군과 아토피성 피부염 기증자에서 6G3 IgG4에 의한 T 세포 증식 감소를 보여주는 두 개의 플롯으로, 증식 감소 백분율(왼쪽)과 분열 지수(오른쪽)로 표시했다.

도 21c는 6G3 IgG4 또는 이소타입 대조군 100 nM의 존재 또는 부재 하에 항-CD3 및 항-CD28 자극 72시간 후 건강한 대조군 및 아토피성 피부염 기증자 PBMC 배양 상층액의 IFNɣ 수준을 보여주는 두 개의 플롯이다.

도 21d는 건강한 대조군과 아토피성 피부염 기증자의 CD3+ T-세포에서 표면 BTLA 발현 수준(평균 형광 강도(MFI)로 표시)을 보여주는 플롯이다.

도 22a는 400mg SC 투여 후 CD3+ 세포에서의 수용체 점유율에 대한 플롯이다. 데이터에 따르면 400mg SC 투여량은 약 9일의 반감기를 제공하고 수용체를 완전히 점유(~7ug/mL)하는 데 충분한 약동학적 노출이 30일 이상 지속되는 것으로 나타났다.

도 22b는 400mg SC 투여 후 CD19+ 세포에서의 수용체 점유율에 대한 플롯이다. 데이터에 따르면 400mg SC 투여량은 약 9일의 반감기를 제공하고 수용체를 완전히 점유(~7ug/mL)하는 데 충분한 약동학적 노출이 30일 이상 지속되는 것으로 나타났다.

도 23a는 GvHD 모델에서 6G3 항체로 10mg/kg 단회 투여, 6G3 항체로 4주간 2주마다 3mg/kg 투여, IgG4 대조 항체로 10mg/kg 단회 투여, IgG4 대조 항체로 4주간 2주마다 3mg/kg 투여, 또는 무치료 동물을 대상으로 살아남은 마우스의 백분율 대 연구일에 관한 플롯이다.

도 23b는 GvHD 모델에서 6G3 항체로 10mg/kg 단회 투여, 6G3 항체로 4주간 2주마다 3mg/kg 투여, IgG4 대조 항체로 10mg/kg 단회 투여, IgG4 대조 항체로 4주간 2주마다 3mg/kg 투여, 또는 무치료 동물을 대상으로 마우스의 체중(시작 시점으로부터 %) 대 연구일에 관한 플롯이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0015] 본 발명은 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 BTLA-결합제를 제공한다. BTLA는 면역글로불린과 유사한 세포외 도메인, 면역 수용체 티로신 기반 억제 모티프(ITIM), 및 면역 수용체 티로신 기반 스위치 모티프(ITSM)를 갖는 30 킬로달톤(kD) 1형 막관통 단백질이다. BTLA는 B세포와 T세포에서 발현되며 종양세포나 APC에서 발현되는 수용체인 헤르페스 바이러스 진입 매개체(HVEM)와 상호 작용하여 B세포와 T세포 활성 모두의 음성 조절자 역할을 한다(Watanabe et al., Nat. Immunol., 4:670-679, 2003). 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결

합제는 BTLA와 HVEM 사이의 결합을 억제하지 않고 BTLA에 결합한다. 일 양상에서, 상기 BTLA-결합제는 BTLA와 HVEM 사이의 결합을 강화한다.

[0016] PD-1 결합제는 면역글로불린 중쇄 가변 영역과 면역글로불린 경쇄 가변 영역

[0017] 을 포함하며, 이들 각각은 일반적으로 CDR1, CDR2, 또는 CDR3라는 세 개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 상기 CDR 영역은 또한 명명법에서 "H" 또는 "L"을 사용하여 중쇄 또는 경쇄를 각각 나타내기도 한다. 즉, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 또는 CDRL3이다. 주어진 Ig 서열의 CDR은 Kabat, Chothia, Martin(Enhanced Chothia), IGMT 또는 AHo와 같은 여러 기존 번호 매기기 체계 중 임의의 것에 의해 결정될 수 있다(이들은 해당 분야에서 널리 알려져 있고 출판된 문헌에 설명되어 있는 번호 매기기 체계에 대해 일반적으로 사용되는 이름으로서 예를 들어 다음을 참조할 것: Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH (1991) 상기 "Kabat" 번호 매기기 체계를 기술함; Chothia, et al., *Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins*, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987) 및 Al-Lazikani et al., *Standard Conformations for the Canonical Structures of Immunoglobulins*, J. Mol. Biol., 273:927 - 948 (1997) 상기 "Chothia" 번호 매기기 체계를 기술함; Abhinandan et al., *Analysis and Improvements to Kabat and Structurally Correct Numbering of Antibody Variable Domains*, Mol. Immunol., 45: 3832 - 3839 (2008) 상기 "Martin" 또는 "Enhanced Chothia" 번호 매기기 체계를 기술함; Lefranc et al., *The IMGT unique numbering for immunoglobulins, T cell Receptors and Ig-like domains*, The Immunologist, 7: 132-136 (1999) 및 Lefranc et al., *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and I superfamily V-like domains*, Dev. Comp. Immunol., 27: 55 - 77 (2003) 상기 "IMGT" 번호 매기기 체계를 기술함; 및 Honegger et al., *Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool*, J. Mol. Biol. 309: 657 - 670 (2001) 상기 "AHo" 번호 매기기 체계를 기술함). 본 명세서에 제공된 BTLA-결합제는 인공적이며 자연적으로 발생하지 않는다. 이들은 실험실 기술에 의해 생성되었으므로 재조합 또는 합성 아미노산 서열을 포함하는 재조합 또는 합성 분자로 간주되는 것이 적절하다. 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드는 생산 환경(예: 세포 배양)에서 제거되어 어느 정도 정제된다는 의미에서 "단리"될 수 있다.

[0018] 본 공개의 한 양상에 따르면, 상기 BTLA-결합제는 BTLA-결합제의 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드를 포함하며, 이는 서열번호 1-15, 207, 208, 217, 또는 218 중 어느 하나의 아미노산 서열, 또는 적어도 이의 CDR을 포함하고; 또는 서열번호 1-15, 207, 208, 217, 또는 218 중 어느 하나와 적어도 80%의 서열 동일성(예: 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 상기 CDR은 Kabat, Chothia, Martin(Enhanced Chothia), IGMT, 또는 AHo 등 알려진 번호 매기기 방식을 사용하여 결정할 수 있다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3는 서열번호 1-15, 207, 208, 217, 또는 218의 잔기 31-35(CDRH1), 50-66(CDRH2), 및 99-106(CDRH3)을 포함한다.

[0019] 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄는 다음의 CDR을 포함한다:

[0020] (a) Asp Tyr Thr Ile His(서열번호 27)를 포함하는 CDRH1;

[0021] (b) Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Asp Xaa1 Phe Lys Xaa2(서열번호 30)를 포함하는 CDRH2, 여기서 Xaa1은 리신(Lys) 또는 글루탐산(Glu)이고, Xaa2는 아스파르트산(Asp) 또는 발린(Val)(예: 서열번호 28, 30, 31, 212, 또는 222)임; 및

[0022] (c) Arg Xaa1 Xaa2 Tyr Xaa3 Met Xaa4 Tyr (서열번호 32)을 포함하는 CDRH3, 여기서 Xaa1은 아스파라긴(Asn) 또는 세린(Ser)이고, Xaa2는 티로신(Tyr) 또는 히스티딘(His)이고, Xaa3은 알라닌(Ala) 또는 발린(Val)이고, Xaa4는 글루탐산(Glu) 또는 아스파르트산(Asp)이다. 이러한 CDRH3 서열의 예로는 예를 들어 서열번호 29, 33, 34, 213, 또는 223을 포함한다.

[0023] 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드는 아미노산 서열 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Xaa1 Thr Xaa2 Thr Asp Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Asp Xaa3 Phe Lys Xaa4 Arg Val Thr Ile Thr Xaa5 Asp Xaa6 Ser Xaa7 Xaa8 Thr Ala Tyr Met Glu Leu

Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Xaa9 Cys Ala Arg Arg Xaa10 Xaa11 Tyr Xaa12 Met Xaa13 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala(서열번호 26), 또는 적어도 그것의 CDR 영역을 포함하며, 여기서

[0024] Xaa1은 페닐알라닌(Phe) 또는 티로신(Tyr)이고,

[0025] Xaa2는 페닐알라닌(Phe) 또는 류신(Leu)이고,

[0026] Xaa3는 리신(Lys) 또는 글루탐산(Glu)이고,

[0027] Xaa4는 아스파르트산(Asp) 또는 발린(Val)이고,

[0028] Xaa5는 알라닌(Ala) 또는 아르기닌(Arg)이고,

[0029] Xaa6는 리신(Lys) 또는 트레오닌(Thr)이고,

[0030] Xaa7은 알라닌(Ala) 또는 세린(Ser)이고,

[0031] Xaa8은 세린(Ser) 또는 트레오닌(Thr)이고,

[0032] Xaa9는 티로신(Tyr) 또는 페닐알라닌(Phe)이며,

[0033] Xaa10은 아스파라긴(Asn) 또는 세린(Ser)이고,

[0034] Xaa11은 티로신(Tyr) 또는 히스티딘(His)이고,

[0035] Xaa12는 알라닌(Ala) 또는 발린(Val)이며,

[0036] Xaa13은 글루탐산(Glu) 또는 아스파르트산(Asp)이다.

[0037] 일부 구체예에서, 상기 Ig 중쇄 폴리펩티드는 서열번호 26을 포함하되, 서열번호 1-15, 207, 208, 217, 또는 218 중 어느 하나와 동일한 CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 보유한다면 그러하다.

[0038] 본 공개의 이러한 양상에 따르면, 상기 BTLA-결합제의 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드는 서열번호 16-25, 209, 210, 219, 또는 220 중 어느 하나의 아미노산 서열, 또는 적어도 이의 CDR; 또는 서열번호 16-25, 209, 210, 219, 또는 220 중 어느 하나와 적어도 80%의 서열 동일성(예: 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 Ig 중쇄와 마찬가지로 상기 CDR은 Kabat, Chothia, Martin(Enhanced Chothia), IGMT, 또는 AHo와 같이 임의의 알려진 번호 매기기 체계를 사용하여 결정할 수 있다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3는 서열번호 16-25, 209, 210, 219, 또는 220의 잔기 24-34(CDRL1), 50-56(CDRL2), 및 89-97(CDRL3)을 포함한다.

[0039] 일부 구체예에서, 상기 Ig 경쇄는 다음의 CDR을 포함한다:

[0040] (a) Lys Ala Ser Gln Asn Val Phe Thr Asn Val Ala(서열번호 36)를 포함하는 CDRL1;

[0041] (b) Ser Ala Ser Tyr Arg Xaa Ser (서열번호 39)를 포함하는 CDRL2, 여기서 Xaa는 티로신(Tyr) 또는 세린(Ser)(예: 서열번호 37, 40, 215, 또는 225)임; 및

[0042] (c) Gln Gln Tyr Xaa1 Xaa2 Tyr Pro Tyr Thr(서열번호 41)을 포함하는 CDRL3, 여기서 Xaa1은 세린(Ser) 또는 아스파라긴(Asn)이고, Xaa2는 트레오닌(Thr) 또는 세린(Ser) (예: 서열번호 38, 41, 42, 216, 또는 226)임.

[0043] 다른 구체예에서, 상기 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드는 아미노산 서열 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Phe Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Xaa1 Pro Lys Xaa2 Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Xaa3 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Xaa4 Cys Gln Gln Tyr Xaa5 Xaa6 Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg(서열번호 35) 또는 적어도 이의 CDR 영역을 포함하며, 여기서

[0044] Xaa1은 세린(Ser) 또는 프로린(Pro)이고,

[0045] Xaa2는 프로린(Pro) 또는 류신(Leu)이고,

[0046] Xaa3는 티로신(Tyr) 또는 세린(Ser)이고,

[0047] Xaa4는 티로신(Tyr) 또는 페닐알라닌(Phe)이고,

[0048] Xaa5는 세린(Ser) 또는 아스파라긴(Asn)이며,

[0049] Xaa6는 트레오닌(Thr) 또는 세린(Ser)이다.

[0050] 일부 구체예에서, 상기 Ig 경쇄 폴리펩티드는 서열번호 35를 포함하되, 서열번호 16-25, 209, 210, 219, 또는 220 중 어느 하나와 동일한 CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 보유한다면 그러하다.

[0051] 본 공개의 또다른 양상에서, 상기 BTLA-결합제는 서열번호 43-156 중 어느 하나, 또는 적어도 이의 CDR; 또는 서열번호 43-156 중 어느 하나와 적어도 80%, 85%, 또는 90%의 서열 동일성(예: 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드를 포함한다. 상기 CDR은 Kabat, Chothia, Martin(Enhanced Chothia), IGMT, 또는 AHo 등 알려진 번호 매기기 방식을 사용하여 결정할 수 있다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3는 서열번호 43-156의 잔기 31-35(CDRH1), 50-66(CDRH2), 및 99-113(CDRH3)을 포함하며, 다만 서열번호 66에서 CDRH1은 잔기 50-67일 수 있고 CDRH3은 잔기 100-114일 수 있으며; 서열번호 141, 150, 152, 153, 155, 및 156에서 CDRH3은 잔기 100-114일 수 있음은 예외이다.

[0052] 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드는 다음의 CDR을 포함한다:

[0053] (a) $X^1SX^2MN$(서열번호 195)을 포함하는 CDRH1, 여기서 $X^1$은 N 또는 T이고, $X^2$는 W, F, H, G, P, R, K, D, S, L, V, N 또는 Y임;

[0054] (b) $RIYPX^1GX^2X^3DTNYX^4GKFK$(서열번호 196)를 포함하는 CDRH2, 여기서:

[0055] $X^1$이 없거나 A이고;

[0056] $X^2$는 D, Y, Q, G, L, F, H, S, P, R, 또는 T이고;

[0057] $X^3$는 G, Y, A, F, S, D, V, T, E, K, 또는 R이며;

[0058] $X^4$는 N, V, Q, R, A, F, Y, S, G, P, 또는 T이며;

[0059] (c) $X^1SGTFX^2X^3GNYX^4X^5YFDV$(서열번호 197)를 포함하는 CDRH3, 여기서:

[0060] $X^1$은 K 또는 R이고;

[0061] $X^2$는 N 또는 D이고;

[0062] $X^3$은 D, S, F, Y, F, V, S, G, T, R, I, L, 또는 E이고;

[0063] $X^4$는 R 또는 H이며;

[0064] $X^5$는 W, R, F, L, N, Y, P, I, V, A, S, G, R, 또는 K이다.

[0065] 일부 구체예에서, 상기 Ig 중쇄는 서열번호 201을 포함하는 CDRH1; 서열번호 202를 포함하는 CDRH2; 및 서열번호 203을 포함하는 CDRH3을 포함한다.

[0066] 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 다음 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드를 포함한다:

[0067] $QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYX^1FSX^2SX^3MNWVRQAPGQGLEWMGRIYPX^4GX^5X^6DTNYX^7GKFKGRVTITADKX^8TX^9TAYMELX^{10}SLRSEX^{11}TAV$
$X_{12}YX_{13}CAX_{14}SGTFX_{15}X_{16}GNYX^{17}X^{18}YFDVWGKGTTVTVSSA$(서열번호 193), 또는 적어도 이의 CDR 영역, 여기서

[0068] $X^1$은 A 또는 V이고;

[0069] $X^2$는 N 또는 T이고;

[0070] $X^3$은 W, F, H, G, P, R, K, D, S, L, V, N, 또는 Y이고;

[0071] $X^4$가 없거나 A이고;

[0072] $X^5$는 D, Y, Q, G, L, F, H, S, P, R, 또는 T이고;

[0073] $X^6$은 G, Y, A, F, S, D, V, T, E, K, 또는 R이고;

[0074] $X^7$은 N, V, Q, R, A, F, Y, S, G, P, 또는 T이고;

[0075] $X^8$은 S 또는 F이고;

[0076] $X^9$는 S, T, 또는 N이고;

[0077] $X^{10}$은 S 또는 R이고;

[0078] $X^{11}$은 D 또는 V이고;

[0079] $X^{12}$가 없거나 Y이고;

[0080] $X^{13}$은 Y 또는 F이고;

[0081] $X^{14}$는 K 또는 R이고;

[0082] $X^{15}$는 N 또는 D이고;

[0083] $X^{16}$은 D, S, F, Y, F, V, S, G, T, R, I, L, 또는 E이고;

[0084] $X^{17}$은 R 또는 H이며;

[0085] $X^{18}$은 W, R, F, L, N, Y, P, I, V, A, S, G, R, 또는 K이다.

[0086] 일부 구체예에서, 상기 Ig 중쇄 폴리펩티드는 서열번호 193을 포함하되, 다만 서열번호 43-156 중 어느 하나와 동일한 CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 보유한다면 그러하다.

[0087] 본 공개의 이러한 양상에 따르면, 상기 결합제는 또한 서열번호 157-192 중 어느 하나, 또는 적어도 이의 CDR을 포함하는 Ig 경쇄; 또는 서열번호 157-192 중 하나와 적어도 80%, 85%, 또는 90%의 서열 동일성(예: 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 추가로 포함한다. 상기 CDR은 Kabat, Chothia, Martin(Enhanced Chothia), IGMT, 또는 AHo 등 알려진 번호 매기기 방식을 사용하여 결정할 수 있다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3는 서열번호 157-192의 잔기 24-34(CDRL1), 50-56(CDRL2), 및 89-97(CDRL3)을 포함한다.

[0088] 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 다음을 포함하는 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

[0089] (a) $RX^1SENIYX^2X^3LA$(서열번호 198)를 포함하는 CDRL1, 여기서

[0090] $X^1$은 A 또는 V이고;

[0091] $X^2$는 S 또는 N이며;

[0092] $X^3$는 H, N, 또는 Y이고;

[0093] (b) $X^1AX^2NLAX^3$(서열번호 199)를 포함하는 CDRL2, 여기서

[0094] $X^1$은 A 또는 N이고;

[0095] $X^2$는 T 또는 K이며;

[0096] $X^3$는 N, L, Q, G, F, V, K, S, R, T, H, 또는 P이고;

[0097] (c) $QX^1FX^2GPPLT$(서열번호 200)를 포함하는 CDRL3, 여기서

[0098] $X^1$은 L 또는 H이고;

[0099] $X^2$는 W, F, Y, P, N, V, K, M, L, G, 또는 S이다.

[0100] 일부 구체예에서, 상기 Ig 경쇄는 서열번호 204를 포함하는 CDRL1; 서열번호 205를 포함하는 CDRL2; 및 서열번호 206을 포함하는 CDRL3을 포함한다.

[0101] 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드는 다음 서열을 포함한다:

[0102] $X^1IQX^2TQSPSSLSASVGDRVTITCRX^3SENIYX^4X^5LAWYQQKX^6GKAPKLLIYX^7AX^8NLAX^9GVPSRFSGSGSGTDX^{10}TLTISSLQPEDFATYYCQX^{11}FX^{12}GPPLTFGGGTKVEIKR$(서열번호 194), 또는 적어도 이의 CDR, 여기서

[0103] $X^1$은 A 또는 D이고;

[0104] $X^2$는 L 또는 M이고;

[0105] $X^3$는 A 또는 V이고;

[0106] $X^4$는 S 또는 N이고;

[0107] $X^5$는 H, N, 또는 Y이고;

[0108] $X^6$은 P 또는 Q이고;

[0109] $X^7$은 A 또는 N이고;

[0110] $X^8$은 T 또는 K이고;

[0111] $X^9$는 N, L, Q, G, F, V, K, S, R, T, H, 또는 P이고;

[0112] $X^{10}$은 F 또는 Y이고;

[0113] $X^{11}$은 L 또는 H이고;

[0114] $X^{12}$는 W, F, Y, P, N, V, K, M, L, G, S이다.

[0115] 일부 구체예에서, 상기 Ig 경쇄 폴리펩티드는 서열번호 194를 포함하되, 다만 서열번호 157-192 중 어느 하나의 동일한 CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 보유한다면 그러하다.

[0116] 일 구체예에 따르면, 상기 BTLA-결합제는 서열번호 144의 면역글로불린 중쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 또는 90%의 서열 동일성(예: 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열; 또는 서열번호 144의 CDR을 적어도 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역으로서, 여기서 CDR 영역은 상기 제공된 바와 같거나(예: CDR1 - 서열번호 201, CDR2 - 서열번호 202, 및 CDR3 - 서열번호 203) 또는 다양

한 알려진 면역글로불린 번호 매기기 체계(예: Kabat, Chothia, Martin(Enhanced Chothia), IGMT, 또는 AHo)에 따라 결정되는 것; 및 서열번호 174의 면역글로불린 경쇄 가변 영역 또는 이와 적어도 80%, 85%, 또는 90%의 서열 동일성(예: 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열번호 174의 CDR을 적어도 포함하는 면역글로불린 경쇄 가변 영역으로서; 여기서 상기 CDR 영역은 상기 제공된 바와 같거나(예: CDR1 - 서열번호 204, CDR2 - 서열번호 205, 및 CDR3 - 서열번호 206) 또는 다양한 알려진 면역글로불린 번호 매기기 체계(예: Kabat, Chothia, Martin(Enhanced Chothia), IGMT, 또는 AHo)에 따라 결정된 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 항체는 서열번호 144의 중쇄 가변 영역과 서열번호 174의 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 카바트가 결정한 바와 같은 이들의 CDR을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 항체는 서열번호 144의 중쇄 가변 영역과 서열번호 174의 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 Chothia에 의해 결정된 바와 같은 이들의 CDR을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 항체는 서열번호 144의 중쇄 가변 영역과 서열번호 174의 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 Martin이 결정한 바와 같은 이들의 CDR을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 항체는 서열번호 144의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 174의 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 IGMT에 의해 결정된 바와 같은 이들의 CDR을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 항체는 서열번호 144의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 174의 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 AHo에 의해 결정된 바와 같은 이들의 CDR을 포함한다.

[0117] 또한, 본 명세서에서 제시된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 BTLA-결합제와 동일한 에피토프에 결합하는 BTLA-결합제도 제공된다. 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 서열번호 144의 중쇄 가변 영역과 서열번호 174의 경쇄 가변 영역을 포함하는 BTLA-결합제와 동일한 에피토프에 결합한다. 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 서열번호 5의 중쇄 가변 영역과 서열번호 17을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 BTLA-결합제; 서열번호 207의 중쇄 가변 영역과 서열번호 209를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 BTLA-결합제; 또는 서열번호 217의 중쇄 가변 영역과 서열번호 219를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 BTLA-결합제와 동일한 에피토프에 결합한다. BTLA-결합제는 여기에 기술된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 BTLA-결합제와 BTLA에 대한 결합을 놓고 경쟁하는 경우 동일한 에피토프에 결합하는 것으로 간주된다. 일부 구체예에서, 본원은 인간 BTLA의 아미노산 잔기 52-65 및/또는 100-106(예: 서열번호 227 및/또는 228)(참조 서열 UniProt ID Q7Z6A9 또는 자연적으로 발생하는 변이체 인간 BTLA의 해당 서열 위치)에 결합하는 BTLA-결합제를 제공한다. 일부 구체예에서, 본원은 인간 BTLA의 아미노산 잔기 46-65, 82-91, 또는 100-106(예: 서열번호 229, 230, 및/또는 231)(참조 서열 UniProt ID Q7Z6A9 또는 자연적으로 발생하는 변이체 인간 BTLA의 해당 서열 위치)에 결합하는 BTLA-결합제를 제공한다.

[0118] 핵산 또는 아미노산 서열과 관련하여 사용되는 서열 "동일성"은 관심 있는 핵산 또는 아미노산 서열을 참조 핵산 또는 아미노산 서열과 비교하여 결정할 수 있다. 동일성 백분율은 최적 정렬 시 관심 서열과 참조 서열 사이에서 동일한(즉, 같은) 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기의 백분율이다. 두 개 이상의 서열 사이의 최적의 정렬을 얻고 동일성을 계산하기 위한 여러 가지 수학적 알고리즘이 알려져 있으며 공개적으로 사용 가능하다. 이러한 프로그램의 예로는 CLUSTAL-W, T-Coffee, ALIGN(핵산 및 아미노산 서열 정렬용), BLAST 프로그램(예: BLAST 2.1, BL2SEQ, 및 메릴랜드주 베데스다에 있는 국립 생명공학 정보 센터에서 운영하는 이후 버전) 및 FASTA 프로그램(예: FASTA3x, FASTM, SSEARCH)(서열 정렬 및 서열 유사성 검색용)이 있다. 서열 정렬 알고리즘도 예를 들어 Altschul et al., *J. Molecular Biol.*, *215*(3): 403-410 (1990), Beigert et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *106*(10): 3770-3775 (2009), Durbin et al., eds., *Biological Sequence Analysis: Probalistic Models of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge, UK (2009), Soding, *Bioinformatics*, *21*(7): 951-960 (2005), Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, *25*(17): 3389-3402 (1997), 및 Gusfield, *Algorithms on Strings, Trees and Sequences*, Cambridge University Press, Cambridge UK (1997))에 개시되어 있다.

[0119] 위에 구체적으로 제시된 중쇄 및 경쇄 서열과 100% 미만의 동일성을 갖는 서열과 관련하여, 상기 언급된 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드 및/또는 경쇄 폴리펩티드의 하나 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 교체하거나 치환할 수 있고, 및/또는 하나 이상의 아미노산을 개시된 아미노산 서열에서 삭제하거나 삽입할 수 있는데, 다만 폴리펩티드의 활성(예: BTLA-결합제의 일부로 존재할 때 BTLA를 결합하는 능력)이 실질적으로 유지되는 경우에 그러하다. BTLA-결합제의 "생물학적 활성"은 예를 들어 특정 BTLA 에피토프에 대한 결합 친화성(수용체에 대한 BTLA 결합을 억제하지 않고 및/또는 생체 내(in vivo) BTLA 활성을 억제하지 않고(예: $IC_{50}$)), 약동학, 및 교차반응성(예: BTLA 단백질의 비인간적 동족체(homolog) 또는 동원체(orthologue), 또는 다른 단백질이나 조직과의

교차 반응성)을 의미한다. 일부 구체예에서, BTLA-결합제의 상기 생물학적 활성에는 수용체(들)에 대한 BTLA-결합을 강화하거나/하고 그렇지 않다면 생체 내에서 BTLA 활성을 증가시키는 상기 제제의 능력이 포함된다. 관련 분야에서 인식되어 있는 항원 결합제의 기타 생물학적 속성이나 특징은 예를 들어 결합력(avidity), 선택성, 용해도, 접힘, 면역 독성, 발현, 및 제형을 포함한다. 앞서 언급된 속성 또는 특징은 ELISA, 경쟁적 ELISA, 표면 플라스몬 공명 분석(BIACORE™), 또는 용액상 경쟁 분석(KINEXA™), 시험관 내 또는 생체 내 중화 검정, 수용체-리간드 결합 분석, 사이토카인 또는 성장 인자 생성 및/또는 분비 검정, 및 신호 전달과 면역조직화학 검정을 포함하되 이에 국한되지 않는 표준 기술을 사용하여 관찰, 측정 및/또는 평가할 수 있다.

[0120] 아미노산 치환이나 대체는 보존적, 반보존적, 또는 비보존적일 수 있다. "보존적 아미노산 치환" 또는 "보존적 돌연변이"라는 문구는 하나의 아미노산이 공통적인 속성을 가진 또다른 아미노산으로 대체되는 것을 의미한다. 개별 아미노산 간의 공통적인 속성을 정의하는 기능적 방법은 동족 생물체의 해당 단백질 간 아미노산 변화의 정규화된 빈도를 분석하는 것이다(Schulz 및 Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York(1979)). 이러한 분석에 따르면, 아미노산 그룹은 그룹 내 아미노산이 서로 우선적으로 교환되는 경우로 정의될 수 있으며, 따라서 전체 단백질 구조에 미치는 영향 측면에서 서로 가장 유사하다(Schulz 및 Schirmer, 상기한 것).

[0121] 아미노산은 "방향족" 또는 "지방족"으로 넓게 분류된다. 방향족 아미노산에는 방향족 고리가 포함된다. "방향족" 아미노산의 예로는 히스티딘(H 또는 His), 페닐알라닌(F 또는 Phe), 티로신(Y 또는 Tyr), 및 트립토판(W 또는 Trp)이 포함된다. 비방향족 아미노산은 "지방족"으로 넓게 분류된다. "지방족" 아미노산의 예로는 글리신(G 또는 Gly), 알라닌(A 또는 Ala), 발린(V 또는 Val), 류신(L 또는 Leu), 이소류신(I 또는 Ile), 메티오닌(M 또는 Met), 세린(S 또는 Ser), 트레오닌(T 또는 Thr), 시스테인(C 또는 Cys), 프롤린(P 또는 Pro), 글루탐산(E 또는 Glu), 아스파르트산(A 또는 Asp), 아스파라긴(N 또는 Asn), 글루타민(Q 또는 Gln), 라이신(K 또는 Lys), 및 아르기닌(R 또는 Arg)이 포함된다.

[0122] 지방족 아미노산은 4개의 하위 그룹으로 세분될 수 있다. "대형 지방족 비극성 하위 그룹"은 발린, 류신, 및 이소류신으로 구성된다. "지방족 약간 극성 하위 그룹"은 메티오닌, 세린, 트레오닌, 및 시스테인으로 구성된다. "지방족 극성/하전된 하위 그룹"은 글루탐산, 아스파르트산, 아스파라진, 글루타민, 리신, 및 아르기닌으로 구성된다. "소규모 잔기 하위 그룹"은 글리신과 알라닌으로 구성된다. 하전된/극성 아미노산 그룹은 세 개의 하위 그룹으로 세분될 수 있다: 리신과 아르기닌으로 구성된 "양으로 하전된 하위 그룹", 글루탐산과 아스파르트산으로 구성된 "음으로 하전된 하위 그룹", 그리고 아스파라긴과 글루타민으로 구성된 "극성 하위 그룹"이다.

[0123] 방향족 아미노산은 두개의 하위 그룹으로 세분될 수 있다: 히스티딘과 트립토판으로 구성된 "질소 고리 하위 그룹"과 페닐알라닌과 티로신으로 구성된 "페닐 하위 그룹"이다.

[0124] 보존적 아미노산 치환의 예로는 위에 기술한 하위 그룹 내에서 아미노산을 치환하는 것, 예를 들어, 리신을 아르기닌 대신으로 치환하거나 그 반대로 하여 양전하를 유지하기, 글루탐산을 아스파르트산 대신으로 치환하거나 그 반대로 하여 음전하를 유지하기, 세린을 트레오닌 대신으로 치환하여 자유 -OH를 유지하기, 및 글루타민을 아스파라긴 대신으로 치환하여 자유 $-NH_2$를 유지하기를 포함한다. "반보존적 돌연변이"에는 위에 나열된 동일 그룹 내의 아미노산 치환은 포함되지만, 동일 하위 그룹 내의 아미노산 치환은 포함되지 않는다. 예를 들어, 아스파라긴을 아스파르트산으로 대체하거나 라이신을 아스파라진으로 대체하는 것은 같은 그룹 내에 있지만 상이한 하위 그룹인 아미노산을 포함하는 것이다. "비보존적 돌연변이"에는 상이한 그룹 간의 아미노산 치환, 예를 들어 리신을 트립토판 대신으로, 페닐알라닌을 세린 대신으로 치환하는 것이 포함된다.

[0125] 앞서 언급한 돌연변이(예: 치환)는 Ig 사슬의 어느 영역에서나 일어날 수 있다. 일부 구체예에서, 아미노산은 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드 및/또는 경쇄 폴리펩티드의 CDR(예: CDR1, CDR2, 또는 CDR3)에서 치환되고; 다른 구체예에서는, 아미노산은 프레임워크 영역에서 치환되고 CDR에서는 치환되지 않으며; 또 다른 실시예에서, 아미노산은 프레임워크 영역과 CDR 둘 다에서 치환된다. 일부 구체예에서, 앞서 언급한 돌연변이는 CDR이 아닌 다른 영역에서 이루어진다. 다시 말해, 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역은 여기에 제공된 서열과 명시된 서열에 동일성을 가질 수 있지만, 구체적으로 제공된 서열의 CDR은 유지할 수 있다.

[0126] 또한, 하나 이상의 아미노산이 상기 언급된 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드 및/또는 경쇄 폴리펩티드에 삽입될 수 있는데, 이는 BTLA-결합제의 맥락에서 폴리펩티드의 기능을 폐지하지 않는다면 그러하다는 것이다(예: BTLA가 수용체에 결합하는 것을 억제하지 않으면서도 상기 폴리펩티드를 포함하는 결합제가 BTLA에 결합하는 것을 방해하지 않는 조건). 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드 및/또는 경쇄 폴리펩티드의 아미노산 서열에 임의의 적합

한 아미노산을 아무리 많이 삽입해도 된다. 일부 구체예에서, 적어도 하나의 아미노산(예: 2개 이상, 5개 이상, 또는 10개 이상의 아미노산)이지만, 20개를 넘지 않는 아미노산(예: 18개 이하, 15개 이하, 또는 12개 이하의 아미노산)이 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드 및/또는 경쇄 폴리펩티드의 아미노산 서열에 삽입될 수 있다. 다른 구체예에서는 1-10개의 아미노산(예: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산)이 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드 및/또는 경쇄 폴리펩티드의 아미노산 서열에 삽입된다. 이러한 측면에서, 아미노산(들)은 상기 언급된 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드 및/또는 경쇄 폴리펩티드 중 어느 하나의 적절한 위치에 삽입될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 아미노산은 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드 및/또는 경쇄 폴리펩티드의 CDR(예: CDR1, CDR2, 또는 CDR3)에 삽입되고; 다른 실시예에서, 상기 아미노산(들)은 프레임워크 영역에 삽입되고 CDR에는 삽입되지 않으며; 또 다른 실시예에서, 상기 아미노산은 프레임워크 영역과 CDR 둘 다에 삽입된다.

[0127] 본 발명의 단리된 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드 및 경쇄 폴리펩티드는 본 명세서에 기재된 특정 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 한정되지 않으며, BTLA-결합제에 포함될 때 BTLA에 대한 결합을 위해 본 발명의 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드 또는 경쇄 폴리펩티드와 경쟁하는 임의의 중쇄 폴리펩티드 또는 경쇄 폴리펩티드도 포함한다. 이와 관련하여, 예를 들어, 상기 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드 또는 경쇄 폴리펩티드는 본 명세서에서 기술하는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드가 인식하는 BTLA의 동일한 에피토프에 결합하는 임의의 중쇄 폴리펩티드 또는 경쇄 폴리펩티드가 될 수 있으며, 이는 BTLA-결합제에 포함될 때 가능하다. 항체 경쟁은 ELISA, Western blot, 또는 면역조직화학 방법을 활용하는 일반적인 펩티드 경쟁 분석을 사용하여 검정할 수 있다(예: 미국 특허 제4,828,981호 및 제8,568,992호; 및 Braitbard et al., Proteome Sci., 4: 12(2006) 참조).

[0128] 상기 BTLA-결합제는 본 명세서에서 제시하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역을 포함하는 단백질 분자로서, BTLA 단백질(예: 항체 또는 그 항원 결합 단편)에 특이적으로 결합한다. 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 BTLA의 그 수용체에 대한 BTLA 결합을 폐지하지 않고, 또는 일부 구체예에서는 억제하지 않고 그 수용체에 BTLA를 결합시킨다. 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 BTLA의 HVEM에 대한 결합을 강화하여 BTLA-매개 신호전달을 증가시킨다. 본 명세서에서 BTLA의 그 수용체에 대한 또는 BTLA-매개 신호 전달과 관련하여 사용되는 용어 "억제"는 결합제가 존재할 때 BTLA의 그 수용체에 대한 결합 또는 BTLA-HVEM 매개 신호 전달을 실질적으로 길항, 금지, 예방, 제한, 늦추기, 방해, 변경, 제거, 또는 중지(전체 또는 일부)할 수 있는 능력을 말하며, 이는 결합제가 없을 때의 이러한 결합 또는 신호 전달과 대비되는 것이다. 그 수용체에 대한 BTLA-결합 또는 BTLA-매개 신호 전달과 관련하여 사용되는 용어 "증가" 또는 "강화"는 결합제가 존재할 때 이러한 결합 또는 신호전달을 어떤 식으로든 및 어느 정도든 증가 또는 강화시키는 것을 의미하며, 결합제가 없는 경우의 그러한 결합 또는 신호전달과 대비되는 것이다. 일부 구체예에서, 그 수용체에 대한 BTLA-결합 또는 BTLA-매개 신호전달은 BTLA 활성 결핍과 관련된 질환 또는 상태의 임의의 증상을 감소 또는 완화하거나, BTLA 활성 강화로부터 이익을 얻거나, 그러한 질환 또는 상태의 진행 또는 중증도를 역전시키기에 충분히 증가한다. 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 BTLA-수용체 결합을 25% 초과로 억제하지 않는다(예: BTLA-수용체 결합을 10% 초과로 또는 5% 초과로 억제하지 않는다). 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 BTLA-결합제가 없는 경우의 BTLA 활성과 비교했을 때, BTLA-수용체 결합을 적어도 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 100%, 또는 상기 값 중 임의의 두 개로 정의되는 범위만큼 증가시킨다.

[0129] 상기 BTLA-결합제는 BTLA와 다른 항원을 결합하는 다중특이적(예: 이중특이적 또는 "이중 반응성") 구조체(예: 이중특이적 또는 이중 반응성 항체와 같은 다중특이적 항체)의 일부가 될 수 있다. 이러한 구조체는 본 명세서에서 기술된 바와 같이 BTLA에 결합하는 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드와 BTLA가 아닌 항원에 결합하는 면역글로불린의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄를 조합하여 포함할 수 있다. 이러한 이중 특이적 BTLA-결합제는 예를 들어 BTLA와 면역계의 또 다른 음성 조절자, 예를 들어 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA-4), T 세포 면역글로불린 및 점액 도메인-3(TIM-3), 프로그램된 죽음 1(PD-1) 및/또는 림프구 활성화 유전자 3 단백질(LAG-3)과 결합할 수 있다. 그러한 다른 표적 항원에 결합하는 면역글로불린은 해당 기술 분야에 알려져 있다.

[0130] 항체 접합체도 여기에 제공된다. 예를 들어, 상기 BTLA-결합제는 (1) 항-BTLA 항체 또는 이의 단편과 (2) 2차 단백질 또는 비단백질 부분의 접합체일 수 있다. 추가적인 설명을 위해, 상기 BTLA-결합제는 다른 펩티드, 형광 분자, 또는 화학 치료제에 결합된 항-BTLA 항체 또는 그 단편을 포함할 수 있다.

[0131] 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 "전체" 면역글로불린 또는 항원-결합 면역글로불린 "단편"일 수 있다. "전체" 면역글로불린은 일반적으로 4개의 폴리펩티드로 구성된다: 2개의 중쇄(H) 폴리펩티드와 2개의 경쇄(L) 폴리펩티드. 각 중쇄는 하나의 N-말단 가변($V_H$) 영역과 3개의 C-말단 불변($C_H1$, $C_H2$, $C_H3$) 영역을 포함하고, 각 경쇄는 하나의 N-말단 가변($V_L$) 영역과 하나의 C-말단 불변($C_L$) 영역을 포함한다. 상기 항체의 경쇄는 그 불변

도메인의 아미노산 서열에 기초하여 카파(k) 또는 람다(l)라는 두 가지 유형으로 구분된다. 일반적인 면역글로불린에서 각 경쇄는 이황화물 결합에 의해 중쇄에 연결되어 있으며, 두 개의 중쇄는 서로 이황화물 결합에 의해 연결되어 있다. 이러한 구성에서, 상기 경쇄 가변 영역은 일반적으로 중쇄의 가변 영역과 정렬되고, 상기 경쇄 불변 영역은 일반적으로 중쇄의 첫번째 불변 영역과 정렬된다. 중쇄의 나머지 불변 영역은 일반적으로 서로 정렬된다.

[0132] 경쇄와 중쇄의 각각의 쌍의 가변 영역 또는 고가변 영역은 항체의 항원 결합 부위를 형성한다. $V_H$ 및 $V_L$ 영역은 동일한 일반 구조를 가지고 있으며, 각 영역은 4개의 프레임워크(FW 또는 FR) 영역을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "프레임워크 영역"은 가변 영역 내의 비교적 보존된 아미노산 서열을 의미하며, 이는 고가변 또는 상보성 결정 영역(CDR) 사이에 위치한다. 각 가변 도메인에는 FR1, FR2, FR3, 및 FR4로 지정된 4개의 프레임워크 영역이 있다. 상기 프레임워크 영역은 가변 영역의 구조적 프레임워크를 제공하는 β 시트를 형성한다(예: C.A. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology, 5th Ed.*, Garland Publishing, New York, NY (2001) 참조). 상기 프레임워크 영역은 세 개의 상보성 결정 영역(CDR)에 의해 연결된다. CDR1, CDR2, 및 CDR3로 알려진 세 개의 CDR은 항체의 "고가변 영역"을 형성하며, 이는 일반적으로 항원 결합을 담당하는 것으로 생각된다.

[0133] 용어 "항체 단편" 및 유사한 용어(예: "항체의 단편", "항체 단편", "항체의 기능적 단편")는 본 명세서에서 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 일부를 의미하는 것으로 상호 교환 가능하게 사용된다(일반적으로, Holliger et al., *Nat. Biotech.*, *23*(9): 1126-1129 (2005)참조). 본 명세서에서 사용되고 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 항체 "단편"에는 문자적 의미의 전체 항체의 단편 또는 조각뿐만 아니라 항체 단편 외에도 천연 항체에 존재하지 않는 링커 또는 기타 요소를 포함할 수 있는 기타 알려진 엔지니어링된 항체 유사 구조체도 포함된다. 예를 들어, 상기 항체 단편은 예를 들어 CDR 중 하나 이상(또는 전체), 가변 영역(또는 그 일부), 불변 영역(또는 그 일부), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 항체 단편의 예로는 (i) $V_L$, $V_H$, $C_L$, 및 $CH_1$ 도메인으로 구성된 1가 단편인 Fab 단편, (ii) 힌지 영역에서 이황화물 가교로 연결된 두 개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편, (iii) 항체의 단일 팔의 $V_L$ 및 $V_H$ 도메인으로 구성된 Fv 단편, (iv) 경미한 환원 조건을 사용하여 $F(ab')_2$ 단편의 이황화물 가교를 끊어서 생성되는 Fab' 단편, (v) 이황화물로 안정화된 Fv 단편(dsFv), 및 (vi) 항원에 특이적으로 결합하는 항체 단일 가변 영역 도메인(VH 또는 VL) 폴리펩티드인 도메인 항체(dAb)가 포함되지만, 이에 국한되지는 않는다. 상기 BTLA-결합제는 단일 사슬 항체 단편일 수도 있다. 단일 사슬 항체 단편의 예로는 이에 국한되지는 않지만 (i) 단일 사슬 Fv(scFv)로서, 이는 합성 링커에 의해 결합된 Fv 단편의 두 도메인(즉, $V_L$ 및 $V_H$)으로 구성된 1가의 분자이며, 상기 합성 링커는 상기 두 도메인이 단일 폴리펩티드 사슬로 합성될 수 있도록 하는 것인 단일 사슬 Fv(scFv)(예: Bird et al., *Science*, *242*: 423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *85*: 5879-5883 (1988); 및 Osbourn et al., *Nat. Biotechnol.*, *16*: 778 (1998) 참조), 및 (ii) 폴리펩티드 사슬의 다이머인 다이어바디로서, 각 폴리펩티드 사슬이 동일한 폴리펩티드 사슬 상에 $V_H$와 $V_L$ 사이의 페어링을 허용하기에는 너무 짧은 펩티드 링커에 의해 VL에 연결된 VH를 포함하며, 이로써 서로 다른 $V_H$-$V_L$ 폴리펩티드 사슬 상의 상보적 도메인 사이의 페어링을 유도하여 두 개의 기능적 항원 결합 부위를 갖는 다이머 분자를 생성하도록 하는 다이어바디를 포함한다. 항체 단편은 해당 기술 분야에 알려져 있으며 예를 들어 미국 특허출원 공개 2009/0093024 A1에 더 자세히 설명되어 있다.

[0134] 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 중쇄 불변 영역, 예를 들어 단편 결정화 가능(Fc) 영역 또는 그 일부를 포함한다. 상기 Fc 영역은 임의의 Ig 클래스/하위 클래스(IgA(IgA1, IgA2), IgD, IgE, IgG(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4), IgM일 수 있으며, 이의 변형체를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 "전체" 또는 "완전한" Ig(즉, 항체)이다. 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 IgG Fc 영역, 예를 들어 IgG1 또는 IgG4를 포함한다. 예를 들어, 상기 BLTA 결합제는 IgG1 또는 IgG4 항체가 될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 각각 서열번호 144 및 174, 또는 적어도 이의 CDR(본 명세서에 제공된 대로 또는 Kabat, Chothia, Martin(Enhanced Chothia), IGMT, 또는 AHo 번호 매기기에 따라 결정된 대로)을 포함하는 가변 중쇄 영역 및 가변 경쇄 영역, 또는 이와 90% 동일성을 포함하는 서열을 포함하며, 여기서 BTLA-결합제는 IgG1 항체이다. 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 각각 서열번호 144 및 174, 또는 적어도 이의 CDR(본 명세서에 제공된 대로 또는 Kabat, Chothia, Martin(Enhanced Chothia), IGMT, 또는 AHo 번호 매기기에 따라 결정된 대로)을 포함하는 가변 중쇄 영역 및 가변 경쇄 영역, 또는 이와 90% 동일성을 포함하는 서열을 포함하며, 여기서 BTLA-결합제는 IgG4 항체이다.

[0135] 상기 BTLA-결합제는 인간 항체, 비인간 항체, 또는 키메라 항체일 수도 있고, 이로부터 얻어질 수도 있다. "키메라"란 인간 및 비인간 영역을 모두 포함하는 항체 또는 그 단편을 의미한다. 바람직하게는, 상기 BTLA-결합제는 인간화 항체이다. "인간화" 항체는 인간 항체 골격과 비인간 항체에서 얻거나 유래된 최소 하나의 CDR을 포함하는 단일클론 항체이다. 비인간 항체에는 임의의 비인간 동물, 예를 들어 설치류(예: 마우스 또는 래트)로부터 단리된 항체가 포함된다. 인간화 항체는 비인간 항체로부터 얻거나 유래된 1개, 2개, 또는 3개의 CDR을 포함할 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 BTLA-결합제의 CDRH3는 마우스 단일클론 항체로부터 얻거나 유래되는 반면, 본 발명의 BTLA-결합제의 나머지 가변 영역 및 불변 영역은 인간 단일클론 항체로부터 얻거나 유래된다.

[0136] 인간 항체, 비인간 항체, 키메라 항체, 또는 인간화 항체는 시험관 내 출처(예: 하이브리도마 또는 항체를 재조합적으로 생성하는 세포주) 및 생체 내 출처(예: 설치류)을 포함한 임의의 수단에 의해 얻을 수 있다. 항체를 생성하는 방법은 당해 기술 분야에 알려져 있으며, 예를 들어 문헌 Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, *5*: 511-519 (1976); Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988); 및 Janeway et al. (eds.), *Immunobiology, 5th Ed.*, Garland Publishing, New York, NY (2001)에 기술되어 있다. 특정 실시예에서, 인간 항체 또는 키메라 항체는 하나 이상의 내인성 면역글로불린 유전자가 하나 이상의 인간 면역글로불린 유전자로 대체된 형질전환 동물(예: 마우스)을 사용하여 생성될 수 있다. 내인성 항체 유전자가 인간 항체 유전자로 효과적으로 대체된 형질전환 마우스의 예로는 Medarex HUMAB-MOUSE™, Kirin TC MOUSE™ 및 Kyowa Kirin KM-MOUSE™가 포함되지만 이에 국한되지 않는다(예: Lonberg, *Nat. Biotechnol., 23(9)*: 1117-25 (2005), 및 Lonberg, *Handb. Exp. Pharmacol.*, *181*: 69-97 (2008) 참조). 인간화 항체는 해당 기술 분야에 알려진 임의의 적절한 방법을 사용하여 생성될 수 있으며(예: An, Z. (ed.), *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2009) 참조), 이에는 예를 들어 비인간 CDR을 인간 항체 골격에 접목하는 것이 포함된다(예: Kashmiri et al., *Methods*, *36*(1): 25-34 (2005); and Hou et al., *J. Biochem.*, *144*(1): 115-120 (2008) 참조). 한 구체예에서, 인간화 항체는 예를 들어, 미국 특허출원 공개 2011/0287485 A1에 기술된 방법을 사용하여 생산할 수 있다.

[0137] 상기 BTLA-결합제는 에피토프에 대한 어떠한 특별한 친화력(affinity)에 의해 제한되지 않는다. "친화력"이란 용어는 두 가지 작용제의 가역적 결합에 대한 평형 상수를 말하며 해리상수($K_D$)로 표현된다. 그러나 일부 구체예에서, 상기 BTLA는 약 1 피코몰(pM) 내지 약 100 마이크로몰(μM)(예: 약 1 피코몰(pM) 내지 약 1 나노몰(nM), 약 1 nM 내지 약 1 마이크로몰(μM), 또는 약 1 μM 내지 약 100 μM)의 BTLA에 대한 친화력을 가질 수 있다. 한 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 1 나노몰 이하의 $K_D$(예: 0.9 nM, 0.8 nM, 0.7 nM, 0.6 nM, 0.5 nM, 0.4 nM, 0.3 nM, 0.2 nM, 0.1 nM, 0.05 nM, 0.025 nM, 0.01 nM, 0.001 nM, 또는 상기 값 중 임의의 두 개로 정의되는 범위)로 BTLA 단백질에 결합할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 200 pM 이하의 $K_D$(예: 190 pM, 175 pM, 150 pM, 125 pM, 110 pM, 100 pM, 90 pM, 80 pM, 75 pM, 60 pM, 50 pM, 40 pM, 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 10 pM, 5 pM, 1 pM 또는 상기 값 중 임의의 두 개로 정의되는 범위)로 BTLA에 결합할 수 있다. 관심 항원 또는 에피토프에 대한 면역글로불린 친화력은 기술적으로 인정된 임의의 검정법을 사용하여 측정할 수 있다. 이러한 방법에는 예를 들어 형광 활성화 세포 분류(FACS), 분리 가능 비드(예: 자기 비드), 표면 플라스몬 공명(SPR), 용액상 경쟁(KINEXA™), 항원 패닝, 경쟁적 결합 분석 및/또는 ELISA가 포함된다(예: Janeway et al.(eds.), *Immunobiology*, 5th ed., Garland Publishing, New York, NY, 2001 참조). 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 표면 플라스몬 공명(SPR)을 사용하여 측정 시 상기 설명한 바와 같은 BTLA에 대한 친화력을 갖는다(예: 1 nM 이하 또는 200 pM 이하). 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 표면 플라스몬 공명(SPR)을 사용하여 측정 시 상기 설명한 바와 같은 BTLA에 대한 친화력을 갖는다(예: 1 nM 이하 또는 200 pM 이하).

[0138] 본 명세서에 제공된 BTLA-결합제는 포유류에서 BTLA 신호전달을 조절(예: 촉진 또는 강화)하거나, 포유류에서 면역 반응을 조절(예: 억제)하거나/하고, BTLA 신호전달 결핍과 연관된 질환 또는 상태(예: BTLA-매개 면역 반응과 관련됨)를 치료 또는 예방하는 것과 같은 임의의 목적에 사용될 수 있다. 따라서, 한 양상에서 본 발명은 포유류에서 BTLA 신호전달을 촉진 또는 강화하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 본 명세서에서 기술된 BTLA-결합제를 포유류에 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 BTLA-결합제는 BTLA의 HVEM에 대한 결합을 촉진 또는 강화하거나, 그렇지 않으면 BTLA 신호전달을 촉진 또는 강화한다.

[0139] 상기 포유류는 BTLA 신호 전달이 부족하거나 BTLA-매개 면역 반응과 연관된 질환이나 상태를 겪는 포유류일 수 있다. 예를 들어, 상기 포유류는 면역억제에 의해 호전되는 질환이나 상태에 시달릴 수 있다. 이런 질환은

BTL 작용(agonism)에 반응하므로 포유류에게 BTLA-결합제를 투여하면 질환이나 상태를 치료하거나 예방할 수 있다. BTLA 신호 전달과 관련이 있고 BTLA 작용에 반응하는 질환, 상태, 또는 장애는 포유류, 바람직하게는 인간에게 BTLA 활성의 증가가 치료적 이점을 가져오거나 BTLA의 저발현 또는 감소된 활성이 질환 또는 장애의 병리학적 효과를 일으키거나 이에 기여하는 임의의 질환 또는 장애일 수 있다. 어떠한 이론이나 작용 기전에 얽매이고 싶지는 않지만, BTLA-결합제는 면역 억제적 BTLA-HVEM 신호전달을 촉진하여 면역 반응을 억제한다고 생각된다.

[0140] "면역 반응"은 예를 들어 항체 생산 및/또는 면역 효과기 세포(예: T-세포)의 활성화, 염증성 사이토카인의 생산 또는 여기에 기술되어 있거나 해당 기술 분야에 공지된 임의의 징후 또는 장애를 수반할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료", "치료하는" 등은 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 얻는 것을 의미한다. 바람직하게는, 그 효과는 치료적인 바, 즉 그 효과가 질환 및/또는 그 질환에 기인하는 부작용을 부분적으로 또는 완전히 치료하는 것이다. 이를 위해, 본 발명의 방법은 BTLA-결합제의 "치료적 유효량"을 투여하는 것을 포함한다. "치료적 유효량"이란 원하는 치료 결과를 얻는 데 필요한 용량과 기간으로 효과적인 양을 말한다. 상기 치료적 유효량은 개인의 질환 상태, 나이, 성별, 및 체중과 같은 요인과 BTLA-결합제가 개인에게 원하는 반응을 이끌어낼 수 있는 능력에 따라 달라질 수 있다.

[0141] 대안적으로 상기 약리학적 및/또는 생리학적 효과는 예방적일 수 있는 바 즉, 효과가 질환 또는 그 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방하는 것이다. 이와 관련하여, 본 발명의 방법은 상기 BTLA-결합제의 "예방적 유효량"을 투여하는 것을 포함한다. "예방적 유효량"이란 원하는 예방적 결과(예: 질환 발병 예방)를 얻는 데 필요한 용량 및 기간으로 효과적인 양을 말한다.

[0142] 상기 BTLA-결합제는 면역 반응을 억제하고 비정상적이거나 과도한 면역 반응과 관련된 질환이나 상태를 치료하는 데 유용하다. 해당 질환이나 장애는 염증성 또는 자가면역 질환(예: T세포 또는 B세포에 의해 유발되는 염증성 질환 또는 상태)일 수 있다. 염증성 또는 자가면역 질환의 예로는 예를 들어 감염(바이러스, 박테리아, 진균 및 기생충), 감염과 관련된 내독소성 쇼크, 관절염, 류마티스 관절염, 천식, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 골반 염증성 질환, 베체트병, 알츠하이머병, 크론병 및 궤양성 대장염을 포함한 염증성 장 질환, 폐로니병, 복강 질환, 담낭 질환, 꼬리뼈 질환, 복막염, 건선, 건선성 관절염, 혈관염, 항중성구 세포질 항체 관련(ANCA) 혈관염, 수술적 유착, 뇌졸중, 1형 당뇨병, 라임병, 관절염, 수막뇌염, 자가면역성 포도막염, 중추 및 말초 신경계의 면역 매개 염증성 질환(예: 다발성 경화증), 루푸스(예컨대 전신성 홍반 루푸스 및 만성 원반상 루푸스) 및 길랭-바 증후군, 아토피성 피부염, 다발성 근염, 피부근염, 자가면역성 간염, 섬유화성 폐포염, 그레이브스병, IgA 신병증, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 메니에르병, 천포창, 유천포창, 원발성 담관염, 간염, 육아종증, 경화증(국소 경화증, 전신 경화증, 및 진행성 전신 경화증), 다발혈관염을 동반한 유두종증, 기타 자가면역 질환, 담관염, 췌장염, 외상(수술), 이식편 대 숙주병, 이식 거부, 심근 경색과 같은 허혈성 질환을 포함한 심장 질환 및 죽상 경화증, 결절성 동맥 주위염(다발성 동맥염 결절 및 미세 다발혈관염), 알레르기성 과립종성 혈관염, 과민성 혈관염, 대동맥염 증후군(타카야수 동맥염), 측두 동맥염, 혈관 내 응고, 골 흡수, 골다공증, 골관절염, 치주염 및 저염소혈증, 스틸병, 코간 증후군, RS3PE, 류마티스성 다발근통, 섬유근육통 증후군, 항인지질 항체 증후군, 호산구성 근막염, 길랭-바레 증후군, 중증 근무력증, 만성 위축성 위염, 굿파스처 증후군, 급속 진행성 사구체신염, 거대적혈구빈혈, 용혈성 빈혈, 자가면역성 호중구감소증, 하시모토 갑상선염, 자가면역성 부신 기능부전, 원발성 갑상선 기능 저하증, 특발성 애디슨병(만성 부신 기능부전), 임신성 포진, 선형 IgA 수포성 피부 질환, 후천성 표피수포증, 원형 탈모증, 백반증, 하라다병, 자가면역 시신경병증, 특발성 무정자증, 재발성 태아 사망, 또는 태아-모체 내성 부족과 관련된 불임을 포함한다.

[0143] 일부 구체예에서, 해당 질환 또는 장애는 관절염(예: 류마티스 관절염 또는 TNF-내성 류마티스 관절염), 거대세포 동맥염, 류마티스성 다발근통, 원발성 쇼그렌 증후군, 원형 탈모증, 원발성 담즙성 담관염(PBC), 백반증, ANCA 혈관염, 1형 당뇨병, 비감염성 포도막염 건선, 이식편 대 숙주병(GvHD) 또는 염증성 장 질환이다.

[0144] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료", "치료하는" 등은 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 얻는 것을 의미한다. 바람직하게는, 그 효과는 치료적인 바, 즉 그 효과가 질환을 부분적으로 또는 완전히 치료하고/하거나 그 질환에 기인하는 부작용을 어느 정도까지 완화하는 것이다. 이를 위해, 본 발명의 방법은 BTLA-결합제의 "치료적 유효량"을 투여하는 것을 포함한다. "치료적 유효량"이란 원하는 치료 결과를 얻는 데 필요한 용량과 기간으로 효과적인 양을 말한다. 상기 치료적 유효량은 개인의 질환 상태, 나이, 성별, 및 체중과 같은 요인과 BTLA-결합제가 개인에게 원하는 반응을 이끌어낼 수 있는 능력에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 BTLA-결합제의 치료적 유효량은 인간 내에서 BTLA 생물학적 활성을 증가시키는 양이다.

[0145] 대안적으로 상기 약리학적 및/또는 생리학적 효과는 예방적일 수 있는 바 즉, 효과가 질환 또는 그 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방하는 것이다. 이와 관련하여, 본 발명의 방법은 상기 BTLA-결합제의 "예방적 유효량"을 투여하는 것을 포함한다. "예방적 유효량"이란 원하는 예방적 결과(예: 질환 발병의 예방)를 얻는 데 필요한 용량 및 기간으로 효과적인 양을 말한다.

[0146] 일부 구체예에서, 염증성 질환 또는 상태를 치료하는 방법은 BTLA-결합제를 주당 최소 7mg, 예를 들어 주당 최소 10mg(예: 주당 20mg~800mg, 주당 70mg~800mg, 주당 70mg~약 300mg, 또는 주당 70mg~약 200mg)의 용량으로 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 용량은 정맥 내로 투여된다. 일부 구체예에서, 염증성 질환 또는 상태를 치료하는 방법은 BTLA-결합제를 주당 최소 20mg, 예를 들어 주당 20mg~800mg, 또는 주당 70mg~800mg(예: 주당 70mg~300mg, 또는 주당 70mg~200mg)의 용량으로 투여하는 것을 포함하며, 여기서 용량은 피하 주사로 투여된다.

[0147] 일부 구체예에서, 상기 방법은 BTLA-결합제를 최소 150mg, 또는 최소 200mg의 단일 정맥 용량으로 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 용량은 3주에 한 번 이하 또는 4주에 한 번 이하(예: 30일에 한 번 이하, 60일에 한 번 이하, 90일에 한 번 이하, 120일에 한 번 이하, 150일에 한 번 이하, 또는 180일에 한 번 이하)로 투여된다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 BTLA-결합제를 최소 300mg(예: 300mg 내지 800mg, 또는 300mg 내지 500mg), 또는 최소 400mg(예: 400mg 내지 800mg, 또는 400mg 내지 500mg)의 단일 피하 용량으로 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 용량은 3주에 한 번 이하 또는 4주에 한 번 이하(예: 30일에 한 번 이하, 60일에 한 번 이하, 90일에 한 번 이하, 120일에 한 번 이하, 150일에 한 번 이하, 또는 180일에 한 번 이하)로 투여된다. 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 BTLA-결합제가 CD19+ B-세포 및/또는 CD3+ T-세포에서 BTLA 수용체 점유율을 90% 이상 유지하는 데 충분한 투여 요법(상기 개시된 것과 같은 투여량 및 투여 간격)으로 투여된다. 모든 투여 요법은 원하는 임상적 결과를 얻기 위한 필요에 따라 계속될 수 있다.

[0148] 상기 BTLA-결합제는 포유류에 투여하기에 적합한 조성물의 일부가 될 수 있다. 바람직하게는, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는(예: 생리학적으로 허용되는) 조성물이며, 이는 담체, 바람직하게는 약학적으로 허용되는(예: 생리학적으로 허용되는) 담체, 및 발명의 아미노산 서열, 항원 결합제, 또는 벡터를 포함한다. 본 발명의 맥락 내에서는 어떠한 적합한 담체라도 사용될 수 있으며, 이러한 담체는 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 담체의 선택은 부분적으로는 조성물을 투여할 수 있는 특정 부위 및 조성물을 투여하는 데 사용되는 특정 방법에 따라 결정된다. 또한, 본 조성물은 치료용 분자(예: 단백질 또는 항체)의 제제에 사용되는 기타 임의의 부형제, 특히 비경구 제제를 포함할 수 있으며, 여기에는 예를 들어 완충액, 삼투성 조절제, 안정제, 계면활성제 등이 포함된다. 상기 조성물은 선택적으로 멸균될 수 있다. 상기 조성물은 보관을 위해 동결시키거나 동결 건조시킬 수 있으며, 사용 전 적합한 멸균 담체 내에서 재구성할 수 있다. 상기 조성물은 예를 들어, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2001)에 기술된 기존 기술에 따라 생성될 수 있다.

[0149] 치료 또는 예방 효능은 치료를 받는 환자를 주기적으로 평가하여 모니터링할 수 있다. 환자의 상태에 따라 며칠 이상 반복적으로 투여하는 경우, 질환 증상이 원하는 수준으로 억제될 때까지 치료를 반복하거나, 대안적으로 환자의 평생 동안 치료를 계속할 수 있다. 그러나 다른 투여 요법도 유용할 수 있으며 이는 본 발명의 범위에 속한다. 원하는 복용량은 상기 조성물의 단일 볼러스 투여, 상기 조성물의 다중 볼러스 투여, 또는 상기 조성물의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0150] 투여는 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 폐, 경피, 근육내, 비강내, 협측, 설하, 또는 좌약 투여를 포함한 임의의 표준 투여 기술을 사용하여 이루어질 수 있다. 상기 조성물은 바람직하게는 비경구 투여에 적합하다. 본 명세서에서 사용되는 "비경구"라는 용어에는 정맥내 주사, 근육내 주사, 피하 주사, 직장 주사, 질 주사, 및 복강내 주사가 포함된다. 더욱 바람직하게는 상기 조성물은 정맥내, 복강내, 또는 피하 주사에 의한 말초 전신 전달을 사용하여 포유류에게 투여된다.

[0151] 일단 포유류(예: 인간)에 투여하면, 해당 기술 분야에 알려진 임의의 적절한 방법에 의해 상기 BTLA-결합제의 생물학적 활성을 측정할 수 있다. 상기 생물학적 활성은 신체 내 BTLA-결합제의 안정성과 상관관계가 있을 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 상기 BTLA-결합제(예: 항체)는 약 30분 내지 45일(예: 약 30분, 약 45분, 약 1시간, 약 2시간, 약 4시간, 약 6시간, 약 10시간, 약 12시간, 약 1일, 약 5일, 약 10일, 약 15일, 약 25일, 약 35일, 약 40일, 약 45일 또는 상기 값 중 임의의 두 개로 정의되는 범위)의 생체 내 반감기를 갖는다. 또 다른 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 약 2시간 내지 20일(예: 약 5시간, 약 10시간, 약 15시간, 약 20시간, 약 2일, 약 3일, 약 7일, 약 12일, 약 14일, 약 17일, 약 19일, 또는 상기 값 중 임의의 두 개로 정의되는 범위)의

생체 내 반감기를 갖는다. 또 다른 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 약 10일 내지 약 40일(예: 약 10일, 약 13일, 약 16일, 약 18일, 약 20일, 약 23일, 약 26일, 약 29일, 약 30일, 약 33일, 약 37일, 약 38일, 약 39일, 약 40일, 또는 상기 값 중 임의의 두 개로 정의되는 범위)의 생체 내 반감기를 갖는다.

[0152] 본 발명의 BTLA-결합제는 단독으로 또는 다른 약물과 병용하여 투여될 수 있다. 예를 들어, BTLA-결합제는 본 명세서에서 공개되는 질환의 치료 또는 예방을 위한 다른 제제, 예를 들어 다른 제제, 항염증제 또는 면역억제제와 병용하여 투여될 수 있다. 이와 관련하여, 예를 들어 상기 BTLA-결합제는 예를 들어 당해 기술 분야에 알려진 임의의 항염제, 글루코코르티코이드, 소분자 면역억제제, 백신, 생물학적 치료법(예: 다른 단일클론 항체, 바이러스, 유전자 치료, 및 적응성 T세포 전이) 및/또는 수술을 포함한 적어도 하나의 다른 제제와 병용하여 사용될 수 있다. 본 발명의 방법이 감염성 질환을 치료하는 경우, 상기 BTLA-결합제는 적어도 하나의 항균제 또는 적어도 하나의 항바이러스제와 병용하여 투여될 수 있다. 이런 양상에서, 상기 항균제는 해당 기술 분야에 알려진 임의의 적합한 항생제일 될 수 있다. 상기 항바이러스제는 특정 바이러스를 특이적으로 표적으로 삼는 임의의 적합한 유형의 임의의 백신(예: 생약독화 백신, 서브유닛 백신, 재조합 벡터 백신) 및 임의의 소분자 항바이러스 요법(예: 바이러스 복제 억제제 및 뉴클레오시드 유사체)일 수 있다.

[0153] 여기에 설명된 BTLA-결합제는 치료적 용도 외에도 진단이나 연구 목적으로 사용될 수 있다. 이런 양상에서, 상기 BTLA-결합제는 BTLA의 부적절한 발현(예: 저발현) 또는 감소된 활성이 질환 또는 장애의 병리학적 영향을 일으키거나 이에 기여하는 장애 또는 질환을 진단하는 방법에 사용될 수 있다. 마찬가지로, 상기 BTLA-결합제는 BTLA 촉진에 반응하는 질환이나 장애에 대해 검사를 받는 개체의 BTLA 단백질 수치를 모니터링하는 검정에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 연구 응용 분야에는 BTLA-결합제와 라벨을 사용하여 샘플(예: 인체 체액 또는 세포나 조직 추출물)에서 BTLA 단백질을 검출하는 방법이 포함된다. 상기 BTLA-결합제는 검출 가능한 모이어티로 공유 결합 또는 비공유 결합한 표지와 같이 변형되어도, 변형되지 않고도 사용할 수 있다. 예를 들어, 검출 가능한 모이어티는 방사성 동위 원소(예: $^{3}H$, $^{14}C$, $^{32}P$, $^{35}S$, 또는 $^{125}I$), 형광 또는 화학 발광 화합물(예: 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 또는 루시페린), 효소(예: 알칼라인 포스파타아제, 베타-갈락토시다제, 또는 서양고추냉이 퍼옥시다아제) 또는 보결 분자단(prosthetic groups)일 수 있다. 항원 결합제(예: 항체)를 검출 가능한 모이어티에 별도로 접합하기 위한 당해 기술 분야에 알려진 임의의 방법은 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있다(예: Hunter et al., *Nature*, *194*: 495-496 (1962); David et al., *Biochemistry*, *13*: 1014-1021 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.*, *40*: 219-230 (1981); 및 Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, *30*: 407-412 (1982) 참조).

[0154] BTLA 단백질 수준은 본 명세서에서 제공된 BTLA-결합제를 사용하여 해당 기술 분야에 알려진 임의의 적합한 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 이러한 방법에는 방사면역측정법(RIA)과 FACS가 포함된다. BTLA의 정상 또는 표준 발현 값은 예를 들어 항원-항체 복합체를 형성하기에 적합한 조건 하에서 BTLA를 포함하거나 포함할 것으로 의심되는 샘플과 BTLA-특이적 항체를 결합하는 것과 같은 임의의 적절한 기술을 사용하여 확립할 수 있다. 상기 항체는 결합되거나 결합되지 않은 항체의 검출을 용이하게 하기 위해 검출 가능한 물질로 직접 또는 간접적으로 표지된다. 적합한 검출 가능 물질에는 다양한 효소, 보결분자단, 형광 물질, 발광 물질, 및 방사성 물질이 포함된다(예: Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) 참조). 그런 다음 샘플에서 발현된 BTLA 폴리펩티드의 양을 표준값과 비교한다.

[0155] 특정 이론이나 작용 기전에 얽매이고 싶지는 않지만, 본 명세서에 설명된 대로 BTLA-결합제를 투여하면 BTLA가 발현되는 세포 중 적어도 일부에서 BTLA 일부가 방출되어 BTLA-결합제가 투여된 개체의 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직(예: 피부 조직)에 존재하는 가용성 BTLA(sBTLA)가 증가하는 것으로 생각된다. 따라서, 본 명세서에는 개체에서 BTLA-결합제의 약리학적 활성을 검출, 측정, 또는 모니터링하는 방법(예: 시험관 내 방법)이 제공되며, 이 방법은 BTLA-결합제가 투여된 개체의 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직(예: 피부 조직)의 샘플에서 가용성 BTLA(sBTLA)를 검출하는 단계를 포함한다. 또한, 본 명세서에서는 환자의 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직(예: 피부 조직) 샘플에서 sBTLA를 검출하거나 측정(예: 시험관 내)하여 BTLA-결합제를 이용한 치료를 위한 환자를 선택하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 환자(환자의 샘플)의 sBTLA 수치가 동일한 유형의 정상적이고 질환이 없는 개체(예: 인간 개체)의 sBTLA 수치에 비해 감소하는 경우 해당 환자가 치료를 위해 선택되는 것이다. 상기 sBTLA는 해당 기술 분야에 알려진 여러 가지 기술을 사용하여 검출하고, 필요한 경우 정량화할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 sBTLA는 개체의 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직 샘플(예: 시험관 내)을 여기에 제공된 BTLA-결합제와 접촉시켜 검출한다. 일부 구체예에서, 개체의 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직 샘플에서 검출된 sBTLA는 BTLA-결합제(예: 이전에 투여된 BTLA-결합제)에 결합된다.

[0156] 일부 구체예에서, 개체에게 투여되는 BTLA-결합제는 개체에서 BTLA의 배출을 유도하며, BTLA가 HVEM에 결합하는 것을 억제하지 않는 BTLA-결합제이다. 상기 BTLA-결합제는 본 명세서에서 설명하는 BTLA-결합제와 같은 임의의 BTLA-결합제일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 서열번호 1-15, 207, 208, 217, 또는 218 중 어느 하나의 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR, 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및 서열번호 16-25, 209, 210, 219, 또는 220 중 어느 하나의 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR; 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들어, 상기 BTLA-결합제는 서열번호 27, 30, 32, 36, 39, 및 41로 표현되는 CDR을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 BTLA-결합제는 서열번호 43-156 중 어느 하나의 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR; 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및 서열번호 157-192 중 어느 하나의 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR; 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 본 명세서에서 기술하는 다른 특징 중 어느 하나 또는 전부를 갖는다. 예를 들어, 상기 BTLA-결합제는 서열번호 195-200으로 표현되는 CDR을 포함할 수 있고; 예를 들어, 서열번호 201-206을 포함하는 CDR을 포함하거나, 서열번호 193 및 194 또는 서열번호 144 및 174의 Ig 중쇄 및 경쇄, 또는 적어도 이의 CDR을 포함하거나, 서열번호 193 및 194 또는 서열번호 144 및 174와 각각 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 Ig 중쇄 및 경쇄를 포함하는 BTLA-결합제이다.

[0157] 일부 구체예에서, BTLA가 투여된 개체의 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직(예: 피부 조직) 내 sBTLA는 sBTLA에 결합하는 포획 항체를 사용하여 검출된다. 상기 포획 항체는 BTLA에 결합하는 임의의 항체일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 포획 항체는 본 명세서에서 제공되는 BTLA 항체이다. 상기 포획 항체는 개체에게 투여된 BTLA-결합제와 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 sBTLA 포획 항체는 개체에 투여되는 BTLA-결합제와 다르다. 일부 구체예에서, 상기 포획 항체는 서열번호 1-15, 207, 208, 217, 또는 218 중 어느 하나를 포함하는 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR, 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및 서열번호 16-25, 209, 210, 219 또는 220 중 어느 하나를 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR, 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 본 명세서에서 설명하는 기타 특징들 중 어느 하나 또는 전부를 갖는다. 추가 실시예에서, 상기 포획 항체는 서열번호 27, 30, 및 32로 표현되는 중쇄 CDR 1-3; 및 서열번호 36, 39, 및 41로 표현되는 경쇄 CDR 1-3; 또는 본 명세서에서 제공되는 보다 구체적으로 언급된 CDR 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 포획 항체는 서열번호 26의 Ig 중쇄(예: 서열번호 1-15, 207, 208, 217, 또는 218 중 어느 하나) 및 서열번호 35의 Ig 경쇄(예: 서열번호 16-25, 209, 210, 219, 또는 220 중 어느 하나)를 포함할 수 있다. 선택적으로, 이러한 구체예와 조합하여, 개체에게 투여되는 BTLA-결합제는 서열번호 43-156 중 어느 하나의 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR; 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및 서열번호 157-192 중 어느 하나의 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR; 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 본 명세서에서 설명하는 다른 특징들 중 어느 하나 또는 전부를 갖는다. 예를 들어, 상기 BTLA-결합제는 서열번호 195-200으로 표시되는 CDR을 포함할 수 있고; 예를 들어, 서열번호 201-206을 포함하는 CDR을 포함하거나, 서열번호 193 및 194 또는 서열번호 144 및 174의 Ig 중쇄 및 경쇄를 포함하는 BTLA-결합제이다.

[0158] 임의의 특정된 이론이나 작용 기전에 얽매이고 싶지는 않지만, 본 명세서에 설명된 바와 같이 BTLA의 HVEM에 대한 결합을 억제하지 않는 항체에 BTLA(또는 sBTLA)를 결합하면 포획 항체의 sBTLA에 대한 결합이 강화된다고 생각된다. 따라서, 본 명세서에서는 또한 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직(예: 피부 조직)에서 sBTLA를 검출 및/또는 정량화하기 위한 분석법을 제공하며, 이 방법은 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직(예: 피부 조직) 샘플을 포획 항체 및 BTLA의 HVEM에 대한 결합을 억제하지 않는 BTLA-결합제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, BTLA가 HVEM에 결합하는 것을 억제하지 않는 BTLA-결합제는 서열번호 43-156 중 어느 하나의 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR; 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및 서열번호 157-192 중 어느 하나의 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR; 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 BTLA-결합제이며, 본 명세서에서 설명하는 기타 특징들 중 어느 하나 또는 전부를 갖는다. 예를 들어, 상기 BTLA-결합제는 서열번호 195-200으로 표현되는 CDR을 포함할 수 있고;. 예를 들어, 서열번호 201-206을 포함하는 CDR을 포함하거나, 서열번호 193 및 194 또는 서열번호 144 및 174의 Ig 중쇄 및 경쇄를 포함하는 BTLA-결합제이다. 일부 구체예에서, 상기 포획 항체는 서열번호 1-15, 207, 208, 217, 또는 218 중 어느 하나를 포함하는 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR, 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및 서열번호 16-25, 209, 210, 219, 또는 220 중 어느 하나를 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR, 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 본 명세서에서 설명하는 기타 특징들 중 어느 하나 또는 전부를 갖는다. 예를 들어, 상기 포획 항체는 서열번호 27,

30 및 32로 표현되는 중쇄 CDR 1-3; 및 서열번호 36, 39, 및 41로 표현되는 경쇄 CDR 1-3을 포함할 수 있거나, 여기에 제공된 보다 구체적으로 언급된 CDR 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 포획 항체는 서열번호 26의 Ig 중쇄(예: 서열번호 1-15, 207, 208, 217, 또는 218 중 어느 하나) 및 서열번호 35의 Ig 경쇄(예: 서열번호 16-25, 209, 210, 219, 또는 220 중 어느 하나)를 포함할 수 있다.

[0159] 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직에서 sBTLA를 검출, 측정, 또는 평가하는 전술한 방법의 일부 구체예에서, 상기 방법은 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직 샘플에서 sBTLA의 농도를 참조 sBTLA 농도와 비교하는 단계를 더 포함할 수 있다. 임의의 적합한 참조 농도를 사용할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 참조 sBTLA 농도는 BTLA-결합제를 투여하기 전 동일한 환자 또는 개체의 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직 샘플에서의 sBTLA의 농도이다. 대안적으로, 또는 이에 추가하여, 상기 참조 sBTLA 농도는 다른 개체의 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직 내 sBTLA 농도에 의해 제공될 수 있는데, 예를 들어, BTLA-결합제를 투여받지 않은 동일한 유형의 정상적이고 질환이 없는 개체, 또는 그러한 개체 집단의 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직 내 sBTLA 농도의 통계적 분석에 의해 확립된 참조 sBTLA 농도이다(예: BTLA-결합제로 치료를 받지 않는 정상적이고 질환이 없는 개체 집단의 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직 샘플 내 sBTLA의 평균 농도). 일부 구체예에서, 상기 참조 sBTLA 농도는 개체의 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직 샘플이나 개체 집단의 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직 샘플을 상기 설명한 포획 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 확립되며; 선택적으로 상기 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직 샘플을 본 명세서에서 설명한 바와 같이 HVEM에 대한 BTLA 결합을 억제하지 않는 BTLA-결합제와 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 접촉시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0160] 다른 구체예에서, 상기 방법은 BTLA-결합제가 투여된 개체의 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직 샘플 내 sBTLA 농도를, BTLA-결합제가 개체에게 투여되기 전 또는 후의 다른 시점에서 동일한 개체의 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직 샘플 내 sBTLA 농도와 비교하는 단계를 포함한다. 예를 들어, sBTLA 농도는 BTLA-결합제를 투여한 후 두 개 이상의 시점에서 측정될 수 있으며, 이를 비교하여 시간 경과에 따른 BTLA-결합제의 효과를 평가할 수 있으며, 선택적으로 BTLA-결합제를 한 번 이상 추가로 투여할 수도 있다. 이런 방식으로 BTLA-결합제를 이용한 치료를 모니터링할 수 있다.

[0161] 또한 본 명세서에서는 BTLA의 HVEM에 대한 결합을 억제하지 않는 BTLA-결합제와 sBTLA에 결합하는 제2 포획 항체를 포함하는 조성물을 제공하는데, 이는 혈액, 혈장, 혈청, 또는 조직에서 sBTLA를 검출, 측정, 또는 모니터링하는 상기 방법에 유용하다. 일부 구체예에서, 상기 BTLA의 HVEM에 대한 결합을 억제하지 않는 BTLA-결합제는 서열번호 43-156 중 어느 하나의 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR; 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및 서열번호 157-192 중 어느 하나의 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR; 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 본 명세서에서 설명하는 기타 특징들 중 하나 또는 전부를 갖는다. 예를 들어, 상기 BTLA-결합제는 서열번호 195-200으로 표현되는 CDR을 포함할 수 있는데, 예를 들어 서열번호 201-206을 포함하는 CDR을 포함하거나, 서열번호 193 및 194 또는 서열번호 144 및 174의 Ig 중쇄 및 경쇄를 포함하는 BTLA-결합제이다. 일부 구체예에서, 상기 포획 항체는 서열번호 1-15, 207, 208, 217, 또는 218 중 하나를 포함하는 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR, 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및 서열번호 16-25, 209, 210, 219, 또는 220 중 하나를 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 이의 CDR, 또는 이와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 본 명세서에서 설명하는 기타 특징들 중 하나 또는 전부를 갖는다. 예를 들어, 상기 포획 항체는 서열번호 27, 30, 및 32로 표시되는 중쇄 CDR 1-3; 및 서열번호 36, 39, 및 41로 표시되는 경쇄 CDR 1-3을 포함할 수 있거나, 여기에 제공된 보다 구체적으로 언급된 CDR 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 포획 항체는 서열번호 26의 Ig 중쇄(예: 서열번호 1-15, 207, 208, 217, 또는 218 중 어느 하나) 및 서열번호 35의 Ig 경쇄(예: 서열번호 16-25, 209, 210, 219, 또는 220 중 어느 하나)를 포함할 수 있다.

[0162] 상기 BTLA-결합제, 포획 항체, 또는 조성물은 키트, 즉 진단 검정을 수행하기 위한 지침과 함께 미리 정해진 양의 시약을 포장한 것으로 제공할 수 있다. 만일 상기 BTLA-결합제가 효소로 표지된 경우, 키트에는 효소에 필요한 기질과 보조 인자(예: 검출 가능한 발색단이나 형광단을 제공하는 기질 전구체)가 포함되는 것이 바람직하다. 이외에도 안정제, 완충액(예: 차단 완충액 또는 용해 완충액) 등과 같은 다른 첨가제가 키트에 포함될 수 있다. 다양한 시약의 상대적인 양을 변화시켜 검정의 감도를 실질적으로 최적화하는 시약 용액의 농도를 제공할 수 있다. 시약은 부형제를 포함한 건조 분말(일반적으로 동결 건조)로 제공될 수 있으며, 이러한 부형제는 용해시 적절한 농도의 시약 용액을 제공한다.

[0163] **핵산**

[0164] 본 발명은 또한 본 명세서에서 제공되는 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드, 및 BTLA-결합제를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 제공한다.

[0165] "핵산 서열"이라는 용어는 DNA 또는 RNA의 중합체, 즉 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있으며 비자연적 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있는 폴리뉴클레오티드를 포괄하도록 의도된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 리보뉴클레오타이드(RNA) 또는 데옥시리보뉴클레오타이드(DNA)와 같이 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체 형태를 지칭한다. 이러한 용어는 분자의 1차 구조를 지칭하며, 이중 가닥 및 단일 가닥 DNA, 및 이중 가닥 및 단일 가닥 RNA를 포함한다. 이러한 용어에는 균등체로서 뉴클레오타이드 유사체에서 만들어진 RNA 또는 DNA의 유사체와 메틸화 및/또는 캡핑된 폴리뉴클레오타이드를 포함하되 이에 국한되지 않는 변형된 폴리뉴클레오타이드가 포함된다. 핵산은 일반적으로 인산 결합에 의해 연결되어 핵산 서열이나 폴리뉴클레오티드를 형성하지만, 해당 기술 분야에는 다른 많은 결합이 알려져 있다(예: 포스포로티오에이트, 보라노포스페이트 등).

[0166] 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드, 면역글로불린 경쇄 폴리펩티드, 또는 BTLA-결합제를 코딩하는 핵산은 벡터의 일부가 될 수 있다. 예를 들어 벡터는 플라스미드, 에피솜, 코스미드, 바이러스 벡터(예: 레트로바이러스 또는 아데노바이러스) 또는 파지일 수 있다. 적합한 벡터 및 벡터 제조 방법은 해당 기술 분야에서 잘 알려져 있다(예: Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001), 및 Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994) 참조).

[0167] 상기 벡터는 일반적으로 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 전사 종결자, 신호 펩티드(예: 오스테오넥틴 신호 펩티드), 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 등과 같은 발현 제어 서열을 포함하며, 이는 숙주 세포에서 코딩 서열의 발현을 제공한다. 예시적인 발현 조절 서열은 당해 기술 분야에 알려져 있으며, 예를 들어, Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Vol.185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)에 기술되어 있다.

[0168] 구성적, 유도적, 및 억제적 프로모터를 포함한 다양한 출처의 다수의 프로모터가 해당 기술 분야에 잘 알려져 있다. 프로모터의 대표적인 출처으로는 예를 들면 바이러스, 포유류, 곤충, 식물, 효모, 및 박테리아 등을 포함하며, 이러한 출처로부터 얻은 적합한 프로모터는 쉽게 구할 수 있거나 예를 들어 ATCC와 같은 보관소나 다른 상업적 또는 개별 출처로부터 공개적으로 구할 수 있는 서열을 기반으로 합성하여 만들 수도 있다. 프로모터는 단방향(즉, 한 방향으로 전사를 개시)이거나 양방향(즉, 3' 또는 5' 방향으로 전사를 개시)일 수 있다. 프로모터의 비제한적 예로는 예를 들어, T7 박테리아 발현 시스템, pBAD(araA) 박테리아 발현 시스템, 거대세포바이러스(CMV) 프로모터, SV40 프로모터, RSV 프로모터를 포함한다. 유도성 프로모터에는 예를 들어 Tet 시스템(미국 특허 제5,464,758호 및 제5,814,618호), Ecdysone 유도성 시스템(No et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *93*: 3346-3351 (1996)), T-REX™ 시스템(Invitrogen, Carlsbad, CA), LACSWITCH™ 시스템(Stratagene, San Diego, CA), 및 Cre-ERT 타목시펜 유도성 재조합효소 시스템(Indra et al., *Nuc. Acid. Res.*, *27*: 4324-4327 (1999); *Nuc. Acid. Res.*, *28*: e99 (2000); 미국 특허 제7,112,715호; 및 Kramer & Fussenegger, *Methods Mol. Biol.*, *308*: 123-144 (2005))을 포함한다.

[0169] 본 명세서에서 사용되는 용어 "인핸서"는 예를 들어 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 전사를 증가시키는 DNA 서열을 지칭한다. 인핸서는 핵산 서열의 코딩 영역으로부터 수 킬로베이스 떨어진 곳에 위치할 수 있으며, 조절 인자의 결합, DNA 메틸화 패턴, 또는 DNA 구조의 변화를 매개할 수 있다. 다양한 출처의 많은 수의 인핸서가 해당 기술 분야에서 잘 알려져 있으며, 복제된 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, ATCC와 같은 보관소 및 기타 상업적 또는 개별적 출처)로 또는 그 내부에서 이용 가능하다. 프로모터(일반적으로 사용되는 CMV 프로모터 등)를 구성하는 다수의 폴리뉴클레오티드도 인핸서 서열을 포함한다. 인핸서는 코딩 서열의 상류, 내부, 또는 하류에 위치할 수 있다.

[0170] 벡터는 또한 "선택 가능한 마커 유전자"를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "선택 가능한 마커 유전자"는 핵산 서열을 발현하는 세포가 해당 선택제의 존재 하에 특이적으로 선택되거나 선택되지 않도록 허용하는 핵산 서열을 말한다. 적합한 선택 마커 유전자는 당해 기술 분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO 1992/008796 및 WO 1994/028143; Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *77*: 3567-3570 (1980); O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *78*: 1527-1531 (1981); Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *78*: 2072-2076 (1981); Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, *150*: 1-14 (1981); Santerre et al., *Gene*, *30*: 147-156 (1984); Kent et al., *Science*, *237*: 901-903 (1987); Wigler et al.,

*Cell*, *11*: 223-232 (1977); Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *48*: 2026-2034 (1962); Lowy et al., *Cell*, *22*: 817-823 (1980); 및 미국특허 제5,122,464호 및 제5,770,359호에 기술되어 있다.

[0171] 일부 구체예에서, 상기 벡터는 숙주 세포에서 복제될 수 있는 "에피솜 발현 벡터" 또는 "에피솜"이며, 적절한 선택적 압력이 존재하는 경우 숙주 세포 내에서 DNA의 염색체 외 부분으로서 지속된다(예: Conese et al., Gene Therapy, 11: 1735-1742(2004) 참조). 대표적인 상업적으로 이용 가능한 에피솜 발현 벡터에는 엡스타인-바 핵 항원 1(EBNA1) 및 엡스타인-바 바이러스(EBV) 복제 기점(oriP)을 활용하는 에피솜 플라스미드가 포함되지만 이에 국한되지는 않는다. Invitrogen(Carlsbad, CA)의 벡터 pREP4, pCEP4, pREP7, 및 pcDNA3.1과 Stratagene(La Jolla, CA)의 pBK-CMV는 EBNA1 및 oriP 대신 T 항원과 SV40 복제 기점을 사용하는 에피솜 벡터의 비제한적 예를 나타낸다.

[0172] 기타 적합한 벡터로는 숙주 세포의 DNA에 무작위로 통합되거나 발현 벡터와 숙주 세포의 염색체 사이의 특정 재조합을 가능하게 하는 재조합 부위를 포함할 수 있는 통합 발현 벡터를 포함한다. 이러한 통합 발현 벡터는 숙주 세포 염색체의 내인성 발현 조절 서열을 활용하여 원하는 단백질의 발현을 달성할 수 있다. 자리 특이적 방식(site specific manner)으로 통합되는 벡터의 예로는 예를 들어 Invitrogen(Carlsbad, CA)의 flp-in 시스템의 구성요소(예: pcDNA™5/FRT)나 Stratagene(La Jolla, CA)의 pExchange-6 Core Vectors에서 찾을 수 있는 것과 같은 cre-lox 시스템을 포함한다. 숙주 세포 염색체에 무작위로 통합되는 벡터의 예로는 예를 들어 Life Technologies(Carlsbad, CA)의 pcDNA3.1(T-항원이 없는 경우 도입 시), Millipore(Billerica, MA)의 UCOE, Promega(Madison, WI)의 pCI 또는 pFN10A(ACT) FLEXI™을 포함한다.

[0173] 바이러스 벡터도 사용될 수 있다. 대표적인 상업적으로 판매되는 바이러스 발현 벡터로는 Crucell, Inc.(Leiden, The Netherlands)로부터 구매가능한 아데노바이러스 기반 Per.C6 시스템, Invitrogen(Carlsbad, CA)로부터 구매가능한 렌티바이러스 기반 pLP1, Stratagene(La Jolla, CA)로부터 구매가능한 레트로바이러스 벡터 pFB-ERV와 pCFB-EGSH가 있으나 이에 국한되지 않는다.

[0174] 본 발명의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열은 동일한 벡터(즉, cis에서) 상에서 세포에 제공될 수 있다. 단방향 프로모터는 각 핵산 서열의 발현을 제어하는 데 사용될 수 있다. 또 다른 실시예에서는, 양방향 프로모터와 단방향 프로모터의 조합을 사용하여 다수의 핵산 서열의 발현을 제어할 수 있다. 본 발명의 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 대안적으로 별도의 벡터(즉, trans에서)상에서 세포의 집단에 제공될 수 있다. 각각의 개별 벡터의 각각의 핵산 서열은 동일하거나 상이한 발현 조절 서열을 포함할 수 있다. 개별 벡터는 세포에 동시에 또는 순차적으로 제공될 수 있다.

[0175] 본 발명의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산(들)을 포함하는 벡터는 그에 의해 코딩된 폴리펩티드를 발현할 수 있는 숙주 세포에 도입될 수 있는 바, 이는 임의의 적합한 원핵 세포 또는 진핵 세포를 포함한다. 따라서, 본 발명은 발명적 벡터를 포함하는 단리된 세포를 제공한다. 바람직한 숙주 세포는 쉽고 안정적으로 성장할 수 있고, 합리적으로 빠른 성장 속도를 가지며, 잘 규명된 발현 시스템을 가지고 있으며, 쉽고 효율적으로 형질 전환되거나 형질감염될 수 있는 세포이다.

[0176] 적합한 원핵 세포의 예로는 바실러스속(예: 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 브레비스), 대장균속(예: 대장균), 슈도모나스속, 스트렙토마이세스속, 살모넬라속 및 에르위니아속의 세포를 포함하되 이에 국한되지 않는다. 특히 유용한 원핵 세포로는 다양한 대장균 균주(예: K12, HB101(ATCC No. 33694), DH5α, DH10, MC1061(ATCC No. 53338), CC102)를 포함한다.

[0177] 일부 구체예에서, 상기 벡터는 진핵 세포에 도입된다. 적합한 진핵 세포는 해당 기술 분야에 알려져 있으며, 예를 들어 효모 세포, 곤충 세포, 및 포유류 세포를 포함한다. 적합한 효모 세포의 예로는 클루이베로마이세스, 피치아, 리노-스포리디움, 사카로마이세스, 및 스키조사카로마이세스 속의 세포를 포함한다. 바람직한 효모 세포로는 예를 들어 Saccharomyces cerivisae와 Pichia pastoris를 포함한다.

[0178] 적합한 곤충 세포는 예를 들어, Kitts et al., Biotechniques, 14: 810-817 (1993); Lucklow, Curr.*Opin. Biotechnol.*, *4*: 564-572 (1993); and Lucklow et al., *J. Virol.*, *67*: 4566-4579 (1993)에 기술되어 있다. 바람직한 곤충 세포로는 Sf-9와 HI5(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 포함한다.

[0179] 일부 구체예에서는 포유류 세포가 본 발명에 활용된다. 적합한 포유류 숙주 세포가 여러 개 해당 분야에 알려져 있으며, 많은 세포가 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)로부터 구할 수 있다. 적합한 포유류 세포의 예로는 중국 햄스터 난소 세포(CHO)(예: CHO-K1 세포, ATCC 번호 CCL61), CHO DHFR-세포(Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *97*: 4216-4220 (1980)), 인간 배아 신장(HEK) 293 또는 293T 세포(ATCC

번호 CRL1573), 및 3T3 세포(ATCC 번호 CCL92)가 포함되지만 이에 국한되지는 않는다. 기타 적합한 포유류 세포주는 원숭이 COS-1(ATCC 번호 CRL1650) 및 COS-7 세포주(ATCC 번호 CRL1651), 뿐만 아니라 CV-1 세포주(ATCC 번호 CCL70)가 있다. 추가적인 예시적인 포유류 숙주 세포로는 영장류 세포주와 설치류 세포주를 포함하며, 형질전환된 세포주도 포함된다. 정상 이배체 세포, 1차 조직의 시험관 내 배양에서 유래한 세포주, 뿐만 아니라 1차 이식편(explant)도 적합하다. 기타 적합한 포유류 세포주로는 마우스 신경아세포종 N2A 세포, HeLa, 마우스 L-929 세포, 및 BHK 또는 HaK 햄스터 세포주를 포함하며, 이에 국한되지는 않는데, 모두 ATCC에서 구할 수 있다. 적합한 포유류 숙주 세포를 선택하는 방법, 세포의 형질전환, 배양, 증폭, 스크리닝, 및 정제 방법은 해당 기술 분야에 알려져 있다.

[0180] 한 구체예에서, 상기 포유류 세포는 인간 세포이다. 예를 들어, 상기 포유류 세포는 인간 림프구(lymphoid) 또는 림프구 유래 세포주, 예를 들어 pre-B 림프구 유래 세포주일 수 있다. 인간 림프구 세포주의 비제한적인 예로는 RAMOS(CRL-1596), Daudi(CCL-213), EB-3(CCL-85), DT40(CRL-2111), 18-81(Jack et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *85*: 1581-1585 (1988)), Raji 세포 (CCL-86), PER.C6 세포 (Crucell Holland B.V., Leiden, The Netherlands), 및 이의 파생물을 포함한다.

[0181] 본 발명의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열은 "형질감염", "형질전환", 또는 "형질도입"과 같은 임의의 적합한 방법에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "형질감염", "형질전환", 또는 "형질도입"은 물리적 또는 화학적 방법을 사용하여 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하는 것을 말한다. 많은 적합한 기술이 해당 기술 분야에 알려져 있으며, 예를 들어 인산칼슘 DNA 공침법(예: Murray E.J. (ed.), *Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Gene Transfer and Expression Protocols*, Humana Press (1991) 참조); DEAE-덱스트란; 전기 천공; 양이온 리포좀 매개 형질감염; 텅스텐 입자를 이용한 미세입자 폭격법(Johnston, Nature, 346: 776-777(1990)); 및 인산 스트론튬 DNA 공침법(Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, *7*: 2031-2034 (1987))을 포함한다. 감염성 입자를 적합한 포장 세포에서 성장시킨 후, 파지 또는 바이러스 벡터를 숙주 세포에 도입할 수 있으며, 이러한 포장 세포 중 다수는 상업적으로 이용 가능하다.

[0182] 상기 핵산 및 세포는 본 명세서에서 설명하는 BTLA-결합제의 제조와 같은 임의의 목적에 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명은 BTLA-결합제를 제조하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 BTLA-결합제의 중쇄 및/또는 경쇄 면역글로불린 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 다르게 표현하면, 이 방법은 세포(예: CHO 및 CHO-K1 세포를 비롯한 본 명세서에서 논의된 세포주와 같은 시험관 내 세포)에서 BTLA-결합제의 면역글로불린 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 핵산을 발현시키는 단계를 포함한다. 면역글로불린 중쇄와 경쇄는 주어진 세포 내의 단일 핵산으로부터 발현될 수 있고, 또는 면역글로불린 중쇄와 경쇄는 동일한 세포 내의 별개의 핵산으로부터 발현될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이 방법은 알려진 기술을 사용하여 세포 또는 세포 배양 배지로부터 BTLA-결합제를 수확 및/또는 정제하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0183] 다음의 실시예들은 본 발명을 더욱 자세히 설명하지만, 물론 이것이 본 발명의 범위를 임의적으로 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0184] **실시예**

[0185] 표 2는 서열번호 1-15의 면역글로불린 중쇄 가변 영역과 서열번호 16-25의 경쇄 가변 영역을 포함하는 BTLA-결합제(예: 항체 또는 항체 단편)의 예를 제공한다.

*표 2*

[0186]

| Ab 식별 | 중쇄 가변 영역 | 경쇄 가변 영역 |
|---|---|---|
| APE08678 | 서열번호 1 | 서열번호 16 |
| APE08729 | 서열번호 2 | 서열번호 16 |
| APE08730 | 서열번호 1 | 서열번호 18 |
| APE08731 | 서열번호 1 | 서열번호 17 |
| APE08756 | 서열번호 4 | 서열번호 18 |
| APE08757 | 서열번호 4 | 서열번호 16 |
| APE08758 | 서열번호 3 | 서열번호 18 |
| APE08759 | 서열번호 3 | 서열번호 16 |
| APE08793 | 서열번호 4 | 서열번호 17 |
| APE08794 | 서열번호 3 | 서열번호 17 |
| APE08795 | 서열번호 2 | 서열번호 18 |

| | | |
|---|---|---|
| APE08796 | 서열번호 2 | 서열번호 17 |
| APE09032 | 서열번호 2 | 서열번호 19 |
| APE09033 | 서열번호 1 | 서열번호 19 |
| APE09065 | 서열번호 1 | 서열번호 21 |
| APE09066 | 서열번호 1 | 서열번호 20 |
| APE09067 | 서열번호 7 | 서열번호 17 |
| APE09068 | 서열번호 6 | 서열번호 17 |
| APE09069 | 서열번호 5 | 서열번호 17 |
| APE09356 | 서열번호 10 | 서열번호 21 |
| APE09357 | 서열번호 10 | 서열번호 17 |
| APE09358 | 서열번호 9 | 서열번호 17 |
| APE09359 | 서열번호 8 | 서열번호 21 |
| APE09360 | 서열번호 8 | 서열번호 17 |
| APE09361 | 서열번호 7 | 서열번호 21 |
| APE09362 | 서열번호 5 | 서열번호 21 |
| APE09491 | 서열번호 5 | 서열번호 19 |
| APE09495 | 서열번호 11 | 서열번호 19 |
| APE09496 | 서열번호 11 | 서열번호 17 |
| APE09785 | 서열번호 13 | 서열번호 19 |
| APE09786 | 서열번호 13 | 서열번호 17 |
| APE09787 | 서열번호 12 | 서열번호 19 |
| APE09788 | 서열번호 12 | 서열번호 17 |
| APE09833 | 서열번호 8 | 서열번호 19 |
| APE09834 | 서열번호 8 | 서열번호 23 |
| APE09835 | 서열번호 8 | 서열번호 22 |
| APE09836 | 서열번호 5 | 서열번호 23 |
| APE09837 | 서열번호 5 | 서열번호 22 |
| APE09838 | 서열번호 2 | 서열번호 23 |
| APE09839 | 서열번호 2 | 서열번호 22 |
| APE09840 | 서열번호 15 | 서열번호 17 |
| APE09841 | 서열번호 15 | 서열번호 19 |
| APE09842 | 서열번호 14 | 서열번호 17 |
| APE09843 | 서열번호 14 | 서열번호 19 |
| APE09897 | 서열번호 8 | 서열번호 25 |
| APE09898 | 서열번호 8 | 서열번호 24 |
| APE09899 | 서열번호 5 | 서열번호 25 |
| APE09900 | 서열번호 5 | 서열번호 24 |
| APE09901 | 서열번호 2 | 서열번호 25 |
| APE09902 | 서열번호 2 | 서열번호 24 |

[0187] 표 2의 항체 또는 항체 단편에 대해 Kabat 번호가 매겨진 CDR은 다음과 같다: CDRH1은 해당 VH 서열의 31-35 위치에 있고; CDRH2는 해당 VH 서열의 50-66 위치에 있고; CDRH3은 해당 VH 서열의 99-106 위치에 있고; CDRL1은 해당 VL 서열의 24-34 위치에 있고; CDRL2는 해당 VL 서열의 50-56 위치에 있으며; CDRL3은 해당 VL 서열의 89-97 위치에 있다. 표 2에 제시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 쌍을 갖거나, 적어도 이의 CDR을 갖는 BTLA-결합제는 본 개시내용의 구체적인 구체예를 제공하는 것이다. 표 2의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 추가 쌍, 또는 적어도 이의 CDR은 또 다른 BTLA-결합제를 제공하며, 이는 본 개시내용의 범위 내에 있는 것으로 간주된다.

[0188] 표 3은 서열번호 43-156의 면역글로불린 중쇄 가변 영역과 서열번호 157-192의 경쇄 가변 영역을 포함하는 BTLA-결합제(예: 항체 또는 항체 단편)의 예를 제공한다.

*표 3*

[0189]

| Ab 식별 | 중쇄 가변 영역 | 경쇄 가변 영역 |
|---|---|---|
| APE08876 | 서열번호 45 | 서열번호 159 |
| APE08894 | 서열번호 45 | 서열번호 158 |
| APE08895 | 서열번호 45 | 서열번호 157 |
| APE08896 | 서열번호 44 | 서열번호 160 |

| | | |
|---|---|---|
| APE08897 | 서열번호 44 | 서열번호 159 |
| APE08898 | 서열번호 44 | 서열번호 158 |
| APE08899 | 서열번호 44 | 서열번호 157 |
| APE08900 | 서열번호 43 | 서열번호 160 |
| APE08901 | 서열번호 43 | 서열번호 159 |
| APE08902 | 서열번호 43 | 서열번호 158 |
| APE08903 | 서열번호 43 | 서열번호 157 |
| APE08904 | 서열번호 45 | 서열번호 160 |
| APE09035 | 서열번호 49 | 서열번호 160 |
| APE09036 | 서열번호 48 | 서열번호 160 |
| APE09037 | 서열번호 47 | 서열번호 160 |
| APE09038 | 서열번호 46 | 서열번호 160 |
| APE09043 | 서열번호 45 | 서열번호 166 |
| APE09044 | 서열번호 45 | 서열번호 165 |
| APE09045 | 서열번호 45 | 서열번호 164 |
| APE09046 | 서열번호 45 | 서열번호 163 |
| APE09047 | 서열번호 45 | 서열번호 162 |
| APE09048 | 서열번호 45 | 서열번호 161 |
| APE09076 | 서열번호 45 | 서열번호 167 |
| APE09233 | 서열번호 44 | 서열번호 167 |
| APE09234 | 서열번호 44 | 서열번호 165 |
| APE09235 | 서열번호 44 | 서열번호 161 |
| APE09236 | 서열번호 52 | 서열번호 161 |
| APE09237 | 서열번호 51 | 서열번호 161 |
| APE09238 | 서열번호 50 | 서열번호 161 |
| APE09261 | 서열번호 52 | 서열번호 160 |
| APE09262 | 서열번호 51 | 서열번호 160 |
| APE09263 | 서열번호 50 | 서열번호 160 |
| APE09783 | 서열번호 54 | 서열번호 160 |
| APE09784 | 서열번호 53 | 서열번호 160 |
| APE09987 | 서열번호 44 | 서열번호 168 |
| APE09988 | 서열번호 45 | 서열번호 168 |
| APE10018 | 서열번호 61 | 서열번호 160 |
| APE10019 | 서열번호 60 | 서열번호 160 |
| APE10020 | 서열번호 59 | 서열번호 160 |
| APE10021 | 서열번호 58 | 서열번호 160 |
| APE10022 | 서열번호 57 | 서열번호 160 |
| APE10023 | 서열번호 56 | 서열번호 160 |
| APE10024 | 서열번호 55 | 서열번호 160 |
| APE10068 | 서열번호 65 | 서열번호 168 |
| APE10070 | 서열번호 63 | 서열번호 168 |
| APE10070 | 서열번호 64 | 서열번호 168 |
| APE10071 | 서열번호 62 | 서열번호 168 |
| APE10072 | 서열번호 65 | 서열번호 160 |
| APE10074 | 서열번호 64 | 서열번호 160 |
| APE10074 | 서열번호 63 | 서열번호 160 |
| APE10075 | 서열번호 62 | 서열번호 160 |
| APE10265 | 서열번호 83 | 서열번호 168 |
| APE10266 | 서열번호 82 | 서열번호 168 |
| APE10267 | 서열번호 81 | 서열번호 168 |
| APE10268 | 서열번호 80 | 서열번호 168 |
| APE10269 | 서열번호 79 | 서열번호 168 |
| APE10270 | 서열번호 78 | 서열번호 168 |
| APE10271 | 서열번호 77 | 서열번호 168 |
| APE10272 | 서열번호 76 | 서열번호 168 |
| APE10273 | 서열번호 75 | 서열번호 168 |
| APE10274 | 서열번호 74 | 서열번호 168 |
| APE10275 | 서열번호 73 | 서열번호 168 |

| | | |
|---|---|---|
| APE10276 | 서열번호 72 | 서열번호 168 |
| APE10277 | 서열번호 71 | 서열번호 168 |
| APE10278 | 서열번호 70 | 서열번호 168 |
| APE10279 | 서열번호 69 | 서열번호 168 |
| APE10280 | 서열번호 68 | 서열번호 160 |
| APE10281 | 서열번호 67 | 서열번호 160 |
| APE10282*† | 서열번호 66 | 서열번호 160 |
| APE10284 | 서열번호 68 | 서열번호 168 |
| APE10285 | 서열번호 67 | 서열번호 168 |
| APE10286*† | 서열번호 66 | 서열번호 168 |
| APE10297 | 서열번호 99 | 서열번호 168 |
| APE10298 | 서열번호 98 | 서열번호 168 |
| APE10299 | 서열번호 97 | 서열번호 168 |
| APE10300 | 서열번호 96 | 서열번호 168 |
| APE10301 | 서열번호 95 | 서열번호 168 |
| APE10302 | 서열번호 94 | 서열번호 168 |
| APE10303 | 서열번호 93 | 서열번호 168 |
| APE10304 | 서열번호 92 | 서열번호 168 |
| APE10305 | 서열번호 91 | 서열번호 168 |
| APE10306 | 서열번호 90 | 서열번호 168 |
| APE10307 | 서열번호 89 | 서열번호 168 |
| APE10308 | 서열번호 88 | 서열번호 168 |
| APE10309 | 서열번호 87 | 서열번호 168 |
| APE10310 | 서열번호 86 | 서열번호 168 |
| APE10311 | 서열번호 85 | 서열번호 168 |
| APE10312 | 서열번호 84 | 서열번호 168 |
| APE10343 | 서열번호 65 | 서열번호 179 |
| APE10344 | 서열번호 65 | 서열번호 178 |
| APE10345 | 서열번호 65 | 서열번호 177 |
| APE10346 | 서열번호 65 | 서열번호 176 |
| APE10347 | 서열번호 65 | 서열번호 175 |
| APE10348 | 서열번호 65 | 서열번호 174 |
| APE10349 | 서열번호 65 | 서열번호 173 |
| APE10350 | 서열번호 65 | 서열번호 172 |
| APE10351 | 서열번호 65 | 서열번호 171 |
| APE10352 | 서열번호 65 | 서열번호 170 |
| APE10353 | 서열번호 65 | 서열번호 169 |
| APE10426 | 서열번호 68 | 서열번호 187 |
| APE10427 | 서열번호 68 | 서열번호 186 |
| APE10428 | 서열번호 68 | 서열번호 185 |
| APE10429 | 서열번호 68 | 서열번호 184 |
| APE10430 | 서열번호 68 | 서열번호 183 |
| APE10431 | 서열번호 68 | 서열번호 182 |
| APE10432 | 서열번호 68 | 서열번호 181 |
| APE10433 | 서열번호 68 | 서열번호 180 |
| APE10462 | 서열번호 118 | 서열번호 175 |
| APE10463 | 서열번호 117 | 서열번호 175 |
| APE10464 | 서열번호 116 | 서열번호 175 |
| APE10465 | 서열번호 115 | 서열번호 175 |
| APE10466 | 서열번호 114 | 서열번호 175 |
| APE10467 | 서열번호 113 | 서열번호 175 |
| APE10468 | 서열번호 112 | 서열번호 175 |
| APE10469 | 서열번호 111 | 서열번호 175 |
| APE10470 | 서열번호 139 | 서열번호 175 |
| APE10471 | 서열번호 138 | 서열번호 175 |
| APE10472 | 서열번호 137 | 서열번호 175 |
| APE10473 | 서열번호 136 | 서열번호 175 |
| APE10474 | 서열번호 135 | 서열번호 175 |

| | | |
|---|---|---|
| APE10475 | 서열번호 134 | 서열번호 175 |
| APE10476 | 서열번호 133 | 서열번호 175 |
| APE10477 | 서열번호 132 | 서열번호 175 |
| APE10478 | 서열번호 131 | 서열번호 175 |
| APE10479 | 서열번호 130 | 서열번호 175 |
| APE10480 | 서열번호 129 | 서열번호 175 |
| APE10481 | 서열번호 128 | 서열번호 175 |
| APE10482 | 서열번호 127 | 서열번호 175 |
| APE10483 | 서열번호 126 | 서열번호 175 |
| APE10484 | 서열번호 125 | 서열번호 175 |
| APE10485 | 서열번호 124 | 서열번호 175 |
| APE10486 | 서열번호 123 | 서열번호 175 |
| APE10487 | 서열번호 122 | 서열번호 175 |
| APE10488 | 서열번호 121 | 서열번호 175 |
| APE10489 | 서열번호 120 | 서열번호 175 |
| APE10490 | 서열번호 119 | 서열번호 175 |
| APE10491 | 서열번호 110 | 서열번호 175 |
| APE10492 | 서열번호 109 | 서열번호 175 |
| APE10493 | 서열번호 108 | 서열번호 175 |
| APE10494 | 서열번호 107 | 서열번호 175 |
| APE10495 | 서열번호 106 | 서열번호 175 |
| APE10496 | 서열번호 105 | 서열번호 175 |
| APE10497 | 서열번호 104 | 서열번호 175 |
| APE10498 | 서열번호 103 | 서열번호 175 |
| APE10499 | 서열번호 102 | 서열번호 175 |
| APE10500 | 서열번호 101 | 서열번호 175 |
| APE10501 | 서열번호 100 | 서열번호 175 |
| APE10513 | 서열번호 139 | 서열번호 174 |
| APE10514 | 서열번호 138 | 서열번호 174 |
| APE10515 | 서열번호 137 | 서열번호 174 |
| APE10516 | 서열번호 136 | 서열번호 174 |
| APE10517 | 서열번호 135 | 서열번호 174 |
| APE10518 | 서열번호 134 | 서열번호 174 |
| APE10519 | 서열번호 133 | 서열번호 174 |
| APE10520 | 서열번호 132 | 서열번호 174 |
| APE10521 | 서열번호 131 | 서열번호 174 |
| APE10522 | 서열번호 130 | 서열번호 174 |
| APE10523 | 서열번호 129 | 서열번호 174 |
| APE10524 | 서열번호 128 | 서열번호 174 |
| APE10525 | 서열번호 127 | 서열번호 174 |
| APE10526 | 서열번호 126 | 서열번호 174 |
| APE10527 | 서열번호 125 | 서열번호 174 |
| APE10528 | 서열번호 124 | 서열번호 174 |
| APE10529 | 서열번호 123 | 서열번호 174 |
| APE10530 | 서열번호 122 | 서열번호 174 |
| APE10531 | 서열번호 121 | 서열번호 174 |
| APE10532 | 서열번호 120 | 서열번호 174 |
| APE10533 | 서열번호 119 | 서열번호 174 |
| APE10534 | 서열번호 110 | 서열번호 174 |
| APE10535 | 서열번호 109 | 서열번호 174 |
| APE10536 | 서열번호 108 | 서열번호 174 |
| APE10537 | 서열번호 107 | 서열번호 174 |
| APE10538 | 서열번호 106 | 서열번호 174 |
| APE10539 | 서열번호 105 | 서열번호 174 |
| APE10540 | 서열번호 104 | 서열번호 174 |
| APE10541 | 서열번호 103 | 서열번호 174 |
| APE10542 | 서열번호 102 | 서열번호 174 |
| APE10543 | 서열번호 101 | 서열번호 174 |

| | | |
|---|---|---|
| APE10544 | 서열번호 100 | 서열번호 174 |
| APE10545 | 서열번호 118 | 서열번호 174 |
| APE10546 | 서열번호 117 | 서열번호 174 |
| APE10547 | 서열번호 116 | 서열번호 174 |
| APE10548 | 서열번호 115 | 서열번호 174 |
| APE10549 | 서열번호 114 | 서열번호 174 |
| APE10550 | 서열번호 113 | 서열번호 174 |
| APE10551 | 서열번호 112 | 서열번호 174 |
| APE10552 | 서열번호 111 | 서열번호 174 |
| APE10553 | 서열번호 68 | 서열번호 189 |
| APE10554 | 서열번호 68 | 서열번호 188 |
| APE10555 | 서열번호 143 | 서열번호 174 |
| APE10556 | 서열번호 142 | 서열번호 174 |
| APE10570† | 서열번호 141 | 서열번호 174 |
| APE10571 | 서열번호 140 | 서열번호 174 |
| APE10577 | 서열번호 68 | 서열번호 174 |
| APE10580 | 서열번호 146 | 서열번호 189 |
| APE10581 | 서열번호 145 | 서열번호 189 |
| APE10583 | 서열번호 146 | 서열번호 174 |
| APE10584 | 서열번호 145 | 서열번호 174 |
| APE10620 | 서열번호 149 | 서열번호 189 |
| APE10621 | 서열번호 148 | 서열번호 189 |
| APE10622 | 서열번호 147 | 서열번호 189 |
| APE10623 | 서열번호 149 | 서열번호 174 |
| APE10624 | 서열번호 148 | 서열번호 174 |
| APE10625 | 서열번호 147 | 서열번호 174 |
| APE10657† | 서열번호 153 | 서열번호 174 |
| APE10658† | 서열번호 152 | 서열번호 174 |
| APE10659 | 서열번호 151 | 서열번호 174 |
| APE10660 | 서열번호 118 | 서열번호 191 |
| APE10661 | 서열번호 147 | 서열번호 190 |
| APE10663 | 서열번호 118 | 서열번호 190 |
| APE10664† | 서열번호 150 | 서열번호 189 |
| APE10665† | 서열번호 150 | 서열번호 174 |
| APE10677† | 서열번호 153 | 서열번호 192 |
| APE10679 | 서열번호 151 | 서열번호 192 |
| APE10678† | 서열번호 152 | 서열번호 192 |
| APE10680† | 서열번호 156 | 서열번호 174 |
| APE10681† | 서열번호 155 | 서열번호 174 |
| APE10682 | 서열번호 154 | 서열번호 174 |
| APE10840 | 서열번호 144 | 서열번호 174 |

[0190] 표 3의 항체 또는 항체 단편의 경우, 카바트 번호가 매겨진 CDR 영역은 다음과 같다: CDRH1은 해당 VH 서열의 31-35 위치에 있고; CDRH2는 해당 VH 서열의 50-66 위치에 있고, 다만, *로 표시된 항체의 경우는 예외인데 CDRH2는 해당 VH 서열의 50-67 위치에 있고; CDRH3은 해당 VH 서열의 99-113 위치에 있고, 다만, †로 표시된 항체의 경우는 예외인데 CDRH3는 100-114 위치에 있다. CDRL1은 해당 VL 서열의 24-34 위치에 있고; CDRL2는 해당 VL 서열의 50-56 위치에 있으며; CDRL3은 해당 VL 서열의 89-97 위치에 있다. 표 3에 제시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 쌍을 갖거나, 적어도 이의 CDR을 갖는 BTLA-결합제는 본 개시내용의 구체적인 구체예를 제공한다. 표 3의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 추가 쌍, 또는 적어도 이의 CDR은 또 다른 BTLA-결합제를 제공하며, 이는 본 개시내용의 범위 내에 있는 것으로 간주된다.

[0191] 다음 예에서 참조된 항체는 다음과 같다:

| Ab 번호 | 서열번호 | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6G3 | CDRH1 | CDRH2 | CDRH3 | CDRL1 | CDRL2 | CDRL3 | 중쇄 가변 영역 | 경쇄 가변 영역 |
| APE10840.x | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 144 | 174 |
| APE12839.x | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 144 | 174 |
| APE13308.x | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 144 | 174 |
| APE10585.x | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 144 | 174 |
| 10D8 | | | | | | | | |
| APE10134 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 207 | 209 |
| APE12774.x | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 | 226 | 217 | 219 |
| APE11482 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 | 226 | 217 | 219 |

[0192]

[0193] 실시예 1

[0194] 항체 6G3는 BTLA 면역 마우스의 비장 세포로부터 표준 융합 기술에 의해 생성된 마우스 하이브리도마에서 유래되었다. 상기 항체는 여기에 설명된 표준 기술을 사용하여 인간화되었다. 최종 최적화된 항체는 표 1에 요약된 벡터를 사용하여 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 발현되었다.

*표 1*

[0195]

| 6G3 | 발현 조건 | H쇄 가변 영역 | L쇄 가변 영역 |
|---|---|---|---|
| APE10840 | ExpiCHO-S™ 일시적 | 서열번호 144 | 서열번호 174 |
| APE12839 | ExpiCHO-S 분류된 안정된 풀 | 서열번호 144 | 서열번호 174 |
| APE13308 | CHO-K1 안정된 풀 | 서열번호 144 | 서열번호 174 |

[0196] 실시예 2

[0197] 이 실시예는 본 명세서에서 개시된 6G3 항-BTLA 항체가 표면 플라스몬 공명에 의해 결정된 바와 같이 인간 BTLA에 대한 결합 친화력(affinity)이 $K_D$ ~5 nM이고,시노몰구스 원숭이 BTLA에 대한 결합 친화력이 $K_D$ ~11 nM임을 보여준다.

[0198] 표면 플라스몬 공명(SPR) 분석은 Biacore T200(GE Healthcare Life Sciences)을 사용하여 수행되었다. 운동 상수(Kinetic constant)는 Biacore T200 평가 소프트웨어의 1:1 결합 모델을 사용하여 결정되었으며, 이를 통해 온/오프 속도(각각 ka와 kd)를 계산하고, 해리 상수는 전반적인 친화력($K_D$)을 측정하는 데 사용되었다. 항인간 IgG(GE Healthcare Life Sciences)를 EDC 활성화 아민 커플링 화학(10μl/min의 유속으로 420초간 접촉)을 사용하여 CM5 칩에 고정화했다. 항체(APE10585.04 6G3 IgG1 및 APE10840.05 6G3 IgG4)는 각각 0.5μg/ml로 10μl/min의 유속을 사용하여 유동 세포와 60초간 접촉시켜 포획했다. 60 nM, 20 nM, 6.7 nM 및 2.2 nM 농도의 단량체 인간 BTLA-his 또는 시노몰구스 원숭이 BTLA-his를 포획된 항체 위로 흘렸다(결합 시간 480초, 해리 시간 1800초). 실험은 25℃에서 진행되었으며 이동상과 모든 희석액에 10 mM HEPES, pH 7.6, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% 폴리소르베이트 20(HBS-EP+, pH 7.6; Teknova)이 포함된 완충액을 사용했다. 각 사이클이 끝날 때마다 결합된 항원은 3M MgCl2(30μl/분)에 2회 연속 노출(60초 및 90초)하여 재생에 의해 제거되었다. 실험에 상응하는 센서그램과 결합 상수는 도 1(인간 BTLA)과 도 1(원숭이 BTLA)에 표시되어 있다. 각 패널의 오른쪽에는 공명 단위(RU)로 표시된 항체 포획 수준이 나열되어 있다.

[0199] 실시예 3

[0200] 이 실시예는 여기에 개시된 6G3 항-BTLA 항체가 Kinetic Exclusion Assay에 의해 결정된 인간 BTLA에 대한 결합 친화력이 $K_D$ ~410 pM이고, 시노몰구스 원숭이 BTLA에 대한 결합 친화력이 $K_D$ ~1.66 nM임을 보여준다.

[0201] 6G3 IgG4(APE10840.04(H쇄 서열번호 144, L쇄 서열번호 174))의 BTLA에 대한 결합의 용액 기반 친화력 측정은 KinExA 3000(Sapidyne Instruments)을 사용하여 결정되었다. Azlactone 비드(ThermoFisher Scientific)를 50mM $Na_2CO_3$ 중의 인간 BTLA ECD-his(30 μg/ml) 또는 시노몰구스 원숭이 BTLA ECD-his(20μg/ml)로 실온에서 2시간 동안 코팅한 후 10mg/ml BSA로 차단했다. 6G3 IgG4 APE10840.04 농도는 인간과 시노몰구스 원숭이 둘다의 BTLA

실험에서 결합을 위해 100 pM로 일정하게 유지되었다. 인간 또는 시노몰구스 원숭이 BTLA ECD-his를 1000 nM 내지 68 fM로 2.5배 희석하여 25℃에서 첨가했다. 샘플 세트는 72시간 동안 4℃에서 평형을 유지한 후, BTLA-커플링된 Azlactone 비드로 유리 항체를 포획하기 전에 6시간 동안 실온에 두었다. 비드에 결합된 6G3를 정량화하기 위한 2차 항체는 Alexa-Fluor-647 AffiPure Donkey- 항인간 IgG(250 ng/ml, Jackson ImmunoResearch Laboratories)이었다. 최대 신호와 배경 신호는 각각 6G3만이 포함된 샘플과 완충액만이 포함된 샘플에서 결정되었다. KinExA Pro Software 3.2.6을 사용하여 데이터를 분석했다. 도 2에서는 인간 BTLA 및 시노몰구스 원숭이 BTLA에 대한 6G3 항체 결합의 $K_D$ 값 분석에서 95% 신뢰 구간을 보여준다.

[0202] 실시예 4

[0203] 이 실시예는 본 명세서에서 개시된 6G3 항체가 안정적으로 형질감염된 293c18 세포에서 발현되는 인간 및 시노몰구스 원숭이 BTLA에 대한 포화 결합을 나타냄을 보여준다.

[0204] 인간 BTLA 구조체를 안정적으로 발현하는 293c18 세포 클론 1E4 또는 시노몰구스 원숭이 BTLA를 안정적으로 발현하는 클론 1G5를 Accutase 용액(Millipore Sigma/Sigma-Aldrich)으로 수확하고 인산 완충 식염수(1% BSA)로 한 번 세척했다. 293c18 원숭이 BTLA 세포에 실온에서 10분 동안 가볍게 흔들어주면서 친유성 카르보시아닌 염료인 DiD(2μM, 1,1'-디옥타데실-3,3,3',3'-테트라메틸린도디카르보시아닌; ThermoFisher Scientific)를 로딩했다. DiD 염색된 세포를 PBS, 1% BSA로 세척하고 인간 BTLA 293c18 세포와 시노몰구스 원숭이 BTLA 293c18-DiD 염색 세포를 동일한 양으로 혼합했다. 세포($2x10^5$ 총 세포/샘플)를 표시된 농도의 정제된 6G3 IgG4(두 생산 로트, APE10840.03 및 APE10840.04(H쇄 서열번호 144, L쇄 서열번호 174)) 또는 암탉 알 리소자임(hen egg lysozyme)에 특이적인 인간 IgG4 이소타입 대조 항체와 함께 FACS 완충액(PBS, 1% BSA, 0.02% 아지드화 나트륨) 중에서 4℃로 10분 동안 가볍게 흔들면서 인큐베이트했다. 세포를 원심분리하고 FACS 완충액으로 한 번 세척한 다음, FACS 완충액에 재현탁시키고, 4℃로 추가 20분 가볍게 흔들어 주면서 인큐베이트했다. 세포를 원심분리하고 BSA가 없는 FACS 완충액으로 한 번 세척하고 실온에서 PBS 중 2% 파라포름알데히드 100 μl/well로 10분간 고정시켰다. 세포를 FACS 완충액으로 한 번 세척한 후 2차 항체(염소 항-인간 Kappa-PE, FACS 완충액 중 0.2μg/ml, SouthernBiotech)와 함께 4℃에서 10분 동안 가볍게 흔들면서 인큐베이트했다. 세포를 세척하고 FACS 완충액에 재현탁시킨 후 BD FACSArray(BD Biosciences) 상에서 형광을 분석했다. 시노몰구스 원숭이 BTLA를 발현하는 DiD 염색 세포(도 3)는 인간 BTLA를 발현하는 세포와 별도로 중앙 형광 강도(MFI)를 분석했다(도 3). 곡선은 GraphPad Prism(GraphPad Software, Inc.)에서 log(억제제) 대 반응 - 가변 기울기(4개 매개변수) 최소 제곱 적합 분석으로 적합하게 되었다.

[0205] 본 명세서에 개시된 6G3 항체 두 개의 로트(APE10840.03 및 APE10840.04)는 도 3에서 보듯이 인간 BTLA 293c18 세포(각각 $EC_{50}$ ~1.7 nM 및 1.8 nM) 및 시노몰구스 원숭이 BTLA 293c18 세포($EC_{50}$ ~2.3 nM)에 대해 유사한 농도-의존적 및 포화 결합을 보여준다.

[0206] 실시예 5

[0207] 이 실시예는 본 명세서에 공개된 6G3 항체가 정상 공여자 인간 말초혈액 $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, 및 $CD20^+$ B 세포에 대해 포화 결합하는 것을 나타냄을 보여준다.

[0208] 인간 말초혈액 단핵세포(PBMC)는 샌디에이고 혈액은행(San Diego, CA)에서 얻은 정상 기증자 혈액을 Histopaque(Sigma-Aldrich) 밀도-구배 원심분리법에 의해 단리했다. PBMC를 세척하고 FACS 완충액(PBS, 1% BSA, 0.02% 아지드화 나트륨) 중 $2x10^7$개 세포/ml로 Human BD Fc Block(2.5 μg/$1x10^6$개 세포, BD Biosciences) 및 LIVE/DEAD® Fixable Yellow Dead Cell Stain(30μl, ThermoFisher Scientific)와 함께 얼음 위에서 10분간 인큐베이트했다. 세포를 FACS 완충액으로 한 번 세척한 후, $1x10^7$ 세포/ml로 FACS 완충액에 재현탁시키고 다음의 표현형 항체를 첨가했다: Alexa Fluor 488-항-인간 CD3ε 클론 SK7, Brilliant Violet 421-항-인간 CD4 클론 OKT4, Brilliant Violet 785-항-인간 CD8 클론 SK1, 및 Brilliant Violet 570-항-인간 CD20 클론 2H7(각각 50 μl; 모두 BioLegend, Inc.에서 구입). 표현형 항체가 첨가된 세포($1x10^6$ 세포/샘플)를 U자형 바닥 96웰 플레이트에 도말하고, 표시된 농도의 DyLight 650 표지된 항-BTLA 또는 이소타입 대조 항체를 FACS 완충액 중에서 4℃로 20분 동안 가볍게 흔들어주면서 인큐베이트했다. 6G3 IgG4(APE10916.02)는 DyLight 650(3.44 mol DyL650/mol 항체)으로 표지된 APE10840이었다. 암탉 알 리소자임에 특이적인 인간 IgG4 이소타입 대조 항체는 DyLight 650(3.22 mol DyL650/mol 항체)으로 표지되었다. 참조 항-BTLA 항체 MIH26은 BioLegend, Inc.에서 Allophycocyanin(APC)-표지 항체로서 구입했다. 샘플은 FACS 완충액으로 한 번 세척하고, 150 μl/well FACS

완충액에 재현탁한 후 4℃에서 10분 동안 추가로 세척했다. 샘플을 원심분리하여 인산완충식염수 중 4% 파라포름알데히드로 실온에서 10분간 고정시켰다. 샘플을 FACS 완충액으로 두 번 세척한 다음 150 μl/well FACS 완충액에 재현탁시키고 NovoCyte Flow Cytometer(ACEA Biosciences, Inc.)로 형광을 분석했다. 데이터는 NovoExpress 소프트웨어(ACEA Biosciences, Inc.)를 사용하여 분석되었다. 게이트형 $CD4^+$ T 세포(도 4), $CD8^+$ T 세포(도 4) 또는 $CD20^+$ B 세포(도 4)에 대한 항-BTLA 또는 이소타입 염색의 중앙 형광 강도를 그래프로 표시하고 곡선을 log(작용제) 대 반응(3개 매개변수) 최소 제곱 적합으로 맞춰 GraphPad Prism(GraphPad Software, Inc.)에 대해 $EC_{50}$을 계산했다.

[0209] 본 명세서에 개시된 DyLight 650으로 표지된 6G3 항체는 건강한 공여자 $CD4^+$ T 세포(도 4), $CD8^+$ T 세포(도 4), 및 $CD20^+$ B 세포(도 4)에 대해 농도 의존적이고 포화적인 결합을 보여준다. 6G3 항체는 $EC_{50}$ ~2.4 nM로 $CD4^+$ T 세포에, $EC_{50}$ ~3.2 nM로 $CD8^+$ T 세포에, 그리고 $EC_{50}$ ~0.5 nM로 $CD20^+$ B 세포에 결합한다. 양성 대조 항-BTLA 항체 MIH26-APC를 사용한 염색은 6G3 항체를 사용한 염색과 유사하다. DyLight 650 표지된 인간 IgG4 이소타입 대조 항체는 이 세포 집단의 염색을 보여주지 않는다(도 4).

[0210] 실시예 6

[0211] 이 실시예는 본 명세서에서 개시된 6G3 항체가 정상적인 시노몰구스 원숭이 말초혈액 $CD3^+$ T 세포와 $CD20^+$ B 세포에 대해 농도 의존적 결합을 보인다는 것을 보여준다.

[0212] 안정적으로 형질감염된 CHO-K1 세포 풀에서 제조된 6G3 IgG4(APE13308)를 제조업체의 지침에 따라 Alexa Fluor 647(AF647)(Alexa Fluor 항체 표지 키트; ThermoFisher Scientific/Molecular Probes)로 표지하고 APE13766.02(6G3-AF647)로 지정했다. Altasciences로부터 정상적인 시노몰구스 원숭이의 신선한 말초혈액을 얻었다. 전혈 샘플(800 μl)을 FcR 차단 시약, 인간(Miltenyi Biotec, Inc.)과 함께 실온에서 10분 동안 인큐베이트한 다음 사이노몰구스 원숭이 T 세포와 B 세포 집단을 구별하기 위하여 형광 표지된 항체 혼합물로 실온으로 어둠 속에서 20분간 염색했다[PerCP-Cy5.5 마우스 항인간 CD3(클론 SP34-2; BD Biosciences), BD Horizon V450 마우스 항인간 CD4(클론 L200; BD Biosciences), APC/Cy7 마우스 항-인간 CD8(클론 SK1; BD Biosciences), Brilliant Violet 785 항-CD20(클론 2H7; BioLegend, Inc.), BD Horizon V500 마우스 항-NHP CD45(클론 D058-1283; BD Biosciences)]. 그런 다음 혈액을 웰들에 나누어 넣고 표시된 농도의 6G3-AF647(APE13766.02), 또는 APC-마우스 항인간 CD272(BTLA) 참조 항체(클론 J168-540; BD Biosciences)와 함께 어두운 곳에서 실온으로 30분 동안 인큐베이트했다. 인큐베이션 후, 적혈구는 2.0ml 희석된 BD Pharm Lyse 용해액(BD Biosciences)을 첨가하여 10분간 용해되었고, 샘플은 5분간 200 xg에서 원심분리되었으며, FACS 완충액[Dulbecco's PBS, 칼슘 불포함, 마그네슘 불포함(Gibco/ThermoFisher Scientific), 25 mM HEPES, pH 7.2, 0.1% BSA, 0.1% 아지드화 나트륨]으로 세척되었고, 4% 파라포름알데히드(200 μl/샘플)로 실온에서 10분간 고정되었다. 샘플을 FACS 완충액으로 두 번 세척한 후 NovoCyte Quanteon 유세포 분석기(ACEA Biosciences, Inc.)로 형광을 분석했다.. 데이터는 NovoExpress 소프트웨어(ACEA Biosciences, Inc.)를 사용하여 분석되었다. 평균 형광 강도(MFI) 값을 그래프로 표시하고 GraphPad Prism(GraphPad Software, Inc.)에서 비선형 회귀 분석에 적용했다. 총 $CD3^+$ 세포에 대한 각 항-BTLA 항체의 MFI 값은 도 5a에 나타내어 있으며, 총 $CD20^+$ 세포에 대한 각 항-BTLA 항체의 MFI 값은 도 5b에 표시되어 있다. 도 5c는 항-CD3 염색과 33 nM APC 표지된 항-BTLA 참조 항체(클론 J168-540) 염색의 도트 플롯 분석을 보여준다. 도 5d는 항-CD3 염색과 100 nM 6G3-AF647 염색의 도트 플롯 분석을 보여준다. 도 5c 및 도 5d에서 각 항-BTLA 항체가 CD3- 세포에 결합하는 것(각 패널의 하단 사분면에 있는 녹색 세포)은 $CD20^+$ B 세포에 결합하는 것을 반영한다.

[0213] 본 명세서에 개시된 AF647로 표지된 6G3 항체는 정상적인 시노몰구스 원숭이의 말초혈액 $CD3^+$ T 세포와 $CD20^+$ B 세포에 농도 의존적으로 결합하는 것으로 나타났다. 사용된 염색 조건(도 5a)에서 CD3+ 말초혈 T 세포에 대한 결합은 항체 100 nM에서 포화되지 않으며(추정 $EC_{50}$ ~3.4 nM), 6G3-AF647의 $CD20^+$ 말초혈 B 세포에 대한 결합은 포화되기 시작했다(대략 EC50 ~1.4 nM)(도 5b). B세포의 6G3-AF647 염색의 MFI는 T세포의 6G3-AF647 염색의 MFI보다 약 9배 더 높다. 정상 $CD3^+$ 및 $CD3^-$ ($CD20^+$) 시노몰구스 원숭이 세포에서 100 nM에서의 6G3-AF647의 염색 패턴은 33 nM에서 상업적으로 판매되는 참조 APC 표지된 항-BTLA 항체 J168의 염색 패턴과 매우 유사하다(각

각 도 5d 및 5c).

[0214] 실시예 7

[0215] 이 실시예는 본 명세서에 개시된 항-BTLA 항체가 세포 표면 BTLA에 결합하기 위해 HVEM 또는 HVEM/LIGHT 복합체와 경쟁하지 않는다는 것을 보여준다.

[0216] 293c18 세포, 인간 BTLA를 안정적으로 발현하는 클론 1E4를 Accutase 용액(Millipore Sigma/Sigma-Aldrich)으로 수확하고 PBS, 1% BSA로 한 번 세척했다. 세포를 U-바닥 96-웰 플레이트에 $2x10^5$/웰로 도말하고 얼음 위에 두었다. 표시된 농도의 두 배로 정제된 항체를 FACS 완충액(PBS, 1% BSA, 0.02% 아지드화 나트륨)에서 3배로 연속 희석했다. 시험된 항체는 암탉 알 리소자임에 특이적인 인간 IgG4 이소타입 대조 항체, 참조 BTLA IgG4 길항제 항체, 및 6G3 IgG4(APE10840.06)였다. 삼량체 HVEM/LIGHT 복합체는 DyLight 650-HVEM 인간 IgG1 Fc와 삼량체 LIGHT-foldon-his를 등몰량(각각 60 nM) 혼합하고 실온에서 15분 동안 사전 인큐베이트하여 사전 형성하였다. DyLight 650-HVEM-Fc(최종 농도 100 nM, 도 6a) 또는 사전 형성된 DyLight 650-HVEM/LIGHT 복합체(HVEM/LIGHT의 최종 농도, 각각 30 nM, 도 6b)를 희석된 항체(항체의 최종 농도는 표시된 대로 임)에 첨가하고 얼음 위에서 15분간 인큐베이트했다. 세포를 원심분리하고 항체와 HVEM(도 6a) 또는 항체와 HVEM/LIGHT 복합체(도 6b)의 혼합물에 부드럽게 재현탁시키고 얼음 위에서 30분간 배양했다. 세포를 원심분리하고 FACS 완충액으로 한 번 세척한 다음 PBS 중 2% 파라포름알데히드로 실온에서 10분간 고정했다. 세포를 한 번 세척한 후 FACS 완충액에 재현탁시키고 BD FACSArray(BD Biosciences)에서 형광을 분석했다. 중앙 형광 강도(MFI)는 GraphPad Prism(GraphPad Software, Inc.)으로 그래프로 표시되었고 곡선은 log(작용제) 대 반응(세 개의 매개변수) 최소 제곱 적합으로 적합하게 되었다.

[0217] 본 명세서에 개시된 6G3 항체(APE10840.06)는 세포 표면 BTLA에 대한, HVEM-Fc(도 6a)의 결합이나 HVEM/LIGHT 복합체(도 6b)의 결합과 경쟁하지 않는다. 6G3 항체가 존재하면 HVEM-Fc가 세포 표면 BTLA에 대해 결합하는 것이 증가하는 것이 관찰된다(도 6a). HVEM/LIGHT 복합체를 사용했을 때도 6G3 의존성 HVEM 결합이 증가했지만 HVEM-Fc만을 사용했을 때 더 두드러졌다(도 6a 및 6b). 참조 길항제 항체는 HVEM 및 HVEM/LIGHT가 BTLA에 결합하는 것을 농도 의존적으로 억제하는 것을 보여준다(도 6a 및 6b). 무관한 이소타입이 매칭되는 IgG4 항체는 HVEM 또는 HVEM/LIGHT가 BTLA에 결합하는 데 영향을 미치지 않는다.

[0218] 실시예 8

[0219] 이 실시예는 본 명세서에 개시된 6G3 및 10D8 항체에 의해 결합되는 인간 BTLA 상의 에피토프가 HVEM 결합 부위로부터 BTLA의 반대면에 있다는 것을 보여준다.

[0220] 본 명세서에 개시된 6G3 및 10D8 항체에 의해 결합된 BTLA 상의 펩티드의 수소-중수소 교환 매핑은 재조합 인간 BTLA 단량체를 사용하여 수행되었다. 실험에 사용된 BTLA는 아미노산 번호 31-155(UniProt ID # Q7Z6A9)에 6-his 태그가 붙은 hBTLA였다. 도 7a, 7b, 및 7c는 Protein Data Bank structure로부터 PyMOL로 렌더링된 인간 HVEM 세포외 결합 도메인(밝은 회색)의 결정 구조에 대한 공간 채우기 모델과 복합체를 이룬 인간 BTLA 세포외 도메인(검은색)의 결정 구조에 대한 리본 모델을 보여준다(Compaan *et al.*, J. Biol Chem 280: 39553-39561 (2005)). 도 7a는 6G3 항체(APE12839.05(H쇄 서열번호 144, L쇄 서열번호 174))를 사용한 수소-중수소 교환 실험을 요약하고, 도 7b는 10D8 항체(APE11482.06)를 사용한 수소-중수소 교환 실험을 요약하고, 도 7c는 참조 BTLA 길항제 항체(APE10693.17)를 사용한 수소-중수소 교환 실험을 요약한다. 각 실험에서, 교환 반응 속도를 확인하기 위하여 BTLA/항체 혼합물 또는 BTLA만을 4, 10, 또는 60분 동안 중수 표지했다. 인큐베이션 후, 상기 BTLA 단백질을 산성 pH에서 급속한 효소적 단백질 분해에 적용하고, 생성된 펩티드에 중수소가 통합되는 정도를 액체 크로마토그래피-질량 분석법으로 정량화했다.

[0221] 매핑 결과 BLTA의 다음과 같은 잔류물이 관련되어 있음을 보여준다:

[0222] **6G3 결합**

[0223] 펩티드 52-65 DPFELECPVKYCAN (서열번호 227)

[0224] 펩티드 100-106 LHFEPVL (서열번호 228)

[0225] **10D8 결합**

[0226] 펩티드 46-65 HSILAGDPFELECPVKYCAN (서열번호 229)

[0227] 펩티드 82-91 LEDRQTSWKE (서열번호 230)

[0228] 펩티드 100-106 LHFEPVL (서열번호 231)

[0229] **참조 길항제 결합**

[0230] 펩티드 39-41 YIK (서열번호 232)

[0231] 펩티드 52-64 DPFELECPVKYCA (서열번호 233)

[0232] 펩티드 100-106 LHFEPVL (서열번호 228)

[0233] 펩티드 124-131 IESHSTTL (서열번호 234)

[0234] 실시예 9

[0235] 이 실시예는 BTLA와 HVEM이 동일한 세포에서 발현될 때, 본 명세서에 개시된 6G3 항체가 NF-κB 루시퍼라제 리포터 검정에서 LIGHT로 유도된 HVEM 신호전달을 억제한다는 것을 보여준다.

[0236] 전장 인간 BTLA, 전장 인간 HVEM, 및 pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] (Promega)에서 파생된 NF-kB-루시퍼라제 리포터 구조체를 안정적으로 발현하는 293c18 세포가 생성되었고, 단일 세포 클로닝되어 huHVEM/huBTLA/NF-κB 루시퍼라제, 클론 8로 지정되었다. 전장 인간 LIGHT를 안정적으로 발현하는 CHO-S 세포를 생성하고 안정적인 풀로서 가장 높은 LIGHT 발현을 하는 것으로 두 번 분류되었다. huHVEM/huBTLA/NF-κB 루시퍼라제 세포를 Accutase 용액(Sigma-Aldrich/Millipore Sigma)으로 수확하고, 10% 태아소혈청이 보충된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium에 재현탁시키고, 평저 96웰 플레이트에 도말(5 x $10^4$개 세포/웰)했다. 37℃, 5% $CO_2$에서 1시간 인큐베이션한 후, 표시된 농도의 6G3 IgG4(APE12839.07(H쇄 서열번호 144, L쇄 서열번호 174)), 암탉 알 리소자임에 대한 특이적 인간 IgG4 이소타입 대조 항체, 또는 인간 IgG4 참조 항-BTLA 길항제 항체를 세포에 첨가했다. 실온에서 30분간 인큐베이션한 후, CHO-S LIGHT 세포를 수확하여 첨가했다(0.55x$10^4$ 세포/웰; 최종 조건, 9:1 HVEM-NF-κB 응답자:CHO-S LIGHT 자극 세포, 이는 NF-κB 반응의 $EC_{50}$을 나타냄). 37℃, 5% $CO_2$에서 4시간 후, Steady-Glo Luciferase Assay System(Promega)을 동일한 부피만큼 웰에 첨가하고 실온에서 10분간 인큐베이트했다. 샘플의 형광은 EnVision Multimode Plater Reader(PerkinElmer)에서 측정 시간 0.1초로 판독했다. 상대 광도 단위(RLU)로 형광을 그래프로 표시하고, 곡선은 GraphPad Prism(GraphPad Software)에서 로그(작용제) 대 반응(세 개의 매개변수) 최소 제곱 적합법으로 맞추었다.

[0237] 도 8에 나타난 NF-κB 루시퍼라제 리포터 검정은 본 명세서에 개시된 6G3 항체가 BTLA와 HVEM이 동일한 세포에서 발현될 때 CHO-S LIGHT에 반응하여 농도 의존적 방식으로 HVEM 의존적 NF-κB 신호전달을 억제한다는 것을 보여준다. 이는 이러한 조건 하에서 본 명세서에 개시된 6G3 항체가 동일 세포에서 HVEM과 BTLA 사이의 상호작용을 촉진하여 LIGHT에 의해 유도되는 HVEM 의존적 NF-κB 신호전달이 감소될 수 있음을 시사한다.

[0238] 도 8에 나타난 NF-κB 루시퍼라제 리포터 분석은 BTLA와 HVEM이 동일한 세포에서 발현될 때 참조 길항제 항체가 CHO-S LIGHT에 반응하여 농도 의존적으로 LIGHT-매개 HVEM-의존적 NF-κB 신호전달을 강화시킨다는 것을 보여준다. 동일한 세포에서 BTLA와 HVEM의 상호작용을 방해함으로써 길항제 항체는 더 많은 결합되지 않은 HVEM 분자가 LIGHT와 상호작용할 수 있도록 허용하여 LIGHT에 의해 유도되는 HVEM 의존적 NF-κB 신호전달을 증가시킨다.

[0239] 실시예 10

[0240] 이 실시예는 형광 공명 에너지 전달(FRET) 검정에서 본 명세서에 개시된 6G3 항체가 동일한 세포 표면 상에서 BTLA/HVEM 복합체를 파괴하지 않는다는 것을 보여준다.

[0241] 도 9a에서, 전장 인간 BTLA와 인간 HVEM을 안정적으로 발현하는 293c18 세포 클론을 Accutase 용액(Millipore Sigma/Sigma-Aldrich)으로 수확하고, FACS 완충액(PBS, 1% BSA, 0.02% 아지드화 나트륨)으로 세척한 후, 흰색 U형 바닥 96웰 플레이트(2x$10^5$개 세포/웰)에 도말했다. 세포를 원심분리한 후, 표시된 농도에서 3배로 연속 희석한 항체를 첨가하고, 세포를 4℃에서 가볍게 흔들어 주면서 1시간 동안 인큐베이트했다. 테스트한 항체는 6G3 IgG4(APE12839.05(H쇄 서열번호 144, L쇄 서열번호 174)), 참조 길항제 항체 IgG4, 및 암탉 알 리소자임에 특이적인 인간 IgG4P 이소타입 대조 항체였다. 세포를 원심분리하고 FACS 완충액으로 세척한 후, FRET 수용체 항체인 APC-anti-HVEM(15㎍/ml; 클론 122, BioLegend)에 재현탁시켰다. FRET 공여 항체는 비오틴-인간화 10D8(APE12774.02)이었고, 0.025㎍/ml 스트렙타비딘-Eu(LANCE Eu-W8044-Streptavidin AD0060, PerkinElmer)로

실온에서 20분 동안 인큐베이트함으로써 10㎍/ml로 사전 복합화하였다. 공여체 복합체인 바이오틴-항-BTLA/스트렙타비딘-Eu를 수용체인 APC-항-HVEM 항체와 함께 플레이트에 첨가하고 4℃에서 24시간 동안 인큐베이트했다. 플레이트를 차가운 FACS 완충액으로 세척하고 EnVision Multimode Plater Reader(PerkinElmer, Santa Clara, CA)에서 샘플의 형광을 판독했다. 665 nm/615 nm에서의 형광 비율은 GraphPad Prism(GraphPad Software)을 이용하여 그래프화하였다. 각 지점은 세 번의 독립적인 반복 실험의 평균±표준오차(SEM)이다. 각 실험에 대한 각 샘플 조건은 5개의 반복 웰에 있었다.

[0242] 도 9a에 나타난 FRET 검정은 형질감염된 293c18 세포 상에 BTLA/HVEM 복합체가 존재함을 보여주며, 본 명세서에 개시된 6G3 항체는 이소타입 대조 항체와 유사하게 최대 40㎍/ml의 농도에서 BTLA/HVEM FRET 신호를 억제하지 않는다는 것을 보여준다. 이 결과는 본 명세서에 개시된 6G3 항체가 동일한 세포 표면에서 BTLA와 HVEM의 상호작용을 억제하지 않는다는 것을 확인한다.

[0243] 도 9a에 나타난 FRET 검정은 참조 길항제 항체가 약 0.65㎍/ml의 $IC_{50}$으로 농도 의존적 방식으로 BTLA/HVEM 복합체 FRET 신호를 억제한다는 것을 보여준다.

[0244] 도 9b에서 전장 인간 BTLA와 인간 HVEM을 안정적으로 발현하는 293c18 세포 클론을 Accutase 용액(Millipore Sigma/Sigma-Aldrich)으로 수확하고, FACS 완충액으로 세척한 후, 흰색 U자형 바닥 96웰 플레이트($2x10^5$개 세포/웰)에 도말했다. 세포를 원심분리한 후, FRET 수용체 항체인 APC-anti-HVEM(클론 122, BioLegend) 또는 APC-mouse IgG1 이소타입 대조 항체를 지정된 농도로 3배 연속 희석하여 플레이트에 첨가했다. 바이오틴화된 FRET 공여 항체는 0.025 ㎍/ml 스트렙타비딘-Eu(LANCE Eu-W8044-Streptavidin AD0060, PerkinElmer)와 실온에서 20분 동안 인큐베이트함으로써 10 ㎍/ml의 농도로 사전 복합체를 형성하였다. 테스트된 바이오틴 접합 FRET 공여 항체는 바이오틴-6G3 IgG4(APE13124.01, 이는 바이오틴 접합 APE12839.05(H쇄 서열번호 144, L쇄 서열번호 174)였음), 바이오틴 참조 길항제 IgG4 항체, 및 암탉 알 리소자임에 특이적인 바이오틴-인간 IgG4 이소타입 대조 항체였다. 모든 웰에서 공여체 바이오틴 항체/스트렙타비딘-Eu 복합체 최종 농도는 항체 0.3㎍/ml 및 스트렙타비딘-Eu 0.75ng/ml였다. 플레이트를 4℃에서 24시간 동안 인큐베이션한 후 차가운 FACS 완충액으로 세척하고 EnVision Multimode Plater Reader(PerkinElmer)에서 샘플의 형광을 측정했다. 665 nm/615 nm에서의 형광 비율은 GraphPad Prism(GraphPad Software)을 이용하여 그래프화하였다. 각 지점은 2번 반복된 웰의 평균±SEM이다.

[0245] 도 9b에 나타난 FRET 검정은 본 명세서에 개시된 바이오틴-6G3 항체와 스트렙타비딘-Eu가 복합되어 존재하는 경우 APC-anti-HVEM의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 증가하는 FRET 신호가 생성된다는 것을 보여준다. 이 실시예는 6G3 항체가 세포 표면 BTLA에 결합하면 BTLA가 동일한 세포 표면의 HVEM과 복합체를 형성할 수 있음을 보여준다.

[0246] 도 9b에 나타난 FRET 검정은 스트렙타비딘-EU와 복합된 바이오틴 참조 길항제 항체가 존재할 경우 BTLA/HVEM 복합체 FRET 신호가 감지되지 않고 바이오틴 이소타입 대조 항체의 신호와 유사하다는 것을 보여준다. 이 실시예는 참조 BTLA 길항제 항체가 동일한 세포 표면에서의 BTLA-HVEM 복합체를 파괴한다는 것을 보여준다.

[0247] 실시예 11

[0248] 이 실시예는 BTLA와 HVEM이 서로 다른 세포에서 발현될 때, 본 명세서에 개시된 6G3 항체가 NF-κB 루시퍼라제 리포터 검정에서 BTLA로 유도된 HVEM 신호전달을 부분적으로 억제한다는 것을 보여준다.

[0249] 전장 인간 HVEM과 NF-κB-루시퍼라제 리포터 구조체를 안정적으로 발현하는 293c18 세포가 생성되어 HVEM/NF-κB 루시퍼라제, 클론 11로 지정되었다. 전장 인간 BTLA를 안정적으로 발현하는 293c18 세포를 생성하고, 단일 세포 클로닝을 한 다음, huBTLA 293c18, 클론 2로 지정했다. 인간 BTLA 293c18 세포를 Accutase 용액(Sigma-Aldrich/Millipore Sigma)으로 수확하고, 10% FBS가 보충된 DMEM에 재현탁시킨 후, 평저 96웰 플레이트에 도말($0.5x10^4$ 세포/웰)했다. 표시된 농도의, 안정적으로 형질감염된 CHO-K1 세포 풀에서 제조된 6G3 IgG4(APE13308.03) 항체, 암탉 알 리소자임에 대한 특이적 인간 IgG4 이소타입 대조 항체, 또는 IgG4 참조 항-BTLA 길항제 항체를 세포에 첨가했다. 실온에서 30분간 인큐베이션한 후 HVEM/NF-κB 세포를 수확하여 첨가했다($5x10^4$ 세포/웰). 37℃, 5% $CO_2$에서 5시간 후, Steady-Glo Luciferase Assay System(Promega)을 동일한 부피만큼 웰에 첨가하고 실온에서 10분 동안 인큐베이트했다. 샘플의 형광은 GloMax Navigator Microplate Luminometer(Promega)를 사용하여 측정 시간 0.3초로 판독하였다. 상대 광도 단위(RLU)로 형광을 그래프로 표시하고, 곡선은 GraphPad Prism(GraphPad Software)에서 로그(작용제) 대 반응(세 개의 매개변수) 최소 제곱 적

합법으로 맞추었다.

[0250] 도 10에 나타난 NF-κB 루시퍼라제 리포터 검정은 본 명세서에 개시된 6G3 항체가 HVEM과 BTLA가 서로 다른 세포에서 발현될 때 BTLA 293c18 세포에 대한 반응으로 농도 의존적 방식으로 HVEM 의존적 NF-κB 신호전달을 부분적으로 억제한다는 것을 보여준다. 이는 이러한 조건 하에서 본 명세서에 개시된 6G3 항체가 BTLA가 상이한 세포에 있을 때 HVEM 신호전달을 부분적으로 억제할 수 있음을 시사한다. 인간 BTLA 293c18 세포를 본 명세서에서 공개된 6G3 항체와 인큐베이트하기 전에 파라포름알데히드로 고정시키거나, 세포 내포작용을 차단하는 다이너민 GTPase 억제제로 세포를 처리한 경우에도 동일한 결과가 얻어진다.

[0251] 도 10에 나타난 NF-κB 루시퍼라제 리포터 검정은 HVEM과 BTLA가 서로 다른 세포에서 발현될 때 참조 길항제인 항-BTLA 항체를 첨가하면 BTLA 매개 HVEM 의존 NF-κB 신호전달이 농도 의존적으로 완전히 억제됨을 보여준다.

[0252] 실시예 12

[0253] 이 실시예는 본 명세서에 개시된 6G3 항체의 직접적인 BTLA 작용제 활성을 SHP2 모집 PathHunter Jurkat BTLA 신호 전달 검정에서 보여준다.

[0254] β-갈락토시다아제 효소 공여체(ED)로 태그된 인간 BTLA와 β-갈락토시다아제 효소 수용체(EA)로 태그된 인간 SHP2를 안정적으로 발현하는 클론성 Jurkat 세포주가 Eurofins DiscoverX(Fremont, CA)에서 생성되었고, Jurkat BTLA-ED SHP2-EA 세포로 지정되었다. 검정 설정을 위해 Jurkat BTLA-ED SHP2-EA 세포를 수확하여 96웰 플레이트(웰당 $2x10^4$개 세포)에 도말했다. 항체 희석액은 별도의 플레이트에서 준비되었다. 테스트된 항체와 단백질은 안정적으로 형질감염된 CHO-K1 세포 풀에서 제조된 6G3 IgG4(APE13308.03) 항체, 암탉 알 리소자임에 특이적인 인간 IgG4 이소타입 대조 항체, 참조 BTLA 길항제 IgG4 항체, 및 인간 HVEM-IgG1 Fc/삼량체 LIGHT(APE11989.16 및 APE07872.05의 몰 비율 1:1.1)의 가용성 복합체였다. 항체와 단백질을 세포 검정 판에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 인큐베이트했다. PathHunter Bioassay Detection 시약을 모든 웰에 첨가하고 실온에서 20분 동안 인큐베이트했다. 그런 다음 Bioassay Detection Reagent 2를 모든 웰에 첨가하고 EnVision Multimode Plater Reader(PerkinElmer)에서 0.1초의 통합 시간으로 형광 신호를 측정하기 전에 실온에서 1시간 동안 인큐베이트했다. 데이터는 GraphPad Prism(GraphPad Software)을 사용하여 그래프로 표시되었다. $EC_{50}$ 값은 제약 조건 없이 가변 기울기(4개 매개변수)를 갖는 시그모이드형 용량 반응 곡선 적합과 최소 제곱법을 사용하여 계산되었다. 데이터는 각 지점에 대한 3중 샘플의 평균(± 표준 편차)을 나타낸다. 검정 및 데이터 분석은 Eurofins DiscoverX(Fremont, CA)에서 프로젝트 ID: DRX-ANAB-190724로 수행되었다.

[0255] 도 11에 나타난 SHP2 모집 PathHunter Jurkat BTLA 신호 전달 검정은 본 명세서에 개시된 6G3 항체가 가용성 항체로서 직접적인 BTLA 작용제 활성을 가지고 농도 의존적으로 낮은 규모의 BTLA 신호 전달($EC_{50}$ = 125 ng/ml)을 유도한다는 것을 보여준다. 본 명세서에 개시된 6G3 항체는 BTLA 세포질 도메인에 SHP2 모집을 유도함으로써, 활성화된 T 세포와 B 세포에서 억제 신호전달을 개시하는 것에 의해 기능할 수 있다.

[0256] 도 11에 나타난 SHP2 모집 PathHunter Jurkat BTLA 신호 전달 검정은 가용성 항체로서 참조 BTLA 길항제 항체가 직접적인 BTLA 작용제 활성을 가지고 있으며 6G3 항체보다 더 높은 최대 신호로 농도 의존적 BTLA 신호 전달($EC_{50}$ = 28.8 ng/ml)을 유도한다는 것을 보여준다. 도 11에 나타난 SHP2 모집 PathHunter Jurkat BTLA 신호 전달 검정에서 가용성 HVEM/LIGHT 복합체는 항체에 비해 가용성 HVEM의 BTLA에 대한 친화력이 낮기 때문에 포화되지 않는, 약한 농도-의존적 유도된 BTLA 신호 전달을 유도한다.

[0257] 실시예 13

[0258] 이 실시예는 SHP2 모집 PathHunter Jurkat BTLA 신호 전달 검정에서 본 명세서에 개시된 6G3 항체가 형질감염된 U-2 OS 세포주에서 HVEM에 의해 유도된 BTLA 신호 전달을 억제하지 않는다는 것을 보여준다.

[0259] β-갈락토시다아제 효소 공여체(ED)로 태그된 인간 BTLA와 β-갈락토시다아제 효소 수용체(EA)로 태그된 인간 SHP2를 안정적으로 발현하는 클론성 Jurkat 세포주(Jurkat BTLA-ED SHP2-EA 세포)와 인간 HVEM을 안정적으로 발현하는 U-2 OS 골육종 세포주(U-2 OS hHVEM 세포)가 Eurofins DiscoverX(Fremont, CA)에서 생성되었다. 검정 설정을 위해 Jurkat BTLA-ED SHP2-EA 세포를 수확하여 96웰 플레이트($2 x10^4$ 세포/웰)에 도말했다. 항체 희석액은 별도의 플레이트에서 준비되었다. 테스트된 항체는 안정적으로 형질감염된 CHO-K1 세포 풀에서 제조된 6G3 IgG4(APE13308.03) 항체, 닭 알 리소자임에 특이적인 인간 IgG4 이소타입 대조 항체, 및 참조 BTLA 길항제 IgG4 항체였다. 표시된 농도의 항체를 검정용 플레이트에 첨가하고 37℃, 5% $CO_2$의 습도가 조절된 인큐베이터에

서 1시간 동안 인큐베이트했다. U-2 OS hHVEM 세포를 수확하여 재현탁시키고, Jurkat BTLA-ED SHP2-EA 세포와 함께 분석 플레이트(5x$10^4$ 세포/웰)에 첨가한 후 실온에서 2시간 동안 인큐베이트했다. PathHunter Bioassay Detection 시약을 모든 웰에 첨가하고 실온에서 30분 동안 인큐베이트했다. 그런 다음 Bioassay Detection Reagent 2를 모든 웰에 첨가하고 EnVision Multimode Plater Reader(PerkinElmer)에서 0.1초의 통합 시간으로 형광 신호를 측정하기 전에 실온에서 1시간 동안 인큐베이트했다. 데이터는 GraphPad Prism(GraphPad 소프트웨어)을 사용하여 그래프로 나타냈고; $IC_{50}$ 값은 제약 조건 없이 가변 기울기(4개 매개변수)를 갖는 시그모이드형 용량 반응 곡선 적합과 최소 제곱법을 사용하여 계산했다. 데이터는 각 지점에 대한 3중 샘플의 평균(± 표준 편차)을 나타낸다. 검정 및 데이터 분석은 Eurofins DiscoverX(Fremont, CA)에서 프로젝트 ID: DRX-ANAB-191210으로 수행되었다.

[0260] 도 12에 나타난 SHP2 모집 PathHunter Jurkat BTLA 신호 전달 검정은 본 명세서에 개시된 6G3 항체가 다른 세포 상에서 HVEM에 의해 유도된 BTLA에 대한 SHP2 모집에 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다.

[0261] 도 12에 나타난 SHP2 모집 PathHunter Jurkat BTLA 신호 전달 검정은 참조 BTLA 길항제 항체가 다른 세포 상에서 HVEM에 의해 유도된 BTLA 신호 전달에 대해 강력한 농도 의존적 억제를 보인다는 것을 보여준다($IC_{50}$ = 8.9 ng/ml).

[0262] 실시예 14

[0263] 이 실시예는 FcγRIa(CD64a)를 형질감염시킨 U-2 OS 세포를 첨가하여 SHP2 모집 PathHunter Jurkat BTLA 신호 전달 검정에서 본 명세서에 개시된 6G3 항체의 직접 BTLA 작용제 활성이 증가하여 FcγR 결합을 제공한 것을 보여준다.

[0264] β-갈락토시다아제 효소 공여체(ED)로 태그된 인간 BTLA 및 β-갈락토시다아제 효소 수용체(EA)로 태그된 인간 SHP2를 안정적으로 발현하는 클론성 Jurkat 세포주(Jurkat BTLA-ED SHP2-EA 세포)와 인간 FcγRIa/CD64a를 안정적으로 발현하는 U-2 OS 골육종 세포주(U-2 OS hFcγRIa 세포)가 Eurofins DiscoverX(Fremont, CA)에서 생성되었다. U-2 OS hFcγRIa 세포를 수확하여 96웰 플레이트에 도말했다(1 x$10^4$ 세포/웰). 항체 희석액을 별도의 플레이트에 준비하여 검정 플레이트에 넣고 37℃, 5% $CO_2$의 습도 인큐베이터에서 1시간 동안 인큐베이트했다. 테스트된 항체는 안정적으로 형질감염된 CHO-K1 세포 풀에서 제조된 6G3 IgG4(APE13308.03) 항체, 닭 알 리소자임에 특이적인 인간 IgG4 이소타입 대조 항체, 및 참조 BTLA 길항제 IgG4 항체였다. Jurkat BTLA-ED SHP2-EA 세포를 수확하여 U-2 OS hFcγRIa 세포와 함께 검정 플레이트(2x$10^4$ 세포/웰)에 첨가했다. 상기 플레이트를 실온에서 2시간 동안 인큐베이트했다. PathHunter Bioassay Detection 시약을 모든 웰에 첨가하고 실온에서 30분 동안 인큐베이트했다. Bioassay Detection Reagent 2를 모든 웰에 첨가하고 EnVision Multimode Plater Reader(PerkinElmer)에서 0.1초 통합 시간으로 형광 신호를 측정하기 전에 실온에서 1시간 동안 인큐베이트했다. 데이터는 GraphPad Prism(GraphPad 소프트웨어)을 사용하여 그래프로 나타냈고; $EC_{50}$ 값은 제약 조건 없이 가변 기울기(4개 매개변수)를 갖는 시그모이드형 용량 반응 곡선 적합과 최소 제곱법을 사용하여 계산했다. 데이터는 각 지점에 대한 3중 샘플의 평균(±표준 편차)을 나타낸다. 검정 및 데이터 검정은 Eurofins DiscoverX(Fremont, CA)에서 프로젝트 ID: DRX-ANAB-191210으로 수행되었다.

[0265] 도 13에 나타난 SHP2 모집 PathHunter Jurkat BTLA 신호 전달 검정은 FcγR본 명세서에 개시된 6G3 항체가 RIa 결합을 제공하는 세포의 존재 하에서 가용성 항체로서 직접적인 BTLA 작용제 활성을 증가시키고 농도 의존적 BTLA 신호 전달($EC_{50}$ = 9.3 ng/ml)을 유도한다는 것을 보여준다.

[0266] 도 13에 나타난 SHP2 모집 PathHunter Jurkat BTLA 신호 전달 검정은 FcγRIa 결합을 제공하는 세포가 존재하는 경우 가용성 항체로서 참조 BTLA 길항제 항체가 직접적인 BTLA 작용제 활성을 가지고 농도 의존적 BTLA 신호 전달($EC_{50}$ = 3.9 ng/ml)을 유도한다는 것을 보여준다.

[0267] 도 13에 나타난 SHP2 모집 PathHunter Jurkat BTLA 신호 전달 검정법은 본 명세서에 개시된 6G3 항체와 참조 BTLA 길항제 항체 모두가 FcγRIa가 없는 Jurkat BTLA 신호 전달 검정법과 비교했을 때 세포 관련 FcγRIa의 존재 하에 더 강력한 효능의 증가된 작용제 활성을 보인다는 것을 보여준다(6G3는 약 13배 더 강력하고 참조 BTLA 길항제는 약 7.4배 더 강력함)(도 11과 도 13 비교). 본 명세서에 공개된 가용성 6G3 항체는 BTLA 세포질 도메인에 SHP2 모집을 유도하고 활성화된 T 세포와 B 세포에서 억제 신호전달을 시작할 수 있지만, FcγRIa 결합

6G3 항체가 직접적인 억제 신호전달을 유도할 잠재성은 더 강화될 수 있다.

[0268] 실시예 15

[0269] 이 실시예는 본 명세서에 개시된 6G3 항체가 4주 동안 주 2회 1mg/kg, 3mg/kg, 또는 10mg/kg으로 투여될 경우 이종(xenogeneic) NSG/Hu-PBMC 이식편 대 숙주병(GvHD) 모델에서 생체 내 효능을 보여준다는 것을 나타낸다.

[0270] 본 명세서에 개시된 6G3 항-BTLA 항체의 효능을 테스트하는 이종 NSG/Hu-PBMC GvHD 모델은 The Jackson Laboratory JAX® In Vivo Pharmacology Services(Sacramento, CA)에서 수행되었다. NOD-scid IL2r$\gamma^{null}$ (NSG) 마우스에게 1 Gy를 조사한 후 도 14a에서와 같이 각 마우스에 10 x $10^6$개의 인간 PBMC를 정맥 주사했다. 항체(암탉 알 리소자임에 대한 특이적 인간 IgG4 이소타입 대조 항체; 및 안정적으로 형질감염된 CHO-K1 세포 풀에서 제조된 6G3 IgG4 APE13308.05 항체)는 PBMC 주사 다음 날부터 시작하여 4주 동안 주 2회 복강내 투여했다. 본 명세서에 공개된 6G3 항체는 1 mg/kg, 3 mg/kg, 또는 10 mg/kg으로 투여되었으며, 인간 IgG4 이소타입 대조 항체는 10 mg/kg으로 투여되었다. 각 항체 치료 그룹에는 그룹당 12마리의 동물이 있었다. 벨라타셉트 바이오시밀러 양성 대조군은 4주 동안 주 3회 75㎍/마우스로 복강내 투여되었다. 벨라타셉트 바이오시밀러 치료군에는 8마리의 동물이 있었다. 상기 연구에서 투여 요법과 투여 그룹은 도 14b에 나와 있다. 42일간의 연구 기간 동안 체중 손실, 사망률, 및 GvHD 점수를 통해 주 3회 질환을 모니터링하여 체중 손실, 활동성, 털의 질감, 창백함, 및 자세를 측정했다. 체중이 10% 이상 감소한 동물은 매일 질환을 모니터링했으며, 시작 체중에 비해 체중이 20% 이상 감소한 동물은 안락사시켰다. 생존에는 Jackson Laboratory JAX® In Vivo Pharmacology Services의 연구 프로토콜에 정의된 종료 지점으로 인해 사망한 채 발견된 동물과 연구에서 제외된 동물이 포함된다. 생존 데이터는 Kaplan-Meier 생존 분석을 사용하여 GraphPad Prism(GraphPad Software)에 그래프로 표시되었으며, 이로써 각 그룹의 중앙 생존율을 계산했다. Gehan-Breslow-Wilcoxon 시험을 사용하여 p값을 계산하여 이소타입 대조군과 쌍으로 비교한 치료군의 통계적 유의성은 GraphPad Prism에 있었다.

[0271] 도 14c에 나타난 GvHD 연구의 생존 결과는 본 명세서에 개시된 6G3 항-BTLA 항체가 시험된 모든 용량에서 이소타입 대조 항체와 비교하여 생존 기간 연장에 있어서 통계적으로 매우 유의미한 효능을 보인다는 것을 보여준다. 6G3 항체의 효능은 용량에 따라 반응했는데, 1mg/kg 용량 치료군은 3mg/kg 및 10mg/kg 치료군에 비해 생존율이 감소했다. 연구 기간 동안 이소타입 대조군의 중앙 생존 기간은 16일, 1mg/kg 6G3 치료군의 중앙 생존 기간은 35일이었고, 3mg/kg 및 10mg/kg 6G3 치료군의 중앙 생존 기간은 정의되지 않았다. 2차 대조군으로서 참조 길항제인 항-BTLA 항체를 10mg/kg으로 투여했다. 참조 길항제 항체로 치료한 동물에서는 이소타입 대조군으로 치료한 동물에 비해 생존 혜택이 관찰되지 않았다.

[0272] 실시예 16

[0273] 이 실시예에서는 6G3 IgG4 항-BTLA 항체를 시노몰구스 원숭이 혈청에 투여한 후 BTLA를 검출하기 위한 96웰 전기화학 형광(ECL) 샌드위치 검정법의 적격성을 설명한다.

[0274] 방법 개발 과정에서 포획 시약 농도, MRD, 검정 완충액 유형 및 검출 시약 농도 등의 분석 매개변수가 확립되었다. 그런 다음 분석 방법의 적격성은 검정 내 및 검정 간 정밀도와 정확도, 희석 선형성, 특이성 및 동결 해동 안정성을 평가하여 수행되었다. 최종 방법은 시노몰구스 원숭이에서 비-GLP 단일 또는 다중-투여 PK, TK 및 내약성 연구에서 얻은 샘플을 분석하는 데 사용될 것이다.

[0275] 96웰 MSD Standard Bind 검정 플레이트(MSD 부품 번호 L15XA-3)를 1.0㎍/mL 항-BTLA 클론 10D8(APE10134) 50㎕로 4℃에서 하룻밤 동안 코팅했다. 다음 날, 코팅된 판을 1X PBST로 3번 세척하고 250㎕ 차단 완충액으로 60~120분 동안 차단했다. BTLA의 검량선 범위는 500-7.8 ng/mL이고 정량 범위는 500~7.8 ng/mL이다. 표준물질은 100% 사이노몰거스 혈청 중 2배 연속 희석을 사용하여 준비되었다. 품질 관리(QC)도 5가지 다른 농도로 정량 범위에 걸쳐 100% 사이노몰거스 혈청에서 준비 및 동결되었다. 모든 표준물질, 샘플 및 대조군은 이후 1:10의 최소 필요 희석률(MRD)로 100 ㎍/ml 6G3 IgG4가 포함된 분석 완충액에 희석하고 진탕기에서 실온으로 1시간 동안 인큐베이트했다. 차단 후, 플레이트를 1X PBST로 세척하고, 희석된 표준물질 50㎕와 샘플 및 QC를 400~500rpm의 진탕기상에서 실온으로 2시간 동안 인큐베이트했다. 샘플 인큐베이트 후, 플레이트를 1X PBST로 3번 세척하고, 0.25㎍/mL의 바이오틴화된 항-BTLA 다클론 검출 항체(ThermoFisher의 PA5-95592) 50㎕를 각 웰에 첨가하고, 진탕기 상에서 실온으로 1시간 동안 인큐베이트했다. 그런 다음 플레이트를 1X PBST로 3번 세척했다. 다음으로, 0.2㎍/mL Strepavidin-SulfoTag 2차 검출 시약을 웰당 50 ㎕씩 각 웰에 첨가하고 진탕기 상에서 실온으로 30분 동안 인큐베이트했다. 그런 다음 플레이트를 1X PBST로 마지막으로 3번 세척했다. 각 웰에 2X MSD Read Buffer T를 웰당 150㎕씩 첨가하고 MSD Quickplex Plate Reader로 플레이트를 판독했다. 표준물질,

샘플 및 대조군 복제본은 2벌로 테스트되었으며, 혈청 농도는 SoftMax Pro 7.01과 1/y^2 가중치의 4개 매개변수 곡선 적합을 사용하여 주요 후보물질의 참조 표준 곡선에 기초하여 역산되었다.

[0276] 방법 적격성 평가를 시작하기 전에 6G3 IgG4 항체에 대한 혈청 기질 간섭을 평가했다. 매트릭스 효과는 관찰되지 않았으며 최소 필요 희석 비율(MRD)은 1:10이 선택되었다.

[0277] 항체 10D8(APE10134)은 포획 항체로서 사용되었다. 6G3 IgG4 항체가 존재할 경우 10D8의 BTLA에 대한 결합이 증가하는 것으로 밝혀졌는데, 이는 Cyno 혈청에서 6G3 IgG4에 의해 결합될 때 BTLA의 구조적 변화를 통해 일어나는 잠재성으로 생각된다. BTLA의 가정된 구조적 변화를 정규화하기 위해 100 μg/ml의 6G3를 희석 완충액과 모든 표준물질, 샘플 및 대조군에 첨가하고 MRD 1:10에 따라 희석한 후 샘플을 10D8 코팅된 MSD 플레이트에 첨가하기 전에 진탕기상에서 실온으로 1시간 동안 인큐베이트했다.

[0278] 500, 50, 5, 0.5, & 0μg/ml 6G3 IgG4로써의 표준 곡선을 MRD 1:10로 100μg/ml 6G3 IgG4를 함유한 검정 완충액에 희석하여 BTLA의 (%RE) 및 정확도(%CV)를 평가했다. 100μg/ml 6G3 IgG4로 인큐베이트한 5가지 표준 곡선 조건은 모두 정량 검정 범위 내의 표준 농도를 갖고 있었으며 회수된 평균 농도(%RE)가 공칭 농도(nominal concentration)의 20% 이내라는 허용 기준을 통과했다. 정밀도(%CV)의 평균 결과는 허용 기준을 통과했으며 모든 샘플에서 20%를 초과하지 않았다. BTLA의 경우 총 오차 비율(%TE)은 30%를 초과하지 않았다.

[0279] 검정 간 정확도(%RE)와 정밀도(%CV)는 두 상이한 날 동안 수행한 6가지 검정 실행에 의해 평가되었으며, 각 플레이트에 대한 검정 곡선과 정량 범위를 정의하는 5가지 수준의 QC가 포함되었다. 평가된 QC의 5가지 수준은 ULOQ(500ng/mL), HQC(400ng/mL), MQC(62.4ng/mL), LQC(15.6ng/mL) 및 LLOQ(7.8ng/mL)였다. 각 QC 레벨에서 실행 당 총 3번의 독립적인 반복이 이중으로 분석되었다. 정량 검정 범위에서 모든 대조군과 표준 농도에 대한 정확도(%RE)의 평균 결과는 회수된 평균 농도가 공칭 농도의 20% 이내라는 허용 기준을 통과했다. 정밀도(%CV)의 평균 결과는 허용 기준을 통과했으며 모든 샘플에서 20%를 초과하지 않았다. BTLA의 경우 검정의 정량적 범위에 있어서 모든 농도에 대해 표준 곡선이나 품질 관리에 대한 총 오차 비율(%TE)이 30%를 초과하지 않았다.

[0280] 상기 방법의 시험 내 정확도(%RE)와 정밀도(%CV)는 5개 수준의 QC를 6번 독립적으로 반복하여 단일 실행으로 평가했다. 대조군의 정확도(%RE) 평균 결과는 회수된 평균 농도가 공칭 농도의 20% 이내라는 허용 기준을 통과했다. 정확도(%CV)의 평균 결과는 허용 기준을 통과했으며 20%를 초과하지 않았다.

[0281] 희석 선형성은 ULOQ 이상의 BTLA 농도로 첨가한 샘플에 다양한 희석을 수행하여 평가했으며, 이를 통해 고농도의 시험 물질을 정량 범위로 희석할 수 있고 검정에 프로존 효과가 없음을 입증했다. 샘플을 검정의 정량적 범위로 희석하고 역계산된 농도를 평가했다. 평균 결과는 최대 1:1600의 희석 계수를 사용하여 샘플을 정량적 범위로 희석할 수 있음을 나타낸다. 평가된 농도에서는 프로존 "후크 효과"가 존재하지 않았다.

[0282] 결과에 따르면 이 검정법은 6G3 IgG4를 투여한 시노몰구스 원숭이 연구에서 수집한 혈청에서 BTLA 농도를 평가하는 데 민감하고 재현성이 있는 것으로 나타났다.

[0283] 실시예 17

[0284] 다음 실시예는 전기화학 형광(ECL) 샌드위치 검정법을 사용하여 시노몰구스 원숭이 혈청과 NOD scid 마우스 혈장에서 가용성 BTLA를 정량적으로 결정하는 방법을 보여준다.

[0285] 96웰 MSD 표준 결합 분석 플레이트(MSD Part#L15XA-3)를 1.0μg/mL 항-BTLA 포획 시약 클론 10D8(APE10134) 50μL로 4℃에서 하룻밤 동안 코팅했다. 다음 날, 코팅된 플레이트를 1X PBST로 3번 세척하고 250μL 차단 완충액으로 60 내지 120분 동안 차단했다. sBTLA의 검량선 범위는 7.8-500 ng/mL이었으며, 시노몰구스 원숭이 혈청에서는 정량 범위가 7.8-500 ng/mL이었고, CD1 마우스 혈장에서는 검량선과 정량 범위가 모두 2.0-1000 ng/mL이었다. 표준물질은 100% 종-특이적 매트릭스에서 2배 연속 희석을 사용하여 준비되었다. 품질 관리(QC)도 5가지 상이한 농도로 정량 범위에 걸쳐 100% 종-특이적 매트릭스에서 준비 및 동결되었다. 모든 표준물질, 샘플 및 대조군은 이후 1:10의 최소 필요 희석률(MRD)로 100μg/mL 6G3가 포함된 검정 완충액에 희석한 후, 진탕기 상에서 실온으로 1시간 동안 인큐베이트했다.

[0286] 차단 후, 플레이트를 1X PBST로 세척하고, 희석된 표준물질, 샘플 및 QC 50μL를 400~500rpm의 진탕기상에서 실온으로 2시간 동안 인큐베이트했다. 샘플 인큐베이트 후, 플레이트를 1X PBST로 3번 세척하고, 0.25μg/mL 바이오틴화된 항-BTLA 클론 PA5-95592(VC2963104B) 검출 항체 50μL를 각 웰에 첨가하고, 진탕기상에서 실온으로 1시간 동안 인큐베이트했다. 그런 다음 플레이트를 1X PBST로 3번 세척했다. 다음으로, 0.2μg/mL Strepavidin-SulfoTag 2차 검출 시약을 웰당 50 μL씩 각 웰에 첨가하고 진탕기 상에서 실온으로 30분 동안 인큐베이트했다.

그런 다음 플레이트를 1X PBST로 마지막으로 3번 세척했다. 각 웰에 2X MSD Read Buffer T를 웰당 150μL씩 첨가하고 MSD Quickplex Plate Reader로 플레이트를 판독했다. 표준물질, 샘플 및 대조군 복제본은 2벌로 테스트되었으며, SoftMax Pro 7.01과 1/y^2 가중치의 4매개변수 곡선 적합을 사용하여 BTLA의 기준 표준 곡선을 기초로 하여 농도를 역산했다.

[0287] 인간 PBMC 이식(engrafted) NOD Scid 마우스(n=19)에게 6G3 IgG4 항체(APE13308)를 세 가지 용량 그룹(1, 3, 및 10mg/kg IP)으로 투여했다. 이소타입형 대조 IgG4(10mg/kg) 또는 CTLA-4-Ig(75μg)를 투여받은 동물은 대조군으로 사용되었다. 동물들에게 일주일에 두 번씩 투여했으며, 연구 중간 시점에 심장 출혈에 의해 혈장 샘플을 수집했다. 결과는 도 15에 제시되어 있다. 또한, 순환 인간 T 세포를 유세포 분석법으로 분석하여 BTLA 발현을 특성화하고, 인간 T 세포를 계산하고, 활성화 마커 CD25를 특성화했다. 결과는 도 19에 나타나 있다. 6G3 IgG4는 인간 T 세포 상에서 BTLA 발현을 감소시키고, 용량 의존적으로 T 세포 확장을 억제했으며, 모든 용량에서 활성화 마커 CD25의 발현을 감소시켰다.

[0288] 두 가지 연구에서 시노몰구스 원숭이의 혈액 샘플이 분석되었다. 첫 번째 연구(n=180)는 세 가지 투여 그룹(10mg/kg IV; 10mg/kg SC; 및 1mg/kg SC)으로 구성되었다. 모든 동물에게 6G3 IgG4를 단일 용량으로 정맥(IV) 또는 피하(SC) 주사로 투여하였고, 모든 군의 모든 동물에게서 투여 전, 투여 후 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336, 504, 672, 및 840시간에 혈액 샘플을 채취했다. 투여 전 샘플과 비히클 대조 투여된 동물이 대조군으로 사용되었다. 결과는 도 16에 제시되어 있다.

[0289] 두 번째 연구에서는 사이노몰거스 원숭이(n=380)에게 6G3를 4개 용량 그룹(10, 50, 100mg/kg SC, 및 100mg/kg IV)으로 투여했다. 모든 동물에게 6G3 IgG4를 1일차, 8일차, 및 15일에 정맥 주사 또는 피하 주사로 매주 투여했으며 모든 그룹의 모든 동물에게서 1일차, 8일차, 및 15일에 혈액 샘플을 채취했다: 투여 전, 투여 후 3시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간. 결과는 도 17에 제시되어 있다. 또한 6G3 IgG4의 혈청 수치도 측정되었다. 결과는 도 18에 제시되어 있다.

[0290] IgG4 이소타입 대조군 또는 CTLA-4-Ig를 투여받은 인간 PBMC 이식 NOD scid 마우스의 샘플이나, 시노몰구스 원숭이 연구에서 투여 전 샘플 또는 비히클 대조군으로 처리한 샘플에서는 측정 가능한 수준의 sBTLA가 검출되지 않았다. 마우스 연구에서 가장 낮은 용량 그룹(1 mg/kg)을 제외하고, 6G3 IgG4를 투여받은 모든 시노몰구스 원숭이의 혈청 샘플과 인간 PBMC가 이식된 NOD scid 마우스의 모든 혈장 샘플에서 유출된 sBTLA가 검출되었다. 연구 결과에 따르면 BTLA는 B세포와 T세포 표면에서 방출되며 sBTLA는 생체 내 6G3 IgG4 활성의 약력학적 마커이다.

[0291] 실시예 18

[0292] 이 실시예는 6G3 IgG4가 수용체 점유율을 달성하고 시노몰구스 원숭이의 T 세포와 B 세포의 BTLA 발현을 감소시킨다는 것을 보여준다.

[0293] 용량 범위 탐색 연구(DRFS)에서 6G3 IgG4의 다중 용량에 대한 효과를 알아보기 위해 유세포분석기를 사용하여 시노몰구스 원숭이 말초 혈액을 분석했다. 동물들에게 4개의 다른 치료 그룹(10mg/kg SC, 50mg/kg SC, 100mg/kg SC, 100mg/kg IV)과 1개의 대조군으로 6G3 IgG4를 투여했다.

[0294] 6G3 IgG4는 T 세포, B 세포 및 NK 세포 절대 수나 백분율 분포에 있어서 비히클 대조군 시험 동물에 비해 유의미한 변화를 일으키지 않았다. 도 20에서 보듯이, 6G3 IgG4를 투여한 모든 동물에서 형광염색체로 표지된 약물(6G3 IgG4-DyL488)의 결합이 비히클 대조군 치료군에 비하여 사라졌으며, 이는 6G3 IgG4를 투여한 BLTA의 수용체 점유율이 T 세포의 경우 > 80%, B 세포의 경우 ~70%임을 보여준다.

[0295] 6G3 IgG4를 투여한 모든 동물은 형광염색체로 표지된 비경쟁적 항-BTLA 항체(클론 10D8)로 검출했을 때 비히클 대조군으로 처리한 동물에 비해 T세포와 B세포에서 BTLA 표면 발현이 감소했다. 도 20에서 볼 수 있듯이 T세포와 B세포에서 BTLA 표면 발현은 각각 약 75%와 약 50% 감소했다.

[0296] T세포와 B세포에서 수용체 점유의 동역학에 차이가 있는 것으로 나타났는데, 이는 매우 빠르게 발생하는 것으로서, T세포와 B세포에서 BTLA 발현 손실이 비교적 느리게 발생하는 것에 대비되는 것으로 나타났다. 이는 6G3 IgG4 의존적 메커니즘이 BTLA 배출을 초래한다는 것을 시사한다. 항약물 항체(ADA)를 개발한 두 동물은 T세포와 B세포에서 수용체 점유율이 다소 감소하고 BTLA 발현이 회복되는 것을 보여주었다.

[0297] 실시예 19

[0298] 이 실시예는 BTLA 세포외 도메인(ECD)이 막관통 도메인 근처에서 제안된 인식 부위에서 세린 프로테아제 3에 의

해 절단된다는 것을 보여준다.

[0299] 프로테아제 3(PR3)는 호중구 활성화 시 세포 외 공간으로 방출되는 호중구 세린 프로테아제이다. PR3는 이전에 체크포인트 수용체 T 세포 면역글로불린과 뮤신 도메인 3(TIM-3)을 절단하여 세포 표면의 TIM-3 수준을 감소시키는 것으로 나타났다.

[0300] 6개의 상이한 레인을 정제된 재조합 PR3 및/또는 BTLA-ECD와 함께 최대 60분 동안 인큐베이트했다. 이들은 (1) PR3 대조군, (2) PR3 60m 대조군, (3) BTLA 대조군, (4) PR3+BTLA 0m, (5) PR3+BTLA 30m, 및 (5) PR3+BTLA 60m로 구성되었다.

[0301] 공동-인큐베이션 후, 가용성 BLTA-ECD가 여러 개의 작은 조각으로 절단되어 PR3가 BTLA를 절단할 수 있는 능력이 있음을 보여주었다. 서열 분석에 의해 BTLA-ECD의 C-말단 쪽으로 최소한 하나의 PR2 인식 모티프가 제안되었다.

[0302] 실시예 20

[0303] 이 실시예에서는 6G3 IgG4가 건강한 대조군(HC)과 아토피성 피부염(AD) 기증자에서 T-세포 증식과 표면 BTLA 발현을 감소시킨다는 것을 보여준다.

[0304] HC 또는 AD 기증자의 PBMC를 0.5μM CFSE로 표지한 다음 가용성 항-CD3(0.5 ng/mL, Biolegend, 카탈로그 번호 300332) 및 가용성 항-CD28(0.5 ng/mL, Biolegend, 카탈로그 번호 302943)로 6G3 IgG4 또는 이소타입 대조군(IgG4-HyHel) 100 nM의 존재 또는 부재 하에 72시간 동안 자극했다. 증식하는 세포는 CFSE 희석에 의해 확인되었다.

[0305] 도 21a는 6G3 IgG4로 처리한 CD3+ T 세포에 이소타입 대조군을 중첩한 히스토그램으로 표시된 HC 및 AD 기증자의 CFSE 히스토그램을 제공한다. 도 21b는 증식 지수(좌측)와 분열 지수(우측)에서 T 세포 증식 감소율을 보여준다. 분열 지수는 각 세대의 분열 횟수를 원래 세포 수로 나눈 값의 합이며, NovoExpress 소프트웨어로 자동화된 세포 주기 증식 분석에 의해 계산된다. HC 및 AD 기증자 PBMC 인큐베이트 상층액의 IFNɣ 수치는 6G3 IgG4 또는 이소타입 대조군 100 nM의 존재 또는 부재 하에 항-CD3 및 항-CD28 자극 후 72시간에 Mesoscale MDS 검정법으로 측정했다. 결과는 도 21c에 나타나 있다. 도 21d는 AF647이 결합된 항-BTLA(클론 #10D8, AnaptysBio.)에 의해 결정된 HC 및 AD 공여자 CD3+ T 세포에서의 BTLA 표면 발현(평균 형광 강도(MFI)로 플롯됨)을 보여준다.

[0306] 결과는 6G3 IgG4가 대조군에 비해 T세포 증식과 표면 BTLA 발현을 감소시키는 것을 보여준다.

[0307] 실시예 21

[0308] 이 실시예는 6G3 IgG4가 인간 환자에게 안전한 복용량으로 높은 BTLA 수용체 점유율을 달성한다는 것을 보여준다.

[0309] 이 연구에는 96명의 개체가 무작위로 배정/치료를 받았으며, 이 중 72명은 단일 오름차순 투여(SAD) 코호트에 속했고 24명은 다중 오름차순 투여(MAD) 코호트에 속했다. SAD 코호트는 정맥 주사(IV) 또는 피하 주사(SC)를 통해 7mg, 20mg, 70mg, 200mg, 400mg, 또는 800mg의 단일 복용량을 투여받았다. MAD 코호트는 4주 동안 70mg, 200mg, 또는 400mg을 매주 SC 투여받았다. 각 코호트에는 8명의 개체가 포함되었으며, 6명에게는 6G3 IgG4 항체를 투여하고 2명에게는 위약을 투여했다. 72명의 SAD 개체 중 71명이 연구를 완료하였고, 24명의 MAD 개체 중 21명이 연구를 완료했다. 치료는 잘 견디어졌으며 안전 신호는 나타나지 않았다.

[0310] CD3+ T 세포와 CD19+ B 세포에서 BTLA 수용체 점유율이 결정되었다. 일부 결과는 도 22a 및 도 22b에 나와 있다. 수용체 점유율은 7mg IV 또는 20mg SC에서 최대화되었으며, 지속 시간은 용량에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 200mg을 정맥 주사(IV)로, 400mg을 피하 주사(SC)로 단회 투여한 결과 30일 이상 90% 이상의 수용체 점유율이 나타났다. 최대 수용체 점유율은 MAD 코호트에서 입증되었듯이 다중 복용량 SC 투여로 유지될 수 있다.

[0311] 실시예 22

[0312] 이 실시예는 본 명세서에 개시된 6G3 항체가 4주 동안 단일 10mg/kg 투여 또는 2주마다 3mg/kg 투여 시 이식편대 숙주병(GvHD) 모델에서 생체 내 효능을 보임을 입증한다.

[0313] 마우스에게 $1x10^7$개의 인간 말초혈 단핵세포(PBMC)가 이식되었다. 그런 다음 4주 동안 6G3 항체 또는 IgG4 이

소타입 대조군을 10mg/kg 또는 3mg/kg으로 단일 복용량(SD) 또는 2주마다(BiW) 주사했다. 또한, 어떠한 치료나 위약 주사도 제외하면서, 생착 수준과 질환 진행을 모니터링하기 위해 치료를 하지 않은 동물의 대조군도 포함시켰다.

[0314] 6G3를 10mg/kg 단일 투여량 또는 4주 동안 3mg/kg의 BiW 투여량으로 치료한 동물은 46일까지 생존 이점이 뚜렷했다. 각 치료군(SD 또는 BiW)에서 단 한 마리의 동물만 질환에 걸렸으며, 다른 동물은 모두 연구 46일째까지 생존했다(n=11). IgG4 이소타입 대조군을 10mg/kg 단일 용량으로 치료한 동물의 평균 생존기간은 20.5일이었고, 또는 BiW 3mg/kg 용량으로 치료한 동물의 평균 생존기간은 20일이었다. 무치료 대조군 동물의 중앙 생존기간은 23일이었다. 결과는 도 23a 및 23b에 나타나 있다.

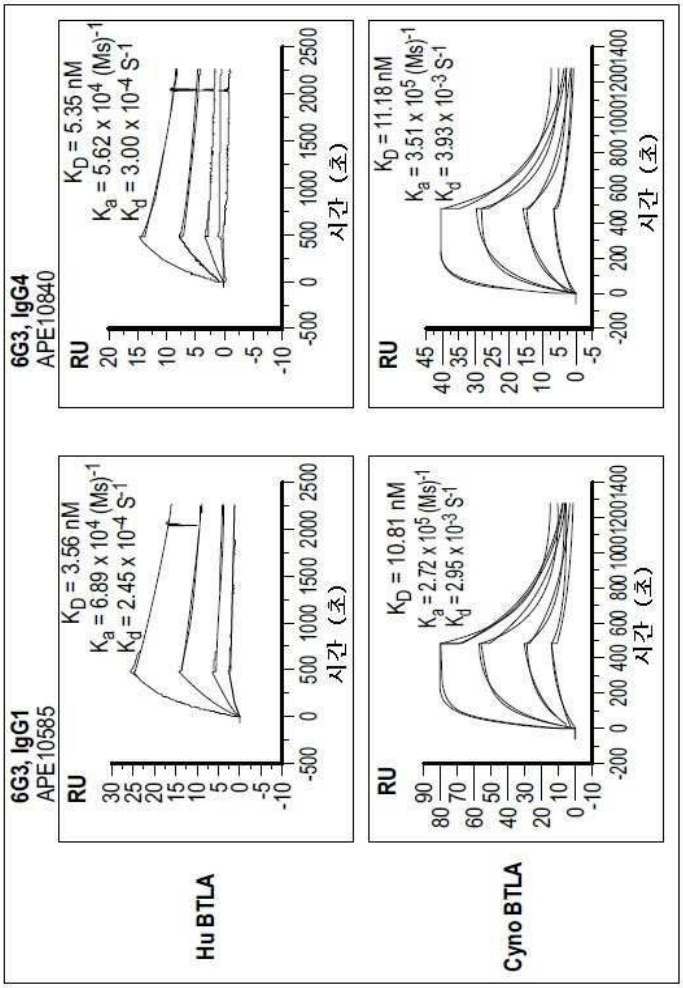
[0315] 여기에 인용된 출판물, 특허 출원 및 특허를 포함한 모든 참고문헌은 각 참고문헌이 개별적으로 구체적으로 참고로 포함되도록 표시되고 여기에 전문이 제시된 것과 동일한 정도로 참고로 여기에 포함된다.

[0316] 발명을 설명하는 맥락에서 "일", "한", "상기", "적어도 하나" 및 이와 유사한 지시어를 사용하는 경우(특히 이하의 청구항의 맥락에서) 본 명세서에 달리 명시되어 있지 않거나 맥락상 명백히 모순되지 않는 한, 단수 및 복수를 모두 포함하는 것으로 해석되어야 한다. "적어도 하나"라는 용어 뒤에 하나 이상의 항목 목록(예: "A와 B 중 적어도 하나")이 오는 경우, 여기에 달리 명시되어 있거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한, 나열된 항목(A 또는 B)에서 선택된 하나의 항목 또는 나열된 항목(A와 B) 중 두 개 이상의 조합을 의미하는 것으로 해석되어야 한다. "포함하는", "가지는", "내포하는" 및 "함유하는"이라는 용어는 달리 언급되지 않는 한 개방형 용어(즉, "포함하지만 이에 국한되지 않음"을 의미)로 해석되어야 한다. 본 명세서에서 값의 범위를 언급한 것은, 본 명세서에서 달리 명시되지 않는 한, 단지 범위 내에 있는 각 값을 개별적으로 지칭하는 간단한 방법으로 의도된 것이며, 각 값은 본 명세서에 개별적으로 언급된 것처럼 본 명세서에 포함된다. 여기에 설명된 모든 방법은 달리 명시되어 있지 않거나 문맥상 명백히 모순되는 경우가 아니면 임의의 적절한 순서에 따라 수행할 수 있다. 여기에 제공된 모든 예 또는 예시적 언어(예: "예컨대")의 사용은 단지 발명을 더 잘 설명하기 위한 것일 뿐, 달리 청구되지 않는 한 발명의 범위를 제한하는 것이 아니다. 본 명세서에 있는 어떠한 언어도 발명의 실시에 필수적인 것으로서 청구되지 않은 요소를 나타내는 것으로 해석되어서는 안 된다.

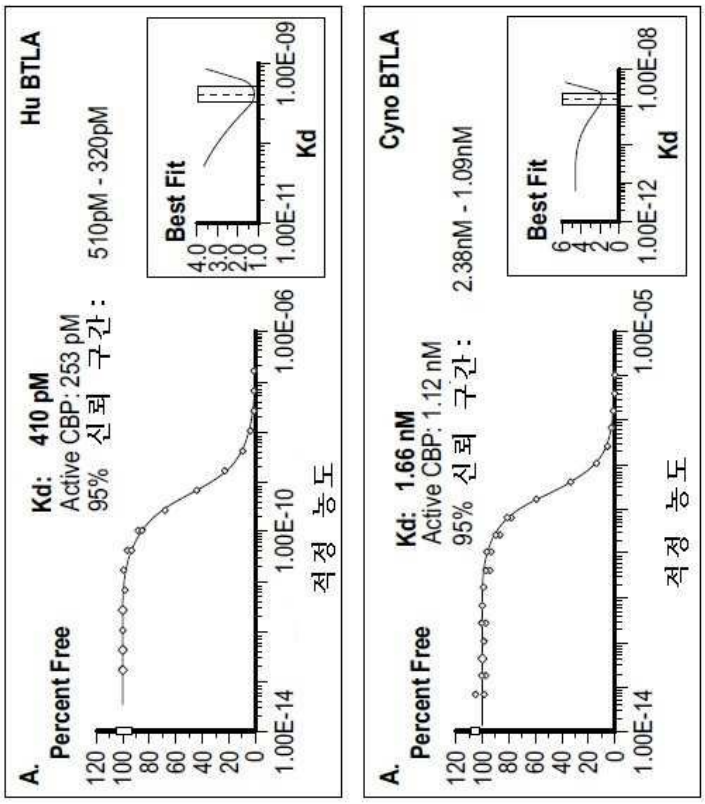
[0317] 본 발명의 바람직한 구체예를 여기에 설명하며, 여기에는 발명자들이 알고 있는 발명을 수행하기 위한 가장 좋은 모드도 포함된다. 이러한 바람직한 구체예의 변형은 앞서 설명한 내용을 판독함으로써 해당 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명백해질 수 있다. 본 발명자들은 숙련된 기술자들이 적절한 경우 이러한 변형을 적용할 것으로 기대하며, 본 발명자들은 본 발명이 여기에 구체적으로 설명된 것 외의 다른 방식으로 실시되기를 의도한다. 따라서 본 발명은 적용 가능한 법률에 따라 허용되는 범위 내에서 여기에 첨부된 청구항에 기술된 주제의 모든 수정 및 균등물을 포함한다. 더욱이, 달리 명시되어 있지 않거나 맥락상 명백히 모순되지 않는 한, 위에 기술된 요소들의 임의의 가능한 변형 형태의 조합은 본 발명에 포함된다.

도면

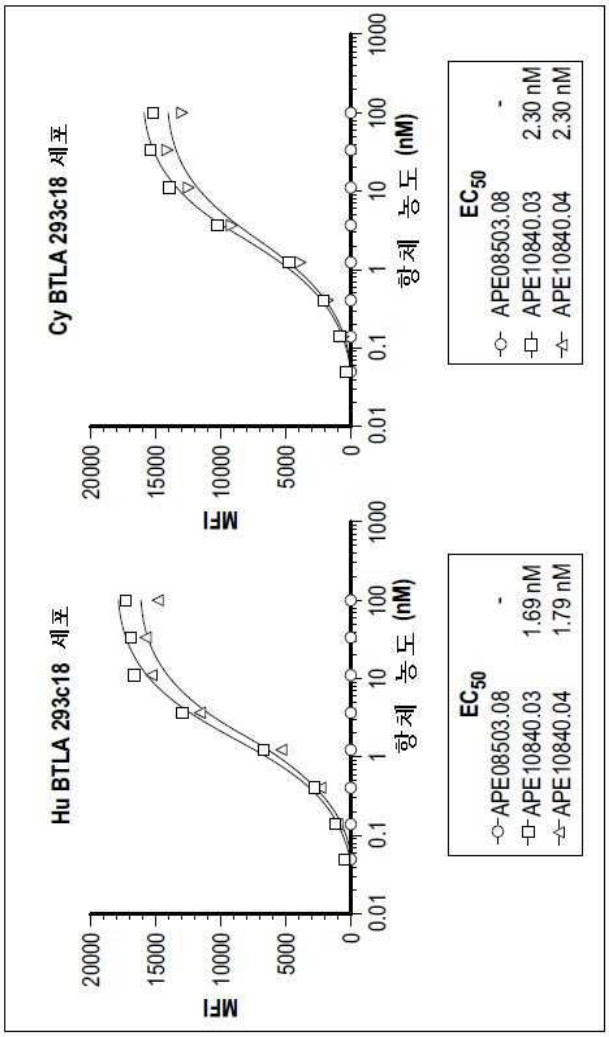
도면1


6G3, IgG1
APE10585
6G3, IgG4
APE10840
Hu BTLA
Cyno BTLA
RU
시간 (초)
$K_D$ = 3.56 nM
$K_a$ = 6.89 x $10^4$ $(Ms)^{-1}$
$K_d$ = 2.45 x $10^{-4}$ $S^{-1}$
$K_D$ = 5.35 nM
$K_a$ = 5.62 x $10^4$ $(Ms)^{-1}$
$K_d$ = 3.00 x $10^{-4}$ $S^{-1}$
$K_D$ = 10.81 nM
$K_a$ = 2.72 x $10^5$ $(Ms)^{-1}$
$K_d$ = 2.95 x $10^{-3}$ $S^{-1}$
$K_D$ = 11.18 nM
$K_a$ = 3.51 x $10^5$ $(Ms)^{-1}$
$K_d$ = 3.93 x $10^{-3}$ $S^{-1}$

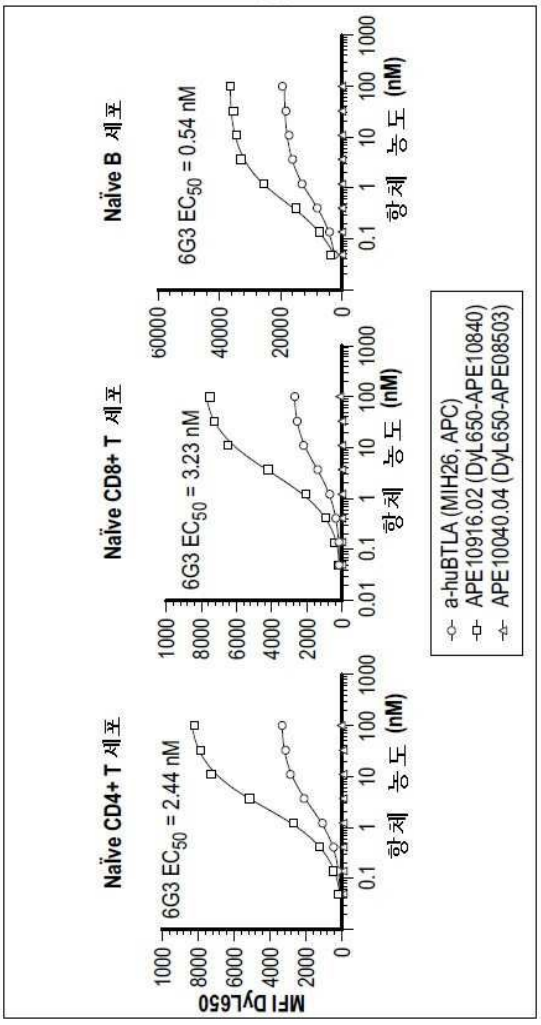
도면2


A.
Hu BTLA
Percent Free
Kd: 410 pM
Active CBP: 253 pM
95% 신뢰 구간 : 510pM - 320pM
Best Fit
Kd
적정 농도
A.
Cyno BTLA
Percent Free
Kd: 1.66 nM
Active CBP: 1.12 nM
95% 신뢰 구간 : 2.38nM - 1.09nM
Best Fit
Kd
적정 농도

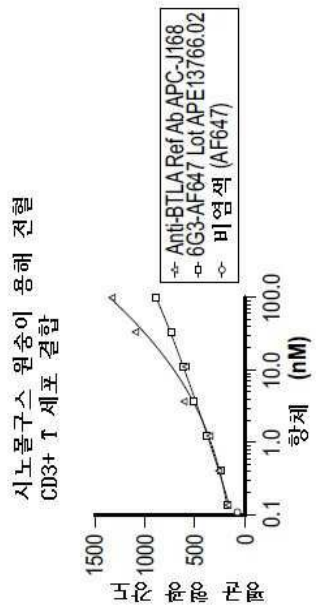
도면3


Hu BTLA 293c18 세포
Cy BTLA 293c18 세포
MFI
항체 농도 (nM)
EC50
APE08503.08 -
APE10840.03 1.69 nM
APE10840.04 1.79 nM
APE08503.08 -
APE10840.03 2.30 nM
APE10840.04 2.30 nM

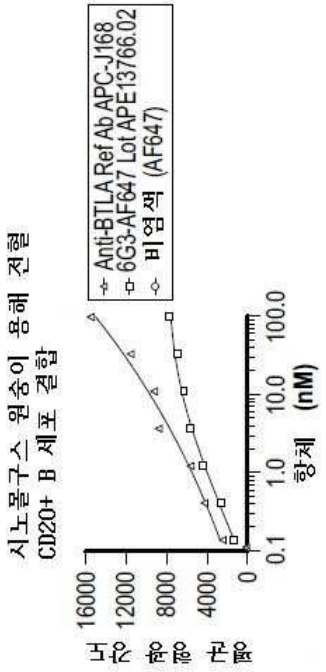
도면4


Naïve CD4+ T 세포
Naïve CD8+ T 세포
Naïve B 세포
MFI DyL650
6G3 EC50 = 2.44 nM
6G3 EC50 = 3.23 nM
6G3 EC50 = 0.54 nM
항체 농도 (nM)
a-huBTLA (MIH26, APC)
APE10916.02 (DyL650-APE10840)
APE10040.04 (DyL650-APE08503)

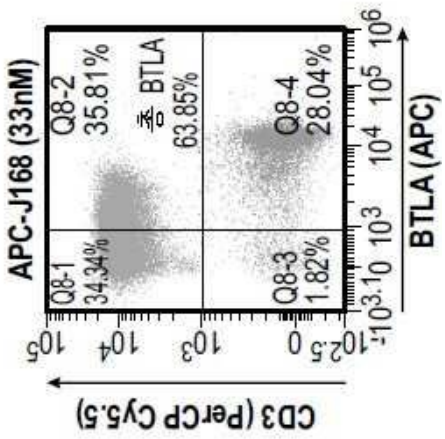
도면5a


시노몰구스 원숭이 용해 전혈
CD3+ T 세포 결합
평균 형광 강도
항체 (nM)
Anti-BTLA Ref Ab APC-J168
6G3-AF647 Lot APE13766.02
비염색 (AF647)

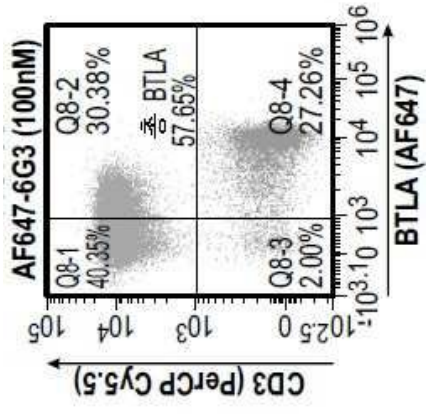
도면5b


시노몰구스 원숭이 용해 전혈
CD20+ B 세포 결합
Anti-BTLA Ref Ab APC-J168
6G3-AF647 Lot APE13766.02
비염색 (AF647)
평균 형광 강도
16000
12000
8000
4000
0
0.1
1.0
10.0
100.0
항체 (nM)

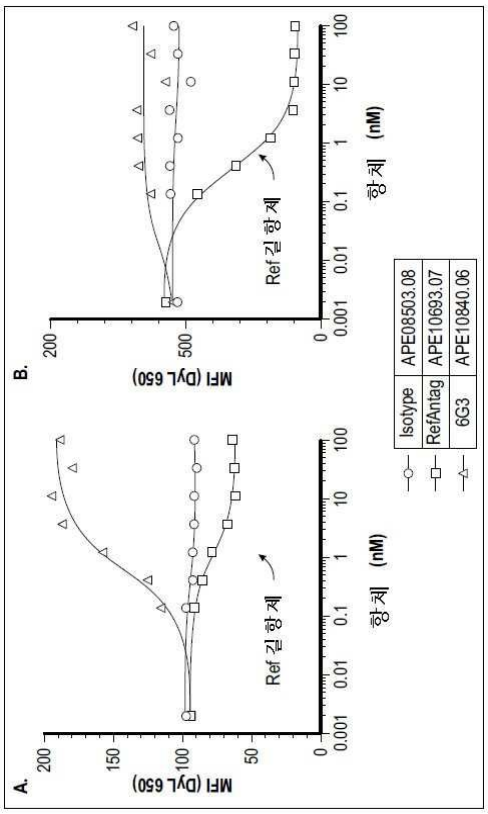
도면5c


APC-J168 (33nM)
CD3 (PerCP Cy5.5)
BTLA (APC)
Q8-1
34.34%
Q8-2
35.81%
총 BTLA
63.85%
Q8-3
1.82%
Q8-4
28.04%

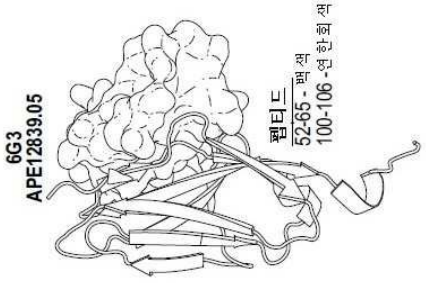
도면5d



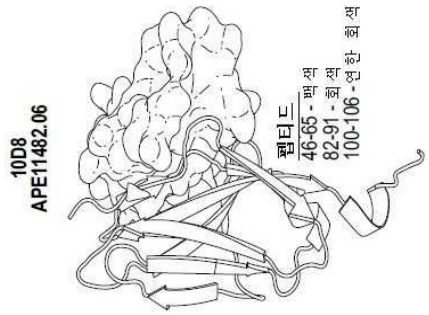

도면6



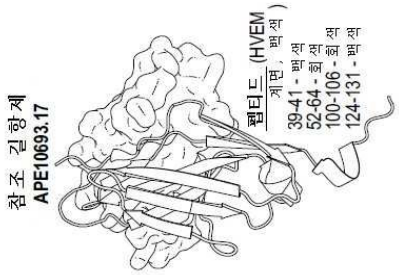

도면7a



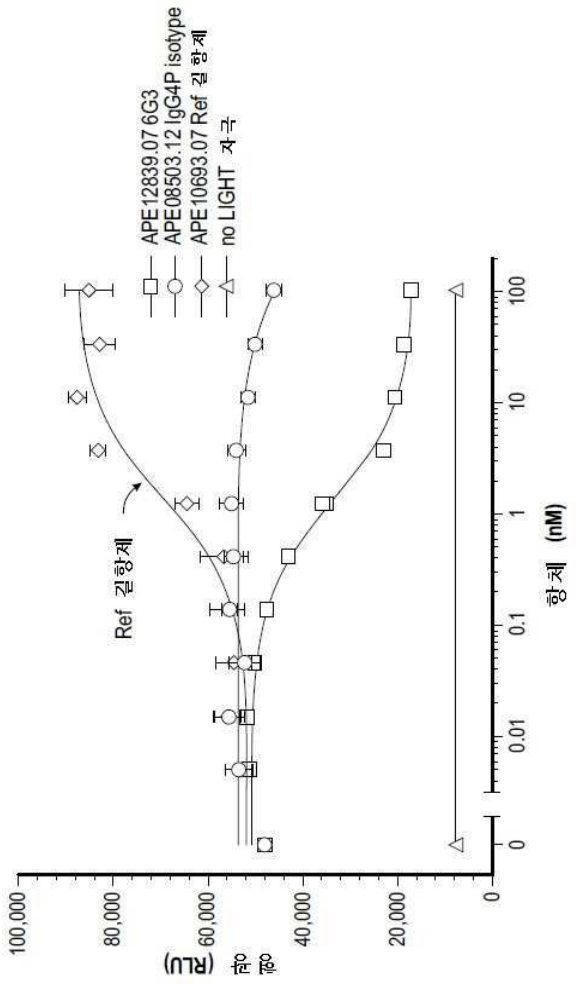
도면7b


10D8
APE11482.06
펩티드
46-65 - 백 쟁
82-91 - 회 쟁
100-106 - 연 한 회 쟁

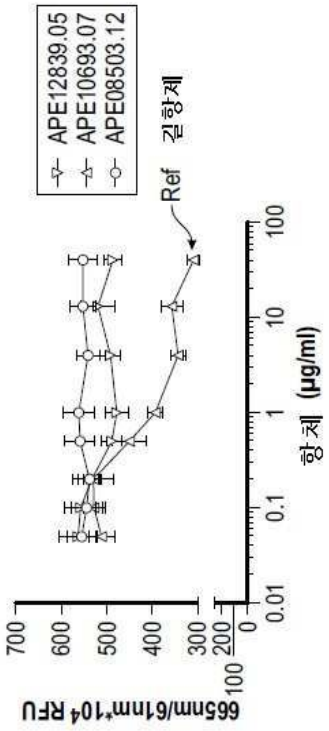
도면7c


참 조 길 항 제
APE10693.17
펩티드 (HVEM
계면, 백 쟁)
39-41 - 백 쟁
52-64 - 회 쟁
100-106 - 회 쟁
124-131 - 백 쟁

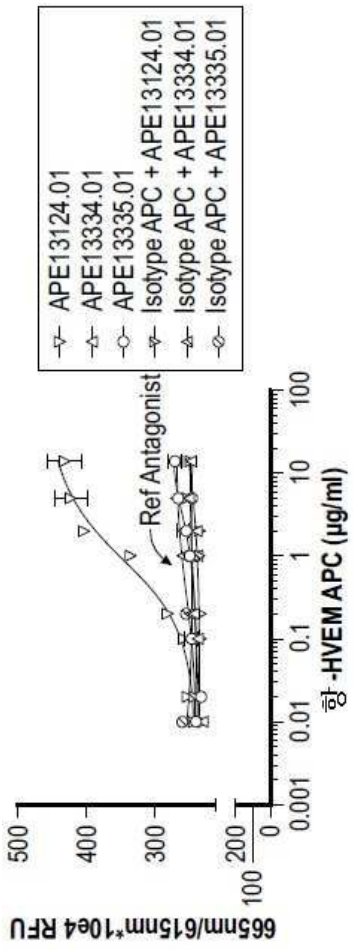
도면8


APE12839.07 6G3
APE08503.12 IgG4P isotype
APE10693.07 Ref 길항제
no LIGHT 자극
Ref 길항제
항체 (nM)
0
0.01
0.1
1
10
100
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
(RLU)

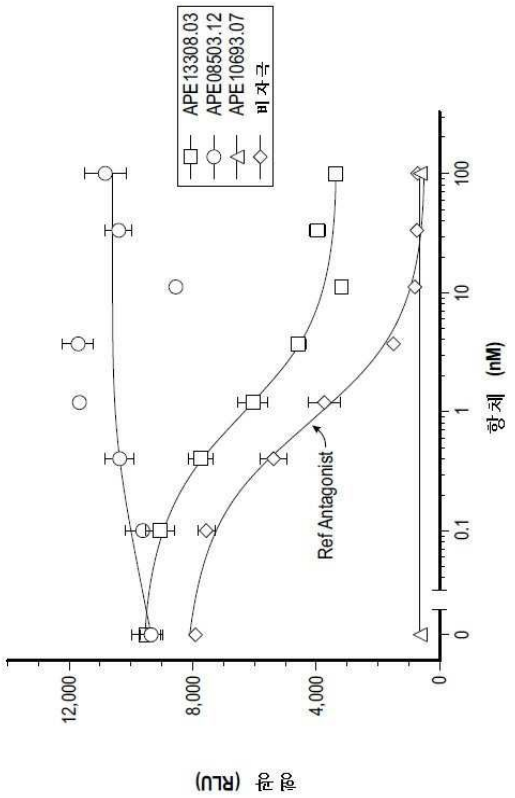
도면9a


APE12839.05
APE10693.07
APE08503.12
Ref 길항제
665nm/61nm*10⁴ RFU
700
600
500
400
300
200
100
0
0.01
0.1
1
10
100
항체 (μg/ml)

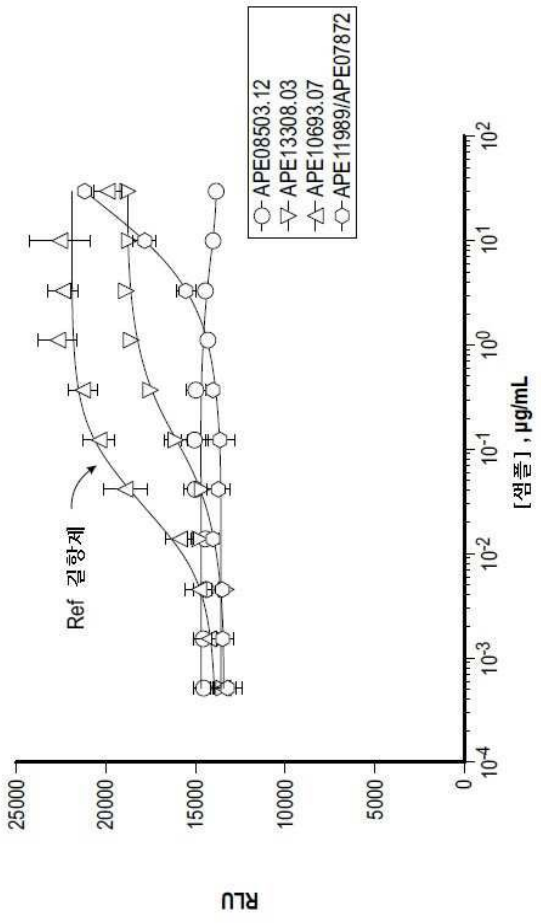
도면9b


APE13124.01
APE13334.01
APE13335.01
Isotype APC + APE13124.01
Isotype APC + APE13334.01
Isotype APC + APE13335.01
Ref Antagonist
665nm/615nm*10e4 RFU
500
400
300
200
100
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
항-HVEM APC (μg/ml)

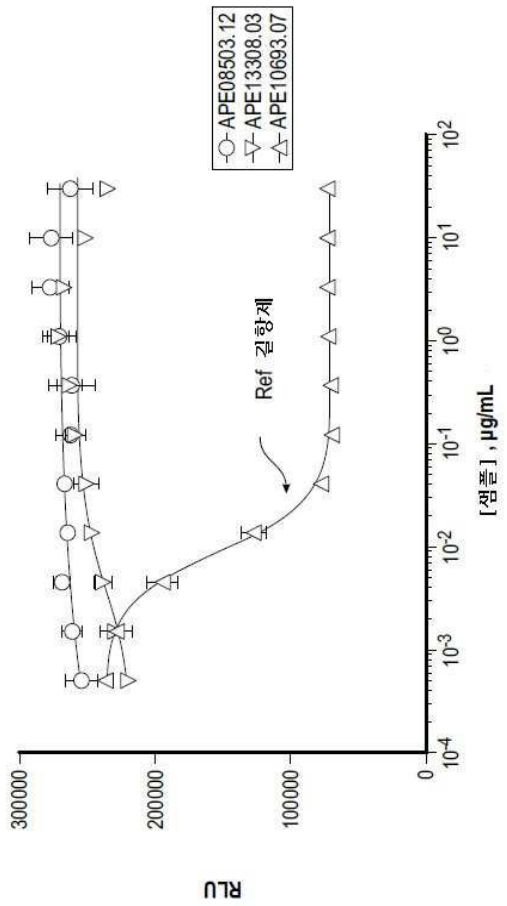
도면10


APE13308.03
APE08503.12
APE10693.07
비자극
Ref Antagonist
항체 (nM)
0
0.1
1
10
100
12,000
8,000
4,000
0
형광 (RLU)

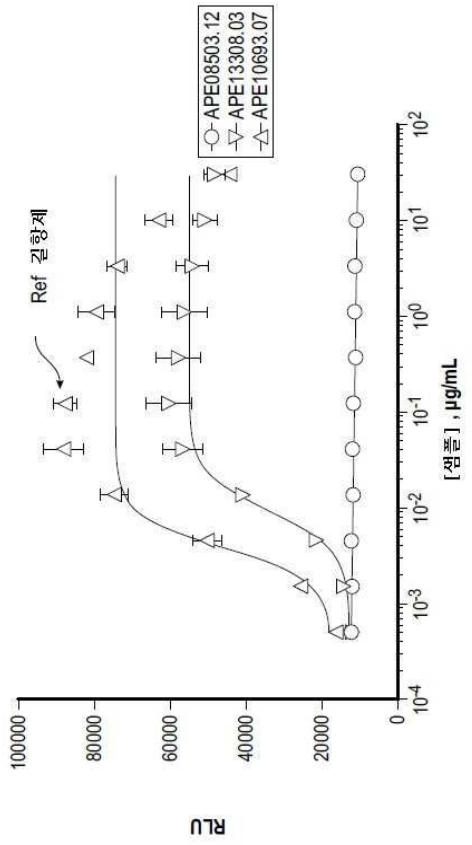
도면11


APE08503.12
APE13308.03
APE10693.07
APE11989/APE07872
Ref 길항제
RLU
25000
20000
15000
10000
5000
0
[샘플] , μg/mL
10-4
10-3
10-2
10-1
100
101
102

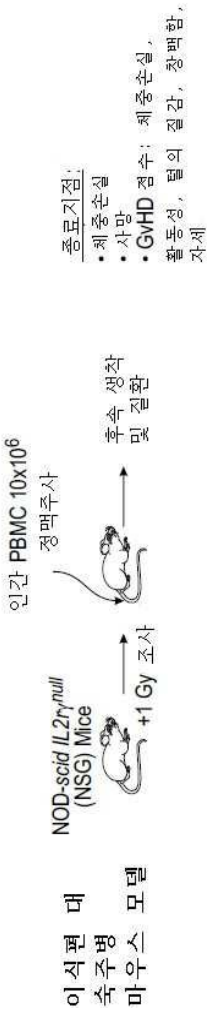
도면12


APE08503.12
APE13308.03
APE10693.07
Ref 길항제
RLU
300000
200000
100000
0
10-4
10-3
10-2
10-1
100
101
102
[샘플], μg/mL

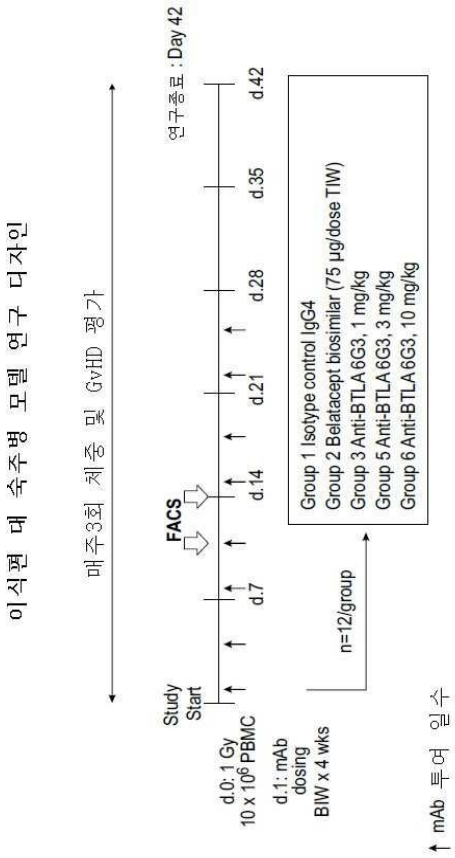
도면13


APE08503.12
APE13308.03
APE10693.07
Ref 길항제
RLU
100000
80000
60000
40000
20000
0
[샘플] , μg/mL
10^-4
10^-3
10^-2
10^-1
10^0
10^1
10^2

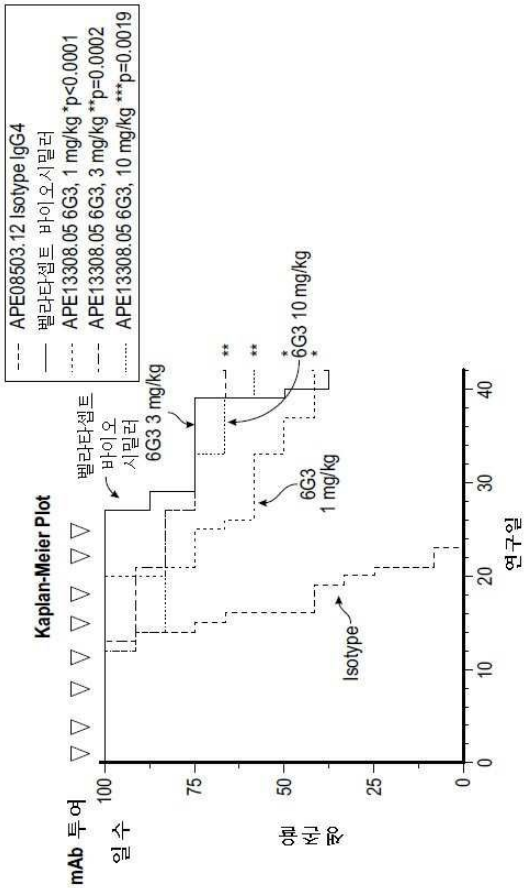
도면14a


이식편 대
숙주병
마우스 모델
NOD-scid IL2rγnull
(NSG) Mice
+1 Gy 조사
인간 PBMC 10x10^6
정맥주사
후속 생착
및 질환
종료지점:
• 체중손실
• 사망
• GvHD 점수: 체중손실,
활동성, 털의 질감, 창백함,
자세

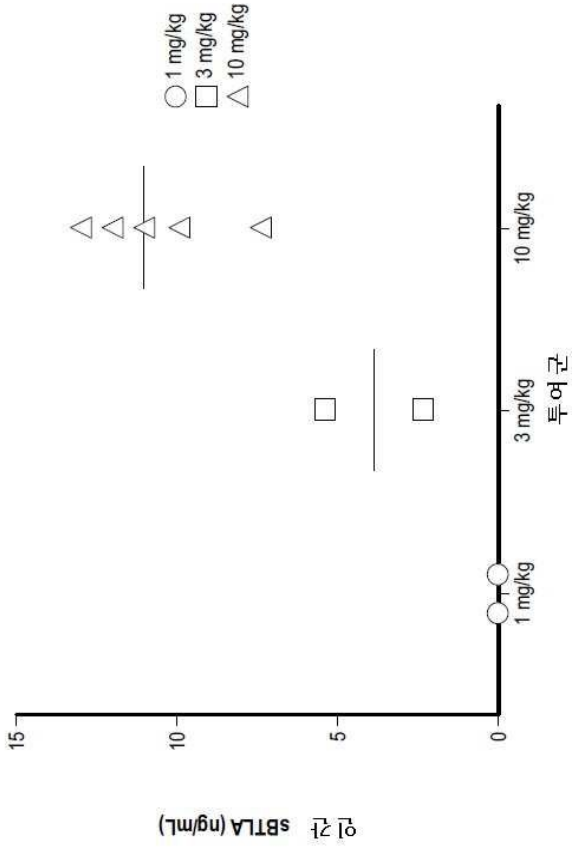
도면14b


이식편 대 숙주병 모델 연구 디자인
매주3회 체중 및 GvHD 평가
연구종료 : Day 42
FACS
Study Start
d.0: 1 Gy
10 x 10^6 PBMC
d.1: mAb dosing
BIW x 4 wks
n=12/group
d.7
d.14
d.21
d.28
d.35
d.42
Group 1 Isotype control IgG4
Group 2 Belatacept biosimilar (75 μg/dose TIW)
Group 3 Anti-BTLA 6G3, 1 mg/kg
Group 5 Anti-BTLA 6G3, 3 mg/kg
Group 6 Anti-BTLA 6G3, 10 mg/kg
↑ mAb 투여 일수

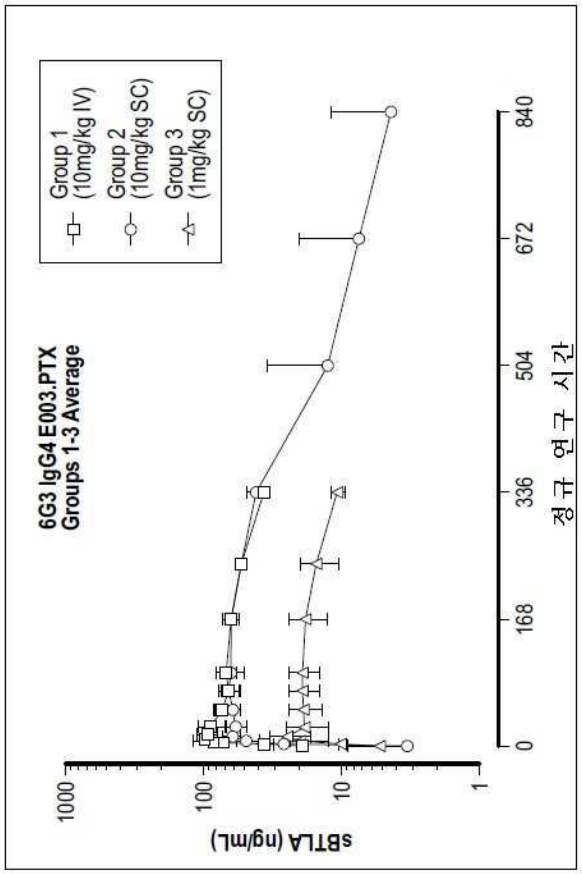
도면14c


APE08503.12 Isotype IgG4
벨라타셉트 바이오시밀러
APE13308.05 6G3, 1 mg/kg *p<0.0001
APE13308.05 6G3, 3 mg/kg **p=0.0002
APE13308.05 6G3, 10 mg/kg ***p=0.0019
Kaplan-Meier Plot
mAb 투여
일 수
생존율
연구일
벨라타셉트 바이오 시밀러 6G3 3 mg/kg
6G3 1 mg/kg
6G3 10 mg/kg
Isotype
100
75
50
25
0
0
10
20
30
40
*
**
**
*

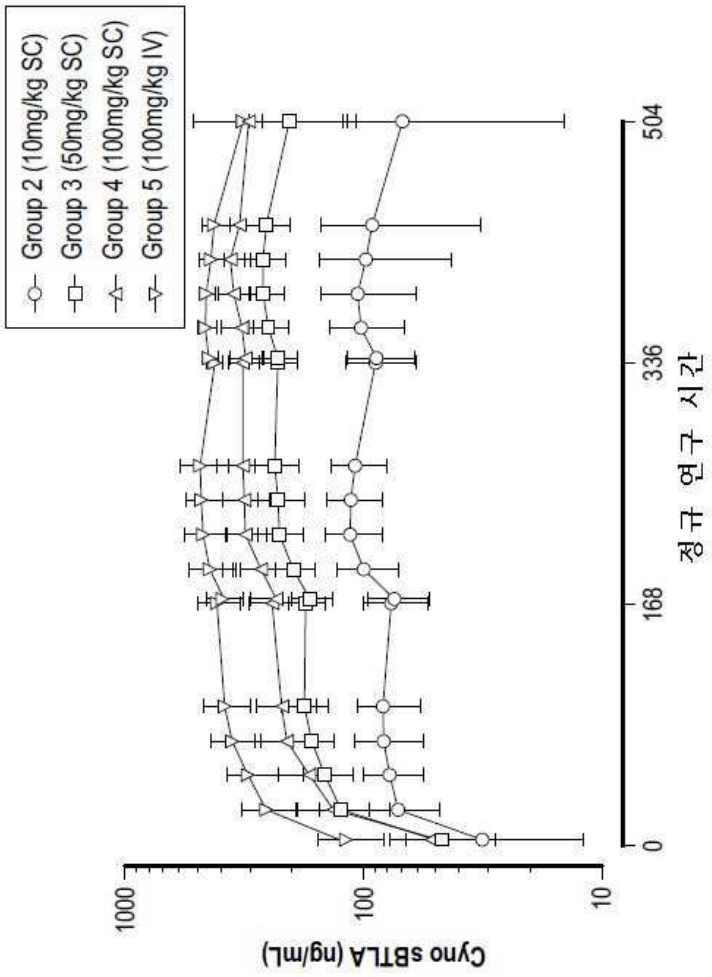
도면15


1 mg/kg
3 mg/kg
10 mg/kg
sBTLA (ng/mL)
혈청 간
15
10
5
0
1 mg/kg
3 mg/kg
10 mg/kg
투여 군

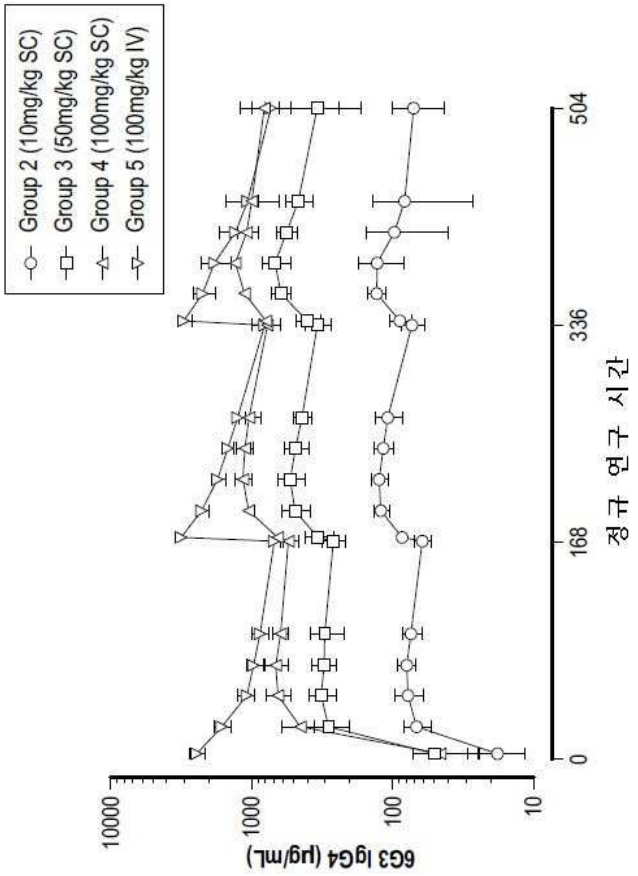
도면16


6G3 IgG4 E003.PTX
Groups 1-3 Average
Group 1 (10mg/kg IV)
Group 2 (10mg/kg SC)
Group 3 (1mg/kg SC)
sBTLA (ng/mL)
1000
100
10
1
0
168
336
504
672
840
정규 연구 시간

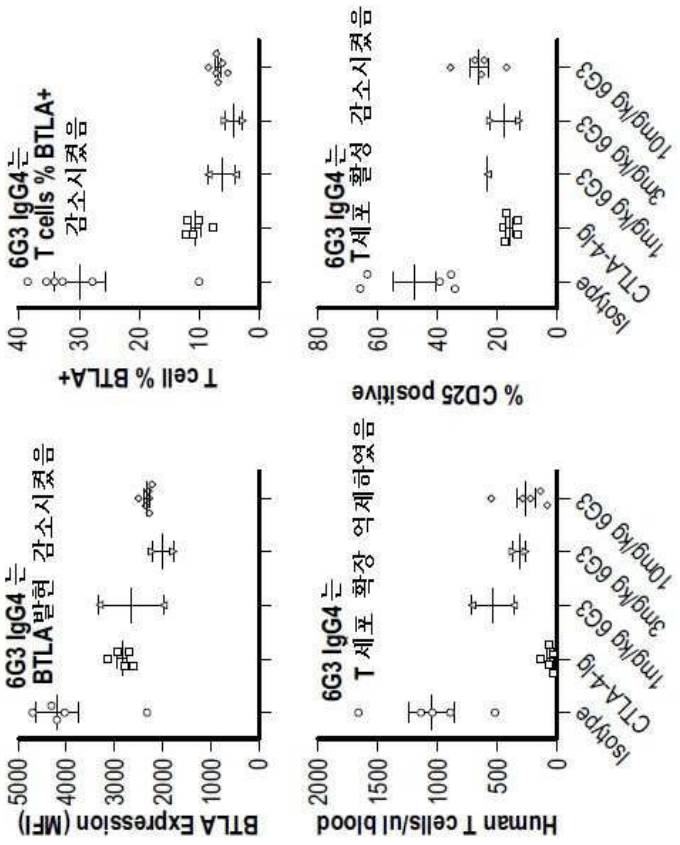
도면17


Group 2 (10mg/kg SC)
Group 3 (50mg/kg SC)
Group 4 (100mg/kg SC)
Group 5 (100mg/kg IV)
Cyno sBTLA (ng/mL)
1000
100
10
0
168
336
504
정규 연구 시간

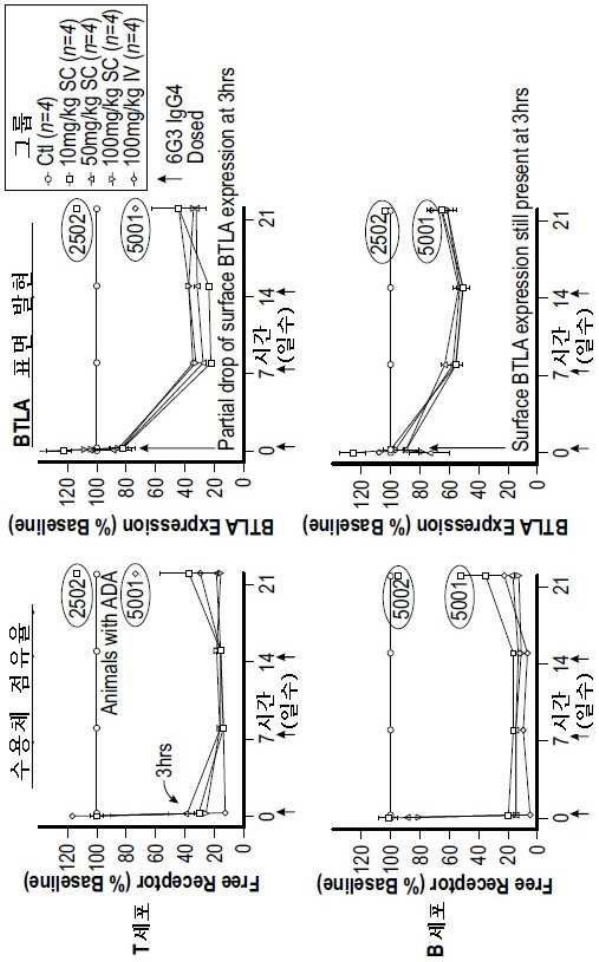
도면18


Group 2 (10mg/kg SC)
Group 3 (50mg/kg SC)
Group 4 (100mg/kg SC)
Group 5 (100mg/kg IV)
6G3 IgG4 (μg/mL)
10000
1000
100
10
0
168
336
504
정규 연구 시간

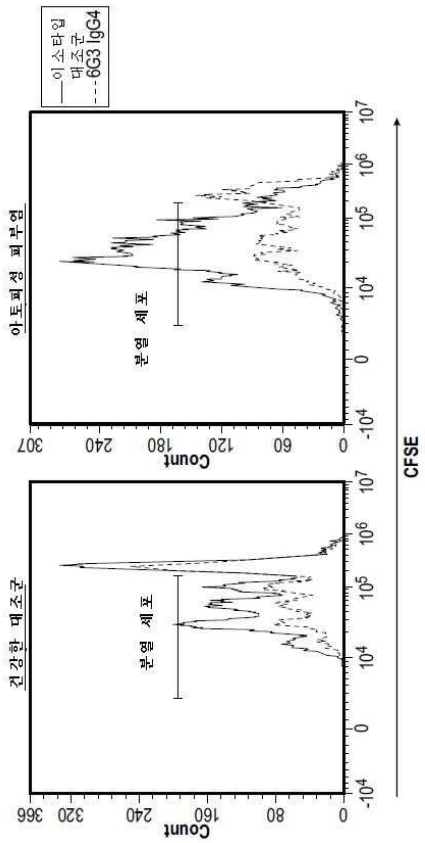
도면19


6G3 IgG4는
T cells % BTLA+
감소시켰음
T cell % BTLA+
6G3 IgG4는
T세포 활성 감소시켰음
% CD25 positive
6G3 IgG4는
BTLA발현 감소시켰음
BTLA Expression (MFI)
6G3 IgG4는
T 세포 확장 억제하였음
Human T cells/ul blood
Isotype
CTLA-4-Ig
1mg/kg 6G3
3mg/kg 6G3
10mg/kg 6G3

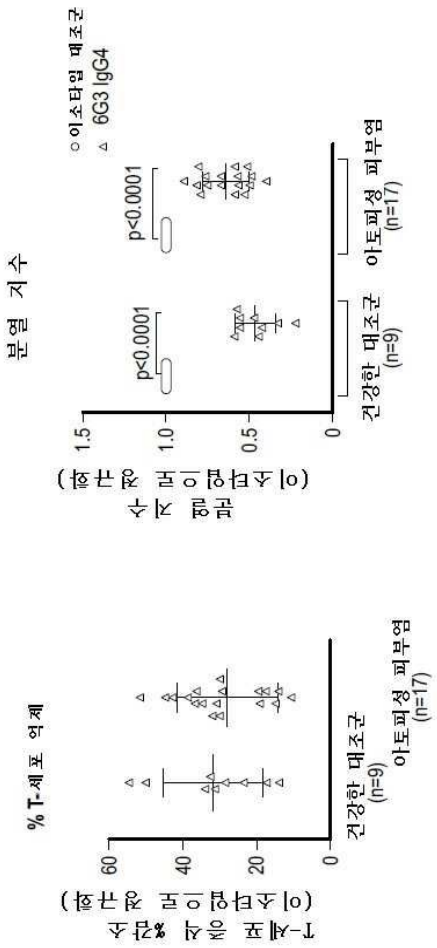
도면20


그룹
Ctl (n=4)
10mg/kg SC (n=4)
50mg/kg SC (n=4)
100mg/kg SC (n=4)
100mg/kg IV (n=4)
6G3 IgG4 Dosed
BTLA 표면 발현
Partial drop of surface BTLA expression at 3hrs
Surface BTLA expression still present at 3hrs
BTLA Expression (% Baseline)
수용체 점유율
Animals with ADA
3hrs
Free Receptor (% Baseline)
7시간 14 21
(일수)
T세포
B세포

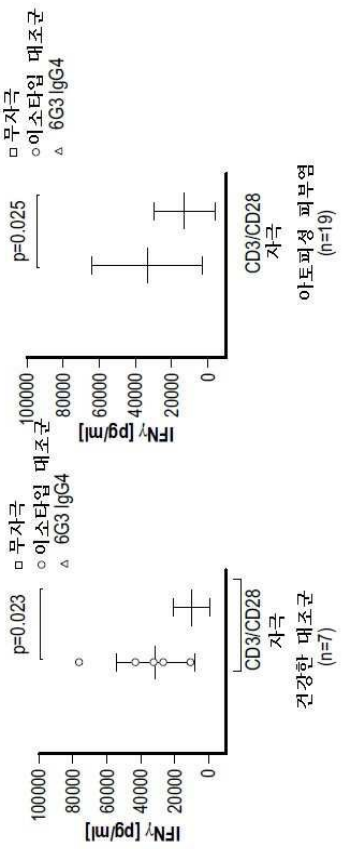
도면21a



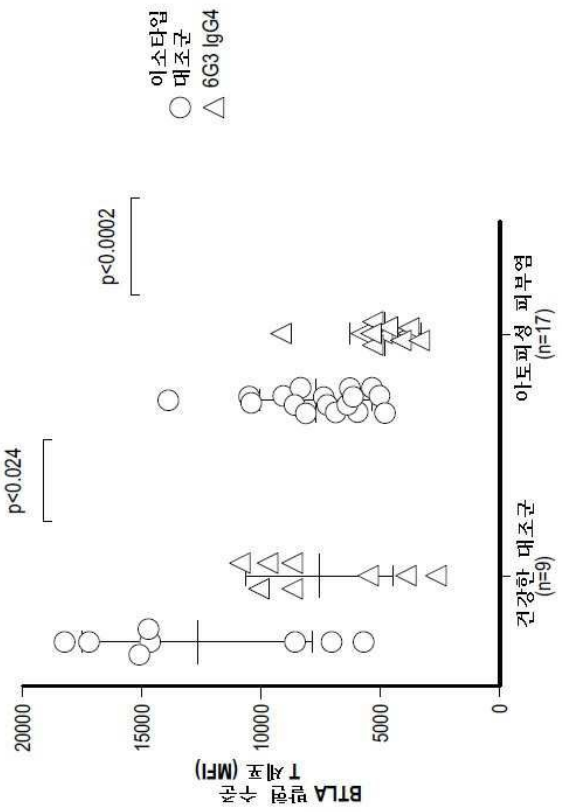
도면21b


분열 지수
이소타입 대조군
6G3 IgG4
p<0.0001
p<0.0001
분열 지수
(이소타입으로 정규화)
1.5
1.0
0.5
0
건강한 대조군
(n=9)
아토피성 피부염
(n=17)
% T-세포 억제
T-세포 증식 %감소
(이소타입으로 정규화)
60
40
20
0
건강한 대조군
(n=9)
아토피성 피부염
(n=17)

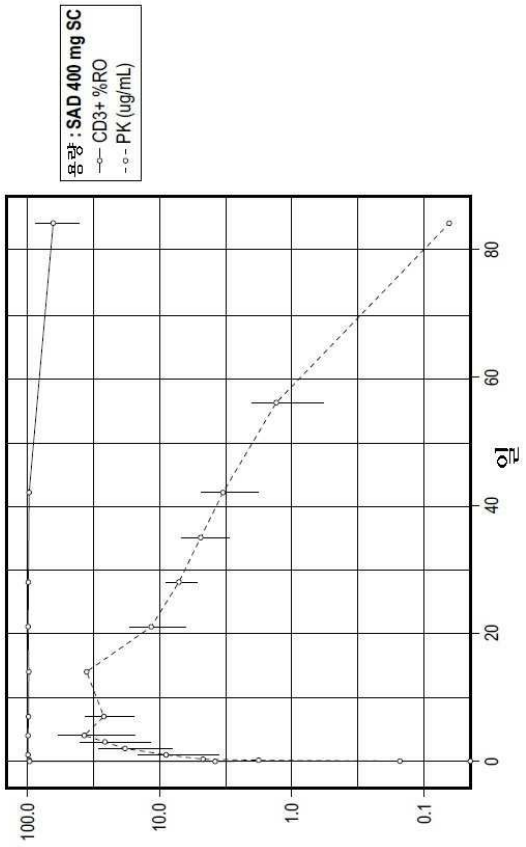
도면21c


□ 무자극
○ 이소타입 대조군
△ 6G3 IgG4
p=0.023
IFNγ [pg/ml]
100000
80000
60000
40000
20000
0
CD3/CD28
자극
건강한 대조군
(n=7)
p=0.025
아토피성 피부염
(n=19)

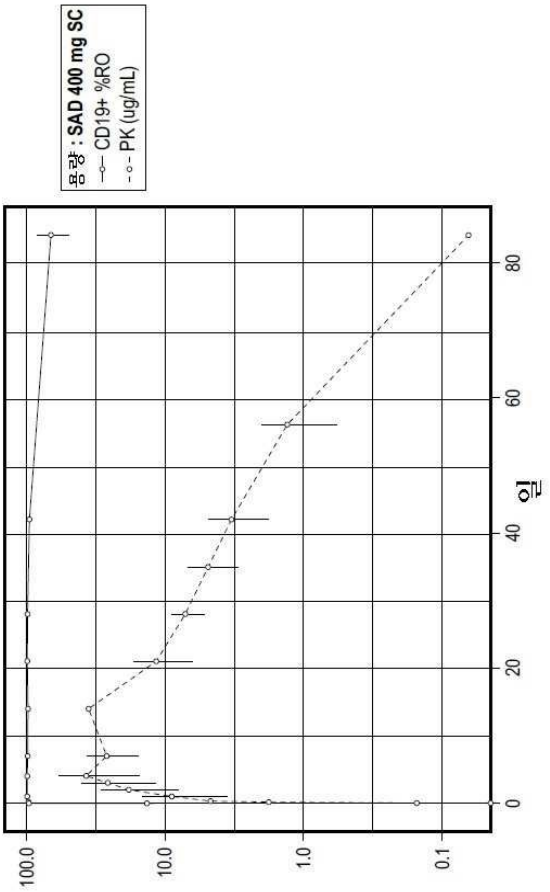
도면21d


이소타입
대조군
△ 6G3 IgG4
p<0.0002
p<0.024
BTLA 발현 수준
T 세포 (MFI)
20000
15000
10000
5000
0
건강한 대조군
(n=9)
아토피성 피부염
(n=17)

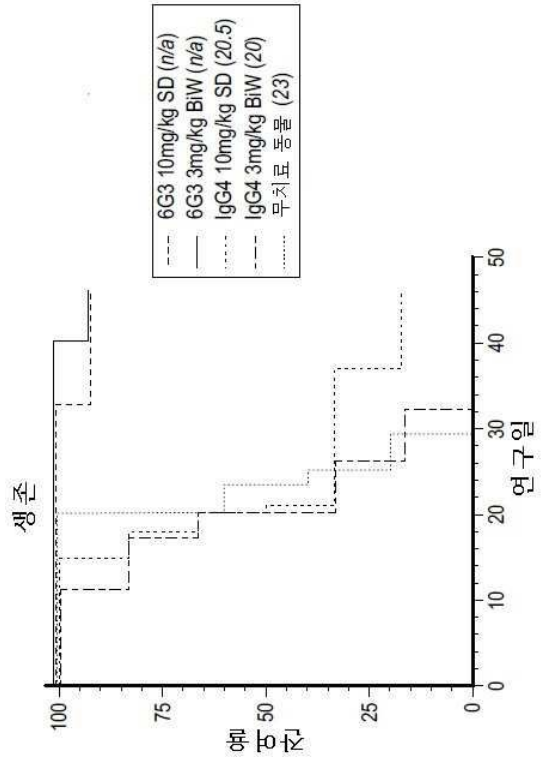
도면22a



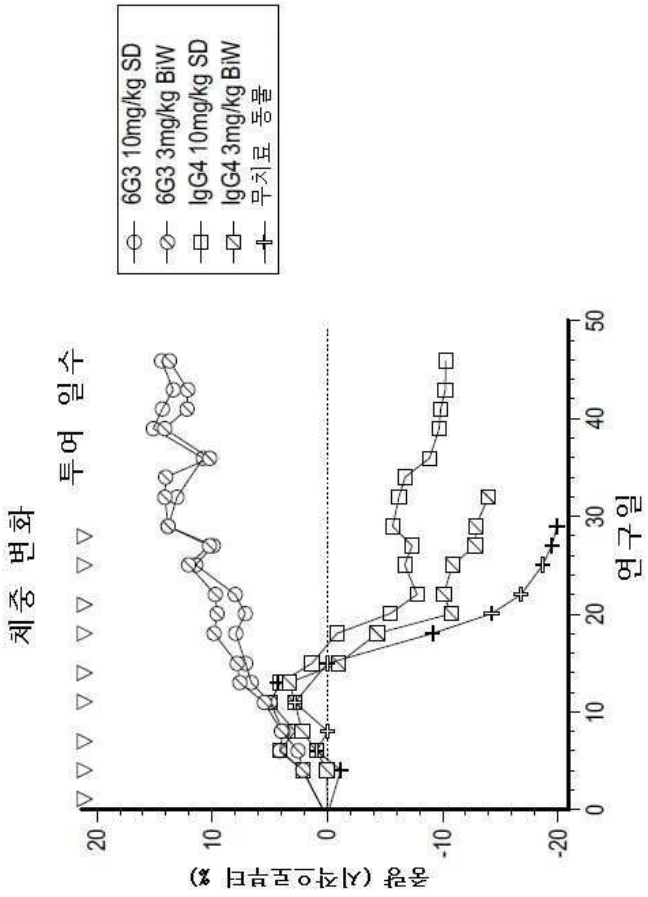
도면22b


용량 : SAD 400 mg SC
CD19+ %RO
PK (ug/mL)
100.0
10.0
1.0
0.1
0
20
40
60
80
일

도면23a


6G3 10mg/kg SD (n/a)
6G3 3mg/kg BiW (n/a)
IgG4 10mg/kg SD (20.5)
IgG4 3mg/kg BiW (20)
무치료 동물 (23)
생존
100
75
50
25
0
0
10
20
30
40
50
연구일

도면23b


6G3 10mg/kg SD
6G3 3mg/kg BiW
IgG4 10mg/kg SD
IgG4 3mg/kg BiW
무치료 동물
체중 변화
투여 일수
종양 (시작으로부터 %)
연구일
20
10
0
-10
-20
0
10
20
30
40
50

*서 열 목 록 (첨부)*



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.