(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년05월29일
(11) 등록번호 10-2669985
(24) 등록일자 2024년05월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/70578 (2013.01)
A61K 38/177 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7002960
(22) 출원일자(국제) 2016년06월29일
심사청구일자 2021년06월29일
(85) 번역문제출일자 2018년01월30일
(65) 공개번호 10-2018-0016618
(43) 공개일자 2018년02월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/040108
(87) 국제공개번호 WO 2017/004213
국제공개일자 2017년01월05일
(30) 우선권주장
62/187,105 2015년06월30일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2006063067 A2*
WO2013074738 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
샌포드 번햄 프레비즈 메디컬 디스커버리 인스티튜트
미국 92037 캘리포니아주 라 졸라 노쓰 토레이 파인스 로드 10901
화이자 인코포레이티드
미국 뉴욕주 10001-2192 뉴욕 허드슨 블러바드 이스트 66
(72) 발명자
웨어 칼 에프.
미국, 캘리포니아 92037, 라 호야, 10901 노스 토레이 파인스 로드
세디 존
미국, 캘리포니아 92037, 라 호야, 10901 노스 토레이 파인스 로드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

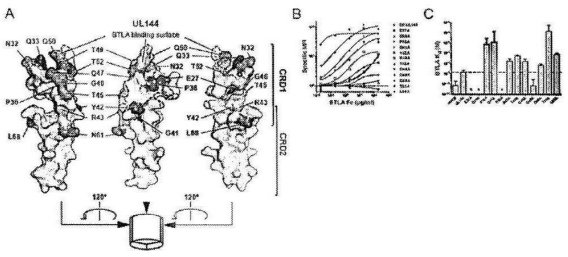
전체 청구항 수 : 총 21 항 심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 **BTLA 융합 단백질 작용제 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 BTLA 작용제 융합 단백질이 면역 반응을 조절한다는 중요한 발견에 기반한다. 특히, 본 발명은 BTLA 증강 BTLA 신호전달에 결합하는 융합 단백질을 제공한다. 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 BTLA 작용제 융합 단백질로 암 및 면역 및 염증성 질환 및 장애를 치료하는 방법을 추가로 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)
C07K 2319/30 (2013.01)
(72) 발명자
아이바지안 티그란
미국, 캘리포니아 92129, 샌 디에고, 13620 프리포트 로드
밀러 브라이언
미국, 캘리포니아 90212, 샌 디에고, 아파트 넘버1425, 7548 샤르망 스트리트
크렐린 나타샤 케이.
미국, 캘리포니아 94070, 샌 카를로스, 27 페퍼 레인

명 세 서

청구범위

청구항 1

비-천연 발생 HVEM(herpesvirus entry mediator, 헤르페스 바이러스 엔트리 매개체) 단백질 및 Fc 단백질을 포함하는 융합 단백질로서, 상기 HVEM 단백질이 HVEM 세포외 도메인을 포함하고, 상기 HVEM 단백질이 각각 서열번호 2를 기준으로, S58R 및 L90A의 변이 또는 S58R, G68T, L70W, 및 L90A의 변이를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 융합 단백질이 BTLA(B and T lymphocyte attenuator, B 및 T 림프구 감쇠제) 작용제인, 융합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, HVEM 단백질이 펩타이드 링커 서열을 통해 Fc 단백질에 융합되는, 융합 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, Fc 단백질이 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4인, 융합 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서, IgG Fc 단백질이 인간 유래인, 융합 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, Fc 단백질이 인간 IgG1 항체의 2개의 중쇄의 제 2 불변 도메인 및 제 3 불변 도메인으로부터 유도된 2개의 동일한 단백질 단편을 포함하는 인간 IgG1 단백질인, 융합 단백질.

청구항 7

제1항에 있어서, HVEM 단백질이 HVEM 신호 서열 및 HVEM 세포외 도메인으로 구성되고, 세포외 도메인은 서열번호 2의 아미노산 39 내지 184로 구성되며, 서열번호 2의 아미노산 39 내지 184가 S58R, G68T, L70W, 및 L90A로 구성된 변이를 함유하는, 융합 단백질.

청구항 8

비-천연 발생 HVEM 단백질 및 Fc 단백질을 포함하는 융합 단백질 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 자가면역 질환을 치료하기 위한 약학 조성물로서, 상기 HVEM 단백질이 HVEM 세포외 도메인을 포함하고, 상기 HVEM 단백질이 각각 서열번호 2를 기준으로, S58R 및 L90A의 변이 또는 S58R, G68T, L70W, 및 L90A의 변이를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 융합 단백질이 BTLA 작용제인, 약학 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, Fc 단백질이 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4인, 약학 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, IgG Fc 단백질이 인간 유래인, 약학 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, Fc 단백질이 인간 IgG1 항체의 2개의 중쇄의 제 2 불변 도메인 및 제 3 불변 도메인으로부터

유도된 2개의 동일한 단백질 단편을 포함하는 인간 IgG1 단백질인, 약학 조성물.

청구항 13

제8항에 있어서, HVEM 단백질이 HVEM 신호 서열 및 HVEM 세포외 도메인으로 구성되고, 세포외 도메인은 서열번호 2의 아미노산 39 내지 184로 구성되며, 서열번호 2의 아미노산 39 내지 184가 S58R, G68T, L70W, 및 L90A로 구성된 변이를 함유하는, 약학 조성물.

청구항 14

제8항에 있어서, 자가면역 질환 또는 장애가 에디슨병(Addison's disease), 근위축성측색경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 크론병(Crohn's disease), 쿠싱 증후군(Cushing's Syndrome), 제1형 당뇨병(diabetes mellitus type 1), 이식편대숙주질환(graft versus host disease), 그레이브스병(Graves' disease), 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 홍반성 낭창(lupus erythematosus), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 건선(psoriasis), 건선성 관절염(psoriatic arthritis), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 유육종증(sarcoidosis), 피부경화증(scleroderma), 전신 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus), 이식거부(transplant rejection), 및 혈관염(vasculitis)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 약학 조성물.

청구항 15

제8항에 있어서, 면역 반응 조절제 또는 화학요법제를 추가로 포함하는, 약학 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 면역 반응 조절제가 에이코사노이드(eicosanoid), 사이토카인(cytokine), 프로스타글란딘(prostaglandin), 인터류킨(interleukin), 케모카인(chemokine), 체크포인트 조절자(checkpoint regulator), TNF 수퍼 패밀리 멤버(TNF superfamily member), TNF 수용체 수퍼 패밀리 멤버(TNF receptor superfamily member) 및 인터페론(interferon)으로 이루어지는 군에서 선택되는, 약학 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서, 면역 반응 조절제가 CXCL-8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL10, IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL15, IL17, IL17, IFN-α, IFN-β, IFN-ε, IFN-ɣ, G-CSF, TNF-α, CTLA4, CD20, PD1, PD1L1, PD1L2, ICOS, CD200, CD52, LTα, LTαβ, LIGHT, CD27L, 41BBL, FasL, Ox40L, April, TL1A, CD30L, TRAIL, RANKL, BAFF, TWEAK, CD40L, EDA1, EDA2, APP, NGF, TNFR1, TNFR2, LTβR, HVEM, CD27, 4-1BB, Fas, Ox40, AITR, DR3, CD30, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, BAFFR, TACI, BCMA, Fn14, CD40, EDAR, XEDAR, DR6, DcR3, NGFR-p75, 및 Taj로 이루어지는 군에서 선택되는, 약학 조성물.

청구항 18

제15항에 있어서, 면역 반응 조절제가 토실리주맙(tocilizumab; Actemra), CDP870 (Cimzia), 에타너셉트(enteracept; Enbrel), 아달리무맙(adalimumab; Humira), 키너렛(Kineret), 아바타셉트(abatacept; Orencia), 인플릭시맙(infliximab; Remicade), 리툭시맙(rituximab; Rituxan), 골리무맙(golimumab; Simponi), 아보넥스(Avonex), 레비프(Rebif), 레시젠(ReciGen), 플레그리디(Plegridy), 베타세론(Betaseron), 코팍손(Copaxone), 노바트론(Novatrone), 나탈리주맙(natalizumab; Tysabri), 핀골리모드(fingolimod; Gilenya), 테리플루노마이드(teriflunomide; Aubagio), BG12, 텍피데라(Tecfidera), 및 알렘투주맙(alemtuzumab; Campath, Lemtrada)으로 이루어지는 군에서 선택되는, 약학 조성물.

청구항 19

제15항에 있어서, 화학요법제가 액티노마이신(Actinomycin), 아자시티딘(Azacitidine), 아자티오프린(Azathioprine), 블레오마이신(Bleomycin), 보르테조밉(Bortezomib), 카보플라틴(Carboplatin), 카페시타빈(Capecitabine), 시스플라틴(Cisplatin), 클로람부실(Chlorambucil), 시클로포스파미드(Cyclophosphamide), 시타라빈(Cytarabine), 다우노루비신(Daunorubicin), 도세탁셀(Docetaxel), 독시플루리딘(Doxifluridine), 독소루비신(Doxorubicin), 에피루비신(Epirubicin), 에포틸론(Epothilone), 에토포시드(Etoposide), 플루오로우라실(Fluorouracil), 겜시타빈(Gemcitabine), 수산화요소(Hydroxyurea), 이다루비신(Idarubicin), 이마티닙

(Imatinib), 이리노테칸(Irinotecan), 메클로레타민(Mechlorethamine), 머캅토퓨린(Mercaptopurine), 메토트렉세이트(Methotrexate), 미톡산트론(Mitoxantrone), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(Paclitaxel), 페메트렉시드(Pemetrexed), 테니포시드(Teniposide), 티오구아닌(Tioguanine), 토포테칸(Topotecan), 발루비신(Valrubicin), 빈블라스틴(Vinblastine), 빈크리스틴(Vincristine), 빈데신(Vindesine), 비노렐빈(Vinorelbine), 파니투무맙(panitumamab), 얼비툭스(Erbitux; cetuximab), 마투주맙(matuzumab), IMC-IIF 8, TheraCIM hR3, 데노수맙(denosumab), 아바스틴(Avastin; bevacizumab), 휴미라(Humira; adalimumab), 허셉틴(Herceptin; trastuzumab), 레미케이드(Remicade; infliximab), 리툭시맙(rituximab), 시나지스(Synagis; palivizumab), 마일로타그(Mylotarg; gemtuzumab, oxogamicin), 랍티바(Raptiva; efalizumab), 티사브리(Tysabri; natalizumab), 제나팍스(Zenapax; dacliximab), 뉴트로스펙(NeutroSpec; Technetium (99mTc) fanolesomab), 토실리주맙(tocilizumab), 프로스타신트(ProstaScint; Indium-Ill labeled Capromab Pendetide), 벡사르(Bexxar; tositumomab), 제발린(Zevalin; yttrium 90에 결합된 ibritumomab tiuxetan(IDEC-Y2B8)), 졸레어(Xolair; omalizumab), 맙테라(MabThera; Rituximab), 레오프로(ReoPro; abciximab), 맙캠퍼스(MabCampath; alemtuzumab), 시뮬렉트(Simulect; basiliximab), 류코스캔(LeukoScan; sulesomab), CEA-Scan(arcitumomab), 벌루마(Verluma; nofetumomab), 파노렉스(Panorex; Edrecolomab), 알렘투주맙(alemtuzumab), CDP 870, 및 나탈리주맙(natalizumab)으로 이루어지는 군에서 선택되는, 약학 조성물.

청구항 20

서열번호 2를 기준으로 변이 S58R, G68T, L70W, 및 L90A를 포함하는 헤르페스 바이러스 엔트리 매개체(herpesvirus entry mediator: HVEM) 단백질.

청구항 21

제20항에 있어서, HVEM 단백질이 HVEM 신호 서열 및 서열번호 2의 아미노산 39 내지 184로 구성되며, 서열번호 2의 아미노산 39 내지 184가 S58R, G68T, L70W, 및 L90A로 구성된 변이를 함유하는, HVEM 단백질.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 연관 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 35 USC §119 (e)에 의거하여 2015년 6월 30일자로 출원된 미국 출원 제 62/187,105 호의 이익을 청구한다. 선행 출원의 개시는 본 출원의 일부로서 고려되며 본원에 이의 내용 전체가 참고로 인용된다.

[0003] 정부 지원

[0004] 본 발명은 국립 보건원 (National Institutes of Health)에 의해 부여된 보조금 번호 R01CA164679에 따른 정부 지원으로 부분적으로 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에 대해 특정 권리를 가지고 있다.

[0005] 서열 목록의 삽입

[0006] 첨부된 서열 목록의 자료는 본원에 참고로 포함된다. 함께 제공되는 서열 목록 텍스트 파일인 BURN1680_1WO_Sequence_Listing은 2016년 6월 29일에 작성되었으며 19kb이다. 이 파일은 Windows OS를 사용하는 컴퓨터에서 Microsoft Word를 사용하여 접근될 수 있다.

[0007] 기술분야

[0008] 본 발명은 일반적으로 융합 단백질에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 BTLA 작용제 융합 단백질의 개발 및 사용 및 면역 반응을 조절하고 질병 및 장애를 치료하기 위한 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0009] 종양 괴사 인자 (TNF) 수용체 헤르페스 바이러스 엔트리 매개체 (herpesvirus entry mediator: HVEM) (TNFRSF14)는 바이러스 병원체에 의한 조작, 및 암 및 자가 면역의 변이를 위한 중심점이다. 인간에서 HVEM은 TNF 슈퍼패밀리 사이토카인, LIGHT 및 림프독소 α, 및 수용체 B 및 T 림프구 감쇠제 (B and T Lymphocyte Attenuator: BTLA) 및 CD160을 포함하는 면역글로불린 패밀리와 상호작용한다. 멤브레인 관련 LIGHT, BTLA 및 CD160은 모두 수용체 관여에 이어 HVEM 하류의 NF-κB 신호전달을 활성화하는 반면 HVEM은 수용체 BTLA 및 CD160을 활성화하여 이웃 세포간에 양방향 신호를 전달한다. HVEM 및 BTLA 또는 CD160을 동시에 발현하는 세포는 입체 장애로 인해 이들 수용체가 세포외 리간드에 접근할 수 없도록 하는 이들 단백질의 세포-내재 복합체를 형성할 수 있다.

[0010] BTLA 매개 저해는 T 세포 및 B 세포의 항원 수용체 신호전달을 포함한 다양한 세포 경로를 조절하는 것으로 나타났다. T 세포에서 BTLA는 SH2 도메인을 포함하는 단백질 티로신 포스파타아제 (SHP)-1 및 2의 활성화를 포함하는 억제 신호전달 경로에 관여하는 것을 처음으로 보였다. 최근에 BTLA는 수지상 세포에서 톨 유사 수용체 신호전달, 및 γδT 세포에서 IL-7 신호전달을 조절하는 것으로 밝혀졌다. 그러나 인간 자연 살해(NK) 세포 에서 HVEM은 또한 인간 거대세포 바이러스 (HCMV)에 대한 숙주 대응 방법으로서 CD160을 통해 세포 용해 및 전 염증 경로를 촉진시킬 수 있다. 또한, 마우스에서의 CD160 결핍을 설명하는 최근의 연구는 NK 세포에서의 프로-염증 기능을 확인하였다.

[0011] 이식편 대 숙주 질환 또는 자가 면역 질환과 같은 면역 매개 병상을 앓고 있는 환자에서 림프구 활성을 억제하도록 고안된 신규 치료법에 대한 큰 미충족 수요가 있다. 많은 종류의 이러한 질병에서 승인된 치료법의 제한된 집합이 있거나 일부 환자는 사용 가능한 치료법에 반응하지 않는다. 신규한 치료법의 매력적인 표적이 면역 질환의 원인인 병원성 림프구에 의해 발현되는 억제 수용체의 작용적 활성화이다. 인간 억제 수용체를 활성화시키기 위해 고안된 항체 기반 치료법을 개발하려는 시도는 동물 모델에서의 유망한 결과에도 불구하고 대부분 실패했다.

발명의 내용

[0012] 본 발명은 BTLA 작용제 융합 단백질이 면역 반응을 조절한다는 중요한 발견에 기반한다. 특히, 본 발명은 BTLA 증강 BTLA 신호전달에 결합하는 융합 단백질을 제공한다. 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 BTLA 작용제 융합 단백질로 암 및 면역 및 염증성 질환 및 장애를 치료하는 방법을 추가로 제공한다.

[0013] 하나의 양태에서, 본 발명은 비-천연 발생 HVEM 단백질 및 Fc 단백질을 포함하는 융합 단백질을 제공하며, 상기 융합 단백질은 HVEM 단백질의 세포외 도메인 및 Fc 단백질을 포함한다. 한 측면에서, 융합 단백질은 BTLA 작용제이다. 또 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이를 포함한다. 추가적인 측면에서, 변이는 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합이다. 한 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 추가로 포함한다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 2개, 3개, 4개 이상의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 포함한다. 특정 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R 및 L90A; S58R 및 G68T; S58R 및 L70W; S58R, L70D 및 L90A; S58R, G68T 및 L90A; S58R, L70W 및 L90A; S58R, G68T, L70D 및 L90A; 또는 S58R, G68T, L70W 및 L90A와 같은 변이 중 적어도 하나를 포함한다. 한 측면에서, Fc 단백질은 IgA, IgG, IgD, IgE 또는 IgM이다. 또 다른 측면에서, Fc 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. 특정 측면에서, IgG Fc 단백질은 인간 유래이다.

[0014] 추가적인 양태에서, 본 발명은 비-천연 발생 HVEM 단백질 및 Fc 단백질과 같은 융합 단백질 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 한 측면에서, 융합 단백질은 BTLA 작용제이다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질의 세포외 도메인 및 Fc 단백질을 포함한다. 또 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이를 포함한다. 추가적인 측면에서, 변이는 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합이다. 추가적인 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 추가로 포함한다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 2개, 3개, 4개 이상의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 포함한다. 특정 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R 및 L90A; S58R 및 G68T; S58R 및 L70W; S58R, L70D 및 L90A; S58R, G68T 및 L90A; S58R, L70W 및 L90A; S58R, G68T, L70D 및 L90A; 또는 S58R, G68T, L70W 및 L90A와 같은 변이 중 적어도 하나를 포함한다. 한 측면에서, Fc 단백질은 IgA, IgG, IgD, IgE 또는 IgM이다. 또 다른 측면에서, Fc 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. 특정 측면에서, IgG Fc 단백질은 인간 유래이다.

[0015] 하나의 실시 양태에서, 본 발명은 비-천연 발생 HVEM 단백질 및 Fc 단백질과 같은 융합 단백질을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하여 BTLA 관련 장애를 치료하는 단계를 포함하는 BTLA 관련 장애의 치료 방법을 제공한다. 한 측면에서, BTLA 관련 장애는 암 또는 자가 면역 질환 또는 장애이다. 추가적인 측면에서, 자가 면역 질환 또는 장애는 에디슨병(Addison's disease), 근위축성측색경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 크론병(Crohn's disease), 쿠싱 증후군(Cushing's Syndrome), 제1형 당뇨병(diabetes mellitus type 1), 이식편대숙주질환(graft versus host disease), 그레이브스병(Graves' disease), 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre

syndrome), 홍반성 낭창(lupus erythematosus), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 건선(psoriasis), 건선성 관절염(psoriatic arthritis), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 유육종증(sarcoidosis), 피부경화증(scleroderma), 전신 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus), 이식거부(transplant rejection), 또는 혈관염(vasculitis)이 있다. 다른 측면에서 암은 전립선, 결장, 복부, 뼈, 유방, 소화계, 간, 췌장, 복막, 내분비선(부신, 부갑상선, 뇌하수체, 정소, 난소, 흉선, 갑상선), 눈, 머리와 목, 신경(중추신경 및 말초신경), 림프계, 골반, 피부, 연조직, 비장, 흉부 또는 비뇨생식관의 암이다. 또 다른 측면에서, BTLA 신호전달이 증가된다. 또 다른 측면에서, 융합 단백질은 BTLA 작용제이다.

[0016] 한 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질의 세포외 도메인 및 Fc 단백질을 포함한다. 추가적인 측면에서, 융합 단백질은 서열번호 2의 아미노산 잔기 39-161 및 Fc 단백질을 포함한다. 또 다른 측면에서, Fc 단백질은 IgA, IgG, IgD, IgE 또는 IgM이다. 특정 측면에서, Fc 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. 특정 측면에서, IgG Fc 단백질은 인간 유래이다. 한 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이를 포함한다. 추가적인 측면에서, 변이는 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합이다. 한 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 추가로 포함한다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 2개, 3개, 4개 이상의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 포함한다. 특정 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R 및 L90A; S58R 및 G68T; S58R 및 L70W; S58R, L70D 및 L90A; S58R, G68T 및 L90A; S58R, L70W 및 L90A; S58R, G68T, L70D 및 L90A; 또는 S58R, G68T, L70W 및 L90A와 같은 변이 중 적어도 하나를 포함한다.

[0017] 한 측면에서, 본 방법은 또한 면역 반응 조절제 또는 화학요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 다른 측면에서, 면역 반응 조절제는 에이코사노이드(eicosanoid), 사이토카인(cytokine), 프로스타글란딘(prostaglandin), 인터류킨(interleukin) 케모카인(chemokine), 체크포인트 조절자(checkpoint regulator), TNF 수퍼 패밀리 멤버(TNF superfamily member), TNF 수용체 수퍼 패밀리 멤버(TNF receptor superfamily member) 및/또는 인터페론(interferon)이다. 추가적인 측면에서, 면역 반응 조절제는 CXCL-8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL10, IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL15, IL17, IL17, IFN-α, IFN-β, IFN-ε, IFN-ɣ, G-CSF, TNF-α, CTLA4, CD20, PD1, PD1L1, PD1L2, ICOS, CD200, CD52, LTα, LTαβ, LIGHT, CD27L, 41BBL, FasL, Ox40L, April, TL1A, CD30L, TRAIL, RANKL, BAFF, TWEAK, CD40L, EDA1, EDA2, APP, NGF, TNFR1, TNFR2, LTβR, HVEM, CD27, 4-1BB, Fas, Ox40, AITR, DR3, CD30, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, BAFFR, TACI, BCMA, Fn14, CD40, EDAR XEDAR, DR6, DcR3, NGFR-p75, 및/또는 Taj다. 특정 측면에서 면역 반응 조절제는 토실리주맙(tocilizumab; Actemra), CDP870 (Cimzia), 에타너셉트(enteracept; Enbrel), 아달리무맙(adalimumab; Humira), 키너렛(Kineret), 아바타셉트(abatacept; Orencia), 인플릭시맙(infliximab; Remicade), 리툭시맙(rituximab; Rituxan), 골리무맙(golimumab; Simponi), 아보넥스(Avonex), 레비프(Rebif), 레시젠(ReciGen), 플레그리디(Plegridy), 베타세론(Betaseron), 코팍손(Copaxone), 노바트론(Novatrone), 나탈리주맙(natalizumab; Tysabri), 핀골리모드(fingolimod; Gilenya), 테리플루노마이드(teriflunomide; Aubagio), BG12, 텍피데라(Tecfidera), 및/또는 알렘투주맙(alemtuzumab; Campath, Lemtrada)이다.

[0018] 추가적인 측면에서, 화학요법제는 액티노마이신(Actinomycin), 아자시티딘(Azacitidine), 아자티오프린(Azathioprine), 블레오마이신(Bleomycin), 보르테조밉(Bortezomib), 카보플라틴(Carboplatin), 카페시타빈(Capecitabine), 시스플라틴(Cisplatin), 클로람부실(Chlorambucil), 시클로포스파미드(Cyclophosphamide), 시타라빈(Cytarabine), 다우노루비신(Daunorubicin), 도세탁셀(Docetaxel), 독시플루리딘(Doxifluridine), 독소루비신(Doxorubicin), 에피루비신(Epirubicin), 에포틸론(Epothilone), 에토포시드(Etoposide), 플루오로우라실(Fluorouracil), 겜시타빈(Gemcitabine), 수산화요소(Hydroxyurea), 이다루비신(Idarubicin), 이마티닙(Imatinib), 이리노테칸(Irinotecan), 메클로레타민(Mechlorethamine), 머캅토퓨린(Mercaptopurine), 메토트렉세이트(Methotrexate), 미톡산트론(Mitoxantrone), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(Paclitaxel), 페메트렉시드(Pemetrexed), 테니포시드(Teniposide), 티오구아닌(Tioguanine), 토포테칸(Topotecan), 발루비신(Valrubicin), 빈블라스틴(Vinblastine), 빈크리스틴(Vincristine), 빈데신(Vindesine), 비노렐빈(Vinorelbine), 파니투무맙(panitumamab), 얼비툭스(Erbitux; cetuximab), 마투주맙(matuzumab), IMC-IIF 8, TheraCIM hR3, 데노수맙(denosumab), 아바스틴(Avastin; bevacizumab), 휴미라(Humira; adalimumab), 허셉틴(Herceptin; trastuzumab), 레미케이드(Remicade; infliximab), 리툭시맙(rituximab), 시나지스(Synagis; palivizumab), 마일로타그(Mylotarg; gemtuzumab, oxogamicin), 랍티바(Raptiva; efalizumab), 티사브리(Tysabri; natalizumab), 제나팍스(Zenapax; dacliximab), 뉴트로스펙(NeutroSpec; Technetium (99mTc)

fanolesomab), 토실리주맙(tocilizumab), 프로스타신트(ProstaScint; Indium-111 labeled Capromab Pendetide), 벡사르(Bexxar; tositumomab), 제발린(Zevalin; ibritumomab, tiuxetan(IDEC-Y2B8), yttrium 90이 결합됨), 졸레어(Xolair; omalizumab), 맙테라(MabThera; Rituximab), 레오프로(ReoPro; abciximab), 맙캠퍼스(MabCampath; alemtuzumab), 시뮬렉트(Simulect; basiliximab), 류코스캔(LeukoScan; sulesomab), CEA-Scan(arcitumomab), 벌루마(Verluma; nofetumomab), 파노렉스(Panorex; Edrecolomab), 알렘투주맙(alemtuzumab), CDP 870, 및/또는 나탈리주맙(natalizumab)이다. 한 측면에서, ERK1/2 및/또는 ZAP70/Syk의 인산화가 감소된다. 다른 측면에서, 전체 세포 인산화 및 SHP2의 인산화가 유도된다.

[0019] 추가적인 양태에서, 본 발명은 비-천연 발생 HVEM 단백질 및 Fc 단백질과 같은 융합 단백질을 대상에게 투여하여 면역 반응을 조절하는 단계를 포함하는, 환자에서 면역 반응 조절 방법을 제공한다. 한 측면에서, 융합 단백질은 BTLA 작용제이다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질의 세포외 도메인 및 Fc 단백질을 포함한다. 또 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이를 포함한다. 추가적인 측면에서, 변이는 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합이다. 추가적인 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 추가로 포함한다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 2개, 3개, 4개 이상의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 포함한다. 특정 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R 및 L90A; S58R 및 G68T; S58R 및 L70W; S58R, L70D 및 L90A; S58R, G68T 및 L90A; S58R, L70W 및 L90A; S58R, G68T, L70D 및 L90A; 또는 S58R, G68T, L70W 및 L90A와 같은 변이 중 적어도 하나를 포함한다. 한 측면에서, Fc 단백질은 IgA, IgG, IgD, IgE 또는 IgM이다. 또 다른 측면에서, Fc 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. 특정 측면에서, IgG Fc 단백질은 인간 유래이다. 한 측면에서, BTLA 신호전달이 증가된다. 다른 측면에서, ERK1/2 및/또는 ZAP70/Syk의 인산화가 감소된다. 부가적인 측면에서, 전체 세포 인산화 및 SHP2의 인산화가 유도된다. 추가적인 측면에서, 대상는 BTLA 관련 질환 또는 장애를 갖는다. 특정 측면에서, BTLA 관련 질환은 암 또는 자가면역 질환 또는 장애이다.

[0020] 하나의 양태에서, 본 발명은 BTLA 발현 세포를 비-천연 HVEM 단백질 및 Fc 단백질과 같은 융합 단백질과 접촉하여 BTLA 신호전달을 조절하는 단계를 포함하는, 세포에서 BTLA 신호전달을 조절하는 방법을 제공한다. 하나에서는 BTLA 신호전달이 증가된다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질의 세포외 도메인 및 Fc 단백질을 포함한다. 또 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이를 포함한다. 추가적인 측면에서, 변이는 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합이다. 추가적인 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 추가로 포함한다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 2개, 3개, 4개 이상의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 포함한다. 특정 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R 및 L90A; S58R 및 G68T; S58R 및 L70W; S58R, L70D 및 L90A; S58R, G68T 및 L90A; S58R, L70W 및 L90A; S58R, G68T, L70D 및 L90A; 또는 S58R, G68T, L70W 및 L90A와 같은 변이 중 적어도 하나를 포함한다. 한 측면에서, Fc 단백질은 IgA, IgG, IgD, IgE 또는 IgM이다. 또 다른 측면에서, Fc 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. 특정 측면에서, IgG Fc 단백질은 인간 유래이다. 한 측면에서, ERK1/2 및/또는 ZAP70/Syk의 인산화가 감소된다. 다른 측면에서, 전체 세포 인산화 및 SHP2의 인산화가 유도된다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1A-C는 UL144의 BTLA 결합 표면의 동정을 나타낸다. 도 1A는 변이된 표면 잔기를 나타내는 인간 CMV UL144의 이미지를 나타낸다. 도 1B는 표시된 UL144 변이에 대한 결합 곡선을 나타낸다. 도 1C는 UL144 단백질에 결합하는 BTLA-Fc의 Kd를 나타낸다.

도 2A-H는 인간 림프종에서 HVEM-리간드 결합 변이체의 동정을 나타낸다. 도 2A는 변이된 표면 잔기를 나타내는 인간 HVEM의 이미지를 나타낸다. 도 2B는 LIGHT로 형질 도입된 세포에서의 HVEM 결합을 나타낸다. 도 2C는 BTLA-Fc로 형질 도입된 세포에서의 HVEM 결합을 나타낸다. 도 2D는 CD160-Fc로 형질 도입된 세포에서의 HVEM 결합을 나타낸다. 그림 2E는 HVEM 변이 단백질에 결합한 LIGHT의 Kd를 보여준다. 도 2F는 HVEM 변이 단백질에 결합하는 BTLA-Fc의 Kd를 나타낸다. 도 2G는 HVEM 변이 단백질에 결합하는 CD160-Fc의 Kd를 나타낸다. 그림 2H는 하나의 DLBCL 샘플을 나타내는 각 컬럼을 가지는 개별 DLBCL 생검의 집합을 나타낸다.

도 3A-E는 HVEM 및 UL144가 BTLA의 동일한 표면에 결합함을 나타낸다. 도 3A는 BTLA의 두 이미지를 나타낸다.

도 3B는 인간 HVEM-Fc의 주사 후의 대표적인 흔적을 나타낸다. 도 3C는 인간 CMV UL144-Fc의 주사 후의 대표적인 흔적을 나타낸다. 도 3D는 BTLA로 형질 도입된 BJAB 세포가 항-BTLA와 함께 배양된 다음 HVEM-Fc로 염색된 것을 나타낸다. 도 3E는 BTLA로 형질 도입된 BJAB 세포를 나타내며, 항-BTLA와 함께 배양한 후 인간 CMV UL144-Fc로 염색하였다.

도 4A-C는 CD160이 BTLA의 HVEM 활성화를 제한한다는 것을 나타낸다. 도 4A-C는 표시된 HVEM 리간드로 형질 도입된 JTAg 세포를 나타내며, Fc 단백질을 포함하거나 포함하지 않는 항-CD3에 결합된 마이크로스피어로 배양하였다. 도 4A는 포스포-ERK1/2 (T202/Y204)에 대해 염색된 세포를 나타낸다. 도 4B는 포스포-ZAP70/Syk (Y319/Y352)에 대해 염색된 세포를 나타낸다. 도 4C는 포스포-티로신에 대해 염색된 세포를 나타낸다.

도 5A-B는 IL-2 신호전달을 억제하는 선택적 BTLA 작용제를 나타낸다. 도 5A는 포스포-JAK1, 포스포-STAT5 및 액틴의 전체 세포 추출물의 웨스턴 블롯을 나타낸다. 도 5B는 액틴에 대해 정규화된 밴드 강도의 정량을 나타내는 그래프이다.

도 6A-C는 새로운 변이 HVEM이 ZAP70/Syk 활성화를 억제함을 보여준다. 도 6A-C는 Fc 단백질이 있거나 없는 항-CD3에 결합된 마이크로스피어로 배양된 HVEM 리간드로 형질 전환된 JTAg 세포를 나타낸다. 도 6A는 포스포-ERK1/2 (T202/Y204)에 대한 염색을 보여준다. 도 6B는 포스포-ZAP70/Syk (Y319/Y352)에 대한 염색을 도시한다. 도 6C는 포스포-SHP2 (Y542)에 대한 염색을 보여준다.

도 7A-E는 BTLA에 대한 UL144 결합에 영향을주는 변이를 나타낸다. 도 7A는 인간 HVEM 및 인간 CMV UL144의 세포외 도메인을 나타낸다. 도 7B는 항-UL144 (2F11)로 염색된 야생형 또는 변이된 인간 CMV UL144로 형질 도입된 293T 세포의 히스토그램을 나타낸다. 도 7C는 야생형 또는 변이된 인간 CMV UL144 또는 LIGHT로 염색된 HVEM으로 형질 감염된 293T 세포를 나타낸다. 도 7D는 야생형 또는 변이된 인간 CMV UL144 또는 BTLA-Fc로 염색된 HVEM으로 형질 도입된 293T 세포를 나타낸다. 도 7E는 야생형 또는 변이된 인간 CMV UL144 또는 CD160-Fc로 염색된 HVEM으로 형질 도입된 293T 세포를 나타낸다.

도 8A-B는 인간 림프종에서의 HVEM-리간드 결합 변이체의 동정을 나타낸다. 도 8A는 인간 FL 및 DLBCL 생검에서 관찰된 TNFRSF14 변이(도트)의 요약을 나타낸다. 도 8B는 항-HVEM으로 염색된 야생형 또는 변이된 인간 HVEM으로 형질 도입된 293T 세포를 나타낸다.

도 9A-F는 HVEM 및 UL144가 BTLA의 동일한 표면에 결합하는 것을 나타낸다. 도 9A는 항-BTLA를 갖는 6F4, J168 또는 MIH26의 특이적 MFI 염색을 나타낸다. 도 9B는 HVEM-Fc 또는 UL144-Fc로 특이적 MFI 염색을 나타낸다. 도 9C는 BTLA 단독 또는 HVEM 또는 HVEM-Fc로 염색된 인간 CMV UL144와 함께 형질 감염된 293T 세포를 나타낸다. 도 9D는 BTLA 단독으로 또는 CMV UL144-Fc로 염색된 HVEM 또는 인간 CMV UL144와 함께 형질 감염된 293T 세포를 나타낸다. 도 9E는 BTLA-Fc로 염색된 HVEM으로 형질 감염된 293T 세포를 나타낸다. 도 9F는 BTLA-Fc로 염색된 HVEM 인간 CMV UL144로 형질 감염된 293T 세포를 나타낸다.

도 10A-B는 CD160이 BTLA의 HVEM 활성화를 제한한다는 것을 나타낸다. 도 10A는 표시된 HVEM 리간드 또는 항-인간 BTLA (상), 항-인간 CD160 (중), 또는 종 특이적 2차에 이은 HVEM-Fc (하)로 염색된 대조 벡터로 형질 도입된 JTAg 세포를 나타낸다. 도 10B는 세포내 염색 전에 적정된 Fc 단백질을 갖거나 갖지 않은 항-IgM에 결합된 마이크로스피어를 배양한 BJAB 세포를 나타낸다.

도 11A-C는 IL-2 신호전달을 억제하는 선택적인 BTLA 작용제를 나타낸다. 도 11A는 표시된 Fc 단백질로 전처리한 PBMC에서 CD19 + B 세포, CD4 + 및 CD8 + T 세포, CD3 + CD56 + 세포, CD56dim 및 CD56bright NK 세포에서 CD69 발현 백분율을 보여주는 그래프이다. 도 11B는 적정된 IL-2로 자극된 NK92 세포의 웨스턴 블롯을 나타낸다. 도 11C는 적정된 IFN-β로 자극된 NK92 세포의 웨스턴 블롯을 나타낸다.

도 12A-B는 새로운 변이 HVEM이 ZAP70/Syk 활성화를 억제한다는 것을 나타낸다. 도 12A-B는 표시된 HVEM 리간드로 형질 도입된 JTAg 세포가 Fc 단백질을 포함하거나 포함하지 않는 항-CD3에 결합된 마이크로스피어와 함께 배양된 것을 나타낸다. 도 12A는 포스포-NF-κB에 대한 염색을 나타낸다. 도 12B는 포스포-티로신에 대한 염색을 나타낸다.

도 13A-G는 다양한 병원체 관련 및 새롭게 생체 공학적으로 제조된 HVEM 뮤테인 BTLA 작용제가 T 세포 신호전달을 억제함을 나타낸다. 표시된 HVEM 리간드로 형질 도입된 JTAg 세포를 Fc 단백질이 있거나 없는 항-CD3에 결합된 마이크로스피어와 함께 배양하였다. 도 13A-B는 포스포-ERK1/2 (T202/Y204)에 대한 염색을 나타낸다. 도 13C는 포스포-NF-κB p65 (S529)에 대한 염색을 나타낸다. 도 13D는 포스포-BTK/ITK (Y551/Y511)에 대한 염색을 나타낸다. 도 13E는 포스포-PC1γ1 (Y783)에 대한 염색을 나타낸다. 도 13F는 포스포-ZAP70/Syk (Y319/Y352)에

대한 염색을 나타낸다. 도 13G는 포스포-티로신에 대한 염색을 나타낸다.

도 14A-B는 BTLA 작용제가 B 세포 신호전달을 억제한다는 것을 나타낸다. BJAB 세포는 적정 된 Fc 단백질을 갖거나 갖지 않는 항-IGM과 결합된 마이크로스피어와 함께 배양되었다. 도 14A는 10분 동안 배양하는 것을 나타낸다. 도 14B는 60분 동안 배양하는 것을 나타낸다.

도 15A-D는 BTLA 작용제가 B 세포의 인터페론 활성화를 억제한다는 것을 나타낸다. 인간 B 세포는 면역글로불린 또는 BTLA 작용제 융합 단백질을 제어하는 마이크로스피어의 존재하에 인터페론-β로 자극된다. 도 15A는 HVEM-Fc 결합 마이크로스피어를 나타낸다. 도 15B는 UL144 Fc 결합 마이크로스피어를 나타낸다. 도 15C는 HVEMR109 Fc 결합 마이크로스피어를 나타낸다. 도 15d는 HVEMRTWA Fc 결합 마이크로스피어를 도시한다.

도 16A-B는 선택적 BTLA 작용제가 NK 세포에서 IL-2 신호전달을 제한한다는 것을 나타낸다. 도 16A는 포스포-JAK1, 포스포-STAT5 및 액틴의 전체 세포 추출물의 웨스턴 블롯을 나타낸다. 도 16B는 액틴에 정규화된 밴드 강도의 정량화 그래프를 나타낸다.

도 17A-C는 마우스 HVEM에서 리간드 선택성의 확인을 나타낸다. LIGHT (BTLA/CD160-sp) 또는 BTLA 및 CD160 (LIGHT-sp)에 대한 결합을 차단한 변이형을 포함하는 HVEM-Fc 뮤테인은 293T 세포에 적정되었다. 도 17A는 CD160으로 형질 감염된 세포를 나타낸다. 도 17B는 마우스 BTLA로 형질 감염된 세포를 나타낸다. 도 17C는 마우스 LIGHT로 형질 감염된 세포를 나타낸다.

도 18A-C는 선택적 HVEM-Fc가 생체 내에서 피부 염증을 억제한다는 것을 나타낸다. 마우스 HVEM-Fc 뮤테인은 피부 염증의 모델로서 이미퀴모드 처리된 동물에게 복강 내 주사되었다. 도 18A는 조직학적 분석을 나타낸다. 도 18B-C는 표피 두께를 나타낸다.

도 19A-B는 인간 HVEM에 대한 핵산 및 아미노산 서열을 나타낸다. 도 19a는 인간 HVEM의 핵산 서열을 나타낸다. 도 19B는 인간 HVEM의 아미노산 서열을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 BTLA 작용제 융합 단백질이 면역 반응을 조절한다는 중요한 발견에 기반한다. 특히, 본 발명은 BTLA 증강 BTLA 신호전달에 결합하는 융합 단백질을 제공한다. 본 발명은 또한 본원에 기재된 바와 같은 BTLA 작용제 융합 단백질로 암 및 면역 및 염증성 질환 및 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 조성물 및 방법이 기술되기 전에, 본 발명은 기술된 특정 조성물, 방법 및 실험 조건에 제한되지 않으며, 그러한 조성물, 방법 및 조건은 다양할 수 있음을 이해해야 한다. 본 명세서에 사용된 용어는 특정 실시예를 설명하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구 범위에 한정되기 때문에 제한하려는 것이 아님을 이해해야 한다.

[0024] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사한 또는 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 이제 기술된다. 하기에 기술된 정의는 본 개시의 이해를 위한 것이지만, 당업자가 보유한 용어의 이해를 결코 대체하지 않는 것으로 간주되어야한다.

[0025] 본 명세서 및 첨부된 청구의 범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 명확하게 달리 지시하지 않는 한 복수 인용 문헌을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "방법"에 대한 언급은 하나 이상의 방법 및/또는 본 개시를 읽을 때 당업자에게 명백해질 본원에 기술된 유형의 단계를 포함한다.

[0026] 항체는 통상적으로 두 개의 동일한 경(L)쇄 및 두 개의 동일한 중(H)쇄로 이루어진 약 150,000 달톤의 이종사량체 (heterotetrameric) 당 단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 공유결합인 이황화 결합에 의해 중쇄에 연결되어 있는 반면, 이황화결합의 수는 다른 면역글로불린 아이소타입의 중쇄에 따라 다양하다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격된 사슬 내 이황화 다리를 갖는다. 각 중쇄는 한쪽 끝에 가변 도메인 (VH)이 이어지고 그 다음에 다수의 불변 도메인이 있다. 각 경쇄는 한쪽 끝에 가변 도메인 (VL)을, 다른 쪽 끝에 고정 도메인을 가지고 있다. 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제 1 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성한다고 여겨진다. 각 가변 영역은 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 초가변 영역 (hypervariable region)이라고 불리는 3 개의 세그먼트를 포함하고 가변 도메인의 더욱 고도로 보존된 부분을 프레임워크 영역 (FR)이라 칭한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 도메

인은 각각 루프를 형성하고 β-시트 구조의 일부를 형성하는 3 개의 CDR로 연결된 4 개의 FR 영역을 포함하며, 주로 β-시트 배열을 채택한다. 각 사슬 내의 CDR은 FR에 의해 근접하여 함께 유지되고, 다른 사슬의 CDR과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다. 불변 도메인은 항체와 항원의 결합에 직접적으로 관여하지는 않지만, 항체 의존성 세포의 세포독성에서 항체의 참여와 같은 다양한 작동기 기능을 나타낸다.

[0027] 그의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 상이한 부류에 할당될 수 있다. IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 5 가지 주요 부류의 면역글로불린이 있으며, 이들 중 몇 개는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2와 같은 하위 부류 (아이소타입)로 더 분류될 수 있다. 면역글로불린의 다른 부류에 해당하는 중쇄 불변 도메인을 각각 α, δ, ε, γ 및 μ라고 부른다. 면역글로불린의 상이한 부류의 서브유닛 구조 및 3 차원 배치는 잘 알려져있다.

[0028] 항체의 Fc 영역은 세포 표면 수용체 및 보체 시스템의 일부 단백질과 상호 작용하는 항체의 꼬리 영역이다. 이 특성은 항체가 면역계를 활성화시키는 것을 허용한다. IgG, IgA 및 IgD 항체 아이소타입에서, Fc 영역은 항체의 2개의 중쇄의 제 2 및 제 3 불변 도메인으로부터 유도된 2개의 동일한 단백질 단편으로 구성된다; IgM 및 IgE Fc 영역은 각 폴리펩티드 사슬에서 3개의 중쇄 불변 도메인 (CH 도메인 2-4)을 포함한다. IgG의 Fc 영역은 고도로 보존된 N- 글리코실화 부위를 갖는다. Fc 단편의 글리코실화는 Fc 수용체-매개 활성에 필수적이다. 이 부위에 부착된 N-글리칸은 주로 복합체 형태의 코어-푸코실화 이중막 구조이다. 또한 소량의 N-글리칸은 GlcNAc와 α-2,6가 결합된 시알산 잔기를 양분한다.

[0029] 본원에 사용된 용어 "항체"는 2개 이상의 손상되지 않은 항체로부터 형성된 무손상 단클론 항체, 다클론 항체, 다중 특이성 항체 (예: 이중 특이성 항체) 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 의미한다.

[0030] "항체 단편"은 손상되지 않은 항체의 일부, 바람직하게는 손상되지 않은 항원의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fc, Fab, Fab', F(ab')2 및 Fv 단편; 디아바디 (diabody), 트리바디 (tribody) 등; 선형 항체; 단쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0031] 본원에서 사용된 용어 "단클론 항체"는 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭한다. 즉, 모집단을 포함하는 개개의 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 변이를 제외하고 동일하다. 단클론 항체는 매우 특이적이며 단일 항원 부위에 대해 지시됩니다. 또한 각 단클론 항체는 항원상의 단일 결정 인자에 대해 지시된다. 그들의 특이성 이외에, 단클론 항체는 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않은 혼성세포 배양에 의해 합성된다는 점에서 유리하다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 단클론 항체는 혼성세포, 재조합 DNA 방법 또는 파지 항체 라이브러리로부터 분리하여 제조할 수 있다.

[0032] 용어 "융합 분자"및 "융합 단백질"은 상호 교환 가능하게 사용되며, 생물학적으로 활성인 폴리펩타이드, 예를 들어 HVEM 또는 항체 또는 그의 단편 (예를 들어, Fc 영역)을 지칭하며, 다른 작동기 분자를 추가로 포함하거나 포함하지 않고, 통상적으로 재조합, 화학적 또는 기타 적절한 방법에 의해 공유 결합된 (즉, 융합된) 단백질 또는 펩타이드 서열을 포함한다. 원할 경우, 융합 분자는 펩타이드 링커 서열을 통해 하나 또는 다수의 부위에서 융합될 수 있다. 또는, 펩타이드 링커는 융합 분자의 형성을 돕기 위해 사용될 수 있다. 특히 바람직한 융합 분자는 융합 단백질이다. 일반적으로 융합 분자는 또한 공액 분자를 포함할 수 있다.

[0033] Fc-융합 단백질 (Fc 키메라 융합 단백질, Fc-Ig, Ig-기반 키메라 융합 단백질 및 Fc-태그 단백질로도 알려짐)은 관심있는 펩타이드 또는 단백질에 유 전적으로 결합된 IgG의 Fc 도메인으로 구성된다. Fc-융합 단백질은 *in vivo* 및 *in vitro* 연구에 유용한 시약이 되었다.

[0034] Fc-융합된 결합 파트너는 단일 펩타이드부터 세포 표면 수용체와의 결합시 활성화되는 리간드, 신호 분자, 이합체화 시에 활성화되는 수용체의 세포외 도메인 또는 단백질 마이크로어레이 내 결합 파트너 식별에 사용된 미끼 단백질이 있다.

[0035] 생체 내에서 Fc 도메인의 가장 중요한 특징 중 하나는 바이오 치료 약물에 대해 개선된 치료 효능을 나타내는 관심 단백질의 혈장 반감기를 극적으로 연장시킬 수 있다는 것이다. 이는 Fc-융합 단백질을 매력적인 바이오 치료제로 만든 특성이다.

[0036] Fc 융합 단백질은 Fc 융합 단백질 및 약학적으로 허용가능한 담체 부형제 또는 담체를 포함하는 약학 조성물의 일부일 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 당업계에 공지되어있다 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)). 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 용량 및 농도에서 수용자에게 비독성이며, 인산염, 시트르산 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제(옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤

즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저 분자량 (약 10 잔기 미만) 폴리 펩타이드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피 롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 단당류, 이당류 및 포도당, 만노오스 또는 덱스트린을 비롯한 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 자당, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염-형성 반대 이온; 금속 복합체 (예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 TWEENTM, PLURONICSTM 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 비이온성 계면 활성제를 포함한다.

[0037] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역 반응을 조절하는"은 면역 반응을 강화 또는 억제하는 것을 의미한다. 일부 측면에서, 본 발명의 융합 단백질은 면역 반응을 억제 또는 감소시킨다.

[0038] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "BTLA 신호전달을 조절하는"은 BTLA 신호전달을 증가 또는 감소시키는 것을 지칭한다. 일부 측면에서, 본 발명의 융합 단백질은 BTLA 신호전달을 증가시킨다.

[0039] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하는" 또는 "치료" 또는 "완화"는 대상의 병리학적 상태 또는 장애를 예방 또는 감속(감소)시키는 치료적 치료, 예방 및/또는 예방 조치를 의미한다. 치료가 필요한 대상은 이미 장애가 있는 대상과 장애를 가지기 쉬운 대상 또는 장애가 예방되어야 하는 대상을 포함한다.

[0040] 본원에 사용 된 용어 "치료제"는 환자 또는 대상에게 투여될 때 원하는 치료 효과를 유도할 수 있는 화합물 또는 조성물을 포함한다. 본 발명의 치료제의 예는 BTLA 작용제 융합 단백질이다.

[0041] 본원에 사용된 바와 같이, 질환을 치료하는데 사용되는 약물의 "유효량"또는 "치료학적 유효량"이란 용어는 질환의 중증도를 줄이거나, 질병 또는 그 치료와 관련된 하나 이상의 증상의 중증도를 줄이거나, 치료된 상태에 따라 어떤 빈도로 발생할 수 있는 더 심각한 증상 또는 더 심각한 질병의 발병을 늦출 수 있는 양이다. "유효량"은 명시된 목적과 관련하여 경험적으로 그리고 일상적인 방식으로 결정될 수 있다.

[0042] 치료제는 대상을 치료하기 위해 국소, 비경구, 피하, 복강내, 폐내, 비강내, 정맥내 및/또는 병변내 투여를 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있다. 그러나, 예시적인 양태에서, 치료제는 액체, 크림, 겔, 연고, 거품 스프레이 등의 형태와 같은 국소 도포용으로 제형화된다

[0043] 본원에서 사용된 용어 "BTLA 관련 장애" 또는 "BTLA 관련 질환"은 BTLA 작용제 융합 단백질로 치료함으로써 이익을 얻는 임의의 상태를 의미한다. BTLA 작용제 융합 단백질 치료로부터 이득을 얻을 수 있는 질병 및 장애의 예는 암, 면역, 자가 면역 및 염증성 질환 및 장애를 포함한다.

[0044] 면역 질환 또는 장애는 면역계의 기능 장애이다. 이러한 장애는 여러 가지 방법으로 특징 지어질 수 있다: 영향을 받는 면역 체계의 구성 요소(들); 면역계가 과활성인지 또는 저활성인지 및 그 상태가 선천성인지 또는 후천성인지. 자가 면역 질환은 신체에 정상적으로 존재하는 물질 및 조직에 대한 신체의 비정상적인 면역 반응으로 발생한다(자가 면역). 자가 면역 질환의 근본적인 병태 생리에 대한 주요 이해는 자가 면역 질환 중 유전적 공유의 현저한 정도를 확인한 전장 유전체 연관 검사의 응용이었다.

[0045] 자가면역 질환은 이에 제한되지 않으나, 급성산재성뇌척수염(Acute disseminated encephalomyelitis, ADEM), 에디슨병(Addison's disease), 무감마글로불린혈증(Agammaglobulinemia), 원형 탈모증(Alopecia areata), 근위축성측색경화증(amyotrophic lateral sclerosis, Lou Gehrig's disease), 강직성 척추염(Ankylosing Spondylitis), 항인지질항체증후군(Antiphospholipid syndrome), 항합성효소항체증후군(Antisynthetase syndrome), 아토피성 알러지(Atopic allergy), 아토피 피부염(Atopic dermatitis), 자가면역성 재생불량성 빈혈(Autoimmune aplastic anemia), 자가면역성 심근증(Autoimmune cardiomyopathy), 자가면역성 장질환(Autoimmune enteropathy), 자가면역성 용혈성 빈혈(Autoimmune hemolytic anemia), 자가면역성 간염(Autoimmune hepatitis), 자가면역성 내이질환(Autoimmune inner ear disease), 자가면역성 림프증식 증후군(Autoimmune lymphoproliferative syndrome), 자가면역성 췌장염(Autoimmune pancreatitis), 자가면역성 말초신경병증(Autoimmune peripheral neuropathy), 자가면역성 다선 증후군(Autoimmune polyendocrine syndrome), 가자면역 프로게스테론 피부염(Autoimmune progesterone dermatitis), 자가면역 혈소판감소성 자반증(Autoimmune thrombocytopenic purpura), 자가면역성 두드러기(Autoimmune urticarial), 자가면역성 포도막염(Autoimmune uveitis), 동심성 경화증(Balo disease/Balo concentric sclerosis), 베체트병(Behcet's disease), 버거씨병(Berger's disease), 비커스태프 뇌염(Bickerstaff's encephalitis), 블라우 증후군(Blau syndrome), 수포성 유천포창(Bullous pemphigoid), 암, 캐슬만병(Castleman's disease), 셀리악병(Celiac disease), 샤가스병(Chagas disease), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증(Chronic inflammatory

demyelinating polyneuropathy), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증(Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy), 만성 폐쇄성 폐질환(Chronic obstructive pulmonary disease), 만성 순환성 다초점 골수염(Chronic recurrent multifocal osteomyelitis), 척-스트라우스 증후군(Churg-Strauss syndrome), 반창성유천포창(Cicatricial pemphigoid), 코간 증후군(Cogan syndrome), 한랭응집소증(Cold agglutinin disease), 보체 성분 2 결핍(Complement component 2 deficiency), 접촉성 피부염(Contact dermatitis), 두개동맥염(Cranial arteritis), 크레스트 증후군(CREST syndrome), 크론병(Crohn's disease), 쿠싱 증후군(Cushing's Syndrome), 급성 백혈구파괴 혈관염(Cutaneous leukocytoclastic angiitis), 데고병(Dego's disease), 델컴병(Dercum's disease), 포진형 피부염(Dermatitis herpetiformis), 피부근염(Dermatomyositis), 제1형 당뇨병(diabetes mellitus type 1), 광범위 급성 전신 경화증 (Diffuse cutaneous systemic sclerosis), 원판상 홍반성 낭창(Discoid lupus erythematosus), 드레슬러 증후군(Dressler's syndrome), 약물 유발성 낭창(Drug-induced lupus), 습진(Eczema), 자궁내막증(Endometriosis), 호산성 근막염(Eosinophilic fasciitis), 호산성 위장염(Eosinophilic gastroenteritis), 호산성 폐렴(Eosinophilic pneumonia), 후천성 표피 수포증(Epidermolysis bullosa acquisita), 결절성 홍반(Erythema nodosum), 태아적아구증(Erythroblastosis fetalis), 필수 혼합한랭글로불린혈증(Essential mixed cryoglobulinemia), 에반스 증후군(Evan's syndrome), 진행성 골화성 섬유이형성증(Fibrodysplasia ossificans progressive), 특발성 폐섬유화증(Fibrosing alveolitis or Idiopathic pulmonary fibrosis), 위염(Gastritis), 위장 유천포창(Gastrointestinal pemphigoid), 사구체 신염(Glomerulonephritis), 굿파스처 증후군(Goodpasture's syndrome), 이식편대숙주질환(graft versus host disease), 그레이브스병(Graves' disease), 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 하시모토 뇌병증(Hashimoto's encephalopathy), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 헤노흐-쇤라인 자반증(Henoch-Schonlein purpura), 임신성 포진(Herpes gestationis aka Gestational Pemphigoid), 화농성 한선염(Hidradenitis suppurativa), 휴-스토빈 증후군(Hughes-Stovin syndrome), 저감마글로불린혈증(Hypogammaglobulinemi), 특발성 염증성 탈수초성 질병(Idiopathic inflammatory demyelinating diseases), 특발성 폐섬유화증(Idiopathic pulmonary fibrosis), 특발성 혈소판 감소성 자반증(Idiopathic thrombocytopenic purpura), IgA 신병증(IgA nephropathy), 포함체 근육염(Inclusion body myositis), 간질성 방광염(Interstitial cystitis), 소아 특발성 관절염(Juvenile idiopathic arthritis aka Juvenile rheumatoid arthritis), 가와사키병(Kawasaki's disease), 람베르트-이튼 근무력 증후군(Lambert-Eaton myasthenic syndrome), 백혈구파괴 혈관염(Leukocytoclastic vasculitis), 편평태선(Lichen planus), 경화성 태선(Lichen sclerosus), 선상 IgA 질환(Linear IgA disease), 루포이드 간염(Lupoid hepatitis aka Autoimmune hepatitis) 홍반성 낭창(lupus erythematosus), 마지드 증후군(Majeed syndrome), 미세장염(Microscopic colitis), 현미경정 다발혈관염(Microscopic polyangiitis), 밀러-피셔 증후군(Miller-Fisher syndrome), 혼합결합 조직병(Mixed connective tissue disease), 피부경화증(Morphea), 급성 두창상 태선양 비강진(Pityriasis lichenoides et varioliformis acuta or Mucha-Habermann disease), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 중증 근무력증(Myasthenia gravis), 근염(Myositis), 메니에르병(Meniere's disease), 기면증(Narcolepsy), 시속척수염(Neuromyelitis optica), 신경근긴장증(Neuromyotonia), 안구 낭포성 천포창(Occular cicatricial pemphigoid), 안구간대경련-근간대경련 증후군(Opsoclonus myoclonus syndrome), 오드 갑상선염(Ord's thyroiditis), 재발성 류머티즘(Palindromic rheumatism), PANDAS(pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcus), 부종양성 소뇌 변성(Paraneoplastic cerebellar degeneration), 야간혈색소뇨증(Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH), 패리-롬버그 증후군(Parry Romberg syndrome), 평면부염(Pars planitis), 파서니지-터너 증후군(Parsonage-Turner syndrome), 심상성 천포창(Pemphigus vulgaris), 변연성 뇌척수염(Perivenous encephalomyelitis), 악성 빈혈(Pernicious anaemia), POEMS 증후군(POEMS syndrome), 결절성 다발동맥염(Polyarteritis nodosa), 류마티스성 다발근통(Polymyalgia rheumatic), 다발성 근염(Polymyositis), 일차성 담즙성 간경화증(Primary biliary cirrhosis), 원발 경화성 담관염(Primary sclerosing cholangitis), 진행성 염증성 신경병증(Progressive inflammatory neuropathy), 건선(psoriasis), 건선성 관절염(psoriatic arthritis), 순적혈구 무형성증(Pure red cell aplasia), 괴저성 농피증(Pyoderma gangrenosum), 라스무센 뇌염(Rasmussen's encephalitis), 레이노드 현상(Raynaud phenomenon), 라이터 증후군(Reiter's syndrome), 재발성 다발 연골염(Relapsing polychondritis), 하지 불안 증후군(Restless leg syndrome), 후복막 섬유증(Retroperitoneal fibrosis), 류마티스성 열(Rheumatic fever), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 유육종증(sarcoidosis), 조현병(Schizophrenia), 슈미트 증후군(Schmidt syndrome), 쉬니츨러 증후군(Schnitzler syndrome), 공막염(Scleritis), 피부경화증(scleroderma), 혈청병(Serum Sickness), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 척추관절증(Spondyloarthropathy), 전신근강직 증후군(Stiff person syndrome), 스틸병(Still's disease), 아급성 세균성 심내막염(Subacute bacterial

endocarditis, SBE), 스삭 증후군(Susac's syndrome), 스위트 증후군(Sweet's syndrome), 시데남무도병(Sydenham chorea), 교감성 안염(Sympathetic ophthalmia), 전신 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus), 타카야수 동맥염(Takayasu's arteritis), 측두동맥염(Temporal arteritis), 혈소판 감소증(Thrombocytopenia), 톨로사-헌트 증후군(Tolosa-Hunt syndrome), 횡단성 척수염(Transverse myelitis), 궤양성 대장염(Ulcerative colitis), 비분류성 척추관절병증(Undifferentiated spondyloarthropathy), 두드러기 혈관염(Urticarial vasculitis), 혈관염(vasculitis), 백반증(Vitiligo), 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis)를 포함한다.

[0046] 본원에 사용된 용어 "면역 조절제"는 면역계를 조절하는 임의의 치료제를 지칭한다. 면역 조절제의 예로는 에이코사노이드(eicosanoid), 사이토카인(cytokine), 프로스타글란딘(prostaglandin), 인터류킨(interleukin) 케모카인(chemokine), 체크포인트 조절자(checkpoint regulator), TNF 수퍼 패밀리 멤버(TNF superfamily member), TNF 수용체 수퍼 패밀리 멤버(TNF receptor superfamily member) 및 인터페론(interferon)이 있다. 면역 조절제의 구체적인 예로는 PGI2, PGE2, PGF2, CCL14, CCL19, CCL20, CCL21, CCL25, CCL27, CXCL12, CXCL13, CXCL-8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL10, IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL15, IL17, IL17, INF-α, INF-β, INF-ε, INF-ɣ, G-CSF, TNF-α, CTLA, CD20, PD1, PD1L1, PD1L2, ICOS, CD200, CD52, LTα, LTαβ, LIGHT, CD27L, 41BBL, FasL, Ox40L, April, TL1A, CD30L, TRAIL, RANKL, BAFF, TWEAK, CD40L, EDA1, EDA2, APP, NGF, TNFR1, TNFR2, LTβR, HVEM, CD27, 4-1BB, Fas, Ox40, AITR, DR3, CD30, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, BAFFR, TACI, BCMA, Fn14, CD40, EDAR XEDAR, DR6, DcR3, NGFR-p75, 및 Taj가 있다. 면역 조절제의 다른 예로는 토실리주맙(tocilizumab; Actemra), CDP870 (Cimzia), 에타너셉트(enteracept; Enbrel), 아달리무맙(adalimumab; Humira), 키너렛(Kineret), 아바타셉트(abatacept; Orencia), 인플릭시맙(infliximab; Remicade), 리툭시맙(rituximab; Rituxan), 골리무맙(golimumab; Simponi), 아보넥스(Avonex), 레비프(Rebif), 레시젠(ReciGen), 플레그리디(Plegridy), 베타세론(Betaseron), 코팍손(Copaxone), 노바트론(Novatrone), 나탈리주맙(natalizumab; Tysabri), 핀골리모드(fingolimod; Gilenya), 테리플루노마이드(teriflunomide; Aubagio), BG12, 텍피데라(Tecfidera), 및 알렘투주맙(alemtuzumab; Campath, Lemtrada)이 있다.

[0047] 암은 신체의 다른 부위로 침투하거나 퍼질 가능성이 있는 비정상적인 세포 성장을 포함하는 질병군이다. 국가암 연구소에 의해 기술된 예시적인 암은 다음을 포함한다 : 급성 림프구성 백혈병, 성인; 급성 림프구성 백혈병, 소아; 급성 골수성 백혈병, 성인; 부신피질 암종; 부신피질 암종, 소아; 에이즈 관련 림프종; 에이즈 관련 악성 종양; 항문 암; 성상세포종(Astrocytoma), 소아의 소뇌; 성상세포종, 소아의 대뇌; 담관암, 간장 밖; 방광암; 방광암, 소아; 골암, 골육종/악성 섬유성 조직 구종(Osteosarcoma/Malignant Fibrous Histiocytoma); 뇌 줄기 세포종, 소아; 뇌종양, 성인; 뇌종양, 뇌 줄기 세포종, 소아; 뇌종양, 소뇌 성상세포종, 소아; 뇌종양, 대뇌 성상세포종/악성 신경종(Cerebral Astrocytoma/Malignant Glioma), 소아; 뇌종양, 상의세포종(Ependymoma), 소아; 뇌종양, 수모세포종(Medulloblastoma), 소아; 뇌 종양, 천막상 원시 신경 외배엽 종양(Supratentorial Primitive Neuroectodermal Tumors), 소아; 뇌종양, 시각 경로 및 시상하부 신경교종(Visual Pathway and Hypothalamic Glioma), 소아; 뇌종양, 소아 (기타); 유방암; 유방암 및 임신; 유방암, 소아; 유방암, 남성; 기관지 선종/유암종, 소아 : 유암종, 소아; 유암종, 위장; 암종, 부신피질; 암종, 섬세포; 원발부위 미상암(Carcinoma of Unknown Primary); 중추 신경계 림프종, 원발성; 소뇌 성상세포종, 소아; 대뇌 성상세포종/악성 신경종, 소아; 자궁경부암; 소아암; 만성 림프성 백혈병; 만성 골수성 백혈병; 만성 골수 증식성 질환(Chronic Myeloproliferative Disorders); 건초 투명세포육종(Clear Cell Sarcoma of Tendon Sheaths); 대장암; 대장암, 소아; 피부 T 세포 림프종; 자궁 내막암; 상의세포종, 소아; 상피암, 난소; 식도암; 식도암, 소아; 유잉 종양 패밀리(Ewing's Family of Tumors); 두개외 배아 세포 종양, 소아; 고환외 생식 세포 종양(Extragonadal Germ Cell Tumor); 간외담관암(Extrahepatic Bile Duct Cancer); 안암, 안구 내 흑색종; 안암, 망막 모세포종; 담낭암; 위 (복부) 암; 위 (복부) 암, 소아; 위장 유암종; 생식 세포 종양, 외안근, 소아; 생식 세포 종양, 신장 외; 생식 세포 종양, 난소; 임신성 영양막 종양; 신경아교종. 소아의 뇌간; 신경아교종. 소아 시각 경로 및 시상 하부; 모양세포 백혈병; 두경부암; 간암, 성인 (원발성); 간암, 소아 (원발성); 호지킨 림프종, 성인; 호지킨 림프종, 소아; 임신성 호지킨 림프종; 하인두암; 시상하부 및 시각경로 신경교종(Hypothalamic and Visual Pathway Glioma), 소아; 안구 내 흑색종; 섬세포 암 (내분비 췌장); 카포시 육종(Kaposi's Sarcoma); 신장암; 후두암; 후두암, 소아; 백혈병, 급성 림프구성, 성인; 백혈병, 급성 림프구성, 소아; 백혈병, 급성 골수성, 성인; 백혈병, 급성 골수성, 소아; 백혈병, 만성 림프구성 백혈병; 백혈병, 만성 골수성; 백혈병, 모양세포; 구순구강암; 간암, 성인 (원발성); 간암, 소아 (원발성); 폐암, 비소 세포; 폐암, 작은 세포; 림프구성 백혈병, 성인 급성; 림프구성 백혈병, 소아 급성; 만성 림프성 백혈병; 림프종,

에이즈-관련; 림프종, 중추 신경계 (원발성); 림프종, 피부 T 세포; 림프종, 호지킨, 성인; 림프종, 호지킨; 소아; 림프종, 임신성 호지킨; 림프종, 비호지킨, 성인; 림프종, 비호지킨, 소아; 림프종, 임신성 비호지킨; 림프종, 원발성 중추 신경계; 발덴스트롬 매크로글로불린혈증(Macroglobulinemia, Waldenstrom's); 남성 유방암; 악성 중피종, 성인; 악성 중피종, 소아; 흉선 악성 종양; 수모세포종, 소아; 흑색종; 흑색종, 안구 내; 메켈 세포암(Merkel Cell Carcinoma); 중피종, 악성의; 잠복 원발성 전이성 목 편평세포암(Metastatic Squamous Neck Cancer with Occult Primary); 다발성 내분비 샘종증, 소아; 다발성 골수종/혈장 세포 신생물; 균상 식육종; 골수이 형성 증후군; 만성 골수성 백혈병, 만성; 골수성 백혈병, 소아 급성; 골수종, 다중; 만성 골수 증식성 질환; 비강/부비동 암; 비인두암; 비인두암, 소아; 신경 모세포종; 비호지킨 림프종, 성인; 비호지킨 림프종, 소아; 임신성 비호지킨 림프종; 비소 세포 폐암; 구강암, 소아; 구강구순암; 구인두암; 뼈의 골육종/악성 섬유성 조직 구종; 난소암, 소아; 난소 상피암; 난소 생식 세포 종양; 난소 저악성 종양; 췌장암; 췌장암, 소아; 췌장암, 섬 세포; 부비동 및 비강 암; 부갑상선암; 음경암; 갈색 세포종; 송과체 및 천막상 원시 신경 외배엽 종양, 소아; 뇌하수체 종양; 혈장 세포 신생물/다발성 골수종; 폐색성 폐색종; 임신성 유방암; 임신성 호지킨 림프종; 임신성 비호지킨 림프종; 원발성 중추 신경계 림프종; 원발성 암, 성인; 원발성 암, 소아; 전립선암; 직장암; 신세포암; 신세포암, 소아; 신우뇨관 이행세포 암종; 망막 모세포종; 횡문근 육종, 소아; 침샘암; 침샘'암, 소아; 육종, 유잉 종양 패밀리; 육종, 카포시; 육종 (골육종)/뼈의 악성 섬유성 조직 구종 육종, 횡문근 육종, 소아; 육종, 연조직, 성인; 육종, 연조직, 소아; 세자리 증후군; 피부암; 피부암, 소아; 피부암 (흑색종); 피부암종, 머켈 세포; 소세포 폐암; 소장암; 연조직 육종, 성인; 연조직 육종, 소아; 악성 원발성, 전이성 편평상피암; 위 (위) 암; 위 (위) 암, 소아; 천막상 원시 신경 외배엽 종양(Supratentorial Primitive Neuroectodermal Tumors), 소아; T 세포 림프종, 피부; 고환암; 흉선종, 소아; 흉선종, 악성; 갑상선 암; 갑상선 암, 소아; 신우뇨관 이행세포 암종; 영양막 종양, 임신성; 원발부위 불명암, 소아; 소아의 비정상적 암; 신우뇨관, 이행세포 암종; 요도암; 자궁 육종; 질암; 시각 경로 및 시상 하부 신경아교종, 소아; 외음부암; 발덴스트롬 마크로글로블린혈증; 및 빌름스 종양(Wilms' Tumor).

[0048] 본원에 사용된 용어 "화학요법제"는 암 치료에 사용되는 임의의 치료제를 의미한다. 화학요법제의 예로는 액티노마이신(Actinomycin), 아자시티딘(Azacitidine), 아자티오프린(Azathioprine), 블레오마이신(Bleomycin), 보르테조밉(Bortezomib), 카보플라틴(Carboplatin), 카페시타빈(Capecitabine), 시스플라틴(Cisplatin), 클로람부실(Chlorambucil), 시클로포스파미드(Cyclophosphamide), 시타라빈(Cytarabine), 다우노루비신(Daunorubicin), 도세탁셀(Docetaxel), 독시플루리딘(Doxifluridine), 독소루비신(Doxorubicin), 에피루비신(Epirubicin), 에포틸론(Epothilone), 에토포시드(Etoposide), 플루오로우라실(Fluorouracil), 겜시타빈(Gemcitabine), 수산화요소(Hydroxyurea), 이다루비신(Idarubicin), 이마티닙(Imatinib), 이리노테칸(Irinotecan), 메클로레타민(Mechlorethamine), 머캅토퓨린(Mercaptopurine), 메토트렉세이트(Methotrexate), 미톡산트론(Mitoxantrone), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(Paclitaxel), 페메트렉시드(Pemetrexed), 테니포시드(Teniposide), 티오구아닌(Tioguanine), 토포테칸(Topotecan), 발루비신(Valrubicin), 빈블라스틴(Vinblastine), 빈크리스틴(Vincristine), 빈데신(Vindesine), 비노렐빈(Vinorelbine), 파니투무맙(panitumamab), 얼비툭스(Erbitux; cetuximab), 마투주맙(matuzumab), IMC-IIF 8, TheraCIM hR3, 데노수맙(denosumab), 아바스틴(Avastin; bevacizumab), 휴미라(Humira; adalimumab), 허셉틴(Herceptin; trastuzumab), 레미케이드(Remicade; infliximab), 리툭시맙(rituximab), 시나지스(Synagis; palivizumab), 마일로타그(Mylotarg; gemtuzumab, oxogamicin), 랍티바(Raptiva; efalizumab), 티사브리(Tysabri; natalizumab), 제나팍스(Zenapax; dacliximab), 뉴트로스펙(NeutroSpec; Technetium (99mTc) fanolesomab), 토실리주맙(tocilizumab), 프로스타신트(ProstaScint; Indium-III labeled Capromab Pendetide), 벡사르(Bexxar; tositumomab), 제발린(Zevalin; ibritumomab, tiuxetan(IDEC-Y2B8), yttrium 90이 결합됨), 졸레어(Xolair; omalizumab), 맙테라(MabThera; Rituximab), 레오프로(ReoPro; abciximab), 맙캠퍼스(MabCampath; alemtuzumab), 시뮬렉트(Simulect; basiliximab), 류코스캔(LeukoScan; sulesomab), CEA-Scan(arcitumomab), 벌루마(Verluma; nofetumomab), 파노렉스(Panorex; Edrecolomab), 알렘투주맙(alemtuzumab), CDP 870, 및 나탈리주맙(natalizumab)이 있다.

[0049] 본 발명의 융합 단백질은 예를 들어 면역 조절제 또는 화학요법제와 조합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 융합 단백질로의 치료는 예를 들어, 면역 조절제 또는 화학요법제와 같은 다른 치료에 우선적이거나, 그 후 또는 주로 동시에 포함한다.

[0050] 면역계는 질병을 예방하는 유기체 내의 생물학적 구조 및 과정의 시스템이다. 이 시스템은 병원균 및 기타 이물질로부터 신체를 보호하고 감염된 세포 및 악성 세포를 파괴하고 세포 파편을 제거하는 상호 작용하는 세포, 세포 생성물 및 세포 형성 조직의 확산된 복합 네트워크이다: 면역계에는 흉선, 비장, 림프절 및 림프 조직, 줄기

세포, 백혈구, 항체 및 림포카인이 포함된다. B 세포 또는 B 림프구는 적응 면역계의 체액성 면역에서 임파구의 일종이며 면역 감시에 중요하다. T 세포 또는 T 림프구는 세포 매개 면역에서 중심 역할을 하는 일종의 림프구이다. T 세포에는 두 가지 주요 아형인 킬러 T 세포와 헬퍼 T 세포가 있다. 또한 면역 반응을 조절하는 역할을 하는 서프레서 T 세포가 있다. 킬러 T 세포는 Class I MHC 분자에 결합된 항원만 인식하며, T 세포는 Class II MHC 분자에 결합된 항원을 인식한다. 이러한 항원 제시의 두 가지 기전은 두 종류의 T 세포의 상이한 역할을 반영한다. 세 번째 작은 하위 유형은 MHC 수용체에 결합하지 않은 손상되지 않은 항원을 인식하는 γδT 세포이다. 대조적으로, B 세포 항원 특이적 수용체는 B 세포 표면상의 항체 분자이며, 항원 처리에 대한 필요없이 전체 병원체를 인식한다. B 세포의 각 혈통은 다른 항체를 발현하므로 B 세포 항원 수용체의 완전한 세트는 신체가 제조할 수 있는 모든 항체를 나타낸다.

[0051] B 및 T 세포 감쇠제 (BTLA 또는 CD272)는 면역계의 필수적인 부분이다. BTLA 발현은 T 세포의 활성화 동안 유도되고, BTLA는 Th1 세포에서 발현된 채로 남아 있지만 Th2 세포에서는 발현되지 않는다. 예정세포사 1 (PD1) 및 세포 독성 T- 림프구 회합 단백질 4 (CTLA4)와 마찬가지로 BTLA는 T 세포 활성화를 조절하는 억제 경로를 활성화한다. 그러나 PD-1 및 CTLA-4와 달리 BTLA는 B7 세포 표면 수용체가 아닌 종양 괴사 패밀리 수용체 (TNF-R)와의 상호 작용을 통해 T 세포 억제를 나타낸다. BTLA는 종양 괴사 인자 (수용체) 슈퍼 패밀리의 리간드이며, 구성원 14 (TNFRSF14)이며 헤르페스 바이러스 엔트리 매개체 (HVEM)로도 알려져 있다. BTLA-HVEM 복합체는 T 세포 면역 반응을 음성적으로 조절한다.

[0052] 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼 패밀리 멤버 (TNFRSF) 헤르페스 바이러스 엔트리 매개체 (HVEM) (TNFRSF14)는 표준 TNF- 관련 리간드, 림프 독소 -α (LT-α) 및 라이트를 결합시킨다; 그러나 HVEM의 두드러진 특징은 면역글로불린 슈퍼 패밀리, B 및 T 림프구 감쇠제 (BTLA) 및 CD160 멤버의 참여이다. HVEM이 별개의 구성에서 다중 리간드와 상호 작용하는 능력은 기능적으로 다양한 내재적 및 양방향 신호전달 세트를 생성한다. 이들 상이한 리간드를 결합시키는 능력은 HVEM의 세포외 도메인에서 2개의 상이한 지형 영역에 존재한다. 이러한 별개의 부위는 HVEM이 전-염증 및 억제 경로를 활성화시키는 능력을 부여한다. HVEM이 병원체에 대한 숙주 방어 뿐만 아니라 여러 신호전달 경로의 연결 고리에서 T-세포 동시 자극, 수지상 세포 (DC) 항상성 조절, 자가 면역 매개 염증 반응과 같은 면역계에서 중요한 역할을 한다는 것은 놀라운 일이 아니다. HVEM은 또한 감각 신경 세포 발달 및 지방 세포 대사의 조절에서 면역계 밖에서 중요한 역할을 할 수 있다. 인간 HVEM 단백질은 283 개의 아미노산을 갖는다 (서열번호 2). 세포외 도메인은 164 아미노산 잔기, 예를 들어 아미노산 39-202를 포함한다. 본 발명의 융합 단백질은 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 또는 190 이상의 HVEM 단백질 잔기 (서열번호 2)를 포함한다. 본 발명의 융합 단백질은 예를 들어 HVEM 단백질 (서열번호 2)의 아미노산 잔기 1-283, 1-202, 1-184, 1-161, 39-202 또는 39-161을 포함할 수 있다.

[0053] 본원에 사용된 용어 "비-천연 발생 HVEM 단백질"은 적어도 하나 이상의 변이를 포함하는 HVEM 단백질 (서열번호 2, 도 19B)을 나타낸다. 본 발명의 융합 단백질은 적어도 하나의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 포함한다. 본 발명의 융합 단백질은 HVEM 단백질에서 적어도 하나의 추가적인 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 포함한다. 본 발명의 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 2개, 3개, 4개 이상의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명의 융합 단백질은 HVEM 단백질에 S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R 및 L90A; S58R 및 G68T; S58R 및 L70W; S58R, L70D 및 L90A; S58R, G68T 및 L90A; S58R, L70W 및 L90A; S58R, G68T, L70D 및 L90A; 또는 S58R, G68T, L70W 및 L90A와 같은 변이 중 적어도 하나를 포함한다.

[0054] BTLA는 HVEM과 상호 작용하기 위해 뚜렷한 표면을 사용한다. BTLA/HVEM 경로는 면역 내성의 유지 및 자가 면역 질환의 예방에 중요한 역할을 한다. BTLA 결핍 마우스는 류마티스성 관절염, 림프구 침윤, 자가 면역성 간염 (AIH)류 질환 및 EAE를 유발한다. HVEM 결핍 마우스는 MOG 펩타이드 유도 EAE에 대한 감수성이 증가하고 T 세포 증식 및 사이토카인 생성을 증가시킨다. 길항 HVEM-Ig는 DBA1 배경 마우스의 콜라겐 유도 관절염에서 자가 면역을 악화시킨다. 따라서, 활성화된 T 세포에서 BTLA의 강제 발현이 면역 질환의 치료를 위한 유망한 전략이 될 것이다.

[0055] 종양 면역과 관련하여, 종양 항원 특이적 CD8+ T 세포는 BTLA를 지속적으로 발현하는 것으로 보인다. CpG 예방 접종은 종양 항원 특이 CD8+ T 세포에서 BTLA의 발현을 부분적으로 하향 조절하고 BTLA/HVEM 매개 저해 신호를 차단한다는 것이 보고되었다. BTLA/HVEM 경로를 차단하는 것이 효과기 T 세포 기능을 향상시키는 수단으로 관련이 있는 것으로 보이지만 HVEM 상호 작용 분자의 복잡성에 주의를 기울여야 한다. IgSF 억제 수용체인 CD160도

HVEM에 결합한다. 또한 TNF 패밀리 멤버인 LIGHT는 HVEM 사용시 동시 자극 신호를 전달한다. 이러한 여러 경로는 우리에게 악성 종양에 대한 새로운 치료적 개입을 어렵게 만든다.

[0056] BTLA/HVEM 경로의 조작은 감염된 환자를 치료하는 유망한 전략이 될 수 있다. BTLA는 마우스에서 피. 베르그헤이(*P. berghei*) ANKA 감염 동안 유도되었고 항-BTLA 길항 mAb는 원생동물에 의해 유발된 대뇌 말라리아의 발병률을 유의적으로 감소시킨다. 따라서, BTLA/HVEM 경로를 교란시키는 병원체는 항-BTLA 단클론 항체 면역 요법을 위한 이상적인 표적이 될 수 있다.

[0057] 억제성 수용체 신호전달의 성공적인 활성화는 활성화된 수용체-리간드 형태와 유사하게, 활성화된 상태에서 억제제 수용체의 배치에 관여하는 수용체 작용제에 대한 용량에 의존한다. 항체 형태의 수용체 작용제는 BTLA 신호전달을 유도하는 활성화된 형태를 촉진할 수 있는 B 및 T 림프구 감쇠제 (BTLA)와 같은 억제 수용체의 특정 에피토프에 관여할 것이다. 이러한 항체의 에피토프는 BTLA 수용체 헤르페스 바이러스 출입 매개체 (HVEM)의 결합 부위와 중첩되지 않는다. 이러한 항체는 BTLA 세포질 도메인의 인산화를 활성화하고 BTLA의 세포질 도메인에 모집한 SHP1 및 2, 활성화 표지자로서 관련된 단백질의 동원 및 인산화를 활성화하여 신호전달을 향상시킨다. BTLA의 억제 신호전달의 활성화는 T 세포의 T 세포 수용체와 B 세포의 B 세포 수용체의 하류에서 정상 신호전달 경로를 음성적으로 조절할 것으로 예측된다. 또한, BTLA 억제 신호전달은 γδT 세포 및 NK 세포와 같은 선천 세포에서 IL-7 및 I 형 인터페론 사이토카인 신호전달을 음성적으로 조절한다.

[0058] β-헤르페스 바이러스 세포거대바이러스 (CMV)는 숙주 면역 반응을 회피하기 위해 그 게놈의 대부분을 사용하고, 잠재적인 감염의 확립으로 바이러스가 진행됨에 따라 이들 유전자의 많은 부분이 사용된다. CMV는 BTLA에 결합하고 HVEM보다 더 큰 정도로 T 세포 증식을 억제하는 HVEM (ORF UL144)의 모방을 나타낸다. 최근 UL144가 NK 세포 활성화를 피하면서 HVEM 수용체 CD160에 결합하지 않는 것으로 나타났다. 세포 용해 세포의 활성화는 또한 암에 대한 면역 반응에 중요하며, 면역 인식 경로에 변이가 있는 종양은 보다 공격적인 종양의 성장 및 사멸과 관련이 있다. 사람 여포성 림프종 (FL)에서는 가장 흔한 이차 변이가 TNFRSF14에서 일어나며, 확산성 B 세포 림프종 (DLBCL)에서도 TNFRSF14가 종종 변이되어 유전자 결실 또는 발현 상실을 초래한다. 그러나, 림프종의 일부에서 몇몇 변이는 HVEM 리간드 결합에 영향을 줄 것으로 예측되었다. 이러한 변이, 또는 변형된 리간드 상호 작용이 종양 미세 환경 내 림프종 적합성에 영향을 줄 수 있는 방법은 아직 분명하지 않다.

[0059] 바이러스성 UL144 단백질과 유사하게, 몇몇 림프종 HVEM 변이체는 CD160에 결합하지 않고 BTLA에 대한 리간드 선택을 나타낸다. CD160의 발현은 야생형 HVEM과 BTLA의 결합 및 T 세포 수용체 신호전달의 억제를 방해한다. 대조적으로, 바이러스 및 변이 HVEM에 의해 유발된 BTLA 활성화는 CD160 발현에 의해 방해받지 않는다. 마지막으로, BTLA의 활성화는 CD160 발현 NK 세포에서 사이토카인 유도 신호 변환기 및 전사 활성화 인자 (STAT)의 인산화를 억제하고, 바이러스 UL144 단백질은 야생형 HVEM보다 사이토카인 신호전달을 더욱 강력하게 억제한다는 것을 발견했다. 따라서, 리간드 경쟁은 HVEM이 억제 신호를 균일하게 결합하는 것을 방해하고, 리간드 선택성은 바이러스 및 변이 HVEM이 BTLA 선택적 작용제의 발달을 위한 경로를 나타내는 독창적인 억제 기능을 유도할 수 있게 한다. 종합하면 이 데이터는 CMV에서의 UL144의 진화와 림프종에서의 체세포 TNFRSF14 변이의 획득, 감염 및 암에서 염증 신호의 억제 및 제한을 촉진하는 잠재적 선택압을 나타낸다.

[0060] 하나의 양태에서, 본 발명은 비-천연 발생 HVEM 단백질 및 Fc 단백질을 포함하는 융합 단백질을 제공하며, 상기 융합 단백질은 HVEM 단백질의 세포외 도메인 및 Fc 단백질을 포함한다. 한 측면에서, 융합 단백질은 BTLA 작용제이다. 또 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이를 포함한다. 추가적인 측면에서, 변이는 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합이다. 한 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 추가로 포함한다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 2개, 3개, 4개 이상의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 포함한다. 특정 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R 및 L90A; S58R 및 G68T; S58R 및 L70W; S58R, L70D 및 L90A; S58R, G68T 및 L90A; S58R, L70W 및 L90A; S58R, G68T, L70D 및 L90A; 또는 S58R, G68T, L70W 및 L90A와 같은 변이 중 적어도 하나를 포함한다. 한 측면에서, Fc 단백질은 IgA, IgG, IgD, IgE 또는 IgM이다. 또 다른 측면에서, Fc 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. 특정 측면에서, IgG Fc 단백질은 인간 유래이다.

[0061] 추가적인 양태에서, 본 발명은 비-천연 발생 HVEM 단백질 및 Fc 단백질과 같은 융합 단백질 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 한 측면에서, 융합 단백질은 BTLA 작용제이다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질의 세포외 도메인 및 Fc 단백질을 포함한다. 또 다른 측면에서, 융합 단백

질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이를 포함한다. 추가적인 측면에서, 변이는 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합이다. 추가적인 양태에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 추가로 포함한다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 2개, 3개, 4개 이상의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 포함한다. 특정 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R 및 L90A; S58R 및 G68T; S58R 및 L70W; S58R, L70D 및 L90A; S58R, G68T 및 L90A; S58R, L70W 및 L90A; S58R, G68T, L70D 및 L90A; 또는 S58R, G68T, L70W 및 L90A와 같은 변이 중 적어도 하나를 포함한다. 한 측면에서, Fc 단백질은 IgA, IgG, IgD, IgE 또는 IgM이다. 또 다른 측면에서, Fc 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. 특정 측면에서, IgG Fc 단백질은 인간 유래이다.

[0062] 하나의 양태에서, 본 발명은 비-천연 발생 HVEM 단백질 및 Fc 단백질과 같은 융합 단백질을 BTLA 관련 질환의 치료가 필요한 대상에게 투여하여 BTLA 관련 장애를 치료하는 단계를 포함하는, BTLA 관련 장애의 치료 방법을 제공한다. 한 측면에서, BTLA 관련 장애는 암 또는 자가 면역 질환 또는 장애이다. 추가적인 측면에서, 자가 면역 질환 또는 장애는 에디슨병(Addison's disease), 근위축성측색경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 크론병(Crohn's disease), 쿠싱 증후군(Cushing's Syndrome), 제1형 당뇨병(diabetes mellitus type 1), 이식편 대숙주질환(graft versus host disease), 그레이브스병(Graves' disease), 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 홍반성 낭창(lupus erythematosus), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 건선(psoriasis), 건선성 관절염(psoriatic arthritis), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 유육종증(sarcoidosis), 피부경화증(scleroderma), 전신 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus), 이식거부(transplant rejection), 또는 혈관염(vasculitis)이 있다. 다른 측면에서 암은 전립선, 결장, 복부, 뼈, 유방, 소화계, 간, 췌장, 복막, 내분비선(부신, 부갑상선, 뇌하수체, 정소, 난소, 흉선, 갑상선), 눈, 머리와 목, 신경(중추신경 및 말초신경), 림프계, 골반, 피부, 연조직, 비장, 흉부 또는 비뇨생식관의 암이다. 또 다른 측면에서, BTLA 신호전달이 증가된다. 또 다른 측면에서, 융합 단백질은 BTLA 작용제이다.

[0063] 한 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질의 세포외 도메인 및 Fc 단백질을 포함한다. 추가적인 측면에서, 융합 단백질은 서열번호 2의 아미노산 잔기 39-161 및 Fc 단백질을 포함한다. 또 다른 측면에서, Fc 단백질은 IgA, IgG, IgD, IgE 또는 IgM이다. 특정 측면에서, Fc 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. 특정 측면에서, IgG Fc 단백질은 인간 유래이다. 한 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이를 포함한다. 추가적인 측면에서, 변이는 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합이다. 한 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이들의 조합을 추가로 포함한다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 2개, 3개, 4개 이상의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 포함한다. 특정 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R 및 L90A; S58R 및 G68T; S58R 및 L70W; S58R, L70D 및 L90A; S58R, G68T 및 L90A; S58R, L70W 및 L90A; S58R, G68T, L70D 및 L90A; 또는 S58R, G68T, L70W 및 L90A와 같은 변이 중 적어도 하나를 포함한다.

[0064] 한 측면에서, 본 방법은 또한 면역 반응 조절제 또는 화학요법제를 투여하는 것을 포함한다. 다른 측면에서, 면역 반응 조절제는 에이코사노이드(eicosanoid), 사이토카인(cytokine), 프로스타글란딘(prostaglandin), 인터류킨(interleukin) 케모카인(chemokine), 체크포인트 조절자(checkpoint regulator), TNF 수퍼 패밀리 멤버(TNF superfamily member), TNF 수용체 수퍼 패밀리 멤버(TNF receptor superfamily member) 및/또는 인터페론(interferon)이다. 추가적인 측면에서, 면역 반응 조절제는 CXCL-8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL10, IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL15, IL17, IL17, IFN-α, IFN-β, IFN-ε, IFN-ɣ, G-CSF, TNF-α, CTLA4, CD20, PD1, PD1L1, PD1L2, ICOS, CD200, CD52, LTα, LTαβ, LIGHT, CD27L, 41BBL, FasL, Ox40L, April, TL1A, CD30L, TRAIL, RANKL, BAFF, TWEAK, CD40L, EDA1, EDA2, APP, NGF, TNFR1, TNFR2, LTβR, HVEM, CD27, 4-1BB, Fas, Ox40, AITR, DR3, CD30, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, BAFFR, TACI, BCMA, Fn14, CD40, EDAR XEDAR, DR6, DcR3, NGFR-p75, 및/또는 Taj다. 특정 측면에서 면역 반응 조절제는 토실리주맙(tocilizumab; Actemra), CDP870 (Cimzia), 에타너셉트(enteracept; Enbrel), 아달리무맙(adalimumab; Humira), 키너렛(Kineret), 아바타셉트(abatacept; Orencia), 인플릭시맙(infliximab; Remicade), 리툭시맙(rituximab; Rituxan), 골리무맙(golimumab; Simponi), 아보넥스(Avonex), 레비프(Rebif), 레시젠(ReciGen), 플레그리디(Plegridy), 베타세론(Betaseron), 코팍손(Copaxone), 노바트론(Novatrone), 나탈리주맙(natalizumab; Tysabri), 핀골리모드(fingolimod; Gilenya), 테리플루노마이드(teriflunomide; Aubagio), BG12, 텍피데라(Tecfidera), 및/또는 알렘투주맙(alemtuzumab; Campath, Lemtrad

a)이다.

[0065] 추가적인 측면에서, 화학요법제는 액티노마이신(Actinomycin), 아자시티딘(Azacitidine), 아자티오프린(Azathioprine), 블레오마이신(Bleomycin), 보르테조밉(Bortezomib), 카보플라틴(Carboplatin), 카페시타빈(Capecitabine), 시스플라틴(Cisplatin), 클로람부실(Chlorambucil), 시클로포스파미드(Cyclophosphamide), 시타라빈(Cytarabine), 다우노루비신(Daunorubicin), 도세탁셀(Docetaxel), 독시플루리딘(Doxifluridine), 독소루비신(Doxorubicin), 에피루비신(Epirubicin), 에포틸론(Epothilone), 에토포시드(Etoposide), 플루오로우라실(Fluorouracil), 겜시타빈(Gemcitabine), 수산화요소(Hydroxyurea), 이다루비신(Idarubicin), 이마티닙(Imatinib), 이리노테칸(Irinotecan), 메클로레타민(Mechlorethamine), 머캅토퓨린(Mercaptopurine), 메토트렉세이트(Methotrexate), 미톡산트론(Mitoxantrone), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(Paclitaxel), 페메트렉시드(Pemetrexed), 테니포시드(Teniposide), 티오구아닌(Tioguanine), 토포테칸(Topotecan), 발루비신(Valrubicin), 빈블라스틴(Vinblastine), 빈크리스틴(Vincristine), 빈데신(Vindesine), 비노렐빈(Vinorelbine), 파니투무맙(panitumamab), 얼비툭스(Erbitux; cetuximab), 마투주맙(matuzumab), IMC-IIF 8, TheraCIM hR3, 데노수맙(denosumab), 아바스틴(Avastin; bevacizumab), 휴미라(Humira; adalimumab), 허셉틴(Herceptin; trastuzumab), 레미케이드(Remicade; infliximab), 리툭시맙(rituximab), 시나지스(Synagis; palivizumab), 마일로타그(Mylotarg; gemtuzumab, oxogamicin), 랍티바(Raptiva; efalizumab), 티사브리(Tysabri; natalizumab), 제나팍스(Zenapax; dacliximab), 뉴트로스펙(NeutroSpec; Technetium (99mTc) fanolesomab), 토실리주맙(tocilizumab), 프로스타신트(ProstaScint; Indium-III labeled Capromab Pendetide), 벡사르(Bexxar; tositumomab), 제발린(Zevalin; ibritumomab, tiuxetan(IDEC-Y2B8), yttrium 90이 결합됨), 졸레어(Xolair; omalizumab), 맙테라(MabThera; Rituximab), 레오프로(ReoPro; abciximab), 맙캠퍼스(MabCampath; alemtuzumab), 시뮬렉트(Simulect; basiliximab), 류코스캔(LeukoScan; sulesomab), CEA-Scan(arcitumomab), 벌루마(Verluma; nofetumomab), 파노렉스(Panorex; Edrecolomab), 알렘투주맙(alemtuzumab), CDP 870, 및/또는 나탈리주맙(natalizumab)이다. 한 측면에서, ERK1/2 및/또는 ZAP70/Syk의 인산화가 감소된다. 다른 측면에서, 전체 세포 인산화 및 SHP2의 인산화가 유도된다.

[0066] 추가적인 양태에서, 본 발명은 비-천연 발생 HVEM 단백질 및 Fc 단백질과 같은 융합 단백질을 대상에게 투여하여 면역 반응을 조절하는 단계를 포함하는, 면역 반응 조절 방법을 제공한다. 한 측면에서, 융합 단백질은 BTLA 작용제이다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질의 세포외 도메인 및 Fc 단백질을 포함한다. 또 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이를 포함한다. 추가적인 측면에서, 변이는 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합이다. 추가적인 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 추가로 포함한다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 2개, 3개, 4개 이상의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 포함한다. 특정 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R 및 L90A; S58R 및 G68T; S58R 및 L70W; S58R, L70D 및 L90A; S58R, G68T 및 L90A; S58R, L70W 및 L90A; S58R, G68T, L70D 및 L90A; 또는 S58R, G68T, L70W 및 L90A와 같은 변이 중 적어도 하나를 포함한다. 한 측면에서, Fc 단백질은 IgA, IgG, IgD, IgE 또는 IgM이다. 또 다른 측면에서, Fc 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. 특정 측면에서, IgG Fc 단백질은 인간 유래이다. 일 양태에서, BTLA 신호전달이 증가된다. 다른 측면에서, ERK1/2 및/또는 ZAP70/Syk의 인산화가 감소된다. 부가적인 측면에서, 총 세포 인산화 및 SHP2의 인산화가 유도된다. 추가의 양태에서, 환자는 BTLA 관련 질환 또는 장애를 갖는다. 특정 측면에서, BTLA 관련 질환은 암 또는자가 면역 질환 또는 장애이다.

[0067] 한 실시 양태에서, 본 발명은 BTLA 발현 세포를 비-천연 HVEM 단백질 및 Fc 단백질과 같은 융합 단백질과 접촉시킴으로써 BTLA 신호전달을 조절하는 단계를 포함하는, 세포에서 BTLA 신호전달을 조절하는 방법을 제공한다. 하나에서는 BTLA 신호가 증가된다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질의 세포외 도메인 및 Fc 단백질을 포함한다. 또 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이를 포함한다. 추가적인 측면에서, 변이는 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합이다. 추가적인 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 하나의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 추가로 포함한다. 다른 측면에서, 융합 단백질은 HVEM 단백질에 적어도 2개, 3개, 4개 이상의 변이, 예를 들어 S58R, S58K, S58Q, G68T, L70D, L70E, L70N, L70W, L90A 또는 이의 조합을 포함한다. 융합 단백질은 HVEM 단백질에 S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R 및 L90A; S58R 및 G68T; S58R 및 L70W; S58R, L70D 및 L90A; S58R, G68T 및 L90A; S58R, L70W 및 L90A; S58R, G68T, L70D 및 L90A; 또는 S58R, G68T, L70W 및 L90A와 같은 변이 중 적어도 하나를 포함한다. 한 측면에서, Fc 단백질은 IgA, IgG, IgD, IgE 또는 IgM이다. 또 다른 측면에서, Fc 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. 특정 측

면에서, IgG Fc 단백질은 인간 유래이다. 한 측면에서, ERK1/2 및/또는 ZAP70/Syk의 인산화가 감소된다. 다른 측면에서, 전체 세포 인산화 및 SHP2의 인산화가 유도된다.

[0068] 본 발명의 모든 측면이 하기 실시예에서 더 설명된다. 그러나, 실시예는 첨부된 청구 범위에 의해 한정되는 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0069] 실시예

[0070] **실시예 1. HVEM에 상응하는 UL144 잔기는 BTLA와의 결합에 필요하다**

[0071] 인간 CMV로 코드화된 UL144는 BTLA에 선택적으로 결합하지만 CD160에는 선택적으로 결합하지 않으며, T 세포 수용체 신호에 의해 활성화된 T 세포 증식을 HVEM 단백질보다 더 크게 저해한다. UL144에 의한 BTLA 선택이 이 두 단백질의 표면 사이의 독특한 상호 작용으로 인한 것인지 여부를 결정하기 위해 UL144의 BTLA 접촉 표면의 구조를 기존에 해결된 HVEM-BTLA 공결정 (도 1A)으로 모델링하였다. 다음으로, 잠재적인 BTLA 결합 표면을 스크리닝하기 위해 알라닌 및 상동성 스캐닝 변이 유발에 의해 HVEM으로부터 발산된 UL144 표면 잔기가 표적화되었다 (도 1). HVEM의 BTLA 결합 표면과 유사한 CRD1 영역의 한쪽면을 중심으로 한 표면을 정의하는 BTLA의 결합이 파괴되거나 감소된 몇몇 UL144 잔기에서 변이가 관찰되었다. 표면 발현이 확인된 가장 중요한 변이는 HVEM의 Gly60 및 Tyr61과 상동인 Gly41 및 Tyr42에서 발생하였다 (도 7). G46K와 N61A 변이가 BTLA (도 1B, C 및 도 7)에 대한 결합을 증가시켰지만, UL144의 상동성 스캐닝 변이는 CD160 또는 TNFSF 리간드, LIGHT에 대한 추가 리간드 결합을 나타내지 않았다. 따라서 단일 변이는 UL144 단백질에 대한 CD160 결합을 회복시키지 못하며, 이는 CMV가 다중 유전자 변형을 통해 BTLA 결합을 선택하기 위해 UL144를 진화시켰을 가능성이 있음을 나타낸다. 특정 잔류 물은 BTLA 결합에 영향을 미친다: Glu^{27}, Gln^{33}, Pro^{36}, Gly^{41}, Tyr^{42}, Thr^{52}, Leu^{68}이 요구되는 것처럼 보인다; Arg^{43}, Thr^{45}는 결합을 감소시킨다; Asn^{32}, Gln^{47}, Gly^{49}, Gln^{50}은 효과가 없는 것으로 보인다; Gly^{46}, Asn^{61}은 결합을 증가시킨다.

[0072] **세포 및 표면 단백질 발현**: EL4 및 293T 세포를 10 % 가열 불활성화된 FBS, 항생제, L-글루타민 및 50μM 2-ME를 함유하는 DMEM에서 유지시켰다. NK92 세포는 8 % 가열 불활성화된 FBS, 8 % 말 혈청, 항생제, L- 글루타민 및 100 U/ml IL-2가 보충된 50μM 2-ME로 RPMI에서 유지시켰다. BJAB 및 Jurkat TAg (JTAg) 세포는 10 % 열 불활성화 된 FBS, 항생제, L- 글루타민 및 50μM 2-ME를 갖는 RPMI에서 유지시켰다. 야생형 및 돌연변이형 인간 BTLA (Watanabe 등 (2003), Nat Immunol 4: 670)를 포함한 레트로 바이러스로 형질 감염된 EL4 세포 및 BJAB 세포를 GFP 발현으로 분류하여 BTLA 발현 세포의 빈도를 증가시켰다. 위형 단일 감염 레트로 바이러스는 이전에 기술된 바와 같이 레트로 바이러스 플라스미드, pCG VSVg 엔벨로프 단백질 및 Hit60 gag-pol의 동시 형질 감염에 의해 생성되었다 (Sedy et al. (2005), Nat Immunol 6:90). UL144 및 BTLA 변이체는 세계 일주 PCR 변이 유발에 의해 생성되었다. 변이체 또는 야생형 UL144를 함유하는 pND 벡터로 인산 칼슘 형질 감염에 의해 형질 도입된 293T 세포를 Fc 결합 연구에 사용하였다. PCR 증폭 및 부위 특이적 돌연변이 유발에 사용된 모든 올리고뉴클레오타이드를 표 1에 나타내었다. JTAgs에서 HVEM 리간드의 일시적인 발현을 위해 T820 구형파 전기천공기를 사용하여 230V에서 65V에서 제어 벡터를 갖는 지시된 DNA 구조물 10μg을 세포에 전기 천공시켰다

[0073] **항체 및 Fc 융합 단백질**: 항-인간 HVEM은 BD Biosciences로부터 입수하였다. 항-인간 BTLA 항체 클론 MIH26 및 J168은 eBioscience 및 BD Biosciences로부터 입수하였다. 항-인간 BTLA 클론 6F4 및 항-UL144 클론 2F11은 이전에 기재된 바와 같이 생산되었다 (Cheung et al. (2005), Proc Natl Acad Sci 102 : 11318, Cheung et al. (2009a), J Immunol 183 : 7286). 동키 항-인간 Fcγ 및 항-FcμF(ab')$_2$ 는 Jackson Immunoresearch로부터 입수하였다. 인간 PBMC 집단을 확인하는 항체는 CD19 FITC, CD56 PE-Cy7, CD8 PE, CD3 PE 610, CD4 eFluor450 및 CD69 PerCP-Cy5.5를 포함한다. 포스포-특이적 항체는 포스포-티로신 PE, 포스포-Akt (S473) PE 및 포스포-SHP-2 (Y542) Alexa647, 포스포-ERK1/2 (pT202/pY204) PerCP-e710 및 포스포-NF-κB p65 (S529) PE. Fc 융합 단백질을 다음과 같이 설계하고 생산하였다: 인간 HVEM의 천연 신호 서열을 포함하는 세포외 도메인 (잔기 1-184)을 3'말단에서 인간 IgG Fc 서열에 융합시켰다. 인간 BTLA 및 CMV UL144의 경우, 잔기 26-150 및 19-132는 각각 5'말단에서 인간 Ig 신호 서열에, 3'말단은 인간 IgG Fc 부위에 융합되었다. Fc 융합 단백질은 CellGro Free 무혈청 배지에서 성장시킨 형질 전환된 293T 세포에서 생산되었고 단백질 A 컬럼에서 친화 크로마토그래피로 정제되었다. 대조 인간 IgG1 단백질은 Sigma-Aldrich로부터 입수하였다. BTLA 선택적 HVEM 돌연변이 단백질은 다음과 같이 3 단계의 변이 유발 과정을 통해 새롭게 조작되었다: 첫째, 표면이 노출된 잔기의 알라닌 변이 유발로 리간드 결합 핫스팟을 확인한다. 리간드 결합의 표적화를 최적화하기 위해 핫스팟에서의 포화 변이 유발; 셋째, BTLA 선택성을 달성하고 친화성을 향상시키기위한 조합 변이 유발.

[0074] **결합 검정**: 유동 세포 계측 결합 검정은 전술한 바와 같이 수행되었다 (Sedy et al., 2013). 간략하게, 세포를 완충액 (2 % FBS 함유 PBS)에서 얼음 위에서 30분 동안 Fc 리간드와 함께 배양하고, 2회 세척하고, 완충액 내 얼음 위에서 15분 동안 항-Fc 2차와 함께 배양하고, 2회 세척하고 분석하였다. 특이적 평균 형광 강도 (MFI)는 대조군 세포 MFI로부터 실험적 세포 MFI를 뺀 값으로 계산되었다.

[0075] **표면 플라스몬 공명 동역학 친화도 측정**: 인간 BTLA-Fc 리간드를 아민 커플링을 사용하여 CM5 센서 칩 상에 150 반응 단위로 고정시켰다. 센소그램은 30 ㎕/min, 25℃의 유속으로 수집되었다. 특이적 결합은 리간드 채널로부터 대조군을 제거함으로써 결정되었다. 표시된 농도의 분석물을 7℃로 냉각된 바이알로부터 주입하였다. 데이터 수집은 15분의 해리에 이어 90 μl 분석물의 3분을 포함한다. 각 주기 이후의 재생은 15 μl 10 mM 글리신 pH 2.5의 30 초 펄스로 수행되었다. 분석물 주입 및 분리 후 처음 10초는 BIAevaluation 소프트웨어 (버전 4.1) 동역학 분석 모듈의 Langmuir 및 Bivalent fit 모델 모두를 사용하여 친화도 측정에 적용되었다.

[0076] **마이크로스피어 활성화된 세포의 포스포플로우 분석**: 알데하이드/설페이트 라텍스 마이크로스피어 (5 ㎛)를 100 μg/ml의 항-Fc μF(ab')$_2$ 단독 또는 표시된 농도의 인간 IgG1, HVEM-Fc, 또는 이전에 기술된 바와 같은 UL144-Fc (Sperling et al. (1998), J immunol 161 : 6459). 간략하게는, 마이크로스피어를 PBS로 세척하고 37℃에서 90분 동안 표시된 단백질과 함께 항온 처리한 다음 완충액 (1 % BSA와 0.1 % 글리신이 첨가된 PBS)으로 막히고 두 번 세척하여 배지에 재현탁하고 세었다. 마이크로스피어를 사용하여 JTAg 및 BJAB 세포를 3:1 비율로 자극하였다. 마이크로스피어를 먼저 96 웰 평면 바닥 플레이트에 첨가한 다음 세포를 PBS로 세척하고 1.5×10^6 cell/ml의 농도로 재현탁시켰다. 플레이트를 잠시 회전시키고 표시된 시간 동안 37℃에서 배양한 다음 PBS 중 2 % 파라포름 알데히드로 고정시키고 37℃에서 10분간 추가 배양하였다. 세포를 완충액 (2 % FBS 함유 PBS)으로 세척하고, 얼음 위에서 30분 동안 Perm III 완충액 (BD Bioscience)에서 침투시키고, 2회 세척하고, 인산염 특이성 항체와 함께 얼음 위에서 30분 동안 배양하고, 2회 세척하고 분석하였다.

[0077] **웨스턴 블로팅**: IL-2 의존성 NK92 모델 세포주를 표시된 농도의 IL-2 또는 인터페론-β를 사용하여 활성화시켰다. IL-2 반응을 시험하는 실험에서, NK92 세포를 IL-2 없이 밤새 배양하여 기저 신호를 재확립시켰다. 융합 단백질 및 항체를 이용한 실험에서, NK92 세포를 활성화하기 전에 얼음 위에서 적어도 15분 동안 대조 인간 IgG1, HVEM-Fc 또는 UL144-Fc 또는 대조 마우스 IgG2a 또는 항-BTLA로 코팅하였다. NK92 세포를 100 μl에서 조건당 2×10^6 세포로 분주하고 표시된 시간 동안 37℃에서 활성화시키고 얼음 냉각된 PBS로 식힌 다음 RIPA 완충액에서 4℃로 20분 동안 용해시킨 다음 4℃에서 14,000 rpm로 원심분리하였다. 추출물을 1 % β-머캅토에탄올을 함유하는 SDS 로딩 완충액에서 5분간 끓여서 10 % Bis-Tris 겔에서 SDS-PAGE로 분석하였다. 단백질을 탱크 방법을 사용하여 PVDF 막으로 옮기고 TBS-T 완충액에서 1 % 오발부민으로 차단하고 포스포-JAK1, 포스포-STAT5, 포스포-STAT1, 포스포-Akt (S473) 및 총 액틴에 대한 항체로 블로팅 한 후, 항-래빗 HRP 또는 항-마우스 HRP에 의해 검출되고 향상된 화학발광에 의해 가시화되었다.

[0078] **인간 PBMC의 사이토카인 활성화**: 이전에 기술된 바와 같이 건강한 공여자로부터 신선한 인간 혈액을 수집하고 준비하였다 (Sedy et al., 2013). 간단히, 피콜 구배 버피 코트로부터 분리된 PBMC를 얼음 위의 표시된 Fc 단백질과 함께 10^6 cell/ml에서 15분 동안 배양한 다음, 유세포 분석에 앞서 6시간 동안 5μg/ml의 항-인간 Fcγ F(ab')$_2$와 가교결합시켰다.

[0079] **실시예 2. 림프종 표적 리간드 결합에서의 체세포 TNFRSF14 변이**

[0080] FL 및 DLBCL에서 수득된 체세포 TNFRSF14 변이는 그의 리간드 및 후속 기능과의 보존된 HVEM 상호 작용을 방해할 가능성이 있음이 밝혀졌다 (도 8). HVEM 구조를 파괴할 것으로 예측되지 않는 림프종 관련 변이가 선택되었고 BTLA, CD160 및 LIGHT에 변이 수용체 결합을 평가했다. 표면 발현되는 것으로 검증된 HVEM 변이체는 리간드 결합에 대한 영향에 따라 세 그룹으로 분류될 수 있다 (도 8). P59S, A102P 또는 R109W가 포함된 변이는 CD160만으로 상호 작용을 방해하였다. Y61C와 G72D 변이는 BTLA와 CD160과의 상호 작용을 막았지만 LIGHT 결합에는 큰 영향을 미치지 않았다. 마지막으로, 변이 G60D와 T82P, 또는 Ser91과 Lys92 사이에 Ile의 삽입은 모든 리간드 상호 작용을 파괴시켰다 (도 2). HVEM Tyr61은 BTLA와 CD160의 결합에 중요하다고 밝혀졌다. 종합하면, 이러한 체세포 변이는 CD160 및 BTLA와의 상호 작용의 특이성 상실 및 LIGHT와의 손상되지 않은 또는 영향을 받은 상호 작용 중 하나와 함께 리간드 결합의 계층 구조를 정의한다. TNFSF14의 유전적 변이는 DLBCL의 추가 집단에서 더 확인되었고, BTLA 또는 TNFSF14에서 결실이 있는 추가 종양을 확인하였다 (도 2H). 인간 FL 및 DLBCL 내의 HVEM 네트워크에서 다중 유전자 병변의 존재는 이들 경로가 종양 미세 환경 내에서 세포 선별에 크게 기여할

수 있음을 나타낸다. 특정 잔기는 리간드 결합에 중요하다: Pro^{59}, Ala^{102}, Arg^{109} - CD160에 결합하지 않음; Tyr^{61} 및 Gly^{72}는 BTLA 또는 CD160에 결합하지 않음; Gly^{60}, Thr^{82} 및 ins91I (Ser^{91} 및 Lys^{92}로 표시됨) - LIGHT, BTLA 또는 CD160에 결합하지 않음 (도 2C-H).

[0081] **실시예 3. HVEM과 UL144는 BTLA의 겹쳐진 표면에 결합한다.**

[0082] 바이러스 UL144 또는 변이 HVEM에 의한 변형된 BTLA 활성이 상이한 표면의 결합으로 인한 것인지 여부를 결정하기 위해, 이들 작용제에 대한 접촉 표면의 BTLA 잔기를 비교하였다. 이전에 작용 물질 활성을 갖는 것으로 밝혀진 항-BTLA 단클론 항체 (클론 MIH26)의 결합이 Glu57 또는 Pro59 중 어느 하나에서의 변이에 의해 파괴된 반면, 경쟁적 항-BTLA 단클론 항체 (클론 J168)의 결합은 Arg42에서의 변이에 의해 파괴되었다 (도 3a 및 도 9a). 특히, MIH26-결합 잔기 Glu57은 작용성 항-BTLA 단클론 항체 (클론 6A6)의 에피토프 내에 포함된 마우스 BTLA의 Gln63에 상동이다. 이와 비교하여, 인간 및 마우스 BTLA에 대한 이전의 연구와 일치하는, HVEM-Fc 및 UL144-Fc 모두 Gln37, Arg42, Pro59 및 His127과의 결합에 대해 유사한 요건이 관찰되었다. BTLA의 HVEM 또는 UL144에 대한 유사한 친화도가 표면 플라스몬 공명을 사용하여 확인되었다 (도 3B, C). BTLA (295 nM)에 대한 UL144-Fc의 결합활성 (KD, 1:1 결합 모델)는 HVEM-Fc (177 nM)보다 약간 작았다 (표 2). HVEM과 UL144간에 미묘한 결합활성 및 결합 차이가 관찰되었지만, 전체 인간 CMV UL144는 HVEM과 BTLA의 결합을 유사하게 모방한다. 도 9A-B는 야생형 또는 변이된 인간 BTLA로 형질 도입된 EL4 세포가 항-인간 BTLA 다클론 항체 또는 단클론 항체 또는 HVEM-Fc 또는 인간 CMV UL144-Fc로 염색되고 이어서 종 특이적 이차를 보여준다. 위에서부터 아래의 그래프는 GFP 발현의 제한된 세포에서 6F4, J168 또는 MIH26 항-BTLA (A), HVEM-Fc 또는 UL144-Fc (B) 염색의 특이적 MFI 염색을 보여준다.

[0083] 림프구에서의 HVEM 및 BTLA 동시 발현은 트랜스에서 외인성 리간드에 의한 활성화를 경쟁적으로 차단하는 세포 표면에 위치한 시스 내 본질 복합체의 형성을 유도한다. BTLA와 함께 발현된 UL144가 트랜스에서 리간드 접근을 방지하기 위해 시스에서 복합체를 형성하는지 또는 트랜스에서 BTLA의 UL144 연결이 HVEM에 의한 BTLA 접근의 입체 장애를 우회할 수 있는지 여부를 결정 하였다. BTLA와 동시 발현된 HVEM 및 UL144는 HVEM-Fc 및 UL144-Fc 모두에 대한 결합을 차단하여 HVEM 및 UL144가 시스에서 BTLA와 유사한 복합체를 형성하고, UL144가 세포 표면에서 예비 형성된 BTLA 시스 복합체를 능가할 수 없음을 나타낸다 (도 9C, D). 그러나, BTLA R42D 변이체의 동시 발현은 트랜스에서 BTLA-Fc에 결합하는 것을 막는 시스 발현된 HVEM이 아니라 UL144가 BTLA-UL144 시스-복합체를 파괴시키기에 충분하지 않을 수 있음을 나타낸다(도 9E, F).

[0084] 단클론 항체 J168 및 MIH26에 의해 인식되는 항체 에피토프는 사량체 비대칭 단위에서 HVEM 분자에 의해 폐색된 BTLA의 표면과 중첩되고, BTLA에 대한 HVEM 결합을 차단할 것으로 예측되었다 (도 3A). 이들 항-BTLA 클론 모두의 적정이 HVEM-Fc 및 BTLA에 대한 UL144-Fc 결합을 간섭하는 반면, 제 3 항-BTLA 단클론 항체 (클론 6F4)는 HVEM-Fc의 BTLA에 대한 결합을 증가시키지만, UL144-Fc의 결합에는 영향을 미치지 않았다 (도 3D, E). 그것의 에피토프는 BTLA 변이체를 사용하여 밝혀지지 않았고, 이 클론은 HVEM에 대한 반응성을 나타내지 않았다. 종합하면, 이러한 데이터는 BTLA의 동일한 표면이 HVEM 및 UL144에 결합하는 데 사용되는 것처럼 보이지만, 리간드 결합에 기여하는 추가적인 구조적 요소가 있을 수 있음을 나타낸다. 또한, BTLA 항체의 에피토프 매핑은 작용제 활성이 인간 BTLA (클론 MIH26의 경우) 및 마우스 BTLA의 Gln63 (클론 6A6의 경우)에서 Glu57 또는 Pro59와 연관되어 있음을 나타낸다. 도 3에서 왼쪽 이미지의 특정 잔기는 항체 바인딩에 대한 요구 사항을 나타낸다: Glu45, Glu57, Pro59는 MIH26 결합에 필요하며, Arg42는 J168 결합에 필요하다. 도 3에서 오른쪽 이미지의 특정 잔기는 HVEM/UL144 결합 에피토프를 나타낸다: Gln37, Arg42, Pro59, His127은 HVEM/UL144 결합, Glu45, Glu57, Phe119, Ser121은 HVEM/UL144에 필요하지 않은 것으로 나타났다.

[0085] **실시예 4. CD160은 HVEM에 대한 경쟁을 통해 BTLA-매개된 억제를 제한한다**

[0086] 다양한 림프구 서브세트에서 CD160 및 LIGHT의 발현은 바이러스 및 암 변이 HVEM이 BTLA 억제 신호전달을 수행하는 능력에 영향을 줄 수 있다. HVEM 리간드의 발현을 변경하면 BTLA 효능에 영향을 주는지 평가하기 위해 이소성 BTLA 또는 CD160 동형 단백질을 발현하는 Jurkat T 세포가 활성화되었다 (도 4 및 도 10A). 고정화된 항-CD3으로 활성화된 대조군 세포는 세포외 신호 조절 키나아제 (ERK) 1/2, 제타-쇄 관련 단백질 키나아제 70kD (ZAP70)/Syk 및 총 세포 티로신의 인산화를 유도하였으며, ERK1/2 인산화는 공동 고정화된 항-CD3 및 HVEM 또는 UL144-Fc로 활성화된 세포에서 감소되었다 (약 50-70 % 감소). 이소성 BTLA 발현은 HVEM 및 UL144가 백그라운드 수준으로 ERK1/2 인산화를 억제하는 능력을 향상시켰으며 ZAP70/Syk 인산화 (약 15-25 %)를 현저히 감소시켰다 (도 4A, B). 티로신 인산화는 HVEM 또는 UL144로 자극 후 BTLA 및 관련 신호 단백질의 활성화를 반영하여 증가되었다 (도 4C). 중요한 것은, 이소성 CD160 (글리코포스포이노시타이드 또는 막관통성 동형단백질)을 발현하는

세포에서, HVEM은 BTLA가 추가적으로 존재하지 않을 경우 ERK1/2 인산화를 억제할 수 없었다. 대조적으로, UL144는 CD160 이소형 발현에 관계없이 ERK1/2 인산화를 억제하였다. HVEM 및 UL144의 작용 활성은 다른 HVEM 리간드의 부재하에 높은 수준의 인간 BTLA를 발현하고 IgM 자극에 반응하여 Syk 의존성 ERK 및 Akt 인산화를 활성화시키는 인간 비호지킨 림프종인 BJAB에서 확인되었다 (도 10B). 구체적으로, 공동 고정화 항-IGM 및 적정 HVEM 또는 UL144-Fc로 활성화 된 세포에서, ERK, Akt 및 세포 포스포-티로신의 인산화의 약 50 % 감소가 대조군 세포와 비교하여 관찰되었다. 종합하면, 이러한 결과는 HVEM이 BTLA 신호를 활성화시키는 능력이 CD160에 대한 BTLA의 상대 비율에 의존하고, 바이러스 모방에 의한 수용체 선택성이 장애를 일으키지 않는 BTLA 작용을 초래한다는 것을 보여준다.

[0087] **실시예 5. BTLA의 작용제 활성화는 전-염증성 사이토카인 자극을 억제한다**

[0088] 가용성 HVEM-Fc는 있지만, UL144-Fc는 없는 시험관 내에서 사이토카인 또는 CMV에 감염된 섬유아세포와 함께 배양된 PBMC에서, 유일하게 공동 자극시킨 CD160-발현 NK 세포의 활성화는 이전에 보여왔다. 병행 연구에서, 다양한 PBMC 서브세트에서 HVEM 및 UL144-Fc에 의해 IL-2가 유도된 CD69 발현의 억제가 BTLA의 발현과 상관 관계가 있음이 관찰되었다 (도 11A). CD160의 존재하에 세포 및 바이러스성 HVEM이 IL-2 신호전달을 억제하는 능력이 추가로 확인되였다 (도 5). 인간 NK 세포주 NK92는 STAT5, Akt 및 ERK 경로의 활성화를 유도하는 키나아제 JAK1의 인산화에 의해 적정 방식으로 IL-2에 반응한다. IL-2를 처리한 세포에서 JAK1, STAT5 및 Akt의 단백질의 인산화가 감소한 것이 관찰되었고 이어서 HVEM-Fc는 아니지만 UL144-Fc 또는 항-BTLA 항체 (클론 MIH26)를 가지는 BTLA의 활성화하여, BTLA의 UL144 표적화가 과도한 CD160의 존재에 의해 방해받지 않는다는 것을 가리킨다 (도 5A, 5B 및 도 11B). BTLA가 I 형 인터페론 신호전달을 조절하는지 여부는 이 경로가 SHP-1 억제에 의해 조절되기 때문에 더 테스트되었다. 항-BTLA 단클론 항체 (클론 MIH26)는 SHP-1 민감성 사이토카인 신호전달 경로에서 BTLA가 광범위한 저해 기능을 나타내는 것을 보여줌으로써 초기 및 후기의 STAT1 인산화의 정도를 감소시켰다 (도 11C). 또한 CD160은 HVEM을 제한하지만, 이의 바이러스성 모방물에서는 BTLA의 결합 및 활성화에 대해 제한하지 못한다. 도 11은 표시된 Fc 단백질로 전처리 한 PBMC 및 표시된 농도의 IL-2로 6시간 동안 자극하여 세포 부분 집합 내에서 CD69 발현을 염색 한 것을 나타낸다. 그래프는 CD19+ B 세포, CD4+ 및 CD8+ T 세포, CD3+CD56+ 세포, CD56dim 및 CD56bright NK 세포에서 CD69 발현의 백분율을 보여준다. B.-C. 항-BTLA (MIH26) 또는 대조군 Ig로 전처리 한 후 표시된 시간에 NK92 세포를 적정된 IL-2 (B.) 및 IFN-β (C.)로 자극시켰다. 웨스턴 블롯은 IL-2 신호를 모니터하기 위해 포스포-JAK1, STAT5 및 Akt (S473)의 전체 세포 추출물을, 또는 IFN-β 신호전달을 모니터하기 위해 포스포-STAT1을, 그리고 전체 단백질 수준을 조절하기 위해 액틴을 보여준다.

[0089] **실시예 6. 생체공학적으로 제조된 HVEM은 BTLA 신호전달을 선택적으로 활성화한다.**

[0090] UL144 및 림프종 변이의 리간드 결합 선택성은 HVEM의 새로운 기술이 BTLA 특이적 작용제를 산출해야 함을 시사했다. 변이 HVEM-Fc 단백질은 알라닌 스캐닝, 포화 및 조합 변이 유발을 통해 조작되었다. S58R 및 L90A (HVEM-RA)에서 변이를 포함하는 HVEM 뮤테인은 BTLA에 대한 선택성을 부여하는 반면, G68T 및 L70W에서의 추가 변이는 BTLA 친화도를 10배 (HVEM-RTWA) 증가시켰다. 주목할만하게, RA 및 RTWA 변이체는 모두 대조군 세포에서 부모 HVEM-Fc 단백질보다 항-CD3 유도된 포스포-ERK1/2를 억제하였고, 모든 HVEM-Fc 단백질은 BTLA를 이소성으로 발현하는 세포에서 백그라운드 수준으로 ERK1/2 인산화를 감소시켰다 (도 6A). 고친화성 HVEM-RTWA 변이체만이 ZAP-70/Syk 인산화를 모든 세포에서 백그라운드 수준으로 유의하게 감소시켰다 (도 6B). 이소성 BTLA를 발현하는 세포에서 HVEM-RA 및 HVEM-RTWA 변이체의 저해 활성은 총 세포 포스포-티로신뿐만 아니라 포스포-SHP2 신호의 극적인 유도와 관련이있다 (도 6C 및 도 12B). 따라서, 생체공학적으로 제조된 HVEM-Fc는 바이러스 및 변이 HVEM의 선택적 및 방해되지 않는 작용을 재생산한다.

[0091] **실시예 7. 다양한 병원체-관련 및 드 노보(de novo) 생체공학적으로 제조된 HVEM 뮤테인 BTLA 작용제는 T 세포 신호전달을 억제한다.**

[0092] HVEM 뮤테인 BTLA 작용제는 T 세포 신호전달을 억제하는 것으로 나타났다. JTAg 세포는 대조군 BTLA, CD160-GPI, CD160-TM, BTLA CD160-GPI 및 BTLACD160-TM HVEM 리간드로 전기 천공에 의해 형질 전환되었고, 활성화 전에 48시간 동안 쉬었거나 또는 표시된 HVEM 리간드를 발현하는 레트로 바이러스로 안정적으로 형질을 도입하였다. JTAg를 활성화시키기 위해, 세포 알데하이드 설페이트 마이크로스피어를 37℃에서 90분 동안 PBS 중의 1μM에서 표시된 HVEM 또는 UL144 Fc 단백질의 유무에 관계없이 100 ㎍/ml의 항-CD3와 결합시켰다. 마이크로스피어는 두 번 씻어서 5분 동안 JTAg 세포와 4:1 마이크로스피어 대 세포 비율에서 배양되었다. 세포를 즉시 2 % 파라 포름 알데하이드로 고정시키고, 90 % 메탄올로 투과성으로 만들고, 표시된 포스포-특이 항체로 염색하였다. 그 후, 세포는 포스포-ERK1/2 (T202/Y204) (도 13A, B), 포스포-NF-κB p65 (S529) (도 13C), 포스포-BTK/ITK

(Y551/Y511) (도 13D), 포스포-PLCγ1 (Y783) (도 13E), 포스포-ZAP70/Syk (Y319/Y352) (도 13F), 및 포스포-티로신 (도 13G)의 세포내 염색이 확인되었다. 도 13A는 염색된 세포의 MFI의 그래프를 도시한다. 도 13A-G. 염색된 세포의 양성 백분율을 보여줍니다. (세 번의 실험을 나타내는 평균±SEM). *, p <0.05; **, p <0.01; ***, p <0.001; ****, p <0.0001.

[0093] **실시예 8. BTLA 작용제는 B세포 신호전달을 억제한다**

[0094] BTLA 작용제는 B 세포 신호전달을 억제하는 것으로 나타났다. BJAB 세포를 활성화시키기 위해 알데히드 설페이트 마이크로스피어를 37 ℃에서 90분 동안 1 μM의 PBS에서 표시된 HVEM 또는 UL144 Fc 단백질의 유무에 관계없이 100 μg/ml의 항-IGM과 결합시켰다. 마이크로스피어는 두 번 씻어서 10분 또는 60분 동안 BJAB 세포와 4:1 마이크로스피어 대 세포 비율에서 배양되었다. 세포를 즉시 2 % 파라포름 알데하이드로 고정시키고, 90 % 메탄올로 투과성으로 만들고, 표시된 포스포-특이 항체로 염색하였다. BJAB 세포는 포스포-ERK1/2 (pT202/pY204), 포스포-Akt (S473) 또는 포스포-티로신의 세포내 염색에 대해 확인되었다 (도 14A-B). 도 14A-B는 포스포-ERK1/2 (pT202/pY204), 포스포-Akt (S473) 또는 포스포-티로신에 대해 양성인 세포의 백분율을 나타낸다.

[0095] BTLA 작용제는 B 세포의 인터페론 활성화를 억제한다. 인간 B 세포를 활성화시키기 위해 알데히드 설페이트 마이크로스피어를 37 ℃에서 90분 동안 1 μM의 PBS에서 표시된 HVEM 또는 UL144 Fc 단백질과 결합시켰다. 마이크로스피어를 두 번 세척하고 정상 인간 공여자 혈액 PBMC로부터 정제된 인간 B 세포와 4:1 마이크로스피어 대 세포 비율로 배양하고, 용해 및 RNA 단리 전에 6시간 동안 10U/ml 인터페론-β로 자극하였다. 도 15는 대조군과 비교하여 세포를 각각의 BTLA 작용제 (HVEM, UL144 Fc, HVEMR109W Fc 및 HVEMRTWA Fc)로 처리했을 때, 표시된 인터페론 자극된 유전자의 각각의 수준에서의 접힘 감소를 나타낸다. (평균±SEM, 2회의 실험으로부터 풀링된 데이터). *, p <0.05; **, p <0.01.

[0096] BTLA 작용제는 NK 세포에서 IL-2 신호전달을 제한하는 것으로 밝혀졌다. NK92 세포를 혈청없이 4시간 이상 배양한 후, 표시된 Fc로 전처리 한 후 0, 1, 5, 15, 30 및 60 분에 20U/ml의 인간 IL-2로 자극하였고, 2㎍/ml로 얼음에서 15 분 동안 처리하였다 (도 16). 활성화 후 세포를 RIPA 완충액에서 용해시키고 단백질 인산화를 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 도 16A는 총 단백질 수준을 조절하기 위해 포스포-JAK1, 포스포-STAT5 및 액틴의 전체 세포 추출물의 웨스턴 블롯을 나타낸다. 도 16B는 액틴에 정규화된 밴드 강도의 정량을 나타내는 그래프를 도시한다.

[0097] **실시예 9. 마우스 HVEM에서 리간드 선택성의 동정**

[0098] 리간드의 선택성을 마우스 HVEM에서 결정하였다. 마우스 HVEM-Fc 뮤테인의 패널은 야생형 HVEM을 포함하는 293T 세포 및 LIGHT (BTLA/CD160-sp) 또는 BTLA 및 CD160 둘 모두와의 결합을 차단할 것으로 예상되는 단일 아미노산 변화를 함유하는 2 가지 변이체에 일시적으로 형질 감염시킴으로써 제조되었다 (LIGHT-sp) 인간 HVEM (도 17) 상동성을 기반으로. HVEM-Fc 단백질을 마우스 CD160 (도 17A), 마우스 BTLA (도 17B) 및 마우스 LIGHT로 일시적으로 형질 감염시킨 293T 세포 상에 적정하고 항-인간 Fc를 사용하여 결합을 검출하였다. 특정 결합은 유세포 분석에서 측정 (도 17C). 그래프는 리간드 발현 세포 상에 HVEM-Fc 단백질의 MFI 염색을 나타낸다.

[0099] **실시예 10. 선택적 HVEM-Fc는 생체 내에서 피부 염증을 억제한다**

[0100] HVEM-Fc는 생체 내에서 피부 염증을 억제하는 것으로 나타났다. 마우스 HVEM-Fc 뮤테인을 피부 염증의 동물 모델에 이미퀴모드로 복강 내 주사하였다. 피부 조직은 매일 치료할 때 각 동물의 면도 된 면에 50mg의 이미퀴모드 (Aldara 제제)를 3회 적용한 후 수확하고 조직학적 분석을 위해 분류했다. 표피의 두께는 각 조직의 길이에 걸쳐 10개의 부위에서 H & E로 염색된 피부 절편에서 정량되었다. 대표적인 이미지는 HVEM 뮤테인으로 처리된 다른 동물 그룹에서 표피 두께를 나타낸다 (도 18A). 도 18B는 표피 두께의 정량화를 나타낸다. *, p <0.05; **, p <0.01; ***, p <0.001; ****, p <0.0001.

[0101] **실시예 11. 요약**

[0102] 본원에 제시된 데이터는 BTLA 선택적 작용제의 바이러스 및 암세포 발현이 HVEM 신호전달 네트워크를 표적화하는 일반적인 전략임을 보여준다. CD160 결합을 피하는 HVEM의 바이러스 진화 및 변이는 병원체 및 암세포에 대한 선택적 이점을 제공하는 것으로 보인다. CMV에서 바이러스성 HVEM 모방의 활성은 HVEM에 비해 CD160 발현 세포에서 방해받지 않고, 림프구에서의 항원 수용체 자극 후 ZAP70/Syk 및 하류 ERK1/2 경로의 활성화를 직접 저해한다는 것이 밝혀졌다. 또한, CD160 발현 NK 세포에서 바이러스 HVEM 모방에 의한 BTLA의 활성화는 염증성 사이토카인 신호전달을 직접적으로 제한한다. 종합하면, 이러한 데이터는 억제 수용체에 의해 염증 신호를 제한하는 잠재력이 바이러스 및 종양과 같은 다양한 세포 내 병원체에 대한 선택적인 압력을 제공할 수 있는 방법을

설명한다. 바이러스 및 종양 변이에 대한 지식 기반은 BTLA에 대한 선택성과 높은 친화성을 달성하기 위해 HVEM의 생체 공학을 촉진시켰으며, 이는 염증 및 증식 과정을 변경시키는 데 유용한 것으로 나타났다.

[0103] UL144 단백질은 부분적으로 그 상동성 때문에 HVEM의 해결된 구조를 사용하여 모델링되었다 (도 1A). 그러나 특정 BTLA 변이체, 6F4 항체에 결합된 BTLA, 그리고 시스의 BTLA에 대한 UL144와 HVEM 사이의 미묘한 결합 차이는 동일하지 않은 상호 작용을 나타냈다 (도 3, 4). UL144는 바이러스-숙주 진화 과정에서 일어난 여러가지 특이성 변화를 반영하는 것으로 보이는 점 변이를 통해 CD160 결합 단백질로 되돌릴 수 없었다. 결과적으로 UL144 단백질은 균주를 통한 BTLA 결합 유지에도 불구하고 항원성이 매우 높다. 대조적으로, 종양 관련 HVEM은 각각 하나의 변이만을 포함하고 있어 모든 CD160 결합을 차단할 수 없다. Ig 도메인과 상호 작용하는 TNF 수용체의 다른 예는 Longo1을 가진 NGFRp75 이다. 특히 HVEM 자체는 헤르페스 심플렉스 바이러스 당단백질 D의 Ig 도메인과의 상호 작용을 통해 처음 발견되었다. CMV는 TNF 관련 세포사멸 유도 리간드 수용체 (TRAIL-R)와 결합하는 다른 단백질인 ORF UL141을 발현한다. 이 두 단백질의 공-복합체는 최근 Ig 도메인으로 UL141 접힘을 나타내지만, 리간드 TRAIL이 BAILA 또는 CD160과의 HVEM 상호 작용과는 별개로 TRAIL-R과 결합하는 표면에서 이들 단백질 사이의 접촉이 일어난다. HVEM은 여러 단백질 종류의 리간드를 채택할 때 독특할 수 있으며 TNFR 단백질의 N 말단 시스테인 리간드 도메인 1 (CRD1)과 Ig 도메인 사이의 복합체는 진핵세포 사이에서 선호되는 단백질-단백질 상호 작용 유형으로 보이지 않는다. 다양한 바이러스에 의한 이러한 비전통적 상호 작용의 빈번한 사용에 주목하면 면역 수용체를 조절하면 병원균 생존을 향상시킬 수 있다는 유혹적인 제안이 나오게 된다.

[0104] BTLA는 인간 NK 세포에서 IL-2 및 I 형 인터페론 신호전달을 억제하고 T 및 B 세포 수용체 신호전달을 조절하는 면역 체크 포인트 억제제로서의 BTLA의 역할을 확인했다. BTLA 하류 억제 신호전달의 메커니즘은 SHP-1 또는 2의 활성화를 포함하는 것으로 생각되며, 아마도 추가 경로를 포함할 것이다. ZAP70/Syk 인산화에 대한 생체 공학적으로 제조된 HVEM-RTWA의 억제 효과는 CD3ζ 및 Syk가 T 및 B 세포에서 BTLA 활성의 직접적인 표적임을 나타내는 이전의 연구와 일치한다. JAK/STAT 신호전달은 SHP-1의 활성화 및 JAK 키나아제 및 STAT 단백질을 포함하는 표적 단백질의 탈 인산화에 의해 부분적으로 조절된다. BTLA 작동제는 SHP-1 모집을 통해 또는 알려지지 않은 억제 경로의 참여를 통해 사이토카인 신호전달을 직접 표적으로 할 수 있다.

[0105] 선택적 바이러스 및 변이 BTLA 작용제와 대조적으로, HVEM은 활성화 된 T 세포에서 BTLA, LIGHT 및 CD160과 상호 작용하지만, NK 세포에서는 CD160의 풍부한 발현이 HVEM을 분리하고 잠재적으로 전-염증성 신호전달을 활성화시킨다. 림프종의 맥락에서 변이된 TNFRSF14는 종종 비기능적 대립 형질과 결합하여 예후가 악화된다. 상기한 실험은 CD160 결합으로부터의 HVEM 변이가 세포 용해성 세포의 활성화를 방지하는 반면, BTLA 결합의 보유는 인접한 세포에서 억제성 신호전달을 활성화시키는 것으로 예측한다. 트랜스에서 HVEM 신호전달을 활성화시킬 수 있는 LIGHT 및 BTLA에서의 DLBCL 결실의 확인은 주요 선택 인자가 종양 침윤 림프구의 활성화라는 가설을 뒷받침한다. 또한 종양 자체가 LIGHT 및 BTLA에 반응하여 HVEM의 생존 신호를 활성화할 수 있다. 특히, 여포 T 헬퍼 세포는 BTLA 및 LIGHT를 현저하게 발현하며, 림프종 내 HVEM 기능의 유지에 기여할 수 있다. HVEM이 리간드 선정을 통해 종양 미세환경에서 림프종 적합성에 어떻게 기여하는지를 지속적으로 조사해야 한다. BTLA, LIGHT 및 CD160의 발현은 세포 유형, 활성화 및 분화 상태에 따라 크게 다르다. 따라서 HVEM 리간드의 동적 조절은 세포의 상황에 따라 활성화 및 억제 신호의 조절을 위한 메커니즘을 제공한다. 수용체와 리간드 발현을 조절하는 요인을 결정하면 면역 반응에서 이들 단백질의 역할을 더 잘 이해할 수 있으며, 이 경로가 치료 중재를 위해 어떻게 조작될 수 있는지를 알 수 있다. BTLA 또는 다른 억제 수용체에 대한 표적 작용제의 개발은 염증성 질환에 대한 치료법의 레퍼토리를 증가시킬 수 있다.

[0106] 본 발명이 상기 실시예를 참조하여 기술되었지만, 변형 및 변화가 본 발명의 사상 및 범위 내에 포함되는 것으로 이해될 것이다. 따라서, 본 발명은 다음의 청구 범위에 의해서만 제한된다.

표 1

[0107] 클로닝 및 부위 지정 변이 유발에 사용되는 프라이머

Gene	Primer	Sequence
	Human CMV UL144	
E27A Mutant	Fiala UL144 E46 For	AAACCCGAAGCAGTGCAATTAGGAAATCAGTG
E27A Mutant	Fiala UL144 E46 Rev	TAATTGCACTGCTTCGGGTTTGCATATTTCAG
V28Y Mutant	UL144_V28YTop	ACCCGAAGAATATCAATTAGGAAATCAGTGTTGTC
V28Y Mutant	UL144_V28YBot	TTCCTAATTGATATTCTTCGGGTTTGCATATTTC
Q29P Mutant	UL144_Q29PTop	GAAGAAGTGCCATTAGGAAATCAGTGTTGTCCC
Q29P Mutant	UL144_Q29PBot	ATTTCCTAATGGCACTTCTTCGGGTTTGCATATTTC

N32S Mutant	UL144_N32STop	GCAATTAGGAAGTCAGTGTTGTCCCCCATGTAAAC
N32S Mutant	UL144_N32SBot	ACAACACTGACTTCCTAATTGCACTTCTTCGG
Q33A Mutant	Fiala UL144 Q52 For	TTAGGAAATGCGTGTTGTCCCCCATGTAAACAAG
Q33A Mutant	Fiala UL144 Q52 Rev	GGGACAACACGCATTTCCTAATTGCACTTCTTC
P36A Mutant	Fiala UL144 P55 For	CAGTGTTGTGCCCCATGTAAACAAGGATATCGTG
P36A Mutant	Fiala UL144 P55 Rev	TTTACATGGGGCACAACACTGATTTCCTAATTG
P37K Mutant	UL144_P37KTop	GTGTTGTCCCAAATGTAAACAAGGATATCGTGTTAC
P37K Mutant	UL144_P37KBot	TTGTTTACATTTGGGACAACACTGATTTCCTAATTG
K39S Mutant	K39STop	TCCCCCATGTTCACAAGGATATCGTGTTACAGG
K39S Mutant	K39SBot	ATATCCTTGTGAACATGGGGGACAACACTGATTTC
G41A Mutant	Fiala UL144 G60 For	TGTAAACAAGCATATCGTGTTACAGGACAATGTAC
G41A Mutant	Fiala UL144 G60 Rev	AACACGATATGCTTGTTTACATGGGGGACAACACTG
Y42A Mutant	UL144F-Y42A-F	CCCCCATGTAAACAAGGAGCTCGTGTTACAGGACAATG
Y42A Mutant	UL144F-Y42A-R	CATTGTCCTGTAACACGAGCTCCTTGTTTACATGGGGG
R43A Mutant	Fiala UL144 R62A For	CAAGGATATGCTGTTACAGGACAATGTACGCAATATAC
R43A Mutant	Fiala UL144 R62A Rev	TCCTGTAACAGCATATCCTTGTTTACATGGGGG
T45A Mutant	Fiala UL144 T64 For	TATCGTGTTGCAGGACAATGTACGCAATATACG
T45A Mutant	Fiala UL144 T64 Rev	ACATTGTCCTGCAACACGATATCCTTGTTTACATGG
G46A Mutant	Fiala UL144 G65 For	CGTGTTACAGCACAATGTACGCAATATACGAGTAC
G46A Mutant	Fiala UL144 G65 Rev	CGTACATTGTGCTGTAACACGATATCCTTGTTTAC
G46K Mutant	FUL144-G46K 5'	AAACAAGGATATCGTGTTACAAAACAATGTACGCAATATACGAGT
G46K Mutant	FUL144-G46K 3'	ACTCGTATATTGCGTACATTGTTTTGTAACACGATATCCTTGTTT
Q47A Mutant	UL144_Q47ATop	GTTACAGGAGCATGTACGCAATATACGAGTACAAC
Q47A Mutant	UL144_Q47ABot	TGCGTACATGCTCCTGTAACACGATATCCTTG
T49G Mutant	UL144_T49GTop	GGACAATGTGGGCAATATACGAGTACAACATGTAC
T49G Mutant	UL144_T49GBot	CGTATATTGCCCACATTGTCCTGTAACACGATATC
Q50A Mutant	Fiala UL144 Q69 For	CAATGTACGGCATATACGAGTACAACATGTACAG
Q50A Mutant	Fiala UL144 Q69 Rev	ACTCGTATATGCCGTACATTGTCCTGTAACACGATATC
T52A Mutant	Fiala UL144 T71 For	ACGCAATATGCGAGTACAACATGTACACTTTGCCC
T52A Mutant	Fiala UL144 T71 Rev	TGTTGTACTCGCATATTGCGTACATTGTTCTGTAAC
N61A Mutant	UL144_N61ATop	CTTTGCCCTGCCGGTACGTATGTATCAGGGC
N61A Mutant	UL144_N61ABot	CGTACCGGCAGGGCAAAGTGTACATGTTGTAC
L68A Mutant	Fiala UL144 L86 For	GTATCAGGGGCTTACAATTGTACCAATTGCACTG
L68A Mutant	Fiala UL144 L86 Rev	ACAATTGTAAGCCCCTGATACATACGTACCGTTAG
E76M Mutant	UL144_E76MTop	CAATTGCACTATGTGTAATGACACTGAGGTTAC
E76M Mutant	UL144_E76MBot	CAATTGCACTATGTGTAATGACACTGAGGTTAC
P106A Mutant	Fiala UL144 P124 For	TTTTCCGTTGCAGGCGTCCAACATCACAAGCAACG
P106A Mutant	Fiala UL144 P124 Rev	TTGGACGCCTGCAACGGAAAATGACGTATAATTC
	Human HVEM	
P59S Mutant	hHVEM_P59STop	CAAGTGCAGTTCAGGTTATCGTGTGAAGGAG
P59S Mutant	hHVEM_P59SBot	CGATAACCTGAACTGCACTTGGGGCAGCAC
G60D Mutant	HuHVEMG60Dfor	tgcagtccagattatcgtgtgaaggaggcctg
G60D Mutant	HuHVEMG60Drev	ACACGATAATCTGGACTGCACTTGGGGC
Y61C Mutant	HuHVEMY61Cfor	GTCCAGGTTGTCGTGTGAAGGAGGCCTGC
Y61C Mutant	HuHVEMY61Crev	CTTCACACGACAACCTGGACTGCACTTGGG
G72D Mutant	hHVEM_G72DTop	GCTGACGGACACAGTGTGTGAACCCTGC
G72D Mutant	hHVEM_G72DBot	ACACACTGTGTCCGTCAGCTCCCCGCAG
T82P Mutant	hHVEM_T82PTop	TCCAGGCCCCTACATTGCCCACCTCAATG
T82P Mutant	hHVEM_T82PBot	AATGTAGGGGCCTGGAGGGCAGGGTTC
Ins91I Mutant	hHVEM_ins91ITop	CTCAATGGCCTAATAAGCAAGTGTCTGCAGTGC
Ins91I Mutant	hHVEM_ins91IBot	CACTTGCTTATTAGGCCATTGAGGTGGGCAATG
A102P Mutant	hHVEM_A102PTop	GTGACCCACCCATGGGCCTGCGCGCG
A102P Mutant	hHVEM_A102PBot	GGCCCATGGGTGGGTCACACATTTGGCACTG
R109W Mutant	HuHVEMR109Wfor	CGCGAGCTGGAACTGCTCCAGGACAGAG
R109W Mutant	HuHVEMR109Wrev	GAGCAGTTCCAGCTCGCGCGCAGGCCC
	Human BTLA	

Q37A Mutant	HuBTLAQ37Atop	catgtgatgtAGCGCTTTATATAAAGAGACAATCTGAACACTC
Q37A Mutant	HuBTLAQ37Abot	CTTTATATAAAGCGCTACATCACATGATTCTTTCCCATG
L38H Mutant	HuBTLAL38Htop	ATGTGATGTACAGCATTATATAAAGAGACAATCTGAACACTCC
L38H Mutant	HuBTLAL38Hbot	TTGTCTCTTTATATAATGCTGTACATCACATGATTCTTTCC
R42D Mutant	HuBTLAR42Dtop	CTTTATATAAAGGACCAATCTGAACACTCCATCTTAGC
R42D Mutant	HuBTLAR42Dbot	GTGTTCAGATTGGTCCTTTATATAAAGCTGTACATCACATGATTC
E45A Mutant	HuBTLAE45Atop	AGAGACAATCTGCACACTCCATCTTAGCAGGAGATCC
E45A Mutant	HuBTLAE45Abot	AAGATGGAGTGTGGAGATTGTCTCTTTATATAAAGCTGTAC
E57A Mutant	HuBTLAE57Atop	CTTTGAACTAGCATGCCCTGTGAAATACTGTGCTAAC
E57A Mutant	HuBTLAE57Abot	TCACAGGGCATGCTAGTTCAAAGGGATCTCCTGCTAAG
P59A Mutant	HuBTLAP59Atop	GAACTAGAATGCGCTGTGAAATACTGTGCTAACAGGC
P59A Mutant	HuBTLAP59Abot	GTATTTCACAGCGCATTCTAGTTCAAAGGGATCTC
K90A Mutant	HuBTLAK90Atop	ACAAGTTGGGCGGAAGAGAAGAACATTTCATTTTTCATTC
K90A Mutant	HuBTLAK90Abot	CTTCTCTTCCGCCCAACTTGTTTGTCTATCTTCAAGTTTTAC
V117A Mutant	HuBTLAV117Atop	TGTTCTGCAAATTTTCAGTCTAATCTCATTGAAAGC
V117A Mutant	HuBTLAV117Abot	GATTAGACTGAAAATTTGCAGAACAGCGGTATGACCC
N118F Mutant	HuBTLAN118Ftop	GCTGTTCTGCATTTTTTCAGTCTAATCTCATTGAAAGC
N118F Mutant	HuBTLAN118Fbot	TAGACTGAAAAAATGCAGAACAGCGGTATGAC
F119A Mutant	HuBTLAF119Atop	GTTCTGCAAATGCTCAGTCTAATCTCATTGAAAGCCAC
F119A Mutant	HuBTLAF119Abot	GAGATTAGACTGAGCATTTGCAGAACAGCGGTATG
S121H Mutant	HuBTLAS121Htop	CAAATTTTCAGCATAATCTCATTGAAAGCCACTCAAC
S121H Mutant	HuBTLAS121Hbot	CAATGAGATTATGCTGAAAATTTGCAGAACAGCG
H127D Mutant	HuBTLAH127Dtop	CATTGAAAGCGACTCAACAACTCTTTATGTGACAGATG
H127D Mutant	HuBTLAH127Dbot	GTTGTTGAGTCGCTTTCAATGAGATTAGACTGAAAATTTG
S128H Mutant	HuBTLAS128Htop	TGAAAGCCACCATACAACTCTTTATGTGACAGATGTAAAAAG
S128H Mutant	HuBTLAS128Hbot	AAGAGTTGTATGGTGGCTTTCAATGAGATTAGACTG

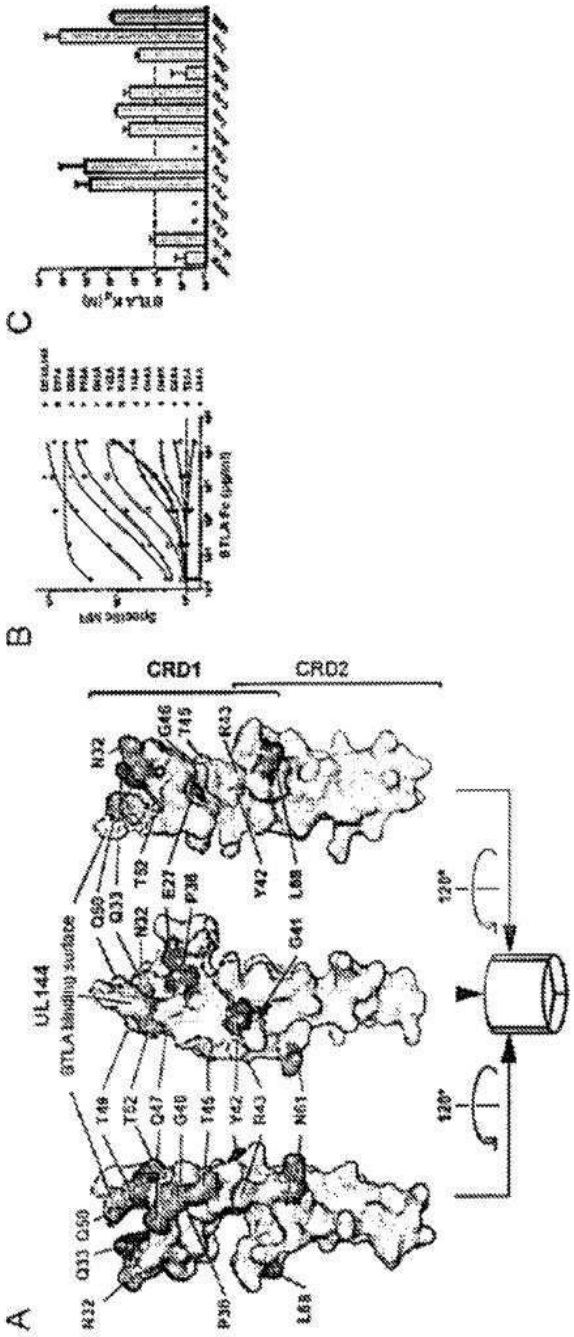
표 2

[0108] Fc 융합 단백질 결합을 위한 1가 및 2가 동역학 속도 상수(kinetic rate constant)

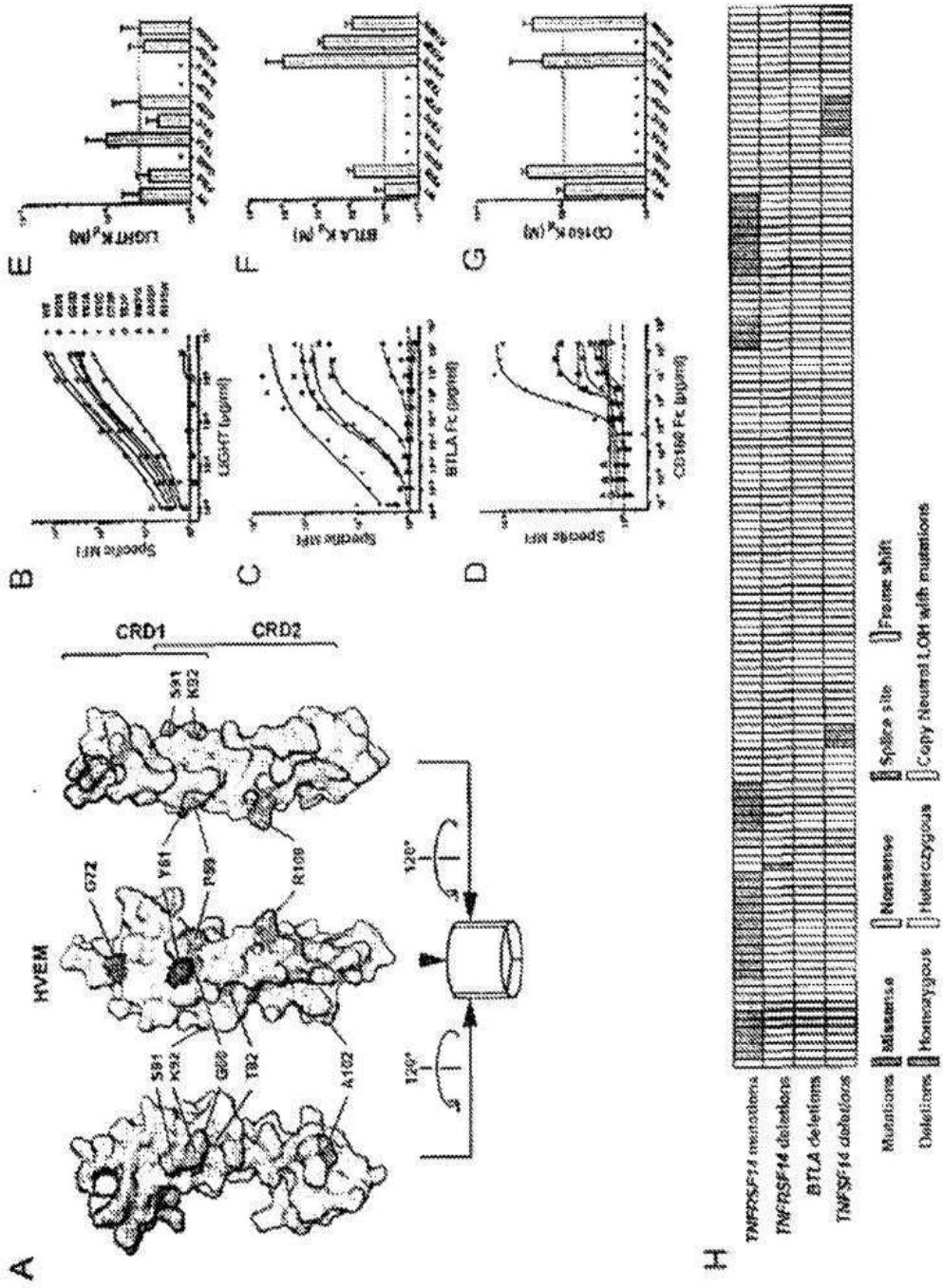
	Analyte	
	HVEM-Fc	HuCMV UL144-Fc
Monovalent Analysis		
k_a ($\times 10^4$ $M^{-1}s^{-1}$)	3.74	1.61
k_d ($\times 10^{-3}$ s^{-1})	6.6	4.76
K_D (nM)	177	295
Bivalent Analysis		
k_{a1} ($\times 10^4$ $M^{-1}s^{-1}$)	1.53	0.781
k_{d1} ($\times 10^{-3}$ s^{-1})	9.02	5.1
k_{a2} ($\times 10^{-3}$ $M^{-1}s^{-1}$)	57.3	0.0139
k_{d2} (s^{-1})	2.05	0.00289

도면

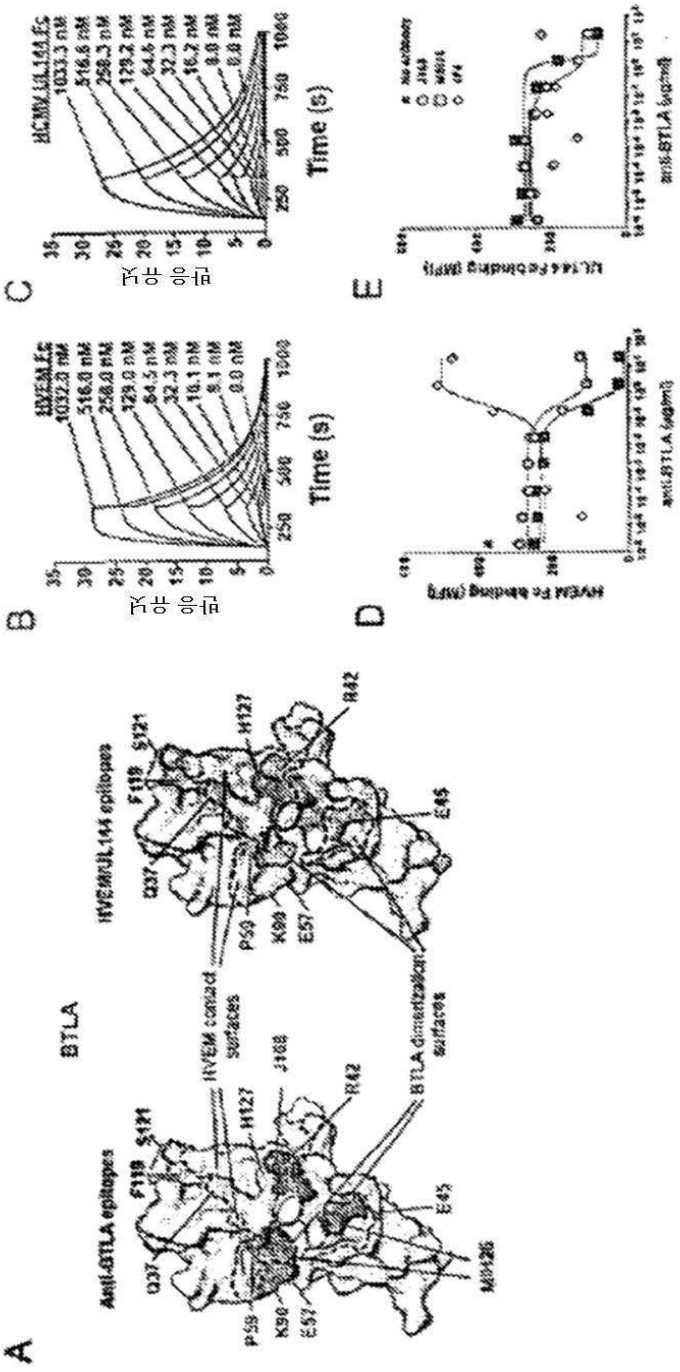
도면1



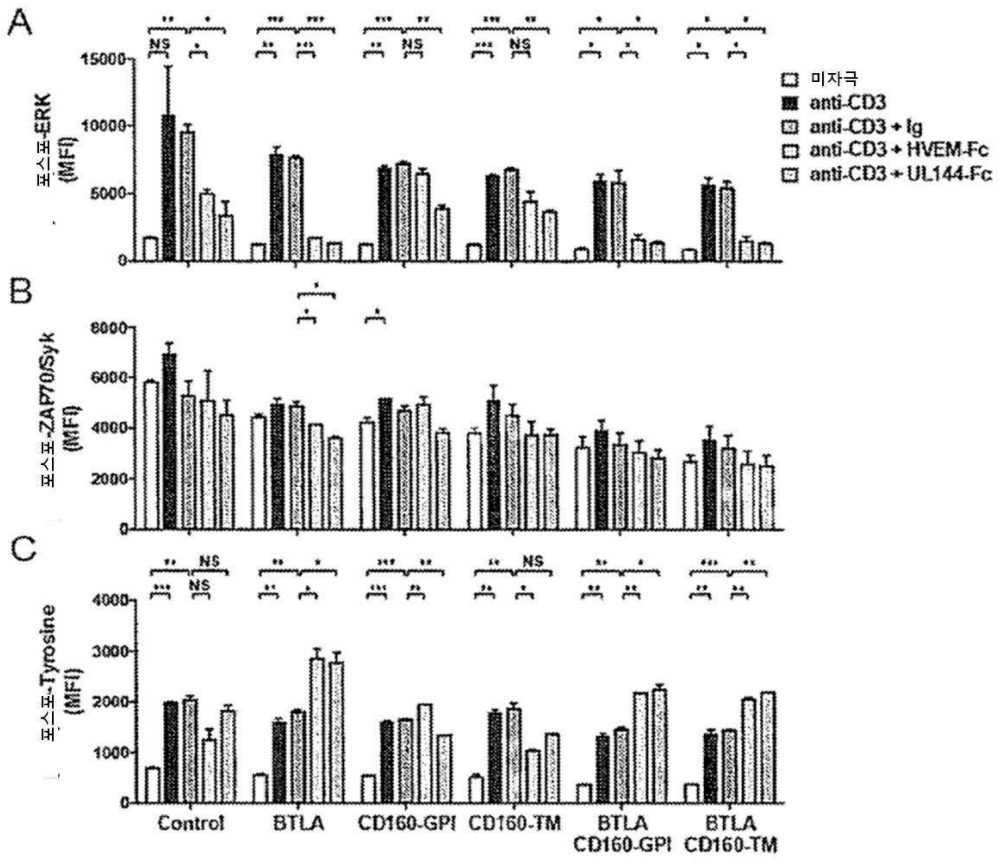
도면2


A
HVEM
CRD1
CRD2
S91
K92
G72
Y81
P89
R109
G80
T82
A102
120°
B
C
D
E
F
G
H
TNFRSF14 mutations
TNFRSF14 deletions
BTLA deletions
TNFSF14 deletions
Mutations
Deletions
Missense
Homozygous
Nonsense
Heterozygous
Splice site
Copy Neutral LOH with mutations
Frame shift

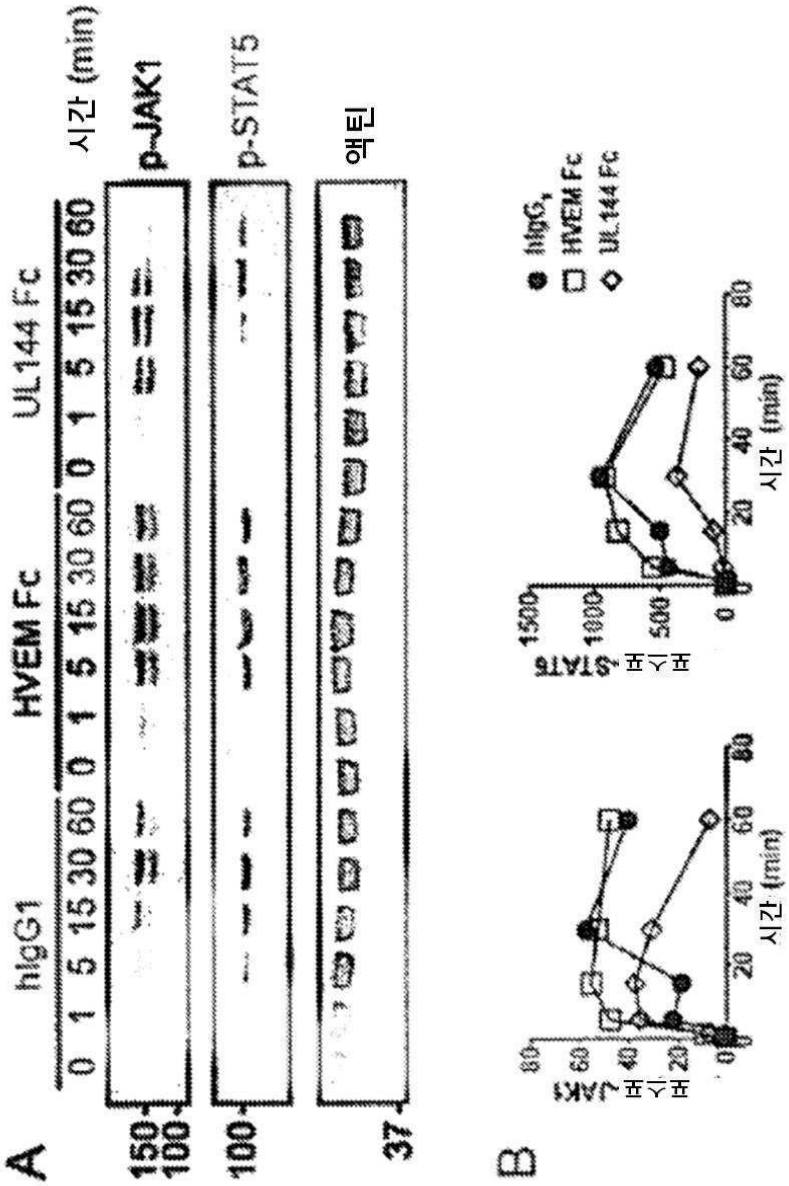
도면3


A
BTLA
Anti-BTLA epitopes
HVEM/UL144 epitopes
HVEM contact surfaces
BTLA dimerization surfaces
B
C
D
E
Time (s)
반응 유닛

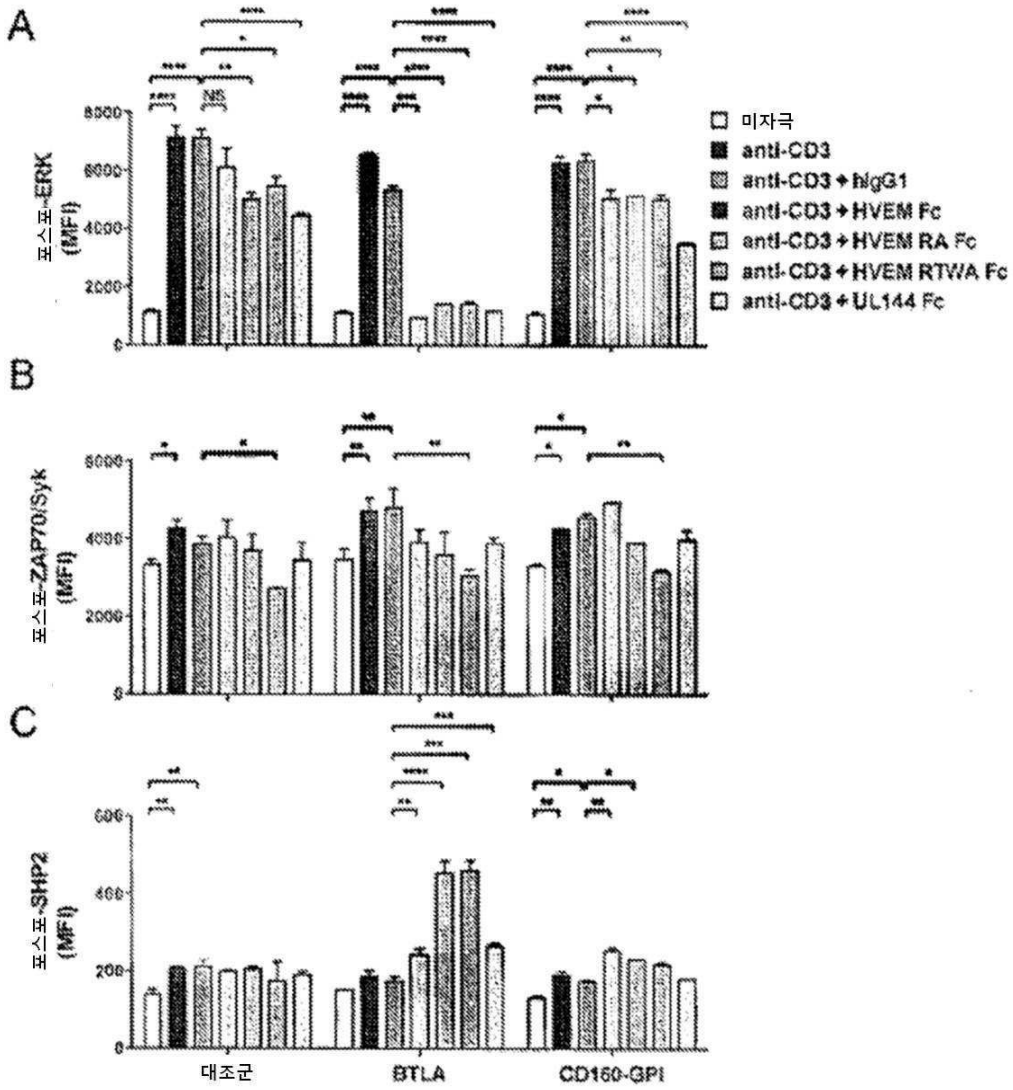
도면4


A
B
C
포스포-ERK (MFI)
포스포-ZAP70/Syk (MFI)
포스포-Tyrosine (MFI)
미자극
anti-CD3
anti-CD3 + Ig
anti-CD3 + HVEM-Fc
anti-CD3 + UL144-Fc
NS
Control
BTLA
CD160-GPI
CD160-TM
BTLA CD160-GPI
BTLA CD160-TM

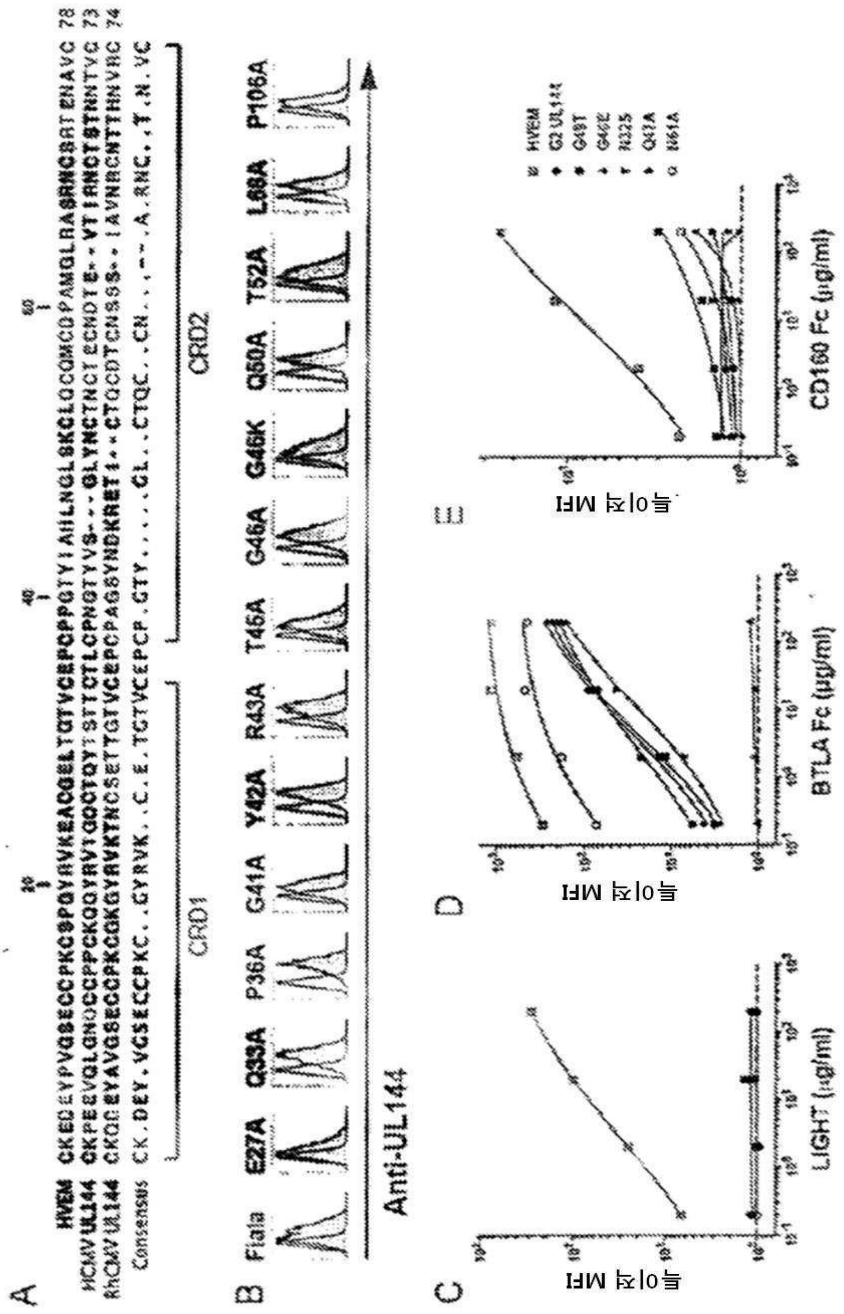
도면5


A
hIgG1
HVEM Fc
UL144 Fc
0 1 5 15 30 60 0 1 5 15 30 60 0 1 5 15 30 60
시간 (min)
p-JAK1
p-STAT5
액틴
150
100
100
37
B
hIgG1
HVEM Fc
UL144 Fc
표시표-STAT5
1500
1000
500
0
0 20 40 60 80
시간 (min)
표시표-JAK1
80
60
40
20
0
0 20 40 60 80
시간 (min)

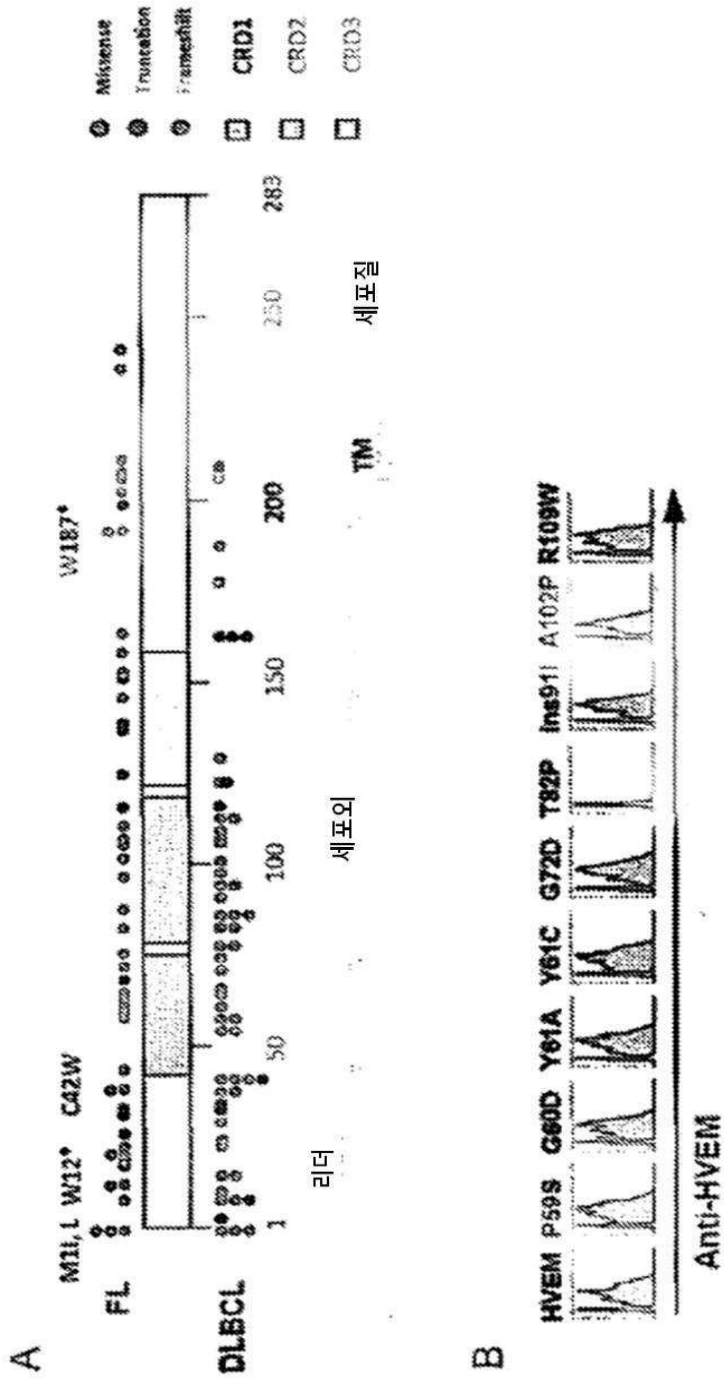
도면6


A
B
C
포스포-ERK (MFI)
포스포-ZAP70/Syk (MFI)
포스포-SHP2 (MFI)
미자극
anti-CD3
anti-CD3 + hIgG1
anti-CD3 + HVEM Fc
anti-CD3 + HVEM RA Fc
anti-CD3 + HVEM RTWA Fc
anti-CD3 + UL144 Fc
대조군
BTLA
CD160-GPI

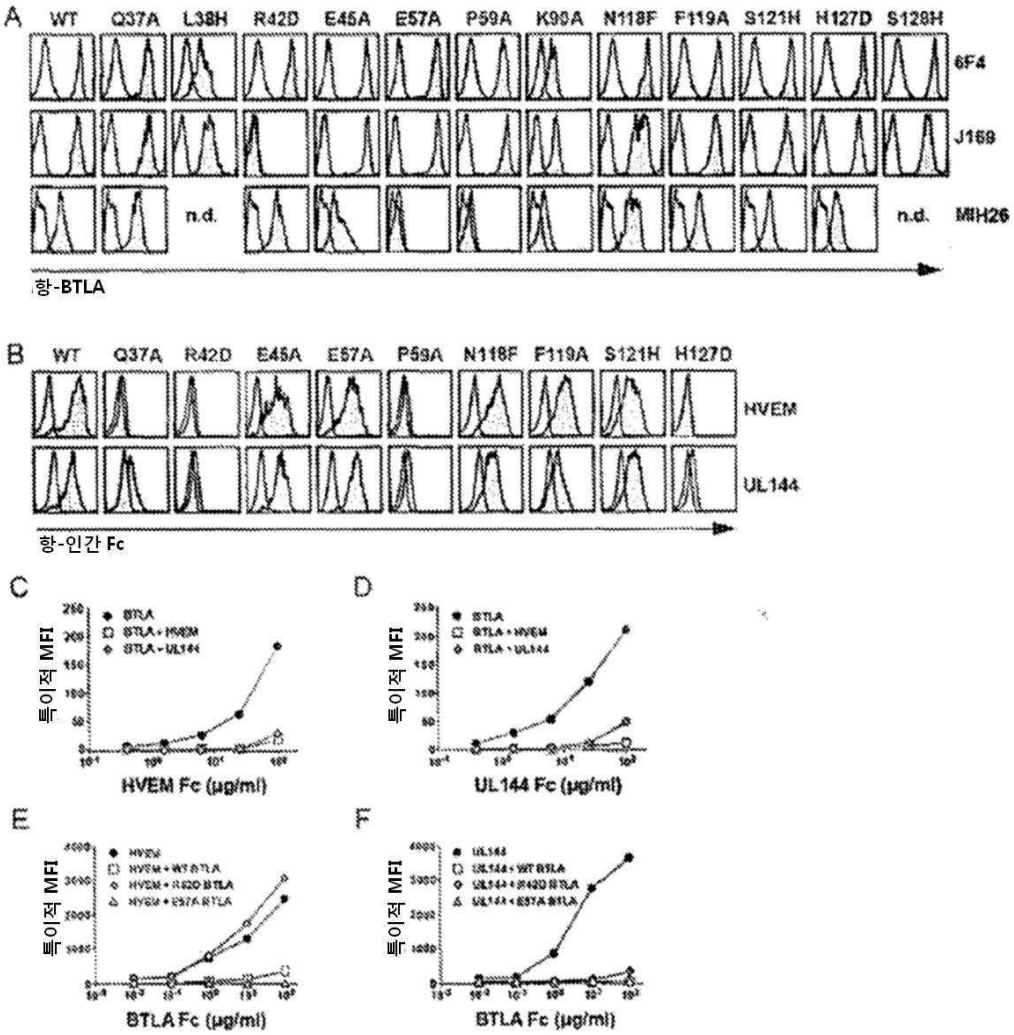
도면7


A
HVEM
HCMV UL144
RhCMV UL144
Consensus
CRD1
CRD2
B
Fiala
E27A
Q33A
P36A
G41A
Y42A
R43A
T45A
G46A
G46K
Q50A
T52A
L68A
P106A
Anti-UL144
C
특이적 MFI
LIGHT (μg/ml)
D
특이적 MFI
BTLA Fc (μg/ml)
E
특이적 MFI
CD160 Fc (μg/ml)
HVEM
G2 UL144
G48T
G46E
N32S
Q47A
N61A

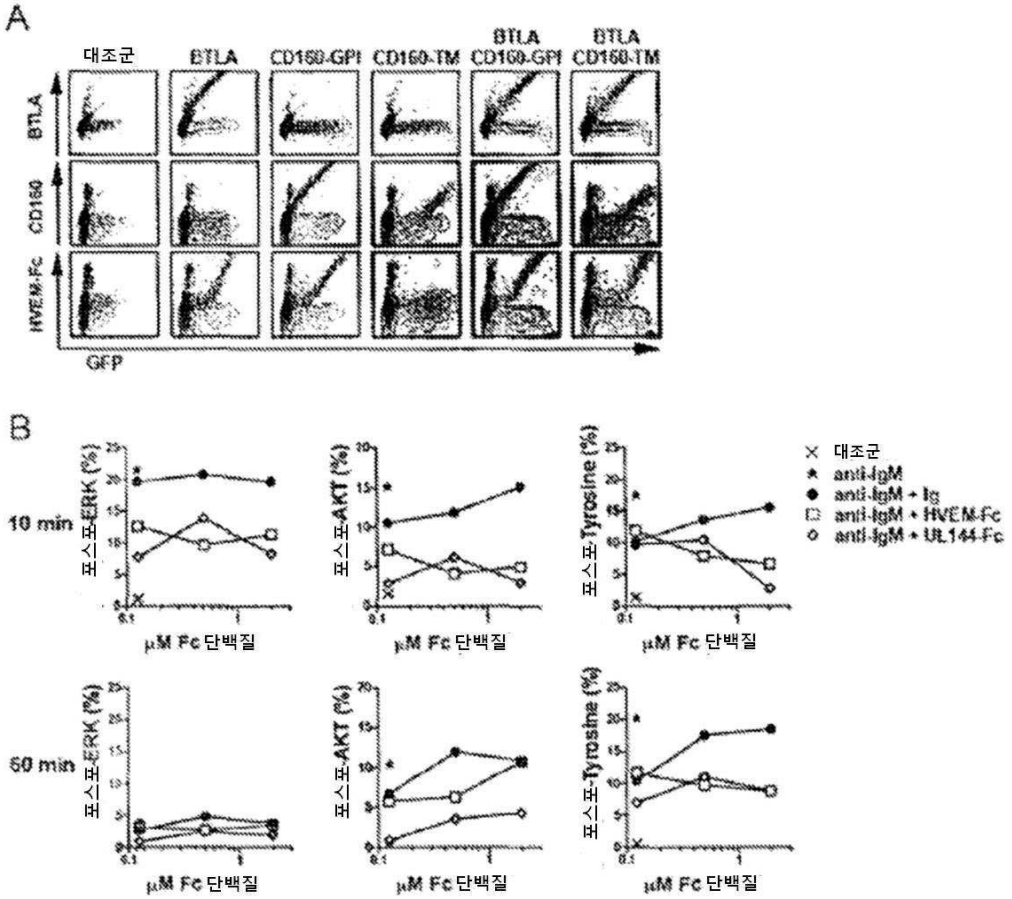
도면8


A
FL
DLECL
M1I, L W12* C42W
W187*
1
50
100
150
200
250
283
리더
세포외
TM
세포질
Missense
Truncation
Frameshift
CRD1
CRD2
CRD3
B
HVEM P59S G60D Y61A Y61C G72D T82P Ins91I A102P R109W
Anti-HVEM

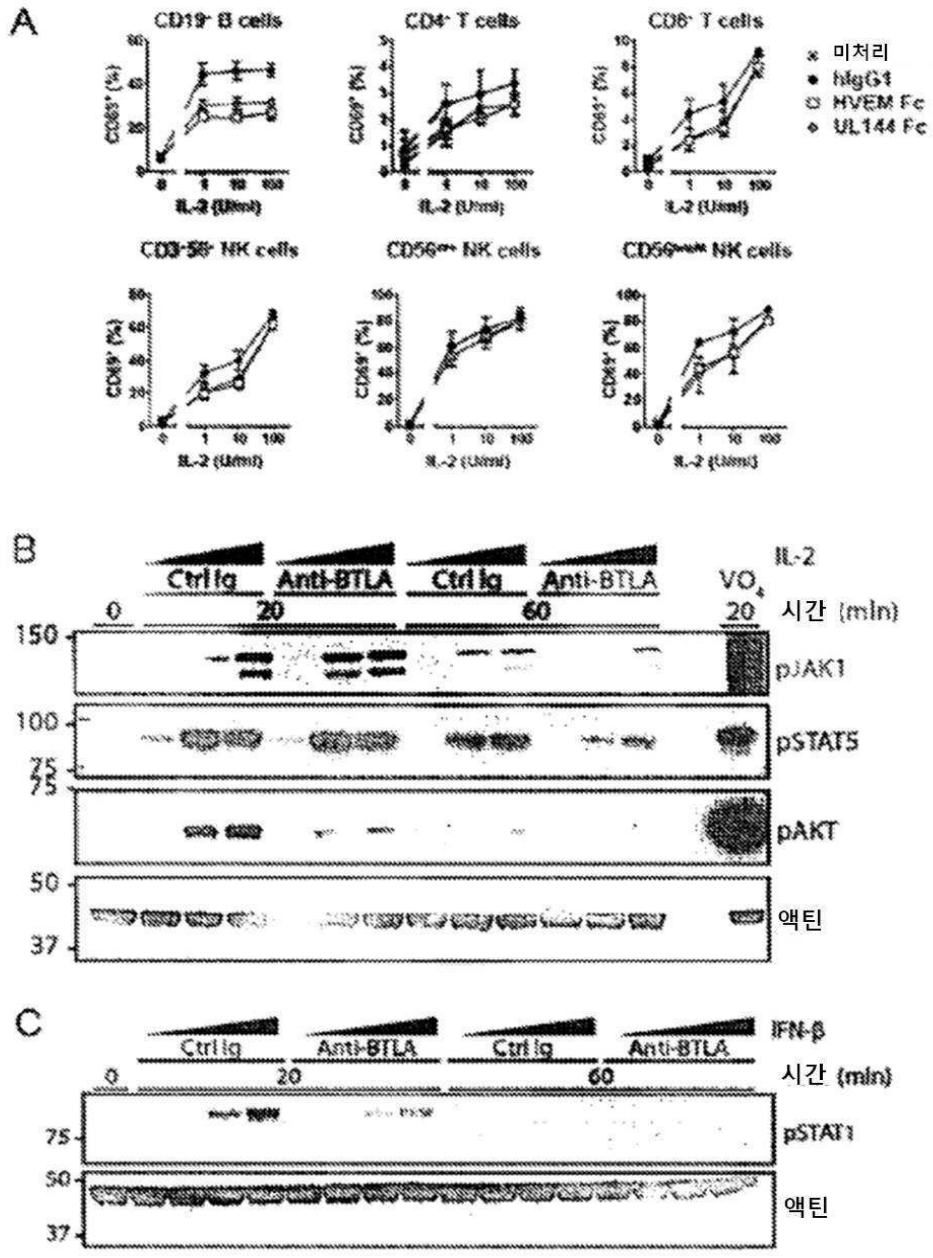
도면9


A
WT
Q37A
L38H
R42D
E45A
E57A
P59A
K99A
N118F
F119A
S121H
H127D
S129H
6F4
J168
n.d.
n.d.
MIH26
항-BTLA
B
WT
Q37A
R42D
E45A
E57A
P59A
N118F
F119A
S121H
H127D
HVEM
UL144
항-인간 Fc
C
특이적 MFI
BTLA
BTLA + HVEM
HVEM Fc (μg/ml)
D
특이적 MFI
UL144 Fc (μg/ml)
E
특이적 MFI
BTLA Fc (μg/ml)
F
특이적 MFI
BTLA Fc (μg/ml)

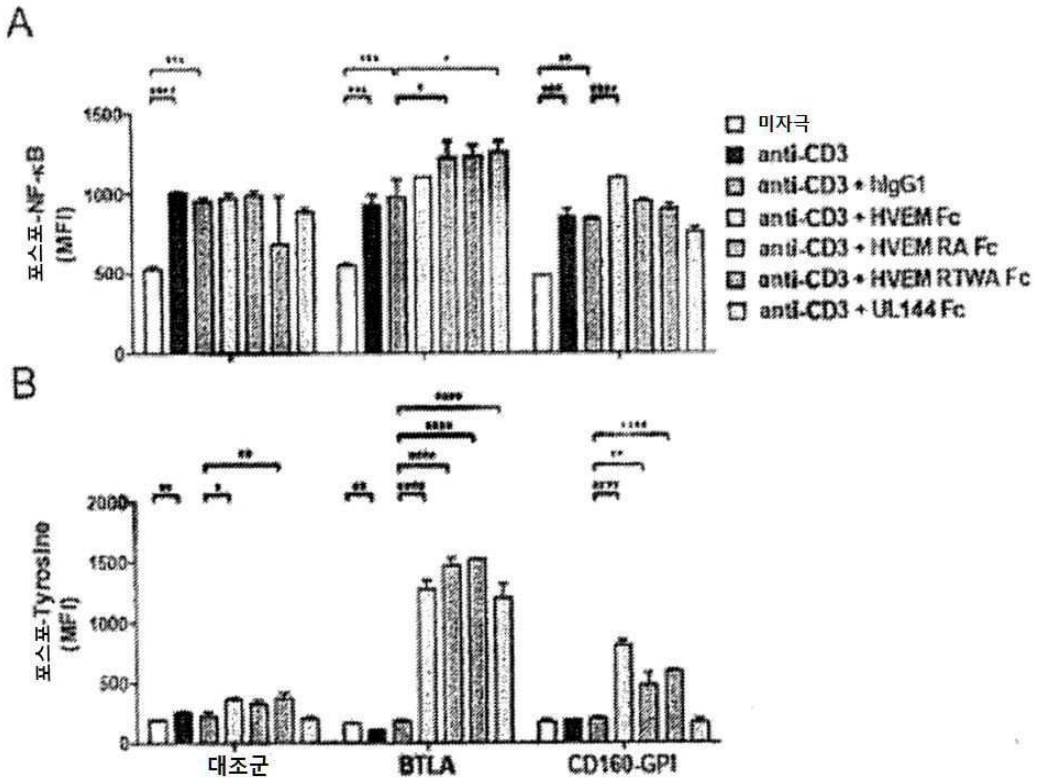
도면10


A
대조군
BTLA
CD160-GPI
CD160-TM
BTLA CD160-GPI
BTLA CD160-TM
BTLA
CD160
HVEM-Fc
GFP
B
10 min
50 min
포스포-ERK (%)
포스포-AKT (%)
포스포-Tyrosine (%)
μM Fc 단백질
대조군
anti-IgM
anti-IgM + Ig
anti-IgM + HVEM-Fc
anti-IgM + UL144-Fc

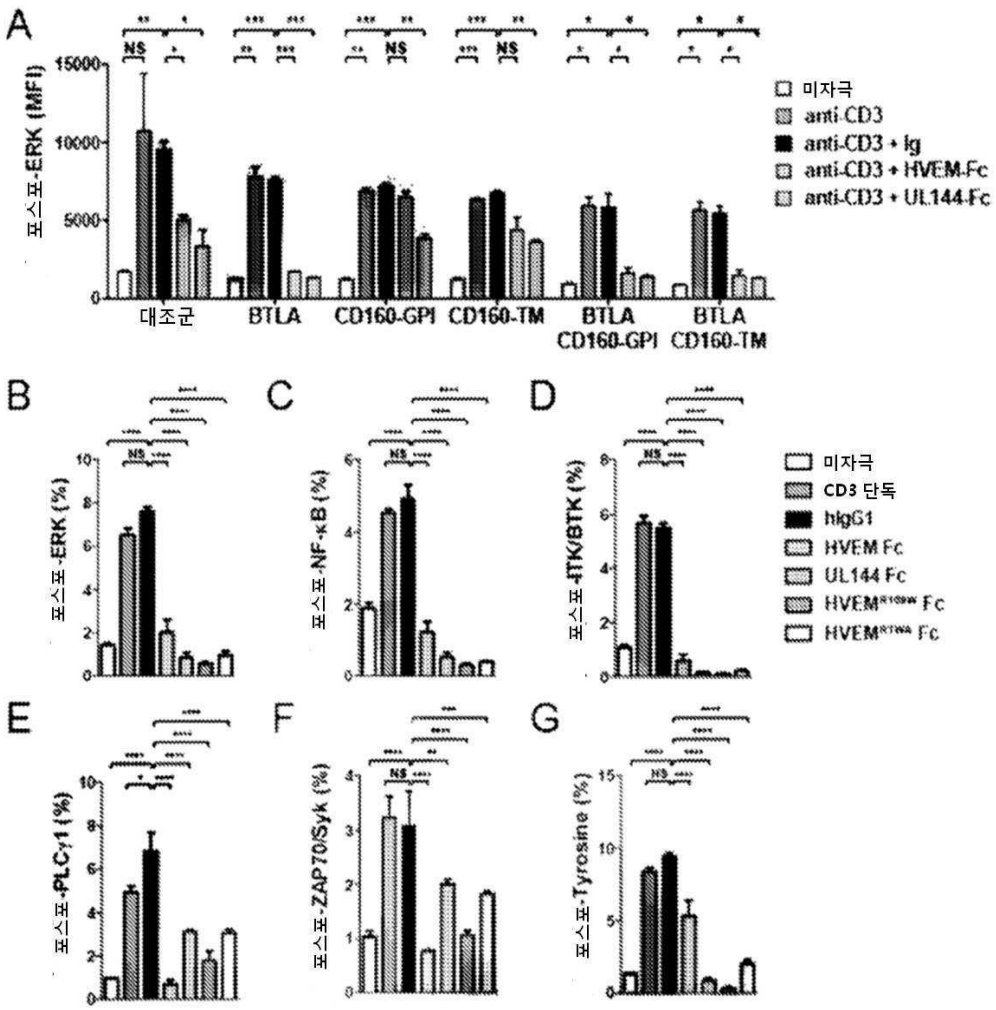
도면11


A
CD19+ B cells
CD4+ T cells
CD8+ T cells
미처리
hIgG1
HVEM Fc
UL144 Fc
CD3-56+ NK cells
CD56dim NK cells
CD56bright NK cells
B
Ctrl Ig
Anti-BTLA
Ctrl Ig
Anti-BTLA
VO4
IL-2
0
20
60
20
시간 (min)
150
pJAK1
100
pSTAT5
75
75
pAKT
50
액틴
37
C
Ctrl Ig
Anti-BTLA
Ctrl Ig
Anti-BTLA
IFN-β
0
20
60
시간 (min)
75
pSTAT1
50
액틴
37

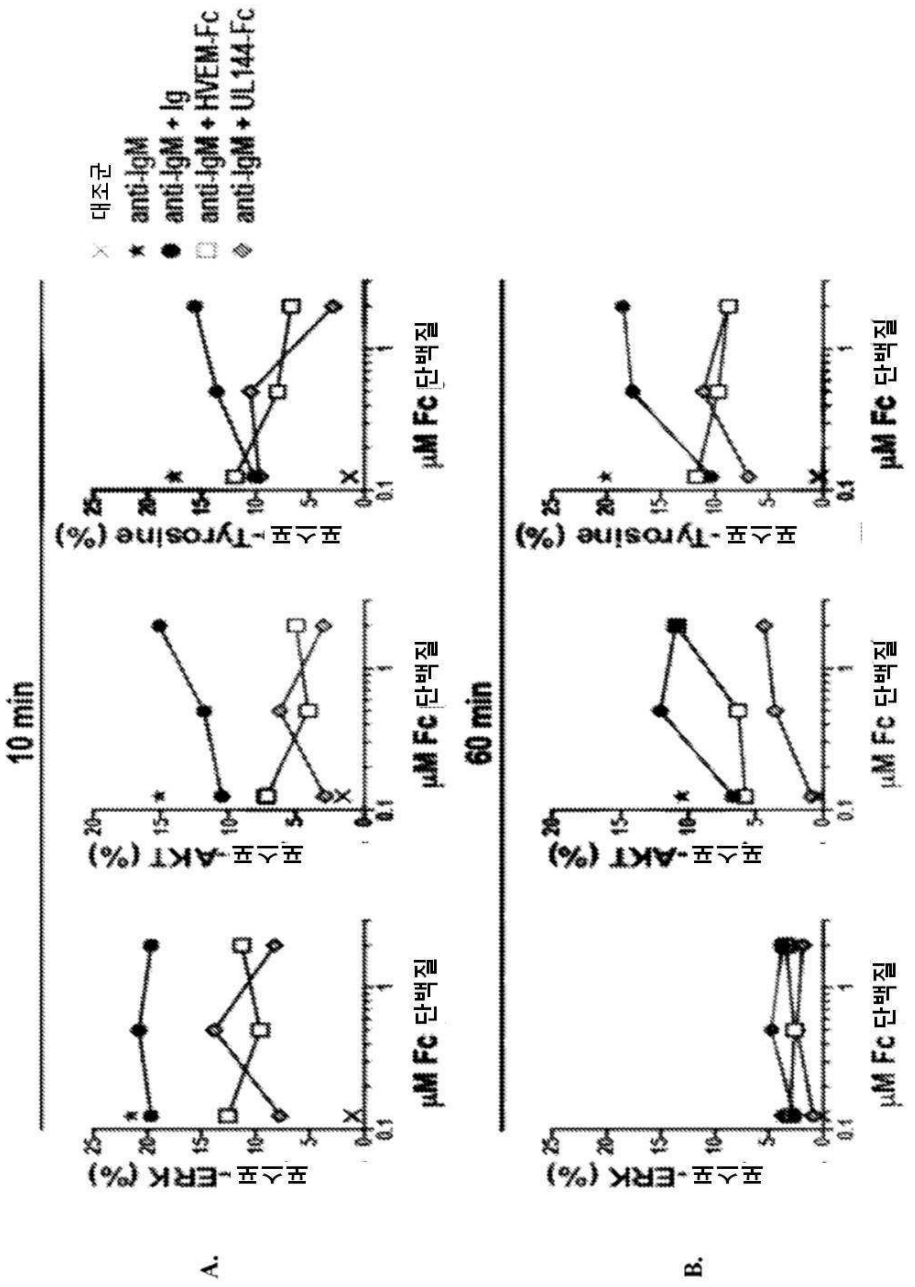
도면12


A
포스포-NF-κB (MFI)
1500
1000
500
0
미자극
anti-CD3
anti-CD3 + hIgG1
anti-CD3 + HVEM Fc
anti-CD3 + HVEM RA Fc
anti-CD3 + HVEM RTWA Fc
anti-CD3 + UL144 Fc
B
포스포-Tyrosine (MFI)
2000
1500
1000
500
0
대조군
BTLA
CD160-GPI

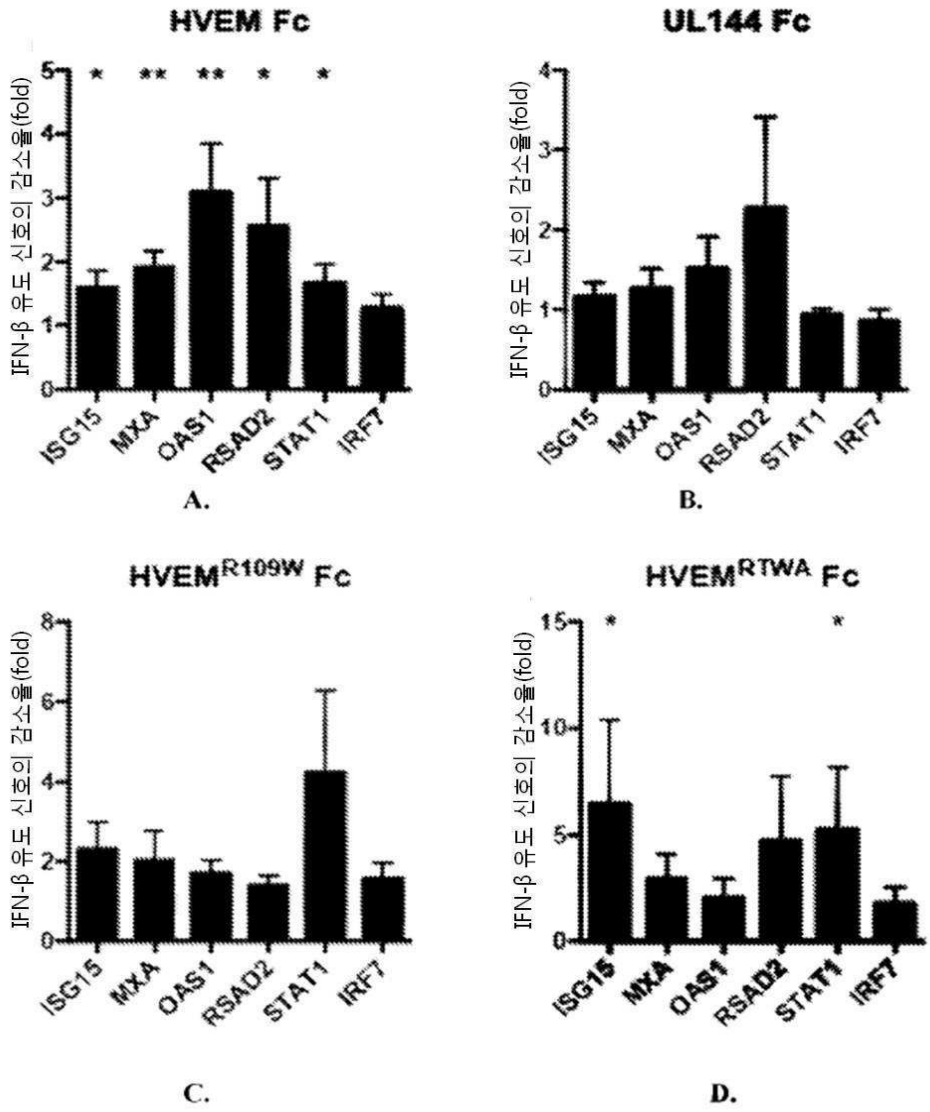
도면13


A
포스포-ERK (MFI)
15000
10000
5000
0
NS
대조군
BTLA
CD160-GPI
CD160-TM
BTLA CD160-GPI
BTLA CD160-TM
미자극
anti-CD3
anti-CD3 + Ig
anti-CD3 + HVEM-Fc
anti-CD3 + UL144-Fc
B
포스포-ERK (%)
C
포스포-NF-κB (%)
D
포스포-ITK/BTK (%)
미자극
CD3 단독
hIgG1
HVEM Fc
UL144 Fc
E
포스포-PLCγ1 (%)
F
포스포-ZAP70/Syk (%)
G
포스포-Tyrosine (%)

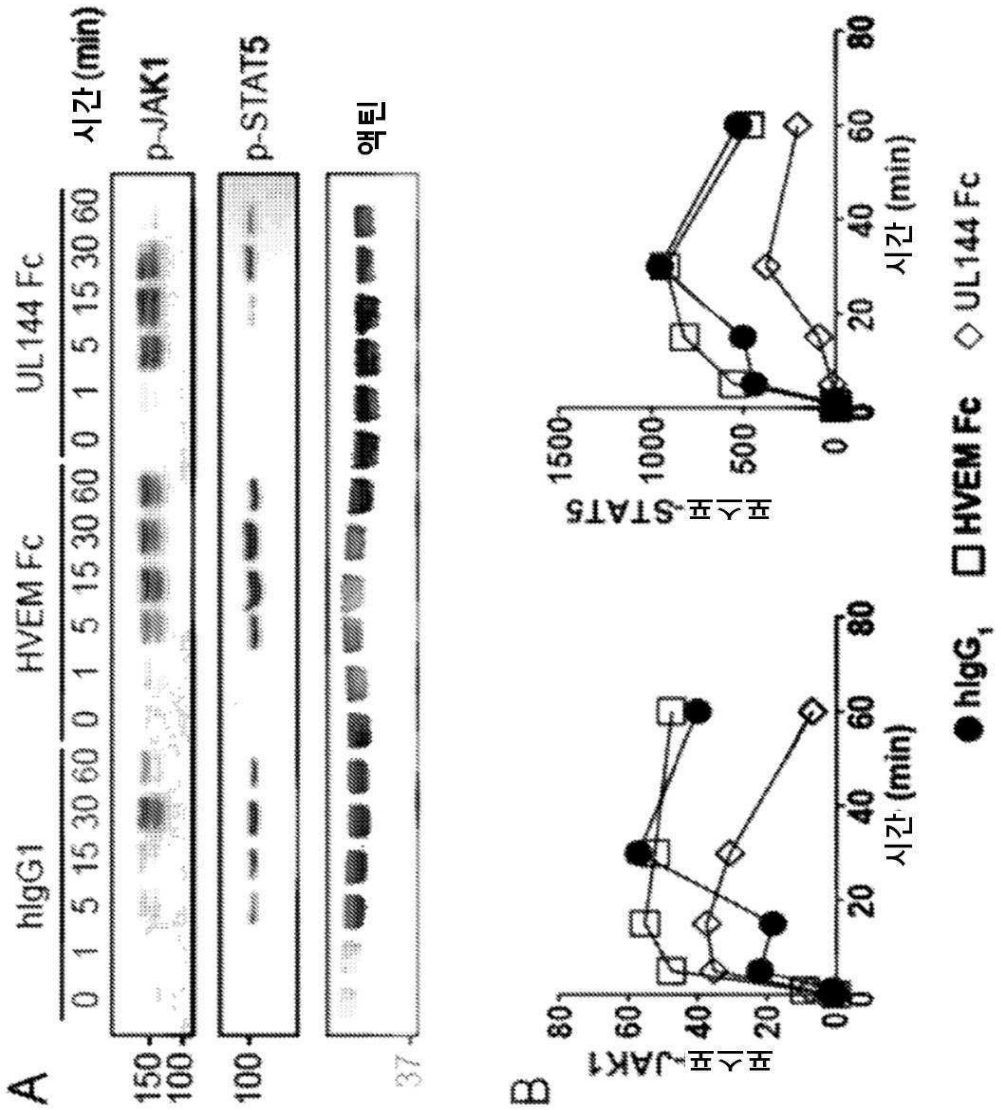
도면14


대조군
anti-IgM
anti-IgM + Ig
anti-IgM + HVEM-Fc
anti-IgM + UL144-Fc
10 min
60 min
표시표-ERK (%)
표시표-AKT (%)
표시표-Tyrosine (%)
μM Fc 단백질
A.
B.

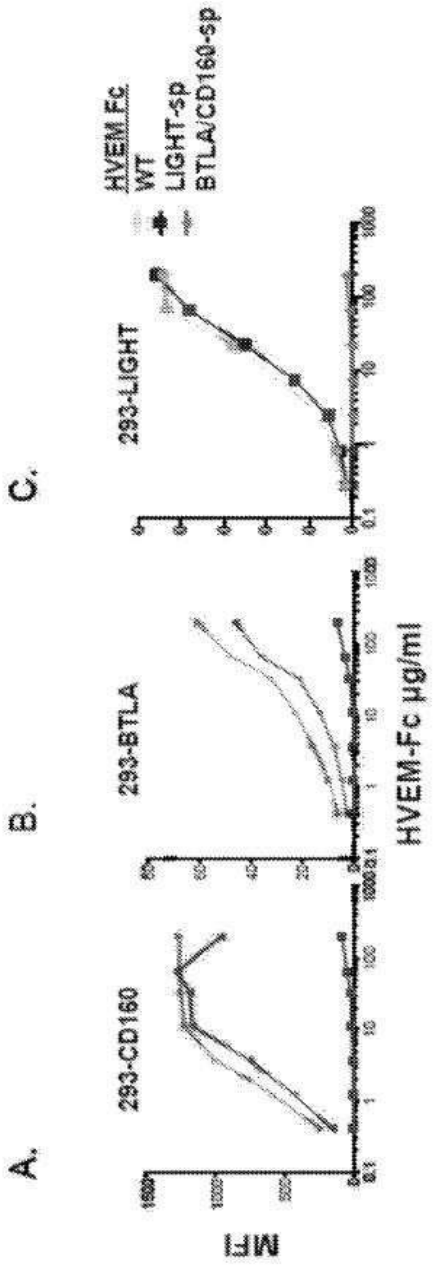
도면15


HVEM Fc
UL144 Fc
HVEM^{R109W} Fc
HVEM^{RTWA} Fc
IFN-β 유도 신호의 감소율(fold)
ISG15
MXA
OAS1
RSAD2
STAT1
IRF7
A.
B.
C.
D.

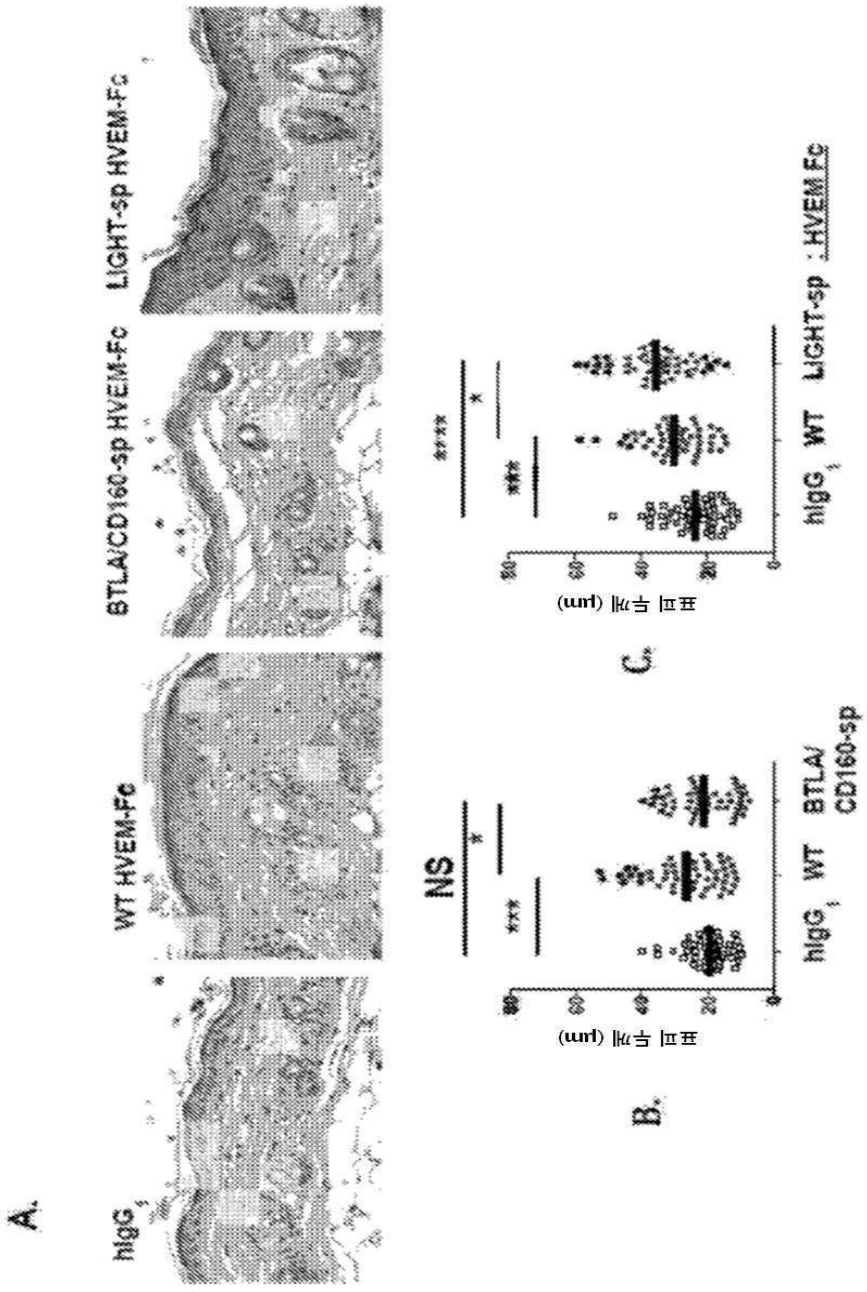
도면16


A
hIgG1
HVEM Fc
UL144 Fc
시간 (min)
0 1 5 15 30 60 0 1 5 15 30 60 0 1 5 15 30 60
p-JAK1
p-STAT5
액틴
150
100
100
37
B
포스포-JAK1
포스포-STAT5
시간 (min)
시간 (min)
hIgG1
HVEM Fc
UL144 Fc

도면17


A.
293-CD160
MFI
B.
293-BTLA
HVEM-Fc μg/ml
C.
293-LIGHT
HVEM Fc
WT
LIGHT-sp
BTLA/CD160-sp

도면18


A.
hIgG1
WT HVEM-Fc
BTLA/CD160-sp HVEM-Fc
LIGHT-sp HVEM-Fc
B.
표피 두께 (μm)
NS
***
*
hIgG1
WT
BTLA/CD160-sp
C.
표피 두께 (μm)
****
***
*
hIgG1
WT
LIGHT-sp : HVEM Fc

도면19

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

A

```
   1 MEPPGDWGPP PWRSTPRTDV LRLVLYLTFL GAPCYAPALP SCKEDEYPVG SECCPKCSPG
  61 YRVKEACGEL TGTVCEPCPP GTYIAHLNGL SKCLQCQMCD PAMGLRASRN CSRTENAVCG
 121 CSPGHFCIVQ DGDHCAACRA YATSSPGQRV QKGGTESQDT LCQNCPPGTF SPNGTLEECQ
 181 HQTKCSWLVT KAGAGTSSSH WVWWFLSGSL VIVIVCSTVG LIICVKRRKP RGDVVKVIVS
 241 VQRKRQEAEG EATVIEALQA PPDVTTVAVE ETIPSFTGRS PNH
```

B

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> SANFORD-BURNHAM PREBYS MEDICAL DISCOVERY INSTITUTE / PFIZER INC.

<120> BTLA FUSION PROTEIN AGONISTS AND USES THEREOF

<130> IPA180001-US

<150> US 62/187,105

<151> 2015-06-30

<160> 91

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1049

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<223> HVEM

<400> 1

gccgcagcaa tggcgctgag ttcctctgct ggagttcatc ctgctagctg ggttcccgag 60

ctgccggtct gagcctgagg catggagcct cctggagact gggggcctcc tccctggaga 120

tccaccccca gaaccgacgt cttgaggctg gtgctgtatc tcaccttcct gggagccccc 180

tgctacgccc cagctctgcc gtcctgcaag gaggacgagt acccagtggg ctccgagtgc 240

tgccccaagt gcagtccagg ttatcgtgtg aaggaggcct gcggggagct gacgggcaca 300

gtgtgtgaac cctgccctcc aggcacctac attgcccacc tcaatggcct aagcaagtgt 360

ctgcagtgcc aaatgtgtga cccagccatg ggcctgcgcg cgagccggaa ctgctccagg 420

acagagaacg ccgtgtgtgg ctgcagccca ggccacttct gcatcgtcca ggacggggac 480

cactgcgccg cgtgccgcgc ttacgccacc tccagcccgg gccagagggt gcagaaggga 540

ggcaccgaga gtcaggacac cctgtgtcag aactgccccc cggggacctt ctctcccaat 600

gggaccctgg aggaatgtca gcaccagacc aagtgcagct ggctggtgac gaaggccgga 660

gctgggacca gcagctccca ctgggtatgg tggtttctct cagggagcct cgtcatcgtc 720

attgtttgct ccacagttgg cctaatcata tgtgtgaaaa gaagaaagcc aaggggtgat 780

gtagtcaagg tgatcgtctc cgtccagcgg aaaagacagg aggcagaagg tgaggccaca 840

gtcattgagg ccctgcaggc ccctccggac gtcaccacgg tggccgtgga ggagacaata 900

ccctcattca cggggaggag cccaaaccac tgacccacag actctgcacc ccgacgccag 960

agatacctgg agcgacggct gctgaaagag gctgtccacc tggcgaaacc accggagccc 1020

ggaggcttgg gggctccgcc ctgggctgg 1049

<210> 2

<211> 283

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Pro Pro Gly Asp Trp Gly Pro Pro Pro Trp Arg Ser Thr Pro

1 5 10 15

Arg Thr Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Tyr Leu Thr Phe Leu Gly Ala

20 25 30

Pro Cys Tyr Ala Pro Ala Leu Pro Ser Cys Lys Glu Asp Glu Tyr Pro

35 40 45

Val Gly Ser Glu Cys Cys Pro Lys Cys Ser Pro Gly Tyr Arg Val Lys
50 55 60
Glu Ala Cys Gly Glu Leu Thr Gly Thr Val Cys Glu Pro Cys Pro Pro
65 70 75 80
Gly Thr Tyr Ile Ala His Leu Asn Gly Leu Ser Lys Cys Leu Gln Cys
85 90 95
Gln Met Cys Asp Pro Ala Met Gly Leu Arg Ala Ser Arg Asn Cys Ser

100 105 110
Arg Thr Glu Asn Ala Val Cys Gly Cys Ser Pro Gly His Phe Cys Ile
115 120 125
Val Gln Asp Gly Asp His Cys Ala Ala Cys Arg Ala Tyr Ala Thr Ser
130 135 140
Ser Pro Gly Gln Arg Val Gln Lys Gly Gly Thr Glu Ser Gln Asp Thr
145 150 155 160
Leu Cys Gln Asn Cys Pro Pro Gly Thr Phe Ser Pro Asn Gly Thr Leu

165 170 175
Glu Glu Cys Gln His Gln Thr Lys Cys Ser Trp Leu Val Thr Lys Ala
180 185 190
Gly Ala Gly Thr Ser Ser Ser His Trp Val Trp Trp Phe Leu Ser Gly
195 200 205
Ser Leu Val Ile Val Ile Val Cys Ser Thr Val Gly Leu Ile Ile Cys
210 215 220
Val Lys Arg Arg Lys Pro Arg Gly Asp Val Val Lys Val Ile Val Ser

225 230 235 240
Val Gln Arg Lys Arg Gln Glu Ala Glu Gly Glu Ala Thr Val Ile Glu
245 250 255
Ala Leu Gln Ala Pro Pro Asp Val Thr Thr Val Ala Val Glu Glu Thr
260 265 270
Ile Pro Ser Phe Thr Gly Arg Ser Pro Asn His
275 280

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

aaacccgaag cagtgcaatt aggaaatcag tg 32

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

taattgcact gcttcgggtt tgcatatttc ag 32

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

acccgaagaa tatcaattag gaaatcagtg ttgtc 35

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

ttcctaattg atattcttcg ggtttgcata tttc 34

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gaagaagtgc cattaggaaa tcagtgttgt ccc 33

<210> 8

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

atttcctaat ggcacttctt cgggtttgca tatttc 36

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gcaattagga agtcagtgtt gtcccccatg taaac 35

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

acaacactga cttcctaatt gcacttcttc gg 32

<210> 11

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

ttaggaaatg cgtgttgtcc cccatgtaaa caag 34

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

gggacaacac gcatttccta attgcacttc ttc 33

<210> 13

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

cagtgttgtg ccccatgtaa acaaggatat cgtg 34

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

tttacatggg gcacaacact gatttcctaa ttg 33

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

gtgttgtccc aaatgtaaac aaggatatcg tgttac 36

<210> 16

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

ttgtttacat ttgggacaac actgatttcc taattg 36

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

tcccccatgt tcacaaggat atcgtgttac agg 33

<210> 18

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

atatccttgt gaacatgggg gacaacactg atttc 35

<210> 19

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

tgtaaacaag catatcgtgt tacaggacaa tgtac 35

<210> 20

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

aacacgatat gcttgtttac atgggggaca acactg 36

<210> 21

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

cccccatgta aacaaggagc tcgtgttaca ggacaatg 38

<210> 22

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

cattgtcctg taacacgagc tccttgttta catggggg 38

<210> 23

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

caaggatatg ctgttacagg acaatgtacg caatatac 38

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

tcctgtaaca gcatatcctt gtttacatgg ggg 33

<210> 25

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

tatcgtgttg caggacaatg tacgcaatat acg 33

<210> 26

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

acattgtcct gcaacacgat atccttgttt acatgg 36

<210> 27

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

cgtgttacag cacaatgtac gcaatatacg agtac 35

<210> 28

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

cgtacattgt gctgtaacac gatatccttg tttac 35

<210> 29

<211> 45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

aaacaaggat atcgtgttac aaaacaatgt acgcaatata cgagt 45

<210> 30

<211> 45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

actcgtatat tgcgtacatt gttttgtaac acgatatcct tgttt 45

<210> 31

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

gttacaggag catgtacgca atatacgagt acaac 35

<210> 32

<211> 32

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

tgcgtacatg ctcctgtaac acgatatcct tg 32

<210> 33

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

ggacaatgtg ggcaatatac gagtacaaca tgtac 35

<210> 34

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

cgtatattgc ccacattgtc ctgtaacacg atatc 35

<210> 35

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

caatgtacgg catatacgag tacaacatgt acag 34

<210> 36

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

actcgtatat gccgtacatt gtcctgtaac acgatatc 38

<210> 37

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

acgcaatatg cgagtacaac atgtacactt tgccc 35

<210> 38

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

tgttgtactc gcatattgcg tacattgttc tgtaac 36

<210> 39

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

tgttgtactc gcatattgcg tacattgttc tgtaac 36

<210> 40

<211> 32

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

cgtaccggca gggcaaagtg tacatgttgt ac 32

<210> 41

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

gtatcagggg cttacaattg taccaattgc actg 34

<210> 42

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

acaattgtaa gcccctgata catacgtacc gttag 35

<210> 43

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

caattgcact atgtgtaatg acactgaggt tac 33

<210> 44

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

caattgcact atgtgtaatg acactgaggt tac 33

<210> 45

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

ttttccgttg caggcgtcca acatcacaag caacg 35

<210> 46

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

ttggacgcct gcaacggaaa atgacgtata attc 34

<210> 47

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

caagtgcagt tcaggttatc gtgtgaagga g 31

<210> 48

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

cgataacctg aactgcactt ggggcagcac 30

<210> 49

<211> 32

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

tgcagtccag attatcgtgt gaaggaggcc tg 32

<210> 50

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

acacgataat ctggactgca cttggggc 28

<210> 51

<211> 29

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

gtccaggttg tcgtgtgaag gaggcctgc 29

<210> 52

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

cttcacacga caacctggac tgcacttggg 30

<210> 53

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 53

gctgacggac acagtgtgtg aaccctgc 28

<210> 54

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 54

acacactgtg tccgtcagct ccccgcag 28

<210> 55

<211> 29

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

tccaggcccc tacattgccc acctcaatg 29

<210> 56

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

aatgtagggg cctggagggc agggttc 27

<210> 57

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 57

ctcaatggcc taataagcaa gtgtctgcag tgc 33

<210> 58

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

cacttgctta ttaggccatt gaggtgggca atg 33

<210> 59

<211> 26

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 59

gtgacccacc catgggcctg cgcgcg 26

<210> 60

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 60

ggcccatggg tgggtcacac atttggcact g 31

<210> 61

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 61

cgcgagctgg aactgctcca ggacagag 28

<210> 62

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 62

gagcagttcc agctcgcgcg caggccc 27

<210> 63

<211> 43

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 63

catgtgatgt agcgctttat ataaagagac aatctgaaca ctc 43

<210> 64

<211> 39

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 64

ctttatataa agcgctacat cacatgattc tttcccatg 39

<210> 65

<211> 43

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 65

atgtgatgta cagcattata taaagagaca atctgaacac tcc 43

<210> 66

<211> 41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 66

ttgtctcttt atataatgct gtacatcaca tgattctttc c 41

<210> 67

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 67

ctttatataa aggaccaatc tgaacactcc atcttagc 38

<210> 68

<211> 45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 68

gtgttcagat tggtccttta tataaagctg tacatcacat gattc 45

<210> 69

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 69

agagacaatc tgcacactcc atcttagcag gagatcc 37

<210> 70

<211> 41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 70

aagatggagt gtggagattg tctctttata taaagctgta c 41

<210> 71

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 71

ctttgaacta gcatgccctg tgaaatactg tgctaac 37

<210> 72

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 72

tcacagggca tgctagttca aagggatctc ctgctaag 38

<210> 73

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 73

gaactagaat gcgctgtgaa atactgtgct aacaggc 37

<210> 74

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 74

gtatttcaca gcgcattcta gttcaaaggg atctc 35

<210> 75

<211> 40

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 75

acaagttggg cggaagagaa gaacatttca ttttttcattc 40

<210> 76

<211> 42

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 76

cttctcttcc gcccaacttg tttgtctatc ttcaagtttt ac 42

<210> 77

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 77

tgttctgcaa attttcagtc taatctcatt gaaagc 36

<210> 78

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 78

gattagactg aaaatttgca gaacagcggt atgaccc 37

<210> 79

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 79

gctgttctgc atttttttcag tctaatctca ttgaaagc 38

<210> 80

<211> 32

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 80

tagactgaaa aaatgcagaa cagcggtatg ac 32

<210> 81

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 81

gttctgcaaa tgctcagtct aatctcattg aaagccac 38

<210> 82

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 82

gagattagac tgagcatttg cagaacagcg gtatg 35

<210> 83

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 83

caaattttca gcataatctc attgaaagcc actcaac 37

<210> 84

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 84

caatgagatt atgctgaaaa tttgcagaac agcg 34

<210> 85

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 85

cattgaaagc gactcaacaa ctctttatgt gacagatg 38

<210> 86

<211> 40

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 86

gttgttgagt cgctttcaat gagattagac tgaaaatttg 40

<210> 87

<211> 42

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 87

tgaaagccac catacaactc tttatgtgac agatgtaaaa ag 42

<210> 88

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 88

aagagttgta tggtggcttt caatgagatt agactg 36

<210> 89

<211> 78

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Cys Lys Glu Asp Glu Tyr Pro Val Gly Ser Glu Cys Cys Pro Lys Cys
1 5 10 15

Ser Pro Gly Tyr Arg Val Lys Glu Ala Cys Gly Glu Leu Thr Gly Thr
20 25 30

Val Cys Glu Pro Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Ile Ala His Leu Asn Gly
35 40 45

Leu Ser Lys Cys Leu Gln Cys Gln Met Cys Ser Pro Ala Met Gly Leu
50 55 60

Arg Ala Ser Arg Asn Cys Ser Arg Thr Glu Asn Ala Val Cys
65 70 75

<210> 90

<211> 71

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Cys Lys Pro Glu Glu Val Gln Gly Asn Cys Cys Pro Pro Cys Lys Gln
1 5 10 15

Gly Tyr Arg Val Thr Gly Gln Cys Thr Gln Tyr Thr Ala Thr Thr Cys
20 25 30

Thr Leu Cys Pro Asn Gly Thr Tyr Val Ser Gly Leu Tyr Asn Cys Thr
35 40 45

Asn Cys Thr Glu Cys Asn Asp Thr Glu Val Thr Ile Arg Asn Cys Thr
50 55 60

Ser Thr Asn Asn Thr Val Cys
65 70

<210> 91

<211> 74

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Cys Lys Gln Asp Glu Tyr Ala Val Gly Ser Glu Cys Cys Pro Lys Cys
1 5 10 15

Gly Lys Gly Tyr Arg Val Lys Thr Asn Cys Ser Glu Thr Thr Gly Thr
20 25 30

Val Cys Glu Pro Cys Pro Ala Gly Ser Tyr Asn Asp Leu Arg Glu Thr
35 40 45

Ile Cys Thr Gln Cys Asp Thr Cys Asn Ser Ser Ser Ile Ala Val Asn
50 55 60

Arg Cys Asn Thr Thr His Asn Val Arg Cys
65 70