



등록특허 10-2815803



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월05일

(11) 등록번호 10-2815803

(24) 등록일자 2025년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01)  
C07K 7/08 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C07K 16/2818 (2013.01)  
A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2018-7018352

(22) 출원일자(국제) 2016년12월01일

심사청구일자 2021년11월29일

(85) 번역문제출일자 2018년06월27일

(65) 공개번호 10-2018-0100122

(43) 공개일자 2018년09월07일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/064385

(87) 국제공개번호 WO 2017/096017

국제공개일자 2017년06월08일

(30) 우선권주장

62/262,293 2015년12월02일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20100172900 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

주식회사 에스티사이언스

대전광역시 서구 문예로 63, 6층633호(둔산동, 행촌회관빌딩)

(72) 발명자

유, 스테픈 성한

미국 버지니아주 20120 센터빌 줄 스타 드라이브 5233

청, 에즈라 명 철

미국 매릴랜드주 20878 노스 포토맥 치숍 랜딩 웨이 14740

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 광장리앤코

전체 청구항 수 : 총 24 항

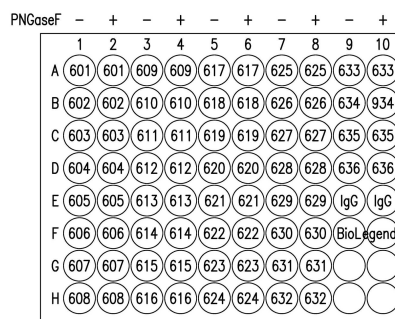
심사관 : 김윤선

(54) 발명의 명칭 당화된 BTLA(B- 및 T-림프구 약화인자)에 특이적인 항체

## (57) 요약

본 발명은 비당화된 BTLA에 비하여 당화된 BTLA(B- 및 T-림프구 약화인자)에 선택적으로 결합하는, 항체와 같은 분자를 제공한다. 암을 치료하거나 진단하는 방법을 비롯한, 그러한 분자를 제조하고 이용하는 방법 또한 제공된다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 당화된 야생형 BTLA(WT)에 면역특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 BTLA N75, N94 또는 N110에서 단일 당화 부위만을 보유하는 하나 이상의 BTLA 이종 돌연변이체에 면역특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 BTLA의 N75, N94 또는 N110 중 어느 것에서도 당화 부위를 보유하지 않는 BTLA 삼중 돌연변이체에 대하여 만약 있다면 단지 백그라운드 결합만을 보여준다.

## 대표도



(52) CPC특허분류

*C07K 7/06* (2013.01)

*C07K 7/08* (2013.01)

*G01N 33/68* (2013.01)

*A61K 2039/505* (2013.01)

*C07K 2317/24* (2013.01)

*C07K 2317/92* (2013.01)

*G01N 2333/70521* (2013.01)

*G01N 2440/38* (2013.01)

(72) 발명자

**김, 용-수**

미국 매릴랜드주 20852 록빌 폴린스 애비뉴 267

**박, 앤드류 에이치.**

미국 매릴랜드주 20879 게이더스버그 #이218 스펙  
트럼 애비뉴 230

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

B- 및 T-림프구 약화인자(B- and T-lymphocyte attenuator)(BTLA)에 결합하고,

(i)

(a) (1) 서열 번호 6의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  상보성 결정 영역 1(complementary determining region 1)(CDR1);

(2) 서열 번호 7의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 8의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR3

을 포함하는 중쇄 가변 영역( $V_H$ );

및

(b) (1) 서열 번호 18의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR1;

(2) 서열 번호 19의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 20의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR3

을 포함하는 경쇄 가변 영역( $V_L$ )으로서;

상기  $V_H$  CDR1-3 및  $V_L$  CDR1-3은 초티아(Chothia) 시스템에 의해 정의되고;

또는

(ii)

(a) (1) 서열 번호 9의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR1;

(2) 서열 번호 10의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 11의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR3

을 포함하는  $V_H$ ;

및

(b) (1) 서열 번호 21의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR1;

(2) 서열 번호 22의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 23의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR3

을 포함하는  $V_L$ 로서;

상기  $V_H$  CDR1-3 및  $V_L$  CDR1-3은 AbM 시스템에 의해 정의되고;

또는

(iii)

(a) (1) 서열 번호 12의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR1;

(2) 서열 번호 13의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 14의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR3

을 포함하는  $V_H$ ;

및

(b) (1) 서열 번호 24의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR1;

(2) 서열 번호 25의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 26의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR3

을 포함하는  $V_L$ 로서;

상기  $V_H$  CDR1-3 및  $V_L$  CDR1-3은 카바트(Kabat) 시스템에 의해 정의되고;

또는

(iv)

(a) (1) 서열 번호 15의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR1;

(2) 서열 번호 16의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 17의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR3

을 포함하는  $V_H$ ;

및

(b) (1) 서열 번호 27의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR1;

(2) 서열 번호 28의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 29의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR3

을 포함하는  $V_L$ 로서;

상기  $V_H$  CDR1-3 및  $V_L$  CDR1-3은 접촉(Contact) 시스템에 의해 정의되는 것

을 포함하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

## 청구항 2

제1항에 있어서,

서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는  $V_H$ 를 포함하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

## 청구항 3

제1항에 있어서,

서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는  $V_L$ 을 포함하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

## 청구항 4

제1항에 있어서,

서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는  $V_H$  및 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는  $V_L$ 을 포함하는, 항체



또는 그의 항원 결합 단편.

## 청구항 5

B- 및 T-림프구 약화인자(BTLA)에 결합하고,

(i)

(a) (1) 서열 번호 34의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  상보성 결정 영역 1(CDR1);

(2) 서열 번호 35의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 36의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR3

을 포함하는 중쇄 가변 영역( $V_H$ );

및

(b) (1) 서열 번호 46의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR1;

(2) 서열 번호 47의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 48의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR3

을 포함하는  $V_L$ 로서;

상기  $V_H$  CDR1-3 및  $V_L$  CDR1-3은 초티아(Chothia) 시스템에 의해 정의되고;

또는

(ii)

(a) (1) 서열 번호 37의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR1;

(2) 서열 번호 38의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 39의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR3

을 포함하는  $V_H$ ;

및

(b) (1) 서열 번호 49의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR1;

(2) 서열 번호 50의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 51의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR3

을 포함하는  $V_L$ 로서;

상기  $V_H$  CDR1-3 및  $V_L$  CDR1-3은 AbM 시스템에 의해 정의되고;

또는

(iii)

(a) (1) 서열 번호 40의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR1;

(2) 서열 번호 41의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 42의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR3

을 포함하는  $V_H$ ;

및

(b) (1) 서열 번호 52의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR1;

(2) 서열 번호 53의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 54의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR3

을 포함하는  $V_L$ 로서;

상기  $V_H$  CDR1-3 및  $V_L$  CDR1-3은 카바트(Kabat) 시스템에 의해 정의되고;

또는

(iv)

(a) (1) 서열 번호 43의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR1;

(2) 서열 번호 44의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 45의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR3

을 포함하는  $V_H$ ;

및

(b) (1) 서열 번호 55의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR1;

(2) 서열 번호 56의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 57의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR3

을 포함하는  $V_L$ 로서;

상기  $V_H$  CDR1-3 및  $V_L$  CDR1-3은 접촉(Contact) 시스템에 의해 정의되는 것

을 포함하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

## 청구항 6

제5항에 있어서,

서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는  $V_H$ 를 포함하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

## 청구항 7

제5항에 있어서,

서열 번호 32의 아미노산 서열을 포함하는  $V_L$ 를 포함하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

## 청구항 8

제5항에 있어서,

서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는  $V_H$  및 서열 번호 32의 아미노산 서열을 포함하는  $V_L$ 를 포함하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

## 청구항 9

B- 및 T-림프구 약화인자(BTLA)에 결합하고,

(i)

(a) (1) 서열 번호 62의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  상보성 결정 영역 1(CDR1);

(2) 서열 번호 63의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 64의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR3

을 포함하는 중쇄 가변 영역( $V_H$ );

및

(b) (1) 서열 번호 74의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR1;

(2) 서열 번호 75의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 76의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR3

을 포함하는  $V_L$ 로서;

상기  $V_H$  CDR1-3 및  $V_L$  CDR1-3은 초티아(Chothia) 시스템에 의해 정의되고;

또는

(ii)

(a) (1) 서열 번호 65의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR1;

(2) 서열 번호 66의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 67의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR3

을 포함하는  $V_H$ ;

및

(b) (1) 서열 번호 77의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR1;

(2) 서열 번호 78의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 79의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR3

을 포함하는  $V_L$ 로서;

상기  $V_H$  CDR1-3 및  $V_L$  CDR1-3은 AbM 시스템에 의해 정의되고;

또는

(iii)

(a) (1) 서열 번호 68의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR1;

(2) 서열 번호 69의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 70의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR3

을 포함하는  $V_H$ ;

및

(b) (1) 서열 번호 80의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR1;

(2) 서열 번호 81의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 82의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR3

을 포함하는  $V_L$ 로서;

상기  $V_H$  CDR1-3 및  $V_L$  CDR1-3은 카밧(Kabat) 시스템에 의해 정의되고;

또는

(iv)

(a) (1) 서열 번호 71의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR1;

(2) 서열 번호 72의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 73의 아미노산 서열로 구성된  $V_H$  CDR3

을 포함하는  $V_H$ ;

및

(b) (1) 서열 번호 83의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR1;

(2) 서열 번호 84의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR2; 및

(3) 서열 번호 85의 아미노산 서열로 구성된  $V_L$  CDR3

을 포함하는  $V_L$ 로서;

상기  $V_H$  CDR1-3 및  $V_L$  CDR1-3은 접촉(Contact) 시스템에 의해 정의되는 것

을 포함하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

#### 청구항 10

제9항에 있어서,

서열 번호 58의 아미노산 서열을 포함하는  $V_H$ 를 포함하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

#### 청구항 11

제9항에 있어서,

서열 번호 60의 아미노산 서열을 포함하는  $V_L$ 을 포함하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

#### 청구항 12

제9항에 있어서,

서열 번호 58의 아미노산 서열을 포함하는  $V_H$  및 서열 번호 60의 아미노산 서열을 포함하는  $V_L$ 을 포함하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

#### 청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 비당화된 BTLA에 비하여 당화된 BTLA;

(ii) 비당화된 BTLA에 비하여 위치 N75, N94, N110 또는 그의 임의의 조합에서 당화된 BTLA;

(iii) 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 또는 169의 아미노산 서열의 5개 이상의 연속 아미

노산의 서열을 포함하는 BTLA 에피토프; 또는

(iv) 서열 번호 86의 BTLA의 R12, H16, K51, T57, S82 또는 S86에 해당하는 아미노산 중 하나 이상을 포함하는 BTLA 에피토프

에 선택적으로 결합하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

#### 청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

BTLA 위치 N75, N94, N110 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 BTLA의 당화 모티프를 특이적으로 마스킹(mask)하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

#### 청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

당화된 BTLA에의 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 결합이 비당화된 BTLA에서 나타난 형광 강도보다 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배 또는 적어도 10배 더 큰 형광 강도에 의해 형광 분석에서 나타내지는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

#### 청구항 16

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 항체가 BTLA에의 헤르페스바이러스-진입 매개자(herpesvirus-entry mediator)(HVEM) 결합을 억제하거나;

(ii) 항체가 재조합성이거나;

(iii) 항체가 IgG, IgM, IgA 또는 그의 항원 결합 단편이거나;

(iv) 항체가 Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F(ab')<sub>3</sub>, 1가 scFv, 2가 scFv 또는 단일 도메인 항체이거나;

(v) 항체가 인간 또는 인간화 항체이거나; 또는

(vi) 항체가 영상화제, 화학요법제, 독소 또는 방사성핵종에 접합되는 것인,

항체 또는 그의 항원 결합 단편.

#### 청구항 17

암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한 조성물로서, 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 약학적 허용 담체를 포함하는 조성물.

#### 청구항 18

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한 약학 조성물.

#### 청구항 19

제18항에 있어서,

암이 유방암, 폐암, 두경부암, 전립선암, 식도암, 기관암, 피부암, 뇌암, 간암, 방광암, 위암, 췌장암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 고환암, 결장암 또는 직장암인, 약학 조성물.

#### 청구항 20

제19항에 있어서,

적어도 제2 항암 치료법과 조합하여 사용하기 위한 것인, 약학 조성물.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 제2 항암 치료법이 수술요법, 화학요법, 방사선요법, 냉동요법, 호르몬요법, 면역요법 또는 사이토카인 요법인, 약학 조성물.

#### 청구항 22

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 BTLA-함유 샘플과 접촉시키는 것을 포함하는, BTLA 당화를 평가하는 방법.

#### 청구항 23

폴리펩티드 및 약학적 허용 담체를 포함하는 조성물을 비인간 동물에게 투여하고 비인간 동물로부터 항체를 분리하는 것을 포함하는, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체의 제조 방법으로서,

상기 폴리펩티드가

(a) 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 인간 BTLA의 적어도 7개 연속 아미노산으로서, 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 및 N110에 해당하는 상기 아미노산 중 적어도 하나가 당화된 것인 아미노산;

(b) 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 또는 169의 아미노산 서열의 5개 이상의 연속 아미노산의 서열; 또는

(c) 서열 번호 86의 BTLA의 R12, H16, K51, T57, S82 또는 S86에 해당하는 아미노산

을 포함하는 것인, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체의 제조 방법.

#### 청구항 24

폴리펩티드를 비인간 동물에게 투여하고 비인간 동물로부터 항체를 분리하는 것을 포함하는, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체의 제조 방법으로서,

상기 폴리펩티드가

(a) 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 인간 BTLA의 적어도 7개 연속 아미노산으로서, 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 및 N110에 해당하는 상기 아미노산 중 적어도 하나가 당화된 것인 아미노산;

(b) 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 또는 169의 아미노산 서열의 5개 이상의 연속 아미노산의 서열; 또는

(c) 서열 번호 86의 BTLA의 R12, H16, K51, T57, S82 또는 S86에 해당하는 아미노산

을 포함하는 것인, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체의 제조 방법.

#### 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

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 1. 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은 2015년 12월 2일에 출원되고 그 전체가 참고로 본원에 포함되는 미국 가출원 62/262,293호에 대한 우선권의 이익을 주장한다.

[0003] 2. 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출되고 그 전체가 참고로 본원에 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2016년 11월 30일에 생성된 상기 ASCII 카피는 명칭이 604556-228009\_SL.txt이고 크기는 48,346 바이트이다.

[0005] 3. 기술분야

[0006] 본 발명은 일반적으로 의학, 분자생물학 및 종양학 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 암 치료를 위한 항체에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0007] 4. 배경 기술

[0008] 인간 및 다른 포유동물의 면역계는 감염 및 질병으로부터 그들을 보호한다. 종양 세포 또는 종양-침윤 림프구에 의한 공역제성 분자의 상향 조절은 암에 대한 T-세포 반응을 약화시키며 면역 반응을 피하기 위하여 종양에 의해 작용되는 기전인 것으로 보인다. 오늘날, T 림프구-연합 항원 4(CTLA-4) 및 프로그램된 사멸 1(PD-1)을 비롯한 다양한 공역제성 분자가 암 세포의 면역 회피에 관련된 것으로 나타났다. 안타고니스트 항체가 면역 회피를 극복하기 위해 개발되고 지금까지 항-CTLA-4 및 항-PD1 항체가 고무적인 결과를 가지고서 임상 시험에서 시험되었다. 하지만, 면역계를 조절함으로써 질병을 안전하게 그리고 효과적으로 치료하는 새로운 치료제의 개발이 시급하게 필요하다. 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법은 이러한 필요를 충족하며 다른 관련 이점을 제공한다.

**발명의 내용**

**과제의 해결 수단**

[0009] 5. 발명의 요약

[0010] 본 발명은 비당화된 B- 및 T-림프구 약화인자(B- and T-lymphocyte attenuator)("BTLA")에 비하여 당화된 BTLA에 선택적으로 결합하는 분리된 단클론 항체를 제공한다. 일부 양태에서, 항체는 비당화된 BTLA에 비하여 위치 N75, N94, 및/또는 N110에서 당화된 BTLA에 선택적으로 결합한다.

[0011] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분리된 항체는 비당화된 BTLA에 비하여, N75, N94, N110 또는 그의 임의의 조합에서 당화된 인간 BTLA에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 N75 당화를 가진 인간 BTLA에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 N94 당화를 가진 인간 BTLA에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 N110 당화를 가진 인간 BTLA에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형

태에서, 분리된 항체는 N75 및 N94 당화를 가진 인간 BTLA에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 N94 및 N110 당화를 가진 인간 BTLA에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 N75 및 N110 당화를 가진 인간 BTLA에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 N75, N94 및 N110 당화를 가진 인간 BTLA에 선택적으로 결합한다.

- [0012] 일부 양태에서, 항체는 하나 이상의 당화 모티프에 선택적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항체는 당화 모티프 및 인접 펩티드를 포함하는 당펩티드에 결합한다. 일부 양태에서, 항체는 삼차원에서 당화 모티프 중 하나 이상 근처에 위치한 펩티드 서열에 결합한다. 일부 양태에서, 항체는 비당화된 BTLA에 대하여 나타난 Kd의 절반보다 적은 Kd로 당화된 BTLA에 결합한다. 추가 양태에서, 항체는 비당화된 BTLA에 대하여 나타난 Kd보다 적어도 10배 적은 Kd로 당화된 BTLA에 결합한다.
- [0013] 일부 실시형태에서, 항체는 BTLA 위치 N75, N94, N110, 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 BTLA의 당화 모티프를 특이적으로 마스킹(mask)한다.
- [0014] 일부 실시형태에서, 당화된 BTLA에의 항체의 결합은 비당화된 BTLA에서 나타난 형광 강도보다 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 또는 적어도 10배 더 큰 형광 강도에 의해 형광 분석에서 나타내진다.
- [0015] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0016] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0017] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0018] 일부 실시형태에서, 항체는 (a)(1)(i) 서열 번호 6, 34, 또는 62, (ii) 서열 번호 9, 37, 또는 65, (iii) 서열 번호 12, 40, 또는 68, 및 (iv) 서열 번호 15, 43, 또는 71로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진  $V_H$  CDR1; (2) (i) 서열 번호 7, 35, 또는 63, (ii) 서열 번호 10, 38, 또는 66, (iii) 서열 번호 13, 41, 또는 69, 및 (iv) 서열 번호 16, 44, 또는 72로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진  $V_H$  CDR2; 및 (3)(i) 서열 번호 8, 36, 또는 64, (ii) 서열 번호 11, 39, 또는 67, (iii) 서열 번호 14, 42, 또는 70, 및 (iv) 서열 번호 17, 45, 또는 73으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진  $V_H$  CDR3을 포함하는 중쇄 가변( $V_H$ ) 영역; 및/또는 (b)(1)(i) 서열 번호 18, 46, 또는 74, (ii) 서열 번호 21, 49, 또는 77, (iii) 서열 번호 24, 52, 또는 80, 및 (iv) 서열 번호 27, 55, 또는 83으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진  $V_L$  CDR1; (2)(i) 서열 번호 19, 47, 또는 75, (ii) 서열 번호 22, 50, 또는 78, (iii) 서열 번호 25, 53, 또는 81, 및 (iv) 서열 번호 28, 56, 또는 84로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진  $V_L$  CDR2; 및 (3)(i) 서열 번호 20, 48, 또는 76, (ii) 서열 번호 23, 51, 또는 79, 및 (iii) 서열 번호 26, 54, 또는 82로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진  $V_L$  CDR3을 포함하는 경쇄 가변( $V_L$ ) 영역을 포함한다.
- [0019] 일부 실시형태에서, 항체는 당화된 BTLA에의 결합을 위해 STC613으로 지정된 항체, STC626으로 지정된 항체, 또는 STC635로 지정된 항체와 경쟁한다.
- [0020] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 또는 169의 아미노산 서열의 5개 이상의 연속 아미노산의 서열을 포함하는 BTLA 에피토프에 특이적으로 결합한다.
- [0021] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 86의 BTLA의 R12, H16, K51, T57, S82, 또는 S86에 해당하는 아미노산 중 하나 이상을 포함하는 BTLA 에피토프에 특이적으로 결합한다.
- [0022] 일부 실시형태에서, 항체는 1  $\mu$ M 이하의 해리 상수(Kd)로 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다.
- [0023] 일부 실시형태에서, 항체는 100 nM 이하, 10 nM 이하, 또는 5 nM 이하의 해리 상수(Kd)로 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다.
- [0024] 일부 실시형태에서, 항체는 5 nM 이하의 해리 상수(Kd)로 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다.

- [0025] 일부 실시형태에서, 항체는 BTLA에의 헤르페스바이러스-진입 매개자(herpesvirus-entry mediator)(HVEM) 결합을 억제한다.
- [0026] 일부 실시형태에서, 항체는 1  $\mu\text{g/ml}$  이하의 IC50으로 HVEM 결합을 억제한다.
- [0027] 일부 실시형태에서, 항체는 0.8  $\mu\text{g/ml}$  이하, 0.6  $\mu\text{g/ml}$  이하, 0.4  $\mu\text{g/ml}$  이하, 0.2  $\mu\text{g/ml}$  이하의 IC50으로 HVEM 결합을 억제한다.
- [0028] 일부 실시형태에서, 항체는 0.2  $\mu\text{g/ml}$  이하의 IC50으로 HVEM 결합을 억제한다.
- [0029] 일부 양태에서, 항체는 재조합적이다. 일부 양태에서, 항체는 IgG, IgM, IgA 또는 그의 항원 결합 단편이다. 다른 양태에서, 항체는 Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F(ab')<sub>3</sub>, 1가 scFv, 2가 scFv, 2특이적 항체, 2특이적 scFv, 또는 단일 도메인 항체이다. 일부 양태에서, 항체는 인간 또는 인간화 항체이다. 추가 양태에서, 항체는 영상화제, 화학요법제, 독소 또는 방사성핵종에 접합된다.
- [0030] 추가 실시형태에서, 본 발명은 약학적 허용 담체내에 실시형태의 항체(예를 들어, 비당화된 BTLA에 비하여 당화된 BTLA에 선택적으로 결합하는 항체)를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0031] 다른 추가 실시형태에서, 본 발명은 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 인간 BTLA의 적어도 7개(예를 들어, 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 더 많은) 인접(contiguous) 아미노산의 단편을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공한다. 추가 양태에서, 실시형태의 분리된 폴리펩티드는 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는, 인간 BTLA의 적어도 7개(예를 들어, 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 더 많은) 연속 아미노산의 단편을 포함하며, 이때 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 상기 아미노산 중 적어도 하나는 당화된다. 일부 양태에서, 실시형태의 폴리펩티드는 면역원성 폴리펩티드(예를 들어, 키홀 림프 헤모시아닌, KLH)에 융합되거나 접합된다. 일부 양태에서, 폴리펩티드는 추가로 C- 또는 N- 말단에서 Cys 잔기를 포함한다. 예를 들어, 일부 양태에서, 폴리펩티드는 Cys 잔기에서의 디설파이드 연결에 의해 면역원성 폴리펩티드에 접합된다.
- [0032] 또 다른 추가 실시형태에서, 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 인간 BTLA의 적어도 7개(예를 들어, 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 더 많은) 연속 아미노산의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 조성물이 제공되며, 이때 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 상기 아미노산 중 적어도 하나는 당화되며, 폴리펩티드는 약학적 허용 담체에서 제형화된다.
- [0033] 다른 추가 실시형태에서, 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 인간 BTLA의 적어도 7개 연속 아미노산의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 면역원성 조성물이 제공되며, 이때 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 상기 아미노산 중 적어도 하나는 당화되며, 폴리펩티드는 약학적 허용 담체에서 제형화된다. 일부 양태에서, 면역원성 조성물은 백반 또는 프로인트 아쥬반트와 같은 아쥬반트를 더 포함한다.
- [0034] 다른 추가 실시형태에서 본 발명은 실시형태의 항체 또는 분리된 폴리펩티드의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 가진 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 암을 치료하는 방법은 개체에게 폴리펩티드(예를 들어, 당화된 BTLA 폴리펩티드)의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 추가 양태에서, 암을 치료하는 방법은 실시형태의 항체(예를 들어, 항체는 비당화된 BTLA에 비하여 당화된 BTLA에 선택적으로 결합함)의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 암은 유방암, 폐암, 두경부암, 전립선암, 식도암, 기관암(tracheal cancer), 피부암, 뇌암, 간암, 방광암, 위암, 췌장암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 고환암, 결장암, 직장암 또는 피부암이다. 일부 양태에서, 암은 부신암, 항문암, 담관암, 방광암, 골암, 성인에서의 뇌/CNS 종양, 아동에서의 뇌/CNS 종양, 유방암, 남성 유방암, 청소년에서의 암, 아동에서의 암, 젊은 성인에서의 암, 원발부위 불명 암(cancer of unknown primary), 캐슬만병(Castleman disease), 자궁경부암, 결장/직장 암, 자궁내막암, 식도암, 유잉 가족 종양(Ewing family tumor), 눈암, 담낭암, 위장관 칼시노이드 종양(gastrointestinal carcinoid tumor), 위장기질 종양(GIST), 임신영양막질병, 호지킨병, 카포시육종, 신장암, 후두암 또는 하인두암, 백혈병(예를 들어, 성인 급성 림프구성(ALL), 급성 골수성(AML), 만성 림프구성(CLL), 만성 골수성(CML), 만성 골수단핵구성(CMML), 아동 백혈병), 간암, 폐암(예를 들어, 비소세포, 소세포), 폐 칼시노이드 종양, 림프종, 피부의 림프종, 악성 중피종, 다발성 골수종, 골수이형성 증후군, 비강암, 부비동암, 비인두암, 신경아세포종, 비호지킨 림프종, 아동에서의 비호지킨 림프종, 구강암, 구인두암, 골육종, 난소암,

췌장암, 음경암, 뇌하수체 종양, 전립선암, 망막아세포종, 횡문근육종, 침샘암, 육종(예를 들어, 성인 연조직암), 피부암(예를 들어, 기질 및 편평 세포, 흑색종, 메르켈 세포), 소장암, 위암, 고환암, 흉선암, 갑상선암, 자궁육종, 질암, 외음부암, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom macroglobulinemia), 또는 월름종양이다. 일부 양태에서, 항체는 약학적 허용 조성물내에 있다. 추가 양태에서, 항체는 전신적으로 투여된다. 구체적 양태에서, 항체는 정맥내로, 피부내로, 종양내로, 근육내로, 복강내로, 피하로 또는 국소로 투여된다.

[0035] 일부 양태에서, 본 방법은 적어도 제2 항암 치료법을 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 제2 항암 치료법은 수술요법, 화학요법, 방사선요법, 냉동요법, 호르몬요법, 면역요법 또는 사이토카인 요법이다.

[0036] 또 다른 추가 실시형태에서, 본 발명은 실시형태의 항체와(예를 들어, 항체는 비당화된 BTLA에 비하여 당화된 BTLA에 선택적으로 결합함) BTLA-함유 샘플을 접촉시키는 것을 포함하는, BTLA 당화, N-연결 당화 또는 N-당화를 평가하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 방법은 시험관내(*in vitro*) 방법이다. 일부 양태에서, 샘플은 세포 샘플이다.

[0037] 또 다른 추가 실시형태에서, 실시형태에 따른 폴리펩티드(예를 들어, 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 인간 BTLA의 적어도 7개 연속 아미노산의 단편을 가지며, 이때 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 상기 아미노산 중 적어도 하나는 당화되는 폴리펩티드)를 동물에게 투여하고 동물로부터 항체를 분리하는 것을 포함하는, 항체의 제조 방법이 제공된다. 예를 들어, 동물은 마우스, 래트, 토끼 또는 인간일 수 있다. 일부 양태에서 본 방법은 항체의 CDR을 확인하고 CDR 주변 서열을 인간화하여 인간화 항체를 생산하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 양태에서, 본 방법은 인간화 항체를 재조합적으로 발현하는 것을 포함한다. 따라서, 추가 실시형태에서, 본 발명은 전술한 방법에 의해 생산된 분리된 항체를 제공한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 발명은 비당화된 BTLA에 비하여 실시형태의 폴리펩티드(예를 들어, 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 인간 BTLA의 적어도 7개 연속 아미노산의 단편을 포함하며, 이때 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 상기 아미노산 중 적어도 하나는 당화되는 폴리펩티드)에 선택적으로 결합하는 분리된 항체를 제공한다.

## 도면의 간단한 설명

### [0038] 6. 도면의 간단한 설명

하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하며 본 발명의 일부 양태를 추가로 입증하기 위하여 포함된다. 본 발명은 본 명세서에 제시된 구체적 실시형태의 상세한 설명과 함께 이들 도면 중 하나 이상을 참고하여 더 잘 이해될 수 있다.

**도 1a - 항-BTLA mAb의 닷 블롯(dot blot) 분석; 실험 배치.** 도 1a는 닷 블롯 분석에서 시험된 항-BTLA mAb 샘플(STC601 - STC636) 및 대조군(IgG 대조군 항체; 미국 캘리포니아주 샌디에고의 바이오레전드(Biolegend)에 의해 시판되는 BTLA 항체)의 배치를 보여주는 도식을 보여준다. "PNGase F+"는 엔도글리코시다제 처리된 BTLA를 나타내고; "PNGase F-"는 미처리된 당화된 BTLA를 나타낸다.

**도 1b - 항-BTLA mAb의 닷 블롯 분석; 실험 결과.** 도 1b는 항-BTLA mAb STC601-STC636의 당-특이적 BTLA 결합을 평가하는 닷 블롯 분석의 예시적 결과를 보여준다.

**도 2 - 항-BTLA mAb의 웨스턴 블롯 분석.** 도 2는 야생형(WT) BTLA 및 단일 N-당화 부위(N75/2NQ, N94/2NQ, N116/2NQ) 또는 무 N-당화 부위(3NQ)를 보유한 BTLA 돌연변이체와의 BTLA mAb의 결합을 보여주는 예시적인 웨스턴 블롯 결과를 보여준다.

**도 3a - 표면 플라즈몬 공명 BTLA 결합 분석;** 도 3a는 BTLA 적정 실험 및 STC613으로 지정된 고정된 항-BTLA mAb에의 BTLA 결합을 보여주는 센서그램(sensorgram)을 보여준다.

**도 3b - 표면 플라즈몬 공명 BTLA 결합 분석;** 도 3b는 BTLA 적정 실험 및 STC626으로 지정된 고정된 항-BTLA mAb에의 BTLA 결합을 보여주는 센서그램을 보여준다.

**도 3c - 표면 플라즈몬 공명 BTLA 결합 분석;** 도 3c는 BTLA 적정 실험 및 STC636으로 지정된 고정된 항-BTLA mAb에의 BTLA 결합을 보여주는 센서그램을 보여준다.

**도 4a - STC613을 이용한 항-BTLA mAb의 비닝(binning).** 도 4a는 BTLA-STC613 복합체와의 항-BTLA mAb의 결합을 보여주는 표면 플라즈몬 공명 실험의 예시적 결과를 보여준다.



**도 4b - STC636을 이용한 항-BTLA mAb의 비닝.** 도 4b는 BTLA-STC636 복합체에의 항-BTLA mAb의 결합을 보여주는 표면 플라즈몬 공명 실험의 예시적 결과를 보여준다.

**도 5 - 항-BTLA mAb의 중화 활성.** 도 5는 5 µg/ml 또는 0.5 µg/ml 항-BTLA mAb의 존재하에서 BTLA:HVEM 복합체 형성을 분석하는 ELISA 분석의 예시적 결과를 보여주는 막대 다이아그램을 보여준다.

**도 6 - STC613 및 STC626의 중화 활성.** 도 6은 ELISA-기반 BTLA:HVEM 경쟁 분석에서 STC613 및 STC626을 위한 적정 곡선을 보여주는 그래프이다.

**도 7 -STC613의 BTLA 에피토프 맵핑.** 도 7은 BTLA-STC613 복합체에서 STC613에 가교된 것으로 밝혀진 BTLA 영역 및 아미노산 위치를 보여주는 그래프를 보여준다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### 7. 상세한 설명

#### 7.1. 개요

BTLA는 2개의 면역수용체 티로신-계 억제성 모티프를 가진 면역글로불린 도메인-함유 당단백질로서 확인되었다. BTLA는 본래의 T 세포에 의해 발현되지 않지만, T 세포의 활성화동안 유도되는 T 림프구상의 억제성 수용체이다. Watanabe *et al.*, *Nature Immunology* 4, 670-679(2003).

N-당화는 소포체(ER)에서 시작되고 골지체에서 후속하여 프로세싱되는 번역후 변형이다(Schwarz & Aeby, *Current Opinion in Structural Biology* 21, 576-582(2011)). 이 타입의 변형은 먼저 NXT 모티프(-Asn-X-Ser/Thr-) 내에 위치한 아스파라긴(Asn) 측쇄 수용체에 올리고당으로 구성된 미리형성된 글리칸을 전달하는 막-연합 올리고사카릴 트랜스퍼라제(OST) 복합체에 의해 촉매된다(Cheung and Reithmeier, *Methods*, 41(4): 451-59 (2007); Helenius and Aeby, *Science* 291(5512): 2364-69(2001)). 미리형성된 글리칸으로부터의 당의 추가 또는 제거는 세포- 및 위치-의존 방식으로 N-당화 캐스케이드를 엄격하게 조절하는 글리코트랜스퍼라제 및 글리코시다제 그룹에 의해 각각 매개된다.

본 명세서에 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "B- 및 T-림프구 약화인자" 또는 "BTLA"는 영장류(예를 들어, 인간, 필리핀 원숭이(cyno)), 개 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 비롯한 임의의 척추동물 공급원으로부터의 BTLA를 말한다. 달리 특정되지 않으면, BTLA는 또한 다양한 BTLA 이소형태, 그의 SNP 변이체를 비롯한 관련 BTLA 폴리펩티드, 및 인산화된 BTLA, 당화된 BTLA, 및 유비퀴틴화된 BTLA를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 변형된 형태의 BTLA를 포함한다.

인간 BTLA의 예시적인 아미노산 서열이 하기에 제공되며, 여기서 N-연결된 당화를 위한 부위는 진하게 밑줄그어 진다(N75, N94, 및 N110):

MKTLPAMLGT GKLFVFFLI PYLDIWNHIG KESCDVQLYI KRQSEHSILA  
GDPFELECPV KYCANRPHVT WCKLNGTTCV KLEDRTTSWK EEKNISFFIL  
HFEPVLPNDN GSYRCSANFQ SNLIESHSTT LYVTDVKSAS ERPSKDEMAS  
RPWLLYRLLP LGGLPLLITT CFCLFCCLRR HQGKQNELSD TAGREINLVD  
AHLKSEQTEA STRQNSQVLL SETGIYDNDP DLCFRMQEGS EVYSNPCLEE  
NKPGIVYASL NHSVIGPNSR LARNVKEAPT EYASICVRS (서열 번호 1)

하기 표에 나타난 대로, 모든 3개의 N-당화 부위는 BTLA의 세포외 도메인에 위치한다.

특징 키(feature key)	위치(들)	길이	설 명
위상 도메인	31 – 157	127	세포외
경막	158 – 178	21	나선형
위상 도메인	179 – 289	111	세포질

- [0048] 구체적 BTLA 이소형태 또는 변이체의 특이적 당화 부위는 그 구체적 BTLA 이소형태 또는 변이체의 아미노산 75, 94, 및 110으로부터 변할 수 있다. 그러한 환경에서, 당업자는 서열 배열 및 본 기술분야에서의 다른 상식에 기초하여 상기에 예시된 인간 BTLA의 N75, N94, 및 N110에 대응하는 임의의 구체적 BTLA 이소형태 또는 변이체의 당화 부위를 결정할 수 있을 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 비당화된 BTLA 이소형태 또는 변이체에 비하여 BTLA 이소형태 또는 변이체의 당화된 형태에 선택적으로 결합하는 항체를 제공한다. BTLA 이소형태 또는 변이체의 당화된 부위는 상기에 제공된 인간 BTLA 서열의 N75, N94, 및 N110의 대응하는 부위일 수 있다. 본 발명은 또한 상기에서 제공되는 인간 BTLA 서열의 위치 N75, N94, 또는 N110에 대응하는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 BTLA 이소형태 또는 변이체의 적어도 7개(예를 들어, 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 더 많은) 연속 아미노산의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.
- [0049] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 관사("a," "an," 및 "the")는 그 관사의 문법적 대상 하나 또는 하나 초과를 말한다. 예로서, 항체는 하나의 항체 또는 하나보다 많은 항체를 말한다.
- [0050] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "또는"은 대안 만을 말하는 것으로 명백하게 표시되거나 대안이 상호 배타적이 아니라면 "및/또는"과 상호교환가능하게 사용된다. 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, "다른"은 적어도 두번째 또는 그 이상을 말한다.
- [0051] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "약"은 값이 그 값을 결정하기 위해 이용되는 장치, 방법을 위한 오차의 고유한 변이 또는 연구 대상간에 존재하는 변이를 포함함을 나타낸다.
- [0052] **7.2. 항체 및 폴리펩티드**
- [0053] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "항체"는 IgG, IgM, IgA, IgD, IgE와 같은, 특정 분자 항원에 결합할 수 있는 면역글로불린(또는 "Ig") 클래스의 폴리펩티드 내의 B 세포의 폴리펩티드 생성물, 및 항원 결합 단편을 가진 다른 분자를 말한다. 항체는 두 개의 동일한 폴리펩티드 쇄 쌍으로 이루어질 수 있으며, 이때 각 쌍은 하나의 중쇄(약 50-70 kDa) 및 하나의 경쇄(약 25 kDa)를 가지며 각 쇄의 각각의 아미노-말단 부분은 약 100 내지 약 130 이상 아미노산의 가변 영역을 포함하며 각 쇄의 각각의 카르복시-말단 부분은 불변 영역을 포함한다(Borrebaeck (ed.) (1995) Antibody Engineering, Second Edition, Oxford University Press.; Kuby (1997) Immunology, Third Edition, W.H. Freeman and Company, New York를 참고한다). 여기서, 특정 분자 항원은 당화된 인간 BTLA를 포함한다. 본 발명에서 제공되는 항체는 다클론 항체, 단클론 항체, 합성 항체, 재조합적으로 생산된 항체, 2-특이적 항체, 다중특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 낙타화(camelized) 항체, 키메라 항체, 인트라바디(intrabodies), 항-이디오타입(항-Id) 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0054] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 항체, 항원 결합 단편 또는 폴리뉴클레오티드와 관련하여 사용될 때 용어 "분리된"은 언급된 분자가 그것이 자연에서 발견되는 적어도 하나의 성분이 없음을 의미한다. 이 용어는 그의 자연 환경에서 발견되는 일부 또는 모든 다른 성분으로부터 제거된 항체, 항원 결합 단편 또는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 항체의 자연 환경의 성분은 예를 들어, 적혈구, 백혈구, 혈소판, 혈장, 단백질, 핵산, 염 및 영양소를 포함한다. 항원 결합 단편의 또는 폴리뉴클레오티드의 자연 환경의 성분은 예를 들어, 지질막, 세포 기관, 단백질, 핵산, 염 및 영양소를 포함한다. 본 발명의 항체, 항원 결합 단편 또는 폴리뉴클레오티드는 또한 그들이 분리되거나 재조합적으로 생산되는 세포의 모든 이들 성분 또는 임의의 다른 성분이 없거나 또는 완전히 실질적으로 없을 수 있다.
- [0055] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "단클론 항체"는 단일 세포 클론 또는 하이브리도마 또는 단일 세포로부터 유도된 세포 집단의 생성물인 항체를 말한다. 단클론 항체는 또한 단일 분자 면역글로불린 중을 생산하기 위해 중쇄 및 경쇄 인코딩 면역글로불린 유전자로부터 재조합 방법에 의해 생산된 항체를 말하고자 한다. 단클론 항체 제제 내의 항체를 위한 아미노산 서열은 실질적으로 균질하며 그러한 제제 내의 항체의 결합 활성은 실질적으로 동일한 항원 결합 활성을 나타낸다. 대조적으로, 다클론 항체는 한 집단 내의 상이한 B 세포로부터 수득되며, 다클론 항체는 특정 항원에 결합하는 면역글로불린 분자들의 조합이다. 다클론 항체의 각 면역글로불린은 동일한 항원의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 단클론 항체 및 다클론 항체 둘 모두를 생산하는 방법은 본 기술분야에 잘 알려져 있다(Harlow and Lane., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 및 Borrebaeck (ed.), Antibody Engineering: A Practical Guide, W.H. Freeman and Co., Publishers, New York, pp. 103-120 (1991)).
- [0056] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "인간 항체"는 인간 가변 영역 및/또는 인간 불

변 영역 또는 인간 생식세포 면역글로불린 서열에 대응하는 그의 일부를 가진 항체를 말한다. 그러한 인간 생식세포 면역글로불린 서열은 Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242에 의해 개시된다. 여기서, 인간 항체는 당화된 인간 BTLA에 결합하며 인간 생식세포 면역글로불린 핵산 서열의 자연 발생 체세포 변이체인 핵산 서열에 의해 인코딩되는 항체를 포함할 수 있다.

[0057] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "키메라 항체"는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유도되거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체에서의 대응 서열과 동일하거나 상동성인 한편, 쇠(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유도되거나 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체에서의 대응 서열과 동일하거나 상동성인 항체, 및 그들이 원하는 생물학적 활성을 나타낸다면 그러한 항체의 단편을 말한다(미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)를 참고한다).

[0058] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "인간화 항체"는 본래의(native) 상보성 결정 영역("CDR") 잔기가 원하는 특이성, 친화성, 및 능력을 가진 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비인간 종(예를 들어, 공여체 항체)의 상응하는 CDR로부터의 잔기에 의해 치환된 인간 면역글로불린(예를 들어, 수용체 항체)을 포함하는 키메라 항체를 말한다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 하나 이상의 FR 영역 잔기가 상응하는 비인간 잔기에 의해 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수용체 항체 또는 공여체 항체에서 발견되지 않는 잔기를 가질 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 더 개선하기 위하여 만들어진다. 인간화 항체 중쇄 또는 경쇄는 적어도 하나 이상의 가변 영역의 실질적인 전부를 가질 수 있으며, 가변 영역 내의 CDR의 전부 또는 실질적인 전부는 비인간 면역글로불린의 CDR에 상응하며 FR의 전부 또는 실질적인 전부는 인간 면역글로불린 서열의 FR이다. 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역(Fc), 전형적으로 인간 면역글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 가질 수 있다. 추가 상세사항을 위하여, Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); 및 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992); Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-4289 (1992); 및 미국 특허 6,800,738호, 6,719,971호, 6,639,055호, 6,407,213호, 및 6,054,297호를 참고한다.

[0059] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "재조합 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 분리되는 항체를 말한다. 재조합 항체는 숙주 세포내로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 이용하여 발현된 항체, 재조합의 조합 항체 라이브러리로부터 분리된 항체, 인간 면역글로불린 유전자에 대해 트랜스제닉 및/또는 트랜스염색체(transchromosomal)인 동물(예를 들어, 마우스 또는 소)로부터 분리된 항체(예를 들어, Taylor, L. D. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295(1992) 참고) 또는 다른 DNA 서열에의 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱에 관련된 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 분리된 항체일 수 있다. 그러한 재조합 항체는 인간 생식세포 면역글로불린 서열로부터 유도된 것을 비롯한 가변 및 불변 영역을 가질 수 있다(Kabat, E. A. *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Humna Services, NIH Publication No. 91-3242를 참고한다). 재조합 항체는 또한 시험관내 돌연변이유발(또는 인간 Ig 서열에 대해 트랜스제닉인 동물이 사용될 경우, 생체내(in vivo) 체세포 돌연변이유발)을 거칠 수 있으며 따라서 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 인간 생식세포 VH 및 VL 서열로부터 유도되고 이에 관련된 반면 생체내에서 인간 항체 생식세포 레파토리 내에 자연적으로는 존재하지 않는 서열일 수 있다.

[0060] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, "중화 항체"는 BTLA와 그의 천연 리간드, 예를 들어, 헤르페스바이러스-진입 매개자(entry mediator)(HVEM)의 결합을 차단하고, BTLA 및/또는 그의 다른 생리학적 활성에 의해 매개되는 시그널링 경로를 억제하는 항체를 말한다. 중화 항체의 IC50은 중화 분석, 예를 들어, BTLA-HVEM 복합체 형성을 분석하는 ELISA 분석에서 BTLA의 50%를 중화시키는데 필요한 항체의 농도를 말한다. 중화 항체의 IC50은 중화 분석에서 0.01 - 10  $\mu\text{g/ml}$  범위일 수 있다.

[0061] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "항원 결합 단편" 및 유사한 용어는 항원에 면역 특이적으로 결합하고 항체에게 항원에 대한 그의 특이성 및 친화성을 부여하는 아미노산 잔기를 포함하는 항체의 부분을 말한다. 항원 결합 단편은 항체의 기능성 단편으로 불릴 수 있다. 항원 결합 단편은 1가, 2가 또는 다가일 수 있다.

[0062] 항원 결합 단편을 가진 분자는 예를 들어, Fd, Fv, Fab, F(ab'), F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>3</sub>, F(ab')<sub>3</sub>, 단일쇄 Fv(scFv), 디아바디(diabody), 트리아바디(triobody), 테트라바디(tetrabody), 미니바디(minibody), 또는 단일

도메인 항체를 포함한다. scFv는 1가 scFv 또는 2가 scFv일 수 있다. 항원 결합 단편을 가진 다른 분자는 그러한 항원 결합 단편이 결합 활성을 보유한다면, 예를 들어, 중쇄 또는 경쇄 폴리펩티드, 가변 영역 폴리펩티드 또는 CDR 폴리펩티드 또는 그의 일부를 포함할 수 있다. 그러한 항원 결합 단편은 예를 들어, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); Myers (ed.), Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, New York: VCH Publisher, Inc.; Huston *et al.*, Cell Biophysics, 22:189-224 (1993); Plückthun and Skerra, Meth. Enzymol., 178:497-515 (1989) 및 Day, E.D., Advanced Immunochemistry, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, NY (1990)에서 개시된 것을 찾을 수 있다. 항원 결합 단편은 적어도 5개 연속 아미노산 잔기, 적어도 10개 연속 아미노산 잔기, 적어도 15개 연속 아미노산 잔기, 적어도 20개 연속 아미노산 잔기, 적어도 25개 연속 아미노산 잔기, 적어도 40개 연속 아미노산 잔기, 적어도 50개 연속 아미노산 잔기, 적어도 60개 연속 아미노산 잔기, 적어도 70개 연속 아미노산 잔기, 적어도 80개 연속 아미노산 잔기, 적어도 90개 연속 아미노산 잔기, 적어도 100개 연속 아미노산 잔기, 적어도 125개 연속 아미노산 잔기, 적어도 150개 연속 아미노산 잔기, 적어도 175개 연속 아미노산 잔기, 적어도 200개 연속 아미노산 잔기, 또는 적어도 250개 연속 아미노산 잔기의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드일 수 있다.

[0063] 항체의 중쇄는 약 50-70 kDa의 폴리펩티드 쇄를 말하며, 이때 아미노-말단 부분은 약 120개 내지 130개 또는 더 많은 아미노산의 가변 영역을 포함하며 카르복시-말단 부분은 불변 영역을 포함한다. 불변 영역은 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열에 기초하여, 알파( $\alpha$ ), 델타( $\delta$ ), 입실론( $\epsilon$ ), 감마( $\gamma$ ) 및 뮤( $\mu$ )로 불리는 다섯 가지 구별되는 타입 중 하나일 수 있다. 구별되는 중쇄는 크기가 상이하다:  $\alpha$ ,  $\delta$  및  $\gamma$ 는 대략 450개 아미노산을 함유하는 한편,  $\mu$  및  $\epsilon$ 는 대략 550개 아미노산을 함유한다. 경쇄와 조합될 경우, 이들 구별되는 타입의 중쇄는 IgG의 4가지 서브클래스, 즉 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 비롯한, 항체의 잘 알려진 5가지 클래스인, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM을 각각 생성한다. 중쇄는 인간 중쇄일 수 있다.

[0064] 항체의 경쇄는 약 25 kDa의 폴리펩티드 쇄를 말하며, 이때 아미노-말단 부분은 약 100개 내지 약 110개 또는 더 많은 아미노산의 가변 영역을 포함하고 카르복시-말단 부분은 불변 영역을 포함한다. 경쇄의 대략적인 길이는 211 내지 217 아미노산이다. 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 카파( $\kappa$ )와 람다( $\lambda$ )로 불리는 두 가지 구별되는 타입이 있다. 경쇄 아미노산 서열은 본 기술분야에 잘 알려져 있다. 경쇄는 인간 경쇄일 수 있다.

[0065] 항체의 가변 도메인 또는 가변 영역은 일반적으로 경쇄 또는 중쇄의 아미노-말단에 위치하며 길이가 중쇄에서는 약 120개 내지 130개 아미노산이고 경쇄에서는 약 100개 내지 110개 아미노산인 항체의 경쇄 또는 중쇄의 부분을 말하며, 각각의 특정 항체의 그의 특정 항원에 대한 결합 및 특이성에서 사용된다. 가변 도메인은 상이한 항체 간에 서열이 광범위하게 다르다. 서열의 변동성은 CDR에 집중되는 한편, 가변 도메인에서 덜 가변성인 부분은 프레임워크 영역(FR)으로 불린다. 경쇄 및 중쇄의 CDR은 항체와 항원의 상호작용을 주로 책임진다. 본 명세서에서 사용되는 아미노산 위치의 넘버링은 Kabat *et al.* (1991) Sequences of proteins of immunological interest. (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.) 5<sup>th</sup> ed에서처럼, EU 인덱스를 따른다. 가변 영역은 인간 가변 영역일 수 있다.

[0066] CDR은 면역글로불린(Ig 또는 항체) VH  $\beta$ -시트 프레임워크의 비-프레임워크 영역 내의 3개의 초가변 영역(H1, H2 또는 H3) 중 하나, 또는 항체 VL  $\beta$ -시트 프레임워크의 비-프레임워크 영역 내의 3개의 초가변 영역(L1, L2 또는 L3) 중 하나를 말한다. 따라서, CDR은 프레임워크 영역 서열 내에 산재된 가변 영역 서열이다. CDR 영역은 당업자에게 잘 알려져 있으며 예를 들어, 항체 가변(V) 도메인 내에서 가장 초가변성 영역으로서 카바트(Kabat)에 의해 정의되었다(Kabat *et al.*, *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616 (1977); Kabat, *Adv. Prot. Chem.* 32:1-75 (1978)). CDR 영역 서열은 또한 보존된  $\beta$ -시트 프레임워크의 일부가 아니며 따라서 상이한 형태를 취할 수 있는 잔기들로서 초티아(Chothia)에 의해 구조적으로 정의되었다(Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). 두 용어는 본 기술분야에서 잘 인식된다. 정규 항체 가변 도메인 내의 CDR의 위치는 많은 구조의 비교에 의해 결정되었다(Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); Morea *et al.*, *Methods* 20:267-279 (2000)). 초가변 영역 내의 잔기의 수는 상이한 항체에서 변하기 때문에, 정규 위치에 대하여 추가의 잔기는 정규 가변 도메인 넘버링 도식에서 잔기 번호에 이웃하여 a, b, c 등으로 통상적으로 넘버링된다(Al-Lazikani *et al.*, *supra*(1997)). 그러한 명명법은 유사하게 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0067] 예를 들어, 표준 명칭에 따라 정의된 CDR이 하기 표 1에 개시된다.



[0068] 표 1: CDR 정의

	예시적 (카뱃 + 초티아)	IMGT	카뱃	AbM	초티아	접촉
V <sub>H</sub> CDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	53-55	47-58
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	96-101	93-101
V <sub>L</sub>	24-34	27-38	24-34	24-34	26-32	30-36

[0069]

	예시적 (카뱃+ 초티아)	IMGT	카뱃	AbM	초티아	접촉
CDR1						
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-52	46-55
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	91-96	89-96

[0070]

[0071]

하나 이상의 CDR이 또한 공유적으로 또는 비공유적으로 분자내로 통합되어 분자가 면역부착소(immunoadhesin)가 되도록 할 수 있다. 면역부착소는 더 큰 폴리펩티드 쇄의 일부로서 CDR(들)을 통합할 수 있거나, CDR(들)을 다른 폴리펩티드 쇄에 공유적으로 연결시킬 수 있거나, 또는 CDR(들)을 비공유적으로 통합할 수 있다. CDR은 면역부착소가 특정 관심 항원에 결합하도록 한다.

[0072]

"프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 CDR에 인접한(flanking) 가변 도메인 잔기를 말한다. FR 잔기는 예를 들어, 키메라, 인간화, 인간, 도메인 항체, 디아바디, 선형 항체 및 2특이적 항체에 존재한다. FR 잔기는 본 명세서에서 정의된 초가변 영역 잔기외의 가변 도메인 잔기이다.

[0073]

본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 항체와 관련하여 사용되는 용어 "분리된"은 항체가 유래되는 세포 또는 조직 공급원으로부터의 세포 물질 또는 다른 오염 단백질 및/또는 다른 오염 성분이 그 항체에 실질적으로 없거나, 또는 화학적으로 합성될 경우 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 그 항체에 실질적으로 없음을 의미한다. "세포 물질이 실질적으로 없는"이라는 언어는 항체가 그것이 분리되거나 재조합적으로 생산된 세포의 세포 성분으로부터 분리된 항체 체제를 포함한다. 따라서, 세포 물질이 실질적으로 없는 항체는 약 30%, 20%, 10%, 또는 5%(건조 중량 기준) 미만의 이종성 단백질(여기서는 "오염 단백질"로도 불림)을 갖는 항체 체제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체가 재조합적으로 생산될 경우, 항체는 배양 배지가 실질적으로 없으며, 예를 들어, 배양 배지는 단백질 체제의 부피의 약 20%, 10%, 또는 5% 미만을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 항체가 화학 합성에 의해 생산되는 경우, 항체는 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없으며, 예를 들어, 항체는 단백질 합성에 관련되는 화학적 전구체 또는 다른 화학물질로부터 분리된다. 따라서 그러한 항체 체제는 관심 항체 외의 다른 화학적 전구체 또는 화합물이 약 30%, 20%, 10%, 5%(건조 중량 기준) 미만이다. 오염 성분은 또한 항체를 위한 치료 용도를 방해할 물질을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않으며, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체는 (1) 99 중량%와 같은, 로우리법(Lowry method)(Lowry *et al.* J. Bio. Chem. 193: 265-275, 1951)에 의해 결정할 때 95 중량% 초과인 항체로, (2) 회전 컵 서열결정장치(spinning cup sequenator)의 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15 잔기를 수득하기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은염색을 이용하여 환원 또는 비환원 조건하에서의 SDS-PAGE에 의해 균질한 정도로 정제될 것이다. 분리된 항체는 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이므로 재조합 세포 내의 제자리(*in situ*) 항체를 포함한다. 하지만, 일

반적으로는, 분리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다. 구체적 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 분리된다.

[0074] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드", "핵산", "핵산 분자" 및 다른 유사한 용어는 상호교환되어 사용되며 DNA, RNA, mRNA 등을 포함한다.

[0075] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 핵산 분자와 관련하여 사용될 때 용어 "분리된"은 핵산 분자가 그 핵산 분자의 천연 공급원에 존재하는 다른 핵산 분자로부터 분리된 것임을 의미한다. 또한, cDNA 분자와 같은, "분리된" 핵산 분자는 재조합 기술에 의해 생산될 경우 다른 세포 물질 또는 배양 배지가 실질적으로 없거나, 또는 화학적으로 합성될 경우 화학적 전구체 또는 다른 화합물이 실질적으로 없을 수 있다. 구체적 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체를 인코딩하는 핵산 분자(들)는 분리되거나 정제된다.

[0076] 본 명세서에서 사용될 때 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "결합하다" 또는 "결합하는"은 분자 간의 상호작용을 말한다. 상호작용은 예를 들어, 수소 결합, 이온 결합, 소수성 상호작용 및/또는 반 데르 발스 상호작용을 비롯한 비공유적 상호작용일 수 있다. 항체와, 당화된 인간 BTLA와 같은 타겟 분자의 단일 에피토프 사이의 전체적인 비공유적 상호작용의 강도는 그 에피토프에 대한 항체의 친화성이다. "결합 친화성"은 일반적으로 분자(예를 들어, 항체와 같은 결합 단백질)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너(예를 들어, 항원) 사이의 비공유적 상호작용의 총 합의 강도를 말한다.

[0077] 항체와 같은 결합 분자 X의 그의 결합 파트너 Y, 예를 들어, 항체의 짝 항원에 대한 친화성은 일반적으로 해리 상수( $K_D$ )에 의해 나타낼 수 있다. 저친화성 항체는 일반적으로 항원에 느리게 결합하고 쉽게 해리하는 경향이 있는 반면, 고친화성 항체는 일반적으로 항원에 더 빠르게 결합하고 더 오래 결합된 채 남아 있는 경향이 있다. 결합 친화성을 측정하는 다양한 방법이 본 기술분야에 알려져 있으며, 그 중 어느 것이든 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. " $K_D$ " 또는 " $K_D$  값"은 본 기술분야에 알려진 분석에 의해, 예를 들어, 결합 분석에 의해 측정될 수 있다.  $K_D$ 는 예를 들어, 관심 항체의 Fab 버전 및 그의 항원으로 수행되는, 방사성라벨링된 항원 결합 분석(RIA)에서 측정될 수 있다(Chen, *et al.*, (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881).  $K_D$  또는  $K_D$  값은 또한 예를 들어, 비아코어(BIAcore)TM-2000 또는 비아코어TM-3000(비아코어, 인크(BIAcore, Inc.)), 뉴저지주 피스카타웨이)를 이용하는 비아코어에 의한 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해, 또는 예를 들어, 옥테트(Octet)QK384 시스템(포르테바이오(ForteBio), 캘리포니아주 먼로 파크)을 이용한 생물층 간섭계법에 의해 측정될 수 있다. 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 만일 항체가 제2 분자 항원보다 더 높은 친화성으로 제1 분자 항원에 결합하면 항체는 제2 분자 항원에 비하여 제1 분자 항원에 "선택적으로 결합"할 수 있다고 말한다. 항체는 일반적으로 완전히 무관한 항원에 결합하지 않는다.

[0078] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 본 명세서에 사용되는 용어 "폴리펩티드"는 2 내지 30개 아미노산(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25 또는 30개 아미노산) 및 더 긴 아미노산 쇠, 예를 들어, 30개 초과 아미노산, 50개 초과 아미노산, 100개 초과 아미노산, 150개 초과 아미노산, 200개 초과 아미노산, 300개 초과 아미노산, 400개 초과 아미노산, 500개 초과 아미노산, 또는 600개 초과 아미노산을 가진 올리고펩티드를 포함한다. 폴리펩티드는 예를 들어, 재조합 발현 또는 화학 합성에 의해 생산될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 번역후에 또는 화학적으로 변형될 수 있다(예를 들어, 당화, 카르바미화, 인산화, 비오티화, 형광 염료의 부착, 등). 폴리펩티드는 특정 부위에서 당화될 수 있다. 폴리펩티드는 천연 유전자 코드에 의해 인코딩되지 않는 비천연 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드는 메틸화 백본 구조, 펩타이드 백본 구조(폴리-N-치환된 글리신), L-아미노산, R-아미노산 등을 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 야생형 서열, 자연 발생 변이체 서열, 돌연변이 서열(예를 들어, 점 돌연변이체, 결실 돌연변이체) 등을 포함할 수 있다.

[0079] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "벡터"는 숙주 세포 내로 핵산 분자를 도입하기 위해 사용되는 물질을 말한다. 사용하기 위해 적응가능한 벡터는 예를 들어, 발현 벡터, 플라스미드, 파아지 벡터, 바이러스 벡터, 에피솜 및 인공 염색체를 포함하며, 인공 염색체는 숙주 세포의 염색체 내로의 안정한 통합을 위해 작동가능한 선택 서열 또는 마커를 포함할 수 있다. 부가적으로, 벡터는 하나 이상의 선택성 마커 유전자 및 적절한 발현 제어 서열을 포함할 수 있다. 포함될 수 있는 선택성 마커 유전자는 예를 들어, 항생제 또는 독소에 대한 저항성을 제공하거나, 영양요구성 결핍을 보충하거나, 또는 배양 배지에 없는 중요 영양소를 공급한다. 발현 제어 서열은 구성적 및 유도성 프로모터, 전사 인핸서, 전사 종결자 및 본 기술분야에 잘 알려진 다른 것들을 포함할 수 있다. 둘 이상의 핵산 분자가 공동발현되는 경우(예를 들어, 항체 중쇄 및 경쇄 둘 모두),

두 핵산 모두가 예를 들어, 하나의 발현 벡터내로 또는 별도의 발현 벡터내로 삽입될 수 있다. 단일 벡터 발현의 경우, 인코딩 핵산은 하나의 공통 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결되거나 하나의 유도성 프로모터와 하나의 구성적 프로모터와 같은 상이한 발현 제어 서열에 연결될 수 있다. 숙주 세포 내로 핵산 분자의 도입은 본 기술분야에 잘 알려진 방법을 이용하여 확인될 수 있다. 그러한 방법은 예를 들어, 노던 블롯(Northern blot) 또는 mRNA의 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 증폭, 또는 유전자 산물의 발현에 대한 면역블롯팅, 또는 도입된 핵산 서열 또는 그의 상응하는 유전자 산물의 발현을 시험하기 위한 다른 적합한 분석 방법과 같은 핵산 분석을 포함한다. 당업자는 핵산 분자가 원하는 산물(예를 들어, 본 발명에서 제공되는 항-BTLA 항체)을 생산하기에 충분한 양으로 발현됨을 이해하며, 발현 수준이 본 기술분야에 잘 알려진 방법을 이용하여 충분한 발현을 수득하기 위하여 최적화될 수 있음이 추가로 이해된다.

[0080] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "숙주 세포"는 핵산 분자로 형질감염된 구체적 대상 세포 및 그러한 세포의 후손 또는 잠재적 후손을 말한다. 그러한 세포의 후손은 후속 세대에서 발생할 수 있는 돌연변이 또는 환경적 영향 또는 숙주 세포 게놈 내로의 핵산 분자의 통합으로 인해, 핵산 분자로 형질감염된 모 세포와 동일하지 않을 수 있다.

[0081] 7.2.1. 항-당화된 BTLA 항체

[0082] 본 발명은 비당화된 BTLA에 비하여 당화된 BTLA에 선택적으로 결합하는 분리된 항체를 제공한다. BTLA는 인간 BTLA일 수 있다. 당화된 BTLA는 BTLA의 특정 N-글리칸 구조 또는 BTLA의 당펩티드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 비당화된 BTLA에 비하여 당화된 BTLA에 선택적으로 결합하는 항원 결합 단편이다.

[0083] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분리된 항체는 비당화된 BTLA에 비하여, N75, N94, N110 또는 그의 임의의 조합에서 당화된 인간 BTLA에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 N75 당화를 가진 인간 BTLA에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 N94 당화를 가진 인간 BTLA에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 N110 당화를 가진 인간 BTLA에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 N75 및 N94 당화를 가진 인간 BTLA에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 N94 및 N110 당화를 가진 인간 BTLA에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 N75 및 N110 당화를 가진 인간 BTLA에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 N75, N94 및 N110 당화를 가진 인간 BTLA에 선택적으로 결합한다.

[0084] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분리된 항체는 BTLA 위치 N75, N94, N110, 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 BTLA의 당화 모티프를 특이적으로 마스킹한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 인간 BTLA의 위치 N75를 포함하는 BTLA의 당화 모티프를 특이적으로 마스킹한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 인간 BTLA의 위치 N94를 포함하는 BTLA의 당화 모티프를 특이적으로 마스킹한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 인간 BTLA의 위치 N110을 포함하는 BTLA의 당화 모티프를 특이적으로 마스킹한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 인간 BTLA의 위치 N75 및 N94를 포함하는 BTLA의 당화 모티프를 특이적으로 마스킹한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 인간 BTLA의 위치 N75 및 N110을 포함하는 BTLA의 당화 모티프를 특이적으로 마스킹한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 인간 BTLA의 위치 N94 및 N110을 포함하는 BTLA의 당화 모티프를 특이적으로 마스킹한다. 일부 실시형태에서, 분리된 항체는 인간 BTLA의 위치 N75, N94 및 N110을 포함하는 BTLA의 당화 모티프를 특이적으로 마스킹한다.

[0085] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 BTLA의 하나 이상의 당화 모티프에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체는 당화 모티프 및 인접 펩티드를 가진 당펩티드에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체는 비당화된 BTLA에 대하여 나타난  $K_D$ 의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%보다 적은  $K_D$ 로 당화된 BTLA에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTLA에 대하여 나타난  $K_D$ 의 50%보다 적은  $K_D$ 로 당화된 BTLA에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체는 비당화된 BTLA에 대하여 나타난  $K_D$ 의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50% 보다 적은  $K_D$ 로 당화된 BTLA에 결합한다. 추가 양태에서, 항체는 비당화된 BTLA에 대하여 나타난  $K_D$ 보다 적어도 10배 적은  $K_D$ 로 당화된 BTLA에 결합한다.

[0086] 일부 실시형태에서, 비당화된 BTLA에 비하여 당화된 BTLA에의 본 발명에서 제공되는 항체의 선택적 결합은 예를 들어, FACS 분석 또는 ELISA에서, 형광 강도(예를 들어, MFI) 측정을 이용하여 결정된다. 예를 들어, 실시예 1 및 3을 참고한다. 일부 실시형태에서, 측정된 형광 강도(예를 들어, MFI)는 당화된 또는 비당화된 BTLA(예를 들

어, 세포 표면 발현된 BTLA, 표면 또는 비드 상에 고정된 BTLA, 또는 벌크 용액 내의 BTLA)에의 형광 라벨링된 본 발명에서 제공되는 항체(예를 들어, FITC 라벨링된 항체)의 결합을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 당화된 BTLA에의 항체의 결합은 비당화된 BTLA에서 나타난 형광 강도보다 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 12배, 적어도 14배, 적어도 16배, 적어도 18배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 30배, 적어도 35배, 적어도 40배, 적어도 45배, 적어도 50배, 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 80배, 적어도 90배, 적어도 100배, 적어도 120배, 적어도 140배, 적어도 160배, 적어도 180배, 또는 적어도 200배 더 큰 형광 강도에 의해 형광 분석에서 나타내진다. 예를 들어, 표 10을 참고한다. 일부 실시형태에서, 당화된 BTLA에의 항체의 결합은 비당화된 BTLA에서 나타난 형광 강도보다 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 또는 적어도 10배 더 큰 형광 강도에 의해 형광 분석에서 나타내진다. 일부 실시형태에서, 당화된 BTLA에의 항체의 결합은 비당화된 BTLA에서 나타난 형광 강도보다 적어도 10배, 적어도 12배, 적어도 14배, 적어도 16배, 적어도 18배, 또는 적어도 20배 더 큰 형광 강도에 의해 형광 분석에서 나타내진다. 일부 실시형태에서, 당화된 BTLA에의 항체의 결합은 비당화된 BTLA에서 나타난 형광 강도보다 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 30배, 적어도 35배, 적어도 40배, 적어도 45배, 적어도 50배, 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 80배, 적어도 90배, 또는 적어도 100배 더 큰 형광 강도에 의해 형광 분석에서 나타내진다. 일부 실시형태에서, 당화된 BTLA에의 항체의 결합은 비당화된 BTLA에서 나타난 형광 강도보다 적어도 100배, 적어도 120배, 적어도 140배, 적어도 160배, 적어도 180배, 또는 적어도 200배 더 큰 형광 강도에 의해 형광 분석에서 나타내진다.

[0087] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 IgG, IgM, IgA, IgD, 또는 IgE일 수 있다. 항-당화된 BTLA 항체는 또한 키메라 항체, 친화성 성숙된 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체일 수 있다. 항-당화된 BTLA 항체는 또한 낙타화 항체, 인트라바디, 항-이디오타입(항-Id) 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 다클론 항체 또는 단클론 항체일 수 있다.

[0088] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 비당화된 BTLA에 비하여 당화된 BTLA에 선택적으로 결합하는 항원 결합 단편이다. 항원 결합 단편은 Fd, Fv, Fab, F(ab'), F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>3</sub>, F(ab')<sub>3</sub>, 단일쇄 Fv(scFv), 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디 또는 단일 도메인 항체일 수 있다. scFv는 1가 scFv, 또는 2가 scFv일 수 있다.

[0089] 비당화된 BTLA에 비하여 당화된 BTLA에 선택적으로 결합하는 여러가지 예시적인 마우스 단클론 항체(mAb)가 생산되고 특성규명되었다. 예를 들어, 실시예 1-7을 참고한다. 예시적인 항-BTLA mAb는 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3 및 IgGM 이소타입을 포함한다. 예를 들어, 표 8을 참고한다. 예를 들어, STC604, STC605, STC606, STC608, STC610, STC613, STC618, STC622, STC626, STC627, STC628, STC630, 및 STC636으로 지정된 항체는 BTLA에의 당화-특이적 결합을 보여준다. 예를 들어, 도 1 및 도 2를 참고한다. 예를 들어, STC604, STC610, STC613, STC618, STC622, STC626, 및 STC635로 지정된 항체는 0.256 nM(STC613) 내지 5.61 nM(STC635) 범위의 KD로, 고 친화성으로 BTLA에 결합한다. 예를 들어, 표 11을 참고한다. 예를 들어, STC613 및 STC626으로 지정된 항체는 1.088 µg/ml(STC613) 및 0.416 µg/ml(STC626)의 IC<sub>50</sub>으로 그의 천연 리간드 HVEM에의 BTLA 결합을 억제한다. 예를 들어, 도 6을 참고한다. STC613으로 지정된 하나의 예시적 항-BTLA mAb의 BTLA 에피토프가 또한 본 발명에서 제공된다. 따라서, 본 발명은 특정 서열 특징을 가진 중화 항-BTLA mAb, BTLA에 당-특이적으로 결합하는 항-BTLA mAb, 및 특정 BTLA 에피토프 및 암치료에서의 그의 용도를 제공한다.

[0090] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 표 2-7에 개시된 아미노산 서열과 같은, 본 명세서에 개시된 단클론 항체(예를 들어, STC613, STC626, 또는 STC635) 중 임의의 하나의 VH 영역, VL 영역, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및/또는 VL CDR3을 포함한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 표 3, 5 및 7에 나타난, (a) STC613으로 지정된 항체; (b) STC626으로 지정된 항체, 또는 (c) STC635로 지정된 항체로부터의 1, 2, 및/또는 3개 중쇄 CDR 및/또는 1, 2, 및/또는 3개 경쇄 CDR을 포함한다.

[0091] STC613으로 지정된 항체는 서열 번호 2인 VH 서열 및 서열 번호 3인 VL 서열을 포함한다.

[0092] STC626으로 지정된 항체는 서열 번호 30인 VH 서열 및 서열 번호 32인 VL 서열을 포함한다.

[0093] STC635로 지정된 항체는 서열 번호 58인 VH 서열 및 서열 번호 60인 VL 서열을 포함한다.



[0094] 표 2: 마우스 단클론 항-인간 BTLA 항체 STC613의 중쇄 가변(VH) 영역과 경쇄 가변(VL) 영역의 서열

	DNA 서열	단백질 서열
중쇄	GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTG AGCTTGTGAGGCCAGGGGCCTCAGTCA AGTTGTCTGCACAGCTTCTGGCTTTAA CATTAGAGACGACTATGTGCACTGGTTG AAACAGAGGCCTGATCAGGGCCTGGAG TGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATG GTAAAACTAAATATGACCCGAAGTTCCA GGACAAGGCCACTATAACTGCAGACAC ATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTC AGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCC GTCTATTCTGTGTTAGAGAGGGGGGTA GTAACACGACTATGCTATGGACTACTG GGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCC TCA (서열 번호 3)	EVQLQQSGAELVRPGASVKL SCTASGFNIRDDYVHWLKQR PDQGLEWIGRIDPANGKTKY DPKFQDKATITADTSSNTAYL QLSSLTSEDTAVYFCVREGGS NYDYAMDYWGQGSVTVSS (서열 번호 2)
카파 경쇄	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCA CTTTGTGCGTTACCATTGGACAACCAGC CTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCTGAGC CTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATT TGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCA GTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTG TCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACA GGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAG ATTTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTATTG CTGGCAAGGTATTCATTTCTCGGACG TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATC AAA (서열 번호 5)	DVVMTQTPLTSLVTIGQPASI SCKSSLSLSDSGKTYLNWL LQRPQSQPKRLIYLVSKLDSG VPDRFTGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGYYCWQGIHFPRTF GGGTKLEIK (서열 번호 4)

[0095]

[0096] 표 3: 마우스 단클론 항-인간 BTLA 항체 STC613의 CDR 서열

I	영역 정의	CDR1	CDR2	CDR3
중쇄	초티아	GFNIRDD (서열 번호 6)	DPANGK (서열 번호 7)	EGGSNYDYAMDY (서열 번호 8)
	AbM	GFNIRDDYVH (서열 번호 9)	RIDPANGKTK (서열 번호 10)	EGGSNYDYAMDY (서열 번호 11)
	카바	DDYVH (서열 번호 12)	RIDPANGKTKYDP KFQD	EGGSNYDYAMDY (서열 번호 14)

[0097]

I	영역 정의	CDR1	CDR2	CDR3
카파 경쇄			(서열 번호 13)	
	접촉	RDDYVH (서열 번호 15)	WIGRIDPANGKTK (서열 번호 16)	VREGGSNYDYAMD (서열 번호 17)
	초티아	KSSLSLSDSGKT YLN (서열 번호 18)	LVSKLDS (서열 번호 19)	WQGIHFPRT (서열 번호 20)
	AbM	KSSLSLSDSGKT YLN (서열 번호 21)	LVSKLDS (서열 번호 22)	WQGIHFPRT (서열 번호 23)
	카바	KSSLSLSDSGKT YLN (서열 번호 24)	LVSKLDS (서열 번호 25)	WQGIHFPRT (서열 번호 26)
	접촉	LDSDGKTYLNWL (서열 번호 27)	RLIYLVSKLD (서열 번호 28)	WQGIHFPR (서열 번호 29)

[0098]

[0099] 표 4: 마우스 단클론 항-인간 BTLA 항체 STC626의 중쇄 가변(VH) 영역과 경쇄 가변(VL) 영역의 서열

	DNA 서열	단백질 서열
중쇄	CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTG AGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCA AGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATAC CTTCACAACTATGGAATGAAGTGGGTG AAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAG TGGATGGGCTGGATAAACACCAACACT GGAGAGCCAACATATGCTGAAGAGTTC AAGGGACGGATTGCCTTCTCTTGGGAAT CCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGAT CAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGC CACATATTTCTGTGCAAGAGAGGGAGTG CGACGGGGGGGGTACTTTTTTGACTACT GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTC CTCA (서열 번호 31)	QIQLVQSGPELKKPGETVKIS CKASGYTFTNYGMNWVKQA PGKGLKWMGWINTNTGEPT YAEFEKGRIFSLSSASTAY LQINNLIKNETATYFCAREG VRRGGYFFDYWGQGTTLTVS S (서열 번호 30)
카파 경쇄	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCT CCCTATCTGTATCTGTGGGAGAACTGT CACCATCACATGTCGAGCAAGTGAGAA TATTTACAGCAATTTAGCATGGTATCAG CAGAAACAGGGAATCTCCTCAGCTC CTGGTCTATGCTGCAACAACTTAGCAG	DIQMTQSPASLSVSVGETVTI TCRASENIYSNLAWYQQKQG KSPQLLVYAATNLADGVPSR FSGSGSGTQYSLKINSLSQSED FGSYHCQHFWGFPFTFGAGT KLEIKRA (서열 번호 32)

[0100]

	DNA 서열	단백질 서열
	ATGGTGTGCCATCAAGGTTCAAGTGGCAG TGGATCAGGCACACAGTATTCCCTCAAG ATCAACAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTG GGAGTTATCACTGTCAACATTTTGGGG TTTTCCATTACGTTTCGGCGCGGGGACA AAGTTGGAAATAAAACGGGCT (서열 번호 33)	

[0101]

[0102] 표 5: 마우스 단클론 항-인간 BTLA 항체 STC626의 CDR 서열

	영역 정의	CDR1	CDR2	CDR3
중쇄	초티아	GYTFTNY (서열 번호 34)	NTNTGE (서열 번호 35)	EGVRRGGYFFDY (서열 번호 36)
	AbM	GYTFTNYGMN (서열 번호 37)	WINTNTGEPT (서열 번호 38)	EGVRRGGYFFDY (서열 번호 39)
	카밧	NYGMN (서열 번호 40)	WINTNTGEPTYAEE FKG (서열 번호 41)	EGVRRGGYFFDY (서열 번호 42)
	접촉	TNYGMN (서열 번호 43)	WMGWINTNTGEPT (서열 번호 44)	AREGVRRGGYFFD (서열 번호 45)
카파 경쇄	초티아	RASENIYSNLA (서열 번호 46)	AATNLAD (서열 번호 47)	QHFWGFPFT (서열 번호 48)
	AbM	RASENIYSNLA (서열 번호 49)	AATNLAD (서열 번호 50)	QHFWGFPFT (서열 번호 51)
	카밧	RASENIYSNLA (서열 번호 52)	AATNLAD (서열 번호 53)	QHFWGFPFT (서열 번호 54)
	접촉	YSNLAWY (서열 번호 55)	LLVYAATNLA (서열 번호 56)	QHFWGFPF (서열 번호 57)

[0103]

[0104] 표 6: 마우스 단클론 항-인간 BTLA 항체 STC635의 중쇄 가변(VH) 영역과 경쇄 가변(VL) 영역의 서열

	DNA 서열	단백질 서열
중쇄	GAGGTTTCAGTCTGCAGCAGTCTGGGGCA GAGCTTGTAAGCCAGGGCCTCAGTC AAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCA ACATTAAGACACCTATATGCACTGGGT GAGGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGA	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGFNIKDTYMHVVRQR PEQGLEWIGRIDPANGYTKY DPKFQGKATITADTSSNTAYL QLSSLTSEDYAVYYCLIDGY

[0105]

	GTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAAT GGTTATACTAAATATGACCCGAAGTTCC AGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACA CATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCT CAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCC GTCTATTACTGTCTCATCTATGATGGTTA CTACGACTCCTTTGACTACTGGGGCCAA GGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA (서열 번호 59)	YDSFDYWGQGTTLTVSS (서열 번호 58)
카파 경쇄	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCA CTTTGTGCGTTCCCATTTGGACAACCAGC CTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGC CTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATT TGAATTGGTTGTACAGAGGCCAGGCCA GTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTG TCTAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACA GGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAG ATTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATTGGGAGTTTATTATTG CTGGCAAGTTACACATTTCTCGGACG TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATC AAA (서열 번호 61)	DVVMQTPLTSLVPIGQPASI SCKSSQSLDSDGKTYLNWL LQRPQGSPKRLIYLVSKLDSG VPDRFTGSGSGTDFTLKISR EAEDLGYYVCWQVTHFPRTF GGGKLEIK (서열 번호 60)

[0106]

[0107]

표 7: 마우스 단클론 항-인간 BTLA 항체 STC635의 CDR 서열

I	영역 정의	CDR1	CDR2	CDR3
중쇄	초티아	GFNIKDT (서열 번호 62)	DPANGY (서열 번호 63)	YDGYYSFDY (서열 번호 64)
	AbM	GFNIKDTYMH (서열 번호 65)	RIDPANGYTK (서열 번호 66)	YDGYYSFDY (서열 번호 67)
	카밧	DTYMH (서열 번호 68)	RIDPANGYTKYDP KFQG (서열 번호 69)	YDGYYSFDY (서열 번호 70)
	접촉	KDTYMH (서열 번호 71)	WIGRIDPANGYTK (서열 번호 72)	LIYDGYYSFD (서열 번호 73)
카파 경쇄	초티아	KSSQSLDSDGKT YLN (서열 번호 74)	LVSCLDS (서열 번호 75)	WQVTHFPRT (서열 번호 76)
	AbM	KSSQSLDSDGKT YLN (서열 번호 77)	LVSCLDS (서열 번호 78)	WQVTHFPRT (서열 번호 79)
	카밧	KSSQSLDSDGKT YLN	LVSCLDS (서열 번호 81)	WQVTHFPRT (서열 번호 82)

[0108]

I	영역 정의	CDR1	CDR2	CDR3
		(서열 번호 80)		
	접촉	LDSGKTYLNWL (서열 번호 83)	RLIYLVSKLD (서열 번호 84)	WQVTHFPR (서열 번호 85)

[0109]

[0110]

일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 VH 영역 또는 VH 도메인을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 VL 영역 또는 VL 쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 (i) VH 도메인 또는 VH 영역; 및/또는 (ii) VL 도메인 또는 VL 영역의 조합을 갖는다.

[0111]

일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 6개 CDR, 예를 들어, 표 3, 5, 또는 7에 확인된 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및/또는 VL CDR3을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 6개보다 적은 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체는 표 3, 5, 또는 7에 확인된 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및/또는 VL CDR3으로 이루어지는 군으로부터 선택된 1, 2, 3, 4, 또는 5개 CDR을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 항체는 본 명세서에 개시된 (a) STC613으로 지정된 항체; (b) STC626으로 지정된 항체; 또는 (c) STC635로 지정된 항체로 이루어지는 군으로부터 선택된 쥐 단클론 항체의 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및/또는 VL CDR3으로 이루어지는 군으로부터 선택된 1, 2, 3, 4, 또는 5개 CDR을 포함하거나 이로 이루어진다. 따라서, 일부 실시형태에서, 항체는 표 3, 5, 또는 7에 확인된 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및/또는 VL CDR3 중 어느 하나의 1, 2, 3, 4, 또는 5개 CDR을 포함하거나 이로 이루어진다.

- [0112] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 표 3, 5, 또는 7에 열거된 하나 이상의(예를 들어, 1, 2, 또는 3개) VH CDR을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 표 3, 5, 또는 7에 열거된 하나 이상의(예를 들어, 1, 2, 또는 3개) VL CDR을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 표 3, 5, 또는 7에 열거된 하나 이상의(예를 들어, 1, 2, 또는 3개) VH CDR 및 표 3, 5, 또는 7에 열거된 하나 이상의 VL CDR을 포함한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 6, 9, 12, 15, 34, 37, 40, 43, 62, 65, 68, 또는 71 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1을 포함한다. 다른 실시형태에서, 항체는 서열 번호 7, 10, 13, 16, 35, 38, 41, 44, 63, 66, 69, 또는 72 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가진 VH CDR2를 포함한다. 다른 실시형태에서, 항체는 서열 번호 8, 11, 14, 17, 36, 39, 42, 45, 64, 67, 70, 또는 73 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가진 VH CDR3을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 표 3, 5, 또는 7에 개시된 아미노산 서열 중 어느 하나에 개시된 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3으로부터 독립적으로 선택된 VH CDR1 및/또는 VH CDR2 및/또는 VH CDR3을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 18, 21, 24, 27, 46, 49, 52, 55, 74, 77, 80, 또는 83 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가진 VL CDR1을 포함한다. 다른 실시형태에서, 항체는 서열 번호 19, 22, 25, 28, 47, 50, 53, 56, 75, 78, 81, 또는 84 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가진 VL CDR2를 포함한다. 다른 실시형태에서, 항체는 서열 번호 20, 23, 26, 29, 48, 51, 54, 57, 76, 79, 82, 또는 85 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가진 VL CDR3을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 표 3, 5, 또는 7에 개시된 아미노산 서열 중 어느 하나에 개시된 VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3으로부터 독립적으로 선택된 VL CDR1 및/또는 VL CDR2 및/또는 VL CDR3을 포함한다.
- [0113] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 (1) (i) 서열 번호 6, 34, 또는 62, (ii) 서열 번호 9, 37, 또는 65, (iii) 서열 번호 12, 40, 또는 68, 및 (iv) 서열 번호 15, 43, 또는 71로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; (2) (i) 서열 번호 7, 35, 또는 63, (ii) 서열 번호 10, 38, 또는 66, (iii) 서열 번호 13, 41, 또는 69, 및 (iv) 서열 번호 16, 44, 또는 72로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가진 VH CDR2; 및 (3) (i) 서열 번호 8, 36, 또는 64; (ii) 서열 번호 11, 39, 또는 67; (iii) 서열 번호 14, 42, 또는 70, 및 (iv) 서열 번호 17, 45, 또는 73으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가진 VH CDR3;을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역, 및/또는 (1) (i) 서열 번호 18, 46, 또는 74; (ii) 서열 번호 21, 49, 또는 77; (iii) 서열 번호 24, 52, 또는 80, 및 (iv) 서열 번호 27, 55, 또는 83으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가진 VL CDR1; (2) (i) 서열 번호 19, 47, 또는 75, (ii) 서열 번호 22, 50, 또는 78, (iii) 서열 번호 25, 53, 또는 81, 및 (iv) 서열 번호 28, 56, 또는 84로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가진 VL CDR2; 및 (3) (i) 서열 번호 20, 48, 또는 76, (ii) 서열 번호 23, 51, 또는 79, (iii) 서열 번호 26, 54, 또는 82, 및 (iv) 서열 번호 29, 57, 또는 85로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가진 VL CDR3;을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 포함한다.
- [0114] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 (1) (i) 서열 번호 6, 34, 또는 62, (ii) 서열 번호 9, 37, 또는 65, (iii) 서열 번호 12, 40, 또는 68, 및 (iv) 서열 번호 15, 43, 또는 71로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; (2) (i) 서열 번호 7, 35, 또는 63, (ii) 서열 번호 10, 38, 또는 66, (iii) 서열 번호 13, 41, 또는 69, 및 (iv) 서열 번호 16, 44, 또는 72로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가진 VH CDR2; 및 (3) (i) 서열 번호 8, 36, 또는 64; (ii) 서열 번호 11, 39, 또는 67; (iii) 서열 번호 14, 42, 또는 70, 및 (iv) 서열 번호 17, 45, 또는 73으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가진 VH CDR3;을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 포함한다.
- [0115] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 (1) (i) 서열 번호 18, 46, 또는 74; (ii) 서열 번호 21, 49, 또는 77; (iii) 서열 번호 24, 52, 또는 80, 및 (iv) 서열 번호 27, 55, 또는 83으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가진 VL CDR1; (2) (i) 서열 번호 19, 47, 또는 75, (ii) 서열 번호 22, 50, 또는 78, (iii) 서열 번호 25, 53, 또는 81, 및 (iv) 서열 번호 28, 56, 또는 84로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가진 VL CDR2; 및 (3) (i) 서열 번호 20, 48, 또는 76, (ii) 서열 번호 23, 51, 또는 79, (iii) 서열 번호 26, 54, 또는 82, 및 (iv) 서열 번호 29, 57, 또는 85로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가진 VL CDR3;을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 포함한다.
- [0116] 본 발명은 또한 표 3, 5, 또는 7에 열거된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 또는 3개) VH CDR 및 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 또는 3개) VL CDR을 포함하는 항체를 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 표 3, 5, 및 7에 열거된 VH CDR1(서열 번호 6, 9, 12, 15, 34, 37, 40, 43, 62, 65, 68, 또는 71) 및 VL CDR1(서열 번호 18, 21, 24, 27, 46, 49, 52, 55, 74, 77, 80, 또는 83); VH CDR1(서열 번호 6, 9, 12, 15, 34, 37, 40, 43, 62, 65, 68, 또는 71) 및 VL CDR2(서열 번호 19, 22, 25, 28, 47, 50, 53, 56, 75, 78, 81, 또는 84); VH CDR1(서열 번호 6, 9,



[illegible]

13, 16, 35, 38, 41, 44, 63, 66, 69, 또는 72), VL CDR1(서열 번호 18, 21, 24, 27, 46, 49, 52, 55, 74, 77, 80, 또는 83) 및 VL CDR2(서열 번호 19, 22, 25, 28, 47, 50, 53, 56, 75, 78, 81, 또는 84); VH CDR1(서열 번호 6, 9, 12, 15, 34, 37, 40, 43, 62, 65, 68, 또는 71), VH CDR2(서열 번호 7, 10, 13, 16, 35, 38, 41, 44, 63, 66, 69, 또는 72), VL CDR1(서열 번호 18, 21, 24, 27, 46, 49, 52, 55, 74, 77, 80, 또는 83) 및 VL CDR3(서열 번호 20, 23, 26, 29, 48, 51, 54, 57, 76, 79, 82, 또는 85); VH CDR1(서열 번호 6, 9, 12, 15, 34, 37, 40, 43, 62, 65, 68, 또는 71), VH CDR2(서열 번호 7, 10, 13, 16, 35, 38, 41, 44, 63, 66, 69, 또는 72), VL CDR2(서열 번호 19, 22, 25, 28, 47, 50, 53, 56, 75, 78, 81, 또는 84) 및 VL CDR3(서열 번호 20, 23, 26, 29, 48, 51, 54, 57, 76, 79, 82, 또는 85); VH CDR1(서열 번호 6, 9, 12, 15, 34, 37, 40, 43, 62, 65, 68, 또는 71), VH CDR3(서열 번호 8, 11, 14, 17, 36, 39, 42, 45, 64, 67, 70, 또는 73), VL CDR1(서열 번호 18, 21, 24, 27, 46, 49, 52, 55, 74, 77, 80, 또는 83) 및 VL CDR2(서열 번호 19, 22, 25, 28, 47, 50, 53, 56, 75, 78, 81, 또는 84); VH CDR1(서열 번호 6, 9, 12, 15, 34, 37, 40, 43, 62, 65, 68, 또는 71), VH CDR3(서열 번호 8, 11, 14, 17, 36, 39, 42, 45, 64, 67, 70, 또는 73), VL CDR1(서열 번호 18, 21, 24, 27, 46, 49, 52, 55, 74, 77, 80, 또는 83) 및 VL CDR3(서열 번호 20, 23, 26, 29, 48, 51, 54, 57, 76, 79, 82, 또는 85); VH CDR1(서열 번호 6, 9, 12, 15, 34, 37, 40, 43, 62, 65, 68, 또는 71), VH CDR3(서열 번호 8, 11, 14, 17, 36, 39, 42, 45, 64, 67, 70, 또는 73), VL CDR2(서열 번호 19, 22, 25, 28, 47, 50, 53, 56, 75, 78, 81, 또는 84) 및 VL CDR3(서열 번호 20, 23, 26, 29, 48, 51, 54, 57, 76, 79, 82, 또는 85); VH CDR2(서열 번호 7, 10, 13, 16, 35, 38, 41, 44, 63, 66, 69, 또는 72), VH CDR3(서열 번호 8, 11, 14, 17, 36, 39, 42, 45, 64, 67, 70, 또는 73), VL CDR1(서열 번호 18, 21, 24, 27, 46, 49, 52, 55, 74, 77, 80, 또는 83) 및 VL CDR2(서열 번호 19, 22, 25, 28, 47, 50, 53, 56, 75, 78, 81, 또는 84); VH CDR2(서열 번호 7, 10, 13, 16, 35, 38, 41, 44, 63, 66, 69, 또는 72), VH CDR3(서열 번호 8, 11, 14, 17, 36, 39, 42, 45, 64, 67, 70, 또는 73), VL CDR1(서열 번호 18, 21, 24, 27, 46, 49, 52, 55, 74, 77, 80, 또는 83) 및 VL CDR3(서열 번호 20, 23, 26, 29, 48, 51, 54, 57, 76, 79, 82, 또는 85); VH CDR2(서열 번호 7, 10, 13, 16, 35, 38, 41, 44, 63, 66, 69, 또는 72), VH CDR3(서열 번호 8, 11, 14, 17, 36, 39, 42, 45, 64, 67, 70, 또는 73), VL CDR1(서열 번호 18, 21, 24, 27, 46, 49, 52, 55, 74, 77, 80, 또는 83) 및 VL CDR2(서열 번호 19, 22, 25, 28, 47, 50, 53, 56, 75, 78, 81, 또는 84) 및 VL CDR3(서열 번호 20, 23, 26, 29, 48, 51, 54, 57, 76, 79, 82, 또는 85); VH CDR1(서열 번호 6, 9, 12, 15, 34, 37, 40, 43, 62, 65, 68, 또는 71), VH CDR2(서열 번호 7, 10, 13, 16, 35, 38, 41, 44, 63, 66, 69, 또는 72), VH CDR3(서열 번호 8, 11, 14, 17, 36, 39, 42, 45, 64, 67, 70, 또는 73), VL CDR1(서열 번호 18, 21, 24, 27, 46, 49, 52, 55, 74, 77, 80, 또는 83) 및 VL CDR2(서열 번호 19, 22, 25, 28, 47, 50, 53, 56, 75, 78, 81, 또는 84); VH CDR1(서열 번호 6, 9, 12, 15, 34, 37, 40, 43, 62, 65, 68, 또는 71), VH CDR2(서열 번호 7, 10, 13, 16, 35, 38, 41, 44, 63, 66, 69, 또는 72), VH CDR3(서열 번호 8, 11, 14, 17, 36, 39, 42, 45, 64, 67, 70, 또는 73), VL CDR1(서열 번호 18, 21, 24, 27, 46, 49, 52, 55, 74, 77, 80, 또는 83) 및 VL CDR2(서열 번호 19, 22, 25, 28, 47, 50, 53, 56, 75, 78, 81, 또는 84), 및 VL CDR3(서열 번호 20, 23, 26, 29, 48, 51, 54, 57, 76, 79, 82, 또는 85); 또는 VH CDR(서열 번호 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 또는 73) 및 VL CDR(서열 번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 또는 85)의 임의의 조합을 포함하는 항체를 제공한다.



- [0124] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 (1) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1; (2) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진다.
- [0125] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 (1) 서열 번호 34의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; (2) 서열 번호 35의 아미노산 서열을 가진 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3을 가진 중쇄 가변(VH) 영역을 가진 항원 결합 단편을 가진다.
- [0126] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 (1) 서열 번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1; (2) 서열 번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진다.
- [0127] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 (1) 서열 번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1; (2) 서열 번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진다.
- [0128] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 (1) 서열 번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1; (2) 서열 번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진다.
- [0129] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 (1) 서열 번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1; (2) 서열 번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 64의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진다.
- [0130] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 (1) 서열 번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1; (2) 서열 번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진다.
- [0131] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 (1) 서열 번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1; (2) 서열 번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 70의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진다.
- [0132] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 (1) 서열 번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1; (2) 서열 번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 73의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진다.
- [0133] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진다. 항체는 단클론 항체일 수 있다. 항체는 인간화 항체일 수 있다.
- [0134] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진다. 항체는 단클론 항체일 수 있다. 항체는 인간화 항체일 수 있다.
- [0135] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 서열 번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진다. 항체는 단클론 항체일 수 있다. 항체는 인간화 항체일 수 있다.
- [0136] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 (1) 서열 번호 18, 21, 24, 27, 46, 49, 52, 55, 74, 77, 80, 또는 83의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1; 및 (2) 서열 번호 19, 22, 25, 28, 47, 50, 53, 56, 75, 78, 81, 또는 84의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2를 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 (1) 서열 번호 18, 21, 24, 27, 46, 49, 52, 55, 74, 77, 80, 또는 83의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1; 및 (3) 서열 번호 20, 23, 26, 29, 48, 51, 54, 57, 76, 79, 82, 또는 85의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 (2) 서열 번호 19, 22, 25, 28, 47, 50, 53, 56, 75, 78, 81, 또는 84의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2; 및 (3) 서열 번호 20, 23, 26, 29, 48, 51, 54, 57, 76, 79, 82, 또는 85의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 가진다.
- [0137] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 서열 번호 18, 21, 24, 27, 46, 49, 52, 55, 74, 77, 80, 또는 83의 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1을 가진 경쇄 가변(VL) 영역을 가진다. VL CDR1은 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. VL CDR1은 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. VL CDR1은 서열 번





CDR3을 가진 경쇄 가변(VL) 영역을 가진다.

- [illegible]

포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 갖는다. 항체는 단클론 항체일 수 있다. 항체는 인간화 항체일 수 있다.

- [illegible]

체 버전이다. 인간화 STC613 항체는 본 명세서에 개시된 STC613의 VH 영역, VL 영역, 또는 VH 및 VL 영역 둘 다를 포함할 수 있다. 인간화 STC613 항체는 또한 본 명세서에 개시된 STC613의 6개의 CDR 영역(VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3)을 포함할 수 있다. 인간화 STC613 항체는 또한 STC613의 6개 미만의 CDR 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 인간화 STC613 항체는 또한 STC613의 1, 2, 3, 4, 또는 5개 CDR 영역(VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3)을 포함할 수 있다.

[0171] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 STC626으로 지정된 마우스 단클론 항체, 또는 그의 인간화 항체 버전이다. 인간화 STC626 항체는 본 명세서에 개시된 STC626의 VH 영역, VL 영역, 또는 VH 및 VL 영역 둘 다를 포함할 수 있다. 인간화 STC626 항체는 또한 본 명세서에 개시된 STC626의 6개의 CDR 영역(VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3)을 포함할 수 있다. 인간화 STC626 항체는 또한 STC626의 6개 미만의 CDR 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 인간화 STC626 항체는 또한 STC626의 1, 2, 3, 4, 또는 5개 CDR 영역(VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3)을 포함할 수 있다.

[0172] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 STC635으로 지정된 마우스 단클론 항체, 또는 그의 인간화 항체 버전이다. 인간화 STC635 항체는 본 명세서에 개시된 STC635의 VH 영역, VL 영역, 또는 VH 및 VL 영역 둘 다를 포함할 수 있다. 인간화 STC635 항체는 또한 본 명세서에 개시된 STC635의 6개의 CDR 영역(VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3)을 포함할 수 있다. 인간화 STC635 항체는 또한 STC635의 6개 미만의 CDR 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 인간화 STC635 항체는 또한 STC635의 1, 2, 3, 4, 또는 5개 CDR 영역(VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3)을 포함할 수 있다.

[0173] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-BTLA 항체는 IgG, IgM, IgA, IgD, 또는 IgE이다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-BTLA 항체는 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3 또는 IgGM이다.

[0174] 본 발명에서 제공된 항원 결합 단편, 또는 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 돌연변이를 도입하기 위하여, 예를 들어, 부위-지시된 돌연변이유발 및 아미노산 치환을 야기하는 PCR-매개 돌연변이유발을 비롯한 당업자에게 알려진 표준 기술이 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도체는 원래 분자에 대하여 25개 미만 아미노산 치환, 20개 미만 아미노산 치환, 15개 미만 아미노산 치환, 10개 미만 아미노산 치환, 5개 미만 아미노산 치환, 4개 미만 아미노산 치환, 3개 미만 아미노산 치환, 또는 2개 미만 아미노산 치환을 포함한다. 구체적 실시형태에서, 유도체는 하나 이상의 예상된 비필수 아미노산 잔기에서 만들어진 보존적 아미노산 치환을 갖는다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 전하를 가진 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 치환되는 것이다. 유사한 전하를 가진 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 본 기술분야에서 정의되어 있다. 이들 패밀리에는 염기성 측쇄(예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 가진 아미노산을 포함한다. 대안적으로, 돌연변이는 포화 돌연변이유발에 의해서와 같이, 코딩 서열의 전부 또는 일부를 따라 무작위로 도입될 수 있으며, 생성된 돌연변이체는 활성을 보유한 돌연변이체를 확인하기 위하여 생물학적 활성에 대해 스크리닝될 수 있다. 돌연변이유발 후, 인코딩된 단백질이 발현될 수 있으며 단백질의 활성이 결정될 수 있다.

[0175] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-BTLA 항체는 BTLA에 특이적으로 결합하며 쥐 단클론 항체 STC613, STC626, 또는 STC635, 또는 VH 도메인 또는 VL 도메인과 같은 그의 항원-결합 단편의 아미노산 서열과 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-BTLA 항체는 서열 번호 2, 4, 30, 32, 58, 또는 60에 개시된 아미노산 서열과 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-BTLA 항체는 상기 표 3, 5, 또는 7에 개시된 VH CDR 아미노산 서열 및/또는 VL CDR 아미노산 서열과 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 VH CDR 및/또는 VL CDR 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0176] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-BTLA 항체는 엄격한 조건(예를 들어, 약 45°C에서 6X 소듐 클로라이드/소듐 시트레이트(SSC)에서 필터-결합된 DNA에의 하이브리드화 후 약 50-65°C에서 0.2xSSC/0.1% SDS에서의



1회 이상의 세척)하에서, 매우 엄격한 조건(예를 들어, 약 45℃에서 6XSSC에서 필터-결합된 핵산에의 하이브리드화 후 약 68℃에서 0.1xSSC/0.2% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 또는 당업자에게 알려진 다른 엄격한 하이브리드화 조건하에서(예를 들어, Ausubel, F.M. *et al.*, eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York at pages 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3을 참고) 표 2, 4 또는 6에 개시된 VH 및/또는 VL 도메인 중 어느 하나를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 보체(complement)에 하이브리드화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 VH 도메인의 아미노산 서열 및/또는 VL 도메인의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0177] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-BTLA 항체는 엄격한 조건(예를 들어, 약 45℃에서 6XSSC에서 필터-결합된 DNA에의 하이브리드화 후 약 50-65℃에서 0.2xSSC/0.1% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 매우 엄격한 조건(예를 들어, 약 45℃에서 6XSSC에서 필터-결합된 핵산에의 하이브리드화 후 약 68℃에서 0.1xSSC/0.2% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 또는 당업자에게 알려진 다른 엄격한 하이브리드화 조건하에서(예를 들어, Ausubel, F.M. *et al.*, eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York at pages 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3을 참고) 표 2, 4 또는 6에 개시된 VH CDR 및/또는 VL CDR 중 어느 하나를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 보체에 하이브리드화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 VH CDR의 아미노산 서열 또는 VL CDR의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0178] 일부 실시형태에서, 본 발명은 또한 표 2, 4 또는 6에 개시된 VH CDR의 아미노산 서열 또는 VL CDR의 아미노산 서열을 인코딩하거나, 또는 엄격한 조건(예를 들어, 약 45℃에서 6X소듐 클로라이드/소듐 시트레이트(SSC)에서 필터-결합된 DNA에의 하이브리드화 후 약 50-65℃에서 0.2xSSC/0.1% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 매우 엄격한 조건(예를 들어, 약 45℃에서 6XSSC에서 필터-결합된 핵산에의 하이브리드화 후 약 68℃에서 0.1xSSC/0.2% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 또는 당업자에게 알려진 다른 엄격한 하이브리드화 조건하에서 표 2, 4 또는 6에 개시된 VH CDR 및/또는 VL CDR 중 어느 하나를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 보체에 하이브리드화하는 분리된 핵산을 제공한다.

[0179] 일부 실시형태에서, 본 발명은 또한 표 2, 4, 또는 6에 개시된 VH 도메인의 아미노산 서열 및/또는 VL 도메인의 아미노산 서열을 인코딩하거나, 또는 엄격한 조건(예를 들어, 약 45℃에서 6X소듐 클로라이드/소듐 시트레이트(SSC)에서 필터-결합된 DNA에의 하이브리드화 후 약 50-65℃에서 0.2xSSC/0.1% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 매우 엄격한 조건(예를 들어, 약 45℃에서 6XSSC에서 필터-결합된 핵산에의 하이브리드화 후 약 68℃에서 0.1xSSC/0.2% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 또는 당업자에게 알려진 다른 엄격한 하이브리드화 조건하에서 표 2, 4 또는 6에 개시된 VH 및/또는 VL 도메인 중 어느 하나를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 보체에 하이브리드화하는 분리된 핵산을 제공한다.

[0180] 일부 실시형태에서, 분리된 핵산은 서열 번호 3, 31 또는 59의 서열을 갖거나 또는 엄격한 조건(예를 들어, 약 45℃에서 6X소듐 클로라이드/소듐 시트레이트(SSC)에서 필터-결합된 DNA에의 하이브리드화 후 약 50-65℃에서 0.2xSSC/0.1% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 매우 엄격한 조건(예를 들어, 약 45℃에서 6XSSC에서 필터-결합된 핵산에의 하이브리드화 후 약 68℃에서 0.1xSSC/0.2% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 또는 당업자에게 알려진 다른 엄격한 하이브리드화 조건하에서 서열 번호 3, 31 또는 59의 뉴클레오티드 서열의 보체에 하이브리드화하는 서열을 가질 수 있다.

[0181] 일부 실시형태에서, 분리된 핵산은 서열 번호 5, 33 또는 61의 서열을 갖거나, 또는 엄격한 조건(예를 들어, 약 45℃에서 6X소듐 클로라이드/소듐 시트레이트(SSC)에서 필터-결합된 DNA에의 하이브리드화 후 약 50-65℃에서 0.2xSSC/0.1% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 매우 엄격한 조건(예를 들어, 약 45℃에서 6XSSC에서 필터-결합된 핵산에의 하이브리드화 후 약 68℃에서 0.1xSSC/0.2% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 또는 당업자에게 알려진 다른 엄격한 하이브리드화 조건하에서 서열 번호 5, 33 또는 61의 뉴클레오티드 서열의 보체에 하이브리드화하는 서열을 가질 수 있다.

[0182] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 예를 들어, 항체의 임의의 타입의 분자의 공유적 부착에 의해, 화학적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 그러나 어떤 제한도 없이, 항체 유도체는 예를 들어, 당화, 아세틸화, 폐길화, 인산화, 아마이드화, 공지의 보호/차단 기에 의한 유도체화, 단백질분해성 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질과의 연결, 등에 의해, 화학적으로 변형된 항체를 포함한다. 많은 화학적 변형 중 임의의 것이 특이적 화학 절단, 아세틸화, 제형화, 투니카마이신의 대사적 합성, 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 공지 기술에 의해 수행될 수 있다. 부가적으로, 항체는 하나 이상의 비전통적 아미노산을 함유할 수 있

다.

[0183] 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 당업자에게 알려진 프레임워크 영역을 가질 수 있다(예를 들어, 인간 또는 비인간 단편). 프레임워크 영역은 예를 들어, 자연 발생 또는 컨센서스(consensus) 프레임워크 영역일 수 있다. 구체적 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체의 프레임워크 영역은 인간이다(예를 들어, 인간 프레임워크 영역의 목록을 위해 Chothia *et al.*, 1998, *J. Mol. Biol.* 278:457-479를 참고하며, 그 전체가 참고로 본원에 포함된다). 또한, Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.) 5th ed를 참고한다.

[0184] STC613의 BTLA 에피토프는 가교 분석에 의해 맵핑하였다. 실시예 7을 참고한다. 표 8은 BTLA와 STC613의 가교된 펩티드를 요약하며, 이것은 STC613의 BTLA 에피토프를 나타낸다(서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166). 도 6은 STC613을 위한 BTLA 항원(서열 번호 86)의 합성된 에피토프를 보여준다:

[0185] IKRQSEHSILA(서열 번호 167) - VKLEDRTSWK(서열 번호 168) - NGSYRCSANFQ (서열 번호 169)

[0186] 표 8: nLC-오비트랩(orbitrap) MS/MS에 의해 분석된 STC613과의 BTLA(서열 번호 86)의 가교된 펩티드.

키모트립신 단백질분해				
서열	단백질 1	단백질 2	서열 단백질 1	서열 단백질 2
SCAASGFTF (서열 번호 156) - YIKRQSEHSIL (서열 번호 161) -a8-b8	STC613_HC	BTLA	21-29	9-19
SVTIGQPASISCKSSL (서열 번호 157)- EDRQTSW (서열 번호 162) -a13-b5	STC613_LC	BTLA	12-29	53-59
SVTIGQPASISCKSSL (서열 번호 157) - RCSANFQSNL-a13 (서열 번호 163) -b3	STC613_LC	BTLA	12-29	84-93
TLKISRVEAEDVG (서열 번호 158)- NGTTCVKL (서열 번호 164) -a15-b7	STC613_LC	BTLA	77-92	45-52
KISRVEAEDVG (서열 번호 159)- EPVLPNDNGSY (서열 번호 165) -a13-b10	STC613_LC	BTLA	79-92	73-83
썬모리신 단백질분해				
서열	단백질 1	단백질 2	서열 단백질 1	서열 단백질 2
ISCKSSL (서열번호 160) - LYIKRQSEHSI (서열 번호 166) -a5-b5	STC613_LC	BTLA	103-108	8-18

[0187]

[0188] \* 펩티드 서열 위치는 서열 번호 2 및 4의 STC613 아미노산 서열(단백질 1), 및 서열 번호 86의 BTLA 아미노산 서열(단백질 2)에 대하여 표시된다.

[0189] 따라서, 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 BTLA 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하는 항-당화된 BTLA 항체를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 STC613의 BTLA 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하는 항-당화된 BTLA 항체를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 본 명세서에 개시된 BTLA의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 STC613의 BTLA 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0190] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 BTLA 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하며, 이때 BTLA 에피토프는 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 또는 169의 아미노산 서열의 적어도 5개 연속 아미노산을 갖는다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 또는 169의 아미노산 서열의 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 또는 적어도 15개 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 또는 169의 아미노산 서열의 적어도 6

개 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 또는 169의 아미노산 서열의 적어도 7개 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 또는 169의 아미노산 서열의 적어도 8개 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 또는 169의 아미노산 서열의 적어도 9개 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 또는 169의 아미노산 서열의 적어도 10개 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 또는 169의 아미노산 서열의 적어도 11개 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 또는 169의 아미노산 서열의 적어도 12개 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 또는 169의 아미노산 서열의 적어도 13개 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 또는 169의 아미노산 서열의 적어도 14개 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 또는 169의 아미노산 서열의 적어도 15개 연속 아미노산을 가질 수 있다. 항-당화된 BTLA 항체는 인간화 항체일 수 있다.

[0191] 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 BTLA 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하며, 이때 BTLA 에피토프는 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 또는 169의 아미노산 서열을 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 BTLA의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가지며, 이때 BTLA 에피토프는 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 또는 169의 아미노산 서열을 갖는다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 161의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 162의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 163의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 164의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 165의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 166의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 167의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 168의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 서열 번호 169의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0192] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 BTLA 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하며, 이때 BTLA 에피토프는 BTLA(서열 번호 86)의 R12, H16, K51, T57, S82, 또는 S86 중 하나 이상의 아미노산을 가진다. BTLA의 에피토프는 BTLA(서열 번호 86)의 R12, H16, K51, T57, S82, 또는 S86 중 1, 2, 3, 4, 또는 5개 아미노산을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 BTLA(서열 번호 86)의 R12, H16, K51, T57, S82, 또는 S86 중 하나의 아미노산을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 BTLA(서열 번호 86)의 R12, H16, K51, T57, S82, 또는 S86 중 2개의 아미노산을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 BTLA(서열 번호 86)의 R12, H16, K51, T57, S82, 또는 S86 중 3개의 아미노산을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 BTLA(서열 번호 86)의 R12, H16, K51, T57, S82, 또는 S86 중 4개의 아미노산을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 BTLA(서열 번호 86)의 R12, H16, K51, T57, S82, 또는 S86 중 5개의 아미노산을 가질 수 있다. 항-당화된 BTLA 항체는 인간화 항체일 수 있다.

[0193] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 BTLA 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하며, 이때 BTLA 에피토프는 BTLA(서열 번호 86)의 R12, H16, K51, T57, S82, 또는 S86 중 하나 이상의 아미노산을 가진다. BTLA의 에피토프는 BTLA(서열 번호 86)의 R12를 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 BTLA(서열 번호 86)의 H16을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 BTLA(서열 번호 86)의 K51을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 BTLA(서열 번호 86)의 T57을 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 BTLA(서열 번호 86)의 S82를 가질 수 있다. BTLA의 에피토프는 BTLA(서열 번호 86)의 S86을 가질 수 있다. 항-당화된 BTLA 항체는 인간화 항체일 수 있다.

[0194] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 당화된 BTLA 또는 그의 폴리펩티드, 또는 폴리펩티드 단편 또는 에피토프에 대해 높은 친화성을 갖는다. 일 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 BTLA에 대해 공지의 항체(예를 들어, 본 명세서의 다른 곳에서 토의된 시판되는 단클론 항체)보다 더 높은 친화성을 가진 항-BTLA 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-BTLA 항체는 본 명세서에 개시되거나 당업자에게 알려진 기술(예를 들어, 비아코어 분석)에 의해 평가할 때 BTLA 항원에 대해 공지의 항-BTLA 항체보다 2- 내지 10-배(또는 그 이상) 더 높은 친화성을 가질 수 있다. 이들 실시형태에 따라, 일 실시형태에서, 항체의 친화성은 비아코어 분석에 의해 평가된다.

[0195] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 1  $\mu$ M 이하, 100 nM 이하, 10 nM 이하, 1 nM

이하, 또는 0.1 nM 이하의 해리 상수( $K_D$ )로 당화된 BTLA 또는 당화된 폴리펩티드 단편 또는 그의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 500 nM 이하의  $K_D$ 를 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 200 nM 이하의  $K_D$ 를 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 100 nM 이하의  $K_D$ 를 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 50 nM 이하의  $K_D$ 를 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 20 nM 이하의  $K_D$ 를 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 10 nM 이하의  $K_D$ 를 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 5 nM 이하의  $K_D$ 를 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 2 nM 이하의  $K_D$ 를 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 1 nM 이하의  $K_D$ 를 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 0.5 nM 이하의  $K_D$ 를 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 0.1 nM 이하의  $K_D$ 를 가진다.

[0196] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 BTLA의 활성을 차단하거나 중화시킬 수 있다. 항-당화된 BTLA 항체는 중화 항체일 수 있다. 중화 항체는 HVEM과 같은 천연 리간드와 BTLA의 결합을 차단할 수 있으며, BTLA 및/또는 그의 다른 생리학적 활성에 의해 매개되는 시그널 경로를 억제할 수 있다. 중화 항체의 IC50은 중화 분석(예를 들어, ELISA)에서 0.01 - 10  $\mu\text{g/ml}$  범위일 수 있다. 중화 항체의 IC50은 10  $\mu\text{g/ml}$  이하일 수 있다. 중화 항체의 IC50은 8  $\mu\text{g/ml}$  이하일 수 있다. 중화 항체의 IC50은 6  $\mu\text{g/ml}$  이하일 수 있다. 중화 항체의 IC50은 4  $\mu\text{g/ml}$  이하일 수 있다. 중화 항체의 IC50은 2  $\mu\text{g/ml}$  이하일 수 있다. 중화 항체의 IC50은 1  $\mu\text{g/ml}$  이하일 수 있다. 중화 항체의 IC50은 0.8  $\mu\text{g/ml}$  이하일 수 있다. 중화 항체의 IC50은 0.6  $\mu\text{g/ml}$  이하일 수 있다. 중화 항체의 IC50은 0.4  $\mu\text{g/ml}$  이하일 수 있다. 중화 항체의 IC50은 0.2  $\mu\text{g/ml}$  이하일 수 있다. 중화 항체의 IC50은 0.1  $\mu\text{g/ml}$  이하일 수 있다. 중화 항체의 IC50은 0.08  $\mu\text{g/ml}$  이하일 수 있다. 중화 항체의 IC50은 0.06  $\mu\text{g/ml}$  이하일 수 있다. 중화 항체의 IC50은 0.04  $\mu\text{g/ml}$  이하일 수 있다. 중화 항체의 IC50은 0.02  $\mu\text{g/ml}$  이하일 수 있다. 중화 항체의 IC50은 0.01  $\mu\text{g/ml}$  이하일 수 있다.

[0197] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 위치 N75, N94, N110 또는 그의 임의의 조합에서 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 위치 N75에서 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 위치 N94에서 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 위치 N110에서 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 위치 N75 및 N94에서 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 위치 N75 및 N110에서 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 위치 N94 및 N110에서 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 위치 N75, N94, 및 N110에서 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다.

[0198] 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 합성 항체, 단클론 항체, 재조합적으로 생산된 항체, 다중특이적 항체(2-특이적 항체 포함), 인간 항체, 인간화 항체, 낙타화 항체, 키메라 항체, 인트라바디, 항-이디오타입(항-Id) 항체, 및 상기 중 어느 것의 기능성 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 기능성 단편의 비제한적인 예는 단일쇄 Fv(scFv)(예를 들어, 1특이적, 2특이적, 등 포함), Fab 단편, F(ab') 단편, F(ab)<sub>2</sub> 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, 디설파이드-연결된 Fv(sdFv), Fd 단편, Fv 단편, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 및 미니바디를 포함한다.

[0199] 구체적으로, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 예를 들어, BTLA 또는 당화된 BTLA에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 함유하는 분자를 포함한다. 본 발명에서 제공되는 면역글로불린 분자는 임의의 타입(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브클래스의 면역글로불린 분자일 수 있다.

[0200] 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 1특이적, 2특이적, 3특이적 항체 또는 더 큰 다중특이성의 항체일 수 있다. 다중특이적 항체는 본 명세서에 개시된 BTLA의 상이한 에피토프에 대해 특이적일 수 있거나, 또는 BTLA 폴리펩티드뿐만 아니라 이중성 에피토프, 예를 들어, 이중성 폴리펩티드 또는 고품지 지체 물질에 대해 특



이적일 수 있다. 구체적 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 BTLA 폴리펩티드의 주어진 에피토프에 대해 1특이적이며 다른 에피토프에는 결합하지 않는다.

[0201] 공지의 수단에 의해 그리고 본 명세서에 개시된 대로, 당화된 BTLA, 그의 각 에피토프 중 하나 이상, 또는 전술한 것중 어느 것의 집합체에 특이적인 다클론 또는 단클론 항체, 항원 결합 단편, 및 결합 도메인 및 CDR(전술한 것중 임의의 것의 조작된 형태 포함)이, 그러한 항원 또는 에피토프가 천연 공급원으로부터 분리되건 또는 천연 화합물의 합성 유도체 또는 변이체이건 간에, 생성될 수 있다.

[0202] 항체는 조류 및 포유동물을 비롯한 임의의 동물 공급원으로부터 생산될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체는 양, 쥐(예를 들어, 마우스 및 래트), 토끼, 염소, 기니피그, 낙타, 말, 또는 닭 유래이다. 또한, 더 새로운 기술은 인간 조합 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 개발하고 스크리닝하는 것을 허용한다. 예를 들어, 박테리오파아지 항체 발현 기술은 그 전체가 참고로 본원에 포함되는 미국 특허 6,946,546호에 개시된 대로, 동물 면역화의 부재하에서 특이적 항체가 생산되도록 한다. 이들 기술은 Marks *et al.*, *Bio/Technol.*, 10:779-783(1992); Stemmer, *Nature*, 370:389-391(1994); Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:3576-3580(1992); Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3809-3813(1994); 및 Schier *et al.*, *Gene*, 169(2):147-155(1996)에서 추가로 개시되며, 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0203] 다양한 동물 중에서 다클론 항체를 생산하기 위한, 그리고 인간화, 키메라 및 완전히 인간을 비롯한 다양한 타입의 단클론 항체를 생산하기 위한 방법이 본 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 하기의 미국 특허는 그러한 방법의 실시가능한 설명을 제공하며 참고로 본원에 포함된다: 그 전체가 참고로 본원에 포함되는, 미국 특허 3,817,837호; 3,850,752호; 3,939,350호; 3,996,345호; 4,196,265호; 4,275,149호; 4,277,437호; 4,366,241호; 4,469,797호; 4,472,509호; 4,606,855호; 4,703,003호; 4,742,159호; 4,767,720호; 4,816,567호; 4,867,973호; 4,938,948호; 4,946,778호; 5,021,236호; 5,164,296호; 5,196,066호; 5,223,409호; 5,403,484호; 5,420,253호; 5,565,332호; 5,571,698호; 5,627,052호; 5,656,434호; 5,770,376호; 5,789,208호; 5,821,337호; 5,844,091호; 5,858,657호; 5,861,155호; 5,871,907호; 5,969,108호; 6,054,297호; 6,165,464호; 6,365,157호; 6,406,867호; 6,709,659호; 6,709,873호; 6,753,407호; 6,814,965호; 6,849,259호; 6,861,572호; 6,875,434호; 6,891,024호; 7,407,659호; 및 8,178,098호.

[0204] 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 단클론 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA는 다클론 항체일 수 있다. 동물은 당화된 BTLA 폴리펩티드에 대해 특이적인 항체를 생산하기 위하여 당화된 BTLA 폴리펩티드와 같은 항원으로 접종될 수 있다. 종종 항원은 면역 반응을 향상시키기 위하여 다른 분자에 결합되거나 접합된다. 접합체는 동물에서 면역 반응을 유발하기 위하여 이용되는 항원에 결합된 임의의 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 또는 비단백질성 물질일 수 있다. 항원 접종에 대한 반응으로 동물에서 생산된 항체는 다양한 개별 항체 생산 B 림프구로부터 만들어진 다양한 비동일 분자(다클론 항체)를 갖는다. 동물에서의 다클론 항체 생산을 위한 정확한 조건을 고려할 때, 동물 혈청 내의 항체 대부분은 그 동물이 면역된 항원성 화합물 상의 집합적 에피토프를 인식한다.

[0205] 이 특이성은 관심 항원 또는 에피토프를 인식하는 항체만을 선택하기 위한 친화성 정제에 의해 더 향상될 수 있다. 단클론 항체 (MAb)를 생성하는 방법은 다클론 항체를 제조하기 위한 방법과 같은 방식으로 시작할 수 있다. 일부 실시형태에서, 마우스 및 래트와 같은 설치류가 단클론 항체의 생성에서 이용된다. 일부 실시형태에서, 토끼, 양 또는 개구리 세포가 단클론 항체의 생성에서 이용된다. 래트의 사용은 잘 알려져 있으며 소정의 이점을 제공할 수 있다. 마우스(예를 들어, BALB/c 마우스)는 일상적으로 사용되며 일반적으로 높은 비율의 안정한 융합체를 제공한다.

[0206] 하이브리도마 기술은 앞서 당화된 BTLA 폴리펩티드로 면역된 마우스로부터의 단일 B 림프구를 불멸 골수종 세포(대개 마우스 골수종)와 융합시키는 것에 관련된다. 이 기술은 단일 항체-생산 세포를 무한한 수의 세대동안 증식시켜, 동일한 항원 또는 에피토프 특이성을 가진 구조적으로 동일한 항체(단클론 항체)의 무한한 양이 생산될 수 있도록 하는 방법을 제공한다.

[0207] 항-당화된 BTLA 항체는 폴리펩티드의 생산을 위해 유용한 본 기술분야에 알려진 임의의 방법, 예를 들어, *시험관내* 합성, 재조합 DNA 생산 등에 의해 생산될 수 있다. 인간화 항체는 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 수 있다. 본 명세서에 개시된 항체는 또한 재조합 면역글로불린 발현 기술을 이용하여 생산될 수 있다. 인간화 항체를 비롯한 면역글로불린 분자의 재조합 생산은 미국 특허 4,816,397호(Boss *et al.*), 미국 특허 6,331,415호 및 4,816,567호(둘 모두 Cabilly *et al.*), 영국 특허 GB 2,188,638호(Winter *et al.*), 및 영국 특허 GB

2,209,757호에 개시되며; 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 인간화 면역글로불린을 비롯한 면역글로불린의 재조합 발현을 위한 기술은 또한 Goeddel *et al.*, Gene Expression Technology Methods in Enzymology Vol. 185 Academic Press (1991), 및 Borreback, Antibody Engineering, W. H. Freeman (1992)에서 찾을 수 있으며; 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 재조합 항체의 생성, 디자인 및 발현에 관한 추가 정보는 Mayforth, Designing Antibodies, Academic Press, San Diego (1993)에서 찾을 수 있다.

[0208] 외래 항체의 가변 영역은 그대로 두고, 인간 기원의 유사한 도메인으로 단클론 항체의 경쇄 및 중쇄 불변 도메인을 치환하기 위한 많은 방법이 개발되었다. 대안적으로, 인간 면역글로불린 유전자를 위해 트랜스제닉인 마우스 또는 래트에서 완전히 인간 단클론 항체가 생산된다. 설치류 및 인간 아미노산 서열 둘 모두를 가진 항체 가변 도메인을 재조합적으로 제작함으로써 단클론 항체의 가변 도메인을 보다 인간 형태로 전환하기 위한 방법 또한 개발되었다. 인간화 단클론 항체에서, 추가변 CDR만이 비인간(예를 들어, 마우스, 래트, 닭, 라마) 단클론 항체로부터 유도되고, 프레임워크 영역은 인간 아미노산 서열로부터 유도된다. 설치류의 특징적인 항체 내 아미노산 서열을 인간 항체의 대응 위치에서 발견되는 아미노산 서열로 치환하는 것은 치료적 사용 동안 해로운 면역 반응의 가능성을 감소시킬 것으로 생각된다. 항체를 생산하는 하이브리도마 또는 다른 세포는 또한 유전자 돌연변이 또는 다른 변화를 거칠 수 있으며, 이는 하이브리도마에 의해 생산된 항체의 결합 특이성을 변화시키거나 변화시키지 않을 수 있다.

[0209] 조작된 항체는 원래 항체의 항원 또는 에피토프 특이성을 보유하는 다른 항체 또는 키메라 분자를 생산하기 위하여 단클론 및 다른 항체와 재조합 DNA 기술을 이용함으로써 생성될 수 있으며, 즉, 분자는 결합 도메인을 갖는다. 그러한 기술은 상이한 항체의 프레임워크 영역, 불변 영역, 또는 불변 영역 + 프레임워크 영역을 위한 유전자 물질에 항체의 면역글로불린 가변 영역 또는 CDR을 인코딩하는 DNA를 도입하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 5,091,513호 및 6,881,557호를 참고하며, 이들은 참고로 본원에 포함된다.

[0210] 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 인간 면역글로불린 서열로부터 유도된 항체 라이브러리를 이용하여 상술한 파아지 디스플레이 방법을 비롯한 본 기술분야에 알려진 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다(미국 특허 4,444,887호 및 4,716,111호; 및 국제 공개 WO 98/46645호, WO 98/50433호, WO 98/24893호, WO 98/16654호, WO 96/34096호, WO 96/33735호, 및 WO 91/10741호를 참고한다). 인간 항체는 기능적인 내인성 면역글로불린을 발현할 수 없으나 인간 면역글로불린 유전자를 발현할 수 있는 트랜스제닉 마우스를 이용하여 생산될 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자 복합체가 무작위로 또는 상동성 재조합에 의해 마우스 배아 줄기 세포내로 도입될 수 있다. 대안적으로, 인간 가변 영역, 불변 영역 및 다양성 영역이 인간 중쇄 및 경쇄 유전자에 더하여 마우스 배아 줄기 세포내로 도입될 수 있다. 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자는 상동성 재조합에 의한 인간 면역글로불린 유전자와의 도입과 별도로 또는 동시에 비기능적으로 만들어질 수 있다. 구체적으로, JH 영역의 동형접합성 결실은 내인성 항체 생산을 방지한다. 변형된 배아 줄기 세포는 확장되고 배반포 내로 미세주입되어 키메라 마우스를 생성한다. 그 후 키메라 마우스가 사육되어 인간 항체를 발현하는 동형접합성 자손을 생산한다. 트랜스제닉 마우스는 선택된 항원, 예를 들어, 당화된 BTLA 폴리펩티드의 전부 또는 일부를 이용하는 종래의 방법을 이용하여 면역된다. 항원에 대해 유도된 단클론 항체는 종래의 하이브리도마 기술을 이용하여 면역된 트랜스제닉 마우스로부터 수득될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 5,916,771호를 참고한다). 트랜스제닉 마우스에 의해 보유된 인간 면역글로불린 트랜스유전자는 B 세포 분화 동안 재배열하고, 이어서 클래스 스위칭 및 체세포 돌연변이를 일으킨다. 따라서, 그러한 기술을 이용하여, 치료적으로 유용한 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체가 생산될 수 있다. 인간 항체를 생산하기 위한 이 기술의 개요를 위해, Lonberg and Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93, 그 전체가 참고로 본원에 포함됨)를 참고한다. 인간 항체 및 인간 단클론 항체를 생산하기 위한 이 기술 및 그러한 항체를 생산하기 위한 프로토콜의 상세한 토의를 위해서는, 예를 들어, 국제 공개 WO 98/24893호, WO 96/34096호, 및 WO 96/33735호; 및 미국 특허 5,413,923호, 5,625,126호, 5,633,425호, 5,569,825호, 5,661,016호, 5,545,806호, 5,814,318호, 및 5,939,598호를 참고하며, 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 또한, 아브게닉스, 인크.(Abgenix, Inc.) (캘리포니아주 프리몬트) 및 메다렉스(Medarex)(뉴저지주 프린스턴)와 같은 회사들이 상술한 것과 유사한 기술을 이용하여 선택된 항원에 대해 유도된 인간 항체를 제공하는데 관련될 수 있다.

[0211] 일 실시형태에서, 항체는 키메라 항체, 예를 들어, 이중성 비인간, 인간 또는 인간화 서열(예를 들어, 프레임워크 및/또는 불변 도메인 서열)에 그래프팅된 비인간 공여체로부터의 항원 결합 서열을 포함하는 항체이다. 일 실시형태에서, 비인간 공여체는 래트이다. 일 실시형태에서, 항원 결합 서열은 합성이며, 예를 들어, 돌연변이 유발에 의해 수득된다(예를 들어, 인간 파아지 라이브러리의 파아지 디스플레이 스크리닝, 등). 일 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 키메라 항체는 쥐 V 영역과 인간 C 영역을 가진다. 일 실시형태에서, 쥐 경쇄 V 영역

은 인간 카파 경쇄에 융합된다. 일 실시형태에서, 쥐 중쇄 V 영역은 인간 IgG1 C 영역에 융합된다.

[0212] 키메라 항체를 생산하는 방법은 본 기술분야에 알려져 있다. 예를 들어, Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi *et al.*, *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies *et al.*, *J. Immunol. Methods* 125:191-202(1989); 및 미국 특허 6,311,415호, 5,807,715호, 4,816,567호, 및 4,816,397호를 참고하며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 비인간 종으로부터의 하나 이상의 CDR 및 인간 면역글로불린 분자로부터의 프레임워크 영역을 포함하는 키메라 항체는 예를 들어, CDR-그래프팅(EP 239,400호; 국제 공개 WO 91/09967호; 및 미국 특허 5,225,539호, 5,530,101호, 및 5,585,089호), 비니어링(veneering) 또는 리설피싱(resurfacing)(EP 592,106호; EP 519,596호; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7:805 (1994); 및 Roguska *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969 (1994)), 및 쇠서플링(chain shuffling)(미국 특허 5,565,332호)를 비롯하여 본 기술분야에 알려진 다양한 기술을 이용하여 생산될 수 있으며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0213] 제조합 키메라 항-당화된 BTLA 항체의 생산을 위한 예시적인 방법은 하기를 포함할 수 있다: a) 종래의 분자생물학 방법에 의해, 쥐 항-당화된 BTLA 단클론 항체의 CDR 및 가변 영역이 인간 면역글로불린으로부터 유도된 Fc 영역에 융합된 항체 중쇄를 인코딩하고 발현하는 발현 벡터를 제작하여, 키메라 항체 중쇄의 발현을 위한 벡터를 생산하고; b) 종래의 분자생물학 방법에 의해, 쥐 항-당화된 BTLA 단클론 항체의 항체 경쇄를 인코딩하고 발현하는 발현 벡터를 제작하여, 키메라 항체 경쇄의 발현을 위한 벡터를 생산하고; c) 종래의 분자 생물학 방법에 의해 숙주 세포에 발현 벡터를 전달하여 키메라 항체의 발현을 위한 형질감염된 숙주 세포를 생산하고; 그리고 d) 종래의 세포 배양 기술에 의해 형질감염된 세포를 배양하여 키메라 항체를 생산하기.

[0214] 제조합 인간화 항-당화된 BTLA 항체의 생산을 위한 예시적인 방법은 하기를 포함할 수 있다: a) 종래의 분자 생물학 방법에 의해, CDR 및 공여체 항체 결합 특이성을 보유하기 위해 필요한 가변 영역 프레임워크의 최소 부분이 쥐 항-당화된 BTLA 단클론 항체와 같은 비인간 면역글로불린으로부터 유도되고 항체의 나머지는 인간 면역글로불린으로부터 유도되는 항체 중쇄를 인코딩하고 발현하는 발현 벡터를 제작하여, 인간화 항체 중쇄의 발현을 위한 벡터를 생산하고; b) 종래의 분자 생물학 방법에 의해, CDR 및 공여체 항체 결합 특이성을 보유하기 위해 필요한 가변 영역 프레임워크의 최소 부분이 쥐 항-당화된 BTLA 단클론 항체와 같은 비인간 면역글로불린으로부터 유도되고 항체의 나머지는 인간 면역글로불린으로부터 유도되는 항체 경쇄를 인코딩하고 발현하는 발현 벡터를 제작하여, 인간화 항체 경쇄의 발현을 위한 벡터를 생산하고; c) 종래의 분자 생물학 방법에 의해 숙주 세포에 발현 벡터를 전달하여 인간화 항체의 발현을 위한 형질감염된 숙주 세포를 생산하고; 그리고 d) 종래의 세포 배양 기술에 의해 형질감염된 세포를 배양하여 인간화 항체를 생산하기.

[0215] 예시적인 방법과 관련하여, 숙주 세포는 상이한 선택성 마커를 함유할 수 있지만, 중쇄 및 경쇄 코딩 서열을 제외하고는 바람직하게는 동일한 그러한 발현 벡터로 공동형질감염될 수 있다. 이 절차는 중쇄와 경쇄 폴리펩티드의 동일한 발현을 제공한다. 대안적으로, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 둘 모두를 인코딩하는 단일 벡터가 이용될 수 있다. 중쇄 및 경쇄를 위한 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA 또는 둘 모두를 포함할 수 있다. 제조합 항체를 발현하기 위해 사용되는 숙주 세포는 *에스캐리키아 콜라이*(*Escherichia coli*)와 같은 세균 세포, 또는 더욱 바람직하게는 진핵 세포(예를 들어, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 HEK-293 세포)일 수 있다. 발현 벡터의 선택은 숙주 세포의 선택에 의존하며, 선택된 숙주 세포에서 원하는 발현 및 조절 특징을 갖기 위하여 선택될 수 있다. 사용될 수 있는 다른 세포주는 CHO-K1, NSO, 및 PER.C6(크루셀(Cruce11), 네덜란드 레이덴)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한, 코돈 용법은 숙주 세포가 종 특이적 코돈 용법 편향(codon usage bias)을 책임지며 단백질 발현을 향상시키도록 선택될 때 최적화될 수 있다. 예를 들어, CHO 세포 발현을 위해 항체를 인코딩하는 DNA는 *크리세투루스 그리세우스*(*Cricetulus griseus*)(이로부터 중국 햄스터 난소 세포가 유도됨)에 의해 우선적으로 사용되는 코돈을 포함할 수 있다. 코돈 최적화 방법은 원하는 숙주 세포에 의한 개선된 발현을 촉진하기 위하여 이용될 수 있다(예를 들어, Wohlgenuth, *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 366(1580):2979-2986 (2011); Jestin, *et al.*, *J. Mol. Evol.* 69(5):452-457 (2009); Bollenbach, *et al.*, *Genome Res.* 17(4):401-404(2007); Kurland, *et al.*, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 31:191-219 (1984); Grosjean, *et al.*, *Gene* 18(3): 199-209(1982)를 참고한다).

[0216] 일 실시형태에서, 항체는 낙타 항체로부터, 바람직하게는 V<sub>H</sub>H 도메인 서열 또는 나노바디(Nanobodies)<sup>TM</sup>로 알려진, 경쇄가 없는 중쇄 낙타 항체로부터 유도된 면역글로불린 단일 가변 도메인이다. 나노바디<sup>TM</sup>(Nb)는 자연 발생 단일쇄 항체의 최소의 기능성 단편 또는 단일 가변 도메인(V<sub>H</sub>H)이며 당업자에게 알려져 있다. 그들은 낙타에서



나타나는 중쇄 단독 항체로부터 유도된다(Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363: 446-448 (1993); Desmyter *et al.*, *Nat. Struct. Biol.*, 803-811 (1996)). "낙타과"에서는, 경쇄 폴리펩티드가 없는 면역글로불린이 발견된다. "낙타과"는 구세계 낙타(*카멜루스 박트리아누스*(*Camelus bactrianus*) 및 *카멜루스 드로메다리우스*(*Camelus dromedarius*)) 및 신세계 낙타(예를 들어, *라마 파코스*(*Lama paccos*), *라마 글라마*(*Lama glama*), *라마 구아니코*(*Lama guanicoe*) 및 *라마 비쿠그나*(*Lama vicugna*))를 포함한다. 단일 가변 도메인 중쇄 항체는 본 명세서에서 나노바디™ 또는 V<sub>H</sub>H 항체로 표시된다. Nb의 작은 크기와 독특한 생물물리학적 특성은 혼하지 않은 또는 숨겨진 에피토프의 인식에 대해 그리고 단백질 타겟의 캐비티 또는 활성 부위내로의 결합에 대해 종래의 항체 단편을 능가한다. 또한, Nb는 다중-특이적이고 다가의 항체로서, 리포터 분자에 부착되어, 또는 인간화되도록 설계될 수 있다. Nb는 안정하고, 위장계에서 생존하며 쉽게 제조될 수 있다.

[0217] 상이한 특이성의 두 가지 항원 결합 부위를 단일 구조체내로 단일화하면, 2특이적 항체가 정교한 특이성을 가지고 두 가지 다른 항원을 합치는 능력을 가져서 치료제로서 큰 잠재력을 갖는다. 2특이적 항체는 원래는 각각이 상이한 면역글로불린을 생산할 수 있는 두 하이브리도마를 융합시켜 제조될 수 있다. 2특이적 항체는 또한 전체 면역글로불린에 존재하는 Fc 부분을 생략하는 한편 두 개의 scFv 항체 단편을 연결하여 생산될 수 있다. 그러한 구조체 내의 각각의 scFv 단위는 합성 폴리펩티드 링커를 통해 서로 연결된, 항체 중쇄(VH) 및 경쇄(VL) 각각으로부터의 하나의 가변 도메인으로 이루어질 수 있으며, 링커는 종종 단백질분해에 대해 최대한 저항성인 한편 최소로 면역원성이도록 하기 위하여 유전적으로 조작된다. 각각의 scFv 단위는 두 scFv 단위를 가교시키는 짧은 (보통 10개 아미노산 미만) 폴리펩티드 스페이서를 포함시키는 것을 비롯한 많은 기술에 의해 연결되어 2특이적 단일쇄 항체를 생성할 수 있다. 생성된 2특이적 단일쇄 항체는 따라서 단일 폴리펩티드 상에 상이한 특이성의 두 가지의 VH/VL 쌍을 함유한 중이며, 이때 각각의 scFv 단위 내의 VH 및 VL 도메인은 이들 두 도메인 간의 분자내 연합을 허용하기에 충분히 긴 폴리펩티드 링커에 의해 분리되며, 그렇게 형성된 scFv 단위는 예를 들어, 하나의 scFv 단위의 VH 도메인과 또 다른 scFv 단위의 VL 도메인 간의 원치않는 연합을 방지하기에 충분히 짧게 유지되는 폴리펩티드 스페이서를 통해 서로에게 인접하여 매인다.

[0218] 항원 결합 단편의 예는 (i) VL, VH, CL, 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 "Fd" 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 "Fv" 단편; (iv) VH 도메인으로 이루어진 "dAb" 단편; (v) 분리된 CDR 영역; (vi) 두 개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')<sub>2</sub> 단편; (vii) VH 도메인과 VL 도메인이 두 도메인이 연합하여 결합 도메인을 형성하는 것을 허용하는 펩티드 링커에 의해 연결되는 단일쇄 Fv 분자("scFv"); (viii) 2-특이적 단일쇄 Fv 이량체(미국 특허 5,091,513호 참고); 및 (ix) 유전자 융합에 의해 제작된 다가 또는 다중특이적 단편인 디아바디(미국 특허 출원 공개 20050214860호)를 제한없이 포함한다. Fv, scFv, 또는 디아바디 분자는 VH 및 VL 도메인을 연결하는 디설파이드 가교의 포함에 의해 안정화될 수 있다. CH3 도메인에 연결된 scFv를 가진 미니바디 또한 만들어질 수 있다(Hu *et al.*, *Cancer Res.*, 56:3055-3061(1996)).

[0219] 항체-유사 결합 펩티드모방체(peptidomimetics)가 또한 실시형태에서 고려된다. Liu *et al.*, *Cell Mol. Biol.*, 49:209-216 (2003)은 "항체 유사 결합 펩티드모방체"(ABiP)를 개시하며, 이것은 삭감된(pared-down) 항체로서 작용하며 덜 성가신 합성 방법뿐만 아니라 더 긴 혈청 반감기의 소정의 이점을 가진 펩티드이다.

### [0220] 7.2.2. 당화된 BTLA 폴리펩티드

[0221] 다른 추가 실시형태에서, 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 인간 BTLA의 적어도 7개(예를 들어, 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 더 많은) 연속 아미노산의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 조성물이 제공되며, 이때 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 상기 아미노산 중 적어도 하나는 당화되며, 폴리펩티드는 약학적 허용 담체에서 제형화된다.

[0222] 일부 실시형태에서, 본 발명은 또한 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 적어도 하나의 아미노산을 가진 인간 BTLA의 적어도 7개 연속 아미노산의 폴리펩티드를 제공하며, 이때 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 상기 아미노산 중 적어도 하나는 당화된다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 당화된 위치 N75에 해당하는 아미노산을 가진 인간 BTLA의 적어도 7개 연속 아미노산을 가진다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 당화된 위치 N94에 해당하는 아미노산을 가진 인간 BTLA의 적어도 7개 연속 아미노산을 가진다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 당화된 위치 N110에 해당하는 아미노산을 가진 인간 BTLA의 적어도 7개 연속 아미노산을 가진다.



- [0223] 예를 들어, 폴리펩티드는 인간 BTLA의 아미노산 70-76의 단편일 수 있으며, 이때 N75는 당화된다. 다른 예로서, 폴리펩티드는 인간 BTLA의 아미노산 90-100의 단편일 수 있으며, 이때 N94는 당화된다. 또 다른 예로서, 폴리펩티드는 인간 BTLA의 아미노산 90-115의 단편일 수 있으며, 이때 N94 및 N110은 당화된다. 당업자는 본 발명에서 고려되는 폴리펩티드가 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 인간 BTLA의 적어도 7개의 연속 아미노산을 가지며, 이때 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 상기 아미노산 중 적어도 하나는 당화되는 임의의 그리고 모든 폴리펩티드를 포함함을 이해할 것이다.
- [0224] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 인간 BTLA의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 연속 아미노산을 갖는다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 인간 BTLA의 적어도 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 또는 270, 280개 연속 아미노산을 갖는다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 발명에서 제공되는 적어도 2개 폴리펩티드를 가진 조성물을 제공한다. 적어도 2개 폴리펩티드는 별도의 분자이거나 한 분자로서 연결될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 적어도 3개 폴리펩티드, 적어도 4개 폴리펩티드 또는 적어도 5개 폴리펩티드를 가진다. 일부 실시형태에서, 조성물은 2개 폴리펩티드, 3개 폴리펩티드, 4개 폴리펩티드, 또는 5개 폴리펩티드를 가진다.
- [0225] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 폴리펩티드는 비천연 아미노산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 비천연 아미노산은  $\alpha$ -아미노기에서 메틸화되어 메틸화된 백본을 가진 펩티드를 생산한다. 일부 실시형태에서, 비천연 아미노산은 R-아미노산이다. 일부 실시형태에서, 비천연 아미노산은 염료(예를 들어, 형광 염료) 또는 친화성 태그(tag)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 폴리펩티드는 화학적 변형을 포함한다. 화학적 변형은 예를 들어, 비오틴, 형광 염료를 이용한 화학적 변형을 포함한다. 당업자는 비천연 아미노산을 폴리펩티드내로 도입하고 폴리펩티드를 화학적으로 변형하기 위한 방법이 본 기술분야에 잘 알려져 있음을 인식할 것이다.
- [0226] 일부 실시형태에서, 실시형태의 폴리펩티드는 면역원성 폴리펩티드(예를 들어, 키홀 림펫 헤모시아닌, KLH)에 융합되거나 접합된다. 일부 양태에서, 폴리펩티드는 추가로 C- 또는 N-말단에서 Cys 잔기를 포함한다. 예를 들어, 일부 양태에서, 폴리펩티드는 Cys 잔기에서의 디설파이드 결합에 의해 면역원성 폴리펩티드에 접합된다.
- [0227] 다른 추가 실시형태에서, 본 발명은 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 인간 BTLA의 적어도 7개 연속 아미노산의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 가지며, 이때 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 상기 아미노산 중 적어도 하나는 당화되며, 폴리펩티드는 약학적 허용 담체에서 제형화되는 면역원성 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 일부 양태에서, 면역원성 조성물은 추가로 백반 또는 프로인트 아췌반트와 같은 아췌반트를 포함한다.
- [0228] 일부 실시형태에서, 동물에게 폴리펩티드를 투여하고 동물로부터 항체를 분리하는 것을 포함하는 항체 제조 방법이 제공되며, 이때 폴리펩티드는 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 적어도 하나의 아미노산을 가진 인간 BTLA의 적어도 7개 연속 아미노산의 단편을 가지며, 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 상기 아미노산 중 적어도 하나는 당화된다. 동물은 마우스, 래트, 토끼 또는 인간일 수 있다. 일부 양태에서, 본 방법은 항체의 CDR을 확인하고 CDR 주변 서열을 인간화하여 인간화 항체를 생산하는 것을 추가로 포함한다. 추가 양태에서, 본 방법은 인간화 항체를 재조합적으로 발현하는 것을 포함한다. 따라서, 추가 실시형태에서, 전술한 방법에 의해 생산된 분리된 항체를 제공한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 발명은 비당화된 BTLA에 비하여 실시형태의 폴리펩티드(예를 들어, 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 인간 BTLA의 적어도 7개 연속 아미노산의 단편을 포함하며, 이때 인간 BTLA의 위치 N75, N94, 또는 N110에 해당하는 상기 아미노산 중 적어도 하나는 당화되는 폴리펩티드)에 선택적으로 결합하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0229] 본 발명에서 제공되는 폴리펩티드는 본 기술분야에 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드는 화학적 합성 또는 재조합 생산에 의해 제조될 수 있다. 재조합 폴리펩티드를 발현하고 정제하기 위한 예시적인 방법은 예를 들어, Scopes R.K., *Protein Purification - Principles and Practice*, Springer Advanced Texts in Chemistry, 3<sup>rd</sup> Edition (1994); Simpson R.J. et al., *Basic Methods in Protein Purification and Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1<sup>st</sup> Edition (2008); Green M.R. and Sambrook J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4<sup>th</sup> Edition (2012); Jensen K.J. et al., *Peptide Synthesis and Applications* (Methods

in Molecular Biology), Humana Press, 2<sup>nd</sup> Edition (2013)에서 찾을 수 있다. 폴리펩티드의 화학적 합성은 본 기술분야에서 잘 알려진 방법을 이용하여 이루어질 수 있다(Kelley and Winkler, 1990, In: Genetic Engineering Principles and Methods, Setlow J. K, ed., Plenum Press, N.Y., Vol. 12, pp 1-19; Stewart *et al.*, 1984, J. M. Young, J. D., Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill; Marglin and Merrifield, *Ann. Rev. Biochem.*, 39:841-866, at 862 (1970). Merrifield, R.B., 1963, *J. Am. Chern. Soc.* 85:2149-2154; Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, Williams *et al.*, Eds., 1997, CRC Press, Boca Raton Fla.; Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Atherton & Sheppard, Eds., 1989, IRL Press, Oxford, England를 참고하며; 또한 미국 특허 4,105,603호; 3,972,859호; 3,842,067호; 및 3,862,925호를 참고한다).

[0230] 7.2.3. 변형 및 유도체

[0231] 당화된 BTLA에 대한 항체는 동물 중, 단클론 세포주 또는 항체의 다른 공급원에 관계없이 당화된 BTLA의 효과를 중화하거나 대응하는 능력을 가질 수 있다. 일부 동물 종은 항체의 Fc 부분을 통한 보체 시스템의 활성화로 인해 알러지 반응을 야기할 가능성이 높을 수 있으므로 그들은 치료 항체의 생성을 위해 덜 바람직할 수 있다. 하지만, 전체 항체는 Fc(보체 결합) 단편으로 그리고 결합 도메인 또는 CDR을 가진 항체 단편으로 효소적으로 분해될 수 있다. Fc 부분의 제거는 항체 단편이 바람직하지 못한 면역 반응을 유발할 가능성을 감소시키며, 따라서, Fc가 없는 항체가 예방 또는 치료 처리를 위해 사용될 수 있다. 상술한 대로, 항체는 또한 다른 종에서 생산되거나 다른 종으로부터의 서열을 가진 항체를 동물에게 투여함으로써 발생하는 해로운 면역학적 결과를 감소시키거나 제거하기 위하여, 키메라, 부분적 또는 완전히 인간이도록 제작될 수 있다.

[0232] 항-당화된 BTLA 항체의 결합 특성은 원하는 특성을 나타내는 변이체에 대한 스크리닝에 의해 더 개선될 수 있다. 예를 들어, 그러한 개선은 본 기술분야에 알려진 다양한 파아지 디스플레이 방법을 이용하여 이루어질 수 있다. 파아지 디스플레이 방법에서는, 기능성 항체 도메인이 그들을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 보유한 파아지 입자의 표면 상에 디스플레이된다. 구체적 실시형태에서, 그러한 파아지는 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리(예를 들어, 인간 또는 쥐)로부터 발현된, Fab 및 Fv 또는 디설파이드-결합 안정화된 Fv와 같은 항원 결합 단편을 디스플레이하기 위하여 이용될 수 있다. 관심 항원에 결합하는 항원 결합 단편을 발현하는 파아지는 항원을 이용하여, 예를 들어, 라벨링된 항원 또는 고체 표면 또는 비드에 결합되거나 포획된 항원을 이용하여, 선택되거나 확인될 수 있다. 이들 방법에서 이용되는 파아지는 전형적으로는 필라멘트성 파아지이며, fd 및 M13을 포함한다. 항원 결합 단편은 파아지 유전자 III 또는 유전자 VIII 단백질에 재조합적으로 융합된 단백질로서 발현된다. 본 명세서에 개시된 항체 또는 폴리펩티드를 제조하기 위해 사용될 수 있는 파아지 디스플레이 방법의 예는 Brinkman *et al.*, *J Immunol Methods*, 182:41-50 (1995); Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 184:177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 24:952-958(1994); Persic *et al.*, *Gene*, 187:9-18 (1997); Burton *et al.*, *Adv. Immunol.* 57:191-280 (1994); PCT 공개 WO 92/001047호; WO 90/02809호; WO 91/10737호; WO 92/01047호; WO 92/18619호; WO 93/11236호; WO 95/15982호; WO 95/20401호; 및 미국 특허 5,698,426호; 5,223,409호; 5,403,484호; 5,580,717호; 5,427,908호; 5,750,753호; 5,821,047호; 5,571,698호; 5,427,908호; 5,516,637호; 5,780,225호; 5,658,727호; 5,733,743호 및 5,969,108호에서 개시된 것들을 포함하며; 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0233] 상기 문헌에 개시된 대로, 파아지 선택 후, 파아지로부터의 항체 코딩 영역이 분리되어 인간화 항체를 비롯한 전체 항체, 또는 임의의 다른 원하는 단편을 생성하기 위해 이용될 수 있으며, 예를 들어, 하기에 상세히 개시된 바처럼, 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 세균을 비롯한 임의의 원하는 숙주에서 발현될 수 있다. 예를 들어, Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 재조합적으로 생산하기 위한 기술 또한 PCT 공개 WO 92/22324호; Mullinax, R. L. *et al.*, *BioTechniques*, 12(6):864-869 (1992); 및 Sawai *et al.*, *Am. J. Reprod. Immunol.* 34:26-34 (1995); 및 Better, M. *et al. Science* 240:1041-1043(1988)에 개시된 것과 같은 본 기술분야에 알려진 방법을 이용하여 이용될 수 있으며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 단일체 Fv 및 항체를 생산하기 위하여 사용될 수 있는 기술의 예는 미국 특허 4,946,778호 및 5,258,498호; Huston, J. S. *et al.*, *Methods in Enzymology* 203:46-88(1991); Shu, L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 90:7995-7999; 및 Skerra, A. *et al.*, *Science* 240:1038-1040 (1988)에 개시된 것을 포함하며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0234] 파아지 디스플레이 기술은 본 명세서에 개시된 항-당화된 BTLA 항체의 친화성을 증가시키기 위하여 이용될 수 있다. 이 기술은 본 명세서에 개시된 조합 방법에서 사용될 수 있는 고 친화성 항체를 수득하는데에 사용될 수

있다. 친화성 성숙으로 불리는 이 기술은 초기 또는 모 항체와 비교할 때 항원에 더 높은 친화성으로 결합하는 항체를 확인하기 위하여 돌연변이유발 또는 CDR 위킹(walking), 및 그러한 수용체 또는 리간드(또는 그들의 세포외 도메인) 또는 그의 항원성 단편을 이용하는 재선택(re-selection)을 이용한다(예를 들어, Glaser, S. M. *et al.*, *J. Immunol.* 149:3903-3913(1992)를 참고한다). 단일 뉴클레오타이드가 아닌 전체 코돈의 돌연변이유발은 아미노산 돌연변이의 반-무작위화 레퍼토리를 야기한다. 라이브러리는 각각이 단일 CDR에서의 단일 아미노산 변경에 의해 상이하며 각 CDR 잔기를 위한 각각의 가능한 아미노산 치환을 대표하는 변이체들을 함유한 변이체 클론들의 집단으로 이루어지도록 제작될 수 있다. 항원에 대해 증가된 결합 친화성을 가진 돌연변이체는 고정된 돌연변이체를 라벨링된 항원과 접촉시킴으로써 스크리닝될 수 있다. 본 기술분야에 알려진 임의의 스크리닝 방법이 항원에 대해 증가된 결합활성(avidity)을 가진 돌연변이체 항체를 확인하기 위해 이용될 수 있다(예를 들어, ELISA)(예를 들어, Wu, H. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95(11):6037-6042(1998); Yelton, D. E. *et al.*, *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995)를 참고한다). 경쇄를 무작위화하는 CDR 위킹 또한 이용될 수 있다(Schier *et al.*, *J. Mol. Biol.* 263:551-567(1996)을 참고한다).

[0235] 임의 돌연변이유발은 개선된 CDR 및/또는 가변 영역을 확인하기 위하여 파아지 디스플레이 방법과 함께 이용될 수 있다. 파아지 디스플레이 기술은 대안적으로는 지시된 돌연변이유발에 의해 CDR 친화성을 증가(또는 감소)시키기 위해 사용될 수 있다(예를 들어, 친화성 성숙 또는 "CDR-위킹"). 이 기술은 초기 또는 모 항체와 비교할 때 항원에 더 높은(또는 더 낮은) 친화성으로 결합하는 CDR을 가진 항체를 확인하기 위하여 타겟 항원 또는 항원성 단편을 이용한다(예를 들어, Glaser, S. M. *et al.*, *J. Immunol.* 149:3903-3913(1992)를 참고한다).

[0236] 그러한 친화성 성숙을 이루는 방법은 예를 들어, Krause, J. C. *et al.*, *MBio.* 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10(2011); Kuan, C. T. *et al.*, *Int. J. Cancer* 10.1002/ijc.25645; Hackel, B. J. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 401(1):84-96(2010); Montgomery, D. L. *et al.*, *MAbs* 1(5):462-474(2009); Gustchina, E. *et al.*, *Virology* 393(1):112-119 (2009); Finlay, W. J. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 388(3):541-558 (2009); Bostrom, J. *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 525:353-376 (2009); Steidl, S. *et al.*, *Mol. Immunol.* 46(1):135-144 (2008); 및 Barderas, R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 105(26):9029-9034 (2008)에서 개시되며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0237] 본 발명은 또한 "모"(또는 야생형) 분자에 비하여 1, 2, 3, 4, 5 또는 그보다 많은 아미노산 치환, 부가, 결실 또는 변형을 가진 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드의 유도체를 제공한다. 그러한 아미노산 치환 또는 부가는 자연 발생(즉, DNA-인코딩된) 또는 비자연 발생 아미노산 잔기를 도입할 수 있다. 그러한 아미노산은 당화(예를 들어, 변경된 만노스, 2-N-아세틸글루코스아민, 갈락토스, 푸코스, 글루코스, 시알산, 5-N-아세틸뉴라민산, 5-글리콜뉴라민산 등 내용물을 가짐), 아세틸화, 페길화, 인산화, 아미드화, 공지 보호/차단 기에 의한 유도체화, 단백질분해성 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질과의 연결, 등이 될 수 있다. 일부 실시형태에서, 변경된 탄수화물 변형은 하기 중 하나 이상을 조절한다: 항체의 가용화, 항체의 준세포 수송(subcellular transport) 및 분비의 촉진, 항체 조립의 촉진, 구조적 온전함(conformational integrity), 및 항체-매개된 이펙터 기능. 일부 실시형태에서, 변경된 탄수화물 변형은 탄수화물 변형이 없는 항체에 비하여 항체 매개 이펙터 기능을 향상시킨다. 변경된 항체 매개된 이펙터 기능을 유도하는 탄수화물 변형은 본 기술분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, Shields, R. L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277(30): 26733-26740 (2002); Davies J. *et al. Biotechnology & Bioengineering* 74(4): 288-294(2001)를 참고하며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다). 탄수화물 내용을 변경하는 방법은 당업자에게 알려져 있으며, 예를 들어, Wallick, S. C. *et al.*, *J. Exp. Med.* 168(3): 1099-1109(1988); Tao, M. H. *et al.*, *J. Immunol.* 143(8): 2595-2601 (1989); Routledge, E. G. *et al.*, *Transplantation* 60(8):847-53 (1995); Elliott, S. *et al.*, *Nature Biotechnol.* 21:414-21(2003); Shields, R. L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277(30): 26733-26740 (2002)를 참고하며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0238] 치환 변이체는 본 발명에서 제공되는 항체 또는 폴리펩티드 내의 하나 이상의 부위에서 하나의 아미노산의 다른 아미노산으로의 교환을 함유할 수 있으며, 다른 기능 또는 특성의 상실이 있거나 없이, 항체 또는 폴리펩티드의 하나 이상의 특성을 조절하기 위해 설계될 수 있다. 치환은 보존적일 수 있으며, 즉, 하나의 아미노산이 유사한 형상과 전하의 아미노산으로 치환된다. 보존적 치환은 본 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 하기의 변화를 포함한다: 알라닌에서 세린으로; 아르기닌에서 리신으로; 아스파라긴에서 글루타민 또는 히스티딘으로; 아스파테이트에서 글루타메이트로; 시스테인에서 세린으로; 글루타민에서 아스파라긴으로; 글루타메이트에서 아스파테이트로; 글리신에서 프롤린으로; 히스티딘에서 아스파라긴 또는 글루타민으로; 이소류신에서 류신 또는 발린으로; 류신에서 발린 또는 이소류신으로; 리신에서 아르기닌으로; 메티오닌에서 류신 또는 이소류신으로; 페



닐알라닌에서 티로신, 류신 또는 메티오닌으로; 세린에서 트레오닌으로; 트레오닌에서 세린으로; 트립토판에서 티로신으로; 티로신에서 트립토판 또는 페닐알라닌으로; 그리고 발린에서 이소류신 또는 류신으로. 대안적으로, 치환은 폴리펩티드의 기능 또는 활성이 영향을 받는 비보존성일 수 있다. 비보존적 변화는 전형적으로 극성 또는 하전된 아미노산과 같은 화학적으로 상이한 잔기를 비극성 또는 비하전 아미노산으로 치환하거나 그 역에 관련된다.

[0239] 일부 실시형태에서, 인간화 항체는 유도체 항체이다. 그러한 인간화 항체는 하나 이상의 비인간 CDR에서 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 부가를 포함한다. 인간화 항체 유도체는 비유도체 인간화 항체와 비교할 때 실질적으로 동일한 결합, 더 나은 결합, 또는 더 나쁜 결합을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, CDR의 1, 2, 3, 4, 또는 5개 아미노산 잔기가 치환되거나, 결실되거나 부가된 것과 같이 돌연변이되었다.

[0240] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 유도체 폴리펩티드이다. 그러한 폴리펩티드는 야생형 인간 BTLA에 비교하여 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 부가를 포함한다. 유도체 폴리펩티드는 비유도체 폴리펩티드와 비교할 때 항-당화된 BTLA 항체와 실질적으로 동일한 결합, 더 나은 결합 또는 더 나쁜 결합을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 인간 BTLA의 1, 2, 3, 4, 또는 5개 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 부가된 것과 같이 돌연변이되었다.

[0241] 본 명세서에 개시된 항체 또는 폴리펩티드는 특이적 화학 절단, 아세틸화, 제형화, 투니카마이신의 대사적 합성 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업자에게 알려진 기술을 이용하여 화학적 변형에 의해 변형될 수 있다. 일 실시형태에서, 유도체 폴리펩티드 또는 유도체 항체는 모 폴리펩티드 또는 항체와 유사하거나 동일한 기능을 보유한다. 다른 실시형태에서, 유도체 폴리펩티드 또는 유도체 항체는 모 폴리펩티드 또는 모 항체에 비하여 변경된 활성을 나타낸다. 예를 들어, 유도체 항체(또는 그 단편)는 모 항체보다 더 단단하게 그의 에피토프에 결합하거나 단백질분해에 더 저항성일 수 있다.

[0242] 유도체화 항체에서의 치환, 부가 또는 결실은 항체의 Fc 영역에 있을 수 있으며 그에 의해 하나 이상의 Fc $\gamma$ R에의 항체의 결합 친화성을 변형하기 위해 작용할 수 있다. 하나 이상의 Fc $\gamma$ R에의 변형된 결합을 가진 항체를 변형하는 방법은 본 기술분야에 알려져 있으며, 예를 들어, PCT 공개 WO 04/029207호, WO 04/029092호, WO 04/028564호, WO 99/58572호, WO 99/51642호, WO 98/23289호, WO 89/07142호, WO 88/07089호, 및 미국 특허 5,843,597호 및 5,642,821호를 참고하며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 다른 분자는 활성화 Fc $\gamma$ R, 예를 들어, Fc $\gamma$ RIIIA에 대해 변경된 친화성을 가질 수 있다. 바람직하게는 그러한 변형은 또한 변경된 Fc-매개된 이펙터 기능을 가진다. Fc-매개된 이펙터 기능에 영향을 주는 변형은 본 기술분야에 잘 알려져 있다(미국 특허 6,194,551호, 및 WO 00/42072호를 참고한다). 일부 실시형태에서, Fc 영역의 변형은 변경된 항체-매개된 이펙터 기능, 다른 Fc 수용체(예를 들어, Fc 활성화 수용체)에의 변경된 결합, 변경된 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 활성, 변경된 C1q 결합 활성, 변경된 보체-의존성 세포독성 활성(CDC), 식세포 활성 또는 그의 임의의 조합을 가진 항체를 생성한다.

[0243] 유도체 항체 또는 폴리펩티드는 또한 포유동물, 바람직하게는 인간에서 모 분자 또는 항체의 변경된 반감기(예를 들어, 혈청 반감기)를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 그러한 변경은 15일 초과, 바람직하게는 20일 초과, 25일 초과, 30일 초과, 35일 초과, 40일 초과, 45일 초과, 2개월 초과, 3개월 초과, 4개월 초과, 또는 5개월 초과를 반감기를 야기한다. 포유동물, 바람직하게는 인간에서 인간화 항체 또는 폴리펩티드의 증가된 반감기는 포유동물에서 상기 항체 또는 폴리펩티드의 더 높은 혈청 역가를 야기하며, 따라서 상기 항체 또는 폴리펩티드의 투여 빈도를 감소시키고 및/또는 투여되는 상기 항체 또는 폴리펩티드의 농도를 감소시킨다. 증가된 생체내 반감기를 가진 항체 또는 폴리펩티드는 당업자에게 알려진 기술에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 증가된 생체내 반감기를 가진 항체 또는 폴리펩티드는 Fc 도메인과 FcRn 수용체 사이의 상호작용에 관련되는 것으로 확인된 아미노산 잔기를 변형(예를 들어, 치환, 결실 또는 추가)함으로써 생성될 수 있다. 본 명세서에 개시된 인간화 항체는 생물학적 반감기를 증가시키기 위해 조작될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 6,277,375호를 참고한다). 예를 들어, 본 명세서에 개시된 인간화 항체는 증가된 생체내 또는 혈청 반감기를 갖도록 Fc-힌지 도메인에서 조작될 수 있다.

[0244] 증가된 생체내 반감기를 가진 본 명세서에 개시된 항체 또는 폴리펩티드는 상기 항체 또는 폴리펩티드에 고분자량 폴리에틸렌글리콜(PEG)과 같은 중합체 분자를 부착함으로써 생성될 수 있다. PEG는 상기 분자 또는 항체의 N- 또는 C-말단에의 PEG의 부위-특이적 접합을 통해 또는 리신 잔기상에 존재하는 입실론-아미노기를 통해 다기능성 링커가 있거나 없이 항체 또는 폴리펩티드에 부착될 수 있다. 생물학적 활성의 최소 상실을 야기하는 선형 또는 분지형 중합체 유도체화가 이용될 수 있다. 접합의 정도는 항체에의 PEG 분자의 적절한 접합을 보장하기 위하여 SDS-PAGE와 질량 분광법에 의해 자세하게 모니터링될 수 있다. 미반응 PEG는 예를 들어, 크기 배제 또는

이온-교환 크로마토그래피에 의해 항체-PEG 접합체로부터 분리될 수 있다.

- [0245] 본 명세서에 개시된 항체 또는 폴리펩티드는 또한 실질적으로 면역원성 반응없이 포유동물 순환계내로 주사될 수 있는 조성물을 제공하기 위하여 Davis *et al.*(미국 특허 4,179,337호 참고)에 의해 개시된 방법 및 커플링제에 의해 변형될 수 있다. Fc 부분의 제거는 항체 단편이 바람직하지 못한 면역 반응을 유발할 가능성을 감소시킬 수 있으므로, Fc가 없는 항체는 예방적 또는 치료적 처리를 위해 이용될 수 있다. 상술한 바와 같이, 항체는 또한 다른 종에서 생산되거나 다른 종으로부터의 서열을 갖는 항체를 동물에게 투여함으로써 야기되는 해로운 면역적 결과를 감소시키거나 제거하기 위하여, 키메라, 부분적 또는 완전히 인간이도록 제작될 수 있다.
- [0246] 7.2.4. 융합체 및 접합체
- [0247] 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드는 또한 다른 단백질과의 융합 단백질로서 발현되거나 또는 다른 모이어티에 화학적으로 접합될 수 있다.
- [0248] 일부 실시형태에서, 본 발명은 Fc 부분을 가진 항체 또는 폴리펩티드를 제공하며, 이때 Fc 부분은 이소타입 또는 서브클래스에 의해 변화될 수 있거나, 키메라 또는 하이브리드일 수 있거나, 및/또는 예를 들어, 이펙터 기능의 개선, 반감기의 제어, 조직 접근성, 생물물리적 특징, 예를 들어, 안정성의 증대, 및 생산 효율 개선(및 더 적은 비용)을 위하여 변형될 수 있다. 개시된 융합 단백질의 제작에서 유용한 많은 변형 및 그들의 제조 방법이 본 기술분야에 알려져 있으며, 예를 들어, Mueller, J. P. *et al.*, *Mol. Immun.* 34(6):441-452 (1997), Swann, P. G., *Curr. Opin. Immun.* 20:493-499 (2008), 및 Presta, L. G., *Curr. Opin. Immun.* 20:460-470 (2008)을 참고한다. 일부 실시형태에서, Fc 영역은 본래의 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 Fc 영역이다. 일부 실시형태에서, Fc 영역은 하이브리드, 예를 들어, IgG2/IgG4 Fc 불변 영역을 가진 키메라이다. Fc 영역에의 변형은 Fc 감마 수용체 및 보체에의 결합을 방지하기 위하여 변형된 IgG4, 하나 이상의 Fc 감마 수용체에의 결합을 개선하기 위하여 변형된 IgG1, 이펙터 기능을 최소화하기 위해 변형된 IgG1(아미노산 변화), (전형적으로 발현 숙주의 변화에 의해)변경된/무 글리칸을 가진 IgG1, 및 FcRn에의 변경된 pH-의존성 결합을 가진 IgG1을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. Fc 영역은 전체 힌지 영역, 또는 전체 힌지 영역보다 적게 포함할 수 있다.
- [0249] 다른 실시형태는 FcR에의 결합이 감소되어 그들의 반감기가 증가된 IgG2-4 하이브리드 및 IgG4 돌연변이체를 포함한다. 대표적인 IG2-4 하이브리드 및 IgG4 돌연변이체는 Angal *et al.*, *Molec. Immunol.* 30(1):105-108 (1993); Mueller *et al.*, *Mol. Immun.* 34(6):441-452 (1997); 및 미국 특허 6,982,323호에 개시되며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 일부 실시형태에서, IgG1 및/또는 IgG2 도메인은 결실되며, 예를 들어, Angal *et al.*은 세린 241이 프롤린으로 치환된 IgG1 및 IgG2를 개시한다.
- [0250] 일부 실시형태에서, 본 발명은 적어도 10개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 70개, 적어도 80개, 적어도 90개 또는 적어도 100개 아미노산을 가진 융합 단백질 또는 폴리펩티드를 제공한다.
- [0251] 일부 실시형태에서, 본 발명은 적어도 하나의 모이어티를 가진 복합체에 연결하거나 공유적으로 결합하거나 복합체로 형성되는 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드를 제공한다. 그러한 모이어티는 진단 또는 치료 작용제로서 분자의 효능을 증가시키는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 모이어티는 영상 작용제, 독소, 치료 효소, 항생제, 방사성라벨링된 뉴클레오타이드 등일 수 있다.
- [0252] 본 발명에서 제공되는 분자는 치료적 모이어티(또는 하나 이상의 치료적 모이어티들)를 포함할 수 있다. 본 발명에서 제공되는 분자는 세포독소, 예를 들어, 세포중식억제성 또는 세포파괴성 작용제와 같은 치료적 모이어티, 치료제 또는 방사성 금속 이온, 예를 들어, 알파-방출제에 접합되거나 재조합적으로 융합된 항체일 수 있다. 세포독소 또는 세포독성 작용제는 세포에 유해한 임의의 작용제를 포함한다. 치료적 모이어티는 항대사물(예를 들어, 메토트렉세이트(methotrexate), 6-머캅토피린(6-mercaptopurine), 6-티오구아닌(6-thioguanine), 시타라빈(cytarabine), 5-플루오로우라실 데카르바진(5-fluorouracil decarbazine)); 알킬화제(예를 들어, 메클로르에타민(mechlorethamine), 티오에파 클로람부실(thioepa chlorambucil), 멜파란(melphalan), 카르무스틴(carmustine)(BCNU) 및 로무스틴(lomustine)(CCNU), 시클로토스파미드(cyclothosphamide), 부설판(busulfan), 디브로모만니톨, 스트렙토조토신(streptozotocin), 미토마이신(mitomycin) C 및 시스디클로로디아민 플래티늄(II)(DDP), 및 시스플라틴(cisplatin)); 안트라사이클린(anthracycline)(예를 들어, 다우노루비신(daunorubicin)(이전에는 다우노마이신(daunomycin)) 및 독소루비신(doxorubicin)); 항생제(예를 들어, d 액티노마이신(actinomycin)(이전에는 액티노마이신), 블레오마이신(bleomycin), 미트라마이신(mithramycin) 및 안트라마이신(anthracycline)(AMC)); 오리스타틴(Auristatin) 분자

(예를 들어, 오리스타틴 PHE, 오리스타틴 F, 모노메틸 오리스타틴 E, 브리오스타틴(bryostatins) 1, 및 솔라스타틴(solastatin) 10; Woyke *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3802-8 (2002), Woyke *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3580-4 (2001), Mohammad *et al.*, *Anticancer Drugs* 12:735-40 (2001), Wall *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:76-80 (1999), Mohammad *et al.*, *Int. J. Oncol.* 15:367-72 (1999)를 참고하며, 이들 모두는 참고로 본원에 포함됨); 호르몬(예를 들어, 글루코코르티코이드, 프로세스틴, 안드로젠 및 에스트로젠), DNA-복구 효소 억제제(예를 들어, 에토포시드(etoposide) 또는 토폠테칸(topotecan)), 키나제 억제제(예를 들어, 화합물 ST1571, 이마티닙(imatinib) 메실레이트(Kantarjian *et al.*, *Clin Cancer Res.* 8(7):2167-76 (2002)); 세포독성 작용제(예를 들어, 파클리탁셀(paclitaxel), 시토크알라신(cytochalasin) B, 그라미시딘(gramicidin) D, 에티뎀 브로마이드, 에메틴(emetine), 미토마이신(mitomycin), 에토포시드(etoposide), 테노포시드(tenoposide), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 콜히친(colchicin), 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 디하이드록시 안트라신 디온(dihydroxy anthracin dione), 미토잔트론(mitoxantrone), 미트라마이신(mithramycin), 액티노마이신 D, 1-테하이드로테스 토스테론, 글루코르티코이드, 프로케인(procaine), 테트라케인(tetracaine), 리도케인(lidocaine), 프로프라놀롤(propranolol), 및 퓨로마이신(puromycin) 및 그의 유사체 또는 상동체 및 미국 특허 6,245,759호, 6,399,633호, 6,383,790호, 6,335,156호, 6,271,242호, 6,242,196호, 6,218,410호, 6,218,372호, 6,057,300호, 6,034,053호, 5,985,877호, 5,958,769호, 5,925,376호, 5,922,844호, 5,911,995호, 5,872,223호, 5,863,904호, 5,840,745호, 5,728,868호, 5,648,239호, 5,587,459호에 개시된 화합물); 파르네실 트랜스퍼라제 억제제(예를 들어, R115777, BMS-214662, 및 예를 들어, 미국 특허 6,458,935호, 6,451,812호, 6,440,974호, 6,436,960호, 6,432,959호, 6,420,387호, 6,414,145호, 6,410,541호, 6,410,539호, 6,403,581호, 6,399,615호, 6,387,905호, 6,372,747호, 6,369,034호, 6,362,188호, 6,342,765호, 6,342,487호, 6,300,501호, 6,268,363호, 6,265,422호, 6,248,756호, 6,239,140호, 6,232,338호, 6,228,865호, 6,228,856호, 6,225,322호, 6,218,406호, 6,211,193호, 6,187,786호, 6,169,096호, 6,159,984호, 6,143,766호, 6,133,303호, 6,127,366호, 6,124,465호, 6,124,295호, 6,103,723호, 6,093,737호, 6,090,948호, 6,080,870호, 6,077,853호, 6,071,935호, 6,066,738호, 6,063,930호, 6,054,466호, 6,051,582호, 6,051,574호, 및 6,040,305호에 의해 개시된 것들); 토포이소머라제(topoisomerase) 억제제(예를 들어, 캄토테신(camptothecin); 이리노테칸(irinotecan); SN-38; 토포테칸(topotecan); 9-아미노캄토테신(9-aminocamptothecin); GG-211(GI 147211); DX-8951f; IST-622; 루비테칸(rubitecan); 피라졸로아크리딘(pyrazoloacridine); XR-5000; 사인토펜(saintopin); UCE6; UCE1022; TAN-1518A; TAN 1518B; KT6006; KT6528; ED-110; NB-506; ED-110; NB-506; 및 레베카마이신(rebeccamycin)); 불가레인(bulgarein); DNA 마이너 그루브(minor groove) 결합제, 예를 들어, 핵스트(Hoescht) 염료 33342 및 핵스트 염료 33258; 니티딘(nitidine); 파가로닌(fagaronine); 에피베르베린(epiberberine); 코라린(coraline); 베타-라파콘(beta-lapachone); BC-4-1; 비스포스포네이트(예를 들어, 알렌드로네이트(alendronate), 시마드로네이트(cimadronate), 클로드로네이트(clodronate), 티루드로네이트(tiludronate), 에티드로네이트(etidronate), 이반드로네이트(ibandronate), 네리드로네이트(neridronate), 올판드로네이트(olpandronate), 리세드로네이트(risedronate), 피리드로네이트(piridronate), 파미드로네이트(pamidronate), 조렌드로네이트(zolendronate)); HMG-CoA 리덕타제 억제제(예를 들어, 로바스타틴(lovastatin), 심바스타틴(simvastatin), 아토르바스타틴(atorvastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 플루바스타틴(fluvastatin), 스타틴(STATIN), 세리바스타틴(cerivastatin), 레스콜(lescol), 루피톨(lupitor), 로수바스타틴(rosuvastatin) 및 아토르바스타틴(atorvastatin)); 안티센스 올리고뉴클레오티드(예를 들어, 미국 특허 6,277,832호, 5,998,596호, 5,885,834호, 5,734,033호, 및 5,618,709호에 개시된 것); 아데노신 디아미나제 억제제(예를 들어, 플루다라빈 포스페이트 및 2-클로로데옥시아데노신); 이브리투모맵 티옥세탄(ibritumomab tiuxetan)(제바린(Zevalin)®); 토시투모맵(tositumomab)(백사르(Bexxar)®)) 및 그의 약학적 허용 염, 용매화물, 클라트레이트(clathrate) 및 전구약물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0253]

추가로, 본 발명에서 제공되는 분자는 주어진 생물 반응을 변형시키는 치료적 모이어티 또는 약물 모이어티에 접합되거나 재조합적으로 융합된 항체일 수 있다. 치료적 모이어티 또는 약물 모이어티는 전통적인 화학적 치료제에 제한되는 것으로 이해되어서는 안된다. 예를 들어, 약물 모이어티는 원하는 생물학적 활성을 보유한 단백질, 펩티드 또는 폴리펩티드일 수 있다. 그러한 단백질은 예를 들어, 아브린(abrin), 리신(ricin) A, 슈도모나스 외독소, 콜레라 독소, 또는 디프테리아 독소와 같은 독소; 종양 괴사 인자,  $\gamma$ -인터페론,  $\alpha$ -인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성자, 어파토시스 작용제, 예를 들어, TNF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , AIM I(국제 공개 WO 97/33899호 참고), AIM II(국제 공개 WO 97/34911호 참고), Fas 리간드(Takahashi



*et al.*, 1994, *J. Immunol.*, 6:1567-1574), 및 VEGF(국제 공개 WO 99/23105호 참고), 항-혈관신생제, 예를 들어, 안지오테나틴, 엔도스타틴 또는 응고 경로의 성분(예를 들어, 조직 인자)와 같은 단백질; 또는 생물 반응 개질제, 예를 들어, 림포카인(예를 들어, 인터페론 감마, 인터루킨-1("IL-1"), 인터루킨-2("IL-2"), 인터루킨-5("IL-5"), 인터루킨-6("IL-6"), 인터루킨-7("IL-7"), 인터루킨 9("IL-9"), 인터루킨-10("IL-10"), 인터루킨-12("IL-12"), 인터루킨-15 ("IL-15"), 인터루킨-23("IL-23"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자("GM-CSF") 및 과립구 콜로니 자극 인자("G-CSF")), 또는 성장 인자(예를 들어, 성장 호르몬("GH")), 또는 응고 작용제(예를 들어, 칼슘, 비타민 K, 조직 인자, 예를 들어, 그러나 이에 제한되지 않는 하게만(Hageman) 인자(인자 XII), 고 분자량 키니노겐(kininogen)(HMWK), 프레칼리크레인(prekallikrein)(PK), 응고 단백질-인자 II(프로트롬빈), 인자 V, XIIa, VIII, XIIIa, XI, XIa, IX, IXa, X, 인지질 및 피브린 단량체)를 포함할 수 있다.

[0254] 또한, 본 발명에서 제공되는 항체는 방사성 금속 이온, 예를 들어, 알파-방출제, 예를 들어, <sup>213</sup>Bi와 같은 치료 적 모이어티 또는 <sup>131</sup>In, <sup>131</sup>Lu, <sup>131</sup>Y, <sup>131</sup>Ho, <sup>131</sup>Sm을 포함하지만 이에 제한되지 않는 방사성금속 이온을 폴리펩티 드에 접합하는데 유용한 대환식 킬레이터에 접합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 대환식 킬레이터는 링커 분자 를 통해 항체에 부착될 수 있는 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(DOTA)이다. 그 러한 링커 분자는 본 기술분야에 일반적으로 알려져 있으며 Denardo *et al.*, 1998, *Clin Cancer Res.* 4(10):2483-90; Peterson *et al.*, 1999, *Bioconjug. Chem.* 10(4):553-7; 및 Zimmerman *et al.*, 1999, *Nucl. Med. Biol.* 26(8):943-50에 개시되며 그 각각은 그 전체가 참고로 포함된다.

[0255] BTLA에 면역특이적으로 결합하는 본 발명에서 제공되는 항체에 접합되거나 재조합적으로 융합된 치료적 모이어 티 또는 약물은 원하는 예방 또는 치료 효과(들)를 이루도록 선택되어야 한다. 일부 실시형태에서, 항체는 변형 된 항체이다. 의사 또는 다른 의료진은 본 발명에서 제공되는 항체에 접합하거나 재조합적으로 융합할 치료적 모이어티 또는 약물을 결정할 때는 하기를 고려해야 한다: 질병의 특성, 질병의 심각도 및 개체의 병태.

[0256] 일부 실시형태에서, 모이어티는 효소, 호르몬, 세포 표면 수용체, 독소(예를 들어, 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소(즉, PE-40), 디프테리아 독소, 리신, 젤로닌(gelonin) 또는 미국자리공 항바이러스 단백질), 단백질(예 를 들어, 종양 괴사 인자, 인터페론(예를 들어, α-인터페론, β-인터페론), 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성화자, 또는 어팍토시스 작용제(예를 들어, 종양 괴사 인자-α, 종양 괴사 인자-β)), 생물 반응 개질제(예를 들어, 림포카인(예를 들어, 인터루킨-1("IL-1"), 인터루킨-2("IL-2"), 인터루킨-6("IL-6")), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자("GM-CSF"), 과립구 콜로니 자극 인자("G-CSF") 또는 대식세포 콜로니 자극 인자("M-CSF")), 또는 성장 인자(예를 들어, 성장 호르몬("GH")), 세포독소(예를 들어, 세포증식 억제제 또는 세포과피 작용제, 예를 들어, 파클리탁셀, 시토킨라신 B, 그라미시딘 D, 에티뎀 브로마이드, 에페틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록 시 안트라신 디온, 미토잔트론, 미트라마이신, 액티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로케인, 테트라케인, 리도케인, 프로프라놀롤, 모노메틸 오리스타틴 F(MMAF), 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE; 예를 들어, 베도틴(vedotin)) 및 퓨로마이신 및 그의 유사체 또는 상동체), 항대사물(예를 들어, 메토타렉세이 트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제(예를 들어, 메클로르에타 민, 티오에파 클로람부실, 펠과란, BiCNU®(카르무스틴;BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 시클로토스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C 및 시스디클로로디아민 플래티늄(II)(DDP), 시스플라틴); 안트 라사이클린(예를 들어, 다우노루비신(이전에는 다우노마이신) 및 독소루비신); 항생제(예를 들어, 닥티노마이신 (이전에는 액티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신(AMC)), 또는 항-유사분열 작용제(예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)일 수 있다.

[0257] 그러한 치료적 모이어티를 항체에 접합하기 위한 기술은 잘 알려져 있으며; 예를 들어, Amon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Reisfeld *et al.* (eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in CONTROLLED DRUG DELIVERY (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in MONOCLONAL ANTIBODIES '84: BIOLOGICAL AND CLINICAL APPLICATIONS, Pinchera *et al.* (eds.), 1985, pp. 475-506); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in MONOCLONAL ANTIBODIES FOR CANCER DETECTION AND THERAPY, Baldwin *et al.* (eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; Thorpe *et al.*, *Immunol. Rev.* 62:119-158 (1982); Carter *et al.*, *Cancer J.* 14(3):154-169 (2008); Alley *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14(4):529-537 (2010);

Carter *et al.*, *Amer. Assoc. Cancer Res. Educ. Book.* 2005(1):147-154 (2005); Carter *et al.*, *Cancer J.* 14(3):154-169(2008); Chari, *Acc. Chem Res.* 41(1):98-107 (2008); Doronina *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784(2003); Ducry *et al.*, *Bioconjug Chem.* 21(1):5-13(2010); Senter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13(3):235-244 (2009); 및 Teicher, *Curr Cancer Drug Targets.* 9(8):982-1004 (2009)를 참고한다.

[0258] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체 및 폴리펩티드는 정제를 촉진하기 위하여, 펩티드와 같은 마커에 접합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 마커는 헥사-히스티딘 펩티드, 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질로부터 유도된 에피토프에 해당하는 헤마글루티닌 "HA" 태그(Wilson, I. A. *et al.*, *Cell*, 37:767-778 (1984)), 또는 "플래그" 태그(Knappik, A. *et al.*, *Biotechniques* 17(4):754-761 (1994))이다.

[0259] 일부 실시형태에서, 모이어티는 분석에서 검출될 수 있는 영상 작용제일 수 있다. 그러한 영상 작용제는 효소, 보결분자단, 방사성라벨, 비방사성 상자성 금속 이온, 합텐, 형광 라벨, 인광 분자, 화학발광 분자, 발색단, 발광 분자, 생물발광 분자, 광친화성 분자, 착색된 입자 또는 리간드, 예를 들어, 비오틴일 수 있다.

[0260] 일부 실시형태에서, 효소는 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알카라인 포스파타제, 베타-갈락토시다제 또는 아세틸콜린 에스테라제를 포함하지만 이에 한정되지 않으며; 보결분자단 복합체는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하지만 이에 한정되지 않으며; 형광 물질은 옴벨리페론, 플루오르세인, 플루오르세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오르세인, 덴실 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함하지만 이에 한정되지 않으며; 발광 물질은 루미놀을 포함하지만 이에 한정되지 않으며; 생물발광 물질은 루시페라제, 루시페린 및 에퀴린(aequorin)을 포함하지만 이에 한정되지 않으며; 방사성 물질은 비스무스(<sup>213</sup>Bi), 탄소(<sup>14</sup>C), 크롬(<sup>51</sup>Cr), 코발트(<sup>57</sup>Co), 불소(<sup>18</sup>F), 가돌리늄(<sup>153</sup>Gd, <sup>159</sup>Gd), 갈륨(<sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga), 게르마늄(<sup>68</sup>Ge), 홀름(<sup>166</sup>Ho), 인듐(<sup>115</sup>In, <sup>113</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>111</sup>In), 요오드(<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>121</sup>I), 란타넘(<sup>140</sup>La), 룩테튬(<sup>177</sup>Lu), 망간(<sup>54</sup>Mn), 몰리브덴(<sup>99</sup>Mo), 팔라듐(<sup>103</sup>Pd), 인(<sup>32</sup>P), 프라세오디뮴(<sup>142</sup>Pr), 프로메튬(<sup>149</sup>Pm), 레늄(<sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re), 로듐(<sup>105</sup>Rh), 루테튬(<sup>97</sup>Ru), 사마리움(<sup>153</sup>Sm), 스칸듐(<sup>47</sup>Sc), 셀레늄(<sup>75</sup>Se), 스트론튬(<sup>85</sup>Sr), 황(<sup>35</sup>S), 테크네튬(<sup>99</sup>Tc), 티타늄(<sup>201</sup>Ti), 주석(<sup>113</sup>Sn, <sup>117</sup>Sn), 삼중수소(<sup>3</sup>H), 크세논(<sup>133</sup>Xe), 이테르븀(<sup>169</sup>Yb, <sup>175</sup>Yb), 이트륨(<sup>90</sup>Y), 아연(<sup>65</sup>Zn); 다양한 양전자 방출 단층촬영술을 이용하는 양전자 방출 금속, 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0261] 영상 작용제는 본 기술분야에 알려진 기술을 이용하여 직접적으로 또는 중간체(예를 들어, 본 기술분야에 알려진 링커)를 통해 간접적으로 본 명세서에 개시된 항체 또는 폴리펩티드에 접합될 수 있다. 예를 들어, 진단제로서 사용하기 위하여 본 명세서에 개시된 항체 및 다른 분자에 접합될 수 있는 금속 이온을 위해 미국 특허 4,741,900호를 참고한다. 일부 접합 방법은 예를 들어, 항체에 부착된 디에틸렌트리아민펜타아세트산 안하이드라이드(DTPA); 에틸렌트리아민테트라아세트산; N-클로로-p-톨루엔설포아미드; 및/또는 테트라클로로-3-6α-디페닐글리코우릴-3과 같은 유기 킬레이팅제를 이용하는 금속 킬레이트 복합체의 사용에 관련된다. 단클론 항체는 또한 글루타르알데히드 또는 페리오데이트와 같은 커플링제의 존재하에서 효소와 반응될 수 있다. 플루오르세인 마커와의 접합체는 이들 커플링제의 존재하에서 또는 이소티오시아네이트와의 반응에 의해 제조될 수 있다.

[0262] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체 또는 폴리펩티드는 미국 특허 4,676,980호에서 Segal에 의해 개시된 대로 항체 이중접합체를 형성하기 위하여 제2 항체에 접합될 수 있다. 그러한 이중접합체 항체는 부가적으로 합텐(예를 들어, 플루오르세인)에, 또는 세포 마커(예를 들어, 4-1-BB, B7-H4, CD4, CD8, CD14, CD25, CD27, CD40, CD68, CD163, CTLA4, GITR, LAG-3, OX40, TIM3, TIM4, TLR2, LIGHT, ICOS, B7-H3, B7-H7, B7-H7CR, CD70, CD47)에 또는 사이토카인(예를 들어, IL-7, IL-15, IL-12, IL-4 TGF-베타, IL-10, IL-17, IFNγ, Flt3, BLys) 또는 케모카인(예를 들어, CCL21)에 결합할 수 있다.

[0263] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드는 또한 고정 지지체에 부착될 수 있으며, 이는 타겟 항원 또는 본 명세서에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편에의 결합을 통해 지지체에 고정된 타겟 항원에 결합할 수 있는 다른 분자의 면역분석 또는 정제를 위해 유용할 수 있다. 그러한 고정 지지체는 유리, 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리프로필렌을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

#### [0264] 7.2.5. 단백질 정제

[0265] 단백질 정제 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다. 이들 기술은 한 수준에서는, 세포, 조직 또는 기관의 균질화 및 폴리펩티드와 비폴리펩티드 분획으로의 조 분획화에 관련된다. 관심 단백질 또는 폴리펩티드는 달리 특정되

지 않으면 부분적 또는 완전한 정제(또는 균질함까지의 정제)를 이루기 위하여 크로마토그래피 및 전기영동 기술을 이용하여 더 정제될 수 있다. 순수한 펩티드의 제조에 특히 적합한 분석 방법은 이온-교환 크로마토그래피, 크기-배제 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 폴리아크릴아미드 젤 전기영동, 친화성 크로마토그래피, 면역친화성 크로마토그래피 및 등전점 포커싱이다. 펩티드를 정제하는 특히 효율적인 방법은 고속-성능 액체 크로마토그래피(FPLC) 또는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)이다. 일반적으로 본 기술분야에 알려진 대로, 다양한 정제 단계를 수행하는 순서는 변할 수 있으며, 또는 일부 단계가 생략되고도 실질적으로 정제된 폴리펩티드의 제조를 위해 적합한 방법이 될 수 있는 것으로 생각된다.

[0266] 정제된 폴리펩티드는 다른 성분으로부터 분리가능한 조성물을 말하고자 하며, 이때 폴리펩티드는 그의 자연적으로-수득가능한 상태에 비하여 어느 정도든 정제된다. 따라서, 분리되거나 정제된 폴리펩티드는 또한 그것이 자연적으로 발생할 수 있는 환경이 없는 폴리펩티드를 말한다. 일반적으로, "정제된"은 다양한 다른 성분을 제거하기 위하여 분획화를 거쳤으며 조성물이 그의 발현된 생물 활성을 실질적으로 보유하는 폴리펩티드 조성물을 말할 것이다. 용어 "실질적으로 정제된"이 사용될 경우, 이 명칭은 폴리펩티드가 조성물의 주요 성분을 형성하는, 예를 들어, 조성물 내의 단백질의 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%, 또는 그 이상을 구성하는 조성물을 말할 것이다.

[0267] 폴리펩티드의 정제 정도를 정량하기 위한 다양한 방법이 본 발명에 비추어 당업자에게 알려져 있다. 이들은 예를 들어, 활성 분획의 비활성을 결정하거나, SDS/PAGE 분석에 의해 분획 내의 폴리펩티드의 양을 평가하는 것을 포함한다. 분획의 순도를 평가하기 위한 바람직한 방법은 분획의 비활성을 계산하고, 그것을 초기 추출물의 비활성에 비교하고, "배 정제 수"에 의해 평가되는, 그안의 순도를 계산하는 것이다. 활성의 양을 나타내기 위하여 사용되는 실제 단위는 물론 정제를 따르기 위해 선택된 구체적 분석 기술, 및 발현된 폴리펩티드가 검출가능한 활성을 나타내는지 여부에 의존할 것이다.

[0268] 폴리펩티드가 그의 가장 정제된 상태로 항상 제공되어야 할 일반적인 요건은 없다. 사실상, 덜 실질적으로 정제된 산물이 일부 실시형태에서, 유용성을 가질 수 있는 것으로 생각된다. 부분 정제는 더 적은 정제 단계를 조합하여 이용하여 또는 상이한 형태의 동일한 일반적 정제 도식을 이용하여 이루어질 수 있다. 예를 들어, HPLC 장치를 이용하여 수행되는 양이온-교환 컬럼 크로마토그래피는 일반적으로 저압 크로마토그래피 시스템을 이용하는 동일한 기술보다 더 큰 "배수" 정제를 야기할 것으로 이해된다. 더 낮은 정도의 상대적 정제를 나타내는 방법은 단백질 산물의 총 회수율에서, 또는 발현된 단백질의 활성을 유지하는데 있어서 이점을 가질 수 있다.

[0269] 친화성 크로마토그래피는 분리될 물질과 그것이 특이적으로 결합할 수 있는 분자 사이의 특이적 친화성에 의존하는 크로마토그래피 절차이다. 이것은 수용체-리간드 타입의 상호작용이다. 컬럼 물질은 결합 파트너 중 하나를 불용성 매트릭스에 공유적으로 커플링시킴으로써 형성된다. 이어서 컬럼 물질은 용액으로부터의 물질을 특이적으로 흡착할 수 있다. 결합이 발생하지 않을 (예를 들어, 변경된 pH, 이온 강도, 온도 등) 조건으로 조건을 변화시킴으로써 용리가 발생한다. 매트릭스는 임의의 유의한 정도로 분자를 흡착하지 않으며 광범위한 화학적, 물리적 및 열적 안정성을 가진 물질이어야 한다. 리간드는 그의 결합 특성에 영향을 주지 않는 방식으로 커플링되어야 한다. 리간드는 또한 상대적으로 단단한 결합을 제공해야 한다. 샘플 또는 리간드를 파괴하지 않고 물질을 용리하는 것이 가능해야 한다.

[0270] 크기-배제 크로마토그래피(SEC)는 용액 내의 분자가 그들의 크기, 또는 보다 기술적 용어로, 그들의 수력학적 부피에 기초하여 분리되는 크로마토그래피 방법이다. 이것은 단백질 및 산업용 중합체와 같은 큰 분자 또는 거대분자 복합체에 보통 적용된다. 전형적으로, 수용액이 컬럼을 통해 샘플을 수송하기 위해 이용될 경우, 유기용매가 이동상으로 이용될 경우 사용되는 명칭 젤 투과 크로마토그래피에 대비하여, 이 기술은 젤 여과 크로마토그래피로 알려진다. SEC의 근본적인 원리는 상이한 크기의 입자가 상이한 속도로 고정상을 통해 용리(여과)할 것이라는 것이다. 이것은 크기에 기초한 입자 용액의 분리를 야기한다. 모든 입자가 동시에 또는 거의 동시에 로딩된다면, 동일한 크기의 입자는 함께 용리될 것이다.

[0271] 고성능 액체 크로마토그래피(또는 고압 액체 크로마토그래피, HPLC)는 화합물을 분리, 동정 및 정량하기 위하여 생화학 및 분석 화학에서 자주 사용되는 컬럼 크로마토그래피 형태이다. HPLC는 크로마토그래피 패킹 물질(고정상)을 보유한 컬럼, 컬럼을 통해 이동상(들)을 이동시키는 펌프, 및 분자의 체류 시간을 보여주는 검출기를 이용한다. 체류 시간은 고정상, 분석되는 분자 및 사용되는 용매(들) 간의 상호작용에 따라 변한다.

[0272] 본 발명은 또한 BTLA-함유 샘플을 실시형태의 항체(예를 들어, 비당화된 BTLA에 비하여 당화된 BTLA에 선택적으로 결합하는 항체)와 접촉시키는 것을 포함하는 BTLA 당화, N-연결된 당화 또는 N-당화를 평가하는 방법을 제

공한다. 일부 양태에서, 본 방법은 시험관내 방법이다. 일부 양태에서, 샘플은 세포 샘플이다.

[0273] 7.2.6. 핵산.

[0274] 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 임의의 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자(DNA 또는 RNA)를 고려한다. 본 발명은 또한 그러한 핵산 분자를 전달하거나 복제할 수 있는 벡터 분자(예를 들어, 플라스미드)를 제공한다. 핵산은 단일쇄, 이중쇄일 수 있으며, 단일쇄 및 이중쇄 부분 둘 모두를 함유할 수 있다.

[0275] 7.3. 약학 제제

[0276] 항체를 함유하는 약학 조성물의 임상적 적용이 이루어질 경우, 일반적으로 의도된 응용을 위해 적합한 약학 또는 치료 조성물을 제조하는 것이 유익할 것이다. 일반적으로, 약학 조성물은 본 명세서에 개시된 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드의 유효량을 가질 수 있거나, 또는 약학적 허용 담체내에 용해되거나 분산된 추가 작용제와 함께 가질 수 있다.

[0277] 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드를 가진 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 중량 기준으로 적어도 0.1%의 항체 또는 폴리펩티드를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 중량 기준으로 적어도 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 그보다 많은 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드를 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 예를 들어, 항-당화된 BTLA 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드는 조성물 중량의 약 2% 내지 약 75%, 약 25% 내지 약 60%, 약 30% 내지 약 50%, 또는 그간의 임의의 범위를 구성할 수 있다. 각각의 치료적으로 유용한 조성물내의 활성 화합물(들)의 양은, 적합한 투여량이 화합물의 임의의 주어진 단위 용량에서 수득되는 방식으로 제조될 수 있다. 가용성, 생체이용률, 생물학적 반감기, 투여 경로, 제품 저장수명, 및 다른 약리학적 고려사항과 같은 인자가 그러한 약학적 제형 제조 분야의 당업자에 의해 고려될 수 있으며, 따라서, 다양한 투여량 및 치료 요법이 바람직할 수 있다.

[0278] 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 표 2에 개시된 쥐 단클론 항체 STC613의 VH 또는 VL 도메인을 포함하는 항-당화된 BTLA 항체를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 표 4에 개시된 쥐 단클론 항체 STC626의 VH 또는 VL 도메인을 포함하는 항-당화된 BTLA 항체를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 표 6에 개시된 쥐 단클론 항체 STC635의 VH 또는 VL 도메인을 포함하는 항-당화된 BTLA 항체를 가질 수 있다.

[0279] 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 표 2에 개시된 쥐 단클론 항체 STC613의 VH 및 VL 도메인 둘 모두를 포함하는 항-당화된 BTLA 항체를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 표 4에 개시된 쥐 단클론 항체 STC626의 VH 및 VL 도메인 둘 모두를 포함하는 항-당화된 BTLA 항체를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 표 6에 개시된 쥐 단클론 항체 STC635의 VH 및 VL 도메인 둘 모두를 포함하는 항-당화된 BTLA 항체를 가질 수 있다.

[0280] 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 표 3에 개시된 쥐 단클론 항체 STC613의 VH CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VH CDR 하나 이상을 포함하는 항-당화된 BTLA 항체를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 표 5에 개시된 쥐 단클론 항체 STC626의 VH CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VH CDR 하나 이상을 포함하는 항-당화된 BTLA 항체를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 표 7에 개시된 쥐 단클론 항체 STC635의 VH CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VH CDR 하나 이상을 포함하는 항-당화된 BTLA 항체를 가질 수 있다.

[0281] 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 표 3에 개시된 쥐 단클론 항체 STC613의 VL CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VL CDR 하나 이상을 포함하는 항-당화된 BTLA 항체를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 표 5에 개시된 쥐 단클론 항체 STC626의 VL CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VL CDR 하나 이상을 포함하는 항-당화된 BTLA 항체를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 표 7에 개시된 쥐 단클론 항체 STC635의 VL CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VL CDR 하나 이상을 포함하는 항-당화된 BTLA 항체를 가질 수 있다.

[0282] 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 표 3에 개시된 쥐 단클론 항체 STC613의 적어도 하나의 VH CDR 및 적어도 하나의 VL CDR을 포함하는 항-당화된 BTLA 항체를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 표 5에 개시된 쥐 단클론 항체 STC626의 적어도 하나의 VH CDR 및 적어도 하나의 VL CDR을 포함하는 항-당화된 BTLA 항체를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 표 7에 개시된 쥐 단클론 항체 STC635의 적어도 하나의 VH



CDR 및 적어도 하나의 VL CDR을 포함하는 항-당화된 BTLA 항체를 가질 수 있다.

- [0283] 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 본 명세서에 개시된 BTLA 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하는 항-당화된 BTLA 항체를 가질 수 있다. BTLA 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC613의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 본 명세서에 개시된 BTLA의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항-당화된 BTLA 항체를 가질 수 있다. BTLA 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC613의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, BTLA 에피토프는 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 또는 169의 아미노산 서열의 적어도 5개 연속 아미노산을 가진다.
- [0284] 조성물은 활성 성분으로서 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드 및 약학적 허용 담체를 가진 약학 조성물일 수 있다. 약학 조성물은 추가로 하나 이상의 추가의 활성 성분을 포함할 수 있다. 약학적 허용 담체는 연방 정부 또는 주 정부의 관리 기관에 의해 승인되거나, 미국 약전, 유럽 약전 또는 다른 일반적으로 인정되는 약전에서 동물, 그리고 더욱 구체적으로는 인간에서의 사용을 위해 열거된 담체일 수 있다.
- [0285] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "담체"는 치료제가 함께 투여되는 희석제, 아쥘 반트(예를 들어, 프로인트 아쥘 반트(완전 또는 불완전)), 부형제, 안정화제 또는 비히클을 말한다. "약학적 허용 담체"는 이용되는 투여량 및 농도에서 그에 노출된 세포 또는 포유동물에 비독성인 담체이며, 이것은 멸균 액체, 예를 들어, 물 및 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일, 예를 들어, 땅콩 오일, 대두 오일, 광유, 참기름 등을 비롯한 오일일 수 있다. 약학적 허용 분자 실체 또는 조성물은 적절한 대로 인간과 같은 동물에게 투여될 경우 해로운, 알러지성의, 또는 다른 뜻밖의 반응을 생산하지 않는다. 항체 또는 추가의 활성 성분을 가진 약학 조성물의 제제는, 참고로 본원에 포함되는 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990에 의해 예시되는 바와 같이, 본 발명에 비추어 당업자에게 알려져 있다. 또한, 동물(예를 들어, 인간) 투여의 경우, 제제는 FDA 생물 표준국(Office of Biological Standards)에 의해 요구되는 멸균성, 발열원성, 일반적 안전성 및 순도 표준을 충족해야 함이 이해될 것이다.
- [0286] 조성물은 ml 당 약 0.001 mg 내지 약 10 mg의 총 항체 또는 폴리펩티드를 포함하는 것으로 생각된다. 따라서, 조성물 내의 항체 또는 폴리펩티드의 농도는 약, 적어도 약 또는 최대 약 0.001, 0.010, 0.050, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 mg/ml 또는 그 이상(또는 그안의 임의의 유효가능한 범위)일 수 있다. 이 중에서, 약, 적어도 약, 또는 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100%가 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드일 수 있다.
- [0287] 활성 성분으로서 본 명세서에 개시된 항체 또는 다른 폴리펩티드를 가진 약학 조성물의 제조는 참고로 본원에 포함되는 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990에 의해 예시되는 바와 같이, 본 발명에 비추어 당업자에게 알려져 있다. 또한, 동물(인간 포함) 투여의 경우, 제제는 FDA 생물 표준국에 의해 요구되는 멸균성, 발열원성, 일반적 안전성 및 순도 표준을 충족해야 함이 이해된다.
- [0288] 약학적 허용 담체는 액체, 반고체, 즉, 페이스트, 또는 고체 담체를 포함한다. 담체 또는 희석제의 예는 지방, 오일, 물, 생리식염수, 지질, 리포솜, 수지, 결합제, 충전제 등, 또는 그 조합을 포함한다. 약학적 허용 담체는 당업자에게 알려진 것처럼, 수성 용매(예를 들어, 물, 알콜성/수성 용액, 에탄올, 생리식염수, 비경구 비히클, 예를 들어, 염화나트륨, 링거 텍스트로스, 등), 비수성 용매(예를 들어, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일 및 주사용 유기 에스테르, 예를 들어, 에틸올리에이트), 분산 매질, 코팅(예를 들어, 레시틴), 계면활성제, 산화방지제, 방부제(예를 들어, 항균 또는 항진균 작용제, 항-산화제, 킬레이팅제, 불활성 가스, 파라벤(예를 들어, 메틸파라벤, 프로필파라벤), 클로로부탄올, 페놀, 솔브산, 티메로살), 등장성 작용제(예를 들어, 당, 염화나트륨), 흡수 지연제(예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트, 젤라틴), 염, 약물, 약물 안정화제(예를 들어, 버퍼, 아미노산, 예를 들어, 글리신 및 리신, 탄수화물, 예를 들어, 텍스트로스, 만노스, 갈락토스, 프럭토스, 락토스, 수크로스, 말토스, 솔비톨, 만니톨 등), 젤, 결합제, 부형제, 붕해제, 윤활제, 감미제, 착향료, 염료, 유체 및 영양 보충제, 그러한 유사 물질 및 그 조합을 포함한다. 임의의 종래의 매질, 작용제, 희석제 또는 담체가 수용체에 또는 그안에 함유된 조성물의 치료 효과에 해로운 경우를 제외하고, 본 방법의 실시에서의 사용을 위해 투여가능한 조성물에서의 그의 사용은 적절하다. 약학 조성물 내의 다양한 성분의 pH 및 정확한 농도는 잘 알려진 파라미터에 따라 조정된다. 본 발명의 일부 양태에 따라, 조성물은 임의의

편리하고 실용적인 방식으로, 즉, 용액, 현탁액, 유화, 혼합, 캡슐화, 흡수, 분쇄 등에 의해, 담체와 조합될 수 있다. 그러한 절차는 당업자에게 일상적이다.

[0289] 일부 실시형태에서, 약학적 허용 담체는 수성 pH 완충 용액일 수 있다. 예로는 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산과 같은 버퍼; 아스코르브산을 비롯한 산화방지제; 저분자량(예를 들어, 약 10개 아미노산 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린을 비롯한, 단당류, 이당류, 및 다른 탄수화물; 킬레이팅제, 예를 들어, EDTA; 당 알콜, 예를 들어, 만니톨 또는 솔비톨; 나트륨과 같은 염-형성 반대이온; 및/또는 트윈(TWEEN)<sup>TM</sup>, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 및 플루로닉스(PLURONICS)<sup>TM</sup>와 같은 비이온성 계면활성제를 포함한다.

[0290] 일부 실시형태에서, 약학적 허용 담체는 물 및 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일, 예를 들어, 땅콩오일, 대두오일, 광유, 참기름 등을 비롯한 오일과 같은 멸균 액체일 수 있다. 물은 특히 약학 조성물이 정맥내로 투여될 때, 담체일 수 있다. 생리식염수 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액은 또한 특히 주사용 용액을 위해 액체 담체로서 이용될 수 있다. 적합한 약학 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카겔, 소듐 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올, 폴리소르베이트-80 등을 포함한다. 조성물은 또한 소량의 습윤 또는 유화 작용제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 현탁액, 에멀전, 정제, 알약, 캡슐, 분말, 서방성 제형 등의 형태를 취할 수 있다.

[0291] 본 발명의 일부 실시형태는 그것이 고체, 액체 또는 에어로졸 형태로 투여되는지 여부, 및 주사와 같은, 투여 경로를 위해 멸균성일 필요가 있는지에 따라 상이한 타입의 담체를 가질 수 있다. 조성물은 정맥내로, 피부내로, 경피로, 기관내로, 동맥내로, 복강내로, 비내로, 질내로, 직장내로, 근육내로, 피하로, 점막으로, 경구로, 국소로, 국부로, 흡입에 의해(예를 들어, 에어로졸 흡입), 주사에 의해, 주입에 의해, 연속 주입에 의해, 지질 조성물(예를 들어, 리포솜)에서 직접적으로, 카테터를 통해, 세척을 통해, 타겟 세포를 국소화 관류 배당(localized perfusion bathing)함에 의해, 또는 다른 방법 또는 당업자에게 알려진 전술한 것의 임의의 조합에 의해 투여하기 위해 제형화될 수 있다(예를 들어, 참고로 본원에 포함되는 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990을 참고한다). 전형적으로, 그러한 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서 제조될 수 있으며; 주사 전에 액체의 첨가시에 용액 또는 현탁액을 제조하기 위해 사용하기 적합한 고체 형태가 또한 제조될 수 있으며; 제제는 또한 유화될 수 있다.

[0292] 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드는 유리 염기, 중성, 또는 염 형태로 조성물 내로 제형화될 수 있다. 약학적 허용 염은 산 부가 염, 예를 들어, 단백질성 조성물의 유리 아미노기로 형성되거나 또는 무기산, 예를 들어, 염산 또는 인산, 또는 유기산, 예를 들어, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 또는 만델산으로 형성된 것들을 포함한다. 유리 카르복실기로 형성된 염은 또한 무기 염기, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 또는 수산화제이철; 또는 유기 염기, 예를 들어, 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘 또는 프로케인으로부터 유도될 수 있다.

[0293] 추가 실시형태에서, 본 발명은 지질을 가진 약학 조성물을 제공한다. 지질은 넓게는 특질상으로 물에서 불용성이고 유기 용매로 추출가능한 물질의 부류를 포함할 수 있다. 그 예는 장쇄 지방족 탄화수소를 함유하는 화합물 및 그 유도체를 포함한다. 지질은 자연 발생이거나 합성(즉, 사람에 의해 설계되거나 생산됨)일 수 있다. 지질은 생물학적 물질일 수 있다. 생물학적 지질은 본 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 중성 지방, 인지질, 포스포글리세라이드, 스테로이드, 테르펜, 라이소지질, 글리코스핑고지질, 당지질, 설��파티드, 에테르-및 에스테르-연결된 지방산을 가진 지질, 중합성 지질 및 그 조합을 포함한다. 당업자가 지질로 이해하는 본 명세서에 구체적으로 개시된 것 외의 다른 화합물 또한 사용될 수 있다.

[0294] 당업자는 지질 비히클에서 조성물을 분산시키기 위해 이용될 수 있는 기술의 범위에 익숙할 것이다. 예를 들어, 항체 또는 폴리펩티드는 당업자에게 알려진 임의의 수단에 의해 지질을 함유한 용액에서 분산되거나, 지질로 용해되거나, 지질로 유화되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 지질에 공유 결합되거나, 지질내에 현탁액으로서 함유되거나, 미셀 또는 리포솜에 함유되거나 복합되거나, 또는 다르게는 지질 또는 지질 구조와 연합될 수 있다. 분산액은 리포솜의 형성을 야기하거나 야기하지 않을 수 있다.

[0295] 일반적으로, 조성물의 성분들은 별도로, 또는 예를 들어, 활성 작용제의 양을 표시하는 앰플 또는 봉지(sachette)와 같은 밀봉 용기내의 건조 동결 분말 또는 무수 농축물로서 단위 투약 형태로 함께 혼합되어 공급



된다. 조성물이 주입에 의해 투여될 경우, 조성물은 멸균 약학 등급 물 또는 염수를 함유한 주입 병과 제공될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 주사를 위한 멸균수 또는 염수의 앰플이 성분들이 투여 전에 혼합될 수 있도록 제공될 수 있다.

[0296] 각각의 치료적으로 유용한 조성물내의 활성 성분의 양은, 적합한 투여량이 화합물의 임의의 주어진 단위 용량에서 수득되는 방식으로 제조될 수 있다. 가용성, 생체이용률, 생물학적 반감기, 투여 경로, 제품 저장수명, 및 다른 약리학적 고려사항과 같은 인자가 그러한 약학적 제형 제조 분야의 당업자에 의해 고려될 수 있으며, 따라서, 다양한 투여량 및 치료 요법이 바람직할 수 있다.

[0297] 단위 용량 또는 투여량은 개체에서의 사용을 위해 적합한 물리적으로 구별되는 단위를 말하며, 각 단위는 그 투여, 즉, 적절한 경로 및 치료 요법과 연합되어 상기에 개시한 원하는 반응을 생산하기 위해 계산된 약학 조성물의 소정의 양을 함유한다. 치료 횟수 및 단위 용량에 따른, 투여될 양은 원하는 효과에 의존한다. 환자 또는 개체에게 투여되는 본 실시형태의 조성물의 실제 투여량은 개체의 체중, 연령, 건강 및 성별, 치료되는 질병의 타입, 질병 침투 정도, 이전 또는 공존하는 치료적 중재, 환자의 특발증, 투여 경로, 및 구체적인 치료 물질의 효능, 안정성 및 독성과 같은 신체적 및 생리학적 인자에 의해 결정될 수 있다. 다른 비제한적인 예에서, 용량은 투여 당 약 1 마이크로그램/kg/체중부터, 약 5 마이크로그램/kg/체중, 약 10 마이크로그램/kg/체중, 약 50 마이크로그램/kg/체중, 약 100 마이크로그램/kg/체중, 약 200 마이크로그램/kg/체중, 약 350 마이크로그램/kg/체중, 약 500 마이크로그램/kg/체중, 약 1 밀리그램/kg/체중, 약 5 밀리그램/kg/체중, 약 10 밀리그램/kg/체중, 약 50 밀리그램/kg/체중, 약 100 밀리그램/kg/체중, 약 200 밀리그램/kg/체중, 약 350 밀리그램/kg/체중, 약 500 밀리그램/kg/체중, 약 1000 밀리그램/kg/체중 이상까지, 그리고 그안의 임의의 유도가능한 범위를 가질 수 있다. 본 명세서에 열거된 수로부터 유도가능한 범위의 비제한적인 예에서, 약 5 밀리그램/kg/체중 내지 약 100 밀리그램/kg/체중, 약 5 마이크로그램/kg/체중 내지 약 500 밀리그램/kg/체중, 등의 범위가 상기에 개시한 수에 기초하여 투여될 수 있다. 투여를 책임지는 실무자는 어떤 경우에도, 조성물 내의 활성 성분(들)의 농도 및 개인 개체를 위한 적절한 용량(들)을 결정할 것이다.

[0298] 당업자는 본 명세서에 개시된 조성물은 치료 제제의 구체적인 특성에 의해 제한되지 않음을 이해할 것이다. 예를 들어, 그러한 조성물은 생리학적으로 용인가능한 액체, 젤 또는 고체 담체, 희석제 및 부형제와 함께 제형내에 제공될 수 있다. 이들 치료 제제는 가축에서와 같은 수의학적 용도를 위해, 그리고 다른 치료제와 유사한 방식으로 인간에서의 임상적 용도를 위해 포유동물에게 투여될 수 있다. 일반적으로, 치료 효능을 위해 요구되는 투여량은 개인 개체의 구체적인 요구뿐만 아니라 투여의 사용 타입 및 양식에 따라 변한다. 인간 환자를 비롯한 동물 환자에게 투여되는 조성물의 실제 투여량은 체중, 병태의 심각성, 치료되는 질병의 타입, 이전 또는 공존하는 치료적 중재, 환자의 특발증 및 투여 경로와 같은 신체적 및 생리학적 인자에 의해 결정될 수 있다. 투여량 및 투여 경로에 따라, 바람직한 투여량 및/또는 유효량의 투여 횟수는 개체의 반응에 따라 변할 수 있다. 투여를 책임지는 실무자는 어떤 경우에도, 조성물 내의 활성 성분(들)의 농도 및 개인 개체를 위한 적절한 용량(들)을 결정할 것이다.

#### [0299] 7.4. 질병의 치료

[0300] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "개체"는 치료, 관찰 및/또는 실험의 대상인 동물을 말한다. "동물"은 척추동물 및 무척추동물, 예를 들어, 어류, 조개류, 파충류, 조류 및 특히 포유동물을 포함한다. "포유동물"은 마우스, 래트, 토끼, 기니피그, 개, 고양이, 양, 염소, 소, 말, 영장류, 예를 들어, 원숭이, 침팬지, 유인원 및 인간을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 개체는 인간이다.

[0301] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "암" 또는 "암의"는 조절되지 않은 세포 성장을 전형적인 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학적 병태를 말한다. 암의 예는 혈액암 및 고형 종양을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0302] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "치료하다", "치료하는", 또는 "치료"는 질병 또는 건강-관련 병태의 치료적 이득을 수득할 목적을 위하여 개체에서의 절차 또는 양상의 수행 또는 개체에의 치료제의 투여 또는 적용을 말한다. 예를 들어, 치료는 개체에게 치료적 유효량의 항-당화원 BTLA 항체의 투여를 포함할 수 있다. 암 환자와 관련하여 사용될 경우, 용어 "치료하다", "치료하는", 또는 "치료"는 암의 심각성을 잠재적으로 감소시키거나, 암의 진행을 지연하거나 늦추는 작용을 말하며, (a) 암 성장의 억제, 암 성장물의 감소, 암의 발생의 중지, 암 침윤성 감소 또는 암의 전이 방지, 및 (b) 암의 퇴행의 야기, 암의 존재와 연합된 하나 이상의 증상의 지연 또는 최소화, 또는 암 환자의 생존의 연장을 포함한다.

- [0303] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "치료적 유효량"은 주어진 질병, 질환 또는 병태, 및/또는 그에 관련된 증상의 심각성 및/또는 기간을 감소 및/또는 완화하기 위해 충분한 작용제(예를 들어, 본 명세서에 개시된 항체 또는 폴리펩티드 또는 본 명세서에 개시된 임의의 다른 작용제)의 양을 말한다. 치료제를 비롯한 작용제의 치료적 유효량은 (i) 주어진 질병, 질환 또는 병태의 진행 또는 진전의 감소 또는 완화, (ii) 주어진 질병, 질환 또는 병태의 재발, 발생 또는 개시의 감소 또는 완화, 및/또는 (iii) 다른 치료법(예를 들어, 본 발명에서 제공되는 항체의 투여 외의 다른 치료법)의 예방 또는 치료 효과의 개선 또는 향상을 위해 필요한 양일 수 있다. 본 발명의 물질/분자/작용제(예를 들어, 항-당화된 BTLA 항체)의 치료적 유효량은 개인의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 물질/분자/작용제가 개인에서 원하는 반응을 유발하는 능력과 같은 인자에 따라 변할 수 있다. 치료적 유효량은 물질/분자/작용제의 임의의 독성 또는 해로운 효과를 치료적으로 유익한 효과가 초과하는 양을 포함한다.
- [0304] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "투여하다" 또는 "투여"는 점막, 피부내, 정맥내, 근육내 전달 및/또는 본 명세서에 개시되거나 본 기술분야에 알려진 임의의 다른 물리적 전달 방법에 의해서와 같이, 신체 밖에 존재하는 물질을 환자 내로 주사하거나 달리 물리적으로 전달하는 행위를 말한다. 질병, 질환 또는 병태 또는 그의 증상이 치료되고 있는 경우, 물질의 투여는 전형적으로 질병, 질환 또는 병태 또는 그의 증상의 개시 후에 발생한다. 질병, 질환 또는 병태 또는 그의 증상이 예방되는 경우, 물질의 투여는 전형적으로 질병, 질환 또는 병태 또는 그의 증상의 개시 전에 발생한다.
- [0305] 본 발명은 또한 항-당화된 BTLA 항체(예를 들어, STC613, STC626, 또는 STC635) 및 당화된 BTLA 폴리펩티드의 치료 용도를 제공한다. 이들 항체 또는 폴리펩티드는 BTLA 시그널링의 활성을 조절하기 위해 사용될 수 있다. 이들 항체 또는 폴리펩티드는 또한 T 세포 활성화 또는 증식에서 BTLA의 억제 활성을 억제함으로써 질병을 치료하기 위해 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 BTLA 시그널링을 억제하거나 차단함으로써 개체의 면역계를 상향 조절하는데 있어서 그러한 항체 또는 폴리펩티드의 용도를 제공한다.
- [0306] 일부 실시형태에서, 본 발명은 또한 암의 치료에서 항-당화된 BTLA 항체(예를 들어, STC613, STC626, 또는 STC635) 및 당화된 BTLA 폴리펩티드의 치료 용도를 제공한다. 면역계의 상향 조절은 암의 치료에서 특히 바람직하며, 따라서 본 발명은 또한 암치료 방법을 제공한다. 암은 세포의 비정상적인 제어되지 않은 성장으로부터 야기되는 신생물 또는 종양을 말한다. 암은 원발성 암 또는 전이성 암일 수 있다.
- [0307] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체(예를 들어, STC613, STC626, 또는 STC635 또는 그의 인간화 변이체)는 개체에서 면역 반응을 조절할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 T 세포 활성화를 촉진할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 T세포 증식을 촉진할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 사이토카인 생산을 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 BTLA를 발현하는 세포의 T-세포 의존성 어팍토시스를 향상시키거나 BTLA를 발현하는 세포의 증식을 억제할 수 있다.
- [0308] 따라서, 본 발명은 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체(예를 들어, STC613, STC626, 또는 STC635 또는 그의 인간화 변이체)의 유효량을 투여함으로써 개체에서 면역 반응을 조절하는 방법을 제공한다. 면역 반응의 조절은 (a) T 세포 활성화의 증가; (b) T 세포 증식의 증가; 및/또는 (c) 사이토카인 생산의 증가를 포함할 수 있다.
- [0309] 일부 실시형태에서, 본 발명은 표 2에 개시된 쥐 단클론 항체 STC613, 표 4에 개시된 쥐 단클론 항체 STC626, 또는 표 6에 개시된 쥐 단클론 항체 STC635의 VH 또는 VL 도메인을 포함하는 항원 결합 단편을 가진 항-당화된 BTLA 항체의 치료 용도를 제공한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 표 2에 개시된 쥐 단클론 항체 STC613, 표 4에 개시된 쥐 단클론 항체 STC626, 또는 표 6에 개시된 쥐 단클론 항체 STC635의 VH 및 VL 도메인 둘 모두를 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 표 2에 개시된 쥐 단클론 항체 STC613, 표 4에 개시된 쥐 단클론 항체 STC626, 또는 표 6에 개시된 쥐 단클론 항체 STC635의 VH CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 하나 이상의 VH CDR을 포함하는 항-당화된 BTLA 항체의 치료 용도를 제공한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 표 2에 개시된 쥐 단클론 항체 STC613, 표 4에 개시된 쥐 단클론 항체 STC626, 또는 표 6에 개시된 쥐 단클론 항체 STC635의 VL CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 하나 이상의 VL CDR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 표 2에 개시된 쥐 단클론 항체 STC613, 표 4에 개시된 쥐 단클론 항체 STC626, 또는 표 6에 개시된 쥐 단클론 항체 STC635의 적어도 하나의 VH CDR 및 적어도 하나의 VL CDR을 포함한다.
- [0310] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 BTLA 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으

로 차단하는 항-당화된 BTLA 항체의 치료 용도를 제공한다. BTLA 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC613의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 BTLA의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항-당화된 BTLA 항체의 치료 용도를 제공한다. BTLA 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC613의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, BTLA 에피토프는 서열 번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 또는 169의 아미노산 서열의 적어도 5개 연속 아미노산을 가진다.

[0311] 본 발명은 또한 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체의 치료 용도를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-당화된 BTLA 항체는 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 위치 N75, N94, N110 또는 그의 임의의 조합에서 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 위치 N75에서 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 위치 N94에서 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 위치 N110에서 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 위치 N75 및 N94에서 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 위치 N75 및 N110에서 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 위치 N94 및 N110에서 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-당화된 BTLA 항체는 위치 N75, N94 및 N110에서 당화된 BTLA에 특이적으로 결합한다.

[0312] 일부 양태에서, 실시형태의 폴리펩티드 또는 항체(예를 들어, 당화된 BTLA 폴리펩티드 또는 STC613, STC626, 또는 STC635와 같은, 당화된 BTLA에 결합하는 항체)는 암을 치료하기 위해 투여될 수 있다. 본 치료 방법이 유용한 암은 임의의 악성 세포 타입, 예를 들어, 고형 종양 또는 혈액 종양에서 발견되는 것들을 포함한다. 예시적인 고형 종양은 췌장, 결장, 맹장, 위, 뇌, 머리, 목, 난소, 신장, 후두, 육종, 폐, 방광, 흑색종, 전립선, 및 유방으로 이루어지는 군으로부터 선택된 기관의 종양을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 혈액 종양은 골수종양, T 또는 B 세포 악성종양, 백혈병, 림프종, 아세포종, 골수종 등의 종양을 포함한다. 본 발명에서 제공되는 방법을 이용하여 치료될 수 있는 암의 추가의 예는 암종, 림프종, 아세포종, 육종, 백혈병, 편평 세포암, 폐암(소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐선암 및 폐의 편평암종 포함), 복막의 암, 간세포암, 위암(위장암 및 위장관 기질 암 포함), 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 다양한 타입의 두경부암, 흑색종, 표재 확산 흑색종, 흑색점 악성 흑색종(lentigo malignant melanoma), 말단 흑자 흑색종(acral lentiginous melanomas), 결절성 흑색종, 및 B-세포 림프종(저 등급/여포성 비호지킨 림프종(NHL); 소형 림프구성(SL) NHL; 중 등급/여포성 NHL; 중 등급 미만성 NHL; 고 등급 면역모세포 NHL; 고 등급 림프아구 NHL; 고 등급 작은 비절개 세포(small non-cleaved cell) NHL; 거대 종양(bulky disease) NHL; 외투세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발덴스트롬 마크로글로블린혈증 포함), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 모양 세포 백혈병, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병(AML) 및 만성 골수아구성 백혈병을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0313] 암은 구체적으로 하기의 조직학적 타입 중 임의의 것일 수 있으나 이들로 제한되지 않는다: 악성 신생물; 암종; 미분화 암종; 거대 및 방추 세포 암종; 소세포 암종; 유두모양 암종; 편평 세포 암종; 림프상피(lymphoepithelial) 암종; 기저 세포 암종; 섬모기질(pilomatrix) 암종; 이행상피(transitional cell) 암종; 유두모양 이행상피 암종; 선암종; 악성 가스트린종; 담관암; 간세포 암종; 결합된 간세포 암종과 담관암; 육주상 선암종(trabecular adenocarcinoma); 샘암종; 선종 폴립에서의 선암종; 선암종, 가족성 대장 폴립증; 고형 암종; 악성 유암종(carcinoid tumor, malignant); 세기관지-폐포(branchiolo-alveolar) 선암종; 유두모양 선암종; 색소형성(chromophobe) 암종; 호산성(acidophil) 암종; 호산세포(oxyphilic) 선암종; 호염기성세포(basophil) 암종; 투명 세포 선암종; 과립 세포 암종; 여포성 선암종; 유두모양 및 여포성 선암종; 비캡슐화 경화성 암종(nonencapsulating sclerosing carcinoma); 부신 피질 암종; 자궁내막양 난소암; 피부 부속기 암종; 아포크린 선암종; 피지샘 선암종; 이구선 선암종; 점액표피모양 암종; 낭선암종; 유두모양 낭선암종; 유두모양 장액성 낭선암종; 점액 낭선암종; 점액 선암종; 반지세포 암종; 침윤성 관 암종; 수질 암종; 소엽암; 염증성 암종; 유방 파제트병(paget's disease, mammary); 샘파리세포 암종; 선편평세포 암종; 편평상피화생을 가진 선암종; 악성 흉선종; 악성 난소 기질 종양; 악성 난포막종(thecoma, malignant); 악성 과립막세포 종양; 악성 남성 세포종; 세르톨리 세포 암종; 악성 간질 세포 종양; 악성 지질 세포 종양; 악성 부신경절종; 악성 유방외 부신경절종(extra-mammary paraganglioma, malignant); 갈색세포종; 사구맥관육종(glomangiosarcoma); 악성 흑색종; 무멜라닌 흑색종(amelanotic melanoma); 표재 확산 흑색종; 거대 색소 모반에서의 악성 흑색종; 유상피 세포 흑색종; 악성 청색 모반; 육종; 섬유육종; 악성 섬유성 조직구종; 점액육종; 지방육종; 평활근육종; 횡문근육종; 배아형 횡문근육종; 포상형문근육종; 기질 육종; 악성 혼합종양; 뮐러관 혼합 종양(mullerian mixed



tumor); 신아세포종; 간아세포종; 암육종; 악성 중간엽종; 악성 브레너 종양(brenner tumor, malignant); 악성  
 엽상 종양; 활막 육종; 악성 중피종; 미분화배세포종; 태생기 암종; 악성 기형종; 악성 난소갑상선종(struma  
 ovarii, malignant); 융모막암종; 악성 증진종; 혈관육종; 악성 혈관내피종; 카포시 육종; 악성  
 혈관주위세포종; 림프관육종; 골육종; 측피질 골육종(juxtacortical osteosarcoma); 연골육종; 악성 연골아세포  
 종; 중간엽 연골육종; 골거대세포종양; 유잉 육종; 악성 치원성 종양; 법랑아세포 치원성육종(ameloblastic  
 odontosarcoma); 악성 사기질모세포종; 사기질모세포 섬유육종; 악성 송과체종양; 척삭종; 악성 신경교종; 상의  
 세포종; 성상세포종; 원형질성 성상세포종(protoplasmic astrocytoma); 원섬유성 성상세포종; 성아세포종; 교모  
 세포종; 뿔피교종; 회소돌기아교모세포종(oligodendroblastoma); 원시 신경외배엽 종양(primitive  
 neuroectodermal); 소뇌 육종(cerebellar sarcoma); 신경절아세포종; 신경아세포종; 망막아세포종; 후각 신경  
 성 종양(olfactory neurogenic tumor); 악성 뇌수막종; 신경섬유육종; 악성 신경초종; 악성 파립 세포 종양; 악  
 성 림프종; 호지킨병; 호지킨스(hodgkin's); 과락아종; 악성 림프종, 소형 림프구성; 악성 림프종, 거대  
 세포, 미만성(malignant lymphoma, large cell, diffuse); 악성 림프종, 여포성; 균상식육종; 기타 명시된 비  
 호지킨 림프종; 악성 조직구증; 다발성 골수종; 비만 세포 육종; 면역증식성 작은 창자 질병  
 (immunoproliferative small intestinal disease); 백혈병; 림프구성 백혈병; 형질구성 백혈병; 적백혈병; 림  
 프육종 세포 백혈병; 골수성 백혈병; 호염기구성 백혈병; 호산구성 백혈병; 단핵구성 백혈병; 비만 세포  
 백혈병; 거대핵세포성 백혈병(megakaryoblastic leukemia); 골수성 육종(myeloid sarcoma); 및 모양 세포 백혈  
 병.

[0314] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체 또는 폴리펩티드는 유방암, 폐암, 두경부암, 전립선암, 식도암, 기관암, 피부암, 뇌암, 간암, 방광암, 위암, 췌장암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 고환암, 결장암, 직장암 또는 피부암인 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0315] 폴리펩티드 또는 항체는 본 발명에서 다양한 양상으로 항종양제로서 사용될 수 있다. 구체적 실시형태에서, 본 발명은 항종양제로서 폴리펩티드 또는 항체를 이용하는 방법을 제공하며, 따라서 종양 세포 성장을 억제하기에 충분한 기간 동안 폴리펩티드 또는 항체의 치료적 유효량과 종양 세포 집단을 접촉시키는 것을 포함한다.

[0316] 리포솜내에 캡슐화, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 항체 또는 융합 단백질을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체-매개 엔도사이토시스(예를 들어, Wu and Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 참고), 레트로바이러스 또는 기타 벡터의 일부로서 핵산의 제작 등과 같은 다양한 전달 시스템이 또한 알려져 있으며, 항-당화된 BTLA 항체 또는 관련 분자, 또는 관련된 약학 조성물을 투여하기 위하여 사용될 수 있다.

[0317] 본 발명에서 제공되는 투여 방법은 비경구 투여(예를 들어, 피부내, 근육내, 복강내, 정맥내 및 피하), 경막외, 및 점막(예를 들어, 비내 및 구강 경로)에 의한, 주사를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체, 다른 분자 또는 약학 조성물은 근육내로, 정맥내로, 피하로, 정맥내로, 복강내로, 경구로, 근육내로, 피하로, 강내(intracavity), 경피로, 또는 진피로 투여된다. 조성물은 임의의 편리한 경로에 의해, 예를 들어, 주입 또는 볼루스 주사에 의해, 상피 또는 점막피부 내벽(mucocutaneous lining)(예를 들어, 구강 점막, 직장 및 장 점막, 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있으며, 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신성이거나 국소적일 수 있다. 또한, 폐 투여 또한 예를 들어, 흡입기 또는 네블라이저의 이용에 의해 그리고 에어로졸화 작용제를 이용한 제형의 이용에 의해 이용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 6,019,968호; 5,985,20호; 5,985,309호; 5,934,272호; 5,874,064호; 5,855,913호; 5,290,540호; 및 4,880,078호; 및 PCT 공개 WO 92/19244호; WO 97/32572호; WO 97/44013호; WO 98/31346호; 및 WO 99/66903호를 참고하며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체, 다른 분자 또는 약학 조성물은 치료를 필요로 하는 영역에 국소적으로 투여되며, 이는 예를 들어, 국소 주입에 의해, 주사에 의해, 또는 임플란트에 의해 이루어질 수 있으며, 상기 임플란트는 실라스틱 막(sialastic membrane)과 같은 막 또는 섬유를 비롯한, 다공성, 비다공성 또는 젤라틴성 물질이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체 또는 다른 분자를 투여할 경우, 항체 또는 다른 분자가 흡수하지 않는 물질을 이용하도록 주의한다.

[0318] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체 또는 폴리펩티드는 타겟팅된 전달을 위하여 리포솜으로 제형화된다. 리포솜은 수성상을 캡슐에 넣는 동심원으로 정돈된 인지질 이중층으로 이루어진 소낭이다. 리포솜은 전형적으로 다양한 타입의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제를 가진다. 리포솜의 구성성분은 생물막의 지질 배열과 유사한 이중층 형태로 배열된다. 리포솜은 부분적으로는 그들의 생체적합성, 낮은 면역원성 및 낮은 독성으로 인해 유용한 전달 비히클일 수 있다. 리포솜의 제조 방법은 본 기술분야에 알려져 있으며 본 발명에서 제공되며, 예를 들어, Epstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688; Hwang et al., 1980

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030-4; 미국 특허 4,485,045호 및 4,544,545호를 참고하며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0319] 본 발명은 또한 미국 특허 5,013,556호에 개시된 것과 같은, 연장된 혈청 반감기, 즉, 향상된 순환 시간을 가진 리포솜의 제조 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 방법에서 사용되는 리포솜은 순환계로부터 빠르게 제거되지 않으며, 즉, 단핵 식세포계(MPS)내로 섭취되지 않는다. 본 발명은 또한 담당자에게 알려진 일반적 방법을 이용하여 제조되는 입체적으로 안정된 리포솜을 제공한다. 입체적으로 안정된 리포솜은 부피가 크고 매우 가요성인 친수성 모이어티를 가진 지질 성분을 함유할 수 있으며, 이것은 혈청 단백질과의 리포솜의 원치않는 반응을 감소시키고, 혈청 성분과의 흡수인화를 감소시키고 MPS에 의한 인지를 감소시킨다. 입체적으로 안정된 리포솜은 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 제조될 수 있다. 리포솜 및 입체적으로 안정된 리포솜의 제조를 위하여, 예를 들어, Bendas *et al.*, 2001 *BioDrugs*, 15(4): 215-224; Allen *et al.*, 1987 *FEBS Lett.* 223: 42-6; Klivanov *et al.*, 1990 *FEBS Lett.*, 268: 235-7; Blum *et al.*, 1990, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1029: 91-7; Torchilin *et al.*, 1996, *J. Liposome Res.* 6: 99-116; Litzinger *et al.*, 1994, *Biochim. Biophys. Acta*, 1190: 99-107; Maruyama *et al.*, 1991, *Chem. Pharm. Bull.*, 39: 1620-2; Klivanov *et al.*, 1991, *Biochim Biophys Acta*, 1062: 142-8; Allen *et al.*, 1994, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13: 285-309를 참고하며, 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0320] 본 발명은 또한 예를 들어, 미국 특허 4,544,545호를 참고하는 특정 기관 타겟팅을 위해, 또는 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 2005/0074403호를 참고하는 특정 세포 타겟팅을 위해, 적응된 리포솜을 제공하며, 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 본 발명에서 제공되는 조성물과 방법에서 사용하기 위해 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG 유도체화된 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 이용한 역상 증발 방법에 의해 생성될 수 있다. 리포솜은 한정된 기공 크기의 필터를 통해 압출되어 원하는 직경을 가진 리포솜을 생성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편을 가진 분자, 예를 들어, F(ab')는 이전에 개시된 방법을 이용하여 리포솜에 접합될 수 있으며, 예를 들어, Martin *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288을 참고하며, 이것은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0321] 본 명세서에 개시된 인간화 또는 키메라 항체는 또한 면역리포솜으로서 제형화될 수 있다. 면역리포솜은 항체 또는 그의 단편이 공유적으로 또는 비공유적으로 리포솜 표면에 연결되는 리포솜 조성물을 말한다. 리포솜 표면의 항체의 연결 화학은 본 기술분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 미국 특허 6,787,153호; Allen *et al.*, 1995, *Stealth Liposomes*, Boca Roton: CRC Press, 233-44; Hansen *et al.*, 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1239: 133-144를 참고하며, 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 방법과 조성물에서 사용하기 위한 면역리포솜은 추가로 입체적으로 안정화된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시되는 인간화 항체는 리포솜의 지질 이중층내에 안정하게 뿌리내린 소수성 앵커에 공유적으로 또는 비공유적으로 연결된다. 소수성 앵커의 예는 인지질, 예를 들어, 포스파티딜에탄올아민(PE), 포스파티딜이노시톨(PI)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 항체와 소수성 앵커 사이의 공유적 연결을 이루기 위하여, 본 기술분야에 알려진 임의의 생화학적 전략이 이용될 수 있으며, 예를 들어, J. Thomas August ed., 1997, *Gene Therapy: Advances in Pharmacology*, Volume 40, Academic Press, San Diego, Calif., p. 399-435를 참고하며, 이것은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 예를 들어, 항체 분자 상의 작용기는 리포솜 연합된 소수성 앵커 상의 활성기와 반응할 수 있으며, 예를 들어, 항체 상의 리신 측쇄의 아미노기는 수용성 카르보디이미드로 활성화된, 리포솜 연합된 N-글루타릴-포스파티딜에탄올아민에 결합될 수 있거나; 또는 환원된 항체의 티올기는 피리디티오프로피오닐포스파티딜에탄올아민과 같은 티올 반응성 앵커를 통해 리포솜에 결합될 수 있다. 예를 들어, Dietrich *et al.*, 1996, *Biochemistry*, 35: 1100-1105; Loughrey *et al.*, 1987, *Biochim. Biophys. Acta*, 901: 157-160; Martin *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288; Martin *et al.*, 1981, *Biochemistry*, 20: 4429-38을 참고하며, 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 항-당화된 BTLA 항체를 갖는 면역리포솜 제형은, 그들이 타겟 세포, 즉, 항체가 결합하는 수용체를 포함하는 세포의 세포질에 활성 성분을 전달하기 때문에, 치료제로서 특히 효과적일 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역리포솜은 혈액, 특히 타겟 세포에서 증가된 반감기를 가질 수 있으며, 타겟 세포의 세포질내로 내부화되어, 치료제의 상실 또는 엔도리소솜 경로에 의한 분해를 피할 수 있다.

[0322] 본 발명에서 제공되는 면역리포솜 조성물은 하나 이상의 소낭 형성 지질, 본 발명의 항체 또는 다른 분자 또는 그의 단편 또는 유도체, 및 선택적으로, 친수성 중합체를 가질 수 있다. 소낭 형성 지질은 아실 쇠와 같은 두 개의 탄화수소 쇠 및 극성 헤드를 가진 지질일 수 있다. 소낭 형성 지질의 예는 인지질, 예를 들어, 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티드산, 포스파티딜이노시톨, 스펅고미엘린 및 당지질, 예를 들어, 세레

브로사이드, 강글리오사이드를 포함한다. 본 발명에서 제공되는 제형에서 유용한 부가적인 지질은 당업자에게 알려져 있으며 명세서내에 포함된다. 일부 실시형태에서, 면역리포좀 조성물은 추가로 친수성 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 및 강글리오사이드 GM1을 포함하며, 이것은 리포좀의 혈청 반감기를 증가시킨다. 친수성 중합체를 리포좀에 접합하는 방법은 본 기술분야에 잘 알려져 있으며 명세서 내에 포함된다. 부가적인 예시적인 면역리포좀 및 그들의 제조 방법은 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 2003/0044407호; PCT 국제 공개 WO 97/38731호, Vingerhede *et al.*, 1994, *Immunomethods*, 4: 259-72; Maruyama, 2000, *Biol. Pharm. Bull.* 23(7): 791-799; Abra *et al.*, 2002, *Journal of Liposome Research*, 12(1&2): 1-3; Park, 2002, *Bioscience Reports*, 22(2): 267-281; Bendas *et al.*, 2001 *BioDrugs*, 14(4): 215-224, J. Thomas August ed., 1997, *Gene Therapy: Advances in Pharmacology*, Volume 40, Academic Press, San Diego, Calif., p. 399-435에서 찾을 수 있으며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0323] 본 발명은 또한 항-당화된 BTLA 항체의 단위 용량을 환자에게 투여함으로써 암환자를 치료하는 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 당화된 BTLA 폴리펩티드의 단위 용량을 환자에게 투여함으로써 암환자를 치료하는 방법을 제공한다. 단위 용량은 개체를 위한 단위 투여량으로서 적합한 물리적으로 구별되는 단위를 말하며, 각 단위는 요구되는 희석제, 즉, 담체 또는 비히클과 연합되어 원하는 치료 효과를 생산하기 위해 계산된 활성 물질의 소정의 양을 함유한다.

[0324] 항체, 폴리펩티드 또는 조성물은 투약 제형과 양립가능한 방식으로 그리고 치료적 유효량으로 투여된다. 투여될 양은 치료될 개체, 개체의 시스템이 활성 성분을 이용하는 능력, 및 원하는 치료 효과의 정도에 의존한다. 투여되도록 요구되는 활성 성분의 정확한 양은 실무자의 판단에 의존하며 각 개인 개체에 특유하다. 하지만, 전신성 적용을 위해 적합한 투여량 범위는 본 명세서에 개시되며 투여 경로에 의존한다. 초기 및 부스터 투여를 위해 적합한 치료 계획이 또한 고려되며 전형적으로 초기 투여 후 후속 주사 또는 다른 투여에 의한 한 시간 이상 간격의 반복 투약에 의해서를 포함한다. 예시적인 다중 투여는 본 명세서에 개시되며 폴리펩티드 또는 항체의 연속적으로 높은 혈청 및 조직 수준을 유지하기 위하여 유용하다. 대안적으로, *생체내* 치료법을 위해 명시된 범위 내에서 혈액내 농도를 유지하기에 충분한 연속적 정맥내 주입이 고려된다.

[0325] 치료적 유효량은 원하는 효과를 이루기 위해 계산된 소정의 양이다. 일반적으로, 투여량은 환자의 연령, 병태, 성별 및 질병의 정도에 따라 변할 것이며 당업자가 결정할 수 있다. 투여량은 만약 합병증이 있으면 개별 의사에 의해 조정될 수 있다.

[0326] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체, 폴리펩티드, 또는 약학 조성물은 앰플 또는 봉지와 같은 밀봉 용기에 포장된다. 일 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체, 폴리펩티드 또는 약학 조성물은 밀봉 용기내의 건조 멸균 동결 분말 또는 무수 농축물로서 공급되며, 개체에게의 투여를 위해 적절한 농도로 물 또는 염수로 재구성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체, 폴리펩티드, 또는 약학 조성물은 적어도 5 mg, 더욱 바람직하게는 적어도 10 mg, 적어도 15 mg, 적어도 25 mg, 적어도 35 mg, 적어도 45 mg, 적어도 50 mg, 또는 적어도 75 mg의 단위 투여량으로 밀봉 용기 내의 건조 멸균 동결 분말로서 공급된다. 본 발명에서 제공되는 동결건조된 항체, 폴리펩티드, 또는 약학 조성물은 그들의 원래 용기에서 2 내지 8 °C에서 저장되어야 하며 재구성된 후 12시간 이내, 바람직하게는 6시간 이내, 5시간 이내, 3시간 이내, 또는 1시간 이내에 투여되어야 한다. 대안적 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체, 폴리펩티드, 또는 약학 조성물은 항체, 폴리펩티드 또는 약학 조성물의 양과 농도를 표시하는 밀봉 용기 내의 액체 형태로 공급된다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체, 폴리펩티드, 또는 약학 조성물의 액체 형태는 적어도 1 mg/ml, 더욱 바람직하게는 적어도 2.5 mg/ml, 적어도 5 mg/ml, 적어도 8 mg/ml, 적어도 10 mg/ml, 적어도 15 mg/ml, 적어도 25 mg/ml, 적어도 50 mg/ml, 적어도 100 mg/ml, 적어도 150 mg/ml, 적어도 200 mg/ml로 밀봉 용기내에 공급된다.

[0327] 제형에서 이용될 정확한 용량은 또한 투여 경로 및 병태의 심각성에 의존할 것이며, 실무자의 판단 및 각 환자의 환경에 따라 결정되어야 한다. 유효 용량은 *시험관내* 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유도된 용량-반응 곡선으로부터 추정될 수 있다. 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드의 경우, 환자에게 투여되는 투여량은 전형적으로 0.01 mg/kg 내지 100 mg/kg 환자 체중이다. 일부 실시형태에서, 환자에게 투여되는 투여량은 0.01 mg/kg 내지 20 mg/kg, 0.01 mg/kg 내지 10 mg/kg, 0.01 mg/kg 내지 5 mg/kg, 0.01 내지 2 mg/kg, 0.01 내지 1 mg/kg, 0.01 mg/kg 내지 0.75 mg/kg, 0.01 mg/kg 내지 0.5 mg/kg, 0.01 mg/kg 내지 0.25 mg/kg, 0.01 내지 0.15 mg/kg, 0.01 내지 0.10 mg/kg, 0.01 내지 0.05 mg/kg, 또는 0.01 내지 0.025 mg/kg 환자 체중이다. 구체적으로, 환자에게 투여되는 투여량은 0.2 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg 또는 10 mg/kg일 수 있다. 0.01 mg/kg만큼 낮은 용량이 주목할만한 약력학적 효과를 보여주는 것으로 예상된다. 0.10-1 mg/kg의 용량 수준이 가장 적절한 것으로 예상된다. 더 높은 용량(예를 들어, 1-30 mg/kg) 또한 활성일 것으로



예상될 수 있다. 일반적으로, 인간 항체는 외래 폴리펩티드에 대한 면역 반응으로 인해 다른 종으로부터의 항체보다 인간 신체내에서 더 긴 반감기를 갖는다. 따라서, 더 낮은 투여량의 인간 항체와 덜 빈번한 투여가 이루어질 수 있다. 또한, 본 발명에서 제공되는 항체 또는 폴리펩티드의 투여량 및 투여 빈도는 예를 들어, 지질화와 같은 변형에 의해 항체의 흡수와 조직 침투를 향상시킴으로써 감소될 수 있다.

[0328] 또 다른 실시형태에서, 조성물은 방출 제어(controlled release) 또는 서방성 시스템으로 전달될 수 있다. 당업자에게 알려진 임의의 기술을 이용하여 본 발명에서 제공되는 하나 이상의 항체, 분자 또는 약학 조성물을 가진 서방성 제형을 생산할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 4,526,938호; PCT 공개 WO 91/05548호; PCT 공개 WO 96/20698호; Ning *et al.*, *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189 (1996), Song *et al.*, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397 (1995); Cleek *et al.*, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854 (1997); 및 Lam *et al.*, *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760(1997)를 참고하며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 일 실시형태에서, 펌프가 방출 제어 시스템에서 사용될 수 있다(Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507; 및 Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574를 참고한다). 다른 실시형태에서, 중합체 물질이 항체 또는 폴리펩티드의 방출 제어를 이루기 위해 사용될 수 있으며(예를 들어, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, *J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61를 참고하며; 또한 Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105를 참고); 미국 특허 5,679,377호; 미국 특허 5,916,597호; 미국 특허 5,912,015호; 미국 특허 5,989,463호; 미국 특허 5,128,326호; PCT 공개 WO 99/15154호; 및 PCT 공개 WO 99/20253호 참고); 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0329] 서방성 제형에서 이용될 수 있는 중합체의 예는 폴리(-하이드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜리드(PLG), 폴리안하이드라이드, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알콜), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락티드(PLA), 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLGA), 및 폴리오르토에스테르를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 방출 제어 시스템은 치료 타겟(예를 들어, 폐)의 근처에 위치되어, 전신적 용량의 일부만을 요구할 수 있다(예를 들어, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)를 참고한다). 다른 실시형태에서, 방출 제어 임플란트로서 유용한 중합성 조성물은 그 전체가 참고로 본원에 포함되는 Dunn *et al.*(미국 특허 5,945,155호 참고)에 따라 이용된다. 중합체 시스템으로부터 생체활성 물질의 제자리 방출 제어의 치료 효과에 기초하여, 이식은 일반적으로 치료적 처리를 필요로 하는 환자의 신체 내의 어느 곳에서도 발생할 수 있다.

[0330] 다른 실시형태에서, 개체의 신체 내의 비중합성 임플란트가 약물 전달 시스템으로서 이용되는 비중합성 지속 전달 시스템이 이용된다. 신체내로 이식시에, 임플란트의 유기 용매는 조성물로부터 주변 조직 유체 내로 흩어지거나, 분산되거나 침출될 것이며, 비중합성 물질은 점진적으로 응집하거나 침전하여 고형의 미세다공성 매트릭스를 형성할 것이다(미국 특허 5,888,533호 참고). 방출 제어 시스템은 또한 Langer에 의한 리뷰에서 토의된다(1990, *Science* 249:1527-1533). 당업자에게 알려진 임의의 기술이 본 발명에서 제공되는 하나 이상의 치료제를 포함하는 서방성 제형을 생산하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 4,526,938호; 국제 공개 WO 91/05548호 및 WO 96/20698호; Ning *et al.*, 1996, *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189; Song *et al.*, 1995, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek *et al.*, 1997, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; 및 Lam *et al.*, 1997, *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760을 참고하며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0331] 본 발명은 또한 조성물이 본 발명에서 제공되는 항체 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 갖는 실시형태를 제공하며, 이때 적절한 핵산 발현 벡터의 일부로서 핵산을 제작하고 예를 들어, 레트로바이러스 벡터의 사용에 의해(미국 특허 4,980,286호 참고), 또는 직접 주사에 의해, 또는 미세입자 충격(예를 들어, 유전자총; 바이올리스틱(Biolistic), 듀퐁(Dupont)), 또는 지질 또는 세포-표면 수용체 또는 형질감염제로 코팅의 사용에 의해, 핵산이 세포내가 되도록 핵산을 투여함으로써, 또는 핵으로 들어가는 것으로 알려진 호메오박스-유사 펩티드에 핵산을 연결시켜 투여함으로써(예를 들어, Joliot *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868 참고), 핵산은 그의 인코딩된 항체 또는 다른 분자의 발현을 촉진하기 위하여 *생체내에서* 투여될 수 있다. 대안적으로, 핵산은 상동성 재조합에 의해 세포내로 도입되고 발현을 위해 숙주 세포 DNA내로 포함될 수 있다.

- [0332] 본 발명에서 제공되는 항체, 폴리펩티드 또는 약학 조성물의 치료적 유효량을 이용한 개체의 치료는 단일 치료 또는 일련의 치료들을 포함할 수 있다. 본 발명에서 제공되는 항체, 폴리펩티드 또는 약학 조성물은 국소적으로 진행된 또는 전이성 암을 가진 암 환자에서 종양 세포 성장을 억제하거나 암 세포를 죽이기 위한 것과 같은, 질병을 치료하기 위하여 전신성으로 또는 국소적으로 투여될 수 있는 것으로 생각된다. 그들은 정맥내로, 척추강 내로 및/또는 복강내로 투여될 수 있다. 그들은 단독으로 또는 항-증식성 약물과 조합되어 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, 그들은 수술 또는 다른 절차 전에 환자에서 암 크기(cancer load)를 감소시키기 위해 투여된다. 대안적으로, 그들은 남아 있는 암(예를 들어, 수술이 제거하지 못한 암)이 생존하지 못하도록 하기 위하여 수술 후에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 그들은 전이를 방지하기 위하여 원발성 암의 퇴행 후에 투여될 수 있다.
- [0333] **7.5. 조합 치료**
- [0334] 일부 실시형태에서, 실시형태의 조성물 및 방법은 제2 또는 부가적인 치료법과 조합된, 당화된 BTLA 폴리펩티드 또는 당화된 BTLA에 선택적으로 결합하는 항체의 투여에 관련된다. 그러한 치료법은 BTLA 또는 당화된 BTLA와 연합된 임의의 질병의 치료에서 적용될 수 있다. 예를 들어, 질병은 암일 수 있으며, 제2 치료법은 항암 또는 항-과증식 치료법이다.
- [0335] 조합 치료법을 비롯한 방법 및 조성물은 다른 항암 또는 항-과증식 치료법의 치료 또는 보호 효과를 향상시키거나, 및/또는 치료 효과를 증가시킨다. 치료 및 예방 방법과 조성물은 암세포의 사멸 및/또는 세포 과증식의 억제와 같은 원하는 효과를 이루기에 효과적인 조합된 양으로 제공될 수 있다. 이 과정은 폴리펩티드 또는 항체 및 제2 치료법의 투여에 관련될 수 있다. 제2 치료법은 직접적인 세포독성 효과를 갖거나 갖지 않을 수 있다. 예를 들어, 제2 치료법은 직접적인 세포독성 효과를 갖지 않고 면역계를 상향조절하는 작용제일 수 있다. 조직, 종양 또는 세포는 작용제 중 하나 이상(예를 들어, 항체 또는 항암제)을 포함하는 하나 이상의 조성물 또는 약리학적 제형(들)에 노출될 수 있거나, 또는 조직, 종양 및/또는 세포를 둘 이상의 구별되는 조성물 또는 제형과 노출시킴으로써 노출될 수 있으며, 이때 하나의 조성물은 1) 폴리펩티드 또는 항체, 2) 항암제 또는 3) 폴리펩티드 또는 항체와 항암제 둘 모두를 제공한다. 또한, 그러한 조합 치료법은 화학요법, 방사선요법, 수술요법 또는 면역요법과 함께 이용될 수 있다.
- [0336] 세포에 적용될 경우, 용어 "접촉되다" 및 "노출되다"는 치료 폴리펩티드 또는 항체 및 화학요법 또는 방사선요법 작용제가 타겟 세포에 전달되거나 타겟 세포에 직접 인접하여 위치되는 과정을 설명하기 위하여 본 명세서에서 사용된다. 세포 사멸을 이루기 위하여, 예를 들어, 두 작용제는 모두 세포를 사멸시키거나 세포 분열을 방지하기에 효과적인 조합된 양으로 세포에 전달된다.
- [0337] 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드는 제2 또는 추가적인 항암 치료에 대하여 그 전에, 그 동안에, 그 후에, 또는 다양한 조합으로 투여될 수 있다. 투여는 동시에부터 수분 내지 수일 내지 수주까지의 범위의 간격일 수 있다. 항체 또는 폴리펩티드가 항암제와 별도로 환자에게 제공되는 실시형태에서는, 일반적으로 각각의 전달 시간 사이에 유의한 기간이 경과하지 않아, 두 화합물이 여전히 환자에게 유익하게 조합된 효과를 나타낼 수 있도록 할 것이다. 그러한 경우, 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드 및 제2 치료법은 서로 약 12 내지 24 또는 72 h 이내에 그리고 더욱 특히 서로 약 6-12 h 이내에 환자에게 제공될 수 있는 것으로 생각된다. 일부 상황에서는 치료를 위한 시간이 상당히 연장되어 각 투여 사이에 수일(2, 3, 4, 5, 6, 또는 7) 내지 수주(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8)가 경과할 수 있다.
- [0338] 일부 실시형태에서, 치료 과정은 1-90일 이상동안 지속될 수 있다(이러한 범위는 그 사이에 있는 일수를 포함한다). 한 가지 작용제는 제1일 내지 제90일(이러한 범위는 그 사이에 있는 일수를 포함함) 또는 그의 임의의 조합 중 어느 날에 주어질 수 있고 다른 작용제는 제1일 내지 제90일(이러한 범위는 그 사이에 있는 일수를 포함함) 또는 그의 임의의 조합 중 어느 날에 주어지는 것으로 생각된다. 하루(24-시간) 이내에, 환자에게 작용제(들)의 1회 투여 또는 다수 투여가 주어질 수 있다. 또한, 치료 과정 후, 항암 치료가 투여되지 않는 기간이 있는 것으로 생각된다. 이 기간은 환자의 병태, 예를 들어, 그들의 예후, 강도, 건강 등에 따라, 1-7 일, 및/또는 1-5 주, 및/또는 1-12 개월 이상(이러한 범위는 그 사이에 오는 일수를 포함함) 지속될 수 있다. 치료 사이클은 필요에 따라 반복될 수 있다.
- [0339] 다양한 조합이 이용될 수 있다. 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드를 "A"로 그리고 제2 항암 치료법을 "B"로 하는 치료의 일부 예가 하기에 열거된다:
- [0340] A/B/A    B/A/B    B/B/A    A/A/B    A/B/B    B/A/A    A/B/B/B    B/A/B/B    B/B/B/A    B/B/A/B    A/A/B/B

A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0341] 제2 치료법과 조합된, 본 발명에서 제공되는 임의의 항체, 폴리펩티드 또는 약학 조성물의 환자에의 투여는 만일 있다면 제2 치료법의 독성을 고려하여, 그러한 제2 치료법의 투여를 위한 일반적인 프로토콜을 따를 것이다. 따라서, 일부 실시형태에서는 병용 요법에 기인하는 독성을 모니터링하는 단계가 있다.

[0342] *화학요법*

[0343] 광범위한 화학요법제가 제2 치료법으로서 본 실시형태에 따라 사용될 수 있다. 화학요법제는 암 치료에서 투여되는 화합물 또는 조성물일 수 있다. 이들 작용제 또는 약물은 세포내에서의 그들의 활성 양식에 의해, 예를 들어, 그들이 세포 사이클에 영향을 주는지 그리고 무슨 단계에서 영향을 주는지에 의해 분류될 수 있다. 대안적으로, 작용제는 DNA를 직접적으로 가교하거나, DNA 내로 삽입되거나, 또는 핵산 합성에 영향을 줌으로써 염색체 및 유사분열 이상을 유도하는 그 능력에 기초하여 특성규명될 수 있다.

[0344] 화학요법제의 예는 알킬화제, 예를 들어, 티오테파(thiotepa) 및 시클로포스파미드; 알킬 설포네이트, 예를 들어, 부설판, 임프로설판(improsulfan), 및 피포설판(piposulfan); 아지리딘(aziridine), 예를 들어, 벤조도파(benzodopa), 카르보쿠온(carboquone), 메투레도파(meturedopa), 및 우레도파(uredopa); 에틸렌이민, 및 알트레타민(altretamine), 트리에틸렌멜라민(triethylenemelamine), 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드, 및 트리메틸올로멜라민을 비롯한 메틸아멜라민(methylamelamine); 아세토제닌(acetogenin)(특히 불라타신(bullatacin) 및 불라타시논(bullatacinone)); 캄토테신(합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴(callystatin); CC-1065(그의 아도젤레신(adozelesin), 카르젤레신(carzelesin) 및 비젤레신(bizelesin) 합성 유사체 포함); 크립토피신(cryptophycin)(특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 도라스타틴; 듀오카르마이신(duocarmycin)(합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 에류테로빈(eleutherobin); 판크라티스타틴(pancratistatin); 사르코딕틴(sarcodictyin); 스폰지스타틴(spongistatin); 니트로젠 머스타드(nitrogen mustard), 예를 들어, 클로람부실, 클로르나파진(chlornaphazine), 콜로포스파미드(cholophosphamide), 에스트라무스틴(estramustine), 이포스파미드(ifosfamide), 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜파란, 노벰비친(novembichin), 페네스테린(phenesterine), 프레드니무스틴(prednimustine), 트로포스파미드(trofosfamide), 및 우라실 머스타드; 니트로소우레아(nitrosurea), 예를 들어, 카르무스틴, 클로로조토신(chlorozotocin), 포테무스틴(fotemustine), 로무스틴, 니무스틴(nimustine), 및 라닌무스틴(ranimustine); 항생제, 예를 들어, 에네딘(enediye) 항생제(예를 들어, 칼리케미신, 특히 칼리케미신 감마1I 및 칼리케미신 오메가1I); 디네미신(dynemicin) A를 비롯한 디네미신; 클로드로네이트(clodronate)와 같은 비스포스포네이트; 에스페라미신(esperamicin); 및 네오카르지노스타틴(neocarzinostatin) 발색단 및 관련 색소단백질 에네딘인 항생제 발색단, 아클라시노마이신(aclacinomycin), 액티노마이신, 아우트라르나이신(authrarnycin), 아자세린(azaserine), 블레오마이신(bleomycin), 캅티노마이신(cactinomycin), 카라비신(carabycin), 카르미노마이신(carminomycin), 카르지노필린(carzinophilin), 크로모마이시니스(chromomycinis), 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신(detorubicin), 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신(모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피콜리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신(marcellomycin), 미토마이신, 예를 들어, 미토마이신 C, 미코페놀산, 노가라르니신(nogalarnycin), 올리보마이신(olivomycin), 페플로마이신(peplomycin), 포트피로마이신(potfiromycin), 퓨로마이신, 쿠엘라마이신(quelamycin), 로도루비신(rodorubicin), 스트렙토니그린(streptonigrin), 스트렙토조신(streptozocin), 투베르시딘(tubercidin), 우베니멕스(ubenimex), 지노스타틴(zinostatin), 및 조루비신(zorubicin); 항-대사물, 예를 들어, 메토틱렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어, 데노프테린(denopterine), 프테로프테린(pteropterin), 및 트리메톱렉세이트(trimetrexate); 퓨린 유사체, 예를 들어, 플루다라빈(fludarabine), 6-머캅토피린, 티아미프린(thiamiprine), 및 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어, 안시타빈(ancitabine), 아자시타딘(azacitidine), 6-아자우리딘(azauridine), 카르모푸르(carmofur), 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘(doxifluridine), 에노시타빈(enocitabine), 및 플록스우리딘(floxuridine); 안드로젠, 예를 들어, 카루스테론(calusterone), 드로모스타노론(dromostanolone) 프로피오네이트, 에피티오스타놀(epitioastanol), 메피티오스탄(mepitioastane), 및 테스토락톤(testolactone); 항-부신(항-adrenals), 예를 들어, 미토탄(mitotane) 및 트리로스탄(trilostane); 엽산 보충제, 예를 들어, 프로린산(frolic acid); 아세그라톤(aceglatone); 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실(eniluracil); 암사크린(amsacrine); 베스트라부실(bestrabucil); 비산트렌(bisantrene); 에다트렉세이트(edatraxate); 데포파민(defofamine); 데메콜신(demecolcine); 디아지쿠온(diaziqune); 엘포르미틴(elformithine); 엘립티늄 아세테이트(eliptinium acetate); 에포티론(epothilone); 에토글루시드

(etoglucid); 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난(lentinan); 로니다이닌(lonidainine); 메이탄시노이드, 예를 들어, 메이탄신 및 안사미토신(ansamitocin); 미토구아존(mitoguazone); 미토잔트론; 모피단몰(mopidanmol); 니트라에린(nitraerine); 펜토스타틴(pentostatin); 페나메트(phenamet); 피라루비신(pirarubicin); 로소잔트론(losoxantrone); 포도필린산( podophyllinic acid); 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진(proc carbazine); PSK 다당류 복합체; 라족산(razoxane); 리족신(rhizoxin); 시조피란(sizofiran); 스피로 게르마늄(spirogermanium); 테누아존산(tenuazonic acid); 트리아지쿠온(triaziquone); 2,2',2"-트리클로로트리 에틸아민; 트리코테센(trichothecene)(특히, T-2 독소, 베라쿠린(verracurin) A, 로리딘(roridin) A 및 안구 이딘( anguidine)); 우레탄; 빈데신; 다카르바진(dacarbazine); 만노무스틴( mannomustine); 미토브로니톨(mitobronitol); 미토락톨(mitolactol); 피포브로만(pipobroman); 가시토신(gacytosine); 아라비노시드(arabinoside)("Ara-C"); 시클로포스파미드; 탁소이드(taxoid), 예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탁셀 켐시타빈; 6-티오구아닌; 머캡토피린; 백금 배위 착물, 예를 들어, 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미토잔트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 노반트론(novantrone); 테니포시드; 에다트렉세이트(edatrexate); 다우노마이신; 아미노프테린(aminopterin); 젤로다(xeloda); 이반드로네이트(ibandronate); 이리노테칸(irinotecan)(예를 들어, CPT-11); 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노이드, 예를 들어, 레티노산; 카페시타빈; 카르보플라틴, 프로카르바진, 플리코마이(plicomycin), 켐시타비엔, 나벨빈(navelbine), 파르네실-단백질 트랜스퍼라제 억제제, 트랜스백금(transplatinum), 및 상기 중 임의의 것의 약학적 허용 염, 산, 또는 유도체를 포함한다.

[0345] 방사선요법

[0346] 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물과 조합되어 사용될 수 있는 다른 종래의 항암 치료법은 방사선요법, 또는 방사선 치료법이다. 방사선요법은  $\gamma$ -선, X-선, 및/또는 종양 세포에의 방사성동위원소의 지시된 전달을 이용하는 것을 포함한다. 마이크로웨이브, 양자빔 조사(미국 특허 5,760,395호 및 4,870,287호; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함됨), 및 UV-조사와 같은 다른 형태의 DNA 손상 인자 또한 고려된다. 모든 이들 인자가 DNA에, DNA의 전구체에, DNA의 복제 및 회복에, 그리고 염색체의 조립 및 유지에 광범위한 손상을 일으킬 가능성이 높다.

[0347] 종양 미세환경은 종양에 침윤하여 면역 반응을 억제하기 위해 기능하는 조절 T 세포 및 골수-유래 억제자 세포의 존재로 인해 본질적으로 억제적이다. 또한, T 세포 및 항원 제시 세포(APC) 상의 일부 억제성 분자의 발현은 효과적인 면역 반응을 제한할 수 있다. 방사선은 종양 세포 어팍토시스, 노쇠, 자가포식(autophagy)의 유도를 통해 항-종양 효과를 매개하며, 일부 상황에서는 더욱 효과적인 면역 반응을 자극할 수 있다.

[0348] 압스코팔(abscopal) 효과는 원발성 종양의 타겟팅된 방사선이 방사선 필드에 있지 않은 원격 부위에서 항종양 반응을 유도하는 생리학적 과정이다. 압스코팔 효과를 책임지는 기전은 면역 매개인 것으로 생각되며 T 세포에의 종양 항원의 항상된 제시 및 국소 및 전신 면역 반응을 자극하는 사이토카인 및 다른 프로염증성 인자의 방출에 관련된다. 압스코팔 효과는 방사선 치료를 받는 원발성 종양으로부터 멀리 위치한 종양에 영향을 주므로, 압스코팔 효과를 촉발할 수 있는 작용제는 종종 그들이 신체 내의 제2 부위로 퍼지면 치료하기 더 어려운 전이성 종양 치료에서 특히 유익할 것이다.

[0349] 본 명세서에 개시된 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드는 국소 및 전신 면역 반응을 자극할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체, 폴리펩티드 또는 약학 조성물의 치료적 유효량은 상승적 압스코팔 효과를 이루기 위하여 방사선요법 전에, 동시에 또는 후에 투여된다.

[0350] 일부 실시형태에서, 숙주에서 종양을 조사에 효과적으로 감작시키는 본 명세서에 개시된 항체, 폴리펩티드 또는 약학 조성물의 치료적 유효량이 투여된다. 조사는 이온화 방사선 및 특히 감마선일 수 있다. 일부 실시형태에서, 감마선은 선형 가속화기에 의해 또는 방사성핵종에 의해 방출된다. 방사성핵종에 의한 종양의 조사는 외부적이거나 내부적일 수 있다.

[0351] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체, 폴리펩티드 또는 약학 조성물의 투여는 종양의 조사 전 최대 1개월, 특히 최대 10일 또는 1주일에 시작한다. 부가적으로, 종양의 조사는 본 명세서에 개시된 항체, 폴리펩티드, 또는 약학 조성물의 투여가 첫번째 및 마지막 조사 세션 사이의 간격에서 유지되도록 분획화된다.

[0352] 조사는 또한 X-선 방사선일 수 있다. X-선을 위한 선량 범위는 연장된 기간(3 내지 4주)을 위한 50 내지 200 렌트겐의 일일 선량에서 2000 내지 6000 렌트겐의 단일 선량까지이다. 방사성동위원소를 위한 선량 범위는 광범위하게 변하며, 동위원소의 반감기, 방출되는 방사선의 강도와 타입, 및 신생물 세포에 의한 흡수에 의존한다.



- [0353] 면역요법
- [0354] 당업자는 면역요법이 본 실시형태의 방법과 조합되거나 함께 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 암치료 맥락에서, 면역요법제는 일반적으로 암세포를 타겟팅하고 파괴하기 위하여 면역 이펙터 세포 및 분자의 사용에 의존한다. 리툭시맙(리툭산(RITUXAN)®)은 그러한 예이다. 예를 들어, 이피루미맙과 같은 면역관문 억제제(Checkpoint inhibitor)는 다른 그러한 예이다. 면역 이펙터는 예를 들어, 종양 세포 표면 상의 일부 마커에 대해 특이적인 항체일 수 있다. 항체 단독이 치료법의 이펙터로서 작용할 수 있거나, 또는 항체는 실제로 세포 사멸을 일으키기 위하여 다른 세포를 모집할 수 있다. 항체는 또한 약물 또는 독소(예를 들어, 화학요법제, 방사성핵종, 리신 A쇄, 콜레라 독소, 백일해 독소)에 접합되고 단지 타겟팅제로서 작용할 수 있다. 대안적으로, 이펙터는 종양 세포 타겟과 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 표면 분자를 보유한 림프구일 수 있다. 다양한 이펙터 세포는 세포독성 T 세포 및 NK 세포를 포함한다.
- [0355] 면역요법의 일 양태에서, 종양 세포는 타겟팅을 받아들일 수 있는, 즉, 대부분의 다른 세포에는 존재하지 않는, 일부 마커를 보유한다. 많은 종양 마커가 존재하며 이들 중 어느 것이든 본 실시형태의 맥락에서 타겟팅을 위해 적합할 수 있다. 일반적인 종양 마커는 CD20, 암배아 항원, 티로시나제(p97), gp68, TAG-72, HMFG, 시알릴 루이스(Sialyl Lewis) 항원, MucA, MucB, PLAP, 라미닌 수용체, erb B, 및 p155를 포함한다. 면역요법의 대안적 양태는 항암 효과를 면역 자극 효과와 조합하는 것이다. 사이토카인, 예를 들어, IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, 감마-IFN, 케모카인, 예를 들어, MIP-1, MCP-1, IL-8, 및 성장 인자, 예를 들어, FLT3 리간드를 비롯한 면역 자극 분자가 또한 존재한다.
- [0356] 현재 조사중이거나 사용중인 면역요법의 예는 면역 아주반트, 예를 들어, *마이코박테리움 보비스*(*Mycobacterium bovis*), *플라스모듐 팔시파룸*(*Plasmodium falciparum*), 디니트로클로로벤젠 및 방향족 화합물(미국 특허 5,801,005호 및 5,739,169호; Hui and Hashimoto, *Infect Immun.*, 66(11):5329-36(1998); Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 66(11):5329-36(1998)); 사이토카인 요법, 예를 들어, 인터페론  $\alpha$ ,  $\beta$ , 및  $\gamma$ , IL-1, GM-CSF, 및 TNF(Bukowski *et al.*, *Clin Cancer Res.*, 4(10):2337-47 (1998); Davidson *et al.*, *J Immunother.*, 21(5):389-98(1998); Hellstrand *et al.*, *Acta Oncol.* 37(4):347-53(1998)); 유전자 치료법, 예를 들어, TNF, IL-1, IL-2, 및 p53(Qin *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(24):14411-6(1998); Austin-Ward and Villaseca, *Rev Med Chil*, 126(7):838-45 (1998); 미국 특허 5,830,880호 및 5,846,945호); 및 단클론 항체, 예를 들어, 항-PD1, 항-PDL1, 항-CD20, 항-강글리오사이드 GM2, 및 항-p185(Topalian *et al.*, *The New England journal of medicine*, 366:2443-2454 (2012); Brahmer *et al.*, *The New England journal of medicine* 366:2455-2465 (2012); Hollander, *Front Immunol* (2012): 3:3. doi: 10.3389/fimmu.2012.00003; Hanibuchi *et al.*, *Int J Cancer*, 78(4):480-5(1998); 미국 특허 5,824,311호)이며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 한 가지 이상의 항암 치료법이 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드에 관련되는 본 명세서에 개시된 치료법에서 이용될 수 있는 것으로 생각된다.
- [0357] 수술
- [0358] 암환자의 대략 60%가 예방적, 진단성 또는 단계화(staging), 치유성(curative) 및 임시적 수술을 포함하는 일부 타입의 수술을 거칠 것이다. 치유성 수술은 암 조직의 전부 또는 일부가 물리적으로 제거, 절제 및/또는 파괴되는 절제술을 포함하며 본 실시형태의 치료, 화학요법, 방사선요법, 호르몬요법, 유전자 치료법, 면역요법 및/또는 대안적 치료법과 같은 다른 치료법과 함께 이용될 수 있다. 종양 절제술은 종양의 적어도 일부의 물리적 제거를 말한다. 종양 절제술에 더하여, 수술에 의한 치료는 레이저 수술, 냉동요법, 전기수술 및 현미경-제어 수술(모스 수술(Mohs' surgery))을 포함한다.
- [0359] 암 세포, 조직, 또는 종양의 전부 또는 일부의 절제시, 신체에 동공이 형성될 수 있다. 치료는 부가적인 항암 치료법을 이용한 그 영역의 관류, 직접 주사 또는 국소 적용에 의해 이루어질 수 있다. 그러한 치료는 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일마다, 또는 1, 2, 3, 4, 및 5주마다 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월마다 반복될 수 있다. 이들 치료는 또한 변하는 투여량일 수 있다.
- [0360] 기타 작용제
- [0361] 치료의 치료적 효능을 개선하기 위하여 본 발명의 실시형태의 일부 양태와 조합되어 다른 작용제가 사용될 수 있는 것으로 생각된다. 이들 추가의 작용제는 세포 표면 수용체 및 갭 연결부(GAP junction)의 상호조절을 일으키는 작용제, 세포증식억제 및 분화 작용제, 세포 부착 억제제, 어팍토시스 유도제에 대한 과증식 세포의 민감성을 증가시키는 작용제, 또는 다른 생물 작용제를 포함한다. 갭 연결부의 수를 상승시켜 세포간 시그널링을 증



가시키는 것은 이웃한 과증식 세포 집단에 대한 항-과증식 효과를 증가시킬 수 있다. 다른 실시형태에서, 세포 증식억제 또는 분화 작용제는 치료의 항-과증식 효능을 개선하기 위하여 본 발명 실시형태의 일부 양태와 조합되어 사용될 수 있다. 세포 부착 억제제는 본 발명 실시형태의 효능을 개선하는 것으로 생각된다. 세포 부착 억제제의 예는 국소 접착 키나제(focal adhesion kinase)(FAK) 억제제 및 로바스타틴이다. 항체 c225와 같은, 어팍토시스에 대한 과증식 세포의 민감성을 증가시키는 다른 작용제가 치료 효능을 개선하기 위하여 본 발명 실시형태의 일부 양태와 조합되어 이용될 수 있음이 추가로 고려된다.

## 7.6. 키트 및 진단제

다양한 양태에서, 본 발명은 치료제 및/또는 다른 치료 및 전달 작용제를 함유하는 키트를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 치료법의 제조 및/또는 투여를 위한 키트가 고려된다. 키트는 본 발명에서 제공되는 약학 조성물 중 임의의 것을 함유하는 하나 이상의 밀봉 바이알을 포함할 수 있다. 키트는 예를 들어, 적어도 항-당화된 BTLA 항체 또는 당화된 BTLA 폴리펩티드, 및 본 발명에서 제공되는 성분을 제조, 제형화 및/또는 투여하거나 본 발명에서 제공되는 방법의 하나 이상의 단계를 수행하기 위한 시약을 포함할 수 있다.

일부 실시형태에서, 키트는 항-당화된 BTLA 항체 및 적어도 하나의 보조제를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 당화된 BTLA 폴리펩티드 및 적어도 하나의 보조제를 포함할 수 있다.

일부 실시형태에서, 키트는 제2 항암제를 추가로 포함한다. 제2 항암제는 화학요법제, 면역요법제, 호르몬치료제, 또는 사이토카인일 수 있다.

일부 실시형태에서, 키트는 또한 에펜도프 튜브, 분석 플레이트, 시린지, 병 또는 튜브와 같은, 키트의 성분과 반응하지 않는 용기인 적합한 용기 수단을 포함할 수 있다. 용기는 플라스틱 또는 유리와 같은 멸균가능한 물질로 만들어질 수 있다.

키트는 본 명세서에 개시된 방법의 절차적 단계를 설명하며 본 명세서에 개시된 것과 실질적으로 동일한 절차를 따르거나 당업자에게 알려진 설명서를 포함할 수 있다. 설명 정보는 컴퓨터를 이용하여 실행할 경우 본 발명에서 제공되는 항체 또는 폴리펩티드의 약학적 유효량 전달의 실제 또는 가상 절차의 디스플레이를 야기하는 기계 판독성 설명서를 함유한 컴퓨터 판독 매체내에 있을 수 있다. 키트는 또한 의약 또는 생물 제품의 제조, 사용 또는 판매를 관리하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 안내문을 포함할 수 있으며, 안내문은 인간 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매의 기관에 의한 승인을 반영한다.

## 8. 실시예

본 명세서에 개시된 다양한 실시형태의 특성과 사상을 실질적으로 변화시키지 않는 변형 또한 고려됨이 이해된다. 따라서, 하기의 실시예는 예시하기 위한 것이며 어떤 방식으로든 제한하고자 하는 것이 아니다.

### 실시예 1 - 당화된 BTLA-결합 항체의 생산

표준 기술을 이용하여(예를 들어, 래트에서 면역원으로서 당화된 에피토프를 포함하는 폴리펩티드를 주사함으로써(Aurand-Lions *et al.*, *Immunity*, 5, 391-405(1996))) 제조한 당화된 BTLA 폴리펩티드에 대한 단클론 항체 패널을 생산한다. 요약하면, 100 µg KLH 담체 단백질(키홀 림프 헤모시아닌, 피얼스(Pierce))에 결합하고 아쥬반트 S6322(시그마)와 혼합된 인간 당화된 BTLA 폴리펩티드를 암컷 위스터(Wister) 래트를 면역시키기 위하여 사용할 수 있다. 총합으로, 세 번의 주사가 9일마다 수행될 것이다. 인간 당화된 BTLA 폴리펩티드의 마지막 s.c. 주사 후 2일에, 배출 림프절로부터의 아세포(blasts)를 Sp2/0 세포에 융합시키고, 하이브리도마를 선정할 것이다. 인간 당화된 BTLA를 특이적으로 인지하는 단클론 항체의 생산에 대해 성장하는 클론을 ELISA에 의해 스크리닝한다. 양성 클론을 서브클로닝하고, 재스크리닝하고, 더 시험할 것이다. 항체를 제조사 설명서에 따라 단백질 G-세파로즈 컬럼(지이 헬스케어(GE HealthCare)) 상에서 정제한다. 단클론 항체를 이용하여 생체내 종양 그래프트 모델을 연구한다. 항체의 VH 및 VL 채를 시퀀싱하고 상보성 결정 영역(CDR)이 IMGT 넘버링 시스템에 의해 결정된다(Lefranc *et al.*, *Nuc Acids Res.*, 27:209-212 (1999)).

상기에 나타난 대로, 예를 들어, 인간 질병의 생체내 치료에서의 사용을 비롯한 소정의 목적을 위하여, 마우스 단클론 항체의 인간화 유도체를 이용하는 것이 바람직하다. 그러한 인간화 항체를 형성하기 위하여, 프레임워크 서열에서의 차이를 확인하기 위하여 마우스 단클론 항체의 프레임워크 서열("모" 서열)이 먼저 "수용체" 인간 항체 세트의 프레임워크 서열과 배열된다. 인간화는 모 서열과 수용체 간에 매칭되지 않는 프레임워크 잔기를 치환함으로써 이루어진다. 베르니에르(Vernier) 구역, VH/VL 채간 계면 또는 CDR 표준 클래스 결정 위치 내의 것과 같은 잠재적으로 중요한 위치에서의 치환은 장래의 역 돌연변이를 위해 분석되었다(Foote, J. *et al.*, J.

*Molec. Biol.* 224:487-499 (1992)를 참고한다).

- [0373] 보존된 도메인 데이터베이스(COD)(Marchler-Bauer, *et al.* (2011) *Nucleic Acids Res.* 39:D225-D229)를 이용하여 각 아미노산 쇠의 도메인 내용 및 각 도메인의 대략적인 경계를 결정할 수 있다. 가변 도메인 경계는 몇몇 일반적으로 사용되는 정의에 따른 CDR의 경계를 따라 정확하게 결정될 수 있다(Kabat, E. A. *et al.* (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242; Chothia, C. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Honegger, A. *et al.*, *J. Molec. Biol.* 309(3):657-670 (2001))
- [0374] 마우스 및 인간 생식세포 서열의 모 서열의 다중 배열은 MAFFT(Katoh, K. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 30:3059-3066 (2002))를 이용하여 생성되며 각 배열에서의 엔트리(entries)는 모 서열에 대한 서열 동일성에 따라 정리된다. 기준 세트는 100% 서열 동일성에서 모으고 불필요한 엔트리를 배제함으로써 유일한 서열 세트의 감소된다.
- [0375] 최적의 수용체 프레임워크 선정은 두 쇠의 프레임워크에 걸친 수용체에 대한 전체적인 모 항체 서열 동일성에 기초하지만; VH/VL 쇠간 계면을 구성하는 위치가 특히 관심대상이다. 부가적으로, CDR 중 5가지에 대해 정의된 표준 구조들의 별개 세트를 책임지는 CDR-루프 길이 및 CDR 위치(Chothia, C. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Martin, A. C. *et al.*, *J. Molec. Biol.* 263:800-815 (1996); Al-Lazinski, B. *et al.*, *J. Molec. Biol.* 273:927-948(1997))는, 어느 생식 세포 프레임워크가 동일한 계면 잔기 둘 모두를 가지며 유사한 CDR-루프 형태를 지지하는 것으로 알려지는지를 결정하기 위하여, 생식세포에 비교된다.
- [0376] 인간 생식세포의 모 항체의 서열 배열에 기초하여, 가장 가까운 매칭 엔트리가 확인된다. 바람직한 인간 생식세포의 선택은 하기 순서의 기준에 기초한다: (1) 프레임워크에 걸친 서열 동일성; (2) 동일하거나 양립성인 쇠간 계면 잔기; (3) 모 CDR 표준 형태를 가진 지지 루프; (4) 중쇄 및 경쇄 생식세포의 조합이 발현된 항체에서 발견됨; 및 (5) 제거되어야 하는 N-당화 부위의 존재.
- [0377] 인간화 항체의 Fv-영역의 구조적 모델이 생성된다. 전체 Fv 뿐만 아니라 FR 및 CDR을 위한 후보 구조적 주형 단편을, 타겟에의 그들의 서열 동일성, 및 용스트롬(Å) 단위의 해상도와 같은 주형 구조의 정량적 결정학적 척도에 기초하여 점수를 매기고, 순위를 매기고 항체 데이터베이스로부터 선택한다.
- [0378] FR 주형에 CDR을 구조적으로 배열하기 위하여, CDR의 어느 한 측상의 5 잔기를 CDR 주형에 포함시킨다. 단편의 배열은 중복 분절 및 생성된 구조적 서열 배열에 기초하여 생성된다. 배열을 따른 주형 단편을 모델러(MODELLER)(SalI, A. *et al.*; *J. Molec. Biol.* 234:779-815(1993))에 의해 프로세싱하였다. 이 프로토콜은 배열된 구조적 주형 세트로부터 유도된 형태적 역제를 생성한다. 제약을 충족한 구조의 앙상블이 공역 기울기(conjugate gradient) 및 모의 어닐링 최적화(simulated annealing optimization) 절차에 의해 생성된다. 모델 구조는 단백질 구조의 점수 및 형태적 제약의 충족으로부터 유도된, 에너지 점수에 기초하여 이 앙상블로부터 선택된다. 모델이 검사되고 타겟과 주형 사이에서 상이한 위치의 측쇄가 측쇄 최적화 알고리즘 및 최소화된 에너지를 이용하여 최적화된다. 시각화 및 계산 도구 묶음을 이용하여 CDR 형태 변이성, 국소 패킹(local packing) 및 표면 분석을 평가하여 하나 이상의 바람직한 모델을 선정한다.
- [0379] 모 항체의 구조적 모델이 제작되고 열등한 원자 패킹, 결합 길이, 결합 각 또는 이면 각에서의 변형과 같은 결함에 대해 검사된다. 이들 결함은 항체의 구조적 안정성에서 잠재적 문제를 나타낼 수 있다. 모델링 프로토콜은 그러한 결함을 최소화하고자 한다. 인간화 Fv의 초기 구조적 모델은 모든 안전한 치환(즉, 결합 친화성 또는 안정성에 영향을 주지 않는 치환) 및 신중한 치환(즉, 위치 치환이 이루어지지만 그 위치가 결합 친화성을 위해 중요할 수 있음)을 함유한다. 결합 친화성을 감소시키거나 안정성을 감소시킬 위험과 관련된 것으로 생각되는 위치에서의 치환은 변경되지 않는다. 주형 조사 및 선택은 모 항체의 밀접하게 매칭되는 변이체 모델이 아닌 우수한 독립 모델을 생성하기 위하여 모 주형 조사와 별도로 수행된다. 잠재적 치환의 평가가 수행될 때 모델은 바람직한 치환 및 역 돌연변이의 효과를 반영하기 위해 업데이트된다.
- [0380] 마우스 단클론 항체(mAb)를 본질적으로는 상술한 대로 인간 당화된 BTLA 폴리펩티드에 대해 생성시켰다. 요약하면, 표준 프로토콜에 따른 SP2/0 쥐 골수종 세포와 100 µg KLH 담체 단백질에 커플링된 인간 당화된 BTLA 폴리펩티드로 면역된 BALB/c 마우스로부터 분리된 비장 세포의 융합에 의해 BTLA에 대한 항체-생산 하이브리도마를 획득하였다. 융합 전에, 면역된 마우스로부터의 혈청을 FACS를 이용하여 면역원에의 결합에 대해 검증하였다. BTLA WT(완전히 당화됨)를 과발현하는 T293 세포를 비오티닌으로 태깅한 후 완전히 비당화된 BTLA를 과발현하는 T293 세포와 혼합하였다. 혼합된 세포를 BTLA에 대한 일차 항체와 항온처리하고 FITC와 접합된 이차 항체로 추

가로 세척하였다. 세척 후, 막결합된 당화된 또는 비당화된 BTLA에의 항체의 상대적 결합을 평가하기 위하여 형광 강도(MFI)를 측정하였다. 비당화된 BTLA에 비하여 당화된 BTLA에서 유의하게 더 높은 MFI를 나타낸 항체를 "당특이적" 항체로 확인하였다. STC601 내지 STC636으로 지정된 마우스 mAb를 생산하는 36개 하이브리도마를 비롯한 여러 단클론 항체-생산 하이브리도마를 생산하였다.

**실시예 2 - 당화된 BTLA-결합 항체의 이소타입결정**

STC601 내지 STC636 mAb의 이소타입을 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich) IS02 시그마 마우스 단클론 항체 이소타입팅 시약을 이용하여, 하이브리도마 상등액의 ELISA 시험에 의해 결정하였다.

요약하면, 100  $\mu$ L 하이브리도마 상등액(1:20) 또는 정제된 항체(1  $\mu$ g/mL)를 화이트 눈크 맥시솔프(white Nunc Maxisorp) 96 웰 플레이트에서 37°C에서 1h동안 흡착시킨 후 세척하고 21°C에서 30' 동안 PBS내의 1% BSA로 차단하고, 세척하고, PBS에서 1:1000 희석된 이소타입결정 용액(시그마 알드리치, 미국 미주리주 세인트루이스) 100  $\mu$ l를 21°C에서 30' 동안 첨가하고, 1:5000 항-염소 IgG-HRP를 21°C에서 15' 동안 첨가하고, 바이오라드 클래리티 웨스턴(BioRad Clarity Western) ECL 기질(바이오라드, 미국 캘리포니아주 허큘레스) 및 빅토르(Victor) X3(펄킨엘머(PerkinElmer), 미국 매사추세츠주 홉킨톤)으로 현상한다.

표 9는 이소타입 결정 결과를 보여준다. STC601-STC636 mAb는 IgG1, IgG2A, IgG2B, 및 IgG3/M 이소타입을 포함하는 것으로 밝혀졌다.

표 9: 항-BTLA mAb STC601-STC636의 이소타입

항-BTLA mAb	이소타입
STC601	G2a
STC602	G1/2a
STC603	G2a
STC604	G1
STC605	G1
STC606	G1
STC607	G2a
STC608	G1
STC609	G2a
STC610	G1
STC611	G1
STC612	G3/M
STC613	G1
STC614	G1
STC615	G1
STC616	G2b
STC617	G1
STC618	G1
STC619	G2b
STC620	G1
STC621	G1
STC622	G1
STC623	G1
STC624	G1
STC625	G1
STC626	G2B
STC627	G1
STC628	G1
STC629	G1
STC630	G1
STC631	G1

항-BTLA mAb	이소타입
STC632	G1
STC633	G1
STC634	M
STC635	G1
STC636	G1

[0387]

[0388]

### 실시예 3 - 당화된 BTLA-결합 항체의 FACS 분석

[0389]

항-BTLA mAb STC601 - STC636이 세포-표면 발현된 BTLA에 결합하는 능력을 형광 활성화 세포 분류(FACS)에 의해 분석하였다.

[0390]

요약하면, BTLA를 293T 세포에서 재조합적으로 과발현시키고 BTLA-293T 세포 및 293T 벡터 대조군에의 STC601 - STC636의 결합을 FACS에 의해 분석하였다.

[0391]

**세포 배양, 안정한 형질감염체 및 형질감염.** 모든 세포는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)(ATCC, 미국 버지니아주 마나사스)으로부터 획득하였다. 이들 세포를 10% 태아 소 혈청(FBS)으로 보충된 DMEM/F12 또는 RPMI 1640 배지에서 성장시켰다. BTLA-안정한 형질감염체 293T 세포를 10  $\mu$ g/mL 퓨로마이신(인비보젠(InvivoGen), 미국 캘리포니아주 샌디에고)을 이용하여 선택하였다. 일시적 형질감염을 위해, 세포를 SN 리포솜(Hu, M. C. et al., 2004, *Cell*, 117:225-237), 리포펙타민 2000, 리포펙타민 LTX(라이프 테크놀로지스(Life Technologies), 미국 캘리포니아주 칼스바드) 또는 PEI를 이용하여, BTLA를 인코딩하는 플라스미드 DNA로 형질감염시켰다.

[0392]

**유세포분석.** BTLA 또는 빈 벡터를 과발현하는 세포를 트립신화에 의해 분리하고  $2 \times 10^6$  세포/mL로 세포 염색 버퍼(CSB)(바이오레전드, 미국 캘리포니아주 샌디에고)에서 수집하였다. 50  $\mu$ L의 세포를 96 웰 둥근-바닥 플레이트에 분취하고, 여기에 50  $\mu$ L의 20  $\mu$ g/mL 일차 항체를 첨가한 후, 부드럽게 혼합한 후 암실에서 4°C에서 1h 항온처리하였다. 세포를 CSB로 세척하고, DAPI를 가진 항-마우스 IgG-PE 접합체(10  $\mu$ g/mL)(1:100)와 암실에서 21°C에서 30'동안 항온처리하였다. 세포를 세척하고 구아바 이지사이트(Guava EasyCyte) HT(밀리포어 담스타트(Millipore Darmstadt), 독일) 또는 FACS 셀레스타(Celesta)(벡톤 디킨슨(Becton Dickinson), 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스) 유세포분석기를 이용하여 데이터를 획득하였다.

[0393]

표 10은 세포-표면 발현된 BTLA에의 항-BTLA mAb 결합을 보여주는 예시적인 FACS 분석 결과를 보여준다. STC601 - STC636 항-BTLA mAb는 모두 293T 빈 벡터 대조군에 비하여 BTLA 발현 293T 세포에서 관찰된 더 강한 결합 FACS 시그널(증가된 %게이트(Gate), 증가된 MR)에 의해 나타난 대로, 세포-표면 발현된 BTLA에 결합하는 것으로 밝혀졌다.

[0394] 표 10: 항-BTLA mAb STC601-STC636의 FACS 분석

STC	293T-BTLA		293T	
	% 게이트	MR	% 게이트	MR
STC601	80.8	729	8.36	12.9
STC602	73.5	564	4.11	12.2
STC603	78.6	928	6.45	12.6
STC604	78.9	960	5.39	12
STC605	82.1	1195	3.68	10.9
STC606	81.6	1123	4.02	11.5
STC607	77.9	607	5.64	12.8
STC608	83.2	1471	3.91	11
STC609	85.6	1240	6.07	12.1
STC610	84.6	1368	4.5	11.2
STC611	85.6	1243	5.62	12.2
STC612	66.6	203	3.23	10.9
STC613	82.4	1561	5.42	12.8
STC614	80.8	1297	4.44	11.6
STC615	71.3	320	5.47	11.5
STC616	86	933	4.02	11.2
STC617	83	1275	4.66	10.4
STC618	82.9	1679	5.2	11.5
STC619	76	530	5.36	11.7
STC620	73.5	880	3.62	10.6
STC621	78.2	1095	6.28	11.9
STC622	80.9	1300	6.91	12.5
STC623	82.9	1162	6.39	12.3
STC624	82.4	1195	4.06	10.4
STC625	72.2	336	4.94	11.4
STC626	86.2	3448	5.73	12
STC627	83	1722	6.78	11.3
STC628	82.1	1610	9.24	12.4
STC629	79	1098	7.88	12.1
STC630	82.5	1496	6.12	11.5
STC631	82.4	1522	5.7	11.7
STC632	77.7	936	5.08	11
STC633	81.9	1623	7.26	12

[0395]

	293T-BTLA		293T	
STC634	74.6	360	7.77	11.3
STC635	82.4	1470	5.75	11.2
STC636	81	1439	7.67	12.4
BTLA (MIH26)	91.3	2848	16.6	17.6
미염색	2.06	8.33	3.09	7.21
이소타입	5.08	11.7	11.6	15.9
2'Ab 단독	10.1	16.6	15.3	18.1

[0396]

[0397] 실시예 4 - 당화된 BTLA-결합 항체의 당특이성

[0398] 항-BTLA mAb의 당특이성을 닷-블롯 및 웨스턴 블롯 분석에 의해 분석하였다.

[0399] 닷 블롯

[0400] 당화된 BTLA 및 탈당화된(N-글리코시다제 F(PNGaseF) 처리됨) BTLA에의 STC601 - STC636 항-BTLA mAb의 당특이적 결합을 닷 블롯 분석에서 시험하였다.

[0401] 요약하면, 0.5  $\mu\text{g}/\text{웰}$ (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 100  $\mu\text{l}/\text{웰}$ )의 당화된 BTLA 또는 탈당화된 BTLA를 96-웰 닷 블롯 장치(바이오-닷



바이오라드(Bio-Dot BioRad), 미국 캘리포니아주 허큘레스)에서 니트로셀룰로스 막상에 고정시켰다. 막을 차단한 후 하이브리도마 상등액( $5 \mu\text{g/mL}$ ;  $100 \mu\text{l}$ /웰) 또는 정제된 마우스 단클론 항체( $1 \mu\text{g/mL}$ ;  $100 \mu\text{l}$ /웰)와 12h 동안  $4^\circ\text{C}$ 에서 항온처리하였다. 니트로셀룰로스 막상의 고정된 BTLA에의 항체-결합을 이차 항체(예를 들어, 1:5,000 - 1:20,000 항-마우스-HRP 이차; 잭슨 랩스(Jackson Labs), 미국, 메인주, 바 하버) 및 영상화(예를 들어, 슈퍼시그널 웨스트 펠토(SuperSignal West Fento), 써모피셔(ThermoFisher), 미국 매사추세츠주 윌람 또는 쉼독 이미저(Chemdoc imager), 바이오라드, 미국 캘리포니아주 허큘레스)를 통해 검출하였다.

[0402] 도 1a 및 1b는 항-BTLA mAb STC601 - STC636의 예시적인 닷 블롯 분석의 결과를 보여준다. 각 항-BTLA mAb( $0.5 \mu\text{g}$ /웰 로딩됨)를 당화된 BTLA(PNGaseF "-") 또는 탈당화된 BTLA(PNGaseF "+")에의 결합에 대해 시험하였다. 비특이적 항체 대조군("IgG",  $0.25 \mu\text{g}$ /웰 로딩됨) 및 시판되는 BTLA 기준 항체(바이오레전드, 미국 캘리포니아주 샌디에고, "바이오레전드",  $5 \mu\text{g}$ /웰 로딩됨) 또한 분석에 포함시켰다. 도 1a는 시험 항체 및 대조군의 실험 배치를 보여준다. 도 1b는 STC601 - STC636 mAb 및 대조군으로 수득한 실험적 닷 블롯 분석의 결과를 도시한다. STC602, STC604, STC605, STC606, STC607, STC608, STC609, STC610, STC611, STC612, STC613, STC614, STC616, STC617, STC618, STC619, STC620, STC621, STC622, STC623, STC624, STC626, STC627, STC628, STC629, STC630, STC631, STC632, STC634, STC635 및 STC636을 비롯한 여러 단클론 항체가 당화된 BTLA에의 당 특이적 결합을 나타냈다.

[0403] 웨스턴 블롯

[0404] 항-BTLA mAb의 당특이성을 면역침전/웨스턴 블롯 분석에 의해 더 분석하였다.

[0405] 면역블롯 분석. 이전에 개시된 대로 면역블롯 분석을 수행하였다(Lim et al., 2008, Gastroenterology, 135:2128-40; 및 Lee et al., 2007, Cell, 130:440-455). 영상 획득 및 밴드 강도의 정량은 쉼독 이미저(바이오라드, 미국 캘리포니아주 허큘레스)를 이용하여 수행하였다. 이차 항체는 항-마우스 또는 -토끼 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 488 또는 594였으며, 핵을 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼스바드)로 염색하였다.

[0406] 도 2는 항-BTLA mAb STC604, STC605, STC606, STC608, STC610, STC613, STC618, STC622, STC626, STC627, STC628, STC630, STC635, 및 STC636을 위한 예시적인 웨스턴 블롯 분석 결과를 보여준다. 웨스턴 블롯 분석에서는, 항-BTLA mAb를 그들이 완전히 당화된 야생형 BTLA를 인식하고 BTLA의 N-당화 부위 중 둘 (N75/2NQ, N94/2NQ, N116/2NQ) 또는 모든 셋(3NQ)이 결합된 일부 BTLA 돌연변이체를 인식하는 그들의 능력에 대해 시험하였다. 모든 시험된 항체는 당화된 야생형 BTLA(WT)를 인식하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 모든 시험된 항-BTLA mAb는 BTLA N75, N94, 또는 N110에서 단일 당화 부위만을 보유한 하나 이상의 BTLA 이중 돌연변이체를 인식하는 것으로 밝혀졌다. 일반적으로, 도 2의 웨스턴 블롯에서 나타난 밴드 강도는 시험된 항체 각각에 의해 인식된 특이적 당화 모티프 및 인식된 당화 모티프에의 시험된 항체의 결합 강도를 나타낸다. 대조적으로, 모든 시험된 항-BTLA mAb는 BTLA의 N75, N94, 또는 N110 당화 부위 어느 것도 보유하지 않은 BTLA 삼중 돌연변이체에 대해서는 만일 있다면 단지 백그라운드 결합만을 나타내는 것으로 밝혀졌다.

[0407] 실시예 5 - 당화된 BTLA-결합 항체의 결합 친화성 및 비닝(binning)

[0408] STC601 - STC636을 비롯한 항-BTLA mAb를 BTLA에 대한 그들의 각각의 결합 친화성에 관하여 특성규명하고 추가로 경쟁 결합 분석 및 에피토프 비닝 실험에서 평가하였다.

[0409] KD 결정 및 비닝. 20 nM 용액 내의 항체/BTLA 복합체를 포르테바이오(ForteBio)의 APC 센서 상에 로딩하고  $1 \text{ mg/mL}$  BSA를 가진 PBS(분석 버퍼)에서 기준선을 확립하였다. 결합은 분석 버퍼내의 항-BTLA 항체에 센서를 담귀서 수행하였다. 해리는 신선한 분석 버퍼에서 수행하였다. 모든 실험은 1,000 rpm에서 셰이킹하는 센서로 수행하였다. 포르테바이오의 데이터 분석 소프트웨어를 이용하여 데이터를 1:1 결합 모델에 피팅하여 결합도와 해리도를 추정(project)하였다. KD 값은 비 kd/ka를 이용하여 계산하였다. 전형적인 에피토프 비닝 분석에서, 10 nM BTLA-His를  $21^\circ\text{C}$ 에서 1h 동안  $\alpha\text{His}$  항체(10 nM)와 사전항온처리하였다. 대조 항체(20 nM)를 AMC 센서(포르테바이오, 미국 캘리포니아주 먼로 파크)상에 로딩하고 센서 상의 남은 Fc-결합 부위를 전체 마우스 IgG 항체(잭슨(Jackson), 미국 메인주 바 하버)로 차단하였다. 센서를 사전항온처리된 항원/2차 항체 혼합물에 노출시켰다. 원시 데이터를 데이터 분석 소프트웨어 7.0(포르테바이오, 미국 캘리포니아주 먼로 파크)을 이용하여 처리하고 항체 쌍을 경쟁적 결합에 대해 평가하였다. 제2 항체에 의한 추가적 결합은 비점령 에피토프(비-경쟁자)를 나타내는 한편, 무 결합은 에피토프 차단(경쟁자)을 나타낸다. SPR 비아코어 X-100을 또한 KD 결정을 위하여 이용하였다. 단백질 A 칩 또는 마우스 IgG 포획 항체 고정된 CM5 칩(비아코어, 질리나, 슬로바키아)을 600 반응 단

위(RU)로 항체로 코팅하고 BTLA ECD를 미세유체 채널에 주입하였다. 비아평가(BIAevaluation) 소프트웨어(비아코어, 질리나, 슬로바키아)의 피팅 툴을 이용하여  $k_D$  값을 획득하였다.

[0410] 표 11은 항-BTLA mAb STC604, STC610, STC613, STC618, STC622, STC626, 및 STC635의 BTLA에 대한 동적 결합 상수( $k_a$  및  $k_d$  속도) 및 결합 친화성( $K_D$  값)을 요약한다. 도 3a-c는 항-BTLA mAb STC613, STC626, 및 STC635의 BTLA에 대한 동적 결합 상수 및 결합 친화성을 결정하기 위한 예시적인 SPR(비아코어™) 실험의 결과를 예시한다.

[0411] 표 11: 항-BTLA mAb의 BTLA에 대한 결합 친화성.

항-BTLA mAb	비아코어 운동 모드		
	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
STC604	1.03E+06	9.60E-04	9.37E-10
STC610	9.23E+05	4.95E-04	5.36E-10
STC613	1.51E+06	3.85E-04	2.56E-10
STC618	5.85E+05	5.01E-04	8.57E-10
STC622	5.34E+05	3.72E-04	6.97E-10
STC626	1.86E+05	4.12E-04	2.21E-09
STC635	4.95E+05	2.78E-03	5.61E-09

[0412]

[0413] 도 4a 및 표 12는 STC613을 이용한 예시적인 경쟁 분석 및 비닝 실험의 결과를 예시한다. 도 4b 및 표 13은 STC636을 이용한 예시적인 경쟁 분석 및 비닝 실험의 결과를 예시한다. 표 14는 비닝 결과의 요약을 제공한다. STC613 및 STC636은 BTLA 결합을 위해 서로 경쟁하지 않는 것으로 밝혀졌다. STC605, STC608, STC626, STC627, STC628, STC630, STC631, 및 STC636은 BTLA 결합을 위해 STC636과 경쟁하는 것으로 밝혀졌으나, STC613과는 경쟁하지 않았다. STC604, STC606, STC610, STC613, STC618, STC622, 및 STC635는 BTLA 결합을 위해 STC613과 경쟁하는 것으로 밝혀졌으나, STC636과는 경쟁하지 않았다.

[0414] 표 12: STC613을 이용한 항-BTLA mAb의 비닝

항-BTLA mAb	로딩 샘플 ID	반응	쌍/차단
STC604	STC613	0.0861	차단
STC605	STC613	0.2983	쌍
STC606	STC613	0.0771	차단
STC608	STC613	0.342	쌍
STC610	STC613	0.0899	차단
STC613	STC613	0.079	차단
STC618	STC613	0.0593	차단
STC622	STC613	0.0598	차단
STC626	STC613	0.2681	쌍
STC627	STC613	0.4649	쌍
STC628	STC613	0.4684	쌍
STC630	STC613	0.4627	쌍
STC631	STC613	0.4701	쌍
항-BTLA mAb	로딩 샘플 ID	반응	쌍/차단
STC635	STC613	0.0846	차단
STC636	STC613	0.4917	쌍

[0415]

[0416] 표 13: STC636을 이용한 항-BTLA mAb의 비닝

항-BTLA mAb	로딩 샘플 ID	반응	쌍/차단
STC605	STC636	0.0033	차단
STC608	STC636	0.0129	차단
STC613	STC636	0.4355	쌍
STC626	STC636	-0.02	차단
STC627	STC636	0.0305	차단
STC628	STC636	0.0347	차단
STC630	STC636	0.0346	차단
STC631	STC636	0.0216	차단

[0417]

[0418] 표 14: 비닝 결과의 요약

그룹	STC613	STC636
패밀리	STC604 STC606 STC610 STC613 STC618 STC622 STC635	STC605 STC608 STC626 STC627 STC628 STC630 STC631 STC636

[0419]

[0420] 실시예 6 - 당화된 BTLA-결합 항체의 중화 활성

[0421] 항-BTLA mAb를 그들이 BTLA-HVEM 단백질 상호작용을 억제하는 능력에 관하여 ELISA 분석을 이용하여 평가하였다.

[0422] *ELISA에 의한 BTLA와 HVEM 상호작용의 억제.* BTLA:HVEM 억제제 스크리닝 분석 키트(Cat. # 72008, BPS 바이오 사이언스(Bioscience), 미국 캘리포니아주 샌디에고)를 제조사의 설명서에 따라 이용하여 항체 중화 활성을 평가하였다. BTLA를 96-웰 플레이트상에 코팅하고 이어서 먼저 0.5 또는 5  $\mu\text{g/mL}$  항체를, 그리고 그 후 비오티닌화된 HVEM을 반응에 첨가하고, 스트렙타비딘-HRP를 첨가하였다. HRP 기질 첨가 후 화학발광을 측정하였다.

[0423] 표 15는 비억제된 BTLA-HVEM 상호작용의 시그널을 반영하는 대조군에 비하여 억제 %로 표현된, 항-BTLA mAb가 BTLA-HVEM 단백질 상호작용을 억제하는 능력을 보여주는 예시적인 ELISA 결과를 제공한다. 예를 들어, 5  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서, STC613은 BTLA-HVEM 상호작용의 99.0%를 억제하는 것으로 밝혀졌으며, STC626은 BTLA-HVEM 상호작용의 96.8%를 억제하는 것으로 밝혀졌으며, STC635는 BTLA-HVEM 상호작용의 97.3%를 억제하는 것으로 밝혀졌다. 도 5 및 도 6은 BTLA-HVEM 경쟁 ELISA의 예시적인 결과를 보여준다. STC613은 1.088  $\mu\text{g/mL}$ 의  $\text{IC}_{50}$ 으로 BTLA-HVEM 상호작용을 억제하는 것으로 밝혀졌다. STC626은 0.416  $\mu\text{g/mL}$ 의  $\text{IC}_{50}$ 으로 BTLA-HVEM 상호작용을 억제하는 것으로 밝혀졌다.

[0424] 표 15: 항-BTLA mAb에 의한 BTLA:HVEM 상호작용의 억제

항 -BTLA mAb	BTLA:HVEM의 억제(%)	
	5 µg/ml mAb	0.5 µg/ml mAb
STC601	58.7	12.3
STC602	70.8	9.3
STC603	59.3	6.3
STC604	98.9	16.3
STC605	75.0	17.4
STC606	98.6	14.2
STC607	56.1	8.8
STC608	62.4	8.0
STC609	26.4	29.7
STC610	96.7	24.3
STC611	25.9	12.3
STC612	15.8	9.2
STC613	99.0	26.1
STC614	97.8	21.5
STC615	17.9	1.6
STC616	18.6	1.8
STC617	46.6	10.2
STC618	99.0	30.7
STC619	23.6	14.6
STC620	32.8	6.7
STC621	98.3	23.7

[0425]

항 -BTLA mAb	BTLA:HVEM의 억제(%)	
	5 µg/ml mAb	0.5 µg/ml mAb
STC622	98.3	22.1
STC623	40.8	12.7
STC624	97.7	18.1
STC625	12.5	10.5
STC626	96.8	45.6
STC627	11.5	-1.6
STC628	-1.0	-2.2
STC629	0.4	-0.7
STC630	1.3	-4.0
STC631	-0.6	-0.1
STC632	87.5	21.7
STC633	18.8	3.4
STC634	16.9	-1.0
STC635	97.3	21.8
STC636	-0.1	4.8

[0426]

[0427] 실시예 7 - STC613의 에피토프 맵핑

[0428] 화학적 가교, 고질량 MALDI 질량 분석법 및 nLC-오비트랩 질량 분석법(코발엑스 아게(CovalX AG), 스위스 취리히)을 이용하여 항-BTLA mAb STC613의 에피토프 맵핑을 수행하였다.

[0429] STC613 에피토프 맵핑을 위해 이용된 BTLA 항원은 하기 아미노산 서열을 가졌다:

KESCDVQLYI KRQSEHSILA GDPFELECPV KYCANRPHVT  
WCKLNGTTCV KLEDRTQTSWK EEKNISFFIL HFEPVLPNDN  
GSYRCSANFQ SNLIESHSTT LYVTGKQNEL SDTAGREINL  
VDHHHHHHH (서열 번호 86)

[0430]

[0431] 표 16-20은 Asp-N, 트립신, 키모트립신, 엘라스타제 및 써모리신 단백질을 분해 후 확인된 개별 펩티드의 서열을 제공한다. 조합하여, 모든 다섯 가지 단백질을 분해 샘플에서 확인된 BTLA 펩티드는 서열 번호 86의 BTLA 아미노산 서열의 100%를 커버한다.

[0432] 표 16은 서열 번호 86의 BTLA 아미노산 서열의 84.3%를 커버하는, 트립신 단백질을 분해 후 확인된 34개의 BTLA 펩티드를 제공한다.

[0433] 표 16: 트립신 단백질을 분해 후 확인된 BTLA 펩티드

서열	변형	위치 펩티드 1 *	위치 펩티드 2
kESCDVQLYIK (서열 번호 87)	K1(GlyGly)	1-11	
KESCDVQLYIK-K11-156 (서열 번호 88)	모노링크(monolink)	1-11	
kESCDVQLYIKR (서열 번호 89)	K1(GlyGly)	1-12	
KESCDVQLYIKR-K11-156 (서열 번호 90)	모노링크	1-12	
KESCDVQLYIKR-K1-S3 (서열 번호 90)	인트라링크(intralink)	1-12	
KESCDVQLYIKR-Y9-K11 (서열 번호 90)	인트라링크	1-12	
ESCDVQLYIKR-K10-155 (서열 번호 91)	모노링크	2-12	
ESCDVQLYIKR-K10-156 (서열 번호 91)	모노링크	2-12	
RQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCK-H27-156 (서열 번호 92)	모노링크	11-43	
RQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCK-K20-155 (서열 번호 92)	모노링크	11-43	
RQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCK-K20-156 (서열 번호 92)	모노링크	11-43	
RQSEHSILAGDPFELECPV (서열 번호 93)	K20(GlyGly)	12-31	
RQSEHSILAGDPFELECPVK (서열 번호 94)	모노링크	12-31	
RQSEHSILAGDPFELECPVK-R1-156 (서열 번호 94)	모노링크	12-31	
QSEHSILAGDPFELECPV (서열 번호 95)	K19(GlyGly)	13-31	
QSEHSILAGDPFELECPVK-H4-156 (서열 번호 96)	모노링크	13-31	
QSEHSILAGDPFELECPVK-S2-155 (서열 번호 96)	모노링크	13-31	
QSEHSILAGDPFELECPVK-S2-156 (서열 번호 96)	모노링크	13-31	
QSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCK-K19-156 (서열 번호 97)	모노링크	13-43	
QSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCK-K19-K31 (서열 번호 97)	인트라링크	13-43	
YCANRPHVTWCK-T9-155 (서열 번호 98)	모노링크	32-43	
YCANRPHVTWCK-T9-156 (서열 번호 98)	모노링크	32-43	
YCANRPHVTWCK-Y1-156 (서열 번호 98)	모노링크	32-43	
NISFFILHFEPVLPNDNGSYR (서열 번호 99)		64-84	
CSANFQSNLIESHSTTLYVTGK-S12-156 (서열 번호 100)	모노링크	85-106	
CSANFQSNLIESHSTTLYVTGK-S14-156 (서열 번호 100)	모노링크	85-106	
CSANFQSNLIESHSTTLYVTGK-S2-156 (서열 번호 100)	모노링크	85-106	
CSANFQSNLIESHSTTLYVTGK-S7-156 (서열 번호 100)	모노링크	85-106	

[0434]



서열	변형	위치 펩티드 1*	위치 펩티드 2
CSANFQSNLIESHSTTLVYTGK-S7-K22 (서열 번호 100)	인트라링크	85-106	
CSANFQSNLIESHSTTLVYTGK-S7-T16 (서열 번호 100)	인트라링크	85-106	
CSANFQSNLIESHSTTLVYTGK-S7-Y18 (서열 번호 100)	인트라링크	85-106	
CSANFQSNLIESHSTTLVYTGK-T15-156 (서열 번호 100)	모노링크	85-106	
QNELSDTAGR (서열 번호 101)		107-116	
EINLVDHHHHHH (서열 번호 102)		117-128	

[0435]

[0436]

\* 펩티드 위치는 서열 번호 86의 BTLA 아미노산 서열에 대하여 표시된다.

[0437]

표 17은 서열 번호 86의 BTLA 아미노산 서열의 96.88%를 커버하는, 키모트립신 단백질분해 후 확인된 75개의 BTLA 펩티드를 제공한다.

[0438]

표 17: 키모트립신 단백질분해 후 확인된 BTLA 펩티드

서열	변형	위치 펩티드 1*	위치 펩티드 2
KEScDVQL (서열 번호 103)	C4(카르바미도메틸)	1-8	
KESCDVQL (서열 번호 104)- KESCDVQL (서열 번호 104) -a1-b1	단백질내 xl	1-8	1-9
KEScDVQLY (서열 번호 105)	C4 (카르바미도메틸)	1-9	
IKRQSEHSIL-H7-155 (서열 번호 106)	모노링크	10-19	
IKRQSEHSIL-K2-S8 (서열 번호 105)	인트라링크	10-19	
IKRQSEHSILAGDPF (서열 번호 107)		10-24	
IKRQSEHSILAGDPF (서열 번호 107)- ELECPVKY (서열 번호 108) -a8-b7	단백질내 xl	10-24	25-32
IKRQSEHSILAGDPF-H7-156 (서열 번호 107)	모노링크	10-24	
IKRQSEHSILAGDPF-K2-156 (서열 번호 107)	모노링크	10-24	
IKRQSEHSILAGDPF-S5-155 (서열 번호 107)	모노링크	10-24	
IKRQSEHSILAGDPFEL (서열 번호 109)		10-26	
AGDPFELEcPVKY (서열 번호 110)	C9(카르바미도메틸)	20-32	
CANRPHVTW (서열 번호 111) - ELECPVKY (서열 번호 108) -a4-b7	단백질내 xl	33-41	25-32
CANRPHVTW (서열 번호 111) -KESCDVQLY (서열 번호 112) -a8-b1	단백질내 xl	33-41	1-9

[0439]

서 열	변 형	위치 펩티드 1*	위치 펩티드 2
CANRPHVTW-R4-156 (서열 번호 111)	모노링크	33-41	
CANRPHVTW-T8-155 (서열 번호 111)	모노링크	33-41	
CANRPHVTW-T8-156 (서열 번호 111)	모노링크	33-41	
cKLnGTTcVKLEDRTQTSW (서열 번호 113)	C1 (카르바미도메틸); N4 (탈아미드화됨) C8 (카르바미도메틸)	42-59	
cKLNGTTcVKLEDRTQTSW (서열 번호 114)	C1 (카르바미도메틸); C8 (카르바미도메틸)	42-59	
NGTTCVKLEDRTQTSW (서열 번호 115) -IESHSTTL (서열 번호 116) -a13-b3	단백질내 xl	45-59	94-102
KEEKNISFF (서열 번호 117)- KESCDVQLY (서열 번호 118) -a1-b1	단백질내 xl	60-68	1-9
EPVLPNDNGSYRCSANF (서열 번호 119) -R12-155	모노링크	73-89	
EPVLPNDNGSYRCSANF (서열 번호 111)- VTGKQNEL (서열 번호 120) -a10-b4	단백질내 xl	73-89	103-110
RCSANFQSNL (서열 번호 121)- NGTTCVKL (서열 번호 122) -a3-b7	단백질내 xl	84-93	45-52
RCSANFQSNL (서열 번호 121)- NGTTCVKL (서열 번호 122) -a8-b7	단백질내 xl	84-93	45-52
QSNLIESHSTTL (서열 번호 123)		90-101	
QSNLIESHSTTL (서열 번호 123)- KEEKNISF (서열 번호 124) -a11-b4	단백질내 xl	90-101	60-67
QSNLIESHSTTL (서열 번호 125)		90-102	
IESHSTTL (서열 번호 126)- ELECPVKY (서열 번호 127) -a4-b7	단백질내 xl	94-102	25-32
VTGKQNELSDTAGREINL (서열 번호 128)		103-120	
VTGKQNELSDTAGREINL (서열 번호 128)- CANRPHVTW (서열 번호 129) -a11-b8	단백질내 xl	103-120	33-41
VTGKQNELSDTAGREINL (서열 번호 128) -ECPVKY (서열 번호 130) -a9-b5	단백질내 xl	103-120	27-32
VTGKQNELSDTAGREINL (서열 번호 128) -ELECPVKY (서열 번호 131) -a11-b7	단백질내 xl	103-120	25-32
VTGKQNELSDTAGREINL (서열 번호 128) -VDHHHHHH (서열 번호 132) -a9-b3	단백질내 xl	103-120	121-128
VTGKQNELSDTAGREINLVDHHHHHH (서열 번호 133)		103-128	

[0440]

서열	변형	위치 펩티드 1*	위치 펩티드 2
VTGKQNELSDTAGREINLVDHHHHHHH (서열 번호 133)	N17 (탈아미드화됨)	103-128	
SDTAGREINL (서열 번호 135) -ECPVKY (서열 번호 130) -a3-b5	단백질내 xl	111-119	27-32
SDTAGREINL (서열 번호 135)- KESCDVQLY (서열 번호 136) -a3-b3	단백질내 xl	111-119	1-9
SDTAGREINLVDHHHHHHH (서열 번호 137)		111-128	
SDTAGREINLVDHHHHHHH (서열 번호 137)- EDRQTSW (서열 번호 138) -a17-b6	단백질내 xl	111-128	53-59
SDTAGREINLVDHHHHHHH-S1-155 (서열 번호 137)	모노링크	111-128	
SDTAGREINLVDHHHHHHH-S1-156 (서열 번호 137)	모노링크	111-128	
SDTAGREINLVDHHHHHHH (서열 번호 137) - VTGKQNEL (서열 번호 139) -a1-b2	단백질내 xl	111-128	103-110
SDTAGREINLVDHHHHHHH (서열 번호 137)- VTGKQNEL-a1-b4	단백질내 xl	111-128	103-110
SDTAGREINLVDHHHHHHH (서열 번호 137) -VTGKQNEL (서열 번호 140)-a3-b4	단백질내 xl	111-128	103-110
SDTAGREINLVDHHHHHHH (서열 번호 137) -VTGKQNEL (서열 번호 140) -a6-b4	단백질내 xl	111-128	103-110
SDTAGREINLVDHHHHHHH (서열 번호 137) -YVTGKQNEL (서열 번호 140)-a17-b5	단백질내 xl	111-128	102-110
SDTAGREINLVDHHHHHHH (서열 번호 137) -YVTGKQNEL (서열 번호 140) -a1-b5	단백질내 xl	111-128	102-110
SDTAGREINLVDHHHHHHH (서열 번호 137) -YVTGKQNEL (서열 번호 140)-a3-b5	단백질내 xl	111-128	102-110

[0441]

[0442]

[0443]

[0444]

\* 펩티드 위치는 서열 번호 86의 BTLA 아미노산 서열에 대하여 표시된다.

표 18은 서열 번호 86의 BTLA 아미노산 서열의 26.56%를 커버하는, ASP-N 단백질분해 후 확인된 7개의 펩티드를 제공한다.

표 18: ASP-N 단백질분해 후 확인된 BTLA 펩티드

서열	변형	위치 펩티드 1*	위치 펩티드 2
DVQLYIKRQSEHSILAG (서열 번호 141)		5-21	
DVQLYIKRQSEHSILAG-R8-156 (서열 번호 141)	모노링크	5-21	
DTAGREINLVDHHHHHHH (서열 번호 142)		112-128	
DTAGREINLVDHHHHHHH-R5-155 (서열 번호 142)	모노링크	112-128	
DTAGREINLVDHHHHHHH-R5-156 (서열 번호 142)	모노링크	112-128	
DTAGREINLVDHHHHHHH-T2-155 (서열 번호 142)	모노링크	112-128	
DTAGREINLVDHHHHHHH-T2-156 (서열 번호 142)	모노링크	112-128	

[0445]

[0446]

[0447]

\* 펩티드 위치는 서열 번호 86의 BTLA 아미노산 서열에 대하여 표시된다.

표 19는 서열 번호 86의 BTLA 아미노산 서열의 21.09%를 커버하는, 엘라스타제 단백질분해 후 확인된 4개의 BTLA 펩티드를 제공한다.

[0448] 표 19: 엘라스타제 단백질분해 후 확인된 BTLA 펩티드

서열	변형	위치 펩티드 1*	위치 펩티드 2
KYCANRPHV (서열 번호 143)- VDHHHHHH (서열 번호 132) -a8-b6	단백질내 xl	31-39	121-128
NRPHVTWCKL (서열 번호 144)- KQNEL (서열 번호 145) -a6-b1	단백질내 xl	35-44	106-110

[0449]

[0450] \* 펩티드 위치는 서열 번호 86의 BTLA 아미노산 서열에 대하여 표시된다.

[0451] 표 20은 서열 번호 86의 BTLA 아미노산 서열의 50.00%를 커버하는, 썬모리신 단백질분해 후 확인된 18개의 BTLA 펩티드를 제공한다.

[0452] 표 20: 썬모리신 단백질분해 후 확인된 BTLA 펩티드

서열	변형	위치 펩티드 1	위치 펩티드 2
LYIKRQSEHS (서열 번호 146)- LIESHSTT (서열 번호 147) -a7-b5	단백질내 xl	8-17	93-100
IKRQSEHS (서열 번호 148)- IKRQSEHS (서열 번호 148) -a3-b3	단백질내 xl	10-17	10-17

[0453]

서열	변형	위치 펩티드 1	위치 펩티드 2
IKRQSEHS (서열 번호 148)- IKRQSEHS (서열 번호 148) -a5-b5	단백질내 xl	10-17	10-17
IKRQSEHS (서열 번호 148)- KESCDVQ (서열 번호 149) -a2-b1	단백질내 xl	10-17	1-7
IKRQSEHS (서열 번호 148)- VTGKQNE (서열 번호 150) -a2-b4	단백질내 xl	10-17	103-109
IKRQSEHSI (서열 번호 151) -K2-156		10-18	
VKYCANRPH (서열 번호 152)- VDHHHHHH (서열 번호 132) -a7-b4	단백질내 xl	30-38	121-128
ANRPHVTWCK -K10-156 (서열 번호 153)	모노링크	34-43	
VKLEDRQTSWKKEKN-K2-155 (서열 번호 154)	모노링크	50-64	
VKLEDRQTSWKKEKN-K2-156 (서열 번호 154)	모노링크	50-64	
IESHSTTLY (서열 번호 155)- IESHSTTLY (서열 번호 155) -a7-b7	단백질내 xl	94-102	94-102

[0454]

[0455] \* 펩티드 위치는 서열 번호 86의 BTLA 아미노산 서열에 대하여 표시된다.

[0456] 높은 분해능으로 STC613의 BTLA 에피토프를 결정하기 위하여, BTLA/STC613 복합체를 중수소화된 가교제와 항온 처리한 후 다중효소 절단(Asp-N, 트립신, 키모트립신, 엘라스타제, 썬모리신)을 거치고 nLC-오비트랩 질량 분석법을 이용하여 샘플을 분석하였다. 트립신, ASP-N, 및 엘라스타제 분해는 가교된 BTLA 및 STC613 펩티드의 검출을 야기하지 않았다. 표 21은 키모트립신 단백질분해 후 확인된 5개의 가교된 STC613 및 BTLA 펩티드를 제공한다. 표 22는 썬모리신 단백질분해 후 확인된 1개의 가교된 STC613-BTLA 펩티드를 제공한다.

[0457] 표 21: 키모트립신 단백질분해 후 중수소화된 가교제로 확인된 BTLA 펩티드

서열	단백질 1	단백질 2	서열 단백질 1*	서열 단백질 2*
SCAASGFTF (서열 번호 156)- YIKRQSEHSIL (서열 번호 161) -a8-b8	STC613_HC	BTLA	21-29	9-19
SVTIGQPASISCKSSLSL	STC613_LC	BTLA	12-29	53-59

[0458]

(서열 번호 157)- EDRQTSW (서열 번호 162) -a13-b5				
SVTIGQPASISCKSSL (서열 번호 157)- RCSANFQSNL-a13 (서열 번호 163) -b3	STC613_LC	BTLA	12-29	84-93
TLKISRVEAEDVG (서열 번호 158)- NGTTCVKL (서열 번호 164) -a15-b7	STC613_LC	BTLA	77-92	45-52
KISRVEAEDVG (서열 번호 159)- EPVLPNDNGSY (서열 번호 165) -a13-b10	STC613_LC	BTLA	79-92	73-83

[0459]

[0460]

\* 펩티드 위치는 서열 번호 2 및 4(단백질 1), 및 서열 번호 86(단백질 2)의 BTLA 아미노산 서열에 대하여 표시된다.

[0461]

표 22: 씨모리신 단백질분해 후 중수소화된 가교제로 확인된 BTLA 펩티드

서열	단백질 1	단백질 2	서열 단백질 1*	서열 단백질 2*
ISCKSSL (서열 번호 160)- LYIKRQSEHSI (서열 번호 166) -a5-b5	STM613_LC	BTLA	103-108	8-18

[0462]

[0463]

\* 펩티드 위치는 서열 번호 2 및 4(단백질 1), 및 서열 번호 86(단백질 2)의 BTLA 아미노산 서열에 대하여 표시된다.

[0464]

도 7은 BTLA/STC613 분자 계면의 더 높은 분해능 분석의 결과를 보여주는 그래프를 보여준다. 분석은 STC613의 BTLA 에피토프가 아미노산 서열 IKRQSEHSILA (서열 번호 167), VKLEDQTSWK (서열 번호 168), 및 NGSYRCSANFQ (서열 번호 169)를 비롯한 BTLA의 세 영역을 포함함을 보여주었다.

[0465]

STC613의 BTLA 에피토프는 BTLA(서열 번호 86)의 아미노산 R12, H16, K51, T57, S82, 및 S86을 포함하는 것으로 밝혀졌다.

[0466]

\* \* \*

[0467]

본 출원 전체에 걸쳐서 다양한 간행물이 참조되었다. 이들 간행물의 내용 전체는 본 발명이 관련되는 본 기술분야의 기술을 더욱 완전히 개시하기 위하여 본 출원에서 참고로 포함된다. 소정의 구체적 실시형태의 실시예가 본 발명에서 제공되는 한편, 다양한 변화와 변형이 이루어질 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 그러한 변형 역시 첨부된 청구범위의 범주내에 속하는 것이다.

[0468]

참고 문헌

[0469]

하기 문헌들은 그들이 본 명세서에 개시된 것들에 보충적인 예시적인 절차 또는 다른 상세사항을 제공하는 정도로, 참고로 구체적으로 본 명세서에 포함된다.

[0470]

미국 특허 3,817,837호

[0471]

미국 특허 3,850,752호

[0472]

미국 특허 3,939,350호

[0473]

미국 특허 3,996,345호

[0474]

미국 특허 4,196,265호

[0475]

미국 특허 4,275,149호

[0476]

미국 특허 4,277,437호

[0477]

미국 특허 4,366,241호

[0478]

미국 특허 4,469,797호



[0479]	미국 특허 4,472,509호
[0480]	미국 특허 4,606,855호
[0481]	미국 특허 4,703,003호
[0482]	미국 특허 4,742,159호
[0483]	미국 특허 4,767,720호
[0484]	미국 특허 4,870,287호
[0485]	미국 특허 4,816,567호
[0486]	미국 특허 4,867,973호
[0487]	미국 특허 4,870,287호
[0488]	미국 특허 4,938,948호
[0489]	미국 특허 4,946,778호
[0490]	미국 특허 5,021,236호
[0491]	미국 특허 5,091,513호
[0492]	미국 특허 5,164,296호
[0493]	미국 특허 5,196,066호
[0494]	미국 특허 5,223,409호
[0495]	미국 특허 5,403,484호
[0496]	미국 특허 5,420,253호
[0497]	미국 특허 5,565,332호
[0498]	미국 특허 5,571,698호
[0499]	미국 특허 5,627,052호
[0500]	미국 특허 5,656,434호
[0501]	미국 특허 5,739,169호
[0502]	미국 특허 5,760,395호
[0503]	미국 특허 5,770,376호
[0504]	미국 특허 5,789,208호
[0505]	미국 특허 5,801,005호
[0506]	미국 특허 5,821,337호
[0507]	미국 특허 5,824,311호
[0508]	미국 특허 5,830,880호
[0509]	미국 특허 5,844,091호
[0510]	미국 특허 5,846,945호
[0511]	미국 특허 5,858,657호
[0512]	미국 특허 5,861,155호
[0513]	미국 특허 5,871,907호
[0514]	미국 특허 5,969,108호

- [0515] 미국 특허 6,054,297호
- [0516] 미국 특허 6,165,464호
- [0517] 미국 특허 6,365,157호
- [0518] 미국 특허 6,406,867호
- [0519] 미국 특허 6,709,659호
- [0520] 미국 특허 6,709,873호
- [0521] 미국 특허 6,753,407호
- [0522] 미국 특허 6,814,965호
- [0523] 미국 특허 6,849,259호
- [0524] 미국 특허 6,861,572호
- [0525] 미국 특허 6,875,434호
- [0526] 미국 특허 6,881,557호
- [0527] 미국 특허 6,891,024호
- [0528] 미국 특허 6,946,546호
- [0529] 미국 특허 7,407,659호
- [0530] 미국 특허 8,178,098호
- [0531] 미국 특허 출원 공개 20050214860호
- [0532] Aurrand-Lions *et al.*, *Immunity*, 5, 391-405(1996)
- [0533] Austin-Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845(1998)
- [0534] Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3809-3813(1994)
- [0535] Barretina *et al.* *Nature* **483**: 603-607 (2012)
- [0536] Brahmer *et al.*, *The New England journal of medicine* **366**:2455-2465 (2012)
- [0537] Bukowski *et al.*, *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347 (1998)
- [0538] Chang *et al.*, *Nature cell biology* **13**: 317-323 (2011)
- [0539] Chang *et al.*, *Cancer cell* **19**, 86-100.
- [0540] Cheng *et al.*, *The Journal of biological chemistry* **288**: 11771-11785 (2013)
- [0541] Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037(1998)
- [0542] Davidson *et al.*, *J. Immunother.*, 21(5):389-398(1998)
- [0543] Desmyter *et al.*, *Nat. Struct. Biol.*, 803-811 (1996)
- [0544] Dunn *et al.*, *Nature immunology* **3**: 991-998 (2002)
- [0545] Francisco *et al.*, *Immunological reviews* 236, 219-242 (2010)
- [0546] Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:3576-3580 (1992)
- [0547] Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363: 446-448 (1993)
- [0548] Hamid *et al.*, *The New England journal of medicine* **369**: 134-144 (2013)
- [0549] Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485 (1998)
- [0550] Heifetz *et al.*, *Biochemistry* **18**: 2186-2192 (1979)

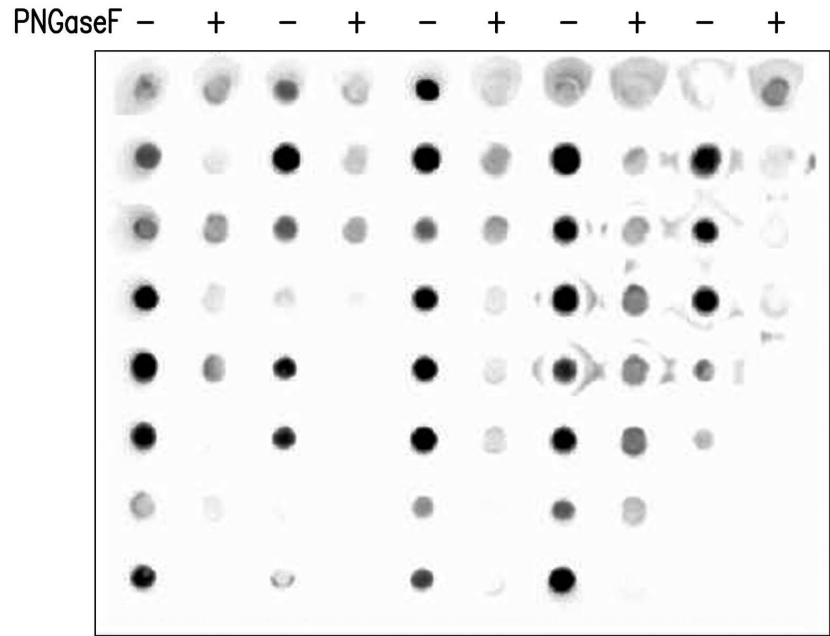
- [0551] Hellstrand *et al.*, *Acta Oncologica*, 37(4):347-353 (1998)
- [0552] Hodi *et al.*, *The New England journal of medicine* **363**, 711-723 (2010).
- [0553] Hollander, *Front. Immun.*, 3:3 (2012)
- [0554] Hu *et al.*, *Cancer Res.*, 56:3055-3061 (1996)
- [0555] Hu *et al.*, *Cell* **117**: 225-237 (2004)
- [0556] Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336 (1998)
- [0557] Leach *et al.*, *Science* **271**: 1734-1736 (1996)
- [0558] Lefranc *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 27:209-212(1999)
- [0559] Lee *et al.*, *Cell* **130**, 440-455 (2007)
- [0560] Lim *et al.*, *Gastroenterology* **135**, 2128-2140 (2008)
- [0561] Lin *et al.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 3011-3016 (2008)
- [0562] Liu *et al.*, *Cell Mol. Biol.*, 49:209-216(2003)
- [0563] Lo *et al.*, *Cancer research* **67**, 9066-9076 (2007)
- [0564] Marks *et al.*, *Bio/Technol.*, 10:779-783(1992)
- [0565] Okazaki *et al.*, *Nature immunology* **14**: 1212-1218 (2013)
- [0566] Page *et al.*, *Annual review of medicine* **65**:185-202 (2014)
- [0567] Pettersen *et al.*, *J Comput Chem* **25**: 1605-1612 (2004)
- [0568] Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416(1998)
- [0569] Robert *et al.*, *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 2232-2239 (2013)
- [0570] Robert *et al.*, *The New England journal of medicine* **364**: 2517-2526 (2011)
- [0571] Schier *et al.*, *Gene*, 169(2):147-155(1996)
- [0572] Schwarz & Aebl, *Current opinion in structural biology* **21**:576-582 (2011)
- [0573] Shen *et al.*, *Nature* **497**: 383-387 (2013)
- [0574] Sheppard *et al.*, *FEBS letters* **574**, 37-41 (2004)
- [0575] Stanley, *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3** (2011)
- [0576] Stemmer, *Nature*, 370:389-391(1994)
- [0577] Topalian *et al.*, *The New England journal of medicine* 366, 2443-2454 (2012)
- [0578] Vigdorovich *et al.*, *Structure* **21**:707-717 (2013)
- [0579] Winn *et al.*, *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **67**: 235-242 (2011)
- [0580] Yang *et al.*, *Investigative ophthalmology & visual science* **49**: 2518-2525 (2008)
- [0581]

도면

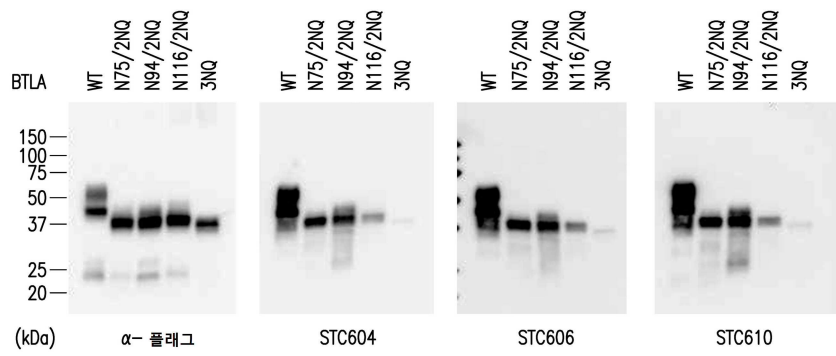
도면1a

PNGaseF	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	601	601	609	609	617	617	625	625	633	633
B	602	602	610	610	618	618	626	626	634	934
C	603	603	611	611	619	619	627	627	635	635
D	604	604	612	612	620	620	628	628	636	636
E	605	605	613	613	621	621	629	629	IgG	IgG
F	606	606	614	614	622	622	630	630	BioLegend	
G	607	607	615	615	623	623	631	631		
H	608	608	616	616	624	624	632	632		

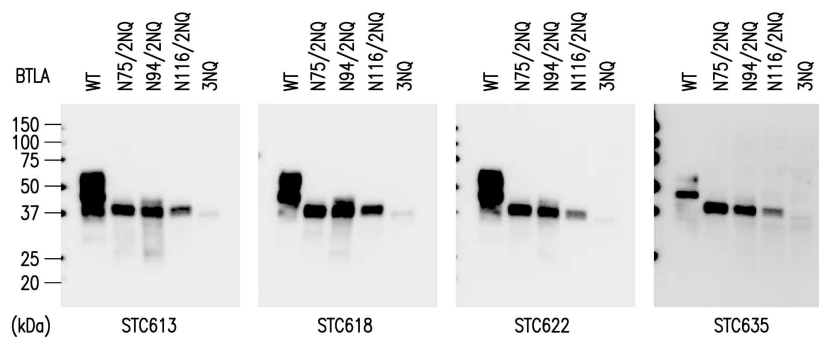
도면1b



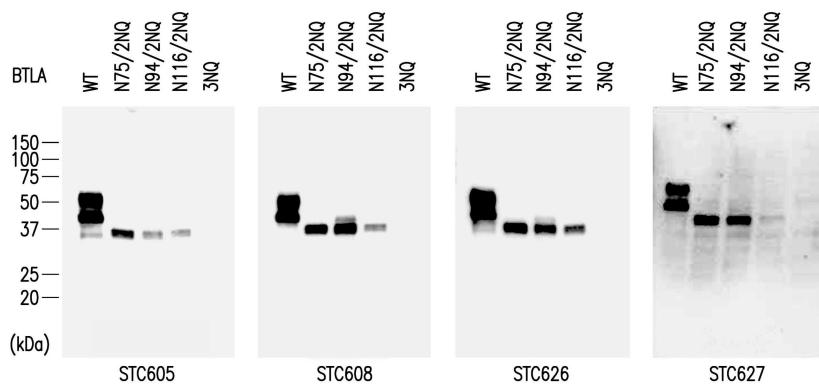
도면2a



도면2b

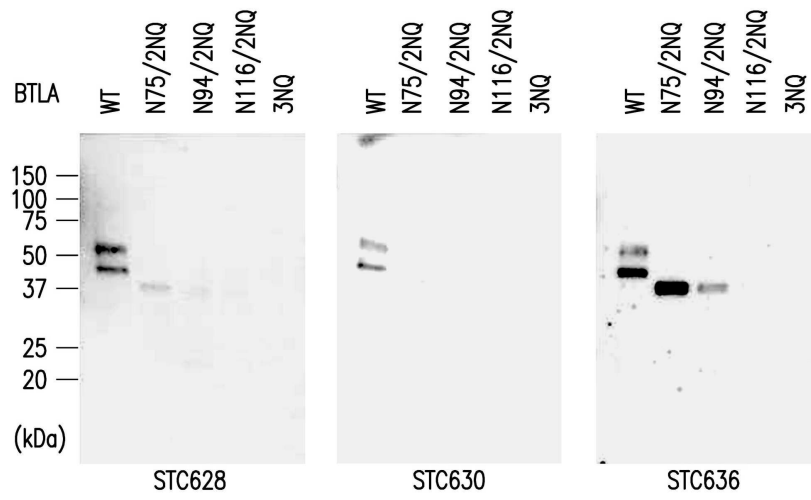


도면2c

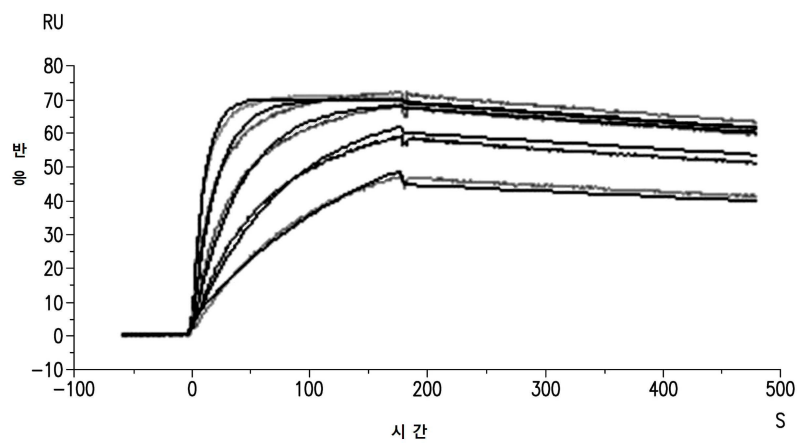




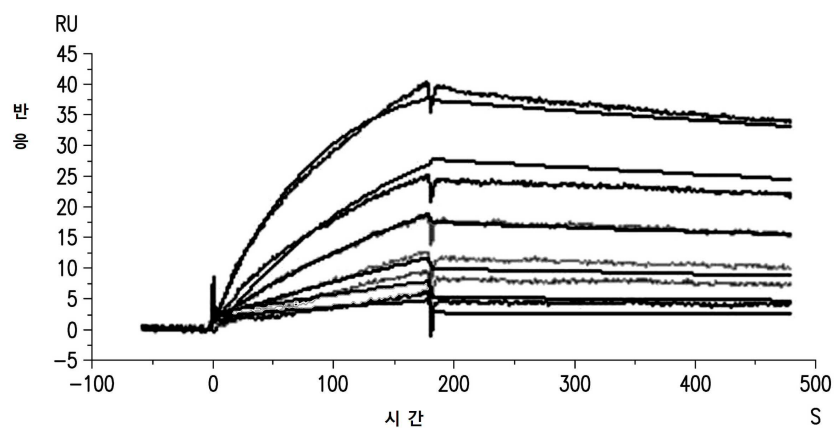
도면2d



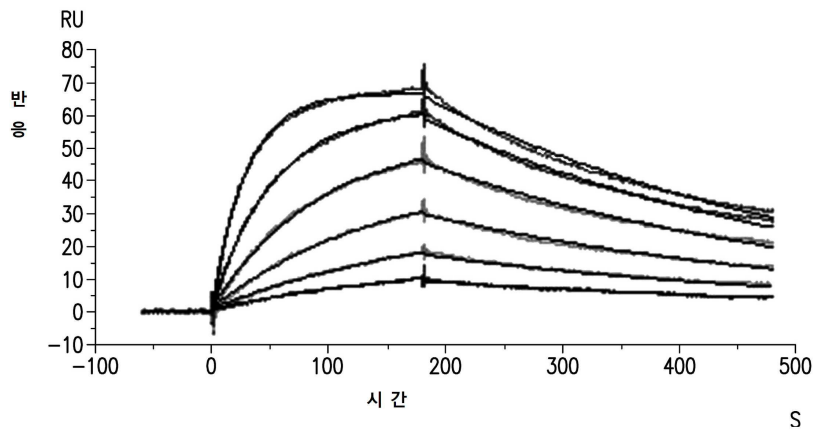
도면3a



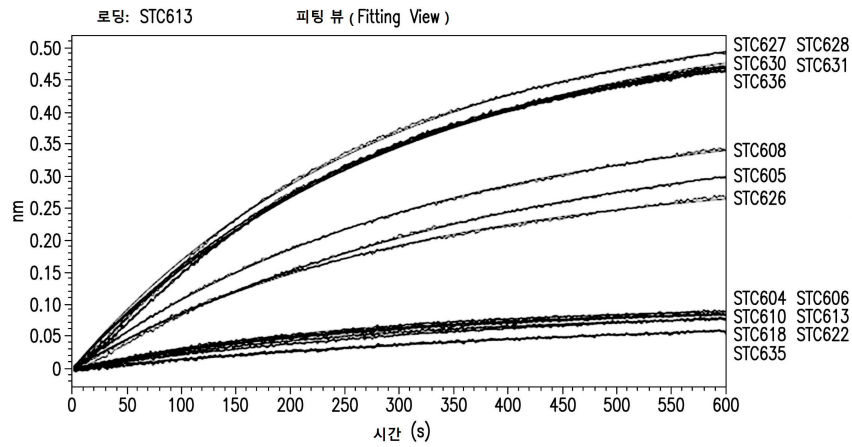
도면3b



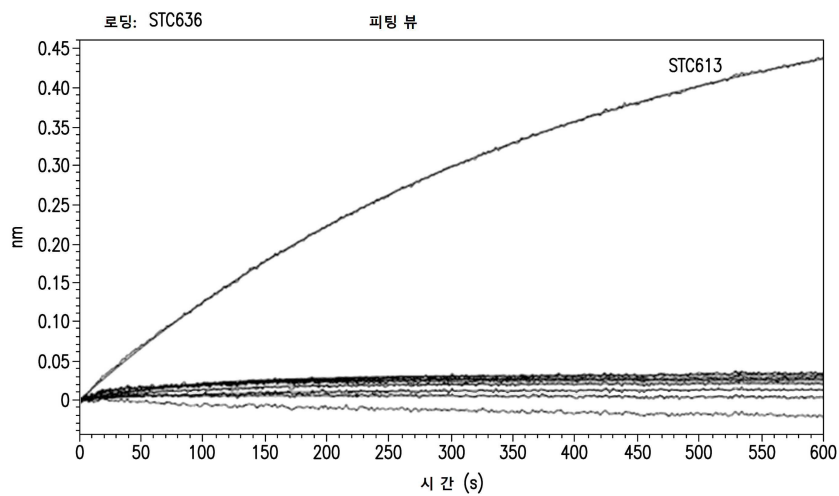
도면3c



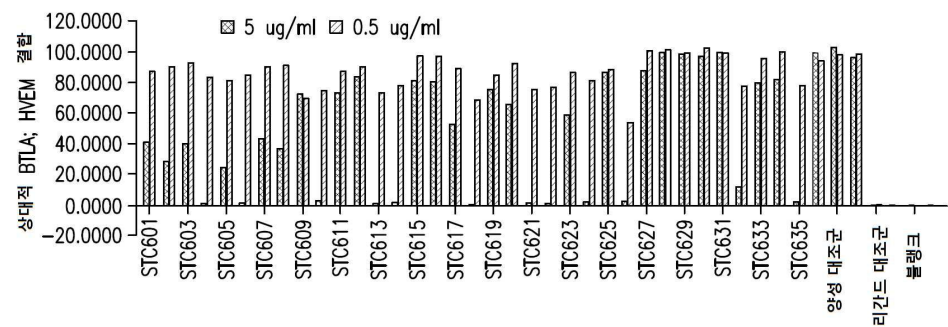
도면4a



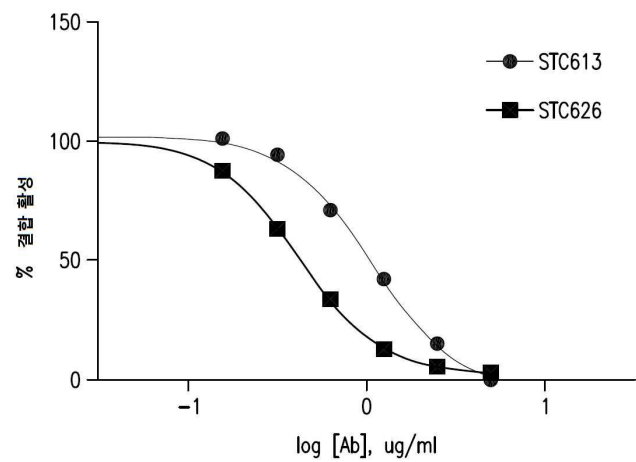
도면4b



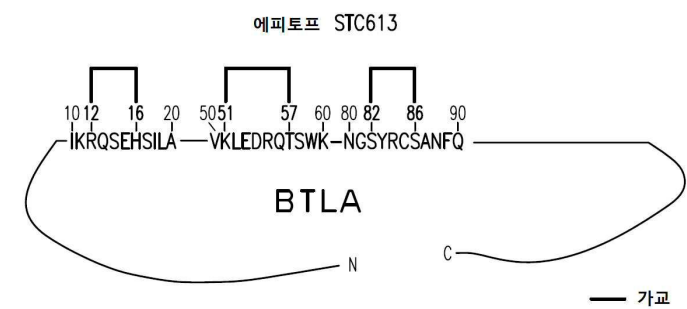
도면5



도면6



도면7



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> STCUBE, INC.

<120> ANTIBODIES SPECIFIC TO GLYCOSYLATED BTLA AND METHODS OF  
USE THEREOF

<130> 604556-228009

<140><141><150> 62/262,293

<151> 2015-12-02

<160> 169

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 289

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Thr Leu Pro Ala Met Leu Gly Thr Gly Lys Leu Phe Trp Val

1 5 10 15

Phe Phe Leu Ile Pro Tyr Leu Asp Ile Trp Asn Ile His Gly Lys Glu

20 25 30

Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser Ile

35 40 45

Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr Cys Ala

50 55 60

Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr Cys Val

65 70 75 80

Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp Lys Glu Glu Lys Asn Ile Ser

85 90 95

Phe Phe Ile Leu His Phe Glu Pro Val Leu Pro Asn Asp Asn Gly Ser

100 105 110

Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser His Ser

115 120 125

Thr Thr Leu Tyr Val Thr Asp Val Lys Ser Ala Ser Glu Arg Pro Ser

130 135 140

Lys Asp Glu Met Ala Ser Arg Pro Trp Leu Leu Tyr Arg Leu Leu Pro

145 150 155 160

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

Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly Ser  
225 230 235 240  
Glu Val Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile Val  
245 250 255  
Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Pro Asn Ser Arg Leu Ala  
260 265 270  
Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val Arg  
275 280 285

Ser

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

<400> 2

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Arg Asp Asp  
20 25 30  
Tyr Val His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45



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

100 105 110  
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 3

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polynucleotide"

<400> 3

gaggttcagc tgcagcagtc tggggctgag cttgtgaggc caggggcctc agtcaagttg 60  
 tcctgcacag cttctggett taacattaga gacgactatg tgcaactggtt gaaacagagg 120  
 cctgatcagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg cgaatggtaa aactaaatat 180

gacccgaagt tccaggacaa ggccactata actgcagaca catcctccaa cacagcctac 240  
 ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct atttctgtgt tagagagggg 300  
 ggtagtaact acgactatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360  
 tca 363

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide"

<400> 4

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1 5 10 15  
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Leu Ser Leu Leu Asp Ser  
20 25 30  
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45  
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60  
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80  
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95  
Ile His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 5

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide"

<400> 5

gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcggtta ccattggaca accagcctcc 60

atctcttgca agtcaagtct gaggctctta gatagtgatg gaaagacata ttgaattgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactct atctggtgtc taaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattattgct ggcaaggtat tcattttcct 300

cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 6

Gly Phe Asn Ile Arg Asp Asp

1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 7

Asp Pro Ala Asn Gly Lys

1 5

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 8

Glu Gly Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 9

Gly Phe Asn Ile Arg Asp Asp Tyr Val Met

1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 10

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Lys Thr Lys

1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 11

Glu Gly Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 12

Asp Asp Tyr Val Met

1 5

<210> 13  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 13  
 Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Lys Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln  
 1 5 10 15  
 Asp

<210> 14  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 14  
 Glu Gly Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10  
 <210> 15  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 15  
 Arg Asp Asp Tyr Val Met  
 1 5  
 <210> 16  
 <211> 13



<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 16  
 Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Lys Thr Lys  
 1 5 10

<210> 17  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 17  
 Val Arg Glu Gly Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp  
 1 5 10

<210> 18  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 18  
 Lys Ser Ser Leu Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15  
 <210> 19  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 19

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 20

Trp Gln Gly Ile His Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 21

Lys Ser Ser Leu Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 22

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 23

Trp Gln Gly Ile His Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 24

Lys Ser Ser Leu Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 25

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 26  
 Trp Gln Gly Ile His Phe Pro Arg Thr  
 1 5

<210> 27  
 <211> 12  
 <212> PRT

<  
 213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 27  
 Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu  
 1 5 10

<210> 28  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 28  
 Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp  
 1 5 10

<210> 29  
 <211> 8

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 29

Trp Gln Gly Ile His Phe Pro Arg

1 5

<210> 30

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 30

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Ile Ala Phe Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Gly Val Arg Arg Gly Gly Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 31

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide"

<400

> 31

cagatccagt tggatgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc	60
tcttgcgaagg cttctgggta taccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct	120
ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacca aacttgaga gccaacatat	180
gctgaagagt tcaaggagc gattgccttc tctttggaat cctctgccag cactgcctat	240
ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggccacat atttctgtgc aagagaggga	300
gtgcgacggg ggggtactt ttttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc	360
tca	363

<210> 32

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly	
1                      5                      10                      15	
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn	
20                      25                      30	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val	
35                      40                      45	
Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50                      55                      60	
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser	
65                      70                      75                      80	
Glu Asp Phe Gly Ser Tyr His Cys Gln His Phe Trp Gly Phe Pro Phe	
85                      90                      95	
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala	

100 105

<210>

33

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide"

<400> 33

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc	60
atcacatgtc gagcaagtga gaatatattac agcaatttag catggtatca gcagaaacag	120
ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct	240
gaagattttg ggagttatca ctgtcaacat ttttgggggtt ttccattcac gttcggcgcg	300

gggacaaaagt tggaaataaa acgggct	327
--------------------------------	-----

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 34

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

1	5
---	---

<210> 35

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 35

Asn Thr Asn Thr Gly Glu

1 5

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 36

Glu Gly Val Arg Arg Gly Gly Tyr Phe Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 37

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn

1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 38

Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr

1 5 10

<210> 39

<211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 39  
 Glu Gly Val Arg Arg Gly Gly Tyr Phe Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 40  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 40  
 Asn Tyr Gly Met Asn  
 1 5

<210> 41  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 41  
 Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 42  
 <211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 42

Glu Gly Val Arg Arg Gly Gly Tyr Phe Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 43

Thr Asn Tyr Gly Met Asn

1 5

<210>

44

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 44

Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr

1 5 10

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 45

Ala Arg Glu Gly Val Arg Arg Gly Gly Tyr Phe Phe Asp

1                      5                      10

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 46

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1                      5                      10

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 47

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1                      5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 48

Gln His Phe Trp Gly Phe Pro Phe Thr



1 5

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 49

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 50

<211> 7

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 50

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 51

Gln His Phe Trp Gly Phe Pro Phe Thr

1 5

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 52

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 53

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 54

Gln His Phe Trp Gly Phe Pro Phe Thr

1 5

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 55

Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr

1 5

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 56

Leu Leu Val Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 57

Gln His Phe Trp Gly Phe Pro Phe

1 5

<210> 58

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 58

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1                    5                    10                    15  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
                   20                    25                    30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                    40                    45  
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe  
                   50                    55                    60  
  
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80  
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95  
 Leu Ile Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
                   100                    105                    110  
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
                   115

<210> 59

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polynucleotide"

<400> 59

gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg	60
tctgcacag cttctggctt caacattaaa gacacctata tgcaactgggt gaggcagagg	120
cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg cgaatggtta tactaaatat	180
gacccgaagt tccagggcaa ggccactata acagcagaca catcctcaa cacagcctac	240
ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtct catctatgat	300
ggttactacg actcctttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca	357

<210> 60

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 60

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Pro Ile Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Val

85 90 95

Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 61

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 61

gatgttgtga tgaccagac tccactcaact ttgtcgggtc ccattggaca accagcctcc 60

atctcttgca agtcaagtca gaggctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactc atctgggtgc taaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaagttac acattttcct 300

cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa

336

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 62

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

1 5

<210> 63

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 63

Asp Pro Ala Asn Gly Tyr

1 5

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 64

Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asp Ser Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 65

<211> 10

<212> PRT



<213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 65

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His

1 5 10

<

210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 66

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys

1 5 10

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 67

Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asp Ser Phe Asp Tyr

1 5 10

<210

> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

```

        peptide"
<400> 68
Asp Thr Tyr Met His
1             5
<210> 69
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 69
Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1             5             10             15

Gly

<210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 70
Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asp Ser Phe Asp Tyr
1             5             10
<210> 71
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 71

```

Lys Asp Thr Tyr Met His

1 5

<210> 72

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 72

Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys

1 5 10

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 73

Leu Ile Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asp Ser Phe Asp

1 5 10

<210> 74

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 74

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 75

<211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 75  
 Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser  
 1 5

<210> 76  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 76  
 Trp Gln Val Thr His Phe Pro Arg Thr  
 1 5

<210> 77  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 77  
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn  
 1 5 10 15

<210> 78  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

```

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      peptide"
<400> 78
Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1           5
<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      peptide"
<400> 79
Trp Gln Val Thr His Phe Pro Arg Thr
1           5
<210> 80
<211> 16
<212> PRT
<
213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      peptide"
<400> 80
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1           5           10           15
<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      peptide"
<400> 81

```

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 82

<211

> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 82

Trp Gln Val Thr His Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 83

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 83

Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu

1 5 10

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 84

Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp

1 5 10

<210> 85



<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 85

Trp Gln Val Thr His Phe Pro Arg

1 5

<210> 86

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His

1 5 10 15

Ser Ile Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr

20 25 30

Cys Ala Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr

35 40 45

Cys Val Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp Lys Glu Glu Lys Asn

50 55 60

Ile Ser Phe Phe Ile Leu His Phe Glu Pro Val Leu Pro Asn Asp Asn

65 70 75 80

Gly Ser Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser

85 90 95

His Ser Thr Thr Leu Tyr Val Thr Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp

100 105 110

Thr Ala Gly Arg Glu Ile Asn Leu Val Asp His His His His His His

115 120 125

<210> 87

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys

1 5 10

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys

1 5 10

<210> 89

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 90

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 92

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Arg Gln Ser Glu His Ser Ile Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu

1 5 10 15

Cys Pro Val Lys Tyr Cys Ala Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys

20 25 30

<210> 93

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Arg Gln Ser Glu His Ser Ile Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu

1 5 10 15

Cys Pro Val Lys

20

<210> 94

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Arg Gln Ser Glu His Ser Ile Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu

1 5 10 15

Cys Pro Val Lys

20

<210> 95

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Gln Ser Glu His Ser Ile Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu Cys

1 5 10 15

Pro Val Lys

<210> 96

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Gln Ser Glu His Ser Ile Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu Cys

1 5 10 15

Pro Val Lys

<210> 97

<211> 31

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 97

Gln Ser Glu His Ser Ile Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu Cys

1 5 10 15

Pro Val Lys Tyr Cys Ala Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys

20 25 30

<210> 98

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Tyr Cys Ala Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys

1 5 10

<210> 99

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

99

Asn Ile Ser Phe Phe Ile Leu His Phe Glu Pro Val Leu Pro Asn Asp

1                    5                    10                    15

Asn Gly Ser Tyr Arg

20

<210> 100

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser His Ser Thr Thr

1                    5                    10                    15

Leu Tyr Val Thr Gly Lys

20

<210> 101

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr Ala Gly Arg

1                    5                    10

<210> 102

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Glu Ile Asn Leu Val Asp His His His His His His

1                    5                    10

<210> 103

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (4)..(4)

<223> Cys(carbamidomethyl)

<400> 103

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu

1 5

<210> 104

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu

1 5

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (4)..(4)

<223> Cys(carbamidomethyl)

<400> 105

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr

1 5

<210> 106

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser Ile Leu

1 5 10

<210> 107

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107



Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser Ile Leu Ala Gly Asp Pro Phe

1 5 10 15

<210> 108

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Glu Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr

1 5

<210> 109

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser Ile Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu

1 5 10 15

Leu

<210> 110

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (9)..(9)

<223

> Cys(carbamidomethyl)

<400> 110

Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr

1 5 10

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Cys Ala Asn Arg Pro His Val Thr Trp

1 5

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr

1 5

<210> 113

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Cys(carbamidomethyl)

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (4)..(4)

<223> Asn(Deamidated)

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Cys(carbamidomethyl)

<400> 113

Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr Cys Val Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr

1 5 10 15

Ser Trp

<210> 114

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Cys(carbamidomethyl)

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Cys(carbamidomethyl)

<400> 114

Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr Cys Val Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr

1 5 10 15

Ser Trp

<210> 115

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Asn Gly Thr Thr Cys Val Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp

1 5 10 15

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Ile Glu Ser His Ser Thr Thr Leu Tyr

1 5

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Lys Glu Glu Lys Asn Ile Ser Phe Phe

1 5

<210> 118

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr

1 5

<210> 119

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Glu Pro Val Leu Pro Asn Asp Asn Gly Ser Tyr Arg Cys Ser Ala Asn

1 5 10 15

Phe

<210> 120

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Val Thr Gly Lys Gln Asn Glu Leu

1 5

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu

1 5 10

<210> 122

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Asn Gly Thr Thr Cys Val Lys Leu

1 5

<210> 123

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser His Ser Thr Thr Leu

1 5 10

<210> 124

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Lys Glu Glu Lys Asn Ile Ser Phe

1 5

<210> 125

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser His Ser Thr Thr Leu Tyr

1 5 10

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Ile Glu Ser His Ser Thr Thr Leu Tyr

1 5

<210>

127

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Glu Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr

1                      5

<210> 128

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Val Thr Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr Ala Gly Arg Glu Ile

1                      5                      10                      15

Asn Leu

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Cys Ala Asn Arg Pro His Val Thr Trp

1                      5

<210> 130

<211>

> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Glu Cys Pro Val Lys Tyr

1                      5

<210> 131

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens



<400> 131

Glu Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr

1 5

<210> 132

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Val Asp His His His His His His

1 5

<210> 133

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Val Thr Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr Ala Gly Arg Glu Ile

1 5 10 15

Asn Leu Val Asp His His His His His His

20 25

<210> 134

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (17)..(17)

<223> Asn(Deamidated)

<400> 134

Val Thr Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr Ala Gly Arg Glu Ile

1 5 10 15

Asn Leu Val Asp His His His His His His

20 25

<210> 135

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

Ser Asp Thr Ala Gly Arg Glu Ile Asn Leu

1 5 10

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr

1 5

<210> 137

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

Ser Asp Thr Ala Gly Arg Glu Ile Asn Leu Val Asp His His His His

1 5 10 15

His His

<210> 138

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp

1 5

<210> 139

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

Val Thr Gly Lys Gln Asn Glu Leu

1 5

<210> 140

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Tyr Val Thr Gly Lys Gln Asn Glu Leu

1 5

<210> 141

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser Ile Leu Ala

1 5 10 15

Gly

<210> 142

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Asp Thr Ala Gly Arg Glu Ile Asn Leu Val Asp His His His His His

1 5 10 15

His

<210> 143

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

Lys Tyr Cys Ala Asn Arg Pro His Val

1 5

<210> 144  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 144  
 Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys Leu  
 1                      5                      10  
 <210> 145  
 <211> 5  
 <212>  
 > PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 145  
 Lys Gln Asn Glu Leu  
 1                      5  
 <210> 146  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 146  
 Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser  
 1                      5                      10  
 <210> 147  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 147  
 Leu Ile Glu Ser His Ser Thr Thr  
 1                      5  
 <210> 148  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 148  
 Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser

1 5  
 <210>  
 > 149  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 149  
 Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln

1 5  
 <210> 150  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 150  
 Val Thr Gly Lys Gln Asn Glu

1 5  
 <210> 151  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 151  
 Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser Ile

1 5  
 <210> 152  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 152  
 Val Lys Tyr Cys Ala Asn Arg Pro His

1 5  
 <210> 153  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 153

Ala Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys

1 5 10

<210> 154

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 154

Val Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp Lys Glu Glu Lys Asn

1 5 10 15

<210> 155

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 155

Ile Glu Ser His Ser Thr Thr Leu Tyr

1 5

<210> 156

<211> 9

<

212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 156

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

1 5

<210> 157

<211> 18

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 157

Ser Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Leu

1 5 10 15

Ser Leu

<210> 158



<211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 158

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr

1 5 10 15

<210> 159

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 159

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr

1 5 10

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 160

Ile Ser Cys Lys Ser Ser Leu Ser Leu

1 5

<210> 161

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 161

Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser Ile Leu

1 5 10

<210> 162

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 162

Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp

1 5  
 <210> 163  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 163

Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu

1 5 10

<210> 164  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 164

Asn Gly Thr Thr Cys Val Lys Leu

1 5

<210> 165  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 165

Glu Pro Val Leu Pro Asn Asp Asn Gly Ser Tyr

1 5 10

<210> 166  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 166

Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser Ile

1 5 10

<210> 167  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 167

Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser Ile Leu Ala

1 5 10

<210> 168

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 168

Val Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp Lys

1 5 10

<210> 169

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 169

Asn Gly Ser Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln

1 5 10