

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0139083
(43) 공개일자 2024년09월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2818 (2013.01)
A61P 37/06 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7029189
- (22) 출원일자(국제) 2023년01월29일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년08월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2023/073699
- (87) 국제공개번호 WO 2023/143564
국제공개일자 2023년08월03일
- (30) 우선권주장
PCT/CN2022/075109 2022년01월29일 중국(CN)
- (71) 출원인
하이파이바이오 인코퍼레이티드
미국 매사추세츠 02139 캄브리지 퍼트넘 애비뉴 237
- (72) 발명자
리, 쥐잉
미국 02139 매사추세츠 캄브리지 퍼트넘 애비뉴 237 하이파이바이오 (에이치케이) 리미티드 내
장, 첸
미국 02139 매사추세츠 캄브리지 퍼트넘 애비뉴 237 하이파이바이오 (에이치케이) 리미티드 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이상남

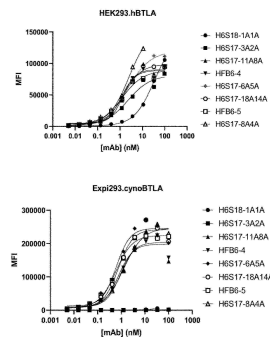
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 BTLA에 대한 항체 및 이의 용도

(57) 요약

BTLA에 특이적인 단클론 항체 및 이의 항원 결합 단편, 및 이를 사용하여 자가면역 장애를 치료하는 방법으로서, 병용요법을 포함하는 방법이 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2317/75 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

선, 빙칭

중국 311200 저장 항저우 샤오산 디스트릭트 진이
로드 넘버 79 타워 디 스위트 255 하이파이바이오
내

아드리안, 프란시스코

미국 02139 매사추세츠 캠브리지 퍼트넘 애비뉴
237 하이파이바이오 (에이치케이) 리미티드 내

슈바이처, 리앙

미국 02139 매사추세츠 캠브리지 퍼트넘 애비뉴
237 하이파이바이오 (에이치케이) 리미티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

인간 BTLA(B림프구 및 T림프구 감쇠제)에 특이적이고 이를 활성화시키며, 선택적으로 시노물구스 BTLA와 교차 반응하는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 상기 단클론 항체는

(1a) 서열번호 1의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 2의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 3의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR)과,

(1b) 서열번호 4의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 5의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 6의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

또는

(2a) 서열번호 61의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 62의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 63의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR)과,

(2b) 서열번호 64의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 65의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 66의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함하며;

선택적으로, 상기 단클론 항체는 자연적으로 발생한 것이 아닌 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서,

(1A) HCVR 서열이 서열번호 (7+2n), 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 중쇄 프레임워크 영역에 적어도 하나의 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하거나/본질적으로 이러한 아미노산 변화로 이루어지거나/이러한 아미노산 변화로 이루어지는 변이형이고;

(1B) LCVR 서열이 서열번호 (8+2n), 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 경쇄 프레임워크 영역에 적어도 하나의 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하거나/본질적으로 이러한 아미노산 변화로 이루어지거나/이러한 아미노산 변화로 이루어지는 변이형이며,

여기서 n은 1, 0 및 2 내지 24 중 어느 하나이거나;

(2A) HCVR 서열이 서열번호 (67+2n), 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 중쇄 프레임워크 영역에 적어도 하나의 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하거나/본질적으로 이러한 아미노산 변화로 이루어지거나/이러한 아미노산 변화로 이루어지는 변이형이고;

(2B) LCVR 서열이 서열번호 (68+2n), 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 경쇄 프레임워크 영역에 적어도 하나의 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하거나/본질적으로 이러한 아미노산 변화로 이루어지거나/이러한 아미노산 변화로 이루어지는 변이형이며,

여기서 n은 0 내지 24 중 어느 하나인, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단클론 항체가 IgG1 항체, IgG2 항체, IgG3 항체 또는 IgG4 항체인, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단클론 항체가 IgG1 항체인, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 IgG1 항체가 서열번호 57, 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 그 안에 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하는 변이형의 중쇄 불변 영역 서열과, 서열번호 58, 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 그 안에 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하는 변이형의 경쇄 불변 영역 서열을 포함하는, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단클론 항체가

(1) 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 및/또는 항체 의존성 세포 매개 포식작용(ADCP)(예컨대, F243L, G236A, S239D/I332E, S239D/A330L/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, 또는 Fc γ RIIa에 대한 결합 증가를 통해 ADCC가 증강된 푸코실화되지 않은(비푸코실화된) 항체(예컨대, Fc 영역에 있는 푸코실화되지 않은 N297))을 조절하고/하거나;

(2) 혈청 반감기를 증강시키는(예컨대, T250Q/M428L, M252Y/S254T/T256E) 중쇄 불변 영역 내 돌연변이를 포함하는 IgG1 항체인, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스 항체, 인간-마우스 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, CDR 이식된 항체 또는 재표면화된 항체인 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제7항에 있어서, 인간화 항체인 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이의 항원 결합 단편이 Fab, Fab', F(ab')₂, F_d, 단일 사슬 Fv 또는 scFv, 디설파이드 결합된 F_v, V-NAR 도메인, IgNar, 인트라바디, IgG Δ CH₂, 미니바디, F(ab')₃, 테트라바디, 트리아바디, 디아바디, 단일 도메인 항체, DVD-Ig, Fcab, mAb₂, (scFv)₂, 또는 scFv-Fc인, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 시노물구스/레서스 원숭이 BTLA와 교차 반응하지만, 마우스 BTLA와는 실질적으로 교차 반응하지 않는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 약 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM, 1 nM, 0.5 nM 또는 그 이하보다 작은 K_d로 인간 BTLA에 결합하는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 BTLA의 아고니스트이며, BTLA에의 결합 시 BTLA로부터의 다운스트림 신호전달을 활성화시키는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 BTLA로부터의 다운스트림 신호전달이 B세포 증식을 저해하고/하거나, T세포(예를 들어, CD4, CD8, Th1, TFH, $\alpha\beta$ 또는 $\gamma\delta$ T세포) 및/또는 혈장 세포 활성화를 저해하는, 단리된 단클론 항체 또는

이의 항원 결합 단편.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, HVEM에 대한 BTLA의 결합을 차단하거나/방해하거나/폐지하지 않는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 10 mg/kg의 용량으로 BIW*6(예를 들어, 21일 동안) 투여될 때(예를 들어, 마우스에 *i.p.*로 투여) 유의한 체중 감소를 유도하지 않는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 생체내 투여될 때(예를 들어, 14일 동안 10 mg/kg의 용량으로 BIW*6, 마우스에 *i.p.*로 투여) CD45⁺ T세포를 유의하게 감소시키는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, GvHD 또는 이의 동물 모델에서 아이소타입 일치 대조군 Ab와 비교하여, 질환 중증도(예를 들어, 3주차 평균 총 질환 점수 3 미만) 및/또는 전체 생존율(예를 들어, 4주차 전체 생존율 적어도 80%)을 유의하게 감소시키는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 18

인간 BTLA에 대한 결합에 대해 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 19

제18항에 있어서, BTLA에의 결합 시 B세포 증식을 저해하고/하거나, T세포(예를 들어, CD4, CD8, Th1, TFH, α β 또는 γ δ T세포) 활성화를 저해하는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

- (1) 서열번호 9의 HCVR 서열, 서열번호 57의 중쇄 불변 영역 서열, 서열번호 10의 LCVR 서열 및 서열번호 58의 경쇄 불변 영역 서열; 또는
- (2) 서열번호 59의 중쇄 아미노산 서열과 서열번호 60의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 21

- (1) 서열번호 9의 HCVR 서열, 서열번호 57의 중쇄 불변 영역 서열, 서열번호 10의 LCVR 서열 및 서열번호 58의 경쇄 불변 영역 서열; 또는
- (2) 서열번호 59의 중쇄 아미노산 서열과 서열번호 60의 경쇄 아미노산 서열을 포함하거나/본질적으로 이로 이루어지거나/이로 이루어지는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 중쇄 또는 경쇄, 또는 이의 항원 결합 부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 23

제22항에 있어서, 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 24

제22항 또는 제23항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

청구항 25

제24항에 있어서, 발현 벡터(예를 들어, 포유류, 효모, 곤충 또는 박테리아 발현 벡터)인 벡터.

청구항 26

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제22항 또는 제23항의 폴리뉴클레오타이드, 또는 제24항 또는 제25항의 벡터를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 정맥내(*i.v.*) 주입 또는 투여용, 또는 피하(*s.c.*) 투여용으로 제형화된 약제학적 조성물.

청구항 28

B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응의 하향조절 또는 자가면역 장애의 치료를 필요로 하는 환자에서 B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응을 하향조절하거나 자가면역 장애를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제22항 또는 제23항의 폴리뉴클레오타이드, 제24항 또는 제25항의 벡터, 또는 제26항 또는 제27항의 약제학적 조성물의 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 자가면역 장애를 치료하기 위한 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 자가면역 장애가 전신 홍반성 루푸스(SLE); 소아 궤양성 대장염을 포함하는 궤양성 대장염(UC); 류마티스 관절염(RA); 만성 판상 건선을 포함하는 건선(Ps); 건선성 관절염(PsA); 소아 크론병을 포함하는 크론병(CD); 염증성 장질환(IBD); 강직성 척추염; 다관절형 소아 특발성 관절염을 포함하는 소아 특발성 관절염(JIA); 화농성 한선염; 비감염성 중간부, 후부 및 전체 포도막염; 자가면역 간염 유사 질환; 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE); MHC 불일치 심장 동종이식; 급성 기도 알레르기로 인한 폐 염증; 이식편대숙주병(GvHD); 또는 동종이계 조혈 줄기세포 이식(aHSCT)인, 방법.

청구항 31

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 자가면역 장애를 치료하는 데 효과적인 추가의 작용제를 상기 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 자가면역 장애가 루푸스인, 방법.

청구항 33

B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응의 하향조절 또는 자가면역 장애의 치료를 필요로 하는 환자에서 B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응을 하향조절하거나 자가면역 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에서의, 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제22항 또는 제23항의 폴리뉴클레오타이드, 제24항 또는 제25항의 벡터, 또는 제26항 또는 제27항의 약제학적 조성물의 용도.

청구항 34

B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응을 하향조절하거나 자가면역 장애를 치료하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제22항 또는 제23항의 폴리뉴클레오타이드, 제24항 또는 제25항의 벡터, 또는 제26항 또는 제27항의 약제학적 조성물을 포함하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 참조

[0002] 본 출원은 2022년 1월 29일자 출원된 PCT/CN2022/075109의 출원일에 대한 우선권을 주장하며, 도면과 서열목록을 포함한 상기 문헌의 전체 내용은 본원에 참조로 인용된다.

[0003] 서열목록

[0004] 본 출원은 XML 형식으로 전자문서로 제출된 서열목록 XML 파일을 포함하며, 이러한 서열목록은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다. 2023년 1월 23일자 생성된 상기 XML 사본의 명칭은 131206-01219_SL_XML.xml이고, 크기는 170,638바이트이다.

배경 기술

[0005] B림프구 및 T림프구 감쇠제(BTLA; CD272로도 알려짐)는 CD28, CTLA-4, ICOS 및 PD-1을 또한 포함하는 CD28 수용체 패밀리의 저해성 구성원이다(문헌[Watanabe *et al.*, *Nat Immunol.* 4:670-679, 2003]). BTLA는 골수계 세포와 림프계 세포 모두에서 면역계 전반에 걸쳐 광범위하게 발현된다(문헌[Han *et al.*, *J Immunol.* 172:5931-9, 2004]). BTLA는 리간드인 헤르페스바이러스 진입 매개체(HVEM)에 의한 결합 후, 포스포타아제 SHP-1과 SHP-2를 이의 세포질 도메인으로 동원하여(문헌[Sedy *et al.*, *Nat Immunol.* 6:90-8, 2005]), 활성화 수용체의 신호전달 연쇄반응을 저해한다.

[0006] 온전한 BTLA 유전자가 결여되어 있는 BTLA 녹아웃 마우스는, 시험관내에서의 과증식성 B세포 및 T세포 반응, 면역화 후 DNP-KLH에 대한 더 높은 역가, 및 EAE에 대한 민감성 증가를 나타낸다(문헌[Watanabe *et al.*, *Nat Immunol.* 4:670-679, 2003]). 노령까지 관찰하면, BTLA 녹아웃 마우스는 자발적으로 자가항체를 생성하여 자가면역 간염 유사 질환을 발생시키고, 여러 기관에 염증 세포 침윤을 일으킨다(문헌[Oya *et al.*, *Arthritis Rheum.* 58: 2498-2510, 2008]). 따라서, BTLA 저해성 수용체는 면역 항상성 유지와 자가면역 저해에서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 나아가, HVEM-BTLA 신호전달은 점막 염증과 감염 면역의 조절에 관여한다(문헌[Shui *et al.*, *J Leukoc Biol.* 89:517-523, 2011]).

[0007] 마우스 BTLA에 결합하는 단클론 항체는 수용체를 통해 신호전달을 유도하여 면역 세포 반응을 저해하는 아고니스트 역할을 할 수 있다. 항-CD3 및 항-CD28 활성화된 T세포는 아고니스트인 항-BTLA 항체(mAh)의 존재 하에서 IL-2 생산 및 증식의 감소를 나타낸다(문헌[Kreig *et al.*, *J Immunol.* 175, 6420-6472, 2005]). 항마우스-BTLA 아고니스트 항체는 이식편대숙주병의 쥐와 모델에서 질환을 개선시키는 것으로 나타났다(문헌[Sakoda *et al.*, *Blood* 117:2506-2514]; 문헌[Albring *et al.*, *J Exp Med.* 207:2551-9, 2010]). 인간 BTLA 수용체를 표적으로 하는 BTLA 아고니스트 항체는 생체외에서 T세포 반응을 저해하는 것으로 나타났으나(문헌[Otsuki *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 344:1121-7, 2006]; 및 W02011/014438), 아직 이러한 항체는 어떠한 질환을 치료하는 목적으로도 승인되지 않았다.

[0008] 따라서, 자가면역 장애의 맥락에서 자가반응성 림프구를 저해하는 BTLA 기능을 조절할 수 있는 치료용 시약을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

[0009] 본 발명의 하나의 양태는, 인간 BTLA(B림프구 및 T림프구 감쇠제)에 특이적이고 이를 활성화시키며, 선택적으로 시노몰구스 BTLA와 교차 반응하는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 상기 단클론 항체는 (1a) 서열번호 1의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 2의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 3의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR)과, (1b) 서열번호 4의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 5의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 6의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는 (2a) 서열번호 61의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 62의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 63의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR)과, (2b) 서열번호 64의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 65의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 66의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함하며; 선택적으로, 상기 단클론 항체는 자연적으로 발생한 것이 아닌 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0010] 특정 실시형태에서, 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서, (1A) HCVR 서열은 서열번호

(7+2n), 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 중쇄 프레임워크 영역에 적어도 하나의 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하거나/본질적으로 이러한 아미노산 변화로 이루어지거나/이러한 아미노산 변화로 이루어지는 변이형이고; (1B) LCVR 서열은 서열번호 (8+2n), 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 경쇄 프레임워크 영역에 적어도 하나의 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하거나/본질적으로 이러한 아미노산 변화로 이루어지거나/이러한 아미노산 변화로 이루어지는 변이형이며, 여기서 n은 1, 0 및 2 내지 24 중 어느 하나이거나; (2A) HCVR 서열은 서열번호 (67+2n), 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 중쇄 프레임워크 영역에 적어도 하나의 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하거나/본질적으로 이러한 아미노산 변화로 이루어지거나/이러한 아미노산 변화로 이루어지는 변이형이고; (2B) LCVR 서열은 서열번호 (68+2n), 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 경쇄 프레임워크 영역에 적어도 하나의 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하거나/본질적으로 이러한 아미노산 변화로 이루어지거나/이러한 아미노산 변화로 이루어지는 변이형이며, 여기서 n은 0 내지 24 중 어느 하나이다.

- [0011] 특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG1 항체, IgG2 항체, IgG3 항체 또는 IgG4 항체이다.
- [0012] 특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체는 IgG1 항체이다.
- [0013] 특정 실시형태에서, IgG1 항체는 서열번호 57, 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 그 안에 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하는 변이형의 중쇄 불변 영역 서열과, 서열번호 58, 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 그 안에 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하는 변이형의 경쇄 불변 영역 서열을 포함한다.
- [0014] 특정 실시형태에서, 단클론 항체는 (1) 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 및/또는 항체 의존성 세포 매개 포식작용(ADCP)(예컨대, F243L, G236A, S239D/I332E, S239D/A330L/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, 또는 Fc γ R1IIa에 대한 결합 증가를 통해 ADCC가 증강된 푸코실화되지 않은(비푸코실화된) 항체(예컨대, Fc 영역에 있는 푸코실화되지 않은 N297))을 조절하고/하거나; (2) 혈청 반감기를 증강시키는(예컨대, T250Q/M428L, M252Y/S254T/T256E) 중쇄 불변 영역 내 돌연변이를 포함하는 IgG1 항체이다.
- [0015] 특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 마우스 항체, 인간-마우스 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, CDR 이식된 항체 또는 재표면화된 항체이다.
- [0016] 특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화 항체이다.
- [0017] 특정 실시형태에서, 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, F_d, 단일 사슬 Fv 또는 scFv, 디설파이드 결합된 Fv, V-NAR 도메인, IgNar, 인트라바디, IgG Δ CH₂, 미니바디, F(ab')₃, 테트라바디, 트리아바디, 디아바디, 단일 도메인 항체, DVD-Ig, Fcab, mAb₂, (scFv)₂, 또는 scFv-Fc이다.
- [0018] 특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 시노물구스/레스스 원숭이 BTLA와 교차 반응하지만, 마우스 BTLA와는 실질적으로 교차 반응하지 않는다.
- [0019] 특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 약 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM, 1 nM, 0.5 nM 또는 그 이하보다 작은 K_d로 인간 BTLA에 결합한다.
- [0020] 특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 BTLA의 아고니스트이며, BTLA에의 결합 시 BTLA로부터의 다운스트림 신호전달을 활성화시킨다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, BTLA로부터의 다운스트림 신호전달은 B세포 증식을 저해하고/하거나, T세포(예를 들어, CD4, CD8, Th1, TFH, $\alpha\beta$ 또는 $\gamma\delta$ T세포) 및/또는 혈장 세포 활성화를 저해한다.
- [0021] 특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 HVEM에 대한 BTLA의 결합을 차단하거나/방해하거나/폐지하지 않는다.
- [0022] 특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 10 mg/kg의 용량으로 BIW*6(예를 들어, 21 일 동안) 투여될 때(예를 들어, 마우스에 *i.p.*로 투여) 유의한 체중 감소를 유도하지 않는다.

- [0023] 특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 생체내 투여될 때(예를 들어, 14일 동안 10 mg/kg의 용량으로 BIW*6, 마우스에 *i.p.*로 투여) CD45⁺ T세포를 유의하게 감소시킨다.
- [0024] 특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 GvHD 또는 이의 동물 모델에서, 예를 들어 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 생체내 투여될 때(예를 들어, 14일 동안 10 mg/kg의 용량으로 BIW*6, 마우스에 *i.p.*로 투여), 아이소타입 일치 대조군 Ab와 비교하여 질환 중증도(예를 들어, 3주차 평균 총 질환 점수 3 미만) 및/또는 전체 생존율(예를 들어, 4주차 전체 생존율 적어도 80%)을 유의하게 감소시킨다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 양태는, 인간 BTLA에 대한 결합에 대해 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0026] 특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 BTLA에의 결합 시 B세포 증식을 저해하고/하거나, T세포(예를 들어, CD4, CD8, Th1, TFH, $\alpha\beta$ 또는 $\gamma\delta$ T세포) 활성화를 저해한다.
- [0027] 특정 실시형태에서, 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (1) 서열번호 9의 HCVR 서열, 서열번호 57의 중쇄 불변 영역 서열, 서열번호 10의 LCVR 서열 및 서열번호 58의 경쇄 불변 영역 서열; 또는 (2) 서열번호 59의 중쇄 아미노산 서열과 서열번호 60의 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 양태는, (1) 서열번호 9의 HCVR 서열, 서열번호 57의 중쇄 불변 영역 서열, 서열번호 10의 LCVR 서열 및 서열번호 58의 경쇄 불변 영역 서열; 또는 (2) 서열번호 59의 중쇄 아미노산 서열과 서열번호 60의 경쇄 아미노산 서열을 포함하거나/본질적으로 이로 이루어지거나/이로 이루어지는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 양태는, 본 발명의 중쇄 또는 경쇄, 또는 이의 항원 결합 부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0030] 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화된다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 양태는, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0032] 특정 실시형태에서, 벡터는 발현 벡터(예를 들어, 포유류, 효모, 곤충 또는 박테리아 발현 벡터)이다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 양태는, 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 또는 본 발명의 벡터를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0034] 특정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 정맥내(*i.v.*) 주입 또는 투여용, 또는 피하(*s.c.*) 투여용으로 제형화된다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 양태는, B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응의 하향조절 또는 자가면역 장애의 치료를 필요로 하는 환자에서 B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응을 하향조절하거나 자가면역 장애를 치료하는 방법으로서, 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 본 발명의 벡터, 또는 본 발명의 약제학적 조성물의 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0036] 특정 실시형태에서, 상기 방법은 자가면역 장애를 치료하기 위한 것이다.
- [0037] 특정 실시형태에서, 자가면역 장애는 전신 홍반성 루푸스(SLE); 소아 궤양성 대장염을 포함하는 궤양성 대장염(UC); 류마티스 관절염(RA); 만성 관상 건선을 포함하는 건선(Ps); 건선성 관절염(PsA); 소아 크론병을 포함하는 크론병(CD); 염증성 장질환(IBD); 강직성 척추염; 다관절형 소아 특발성 관절염을 포함하는 소아 특발성 관절염(JIA); 화농성 한선염; 비감염성 중간부, 후부 및 전체 포도막염; 자가면역 간염 유사 질환; 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE); MHC 불일치 심장 동종이식; 급성 기도 알레르기로 인한 폐 염증; 이식편대숙주병(GvHD); 또는 동종이계 조혈 줄기세포 이식(aHSCT)이다.
- [0038] 특정 실시형태에서, 상기 방법은 자가면역 장애를 치료하는 데 효과적인 추가의 작용제를 상기 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 양태는, B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응의 하향조절 또는 자가면역 장애의 치료를 필요로 하는 환자에서 B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응을 하향조절하거나 자가면역 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에서의, 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 본 발명의 벡터, 또는 본 발명의 약제학적 조성물의 용도를 제공한다.

[0040] 본 발명의 또 다른 양태는, B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응을 하향조절하거나 자가면역 장애를 치료하는데 사용하기 위한, 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 본 발명의 벡터, 또는 본 발명의 약제학적 조성물을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0041] 실시예 또는 청구범위에만 기재된 것들을 포함하여 본원에 기재된 본 발명의 임의의 하나의 실시형태는, 본 발명의 임의의 다른 하나 이상의 실시형태와 조합될 수 있으며, 단, 이러한 조합은 명백하게 부인되거나 부적절한 것이 아니어야 함을 이해해야 한다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은, 인간 BTLA(HEK293.hBTLA)를 과발현하는 HEK293 세포 또는 시노몰구스 BTLA(HEK293.cynoBTLA)를 과발현하는 Expi293 세포에 대한 항-BTLA 항체의 결합을 보여준다. AF647 접합된 항인간 IgG Fc 2차 항체를 이용하여 유세포분석(판독값: 평균 형광 강도, MFI)으로 표적세포에 결합하는 항-BTLA 항체를 정량화하였다.

도 2a는, 대조군 및 후보 항-BTLA 항체에 의한 항-IgM 자극 4일 후 1차 B세포 증식의 저해를 보여준다. 벤치마크 22B3과 유사하거나 이보다 큰 정도로 항-IgM 매개 B세포 증식을 저해하는 능력에 기반하여 HFB6-4와 HFB6-5를 선택하였다. B세포 증식은 자극되지 않은 B세포와 관련된 CFSE 회색(% CFSE10)으로 정량화하고, 분열%로 표시하였다.

도 2b는, HFB6-4와 HFB6-5가 BTLA에 결합될 때 HVEM의 천연 리간드인 HVEM을 대체할 수 없음을 보여준다. 상단 패널은 BTLA를 발현하는 Jurkat 리포터 세포주 및 NFAT 결합 프로모터에 의해 구동되는 루시페라아제 리포터와 공동 배양된, TCR 활성화제(TCRa)와 HVEM(BTLA의 리간드)을 발현하도록 조작된 CHO 세포주를 보여주는 예시적인 도식이다. 양성 대조군인 항-BTLA 차단 항체 JS004와 시험된 다수의 다른 항-BTLA 항체(하단 패널 참조)는 용량 의존적 방식으로 HVEM 매개 T세포 저해를 역전시킬 수 있었다. 하지만, HVEM 매개 T세포 저해를 역전시키는 HFB6-4와 HFB6-5의 능력은 실질적으로 사라졌다(하단 패널 참조).

도 3은, 벤치마크 항체 22B3과 비교한 HFB6-4 및 HFB6-5에 의한 TCR 신호전달의 저해를 보여준다. 좌측 패널은 다음과 같은 검정을 도시한 것이다: 세포 표면에서 FcγRIIb를 발현하는 CHO 세포를 먼저, 항-CD3 항체의 존재 유무 하에서, 항-BTLA 항체, 아이소타입 대조군 MGO 또는 벤치마크 항체 22B3과 함께 인큐베이션하였다. 이어서, 항체로 덮인 CHO 세포를 표면 TCR 및 BTLA를 발현하는 Jurkat 리포터 세포와 함께 인큐베이션하였다. TCR 신호전달의 다운스트림에 있는 NFAT 프로모터의 전사 제어 하에서 루시페라아제 리포터 유전자의 활성을 통해 리포터 세포에서 TCR 신호전달을 측정하였다. 우측 패널은 검정에서 상이한 항체를 시험하여 얻은 발광 판독값을 보여준다.

도 4는, 아이소타입 대조군(MGO53), 벤치마크 항체 22B3, HFB6-4 항체 및 HFB6-5 항체에 의한 항-IgM 자극(10 μg/ml) 후 1차 B세포 증식의 저해를 보여준다. 3명의 상이한 공여자 유래의 1차 B세포와(좌측 패널)와 다양한 농도(0.41 nM 내지 100 nM)(우측 패널)에서 항체의 효과를 시험하였다.

도 5는, 인간 BTLA(HEK293.hBTLA)를 과발현하는 HEK293 세포 또는 시노몰구스 BTLA(HEK293.cynoBTLA)를 과발현하는 Expi293 세포에 대한 HFB6-4 항체의 인간화 변이체와 HFB6-5 항체의 인간화 변이체의 결합을 보여준다. AF647 접합된 항인간 IgG Fc 2차 항체를 이용하여 유세포분석(판독값: 평균 형광 강도, MFI)으로 표적세포에 결합하는 항-BTLA 항체를 정량화하였다.

도 6a는, 1 μg/ml 및 10 μg/ml 농도에서, 아이소타입 대조군 항체(MGO53), 벤치마크 항체 22B3, HFB6-4의 인간화 변이체 및 HFB6-5의 인간화 변이체에 의한 항-IgM 유도 1차 B세포 증식의 저해를 보여준다. B세포 증식은 자극되지 않은 B세포와 관련된 CFSE 회색(% CFSE10)으로 정량화하고, 분열%로 표시하였다.

도 6b는, Jurkat 리포터 세포에서 발광 리포터 유전자의 활성에 의해 생성된 발광 신호(RLU: 상대 광 단위)로 측정된, 아이소타입 대조군 항체(MGO53), 벤치마크 항체 22B3, HFB6-4의 인간화 변이체 및 HFB6-5의 인간화 변이체에 의한 항-CD3 유도 Jurkat 세포 활성화의 저해를 보여준다.

도 7은, 10 mg/kg 용량의 정맥내 주사 후 C57BL/6 마우스에서 HFB6-4의 인간화 변이체와 HFB6-5의 인간화 변이체의 약동학적 프로파일을 보여준다. 주사하고 1시간, 24시간 및 72시간 후에 혈액을 샘플링하였다.

도 8a 내지 도 8g는, 급성 이식편대숙주병(GvHD)의 NSG 마우스 모델에서 인간 말초혈액 단핵 세포(hPBMC)의 접종 후 면역 반응을 저해하는데 있어 관심 항체의 치료 효능을 보여준다. 도 8a는, 실험의 개략도를 보여준다. 도 8b는, 실험의 상세한 실험 설계와 판독값을 보여준다. 도 8c 내지 도 8g는, 총 질환 점수(도 8c), RCBW%(도

8d), 림프구 집단 하에서의 hCD45+ 세포%(도 8e) 및 생존율%(도 8f와 도 8g)을 포함하는, 접종 후 최대 14일 내지 21일까지의 예비 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 1. 개요
- [0044] 본원에 기재된 본 발명은 인간 BTLA(B림프구 및 T림프구 감쇠제)에 특이적이고 이를 활성화시키는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 즉, BTLA 아고니스트 항체를 제공한다. 본 발명의 BTLA 아고니스트 항체는 원숭이(예를 들어, 레서스 원숭이 및/또는 시노몰구스 원숭이) BTLA와 같은 비인간 영장류 BTLA와 선택적으로 교차 반응하지만, 설치류(예를 들어, 마우스 또는 래트 BTLA)와는 교차 반응하지 않을 수 있다.
- [0045] 본원에 기재된 본 발명에 따르면, 마우스를 인간 BTLA의 재조합 세포의 도메인(ECD)으로 면역화시켜 일련의 다양한 항체를 생성하는 방식으로 초기에 본 발명의 특정 BTLA 아고니스트 항체를 얻고, 이후에 결합, 교차 반응성, 선택성 및/또는 다른 기능적 활성화에 대해 특징분석하였다. 이어서, 이러한 특정 항체를 1차 B세포 및/또는 T세포의 IgM 유도 증식을 저해하는 능력에 대해 선택하였다. 기능성인 것으로 선택된 항체는 또한 인간 BTLA의 비인간 영장류(예컨대, 원숭이) 동원체에 대해 교차 반응성을 나타낼 수 있는데, 이는 비인간 숙주(예를 들어, 비인간 영장류 또는 NHP) 동물에서 인간 치료제의 독성 연구를 위한 유익한 특징일 수 있다.
- [0046] 추가 특징분석 및 인간화를 위해, 인간 BTLA에 대해 나노몰 이하 또는 한 자릿수 나노몰 농도의 결합 친화도를 갖는, 본원에서 HFB6-4와 HFB6-5로 지칭된, 2개의 예시적인 마우스 항체를 초기에 식별하였다.
- [0047] 이러한 마우스 항체의 몇몇 인간화 변이체(HFB6-4hz1-hG1 포함)를 IgG1 아이소타입으로 생성하였으며, 이들은 각각의 마우스-인간 키메라 모 항체의 결합 및 교차 반응성 프로파일뿐 아니라, B세포, T세포 및/또는 혈장 세포를 포함하는 면역 세포에 대한 저해 효과도 유지하였다.
- [0048] 마우스 면역 장애 모델에서 이러한 항체에 대한 예비 시험관내 및 생체내 효능 평가를 수행하였으며, 초기 독성 및 개발 가능성 분석도 수행하였다. 예비 데이터에 따르면, 대상 단클론 항체는 BTLA 아고니스트로서 특정 벤치마크 항체보다 더 효과적이며, B세포와 T세포를 더 효과적으로 저해하였다.
- [0049] 이러한 항체의 기능성 프로파일은 이의 유리한 개발 가능성 및 약동학적 프로파일과 함께, 다양한 자가면역 질환(예를 들어, 이식편대숙주병 또는 GvHD)과 같은 면역 장애를 치료하기 위한 신규한 치료제로서의 개발을 뒷받침한다.
- [0050] 따라서, 본 발명의 하나의 양태는, 인간 BTLA(B림프구 및 T림프구 감쇠제)에 특이적이고 이를 활성화시키며, 선택적으로 시노몰구스 BTLA와 교차 반응하는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 상기 단클론 항체는 (1a) 서열번호 1의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 2의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 3의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR)과, (1b) 서열번호 4의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 5의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 6의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는 (2a) 서열번호 61의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 62의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 63의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR)과, (2b) 서열번호 64의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 65의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 66의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함하며; 선택적으로, 상기 단클론 항체는 자연적으로 발생한 것이 아닌 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0051] 특정 실시형태에서, CDR 영역 서열은 IMGT 넘버링 체계를 기반으로 한다. Kabat, Chothia 또는 Martin(개선된 Chothia) 체계와 같은 다른 넘버링 체계에 상응하는 CDR 서열은 항체 서열 정렬에 따라 용이하게 유도될 수 있다.
- [0052] 관련 양태에서, 본 발명은 (1) 서열번호 9의 HCVR 서열, 서열번호 57의 중쇄 불변 영역 서열, 서열번호 10의 LCVR 서열 및 서열번호 58의 경쇄 불변 영역 서열; 또는 (2) 서열번호 59의 중쇄 아미노산 서열과 서열번호 60의 경쇄 아미노산 서열을 포함하거나/본질적으로 이로 이루어지거나/이로 이루어지는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0053] 관련 양태에서, 본 발명은 인간 BTLA(예컨대, 서열번호 121)에 대한 결합에 대해 본원에 정의된 바와 같은 정의된 CDR 및/또는 VH/VL 영역 서열을 갖는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0054] 본 발명의 또 다른 양태는, 본원에 기재된 바와 같은 임의의 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 또

는 경쇄, 또는 이의 항원 결합 부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 관련 양태에서, 본 발명은 또한, 엄격한 조건 하에서 폴리뉴클레오타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드의 보체와 혼성화되는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

- [0055] 본 발명의 또 다른 양태는, 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0056] 본 발명의 또 다른 양태는, 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 또는 본 발명의 벡터를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0057] 본 발명의 또 다른 양태는, B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응의 하향조절 또는 자가면역 장애의 치료를 필요로 하는 환자에서 B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응을 하향조절하거나 자가면역 장애를 치료하는 방법으로서, 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 본 발명의 벡터, 또는 본 발명의 약제학적 조성물의 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0058] 본 발명의 또 다른 양태는, B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응의 하향조절 또는 자가면역 장애의 치료를 필요로 하는 환자에서 B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응을 하향조절하거나 자가면역 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에서의, 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 본 발명의 벡터, 또는 본 발명의 약제학적 조성물의 용도를 제공한다.
- [0059] 본 발명의 또 다른 양태는, B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응을 하향조절하거나 자가면역 장애를 치료하는데 사용하기 위한, 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 본 발명의 벡터, 또는 본 발명의 약제학적 조성물을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0060] 본 발명의 상세한 양태는 하기 다양한 섹션에 추가로 및 별도로 기재되어 있다. 하지만, 실시예 또는 도면에만 기재된 실시형태와 하기 하나의 섹션에만 기재된 실시형태를 포함하는 본 발명의 임의의 하나의 실시형태는, 본 발명의 임의의 다른 실시형태(들)와 조합될 수 있다.
- [0061] 2. 정의
- [0062] 가장 넓은 의미에서 "항체"라는 용어는, 비제한적으로, 단클론 항체, 다클론 항체 및 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)를 포함하는 다양한 항체 구조를 포함한다. "항체"라는 용어는 또한, 광범위하게 중쇄의 상보성 결정 영역(CDR) 1, CDR2 및 CDR3과 경쇄의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 분자를 나타낼 수 있으며, 이러한 분자는 항원에 결합할 수 있다. "항체"라는 용어에는 또한, 비제한적으로, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 및 마우스, 인간, 시노물구스 원숭이 등과 같은 다양한 종의 항체가 포함된다.
- [0063] 하지만, 좁은 의미에서 "항체"는, 키메라 단클론 항체, 인간화 단클론 항체 및 인간 단클론 항체를 포함하는 다양한 단클론 항체를 나타내며, 특히 본 발명의 인간화 단클론 항체를 나타낸다.
- [0064] 일부 실시형태에서, 항체는 중쇄 가변 영역(HCVR)과 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 중쇄 가변 영역과 중쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 적어도 하나의 중쇄(HC)와, 경쇄 가변 영역과 경쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 적어도 하나의 경쇄(LC)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 2개의 중쇄(여기서 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역과 중쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함함)와 2개의 경쇄(여기서 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역과 경쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함함)를 포함한다.
- [0065] 본원에 사용된 단일 사슬 Fv(scFv), 또는 예를 들어 모두 6개의 CDR(3개의 중쇄 CDR과 3개의 경쇄 CDR)을 포함하는 단일 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 임의의 다른 항체는 중쇄와 경쇄를 갖는 것으로 간주된다. 일부 이러한 실시형태에서, 중쇄는 3개의 중쇄 CDR을 포함하는 항체의 영역이고, 경쇄는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 항체의 영역이다.
- [0066] 본원에 사용된 "중쇄 가변 영역(HCVR)"이라는 용어는, 최소한, 중쇄 CDR1(CDR-H1), 프레임워크 2(HFR2), CDR2(CDR-H2), FR3(HFR3) 및 CDR3(CDR-H3)을 포함하는 영역을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 또한 CDR-H1의 N-말단인 FR1(HFR1)의 적어도 일부(예를 들어, 전체) 및/또는 CDR-H3의 C-말단인 FR4(HFR4)의 적어도 일부(예를 들어, 전체)를 포함한다.
- [0067] 본원에 사용된 "중쇄 불변 영역"이라는 용어는, 적어도 3개의 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 영역을 나타낸다. 비제한적인 예시적인 중쇄 불변 영역에는, γ , δ 및 α 가 포함된다. 비제한적인 예시적인 중쇄 불변 영역에는 또한 ϵ 과 μ 가 포함된다. 각각의 중쇄 불변 영역은 항체 아이소타입에 해당한다. 예를

들어, γ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgG 항체이고, δ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgD 항체이고, α 불변 영역을 포함하는 항체는 IgA 항체이고, ϵ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgE 항체이고, μ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgM 항체이다.

- [0068] 특정 아이소타입은 서브클래스로 추가로 세분될 수 있다. 예를 들어, IgG 항체에는, 비제한적으로, IgG1(γ 1 불변 영역 포함), IgG2(γ 2 불변 영역 포함), IgG3(γ 3 불변 영역 포함) 및 IgG4(γ 4 불변 영역 포함) 항체가 포함되고; IgA 항체에는, 비제한적으로, IgA1(α 1 불변 영역 포함) 및 IgA2(α 2 불변 영역 포함) 항체가 포함되고; IgM 항체에는, 비제한적으로, IgM1(μ 1 불변 영역 포함) 및 IgM2(μ 2 불변 영역 포함) 항체가 포함된다.
- [0069] 특정 실시형태에서, 본 발명의 항체는 IgG1 항체이다.
- [0070] 본원에 사용된 "중쇄"라는 용어는, 리더 서열이 있거나 없는, 적어도 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 중쇄는 중쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함한다. 본원에 사용된 "전장 중쇄"라는 용어는, 리더 서열이 있거나 없고 C-말단 리신이 있거나 없는, 중쇄 가변 영역과 중쇄 불변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 나타낸다.
- [0071] 본원에 사용된 "경쇄 가변 영역(LCVR)"이라는 용어는, 경쇄 CDR1(CDR-L1), 프레임워크(FR) 2(LFR2), CDR2(CDR-L2), FR3(LFR3) 및 CDR3(CDR-L3)을 포함하는 영역을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 경쇄 가변 영역은 또한 FR1(LFR1)의 적어도 일부(예를 들어, 전체) 및/또는 FR4(LFR4)의 적어도 일부(예를 들어, 전체)를 포함한다.
- [0072] 본원에 사용된 "경쇄 불변 영역"이라는 용어는, 경쇄 불변 도메인, C_L 을 포함하는 영역을 나타낸다. 비제한적인 예시적인 경쇄 불변 영역에는, λ 와 κ 가 포함된다.
- [0073] 본원에 사용된 "경쇄"라는 용어는, 리더 서열이 있거나 없는, 적어도 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 경쇄는 경쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함한다. 본원에 사용된 "전장 경쇄"라는 용어는, 리더 서열이 있거나 없는, 경쇄 가변 영역과 경쇄 불변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 나타낸다.
- [0074] (항체의) "항체 단편", "항원 결합 부분" 또는 "항원 결합 단편"이라는 용어에는, 비제한적으로, Fv, 단일 사슬 Fv(scFv), Fab, Fab' 및 (Fab')₂와 같은, 항원에 결합할 수 있는 단편이 포함된다. 특정 실시형태에서, 항체 단편에는 Fab, Fab', F(ab')₂, F_d, 단일 사슬 Fv 또는 scFv, 디설파이드 결합된 F_v, V-NAR 도메인, IgNar, 인트라바디, IgG Δ CH₂, 미니바디, F(ab')₃, 테트라바디, 트리아바디, 디아바디, 단일 도메인 항체, DVD-Ig, Fcab, mAb₂, (scFv)₂, 또는 scFv-Fc가 포함된다.
- [0075] "Fab"이라는 용어는, 분자량이 대략 50,000 달톤이고 항원에 대한 결합 활성을 갖는 항체 단편을 나타낸다. 이는 중쇄의 N-말단 측의 대략 절반과 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 경쇄 전체를 포함한다. Fab은 특히 면역글로불린을 프로테아제인 파파인으로 처리하여 얻을 수 있다.
- [0076] "F(ab')₂"라는 용어는, 대략 100,000 달톤이고 항원에 대한 결합 활성을 갖는 단편을 나타낸다. 이러한 단편은 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지를 통해 연결된 2개의 Fab 단편보다 약간 더 크다. 이러한 단편은 면역글로불린을 프로테아제인 펩신으로 처리하여 얻는다. Fab 단편은 힌지 영역의 디설파이드 브릿지의 절단에 의해 F(ab')₂ 단편으로부터 얻을 수 있다.
- [0077] 단일 Fv 사슬 "scFv"는 VL 도메인과 VH 도메인을 코딩하는 유전자와, 이러한 도메인에 결합하도록 의도된 펩타이드를 코딩하는 서열을 사용하여 합성된 VH:VL 폴리펩타이드에 해당한다. 본 발명에 따른 scFv에는, 예를 들어 유전자 재조합 기술을 사용하여 적절한 입체형태로 유지되는 CDR이 포함된다.
- [0078] "scFv"의 이량체는 펩타이드 결합에 의해 함께 연결된 2개의 scFv 분자에 해당한다. 이러한 Fv 사슬은 흔히 펩타이드를 코딩하는 링커 서열에 의해 연결된 VH와 VL을 코딩하는 유전자를 포함하는 융합 유전자의 발현 결과이다. 인간 scFv 단편은, 바람직하게는 유전자 재조합 기술의 사용을 통해 적절한 입체형태로 유지되는 CDR을 포함할 수 있다.
- [0079] "dsFv" 단편은 디설파이드 브릿지에 의해 안정화된 VH-VL 이중이량체이며; 2가일 수 있다(dsFv)₂. 2가 Sc(Fv)₂ 또는 다가 항체의 단편은 1가 scFv의 회합에 의해 자발적으로 형성될 수 있거나, scFv 단편을 펩타이드 결합 서열로 연결하는 방식으로 생성될 수 있다.

- [0080] Fc 단편은 항체의 생물학적 활성, 특히 면역 이펙터에 의해 인식되거나 보체를 활성화시키는 능력을 뒷받침한다. 이는 현지 영역 다음에 있는 중쇄의 불변 단편으로 이루어진다.
- [0081] "디아바디"라는 용어는, 2개의 항원 고정 부위를 갖는 작은 항체 단편을 나타낸다. 이러한 단편은, 동일한 VH-VL 폴리펩타이드 사슬에서, 가변 경쇄 도메인 VL에 연결된 가변 중쇄 도메인 VH를 포함한다. 동일한 사슬의 2개의 도메인의 매칭을 허용하기에는 너무 짧은 결합 서열을 사용하면, 또 다른 사슬의 2개의 상보적 도메인과의 매칭이 필연적으로 발생하여, 2개의 항원 고정 부위가 생성된다.
- [0082] "동일한 에피토프에 결합하는 항체" 또는 "(또 다른) 항체와 결합에 대해 경쟁하는 항체"는 항체 경쟁 검정에 의해 결정될 수 있는 항체를 나타낸다. 이는 경쟁 검정에서 항원에 대한 참조 항체의 결합을 50% 이상 차단하는 항체를 나타내며, 반대로 참조 항체는 경쟁 검정에서 항원에 대한 항체의 결합을 50% 이상 차단한다. 동일한 에피토프에 대해 경쟁하는 항체의 맥락에서 사용될 때 "경쟁하다"라는 용어는, 시험되는 항체가 공통 항원에 대한 참조 항체의 특이적 결합을 방지하거나 저해하는 검정에 따라 항체 사이의 경쟁이 결정된다는 것을 의미한다.
- [0083] 다수의 유형의 경쟁적 결합 검정, 예를 들어 고체상 직접 또는 간접 방사성면역검정(RIA), 고체상 직접 또는 간접 효소 면역검정(EIA), 샌드위치 경쟁 검정(예를 들어, 문헌[Stahli *et al.*, 1983, Methods in Enzymology 9:242-253] 참조); 고체상 직접 비오틴-아비딘 EIA(예를 들어, 문헌[Kirkland *et al.*, 1986, J. Immunol. 137:3614-3619] 참조); 고체상 직접 표지 검정; 고체상 직접 표지 샌드위치 검정(예를 들어, 문헌[Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press] 참조); I^{125} 표지를 사용하는 고체상 직접 표지 RIA(예를 들어, 문헌[Morel *et al.*, 1988, Molec. Immunol. 25:7-15] 참조); 고체상 직접 비오틴-아비딘 EIA(예를 들어, 문헌[Cheung, *et al.*, 1990, Virology 176:546-552] 참조); 및 직접 표지 RIA(문헌[Moldenhauer *et al.*, 1990, Scand. J. Immunol.]가 사용될 수 있다.
- [0084] 전형적으로, 이러한 검정은 표지되지 않은 시험 항원 결합 단백질과 표지된 참조 항체 중 어느 하나를 포함하는 고체 표면 또는 세포에 결합된 정제된 항원을 사용하는 것이 포함된다. 경쟁적 저해는 시험 항체의 존재 하에서 고체 표면 또는 세포에 결합된 표지의 양을 결정하는 방식으로 측정된다. 통상적으로, 시험 항체는 과량으로 존재한다. 경쟁 검정에 따라 확인된 항체(경쟁 항체)에는, 참조 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체와, 입체 장애가 발생하도록 참조 항체에 의해 결합된 에피토프에 충분히 근접한 인접 에피토프에 결합하는 항체가 포함된다. 일부 실시형태에서, 경쟁 항체가 과량으로 존재하는 경우, 이는 공통 항원에 대한 참조 항체의 특이적 결합을 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75% 저해할 것이다. 일부 예에서, 결합은 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 이상 저해된다.
- [0085] "항원"이라는 용어는, 항체 또는 이의 면역학적 기능성 단편과 같은 선택적 결합체에 의해 결합될 수 있으며, 또한 해당 항원에 결합할 수 있는 항체를 생성하기 위해 포유동물에 사용될 수 있는 분자 또는 분자의 일부를 나타낸다. 항원은 항체와 상호작용할 수 있는 하나 이상의 에피토프를 보유할 수 있다.
- [0086] "에피토프"라는 용어는, 항체 또는 이의 단편과 같은 선택적 결합체에 의해 결합되는 항원 분자의 부분이다. 상기 용어에는, 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 결정인자가 포함된다. 에피토프는 연속적이거나 연속적이지 않을 수 있다(예를 들어, 폴리펩타이드에서, 폴리펩타이드 서열에서는 서로 연속적이지 않지만, 분자의 맥락에서는 항원 결합 단백질에 의해 결합되는 아미노산 잔기). 일부 실시형태에서, 에피토프는 항체를 생성하는 데 사용되는 에피토프와 유사한 3차원 구조를 포함하지만, 항체를 생성하는 데 사용되는 에피토프에서 발견되는 아미노산 잔기를 포함하지 않거나 이 중 일부만 포함한다는 점에서 모방적일 수 있다. 에피토프 결정인자는 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴기 또는 설포닐기와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 그룹화를 포함할 수 있으며, 특정 3차원 구조적 특징 및/또는 특정 전하 특징을 가질 수 있다.
- [0087] 일부 실시형태에서, "에피토프"는 이를 결정하는 데 사용되는 방법에 따라 정의된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 항체가 수소-중수소 교환(HDX)에 따라 결정 시 항원의 동일한 영역에 결합하는 경우, 항체는 참조 항체와 동일한 에피토프에 결합한다.
- [0088] 특정 실시형태에서, 항체가 X선 결정학에 따라 결정 시 항원의 동일한 영역에 결합하는 경우, 항체는 참조 항체와 동일한 에피토프에 결합한다.
- [0089] 본원에 사용된 "키메라 항체"는, 제1 종(예컨대, 마우스, 래트, 시노물구스 원숭이 등)에서 유래한 적어도 하나의 가변 영역과 제2 종(예컨대, 인간, 시노물구스 원숭이, 닭 등)에서 유래한 적어도 하나의 불변 영역을 포함하는 항체를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 키메라 항체는 적어도 하나의 마우스 가변 영역과 적어도 하나의

인간 불변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키메라 항체의 가변 영역은 모두 제1 종에서 유래한 것이고, 키메라 항체의 불변 영역은 모두 제2 종에서 유래한 것이다.

- [0090] 본원에 사용된 "인간화 항체"는, 비인간 가변 영역(예컨대, 마우스, 래트, 시노몰구스 원숭이, 닭 등)의 프레임워크 영역 내 적어도 하나의 아미노산이 인간 가변 영역의 상응하는 아미노산으로 대체된 항체를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 인간화 항체는 적어도 하나의 인간 불변 영역 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인간화 항체 단편은 Fab, scFv, (Fab')₂ 등이다.
- [0091] 본원에 사용된 "CDR 이식된 항체"는, 제1(비인간) 종의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)이 제2(인간) 종의 프레임워크 영역(FR)에 이식된 인간화 항체를 나타낸다.
- [0092] 본원에 사용된 "인간 항체"는, 인간에서 생산된 항체, 인간 면역글로불린 유전자를 포함하는 비인간 동물에서 생산된 항체(예컨대, XenoMouse[®]), 및 과지 디스플레이(여기서 항체 레파토리는 인간 면역글로불린 서열을 기반으로 함)와 같은 시험관내 방법을 사용하여 선택된 항체를 나타낸다.
- [0093] "숙주세포"는 벡터 또는 단리된 폴리뉴클레오타이드의 수용체일 수 있거나 수용체였던 세포를 나타낸다. 숙주세포는 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있다. 예시적인 진핵세포에는, 영장류 또는 비영장류 동물 세포와 같은 포유류 세포; 효모와 같은 진균 세포; 식물 세포; 및 곤충 세포가 포함된다. 비제한적인 예시적인 포유류 세포에는, 비제한적으로, NSO 세포, PER.C6[®] 세포(Cruce11), 및 293 세포와 CHO 세포, 및 이들의 유도체(예컨대, 각각 293-6E 세포와 DG44 세포)가 포함된다.
- [0094] 본원에 사용된 "단리된"이라는 용어는, 자연에서 전형적으로 함께 발견되는 구성요소 중 적어도 일부에서 분리되었거나, 전형적으로 함께 생성되는 구성요소 중 적어도 일부에서 분리된 분자를 나타낸다. 예를 들어, 폴리펩타이드는 이를 생성한 세포의 구성요소 중 적어도 일부에서 분리되는 경우 "단리된" 것으로 지칭된다. 폴리펩타이드가 발현 후 세포에 의해 분비되는 경우, 폴리펩타이드를 생성한 세포로부터 폴리펩타이드를 함유하는 상청액을 분리하는 것은, 폴리펩타이드를 "단리하는" 것으로 간주된다. 유사하게, 폴리뉴클레오타이드는 자연에서 전형적으로 발견되는 더 큰 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, DNA 폴리뉴클레오타이드의 경우, 게놈 DNA 또는 미토콘드리아 DNA)의 일부가 아니거나, 예를 들어 RNA 폴리뉴클레오타이드의 경우, 이를 생성한 세포의 구성요소 중 적어도 일부에서 분리되는 경우 "단리된" 것으로 지칭된다. 따라서, 숙주세포 내부의 벡터에 함유된 DNA 폴리뉴클레오타이드는 해당 폴리뉴클레오타이드가 자연의 해당 벡터에서 발견되지 않는 한 "단리된" 것으로 지칭될 수 있다.
- [0095] "대상"과 "환자"라는 용어는, 인간과 같은 포유동물을 나타내기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 일부 실시형태에서, 비제한적으로, 설치류, 유인원, 고양이과, 개과, 말, 소, 돼지, 양, 염소, 포유류 실험실 동물, 포유류 농장 동물, 포유류 스포츠 동물 및 포유류 애완동물을 포함하는 다른 비인간 포유동물을 치료하는 방법이 또한 제공된다. 일부 예에서, "대상" 또는 "환자"는 질환 또는 장애에 대한 치료를 필요로 하는 (인간) 대상 또는 환자를 나타낸다.
- [0096] 본원에 사용된 "샘플" 또는 "환자 샘플"이라는 용어는, 예를 들어 물리적, 생화학적, 화학적 및/또는 생리학적인 특징에 기반하여 특징분석하고/하거나 식별하고자 하는 세포 및/또는 다른 분자 엔티티를 함유하는 관심 대상에서 얻거나 유도된 물질을 나타낸다. 예를 들어, "질환 샘플"이라는 어구 및 이의 변형은 특징분석하고자 하는 세포 및/또는 분자 엔티티를 함유하는 것으로 예상되거나 알려진 관심 대상에서 얻은 임의의 샘플을 나타낸다.
- [0097] "조직 또는 세포 샘플"은 대상 또는 환자의 조직에서 얻은 유사한 세포의 집합을 의미한다. 조직 또는 세포 샘플의 공급원은 신선한, 동결된 및/또는 보존된 기관 또는 조직 샘플, 또는 생검 또는 흡인물에서 얻은 고체 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성성분; 가래, 뇌척수액, 양수, 복막액 또는 간질액과 같은 체액; 대상의 임신 또는 발달 중 임의의 시점에서의 세포일 수 있다. 조직 샘플은 또한 1차 또는 배양된 세포 또는 세포주일 수 있다. 선택적으로, 조직 또는 세포 샘플은 질환 조직/기관에서 얻는다. 조직 샘플은 자연에서 조직과 자연적으로 혼합되어 있지 않은 화합물, 예컨대 보존제, 항응고제, 완충제, 고정제, 영양소, 항생제 등을 함유할 수 있다.
- [0098] 본원에 사용된 "참조 샘플", "참조 세포" 또는 "참조 조직"은, 본 발명의 방법 또는 조성물을 사용하여 식별되는 질환 또는 병태에 걸리지 않은 것으로 알려지거나 여겨지는 공급원에서 얻은 샘플, 세포 또는 조직을 나타낸다. 하나의 실시형태에서, 참조 샘플, 참조 세포 또는 참조 조직은 본 발명의 조성물 또는 방법을 사용하여 질환 또는 병태가 식별되는 동일한 대상 또는 환자의 신체의 건강한 부분에서 얻는다. 하나의 실시형태에서, 참

조 샘플, 참조 세포 또는 참조 조직은 본 발명의 조성물 또는 방법을 사용하여 질환 또는 병태가 식별되는 대상 또는 환자가 아닌 적어도 하나의 개체의 신체의 건강한 부분에서 얻는다. 일부 실시형태에서, 참조 샘플, 참조 세포 또는 참조 조직은 질환 또는 병태가 발생하기 전, 또는 질환 또는 병태의 초기 단계에 환자로부터 이전에 얻은 것이다.

[0099] "장애" 또는 "질환"은 본 발명의 하나 이상의 BTLA 안타고니스트를 이용한 치료로부터 유익을 얻을 수 있는 임의의 병태이다. 이에, 포유동물이 문제가 되는 장애에 걸리기 쉬운 병리학적 병태를 포함하는 만성 및 급성 장애 또는 질환이 포함된다. 본원에서 치료하고자 하는 장애의 비제한적인 예에는, 자가면역 장애가 포함된다.

[0100] "과활동성 면역 장애"는, 면역계가 대상의 세포, 기관 또는 이식편을 바람직하지 않게 공격하거나, 면역계의 세포가 제어되지 않게 증식하는 임의의 질병을 의미한다. 통상의 과활동성 면역 장애에는, 자가면역 장애, 및 이식편대숙주병과 같은 동종이계 이식편의 거부반응이 포함된다.

[0101] "치료"는, 예를 들어 목적이 표적화된 병리학적 병태 또는 장애를 늦추는 것(완화시키는 것)뿐 아니라, 예를 들어 목적이 병태 또는 장애의 재발을 저해하는 것과 같은 치료적 치료를 나타낸다. "치료"는 인간을 포함하는 포유동물에서 질환(본원에서 "장애" 또는 "병태"로도 지칭됨)을 위한 치료제의 임의의 투여 또는 적용을 포함하며, 이에, 질환 또는 질환의 진행을 저해하는 것, 질환 또는 이의 진행을 저해하거나 늦추는 것, 질환의 발달을 저지하는 것, 질환을 부분적으로 또는 완전히 완화시키는 것, 질환의 하나 이상의 증상을 부분적으로 또는 완전히 완화시키는 것, 또는 소실된, 누락된 또는 결함이 있는 기능을 복원하거나 복구하는 것; 또는 비효율적인 과정을 자극하는 것이 포함된다. "치료"라는 용어에는 또한, 임의의 표현형 특징의 중증도를 감소시키는 것 및/또는 해당 특징의 발생률, 정도 또는 가능성을 감소시키는 것이 포함된다. 치료를 필요로 하는 대상에는, 이미 장애를 앓고 있는 대상뿐 아니라, 장애의 재발 위험이 있는 대상, 또는 장애의 재발을 예방하거나 늦춰야 하는 대상이 포함된다.

[0102] "유효량" 또는 "치료적 유효량"이라는 용어는, 대상에서 질환 또는 장애를 치료하는 데 효과적인 약물의 양을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 유효량은 목적하는 치료 또는 예방 결과를 달성하는 데 필요한 투여량으로 필요한 기간 동안 효과적인 양을 나타낸다. 본 발명의 항체의 치료적 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 이끌어 내는 안타고니스트의 능력과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 치료적 유효량은 치료적으로 유익한 효과가 대상 항체의 임의의 독성 또는 유해한 효과보다 우세한 양을 포함한다.

[0103] "예방적 유효량"은, 목적하는 예방 결과를 달성하는 데 필요한 투여량으로 필요한 기간 동안 효과적인 양을 나타낸다. 반드시 그러한 것은 아니지만 전형적으로, 예방적 용량은 질환 이전 또는 질환의 초기 단계에서 대상에게 사용되며, 예방적 유효량은 치료적 유효량보다 적을 수 있다.

[0104] "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 대상에게의 투여를 위한 "약제학적 조성물"을 함께 구성하는 치료제와 함께 사용하기 위한 당업계에서 통상적인 비독성 고체, 반고체 또는 액체 충전제, 희석제, 캡슐화 물질, 제형 보조제, 또는 담체를 나타낸다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 이용되는 투여량에서 및 농도에서 수용체에 비독성이며, 제형의 다른 성분과 상용 가능하다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 이용되는 제형에 적절하다. 예를 들어, 치료제가 경구 투여되는 경우, 담체는 겔 캡슐일 수 있다. 치료제가 피하 투여되는 경우, 담체는 피부에 자극을 주지 않으며 주사 부위 반응을 유발하지 않는 것이 이상적이다.

[0105] "제조 물품"은 적어도 하나의 시약, 예를 들어 질환 또는 장애의 치료를 위한 약제, 또는 본원에 기재된 바이오마커를 특이적으로 검출하기 위한 프로브를 포함하는 임의의 제품(예를 들어, 패키지 또는 용기) 또는 키트이다. 일부 실시형태에서, 이러한 제품 또는 키트는 본원에 기재된 방법을 수행하기 위한 단위로서 홍보되거나, 배포되거나 또는 판매된다.

[0106] 3. 과활동성 면역 장애의 치료 방법

[0107] 본원에 기재된 본 발명은 인간과 다른 비인간 포유동물을 치료하는 방법에 사용하기 위한 항-BTLA 항체를 제공한다.

[0108] 병리학적 상황에서, 면역계는 과도하게 활동성이 되어 정상적이고 건강한 조직을 공격하여, 자가면역 질환을 유발한다. 다른 병리학적 상황에서, 면역계의 세포는 과도하게 증식할 수 있다(예를 들어, B세포 림프종과 같은 림프종). 다른 상황에서, 면역계는 의도된 바와 같이 외래 엔티티를 공격하지만, 동종이계 이식과 같은 경우에서는 동종이계 엔티티를 수용하는 것이 목적하는 결과이다.

- [0109] 따라서, 일부 비제한적인 실시형태에서, 본 발명의 항-BTLA 아고니스트 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 면역 반응을 약화시키는 치료로부터 유익을 얻을 수 있는 대상, 예를 들어 자가면역 질환을 앓고 있는 대상 또는 동종이계 이식편을 받은 대상에 사용될 수 있다. 본 발명의 항-BTLA 항체는, 예를 들어 T세포 및/또는 B세포, 및 혈장 세포의 증식 및/또는 활성을 저해하는 방식으로 면역 반응을 억제한다.
- [0110] 즉, 본원에 기재된 본 발명은, B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응의 하향조절 또는 자가면역 장애의 치료를 필요로 하는 환자에서 B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응을 하향조절하거나 자가면역 장애를 치료하는 방법으로서, 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 본 발명의 벡터, 또는 본 발명의 약제학적 조성물의 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0111] 관련 양태는, B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응의 하향조절 또는 자가면역 장애의 치료를 필요로 하는 환자에서 B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응을 하향조절하거나 자가면역 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에서의, 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 본 발명의 벡터, 또는 본 발명의 약제학적 조성물의 용도를 제공한다.
- [0112] 또 다른 관련 양태는, B세포 매개 또는 T세포 매개 면역 반응을 하향조절하거나 자가면역 장애를 치료하는 데 사용하기 위한, 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 본 발명의 벡터, 또는 본 발명의 약제학적 조성물을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0113] 일부 실시형태에서, 과활동성 면역 장애를 치료하거나 예방하는 방법으로서, 과활동성 면역 장애의 치료를 필요로 하는 대상에게 대상 항-BTLA 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0114] 일부 실시형태에서, 과활동성 면역 장애를 치료하는 방법으로서, 과활동성 면역 장애의 치료를 필요로 하는 대상, 예를 들어 과활동성 면역 장애, 예를 들어 자가면역 질환으로 진단되었거나, 이러한 질환을 앓게 될 위험이 높거나 또는 이러한 질환의 증상을 나타내는 대상에게 임의의 대상 항-BTLA 아고니스트 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0115] 대상 항-BTLA 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로 치료될 수 있는 비제한적인 예시적인 과활동성 면역 장애, 예를 들어 자가면역 질환이 본원에 제시되어 있으며, 이에는, 전신 홍반성 루푸스(SLE); 소아 궤양성 대장염을 포함하는 궤양성 대장염(UC); 류마티스 관절염(RA); 만성 판상 건선을 포함하는 건선(Ps); 건선성 관절염(PsA); 소아 크론병을 포함하는 크론병(CD); 염증성 장질환(IBD); 강직성 척추염; 다관절형 소아 특발성 관절염을 포함하는 소아 특발성 관절염(JIA); 화농성 한선염; 비감염성 중간부, 후부 및 전체 포도막염; 자가면역 간염 유사 질환; 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE); MHC 불일치 심장 동종이식; 급성 기도 알레르기로 인한 폐 염증; 이식편 대숙주병(GvHD); 또는 동종이계 조혈 줄기세포 이식(aHSCT)이 포함된다.
- [0116] 특정 실시형태에서, 과활동성 면역 장애는 전신 홍반성 루푸스(SLE 또는 루푸스)이다. 루푸스는 B세포 및 T세포 면역 조절장애로 인해 핵, 세포질 및/또는 세포 표면 분자에 대한 병원성 자가항체가 병리적으로 형성되는 것을 특징으로 한다. 순환하는 항원 항체 면역 복합체의 국소 형성 및/또는 증착은 완화와 악화를 특징으로 하는 광범위한 전신 및 기관 특이적 임상 증상의 원인이 되는 염증 반응을 촉발시켜, 다기관계 손상, 및 잠재적으로 종말기관 부전을 유도한다. 루푸스는 장애가 되는 증상과 진행성 기관 손상을 특징으로 하는 다측면적인 자가면역 질환이다.
- [0117] 특정 실시형태에서, 과활동성 면역 장애는 염증성 장질환(IBD)이다. IBD는 위장(GI)관 손상을 초래하는 만성 염증을 특징으로 하는 크론병(CD)과 궤양성 대장염(UC)의 두 가지 병태를 포함한다. IBD의 일부 일반적인 증상에는 지속적인 설사, 복통, 직장 출혈/혈변, 체중 감소 및 피로가 있다.
- [0118] 특정 실시형태에서, 과활동성 면역 장애는 대상의 면역계가 공여체에서 얻은 동종이계 이식편을 공격하는 병태, 예를 들어 이식편대숙주병(GvHD)이다. GvHD는 이식 후 임의의 시점에서 일어날 수 있으며, 급성 또는 만성일 수 있다. 골수 이식에서, GvHD는 골수가 세포를 만들기 시작한 후에 더 흔하게 발생한다. 증상은 대상이 해당 병태를 앓은 기간에 따라 달라질 수 있지만, 구강 궤양, 복통 및 발진을 포함할 수 있다.
- [0119] 일부 실시형태에서, 과활동성 면역 장애를 예방하는 방법으로서, 과활동성 면역 관련 장애의 증상이 발생할 위험이 있는 대상에게 예방적으로 대상 항-BTLA 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 예를 들어, 대상 항-BTLA 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 동종이계 이식편을 받기 전에 대상에게 투여될 수 있다.

- [0120] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항-BTLA 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단독으로 사용될 수 있거나, 대안적으로 질환 또는 적응증을 치료할 수 있는 것으로 알려진 임의의 다른 적합한 화합물과 병용될 수 있다.
- [0121] 따라서, 본 발명의 특정 실시형태에 따르면, 상기 정의된 바와 같이 BTLA에 대해 지시되고 T세포 및/또는 B세포, 및 혈장 세포를 저해하는 항체는, 과활동성 면역계와 관련된 질환, 예를 들어 루푸스와 같은 자가면역 질환을 치료하기 위한 제2 치료제와 병용된다.
- [0122] 이러한 병용요법에서, 본 발명의 항체는 제2 치료제 이전에, 이후에 또는 이와 동시에 사용될 수 있다. 병용요법에 대해서는 하기 섹션 참조.
- [0123] 4. 투여 경로 및 담체
- [0124] 다양한 실시형태에서, 대상 아고니스트 항-BTLA 단클론 항체는 피하 또는 정맥내 투여될 수 있다. 간결성을 위해, "대상 항-BTLA 단클론 항체"는 본 발명의 마우스-인간 키메라 항-BTLA 항체뿐 아니라, 이의 인간화 변이체를 나타낸다.
- [0125] 일부 실시형태에서, 대상 항-BTLA 단클론 항체는, 비제한적으로, 경구, 동맥내, 비경구, 비강내, 근육내, 심장내, 심실내, 기관내, 협측, 직장, 복강내, 정맥내 및 피하 투여, 흡입, 피내, 국소, 경피 및 척수강내, 또는 다르게는, 예를 들어 이식을 포함하는 다양한 경로를 통해 생체내 투여될 수 있다.
- [0126] 일부 실시형태에서, 대상 항-BTLA 단클론 항체는 정맥내(*i.v.*) 또는 피하(*s.c.*) 투여를 통해 투여될 수 있다.
- [0127] 대상 항체 조성물은, 비제한적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 연고, 용액, 좌제, 관장제, 주사, 흡입제 및 에어로졸을 포함하는 고체, 반고체, 액체 또는 가스 형태의 제제로 제형화될 수 있다.
- [0128] 다양한 실시형태에서, 대상 항-BTLA 단클론 항체를 포함하는 조성물은 매우 다양한 약제학적으로 허용 가능한 담체와 함께 제형으로 제공된다(예를 들어, 문헌[Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003)]; 문헌[Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004)]; 문헌[Kibbe *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)] 참조). 비히클, 아췌반트 및 희석제를 포함하는 다양한 약제학적으로 허용 가능한 담체가 이용 가능하다. 나아가, pH 조정제 및 완충제, 등장성 조정제, 안정화제, 습윤제 등과 같은 다양한 약제학적으로 허용 가능한 보조 물질이 또한 이용 가능하다. 비제한적인 예시적인 담체에는, 식염수, 완충 식염수, 텍스트로오스, 물, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 조합이 포함된다.
- [0129] 다양한 실시형태에서, 대상 항-BTLA 단클론 항체를 포함하는 조성물은, 목적하는 경우, 가용화제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제 및 보존제와 같은 통상의 첨가제와 함께, 이러한 항체를 식물성 또는 기타 오일, 합성 지방산 글리세리드, 고급 지방산의 에스테르, 또는 프로필렌 글리콜과 같은 수성 또는 비수성 용매 중에 용해, 현탁 또는 유화시키는 방식으로 피하 투여를 포함하는 주사용으로 제형화될 수 있다.
- [0130] 다양한 실시형태에서, 상기 조성물은, 예를 들어 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소 등과 같은 가압 가능한 추진제를 사용하여 흡입용으로 제형화될 수 있다.
- [0131] 다양한 실시형태에서, 상기 조성물은, 예컨대 생분해성 또는 비생분해성 중합체를 이용하여 지속 방출 마이크로캡슐로 제형화될 수 있다. 비제한적인 예시적인 생분해성 제형에는, 폴리락트산-글리콜산(PLGA) 중합체가 포함된다. 비제한적인 예시적인 비생분해성 제형에는, 폴리글리세린 지방산 에스테르가 포함된다. 이러한 제형을 제조하는 특정 방법은, 예를 들어 EP 1125584 A1에 기재되어 있다.
- [0132] 각각 1회 이상 용량의 대상 항-BTLA 단클론 항체가 함유된 용기를 하나 이상 포함하는 약제학적 투여량 팩이 또한 제공된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 추가 작용제를 포함하거나 포함하지 않고 대상 항-BTLA 단클론 항체를 포함하는 조성물을 선결된 양으로 함유하는 단위 투여량이 제공된다. 일부 실시형태에서, 이러한 단위 투여량은 주사용 1회용 사전 충전 시린지에 공급된다. 다양한 실시형태에서, 단위 투여량에 포함된 조성물은 식염수, 수크로오스 등; 포스페이트 등과 같은 완충제를 포함할 수 있고/있거나; 안정적이고 효과적인 pH 범위 내에서 제형될 수 있다. 대안적으로, 일부 실시형태에서, 상기 조성물은 적절한 액체, 예를 들어 멸균수의 첨가 시 재구성될 수 있는 동결건조된 분말로 제공될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 조성물은, 비제한적으로, 수크로오스와 아르기닌을 포함하는, 단백질 응고를 저해하는 하나 이상의 물질을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 헤파린 및/또는 프로테오글리칸을 포함한다.

- [0133] 약제학적 조성물은 특정 적응증의 치료 또는 예방에 효과적인 양으로 투여된다. 치료적 유효량은 전형적으로 치료하고자 하는 대상의 체중, 대상의 신체 또는 건강 상태, 치료하고자 하는 병태의 범위, 또는 치료하고자 하는 대상의 연령에 따라 달라진다.
- [0134] 5. 병용요법
- [0135] 본 발명의 대상 항-BTLA 단클론 항체(이의 기능성 단편 포함)는 이를 필요로 하는 대상에게 다른 생물학적 활성 물질 또는 질환의 치료를 위한 다른 치료 절차와 조합으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 대상 항-BTLA 단클론 항체는 단독으로, 또는 다른 치료 방식과 함께 투여될 수 있다. 이는 면역억제제와 같은 다른 치료 방식 이전에, 이와 실질적으로 동시에 또는 이후에 제공될 수 있다.
- [0136] 과활동성 면역 장애의 치료를 위해, 대상 항-BTLA 단클론 항체는 코르티코스테로이드, Janus 키나아제 저해제, 칼시뉴린 저해제, mTOR 저해제, IMDH 저해제 및 다른 면역억제제와 같은 하나 이상의 면역억제제와 함께 투여될 수 있다.
- [0137] 특정 실시형태에서, 대상 항-BTLA 단클론 항체는 대상, 예를 들어 자가면역 장애를 앓고 있는 대상에게 또 다른 치료와 동시에 또는 연속적으로 투여된다. 예를 들어, 대상 항-BTLA 단클론 항체는 하나 이상의 면역억제제와 함께 투여될 수 있다.
- [0138] 특정 실시형태에서, 과활동성 면역 장애를 앓고 있는 대상을 치료하는 방법은, 대상에게 본 발명의 항-BTLA 단클론 항체와, 코르티코스테로이드, 예를 들어 스테로이드와 같은 하나 이상의 면역억제제를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0139] 대상 항-BTLA 단클론 항체와 병용투여될 수 있는 면역억제제에는, 비제한적으로, 이부프로펜(ibuprofen), 나프록센(naproxen), 디클로페낙(diclofenac), 셀레콕시브(celecoxib), 메페남산(mefenamic acid), 에토리콕시브(etoricoxib), 인도메타신(indomethacin) 및 고용량 아스피린과 같은 비스테로이드성 항염증성 약물(NSAID); 히드록시클로로퀸 및 클로로퀸 포스페이트와 같은 항말라리아 약물; 프레드니손(prednisone), 부데소니드(budesonide) 및 프레드니솔론(prednisolone)과 같은 코르티코스테로이드; 토파시티닙(tofacitinib)과 같은 Janus 키나아제 저해제; 시클로스포린(cyclosporine) 및 타크로리무스(tacrolimus)와 같은 칼시뉴린 저해제; 시롤리무스(silrolimus) 및 에버롤리무스(everolimus)와 같은 mTOR 저해제; 및 아자티오프린(azathioprine), 레플루노미드(leflunomide) 및 마이코페놀레이트(mycophenolate)와 같은 IMDH 저해제가 포함된다.
- [0140] 6. 예시적인 항-BTLA 단클론 항체
- [0141] 본원에 기재된 본 발명은 BTLA 또는 이의 항원 결합 단편에 특이적인 아고니스트 단클론 항체를 제공한다.
- [0142] 따라서, 본 발명의 하나의 양태는, HFB6-4 또는 HFB6-5에 의해 결합된 에피토프에 대한 결합에 대해 본원에 기재된 임의의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0143] 본 발명의 또 다른 관련 양태는, 인간 BTLA에 특이적인 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 상기 단클론 항체는 (1a) 서열번호 1의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 2의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 3의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR)과, (1b) 서열번호 4의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 5의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 6의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는 (2a) 서열번호 61의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 62의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 63의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR)과, (2b) 서열번호 64의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 65의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 66의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함하는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0144] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 CDR 영역 서열은 IMGT 넘버링 체계를 기반으로 한다. Kabat, Chothia 또는 Martin(개선된 Chothia) 체계와 같은 다른 넘버링 체계에 상응하는 CDR 서열은 항체 서열 정렬에 따라 용이하게 유도될 수 있다.
- [0145] 상기 기재된 본 발명의 임의의 양태에 있어서, 일부 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서, (1A) HCVR 서열은 서열번호 7이고/이거나, (1B) LCVR 서열은 서열번호 8이거나, 또는 (2A) HCVR 서열은 서열번호 67이고/이거나, (2B) LCVR 서열은 서열번호 68이다.
- [0146] 일부 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서, HCVR 서열은 서열번호 7, 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 중쇄 프레임워크 영역에 적어도

도 하나의 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하거나/본질적으로 이러한 아미노산 변화로 이루어지거나/이러한 아미노산 변화로 이루어지는 변이형이고/이거나; LCVR 서열은 서열번호 114, 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 경쇄 프레임워크 영역에 적어도 하나의 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하거나/본질적으로 이러한 아미노산 변화로 이루어지거나/이러한 아미노산 변화로 이루어지는 변이형이다.

[0195] 일부 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서, HCVR 서열은 서열번호 115, 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 중쇄 프레임워크 영역에 적어도 하나의 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하거나/본질적으로 이러한 아미노산 변화로 이루어지거나/이러한 아미노산 변화로 이루어지는 변이형이고/이거나; LCVR 서열은 서열번호 116, 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 경쇄 프레임워크 영역에 적어도 하나의 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하거나/본질적으로 이러한 아미노산 변화로 이루어지거나/이러한 아미노산 변화로 이루어지는 변이형이다.

[0196] 일부 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (1a) 서열번호 117의 중쇄 서열; 및/또는 서열번호 118의 경쇄 서열, 또는 (2a) 서열번호 119의 중쇄 서열; 및/또는 (2b) 서열번호 120의 경쇄 서열을 갖는다.

[0197] 본 발명의 항체의 서열 중 일부가 하기 제시된다.

[0198] HFB6-4-hG1 (인간-마우스 키메라 단클론 항체)

[0199] CDR-H1: CTTSGFNIKDTYIHW (서열번호 1)

[0200] CDR-H2: GRNDPANGNTKYD (서열번호 2)

[0201] CDR-H3: CASYEGYERFGYW (서열번호 3)

[0202] CDR-L1: CKSSQSLLDRDGKTYLW (서열번호 4)

[0203] CDR-L2: LVSKLDS (서열번호 5)

[0204] CDR-L3: CWQDTHFPYTF (서열번호 6)

[0205] HCVR:
EVQLQQSGAELVNPASVKLSCTTSGFNIKDTYIHWVKRPEQGLEWIGRNDPANGNTKYDPKFQKGKATITADTSSSTAYLQLSSLTSEDYAVYYCASYEGY
YERFGYWGQGLTVTSA (서열번호 7)

[0206] LCVR:

[0207] DVVMTQAPLTLVTIGQPASISCKSSQSLLDRDGKTYLWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQDTHFPYT
FGGGTKLEIK (서열번호 8)

[0208] HC:
EVQLQQSGAELVNPASVKLSCTTSGFNIKDTYIHWVKRPEQGLEWIGRNDPANGNTKYDPKFQKGKATITADTSSSTAYLQLSSLTSEDYAVYYCASYEGY
YERFGYWGQGLTVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCTPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 117)

[0209] LC:
DVVMTQAPLTLVTIGQPASISCKSSQSLLDRDGKTYLWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQDTHFPYT
FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 118)

[0210] HFB6-5-hG1 (인간-마우스 키메라 단클론 항체)

[0211] CDR-H1: CTASGVNIKDTYMYW (서열번호 61)

[0212] CDR-H2: GRIDPANGYTRYD (서열번호 62)

[0213] CDR-H3: CAVYDGYYESFDVW (서열번호 63)

[0214] CDR-L1: CKSSQSLLDSDGKTYLNW (서열번호 64)

[0215] CDR-L2: LVSKLDS (서열번호 65)

[0216] CDR-L3: CWQGTLPRTF (서열번호 66)

[0217] HCVR:
EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGVNIKDTYMYVVKRPEQGLEWIGRIDPANGYTRYDPKFQGKATITADTSSNTAHLQLSSLTSEDAAVYYCAVYDGY
YESFDVWGAGTTVTSS (서열번호 67)

[0218] LCVR:

[0219] DVVMTQAPLTLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVIYCWQGTLPRT
FGGGTKLEIK (서열번호 68)

[0220] HC:
EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGVNIKDTYMYVVKRPEQGLEWIGRIDPANGYTRYDPKFQGKATITADTSSNTAHLQLSSLTSEDAAVYYCAVYDGY
YESFDVWGAGTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 119)

[0221] LC:
DVVMTQAPLTLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVIYCWQGTLPRT
FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 120)

[0222] [표 1]

HFB6-4 의 인간화 변이체 (서열은 서열목록 참조)

항체	VH	VL
HFB6-4hz1-hG1	서열번호 9	서열번호 10
HFB6-4hz2-hG1	서열번호 11	서열번호 12
HFB6-4hz3-hG1	서열번호 13	서열번호 14
HFB6-4hz4-hG1	서열번호 15	서열번호 16
HFB6-4hz5-hG1	서열번호 17	서열번호 18
HFB6-4hz6-hG1	서열번호 19	서열번호 20
HFB6-4hz7-hG1	서열번호 21	서열번호 22
HFB6-4hz8-hG1	서열번호 23	서열번호 24
HFB6-4hz9-hG1	서열번호 25	서열번호 26
HFB6-4hz10-hG1	서열번호 27	서열번호 28
HFB6-4hz11-hG1	서열번호 29	서열번호 30
HFB6-4hz12-hG1	서열번호 31	서열번호 32
HFB6-4hz13-hG1	서열번호 33	서열번호 34
HFB6-4hz14-hG1	서열번호 35	서열번호 36
HFB6-4hz15-hG1	서열번호 37	서열번호 38
HFB6-4hz16-hG1	서열번호 39	서열번호 40
HFB6-4hz17-hG1	서열번호 41	서열번호 42
HFB6-4hz18-hG1	서열번호 43	서열번호 44
HFB6-4hz19-hG1	서열번호 45	서열번호 46
HFB6-4hz20-hG1	서열번호 47	서열번호 48
HFB6-4hz21-hG1	서열번호 49	서열번호 50
HFB6-4hz22-hG1	서열번호 51	서열번호 52
HFB6-4hz23-hG1	서열번호 53	서열번호 54
HFB6-4hz24-hG1	서열번호 55	서열번호 56

[0223]

[0224] [표 2]

HFB6-5 의 인간화 변이체 (서열은 서열목록 참조)

항체	VH	VL
HFB6-5hz1-hG1	서열번호 69	서열번호 70
HFB6-5hz2-hG1	서열번호 71	서열번호 72
HFB6-5hz3-hG1	서열번호 73	서열번호 74
HFB6-5hz4-hG1	서열번호 75	서열번호 76
HFB6-5hz5-hG1	서열번호 77	서열번호 78
HFB6-5hz6-hG1	서열번호 79	서열번호 80
HFB6-5hz7-hG1	서열번호 81	서열번호 82
HFB6-5hz8-hG1	서열번호 83	서열번호 84
HFB6-5hz9-hG1	서열번호 85	서열번호 86
HFB6-5hz10-hG1	서열번호 87	서열번호 88
HFB6-5hz11-hG1	서열번호 89	서열번호 90
HFB6-5hz12-hG1	서열번호 91	서열번호 92
HFB6-5hz13-hG1	서열번호 93	서열번호 94
HFB6-5hz14-hG1	서열번호 95	서열번호 96
HFB6-5hz15-hG1	서열번호 97	서열번호 98
HFB6-5hz16-hG1	서열번호 99	서열번호 100
HFB6-5hz17-hG1	서열번호 101	서열번호 102
HFB6-5hz18-hG1	서열번호 103	서열번호 104
HFB6-5hz19-hG1	서열번호 105	서열번호 106
HFB6-5hz20-hG1	서열번호 107	서열번호 108
HFB6-5hz21-hG1	서열번호 109	서열번호 110
HFB6-5hz22-hG1	서열번호 111	서열번호 112
HFB6-5hz23-hG1	서열번호 113	서열번호 114
HFB6-5hz24-hG1	서열번호 115	서열번호 116

[0225]

[0226]

일부 실시형태에서, 본 발명의 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간-마우스 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, CDR 이식된 항체 또는 재표면화된 항체이다.

[0227]

특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG1 항체, IgG2 항체, IgG3 항체 또는 IgG4 항체이다.

[0228]

특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG1 항체이다.

[0229]

특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 57, 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 그 안에 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하는 변이형의 중쇄 불변 영역 서열과, 서열번호 58, 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 그 안에 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하는 변이형의 경쇄 불변 영역 서열을 포함하는 IgG1 항체이다.

[0230]

특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (1) 항체 의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC) 및/또는 항체 의존성 세포 매개 포식작용(ADCP)(예컨대, F243L, G236A, S239D/I332E, S239D/A330L/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, 또는 Fc γ RIIIa에 대한 결합 증가를 통해 ADCC가 증강된 푸코실화되지 않은(비푸코실화된) 항체(예컨대, Fc 영역에 있는 푸코실화되지 않은 N297))을 조절하고/하거나; (2) 혈청 반감기를 증강시키는(예컨대, T250Q/M428L, M252Y/S254T/T256E) 중쇄 불변 영역 내 돌연변이를 포함하는 IgG1 항체이다.

[0231]

특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 마우스 항체, 인간-마우스 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, CDR 이식된 항체 또는 재표면화된 항체이다.

[0232]

특정 실시형태에서, 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화 항체이다.

[0233]

일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, F_d, 단일 사슬 Fv 또는 scFv, 디설파이드 결합된 Fv, V-NAR 도메인, IgNar, 인트라바디, IgG Δ CH₂, 미니바디, F(ab')₃, 테트라바디, 트리아바디, 디아바디, 단일 도메인 항체, DVD-Ig, Fcab, mAb₂, (scFv)₂, 또는 scFv-Fc이다.

[0234]

특정 실시형태에서, 본 발명의 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 BTLA에 특이적이며, 예를 들어 마

우스 BTLA와는 실질적으로 교차 반응하지 않는다.

[0235] 특정 실시형태에서, 본 발명의 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 원숭이 BTLA(예를 들어, 시노몰구스 원숭이 또는 레서스 원숭이 BTLA, 예컨대 서열번호 122)와 같은 비인간 1차 BTLA와 교차 반응한다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 마우스 BTLA(예컨대, 서열번호 123)와 같은 설치류 BTLA와 교차 반응하지 않는다. 인간, 원숭이 및 마우스 BTLA의 당업계에서 알려진 예시적인 아미노산 서열이 하기에 열거된다.

	BTLA 서열
인간 BTLA (수탁번호 NP_861445.3)	MKTLPAMLGTGKLFVWVFFLIPYLDIWNHKGKESCDVQLYIKRQSEH SILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCKLNGTTCVKLEDRQTSWKE EKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTTLTYVTDVKS ASERPSKDEMASRPWLLYSLLPLGGLPLLITTCFCLFCCLRRHQGK QNELSDTAGREINLVD AHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDP DLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSHVIGPNSRLARNVK EAPTEYASICVRS (서열번호 121)
시노몰구스/레서스 마크 BTLA (수탁번호 XP_001104281.1)	MKTLPAMLGSGRLFVWVFLIPYLDIWNHKGKESCDVQLYIKRQSYH SIFAGDPFKLECPVKYCAHRPQVTWCKLNGTTCVKLEGRHTSWKQ EKNLSFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFLSAIIESHSTTLTYVTDVKS SERPSKDEMASRPWLLYSLLPLGGLPLLITTCFCLFCFLRRHQGKQ ELSDTTGREITLVDVFPKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNEPDC FRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIYASLNHSHIALNSRQARNVKEAPT EYASICVRS (서열번호 122)
마우스 BTLA (수탁번호 NP_001032808.2)	MKTVPAMLGTGPRFLREFFILHLGLWSILCEKATKRNDDECPVQLTIT RNSKQSARTGELFKIQCPVKYCVHRPNVTWCKHNGTICVPLEVSPQ LYTSWEENQSVPVFVLHFKPIHLSDNGSYSCSTNFNSQVINSHSVTI HVTERTQNSSEHPLITVSDIPDATNASGPSTMEERPGRTWLLYTLLP LGALLLLACVCLLCLFKRIQGGKEKPSDLAGRDTNLVDIPASSRT NHQALPSGTGIYDNDPWSSMQDESELTISLQSERNNQGIVYASLNH CVIGRNPQRQENMQEAPTEYASICVRS (서열번호 123)

[0236]

[0237] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 인간 BTLA에 대한 해리 상수(K_D)는 $\leq 1 \mu M$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 50 \text{ nM}$, $\leq 25 \text{ nM}$, $\leq 20 \text{ nM}$, $\leq 15 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 5 \text{ nM}$, $\leq 2 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$ 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들어, 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)이다.

[0238] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 HFB6-4에 의해 결합된 에피토프에 결합한다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 HFB6-5에 의해 결합된 에피토프에 결합한다.

[0239] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 BTLA의 아고니스트이며, BTLA에의 결합 시 BTLA로부터의 다운스트림 신호전달을 활성화시킨다.

[0240] 일부 실시형태에서, 상기 BTLA로부터의 다운스트림 신호전달은 B세포 증식을 저해하고/하거나, T세포(예를 들어, CD4, CD8, Th1, TFH, $\alpha \beta$ 또는 $\gamma \delta$ T세포) 및/또는 혈장 세포 활성화를 저해한다.

[0241] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 HVEM에 대한 BTLA의 결합을 차단하거나/방해하거나/폐지하지 않는다.

[0242] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 BTLA에의 결합 시 B세포 증식을 저해하고/하거나, T세포(예를 들어, CD4, CD8, Th1, TFH, $\alpha \beta$ 또는 $\gamma \delta$ T세포) 활성화를 저해한다.

[0243] 특정 실시형태에서, 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (1) 서열번호 9의 HCVR 서열, 서열번호 57의 중쇄 불변 영역 서열, 서열번호 10의 LCVR 서열 및 서열번호 58의 경쇄 불변 영역 서열; 또는 (2) 서열번호 59의 중쇄 아미노산 서열과 서열번호 60의 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0244] 관련 양태에서, 본 발명은 (1) 서열번호 9의 HCVR 서열, 서열번호 57의 중쇄 불변 영역 서열, 서열번호 10의 LCVR 서열 및 서열번호 58의 경쇄 불변 영역 서열; 또는 (2) 서열번호 59의 중쇄 아미노산 서열과 서열번호 60의 경쇄 아미노산 서열을 포함하거나/본질적으로 이로 이루어지거나/이로 이루어지는 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0245] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편(인간화 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편 포함)은, 고온(예를 들어, 25°C 또는 40°C 에서 보관 시 안정함), 낮은 pH 조건(예를 들어, 실온에서 pH

3.5 부근), 및/또는 수 차례의 동결/해동 사이클 후에 안정한 것을 포함하여, 양호한 개발 가능성 프로파일을 갖는다.

[0246] 특정 실시형태에서, 본 발명의 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편(인간화 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편 포함)은, 항체의 개발 가능성을 개선시키기 위해 설계된 아미노산 서열 내 하나 이상의 점 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Raybould et al., Five computational developability guidelines for therapeutic antibody profiling, *PNAS* 116(10): 4025-4030, 2019]에는 가변 도메인 서열의 다운로드 가능한 상동성 모델을 구축하고, 이를 다섯 가지 개발 가능성 가이드라인에 대해 시험하고, 잠재적인 서열 책임과 표준 형태를 보고하는 컴퓨터 도구인 TAP(Therapeutic Antibody Profiler)가 기재되어 있다. 상기 저자들은 나아가 하기 웹사이트에서 무료로 이용 가능한 TAP를 제공한다: opig.stats.ox.ac.uk/webapps/sabdab-sabpred/TAP.php.

[0247] 항원에 대한 목적하는 친화도를 달성하는 것 외에도 치료용 mAb 개발에는 여러 장벽이 있다. 이에, 고유한 면역원성, 화학적 및 입체형태적 불안정성, 자가 회합, 높은 점도, 다중특이성 및 불량한 발현이 포함된다. 예를 들어, 특히 고도로 가변적인 상보성 결정 영역(CDR)에서 높은 수준의 소수성은 응집, 점도 및 다중특이성과 반복적으로 연관이 있었다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 순전하 비대칭은 또한 고농도에서 자가 회합 및 점도와 상관관계가 있다. CDR에서 양전하와 음전하의 패치는 높은 수준의 제거율 및 불량한 발현 수준과 관련이 있다. 제품 이질성은 종종 번역 후 변형 또는 번역 동시 변형이 발생하기 쉬운 특정 서열 모티프로 인해(예를 들어, 산화, 이성질화 또는 글리코실화를 통해) 발생한다. 서열 책임의 식별을 용이하게 하기 위해 컴퓨터 도구를 이용할 수 있다. 문헌[Warszawski et al., Optimizing antibody affinity and stability by the automated design of the variable light-heavy chain interfaces. *PLoS Comput Biol* 15(8): e1007207. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007207>]에는 또한, 가변 경쇄-중쇄 인터페이스의 자동화 설계를 통해 항체 친화도와 안정성을 최적화하는 방법이 기재되어 있다. 후보 항체의 잠재적인 개발 가능성 문제를 확인하기 위해 추가의 방법을 이용할 수 있으며, 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 통상의 방법을 통해 후보 항체에 하나 이상의 점 돌연변이를 도입하여 이러한 문제를 해결하는 방식으로 본 발명의 최적화된 치료용 항체를 유도할 수 있다.

[0248] 7. 인간화 항체

[0249] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체는 인간화 항체이다. 인간화 항체는 비인간 항체에 대한 인간 면역 반응(예컨대, 인간 항마우스 항체(HAMA) 반응)을 감소시키거나 제거하여, 항체 치료제에 대한 면역 반응을 유도하고 치료제의 유효성을 감소시킬 수 있기 때문에, 인간화 항체는 치료 분자로서 유용하다.

[0250] 항체는 임의의 표준 방법에 따라 인간화될 수 있다. 비제한적인 예시적인 인간화 방법에는, 예를 들어 미국 특허 제5,530,101호; 제5,585,089호; 제5,693,761호; 제5,693,762호; 제6,180,370호; 문헌[Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986)]; 문헌[Riechmann et al, *Nature* 332: 323-27 (1988)]; 문헌[Verhoeyen et al, *Science* 239: 1534-36 (1988)]; 및 미국 특허 출원 공개 2009/0136500에 기재된 방법이 포함된다. 상기 문헌들은 모두 참조로 인용된다.

[0251] 인간화 항체는 비인간 가변 영역의 프레임워크 영역 내 적어도 하나의 아미노산이 인간 프레임워크 영역 내 상응하는 위치의 아미노산으로 대체된 항체이다. 일부 실시형태에서, 비인간 가변 영역의 프레임워크 영역 내 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 15개 또는 적어도 20개 아미노산이 하나 이상의 인간 프레임워크 영역 내 하나 이상의 상응하는 위치의 아미노산으로 대체된다.

[0252] 일부 실시형태에서, 치환에 사용되는 상응하는 인간 아미노산 중 일부는 상이한 인간 면역글로불린 유전자의 프레임워크 영역에서 유래한 것이다. 즉, 일부 이러한 실시형태에서, 하나 이상의 비인간 아미노산은 제1 인간 항체의 인간 프레임워크 영역의 상응하는 아미노산으로 대체되거나 제1 인간 면역글로불린 유전자에 의해 인코딩될 수 있고, 하나 이상의 비인간 아미노산은 제2 인간 항체의 인간 프레임워크 영역의 상응하는 아미노산으로 대체되거나 제2 인간 면역글로불린 유전자에 의해 인코딩될 수 있고, 하나 이상의 비인간 아미노산은 제3 인간 항체의 인간 프레임워크 영역의 상응하는 아미노산으로 대체되거나 제3 인간 면역글로불린 유전자에 의해 인코딩될 수 있다. 나아가, 일부 실시형태에서, 단일 프레임워크 영역, 예를 들어 FR2 내 치환에 사용되는 모든 상응하는 인간 아미노산은 동일한 인간 프레임워크에서 유래할 필요가 없다. 하지만, 일부 실시형태에서, 치환에 사용되는 모든 상응하는 인간 아미노산은 동일한 인간 항체에서 유래되거나, 동일한 인간 면역글로불린 유전자에 의해 인코딩된다.

- [0253] 일부 실시형태에서, 항체는 하나 이상의 전체 프레임워크 영역을 상응하는 인간 프레임워크 영역으로 대체하는 방식으로 인간화된다. 일부 실시형태에서, 대체되는 비인간 프레임워크 영역에 대해 최고 수준의 상동성을 갖는 인간 프레임워크 영역이 선택된다. 일부 실시형태에서, 이러한 인간화 항체는 CDR 이식된 항체이다.
- [0254] 일부 실시형태에서, CDR 이식 후, 하나 이상의 프레임워크 아미노산은 마우스 프레임워크 영역 내 상응하는 아미노산으로 다시 변경된다. 일부 실시형태에서, 이러한 "역 돌연변이"는 하나 이상의 CDR의 구조에 기여하는 것으로 보이고/보이거나, 항원 접촉에 관여할 수 있고/있거나, 항체의 전반적인 구조적 완전성에 관여하는 것으로 보이는 하나 이상의 마우스 프레임워크 아미노산을 보유하도록 만들어진다. 일부 실시형태에서, CDR 이식 후 항체의 프레임워크 영역에 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하, 1개 또는 0개의 역 돌연변이가 만들어진다.
- [0255] 일부 실시형태에서, 인간화 항체는 또한 인간 중쇄 불변 영역 및/또는 인간 경쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0256] 일부 실시형태에서, 본 발명의 인간화 항-BTLA 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표 1 및 표 2와 첨부된 서열목록(명세서의 일부로서 본원에 포함됨)에 열거된 항체 중 하나이다.
- [0257] 8. 인간 항체
- [0258] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 임의의 적합한 방법으로 만들어질 수 있다. 비제한적인 예시적인 방법에는, 인간 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 유전자이식 마우스에서 인간 항체를 만드는 것이 포함된다. 예를 들어, 문헌[Jakovovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551-55 (1993)]; 문헌[Jakovovits *et al.*, Nature 362: 255-8 (1993)]; 문헌[onberg *et al.*, Nature 368: 856-9 (1994)]; 및 미국 특허 제5,545,807호; 제6,713,610호; 제6,673,986호; 제6,162,963호; 제5,545,807호; 제6,300,129호; 제6,255,458호; 제5,877,397호; 제5,874,299호; 및 제5,545,806호 참조.
- [0259] 비제한적인 예시적인 방법에는 또한, 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 인간 항체를 만드는 것이 포함된다. 예를 들어, 문헌[Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol. 227: 381-8 (1992)]; 문헌[Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-97 (1991)]; 및 PCT 특허 출원 공개 WO 99/10494 참조.
- [0260] 항체 불변 영역
- [0261] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 인간화, 키메라 또는 인간 항체는 하나 이상의 인간 불변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인간 중쇄 불변 영역은 IgA, IgG 및 IgD에서 선택되는 아이소타입을 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 경쇄 불변 영역은 κ 와 λ 에서 선택되는 아이소타입을 갖는다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 IgG 불변 영역, 예를 들어 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 Fc 융합 파트너는, 예를 들어 IgG1 불변 영역에 C237S 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 IgG2 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 이러한 실시형태에서, IgG2 불변 영역은 미국 특허 제6,900,292호에 기재된 바와 같은 P331S 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 IgG4 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 이러한 실시형태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 IgG4 불변 영역에 S241P 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Angal *et al.*, Mol. Immunol. 30(1):105-108 (1993)] 참조. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 IgG4 불변 영역과 인간 κ 경쇄를 포함한다.
- [0262] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 57, 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 그 안에 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하는 변이형의 중쇄 불변 영역 서열과, 서열번호 58, 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖고 그 안에 아미노산 변화(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)를 포함하는 변이형의 경쇄 불변 영역 서열을 포함하는 인간 IgG1 불변 영역을 포함한다.
- [0263] 중쇄 불변 영역의 선택은 항체가 생체내에서 이펙터 기능을 가질 것인지 여부를 결정할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 이펙터 기능에는 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC)이 포함되며, 이는 항체가 결합되는 세포의 사멸을 초래할 수 있다. 전형적으로, 인간 IgG1 또는 IgG3 중쇄를 포함하는 항체는 이펙터 기능을 갖는다.
- [0264] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 및/또는 항체 의존성 세포 매개 포식작용(ADCP)을 조절하는 중쇄 불변 영역 내 돌연변이(예컨대, F243L, G236A, S239D/I332E, S239D/A330L/I332E, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, S298A/E333A/K334A, 또는 Fc γ RIIa에 대한 결합 증가를 통해 ADCC가 증강된 푸코실화되지 않은(비푸코실화된) 항체(예컨대, Fc 영역에

있는 푸코실화되지 않은 N297))를 포함하는 IgG1 항체이다.

- [0265] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단리된 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 혈청 반감기를 증강시키는 중쇄 불변 영역 내 돌연변이(예컨대, T250Q/M428L 및 M252Y/S254T/T256E)를 포함하는 IgG1 항체이다.
- [0266] 일부 실시형태에서, 이펙터 기능은 바람직하지 않다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 이펙터 기능은 염증성 병태 및/또는 자가면역 장애의 치료에 바람직하지 않을 수 있다. 일부 이러한 실시형태에서, 인간 IgG4 또는 IgG2 중쇄 불변 영역이 선택되거나 조작된다. 일부 실시형태에서, IgG4 불변 영역은 S241P 돌연변이를 포함한다.
- [0267] 본원에 기재된 임의의 항체는 임의의 적합한 방법에 따라 정제될 수 있다. 이러한 방법에는, 비제한적으로, 친화성 매트릭스 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 사용하는 것이 포함된다. 적합한 친화성 리간드에는, 항체가 결합하는 항원 및/또는 에피토프와, 항체 불변 영역에 결합하는 리간드가 포함된다. 예를 들어, 불변 영역에 결합하고 항체를 정제하기 위해 단백질 A, 단백질 G, 단백질 A/G 또는 항체 친화성 컬럼이 사용될 수 있다.
- [0268] 일부 실시형태에서, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 예를 들어 부틸 또는 페닐 컬럼이 또한 일부 폴리펩타이드를 정제하는 데 사용된다. 폴리펩타이드를 정제하는 다수의 방법이 당업계에 알려져 있다.
- [0269] 대안적으로, 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 항체는 무세포 시스템에서 생산된다. 비제한적인 예시적인 무세포 시스템은, 예를 들어 문헌[Sitaraman *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009)]; 문헌[Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004)]; 문헌[Endo *et al.*, *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003)]에 기재되어 있다.
- [0270] 9. 본 발명의 항체를 인코딩하는 핵산 분자
- [0271] 본 발명은 또한 본원에 기재된 항체의 하나 이상의 사슬을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 분자를 제공한다. 일부 실시형태에서, 핵산 분자는 본원에 기재된 항체의 중쇄 또는 경쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 핵산 분자는 본원에 기재된 항체의 중쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드와 경쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 모두 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 핵산 분자는 중쇄를 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 제2 핵산 분자는 경쇄를 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0272] 일부 이러한 실시형태에서, 중쇄와 경쇄는 하나의 핵산 분자에서, 또는 2개의 별도의 핵산 분자에서 2개의 별도의 폴리펩타이드로서 발현된다. 항체가 scFv인 경우와 같은 일부 실시형태에서, 단일 폴리뉴클레오타이드는 함께 연결된 중쇄와 경쇄를 모두 포함하는 단일 폴리펩타이드를 인코딩한다.
- [0273] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 항체의 중쇄 또는 경쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는, 번역될 때, 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에 위치하는 리더 서열을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 상기 논의된 바와 같이, 리더 서열은 천연 중쇄 또는 경쇄 리더 서열일 수 있거나, 또 다른 이중 리더 서열일 수 있다.
- [0274] 핵산 분자는 당업계에서 통상적인 재조합 DNA 기술을 사용하여 작제될 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산 분자는 포유류 세포와 같은 선택된 숙주세포에서의 발현에 적합한 발현 벡터이다.
- [0275] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 항체의 중쇄 또는 경쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화된다.
- [0276] 10. 벡터
- [0277] 본원에 기재된 항체의 중쇄 및/또는 경쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터가 제공된다. 이러한 벡터에는, 비제한적으로, DNA 벡터, 파지 벡터, 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 등이 포함된다. 일부 실시형태에서, 벡터는 중쇄를 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오타이드 서열과 경쇄를 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 중쇄와 경쇄는 벡터에서 2개의 별도의 폴리펩타이드로서 발현된다. 일부 실시형태에서, 중쇄와 경쇄는, 예를 들어 항체가 scFv인 경우, 단일 폴리펩타이드의 일부로서 발현된다.
- [0278] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 항체의 중쇄 및/또는 경쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터는 발현 벡터(예를 들어, 포유류, 효모, 곤충 또는 박테리아 발현 벡터)이다.

- [0279] 일부 실시형태에서, 제1 벡터는 중쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 제2 벡터는 경쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 벡터와 제2 벡터는 숙주세포에 유사한 양(예컨대, 유사한 몰량 또는 유사한 질량)으로 트랜스펙션된다. 일부 실시형태에서, 제1 벡터와 제2 벡터의 몰 또는 질량 비 5:1 내지 1:5로 숙주세포에 트랜스펙션된다. 일부 실시형태에서, 중쇄를 인코딩하는 벡터와 경쇄를 인코딩하는 벡터에 대해 1:1 내지 1:5의 질량비가 사용된다. 일부 실시형태에서, 중쇄를 인코딩하는 벡터와 경쇄를 인코딩하는 벡터에 대해 1:2의 질량비가 사용된다.
- [0280] 일부 실시형태에서, CHO 세포 또는 CHO 유래 세포, 또는 NSO 세포에서 폴리펩타이드의 발현에 최적화된 벡터가 선택된다. 예시적인 이러한 벡터는, 예를 들어 문헌[Running Deer *et al.*, Biotechnol. Prog. 20:880-889 (2004)]에 기재되어 있다. 일부 실시형태에서, 인간을 포함하는 동물에서 대상 항체의 생체내 발현을 위한 벡터가 선택된다. 일부 이러한 실시형태에서, 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들의 발현은 조직 특이적 방식으로 기능하는 프로모터 또는 프로모터들의 제어 하에 있다. 예를 들어, 간 특이적 프로모터는, 예를 들어 PCT 특허 출원 공개 WO 2006/076288에 기재되어 있다.
- [0281] 11. 숙주세포
- [0282] 다양한 실시형태에서, 본원에 기재된 항체의 중쇄 및/또는 경쇄는 박테리아 세포와 같은 원핵세포; 또는 진균 세포(예컨대, 효모), 식물 세포, 곤충 세포 및 포유류 세포와 같은 진핵세포에서 발현될 수 있다. 이러한 발현은, 예를 들어 당업계에서 알려진 절차에 따라 수행될 수 있다. 폴리펩타이드를 발현시키는 데 사용될 수 있는 예시적인 진핵세포에는, 비제한적으로, COS7 세포를 포함하는 COS 세포; 293-6E 세포를 포함하는 293 세포; CHO-S 세포와 DG44 세포를 포함하는 CHO 세포; PER.C6® 세포(Crucell); 및 NSO 세포가 포함된다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 항체의 중쇄 및/또는 경쇄는 효모에서 발현될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 2006/0270045 A1 참조. 일부 실시형태에서, 특정 진핵 숙주세포는 항-BTLA 항체의 중쇄 및/또는 경쇄에 목적하는 번역 후 변형을 만드는 능력에 기반하여 선택된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, CHO 세포는 293 세포에서 생산된 동일한 폴리펩타이드보다 높은 시알릴화 수준을 갖는 폴리펩타이드를 생산한다.
- [0283] 목적하는 숙주세포에 하나 이상의 핵산을 도입하는 것은, 비제한적으로, 인산칼슘 트랜스펙션, DEAE-덱스트란 매개 트랜스펙션, 양이온성 지질 매개 트랜스펙션, 전기천공, 형질도입, 감염 등을 포함하는 임의의 방법에 의해 달성될 수 있으며, 비제한적인 예시적인 방법은, 예를 들어 문헌[Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)]에 기재되어 있다. 핵산은 임의의 적합한 방법에 따라 목적하는 숙주세포에서 일시적으로 또는 안정적으로 트랜스펙션될 수 있다.
- [0284] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 폴리펩타이드는 임의의 적합한 방법에 따라 폴리펩타이드를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 분자로 조작되거나 트랜스펙션된 동물의 생체내에서 생산될 수 있다.
- [0285] 실시예
- [0286] 실시예 1 시노물구스 원숭이 BTLA와 교차 반응하는 인간 BTLA 아고니스트 항체의 식별
- [0287] 본 실시예는, 벤치마크 BTLA 아고니스트 항체(본원에서 22B3로 지칭됨)와 유사하거나 이보다 큰 정도로 항-IgM 매개 B세포 증식을 저해하는 능력(도 2a)뿐 아니라, HVEM 매개 T세포 저해를 역전시키지 못하는 능력(도 2b)에 기반하여 2개의 마우스 리드 항체 후보(HFB6-4와 HFB6-5)를 식별하는 방법을 설명한다. 따라서, 이러한 마우스 항체는 BTLA에 결합하고 BTLA의 다운스트림에서 면역억제 기능을 개시하는 능력뿐 아니라, BTLA에 결합될 때 BTLA의 천연 리간드(즉, HVEM)를 대체하지 못하는 능력으로 인해 때때로 "아고니스트 비(non)차단제"로 지칭된다.
- [0288] 도 1에서, 인간 BTLA를 과발현하는 HEK293 세포와 시노물구스 BTLA를 과발현하는 Expi293 세포를 상이한 농도의 항-BTLA 모 항체와 함께 인큐베이션하였다. AF647 접합된 항인간 IgG Fc 2차 항체를 이용하여 유세포분석으로 표적세포에 결합하는 항-BTLA 항체를 정량화하였다. HFB6-4 모 항체와 HFB6-5 모 항체는 한 자릿수 nM 친화도로 인간 BTLA와 cyno BTLA에 결합하는 것으로 확인되었다.
- [0289] 도 2a에서, EasySep™ 인간 B세포 분리 키트를 사용하여 건강한 공여자 PBMC에서 1차 B세포를 분리하고, CFSE로 표지하였다. B세포를 100 nM 항-BTLA 항체 또는 대조군 항체의 존재 하에서 10 µg/mL 항-IgM으로 자극하였다. 4일 후, 자극되지 않은 B세포와 관련된 CFSE 회색(% CFSElo)으로 B세포 증식을 정량화하였다.
- [0290] HVEM-BTLA 차단 리포터 검정에서, TCR 활성화제(TCRa)와 BTLA 리간드 HVEM을 발현하도록 조작된 CHO 세포주와 NFAT 결합 프로모터에 의해 구동되는 루시퍼라아제 리포터 및 BTLA를 발현하는 Jurkat 리포터 세포주와 함께 공

동 배양하였다. 벤치마크 항-BTLA 차단 항체(본원에서 JS004로 지칭됨)의 적용은 HVEM 매개 T세포 저해를 역전시킬 수 있었지만, HFB6-4와 HFB6-5는 역전시키지 못했다(도 2b).

[0291] 나아가, 비닝 실험에 기반하여 HFB6-4 에피토프와 22B3 에피토프가 BTLA/HVEM 결합 인터페이스에서 중첩되는 것을 확인하였다. 따라서, 상이한 항체가, 명백하게 동일하거나 실질적으로 중첩되는 에피토프에 결합하더라도, 실질적으로 상이한 생물학적 활성을 나타낸다는 것은 특히 놀라운 일이다.

[0292] 구체적으로, ELISA 비닝 실험에서, ELISA 플레이트를 각각의 포획 항체(HFB6-4 또는 22B3) 또는 리간드(재조합 Fc 태깅된 HVEM) 5 µg/mL로 코팅하였다. 차단 후, 재조합 his 태깅된 BTLA(BTLA-his)를 용액 중 과량(30 µg/mL)의 경쟁 항체 또는 아이소타입 대조군 항체(MG053)와 함께 투여하였다. HRP 접합된 항-his 2차 항체를 이용하여 포획된 BTLA-his를 검출하였다. 경쟁 항체로서 MG053을 사용한 것과 비교하여 BTLA-his 포획 저해율을 정량화하였다(하기 표 참조).

		포획 항체/리간드 (5 µg/ml)		
		HFB6-4	22B3	HVEM-Fc
용액 항체 (30 µg/ml)	HFB6-4	102	67	84
	22B3	104	87	93
	MG053 (C-)	0	0	0

[0293]

[0294] 데이터에 따르면, HFB6-4는 고정된 22B3에 대한 재조합 BTLA(BTLA-his)의 결합(그 반대의 경우도 마찬가지임)과, 재조합 HVEM(HVEM-Fc)에 대한 결합을 방지하였다. 이러한 데이터는, HFB6-4 에피토프와 22B3 에피토프가 BTLA/HVEM 결합 인터페이스에서 중첩됨을 나타낸다.

[0295] 실시예 2 T세포 활성화를 저해하는 hBTLA 아고니스트 항체 HFB6-4와 HFB6-5

[0296] 본 실험은, 단리된 HFB6-4 항체와 HFB6-5 항체가 T세포 활성화를 저해하는 능력으로 입증되는 바와 같이 기능성 hBTLA 아고니스트임을 입증한다.

[0297] 본 검정에서, 세포 표면에서 Fc γRIIb를 발현하는 CHO 세포를 먼저 항-CD3 항체의 존재 유무 하에서 HFB6-4 또는 HFB6-5와 같은 시험 항체(또는 양성 대조군 또는 음성 대조군 항체)와 함께 인큐베이션하여, 시험 항체(및 항-CD3 항체(첨가되는 경우))가 Fc 영역을 통해 표면 Fc γRIIb에 결합되게 하였다.

[0298] 이어서, 시험 항체로 덮인 CHO 세포를 표면 TCR 및 BTLA를 발현하는 Jurkat 리포터 세포와 함께 인큐베이션하였다. 항-CD3 항체가 또한 CHO 세포에 존재하는 경우, 항-CD3 항체에 의한 TCR 활성화 시, HFB6-4 및 HFB6-5와 같은 BTLA 아고니스트 항체는 BTLA에 결합하고 다운 스트림 BTLA 신호전달을 자극시켜, TCR 다운스트림 NFAT 프로모터의 전사 제어 하에서 루시퍼라아제 리포터 유전자에 의해 리포터 세포에서 측정된 바와 같이 TCR 신호전달을 저해하였다.

[0299] TCR 활성화를 자극하기 위해 항-CD3 항체를 첨가하지 않은 경우, 음성 대조군에서는 루시퍼라아제 활성이 검출되지 않았다. 루시퍼라아제 활성은 BTLA에 결합하지 않은 대조군 항체 MGO의 존재 하에서 감쇠되지 않았다.

[0300] 대조적으로, 벤치마크 BTLA 아고니스트 항체 22B3는 TCR 매개 루시퍼라아제 활성을 용량 의존적 방식으로 감소시켰다/저해하였다. HFB6-4와 HFB6-5뿐 아니라, 또 다른 BTLA 아고니스트 항체인 H6S8-9A10A는, 벤치마크 항체 22B3보다 큰 정도로 TCR 매개 루시퍼라아제 활성을 저해하였다. 도 3 참조.

[0301] 데이터에 따르면, HFB6-4, HFB6-5 및 H6S8-9A10A는 TCR 신호전달을 저해하는 데 있어서 적어도 벤치마크 아고니스트 항체 22B3 만큼(더 우수하지는 않더라도) 우수하였다.

[0302] 실시예 3 B세포 증식을 저해하는 hBTLA 아고니스트 항체 HFB6-4/HFB6-5

[0303] 본 실시예는, BTLA 아고니스트 항체 HFB6-4 및 HFB6-5가 시험된 모든 공여자에서 벤치마크 아고니스트 항체 22B3에 필적한 정도로 1차 B세포 증식을 저해함을 입증한다.

[0304] EasySep™ 인간 B세포 단리 키트를 사용하여 건강한 공여자 PBMC에서 1차 B세포를 단리하고, CFSE로 표지하였다. B세포를 항-BTLA 항체 또는 대조군 항체의 존재 하에서 10 µg/mL 항-IgM으로 자극하였다. 4일 후, 자극되지 않은 B세포와 관련된 CFSE 회색(% CFSE10)으로 B세포 증식을 정량화하였다.

[0305] HFB6-4와 HFB6-5는 벤치마크 22B3 항체와 유사한 수준(공여자 015와 공여자 017) 또는 벤치마크 22B3 항체보다 우수한 수준(공여자 019)으로 3명의 상이한 공여자 유래의 1차 B세포 증식을 저해하였다(도 4, 좌측 패널).

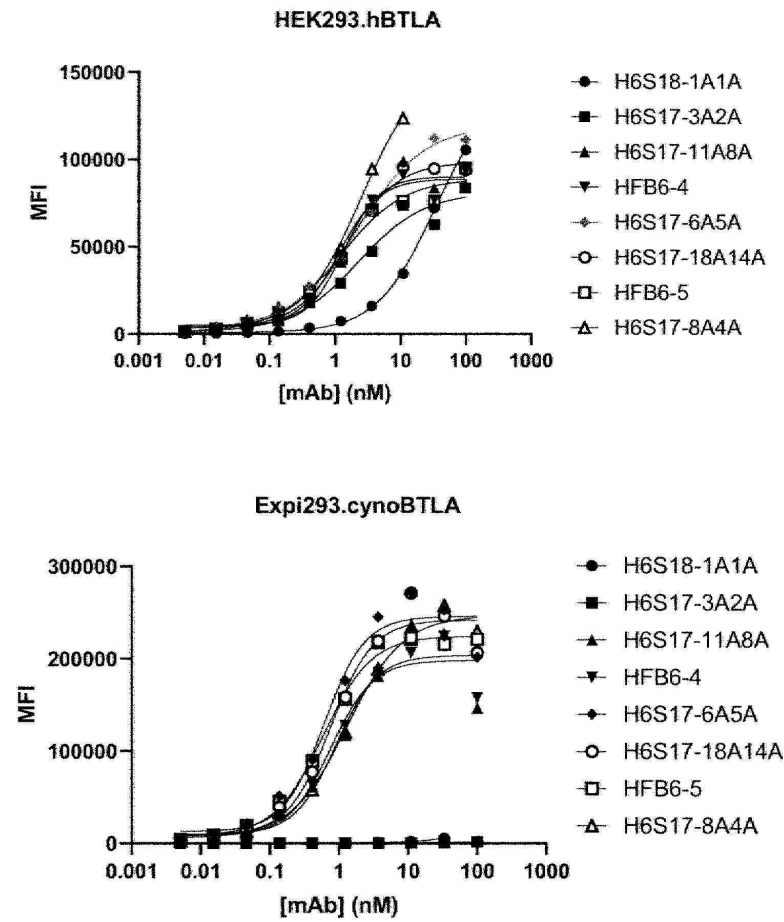
HFB6-4와 HFB6-5의 농도가 증가할수록 1차 B세포 증식의 저해도 증가하였다(도 4, 우측 패널).

- [0306] 실시예 4 인간화 HFB6-4/HFB6-5 변이체의 결합 및 교차 반응성
- [0307] 본 실험은, HFB6-4의 인간화 변이체 및 HFB6-5의 인간화 변이체가 모두 모 HFB6-4 항체 및 모 HFB6-5 항체와 마찬가지로, hBTLA에 결합하고 시노물구스 원숭이 BTLA와 높은 친화도로 교차 반응함을 입증한다.
- [0308] 간략하게, 각각 24개의 HFB6-4의 인간화 변이체와 HFB6-5의 인간화 변이체(예를 들어, HFB6-4-hz1 내지 HFB6-4-hz24와 HFB6-5-hz1 내지 HFB6-5-hz24)를 표준 인간화 프로토콜에 기반하여 생성하고, 생성된 인간화 변이체를 시험하여 hBTLA와 cynoBTLA에 대한 고친화성 결합체를 식별하였다.
- [0309] 인간 BTLA를 과발현하는 HEK293 세포와 시노물구스 BTLA를 과발현하는 Expi293 세포를 상이한 농도의 인간화 항-BTLA 항체와 함께 인큐베이션하였다. AF647 접합된 항인간 IgG Fc 2차 항체를 이용하여 유세포분석으로 표적 세포에 결합하는 항-BTLA 항체를 정량화하였다. 도 5 참조.
- [0310] 결과에 따르면, HFB6-4 인간화 변이체와 HFB6-5 인간화 변이체는 한 자릿수 nM 친화도로 인간 BTLA와 시노물구스 BTLA에 결합하였다.
- [0311] 실시예 5 B세포 증식과 T세포 리포터 활성을 저해하는 HFB6-4 인간화 변이체와 HFB6-5 인간화 변이체
- [0312] B세포 증식과 T세포 리포터 활성을 저해하는 데 있어서의 선택된 HFB6-4 인간화 변이체와 HFB6-5 인간화 변이체의 능력을 모 항체 및 벤치마크 대조군의 해당 능력과 비교하였다.
- [0313] B세포 증식 억제 검정에서, EasySep™ 인간 B세포 분리 키트를 사용하여 건강한 공여자 PBMC에서 1차 B세포를 분리하고, CFSE로 표지하였다. B세포를 1 µg/mL 및 10 µg/mL의 항-BTLA 항체 또는 대조군 항체의 존재 하에서 10 µg/mL 항-IgM으로 자극하였다. 4일 후, 자극되지 않은 B세포와 관련된 CFSE 희석(% CFSE10)으로 B세포 증식을 정량화하였다.
- [0314] T세포 억제 리포터 검정에서, FcγRIIb를 발현하도록 조작된 CHO 세포주를 사용하여 항-CD3 항체와 항-BTLA 항체를 가교시켰다. Fc 수용체가 교차되면, 항-BTLA 아고니스트 항체는 BTLA와 NFAT 루시페라아제 리포터를 발현하는 Jurkat 리포터 세포주에서 TCR-NFAT 경로 활성화에 의해 유도되는 루시페라아제 리포터 신호를 저해할 수 있었다.
- [0315] 결과에 따르면, 선택된 HFB6-4 인간화 변이체와 HFB6-5 인간화 변이체는 B세포 증식(도 6a)과 T세포 리포터 활성(도 6b)을 저해하는 데 있어 모 HFB6-4와 모 HFB6-5의 활성을 유지하였다.
- [0316] 실시예 6 야생형 C57BL/6 마우스에서 선택된 HFB6-4 인간화 변이체와 HFB6-5 인간화 변이체의 바람직한 PK 프로파일
- [0317] HFB6-4 인간화 변이체와 HFB6-5 인간화 변이체의 약동학적 프로파일을 조사하기 위해, 선택된 변이체의 1회 용량(10 mg/kg)을 야생형 C57BL/6 마우스에 정맥내 주사하였다. 1시간, 24시간 및 72시간 후, 혈액을 채취하고, ELISA로 선택된 항체의 혈장 농도를 측정하였다.
- [0318] 데이터에 따르면, HFB6-4 인간화 변이체 HFB6-4hz1-hG1과 HFB6-4hz6-hG1, 및 HFB6-5 인간화 변이체 HFB6-5hz12-hG1, HFB6-5hz19-hG1 및 HFB6-5hz24-hG1과 같은 선택된 인간화 변이체는 10 mg/kg의 1회 용량으로 투여될 때 마우스에서 연장된 노출을 나타냈다.
- [0319] 실시예 7 선택된 인간화 변이체의 유리한 개발 가능성
- [0320] 선택된 HFB6-4 인간화 변이체와 HFB6-5 인간화 변이체의 개발 가능성을 조사한 결과, 해당 변이체들은 용융 온도 검정, 4°C 및 37°C에서의 안정성, 및 낮은 pH(예를 들어, pH 3.8)에서의 안정성과 같은 다수의 검정에서 유리한 개발 가능성 특징을 나타냈다.
- [0321] 실시예 8 hPBMNC-NSG 급성 GVHD 모델에서의 치료 효능
- [0322] 본 실시예는, 대상 BTLA 아고니스트 항체가 급성 GVHD(이식편대숙주병)의 NSG 마우스 모델에서 면역 반응을 저해하는 데 효과적임을 입증한다.
- [0323] 본 실험에서는, 대상 BTLA 아고니스트 항체의 생체내 효능을 급성 이식편대숙주병(GVHD)의 이종 인간화 마우스 모델에서 평가하였다. 이러한 마우스 모델은 준치사량으로 방사선 조사된 NSG 마우스에서 인간 PBMC의 결합에 의해 유도된 T세포 매개 질환이다. 실험 프로토콜의 도식적인 도면이 도 8a에 예시되어 있다.

- [0324] 도 8b는, 각 치료군에 대한 용량과 측정하고자 하는 관독값을 포함하는 상세한 실험 설계를 보여준다. 4개의 치료군에는 각각 8마리 마우스가 있었다. 이러한 치료군에는, PBS 음성 대조군(G1), IgG1 아이소타입 일치 대조군(MG053-hG1, G2), BTLA 아고니스트 항체(HFB6-4-hz1-hG1) 군(G3) 및 22B3 벤치마크 대조군(G4)이 포함되어 있었다.
- [0325] 예비 데이터에 따르면, hPBMC 접종 후 14일차에, 대상 BTLA 아고니스트 항체 HFB6-4-hz1-hG1로 처리된 G3 마우스는 아이소타입 일치 대조군 G2와 비교하여 통계적으로 유의한 hCD45+ 면역 세포 감소%를 나타냈다. 한편, 벤치마크 군 G4는 동일한 시점에 임의의 차이가 있더라도 통계적으로 유의한 차이를 나타내는 것으로 보이지 않았다. 도 8e 참조.
- [0326] 나아가, 도 8f의 Kaplan-Meier 생존 곡선에 따르면, 실험 종료 시점인 28일차에 대상 BTLA 아고니스트 항체 HFB6-4-hz1-hG1로 처리된 G3 마우스 중 85%가 넘는 마우스가 생존해 있었다. 이는, PBS 대조군(G1)과 아이소타입 일치 MG053-hG1 대조군(G2)의 생존율 <20%보다 통계적으로 유의하게 더 높은 수준이었다.
- [0327] 한편, 22B3 벤치마크 항체로 처리된 처리군인 G4 대조군에서 15일차 후 생존율이 점진적으로 감소하여, 처리된 마우스의 생존율은 40% 미만이었다. G3 군과 G4 군 사이의 생존율 차이 또한 통계적으로 유의하였다.
- [0328] 또한, HFB6-4hz1-hG1 처리군(G3)은 PBS 대조군 G1, 아이소타입 일치 대조군 G2 및 22B3 벤치마크 군 G4와 비교하여, 유의하게 감소된 총 질량 점수(도 8c 참조)와 상대적으로 제어되는 체중(RCBD) 감소(도 8d)를 나타냈다.
- [0329] 동일한 hPBMC-NSG 급성 GvHD 모델에서 더 높은 용량의 대조군 항체 22B3과 비교하여 더 적은 용량의 HFB6-4hz1-hG1로 HFB6-4hz1-hG1의 용량 반응 효능을 또한 평가하였다(도 8g). 구체적으로, 1 mg/kg, 3 mg/kg 및 10 mg/kg의 HFB6-4hz1-hG1을 이용하여 처리한 결과는 모두, 10 mg/kg의 22B3-hG4와 10 mg/kg의 HFB6-4hz1의 IgG4 버전(HFB6-4hz1-hG4P)보다 큰 생존 이점을 나타냈다. IgG4 형식에서도, HFB6-4hz1-hG4P는 10 mg/kg의 22B3-hG4P보다 우수하였다. 나아가, HFB6-4hz1-hG1(10 mg/kg) 처리는, 인간에서 급성 GvHD를 예방하는 것으로 입증된 아바타셉트(abatacept)(6.13 mg/kg, 10 mg/kg 항체에 해당하는 물)보다 장기적인 생존 이점을 입증하였다.
- [0330] 이러한 데이터에 따르면, 대상 BTLA 아고니스트 항체 HFB6-4-hz1-hG1은, 적어도 치료 기간 전반에 걸쳐 더 나은 치료 효능, 전반적인 연장 및 더 나은 생존율뿐 아니라, 감소된 독성과 관련하여, 실험 조건 하의 이러한 급성 GvHD 마우스 모델에서 벤치마크 22B3 아고니스트 항체보다 우수하였다.
- [0331] 전반적으로, 상기 데이터에 따르면, HFB6-4와 HFB6-5, 및 이들에게 유도된 인간화 변이체와 같은 대상 BTLA 아고니스트 항체는 인간 BTLA와 cyno BTLA에 대해 한 자릿수 결합 친화도를 나타냈고; 이러한 항체의 다수의 인간화 변이체(예컨대, HFB6-4hz1-hG1)는 B세포 증식 억제와 T세포 리포터 검정에서 모 항체 기능을 유지하였으며; 이러한 항체는 효능 평가에 있어서 q3d 이하의 투여 빈도를 뒷받침하는 야생형 마우스에서의 유리한 PK 프로파일을 나타냈다. 나아가, 급성 GvHD의 생체내 hPBMC-NSG 마우스 모델에서, 대상 인간화 변이체 HFB6-4hz1-hG1은 심지어 대조군 항체의 십분의 일(1/10) 또는 삼분의 일(1/3)의 용량에서도 벤치마크 아고니스트 항체 22B3보다 더 효과적이며 더 적은 독성을 나타내는 것으로 입증되었다.

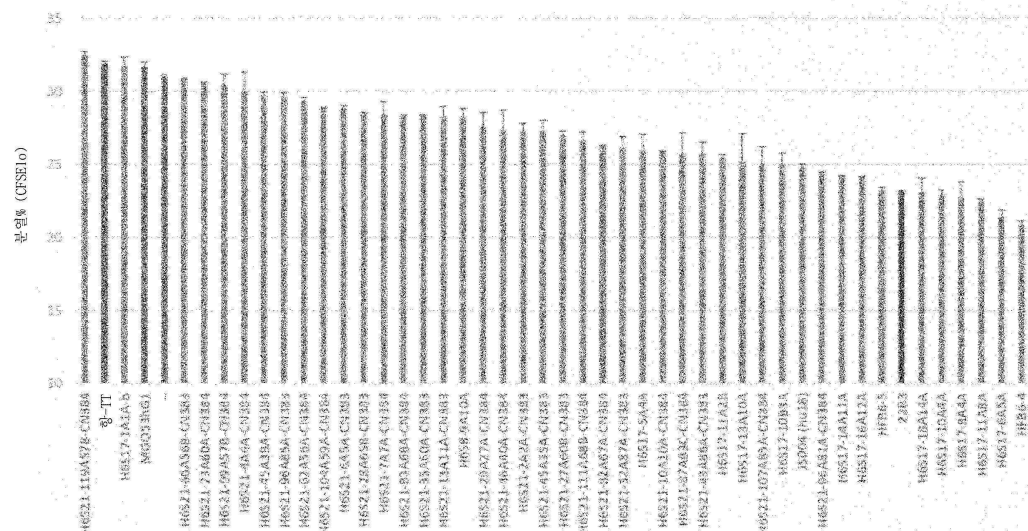
도면

도면1

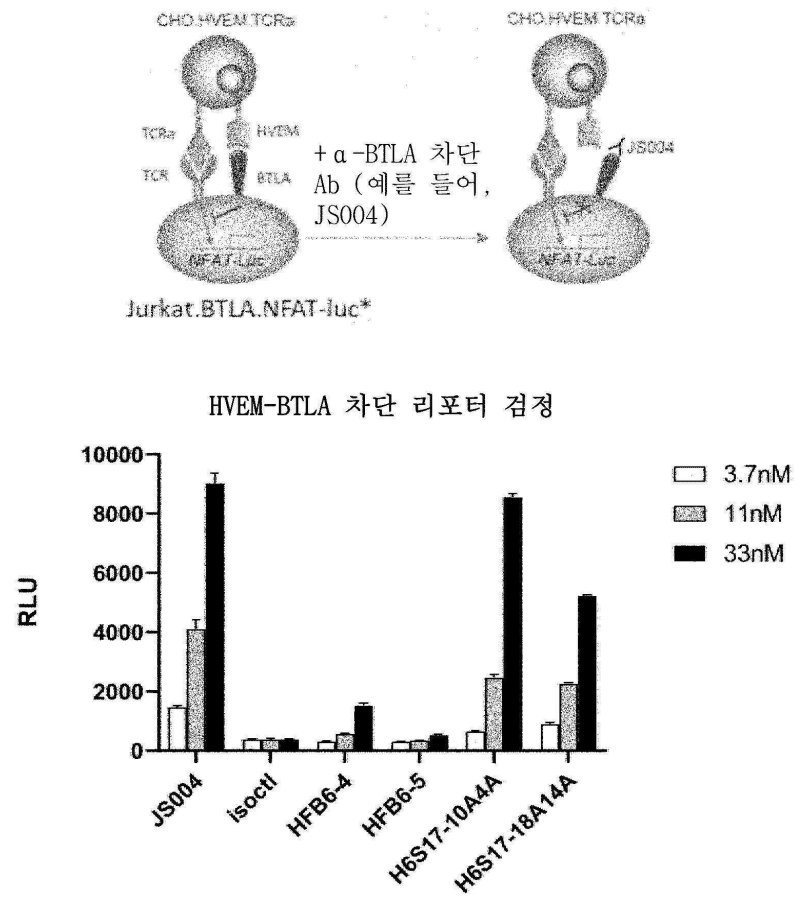


도면2a

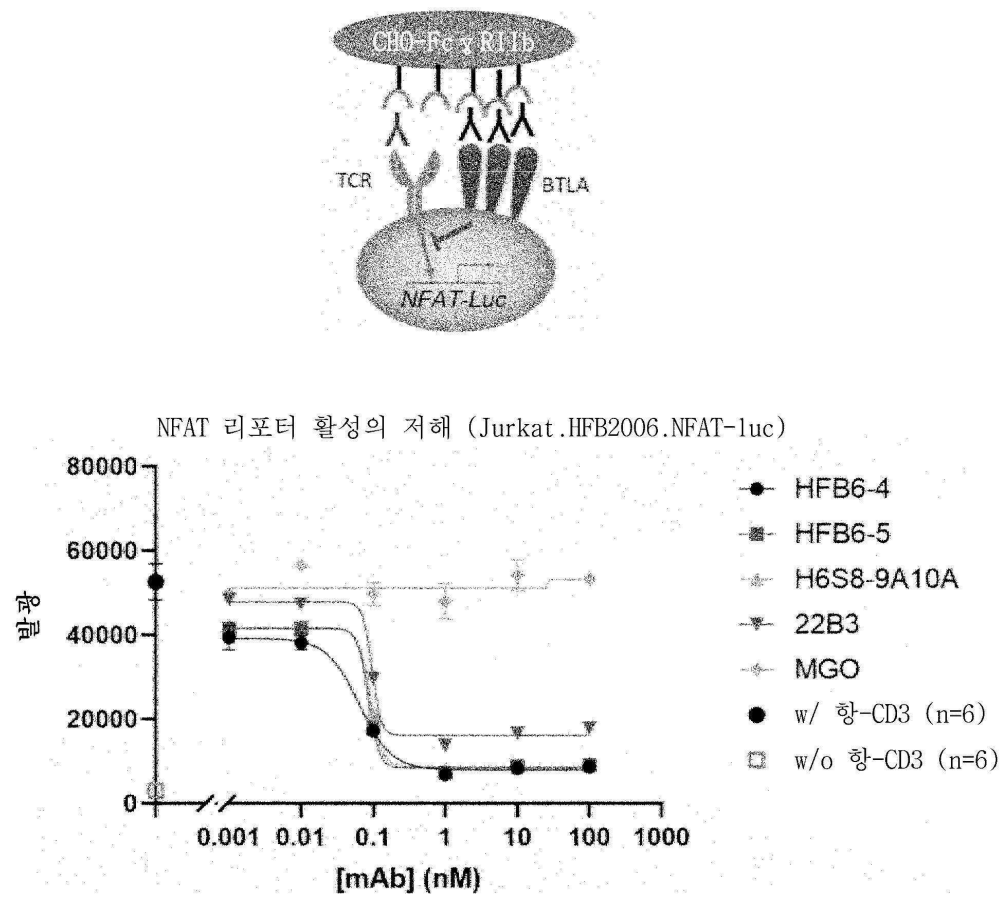
1차 B세포 증식 (항-IgM 자극)



도면2b

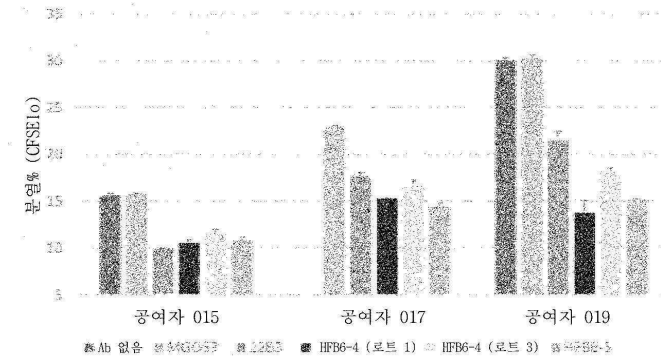


도면3

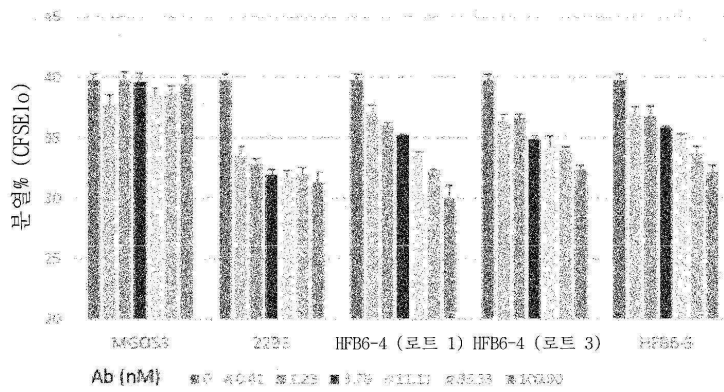


도면4

1차 B세포 증식의 저해 (3명의 공여자)

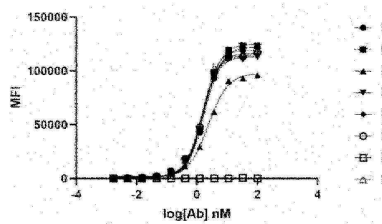


1차 B세포 증식의 저해 (공여자 16)



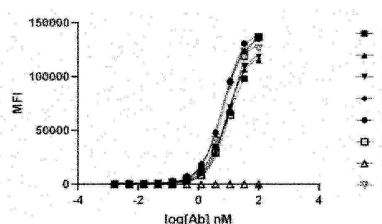
도면5

HEK293.hBTLA

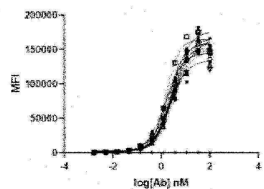


- HFB6-4hz1
- HFB6-4hz2
- ▲ HFB6-4hz3
- ▼ HFB6-4hz4
- ◆ HFB6-4hz5
- HFB6-4hz6
- MGO53
- △ HFB6-4

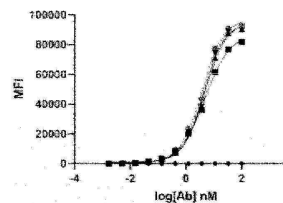
Expi293.cynoBTLA



- HFB6-4hz1
- ▲ HFB6-4hz2
- ▼ HFB6-4hz6
- ◆ HFB6-4hz7
- HFB6-4hz8
- HFB6-4hz12
- △ MGO53
- ▽ HFB6-4



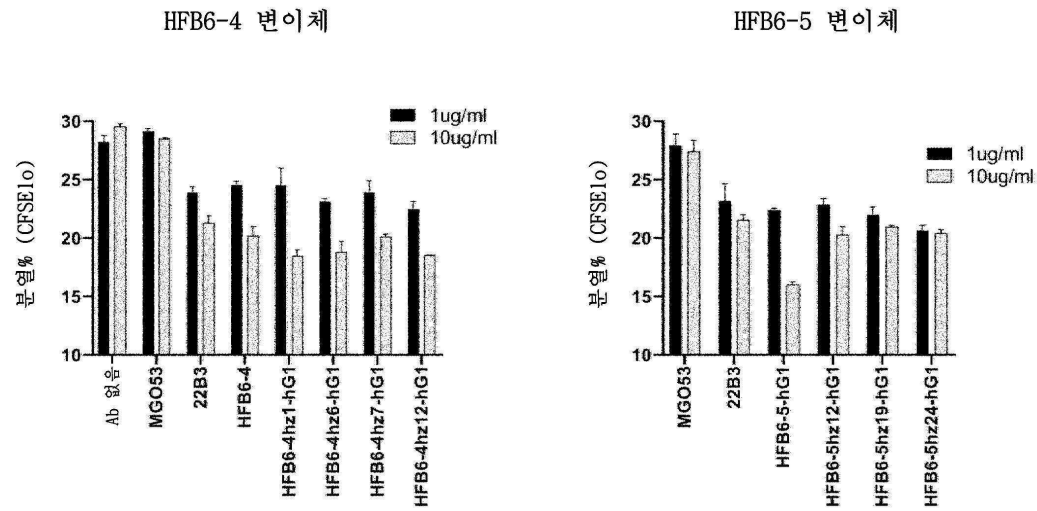
- HFB6-5hz6-hG1
- HFB6-5hz9-hG1
- ▲ HFB6-5hz12-hG1
- ▼ HFB6-5hz14-hG1
- ◆ HFB6-5hz15-hG1
- HFB6-5hz18-hG1
- HFB6-5hz19-hG1
- △ HFB6-5hz21-hG1
- ▽ HFB6-5hz24-hG1
- △ MGO53-hG1
- ▽ HFB6-5



- HFB6-5hz12
- ▲ HFB6-5hz19
- ▼ HFB6-5hz24
- ◆ MGO53
- HFB6-5

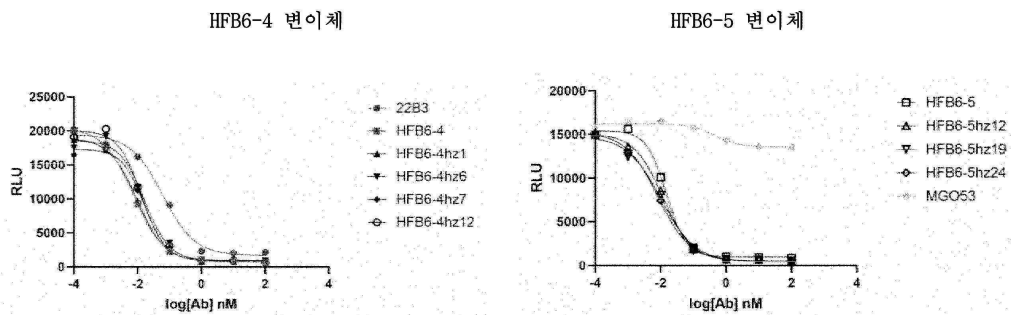
도면6a

항-IgM 유도 1차 B세포 증식의 저해



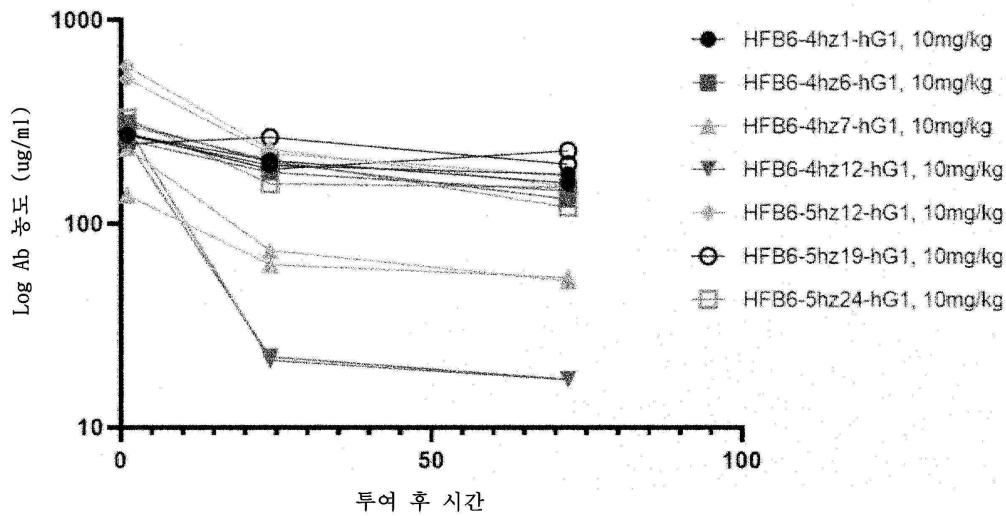
도면6b

항-CD3 유도 Jurkat 세포 활성화의 저해 (CHO.CD32B 가교)

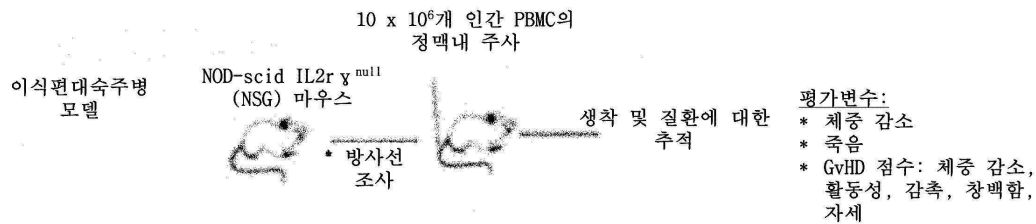


도면7

C57BL6 마우스(N=2)에서 HFB6-4 또는 HFB6-5의 hz 변이체의 HFB2006-13 PK 프로파일



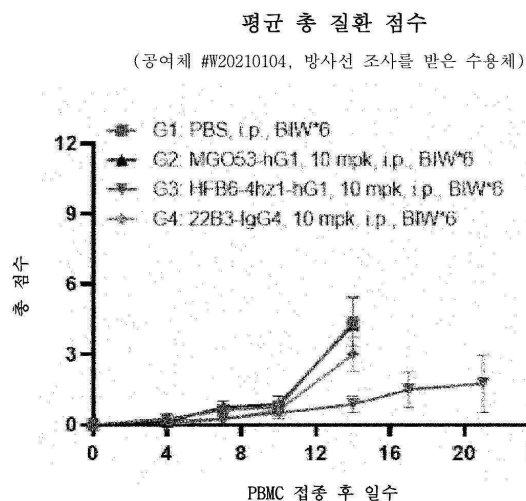
도면8a



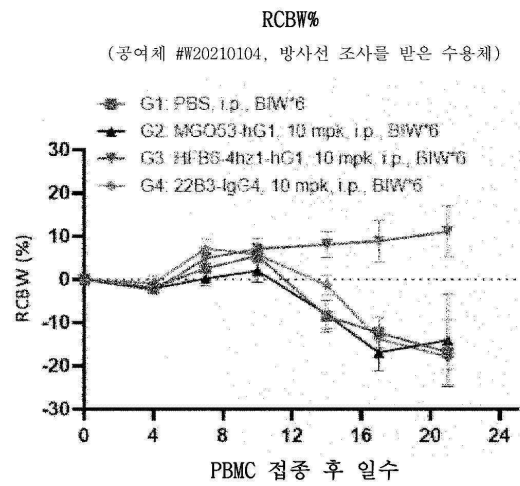
도면8b

4개의 군, n=8/군, 10 mg/kg, BIW*6	관독값
G1. PBS	1. 체중
G2. TT-hG1	2. 질환 점수
G3. HFB6-4hz1-hG1	3. hPBMC 접종 후 14일차 및 28일차에서의 림프구 내 hCD45+ 세포%
G4. 22B3	4. 생존

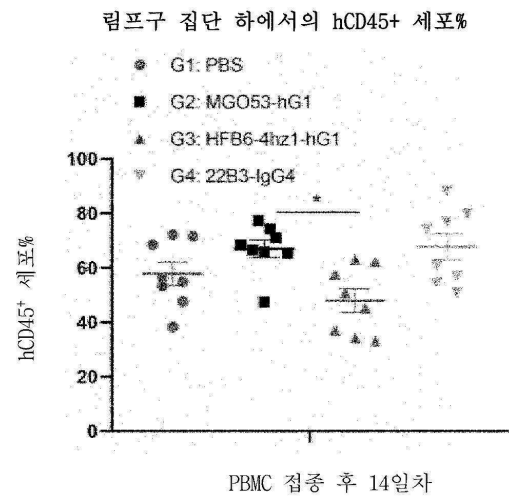
도면8c



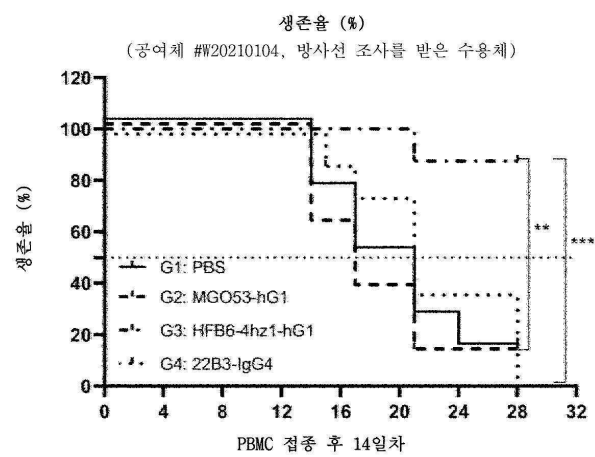
도면8d



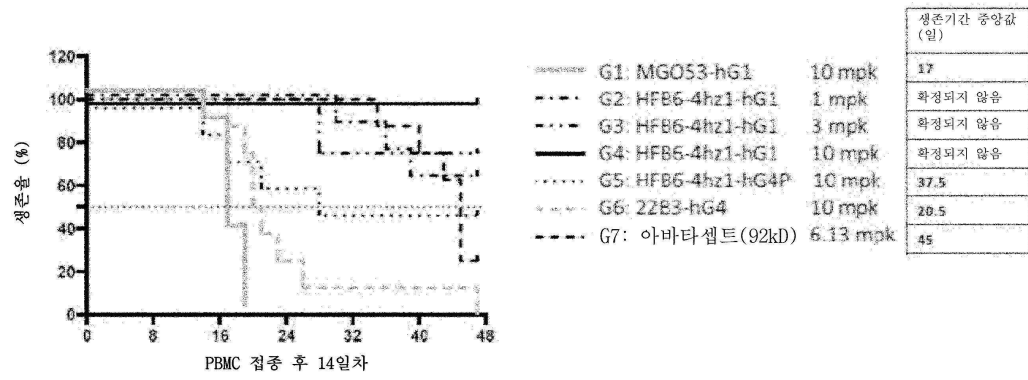
도면8e



도면8f



도면 8g



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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