



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS PARA BTLA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE MEDAREX, INC.

DOMICILIO PRINCETON, NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS

74. APODERADO ALVARO CORREA ORDÓÑEZ

22. BOGOTÁ, D. C., Febrero 22, 2019.

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-031267- -00000-0000

Fecha: 2012-02-22 16:39:44
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 388

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE :

☒ X

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒ X

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: MEDAREX, INC.

Dirección: Route 206 & Province Line Rd. Princeton, NJ 08543-4000, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6

Teléfono: 6341500

Fax: 3762211

E-Mail: office.bogota@bakermckenzie.com

IDENTIFICACION

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual

Número

79.143.366 Usaquén TP 20281

④

INVENTOR (ES)

(72)

Nombre: MATARAZA, Jennifer, Marie; VAN ELSAS, Andrea; KORMAN, Alan, J.; HALK, Edward, L.; THUDIUM, Kent, B.; SELBY, Mark; SPROUL, Timothy, W.; LEBLANC, Heidi, N.

Dirección: 320 Bent Street Cambridge, Massachusetts 02141 (US); P.O. Box 20 NL-5340 BH Oss (NL); 521 Cottonwood Drive Milpitas, California 95035 (US); 521 Cottonwood Drive Milpitas, California 95035 (US); 521 Cottonwood Drive Milpitas, California 95035 (US); 521 Cottonwood Drive Milpitas, California 95035 (US); 521 Cottonwood Drive Milpitas, California 95035 (US); 521 Cottonwood Drive Milpitas, California 95035 (US)

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América y Holanda (Respectivamente)

⑤

PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/043182

Fecha 26-07-2010

Publicación Internacional No. WO2011/014138

Fecha 03-02-2011

⑥

Título (54) ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS PARA BTLA

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 16/28; A61K 39/395; A61P 37/06

⑧

Prioridad

SI

☒ X

NO

☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

31-07-2009

03-11-2009

(31) Número de Solicitud

61/230,332

61/257,612

⑨

Comprobante de pago No. 12-003779 - 12-008972 - 12-008925

Fecha 13-01-2012 - 30-01-2012 - 30-01-2012

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos
listado de Secuencias

11

FIGURA CARATERISTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

2012/001

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 003779
		Bogotá D.C., Enero 13 de 2012 - 16:51:56

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411692610	12/01/2012	71.178.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00 590.000.00
			\$590.000.00
			=====

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
-*****-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-031267- -00000-0000
Fecha: 2012-02-22 16:39:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 388

2012/002

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 008972

Bogotá D.C., Enero 30 de 2012 - 16:34:29

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE

NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	450325595	27/01/2012	83.977.500.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES	EN N. CREACION CORRECCION A SOLICITUD EN TRAMITE / MODIFICA	120.000.00	120.000.00
				\$120.000.00

SON: **CIENTO VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-031267- -00000-0000

Fecha: 2012-02-22 16:39:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 388

2012/002

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 008925

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C., Enero 30 de 2012 - 16:34:29

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE

NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	450325595	27/01/2012	83.977.500.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMITE	30.000.00	30.000.00
				\$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-031267- -00000-0000

Fecha: 2012-02-22 16:39:44
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 388

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 30 de 2012 - 16:35:03

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
PATENTE DE INVENCION		PCT ☒	MODELO DE UTILIDAD
			DISEÑO INDUSTRIAL
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/28; A61K 39/395; A61P 37/06			
(71) Solicitante(s): MEDAREX, INC.			
(72) Inventor(es): MATARAZA, Jennifer, Marie; VAN ELSAS, Andrea; KORMAN, Alan, J.; HALK, Edward, L.; THUDIUM, Kent, B.; SELBY, Mark; SPROUL, Timothy, W.; LEBLANC, Heidi, N.			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/230,332	31-07-2009	US
	61/257,612	03-11-2009	US
(85) Fecha inicio fase nacional: 29-02-2012		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: : 03-02-2011	
Fecha de presentación de la solicitud: 26-07-2010		N° publicación: WO2011/014138	
No. de solicitud: PCT/US2010/043182			
(54) Título: ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS PARA BTLA			

 Industria y Comercio		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMATICO	
SUPERINTENDENCIA		PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐	
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/28; A61K 39/395; A61P 37/06			
(71) Solicitante(s) MEDAREX, INC.			
(72) Inventor(es): MATARAZA, Jennifer, Marie; VAN ELSAS, Andrea; KORMAN, Alan, J.; HALK, Edward, L.; THUDIUM, Kent, B.; SELBY, Mark; SPROUL, Timothy, W.; LEBLANC, Heidi, N.			
(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/230,332	31-07-2009	US
	61/257,612	03-11-2009	US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 29-02-2012		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 03-02-2011	
Fecha de presentación de la solicitud: 26-07-2010		No. Publicación: WO2011/014138	
No. de solicitud: PCT/US2010/043182			
(54) Título: ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS PARA BTLA			
(57) Resumen: La presente invención se refiere a compuestos de unión específicos para BTLA, y a sus usos. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos completamente humanos, que reconocen BTLA humano y modulan su actividad en cáncer, trastornos inflamatorios y autoinmunitarios.			
CONTINUA AL RESPALDO ...			

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 16/28; A61K 39/395; A61P 37/06	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) MEDAREX, INC.	
(30) Prioridad	(31) No.	32) Fecha	(33) País
	61/230,332	31-07-2009	US
	61/257,612	03-11-2009	US
		(72) Inventor(es) MATARAZA, Jennifer, Marie; VAN ELSAS, Andrea; KORMAN, Alan, J.; HALK, Edward, L.; THUDIUM, Kent, B.; SELBY, Mark; SPROUL, Timothy, W.; LEBLANC, Heidi, N.	
		(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 29-02-2012		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 03-02-2011
	Fecha de presentación de la solicitud: 26-07-2010		N° publicación: WO2011/014138
	No. de solicitud PCT/US2010/043182		
(54) Titulo: ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS PARA BTLA			

Resumen: La presente invención se refiere a compuestos de unión específicos para BTLA, y a sus usos. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos completamente humanos, que reconocen BTLA humano y modulan su actividad en cáncer, trastornos inflamatorios y autoinmunitarios.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
3 February 2011 (03.02.2011)

PCT



(10) International Publication Number
WO 2011/014438 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(74) Agent: KLANN, Amy, G.; Schering-Plough Corporation,
2000 Galloping Hill Road, Patent Dept. K-6-1 1990, Ken-
ilworth, New Jersey 07033-0530 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2010/043182

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:
26 July 2010 (26.07.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/230,332 31 July 2009 (31.07.2009) US
61/257,612 3 November 2009 (03.11.2009) US

(71) Applicants (for all designated States except US): N.V.
ORGANON [NL/NL]; Kloosterstraat 6, NL-5349 AB
Oss (NL). MEDAREX, INC. [US/US]; Rt. 206 &
Province Line Road, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MATARAZA, Jen-
nifer, Marie [US/US]; 320 Bent Street, Cambridge, Mas-
sachusetts 02141 (US). VAN ELSAS, Andrea [NL/NL];
P.O. Box 20, NL-5340 BH Oss (NL). KORMAN, Alan,
J. [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, California
95035 (US). HALK, Edward, L. [US/US]; 521 Cotton-
wood Drive, Milpitas, California 95035 (US). THUDI-
UM, Kent, B. [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas,
California 95035 (US). SELBY, Mark [US/US]; 521
Cottonwood Drive, Milpitas, California 95035 (US).
SPROUL, Timothy, W. [US/US]; 521 Cottonwood
Drive, Milpitas, California 95035 (US). LEBLANC, Hei-
di, N. [CA/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, Cali-
fornia 95035 (US).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: FULLY HUMAN ANTIBODIES TO BTLA

(57) Abstract: The present invention relates to binding compounds specific for BTLA and uses thereof. More specifically, the in-
vention relates to fully human antibodies that recognize human BTLA and modulate its activity in cancer, inflammatory, and au-
toimmune disorders.



WO 2011/014438 A1

FULLY HUMAN ANTIBODIES TO BTLA

[0001] This application claims the benefit of U.S. provisional patent application No. 61/230,332 filed July 31, 2009, and U.S. Provisional patent application No. 61/257,612 filed November 3, 2009, each of which are herein incorporated by reference in their entireties.

FIELD OF THE INVENTION

[0002] The present invention relates generally to antibodies or antigen binding fragments that bind to BTLA and uses thereof. More specifically, the invention relates to fully human antibodies that recognize human BTLA and modulate its activity, particularly in inflammatory, autoimmune and proliferative disorders.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] The immune system functions to protect individuals from infectious agents, *e.g.*, bacteria, multi-cellular organisms, and viruses, as well as from cancers. This system includes several types of lymphoid and myeloid cells such as monocytes, macrophages, dendritic cells (DCs), eosinophils, T cells, B cells, and neutrophils. These lymphoid and myeloid cells often produce signaling proteins known as cytokines. The immune response includes inflammation, *i.e.*, the accumulation of immune cells systemically or in a particular location of the body. In response to an infective agent or foreign substance, immune cells secrete cytokines which, in turn, modulate immune cell proliferation, development, differentiation, or migration. Immune responses can produce pathological consequences, *e.g.*, when it involves excessive inflammation, as in the autoimmune disorders (see, *e.g.*, Abbas *et al.* (eds.) (2000) *Cellular and Molecular Immunology*, W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA; Oppenheim and Feldmann (eds.) (2001) *Cytokine Reference*, Academic Press, San Diego, CA; von Andrian and Mackay (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1020-1034; Davidson and Diamond (2001) *New Engl. J. Med.* 345:340-350).

[0004] Positive and negative co-stimulatory signals play critical roles in the modulation of B and T cell activity, and the molecules that mediate these signals have proven to be effective targets for immunomodulatory agents. Positive co-stimulation, in addition to T cell receptor (TCR) engagement, is required for optimal activation of naive T cells, whereas negative co-stimulation is believed to be required for the acquisition of immunologic tolerance to self, as well as the termination of effector T cell functions. Upon interaction with B7.1 or B7.2 on the surface of antigen-presenting cells (APC), CD28, the prototypic T cell costimulatory molecule, emits signals that promote T cell proliferation and differentiation in

response to TCR engagement, while the CD28 homologue cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) mediates inhibition of T cell proliferation and effector functions (Chambers et al, *Ann. Rev. Immunol.*, 19:565-594, 2001; Egen *et al.*, *Nature Immunol.*, 3:611-618, 2002). Several new molecules with homology to the B7 family have been discovered (Abbas et al, *Nat. Med.*, 5:1345-6,1999; Coyle *et al.*, *Nat. Immunol.*, 2: 203-9, 2001; Carreno *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 20: 29-53, 2002; Liang *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 14: 384-90, 2002), and their role in T cell activation is just beginning to be elucidated.

[0005] These new costimulatory ligands include B7h, PD-L1, PD-L2, and B7-H3. B7h (Swallow et al, *Immunity*, 11: 423-32, 1999), also known as B7RP-1 (Yoshinaga et al, *Nature*, 402: 827-32, 1999), GL50 (Ling, et al, *J. Immunol.*, 164:1653- 7, 2000), B7H2 (Wang et al, *Blood*, 96: 2808-13, 2000), and LICOS (Brodie et al, *Curr. Biol.*, 10: 333-6, 2000), binds to an inducible costimulator (ICOS) on activated T cells, and costimulates T cell proliferation and production of cytokines such as interleukin 4 (IL- 4) and IL-10.

[0006] PD-L1 (Freeman et al, *J. Exp. Med.*, 192: 1027-34, 2000), also known as B7-H1 (Dong et al, *Nat. Med.*, 5, 1365-9, 1999), and PD-L2 (Latchman et al, *Nat. Immunol.*, 2:261-8, 2001), also known as B7-DC (Tseng et al, *J. Exp. Med.*, 193, 839-46, 2001) bind to programmed death 1 (PD-1) receptor on T and B cells.

[0007] Finally, B7-H3 binds an as yet currently unknown counter-receptor on activated T cells, and is reported to enhance proliferation of CD4+ T helper (Th) cells and CD8+ cytotoxic T lymphocytes (CTLs or Tcs) and selectively enhance IFN- γ expression (Chapoval et al, *Nat. Immunol*, 2, 269-74, 2001; Sun et al, *J. Immunol.*, 168, 6294-7, 2002).

[0008] The identification of additional molecules that have T cell costimulatory activity is of keen interest due to their fundamental biological importance and the therapeutic potential of agents capable of affecting their activity. Agents capable of modulating costimulatory signals, and thereby capable of modulating the activation and/or effector functions of CD8+ CTLs and CD4+ Th cells find use in the modulation of immune responses, and are highly desirable.

[0009] In particular, many autoimmune disorders are known to involve autoreactive T cells and autoantibodies. Agents that are capable of inhibiting or eliminating autoreactive lymphocytes without compromising the immune system's ability to defend against pathogens are highly desirable.

[0010] Conversely, many cancer immunotherapies, such as adoptive immunotherapy, expand tumor-specific T cell populations and direct them to attack and kill tumor cells (Dudley *et al.*, *Science* 298:850-854, 2002; Pardoll, *Nature Biotech.*,20: 1207-1208, 2002; Egen *et al.*,

Nature Immunol., 3:611-618, 2002). Agents capable of augmenting tumor attack are also highly desirable.

[0011] In addition, immune responses directed against different antigens (*e.g.*, microbial antigens or tumor antigens), while detectable, are frequently of insufficient magnitude to afford protection against a disease process mediated by agents (*e.g.*, infectious microorganisms or tumor cells) expressing those antigens. It is often desirable to administer to the subject, in conjunction with the antigen, an adjuvant that serves to enhance the immune response to the antigen in the subject.

[0012] It is also desirable to inhibit normal immune responses to antigen under certain circumstances. For example, the suppression of normal immune responses in a patient receiving a transplant is desirable, and agents that exhibit such immunosuppressive activity are highly desirable.

[0013] Costimulatory signals, particularly positive costimulatory signals, also play a role in the modulation of B cell activity. For example, B cell activation and the survival of germinal center B cells require T cell-derived signals in addition to stimulation by antigen.

[0014] CD40 ligand present on the surface of helper T cells interacts with CD40 on the surface of B cells, and mediates many such T-cell dependent effects in B cells.

[0015] The protein BTLA (B and T lymphocyte attenuator) is a member of the CD28 family of receptors that also includes CD28, CTLA-4, ICOS, and PD-1. The initial members of the family, CD28 and ICOS, were discovered by functional effects on augmenting T cell proliferation following the addition of monoclonal antibodies (Hutloff *et al.* (1999) Nature 397:263-266; Hansen *et al.* (1980) Immunogenics 10:247-260). BTLA was discovered through screening for differential expression in TH1 cells. In addition, BTLA has been described as providing negative inhibitory signals, analogous to CTLA-4. In the presence of agonist anti-BTLA Mab, anti-CD3 and anti-CD28 activated T-cells show reduced IL-2 production and proliferation (Kreig *et al.*, J. Immunol., 175, 6420-6472, 2005). Mice lacking an intact BTLA gene show higher titers to DNP-KLH post-immunization and an increased sensitivity to EAE (Watanabe *et al.*, Nat. Immunol, 4, 670-679, 2003). HVEM (herpes virus entry mediator) has been shown to be a ligand for BTLA (Scully *et al.* (2005) Nat. Immunol. 6:90-98; Gonzalez *et al.* (2005) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 102: 1116-1121).

[0016] Accordingly, agents that recognize BTLA, in particular antibodies and binding agents thereof that recognize BTLA, and methods of using such agents, are desired.

[0017] Antibodies can be used as therapeutic agents. Certain antibodies when used as a therapeutic agent *in vivo* can cause undesired immunogenicity of the antibodies. As most

monoclonal antibodies are derived from rodents, repeated use in humans results in the generation of an immune response against the therapeutic antibody, *e.g.*, human against mouse antibodies or HAMA. Such an immune response results in a loss of therapeutic efficacy at a minimum and a potential fatal anaphylactic response at a maximum. One approach for reducing the immunogenicity of rodent antibodies involves the production of chimeric antibodies, in which mouse variable regions (Fv) were fused with human constant regions (Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-43). However, mice injected with hybrids of human variable regions and mouse constant regions develop a strong anti-antibody response directed against the human variable region, suggesting that the retention of the entire rodent Fv region in such chimeric antibodies may still result in unwanted immunogenicity in patients.

[0018] Additionally, grafting of rodent complementarity determining region (CDR) loops of variable domains onto human frameworks (*i.e.*, humanization) has been used to further minimize rodent sequences. Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522; Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534. However, CDR loop exchanges still do not uniformly result in an antibody with the same binding properties as the antibody of origin. Changes in framework residues (FR), residues involved in CDR loop support, in humanized antibodies also are often required to preserve antigen binding affinity. Kabat *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147:1709. While the use of CDR grafting and framework residue preservation in a number of humanized antibody constructs has been reported, it is difficult to predict if a particular sequence will result in the antibody with the desired binding, and sometimes biological, properties. *See, e.g.*, Queen *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029, Gorman *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4181, and Hodgson (1991) *Biotechnology (NY)* 9:421-5. Moreover, most prior studies used different human sequences for animal light and heavy variable sequences, rendering the predictive nature of such studies questionable. Sequences of known antibodies have been used or, more typically, those of antibodies having known X-ray crystal structures, such as antibodies NEW and KOL. *See, e.g.*, Jones *et al.*, *supra*; Verhoeven *et al.*, *supra*; and Gorman *et al.*, *supra*. Exact sequence information has been reported for a few humanized constructs.

[0019] The need exists for anti-BTLA antibodies, and in particular anti-BTLA monoclonal antibodies, for use in treatment of human disorders, such as inflammatory, autoimmune, and proliferative disorders. Such antibodies will preferably exhibit low immunogenicity in human subjects, allowing for repeated administration without adverse immune responses.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0020] The present invention relates to anti-human BTLA antibodies having one or more desirable properties, including high binding affinities, neutralizing activities, good pharmacokinetics and low antigenicity in human subjects. The invention also relates to use of the antibodies of the present invention in the treatment of disease.

[0021] In certain embodiments, the invention relates to an isolated antibody or antigen binding fragment thereof which binds to human B and T lymphocyte attenuator (BTLA), comprising one or more properties selected from the group consisting of: a) does not block binding of BTLA to herpes virus entry mediator (HVEM); b) cross reacts with cynomolgus BTLA; c) exhibits a K_D for binding to human BTLA of at most about 2.4×10^{-9} ; and d) exhibits an EC_{50} of from about 10-100 nM in an *in vitro* assay measuring B or T cell activation.

[0022] In additional embodiments, the invention relates to an isolated antibody or antigen binding fragment thereof which binds to human BTLA, comprising one or more properties selected from the group consisting of: a) blocks binding of BTLA to HVEM; b) cross reacts with cynomolgus BTLA; and c) exhibits a K_D for binding to human BTLA of at most about 4.6×10^{-9} .

[0023] In additional embodiments, the invention relates to an isolated agonist antibody or antigen binding fragment thereof which binds BTLA selected from the group consisting of hu Mab8D5 and hu Mab8A3, wherein the antibody specifically binds BTLA and does not block binding to HVEM.

[0024] In additional embodiments, the invention relates to an isolated agonist antibody or antigen binding fragment thereof which binds BTLA selected from the group consisting of hu Mab21H6 hu and Mab19A7, wherein the antibody specifically binds BTLA and also blocks binding to HVEM.

[0025] In yet additional embodiments the invention relates to an isolated antibody or antigen binding fragment thereof which binds BTLA comprising at least one V_L CDR domain selected from the group consisting of SEQ ID Nos.: 12, 13, and 14 and at least one V_H CDR domain selected from the group consisting of SEQ ID Nos.: 5, 6, and 7.

[0026] In yet additional embodiments the invention relates to an isolated antagonist antibody or antigen binding fragment thereof which binds BTLA, comprising at least one V_L CDR domain selected from the group consisting of SEQ ID Nos.: 26, 27, 28, and at least one V_H CDR domain selected from the group consisting of SEQ ID Nos.: 19, 20, and 21.

[0027] In yet additional embodiments the invention relates to an isolated antibody or antigen binding fragment thereof, comprising a heavy chain variable region and a light chain variable region, wherein: (a) the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11 (8D5 heavy chain); and (b) the light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 18 (8D5 light chain).

[0028] In yet additional embodiments the invention relates to an isolated antibody or antigen binding fragment thereof, comprising: (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:5 (8D5 HCDR1); (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:6 (8D5 HCDR2); (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:7 (8D5 HCDR3); (d) a light chain variable region CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12(8D5 LCDR1); (e) a light chain variable region CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:13 (8D5 LCDR2); and (f) a light chain variable region CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14(8D5 LCDR3); wherein the antibody specifically binds BTLA and does not block binding to HVEM.

[0029] In yet additional embodiments the invention relates to an isolated antibody or antigen binding fragment thereof, comprising: (a) a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human VH gene (SEQ ID NO:8) [encoding 8D5]; and (b) a light chain variable region that is the product of or derived from a human VK gene (SEQ ID NO:15) [encoding 8D5]; wherein the antibody specifically binds BTLA.

[0030] In yet additional embodiments the invention relates to an isolated antibody or antigen binding fragment thereof, wherein the antibody cross-competes for binding to BTLA with a reference antibody that comprises: (a) the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 or SEQ ID NO:11 (8D5 heavy chain); (b) the light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:18 (8D5 light chain); wherein the isolated monoclonal antibody, or antigen-fragment thereof, is a BTLA agonist.

[0031] In certain embodiments, the heavy chain and light chain are connected by a flexible linker to form a single-chain antibody.

[0032] In certain embodiments, the antibody or antigen binding fragment is a single-chain Fv antibody. In certain embodiments, the antibody or antigen binding fragment is a Fab antibody. In certain embodiments, the antibody or antigen binding fragment is a Fab' antibody. In certain embodiments, the antibody or antigen binding fragment is a (Fab')₂ antibody.

[0033] In certain embodiments, the antibody or antigen binding fragment is a fully human monoclonal or recombinant antibody.

[0034] In certain embodiments, the antibody or antigen binding fragment decreases BTLA activity and/or signaling.

[0035] In certain embodiments, the antibody or antigen binding fragment increases BTLA activity and/or signaling.

[0036] In yet additional embodiments, the invention relates to an isolated polypeptide comprising the V_L domains or the V_H domains of any of the antibodies or antigen binding fragments described herein.

[0037] In yet additional embodiments, the invention relates to an isolated nucleic acid encoding the V_L domains or the V_H domains of any of the antibodies or antigen binding fragments described herein.

[0038] In yet additional embodiments, the invention relates to a composition comprising one or more antibodies or antigen binding fragments as described herein and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

[0039] In yet additional embodiments, the invention relates to a method of treating a condition caused by decreased expression and/or activity of BTLA in a subject, comprising administering to the subject an effective amount of the pharmaceutical composition as described herein. In particular, any disease or disorder marked by the presence or activity of T or B cells can be treated by a BTLA agonist antibody (*i.e.*, a disease or disorder that involves the presence of BTLA positive immune cells can be managed or treated by activating BTLA receptor function). In certain embodiments, the one or more antibodies or antigen binding fragment thereof is selected from the group consisting of hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7, or hu Mab4C7.

[0040] In yet additional embodiments, the invention relates to a method of treating an inflammatory or autoimmune disorder in a subject comprising administering an effective amount of the antibody or antigen binding fragments as described herein to the subject. In certain embodiments, the inflammatory or autoimmune disorder is selected from the group consisting of inflammatory bowel disorders (*e.g.*, Crohn's disease, ulcerative colitis, and inflammatory bowel disease), inflammatory fibrosis (*e.g.*, scleroderma, lung fibrosis, and cirrhosis), rheumatoid arthritis (RA), osteoarthritis, osteoporosis, asthma (including allergic asthma), allergies, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), multiple sclerosis, psoriasis, uveitis, graft versus host disease (GVHD), juvenile early-onset Type I diabetes, transplant rejection, SLE, and Sjögren's syndrome. Such methods of treatment may further

comprise administering one or more additional therapeutic agents, such as immunosuppressive or anti-inflammatory agents. In yet additional embodiments, the disorder is rheumatoid arthritis.

[0041] In yet additional embodiments, the inflammatory bowel disorder is selected from the group consisting of Crohn's disease, ulcerative colitis, and inflammatory bowel disease.

[0042] In yet additional embodiments, the invention relates to a method of treating transplant rejection and/or graft-versus-host disease.

[0043] In yet additional embodiments, the invention relates to a method of treating diabetes type I.

[0044] In yet additional embodiments, the invention relates to the use of the antibody or antigen binding fragment as described herein for the preparation of a medicament to treat an inflammatory or autoimmune disorder in a subject.

[0045] In yet additional embodiments, the invention relates to the use of the antibody or antigen binding fragment as described herein for the preparation of a medicament to decrease the activity of BTLA.

[0046] In yet additional embodiments, the invention relates to a method of increasing the immune response in a subject comprising administering an effective amount of the pharmaceutical composition to the subject. In certain embodiments, the one or more antibodies or antigen binding fragment thereof is hu Mab4C7.

[0047] In yet additional embodiments, the invention relates to the use of an antagonist antibody as described herein for the preparation of a medicament to increase the activity of BTLA.

[0048] In yet additional embodiments, the invention relates to the use of any of the antibody or antibody fragments described herein for diagnostic use.

[0049] In yet additional embodiments, the invention relates to a kit comprising any of the antibodies of or antigen binding fragments described herein.

[0050] In yet additional embodiments, the invention relates to a complex comprising BTLA and any one of the antibody or antigen binding fragments described herein.

[0051] In yet additional embodiments, the invention relates to an expression vector comprising the isolated nucleic acid encoding a polypeptide encoding any of the VH or VL chains described herein. In yet additional embodiments, the invention relates to host cell comprising the expression vector described herein.

[0052] In yet additional embodiments, the invention relates to a method of producing the antibody of antigen binding fragment thereof as described herein comprising:

[0053] (a) culturing the host cell described herein in culture medium under conditions wherein the nucleic acid sequence is expressed, thereby producing polypeptide comprising the light and heavy chain variable regions; and

[0054] (b) recovering the polypeptides from the host cell or culture medium.

[0055] In yet additional embodiments, the invention relates to an isolated antibody or antigen binding fragment thereof, wherein the antibody cross-competes for binding to BTLA with a reference antibody that comprises:

[0056] (a) the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 23 (4C7 heavy chain);

[0057] (b) the light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:30 (4C7 light chain); wherein the isolated monoclonal antibody, or antigen-fragment thereof, is a BTLA antagonist.

[0058] In yet additional embodiments, the invention relates to an isolated nucleic acid encoding an immunoglobulin polypeptide comprising CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 found in a light chain variable region that comprises the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:18.

[0059] In yet additional embodiments, the invention relates to an isolated immunoglobulin polypeptide comprising CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 found in a light chain variable region that comprises the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:18.

[0060] In yet additional embodiments, the invention relates to an isolated nucleic acid encoding an immunoglobulin polypeptide comprising CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 found in a heavy chain variable region that comprises the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11.

[0061] In yet additional embodiments, the invention relates to an isolated immunoglobulin polypeptide comprising CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 found in a heavy chain variable region that comprises the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11.

[0062] In yet additional embodiments, the invention relates to an isolated nucleic acid encoding an immunoglobulin polypeptide comprising CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 found in a light chain variable region that comprises the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:32.

[0063] In yet additional embodiments, the invention relates to an isolated immunoglobulin polypeptide comprising CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 found in a light chain variable region that comprises the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:32.

[0064] In yet additional embodiments, the invention relates to an isolated nucleic acid encoding an immunoglobulin polypeptide comprising CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 found in a heavy chain variable region that comprises the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 25.

[0065] In yet additional embodiments, the invention relates to an isolated immunoglobulin polypeptide comprising CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 found in a heavy chain variable region that comprises the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:25.

[0066] In certain embodiments, these nucleic acid constructs and/or polypeptides are useful in methods of making an antibody.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0067] Figures 1A-C show the sequences of the heavy and light chain variable regions of hu Mab 8D5. Figure 1A shows the mature amino acid sequence of VH chain and the encoding nucleic acid sequence. The CDR1, CDR2, and CDR3 sequences are indicated with waved lines above the amino acid sequence. Figure 1B shows the mature amino acid sequence of the VL chain and the encoding nucleic acid sequence. The CDR1, CDR2, and CDR3 sequences are indicated with waved lines above the amino acid sequence. Figure 1C shows sequence features of the heavy and light chain variable regions of Hu Mab8D5.

[0068] Figures 2A-C show the sequences of the heavy and light chain variable regions of hu Mab 4C7. Figure 2A shows the mature amino acid sequence of VH chain and the encoding nucleic acid sequence. The CDR1, CDR2, and CDR3 sequences are indicated with waved lines above the amino acid sequence. Figure 2B shows the mature amino acid sequence of the Vk and the encoding nucleic acid sequence. The CDR1, CDR2, and CDR3 sequences are indicated with waved lines above the amino acid sequence. Figure 2C shows sequence features of the heavy and light chain variable regions of hu Mab4C7.

[0069] Figures 3A-D show binding and cross reactivity features of hu Mab8D5 and hu Mab4C7. Figure 3A shows the binding profile of hu Mab8D5 for human BTLA expressed on CHO cells. Figure 3B shows the binding profile of hu Mab8D5 for cyno BTLA expressed on CHO cells. Figure 3C shows the binding profile of hu Mab4C7 for human BTLA expressed on CHO cells. Figure 3D shows the binding profile of hu Mab4C7 for cyno BTLA expressed on CHO cells.

[0070] Figures 4A-B show the results of testing the ability of the antibodies to block human HVEM binding to CHO cells expressing human BTLA. Figure 4A shows that hu Mab4C7 blocks human HVEM binding to CHO cells expressing human BTLA. Figure 4B shows that hu Mab8D5 fails to block human HVEM binding to CHO cells expressing human BTLA.

[0071] Figure 5 is a graph showing that hu Mab8D5, as well as hu Mab8D5 Fab' fragment, inhibits anti-CD3 induced proliferation of human T cell blasts.

[0072] Figures 6A-D are graphs showing the effects of hu Mab8D5 and hu Mab4C7 on SEB-induced human and cyno monkey T-cell response.

[0073] Figures 7A-B are graphs showing that human recall T cell response to tetanus toxoid challenge is decreased by hu Mab8D5.

[0074] Figures 8A-B are graphs showing that human recall T cell response to tetanus toxoid challenge is increased by hu Mab4C7.

[0075] Figure 9 is a graph showing that human B cell function is inhibited by hu Mab8D5.

[0076] Figures 10A-B are graphs showing the inhibition of peripheral blood B cell chemokine production by hu Mab8D5.

[0077] Figure 11 is a graph showing that hu Mab8D5 does not autonomously stimulate immune activity in healthy donor blood.

[0078] Figures 12A-B are Western blots showing hu Mab8D5 and hu Mab4C7 (Fig. 12A) binding to BTLA and hu Mab8D5 reducing TCR ξ phosphorylation (Fig. 12B).

[0079] Figures 13A-B are graphs showing that hu Mab8D5 suppressed SEB response and B cell proliferation in a dose dependent manner.

[0080] Figures 14A-D are graphs illustrating that the tested anti-BTLA agonist antibodies do not elicit a cytokine storm in human PBMC cultures, as measured by the lack of production of IL-2 (Figs. 14A, B), IFN γ (Figs. 14C), and TNF α (Fig. 14D) in human PBMC cultures.

[0081] Figure 15 is a graph of day 28 ELISA results showing that hu Mab8D5 inhibited human anti-TT recall IgG response in SCIDhu SPL mice.

[0082] Figure 16 is a graph of day 28 ELISA results showing that hu Mab8D5 inhibited human total IgG response in SCIDhu SPL mice.

[0083] Figures 17A-B are graphs showing titers from individual treated mice illustrating that hu Mab8D5 inhibited human anti-TT recall IgG response in SCIDhu SPL mice (Fig. 17A), compared to isotype control (Fig. 17B).

[0084] Figures 18A-B are graphs showing titers from individual treated mice illustrating that hu Mab8D5 inhibited human total IgG response in SCIDhu SPL mice (Fig. 18A) compared to isotype control (Fig. 18B).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0085] The mammalian immune system has developed several pathways to harness the potentially harmful activities of T and B lymphocytes. These include a wide variety of cytokine-receptor pathways as well as costimulation pathways involving receptors like CD28, CTLA-4, PD-1 and BTLA. Whereas the CD28 – B7 interaction is an example of a positive costimulatory pathway (*i.e.*, CD28 triggering enhances T cell responses to antigen specific triggers), the other three receptors are representations of inhibitory costimulation pathways. CTLA-4, PD-1 and BTLA show overlapping, but distinct expression profiles, and limit the activity of T and B lymphocytes as well as other immune cells in a non-redundant fashion. (See, Deppong *et al.* J Immunol 2006, Tao *et al.*, J Immunol 2005). Whereas CTLA-4 competes with CD28 for binding of B7.1 and B7.2 (CD80 and CD86) and sets a primordial threshold for naïve T cell activation in lymph nodes and spleen, PD-1 and BTLA each have their own unique ligands (PD-L1/L2 and HVEM, respectively) and appear to control peripheral T cell homeostasis and re-activation. (See, Krieg *et al.* Nat Immunol 2007.)

BTLA downregulates B and T cell activation

[0086] As indicated by its name, B-and T-Lymphocyte Attenuator (BTLA) is expressed on both resting and activated B- and T- lymphocytes. BTLA is a type I transmembrane glycoprotein and has a cytoplasmic tail which contains several inhibitory tyrosine motifs (Watanabe, 2003). BTLA bears some structural similarity to members of the CD28/CTLA-4 family, but several factors make it a unique member. Human BTLA contains the following characterized domains: Ig extracellular domain: residues 51-117; transmembrane domain: residues 153-173; ITIM domain: residues 255-260; and an ITSM domain: residues 280-285 (with reference to human SEQ ID NO:2). ITIM stands for immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, while ITSM stands for immunoreceptor tyrosine-based switch motif.

[0087] The BTLA Ig intermediate-type (I set-type) extracellular domain corresponding to residues 43-134 of SEQ ID NO:2 is responsible for ligand binding and is not found in other members of the CD28/CTLA-4 family. In addition, the ligand for BTLA is not a B7 family member, but rather it is the TNFR superfamily receptor herpesvirus entry mediator (HVEM) (Sedy, 2005). HVEM is expressed on peripheral B and T cells and monocytes, and the crystal structure of HVEM bound to BTLA has been solved (Compaan, 2005).

[0088] Several *in vivo* studies demonstrated the inhibitory role for BTLA in lymphocyte responses. BTLA-deficient mice generated by Murphy and co-workers (Washington University St. Louis) exhibited a three-fold increase in IgG production in response to T-dependent antigen. In addition, T and B cells isolated from BTLA^{-/-} mice showed a greater proliferative response to antigen-receptor stimulation using -CD3 and anti-IgM, respectively (Watanabe, 2003). In overexpression studies, BTLA was found associated with the B cell receptor complex and with the T cell receptor. In line with this finding, antigen-receptor independent stimulation using Con A (T cells) or LPS (B cells) is not affected in BTLA deficient lymphocytes and cannot be modulated using anti-BTLA antibodies.

[0089] BTLA knockout mice have been shown to develop spontaneous autoimmune disease over time and have a decreased lifespan (Oya, 2008). Ligation of BTLA by HVEM leads to downregulation of T cell activation and proliferation (Sedy, 2005). BTLA knockout mice exhibit increased disease severity in autoimmune encephalomyelitis (EAE) and allergic airway inflammation models, both of which are dependent on T cell activity (Watanabe, 2005; Deppong, 2006). An association between a SNP in the human BTLA gene and susceptibility to RA has also been shown (Lin, 2006). However, little is yet known about the role of BTLA signaling in pathological conditions.

[0090] Thus, for autoimmune and certain proliferative diseases, there is an ongoing need to develop treatments that exploit the inhibitory role of BTLA in lymphocyte responses, while allowing for BTLA-HVEM binding.

[0091] Agonist BTLA antibodies are particularly well-suited for this role. In the course of selection of over 200 mAbs generated using the Ultimab platform, a number of agonist antibodies and antagonist BTLA antibodies were identified. Out of the over 200 mAbs, several antibodies including hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, and hu Mab19A7 were identified that activate inhibitory BTLA receptor function (*i.e.*, agonist antibodies). Hu Mab8D5 and hu Mab8A3 are BTLA agonists that do not block HVEM ligand binding to BTLA. Hu Mab21H6 and hu Mab19A7 activate inhibitory BTLA receptor function while also blocking HVEM ligand binding to BTLA. These agonist antibodies exhibit ~12-14 nM binding affinity for BTLA, and also inhibit T and B cell responses in human donor blood with an EC₅₀ of ~30-100 nM. When re-expressed as an IgG4, as well as a monovalent Fab' fragment, hu Mab8D5 maintained its immune inhibitory activity *in vitro*. These agonist BTLA antibodies also bind to cynomolgus BTLA with similar affinity and demonstrate equivalent inhibition of cynomolgus T cell responses. However, these agonist antibodies do not cross-react with mouse BTLA. In mouse pharmacological studies, hu Mab8D5 exhibited a half-life

of ~16 days, consistent with expectations for a human IgG4. These receptor agonistic mAbs inhibit and suppress T and B lymphocyte activity *in vitro*, and also exhibit such activity in *in vivo* model systems. Agonist antibodies of the present invention are distinguished by having the ability to inhibit B cell activation by cognate antigen without depleting the B cells. Additionally, agonist antibodies of the present invention are also distinguished by the ability to target B and T cell activation simultaneously.

[0092] In addition to the four agonist anti-BTLA antibodies described above, the selection also identified an antagonist antibody hu Mab4C7. This antibody exhibits immune stimulating effects as shown in Figures 6C-D and Figures 8A-B and therefore is expected to be useful as a cancer treatment, or for treatment of certain pathogenic infections, and as an adjuvant to a vaccine. The use of a BTLA antagonist such as Mab4C7 for stimulating the immune response in the context of cancer is expected to correlate with these results as well as results illustrating that blocking BTLA-HVEM ligation during priming of naïve CD8+ T cells contributes to enhanced T cell proliferation. (See, Derré *et al.* J. Clin. Invest. 2010, 120: 157-167).

[0093] For BTLA agonists, the ability to suppress both antigen-specific T and B cell responses will provide methods for modulating BTLA activity that are expected to be useful for conditions such as arthritis, SLE, Sjogren's disease, ulcerative colitis and Crohn's disease, as well as solid organ transplants (*i.e.*, kidney, liver and other organs, including tissue transplants). Current treatments exhibit deficiencies in part because suppressing T cells alone is not sufficient to achieve the desired effects. The anti-BTLA antibodies of the present invention may be efficacious for the treatment of arthritis, ulcerative colitis and Crohn's disease, as well as solid organ transplants (*i.e.*, kidney, liver and other organs) by the ability to suppress both T- and B-cell responses. The ability of each of the agonist antibodies of the present invention, when re-expressed as an IgG4, as well as a monovalent Fab' fragment to maintain immune inhibitory activity *in vitro* and *in vivo* models, provides desirable traits for novel treatments.

Abbreviations

[0094] Throughout the detailed description and examples of the invention the following abbreviations will be used:

- [0095] ADCC Antibody-dependent cellular cytotoxicity
- [0096] BTLA B-and T- Lymphocyte Attenuator
- [0097] HVEM Herpes Virus Entry Mediator
- [0098] Hu Mab8D5 fully human monoclonal agonist anti-BTLA antibody

[0099]	Hu Mab8A3	fully human monoclonal agonist anti-BTLA antibody
[00100]	Hu Mab21H6	fully human monoclonal agonist anti-BTLA antibody
[00101]	Hu Mab19A7	fully human monoclonal agonist anti-BTLA antibody
[00102]	Hu Mab4C7	fully human monoclonal antagonist anti-BTLA antibody
[00103]	Hu Mab 20H4	fully human monoclonal anti-BTLA antibody
[00104]	Hu Mab 15C5	fully human monoclonal anti-BTLA antibody
[00105]	CDC	Complement-dependent cytotoxicity
[00106]	CDR	Complementarity determining region in the immunoglobulin variable regions, defined using the Kabat numbering system
[00107]	CHO	Chinese hamster ovary
[00108]	CTL	Cytotoxic T lymphocyte
[00109]	EC50	concentration resulting in 50% efficacy or binding
[00110]	ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
[00111]	FW	Antibody framework region: the immunoglobulin variable regions excluding the CDR regions
[00112]	HRP	Horseradish peroxidase
[00113]	IL-2	interleukin 2
[00114]	IL-5	interleukin 5
[00115]	IFN	interferon
[00116]	IC50	concentration resulting in 50% inhibition
[00117]	IgG	Immunoglobulin G
[00118]	Kabat	An immunoglobulin alignment and numbering system pioneered by Elvin A. Kabat ((1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)
[00119]	mAb or Mab or MAb	Monoclonal antibody
[00120]	MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
[00121]	MOA	Mechanism of action
[00122]	NHS	Normal human serum
[00123]	PCR	Polymerase chain reaction
[00124]	PK	Pharmacokinetics
[00125]	SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
[00126]	TT	Tetanus toxoid

[00127] V region The segment of IgG chains which is variable in sequence between different antibodies. It extends to Kabat residue 109 in the light chain and 113 in the heavy chain.

[00128] VH Immunoglobulin heavy chain variable region

[00129] VK Immunoglobulin kappa light chain variable region

DEFINITIONS

[00130] So that the invention may be more readily understood, certain technical and scientific terms are specifically defined below. Unless specifically defined elsewhere in this document, all other technical and scientific terms used herein have the meaning commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs.

[00131] As used herein, including the appended claims, the singular forms of words such as "a," "an," and "the," include their corresponding plural references unless the context clearly dictates otherwise.

[00132] "Activation," "stimulation," and "treatment," as it applies to cells or to receptors, may have the same meaning, *e.g.*, activation, stimulation, or treatment of a cell or receptor with a ligand, unless indicated otherwise by the context or explicitly. "Ligand" encompasses natural and synthetic ligands, *e.g.*, cytokines, cytokine variants, analogues, muteins, and binding compounds derived from antibodies. "Ligand" also encompasses small molecules, *e.g.*, peptide mimetics of cytokines and peptide mimetics of antibodies. "Activation" can refer to cell activation as regulated by internal mechanisms as well as by external or environmental factors. "Response," *e.g.*, of a cell, tissue, organ, or organism, encompasses a change in biochemical or physiological behavior, *e.g.*, concentration, density, adhesion, or migration within a biological compartment, rate of gene expression, or state of differentiation, where the change is correlated with activation, stimulation, or treatment, or with internal mechanisms such as genetic programming.

[00133] "Activity" of a molecule may describe or refer to the binding of the molecule to a ligand or to a receptor, to catalytic activity; to the ability to stimulate gene expression or cell signaling, differentiation, or maturation; to antigenic activity, to the modulation of activities of other molecules, and the like. "Activity" of a molecule may also refer to activity in modulating or maintaining cell-to-cell interactions, *e.g.*, adhesion, or activity in maintaining a structure of a cell, *e.g.*, cell membranes or cytoskeleton. "Activity" can also mean specific activity, *e.g.*, [catalytic activity]/[mg protein], or [immunological activity]/[mg protein], concentration in a biological compartment, or the like. "Activity" may refer to modulation of components of the innate or the adaptive immune systems. "Proliferative activity" encompasses an activity that

promotes, that is necessary for, or that is specifically associated with, *e.g.*, normal cell division, as well as cancer, tumors, dysplasia, cell transformation, metastasis, and angiogenesis.

[00134] "Administration" and "treatment," as it applies to an animal, human, experimental subject, cell, tissue, organ, or biological fluid, refers to contact of an exogenous pharmaceutical, therapeutic, diagnostic agent, or composition to the animal, human, subject, cell, tissue, organ, or biological fluid. "Administration" and "treatment" can refer, *e.g.*, to therapeutic, pharmacokinetic, diagnostic, research, and experimental methods. Treatment of a cell encompasses contact of a reagent to the cell, as well as contact of a reagent to a fluid, where the fluid is in contact with the cell. "Administration" and "treatment" also means *in vitro* and *ex vivo* treatments, *e.g.*, of a cell, by a reagent, diagnostic, binding compound, or by another cell. The term "subject" includes any organism, preferably an animal, more preferably a mammal (*e.g.*, rat, mouse, dog, cat, rabbit) and most preferably a human.

[00135] As used herein, a BTLA agonist antibody refers to an antibody that binds to BTLA and enhances its coinhibitory signal to B and T cells.

[00136] As used herein, a BTLA antagonist antibody refers to an antibody that binds to BTLA and prevents the coinhibitory signal delivery to B and T cells.

[00137] In an embodiment of the invention, where possible, a composition of the invention is administered to a subject in accordance with the Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; 57th edition (November 1, 2002)).

[00138] In certain embodiments, the anti-BTLA antibody or antigen binding fragment thereof can be administered by an invasive route such as by injection (see above). Administration by a non-invasive route (*e.g.*, orally; for example, in a pill, capsule or tablet) is also within the scope of the present invention. In an embodiment of the invention, an anti-BTLA antibody or antigen binding fragment thereof, or pharmaceutical composition thereof, is administered intravenously, subcutaneously, intramuscularly, intraarterially, intra-articular (*e.g.* in arthritis joints), by inhalation, aerosol delivery, or intratumorally. In certain embodiments, the anti-BTLA antibody or antigen binding fragment thereof is administered in combination with a chemotherapeutic agent (*e.g.*, gefitinib (*e.g.*, Iressa™)) administered orally in tablet form. In another embodiment, the chemotherapeutic agent is paclitaxel (*e.g.*, Taxol®) which is administered intravenously.

[00139] In yet another embodiment, the anti-BTLA antibody or antigen binding fragment thereof is administered in combination with at least one additional therapeutic agent, such as, but not limited to other monoclonal antibodies directed to CTLA-4 (*e.g.*, AVASTIN (bevacizumab), MYLOTARG (gemtuzumab), BEXXAR (tositumomab), RITUXAN

(rituximab), HERCEPTIN (trastuzumab)), or protein ligands having similar effects; agents that activate antigen presenting cells (dendritic cells, macrophages, B cells, monocytes), including type 1 interferons (*e.g.*, interferon alpha and beta); interferon gamma; BCG; agents that provide tumor antigens in any and all forms, including protein antigens, peptide antigens, whole cell lysates and derivatives thereof; genetically encoded antigens (*e.g.*, adenovirus encoded antigens); cellular components of the immune system that have been altered either *in vivo* or *ex vivo* to enhance their immune properties (*e.g.*, autologous dendritic cells, lymphocytes, heat shock proteins, etc.); chemotherapeutic agents such as, but not limited to, cyclophosphamide, methotrexate, etoposide, adriamycin, taxanes, fluorouracil, cytosine arabinoside (AraC), and platinum-containing agents, among numerous others. Examples of antigens include PSA antigens (*e.g.*, PROSTVAC/TRICOM) and melanoma-derived gp100 antigens. The combination may also be administered in combination with a cytokine or growth factor such as but not limited to GM-CSF, or with an immunostimulatory nucleotide, such as but not limited to CpG ODN PF3512676 (also known as ProMune, *See* WO2007/008463).

[00140] Additionally, in certain embodiments, the anti-BTLA antibody or antigen binding fragment thereof can be administered in combination with antibodies such as anti-CTLA-4 and anti-PD1, including those described in U.S. Patent No. 6,682,736 and U.S. Patent No. 7,563,869, respectively.

[00141] Compositions can be administered with medical devices known in the art. For example, a pharmaceutical composition of the invention can be administered by injection with a hypodermic needle.

[00142] The pharmaceutical compositions of the invention may also be administered with a needleless hypodermic injection device; such as the devices disclosed in U.S. Patent Nos. 6,620,135; 6,096,002; 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 or 4,596,556.

[00143] Examples of well-known implants and modules for administering pharmaceutical compositions include: U.S. Patent No. 4,487,603, which discloses an implantable micro-infusion pump for dispensing medication at a controlled rate; U.S. Patent No. 4,447,233, which discloses a medication infusion pump for delivering medication at a precise infusion rate; U.S. Patent No. 4,447,224, which discloses a variable flow implantable infusion apparatus for continuous drug delivery; U.S. Patent No. 4,439,196, which discloses an osmotic drug delivery system having multi-chamber compartments. Many other such implants, delivery systems, and modules are well known to those skilled in the art.

[00144] “Treat” or “treating” means to administer a therapeutic agent, such as a composition containing any of the binding compounds of the present invention, internally or externally to a patient having one or more disease symptoms for which the agent has known therapeutic activity. Typically, the agent is administered in an amount effective to alleviate one or more disease symptoms in the treated patient or population, whether by inducing the regression of or inhibiting the progression of such symptom(s) by any clinically measurable degree. The amount of a therapeutic agent that is effective to alleviate any particular disease symptom (also referred to as the “therapeutically effective amount”) may vary according to factors such as the disease state, age, and weight of the patient, and the ability of the drug to elicit a desired response in the patient. Whether a disease symptom has been alleviated can be assessed by any clinical measurement typically used by physicians or other skilled healthcare providers to assess the severity or progression status of that symptom. While an embodiment of the present invention (*e.g.*, a treatment method or article of manufacture) may not be effective in alleviating the target disease symptom(s) in every patient, it should alleviate the target disease symptom(s) in a statistically significant number of patients as determined by any statistical test known in the art such as the Student’s t-test, the χ^2 -test, the U-test according to Mann and Whitney, the Kruskal-Wallis test (H-test), Jonckheere-Terpstra-test and the Wilcoxon-test.

[00145] “Treatment,” as it applies to a human, veterinary, or research subject, refers to therapeutic treatment, prophylactic or preventative measures, to research and diagnostic applications. “Treatment” as it applies to a human, veterinary, or research subject, or cell, tissue, or organ, encompasses contact of a BTLA agonist or antagonist to a human or animal subject, a cell, tissue, physiological compartment, or physiological fluid. “Treatment of a cell” also encompasses situations where the BTLA agonist or antagonist contacts BTLA receptor, *e.g.*, in the fluid phase or colloidal phase, but also situations where the agonist or antagonist does not contact the cell or the receptor.

[00146] In certain embodiments, an anti-BTLA antibody or antigen-binding fragment thereof, alone, or in combination can be used for treating or preventing any disease or condition in a subject in need of such treatment or prevention.

[00147] With respect to antagonist anti-BTLA antibodies, in certain embodiments, the condition is mediated, for example, by elevated expression or activity of BTLA, or by elevated expression of its ligand (*e.g.*, HVEM) and may be treated or prevented by modulation of BTLA-HVEM ligand binding, activity or expression. In certain embodiments, the disease or condition is mediated by an increased level of BTLA, and/or HVEM and is treated or

prevented by decreasing BTLA-HVEM ligand binding, activity, or expression. Antagonist anti-BTLA antibodies as described herein will block the activity of BTLA as a negative signaling molecule and will result in upregulating the response to tumors by T and B cells.

[00148] The term "B and T lymphocyte attenuator" and "BTLA", genes/ proteins are used interchangeably, which includes variants, isoforms, homologs orthologs and paralogs. For example, antibodies specific for human BTLA may, in certain embodiments, cross-react with BTLA from species other than human. In other embodiments the antibodies specific for human BTLA may be completely specific for human BTLA and may not exhibit species or other types of cross reactivity. The term "human BTLA" unless otherwise noted, refers to a human BTLA sequence. Human BTLA sequences, unless otherwise noted, encompass all human isotypes and BTLA variants, such as the complete amino acid sequence of human BTLA that has Genbank Accession No. AAP44003. There are also at least two human BTLA transcript variants. Transcript variant 1 described at GenBank Accession No. NP_861445 is 289 amino acids in length and exhibits nearly 98% identity with the BTLA sequence of Accession No. AAP44003. This variant represents the longer transcript and encodes the longer isoform of 289 amino acids. Transcript variant 2 (GenBank Accession No. NM_001085357) lacks an alternate in-frame exon, compared to variant 1, resulting in a shorter protein of 241 amino acids (isoform 2, GenBank Accession No. NP_001078826), compared to isoform 1.

[00149] The human BTLA sequences may differ by having, for example, conserved mutations or mutations in non-conserved regions and the BTLA has substantially the same biological function as the human BTLA of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:35, or SEQ ID NO:37. For example, a biological function of human BTLA is to suppress an immune response, such as a T-cell response. That is, BTLA is considered to be a negative regulator. It has C-terminal inhibitor motifs that are involved in reducing IL-2 production and T cell expansion (Watanabe *et al.*, Nat. Immunol., 4, 670-679, 2003; Chemnitz *et al.*, J. Immunol., 176, 6603-6614, 2006). In addition, a biological function of human BTLA may be having, for example, an epitope in the extracellular domain of BTLA that is specifically bound by an antibody of the instant disclosure.

[00150] A particular BTLA sequence will generally be at least 90% identical in amino acid sequence to human BTLA of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:35, or SEQ ID NO:37, or other isoforms, and contain amino acid residues that identify the amino acid sequence as being human when compared to BTLA amino acid sequences of other species (*e.g.*, murine). In certain cases, a human BTLA may be at least 95%, or even at least 96%, 97%, 98% or 99% identical to human BTLA of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:35, or SEQ ID NO:37, or other

isoforms or variants. In certain embodiments, a human BTLA sequence will display no more than 10 amino acid differences from the BTLA of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:35, or SEQ ID NO:37, or other isoforms or variants. In certain embodiments, the human BTLA may display no more than 5, or even no more than 4, 3, 2, or 1 amino acid difference from the BTLA of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:35, or SEQ ID NO:37, or other isoforms or variants. Percent identity can be determined as described herein. The term "immune response" refers to the action of, for example, lymphocytes, antigen presenting cells, phagocytic cells, granulocytes, and soluble macromolecules produced by the above cells or the liver (including antibodies, cytokines, and complement) that results in selective damage to, destruction of, or elimination from the human body of invading pathogens, cells or tissues infected with pathogens, cancerous cells, or, in cases of autoimmunity or pathological inflammation, normal human cells or tissues.

[00151] In certain instances it is useful to conduct corollary studies on mouse analog antibodies. Suitable methods as described herein can be used to generate anti-BTLA mouse antibodies as well as to select and characterize mouse anti-BTLA antibodies. While any mouse BTLA peptide with desired features and activities can be used to generate mouse BTLA antibodies, the sequences described by Watanabe *et al.* Nat. Immunol. 4 (7), 670-679 (2003) including GenBank Accession No. AAP44002 (306 amino acids) coded for by GenBank Accession No. AY293285 are preferred.

[00152] Additionally, a number of mouse BTLA splice variants have been characterized, and in certain instances, any of these can be utilized for generating anti-mouse BTLA antibodies. Mouse BTLA splice variants include the coding sequence NM_001037719 and corresponding amino acid sequence NP_001032808 for the longer transcript variant 1 (306 amino acids in length) and the shorter transcript 2 variant sequence is described at GenBank NP_808252 (305 amino acids in length); which uses an alternate in-frame splice site in the 3' coding region, compared to variant 1, resulting in a shorter protein (isoform 2).

[00153] As used herein, the term "antibody" refers to any form of antibody that exhibits the desired biological activity. Thus, it is used in the broadest sense and specifically covers, but is not limited to, monoclonal antibodies (including full length monoclonal antibodies), polyclonal antibodies, multispecific antibodies (*e.g.*, bispecific antibodies), humanized, fully human antibodies, chimeric antibodies and camelized single domain antibodies. As used herein, the terms "anti BTLA antibody" or "antigen binding fragment" of an antibody (the "parental antibody") encompass a fragment or a derivative of an antibody, typically including at least a fragment of the antigen binding or variable regions (*e.g.* one or more CDRs) of the

parental antibody, that retains at least some of the binding specificity of the parental antibody. Examples of antibody binding fragments include, but are not limited to, Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies; single-chain antibody molecules, *e.g.*, sc-Fv; nanobodies and multispecific antibodies formed from antibody fragments. Typically, a binding fragment or derivative retains at least 10% of its BTLA binding activity when that activity is expressed on a molar basis. Preferably, a binding fragment or derivative retains at least 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% or 100% or more of the BTLA binding affinity as the parental antibody. It is also intended that an anti BTLA antigen binding fragment can include conservative or non conservative amino acid substitutions (referred to as "conservative variants" or "function conserved variants" of the antibody) that do not substantially alter its biologic activity. The term "binding compound" refers to both antibodies and binding fragments thereof.

[00154] "Isolated antibody" refers to the purification status of a binding compound and in such context means the molecule is substantially free of other biological molecules such as nucleic acids, proteins, lipids, carbohydrates, or other material such as cellular debris and growth media. Generally, the term "isolated" is not intended to refer to a complete absence of such material or to an absence of water, buffers, or salts, unless they are present in amounts that substantially interfere with experimental or therapeutic use of the binding compound as described herein.

[00155] A "Fab fragment" is comprised of one light chain and the C_{H1} and variable regions of one heavy chain. The heavy chain of a Fab molecule cannot form a disulfide bond with another heavy chain molecule.

[00156] An "Fc" region contains two heavy chain fragments comprising the C_{H1} and C_{H2} domains of an antibody. The two heavy chain fragments are held together by two or more disulfide bonds and by hydrophobic interactions of the C_{H3} domains.

[00157] A "Fab' fragment" contains one light chain and a portion or fragment of one heavy chain that contains the V_H domain and the C_{H1} domain and also the region between the C_{H1} and C_{H2} domains, such that an interchain disulfide bond can be formed between the two heavy chains of two Fab' fragments to form a F(ab')₂ molecule.

[00158] A "F(ab')₂ fragment" contains two light chains and two heavy chains containing a portion of the constant region between the C_{H1} and C_{H2} domains, such that an interchain disulfide bond is formed between the two heavy chains. A F(ab')₂ fragment thus is composed of two Fab' fragments that are held together by a disulfide bond between the two heavy chains.

[00159] The "Fv region" comprises the variable regions from both the heavy and light chains, but lacks the constant regions.

[00160] The term "single-chain Fv" or "scFv" antibody refers to antibody fragments comprising the V_H and V_L domains of an antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Generally, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V_H and V_L domains which enables the scFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of scFv, see Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315. See also, International Patent Application Publication No. WO 88/01649 and U.S. Pat. Nos. 4,946, 778 and 5,260,203.

[00161] A "domain antibody" is an immunologically functional immunoglobulin fragment containing only the variable region of a heavy chain or the variable region of a light chain. In some instances, two or more V_H regions are covalently joined with a peptide linker to create a bivalent domain antibody. The two V_H regions of a bivalent domain antibody may target the same or different antigens.

[00162] A "bivalent antibody" comprises two antigen binding sites. In some instances, the two binding sites have the same antigen specificities. However, bivalent antibodies may be bispecific (see below).

[00163] As used herein, unless otherwise indicated, an "anti-BTLA" antibody refers to an antibody that is raised against human BTLA or a variant thereof, or any antigenic fragment thereof.

[00164] The term "monoclonal antibody", as used herein, refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic epitope. In contrast, conventional (polyclonal) antibody preparations typically include a multitude of antibodies directed against (or specific for) different epitopes. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256: 495, or may be made by recombinant DNA methods (*see, e.g.*, U.S. Pat. No. 4,816,567). The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in Clackson *et al.* (1991)

Nature 352: 624-628 and Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, for example. See also Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731.

[00165] In certain embodiments, monoclonal antibodies include "chimeric" antibodies (immunoglobulins) in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (U.S. Pat. No. 4,816,567; and Morrison *et al.*, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855).

[00166] As used herein, a "chimeric antibody" is an antibody having the variable domain from a first antibody and constant domain from a second antibody, where the first and second antibodies are from different species. Typically the variable domains are obtained from an antibody from an experimental animal (the "parental antibody"), such as a rodent, and the constant domain sequences are obtained from human antibodies, so that the resulting chimeric antibody will be less likely to elicit an adverse immune response in a human subject than the parental rodent antibody.

[00167] In certain embodiments, monoclonal antibodies herein also include camelized single domain antibodies. See, *e.g.*, Muyldermans *et al.* (2001) *Trends Biochem. Sci.* 26:230; Reichmann *et al.* (1999) *J. Immunol. Methods* 231:25; WO 94/04678; WO 94/25591; U.S. Pat. No. 6,005,079). In one embodiment, the present invention provides single domain antibodies comprising two V_H domains with modifications such that single domain antibodies are formed.

[00168] As used herein, the term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a heavy chain variable domain (V_H) connected to a light chain variable domain (V_L) in the same polypeptide chain (V_H-V_L or V_L-V_H). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, *e.g.*, EP 404,097; WO 93/11161; and Holliger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448. For a review of engineered antibody variants generally see Holliger and Hudson (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1126-1136.

[00169] As used herein, the term "humanized antibody" refers to forms of antibodies that contain sequences from both human and non-human (*e.g.*, murine, rat) antibodies. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically

two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin, and all or substantially all of the framework (FR) regions are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody may optionally comprise at least a portion of a human immunoglobulin constant region (Fc).

[00170] The antibodies of the present invention also include antibodies with modified (or blocked) Fc regions to provide altered effector functions. See, *e.g.*, U.S. Pat. No. 5,624,821; WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702. Such modification can be used to enhance or suppress various reactions of the immune system, with possible beneficial effects in diagnosis and therapy. Alterations of the Fc region include amino acid changes (substitutions, deletions and insertions), glycosylation or deglycosylation, and adding multiple Fc. Changes to the Fc can also alter the half-life of antibodies in therapeutic antibodies, enabling less frequent dosing and thus increased convenience and decreased use of material. See Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731 at 734-35.

[00171] The term "fully human antibody" refers to an antibody that comprises human immunoglobulin protein sequences only. A fully human antibody may contain murine carbohydrate chains if produced in a mouse, in a mouse cell, or in a hybridoma derived from a mouse cell. Similarly, "mouse antibody" refers to an antibody that comprises mouse immunoglobulin sequences only. Alternatively, a fully human antibody may contain rat carbohydrate chains if produced in a rat, in a rat cell, or in a hybridoma derived from a rat cell. Similarly, "rat antibody" refers to an antibody that comprises rat immunoglobulin sequences only.

Antibody Structure

[00172] In general, the basic antibody structural unit is known to comprise a tetramer. Each tetramer includes two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one "light" (about 25 kDa) and one "heavy" chain (about 50-70 kDa). The amino-terminal portion or fragment of each chain may include a variable region of about 100 to 110 or more amino acids primarily responsible for antigen recognition. The carboxy-terminal portion or fragment of each chain may define a constant region primarily responsible for effector function. Typically, human light chains are classified as kappa and lambda light chains. Furthermore, human heavy chains are typically classified as mu, delta, gamma, alpha, or epsilon, and define the antibody's isotype as IgM, IgD, IgG, IgA, and IgE, respectively. Within light and heavy chains, the variable and constant regions are joined by a "J" region of about 12 or more amino acids, with the heavy chain also including a "D" region of about 10 more amino acids. See generally, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989).

[00173] The variable regions of each light/heavy chain pair to form the antibody binding site. Thus, in general, an intact IgG antibody has two binding sites. Except in bifunctional or bispecific antibodies, the two binding sites are, in general, the same.

[00174] Normally, the chains all exhibit the same general structure of relatively conserved framework regions (FR) joined by three hypervariable regions, also called complementarity determining regions or CDRs. The CDRs from the two chains of each pair are usually aligned by the framework regions, enabling binding to a specific epitope. In general, from N-terminal to C-terminal, both light and heavy chains comprise the domains FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 and FR4. The assignment of amino acids to each domain is, generally, in accordance with the definitions of Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, *et al.*; National Institutes of Health, Bethesda, Md. ; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978) *Adv. Prot. Chem.* 32:1-75; Kabat, *et al.*, (1977) *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616; Chothia, *et al.*, (1987) *J Mol. Biol.* 196:901-917 or Chothia, *et al.*, (1989) *Nature* 342:878-883.

[00175] As used herein, the term "hypervariable region" refers to the amino acid residues of an antibody which are responsible for antigen-binding. The hypervariable region comprises amino acid residues from a "complementarity determining region" or "CDR" (*i.e.* residues 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) and 89-97 (CDRL3) in the light chain variable domain and residues 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) and 95-102 (CDRH3) in the heavy chain variable domain; Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) and/or those residues from a "hypervariable loop" (*i.e.* residues 26-32 (CDRL1), 50-52 (CDRL2) and 91-96 (CDRL3) in the light chain variable domain and 26-32 (CDRH1), 53-55 (CDRH2) and 96-101 (CDRH3) in the heavy chain variable domain; Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917). As used herein, the term "framework" or "FR" residues refers to those variable domain residues other than the hypervariable region residues defined herein as CDR residues.

[00176] "Binding substance" refers to a molecule, small molecule, macromolecule, antibody, a fragment or analogue thereof, or soluble receptor, capable of binding to a target. "Binding substance" also may refer to a complex of molecules, *e.g.*, a non-covalent complex, to an ionized molecule, and to a covalently or non-covalently modified molecule, *e.g.*, modified by phosphorylation, acylation, cross-linking, cyclization, or limited cleavage, that is capable of binding to a target. "Binding substance" may also refer to a molecule capable of binding to a target in combination with a stabilizer, excipient, salt, buffer, solvent, or additive. "Binding" may be defined as an association of the binding substance with a target where the

association results in reduction in the normal Brownian motion of the binding substance, in cases where the binding substance can be dissolved or suspended in solution.

[00177] "Effective amount" encompasses an amount sufficient to ameliorate or prevent a symptom or sign of the medical condition. Effective amount also means an amount sufficient to allow or facilitate diagnosis. An effective amount for a particular patient or veterinary subject may vary depending on factors such as the condition being treated, the overall health of the patient, the method route and dose of administration and the severity of side affects (see, *e.g.*, U.S. Pat. No. 5,888,530 issued to Netti, *et al.*). An effective amount can be the maximal dose or dosing protocol that avoids significant side effects or toxic effects. The effect will result in an improvement of a diagnostic measure or parameter by at least 5%, usually by at least 10%, more usually at least 20%, most usually at least 30%, preferably at least 40%, more preferably at least 50%, most preferably at least 60%, ideally at least 70%, more ideally at least 80%, and most ideally at least 90%, where 100% is defined as the diagnostic parameter shown by a normal subject (see, *e.g.*, Maynard, *et al.* (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., London, UK).

[00178] "Exogenous" refers to substances that are produced outside an organism, cell, or human body, depending on the context. "Endogenous" refers to substances that are produced within a cell, organism, or human body, depending on the context.

[00179] "Homology" refers to sequence similarity between two polynucleotide sequences or between two polypeptide sequences. When a position in both of the two compared sequences is occupied by the same base or amino acid monomer subunit, *e.g.*, if a position in each of two DNA molecules is occupied by adenine, then the molecules are homologous at that position. The percent of homology between two sequences is a function of the number of matching or homologous positions shared by the two sequences divided by the number of positions compared $\times 100$. For example, if 6 of 10 of the positions in two sequences are matched or homologous when the sequences are optimally aligned then the two sequences are 60% homologous. Generally, the comparison is made when two sequences are aligned to give maximum percent homology.

[00180] "Immune condition" or "immune disorder" encompasses, *e.g.*, pathological inflammation, an inflammatory disorder, and an autoimmune disorder or disease. "Immune condition" also refers to infections, persistent infections, and proliferative conditions, such as cancer, tumors, and angiogenesis, including infections, tumors, and cancers that resist

eradication by the immune system. "Cancerous condition" includes, *e.g.*, cancer, cancer cells, tumors, angiogenesis, and precancerous conditions such as dysplasia.

[00181] "Inflammatory disorder" means a disorder or pathological condition where the pathology results, in whole or in part, from, *e.g.*, a change in number, change in rate of migration, or change in activation, of cells of the immune system. Cells of the immune system include, *e.g.*, T cells, B cells, monocytes or macrophages, antigen presenting cells (APCs), dendritic cells, microglia, NK cells, NKT cells, neutrophils, eosinophils, mast cells, or any other cell specifically associated with the immunology, for example, cytokine-producing endothelial or epithelial cells.

[00182] "Isolated binding compound" refers to the purification status of a binding compound and in such context means the molecule is substantially free of other biological molecules such as nucleic acids, proteins, lipids, carbohydrates, or other material such as cellular debris and growth media. Generally, the term "isolated" is not intended to refer to a complete absence of such material or to an absence of water, buffers, or salts, unless they are present in amounts that substantially interfere with experimental or therapeutic use of the binding compound as described herein.

[00183] "Isolated nucleic acid molecule" means a DNA or RNA of genomic, mRNA, cDNA, or synthetic origin or some combination thereof which is not associated with all or a portion of a polynucleotide in which the isolated polynucleotide is found in nature, or is linked to a polynucleotide to which it is not linked in nature. For purposes of this disclosure, it should be understood that "a nucleic acid molecule comprising" a particular nucleotide sequence does not encompass intact chromosomes. Isolated nucleic acid molecules "comprising" specified nucleic acid sequences may include, in addition to the specified sequences, coding sequences for up to ten or even up to twenty or more other proteins or portions or fragments thereof, or may include operably linked regulatory sequences that control expression of the coding region of the recited nucleic acid sequences, and/or may include vector sequences.

[00184] The phrase "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to use promoters, polyadenylation signals, and enhancers.

[00185] A nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein

that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

[00186] As used herein, the expressions "cell," "cell line," and "cell culture" are used interchangeably and all such designations include progeny. Thus, the words "transformants" and "transformed cells" include the primary subject cell and cultures derived therefrom without regard for the number of transfers. It is also understood that all progeny may not be precisely identical in DNA content, due to deliberate or inadvertent mutations. Mutant progeny that have the same function or biological activity as screened for in the originally transformed cell are included. Where distinct designations are intended, it will be clear from the context.

[00187] As used herein, "polymerase chain reaction" or "PCR" refers to a procedure or technique in which minute amounts of a specific piece of nucleic acid, RNA and/or DNA, are amplified as described in, *e.g.*, U.S. Pat. No. 4,683,195. Generally, sequence information from the ends of the region of interest or beyond needs to be available, such that oligonucleotide primers can be designed; these primers will be identical or similar in sequence to opposite strands of the template to be amplified. The 5' terminal nucleotides of the two primers can coincide with the ends of the amplified material. PCR can be used to amplify specific RNA sequences, specific DNA sequences from total genomic DNA, and cDNA transcribed from total cellular RNA, bacteriophage or plasmid sequences, etc. *See generally* Mullis *et al.* (1987) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263; Erlich, ed., (1989) *PCR TECHNOLOGY* (Stockton Press, N.Y.) As used herein, PCR is considered to be one, but not the only, example of a nucleic acid polymerase reaction method for amplifying a nucleic acid test sample comprising the use of a known nucleic acid as a primer and a nucleic acid polymerase to amplify or generate a specific piece of nucleic acid.

[00188] As used herein, the term "germline sequence" refers to a sequence of unrearranged immunoglobulin DNA sequences. Any suitable source of unrearranged immunoglobulin may be used.

[00189] "Inhibitors" and "antagonists," or "activators" and "agonists," refer to inhibitory or activating molecules, respectively, *e.g.*, for the activation of, *e.g.*, a ligand,

receptor, cofactor, a gene, cell, tissue, or organ. A modulator of, *e.g.*, a gene, a receptor, a ligand, or a cell, is a molecule that alters an activity of the gene, receptor, ligand, or cell, where activity can be activated, inhibited, or altered in its regulatory properties. The modulator may act alone, or it may use a cofactor, *e.g.*, a protein, metal ion, or small molecule. Inhibitors are compounds that decrease, block, prevent, delay activation, inactivate, desensitize, or down regulate, *e.g.*, a gene, protein, ligand, receptor, or cell. Activators are compounds that increase, activate, facilitate, enhance activation, sensitize, or up regulate, *e.g.*, a gene, protein, ligand, receptor, or cell. An inhibitor may also be defined as a compound that reduces, blocks, or inactivates a constitutive activity. An "agonist" is a compound that interacts with a target to cause or promote an increase in the activation of the target. An "antagonist" is a compound that opposes the actions of an agonist. An antagonist prevents, reduces, inhibits, or neutralizes the activity of an agonist. An antagonist can also prevent, inhibit, or reduce constitutive activity of a target, *e.g.*, a target receptor, even where there is no identified agonist. In the case of BTLA, a BTLA agonist would initiate and potentiate the negative signal delivered by BTLA to B and T cells. On the other hand, a BTLA antagonist would block that signal to B and T cells, thus augmenting B and T cell activation/proliferation.

[00190] To examine the extent of inhibition, for example, samples or assays comprising a given, *e.g.*, protein, gene, cell, or organism, are treated with a potential activator or inhibitor and are compared to control samples without the inhibitor. Control samples, *i.e.*, samples not treated with antagonist, are assigned a relative activity value of 100%. Inhibition is achieved when the activity value relative to the control is about 90% or less, typically 85% or less, more typically 80% or less, most typically 75% or less, generally 70% or less, more generally 65% or less, most generally 60% or less, typically 55% or less, usually 50% or less, more usually 45% or less, most usually 40% or less, preferably 35% or less, more preferably 30% or less, still more preferably 25% or less, and most preferably less than 25%. Activation is achieved when the activity value relative to the control is about 110%, generally at least 120%, more generally at least 140%, more generally at least 160%, often at least 180%, more often at least 2-fold, most often at least 2.5-fold, usually at least 5-fold, more usually at least 10-fold, preferably at least 20-fold, more preferably at least 40-fold, and most preferably over 40-fold higher.

[00191] Endpoints in activation or inhibition can be monitored as follows. Activation, inhibition, and response to treatment, *e.g.*, of a cell, physiological fluid, tissue, organ, and animal or human subject, can be monitored by an endpoint. The endpoint may comprise a predetermined quantity or percentage of, *e.g.*, indicia of inflammation, oncogenicity, or cell

degranulation or secretion, such as the release of a cytokine, toxic oxygen, or a protease. The endpoint may comprise, *e.g.*, a predetermined quantity of ion flux or transport; cell migration; cell adhesion; cell proliferation; potential for metastasis; cell differentiation; and change in phenotype, *e.g.*, change in expression of gene relating to inflammation, apoptosis, transformation, cell cycle, or metastasis (see, *e.g.*, Knight (2000) *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30:145-158; Hood and Cheresch (2002) *Nature Rev. Cancer* 2:91-100; Timme, *et al.* (2003) *Curr. Drug Targets* 4:251-261; Robbins and Itzkowitz (2002) *Med. Clin. North Am.* 86:1467-1495; Grady and Markowitz (2002) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3:101-128; Bauer, *et al.* (2001) *Glia* 36:235-243; Stanimirovic and Satoh (2000) *Brain Pathol.* 10:113-126).

[00192] An endpoint of inhibition is generally 75% of the control or less, preferably 50% of the control or less, more preferably 25% of the control or less, and most preferably 10% of the control or less. Generally, an endpoint of activation is at least 150% the control, preferably at least two times the control, more preferably at least four times the control, and most preferably at least ten times the control.

[00193] "Ligand" refers, *e.g.*, to a small molecule, peptide, polypeptide, and membrane associated or membrane-bound molecule, or complex thereof, that can act as an agonist or antagonist of a receptor. "Ligand" also encompasses an agent that is not an agonist or antagonist, but that can bind to the receptor. Moreover, "ligand" includes a membrane-bound ligand that has been changed, *e.g.*, by chemical or recombinant methods, to a soluble version of the membrane-bound ligand. By convention, where a ligand is membrane-bound on a first cell, the receptor usually occurs on a second cell. The second cell may have the same or a different identity as the first cell. A ligand or receptor may be entirely intracellular, that is, it may reside in the cytosol, nucleus, or some other intracellular compartment. The ligand or receptor may change its location, *e.g.*, from an intracellular compartment to the outer face of the plasma membrane. The complex of a ligand and receptor is termed a "ligand receptor complex." Where a ligand and receptor are involved in a signaling pathway, the ligand occurs at an upstream position and the receptor occurs at a downstream position of the signaling pathway. HVEM is a TNF-receptor superfamily member. In addition to binding BTLA, it also can bind LIGHT, LT α and CD160.

[00194] "Small molecule" is defined as a molecule with a molecular weight that is less than 10 kDa, typically less than 2 kDa, preferably less than 1 kDa, and most preferably less than about 500 Da. Small molecules include, but are not limited to, inorganic molecules, organic molecules, organic molecules containing an inorganic component, molecules comprising a radioactive atom, synthetic molecules, peptide mimetics, and antibody mimetics.

As a therapeutic, a small molecule may be more permeable to cells, less susceptible to degradation, and less apt to elicit an immune response than large molecules. Small molecules, such as peptide mimetics of antibodies and cytokines, as well as small molecule toxins, have been described (see, *e.g.*, Casset, *et al.* (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307:198-205; Muyldermans (2001) *J. Biotechnol.* 74:277-302; Li (2000) *Nat. Biotechnol.* 18:1251-1256; Apostolopoulos, *et al.* (2002) *Curr. Med. Chem.* 9:411-420; Monfardini, *et al.* (2002) *Curr. Pharm. Des.* 8:2185-2199; Domingues, *et al.* (1999) *Nat. Struct. Biol.* 6:652-656; Sato and Sone (2003) *Biochem. J.* 371:603-608; U.S. Patent No. 6,326,482 issued to Stewart, *et al.*).

[00195] “Specifically” or “selectively” binds, when referring to a ligand/receptor, antibody/antigen, or other binding pair, indicates a binding reaction that is determinative of the presence of the protein in a heterogeneous population of proteins and other biologics. Thus, under designated conditions, a specified ligand binds to a particular receptor and does not bind in a significant amount to other proteins present in the sample. The antibody, or binding compound derived from the antigen-binding site of an antibody, of the contemplated method binds to its antigen, or a variant or mutein thereof, with an affinity that is at least two fold greater, preferably at least ten times greater, more preferably at least 20-times greater, and most preferably at least 100-times greater than the affinity with any other antigen.

[00196] As used herein, the term “immunomodulatory agent” refers to natural or synthetic agents that suppress or modulate an immune response. The immune response can be a humoral or cellular response. Immunomodulatory agents encompass immunosuppressive or anti-inflammatory agents.

[00197] “Immunosuppressive agents”, “immunosuppressive drugs”, or “immunosuppressants” as used herein are therapeutics that are used in immunosuppressive therapy to inhibit or prevent activity of the immune system. Clinically they are used to prevent the rejection of transplanted organs and tissues (*e.g.* bone marrow, heart, kidney, liver), and/or in the treatment of autoimmune diseases or diseases that are most likely of autoimmune origin (*e.g.* rheumatoid arthritis, myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus, ulcerative colitis, multiple sclerosis). Immunosuppressive drugs can be classified as: glucocorticoids; cytostatics; antibodies; biological response modifiers such as Ig fusion proteins including CTLA-4/Ig (Abatacept™); drugs acting on immunophilins; other drugs, including known chemotherapeutic agents used in the treatment of proliferative disorders, such as mycophenolatemofetil (MMF). For multiple sclerosis, in particular, the antibodies of the present invention can be administered in conjunction with a new class of myelin binding protein-like therapeutics, known as copaxones.

[00198] "Anti-inflammatory agents" or "anti-inflammatory drugs" refer to both steroidal and non-steroidal therapeutics. Steroids, also known as corticosteroids, are drugs that closely resemble cortisol, a hormone produced naturally by adrenal glands. Steroids are used as the main treatment for certain inflammatory conditions, such as: systemic vasculitis (inflammation of blood vessels); and myositis (inflammation of muscle). Steroids might also be used selectively to treat inflammatory conditions such as: rheumatoid arthritis (chronic inflammatory arthritis occurring in joints on both sides of the body); systemic lupus erythematosus (a generalized disease caused by abnormal immune system function); Sjögren's syndrome (chronic disorder that causes dry eyes and a dry mouth).

[00199] Non-steroidal anti-inflammatory drugs, usually abbreviated to NSAIDs, are drugs with analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects - they reduce pain, fever and inflammation. The term "non-steroidal" is used to distinguish these drugs from steroids, which (amongst a broad range of other effects) have a similar eicosanoid-depressing, anti-inflammatory action. NSAIDs are generally indicated for the symptomatic relief of the following conditions: rheumatoid arthritis; osteoarthritis; inflammatory arthropathies (e.g. ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, Reiter's syndrome); acute gout; dysmenorrhoea; metastatic bone pain; headache and migraine; postoperative pain; mild-to-moderate pain due to inflammation and tissue injury; pyrexia; and renal colic. NSAIDs include salicylates, arylalkanoic acids, 2-arylpropionic acids (profens), N-arylanthranilic acids (fenamic acids), oxicams, coxibs, and sulphonanilides.

[00200] Disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) may be administered, often in combination with NSAIDs. Commonly prescribed DMARDs include hydroxychloroquine/chloroquine, methotrexate, gold therapy, sulfasalazine, and azathioprine.

[00201] A "signal transduction pathway" refers to the biochemical relationship between a variety of signal transduction molecules that play a role in the transmission of a signal from one portion of a cell to another portion of a cell. As used herein, the phrase "cell surface receptor" includes, for example, molecules and complexes of molecules capable of receiving a signal and the transmission of such a signal across the plasma membrane of a cell. An example of a "cell surface receptor" of the present disclosure is the BTLA receptor.

Antibodies Specific for Human BTLA

[00202] The present invention generally isolated antibodies or antigen binding fragments thereof that bind BTLA and uses of such antibodies or antigen binding fragments thereof. More specifically, the invention provides isolated fully human anti BTLA antibodies and methods of use of the antibodies or antigen binding fragments thereof in the treatment of

disease. Examples of fully human anti-BTLA antibodies include, but are not limited to: Hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7, and hu Mab4C7.

[00203] The present invention provides an isolated anti-BTLA agonist antibody or antigen binding fragment thereof wherein the antibody or antigen binding fragment exhibits one or more of the following properties: (1) does not block binding of HVEM or LIGHT to human BTLA; (2) cross reacts with cynomolgus BTLA; (3) has a K_D for binding to human BTLA of at most about 2.5×10^{-9} in a protein binding assay (*e.g.*, Biacore); and (4) an EC_{50} of at least about 10 nM in a T and B cell activation assay. In one embodiment anti-BTLA antibody or antigen binding fragment thereof has a K_D for binding to human BTLA of at most about 2.5×10^{-9} in a protein binding assay (*e.g.*, Biacore; Examples 2-3) and an EC_{50} of about 10-100 nM in a T and B cell activation assay.

[00204] In another embodiment, the antibody or antigen binding fragment is an isolated fully human antibody or antigen binding fragment thereof which blocks binding of HVEM to BTLA. In yet another embodiment, Examples of such antibodies include, but are not limited to, the fully human anti-BTLA antibody, hu Mab4C7.

[00205] The isolated antibody or antigen binding fragment thereof, that binds BTLA can comprise one, two, three, four, five, or six complementarity determining regions (CDRs) of the described antibodies and antigen-binding fragments of the invention. The one, two, three, four, five, or six CDRs may be independently selected from the described CDR sequences (*e.g.*, Table 1, Table 2) of the antibodies and antigen-binding fragments of the invention. Alternatively, the one, two, three, four, five, or six CDRs may be selected from the CDR sequences of a single described antibody or antigen-binding fragment of the invention. In certain embodiments, one two or three CDRs are selected from the V_L CDRs (*e.g.*, Table 1; SEQ ID NOs:12-14) of the described agonist antibodies and/or one, two or three CDRs selected from the V_H CDRs (*e.g.*, Table 2; SEQ ID NOs:5-7) of the described invention. In another embodiment, one two or three CDRs are selected from the V_L CDRs (*e.g.*, Table 1; SEQ ID NOs:26-28) of the described antagonist antibodies and/or one, two or three CDRs selected from the V_H CDRs (*e.g.*, Table 2; SEQ ID NOs:19-21) of the described invention.

[00206] The isolated antibody or antigen-binding fragment thereof that binds BTLA can comprise at least one antibody light chain variable (V_L) domain comprising one or more of CDR-L1, CDR-L2 or CDR-L3 selected from the group consisting of: (a) CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 of the variable region of antibody hu Mab8D5; (b) CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 of the variable region of antibody hu Mab8A3; (c) CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 of the

variable region of antibody hu Mab21H6; and (d) CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 of the variable region of antibody hu Mab19A7.

[00207] The isolated antibody or antigen-binding fragment thereof that binds BTLA can comprise at least one antibody heavy chain variable (V_H) domain comprising one or more of CDR-H1, CDR-H2 or CDR-H3 selected from the group consisting of: (a) CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 of the variable region of antibody hu Mab8D5; (b) CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 of the variable region of antibody hu Mab8A3; (c) CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 of the variable region of antibody hu Mab21H6; and (d) CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 of the variable region of antibody hu Mab19A7.

[00208] In a preferred embodiment the isolated antibody or antigen-binding fragment thereof that binds BTLA comprises at least one antibody light chain variable (V_L) domain comprising a CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 selected from the group consisting of: (a) CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 of the variable region of antibody hu Mab8D5; (b) CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 of the variable region of antibody hu Mab8A3; (c) CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 of the variable region of antibody hu Mab21H6; and (d) CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 of the variable region of antibody hu Mab19A7 and at least one antibody heavy chain variable (V_H) domain comprising a CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 selected from the group consisting of: (a) CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 of the variable region of antibody hu Mab8D5; (b) CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 of the variable region of antibody hu Mab8A3; (c) CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 of the variable region of antibody hu Mab21H6; and (d) CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 of the variable region of antibody hu Mab19A7.

[00209] Sequences of light and heavy chain CDRs of the antibodies of the present invention are provided in Tables 1 and 2, respectively. By way of example and not limitation, the V_L domain CDRs for agonist antibodies are selected from SEQ ID NOs: 12-14, while V_L domain CDRs for antagonist antibodies are selected from SEQ ID NOs:26-28. Similarly, V_H domain CDRs for agonist antibodies are selected from SEQ ID NOs: 7-9, while V_H domain CDRs for antagonist antibodies are selected from SEQ ID NOs: 10-12.

Table 1: Light Chain CDRs

Antibody	CDR1	CDR2	CDR3
8D5 (agonist)	(SEQ ID NO:12)	(SEQ ID NO:13)	(SEQ ID NO:14)
4C7 (antagonist)	(SEQ ID NO:26,	(SEQ ID NO:27, V _K)	(SEQ ID NO:28, V _K)

	V _K)		
--	------------------	--	--

Table 2: Heavy Chain CDRs

Antibody	CDR1	CDR2	CDR3
8D5 (agonist)	(SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO:6)	(SEQ ID NO:7)
4C7 (antagonist)	(SEQ ID NO:19)	(SEQ ID NO:20)	(SEQ ID NO:21)

[00210] The present invention further provides an isolated antibody or antigen binding fragment thereof that binds BTLA and functions as an agonist antibody and comprises the mature V_L domain of antibody Hu Mab8D5 (SEQ ID No:18). In a preferred embodiment, the antibody is a fully human monoclonal antibody. Examples of preferred fully human agonist anti-BTLA antibodies include, but are not limited to hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7, and antigen binding fragments thereof.

[00211] The present invention further provides an isolated antibody or antigen binding fragment thereof that binds BTLA and functions as an antagonist and comprises the mature V_L domain of antibody Hu Mab4C7 (SEQ ID No:32). In a preferred embodiment, the antibody is a fully human monoclonal antibody. An example of a preferred fully human antagonist anti-BTLA antibody includes, but is not limited to hu Mab4C7 and antigen binding fragments thereof.

[00212] The present invention further provides an isolated antibody or antigen binding fragment thereof that binds BTLA and functions as an agonist and comprises at least one V_H domain selected from the group consisting of (a) the mature V_H domain of antibody Hu Mab8D5 (SEQ ID No:11). In a preferred embodiment the antibody is a fully human monoclonal agonist anti-BTLA antibody. Examples of preferred fully human agonist anti-BTLA antibodies include, but are not limited to hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7, and antigen binding fragments thereof.

[00213] The present invention further provides an isolated antibody or antigen binding fragment thereof that binds BTLA and functions as an antagonist and comprises at least one V_H domain selected from the group consisting of (a) the mature V_H domain of antibody hu Mab4C7 (SEQ ID No:25). In a preferred embodiment the antibody is a fully human antagonist anti-BTLA antibody. An example of a preferred fully human antagonist anti-BTLA antibody includes, but is not limited to hu Mab4C7 and antigen binding fragments thereof.

[00214] The present invention provides an isolated agonist antibody or antigen binding fragment thereof that binds BTLA and has at least one V_L domain selected from the group consisting of SEQ ID Nos.:12, 13, and 14 and at least one V_H domain selected from the group consisting of SEQ ID Nos.: 5, 6, and 7. In a preferred embodiment the antibody is a fully human agonist anti-BTLA antibody. Examples of preferred fully human agonist anti-BTLA antibodies include, but are not limited to hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7, and antigen binding fragments thereof.

[00215] The present invention provides an isolated antagonist antibody or antigen binding fragment thereof that binds BTLA and has at least one V_L domain selected from the group consisting of SEQ ID Nos.:26, 27, 28, and at least one V_H domain selected from the group consisting of SEQ ID Nos.: 19, 20, and 21. In a preferred embodiment the antibody is a fully human antagonist anti-BTLA antibody. Examples of preferred fully human antagonist anti-BTLA antibodies include, but are not limited to, hu Mab4C7 and antigen binding fragments thereof.

[00216] In one embodiment, the isolated antibody of the present invention comprises a heavy chain constant region, preferably a human constant region, such as γ 1, γ 2, γ 3, or γ 4 human heavy chain constant region or a variant thereof. In another embodiment, the binding compound comprises a light chain constant region, preferably a human light chain constant region, such as lambda or kappa human light chain region or variant thereof. By way of example, and not limitation the human heavy chain constant region can be γ 1 and the human light chain constant region can be kappa. In an alternative embodiment, the Fc region of the antibody is γ 4 with a Ser228Pro mutation (Schuurman, J *et. al.*, *Mol. Immunol.* 38: 1-8, 2001).

[00217] In one embodiment, the antigen binding fragment is selected from the group consisting of Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, and a diabody.

[00218] The invention also provides isolated polypeptides comprising the V_L domains (*e.g.*, SEQ ID Nos.:16, 18, 30, 32, 37, and 38) and isolated polypeptides comprising the V_H domains (*e.g.*, SEQ ID Nos.:9, 11, 23, and 25) of the antibodies of the invention. In one embodiment the invention provides an antibody or antigen binding fragment thereof that binds BTLA and has V_L domains V_H domains with at least 95%, 90%, 85%, 80%, 75% or 50% sequence homology. In another embodiment the binding compound of the present invention comprises V_L and V_H domains (with and without signal sequence) having up to 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 or more conservative or non conservative amino acid substitutions, while still exhibiting the desired binding property.

[00219] “Conservatively modified variants” or “conservative substitution” refers to substitutions of amino acids in a protein with other amino acids having similar characteristics (e.g. charge, side-chain size, hydrophobicity/hydrophilicity, backbone conformation and rigidity, etc.), such that the changes can frequently be made without altering the biological activity of the protein. Those of skill in this art recognize that, in general, single amino acid substitutions in non-essential regions of a polypeptide do not substantially alter biological activity (see, e.g., Watson *et al.* (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). In addition, substitutions of structurally or functionally similar amino acids are less likely to disrupt biological activity. Various embodiments of the binding compounds of the present invention comprise polypeptide chains with sequences that include up to 0 (no changes), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 or more conservative amino acid substitutions when compared with the specific amino acid sequences disclosed herein, e.g. SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 25, 30, 32, and 37. As used herein, the phrase “up to X” conservative amino acid substitutions includes 0 substitutions and any number of substitutions up to and including X substitutions. Such exemplary substitutions are preferably made in accordance with those set forth in Table 3 as follows:

[00220] **TABLE 3**
Exemplary Conservative Amino Acid Substitutions

[00221]

Original residue	Conservative substitution
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu

Original residue	Conservative substitution
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Function-conservative variants of the antibodies of the invention are also contemplated by the present invention. "Function-conservative variants" are those in which one or more amino acid residues in a protein or enzyme have been changed without altering the overall conformation and function of the polypeptide, including, but, by no means, limited to, replacement of an amino acid with one having similar properties.

Amino Acid Substitutions

[00222] The invention also provides isolated polypeptides comprising the V_L domains of agonist BTLA antibodies (*e.g.*, SEQ ID Nos.:16 and 18) and isolated polypeptides comprising the V_H domains (*e.g.*, SEQ ID Nos.: 9 and 11) of agonist BTLA antibodies of the invention having up to 0, 1, 2, 3, 4, or 5 or more amino acid substitutions, while still exhibiting the ability to bind to BTLA.

[00223] In additional embodiments, the invention provides isolated polypeptides comprising the V_L domains of antagonist BTLA antibodies (*e.g.*, SEQ ID Nos.: 30 or 32) and isolated polypeptides comprising the V_H domains (*e.g.*, SEQ ID Nos.: 23 or 25) of antagonist BTLA antibodies of the invention having up to 0, 1, 2, 3, 4, or 5 or more amino acid substitutions, while still exhibiting the ability to bind to BTLA.

[00224] In another embodiment, the invention provides an antibody or antigen binding fragment thereof that binds human BTLA and has V_L domains V_H domains with at least 95%, 90%, 85%, 80%, 75% or 50% sequence homology to one or more of the V_L domains or V_H domains described herein, and exhibits binding to human BTLA. In another embodiment the binding compound of the present invention comprises V_L and V_H domains (with and without signal sequence) having up to 0, 1, 2, 3, 4, or 5 or more amino acid substitutions, and exhibits binding to human BTLA.

[00225] In certain embodiments, it will be desirable to change certain amino acids containing exposed side-chains to another amino acid residue in order to provide for greater chemical stability of the final antibody, as follows. For example, an asparagine (Asn) residue may be changed to Gln or Ala to reduce the potential for formation of isoaspartate at any Asn-

Gly sequences within a CDR. A similar problem may occur at a Asp-Gly sequence. *See*, Reissner and Aswad (2003) *Ceill. Mol. Life Sci.* 60:1281. Isoaspartate formation may debilitate or completely abrogate binding of an antibody to its target antigen. *See*, Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731 at 734. In one embodiment, the asparagine is changed to glutamine (Gln). It may also be desirable to alter an amino acid adjacent to an asparagine (Asn) or glutamine (Gln) residue to reduce the likelihood of deamidation, which occurs at greater rates when small amino acids occur adjacent to asparagine or glutamine. *See*, Bischoff & Kolbe (1994) *J. Chromatog.* 662:261. In addition, any methionine residues (typically solvent exposed Met) in CDRs may be changed to Lys, Leu, Ala, or Phe in order to reduce the possibility that the methionine sulfur would oxidize, which could reduce antigen binding affinity and also contribute to molecular heterogeneity in the final antibody preparation. *Id.* In one embodiment, the methionine is changed to alanine (Ala). Additionally, in order to prevent or minimize potential scissile Asn-Pro peptide bonds, it may be desirable to alter any Asn-Pro combinations found in a CDR to Gln-Pro, Ala-Pro, or Asn-Ala. Antibodies with such substitutions are subsequently screened to ensure that the substitutions do not decrease BTLA binding affinity or other desired biological activity to unacceptable levels.

[00226] **TABLE 4 Exemplary stabilizing CDR variants**

CDR Residue/s→	Stabilizing Variant Sequence
Asn-Gly (N-G)	Gln-Gly, Ala-Gly, or Asn-Ala (Q-G), (A-G), or (N-A)
Asp-Gly (D-G)	Glu-Gly, Ala-Gly or Asp-Ala (E-G), (A-G), or (D-A)
Met (typically solvent exposed) (M)	Lys, Leu, Ala, or Phe (K), (L), (A), or (F)
Asn (N)	Gln or Ala (Q) or (A)
Asn-Pro (N-P)	Gln-Pro, Ala-Pro, or Asn-Ala (Q-P), (A-P), or (N-A)

[00227] **Exemplary CDR variants for 8D5 VH include:**
CDR1: SYDMH (SEQ ID NO:5)
CDR1 variant SYDXH= wherein X is M, K, L, A, or F (SEQ ID NO:38)

CDR3: EGMAAHNYYGMDV (SEQ ID NO:7)

CDR3 variant EGX₁AAHX₂YYGX₁DV = wherein X₁ is M, K, L, A, or F; X₂ is N, Q or A (SEQ ID NO:39)

[00228] The X variations for the VH CDRs can be independently selected in any combination.

[00229] Exemplary CDR variants for 8D5 VL include:

[00230] CDR2: DASNRAT (SEQ ID NO:13)

[00231] CDR2 variant: DASXRAT= wherein X is Q or A (SEQ ID NO:40)

[00232] CDR3: QQRSNWPPIT (SEQ ID NO:14)

[00233] CDR3 variant: QQRSXWPPIT = wherein X is Q or A (SEQ ID NO:41)

[00234] The X variations for the VL CDRs can be independently selected in any combination. Additionally, any X variation described herein can be independently selected in any combination, as long as the desired activity or binding ability is maintained.

[00235] Exemplary CDR variants for 4C7 VH include:

CDR2: YIYYSGSTKYNPSLKS (SEQ ID NO:20)

CDR2 variant: YIYYSGSTKYX₁X₂SLKS = wherein X₁X₂ are N-P, Q-P, A-P, or N-A (SEQ ID NO:42)

CDR3: EWPYYYYEMDV (SEQ ID NO:21)

CDR3 variant: EWPYYYYEXDV= wherein X is M, K, L, A, or F (SEQ ID NO:43)

[00236] The X variations for the VH CDRs can be independently selected in any combination.

[00237] The terms "consists essentially of," or variations such as "consist essentially of" or "consisting essentially of," as used throughout the specification and claims, indicate the inclusion of any recited elements or group of elements, and the optional inclusion of other elements, of similar or different nature than the recited elements, which do not materially change the basic or novel properties of the specified dosage regimen, method, or composition. As a nonlimiting example, a binding compound which consists essentially of a recited amino acid sequence may also include one or more amino acids that do not materially affect the properties of the binding compound.

Nucleic Acid Hybridization Background

[00238] The present invention includes anti-BTLA antibodies and fragments thereof, such as those encoded by nucleic acids as described in Tables 1-2, or those that encode amino acid residues as described in Table 4, as well as nucleic acids which hybridize thereto.

Preferably, the nucleic acids hybridize under low stringency conditions, more preferably under moderate stringency conditions and most preferably under high stringency conditions and, preferably, exhibit BTLA binding activity. A nucleic acid molecule is "hybridizable" to another nucleic acid molecule, such as a cDNA, genomic DNA, or RNA, when a single stranded form of the nucleic acid molecule can anneal to the other nucleic acid molecule under the appropriate conditions of temperature and solution ionic strength (see Sambrook, *et al.*, supra). The conditions of temperature and ionic strength determine the "stringency" of the hybridization. Typical low stringency hybridization conditions include 55°C, 5X SSC, 0.1% SDS and no formamide; or 30% formamide, 5X SSC, 0.5% SDS at 42°C. Typical, moderate stringency hybridization conditions are similar to the low stringency conditions except the hybridization is carried out in 40% formamide, with 5X or 6X SSC and 0.1% SDS at 42°C. High stringency hybridization conditions are similar to low stringency conditions except the hybridization conditions are carried out in 50% formamide, 5X or 6X SSC at 42°C or, optionally, at a higher temperature (*e.g.*, 57°C, 59°C, 60°C, 62°C, 63°C, 65°C or 68°C). In general, SSC is 0.15M NaCl and 0.015M Na-citrate. Hybridization requires that the two nucleic acids contain complementary sequences, although, depending on the stringency of the hybridization, mismatches between bases are possible. The appropriate stringency for hybridizing nucleic acids depends on the length of the nucleic acids and the degree of complementation, variables well known in the art. The greater the degree of similarity or homology between two nucleotide sequences, the higher the stringency under which the nucleic acids may hybridize. For hybrids of greater than 100 nucleotides in length, equations for calculating the melting temperature have been derived (see Sambrook, *et al.*, supra, 9.50-9.51). For hybridization with shorter nucleic acids, *i.e.*, oligonucleotides, the position of mismatches becomes more important, and the length of the oligonucleotide determines its specificity (see Sambrook, *et al.*, supra, 11.7-11.8).

[00239] Also included in the present invention are nucleic acids comprising nucleotide sequences and polypeptides comprising amino acid sequences which are at least about 70% identical, preferably at least about 80% identical, more preferably at least about 90% identical and most preferably at least about 95% identical (*e.g.*, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) to the reference nucleotide and amino acid sequences when the comparison is performed by a BLAST algorithm wherein the parameters of the algorithm are selected to give the largest match between the respective sequences over the entire length of the respective reference sequences. Polypeptides comprising amino acid sequences which are at least about 70% similar, preferably at least about 80% similar, more preferably at least about 90% similar and

most preferably at least about 95% similar (*e.g.*, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) to any of the reference amino acid sequences when the comparison is performed with a BLAST algorithm wherein the parameters of the algorithm are selected to give the largest match between the respective sequences over the entire length of the respective reference sequences, are also included in the present invention.

[00240] Sequence identity refers to exact matches between the nucleotides or amino acids of two sequences which are being compared. Sequence similarity refers to both exact matches between the amino acids of two polypeptides which are being compared in addition to matches between nonidentical, biochemically related amino acids. Biochemically related amino acids which share similar properties and may be interchangeable are discussed above.

[00241] The following references regarding the BLAST algorithms are useful: BLAST ALGORITHMS: Altschul, S.F., *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., *et al.*, (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L., *et al.*, (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F., *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J., *et al.*, (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J.C., *et al.*, (1993) Comput. Chem. 17:149-163; Hancock, J.M. *et al.*, (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70; ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff, M.O., *et al.*, "A model of evolutionary change in proteins." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), pp. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Schwartz, R.M., *et al.*, "Matrices for detecting distant relationships." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3." M.O. Dayhoff (ed.), pp. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Altschul, S.F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D.J., *et al.*, (1991) Methods 3:66-70; Henikoff, S., *et al.*, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919; Altschul, S.F., *et al.*, (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; ALIGNMENT STATISTICS: Karlin, S., *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268; Karlin, S., *et al.*, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877; Dembo, A., *et al.*, (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; and Altschul, S.F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) pp. 1-14, Plenum, New York.

[00242] In another embodiment, the invention relates to an isolated nucleic acid, for example DNA, encoding the isolated antibodies or antigen binding fragment of the invention. In one embodiment, the isolated nucleic acid encodes an agonist antibody or antigen binding fragment thereof comprising at least one mature antibody light chain variable (V_L) domain and at least one mature antibody heavy chain variable (V_H) domain, wherein the V_L domain comprises at least three CDRs having a sequence selected from SEQ ID NOs: 12-14, and the

V_H domain comprises at least at least three CDRs having a sequence selected from SEQ ID NOs: 5-7. In one embodiment, the isolated nucleic acid encodes the mature light and heavy chain variable region sequences of SEQ ID No:18 and SEQ ID NO:11, respectively. In some embodiments the isolated nucleic acid encodes both a light chain and a heavy chain on a single nucleic acid molecule, and in other embodiments the light and heavy chains are encoded on two or more separate nucleic acid molecules. In another embodiment the nucleic acids further encodes a signal sequence.

[00243] This invention also provides expression vectors comprising the isolated nucleic acids of the invention, wherein the nucleic acid is operably linked to control sequences that are recognized by a host cell when the host cell is transfected with the vector. Also provided are host cells comprising an expression vector of the present invention. The invention further relates to methods of producing a binding compound of the present invention comprising culturing a host cell harboring an expression vector encoding the binding compound in culture medium, and isolating the binding compound from the host cell or culture medium.

[00244] The invention also relates to antibodies or antigen binding fragments thereof that bind to the same epitope on human BTLA as antibody hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, or hu Mab19A7 (*i.e.*, an agonist antibody) or hu Mab4C7 (*i.e.*, an antagonist antibody blocking binding with HVEM), for example antibodies that are able to cross-block binding of any of the antibodies of the present invention.

[00245] By way of example, and not limitation, the fully human antibodies of the invention bind human BTLA with a K_D value of no more than about 100 nM (1×10^{-7} M); preferably no more than about 10nM; more preferably no more than about 1nM. Even more preferred are embodiments in which the antibodies have K_D values of no more than about 200 pM (2×10^{-10} M), 100 pM, 50 pM, 20 pM, 10 pM, 5pM or even 2 pM.

[00246] Any suitable method for generating antibodies may be used to generate the antibodies of the present invention. Any suitable form of the human BTLA can be used as the immunogen (antigen) for the generation of the antibodies. By way of example and not limitation, any human BTLA isoform or fragment thereof may be used as the immunogen. Examples include, but are not limited to, isoforms and splice variants of human BTLA as described herein. In an alternative embodiment, rhesus BTLA can be used as the immunogen for generation of the antibodies.

[00247] In a preferred embodiment, fully-human monoclonal antibodies directed against BTLA are generated using transgenic mice carrying parts of the human immune system rather than the mouse system. These transgenic mice, which may be referred to, herein, as "HuMAb"

mice, contain a human immunoglobulin gene miniloci that encodes unrearranged human heavy (μ and γ) and κ light chain immunoglobulin sequences, together with targeted mutations that inactivate the endogenous μ and κ chain loci (Lonberg, N., *et al.*, (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Accordingly, the mice exhibit reduced expression of mouse IgM or κ , and in response to immunization, the introduced human heavy and light chain transgenes undergo class switching and somatic mutation to generate high affinity human IgG κ monoclonal antibodies (Lonberg, N., *et al.*, (1994), *supra*; reviewed in Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N., *et al.*, (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93, and Harding, F., *et al.*, (1995) *Ann. N. Y Acad. Sci* 764:536-546). The preparation of HuMab mice is commonly known in the art and is described, for example, in Taylor, L., *et al.*, (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J., *et al.*, (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon, *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:3720-3724; Choi, *et al.*, (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J., *et al.*, (1993) *EMBO J.* 12: 821- 830; Tuaillon, *et al.*, (1994) *J Immunol.* 152:2912-2920; Lonberg, *et al.*, (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Taylor, L., *et al.*, (1994) *International Immunology* 6: 579-591; Lonberg, N., *et al.*, (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93; Harding, F., *et al.*, (1995) *Ann. N.Y Acad. Sci* 764:536-546; Fishwild, D., *et al.*, (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 and Harding, *et al.*, (1995) *Annals NY Acad. Sci.* 764:536-546. See further, U.S. Patent Nos. 5,545,806; 5, 569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874, 299; 5,770,429 and 5,545,807; and International Patent Application Publication Nos. WO 98/24884; WO 94/25585; WO 93/12227; WO 92/22645 and WO 92/03918.

[00248] To generate fully human, monoclonal antibodies to BTLA, HuMab mice can be immunized with an antigenic BTLA polypeptide, preferably residues 31-152 of SEQ ID NO:35, as described by Lonberg, N., *et al.*, (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D., *et al.*, (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 and WO 98/24884. Preferably, the mice will be 6-16 weeks of age upon the first immunization. For example, a purified preparation of BTLA can be used to immunize the HuMab mice intraperitoneally and/or subcutaneously. The mice can also be immunized with whole HEK293 or CHO cells which are stably transfected with a BTLA gene. An "antigenic BTLA polypeptide" may refer to a BTLA polypeptide or any fragment thereof, preferably any BTLA fragment which elicits an anti-BTLA immune response, preferably in HuMab mice.

[00249] In general, HuMab transgenic mice respond well when initially immunized intraperitoneally (IP) and/or subcutaneously with antigen in MPL[®] + TDM adjuvant (Sigma,

Product No. M6536), followed by every other week or every two or three weeks IP immunizations (usually, up to a total of 6) with antigen in MPL[®] + TDM adjuvant. Mice can be immunized, first, with cells expressing BTLA (*e.g.*, stably transfected HEK293 or CHO cells), then with a soluble fragment of BTLA (*e.g.*, residues 31-152 of SEQ ID NO:35) and continually receive alternating immunizations with the two antigens. The immune response can be monitored over the course of the immunization protocol with plasma samples being obtained by retroorbital bleeds. The plasma can be screened for the presence of anti-BTLA antibodies, for example by ELISA, and mice with sufficient titers of immunoglobulin can be used for fusions. Mice can be boosted intravenously with antigen 4 days before sacrifice and removal of the spleen. It is expected that 2-3 fusions for each antigen may need to be performed. Several mice can be immunized for each antigen.

[00250] Hybridoma cells which produce the monoclonal, fully human anti-BTLA antibodies may be produced by methods which are commonly known in the art. These methods include, but are not limited to, the hybridoma technique originally developed by Kohler, *et al.*, (1975) (Nature 256:495-497), as well as the trioma technique (Hering, *et al.*, (1988) Biomed. Biochim. Acta. 47:211-216 and Hagiwara, *et al.*, (1993) Hum. Antibod. Hybridomas 4:15), the human B-cell hybridoma technique (Kozbor, *et al.*, (1983) Immunology Today 4:72 and Cote, *et al.*, (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 80:2026-2030), the EBV-hybridoma technique (Cole, *et al.*, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985), and electric field based electrofusion using a Cyto Pulse large chamber cull fusion electroporator (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Preferably, mouse splenocytes are isolated and fused with PEG or by electrofusion to a mouse myeloma cell line based upon standard protocols. The resulting hybridomas may then be screened for the production of antigen-specific antibodies. For example, single cell suspensions of splenic lymphocytes from immunized mice may be fused to one-sixth the number of P3X63- Ag8.653 nonsecreting mouse myeloma cells (ATCC, CRL 1580) with 50% PEG. Cells may be plated at approximately 2×10^5 cells/mL in a flat bottom microtiter plate, followed by a two week incubation in selective medium containing 20% fetal Clone Serum, 18% "653" conditioned media, 5% origen (IGEN), 4 mM L-glutamine, 1 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 5mM HEPES, 0.055 mM 2-mercaptoethanol, 50 units/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, 50 mg/ml gentamycin and 1X HAT (Sigma; the HAT is added 24 hours after the fusion). After two weeks, cells may be cultured in medium in which the HAT is replaced with HT. Individual wells may then be screened by ELISA for human anti- BTLA monoclonal IgG antibodies. Once extensive hybridoma growth occurs, medium can be

observed usually after 10-14 days. The antibody secreting hybridomas may be replated, screened again, and if still positive for human IgG, anti-BTLA monoclonal antibodies, can be subcloned at least twice by limiting dilution. The stable subclones may then be cultured *in vitro* to generate small amounts of antibody in tissue culture medium for characterization.

[00251] The anti-BTLA antibodies and antigen-binding fragments thereof of the present invention may also be produced recombinantly (*e.g.*, in an *E.coli*/T7 expression system as discussed above). In this embodiment, nucleic acids encoding the antibody molecules of the invention (*e.g.*, V_H or V_L) may be inserted into a pET-based plasmid and expressed in the *E.coli*/T7 system. There are several methods by which to produce recombinant antibodies which are known in the art. One example of a method for recombinant production of antibodies is disclosed in U.S. Patent No. 4,816,567. Transformation can be by any known method for introducing polynucleotides into a host cell. Methods for introduction of heterologous polynucleotides into mammalian cells are well known in the art and include dextran-mediated transfection, calcium phosphate precipitation, polybrene-mediated transfection, protoplast fusion, electroporation, encapsulation of the polynucleotide(s) in liposomes, biolistic injection and direct microinjection of the DNA into nuclei. In addition, nucleic acid molecules may be introduced into mammalian cells by viral vectors. Methods of transforming cells are well known in the art. See, for example, U.S. Patent Nos. 4,399,216; 4,912,040; 4,740,461 and 4,959,455.

[00252] Anti-BTLA antibodies can also be synthesized by any of the methods set forth in U.S. Patent No. 6,331,415.

[00253] Mammalian cell lines available as hosts for expression are well known in the art and include many immortalized cell lines available from the American Type Culture Collection (ATCC). These include, *inter alia*, Chinese hamster ovary (CHO) cells, NSO, SP2 cells, HeLa cells, baby hamster kidney (BHK) cells, monkey kidney cells (COS), human hepatocellular carcinoma cells (*e.g.*, Hep G2), A549 cells, 3T3 cells, HEK-293 cells and a number of other cell lines. Mammalian host cells include human, mouse, rat, dog, monkey, pig, goat, bovine, horse and hamster cells. Cell lines of particular preference are selected through determining which cell lines have high expression levels. Other cell lines that may be used are insect cell lines, such as Sf9 cells, amphibian cells, bacterial cells, plant cells and fungal cells. When recombinant expression vectors encoding the heavy chain or antigen-binding portion or fragment thereof, the light chain and/or antigen-binding fragment thereof are introduced into mammalian host cells, the antibodies are produced by culturing the host cells for a period of

[00258] A bispecific or bifunctional antibody is an artificial hybrid antibody having two different heavy/light chain pairs and two different binding sites. Bispecific antibodies can be produced by a variety of methods including fusion of hybridomas or linking of Fab' fragments. See, *e.g.*, Songsivilai, *et al.*, (1990) Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321, Kostelny, *et al.*, (1992) J Immunol. 148:1547- 1553. In addition, bispecific antibodies may be formed as "diabodies" (Holliger, *et al.*, (1993) PNAS USA 90:6444-6448) or as "Janusins" (Traunecker, *et al.*, (1991) EMBO J. 10:3655-3659 and Traunecker, *et al.*, (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7:51-52).

[00259] The present invention includes "chimeric antibodies"- an antibody which comprises a variable region of the present invention fused or chimerized with an antibody region (*e.g.*, constant region) from another, non-human species (*e.g.*, mouse, horse, rabbit, dog, cow, chicken). These antibodies may be used to modulate the expression or activity of BTLA in the non-human species.

[00260] "Single-chain Fv" or "sFv" antibody fragments have the V_H and V_L domains of an antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Generally, the sFv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V_H and V_L domains which enables the sFv to form the desired structure for antigen binding. Techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Patent Nos. 5,476,786; 5,132,405 and 4,946,778) can be adapted to produce anti-BTLA-specific single chain antibodies. For a review of sFv see Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, N.Y., pp. 269-315 (1994).

[00261] "Disulfide stabilized Fv fragments" and "dsFv" refer to antibody molecules comprising a variable heavy chain (V_H) and a variable light chain (V_L) which are linked by a disulfide bridge.

[00262] Antibody fragments within the scope of the present invention also include F(ab)₂ fragments which may be produced by enzymatic cleavage of an IgG by, for example, pepsin. Fab fragments may be produced by, for example, reduction of F(ab)₂ with dithiothreitol or mercaptoethylamine. A Fab fragment is a V_L-C_L chain appended to a V_H-C_{H1} chain by a disulfide bridge. A F(ab)₂ fragment is two Fab fragments which, in turn, are appended by two disulfide bridges. The Fab portion of an F(ab)₂ molecule includes a portion of the F_c region between which disulfide bridges are located. An Fv fragment is a V_L or V_H region.

[00263] Depending on the amino acid sequences of the constant domain of their heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are at least five major

time sufficient to allow for expression of the antibody in the host cells or, more preferably, secretion of the antibody into the culture medium in which the host cells are grown.

[00254] Antibodies can be recovered from the culture medium using standard protein purification methods. Further, expression of antibodies of the invention (or other moieties therefrom) from production cell lines can be enhanced using a number of known techniques. For example, the glutamine synthetase gene expression system (the GS system) is a common approach for enhancing expression under certain conditions. The GS system is discussed in whole or part in connection with European Patent Nos. 0 216 846, 0 256 055, and 0 323 997 and European Patent Application No. 89303964.4.

[00255] It is likely that antibodies expressed by different cell lines or in transgenic animals will have different glycosylation from each other. However, all antibodies encoded by the nucleic acid molecules provided herein, or comprising the amino acid sequences provided herein are part of the instant invention, regardless of the glycosylation of the antibodies. Similarly, in certain embodiments, non fucosylated antibodies are advantageous, because they typically exhibit more potent efficacy than their fucosylated counterparts both *in vitro* and *in vivo*, and are not likely to be immunogenic because their carbohydrate structures are a normal component of natural human serum IgG.

[00256] The term "monoclonal antibody," as used herein, refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Monoclonal antibodies are advantageous in that they may be synthesized by a hybridoma culture, essentially uncontaminated by other immunoglobulins. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being amongst a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. As mentioned above, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler, *et al.*, (1975) Nature 256: 495.

[00257] A polyclonal antibody is an antibody which was produced among or in the presence of one or more other, non-identical antibodies. In general, polyclonal antibodies are produced from a B-lymphocyte in the presence of several other B-lymphocytes which produced non-identical antibodies. Usually, polyclonal antibodies are obtained directly from an immunized animal.

classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), *e.g.* IgG-1, IgG-2, IgG-3 and IgG-4; IgA-1 and IgA-2.

Antibody Engineering

[00264] Engineered antibodies of the invention include those in which modifications have been made to framework residues within V_H and/or V_L, *e.g.* to improve the properties of the antibody. Typically such framework modifications are made to decrease the immunogenicity of the antibody. For example, one approach is to "backmutate" one or more framework residues to the corresponding germline sequence. More specifically, an antibody that has undergone somatic mutation can contain framework residues that differ from the germline sequence from which the antibody is derived. Such residues can be identified by comparing the antibody framework sequences to the germline sequences from which the antibody is derived.

[00265] For example, Table A shows regions where a framework region amino acid position (using Kabat numbering system) differs from the germline and how this position can be backmutated to the germline by the indicated substitutions:

Table A – Exemplary Backmutations		
Region	Framework Amino Acid Position (Kabat Numbering)	Backmutation
4C7 V _H	25	H25S
4C7 V _H	68	S68T
4C7 V _H	82a	T82aT

[00266] Another type of framework modification involves mutating one or more residues within the framework region, or even within one or more CDR regions, to remove T cell epitopes to thereby reduce the potential immunogenicity of the antibody. This approach is also referred to as "deimmunization" and is described in further detail in U.S. Patent Publication No. 20030153043.

[00267] In addition or alternative to modifications made within the framework or CDR regions, antibodies of the invention can be engineered to include modifications within the Fc region, typically to alter one or more functional properties of the antibody, such as serum half-life, complement fixation, Fc receptor binding, and/or antigen-dependent cellular cytotoxicity. Furthermore, an antibody of the invention can be chemically modified (*e.g.*, one or more chemical moieties can be attached to the antibody) or be modified to alter its glycosylation, again to alter one or more functional properties of the antibody. Each of these embodiments is

described in further detail below. The numbering of residues in the Fc region is that of the EU index of Kabat.

[00268] In a preferred embodiment, the antibody is an IgG4 isotype antibody comprising a Serine to Proline mutation at a position corresponding to position 228 (S228P; EU index) in the hinge region of the heavy chain constant region. This mutation has been reported to abolish the heterogeneity of inter-heavy chain disulfide bridges in the hinge region (Angal *et al. supra*; position 241 is based on the Kabat numbering system). For example, in various embodiments, an anti-BTLA antibody of the invention can comprise the heavy chain variable region of 8D5 (SEQ ID NO: 9 or 11) or 4C7 (SEQ ID NO: 23 or 25) linked to a human IgG4 constant region in which the Serine at a position corresponding to position 241 as described in Angal *et al., supra*, has been mutated to Proline. Thus, for the 8D5 and 4C7 heavy chain variable regions linked to a human IgG4 constant region, this mutation corresponds to an S228P mutation by the EU index.

[00269] In one embodiment, the hinge region of CH1 is modified such that the number of cysteine residues in the hinge region is altered, *e.g.*, increased or decreased. This approach is described further in U.S. Patent No. 5,677,425. The number of cysteine residues in the hinge region of CH1 is altered to, for example, facilitate assembly of the light and heavy chains or to increase or decrease the stability of the antibody.

[00270] In another embodiment, the Fc hinge region of an antibody is mutated to decrease the biological half life of the antibody. More specifically, one or more amino acid mutations are introduced into the CH2-CH3 domain interface region of the Fc-hinge fragment such that the antibody has impaired Staphylococcal protein A (SpA) binding relative to native Fc-hinge domain SpA binding. This approach is described in further detail in U.S. Patent No. 6,165,745.

[00271] In another embodiment, the antibody is modified to increase its biological half life. Various approaches are possible. For example, one or more of the following mutations can be introduced: T252L, T254S, T256F, as described in U.S. Patent No. 6,277,375. Alternatively, to increase the biological half life, the antibody can be altered within the CH1 or CL region to contain a salvage receptor binding epitope taken from two loops of a CH2 domain of an Fc region of an IgG, as described in U.S. Patent Nos. 5,869,046 and 6,121,022.

[00272] In yet other embodiments, the Fc region is altered by replacing at least one amino acid residue with a different amino acid residue to alter the effector function(s) of the antibody. For example, one or more amino acids selected from amino acid residues 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 and 322 can be replaced with a different amino acid residue such that

the antibody has an altered affinity for an effector ligand but retains the antigen-binding ability of the parent antibody. The effector ligand to which affinity is altered can be, for example, an Fc receptor or the C1 component of complement. This approach is described in further detail in U.S. Patent Nos. 5,624,821 and 5,648,260.

[00273] In another example, one or more amino acids selected from amino acid residues 329, 331 and 322 can be replaced with a different amino acid residue such that the antibody has altered C1q binding and/or reduced or abolished complement dependent cytotoxicity (CDC). This approach is described in further detail in U.S. Patent No. 6,194,551.

[00274] In another example, one or more amino acid residues within amino acid positions 231 and 239 are altered to thereby alter the ability of the antibody to fix complement. This approach is described further in PCT Publication WO 94/29351.

[00275] In yet another example, the Fc region is modified to increase the ability of the antibody to mediate antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and/or to increase the affinity of the antibody for an Fcγ receptor by modifying one or more amino acids at the following positions: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 or 439. This approach is described further in PCT Publication WO 00/42072. Moreover, the binding sites on human IgG1 for FcγR1, FcγR2, FcγR3 and FcRn have been mapped and variants with improved binding have been described (*see* Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Specific mutations at positions 256, 290, 298, 333, 334 and 339 were shown to improve binding to FcγR3. Additionally, the following combination mutants were shown to improve FcγR3 binding: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A and S298A/E333A/K334A.

[00276] In still another embodiment, the glycosylation of an antibody is modified. For example, an aglycosylated antibody can be made (*i.e.*, the antibody lacks glycosylation). Glycosylation can be altered to, for example, increase the affinity of the antibody for antigen. Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example, altering one or more sites of glycosylation within the antibody sequence. For example, one or more amino acid substitutions can be made that result in elimination of one or more variable region framework glycosylation sites to thereby eliminate glycosylation at that site. Such aglycosylation may increase the affinity of the antibody for antigen. *See, e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,714,350 and 6,350,861.

[00277] Additionally or alternatively, an antibody can be made that has an altered type of glycosylation, such as a hypofucosylated antibody having reduced amounts of fucosyl residues or an antibody having increased bisecting GlcNac structures. Such altered glycosylation patterns have been demonstrated to increase the ADCC ability of antibodies. Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example, expressing the antibody in a host cell with altered glycosylation machinery. Cells with altered glycosylation machinery have been described in the art and can be used as host cells in which to express recombinant antibodies of the invention to thereby produce an antibody with altered glycosylation. For example, the cell lines Ms704, Ms705, and Ms709 lack the fucosyltransferase gene, FUT8 (α (1,6)-fucosyltransferase), such that antibodies expressed in the Ms704, Ms705, and Ms709 cell lines lack fucose on their carbohydrates. The Ms704, Ms705, and Ms709 FUT8^{-/-} cell lines were created by the targeted disruption of the FUT8 gene in CHO/DG44 cells using two replacement vectors (*see* U.S. Patent Publication No. 20040110704 and Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). As another example, EP 1,176,195 describes a cell line with a functionally disrupted FUT8 gene, which encodes a fucosyl transferase, such that antibodies expressed in such a cell line exhibit hypofucosylation by reducing or eliminating the α -1,6 bond-related enzyme. EP 1,176,195 also describes cell lines which have a low enzyme activity for adding fucose to the N-acetylglucosamine that binds to the Fc region of the antibody or does not have the enzyme activity, for example the rat myeloma cell line YB2/0 (ATCC CRL 1662). PCT Publication WO 03/035835 describes a variant CHO cell line, Lec13 cells, with reduced ability to attach fucose to Asn(297)-linked carbohydrates, also resulting in hypofucosylation of antibodies expressed in that host cell (*see* also Shields *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Antibodies with a modified glycosylation profile can also be produced in chicken eggs, as described in PCT Publication WO 06/089231. Alternatively, antibodies with a modified glycosylation profile can be produced in plant cells, such as *Lemna* (US Patent 7,632,983). Methods for production of antibodies in a plant system are disclosed in the U.S. Patents 6,998,267 and 7,388,081. PCT Publication WO 99/54342 describes cell lines engineered to express glycoprotein-modifying glycosyl transferases (*e.g.*, β (1,4)-N-acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII)) such that antibodies expressed in the engineered cell lines exhibit increased bisecting GlcNac structures which results in increased ADCC activity of the antibodies (*see* also Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Alternatively, the fucose residues of the antibody can be cleaved off using a fucosidase

enzyme; *e.g.*, the fucosidase α -L-fucosidase removes fucosyl residues from antibodies (Tarentino *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

[00278] Another modification of the antibodies herein that is contemplated by this disclosure is pegylation. An antibody can be pegylated to, for example, increase the biological (*e.g.*, serum) half life of the antibody. To pegylate an antibody, the antibody, or fragment thereof, typically is reacted with polyethylene glycol (PEG), such as a reactive ester or aldehyde derivative of PEG, under conditions in which one or more PEG groups become attached to the antibody or antibody fragment. Preferably, the pegylation is carried out via an acylation reaction or an alkylation reaction with a reactive PEG molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer). As used herein, the term "polyethylene glycol" is intended to encompass any of the forms of PEG that have been used to derivatize other proteins, such as mono (C1-C10) alkoxy- or aryloxy-polyethylene glycol or polyethylene glycol-maleimide. In certain embodiments, the antibody to be pegylated is an aglycosylated antibody. Methods for pegylating proteins are known in the art and can be applied to the antibodies of the invention. *See, e.g.*, EP 0 154 316 and EP 0 401 384.

Antibody Physical Properties

[00279] Antibodies of this disclosure can be characterized by their various physical properties, to detect and/or differentiate different classes thereof.

[00280] Antibodies of the present disclosure can contain one or more glycosylation sites in either the light or heavy chain variable region. Such glycosylation sites may result in increased immunogenicity of the antibody or an alteration of the pK of the antibody due to altered antigen binding (Marshall *et al* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala and Morrison (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al* (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al* (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Glycosylation has been known to occur at motifs containing an N-X-S/T sequence. In some instances, it is preferred to have an anti-BTLA antibody that does not contain variable region glycosylation. This can be achieved either by selecting antibodies that do not contain the glycosylation motif in the variable region or by mutating residues within the glycosylation region.

[00281] In a preferred embodiment, the antibodies of the present disclosure do not contain asparagine isomerism sites. The deamidation of asparagine may occur on N-G or D-G sequences and result in the creation of an isoaspartic acid residue that introduces a kink into the polypeptide chain and decreases its stability (isoaspartic acid effect).

[00282] Each antibody will have a unique isoelectric point (pI), which generally falls in the pH range between 6 and 9.5. The pI for an IgG1 antibody typically falls within the pH range of 7-9.5 and the pI for an IgG4 antibody typically falls within the pH range of 6-8. There is speculation that antibodies with a pI outside the normal range may have some unfolding and instability under *in vivo* conditions. Thus, it is preferred to have an anti-BTLA antibody that contains a pI value that falls in the normal range. This can be achieved either by selecting antibodies with a pI in the normal range or by mutating charged surface residues.

[00283] Each antibody will have a characteristic melting temperature, with a higher melting temperature indicating greater overall stability *in vivo* (Krishnamurthy R and Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Generally, it is preferred that the T_{M1} (the temperature of initial unfolding) be greater than 60°C, preferably greater than 65°C, even more preferably greater than 70°C. The melting point of an antibody can be measured using differential scanning calorimetry (Chen *et al* (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando *et al* (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) or circular dichroism (Murray *et al.* (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

[00284] In a preferred embodiment, antibodies are selected that do not degrade rapidly. Degradation of an antibody can be measured using capillary electrophoresis (CE) and MALDI-MS (Alexander AJ and Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

[00285] In another preferred embodiment, antibodies are selected that have minimal aggregation effects, which can lead to the triggering of an unwanted immune response and/or altered or unfavorable pharmacokinetic properties. Generally, antibodies are acceptable with aggregation of 25% or less, preferably 20% or less, even more preferably 15% or less, even more preferably 10% or less and even more preferably 5% or less. Aggregation can be measured by several techniques, including size-exclusion column (SEC), high performance liquid chromatography (HPLC), and light scattering.

Antibody Conjugates

[00286] The anti-BTLA antibody molecules of the invention may also be conjugated to a chemical moiety. The chemical moiety may be, *inter alia*, a polymer, a radionuclide or a cytotoxic factor. Preferably the chemical moiety is a polymer which increases the half-life of the antibody molecule in the body of a subject. Suitable polymers include, but are not limited to, polyethylene glycol (PEG) (*e.g.*, PEG with a molecular weight of 2kDa, 5 kDa, 10 kDa, 12kDa, 20 kDa, 30kDa or 40kDa), dextran and monomethoxypolyethylene glycol (mPEG). Lee, *et al.*, (1999) (*Bioconj. Chem.* 10:973-981) discloses PEG conjugated single-chain antibodies. Wen, *et al.*, (2001) (*Bioconj. Chem.* 12:545-553) disclose conjugating antibodies

with PEG which is attached to a radiometal chelator (diethylenetriaminopentaacetic acid (DTPA)).

[00287] The antibodies and antibody fragments of the invention may also be conjugated with labels such as ^{99}Tc , ^{90}Y , ^{111}In , ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , ^{131}I , ^{11}C , ^{15}O , ^{13}N , ^{18}F , ^{35}S , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{226}Ra , ^{60}Co , ^{59}Fe , ^{57}Se , ^{152}Eu , ^{67}Cu , ^{217}Ci , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , ^{234}Th , and ^{40}K , ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{52}Tr and ^{56}Fe .

[00288] The antibodies and antibody fragments of the invention may also be conjugated with fluorescent or chemiluminescent labels, including fluorophores such as rare earth chelates, fluorescein and its derivatives, rhodamine and its derivatives, isothiocyanate, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, o-phthalaldehyde, fluorescamine, ^{152}Eu , dansyl, umbelliferone, luciferin, luminal label, isoluminal label, an aromatic acridinium ester label, an imidazole label, an acridinium salt label, an oxalate ester label, an aequorin label, 2,3-dihydrophthalazinediones, biotin/avidin, spin labels and stable free radicals.

[00289] The antibody molecules may also be conjugated to a cytotoxic factor such as diphtheria toxin, *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A chain, ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleurites fordii* proteins and compounds (e.g., fatty acids), dianthin proteins, *Phytolacca americana* proteins PAPI, PAPII, and PAP-S, *momordica charantia* inhibitor, curcin, crotin, *saponaria officinalis* inhibitor, mitogellin, restrictocin, phenomycin, and enomycin.

[00290] Any method known in the art for conjugating the antibody molecules of the invention to the various moieties may be employed, including those methods described by Hunter, *et al.*, (1962) *Nature* 144:945; David, *et al.*, (1974) *Biochemistry* 13:1014; Pain, *et al.*, (1981) *J. Immunol. Meth.* 40:219; and Nygren, J., (1982) *Histochem. and Cytochem.* 30:407. Methods for conjugating antibodies are conventional and very well known in the art.

[00291] In yet other embodiments, different constant domains may be appended to humanized V_L and V_H regions derived from the CDRs provided herein. For example, if a particular intended use of an antibody (or fragment) of the present invention were to call for altered effector functions, a heavy chain constant domain other than IgG1 may be used, or hybrid IgG1/IgG4 may be utilized.

[00292] Although IgG1 antibodies provide for long half-life and for effector functions, such as complement activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity, such activities may not be desirable for all uses of the antibody. In such instances an IgG4 constant domain, for example, may be used. In hu Mab8D5, the IgG4 constant domain differs from the native human IgG4 constant domain (Swiss-Prot Accession No. P01861.1) at position 108

(corresponding to position 228 in the EU system and position 241 in the KABAT system), where the native Ser108 is replaced with Pro, in order to prevent a potential inter-chain disulfide bond between Cys106 and Cys109 (corresponding to positions Cys 226 and Cys 229 in the EU system and positions Cys 239 and Cys 242 in the KABAT system) that could interfere with proper intra-chain disulfide bond formation. See Angal *et al.* (1993) *Mol. Immunol.* 30:105.

[00293] For hu Mab21H6, hu Mab8A3, hu Mab15C5, hu Mab19A7, and hu Mab 20H4, the sequences described in Table 7 are based on human heavy chain IgG1.

Diseases

[00294] The invention also provides methods of treating subjects, including human subjects, in need of treatment with the isolated antibodies or antigen binding fragment thereof with the antibody or antigen binding fragment thereof, preferably a fully human antibody, of the present invention. Such subjects may have an inflammatory or autoimmune disorder, such as inflammatory bowel disorders (*e.g.*, Crohn's disease, ulcerative colitis, and inflammatory bowel disease), inflammatory fibrosis (*e.g.*, scleroderma, lung fibrosis, and cirrhosis), rheumatoid arthritis (RA), osteoarthritis, osteoporosis, asthma (including allergic asthma), allergies, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), multiple sclerosis, psoriasis, uveitis, graft versus host disease (GVHD), juvenile early-onset Type I diabetes, transplant rejection, SLE, and Sjögren's syndrome. Such methods of treatment may further comprise administering one or more additional therapeutic agents, such as immunosuppressive or anti-inflammatory agents. By way of example, and not limitation, inflammatory bowel disorders are treated by the methods described herein. In a particularly preferred embodiment, Crohn's disease and ulcerative colitis are treated by the methods described herein.

Inflammatory Bowel Disease (IBD)

[00295] IBD is the name for a group of disorders (*e.g.* Crohn's disease and ulcerative colitis) in which the intestines become inflamed, resulting in abdominal cramps and pain, diarrhea, weight loss and intestinal bleeding. IBD affects over 600,000 Americans. Conventional treatment options include sulfasalazine, corticosteroids (*e.g.* prednisone), immune system suppressors such as azathioprine and mercaptopurine, or an antibiotic (*e.g.*, metronidazole) for Crohn's disease. Therapeutic monoclonal antibody treatments include etanercept, natalizumab and infliximab.

[00296] The anti-BTLA antibodies of the present invention may be used to treat IBD in subjects in need of such treatment. The anti-BTLA antibodies of the present invention may

also be combined with other treatments for IBD, *e.g.* IL-10 (see U.S. Pat. Nos. 5,368,854, 7,052,686), steroids and sulfasalazine.

Graft-versus-Host disease (GVHD)

[00297] Graft-versus-host disease (GVHD) is a common complication of allogeneic bone marrow transplantation in which functional immune cells in the transplanted marrow recognize the recipient as "foreign" and mount an immunologic attack. It can also take place in a blood transfusion under certain circumstances. Three criteria are typically associated with GVHD:

[00298] 1) Administration of an immunocompetent graft, with viable and functional immune cells;

[00299] 2) The recipient is immunologically disparate – histoincompatible; and

[00300] 3) The recipient is immunocompromised and therefore cannot destroy or inactivate the transplanted cells.

[00301] After bone marrow transplantation, T cells present in the graft attack the tissues of the transplant recipient after perceiving host tissues as antigenically foreign. The T cells produce an excess of cytokines, including TNF alpha and interferon-gamma (IFNg). A wide range of host antigens can initiate graft-versus-host-disease, among them the human leukocyte antigens (HLAs). However, graft-versus-host disease can occur even when HLA-identical siblings are the donors. HLA-identical siblings or HLA-identical unrelated donors often have genetically different proteins (*i.e.*, minor histocompatibility antigens) that can be presented by MHC molecules to the recipient's T-cells, which see these antigens as foreign and so mount an immune response.

[00302] BTLA agonist antibodies are expected to inhibit the activation, proliferation and effector function of grafted T and B cells that react to allogeneic antigens (including, but not limited to minor and major histocompatibility antigens) present in tissues of the recipient or host. Inhibition of these graft derived T and B cells is expected to occur by virtue of their expression of BTLA on the cell surface. While not being bound by theory, a BTLA agonist antibody is expected to inhibit pathogenic immune responses by 'forced engagement'. BTLA agonist antibodies may inhibit pathogenic immune responses indirectly for instance through the activation of other inhibitory cells such as regulatory T cells, or through modulation of antigen-presenting cells. BTLA agonist antibodies are expected to suppress or inhibit anti-host responses by lymphocytes originating from the graft either alone or in combination with other immune suppressive agents, used to prevent or treat the symptoms of graft versus host disease.

[00303] In a further embodiment, the invention also relates to methods of treatment comprising administration of a therapeutically effective amount of an anti-BTLA antibody or antigen binding fragment thereof in combination with one or more other therapeutic agents. By way of example, and not limitation, the one or more therapeutic agents include anti-IL-23, IL-1 β , IL-6, TGF- β , CTLA4 fusion proteins, and small molecule anti-inflammatories, such as mycophenolate mofetil methotrexate (See, *e.g.*, Veldhoen (2006) *Immunity* 24:179-189; Dong (2006) *Nat. Rev. Immunol.* 6(4):329-333) or a combination. In various embodiments the one or more other therapeutic agents is administered before, concurrently with, or after the anti-BTLA antibody or antigen binding fragment thereof.

[00304] Additionally, in certain embodiments, the anti-BTLA antibody or antigen binding fragment thereof can be administered in combination with immunosuppressive drugs used to treat transplant rejection including any combination of one or more of the following:

- [00305] calcineurin inhibitors (*e.g.*, ciclosporin and tacrolimus),
- [00306] mTOR inhibitors (*e.g.*, sirolimus and everolimus),
- [00307] anti-proliferatives (*e.g.*, azathioprine and mycophenolic acid),
- [00308] corticosteroids (*e.g.*, prednisolone and hydrocortisone),
- [00309] antibodies with immunosuppressive effects (*e.g.*, monoclonal anti-IL-2R α receptor antibodies including basiliximab and daclizumab),
- [00310] and polyclonal anti-T-cell antibodies (*e.g.*, anti-thymocyte globulin (ATG) and anti-lymphocyte globulin (ALG)).

[00311] The invention also relates to compositions and formulations of the antibodies or antigen binding fragment thereof of the present invention, comprising the binding compound and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent, and optionally one or more immunosuppressive or anti-inflammatory agents.

Experimental and diagnostic uses

[00312] The antibodies and fragments of the invention may be used as affinity purification agents. In this process, the antibodies or fragments are immobilized on a solid phase such as a Sephadex resin or filter paper, using methods well known in the art. The immobilized antibody or fragment is contacted with a sample containing the BTLA protein (or fragment thereof) to be purified, and thereafter the support is washed with a suitable solvent that will remove substantially all the material in the sample except the BTLA protein, which is bound to the immobilized antibody or fragment. Finally, the support is washed with a solvent which elutes the bound BTLA from the column (*e.g.*, protein A). Such immobilized antibodies form part of the present invention.

[00313] The present invention also provides antigens for generating secondary antibodies which are useful for example for performing Western blots and other immunoassays discussed herein. Specifically, the present invention includes polypeptides comprising the variable regions and/or CDR sequences which may be used to generate an anti-BTLA or anti-BTLA secondary antibody. Detectably labeled anti-hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7, hu Mab4C7 or anti-Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7, hu Mab4C7 secondary antibodies are within the scope of the present invention.

[00314] Anti-BTLA antibodies or fragments thereof may also be useful in diagnostic assays for BTLA protein, *e.g.*, detecting its expression in specific cells, tissues, or serum. Such diagnostic methods may be useful in various disease diagnoses.

[00315] For example, embodiments of the invention include ELISA assays (enzyme-linked immunosorbent assay) incorporating the use of an anti-BTLA antibody or fragment thereof of the invention. For example, in an embodiment of the invention, such a method comprises the following steps:

[00316] (a) coat a substrate (*e.g.*, surface of a microtiter plate well, *e.g.*, a plastic plate) with anti-BTLA antibody or antigen-binding fragment thereof;

[00317] (b) apply a sample to be tested for the presence of BTLA to the substrate;

[00318] (c) wash the plate, so that unbound material in the sample is removed;

[00319] (d) apply detectably labeled antibodies (*e.g.*, enzyme-linked antibodies) which are also specific to the BTLA antigen;

[00320] (e) wash the substrate, so that the unbound, labeled antibodies are removed;

[00321] (f) if the labeled antibodies are enzyme linked, apply a chemical which is converted by the enzyme into a fluorescent signal; and

[00322] (g) detect the presence of the labeled antibody.

[00323] In an embodiment of the invention, the labeled antibody is labeled with peroxidase which react with ABTS (*e.g.*, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) or 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine to produce a color change which is detectable. Alternatively, the labeled antibody is labeled with a detectable radioisotope (*e.g.*, ^3H) which can be detected by scintillation counter in the presence of a scintillant. An anti-BTLA antibody of the invention may be used in a Western blot or immuno protein blot procedure. Such a procedure forms part of the present invention and includes *e.g.*:

[00324] (1) contacting a membrane or other solid substrate to be tested for the presence of bound BTLA or a fragment thereof with an anti-BTLA antibody or antigen-binding fragment thereof of the invention. Such a membrane may take the form of a nitrocellulose or

vinyl-based (*e.g.*, polyvinylidene fluoride (PVDF)) membrane to which proteins to be tested for the presence of BTLA in a non-denaturing PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) gel or SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) gel have been transferred (*e.g.*, following electrophoretic separation in the gel). Before contact of membrane with the anti-BTLA antibody or fragment, the membrane is optionally blocked, *e.g.*, with non-fat dry milk or the like so as to bind non-specific protein binding sites on the membrane.

[00325] (2) washing the membrane one or more times to remove unbound anti-BTLA antibody or fragment and other unbound substances; and

[00326] (3) detecting the bound anti-BTLA antibody or fragment.

[00327] Detection of the bound antibody or fragment may be by binding the antibody or fragment with a secondary antibody (an anti-immunoglobulin antibody) which is detectably labeled and, then, detecting the presence of the secondary antibody.

[00328] The anti-BTLA antibodies and antigen-binding fragments thereof of the invention may also be used for immunohistochemistry. Such a method forms part of the present invention and comprises, *e.g.*, (1) contacting a cell to be tested for the presence of BTLA with an anti-BTLA antibody or antigen-binding fragment thereof of the invention; and (2) detecting the antibody or fragment on or in the cell.

[00329] If the antibody or fragment itself is detectably labeled, it can be detected directly. Alternatively, the antibody or fragment may be bound by a detectably labeled secondary antibody which is detected.

[00330] Certain anti-BTLA antagonist antibodies and antigen-binding fragments thereof of the invention may also be used for *in vivo* tumor imaging. Such a method forms part of the present invention and may include injection of a radiolabeled anti-BTLA antibody or antigen-binding fragment thereof of the invention into the body of a patient to be tested for the presence of a tumor associated with BTLA expression followed by nuclear imaging of the body of the patient to detect the presence of the labeled antibody or fragment *e.g.*, at loci comprising a high concentration of the antibody or fragment which are bound to the tumor.

[00331] Imaging techniques include SPECT imaging (single photon emission computed tomography) or PET imaging (positron emission tomography). Labels include *e.g.*, iodine-123 (^{123}I) and technetium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), *e.g.*, in conjunction with SPECT imaging or ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O or ^{18}F , *e.g.*, in conjunction with PET imaging or Indium-111 (See *e.g.*, Gordon *et al.*, (2005) International Rev. Neurobiol. 67:385-440).

Kits

[00332] The present invention also provides kits comprising the components of the combinations of the invention in kit form. A kit of the present invention includes one or more components including, but not limited to, a binding composition, as discussed herein, which specifically binds BTLA (*e.g.*, agonist antibodies hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, or hu Mab19A7, or antagonist antibody hu Mab4C7) in association with one or more additional components including, but not limited to a pharmaceutically acceptable carrier and/or a chemotherapeutic agent, as discussed herein. The binding composition and/or the chemotherapeutic agent can be formulated as a pure composition or in combination with a pharmaceutically acceptable carrier, in a pharmaceutical composition.

[00333] In one embodiment, a kit includes a binding composition of the invention (*e.g.*, agonist antibodies hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, or hu Mab19A7, or antagonist antibody hu Mab4C7) or a pharmaceutical composition thereof in one container (*e.g.*, in a sterile glass or plastic vial) and a pharmaceutical composition thereof and/or a chemotherapeutic agent in another container (*e.g.*, in a sterile glass or plastic vial).

[00334] In another embodiment of the invention, the kit comprises a combination of the invention, including a binding composition component (*e.g.*, agonist antibodies hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, or hu Mab19A7, or antagonist antibody hu Mab4C7) along with a pharmaceutically acceptable carrier, optionally in combination with one or more chemotherapeutic agent component formulated together, optionally, in a pharmaceutical composition, in a single, common container.

[00335] If the kit includes a pharmaceutical composition for parenteral administration to a subject, the kit can include a device for performing such administration. For example, the kit can include one or more hypodermic needles or other injection devices as discussed above.

[00336] The kit can include a package insert including information concerning the pharmaceutical compositions and dosage forms in the kit. Generally, such information aids patients and physicians in using the enclosed pharmaceutical compositions and dosage forms effectively and safely. For example, the following information regarding a combination of the invention may be supplied in the insert: pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical studies, efficacy parameters, indications and usage, contraindications, warnings, precautions, adverse reactions, overdose, proper dosage and administration, how supplied, proper storage conditions, references, manufacturer/distributor information and patent information.

Pharmaceutical Compositions and Administration

[00337] To prepare pharmaceutical or sterile compositions of the anti-huBTLA antibodies of the present invention, the antibody is admixed with a pharmaceutically

acceptable carrier or excipient. See, e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences* and *U.S. Pharmacopeia: National Formulary*, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984).

[00338] Formulations of therapeutic and diagnostic agents may be prepared by mixing with acceptable carriers, excipients, or stabilizers in the form of, e.g., lyophilized powders, slurries, aqueous solutions or suspensions (see, e.g., Hardman, *et al.* (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, *et al.* (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY). In one embodiment, anti-BTLA antibodies of the present invention are diluted to an appropriate concentration in a sodium acetate solution pH 5-6, and NaCl or sucrose is added for tonicity. Additional agents, such as polysorbate 20 or polysorbate 80, may be added to enhance stability.

[00339] Toxicity and therapeutic efficacy of the antibody compositions, administered alone or in combination with another agent, can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., for determining the LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population) and the ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index (LD₅₀/ED₅₀). Antibodies exhibiting high therapeutic indices are preferred. The data obtained from these cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in human. The dosage of such compounds lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration.

[00340] The mode of administration can vary. Suitable routes of administration include oral, rectal, transmucosal, or intestinal administration; parenteral delivery, including intramuscular, subcutaneous, intramedullary injections, as well as intrathecal, direct intraventricular, intravenous, intraperitoneal, intranasal, or intraocular injections. Administration can be carried out in a variety of conventional ways, such as oral ingestion, inhalation, insufflation, topical application or cutaneous, transdermal, subcutaneous, intraperitoneal, parenteral, intra-arterial or intravenous injection. Intravenous administration to the patient is preferred.

[00341] Alternately, one may administer the antibody in a local rather than systemic manner, for example, via injection of the antibody directly into an arthritic joint or pathogen-induced lesion characterized by immunopathology, often in a depot or sustained release formulation. Furthermore, one may administer the antibody in a targeted drug delivery system, for example, in a liposome coated with a tissue-specific antibody, targeting, for example, arthritic joint or pathogen-induced lesion characterized by immunopathology. The liposomes will be targeted to and taken up selectively by the afflicted tissue.

[00342] The administration regimen depends on several factors, including the serum or tissue turnover rate of the therapeutic antibody, the level of symptoms, the immunogenicity of the therapeutic antibody, and the accessibility of the target cells in the biological matrix. Preferably, the administration regimen delivers sufficient therapeutic antibody to effect improvement in the target disease state, while simultaneously minimizing undesired side effects. Accordingly, the amount of biologic delivered depends in part on the particular therapeutic antibody and the severity of the condition being treated. Guidance in selecting appropriate doses of therapeutic antibodies is available (see, *e.g.*, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert, *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom *et al.* (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon *et al.* (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602).

[00343] Determination of the appropriate dose is made by the clinician, *e.g.*, using parameters or factors known or suspected in the art to affect treatment. Generally, the dose begins with an amount somewhat less than the optimum dose and it is increased by small increments thereafter until the desired or optimum effect is achieved relative to any negative side effects. Important diagnostic measures include those of symptoms of, *e.g.*, the inflammation or level of inflammatory cytokines produced. Preferably, a biologic that will be used is derived from the same species as the animal targeted for treatment, thereby minimizing an inflammatory, autoimmune, or proliferative response to the reagent. In the case of human subjects, for example, chimeric, humanized and fully human antibodies are preferred.

[00344] Antibodies, antibody fragments, and cytokines can be provided by continuous infusion, or by doses administered, *e.g.*, daily, 1-7 times per week, weekly, bi-weekly, monthly, bimonthly etc. Doses may be provided intravenously, subcutaneously, topically,

orally, nasally, rectally, intramuscular, intracerebrally, intraspinally, or by inhalation. A total weekly dose is generally at least 0.05 µg/kg body weight, more generally at least 0.2 µg/kg, 0.5 µg/kg, 1 µg/kg, 10 µg/kg, 100 µg/kg, 0.25 mg/kg, 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg, 5.0 mg/ml, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg or more (see, *e.g.*, Yang, *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herold, *et al.* (2002) *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu, *et al.* (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji, *et al.* (20003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144). Doses may also be provided to achieve a pre-determined target concentration of anti-BTLA antibody in the subject's serum, such as 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 µg/ml or more. In other embodiments, a fully human BTLA antibody of the present invention is administered subcutaneously or intravenously, on a weekly, biweekly or "every 4 weeks" basis at 10, 20, 50, 80, 100, 200, 500, 1000 or 2500 mg/subject.

[00345] As used herein, "inhibit" or "treat" or "treatment" includes a postponement of development of the symptoms associated with a disorder and/or a reduction in the severity of the symptoms of such disorder. The terms further include ameliorating existing uncontrolled or unwanted symptoms, preventing additional symptoms, and ameliorating or preventing the underlying causes of such symptoms. Thus, the terms denote that a beneficial result has been conferred on a vertebrate subject with a disorder, disease or symptom, or with the potential to develop such a disorder, disease or symptom.

[00346] As used herein, the terms "therapeutically effective amount", "therapeutically effective dose" and "effective amount" refer to an amount of a BTLA binding compound of the invention that, when administered alone or in combination with an additional therapeutic agent to a cell, tissue, or subject, is effective to prevent or ameliorate one or more symptoms of a disease or condition or the progression of such disease or condition. A therapeutically effective dose further refers to that amount of the binding compound sufficient to result in amelioration of symptoms, *e.g.*, treatment, healing, prevention or amelioration of the relevant medical condition, or an increase in rate of treatment, healing, prevention or amelioration of such conditions. When applied to an individual active ingredient administered alone, a therapeutically effective dose refers to that ingredient alone. When applied to a combination, a therapeutically effective dose refers to combined amounts of the active ingredients that result in the therapeutic effect, whether administered in combination, serially or simultaneously. An effective amount of a therapeutic will result in an improvement of a diagnostic measure or parameter by at least 10%; usually by at least 20%; preferably at least about 30%; more preferably at least 40%, and most preferably by at least 50%.

[00347] Methods for co-administration with a second therapeutic agent, *e.g.*, cytokine, another therapeutic antibody, steroid, chemotherapeutic agent, or antibiotic are well known in the art, see, *e.g.*, Hardman, *et al.* (eds.) (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed., McGraw-Hill, New York, NY; Poole and Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner and Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA. The pharmaceutical composition of the invention may also contain immunosuppressive or immunomodulating agents. Any suitable immunosuppressive agent can be employed, including but not limited to anti-inflammatory agents, corticosteroids, cyclosporine, tacrolimus (*i.e.*, FK-506), sirolimus, interferons, soluble cytokine receptors (*e.g.*, sTNRF and sIL-1R), agents that neutralize cytokine activity (*e.g.*, inflixmab, etanercept), mycophenolate mofetil, 15-deoxyspergualin, thalidomide, glatiramer, azathioprine, leflunomide, cyclophosphamide, methotrexate, and the like. The pharmaceutical composition can also be employed with other therapeutic modalities such as phototherapy and radiation.

[00348] The BTLA binding compounds of the present invention can also be used in combination with one or more agonists or antagonists of other cytokines (*e.g.* antibodies), including but not limited to, IL-23, IL-1 β , IL-6, CTLA-4, CTLA-4/Ig fusion, and TGF- β . See, *e.g.*, Veldhoen (2006) *Immunity* 24:179-189; Dong (2006) *Nat. Rev. Immunol.* 6(4):329-333. In various embodiments, the BTLA binding compound of the invention is administered before, concurrently with, or after administration of the another agonist/s or antagonist/s. In one embodiment, a BTLA binding compound of the present invention is used in treatment of the acute early phase of an adverse immune response (*e.g.* MS, Crohn's Disease, juvenile early-onset type I diabetes) alone or in combination with an IL-23 antagonist. In the latter case, the BTLA binding compound may be gradually decreased and treatment with the antagonist of IL-23 alone is continued to maintain suppression of the adverse response. Alternatively, antagonists to IL-1 β , IL-6 and/or TGF- β may be administered concurrently, before or after an BTLA binding compound of the present invention. See Cua and Kastelein (2006) *Nat. Immunol.* 7:557-559; Tato and O'Shea (2006) *Nature* 441:166-168; Iwakura and Ishigame (2006) *J. Clin. Invest.* 116:1218-1222.

[00349] Typical veterinary, experimental, or research subjects include monkeys, dogs, cats, rats, mice, rabbits, guinea pigs, horses, and humans.

USES

[00350] The present invention provides methods for using engineered anti-BTLA antibodies for the treatment and diagnosis of inflammatory disorders and conditions, as well as autoimmune and proliferative disorders. Methods are provided for the diagnosis, prevention or treatment of inflammatory bowel disease (IBD), multiple sclerosis (MS), chronic obstructive pulmonary disease (COPD), cystic fibrosis (CF), psoriasis, systemic scleroderma, GVHD, allograft rejection, SLE, Sjögren's syndrome, juvenile early-onset type I diabetes autoimmune myocarditis and peritoneal adhesions (*See, e.g., Chung et al. (2002) J. Exp. Med. 195:1471-78*).

[00351] In certain embodiments, the antibody or antigen binding fragments of the invention, which specifically bind to human BTLA, can be used to increase, enhance, stimulate, or up-regulate an immune response related to BTLA activity. In certain embodiments, antibodies of the present invention that do not block binding of BTLA to HVEM (*e.g.* agonist antibodies Hu Mab8D5, huMab8A3) are used therapeutically to stabilize BTLA in subjects in need of prolonged BTLA activity. Anti-BTLA agonist antibodies (*e.g.*, Hu Mab8D5, huMab8A3, hu Mab21H6, and hu Mab19A7) activate inhibitory receptor function of BTLA. Subjects who would benefit from such treatment include patients suffering from an inflammatory or autoimmune disorder, such as inflammatory bowel disorders (*e.g.*, Crohn's disease, ulcerative colitis, and inflammatory bowel disease), inflammatory fibrosis (*e.g.*, scleroderma, lung fibrosis, and cirrhosis), rheumatoid arthritis (RA), osteoarthritis, osteoporosis, asthma (including allergic asthma), allergies, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), multiple sclerosis, psoriasis, uveitis, graft versus host disease (GVHD), juvenile early-onset Type I diabetes, transplant rejection, SLE, and Sjögren's syndrome. Such methods of treatment may further comprise administering one or more additional therapeutic agents, such as immunosuppressive or anti-inflammatory agents.

Rheumatoid Arthritis (RA)

[00352] RA is a progressive, systemic disease characterized by inflammation of the synovial joints affecting about 0.5% of the world's population. *See, Emery (2006) BMJ 332:152-155*. Joint inflammation can lead to deformity, pain, stiffness and swelling, and ultimately to irreversible deterioration of the joint. Affected joints include knees, elbows, neck and joints of the hands and feet. Conventional treatment involves use of NSAIDs to alleviate symptoms, followed by administration of disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs) such as gold, penicillamine, sulfasalazine and methotrexate. Recent advances include treatment with TNF- α inhibitors, including monoclonal antibodies, such as infliximab,

adalimumab and golimumab, and receptor fusion proteins, such as etanercept. Treatment with these TNF- α inhibitors dramatically reduces structural damage from the disease.

[00353] The anti-BTLA agonist antibodies of the present invention may be used to treat RA in subjects in need of such treatment. The anti-BTLA antibodies of the present invention may also be combined with other treatments for RA, *e.g.* methotrexate, azathioprine, cyclophosphamide, steroids, mycophenolate mofetil, NSAIDs, or TNF- α inhibitors (antibodies or receptor fragments).

[00354] In one embodiment, the anti-BTLA antibodies of the present invention are used to treat human subjects who have not previously responded adequately to treatment with DMARDs alone. In another embodiment, treatment with the anti-BTLA antibodies of the present invention is begun early in the course of disease, without requiring prior failure of DMARD therapy. Such early intervention may be appropriate, for example, once the safety of the antibody therapy has been firmly established.

[00355] Clinical improvement is measured by determining the ACR score, as described in more detail in Example 18. In various embodiments, ACR scores of 20, 50, and 70 are the desired endpoint, and these endpoints may be assessed at any appropriate point in the course of treatment, such as 5, 10, 15, 24, 40, 50 or more weeks.

Inflammatory Bowel Disease (IBD)

[00356] IBD is the name for a group of disorders (*e.g.* Crohn's disease and ulcerative colitis) in which the intestines become inflamed, resulting in abdominal cramps and pain, diarrhea, weight loss and intestinal bleeding. IBD affects over 600,000 Americans. Conventional treatment options include sulfasalazine, corticosteroids (*e.g.* prednisone), immune system suppressors such as azathioprine and mercaptopurine, or an antibiotic (*e.g.* metronidazole) for Crohn's disease. Therapeutic monoclonal antibody treatments include etanercept, natalizumab and infliximab.

[00357] The anti-BTLA agonist antibodies of the present invention may be used to treat IBD in subjects in need of such treatment. The anti-BTLA agonist antibodies of the present invention may also be combined with other treatments for IBD, *e.g.* IL-10 (see U.S. Pat. Nos. 5,368,854, 7,052,686), steroids and sulfasalazine.

Psoriasis

[00358] The skin serves as an important boundary between the internal milieu and the environment, preventing contact with potentially harmful antigens. In the case of antigen/pathogen penetration, an inflammatory response is induced to eliminate the antigen. This response leads to a dermal infiltrate that consists predominantly of T cells,

polymorphonuclear cells, and macrophages (see, *e.g.*, Williams and Kupper (1996) *Life Sci.*, 58:1485-1507.) Normally, this inflammatory response, triggered by the pathogen, is under tight control and will be halted upon elimination of the pathogen.

[00359] In certain cases this inflammatory response occurs without external stimuli and without proper controls, leading to cutaneous inflammation. The present invention provides methods for treating and diagnosing cutaneous inflammation. Cutaneous inflammation, the result of the cellular infiltrate noted above as well as the secreted cytokines from these cells, encompasses several inflammatory disorders such as cicatricial pemphigoid, scleroderma, hidradenitis suppurativa, toxic epidermal necrolysis, acne, osteitis, graft vs. host disease (GvHD), pyoderma gangrenosum, and Behcet's Syndrome (see, *e.g.*, Williams and Griffiths (2002) *Clin. Exp. Dermatol.*, 27:585-590). The most common form of cutaneous inflammation is psoriasis.

[00360] Psoriasis is characterized by T cell mediated hyperproliferation of keratinocytes coupled with an inflammatory infiltrate. The disease has certain distinct overlapping clinical phenotypes including chronic plaque lesions, skin eruptions, and pustular lesions (see, *e.g.*, Gudjonsson *et al.* (2004) *Clin Exp. Immunol.* 135:1-8). Approximately 10% of psoriasis patients develop arthritis. The disease has a strong but complex genetic predisposition, with 60% concordance in monozygotic twins.

[00361] The typical psoriatic lesion is a well defined erythematous plaque covered by thick, silvery scales. The inflammation and hyperproliferation of psoriatic tissue is associated with a different histological, antigenic, and cytokine profile than normal skin. Among the cytokines associated with psoriasis are: TNF α , IL-19, IL-18, IL-15, IL-12, IL-7, IFN γ , IL-17A and IL-23 (see Gudjonsson *et al.*, *supra*).

[00362] Anti-BTLA antibodies of the present invention, either alone or in combination with other agents, may also be used in prevention, treatment, diagnosis and prediction of psoriasis flare-ups.

Systemic Lupus Erythematosus (SLE)

[00363] Lupus erythematosus is a connective tissue disease. Lupus is a chronic inflammatory disease that occurs when the body's immune system attacks its own tissues and organs. Inflammation caused by lupus can affect many different body systems, including joints, skin, kidneys, blood cells, heart, and lungs. Lupus occurs more frequently in women than men, although the reasons for this are unknown. Four types of lupus exist — systemic lupus erythematosus, discoid lupus erythematosus, drug-induced lupus erythematosus and neonatal lupus. Of these, systemic lupus erythematosus is the most common and serious form

of lupus. In certain embodiments, anti-BTLA agonist antibodies of the present invention may be used to treat lupus in subjects in need of such treatment. The anti-BTLA antibodies may be combined with other treatments for lupus including NSAID's, certain anti-malaria drugs (*e.g.*, hydroxychloroquine and corticosteroids, immunosuppressive drugs (*e.g.*, cyclophosphamide (Cytoxan) and azathioprine (Imuran), and mycophenolate mofetil (CellCept)), Rituximab, and Dehydroepiandrosterone (DHEA).

[00364] Sjögren's syndrome is another chronic disorder that causes dry eyes and a dry mouth. In certain embodiments, anti-BTLA antibodies of the present invention may be useful for treating individuals with Sjögren's syndrome. The anti-BTLA antibodies of the present invention may also be combined with other treatments for Sjögren's syndrome, along the lines described for Lupus.

Multiple Sclerosis (MS)

[00365] MS is thought to be an autoimmune disease of the central nervous system (CNS) involving loss of myelin from nerve fibers, resulting in plaques or lesions. The most common form is relapsing/remitting MS in which well defined symptomatic flare-ups occur, followed by periods of partial or complete remission. Conventional treatment options include interferon- β -1a and -1b, mitoxantrone, the tetrapeptide glatiramer acetate, therapeutic alpha-4-integrin-specific antibodies (natalizumab), or small molecule antagonists of alpha-4-integrin (*e.g.* those disclosed at WO2003/084984).

[00366] In certain embodiments, anti-BTLA agonist antibodies of the present invention may be used to treat MS in subjects in need of such treatment. The anti-BTLA antibodies may also be combined with other treatments for MS, *e.g.* interferon- β , interferon- α , steroids or alpha-4-integrin-specific antibodies.

Cancer

[00367] Antagonist antibody or antigen binding fragments of the invention (exemplified by hu Mab4C7) can be used to treat cancer (*i.e.*, to inhibit the growth or survival of tumor cells). Preferred cancers whose growth may be inhibited using the antagonist antibodies of the invention include cancers typically responsive to immunotherapy, but also cancers that have not hitherto been associated with immunotherapy. Non-limiting examples of preferred cancers for treatment include melanoma (*e.g.*, metastatic malignant melanoma), renal cancer (*e.g.* clear cell carcinoma), prostate cancer (*e.g.* hormone refractory prostate adenocarcinoma), pancreatic adenocarcinoma, breast cancer, colon cancer, lung cancer (*e.g.* non-small cell lung cancer), esophageal cancer, squamous cell carcinoma of the head and neck, liver cancer, ovarian cancer, cervical cancer, thyroid cancer, glioblastoma, glioma, leukemia, lymphoma, and other

neoplastic malignancies. Additionally, the invention includes refractory or recurrent malignancies whose growth may be inhibited using the antibodies of the invention.

[00368] Antagonist antibody or antibody fragments of the invention can be used alone or in combination with: other anti-neoplastic agents or immunogenic agents (for example, attenuated cancerous cells, tumor antigens (including recombinant proteins, peptides, and carbohydrate molecules), antigen presenting cells such as dendritic cells pulsed with tumor derived antigen or nucleic acids, immune stimulating cytokines (for example, IL-2, IFN α 2, GM-CSF), and cells transfected with genes encoding immune stimulating cytokines such as but not limited to GM-CSF); standard cancer treatments (for example, chemotherapy, radiotherapy or surgery); or other antibodies (including but not limited to antibodies to VEGF, EGFR, Her2/neu, VEGF receptors, other growth factor receptors, CD20, CD40, CTLA-4, OX-40, 4-1BB, PD-1, PD-L1, CTLA-4, ICOS, and other molecules in negative regulatory pathways).

Infectious Diseases

[00369] Antagonist antibody or antigen binding fragments of the invention (exemplified by hu Mab4C7) can also be used to prevent or treat infections and infectious disease. The antibody or antibody fragments can be used alone, or in combination with vaccines, to stimulate the immune response to pathogens, toxins, and self-antigens. The antibodies or antigen-binding fragment thereof can be used to stimulate immune response to viruses infectious to humans, such as, but not limited to, human immunodeficiency viruses, hepatitis viruses class A, B and C, Epstein Barr virus, human cytomegalovirus, human papilloma viruses, herpes viruses. The antibodies or antigen-binding fragment thereof can be used to stimulate immune response to infection with bacterial or fungal parasites, and other pathogens.

Vaccination Adjuvant

[00370] Antagonist antibody or antigen binding fragments of the invention (exemplified by hu Mab4C7) can be used in conjunction with other recombinant proteins and/or peptides (such as tumor antigens or cancer cells) in order to increase an immune response to these proteins (*i.e.*, in a vaccination protocol).

[00371] For example, in certain embodiments, anti-BTLA antagonist antibodies and antibody fragments thereof may be used to stimulate antigen-specific immune responses by coadministration of an anti-BTLA antibody with an antigen of interest (*e.g.*, a vaccine). Accordingly, in another aspect the invention provides a method of enhancing an immune response to an antigen in a subject, comprising administering to the subject: (i) the antigen; and (ii) an anti-BTLA antibody of the invention or antigen-binding fragment thereof, such that an

immune response to the antigen in the subject is enhanced. The antigen can be, for example, a tumor antigen, a viral antigen, a bacterial antigen or an antigen from a pathogen. Non-limiting examples of such antigens include, without limitation, tumor antigens, or antigens from the viruses, bacteria or other pathogens.

Th2 Mediated Diseases

[00372] In certain embodiments, anti-BTLA antagonist antibodies and antibody fragments of the invention (exemplified by hu Mab4C7) can also be used to treat Th2 mediated diseases, such as asthma and allergy. This is based on the finding that the antibodies of the invention can help induce a Th1 response. Thus, the antibodies of the invention can be used to in Th2 mediated diseases to generate a more balanced immune response.

***Ex-Vivo* Activation of T cells**

[00373] In certain embodiments, the antibodies and antigen fragments of the invention (exemplified by hu Mab4C7) can also be used for the *ex vivo* activation and expansion of antigen specific T cells and adoptive transfer of these cells into recipients in order to increase antigen-specific T cells against tumor. These methods may also be used to activate T cell responses to infectious agents such as CMV. *Ex vivo* activation in the presence of anti-BTLA antibodies may be expected to increase the frequency and activity of the adoptively transferred T cells.

Other Combination Therapies

[00374] As previously described, anti-BTLA antibodies of the invention can be coadministered with one or other more therapeutic agents, *e.g.*, a cytotoxic agent, a radiotoxic agent, or an immunosuppressive agent. The antibody can be linked to the agent (as an immunocomplex) or can be administered separately from the agent. In the latter case (separate administration), the antibody can be administered before, after or concurrently with the agent or can be co-administered with other known therapies.

[00375] Antibodies and antigen binding fragments of the invention can also be used to increase the effectiveness of donor engrafted tumor specific T cells.

[00376] Many modifications and variations of this invention can be made without departing from its spirit and scope, as will be apparent to those skilled in the art. The invention is defined by the terms of the appended claims, along with the full scope of equivalents to which such claims are entitled. The specific embodiments described herein, including the following examples, are offered by way of example only, and do not by their details limit the scope of the invention.

GENERAL METHODS

[00377] Standard methods in molecular biology are described (Maniatis, *et al.* (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). Standard methods also appear in Ausbel, *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols.1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, which describes cloning in bacterial cells and DNA mutagenesis (Vol. 1), cloning in mammalian cells and yeast (Vol. 2), glycoconjugates and protein expression (Vol. 3), and bioinformatics (Vol. 4).

[00378] Methods for protein purification including immunoprecipitation, chromatography, electrophoresis, centrifugation, and crystallization are described (Coligan, *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). Chemical analysis, chemical modification, post-translational modification, production of fusion proteins, glycosylation of proteins are described (see, *e.g.*, Coligan, *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel, *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391). Production, purification, and fragmentation of polyclonal and monoclonal antibodies are described (Coligan, *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, *supra*). Standard techniques for characterizing ligand/receptor interactions are available (see, *e.g.*, Coligan, *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York).

[00379] Monoclonal, polyclonal, and humanized antibodies can be prepared (see, *e.g.*, Sheperd and Dean (eds.) (2000) *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, New York, NY; Kontermann and Dubel (eds.) (2001) *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, New York; Harlow and Lane (1988) *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 139-243; Carpenter, *et al.* (2000) *J. Immunol.* 165:6205; He, *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:1029; Tang *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274:27371-27378; Baca *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; Chothia *et al.* (1989) *Nature* 342:877-883; Foote and Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-499; U.S. Pat. No. 6,329,511).

[00380] An alternative to humanization is to use human antibody libraries displayed on phage or human antibody libraries in transgenic mice (Vaughan *et al.* (1996) *Nature*

Biotechnol. 14:309-314; Barbas (1995) *Nature Medicine* 1:837-839; Mendez *et al.* (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Hoogenboom and Chames (2000) *Immunol. Today* 21:371-377; Barbas *et al.* (2001) *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Kay *et al.* (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego, CA; de Bruin *et al.* (1999) *Nature Biotechnol.* 17:397-399).

[00381] Single chain antibodies and diabodies are described (see, *e.g.*, Malecki *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:213-218; Conrath *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:7346-7350; Desmyter *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:26285-26290; Hudson and Kortt (1999) *J. Immunol. Methods* 231:177-189; and U.S. Pat. No. 4,946,778). Bifunctional antibodies are provided (see, *e.g.*, Mack, *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7021-7025; Carter (2001) *J. Immunol. Methods* 248:7-15; Volkel, *et al.* (2001) *Protein Engineering* 14:815-823; Segal, *et al.* (2001) *J. Immunol. Methods* 248:1-6; Brennan, *et al.* (1985) *Science* 229:81-83; Raso, *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:27623; Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; Traunecker, *et al.* (1991) *EMBO J.* 10:3655-3659; and U.S. Pat. Nos. 5,932,448, 5,532,210, and 6,129,914).

[00382] Bispecific antibodies are also provided (see, *e.g.*, Azzoni *et al.* (1998) *J. Immunol.* 161:3493; Kita *et al.* (1999) *J. Immunol.* 162:6901; Merchant *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275:9115; Pandey *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275:38633; Zheng *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:12999; Propst *et al.* (2000) *J. Immunol.* 165:2214; Long (1999) *Ann. Rev. Immunol.* 17:875).

[00383] Purification of antigen is not necessary for the generation of antibodies. Animals can be immunized with cells bearing the antigen of interest. Splenocytes can then be isolated from the immunized animals, and the splenocytes can fused with a myeloma cell line to produce a hybridoma (see, *e.g.*, Meyaard *et al.* (1997) *Immunity* 7:283-290; Wright *et al.* (2000) *Immunity* 13:233-242; Preston *et al.*, *supra*; Kaithamana *et al.* (1999) *J. Immunol.* 163:5157-5164).

[00384] Antibodies can be conjugated, *e.g.*, to small drug molecules, enzymes, liposomes, polyethylene glycol (PEG). Antibodies are useful for therapeutic, diagnostic, kit or other purposes, and include antibodies coupled, *e.g.*, to dyes, radioisotopes, enzymes, or metals, *e.g.*, colloidal gold (see, *e.g.*, Le Doussal *et al.* (1991) *J. Immunol.* 146:169-175; Gibellini *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:3891-3898; Hsing and Bishop (1999) *J. Immunol.* 162:2804-2811; Everts *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168:883-889).

[00385] Methods for flow cytometry, including fluorescence activated cell sorting (FACS), are available (see, *e.g.*, Owens, *et al.* (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2nd ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ). Fluorescent reagents suitable for modifying nucleic acids, including nucleic acid primers and probes, polypeptides, and antibodies, for use, *e.g.*, as diagnostic reagents, are available (Molecular Probes (2003) *Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) *Catalogue*, St. Louis, MO).

[00386] Standard methods of histology of the immune system are described (see, *e.g.*, Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, New York, NY; Hiatt, *et al.* (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, PA; Louis, *et al.* (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, NY).

[00387] Software packages and databases for determining, *e.g.*, antigenic fragments, leader sequences, protein folding, functional domains, glycosylation sites, and sequence alignments, are available (see, *e.g.*, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne, *et al.* (2000) *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne, *et al.* (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16:741-742; Wren, *et al.* (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690).

EXAMPLE 1

Fully Human BTLA Antibodies

[00388] Fully human monoclonal antibodies specific for human BTLA were generated using Medarex, Inc.'s UltiMab antibody generation platform by immunizing mice with a combination of CHO cells overexpressing membrane-bound huBTLA and huBTLA-Fc fusion protein in MPL® + TDM adjuvant. Mice were immunized with BTLA-Fc fusion protein or cells expressing membrane-bound BTLA expressing mature extracellular domain (residues 31-152 of SEQ ID NO: 35). This sequence corresponds with the extracellular domain of transcript 1 variant described at GenBank Accession No. NP_861445 sequence (that matches human BTLA transcript 1 variant (NP_861445), with one amino acid difference in the intracellular domain at position 267 ((Pro267Leu, SEQ ID NO:35, encoded by SEQ ID NO:36) relative to NP_861445 (SEQ ID NO:37). After multiple rounds of immunization and serum titering, selected mice were chosen for fusion. One fusion produced 49 anti-BTLA Mabs most of

which were of the IgG4 isotype. Another fusion produced 154 MAbs most of which were of the IgG1 isotype, including the Mab8D5.

[00389] Following human gamma/kappa screening, anti-BTLA MAbs were initially characterized and selected based on binding to BTLA-Ig by ELISA, FACS/FMAT screening on CHO/huBTLA and CHO parental cells to eliminate CHO positive MAbs, and for their ability to block HVEM binding to BTLA CHO cells. Relative affinity determinations were made using BIAcore surface plasmon resonance analysis. The hu Mab8D5 binds equally well to both human and cynomolgus BTLA, but has no blocking activity. Hu Mab8D5 also demonstrated agonist activity in B- and T-cell functional assays as described herein.

[00390] Hu Mab8D5 is a fully human monoclonal antibody of the IgG4/kappa isotype (containing the stabilizing 228 proline mutation) that binds to human BTLA with approximately 2 nM affinity (BIAcore). The Hu Mab8D5 antibody is non-blocking and does not interfere with HVEM binding. Three additional antibodies, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7 exhibit similar, but not identical functional properties to those of hu Mab8D5. While hu Mab8A3 is also a non-blocking agonist antibody that does not interfere with HVEM binding, hu Mab21H6 and hu Mab19A7 are agonists that also block binding of HVEM with BTLA.

Anti-BTLA Antibody Isotype selection

[00391] Antibodies of the IgG4 isotype poorly bind complement C1q and therefore do not significantly activate complement. IgG4 antibodies also bind weakly to Fcγ receptors, leading to inefficient or absent antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) (reviewed in Presta, 2002). The initially selected 8D5 IgG1 Mab was re-expressed as a human IgG4 containing the stabilizing Adair S228P mutation, to produce an anti-BTLA antibody that lacks effector function. The variable regions were subcloned into Ubiquitous Chromatin Opening Element (UCOE; Millipore, Billerica, MA) vectors, which contain the human kappa constant region and the human gamma 4 constant region with the S228P hinge mutation (Angal, 1993). Heavy and light chain expression vectors were linearized and cotransfected into CHO-S cells (Invitrogen, Carlsbad, CA) and stable clones were selected in CD CHO medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing G418 and puromycin. Clones were screened for expression using a human gamma/kappa sandwich ELISA, and the best producing line was scaled up to 2L for production and purification. The IgG4 version of the original 8D5 Mab is referred to herein as hu Mab8D5 (or hu Mab8D5 G4). The IgG1 version of 8D5 is referred to herein as hu Mab8D5 G1.

Anti-BTLA Antibody Sequences

[00392] Using degenerate primer PCR-based methods, the DNA sequence of heavy and light chain variable regions of the hu Mab8D5 and hu Mab4C7 sequences were determined. Total RNA was prepared from 5×10^6 hybridoma cells using the RNeasy Mini Kit according to manufacturer's instructions (Qiagen, Valencia, CA, USA). cDNA was prepared by the 5'-RACE protocol with the SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) and SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), both according to manufacturer's instructions. The V-regions of each antibody were amplified using a 3' human-specific constant region primer, (VH primer HLB02 (SEQ ID NO:33); VK primer LY49 (SEQ ID NO:34)), paired with the 5' RACE universal primer mix. PCR products containing the V-region were cloned into the pCR4-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and transformed into *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Either miniprep DNA or Templiphi (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ, USA) were prepared, and subjected to DNA sequencing (Sequetech, Mountain View, CA, USA). The resultant DNA sequences were analyzed for in-frame rearrangements and other antibody characteristics. Sequences of heavy and light chain variable regions of hu Mab8D5 are shown in Figures 1A-C. Complementarity determining regions (CDRs) are labeled. Sequence features are outlined in Figure 1C. The sequences of heavy and light chain variable regions of the antagonist antibody Hu Mab4C7 are shown in Figures 2A-C.

EXAMPLE 2

Anti-BTLA Antibody Binding Affinities

[00393] Cell-based flow cytometry was used to determine apparent binding affinities of hu Mab8D5 (Figures 3A-B) and hu Mab4C7 to human and cynomolgus BTLA (Figures 3C-D). Half-maximal binding of human and cynomolgus BTLA occurred at ~12 nM for both the IgG1 and IgG4 versions of hu Mab8D5. For agonist binding analysis (Figures 3A-B), hu Mab8D5 was titrated 3-fold from 20 $\mu\text{g/ml}$ on CHO cells expressing human BTLA or 2-fold from 50 $\mu\text{g/ml}$ on CHO cells expressing cynomolgus BTLA in 4°C buffer containing 0.02% sodium azide to prevent receptor internalization. PE-anti-huFc was used for detection. This data illustrates that hu Mab8D5 binds to human and cynomolgus BTLA. Agonists huMab8A3, hu Mab21H6, and hu Mab19A7 exhibit similar binding affinities to that of hu Mab8D5.

[00394]

Table 5: BIAcore Results			
Clone ID	$K_D \times 10^{-9}$ (M)	$k_{on} \times 10^4$ (1/Ms)	$k_{off} \times 10^{-4}$ (1/s)
8D5 (G4) agonist	2.99	4.58	1.37

21H6 (G1)	5.50	5.11	2.82
8A3 (G1)	9.27	2.88	5.96
19A7 (G1)	20.7	2.88	5.96

[00395] For antagonist binding analysis (Figures 3C-D) hu Mab4C7 was titrated 3-fold from 20 µg/ml on CHO cells expressing human BTLA or 2-fold from 50 µg/ml on CHO cells expressing cynomolgus BTLA in 4 °C buffer containing 0.02% sodium azide to prevent receptor internalization.. PE-anti-huFc was used for detection. For hu Mab4C7, half-maximal binding of human and cynomolgus BTLA occurred at ~1.6 nM for both the IgG1 and IgG4 versions of hu Mab4C7, as shown in Figures 3C-D. This data illustrates that hu Mab4C7 binds to human and cynomolgus BTLA.

EXAMPLE 3

BIAcore

The antibodies were further profiled in order to elucidate binding kinetics and calculate equilibrium binding constants using BIAcore analysis demonstrating fast-on slow-off kinetics. For BIAcore, the test antibodies were captured on an anti-CH1 chip.

[00396] Hu Mab8D5 G4 exhibited an apparent Kd of 2.4 nM. The antagonist antibody hu Mab4C7 exhibited an apparent Kd of 4.6 nM.

TABLE 6 BIAcore Results

HuMAb	Ka (1/Ms)*(10 ⁴)	Kd (1/s)*(10 ⁻⁴)	KD (nM)
8D5 (G4) agonist	7.9	1.9	2.4
4C7 antagonist	9.25	4.3	4.6

EXAMPLE 4

HVEM Blocking Ability

[00397] The antibodies were tested to determine their ability to block the binding of HVEM to human BTLA. The ability to block the binding of HVEM to human BTLA was measured using a competitive cell-based flow cytometry assay. Serially diluted hu Mab8D5 was applied for 15 minutes to CHO cells expressing human BTLA (in buffer containing 0.02% sodium azide to prevent receptor internalization) prior to the addition of biotinylated human HVEM-Fc (R&D Systems; 1 µg/mL) for 30 minutes at 4 °C. For the results shown in Figure 4B, hu Mab8D5 was titrated 3 fold starting from 50 µg/ml and PE-SA was used for detection.

[00398] The HVEM blocking ability of hu Mab4C7 is shown in Figure 4A from the same assay. Serially diluted hu Mab4C7 was applied for 15 minutes to CHO cells expressing human BTLA (in buffer containing 0.02% sodium azide to prevent receptor internalization) prior to the addition of biotinylated human HVEM-Fc (R&D Systems; 1 µg/mL) for 30 minutes at 4°C. For the results shown in Figure 4A, hu Mab4C7 was titrated 3 fold starting from 50 µg/ml and PE-SA was used for detection. Washed cells were resuspended in 4 °C buffer containing propidium iodide (PI) as well as 0.02% sodium azide to prevent receptor internalization and analyzed by flow cytometry. Live cells were gated based on exclusion of PI-positive cells from the FSC/SSC gate and their geometric mean fluorescence was measured. The results in Figure 4A show hu Mab4C7 blocks human HVEM (hHVEM) binding to CHO cells expressing hBTLA.

[00399] As shown in Figure 4B, hu Mab8D5 does not inhibit or compete with binding of HVEM to human BTLA. Similar results were obtained for antibody huMab8A3. As shown in Figure 4A, huMab4C7 inhibits or competes with binding of HVEM to human BTLA. Similar blocking results were obtained for antibodies hu Mab21H6, hu Mab19A7.

EXAMPLE 5

Human T cell response to CD3 cross-linking is inhibited by hu Mab8D5

[00400] Anti-BTLA agonist antibodies and antibody fragments were tested for their capacity to decrease T cell activity *in vitro* using blood cells from healthy volunteers stimulated in various settings. A classical T cell stimulation assay was utilized that employs anti-CD3 Mab to cross-link the T cell receptor complex on the cell surface of all competent human T cells.

[00401] T cell blasts were generated in culture from human PBMCs using PHA and IL-2. Blasts were stimulated with immobilized anti-CD3 Abs for 48 hours in the presence or absence of soluble hu Mab8D5, hu Mab8D5 Fab fragment or IgG1 isotype control. Proliferation was measured by thymidine incorporation as shown in Figure 5.

[00402] In this assay, hu Mab8D5 was demonstrated to inhibit proliferation suggesting that the outcome of concurrent stimulation of the antigen receptor and BTLA on T cells is suppression of T cell response (Fig. 5). The hu Mab8D5 antibody added to these cultures as monovalent Fab' fragments demonstrated similar activity, which strongly indicates that hu Mab8D5 activates BTLA receptor function by hitting a functional epitope, and not by cross-linking of multiple BTLA molecules on the cell surface. This data illustrates that hu Mab8D5 inhibits anti-CD3 induced proliferation of human T cell blasts.

EXAMPLE 6

Human T cell response to SEB is inhibited by hu Mab8D5 and increased by hu Mab4C7

[00403] Another assay used to characterize the functional consequence of activating the BTLA receptor employs *Staphylococcus* enterotoxin B (SEB) to engage and activate all human T cells expressing the V β 3, V β 12, V β 14, V β 17 and some other T cell receptor chains, depending on the dose of SEB. Depending on the donor, SEB activates up to 20% of all T cells determined by IL-2 production.

[00404] In the present analyses, healthy human (Fig. 6A) or cynomolgus monkey donor blood (Fig. 6B) was diluted 1:10 and pre-incubated with antibodies before adding superantigen SEB (1 μ g/ml) to the culture. Human IgG4 (HuIgG4) is the isotype control Mab for hu Mab8D5. A single representative human and monkey donor are shown.

[00405] After 2 days, IL-2 production was measured by ELISA. Hu Mab8D5 decreased IL-2 production compared to control human IgG4 in both human and monkey donors.

[00406] The soluble CTLA-4-Ig fusion protein (CTLA-4/Ig), which blocks the interaction between the costimulatory receptor CD28 and its ligands CD80/CD86, decreased the SEB-induced IL-2 production, further validating the SEB stimulation assay as a method to quantify T cell activity after manipulation of costimulatory pathways. The decrease in IL-2 production by the tested agonist anti-BTLA antibodies was found to be dose-dependent (Figures 6A-B). Antibodies hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7 may also have similar effects on IL-2 production.

[00407] These assays were also conducted with hu Mab4C7, according to the methods described above. Hu Mab4C7, in contrast to CTLA-4/Ig and hu Mab8D5, increased IL-2 production compared to control human IgG4 in both human (Fig. 6C) and monkey donors (Fig. 6D).

[00408] The ability of the tested anti-human BTLA Mabs to cross-react with monkey BTLA is especially useful in testing for the ability of the Mabs to modulate T cell responses in well-tested models such as monkey kidney transplant and EAE systems, which are indicative of disease modulation *in vivo*. The ability of the tested agonist anti-BTLA antibodies to decrease IL-2 production in the SEB stimulation assay indicates that these antibodies would be suitable for controlling or preventing conditions such as graft versus host disease.

EXAMPLE 7

Inhibition of Tetanus Toxoid (TT) dependent IFN γ production and proliferation by hu Mab8D5 in blood cells from TT-vaccinated donors

[00409] Additionally, it was examined whether the ability of anti-BTLA treatment suppressed an antigen-specific response using the tetanus toxoid (TT) recall antigen. TT was added to PBMCs at 0.1 µg/ml, cytokine and proliferation were analyzed after 7 days. PBMC from recently TT vaccinated individuals were restimulated *in vitro* for 7 days using TT in the presence or absence of Abatacept (CTLA-4/Ig), hu Mab8D5, or control isotype antibody IgG4. Interferon gamma (IFN γ) production was measured by ELISA and proliferation was measured by tritiated thymidine incorporation.

[00410] TT-induced IFNγ production (Figures 7A) and proliferation (Figures 7B) were markedly reduced by CTLA-4/Ig and by hu Mab8D5 compared to antigen alone. These data indicate that hu Mab8D5 is capable of inhibiting T cell responses triggered through the (antigen-specific) T cell receptor complex. Both primary and secondary (recall) responses are suppressed in the presence of hu Mab8D5.

EXAMPLE 8

Increase in Tetanus Toxoid (TT) dependent IFNγ production and proliferation by hu Mab4C7 in blood cells from TT-vaccinated donors

[00411] The IFNγ production (Figure 8A) and proliferation analyses (Figure 8B) were also carried out, as described above, using the antagonist antibody hu Mab4C7. TT-induced IFNγ production (Figures 8A) and proliferation (Figures 8B) were markedly increased by hu Mab4C7 compared to antigen alone. These results indicate that hu Mab4C7 is capable of increasing T cell responses triggered through the antigen-specific T cell receptor complex. Both primary and secondary (recall) responses are increased in the presence of hu Mab4C7.

EXAMPLE 9

Human B Cell Function is inhibited by hu Mab8D5

[00412] Human B cells were isolated from peripheral blood and stimulated with anti-IgM in the presence or absence of anti-BTLA Mabs. Specifically, B cells were isolated by negative selection from human whole blood and stimulated with 10 µg/ml of anti-IgM F(ab')₂ fragments in the presence or absence of hu Mab8D5, CTLA-4/Ig or isotype control. Proliferation was measured by thymidine incorporation after 48h. Hu Mab8D5 produced a dose-dependent decrease in B cell proliferation, while an isotype control and CTLA-4/Ig had no effect, as shown in Fig. 9. Similar results were obtained for antibody huMab8A3.

EXAMPLE 10

Inhibition of peripheral blood B cell chemokine production by hu Mab8D5

[00413] Cross-linking of surface IgM on naïve B cells leads to enhanced production of chemokines such as MIP1α and MIP1β. Figures 10A-B represent graphs showing the

inhibition of peripheral blood B cell chemokine production by hu Mab8D5. B cells were isolated by negative selection from human whole blood and stimulated with 10 $\mu\text{g/ml}$ of anti-IgM F(ab')₂ fragments in the presence or absence of hu Mab8D5 or isotype control. MIP1 α and β production were measured by ELISA.

[00414] In addition to limiting B cell proliferation, hu Mab8D5 reduced chemokine production of MIP1 α (Fig. 10A) and MIP1 β (Fig. 10B) of anti-IgM triggered B cells in a dose-dependent fashion. Importantly, hu Mab8D5 and control antibodies were tested in experiments using non-antigen-specific triggers, such as CD40L plus IL-4, which potently induce B cell proliferation without engaging the B cell receptor. Under these conditions, no activity of hu Mab8D5 was detected.

EXAMPLE 11

Hu Mab8D5 does not autonomously elicit immune activity

[00415] Figure 11 is a graph showing that hu Mab8D5 does not autonomously stimulate immune activity in healthy donor blood. Diluted whole blood from humans was stimulated with the superantigen SEB in the presence or absence of hu Mab8D5 or CTLA-4-Ig. HuIgG4 is the isotype control mAb for hu Mab8D5. Hu Mab8D5 was also added to blood in the absence of SEB stimulation. After 48 hours (h), IL-2 production was measured by ELISA.

[00416] In the TT recall response assays, as well as in the SEB stimulation assays (using human whole blood), hu Mab8D5 does not stimulate detectable proliferation or cytokine responses without concurrent specific stimulation of the T cell receptor. This demonstrates that hu Mab8D5 is not likely to induce inadvertent cytokine storm-like events in patients.

EXAMPLE 12

Hu Mab8D5 triggers BTLA inhibitory signaling activity

[00417] Hu Mab8D5 and hu Mab4C7 immuno-precipitates BTLA protein from B cells, and pretreatment with hu Mab8D5 reduces TCR ξ phosphorylation. Lysates from human peripheral blood B cells were immuno-precipitated with various BTLA HuMAbs. huIgG4 is an isotype control, hu Mab4C7 (an antagonist antibody), and 2G9, are other BTLA HuMAbs. For Fig. 12B, CD4 T cells were isolated from peripheral blood and treated as follows: Lane 1= unstimulated cells, Lane 2= stimulated for 30 min with anti-CD3 T cell expander beads, Lane 3= treated with 25 $\mu\text{g/ml}$ hu Mab8D5- (labeled as clone 8D5) prior to 30 min. stimulation with expander beads. Top blot of whole cell lysates is probed for total CD3 ξ , while bottom blot is probed with a phospho-specific CD3 ξ Ab. M lane is molecular weight markers, numbers indicated kD.

[00418] In peripheral blood B cells derived from healthy donors, hu Mab8D5 and hu Mab4C7 were shown to specifically bind to and immunoprecipitate BTLA (Fig. 12A). In peripheral blood CD4+ T cells stimulated with anti-CD3 plus anti-CD28, pre-incubation with hu Mab8D5 was found to reduce phosphorylation of the TCR ξ chain, which is critical for initiation of TCR/CD3 signaling (Fig. 12B).

EXAMPLE 13

Hu Mab8D5 is active as a monovalent Fab'

[00419] For Fig. 13A, diluted whole blood from humans was stimulated with the superantigen SEB in the presence or absence of hu Mab8D5 Fab or isotype control Fab for hu Mab8D5. After 48h, IL-2 production was measured by ELISA. For Fig. 13B, B cells were isolated by negative selection from human whole blood and stimulated with 10 μ g/ml of anti-IgM F(ab')₂ fragments in the presence or absence of hu Mab8D5 Fab or isotype control Fab. Proliferation was measured by thymidine incorporation after 48h. Figures 13A-B illustrate that hu Mab8D5 suppressed SEB response and B cell proliferation in a dose dependent manner.

[00420] As described herein, the hu Mab8D5 was found to trigger BTLA activity when added to T or B cell cultures as a monovalent Fab'. The relative potency (but not the relative efficacy) of the Fab' was approximately 10-fold less than that of the full Mab which suggests that loss of potency was merely due to loss of avidity. Hu Mab8D5 as a Fab' fragment was able to dose-dependently suppress both an SEB response in human whole blood and anti-IgM-induced B cell proliferation (Figures 13A-B). Like other Ig-fold cell surface receptors, BTLA immune suppressive activity could also be triggered when any BTLA binding antibody was coated onto plastic (through cross-linking of multiple receptors). However, the fact that monovalent binding of hu Mab8D5 to BTLA appears to fully activate the inhibitory function seems to be a unique feature of BTLA (*e.g.* that is not shared with negative costimulatory protein family members PD-1 or CTLA-4). Since hu Mab8D5 does not impede binding of HVEM, the natural ligand of BTLA, while not wishing to be bound by theory, this indicates that hu Mab8D5 hits an (potentially allosteric) epitope on the extracellular domain of BTLA inducing a conformational change and subsequent intracellular signaling.

EXAMPLE 14

Cytokine Storm

[00421] BTLA is an immunomodulatory receptor of the CD28 family. A potential complication of utilizing an agonist antibody is induction of "cytokine storm" activity *in vivo*. Cytokine storm is a systemic inflammatory response characterized by a rapid induction of

proinflammatory cytokines due to an interruption of the positive feedback loop between cytokines and immune cells. Procedures to improve predictive preclinical safety testing of immunomodulatory therapeutics have been developed (*e.g.*, by the National Institute for Biological Standards and Control, UK, *See*, Stebbings, 2007). *In vitro* testing of hu Mab8D5, utilizing current models and methodology to predict the potential for cytokine storm *in vivo* has been performed. The cytokine storm assays were conducted using purified positive cytokine storm control agonist antibody as the positive reference. In these assays, immobilized positive control agonist mAb produced a robust IL-2 response in the absence of additional stimulation. When immobilized in the same manner, neither hu Mab8D5 nor control IgG4 induced IL-2 secretion, as shown in Figures 14A-B. Figures 14B-D, illustrate that agonist antibodies hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab15C5, hu Mab20H4, and hu Mab19A7 also did not elicit production of the inflammatory cytokines interferon gamma (IFN γ) and tumor necrosis factor alpha (TNF α) when supercrosslinked (under conditions as described above). The positive control agonist mAb, in contrast, produced both an IFN γ and TNF α response. Thus, none of the tested anti-BTLA agonist antibodies elicited a cytokine storm in human PBMC cultures, and likewise they would not be expected to elicit a cytokine storm *in vivo*, based on the results in this *in vitro* reference model.

[00422] As demonstrated in Example 11 and Fig. 11, hu Mab8D5 does not autonomously stimulate immune function in any of the functional assays employed. Addition of hu Mab8D5 in the absence of T cell specific triggering does not result in measurable changes in cytokine secretion or proliferation. Furthermore, in tests forcing higher level cross-linking by coating hu Mab8D5 onto plastic, the mAb did not induce cytokine release or proliferation. Based on these data, the inhibitory nature of the BTLA-HVEM interaction, and the fact that triggering BTLA incurs inhibitory intracellular signaling, the potential risk of a cytokine storm is considered highly unlikely.

EXAMPLE 15

Tolerability and side effects in animal models

[00423] There were no tolerability issues or side effects noted in any animal studies with hu Mab8D5 or hu Mab4C7.

EXAMPLE 16

Effects of 8D5 in SCIDhu SPL –A Human Immune Response Model

[00424] In order to determine whether HuMab anti-BTLA agonist IgG4 clone 8D5 can inhibit human T cell dependent mediated B cell IgG production in the SCIDhu SPL model of human immune response was used to probe the potential of HuMabs to modulate immune

responses *in vivo*. CTLA-4-Ig was used as a control because it is an immunosuppressant that reduces T-cell responses and is known to affect T-cell dependent antibody production by B cells.

[00425] Briefly, SCID mice were engrafted i.p. with human spleen cells, immunized with 100 µg tetanus toxoid and treated with 200 µg target specific or control antibodies on days 0, 5, 9 and 14. Mice were boosted with TT on day 7. On Day 28 the mice were euthanized, sera were collected and peritoneal exudate cells (PEC) were harvested. PEC were analyzed by FACS for lymphocyte subset marker expression to evaluate Ab treatment effects on relative cell numbers. TT-specific and total human IgG concentrations in day 28 sera were quantified by ELISA.

[00426] ELISA of Day 28 sera showed that hu MAb8D5 inhibited human anti-TT recall and total IgG responses in SCIDhu SPL mice (Figures 15, 16, 17A & 18A) compared to the isotype control huIgG4 (Figures 17B & 18B). Anti-BTLA hu MAb8D5 displayed similar efficacy as CTLA-4-Ig for lowering total and TT-specific IgG titers compared to isotype control huIgG4 treated mice. Figures 17A, 17B, 18A, and 18B show plots of the titers from individual treated mice. In summary, these data are consistent with hu MAb8D5 behaving as an agonist of BTLA and that hu MAb8D5-induced BTLA signaling inhibits human T cell activation, expansion and subsequent T cell dependent recall Ag specific and total IgG production by human B cells.

EXAMPLE 17

[00427] **SCID- RA Synovium model**

[00428] The SCID-RA synovium model involves transplantation of synovium from RA-patients to immune-deficient SCID mice to create a humanized mouse model for RA. RA synovial grafts can persist in SCID mice and maintain the morphology and characteristics of the RA joint, including synovial hyperplasia, inflammation, immune reactivity and angiogenesis. RA synovium are obtained from joint replacement surgery (*e.g.* hip, knee, shoulder). The SCID immuno-deficient mice have no functional T and B cells and exhibit no graft rejection.

[00429] Synovium are collected during surgery and directly processed into small pieces (biopsies of 6mm). Synovium samples are freshly transplanted to SCID-mice into subcutaneous pockets on the back. After a 7 day engraftment period, IP injections of control or treatment/test antibodies are given on days 7 and 10. On day 14, mice are sacrificed, blood and synovia are collected. Analyses include serum cytokine ELISA, H + E staining and serum antibody quantification.

SEQUENCE INDEX

Table 7

SEQ ID NO:	Description
1	cDNA sequence encoding human BTLA isoform; Accession No. AY293286
2	Amino acid sequence of Human BTLA Accession No. AAP44003
3	Mouse BTLA nucleotide sequence (Accession No. AY293285)
4	Mouse BTLA amino acid sequence (Accession No. AAP44002)
5	anti-BTLA 8D5 VH CDR1
6	anti-BTLA 8D5 VH CDR2
7	anti-BTLA 8D5 VH CDR3
8	anti-BTLA 8D5 VH, nucleotide sequence including leader sequence
9	anti-BTLA 8D5 VH amino acid sequence including leader sequence
10	anti-BTLA 8D5 VH, nucleotide sequence without leader sequence
11	anti-BTLA 8D5 VH, amino acid sequence without leader sequence
12	anti-BTLA 8D5 V _K CDR1
13	anti-BTLA 8D5 V _K CDR2
14	anti-BTLA 8D5 V _K CDR3
15	anti-BTLA 8D5 V _K , nucleotide sequence including leader sequence
16	anti-BTLA 8D5 V _K amino acid sequence including leader sequence
17	anti-BTLA 8D5 V _K , nucleotide sequence without leader sequence
18	anti-BTLA 8D5 V _K , amino acid sequence without leader sequence
19	anti-BTLA 4C7 VH CDR1
20	anti-BTLA 4C7 VH CDR2
21	anti-BTLA 4C7 VH CDR3
22	anti-BTLA 4C7 VH, nucleotide sequence including leader sequence
23	anti-BTLA 4C7 VH amino acid sequence including leader sequence
24	anti-BTLA 4C7 VH, nucleotide sequence without leader sequence
25	anti-BTLA 4C7 VH, amino acid sequence without leader sequence
26	anti-BTLA 4C7 V _K CDR1
27	anti-BTLA 4C7 V _K CDR2
28	anti-BTLA 4C7 V _K CDR3

29	anti-BTLA 4C7 V _K , nucleotide sequence including leader sequence
30	anti-BTLA 4C7 V _K amino acid sequence including leader sequence
31	anti-BTLA 4C7 V _H , nucleotide sequence without leader sequence
32	anti-BTLA 4C7 V _H , amino acid sequence without leader sequence
33	HLB02 sequencing primer
34	LY49 sequencing primer
35	Human BTLA amino acid sequence
36	Human BTLA nucleotide sequence
37	Human BTLA amino acid sequence Accession No. NP_861445
38	8D5 V _H CDR1 variants
39	8D5 CDR3 variants
40	8D5 V _K CDR2 variants
41	8D5 V _K CDR3 variants
42	4C7 V _H CDR2 variants
43	4C7 V _H CDR3 variants
44	anti-BTLA 21H6 V _H nucleotide sequence
45	anti-BTLA 21H6 V _H amino acid sequence
46	anti-BTLA 21H6 V _{K1} nucleotide sequence
47	anti-BTLA 21H6 V _{K1} amino acid sequence
48	anti-BTLA 21H6 V _{K2} nucleotide sequence
49	anti-BTLA 21H6 V _{K2} amino acid sequence
50	anti-BTLA 21H6 V _{K3} nucleotide sequence
51	anti-BTLA 21H6 V _{K3} amino acid sequence
52	anti-BTLA 8A3 V _H nucleotide sequence
53	anti-BTLA 8A3 V _H amino acid sequence
54	anti-BTLA 8A3 V _K nucleotide sequence
55	anti-BTLA 8A3 V _K amino acid sequence
56	anti-BTLA 19A7 V _H nucleotide sequence
57	anti-BTLA 19A7 V _H amino acid sequence
58	anti-BTLA 19A7 V _K nucleotide sequence
59	anti-BTLA 19A7 V _K amino acid sequence
60	anti-BTLA 20H4 V _H nucleotide sequence
61	anti-BTLA 20H4 V _H amino acid sequence

62	anti-BTLA 20H4 V κ nucleotide sequence
63	anti-BTLA 20H4 V κ amino acid sequence
64	anti-BTLA 15C5 VH nucleotide sequence
65	anti-BTLA 15C5 VH amino acid sequence
66	anti-BTLA 15C5 V κ nucleotide sequence
67	anti-BTLA 15C5 V κ amino acid sequence

REFERENCES

- [00430] Ansari MJ, Salama AD, Chitnis T, Smith RN, Yagita H, Akiba H, *et al.* The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med.* 2003;198:63-9.
- [00431] Compaan DM, Gonzalez LC, Tom I, Loyet KM, Eaton D, Hymowitz SG. Attenuating lymphocyte activity: the crystal structure of the BTLA-HVEM complex. *J Biol Chem.* 2005; 280:39553-61.
- [00432] Deppong C, Juehne TI, Hurchla M, Friend LD, Shah DD, Rose CM, *et al.* Cutting edge: B and T lymphocyte attenuator and programmed death receptor-1 inhibitory receptors are required for termination of acute allergic airway inflammation. *J Immunol.* 2006;176:3909-13.
- [00433] Han P, Goularte OD, Rufner K, Wilkinson B, Kaye J. An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection. *J Immunol.* 2004;172:5931-9.
- [00434] Harrop JA, McDonnell PC, Brigham-Burke M, Lyn SD, Minton J, Tan KB, *et al.* Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth. *J Biol Chem.* 1998; 273:27548-56.
- [00435] Lin SC, Kuo CC, Chan CH. Association of a BTLA gene polymorphism with the risk of rheumatoid arthritis. *J Biomed Sci.* 2006;13:853-60.
- [00436] Oya Y, Watanabe N, Owada T, Oki M, Hirose K, Suto A, *et al.* Development of autoimmune hepatitis-like disease and production of autoantibodies to nuclear antigens in mice lacking B and T lymphocyte attenuator. *Arthritis Rheum.* 2008; 58:2498-510.
- [00437] Presta LG. Engineering antibodies for therapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2002; 3:237-256.

- [00438] Sedy JR, Gavrieli M, Potter KG, Hurchla MA, Lindsley RC, Hildner K, *et al.* B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol.* 2005; 6:90-8.
- [00439] Stebbings R, Findlay L, Edwards C, Eastwood D, Bird C, North D, *et al.* "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. *J Immunol.* 2007; 179:3325-31.
- [00440] Steinberg MW, Turovskaya O, Shaikh RB, Kim G, McCole DF, Pfeffer K, *et al.* A crucial role for HVEM and BTLA in preventing intestinal inflammation. *J Exp Med.* 2008; 205:1463-76.
- [00441] Truong W, Plester JC, Hancock WW, Merani S, Murphy TL, Murphy KM, *et al.* Combined coinhibitory and costimulatory modulation with anti-BTLA and CTLA4Ig facilitates tolerance in murine islet allografts. *Am J Transplant.* 2007; 7:2663-74.
- [00442] Truong W, Hancock WW, Plester JC, Merani S, Rayner DC, Thangavelu G, Murphy KM, *et al.* BTLA targeting modulates lymphocyte phenotype, function, and numbers and attenuates disease in nonobese diabetic mice. *J Leukoc Biol.* 2009.
- [00443] Vendel AC, Calemene-Fenau J, Izrael-Tomasevic A, Chauhan V, Arnott D, Eaton DL. B and T lymphocyte attenuator regulates B cell receptor signaling by targeting Syk and BLNK. *J Immunol.* 2009; 182:1509-17.
- [00444] Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, Yang J, Fallarino F, Loftin SK, *et al.* BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol* 2003; 4:670-9.
- [00445] Derré, L, Rivals, J-P, Jandus, C, Pastor, S., Rimoldi, D, Romero, P., Michielin, O., Olive, D, and Speiser D. BTLA Mediates inhibition of human tumor-specific CD8+ T cells that can be partially reversed by vaccination. *J. Clinl. Invest.* 2010, 120:157-167.

[00446] The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and the accompanying figures. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

[00447] Patents, patent applications, Genbank Accession Numbers and publications are cited throughout this application, the disclosures of which, particularly, including all disclosed chemical structures and antibody amino acid sequences therein, are incorporated herein by

reference. Citation of the above publications or documents is not intended as an admission that any of the foregoing is pertinent prior art, nor does it constitute any admission as to the contents or date of these publications or documents. All references cited herein are incorporated by reference to the same extent as if each individual publication, patent application, or patent, was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

[00448] The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one skilled in the art to practice the invention. Various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated antibody or antigen binding fragment thereof which binds BTLA comprising at least one V_L CDR domain selected from the group consisting of SEQ ID Nos.:12, 13, and 14 and at least one V_H CDR domain selected from the group consisting of SEQ ID Nos.: 5, 6, and 7.
2. An isolated antibody or antigen binding fragment thereof which binds BTLA, comprising at least one V_L CDR domain selected from the group consisting of SEQ ID Nos.:26, 27, 28 and at least one V_H CDR domain selected from the group consisting of SEQ ID Nos.: 19, 20, and 21.
3. An isolated antibody or antigen binding fragment thereof, comprising a heavy chain variable region and a light chain variable region, wherein:
 - (a) the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11 (8D5 heavy chain); and
 - (b) the light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 18 (8D5 light chain).
4. An isolated antibody or antigen binding fragment thereof, comprising:
 - (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:5 (8D5 HCDR1);
 - (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:6 (8D5 HCDR2);
 - (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:7 (8D5 HCDR3);
 - (d) a light chain variable region CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12(8D5 LCDR1);
 - (e) a light chain variable region CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:13 (8D5 LCDR2); and
 - (f) a light chain variable region CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14(8D5 LCDR3);wherein the antibody specifically binds BTLA and does not block binding to HVEM.
5. An isolated antibody or antigen binding fragment thereof, comprising:
 - (a) a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human VH gene (SEQ ID NO:8) [encoding 8D5]; and

(b) a light chain variable region that is the product of or derived from a human VK gene (SEQ ID NO:15) [encoding 8D5]; wherein the antibody specifically binds BTLA.

6. An isolated polypeptide comprising the V_L domains or the V_H domains of any of the antibodies or antigen binding fragments of claims 1-5.
7. An isolated nucleic acid encoding the V_L domains or the V_H domains of any of the antibodies or antigen binding fragments of claims 1-5, or the isolated polypeptide of claim 6.
8. A composition comprising one or more antibodies or antigen binding fragments of any one of claims 1-5, or the isolated polypeptide of claim 6, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.
9. A method of treating a condition caused by decreased expression and/or activity of BTLA in a subject, comprising administering to the subject an effective amount of the composition comprising one or more antibodies or antigen binding fragments of any one of claims 1 or 3-5.
10. A method of treating an inflammatory or autoimmune disorder in a subject comprising administering an effective amount of the agonist antibody or antigen binding fragments of any one of claims 1 or 3-5 to the subject.
11. The method of claim 10, wherein the inflammatory or autoimmune disorder is selected from the group consisting of Crohn's disease, ulcerative colitis, inflammatory bowel disease, inflammatory fibrosis, scleroderma, lung fibrosis, and cirrhosis, rheumatoid arthritis (RA), osteoarthritis, osteoporosis, asthma (including allergic asthma), allergies, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), multiple sclerosis, psoriasis, uveitis, graft versus host disease (GVHD), juvenile early-onset Type I diabetes, transplant rejection, SLE, and Sjögren's syndrome.
12. A method of increasing the immune response in a subject comprising administering an effective amount of a composition comprising the antibody or antigen binding fragment of claim 2 to the subject.
13. An expression vector comprising the isolated nucleic acid of claim 7.
14. A host cell comprising the expression vector of claim 13.

15. A method of producing the antibody or antigen binding fragment thereof, according to any one of claims 1-5 comprising:
- a. culturing the host cell of claim 14 in culture medium under conditions wherein the nucleic acid sequence is expressed, thereby producing a polypeptide comprising the light and heavy chain variable regions; and
 - b. recovering the polypeptides from the host cell or culture medium.

M00238 SEQUENCELISTING.TXT
SEQUENCE LISTING

<110> N.V. ORGANON
MEDAREX, INC.

<120> FULLY HUMAN ANTIBODIES TO BTLA

<130> JB20097017

<140>
<141>

<150> 61/257,612
<151> 2009-11-03

<150> 61/230,332
<151> 2009-07-31

<160> 67

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 870
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
atgaagacat tgcctgccat gcttggaact gggaaattat tttgggtctt cttcttaatc 60
ccatatctgg acatctggaa catccatggg aaagaatcat gtgatgtaca gctttatata 120
aagagacaat ctgaacactc catcttagca ggagatccct ttgaactaga atgccctgtg 180
aaatactgtg ctaacaggcc tcatgtgact tggtgcaagc tcaatggaac aacatgtgta 240
aaacttgaag atagacaaac aagttggaag gaagagaaga acatttcatt tttcattcta 300
cattttgaac caatgcttcc taatgacaat gggtcatacc gctgttctgc aaattttcag 360
tctaattctca ttgaaagcca ctcaacaact ctttatgtga cagatgtaaa aggtgcctca 420
gaacgaccct ccaaggacga agtggaagc agaccctggc tcctgtatag tttacttctc 480
ttgggggggat tgcctctact catcactacc tggttctgcc tgttctgctg cctgagaagg 540
caccaaggaa agcaaaatga actctctgac acagcaggaa gggaaattaa tctggttgat 600
gctcacctta agagcgagca aacagaagca agcaccaggc aaaattccca agtactgcta 660
tcagaagctg gaatttatga taatgaccct gacctttgtt tcaggatgca ggaagggctc 720
gaagtttgtt ctaatccatg cctggaagaa aacaaaccag gcattgttta tgcttcctcg 780
aaccattctg tcattggact gaactcaaga ctggcaagaa atgtaaaaga agcaccaaca 840
gaatatgcat ccatatgtgt gaggagttaa 870

<210> 2
<211> 289
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
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

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

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 Met 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 Gly Ala Ser Glu Arg Pro Ser
130 135 140

Lys Asp Glu Val Ala Ser Arg Pro Trp Leu Leu Tyr Ser Leu Leu Pro
145 150 155 160

Leu Gly Gly Leu Pro Leu Leu Ile Thr Thr Trp 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 Ala 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 Cys 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 Leu 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> 3

<211> 921

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

atgaagacag tgcctgccat gcttgggact cctcggttat ttagggaatt cttcatcctc 60

catctgggccc tctggagcat cctttgtgag aaagctacta agaggaatga tgaagagtgt 120

gaagtgaac ttaatattaa gaggaattcc aaacactctg cctggacagg agagttattt 180

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

```

aaaattgaat gtcctgtgaa atactgtgtt catagaccta atgtgacttg gtgtaagcac      240
aatggaacaa tctgggtacc ccttgaagtt ggtcctcagc tataactag ttgggaagaa      300
aatcgatcag ttccggtttt tgttctccat tttaaaccac tacatctcag tgataacggg      360
tcgtatagct gttctacaaa cttcaattct caagttatta atagccattc agtaaccatc      420
catgtgagag aaaggactca aaactcttca gaacacccac taataacagt atctgacatc      480
ccagatgcca ccaatgcctc aggaccatcc accatggaag agaggccagg caggacttgg      540
ctgctttaca ccttgcttcc tttgggggca ttgcttctgc tccttgcttg tgtctgcctg      600
ctctgctttc tgaaaaggat ccaagggaaa gaaaagaagc cttctgactt ggcaggaagg      660
gacactaacc tggttgatat tccagccagt tccaggacaa atcaccaagc actgccatca      720
ggaactggaa tttatgataa tgatccctgg tctagcatgc aggatgaatc tgaattgaca      780
attagcttgc aatcagagag aaacaaccag ggcattgttt atgcttcttt gaaccattgt      840
gttattggaa ggaatccaag acaggaaaac aacatgcagg aggcacccac agaatatgca      900
tccatttgtg tgagaagtta a                                              921

```

```

<210> 4
<211> 306
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<400> 4
Met Lys Thr Val Pro Ala Met Leu Gly Thr Pro Arg Leu Phe Arg Glu
1          5          10          15

```

```

Phe Phe Ile Leu His Leu Gly Leu Trp Ser Ile Leu Cys Glu Lys Ala
          20          25          30

```

```

Thr Lys Arg Asn Asp Glu Glu Cys Glu Val Gln Leu Asn Ile Lys Arg
          35          40          45

```

```

Asn Ser Lys His Ser Ala Trp Thr Gly Glu Leu Phe Lys Ile Glu Cys
          50          55          60

```

```

Pro Val Lys Tyr Cys Val His Arg Pro Asn Val Thr Trp Cys Lys His
65          70          75          80

```

```

Asn Gly Thr Ile Trp Val Pro Leu Glu Val Gly Pro Gln Leu Tyr Thr
          85          90          95

```

```

Ser Trp Glu Glu Asn Arg Ser Val Pro Val Phe Val Leu His Phe Lys
          100          105          110

```

```

Pro Ile His Leu Ser Asp Asn Gly Ser Tyr Ser Cys Ser Thr Asn Phe
          115          120          125

```

```

Asn Ser Gln Val Ile Asn Ser His Ser Val Thr Ile His Val Arg Glu
          130          135          140

```

```

Arg Thr Gln Asn Ser Ser Glu His Pro Leu Ile Thr Val Ser Asp Ile
          145          150          155          160

```

```

Pro Asp Ala Thr Asn Ala Ser Gly Pro Ser Thr Met Glu Glu Arg Pro
          165          170          175

```

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

Gly Arg Thr Trp Leu Leu Tyr Thr Leu Leu Pro Leu Gly Ala Leu Leu
180 185 190

Leu Leu Leu Ala Cys Val Cys Leu Leu Cys Phe Leu Lys Arg Ile Gln
195 200 205

Gly Lys Glu Lys Lys Pro Ser Asp Leu Ala Gly Arg Asp Thr Asn Leu
210 215 220

Val Asp Ile Pro Ala Ser Ser Arg Thr Asn His Gln Ala Leu Pro Ser
225 230 235 240

Gly Thr Gly Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Trp Ser Ser Met Gln Asp Glu
245 250 255

Ser Glu Leu Thr Ile Ser Leu Gln Ser Glu Arg Asn Asn Gln Gly Ile
260 265 270

Val Tyr Ala Ser Leu Asn His Cys Val Ile Gly Arg Asn Pro Arg Gln
275 280 285

Glu Asn Asn Met Gln Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val
290 295 300

Arg Ser
305

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Ser Tyr Asp Met His
1 5

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Val Ile Gly Pro Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 7
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Glu Gly Met Ala Ala His Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 8
<211> 420
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
atggagttgg ggctgagctg ggttttcctt gttgctatat tagaaggtgt ccagtgtgag

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagccgg gggggtcctt gagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac catcagtagt tacgacatgc actgggtccg ccaagcaaca 180
 ggaaaaggtc tggagtgggt ctgagttatt ggtcctgctg gtgacacata ctatccaggc 240
 tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gaaaatgcca agaactcctt gtatcttcaa 300
 atgaacagcc tgagagccgg ggacacggct gtgtattact gtgcaagaga ggggatggct 360
 gccacaact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctctca 420

<210> 9
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile
 35 40 45

Ser Ser Tyr Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Pro Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly
 65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser
 85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Met Ala Ala His Asn Tyr Tyr Gly Met Asp
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 10
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccatcagt agttacgaca tgcactgggt ccgccaagca 120
 acaggaaaag gtctggagtg ggtctcagtt attggtcctg ctggtgacac atactatcca 180
 ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaagaactc cttgtatctt 240
 caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag agaggggatg 300
 gctgcccaca actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

<210> 11
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Gly Pro Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Gly Met Ala Ala His Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 15
<211> 384
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
atggaagccc cagctcagct tctcttcttc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	120
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct	180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcccccgat caccttcggc	360
caagggacac gactggagat taaa	384

<210> 16
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Asn Trp Pro Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 17
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcccccgat caccttcggc	300
caagggacac gactggagat taaa	324

<210> 18
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 His Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Glu Trp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Glu Met Asp Val
 1 5 10

<210> 22
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 atgaaacatc tgtggttctt ctttctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
 gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct atccctcacc 120
 tgcactgtcc atggtggctc catcaatcat tactactgga gctggatccg gcagccccc 180
 gggaagggac tggaatggat tggatatatc tattacagtg ggagcaccaa gtacaatccc 240
 tccctcaaga gtcgcgtcag catatcagta gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaag 300
 ctgacctctg tgaccgctgc ggacacggcc gtgtattatt gtgcgagaga gtggccctac 360

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

tattactacg aaatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 414

<210> 23
<211> 138
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val His Gly Gly Ser Ile
35 40 45

Asn His Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Ser Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Glu Trp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Glu Met Asp Val Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 24
<211> 357
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 24
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctatccctc 60
acctgcactg tccatggtgg ctccatcaat cattactact ggagctggat ccggcagccc 120
ccaggaagg gactggaatg gattggatat atctattaca gtgggagcac caagtacaat 180
ccctccctca agatgcgct cagcatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgacct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt attgtgagag agagtggccc 300
tactattact acgaaatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctctctca 357

<210> 25
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val His Gly Gly Ser Ile Asn His Tyr
20 25 30

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Ser Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Trp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Glu Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe Arg Thr
1 5

<210> 29
<211> 384
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 29
atggaaaccc cagcgagct tctcttctc ctgtactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gttcatttcg gacgttcggc 360
caagggacca aggtggaaat caaa 384

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

<210> 30
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Gly Ser Ser Phe Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 31
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 31
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gttcatttcg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 32
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe
85 90 95

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 33
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 33
gcctgagttc cacgacaccg tc 22

<210> 34
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 34
gcaggcacac aacagaggca gttccagatt tc 32

<210> 35
<211> 289
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35
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

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

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 Ser 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 Leu 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> 36
 <211> 870
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 atgaagacat tgcctgccat gcttggaaact gggaaattat tttgggtcctt cttcttaatc 60
 ccatactctgg acatctggaa catccatggg aaagaatcat gtgatgtaca gctttatata 120
 aagagacaat ctgaacactc catcttagca ggagatccct ttgaactaga atgccctgtg 180
 aaatactgtg ctaacaggcc tcatgtgact tgggtgcaagc tcaatggaac aacatgtgta 240
 aaacttgaag atagacaaac aagttggaag gaagagaaga acatttcatt tttcattcta 300
 cattttgaac cagtgccttc taatgacaat gggtcatacc gctgttctgc aaattttcag 360
 tctaattctca ttgaaagcca ctcaacaact ctttatgtga cagatgtaaa aagtgcctca 420
 gaacgaccct ccaaggacga aatggcaagc agaccctggc tcctgtatag tttacttcct 480
 ttgggggggat tgcctctact catcactacc tgtttctgcc tgttctgctg cctgagaagg 540
 caccaaggaa agcaaaatga actctctgac acagcaggaa gggaaattaa cctggttgat 600

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

gctcacctta agagttagca aacagaagca agcaccaggc aaaattccca agtactgcta 660
tcagaaactg gaatttatga taatgaccct gacctttgtt tcaggatgca ggaagggctt 720
gaagtttatt ctaatccatg cctggaagaa aacaaaccag gcattgttta tgcttccttg 780
aaccattctg tcattggact gaactcaaga ctggcaagaa atgtaaaaga agcaccaaca 840
gaatatgcat ccatatgtgt gaggagttaa 870

<210> 37
<211> 289
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37
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 Ser 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

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

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> 38
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> /replace="Lys" or "Leu" or "Ala" or "Phe"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> /note="Residue given in the sequence has no preference
 with respect to those in the annotations for said position"

<400> 38
 Ser Tyr Asp Met His
 1 5

<210> 39
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (3)..(3)
 <223> /replace="Lys" or "Leu" or "Ala" or "Phe"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> /note="Residue given in the sequence has no preference
 with respect to those in the annotations for said position"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(7)
 <223> /replace="Gln" or "Ala"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> /note="Residue given in the sequence has no preference
 with respect to those in the annotations for said position"

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (11)..(11)
 <223> /replace="Lys" or "Leu" or "Ala" or "Phe"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> /note="Residue given in the sequence has no preference
 with respect to those in the annotations for said position"

<400> 39
 Glu Gly Met Ala Ala His Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 40
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> /replace="Ala"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> /note="Residue given in the sequence has no preference
 with respect to that in the annotation for said position"

<400> 40
 Asp Ala Ser Gln Arg Ala Thr
 1 5

<210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> /replace="Ala"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> /note="Residue given in the sequence has no preference
 with respect to that in the annotation for said position"

<400> 41
 Gln Gln Arg Ser Gln Trp Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

<210> 42
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

```

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

<220>
<221> VARIANT
<222> (11)..(11)
<223> /replace="Gln" or "Ala"

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
      with respect to those in the annotations for said position"

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> /replace="Ala"

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
      with respect to that in the annotation for said position"

<400> 42
Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1           5           10           15

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

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

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> /replace="Lys" or "Leu" or "Ala" or "Phe"

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
      with respect to those in the annotations for said position"

<400> 43
Glu Trp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Glu Met Asp Val
1           5           10

<210> 44
<211> 441
<212> DNA
<213> Artificial sequence

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

<400> 44
atggacatac tttgttccac gctcctgcta ctgactgtcc cgtcctgggt cttatcccag      60
gtcaccttga gggagtctgg tcctgcgctg gtgaaaccca cacagaccct cacactgacc      120
tgcaccttct ctgggttctc actcagcact agtggaatgg gtgtgagctg gatccgtcag      180

```

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

ccccagggga aggccctgga gtggcttgca gtcattgatt gggatggtac taaagactac	240
agcacatctc tgaagaccag gctcaccatc tccaaggaca cctccaaaaa ccaggtggtc	300
cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc acggatccgt	360
attaatgtgg ttcggggagt tattatcaac tactatggta tggacgtctg gggccaaggg	420
accacggtca ccgtctctc a	441

<210> 45
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 45
 Met Asp Ile Leu Cys Ser Thr Leu Leu Leu Leu Thr Val Pro Ser Trp
 1 5 10 15

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

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Leu Glu Trp Leu Ala Val Ile Asp Trp Asp Gly Thr Lys Asp Tyr
 65 70 75 80

Ser Thr Ser Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
 100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Arg Ile Asn Val Val Arg Gly Val Ile
 115 120 125

Ile Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 130 135 140

Val Ser Ser
 145

<210> 46
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 46
 atggaaaccc cagcgcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca	240
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	300
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta ggtcacccgc gtacactttt	360
ggccagggga ccaagctgga gatcaaa	387

<210> 47
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 47
 Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110

Gly Arg Ser Pro Ala Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

Lys

<210> 48
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

atggaagccc cagctcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga	60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct	180

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccattcac tttcggccct 360
gggaccaaag tggatatcaa a 381

<210> 49
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

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

<400> 49
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Asn Trp Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
115 120 125

<210> 50
<211> 384
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 50
atggaaaccc cagcgagct tctcttctc ctgtactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gatgcatcca acagggccac tggcatccca 240
gccaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagcctagag 300
cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcag cagcgtagca actggccatt cactttcggc 360

cctgggacca aagtggatat caaa 384

<210> 51
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

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

<400> 51
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
100 105 110

Ser Asn Trp Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
115 120 125

<210> 52
<211> 432
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 52
atggagtttg tgctgagctg ggttttcctt gttgctatat taaaaggtgt ccagtgtgag 60
gttcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg gggggtcct gagactctcc 120
tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatgctatgc actgggttcg ccaggctcca 180
ggaaaaggtc tggagtgggt ttcagttatt ggtactggtg ttgccacata ctatgcagac 240
tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca agaactcctt gtttcttcat 300
atgaacagcc tgagagccga ggacatggct gtgtattact gtgcaagagg cttttactat 360
ggttcgggga ctaattatta caaccgcggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 420
accgtctcct ca 432

<210> 53
<211> 144

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

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

<400> 53
Met Glu Phe Val Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Thr Gly Val Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
85 90 95

Leu Phe Leu His Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Tyr Asn
115 120 125

Arg Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 54
<211> 384
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 54
atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccgta cacttttggc 360
caggggacca agctggagat caaa 384

<210> 55
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

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

<400> 55
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Gly Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 56
<211> 441
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 56
atggacatac tttgttccac gtcctgcta ctgactgtcc cgtcctgggt cttatcccag 60
gtcaccttga gggagtctgg tcctgcgctg gtgaaacca cacagaccct cacactgacc 120
tgcaccttct ctgggggtctc actcagcact agtggaatgt gtgtgagctg gatccgtcag 180
ccccaggga aggccctgga gtggcttgca gtcattgatt gggatgatga taaatactac 240
aacacatctc tgaagaccag gtcaccatc tccaaggaca cctccaaaaa ccagggtggtc 300
cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc acggctacgt 360
attactgtgg ttcggggagt tattataacc tactacggtc tggacgtctg gggccaaggg 420
accacggtca ccgtctcctc a 441

<210> 57
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

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

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

<400> 57
Met Asp Ile Leu Cys Ser Thr Leu Leu Leu Leu Thr Val Pro Ser Trp
1 5 10 15

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

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Val Ser Leu
35 40 45

Ser Thr Ser Gly Met Cys Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Leu Glu Trp Leu Ala Val Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
65 70 75 80

Asn Thr Ser Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
85 90 95

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Arg Ile Thr Val Val Arg Gly Val Ile
115 120 125

Ile Thr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
130 135 140

Val Ser Ser
145

<210> 58
<211> 381
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 58
atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgtactctt ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta ggtcactcac tttcggccct 360
gggaccaaag tggatatcaa a 381

<210> 59
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

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

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

<400> 59
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Gly Arg Ser Leu Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
115 120 125

<210> 60
<211> 432
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 60
atggagtttg tgctgagctg ggttttcctt gttgctatat taaaaggtgt ccagtgtgag 60
gttcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg gggggtcctt gagactctcc 120
tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatgctatgc actgggttcg ccagggtcca 180
ggaaaaggtc tggagtgggt atcagttatt ggtcctggtg gtggcacata ctatgcagac 240
tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca agaactcctt gtatcttcaa 300
atgaacagcc tgagagccga ggacatggct gtgtatttct gtgcaagagg ctattactat 360
ggttcgggga atttttttaa gaattacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 420
accgtctcct ca 432

<210> 61
<211> 144
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

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

<400> 61
Met Glu Phe Val Leu Ser Trp val Phe Leu val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Pro Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr
100 105 110

Phe Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Phe Phe Lys Asn
115 120 125

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 62
<211> 384
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 62
atggaaaccc cagcgagct tctcttctc ctgtactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gccggggccac tggcatccca 240
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatggtg gctcaccgta cacttttggc 360
caggggacca agctgcagat caaa 384

<210> 63
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

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

<400> 63
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Gly Gly Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys
115 120 125

<210> 64
<211> 438
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 64	
atggagtttg ggctgaactg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc	120
tgtgaagcgt ctggattcac cttcaataac tatgacatga actgggtccg ccaggctcca	180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggaatgatg gaagtaataa atactttgca	240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agaggttttt	360
actatggttc ggggaattat tataacctac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc	420
acggtcaccg tctcctca	438

<210> 65
<211> 146
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

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

<400> 65	
Met Glu Phe Gly Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly	
1 5 10 15	
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln	
20 25 30	
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
35 40 45	

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

Asn Asn Tyr Asp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Phe Thr Met Val Arg Gly Ile Ile Ile
115 120 125

Thr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
130 135 140

Ser Ser
145

<210> 66
<211> 384
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 66
atggaaaccc cagcgcagct tctcttcttc ctgtactctt ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtt tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gatttacttc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta ggtcaatcat caccttcggc 360
caagggacac gactggagat taaa 384

<210> 67
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

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

<400> 67
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Phe Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

M00238 SEQUENCELISTING.TXT

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Gly Arg Ser Ile Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
115 120 125

FIGURE 1A

Anti- BTLA 8D5 VH

V segment: 3-13
D segment: ND
J segment: JH6b

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L
1 GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCG GGG GGG TCC CTG

CDR1
~~~~~  
R L S C A A S G F T I S S Y D M H W  
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC ATC AGT AGT TAC GAC ATG CAC TGG

CDR2  
~~~~~  
V R Q A T G K G L E W V S V I G P A
109 GTC CGC CAA GCA ACA GGA AAA GGT CTG GAG TGG GTC TCA GTT ATT GGT CCT GCT

CDR2
~~~~~  
G D T Y Y P G S V K G R F T I S R E  
163 GGT GAC ACA TAC TAT CCA GGC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAA

N A K N S L Y L Q M N S L R A G D T  
217 AAT GCC AAG AAC TCC TTG TAT CTT CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GGG GAC ACG

CDR3  
~~~~~  
A V Y Y C A R E G M A A H N Y Y G M
271 GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGA GAG GGG ATG GCT GCC CAC AAC TAC TAC GGT ATG

CDR3
~~~~~  
D V W G Q G T T V T V S S  
325 GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA



FIGURE 1B

Anti- BTLA 8D5 VK

V segment: L6  
J segment: JK5

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1  GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
 A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

 CDR2
                                ~~~~~
      Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A   S   N   R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      ~~~~~
 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

 CDR3
                                ~~~~~
      L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q   Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      ~~~~~
 R S N W P P I T F G Q G T R L E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCC CCG ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA
```

**FIGURE 1C**

**Sequence features of the heavy and light chain variable regions of Hu 8D5 BTLA mAb.**

|                                                         |                                    |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------|
| <b>N-X-S/T</b><br><b>(N-glycosylation potential)</b>    | No                                 |
| <b>N-G sequence</b><br><b>(deamidation potential)</b>   | No                                 |
| <b>D-P sequence</b><br><b>(hydrolysis potential)</b>    | No                                 |
| <b>D-G sequence</b><br><b>(isomerization potential)</b> | No                                 |
| <b>M in CDRs</b><br><b>(oxidation potential)</b>        | VH CDR1 (germline)<br>2 in VH CDR3 |
| <b>Unpaired C residue</b>                               | No                                 |

**FIGURE 2A**  
**Anti-BTLA antagonist 4C7 VH Sequences**

V segment: 4-59  
D segment: ND  
J segment: JH6b

Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L  
1 CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC CTA

CDR1  
S L T C T V H G G S I N H Y Y W S W  
55 TCC CTC ACC TGC ACC GTC CAT GGT GGC TCC ATC AAT CAT TAC TAC TGG AGC TGG

CDR2  
I R Q P P G K G L E W I G Y I Y Y S  
109 ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAA TGG ATT GGA TAT ATC TAT TAC AGT

CDR2  
G S T K Y N P S L K S R V S I S V D  
163 GGG AGC ACC AAG TAC AAT CCC TCC CTC AAG AGT CGC GTC AGC ATA TCA GTA GAC

T S K N Q F S L K L T S V T A A D T  
217 ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG ACC TCT GTG ACC GCT GCG GAC ACG

CDR3  
A V Y Y C A R E W P Y Y Y Y E M D V  
271 GCC GTG TAT TAT TGT GCG AGA GAG TGG CCC TAC TAT TAC TAC GAA ATG GAC GTC

W G Q G T T V T V S S  
325 TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

FIGURE 2B  
Anti-BTLA 4C7 VK

V segment: A27  
J segment: JK1

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R  
1 GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W  
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

CDR2

Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S  
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

CDR2

R A T G I P D R F S G S G S G T D F  
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

CDR3

T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q  
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

CDR3

Q Y G S S F R T F G Q G T K V E I K  
271 CAG TAT GGT AGT TCA TTT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

**FIGURE 2C**

**Sequence features of the heavy and light chain variable regions of Hu 4C7 BTLA mAb.**

|                                                         |                                   |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>N-X-S/T</b><br><b>(N-glycosylation potential)</b>    | No                                |
| <b>N-G sequence</b><br><b>(deamidation potential)</b>   | No                                |
| <b>D-P sequence</b><br><b>(hydrolysis potential)</b>    | No                                |
| <b>D-G sequence</b><br><b>(isomerization potential)</b> | No                                |
| <b>M in CDRs</b><br><b>(oxidation potential)</b>        | One in VH CDR3 (germline encoded) |
| <b>Unpaired C residue</b>                               | No                                |
| <b>Comments</b>                                         | VK no framework changes           |

FIGURES 3A-B

FIGURE 3A

8D5 binds human BTLA expressed on CHO cells

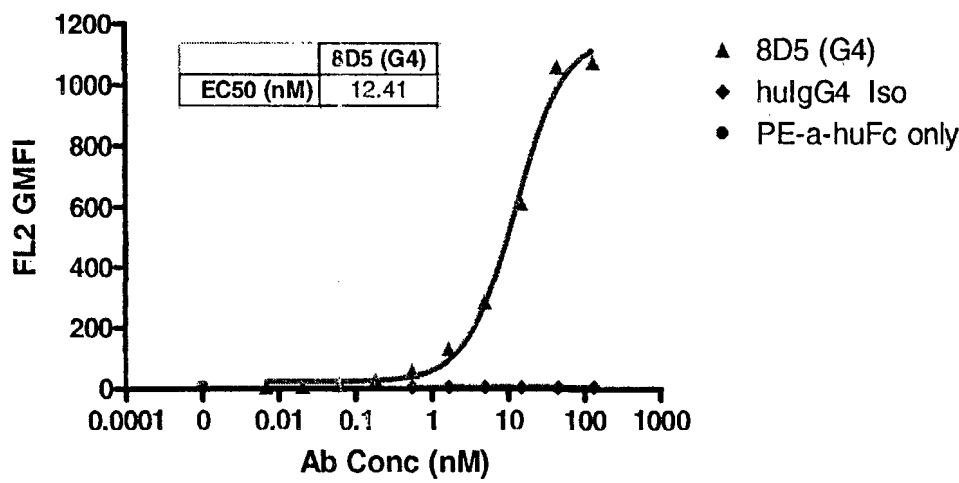
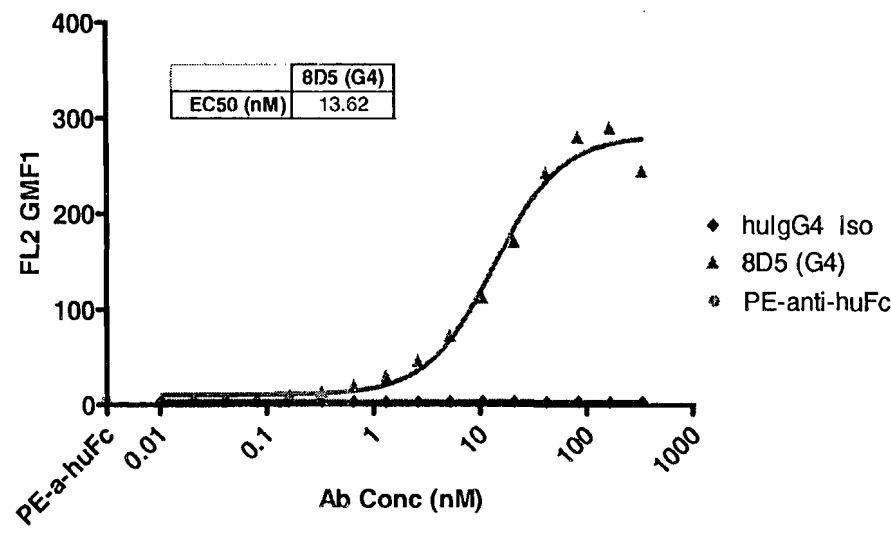


FIGURE 3B

8D5 binds cynomolgus BTLA expressed on CHO cells



FIGURES 3C-D

FIGURE 3C

4C7 binds human BTLA expressed on CHO cells

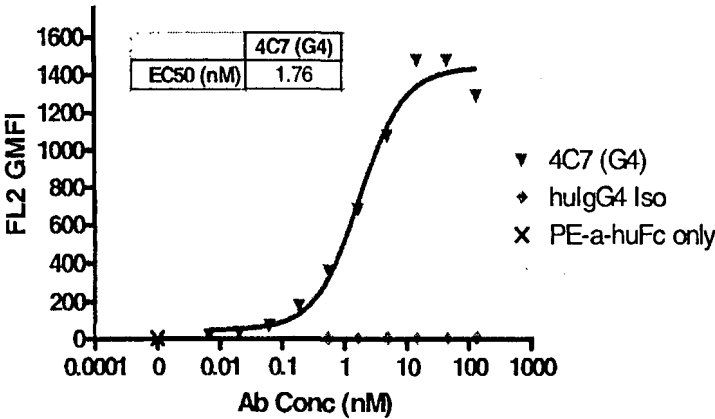
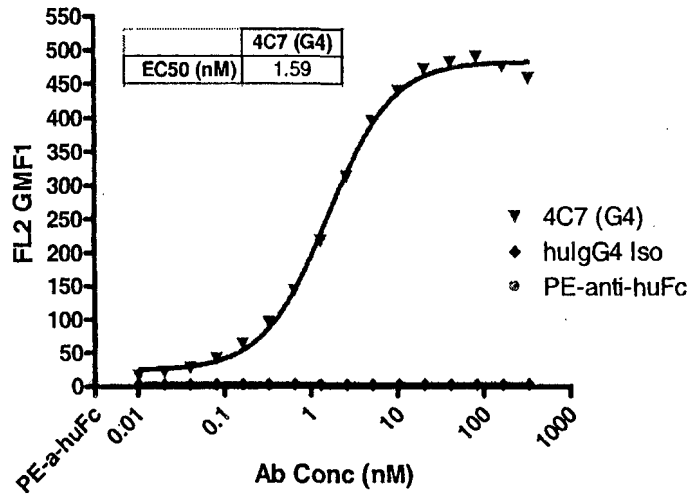


FIGURE 3D

4C7 binds cynomolgus BTLA expressed on CHO cells



FIGURES 4A-B

FIGURE 4A

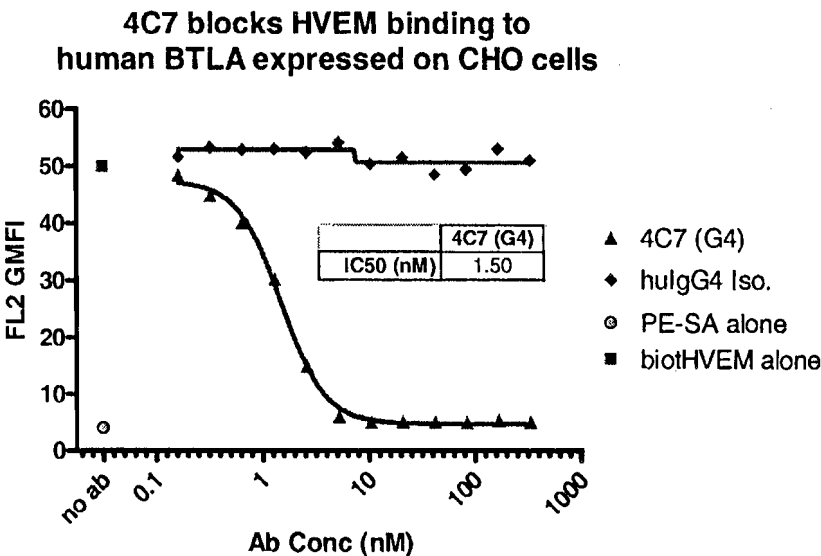


FIGURE 4B

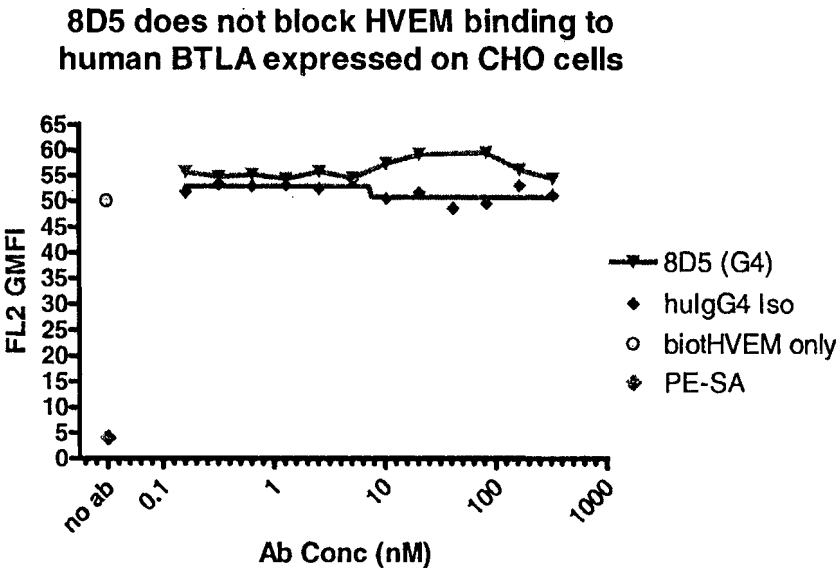
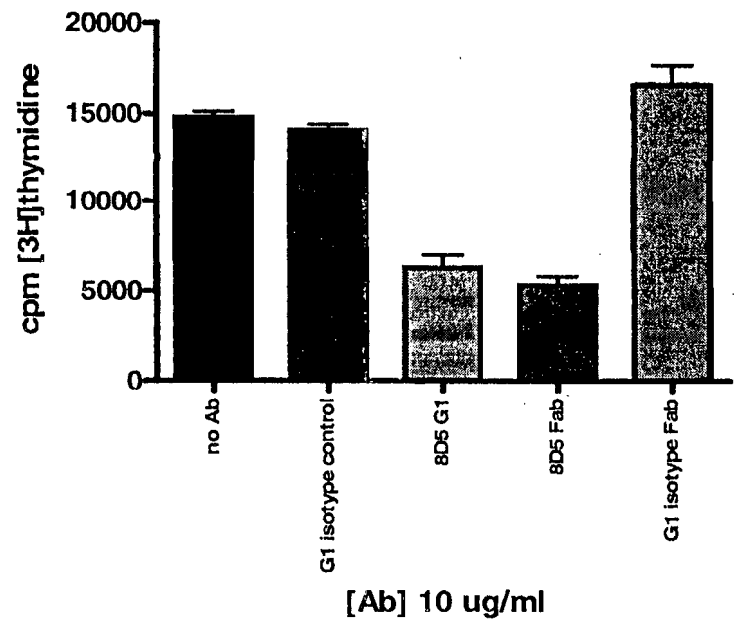


FIGURE 5



FIGURES 6A-B

FIGURE 6A

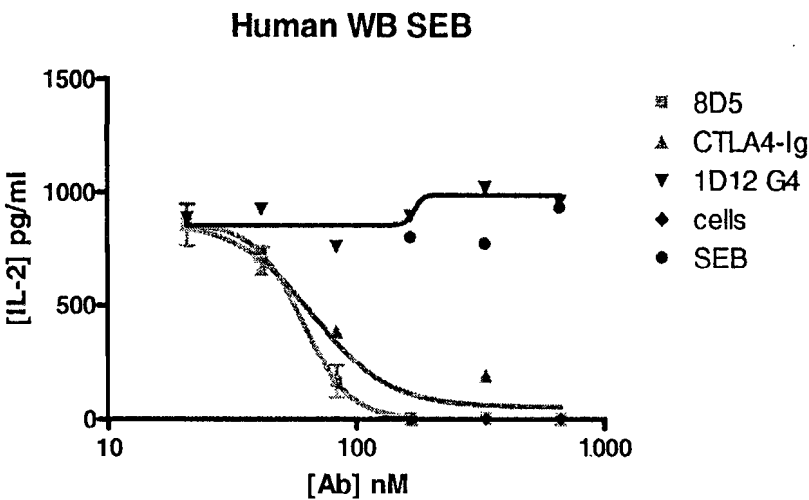


FIGURE 6B

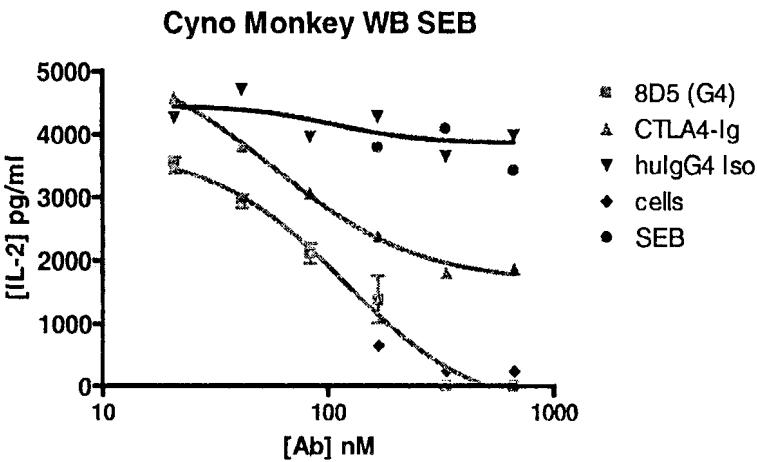


FIGURE 6C

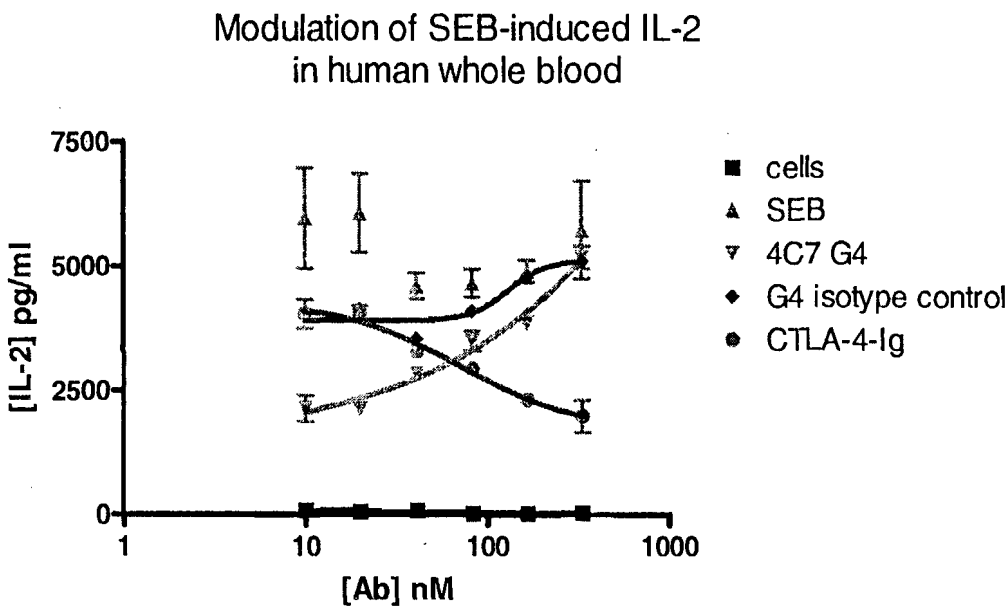
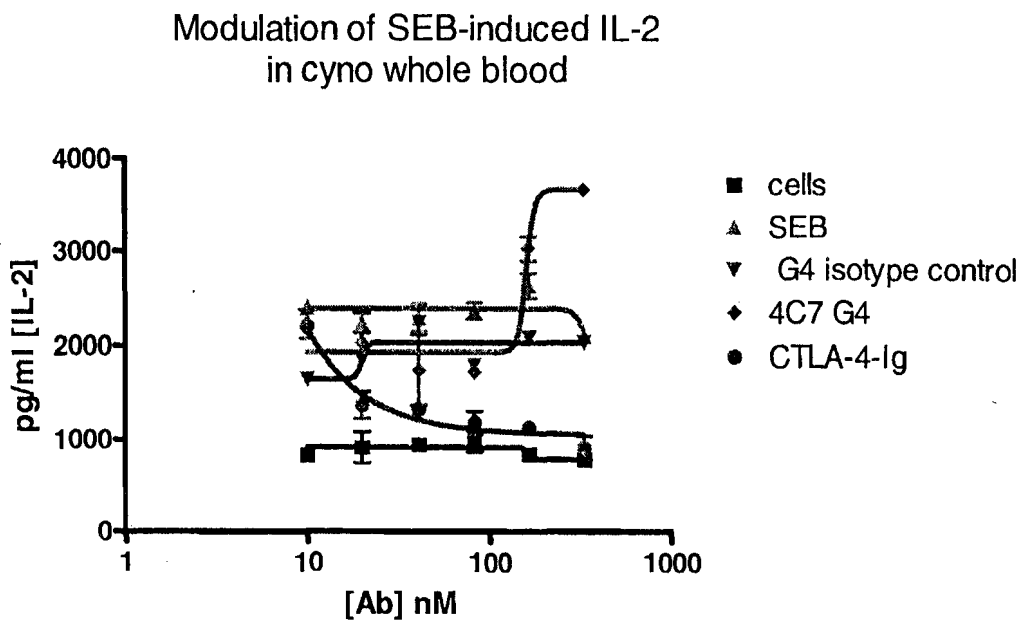


FIGURE 6D



FIGURES 7A-B

FIGURE 7A

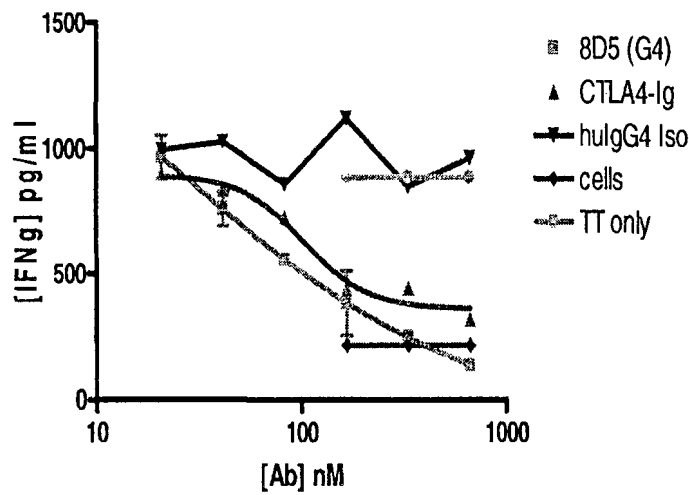
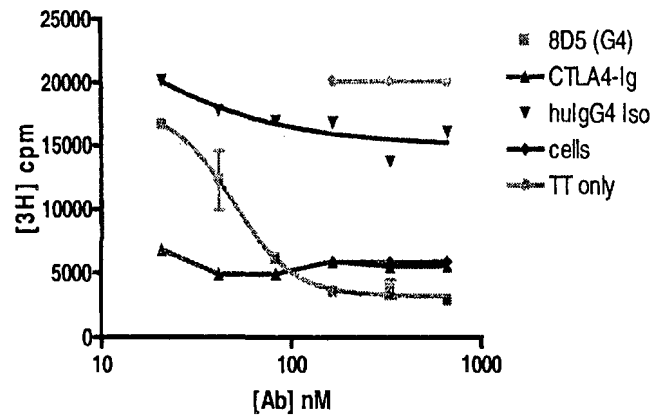


FIGURE 7B



FIGURES 8A-B

FIGURE 8A

Modulation of TT-induced IFN  $\gamma$  response

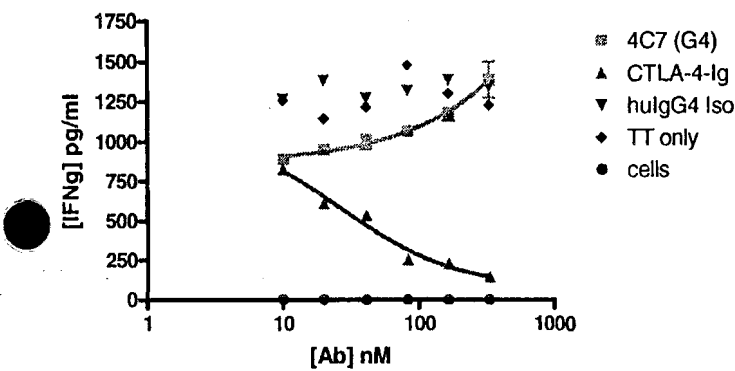


FIGURE 8B

Modulation of TT-induced proliferative response

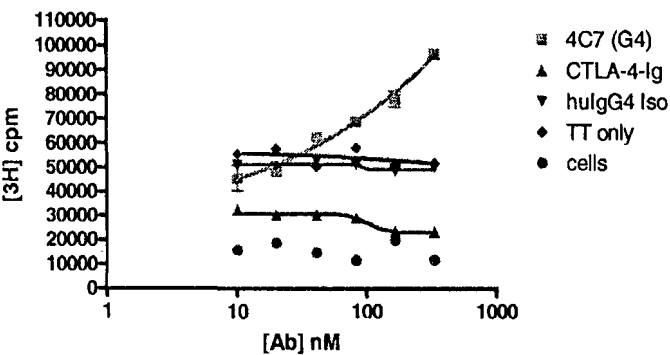
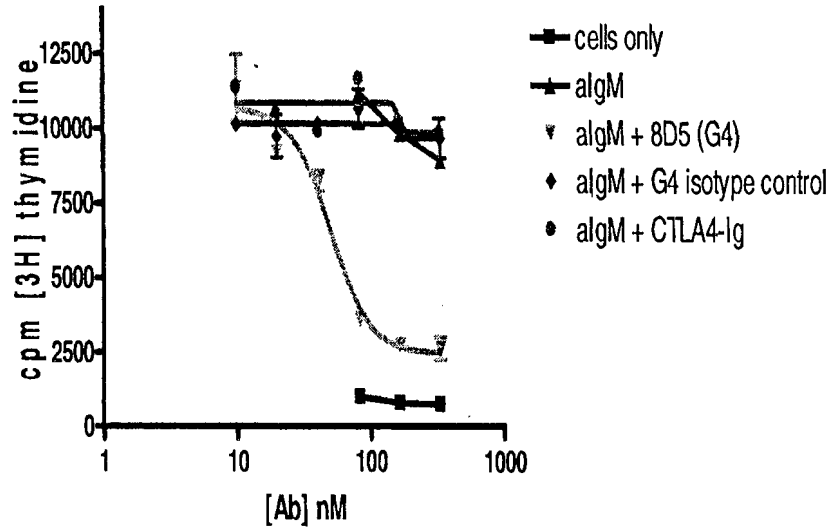


FIGURE 9

Human B Cell function is Inhibited by hu Mab8D5



FIGURES 10A-B

FIGURE 10A

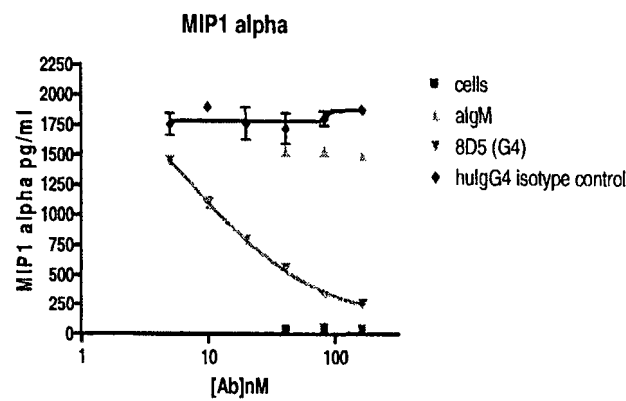


FIGURE 10B

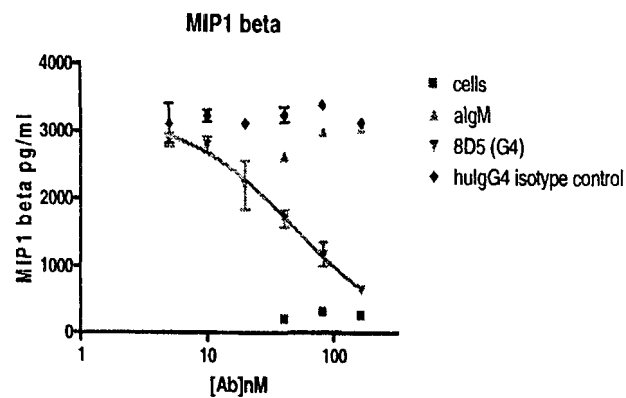


FIGURE 11

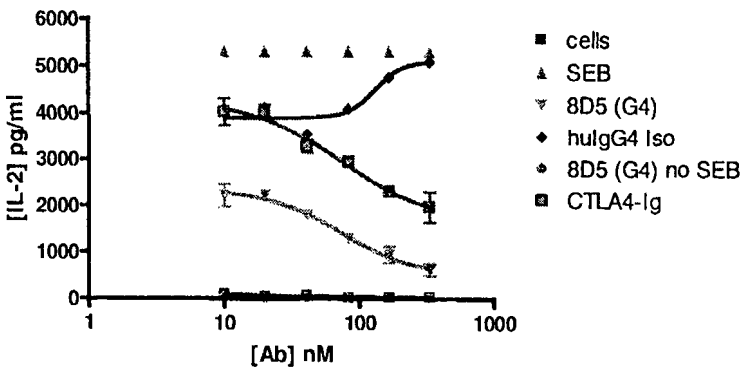
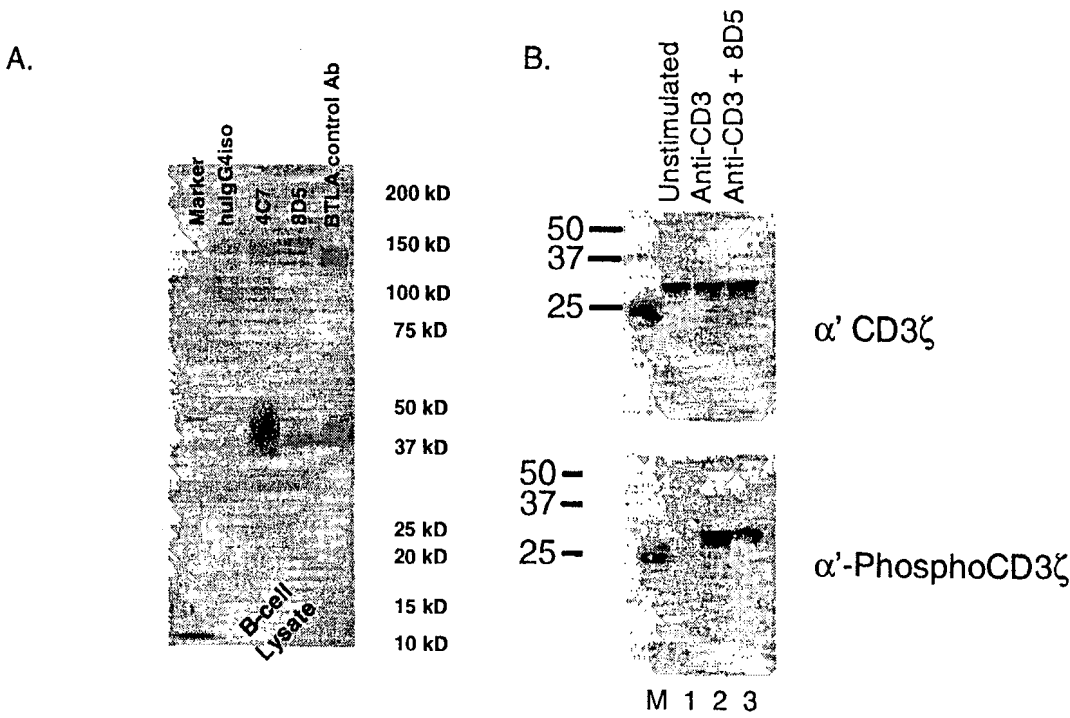


FIGURE 12A-B



FIGURES 13A-B

FIGURE 13A

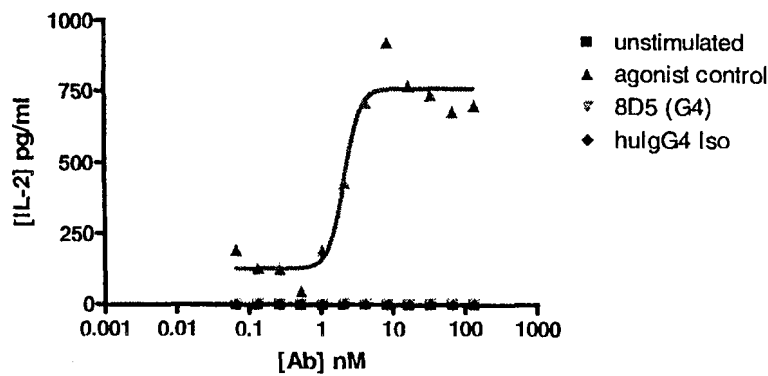


FIGURE 13B

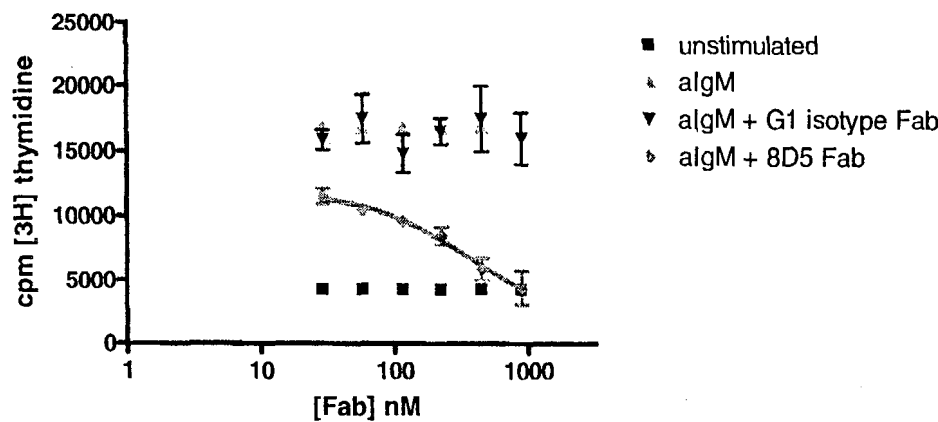


FIGURE 14A

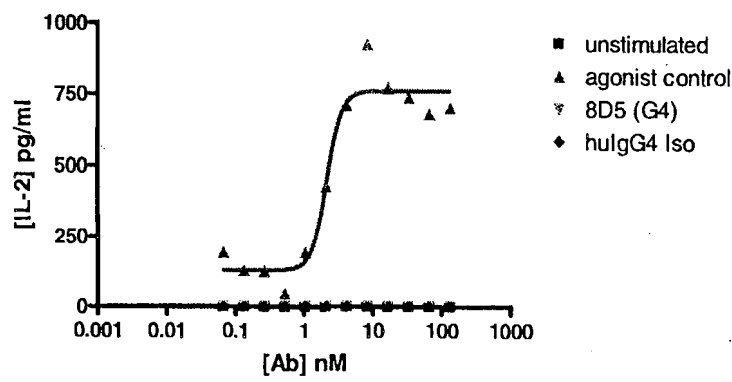


FIGURE 14B  
IL-2

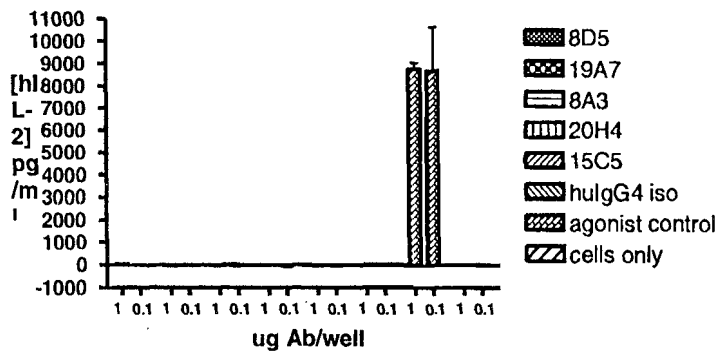


FIGURE 14C  
TNF $\alpha$

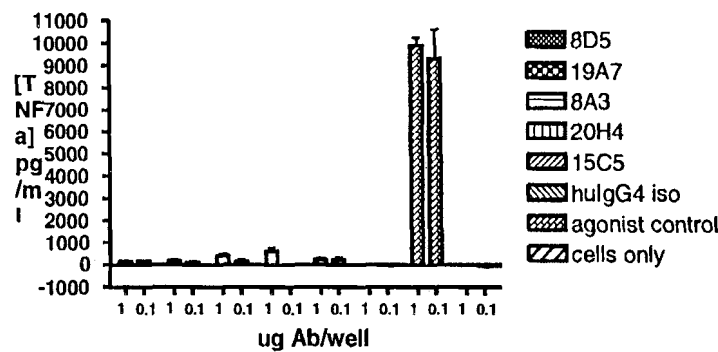


FIGURE 14D  
IFN $\gamma$

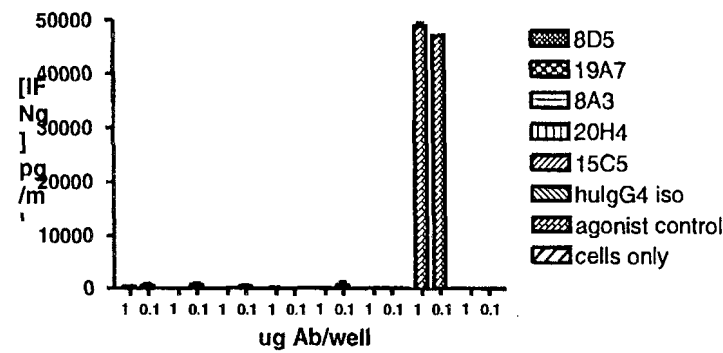


FIGURE 15

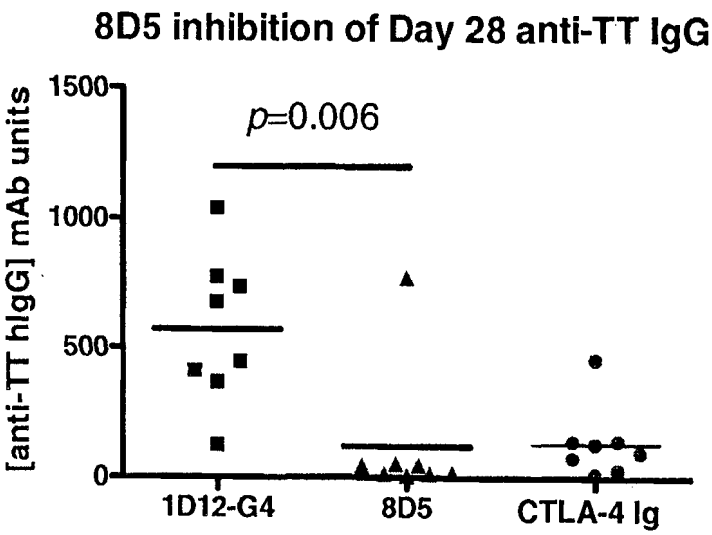
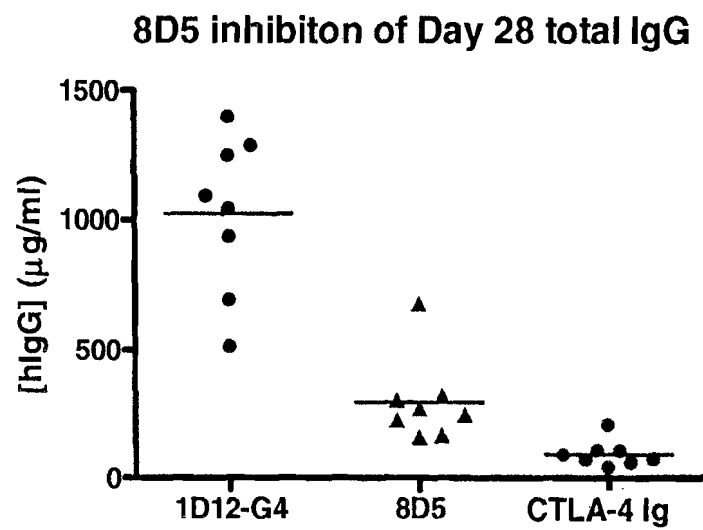
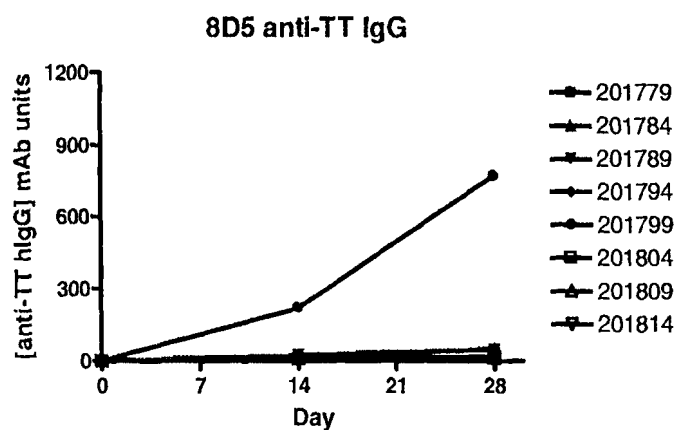


FIGURE 16

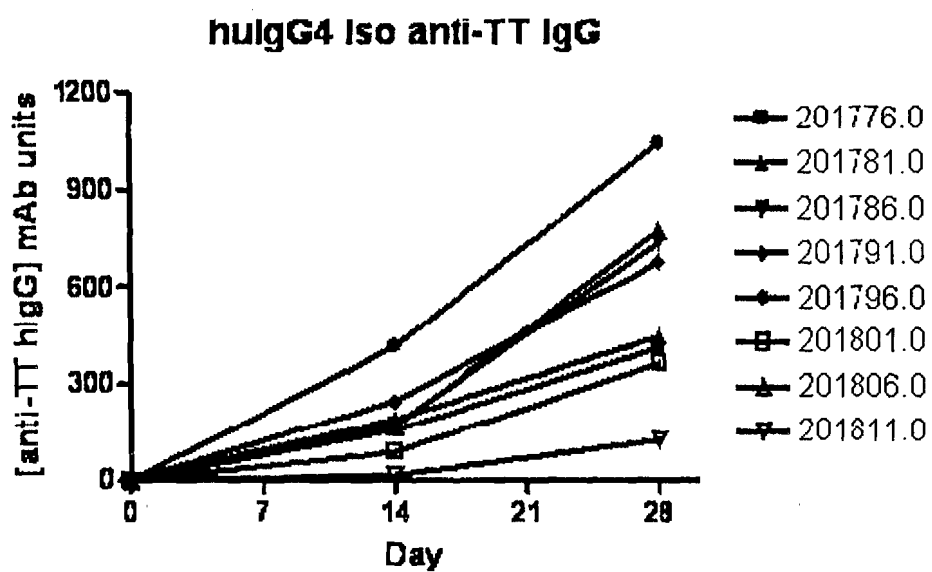


**FIGURES 17A-B**

FIGURE 17A



**FIGURE 17B**



FIGURES 18A-B

FIGURE 18A

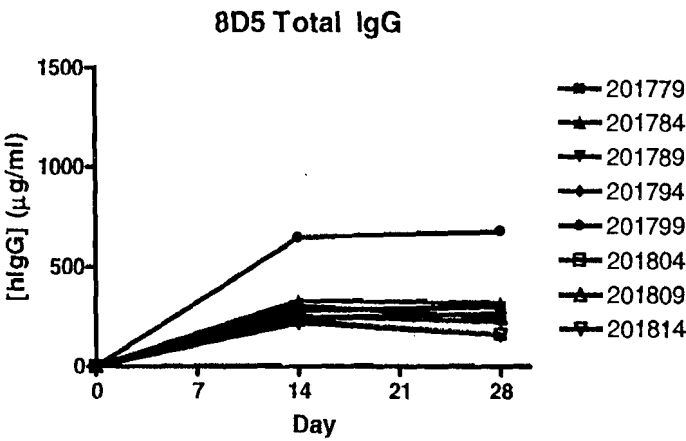
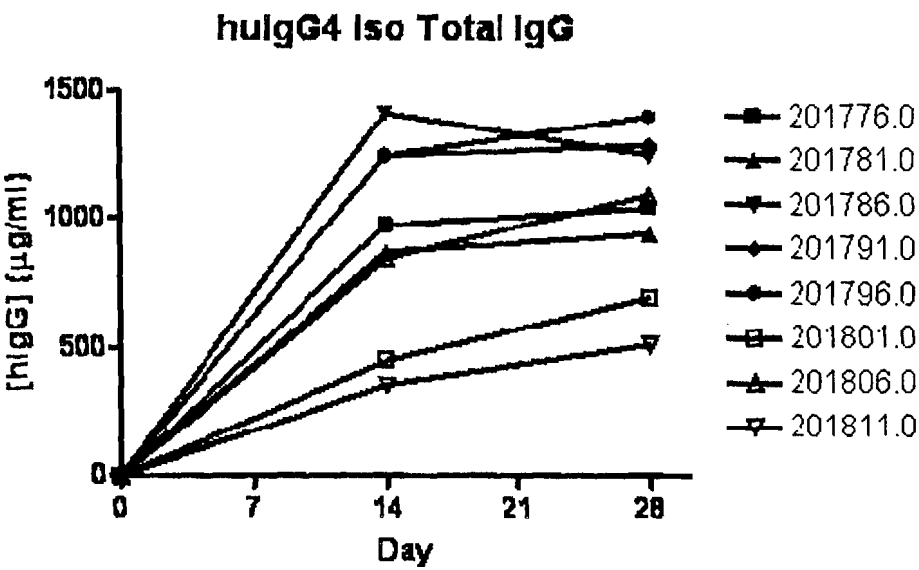


FIGURE 18B



**ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS PARA BTLA**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Nro. 61/230.332, presentada el 31 de julio de 2009, y de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Nro. 61/257.612, presentada el 3 de noviembre de 2009, cada una de las cuales se incorpora en la presente solicitud a modo de referencia, en su totalidad.

**CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere, en general, a anticuerpos o fragmentos de unión de antígeno que se unen a BTLA, y a sus usos. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos completamente humanos que reconocen BTLA humano y modulan su actividad, en particular, en trastornos inflamatorios, autoinmunitarios y proliferativos.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El sistema inmunitario funciona para proteger a los individuos contra agentes infecciosos, por ejemplo, bacterias, organismos multicelulares y virus, al igual que contra el cáncer. Este sistema incluye varios tipos de células linfoides y mieloides, tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas (DC, según su sigla en inglés), eosinófilos, células T, células B y neutrófilos. Estas células linfoides y mieloides a menudo producen proteínas de señalización conocidas como citoquinas. La respuesta inmunitaria comprende la inflamación, es decir, la acumulación de células inmunitarias en forma sistémica o en una región particular del organismo. En respuesta a un agente infeccioso o a una sustancia extraña, las células inmunitarias secretan citoquinas, que, a su vez, modulan la proliferación de células inmunitarias, su desarrollo, diferenciación o migración. Las respuestas inmunitarias pueden producir consecuencias patológicas, por ejemplo, cuando hay excesiva inflamación, como en los trastornos autoinmunitarios (ver, por

ejemplo, las referencias de Abbas *et al.* (eds.) (2000) *Cellular and Molecular Immunology*, W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA; Oppenheim and Feldmann (eds.) (2001) *Cytokine Reference*, Academic Press, San Diego, CA; von Andrian and Mackay (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1020–1034; Davidson and Diamond  
5 (2001) *New Engl. J. Med.* 345:340–350).

Las señales de estimulación conjunta positiva y negativa cumplen roles decisivos en la modulación de la actividad de células B y T, y las moléculas que median estas señales han demostrado ser eficaces blancos para los agentes inmunomoduladores. La estimulación conjunta positiva, además de la disposición  
10 de receptor de células T (TCR, según su sigla en inglés), es necesaria para la óptima activación de células T naive (sin exposición previa de antígeno), mientras que se cree que la estimulación conjunta negativa es necesaria para la adquisición de la tolerancia inmunológica a autoantígeno, al igual que para la terminación de funciones de células T efectoras. Al interactuar con B7.1 o B7.2  
15 sobre la superficie de células que presentan antígeno (APC), CD28, la molécula coestimulante de célula T prototípica, emite señales que promueven la proliferación de células T y la diferenciación, en respuesta al compromiso de TCR, mientras el antígeno 4 de linfocito T citotóxico homólogo de CD28 (CTLA-4)  
media la inhibición de la proliferación de células T y las funciones efectoras  
20 (Chambers *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 19: 565–594, 2001; Egen *et al.*, *Nature Immunol.*, 3: 611–618, 2002). Se han descubierto varias moléculas nuevas con homología a la familia B7 (Abbas *et al.*, *Nat. Med.*, 5: 1345–6, 1999; Coyle *et al.*, *Nat. Immunol.*, 2: 203–9, 2001; Carreno *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 20: 29–53, 2002; Liang *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 14: 384–90, 2002), y su rol en la  
25 activación de células T recién está comenzando a ser dilucidado.

Estos nuevos ligandos coestimulantes incluyen B7h, PD-L1, PD-L2 y B7-H3. B7h (Swallow *et al.*, *Immunity*, 11: 423–32, 1999), también conocido como

B7RP-1 (Yoshinaga *et al*, *Nature*, 402: 827-32, 1999), GL50 (Ling, *et al*, *J. Immunol.*, 164: 1653-7, 2000), B7H2 (Wang *et al*, *Blood*, 96: 2808-13, 2000) y LICOS (Brodie *et al*, *Curr. Biol.*, 10: 333-6, 2000), se une a un coestimulante inducible (ICOS) en células T activadas, y coestimula la proliferación de células T y la producción de citoquinas tales como interleuquina 4 (IL-4) e IL-10.

PD-L1 (Freeman *et al*, *J. Exp. Med.*, 192: 1027-34, 2000), también conocido como B7-H1 (Dong *et al*, *Nat. Med.*, 5, 1365-9, 1999), y PD-L2 (Latchman *et al*, *Nat. Immunol.*, 2: 261-8, 2001), también conocido como B7-DC (Tseng *et al*, *J. Exp. Med.*, 193, 839-46, 2001) se unen al receptor de muerte programada 1 (PD-1) en células T y B.

Finalmente, B7-H3 se une a un contrarreceptor actualmente aún desconocido en células T activadas, y según se informa, aumenta la proliferación de linfocitos T cooperadores (Th) CD4+ y linfocitos T citotóxicos (CTL o Tc, según su sigla en inglés) CD8+, y aumenta selectivamente la expresión de IFN- $\gamma$  (Chapoval *et al*, *Nat. Immunol.*, 2, 269-74, 2001; Sun *et al*, *J. Immunol.*, 168, 6294-7, 2002).

La identificación de moléculas adicionales que tienen actividad coestimulante de células T es de gran interés debido a su importancia biológica fundamental y al potencial terapéutico de agentes capaces de afectar su actividad. Los agentes capaces de modular señales coestimulantes y, de ese modo, capaces de modular la activación y las funciones efectoras de células CD8+ CTL y CD4+ Th encuentran uso en la modulación de respuestas inmunitarias, y son sumamente deseables.

En particular, se sabe que muchos trastornos autoinmunitarios involucran células T autorreactivas y autoanticuerpos. Los agentes capaces de inhibir o eliminar linfocitos autorreactivos sin comprometer la capacidad del sistema inmunitario para defender contra patógenos son sumamente deseables.

De manera inversa, muchas inmunoterapias contra el cáncer, tales como la inmunoterapia adoptiva, expanden poblaciones de células T específicas de tumor y las dirigen hacia el ataque y la muerte de células tumorales (Dudley *et al.*, *Science*, 298: 850–854, 2002; Pardoll, *Nature Biotech.*, 20: 1207–1208, 2002; Egen *et al.*, *Nature Immunol.*, 3: 611–618, 2002). Los agentes capaces de aumentar el ataque tumoral son también sumamente deseables.

Además, las respuestas inmunitarias dirigidas contra diferentes antígenos (por ejemplo, antígenos microbianos o antígenos tumorales), si bien son detectables, con frecuencia son de insuficiente magnitud para lograr la protección contra un proceso de enfermedad mediado por agentes (por ejemplo, microorganismos infecciosos o células tumorales) que expresan dichos antígenos. A menudo es conveniente la administración al sujeto, en conjunto con el antígeno, de un agente complementario que sirve para aumentar la respuesta inmunitaria al antígeno en el sujeto.

Asimismo, es conveniente inhibir las respuestas inmunitarias normales al antígeno en ciertas circunstancias. Por ejemplo, es deseable la supresión de respuestas inmunitarias normales en un paciente que recibe un trasplante, y los agentes que exhiben dicha actividad inmunosupresora son sumamente deseables.

Las señales coestimulantes, en particular, las señales coestimulantes positivas, cumplen también una función en la modulación de la actividad de células B. Por ejemplo, la activación de células B y la sobrevivencia de células B de centro germinal requieren señales derivadas de células T, además de la estimulación por antígeno.

El ligando CD40 presente sobre la superficie de linfocitos T cooperadores interactúa con CD40 sobre la superficie de células B, y media muchos de dichos efectos dependientes de células T en células B.

La proteína BTLA (atenuante de linfocitos B y T) es un miembro de la familia CD28 de receptores, que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y PD-1. Los miembros iniciales de la familia, CD28 e ICOS, fueron descubiertos por los efectos funcionales sobre el aumento de la proliferación de células T luego del agregado de anticuerpos monoclonales (Hutloff *et al.* (1999), *Nature*, 397: 263–266; Hansen *et al.* (1980), *Immunogenics*, 10: 247–260). BTLA se descubrió a través de la identificación sistemática de la expresión diferencial en células TH1. Además, se ha descrito que BTLA proporciona señales inhibitoras negativas, análogas a CTLA-4. En presencia de agonista Mab anti-BTLA, las células T activadas por anti-CD3 y anti-CD28 muestran reducida producción y proliferación de IL-2 (Kreig *et al.*, *J. Immunol.*, 175, 6420–6472, 2005). Los ratones que carecen de un gen intacto BTLA muestran mayores valoraciones para DNP-KLH luego de la inmunización, y una mayor sensibilidad a EAE (sigla en inglés de “encefalomielitis autoinmunitaria experimental”) (Watanabe *et al.*, *Nat. Immunol.*, 4, 670–679, 2003). HVEM (mediador de entrada del virus de herpes) ha demostrado ser un ligando para BTLA (Scully *et al.* (2005), *Nat. Immunol.* 6: 90–98; Gonzalez *et al.* (2005), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 1116–1121).

Por lo tanto, se desean agentes que reconocen BTLA, en particular, anticuerpos y sus agentes de unión que reconocen BTLA, y métodos de uso de dichos agentes.

Los anticuerpos pueden usarse como agentes terapéuticos. Ciertos anticuerpos, cuando se usan como agentes terapéuticos *in vivo*, pueden causar inmunogenicidad indeseada de los anticuerpos. Como la mayoría de los anticuerpos monoclonales derivan de roedores, el uso repetido en humanos logra la generación de una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo terapéutico, por ejemplo, anticuerpos humanos contra ratón o HAMA. Dicha respuesta inmunitaria logra una pérdida de eficacia terapéutica como mínimo, y una potencial respuesta

de anafilaxis mortal, como máximo. Un enfoque para la reducción de la inmunogenicidad de anticuerpos roedores involucra la producción de anticuerpos quiméricos, en los cuales se fusionaron regiones variables de ratón (Fv) con regiones constantes humanas (Liu *et al.* (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439–43). Sin embargo, los ratones inyectados con híbridos de regiones variables humanas y regiones constantes de ratón desarrollan una fuerte respuesta antianticuerpo dirigida contra la región variable humana, lo que sugiere que la retención de la región Fv de roedor entera en dichos anticuerpos quiméricos puede aun lograr la inmunogenicidad indeseada en los pacientes.

10        Asimismo, se ha empleado el injerto de anillas de regiones determinantes de complementariedad (CDR, según su sigla en inglés) de roedores de dominios variables, en marcos humanos (es decir, humanización), a fin de minimizar adicionalmente las secuencias de roedores. Jones *et al.* (1986), *Nature*, 321: 522; Verhoeyen *et al.* (1988), *Science*, 239: 1534. Sin embargo, los intercambios de  
15        anillas de CDR aún no logran de manera uniforme un anticuerpo con las mismas propiedades de unión que el anticuerpo de origen. Los cambios en los residuos de marco (FR, según su sigla en inglés), residuos involucrados en el sostén de anilla de CDR, en anticuerpos humanizados a menudo también son necesarios para preservar la afinidad de unión de antígeno. Kabat *et al.* (1991), *J. Immunol.* 147:  
20        1709. Si bien se ha informado el uso de injerto de CDR y la preservación de residuos de marco en una cantidad de construcciones de anticuerpos humanizados, es difícil predecir si una secuencia particular logrará el anticuerpo con la unión deseada, y a veces, las propiedades biológicas. Ver, por ejemplo, las referencias de Queen *et al.* (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: ,10029,  
25        Gorman *et al.* (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4181, y Hodgson (1991), *Biotechnology (NY)* 9: 421–5. Además, la mayoría de los estudios previos utilizaron diferentes secuencias humanas para secuencias variables liviana y

pesada animales, lo que torna cuestionable la naturaleza predictiva de dichos estudios. Se han utilizado secuencias de anticuerpos conocidos, o más habitualmente, aquellas de anticuerpos que tienen estructuras cristalinas de rayos X conocidas, tales como anticuerpos NEW y KOL. Ver, por ejemplo, las referencias de Jones *et al.*, *supra*; Verhoeven *et al.*, *supra*; y Gorman *et al.*, *supra*. Se ha informado la información de secuencia exacta para algunas construcciones humanizadas.

Existe la necesidad de anticuerpos anti-BTLA, y en particular, anticuerpos monoclonales anti-BTLA, para el uso en el tratamiento de trastornos humanos, tales como trastornos inflamatorios, autoinmunitarios y proliferativos. Dichos anticuerpos, preferentemente, exhibirán baja inmunogenicidad en sujetos humanos, a fin de permitir la administración repetida, sin respuestas inmunitarias adversas.

15

### SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos BTLA antihumanos que tienen una o más propiedades deseables, que incluyen altas afinidades de unión, actividades neutralizantes, buena farmacocinética y baja antigenicidad en sujetos humanos. La invención además se refiere al uso de los anticuerpos de la presente invención en el tratamiento de enfermedades.

20

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno que se une a atenuante de linfocito B y T humano (BTLA, según su sigla en inglés), que comprende una o más propiedades seleccionadas del grupo que consiste en: a) no bloquea la unión de BTLA al mediador de entrada del virus del herpes (HVEM); b) reacciona en forma cruzada con BTLA de macaco; c) exhibe un  $K_D$  para la unión a BTLA humano de

25

cómo máximo  $2,4 \times 10^{-9}$ ; y d) exhibe un  $EC_{50}$  de aproximadamente 10–100 nM en un ensayo *in vitro* que mide la activación de células B o T.

En realizaciones adicionales, la invención se refiere a un anticuerpo aislado, o un fragmento del mismo de unión a antígeno, que se une a TALA humano, que comprende una o más propiedades seleccionadas del grupo que  
5 consiste en: a) bloquea la unión de BTLA a HVEM; b) reacciona en forma cruzada con BTLA de macaco; y c) exhibe un  $K_D$  para la unión a BTLA humano de cómo máximo aproximadamente  $4,6 \times 10^{-9}$ .

En realizaciones adicionales, la invención se refiere a un anticuerpo agonista aislado, o un fragmento del mismo de unión a antígeno, que se une a  
10 BTLA seleccionado del grupo que consiste en hu Mab8D5 y hu Mab8A3, donde el anticuerpo se une específicamente a BTLA y no bloquea la unión a HVEM.

En realizaciones adicionales, la invención se refiere a un anticuerpo agonista aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno que se une a  
15 BTLA seleccionado del grupo que consiste en hu Mab21H6 hu y Mab19A7, donde el anticuerpo se une específicamente a BTLA y además bloquea la unión a HVEM.

En aun realizaciones adicionales, la invención se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno que se une a BTLA que  
20 comprende por lo menos un dominio de CDR  $V_L$  seleccionado del grupo que consiste en SEQ. ID. NOS.: 12, 13 y 14, y por lo menos un dominio de CDR  $V_H$  seleccionado del grupo que consiste en SEQ. ID. NOS.: 5, 6 y 7.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un anticuerpo antagonista aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno que se une a  
25 BTLA, que comprende por lo menos un dominio de CDR  $V_L$  seleccionado del grupo que consiste en SEQ. ID. NOS.: 26, 27, 28, y por lo menos un dominio de CDR  $V_H$  seleccionado del grupo que consiste en SEQ. ID. NOS.: 19, 20 y 21.

Aun en otras realizaciones, la invención se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena liviana, donde: (a) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 11 (cadena pesada 8D5); y (b) la región variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 18 (cadena liviana 8D5).

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno que comprende: (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 5 (HCDR1 8D5); (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 6 (HCDR2 8D5); (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 7 (HCDR3 8D5); (d) una región variable de cadena liviana CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 12 (LCDR1 8D5); (e) una región variable de cadena liviana CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 13 (LCDR2 8D5); y (f) una región variable de cadena liviana CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 14 (LCDR3 8D5); donde el anticuerpo se une específicamente a BTLA y no bloquea la unión a HVEM.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un anticuerpo aislado, o un fragmento del mismo de unión a antígeno, que comprende: (a) una región variable de cadena pesada que es el producto de un gen VH humano, o que deriva de este (SEQ. ID. NO.: 8) [que codifica 8D5]; y (b) una región variable de cadena liviana que es el producto de un gen VK humano, o que deriva de este (SEQ. ID. NO.: 15) [que codifica 8D5]; donde el anticuerpo se une específicamente a BTLA.

Aun en otras realizaciones, la invención se refiere a un anticuerpo aislado, o un fragmento del mismo de unión a antígeno, donde el anticuerpo compite en forma cruzada por la unión a BTLA, con un anticuerpo de referencia que comprende: (a) la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 9 o SEQ. ID. NO.: 11 (cadena pesada 8D5); (b) la región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 16 o SEQ. ID. NO.: 18 (cadena liviana 8D5); donde el anticuerpo monoclonal aislado, o un fragmento del mismo de unión a antígeno, es un agonista de BTLA.

10 En ciertas realizaciones, la cadena pesada y la cadena liviana están conectadas por un conector flexible, para formar un anticuerpo de cadena simple.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento del mismo de unión a antígeno es un anticuerpo Fv de cadena simple. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento del mismo de unión a antígeno es un anticuerpo Fab.

15 En ciertas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento del mismo de unión a antígeno es un anticuerpo Fab'. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento del mismo de unión a antígeno es un anticuerpo (Fab')<sub>2</sub>.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno es un anticuerpo recombinado o monoclonal completamente humano.

20 En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno disminuye la señalización o actividad de BTLA.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno aumenta la señalización o actividad de BTLA.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un polipéptido aislado que comprende los dominios V<sub>L</sub> o los dominios V<sub>H</sub> de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión de antígeno que se describen en esta solicitud.

25

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica los dominios  $V_L$  o los dominios  $V_H$  de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión de antígeno que se describen en esta solicitud.

- 5       Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a una composición que comprende uno o más anticuerpos o fragmentos de unión de antígeno como se describen en esta solicitud, y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

- 10       Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un método de tratamiento de una afección causada por la menor expresión o actividad de BTLA en un sujeto, que comprende la administración al sujeto, de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica que se describe en esta solicitud. En particular, cualquier enfermedad o trastorno marcado por la presencia o actividad de células T o B puede ser tratado por un anticuerpo agonista de BTLA (es decir, una
- 15       enfermedad o un trastorno que comprometa la presencia de células inmunitarias positivas BTLA puede ser controlado o tratado mediante la activación de la función del receptor BTLA). En ciertas realizaciones, uno o más anticuerpos o sus fragmentos de unión de antígeno se seleccionan del grupo que consiste en hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7, o hu Mab4C7.

- 20       Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un método de tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmunitario en un sujeto, que comprende la administración de una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno como se describe en esta solicitud, al sujeto. En ciertas realizaciones, el trastorno inflamatorio o autoinmunitario se selecciona del grupo
- 25       que consiste en trastornos intestinales inflamatorios (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enfermedad intestinal inflamatoria), fibrosis inflamatoria (por ejemplo, esclerodermia, fibrosis pulmonar y cirrosis), artritis reumatoide (AR),

artrosis, osteoporosis, asma (que incluye asma alérgica), alergias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), esclerosis múltiple, soriasis, uveítis, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), diabetes tipo I de inicio temprano juvenil, rechazo de trasplantes, LES (lupus eritematoso sistémico), síndrome de

5 Sjögren. Dichos métodos de tratamiento además pueden comprender la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales, como agentes inmunosupresores o agentes antiinflamatorios. Aun en realizaciones adicionales, el trastorno es artritis reumatoide.

Aun en realizaciones adicionales, el trastorno intestinal inflamatorio se

10 selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, y enfermedad intestinal inflamatoria.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un método de tratamiento de rechazo de trasplantes o de la enfermedad de injerto contra huésped.

15 Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un método de tratamiento de diabetes tipo I.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere al uso del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno como se describe en esta solicitud, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno

20 inflamatorio o autoinmunitario, en un sujeto.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere al uso del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno como se describe en esta solicitud, para la preparación de un medicamento para la disminución de la actividad de BTLA.

25 Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un método para el aumento de la respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica, al sujeto.

En ciertas realizaciones, uno o más anticuerpos o sus fragmentos de unión de antígeno son hu Mab4C7.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere al uso de un anticuerpo antagonista como se describe en esta solicitud, para la preparación de un medicamento para aumentar la actividad de BTLA.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere al uso de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se describen en esta solicitud, para el uso de diagnóstico.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un equipo que comprende cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión de antígeno que se describen en esta solicitud.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un complejo que comprende BTLA y cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión de antígeno que se describen en esta solicitud.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que codifica cualquiera de las cadenas VH o VL que se describen en esta solicitud. Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a una célula huésped que comprende el vector de expresión que se describe en esta solicitud.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un método de producción del anticuerpo o un fragmento del mismo de unión a antígeno, como se describe en esta solicitud, que comprende:

- (a) el cultivo de la célula huésped que se describe en esta solicitud, en medio de cultivo, en condiciones donde se expresa la secuencia de ácido nucleico, a fin de producir polipéptido que comprende las regiones variables de cadena liviana y pesada; y

(b) la recuperación de los polipéptidos de la célula huésped o el medio de cultivo.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno, donde el anticuerpo  
5 compite en forma cruzada por la unión a BTLA con un anticuerpo de referencia que comprende:

(a) la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 23 (cadena pesada 4C7);

(b) la región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de  
10 aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 30 (cadena liviana 4C7); donde el anticuerpo monoclonal aislado, o un fragmento del mismo de unión a antígeno, es un antagonista de BTLA.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de inmunoglobulina que comprende  
15 CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 hallados en una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ. ID. NO.: 18.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un polipéptido de inmunoglobulina aislado que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 hallados en una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de  
20 aminoácidos expuesta en SEQ. ID. NO.:18.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de inmunoglobulina que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 hallados en una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ. ID. NO.: 11.

25 Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un polipéptido de inmunoglobulina aislado que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 hallados

en una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ. ID. NO.: 11.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de inmunoglobulina que comprende  
5 CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 hallados en una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ. ID. NO.: 32.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un polipéptido de inmunoglobulina aislado que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 hallados en una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de  
10 aminoácidos expuesta en SEQ. ID. NO.: 32.

Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de inmunoglobulina que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 hallados en una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ. ID. NO.: 25.

15 Aun en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un polipéptido de inmunoglobulina aislado que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 hallados en una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ. ID. NO.: 25.

En ciertas realizaciones, estas construcciones de ácido nucleico y  
20 polipéptidos son útiles en los métodos para la producción de un anticuerpo.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Las Figuras 1A-C muestran las secuencias de las regiones variables de cadena pesada y liviana de hu Mab 8D5. La Figura 1A muestra la secuencia de  
25 aminoácidos madura de la cadena VH y la secuencia de ácido nucleico codificadora. Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 se indican con líneas ondeadas sobre la secuencia de aminoácidos. La Figura 1B muestra la secuencia

de aminoácidos madura de la cadena VL y la secuencia de ácido nucleico codificadora. Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 se indican con líneas ondeadas sobre la secuencia de aminoácidos. La Figura 1C muestra los rasgos de secuencia de las regiones variables de cadena pesada y liviana de Hu Mab8D5.

Las Figuras 2A–C muestran las secuencias de las regiones variables de cadena pesada y liviana de hu Mab 4C7. La Figura 2A muestra la secuencia de aminoácidos madura de la cadena VH y la secuencia de ácido nucleico codificadora. Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 se indican con líneas ondeadas sobre la secuencia de aminoácidos. La Figura 2B muestra la secuencia de aminoácidos madura de la Vk y la secuencia de ácido nucleico codificadora. Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 se indican con líneas ondeadas sobre la secuencia de aminoácidos. La Figura 2C muestra los rasgos de secuencia de las regiones variables de cadena pesada y liviana de hu Mab4C7.

Las Figuras 3A–D muestran los rasgos de unión y reactividad cruzada de hu Mab8D5 y hu Mab4C7. La Figura 3A muestra el perfil de unión de hu Mab8D5 para BTLA humano expresado en células CHO. La Figura 3B muestra el perfil de unión de hu Mab8D5 para BTLA macaco expresado en células CHO. La Figura 3C muestra el perfil de unión de hu Mab4C7 para BTLA humano expresado en células CHO. La Figura 3D muestra el perfil de unión de hu Mab4C7 para BTLA macaco expresado en células CHO.

Las Figuras 4A–B muestran los resultados de ensayo de la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión de HVEM humano a células CHO que expresan BTLA humano. La Figura 4A muestra que hu Mab4C7 bloquea la unión de HVEM humano a células CHO que expresan BTLA humano. La Figura 4B muestra que hu Mab8D5 no bloquea la unión de HVEM humano a células CHO que expresan BTLA humano.

La Figura 5 es un gráfico que muestra que hu Mab8D5, al igual que el fragmento Fab' de hu Mab8D5, inhiben la proliferación inducida por anti-CD3 de blastocitos de células T humanas.

Las Figuras 6A–D son gráficos que muestran los efectos de hu Mab8D5 y hu Mab4C7 sobre la respuesta de células T de macaco y humanas inducida por SEB.

Las Figuras 7A–B son gráficos que muestran que la respuesta de células T de rellamada humanas a la estimulación con toxoide tetánico es disminuida por hu Mab8D5.

Las Figuras 8A–B son gráficos que muestran que la respuesta de células T de rellamada humanas a la estimulación con toxoide tetánico es aumentada por hu Mab4C7.

La Figura 9 es un gráfico que muestra que la función de células B humanas es inhibida por hu Mab8D5.

Las Figuras 10A–B son gráficos que muestran la inhibición de la producción de quimioquina de célula B de sangre periférica por hu Mab8D5.

La Figura 11 es un gráfico que muestra que hu Mab8D5 no estimula en forma autónoma la actividad inmunitaria en sangre de donante sano.

Las Figuras 12A–B son *Western blots* que muestran la unión de hu Mab8D5 y hu Mab4C7 (Fig. 12A) a BTLA y la reducción de hu Mab8D5, de la fosforilación de TCR $\xi$  (Fig. 12B).

Las Figuras 13A–B son gráficos que muestran que hu Mab8D5 suprimió la respuesta de SEB y la proliferación de células B de manera dependiente de la dosis.

Las Figuras 14A–D son gráficos que ilustran que los anticuerpos agonistas anti-BTLA ensayados no producen una tormenta de citoquinas en cultivos de PBMC (sigla en inglés de “células mononucleares de sangre periférica”) humanos,

según lo medido por la falta de producción de IL-2 (Figs. 14A, B), IFN $\gamma$  (Figs. 14C) y TNF $\alpha$  (Fig. 14D) en cultivos de PBMC humanos.

La Figura 15 es un gráfico de los resultados del ensayo ELISA del día 28 que muestra que hu Mab8D5 inhibió la respuesta de IgG de rellamada anti-TT humana en ratones SPL SCIDhu.

La Figura 16 es un gráfico de los resultados del ensayo ELISA del día 28 que muestra que hu Mab8D5 inhibió la respuesta de IgG total humana en ratones SPL SCIDhu.

Las Figuras 17A–B son gráficos que muestran las valoraciones de ratones tratados individuales, que ilustran que hu Mab8D5 inhibió la respuesta de IgG de rellamada anti-TT humana en ratones SPL SCIDhu (Fig. 17A), en comparación con el control de isotipo (Fig. 17B).

Las Figuras 18A–B son gráficos que muestran las valoraciones de ratones tratados individuales, que ilustran que hu Mab8D5 inhibió la respuesta de IgG total humana en ratones SPL SCIDhu (Fig. 18A), en comparación con el control de isotipo (Fig. 18B).

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

El sistema inmunitario mamífero ha desarrollado varias vías para aprovechar las actividades potencialmente nocivas de los linfocitos T y B. Estas incluyen una amplia variedad de vías de receptor de citoquina, al igual que vías de coestimulación que involucran receptores como CD28, CTLA-4, PD-1 y BTLA. Mientras que la interacción de CD28 – B7 es un ejemplo de una vía de coestimulación positiva (es decir, el desencadenamiento de CD28 aumenta las respuestas de las células T a desencadenantes específicos de antígeno), los otros tres receptores son representaciones de vías de coestimulación inhibitorias. CTLA-4, PD-1 y BTLA muestran superposición, si bien, perfiles de expresión

distintivos, y limitan la actividad de linfocitos T y B al igual que otras células inmunitarias, de manera no innecesaria (ver las referencias de Deppong *et al.*, *J. Immunol.*, 2006, Tao *et al.*, *J. Immunol.*, 2005). Mientras que CTLA-4 compite con CD28 por la unión de B7.1 y B7.2 (CD80 y CD86) y establece un umbral primordial para la activación de células T naive (sin exposición previa de antígeno) en los ganglios linfáticos y el bazo, PD-1 y BTLA tienen, independientemente, sus propios ligandos de carácter único (PD-L1/-L2 y HVEM, respectivamente), y parecen controlar la homeostasis de células T periféricas y la reactivación (ver la referencia de Krieg *et al.*, *Nat. Immunol.*, 2007).

10

### **BTLA regula en forma descendente la activación de células B y T.**

Como lo indica su nombre, el atenuantes de linfocitos B y T (BTLA) es expresado tanto en linfocitos B y T en reposo como activados. BTLA es una glicoproteína de transmembrana de tipo I, y tiene una cola citoplásmica que contiene varios motivos de tirosina inhibitorios (Watanabe, 2003). BTLA tiene cierta similitud estructural con miembros de la familia CD28/CTLA-4, si bien varios factores lo hacen un miembro de carácter único. BTLA humano contiene los siguientes dominios caracterizados: dominios extracelular Ig: residuos 51-117; dominio de transmembrana: residuos 153-173; dominio ITIM: residuos 255-260; y un dominio ITSM: residuos 280-285 (con referencia a SEQ. ID. NO.:2 humana). ITIM significa "motivo de inhibición a base de tirosina de inmunorreceptor", mientras que ITSM significa "motivo de cambio a base de tirosina de inmunorreceptor".

El dominio extracelular de tipo intermedio de Ig (tipo I) de BTLA que corresponde a los residuos 43-134 de SEQ. ID. NO.: 2 es responsable de la unión de ligando, y no se halla en otros miembros de la familia CD28/CTLA-4. Además, el ligando para BTLA no es un miembro de la familia B7, sino, en

25

cambio, es el mediador de entrada del virus del herpes (HVEM) de receptor de la superfamilia de TNFR (sigla en inglés de “receptor de factor de necrosis tumoral”) (Sedy, 2005). HVEM es expresado en monocitos y células y T periféricas, y se ha resuelto la estructura cristalina de HVEM ligado a BTLA (Compaan, 2005).

5           Varios estudios *in vivo* demostraron el rol inhibitorio de BTLA en las respuestas de linfocitos. Los ratones deficientes en BTLA generados por Murphy y colaboradores (Washington University St. Louis) exhibieron un aumento de tres veces en la producción de IgG, en respuesta al antígeno dependiente de T. Asimismo, las células T y B aisladas de ratones BTLA<sup>-/-</sup> mostraron mayor  
10           respuesta proliferativa a la estimulación de receptor de antígeno usando –CD3 y anti-IgM, respectivamente (Watanabe, 2003). En estudios de sobreexpresión, se halló que BTLA estaba asociado con el complejo de receptor de células B y con el receptor de células T. En línea con este hallazgo, la estimulación independiente de receptor de antígeno usando Con A (células T) o LPS (células B) no es  
15           afectada en linfocitos deficientes en BTLA, y no puede ser modulada usando anticuerpos anti-BTLA.

          Los ratones de noqueo (*knockout*: inactivación de genes específicos como modelo de enfermedad; una mutante individual donde se ha reemplazado un solo gen funcional por una forma no funcional del gen) de BTLA han mostrado el  
20           desarrollo de enfermedad autoinmunitaria espontánea con el transcurso del tiempo, y tienen menor tiempo de vida (Oya, 2008). La ligación de BTLA por HVEM conduce a la regulación descendente de la activación y proliferación de células T (Sedy, 2005). Los ratones de noqueo de BTLA exhiben mayor gravedad de la enfermedad en modelos de encefalomiелitis autoinmunitaria (EAE) e  
25           inflamación alérgica de las vías respiratorias, ambas, dependientes de la actividad de las células T (Watanabe, 2005; Deppong, 2006). Se ha observado además una asociación entre un SNP (sigla en inglés de “polimorfismo de nucleótido simple”)

en el gen BTLA humano y la sensibilidad a la AR (Lin, 2006). Sin embargo, aún poco se sabe acerca del rol de la señalización de BTLA en afecciones patológicas.

Por lo tanto, para enfermedades autoinmunitarias y ciertas enfermedades proliferativas, existe una continua necesidad de desarrollar tratamientos que exploten el rol inhibitorio de BTLA en las respuestas linfocíticas, y a la vez, permitan la unión de BTLA–HVEM.

Los anticuerpos BTLA agonistas son en particular muy adecuados para este rol. En el curso de la selección de más de 200 mAb generados usando la plataforma Ultimab, se identificaron una cantidad de anticuerpos agonistas y anticuerpos BTLA antagonistas. De los más de 200 mAb, se identificaron varios anticuerpos, que incluyeron hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6 y hu Mab19A7, que activaron la función del receptor de BTLA inhibitoria (es decir, anticuerpos agonistas). Hu Mab8D5 y hu Mab8A3 son agonistas de BTLA que no bloquean la unión de ligando HVEM a BTLA. Hu Mab21H6 y hu Mab19A7 activan la función de receptor BTLA inhibitoria, mientras que, a la vez, bloquean la unión de ligando HVEM a BTLA. Estos anticuerpos agonistas exhiben ~12–14 nM de afinidad de unión para BTLA, y además, inhiben las respuestas de células T y B en sangre de donante humano, con un valor de EC50 de ~30–100 nM. Cuando se expresó nuevamente como una IgG4, al igual que como un fragmento Fab' monovalente, hu Mab8D5 mantuvo su actividad inhibitoria inmunitaria *in vitro*. Estos anticuerpos BTLA agonistas también se unen a BTLA de macaco con afinidad similar, y demuestran inhibición equivalente de las respuestas de células T de macaco. Sin embargo, estos anticuerpos agonistas no reaccionan en forma cruzada con BTLA de ratón. En estudios farmacológicos de ratón, hu Mab8D5 exhibió una semivida de ~16 días, de manera consecuente con lo esperado para una IgG4 humana. Estos mAb agonistas de receptor inhiben y suprimen la

actividad de linfocitos T y B *in vitro*, y además, exhiben dicha actividad en sistemas de modelos *in vivo*. Los anticuerpos agonistas de la presente invención se distinguen por tener la capacidad de inhibir la activación de células B por antígeno cognado, sin reducir las células B. Asimismo, los anticuerpos agonistas  
5 de la presente invención también se distinguen por la capacidad de dirigirse a la activación de células B y T en forma simultánea.

Además de los cuatro anticuerpos anti-BTLA agonistas que se describen con anterioridad, la selección también identificó un anticuerpo antagonista hu Mab4C7. Este anticuerpo exhibe efectos estimulantes inmunitarios, como se  
10 muestra en las Figuras 6C–D y en las Figuras 8A–B, y por lo tanto, se espera que sea útil como tratamiento contra el cáncer, o para el tratamiento de ciertas infecciones patógenas, y como un agente complementario para una vacuna. Se espera que el uso de un antagonista de BTLA, tal como Mab4C7, para la estimulación de la respuesta inmunitaria en el contexto del cáncer se correlacione  
15 con estos resultados, al igual que los resultados que ilustran que el bloqueo de la ligación de BTLA–HVEM durante el cebado de células T CD8 + naive contribuye a la mayor proliferación de células T (ver la referencia de Derré *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 2010, 120: 157–167).

Para agonistas de BTLA, la capacidad de suprimir tanto las respuestas de  
20 células B como T específicas de antígeno proporcionará métodos para la modulación de la actividad de BTLA, que se espera sean útiles para afecciones tales como artritis, LES, enfermedad de Sjogren, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, al igual que para trasplantes de órganos sólidos (es decir, riñón, hígado y otros órganos, que incluyen trasplantes de tejidos). Los tratamientos actuales  
25 exhiben deficiencias, en parte, debido a que la supresión de células T sola no es suficiente para lograr los efectos deseados. Los anticuerpos anti-BTLA de la presente invención pueden ser eficaces para el tratamiento de la artritis, colitis

5

**Abreviaturas.**

10

ADCC      Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

BTLA      Atenuante de linfocitos B y T

|      |                                             |
|------|---------------------------------------------|
| HVEM | Mediador de la entrada del virus del herpes |
|------|---------------------------------------------|

15

Hu Mab8A3 anticuerpo anti-BTLA agonista monoclonal completamente humano

Hu Mab21H6 anticuerpo anti-BTLA agonista monoclonal completamente humano

20

Hu Mab4C7 anticuerpo anti-BTLA antagonista monoclonal completamente humano

Hu Mab 20H4 anticuerpo anti-BTLA monoclonal completamente humano

25

CDC      Citotoxicidad dependiente de complemento

|    |                |                                                                                                                                                                                                                                    |
|----|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | CDR            | Región determinante de complementariedad en las regiones variables de inmunoglobulina, definidas usando el sistema de numeración Kabat                                                                                             |
|    | CHO            | Ovarios de hámster chino                                                                                                                                                                                                           |
|    | CTL            | Linfocito T citotóxico                                                                                                                                                                                                             |
| 5  | EC50           | concentración que logra el 50% de eficacia o inhibición                                                                                                                                                                            |
|    | ELISA          | Ensayo inmunosorbente ligado a enzima                                                                                                                                                                                              |
|    | FW             | Región de marco de anticuerpo: las regiones variables de inmunoglobulina excluyendo las regiones CDR                                                                                                                               |
|    | HRP            | Peroxidasa de rábano rusticano                                                                                                                                                                                                     |
| 10 | IL-2           | Interleuquina 2                                                                                                                                                                                                                    |
|    | IL-5           | Interleukina 5                                                                                                                                                                                                                     |
|    | IFN            | Interferón                                                                                                                                                                                                                         |
|    | IC50           | Concentración que logra el 50% de inhibición                                                                                                                                                                                       |
|    | IgG            | Inmunoglobulina G                                                                                                                                                                                                                  |
| 15 | Kabat          | Un sistema de numeración y alineación de inmunoglobulina diseñado por Elvin A. Kabat ((1991): <i>Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed.</i> Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) |
|    | mAb; Mab o MAb | Anticuerpo monoclonal                                                                                                                                                                                                              |
| 20 | MES            | Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico                                                                                                                                                                                                |
|    | MOA            | Mecanismo de acción (sigla en inglés)                                                                                                                                                                                              |
|    | NHS            | Suero humano normal (sigla en inglés)                                                                                                                                                                                              |
|    | PCR            | Reacción en cadena de la polimerasa (sigla en inglés)                                                                                                                                                                              |
|    | PK             | Farmacocinética                                                                                                                                                                                                                    |
| 25 | SEB            | Estafilococo Enterotoxina B                                                                                                                                                                                                        |
|    | TT             | Toxoide tetánico                                                                                                                                                                                                                   |

- Región V

El segmento de cadenas de IgG que es variable en su secuencia entre diferentes anticuerpos. Se extiende hasta el residuo de Kabat 109 en la cadena liviana, y el 113, en la cadena pesada.
- VH

Región variable de cadena pesada de inmunoglobulina
- 5VK

Región variable de cadena liviana kappa de inmunoglobulina

**DEFINICIONES.**

A fin de que la invención pueda ser comprendida con mayor facilidad, ciertos términos técnicos y científicos se definen específicamente a continuación.

10 A menos que se definan en forma específica en otro sitio en este documento, todos los otros términos técnicos y científicos utilizados en esta solicitud tienen el significado comúnmente entendido por el experto en el arte al cual pertenece esta invención.

De acuerdo con la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones

15 adjuntas, las formas singulares de “un”, “una” y “el/la” incluyen sus correspondientes referencias plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Los términos “activación”, “estimulación” y “tratamiento”, aplicados a células o a receptores, pueden tener el mismo significado, por ejemplo, la activación,

20 estimulación o el tratamiento de una célula o de un receptor con un ligando, a menos que sea indicado lo contrario por el contexto o en forma explícita. El término “ligando” contempla ligandos naturales y sintéticos, por ejemplo, citoquinas, variantes de citoquinas, análogos, muteínas y compuestos de unión derivados de anticuerpos. El “ligando” además abarca moléculas pequeñas, por

25 ejemplo, miméticos peptídicos de citoquinas y miméticos peptídicos de anticuerpos. La “activación” puede referirse a la activación celular, regulada por mecanismos internos, al igual que por factores externos o ambientales. El término

“respuesta”, por ejemplo, de una célula, un tejido, órgano u organismo, contempla un cambio en el comportamiento bioquímico o fisiológico, por ejemplo, en la concentración, densidad, adhesión o migración, dentro de un compartimiento biológico; el índice de expresión de genes; o el estado de diferenciación, donde el  
5 cambio se correlaciona con la activación, estimulación o el tratamiento, o con mecanismos internos tales como la programación genética.

La “actividad” de una molécula puede describir o referirse a la unión de la molécula a un ligando o a un receptor; a la actividad catalítica; a la capacidad de estimular la expresión de genes o la señalización, diferenciación o maduración  
10 celular; a la actividad antigénica; a la modulación de actividades de otras moléculas; y similares. La “actividad” de una molécula también puede referirse a la actividad en la modulación o el mantenimiento de las interacciones de célula a célula, por ejemplo, la adhesión, o la actividad en el mantenimiento de la estructura de una célula, por ejemplo, membranas celulares o citoesqueleto. La  
15 “actividad” también puede significar la actividad específica, por ejemplo, [actividad catalítica]/[mg de proteína], o [actividad inmunológica]/[mg de proteína], la concentración en un compartimiento biológico, o similares. La “actividad” puede referirse a la modulación de componentes de los sistemas inmunitarios innato o adaptativo. La “actividad proliferativa” contempla una actividad que favorece, por  
20 ejemplo, la división celular normal, al igual que tipos de cáncer, tumores, displasia, la transformación celular, metástasis y angiogénesis, o que es necesaria para dichos procesos, o que se asocia específicamente con ellos.

La “administración” y el “tratamiento”, aplicados a un animal, humano, sujeto experimental, una célula, un tejido, órgano, o líquido biológico, se refiere al  
25 contacto de una composición o un agente exógeno farmacéutico, terapéutico, o de diagnóstico, con el animal, humano, sujeto, con la célula, el tejido, órgano o líquido biológico. La “administración” y el “tratamiento” pueden referirse, por

ejemplo, a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, de diagnóstico, de investigación, y experimentales. El tratamiento de una célula contempla el contacto de un reactivo con la célula, al igual que el contacto de un reactivo con un líquido, donde el líquido está en contacto con la célula. La “administración” y el “tratamiento” además significan los tratamientos *in vitro* y *ex vivo*, por ejemplo, de una célula, con un reactivo, compuesto de diagnóstico, compuesto de unión o con otra célula. El término “sujeto” incluye cualquier organismo, preferentemente, un animal, más preferentemente, un mamífero (por ejemplo, una rata, un ratón, perro, gato, conejo), y con mayor preferencia, un humano.

10 De acuerdo con la presente solicitud, un anticuerpo agonista de BTLA se refiere a un anticuerpo que se une a BTLA y aumenta su señal coinhibitoria para células B y T.

De acuerdo con esta solicitud, un anticuerpo antagonista de BTLA se refiere a un anticuerpo que se une a BTLA y evita la liberación de la señal coinhibitoria para células B y T.

15 En una realización de la invención, cuando es posible, una composición de la invención se administra a un sujeto de acuerdo con la referencia *Physicians' Desk Reference* 2003 (Thomson Healthcare; 57th edition (November 1, 2002)).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-BTLA o un fragmento del mismo de unión a antígeno puede administrarse por medio de una vía invasiva, tal como mediante la inyección (ver anteriormente). La administración por una vía no invasiva (por ejemplo, la vía oral, tal como en forma de una pastilla, cápsula o un comprimido) se encuentra asimismo dentro del alcance de la presente invención. En una realización de la invención, un anticuerpo anti-BTLA o un fragmento del mismo de unión a antígeno, o una composición farmacéutica de dicho anticuerpo o fragmento, se administra por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraarterial, intraarticular (por ejemplo, en las articulaciones artríticas), por

inhalación, por suministro en aerosol, o por vía intratumoral. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-BTLA o un fragmento del mismo de unión a antígeno se administra en combinación con un agente quimioterapéutico (por ejemplo, gefitinib (tal como Iressa™)), administrado por vía oral en forma de comprimido. En otra realización, el agente quimioterapéutico es paclitaxel (tal como Taxol®), que se administra por vía intravenosa.

Aun en otra realización, el anticuerpo anti-BTLA o un fragmento del mismo de unión a antígeno se administra en combinación con por lo menos un agente terapéutico adicional, tal como, sin limitación, otros anticuerpos monoclonales dirigidos a CTLA-4 (por ejemplo, AVASTIN (bevacizumab), MYLOTARG (gemtuzumab), BEXXAR (tositumomab), RITUXAN (rituximab), HERCEPTIN (trastuzumab)), o ligandos de proteínas que tienen efectos similares; agentes que activan células que presentan antígeno (células dendríticas, macrófagos, células B, monocitos), que incluyen interferones tipo 1 (por ejemplo, interferones alfa y beta); interferón gamma; BCG (Bacilo de Calmette y Guérin); agentes que proporcionan antígenos tumorales en cualquier forma, por ejemplo, antígenos de proteínas, antígenos peptídicos, lisados de células enteras, y sus derivados; antígenos genéticamente codificados (por ejemplo, antígenos codificados por adenovirus); componentes celulares del sistema inmunitario que han sido alterados o bien *in vivo* o *ex vivo*, de modo de aumentar sus propiedades inmunitarias (por ejemplo, células dendríticas autólogas, linfocitos, proteínas de choque de calor, etc.); agentes quimioterapéuticos, tales como, sin limitación, ciclofosfamida, metotrexato, etoposida, adriamicina, taxanos, fluoruracilo, citosina arabinosida (AraC) y agentes que contienen platino, entre muchos más. Ejemplos de antígenos incluyen antígenos PSA (sigla en inglés de "antígeno específico prostático") (por ejemplo, PROSTVAC/TRICOM) y antígenos gp100 derivados de melanoma. La combinación también puede administrarse en combinación con una

citoquina o un factor de crecimiento, por ejemplo, sin limitación, GM-CSF (sigla en inglés de "factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos"), o con un nucleótido inmunoestimulante, tal como, sin limitación, CpG ODN PF3512676 (también conocido como ProMune; ver el documento WO 2007/008463).

5           Asimismo, en ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-BTLA o un fragmento del mismo de unión a antígeno puede administrarse en combinación con anticuerpos tales como anti-CTLA-4 y anti-PD1, que incluyen aquellos descritos en la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.682.736 y en la Patente de los Estados Unidos Nro. 7.563.869, respectivamente.

10           Las composiciones pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en el arte. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede administrarse por medio de la inyección con una aguja hipodérmica.

          Las composiciones farmacéuticas de la invención además pueden ser administradas con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja; por ejemplo,  
15           con los dispositivos revelados en las Patentes de los Estados Unidos Nros. 6.620.135; 6.096.002; 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824 o 4.596.556.

          Ejemplos de implantes bien conocidos y módulos para la administración de las composiciones farmacéuticas incluyen: Patente de los Estados Unidos Nro.  
20           4.487.603, que revela una bomba de microinfusión implantable para el suministro de medicación a una velocidad controlada; Patente de los Estados Unidos Nro. 4.447.233, que revela una bomba de infusión de medicación para la liberación de medicación a un índice de infusión preciso; Patente de los Estados Unidos Nro. 4.447.224, que revela un aparato de infusión implantable de caudal variable para  
25           la liberación continua de fármaco; Patente de los Estados Unidos Nro. 4.439.196, que revela un sistema de liberación osmótica de fármaco, que tiene

compartimientos de múltiples cámaras. Los expertos en el arte conocen muchos otros implantes, sistemas de suministro y módulos.

El término "tratamiento" o "tratar" significa la administración de un agente terapéutico, tal como una composición que contiene cualquiera de los compuestos de unión de la presente invención, en forma interna o externa, a un paciente que tiene uno o más síntomas de la enfermedad para la cual el agente tiene actividad terapéutica conocida. Habitualmente, el agente se administra en una cantidad eficaz para el alivio de uno o más síntomas de la enfermedad en el paciente o la población tratada, o bien mediante la inducción de la regresión o la inhibición del avance de dichos síntomas, en cualquier grado clínicamente mensurable. La cantidad de un agente terapéutico, eficaz para el alivio de cualquier síntoma de la enfermedad particular (también denominada la "cantidad terapéuticamente eficaz") puede variar de acuerdo con factores tales como la enfermedad, la edad y el peso del paciente, y la capacidad del fármaco para producir una respuesta deseada en el paciente. El alivio de un síntoma de la enfermedad puede ser evaluado por medio de cualquier medición clínica utilizada típicamente por los médicos o por otros profesionales de la salud a fin de evaluar la gravedad o el estado de avance de dicho síntoma. Si bien una realización de la presente invención (por ejemplo, un método de tratamiento o un artículo de fabricación) puede no ser eficaz en el alivio de los síntomas de la enfermedad blanco en todos los pacientes, debe aliviar los síntomas de la enfermedad blanco en una cantidad estadísticamente significativa de pacientes, conforme a lo determinado por cualquier ensayo estadístico conocido en el arte, tal como la prueba de la t de Student, la prueba  $\chi^2$ , la prueba de la U de acuerdo con Mann y Whitney, la prueba de Kruskal–Wallis (prueba de la H), la prueba de Jonckheere–Terpstra y la prueba de Wilcoxon.

El término "tratamiento", aplicado a un sujeto humano, veterinario, o de investigación, se refiere al tratamiento terapéutico, profiláctico o a medidas preventivas, a aplicaciones de investigación y de diagnóstico. El término "tratamiento", aplicado a un sujeto humano, veterinario, o de investigación, o a una célula, un tejido u órgano, abarca el contacto de un agonista o antagonista de BTLA con un sujeto humano o animal, con una célula, un tejido, compartimiento fisiológico, o líquido fisiológico. El "tratamiento de una célula" además contempla situaciones donde el agonista o antagonista de BTLA se pone en contacto con el receptor de BTLA, por ejemplo, en la fase líquida o la fase coloidal, y también, situaciones donde el agonista o antagonista no se pone en contacto con la célula o el receptor.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-BTLA o un fragmento del mismo de unión a antígeno, solo, o en combinación, puede usarse para el tratamiento o la prevención de cualquier enfermedad o afección en un sujeto que necesita dicho tratamiento o dicha prevención.

Con respecto a anticuerpos anti-BTLA antagonistas, en ciertas realizaciones, la afección es mediada, por ejemplo, por la elevada expresión o actividad de BTLA, o por la elevada expresión de su ligando (por ejemplo, HVEM), y puede ser tratada o prevenida mediante la modulación de la unión de ligando BTLA-HVEM, de su actividad o expresión. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección es mediada por una mayor concentración de BTLA o HVEM, y es tratada o prevenida mediante la disminución de la unión de ligando BTLA-HVEM, de su actividad, o expresión. Los anticuerpos anti-BTLA antagonistas que se describen en esta solicitud bloquearán la actividad de BTLA como una molécula de señalización negativa, y lograrán la regulación ascendente de la respuesta a tumores por células T y B.

Los términos "atenuante de linfocitos B y T" y "BTLA", genes/proteínas, se usan de modo indistinto, e incluyen variantes, isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para BTLA humano pueden, en ciertas realizaciones, reaccionar en forma cruzada con BTLA de especies diferentes de la humana. En otras realizaciones, los anticuerpos específicos para BTLA humano pueden ser completamente específicos para BTLA humano, y pueden no exhibir reactividad cruzada de especies u otros tipos de reactividad cruzada. El término "BTLA humano", a menos que se observe lo contrario, se refiere a una secuencia de BTLA humana. Las secuencias de BTLA humanas, a menos que se observe lo contrario, abarcan todos los isotipos humanos y variantes de BTLA, tales como la secuencia de aminoácidos completa de BTLA humano que tiene el Nro. de Acceso Genbank AAP44003. Además, existen por lo menos dos variantes de transcripción de BTLA humano. La Variante de Transcripción 1 descrita en el Nro. de Acceso GenBank NP\_861445 tiene 289 aminoácidos de longitud, y exhibe casi 98% de identidad con respecto a la secuencia de BTLA de Acceso Nro. AAP44003. Esta variante representa la transcripción más larga, y codifica la isoforma más larga de 289 aminoácidos. La Variante de Transcripción 2 (Nro. de Acceso GenBank NM\_001085357) carece de un exón en marco alternado, en comparación con la variante 1, para obtener una proteína más corta de 241 aminoácidos (isoforma 2, Nro. de Acceso GenBank NP\_001078826), en comparación con la isoforma 1.

Las secuencias de BTLA humanas pueden diferir por tener, por ejemplo, mutaciones conservadas, o mutaciones en regiones no conservadas, y el BTLA tiene sustancialmente la misma función biológica que el BTLA humano de SEQ. ID. NO.: 2, SEQ. ID. NO.: 35, o SEQ. ID. NO.: 37. Por ejemplo, una función biológica de BTLA humano consiste en la supresión de una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta de célula T. Esto es, se considera que BTLA es un

regulador negativo. Tiene motivos de inhibidor C-terminal que participan en la reducción de la producción de IL-2 y la expresión de células T (Watanabe *et al.*, *Nat. Immunol.*, 4, 670-679, 2003; Chemnitz *et al.*, *J. Immunol.*, 176, 6603-6614, 2006). Además, una función biológica de BTLA humano puede ser tener, por  
5 ejemplo, un epítipo en el dominio extracelular de BTLA que está específicamente ligado por un anticuerpo de la presente invención. .

Una secuencia de BTLA particular, en general, será por lo menos 90% idéntica en términos de secuencia de aminoácidos, a BTLA humano de SEQ. ID. NO.: 2, SEQ. ID. NO.: 35, o SEQ. ID. NO.: 37, u otras isoformas, y contendrá  
10 residuos de aminoácidos que identifican la secuencia de aminoácidos como humana cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de BTLA de otras especies (por ejemplo, murina). En ciertos casos, un BTLA humano puede ser por lo menos 95%, o aun por lo menos 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a BTLA humano de SEQ. ID. NO.: 2, SEQ. ID. NO.: 35, o SEQ. ID. NO.: 37, u otras  
15 isoformas o variantes. En ciertas realizaciones, una secuencia de BTLA humano exhibirá no más de 10 diferencias de aminoácidos con respecto al BTLA de SEQ. ID. NO.: 2, SEQ. ID. NO.: 35, o SEQ. ID. NO.: 37, u otras isoformas o variantes. En ciertas realizaciones, el BTLA humano puede exhibir no más de 5, o aun no más de 4, 3, 2, ó 1 diferencias de aminoácidos con respecto al BTLA de SEQ. ID.  
20 NO.: 2, SEQ. ID. NO.: 35, o SEQ. ID. NO.: 37, u otras isoformas o variantes. El porcentaje de identidad puede ser determinado como se describe en la presente solicitud. El término "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células que presentan antígeno, células fagocíticas, granulocitos, y macromoléculas solubles producidas por las célula anteriores o por el hígado (que  
25 incluyen anticuerpos, citoquinas y complemento), que logra el daño selectivo, la destrucción o eliminación del organismo humano, de patógenos invasivos, células

o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas, o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

En ciertos casos, es útil la realización de estudios corolarios sobre anticuerpos análogos de ratón. Los métodos adecuados descriptos en esta  
5 solicitud pueden usarse para generar anticuerpos de ratón anti-BTLA, al igual que para la selección y caracterización de anticuerpos anti-BTLA de ratón. Si bien puede usarse cualquier péptido BTLA de ratón con los rasgos y las actividades deseados, para la generación de anticuerpos BTLA de ratón, se prefieren las secuencias descriptas por Watanabe *et al.*, *Nat. Immunol.*, 4 (7), 670–679 (2003),  
10 que incluyen el Nro. de Acceso GenBank AAP44002 (306 aminoácidos) codificadas por el Nro. de Acceso GenBank AY293285.

Asimismo, se han caracterizado una cantidad de variantes de empalme de BTLA de ratón, y en ciertos casos, cualquiera de estas puede ser utilizada para la generación de anticuerpos BTLA antirratón. Las variantes de empalme BTLA de  
15 ratón incluyen la secuencia codificadora NM\_001037719 y la correspondiente secuencia de aminoácidos NP\_001032808 para la variante de transcripción más larga 1 (306 aminoácidos de longitud), y la secuencia de variante de transcripción más corta 2 se describe en GenBank NP\_808252 (305 aminoácidos de longitud), que emplea un sitio de empalme en marco alternado en la región codificadora 3',  
20 en comparación con la variante 1, de modo de lograr una proteína más corta (isoforma 2).

De acuerdo con la presente solicitud, el término “anticuerpo” se refiere a cualquier forma de anticuerpo que exhiba la actividad biológica deseada. Por lo tanto, se usa en el más amplio sentido, y específicamente, cubre, sin limitación,  
25 anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos bisepecíficos), anticuerpos humanizados, anticuerpos completamente

humanos, anticuerpos quiméricos y anticuerpos de dominio simple camelizados. Conforme a esta invención, los términos “anticuerpo anti-BTLA” o “fragmento de unión de antígeno” de un anticuerpo (el “anticuerpo progenitor”) abarcan un fragmento o un derivado de un anticuerpo, que típicamente incluye por lo menos un fragmento de las regiones variables o de unión de antígeno (por ejemplo, una o más CDR) del anticuerpo progenitor, que retiene por lo menos parte de la especificidad de unión del anticuerpo progenitor. Ejemplos de fragmentos de unión de anticuerpos incluyen, sin limitación, fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena simple, por ejemplo, sc-Fv; nanocuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Habitualmente, un fragmento de unión o derivado retiene por lo menos 10% de su actividad de unión de BTLA cuando la actividad es expresada sobre una base molar. Preferentemente, un fragmento de unión o derivado retiene por lo menos 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% o más de la afinidad de unión de BTLA del anticuerpo progenitor. Asimismo, se tiene la intención de que un fragmento de unión de antígeno anti-BTLA pueda incluir sustituciones de aminoácidos no conservadoras o conservadoras (denominadas “variantes conservadoras” o “variantes de función conservada” del anticuerpo), que no alteran de modo sustancial su actividad biológica. El término “compuesto de unión” se refiere tanto a anticuerpos como a sus fragmentos de unión.

Un “anticuerpo aislado” se refiere al estado de purificación de un compuesto de unión, y en dicho contexto, significa que la molécula está sustancialmente libre de otras moléculas biológicas tales como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, carbohidratos, u otro material tal como restos celulares y medios de crecimiento. En general, el término “aislado” no tiene el propósito de hacer referencia a la ausencia completa de dicho material, o a la ausencia de agua, reguladores, o sales, a menos que se presenten en cantidades que

interfieran de manera sustancial con el uso experimental o terapéutico del compuesto de unión, como se describe en esta solicitud.

Un "fragmento Fab" está comprendido por una cadena liviana y las regiones  $C_{H1}$  y variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una  
5 molécula Fab no puede formar un enlace de disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

Una región "Fc" contiene dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios  $C_{H1}$  y  $C_{H2}$  de un anticuerpo. Los dos fragmentos de cadena pesada se mantienen juntos por medio de dos o más enlaces de disulfuro  
10 y por interacciones hidrófobas de los dominios  $C_{H3}$ .

Un "fragmento Fab" contiene una cadena liviana y una porción o un fragmento de una cadena pesada que contiene el dominio  $V_H$  y el dominio  $C_{H1}$ , y además, la región entre los dominios  $C_{H1}$  y  $C_{H2}$ , de modo que puede formarse un enlace de disulfuro de intercadena entre las dos cadenas pesadas de dos  
15 fragmentos Fab', a fin de formar una molécula  $F(ab')_2$ .

Un "fragmento  $F(ab')_2$ " contiene dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios  $C_{H1}$  y  $C_{H2}$ , de modo que se forma un enlace de disulfuro de intercadena entre las dos cadenas pesadas. Un fragmento  $F(ab')_2$ , por lo tanto, está compuesto por dos  
20 fragmentos Fab' que se mantienen juntos por medio de un enlace de disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

La "región Fv" comprende las regiones variables tanto de las cadenas pesada y liviana, si bien carece de las regiones constantes.

El término anticuerpo "Fv de cadena simple" o "scFv" se refiere a  
25 fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un anticuerpo, donde estos dominios se presentan en una cadena de polipéptido sola. En general, el polipéptido Fv además comprende un conector de polipéptido

entre los dominios  $V_H$  y  $V_L$ , que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión de antígeno. Para una reseña de scFv, ver la referencia de Pluckthun (1994): *THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315. Ver, además, la Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nro. WO 88/01649, y las Patentes de los Estados Unidos Nros. 4.946. 778 y 5.260.203.

Un "anticuerpo de dominio" es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que contiene solo la región variable de una cadena pesada, o la región variable de una cadena liviana. En algunos casos, dos o más regiones  $V_H$  están covalentemente unidas con un conector peptídico de modo de crear un anticuerpo de dominio bivalente. Las dos regiones  $V_H$  de un anticuerpo de dominio bivalente pueden dirigirse a los mismos o a diferentes antígenos.

Un "anticuerpo bivalente" comprende dos sitios de unión de antígeno. En algunos casos, los dos sitios de unión tienen las mismas especificidades de antígeno. Sin embargo, los anticuerpos bivalentes pueden ser biespecíficos (ver a continuación).

De acuerdo con la presente solicitud, a menos que se indique lo contrario, un "anticuerpo anti-BTLA" se refiere a un anticuerpo producido contra BTLA humano, o una de sus variantes, o cualquiera de sus fragmentos antigénicos.

El término "anticuerpo monoclonal", de acuerdo con la presente solicitud, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, que los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos, excepto posibles mutaciones naturales que puedan presentarse en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y se dirigen contra un solo epítipo antigénico. En contraste, las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) típicamente incluyen una cantidad de anticuerpos dirigidos contra (o específicos

para) diferentes epítomos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo, a decir, obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como la necesidad de la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales por ser usados en la presente invención pueden prepararse por medio del método de hibridoma, descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975); o pueden prepararse usando métodos biotecnológicos (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nro. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" además pueden aislarse de genotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en las referencias de Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624–628 (1991); y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581–597. Ver, además, la referencia de Presta (2005), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 116: 731.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas), donde una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la cadena es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, al igual que fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nro. 4.816.567; y la referencia de Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851–6855 (1984)).

De acuerdo con la presente solicitud, un "anticuerpo quimérico" es un anticuerpo que tiene el dominio variable de un primer anticuerpo, y un dominio constante de un segundo anticuerpo, donde el primer y el segundo anticuerpos son de diferentes especies. Habitualmente, los dominios variables se obtienen de

un anticuerpo de un animal experimental (el "anticuerpo progenitor"), tal como un roedor, y las secuencias de dominio constante se obtienen de anticuerpos humanos, de modo que será menos probable que el anticuerpo quimérico resultante produzca una respuesta inmunitaria adversa en un sujeto humano, en  
5 comparación con el anticuerpo roedor progenitor.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales de la presente solicitud además incluyen anticuerpos de dominio simple camelizados. Ver, por ejemplo, las referencias de Muyldermans *et al.* (2001), *Trends Biochem. Sci.* 26: 230; Reichmann *et al.* (1999), *J. Immunol. Methods*, 231: 25; WO 94/04678; WO  
10 94/25591; Patente de los Estados Unidos Nro. 6.005.079). En una realización, la presente invención provee anticuerpos de dominio simple que comprenden dos dominios  $V_H$  con modificaciones, de modo que se forman anticuerpos de dominio simple.

De acuerdo con la presente solicitud, el término "diacuerpos" se refiere a  
15 fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión de antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena liviana ( $V_L$ ) en la misma cadena de polipéptido ( $V_H-V_L$  o  $V_L-V_H$ ). Mediante la utilización de un conector demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios en la misma cadena, los dominios  
20 se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena, y crear dos sitios de unión de antígeno. Los diacuerpos se describen en forma más completa, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y en la referencia de Holliger *et al.* (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444–6448. Para una reseña de variantes de anticuerpos diseñadas ver, en general, la  
25 referencia de Holliger and Hudson (2005), *Nat. Biotechnol.* 23: 1126–1136.

Conforme a la presente invención, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias tanto de anticuerpos

humanos como no humanos (por ejemplo, murinos, de rata). En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente, dos dominios variables, donde la totalidad o sustancialmente la totalidad de las anillas hipervariables corresponden a aquellas  
5 de una inmunoglobulina no humana, y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones de marco (FR) son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado, en forma opcional, puede comprender por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina humana (Fc).

Los anticuerpos de la presente invención además incluyen anticuerpos con  
10 regiones Fc modificadas (o bloqueadas), de manera de proporcionar funciones efectoras alteradas. Ver, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nro. 5.624.821; y los documentos WO 2003/086310; WO 2005/120571; WO 2006/0057702. Dicha modificación puede usarse a fin de aumentar o suprimir diversas reacciones del sistema inmunitario, con posibles efectos benéficos en el  
15 diagnóstico y la terapia. Las alteraciones de la región Fc incluyen cambios de aminoácidos (sustituciones, deleciones e inserciones), glicosilación o desglicosilación, y la adición de múltiples Fc. Los cambios en la Fc también pueden alterar la semivida de los anticuerpos, en anticuerpos terapéuticos, de modo de permitir la dosificación menos frecuente y, por lo tanto, la mayor  
20 conveniencia y el menor uso de material. Ver la referencia de Presta (2005), *J. Allergy Clin. Immunol.* 116: 731 en 734–35.

El término "anticuerpo completamente humano" se refiere a un anticuerpo que comprende solo secuencias de proteína de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo completamente humano puede contener cadenas de carbohidratos  
25 murinas si es producido en un ratón, en una célula de ratón, o en un hibridoma derivado de una célula de ratón. Asimismo, un "anticuerpo de ratón" se refiere a un anticuerpo que solo comprende secuencias de inmunoglobulina de ratón.

Alternativamente, un anticuerpo completamente humano puede contener cadenas de carbohidratos de rata si es producido en una rata, en una célula de rata o en un hibridoma derivado de una célula de rata. Además, el “anticuerpo de rata” se refiere a un anticuerpo que comprende solo secuencias de inmunoglobulina de rata.

### Estructura de los anticuerpos.

En general, la unidad estructural básica de los anticuerpos se muestra de manera de comprender un tetrámero. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, donde cada par tiene una cadena “liviana” (aproximadamente 25 kDa) y una cadena “pesada” (aproximadamente 50–70 kDa). El fragmento o la porción amino-terminal de cada cadena puede incluir una región variable de alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígeno. El fragmento o la porción carboxi-terminal de cada cadena puede definir una región constante principalmente responsable de la función efectora. Habitualmente, las cadenas livianas humanas se clasifican como cadenas livianas kappa y lambda. Además, las cadenas pesadas humanas típicamente se clasifican como mu, delta, gamma, alfa, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas livianas y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región “J” de aproximadamente 12 o más aminoácidos, donde la cadena pesada además incluye una región “D” de alrededor de 10 aminoácidos más. Ver, en general, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

Las regiones variables de cada cadena pesada y liviana se emparejan para formar el sitio de unión de anticuerpo. En consecuencia, en general, un anticuerpo intacto IgG tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, en general, los dos sitios de unión son los mismos.

Normalmente, todas las cadenas exhiben la misma estructura general de regiones de marco relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones de determinación de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par  
5 habitualmente están alineadas por las regiones de marco, a fin de permitir la unión a un epítopo específico. En general, desde N-terminal hasta C-terminal, tanto la cadena liviana como la pesada comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es, en general, de acuerdo con las definiciones de *Sequences of Proteins of*  
10 *Immunological Interest*, Kabat, *et al.*; National Institutes of Health, Bethesda, Md. ; 5<sup>th</sup> ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978) *Adv. Prot. Chem.* 32:1-75; Kabat, *et al.*, (1977), *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616; Chothia, *et al.*, (1987) *J Mol. Biol.* 196: 901-917 o Chothia, *et al.*, (1989), *Nature*, 342: 878-883.

De acuerdo con la presente invención, el término "región hipervariable" se  
15 refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión de antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región de determinación de complementariedad" o "CDR" (es decir, los residuos 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) y 89-97 (CDRL3) en el dominio variable de cadena liviana, y los residuos 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) y 95-  
20 102 (CDRH3), en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.* (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) y/o aquellos residuos de una "anilla hipervariable" (es decir, los residuos 26-32 (CDRL1), 50-52 (CDRL2) y 91-96 (CDRL3) en el dominio variable de cadena liviana, y 26-32 (CDRH1), 53-55  
25 (CDRH2) y 96-101 (CDRH3), en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk (1987), *J. Mol. Biol.* 196: 901-917). De acuerdo con esta solicitud, el término residuos de "marco" o "FR" se refiere a aquellos residuos de dominio variable

diferentes de los residuos de región hipervariable definidos en esta solicitud como residuos de CDR.

Un "agente de unión" se refiere a una molécula, molécula pequeña, macromolécula, un anticuerpo, un fragmento o análogo de anticuerpo, o un receptor soluble, capaz de unión a un blanco. Un "agente de unión" además  
5 puede hacer referencia a un complejo de moléculas, por ejemplo, un complejo no covalente, a una molécula ionizada, y a una molécula covalente o no covalentemente modificada, por ejemplo, modificada mediante la fosforilación, acilación, el entrecruzamiento, el ciclado, o la disociación limitada, que es capaz  
10 de unión a un blanco. Un "agente de unión" también puede referirse a una molécula capaz de unión a un blanco en combinación con un estabilizador, excipiente, una sal, un regulador, solvente o aditivo. La "unión" puede definirse como una asociación del agente de unión con un blanco, donde la asociación logra la reducción del movimiento browniano normal del agente de unión, en los  
15 casos donde el agente de unión puede ser disuelto o suspendido en solución.

Una "cantidad eficaz" abarca una cantidad suficiente para aliviar o prevenir un síntoma o signo de la afección médica. La cantidad eficaz además significa una cantidad suficiente para permitir o facilitar el diagnóstico. Una cantidad eficaz para un sujeto veterinario o paciente particular puede variar conforme a factores  
20 tales como la afección tratada, el estado de salud general del paciente, el método de vía y dosis de la administración, y la gravedad de los efectos secundarios (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nro. 5.888.530, cedida a Netti, *et al.*). Una cantidad eficaz puede ser la dosis máxima o el protocolo de dosificación que evita efectos secundarios o efectos tóxicos significativos. El efecto logrará una  
25 mejoría de un parámetro o una medida de diagnóstico de por lo menos el 5%, habitualmente, por lo menos el 10%, más habitualmente, por lo menos el 20%, más habitualmente, por lo menos el 30%, preferentemente, por lo menos el 40%,

más preferentemente, por lo menos el 50%, con mayor preferencia, por lo menos el 60%, con mayor preferencia, por lo menos el 70%, aun con mayor preferencia, por lo menos el 80%, e incluso con mayor preferencia, por lo menos el 90%, donde el 100% se define como el parámetro de diagnóstico expuesto por un  
5 sujeto normal (ver, por ejemplo, las referencias de Maynard, *et al.* (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., London, UK).

El término “exógeno” se refiere a sustancias que son producidas fuera de  
10 un organismo, de una célula, o del organismo humano, de acuerdo con el contexto. El término “endógeno” se refiere a sustancias que son producidas dentro de una célula, de un organismo, o del organismo humano, conforme al contexto.

El término “homología” se refiere a la similitud de secuencia entre dos  
15 secuencias de polinucleótidos o entre dos secuencias de polipéptidos. Cuando una posición en ambas secuencias comparadas es ocupada por la misma base o la misma subunidad de monómero de aminoácido, por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN es ocupada por adenina, entonces las moléculas son homólogas en dicha posición. El porcentaje de homología entre  
20 dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias, dividido por la cantidad de posiciones comparadas  $\times 100$ . Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias coinciden o son homólogas cuando las secuencias son óptimamente alineadas, entonces las dos secuencias son 60% homólogas. En general, la  
25 comparación se efectúa cuando dos secuencias son alineadas de modo de obtener el máximo porcentaje de homología.

Los términos “afección inmunitaria” o “trastorno inmunitario” contempla, por ejemplo, la inflamación patológica, un trastorno inflamatorio, y una enfermedad o un trastorno autoinmunitario. Una “afección inmunitaria” además se refiere a infecciones, infecciones persistentes y afecciones proliferativas, tales como

5 cáncer, tumores y angiogénesis, lo que abarca infecciones, tumores y cáncer, que resisten la erradicación por el sistema inmunitario. Una “afección cancerosa” incluye, por ejemplo, cáncer, células cancerosas, tumores, angiogénesis y afecciones precancerosa tales como displasia.

Un “trastorno inflamatorio” significa un trastorno o una afección patológica

10 donde la patología es consecuencia, en su totalidad o en parte, de, por ejemplo, un cambio en la cantidad, un cambio en el índice de migración, o un cambio en la activación de células del sistema inmunitario. Las células del sistema inmunitario incluyen, por ejemplo, células T, células B, monocitos o macrófagos, células que presentan antígeno (APC, según su sigla en inglés), células dendríticas,

15 microgliocitos, células NK (linfocitos citolíticos naturales), células NKT, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, o cualquier otra célula específicamente asociada con la inmunología, por ejemplo, células epiteliales o endoteliales productoras de citoquinas.

Un “anticuerpo de unión aislado” se refiere al estado de purificación de un

20 compuesto de unión, y en dicho contexto, significa que la molécula está sustancialmente libre de otras moléculas biológicas tales como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, carbohidratos, o u otro material tal como restos celulares y medios de crecimiento. En general, el término “aislado” no tiene la intención de referirse a la ausencia completa de dicho material, o a la ausencia de agua,

25 reguladores o sales, a menos que estos se presenten en cantidades que interfieren de manera sustancial con el uso experimental o terapéutico del compuesto de unión, como se describe en esta solicitud.

Una "molécula de ácido nucleico aislada" significa un ADN o ARN de origen genómico, ARNm, ADNc o sintético o alguna combinación de los anteriores, que no está asociada con la totalidad o con una porción de un polinucleótido donde el polinucleótido aislado se halla en la naturaleza, o está ligada a un polinucleótido al cual no se liga en la naturaleza. Para los propósitos de esta invención, debe entenderse que "una molécula de ácido nucleico que comprende" una secuencia de nucleótidos particular no contempla cromosomas intactos. Las moléculas de ácido nucleico aisladas que "comprenden" secuencias de ácido nucleico específicas pueden incluir, además de las secuencias especificadas, secuencias codificadoras para hasta diez, o aun, hasta veinte o más otras proteínas o sus porciones o fragmentos, o pueden incluir secuencias reguladoras funcionalmente ligadas que controlan la expresión de la región codificadora de las secuencias de ácido nucleico citadas; o pueden incluir secuencias de vectores.

La frase "secuencias de control" se refieren a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificadora funcionalmente ligada en un organismo huésped particular. Las secuencias de control adecuadas para procariotos, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente, una secuencia de operador, y un sitio de unión de ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y mejoradores.

Un ácido nucleico está "funcionalmente ligado" cuando está colocado en relación funcional con respecto a otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o un líder de secreción está funcionalmente ligado al ADN para un polipéptido, si es expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o mejorador está funcionalmente ligado a una secuencia codificadora si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión de ribosoma está funcionalmente ligado a una secuencia codificadora si está ubicado de modo de facilitar la traducción. En general, el

término "funcionalmente ligado" significa que las secuencias de ADN ligadas son contiguas, y en el caso de un líder de secreción, son contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los mejoradores no necesariamente deben ser contiguos. La unión se logra mediante la ligación en sitios de restricción convenientes. Si  
5 dichos sitios no existen, se usan conectores o adaptadores de oligonucleótidos sintéticos, de acuerdo con la práctica convencional.

Conforme a la presente invención, los términos "célula", "estirpe celular", y "cultivo celular" se usan de modo indistinto, y todas dichas designaciones incluyen la descendencia. Por lo tanto, los términos "transformantes" y "células  
10 transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y cultivos derivados de ella, sin consideración de la cantidad de transferencias. Se entiende además que toda la descendencia puede no ser precisamente idéntica en términos de contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la identificada  
15 sistemáticamente en la célula originalmente transformada. Cuando se proponen designaciones distintivas, estas serán claras a partir del contexto.

Conforme a la presente solicitud, la "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" se refiere a un procedimiento o una técnica donde cantidades diminutas de un trozo específico de ácido nucleico, ARN o ADN son amplificadas, como se  
20 describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nro. 4.683.195. En general, la información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá debe estar disponible, de modo de poder diseñar cebadores de oligonucleótidos; estos cebadores serán idénticos o similares a las hebras opuestas del patrón por ser amplificado. Los nucleótidos terminales 5' de los dos  
25 cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR puede usarse de modo de amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas del ADN genómico total, y ADNc transcrito desde ARN

celular total, secuencias de bacteriófagos o plásmidos, etc. Ver, en general, las referencias de Mullis *et al.* (1987), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263; Erlich, ed., (1989), *PCR TECHNOLOGY* (Stockton Press, N. Y.). De acuerdo con esta solicitud, se considera que la PCR es un ejemplo, si bien no el único, de un  
5 método de reacción de la polimerasa de ácido nucleico para la amplificación de una muestra de ensayo de ácido nucleico, que comprende el uso de un ácido nucleico conocido como cebador, y una polimerasa de ácido nucleico para la amplificación o generación de un trozo específico de ácido nucleico.

De acuerdo con la presente solicitud, el término "secuencia de línea  
10 germinal" se refiere a una secuencia de ADN de inmunoglobulina no redispuesta. Puede usarse cualquier fuente adecuada de inmunoglobulina no redispuesta.

Los "inhibidores" y "antagonistas", o "activadores" y "agonistas" se refieren a moléculas inhibitorias o activadoras, respectivamente, por ejemplo, para la activación de, por ejemplo, un ligando, receptor, cofactor, un gen, una célula, un  
15 tejido, o un órgano. Por ejemplo, un modulador de un gen, receptor, ligando, o de una célula es una molécula que altera una actividad del gen, receptor, ligando, o de la célula, donde la actividad puede ser activada, inhibida, o alterada en sus propiedades reguladoras. El modulador puede actuar solo, o puede utilizar un cofactor, por ejemplo, una proteína, un ion metálico o una molécula pequeña. Los  
20 inhibidores son compuestos que disminuyen, bloquean, previenen, demoran la activación, inactivan, desensibilizan o regulan en forma descendente, por ejemplo, un gen, una proteína, un ligando, un receptor, o una célula. Los activadores son compuestos que aumentan, activan, facilitan, aumentan la activación, sensibilizan o regulan en forma ascendente, por ejemplo, un gen, una proteína, un ligando,  
25 receptor, o una célula. Un inhibidor también puede definirse como un compuesto que reduce, bloquea o inactiva una actividad constitutiva. Un "agonista" es un compuesto que interactúa con un blanco para causar o favorecer un aumento en

la activación del blanco. Un "antagonista" es un compuesto que se opone a las acciones de un agonista. Un antagonista previene, reduce, inhibe, o neutraliza la actividad de un agonista. Un antagonista además puede prevenir, inhibir, o reducir la actividad constitutiva de un blanco, por ejemplo, un receptor blanco, aun  
5 cuando no haya agonista identificado. En el caso de BTLA, un agonista de BTLA iniciará y potenciará la señal negativa suministrada por BTLA a células B y T. Por otra parte, un antagonista de BTLA bloqueará la señal para células B y T, para aumentar así la activación o proliferación de células B y T.

A fin de estudiar el alcance de inhibición, por ejemplo, se tratan muestras o  
10 ensayos que comprenden una proteína, un gen, una célula o un organismo determinado, con un potencial activador o inhibidor, y se comparan con muestras de control sin el inhibidor. Las muestras de control, es decir, muestras no tratadas con antagonista, son asignadas un valor de actividad relativo de 100%. La inhibición se logra cuando el valor de actividad relativo al control es de alrededor  
15 del 90% o menos, típicamente, 85% o menos, más habitualmente, 80% o menos, más habitualmente, 75% o menos; en general, 70% o menos, más en general, 65% o menos, más aun en general, 60% o menos, típicamente, 55% o menos, habitualmente, 50% o menos, más habitualmente, 45% o menos, aun más habitualmente, 40% o menos, preferentemente, 35% o menos, más  
20 preferentemente, 30% o menos, aun más preferentemente, 25% o menos, y con mayor preferencia, menos de 25%. La activación se logra cuando el valor de actividad relativo al control es de alrededor del 110%, en general, por lo menos 120%, más en general, por lo menos 140%, más en general, por lo menos 160%, a menudo, por lo menos 180%, más a menudo, por lo menos de 2 veces, más a  
25 menudo, por lo menos 2,5 veces, habitualmente, por lo menos 5 veces, más habitualmente, por lo menos 10 veces, preferentemente, por lo menos 20 veces,

más preferentemente, por lo menos 40 veces, y con mayor preferencia, por lo menos más de 40 veces mayor.

Los criterios de valoración en la activación o inhibición pueden ser controlados de la siguiente manera. La activación, inhibición y la respuesta al tratamiento, por ejemplo, de una célula, un líquido fisiológico, un tejido, órgano y un sujeto humano o animal, pueden controlarse por medio de un criterio de valoración. El criterio de valoración puede comprender una cantidad o un porcentaje predeterminado, por ejemplo, de indicios de inflamación, oncogenicidad, o secreción o desgranulación celular, tal como la liberación de una citoquina, de oxígeno tóxico, o de una proteasa. El criterio de valoración puede comprender, por ejemplo, una cantidad predeterminada del flujo o transporte de iones; la migración celular; la adhesión celular; la proliferación celular; el potencial para la metástasis; la diferenciación celular; y el cambio en el fenotipo, por ejemplo, el cambio en la expresión de genes en relación con la inflamación, la apoptosis, la transformación, el ciclo celular o la metástasis (ver, por ejemplo, las referencias de Knight (2000), *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 30: 145–158; Hood and Cheresch (2002), *Nature Rev. Cancer*, 2:91–100; Timme, *et al.* (2003), *Curr. Drug Targets* 4: 251–261; Robbins and Itzkowitz (2002), *Med. Clin. North Am.* 86: 1467–1495; Grady and Markowitz (2002), *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 3: 101–128; Bauer, *et al.* (2001) *Glia*, 36: 235–243; Stanimirovic and Satoh (2000), *Brain Pathol.* 10: 113–126).

Un criterio de valoración de inhibición es, en general, el 75% del control o menos; preferentemente, el 50% del control o menos; más preferentemente, el 25% del control o menos; y con mayor preferencia, el 10% del control, o menos. En general, un criterio de valoración de activación es por lo menos el 150% del control, preferentemente, por lo menos dos veces más que el control; más

preferentemente, por lo menos cuatro veces más que el control, y con mayor preferencia, por lo menos diez veces más que el control.

Un "ligando" se refiere, por ejemplo, a una molécula pequeña, un péptido, un polipéptido y una molécula ligada a la membrana o asociada a la membrana, o a uno de sus complejos, que puede actuar como un agonista o antagonista de un receptor. El término "ligando" además contempla un agente que no es un agonista o antagonista, si bien puede unirse al receptor. Asimismo, un "ligando" incluye un ligando ligado a membrana, que se ha cambiado, por ejemplo, mediante métodos químicos o biotecnológicos, a una versión soluble del ligando ligado a la membrana. Por convención, cuando un ligando está ligado a la membrana en una primera célula, el receptor habitualmente aparece en una segunda célula. La segunda célula puede tener la misma o diferente identidad que la primera célula. Un ligando o receptor puede ser enteramente intracelular, es decir, puede residir en el citosol, en el núcleo, o en algún otro compartimiento intracelular. El ligando o receptor puede cambiar su ubicación, por ejemplo, de un compartimiento intracelular a la superficie externa de la membrana plasmática. El complejo de un ligando y receptor se denomina un "complejo de receptor de ligando". Cuando un ligando y un receptor participan en una vía de señalización, el ligando aparece en una posición corriente ascendente, y el receptor aparece en una posición corriente descendente de la vía de señalización. HVEM es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF. Además de la unión a BTLA, también puede unirse a LIGHT, LT $\alpha$  y CD160.

Una "molécula pequeña" se define como una molécula con un peso molecular inferior a 10 kDa, típicamente, inferior a 2 kDa, preferentemente, inferior a 1 kDa, y con mayor preferencia, inferior a alrededor de 500 Da. Las moléculas pequeñas incluyen, sin limitación, moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas, moléculas orgánicas que contienen un componente inorgánico, moléculas que

comprenden un átomo radiactivo, moléculas sintéticas, miméticos peptídicos y miméticos de anticuerpos. Como un agente terapéutico, una molécula pequeña puede ser más permeable a las células, menos sensible a la degradación y menos apta para la producción de una respuesta inmunitaria, en comparación con  
5 las moléculas grandes. Se han descrito moléculas pequeñas, tales como miméticos peptídicos de anticuerpos y citoquinas, al igual que toxinas de moléculas pequeñas (ver, por ejemplo, las referencias de Casset, *et al.* (2003), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307: 198–205; Muyldermans (2001), *J. Biotechnol.*, 74: 277–302; Li (2000), *Nat. Biotechnol.*, 18: 1251–1256;  
10 Apóstolopoulos, *et al.* (2002), *Curr. Med. Chem.*, 9: 411–420; Monfardini, *et al.* (2002), *Curr. Pharm. Des.*, 8: 2185–2199; Domingues, *et al.* (1999), *Nat. Struct. Biol.*, 6: 652–656; Sato and Sone (2003), *Biochem. J.*, 371: 603–608; Patente de los Estados Unidos Nro. 6.326.482, cedida a Stewart, *et al.*).

La unión “específica” o “selectiva”, con referencia a un ligando/receptor, anticuerpo/antígeno, u otro par de unión, indica una reacción de unión que es  
15 determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros componentes biológicos. En consecuencia, en las condiciones designadas, un ligando especificado se une a un receptor particular y no se une de manera significativa a otras proteínas presentes en la muestra. El anticuerpo, o  
20 compuesto de unión derivado del sitio de unión de antígeno de un anticuerpo, del método contemplado, se une a su antígeno, o a una de sus variantes o muteínas, con una afinidad que es por lo menos dos veces mayor, preferentemente, por lo menos diez veces mayor, más preferentemente, por lo menos 20 veces mayor, y con mayor preferencia, por lo menos 100 veces mayor, que la afinidad con  
25 cualquier otro antígeno.

De acuerdo con la presente solicitud, el término “agente inmunomodulador” se refiere a agentes naturales o sintéticos que suprimen o modulan una respuesta

inmunitaria. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta humoral o celular. Los agentes inmunomoduladores abarcan agentes inmunosupresores o antiinflamatorios.

Los “agentes inmunosupresores”, “fármacos inmunosupresores” o “inmunosupresores”, de acuerdo con esta solicitud, son agentes terapéuticos que se usan en la terapia de la actividad del sistema inmunitario. Clínicamente, se usan para prevenir el rechazo de tejidos y órganos trasplantados (por ejemplo, médula ósea, corazón, riñón), o en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o enfermedades que con mayores probabilidades son de origen autoinmunitario (por ejemplo, artritis reumatoide, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple). Los fármacos inmunosupresores pueden clasificarse como: glucocorticoesteroides; agentes citoestáticos; anticuerpos; modificadores de la respuesta biológica tales como proteínas de fusión Ig que incluyen CTLA-4/Ig (Abatacept™); fármacos que actúan sobre inmunofilinas; otros fármacos, que incluyen agentes quimioterapéuticos conocidos utilizados en el tratamiento de trastornos proliferativos, tales como micofenolatemofetil (MMF). Para la esclerosis múltiple, en particular, los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse en conjunto con una nueva clase de agentes terapéuticos del tipo proteína de unión de mielina, conocida como copaxonas.

Los “agentes antiinflamatorios” o “fármacos antiinflamatorios” se refieren tanto a agentes terapéuticos corticoesteroides como no corticoesteroides. Los corticoesteroides, también conocidos como corticoides, son fármacos que se asemejan estrechamente al cortisol, una hormona producida naturalmente por las glándulas suprarrenales. Los corticoesteroides se usan como el principal tratamiento para ciertas afecciones inflamatorias, tales como: vasculitis sistémica (inflamación de los vasos sanguíneos); y miositis (inflamación del músculo). Los

corticoesteroides también podrían usarse en forma selectiva para el tratamiento de afecciones inflamatorias tales como: artritis reumatoide (artritis inflamatoria crónica que se produce en las articulaciones, en ambos laterales del cuerpo); lupus eritematoso sistémico (una enfermedad generalizada causada por la función anormal del sistema inmunitario); síndrome de Sjögren (trastorno crónico que causa sequedad ocular y bucal).

Los fármacos antiinflamatorios no corticoesteroides, habitualmente abreviados como AINE, son fármacos con efectos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios –reducen el dolor, la fiebre y la inflamación. El término “no corticoesteroide” se usa para distinguir estos fármacos de los corticoesteroides, que (entre una amplia gama de otros efectos) tienen una acción similar antiinflamatoria, depresora eicosanoide. Los AINE se indican generalmente para el alivio sintomático de las siguientes afecciones: artritis reumatoide; artrosis; artropatías inflamatorias (por ejemplo, espondiloartritis anquilosante, artritis soriásica, síndrome de Reiter); gota aguda; dismenorrea; dolor óseo metastásico; cefalea y migraña; dolor posoperatorio; dolor leve a moderado debido a la inflamación y la lesión de tejido; pirexia; y cólico renal. Los AINE incluyen salicilatos, ácidos arilalcanoicos, ácidos 2–arilpropiónicos (profenos), ácidos N–arilantranílicos (ácidos fenámicos), oxicámicos, coxibs y sulfonanilidas.

Pueden administrarse fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD, según su sigla en inglés), a menudo, en combinación con los AINE. Los fármacos DMARD comúnmente prescritos incluyen hidroxicloroquina/cloroquina, metotrexato, terapia de oro, sulfasalazina y azatioprina.

Una “vía de transducción de señal” se refiere a la relación bioquímica entre una diversidad de moléculas de transducción de señal que cumplen un rol en la transmisión de una señal desde una porción de una célula hacia otra porción de

una célula. De acuerdo con la presente solicitud, el término “receptor de superficie celular” incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal, y la transmisión de dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un “receptor de superficie celular” de la  
5 presente invención es el receptor BTLA.

**Anticuerpos específicos para BTLA humano.**

La presente invención provee generalmente anticuerpos aislados o sus fragmentos de unión de antígeno que se unen a BTLA, y usos de dichos anticuerpos o sus fragmentos de unión de antígeno. Más específicamente, la  
10 invención provee anticuerpos anti-BTLA completamente humano aislados y métodos de uso de los anticuerpos o sus fragmentos de unión de antígeno, en el tratamiento de enfermedades. Ejemplos de anticuerpos anti-BTLA completamente humanos incluyen, sin limitación, Hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7 y hu Mab4C7.

15 La presente invención provee un anticuerpo agonista anti-BTLA aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno, donde el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno exhibe una o más de las siguientes propiedades: (1) no bloquea la unión de HVEM o LIGHT a BTLA humano; (2) reacciona en forma cruzada con BTLA macaco; (3) tiene un valor de  $K_D$  para la unión a BTLA humano  
20 de, como máximo, alrededor de  $2,5 \times 10^{-9}$ , en un ensayo de unión de proteína (por ejemplo, Biacore); y (4) un valor de  $EC_{50}$  de por lo menos alrededor de 10 nM, en un ensayo de activación de células T y B. En una realización, el anticuerpo anti-BTLA o un fragmento del mismo de unión a antígeno tiene un valor  $K_D$  para la unión a BTLA humano de, como máximo, alrededor de  $2,5 \times 10^{-9}$ , en un ensayo  
25 de unión de proteína (por ejemplo, Biacore; Ejemplos 2–3) y un valor de  $EC_{50}$  de alrededor de 10–100 nM, en un ensayo de activación de células T y B.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno es un anticuerpo completamente humano aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno, que bloquea la unión de HVEM a BTLA. Aun en otra realización, los Ejemplos de dichos anticuerpos incluyen, sin limitación, el anticuerpo anti-BTLA  
5 completamente humano, hu Mab4C7.

El anticuerpo aislado, o un fragmento del mismo de unión a antígeno, que se une a BTLA, puede comprender una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones de determinación de complementariedad (CDR) de los anticuerpos descritos y fragmentos de unión de antígeno de la invención. Las una, dos, tres, cuatro, cinco  
10 o seis CDR pueden seleccionarse de manera independiente de las secuencias de CDR descritas (ver Tabla 1, Tabla 2) de los anticuerpos y fragmentos de unión de antígeno de la invención. Alternativamente, las una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR pueden seleccionarse de las secuencias de CDR de un solo anticuerpo descrito o fragmento de unión de antígeno de la invención. En ciertas  
15 realizaciones, una, dos o tres CDR se seleccionan de las CDR de  $V_L$  (por ejemplo, Tabla 1; SEQ. ID. NOS.: 12–14) de los anticuerpos agonistas descritos, y/o una, dos o tres CDR son seleccionadas de las CDR de  $V_H$  (por ejemplo, Tabla 2; SEQ. ID. NOS.: 5–7) de la invención descrita. En otra realización, una, dos o tres CDR se seleccionan de las CDR de  $V_L$  (por ejemplo, Tabla 1; SEQ. ID. NOS.: 26–28)  
20 de los anticuerpos antagonistas descritos, y una, dos o tres CDR se seleccionan de las CDR de  $V_H$  (por ejemplo, Tabla 2; SEQ. ID. NOS.: 19–21) de la invención descrita.

El anticuerpo aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno que se une a BTLA puede comprender por lo menos un dominio variable de cadena liviana de anticuerpo ( $V_L$ ) que comprende una o más de CDR–L1, CDR–L2 o  
25 CDR–L3 seleccionadas del grupo que consiste en: (a) CDR–L1, CDR–L2 y CDR–L3 de la región variable del anticuerpo hu Mab8D5; (b) CDR–L1, CDR–L2 y CDR–

L3 de la región variable del anticuerpo hu Mab8A3; (c) CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la región variable del anticuerpo hu Mab21H6; y (d) CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la región variable del anticuerpo hu Mab19A7.

El anticuerpo aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno que se une a BTLA puede comprender por lo menos un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (V<sub>H</sub>) que comprende una o más de CDR-H1, CDR-H2 o CDR-H3 seleccionadas del grupo que consiste en: (a) CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la región variable del anticuerpo hu Mab8D5; (b) CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la región variable del anticuerpo hu Mab8A3; (c) CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la región variable del anticuerpo hu Mab21H6; y (d) CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la región variable del anticuerpo hu Mab19A7.

En una realización preferida, el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno que se une a BTLA comprende por lo menos un dominio variable de cadena liviana de anticuerpo (V<sub>L</sub>) que comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 seleccionadas del grupo que consiste en: (a) CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la región variable del anticuerpo hu Mab8D5; (b) CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la región variable del anticuerpo hu Mab8A3; (c) CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la región variable del anticuerpo hu Mab21H6; y (d) CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la región variable del anticuerpo hu Mab19A7, y por lo menos un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) que comprende una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 seleccionadas del grupo que consiste en: (a) CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la región variable del anticuerpo hu Mab8D5; (b) CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la región variable del anticuerpo hu Mab8A3; (c) CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la región variable del anticuerpo hu Mab21H6; y (d) CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la región variable del anticuerpo hu Mab19A7.

Las secuencias de las CDR de cadena liviana y pesada de los anticuerpos de la presente invención se proporcionan en las Tablas 1 y 2, respectivamente. A modo de ejemplo, y no de limitación, las CDR de dominio V<sub>L</sub> para anticuerpos agonistas se seleccionan de SEQ. ID. NOS.: 12–14, mientras que las CDR de dominio V<sub>L</sub> para anticuerpos antagonistas se seleccionan de SEQ. ID. NOS.: 26–28. Asimismo, las CDR de dominio V<sub>H</sub> para anticuerpos agonistas se seleccionan de SEQ. ID. NOS.: 7–9, mientras que las CDR de dominio V<sub>H</sub> para anticuerpos antagonistas se seleccionan de SEQ. ID. NOS.: 10–12.

10                   **Tabla 1: CDR de cadena liviana.**

| Anticuerpo                  | CDR1                                | CDR2                                | CDR3                                |
|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>8D5</b><br>(agonista)    | (SEQ. ID. NO.: 12)                  | (SEQ. ID. NO.: 13 )                 | (SEQ. ID. NO.: 14)                  |
| <b>4C7</b><br>(antagonista) | (SEQ. ID. NO.: 26, V <sub>K</sub> ) | (SEQ. ID. NO.: 27, V <sub>K</sub> ) | (SEQ. ID. NO.: 28, V <sub>K</sub> ) |

**Tabla 2: CDR de cadena pesada.**

| Anticuerpo                  | CDR1                | CDR2               | CDR3               |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| <b>8D5</b><br>(agonista)    | (SEQ. ID. NO.: 5)   | (SEQ. ID. NO.: 6 ) | (SEQ. ID. NO.: 7)  |
| <b>4C7</b><br>(antagonista) | (SEQ. ID. NO.: 19 ) | (SEQ. ID. NO.: 20) | (SEQ. ID. NO.: 21) |

La presente invención provee además un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno, que se une a BTLA y funciona como un anticuerpo agonista, y comprende el dominio V<sub>L</sub> maduro del anticuerpo Hu Mab8D5 (SEQ. ID. NO.: 18). En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal completamente humano. Ejemplos de anticuerpos anti-BTLA agonistas completamente humanos preferidos incluyen, sin limitación, hu

Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7, y sus fragmentos de unión de antígeno.

La presente invención además provee un anticuerpo aislado, o un fragmento del mismo de unión a antígeno, que se une a BTLA y funciona como un antagonista, y comprende el dominio  $V_L$  maduro del anticuerpo Hu Mab4C7 (SEQ. ID. NO.: 32). En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal completamente humano. Un ejemplo de un anticuerpo anti-BTLA antagonista completamente humano preferido es, sin limitación, hu Mab4C7 y sus fragmentos de unión de antígeno.

Además, la presente invención provee un anticuerpo aislado, o un fragmento del mismo de unión a antígeno, que se une a BTLA, y funciona como un agonista, y comprende por lo menos un dominio  $V_H$  seleccionado del grupo que consiste en (a) el dominio  $V_H$  maduro del anticuerpo Hu Mab8D5 (SEQ. ID. NO.: 11). En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo anti-BTLA agonista monoclonal completamente humano. Ejemplos de anticuerpos anti-BTLA agonistas completamente humanos preferidos incluyen, sin limitación, hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7, y sus fragmentos de unión de antígeno.

La presente invención provee, asimismo, un anticuerpo aislado, o un fragmento del mismo de unión a antígeno, que se une a BTLA y funciona como un antagonista, y que comprende por lo menos un dominio  $V_H$  seleccionado del grupo que consiste en (a) el dominio  $V_H$  maduro del anticuerpo hu Mab4C7 (SEQ. ID. NO.: 25). En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo anti-BTLA antagonista completamente humano. Un ejemplo de un anticuerpo anti-BTLA antagonista completamente humano preferido es, sin limitación, hu Mab4C7 y sus fragmentos de unión de antígeno.

La presente invención provee además un anticuerpo agonista aislado, o un fragmento del mismo de unión a antígeno, que se une a BTLA y tiene por lo menos un dominio  $V_L$  seleccionado del grupo que consiste en SEQ. ID. NOS: 12, 13 y 14, y por lo menos un dominio  $V_H$  seleccionado del grupo que consiste en  
5 SEQ. ID. NOS.: 5, 6 y 7. En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo anti-BTLA agonista completamente humano. Ejemplos de anticuerpos anti-BTLA agonistas completamente humanos preferidos incluyen, sin limitación, hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7, y sus fragmentos de unión de antígeno.

10 La presente invención además provee un anticuerpo antagonista aislado, o un fragmento del mismo de unión a antígeno, que se une a BTLA, y que tiene por lo menos un dominio  $V_L$  seleccionado del grupo que consiste en SEQ. ID. NOS.: 26, 27, 28, y por lo menos un dominio  $V_H$  seleccionado del grupo que consiste en SEQ. ID. NOS.: 19, 20 y 21. En una realización preferida, el anticuerpo es un  
15 anticuerpo anti-BTLA antagonista completamente humano. Ejemplos de anticuerpos anti-BTLA antagonistas completamente humanos preferidos incluyen, sin limitación, hu Mab4C7 y sus fragmentos de unión de antígeno.

En una realización, el anticuerpo aislado de la presente invención comprende una región constante de cadena pesada, preferentemente, una región  
20 constante humana, tal como la región constante de cadena pesada humana  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ , o  $\gamma 4$  o una de sus variantes. En otra realización, el compuesto de unión comprende una región constante de cadena liviana, preferentemente, una región constante de cadena liviana humana, tal como la región de cadena liviana humana lambda o kappa o una de sus variantes. A modo de ejemplo, y no de  
25 limitación, la región constante de cadena pesada humana puede ser  $\gamma 1$ , y la región constante de cadena liviana humana puede ser kappa. En una realización

alternativa, la región Fc del anticuerpo es  $\gamma 4$ , con una mutación Ser228Pro (Schuurman, J *et. al.*, *Mol. Immunol.* 38: 1–8, 2001).

En una realización, el fragmento de unión de antígeno se selecciona del grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'–SH, Fv, scFv, F(ab')<sub>2</sub> y un diacuerpo.

5        La invención provee además polipéptidos aislados que comprenden los dominios V<sub>L</sub> (por ejemplo, SEQ. ID. NOS.: 16, 18, 30, 32, 37 y 38) y polipéptidos aislados que comprenden los dominios V<sub>H</sub> (por ejemplo, SEQ. ID. NOS.: 9, 11, 23 y 25) de los anticuerpos de la invención. En una realización, la invención provee un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión a antígeno que se une a BTLA  
10        y tiene dominios V<sub>L</sub> y dominios V<sub>H</sub> con por lo menos 95%, 90%, 85%, 80%, 75% o 50% de homología de secuencia. En otra realización, el compuesto de unión de la presente invención comprende dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> (con y sin secuencia de señal) que tienen hasta 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, y aun exhiben la propiedad de unión  
15        deseada.

Los términos “variantes conservadoramente modificadas” o “sustitución conservadora” se refieren a sustituciones de aminoácidos en una proteína, con otros aminoácidos que tienen características similares (por ejemplo, carga, tamaño de cadena lateral, hidrofobicidad/hidrofiliidad, conformación de espinazo  
20        y rigidez, etc.), de modo que pueden efectuarse cambios con frecuencia sin alterar la actividad biológica de la proteína. Los expertos en el arte reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran de manera sustancial la actividad biológica (ver, por ejemplo, la referencia de Watson *et al.* (1987), *Molecular*  
25        *Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). Además, es menos probable que las sustituciones de aminoácidos estructuralmente o funcionalmente similares alteren la actividad biológica.

Diversas realizaciones de los compuestos de unión de la presente invención comprenden cadenas de polipéptidos con secuencias que incluyen hasta 0 (sin cambios), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 o más sustituciones de aminoácidos conservadoras, en comparación con las secuencias de aminoácidos específicas que se revelan, por ejemplo, en las SEQ. ID. NOS.: 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 25, 30, 32 y 37. De acuerdo con esta solicitud, la frase “hasta X” sustituciones de aminoácidos conservadoras incluye 0 sustituciones, y cualquier cantidad de sustituciones, hasta X sustituciones inclusive. Dichas sustituciones ejemplares se realizan, preferentemente, de acuerdo con aquellas expuestas en la Tabla 3 que sigue.

**TABLA 3.**  
**Sustituciones de aminoácidos conservadoras.**

| Residuo original | Sustitución conservadora |
|------------------|--------------------------|
| Ala (A)          | Gly; Ser                 |
| Arg (R)          | Lys; His                 |
| Asn (N)          | Gln; His                 |
| Asp (D)          | Glu; Asn                 |
| Cys (C)          | Ser; Ala                 |
| Gln (Q)          | Asn                      |
| Glu (E)          | Asp; Gln                 |
| Gly (G)          | Ala                      |
| His (H)          | Asn; Gln                 |
| Ile (I)          | Leu; Val                 |
| Leu (L)          | Ile; Val                 |
| Lys (K)          | Arg; His                 |
| Met (M)          | Leu; Ile; Tyr            |
| Phe (F)          | Tyr; Met; Leu            |
| Pro (P)          | Ala                      |
| Ser (S)          | Thr                      |
| Thr (T)          | Ser                      |
| Trp (W)          | Tyr; Phe                 |

| Residuo original | Sustitución conservadora |
|------------------|--------------------------|
| Tyr (Y)          | Trp; Phe                 |
| Val (V)          | Ile; Leu                 |

La presente invención contempla además variantes de los anticuerpos de la invención conservadoras de la función. Las “variantes conservadoras de la función” son aquellas en las cuales uno o más residuos de aminoácidos en una proteína o enzima han sido cambiados, sin alterar la conformación y función generales del polipéptido, lo que incluye, sin limitación alguna, el reemplazo de un aminoácido con otro que tiene propiedades similares.

**Sustituciones de aminoácidos.**

La invención provee además polipéptidos aislados que comprenden los dominios V<sub>L</sub> de anticuerpos de BTLA agonistas (por ejemplo, SEQ. ID. NOS.: 16 y 18) y polipéptidos aislados que comprenden los dominios V<sub>H</sub> (por ejemplo, SEQ. ID. NOS.: 9 y 11) de anticuerpos de BTLA agonistas de la invención, que tienen hasta 0, 1, 2, 3, 4, ó 5 o más sustituciones de aminoácidos, y aún exhiben la capacidad de unión a BTLA.

En realizaciones adicionales, la invención provee polipéptidos aislados que comprenden los dominios V<sub>L</sub> de anticuerpos de BTLA antagonistas (por ejemplo, SEQ. ID. NOS.: 30 ó 32) y polipéptidos aislados que comprenden los dominios V<sub>H</sub> (por ejemplo, SEQ. ID. NOS.: 23 ó 25) de anticuerpos de BTLA antagonistas de la invención que tienen hasta 0, 1, 2, 3, 4, ó 5 o más sustituciones de aminoácidos, y aún exhiben la capacidad de unión a BTLA.

En otra realización, la invención provee un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión a antígeno, que se une a BTLA humano y tiene dominios V<sub>L</sub> y dominios V<sub>H</sub> con por lo menos 95%, 90%, 85%, 80%, 75% o 50% de homología de secuencia con respecto a uno o más de los dominios V<sub>L</sub> o los dominios V<sub>H</sub> que se describen en esta solicitud, y que exhibe unión a BTLA humano. En otra

realización, el compuesto de unión de la presente invención comprende dominios  $V_L$  y  $V_H$  (con y sin secuencia de señal) que tienen hasta 0, 1, 2, 3, 4, ó 5 o más sustituciones de aminoácidos, y exhibe unión a BTLA humano.

En ciertas realizaciones, será deseable cambiar ciertos aminoácidos que  
5 contienen cadenas laterales expuestas, por otro residuo de aminoácido, a fin de proporcionar mayor estabilidad química del anticuerpo final. Por ejemplo, un residuo asparagina (Asn) puede ser cambiado por Gln o Ala a fin de reducir el potencial para la formación de isoaspartato en cualquiera de las secuencias Asn-Gly dentro de una CDR. Un problema similar puede producirse en una secuencia  
10 de Asp-Gly. Ver la referencia de Reissner y Aswad (2003), *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 1281. La formación de isoaspartato puede debilitar o anular por completo la unión de un anticuerpo a su antígeno blanco. Ver la referencia de Presta (2005), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 116: 731, en 734. En una realización, la asparagina es cambiada por glutamina (Gln). Puede ser conveniente también alterar un  
15 aminoácido adyacente a un residuo asparagina (Asn) o glutamina (Gln) de modo de reducir la probabilidad de desamidación, que se produce en mayores índices cuando hay aminoácidos pequeños adyacentes a asparagina o glutamina. Ver la referencia de Bischoff & Kolbe (1994), *J. Chromatog.* 662: 261. Además, cualquier residuo metionina (típicamente Met expuesto a solvente) en CDR puede ser  
20 cambiado por Lys, Leu, Ala, o Phe a fin de reducir la posibilidad de oxidación del azufre de metionina, lo que podría reducir la afinidad de unión de antígeno y, además, contribuir a la heterogeneidad molecular en la preparación de anticuerpo final. En una realización, la metionina es cambiada por alanina (Ala). Asimismo, a fin de prevenir o minimizar potenciales enlaces peptídicos Asn-Pro hendibles,  
25 puede ser deseable alterar cualquier combinación Asn-Pro hallada en una CDR, para obtener Gln-Pro, Ala-Pro, o Asn-Ala. Los anticuerpos con dichas sustituciones luego se someten a la identificación sistemática de modo de

garantizar que las sustituciones no disminuyan la afinidad de unión de BTLA u otra actividad biológica deseada, hasta niveles inaceptables.

**TABLA 4. Variantes de CDR estabilizadoras ejemplares.**

| Residuo/s CDR →                              | Secuencia Variante Estabilizadora                    |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Asn–Gly<br>(N–G)                             | Gln–Gly, Ala–Gly, o Asn–Ala<br>(Q–G), (A–G), o (N–A) |
| Asp–Gly<br>(D–G)                             | Glu–Gly, Ala–Gly o Asp–Ala<br>(E–G), (A–G), o (D–A)  |
| Met (típicamente expuesta a solvente)<br>(M) | Lys, Leu, Ala, o Phe<br>(K), (L), (A), o (F)         |
| Asn<br>(N)                                   | Gln o Ala<br>(Q) o (A)                               |
| Asn–Pro<br>(N–P)                             | Gln–Pro, Ala–Pro, o Asn–Ala<br>(Q–P), (A–P), o (N–A) |

5

Las variantes de CDR ejemplares para VH de 8D5 incluyen:

CDR1: SYDMH (SEQ. ID. NO.: 5).

CDR1 variante SYDXH = donde X es M, K, L, A, o F (SEQ. ID. NO.: 38).

10

CDR3: EGMAAHNYYGMDV (SEQ. ID. NO.: 7).

CDR3 variante EGX<sub>1</sub>AAHX<sub>2</sub>YYGX<sub>1</sub>DV = donde X<sub>1</sub> es M, K, L, A, o F; X<sub>2</sub> es N, Q o A (SEQ. ID. NO.: 39).

Las variaciones X para las CDR de VH pueden seleccionarse de manera independiente en cualquier combinación.

15

Las variantes de CDR ejemplares para VL de 8D5 incluyen:

CDR2: DASNRAT (SEQ. ID. NO.: 13).

CDR2 variante: DASXRAT = donde X es Q o A (SEQ. ID. NO.: 40).

CDR3: QQRSNWPPIT (SEQ. ID. NO.: 14).

CDR3 variante: QQRSXWPPIT = donde X es Q o A (SEQ. ID. NO.: 41).

5 Las variaciones X para las CDR de VL pueden seleccionarse de manera independiente en cualquier combinación. Además, cualquier variación X descrita en estas solicitud puede seleccionarse de modo independiente en cualquier combinación, siempre que se mantengan la actividad o capacidad de unión deseadas.

Las variantes de CDR ejemplares para VH de 4C7 incluyen:

10 CDR2: YIYYSGSTKYNPSLKS (SEQ. ID. NO.: 20).

CDR2 variante: YIYYSGSTKYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>SLKS = donde X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> son N-P, Q-P, A-P, o N-A (SEQ. ID. NO.: 42).

CDR3: EWPYYYYEMDV (SEQ. ID. NO.: 21).

15 CDR3 variante: EWPYYYYEXDV = donde X es M, K, L, A, o F (SEQ. ID. NO.: 43).

Las variaciones X para las CDR de VH pueden seleccionarse de manera independiente en cualquier combinación.

Las expresiones "que consiste esencialmente en" o variaciones tales como "que consisten esencialmente en" o similares, utilizadas a lo largo de la memoria  
20 descriptiva y de las reivindicaciones, indican la inclusión de cualquier elemento o grupo de elementos citados, y la inclusión opcional de otros elementos, de similar o diferente naturaleza en comparación con aquella de los elementos citados, que no cambian materialmente las propiedades básicas o novedosas del régimen de dosificación, método o de la composición especificados. A modo de ejemplo no  
25 limitativo, un compuesto de unión que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos citada puede incluir también uno o más aminoácidos que no afectan materialmente las propiedades del compuesto de unión.

### Fondo de hibridación de ácido nucleico.

La presente invención incluye anticuerpos anti-BTLA y sus fragmentos, tales como aquellos codificados por ácidos nucleicos como se describe en las Tablas 1–2, o aquellos que codifican residuos de aminoácidos como se describe en la Tabla 4, al igual que ácidos nucleicos que hibridan con ellos. Preferentemente, los ácidos nucleicos hibridan en condiciones de baja rigurosidad, más preferentemente, en condiciones de rigurosidad moderada, y con mayor preferencia, en condiciones de alta rigurosidad, y preferentemente, exhiben actividad de unión de BTLA. Una molécula de ácido nucleico es “hibrizable” con otra molécula de ácido nucleico, tal como un ADNc, ADN genómico, o ARN, cuando una forma de hebra simple de la molécula de ácido nucleico puede anelarse (*annealing*: proceso de enfrentamiento y apareamiento de dos hebras de nucleótidos o parte de esas hebras) con la otra molécula de ácido nucleico en las condiciones apropiadas de temperatura y concentración iónica de solución (ver la referencia de Sambrook, *et al.*, supra). Las condiciones de temperatura y concentración iónica determinan la “rigurosidad” de la hibridación. Las condiciones típicas de hibridación de baja rigurosidad incluyen 55°C, 5 X SSC, 0,1% SDS y sin formamida; o 30% de formamida, 5 X SSC, 0,5% SDS a 42°C. Las condiciones típicas de hibridación de rigurosidad moderada son similares a las condiciones de baja rigurosidad, excepto que la hibridación se lleva a cabo en 40% de formamida, con 5 X o 6 X de SSC y 0,1% de SDS a 42°C. Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad son similares a las condiciones de hibridación de baja rigurosidad, excepto que las condiciones de hibridación se llevan a cabo en 50% de formamida, 5X o 6X de SSC a 42°C o, en forma opcional, a una temperatura más alta (por ejemplo, 57°C, 59°C, 60°C, 62°C, 63°C, 65°C o 68°C). En general, SSC es NaCl, 0,15 M, y Na–citrato, 0,015 M. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias

complementarias, si bien, de acuerdo con la rigurosidad de la hibridación, son posibles no coincidencias entre las bases. La rigurosidad apropiada para los ácidos nucleicos hibridantes depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementación, variables bien conocidas en el arte. Cuanto mayor es el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor es la rigurosidad en la cual pueden hibridar los ácidos nucleicos. Para híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han derivado ecuaciones para calcular la temperatura de fusión (ver la referencia de Sambrook, *et al.*, *supra*, 9.50–9.51). Para la hibridación con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, la posición de las no coincidencias se torna más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (ver la referencia de Sambrook, *et al.*, *supra*, 11.7–11.8).

Se incluyen además en la presente invención ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos y polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos que son por lo menos aproximadamente 70% idénticas, preferentemente, por lo menos aproximadamente 80% idénticas, más preferentemente, por lo menos aproximadamente 90% idénticas, y con mayor preferencia, por lo menos aproximadamente 95% idénticas (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) a las secuencias de referencia de nucleótidos y aminoácidos cuando la comparación se realiza por medio de un algoritmo BLAST, donde los parámetros del algoritmo se seleccionan de modo de obtener la mayor coincidencia entre las respectivas secuencias sobre la longitud entera de las respectivas secuencias de referencia. Los polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos que son por lo menos aproximadamente 70% similares, preferentemente, por lo menos aproximadamente 80% similares, más preferentemente, por lo menos aproximadamente 90% similares, y con mayor preferencia, por lo menos aproximadamente 95% similares (por ejemplo, 95%,

96%, 97%, 98%, 99%, 100%) a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de referencia, cuando la comparación se realiza con un algoritmo BLAST donde los parámetros del algoritmo se seleccionan de modo de lograr la mayor coincidencia entre las respectivas secuencias sobre la longitud entera de las respectivas  
5 secuencias de referencia, se incluyen también en la presente invención.

La identidad de secuencia se refiere a coincidencias exactas entre los nucleótidos o aminoácidos de dos secuencias que se comparan. La similitud de secuencia se refiere tanto a coincidencias exactas entre los aminoácidos de dos polipéptidos que se comparan, como a coincidencias entre aminoácidos no  
10 idénticos, bioquímicamente relacionados. Los aminoácidos bioquímicamente relacionados que comparten propiedades similares y que pueden ser intercambiables se describen con anterioridad.

Son útiles las siguientes referencias con respecto a los algoritmos BLAST. BLAST ALGORITHMS: Altschul, S.F., *et al.*, (1990), *J. Mol. Biol.* 215: 403-410; Gish, W., *et al.*, (1993), *Nature Genet.* 3: 266-272; Madden, T. L., *et al.*, (1996),  
15 *Meth. Enzymol.* 266: 131-141; Altschul, S. F., *et al.*, (1997), *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402; Zhang, J., *et al.* (1997), *Genome Res.*, 7: 649-656; Wootton, J. C., *et al.* (1993), *Comput. Chem.* 17: 149-163; Hancock, J. M. *et al.* (1994), *Comput. Appl. Biosci.*, 10: 67-70; ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff, M. O., *et al.*, "A model of evolutionary change in proteins" en *Atlas of Protein*  
20 *Sequence and Structure* (1978) vol. 5, supl. 3. M. O. Dayhoff (ed.), pp. 345-352, *Natl. Biomed. Res. Found.*, Washington, DC; Schwartz, R. M., *et al.*, "Matrices for detecting distant relationships" en *Atlas of Protein Sequence and Structure* (1978) vol. 5, supl. 3. M. O. Dayhoff (ed.), pp. 353-358, *Natl. Biomed. Res. Found.*,  
25 Washington, DC; Altschul, S. F., (1991), *J. Mol. Biol.* 219: 555-565; States, D. J., *et al.*, (1991), *Methods* 3: 66-70; Henikoff, S., *et al.*, (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10915-10919; Altschul, S. F., *et al.* (1993), *J. Mol. Evol.* 36: 290-300;

ALIGNMENT STATISTICS: Karlin, S., *et al.*, (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264–2268; Karlin, S., *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873–5877; Dembo, A., *et al.*, (1994) *Ann. Prob.* 22: 2022–2039; y Altschul, S. F., "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments" en  
5 *Theoretical and Computational Methods in Genome Research* (S. Suhai, ed.), (1997) pp. 1–14, Plenum, New York.

En otra realización, la invención se refiere a un ácido nucleico aislado, por ejemplo, ADN, que codifica los anticuerpos aislados o fragmentos de unión de antígeno de la invención. En una realización, el ácido nucleico aislado codifica un  
10 anticuerpo agonista o un fragmento del mismo de unión a antígeno que comprende por lo menos un dominio variable de cadena liviana de anticuerpo maduro ( $V_L$ ) y por lo menos un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo maduro ( $V_H$ ), donde el dominio  $V_L$  comprende por lo menos tres CDR que tienen una secuencia seleccionada de SEQ. ID. NOS.: 12–14, y el dominio  $V_H$   
15 comprende por lo menos tres CDR que tienen una secuencia seleccionada de SEQ. ID. NOS.: 5–7. En una realización, el ácido nucleico aislado codifica las secuencias de región variable de cadena pesada y liviana maduras de SEQ. ID. NO.: 18 y SEQ. ID. NO.: 11, respectivamente. En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado codifica tanto una cadena liviana como una cadena pesada en  
20 una sola molécula de ácido nucleico, y en otras realizaciones, las cadenas liviana y pesada son codificadas en dos o más moléculas de ácido nucleico separadas. En otra realización, los ácidos nucleicos además codifican una secuencia de señal.

Esta invención además proporciona vectores de expresión que  
25 comprenden los ácidos nucleicos aislados de la invención, donde el ácido nucleico está funcionalmente ligado a secuencias de control que son reconocidas por una célula huésped cuando la célula huésped es transfectada con el vector.

Se proveen además células huéspedes que comprenden un vector de expresión de la presente invención. La invención además se refiere a métodos de producción de un compuesto de unión de la presente invención, que comprenden el cultivo de una célula huésped que alberga un vector de expresión que codifica  
5 el compuesto de unión, en medio de cultivo, y el aislamiento del compuesto de unión, de la célula huésped o del medio de cultivo.

La invención se refiere además a anticuerpos o sus fragmentos de unión de antígeno, que se unen al mismo epítipo en BTLA humano, que el anticuerpo hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, o hu Mab19A7 (es decir, un anticuerpo  
10 agonista) o hu Mab4C7 (es decir, un anticuerpo antagonista que bloquea la unión con HVEM), por ejemplo, anticuerpos que son capaces de bloquear en forma cruzada la unión de cualquiera de los anticuerpos de la presente invención.

A modo de ejemplo, y no de limitación, los anticuerpos completamente humanos de la invención se unen a BTLA humano con un valor  $K_D$  de no más de  
15 aproximadamente 100 nM ( $1 \times 10^{-7}$  M); preferentemente, no más de alrededor de 10 nM; más preferentemente, no más de alrededor de 1 nM. Se prefieren aun más las realizaciones en las cuales los anticuerpos tienen valores  $K_D$  no superiores a alrededor de 200 pM ( $2 \times 10^{-10}$  M), 100 pM, 50 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM o aun 2 pM.

20 Puede usarse cualquier método adecuado para la generación de anticuerpos, a fin de generar los anticuerpos de la presente invención. Cualquier forma adecuada del BTLA humano puede usarse como el inmunógeno (antígeno) para la generación de los anticuerpos. A modo de ejemplo y no de limitación, puede usarse cualquier isoforma de BTLA humano o su fragmento, como el  
25 inmunógeno. Ejemplos incluyen, sin limitación, isoformas y variantes de empalme de BTLA humano como se describen en esta solicitud. En una realización

alternativa, puede usarse BTLA de macaco de la India como el inmunógeno, para la generación de los anticuerpos.

En una realización preferida, se generan anticuerpos monoclonales completamente humanos dirigidos contra BTLA, usando ratones transgénicos que portan partes del sistema inmunitario humano, en lugar del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos, que, en esta solicitud, pueden denominarse ratones “HuMAb”, contienen miniloci (minilugares) de genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de cadena liviana  $\kappa$  y pesada ( $\mu$  y  $\gamma$ ) humanas no redispuestas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los lugares de cadena  $\mu$  y  $\kappa$  endógenos (Lonberg, N., *et al.*, (1994), *Nature*, 368 (6474): 856–859). Por lo tanto, los ratones exhiben menor expresión de IgM de ratón o  $\kappa$ , y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y liviana humanas introducidos sufren el cambio de clase y la mutación somática, de manera de generar anticuerpos monoclonales IgGk humanos de alta afinidad (Lonberg, N., *et al.*, (1994), *supra*; reseñado en la referencia de Lonberg, N. (1994), *Handbook of Experimental Pharmacology*, 113: 49–101; Lonberg, N., *et al.*, (1995), *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65–93, y Harding, F., *et al.*, (1995), *Ann. N. Y Acad. Sci.*, 764: 536–546). La preparación de ratones HuMAb es comúnmente conocida en el arte y es descripta, por ejemplo, en las referencias de Taylor, L., *et al.*, (1992), *Nucleic Acids Research*, 20: 6287–6295; Chen, J., *et al.*, (1993), *International Immunology*, 5: 647–656; Tuaillon, *et al.*, (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90: 3720–3724; Choi, *et al.*, (1993), *Nature Genetics*, 4: 117–123; Chen, J., *et al.* (1993), *EMBO J.*, 12: 821–830; Tuaillon, *et al.*, (1994), *J. Immunol.*, 152: 2912–2920; Lonberg, *et al.*, (1994), *Nature*, 368 (6474): 856–859; Lonberg, N. (1994), *Handbook of Experimental Pharmacology*, 113: 49–101; Taylor, L., *et al.*, (1994), *International Immunology*, 6: 579–591; Lonberg, N., *et al.*, (1995), *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65–93; Harding, F., *et al.*, (1995), *Ann. N.Y Acad. Sci.*,

764: 536–546; Fishwild, D., *et al.* (1996), *Nature Biotechnology*, 14: 845–851, y Harding, *et al.* (1995), *Annals NY Acad. Sci.*, 764: 536–546. Ver, además, las Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; 5.770.429 y  
5 5.545.807; y las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional Nros. WO 98/24884; WO 94/25585; WO 93/12227; WO 92/22645 y WO 92/03918.

A fin de generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para BTLA, los ratones HuMab pueden ser inmunizados con un polipéptido BTLA antigénico, preferentemente, los residuos 31–152 de SEQ. ID. NO.: 35, como lo  
10 describen Lonberg, N., *et al.* (1994), *Nature*, 368 (6474): 856–859; Fishwild, D., *et al.*, (1996), *Nature Biotechnology*, 14: 845–851 y WO 98/24884. Preferentemente, los ratones tendrán 6–16 semanas de edad en la primera inmunización. Por ejemplo, puede usarse una preparación purificada de BTLA a fin de inmunizar los ratones HuMab en forma intraperitoneal o subcutánea. Los ratones también  
15 pueden ser inmunizados con células enteras HEK293 o CHO establemente transfectadas con un gen de BTLA. Un “polipéptido BTLA antigénico” puede hacer referencia a un polipéptido BTLA o cualquiera de sus fragmentos, preferentemente, cualquier fragmento de BTLA que produzca una respuesta inmunitaria anti-BTLA, preferentemente, en ratones HuMab.

20 En general, los ratones transgénicos HuMab responden bien con la inmunización inicial por vía intraperitoneal (IP) o subcutánea con antígeno en MPL<sup>®</sup> + TDM coadyuvante (Sigma, Producto Nro. M6536), seguida de inmunizaciones IP cada dos semanas o cada dos o tres semanas (habitualmente, durante un total de 6) con antígeno en MPL<sup>®</sup> + TDM coadyuvante. Los ratones  
25 pueden ser inmunizados, en primer lugar, con células que expresan BTLA (por ejemplo, células CHO o HEK293 establemente transfectadas), luego, con un fragmento soluble de BTLA (por ejemplo, los residuos 31–152 de SEQ. ID. NO.:

35), y reciben en forma continua inmunizaciones alternantes con los dos antígenos. La respuesta inmunitaria puede ser controlada durante el curso del protocolo de inmunización, donde se obtienen muestras de plasma mediante tomas de muestras de sangre retroorbitales. El plasma puede ser sometido a la  
5 identificación sistemática a fin de establecer la presencia de anticuerpos anti-BTLA, por ejemplo, por ELISA, y los ratones con suficientes valoraciones de inmunoglobulina pueden usarse para las fusiones. Los ratones pueden ser reforzados por vía intravenosa con antígeno, 4 días antes del sacrificio y la remoción del bazo. Se espera que pueda ser necesario realizar 2–3 fusiones para  
10 cada antígeno. Pueden ser inmunizados varios ratones para cada antígeno.

Las células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales, completamente humanos, anti-BTLA pueden ser producidas por métodos comúnmente conocidos en el arte. Estos métodos incluyen, sin limitación, la técnica de hibridoma originalmente desarrollada por Kohler, *et al.* (1975) (*Nature*,  
15 256: 495–497), al igual que la técnica de trioma (Hering, *et al.* (1988), *Biomed. Biochim. Acta.*, 47: 211–216, y Hagiwara, *et al.*, (1993), *Hum. Antibod. Hybridomas*, 4: 15), la técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor, *et al.*, (1983), *Immunology Today*, 4: 72, y Cote, *et al.*, (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 80: 2026–2030); la técnica de hibridoma EBV (Cole, *et al.*, en *Monoclonal*  
20 *Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77–96, 1985), y la electrofusión sobre la base de campo eléctrico usando un electroporador de fusión de desecho de cámara grande Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Preferentemente, se aíslan esplenocitos de ratón y se fusionan con PEG o mediante la electrofusión, a un estirpe celular de mieloma de ratón sobre la  
25 base de protocolos convencionales. Los hibridomas resultantes entonces pueden ser sometidos a la identificación sistemática a fin de establecer la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, pueden fusionarse

suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados, con un sexto de la cantidad de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63– Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50%. Las células pueden colocarse en placas, en una proporción de aproximadamente  $2 \times 10^5$  células/ml, en una placa de microvaloración de base plana; a continuación, se realiza una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene 20% de suero de clon fetal, 18% de medio acondicionado “653”, 5% de origen (IGEN), L–glutamina, 4 mM; L–glutamina, 1 mM; piruvato sódico, 1 mM; HEPES, 5 mM; 2–mercaptoetanol, 0,055 mM; 50 unidades/ml de penicilina; 50 mg/ml de estreptomycin; 50 mg/ml de gentamicina; y 1X HAT (Sigma; el HAT se agrega 24 horas después de la fusión). Después de dos semanas, las células pueden ser cultivadas en medio, donde el HAT es reemplazado por HT. Los receptáculos individuales entonces pueden ser sometidos a la identificación sistemática por medio del ensayo ELISA a fin de establecer anticuerpos IgG monoclonales humanos anti–BTLA. Una vez que se produce el crecimiento de hibridoma extenso, el medio puede observarse habitualmente luego de 10–14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpo pueden colocarse nuevamente en placa, pueden ser sometidos otra vez a la identificación sistemática, y si aún son positivos para anticuerpos IgG monoclonales anti–BTLA humanos, pueden subclonarse por lo menos dos veces, limitando la dilución. Los subclones estables entonces pueden cultivarse *in vitro* a fin de generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejido, para la caracterización.

Los anticuerpos anti–BTLA y sus fragmentos de unión de antígeno de la presente invención también pueden producirse de manera recombinada (o biotecnológica) (por ejemplo, en un sistema de expresión de *E.coli*/T7 como se describe anteriormente). En esta realización, los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de anticuerpo de la invención (por ejemplo,  $V_H$  o  $V_L$ ) pueden

insertarse en un plásmido sobre la base de pET y expresarse en el sistema de *E.coli*/T7. Hay varios métodos por los cuales pueden producirse anticuerpos recombinados, que son conocidos en el arte. Un ejemplo de método para la producción recombinada o biotecnológica de anticuerpos se describe en la

5 Patente de los Estados Unidos Nro. 4.816.567. La transformación puede efectuarse por cualquier método conocido para la introducción de polinucleótidos en una célula huésped. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células mamíferas son bien conocidos en el arte, e incluyen la transfección mediada por dextrano, la precipitación de fosfato de calcio, la

10 transfección mediada por polibreno, la fusión de protoplastos, la electroporación, la encapsulación de los polinucleótidos en liposomas, la inyección biolística y la microinyección directa del ADN en el núcleo. Además, las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en células mamíferas por medio de vectores virales. Los métodos para la transformación de células son bien conocidos en el arte. Ver,

15 por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nros. 4.399.216; 4.912.040; 4.740.461 y 4.959.455.

Los anticuerpos anti-BTLA también pueden ser sintetizados por cualquiera de los métodos expuestos en la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.331.415.

Las estirpes celulares mamíferas que pueden obtenerse para la expresión

20 son bien conocidas en el arte, e incluyen muchas estirpes celulares inmortalizadas que pueden obtenerse en la American Type Culture Collection (ATCC) (Colección de Cultivos de Tipo Americano). Estas incluyen, *inter alia*, células de ovario de hámster chino (CHO, según su sigla en inglés), células NSO, SP2, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK, según su sigla en

25 inglés), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549, células 3T3, células HEK-293 y una cantidad de otras estirpes celulares. Las células huéspedes mamíferas

abarcen células humanas, de ratón, rata, perro, mono, cerdo, cabra, vaca, caballo y hámster. Las estirpes celulares de particular preferencia se seleccionan mediante la determinación de las estirpes celulares que tienen altos niveles de expresión. Otras estirpes celulares que pueden usarse son estirpes celulares de insectos, tales como células Sf9, células anfibias, células bacterianas, células de plantas y células fúngicas. Cuando los vectores de expresión recombinados que codifican la cadena pesada o su fragmento o porción de unión de antígeno, la cadena liviana o un fragmento del mismo de unión a antígeno se introducen en células huéspedes mamíferas, los anticuerpos se producen mediante el cultivo de las células huéspedes durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huéspedes, o más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual se desarrollan las células huéspedes.

Los anticuerpos pueden ser recuperados del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales. Además, la expresión de anticuerpos de la invención (u otras de sus porciones) desde estirpes celulares de producción puede incrementarse empleando una cantidad de técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión de genes de glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para aumentar la expresión en ciertas condiciones. El sistema GS se describe en su totalidad o en parte en relación con las Patentes Europeas Nros. 0.216.846, 0.256.055 y 0.323.997, y la Solicitud de Patente Europea Nro. 89303964.4.

Es probable que los anticuerpos expresados por diferentes estirpes celulares o en animales transgénicos tengan diferente glicosilación entre sí. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en esta solicitud, o que comprenden las secuencias de aminoácidos provistas en esta solicitud, son parte de la presente invención, sin

consideración de la glicosilación de los anticuerpos. Asimismo, en ciertas realizaciones, son convenientes los anticuerpos no fucosilados, debido a que estos típicamente exhiben eficacia más potente que sus contrapartes fucosiladas, tanto *in vitro* como *in vivo*, y probablemente, no sean inmunógenos, ya que sus  
5 estructuras de carbohidrato son un componente normal de IgG sérica humana natural.

El término “anticuerpo monoclonal”, de acuerdo con esta solicitud, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, que los anticuerpos individuales que comprenden la  
10 población son idénticos, excepto posibles mutaciones naturales que puedan presentarse en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y se dirigen contra un solo sitio antigénico. Los anticuerpos monoclonales son convenientes por cuanto pueden ser sintetizados por un cultivo de hibridoma, esencialmente no contaminado por otras inmunoglobulinas. El  
15 modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo, a decir, obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como la necesidad de la producción del anticuerpo por ningún método particular. Como se menciona anteriormente, los anticuerpos monoclonales por ser usados de acuerdo con la presente invención pueden ser  
20 preparados por el método de hibridoma, descrito por primera vez por Kohler, *et al.*, (1975), *Nature*, 256: 495.

Un anticuerpo policlonal es un anticuerpo producido entre uno o más anticuerpos no idénticos, o en presencia de uno o más anticuerpos no idénticos adicionales. En general, los anticuerpos policlonales son producidos a partir de un  
25 linfocito B en presencia de varios linfocitos B adicionales, que producen anticuerpos no idénticos. Habitualmente, los anticuerpos policlonales se obtienen directamente a partir de un animal inmunizado.

Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos diferentes pares de cadenas pesada/liviana y dos diferentes sitios de unión. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser producidos por medio de una diversidad de métodos, que incluyen la fusión de hibridomas o la unión de  
5 fragmentos Fab'. Ver, por ejemplo, las referencias de Songsivilai, *et al.*, (1990), *Clin. Exp. Immunol.*, 79: 315–321, Kostelny, *et al.*, (1992), *J. Immunol.*, 148: 1547– 1553. Además, los anticuerpos biespecífico pueden formarse como “diacuerpos” (Holliger, *et al.*, (1993), *PNAS USA*, 90: 6444–6448) o como “janusinas” (Traunecker, *et al.*, (1991), *EMBO J.*, 10: 3655–3659 y Traunecker, *et*  
10 *al.*, (1992), *Int. J. Cancer Suppl.* 7: 51–52).

La presente invención comprende “anticuerpos quiméricos”, es decir, un anticuerpo que comprende una región variable de la presente invención fusionada o quimerizada con una región de anticuerpo (por ejemplo, región constante) de otra especie no humana (por ejemplo, ratón, caballo, conejo, perro, vaca, pollo).  
15 Estos anticuerpos pueden usarse para modular la expresión o actividad de BTLA en la especie no humana.

Los fragmentos de anticuerpos “Fv de cadena simple” o “sFv” tienen los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un anticuerpo, donde estos dominios se presentan en una sola cadena de polipéptido. En general, el polipéptido sFv además comprende un  
20 conector de polipéptido entre los dominios  $V_H$  y  $V_L$ , que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión de antígeno. Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena simple (Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.476.786; 5.132.405 y 4.946.778) pueden ser adaptadas para la producción de anticuerpos de cadena simple específicos anti-BTLA. Para una  
25 reseña de sFv, ver la referencia de Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, N.Y., pp. 269–315 (1994).

Los "fragmentos Fv estabilizados con disulfuro" y "dsFv" se refieren a moléculas de anticuerpo que comprenden una cadena pesada variable ( $V_H$ ) y una cadena liviana variable ( $V_L$ ), unidas por un puente de disulfuro.

Los fragmentos de anticuerpos dentro del alcance de la presente invención  
5 además incluyen fragmentos  $F(ab)_2$ , que pueden ser producidos por medio de la disociación enzimática de un IgG, por ejemplo, por pepsina. Los fragmentos Fab pueden producirse, por ejemplo, mediante la reducción de  $F(ab)_2$  con ditioneitol o mercaptoetilamina. Un fragmento Fab es una cadena  $V_L-C_L$  adjunta a una cadena  $V_H-C_{H1}$  por medio de un puente de disulfuro. Un fragmento  $F(ab)_2$  consiste en dos  
10 fragmentos Fab que, a su vez, están unidos por dos puentes de disulfuro. La porción Fab de una molécula  $F(ab)_2$  incluye una porción de la región  $F_c$  entre la cual se ubican los puentes de disulfuro. Un fragmento  $F_v$  es una región  $V_L$  o  $V_H$ .

De acuerdo con las secuencias de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden ser asignadas a diferentes  
15 clases. Hay por lo menos cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4; IgA-1 e IgA-2.

#### **Diseño de anticuerpos.**

Los anticuerpos diseñados de la invención incluyen aquellos en los cuales  
20 se han efectuado modificaciones a residuos de marco dentro de  $V_H$  y/o  $V_L$ , por ejemplo, a fin de mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, dichas modificaciones de marco se realizan de modo de disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque consiste en la "mutación inversa" de uno o más residuos de marco, hasta la correspondiente secuencia de línea germinal.  
25 Más específicamente, un anticuerpo que se ha sometido a la mutación somática puede contener residuos de marco que difieren de la secuencia de línea germinal de la cual deriva el anticuerpo. Dichos residuos pueden ser identificados mediante

la comparación de las secuencias de marco del anticuerpo, con las secuencias de línea germinal de las cuales deriva el anticuerpo.

A modo de ejemplo, la Tabla A muestra regiones donde una posición de aminoácido de región de marco (usando el sistema de numeración Kabat) difiere de la línea germinal, y la manera en que esta posición puede ser mutada inversamente hasta la línea germinal por medio de las sustituciones indicadas:

| Tabla A – Mutaciones inversas ejemplares |                                                    |                  |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------|
| Región                                   | Posición de aminoácido de marco (Numeración Kabat) | Mutación inversa |
| 4C7 V <sub>H</sub>                       | 25                                                 | H25S             |
| 4C7 V <sub>H</sub>                       | 68                                                 | S68T             |
| 4C7 V <sub>H</sub>                       | 82a                                                | T82aT            |

Otro tipo de modificación de marco supone la mutación de uno o más residuos dentro de la región de marco, o aun dentro de una o más regiones de CDR, a fin de eliminar epítopos de células T, de modo de reducir la potencial inmunogenicidad del anticuerpo. Este enfoque también se denomina “desinmunización”, y se describe en mayor detalle en la Publicación de Patente de los Estados Unidos Nro. 20030153043.

Además de las modificaciones realizadas dentro de las regiones de marco o CDR, o en forma alternativa a dichas modificaciones, los anticuerpos de la invención pueden ser diseñados de manea de incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente, a fin de alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, por ejemplo, la semivida sérica, la fijación de complemento, la unión de receptor Fc, o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Asimismo, un anticuerpo de la invención puede ser químicamente modificado (por ejemplo, pueden unirse una o más porciones químicas al anticuerpo), o puede ser modificado de modo de alterar su glicosilación, nuevamente, a fin de alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se

describe en mayor detalle a continuación. La numeración de residuos en la región Fc es aquella del índice EU de Kabat.

En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo isotipo IgG4 que comprende una mutación de Serina a Prolina en una posición que  
5 corresponde a la posición 228 (S228P; índice EU) en la región de bisagra de la región constante de cadena pesada. Se ha informado que esta mutación anula la heterogeneidad de puentes de disulfuro de intercadenas pesadas en la región de bisagra (Angal *et al. supra*; la posición 241 se basa en el sistema de numeración Kabat). Por ejemplo, en diversas realizaciones, un anticuerpo anti-BTLA de la  
10 invención puede comprender la región variable de cadena pesada de 8D5 (SEQ. ID. NO.: 9 u 11) o 4C7 (SEQ. ID. NO.: 23 ó 25) ligada a una región constante de IgG4 humana en la cual la Serina en la posición correspondiente a la posición 241 como se describe en la referencia de Angal *et al., supra* ha sido mutada a Prolina. En consecuencia, para las regiones variables de cadena pesada de 8D5 y 4C7  
15 ligadas a una región constante de IgG4 humana, esta mutación corresponde a una mutación S228P por el índice EU.

En una realización, la región de bisagra de CH1 es modificada de modo que la cantidad de residuos cisteína en la región de bisagra es alterada, por ejemplo, aumentada o disminuida. Este enfoque se describe adicionalmente en la  
20 Patente de los Estados Unidos Nro. 5.677.425. La cantidad de residuos cisteína en la región de bisagra de CH1 es alterada a fin de, por ejemplo, facilitar el montaje de las cadenas liviana y pesada, o a fin de aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región de bisagra Fc de un anticuerpo es mutada de  
25 modo de disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de interfaz de dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra, de manera que el anticuerpo tenga

unión alterada de la proteína A de *Staphylococcyi* (SpA) en relación con la unión de SpA de dominio Fc-bisagra natural. Este enfoque se describe en mayor detalle en la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.165.745.

En otra realización, el anticuerpo es modificado de modo de aumentar su semivida biológica. Son posibles diversos enfoques. Por ejemplo, pueden introducirse una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.277.375. Alternativamente, a fin de aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede ser alterado dentro de la región CH1 o CL de modo de contener un epítipo de unión de receptor de rescate tomado de dos anillas de un dominio CH2 de una región Fc de un IgG, como se describe en las Patente de los Estados Unidos Nros. 5.869.046 y 6.121.022.

Aun en otras realizaciones, la región Fc es alterada mediante el reemplazo de por lo menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente, a fin de alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden ser reemplazados con un residuo de aminoácido diferente, de modo que el anticuerpo tenga afinidad alterada para un ligando efector, y retenga la capacidad de unión de antígeno del anticuerpo progenitor. El ligando efector para el cual se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 de complemento. Este enfoque se describe en mayor detalle en las Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.624.821 y 5.648.260.

En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 pueden ser reemplazados con un residuo de aminoácido diferente, de modo que el anticuerpo tenga alterada unión de C1q o menor o anulada citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Este enfoque se describe en mayor detalle en la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.194.551.

En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las posiciones de aminoácidos 231 y 239 son alterados a fin de alterar la capacidad del anticuerpo para fijar complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la Publicación PCT WO 94/29351.

- 5           Aun en otro ejemplo, la región Fc es modificada de manera de aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o para aumentar la afinidad del anticuerpo para un receptor Fcγ mediante la modificación de uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270,  
10   272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ó 439. Este enfoque se describe adicionalmente en la Publicación PCT WO 00/42072. Además, los sitios de unión en IgG1 humana para  
15   FcγR1, FcγRII, FcγRIII y FcRn se han cartografiado, y se han descrito las variantes con mayor unión (ver la referencia de Shields *et al.* (2001), *J. Biol. Chem.* 276: 6591–6604). Las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 demostraron aumentar la unión a FcγRIII. Además, las siguientes mutantes de combinación demostraron aumentar la unión de FcγRIII:  
20   T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

- Aun en otra realización, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, puede prepararse un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse, por ejemplo, a fin de aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Dichas modificaciones de  
25   carbohidratos pueden efectuarse, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden efectuarse una o más sustituciones de aminoácidos que logran la eliminación de

uno o más sitios de glicosilación de marco de región variable, a fin de eliminar la glicosilación en dicho sitio. Dicha glicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno, Ver, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.714.350 y 6.350.861.

- 5        Además o alternativamente, puede prepararse un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene menores cantidades de residuos fucosilo, o un anticuerpo que tiene más estructuras GlcNac de bisectadas. Dichos patrones de glicosilación alterados han demostrado incrementar la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Dichas
- 10        modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, mediante la expresión del anticuerpo en una célula huésped con alterada maquinaria de glicosilación. Las células con alterada maquinaria de glicosilación se han descrito en el arte, y pueden usarse como células huéspedes en las cuales expresar anticuerpos recombinados de la invención, a fin de producir un
- 15        anticuerpo con alterada glicosilación. Por ejemplo, las estirpes celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 ( $\alpha$  (1,6)-fucosiltransferasa), de manera que los anticuerpos expresados en las estirpes celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos. Las estirpes celulares Ms704, Ms705 y Ms709 FUT8<sup>-/-</sup> fueron creadas mediante la
- 20        alteración dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44, usando dos vectores de reemplazo (ver la Publicación de Patente de los Estados Unidos Nro. 20040110704 y la referencia de Yamane-Ohnuki *et al.* (2004), *Biotechnol Bioeng.*, 87: 614-22). A modo de otro ejemplo, la patente EP 1.176.195 describe una estirpe celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil
- 25        transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en dicha estirpe celular exhiben hipofucosilación, mediante la reducción o eliminación de la enzima relacionada con el enlace  $\alpha$ -1,6. La patente EP 1.176.195 además describe

estirpes celulares que tienen baja actividad enzimática para la adición de fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo, o que no tiene la actividad enzimática, por ejemplo, la estirpe celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La Publicación PCT WO 03/035835 describe una estirpe

5 celular CHO variante, células Lec13, con menor capacidad para unir fucosa a carbohidratos ligados a Asn(297), que además logran la hipofucosilación de anticuerpos expresados en dicha célula huésped (ver, además, la referencia de Shields *et al.* (2002), *J. Biol. Chem.* 277: 26733–26740). Los anticuerpos con un perfil modificado de glicosilación también pueden producirse en huevos de pollo,

10 como se describe en la Publicación PCT WO 06/089231. Alternativamente, pueden producirse anticuerpos con un perfil de glicosilación modificado, en células de plantas, tales como *Lemna* (Patente de los Estados Unidos Nro. 7.632.983). Los métodos para la producción de anticuerpos en un sistema de planta se describen en las Patentes de los Estados Unidos Nros. 6.998.267 y

15 7.388.081. La Publicación PCT WO 99/54342 describe estirpes celulares diseñadas para expresar glicosil transferasas modificadoras de glicoproteínas (por ejemplo,  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de modo que los anticuerpos expresados en las estirpes celulares diseñadas exhiben más estructuras GlcNac de bisección, lo que logra mayor actividad ADCC de los

20 anticuerpos (ver, además, la referencia de Umana *et al.* (1999), *Nat. Biotech.* 17: 176–180). Alternativamente, los residuos de fucosa del anticuerpo pueden ser disociados usando una enzima fucosidasa; por ejemplo, la fucosidasa  $\alpha$ -L-fucosidasa elimina residuos fucosilo de los anticuerpos (Tarentino *et al.* (1975) *Biochem.* 14: 5516–23).

25 Otra modificación de los anticuerpos de esta invención contemplada por la invención es la pegilación. Un anticuerpo puede ser pegilado, por ejemplo, con el objetivo de aumentar la semivida biológica (por ejemplo, sérica) del anticuerpo. A

fin de pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o su fragmento, típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las cuales uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferentemente, la pegilación se lleva a  
5 cabo por medio de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). De acuerdo con esta solicitud, el término "polietilenglicol" tiene el propósito de abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivar otras proteínas, por ejemplo, mono (C1–C10) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol o  
10 polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo por ser pegilado es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para la pegilación de proteínas son conocidos en el arte, y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención. Ver, por ejemplo, la patente EP.0.154.316 y la patente EP 0.401.384.

#### **Propiedades físicas de los anticuerpos.**

15 Los anticuerpos de esta invención pueden ser caracterizados por sus diversas propiedades físicas, a fin de detectar o diferenciar sus distintas clases.

Los anticuerpos de la presente invención pueden contener uno o más sitios de glicosilación, o bien en la región variable de cadena liviana o pesada. Dichos sitios de glicosilación pueden lograr mayor inmunogenicidad del anticuerpo, o la  
20 alteración del valor pK del anticuerpo debido a la alterada unión de antígeno (Marshall *et al* (1972), *Annu. Rev. Biochem.*, 41: 673–702; Gala and Morrison (2004), *J. Immunol.* 172: 5489–94; Wallick *et al* (1988), *J. Exp. Med.*, 168: 1099–109; Spiro (2002) *Glycobiology*, 12: 43R–56R; Parekh *et al* (1985), *Nature*, 316: 452–7; Mimura *et al.* (2000), *Mol. Immunol.*, 37: 697–706). Se sabe que la  
25 glicosilación se produce en motivos que contienen una secuencia N–X–S/T. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-BTLA que no contenga glicosilación de región variable. Esto puede lograrse o bien mediante la selección

de anticuerpos que no contienen el motivo de glicosilación en la región variable, o mediante la mutación de residuos dentro de la región de glicosilación.

En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención no contienen sitios de isomerismo de asparagina. La desamidación de asparagina  
5 puede producirse en secuencias N-G o D-G, y lograr la creación de un residuo de ácido isoaspártico que introduce un defecto en la cadena de polipéptido y disminuye su estabilidad (efecto de ácido isoaspártico).

Cada anticuerpo tendrá un punto isoeléctrico único (pI), que, generalmente, se encuentra en el rango de pH entre 6 y 9,5. El pI para un anticuerpo IgG1  
10 típicamente se encuentran dentro del rango de pH de 7-9,5, y el pI para un anticuerpo IgG4 típicamente se encuentra dentro del rango de pH de 6-8. Se cree que los anticuerpos con un pI fuera del rango normal pueden tener cierto desplegado e inestabilidad en condiciones *in vivo*. Por lo tanto, se prefiere tener un anticuerpo anti-BTLA que tenga un valor pI que se encuentre en el rango  
15 normal. Esto puede lograrse o bien mediante la selección de anticuerpos con un pI en el rango normal, o mediante la mutación de residuos de superficie cargados.

Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión característica, donde una temperatura de fusión más alta indica mayor estabilidad general *in vivo* (Krishnamurthy, R., y Manning, M. C. (2002), *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 3: 361-  
20 71). En general, se prefiere que la  $T_{M1}$  (la temperatura de desplegado inicial) sea superior a 60°C, preferentemente, superior a 65°C, aun más preferentemente, superior a 70°C. El punto de fusión de un anticuerpo puede medirse usando la calorimetría de barrido diferencial (Chen *et al* (2003), *Pharm. Res.*, 20: 1952-60; Ghirlando *et al* (1999), *Immunol. Lett.*, 68: 47-52) o el dicroísmo circular (Murray  
25 *et al.* (2002), *J. Chromatogr. Sci.*, 40: 343-9).

En una realización preferida, se seleccionan anticuerpos que no se degradan rápidamente. La degradación de un anticuerpo puede medirse usando

la electroforesis capilar (CE, según su sigla en inglés) y MALDI-MS (Ionización/Desorción láser asistida por matriz/espectrometría de masa) (Alexander, A. J. y Hughes, D. E. (1995), *Anal. Chem.*, 67: 3626-32).

En otra realización preferida, se seleccionan los anticuerpos que tienen  
5 mínimos efectos de agregación, lo que puede conducir al desencadenamiento de una respuesta inmunitaria indeseada, o a propiedades farmacocinéticas alteradas o desfavorables. En general, los anticuerpos son aceptables con una agregación del 25% o menos, preferentemente, del 20% o menos, aun más preferentemente, del 15% o menos, aun más preferentemente, del 10% o menos, y aun más  
10 preferentemente, del 5% o menos. La agregación puede medirse por varias técnicas, que incluyen la columna de exclusión por tamaño (SEC, según su sigla en inglés), la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, según su sigla en inglés) y la diseminación de luz.

#### **Conjugados de anticuerpos.**

15 Las moléculas de anticuerpos anti-BTLA de la invención pueden conjugarse además con una porción química. La porción química puede ser, *inter alia*, un polímero, un radionúclido o un factor citotóxico. Preferentemente, la porción química es un polímero que aumenta la semivida de la molécula de anticuerpo en el organismo de un sujeto. Los polímeros adecuados incluyen, sin  
20 limitación, polietilenglicol (PEG) (por ejemplo, PEG con un peso molecular de 2kDa, 5 kDa, 10 kDa, 12 kDa, 20 kDa, 30 kDa o 40 kDa), dextrano y monometoxipolietilenglicol (mPEG). Lee, *et al.* (1999) (*Bioconj. Chem.*, 10: 973-981) revelan anticuerpos de cadena simple conjugados con PEG. Wen, *et al.* (2001) (*Bioconj. Chem.*, 12: 545-553) revelan anticuerpos de conjugación con  
25 PEG, unido a un quelante radiometálico (ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA, según su sigla en inglés)).

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención, asimismo, pueden conjugarse con marcas tales como  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{57}\text{To}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{57}\text{Se}$ ,  $^{152}\text{Eu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{217}\text{Ci}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{234}\text{Th}$ , y  $^{40}\text{K}$ ,  $^{157}\text{Gd}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{52}\text{Tr}$  y  $^{56}\text{Fe}$ .

- 5 Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención también pueden conjugarse con marcas fluorescentes o quimioluminscentes, que incluyen fluoróforos tales como quelatos de tierras raras, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, isotiocianato, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaladehído, fluorescamina,  $^{152}\text{Eu}$ , dansilo, umbeliferona, luciferina, marca luminal, 10 marca isoluminal, una marca de éster de acridinio aromático, una marca de imidazol, una marca de sal de acridimio, una marca de éster de oxalato, una marca de aecurina, 2,3-dihidroftalazinadionas, biotina/avidina, marcas espín y radicales libres estables.

- Las moléculas de anticuerpos pueden ser conjugadas también con un 15 factor citotóxico, tal como toxina de difteria, cadena A de exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii* y compuestos (por ejemplo, ácidos grasos), proteínas de diantina, proteínas de *Phytoiacca americana* PAPI, PAPII y PAP-S, inhibidor de *Momordica Charantia*, curcina, 20 crotina, inhibidor de *Saponaria Officinalis*, mitogelina, restrictocina, fenomicina y enomicina.

- Puede emplearse cualquier método conocido en el arte para la conjugación de las moléculas de anticuerpo de la invención con las diversas porciones, por ejemplo, aquellos métodos descriptos por Hunter, *et al.*, (1962), *Nature*, 144: 945; 25 David, *et al.* (1974), *Biochemistry*, 13: 1014; Pain, *et al.* (1981), *J. Immunol. Meth.*, 40: 219; y Nygren, J. (1982), *Histochem. and Cytochem.*, 30: 407. Los métodos

para la conjugación de anticuerpos son convencionales, y son bien conocidos en el arte.

Aun en otras realizaciones, pueden adjuntarse diferentes dominios constantes a regiones humanizadas  $V_L$  y  $V_H$  derivadas de las CDR proporcionadas en esta solicitud. Por ejemplo, si un uso propuesto particular de un anticuerpo (o fragmento) de la presente invención fuera la demanda de funciones efectoras alteradas, puede usarse un dominio constante de cadena pesada diferente de IgG1, o puede utilizarse IgG1/IgG4 híbrido.

Si bien los anticuerpos IgG1 proporcionan larga semivida y funciones efectoras, tales como la activación de complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, dichas actividades pueden no ser deseables para todos los usos del anticuerpo. En dichos casos, puede usarse, por ejemplo, un dominio constante de IgG4. En hu Mab8D5, el dominio constante de IgG4 difiere del dominio constante de IgG4 humano nativo (Swiss-Prot Acceso Nro. P01861.1) en la posición 108 (correspondiente a la posición 228 en el sistema EU y a la posición 241 en el sistema KABAT), donde el Ser108 nativo es reemplazado con Pro, a fin de prevenir un potencial enlace de disulfuro de intercadena entre Cys106 y Cys109 (correspondientes a las posiciones Cys 226 y Cys 229 en el sistema EU y a las posiciones Cys 239 y Cys 242 en el sistema KABAT), que podría interferir con la apropiada formación de enlace de disulfuro de intracadena. Ver la referencia de Angal *et al.* (1993), *Mol. Immunol.*, 30: 105.

Para hu Mab21H6, hu Mab8A3, hu Mab15C5, hu Mab19A7 y hu Mab 20H4, las secuencias descritas en la Tabla 7 se basan en la cadena pesada humana IgG1.

## **Enfermedades.**

La invención además provee métodos de tratamiento de sujetos, que incluyen sujetos humanos, que necesitan tratamiento con los anticuerpos aislados

o sus fragmentos de unión de antígeno, preferentemente, un anticuerpo completamente humano, de la presente invención. Dichos sujetos pueden tener una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria, tal como trastornos intestinales inflamatorios (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enfermedad

5 intestinal inflamatoria), fibrosis inflamatoria (por ejemplo, esclerodermia, fibrosis pulmonar y cirrosis), artritis reumatoide (AR), artrosis, osteoporosis, asma (que incluye asma alérgica), alergias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), esclerosis múltiple, soriasis, uveítis, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), diabetes tipo I de inicio temprano juvenil, rechazo de trasplantes,

10 LES y síndrome de Sjögren. Dichos métodos de tratamiento además pueden comprender la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales, , tales como agentes inmunosupresores o antiinflamatorios. A modo de ejemplo, y no de limitación, los trastornos intestinales inflamatorios son tratados con los métodos que se describen en esta solicitud. En una realización particularmente

15 preferida, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa son tratadas por los métodos que se describen en esta solicitud.

#### **Enfermedad intestinal inflamatoria (EII).**

La EII es la denominación de un grupo de trastornos (por ejemplo, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa) en los cuales el intestino se inflama, y

20 se sufren calambres y dolor abdominales, diarrea, descenso de peso y hemorragia intestinal. La EII afecta a más de 600.000 norteamericanos. Las opciones convencionales de tratamiento incluyen sulfasalazina, corticoesteroides (por ejemplo, prednisona), supresores del sistema inmunitario tales como azatioprina y mercaptopurina, o un antibiótico (por ejemplo, metronidazol), para la

25 enfermedad de Crohn. Los tratamientos con anticuerpos monoclonales terapéuticos incluyen etanercept, natalizumab e infliximab.

Los anticuerpos anti-BTLA de la presente invención pueden usarse para tratar la EII en sujetos que necesitan dicho tratamiento. Los anticuerpos anti-BTLA de la presente invención además pueden combinarse con otros tratamientos para la EII, por ejemplo, IL-10 (ver las Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.368.854; 7.052.686), corticoesteroides y sulfasalazina.

#### **Enfermedad de injerto contra huésped (EICH).**

La enfermedad de injerto contra huésped (EICH) es una complicación común del alotrasplante de médula ósea, en el cual las células inmunitarias funcionales en la médula trasplantada reconocen al receptor como "extraño" y montan un ataque inmunológico. Puede tener lugar también en la transfusión de sangre, en ciertas circunstancias. Habitualmente, se asocian tres criterios con EICH:

- 1) la administración de un injerto inmunocompetente, con células inmunitarias viables y funcionales;
- 2) el receptor es inmunológicamente distinto – histoincompatible; y
- 3) el receptor es inmunocomprometido, y por lo tanto, no puede destruir o inactivar las células trasplantadas.

Después del trasplante de médula ósea, las células T presentes en el injerto atacan los tejidos del receptor del trasplante, luego de percibir los tejidos del huésped como antigénicamente extraños. Las células T producen un exceso de citoquinas, que incluyen TNF alfa e interferón gamma (IFNg). Una amplia gama de antígenos huéspedes pueden iniciar la enfermedad de injerto contra huésped, entre ellos, los antígenos leucocitarios humanos (HLA, según su sigla en inglés). Sin embargo, la enfermedad de injerto contra huésped puede producirse aun cuando los donantes sean hermanos idénticos para HLA. Los hermanos idénticos para HLA o donantes no relacionados idénticos para HLA a menudo tienen proteínas genéticamente diferentes (es decir, antígenos

histocompatibilidad menor), que pueden ser presentadas por las moléculas del MHC (sigla en inglés de “complejo de histocompatibilidad mayor”) a las células T del receptor, que ven a estos antígenos como extraños, y en consecuencia, montan una respuesta inmunitaria.

5           Se espera que los anticuerpos agonistas de BTLA inhiban la activación, proliferación y la función efectora de células B y T injertadas, que reaccionan con aloantígenos (que incluyen, sin limitación, antígenos de histocompatibilidad menor y mayor) presentes en tejidos del receptor o del huésped. Se espera que la inhibición de estas células B y T derivadas del injerto se produzca en virtud de su  
10       expresión de BTLA sobre la superficie celular. Aunque sin limitación a la teoría, se espera que un anticuerpo agonista de BTLA inhiba las respuestas inmunitarias patógenas mediante el “compromiso obligado”. Los anticuerpos agonistas de BTLA pueden inhibir las respuestas inmunitarias patógenas indirectamente, por ejemplo, a través de la activación de otras células inhibitorias tales como células T  
15       reguladoras, o a través de la modulación de células que presentan antígeno. Se espera que los anticuerpos agonistas de BTLA supriman o inhiban las respuestas contra el huésped de los linfocitos que se originan en el injerto, ya sea solos, ya sea en combinación con otros agentes supresores inmunitarios utilizados para la prevención o el tratamiento de los síntomas de la enfermedad de injerto contra  
20       huésped.

          En una realización adicional, la invención se refiere además a métodos de tratamiento que comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-BTLA o un fragmento del mismo de unión a antígeno, en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. A modo de  
25       ejemplo y no de limitación, uno o más agentes terapéuticos incluyen proteínas de fusión anti-IL-23, IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ , CTLA4, y antiinflamatorios de molécula pequeña, tales como micofenolato mofetil metotrexato (ver, por ejemplo, las

referencias de Veldhoen (2006), *Immunity*, 24: 179–189; Dong (2006), *Nat. Rev. Immunol.* 6 (4): 329–333), o una combinación. En diversas realizaciones, uno o más de los agentes terapéuticos adicionales se administran antes o después del anticuerpo anti-BTLA o un fragmento del mismo de unión a antígeno, o en forma  
5 concurrente con dicho anticuerpo o fragmento.

Además, en ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-BTLA o un fragmento del mismo de unión a antígeno puede administrarse en combinación con fármacos inmunosupresores utilizados para tratar el rechazo de trasplantes, que incluyen cualquier combinación de uno o más de los siguientes:

- 10 inhibidores de calcineurina (por ejemplo, ciclosporina y tacrolimus),
- inhibidores de mTOR (sigla en inglés de “blanco mamífero de rapamicina”) (por ejemplo, sirolimus y everolimus),
- antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina y ácido micofenólico),
- corticoesteroides (por ejemplo, prednisolona e hidrocortisona),
- 15 anticuerpos con efectos inmunosupresores (por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-IL-receptor2R $\alpha$  que incluyen basiliximab y daclizumab),
- y anticuerpos policlonales anticélulas T (por ejemplo, antitimocito globulina (ATG) y antilinfocito globulina (ALG)).

La invención además se refiere a composiciones y formulaciones de los  
20 anticuerpos o sus fragmentos de unión de antígeno de la presente invención, que comprenden el compuesto de unión y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, y en forma opcional, uno o más agentes inmunosupresores o antiinflamatorios.

#### **Usos experimentales y de diagnóstico.**

25 Los anticuerpos y fragmentos de la invención pueden usarse como agentes de purificación de afinidad. En este proceso, los anticuerpos o fragmentos son inmovilizados en una fase sólida tal como papel filtro o resina Sephadex, usando

métodos bien conocidos en el arte. El anticuerpo o fragmento inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene la proteína BTLA (o su fragmento) por ser purificada, y a continuación, se lava el soporte con un solvente adecuado que removerá sustancialmente todo el material en la muestra, excepto  
5 la proteína BTLA, que está ligada al anticuerpo o fragmento inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con un solvente que eluye el BTLA ligado de la columna (por ejemplo, proteína A). Dichos anticuerpos inmovilizados forman parte de la presente invención.

La presente invención además provee antígenos para la generación de  
10 anticuerpos secundarios útiles, por ejemplo, para efectuar *Western blots* y otros inmunoensayos descritos en esta solicitud. Específicamente, la presente invención incluye polipéptidos que comprenden las regiones variables o secuencias de CDR que pueden usarse para la generación de un anticuerpo anti-BTLA o anticuerpo secundario anti-BTLA. Se encuentran dentro del alcance de la  
15 presente invención los anticuerpos secundarios detectablemente marcados anti-hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7, hu Mab4C7 o anti-Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7, hu Mab4C7.

Los anticuerpos anti-BTLA o sus fragmentos también pueden ser útiles en ensayos de diagnóstico para establecer la proteína BTLA, por ejemplo, para la  
20 detección de su expresión en células, tejidos o suero específicos. Dichos métodos de diagnóstico pueden ser útiles en diversos diagnósticos de enfermedad.

Por ejemplo, las realizaciones de la invención incluyen ensayos ELISA (sigla en inglés de: ensayo inmunosorbente ligado a enzima) que incorporan el uso de un anticuerpo anti-BTLA de la invención o su fragmento. A modo de  
25 ejemplo, en una realización de la invención, dicho método comprende las siguientes etapas:

(a) el revestimiento de un sustrato (por ejemplo, la superficie de un receptáculo de una placa de microvaloración, tal como una placa de plástico) con un anticuerpo anti-BTLA o un fragmento del mismo de unión a antígeno;

5 (b) la aplicación de una muestra por ensayar a fin de establecer la presencia de BTLA, al sustrato;

(c) el lavado de la placa, de modo de remover el material no ligado en la muestra;

10 (d) la aplicación de anticuerpos detectablemente marcados (por ejemplo, anticuerpos ligados a enzima) que también sean específicos para el antígeno BTLA;

(e) el lavado del sustrato, de modo de remover los anticuerpos marcados no ligados;

(f) si los anticuerpos marcados están ligados a enzima, la aplicación de un agente químico que es convertido por la enzima en una señal fluorescente; y

15 (g) la detección de la presencia del anticuerpo marcado.

En una realización de la invención, el anticuerpo marcado es marcado con peroxidasa, que reacciona con ABTS (por ejemplo, ácido 2,2'-azino-bis(3-  
20 etilbenztiazolina-6-sulfónico)) o 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, para producir un cambio de color que es detectable. Alternativamente, el anticuerpo marcado es marcado con un radioisótopo detectable (por ejemplo,  $^3\text{H}$ ) que puede ser detectado mediante un contador de centelleo en presencia de un centellante. Un anticuerpo anti-BTLA de la invención puede ser usado en un procedimiento de *Western blot* o de *blot* de inmunoproteína. Dicho procedimiento forma parte de la presente invención e incluye, por ejemplo:

25 (1) el contacto de una membrana u otro sustrato sólido por ser ensayado a fin de establecer la presencia de BTLA ligado o uno de sus fragmentos, con un anticuerpo anti-BTLA o un fragmento del mismo de unión a antígeno de la

invención. Dicha membrana puede adoptar la forma de una membrana a base de nitrocelulosa o vinilo (por ejemplo, fluoruro de polivinilideno (PVDF)), a la cual las proteínas por ser ensayadas a fin de establecer la presencia de BTLA en un gel no desnaturizante de PAGE (electroforesis de gel de poliacrilamida) o en un gel de SDS-PAGE (electroforesis de gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico) se han transferido (por ejemplo, luego de la separación de electroforesis en el gel). Antes del contacto de la membrana con el anticuerpo anti-BTLA o fragmento, la membrana es opcionalmente bloqueada, por ejemplo, con leche descremada en polvo o similar, de modo de ligar sitios de unión de proteína no específicos sobre la membrana.

(2) el lavado de la membrana una o más veces, a fin de remover anticuerpo anti-BTLA no ligado o su fragmento, y otras sustancias no ligadas; y

(3) la detección del anticuerpo anti-BTLA ligado o su fragmento.

La detección del anticuerpo ligado o fragmento puede efectuarse mediante la unión del anticuerpo o fragmento con un anticuerpo secundario (un anticuerpo antiinmunoglobulina) que está marcado en forma detectable, y luego, la detección de la presencia del anticuerpo secundario.

Los anticuerpos anti-BTLA y sus fragmentos de unión de antígeno de la invención pueden usarse, asimismo, para la inmunohistoquímica. Dicho método forma parte de la presente invención, y comprende, por ejemplo: (1) el contacto de una célula por ensayar a fin de establecer la presencia de BTLA, con un anticuerpo anti-BTLA o un fragmento del mismo de unión a antígeno de la invención; y (2) la detección del anticuerpo o fragmento sobre la célula o en la célula.

Si el anticuerpo o fragmento en sí mismo está marcado en forma detectable, puede ser detectado directamente. De manera alternativa, el

anticuerpo o fragmento puede estar ligado por un anticuerpo secundario marcado en forma detectable, que es detectado.

Ciertos anticuerpos anti-BTLA antagonistas y sus fragmentos de unión de antígeno de la invención pueden usarse además para la toma de imágenes tumorales *in vivo*. Dicho método forma parte de la presente invención, y puede comprender la inyección de un anticuerpo anti-BTLA radiomarcado o un fragmento del mismo de unión a antígeno de la invención, en el organismo de un paciente por ser ensayado a fin de establecer la presencia de un tumor asociado con la expresión de BTLA, seguida de la toma de imágenes nucleares del organismo del paciente, a fin de detectar la presencia del anticuerpo marcado o fragmento, por ejemplo, en *loci* (lugares) que comprenden una alta concentración del anticuerpo o fragmento, ligados al tumor.

Las técnicas de toma de imágenes incluyen la tomografía SPECT (sigla en inglés de: tomografía computada por emisión de fotón simple) o la tomografía TEP (tomografía por emisión de positrones). Las marcas incluyen, por ejemplo, yodo-123 ( $^{123}\text{I}$ ) y tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), por ejemplo, en conjunto con la tomografía SPECT;  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$  o  $^{18}\text{F}$ , por ejemplo, en conjunto con la tomografía TEP; o indio-111 (ver, por ejemplo, la referencia de, Gordon *et al.*, (2005), *International Rev. Neurobiol.* 67: 385–440).

#### Equipos.

La presente invención provee además equipos que comprenden los componentes de las combinaciones de la invención en forma de un equipo. Un equipo de la presente invención incluye uno o más componentes que comprenden, sin limitación, una composición de unión, como se describe en esta solicitud, que se une específicamente a BTLA (por ejemplo, anticuerpos agonistas hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, o hu Mab19A7, o anticuerpo antagonista hu Mab4C7) en asociación con uno o más componentes adicionales que incluyen,

sin limitación, un portador farmacéuticamente aceptable o un agente quimioterapéutico, como se describe en la presente solicitud. La composición de unión y el agente quimioterapéutico pueden formularse como una composición pura o en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable, en una  
5 composición farmacéutica.

En una realización, un equipo comprende una composición de unión de la invención (por ejemplo, anticuerpos agonistas hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, o hu Mab19A7, o anticuerpo antagonista hu Mab4C7), o una composición farmacéutica de esta en un recipiente (por ejemplo, en un vial de  
10 plástico o vidrio estéril) y una composición farmacéutica de esta y/o un agente quimioterapéutico en otro recipiente (por ejemplo, en un vial de plástico o vidrio estéril).

En otra realización de la invención, el equipo comprende una combinación de la invención, que incluye un componente de composición de unión (por  
15 ejemplo, anticuerpos agonistas hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, o hu Mab19A7, o anticuerpo antagonista hu Mab4C7) junto con un portador farmacéuticamente aceptable, en forma opcional, en combinación con uno o más componentes de agentes quimioterapéuticos formulados juntos, opcionalmente, en una composición farmacéutica, en un solo recipiente común.

20 Si el equipo incluye una composición farmacéutica para administración parenteral a un sujeto, el equipo puede incluir un dispositivo para realizar dicha administración. Por ejemplo, el equipo puede comprender una o más agujas hipodérmicas u otros dispositivos de inyección, como se describe anteriormente.

El equipo puede comprender un prospecto que incluye información en  
25 relación con las composiciones farmacéuticas y las formas farmacéuticas en el equipo. En general, dicha información ayuda a los pacientes y médicos en el uso de las composiciones farmacéuticas contenidas y las formas farmacéuticas de

manera eficaz y segura. Por ejemplo, la siguiente información con respecto a una combinación de la invención puede ser suministrada en el prospecto: farmacocinética, farmacodinámica, estudios clínicos, parámetros de eficacia, indicaciones y uso, contraindicaciones, advertencias, precauciones, reacciones  
5 adversas, sobredosificación, dosificación y administración apropiadas, forma de suministro, condiciones apropiadas de almacenamiento, referencias, información del fabricante y distribuidor e información sobre patente.

#### **Composiciones farmacéuticas y administración.**

A fin de preparar composiciones farmacéuticas o estériles de los  
10 anticuerpos anti-huBTLA de la presente invención, el anticuerpo se mezcla con un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. Ver, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences* y *U. S. Pharmacopeia: National Formulary*, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984).

Las formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico pueden  
15 prepararse mediante la mezcla con portadores, excipientes o estabilizadores aceptables, en forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, suspensiones, suspensiones o soluciones acuosas (ver, por ejemplo, las referencias de Hardman, *et al.* (2001): *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000): *Remington: The  
20 Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, *et al.* (eds.) (1993), *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990), *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990), *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner  
25 and Kotkoskie (2000), *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY). En una realización, los anticuerpos anti-BTLA de la presente invención se diluyen hasta una concentración apropiada en una solución de acetato sódico

a pH 5–6, y se agrega NaCl o sacarosa, para auxiliar a la tonicidad. Pueden agregarse agentes adicionales, tales como polisorbato 20 o polisorbato 80, a fin de mejorar la estabilidad.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones de anticuerpos, administradas solas o en combinación con otro agente, pueden establecerse por medio de procedimientos farmacéuticos convencionales, en cultivos de células o en animales experimentales, por ejemplo, para la determinación del valor LD<sub>50</sub> (la dosis mortal para el 50% de la población) y el valor ED<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico (LD<sub>50</sub>/ ED<sub>50</sub>). Se prefieren los anticuerpos que exhiben altos índices terapéuticos. La información obtenida de estos ensayos de cultivos de células y estudios en animales puede usarse en la formulación de un rango de dosificación para el uso en humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra, preferentemente, dentro de un rango de concentraciones en circulación que incluyen el ED<sub>50</sub>, con poca o nula toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango de acuerdo con la forma farmacéutica empleada y la vía de administración.

El modo de administración puede variar. Las vías adecuadas de administración incluyen la administración oral, rectal, transmucosal, o intestinal; el suministro parenteral, que incluye las inyecciones intramuscular, subcutánea, intramedular, al igual que las inyecciones intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, o intraocular. La administración puede llevarse a cabo de una diversidad de maneras convencionales, por ejemplo, mediante la ingestión oral, inhalación, insuflación, aplicación tópica o cutánea, inyección transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, parenteral, intraarterial o intravenosa. Se prefiere la administración intravenosa al paciente.

Alternativamente, puede administrarse el anticuerpo de una manera local, en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante la inyección del anticuerpo directamente en una articulación artrítica o en una lesión inducida por patógenos, caracterizada por la inmunopatología, a menudo, en una formulación de liberación controlada o de liberación sostenida. Además, el anticuerpo puede administrarse en un sistema de suministro de fármacos dirigido, por ejemplo, en un liposoma recubierto con un anticuerpo específico de tejido, que se dirige, por ejemplo, a una articulación artrítica o a una lesión inducida por patógenos caracterizada por la inmunopatología. Los liposomas serán dirigidos al tejido afectado, y serán absorbidos selectivamente por este.

El régimen de administración depende de varios factores, que incluyen el índice de recambio de suero o tejido del anticuerpo terapéutico, el grado de los síntomas, la inmunogenicidad del anticuerpo terapéutico y la accesibilidad de las células blanco en la matriz biológica. Preferentemente, el régimen de administración suministra suficiente anticuerpo terapéutico para lograr una mejoría en el estado de enfermedad blanco, y a la vez, minimizar en forma simultánea los efectos secundarios indeseados. Por lo tanto, la cantidad de agente biológico suministrada depende en parte del anticuerpo terapéutico particular y la gravedad de la afección tratada. Puede obtenerse una guía para la selección de las dosis apropiadas de anticuerpos terapéuticos (ver, por ejemplo, las referencias de Wawrzynczak (1996), *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991), *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993), *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert, et al. (2003), *New Engl. J. Med.*, 348: 601–608; Milgrom et al. (1999), *New Engl. J. Med.*, 341: 1966–1973; Slamon et al. (2001), *New Engl. J. Med.*, 344: 783–792; Beniaminovitz et al. (2000), *New Engl. J. Med.*, 342: 613–619; Ghosh et

al. (2003), *New Engl. J. Med.*, 348: 24–32; Lipsky et al. (2000), *New Engl. J. Med.*, 343: 1594–1602).

- La determinación de la dosis apropiada es efectuada por el médico, por ejemplo, usando parámetros o factores conocidos o que se cree, en el arte, que afectan el tratamiento. En general, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima, y luego aumenta en pequeños incrementos, hasta lograr el efecto deseado u óptimo, en relación con cualquier efecto secundario negativo. Las medidas de diagnóstico importantes incluyen aquellos síntomas de, por ejemplo, la inflamación o el nivel de citoquinas inflamatorias producidas.
- Preferentemente, un agente biológico utilizado deriva de la misma especie que el animal al que se dirige el tratamiento, a fin de minimizar una respuesta inflamatoria, autoinmunitaria, o proliferativa al reactivo. En el caso de sujetos humanos, por ejemplo, se prefieren los anticuerpos quiméricos, humanizados, y completamente humanos.
- Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y citoquinas pueden proporcionarse mediante la infusión continua, o por medio de dosis administradas, por ejemplo, diariamente, 1–7 veces por semana, una vez por semana, cada dos semanas, una vez por mes, cada dos meses, etc. Las dosis pueden suministrarse por vía intravenosa, subcutánea, tópica, oral, nasal, rectal, intramuscular, intracerebral, intraespinal, o por inhalación. Una dosis semanal total, en general, es de por lo menos 0,05 µg/kg de peso corporal, más generalmente, de por lo menos 0,2 µg/kg, 0,5 µg/kg, 1 µg/kg, 10 µg/kg, 100 µg/kg, 0,25 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/ml, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg o más (ver, por ejemplo, las referencias de Yang, et al. (2003), *New Engl. J. Med.*, 349: 427–434; Herold, et al. (2002), *New Engl. J. Med.*, 346: 1692–1698; Liu, et al. (1999), *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, 67: 451–456; Portielji, et al. (2003), *Cancer Immunol. Immunother.*, 52: 133–144). Las dosis también pueden suministrarse de modo de

lograr una concentración blanco predeterminada de anticuerpo anti-BTLA en el suero del sujeto, tal como 0,1; 0.3; 1; 3; 10; 30; 100; 300 µg/ml o más. En otras realizaciones, un anticuerpo de BTLA completamente humano de la presente invención se administra por vía subcutánea o intravenosa, sobre una base  
5 semanal, cada dos semanas o cada cuatro semanas, en una dosis de 10; 20; 50; 80; 100; 200; 500; 1000 ó 2500 mg/sujeto.

De acuerdo con la presente solicitud, los términos “inhibir”, “tratar” o “tratamiento” incluyen una postergación del desarrollo de los síntomas asociados con un trastorno, o una reducción de la gravedad de los síntomas de dicho  
10 trastorno. Los términos además incluyen el alivio de los síntomas existentes indeseados o no controlados, la prevención de síntomas adicionales y el alivio o la prevención de las causas subyacentes de dichos síntomas. En consecuencia, los términos denotan que se ha conferido un efecto beneficioso en un sujeto vertebrado que sufre de un trastorno, una enfermedad, o un síntoma, o que tiene  
15 el potencial de desarrollar dicho trastorno, dicha enfermedad o dicho síntoma.

De acuerdo con la presente solicitud, los términos “cantidad terapéuticamente eficaz”, “dosis terapéuticamente eficaz” y “cantidad eficaz” se refieren a una cantidad de un compuesto de unión de BTLA de la invención que, cuando se administra sola o en combinación con un agente terapéutico adicional,  
20 a una célula, un tejido o un sujeto, es eficaz para la prevención o el alivio de uno o más síntomas de una enfermedad o afección, o del avance de dicha enfermedad o afección. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad del compuesto de unión, suficiente para lograr el alivio de los síntomas, por ejemplo, el tratamiento, la curación, la prevención o el alivio de la afección pertinente, o un  
25 aumento en el índice de tratamiento, curación, prevención o alivio de dichas afecciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual administrado solo, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a dicho ingrediente solo. Cuando se

aplica a una combinación, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a las cantidades combinadas de los ingredientes activos, que logran el efecto terapéutico, ya sea administrados en combinación, ya sea en forma sucesiva o simultánea. Una cantidad eficaz de un agente terapéutico logrará una mejoría de una medida o un parámetro de diagnóstico de por lo menos el 10%;  
5 habitualmente, de por lo menos el 20%; preferentemente, de por lo menos alrededor del 30%; más preferentemente, de por lo menos el 40%, y con mayor preferencia, de por lo menos el 50%.

Los métodos para la administración conjunta con un segundo agente  
10 terapéutico, por ejemplo, una citoquina, otro anticuerpo terapéutico, un corticoesteroide, agente quimioterapéutico o antibiótico, son bien conocidos en el arte. Ver, por ejemplo, las referencias de *Hardman, et al. (eds.) (2001), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill, New York, NY; *Poole and Peterson (eds.) (2001), Pharmacotherapeutics for*  
15 *Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; *Chabner and Longo (eds.) (2001), Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA. La composición farmacéutica de la invención además puede contener agentes inmunosupresores o inmunomoduladores. Puede emplearse cualquier agente inmunosupresor  
20 adecuado, por ejemplo, sin limitación, agentes antiinflamatorios, corticoesteroides, ciclosporina, tacrolimus (es decir, FK-506), sirolimus, interferones, receptores de citoquinas solubles (por ejemplo, sTNRF y sIL-1R), agentes que neutralizan la actividad de las citoquinas (por ejemplo, inflixmab, etanercept), micofenolato mofetilo, 15-desoxiespergualina, talidomida, glatiramer, azatioprina, leflunomida,  
25 ciclofosfamida, metotrexato y similares. La composición farmacéutica puede emplearse también con otras modalidades terapéuticas, tales como la fototerapia y la radiación.

Los compuestos de unión de BTLA de la presente invención además pueden usarse en combinación con uno o más agonistas o antagonistas de otras citoquinas (por ejemplo, anticuerpos), que incluyen, sin limitación, IL-23, IL-1 $\beta$ , IL-6, CTLA-4, fusión de CTLA-4/Ig y TGF- $\beta$ . Ver, por ejemplo, las referencias de

5 Veldhoen (2006), *Immunity*, 24: 179-189; Dong (2006), *Nat. Rev. Immunol.*, 6 (4): 329-333. En diversas realizaciones, el compuesto de unión de BTLA de la invención se administra antes o después de la administración de los otros agonistas o antagonistas, o se administra en forma concurrente con dichos agonistas o antagonistas adicionales. En una realización, un compuesto de unión

10 de BTLA de la presente invención se usa en el tratamiento de la fase temprana aguda de una respuesta inmunitaria adversa (por ejemplo, EM (esclerosis múltiple), enfermedad de Crohn, diabetes tipo I de inicio temprano juvenil), solo o en combinación con un antagonista de IL-23. En este último caso, el compuesto de unión de BTLA puede disminuirse en forma gradual, y el tratamiento con el

15 antagonista de IL-23 solo se continúa de modo de mantener la supresión de la respuesta adversa. Alternativamente, los antagonistas para IL-1 $\beta$ , IL-6 o TGF- $\beta$  pueden administrarse antes o después de un compuesto de unión de BTLA de la presente invención, o en forma concurrente con dicho compuesto de unión. Ver las referencias de Cua and Kastelein (2006), *Nat. Immunol.* 7:557-559; Tato and

20 O'Shea (2006), *Nature*, 441: 166-168; Iwakura and Ishigame (2006), *J. Clin. Invest.*, 116: 1218-1222.

Los sujetos típicos veterinarios, experimentales, o de investigación incluyen monos, perros, gatos, ratas, ratones, conejos, cobayos, caballos y humanos.

### USOS

25 La presente invención provee métodos para el uso de los anticuerpos anti-BTLA diseñados, en el tratamiento y el diagnóstico de afecciones y trastornos inflamatorios, al igual que de trastornos autoinmunitarios y proliferativos. Se

proveen métodos para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria (EII), esclerosis múltiple (EM), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística (FQ), soriasis, esclerodermia sistémica, EICH, rechazo de aloinjertos, LES, síndrome de Sjögren, diabetes tipo I de inicio temprano juvenil, miocarditis autoinmunitaria y adhesiones peritoneales (ver, por ejemplo, la referencia de Chung *et al.* (2002), *J. Exp. Med.* 195: 1471–78).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de la invención, que se une específicamente a BTLA humano, puede usarse para aumentar, mejorar, estimular o regular en forma ascendente una respuesta inmunitaria relacionada con la actividad de BTLA. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención que no bloquean la unión de BTLA a HVEM (por ejemplo, los anticuerpos agonistas Hu Mab8D5, huMab8A3) se usan terapéuticamente a fin de estabilizar BTLA en sujetos que necesitan la actividad de BTLA prolongada. Los anticuerpos agonistas anti-BTLA (por ejemplo, Hu Mab8D5, huMab8A3, hu Mab21H6 y hu Mab19A7) activan la función de receptor de inhibición de BTLA. Los sujetos que se beneficiarán con dicho tratamiento incluyen pacientes que sufren de un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, por ejemplo, trastornos intestinales inflamatorios (tales como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enfermedad intestinal inflamatoria), fibrosis inflamatoria (por ejemplo, esclerodermia, fibrosis pulmonar y cirrosis), artritis reumatoide (AR), artrosis, osteoporosis, asma (que incluye asma alérgica), alergias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), esclerosis múltiple, soriasis, uveítis, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), diabetes tipo I de inicio temprano juvenil, rechazo de trasplantes, LES y síndrome de Sjögren. Dichos métodos de tratamiento además pueden comprender la administración de uno o más agentes

terapéuticos adicionales, tales como agentes inmunosupresores o antiinflamatorios.

#### **Artritis reumatoide (AR).**

La AR es una enfermedad sistémica progresiva, caracterizada por la inflamación de las articulaciones sinoviales, que afecta a aproximadamente el 0,5% de la población mundial. Ver la referencia de Emery (2006), *BMJ*, 332: 152–155. La inflamación articular puede conducir a la deformidad, el dolor, la rigidez e hinchazón, y en última instancia, al deterioro irreversible de la articulación. Las articulaciones afectadas incluyen las rodillas, los codos, el cuello y las articulaciones de las manos y los pies. El tratamiento convencional involucra el uso de AINE de manera de aliviar los síntomas, seguido de la administración de fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD) tales como oro, penicilamina, sulfasalazina y metotrexato. Los avances recientes contemplan el tratamiento con inhibidores de TNF- $\alpha$ , entre ellos, anticuerpos monoclonales tales como infliximab, adalimumab y golimumab, y proteínas de fusión de receptor tales como etanercept. El tratamiento con estos inhibidores de TNF- $\alpha$  reduce drásticamente el daño estructural como consecuencia de la enfermedad.

Los anticuerpos agonistas anti-BTLA de la presente invención pueden usarse para el tratamiento de AR en sujetos que necesitan dicho tratamiento. Los anticuerpos anti-BTLA de la presente invención además pueden combinarse con otros tratamientos para la AR, por ejemplo, con metotrexato, azatioprina, ciclofosfamida, corticoesteroides, micofenolato mofetilo, AINE o inhibidores de TNF- $\alpha$  (anticuerpos o fragmentos de receptor).

En una realización, los anticuerpos anti-BTLA de la presente invención se usan en el tratamiento de sujetos humanos que no han respondido previamente de manera apropiada al tratamiento con DMARD solos. En otra realización, el tratamiento con los anticuerpos anti-BTLA de la presente invención se inicia

temprano en el curso de la enfermedad, sin la necesidad de fracaso previo de la terapia de DMARD. Dicha intervención temprana puede ser apropiada, por ejemplo, una vez que se ha establecido firmemente la seguridad de la terapia de anticuerpo.

- 5           La mejoría clínica se mide mediante la determinación del puntaje ACR (American College of Rheumatology), como se describe en más detalle en el Ejemplo 18. En diversas realizaciones, los puntajes ACR de 20, 50 y 70 son el criterio de valoración deseado, y estos criterios de valoración pueden ser evaluados en cualquier momento apropiado en el curso del tratamiento, por  
10           ejemplo, 5, 10, 15, 24, 40, 50 o más semanas.

#### **Enfermedad intestinal inflamatoria (EII).**

- La EII es la denominación de un grupo de trastornos (por ejemplo, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa) en los cuales el intestino se inflama, y se sufren calambres y dolor abdominales, diarrea, descenso de peso y  
15           hemorragia intestinal. La EII afecta a más de 600.000 norteamericanos. Las opciones convencionales de tratamiento incluyen sulfasalazina, corticoesteroides (por ejemplo, prednisona), supresores del sistema inmunitario tales como azatioprina y mercaptopurina, o un antibiótico (por ejemplo, metronidazol), para la enfermedad de Crohn. Los tratamientos con anticuerpos monoclonales  
20           terapéuticos incluyen etanercept, natalizumab e infliximab.

- Los anticuerpos agonistas anti-BTLA de la presente invención pueden usarse para tratar la EII en sujetos que necesitan dicho tratamiento. Los anticuerpos agonistas anti-BTLA de la presente invención además pueden combinarse con otros tratamientos para la EII, por ejemplo, IL-10 (ver las  
25           Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.368.854; 7.052.686), corticoesteroides y sulfasalazina.

### Soriasis.

La piel sirve como una importante frontera entre el medio interno y el entorno, a fin de prevenir el contacto con antígenos potencialmente nocivos. En el caso de la penetración de antígeno/patógeno, se induce una respuesta inflamatoria con el objetivo de eliminar el antígeno. Esta respuesta conduce a una infiltración dérmica que consiste predominantemente en células T, células polimorfonucleares y macrófagos (ver, por ejemplo, la referencia de Williams and Kupper (1996), *Life Sci.*, 58: 1485–1507). Normalmente, esta respuesta inflamatoria, desencadenada por el patógeno, se encuentra bajo riguroso control, y será interrumpida con la eliminación del patógeno.

En ciertos casos, esta respuesta inflamatoria se produce sin estímulos externos, y sin controles apropiados, para conducir a la inflamación cutánea. La presente invención provee métodos para el tratamiento y el diagnóstico de la inflamación cutánea. La inflamación cutánea, la consecuencia de la infiltración celular observada con anterioridad, al igual que de las citoquinas secretadas desde estas células, abarca varios trastornos inflamatorios, tales como penfigoide cicatricial, esclerodermia, hidrosadenitis supurativa, necrólisis epidérmica tóxica, acné, osteítis, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), pirodermia gangrenosa y síndrome de Behcet (ver, por ejemplo, la referencia de Williams and Griffiths (2002), *Clin. Exp. Dermatol.*, 27: 585–590). La forma más común de inflamación cutánea es la soriasis.

La soriasis se caracteriza por la hiperproliferación mediada por células T, de queratinocitos, junto con una infiltración inflamatoria. La enfermedad tiene ciertos fenotipos clínicos de superposición distintivos, que incluyen lesiones plaquetarias crónicas, erupciones cutáneas y lesiones pustulares (ver, por ejemplo, la referencia de Gudjonsson *et al.* (2004), *Clin. Exp. Immunol.*, 135: 1–8). Aproximadamente el 10% de los pacientes de soriasis desarrollan artritis. La

enfermedad tiene una fuerte y compleja predisposición genética, con 60% de concordancia en gemelos monocigóticos.

La lesión soriásica típica es una placa eritematosa bien definida cubierta por escamas gruesas argéntneas. La inflamación e hiperproliferación del tejido soriásico se asocia con un perfil de citoquina, antigénico e histológico diferente  
5 que el de la piel normal. Entre las citoquinas asociadas con la soriasis, se encuentran: TNF $\alpha$ , IL-19, IL-18, IL-15, IL-12, IL-7, IFN $\gamma$ , IL-17A e IL-23 (ver la referencia de Gudjonsson *et al.*, *supra*).

Los anticuerpos anti-BTLA de la presente invención, solos o en  
10 combinación con otros agentes, pueden usarse en la prevención, el tratamiento, el diagnóstico y la predicción de rebrotes soriásicos.

#### **Lupus eritematoso sistémico (LES).**

El lupus eritematoso es una enfermedad del tejido conectivo. El lupus es una enfermedad inflamatoria crónica que se produce cuando el sistema  
15 inmunitario del organismo ataca sus propios tejidos y órganos. La inflamación causada por el lupus puede afectar muchos sistemas diferentes del organismo, entre ellos, las articulaciones, la piel, los riñones, células sanguíneas, el corazón y los pulmones. El lupus se produce con mayor frecuencia en mujeres que en hombres, si bien las razones para esto son desconocidas. Existen cuatro tipos de  
20 lupus: lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso discoide, lupus eritematoso inducido por drogas y lupus neonatal. Naturalmente, el lupus eritematoso sistémico es la forma más común y más grave de lupus. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-BTLA de la presente invención pueden usarse para el  
tratamiento del lupus en sujetos que necesitan dicho tratamiento. Los anticuerpos  
25 anti-BTLA pueden combinarse con otros tratamientos para el, que incluyen AINE, ciertos fármacos antipalúdicos (por ejemplo, hidroxiclороquina y corticoesteroides, fármacos inmunosupresores (por ejemplo, ciclofosfamida (Cytoxan) y azatioprina

(Imuran), y micofenolato mofetilo (CellCept)), rituximab y dehidroepiandrosterona (DHEA).

El síndrome de Sjögren es otro trastorno crónico que causa sequedad ocular y bucal. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-BTLA de la presente  
5 invención pueden ser útiles para el tratamiento de individuos con síndrome de Sjögren. Los anticuerpos anti-BTLA de la presente invención pueden combinarse también con otros tratamientos para el síndrome de Sjögren, de la línea descripta para el lupus.

#### **Esclerosis múltiple (EM).**

10 Se cree que la EM es una enfermedad autoinmunitaria del sistema nervioso central (SNC) que compromete la pérdida de mielina de las fibras nerviosas, para producir placas o lesiones. La forma más común es la EM de recaída/remisión, en la cual se producen rebrotes sintomáticos bien definidos, seguidos de períodos de remisión parcial o completa. Las opciones de tratamiento convencionales incluyen  
15 interferón- $\beta$ -1a y -1b, mitoxantrona, el tetrapéptido acetato de glatiramer, anticuerpos terapéuticos específicos de alfa-4-integrina (natalizumab), o antagonistas de molécula pequeña de alfa-4-integrina (por ejemplo, aquellos revelados en el documento WO 2003/084984).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-BTLA agonistas de la  
20 presente invención pueden usarse para el tratamiento de la EM en sujetos que necesitan dicho tratamiento. Los anticuerpos anti-BTLA también pueden combinarse con otros tratamientos para la EM, por ejemplo, interferón- $\beta$ , interferón- $\alpha$ , corticoesteroides o anticuerpos específicos de alfa-4-integrina.

#### **Cáncer.**

25 Los anticuerpos antagonistas, o sus fragmentos de unión de antígeno, de la invención (ejemplificados por hu Mab4C7) pueden usarse para el tratamiento del cáncer (es decir, para la inhibición del crecimiento o la supervivencia de células

- tumorales). Los tipos de cáncer preferidos cuyo crecimiento puede inhibirse con los anticuerpos antagonistas de la invención incluyen tipos de cáncer típicamente sensibles a la inmunoterapia, si bien, además, tipos de cáncer que no han sido asociados hasta la fecha con la inmunoterapia. Ejemplos no limitativos de tipos de
- 5 cáncer preferidos para el tratamiento incluyen melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico), cáncer renal (por ejemplo, carcinoma renal), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata con resistencia hormonal), adenocarcinoma pancreático, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer
- 10 esofágico, carcinoma de célula escamosa de la cabeza y el cuello, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer tiroideo, glioblastoma, glioma, leucemia, linfoma y otras enfermedades malignas neoplásicas. Además, la invención incluye enfermedades malignas resistentes o recurrentes cuyo crecimiento puede ser inhibido usando los anticuerpos de la invención.
- 15 Los fragmentos de anticuerpos o anticuerpos antagonistas de la invención pueden usarse solos o en combinación con: otros agentes antineoplásicos o inmunógenos (por ejemplo, células cancerosas atenuadas, antígenos tumorales (que incluyen proteínas recombinadas, péptidos y moléculas de carbohidratos), células que presentan antígeno tales como células dendríticas pulsadas con
- 20 antígeno derivado de tumor o ácidos nucleicos, citoquinas estimulantes inmunitarias (por ejemplo, IL-2, IFN $\alpha$ 2, GM-CSF), y células transfectadas con genes que codifican citoquinas estimulantes inmunitarias tales como, sin limitación, GM-CSF); tratamientos contra el cáncer convencionales (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia o cirugía); u otros anticuerpos (que incluyen, sin
- 25 limitación, anticuerpos para VEGF, EGFR, Her2/neu, receptores de VEGF, otros receptores de factores de crecimiento, CD20, CD40, CTLA-4, OX-40, 4-1BB, PD-1, PD-L1, CTLA-4, ICOS, y otras moléculas en vías reguladoras negativas).

### **Enfermedades infecciosas.**

El anticuerpo antagonista o sus fragmentos de unión de antígeno de la invención (ejemplificados por hu Mab4C7) pueden usarse también en la prevención o el tratamiento de infecciones y enfermedades infecciosas. El anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo pueden usarse solos o en combinación con vacunas, de manera de estimular la respuesta inmunitaria a patógenos, toxinas y autoantígenos. Los anticuerpos o sus fragmentos de unión de antígeno pueden utilizarse para estimular la respuesta inmunitaria a virus infecciosos para humanos, tales como, sin limitación, virus de inmunodeficiencia humana, virus de hepatitis clase A, B y C, virus de Eppstein Barr, citomegalovirus humano, virus de papiloma humano, virus de herpes. Los anticuerpos o sus fragmentos de unión de antígeno pueden usarse para estimular la respuesta inmunitaria a infecciones con parásitos bacterianos o fúngicos, y otros patógenos.

### **Complemento de vacunación.**

Los anticuerpos antagonistas o sus fragmentos de unión de antígeno de la invención (ejemplificados por hu Mab4C7) pueden usarse en conjunto con otros péptidos o proteínas recombinados (tales como antígenos tumorales o células cancerosas) a fin de aumentar la respuesta inmunitaria a estas proteínas (es decir, en un protocolo de vacunación).

Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-BTLA antagonistas y sus fragmentos pueden usarse para estimular las respuestas inmunitarias específicas de antígeno, mediante la administración conjunta de un anticuerpo anti-BTLA con un antígeno de interés (por ejemplo, una vacuna). Por lo tanto, en otro aspecto, la invención provee un método para aumentar la respuesta inmunitaria a un antígeno en un sujeto, que comprende la administración, al sujeto, de: (i) el antígeno; y (ii) un anticuerpo anti-BTLA de la invención, o un fragmento del mismo de unión a antígeno, de modo de aumentar

la respuesta inmunitaria al antígeno, en el sujeto. El antígeno puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, o un antígeno de un patógeno. Ejemplos no limitativos de dichos antígenos incluyen, sin limitación, antígenos tumorales, o antígenos de virus, bacterias u otros patógenos.

#### **Enfermedades mediadas por Th2.**

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-BTLA y sus fragmentos, de la invención (ejemplificados por hu Mab4C7) pueden usarse también para el tratamiento de enfermedades mediadas por Th2, tales como asma y alergia. Este uso se basa en el hallazgo de que los anticuerpos de la invención pueden ayudar a la inducción de una respuesta Th1. Por lo tanto, los anticuerpos de la invención pueden usarse en enfermedades mediadas por Th2 para generar una respuesta inmunitaria más equilibrada.

#### **Activación ex vivo de células T.**

En ciertas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos de unión de antígeno de la invención (ejemplificados por hu Mab4C7) pueden usarse también para la activación ex vivo y la expansión de células T específicas de antígeno, y la transferencia adoptiva de estas células a receptores, a fin de aumentar las células T específicas de antígeno contra el tumor. Estos métodos también pueden usarse para activar las respuestas de las células T a agentes infecciosos tales como CMV (citomegalovirus). Puede esperarse que la activación ex vivo en presencia de anticuerpos anti-BTLA aumente la frecuencia y actividad de las células T adoptivamente transferidas.

#### **Otras terapias de combinación.**

Como se describe anteriormente, los anticuerpos anti-BTLA de la invención pueden administrarse en forma conjunta con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico,

o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede ligarse al agente (como un inmunocomplejo), o puede administrarse en forma separada del agente. En el último caso (la administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes o después del agente, o en forma conjunta con el agente, o puede administrarse en forma conjunta con otras terapias conocidas.

Los anticuerpos y sus fragmentos de unión de antígeno de la invención también pueden usarse a fin de aumentar la eficacia de células T específicas de tumor injertadas de donante.

Pueden efectuarse muchas modificaciones y variaciones de esta invención, sin alejarse de su espíritu y alcance, como será evidente para los expertos en el arte. La invención se define en términos de las reivindicaciones anexas, junto con el alcance completo de los equivalentes a los cuales tienen derecho dichas reivindicaciones. Las realizaciones específicas que se describen en esta solicitud, que incluyen los siguientes ejemplos, se ofrecen solo a modo de ejemplo, y con sus detalles, no limitan el alcance de la invención.

#### **MÉTODOS GENERALES.**

Se describen los métodos convencionales de la biología molecular (Maniatis, *et al.* (1982), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook and Russell (2001), *Molecular Cloning, 3<sup>rd</sup> ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993), *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). Aparecen también métodos convencionales en la referencia de Ausbel, *et al.* (2001), *Current Protocols in Molecular Biology, Vols.1-4*, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, que describe la clonación en células bacterianas y la mutagénesis de ADN (Vol. 1), la clonación en células mamíferas y levaduras (Vol. 2), glicoconjugados y la expresión de proteínas (Vol. 3), y la bioinformática (Vol. 4).

- Se describen los métodos para la purificación de proteínas, que incluyen la inmunoprecipitación, la cromatografía, la electroforesis, la centrifugación y la cristalización (Coligan, *et al.* (2000), *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). Se describen el análisis químico, la
- 5 modificación química, la modificación postraducción, la producción de proteínas de fusión, la glicosilación de proteínas (ver, por ejemplo, las referencias de Coligan, *et al.* (2000), *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel, *et al.* (2001), *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5–16.22.17; Sigma-
- 10 Aldrich, Co. (2001), *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pp. 45–89; Amersham Pharmacia Biotech (2001), *BioDirectory*, Piscataway, N. J., pp. 384–391). Se describen la producción, purificación y fragmentación de anticuerpos policlonales y monoclonales (Coligan, *et al.* (2001), *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane
- 15 (1999), *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, *supra*). Pueden obtenerse técnicas convencionales para la caracterización de las interacciones de ligando/receptor (ver, por ejemplo, la referencia de Coligan, *et al.* (2001), *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York).
- 20 Pueden prepararse anticuerpos monoclonales, policlonales y humanizados (ver, por ejemplo, las referencias de Sheperd and Dean (eds.) (2000), *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, New York, NY; Kontermann and Dubel (eds.) (2001), *Antibody Engineering*, Springer–Verlag, New York; Harlow and Lane (1988), *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press,
- 25 Cold Spring Harbor, NY, pp. 139–243; Carpenter, *et al.* (2000), *J. Immunol.* 165:6205; He, *et al.* (1998), *J. Immunol.* 160:1029; Tang *et al.* (1999), *J. Biol. Chem.*, 274: 27371–27378; Baca *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.*, 272: 10678–10684;

Chothia *et al.* (1989), *Nature*, 342: 877–883; Foote and Winter (1992), *J. Mol. Biol.* 224: 487–499; Patente de los Estados Unidos Nro. 6.329.511).

Una alternativa a la humanización consiste en el uso de genotecas de anticuerpos humanos exhibidas en fagos, o genotecas de anticuerpos humanos en ratones transgénicos (Vaughan *et al.* (1996), *Nature Biotechnol.*, 14: 309–314; Barbas (1995), *Nature Medicine*, 1: 837–839; Mendez *et al.* (1997), *Nature Genetics*, 15: 146–156; Hoogenboom and Chames (2000), *Immunol. Today* 21: 371–377; Barbas *et al.* (2001), *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Kay *et al.* (1996), *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego, CA; de Bruin *et al.* (1999), *Nature Biotechnol.* 17: 397–399).

Se describen diacuerpos y anticuerpos de cadena simple (ver, por ejemplo, las referencias de Malecki *et al.* (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 213–218; Conrath *et al.* (2001), *J. Biol. Chem.* 276: 7346–7350; Desmyter *et al.* (2001), *J. Biol. Chem.*, 276: 26285–26290; Hudson and Kortt (1999), *J. Immunol. Methods* 231: 177–189; y Patente de los Estados Unidos Nro. 4.946.778). Se proveen anticuerpos bifuncionales (ver, por ejemplo, las referencias de Mack, *et al.* (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7021–7025; Carter (2001), *J. Immunol. Methods*, 248: 7–15; Volkel, *et al.* (2001), *Protein Engineering*, 14: 815–823; Segal, *et al.* (2001), *J. Immunol. Methods*, 248: 1–6; Brennan, *et al.* (1985), *Science*, 229: 81–83; Raso, *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.*, 272: 27623; Morrison (1985), *Science*, 229: 1202–1207; Traunecker, *et al.* (1991), *EMBO J.*, 10: 3655–3659; y Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.932.448, 5.532.210 y 6.129.914).

Se proveen además anticuerpos biespecíficos (ver, por ejemplo, las referencias de Azzoni *et al.* (1998), *J. Immunol.*, 161: 3493; Kita *et al.* (1999), *J. Immunol.*, 162: 6901; Merchant *et al.* (2000), *J. Biol. Chem.*, 74: 9115; Pandey *et al.* (2000), *J. Biol. Chem.*, 275: 38633; Zheng *et al.* (2001), *J. Biol. Chem.* 276:

12999; Propst *et al.* (2000), *J. Immunol.*, 165: 2214; Long (1999), *Ann. Rev. Immunol.*, 17: 875).

La purificación de antígeno no es necesaria para la generación de anticuerpos. Los animales pueden ser inmunizados con células que portan el  
5 antígeno de interés. Entonces pueden aislarse esplenocitos de los animales inmunizados, y los esplenocitos pueden fusionarse con una estirpe celular de mieloma a fin de producir un hibridoma (ver, por ejemplo, las referencias de Meyaard *et al.* (1997), *Immunity*, 7: 283–290; Wright *et al.* (2000), *Immunity*, 13: 233–242; Preston *et al.*, *supra*; Kaithamana *et al.* (1999), *J. Immunol.*, 163: 5157–  
10 5164).

Los anticuerpos pueden conjugarse, por ejemplo, con moléculas de fármaco pequeñas, enzimas, liposomas, polietilenglicol (PEG). Los anticuerpos son útiles para propósitos terapéuticos, de diagnóstico, de equipo u otros propósitos, e incluyen anticuerpos acoplados, por ejemplo, con colorantes,  
15 radioisótopos, enzimas, o metales, por ejemplo, oro coloidal (ver, por ejemplo, las referencias de Le Doussal *et al.* (1991), *J. Immunol.*, 146: 169–175; Gibellini *et al.* (1998), *J. Immunol.*, 160: 3891–3898; Hsing and Bishop (1999), *J. Immunol.*, 162: 2804–2811; Everts *et al.* (2002), *J. Immunol.*, 168: 883–889).

Pueden obtenerse los métodos para la citometría de flujo, que incluye la  
20 clasificación de células activada por fluorescencia (FACS, según su sigla en inglés) (ver, por ejemplo, las referencias de Owens, *et al.* (1994), *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001), *Flow Cytometry*, 2<sup>nd</sup> ed.; Wiley–Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003), *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ). Pueden obtenerse  
25 los reactivos fluorescentes adecuados para ácidos nucleicos modificadores, que incluyen sondas y cebadores de ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos, para el uso, por ejemplo, como reactivos de diagnóstico (Molecular Probes (2003)

*Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma–Aldrich (2003) *Catalogue*, St. Louis, MO).

Se describen los métodos convencionales de histología del sistema inmunitario (ver, por ejemplo, las referencias de Muller–Harmelink (ed.) (1986),  
 5 *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, New York, NY; Hiatt, *et al.* (2000), *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, PA; Louis, *et al.* (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw–Hill, New York, NY).

Pueden obtenerse paquetes de programas informáticos y bases de datos  
 10 para la determinación, por ejemplo, de fragmentos antigénicos, secuencias líder, plegado de proteínas, dominios funcionales, sitios de glicosilación y alineaciones de secuencias (ver, por ejemplo, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne, *et al.* (2000)  
 15 *Bioinformatics* 16: 741–742; Menne, *et al.* (2000), *Bioinformatics Applications Note* 16: 741–742; Wren, *et al.* (2002), *Comput. Methods Programs Biomed.* 68: 177–181; von Heijne (1983), *Eur. J. Biochem.* 133:17–21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14: 4683–4690).

### EJEMPLO 1

#### 20 **Anticuerpos de BTLA completamente humanos.**

Los anticuerpos monoclonales completamente humanos específicos para BTLA humano se generaron usando la plataforma de generación de anticuerpos UltiMAB de Medarex, Inc., mediante la inmunización de ratones con una combinación de células CHO que sobreexpresaban huBTLA ligado a membrana y  
 25 proteína de fusión huBTLA–Fc en coadyuvante MPL® + TDM. Los ratones se inmunizaron con proteína de fusión BTLA–Fc o células que expresaban BTLA ligado a membrana que expresaba dominio extracelular maduro (residuos 31–152

de SEQ. ID. NO.: 35). Esta secuencia se corresponde con el dominio extracelular de la variante de transcripción 1 descrita en la secuencia de Acceso GenBank Nro. NP\_861445 (que coincide con la variante de transcripción 1 de BTLA humano (NP\_861445), con una diferencia de aminoácido en el dominio intracelular en la posición 267 ((Pro267Leu, SEQ. ID. NO.: 35, codificada por SEQ. ID. NO.: 36), en relación con NP\_861445 (SEQ. ID. NO.: 37). Después de múltiples rondas de inmunización y valoración de suero, se eligieron los ratones seleccionados para la fusión. Una fusión produjo 49 Mab anti-BTLA, la mayoría de los cuales eran del isotipo IgG4. Otra fusión produjo 154 MAb, la mayoría de los cuales eran del isotipo IgG1, que incluían el Mab8D5.

Luego de la identificación sistemática de gamma/kappa humano, los Mab anti-BTLA fueron inicialmente caracterizados y seleccionados sobre la base de la unión a BTLA-Ig, por ELISA, FACS/FMAT para la identificación sistemática sobre CHO/huBTLA y células parentales CHO a fin de eliminar Mab CHO positivos, y a fin de establecer su capacidad para bloquear la unión de HVEM a células CHO BTLA. Se efectuaron determinaciones de afinidad relativa usando el análisis de resonancia de plasmón de superficie BIACore. El hu Mab8D5 se une igualmente bien tanto a BTLA humano como macaco, si bien no tiene actividad de bloqueo. Hu Mab8D5 además demostró actividad agonista en ensayos funcionales de células B y T, como se describe en la presente solicitud.

Hu Mab8D5 es un anticuerpo monoclonal completamente humano del isótopo IgG4/kappa (que contiene la mutación estabilizante 228 prolina), que se une a BTLA humano con aproximadamente 2 nM de afinidad (BIAcore). El anticuerpo Hu Mab8D5 no es bloqueante, y no interfiere con la unión de HVEM. Tres anticuerpos adicionales, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7, exhiben propiedades funcionales similares, aunque no idénticas, a aquellas de hu Mab8D5. Si bien hu Mab8A3 es también un anticuerpo agonista no bloqueante,

que no interfiere con la unión de HVEM, hu Mab21H6 y hu Mab19A7 son agonistas que además bloquean la unión de HVEM con BTLA.

#### **Selección de isotipo de anticuerpo anti-BTLA.**

Los anticuerpos del isotipo IgG4 se unen en forma deficiente al  
5 complemento C1q, y por lo tanto, no activan de manera significativa el  
complemento. Los anticuerpos IgG4 además se unen débilmente a receptores  
Fcγ, para conducir a la ineficiente o ausente citotoxicidad mediada por células  
dependiente de anticuerpo (ADCC, según su sigla en inglés) (reseñado en la  
referencia de Presta, 2002). El Mab inicialmente seleccionado 8D5 IgG1 fue  
10 reexpresado como un IgG4 humano que contenía la mutación estabilizadora Adair  
S228P, a fin de producir un anticuerpo anti-BTLA que carece de función efectora.  
Las regiones variables se subclonaron en vectores de elemento de abertura de  
cromatina ubicuo (Ubiquitous Chromatin Opening Element (UCOE; Millipore,  
Billerica, MA)), que contenían la región constante kappa humana y la región  
15 constante humana gamma 4 con la mutación de bisagra S228P (Angal, 1993).  
Los vectores de expresión de cadena pesada y liviana se linealizaron y se  
transfectaron en forma conjunta en células CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA), y  
se seleccionaron los clones estables en medio CD CHO (Invitrogen, Carlsbad,  
CA) que contenía G418 y puromicina. Los clones se sometieron a la identificación  
20 sistemática a fin de establecer la expresión, usando un ensayo ELISA de  
intercalación humano gamma/kappa, y la línea de mayor producción se amplió  
hasta 2 l, para la producción y purificación. La versión IgG4 del Mab original 8D5  
se denomina, en esta solicitud, hu Mab8D5 (o hu Mab8D5 G4). La versión IgG1  
de 8D5 se denomina en esta solicitud hu Mab8D5 G1.

#### **Secuencias de anticuerpos anti-BTLA.**

Usando métodos sobre la base de la PCR de cebador degenerado, se  
determinaron las secuencias de ADN de las regiones variables de cadena pesada

y liviana de las secuencias de hu Mab8D5 y hu Mab4C7. Se preparó el ARN total a partir de  $5 \times 10^6$  células de hibridoma, empleando el equipo RNeasy Mini Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA, USA). Se preparó ADNc por el protocolo 5'–RACE con el equipo de amplificación de ADNc SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) y transcriptasa inversa SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), ambos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las regiones V de cada anticuerpo se amplificaron usando un cebador de región constante específica de humano 3' (cebador VH HLB02 (SEQ. ID. NO.: 33); cebador VK LY49 (SEQ. ID. NO.: 34)), junto con mezcla de cebador universal 5' RACE. Los productos de PCR que contenían la región V se clonaron en el vector pCR4–TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se transformaron en la cepa de *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Se preparó ADN miniprep o Templphi (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ, USA), y se sometió al secuenciamiento de ADN (Sequetech, Mountain View, CA, USA). Las secuencias de ADN resultantes se analizaron a fin de establecer las redistribuciones en marco, y otras características de anticuerpo. Las secuencias de las regiones variables de cadena pesada y liviana de hu Mab8D5 se muestran en las Figuras 1A–C. Las regiones de determinación de complementariedad (CDR) están marcadas. Los rasgos de secuencia se reseñan en la Figura 1C. Las secuencias de las regiones variables de cadena pesada y liviana del anticuerpo antagonista Hu Mab4C7 se muestran en las Figuras 2A–C.

## EJEMPLO 2

### Afinidades de unión de anticuerpo anti–BTLA.

Se usó la citometría de flujo sobre la base de células a fin de determinar las afinidades de unión aparentes de hu Mab8D5 (Figuras 3A–B) y hu Mab4C7 a BTLA humano y de macaco (Figuras 3C–D). La unión máxima media de BTLA

humano y de macaco se produjo a ~12 nM, tanto para las versiones IgG1 como IgG4 de hu Mab8D5. Para el análisis de la unión de agonista (Figuras 3A–B), hu Mab8D5 se valoró 3 veces a partir de 20 µg/ml en células CHO que expresaban BTLA humano, o 2 veces, a partir de 50 µg/ml en células CHO que expresaban BTLA de macaco en regulador a 4°C que contenía 0,02% de azida sódica, a fin de prevenir la internalización de receptor. Se usó PE–anti–huFc para la detección. Esta información ilustra que hu Mab8D5 se une a BTLA humano y de macaco. Los agonistas huMab8A3, hu Mab21H6 y hu Mab19A7 exhiben afinidades de unión similares a aquella de hu Mab8D5.

10

Tabla 5: Resultados BIAcore

| Clon ID           | $K_D \times 10^{-9}$<br>(M) | $k_{on} \times 10^4$<br>(1/Ms) | $k_{off} \times 10^{-4}$<br>(1/s) |
|-------------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 8D5 (G4) agonista | 2,99                        | 4,58                           | 1,37                              |
| 21H6 (G1)         | 5,50                        | 5,11                           | 2,82                              |
| 8A3 (G1)          | 9,27                        | 2,88                           | 5,96                              |
| 19A7 (G1)         | 20,7                        | 2,88                           | 5,96                              |

Para el análisis de unión de antagonista (Figuras 3C–D) hu Mab4C7 se valoró 3 veces a partir de 20 µg/ml en células CHO que expresaban BTLA humano, o 2 veces a partir de 50 µg/ml en células CHO que expresaban BTLA de macaco, en regulador a 4°C que contenía 0,02% de azida sódica, a fin de prevenir la internalización de receptor. Se usó PE–anti–huFc para la detección. Para hu Mab4C7, la unión máxima media de BTLA humano y de macaco se produjo a ~1,6 nM, tanto para la versión IgG1 como para IgG4 de hu Mab4C7, como se muestra en las Figuras 3C–D. Esta información ilustra que hu Mab4C7 se une a BTLA humano y de macaco.

15

EJEMPLO 3

BIAcore.

Los anticuerpos se perfilaron adicionalmente a fin de dilucidar la cinética de unión, y calcular las constantes de unión de equilibrio usando el análisis BIAcore, para demostrar cinética de rápido encendido y lento apagado. Para BIAcore, los anticuerpos de ensayo se capturaron en un chip anti-CH1.

Hu Mab8D5 G4 exhibió un Kd aparente de 2,4 nM. El anticuerpo antagonista hu Mab4C7 exhibió un Kd aparente de 4,6 nM.

10

TABLA 6. Resultados de BIAcore.

| HuMAb             | Ka (1/Ms)*(10 <sup>4</sup> ) | Kd (1/s)*(10 <sup>-4</sup> ) | KD (nM) |
|-------------------|------------------------------|------------------------------|---------|
| 8D5 (G4) agonista | 7,9                          | 1,9                          | 2,4     |
| 4C7 antagonista   | 9,25                         | 4,3                          | 4,6     |

EJEMPLO 4

Capacidad de bloqueo de HVEM.

Los anticuerpos se ensayaron a fin de determinar su capacidad para bloquear la unión de HVEM a BTLA humano. La capacidad para bloquear la unión de HVEM a BTLA humano se midió usando un ensayo de citometría de flujo sobre la base de células competitivo. Se aplicó hu Mab8D5 sucesivamente diluido, durante 15 minutos, a células CHO que expresaban BTLA humano (en regulador que contenía 0,02% de azida sódica a fin de prevenir la internalización de receptor), antes de la adición de HVEM-Fc humano biotinilado (R&D Systems; 1 µg/ml), durante 30 minutos, a 4°C. Para los resultados que se muestran en la Figura 4B, hu Mab8D5 se valoró 3 veces iniciando a partir de 50 µg/ml, y se usó PE-SA para la detección.

La capacidad de bloqueo de HVEM de hu Mab4C7 se muestra en la Figura 4A del mismo ensayo. Se aplicó hu Mab4C7 sucesivamente diluido, durante 15

minutos, a células CHO que expresaban BTLA humano (en regulador que contenía 0,02% de azida sódica a fin de prevenir la internalización de receptor) antes de la adición de HVEM-Fc humano biotinilado (R&D Systems; 1 µg/ml), durante 30 minutos, a 4°C. Para los resultados que se muestran en la Figura 4A, hu Mab4C7 se valoró 3 veces iniciando a partir de 50 µg/ml, y se usó PE-SA para la detección. Las células lavadas se resuspendieron en regulador a 4°C que contenía yoduro de propidio (PI), al igual que 0,02% de azida sódica, a fin de prevenir la internalización de receptor, y se analizaron mediante la citometría de flujo. Las células vivas se ingresaron sobre la base de la exclusión de células PI-positivas, de la puerta de entrada FSC/SSC, y se midió su media de fluorescencia geométrica. Los resultados de la Figura 4A muestran que hu Mab4C7 bloquea la unión de HVEM humano (hHVEM) a células CHO que expresan hBTLA.

Como se muestra en la Figura 4B, hu Mab8D5 no inhibe la unión de HVEM a BTLA humano, ni compite con ella. Se obtuvieron resultados similares para el anticuerpo huMab8A3. Como se muestra en la Figura 4A, huMab4C7 inhibe la unión de HVEM a BTLA humano, o compite con ella. Se obtuvieron resultados similares de bloqueo para los anticuerpos hu Mab21H6, hu Mab19A7.

#### EJEMPLO 5

**La respuesta de células T humanas al entrecruzamiento de CD3 es inhibida por hu Mab8D5.**

Los anticuerpos agonistas anti-BTLA y fragmentos de anticuerpos se ensayaron a fin de establecer su capacidad para disminuir la actividad de células T *in vitro*, usando células sanguíneas de voluntarios sanos estimuladas en diversos parámetros. Se utilizó un ensayo de estimulación de células T clásico que empleaba Mab anti-CD3 para el entrecruzamiento del complejo de receptor

de células T sobre la superficie celular de todas las células T humanas competentes.

Se generaron blastocitos de células T en cultivo, a partir de PBMC humanas usando PHA e IL-2. Los blastocitos se estimularon con Ab anti-CD3  
5 inmovilizados, durante 48 horas en presencia o ausencia de hu Mab8D5 soluble, fragmento Fab de hu Mab8D5 o IgG1 isotipo control. Se midió la proliferación mediante la incorporación de timidina, como se muestra en la Figura 5.

En este ensayo, hu Mab8D5 demostró inhibir la proliferación, lo que sugiere que el resultado de la estimulación concurrente del receptor de antígeno y BTLA  
10 en células T es la supresión de la respuesta de las células T (Fig. 5). El anticuerpo hu Mab8D5 agregado a estos cultivos como fragmentos Fab' monovalentes demostró actividad similar, lo que indica con fuerza que hu Mab8D5 activa la función de receptor de BTLA mediante el acierto a un epítipo funcional, y no mediante el entrecruzamiento de múltiples moléculas de BTLA sobre la superficie  
15 celular. Esta información ilustra que hu Mab8D5 inhibe la proliferación de blastocitos de células T humanos inducida por anti-CD3.

#### EJEMPLO 6

**La respuesta de células T humanas a SEB es inhibida por hu Mab8D5 y aumentada por hu Mab4C7.**

Otro ensayo utilizado para la caracterización de la consecuencia funcional de la activación del receptor BTLA emplea la enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB) a fin de comprometer y activar todas las células T humanas que expresan V $\beta$ 3, V $\beta$ 12, V $\beta$ 14, V $\beta$ 17 y algunas otras cadenas de receptor de célula T,  
20 conforme a la dosis de SEB. De acuerdo con el donante, SEB activa hasta el 20% de todas las células T, determinado por la producción de IL-2.  
25

En los presentes análisis, se diluyó sangre de donante sano humano (Fig. 6A) o de macaco (Fig. 6B), 1:10, y se preincubó con anticuerpos, antes de la

adición de superantígeno SEB (1  $\mu$ g/ml) al cultivo. IgG4 humano (HuIgG4) es el Mab de control de isotipo para hu Mab8D5. Se muestran un solo donante de mono y humano representativo.

Después de 2 días, se midió la producción de IL-2 por ELISA. Hu Mab8D5  
5 disminuyó la producción de IL-2 en comparación con el control de IgG4 humano, tanto en el donante humano como en el mono.

La proteína de fusión soluble CTLA-4-Ig (CTLA-4/Ig), que bloquea la interacción entre el receptor coestimulante CD28 y sus ligandos CD80/CD86, disminuyó la producción de IL-2 inducida por SEB, para validar adicionalmente el  
10 ensayo de estimulación de SEB como un método para la cuantificación de la actividad de células T luego de la manipulación de las vías coestimulantes. Se halló que la disminución en la producción de IL-2 por los anticuerpos agonistas ensayados anti-BTLA era dependiente de la dosis (Figuras 6A-B). Los anticuerpos hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7 también pueden tener efectos  
15 similares sobre la producción de IL-2.

Estos ensayos además se llevaron a cabo con hu Mab4C7, de acuerdo con los métodos que se describen anteriormente. Hu Mab4C7, en contraste a CTLA-4/Ig y hu Mab8D5, aumentó la producción de IL-2 en comparación con el control de IgG4 humano, tanto en el donante humano (Fig. 6C) como en el mono (Fig.  
20 6D).

La capacidad de los Mab de BTLA antihumanos ensayados para reaccionar en forma cruzada con BTLA de mono es especialmente útil en el ensayo para establecer la capacidad de los Mab para modular las respuestas de células T en modelos bien ensayados, tales como los sistemas de trasplante de riñón de mono  
25 y EAE, que son indicativos de la modulación de enfermedad *in vivo*. La capacidad de los anticuerpos anti-BTLA agonistas ensayados para disminuir la producción de IL-2 en el ensayo de estimulación de SEB indica que estos anticuerpos serían

adecuados para el control o la prevención de afecciones tales como la enfermedad de injerto contra huésped.

#### EJEMPLO 7

**Inhibición de la producción y proliferación de IFN $\gamma$  dependiente de toxoide tetánico (TT) por hu Mab8D5 en células sanguíneas de donantes vacunados con TT.**

Además, se estudió si la capacidad del tratamiento anti-BTLA suprimía una respuesta específica de antígeno usando el antígeno de rellamada de toxoide tetánico (TT). Se agregó TT a PBMC, en una concentración de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ; se analizaron la citoquina y la proliferación luego de 7 días. Se reestimularon PBMC de individuos recién vacunados con TT, *in vitro*, durante 7 días, usando TT en presencia o ausencia de Abatacept (CTLA-4/Ig), hu Mab8D5, o anticuerpo IgG4 de isotipo de control. Se midió la producción de interferón gamma (IFN  $\gamma$ ) por medio del ensayo ELISA, y se midió la proliferación mediante la incorporación de timidina tritiada.

La producción de IFN $\gamma$  inducida por TT (Figura 7A) y la proliferación (Figura 7B) fueron marcadamente reducidas por CTLA-4/Ig y por hu Mab8D5, en comparación con el antígeno solo. Esta información indica que hu Mab8D5 es capaz de inhibir las respuestas de células T desencadenadas a través del complejo de receptor de células T (específico de antígeno). Se suprimen tanto las respuestas primarias como secundarias (rellamada) en presencia de hu Mab8D5.

#### EJEMPLO 8

**Incremento de la producción y proliferación de IFN $\gamma$  dependiente de toxoide tetánico (TT) por hu Mab4C7 en células sanguíneas de donantes vacunados con TT.**

Los análisis de producción de IFN $\gamma$  (Figura 8A) y proliferación (Figura 8B) se llevaron a cabo, asimismo, como se describe anteriormente, usando el

anticuerpo antagonista hu Mab4C7. La producción de IFN $\gamma$  inducida por TT (Figura 8A) y la proliferación (Figura 8B) fueron notablemente aumentadas por hu Mab4C7 en comparación con antígeno solo. Estos resultados indican que hu Mab4C7 es capaz de aumentar las respuestas de las células T desencadenadas a través del complejo de receptor de células T específico de antígeno. Tanto las respuestas primarias como las secundarias (rellamada) son aumentadas en presencia de hu Mab4C7.

#### EJEMPLO 9

##### **La función de células B humanas es inhibida por hu Mab8D5.**

Se aislaron células B humanas de sangre periférica, y se estimularon con anti-IgM en presencia o ausencia de Mab anti-BTLA. Específicamente, se aislaron células B mediante la selección negativa de sangre completa humana, y se estimularon con 10  $\mu$ g/ml de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> anti-IgM en presencia o ausencia de hu Mab8D5, CTLA-4/Ig o isotipo de control. Se midió la proliferación mediante la incorporación de timidina luego de 48 h. Hu Mab8D5 produjo una disminución dependiente de la dosis, en la proliferación de células B, mientras que un isotipo control y CTLA-4/Ig no tuvieron efecto, como se muestra en la Fig. 9. Se obtuvieron resultados similares para el anticuerpo huMab8A3.

#### EJEMPLO 10

##### **Inhibición de la producción de quimioquina de células B de sangre periférica por hu Mab8D5.**

El entrecruzamiento de IgM de superficie en células B naive conduce a la mayor producción de quimioquinas tales como MIP1 $\alpha$  y MIP1 $\beta$ . Las Figuras 10A–B representan gráficos que muestran la inhibición de la producción de quimioquina de células B de sangre periférica por hu Mab8D5. Las células B se aislaron mediante la selección negativa, de sangre completa humana, y se estimularon con 10  $\mu$ g/ml de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> anti-IgM, en presencia o

ausencia de hu Mab8D5 o isotipo de control. Se midió la producción de MIP1  $\alpha$  y  $\beta$  por medio del ensayo ELISA.

Además de limitar la proliferación de células B, hu Mab8D5 redujo la producción de quimioquina de MIP1 $\alpha$  (Fig. 10A) y MIP1 $\beta$  (Fig. 10B) de células B, desencadenada por anti-IgM, de manera dependiente de la dosis. Es importante el hecho de que hu Mab8D5 y anticuerpos de control se ensayaron en experimentos usando desencadenantes no específicos de antígeno, tales como CD40L más IL-4, que inducen potentemente la proliferación de células B sin comprometer el receptor de células B. En estas condiciones, no se detectó actividad de hu Mab8D5.

### EJEMPLO 11

#### **Hu Mab8D5 no produce en forma autónoma actividad inmunitaria.**

La Figura 11 es un gráfico que muestra que hu Mab8D5 no estimula en forma autónoma la actividad inmunitaria en sangre de donantes sanos. Se estimuló sangre completa diluida de humanos, con el superantígeno SEB en presencia o ausencia de hu Mab8D5 o CTLA-4-Ig. HuIgG4 es el mAb de isotipo de control para hu Mab8D5. Hu Mab8D5 también se agregó a la sangre en ausencia de estimulación de SEB. Después de 48 horas (h), se midió la producción de IL-2 por medio del ensayo ELISA.

En los ensayos de respuesta de rellamada TT, al igual que en los ensayos de estimulación de SEB (usando sangre completa humana), hu Mab8D5 no estimula la proliferación detectable o las respuestas de citoquinas sin la estimulación específica concurrente del receptor de células T. Esto demuestra que no es probable que hu Mab8D5 induzca eventos de tipo tormenta de citoquinas inadvertidos en los pacientes.

## EJEMPLO 12

### **Hu Mab8D5 desencadena la actividad de señalización inhibitoria de BTLA.**

Hu Mab8D5 y hu Mab4C7 inmunoprecipitan proteína BTLA de células B, y  
5 el pretratamiento con hu Mab8D5 reduce la fosforilación de TCR $\xi$ . Los lisados de  
células B de sangre periférica humana fueron inmunoprecipitados con diversos  
HuMAb de BTLA. El hulG4 es un isotipo de control, hu Mab4C7 (un anticuerpo  
antagonista) y 2G9 son otros HuMAb de BTLA. Para la Fig. 12B, las células CD4  
T se aislaron de sangre periférica y se trataron de la siguiente manera: Columna  
10 1= células no estimuladas; Columna 2 = estimuladas durante 30 min con cuentas  
expansoras de células T anti-CD3; Columna 3 = tratadas con 25  $\mu$ g/ml de hu  
Mab8D5- (marcado como clon 8D5) antes de los 30 min de estimulación con  
cuentas expansoras. El *blot* superior de los lisados de células enteras es  
sondeado para detectar el CD3 $\xi$  total, mientras que el *blot* inferior es sondeado  
15 con un CD3 $\xi$ Ab fosfoespecífico. La columna M representa los marcadores de  
peso molecular, números indicados kD.

En células B de sangre periférica derivadas de donantes sanos, hu  
Mab8D5 y hu Mab4C7 demostraron unirse específicamente a BTLA, e  
inmunoprecipitarlo (Fig. 12A). En células T CD4+ de sangre periférica estimuladas  
20 con anti-CD3 más anti-CD28, se halló que la incubación previa con hu Mab8D5  
redujo la fosforilación de la cadena TCR $\xi$ , lo que es decisivo para la iniciación de  
la señalización de TCR/CD3 (Fig. 12B).

## EJEMPLO 13

### **Hu Mab8D5 es activo como un Fab' monovalente.**

25 Para la Fig. 13A, se estimuló sangre completa diluida de humanos con el  
superantígeno SEB, en presencia o ausencia de Fab de hu Mab8D5 o Fab de  
isotipo de control para hu Mab8D5. Después de 48 h, la producción de IL-2 se

midió mediante un ensayo ELISA. Para la Fig. 13B, las células B se aislaron mediante la selección negativa de sangre completa humana, y se estimularon con 10 µg/ml de fragmentos anti-IgM F(ab')<sub>2</sub> en presencia o ausencia de Fab hu Mab8D5 o Fab de isotipo de control. La proliferación se midió mediante la  
5 incorporación de timidina después de 48 h. Las Figuras 13A–B ilustran que hu Mab8D5 suprimió la respuesta SEB y la proliferación de células B de manera dependiente de la dosis.

Como se describe en esta solicitud, se halló que hu Mab8D5 desencadenaba la actividad de BTLA cuando se agregaba a cultivos de células T  
10 o B como un Fab' monovalente. La potencia relativa (aunque no la eficacia relativa) del Fab' fue aproximadamente 10 veces menor que aquella del Mab completo, lo que sugiere que la pérdida de potencia solo se debió a la pérdida de afinidad. Hu Mab8D5 como un fragmento Fab' fue capaz de suprimir, de manera dependiente de la dosis, tanto una respuesta SEB en sangre completa humana,  
15 como la proliferación de células B inducida por anti-IgM (Figuras 13A–B). Como otros receptores de superficie celular de plegado Ig, la actividad inmunosupresora de BTLA también pudo ser desencadenada cuando se revistió plástico con cualquier anticuerpo de unión de BTLA (a través del entrecruzamiento de múltiples receptores). Sin embargo, el hecho de que la unión monovalente de hu  
20 Mab8D5 a BTLA parece activar por completo la función inhibitoria parece ser un rasgo único de BTLA (por ejemplo, que no es compartido con los miembros de la familia de proteínas coestimulantes negativas PD-1 o CTLA-4). Debido a que hu Mab8D5 no impide la unión de HVEM, el ligando natural de BTLA, si bien no es la intención seguir la teoría, esto indica que hu Mab8D5 acierta a un epítipo  
25 (potencialmente alostérico) en el dominio extracelular de BTLA, para inducir un cambio de conformación y la posterior señalización intracelular.

#### EJEMPLO 14

##### Tormenta de citoquinas.

BTLA es un receptor inmunomodulador de la familia de CD28. Una potencial complicación de la utilización de un anticuerpo agonista es la inducción de la actividad de "tormenta de citoquinas" *in vivo*. La tormenta de citoquinas es una respuesta inflamatoria sistémica caracterizada por una rápida inducción de citoquinas proinflamatorias debido a una interrupción de la retroalimentación entre citoquinas y células inmunitarias. Se han desarrollado procedimientos para mejorar la evaluación de la seguridad preclínica predictiva de agentes terapéuticos inmunomoduladores (por ejemplo, el National Institute for Biological Standards and Control, UK, ver la referencia de Stebbings, 2007). Se ha efectuado la evaluación *in vitro* de hu Mab8D5, utilizando los modelos y metodologías actuales para predecir el potencial para la tormenta de citoquinas *in vivo*. Los ensayos de tormenta de citoquinas se llevaron a cabo usando anticuerpo agonista de control de tormenta de citoquinas positiva purificado, como la referencia positiva. En estos ensayos, el mAb agonista de control positivo inmovilizado produjo una fuerte respuesta de IL-2 en ausencia de estimulación adicional. Con la inmovilización de la misma manera, ni hu Mab8D5 ni el control IgG4 indujeron la secreción de IL-2, como se muestra en las Figuras 14A–B. Las Figuras 14B–D ilustran que los anticuerpos agonistas hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab15C5, hu Mab20H4 y hu Mab19A7 tampoco estimularon la producción de las citoquinas inflamatorias interferón gamma (IFN $\gamma$ ) y factor alfa de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) cuando fueron superentrecruzados (en las condiciones que se describen con anterioridad). El agonista de control positivo mAb, en contraste, produjo tanto una respuesta de IFN $\gamma$  como de TNF $\alpha$ . Por lo tanto, ninguno de los anticuerpos agonistas anti-BTLA ensayados produjo una tormenta de citoquinas en cultivos de PBMC humanos, y asimismo, no se esperaría que produzcan una tormenta de

citoquinas *in vivo*, sobre la base de los resultados de este modelo de referencia *in vitro*.

Como se demuestra en el Ejemplo 11 y en la Fig. 11, hu Mab8D5 no estimula en forma autónoma la función inmunitaria en ninguno de los ensayos  
5 funcionales empleados. La adición de hu Mab8D5 en ausencia del desencadenamiento específico de células T no logra cambios mensurables en la secreción o proliferación de citoquinas. Además, en ensayos que obligan mayor nivel de entrecruzamiento mediante el revestimiento de plástico con hu Mab8D5, el mAb no indujo la liberación o proliferación de citoquina. Sobre la base de esta  
10 información, la naturaleza inhibitoria de la interacción de BTLA–HVEM, y el hecho de que el desencadenamiento de BTLA incurre en la señalización intracelular inhibitoria, se considera que el riesgo potencial de una tormenta de citoquinas es altamente improbable.

#### EJEMPLO 15

##### 15 Tolerancia y efectos secundarios en modelos animales.

No hay cuestiones de tolerancia o efectos secundarios observados en ningún estudio en animales con hu Mab8D5 o hu Mab4C7.

#### EJEMPLO 16

##### 20 Efectos de 8D5 en SCIDhu SPL – Un modelo de respuesta inmunitaria humana.

A fin de determinar si el clon de IgG4 agonista HuMab anti–BTLA 8D5 podía inhibir la producción de IgG de células B mediada dependiente de células T humanas en el modelo SCIDhu SPL de respuesta inmunitaria humana, se usó este modelo para sondear el potencial de HuMab para modular las respuestas  
25 inmunitarias *in vivo*. Se usó CTLA–4–Ig como un control, debido a que es un inmunosupresor que reduce las respuestas de células T, y se sabe que afecta la producción de anticuerpo dependiente de células T, por células B.

En resumen, se injertó a ratones SCID, i. p., con células del bazo humanas, se los inmunizó con 100 µg de toxoide tetánico, y se trataron con 200 µg de anticuerpos específicos blanco o de control los días 0, 5, 9 y 14. Los ratones se reforzaron con TT el día 7. El día 28, los ratones se sacrificaron, se recogió el suero, y las células de exudado peritoneal (PEC, según su sigla en inglés) se cosecharon. Se analizaron las PEC por FACS, a fin de establecer la expresión de marcador de subclase de linfocito de modo de evaluar los efectos del tratamiento de Ab sobre las cantidades celulares relativas. Las concentraciones de IgG humana total y específicas de TT en el suero del día 28 se cuantificaron mediante el ensayo ELISA.

El ensayo ELISA del suero del día 28 mostró que hu MAb8D5 inhibió las respuestas de IgG total y de rellamada anti-TT humana en ratones SCIDhu SPL (Figuras 15, 16, 17A y 18A), en comparación con el isotipo de control hulG4 (Figuras 17B y 18B). El hu MAb8D5 anti-BTLA exhibió eficacia similar a CTLA-4-Ig para la disminución de las valoraciones de IgG total y específica de TT, en comparación con los ratones tratados con el isotipo de control hulG4. Las Figuras 17A, 17B, 18A y 18B muestran diagramas de las valoraciones de ratones tratados individuales. En resumen, esta información es consecuente con el comportamiento de hu MAb8D5 como un agonista de BTLA, y mostró que la señalización de BTLA inducida por hu MAb8D5 inhibe la activación de células T humanas, la expansión y posterior producción de IgG total y específica de Ag de rellamada dependiente de célula T por células B humanas.

### EJEMPLO 17

#### Modelo de membrana sinovial de SCID-AR.

El modelo de membrana sinovial de SCID-AR involucra el trasplante de membrana sinovial de pacientes de AR, a ratones SCID inmunodeficientes de manera de crear un modelo de ratón humanizado para AR. Los injertos de

membrana sinovial de AR pueden persistir en los ratones SCID, y mantener la morfología y las características de la articulación de AR, lo que incluye la hiperplasia de la membrana sinovial, inflamación, reactividad inmunitaria, y angiogénesis. Las membranas sinoviales de AR se obtienen de la cirugía de  
5 reemplazo articular (por ejemplo, cadera, rodilla, hombro). Los ratones SCID inmunodeficientes no tienen células B y T funcionales, y no exhiben rechazo de trasplante.

Se recogen las membranas sinoviales durante la cirugía, y se procesan directamente en pequeños trozos (biopsias de 6 mm). Las muestras de  
10 membrana sinovial se trasplantan inmediatamente después de haber sido obtenidas, en ratones SCID, en cavidades subcutáneas en el dorso. Después de un período de injertación de 7 días, se suministran inyecciones IP de control o de anticuerpos de tratamiento/ensayo, los días 7 y 10. El día 14, los ratones son sacrificados, y se recogen la sangre y la membrana sinovial. Los análisis incluyen  
15 el ensayo ELISA de citoquina sérica, tinción H + E y cuantificación de anticuerpo sérico.

ÍNDICE DE SECUENCIAS

Tabla 7.

| SEQ. ID. NO.: | Descripción                                                                     |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1             | Secuencia de ADNc que codifica la isoforma humana de BTLA; Acceso Nro. AY293286 |
| 2             | Secuencia de aminoácidos de BTLA humano Acceso Nro. AAP44003                    |
| 3             | Secuencia de nucleótidos de BTLA de ratón (Acceso Nro. AY293285)                |
| 4             | Secuencia de aminoácidos de BTLA de ratón (Acceso Nro. AAP44002)                |
| 5             | anti-BTLA 8D5, VH CDR1                                                          |
| 6             | anti-BTLA 8D5, VH CDR2                                                          |
| 7             | anti-BTLA 8D5, VH CDR3                                                          |
| 8             | anti-BTLA 8D5, VH, secuencia de nucleótidos que incluye secuencia líder         |

|    |                                                                         |
|----|-------------------------------------------------------------------------|
| 9  | anti-BTLA 8D5, VH, secuencia de aminoácidos que incluye secuencia líder |
| 10 | anti-BTLA 8D5, VH, secuencia de nucleótidos sin secuencia líder         |
| 11 | anti-BTLA 8D5, VH, secuencia de aminoácidos sin secuencia líder         |
| 12 | anti-BTLA 8D5, Vκ CDR1                                                  |
| 13 | anti-BTLA 8D5, Vκ CDR2                                                  |
| 14 | anti-BTLA 8D5, Vκ CDR3                                                  |
| 15 | anti-BTLA 8D5, Vκ, secuencia de nucleótidos que incluye secuencia líder |
| 16 | anti-BTLA 8D5, Vκ secuencia de aminoácidos que incluye secuencia líder  |
| 17 | anti-BTLA 8D5, Vκ, secuencia de nucleótidos sin secuencia líder         |
| 18 | anti-BTLA 8D5, Vκ, secuencia de aminoácidos sin secuencia líder         |
| 19 | anti-BTLA 4C7, VH CDR1                                                  |
| 20 | anti-BTLA 4C7, VH CDR2                                                  |
| 21 | anti-BTLA 4C7, VH CDR3                                                  |
| 22 | anti-BTLA 4C7, VH, secuencia de nucleótidos que incluye secuencia líder |
| 23 | anti-BTLA 4C7, VH, secuencia de aminoácidos que incluye secuencia líder |
| 24 | anti-BTLA 4C7, VH, secuencia de nucleótidos sin secuencia líder         |
| 25 | anti-BTLA 4C7, VH, secuencia de aminoácidos sin secuencia líder         |
| 26 | anti-BTLA 4C7, Vκ, CDR1                                                 |
| 27 | anti-BTLA 4C7, Vκ, CDR2                                                 |
| 28 | anti-BTLA 4C7, Vκ, CDR3                                                 |
| 29 | anti-BTLA 4C7, Vκ, secuencia de nucleótidos que incluye secuencia líder |
| 30 | anti-BTLA 4C7, Vκ, secuencia de aminoácidos que incluye secuencia líder |
| 31 | anti-BTLA 4C7 VH, secuencia de nucleótidos sin secuencia líder          |
| 32 | anti-BTLA 4C7, VH, secuencia de aminoácidos sin secuencia líder         |
| 33 | HLB02 cebador de secuenciamiento                                        |
| 34 | LY49 cebador de secuenciamiento                                         |
| 35 | Secuencia de aminoácidos de BTLA humano                                 |
| 36 | Secuencia de nucleótidos de BTLA humano                                 |
| 37 | Secuencia de aminoácidos de BTLA humano Acceso Nro. NP_861445           |
| 38 | 8D5 VH CDR1, variantes                                                  |
| 39 | 8D5 CDR3, variantes                                                     |

|    |                                                           |
|----|-----------------------------------------------------------|
| 40 | 8D5 V <sub>K</sub> CDR2, variantes                        |
| 41 | 8D5 V <sub>K</sub> CDR3, variantes                        |
| 42 | 4C7 V <sub>H</sub> CDR2, variantes                        |
| 43 | 4C7 V <sub>H</sub> CDR3, variantes                        |
| 44 | Secuencia de nucleótidos anti-BTLA 21H6, V <sub>H</sub>   |
| 45 | anti-BTLA 21H6, V <sub>H</sub> , secuencia de aminoácidos |
| 46 | anti-BTLA 21H6 V <sub>K1</sub> secuencia de nucleótidos   |
| 47 | anti-BTLA 21H6 V <sub>K1</sub> secuencia de aminoácidos   |
| 48 | anti-BTLA 21H6 V <sub>K2</sub> secuencia de nucleótidos   |
| 49 | anti-BTLA 21H6 V <sub>K2</sub> secuencia de aminoácidos   |
| 50 | anti-BTLA 21H6 V <sub>K3</sub> secuencia de nucleótidos   |
| 51 | anti-BTLA 21H6 V <sub>K3</sub> secuencia de aminoácidos   |
| 52 | anti-BTLA 8A3 V <sub>H</sub> secuencia de nucleótidos     |
| 53 | anti-BTLA 8A3 V <sub>H</sub> secuencia de aminoácidos     |
| 54 | anti-BTLA 8A3 V <sub>K</sub> secuencia de nucleótidos     |
| 55 | anti-BTLA 8A3 V <sub>K</sub> secuencia de aminoácidos     |
| 56 | anti-BTLA 19A7 V <sub>H</sub> secuencia de nucleótidos    |
| 57 | anti-BTLA 19A7 V <sub>H</sub> secuencia de aminoácidos    |
| 58 | anti-BTLA 19A7 V <sub>K</sub> secuencia de nucleótidos    |
| 59 | anti-BTLA 19A7 V <sub>K</sub> secuencia de aminoácidos    |
| 60 | anti-BTLA 20H4 V <sub>H</sub> secuencia de nucleótidos    |
| 61 | anti-BTLA 20H4 V <sub>H</sub> secuencia de aminoácidos    |
| 62 | anti-BTLA 20H4 V <sub>K</sub> secuencia de nucleótidos    |
| 63 | anti-BTLA 20H4 V <sub>K</sub> secuencia de aminoácidos    |
| 64 | anti-BTLA 15C5 V <sub>H</sub> secuencia de nucleótidos    |
| 65 | anti-BTLA 15C5 V <sub>H</sub> secuencia de aminoácidos    |
| 66 | anti-BTLA 15C5 V <sub>K</sub> secuencia de nucleótidos    |
| 67 | anti-BTLA 15C5 V <sub>K</sub> secuencia de aminoácidos    |

## REFERENCIAS.

- Ansari, M. J., Salama, A. D., Chitnis, T., Smith, R. N., Yagita, H., Akiba, H., *et al.*, "The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice". *J. Exp. Med.*, 2003; 198:63-9.
- 5        Compaan, D. M., Gonzalez, L. C., Tom, I., Loyet, K. M., Eaton, D., Hymowitz, S. G., "Attenuating lymphocyte activity: the crystal structure of the BTLA-HVEM complex". *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 39553-61.
- Deppong, C., Juehne, T. I., Hurchla, M., Friend, L. D., Shah, D. D., Rose, C. M., *et al.*, "Cutting edge: B and T lymphocyte attenuator and programmed death
- 10        receptor-1 inhibitory receptors are required for termination of acute allergic airway inflammation". *J. Immunol.*, 2006; 176: 3909-13.
- Han, P., Goularte, O. D., Rufner, K., Wilkinson, B., Kaye, J., "An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection". *J. Immunol.* 2004;172: 5931-9.
- 15        Harrop, J. A., McDonnell, P. C., Brigham-Burke, M., Lyn, S. D., Minton, J., Tan, K. B., *et al.*, "Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth". *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 27548-56.
- Lin, S. C., Kuo, C. C., Chan, C. H., "Association of a BTLA gene
- 20        polymorphism with the risk of rheumatoid arthritis." *J. Biomed. Sci.*, 2006; 13: 853-60.
- Oya, Y., Watanabe, N., Owada, T., Oki, M., Hirose, K., Suto, A., *et al.*, "Development of autoimmune hepatitis-like disease and production of autoantibodies to nuclear antigens in mice lacking B and T lymphocyte attenuator".
- 25        *Arthritis Rheum.*, 2008; 58: 2498-510.
- Presta, L. G., "Engineering antibodies for therapy". *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2002; 3: 237-256.

Sedy, J. R., Gavrieli, M., Potter, K. G., Hurchla, M. A., Lindsley, R. C., Hildner, K., *et al.*, "B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator". *Nat. Immunol.*, 2005; 6: 90–8.

Stebbing, R., Findlay, L., Edwards, C., Eastwood, D., Bird, C., North, D., *et al.*, "'Cytokine storm' in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics". *J. Immunol.*, 2007; 179: 3325–31.

Steinberg, M. W., Turovskaya, O., Shaikh, R. B., Kim, G., McCole, D. F., Pfeffer, K., *et al.*, "A crucial role for HVEM and BTLA in preventing intestinal inflammation". *J. Exp. Med.*, 2008; 205: 1463–76.

Truong, W., Plester, J. C., Hancock, W. W., Merani, S., Murphy, T. L., Murphy, K. M., *et al.*, "Combined coinhibitory and costimulatory modulation with anti-BTLA and CTLA4Ig facilitates tolerance in murine islet allografts". *Am. J. Transplant.* 2007; 7: 2663–74.

Truong, W., Hancock, W. W., Plester, J. C., Merani, S., Rayner, D. C., Thangavelu, G., Murphy, K. M., *et al.*, "BTLA targeting modulates lymphocyte phenotype, function, and numbers and attenuates disease in nonobese diabetic mice". *J. Leukoc. Biol.*, 2009.

Vendel, A. C., Calemine-Fenau, J., Izrael-Tomasevic, A., Chauhan, V., Arnott, D., Eaton, D. L., "B and T lymphocyte attenuator regulates B cell receptor signaling by targeting Syk and BLNK". *J. Immunol.*, 2009; 182: 1509–17.

Watanabe, N., Gavrieli, M., Sedy, J. R., Yang, J., Fallarino, F., Loftin, S. K., *et al.*, "BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1". *Nat. Immunol.*, 2003; 4: 670–9.

Derré, L., Rivals, J. P., Jandus, C., Pastor, S., Rimoldi, D., Romero, P., Michielin, O., Olive, D., and Speiser, D. "BTLA Mediates inhibition of human

tumor-specific CD8+ T cells that can be partially reversed by vaccination". *J. Clinl. Invest.*, 2010, 120: 157-167.

La presente invención no debe ser limitada en su alcance por las  
5 realizaciones específicas que se describen en esta solicitud. De hecho, serán  
evidentes para los expertos en el arte diversas modificaciones de la invención,  
además de aquellas descritas en esta solicitud, a partir de la descripción  
precedente y de las figuras anexas. Dichas modificaciones tienen el propósito de  
encontrarse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10 A lo largo de la presente solicitud, se citan patentes, solicitudes de patente,  
Números de Acceso Genbank y publicaciones, cuyas descripciones, en particular,  
que incluyen todas las estructuras químicas reveladas y secuencias de  
aminoácidos de anticuerpos, se incorporan en la presente solicitud a modo de  
referencia. La cita de las publicaciones o documentos mencionados no tiene la  
15 intención de ser interpretada como una admisión de que algo de lo precedente es  
arte previo pertinente, ni constituye ninguna admisión en términos de los  
contenidos o de la fecha de estas publicaciones o documentos. Todas las  
referencias citadas en esta solicitud se incorporan a modo de referencia, al mismo  
alcance que si cada publicación, solicitud de patente, o patente individual fuera  
20 específica e individualmente indicada para ser incorporada a modo de referencia.

La memoria descriptiva precedente presentada por escrito se considera  
suficiente para permitir al experto en el arte la puesta en práctica de la invención.  
Diversas modificaciones de la invención, además de aquellas expuestas y  
descritas en esta solicitud, serán evidentes para los expertos en el arte a partir  
25 de la descripción detallada, y se encuentran dentro del alcance de las  
reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> N.V. ORGANON  
MEDAREX, INC.

<120> ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS PARA BTLA

<130> JB20097017

<140>

<141>

<150> 61/257.612

<151> 03-11-2009

<150> 61/230.332

<151> 31-07-2009

<160> 67

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 870

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| atgaagacat tgcctgccat gcttggaact gggaaattat tttgggtctt cttcttaatc | 60  |
| ccatatctgg acatctggaa catccatggg aaagaatcat gtgatgtaca gctttatata | 120 |
| aagagacaat ctgaacactc catcttagca ggagatccct ttgaactaga atgccctgtg | 180 |
| aaatactgtg ctaacaggcc tcatgtgact tggtgcaagc tcaatggaac aacatgtgta | 240 |
| aaacttgaag atagacaaac aagttggaag gaagagaaga acatttcatt tttcattcta | 300 |

cattttgaac caatgcttcc taatgacaat gggtcatacc gctgttctgc aaattttcag 360

tctaattctca ttgaaagcca ctcaacaact ctttatgtga cagatgtaaa aggtgcctca 420

gaacgaccct ccaaggacga agtggcaagc agaccctggc tcctgtatag tttacttcct 480

ttgggggggat tgcctctact catcactacc tggttctgcc tgttctgctg cctgagaagg 540

caccaaggaa agcaaaatga actctctgac acagcaggaa gggaaattaa tctggttgat 600

gctcacctta agagcgagca aacagaagca agcaccaggc aaaattccca agtactgcta 660

tcagaagctg gaatttatga taatgaccct gacctttggt tcaggatgca ggaagggctc 720

gaagtttggt ctaatccatg cctggaagaa aacaaaccag gcattgttta tgcttcctcg 780

aaccattctg tcattggact gaactcaaga ctggcaagaa atgtaaaaga agcaccaaca 840

gaatatgcat ccatatgtgt gaggagttaa 870

<210> 2

<211> 289

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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 Met 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 Gly Ala Ser Glu Arg Pro Ser  
130 135 140

Lys Asp Glu Val Ala Ser Arg Pro Trp Leu Leu Tyr Ser Leu Leu Pro  
145 150 155 160

Leu Gly Gly Leu Pro Leu Leu Ile Thr Thr Trp 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 Ala 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 Cys 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 Leu 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> 3
- <211> 921
- <212> ADN
- <213> Mus musculus

<400> 3  
atgaagacag tgcctgccat gcttgggact cctcggttat ttagggaatt cttcatcctc 60  
catctgggcc tctggagcat cctttgtgag aaagctacta agaggaatga tgaagagtgt 120

gaagtgaac ttaatattaa gaggaattcc aaacactctg cctggacagg agagttattt 180

aaaattgaat gtcctgtgaa atactgtggt catagaccta atgtgacttg gtgtaagcac 240

aatggaacaa tctgggtacc ccttgaagtt ggtcctcagc tatacactag ttgggaagaa 300

aatcgatcag ttccggtttt tgttctccat tttaaaccaa tacatctcag tgataacggg 360

tcgtatagct gttctacaaa cttcaattct caagttatta atagccattc agtaaccatc 420

catgtgagag aaaggactca aaactcttca gaacaccac taataacagt atctgacatc 480

ccagatgcca ccaatgcctc aggaccatcc accatggaag agaggccagg caggacttgg 540

ctgctttaca ccttgcttcc tttgggggca ttgcttctgc tccttgacctg tgtctgcctg 600

ctctgctttc tgaaaaggat ccaagggaaa gaaaagaagc cttctgactt ggcaggaagg 660

gacactaacc tggttgatat tccagccagt tccaggacaa atcaccaagc actgccatca 720

ggaactggaa tttatgataa tgatccctgg tctagcatgc aggatgaatc tgaattgaca 780

attagcttgc aatcagagag aaacaaccag ggcattgttt atgcttcttt gaaccattgt 840

gttattggaa ggaatccaag acaggaaaac aacatgcagg aggcaccac agaatatgca 900

tccatttgtg tgagaagtta a 921

<210> 4

<211> 306

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Lys Thr Val Pro Ala Met Leu Gly Thr Pro Arg Leu Phe Arg Glu

1 5 10 15

Phe Phe Ile Leu His Leu Gly Leu Trp Ser Ile Leu Cys Glu Lys Ala  
20 25 30

Thr Lys Arg Asn Asp Glu Glu Cys Glu Val Gln Leu Asn Ile Lys Arg  
35 40 45

Asn Ser Lys His Ser Ala Trp Thr Gly Glu Leu Phe Lys Ile Glu Cys  
50 55 60

Pro Val Lys Tyr Cys Val His Arg Pro Asn Val Thr Trp Cys Lys His  
65 70 75 80

Asn Gly Thr Ile Trp Val Pro Leu Glu Val Gly Pro Gln Leu Tyr Thr  
85 90 95

Ser Trp Glu Glu Asn Arg Ser Val Pro Val Phe Val Leu His Phe Lys  
100 105 110

Pro Ile His Leu Ser Asp Asn Gly Ser Tyr Ser Cys Ser Thr Asn Phe  
115 120 125

Asn Ser Gln Val Ile Asn Ser His Ser Val Thr Ile His Val Arg Glu  
130 135 140

Arg Thr Gln Asn Ser Ser Glu His Pro Leu Ile Thr Val Ser Asp Ile  
145 150 155 160

Pro Asp Ala Thr Asn Ala Ser Gly Pro Ser Thr Met Glu Glu Arg Pro  
165 170 175

Gly Arg Thr Trp Leu Leu Tyr Thr Leu Leu Pro Leu Gly Ala Leu Leu  
180 185 190

Leu Leu Leu Ala Cys Val Cys Leu Leu Cys Phe Leu Lys Arg Ile Gln  
195 200 205

Gly Lys Glu Lys Lys Pro Ser Asp Leu Ala Gly Arg Asp Thr Asn Leu  
210 215 220

Val Asp Ile Pro Ala Ser Ser Arg Thr Asn His Gln Ala Leu Pro Ser  
225 230 235 240

Gly Thr Gly Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Trp Ser Ser Met Gln Asp Glu  
245 250 255

Ser Glu Leu Thr Ile Ser Leu Gln Ser Glu Arg Asn Asn Gln Gly Ile  
260 265 270

Val Tyr Ala Ser Leu Asn His Cys Val Ile Gly Arg Asn Pro Arg Gln  
275 280 285

Glu Asn Asn Met Gln Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val  
290 295 300

Arg Ser  
305

<210> 5  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
Ser Tyr Asp Met His  
1 5

<210> 6  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6  
Val Ile Gly Pro Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly  
1 5 10 15

<210> 7  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
Glu Gly Met Ala Ala His Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
1 5 10

<210> 8  
<211> 420  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 8  
atggagttgg ggctgagctg ggttttcctt gttgctatat tagaaggtgt ccagtgtgag 60  
  
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagccgg gggggtcctt gagactctcc 120  
  
tgtgcagcct ctggattcac catcagtagt tacgacatgc actgggtccg ccaagcaaca 180  
  
ggaaaaggtc tggagtgggt ctcaattatt ggtcctgctg gtgacacata ctatccaggc 240  
  
tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gaaaatgcc aagaactcctt gtatcttcaa 300  
  
atgaacagcc tgagagccgg ggacacggct gtgtattact gtgcaagaga ggggatggct 360  
  
gcccacaact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 420

<210> 9  
<211> 140  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 9  
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly  
1 5 10 15  
  
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
20 25 30  
  
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile  
35 40 45  
  
Ser Ser Tyr Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Pro Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly  
65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser  
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Met Ala Ala His Asn Tyr Tyr Gly Met Asp  
115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
130 135 140

```
<210> 10
<211> 363
<212> ADN
<213> Homo sapiens
```

```
<400> 10
gagggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccatcagt agttacgaca tgcactgggt ccgccaagca 120
acaggaaaag gtctggagtg ggtctcagtt attggctctg ctggtgacac atactatcca 180
ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaagaactc cttgtatctt 240
caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag agaggggatg 300
gctgcccaca actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
```

tca 363

<210> 11  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 11  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Val Ile Gly Pro Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Glu Gly Met Ala Ala His Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 12  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 13  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 13  
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1 5

<210> 14  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 14  
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Ile Thr  
1 5 10

<210> 15  
<211> 384  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60  
  
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120  
  
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180  
  
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240  
  
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300  
  
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccccgat caccttcggc 360  
  
caagggacac gactggagat taaa 384

<210> 16  
<211> 128  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 16  
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser  
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
50 55 60

<211> 108

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 18  
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1                  5                  10                  15  
  
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
                  20                  25                  30  
  
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
          35                  40                  45  
  
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50                  55                  60  
  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65                  70                  75                  80  
  
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro  
                  85                  90                  95  
  
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
                  100                  105

<210> 19  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 19

His Tyr Tyr Trp Ser  
1 5

<210> 20  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 20  
Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 21  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 21  
Glu Trp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Glu Met Asp Val  
1 5 10

<210> 22  
<211> 414  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 22  
atgaaacatc tgtggttctt ctttctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60  
  
gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct atccctcacc 120  
  
tgcaactgtcc atggtggctc catcaatcat tactactgga gctggatccg gcagccccca 180  
  
gggaagggac tggaatggat tggatatatc tattacagtg ggagcaccaa gtacaatccc 240

tccctcaaga gtcgctcag catatcagta gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaag 300  
ctgacctctg tgaccgctgc ggacacggcc gtgtattatt gtgcgagaga gtggccctac 360  
tattactacg aaatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 414

<210> 23  
<211> 138  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 23  
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys  
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val His Gly Gly Ser Ile  
35 40 45

Asn His Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Pro  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Ser Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Glu Trp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Glu Met Asp Val Trp  
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
130 135

<210> 24  
<211> 357  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 24  
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctatccctc 60  
  
acctgcactg tccatggtgg ctccatcaat cattactact ggagctggat ccggcagccc 120  
  
ccaggggaagg gactggaatg gattggatat atctattaca gtgggagcac caagtacaat 180  
  
ccctccctca agagtcgcgt cagcatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240  
  
aagctgacct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt attgtgcgag agagtggccc 300  
  
tactattact acgaaatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctctctca 357

<210> 25  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 25

<213> Homo sapiens

<400> 26  
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 27  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 27  
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 28  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 28  
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe Arg Thr  
1 5

<210> 29  
<211> 384  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 29  
atggaaaccc cagcgagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60  
  
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120  
  
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatcca240

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag300

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gttcatttcg gacgttcggc360

caagggacca aggtggaaat caaa384

<210> 30  
<211> 128  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 30  
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
151015

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser  
202530

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
354045

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
505560

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro  
65707580

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
859095

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr  
100 105 110

Gly Ser Ser Phe Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
115 120 125

<210> 31  
<211> 324  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 31  
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
  
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120  
  
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180  
  
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240  
  
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gttcatttcg gacgttcggc 300  
  
caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 32  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 32  
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe  
85 90 95

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 33  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 33  
gcctgagttc cacgacaccg tc 22

<210> 34  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 34  
gcaggcacac aacagaggca gttccagatt tc 32

<210> 35  
<211> 289  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 35  
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 Ser 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 Leu 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> 36
- <211> 870
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

<400> 36  
atgaagacat tgcctgccat gcttggaact gggaaattat tttgggtcctt cttcttaatc 60  
  
ccatatctgg acatctggaa catccatggg aaagaatcat gtgatgtaca gctttatata 120  
  
aagagacaat ctgaacactc catcttagca ggagatccct ttgaactaga atgccctgtg 180  
  
aaatactgtg ctaacaggcc tcatgtgact tggtgcaagc tcaatggaac aacatgtgta 240

aaacttgaag atagacaaac aagttggaag gaagagaaga acatttcatt tttcattcta 300  
cattttgaac cagtgttcc taatgacaat gggcatacc gctgttctgc aaattttcag 360  
tctaattctca ttgaaagcca ctcaacaact ctttatgtga cagatgtaaa aagtgcctca 420  
gaacgaccct ccaaggacga aatggcaagc agaccctggc tcctgtatag ttacttcct 480  
ttgggggggat tgcctctact catcactacc tgtttctgcc tgttctgctg cctgagaagg 540  
caccaaggaa agcaaaatga actctctgac acagcaggaa gggaaattaa cctggttgat 600  
gctcacctta agagtgagca aacagaagca agcaccaggc aaaattccca agtactgcta 660  
tcagaaactg gaatttatga taatgaccct gacctttgtt tcaggatgca ggaaggtct 720  
gaagtttatt ctaatccatg cctggaagaa aacaaaccag gcattgttta tgcttcctg 780  
aaccattctg tcattggact gaactcaaga ctggcaagaa atgtaaaaga agcaccaaca 840  
gaatatgcat ccatatgtgt gaggagttaa 870

<210> 37  
<211> 289  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 37  
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 Ser 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> 38
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazo = "Lys" o "Leu" o "Ala" o "Phe"

<220>

<221> misc\_rasgo

<222> (20)..(21)

<223> /nota = "el residuo proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"

<400> 38

Ser Tyr Asp Met His

1                      5

<210> 39

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazo = "Lys" o "Leu" o "Ala" o "Phe"

```
<220>
<221> misc_rasgo
<222> (3)..(3)
<223> /nota="El residuo proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con
respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"
```

```
<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazo = "Gln" o "Ala"
```

```
<220>
<221> misc_rasgo
<222> (7)..(7)
<223> /nota ="El residuo proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con
respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"
```

```
<220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> /reemplazo = "Lys" o "Leu" o "Ala" o "Phe"
```

```
<220>
<221> misc_rasgo
<222> (11)..(11)
<223> /nota = "El residuo proporcionado en la secuencia no tiene preferencia
con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"
```

<400> 39  
Glu Gly Met Ala Ala His Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
1 5 10

```
<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazo = "Ala"

<220>

<221> misc\_rasgo

<222> (4)..(4)

<223> /nota = "El residuo proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquel en la anotación para dicha posición"

<400> 40

Asp Ala Ser Gln Arg Ala Thr

1

5

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazo = "Ala"

<220>

<221> misc\_rasgo  
<222> (5)..(5)  
<223> /nota ="El residuo proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquel en la anotación para dicha posición"

<400> 41  
Gln Gln Arg Ser Gln Trp Pro Pro Ile Thr  
1                   5                   10

<210> 42  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (11)..(11)  
<223> /reemplazo = "Gln" o "Ala"

<220>  
<221> misc\_rasgo  
<222> (11)..(11)  
<223> /nota="El residuo proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (12)..(12)  
<223> /reemplazo = "Ala"

<220>

<221> misc\_rasgo  
<222> (12)..(12)  
<223> /nota="El residuo proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquel en la anotación para dicha posición "

<400> 42  
Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1                    5                    10                    15

<210> 43  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (9)..(9)  
<223> /reemplazo = "Lys" o "Leu" o "Ala" o "Phe"

<220>  
<221> misc\_rasgo  
<222> (9)..(9)  
<223> /nota="El residuo proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"

<400> 43  
Glu Trp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Glu Met Asp Val  
1                    5                    10

<210> 44

<211> 441  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 44  
atggacatac tttgttccac gtccttgcta ctgactgtcc cgtcctgggt cttatcccag 60  
  
gtcaccttga gggagtctgg tcctgcgctg gtgaaacca cacagaccct cacactgacc 120  
  
tgcaccttct ctgggttctc actcagcact agtggaatgg gtgtgagctg gatccgtcag 180  
  
ccccaggggaggccctgga gtggcttgca gtcattgatt gggatggtac taaagactac 240  
  
agcacatctc tgaagaccag gctcaccatc tccaaggaca cctccaaaaa ccaggtggtc 300  
  
cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc acggatccgt 360  
  
attaatgtgg ttcggggagt tattatcaac tactatggta tggacgtctg gggccaaggg 420  
  
accacggtca ccgtctcctc a 441

<210> 45  
<211> 147  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 45  
Met Asp Ile Leu Cys Ser Thr Leu Leu Leu Leu Thr Val Pro Ser Trp  
1 5 10 15

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

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu  
35 40 45

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
50 55 60

Ala Leu Glu Trp Leu Ala Val Ile Asp Trp Asp Gly Thr Lys Asp Tyr  
65 70 75 80

Ser Thr Ser Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys  
85 90 95

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala  
100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Arg Ile Asn Val Val Arg Gly Val Ile  
115 120 125

Ile Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
130 135 140

Val Ser Ser  
145

<210> 46

<211> 387  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 46  
atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60  
  
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120  
  
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180  
  
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240  
  
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300  
  
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta ggtcacccgc gtacactttt 360  
  
ggccagggga ccaagctgga gatcaaa 387

<210> 47  
<211> 129  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 47  
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser  
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro  
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr  
100 105 110

Gly Arg Ser Pro Ala Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
115 120 125

Lys

- <210> 48
- <211> 381
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 48  
atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60  
  
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120  
  
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180  
  
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240  
  
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300  
  
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccattcac tttcggccct 360  
  
gggaccaaag tggatatcaa a 381

<210> 49  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 49  
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
1 5 10 15  
  
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser  
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala  
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser  
100 105 110

Asn Trp Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
115 120 125

<210> 50  
<211> 384  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 50  
atggaaaccc cagcgagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120  
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180  
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gatgcatcca acagggccac tggcatccca 240  
gccaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagcctagag 300  
cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcag cagcgtagca actggccatt cactttcggc 360  
cctgggacca aagtggatat caaa 384

<210> 51  
<211> 128  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 51  
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
1 5 10 15  
  
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser  
20 25 30  
  
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
35 40 45  
  
Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro  
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg  
100 105 110

Ser Asn Trp Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
115 120 125

<210> 52

<211> 432

<212> ADN

### <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<221> fuente

```
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"
```

<400> 52

atggagtttg tgctgagctg ggttttcctt gttgctatat taaaagggtgt ccagtgtgag 60

gttcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg gggggtcctt gagactctcc 120

tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatgctatgc actggggttcg ccaggctcca 180

ggaaaaggtc tggagtgggt ttcagttatt ggtactggtg ttgccacata ctatgcagac 240

tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcc aagaactcctt gttttcttcat 300

atgaacagcc tgagagccga ggacatggct gtgtattact gtgcaagagg cttttactat 360  
ggttcgggga ctaattatta caaccgcggt atggacgtct ggggcccaagg gaccacggtc 420  
accgtctcct ca 432

<210> 53  
<211> 144  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 53  
Met Glu Phe Val Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly  
1 5 10 15  
  
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His  
20 25 30  
  
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe  
35 40 45  
  
Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60  
  
Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Thr Gly Val Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser  
85 90 95

Leu Phe Leu His Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Tyr Asn  
115 120 125

Arg Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
130 135 140

<210> 54  
<211> 384  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 54  
atggaaaccc cagcgagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60  
  
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120  
  
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180  
  
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240  
  
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgta cacttttggc360

caggggacca agctggagat caaa384

<210> 55

<211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 55

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro

151015

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

202530

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

354045

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

505560

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro

65707580

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

859095

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr  
100 105 110

Gly Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
115 120 125

<210> 56  
<211> 441  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 56  
atggacatac tttgttccac gctcctgcta ctgactgtcc cgtcctgggt cttatcccag 60  
  
gtcaccttga gggagtctgg tcctgcgctg gtgaaacca cacagaccct cacactgacc 120  
  
tgcaccttct ctggggtctc actcagcact agtggaatgt gtgtgagctg gatccgtcag 180  
  
ccccagggga aggccctgga gtggcttgca gtcattgatt gggatgatga taaatactac 240  
  
aacacatctc tgaagaccag gctcaccatc tccaaggaca cctccaaaaa ccaggtgggc 300  
  
cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc acggctacgt 360  
  
attactgtgg ttcggggagt tattataacc tactacgggc tggacgtctg gggccaaggg 420  
  
accacggtca ccgtctcctc a 441

<210> 57

<211> 147  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 57  
Met Asp Ile Leu Cys Ser Thr Leu Leu Leu Leu Thr Val Pro Ser Trp  
1                  5                  10                  15  
  
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys  
                  20                  25                  30  
  
Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Val Ser Leu  
          35                  40                  45  
  
Ser Thr Ser Gly Met Cys Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
      50                  55                  60  
  
Ala Leu Glu Trp Leu Ala Val Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr  
65                  70                  75                  80  
  
Asn Thr Ser Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys  
          85                  90                  95  
  
Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala  
          100                  105                  110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Arg Ile Thr Val Val Arg Gly Val Ile  
115 120 125

Ile Thr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
130 135 140

Val Ser Ser  
145

<210> 58  
<211> 381  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 58  
atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60  
  
gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120  
  
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180  
  
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240  
  
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300  
  
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta ggctcactcac tttcgggcct 360  
  
gggaccaaag tggatatcaa a 381

<210> 59  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 59  
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
1                    5                    10                    15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser  
                  20                    25                    30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
                  35                    40                    45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
                  50                    55                    60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro  
65                    70                    75                    80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
                  85                    90                    95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr  
                  100                    105                    110

Gly Arg Ser Leu Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
115 120 125

<210> 60  
<211> 432  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 60  
atggagtttg tgctgagctg ggtttttcctt gttgctatat taaaaggtgt ccagtgtgag 60  
  
gttcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg gggggtcctt gagactctcc 120  
  
tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatgctatgc actgggttcg ccaggctcca 180  
  
ggaaaaggtc tggagtgggt atcagttatt ggtcctggtg gtggcacata ctatgcagac 240  
  
tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcc aagaactcctt gtatcttcaa 300  
  
atgaacagcc tgagagccga ggacatggct gtgtatttct gtgcaagagg ctattactat 360  
  
ggttcgggga atttttttaa gaattacggt atggacgtct ggggcccaagg gaccacggtc 420  
  
accgtctcct ca 432

<210> 61  
<211> 144  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220> .  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 61  
Met Glu Phe Val Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly  
1                    5                    10                    15  
  
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His  
                  20                    25                    30  
  
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe  
                  35                    40                    45  
  
Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
                  50                    55                    60  
  
Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Pro Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp  
65                    70                    75                    80  
  
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser  
                  85                    90                    95  
  
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr  
                  100                    105                    110  
  
Phe Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Phe Phe Lys Asn  
                  115                    120                    125

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
130 135 140

<210> 62  
<211> 384  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 62  
atggaaacct cagcgagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60  
  
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120  
  
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180  
  
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gccggggccac tggcatccca 240  
  
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300  
  
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatgggtg gctcaccgta cacttttggc 360  
  
caggggacca agctgcagat caaa 384

<210> 63  
<211> 128  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 63

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
1                5                10                15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser  
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro  
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr  
100 105 110

Gly Gly Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys  
115 120 125

<210> 64

<211> 438

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 64  
atggagtttg ggctgaactg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60  
  
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120  
  
tgtgaagcgt ctggattcac cttcaataac tatgacatga actgggtccg ccaggctcca 180  
  
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggaatgatg gaagtaataa atactttgca 240  
  
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300  
  
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agaggttttt 360  
  
actatggttc ggggaattat tataacctac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 420  
  
acggtcaccg tctcctca 438

<210> 65  
<211> 146  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"  
  
<400> 65

Met Glu Phe Gly Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly  
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
35 40 45

Asn Asn Tyr Asp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Ala  
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Phe Thr Met Val Arg Gly Ile Ile Ile  
115 120 125

Thr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
130 135 140

Ser Ser  
145

<210> 66  
<211> 384  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 66  
atggaaacct cagcgagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60  
  
gaaattgtgt tgacgcagtt tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120  
  
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180  
  
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240  
  
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300  
  
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta ggtcaatcat caccttcggc 360  
  
caagggacac gactggagat taaa 384

<210> 67  
<211> 128  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 67

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Phe Pro Gly Thr Leu Ser  
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro  
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr  
100 105 110

Gly Arg Ser Ile Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
115 120 125

### REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descripto y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

- 5           1.     Un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno que se une a BTLA, que comprende por lo menos un dominio de CDR V<sub>L</sub> seleccionado del grupo que consiste en SEQ. ID. NOS.: 12, 13 y 14, y por lo menos un dominio de CDR V<sub>H</sub> seleccionado del grupo que consiste en SEQ. ID. NOS.: 5, 6 y 7.
- 10          2.     Un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno que se une a BTLA, que comprende por lo menos un dominio de CDR V<sub>L</sub> seleccionado del grupo que consiste en SEQ. ID. NOS.: 26, 27, 28, y por lo menos un dominio de CDR V<sub>H</sub> seleccionado del grupo que consiste en SEQ. ID. NOS.: 19, 20 y 21.
- 15          3.     Un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena liviana, donde:
  - (a) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 11 (cadena pesada 8D5); y
  - 20       (b) la región variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 18 (cadena liviana 8D5).
4.     Un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno, que comprende:
  - (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la
  - 25       secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 5 (HCDR1 8D5);
  - (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la
  - secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 6 (HCDR2 8D5);

(c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 7 (HCDR3 8D5);

(d) una región variable de cadena liviana CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 12 (LCDR1 8D5);

5       (e) una región variable de cadena liviana CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 13 (LCDR2 8D5); y

(f) una región variable de cadena liviana CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. NO.: 14 (LCDR3 8D5);

10       donde el anticuerpo se une específicamente a BTLA y no bloquea la unión a HVEM.

5.       Un anticuerpo aislado, o un fragmento del mismo de unión a antígeno, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que es el producto de un gen VH humano, o que deriva de este (SEQ. ID. NO.: 8) [que codifica 8D5]; y

15       (b) una región variable de cadena liviana que es el producto de un gen VK humano, o que deriva de este (SEQ. ID. NO.: 15) [que codifica 8D5]; donde el anticuerpo se une específicamente a BTLA.

20       6.       Un polipéptido aislado que comprende los dominios  $V_L$  o los dominios  $V_H$  de cualquiera de los anticuerpos o sus fragmentos de unión de antígeno de las reivindicaciones 1–5.

7.       Un ácido nucleico aislado que codifica los dominios  $V_L$  o los dominios  $V_H$  de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión de antígeno de las reivindicaciones 1–5, o el polipéptido aislado de la reivindicación 6.

25       8.       Una composición que comprende uno o más anticuerpos o fragmentos de unión de antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1–5, o el polipéptido aislado de la reivindicación 6, y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

9. Un método de tratamiento de una afección causada por la menor expresión o actividad de BTLA en un sujeto, que comprende la administración al sujeto, de una cantidad eficaz de la composición que comprende uno o más anticuerpos o fragmentos de unión de antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3-5.

10. Un método de tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmunitario en un sujeto, que comprende la administración al sujeto, de una cantidad eficaz del anticuerpo agonista o fragmentos de unión de antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3-5.

10 11. El método de la reivindicación 10, donde el trastorno inflamatorio o autoinmunitario se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad intestinal inflamatoria, fibrosis inflamatoria, esclerodermia, fibrosis pulmonar y cirrosis; artritis reumatoide (AR), artrosis, osteoporosis, asma (que incluye asma alérgica), alergias, enfermedad pulmonar  
15 obstructiva crónica (EPOC), esclerosis múltiple, soriasis, uveítis, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), diabetes tipo I de inicio temprano juvenil, rechazo de trasplantes, LES (lupus eritematoso sistémico) y síndrome de Sjögren.

12. Un método para aumentar la respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la administración al sujeto, de una cantidad eficaz de una composición  
20 que comprende el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de la reivindicación 2.

13. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 7.

14. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la  
25 reivindicación 13.

15. Un método para la producción del anticuerpo o un fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende:

5 a. el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 14 en medio de cultivo, en condiciones donde se expresa la secuencia de ácido nucleico a fin de producir un polipéptido que comprende las regiones variables de cadena liviana y pesada; y

b. la recuperación de los polipéptidos de la célula huésped o del medio de cultivo.

10

p. de: N.V. ORGANON \* MEDAREX, INC.

**RESUMEN**

La presente invención se refiere a compuestos de unión específicos para BTLA, y a sus usos. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos completamente humanos, que reconocen BTLA humano y modulan su actividad

5 en cáncer, trastornos inflamatorios y autoinmunitarios.

Anti- BTLA 8D5 VH

V segmento: 3-13  
D segmento: ND  
J segmento: JH6b

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L  
1 GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCG GGG GGG TCC CTG

CDR1

R L S C A A S G F T I S S Y D M H W  
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC ATC AGT AGT TAC GAC ATG CAC TGG

CDR2

V R Q A T G K G L E W V S V I G P A  
109 GTC CGC CAA GCA ACA GGA AAA GGT CTG GAG TGG GTC TCA GTT ATT GGT CCT GCT

CDR2

G D T Y Y P G S V K G R F T I S R E  
163 GGT GAC ACA TAC TAT CCA GGC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAA

N A K N S L Y L Q M N S L R A G D T  
217 AAT GCC AAG AAC TCC TTG TAT CTT CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GGG GAC ACG

CDR3

A V Y Y C A R E G M A A H N Y Y G M  
271 GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGA GAG GGG ATG GCT GCC CAC AAC TAC TAC GGT ATG

CDR3

D V W G Q G T T V T V S S  
325 GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

FIGURA 1A

Anti- BTLA 8D5 VK

V segmento: L6  
J segmento: JK5

```

 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

 CDR1
                                ~~~~~~
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   L   A   W   Y
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                ~~~~~~
 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

 CDR2
                                ~~~~~~
      A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~~
 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

 CDR3
                                ~~~~~~
      R   S   N   W   P   P   I   T   F   G   Q   G   T   R   L   E   I   K
271 CGT AGC AAC TGG CCC CCG ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA
```

FIGURA 1B

Rasgos de secuencias de las regiones variables de cadena pesada y liviana de mAb Hu 8D5 BTLA.

|                                               |                                          |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------|
| N-X-S/T<br>(potencial de N-glicosilación)     | No                                       |
| Secuencia N-G<br>(potencial de desamidación)  | No                                       |
| Secuencia D-P<br>(potencial de hidrólisis)    | No                                       |
| Secuencia D-G<br>(potencial de isomerización) | No                                       |
| M en CDRs<br>(potencial de oxidación)         | VH CDR1 (línea germinal)<br>2 en VH CDR3 |
| Residuo C no emparejado                       | No                                       |

FIGURA 1C

Secuencias VH 4C7 antagonista Anti-BTLA

V segmento: 4-59  
D segmento: ND  
J segmento: JH6b

Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L  
1 CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC CTA

CDR1

S L T C T V H G G S I N H Y Y W S W  
55 TCC CTC ACC TGC ACT GTC CAT GGT GGC TCC ATC AAT CAT TAC TAC TGG AGC TGG

CDR2

I R Q P P G K G L E W I G Y I Y Y S  
109 ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAA TGG ATT GGA TAT ATC TAT TAC AGT

CDR2

G S T K Y N P S L K S R V S I S V D  
163 GGG AGC ACC AAG TAC AAT CCC TCC CTC AAG AGT CGC GTC AGC ATA TCA GTA GAC

T S K N Q F S L K L T S V T A A D T  
217 ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG ACC TCT GTG ACC GCT GCG GAC ACG

CDR3

A V Y Y C A R E W P Y Y Y Y E M D V  
271 GCC GTG TAT TAT TGT GCG AGA GAG TGG CCC TAC TAT TAC TAC GAA ATG GAC GTC

W G Q G T T V T V S S  
325 TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

FIGURA 2A

VK 4C7 Anti-BTLA

V segmento: A27  
J segmento: JK1

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R  
1 GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

~~~~~  
A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

CDR2

~~~~~  
Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S  
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

CDR2

~~~~~  
R A T G I P D R F S G S G S G T D F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

CDR3

~~~~~  
T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q  
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

CDR3

~~~~~  
Q Y G S S F R T F G Q G T K V E I K
271 CAG TAT GGT AGT TCA TTT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

FIGURA 2B

Rasgos de secuencias de las regions variables de cadena pesada y liviana de mAb Hu 4C7 BTLA.

N-X-S/T (potencial de N-glicosilación)	No
Secuencia N-G (potencial de desamidación)	No
Secuencia D-P (potencial de hidrólisis)	No
Secuencia D-G (potencial de isomerización)	No
M en CDRs (potencial de oxidación)	Uno en VH CDR3 (codificado línea germinal)
Residuo C no emparejado	No
Observaciones	VK Sin cambios de marco

FIGURA 2C

FIGURA 3A

8D5 se une a BTLA humano expresado em células CHO

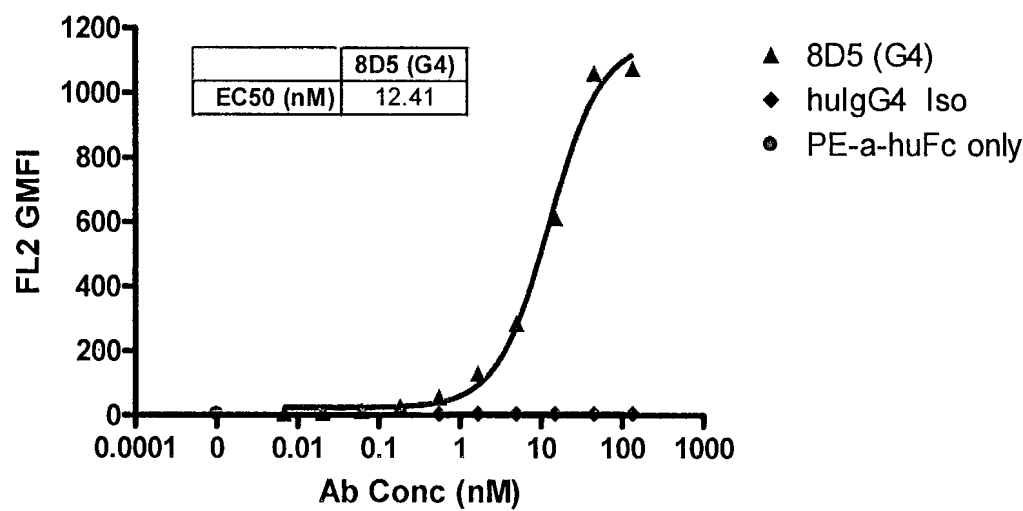
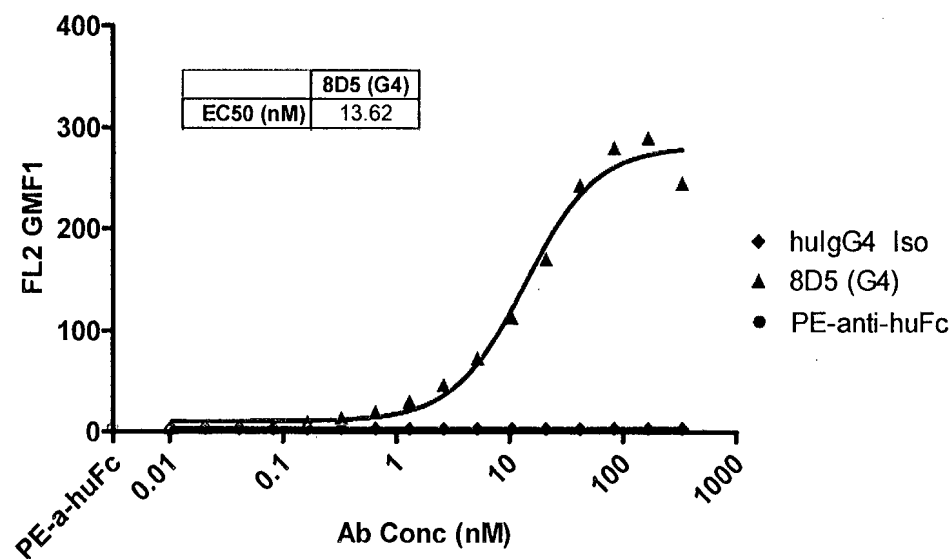


FIGURA 3B

8D5 se une a BTLA de macaco expresado em células CHO



FIGURAS 3A-B

FIGURA 3C

4C7 se une a BTLA humano expresado en células CHO

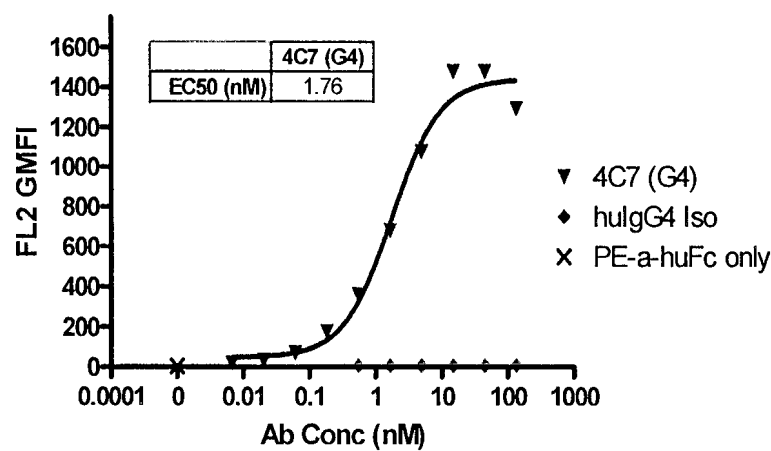
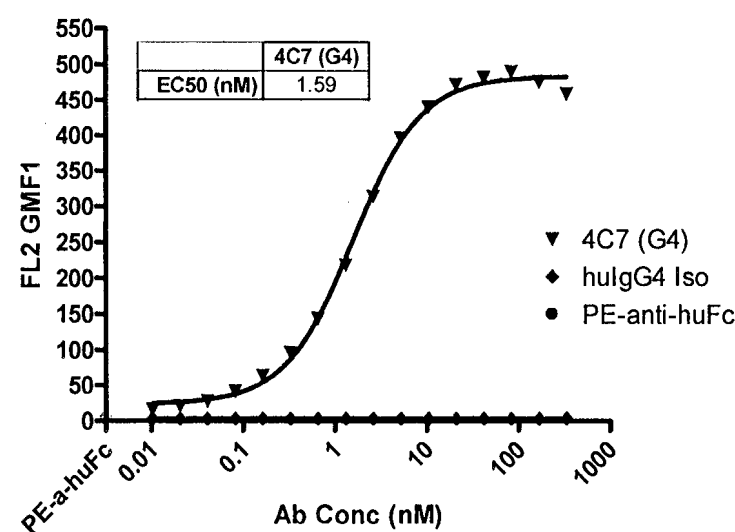


FIGURA 3D

4C7 se une a BTLA de macaco expresado en células CHO



FIGURAS 3C-D

FIGURA 4A

4C7 bloquea la unión de HVEM a BTLA humano expresado en células CHO

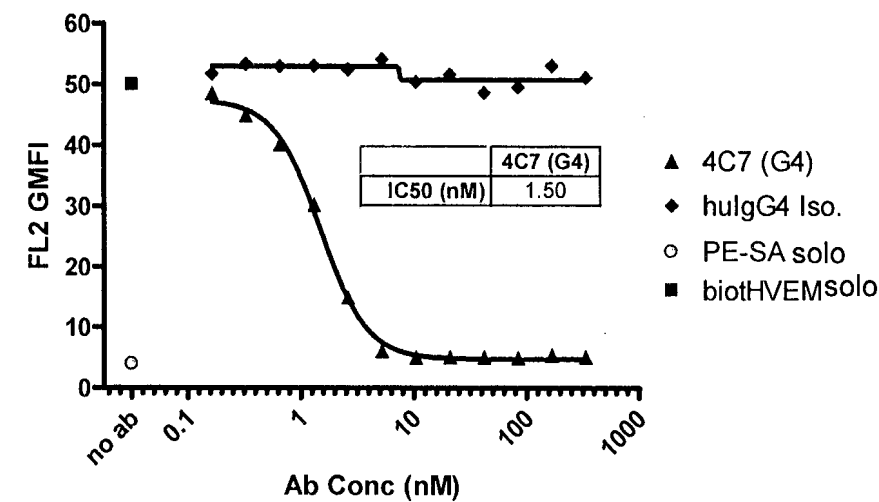
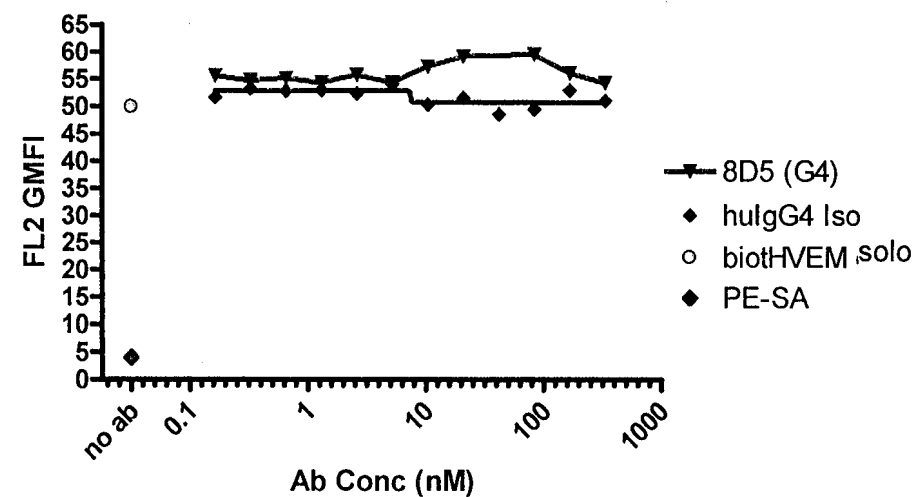


FIGURA 4B

8D5 no bloquea la union de HVEM a BTLA humano expresado en células CHO



FIGURAS 4A-B

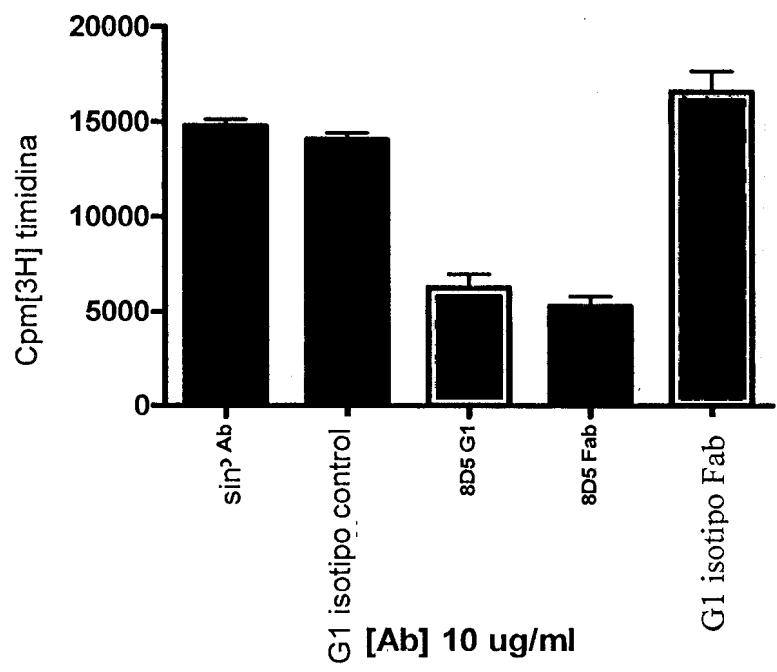


FIGURA 5

FIGURA 6A

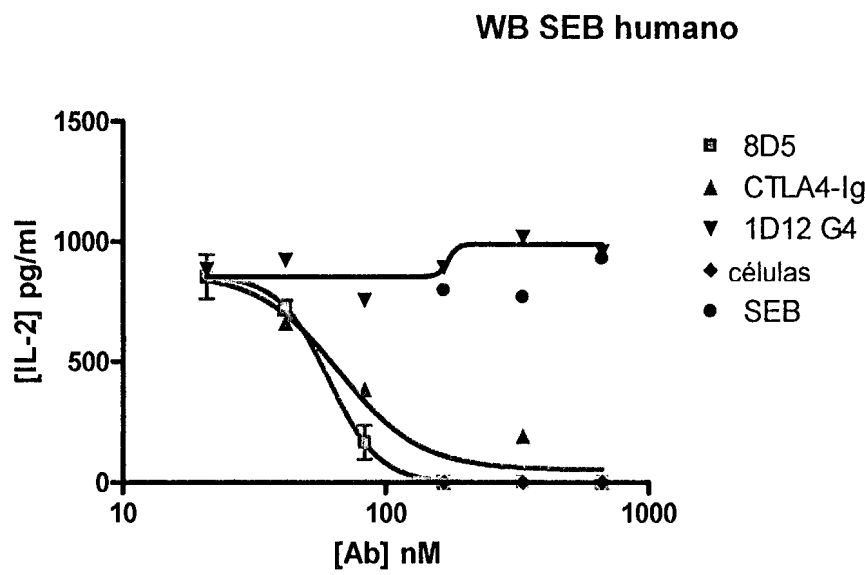
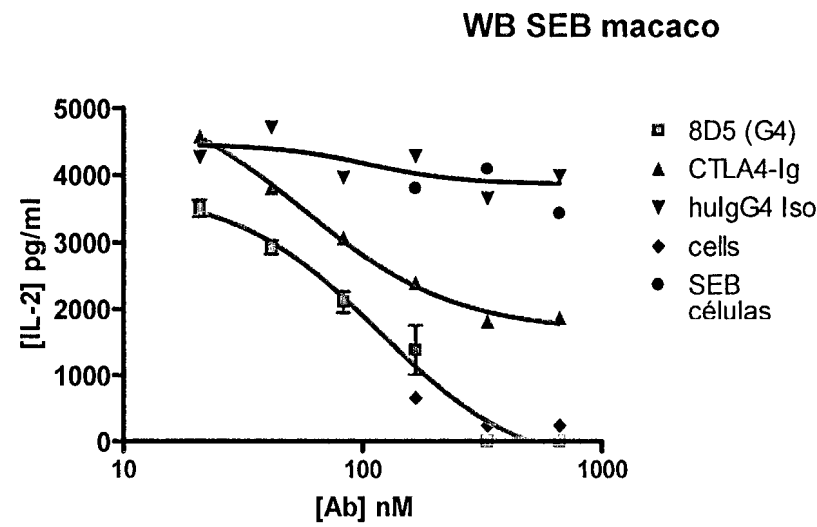


FIGURA 6B



FIGURAS 6 A-B

FIGURA 6C

Modulación de IL- 2 inducida por SEB en sangre completa humana

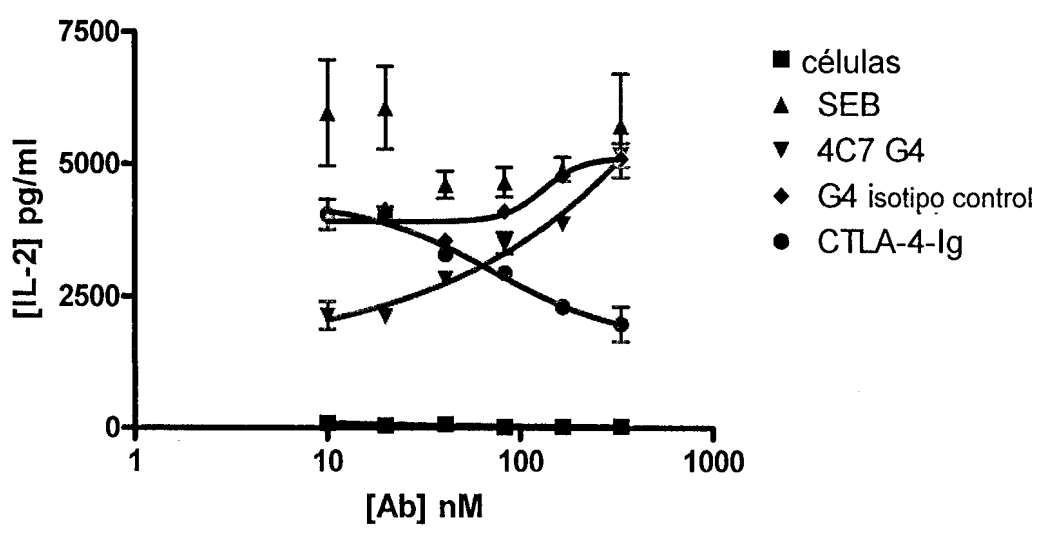
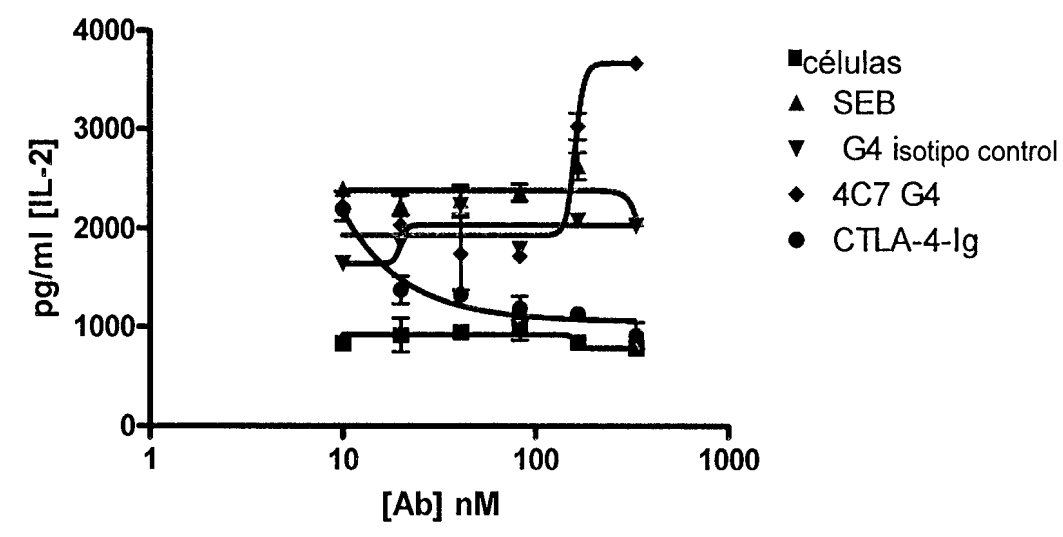


FIGURA 6D

Modulación de IL-2 inducida por SEB en sangre completa de macaco



FIGURAS 6 C-D

FIGURA 7A

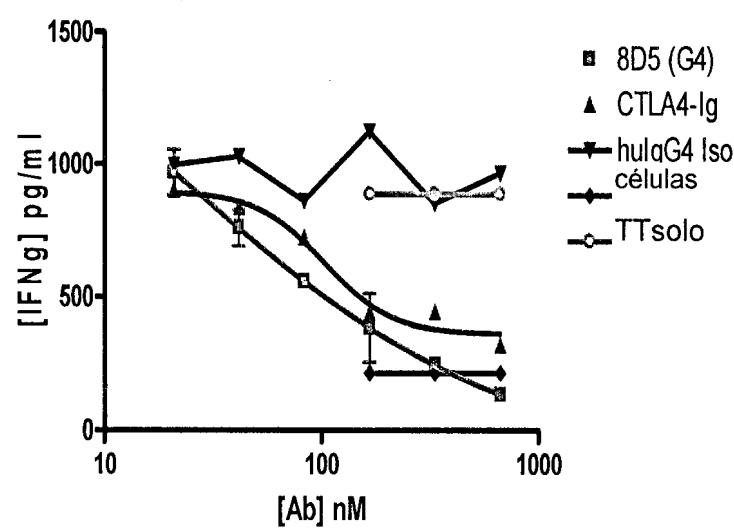
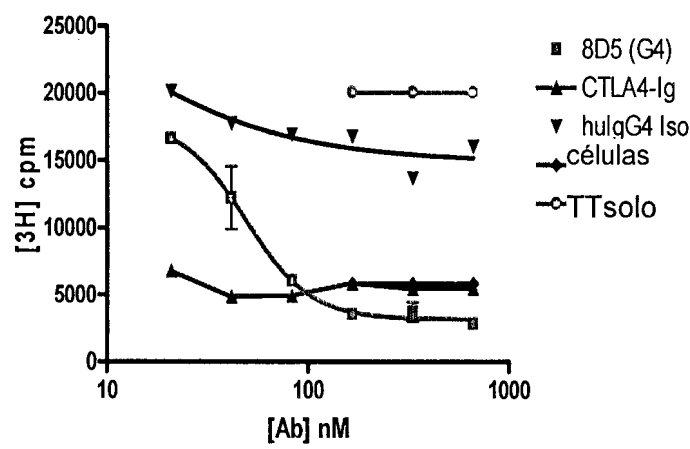


FIGURA 7B



FIGURAS 7A-B

FIGURA 8A

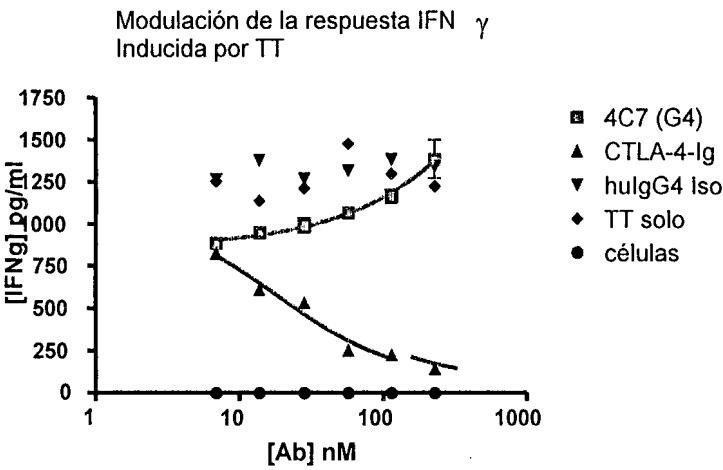
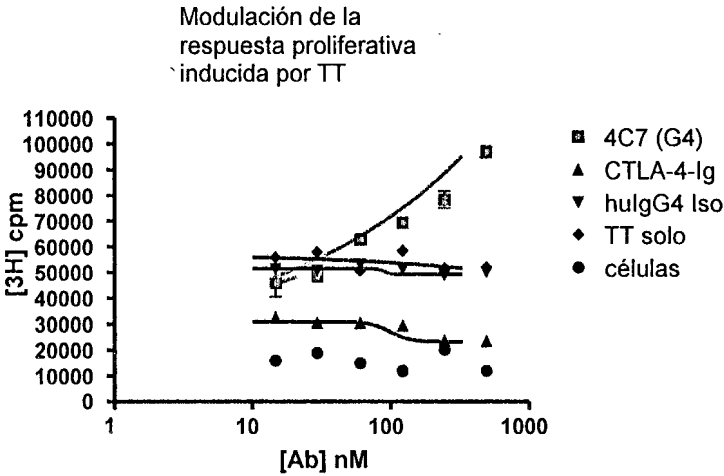


FIGURA 8B



FIGURAS 8 A-B

La function de células B humanas es inhibida por hu Mab8D5

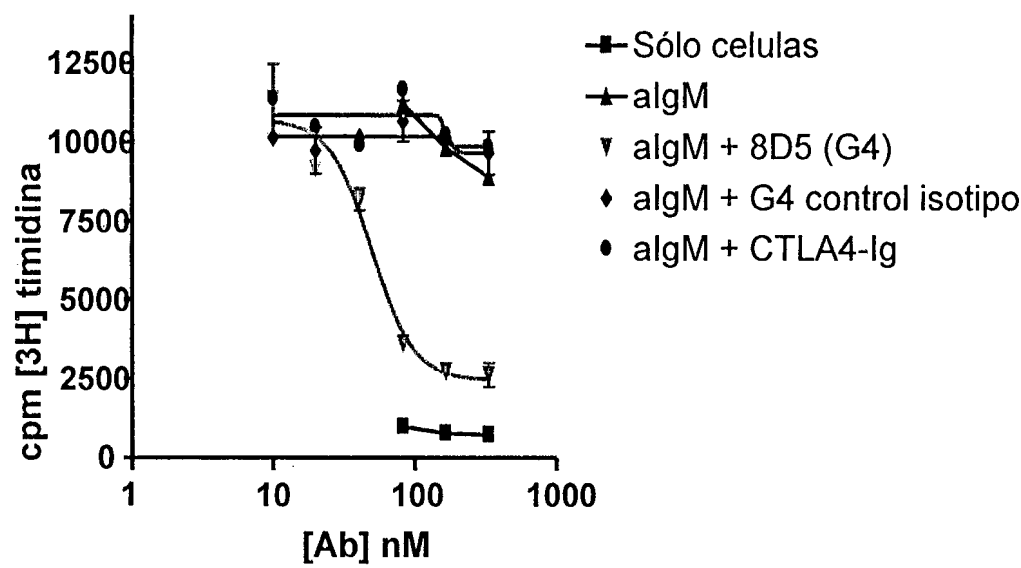


FIGURA 9

FIGURA 10A

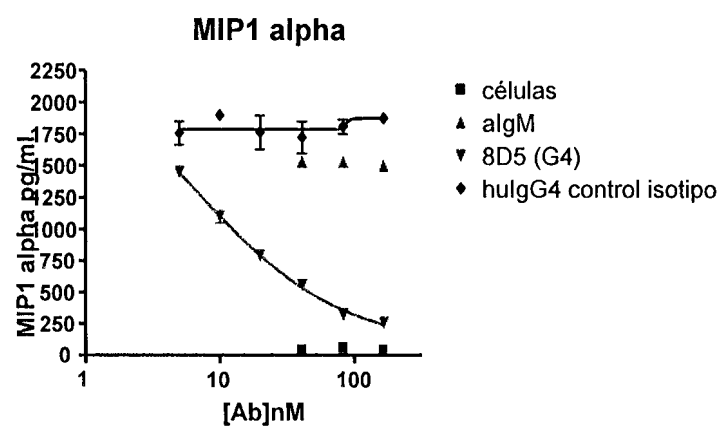
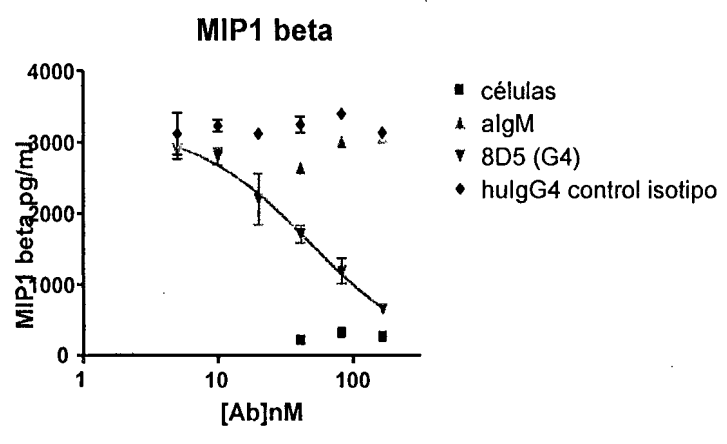


FIGURA 10B



FIGURAS 10 A-B

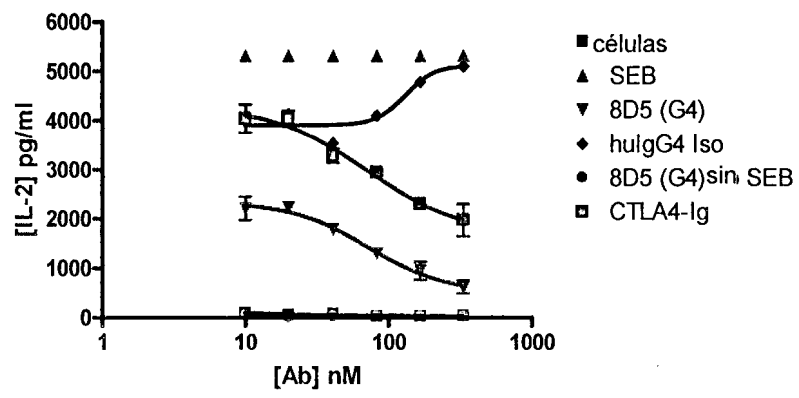
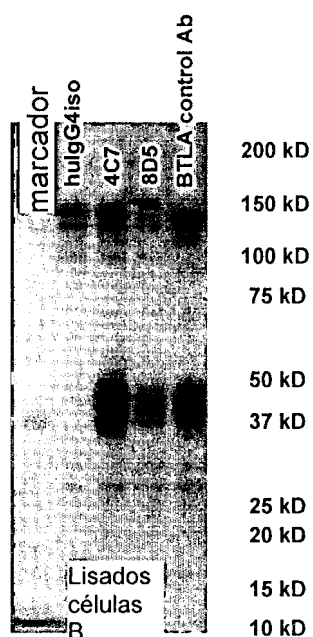


FIGURA 11

A.



B.

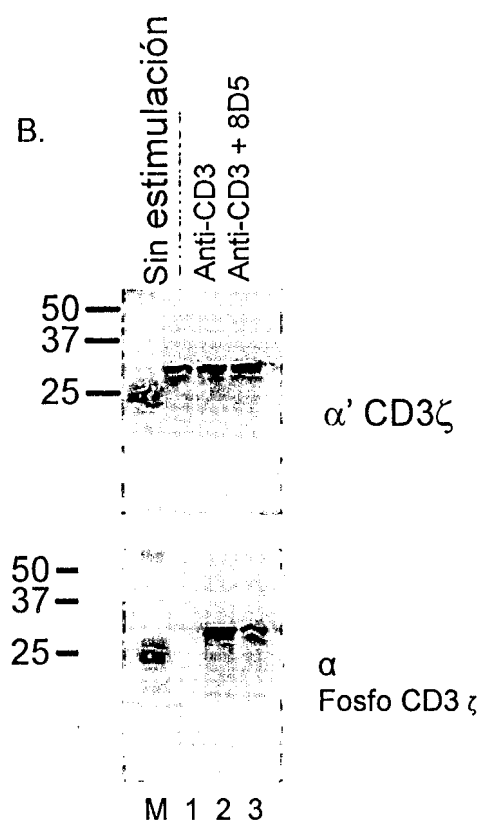


FIGURA 12 A-B

FIGURA 13A

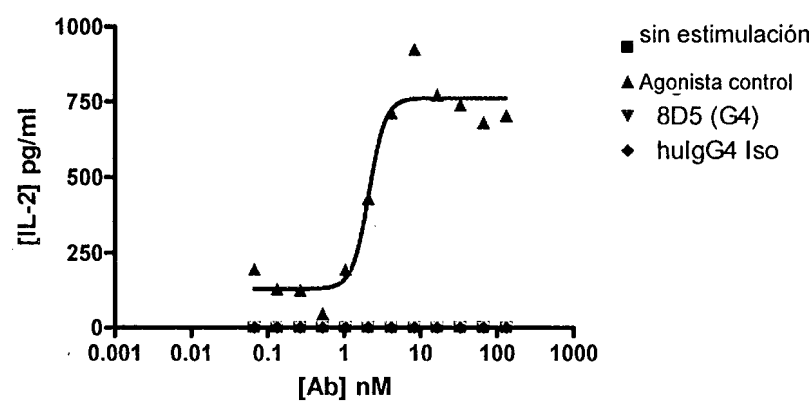
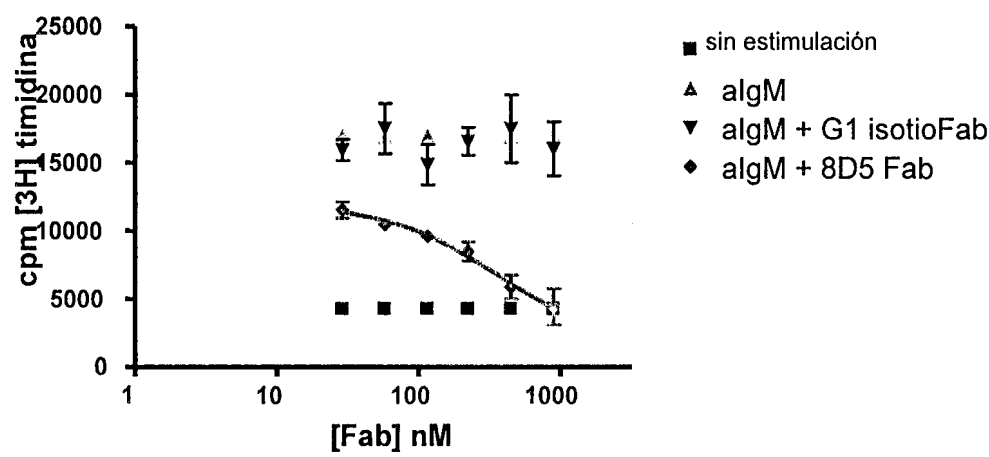


FIGURA 13B



FIGURAS 13A-B

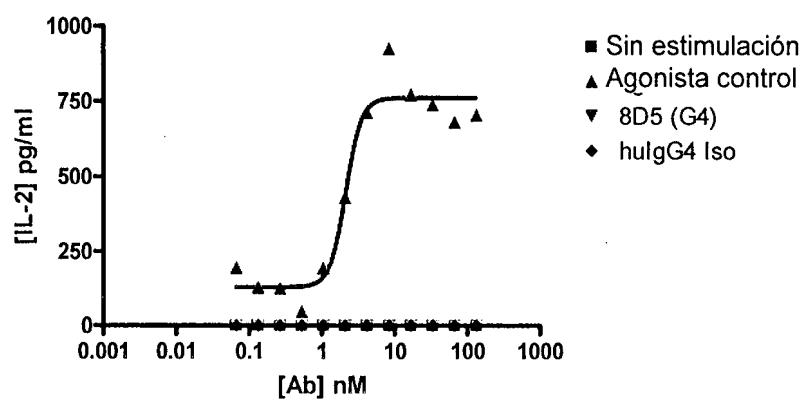


FIGURA 14A

FIGURA 14 B

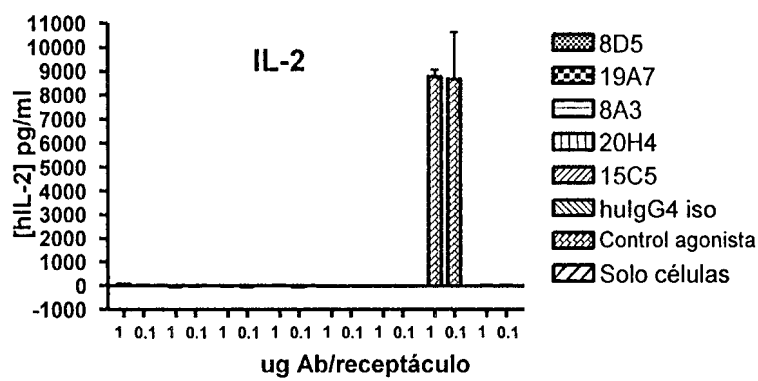


FIGURA 14 C

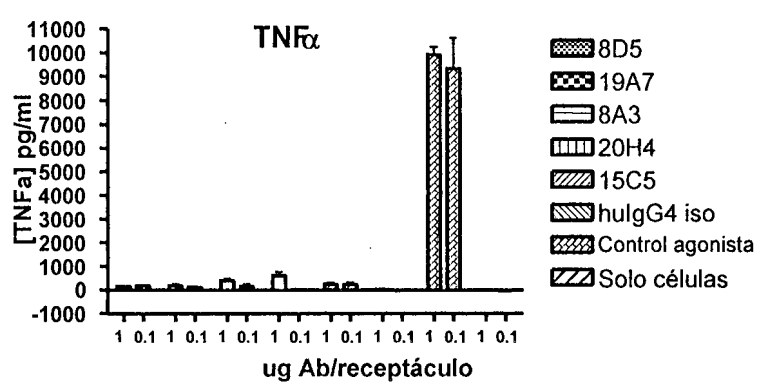
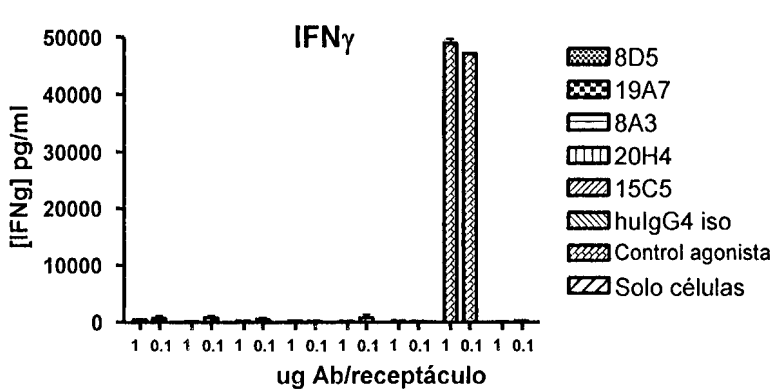


FIGURA 14 D



FIGURAS 14 B-C-D

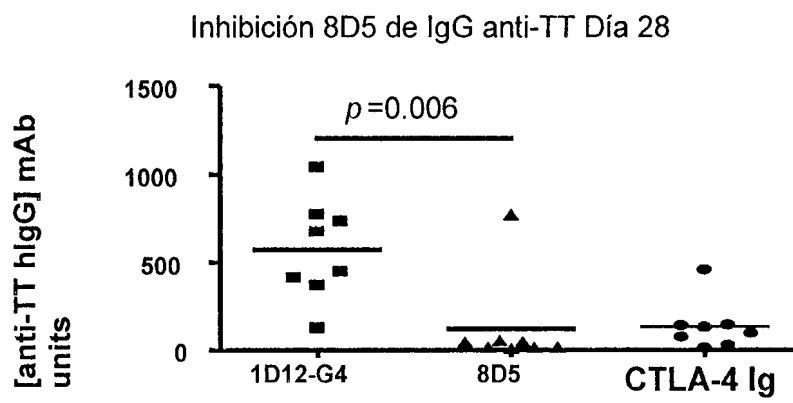


FIGURA 15

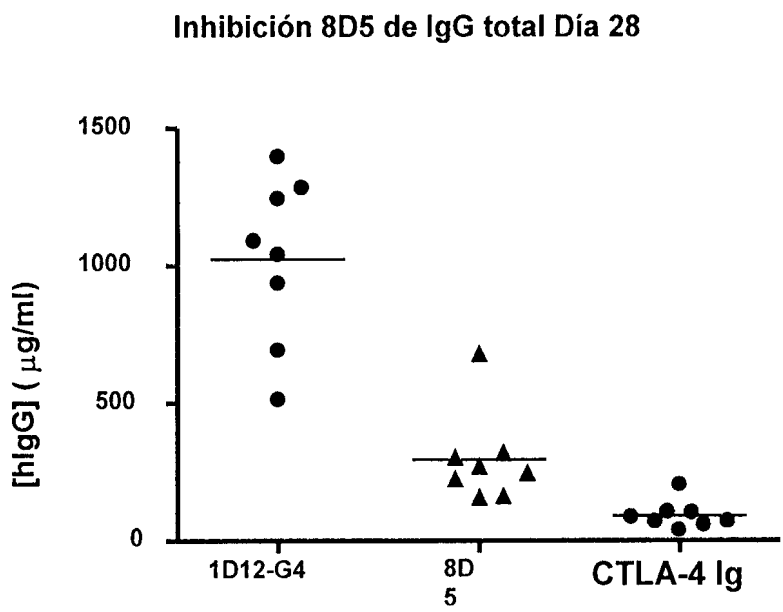


FIGURA 16

FIGURA 17A

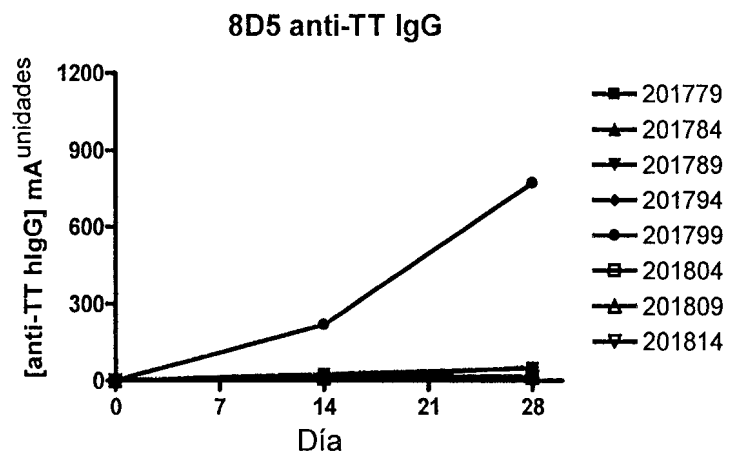
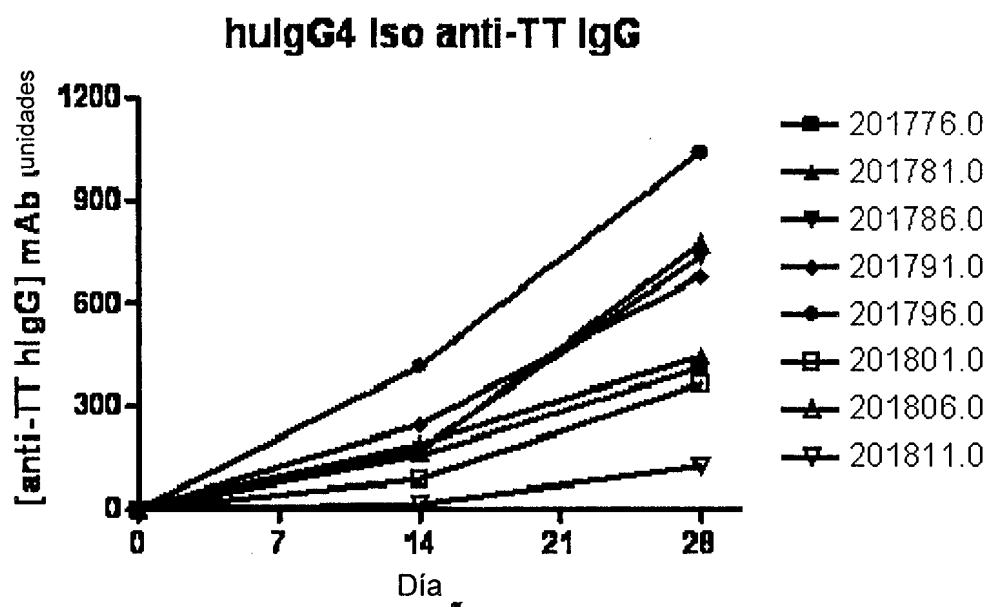


FIGURA 17B



FIGURAS 17A-B

FIGURA 18A

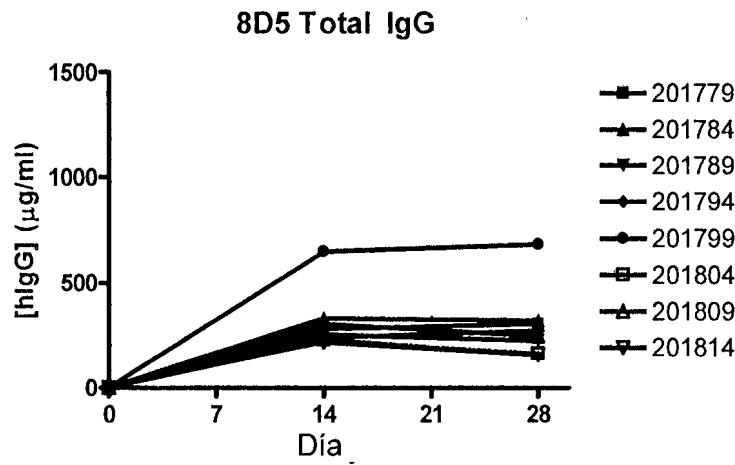
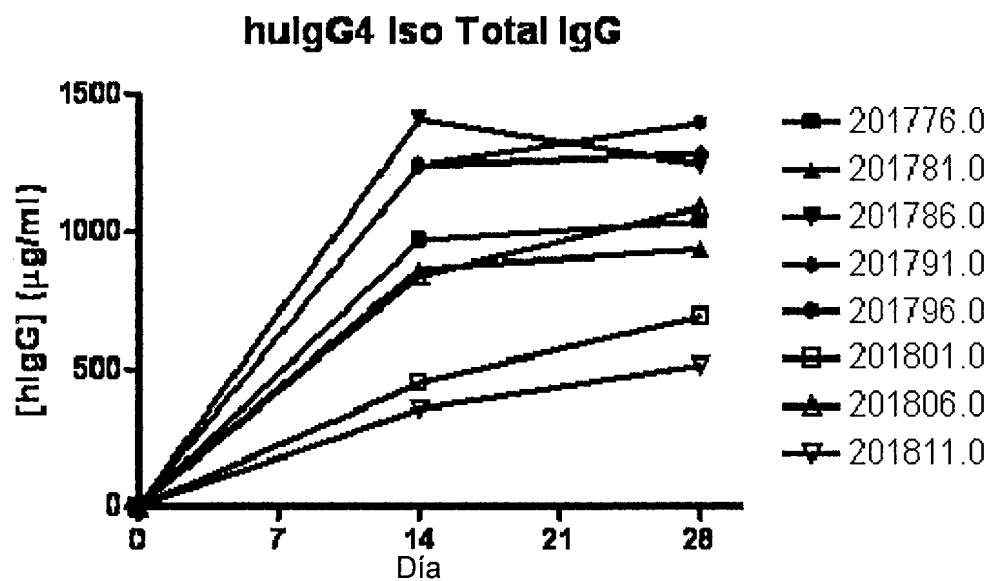


FIGURA 18B



FIGURAS 18A-B



No. 12-031267- -00000-0000

Fecha: 2012-02-22 16:39:44
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 388

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐