



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0065433
(43) 공개일자 2025년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2025-7014103(분할)

(22) 출원일자(국제) 2016년12월01일
심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2018-7018350
원출원일자(국제) 2016년12월01일
심사청구일자 2021년11월29일

(85) 번역문제출일자 2025년04월28일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/064436

(87) 국제공개번호 WO 2017/096051
국제공개일자 2017년06월08일

(30) 우선권주장
62/262,309 2015년12월02일 미국(US)

(71) 출원인
주식회사 에스티큐브엔컴퍼니
서울특별시 강남구 삼성로96길 12, 7층(삼성
동, 정석빌딩)
더 보드 오브 리젠프 오브 더 유니버시티 오브 텍
사스 시스템
미국, 텍사스 78701, 오스틴, 210 웨스트 7 스트
리트

(72) 발명자
유, 스텝ен 성한
미국 버지니아주 20120 센터빌 줄 스타 드라이브
5233
슈라체, 마이클 조셉
미국 메릴랜드주 20876 저먼타운 텔리반 웨이
21203
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인 광장리앤고

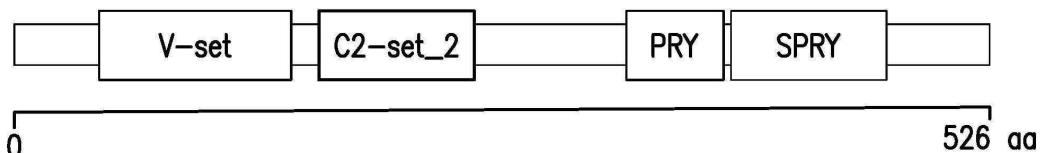
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항체와 분자 및 그의 치료 용도

(57) 요약

본 발명은 항-BTN1A1 항체와 같은, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 제공한다. 이들 분자는 항-당화된 BTN1A1 항체와 같은, 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 포함한다. 이들을 암치료법에서 또는 암 진단제로서 사용하는 방법을 비롯하여, 이 분자들을 제조하고 이 용하는 방법을 또한 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/41 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자
린, 스티븐 허센

미국 텍사스주 77584 펠랜드 레이븐스 크릭 드라이
브 2726

샤르마, 암리쉬

미국 텍사스주 77025 휴스턴 벨몬테인 스트리트
2601 에이피티. B208

명세서

청구범위

청구항 1

BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 포함하는 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합하는 분자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd의 절반 보다 적은 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합하며, 이때 선택적으로 상기 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd보다 적어도 10배 적은 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합하는 분자.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 형광 강도(MFI)의 적어도 2배의 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합하는 분자.

청구항 5

제2항에 있어서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215, N449, 또는 이들의 임의의 조합에서의 BTN1A1 당화를 면역 특이적으로 마스킹(masking)하고, 이때 선택적으로 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N215에서의 BTN1A1 당화를 면역 특이적으로 마스킹하는 분자.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은

(a)

- (1) 서열 번호 7, 10, 13 및 16으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_H CDR1;
- (2) 서열 번호 8, 11, 14 및 17로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_H CDR2; 및
- (3) 서열 번호 9, 12, 15 및 18로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_H CDR3

을 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역; 또는

(b)

- (1) 서열 번호 19, 22, 25 및 28로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_L CDR1;
 - (2) 서열 번호 20, 23, 26 및 29로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_L CDR2; 및
 - (3) 서열 번호 21, 24, 27 및 30로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_L CDR3
- 을 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역
- 을 포함하는 분자.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은

- (1) 서열 번호 7, 10, 13 및 16으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_H CDR1;
 - (2) 서열 번호 8, 11, 14 및 17로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_H CDR2; 및
 - (3) 서열 번호 9, 12, 15 및 18로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_H CDR3
- 을 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역을 포함하는 문자.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 중쇄 가변(V_H) 영역은

- (a) (1) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR1;
 - (2) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR2; 및
 - (3) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR3;
- (b) (1) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR1;
 - (2) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR2; 및
 - (3) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR3;
- (c) (1) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR1;
 - (2) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR2; 및
 - (3) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR3; 또는
- (d) (1) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR1;
 - (2) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR2; 및
 - (3) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR3

을 포함하는 문자.

청구항 9

제7항에 있어서, 중쇄 가변(V_H) 영역은 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 문자.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은

- (1) 서열 번호 19, 22, 25 및 28로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_L CDR1;
 - (2) 서열 번호 20, 23, 26 및 29로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_L CDR2; 및
 - (3) 서열 번호 21, 24, 27 및 30으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_L CDR3
- 을 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역을 포함하는 문자.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 경쇄 가변(V_L) 영역은

- (a) (1) 서열 번호 19의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR1;

- (2) 서열 번호 20의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR2; 및
- (3) 서열 번호 21의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR3;
- (b) (1) 서열 번호 22의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR1;
- (2) 서열 번호 23의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR2; 및
- (3) 서열 번호 24의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR3;
- (c) (1) 서열 번호 25의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR1;
- (2) 서열 번호 26의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR2; 및
- (3) 서열 번호 27의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR3; 또는
- (d) (1) 서열 번호 28의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR1;
- (2) 서열 번호 29의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR2; 및
- (3) 서열 번호 30의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR3

을 포함하는 문자.

청구항 12

제10항에 있어서, 경쇄 가변(V_L) 영역은 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 문자.

청구항 13

제6항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은

- (a) (1) 서열 번호 7, 10, 13 및 16으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_H CDR1;
 - (2) 서열 번호 8, 11, 14 및 17로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_H CDR2; 및
 - (3) 서열 번호 9, 12, 15 및 18로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_H CDR3
- 을 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역, 및
- (b) (1) 서열 번호 19, 22, 25 및 28로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_L CDR1;
 - (2) 서열 번호 20, 23, 26 및 29로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_L CDR2; 및
 - (3) 서열 번호 21, 24, 27 및 30으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_L CDR3
- 을 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역

을 포함하는 문자.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은

- (i)(a)(1) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR1;
- (2) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR2; 및
- (3) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR3을 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역; 및

- (b) (1) 서열 번호 19의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR1;
 - (2) 서열 번호 20의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR2; 및
 - (3) 서열 번호 21의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR3을 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역;
 - (ii) (a)(1) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR1;
 - (2) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR2; 및
 - (3) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR3을 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역; 및
 - (b) (1) 서열 번호 22의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR1;
 - (2) 서열 번호 23의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR2; 및
 - (3) 서열 번호 24의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR3을 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역;
 - (iii) (a)(1) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR1;
 - (2) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR2; 및
 - (3) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR3을 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역; 및
 - (b) (1) 서열 번호 25의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR1;
 - (2) 서열 번호 26의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR2; 및
 - (3) 서열 번호 27의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR3을 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역; 또는
 - (iv) (a)(1) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR1;
 - (2) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR2; 및
 - (3) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 가진 V_H CDR3을 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역; 및
 - (b) (1) 서열 번호 28의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR1;
 - (2) 서열 번호 29의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR2; 및
 - (3) 서열 번호 30의 아미노산 서열을 가진 V_L CDR3을 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역
- 을 포함하는 문자.

청구항 15

제13항에 있어서, V_H 영역은 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하고, V_L 영역은 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 문자.

청구항 16

BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가지며, 이때 BTN1A1과의 결합은 용량-의존 방식으로 BTN1A1과 제6항 내지 제15항 중 어느 한 항의 문자의 결합을 경쟁적으로 차단하는 문자.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 서열 번호 31-41로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 7개 연속 아미노산을 갖는 BTN1A1의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 문자.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 에피토프는 서열 번호 34의 적어도 7개 연속 아미노산을 포함하는 분자.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 에피토프는 서열 번호 35의 적어도 7개 연속 아미노산을 포함하는 분자.

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 에피토프는 서열 번호 40의 적어도 7개 연속 아미노산을 포함하는 분자.

청구항 21

제17항에 있어서, 상기 에피토프는 서열 번호 31-41로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 또는 적어도 12개 연속 아미노산을 포함하는 분자.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 에피토프는 서열 번호 31-41로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 분자.

청구항 23

BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가지며, 이때 BTN1A1에의 결합은 용량-의존 방식으로 BTN1A1과 제17항 내지 제21항 중 어느 한 항의 분자의 결합을 경쟁적으로 차단하는 분자.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 $1 \mu M$ 이하의 해리 상수(K_d)로 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 분자.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 $100 nM$ 이하, $10 nM$ 이하, 또는 $5 nM$ 이하의 해리 상수(K_d)로 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 분자.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자는 항체인 분자.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 항체는 단클론 항체인 분자.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 항체는 인간 항체 또는 인간화 항체인 분자.

청구항 29

제26항에 있어서, 상기 항체는 IgG, IgM, 또는 IgA인 분자.

청구항 30

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자는 Fab' , $F(ab')2$, $F(ab')3$, 1가 $scFv$, 2가 $scFv$, 또는 단일 도메인 항체인 분자.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 분자는 재조합적으로 생산되는 분자.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 분자의 유효량과 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, BTN1A1을 발현하는 세포의 증식을 억제하는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 세포는 암세포인 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 암세포는 폐암 세포, 전립선암 세포, 혀장암 세포, 난소암 세포, 간암 세포, 두경부암 세포, 유방암 세포, 및 위암 세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 상기 암세포는 폐암 세포인 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 폐암 세포는 비소세포 폐암(NSCLC) 세포인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 NSCLC 세포는 편평 NSCLC 세포인 방법.

발명의 설명**기술 분야****[0001] 1. 기술분야**

본 발명은 일반적으로 암 면역학 및 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 본 발명은 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 항-BTN1A1 항체 또는 다른 분자, 및 그의 치료 용도를 제공한다.

배경 기술**[0003] 2. 배경기술**

인간 및 다른 포유동물의 면역계는 감염 및 질병으로부터 그들을 보호한다. 많은 자극성 및 억제성 리간드와 수용체가 자가-면역을 제한하는 한편 감염에 대한 면역 반응을 최대화하기 위하여 엄격한 제어 시스템을 제공한다. 최근에는, 항-PD1 또는 항-PDL1 항체와 같은, 면역 반응을 조절하는 치료제가 일부 암 치료에서 효과적인 것으로 밝혀졌다. 하지만, 면역계를 조절함으로써 질병을 안전하게 그리고 효과적으로 치료하는 새로운 치료제의 개발이, 특히 전이성 암을 위해 시급히 필요하다. 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법은 이러한 필요를 충족하며 다른 관련 효과를 제공한다.

발명의 내용**과제의 해결 수단****[0005] 3. 발명의 요약**

본 발명은 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 제공한다. 일부 실시형태에서, 분자는 항-BTN1A1 항체이다.

일부 실시형태에서, 분자는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215, 및/또는 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 하나 이상의 당화 모티

프에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역 특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다.

[0008] 일부 실시형태에서, 문자는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가지며, 이때 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55, N215, 및/또는 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N215에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 하나 이상의 당화 모티프에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55 및 N215에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55, N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다.

[0009] 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd의 절반보다 적은 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd보다 적어도 10 배 적은 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다.

[0010] 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 형광 강도(MFI)의 적어도 두배의 형광 강도로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI의 적어도 5배의 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합한다.

[0011] 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215, 및/또는 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹(mask)한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 BTN1A1의 하나 이상의 당화 모티프를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N215에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215 및 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다.

[0012] 일부 실시형태에서, 본 발명은 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하며 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH 또는 VL 도메인을 포함하는 항원 결합 단편을 가진 문자를 제공한다. 일부 실시형태에서, 문자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH 및 VL 도메인 둘 모두를 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 문자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH CDR 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가진 VH CDR 하나 이상을 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 문자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VL CDR 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가진 VL CDR 하나 이상을 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 문자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 적어도 하나의 VH CDR 및 적어도 하나의 VL CDR을 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다.

[0013] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 문자는 (a) (1) 서열 번호 7, 10, 13 및 16으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_H CDR1; (2) 서열 번호 8, 11, 14 및 17로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_H CDR2; 및 (3) 서열 번호 9, 12, 15 및 18로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_H CDR3:을 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역, 또는 (b) (1) 서열 번호 19, 22, 25 및 28로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_L CDR1; (2) 서열 번호 20, 23, 26 및 29로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 V_L CDR2; 및 (3) 서열 번호 21, 24, 27 및 30으로 이루어지는 군으로부터 선택된

아미노산 서열을 가진 V_L CDR3:을 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역:을 포함하는 항원 결합 단편을 갖는다.

- [0014] 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 항-BTN1A1 항체의 VH 쇄, VL 쇄, VH 도메인, VL 도메인, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및/또는 VL CDR3을 인코딩하는 분리된 핵산 분자를 제공한다. 이를 핵산 분자를 포함하는 백터 및 숙주 세포가 추가로 제공된다.
- [0015] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 본 명세서에 개시된 BTN1A1 에피토프를 (예를 들어, 투여량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하는 항원 결합 단편을 가진다. BTN1A1 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC810의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, 분자는 본 명세서에 개시된 BTN1A1의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. BTN1A1 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC810의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, BTN1A1 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 5개 연속 아미노산을 갖는다.
- [0016] 일부 실시형태에서, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자는 항-당화된 BTN1A1 항체를 비롯한 항-BTN1A1 항체이다. 항체는 단클론 항체일 수 있다. 항체는 인간화 항체일 수 있다. 항체는 인간 항체일 수 있다. 항체는 IgG, IgM, 또는 IgA일 수 있다.
- [0017] 일부 실시형태에서, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자는 Fab' , $F(ab')2$, $F(ab')3$, 1가 $scFv$, 2가 $scFv$, 또는 단일 도메인 항체이다.
- [0018] 일부 실시형태에서, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자는 재조합적으로 생산된다. 일부 실시형태에서, 분자는 영상화제, 화학요법제, 독소 또는 방사성핵종에 접합된다.
- [0019] 본 발명은 또한 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자 및 약학적 허용 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자, 및 보조제를 포함하는 키트를 추가로 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)를 제공한다. 본 발명은 또한 화합물과 접합된 본 발명에서 제공되는 분자를 세포와 접촉시킴으로써 BTN1A1을 발현하는 세포에 화합물을 전달하기 위하여 본 발명에서 제공되는 분자를 이용하는 방법을 제공한다. 화합물은 본 명세서에 개시되는 영상화제, 치료제, 독소 또는 방사성핵종일 수 있다. 화합물은 항-BTN1A1 항체에 접합될 수 있다. 접합체는 ADC와 같은, 본 명세서에 개시된 임의의 접합체일 수 있다. 세포는 암 세포일 수 있다. 세포는 또한 암세포와 정상 세포 둘 모두를 포함하는 세포 집단일 수 있다.
- [0021] 본 발명은 또한 항-BTN1A1 항체를 비롯한, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 분자의 유효량을 투여함으로써 개체에서 면역 반응을 조절하는 방법을 제공한다. 면역 반응의 조절은 (a) T 세포 활성화 증가; (b) T 세포 증식 증가; 및/또는 (c) 사이토카인 생산 증가를 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명은 또한 항-BTN1A1 항체를 비롯한, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 분자의 유효량을 세포와 접촉시킴으로써 BTN1A1을 발현하는 세포의 T-세포 의존성 어പ토시스(apoptosis)를 향상시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 항-BTN1A1 항체를 비롯한, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 분자의 유효량을 세포와 접촉시킴으로써 BTN1A1을 발현하는 세포의 증식을 억제하는 방법을 제공한다. 세포는 암세포일 수 있다.
- [0023] 부가적으로, 본 발명은 본 명세서에 개시된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자의 유효량을 개체에게 투여함으로써 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 분자는 항-BTN1A1 항체이다. 일부 실시형태에서, 분자는 항-당화된 BTN1A1 항체이다. 일부 실시형태에서, 치료는 개체에서 면역 반응을 활성화시키거나, 또는 T 세포의 활성화 및 증식을 촉진할 수 있다. 일부 실시형태에서, 분자는 암 세포에 결합하고 면역 반응을 유도하여 암세포의 파괴를 야기한다. 일부 실시형태에서, 암세포의 파괴는 분자의 ADCC 활성에 의해 매개된다. 일부 실시형태에서, 암세포의 파괴는 분자의 CDC 활성에 의해 매개된다.
- [0024] 일부 실시형태에서, 개체는 전이성 암을 가진다. 암은 혈액암 또는 고형 종양일 수 있다. 일부 실시형태에서, 암은 백혈병, 림프종 및 골수종으로 이루어지는 군으로부터 선택된 혈액암이다. 일부 실시형태에서, 암은 유방암, 폐암, 흉선암, 갑상선암, 두경부암, 전립선암, 식도암, 기관암, 뇌암, 간암, 방광암, 신장암, 위암, 췌장암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 고환암, 결장암, 직장암 및 피부암으로 이루어진 군으로부터 선택된 고형 종양이다. 피부암은 흑색종 또는 비흑색종 피부암일 수 있다.

[0025]

일부 실시형태에서, 본 방법은 본 명세서에 개시된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 개체에게 조직적 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 분자는 정맥내로, 피부내로, 종양내로, 근육내로, 복강내로, 피하로 또는 국소로 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 개체에게 제2 항암 치료법을 투여하는 것을 포함하며, 이 치료법은 수술요법, 화학요법, 생물학적 타겟팅된 치료법, 소분자 타겟팅된 치료법, 방사선요법, 냉동요법, 호르몬요법, 면역요법 또는 사이토카인요법일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026]

4. 도면의 간단한 설명

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

도 1 - 인간 BTN1A1의 선형 구조. 도 1은 인간 BTN1A1의 선형 구조를 도시하며, 이 구조는 두 개의 면역글로불린 도메인(V-set, C2-set_2) 및 두 개의 단백질 상호작용 도메인(PRY, SPRY)을 포함한다.

도 2 - 인간 BTN1A1의 서브-클로닝(Sub-cloning). C-말단 플래그(flag) 태그(tag)를 가진 인간 BTN1A1의 전체 코딩 서열(CD)을 표준 클로닝 방법을 이용하여 pcDNA3내로 서브클로닝하였다. 도 2에 도시된 대로, 상부 밴드는 벡터 골격에 해당하며, 하부 밴드는 플래그 태그를 가진 인간 BTN1A1의 CD에 해당한다.

도 3 - 293T 세포에서 당화 특이적 돌연변이체 및 야생형 BTN1A1의 발현. 부위 지시된 돌연변이유발을 이용하여, 인간 BTN1A1의 세포외 도메인 내의 당화 부위에서 특이적 돌연변이가 이루어졌다(N55Q, N215Q 및 복합 N55Q 및 N215Q). 야생형 BTN1A1 및 그의 돌연변이체 형태 둘 모두의 발현이 도 3에 도시된다. 나타난 대로, BTN1A1의 복합 돌연변이체(N55Q 및 N215Q)는 발현에 실패하여, BTN1A1의 당화가 그의 발현에 중요함을 입증한다.

도 4 - BTN1A1은 N-연결 당화된다. 세포외 도메인을 발현하는 재조합 인간 BTN1A1 단백질을 한 시간 동안 가짜 (-) 또는 PNGase F로 처리하고, 폴리아크릴아미드 젤 전기영동(PAGE)하고 쿠마시 염색하였다. 도 4에 도시된 대로, PNGase F 처리 레인에서 명백한 이동이 관찰되어, BTN1A1의 N-연결 당화를 나타냈다. 화살표에 해당하는 밴드가 PNGase F 단백질이다.

도 5 - 전장 인간 BTN1A1 단백질에서 추정 당화 부위. 인간 BTN1A1의 전장 서열(서열 번호 1)을 N-연결 당화 부위(Nx[ST] 패턴 예측 소프트웨어 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GLYCOSITE/glycosite.html>)에 입력하였다. 소프트웨어에 의해 확인된 세 개의 후보 당화 부위가 도 5에 도시된 서열에서 적색으로 강조된다.

도 6 - BTN1A1의 세포외 도메인의 당화 부위에서의 고도의 상동성. 세 가지 종(호모 사피엔스(*Homo sapiens*), 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*) 및 보스 타우루스(*Bos taurus*))으로부터의 검증된 BTN1A1 서열을 유니프로트(uniprot)(www.uniprot.org)으로부터 수집하고, 당화 부위 예측 소프트웨어 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GLYCOSITE/glycosite.html>)로 처리하고 클러스탈(clustal) W2(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)를 이용하여 배열하였다. 도 6에 도시한 대로, 당화 부위(출현 순서대로, 각각, 서열 번호 49-54)는 종 간에 진화적으로 보존된다.

도 7a - 항 CD3/CD28 자극에 의한 활성화 후 마우스 T 세포에서 세포 표면 BTN1A1의 고 유도. 미접촉 마우스 T 세포를 2일 동안 가짜로 자극하거나(좌측) 또는 항 CD3(5 ug/ml) 및 항CD28(5 ug/ml)로 자극하고 유세포분석을 하였다. 도 7a는 가짜로 처리된 세포에 비하여 CD3/CD28 자극된 세포에서 세포 표면 BTN1A1의 높은 유도를 도시한다.

도 7b - 항 CD3/CD28 자극에 의한 활성화 후 마우스 T 세포에서 세포 표면 BTN1A1의 고 유도. 미접촉 마우스 T 세포를 2일 동안 가짜로 자극하거나(적색) 또는 항 CD3(5 ug/ml) 및 항-CD28(5 ug/ml)로 자극하고(오렌지색) 유세포분석을 하였다. BTN1A1의 발현을 이차 항체 단독 대조군에 비교하였다. 도 7b는 가짜로 처리된 세포에 비하여 CD3/CD28 자극된 세포에서 세포 표면 BTN1A1의 높은 유도를 도시한다. 청색 곡선은 이소타입 대조군이다.

도 8 - 골수 세포는 B16-Ova 흑색종 세포에서 BTN1A1 발현을 유도한다. B16-Ova 세포 내의 세포외 BTN1A1을 항체 단독 대조군 또는 FITC-BTN1A1 항체로 염색하여 검출하였으며, BTN1A1 발현 수준은 유세포분석을 이용하여 검사하였다. 용어 "BM"은 골수를 나타낸다.

도 9 - 마우스 항-인간 BTN1A1 항체의 닷 블랏(Dot blot) 분석. 도 9a는 닷 블랏 분석의 결과를 보여주며, 이것

은 마우스 항-인간 BTN1A1 단클론 항체의 당-특이성(glyco-specificity)을 분석하기 위하여 이용되었다. 6xHis로 태깅된 항원 BTN1A1-ECD를 PNGase F로 처리하여 N-당화를 제거하였다. 다클론 항체를 양성 대조군으로 이용하였다. BTN1A1의 종 특이성을 시험하기 위하여, 인간 IgG1 Fc 영역으로 태깅된 인간 및 마우스 BTN1A1을 이용하였다(레인 1-4는 인간 BTN1A1-Fc이고 레인 5-8은 마우스 BTN1A1-Fc임). 용어 "ECD"는 세포와 도메인을 나타낸다. 도 9b는 도 9a에 나타난 닷 블랏의 배치를 제공한다.

도 10 - 마우스 항-인간 BTN1A1 단클론 항체의 FACS 분석. 인간 BTN1A1-2NQ (즉, N55Q 및 N215Q) 및 인간 BTN1A1 WT를 일시적 형질감염에 의해 HEK293T 세포에서 발현시켰다. hBTN1A1의 표면 발현은 STC702, STC810, STC819, STC820, STC821, STC822, STC838, 및 STC839로 표시된 항-BTN1A1 단클론 항체를 이용한 FACS 분석에 의해 측정하였다. 항-BTN1A1 다클론 항체를 양성 대조군으로 이용하였다.

도 11 - 고정된 STC810 MAb에의 BTN1A1-Fc 및 BTN1A1-His 결합의 표면 플라즈몬 공명 분석. 도 11a: 단백질 A-CM5 침상에 고정된 STC810에의 가용성 BTN1A1-Fc 단백질(2배 희석을 가진 2 - 64 nM)의 실시간 결합을 보여주는 센서그램. 어떤 고정된 단백질도 없는 유동 세포를 비특이적 결합을 위한 대조군으로 사용하였으며 제시된 데이터로부터 차감하였다. 도 11b: 단백질 A-CM5 침상에 고정된 STC810에의 가용성 BTN1A1-His 단백질(4배 희석을 가진 2 - 64 nM)의 실시간 결합을 보여주는 센서그램.

도 12 - BTN1A1-Fc의 에피토프 맵핑. STC810 및 BTN1A1(ECD)-Fc를 Ag-Ab 가교시키고 고-질량 MALDI에 의해 분석하였다. 도 12는 R41, K42, K43, T185 및 K188을 비롯한, STC810에 가교된 BTN1A1 (ECD)-Fc의 아미노산 잔기를 보여준다.

도 13 - BTN1A1-Fc의 에피토프 맵핑. STC810 및 BTN1A1(ECD)-His를 Ag-Ab 가교시키고 고-질량 MALDI에 의해 분석하였다. 도 13은 R68, K78, T175, S179 및 T185를 비롯한, STC810에 가교된 BTN1A1 (ECD)-His의 아미노산 잔기를 보여준다.

도 14 - 네이티브 또는 변성 조건에서 BTN1A1 WT, N55Q, N215Q 및 2NQ 돌연변이체의 웨스턴 블로트 분석. (상부 패널) HEK293T 세포를 야생형 BTN1A1 및 N55Q, N215Q, 및 2NQ(즉, N55Q 및 N215Q)를 비롯한 돌연변이체 BTN1A1를 위한 발현 벡터로 일시적으로 형질감염시켰다. 형질감염 후 48 h에, 전체-세포 용해물을 제조하고 본래의 SDS-PAGE에서 단백질을 분리시켰다. 젤을 STC810을 위한 항체를 이용하여 면역블로트 분석하였다. (하부 패널) 상기에서 제조된 세포 용해물을 β -мер캅토에탄올에 의해 환원시키고 끓여서 변성시켰다. 샘플을 SDS-PAGE에서 분리하고 STC810을 위한 항체를 이용하여 면역블로트 분석하였다. BTN1A1-Fc를 양성 대조군으로 이용하였다.

도 15 - 공초점 현미경에 의한 STC810 항체의 면역형광 분석. HEK293T 세포를 야생형 BTN1A1(BTN1A1 WT) 및 돌연변이체 BTN1A1(BTN1A1-2NQ(즉, N55Q 및 N215Q))를 위한 발현 벡터로 일시적으로 형질감염시켰다. 세포를 커버슬립에 도말하고 BTN1A1에 대한 일차 항체(STC810) 및 마우스 IgG에 대한 이차 항체로 탐침하였다. 청색 염색은 핵을 염색하는 DAPI이다.

도 16 - 전립선 종양에서 BTN1A1 발현의 면역조직화학. 암 환자로부터의 전립선 조직의 포르말린-고정된 파라핀-매립 색션을 마우스 항-인간 BTN1A1 항체를 이용하여 BTN1A1을 면역염색시키고, 헤마톡실린 대조염색을 이용하여 3,3'-디아미노벤자린(DAB)에 의해 시각화하였다(패널 B, 3 μ g/ml STC810; 패널 D, 5 μ g/ml STC810). 마우스 IgG를 음성 대조군으로 이용하였다(패널 A, 3 μ g/ml 마우스 IgG; 패널 C, 5 μ g/ml 마우스 IgG).

도 17 - OPAL 염색에 의한 전립선 종양 샘플에서의 BTN1A1 발현. 각 형광으로부터 DAPI, CD8, 시토케라틴 및 BTN1A1(STC810)을 분리하는 다중분광 데이터로부터의 비혼합된 합성(composite) 이미지. 다중 염색(multiplexed staining) 방법은 각 항체 및 DAPI 대조염색을 위한 면역형광 라벨을 증폭시키는 티라미드 시그널 증폭(TSA) 연속 적용으로 이루어진다. 면역형광 라벨링 이전에, 모든 네 가지 항원이 단일 마이크로웨이브 단계로 복구된다. 각 라벨링 사이클은 일차 항체, 호스 래디쉬 퍼옥시다제(HRP)에 접합된 이차 항체 및 형광단에 접합된 TSA의 적용으로 이루어진다. 각각의 TSA-형광단 접합체가 적용된 후, 샘플은 일차 및 이차 항체를 제거하기 위하여 다시 마이크로웨이브로 처리되어, 공유적으로 결합되고 마이크로웨이브 노출에 매우 회복력이 있는 TSA-형광단 구조체를 남긴다. 펠킨엘머(PerkinElmer)로부터의 벡트라(Vectra)® 다중스펙트럼 슬라이드 분석 시스템을 이용하여 샘플을 영상화하여 슬라이드 당 25개 관심 필드를 자동적으로 획득하였다. 병합된(merged) 이미지가 하부 우측 패널에 나타난다.

도 18 - STC810은 전체 T 세포로 처리된 hBTN1A1 과 발현 PC3 세포에서 어팝토시스를 야기하였다. T 세포를 항-CD3 항체(100 ng/ml) 및 항체의 존재하의 IL-2(10 ng/ml)로 활성화시켰다. 1:10의 암세포:T 세포 비를 이 연구에서 이용하였다. 항체(STC810) 처리에 의해 야기된 PC3 세포(전립선암 세포)의 어팝토시스는 실시간 영상화 시

스템 인큐사이트(Incucyte) ZOOM(에센 바이오사이언스(Essen Bioscience)) 및 녹색 카스파제 3/7 형광 기질(10 μ M, 에센 바이오사이언스)을 이용하여 모니터하였다. 도 18a는 녹색 카스파제 3/7 형광 PC3 세포로 염색된 어댑토시스성 세포를 보여준다. 도 18b는 항체로 처리 후 120 h에 PC3 세포의 상대적 어댑토시스의 계산을 보여준다. 도 18c는 플레이트 상의 PC3 세포의 컨플루언시(confluence)에 의해 모니터된 암세포의 증식을 보여준다. 도 18d는 항체로 처리 후 120 h에 PC3 세포의 상대적 증식의 계산을 보여준다.

도 19 - 듀오링크 분석(Duolink assay). 듀오링크 분석은 일반적으로 단일 단백질-단백질 상호작용을 검출하기 위하여 하기의 6 단계를 포함한다: 1. 타겟 일차 항체와 항온처리; 2. PLA 프로브 "PLUS" 및 "MINUS" 첨가; 3. 연결자 올리고뉴클레오티드(connector oligos)를 하이브리드화; 4. 완전한 DNA 환을 형성하기 위한 결찰; 5. 회전환 증폭(Rolling circle amplification); 및 6. 상호작용을 밝히기 위한 형광 프로브 첨가.

도 20 - STC810에 의한 BTN1A1의 리소좀 내부화(internalization). 폴리-L-리신 커버슬립에서 배양된 BTN1A1 WT 또는 BTN1A1 2NQ를 과발현하는 293T 세포를 1h 동안 10 μ g/mL STC810으로 처리하거나 미처리한 후, 듀오링크 시약을 이용하여 STC810 5 μ g/mL 및 항-LAMP1 1 μ g/mL로 동시에 염색하여 리소좀 마커와 BTN1A1의 코로컬리제이션(cocalocalization)을 나타내는 녹색 형광을 생성하였다(도 22b). 녹색 스팟 및 핵을 정량하였으며 비율이 차트에 나타난다(도 22a). 여러 바는 SEM을 나타낸다. * P=0.04

도 21 - FACS에 의한 BTN1A1 WT 및 BTN1A1 2NQ 발현의 검출. BTN1A1 WT, BTN1A1 2NQ, 또는 빈 벡터(EV)를 과발현하는 HEK293T 세포의 FACS 분석. 플래그 발현은 HEK293T 세포에서 BTN1A1(WT 또는 2NQ; 플래그 태깅됨)의 발현을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027]

5. 발명의 상세한 설명

[0028]

공자극성 분자의 B7 패밀리는 면역 세포의 활성화 및 억제를 유도할 수 있다. 관련된 분자 패밀리 - 부티로필린(butyrophilin) - 또한 B7 패밀리 구성원과 유사한 면역조절 기능을 가진다. 부티로필린, 서브패밀리 1, 구성원 A1("BTN1A1")은 타입 I 막 당단백질이고 우유 지방구 막(fat globule membrane)의 주요 성분이며, B7 패밀리와 구조적 유사성을 가진다. BTN1A1은 우유에서 지방 방울(fat droplet)의 형성을 조절하는 주요 단백질로서 알려져 있다(Ogg *et al.* PNAS, 101(27):10084-10089 (2004)). BTN1A1은 T 세포를 비롯한 면역 세포에서 발현된다. 재조합 BTN1A1을 이용한 치료는 T 세포 활성화를 억제하고 EAE의 동물 모델을 보호하는 것으로 밝혀졌다.(Stefferl *et al.*, *J. Immunol.* 165(5):2859-65 (2000)).

[0029]

BTN1A1은 또한 암세포에서 특이적으로 그리고 높게 발현된다. 암세포에서 BTN1A1은 또한 당화된다. BTN1A1의 발현은 암 진단을 돋기 위해 그리고 암 치료의 효능을 평가하기 위하여 이용될 수 있다.

[0030]

본 발명은 BTN1A1에 면역특이적으로 결합할 수 있는 항-BTN1A1 항체 및 다른 분자, 및 암 진단, 암 치료의 평가, 또는 면역 세포의 활성 조절에서 그리고 암 치료에서 그의 이용 방법을 제공한다.

[0031]

5.1. 정의

[0032]

본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 관사("a," "an," 및 "the")는 그 관사의 문법적 대상 하나 또는 하나 초과를 말한다. 예로서, 항체는 하나의 항체 또는 하나보다 많은 항체를 말한다.

[0033]

본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "부티로필린, 서브패밀리 1, 구성원 A1" 또는 "BTN1A1"은 영장류(예를 들어, 인간, 필리핀 원숭이(cyno)), 개 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 비롯한 임의의 척추동물 공급원으로부터의 BTN1A1을 말한다. 달리 특정되지 않으면, BTN1A1은 또한 다양한 BTN1A1 이소타입, 그의 SNP 변이체를 비롯한 관련 BTN1A1 폴리펩티드, 및 인산화된 BTN1A1, 당화된 BTN1A1, 및 유비퀴틴화된 BTN1A1을 포함하지만 이에 제한되지 않는 상이한 변형된 형태의 BTN1A1을 포함한다. 본 명세서에서 사용될 때, 당화된 BTN1A1은 N55, N215, 및/또는 N449 당화를 가진 BTN1A1을 포함한다.

[0034]

인간 BTN1A1의 예시적인 아미노산 서열(BC096314.1 GI: 64654887)이 하기에 제공되며 잠재적인 당화 부위가 진하게 밑줄그어진다:

MAVFPSSGLPRCLLTLILLQLPKLDSAPFDVIGPPEPILAVVGEDAQLPCRL
SPNASAEHLELRWFRKKVSPA
 LVHRDGREQEAEQMPEYRGRATLVQDGIAKGRV
 ALRIRGVRSDDGEYTCFFREDGSYEEALVHLKVAALGSDPHISMQVQENGEICLEC
 TSVGWYPEPQVQWR
 TSKGEKFPSTSESNPDEEGLFTVAASVI
RTSAKNVSCYIQN
 LLGQEKKVEISIPASSLPRLTPWIVAVA
 VILMVLGLLTIGSIFTWRLYNERPRERRNE
 FSSKERLLEELWKKKATLHAVDVTLDPTAHPHLFLYEDSKSVRLEDSRQKLPEKTE
 RFDSWPCVLGRETFTSGRHYWEVEVGDRDWAIGVCREVMKKGFDPMTPENGFW
 AVELYGNGYWALTPLRPLLAGPPRRVGIFLDYESGDISFYNMNDGSDIYTFSNVT
 SGPLRPFFCLWSSGKKPLTICPIADGPERVTVIANAQDLSKEIPLSPMGEDSAPR
 DADT
 LHSKLIPTQPSQGAP (서열 번호 1)

[0035]

[0036]

인간 BTN1A1의 예시적인 인코딩 핵산 서열(BC096314.1 GI: 64654887)이 하기에 제공된다:

ATGGCAGTTTCCAAGCTCCGGTCTCCCCAGATGTCTGCTCACCCCTCA
 TTCTCCTCCAGCTGCCAAACTGGATTCA
 GAGCTCCCTTGACGTGATTGGACCCCCCG
 GAGCCCATCCTGGCCGTTGTGGGTGAGGACGCCAAGCTGCCCTGTCGCCTGTCTC
 CGAACGCGAGCGCCGAGCACTGGAGCTACGCTGGTCCAGGAAGGCCGAGCAGATGCCCG
 CGGCCGTGCTGGTGCATAGGGACGGCGCGAGCAGGAAGGCCGAGCAGATGCCCG
 AGTACCGCGGGCGGGCGACGCTGGTCCAGGACGGCATGCCAAGGGGCGCGTGG
 CCTTGAGGATCCGTGGCGTCAGAGTCTTGACGACGGGAGTACACGTGCTTTT
 CAGGGAGGATGGAAGCTACGAAGAACCCCTGGTGCATCTGAAGGTGGCTGCTCT
 GGGCTCTGACCCTCACATCAGTATGCAAGTTCAAGAGAATGGAGAAATCTGTCTG
 GAGTGCACCTCAGTGGATGGTACCCAGAGCCCCAGGTGCAGTGGAGAACTTCC
 AAGGGAGAGAAGTTCCATCTACATCAGAGTCCAGGAATCCTGATGAAGAAGGT
 TTGTTCACTGTGGCTGCTTCAGTGATCATCAGAGACACTTCTCGAAAAATGTGT
 CCTGCTACATCCAGAATCTCCTCTTGGCCAGGAGAAGAAAGTAGAAATATCCAT
 ACCAGCTTCCCTCCCTCCCAAGGCTGACTCCCTGGATAGTGGCTGTGGCTGTCATC

[0037]

CTGATGGTTCTAGGACTTCTCACCATGGGTCCATATTTCACTGGAGACTATA
 CAACGAAAGACCCAGAGAGAGGAGGAATGAATTCTAGCTCTAAAGAGAGACTCCT
 GGAAGAACTCAAATGGAAAAAGGCTACCTGCATGCAGTTGATGTGACTCTGGA
 CCCAGACACAGCTCATCCCCACCTCTTCTTATGAGGATTCAAAATCTGTTGAC
 TGGAGATTCACTCAGAAACTGCCTGAGAAAACAGAGAGATTGACTCCTGGC
 CCTGTGTGTTGGGCCGTGAGACCTCACCTCAGGAAGGCATTACTGGGAGGTGGA
 GGTGGGAGACAGGACTGACTGGCAATCGCGTGTGTAGGGAGAATGTGATGAA
 GAAAGGATTGACCCCCATGACTCCTGAGAATGGGTTCTGGGCTGTAGAGTTGTAT
 GGAAATGGGTACTGGGCCCTCACTCCTCTCCGGACCCCTCTCCCATTGGCAGGGC
 CCCCCACGCCGGTTGGGATTTCTAGACTATGAATCAGGAGACATCTCCTCTA
 CAACATGAATGATGGATCTGATATCTATACTTCTCCAATGTCACTTCTCTGGCC
 CCCTCCGGCCCTTCTTGCCTATGGTAGCGGTAAAAAGCCCTGACCATCTGC
 CCAATTGCTGATGGGCCTGAGAGGGTCACAGTCATTGCTAATGCCAGGACCTT
 CTAAGGAGATCCCCATTGTCCCCATGGGGGAGGACTCTGCCCTAGGGATGCAG
 ACACTCTCCATTCTAAGCTAACCCCTACCCAAACCCAGCCAAGGGGCACCTAA

(서열 번호 2)

[0038]

[0039]

본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "항체"는 특정 분자 항원에 결합할 수 있으며 두 개의 동일한 폴리펩티드 쇄 쌍으로 이루어지며 이때 각 쌍은 하나의 중쇄(약 50-70 kDa) 및 하나의 경쇄(약 25 kDa)를 가지며 각 쇄의 각각의 아미노-말단 부분은 약 100 내지 약 130 이상 아미노산의 가변 영역을 포함하며 각 쇄의 각각의 카르복시-말단 부분은 불변 영역을 포함하는, 면역글로불린(또는 "Ig") 클래스의 폴리펩티드 내의 B 세포의 폴리펩티드 생성물을 말한다(Borrebaeck (ed.) (1995) Antibody Engineering, Second Edition, Oxford University Press.; Kuby (1997) Immunology, Third Edition, W.H. Freeman and Company, New York를 참고한다). 여기서, 특정 분자 항원은 BTN1A1 폴리펩티드, BTN1A1 단편 또는 BTN1A1 에피토프일 수 있는, 타겟 BTN1A1을 포함한다. 본 발명에서 제공되는 항체는 단클론 항체, 합성 항체, 재조합적으로 생산된 항체, 2-특이적 항체, 다중특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 낙타화(camelized) 항체, 키메라 항체, 인트라바디(intrabodies), 항-이디오타입(항-Id) 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0040]

본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "단클론 항체"는 단일 세포 클론 또는 하이브리도마 또는 단일 세포로부터 유도된 세포 집단의 생성물인 항체를 말한다. 단클론 항체는 또한 단일 분자 면역글로불린 종을 생산하기 위해 중쇄 및 경쇄 인코딩 면역글로불린 유전자로부터 재조합 방법에 의해 생산된 항체를 말하고자 한다. 단클론 항체 제제 내의 항체를 위한 아미노산 서열은 실질적으로 균질하며 그러한 제제 내의 항체의 결합 활성은 실질적으로 동일한 항원 결합 활성을 나타낸다. 대조적으로, 다클론 항체는 한 집단 내의 상이한 B 세포로부터 수득되며, 다클론 항체는 특정 항원에 결합하는 면역글로불린 분자들의 조합이다. 다클론 항체의 각 면역글로불린은 동일한 항원의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 단클론 항체 및 다클론 항체 둘 모두를 생산하는 방법은 본 기술분야에 잘 알려져 있다(Harlow and Lane., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) and Borrebaeck (ed.), Antibody Engineering: A Practical Guide, W.H. Freeman and Co., Publishers, New York, pp. 103-120 (1991)).

[0041]

본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "인간 항체"는 인간 가변 영역 및/또는 인간 불변 영역 또는 인간 생식세포 면역글로불린 서열에 대응하는 그의 일부를 가진 항체를 말한다. 그러한 인간 생식세포 면역글로불린 서열은 Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242에 의해 개시된다. 여기서, 인간 항체는 BTN1A1에 결합하며 인간 생식세포 면역글로불린 핵산 서열의 자연 발생 체세포 변이체인 핵산 서열에 의해 인코딩되는 항체를 포함할 수 있다.

[0042]

본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "키메라 항체"는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유도되거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체에서의 대응 서열과 동일하거나 상

동성인 한편, 쇄(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유도되거나 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체에서의 대응 서열과 동일하거나 상동성인 항체, 및 그들이 원하는 생물학적 활성을 나타낸다면 그러한 항체의 단편을 말한다(미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)를 참고한다).

[0043] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "인간화 항체"는 본래의(native) 상보성 결정 영역("CDR") 잔기가 원하는 특이성, 친화성, 및 능력을 가진 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비인간 종(예를 들어, 공여체 항체)의 상응하는 CDR로부터의 잔기에 의해 치환된 인간 면역글로불린(예를 들어, 수용체 항체)을 포함하는 키메라 항체를 말한다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 하나 이상의 FR 영역 잔기에 상응하는 비인간 잔기에 의해 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수용체 항체 또는 공여체 항체에서 발견되지 않는 잔기를 가질 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 더 개선하기 위하여 만들어진다. 인간화 항체 중쇄 또는 경쇄는 적어도 하나 이상의 가변 영역의 실질적인 전부를 가질 수 있으며, 가변 영역 내의 CDR의 전부 또는 실질적인 전부는 비인간 면역글로불린의 CDR에 상응하며 FR의 전부 또는 실질적인 전부는 인간 면역글로불린 서열의 FR이다. 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역(Fc), 전형적으로 인간 면역글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 가질 수 있다. 추가 상세사항을 위하여, Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); 및 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992); Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-4289 (1992); 및 미국 특허 6,800,738호, 6,719,971호, 6,639,055호, 6,407,213호, 및 6,054,297호를 참고한다.

[0044] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "재조합 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 분리되는 항체를 말한다. 재조합 항체는 숙주 세포내로 형질감염된 재조합 발현 백터를 이용하여 발현된 항체, 재조합의 조합 항체 라이브러리로부터 분리된 항체, 인간 면역글로불린 유전자에 대해 트랜스제닉 및/또는 트랜스염색체(transchromosomal)인 동물(예를 들어, 마우스 또는 소)로부터 분리된 항체(예를 들어, Taylor, L. D. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295(1992) 참고) 또는 다른 DNA 서열에의 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱에 관련된 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 분리된 항체일 수 있다. 그러한 재조합 항체는 인간 생식세포 면역글로불린 서열로부터 유도된 것을 비롯한 가변 및 불변 영역을 가질 수 있다(Kabat, E. A. *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242를 참고한다). 재조합 항체는 또한 인 비트로 돌연변이유발(또는 인간 Ig 서열에 대해 트랜스제닉인 동물이 사용될 경우, 인 비보 체세포 돌연변이유발)을 거칠 수 있으며 따라서 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 인간 생식세포 VH 및 VL 서열로부터 유도되고 이에 관련된 반면 인 비보에서 인간 항체 생식세포 레파토리 내에 자연적으로는 존재하지 않는 서열일 수 있다.

[0045] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, "중화 항체"는 BTN1A1와 그의 천연 리간드의 결합을 차단하고 BTN1A1 및/또는 그의 다른 생리학적 활성을 의해 막개되는 시그널링 경로를 억제하는 항체를 말한다. 중화 항체의 IC50은 중화 분석에서 BTN1A1의 50%를 중화시키는데 필요한 항체의 농도를 말한다. 중화 항체의 IC50은 중화 분석에서 0.01 - 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위일 수 있다.

[0046] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "항원 결합 단편" 및 유사한 용어는 항원에 면역 특이적으로 결합하고 항체에게 항원에 대한 그의 특이성 및 친화성을 부여하는 아미노산 잔기를 포함하는 항체의 부분을 말한다. 항원 결합 단편은 항체의 기능성 단편으로 불릴 수 있다. 항원 결합 단편은 1가, 2가 또는 다가일 수 있다.

[0047] 항원 결합 단편을 가진 분자는 예를 들어, Fd, Fv, Fab, F(ab'), F(ab)₂, F(ab')₂, 단일쇄 Fv(scFv), 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody), 테트라바디(tetraabody), 미니바디(minibody), 또는 단일 도메인 항체를 포함한다. scFv는 1가 scFv 또는 2가 scFv일 수 있다. 항원 결합 단편을 가진 다른 분자는 그러한 항원 결합 단편이 결합 활성을 보유한다면, 예를 들어, 중쇄 또는 경쇄 폴리펩티드, 가변 영역 폴리펩티드 또는 CDR 폴리펩티드 또는 그의 일부를 포함할 수 있다. 그러한 항원 결합 단편은 예를 들어, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); Myers (ed.), *Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, New York: VCH Publisher, Inc.; Huston *et al.*, *Cell Biophysics*, 22:189-224 (1993); Plückthun and Skerra, *Meth. Enzymol.*, 178:497-515 (1989) 및 Day, E.D., *Advanced Immunochemistry*, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, NY (1990)에서 개시된 것을 찾을 수 있다. 항원 결합 단편은 적어도 5개 연속 아미노산 잔기(contiguous amino acid residues), 적어도 10개 연속 아

미노산 잔기, 적어도 15개 연속 아미노산 잔기, 적어도 20개 연속 아미노산 잔기, 적어도 25개 연속 아미노산 잔기, 적어도 40개 연속 아미노산 잔기, 적어도 50개 연속 아미노산 잔기, 적어도 60개 연속 아미노산 잔기, 적어도 70개 연속 아미노산 잔기, 적어도 80개 연속 아미노산 잔기, 적어도 90개 연속 아미노산 잔기, 적어도 100개 연속 아미노산 잔기, 적어도 125개 연속 아미노산 잔기, 적어도 150개 연속 아미노산 잔기, 적어도 175개 연속 아미노산 잔기, 적어도 200개 연속 아미노산 잔기, 또는 적어도 250개 연속 아미노산 잔기의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드일 수 있다.

[0048] 항체의 중쇄는 약 50-70 kDa의 폴리펩티드 쇄를 말하며, 이때 아미노-말단 부분은 약 120개 내지 130개 이상 아미노산의 가변 영역을 포함하며 카르복시-말단 부분은 불변 영역을 포함한다. 불변 영역은 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열에 기초하여, 알파(α), 델타(δ), 입실론(ε), 감마(γ) 및 뮤(μ)로 불리는 다섯 가지 구별되는 타입 중 하나 일 수 있다. 구별되는 중쇄는 크기가 상이하다: α , δ 및 γ 는 대략 450개 아미노산을 함유하는 한편, μ 및 ε 은 대략 550개 아미노산을 함유한다. 경쇄와 조합될 경우, 이를 구별되는 타입의 중쇄는 IgG의 4 가지 서브클래스, 즉 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 비롯한, 항체의 잘 알려진 5가지 클래스인, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM을 생성한다. 중쇄는 인간 중쇄일 수 있다.

[0049] 항체의 경쇄는 약 25 kDa의 폴리펩티드 쇄를 말하며, 이때 아미노-말단 부분은 약 100개 내지 약 110개 이상 아미노산의 가변 영역을 포함하고 카르복시-말단 부분은 불변 영역을 포함한다. 경쇄의 대략적인 길이는 211 내지 217 아미노산이다. 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 카파(κ)와 람다(λ)로 불리는 두 가지 구별되는 타입이 있다. 경쇄 아미노산 서열은 본 기술분야에 잘 알려져 있다. 경쇄는 인간 경쇄일 수 있다.

[0050] 항체의 가변 도메인 또는 가변 영역은 일반적으로 경쇄 또는 중쇄의 아미노-말단에 위치하며 길이가 중쇄에서는 약 120개 내지 130개 아미노산이고 경쇄에서는 약 100개 내지 110개 아미노산인 항체의 경쇄 또는 중쇄의 부분을 말하며, 각각의 특정 항체의 그의 특정 항원에 대한 결합 및 특이성에서 사용된다. 가변 도메인은 상이한 항체 간에 서열이 광범위하게 다르다. 서열의 변동성은 CDR에 집중되는 한편, 가변 도메인에서 덜 가변성인 부분은 골격 영역(FR)으로 불린다. 경쇄 및 중쇄의 CDR은 항체와 항원의 상호작용을 주로 책임진다. 본 명세서에서 사용되는 아미노산 위치의 넘버링은 Kabat *et al.* (1991) Sequences of proteins of immunological interest. (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.) 5th ed에서처럼, EU 인덱스를 따른다. 가변 영역은 인간 가변 영역일 수 있다.

[0051] CDR은 면역글로불린(Ig 또는 항체) VH β -시트 골격의 비-골격 영역 내의 3개의 초가변 영역(H1, H2 또는 H3) 중 하나, 또는 항체 VL β -시트 골격의 비-골격 영역 내의 3개의 초가변 영역(L1, L2 또는 L3) 중 하나를 말한다. 따라서, CDR은 골격 영역 서열 내에 산재된 가변 영역 서열이다. CDR 영역은 당업자에게 잘 알려져 있으며 예를 들어, 항체 가변(V) 도메인 내에서 가장 초가변성 영역으로서 카밧(Kabat)에 의해 정의되었다(Kabat *et al.*, *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616 (1977); Kabat, *Adv. Prot. Chem.* 32:1-75 (1978)). CDR 영역 서열은 또한 보존된 β -시트 골격의 일부가 아니며 따라서 상이한 형태를 취할 수 있는 잔기들로서 초티아(Chothia)에 의해 구조적으로 정의되었다(Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). 두 용어는 본 기술분야에서 잘 인식된다. 정규 항체 가변 도메인 내의 CDR의 위치는 많은 구조의 비교에 의해 결정되었다(Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); Morea *et al.*, *Methods* 20:267-279 (2000)). 초가변 영역 내의 잔기의 수는 상이한 항체에서 변하기 때문에, 정규 위치에 대하여 추가의 잔기는 정규 가변 도메인 넘버링 도식에서 잔기 번호에 이웃하여 a, b, c 등으로 통상적으로 넘버링된다(Al-Lazikani *et al.*, *supra*(1997)). 그러한 명명법은 유사하게 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0052] 예를 들어, 표준 명칭에 따라 정의된 CDR이 하기 표 1에 개시된다.

[0053]

표 1: CDR 정의

	예시적 (카밧 + 초티아)	IMGT	캬밧	AbM	초티아	접촉
V _H CDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	91-96	89-96

[0054]

[0055]

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

[0056]

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

[0057]

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

[0058]

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

[0059]

본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 핵산 분자와 관련하여 사용될 때 용어 "분리된"은 핵산 분자가 그 핵산 분자의 천연 공급원에 존재하는 다른 핵산 분자로부터 분리된 것임을 의미한다. 또한, cDNA 분자와 같은, "분리된" 핵산 분자는 재조합 기술에 의해 생산될 경우 다른 세포 물질 또는 배양 배지가 실질적

으로 없거나, 또는 화학적으로 합성될 경우 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다. 구체적 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체를 인코딩하는 핵산 분자(들)는 분리되거나 정제된다.

[0060] 본 명세서에서 사용될 때 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "결합하다" 또는 "결합하는"은 분자 간의 상호작용을 말한다. 상호작용은 예를 들어, 수소 결합, 이온 결합, 소수성 상호작용 및/또는 반 데르 발스 상호작용을 비롯한 비공유적 상호작용일 수 있다. 항체와, BTN1A1과 같은 타겟 분자의 단일 에피토프 사이의 전체적인 비공유적 상호작용의 강도는 그 에피토프에 대한 항체의 친화성이다. "결합 친화성"은 일반적으로 분자(예를 들어, 항체와 같은 결합 단백질)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너(예를 들어, 항원) 사이의 비공유적 상호작용의 총 합의 강도를 말한다.

[0061] 항체와 같은 결합 분자 X의 그의 결합 파트너 Y, 예를 들어, 항체의 짹 항원에 대한 친화성은 일반적으로 해리 상수(K_D)에 의해 나타낼 수 있다. 저친화성 항체는 일반적으로 항원에 느리게 결합하고 쉽게 해리하는 경향이 있는 반면, 고친화성 항체는 일반적으로 항원에 더 빠르게 결합하고 더 오래 결합된 채 남아 있는 경향이 있다. 결합 친화성을 측정하는 다양한 방법이 본 기술분야에 알려져 있으며, 그 중 어느 것이든 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. " K_D " 또는 " K_D 값"은 본 기술분야에 알려진 분석에 의해, 예를 들어, 결합 분석에 의해 측정될 수 있다. K_D 는 예를 들어, 관심 항체의 Fab 버전 및 그의 항원으로 수행되는, 방사성라벨링된 항원 결합 분석(RIA)에서 측정될 수 있다(Chen, et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881). K_D 또는 K_D 값은 또한 예를 들어, 비아코어(BIAcore)TM-2000 또는 비아코어TM-3000(비아코어, 인크(BIAcore, Inc.), 뉴저지주 퍼스카타웨이)를 이용하는 비아코어에 의한 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해, 또는 예를 들어, 옥텟(Octet)QK384 시스템(포르테바이오(ForteBio), 캘리포니아주 먼로 파크)을 이용한 생물층 간섭계법에 의해 측정될 수 있다.

[0062] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 만일 그러한 결합이 그의 짹 항원에 대한 항체의 특이성과 친화성을 나타낸다면, 분자는 제2 분자에 "면역특이적으로 결합"할 수 있는 것으로 얘기한다. 만일 그러한 결합이 항체의 항원 인식 부위에 관련된다면, 항체는 항원의 타겟 영역 또는 형태("에피토프")에 면역특이적으로 결합한다. 특정 항원에 면역특이적으로 결합하는 항체는, 만일 다른 항원이 예를 들어, 면역분석, 비아코어® 분석, 또는 본 기술분야에 알려진 다른 분석에 의해 결정할 때 항원 인식 부위에 의해 인식되는 일부 서열 또는 형태 유사성을 갖는다면, 더 낮은 친화성으로 다른 항원에 결합할 수 있다. 항체는 일반적으로 전적으로 무관한 항원에는 결합하지 않는다. 일부 항체(및 그들의 항원 결합 단편)는 다른 항원과 교차반응하지 않는다. 항체는 또한 Fc 영역과 같은, 항원 인식 부위에 관련되지 않는 항체의 다른 영역/도메인 내의 결합 도메인에 의해, FcR 수용체에와 같이, 면역특이적이지 않은 방식으로 다른 분자에 결합할 수 있다.

[0063] 당화 부위를 포함하는 항원 또는 항원의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편은 당화된 형태 또는 비당화된 형태 둘 모두의 항원 또는 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 항원 또는 에피토프에 비하여 당화된 항원 또는 에피토프에 우선적으로 결합한다. 우선적인 결합은 결합 친화성에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 비당화된 BTN1A1에 비하여 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 K_D 보다 적은 K_D 로 당화된 BTN1A1에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 K_D 보다 적은 K_D 로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 K_D 의 약 75%, 약 50%, 약 25%, 약 10%, 약 5%, 약 2.5%, 또는 약 1%인 K_D 로 당화된 BTN1A1에 결합한다.

[0064] 우선적인 결합은 또한 결합 분석에 의해 결정될 수 있으며 예를 들어, 형광 강도("MFI")에 의해 나타낼 수 있다. 예를 들어, 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI보다 높은 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI의 적어도 2배의 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI의 적어도 3배의 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI의 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 15배, 또는 적어도 20배의 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합한다.

[0065] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 분자는 항원 또는 에피토프, 또는 그의 특정 당화 부위의 당화를 "면역특이적으로 마스킹"한다고 하며, (1) 항원 또는 에피토프가 당화될 수 없도록, 비당화된 항원 또는 에피토프의 당화 부위를 차단하거나, 또는 (2) 당화된 항원 또는 에피토프에 또는 당화된 항원 또는 에피

토프의 특정 당화 부위에서 결합하고 당화에 의해 매개되는 다운스트림 시그널링과 같은 당화의 생리학적 효과를 방지하는 그의 능력을 말한다. 예를 들어, BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹하는 항체 또는 항원 결합 단편은 (1) 비당화된 BTN1A1의 당화 부위를 차단하고 그의 당화를 방지하거나 또는 (2) 당화된 BTN1A1에 결합하고 당화에 의해 매개되는 면역억제 효과와 같은 당화의 생리학적 효과를 방지하는 항체 또는 항원 결합 단편을 말한다. 다른 예로서, N55 및 N215에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹하는 항체 또는 항원 결합 단편은 (1) 비당화된 BTN1A1의 N55 및 N215를 차단하고 N55 및 N215의 당화를 방지하거나 또는 (2) N55 및 N215에서 당화된 BTN1A1에 결합하고 당화에 의해 매개되는 면역억제 효과와 같은 당화의 생리학적 효과를 방지하는 항체 또는 항원 결합 단편을 말한다.

[0066] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "담체"는 치료제가 함께 투여되는 희석제, 아쥬반트(예를 들어, 프로인트 아쥬반트(Freund's adjuvant)(완전 또는 불완전)), 부형제, 안정화제 또는 비히클을 말한다. "약학적 허용 담체"는 이용되는 투여량 및 농도에서 그에 노출된 세포 또는 포유동물에 비독성인 담체이며, 이것은 멸균 액체, 예를 들어, 물 및 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일, 예를 들어, 땅콩 오일, 대두 오일, 광유, 참기름 등일 수 있다.

[0067] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "벡터"는 숙주 세포 내로 핵산 분자를 도입하기 위해 사용되는 물질을 말한다. 사용하기 위해 적용가능한 벡터는 예를 들어, 발현 벡터, 플라스미드, 파아지 벡터, 바이러스 벡터, 에피좀 및 인공 염색체를 포함하며, 이는 숙주 세포의 염색체 내로의 안정한 통합을 위해 작동가능한 선택 서열 또는 마커를 포함할 수 있다. 부가적으로, 벡터는 하나 이상의 선택성 마커 유전자 및 적절한 발현 제어 서열을 포함할 수 있다. 포함될 수 있는 선택성 마커 유전자는 예를 들어, 항생제 또는 독소에 대한 저항성을 제공하거나, 영양요구성 결핍을 보충하거나, 또는 배양 배지에 없는 중요 영양소를 공급한다. 발현 제어 서열은 구성적 및 유도성 프로모터, 전사 인핸서, 전사 종결자 및 본 기술분야에 잘 알려진 다른 것들을 포함할 수 있다. 둘 이상의 핵산 분자가 공동발현되는 경우(예를 들어, 항체 중쇄 및 경쇄 둘 모두), 두 핵산 모두가 예를 들어, 하나의 발현 벡터내로 또는 별도의 발현 벡터내로 삽입될 수 있다. 단일 벡터 발현의 경우, 인코딩 핵산은 하나의 공통 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결되거나 하나의 유도성 프로모터와 하나의 구성적 프로모터와 같은 상이한 발현 제어 서열에 연결될 수 있다. 숙주 세포 내로 핵산 분자의 도입은 본 기술분야에 잘 알려진 방법을 이용하여 확인될 수 있다. 그러한 방법은 예를 들어, 노던 블로트(Northern blot) 또는 mRNA의 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 증폭, 또는 유전자 산물의 발현에 대한 면역블로팅, 또는 도입된 핵산 서열 또는 그의 상응하는 유전자 산물의 발현을 시험하기 위한 다른 적합한 분석 방법과 같은 핵산 분석을 포함한다. 당업자는 핵산 분자가 원하는 산물(예를 들어, 본 발명에서 제공되는 항-BTN1A1 항체)을 생산하기에 충분한 양으로 발현됨을 이해하며, 발현 수준이 본 기술분야에 잘 알려진 방법을 이용하여 충분한 발현을 수득하기 위하여 최적화될 수 있음이 추가로 이해된다.

[0068] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "숙주 세포"는 핵산 분자로 형질감염된 구체적 대상 세포 및 그러한 세포의 후손 또는 잠재적 후손을 말한다. 그러한 세포의 후손은 후속 세대에서 발생할 수 있는 돌연변이 또는 환경적 영향 또는 숙주 세포 계놈 내로의 핵산 분자의 통합으로 인해, 핵산 분자로 형질감염된 모 세포와 동일하지 않을 수 있다.

[0069] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "개체"는 치료, 관찰 및/또는 실험의 대상인 동물을 말한다. "동물"은 척추동물 및 무척추동물, 예를 들어, 어류, 조개류, 과충류, 조류 및 특히 포유동물을 포함한다. "포유동물"은 마우스, 래트, 토끼, 기니피그, 개, 고양이, 양, 염소, 소, 말, 영장류, 예를 들어, 원숭이, 침팬지, 유인원 및 인간을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0070] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "암" 또는 "암의"는 조절되지 않은 세포 성장을 전형적인 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학적 병태를 말한다. 암의 예는 혈액암 및 고형 종양을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0071] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "치료하다", "치료하는", "치료"는 암 환자와 관련하여 사용될 경우, 암의 심각성을 감소시키거나, 암의 진행을 지연하거나 늦추는 작용을 말하며, (a) 암 성장의 억제, 또는 암 발생의 중지, 및 (b) 암의 퇴행의 야기, 또는 암의 존재와 연합된 하나 이상의 증상의 지연 또는 최소화를 포함한다.

[0072] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "치료적 유효량"은 주어진 질병, 질환 또는 병태, 및/또는 그에 관련된 증상의 심각성 및/또는 기간을 감소 및/또는 완화하기 위해 충분한 작용제(예를 들어, 본 명세서에 개시된 항체 또는 본 명세서에 개시된 임의의 다른 작용제)의 양을 말한다. 치료제를 비롯한

작용제의 치료적 유효량은 (i) 주어진 질병, 질환 또는 병태의 진행 또는 진전의 감소 또는 완화, (ii) 주어진 질병, 질환 또는 병태의 재발, 발생 또는 개시의 감소 또는 완화, 및/또는 (iii) 다른 치료법(예를 들어, 본 발명에서 제공되는 항체의 투여 외의 다른 치료법)의 예방 또는 치료 효과의 개선 또는 향상을 위해 필요한 양일 수 있다. 본 발명의 물질/분자/작용제(예를 들어, 항-BTN1A1 항체)의 치료적 유효량은 개인의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 물질/분자/작용제가 개인에서 원하는 반응을 유발하는 능력과 같은 인자에 따라 변할 수 있다. 치료적 유효량은 물질/분자/작용제의 임의의 독성 또는 해로운 효과를 치료적으로 유익한 효과가 초과하는 양을 포함한다.

[0073] 본 명세서에서 사용될 때, 그리고 달리 특정되지 않으면, 용어 "투여하다" 또는 "투여"는 점막, 피부내, 정맥내, 근육내 전달 및/또는 본 명세서에 개시되거나 본 기술분야에 알려진 임의의 다른 물리적 전달 방법에 의해서와 같이, 신체 밖에 존재하는 물질을 환자 내로 주사하거나 달리 물리적으로 전달하는 행위를 말한다. 질병, 질환 또는 병태 또는 그의 증상이 치료되고 있는 경우, 물질의 투여는 전형적으로 질병, 질환 또는 병태 또는 그의 증상의 개시 후에 발생한다. 질병, 질환 또는 병태 또는 그의 증상이 예방되는 경우, 물질의 투여는 전형적으로 질병, 질환 또는 병태 또는 그의 증상의 개시 전에 발생한다.

5.2 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자

[0075] 본 발명은 항-BTN1A1 항체를 비롯한, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 제공한다. 일부 실시형태에서, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편은 BTN1A1의 단편 또는 에피토프에 결합한다. 일부 실시형태에서, BTN1A1 에피토프는 선형 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, BTN1A1 에피토프는 구조적(conformation) 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 발명에서 제공되는 분자는 BTN1A1의 면역 억제 기능을 억제한다.

[0076] N-당화는 소포체(ER)에서 시작되고 골지체에서 후속하여 프로세싱되는 변역후 변형이다(Schwarz and Aebi, *Curr. Opin. Struc. Bio.*, 21(5): 576-582 (2011)). 이 타입의 변형은 먼저 NXT 모티프(-Asn-X-Ser/Thr-) 내에 위치한 아스파라긴(Asn) 측쇄 수용체에 올리고당으로 구성된 미리형성된 글리칸을 전달하는 막-연합 올리고사카릴 트랜스퍼라제(OST) 복합체에 의해 촉매된다(Cheung and Reithmeier, *Methods*, 41: 451-459 (2007); Helenius and Aebi, *Science*, 291(5512): 2364-9(2001)). 미리형성된 글리칸으로부터의 당의 추가 또는 제거는 세포- 및 위치-의존 방식으로 N-당화 캐스케이드를 엄격하게 조절하는 글리코트랜스퍼라제 및 글리코시다제 그룹에 의해 각각 매개된다.

[0077] 일부 실시형태에서, 분자는 BTN1A1의 하나 이상의 당화 모티프에 선택적으로 결합하는 항원 결합 단편을 갖는다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 당화 모티프와 인접 펩티드를 가진 당펩티드에 면역특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 삼차원에서 당화 모티프 중 하나 이상 근처에 위치한 펩티드 서열에 면역특이적으로 결합한다.

[0078] 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화 BTN1A1에 대해 나타낸 Kd의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%보다 적은 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화 BTN1A1에 대해 나타낸 Kd의 50% 보다 적은 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화 BTN1A1에 대해 나타낸 Kd의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50% 보다 적은 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 추가 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화 BTN1A1에 대해 나타낸 Kd보다 적어도 10배 적은 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다.

[0079] 구체적 BTN1A1 이소타입 또는 변이체의 특이적 당화 부위는 그 구체적 BTN1A1 이소타입 또는 변이체의 위치 55, 215 또는 449에서의 아미노산으로부터 변할 수 있다. 그러한 환경에서, 당업자는 서열 배열 및 본 기술분야에서의 다른 상식에 기초하여 상기에 예시된 인간 BTN1A1의 N55, N215, 및 N449에 대응하는 임의의 구체적 BTN1A1 이소타입 또는 변이체의 당화 부위를 결정할 수 있을 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 비당화된 BTN1A1 이소타입 또는 변이체에 비하여 BTN1A1 이소타입 또는 변이체의 당화된 형태에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 갖는 분자를 제공한다. BTN1A1 이소타입 또는 변이체의 당화된 부위는 상기에 제공된 인간 BTN1A1 서열의 N55, N215, 및 N449의 상응하는 부위일 수 있다.

[0080] 일부 실시형태에서, 분자는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 갖는다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215, 및/또는 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치

N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 하나 이상의 당화 모티프에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다.

[0081] 일부 실시형태에서, 분자는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가지며, 이때 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55, N215, 및/또는 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N215에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 하나 이상의 당화 모티프에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55 및 N215에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55 및 N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55, N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다.

[0082] 우선적 결합은 결합 친화성에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd보다 적은 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd의 절반보다 적은 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd의 약 75%인 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd의 약 50%인 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd의 약 25%인 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd의 약 10%인 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd의 약 5%인 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd의 약 2.5%인 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd의 약 1%인 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다.

[0083] 우선적 결합은 또한 예를 들어, 형광 강도("MFI")에 의해 나타내지는 결합 분석에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI보다 높은 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI의 적어도 2배의 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI의 적어도 3배의 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI의 적어도 5배의 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI의 적어도 10배의 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI의 적어도 15배의 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI의 적어도 20배의 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합한다.

[0084] 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215, 및/또는 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N215에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215 및 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215 및 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다.

[0085]

5.2.1. 항원 결합 단편을 가진 항체 및 다른 분자

[0086]

일부 실시형태에서, 항-BTN1A1 항체 또는 항-당화된 BTN1A1 항체는 IgG, IgM, IgA, IgD, 또는 IgE일 수 있다. 항-BTN1A1 항체 또는 항-당화된 BTN1A1 항체는 또한 키메라 항체, 친화성 성숙된 항체, 인간화 항체, 또는 인간 항체일 수 있다. 항-BTN1A1 항체 또는 항-당화된 BTN1A1 항체는 또한 낙타화 항체, 인트라바디, 항-이디오타입(항-Id) 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항-BTN1A1 항체 또는 항-당화된 BTN1A1 항체는 다클론 항체 또는 단클론 항체일 수 있다.

[0087]

항체는 조류 및 포유동물을 비롯한 임의의 동물 공급원으로부터 생산될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체는 양, 쥐(예를 들어, 마우스 및 래트), 토끼, 염소, 기니피그, 낙타, 말, 또는 닭 유래이다. 또한, 더 새로운 기술은 인간 조합 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 개발하고 스크리닝하는 것을 허용한다. 예를 들어, 박테리오파아지 항체 발현 기술은 그 전체가 참고로 본원에 포함되는 미국 특허 6,946,546호에 개시된 대로, 동물 면역화의 부재하에서 특이적 항체가 생산되도록 한다. 이들 기술은 Marks (1992); Stemmer (1994); Gram *et al.* (1992); Barbas *et al.* (1994); 및 Schier *et al.* (1996)에서 추가로 개시되며, 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0088]

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

[0089]

항-BTN1A1 항체 또는 항-당화된 BTN1A1 항체를 비롯한, BTN1A1 또는 특이적으로 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자는 또한 폴리펩티드의 생산을 위해 유용한 본 기술분야에 알려진 임의의 방법, 예를 들어, 인 비트로 합성, 재조합 DNA 생산 등에 의해 생산될 수 있다. 인간화 항체는 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 수 있다. 본 명세서에 개시된 항체는 또한 재조합 면역글로불린 발현 기술을 이용하여 생산될 수 있다. 인간화 항체를 비롯한 면역글로불린 분자의 재조합 생산은 미국 특허 4,816,397호(Boss *et al.*), 미국 특허 6,331,415호 및 4,816,567호(둘 모두 Cabilly *et al.*), 영국 특허 GB 2,188,638호(Winter *et al.*), 및 영국 특허 GB 2,209,757호에 개시되며; 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 인간화 면역글로불린을 비롯한 면역글로불린의 재조합 발현을 위한 기술은 또한 Goeddel *et al.*, Gene Expression Technology Methods in Enzymology Vol. 185 Academic Press (1991), 및 Borreback, Antibody Engineering, W. H. Freeman (1992)에서 찾을 수 있으며; 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 재조합 항체의 생성, 디자인 및 발현에 관한 추가 정보는 Mayforth, Designing Antibodies, Academic Press, San Diego (1993)에서 찾을 수 있다.

[0090]

일부 실시형태에서, 항-BTN1A1 항체 또는 항-당화된 BTN1A1 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 인간 면역글로불린 서열로부터 유도된 항체 라이브러리를 이용하는 상술한 파아지 디스플레이 방법을 비롯한 본 기술분야에 알려진 다양한 방법에 의해 만들어질 수 있다(미국 특허 4,444,887호 및 4,716,111호; 및 국제 공개WO 98/46645호, WO 98/50433호, WO 98/24893호, WO 98/16654호, WO 96/34096호, WO 96/33735호, 및 WO 91/10741호를 참고한다). 인간 항체는 기능적인 내인성 면역글로불린을 발현할 수 없으나 인간 면역글로불린 유전자를 발현할 수 있는 트랜스제닉 마우스를 이용하여 생산될 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자 복합체가 무작위로 또는 상동성 재조합에 의해 마우스 배아 줄기 세포내로 도입될 수 있다. 대안적으로, 인간 가변 영역, 불변 영역 및 다양성 영역이 인간 중쇄 및 경쇄 유전자에 더하여 마우스 배아 줄기 세포내로 도입될 수 있다. 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자는 상동성 재조합에 의한 인간 면역글로불린 유전자좌의 도입과 별도로 또는 동시에 비기능적으로 만들어질 수 있다. 구체적으로, JH 영역의 동형접합성 결실은 내인성 항체 생산을 방지한다. 변형된 배아 줄기 세포는 확장되고 배반포 내로 미세주입되어 키메라 마우스를 생성한다. 그 후 키메라 마우스가 사육되어 인간 항체를 발현하는 동형접합성 자손을 생산한다. 트랜스제닉 마우스는 선택된 항원, 예를 들어, BTN1A1 폴리펩티드, 또는 당화된 BTN1A1 폴리펩티드의 전부 또는 일부를 이용하는 종래의 방법을 이용하여 면역된다. 항원에 대해 유도된 단클론 항체는 종래의 하이브리도마 기술을 이용하여 면역된 트랜스

제닉 마우스로부터 수득될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 5,916,771호를 참고한다). 트랜스제닉 마우스에 의해 보유된 인간 면역글로불린 트랜스유전자는 B 세포 분화 동안 재배열하고, 이어서 클래스 스위칭 및 체세포 돌연변이를 일으킨다. 따라서, 그러한 기술을 이용하여, 치료적으로 유용한 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체가 생산될 수 있다. 인간 항체를 생산하기 위한 이 기술의 개요를 위해, Lonberg and Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93, 그 전체가 참고로 본원에 포함됨)를 참고한다. 인간 항체 및 인간 단클론 항체를 생산하기 위한 이 기술 및 그러한 항체를 생산하기 위한 프로토콜의 상세한 토의를 위해서는, 예를 들어, 국제 공개 WO 98/24893 호, WO 96/34096호, 및 WO 96/33735호; 및 미국 특허 5,413,923호, 5,625,126호, 5,633,425호, 5,569,825호, 5,661,016호, 5,545,806호, 5,814,318호, 및 5,939,598호를 참고하며, 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 또한, 아브게닉스, 인크.(Abgenix, Inc.)(캘리포니아주 프리몬트) 및 메다렉스(Medarex)(뉴저지주 프린스턴)와 같은 회사들이 상술한 것과 유사한 기술을 이용하여 선택된 항원에 대해 유도된 인간 항체를 제공하는데 관련될 수 있다.

[0091] 일부 실시형태에서, 항-BTN1A1 항체 또는 항-당화된 BTN1A1 항체는 키메라 항체, 예를 들어, 이종성 비인간, 인간 또는 인간화 서열(예를 들어, 골격 및/또는 불변 도메인 서열)에 그래프팅된 비인간 공여체로부터의 항원 결합 서열을 가진 항체이다. 일 실시형태에서, 비인간 공여체는 래트이다. 일 실시형태에서, 항원 결합 서열은 합성이며, 예를 들어, 돌연변이유발에 의해 수득된다(예를 들어, 인간 파아지 라이브러리의 파아지 디스플레이 스크리닝, 등). 일 실시형태에서, 키메라 항체는 마우스 V 영역과 인간 C 영역을 가질 수 있다. 일 실시형태에서, 마우스 경쇄 V 영역은 인간 카파 경쇄에 융합된다. 일 실시형태에서, 마우스 중쇄 V 영역은 인간 IgG1 C 영역에 융합된다.

[0092] 키메라 항체를 생산하는 방법은 본 기술분야에 알려져 있다. 예를 들어, Morrison, 1985, *Science* 229:1202; Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques* 4:214; Gillies *et al.*, 1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; 및 미국 특허 6,311,415호, 5,807,715호, 4,816,567호, 및 4,816,397호를 참고하며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 비인간 종으로부터의 하나 이상의 CDR 및 인간 면역글로불린 분자로부터의 골격 영역을 포함하는 키메라 항체는 예를 들어, CDR-그래프팅(EP 239,400호; 국제 공개 WO 91/09967호; 및 미국 특허 5,225,539호, 5,530,101호, 및 5,585,089호), 베니어링(veneering) 또는 리설피싱(resurfacing)(EP 592,106호; EP 519,596호; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7:805; 및 Roguska *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969), 및 쇄 셔플링(chain shuffling)(미국 특허 5,565,332호)를 비롯하여 본 기술분야에 알려진 다양한 기술을 이용하여 생산될 수 있으며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0093] 재조합 키메라 항-BTN1A1 항체의 생산을 위한 예시적인 방법은 하기를 포함할 수 있다: a) 종래의 분자생물학 방법에 의해, 마우스 항-BTN1A1(또는 항-당화된 BTN1A1) 단클론 항체의 CDR 및 가변 영역이 인간 면역글로불린으로부터 유도된 Fc 영역에 융합된 항체 중쇄를 인코딩하고 발현하는 발현 벡터를 제작하여, 키메라 항체 중쇄의 발현을 위한 벡터를 생산하고; b) 종래의 분자생물학 방법에 의해, 마우스 항-BTN1A1(또는 항-당화된 BTN1A1) 단클론 항체의 항체 경쇄를 인코딩하고 발현하는 발현 벡터를 제작하여, 키메라 항체 경쇄의 발현을 위한 벡터를 생산하고; c) 종래의 분자 생물학 방법에 의해 숙주 세포에 발현 벡터를 전달하여 키메라 항체의 발현을 위한 형질감염된 숙주 세포를 생산하고; 그리고 d) 종래의 세포 배양 기술에 의해 형질감염된 세포를 배양하여 키메라 항체를 생산하기.

[0094] 재조합 인간화 항-BTN1A1 항체의 생산을 위한 예시적인 방법은 하기를 포함할 수 있다: a) 종래의 분자 생물학 방법에 의해, CDR 및 공여체 항체 결합 특이성을 보유하기 위해 필요한 가변 영역 골격의 최소 부분이 마우스 항-BTN1A1 (또는 항-당화된 BTN1A1) 단클론 항체와 같은 비인간 면역글로불린으로부터 유도되고 항체의 나머지는 인간 면역글로불린으로부터 유도되는 항체 중쇄를 인코딩하고 발현하는 발현 벡터를 제작하여, 인간화 항체 중쇄의 발현을 위한 벡터를 생산하고; b) 종래의 분자 생물학 방법에 의해, CDR 및 공여체 항체 결합 특이성을 보유하기 위해 필요한 가변 영역 골격의 최소 부분이 마우스 항-BTN1A1 (또는 항-당화된 BTN1A1) 단클론 항체와 같은 비인간 면역글로불린으로부터 유도되고 항체의 나머지는 인간 면역글로불린으로부터 유도되는 항체 경쇄를 인코딩하고 발현하는 발현 벡터를 제작하여, 인간화 항체 경쇄의 발현을 위한 벡터를 생산하고; c) 종래의 분자 생물학 방법에 의해 숙주 세포에 발현 벡터를 전달하여 인간화 항체의 발현을 위한 형질감염된 숙주 세포를 생산하고; 그리고 d) 종래의 세포 배양 기술에 의해 형질감염된 세포를 배양하여 인간화 항체를 생산하기.

[0095] 예시적인 방법과 관련하여, 숙주 세포는 상이한 선택성 마커를 함유할 수 있지만, 중쇄 및 경쇄 코딩 서열을 제외하고는 바람직하게는 동일한 그러한 발현 벡터로 공동형질감염될 수 있다. 이 절차는 중쇄와 경쇄 폴리펩티드의 동일한 발현을 제공한다. 대안적으로, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 둘 모두를 인코딩하는 단일 벡터가 이용될

수 있다. 중쇄 및 경쇄를 위한 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA 또는 둘 모두를 포함할 수 있다. 재조합 항체를 발현하기 위해 사용되는 숙주 세포는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)와 같은 세균 세포, 또는 더욱 바람직하게는 진핵 세포(예를 들어, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 HEK-293 세포)일 수 있다. 발현 벡터의 선택은 숙주 세포의 선택에 의존하며, 선택된 숙주 세포에서 원하는 발현 및 조절 특징을 갖기 위하여 선택될 수 있다. 사용될 수 있는 다른 세포주는 CHO-K1, NSO, 및 PER.C6(크루셀(Cruce11), 네델란드 레이덴)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한, 코돈 용법은 숙주 세포가 종 특이적 코돈 용법 편향(codon usage bias)을 책임지며 단백질 발현을 향상시키도록 선택될 때 최적화될 수 있다. 예를 들어, CHO 세포 발현을 위해 항체를 인코딩하는 DNA는 크리세투루스 그리세우스(*Cricetulus griseus*)(이로부터 중국 햄스터 난소 세포가 유도됨)에 의해 우선적으로 사용되는 코돈을 포함할 수 있다. 코돈 최적화 방법은 원하는 숙주 세포에 의한 개선된 발현을 촉진하기 위하여 이용될 수 있다(예를 들어, Wohlgemuth, I. et al., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 366(1580):2979-2986 (2011); Jestin, J. L. et al., *J. Mol. Evol.* 69(5):452-457 (2009); Bollenbach, T. et al., *Genome Res.* 17(4):401-404(2007); Kurland, C. G. et al., *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 31:191-219 (1984); Grosjean, H. et al., *Gene* 18(3): 199-209(1982)를 참고한다).

[0096]

일부 실시형태에서, 항-BTN1A1 항체 또는 항-당화된 BTN1A1 항체는 단클론 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항-BTN1A1 항체 또는 항-당화된 BTN1A1 항체는 다클론 항체일 수 있다. 동물은 BTN1A1 폴리펩티드 또는 당화된 BTN1A1 폴리펩티드에 대해 특이적인 항체를 생산하기 위하여 BTN1A1 폴리펩티드 또는 당화된 BTN1A1 폴리펩티드와 같은 항원으로 접종될 수 있다. 종종 항원은 면역 반응을 향상시키기 위하여 다른 분자에 결합되거나 접합된다. 접합체는 동물에서 면역 반응을 유발하기 위하여 이용되는 항원에 결합된 임의의 웨티드, 폴리펩티드, 단백질, 또는 비단백질성 물질일 수 있다. 항원 접종에 대한 반응으로 동물에서 생산된 항체는 다양한 개별 항체 생산 B 림프구로부터 만들어진 다양한 비동일 분자(다클론 항체)를 갖는다. 동물에서의 다클론 항체 생산을 위한 정확한 조건을 고려할 때, 동물 혈청 내의 항체 대부분은 그 동물이 면역된 항원성 화합물 상의 접합적 에피토프를 인식한다.

[0097]

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

[0098]

하이브리도마 기술은 앞서 BTN1A1 폴리펩티드 또는 당화된 BTN1A1 폴리펩티드로 면역된 마우스로부터의 단일 B 림프구를 불멸 골수종 세포(대개 마우스 골수종)와 융합시키는 것에 관련된다. 이 기술은 단일 항체-생산 세포를 무한한 수의 세대동안 증식시켜, 동일한 항원 또는 에피토프 특이성을 가진 구조적으로 동일한 항체(단클론 항체)의 무한한 양이 생산될 수 있도록 하는 방법을 제공한다.

[0099]

일 실시형태에서, 항체는 낙타 항체로부터, 바람직하게는 V_{H} 도메인 서열 또는 나노바디(Nanobodies)TM로 알려진, 경쇄가 없는 중쇄 낙타 항체로부터 유도된 면역글로불린 단일 가변 도메인이다. 나노바디TM(Nb)는 자연 발생 단일쇄 항체의 최소의 기능성 단편 또는 단일 가변 도메인(V_{H})이며 당업자에게 알려져 있다. 그들은 낙타에서 나타나는 중쇄 단독 항체로부터 유도된다(Hamers-Casterman et al., *Nature*, 363(6428):446-8 (1993); Desmyter et al., *Nat Struct Biol.*, 3(9):803-11. (1996)). "낙타과"에서는, 경쇄 폴리펩티드가 없는 면역글로불린이 발견된다. "낙타과"는 구세계 낙타(카멜루스 박트리아누스(*Camelus bactrianus*) 및 카멜루스 드로메디리우스(*Camelus dromedarius*)) 및 신세계 낙타(예를 들어, 라마 파코스(*Lama paccos*), 라마 글라마(*Lama glama*), 라마 구아니코(*Lama guanicoe*) 및 라마 비쿠그나(*Lama vicugna*))를 포함한다. 단일 가변 도메인 중쇄 항체는 본 명세서에서 나노바디TM 또는 V_{H} 항체로 표시된다. Nb의 작은 크기와 독특한 생물물리학적 특성은 흔하지 않은 또는 숨겨진 에피토프의 인식에 대해 그리고 단백질 타겟의 캐비티 또는 활성 부위내로의 결합에 대해 종래의 항체 단편을 능가한다. 또한, Nb는 다중-특이적이고 다가의 항체로서, 리포터 분자에 부착되어, 또는 인간화되도록 설계될 수 있다. Nb는 안정하고, 위장계에서 생존하며 쉽게 제조될 수 있다.

[0100]

상이한 특이성의 두 가지 항원 결합 부위를 단일 구조체내로 단일화하면, 이중특이적 항체가 정교한 특이성을 가지고 두 가지 다른 항원을 합치는 능력을 가져서 치료제로서 큰 잠재력을 갖는다. 이중특이적 항체는 각각이 상이한 면역글로불린을 생산할 수 있는 두 하이브리도마를 융합시켜 제조될 수 있다. 이중특이적 항체는 또한

전체 면역글로불린에 존재하는 Fc 부분을 생략하는 한편 두 개의 scFv 항체 단편을 연결하여 생산될 수 있다. 그러한 구조체 내의 각각의 scFv 단위는 합성 폴리펩티드 링커를 통해 서로 연결된, 항체 중쇄(VH) 및 경쇄(VL) 각각으로부터의 하나의 가변 도메인으로 이루어질 수 있으며, 링커는 종종 단백질분해에 대해 최대한 저항성인 한편 최소로 면역원성이도록 하기 위하여 유전적으로 조작된다. 각각의 scFv 단위는 두 scFv 단위를 가교시키는 짧은(보통 10개 아미노산 미만) 폴리펩티드 스페이서를 포함시키는 것을 비롯한 많은 기술에 의해 연결되어 이 중특이적 단일체 항체를 생성할 수 있다. 생성된 이중특이적 단일체 항체는 따라서 단일 폴리펩티드 상에 상이한 특이성의 두 가지의 VH/VL 쌍을 함유한 종이며, 이때 각각의 scFv 단위 내의 VH 및 VL 도메인은 이들 두 도메인 간의 분자내 연합을 허용하기에 충분히 긴 폴리펩티드 링커에 의해 분리되며, 그렇게 형성된 scFv 단위는 예를 들어, 하나의 scFv 단위의 VH 도메인과 또 다른 scFv 단위의 VL 도메인 간의 원치않는 연합을 방지하기에 충분히 짧게 유지되는 폴리펩티드 스페이서를 통해 서로에게 인접하여 연결된다.

[0101]

BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자의 예는 (i) VL, VH, CL, 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 "Fd" 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 "Fv" 단편; (iv) VH 도메인으로 이루어진 "dAb" 단편; (v) 분리된 CDR 영역; (vi) 두 개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')2 단편; (vii) VH 도메인과 VL 도메인이 두 도메인이 연합하여 결합 도메인을 형성하는 것을 허용하는 웨პ티드 링커에 의해 연결되는 단일체 Fv 분자("scFv"); (viii) 2-특이적 단일체 Fv 이량체(미국 특허 5,091,513호 참고); 및 (ix) 유전자 융합에 의해 제작된 다가 또는 다중특이적 단편인 디아바디(미국 특허 출원 공개 20050214860호)를 제한없이 포함한다. Fv, scFv, 또는 디아바디 분자는 VH 및 VL 도메인을 연결하는 다이설파이드 가교의 포함에 의해 안정화될 수 있다. CH3 도메인에 연결된 scFv를 가진 미니바디 또한 만들어질 수 있다(Hu *et al.*, *Cancer Res.*, 56(13):3055-61(1996)).

[0102]

항체-유사 결합 웨პ티드모방체(peptidomimetics)가 또한 실시형태에서 고려된다. Murali *et al.*, *Cell Mol. Biol.*, 49 (2):209-216 (2003)는 "항체 유사 결합 웨პ티드모방체"(ABiP)를 개시하며, 이것은 삭감된(pared-down) 항체로서 작용하며 덜 성가신 합성 방법뿐만 아니라 더 긴 혈청 반감기의 소정의 이점을 가진 웨პ티드이며, 상기 문헌은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0103]

5.2.2. 항- BTN1A1 항체

[0104]

BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 총 68개의 마우스 단클론 항체를 클로닝하고 특성을 규명하였다(하기 표 4). 예를 들어, STC810으로 표시된 항체(STC838로도 불림)는 높은 친화성을 가진 당화 특이적 결합을 보여주었다(STC810과 hBTN1A1-Fc 사이의 KD는 비아코어에 의해 1.81 nM로 그리고 옥테트에 의해 2.12 nm로 결정되었다). 하기와 상세히 개시되는 것처럼, 단클론 항-BTN1A1 항체, 예를 들어, STC810의 처리는 암세포의 T-세포 의존성 어പ토시스를 향상시켰고, 암세포의 증식을 억제하였으며, 또한 리소좀으로의 BTN1A1의 당화 의존적 내부화를 야기하였다. STC810의 에피토프가 또한 본 발명에서 제공된다. 따라서, 본 발명은 특정 서열 특징을 가진 항-BTN1A1 항체, 특정 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항-BTN1A1 항체, 및 암치료에서 그의 용도를 제공한다.

[0105]

일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-BTN1A1 항체는 본 명세서에 개시된 단클론 항체 STC810 또는 그의 인간화 변이체의 VH 도메인, VL 도메인, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및/또는 VL CDR3을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-BTN1A1 항체는 인간 생식세포 면역글로불린 아미노산 서열 또는 그의 변이체의 VH FR1, VH FR2, VH FR3, VH FR4, VL FR1, VL FR2, VL FR3, 및/또는 VL FR4를 추가로 포함할 수 있다.

[0106]

일부 실시형태에서, 항-BTN1A1 항체는 6개 미만의 CDR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및/또는 VL CDR3으로 이루어진 군으로부터 선택된 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 CDR을 포함하거나 이로 이루어진다. 구체적 실시형태에서, 항체는 본 명세서에 개시된 단클론 항체 STC810 또는 그의 인간화 변이체의 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및/또는 VL CDR3으로 이루어진 군으로부터 선택된 1, 2, 3, 4, 또는 5개 CDR을 포함하거나 이로 이루어진다. 구체적 실시형태에서, 항체는 인간 생식세포 면역글로불린 아미노산 서열 또는 그의 변이체의 VH FR1, VH FR2, VH FR3, VH FR4, VL FR1, VL FR2, VL FR3, 및/또는 VL FR4를 추가로 포함한다.

[0107]

구체적 실시형태에서, 항체는 인간화 항체, 단클론 항체, 재조합 항체, 항원 결합 단편 또는 그의 임의의 조합이다. 특정 실시형태에서, 항체는 인간화 단클론 항체, 또는 그의 항원 결합 단편이다.

[0108]

일부 실시형태에서, 본 발명은 (i) 본 발명에서 제공되는 항-BTN1A1 항체가 BTN1A1 폴리펩티드(예를 들어, 세포 표면-발현된 또는 가용성 BTN1A1), BTN1A1 단편, 또는 BTN1A1 에피토프에 결합하는 것을 (예를 들어, 용량-의존

방식으로) 경쟁적으로 차단하거나, 및/또는 (ii) 본 발명에서 제공되는 항-BTN1A1 항체(예를 들어, 인간화 항-BTN1A1 항체)에 의해 결합되는 BTN1A1 에피토프에 결합하는, 인간화 항체를 비롯한 항체를 제공한다. 다른 실시 형태에서, 항체는 본 명세서에 개시된 단클론 항체 STC810 또는 그의 인간화 변이체가 BTN1A1 폴리펩티드(예를 들어, 세포 표면-발현된 또는 가용성 BTN1A1), BTN1A1 단편, 또는 BTN1A1 에피토프에 결합하는 것을 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단한다. 다른 실시형태에서, 항체는 본 명세서에 개시된 단클론 항체 BTN1A1 또는 그의 인간화 변이체(예를 들어, 인간화 항-BTN1A1 항체)에 의해 결합되는(예를 들어, 인식되는) BTN1A1 에피토프에 결합한다.

[0109] 표 2a: 마우스 단클론 항-인간 BTN1A1 항체 STC810의 중쇄 가변(VH) 영역 및 경쇄 가변(VL) 영역의 서열

	DNA 서열	단백질 서열
중쇄	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTG AGCTGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTGA AGATATCCTGCAAGGCTCTGGATACAC ATTCACTCACTACAACATGGACTGGGTG AAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAA TGGATTGGATATATTATCCTCCAATG GTGGTACTGGCTACAAACCAGAAATTCAA GAGCAGGGCCACATTGACTGTAGACAA GTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAACTC CACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAG TCTATTACTGTGCAAGAGGGGCCTATCA CTACGGTAGTTCTACGCCTACTGGTAC TTCGATGTCTGGGCGCAGGGACACCG GTCACCGTCTCCTCA (서열 번호 4)	EVQLQQSGPELVKPGASVKIS CKASGYTFTHYNMDWVKQS HGKSLEWIGYIYPSNGGTGY NQKFKSRATLTVDKSSSTAY MELHSLTSEDSA VYYCARGA YHYGSSYAYWYFDVWGAGT TVTVSS (서열 번호 3)
카파 경쇄	GATATCCAGATGACACAGACTACATCCT CCCTGTCTGCCTCTGGGAGACAGAGT CACCATCAGTTGCAGTGCAAGTCAGGAC ATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGC AGAAACCAAGATGAAACTGTTAAACTCCT GATCTCTTACACATCAAGTTACACTCA GGAGTCCCACATCAAGATTCAAGTGGCAGTG GGTCTGGGACAGATTATTCTCTCACCAT CAGCAACCTGGCACCTGAAGATATTGCC ACTTACTATTGTCAGCAGTCTAGTAAGC TTCCATTACGTTGGCTCGGGACAGA GTTGGAAATAAACGGGCT (서열 번호 6)	DIQMTQTTSSLSASLGDRV SCSASQDISNYLNWYQQKPD ETVKLLISYTSSLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLAPEDIAT YYCQQSSKLPFTFGSGTELEI KRA (서열 번호 5)

[0110]

[0111] 표 2b: 마우스 단클론 항-인간 BTN1A1 항체 STC810의 CDR 서열

	영역 정의	CDR1	CDR2	CDR3
중쇄	초티아	(서열 번호 7) GYTFTHY	(서열 번호 8) YPSNGG	(서열 번호 9) GAYHYGSSYAYW YFDV
	AbM	(서열 번호 10) GYTFTHYNMD	(서열 번호 11) YIYPSNGGTG	(서열 번호 12) GAYHYGSSYAYW YFDV
	카밧	(서열 번호 13) HYNMD	(서열 번호 14) YIYPSNGGTGYNQ KFKS	(서열 번호 15) GAYHYGSSYAYW YFDV
	접촉	(서열 번호 16) THYNMD	(서열 번호 17) WIGYIYPSNGGTG	(서열 번호 18) ARGAYHYGSSYA
카파 경쇄	초티아	(서열 번호 19) SASQDISNYLN	(서열 번호 20) YTSSLHS	(서열 번호 21) QQSSKLPFT
	AbM	(서열 번호 22) SASQDISNYLN	(서열 번호 23) YTSSLHS	(서열 번호 24) QQSSKLPFT
	카밧	(서열 번호 25) SASQDISNYLN	(서열 번호 26) YTSSLHS	(서열 번호 27) QQSSKLPFT
	접촉	(서열 번호 28) SNYLNWY	(서열 번호 29) LLISYTSSLH	(서열 번호 30) QQSSKLPF

[0112]

[0113] 따라서, 본 발명은 하기의 서열 특징을 가진 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 (a) (1) 서열 번호 7, 10, 13, 또는 16의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; (2) 서열 번호 8, 11, 14 또는 17의 아미노산 서열을 가진 VH CDR2; 및 (3) 서열 번호 9, 12, 15 또는 18의 아미노산 서열을 가진 VH CDR3:을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역; 및/또는 (b) (1) 서열 번호 19, 22, 25 또는 28의 아미노산 서열을 가진 VL CDR1; (2) 서열 번호 20, 23, 26 또는 29의 아미노산 서열을 가진 VL CDR2; 및 (3) 서열 번호 21, 24, 27 또는 30의 아미노산 서열을 가진 VL CDR3:을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 (a) (1) 서열 번호 7, 10, 13, 또는 16의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; (2) 서열 번호 8, 11, 14 또는 17의 아미노산 서열을 가진 VH CDR2; 및 (3) 서열 번호 9, 12, 15 또는 18의 아미노산 서열을 가진 VH CDR3:을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역; 및/또는 (b) (1) 서열 번호 19, 22, 25 또는 28의 아미노산 서열을 가진 VL CDR1; (2) 서열 번호 20, 23, 26 또는 29의 아미노산 서열을 가진 VL CDR2; 및 (3) 서열 번호 21, 24, 27 또는 30의 아미노산 서열을 가진 VL CDR3:을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 가진 항체를 제공한다. 항체는 단클론 항체일 수 있다. 항체는 인간화 항체일 수 있다.

[0114]

일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 (1) 서열 번호 7, 10, 13, 또는 16의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; (2) 서열 번호 8, 11, 14 또는 17의 아미노산 서열을 가진 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 9, 12, 15 또는 18의 아미노산 서열을 가진 VH CDR3:을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다. 일부 실시형태에서, 중쇄 가변(VH) 영역은 (1) 서열 번호 7, 10, 13, 또는 16의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; 및 (2) 서열 번호 8, 11, 14 또는 17의 아미노산 서열을 가진 VH CDR2를 포함한다. 일부 실시형태에서, 중쇄 가변(VH) 영역은 (1) 서열 번호 7, 10, 13, 또는 16의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; 및 (3) 서열 번호 9, 12, 15 또는 18의 아미노산 서열을 가진 VH CDR3을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 (1) 서열 번호 7, 10, 13, 또는 16의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; 및 (3) 서열 번호 9, 12, 15 또는 18의 아미노산 서열을 가진 VH CDR3:을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다.

[0115]

일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 서열 번호 7, 10, 13, 또는 16의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다. VH CDR1은 서열 번호 7의 아미노산 서열을 가질 수 있다. VH CDR1은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 가질 수 있다. VH CDR1은 서열 번호 13의 아미노산 서열을 가질 수 있다. VH CDR1은 서열 번호 16의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0116]

일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 서열 번호 8, 11, 14 또는 17의 아미노산 서열을 가진 VH

CDR2를 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다. VH CDR2는 서열 번호 8의 아미노산 서열을 가질 수 있다. VH CDR2는 서열 번호 11의 아미노산 서열을 가질 수 있다. VH CDR2는 서열 번호 14의 아미노산 서열을 가질 수 있다. VH CDR2는 서열 번호 17의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0117] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 문자는 서열 번호 9, 12, 15 또는 18의 아미노산 서열을 가진 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다. VH CDR3은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 가질 수 있다. VH CDR3은 서열 번호 12의 아미노산 서열을 가질 수 있다. VH CDR3은 서열 번호 15의 아미노산 서열을 가질 수 있다. VH CDR3은 서열 번호 20의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0118] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 문자는 (1) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; (2) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 가진 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 가진 VH CDR3:을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다.

[0119] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 문자는 (1) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; (2) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 가진 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 가진 VH CDR3:을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다.

[0120] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 문자는 (1) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; (2) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 가진 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 가진 VH CDR3:을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다.

[0121] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 문자는 (1) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; (2) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 가진 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 가진 VH CDR3:을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다.

[0122] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 문자는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 가진 중쇄 가변(VH) 영역을 갖는 항원 결합 단편을 갖는다. 문자는 항체일 수 있다. 항체는 단클론 항체일 수 있다. 항체는 인간화 항체일 수 있다.

[0123] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 문자는 (1) 서열 번호 19, 22, 25 또는 28의 아미노산 서열을 가진 VL CDR1; (2) 서열 번호 20, 23, 26 또는 29의 아미노산 서열을 가진 VL CDR2; 및 (3) 서열 번호 21, 24, 27 또는 30의 아미노산 서열을 가진 VL CDR3:을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다.

[0124] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 문자는 (1) 서열 번호 19, 22, 25 또는 28의 아미노산 서열을 가진 VL CDR1; 및 (2) 서열 번호 20, 23, 26 또는 29의 아미노산 서열을 가진 VL CDR2:를 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 문자는 (1) 서열 번호 19, 22, 25 또는 28의 아미노산 서열을 가진 VL CDR1; 및 (3) 서열 번호 21, 24, 27 또는 30의 아미노산 서열을 가진 VL CDR3:을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 문자는 (2) 서열 번호 20, 23, 26 또는 29의 아미노산 서열을 가진 VL CDR2: 및 (3) 서열 번호 21, 24, 27 또는 30의 아미노산 서열을 가진 VL CDR3:을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다.

[0125] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 문자는 서열 번호 19, 22, 25 또는 28의 아미노산 서열을 가진 VL CDR1을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다. VL CDR1은 서열 번호 19의 아미노산 서열을 가질 수 있다. VL CDR1은 서열 번호 22의 아미노산 서열을 가질 수 있다. VL CDR1은 서열 번호 25의 아미노산 서열을 가질 수 있다. VL CDR1은 서열 번호 28의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0126] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 문자는 서열 번호 20, 23, 26 또는 29의 아미노산 서열을 가진 VL CDR2를 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다. VL CDR2는 서열 번호 23의 아미노산 서열을 가질 수 있다. VL CDR2는 서열 번호 26의 아미노산 서열을 가질 수 있다. VL CDR2는 서열 번호 29의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0127] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 문자는 서열 번호 21, 24, 27 또는 30의 아미노산 서열을 가진 VL CDR3을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다. VL CDR3은 서열 번호 21의 아미노산 서열을 가질 수 있다. VL CDR3은 서열 번호 24의 아미노산 서열을 가질 수 있다. VL CDR3은 서열 번호 27의 아미노산 서열을 가질 수 있다. VL CDR3은 서열 번호 30의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

- [0128] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 (1) 서열 번호 19의 아미노산 서열을 가진 VL CDR1; (2) 서열 번호 20의 아미노산 서열을 가진 VL CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 21의 아미노산 서열을 가진 VL CDR3을 가진 경쇄 가변(VL) 영역을 갖는 항원 결합 단편을 가진다.
- [0129] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 (1) 서열 번호 22의 아미노산 서열을 가진 VL CDR1; (2) 서열 번호 23의 아미노산 서열을 가진 VL CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 24의 아미노산 서열을 가진 VL CDR3을 가진 경쇄 가변(VL) 영역을 갖는 항원 결합 단편을 가진다.
- [0130] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 (1) 서열 번호 25의 아미노산 서열을 가진 VL CDR1; (2) 서열 번호 26의 아미노산 서열을 가진 VL CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 27의 아미노산 서열을 가진 VL CDR3을 가진 경쇄 가변(VL) 영역을 갖는 항원 결합 단편을 가진다.
- [0131] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 (1) 서열 번호 28의 아미노산 서열을 가진 VL CDR1; (2) 서열 번호 29의 아미노산 서열을 가진 VL CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 30의 아미노산 서열을 가진 VL CDR3을 가진 경쇄 가변(VL) 영역을 갖는 항원 결합 단편을 가진다.
- [0132] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 가진 경쇄 가변(VL) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다. 분자는 항체일 수 있다. 항체는 단클론 항체일 수 있다. 항체는 인간화 항체일 수 있다.
- [0133] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 (a) (1) 서열 번호 7, 10, 13, 또는 16의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; (2) 서열 번호 8, 11, 14 또는 17의 아미노산 서열을 가진 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 9, 12, 15 또는 18의 아미노산 서열을 가진 VH CDR3:을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역; 및 (b) (1) 서열 번호 19, 22, 25 또는 28의 아미노산 서열을 가진 VL CDR1; (2) 서열 번호 20, 23, 26 또는 29의 아미노산 서열을 가진 VL CDR2; 및 (3) 서열 번호 21, 24, 27 또는 30의 아미노산 서열을 가진 VL CDR3:을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 가진 항원 결합 단편을 갖는다. 분자는 항체일 수 있다. 항체는 단클론 항체일 수 있다. 항체는 인간화 항체일 수 있다.
- [0134] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 (a) (1) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; (2) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 가진 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 가진 VH CDR3:을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역; 및 (b) (1) 서열 번호 19의 아미노산 서열을 가진 VL CDR1; (2) 서열 번호 20의 아미노산 서열을 가진 VL CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 21의 아미노산 서열을 가진 VL CDR3:을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 갖는 항원 결합 단편을 가진다. 분자는 항체일 수 있다. 항체는 단클론 항체일 수 있다. 항체는 인간화 항체일 수 있다.
- [0135] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 (a) (1) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; (2) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 가진 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 가진 VH CDR3:을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역; 및 (b) (1) 서열 번호 22의 아미노산 서열을 가진 VL CDR1; (2) 서열 번호 23의 아미노산 서열을 가진 VL CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 24의 아미노산 서열을 가진 VL CDR3:을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 갖는 항원 결합 단편을 가진다. 분자는 항체일 수 있다. 항체는 단클론 항체일 수 있다. 항체는 인간화 항체일 수 있다.
- [0136] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 (a) (1) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; (2) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 가진 VH CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 가진 VH CDR3:을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역; 및 (b) (1) 서열 번호 25의 아미노산 서열을 가진 VL CDR1; (2) 서열 번호 26의 아미노산 서열을 가진 VL CDR2; 및/또는 (3) 서열 번호 27의 아미노산 서열을 가진 VL CDR3:을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 갖는 항원 결합 단편을 가진다. 분자는 항체일 수 있다. 항체는 단클론 항체일 수 있다. 항체는 인간화 항체일 수 있다.
- [0137] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 (a) (1) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 가진 VH CDR1; (2) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 가진 VH CDR2; 및 (3) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 가진 VH CDR3:을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역; 및 (b) (1) 서열 번호 28의 아미노산 서열을 가진 VL CDR1; (2) 서열 번호 29의 아미노산 서열을 가진 VL CDR2; 및 (3) 서열 번호 30의 아미노산 서열을 가진 VL CDR3:을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 갖는 항원 결합 단편을 가진다. 분자는 항체일 수 있다. 항체는 단클론 항체일 수 있다. 항체는 인간화 항체일 수 있다.

- [0138] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 가진 VH 영역 및 서열 번호 5의 아미노산 서열을 가진 VL 영역을 갖는 항원 결합 단편을 가진다. 분자는 항체일 수 있다. 항체는 단클론 항체일 수 있다. 항체는 인간화 항체일 수 있다.
- [0139] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 STC810으로 표시되는 마우스 단클론 항체, 또는 그의 인간화 항체 버전이다. 인간화 STC810 항체는 본 명세서에 개시된 STC810의 VH 영역, VL 영역, 또는 VH와 VL 영역 둘 모두를 가질 수 있다. 인간화 STC810 항체는 또한 본 명세서에 개시된 STC810의 6개 CDR 영역(VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3)을 가질 수 있다. 인간화 STC810 항체는 또한 STC810의 CDR 영역 6개 미만을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 인간화 STC810 항체는 또한 STC810의 1, 2, 3, 4 또는 5개 CDR 영역(VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3)을 가질 수 있다.
- [0140] 본 발명에서 제공된 항원 결합 단편, 또는 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 돌연변이를 도입하기 위하여, 예를 들어, 부위-지시된 돌연변이유발 및 아미노산 치환을 야기하는 PCR-매개 돌연변이유발을 비롯한 당업자에게 알려진 표준 기술이 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도체는 원래 분자에 대하여 25개 미만 아미노산 치환, 20개 미만 아미노산 치환, 15개 미만 아미노산 치환, 10개 미만 아미노산 치환, 5개 미만 아미노산 치환, 4개 미만 아미노산 치환, 3개 미만 아미노산 치환, 또는 2개 미만 아미노산 치환을 포함한다. 구체적 실시형태에서, 유도체는 하나 이상의 예상된 비필수 아미노산 잔기에서 만들어진 보존적 아미노산 치환을 갖는다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 전하를 가진 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 치환되는 것이다. 유사한 전하를 가진 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 본 기술분야에서 정의되어 있다. 이들 패밀리는 염기성 측쇄(예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 가진 아미노산을 포함한다. 대안적으로, 돌연변이는 포화 돌연변이유발에 의해서와 같이, 코딩 서열의 전부 또는 일부를 따라 무작위로 도입될 수 있으며, 생성된 돌연변이체는 활성을 보유한 돌연변이체를 확인하기 위하여 생물학적 활성에 대해 스크리닝될 수 있다. 돌연변이유발 후, 인코딩된 단백질이 발현될 수 있으며 단백질의 활성이 결정될 수 있다.
- [0141] 일 실시형태에서, BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 발명에서 제공되는 분자는 마우스 단클론 항체 STC810, 또는 그의 항원-결합 단편, 예를 들어, VH 도메인 또는 VL 도메인의 아미노산 서열과 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 서열 번호 3 또는 5에 개시된 아미노산 서열과 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 표 2에 개시된 VH CDR 아미노산 서열 및/또는 VL CDR 아미노산 서열과 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 VH CDR 및/또는 VL CDR 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0142] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 염격한 조건(예를 들어, 약 45°C에서 6X 소듐 클로라이드/소듐 시트레이트(SSC)에서 필터-결합된 DNA에의 하이브리드화 후 약 50-65°C에서 0.2xSSC/0.1% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 매우 염격한 조건(예를 들어, 약 45°C에서 6XSSC에서 필터-결합된 핵산에의 하이브리드화 후 약 68°C에서 0.1xSSC/0.2% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 또는 당업자에게 알려진 다른 염격한 하이브리드화 조건하에서(예를 들어, Ausubel, F.M. et al., eds., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York at pages 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3을 참고) 표 2에 개시된 VH 및/또는 VL 도메인 중 어느 하나를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 상보체(complement)에 하이브리드화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 VH 도메인의 아미노산 서열 및/또는 VL 도메인의 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0143] 다른 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 염격한 조건(예를 들어, 약 45°C에서 6XSSC에서 필터-결합된 DNA에의 하이브리드화 후 약 50-65°C에서 0.2xSSC/0.1% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 매우 염격한 조건(예를 들어, 약 45°C에서 6XSSC에서 필터-결합된 핵산에의 하이브리드화 후 약 68°C에서 0.1xSSC/0.2% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 또는 당업자에게 알려진 다른 염격한 하이브리드화 조건하에서(예를 들어,

Ausubel, F.M. et al., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York at pages 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3을 참고) 표 2에 개시된 VH CDR 및/또는 VL CDR 중 어느 하나를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 상보체에 하이브리드화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 VH CDR의 아미노산 서열 또는 VL CDR의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0144] 일부 실시형태에서, 본 발명은 또한 표 2에 개시된 VH CDR의 아미노산 서열 또는 VL CDR의 아미노산 서열을 인코딩하거나, 또는 염격한 조건(예를 들어, 약 45°C에서 6X소듐 클로라이드/소듐 시트레이트(SSC)에서 필터-결합된 DNA에의 하이브리드화 후 약 50-65°C에서 0.2xSSC/0.1% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 매우 염격한 조건(예를 들어, 약 45°C에서 6XSSC에서 필터-결합된 핵산에의 하이브리드화 후 약 68°C에서 0.1xSSC/0.2% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 또는 당업자에게 알려진 다른 염격한 하이브리드화 조건하에서 표 2에 개시된 VH CDR 및/또는 VL CDR 중 어느 하나를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 상보체에 하이브리드화하는 분리된 핵산을 제공한다.

[0145] 일부 실시형태에서, 본 발명은 또한 표 2에 개시된 VH 도메인의 아미노산 서열 및/또는 VL 도메인의 아미노산 서열을 인코딩하거나, 또는 염격한 조건(예를 들어, 약 45°C에서 6X소듐 클로라이드/소듐 시트레이트(SSC)에서 필터-결합된 DNA에의 하이브리드화 후 약 50-65°C에서 0.2xSSC/0.1% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 매우 염격한 조건(예를 들어, 약 45°C에서 6XSSC에서 필터-결합된 핵산에의 하이브리드화 후 약 68°C에서 0.1xSSC/0.2% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 또는 당업자에게 알려진 다른 염격한 하이브리드화 조건하에서 표 2에 개시된 VH 및/또는 VL 도메인 중 어느 하나를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 상보체에 하이브리드화하는 분리된 핵산을 제공한다.

[0146] 일부 실시형태에서, 분리된 핵산은 서열 번호 4의 서열을 갖거나 또는 염격한 조건(예를 들어, 약 45°C에서 6X 소듐 클로라이드/소듐 시트레이트(SSC)에서 필터-결합된 DNA에의 하이브리드화 후 약 50-65°C에서 0.2xSSC/0.1% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 매우 염격한 조건(예를 들어, 약 45°C에서 6XSSC에서 필터-결합된 핵산에의 하이브리드화 후 약 68°C에서 0.1xSSC/0.2% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 또는 당업자에게 알려진 다른 염격한 하이브리드화 조건하에서 서열 번호 4의 뉴클레오티드 서열의 상보체에 하이브리드화하는 서열을 가질 수 있다.

[0147] 일부 실시형태에서, 분리된 핵산은 서열 번호 6의 서열을 갖거나, 또는 염격한 조건(예를 들어, 약 45°C에서 6X 소듐 클로라이드/소듐 시트레이트(SSC)에서 필터-결합된 DNA에의 하이브리드화 후 약 50-65°C에서 0.2xSSC/0.1% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 매우 염격한 조건(예를 들어, 약 45°C에서 6XSSC에서 필터-결합된 핵산에의 하이브리드화 후 약 68°C에서 0.1xSSC/0.2% SDS에서의 1회 이상의 세척)하에서, 또는 당업자에게 알려진 다른 염격한 하이브리드화 조건하에서 서열 번호 6의 뉴클레오티드 서열의 상보체에 하이브리드화하는 서열을 가질 수 있다.

[0148] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 예를 들어, 항체에의 임의의 타입의 분자의 공유적 부착에 의해, 화학적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 그러나 어떤 제한도 없이, 항체 유도체는 예를 들어, 당화, 아세틸화, 폐길화, 인산화, 아미드화, 공지의 보호/차단 기에 의한 유도체화, 단백질분해성 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에의 연결, 등에 의해, 화학적으로 변형된 항체를 포함한다. 많은 화학적 변형 중 임의의 것이 특이적 화학 절단, 아세틸화, 제형화, 투니카마이신의 대사적 합성, 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 공지 기술에 의해 수행될 수 있다. 부가적으로, 항체는 하나 이상의 비전통적 아미노산을 함유할 수 있다.

[0149] 본 발명에서 제공되는 분자는 당업자에게 알려진 골격 영역을 가질 수 있다(예를 들어, 인간 또는 비인간 단편). 골격 영역은 예를 들어, 자연 발생 또는 컨센서스(consensus) 골격 영역일 수 있다. 구체적 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체의 골격 영역은 인간이다(예를 들어, 인간 골격 영역의 목록을 위해 Chothia et al., 1998, *J. Mol. Biol.* 278:457-479를 참고하며, 그 전체가 참고로 본원에 포함된다). 또한, Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.) 5th ed를 참고한다.

[0150] STC810의 BTN1A1 에피토프는 가교 분석에 의해 맵핑되었다. 표 3은 BTN1A1-Fc와 STC810의 가교된 펩티드를 요약하며, 이것은 STC810의 BTN1A1 에피토프를 나타낸다(서열 번호 31-33). 도 12는 STC810을 위한 BTN1A1(ECD)-Fc 항원의 합성된 에피토프를 보여준다:

[0151] LELRWFRKKVSPA (서열 번호 34) – EEGLFTVAASVIIRDTSAKNV (서열 번호 35)

[0152] 표 4는 BTN1A1-His와 STC810의 가교된 펩티드를 요약하며, 이것은 STC810의 BTN1A1 에피토프를 나타낸다(서열

번호 36-39). 도 13은 STC810을 위한 BTN1A1(ECD)-His 항원의 합성된 에피토프를 보여준다.

[0153] GRATLVQDGIAKGRV (서열 번호 40) – EEGLFTVAASVIIRDTSAKNV (서열 번호 41)

[0154] 표 3: nLC-오비트랩(orbitrap) MS/MS에 의해 분석된 STC810과의 BTN1A1-FC의 가교된 펩티드.

단백질 분해	서열	단백질 1	단백질 2	서열 단백질 1	서열 단백질 2
키모트립신	RKKVSPAVL (서열 번호 31) -YCARGAY (서열 번호 42) -a1-b1	BTN1A1 -FC	STC810 HC	41-49	95-101
	RKKVSPAVL (서열 번호 31) -YCARGAY (서열 번호 42) -a2-b1	BTN1A1 -FC	STC810 HC	41-49	95-101
	RKKVSPAVL (서열 번호 31) -YCARGAY (서열 번호 42) -a3-b1	BTN1A1 -FC	STC810 HC	41-49	95-101
	TVAASVIIRDTSAKNV SCY (서열 번호 32) -TFTHY (서열 번호 43) -a11-b3	BTN1A1 -FC	STC810 HC	175-193	28-32
	TVAASVIIRDTSAKNV SCY (서열 번호 32) -TFTHY (서열 번호 43) -a11-b4	BTN1A1 -FC	STC810 HC	175-193	28-32
	TVAASVIIRDTSAKNV SCY (서열 번호 32) -TFTHY (서열 번호 43) -a14-b4	BTN1A1 -FC	STC810 HC	175-193	28-32
써모리신	IRDTSAKN (서열 번호 33) -FTFGSGTE (서열 번호 44) -a4-b7	BTN1A1 -FC	STC810LC	182-189	96-105

[0155]

[0156]

표 4: nLC-오비트랩 MS/MS에 의해 분석된 STC810과의 BTN1A1- His의 가교된 펩티드.

단백질분해	서열	단백질 1	단백질 2	서열 단백질 1	서열 단백질 2
트립신	ATLVQDGIAKGR (서열 번호 36) – SLEWIGIYIYPSNGGTG YNQKFKSR (서열 번호 45) -a10-b11	BTN1A1 -His	STC810 HC	69-80	44-67
	NPDEEGLFTVAASVIIR DTSAK (서열 번호 37) -LLISYTSSLHSGVPSR (서열 번호 46) -a13-b6	BTN1A1 -His	STC810 LC	167-188	46-61
	NPDEEGLFTVAASVIIR DTSAK (서열 번호 37) - LLISYTSSLHSGVPSR(서열 번호 46) -a9-b6	BTN1A1 -His	STC810 LC	167-188	46-61
키모트립신	TVAASVIIRDTSAKNV SCY (서열 번호 38) – TFTHY (서열 번호 47) -a11-b3	BTN1A1 -His	STC810 HC	175-193	28-32
	TVAASVIIRDTSAKNV SCY (서열 번호 38) – TFTHY (서열 번호 47) -a5-b3	BTN1A1 -His	STC810 HC	175-193	28-32
써모리신	AEQXPEYRGRAT (서열 번호 39) –LHSGVPSR (서열 번호 48) -a10-b2	BTN1A1 -His	STC810 LC	59-70	54-61

[0157]

[0158]

따라서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 BTN1A1 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 STC810의 BTN1A1 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 본 명세서에 개시된 BTN1A1의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 STC810의 BTN1A1 에피토프에 면역 특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진다. 분자는 항체일 수 있다. 항체는 단클론 항체일 수 있다. 항체는 인간화 항체일 수 있다.

[0159]

일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 BTN1A1 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하는 항-BTN1A1 항체를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 STC810의 BTN1A1 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하는 항-BTN1A1 항체를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-BTN1A1 항체는 본 명세서에 개시된 BTN1A1의 에피토프에 면역특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항-BTN1A1 항체는 STC810의 BTN1A1 에피토프에 면역특이적으로 결합한다.

[0160]

일부 실시형태에서, 분자는 BTN1A1 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하는 항원 결합 단편을 가지며, 이때 BTN1A1 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 5개의 연속 아미노산을 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 BTN1A1의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가지며, 이때 BTN1A1 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 5개의 연속 아미노산을 가진다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 또는 적어도 15개의 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 6개의 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 7개의 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 8개의 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 9개의 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 10개의 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 11개의 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 31-41의

아미노산 서열의 적어도 12개의 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 13개의 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 14개의 연속 아미노산을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 15개의 연속 아미노산을 가질 수 있다. 분자는 항체일 수 있다. 항체는 단클론 항체일 수 있다. 항체는 인간화 항체일 수 있다.

[0161] 일부 실시형태에서, 분자는 BTN1A1 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하는 항원 결합 단편을 가지며, 이때 BTN1A1 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열을 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 BTN1A1의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가지며, 이때 BTN1A1 에피토프는 서열 번호 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 또는 41의 아미노산 서열을 갖는다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 31의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 32의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 33의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 34의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 35의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 36의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 37의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 38의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 39의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 40의 아미노산 서열을 가질 수 있다. BTN1A1의 에피토프는 서열 번호 41의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0162] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 BTN1A1, 당화된 BTN1A1 또는 그의 폴리펩티드, 또는 폴리펩티드 단편 또는 에피토프에 대해 높은 친화성을 갖는다. 일 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 공지 항체(예를 들어, 본 명세서에서 토의된 상업적으로 입수 가능한 단클론 항체)보다 BTN1A1 항체에 대해 더 높은 친화성을 가진 항-BTN1A1 항체일 수 있다. 구체적 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 본 명세서에 개시되거나 당업자에게 알려진 기술(예를 들어, 비아코어 분석)에 의해 평가할 때 공지의 항-BTN1A1 항체보다 BTN1A1 항원에 대해 2- 내지 10-배(또는 그 이상) 더 높은 친화성을 가질 수 있는 항-BTN1A1 항체일 수 있다. 이를 실시형태에 따라, 항체의 친화성은, 일 실시형태에서, 비아코어 분석에 의해 평가된다.

[0163] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 $1 \mu\text{M}$ 이하, 100nM 이하, 10nM 이하, 또는 0.1nM 이하의 해리 상수(K_d)로 BTN1A1, 당화된 BTN1A1 또는 그의 폴리펩티드, 또는 폴리펩티드 단편 또는 에피토프에 결합하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 500nM 이하의 K_d 를 가진 항-BTN1A1 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 200nM 이하의 K_d 를 가진 항-BTN1A1 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 100nM 이하의 K_d 를 가진 항-BTN1A1 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 50nM 이하의 K_d 를 가진 항-BTN1A1 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 20nM 이하의 K_d 를 가진 항-BTN1A1 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 10nM 이하의 K_d 를 가진 항-BTN1A1 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 5nM 이하의 K_d 를 가진 항-BTN1A1 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 2nM 이하의 K_d 를 가진 항-BTN1A1 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 1nM 이하의 K_d 를 가진 항-BTN1A1 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 0.5nM 이하의 K_d 를 가진 항-BTN1A1 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 0.1nM 이하의 K_d 를 가진 항-BTN1A1 항체일 수 있다.

[0164] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 분자는 BTN1A1의 활성을 차단하거나 중화시킬 수 있다. 분자는 중화 항체일 수 있다. 중화 항체는 BTN1A1과 그의 천연 리간드의 결합을 차단할 수 있으며 BTN1A1 및/또는 그의 다른 생리학적 활성에 의해 매개되는 시그널링 경로를 억제할 수 있다. 중화 항체의 IC₅₀은 중화 분석에서 $0.01 - 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 범위일 수 있다. 중화 항체의 IC₅₀은 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하일 수 있다. 중화 항체의 IC₅₀은 $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하일 수 있다. 중화 항체의 IC₅₀은 $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하일 수 있다. 중화 항체의 IC₅₀은 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하일 수 있다. 중화 항체의 IC₅₀은 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하일 수 있다. 중화 항체의 IC₅₀은 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하일 수 있다. 중화 항체의 IC₅₀은 $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하일 수 있다. 중화 항체의 IC₅₀은 $0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하일 수 있다. 중화 항체의 IC₅₀은 $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하일 수 있다. 중화 항체의 IC₅₀은 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하일 수 있다. 중화 항체의 IC₅₀은 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하일 수 있다. 중화 항체의 IC₅₀은 $0.08 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하일 수 있다. 중화 항체의 IC₅₀은 $0.06 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하일 수 있다. 중화 항체의 IC₅₀은 $0.04 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하일 수 있다. 중화 항체의 IC₅₀은 $0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하일 수 있다. 중화 항체의 IC₅₀은 $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하일 수 있다.

[0165] BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 발명에서 제공되는 분자는 항-BTN1A1 항체일 수 있다. 본 발명에서 제공되는 항체는 합성 항체, 단클론 항체, 재조합적으로 생산된 항체, 다

중특이적 항체(2-특이적 항체 포함), 인간 항체, 인간화 항체, 낙타화 항체, 키메라 항체, 인트라바디, 항-이디 오타입(항-Id) 항체, 및 상기 중 어느 것의 기능성 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 기능성 단편의 비제한적인 예는 단일쇄 Fv(scFv)(예를 들어, 단일특이적, 이중특이적, 등 포함), Fab 단편, F(ab') 단편, F(ab)₂ 단편, F(ab')₂ 단편, 다이설파이드-연결된 Fv(sdFv), Fd 단편, Fv 단편, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 및 미니바디를 포함한다.

[0166] 구체적으로, 본 발명에서 제공되는 분자는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 예를 들어, BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 함유하는 분자를 포함한다. 본 발명에서 제공되는 면역글로불린 분자는 임의의 타입(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브클래스의 면역글로불린 분자일 수 있다.

[0167] 본 발명에서 제공되는 분자는 단일특이적, 이중특이적, 삼중특이적 항체 또는 더 큰 다중특이성의 항체일 수 있다. 다중특이적 항체는 본 명세서에 개시된 BTN1A1의 상이한 에피토프에 대해 특이적일 수 있거나, 또는 BTN1A1 폴리펩티드뿐만 아니라 이종성 에피토프, 예를 들어, 이종성 폴리펩티드 또는 고형 지지체 물질에 대해 특이적일 수 있다. 구체적 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 BTN1A1 폴리펩티드의 주어진 에피토프에 대해 단일특이적이며 다른 에피토프에는 결합하지 않는다.

5.2.3. 변형 및 유도체

[0169] BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 상기 분자 중 어느 것의 결합 특성은 원하는 특성을 나타내는 변이체에 대한 스크리닝에 의해 더 개선될 수 있다. 예를 들어, 그러한 개선은 본 기술분야에 알려진 다양한 파아지 디스플레이 방법을 이용하여 이루어질 수 있다. 파아지 디스플레이 방법에서는, 기능성 항체 도메인이 그들을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 보유한 파아지 입자의 표면 상에 디스플레이된다. 구체적 실시형태에서, 그러한 파아지는 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리(예를 들어, 인간 또는 마우스)로부터 발현된, Fab 및 Fv 또는 다이설파이드-결합 안정화된 Fv와 같은 항원 결합 단편을 디스플레이하기 위하여 이용될 수 있다. 관심 항원에 결합하는 항원 결합 단편을 발현하는 파아지는 항원을 이용하여, 예를 들어, 라벨링된 항원 또는 고체 표면 또는 비드에 결합되거나 포획된 항원을 이용하여, 선택되거나 확인될 수 있다. 이들 방법에서 이용되는 파아지는 전형적으로는 필라멘트성 파아지이며, fd 및 M13을 포함한다. 항원 결합 단편은 파아지 유전자 III 또는 유전자 VIII 단백질에 재조합적으로 융합된 단백질로서 발현된다. 본 명세서에 개시된 항원 결합 단편을 가진 항체 또는 다른 분자를 제조하기 위해 사용될 수 있는 파아지 디스플레이 방법의 예는 Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 182:41-50 (1995); Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 184:177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 24:952-958(1994); Persic *et al.*, *Gene*, 187:9-18 (1997); Burton *et al.*, *Adv. Immunol.* 57:191-280 (1994); PCT 공개 WO 92/001047호; WO 90/02809호; WO 91/10737호; WO 92/01047호; WO 92/18619호; WO 93/11236호; WO 95/15982호; WO 95/20401호; 및 미국 특허 5,698,426호; 5,223,409호; 5,403,484호; 5,580,717호; 5,427,908호; 5,750,753호; 5,821,047호; 5,571,698호; 5,427,908호; 5,516,637호; 5,780,225호; 5,658,727호; 5,733,743호 및 5,969,108호에서 개시된 것들을 포함하며; 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0170] 상기 문헌에 개시된 대로, 파아지 선택 후, 파아지로부터의 항체 코딩 영역이 분리되어 인간화 항체를 비롯한 전체 항체, 또는 임의의 다른 원하는 단편을 생성하기 위해 이용될 수 있으며, 예를 들어, 하기에 상세히 개시된 바처럼, 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 세균을 비롯한 임의의 원하는 숙주에서 발현될 수 있다. 예를 들어, Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편을 재조합적으로 생산하기 위한 기술 또한 PCT 공개 WO 92/22324호; Mullinax, R. L. *et al.*, *BioTechniques*, 12(6):864-869 (1992); 및 Sawai *et al.*, *Am. J. Reprod. Immunol.* 34:26-34 (1995); 및 Better, M. *et al.* *Science* 240:1041-1043(1988)에 개시된 것과 같은 본 기술분야에 알려진 방법을 이용하여 이용될 수 있으며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 단일쇄 Fv 및 항체를 생산하기 위하여 사용될 수 있는 기술의 예는 미국 특허 4,946,778호 및 5,258,498호; Huston, J. S. *et al.*, *Methods in Enzymology* 203:46-88(1991); Shu, L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 90:7995-7999; 및 Skerra, A. *et al.*, *Science* 240:1038-1040 (1988)에 개시된 것을 포함하며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0171] 파아지 디스플레이 기술은 본 명세서에 개시된 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 항-BTN1A1 항체 또는 항-당화된 BTN1A1 항체, 또는 다른 분자의 친화성을 증가시키기 위해 이용될 수 있다. 이 기술은 본 명세서에 개시된 조합 방법에서 사용될 수 있는 고 친화성 항체를 수득하는데에 사용

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

[0172] 임의 돌연변이유발은 개선된 CDR 및/또는 가변 영역을 확인하기 위하여 파아지 디스플레이 방법과 함께 이용될 수 있다. 파아지 디스플레이 기술은 대안적으로는 지시된 돌연변이유발에 의해 CDR 친화성을 증가(또는 감소)시키기 위해 사용될 수 있다(예를 들어, 친화성 성숙 또는 "CDR-워킹"). 이 기술은 초기 또는 모 항체와 비교할 때 항원에 더 높은(또는 더 낮은) 친화성으로 결합하는 CDR을 가진 항체를 확인하기 위하여 타겟 항원 또는 항원성 단편을 이용한다(예를 들어, Glaser, S. M. et al., *J. Immunol.* 149:3903-3913(1992)를 참고한다).

[0173] 그러한 친화성 성숙을 이루는 방법은 예를 들어, Krause, J. C. et al., *MBio.* 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10(2011); Kuan, C. T. et al., *Int. J. Cancer* 10.1002/ijc.25645; Hackel, B. J. et al., *J. Mol. Biol.* 401(1):84-96(2010); Montgomery, D. L. et al., *MAbs* 1(5):462-474(2009); Gustchina, E. et al., *Virology* 393(1):112-119 (2009); Finlay, W. J. et al., *J. Mol. Biol.* 388(3):541-558 (2009); Bostrom, J. et al., *Methods Mol. Biol.* 525:353-376 (2009); Steidl, S. et al., *Mol. Immunol.* 46(1):135-144 (2008); 및 Barderas, R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 105(26):9029-9034 (2008)에서 개시되며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0174] 본 발명은 또한 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 상술한 문자 중 어느 것의 유도체를 제공하며, 이것은 항-BTN1A1 항체 또는 항-당화된 BTN1A1 항체일 수 있으나, "모" (또는 야생형) 문자에 대하여 1, 2, 3, 4, 5개 이상의 아미노산 치환, 부가, 결실 또는 변형을 가진다. 그러한 아미노산 치환 또는 부가는 자연 발생(즉, DNA-인코딩된) 또는 비자연 발생 아미노산 잔기를 도입할 수 있다. 그러한 아미노산은 당화(예를 들어, 변경된 만노스, 2-N-아세틸글루코스아민, 갈락토스, 푸코스, 글루코스, 시알산, 5-N-아세틸뉴라민산, 5-글리콜뉴라민산 등 내용물을 가짐), 아세틸화, 폐길화, 인산화, 아미드화, 공지 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해성 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에의 연결, 등이 될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 변경된 탄수화물 변형은 하기 중 하나 이상을 조절한다: 항체의 가용화, 항체의 준세포 수송(subcellular transport) 및 분비의 촉진, 항체 조립의 촉진, 구조적 온전함(conformational integrity), 및 항체-매개된 이펙터 기능. 일부 실시형태에서, 변경된 탄수화물 변형은 탄수화물 변형이 없는 항체에 비하여 항체 매개 이펙터 기능을 향상시킨다. 변경된 항체 매개된 이펙터 기능을 유도하는 탄수화물 변형은 본 기술분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, Shields, R. L. et al., *J. Biol. Chem.* 277(30): 26733-26740 (2002); Davies J. et al., *Biotechnology & Bioengineering* 74(4): 288-294(2001)를 참고하며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다). 탄수화물 내용을 변경하는 방법은 당업자에게 알려져 있으며, 예를 들어, Wallick, S. C. et al., *J. Exp. Med.* 168(3): 1099-1109(1988); Tao, M. H. et al., *J. Immunol.* 143(8): 2595-2601 (1989); Routledge, E. G. et al., *Transplantation* 60(8):847-53 (1995); Elliott, S. et al., *Nature Biotechnol.* 21:414-21(2003); Shields, R. L. et al., *J. Biol. Chem.* 277(30): 26733-26740 (2002)를 참고하며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0175] 일부 실시형태에서, 인간화 항체는 유도체 항체이다. 그러한 인간화 항체는 하나 이상의 비인간 CDR에서 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 부가를 포함한다. 인간화 항체 유도체는 비유도체 인간화 항체와 비교할 때 실질적으로 동일한 결합, 더 나은 결합, 또는 더 나쁜 결합을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, CDR의 1, 2, 3, 4, 또는 5개 아미노산 잔기가 치환되거나, 결실되거나 부가된 것처럼 돌연변이되었다.

[0176] 본 명세서에 개시된 문자와 항체는 특정 화학적 절단, 아세틸화, 제형화, 투니카마이신의 대사적 합성, 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업자에게 알려진 기술을 이용한 화학적 변형에 의해 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도체 문자 또는 유도체 항체는 모 문자 또는 항체와 유사하거나 동일한 기능을 보유한다. 다른 실시

형태에서, 유도체 분자 또는 유도체 항체는 모 분자 또는 모 항체에 비하여 변경된 활성을 나타낸다. 예를 들어, 유도체 항체(또는 그 단편)은 모 항체보다 더 단단하게 그의 에피토프에 결합할 수 있거나 단백질분해에 더 저항성일 수 있다.

[0177] 유도체화 항체에서의 치환, 부가 또는 결실은 항체의 Fc 영역에 있을 수 있으며 그에 의해 하나 이상의 Fc γ R에의 항체의 결합 친화성을 변형하기 위해 작용할 수 있다. 하나 이상의 Fc γ R에의 변형된 결합을 가진 항체를 변형하는 방법은 본 기술분야에 알려져 있으며, 예를 들어, PCT 공개 WO 04/029207호, WO 04/029092호, WO 04/028564호, WO 99/58572호, WO 99/51642호, WO 98/23289호, WO 89/07142호, WO 88/07089호, 및 미국 특허 5,843,597호 및 5,642,821호를 참고하며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 다른 분자는 활성화 Fc γ R, 예를 들어, Fc γ RIIIA에 대해 변경된 친화성을 가질 수 있다. 바람직하게는 그러한 변형은 또한 변경된 Fc-매개된 이펙터 기능을 가진다. Fc-매개된 이펙터 기능에 영향을 주는 변형은 본 기술분야에 잘 알려져 있다(미국 특허 6,194,551호, 및 WO 00/42072호를 참고한다). 일부 실시형태에서, Fc 영역의 변형은 변경된 항체-매개된 이펙터 기능, 다른 Fc 수용체(예를 들어, Fc 활성화 수용체)에의 변경된 결합, 변경된 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 활성, 변경된 C1q 결합 활성, 변경된 보체-의존성 세포독성 활성(CDC), 식세포 활성 또는 임의의 그 조합을 가진 항체를 생성한다.

[0178] ADCC는 FcR을 발현하는 항원-비특이적 세포독성 세포(예를 들어, 천연 킬러(NK) 세포, 호중구, 및 대식세포)가 타겟 세포의 표면에 결합된 항체를 인식하고 후속하여 타겟 세포의 용해(즉, "사멸")를 야기하는 세포-매개 반응이다. 일차 매개자 세포는 NK 세포이다. NK 세포는 Fc γ RII만을 발현하며, Fc γ RIIIA는 활성화 수용체이고 Fc γ RIIIB는 억제성 수용체이며; 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다(Ravetch *et al.* (1991) *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92). ADCC 활성은 타겟 세포의 용해가 최대의 절반인 항체 또는 Fc 융합 단백질의 농도로서 표현될 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 용해 수준이 야생형 대조군에 의한 최대의 절반 용해 수준과 동일한, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합 단백질의 농도는 야생형 대조군 자체의 농도 보다 적어도 2-, 3-, 5-, 10-, 20-, 50-, 100-배 더 낮다. 부가적으로, 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합 단백질은 야생형 대조군에 비교할 때 더 높은 최대 타겟 세포 용해를 나타낼 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 Fc 융합 단백질의 최대 타겟 세포 용해는 야생형 대조군의 것보다 10%, 15%, 20%, 25% 이상 더 높을 수 있다.

[0179] 본 명세서에 개시된 분자와 항체는 향상된 효능을 갖도록 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 분자와 항체는 예를 들어, ADCC 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC)을 향상시키기 위하여, 이펙터 기능에 대하여 변형된다. 일부 실시형태에서, 이들 치료 분자 또는 항체는 Fc 수용체를 보유한 킬러 세포와 향상된 상호작용을 갖는다. ADCC와 같은 이펙터 기능의 향상은 Fc 영역에의 하나 이상의 아미노산 치환의 도입을 비롯한 다양한 수단에 의해 이루어질 수 있다. 또한, 시스테인 잔기(들)가 Fc 영역에 도입되어, 이 영역에서 쇄간 다이설파이드 결합 형성을 허용할 수 있다. 동종이량체 항체는 또한 개선된 내부화 능력 및/또는 증가된 CDC 및 ADCC를 가질 수 있다. Caron *et al.*, *J. Exp. Med.*, 176:1191-95 (1992) 및 Shopes, B. J. *Immunol.*, 148:2918-22 (1992). 향상된 항암 활성을 가진 동종이량체 항체가 또한 이종이기능성 가교체를 이용하여 제조될 수 있다. Wolff *et al.*, *Cancer Research*, 53:2560-65 (1993). 부가적으로, 항체 또는 분자는 이중 Fc 영역을 갖도록 조작될 수 있으며 이에 의해 향상된 CDC 및 ADCC 능력을 가질 수 있다. Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-30 (1989).

[0180] Fc 영역의 당화 패턴은 또한 조작될 수 있다. 많은 항체 당화 형태가 ADCC를 비롯한 이펙터 기능에 대해 긍정적인 영향을 갖는 것으로 보고되었다. 따라서, Fc 영역의 탄수화물 성분의 조작, 특히 코어 푸코실화를 감소시키는 것은 또한 향상된 치료 효능을 가질 수 있다. Shinkawa T, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 278:3466-73 (2003); Niwa R, *et al.*, *Cancer Res.*, 64:2127-33 (2004); Okazaki A, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 336:1239^19 (2004); 및 Shields RL, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277:26733-40 (2002). 선택된 당형태(glycoform)를 가진 본 명세서에 개시된 항체 또는 분자는 당화 경로 억제제, 당화 경로에서 특정 효소의 활성이 없거나 감소된 돌연변이체 세포주, 향상되거나 넉아웃된 당화 경로 내의 유전자 발현을 가진 조작된 세포 및 글리코시다제 및 글리코실트랜스퍼라제를 이용한 인 비트로 리모델링의 이용을 비롯한 많은 수단에 의해 생산될 수 있다. Fc 영역의 당화를 변형시키고 항원 결합 단편을 가진 항체 또는 다른 분자의 치료 효능을 향상시키기 위한 방법은 본 기술분야에 알려져 있다. Rothman *et al.*, *Molecular Immunology* 26: 1113- 1123 (1989); Umana *et al.*, *Nature Biotechnology* 17: 176-180 (1999); Shields *et al.*, *JBC* 277:26733-26740 (2002); Shinkawa *et al.*, *JBC* 278: 3466-3473 (2003); Bischoff *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265(26):15599-15605 (1990); 미국 특허 6,861,242호 및 7,138,262호, 및 US 공개 2003/0124652호가 있으며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 당업자는 본 발명에서 제공되는 항체와 분자가 치료 효능을 향상시키는 것으로 본 기술분야에서 알려진 임의의 방법에 의해 변형될

수 있음을 이해할 것이다.

[0181] 유도체 분자 또는 항체는 또한 포유동물, 바람직하게는 인간에서 모 분자 또는 항체의 변경된 반감기(예를 들어, 혈청 반감기)를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 그러한 변경은 15일 초파, 바람직하게는 20일 초파, 25일 초파, 30일 초파, 35일 초파, 40일 초파, 45일 초파, 2개월 초파, 3개월 초파, 4개월 초파, 또는 5개월 초파의 반감기를 야기한다. 포유동물, 바람직하게는 인간에서 인간화 항체 또는 다른 분자의 증가된 반감기는 포유동물에서 상기 항체 또는 다른 분자의 더 높은 혈청 역가를 야기하며, 따라서 상기 항체 또는 다른 분자의 투여 빈도를 감소시키고 및/또는 투여되는 상기 항체 또는 다른 분자의 농도를 감소시킨다. 증가된 인 비보 반감기를 가진 분자 또는 항체는 당업자에게 알려진 기술에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 증가된 인 비보 반감기를 가진 분자 또는 항체는 Fc 도메인과 FcRn 수용체 사이의 상호작용에 관련되는 것으로 확인된 아미노산 잔기를 변형(예를 들어, 치환, 결실 또는 추가)함으로써 생성될 수 있다. 본 명세서에 개시된 인간화 항체는 생물학적 반감기를 증가시키기 위해 조작될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 6,277,375호를 참고한다). 예를 들어, 본 명세서에 개시된 인간화 항체는 증가된 인 비보 또는 혈청 반감기를 갖도록 Fc-힌지 도메인에서 조작될 수 있다.

[0182] 증가된 인 비보 반감기를 가진 본 명세서에 개시된 분자 또는 항체는 상기 항체 또는 항체 단편에 고분자량 폴리에틸렌글리콜(PEG)과 같은 중합체 분자를 부착함으로써 생성될 수 있다. PEG는 상기 분자 또는 항체의 N- 또는 C-말단에의 PEG의 부위-특이적 접합을 통해 또는 리신 잔기상에 존재하는 입실론-아미노기를 통해 다기능성 링커가 있거나 없이 분자 또는 항체에 부착될 수 있다. 생물학적 활성의 최소 상실을 야기하는 선형 또는 분지형 중합체 유도체화가 이용될 수 있다. 접합의 정도는 항체에의 PEG 분자의 적절한 접합을 보장하기 위하여 SDS-PAGE와 질량 분광법에 의해 자세하게 모니터될 수 있다. 미반응 PEG는 예를 들어, 크기 배제 또는 이온-교환 크로마토그래피에 의해 항체-PEG 접합체로부터 분리될 수 있다.

[0183] 본 명세서에 개시된 분자 또는 항체는 또한 실질적으로 면역원성 반응없이 포유동물 순환계내로 주사될 수 있는 조성물을 제공하기 위하여 Davis *et al.*(미국 특허 4,179,337호 참고)에 의해 개시된 방법 및 커플링제에 의해 변형될 수 있다. Fc 부분의 제거는 항체 단편이 바람직하지 못한 면역 반응을 유발할 가능성을 감소시킬 수 있으므로, Fc가 없는 항체는 예방적 또는 치료적 처리를 위해 이용될 수 있다. 상술한 바와 같이, 항체는 또한 다른 종에서 생산되거나 다른 종으로부터의 서열을 갖는 항체를 동물에게 투여함으로써 야기되는 해로운 면역적 결과를 감소시키거나 제거하기 위하여, 키메라, 부분적 또는 완전히 인간이도록 제작될 수 있다.

5.2.3. 융합체 및 접합체

[0185] 본 발명은 항-BTN1A1 항체 및 항-당화된 BTN1A1 항체를 비롯한, BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 제공한다. 일부 실시형태에서, 그러한 분자는 다른 단백질과의 융합 단백질로서 발현되거나 다른 모이어티에 화학적으로 접합된다.

[0186] 일부 실시형태에서, 분자는 Fc 부분을 가진 융합 단백질이며, 이때 Fc 부분은 이소타입 또는 서브클래스에 의해 변화될 수 있거나, 키메라 또는 하이브리드일 수 있거나, 및/또는 예를 들어, 이펙터 기능의 개선, 반감기의 제어, 조직 접근성, 생물물리적 특징, 예를 들어, 안정성의 증대, 및 생산 효율 개선(및 더 적은 비용)을 위하여 변형될 수 있다. 개시된 융합 단백질의 제작에서 유용한 많은 변형 및 그들의 제조 방법이 본 기술분야에 알려져 있으며, 예를 들어, Mueller, J. P. *et al.*, *Mol. Immun.* 34(6):441-452 (1997), Swann, P. G., *Curr. Opin. Immun.* 20:493-499 (2008), 및 Presta, L. G., *Curr. Opin. Immun.* 20:460-470 (2008)를 참고한다. 일부 실시형태에서 Fc 영역은 본래의 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 Fc 영역이다. 일부 실시형태에서 Fc 영역은 하이브리드, 예를 들어, IgG2/IgG4 Fc 불변 영역을 가진 키메라이다. Fc 영역에의 변형은 Fc 감마 수용체 및 보체에의 결합을 방지하기 위하여 변형된 IgG4, 하나 이상의 Fc 감마 수용체에의 결합을 개선하기 위하여 변형된 IgG1, 이펙터 기능을 최소화하기 위해 변형된 IgG1(아미노산 변화), (전형적으로 발현 숙주의 변화에 의해)변경된/무글리칸을 가진 IgG1, 및 FcRn에의 변경된 pH-의존성 결합을 가진 IgG1을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. Fc 영역은 전체 힌지 영역, 또는 전체 힌지 영역보다 적게 포함할 수 있다.

[0187] 다른 실시형태는 FcR에의 결합이 감소되어 그들의 반감기가 증가된 IgG2-4 하이브리드 및 IgG4 돌연변이체를 포함한다. 대표적인 IgG2-4 하이브리드 및 IgG4 돌연변이체는 Angal *et al.*, *Mol. Immunol.* 30(1):105-108 (1993); Mueller *et al.*, *Mol. Immun.* 34(6):441-452 (1997); 및 미국 특허 6,982,323호에 개시되며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 일부 실시형태에서, IgG1 및/또는 IgG2 도메인은 결실되며, 예를 들어, Angal *et al.*은 세린 241이 프롤린으로 치환된 IgG1 및 IgG2를 개시한다.

- [0188] 일부 실시형태에서, 분자는 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90 또는 적어도 100개 아미노산을 가진 폴리펩티드이다.
- [0189] 일부 실시형태에서, 본 발명은 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 제공하며, 이들은 적어도 하나의 모이어티에 연결되거나 공유적으로 결합하거나 모이어티와 복합체를 형성한다. 그러한 모이어티는 진단 또는 치료 제제로서 분자의 효능을 증가시키는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 모이어티는 영상 작용제, 독소, 치료 효소, 항생제, 방사성라벨링된 뉴클레오티드 등일 수 있다.
- [0190] 본 발명에서 제공되는 분자는 치료적 모이어티(또는 하나 이상의 치료적 모이어티들)를 포함할 수 있다. 본 발명에서 제공되는 분자는 세포독소, 예를 들어, 세포증식억제성 또는 세포파괴성 작용제와 같은 치료적 모이어티, 치료제 또는 방사성 금속 이온, 예를 들어, 알파-방출제에 접합되거나 재조합적으로 융합된 항체일 수 있다. 세포독소 또는 세포독성 작용제는 세포에 유해한 임의의 작용제를 포함한다. 치료적 모이어티는 항대사물(예를 들어, 메토트렉세이트(methotrexate), 6-머캡토퓨린(6-mercaptopurine), 6-티오구아닌(6-thioguanine), 시타라빈(cytarabine), 5-플루오로우라실 데카르바진(5-fluorouracil decarbazine)); 알킬화제(예를 들어, 메클로르에타민(mechlorethamine), 티오에파 클로람부실(thioepa chlorambucil), 멜파란(melphalan), 카르무스틴(carmustine)(BCNU) 및 로무스틴(lomustine)(CCNU), 시클로토스파미드(cyclothosphamide), 부설판(busulfan), 디브로모만니톨, 스트렙토조토신(streptozotocin), 미토마이신(mitomycin) C 및 시스디클로로디아민 플래티늄(II)(DDP), 및 시스플라틴(cisplatin)); 안트라사이클린(anthracycline)(예를 들어, 다우노루비신(daunorubicin)(이전에는 다우노마이신(daunomycin)) 및 독소루비신(doxorubicin)); 항생제(예를 들어, d 액티노마이신(actinomycin)(이전에는 액티노마이신), 블레오마이신(bleomycin), 미트라마이신(mithramycin) 및 안트라마이신(anthramycin)(AMC)); 오리스타틴(Auristatin) 분자(예를 들어, 오리스타틴 PHE, 오리스타틴 F, 모노메틸 오리스타틴 E, 브리오스타틴(bryostatin) 1, 및 솔라스타틴(solastatin) 10; Woyke *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3802-8 (2002), Woyke *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3580-4 (2001), Mohammad *et al.*, *Anticancer Drugs* 12:735-40 (2001), Wall *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:76-80 (1999), Mohammad *et al.*, *Int. J. Oncol.* 15:367-72 (1999)를 참고하며, 이들 모두는 참고로 본원에 포함됨); 호르몬(예를 들어, 글루코코르티코이드, 프로제스틴, 안드로겐 및 에스트로겐), DNA-복구 효소 억제제(예를 들어, 에토포시드(etoposide) 또는 토포테칸(topotecan)), 키나제 억제제(예를 들어, 화합물 ST1571, 이마티닙(imatinib) 메실레이트(Kantarjian *et al.*, *Clin Cancer Res.* 8(7):2167-76 (2002)); 세포독성 작용제(예를 들어, 파클리타센(paclitaxel), 시토칼라신(cytochalasin) B, 그라미시딘(gramicidin) D, 에티듐 브로마이드, 에메틴(emetine), 미토마이신(mitomycin), 에토포시드(etoposide), 테노포시드(tenoposide), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 콜히친(colchicine), 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 디하이드록시 안트라신 디온(dihydroxyanthracin dione), 미토잔트론(mitoxantrone), 미트라마이신(mithramycin), 액티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코르티코이드, 프로케인(procaine), 테트라케인(tetracaine), 리도케인(lidocaine), 프로프라놀올(propranolol), 및 퓨로마이신(puromycin) 및 그의 유사체 또는 상동체 및 미국 특허 6,245,759호, 6,399,633호, 6,383,790호, 6,335,156호, 6,271,242호, 6,242,196호, 6,218,410호, 6,218,372호, 6,057,300호, 6,034,053호, 5,985,877호, 5,958,769호, 5,925,376호, 5,922,844호, 5,911,995호, 5,872,223호, 5,863,904호, 5,840,745호, 5,728,868호, 5,648,239호, 5,587,459호에 개시된 화합물); 파르네실트랜스퍼라제 억제제(예를 들어, R115777, BMS-214662, 및 예를 들어, 미국 특허 6,458,935호, 6,451,812호, 6,440,974호, 6,436,960호, 6,432,959호, 6,420,387호, 6,414,145호, 6,410,541호, 6,410,539호, 6,403,581호, 6,399,615호, 6,387,905호, 6,372,747호, 6,369,034호, 6,362,188호, 6,342,765호, 6,342,487호, 6,300,501호, 6,268,363호, 6,265,422호, 6,248,756호, 6,239,140호, 6,232,338호, 6,228,865호, 6,228,856호, 6,225,322호, 6,218,406호, 6,211,193호, 6,187,786호, 6,169,096호, 6,159,984호, 6,143,766호, 6,133,303호, 6,127,366호, 6,124,465호, 6,124,295호, 6,103,723호, 6,093,737호, 6,090,948호, 6,080,870호, 6,077,853호, 6,071,935호, 6,066,738호, 6,063,930호, 6,054,466호, 6,051,582호, 6,051,574호, 및 6,040,305호에 의해 개시된 것들); 토포이소머라제(topoisomerase) 억제제(예를 들어, 캄토테신(camptothecin); 아리노테칸(irinotecan); SN-38; 토포테칸(topotecan); 9-아미노캄토테신(9-aminocamptothecin); GG-211(GI 147211); DX-8951f; IST-622; 루비테칸(rubitecan); 피라졸로아크리딘(pyrazoloacridine); XR-5000; 사인토핀(saintopin); UCE6; UCE1022; TAN-1518A; TAN 1518B; KT6006; KT6528; ED-110; NB-506; ED-110; NB-506; 및 레베카마이신(rebeccamycin)); 불가레인(bulgarein); DNA 마이너 그루브(minor groove) 결합제, 예를 들어, 흐스트(Hoescht) 염료 33342 및 흐스

트 염료 33258; 니티딘(nitidine); 파가로닌(fagaronine); 에피베르베린(epiberberine); 코라린(coralyne); 베타-라파콘(beta-lapachone); BC-4-1; 비스포스포네이트(예를 들어, 알렌드로네이트(alendronate), 시마드로네이트(cimadrone), 클로드로네이트(clodronate), 티루드로네이트(tiludronate), 에티드로네이트(etidronate), 이반드로네이트(ibandronate), 네리드로네이트(neridronate), 올판드로네이트(olpandronate), 리세드로네이트(risedronate), 피리드로네이트(piridronate), 패미드로네이트(pamidronate), 조렌드로네이트(zolendronate)); HMG-CoA 리덕타제 억제제(예를 들어, 로바스타틴(lovastatin), 심바스타틴(simvastatin), 아토르바스타틴(atorvastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 플루바스타틴(fluvastatin), 스타틴(statin), 세리바스타틴(cerivastatin), 레스콜(lescol), 루피톨(lupitor), 로수바스타틴/rosuvastatin) 및 아토르바스타틴(atorvastatin)); 안티센스 올리고뉴클레오티드(예를 들어, 미국 특허 6,277,832호, 5,998,596호, 5,885,834호, 5,734,033호, 및 5,618,709호에 개시된 것); 아데노신 디아미나제 억제제(예를 들어, 플루다라빈 포스페이트 및 2-클로로데옥시아데노신); 이브리투모맙 티옥세탄(ibritumomab tiuxetan)(제바린(Zevalin)®); 토시투모맙(tositumomab)(백사르(Bexxar)®) 및 그의 약학적 허용 염, 용매화물, 클라트레이트(clathrate) 및 전구약물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0191]

추가로, 본 발명에서 제공되는 분자는 주어진 생물 반응을 변형시키는 치료적 모이어티 또는 약물 모이어티에 접합되거나 재조합적으로 융합된 항체일 수 있다. 치료적 모이어티 또는 약물 모이어티는 전통적인 화학적 치료제에 제한되는 것으로 이해되어서는 안된다. 예를 들어, 약물 모이어티는 원하는 생물학적 활성을 보유한 단백질, 웨티드 또는 폴리웨티드일 수 있다. 그러한 단백질은 예를 들어, 아브린(abrin), 리신(ricin) A, 슈도모나스 외독소, 콜레라 독소, 또는 디프테리아 독소와 같은 독소; 종양 괴사 인자, γ -인터페론, α -인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성자, 어펩토시스 작용제, 예를 들어, TNF- γ , TNF- γ , AIM I(국제 공개 WO 97/33899호 참고), AIM II(국제 공개 WO 97/34911호 참고), Fas 리간드(Takahashi *et al.*, 1994, *J. Immunol.*, 6:1567-1574), 및 VEGF(국제 공개 WO 99/23105호 참고), 항-혈관신생제, 예를 들어, 안지오스타틴, 엔도스타틴 또는 응고 경로의 성분(예를 들어, 조직 인자)와 같은 단백질; 또는 생물 반응 개질제, 예를 들어, 림포카인(예를 들어, 인터페론 감마, 인터루킨-1("IL-1"), 인터루킨-2("IL-2"), 인터루킨-5("IL-5"), 인터루킨-6("IL-6"), 인터루킨-7("IL-7"), 인터루킨 9("IL-9"), 인터루킨-10("IL-10"), 인터루킨-12("IL-12"), 인터루킨-15 ("IL-15"), 인터루킨-23("IL-23"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자("GM-CSF") 및 과립구 콜로니 자극 인자("G-CSF")), 또는 성장 인자(예를 들어, 성장 호르몬("GH")), 또는 응고 작용제(예를 들어, 칼슘, 비타민 K, 조직 인자, 예를 들어, 그러나 이에 제한되지 않는 하게만(Hageman) 인자(인자 XIII), 고분자량 키니노겐(kininogen)(HMWK), 프레칼리크레인(prekallikrein)(PK), 응고 단백질-인자 II(프로트롬빈), 인자 V, XIIa, VIII, XIIIa, XI, XIa, IX, IXa, X, 인지질 및 페브린 단량체)를 포함할 수 있다.

[0192]

또한, 본 발명에서 제공되는 항체는 방사성 금속 이온, 예를 들어, 알파-방출제, 예를 들어, ^{213}Bi 와 같은 치료적 모이어티 또는 ^{131}In , ^{131}LU , ^{131}Y , ^{131}Ho , ^{131}Sm 을 포함하지만 이에 제한되지 않는 방사성금속 이온을 폴리웨티드에 접합하는데 유용한 대환식 킬레이터에 접합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 대환식 킬레이터는 링커 분자를 통해 항체에 부착될 수 있는 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(DOTA)이다. 그러한 링커 분자는 본 기술분야에 일반적으로 알려져 있으며 Denardo *et al.*, 1998, *Clin Cancer Res.* 4(10):2483-90; Peterson *et al.*, 1999, *Bioconjug. Chem.* 10(4):553-7; 및 Zimmerman *et al.*, 1999, *Nucl. Med. Biol.* 26(8):943-50에 개시되며 그 각각은 그 전체가 참고로 포함된다.

[0193]

BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 본 발명에서 제공되는 항체에 접합되거나 재조합적으로 융합된 치료적 모이어티 또는 약물을 원하는 예방 또는 치료 효과(들)를 이루도록 선택되어야 한다. 일부 실시형태에서, 항체는 변형된 항체이다. 의사 또는 다른 의료진은 본 발명에서 제공되는 항체에 접합하거나 재조합적으로 융합할 치료적 모이어티 또는 약물을 결정할 때는 하기를 고려해야 한다: 질병의 특성, 질병의 심각도 및 개체의 병태.

[0194]

일부 실시형태에서, 모이어티는 효소, 호르몬, 세포 표면 수용체, 독소(예를 들어, 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소(즉, PE-40), 디프테리아 독소, 리신, 젤로닌(gelonin) 또는 미국자리공 항바이러스 단백질), 단백질(예를 들어, 종양 괴사 인자, 인터페론(예를 들어, α -인터페론, β -인터페론), 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성자, 또는 어펩토시스 작용제(예를 들어, 종양 괴사 인자- α , 종양 괴사 인자- β)), 생물 반응 개질제(예를 들어, 림포카인(예를 들어, 인터루킨-1("IL-1"), 인터루킨-2("IL-2"), 인터루킨-6("IL-6")), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자("GM-CSF"), 과립구 콜로니 자극 인자("G-CSF") 또는 대식세포 콜로니 자극 인자("M-CSF")), 또는 성장 인자(예를 들어, 성장 호르몬("GH"))), 세포독소(예를 들어, 세포증식 억제 또는 세포파괴 작용제, 예를 들어, 파클리탁셀, 시토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티듐 브로마이드, 에메틴,

미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빙크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미토잔트론, 미트라마이신, 액티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코르티코이드, 프로케인, 테트라케인, 리도케인, 프로프라놀올, 모노메틸 오리스타틴 F(MMAF), 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE; 예를 들어, 베도틴(vedotin)) 및 퓨로마이신 및 그의 유사체 또는 상동체), 항대사물(예를 들어, 메토트렉세이트, 6-머캡토퓨린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제(예를 들어, 메클로르에타민, 티오에파 클로람부실, 멜파란, BiCNU®(카르무스틴;BCNU) 및 로무스틴(CCNU), 시클로토스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C 및 시스디클로로디아민 플래티늄(II)(DDP), 시스플라틴); 안트라사이클린(예를 들어, 다우노루비신(이전에는 다우노마이신) 및 독소루비신); 항생제(예를 들어, 닥티노마이신(이전에는 액티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신(AMC)), 또는 항-유사분열 작용제(예를 들어, 빙크리스틴 및 빈블라스틴)일 수 있다.

[0195] 그러한 치료적 모이어티를 항체에 접합하기 위한 기술은 잘 알려져 있으며; 예를 들어, Amon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Reisfeld *et al.* (eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in CONTROLLED DRUG DELIVERY (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in MONOCLONAL ANTIBODIES '84: BIOLOGICAL AND CLINICAL APPLICATIONS, Pinchera *et al.* (eds.), 1985, pp. 475-506); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in MONOCLONAL ANTIBODIES FOR CANCER DETECTION AND THERAPY, Baldwin *et al.* (eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; Thorpe *et al.*, *Immuno1. Rev.* 62:119-158 (1982); Carter *et al.*, *Cancer J.* 14(3):154-169 (2008); Alley *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14(4):529-537 (2010); Carter *et al.*, *Amer. Assoc. Cancer Res. Educ. Book.* 2005(1):147-154 (2005); Carter *et al.*, *Cancer J.* 14(3):154-169(2008); Chari, *Acc. Chem Res.* 41(1):98-107 (2008); Doronina *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784(2003); Ducry *et al.*, *Bioconjug Chem.* 21(1):5-13(2010); Senter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13(3):235-244 (2009); 및 Teicher, *Curr Cancer Drug Targets.* 9(8):982-1004 (2009)를 참고한다.

[0196] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 분자는 정제를 촉진하기 위하여, 웨티드와 같은 마커에 접합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 마커는 핵사-히스티딘 웨티드(서열 번호 55), 인플루엔자 혜마글루티닌 단백질로부터 유도된 에피토프에 해당하는 혜마글루티닌 "HA" 태그(Wilson, I. A. *et al.*, *Cell*, 37:767-778 (1984)), 또는 "플래그" 태그(Knappik, A. *et al.*, *Biotechniques* 17(4):754-761 (1994))이다.

[0197] 일부 실시형태에서, 모이어티는 분석에서 검출될 수 있는 영상 작용제일 수 있다. 그러한 영상 작용제는 효소, 보결분자단, 방사성라벨, 비방사성 상자성 금속 이온, 합텐, 형광 라벨, 인광 분자, 화학발광 분자, 발색단, 발광 분자, 생물발광 분자, 광친화성 분자, 착색된 입자 또는 리간드, 예를 들어, 비오틴일 수 있다.

[0198] 일부 실시형태에서, 효소는 호스래디쉬 페옥시다제, 알카라인 포스파타제, 베타-갈락토시다제 또는 아세틸콜린 에스테라제를 포함하지만 이에 한정되지 않으며; 보결분자단 복합체는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하지만 이에 한정되지 않으며; 형광 물질은 웜밸리페론, 플루오르세인, 플루오르세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오르세인, 댄실 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함하지만 이에 한정되지 않으며; 발광 물질은 루미놀을 포함하지만 이에 한정되지 않으며; 생물발광 물질은 루시퍼라제, 루시페린 및 애퀴린(aequorin)을 포함하지만 이에 한정되지 않으며; 방사성 물질은 비스무스(²¹³Bi), 탄소(¹⁴C), 크롬(⁵¹Cr), 코발트(⁵⁷Co), 불소(¹⁸F), 가돌리늄(¹⁵³Gd, ¹⁵⁹Gd), 갈륨(⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), 게르마늄(⁶⁸Ge), 홀뮴(¹⁶⁶Ho), 인듐(¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), 요오드(¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), 란타늄(¹⁴⁰La), 류테튬(¹⁷⁷Lu), 망간(⁵⁴Mn), 몰리브덴(⁹⁹Mo), 팔라듐(¹⁰³Pd), 인(³²P), 프라세오디뮴(¹⁴²Pr), 프로메튬(¹⁴⁹Pm), 레늄(¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re), 로듐(¹⁰⁵Rh), 루테븀(⁹⁷Ru), 사마리움(¹⁵³Sm), 스칸듐(⁴⁷Sc), 셀레늄(⁷⁵Se), 스트론튬(⁸⁵Sr), 황(³⁵S), 테크네튬(⁹⁹Tc), 탈륨(²⁰¹Tl), 주석(¹¹³Sn, ¹¹⁷Sn), 삼중수소(³H), 크세논(¹³³Xe), 이테르비움(¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb), 이트륨(⁹⁰Y), 아연(⁶⁵Zn); 다양한 양전자 방출 단층촬영술을 이용하는 양전자 방출 금속, 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0199] 영상 작용제는 본 기술분야에 알려진 기술을 이용하여 직접적으로 또는 중간체(예를 들어, 본 기술분야에 알려진 링커)를 통해 간접적으로 항원 결합 단편을 가진 분자에 접합될 수 있다. 예를 들어, 진단제로서 사용하기 위하여 본 명세서에 개시된 항체 및 다른 분자에 접합될 수 있는 금속 이온을 위해 미국 특허 4,741,900호를 참고한다. 일부 접합 방법은 예를 들어, 항체에 부착된 디에틸렌트리아민펜타아세트산 안하이드라이드(DTPA); 애

틸렌트리아민테트라아세트산; N-클로로-p-톨루엔설폰아미드; 및/또는 테트라클로로-3-6 α -디페닐글리코우릴-3과 같은 유기 칼레이팅제를 이용하는 금속 칼레이트 복합체의 사용에 관련된다. 단클론 항체는 또한 글루타르알데히드 또는 폐리오데이트와 같은 커플링제의 존재하에서 효소와 반응될 수 있다. 플루오르세인 마커와의 접합체는 이들 커플링제의 존재하에서 또는 이소티오시아네이트와의 반응에 의해 제조될 수 있다.

[0200] 본 명세서에 개시된 분자는 미국 특허 4,676,980호에서 Segal에 의해 개시된 대로 항체 이종접합체를 형성하기 위하여 제2 항체에 접합될 수 있다. 그러한 이종접합체 항체는 부가적으로 핫텐(예를 들어, 플루오르세인)에, 또는 세포 마커(예를 들어, 4-1-BB, B7-H4, CD4, CD8, CD14, CD25, CD27, CD40, CD68, CD163, CTLA4, GITR, LAG-3, OX40, TIM3, TIM4, TLR2, LIGHT, ICOS, B7-H3, B7-H7, B7-H7CR, CD70, CD47)에 또는 사이토카인(예를 들어, IL-7, IL-15, IL-12, IL-4 TGF-베타, IL-10, IL-17, IFN γ , Flt3, BLys) 또는 케모카인(예를 들어, CCL21)에 결합할 수 있다.

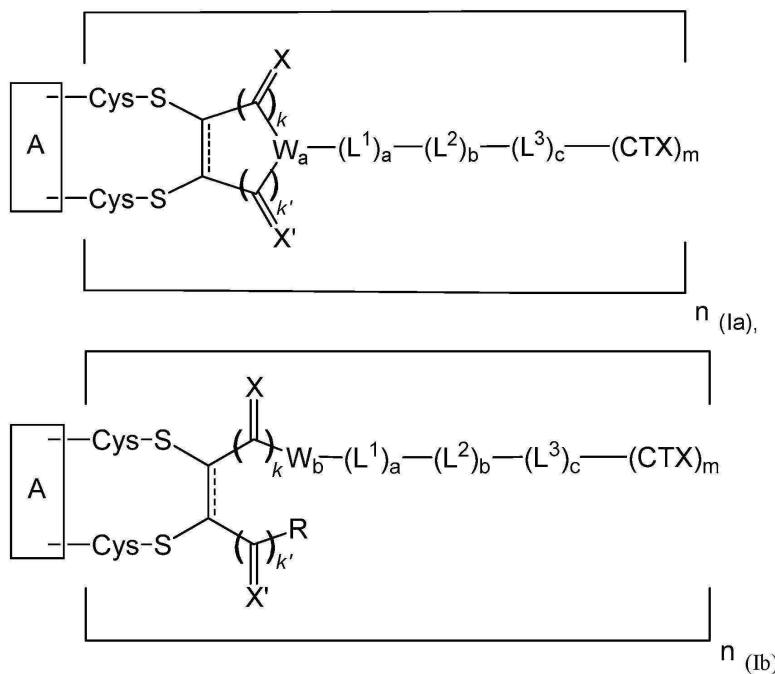
[0201] 본 명세서에 개시된 분자는 고형 지지체에 부착될 수 있으며, 이는 타겟 항원 또는 본 명세서에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편에의 결합을 통해 지지체에 고정된 타겟 항원에 결합할 수 있는 다른 분자의 면역분석 또는 정제를 위해 유용할 수 있다. 그러한 고형 지지체는 유리, 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리프로필렌을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0202] 본 발명은 또한 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 임의의 그러한 항체, 항원 결합 단편, 및 분자를 인코딩하는 핵산 분자(DNA 또는 RNA)를 제공한다. 본 발명은 또한 그러한 핵산 분자를 전달하거나 복제할 수 있는 벡터 분자(예를 들어, 플라스미드)를 제공한다. 핵산은 단일쇄, 이중쇄일 수 있으며, 단일쇄 및 이중쇄 부분 둘 모두를 함유할 수 있다.

항체-약물 접합체(ADC)

[0204] 본 발명에서 제공되는 분자는 세포내로 BTN1A1의 내부화를 야기할 수 있다. 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 임의의 항-BTN1A1 항체를 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)를 제공한다. 구체적 실시형태에서, 본 발명은 항체로서 STC810 또는 그의 인간화 변이체를 갖는 ADC를 제공한다.

[0205] 일부 실시형태에서, 본 발명은 하기 식 (Ia) 및 (Ib)의 항체-약물 접합체를 비롯한, 항체-약물 접합체 또는 그의 약학적 허용염을 제공한다:



[0206]

[0207] 상기 식에서,

[0208] A는 항원 결합 단편을 가진 분자이며;

[0209] 두 개의 도시된 시스테인 잔기는 A내의 개방된 시스테인-시스테인 디설파이드 결합으로부터 오며;

- [0210] 각각의 X 및 X'은 독립적으로 O, S, NH, 또는 NR¹이며, 이때 R¹은 C₁₋₆ 알킬이며;
- [0211] W_a는 =N-, =CH-, =CHCH₂-, =C(R²)-, 또는 =CHCH(R²)-이고; W_b는 =NH-, =N(R¹)-, =CH₂-, =CH₂NH-, =CH₂N(R¹)-, =CH₂CH₂-, =CH(R²)-, 또는 =CH₂CH(R²)-이며; 이때 R¹ 및 R²는 독립적으로 C₁₋₆ 알킬이며;
- [0212] CTX는 세포독소이고;
- [0213] R은 임의의 화학기이며; 또는 R은 부재하며;
- [0214] 각각의 L¹, L² 및 L³은 독립적으로 -O-, -C(O)-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -NH-, -NCH₃-, -(CH₂)_q-, -NH(CH₂)₂NH-, -OC(O)-, -CO₂-, -NHCH₂CH₂C(O)-, -C(O)NHCH₂CH₂NH-, -NHCH₂C(O)-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -NCH₃C(O)-, -C(O)NCH₃- , -(CH₂CH₂O)_p, -(CH₂CH₂O)_pCH₂CH₂-, -CH₂CH₂-(CH₂CH₂O)_p-, -OCH(CH₂O)-₂, -(AA)_r-, 시클로펜타닐, 시클로헥사닐, 비치환 페닐에닐, 및 할로, CF₃-, CF₃O-, CH₃O-, -C(O)OH, -C(O)OC₁₋₃ 알킬, -C(O)CH₃, -CN, -NH-, -NH₂, -O-, -OH, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, 및 C₁₋₃ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된 1 또는 2 치환기에 의해 치환된 페닐에닐로 이루어진 군으로부터 선택된 링커이며;
- [0215] a, b 및 c는 각각 독립적으로 0, 1, 2 또는 3의 정수이며, 단 a, b 또는 c 중 적어도 하나는 1이며;
- [0216] 각각의 k 및 k'은 독립적으로 0 또는 1의 정수이고;
- [0217] 각각의 p는 독립적으로 1 내지 14의 정수이며;
- [0218] 각각의 q는 독립적으로 1 내지 12의 정수이고;
- [0219] 각각의 AA는 독립적으로 아미노산이며;
- [0220] 각각의 r은 1 내지 12이고;
- [0221] m은 1 내지 4의 정수이며;
- [0222] n은 1 내지 4의 정수이고;
- [0223] ----- 결합은 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.
- [0224] 화학식 (Ib)의 항체-약물 접합체(ADC)의 일부 실시형태에서, R은 본 명세서에서 정의된 대로, W, (L¹)_a, (L²)_b, (L³)_c, Z, W-(L¹)_a-(L²)_b-(L³)_c, (L¹)_a-(L²)_b-(L³)_c-Z, 및 W-(L¹)_a-(L²)_b-(L³)_c-Z로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, R은 W, (L¹)_a, (L²)_b, (L³)_c, 및 W-(L¹)_a-(L²)_b-(L³)_c로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, R은 Z, (L¹)_a-(L²)_b-(L³)_c-Z, 및 W-(L¹)_a-(L²)_b-(L³)_c-Z로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0225] 화학식 (Ib)의 항체-약물 접합체(ADC)의 일부 실시형태에서, R은 검출가능한 프로브이다. 일부 실시형태에서, R은 형광단, 발색단, 방사성라벨, 효소, 리간드, 항체 또는 항체 단편이다. 일부 실시형태에서, R은 리간드(예를 들어, 종양 세포 상의 수용체에 대해 특이적인 리간드, 예를 들어, 전립선 특이적 막 항원, 또는 바이러스 감염된 세포, 예를 들어, HIV 감염된 세포)이다.
- [0226] 화학식 (Ib)의 항체-약물 접합체(ADC)의 일부 실시형태에서, R은 아미드, N-(C₁₋₆ 알킬)아미드, 카바메이트, N-(C₁₋₆ 알킬)카바메이트, 아민, N-(C₁₋₆ 알킬)아민, 에테르, 티오에테르, 우레아, N-(C₁₋₆ 알킬)우레아, 또는 N,N-디(C₁₋₆ 알킬)우레아 결합을 통해 링커 분자의 나머지에 결합된다.
- [0227] 화학식 (Ia) 또는 (Ib)의 항체-약물 접합체(ADC)의 일부 실시형태에서, 각각의 L¹, L² 및 L³은 -NHC(O)-, -C(O)NH-, -(CH₂CH₂O)_p, -(CH₂CH₂O)_pCH₂CH₂-, -CH₂CH₂-(CH₂CH₂O)_p-, -OCH(CH₂O)-₂, -(AA)_r-, 비치환된 페닐에닐, 및 할로, CF₃-, CF₃O-, CH₃O-, -C(O)OH, -C(O)OC₁₋₃ 알킬, -C(O)CH₃, -CN, -NH-, -NH₂, -O-, -OH, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, 및 C₁₋₃ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 또는 2 치환기에 의해 치환된 페닐에닐로 이루어진 군으로부터

독립적으로 선택되며; 이때 a, b 및 c는 각각 독립적으로 0 또는 1이고; 각각의 p와 r은 독립적으로 1, 2 또는 3이다. 일부 실시형태에서, L^1 , L^2 및 L^3 중 하나 이상은 $-(AA)_r$ -이고, 이때 $-(AA)_r$ -은 ValCit (예를 들어, 첫번째 아미노산은 발린이고, 두번째 아미노산은 시트룰린이고, r은 1임)이다. 일부 실시형태에서, L^1 , L^2 및 L^3 중 하나 이상은 $-(AA)_r$ -이고, 이때 $-(AA)_r$ -은 ValAla(예를 들어, 첫번째 아미노산은 발린이고, 두번째 아미노산은 알라닌이고, r은 1임)이다. 일부 실시형태에서, L^1 , L^2 및 L^3 중 하나 이상은 $-C(O)OH$ 및 $-NH_2$ 에 의해 치환된 페닐에닐이다. 일부 실시형태에서, L^1 , L^2 및 L^3 중 하나 이상은 $-C(O)OH$ 및 $-NH$ 에 의해 치환된 페닐에닐이다. 일부 실시형태에서, L^1 , L^2 및 L^3 중 하나 이상은 $-OC(O)-$ 및 $-NH-$ 에 의해 치환된 페닐에닐이다. 일부 실시형태에서, L^1 , L^2 및 L^3 중 하나 이상은 $-O-$ 및 $-NH-$ 에 의해 치환된 페닐에닐이다. 일부 실시형태에서, L^1 , L^2 및 L^3 중 하나 이상은 $-C(O)O-$, $-OC(O)-$ 또는 $-O-$ 로 선택적으로 치환되는 파라 아미노벤질(PAB)이다. 일부 실시형태에서, L^1 은 $-(CH_2)_q$ -이고, L^2 는 부재하며, L^3 은 부재하고, CTX는 아미드 결합을 통해 $(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c$ 에 결합된다. 일부 실시형태에서, L^1 은 $-(CH_2)_q$ -이고, L^2 는 $-(OCH_2CH_2)_p$ -이며, L^3 은 부재하고, CTX는 아미드 결합을 통해 $(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c$ 에 결합된다. 일부 실시형태에서, L^1 은 $-(CH_2CH_2O)_p$ -이고, L^2 는 $-(CH_2)_q$ -이며, L^3 은 부재하고, CTX는 아미드 결합을 통해 $(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c$ 에 결합된다. 일부 실시형태에서, 각각의 L^1 은 $-(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2-$ 및 $-CH_2CH_2-(CH_2CH_2O)_p-$ 로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택되며, L^2 는 부재하고, L^3 은 부재하며, CTX는 아미드 결합을 통해 $(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c$ 에 결합된다. 일부 실시형태에서, 각각의 L^1 은 $-(CH_2)_q-$, $-(CH_2CH_2O)_p-$, $-(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2-(CH_2CH_2O)_p-$, 및 $-C(O)-$ 로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택되며, L^2 는 Val-Cit이고, L^3 은 PAB이며, CTX는 아미드 결합을 통해 $(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c$ 에 결합된다. 일부 실시형태에서, 각각의 L^1 은 $-(CH_2)_q-$, $-(CH_2CH_2O)_p-$, $-(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2-(CH_2CH_2O)_p-$, 및 $-C(O)-$ 로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택되며, L^2 는 Val-Ala이고, L^3 은 PAB이며, CTX는 아미드 결합을 통해 $(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c$ 에 결합된다. 일부 실시형태에서, 각각의 L^1 은 $-(CH_2)_q-$, $-(CH_2CH_2O)_p-$, $-(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2-(CH_2CH_2O)_p-$, 및 $-C(O)-$ 로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택되며, L^2 는 Val-Cit이고, L^3 은 PAB이며, CTX는 아미드 결합을 통해 $(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c$ 에 결합된다. 일부 실시형태에서, 각각의 L^1 은 $-(CH_2)_q-$, $-(CH_2CH_2O)_p-$, $-(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2-(CH_2CH_2O)_p-$, 및 $-C(O)-$ 로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택되며, L^2 는 Val-Ala이고, L^3 은 PAB이며, CTX는 아미드 결합을 통해 $(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c$ 에 결합된다.

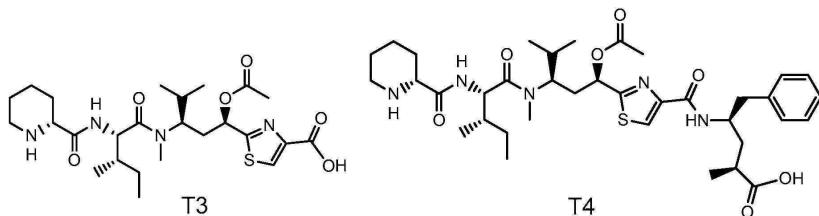
- [0228] 화학식 (Ia) 또는 (Ib)의 항체-약물 접합체(ADC)의 일부 실시형태에서, CTX는 튜불린 안정화제, 튜불린 불안정화제, DNA 알킬화제, DNA 마이너 그루브 결합제, DNA 인터칼레이터, 토포이소머라제 I 억제제, 토포이소머라제 II 억제제, 기라제(gyrase) 억제제, 단백질 합성 억제제, 프로테오좀 억제제 및 항-대사물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0229] 화학식 (Ia) 또는 (Ib)의 항체-약물 접합체(ADC)의 일부 실시형태에서, CTX는 화학요법제이다. 당업자는 예를 들어, Chu, E., DeVite, V. T., 2012, Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual 2012 (Jones & Bartlett Learning Oncology), 및 유사한 문서에서 개시된 적절한 화학요법제를 알고 있을 것이다.
- [0230] 일부 실시형태에서, CTX는 임의의 FDA-승인된 화학요법제이다. 일부 실시형태에서, CTX는 암 치료를 위해 이용 가능한 임의의 FDA-승인된 화학요법제일 수 있다.
- [0231] 일부 실시형태에서, CTX는 알킬화제, 안트라사이클린, 세포골격 과괴물질(cytoskeletal disruptor)(탁산(taxane)), 에포티론(epothilone), 히스톤 데아세틸라제 억제제(HDAC), 토포이소머라제 I의 억제제, 토포이소머라제 II의 억제제, 키나제 억제제, 단클론 항체, 뉴클레오티드 유사체, 웨티드 항생제, 백금계 작용제, 레티노이드, 빈카(Vinca) 알카로이드 또는 그 유도체, 및 방사성동위원소로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0232] 일부 실시형태에서, CTX는 액티노마이신, 올-트랜스 레티노산(all-trans retinoic acid), 아자시티딘(Azacitidine), 아자티오프린(Azathioprine), 블레오마이신, 보르테조맙(Bortezomib), 카르보플라틴(Carboplatin), 카페시타빈(Capecitabine), 시스플라틴, 클로람부실, 시클로포스파미드(Cyclophosphamide), 시

타라빈, 다우노루비신, 도세탁셀(Docetaxel), 독시플루리딘(Doxifluridine), 독소루비신, 에피루비신(Epirubicin), 에포티론, 에토포시드, 플루오로우라실, 젬시타빈(Gemcitabine), 하이드록시우레아(Hydroxyurea), 이다루비신(Idarubicin), 이마티닙, 이리노테칸, 메클로르에타민, 머캡토퓨린, 메토트렉세이트, 미토잔트론, 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀, 페메트렉세드(Pemetrexed), 테니포시드(Teniposide), 티오구아닌, 토포테칸, 발루비신(Valrubicin), 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신(Vindesine), 및 비노렐빈(Vinorelbine)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

일부 실시형태에서, CTX는 투불린 안정화제, 투불린 불안정화제, DNA 알킬화제, DNA 마이너 그루브 결합제, DNA 인터칼레이터, 토포이소머라제 I 억제제, 토포이소머라제 II 억제제, 기라제 억제제, 단백질 합성 억제제, 프로테오좀 억제제 및 항-대사물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

일부 실시형태에서, CTX는 액티노마이신 D, 아모나피드(Amonafide), 오리스타틴, 벤조페논, 벤조티아졸, 칼리케미신, 캄토테신, CC-1065(NSC 298223), 세마도틴(Cemadotin), 콜히친, 콤브레타스타틴(Combretastatin) A4, 도라스타틴(Dolastatin), 독소루비신, 엘리나피드(Elinafide), 엠탄신(Emtansine)(DM1), 에토포시드, KF-12347(레이이나마이신(Leinamycin)), 메이탄시노이드, 메토트렉세이트, 미토잔트론, 노코다졸(Nocodazole), 프로테오좀 억제제 1(PSI 1), 로리딘(Roridin) A, T-2 독소(트리코테센 유사체), 탁솔(Taxol), 투불리신, 벨카드(Velcade)®, 및 빙크리스틴으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, CTX는 오리스타틴, 칼리케미신, 메이탄시노이드, 또는 투불리신이다.

일부 실시형태에서, CTX는 모노메틸오리스타틴(monomethylauristatin) E (MMAE), 모노메틸오리스타틴 F(MMAF), 피롤로벤조디아제핀(PDB), 칼리케미신 γ , 메르탄신 또는 투불리신 T2이다. 일부 실시형태에서, CTX는 MMAE 또는 MMAF이다. 일부 실시형태에서, CTX는 PDB이다. 일부 실시형태에서, CTX는 투불리신 T2이다. 일부 실시형태에서, CTX는 투불리신 T3, 또는 투불리신 T4이며, 그 구조가 하기에 제공된다:



따라서, 본 발명에서 제공되는 접합 또는 융합 단백질은 본 명세서에 개시된 임의의 항-BTN1A1 항체 또는 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 접합 또는 융합 단백질은 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH 또는 VL 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 접합 또는 융합 단백질은 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH 및 VL 도메인 둘 모두를 포함한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명에서 제공되는 접합 또는 융합 단백질은 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VH CDR 하나 이상을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 접합 또는 융합 단백질은 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VL CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VL CDR 하나 이상을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 접합 또는 융합 단백질은 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 적어도 하나의 VH CDR 및 적어도 하나의 VL CDR을 포함한다.

일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 접합 또는 융합 단백질은 본 명세서에 개시된 BTN1A1 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하는 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. BTN1A1 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC810의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 접합 또는 융합 단백질은 본 명세서에 개시된 BTN1A1의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. BTN1A1 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC810의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, BTN1A1 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 5개 연속 아미노산을 갖는다.

5.3 조성물

본 발명은 또한 BTN1A1(당화된 BTN1A1 포함)에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 갖는 분자를 가진 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 항-BTN1A1 항체(항-당화된 BTN1A1 항체 포함)를 가진다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215, 및/또는 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원

결합 단편은 위치 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 하나 이상의 당화 모티프에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다.

[0241] 일부 실시형태에서, 본 발명은 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 문자를 갖는 조성물을 제공하며, 이때 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55, N215, 및/또는 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N215에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 하나 이상의 당화 모티프에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55 및 N215에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55, N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다.

[0242] 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd의 절반 보다 적은 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd보다 적어도 10배 적은 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다.

[0243] 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI의 적어도 두배 높은 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI의 적어도 5배의 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합한다.

[0244] 일부 양태에서, 본 발명은 위치 N55, N215, 및/또는 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹하는 항원 결합 단편을 가진 문자를 갖는 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 BTN1A1의 하나 이상의 당화 모티프를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N215에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215 및 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215 및 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다.

[0245] 일부 실시형태에서, 조성물은 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH 또는 VL 도메인을 포함하는 항원 결합 단편을 가진 문자를 가질 수 있다. 일 실시형태에서, 조성물은 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH 및 VL 도메인 둘 모두를 포함하는 항원 결합 단편을 가진 문자를 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 조성물은 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VH CDR 하나 이상을 포함하는 항원 결합 단편을 가진 문자를 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 조성물은 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VL CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VL CDR 하나 이상을 포함하는 항원 결합 단편을 가진 문자를 가질 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH CDR 및 VL CDR을 포함하는 항원 결합 단편을 가진 문자를 가질 수 있다.

[0246] 일부 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에 개시된 BTN1A1 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하는 항원 결합 단편을 가진 문자를 가질 수 있다. BTN1A1 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC810의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에 개시된 BTN1A1의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 문자를 가질 수 있다. BTN1A1 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC810의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, BTN1A1 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 5개 연속 아미노산을 갖는다.

[0247]

일부 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에 개시된 항체 또는 다른 분자를 적어도 0.1 중량% 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 항-BTN1A1 항체 또는 다른 분자를 중량 기준으로 적어도 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 그보다 많이 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 예를 들어, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 항-BTN1A1 항체 또는 다른 분자는 조성물 중량의 약 2% 내지 약 75%, 약 25% 내지 약 60%, 약 30% 내지 약 50%, 또는 그안의 임의의 범위를 차지할 수 있다.

[0248]

조성물은 활성 성분으로서 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 항-BTN1A1 항체 또는 다른 분자, 및 약학적 허용 담체를 갖는 약학 조성물일 수 있다. 약학 조성물은 추가로 하나 이상의 부가적인 활성 성분을 포함할 수 있다. 약학적 허용 담체는 연방 정부 또는 주 정부의 관리 기관에 의해 승인되거나, 미국 약전, 유럽 약전 또는 다른 일반적으로 인정되는 약전에서 동물, 그리고 더욱 구체적으로는 인간에서의 사용을 위해 열거된 담체일 수 있다.

[0249]

활성 성분으로서 본 명세서에 개시된 항체 또는 다른 분자를 가진 약학 조성물의 제제는, 참고로 본원에 포함되는 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990에 의해 예시되는 바와 같이, 본 발명에 비추어 당업자에게 알려져 있다. 또한, 동물(인간 포함) 투여의 경우, 제제는 FDA 생물 표준국(Office of Biological Standards)에 의해 요구되는 멸균성, 발열원성, 일반적 안전성 및 순도 표준을 충족해야 한다.

[0250]

약학적 허용 담체는 액체, 반고체, 즉, 페이스트, 또는 고체 담체를 포함한다. 담체 또는 희석제의 예는 지방, 오일, 물, 생리식염수, 지질, 리포좀, 수지, 결합제, 충전제 등, 또는 그 조합을 포함한다. 약학적 허용 담체는 당업자에게 알려진 것처럼, 수성 용매(예를 들어, 물, 알콜성/수성 용액, 에탄올, 생리식염수, 비경구 비허클, 예를 들어, 염화나트륨, 링거 텍스트로스, 등), 비수성 용매(예를 들어, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일 및 주사용 유기 에스테르, 예를 들어, 에틸올리에이트), 분산 매질, 코팅(예를 들어, 레시틴), 계면활성제, 산화방지제, 방부제(예를 들어, 항균 또는 항진균 작용제, 항-산화제, 퀼레이팅제, 불활성 가스, 파라벤(예를 들어, 메틸파라벤, 프로필파라벤), 클로로부탄올, 페놀, 솔브산, 티메로살), 등장성 작용제(예를 들어, 당, 염화나트륨), 흡수 지연제(예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트, 젤라틴), 염, 약물, 약물 안정화제(예를 들어, 베퍼, 아미노산, 예를 들어, 글리신 및 리신, 탄수화물, 예를 들어, 텍스트로스, 만노스, 갈락토스, 프력토스, 락토스, 수크로스, 말토스, 솔비톨, 만니톨 등), 젤, 결합제, 부형제, 봉제제, 윤활제, 감미제, 착향료, 염료, 유체 및 영양 보충제, 그러한 유사 물질 및 그 조합을 포함한다. 임의의 종래의 매질, 작용제, 희석제 또는 담체가 수용체에게 또는 그안에 함유된 조성물의 치료 효과에 해로운 경우를 제외하고, 본 방법의 실시에서의 사용을 위해 투여가능한 조성물에서의 그의 사용은 적절하다. 약학 조성물 내의 다양한 성분의 pH 및 정확한 농도는 잘 알려진 파라미터에 따라 조정된다. 본 발명의 일부 양태에 따라, 조성물은 임의의 편리하고 실용적인 방식으로, 즉, 용액, 혼탁액, 유화, 혼합, 캡슐화, 흡수, 분쇄 등에 의해, 담체와 조합될 수 있다. 그러한 절차는 당업자에게 일상적이다.

[0251]

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

[0252]

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

[0253]

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

[0254]

BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 항-BTN1A1 항체 또는 다른 분자는 유리 염기, 중성, 또는 염 형태로 조성물 내로 제형화될 수 있다. 약학적 허용 염은 산 부가 염, 예를 들어, 단백질성 조성물의 유리 아미노기로 형성되거나 또는 무기 산, 예를 들어, 염산 또는 인산, 또는 유기산, 예를 들어, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 또는 만델산으로 형성된 것들을 포함한다. 유리 카르복실기로 형성된 염은 또한 무기 염기, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 또는 수산화제이철; 또는 유기 염기, 예를 들어, 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘 또는 프로케인으로부터 유도될 수 있다.

[0255]

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

[0256]

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

[0257]

일반적으로, 조성물의 성분들은 별도로, 또는 예를 들어, 활성 작용제의 양을 표시하는 앰플 또는 봉지 (sachette)와 같은 밀봉 용기내의 건조 동결 분말 또는 무수 농축물로서 단위 투약 형태로 함께 혼합되어 공급된다. 조성물이 주입에 의해 투여될 경우, 조성물은 멸균 약학 등급 물 또는 염수를 함유한 주입 병과 제공될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 주사를 위한 멸균수 또는 염수의 앰풀이 성분들이 투여 전에 혼합될 수 있도록 제공될 수 있다.

[0258]

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

[0259]

단위 용량 또는 투여량은 개체에서의 사용을 위해 적합한 물리적으로 구별되는 단위를 말하며, 각 단위는 그 투여, 즉, 적절한 경로 및 치료 요법과 연합되어 상기에 개시한 원하는 반응을 생산하기 위해 계산된 약학 조성물의 소정의 양을 함유한다. 치료 횟수 및 단위 용량에 따른, 투여될 양은 원하는 효과에 의존한다. 환자 또는 개체에게 투여되는 본 실시형태의 조성물의 실제 투여량은 개체의 체중, 연령, 건강 및 성별, 치료되는 질병의 타입, 질병 침투 정도, 이전 또는 공존하는 치료적 중재, 환자의 특발증, 투여 경로, 및 구체적 치료 물질의 효능, 안정성 및 독성과 같은 신체적 및 생리학적 인자에 의해 결정될 수 있다. 다른 비제한적인 예에서, 용량은 투여 당 약 1 마이크로그램/kg/체중부터, 약 5 마이크로그램/kg/체중, 약 10 마이크로그램/kg/체중, 약 50 마이크로그램/kg/체중, 약 100 마이크로그램/kg/체중, 약 200 마이크로그램/kg/체중, 약 350 마이크로그램/kg/체중, 약 500 마이크로그램/kg/체중, 약 1 밀리그램/kg/체중, 약 5 밀리그램/kg/체중, 약 10 밀리그램/kg/체중, 약 50 밀리그램/kg/체중, 약 100 밀리그램/kg/체중, 약 200 밀리그램/kg/체중, 약 350 밀리그램/kg/체중, 약 500 밀리그램/kg/체중, 약 1000 밀리그램/kg/체중 이상까지, 그리고 그안의 임의의 유도가능한 범위를 가질 수

있다. 본 명세서에 열거된 수로부터 유도가능한 범위의 비제한적인 예에서, 약 5 밀리그램/kg/체중 내지 약 100 밀리그램/kg/체중, 약 5 마이크로그램/kg/체중 내지 약 500 밀리그램/kg/체중, 등의 범위가 상기에 개시한 수에 기초하여 투여될 수 있다. 투여를 책임지는 실무자는 어떤 경우에도, 조성물 내의 활성 성분(들)의 농도 및 개인 개체를 위한 적절한 용량(들)을 결정할 것이다.

[0260] 당업자는 본 명세서에 개시된 조성물은 치료 제제의 구체적 특성에 의해 제한되지 않음을 이해할 것이다. 예를 들어, 그러한 조성물은 생리학적으로 용인가능한 액체, 젤 또는 고체 담체, 희석제 및 부형제와 함께 제형내에 제공될 수 있다. 이들 치료 제제는 가축에서와 같은 수의학적 용도를 위해, 그리고 다른 치료제와 유사한 방식으로 인간에서의 임상적 용도를 위해 포유동물에게 투여될 수 있다. 일반적으로, 치료 효능을 위해 요구되는 투여량은 개인 개체의 구체적 요구뿐만 아니라 투여의 사용 타입 및 양식에 따라 변한다. 인간 환자를 비롯한 동물 환자에게 투여되는 조성물의 실제 투여량은 체중, 병태의 심각성, 치료되는 질병의 타입, 이전 또는 공존하는 치료적 중재, 환자의 특발증 및 투여 경로와 같은 신체적 및 생리학적 인자에 의해 결정될 수 있다. 투여량 및 투여 경로에 따라, 바람직한 투여량 및/또는 유효량의 투여 횟수는 개체의 반응에 따라 변할 수 있다. 투여를 책임지는 실무자는 어떤 경우에도, 조성물 내의 활성 성분(들)의 농도 및 개인 개체를 위한 적절한 용량(들)을 결정할 것이다.

5.4 치료 용도 및 치료 방법

[0261] BTN1A1은 암세포에서 특이적으로 그리고 높게 발현된다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 암 치료에서 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자의 치료 용도를 제공한다. 일부 실시 형태에서, 이들 분자는 BTN1A1-발현 암세포에 결합하고 이들 암세포의 파괴를 야기하는 면역 반응을 유도한다. 항-BTN1A1 항체(예를 들어, STC810 또는 그의 인간화 변이체)를 비롯한 본 발명에서 제공되는 분자는 암세포의 T-세포 의존성 어댑토시스를 향상시키고 암세포의 증식을 억제할 수 있다.

[0262] 항-BTN1A1 항체(예를 들어, STC810 또는 그의 인간화 변이체)를 비롯한, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 발명에서 제공되는 분자는 리소좀내로의 BTN1A1의 내부화를 야기할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 화합물과 접합된 본 발명에서 제공되는 분자와 세포를 접촉시켜 BTN1A1을 발현하는 세포에 화합물을 전달하기 위하여 본 발명에서 제공되는 분자를 이용하는 방법을 제공한다. 화합물은 본 명세서에 개시된 영상화제, 치료제, 독소 또는 방사성핵종일 수 있다. 화합물은 항-BTN1A1 항체와 접합될 수 있다. 접합체는 ADC와 같은, 본 명세서에 개시된 임의의 접합체일 수 있다. 세포는 암세포일 수 있다. 세포는 또한 암세포와 정상 세포 둘 모두를 포함하는 세포 집단일 수 있다. 암세포는 BTN1A1을 특이적으로 그리고 높게 발현하므로, 본 명세서에 개시된 분자는 암세포에는 특정 약물을 전달하지만 정상 세포에는 전달하지 않기 위해 이용될 수 있다.

[0263] 항-BTN1A1 항체(예를 들어, STC810 또는 그의 인간화 변이체)를 비롯한, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 발명에서 제공되는 분자는 개체에서 면역 반응을 조절할 수 있다. 본 발명에서 제공되는 분자는 T 세포 활성화를 촉진할 수 있다. 본 발명에서 제공되는 분자는 T 세포 증식을 촉진할 수 있다. 본 발명에서 제공되는 분자는 사이토카인 생산을 증가시킬 수 있다. 본 발명에서 제공되는 분자는 또한 BTN1A1을 발현하는 세포의 T-세포 의존성 어댑토시스를 향상시키거나, BTN1A1을 발현하는 세포의 증식을 억제할 수 있다.

[0264] 따라서, 본 발명은 항-BTN1A1 항체(예를 들어, STC810 또는 그의 인간화 변이체)를 비롯한, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에서 개시된 분자의 유효량을 투여함으로써 개체에서 면역 반응을 조절하는 방법을 제공한다. 면역 반응의 조절은 (a) T 세포 활성화의 증가; (b) T 세포 증식의 증가; 및/ 또는 (c) 사이토카인 생산의 증가를 포함할 수 있다.

[0265] 본 발명은 또한 항-BTN1A1 항체(예를 들어, STC810 또는 그의 인간화 변이체)를 비롯한, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에서 개시된 분자의 유효량과 세포를 접촉시킴으로써 BTN1A1을 발현하는 세포의 T-세포 의존성 어댑토시스를 향상시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 항-BTN1A1 항체(예를 들어, STC810 또는 그의 인간화 변이체)를 비롯한, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에서 개시된 분자의 유효량과 세포를 접촉시킴으로써 BTN1A1을 발현하는 세포의 증식을 억제하는 방법을 제공한다. 세포는 암세포일 수 있다.

[0266] 일부 실시형태에서, 이들 분자는 T 세포 활성화 또는 증식에서 BTN1A1의 억제성 활성을 억제함으로써 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 BTN1A1 시그널링을 억제하거나 차단함으로써 개체의 면역계를 상향조절하는데 있어서 이들 분자의 용도를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 BTN1A1이 T 세포에 결합하

는 것을 차단하기 위한 이들 분자의 용도를 제공한다.

[0268] 일부 실시형태에서, 이들 분자는 ADCC 또는 CDC 기전을 통한 암세포의 파괴를 야기한다. 일부 실시형태에서, 이들 분자는 향상된 ADCC 활성을 갖도록 조작된다. 일부 실시형태에서, 이들 분자는 향상된 CDC 활성을 갖도록 조작된다. 예를 들어, 이들 분자는 Fc 수용체를 보유한 킬러 세포와의 상호작용이 향상되도록 조작될 수 있다. 조작된 항체 또는 Fc-융합 단백질을 비롯한 그러한 조작된 분자를 생산하는 방법은 본 명세서에 개시되며 본 기술 분야에도 알려져 있다.

[0269] 일부 실시형태에서, 본 발명은 BTN1A1을 과발현하는 개체에서 질병 또는 질환을 치료하기 위한, 항-BTN1A1 항체 및 항-당화된 BTN1A1 항체를 비롯한, BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자의 용도를 제공한다. 일부 실시형태에서, 개체에서 BTN1A1의 발현 수준은 기준 수준보다 높다. 기준 수준은 건강한 개인 집단에서 BTN1A1의 평균 또는 중간 발현 수준일 수 있다. 기준 수준은 또한 샘플 집단의 발현 수준의 통계적 분석에 의해 결정될 수 있다.

[0270] 본 발명은 또한 항-BTN1A1 항체 및 항-당화된 BTN1A1 항체를 비롯한, BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자의 치료 용도를 제공한다. 일부 실시형태에서, 분자는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 갖는다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215, 및/ 또는 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다.

[0271] 일부 실시형태에서, 본 발명은 비당화된 BTN1A1에 비하여 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자의 치료 용도를 제공한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55, N215, 및/ 또는 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N55에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N215에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 위치 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N215에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다.

[0272] 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd의 절반 보다 적은 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd보다 적어도 10 배 적은 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다.

[0273] 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI의 적어도 두배의 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI의 적어도 5배의 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합한다.

[0274] 일부 양태에서, 본 발명은 위치 N55, N215, 및/ 또는 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹하는 항원 결합 단편을 가진 분자의 치료 용도를 제공한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N215에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215 및 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215 및 N449에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다.

- [0275] 일부 실시형태에서, 본 발명은 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH 또는 VL 도메인을 포함하는 항원 결합 단편을 가진 분자의 치료 용도를 제공한다. 일부 실시형태에서, 분자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH 및 VL 도메인 둘 모두를 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VH CDR 하나 이상을 포함하는 항원 결합 단편을 가진 분자의 치료 용도를 제공한다. 다른 실시형태에서, 분자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VL CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VL CDR 하나 이상을 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 분자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 적어도 하나의 VH CDR 및 적어도 하나의 VL CDR을 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다.
- [0276] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 BTN1A1 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하는 항원 결합 단편을 가진 분자의 치료 용도를 제공한다. BTN1A1 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC810의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 BTN1A1의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자의 치료용도를 제공한다. BTN1A1 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC810의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, BTN1A1 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 5개 연속 아미노산을 갖는다.
- [0277] 5.4.1. 질병 및 질환
- [0278] 일부 실시형태에서, 본 발명은 IFN- γ 와 같은 사이토카인의 증가된 생산을 매개하기 위한 항체 또는 다른 분자의 용도를 제공한다. 따라서, 본 발명은 난소 및 다른 형태의 암과 같은, 사이토카인으로 치료될 수 있는 질병 및 병태의 치료에서 그러한 항체 또는 다른 분자의 용도를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 증가된 T 세포 활성 또는 증식을 매개하는데 있어서 항체 및 다른 분자의 용도를 제공한다. 따라서, 일부 실시형태에서 암과 같은, T 세포 활성 또는 증식을 증가시킴으로써 치료가능한 질병 및 병태의 치료에서 그러한 항체 및 다른 분자의 용도를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 증가된 T 세포 활성 및 증가된 T 세포 증식 둘 모두를 매개하기 위한 본 명세서에 개시된 항체 또는 다른 분자의 용도를 제공한다.
- [0279] 면역계의 상향조절은 암의 치료에서 특히 바람직하다. 부가적으로, BTN1A1은 암세포에서 특이적으로 그리고 높게 발현된다. 본 명세서에 개시된 분자는 암세포에 결합하고 직접적 세포독성에 의해 또는 ADCC 또는 CDC 기전을 통해 암세포의 파괴를 야기할 수 있다. 따라서, 본 발명은 암 치료 방법을 제공한다. 암은 세포의 비정상적인 비제어된 성장으로부터 야기되는 신생물 또는 종양을 말한다. 암은 원발성 암 또는 전이성 암일 수 있다.
- [0280] 일부 실시형태에서, 본 발명은 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 투여함으로써 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 치료 방법이 유용할 수 있는 암은 고형 종양 또는 혈액암에서 발견되는 것과 같은, 임의의 악성 세포 타입을 포함한다. 예시적인 고형 종양은 혀장, 결장, 맹장, 식도, 위, 뇌, 머리, 목, 갑상선, 흉선, 난소, 신장, 후두, 육종, 폐, 방광, 흑색종, 전립선, 및 유방으로 이루어진 군으로부터 선택된 기관의 종양을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 혈액암은 골수의 종양, T 또는 B 세포 악성종양, 백혈병, 림프종, 아세포종, 골수종 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0281] 본 발명에서 제공되는 방법을 이용하여 치료될 수 있는 암의 추가의 예는 암종, 림프종, 아세포종, 육종, 백혈병, 편평세포암, 폐암(소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐선암 및 폐의 편평암종, 중피종 포함), 복막의 암, 간세포암, 위암(위장암 및 위장관 기질 암 포함), 식도암, 혀장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 다양한 타입의 두경부암, 흑색종, 표재 확산 흑색종, 흑색점 악성 흑색종(lentigo malignant melanoma), 말단 흑자 흑색종(acral lentiginous melanomas), 결절성 흑색종, 포도막 흑색종, 배세포종(난황난 종양, 고환암, 음모암), 및 B-세포 림프종(저 등급/여포성 비호지킨 림프종(NHL); 소형 림프구성(SL) NHL; 중 등급/여포성 NHL; 중 등급 미만성 NHL; 고 등급 면역모세포 NHL; 고 등급 림프구구(NHL; 고 등급 작은 비절개 세포(small non-cleaved cell) NHL; 거대 종양(bulky disease) NHL; 외투세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia) 포함), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 모양 세포 백혈병, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병(AML) 및 만성 골수아구성 백혈병을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0282] 암은 또한 하기의 조직학적 타입 중 임의의 것일 수 있다: 악성 신생물; 암종; 미분화 암종; 거대 및 방추 세포 암종; 소세포 암종; 유두모양 암종; 편평 세포 암종; 림프상피(lymphoepithelial) 암종; 기저 세포 암종; 섬모 기질(pilomatrix) 암종; 이행상피(transitional cell) 암종; 유두모양 이행상피 암종; 선암종; 악성

가스트린종; 담관암; 간세포 암종; 결합된 간세포 암종과 담관암; 육주상 선암종(trabecular adenocarcinoma); 샘낭암종; 선종 풀립에서의 선암종; 선암종, 가족성 대장 풀립증; 고형 암종; 악성 유암종(carcinoid tumor, malignant); 세기관지-폐포(bronchiolo-alveolar) 선암종; 유두모양 선암종; 색소형성(chromophobe) 암종; 호산성(acidophil) 암종; 호산세포(oxyphilic) 선암종; 호염기성세포(basophil) 암종; 투명 세포 선암종; 과립 세포 암종; 여포성 선암종; 유두모양 및 여포성 선암종; 비캡슐화 경화성 암종(nonencapsulating sclerosing carcinoma); 부신 피질 암종; 자궁내막양 난소암; 피부 부속기 암종; 아포크린 선암종; 피지샘 선암종; 이구선 선암종; 점액포피모양 암종; 낭선암종; 유두모양 낭선암종; 유두모양 장액성 낭선암종; 점액 낭선암종; 점액 선암종; 반지세포 암종; 침윤성 관 암종; 수질 암종; 소엽암; 염증성 암종; 유방 파제트병(paget's disease, mammary); 샘파리세포 암종; 선편평세포 암종; 편평상피화생을 가진 선암종; 악성 흉선종; 악성 난소 기질 종양; 악성 난포막종(thecoma, malignant); 악성 과립막세포 종양; 악성 남성세포종; 세르톨리 세포 암종; 악성 간질 세포 종양; 악성 지질 세포 종양; 악성 부신경절종; 악성 유방외 부신경절종(extra-mammary paraganglioma, malignant); 갈색세포종; 사구맥관육종(glomangiosarcoma); 악성 흑색종; 무멜라닌 흑색종(amelanotic melanoma); 표재 확산 흑색종; 거대 색소 모반에서의 악성 흑색종; 유상피세포 흑색종; 악성 청색 모반; 육종; 섬유육종; 악성 섬유성 조직구증; 점액육종; 지방육종; 평활근육종; 횡문근육종; 배아형 횡문근육종; 포상횡문근육종; 기질 육종; 악성 혼합종양; 물러관 혼합 종양(mullerian mixed tumor); 신아세포종; 간아세포종; 암육종; 악성 중간엽종; 악성 브레너 종양(brenner tumor, malignant); 악성 염상 종양; 활막 육종; 악성 중피종; 미분화배세포종; 태생기 암종; 악성 기형종; 악성 난소갑상선종(struma ovarii, malignant); 융모막암종; 악성 중신종; 혈관육종; 악성 혈관내피종; 카포시 육종; 악성 혈관주위세포종; 림프관육종; 골육종; 측피질 골육종(juxtacortical osteosarcoma); 연골육종; 악성 연골아세포종; 중간엽 연골육종; 골거대세포종양; 유잉 육종; 악성 치원성 종양; 범탕아세포 치원성육종(ameloblastic odontosarcoma); 악성 사기질모세포종; 사기질모세포 섬유육종; 악성 송과체종양; 척삭종; 악성 신경교종; 상의세포종; 성상세포종; 원형질성 성상세포종(protoplasmic astrocytoma); 원섬유성 성상세포종; 성아세포종; 교모세포종; 펩지교종; 희소돌기아교모세포종(oligodendroblastoma); 원시 신경외배엽 종양(primitive neuroectodermal); 소뇌 육종(cerebellar sarcoma); 신경절아세포종; 신경아세포종; 망막아세포종; 후각 신경성 종양(olfactory neurogenic tumor); 악성 뇌수막종; 신경섬유육종; 악성 신경초종; 악성 과립 세포 종양; 악성 림프종; 호지킨병; 호지킨스(hodgkin's); 파라육아종; 악성 림프종, 소형 림프구성; 악성 림프종, 거대 세포, 미만성(malignant lymphoma, large cell, diffuse); 악성 림프종, 여포성; 균상식육종; 기타 명시된 비호지킨 림프종; 악성 조직구증; 다발성 골수종; 비만 세포 육종; 면역증식성 작은 창자 질병(immunoproliferative small intestinal disease); 백혈병; 림프구성 백혈병; 형질구성 백혈병; 적백혈병; 림프육종 세포 백혈병; 골수성 백혈병; 호염기구성 백혈병; 호산구성 백혈병; 단핵구성 백혈병; 비만 세포 백혈병; 거대핵세포성 백혈병(megakaryoblastic leukemia); 골수성 육종(myeloid sarcoma); 및 모양 세포 백혈병.

[0283]

일부 실시형태에서, 본 발명은 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 문자를 투여함으로써 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이때 암은 폐암, 전립선암, 췌장암, 난소암, 간암, 두경부암, 유방암, 또는 위암이다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 문자를 투여함으로써 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이때 암은 폐암일 수 있다. 폐암은 비소세포 폐암(NSCLC)일 수 있다. 폐암은 소세포 폐암(SCLC)일 수 있다. NSCLC는 편평 NSCLC일 수 있다. 폐암을 치료하기 위해 사용되는 문자는 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 임의의 문자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215, N449, 또는 임의의 그 조합에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 폐암을 치료하기 위해 사용되는 문자는 STC810이다. 일부 양태에서, NSCLC를 치료하기 위해 사용되는 문자는 STC810이다. 일부 양태에서, 편평 NSCLC를 치료하기 위해 사용되는 문자는 STC810이다.

[0284]

일부 실시형태에서, 본 발명은 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 문자를 투여함으로써 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이때 암은 전립선암일 수 있다. 전립선암을 치료하기 위해 사용되는 문자는 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 임의의 문자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215, N449, 또는 임의의 그 조합에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 전립선암을 치료하기 위해 사용되는 문자는 STC810이다.

- [0285] 일부 실시형태에서, 본 발명은 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 문자를 투여함으로써 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이때 암은 췌장암일 수 있다. 췌장암을 치료하기 위해 사용되는 문자는 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 임의의 문자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215, N449, 또는 임의의 그 조합에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 췌장암을 치료하기 위해 사용되는 문자는 STC810이다.
- [0286] 일부 실시형태에서, 본 발명은 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 문자를 투여함으로써 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이때 암은 난소암일 수 있다. 난소암을 치료하기 위해 사용되는 문자는 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 임의의 문자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215, N449, 또는 임의의 그 조합에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 난소암을 치료하기 위해 사용되는 문자는 STC810이다.
- [0287] 일부 실시형태에서, 본 발명은 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 문자를 투여함으로써 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이때 암은 간암일 수 있다. 간암을 치료하기 위해 사용되는 문자는 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 임의의 문자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215, N449, 또는 임의의 그 조합에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 간암을 치료하기 위해 사용되는 문자는 STC810이다.
- [0288] 일부 실시형태에서, 본 발명은 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 문자를 투여함으로써 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이때 암은 두경부암일 수 있다. 두경부암을 치료하기 위해 사용되는 문자는 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 임의의 문자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215, N449, 또는 임의의 그 조합에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 두경부암을 치료하기 위해 사용되는 문자는 STC810이다.
- [0289] 일부 실시형태에서, 본 발명은 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 문자를 투여함으로써 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이때 암은 유방암일 수 있다. 유방암을 치료하기 위해 사용되는 문자는 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 임의의 문자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215, N449, 또는 임의의 그 조합에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 유방암을 치료하기 위해 사용되는 문자는 STC810이다.
- [0290] 일부 실시형태에서, 본 발명은 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 문자를 투여함으로써 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이때 암은 위암일 수 있다. 위암을 치료하기 위해 사용되는 문자는 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 임의의 문자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215, N449, 또는 임의의 그 조합에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다. 일부 양태에서, 위암을 치료하기 위해 사용되는 문자는 STC810이다.
- [0291] 암을 치료하기 위해 사용되는 문자는 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 임의의 문자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 비하여 당화된 BTN1A1에 우선적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd의 절반 보다 적은 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 Kd보다 적어도 10배 적은 Kd로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI의 적어도 두배의 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합한다. 일부 실시

형태에서, 항원 결합 단편은 비당화된 BTN1A1에 대하여 나타낸 MFI의 적어도 5배의 MFI로 당화된 BTN1A1에 결합 한다.

[0292] 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215, N449, 또는 임의의 그 조합에서의 BTN1A1 당화를 면역특이적으로 마스킹한다.

[0293] 일부 양태에서, 암 치료를 위해 유용한 분자는 STC810이다.

5.4.2. 투여 방법

[0295] 본 발명은 또한 본 발명에서 제공되는 항체 또는 분자의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써 항종양제로서 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 항-BTN1A1 항체 또는 다른 분자를 이용하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 환자는 암환자이다.

[0296] 리포좀내에 캡슐화, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 항체 또는 융합 단백질을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체-매개 엔도사이토시스(예를 들어, Wu and Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 참고), 레트로바이러스 또는 기타 벡터의 일부로서 핵산의 제작 등과 같은 다양한 전달 시스템이 또한 알려져 있으며, BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 항-BTN1A1 항체 또는 다른 분자, 또는 관련된 약학 조성물을 투여하기 위하여 사용될 수 있다.

[0297] 본 발명에서 제공되는 투여 방법은 비경구 투여(예를 들어, 피부내, 근육내, 복강내, 정맥내 및 피하), 경막외, 및 점막(예를 들어, 비내 및 구강 경로)에 의한, 주사를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체, 다른 분자 또는 약학 조성물은 근육내로, 정맥내로, 피하로, 정맥내로, 복강내로, 경구로, 근육내로, 피하로, 강내(intracavity), 경피로, 또는 진피로 투여된다. 조성물은 임의의 편리한 경로에 의해, 예를 들어, 주입 또는 볼루스 주사에 의해, 상피 또는 점막피부 내벽(mucocutaneous lining)(예를 들어, 구강 점막, 직장 및 장 점막, 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있으며, 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신성이거나 국소적일 수 있다. 또한, 폐 투여 또한 예를 들어, 흡입기 또는 네뷸라이저의 이용에 의해 그리고 에어로졸화 작용제를 이용한 제형의 이용에 의해 이용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 6,019,968호; 5,985,20호; 5,985,309호; 5,934,272호; 5,874,064호; 5,855,913호; 5,290,540호; 및 4,880,078호; 및 PCT 공개 WO 92/19244호; WO 97/32572호; WO 97/44013호; WO 98/31346호; 및 WO 99/66903호를 참고하며; 이를 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체, 다른 분자 또는 약학 조성물은 치료를 필요로 하는 영역에 국소적으로 투여되며, 이는 예를 들어, 국소 주입에 의해, 주사에 의해, 또는 임플란트에 의해 이루어질 수 있으며, 상기 임플란트는 실라스틱 막(sialastic membrane)과 같은 막 또는 섬유를 비롯한, 다공성, 비다공성 또는 젤라틴성 물질이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체 또는 다른 분자를 투여할 경우, 항체 또는 다른 분자가 흡수하지 않는 물질을 이용하도록 주의한다.

[0298] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 인간화 또는 키메라 항체는 타겟팅된 전달을 위하여 리포좀으로 제형화된다. 리포좀은 수성상을 캡슐에 넣는 동심원으로 정돈된 인지질 이중층으로 이루어진 소낭이다. 리포좀은 전형적으로 다양한 타입의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제를 가진다. 리포좀의 구성성분은 생물막의 지질 배열과 유사한 이중층 형태로 배열된다. 리포좀은 부분적으로 그들의 생체적합성, 낮은 면역원성 및 낮은 독성으로 인해 유용한 전달 비하를 일 수 있다. 리포좀의 제조 방법은 본 기술분야에 알려져 있으며 본 발명에서 제공되며, 예를 들어, Epstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688; Hwang et al., 1980 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030-4; 미국 특허 4,485,045호 및 4,544,545호를 참고하며; 이를 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0299] 본 발명은 또한 미국 특허 5,013,556호에 개시된 것과 같은, 연장된 혈청 반감기, 즉, 향상된 순환 시간을 가진 리포좀의 제조 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 방법에서 사용되는 리포좀은 순환계로부터 빠르게 제거되지 않으며, 즉, 단핵 식세포계(MPS)내로 섭취되지 않는다. 본 발명은 또한 당업자에게 알려진 일반적 방법을 이용하여 제조되는 입체적으로 안정된 리포좀을 제공한다. 입체적으로 안정된 리포좀은 부피가 크고 매우 가요성인 친수성 모이어티를 가진 지질 성분을 함유할 수 있으며, 이것은 혈청 단백질과의 리포좀의 원치않는 반응을 감소시키고, 혈청 성분과의 옵소닌화를 감소시키고 MPS에 의한 인지를 감소시킨다. 입체적으로 안정된 리포좀은 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 제조될 수 있다. 리포좀 및 입체적으로 안정된 리포좀의 제조를 위하여, 예를 들어, Bendas et al., 2001 *BioDrugs*, 15(4): 215-224; Allen et al., 1987 *FEBS Lett.* 223: 42-6; Klibanov et al., 1990 *FEBS Lett.*, 268: 235-7; Blum et al., 1990, *Biochim. Biophys. Acta.*,

1029: 91-7; Torchilin *et al.*, 1996, *J. Liposome Res.* 6: 99-116; Litzinger *et al.*, 1994, *Biochim. Biophys. Acta*, 1190: 99-107; Maruyama *et al.*, 1991, *Chem. Pharm. Bull.*, 39: 1620-2; Klibanov *et al.*, 1991, *Biochim Biophys Acta*, 1062: 142-8; Allen *et al.*, 1994, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 13: 285-309를 참고하며, 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0300] 본 발명은 또한 예를 들어, 미국 특허 4,544,545호를 참고하는 특정 기관 타겟팅을 위해, 또는 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 2005/0074403호를 참고하는 특정 세포 타겟팅을 위해, 적응된 리포좀을 제공하며, 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 본 발명에서 제공되는 조성물과 방법에서 사용하기 위해 특히 유용한 리포좀은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG 유도체화된 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 이용한 역상 증발 방법에 의해 생성될 수 있다. 리포좀은 한정된 기공 크기의 필터를 통해 압출되어 원하는 직경을 가진 리포좀을 생성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편을 가진 분자, 예를 들어, F(ab')는 이전에 개시된 방법을 이용하여 리포좀에 접합될 수 있으며, 예를 들어, Martin *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288을 참고하며, 이것은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0301] 본 명세서에 개시된 인간화 또는 키메라 항체는 또한 면역리포좀으로서 제형화될 수 있다. 면역리포좀은 항체 또는 그의 단편이 공유적으로 또는 비공유적으로 리포좀 표면에 연결되는 리포좀 조성물을 말한다. 리포좀 표면에의 항체의 연결 화학은 본 기술분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 미국 특허 6,787,153호; Allen *et al.*, 1995, *Stealth Liposomes*, Boca Raton: CRC Press, 233-44; Hansen *et al.*, 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1239: 133-144를 참고하며, 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 방법과 조성물에서 사용하기 위한 면역리포좀은 추가로 입체적으로 안정화된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시되는 인간화 항체는 리포좀의 지질 이중층내에 안정하게 뿌리내린 소수성 앵커에 공유적으로 또는 비공유적으로 연결된다. 소수성 앵커의 예는 인지질, 예를 들어, 포스파티딜에탄올아민(PE), 포스파티딜이노시톨(PI)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 항체와 소수성 앵커 사이의 공유적 연결을 이루기 위하여, 본 기술분야에 알려진 임의의 생화학적 전략이 이용될 수 있으며, 예를 들어, J. Thomas August ed., 1997, *Gene Therapy: Advances in Pharmacology*, Volume 40, Academic Press, San Diego, Calif., p. 399-435를 참고하며, 이것은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 예를 들어, 항체 분자 상의 작용기는 리포좀 연합된 소수성 앵커 상의 활성 기와 반응할 수 있으며, 예를 들어, 항체 상의 리신 측쇄의 아미노기는 수용성 카르보디이미드로 활성화된, 리포좀 연합된 N-글루타릴-포스파티딜에탄올아민에 결합될 수 있거나; 또는 환원된 항체의 티올기는 피리딜티오프로피오닐포스파티딜에탄올아민과 같은 티올 반응성 앵커를 통해 리포좀에 결합될 수 있다. 예를 들어, Dietrich *et al.*, 1996, *Biochemistry*, 35: 1100-1105; Loughrey *et al.*, 1987, *Biochim. Biophys. Acta*, 901: 157-160; Martin *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288; Martin *et al.*, 1981, *Biochemistry*, 20: 4429-38을 참고하며, 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 항-BTN1A1 항체 또는 다른 분자를 갖는 면역리포좀 제형은, 그들이 타겟 세포, 즉, 항체가 결합하는 수용체를 포함하는 세포의 세포질에 활성 성분을 전달하기 때문에, 치료제로서 특히 효과적일 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역리포좀은 혈액, 특히 타겟 세포에서 증가된 반감기를 가질 수 있으며, 타겟 세포의 세포질내로 내부화되어, 치료제의 상설 또는 엔도리소좀 경로에 의한 분해를 피할 수 있다.

[0302] 본 발명에서 제공되는 면역리포좀 조성물은 하나 이상의 소낭 형성 지질, 본 발명의 항체 또는 다른 분자 또는 그의 단편 또는 유도체, 및 선택적으로, 친수성 중합체를 가질 수 있다. 소낭 형성 지질은 두 개의 탄화수소쇄, 예를 들어, 아실 쇄 및 극성 헤드기를 가진 지질일 수 있다. 소낭 형성 지질의 예는 인지질, 예를 들어, 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티드산, 포스파티딜이노시톨, 스팽고미엘린 및 당지질, 예를 들어, 세레브로사이드, 강글리오사이드를 포함한다. 본 발명에서 제공되는 제형에서 유용한 부가적인 지질은 당업자에게 알려져 있으며 명세서내에 포함된다. 일부 실시형태에서, 면역리포좀 조성물은 추가로 친수성 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 및 강글리오사이드 GM1을 포함하며, 이것은 리포좀의 혈청 반감기를 증가시킨다. 친수성 중합체를 리포좀에 접합하는 방법은 본 기술분야에 잘 알려져 있으며 명세서 내에 포함된다. 부가적인 예시적인 면역리포좀 및 그들의 제조 방법은 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 2003/0044407호; PCT 국제 공개 WO 97/38731호, Vingerhoeeds *et al.*, 1994, *Immunomethods*, 4: 259-72; Maruyama, 2000, *Biol. Pharm. Bull.* 23(7): 791-799; Abra *et al.*, 2002, *Journal of Liposome Research*, 12(1&2): 1-3; Park, 2002, *Bioscience Reports*, 22(2): 267-281; Bendas *et al.*, 2001 *BioDrugs*, 14(4): 215-224, J. Thomas August ed., 1997, *Gene Therapy: Advances in Pharmacology*, Volume 40, Academic Press, San Diego, Calif., p. 399-435에서 찾을 수 있으며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0303]

본 발명은 또한 BTN1A1 또는 특이적으로 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항-BTN1A1 항체 또는 다른 분자를 환자에게 단위 용량을 투여함으로써 암환자를 치료하는 방법을 제공한다. 단위 용량은 개체를 위한 단위 투여량으로서 적합한 물리적으로 구별되는 단위를 말하며, 각 단위는 요구되는 회석제, 즉, 담체 또는 비히클과 연합되어 원하는 치료 효과를 생산하기 위해 계산된 활성 물질의 소정의 양을 함유한다.

[0304]

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

[0305]

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

[0306]

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

[0307]

제형에서 이용될 정확한 용량은 또한 투여 경로 및 병태의 심각성에 의존할 것이며, 실무자의 판단 및 각 환자의 상황에 따라 결정되어야 한다. 유효 용량은 인 비트로 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유도된 용량-반응 곡선으로부터 추정될 수 있다. BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 항-BTN1A1 항체 또는 다른 분자의 경우, 환자에게 투여되는 투여량은 전형적으로 0.01 mg/kg 내지 100 mg/kg 환자 체중이다. 일부 실시형태에서, 환자에게 투여되는 투여량은 0.01 mg/kg 내지 20 mg/kg, 0.01 mg/kg 내지 10 mg/kg, 0.01 mg/kg 내지 5 mg/kg, 0.01 내지 2 mg/kg, 0.01 내지 1 mg/kg, 0.01 mg/kg 내지 0.75 mg/kg, 0.01 mg/kg 내지 0.5 mg/kg, 0.01 mg/kg 내지 0.25 mg/kg, 0.01 내지 0.15 mg/kg, 0.01 내지 0.10 mg/kg, 0.01 내지 0.05 mg/kg, 또는 0.01 내지 0.025 mg/kg 환자 체중이다. 구체적으로, 환자에게 투여되는 투여량은 0.2 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg 또는 10 mg/kg일 수 있다. 0.01 mg/kg만큼 낮은 용량이 주목할만한 약력학적 효과를 보여주는 것으로 예상된다. 0.10-1 mg/kg의 용량 수준이 가장 적절한 것으로 예상된다. 더 높은 용량(예를 들어, 1-30 mg/kg) 또한 활성일 것으로 예상될 수 있다. 일반적으로, 인간 항체는 외래 폴리펩티드에 대한 면역 반응으로 인해 다른 종으로부터의 항체보다 인간 신체내에서 더 긴 반감기를 갖는다. 따라서, 더 낮은 투여량의 인간 항체와 덜 빈번한 투여가 이루어질 수 있다. 또한, 본 발명에서 제공되는 항체 또는 다른 분자의 투여량 및 투여 빈도는 예를 들어, 지질화와 같은 변형에 의해 항체의 흡수와 조직 침투를 향상시킴으로써 감소될 수 있다.

[0308]

또 다른 실시형태에서, 조성물은 방출 제어(controlled release) 또는 서방성 시스템으로 전달될 수 있다. 당업자에게 알려진 임의의 기술을 이용하여 본 발명에서 제공되는 하나 이상의 항체, 분자 또는 약학 조성물을 가진 서방성 제형을 생산할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 4,526,938호; PCT 공개 WO 91/05548호; PCT 공개 WO 96/20698호; Ning et al., *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189 (1996), Song et al., *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397 (1995); Cleek et al., *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel.*

Bioact. Mater. 24:853-854 (1997); 및 Lam *et al.*, *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760(1997)를 참고하며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 일 실시형태에서, 펌프가 방출 제어 시스템에서 사용될 수 있다(Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507; 및 Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574를 참고한다). 다른 실시형태에서, 중합체 물질이 항체의 방출 제어를 이루기 위해 사용될 수 있으며(예를 들어, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61를 참고하며; 또한 Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105를 참고); 미국 특허 5,679,377호; 미국 특허 5,916,597호; 미국 특허 5,912,015호; 미국 특허 5,989,463호; 미국 특허 5,128,326호; PCT 공개 WO 99/15154호; 및 PCT 공개 WO 99/20253호 참고); 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0309] 서방성 제형에서 이용될 수 있는 중합체의 예는 폴리(-하이드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜리드(PLG), 폴리안하이드라이드, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알콜), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락티드(PLA), 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLGA), 및 폴리오르토에스테르를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 방출 제어 시스템은 치료 타겟(예를 들어, 폐)의 근처에 위치되어, 전신적 용량의 일부만을 요구할 수 있다(예를 들어, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)를 참고한다). 다른 실시형태에서, 방출 제어 임플란트로서 유용한 중합성 조성물은 그 전체가 참고로 본원에 포함되는 Dunn *et al.*(미국 특허 5,945,155호 참고)에 따라 이용된다. 중합체 시스템으로부터 생체활성 물질의 인 시추 방출 제어의 치료 효과에 기초하여, 이식은 일반적으로 치료적 처리를 필요로 하는 환자의 신체 내의 어느 곳에서든 발생할 수 있다.

[0310] 다른 실시형태에서, 개체의 신체 내의 비중합성 임플란트가 약물 전달 시스템으로서 이용되는 비중합성 지속 전달 시스템이 이용된다. 신체내로 이식시에, 임플란트의 유기 용매는 조성물로부터 주변 조직 유체 내로 흘어지거나, 분산되거나 침출될 것이며, 비중합성 물질은 점진적으로 응집하거나 침전하여 고형의 미세다공성 매트릭스를 형성할 것이다(미국 특허 5,888,533호 참고). 방출 제어 시스템은 또한 Langer에 의한 리뷰에서 토의된다(1990, *Science* 249:1527-1533). 당업자에게 알려진 임의의 기술이 본 발명에서 제공되는 하나 이상의 치료제를 포함하는 서방성 제형을 생산하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 4,526,938호; 국제 공개 WO 91/05548호 및 WO 96/20698호; Ning *et al.*, 1996, *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189; Song *et al.*, 1995, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek *et al.*, 1997, *Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; 및 Lam *et al.*, 1997, *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760을 참고하며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0311] 본 발명은 또한 조성물이 본 발명에서 제공되는 항체 또는 다른 분자를 인코딩하는 핵산을 갖는 실시형태를 제공하며, 이때 적절한 핵산 발현 백터의 일부로서 핵산을 제작하고 예를 들어, 레트로바이러스 백터의 사용에 의해(미국 특허 4,980,286호 참고), 또는 직접 주사에 의해, 또는 미세입자 충격(예를 들어, 유전자총; 바이올리스틱(Biolistic), 듀퐁(Dupont)), 또는 지질 또는 세포-표면 수용체 또는 형질감염제로 코팅의 사용에 의해, 핵산이 세포내가 되도록 핵산을 투여함으로써, 또는 핵으로 들어가는 것으로 알려진 호메오박스-유사 웨티드에 핵산을 연결시켜 투여함으로써(예를 들어, Joliot *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868 참고), 핵산은 그의 인코딩된 항체 또는 다른 분자의 발현을 촉진하기 위하여 인 비보에서 투여될 수 있다. 대안적으로, 핵산은 상동성 재조합에 의해 세포내로 도입되고 발현을 위해 숙주 세포 DNA내로 포함될 수 있다.

[0312] 본 발명에서 제공되는 항체, 다른 분자 또는 약학 조성물의 치료적 유효량을 이용한 개체의 치료는 단일 치료 또는 일련의 치료들을 포함할 수 있다. 본 발명에서 제공되는 항체, 분자 또는 약학 조성물은 국소적으로 진행된 또는 전이성 암을 가진 암 환자에서 종양 세포 성장을 억제하거나 암 세포를 죽이기 위한 것과 같은, 질병을 치료하기 위하여 전신적으로 또는 국소적으로 투여될 수 있는 것으로 생각된다. 그들은 정맥내로, 척추강내로 및/또는 복강내로 투여될 수 있다. 그들은 단독으로 또는 항-증식성 약물과 조합되어 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, 그들은 수술 또는 다른 절차 전에 환자에서 암 크기(cancer load)를 감소시키기 위해 투여된다. 대안적으로, 그들은 남아 있는 암(예를 들어, 수술이 제거하지 못한 암)이 생존하지 못하도록 하기 위하여 수술 후에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 그들은 전이를 방지하기 위하여 원발성 암의 퇴행 후에 투여될 수 있다.

5.5 병용 요법

[0313] 본 발명은 또한 제2 치료법과 조합하여, BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 항-BTN1A1 항체(항-당화된 BTN1A1 항체 포함) 또는 다른 분자를 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함하는 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 개체는 암 환자이고 제2 치료법은 항암 또는 항-과증식 치료법이다.

[0315] 일부 실시형태에서, 다른 항암 또는 항-과증식 치료법과 조합되어 사용될 경우, 본 발명에서 제공되는 항체 또는 다른 분자의 투여를 포함하는 조성물 및 방법은 다른 항암 또는 항-과증식 치료법의 치료 효능을 향상시킬 수 있다. 따라서, 본 발명에서 개시된 방법과 조성물은 암세포의 사멸, 세포 과증식의 억제 및/또는 암 전이의 억제와 같은 원하는 효과를 이루기 위하여 제2 치료법과 조합되어 제공될 수 있다.

[0316] 일부 실시형태에서, 화학요법, 타겟팅된 치료법, 냉동요법, 고열요법, 광역동 치료법, 고강도 집속 초음파(HIFU) 치료법, 방사선요법, 또는 수술요법과 같은 제2 치료법은 직접적인 세포독성 효과를 갖는다. 타겟팅된 치료법은 생물학적 타겟팅된 치료법 또는 소분자 타겟팅된 치료법일 수 있다. 다른 실시형태에서, 제2 치료법은 직접적인 세포독성 효과를 갖지 않는다. 예를 들어, 제2 치료법은 직접적인 세포독성 효과없이 면역계를 상향조절하는 작용제일 수 있다.

[0317] 본 발명은 제2 또는 부가적인 치료법과 조합하여, BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 항-BTN1A1 항체 또는 다른 분자를 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 본 발명에서 제공되는 항체, 다른 분자 또는 약학 조성물은 제2 항암 치료법에 대하여 그 전에, 그 동안, 그 후에, 또는 다양한 조합으로 투여될 수 있다. 투여는 동시에로부터 수분 내지 수일 내지 수주까지 범위의 간격일 수 있다. 본 명세서에서 개시된 항체 또는 다른 분자가 제2 항암제와 별도로 환자에게 제공되는 일부 실시형태에서는, 일반적으로 각각의 전달 시간 사이에 유의한 기간이 경과하지 않아, 두 화합물이 여전히 환자에게 유익하게 조합된 효과를 나타낼 수 있도록 할 것이다. 그러한 경우, 본 발명에서 제공되는 항체 또는 다른 분자 및 제2 항암 치료법은 서로 약 12 내지 24 또는 72 h 이내에 그리고 더욱 특히 서로 약 6-12 h 이내에 환자에게 제공될 수 있는 것으로 생각된다. 일부 상황에서는 치료를 위한 시간이 상당히 연장되어 각 투여 사이에 수일(2, 3, 4, 5, 6, 또는 7) 내지 수주(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8)가 경과할 수 있다.

[0318] 일부 실시형태에서, 치료 과정은 1-90일 이상동안 지속할 것이다(이러한 범위는 그 사이에 있는 일수를 포함한다). 한 가지 작용제는 제1일 내지 제90일(이러한 범위는 그 사이에 있는 일수를 포함함) 또는 임의의 그 조합 중 어느 날에 주어질 수 있고 다른 작용제는 제1일 내지 제90일(이러한 범위는 그 사이에 있는 일수를 포함함) 또는 임의의 그 조합 중 어느 날에 주어지는 것으로 생각된다. 하루(24-시간) 이내에, 환자에게 작용제(들)의 1회 투여 또는 다수 투여가 주어질 수 있다. 또한, 치료 과정 후, 항암 치료가 투여되지 않는 기간이 있는 것으로 생각된다. 이 기간은 환자의 병태, 예를 들어, 그들의 예후, 강도, 건강 등에 따라, 1-7 일, 및/또는 1-5 주, 및/또는 1-12 개월 이상(이러한 범위는 그 사이에 오는 일수를 포함함) 지속될 수 있다. 치료 사이클은 필요에 따라 반복될 수 있다.

[0319] 다양한 조합이 이용될 수 있다. 본 명세서에 개시된 항-BTN1A1 항체 또는 다른 분자를 "A"로 그리고 제2 항암 치료법을 "B"로 하는 치료의 일부 예가 하기에 열거된다:

[0320] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B
A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0321] 제2 치료법과 조합된, 본 발명에서 제공되는 임의의 항체, 분자 또는 약학 조성물의 환자에의 투여는 만일 있다면 제2 치료법의 독성을 고려하여, 그러한 제2 치료법의 투여를 위한 일반적인 프로토콜을 따를 것이다. 따라서, 일부 실시형태에서는 병용 요법에 기인하는 독성을 모니터링하는 단계가 있다.

화학요법

[0323] 광범위한 화학요법제가 제2 치료법으로서 본 실시형태에 따라 사용될 수 있다. 화학요법제는 암 치료에서 투여되는 화합물 또는 조성물일 수 있다. 이를 작용제 또는 약물은 세포내에서의 그들의 활성 양식에 의해, 예를 들어, 그들이 세포 사이클에 영향을 주는지 그리고 무슨 단계에서 영향을 주는지에 의해 분류될 수 있다. 대안적으로, 작용제는 DNA를 직접적으로 가교하거나, DNA 내로 삽입되거나, 또는 핵산 합성에 영향을 줌으로써 염색체 및 유사분열 이상을 유도하는 그 능력에 기초하여 특성규명될 수 있다.

[0324] 화학요법제의 예는 알킬화제, 예를 들어, 티오텐파(thiotepa) 및 시클로포스파미드; 알킬 설포네이트, 예를 들

어, 부설판, 임프로설판(improsulfan), 및 피포설판(piposulfan); 아지리딘(aziridine), 예를 들어, 벤조도파(benzodopa), 카르보쿠온(carboquone), 메투레도파(meturedopa), 및 우레도파(uredopa); 에틸렌이민, 및 알트레타민(altretamine), 트리에틸렌멜라민(triethylenemelamine), 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드, 트리메틸올로멜라민을 비롯한 메틸아멜라민(methylamelamine); 아세토제닌(acetogenin)(특히 불라타신(bullatacin) 및 불라타시논(bullatacinone)); 캄토테신(합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴(callystatin); CC-1065(그의 아도젤레신(adozelesin), 카르젤레신(carzelesin) 및 비젤레신(bizelesin) 합성 유사체 포함); 크립토피신(cryptophycin)(특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 도라스타틴; 듀오카르마이신(duocarmycin)(합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 에류테로빈(eleutherobin); 판크라티스타틴(pancratistatin); 사르코딕틴(sarcodictyin); 스폰지스타틴(spongistatin); 니트로젠 머스타드(nitrogen mustard), 예를 들어, 클로람부실, 클로르나파진(chlornaphazine), 콜로포스파미드(cholophosphamide), 에스트라무스틴(estramustine), 이포스파미드(ifosfamide), 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜파란, 노벰비친(novembichin), 페네스테린(phenesterine), 프레드니무스틴(prednimustine), 트로포스파미드(trofosfamide), 및 우라실 머스타드; 니트로스우레아(nitrosurea), 예를 들어, 카르무스틴, 클로로조토신(chlorozotocin), 포테무스틴(fotemustine), 로무스틴, 니무스틴(nimustine), 및 라님누스틴(ranimustine); 항생제, 예를 들어, 에네딘(enediyne) 항생제(예를 들어, 칼리케미신, 특히 칼리케미신 감마1I 및 칼리케미신 오메가1I); 디네미신(dynemicin) A를 비롯한 디네미신; 클로드로네이트(clodronate)와 같은 비스포스포네이트; 에스페라미신(esperamicin); 및 네오카르지노스타틴(neocarzinostatin) 발색단 및 관련 색소단백질 에네디인 항생제 발색단, 아클라시노마이신(aclacinomysin), 액티노마이신, 아우트라르나이신(authrarnycin), 아자세린(azaserine), 블레오마이신(bleomycin), 캐티노마이신(cactinomycin), 카라비신(carabacin), 카르미노마이신(carminomycin), 카르지노필린(carzinophilin), 크로모마이시니스(chromomycinis), 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신(detorubicin), 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신(모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신(marcellomycin), 미토마이신, 예를 들어, 미토마이신 C, 미코페놀산, 노가라르니신(nogalarnycin), 올리보마이신(olivomycin), 페플로마이신(peplomycin), 포트피로마이신(potfiromycin), 퓨로마이신, 쿠엘라마이신(quelamycin), 로도루비신(rodorubicin), 스트렙토니그린(streptonigrin), 스트렙토조신(streptozocin), 투베르시딘(tubercidin), 우베니멕스(ubenimex), 지노스타틴(zinostatin), 및 조루비신(zorubicin); 항-대사물, 예를 들어, 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어, 데노프테린(denopterin), 프테로프테린(pteropterin), 및 트리메트렉세이트(trimetrexate); 퓨린 유사체, 예를 들어, 플루다라빈(fludarabine), 6-미캡토퓨린, 티아미프린(thiamiprime), 및 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어, 안시타빈(ancitabine), 아자시티딘(azacitidine), 6-아자우리딘(azauridine), 카르모푸르(carmofur), 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘(doxifluridine), 에노시타빈(enocitabine), 및 플록스우리딘(floxuridine); 안드로겐, 예를 들어, 카루스테론(calusterone), 드로모스타노론(dromostanolone) 프로페오네이트, 에피티오스타놀(epitiostanol), 메피티오스탄(mepitiostane), 및 테스토락톤(testolactone); 항-부신(anti-adrenals), 예를 들어, 미토탄(mitotane) 및 트리로스탄(trilostane); 엽산 보충제, 예를 들어, 프로린산(frolinic acid); 아세그라톤(aceglatone); 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실(eniluracil); 암사크린(amsacrine); 베스트라부실(bestrabucil); 비산트렌(bisantrene); 에다트랙세이트(edatraxate); 데포파민(defofamine); 테메콜신(demecolcine); 디아지쿠온(diaziquone); 엘포르미틴(elformithine); 엘립티니움 아세테이트(eliptinium acetate); 에포티론(epothilone); 에토글루시드(etoglucid); 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난(lentinan); 로니다이닌(ionidainine); 메이탄시노이드, 예를 들어, 메이탄신 및 안사미토신(ansamitocin); 미토구아존(mitoguazone); 미토잔트론; 모피단몰(mopidanmol); 니트라에린(nitraerine); 펜토스타틴(pentostatin); 페나메트(phemamet); 피라루비신(pirarubicin); 로소잔트론(losoxanthrone); 포도필린산(podophyllinic acid); 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진(procarbazine); PSK 다당류 복합체; 라족산(razoxane); 리족신(rhizoxin); 시조피란(sizofiran); 스피로제르마늄(spirogermanium); 테누아존산(tenuazonic acid); 트리아지쿠온(triaziqone); 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센(trichothecene)(특히, T-2 독소, 베라쿠린(verrucurin) A, 로리딘(roridin) A 및 안구이딘(anguidine)); 우레탄; 벤데신; 다카르바진(dacarbazine); 만노무스틴(mannomustine); 미토브로니톨(mitobronitol); 미토락톨(mitolactol); 피포브로만(pipobroman); 가시토신(gacytosine); 아라비노시드(arabinoside)("Ara-C"); 시클로포스파미드; 탁소이드(taxoid), 예를 들어, 파클리타셀 및 도세탁셀 켐시타빈; 6-티오구아닌; 미캡토퓨린; 백금 치물, 예를 들어, 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미토잔트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 노반트론(novantrone); 테니포시드; 에다트렉세이트(edatrexate); 다우노마이신; 아미노프테린(aminopterin); 젤로다(xeloda); 이반드로네이트

(ibandronate); 이리노테칸(irinotecan)(예를 들어, CPT-11); 토포이소미라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노이드, 예를 들어, 레티노산; 카페시타빈; 카르보플라틴, 프로카르바진, 플리코마이신(plicomycin), 켐시타비엔, 나벨빈(navelbine), 파르네실-단백질 트랜스퍼라제 억제제, 트랜스백금(transplatinum), 및 상기 중 임의의 것의 약학적 허용 염, 산, 또는 유도체를 포함한다.

[0325] 방사선요법

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

[0327] 종양 미세환경은 종양에 침윤하여 면역 반응을 억제하기 위해 기능하는 조절 T 세포 및 골수-유래 억제자 세포의 존재로 인해 본질적으로 억제성이다. 또한, T 세포 및 항원 제시 세포(APC) 상의 일부 억제성 분자의 발현은 효과적인 면역 반응을 제한할 수 있다. 방사선은 종양 세포 어പ토시스, 노쇠, 자가포식(autophagy)의 유도를 통해 항-종양 효과를 매개하며, 일부 상황에서는 더욱 효과적인 면역 반응을 자극할 수 있다.

[0328] 방사선은 종양 세포를 스트레스 상태하에 두어서 종양 세포가 스트레스에서 생존하기 위한 기전을 활성화할 수 있도록 하기 위한 수단일 수 있다. 그러한 스트레스 상태하에서 활성화된 분자는 방사선과 조합되어 사용되는 치료법을 위한 타겟으로 작용할 수 있다. BTN1A1은 그러한 상태하에서 과다발현하는 잠재적 타겟으로 확인되었다.

[0329] BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 분자는 국소적 및 전신성 면역 반응을 자극할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체, 다른 분자, 또는 약학 조성물의 치료적 유효량은 상승적 효과를 이루기 위하여 방사선요법 이전에, 동시에, 또는 이후에 투여된다.

[0330] 일부 실시형태에서, 숙주 내의 종양을 조사에 대하여 효과적으로 감작시키는, 본 명세서에 개시된 항체, 다른 분자, 또는 약학 조성물의 치료적 유효량이 투여된다. 조사는 이온화 방사선 및 특히 감마선일 수 있다. 일부 실시형태에서, 감마선은 선형 가속기에 의해 또는 방사성핵종에 의해 방출된다. 방사성핵종에 의한 종양의 조사는 외부적 또는 내부적일 수 있다.

[0331] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체, 다른 분자, 또는 약학 조성물의 투여는 종양의 조사 전 최대 1개월, 특히 최대 10일 또는 1주일에 시작한다. 부가적으로, 종양의 조사는 본 명세서에 개시된 항체, 다른 분자, 또는 약학 조성물의 투여가 첫번째 및 마지막 조사 세션 사이의 간격에서 유지되도록 분획화된다.

[0332] 조사는 또한 X-선 방사선, 감마선 방사선, 또는 하전된 입자 방사선(양자빔, 탄소 빔, 헬륨 빔)(또는 일반적으로 "방사선")일 수 있다. 방사선을 위한 선량 범위는 일부 간격 기간(2일 이상 내지 수주)을 위한 50 내지 600 레트겐의 일일 선량에서 800 내지 6000 레트겐의 단일 선량까지이다. 방사선은 매일 한번, 매일 두번, 매일 세번, 또는 매일 네번 투여될 수 있다. 방사성동위원소를 위한 선량 범위는 광범위하게 변하며, 동위원소의 반감기, 방출되는 방사선의 강도와 타입, 및 신생물 세포에 의한 흡수에 의존한다.

[0333] 타겟팅된 치료법

[0334] 타겟팅된 암 치료법은 암의 성장, 진행 및 확산에 관련되는 특정 분자("분자 타겟")를 방해함으로써 암의 성장과 확산을 차단하는 약물 또는 다른 물질이다. 타겟팅된 암 치료법은 또한 "분자적으로 타겟팅된 약물", "분자적으로 타겟팅된 치료법", "정밀 의료" 또는 유사한 명칭으로 불린다. 표준 화학요법과 다르게, 타겟팅된 치료법은 암과 연합된 특정 분자 타겟에 작용하는 반면, 표준 화학요법은 일반적으로 모든 신속하게 분열하는 정상 및 암 세포에 작용한다.

[0335] 타겟팅된 치료법은 소분자 타겟팅된 치료법 및 생물학적 타겟팅된 치료법, 예를 들어, 단클론 항체를 모두 포함한다. 소분자 화합물은 전형적으로 세포 내에 위치한 타겟을 위해 개발되며, 그 이유는 그러한 작용체는 상대적으로 쉽게 세포에 들어갈 수 있기 때문이다. 단클론 항체와 같은 생물학적 타겟팅된 치료법은 보통 세포 밖의 또는 세포 표면 상에 있는 타겟을 위해 사용된다.

[0336] 많은 상이한 타겟팅된 치료법이 암 치료에서의 사용을 위해 승인되었다. 이들 치료법은 호르몬요법, 시그널 전

달 억제제, 유전자 발현 조절제, 어펩토시스 유도제, 혈관신생 억제제, 면역요법 및 독소 전달 분자를 포함한다.

[0337] 호르몬요법은 성장을 위해 일부 호르몬을 요구하는 호르몬-민감성 종양의 성장을 자연시키거나 중단시킨다. 호르몬요법은 신체가 호르몬을 생성하지 못하게 하거나 호르몬의 작용을 방해함으로써 작용한다. 호르몬요법은 유방암 및 전립선암에 대해 승인되었다.

[0338] 시그널 전달 억제제는 세포가 그의 환경으로부터의 시그널에 반응하는 과정인 시그널 전달에 참여하는 분자의 활성을 차단한다. 이 과정동안, 일단 세포가 특정 시그널을 수신하면, 시그널은 궁극적으로 적절한 반응(들)을 생산하는 일련의 생화학적 반응을 통해 세포내에서 전달된다. 일부 암에서는, 악성 세포가 외부 성장 인자에 의해 그렇게 하도록 자극되지 않고서도 연속적으로 분활하도록 자극된다. 시그널 전달 억제제는 이러한 부적절한 시그널링을 방해한다.

[0339] 유전자 발현 조절제는 유전자 발현의 제어에서 역할을 하는 단백질의 기능을 변형시킨다. 어펩토시스 유도제는 암세포가 어펩토시스로 불리는 제어된 세포 사멸 과정을 거치도록 야기한다. 어펩토시스는 신체가 불필요하거나 비정상인 세포를 제거하기 위해 사용하는 한 가지 방법이지만, 암세포는 어펩토시스를 피하기 위한 전략을 가진다. 어펩토시스 유도제는 암세포의 사멸을 야기하기 위하여 이를 전략을 해결할 수 있다.

[0340] 혈관신생 억제제는 새로운 혈관이 종양까지 성장하는 것(종양 혈관신생으로 불리는 과정)을 차단한다. 혈액은 종양이 계속 성장하기 위해 필요로 하는 산소와 영양소를 제공하므로 혈액 공급은 종양이 일정 크기 이상으로 성장하는데 필요하다. 혈관신생을 방해하는 치료는 종양 성장을 차단할 수 있다. 혈관신생을 억제하는 일부 타겟팅된 치료법은 새로운 혈관 형성을 자극하는 물질인 혈관 내피 성장 인자(VEGF)의 작용을 방해한다. 다른 혈관신생 억제제는 새로운 혈관 성장을 자극하는 다른 분자를 타겟팅한다.

[0341] 면역요법은 면역계가 암세포를 파괴하도록 촉발한다. 일부 면역요법은 암세포의 표면 상의 특정 분자를 인식하는 단클론 항체이다. 타겟 분자에의 단클론 항체의 결합은 그 타겟 분자를 발현하는 세포의 면역 파괴를 야기한다. 다른 단클론 항체는 일부 면역 세포에 결합하여 이를 세포가 암 세포를 더 잘 사멸시키도록 돋는다.

[0342] 독성 분자를 전달하는 단클론 항체는 암세포의 사멸을 특이적으로 야기할 수 있다. 일단 항체가 그의 타겟 세포에 결합하면, 방사성 물질 또는 독성 화합물과 같은 항체에 연결된 독성 분자가 세포에 의해 섭취되어, 결과적으로 그 세포를 사멸시킨다. 독소는 항체를 위한 타겟이 결핍된 세포, 즉, 신체내의 대부분의 세포에는 영향을 주지 않을 것이다.

[0343] 암 백신 및 유전자 치료법은 또한 그들이 특정 암세포의 성장을 방해하므로 타겟팅된 치료법으로 간주된다.

[0344] 예를 들어, 제2 치료법으로서 본 실시형태에 따라 사용될 수 있는 FDA 승인된 타겟팅된 치료법의 목록이 하기에 제공된다.

[0345] · 위 또는 위식도 접합부의 선암종: 트라스투주맙(Trastuzumab)(허셉틴(Herceptin)®), 라무시루맙(ramucirumab)(시람자(Cyramza)®)

[0346] · 기저 세포 암종: 비스모데깁(Vismodegib)(에리베지(Erivedge)TM), 소니데깁(sonidegib)(오돔조(Odomzo)®)

[0347] · 뇌암: 베바시주맙(Bevacizumab)(아바스틴(Avastin)®), 에베로리무스(everolimus)(아피니토르(Afinitor)®)

[0348] · 유방암: 에베로리무스(아피니토르®), 타목시펜, 토레미펜(toremifene)(파레스톤(Fareston)®), 트라스투주맙(허셉틴®), 풀베스트란트(fulvestrant)(파스로덱스(Faslodex)®), 아나스트로졸(anastrozole)(아리미덱스(Arimidex)®), 엑세메스탄(exemestane)(아로마신(Aromasin)®), 라파티닙(lapatinib)(티케르브(Tykerb)®), 레트로졸(letrozole)(페마라(Femara)®), 페르투주맙(pertuzumab)(페르제타(Perjeta)®), 아도-트라스투주맙엠탄신(ado-trastuzumab emtansine)(카드시라(Kadcyla)TM), 팔보시클립(palbociclib)(이브란스(Ibrance)®)

[0349] · 자궁경부암: 베바시주맙(아바스틴®)

[0350] · 대장암: 세툭시맙(Cetuximab)(에르비툭스(Erbtux)®), 파니투무맙(panitumumab)(벡티빅스(Vectibix)®), 베바시주맙(아바스틴®), 지브-아플리베르셉트(ziv-afiblercept)(잘트랩(Zaltrap)®), 레고라페닙(regorafenib)(스티바르가(Stivarga)®), 라무시루맙(시람자®)

[0351] · 용기성피부섬유종: 이마티닙 메실레이트(글리벡(Gleevec)®)

- [0352] · 내분비/신경내분비 종양: 란레오티드 아세테이트(Lanreotide acetate)(소마툴린(Somatuline)® 디포(Depot))
- [0353] · 두경부암: 세툭시맙(에르비툭스(Erbxitux)®)
- [0354] · 위장 기질 종양: 이마티닙 메실레이트(글리벡®), 수니티닙(sunitinib)(수텐트(Sutent)®), 레고라페닙(스티바르가®)
- [0355] · 골 거대세포 종양: 데노수맙(Denosumab)(엑스지바(Xgeva)®)
- [0356] · 카포시육종: 알리트레티노인(Alitretinoin)(판레틴(Panretin)®)
- [0357] · 신장암: 베바시주맙(아바스틴®), 소라페닙(sorafenib)(넥사바르(Nexavar)®), 수니티닙(수텐트(Sutent)®), 파조파닙(pazopanib)(보트리엔트(Votrient)®), 템시로리무스(temsirolimus)(토리셀(Torisel)®), 에베로리무스(아피니토르®), 악시티닙(axitinib)(인리타(Inlyta)®)
- [0358] · 백혈병: 트레티노인(Tretinoin)(베사노이드(Vesanoid)®), 이마티닙 메실레이트(글리벡®), 다사티닙(dasatinib)(스프리셀(Sprycel)®), 니로티닙(nilotinib)(타시그나(Tasigna)®), 보수티닙(bosutinib)(보수리프(Bosulif)®), 리툭시맙(rituximab)(리툭산(Rituxan)®), 아лем투주맙(alemtuzumab)(캄파스(Campath)®), 오파투무맙(ofatumumab)(아르제라(Arzerra)®), 오비누투주맙(obinutuzumab)(가지바(Gazyva)TM), 이브루티닙(ibrutinib)(임브루비카(Imbruvica)TM), 이데라리십(idelalisib)(지델리그(Zydelig)®), 블리나투모맙(blinatumomab)(블린시토(Blincyto)TM)
- [0359] · 간암: 소라페닙(넥사바르®)
- [0360] · 폐암: 베바시주맙(아바스틴®), 크리조티닙(crizotinib)(잘코리(Xalkori)®), 엘로티닙(erlotinib)(타르세바(Tarceva)®), 제피티닙(gefitinib)(이레사(Iressa)®), 아파티닙 디말리에이트(afatinib dimaleate)(지로트리프(Gilotrif)®), 세르티닙(ceritinib)(LDK378/지카디아(Zykadia)), 라무시루맙(시람자®), 니보루맙(nivolumab)(옵디보(Opdivo)®), 펜브로리주맙(pembrolizumab)(키트루다(Keytruda)®)
- [0361] · 럼프종: 이브리투모맙 티وخ세탄(Ibrutinomab tiuxetan)(제바린(Zevalin)®), 테니류킨 디프티툭스(denileukin diftitox)(온탁(Ontak)®), 브렌툭시맙 베도틴(brentuximab vedotin)(애드세트리스(Adcetris)®), 리툭시맙(리툭산®), 보리노스타트(vorinostat)(조린자(Zolinza)®), 로미depsin(romidepsin)(이스토다스(Istodax)®), 벡사로텐(bexarotene)(타르그레틴(Targretin)®), 보르테조맙(bortezomib)(벨카데(Velcade)®), 프라라트렉세이트(pralatrexate)(포로틴(Folotyn)®), 레나리오미드(lenaliomide)(레브리미드(Revlimid)®), 이브루티닙(ibrutinib)(임브루비카(Imbruvica)TM), 실툭시맙(siltuximab)(실반트(Sylvant)TM), 이델라리십(idelalisib)(지델리그(Zydelig)®), 벨리노스타트(belinostat)(베레오닥(Beleodaq)TM)
- [0362] · 흑색종: 이피리무맙(Ipilimumab)(예르보이(Yervoy)®), 베무라페닙(vemurafenib)(젤보라프(Zelboraf)®), 트라메티닙(trametinib)(메키니스트(Mekinist)®), 다브라페닙(dabrafenib)(타핀라르(Tafinlar)®), 펜브로리주맙(키트루다®), 니보루맙(옵디보®)
- [0363] · 다발성 골수종: 보르테조맙(벨카데®), 카르필조맙(carfilzomib)(카프로리스(Kyprolis)®), 레나리오미드(lenaliomide)(레브리미드(Revlimid)®), 포마리도미드(pomalidomide)(포마리스트(Pomalyst)®), 파노비노스타트(panobinostat)(파리닥(Farydak)®)
- [0364] · 골수형성이상/골수증식 질환: 이마티닙 메실레이트(글리벡®), 룩소리티닙 포스페이트(ruxolitinib phosphate)(자카피(Jakafi)TM)
- [0365] · 신경아세포종: 디누툭시맙(Dinutuximab)(유니툭신(Unituxin)TM)
- [0366] · 난소 상피/나팔관/일차성 복막 암: 베바시주맙(아바스틴®), 오라파립(olaparib)(린파르자(Lynparza)TM)
- [0367] · 췌장암: 엘로티닙(Erlotinib)(타르세바(Tarceva)®), 에베로리무스(아피니토르®), 수니티닙(수텐트(Sutent)®)
- [0368] · 전립선암: 카바지탁셀(Cabazitaxel)(제브타나(Jevtana)®), 엔자루트아미드(enzalutamide)(엑스탄디(Xtandi)®), 아비라테론 아세테이트(abiraterone acetate)(지티가(Zytiga)®), 라듐 223 클로라이드(조피고(Xofigo)®)

- [0369] · 연조직 육종: 파조파닙(보트리엔트®)
- [0370] · 전신비만세포종: 이마티닙 메실레이트(글리벡®)
- [0371] · 갑상선암: 카보잔티닙(Cabozantinib)(코메트리크(Cometriq)TM), 반데타닙(vandetanib)(카프렐사(Caprelsa)®, 소라페닙(넥사바르®), 렌바티닙 메실레이트(lenvatinib mesylate)(렌비마(Lenvima)TM)
- [0372] 면역요법
- [0373] 당업자는 면역요법이 본 실시형태의 방법과 조합되거나 함께 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 암치료 맥락에서, 면역요법은 일반적으로 암세포를 타겟팅하고 파괴하기 위하여 면역 이펙터 세포 및 분자의 사용에 의존한다. 리툭시맙(리툭산®)은 그러한 예이다. 예를 들어, 이피루미맙과 같은 면역관문 억제제(Checkpoint inhibitor)는 다른 그러한 예이다. 면역 이펙터는 예를 들어, 종양 세포 표면 상의 일부 마커에 대해 특이적인 항체일 수 있다. 항체 단독이 치료법의 이펙터로서 작용할 수 있거나, 또는 항체는 실제로 세포 사멸을 일으키기 위하여 다른 세포를 모집할 수 있다. 항체는 또한 약물 또는 독소(예를 들어, 화학요법제, 방사성핵종, 리신 A 쇄, 콜레라 독소, 백일해 독소)에 접합되고 단지 타겟팅제로서 작용할 수 있다. 대안적으로, 이펙터는 종양 세포 타겟과 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 표면 분자를 보유한 림프구일 수 있다. 다양한 이펙터 세포는 세포독성 T 세포 및 NK 세포를 포함한다.
- [0374] 면역요법의 일 양태에서, 종양 세포는 타겟팅을 받아들일 수 있는, 즉, 대부분의 다른 세포에는 존재하지 않는, 일부 마커를 보유한다. 많은 종양 마커가 존재하며 이들 중 어느 것이든 본 실시형태의 맥락에서 타겟팅을 위해 적합할 수 있다. 일반적인 종양 마커는 CD20, 암배아 항원, 티로시나제(p97), gp68, TAG-72, HMFG, 시알릴 루이스(Sialyl Lewis) 항원, MucA, MucB, PLAP, 라미닌 수용체, erb B, 및 p155를 포함한다. 면역요법의 대안적 양태는 항암 효과를 면역 자극 효과와 조합하는 것이다. 사이토카인, 예를 들어, IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, 감마-IFN, 케모카인, 예를 들어, MIP-1, MCP-1, IL-8, 및 성장 인자, 예를 들어, FLT3 리간드를 비롯한 면역 자극 분자가 또한 존재한다.
- [0375] 현재 조사중이거나 사용중인 면역요법의 예는 면역 아쥬반트(adjuvant), 예를 들어, 마이코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*), 플라스모듐 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 디니트로클로로벤젠 및 방향족 화합물(미국 특허 5,801,005호 및 5,739,169호; Hui and Hashimoto, *Infect Immun.*, 66(11):5329-36(1998); Christodoulides et al., *Microbiology*, 66(11):5329-36(1998)); 사이토카인요법, 예를 들어, 인터페론 α , β , 및 γ , IL-1, GM-CSF, 및 TNF (Bukowski et al., *Clin Cancer Res.*, 4(10):2337-47 (1998); Davidson et al., *J Immunother.*, 21(5):389-98(1998); Hellstrand et al., *Acta Oncol.* 37(4):347-53(1998)); 유전자 치료법, 예를 들어, TNF, IL-1, IL-2, 및 p53(Qin et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(24):14411-6(1998); Austin-Ward and Villaseca, *Rev Med Chil*, 126(7):838-45 (1998); 미국 특허 5,830,880호 및 5,846,945호); 및 단클론 항체, 예를 들어, 항-PD1, 항-PDL1, 항-CD20, 항-강글리오사이드 GM2, 및 항-p185(Topalian et al., *The New England journal of medicine*, 366:2443-2454 (2012); Brahmer et al., *The New England journal of medicine* 366:2455-2465 (2012); Hollander, *Front Immunol* (2012): 3:3. doi: 10.3389/fimmu.2012.00003; Hanibuchi et al., *Int J Cancer*, 78(4):480-5(1998); 미국 특허 5,824,311호)이며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 한 가지 이상의 항암 치료법이 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자의 사용에 관련되는 본 명세서에 개시된 치료법과 이용될 수 있다.
- [0376] 수술
- [0377] 암환자의 대략 60%가 예방적, 진단성 또는 단계화(staging), 치유성(curative) 및 임시적 수술을 포함하는 일부 타입의 수술을 거칠 것이다. 치유성 수술은 암 조직의 전부 또는 일부가 물리적으로 제거, 절제 및 또는 파괴되는 절제술을 포함하며 본 실시형태의 치료, 화학요법, 방사선요법, 호르몬요법, 유전자 치료법, 면역요법 및/또는 대안적 치료법과 같은 다른 치료법과 함께 이용될 수 있다. 종양 절제술은 종양의 적어도 일부의 제거를 말한다. 종양 절제술에 더하여, 수술에 의한 치료는 레이저 수술, 냉동요법, 전기수술 및 현미경-제어 수술(모스 수술(Mohs' surgery))을 포함한다.
- [0378] 암 세포, 조직, 또는 종양의 전부 또는 일부의 절제시, 신체에 공동(cavity)이 형성될 수 있다. 치료는 부가적인 항암 치료법을 이용한 그 영역의 관류, 직접 주사 또는 국소 적용에 의해 이루어질 수 있다. 그러한 치료는 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일마다, 또는 1, 2, 3, 4, 및 5주마다 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월마다 반복될 수 있다. 이들 치료는 또한 변하는 투여량일 수 있다.

[0379] **부가적인 치료법 타입**

[0380] 냉동요법, 고열요법, 광역동 치료법, 및 고강도 집속 초음파(HIFU) 치료법을 포함하지만 이에 제한되지 않는 본 기술분야에 알려진 부가적인 타입의 암 치료법이 본 발명에서 제공되는 방법 및 조성물과 조합되거나 함께 이용될 수 있다.

[0381] 냉동요법(냉동수술로도 불림)은 비정상 조직을 파괴하기 위하여 액체 질소(또는 아르곤 가스)에 의해 생성된 극심한 차가움을 이용하는 것이다. 냉동수술은 피부 상의 종양과 같은 외부 종양을 치료하기 위하여 사용된다. 외부 종양의 경우, 액체 질소는 면봉 또는 분무 장치를 이용하여 암세포에 직접적으로 적용된다. 냉동수술은 또한 신체 내의 종양(내부 종양 및 골 내의 종양)을 치료하기 위하여 이용될 수 있다. 내부 종양의 경우, 액체 질소 또는 아르곤 가스는 종양과 접촉하여 배치되는, 냉동프로브로 불리는 중공 장비를 통해 순환된다. 프로브는 수술동안 종양 내에 또는 피부를 통해(경피로) 놓여질 수 있다. 냉동수술 후, 동결된 조직은 해동되고, 자연적으로 신체에 의해 흡수되거나(내부 종양의 경우), 또는 용해되고 딱지를 형성한다(외부 종양의 경우).

[0382] 고열요법(열 치료법 또는 온열요법으로도 불림)은 신체 조직이 고온(최대 113 °F)에 노출되는 암 치료 타입이다. 국소, 국부, 및 전신 고열요법을 비롯한 여러가지 고열요법 방법이 있다.

[0383] 국소 고열요법에서는, 종양을 가열하기 위하여 에너지를 전달하는 다양한 기술을 이용하여, 종양과 같은 작은 영역에 열이 적용된다. 마이크로웨이브, 무선주파수 및 초음파를 비롯한 상이한 타입의 에너지가 열을 가하기 위하여 사용될 수 있다. 종양 위치에 따라, 외부 접근, 관내(intraluminal) 또는 강내(endocavitory) 방법 및 세포간 기술을 비롯하여, 국소 고열요법에의 여러가지 접근법이 있다.

[0384] 국부 고열요법에서는, 체강, 기관 또는 사지와 같은 조직의 큰 영역을 가열하기 위하여, 심부 조직 접근법, 국부 관류 기술, 및 연속적 고열 복강내 관류(CHPP)를 비롯한 다양한 접근법이 사용될 수 있다.

[0385] 전신 고열요법은 신체에 걸쳐 퍼진 전이성 암을 치료하기 위해 이용될 수 있으며, 이 요법은 열 챔버(큰 인큐베이터와 유사) 또는 고온수 담요의 사용을 비롯하여 체온을 107-108 °F로 상승시키는 여러 기술에 의해 이루어질 수 있다.

[0386] 광역동 치료법(PDT)은 광감작제 또는 광감작 작용제로 불리는 약물 및 특정 타입의 광을 이용하는 치료이다. 광감작제가 특정 파장의 광에 노출될 경우, 그들은 근처의 세포를 사멸시키는 산소 형태를 생산한다. 암치료를 위한 PDT의 제1 단계에서는, 광감작 작용제가 혈류내로 주사된다. 상기 작용제는 전신에 걸쳐서 세포에 의해 흡수되지만 정상 세포에서보다 암세포에서 더 오래 머무른다. 주사 후 대략 24 내지 72시간 후, 대부분의 작용제가 정상 세포를 떠났지만 암세포에는 남아 있을 때, 종양이 광에 노출된다. 종양내의 광감작제는 광을 흡수하여 근처의 암세포를 파괴하는 산소 활성 형태를 생산한다.

[0387] PDT를 위해 사용되는 광은 레이저 또는 다른 공급원으로부터 올 수 있다. 레이저 광은 신체내 영역으로 광을 전달하기 위하여 섬유 광케이블(광을 전송하는 얇은 섬유)을 통해 보내질 수 있다. 다른 광원은 발광 다이오드(LED)를 포함하며, 이것은 피부암과 같은 표면 종양을 위해 사용될 수 있다. 체외 광영동요법(Extracorporeal photopheresis)(ECP)은 환자의 혈액 세포를 수집하고, 그들을 광감작 작용제를 이용하여 신체 밖에서 처리하고, 그들을 광에 노출시킨 후, 그들을 환자에게 돌려보내기 위해 기계가 사용되는 PDT 타입이다.

[0388] 고강도 집속 초음파 치료법(또는 HIFU)은 암치료의 한 타입이다. 의사들은 암의 특정 부분에 강한 빛출기를 전달하고 암세포를 사멸시키는 고주파수 음파를 발하는 기계를 이용하여 HIFU 치료를 제공한다.

[0389] **기타 작용제**

[0390] 치료의 치료적 효능을 개선하기 위하여 본 발명의 실시형태의 일부 양태와 조합되어 다른 작용제가 사용될 수 있는 것으로 생각된다. 이를 추가의 작용제는 세포 표면 수용체 및 캡 연결부(GAP junction)의 상향조절을 일으키는 작용제, 세포증식억제 및 분화 작용제, 세포 부착 억제제, 어펩토시스 유도제에 대한 과증식 세포의 민감성을 증가시키는 작용제, 또는 다른 생물 작용제를 포함한다. 캡 연결부의 수를 상승시켜 세포간 시그널링을 증가시키는 것은 이웃한 과증식 세포 집단에 대한 항-과증식 효과를 증가시킬 수 있다. 다른 실시형태에서, 세포 증식억제 또는 분화 작용제는 치료의 항-과증식 효능을 개선하기 위하여 본 발명 실시형태의 일부 양태와 조합되어 사용될 수 있다. 세포 부착 억제제는 본 발명 실시형태의 효능을 개선하는 것으로 생각된다. 세포 부착 억제제의 예는 국소 접착 키나제(focal adhesion kinase)(FAK) 억제제 및 로바스타틴이다. 항체 c225와 같은, 어펩토시스에 대한 과증식 세포의 민감성을 증가시키는 다른 작용제가 치료 효능을 개선하기 위하여 본 발명 실시 형태의 일부 양태와 조합되어 이용될 수 있음이 추가로 고려된다.

5.6 동반 진단

[0391] **5.6 동반 진단**

BTN1A1은 암세포에서 높게 그리고 특이적으로 발현된다. 본 발명은 또한 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 분자를 이용하여 개체로부터의 샘플 내의 BTN1A1의 발현을 검출하는 방법을 제공한다. 따라서, 본 발명은 또한 암 진단제로서 본 명세서에 개시된 분자의 용도를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 문자와 BTN1A1 사이의 복합체를 형성하기 위하여 본 명세서에 개시된 문자와 샘플을 접촉시키고, 샘플 내의 복합체를 검출함으로써 개체로부터의 샘플에서 BTN1A1을 검출하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 문자와 BTN1A1 사이의 복합체를 형성하기 위하여 본 명세서에 개시된 문자와 개체로부터의 샘플을 접촉시키고, 복합체를 검출하고, 그리고 복합체가 샘플에서 검출되면 개체가 암을 가질 가능성이 있는 것으로 진단하는 것을 포함하는, 개체의 암진단을 제공하거나 돋기 위한 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 문자를 이용하여 샘플 내의 당화된 BTN1A1의 존재를 검출하는 것을 포함한다.

[0393] 일부 실시형태에서, 문자는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진다. 일부 양태에서, 문자는 위치 N55, N215, 및/또는 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다.

[0394] 일부 실시형태에서, 문자는 항-BTN1A1 항체이다. 일부 실시형태에서, 문자는 항-당화된 BTN1A1 항체이다.

[0395] 일부 실시형태에서, 본 발명은 또한 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH 또는 VL 도메인을 포함하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 분자를 이용하여 개체로부터의 샘플에서 BTN1A1의 발현을 검출하기 위한 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 문자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH 및 VL 도메인 모두를 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VH CDR 하나 이상을 포함하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 분자를 이용하여 개체로부터의 샘플에서 BTN1A1의 발현을 검출하는 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 문자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VL CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VL CDR 하나 이상을 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 문자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 적어도 하나의 VH CDR 및 적어도 하나의 VL CDR을 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다.

[0396] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 BTN1A1 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 분자를 이용하여 개체로부터의 샘플에서 BTN1A1의 발현을 검출하는 방법을 제공한다. BTN1A1 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC810의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 BTN1A1의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 분자를 이용하여 개체로부터의 샘플에서 BTN1A1의 발현을 검출하는 방법을 제공한다. BTN1A1 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC810의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, BTN1A1 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 5개의 연속 아미노산을 갖는다.

[0397] 일부 실시형태에서, 샘플 내의 BTN1A1의 검출은 본 명세서에 개시된 분자를 이용하여 샘플 내의 BTN1A1의 발현 수준을 측정하는 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, BTN1A1의 검출은 개체로부터의 샘플 내의 BTN1A1의 발현 수준을 기준 수준에 비교하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 본 명세서에 개시된 분자를 이용하여 샘플 내의 BTN1A1의 발현 수준을 측정하고, 샘플 내의 BTN1A1의 발현 수준을 기준 수준에 비교하고, 만일 샘플 내의 BTN1A1의 발현 수준이 기준 수준보다 높으면 개체가 암을 가질 가능성이 있는 것으로 진단하는 것을 포함한다.

[0398] 일부 실시형태에서, BTN1A1 수준의 측정은 항-당화된 BTN1A1 항체와 같은, 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 이용하여 당화된 BTN1A1의 수준을 측정하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플 내의 당화된 BTN1A1의 수준의 측정은 샘플 내의 당화된 BTN1A1의 수준을 기준 수준에 비교하고,

만일 샘플 내의 당화된 BTN1A1의 수준이 기준 수준보다 높으면 개체가 암을 가질 가능성이 있는 것으로 진단하는 것을 추가로 포함한다.

[0399] 일부 실시형태에서, 기준 수준은 건강한 개인으로부터의 샘플에서 BTN1A1의 발현 수준일 수 있다. 일부 실시형태에서, 기준 수준은 건강한 개인의 집단으로부터의 샘플에서 BTN1A1의 평균 또는 중간 발현 수준일 수 있다. 기준 수준은 또한 집단의 샘플로부터의 BTN1A1의 발현 수준의 통계적 분석에 의해 결정된 컷오프 값을 수 있다. 그러한 컷오프 값을 결정하기 위하여 사용될 수 있는 통계적 방법은 본 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 수신자 오퍼레이터 특성(Receiver Operator Characteristic)(ROC) 분석을 이용하여 기준 발현 비를 결정할 수 있다. ROC 분석의 리뷰는 그 자체가 참고로 본원에 포함되는 Soreide, *J Clin Pathol*, 10:1136 (2008)에서 찾을 수 있다.

[0400] 일부 실시형태에서, 개체는 일상적인 건강진단을 받는 건강한 개체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 건강한 개체는 본 기술분야에 잘 알려진 소정의 위험 인자의 존재에 의해 결정될 때, 암을 가질 위험이 있다. 그러한 위험 인자는 유전적 소인, 개인 질병 이력, 가족성 질병 이력, 라이프스타일 인자, 환경 인자, 진단 지표 등을 제한 없이 포함한다. 일부 실시형태에서, 개체는 무증상이다. 무증상 개체는 추가로 암의 온전한 조기 진단 지표를 나타내지만 다르게는 증상이나 통증이 없는 암 환자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 개체는 암을 가진다.

[0401] 일부 실시형태에서, 개체는 암을 가진 것으로 의심된다. 일부 실시형태에서, 개체는 암에 걸릴 유전적 소인 또는 암의 가족력을 가진다. 일부 실시형태에서, 개체는 암의 발생을 촉진하는 소정의 라이프스타일 인자에 노출되거나 또는 개체는 암의 임상적 질병 징후를 보여준다. 일부 실시형태에서, 개체는 암을 진단하거나 암에 걸릴 위험을 평가하기 위하여 임상적 정밀검사를 받고 있는 환자이다.

[0402] 암은 전이성 암일 수 있다. 암은 혈액암 또는 고형 종양일 수 있다. 일부 실시형태에서, 암은 백혈병, 림프종 및 골수종으로 이루어지는 군으로부터 선택된 혈액암이다. 일부 실시형태에서, 암은 유방암, 폐암, 흉선암, 갑상선암, 두경부암, 전립선암, 식도암, 기관암, 뇌암, 간암, 방광암, 신장암, 위암, 췌장암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 고환암, 결장암, 직장암 또는 피부암, 흑색종성 및 비-흑색종성 피부암 둘 모두로 이루어지는 군으로부터 선택된 고형 종양이다. 암은 본 명세서에 개시된 임의의 다른 타입의 암일 수 있다.

[0403] 일부 실시형태에서, 개체는 치료경험이 없다. 일부 실시형태에서, 개체는 암을 위한 치료(예를 들어, 화학요법)을 진행중이다. 일부 실시형태에서, 개체는 병에 차도가 있다. 일부 실시형태에서, 병의 차도는 약물-유도된 것이다. 일부 실시형태에서, 병의 차도는 약물이 없는 것이다.

[0404] 일부 실시형태에서, BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1을 검출하는 방법은 개체로부터 샘플을 수득하는 것을 포함한다. 개체는 인간일 수 있다. 개체는 암환자일 수 있다. 샘플은 전혈 샘플, 골수 샘플, 부분 정제된 혈액 샘플, PBMC, 조직 생검, 순환 종양 세포, 단백질 복합체 또는 엑소좀(exosome)과 같은 순환 요소일 수 있다. 일부 실시형태에서, 샘플은 혈액 샘플이다. 일부 실시형태에서, 샘플은 조직 생검이다.

[0405] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 방법은 항-BTN1A1 항체 및 항-당화된 BTN1A1 항체를 비롯한, 본 명세서에 개시된 문자를 이용하는 다양한 면역조직화학(IHC) 접근법 또는 다른 면역분석 방법을 이용하여 샘플에서 BTN1A1을 검출하는 것을 포함한다.

[0406] 조직 색션의 IHC 염색은 샘플 내의 단백질의 존재를 평가하거나 검출하는 신뢰성있는 방법인 것으로 나타났다. 면역조직화학 기술은 탐침하기 위하여 항체를 이용하고 일반적으로 발색 또는 형광 방법에 의해, 인 시추에서 세포 항원을 시각화한다. 따라서, BTN1A1에 대해 특이적인 항체 또는 항혈청, 바람직하게는 다클론 항혈청, 그리고 가장 바람직하게는 단클론 항체가 사용될 수 있다. 하기에 보다 상세히 토의되는 바처럼, 항체는 예를 들어, 방사성 라벨, 형광 라벨, 합텐 라벨, 예를 들어, 비오틴, 또는 효소, 예를 들어, 호스 래디쉬 퍼옥시다제 또는 알카라인 포스파타제를 이용한 항체 자체의 직접 라벨링에 의해 검출될 수 있다. 대안적으로, 라벨링되지 않은 일차 항체가 일차 항체에 대해 특이적인, 항혈청, 다클론 항혈청 또는 단클론 항체를 포함하는 라벨링된 이차 항체와 함께 이용된다. 면역조직화학 프로토콜 및 키트는 본 기술분야에 잘 알려져 있으며 상업적으로 이용가능하다. 슬라이드 제조 및 IHC 프로세싱을 위한 자동화 시스템이 상업적으로 이용가능하다. 벤타나(Ventana)® 벤치마크(BenchMark) XT 시스템이 그러한 자동화 시스템의 예이다.

[0407] 표준 면역학적 및 면역분석 절차는 *Basic and Clinical Immunology* (Stites & Terr eds., 7th ed. 1991)에서 찾을 수 있다. 또한, 면역분석은 *Enzyme Immunoassay* (Maggio, ed., 1980); 및 상기 Harlow & Lane에서 광범위하게 리뷰된 여러 형태 중 어느 것으로든 수행될 수 있다. 일반적인 면역분석의 리뷰를 위해서는, 또한 *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, volume 37 (Asai, ed. 1993); *Basic and Clinical Immunology*

(Stites & Ten, eds., 7th ed. 1991)를 참고한다.

- [0408] BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1을 검출하기 위하여 일반적으로 이용되는 분석은 효소-연결 면역흡착 분석(ELISA), 형광 면역흡착 분석(FIA), 화학발광 면역흡착 분석(CLIA), 방사면역측정법(RIA), 효소 멀티플라이드 면역분석 (enzyme multiplied immunoassay)(EMI), 고체상 방사면역측정법(SPROA), 형광 편광(FP) 분석, 형광 공명 에너지 전이(FRET) 분석, 시간-분해 형광 공명 에너지 전이(TR-FRET) 분석 및 표면 플라즈몬 공명(SPR) 분석을 포함한다.
- [0409] 일부 실시형태에서, ELISA는 샌드위치 ELISA이다. 일부 실시형태에서, ELISA는 직접 ELISA이다. 일부 실시형태에서, ELISA는 고체 지지체상에(예를 들어, 미세적정 플레이트 웰의 또는 큐벳의 벽 상에) 본 명세서에 개시된 분자를 고정화시키는 처음 단계를 포함한다.
- [0410] BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1을 검출하기 위한 분석은 비경쟁적 분석, 예를 들어, 샌드위치 분석, 및 경쟁적 분석을 포함한다. 전형적으로, ELISA 분석과 같은 분석이 이용될 수 있다. ELISA 분석은 예를 들어, 혈액, 혈장, 혈청 또는 골수를 비롯한 다양한 조직과 샘플을 분석하기 위해 본 기술분야에 알려져 있다.
- [0411] 그러한 분석 포맷을 이용하는 광범위한 면역분석 기술이 이용가능하며, 예를 들어, 미국 특허 4,016,043호, 4,424,279호, 및 4,018,653호를 참고하며, 이들은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 이들은 비경쟁적 타입의 단일-부위 및 2-부위 또는 "샌드위치" 분석, 및 전통적 경쟁적 결합 분석을 포함한다. 이들 분석은 또한 타겟 항원에의 라벨링된 항체의 직접 결합을 포함한다. 샌드위치 분석은 일반적으로 사용되는 분석이다. 샌드위치 분석 기술의 많은 변형이 존재한다. 예를 들어, 전형적인 포워드 분석(forward assay)에서는, 라벨링되지 않은 항-BTN1A1 항체가 고형 기질상에 고정되고, 시험될 샘플이 결합된 항체와 접촉하게 된다. 항체-항원 복합체의 형성을 허용하기에 충분한 기간 동안, 적합한 항온처리 기간 후, 검출가능한 시그널을 생산할 수 있는 리포터 분자로 라벨링된 제2 항-BTN1A1 항체가 첨가되고 항온처리되어, 항체-항원-라벨링된 항체의 또 다른 복합체의 형성을 위해 충분한 시간을 허용한다. 임의의 미반응 물질이 세척하여 제거되고, 항원의 존재는 리포터 분자에 의해 생산된 시그널의 관찰에 의해 결정된다. 결과는 시각적 시그널의 단순 관찰에 의해 정성적이거나, 또는 표준량의 항원을 함유한 대조군 샘플과의 비교에 의해 정량될 수 있다.
- [0412] 포워드 분석의 변형은 동시 분석을 포함하며, 여기서는 샘플과 라벨링된 항체 둘 모두가 동시에 결합된 항체에 첨가된다. 쉽게 명백할 임의의 사소한 변형을 비롯하여 이들 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다. 전형적인 포워드 샌드위치 분석에서는, 예를 들어, 제1 항-BTN1A1 항체가 고형 표면에 공유적으로 또는 수동적으로 결합된다. 고형 표면은 유리 또는 중합체일 수 있으며, 가장 일반적으로 사용되는 중합체는 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드, 또는 폴리프로필렌이다. 고형 지지체는 튜브, 비드, 미세플레이트의 디스크, 또는 면역분석을 수행하기에 적합한 임의의 다른 표면 형태일 수 있다. 결합 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있으며 일반적으로 가교, 공유 결합 또는 물리적 흡착으로 이루어지며, 중합체-항체 복합체는 시험 샘플을 위한 제조에서 세척된다. 그 후 시험될 샘플의 분액이 고체상 복합체에 첨가되고, 항체에 존재하는 임의의 서브유닛의 결합을 허용하기에 적합한 조건(예를 들어, 실온 내지 40°C, 예를 들어, 25°C 내지 32°C 포함)하에서 충분한 기간동안(예를 들어, 2-40분 또는 더 편리하다면 밤새) 항온처리된다. 항온처리 기간 후, 항체 서브유닛 고체상이 세척되고 건조되며 항원의 일부에 대해 특이적인 제2 항체와 항온처리된다. 제2 항-BTN1A1 항체는 분자 마커에의 제2 항체의 결합을 나타내기 위해 사용되는 리포터 분자에 연결된다.
- [0413] 일부 실시형태에서, 유세포분석(FACS)은 샘플 내의 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1의 수준을 검출하기 위해 이용될 수 있다. 유세포분석기는 형광색소-태깅된 항체의 강도를 검출하고 보고하며, 이 강도는 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1의 수준을 나타낸다. 비-형광 세포질 단백질은 또한 투과성이 된 세포를 염색하여 관찰될 수 있다. 염색은 소정의 분자에 결합할 수 있는 형광 화합물 또는 선택 분자에 결합하는 형광색소-태깅된 항체일 수 있다.
- [0414] 효소 면역분석의 경우에, 효소는 일반적으로 글루타르알데하이드 또는 폐리오데이트에 의해, 제2 항체에 접합된다. 하지만, 쉽게 인식될 것처럼, 당업자가 쉽게 이용가능한 광범위한 상이한 접합 기술이 존재한다. 일반적으로 사용되는 효소는 호스래디쉬 폐옥시다제, 글루코스 옥시다제, 베타-갈락토시다제, 및 알카라인 포스파타제를 포함하며, 다른 것들이 본 명세서에 토의된다. 특정 효소와 사용될 기질이 일반적으로 상응하는 효소에 의한 가수분해시에 검출가능한 색상 변화의 생산을 위해 선정된다. 적합한 효소의 예는 알카라인 포스파타제 및 폐옥시다제를 포함한다. 상기한 발색 기질이 아닌, 형광 생성물을 생성하는 형광원 기질을 이용하는 것도 가능하다. 모든 경우에, 효소-라벨링된 항체는 제1 항체-분자 마커 복합체에 첨가되고, 결합한 후, 과량의 시약이 세척하여 제거된다. 그 후 적절한 기질을 함유한 용액이 항체-항원-항체의 복합체에 첨가된다. 기질은 제2 항체에 연결된 효소와 반응하여, 정성적인 시각적 시그널을 생성하며, 이것은 보통 분광학적으로 정량되어, 샘플에 존재

하는 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1의 양의 지표를 제공할 수 있다. 대안적으로, 플루오르세인 및 로다민과 같은 형광 화합물이 항체의 결합 능력의 변경없이 항체에 화학적으로 결합될 수 있다. 특정 파장의 광의 조사에 의해 활성화될 경우, 형광색소-라벨링된 항체는 광 에너지를 흡착하여, 분자에서 상태를 흥분성으로 유도하고, 광현미경으로 시각적으로 검출가능한 특징적인 색상에서의 광 방출이 이어진다. EIA에서처럼, 형광 라벨링된 항체는 제1 항체-분자 마커 복합체에 결합하도록 허용된다. 미결합 시약의 세척 후, 남은 삼원 복합체가 그 후 적절한 파장의 광에 노출되며, 관찰된 형광은 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1의 존재를 나타낸다. 면역형광 및 EIA 기술은 둘 모두 본 기술분야에서 잘 확립되어 있으며 본 명세서에서 토의된다.

[0415] 따라서, 본 발명은 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 분자를 이용하여 개체로부터의 샘플 내의 BTN1A1의 존재 또는 발현 수준을 검출하는 것을 포함하는, 암 진단 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 암을 가진 것으로 진단된 개체에게 암 치료를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 암 치료는 본 명세서에 개시되거나 다르게는 본 기술분야에 알려진 임의의 암 치료법일 수 있다. 일부 실시형태에서, 암 치료는 개체에게 치료적 유효량의 항-BTN1A1 항체를 투여하는 것을 포함한다.

5.7 치료의 효능 평가

[0416] [0417] 개체에서 BTN1A1의 발현 수준은 암 발달과 상관될 수 있다. BTN1A1 수준의 증가는 암 진행을 나타낼 수 있으며, BTN1A1 수준의 감소는 암 퇴행을 나타낼 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 분자를 이용하는 치료 과정에 걸쳐 개체의 샘플내의 BTN1A1 수준을 모니터함으로써 개체에서 특정 암 치료의 효능을 평가하기 위한 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 BTN1A1의 발현 수준의 검출을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 당화된 BTN1A1의 수준의 검출을 포함한다.

[0418] 일부 실시형태에서, 분자는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진다. 일부 양태에서, 분자는 위치 N55, N215, 및/또는 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 하나 이상의 당화 모티프에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 분자는 항-BTN1A1 항체이다. 일부 실시형태에서, 분자는 항-당화된 BTN1A1 항체이다.

[0419] 일부 실시형태에서, 본 발명은 또한 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 분자를 이용하는 치료 과정에 걸쳐 개체의 샘플에서 BTN1A1 수준을 모니터함으로써 개체에서 특정 암 치료의 효능을 평가하기 위한 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 분자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH 또는 VL 도메인을 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 분자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH 및 VL 도메인 둘 모두를 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 분자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VH CDR 하나 이상을 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 분자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VL CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VL CDR 하나 이상을 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 분자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 적어도 하나의 VH CDR 및 적어도 하나의 VL CDR을 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다.

[0420] 일부 실시형태에서, 본 발명은 또한 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 분자를 이용하는 치료 과정에 걸쳐 개체의 샘플에서 BTN1A1 수준을 모니터함으로써 개체에서 특정 암 치료의 효능을 평가하기 위한 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 분자는 본 명세서에 개시된 BTN1A1 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. BTN1A1 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC810의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, 분자는 본 명세서에 개시된 BTN1A1의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. BTN1A1 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC810의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, BTN1A1 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 5개의 연속 아미노산을 갖는다.

[0421] 일부 실시형태에서, 본 발명은 a) 치료 과정에 걸쳐서 제1 및 적어도 하나의 후속 시점에서 환자로부터 수득한 둘 이상의 샘플을 본 명세서에 개시된 분자와 접촉시키고; b) 둘 이상의 샘플내의 BTN1A1의 수준을 측정하고, c) 둘 이상의 샘플내의 BTN1A1의 수준을 비교하는 것을 포함하며, 이때 제1 시점에서 수득된 샘플내의 BTN1A1의 수준에 비하여 후속 시점에서 수득된 샘플내의 BTN1A1의 감소된 수준은 암 치료가 효과있음을 나타내는, 환자에

서 특정 암치료의 효능을 평가하는 방법을 제공한다. 분자는 항-BTN1A1 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서, BTN1A1 수준은 당화된 BTN1A1의 수준일 수 있다. 분자는 또한 항-당화된 BTN1A1 항체일 수 있다.

[0422] 일부 실시형태에서, 본 방법은 치료 과정에 걸쳐서 제1 및 적어도 하나의 후속 시점에서 환자로부터 수득한 둘 이상의 샘플을 본 명세서에 개시된 분자와 접촉시켜 분자와 샘플 내의 BTN1A1 사이에 복합체를 형성하고, 샘플 내의 복합체를 측정하여 둘 이상의 샘플 내의 BTN1A1의 수준을 측정하는 것을 포함한다.

[0423] 일부 실시형태에서, 둘 이상의 샘플로부터의 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1의 수준은 하나의 분석에서 측정된다. 다른 실시형태에서, 둘 이상의 샘플로부터의 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1의 수준은 다수의 분석에서 측정된다. 일부 실시형태에서, BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1의 수준은 샘플이 개체로부터 수득된 날과 동일한 날에 측정된다. 일부 실시형태에서, BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1의 수준은 개체로부터 수득된 샘플의 저장없이 측정된다.

[0424] 암환자로부터의 샘플은 전혈 샘플, 골수 샘플, 부분 정제된 혈액 샘플, PBMC, 조직 생검, 순환 종양 세포, 단백질 복합체 또는 엑소좀과 같은 순환 요소일 수 있다. 일부 실시형태에서, 샘플은 혈액 샘플이다. 일부 실시형태에서, 샘플은 조직 생검이다. 당업자는 본 명세서에 개시되거나 다르게는 본 기술분야에 알려진 샘플 내의 단백질의 발현 수준을 결정하는 임의의 방법이 암환자로부터의 샘플 내의 BTN1A1의 수준을 결정하기 위해 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 면역분석을 포함한다. 면역분석은 BTN1A1을 탐침하고 시각화하기 위하여 본 명세서에 개시된 분자를 이용하는 것을 포함하는, 면역조직화학 접근법일 수 있다. 면역분석은 FIA, CLIA, RIA, EMI, SPROA, FP 분석, FRET 분석, TR-FRET 분석 또는 SPR 분석을 포함할 수 있다.

[0425] 암 치료 또는 암 치료법은 수술요법, 화학요법, 생물학적 타겟팅된 치료법, 소분자 타겟팅된 치료법, 방사선요법, 냉동요법, 호르몬요법, 면역요법 및 사이토카인요법을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 본 명세서에 개시되거나 또는 다르게는 본 기술분야에 알려진 임의의 치료법일 수 있다. 일부 실시형태에서, 암 치료는 임상적 개발에서의 실험적 암 치료를 비롯한 FDA-승인된 암 치료를 포함한다. 일부 실시형태에서, 암 치료는 둘 이상의 약물 또는 두 가지 이상 타입의 치료법의 조합을 이용한 치료를 포함한다.

[0426] 일부 실시형태에서, 암 치료는 암환자에게 항-BTN1A1 항체를 투여하는 것을 포함한다.

[0427] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 샘플은 암 치료 과정의 시작시에 수득되었으며 하나 이상의 샘플은 치료 과정에 걸쳐서 나중 시점에 수득되었다. 일부 실시형태에서, 후속 시점은 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 15 이상, 20 이상, 25 이상 또는 30 이상 시점이다.

[0428] 일부 실시형태에서, 본 방법은 만일 치료가 효과가 없는 것으로 결정되면 치료를 조정하는 것을 추가로 포함한다. 치료의 조정은 예를 들어, 약물 치료의 용량의 조정, 약물 치료의 빈도의 증가, 상이한 약물 또는 약물의 조합을 이용한 치료, 또는 치료의 종결을 포함할 수 있다.

[0429] 일부 실시형태에서, 본 방법은 만일 치료가 효과가 있는 것으로 결정되면 치료를 반복하는 것을 추가로 포함한다.

[0430] 일부 실시형태에서, 제1 시점에 수득된 샘플 내의 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1의 수준은 후속 시점에서 10%보다 많이, 20%보다 많이, 30%보다 많이, 40%보다 많이, 50%보다 많이, 60%보다 많이, 70%보다 많이, 80%보다 많이, 90%보다 많이, 95%보다 많이, 또는 99%보다 많이 감소된다.

5.8 환자 선정

[0431] 본 발명은 환자로부터의 샘플 내의 BTN1A1의 존재 또는 발현 수준을 결정함으로써 암 치료에 대한 암환자의 반응성을 예측하기 위한, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자의 용도를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 샘플을 본 명세서에 개시된 분자와 접촉시켜 분자와 BTN1A1 사이에 복합체를 형성함으로써 암환자로부터의 샘플 내의 BTN1A1을 검출하고, 만일 복합체가 검출되면 암 치료에 개체가 반응성일 것으로 예측하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 이용하여 샘플 내의 당화된 BTN1A1의 존재를 검출하는 것을 포함한다.

[0433] 일부 실시형태에서, 분자는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진다. 일부 양태에서, 분자는 위치 N55, N215, 및/또는 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 하나 이상

의 당화 모티프에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55, N215 및 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다.

[0434] 일부 실시형태에서, 분자는 항-BTN1A1 항체이다. 일부 실시형태에서, 분자는 항-당화된 BTN1A1 항체이다.

[0435] 일 실시형태에서, 환자 선정을 위해 사용될 수 있는 본 발명에서 제공되는 분자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH 또는 VL 도메인을 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 일 실시형태에서, 분자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH 및 VL 도메인 둘 모두를 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 분자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VH CDR 하나 이상을 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 분자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VL CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VL CDR 하나 이상을 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 분자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 적어도 하나의 VH CDR 및 적어도 하나의 VL CDR을 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다.

[0436] 일부 실시형태에서, 환자 선정을 위해 사용될 수 있는 본 발명에서 제공되는 분자는 본 명세서에 개시된 BTN1A1 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. BTN1A1 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC810의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, 분자는 본 명세서에 개시된 BTN1A1의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. BTN1A1 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC810의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, BTN1A1 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 5개의 연속 아미노산을 갖는다.

[0437] 다른 실시형태에서, 샘플 내의 BTN1A1의 검출은 본 명세서에 개시된 분자를 이용하여 샘플 내의 BTN1A1의 발현 수준을 측정하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, BTN1A1의 검출은 개체로부터의 샘플 내의 BTN1A1의 발현 수준을 기준 수준에 비교하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 항-BTN1A1 항체를 이용하여 샘플 내의 BTN1A1의 발현 수준을 측정하고, 샘플 내의 BTN1A1의 발현 수준을 기준 수준에 비교하고, 만일 샘플 내의 BTN1A1의 발현 수준이 기준 수준보다 높으면 개체가 암 치료에 반응성일 것으로 예측하는 것을 포함한다.

[0438] 일부 실시형태에서, BTN1A1 수준의 측정은 항-당화된 BTN1A1 항체를 이용하여 당화된 BTN1A1의 수준을 측정하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플 내의 당화된 BTN1A1의 수준의 측정은 샘플 내의 당화된 BTN1A1의 수준을 기준 수준에 비교하고, 만일 샘플 내의 당화된 BTN1A1의 수준이 기준 수준보다 높으면 개체가 암 치료에 반응성일 것으로 예측하는 것을 추가로 포함한다.

[0439] 암환자로부터의 샘플은 전혈 샘플, 골수 샘플, 부분 정제된 혈액 샘플, PBMC, 조직 생검, 순환 종양 세포, 단백질 복합체 또는 엑소좀과 같은 순환 요소일 수 있다. 일부 실시형태에서, 샘플은 혈액 샘플이다. BTN1A1의 존재를 검출하거나 BTN1A1의 발현 수준을 측정하는 방법은 본 명세서에 개시되거나 다르게는 본 기술분야에 알려진다.

[0440] 암 치료 또는 암 치료법은 수술요법, 화학요법, 생물학적 타겟팅된 치료법, 소분자 타겟팅된 치료법, 방사선요법, 냉동요법, 호르몬요법, 면역요법 및 사이토카인요법을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 본 명세서에 개시되거나 또는 다르게는 본 기술분야에 알려진 임의의 치료법일 수 있다. 일부 실시형태에서, 암 치료는 임상적 개발에서의 실험적 암 치료를 비롯한 FDA-승인된 암 치료를 포함한다. 일부 실시형태에서, 암 치료는 둘 이상의 약물 또는 두 가지 이상 타입의 치료법의 조합을 이용한 치료를 포함한다.

[0441] 일부 실시형태에서, 암 치료는 암 환자에게 항-BTN1A1 항체를 투여하는 것을 포함한다.

5.9 키트

[0443] 본 발명은 본 명세서에 개시된 분자 및 하나 이상의 보조제를 함유한 키트를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 발명에서 제공되는 치료법을 제조 및/또는 투여하기 위한 키트를 제공한다. 키트는 본 명세서에 개시된 약학 조성을 중 임의의 것을 함유하는 하나 이상의 밀봉된 바이알을 가질 수 있다. 키트는 예를 들어, BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자, 및 그 분자를 제조, 제형화 및/또는 투여하거나 본 명세서에 개시된 방법의 하나 이상의 단계를 수행하기 위한 시약을 포함할 수 있다.

[0444] 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단

편은 위치 N55, N215, 및/또는 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다.

[0445] 일부 실시형태에서, 분자는 항-BTN1A1 항체이다. 일부 실시형태에서, 항-BTN1A1 항체는 항-당화된 BTN1A1 항체이다. 일부 실시형태에서, 항-BTN1A1 항체는 인간화 항체 또는 인간 항체이다.

[0446] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 키트는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH 또는 VL 도메인을 포함하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 키트는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH 및 VL 도메인 둘 모두를 포함하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 키트는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VH CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VH CDR 하나 이상을 포함하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 분자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 VL CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가진 VL CDR 하나 이상을 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 분자는 표 2에 개시된 마우스 단클론 항체 STC810의 적어도 하나의 VH CDR 및 적어도 하나의 VL CDR을 포함하는 항원 결합 단편을 가질 수 있다.

[0447] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 키트는 본 명세서에 개시된 BTN1A1 에피토프를 (예를 들어, 용량-의존 방식으로) 경쟁적으로 차단하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 포함할 수 있다. BTN1A1 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC810의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 키트는 본 명세서에 개시된 BTN1A1의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자를 포함할 수 있다. BTN1A1 에피토프는 본 명세서에 개시된 STC810의 에피토프일 수 있다. 일부 실시형태에서, BTN1A1 에피토프는 서열 번호 31-41의 아미노산 서열의 적어도 5개의 연속 아미노산을 갖는다.

[0448] 일부 실시형태에서, 키트는 제2 항암제를 추가로 포함한다. 제2 항암제는 화학요법제, 면역요법제, 호르몬치료제, 또는 사이토카인일 수 있다.

[0449] 본 발명은 또한 암을 위한 동반 진단으로서 사용될 수 있는 키트를 제공한다. 일부 실시형태에서, 키트는 암 진단을 제공하거나 돋기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 암 치료의 효능을 평가하기 위하여 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 암 치료에 대한 환자의 반응성을 예측하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 특정 암 치료를 위한 환자를 선정하기 위해 사용될 수 있다. 키트는 예를 들어, 샘플 내의 BTN1A1을 검출하기 위한 시약을 포함할 수 있다.

[0450] 시약은 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 분자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 분자는 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진다. 일부 양태에서, 분자는 위치 N55, N215, 및/또는 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N449에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 항원 결합 단편은 위치 N55 및 N215에서 당화된 BTN1A1에 면역특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 분자는 항-BTN1A1 항체이다. 일부 실시형태에서, 분자는 항-당화된 BTN1A1 항체이다.

[0451] 암 치료법은 수술요법, 화학요법, 생물학적 타겟팅된 치료법, 소분자 타겟팅된 치료법, 방사선요법, 냉동요법, 호르몬요법, 면역요법 및 사이토카인요법을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 본 명세서에 개시되거나 또는 다른 개는 본 기술분야에 알려진 임의의 치료법일 수 있다. 일부 실시형태에서, 암 치료법은 항-당화된 BTN1A1 항체를 비롯한, 항-BTN1A1 항체와 같은, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 분자를 암 환자에게 투여하는 것을 포함한다.

[0452] 일부 실시형태에서, 진단 키트를 위한 보조 시약은 이차 항체, 검출 시약, 고정화 버퍼, 차단 버퍼, 세척 버퍼, 검출 버퍼, 또는 임의의 그 조합일 수 있다.

[0453] 이차 항체는 예를 들어, 항-인간 IgA 항체, 항-인간 IgD 항체, 항-인간 IgE 항체, 항-인간 IgG 항체, 또는 항-인간 IgM 항체를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이차 항체는 항-소 항체이다. 이차 검출 항체는 단클론

또는 다클론 항체일 수 있다. 이차 항체는 마우스, 래트, 햄스터, 염소, 낙타, 닭, 토끼 및 기타를 비롯한, 임의의 포유동물 유기체로부터 유도될 수 있다. 이차 항체는 효소(예를 들어, 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP), 알카라인 포스파타제(AP), 루시퍼라제 등) 또는 염료(예를 들어, 비색 염료, 형광 염료, 형광 공명 에너지 전이(FRET)-염료, 시간-분해(TR)-FRET 염료 등)에 접합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이차 항체는 HRP-접합된 다클론 토끼-항-인간 IgG 항체이다.

[0454] 일부 양태에서, 검출 시약은 형광 검출 시약 또는 발광 검출 시약을 함유한다. 일부 다른 양태에서, 발광 검출 시약은 루미놀 또는 루시페린을 함유한다.

[0455] 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(트리스)-계 버퍼(예를 들어, 트리스-완충 염수, TBS) 또는 포스페이트 버퍼(예를 들어, 포스페이트-완충 염수, PBS)와 같은 많은 세척 버퍼가 본 기술분야에 알려져 있다. 세척 버퍼는 이온성 또는 비이온성 세정제와 같은 세정제를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 세척 버퍼는 트윈®20(예를 들어, 약 0.05% 트윈®20)을 비롯한 PBS 버퍼(예를 들어, 약 pH 7.4)이다.

[0456] 본 기술분야에 알려진 임의의 희석 버퍼가 본 발명의 키트에 포함될 수 있다. 희석 버퍼는 담체 단백질(예를 들어, 소 혈청 일부민, BSA) 및 세정제(예를 들어, 트윈®20)을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 희석 버퍼는 BSA(예를 들어, 약 1% BSA) 및 트윈®20(예를 들어, 약 0.05% 트윈®20)을 비롯한 PBS(예를 들어, 약 pH 7.4)이다.

[0457] 일부 실시형태에서, 검출 시약은 비색 검출 시약, 형광 검출 시약, 또는 화학발광 검출 시약이다. 일부 실시형태에서, 비색 검출 시약은 PNPP(p-니트로페닐 포스페이트), ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설플산) 또는 OPD(o-페닐렌디아민)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 형광 검출 시약은 콴타블루(QuantaBlu)TM 또는 콴타레드(QuantaRed)TM (써모 사이언티픽(Thermo Scientific), 매사추세츠주 월댐)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 발광 검출 시약은 루미놀 또는 루시페린을 포함한다. 일부 실시형태에서, 검출 시약은 기폭제(trigger)(예를 들어, H2O2) 및 추적자(예를 들어, 이소루미놀-접합체)를 포함한다.

[0458] 본 기술분야에 알려진 임의의 검출 버퍼가 본 발명의 키트에 포함될 수 있다. 일부 실시형태에서 검출 버퍼는 시트레이트-포스페이트 버퍼(예를 들어, 약 pH 4.2)이다.

[0459] 본 기술분야에 알려진 임의의 정지 용액이 본 발명의 키트에 포함될 수 있다. 본 발명의 정지 용액은 검출 시약 및 상응하는 분석 시그널의 추가 발생을 종결시키거나 지연시킨다. 정지 용액은 예를 들어, 저-pH 버퍼(예를 들어, 글리신-버퍼, pH 2.0), 카오트로픽제(chaotrophic agent)(예를 들어, 구아니디늄 클로라이드, 소듐-도데실설플레이트(SDS)) 또는 환원제(예를 들어, 디티오트레이톨, 머캡토에탄올) 등을 포함할 수 있다.

[0460] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 키트는 자동화 분석 시스템을 위한 세척 시약을 포함한다. 자동화 분석 시스템은 임의의 제조사에 의한 시스템을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 자동화 분석 시스템은 예를 들어, 바이오-플래시(BIO-FLASH)TM, 베스트(BEST) 2000TM, DS2TM, ELx50 와셔(WASHER), ELx800 와셔, ELx800 리더(READER), 및 오토블롯(Autoblot) S20TM을 포함한다. 세척 시약은 본 기술분야에 알려진 임의의 세척 시약을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 세척 시약은 자동화 분석 시스템의 제조사에 의해 권장되는 세척 시약이다.

[0461] 일부 실시형태에서, 키트는 또한 에펜돌프 튜브, 분석 플레이트, 시린지, 병 또는 튜브와 같은, 키트의 성분과 반응하지 않는 용기인 적합한 용기 수단을 포함할 수 있다. 용기는 플라스틱 또는 유리와 같은 멸균가능한 물질로 만들어질 수 있다.

[0462] 일부 실시형태에서, 키트는 고형 지지체를 추가로 포함한다. 고형 지지체는 본 발명의 단백질이 그 위에 고정될 수 있는 본 기술분야에 알려진 임의의 지지체를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 고형 기질은 미세적정 웰 플레이트, 슬라이드(예를 들어, 유리 슬라이드), 칩(예를 들어, 단백질 칩, 바이오센서 칩, 예를 들어, 비아코어 칩), 미세유체 카트리지, 큐벳, 비드(예를 들어, 자기 비드) 또는 수지이다.

[0463] 일부 다른 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 키트는 개체로부터의 샘플내의 BTN1A1 또는 당화된 BTN1A1을 검출하기 위해 키트의 서브유닛을 이용하기 위한 설명서를 포함한다.

[0464] 본 발명에서 제공되는 키트는 특정 분석 기술에 맞춰질 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 ELISA 키트, 닷 블롯(Dot Blot) 키트, 화학발광 면역분석(CIA) 키트 또는 멀티플렉스 키트이다. 일부 실시형태에서, ELSA 키트는 세척 버퍼, 샘플 희석제, 이차 항체-효소 접합체, 검출 시약 및 정지 용액을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 닷 블롯 키트는 세척 버퍼, 샘플 희석제, 이차 항체-효소 접합체, 검출 시약 및 정지 용액을 포함한다. 일

부 실시형태에서, CIA 키트는 세척 버퍼, 샘플 희석제, 추적자(예를 들어, 이소루미놀-접합체) 및 기폭제(예를 들어, H2O2)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 멀티플렉스 키트는 세척 버퍼, 샘플 희석제, 이차 항체-효소 접합체를 포함한다.

[0465] 일부 실시형태에서, 본 발명의 키트는 키트가 암의 진단, 예후 또는 모니터링을 위해 이용됨을 표시하는 라벨을 포함하는 포장을 갖는다. 일부 실시형태에서, 키트는 암 치료를 위한 동반 진단으로서 사용된다. 일부 다른 실시형태에서, 포장은 키트가 암 약물과 사용됨을 나타내는 라벨을 가진다. 일부 실시형태에서, 키트는 특정 암 치료를 위해 환자를 선정하기 위해 사용된다.

[0466] 일부 실시형태에서, 키트의 포장은 FDA-승인된 라벨을 포함한다. FDA 승인된 라벨은 FDA-승인된 용도의 통보 및 설명서를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 연구 용도 한정(RUO) 또는 조사 용도 한정(IUO)을 위해 라벨링된다. 일부 실시형태에서, 키트는 인 비트로 진단 용도(IVD)를 위해 라벨링된다. 일부 실시형태에서, 키트는 타이틀 21, 미국연방규정집(Code of Federal Regulations), 섹션 809, 서브파트 B(21 CFR 89, Subpart B)에 따라 라벨링된다.

6. 실시예

[0468] 본 명세서에 개시된 다양한 실시형태의 특성과 사상을 실질적으로 변화시키지 않는 변형 또한 고려됨이 이해된다. 따라서, 하기의 실시예는 예시하기 위한 것이며 어떤 방식으로도 제한하고자 하는 것이 아니다.

6.1 실시예 1: 암 치료법을 위한 타겟으로서 BTN1A1의 확인

[0469] 방사선은 종양 세포를 스트레스 상태하에 두어 종양 세포가 스트레스에서 생존하기 위한 기전을 활성화할 수 있도록 하며, 그러한 상태하에서 활성화된 분자는 독립적인 치료법 또는 방사선과의 조합 치료법을 위한 타겟으로서 작용할 수 있다. BTN1A1은 그러한 상태하에서 과발현하는 타겟으로서 확인되었다. 미접촉 T 세포를 비-종양 보유 마우스로부터 분리하고 96웰 플레이트내에 두었다. 관심 shRNA를 함유하는 렌티바이러스 벡터를 이용하여 T 세포를 감염시킴으로써 비접촉 T 세포를 넉다운된 특정 관심 유전자를 함유하도록 조작하였다. 특정 후보 유전자의 넉다운은 한번에 한 웰에서 이루어졌다.

[0471] 안정한 표현형을 획득한 후, shRNA 처리된 T 세포를, (1) 조사된(irradiated) 동물로부터 분리된 억제자 세포; 및 (2) 비조사된 동물로부터 분리된 억제자 세포의 두 세트의 억제자 세포를 이용하여, 항원 또는 항-CD3 + 항-CD28의 존재하에서 억제자 세포와 항온처리하였다. 그 후 그 전체가 참고로 본원에 포함되는 Dolcetti *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, 14.17.1-14.17.25 (2010)에 개시된 것과 실질적으로 유사한 절차를 이용하여 ^{3}H -티미딘 포함을 모니터링함으로써 T-세포 증식을 개별 웰에서 평가하였다.

[0472] 조사 대(vs.) 비조사 동물로부터 분리된 T 세포의 반응을 동일한 인 비트로 억제 분석에서 비교하였다. 비-타겟 대조 shRNA로 처리된 T 세포에서 증식이 억제된 반면, 면역 반응을 부정적으로 조절(억제)하는 타겟 유전자의 불활성화는 향상된 반응(감소된 억제)을 야기하였다. 조사된 동물로부터 분리된 억제자 세포와 조합될 경우, BTN1A1의 넉다운을 함유한 샘플에서 유의하게 더 우수한 T 세포 증식(즉, 감소된 T 세포 억제)이 관찰되어, BTN1A1이 T 세포 반응의 억제에 관여함을 지지하였다. 따라서, BTN1A1이 암 치료법을 위한 타겟으로서, 특히, 그의 억제가 스트레스받은 암 세포에 의한 면역억제 효과를 해방시킴으로써 환자 자신의 면역계를 활성화시킬 수 있는 타겟으로서 확인되었다. 더욱이, BTN1A1의 억제는 방사선요법과 같은 추가적인 치료법에 대해 종양을 민감화시키는 것으로 예상된다.

6.2 실시예 2: 인간 BTN1A1의 당화의 분석

[0474] N-당화는 NXT 모티프(-Asn-X-Ser/Thr-)내에 위치한 아스파라긴(Asn) 측쇄 수용체에 올리고당으로 이루어진 사전 형성 글리칸을 전달하는 막-연합 올리고사카릴 트랜스퍼라제(OST) 복합체에 의해 먼저 촉매되는 번역후 변형이다(Cheung and Reithmeier, 2007; Helenius and Aebi, 2001). 도 4에 나타난 대로, 인간 BTN1A1의 N-당화는 PNGase F에 의한 처리 후 쿠마시 염색된 PAGE 젤 상에서의 단백질의 하향 이동에 의해 확인되었다.

[0475] 인간 BTN1A1의 전장 서열을 N-연결 당화 부위(Nx[ST] 패턴 예측 소프트웨어에 입력하였다 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GLYCOSITE/glycosite.html>)). 소프트웨어에 의해 세 가지 잠재적인 당화 부위가 확인되었으며, 이들은 N55, N215, 및/또는 N449였다. 도 5에 나타난 대로, N55 및 N215는 BTN1A1의 세포외 도메인에 있으며, N449는 세포내 도메인에 있다.

[0476] 당화 부위를 정확히 찾아내기 위하여, 상이한 종으로부터의 BTN1A1 아미노산 서열의 서열 배열을 수행하여 진화적으로 보존된 NXT 모티프인, 컨센서스 N-당화 인식 서열을 조사하였다. 도 6에 나타난 대로, BTN1A1의 세포외

도메인의 당화 부위에서 고도의 상동성이 관찰되었다. 따라서, 당화 부위는 종간에 진화적으로 보존된다.

[0477] 본 명세서에 개시된 항-BTN1A1 항체는 BTN1A1의 당화 패턴을 연구하기 위하여 이용될 수 있다. 서열 배열에 의해 확인된 잠재적 당화 부위가 사실상 당화되는지를 추가로 확인하기 위하여, 정제된 인간 BTN1A1의 트립신분해 펩티드를 나노 LC-MS/MS에 의해 분석한다. 복합체 타입 N-글리칸을 보유한 당펩티드가 N-당화 부위에 대해 확인될 수 있다.

6.3 실시예 3: 인간화 항-BTN1A1 항체의 생산

[0479] 단클론 항체 패널은 표준 기술을 이용하여(예를 들어, 래트에서 면역원으로서 BTN1A1 에피토프를 포함하는 폴리펩티드를 주사함으로써(Aurrand-Lions *et al.*, *Immunity*, 5(5):391-405(1996)) 재조합 BTN1A1 폴리펩티드에 대하여 생성된다. BTN1A1 폴리펩티드는 전장 인간 BTN1A1, 또는 BTN1A1 에피토프를 가진 그 단편일 수 있다. 요약하면, 100 μ g KLH 담체 단백질(키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin), 피얼스(Pierce))에 결합되고 아쥬반트 S6322(시그마(Sigma))와 혼합된 인간 BTN1A1 폴리펩티드를 사용하여 암컷 위스터(Wister) 래트를 면역시킨다. 통틀어, 9일마다 세 번의 주사가 수행된다. 인간 BTN1A1 폴리펩티드의 마지막 s.c. 주사 후 2일에, 배출 림프절로부터의 아세포(blasts)를 Sp2/0 세포에 융합시키고, 하이브리도마를 선정한다. 인간 BTN1A1을 특이적으로 인지하는 단클론 항체의 생산에 대해 성장하는 클론을 ELISA에 의해 스크리닝한다. 양성 클론을 서브클로닝하고, 재스크리닝하고, 더 시험한다. 항체를 제조사 설명서에 따라 단백질 G-세파로즈 컬럼(지이 헬스케어(GE HealthCare)) 상에서 정제한다. 항체의 VH 및 VL 쇄를 시퀀싱할 수 있으며 CDR이 IMGT 넘버링 시스템에 의해 결정될 수 있다(Lefranc *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 27(1):209-12 (1999)).

[0480] 상기에 나타난 대로, 예를 들어, 인간 질병의 인 비보 치료에서의 사용을 비롯한 소정의 목적을 위하여, 마우스 단클론 항체의 인간화 유도체를 이용하는 것이 바람직하다.

[0481] 그러한 인간화 항체를 형성하기 위하여, 골격 서열에서의 차이를 확인하기 위하여 마우스 단클론 항체의 골격 서열("모" 서열)이 먼저 "수용체" 인간 항체 세트의 골격 서열과 배열된다. 인간화는 모 서열과 수용체 간에 매칭되지 않는 골격 잔기를 치환함으로써 이루어진다. 베르니에르(Vernier) 구역, VH/VL 쇄간 계면 또는 CDR 표준 클래스 결정 위치 내의 것과 같은 잠재적으로 중요한 위치에서의 치환은 장래의 역 돌연변이를 위해 분석되었다(Foote, J. *et al.*, *J. Molec. Biol.* 224:487-499 (1992)를 참고한다).

[0482] 보존된 도메인 데이터베이스(COD)(Marchler-Bauer, *et al.* (2011) *Nucleic Acids Res.* 39:D225-D229)를 이용하여 각 아미노산 쇄의 도메인 내용 및 각 도메인의 대략적인 경계를 결정할 수 있다. 가변 도메인 경계는 몇몇 일반적으로 사용되는 정의에 따른 CDR의 경계를 따라 정확하게 결정될 수 있다(Kabat, E. A. *et al.* (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242; Chothia, C. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Honegger, A. *et al.*, *J. Molec. Biol.* 309(3):657-670 (2001))

[0483] 마우스 및 인간 생식세포 서열에의 모 서열의 다중 배열은 MAFFT(Katoh, K. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 30: 3059-3066 (2002))를 이용하여 생성되며 각 배열에서의 엔트리(entries)는 모 서열에 대한 서열 동일성에 따라 정리된다. 기준 세트는 100% 서열 동일성에서 모으고 불필요한 엔트리를 배제함으로써 유일한 서열 세트로 바뀐다.

[0484] 최적의 수용체 골격 선정은 두 쇄의 골격에 걸친 수용체에 대한 전체적인 모 항체 서열 동일성에 기초하며; 하지만, VH/VL 쇄간 계면을 구성하는 위치가 특히 관심대상이다. 부가적으로, CDR 중 5가지에 대해 정의된 표준 구조들의 별개 세트를 책임지는 CDR-루프 길이 및 CDR 위치(Chothia, C. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Martin, A. C. *et al.*, *J. Molec. Biol.* 263:800-815 (1996); Al-Laziniki, B. *et al.*, *J. Molec. Biol.* 273:927-948(1997))는, 어느 생식 세포 골격이 동일한 계면 잔기 둘 모두를 가지며 유사한 CDR-루프 형태를 지지하는 것으로 알려지는지를 결정하기 위하여, 생식세포에 비교된다.

[0485] 인간 생식세포에의 모 항체의 서열 배열에 기초하여, 가장 가까운 매칭 엔트리가 확인된다. 바람직한 인간 생식 세포의 선택은 하기 순서의 기준에 기초한다: (1) 골격에 걸친 서열 동일성; (2) 동일하거나 양립성인 쇄간 계면 잔기; (3) 모 CDR 표준 형태를 가진 지지 루프; (4) 중쇄 및 경쇄 생식세포의 조합이 발현된 항체에서 발견됨; 및 (5) 제거되어야 하는 N-당화 부위의 존재.

[0486] 인간화 항체의 Fv-영역의 구조적 모델이 생성된다. 전체 Fv 뿐만 아니라 FR 및 CDR을 위한 후보 구조적 주형 단편을, 타겟에의 그들의 서열 동일성, 및 옹스트롬(Å) 단위의 해상도와 같은 주형 구조의 정량적 결정학적 척도

에 기반한 항체 데이터베이스로부터 점수를 매기고, 순위를 매기고 선택한다.

[0487] FR 주형에 CDR을 구조적으로 배열하기 위하여, CDR의 어느 한 측상의 5 잔기를 CDR 주형에 포함시킨다. 단편의 배열은 중복 분절 및 생성된 구조적 서열 배열에 기초하여 생성된다. 배열을 따른 주형 단편을 모델러(MODELLER)(Sali, A. et al.; *J. Molec. Biol.* 234:779-815(1993))에 의해 프로세싱하였다. 이 프로토콜은 배열된 구조적 주형 세트로부터 유도된 형태적 억제를 생성한다. 제약을 충족한 구조의 양상들이 공역 기울기(conjugate gradient) 및 모의 어닐링 최적화(simulated annealing optimization) 절차에 의해 생성된다. 모델 구조는 단백질 구조의 점수 및 형태적 제약의 충족으로부터 유도된, 에너지 점수에 기초하여 이 양상들로부터 선택된다. 모델이 검사되고 타겟과 주형 사이에서 상이한 위치의 측쇄가 측쇄 최적화 알고리즘 및 최소화된 에너지를 이용하여 최적화된다. 시각화 및 계산 도구 뮤음을 이용하여 CDR 형태 변이성, 국소 패킹(local packing) 및 표면 분석을 평가하여 하나 이상의 바람직한 모델을 선정한다.

[0488] 모 항체의 구조적 모델이 제작되고 열등한 원자 패킹, 결합 길이, 결합 각 또는 이면 각에서의 변형과 같은 결합에 대해 검사된다. 이들 결합은 항체의 구조적 안정성에서 잠재적 문제를 나타낼 수 있다. 모델링 프로토콜은 그러한 결합을 최소화하고자 한다. 인간화 Fv의 초기 구조적 모델은 모든 안전한 치환(즉, 결합 친화성 또는 안정성에 영향을 주지 않는 치환) 및 신중한 치환(즉, 위치 치환이 이루어지지만 그 위치가 결합 친화성을 위해 중요할 수 있음)을 함유한다. 결합 친화성을 감소시키거나 안정성을 감소시킬 위험과 관련될 것으로 생각되는 위치에서의 치환은 변경되지 않는다. 주형 조사 및 선택은 모 항체의 밀접하게 매칭되는 변이체 모델이 아닌 우수한 독립 모델을 생성하기 위하여 모 주형 조사와 별도로 수행된다. 잠재적 치환의 평가가 수행될 때 모델은 바람직한 치환 및 역 돌연변이의 효과를 반영하기 위해 업데이트된다.

6.4 실시예 4: BTN1A1의 당화의 기능적 분석

[0489] 당화 부위를 확인하기 위하여 돌연변이유발 분석을 수행하였다. BTN1A1의 구체적 당화 부위(들)를 결정하기 위하여 일련의 아스파라긴(N)에서 글루타민(Q)으로의 치환을 생성하고, 만일 N에서 Q로의 돌연변이체가 야생형에 비하여 당화의 감소를 나타내면 당화 부위가 확인되었다. 부위 지시된 돌연변이유발을 이용하여, 세포외 도메인 내의 당화 부위 상의 돌연변이(N55Q, N215Q 및 복합 N55Q 및 N215Q)를 포함하는 인간 BTN1A1 돌연변이를 만들었다. 야생형 BTN1A1과 함께 이들 당화 특이적 돌연변이체를 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 293T 세포에서 발현시켰다. 세포를 용해시키고 야생형 BTN1A1과 함께 당화 특이적 돌연변이체의 발현을 웨스턴 블로트에 의해 검출하였다. 도 3에 나타난 대로, N55Q 및 N215Q 각각은 블로트에서 단백질의 하향 이동을 야기하여, 이들 돌연변이 형태 상의 당화의 상실을 나타냈다. 부가적으로, 복합 N55Q 및 N215Q 돌연변이를 가진 BTN1A1 돌연변이는 293T 세포에서 발현되지 않아, 이들 두 부위 중 적어도 하나에서의 BTN1A1의 당화가 그 발현에 중요함을 입증하였다.

6.5 실시예 5: 항 CD3/CD28 자극에 의한 마우스 T 세포에서의 세포 표면 BTN1A1의 유도

[0490] 미접촉 마우스 T 세포를 2일동안 거짓 자극하거나(좌측) 또는 항 CD3(5 ug/ml) 및 항 CD28(5ug/ml)로 자극하고 유세포 분석을 거쳤다. 도 7a 및 도 7b에 나타난 대로, 거짓 처리된 세포에 비하여 CD3/CD28 자극된 세포에서 세포 표면 BTN1A1의 높은 유도가 관찰되어, CD3/CD28에 의해 자극된 T 세포의 활성화가 BTN1A1의 발현 증가를 야기할 수 있음을 입증하였다.

6.6 실시예 6: B16-Ova 흑색종 세포에서 BTN1A1 발현의 유도

[0491] B16-Ova 세포에서 세포외 BTN1A1을 항체 단독 대조군 또는 FITC-BTN1A1 항체를 이용한 염색에 의해 검출하였으며, BTN1A1 발현 수준을 유세포 분석에 의해 검사하였다. 도 8에 나타난 대로, 골수 세포는 B16-ova 흑색종 세포에서 세포외 BTN1A1의 발현을 유도하였다.

6.7 실시예 7: 마우스 항-인간 BTN1A1 항체의 생산 및 특성규명

[0492] 표준 프로토콜에 따른 SP2/0 마우스 골수종 세포와 BTN1A1-면역된 BALB/c 마우스로부터 분리된 비장 세포의 융합에 의해 BTN1A1에 대한 항체-생산 하이브리도마를 수득하였다. 융합 전에, 마우스로부터의 혈청을 FACS를 이용하여 면역원에의 결합에 대해 검증하였다. 총 68개의 단클론 항체-생산 하이브리도마(mAb)를 생성하였다.

[0493] 단클론 항체의 이소타입을 ELISA에 의해 결정하였으며 하기 표 5에 제공된다. 하이브리도마 배양 상등액 내의 MAb의 이소타입을 ELISA 기술에 따라 결정하였다(시그마-알드리치(Sigma-Aldrich) ISO2 SIGMA 마우스 단클론 항체 이소타이핑 시약).

[0498]

표 5. 마우스 항-인간 BTN1A1 단클론 항체의 이소타입

STC#	이소타입	STC#	이소타입	STC#	이소타입
801	G1/M	823	G1	701	G2a
802	G1/M	824	G1	704	G2a
803	M	825	G1	705	M
804	G1	826	G1	706	G2a
805	G1	827	G1	707	G2a
806	G1	828	G1	708	G2a
807	G1	829	G1	711	G2a
808	G1	830	G1	712	G2a

[0499]

809	G1	831	G1	716	G2a
810	G2a	832	G1	719	G2a
811	G1	833	G1	720	G2a
812	G1	834	G1	721	G2a
813	G1	835	G1	722	G2a
814	G1	837	G1	723	G2a
815	G1	839	G1	727	G2a
816	G1	840	G1	729	G2a
817	G1	848	G1	730	G2a
818	G1	852	G1	732	G2a
819	G1	858	G1	733	G2a/A
820	G1	860	G1	734	G2a
821	G1	861	G1	735	G2a
822	G1	862	G1	736	G2a
		863	G1		
		866	G1		

[0500]

[0501]

단클론 항-BTN1A1 항체의 당-특이성은 닷 블롯 분석에 의해 특성규명하였다. 각 항-BTN1A1 mAb(0.5 μ g/웰로당됨)를 당화된 BTN1A1(PNGaseF "-") 또는 탈당화된 BTN1A1(PNGaseF "+")에의 결합에 대해 시험하였다. 비특이적 항체 대조군("IgG," 0.25 μ g/웰로당됨) 또한 분석에 포함시켰다. 도 9a-9b에 나타난 대로, 당화된 BTN1A1 단백질 및 비당화된 BTN1A1(PNGase F로 처리된 BTN1A1 단백질) 둘 모두를 고체상에 코팅하고 mAb 및 항원 결합 친화성에 대해 시험하였다. 더 높은 밴드 강도에 의해 나타난 대로, 모든 13개의 시험된 mAb(STC703, STC709, STC710, STC713, STC715, STC717, STC725, STC738, STC810, STC819, STC820, STC822, 및 STC838)가 비당화된 BTN1A1 단백질(PNGase F 처리된 단백질)에 비하여 당화된 BTN1A1 단백질에서 더 높은 친화성을 나타냈다. 단클론 항-BTN1A1 항체의 당-특이성을 또한 FACS 분석에 의해 특성규명하였다. BTN1A1 WT(완전히 당화됨) 및 2NQ(완전히 비당화됨)를 과발현하는 293T 세포를 BTN1A1에 대한 일차 항체와 항온처리하고, FITC와 접합된 이차 항체로 추가로 세척하였다. 세척 후, 형광 강도(MFI)를 측정하여 막 결합된 당화된 또는 비당화된 BTN1A1에의 항체의 상대적 결합을 평가하였다. 비당화된 BTN1A1에 비하여 당화된 BTN1A1에서 유의하게 더 높은 MFI를 나타낸 항체를 당-특이적 항체로 확인하였다. 예를 들어, STC810(STC838과 동일한 항체)은 비당화된 BTN1A1에 비하여 당화된 BTN1A1에서 적어도 5배 더 높은 MFI를 나타냈다. 8가지의 단클론 항-BTN1A1 항체(STC702, STC810, STC819, STC820, STC821, STC822, STC838 및 STC839)를 FACS에서 추가로 시험하였으며(도 10) BTN1A1에의 그들의 결합 능력 및 당화 특이성이 검증되었다.

[0502] **6.8 실시예 8: 비아코어 및 옥테트에 의한 STC810의 K_D 분석.**

[0503] 비아코어 분석에서는, 표면 플라즈몬 공명에 의해 BTN1A1과 단클론 항-BTN1A1 항체 STC810 사이의 결합 친화성을 측정하였다. BTN1A1-ECD에 의한 항체의 적정의 센서그램 및 포화 곡선을 6xHis 또는 인간 IgG1 Fc로 태깅하였다. 단백질 A 칩(비아코어)을 600 반응 단위(RU)로 항체로 코팅하고 BTN1A1 ECD를 미세유체 채널에 주입하였다. 비아평가(BIAevaluation) 소프트웨어(비아코어)의 피팅 룰을 이용하여 K_D 값을 수득하였다. 도 11은 가용성 BTN1A1-Fc 단백질(2배 희석을 가진 2 - 64 nM; 도 11a) 또는 가용성 BTN1A1-His 단백질(4배 희석을 가진 2 - 64 nM; 도 11b)의 단백질 A-CM5 침상에 고정된 STC810에의 실시간 결합을 보여주는 센서그램을 제공한다. 임의의 고정된 단백질이 없는 유동 세포를 비특이적 결합을 위한 대조군으로 이용하고 제시된 데이터로부터 차감하였다.

[0504] STC810의 K_D 값을 또한 옥테트 분석에서 결정하였다. 고처리 K_D 스크리닝을 위하여, 항체 리간드를 20 nM 용액을 통해 센서에 로딩하였다. 기준선은 1 mg/ml 소 혈청 알부민을 함유한 PBS(분석 버퍼)에서 확립하였으며, 분석 버퍼내의 분석물의 단일 농도에 센서를 잡기게 하여 결합 단계를 수행하였다. 해리를 수행하고 신선한 분석 버퍼에서 모니터하였다. 모든 실험은 1,000 rpm에서 쉐이킹하는 센서로 수행하였다. 포르테바이오의 데이터 분석 소프트웨어를 이용하여 데이터를 1:1 결합 모델에 피팅하여 결합 속도와 해리 속도를 추출하였다. K_D 값을 비 kd/ka 를 이용하여 계산하였다. 전형적인 에피토프 비닝(binning) 분석에서, 항원 BTN1A1-Fc(10 nM)을 실온에서 1h 동안 제2 항체(10 nM)와 사전항온처리하였다. 대조 항체(20 nM)를 AMC 센서(포르테바이오)상에 로딩하고 센서 상의 남은 Fc-결합 부위를 전체 마우스 IgG 항체(잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch))로 차단하였다. 센서를 사전항온처리된 항원-제2 항체 혼합물을 노출시켰다. 원시 데이터를 포르테바이오의 데이터 분석 소프트웨어 7.0을 이용하여 처리하고 항체 쌍을 경쟁적 결합에 대해 평가하였다. 제2 항체에 의한 추가적 결합은 비점령 에피토프(비-경쟁자)를 나타내는 한편, 무 결합은 에피토프 차단(경쟁자)을 나타낸다.

[0505] 비아코어 분석 및 옥테트 분석 둘 모두에 의해 측정된 STC810의 K_D 값이 하기 표 6에 제공된다.

[0506] 표 6: 비아코어 및 옥테트에 의한 결정된 STC810의 K_D

항체	항원	K_D (M)	kd (1/Ms)	ka (1/s)	측정 수단
STC810	hBTN1A1-His	1.49E-08	2.69E+05	4.02E-03	비아코어
STC810	hBTN1A1-Fc	1.81E-09	9.89E+04	1.80E-04	비아코어
STC810	hBTN1A1-Fc	2.12E-09	1.45E+05	3.09E-04	옥테트

[0507]

[0508] **6.9 실시예 9: STC810의 에피토프 맵핑**

[0509] Ag-Ab 가교를 이용한 고질량 MALDI 분석에 의해 마우스 항-인간 BTN1A1 단클론 항체 STC810를 위한 에피토프 맵핑을 수행하였다. 표 3은 nLC-오비트랩 MS/MS에 의해 분석된 BTN1A1-Fc 및 STC810의 가교된 웨티드를 요약한다. 중수소화된 d0 d12를 가진 항체/항원 가교된 복합체의 프로테아제 분해 후, nLC-오비트랩 MS/MS 분석은 BTN1A1(ECD)-Fc 항원과 STC810 항체 사이의 3개의 가교된 웨티드를 검출하도록 하였다. 이들 가교된 웨티드는 엑스퀘스트(Xquest) 및 스타브록스(Stavrox) 소프트웨어 둘 모두로 검출되었다. 도 12는 STC810을 위한 BTN1A1(ECD)-Fc 항원의 에피토프를 보여준다:

[0510] LELRWFRKKVSPA (서열 번호34) – E EGLFTVAASVIIRDTSAKNV (서열 번호35)

[0511] 도 12에 나타난 대로, STC810에 가교된 BTN1A1(ECD)-Fc의 아미노산 잔기는 R41, K42, K43, T185 및 K188을 포함한다.

[0512] 표 4는 nLC-오비트랩 MS/MS에 의해 분석된 BTN1A1-His 및 STC810의 가교된 웨티드를 요약한다. 중수소화된 d0

d12를 가진 항체/항원 가교된 복합체의 프로테아제 분해 후, nLC-오비트랩 MS/MS 분석은 BTN1A1(ECD)-His 항원과 STC810 항체 사이의 3개의 가교된 웨프티드를 검출하도록 하였다. 이들 가교된 웨프티드는 엑스퀘스트 및 스타브록스 소프트웨어 둘 모두로 검출되었다. 도 13은 STC810을 위한 BTN1A1(ECD)-His 항원의 에피토프를 보여준다

[0513] GRATLVQDGIAKGRV (서열 번호40) – EEGLFTVAASVIIRDTSAKNV (서열 번호41)

[0514] 도 13에 나타난 대로, STC810에 가교된 BTN1A1(ECD)-His의 아미노산 잔기는 R68, K78, T175, S179 및 T185를 포함한다.

[0515] 도 12-13 및 상기 표 6과 7에 나타난 STC810과 가교된 BTN1A1의 웨프티드는 따라서 단클론 항체 STC810을 위한 BTN1A1 상의 결합 부위로서 확인되었다.

6.10 실시예 10: STC810의 특성규명

[0517] STC810 및 BTN1A1 WT 및 그의 비당화된 BTN1A1 변이체의 면역특이적 결합을 웨스턴 블롯 및 또한 공초점 현미경에 의해 시험하였다. HEK293T 세포를 야생형 BTN1A1 및 N55Q, N215Q, 및 2NQ(즉, N55Q 및 N215Q)를 포함하는 돌연변이체 BTN1A1을 위한 발현 벡터로 일시적으로 형질감염시켰다. 웨스턴 블롯 분석에서, 형질감염 후 48h에, 전세포 용해물을 제조하고 단백질을 본래의 SDS-PAGE에서 분리하였다. 젤을 STC810을 위한 항체를 이용한 면역블롯 분석하였다. STC810에 의해 검출된 야생형 BTN1A1 및 돌연변이 BTN1A1의 발현이 도 14에 제공된다. 도 14(상부 패널)에 나타난 대로, STC810에 의해 검출가능한 BTN1A1 N55Q 돌연변이체 및 돌연변이체 N215Q의 발현은 BTN1A1에 비교하여 감소되었으며, BTN1A1 2NQ 돌연변이체의 발현은 더 유의하게 감소되었다.

[0518] HEK293T 세포에서 야생형 BTN1A1(BTN1A1 WT) 및 돌연변이체 BTN1A1(BTN1A1-2NQ(즉, N55Q 및 N215Q))의 발현을 또한 STC810을 이용한 염색에 의해 공초점 현미경으로 관찰하였다. 도 15에 나타난 대로, BTN1A1 WT는 HEK293T 세포에서 STC810에 의해 주로 세포 표면에서 양성으로 염색되었으며; BTN1A1 2NQ도 염색되었으나, STC810에 의해 검출가능한 발현은 BTN1A1 WT에 비하여 더욱 약했다.

6.11 실시예 11: STC810을 이용한 BTN1A1의 단백질 발현 분석

[0520] 인간 전립선 암 샘플에서 BTN1A1의 발현을 검사하고 면역조직화학(IHC) 염색 및 OPAL 염색에 의해 확인하였다. IHC 염색을 수행하기 위하여, 암환자로부터의 전립선 조직의 포르말린-고정된 파라핀-매립 색션을 STC810을 이용하여 BTN1A1의 면역염색을 수행하고, 헤마톡실린 대조염색을 이용하여 3,3'-디아미노벤자린(DAB)에 의해 시각화하였다. 도 16에 나타난 대로 STC810에 의한 양성 염색이 관찰되었으나 마우스 IgG에서는 관찰되지 않았다(패널 A, 3 µg/ml 마우스 IgG; 패널 C, 5 µg/ml 마우스 IgG; 패널 B, 3 µg/ml STC810; 패널 D, 5 µg/ml STC810).

[0521] 전립선 종양 샘플에서 BTN1A1 발현은 또한 STC810을 이용한 OPAL 염색에 의해 검출되었다. 도 17에 나타난 대로 항원 CD8 및 시토케라틴 또한 BTN1A1과 함께 염색되었다.

6.12 실시예 12: 항-BTN1A1 항체에 의한 암세포의 어펩토시스 활성화 및 증식 억제

[0523] 항-BTN1A1 항체 STC810의 기능을 어펩토시스 분석 및 세포 증식 분석으로 분석하였다. 도 18a-b에 나타난 대로, STC810은 활성화된 T 세포로 처리된 hBTN1A1 과발현 전립선암 세포(PC3 세포)에서 어펩토시스를 야기하였다. 도 18a는 녹색 카스파제 3/7 형광 PC3 세포로 염색된 어펩토시스 세포를 보여준다. 도 18b는 항체로 처리 후 120 h에 PC3 세포의 상대적 어펩토시스의 계산을 보여준다. 나타난 대로, STC810은 용량 의존 방식으로 PC3 세포의 T 세포 의존성 어펩토시스를 유의하게 증가시켰다. 5 µg/ml STC810으로 처리되었을 때 PC3 세포의 상대적 어펩토시스가 증가하였으며; 50 µg/ml STC810으로 세포가 처리되었을 때 적어도 두배가 되었다.

[0524] 도 18c-d에서 나타난 대로, STC810은 또한 활성화된 T 세포로 처리된 hBTN1A1 과발현 전립선암 세포(PC3 세포)에서 세포 증식을 억제하였다. 도 18c는 플레이트상의 PC3 세포의 컨플루언시에 의해 모니터할 때 전립선암 세포의 증식을 보여준다. 도 18d는 항체를 이용한 처리 후 120 h에 PC3 세포의 상대적 증식의 계산을 보여준다. 나타난 대로, STC810은 용량 의존 방식으로 PC3 세포의 증식을 유의하게 억제하였다. PC3 세포의 증식률은 50 µg/ml STC810으로 세포가 처리되었을 때 약 50%만큼 감소되었다. 이들 데이터는 항-BTN1A1 항체가 어펩토시스를 향상시킬 수 있으며 전립선암 세포와 같은 암세포의 증식을 감소시킬 수 있음을 보여주었다.

6.13 실시예 13: 항-BTN1A1 항체에 의한 BTN1A1의 리소좀 내부화

[0526] 도 19에 제공되는 바와 같이, 하나의 단백질-단백질 상호작용이 듀오링크에 의해 검출될 수 있으며, 이것은 보통 하기 단계를 포함한다: 1. 타겟 일차 항체와 항온처리; 2. PLA 프로브 "PLUS" 및 "MINUS" 칩가; 3. 연결자 올리고뉴클레오티드를 하이브리드화; 4. 완전한 DNA 환을 형성하기 위한 결찰; 5. 회전환 증폭; 및 6. 상호작용

을 밝히기 위한 형광 프로브 첨가.

[0527]

상이한 종에서 생성된 일차 항체를 이용하여 두 가지 관심 타겟을 마킹하고; DNA 환의 절반 두 개로 태깅된 특별한 이차 항체를 이용한다. 만일 두 가지의 단백질 타겟이 아주 인접하면, DNA 리가제와의 반응이 DNA 환을 완성할 것이다. 그 후 DNA 폴리머라제 반응이 긴 쇄를 생성하고, 여기에 형광-라벨링된 프로브가 하이브리드할 수 있으며, 이것은 시그널의 특이성과 상당한 증폭 둘 모두를 이루며, 단일 단백질-단백질 상호작용의 검출이 이루어질 수 있다.

[0528]

듀오링크 기술을 이용하여 BTN1A1과 리소좀 마커 LAMP1 사이의 결합을 검출하였으며, 이것은 리소좀에의 BTN1A1의 내부화를 나타낸다. WT 또는 2NQ BTN1A1을 안정하게 과발현하는 HEK293T 세포를 폴리-L-리신-코팅된 커버슬립상에 도말하고 37°C 5% CO₂에서 밤새 부착시켰다. 세포를 10 µg/mL mIgG1 또는 STC810으로 1h 처리하고, 20' 동안 10% NBF로 고정한 후, 5 µg/mL의 마우스 STC810 및 1 µg/mL의 토끼 항-LAMP1(ab24170, 앱캠(Abcam), 영국 캠브리지) 및 듀오링크 이차 PLA 항체(DUO92001, 시그마, 미국 미주리주 세인트루이스)로 염색하였으며 제조사의 설명서에 따라 녹색 검출을 하였다. DAPI를 가진 벡터쉴드(Vectashield)(벡터(Vector), 미국 캘리포니아주 벌링검)를 이용하여 커버슬립을 덮고 니콘(Nikon) A1 공초점 현미경으로 영상화하였다.

[0529]

도 20a 및 20b에 나타난 대로, 항체 STC810은 BTN1A1(야생형, 당화된 버전)을 내부화하였으나, BTN1A1 2NQ(N55Q 및 N215Q)를 내부화하지 않았다. STC810으로 처리시에, BTN1A1 WT를 안정적으로 과발현하지만 BTN1A1 2NQ를 과발현하지 않는 세포는 핵 당 녹색 형광 스팟의 수의 증가를 반영하여, BTN1A1과 LAMP1 사이의 코로컬리제이션의 증가를 나타낸다. LAMP1은 리소좀 마커이며, 녹색 스팟은 세포의 세포기질 구획내에 국소화되어, BTN1A1이 STC810과의 상호작용 후 리소좀 구획으로 활발하게 내부화되었음을 나타낸다. 2NQ BTN1A1의 리소좀 국소화는 STC810 처리 후 증가하지 않아, 당화된 모이어티에 대한 STC810의 특이성이 WT BTN1A1에서 보존되었음을 입증하였다. 검출된 결합은 정량되었으며, 통계 분석이 하기 표 7에 제공된다. 정량된 결과는 도 20a에 제공된다.

[0530]

표 7: 듀오링크 결과의 통계적 분석.

[0531]

표 7(a): 아노바(Anova): 단일 인자. 요약

컬럼	그룹	카운트	합계	평균	분산
1	BTN1A1 WT / 대조군	3	10.45894	3.486314	9.837783
2	BTN1A1 WT /STC801	3	106.7864	35.59547	252.3242
3	BTN1A1 2NQ/ 대조군	3	7.213255	2.404418	0.648216
4	BTN1A1 2NQ /STC801	3	11.78599	3.928663	5.793434

변이원	SS	df	MS	F	P- 값	F crit
그룹 간	2354.339381	3	784.7798	11.68681	0.002705	4.066181
그룹 내	537.2072009	8	67.1509			
전체	2891.546582	11				

[0532]

[0533]

표 7(b): t-시험: 평균을 위한 쌍을 이룬 두 샘플

	변수 1	변수 2
평균	3.486314139	35.59546576
분산	9.837783416	252.3241663
관찰	3	3
피어슨 상관계수	-0.213256329	
가설 평균 차	0	
df	2	
t Stat	-3.303545862	
P(T<=t) 단측 (one-tail)	0.040347331	
t 임계 단측	2.91998558	
P(T<=t) 양측(two-tail)	0.080694662	
t 임계 양측	4.30265273	

[0534]

[0535]

HEK293T 세포에서 BTN1A1 WT 및 BTN1A1 2NQ의 발현을 검출하고 FACS 분석에 의해 확인하였으며(도 21), BTN1A1 WT 및 BTN1A1 2NQ 둘 모두의 발현은 STC810에 의한 리소좀에의 BTN1A1 2NQ가 아닌 BTN1A1 WT의 특이적 내부화가 BTN1A1 2NQ의 발현 결핍으로 인한 것이 아니었음을 입증하였다.

[0536]

6.14 실시예 14

[0537]

BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 발명에서 제공되는 분자는 영상화제, 치료제, 독소 또는 방사성핵종에 접합될 수 있다. 치료제는 화학요법제이다. 치료는 세포독소이다. 본 발명에서 제공되는 분자는 영상화제에 접합될 수 있다.

[0538]

본 발명은 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 발명에서 제공되는 문자, 및 약학적 허용 담체를 가진 조성물을 제공한다. 본 발명은 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 발명에서 제공되는 문자, 및 보조제를 가진 조성물을 제공한다.

[0539]

본 발명은 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 발명에서 제공되는 문자의 VH 영역 또는 VL 영역을 인코딩하는 분리된 핵산을 제공한다. 문자는 STC810일 수 있다. 분리된 핵산은 서열 번호 4의 서열을 가질 수 있다. 분리된 핵산은 서열 번호 6의 서열을 가질 수 있다.

[0540]

본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 핵산 문자를 가진 벡터를 제공한다. 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 벡터를 가진 숙주 세포를 제공한다.

[0541]

본 발명은 또한 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시되는 문자와 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, BTN1A1을 발현하는 세포에 화합물을 전달하는 방법을 제공하며, 상기 문자는 화합물과 접합된다. 세포는 암세포일 수 있다. 화합물은 영상화제, 치료제, 독소 또는 방사성핵종일 수 있다.

[0542]

본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 문자의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 면역반응을 조절하는 방법을 제공하며, 상기 문자는 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진다. 조절은 (a) T 세포 활성화의 증가; (b) T 세포 증식의 증가; 또는 (c) 사이토카인 생산의 증가를 포함할 수 있다.

[0543]

본 발명은 또한 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에서 개시되는 문자의 유효량과 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, BTN1A1을 발현하는 세포의 T-세포 의존성 어പ토시스를 향상시키는 방법을 제공한다.

[0544]

본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 문자의 치료적 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 가진 개체를 치료하는 방법을 제공하며, 이때 문자는 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진다. 암은 혈액암 또는 고형 종양이다. 암은 유방암, 폐암, 갑상선암, 흉선암, 두경부암, 전립선암, 식도암, 기관암, 뇌암, 간암, 방광암, 신장암, 위암, 췌장암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 고환암, 결장암, 직장암 또는 피부암과 같은 고형 종양일 수 있다. 암은 백혈병, 림프종 또는 골수종과 같은 혈액암일 수 있다. 문자는 전신적으로 투여된다. 문자는 정맥내로, 피부내로, 종양내로, 근육내로, 복강내로, 피하로 또는 국소적으로 투여될 수

있다.

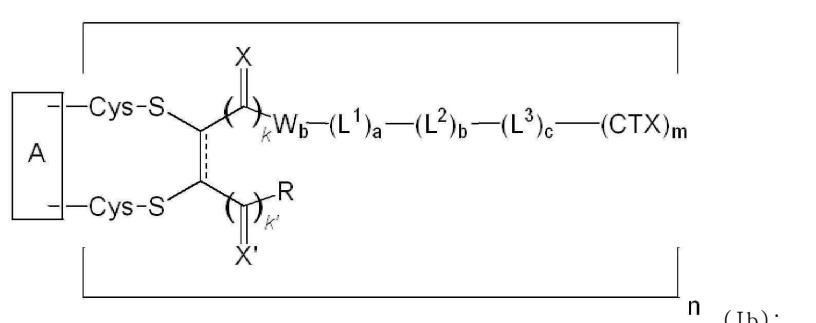
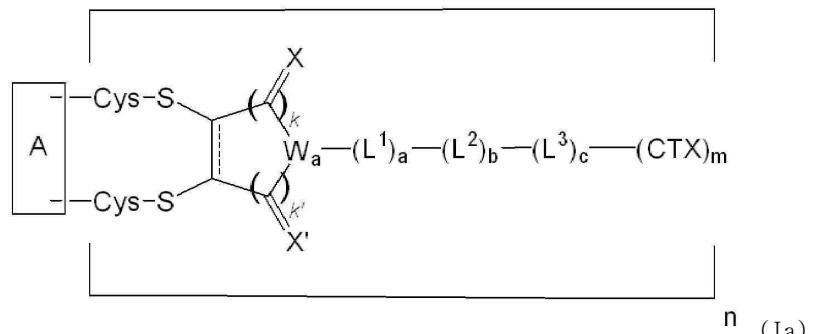
[0545] 본 방법은 개체에게 적어도 제2 항암 치료법을 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 제2 항암 치료법은 수술 요법, 화학요법, 방사선요법, 냉동요법, 고열요법, 고강도 집속 초음파 치료법, 호르몬요법, 면역요법 또는 사이토카인요법일 수 있다. 제2 항암 치료법은 방사선요법이다.

[0546] 본 발명은 또한 본 발명에서 제공되는 분자와 개체로부터의 샘플을 접촉시켜 분자와 BTN1A1 사이에 복합체를 형성하고, 샘플 내의 복합체를 검출하는 것을 포함하는, 개체로부터의 샘플에서 BTN1A1을 검출하는 방법을 제공하며, 이때 분자는 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진다.

[0547] 본 방법은 상기 복합체가 검출되면 개체가 암을 가질 가능성이 있는 것으로 진단하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 본 방법은 만일 상기 복합체가 검출되면 개체가 암치료에 반응성일 가능성이 있는 것으로 예측하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 본 방법은 개체로부터의 샘플 내의 BTN1A1의 발현 수준을 기준 수준에 비교하고 만일 샘플 내의 BTN1A1의 발현 수준이 기준 수준보다 높으면 개체가 암을 가질 가능성이 있는 것으로 진단하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 기준 수준은 건강한 개인으로부터의 샘플 내의 BTN1A1의 발현 수준일 수 있다. 샘플은 전혈 샘플, 골수 샘플, 부분 정제된 혈액 샘플, PBMC, 조직 생검, 순환 중앙 세포, 순환 단백질 복합체 또는 순환 엑소좀과 같을 수 있다. 복합체는 효소-연결 면역흡착 분석(ELISA), 형광 면역흡착 분석(FIA), 화학발광 면역흡착 분석(CLIA), 방사면역측정법(RIA), 효소 멀티플라이드 면역분석, 고체상 방사면역측정법(SPROA), 형광 편광(FP) 분석, 형광 공명 에너지 전이(FRET) 분석, 시간-분해 형광 공명 에너지 전이(TR-FRET) 분석, 표면 플라즈몬 공명(SPR) 분석 또는 면역조직화학(IHC) 방법과 같은 분석에 의해 검출될 수 있다.

[0548] 본 발명은 또한 a) 치료 과정에 걸쳐서 제1 및 적어도 하나의 후속 시점에서 환자로부터 수득한 둘 이상의 샘플을, BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 분자와 접촉시키고; b) 둘 이상의 샘플내의 BTN1A1의 수준을 측정하고, c) 둘 이상의 샘플내의 BTN1A1의 수준을 비교하는 것을 포함하며, 이때 제1 시점에서 수득된 샘플에서의 BTN1A1의 수준에 비하여 후속 시점에서 수득된 샘플내의 BTN1A1의 감소된 수준은 암 치료가 효과있음을 나타내는, 환자에서 특정 암치료의 효능을 평가하는 방법을 제공한다.

[0549] 본 발명은 또한 하기 화학식 (Ia) 또는 (Ib)의 항체-약물 접합체 또는 그의 약학적 허용 염을 제공한다:



[0552] 상기 식에서,

[0553] A는 BTN1A1에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 가진 본 명세서에 개시된 분자이며;

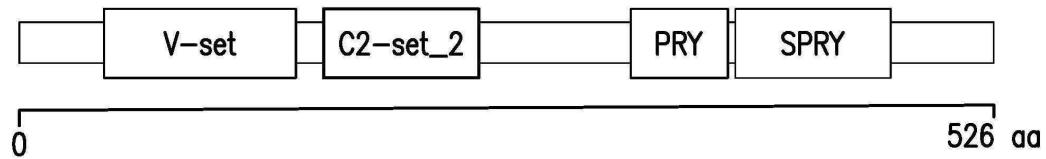
[0554] 두 개의 도시된 시스테인 잔기는 A내의 개방된 시스테인-시스테인 디설파이드 결합으로부터 오며;

[0555] 각각의 X 및 X'은 독립적으로 O, S, NH, 또는 NR¹이며, 이때 R¹은 C₁₋₆ 알킬이며;

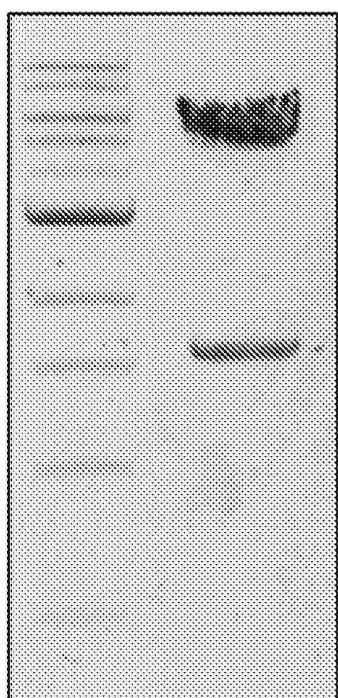
- [0556] W_a 는 $=N-$, $=CH-$, $=CHCH_2-$, $=C(R^2)-$, 또는 $=CHCH(R^2)-$ 이고; W_b 는 $-NH-$, $-N(R^1)-$, $-CH_2-$, $-CH_2-NH-$, $-CH_2-N(R^1)-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH(R^2)-$, 또는 $-CH_2CH(R^2)-$ 이며; 이때 R^1 및 R^2 는 독립적으로 C_{1-6} 알킬이며;
- [0557] CTX는 세포독소이고;
- [0558] R은 임의의 화학기이며; 또는 R은 부재하며;
- [0559] 각각의 L^1 , L^2 및 L^3 은 독립적으로 $-O-$, $-C(O)-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-NH-$, $-NCH_3-$, $-(CH_2)_q-$, $-NH(CH_2)_2NH-$, $-OC(O)-$, $-CO_2-$, $-NHCH_2CH_2C(O)-$, $-C(O)NHCH_2CH_2NH-$, $-NHCH_2C(O)-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NH-$, $-NCH_3C(O)-$, $-C(O)NCH_3-$, $-(CH_2CH_2O)_p$, $-(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2-(CH_2CH_2O)_p-$, $-OCH(CH_2O)_2$, $-(AA)_r-$, 시클로펜타닐, 시클로헥사닐, 비치환 페닐에닐, 및 할로, CF_3- , CF_3O- , CH_3O- , $-C(O)OH$, $-C(O)OC_{1-3}$ 알킬, $-C(O)CH_3$, $-CN$, $-NH-$, $-NH_2$, $-O-$, $-OH$, $-NHCH_3$, $-N(CH_3)_2$, 및 C_{1-3} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된 1 또는 2 치환기에 의해 치환된 페닐에닐로 이루어진 군으로부터 선택된 링커이며;
- [0560] a, b 및 c는 각각 독립적으로 0, 1, 2 또는 3의 정수이며, 단 a, b 또는 c 중 적어도 하나는 1이며;
- [0561] 각각의 k 및 k' 은 독립적으로 0 또는 1의 정수이고;
- [0562] 각각의 p는 독립적으로 1 내지 14의 정수이며;
- [0563] 각각의 q는 독립적으로 1 내지 12의 정수이고;
- [0564] 각각의 AA는 독립적으로 아미노산이며;
- [0565] 각각의 r은 1 내지 12이고;
- [0566] m은 1 내지 4의 정수이며;
- [0567] n은 1 내지 4의 정수이고;
- [0568] ----- 결합은 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.
- [0569] A는 항-BTN1A1 항체일 수 있다. CTX는 투불린 안정화제, 투불린 불안정화제, DNA 알킬화제, DNA 마이너 그루브 결합제, DNA 인터칼레이터, 토포이소머라제 I 억제제, 토포이소머라제 II 억제제, 기라제 억제제, 단백질 합성 억제제, 프로테오좀 억제제 또는 항-대사물과 같을 수 있다. CTX는 액티노마이신 D, 아모나피드, 오리스타틴, 벤조페논, 벤조티아졸, 칼리케미신, 캄토테신, CC-1065(NSC 298223), 세마도틴, 콜히친, 콤브레타스타틴 A4, 도라스타틴, 독소루비신, 엘리나피드, 엔탄신(DM1), 에토포시드, KF-12347(레이나마이신), 메이탄시노이드, 메토트렉세이트, 미토잔트론, 노코다졸, 프로테오좀 억제제 1(PSI 1), 로리딘 A, T-2 독소(트리코테센 유사체), 탁솔, 투불리신, 벨카드®, 또는 빙크리스틴과 같을 수 있다. CTX는 오리스타틴, 칼리케미신, 메이탄시노이드, 또는 투불리신일 수 있다. CTX는 모노메틸오리스타틴 E, 모노메틸오리스타틴 F, 칼리케미신 γ , 메르탄신, 피롤로벤조디아제핀, 투불리신 T2, 투불리신 T3, 또는 투불리신 T4일 수 있다.
- [0570] * * *
- [0571] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 함유하며 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 2016년 11월 28일에 생성된 상기 ASCII 카피의 명칭은 604556-228007_SL.TXT이고 크기는 23,359 바이트이다.
- [0572] 본 출원 전체에 걸쳐서 다양한 간행물이 참조되었다. 이들 간행물의 내용 전체는 본 발명이 관련되는 본 기술분야의 기술을 더욱 완전히 개시하기 위하여 본 출원에서 참고로 포함된다. 소정의 구체적 실시형태의 실시예가 본 발명에서 제공되는 한편, 다양한 변화와 변형이 이루어질 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 그러한 변형 역시 첨부된 청구범위의 범주내에 속하는 것이다.

도면

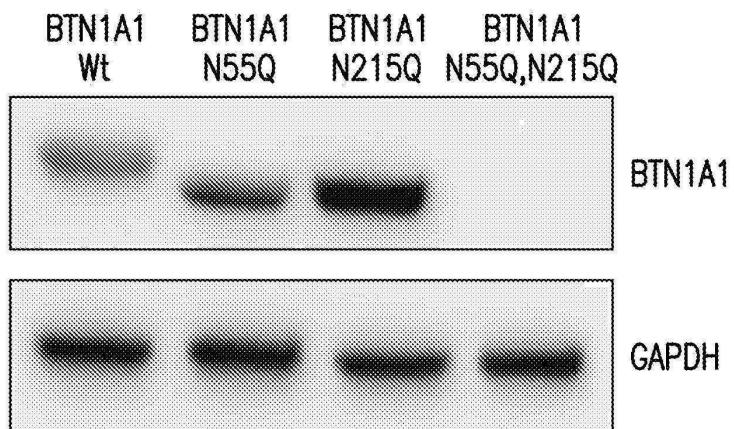
도면1



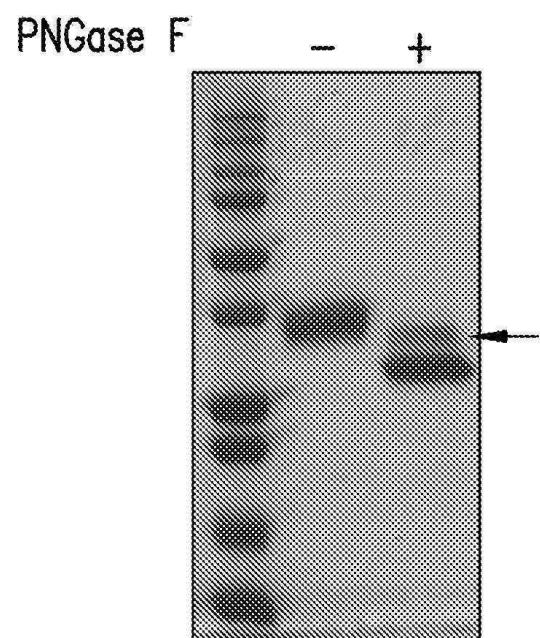
도면2



도면3



도면4



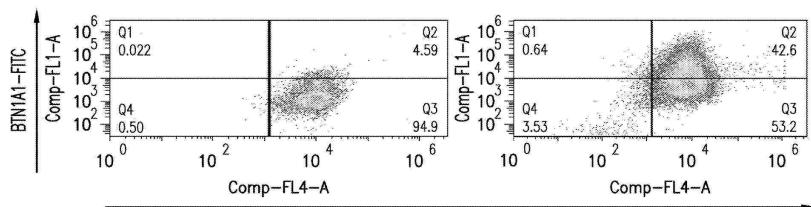
도면5

MAVFPSSGLPRCLLTLILLQLPKLDSAPFDVIGPPEPILAWGE
 DAE LPCRLSPN~~A~~SAEHLELRWFRKKVSPAVLVHRDGREQEAEQMPEYRGRATLVQDG
 IAKGRVALRIRGVVRVSDDGEYTCFFREDGSYEEALVHLKVAALGSDPHISMQVQENGEI
 CLECTS~~V~~GWY~~P~~EPQVQWRTSKGEKF~~P~~STSESRNPDEEGLFTVAASVIIRD~~T~~STK~~N~~WSC
 YIQNLLLGQEK~~K~~VEISIPASSLPRLTPWIVAVAVILMVLGLLTIGSIFTWRLYNERP
 RERRNEFSSKERLLEELK~~W~~KKATLHAVDVTLDPTAHPHLFLYEDSKSVRLEDSRQKL
 PEKTERFD~~S~~WPCVLGRETFTSGRH~~W~~EV~~E~~VGDR~~T~~DWAIGVCRENV~~M~~KKGF~~D~~PMTPENG
 FWAVELYGNGY~~W~~AL~~T~~PLRPLLAGP~~R~~RVGIFLDYESGDISFYNMNDGSDIYTF~~S~~
~~TF~~SGPLRPFFCLWSSGKKPLTICPIADGPERVTVIANAQDL~~S~~KEIPLSPMGEESAPRD
 ADTLHSKLIPTQPSQ~~G~~AP

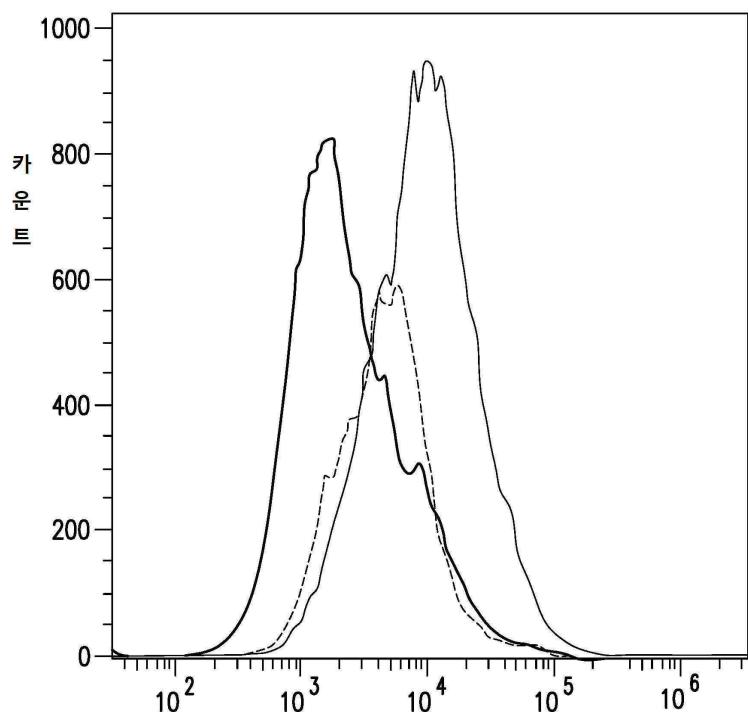
도면6

RLSPN~~A~~SAEH (N55) (호모 사피엔스)
 GFSPN~~A~~SSEY (N56) (무스 무스쿨루스)
 RLSPN~~V~~SAKG (N55) (보스 타우루스)
 TSAK~~N~~VSCYI (N215) (호모 사피엔스)
 SSIK~~N~~MSCCI (N216) (무스 무스쿨루스)
 SSMK~~N~~VSCCI (N215) (보스 타우루스)

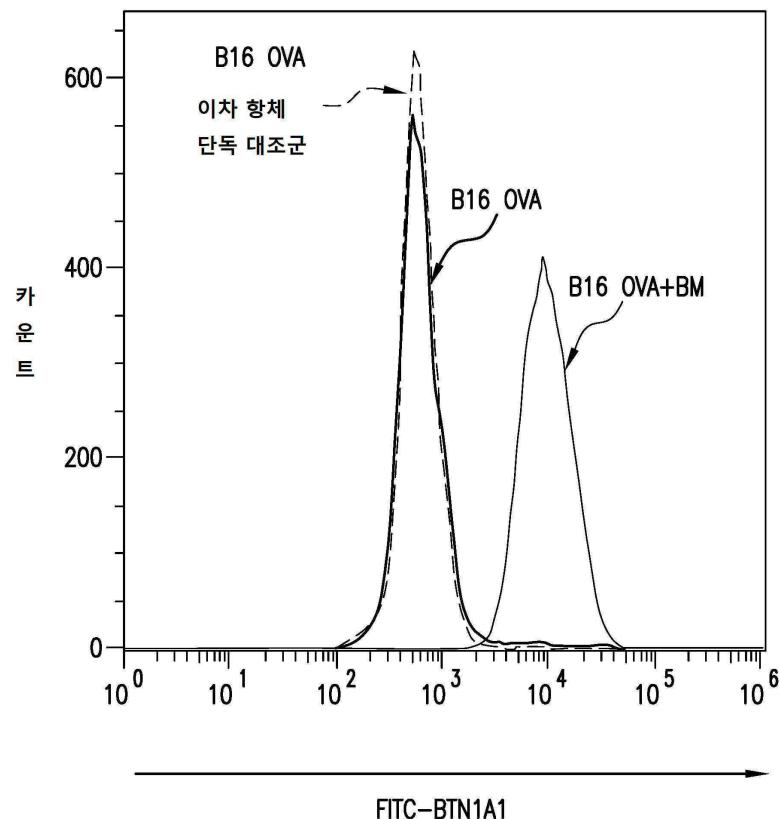
도면7a



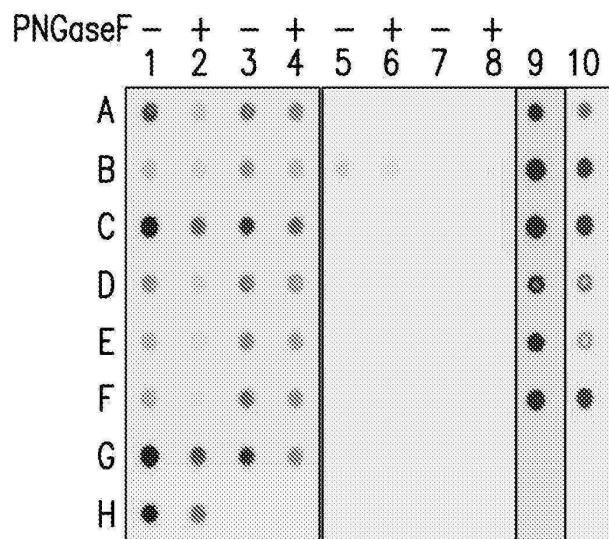
도면7b



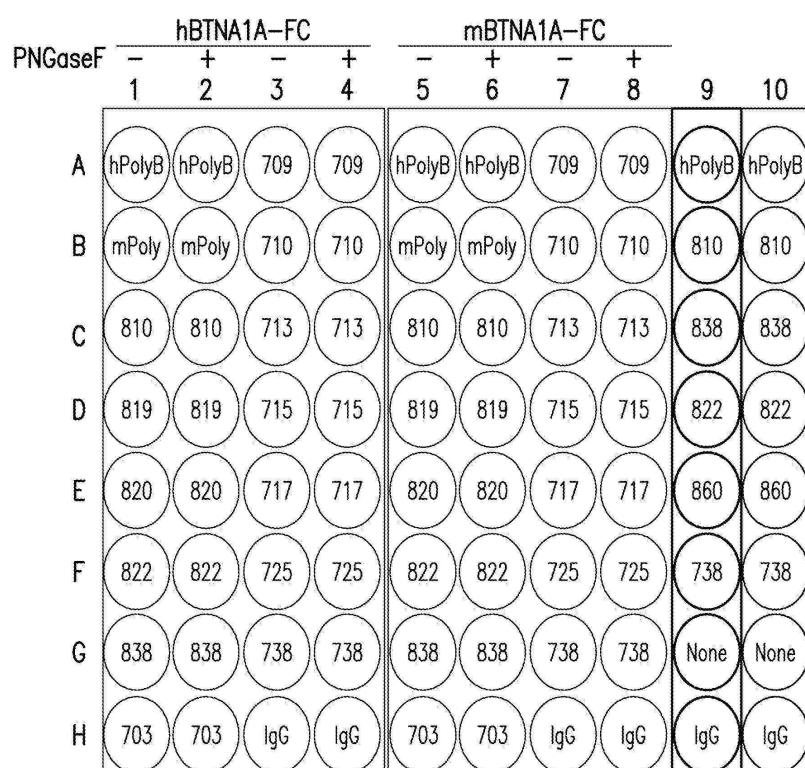
도면8



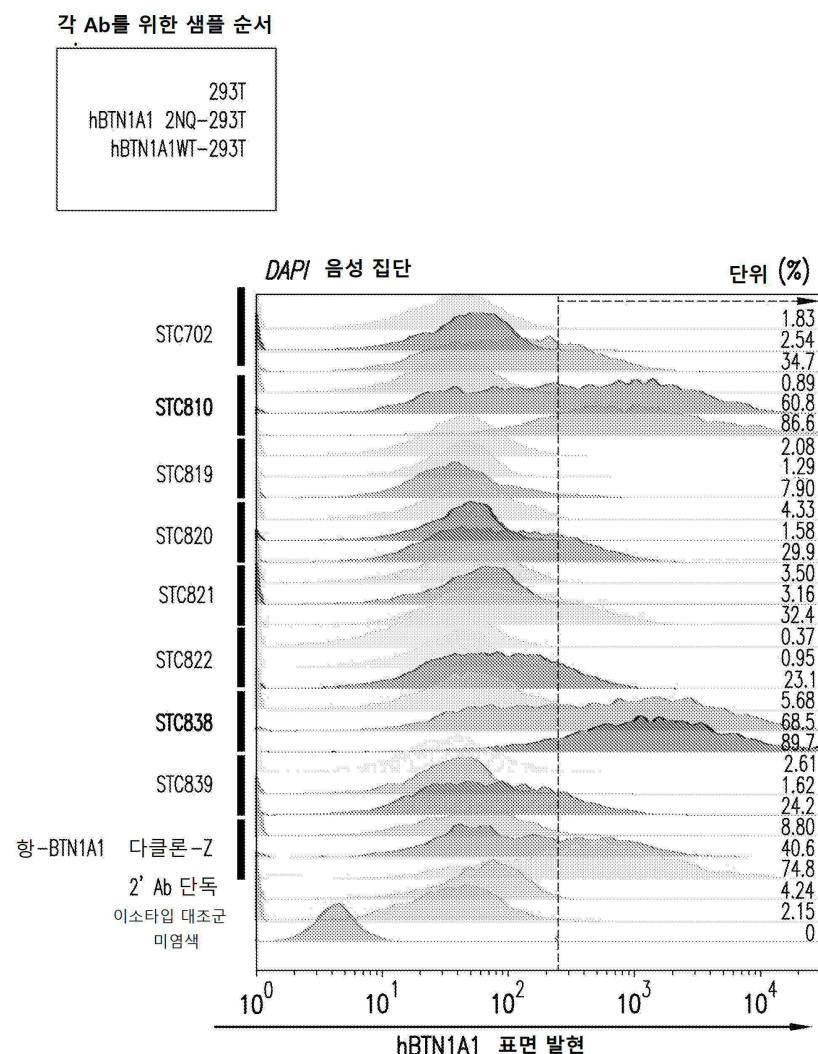
도면9a



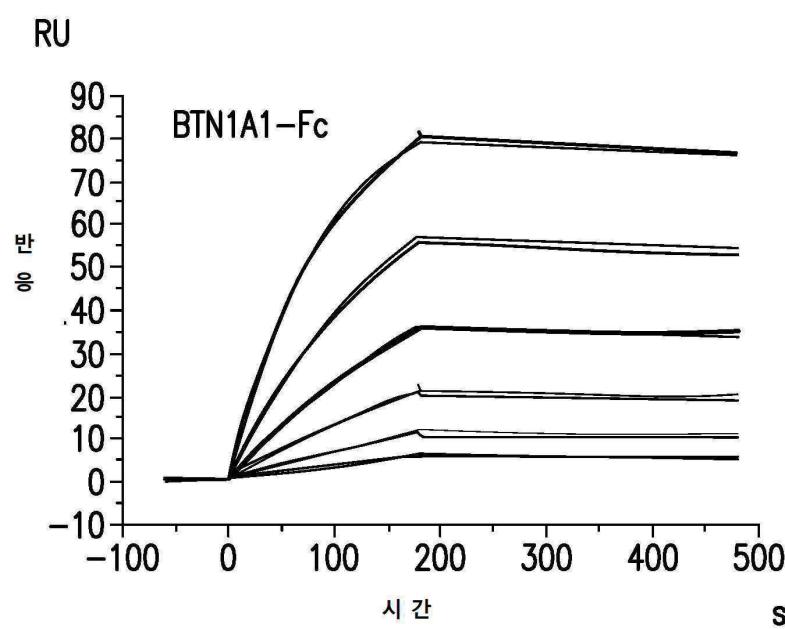
도면9b



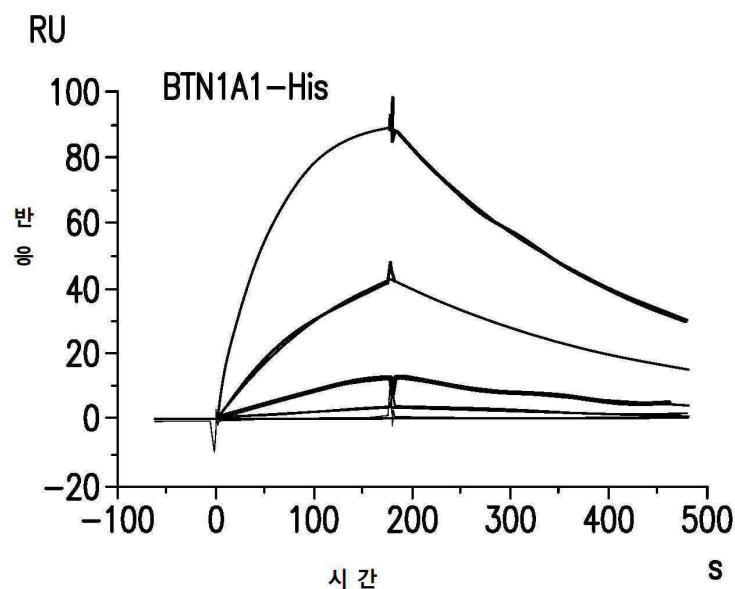
도면10



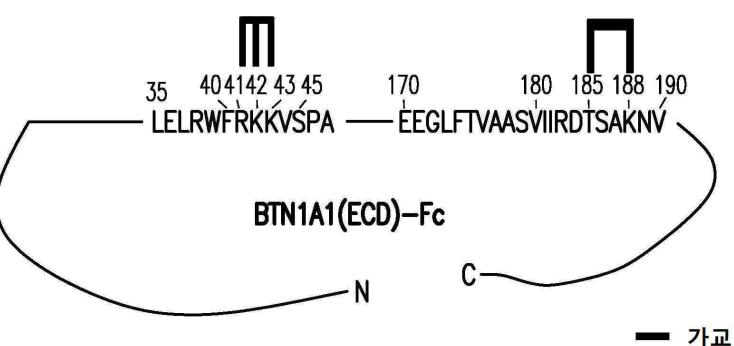
도면11a



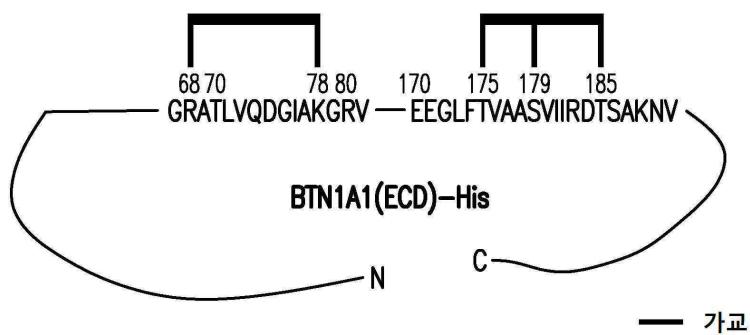
도면11b



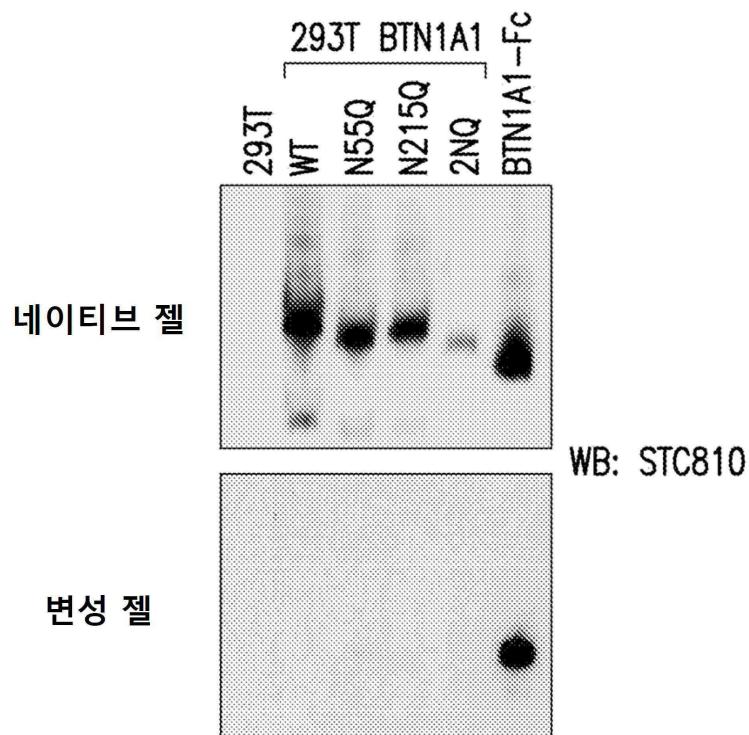
도면12



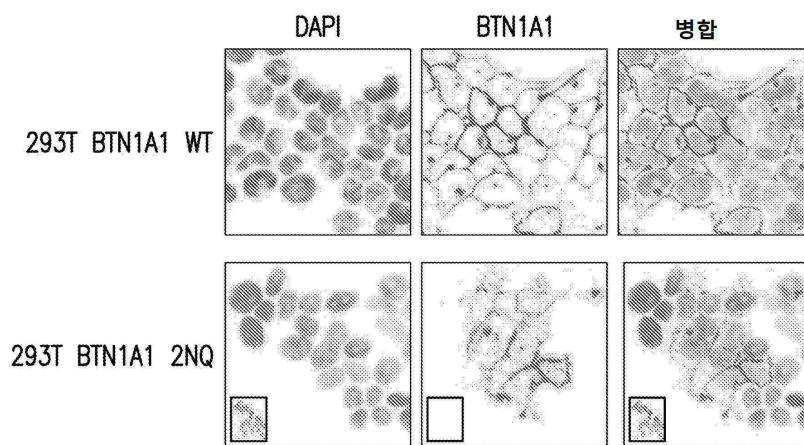
도면13



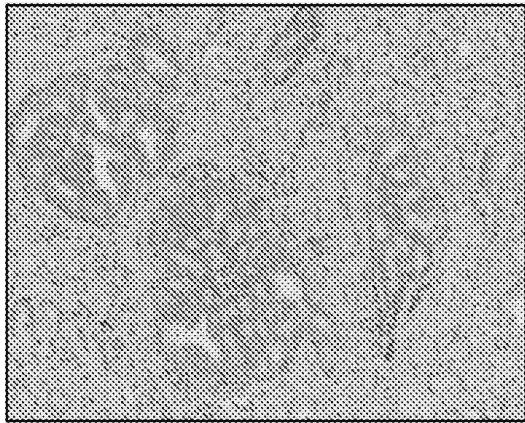
도면14



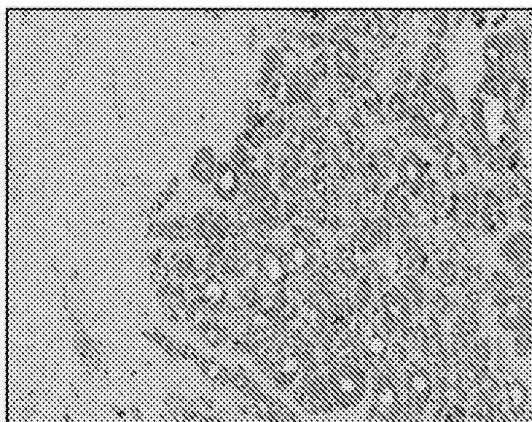
도면15



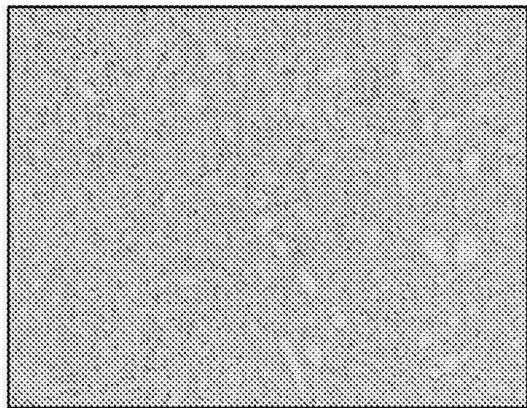
도면 16a



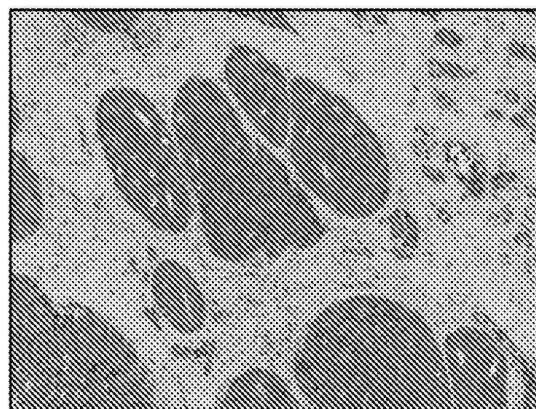
도면 16b



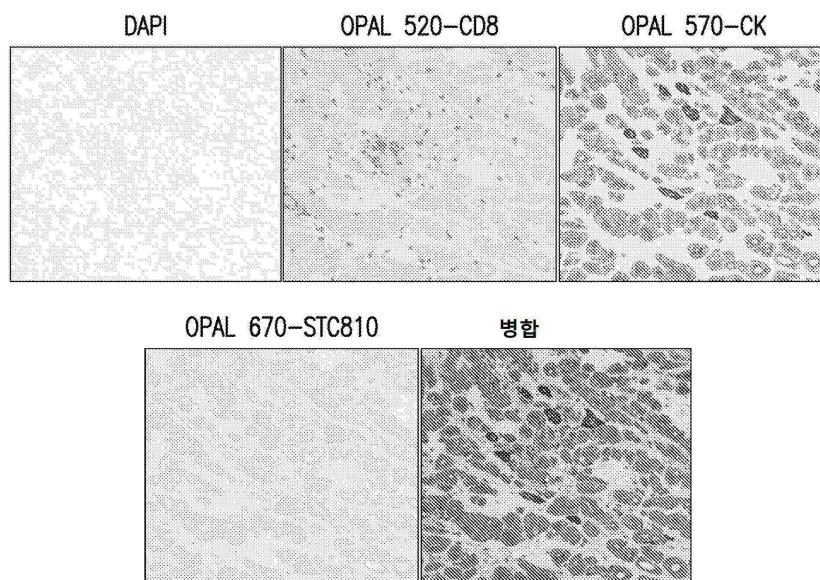
도면 16c



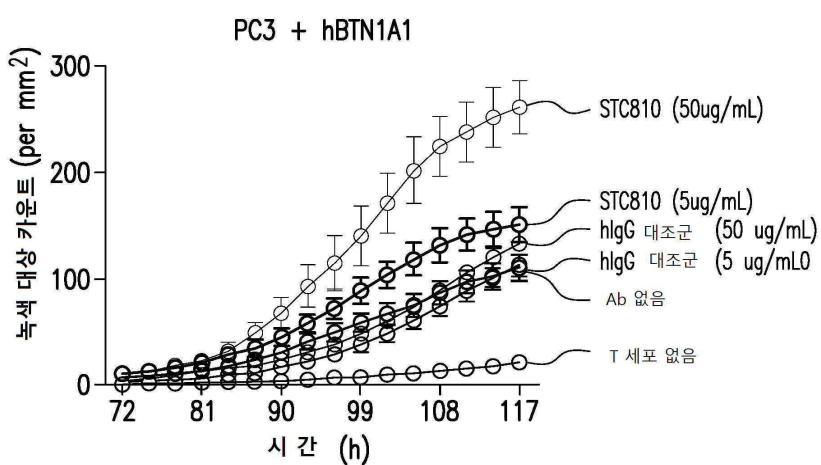
도면16d



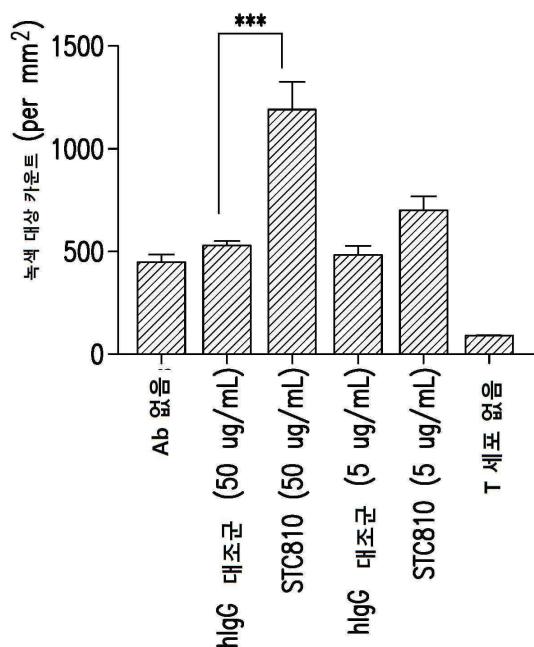
도면17



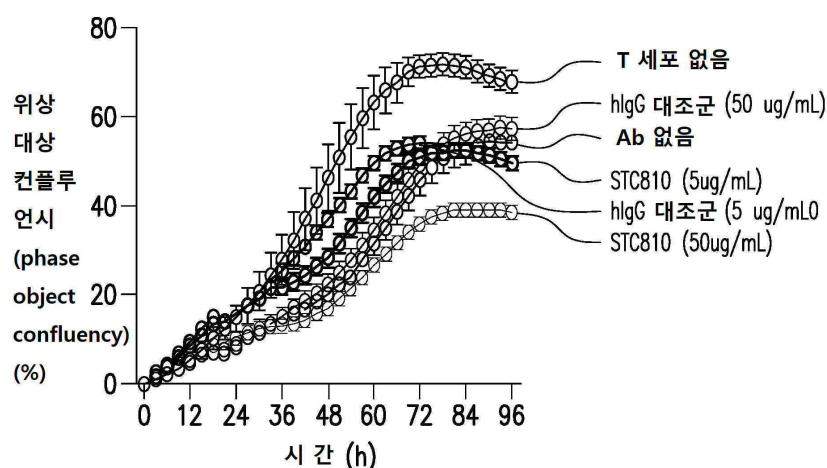
도면18a



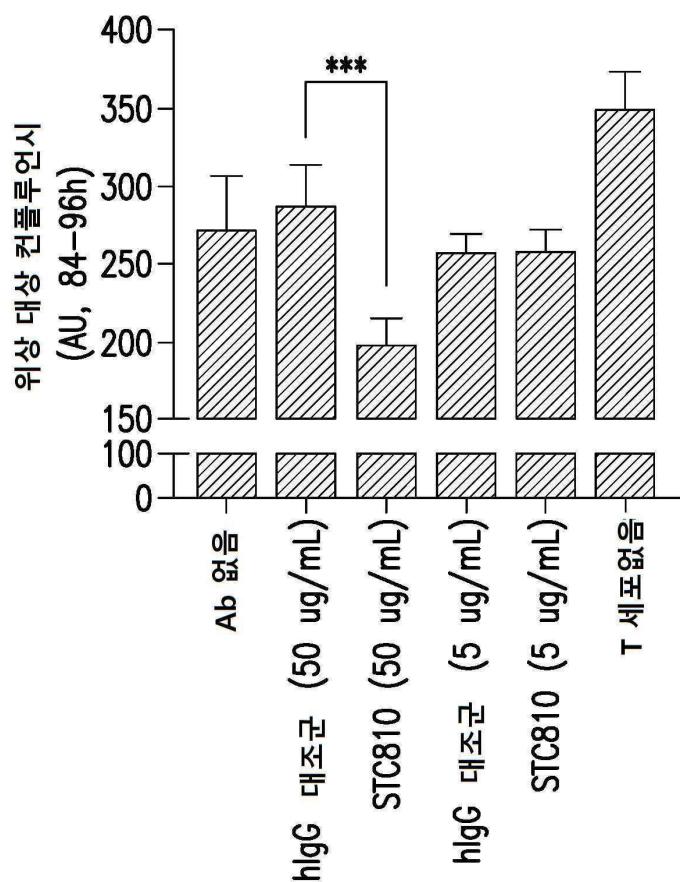
도면18b



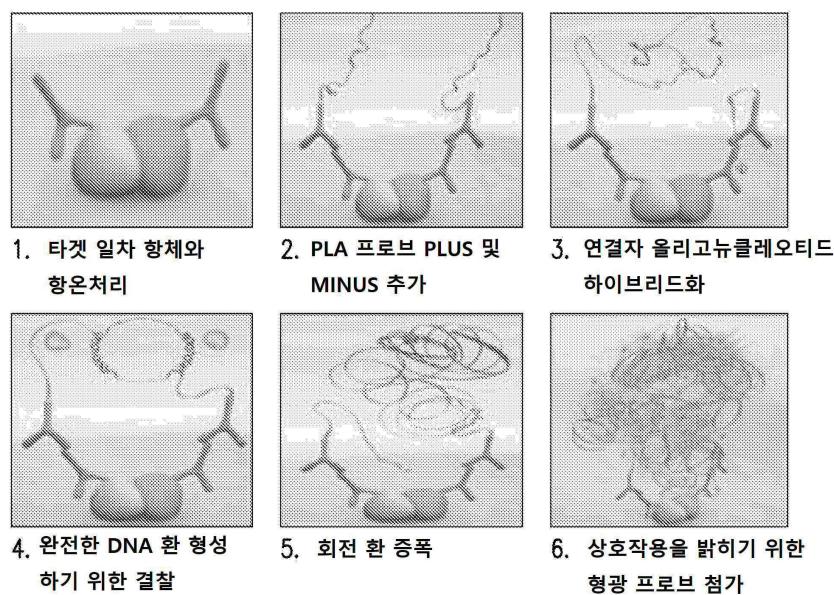
도면18c



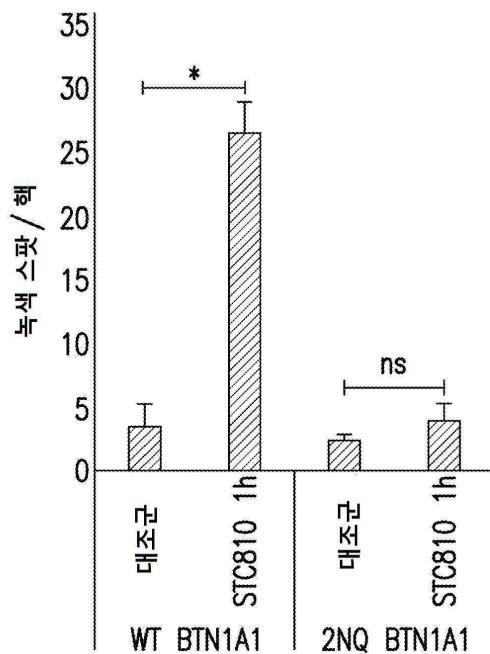
도면18d



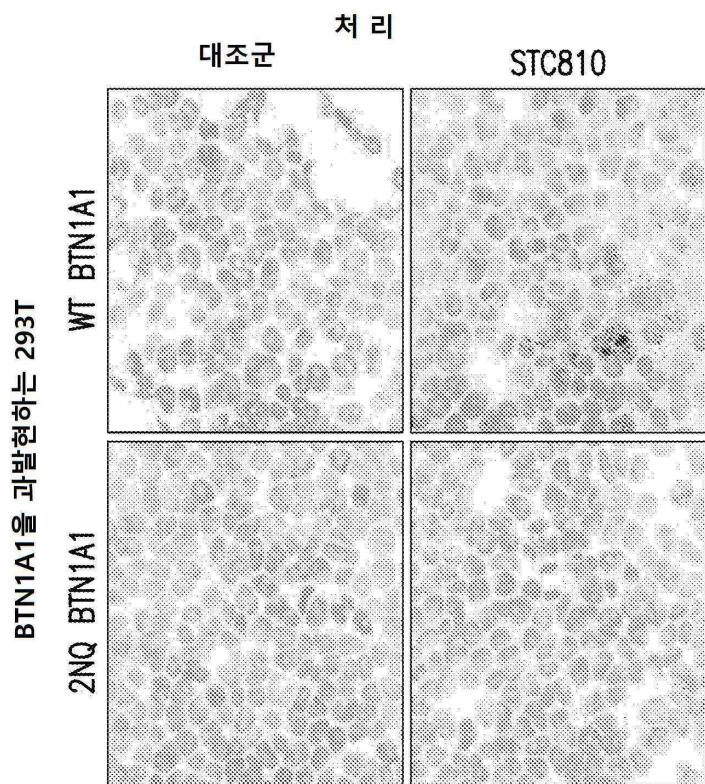
도면19



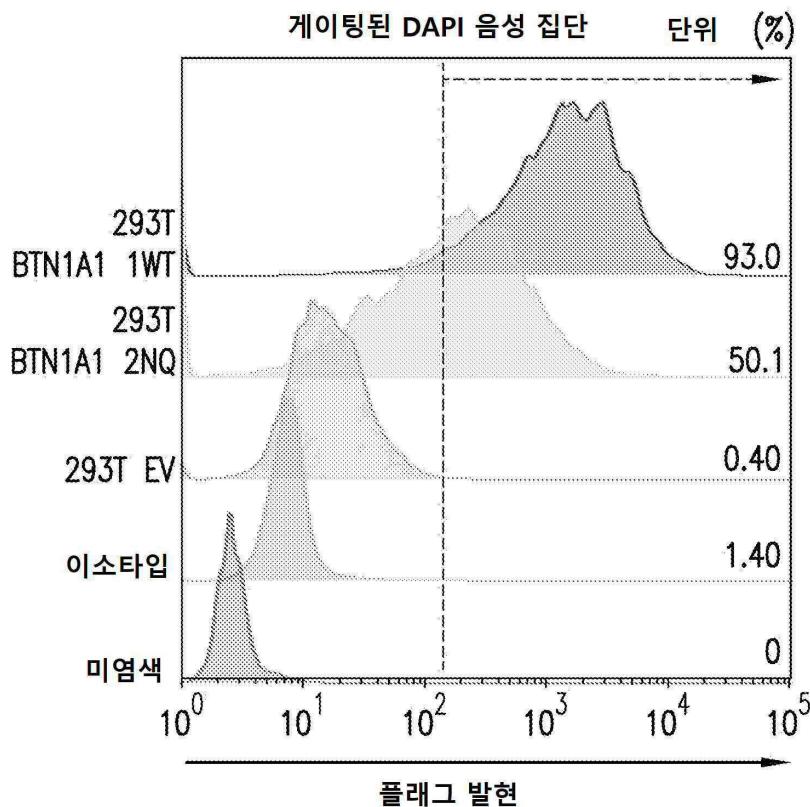
도면20a



도면20b



도면21



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

STCUBE & CO., INC.

<120> ANTIBODIES AND MOLECULES THAT IMMUNOSPECIFICALLY BIND TO BTN1A1

AND THE THERAPEUTIC USES THEREOF

<130> 604556-228007

<140><141><150> 62/262,309

<151> 2015-12-02

<160> 55

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 526

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Val Phe Pro Ser Ser Gly Leu Pro Arg Cys Leu Leu Thr Leu

1 5 10 15

Ile Leu Leu Gln Leu Pro Lys Leu Asp Ser Ala Pro Phe Asp Val Ile

20 25 30

Gly Pro Pro Glu Pro Ile Leu Ala Val Val Gly Glu Asp Ala Lys Leu

35 40 45

Pro Cys Arg Leu Ser Pro Asn Ala Ser Ala Glu His Leu Glu Leu Arg

50 55 60

Trp Phe Arg Lys Lys Val Ser Pro Ala Val Leu Val His Arg Asp Gly

65 70 75 80

Arg Glu Gln Glu Ala Glu Gln Met Pro Glu Tyr Arg Gly Arg Ala Thr

85 90 95

Leu Val Gln Asp Gly Ile Ala Lys Gly Arg Val Ala Leu Arg Ile Arg

100 105 110

Gly Val Arg Val Ser Asp Asp Gly Glu Tyr Thr Cys Phe Phe Arg Glu

115 120 125

Asp Gly Ser Tyr Glu Glu Ala Leu Val His Leu Lys Val Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Ser Asp Pro His Ile Ser Met Gln Val Gln Glu Asn Gly Glu Ile

145 150 155 160

Cys Leu Glu Cys Thr Ser Val Gly Trp Tyr Pro Glu Pro Gln Val Gln

165 170 175

Trp Arg Thr Ser Lys Gly Glu Lys Phe Pro Ser Thr Ser Glu Ser Arg

180 185 190

Asn Pro Asp Glu Glu Gly Leu Phe Thr Val Ala Ala Ser Val Ile Ile

195 200 205

Arg Asp Thr Ser Ala Lys Asn Val Ser Cys Tyr Ile Gln Asn Leu Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

Pro Arg Leu Thr Pro Trp Ile Val Ala Val Ala Val Ile Leu Met Val

245	250	255
Leu Gly Leu Leu Thr Ile Gly Ser Ile Phe Phe Thr Trp Arg Leu Tyr		
260	265	270
Asn Glu Arg Pro Arg Glu Arg Arg Asn Glu Phe Ser Ser Lys Glu Arg		
275	280	285
Leu Leu Glu Glu Leu Lys Trp Lys Lys Ala Thr Leu His Ala Val Asp		
290	295	300
Val Thr Leu Asp Pro Asp Thr Ala His Pro His Leu Phe Leu Tyr Glu		
305	310	315
Asp Ser Lys Ser Val Arg Leu Glu Asp Ser Arg Gln Lys Leu Pro Glu		
325	330	335
Lys Thr Glu Arg Phe Asp Ser Trp Pro Cys Val Leu Gly Arg Glu Thr		
340	345	350
Phe Thr Ser Gly Arg His Tyr Trp Glu Val Glu Val Gly Asp Arg Thr		
355	360	365
Asp Trp Ala Ile Gly Val Cys Arg Glu Asn Val Met Lys Lys Gly Phe		
370	375	380
Asp Pro Met Thr Pro Glu Asn Gly Phe Trp Ala Val Glu Leu Tyr Gly		
385	390	395
Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Thr Pro Leu Arg Thr Pro Leu Pro Leu Ala		
405	410	415
Gly Pro Pro Arg Arg Val Gly Ile Phe Leu Asp Tyr Glu Ser Gly Asp		
420	425	430
Ile Ser Phe Tyr Asn Met Asn Asp Gly Ser Asp Ile Tyr Thr Phe Ser		
435	440	445
Asn Val Thr Phe Ser Gly Pro Leu Arg Pro Phe Phe Cys Leu Trp Ser		
450	455	460
Ser Gly Lys Pro Leu Thr Ile Cys Pro Ile Ala Asp Gly Pro Glu		
465	470	475
Arg Val Thr Val Ile Ala Asn Ala Gln Asp Leu Ser Lys Glu Ile Pro		
485	490	495

Leu Ser Pro Met Gly Glu Asp Ser Ala Pro Arg Asp Ala Asp Thr Leu

500 505 510

His Ser Lys Leu Ile Pro Thr Gln Pro Ser Gln Gly Ala Pro

515 520 525

<210> 2

<211> 1581

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atggcagttt tcccaagctc cggctctccc agatgtctgc tcaccctcat tctccctccag	60
ctgccccaaac tggattcagc tcccttgac gtgattggac cccggagcc catcctggcc	120
gttgtgggtg aggacgccaa gctgccctgt cgcctgtctc cgaacgcgag cgccgagcac	180
ttggagctac gctggttccg aaagaagggtt tcgcggccg tgctggtgca tagggacggg	240
cgcgagcagg aagccgagca gatgcccag taccgcggc gggcgacgct ggtccaggac	300
ggcatcgcca aggggcccgtt ggccttgagg atccgtggcg tcagagtctc tgacgacggg	360

gagtagacacgt gctttttag ggaggatgga agctacgaag aagccctggc gcatctgaag	420
gtggctgctc tgggctctga ccctcacatc agtatgcaag ttcaagagaa tggagaaatc	480
tgtctggagt gcacccatgt gggatggta ccagagcccc aggtgcagt gagaacttcc	540
aaggagaga agtttccatc tacatcagag tccagaaatc ctgatgaaga agtttttttc	600
actgtggctg cttagtgcatc catcagagac acttctgcga aaaatgtgtc ctgctacatc	660
cagaatctcc ttcttgccca ggagaagaaa gtagaaatat ccataccagc ttccctccctc	720
ccaaggctga ctccctggat agtggctgtc gctgtcatcc tgatggttct aggacttctc	780

accatgggtt ccataaaaaa cacttggaga ctataacaacg aaagacccag agagaggagg	840
aatgaattca gctctaaaga gagactcctg gaagaactca aatggaaaaa ggctaccttg	900
catgcagttt atgtgactct ggacccagac acagctcatc cccacccctt tctttatgag	960
gattcaaaat ctgttcgact ggaagattca cgtcagaaac tgcctgagaa aacagagaga	1020
tttgactctt ggcctgtgt gttggccgt gagacccatca cctcaggaag gcattactgg	1080
gaggtggagg tgggagacag gactgactgg gcaatcgccg tggtaggaa gaatgtgtatg	1140
aagaaaggat ttgacccat gactccttag aatgggttct gggctgtaga gttgtatgga	1200

aatgggtact gggccctcac tcctctccgg accccctctcc cattggcagg gccccacgc	1260
cgggttggga tttcctaga ctatgaatca ggagacatct cttctacaa catgaatgat	1320

ggatctgata tctatacttt ctccaatgtc actttctctg gccccctccg gcccttcttt	1380
tgcctatggt cttagcgtaa aaagcccctg accatctgcc caattgctga tgggccttag	1440
agggtcacag tcattgctaa tgcccaggac ctttctaagg agatcccatt gtccccatg	1500
ggggaggact ctgcccctag ggatgcagac actctccatt ctaagctaat ccctacccaa	1560
cccagccaag gggcacctta a	1581

<210> 3

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Ala Tyr His Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Tyr Trp Tyr Phe

100 105 110

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 4

<211> 375

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 4

gagggtccagc	tgcagcagtc	tggacctgag	ctggtaaagc	ctggggcttc	agtgaagata	60
tcctgcaagg	cttctggata	cacattcaact	cactacaaca	tggactgggt	gaagcagagc	120
catgaaaga	gccttgaatg	gattggatat	atttacctt	ccaatggtgg	tactggctac	180

aaccagaat	tcaagagcag	ggccacatig	actgttagaca	agtccctccag	cacagcc tac	240
atggaactcc	acagcctgac	atctgaggac	tctgcagtc	attactgtgc	aagaggggcc	300
tatcaactacg	gtagttccta	cgcctactgg	tacttcgatg	tctggggcgc	agggaccacg	360
gtcaccgtct	cctca					375

<210> 5

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

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

65	70	75	80												
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Ser	Lys	Leu	Pro	Phe
85												95			

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

100 105

<210> 6

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 6

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtccacc 60

atcagttgca gtgcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120

gatgaaaactg taaaactcct gatctttac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca 180

agattcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggcacct 240

gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tctagtaagc ttccattcac gttcggctcg 300

gggacagagt tgaaataaaa acgggct 327

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr

1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 8

Tyr Pro Ser Asn Gly Gly

1 5

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 9

Gly Ala Tyr His Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10 15

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 10

Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr Asn Met Asp

1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 11

Tyr Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Gly Thr Gly

1 5 10

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 12

Gly Ala Tyr His Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10 15

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 13

His Tyr Asn Met Asp

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 14

Tyr Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 15

Gly Ala Tyr His Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10 15

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 16

Thr His Tyr Asn Met Asp

1 5

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 17

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Gly Thr Gly

1 5 10

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 18

Ala Arg Gly Ala Tyr His Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Tyr Trp Tyr Phe

1 5 10 15

Asp

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 19

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 20

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 21

Gln Gln Ser Ser Lys Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 22

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 23

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 24

Gln Gln Ser Ser Lys Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 25

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 26

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 27

Gln Gln Ser Ser Lys Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 28

Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr

1 5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 29

Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Ser Leu His

1 5 10

<210> 30

<211> 8

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 30

Gln Gln Ser Ser Lys Leu Pro Phe

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 31

Arg Lys Lys Val Ser Pro Ala Val Leu

1 5

<210> 32

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 32

Thr Val Ala Ala Ser Val Ile Ile Arg Asp Thr Ser Ala Lys Asn Val

1 5 10 15

Ser Cys Tyr

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 33

Ile Arg Asp Thr Ser Ala Lys Asn

1 5

<210

> 34

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 34

Leu Glu Leu Arg Trp Phe Arg Lys Lys Val Ser Pro Ala

1 5 10

<210> 35

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 35

Glu Glu Gly Leu Phe Thr Val Ala Ala Ser Val Ile Ile Arg Asp Thr

1 5 10 15

Ser Ala Lys Asn Val

20

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 36

Ala Thr Leu Val Gln Asp Gly Ile Ala Lys Gly Arg

1 5 10

<210> 37

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 37

Asn Pro Asp Glu Glu Gly Leu Phe Thr Val Ala Ala Ser Val Ile Ile

1 5 10 15

Arg Asp Thr Ser Ala Lys

20

<210> 38

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 38

Thr Val Ala Ala Ser Val Ile Ile Arg Asp Thr Ser Ala Lys Asn Val

1 5 10 15

Ser Cys Tyr

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Any amino acid

<400> 39

Ala Glu Gln Xaa Pro Glu Tyr Arg Gly Arg Ala Thr

1 5 10

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 40

Gly Arg Ala Thr Leu Val Gln Asp Gly Ile Ala Lys Gly Arg Val

1 5 10 15

<210> 41

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 41

Glu Glu Gly Leu Phe Thr Val Ala Ala Ser Val Ile Ile Arg Asp Thr

1 5 10 15

Ser Ala Lys Asn Val

20

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 42

Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Tyr

1 5

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 43

Thr Phe Thr His Tyr

1 5

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 44

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Glu

1 5

<210> 45

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 45

Ser Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Gly Thr Gly

1 5 10 15

Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ser Arg

20

<210> 46

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 46

Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg

1 5 10 15

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 47

Thr Phe Thr His Tyr

1 5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 48

Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg

1 5

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Arg Leu Ser Pro Asn Ala Ser Ala Glu His

1 5 10

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

Gly Phe Ser Pro Asn Ala Ser Ser Glu Tyr

1 5 10

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 51

Arg Leu Ser Pro Asn Val Ser Ala Lys Gly

1 5 10

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Thr Ser Ala Lys Asn Val Ser Cys Tyr Ile

1 5 10

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

Ser Ser Ile Lys Asn Met Ser Cys Cys Ile

1 5 10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 54

Ser Ser Met Lys Asn Val Ser Cys Cys Ile

1 5 10

<210> 55

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

6xHis tag"

<400> 55

His His His His His His

1

5