



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월13일

(11) 등록번호 10-2010098

(24) 등록일자 2019년08월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7006624

(22) 출원일자(국제) 2012년08월17일

심사청구일자 2017년08월17일

(85) 번역문제출일자 2014년03월12일

(65) 공개번호 10-2014-0054238

(43) 공개일자 2014년05월08일

(86) 국제출원번호 PCT/US2012/051373

(87) 국제공개번호 WO 2013/026004

국제공개일자 2013년02월21일

(30) 우선권주장

61/524,708 2011년08월17일 미국(US)

61/646,111 2012년05월11일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2011020529 A2*

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 2006, 제35권, 제2호, 페이지 252-259

American Journal of Pathology, 2005, 제166권, 제6호, 페이지 1883-1894

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

더 리전트 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아

미국 94607-5200 캘리포니아주 오클랜드 플랭크린
스트리트 1111 12층

(72) 발명자

니시무라, 스티븐

미국 94941 캘리포니아주 밀 베리 글렌우드 애비뉴 601

루, 지안통

미국 94066 캘리포니아주 산 브루노 린덴 애비뉴 69

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 인테그린 알파-Ⅴ 베타-8에 결합하는 항체

(57) 요약

본원에서는 α β 8의 β 8 서브유닛에 대하여 높은 친화도를 갖는 항체를 제공한다.

대 표 도



(72) 발명자

바론, 조디 린

미국 94941 캘리포니아주 밀 벨리 글렌우드 애비뉴
601

마크스, 제임스

미국 94707 캘리포니아주 켄싱تون 아드모어 로드
107

명세서

청구범위

청구항 1

$\alpha v \beta 8$ 에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체로서,

활성인 성숙 TGF β 웹티드의 방출은 억제시키지만, $\alpha v \beta 8$ -발현 세포 상의 $\alpha v \beta 8$ 에 대한 잠재성 TGF β 의 부착은 유의하게 억제시키지 않고,

서열 8의 중쇄 가변 영역 및 서열 9의 경쇄 가변 영역을 갖는 인간화된 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, scFv 항체인 인간화된 항체.

청구항 3

제약상 허용되는 부형제 중 제1항 또는 제2항에 따른 인간화된 항체를 포함하는,

염증성 장 질환 (IBD), 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 천식, 관절염, 간 섬유증, 폐 섬유화 장애, 염증성 뇌 자가면역 질환, 다발성 경화증, 탈수초성 질환, 신경염증, 신장 질환, 선암종, 편평세포 암종, 신경교종, 및 유방 암종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 $\alpha v \beta 8$ 관련 장애를 진단하기 위한 제약 조성물.

청구항 4

제약상 허용되는 부형제 중 제1항 또는 제2항에 따른 인간화된 항체를 포함하는,

개체에서 TGF β 신호전달을 감소시켜 염증성 장 질환 (IBD), 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 천식, 관절염, 간 섬유증, 폐 섬유화 장애, 염증성 뇌 자가면역 질환, 다발성 경화증, 탈수초성 질환, 신경염증, 신장 질환, 선암종, 편평세포 암종, 신경교종, 및 유방 암종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 병증을 호전시키기 위한 제약 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 개체가 염증성 장 질환 (IBD)을 앓고, TGF β 신호전달의 감소로 IBD가 호전되는 것인 제약 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 개체가 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 섬유화 폐 장애, 또는 둘 다를 앓고, TGF β 신호전달의 감소로 COPD, 섬유화 폐 장애, 또는 둘 다가 호전되는 것인 제약 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 개체가 관절염을 앓고, TGF β 신호전달의 감소로 관절염이 호전되는 것인 제약 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서, 개체가 천식을 앓고, TGF β 신호전달의 감소로 천식이 호전되는 것인 제약 조성물.

청구항 9

제4항에 있어서, 개체가 간 섬유화 장애를 앓고, TGF β 신호전달의 감소로 간 섬유증이 호전되는 것인 제약 조성물.

청구항 10

시험관내에서 개체로부터의 세포를 제1항 또는 제2항의 인간화된 항체와 접촉시키는 단계, 및

세포에 대한 인간화된 항체의 결합을 검출하는 단계

를 포함하며,

인간화된 항체가 세포에 결합하였다면, 이는 개체가 염증성 장 질환 (IBD), 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 천식, 관절염, 간 섬유증, 폐 섬유화 장애, 염증성 뇌 자가면역 질환, 다발성 경화증, 탈수초성 질환, 신경염증, 신장 질환, 선암증, 편평세포 암증, 신경교종, 및 유방 암증으로 이루어진 군으로부터 선택된 $\alpha v \beta 8$ 관련 장애를 앓고 있음을 나타내는 것인,

개체에서 상기 $\alpha v \beta 8$ 관련 장애를 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 세포가 고정된 것인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, $\alpha v \beta 8$ 관련 장애가 염증성 장 질환인 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, $\alpha v \beta 8$ 관련 장애가 관절염인 방법.

청구항 14

제10항에 있어서, $\alpha v \beta 8$ 관련 장애가 간 섬유증인 방법.

청구항 15

제10항에 있어서, $\alpha v \beta 8$ 관련 장애가 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 섬유화 폐 장애, 또는 둘 다인 방법.

청구항 16

제10항에 있어서, $\alpha v \beta 8$ 관련 장애가 천식인 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 2011년 8월 17일자로 출원된 미국 가특허 출원 번호 제61/524,708호, 및 2012년 5월 11일자로 출원된 미국 가특허 출원 번호 제61/646,111호를 우선권 주장하며, 이를 가출원은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003]

ASCII 텍스트 파일로 제출된 "서열 목록," 표, 또는 컴퓨터 프로그램 목록 부록에 대한 언급

[0004]

기계 포맷 IBM-PC, MS-윈도우즈 운영 체계로 2012년 8월 17일 작성된 파일 81906-848664_ST25.TXT로 기록된 서열 목록은 본원에서 참조로 포함된다.

[0005]

연방정부 지원 연구 및 개발 하에 이루어진 발명의 권리에 관한 언급

[0006]

본 발명은 미국립보건원(National Institutes of Health)에 의해서 수여된 보조금 번호 HL63993, NS-44155, U01 AI075443의 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에서 특정 권리들을 가진다.

배경 기술

[0007]

다기능성 시토카인인 형질전환 성장 인자- β (TGF β)는 무척추 및 척추 종에서 발생 단계 및 성체 단계 동안 면역, 내피, 상피, 및 중간엽 세포에 영향을 미친다. 포유동물에서 이들의 기능은 널리 발현되는 3가지 이소형, TGF- β 1, 2, 및 3에 의해 매개된다. 3가지 이소형 모두 같은 세포 표면 수용체 (TGFBR2 및 ALK5)와 상호작용하고, 정규 (즉, SMAD) 또는 비정규 (즉, MAPK, JUN, PI3K, PP2A, Rho, PAR6) 신호전달 이펙터를 수반하는, 같은 세포내 신호전달 경로를 통해 신호를 전달한다. 정규 TGF β 신호전달 경로에서, 신호는 세포질 SMAD-2/3의 인산화, SMAD-4와의 복합체 형성, SMAD-2/3/4 복합체의 핵으로의 전위, 및 섬유 생성 반응에 관여하는 많은 유전자의 프로모터 영역에 위치하는 SMAD 반응 요소에의 결합을 통해 TGF β 수용체로부터 전파된다. TGF β 이소형은 유사한 신호전달 파트너를 갖는 반면, 각각은 상이한 생물학적 기능을 수행한다. TGF β 이소형은 TGF β 수용체에의 결합 친화도, 활성화 기전, 신호전달 강도 또는 지속 기간, 또는 공간 및/또는 시간상의 분포에 있어서 차이를 보인다.

[0008]

TGF β 이소형, 수용체, 및 신호전달 매개 인자의 녹아웃 및 조건부 결실 모델 뿐만 아니라, TGF β 이소형 모두를 표적화하는 기능 차단제를 통해 T-세포, 심장, 폐, 혈관, 및 혈소판 발생에서의 TGF β 에 대한 필수적인 역할이 밝혀졌다. TGF β 1이 부족한 마우스는 난황낭 혈관형성 결함으로 인하여 자궁에서 사망하거나, 중증의 다기관 자가면역을 앓으면서 성체가 될 때까지 생존한다. TGF β 신호전달 매개 인자인 Smad2의 유전자 결실을 통해 상기 인자는 조기 패턴화 및 중배엽 형성에서 필수적인 것으로 밝혀졌다. Smad3이 결핍된 마우스는 생존능이 있고, 생식력이 있는 하지만, 사지 기형, 면역 조절 이상, 대장염, 결장 암종, 및 폐포 비대를 보인다. 성인 조직에서, TGF β 경로는 환경 스트레스에 대한 반응에서의 항상성을 유지시키기 위한 면역, 중간엽, 및 상피 세포의 상호작용에 관여한다.

[0009]

TGF β 에 의해 매개되는 항상성 경로는 만성 반복 손상에 대한 반응에서 교란되어 있다. TGF β 는 상피 상처 치유를 지연시키는 것으로서, 손상에 대한 반응에서의 주된 섬유 생성 유발성 시토카인이다. TGF β 는 상피 증식 및 이동을 억제시키고, 아폽토시스를 촉진시키며, 섬유모세포 동원, 섬유모세포 수축력, 및 세포외 기질 침착을 유도함으로써 중간엽 구획을 확장시킨다. 아데노바이러스 제조합 TGF- β 1이 설치류 폐로 기관내 전달되면 기도 주변 및 폐 간질에서의 섬유모세포 축적 및 I형 및 III형 콜라겐의 발현은 급증하게 된다. 중화 항-TGF β 항체는 블레오마이신 또는 방사선 유발성 폐 섬유증을 차단시킬 수 있다.

[0010]

TGF β 활성 증가는 주로 TGF β 1에 의해 매개되는 섬유화 폐 질환, 사구체 경화증, 및 심혈관 재협착에서 중요한 역할을 할 수 있다. 인간에서의 TGF β 1의 기능은, TGF β 1 그 자체 또는 그의 신호전달 이펙터를 수반하는 유전장애에 의해 보여지는 바와 같이 복잡하다. TGF β 경로의 활성을 증가시키는 돌연변이는 골 대사에서 (즉, 카무라티-엥겔만(Camurati-Engelmann) 병), 결합 조직에서 (즉, 마판(Marfan) 증후군), 및 대동맥류 (즉, 로이-디에츠(Loeys-Dietz) 증후군)에서 결함을 일으킨다. TGF β 경로의 활성을 감소시키는 돌연변이는 암과 관련이 있다. 그러나, TGF β 또한 종양 성장 및 전이를 증진시킬 수 있는 바, 암에서 종양 억제 인자로서의 TGF β 의 역할은 간단하지만은 않다.

[0011]

TGF β 의 여러가지 본질적 기능에도 불구하고, 범-TGF β 중화 항체를 단일 용량으로 또는 단기간 투여하는 것은 상당한 내성을 가지고 있다. 설치류에서 기관 섬유증 또는 암종 세포 성장 및 전이를 억제시키는 용량에서는 어떤 부작용도 관찰되지 않았다. 이러한 치료는 또한 실험상의 섬유증을 효과적으로 억제시킨다. 전이성 신장 세포 암종, 흑색종, 초점성 분절성 사구체경화증, 및 특발성 폐 섬유증 (겐자임 코포레이션(Genzyme Corporation), genzymeclinicalresearch.com에서 이용가능)에 대한, 단일 용량의 중화 범-TGF β 항체를 이용한 I/II상 임상 시험은 현재 진행 중에 있다.

발명의 내용

[0012]

본 발명의 간단한 개요

[0013]

본원에서는 α v β 8에 의해 매개되는 TGF β 활성 증가와 관련된 장애를 진단 및 치료하는 데 사용될 수 있는 항체 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, α v β 8에 특이적으로 결합하는 단리된 항체로서, 여기서 단리된 항체는 활성인 성숙 TGF β 웨პ티드의 방출은 억제시키지만, α v β 8-발현 세포 상의 α v β 8에 대한 잠재성 TGF β 의 부착은 유의하게 억제시키지 않고, 여기서 단리된 항체는 고정된 α v β 8-발현 세포 (예컨대, 포르말린에 고정)에 결합하는 것인, 단리된 항체를 제공한다. 이러한 활성을 갖는 항체를 11E8이라고 지칭하고, 상기 용어는 11E8 항체의 친화도 성숙된, 인간화된, 키메라, 및 표지화된 버전 뿐만 아니라, 그의 α v β 8-결합 단편도 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 항체는 서열 1 내에 존재하는 β 8 상의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 10에 제시된 중쇄 CDR (서열 48, 49, 및 50)을 포함한다. 일부 실시양태에서,

항체는 서열 11에 제시된 경쇄 CDR (서열 51, 52, 및 53)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 10에 제시된 중쇄 CDR 및 서열 11에 제시된 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 10에 제시된 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 11에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 10에 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열 11에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 11E8Mut28의 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 11E8Mut28의 중쇄 가변 영역 서열 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 11E8Mut94의 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 11E8Mut94의 중쇄 가변 영역 서열 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 11E8Mut39의 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 항체는 높은 친화도로, 예컨대 항- α v β 8 항체 37E1보다 더 높은 친화도로, 나노몰 또는 피코몰 범위의 친화도로, 또는 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} 이하의 Kd로 β 8 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 단리된 항체는 50 kD 미만, 25 kD 미만이거나, 또는 단일 쇄 항체 (예컨대, scFv)이다. 일부 실시양태에서, 항- α v β 8 항체 37E1 또는 37E1B5는 α v β 8-발현 세포 상의 α v β 8에 대한 결합에 대하여 11E8 항체와 경쟁한다. 본원에 기술된 단리된 항체 및 제약 부형제를 포함하는 제약 조성물 또한 제공한다.

[0014]

α v β 8에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체로서, 여기서 단리된 항체는 활성인 성숙 TGF β 웨티드의 방출은 억제시키지만, α v β 8-발현 세포 상의 α v β 8에 대한 잠재성 TGF β 의 부착은 유의하게 억제시키지 않는 것인, 인간화된 항체를 추가로 제공한다. 이러한 활성을 갖는 항체를 h37E1B5 (인간화된 37E1B5 또는 Hu37E1B5)라고 지칭하고, 상기 용어는 표지화된 h37E1B5 및 그의 α v β 8-결합 단편을 의미한다. 일부 실시양태에서, 인간화된 항체는 서열 1 내에 존재하는 β 8 상의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 인간화된 항체는 높은 친화도로, 예컨대 항- α v β 8 항체 37E1보다 더 높은 친화도로, 나노몰 또는 피코몰 범위의 친화도로, 또는 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} 이하의 Kd로 β 8 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 단리된 항체는 50 kD 미만, 25 kD 미만이거나, 또는 단일 쇄 항체 (예컨대, scFv)이다. 일부 실시양태에서, 인간화된 항체는 서열 8의 중쇄 가변 영역 및 서열 9의 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간화된 항체는 서열 8의 중쇄 가변 영역 및 서열 9의 경쇄 가변 영역을 가진다. 본원에 기술된 인간화된 항체 및 제약 부형제를 포함하는 제약 조성물 또한 제공한다.

[0015]

α v β 8에 의해 매개되는 TGF β 활성 증가와 관련된 장애를 진단하는 데 사용될 수 있는 항체 조성물 또한 제공한다. 일부 실시양태에서, α v β 8에 특이적으로 결합하는 단리된 항체로서, 여기서 항체는 활성인 성숙 TGF β 웨티드의 방출, 또는 α v β 8-발현 세포 상의 α v β 8에 대한 잠재성 TGF β 의 부착을 억제시키지 않고, 여기서 단리된 항체는 고정된 (예컨대, 포르말린에 고정) α v β 8-발현 세포 또는 조직에 결합하고, 여기서 항체가 세포 또는 조직에서 α v β 8 발현 수준을 구별짓는 것인 (예컨대, 항체는 상이한 세포 상의 α v β 8 발현 수준을 비교하는 데 사용될 수 있는 것인), 단리된 항체를 제공한다. 이러한 활성을 갖는 항체를 6B9 및 4F1이라고 지칭하고, 이는 6B9 및 4F1 항체의 친화도 성숙된, 인간화된, 키메라, 및 표지화된 버전 뿐만 아니라, 그의 α v β 8-결합 단편도 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 항체는 서열 14 내에 존재하는 β 8 상의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 인간 β 8의 S95를 포함하며, 인간 β 8의 전장의 서열은 서열 17에 제시되어 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 18에 제시된 중쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 19에 제시된 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 18에 제시된 중쇄 CDR 및 서열 19에 제시된 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 18에 제시된 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 19에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 18에 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열 19에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 6B9Mut1의 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 6B9Mut1의 중쇄 가변 영역 서열 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 20에 제시된 중쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 21에 제시된 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 20에 제시된 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 21에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 20에 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열 21에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 항체는 높은 친화도로, 예컨대 나노몰 또는 피코몰 범위의 친화도로, 또는 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} 이하의 Kd로 β 8 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 단리된 항체는 50 kD 미만, 25 kD 미만이거나, 또는 단일 쇄 항체 (예컨대, scFv)이다. 일부 실시양태에서, 항- α v β 8 항체 6B9 또는 4F1은 α v β 8-발현 세포 상의 α v β 8에 대한 결합에 대하여 37E1, 37E1B5, 또는 11E8 항체와 결합에 대해 경쟁하지 않는다. 본원에 기술된 단리된 항체 및 제약 부형제를 포함하는 제약 조성물 또한 제공한다.

된 항체 및 제약 부형제를 포함하는 제약 조성물을 또한 제공한다.

[0016] 본원에서는 (상기 기술된 바와 같은) 개체에게 11E8 또는 h37E1B5 항체를 포함하는 제약 조성물을 투여하여 개체에서 TGF β 신호전달을 감소시키는 것을 포함하는, 개체에서 TGF β 신호전달을 감소시키는 (TGF β 활성을 감소시키거나, 활성인 성숙 TGF β 의 방출을 감소시키는) 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 개체는 염증성 장질환 (IBD), 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 천식, 관절염, 간 섬유증, 폐 섬유화 장애, 염증성 뇌 자가면역 질환, 다발성 경화증, 탈수초성 질환, 신경염증, 신장 질환, 선암종, 편평세포 암종, 신경교종, 및 유방 암종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 병증 (질환, 장애)을 앓는 개체이고; TGF β 신호전달의 감소로 병증은 호전된다.

[0017] 개체로부터의 세포를 상기 기술된 바와 같은 11E8, 6B9, 또는 4F1 항체와 접촉시키는 단계, 및 세포에 대한 단리된 항체의 결합을 검출하는 단계를 포함하며, 단리된 항체가 세포에 결합하였다면, 이는 개체가 α v β 8 관련 장애를 앓고 있음을 나타내는 것인, 개체에서 α v β 8 관련 장애를 진단하는 방법을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, α v β 8 관련 장애는 염증성 장 질환 (IBD), 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 천식, 관절염, 간 섬유증, 폐 섬유화 장애, 염증성 뇌 자가면역 질환, 다발성 경화증, 탈수초성 질환, 신경염증, 신장 질환, 선암종, 편평세포 암종, 신경교종, 및 유방 암종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서 (예컨대, 시험관내 진단 기법에서), 세포는 고정된 것이다. 일부 실시양태에서, α v β 8 관련 장애는 IBD이고, 세포는 개체의 장 (예컨대, 결장 또는 창자)으로부터 수득된 것이다. 일부 실시양태에서, α v β 8 관련 장애는 관절염이고, 세포는 개체로부터의 연골세포(chondrocyte) 또는 연골(cartilage) 세포이다. 일부 실시양태에서, α v β 8 관련 장애는 간 섬유증이고, 세포는 개체로부터의 간 성상 세포이다. 일부 실시양태에서, α v β 8 관련 장애는 천식, COPD, 또는 폐 섬유증이고, 세포는 개체의 기도로부터 수득된 것이다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 개체에게 (11E8, 37E1B5, 또는 h37E1B5 항체를 포함하는) 제약 조성물을 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0018] 시험 세포 상에서의 상대적인 α v β 8 발현 수준을 측정하는 방법을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 시험 세포를 6B9 항체와 접촉시키는 단계, 시험 세포에의 6B9 항체 결합을 검출하는 단계, 및 6B9 항체의 결합 수준을 대조군 세포의 것과 비교하여 시험 세포 상에서의 상대적인 α v β 8 발현 수준을 측정하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 시험 세포를 4F1 항체와 접촉시키는 단계, 시험 세포에의 4F1 항체 결합을 검출하는 단계, 및 4F1 항체의 결합 수준을 대조군 세포의 것과 비교하여 시험 세포 상에서의 상대적인 α v β 8 발현 수준을 측정하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 시험 세포는 고정된 (예컨대, 포르말린에 고정) 것이다. 일부 실시양태에서, 대조군 세포는 고정된 것이다. 일부 실시양태에서, 대조군 세포는 야생형인 비-암 세포이다. 일부 실시양태에서, 대조군 세포는 (α v β 8 관련 장애를 앓지 않는 개체로부터의) 건강한 세포이다. 일부 실시양태에서, 발현 수준은 세포 중의 계놈 β 8 복제수를 나타내며, 따라서, 예컨대 상대적인 발현 수준이 비-암 대조군보다 더 높다면, 이는 시험 세포 중의 계놈 β 8 복제수가 증가되어 있음을 나타내는 것이다. 일부 실시양태에서, 시험 세포는 개체로부터의 생물학적 샘플 (예컨대, 시험관내 유체 또는 조직샘플)로 존재한다. 일부 실시양태에서, 시험 세포는 개체에서 계내에 존재한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 시험 세포에서 α v β 8 발현이 정상보다 높을 경우, 개체를 (본원에 기술된 것과 같은) α v β 8 관련 장애를 앓는 것으로 진단하는 단계를 추가로 포함한다. 대조군 세포는 (예컨대, 정상적인 발현 수준을 나타내는) 건강한 개체로부터의 것일 수 있거나, 또는 양성 대조군, 예컨대 α v β 8 발현이 증가되어 있는 것으로 알려져 있거나, 또는 α v β 8 관련 장애를 앓는 개체로부터의 것인 양성 대조군일 수 있다.

[0019] α v β 8에 특이적으로 결합하는 단리된 항체로서, 여기서 상기 항체는 활성인 성숙 TGF β 웨티드의 방출, 또는 α v β 8-발현 세포 상의 α v β 8에 대한 잠재성 TGF β 의 부착을 억제시키지 않는 것인, 단리된 항체를 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 단리된 항체는 서열 1 내에 존재하는 β 8 상의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 이러한 활성을 갖는 항체를 14E5라고 지칭하고, 상기 용어는 14E5 항체의 친화도 성숙된, 인간화된, 키메라, 및 표지화된 버전 뿐만 아니라, 그의 α v β 8-결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 12에 제시된 중쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 13에 제시된 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 12에 제시된 중쇄 CDR 및 서열 13에 제시된 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 14E5Mut11, 14E5Mut42, 14E5Mut54, 14E5Mut68, 14E5Mut65, 14E5Mut83, 및 14E5Mut95로 이루어진 군으로부터 선택되는 친화도 성숙된 항체의 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 12에 제시된 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 13에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 12에 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열 13에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 14E5Mut11, 14E5Mut42, 14E5Mut54, 14E5Mut68, 14E5Mut65, 14E5Mut83, 및 14E5Mut95로 이루어진 군으로부터 선택되는 친화도 성숙된 항체의 중쇄 가변 영역 서열 및 경쇄 가변 영역 서열

을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 항체는 높은 친화도로, 예컨대 항- $\alpha\text{v}\beta 8$ 항체 37E1보다 더 높은 친화도로, 나노몰 또는 피코몰 범위의 친화도로, 또는 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} 이하의 Kd로 $\beta 8$ 애피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 단리된 항체는 50 kD 미만, 25 kD 미만이거나, 또는 단일 쇄 항체 (예컨대, scFv)이다. 일부 실시양태에서, 항- $\alpha\text{v}\beta 8$ 항체 37E1 또는 37E1B5는 $\alpha\text{v}\beta 8$ -발현 세포 상의 $\alpha\text{v}\beta 8$ 에 대한 결합에 대하여 14E5 항체와 경쟁한다.

[0020] 세포를 14E5 항체와 접촉시키는 단계, 및 항체가 상기 세포에 결합하였는지 여부를 측정하는 단계를 포함하고, 항체가 상기 세포에 결합하였다면, 이는 $\alpha\text{v}\beta 8$ -발현 세포가 존재함을 나타내는 것인, $\alpha\text{v}\beta 8$ -발현 세포의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 접촉 단계는 생체내에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 접촉 단계는 시험관내에서 수행된다.

[0021] 상기 방법은 개체로부터의 세포를 상기 기술된 바와 같은 14E5 항체와 접촉시키는 단계, 및 세포에 대한 단리된 항체의 결합을 검출하는 단계를 포함하며, 단리된 항체가 세포에 결합하였다면, 이는 개체가 $\alpha\text{v}\beta 8$ 관련 장애를 앓고 있음을 나타내는 것인, 개체에서 $\alpha\text{v}\beta 8$ 관련 장애를 진단하는 방법에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, $\alpha\text{v}\beta 8$ 관련 장애는 염증성 장 질환 (IBD), 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 천식, 관절염, 간 섬유증, 폐 섬유화 장애, 염증성 뇌 자가면역 질환, 다발성 경화증, 탈수초성 질환, 신경염증, 신장 질환, 선암종, 편평세포 암종, 신경교종, 및 유방 암종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, $\alpha\text{v}\beta 8$ 관련 장애는 IBD이고, 세포는 개체의 장 (예컨대, 결장 또는 창자)으로부터 수득된 것이다. 일부 실시양태에서, $\alpha\text{v}\beta 8$ 관련 장애는 관절염이고, 세포는 개체로부터의 연골세포 또는 연골 세포이다. 일부 실시양태에서, $\alpha\text{v}\beta 8$ 관련 장애는 간 섬유증이고, 세포는 개체로부터의 간 성상 세포이다. 일부 실시양태에서, $\alpha\text{v}\beta 8$ 관련 장애는 천식, COPD, 또는 폐 섬유증이고, 세포는 개체의 기도로부터 수득된 것이다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 개체에게 (11E8, 37E1B5, 또는 h37E1B5 항체를 포함하는) 제약 조성물을 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 37E1, 37E1B5, 및 인간화된 37E1B5 항체에 대한 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 정렬을 보여주는 것이다. CDR 및 프레임워크 서열은 표시되어 있다.

도 2는 ITGB8 트랜스제닉 마우스에서 간 성상 세포 상의 인간 $\beta 8$ 의 발현을 보여주는 것이다. 14E5 항체를 사용하여 측정된 것으로서, 상단 패널은 이소형 대조군을 보여주는 것인 반면, 하단 패널은 $\beta 8$ 발현을 보여주는 것이다.

도 3은 폐 폐포 대식세포, 수지상 세포, 종격 림프절 세포, T 및 B 세포 상의 $\beta 8$ 의 발현을 보여주는 것이며, 다른 기관들에서의 염색 데이터에 관한 요약을 제공하는 것이다. A) 폐 대식세포: 자가형광성+, CD11Chi+, F480+, CD8+, CD11B-, Ly6G-, CD103-, Ly6C+/-, TCR-; B) 폐 수지상 세포: 자가형광성-, CD11C 중간+, F480 (대개는 음성), CD8+, CD11B+, CD103+/-, Ly6C+/-, TCR-, Ly6G-, GR-1-C) C) 폐 T 세포: TCR $\alpha\beta$ +, CD3+, B220-, 클래스 II-, CD19-, 비-자가형광성; D) 폐 B 세포: TCR $\alpha\beta$ -, CD3-, B220+, 클래스 II+, CD19+, 비-자가형광성; E) MLN 수지상 세포: 자가형광성-, CD11C 중간+, CD11B+, 클래스 II MHC hi, F480-, Ly6C+/-, Ly6G- (아마도 CD8+, CD103+/-, GR-1+/-); F) MLN B 세포: TCR $\alpha\beta$ -, CD3-, B220+, 클래스 II+, CD19+, 비-자가형광성; G) 다중 기관에서의 염색 데이터에 관한 요약표. 염색은 하이브리도마 클론 14E5를 사용하여 수행하였다.

도 4는 BACtg 마우스에서 37E1B5 투여가 소장 크기 (염증)에 미치는 효과를 보여주는 것이다.

도 5는 대조군 (비처리) 및 37E1B5 처리된 BACtg 마우스의 소장의 단면을 찍은 사진을 보여주는 것이다.

도 6은 항체 4F1 및 6B9가 $\beta 8$ 을 발현하는 포르말린-고정된 293 세포 (293 B8)에 특이적으로 결합하고, 그를 염색시키지만, 비-형질감염된 293 세포 (293 WT)에는 그렇지 못하다는 것을 보여주는 것이다. 항체는 또한 인테그린 $\beta 8$ 트랜스제닉 마우스로부터의 포르말린-고정된 뇌 절편을 염색시킨다 (ITGB8 BAC).

도 7은 하이브리도마 클론 4F1이 ITGB8 BAC 트랜스제닉 (Tg) 마우스의 포르말린-고정된, 파라핀-포매된 뇌 및 폐를 특이적으로 염색시킨다는 것을 보여주는 것이다. ITGB8 BAC Tg 또는 야생형 (WT) 마우스의 뇌 또는 폐를 10% 완충처리된 포르말린 중에서 밤새도록 고정시키고, 조직을 프로세싱하고, 파라핀에 포매시키고, 절편으로 만들었다. 상기와 동일한 항원 열 회수를 사용하여 면역염색을 수행하고, 시판용 키트 (다코(Dako))를 사용하여 항체를 검출하였다.

도 8은 포르말린-고정된, 파라핀-포매된 ITGB8 BAC 트랜스제닉 (Tg) 마우스 뇌의 면역염색에 의해 제시되는 바

와 같이, 하이브리도마 클론 6B9가 복제수 변이를 검출할 수 있다는 것을 보여주는 것이다. WT (하단 패널)와 비교하여 3종의 Tg 마우스 계통 (B, C, 및 D)이 제시되어 있다. 복제수는 하기와 같다: 1개의 복제물 (D-계통 BAC/WT), 2개의 복제물 (B 및 C-계통 BAC/WT; D-계통 BAC/BAC) 또는 4개의 복제물 (B 및 C-계통 BAC/BAC).

도 9는 포르말린-고정된, 파라핀-포매된 *ITGB8* BAC 트랜스제닉 (Tg) 마우스 폐의 면역염색에 의해 제시되는 바와 같이, 클론 4F1의 가변 도메인으로부터 유래된 재조합 모노클로날 토끼 IgG가 복제수 변이를 검출할 수 있다는 것을 보여주는 것이다. WT (하단 패널)와 비교하여 3종의 Tg 마우스 계통 (B, C, 및 D)이 제시되어 있다. 복제수는 하기와 같다: 1개의 복제물 (D-계통 BAC/WT), 2개의 복제물 (B 및 C-계통 BAC/WT; D-계통 BAC/BAC) 또는 4개의 복제물 (B 및 C-계통 BAC/BAC).

도 10은 포르말린-고정된, 파라핀-포매된 인간 섬유화 폐의 면역염색에 의해, 클론 4F1의 가변 도메인으로부터 유래된 재조합 모노클로날 토끼 IgG가 $\alpha v\beta 8$ 발현을 검출할 수 있다는 것을 보여주는 것이다. 화살표 표시는 방추상 세포의 염색부를 가리키는 것으로서, 이는 조밀한 섬유 결합 조직에 포매된 섬유모세포를 나타내는 것이다.

도 11a-b는 각종의 발견된 항체, 및 이어서 친화도 성숙된 변이체 ("Mut"로 지명)에 대한 중쇄 가변 서열을 보여주는 것이다. 굵은체 및 밑줄체로 표시된 아미노산은 원래의 ("wt") 항체 중쇄 가변 영역 서열로부터의 변이를 가리키는 것이다.

도 12a-b는 각종의 발견된 항체, 및 이어서 친화도 성숙된 변이체 ("Mut"로 지명)에 대한 경쇄 가변 서열을 보여주는 것이다. 굵은체 및 밑줄체로 표시된 아미노산은 원래의 ("wt") 항체 경쇄 가변 영역 서열로부터의 변이를 가리키는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023]

본 발명의 상세한 설명

[0024]

I. 도입

[0025]

형질전환 성장 인자 β (TGF β)는 원래 비-신생물성 세포에서 형질전환된 표현형을 유도할 수 있는 종양유전자인 것으로서 특징이 규명되었다. 그 아래로 유사한 아미노산 도메인의 존재에 기초하여 다수의 TGF β 패밀리 구성원의 특징이 규명되었다.

[0026]

일부 TGF β 이소형은 포유동물에서 편재하여 발현되지만 (TGF β 1-3), TGF β 의 잠재성 관련 도메인 (LAP)인 프로펩티드와의 비-공유 상호작용에 의해 불활성 형태로 유지된다. TGF β 가 신호를 전달하기 위해서는 TGF β 활성화라고 불리는 과정에 의해 그의 불활성 복합체로부터 유리되어야 한다. 잠재성 TGF β 복합체는 3개의 성분: 활성 (성숙) TGF β 이량체, LAP (잠재성 관련 펩티드) 및 LTBP (잠재성 TGF β 결합 단백질)를 포함한다. LAP는 TGF β 전구체 단백질의 N 말단 단부를 나타내는, 이황화 결합에 의해 연결된 이량체이다. 성숙한 TGF β 단백질은 전구체의 C 말단 단부 (약 25 kD)를 나타낸다. TGF β 와 LAP 사이의 결합은 골지 내에서 단백질 분해 방식으로 절단되지만, TGF β 프로펩티드는 비-공유 상호작용에 의해 TGF β 에 결합되어 있는 상태 그대로 남아있다. TGF β 및 LAP로 이루어진 복합체는 소형 잠재성 복합체 (SLC)로 명명된다. 이는 잠재성을 부여하는 LAP 및 TGF β 의 회합물이다. LAP-TGF β 결합은 가역적이고, 단리된 정제된 성분은 재조합하여 불활성 SLC를 형성할 수 있다. SLC 및 보다 더 큰 복합체, 이 둘 모두는 불활성이기 때문에, 본원에서는 잠재성 TGF β 라고 지칭한다.

[0027]

일반적으로, 인테그린은 부착 분자이고, 세포의 세포외 기질 단백질에의 부착을 매개한다. 인테그린 $\alpha v\beta 8$ 은 TGF β 의 LAP에 결합하고, TGF β 1 및 3의 활성화를 매개한다 (문헌 [Mu et al., (2002) *J. Cell Biol.* 159:493]). TGF β 의 인테그린 $\alpha v\beta 8$ -매개 활성화는 TGF β 의 생체내 활성화 (즉, 성숙 TGF β 폴리펩티드의 방출)에 요구되며, 따라서, $\alpha v\beta 8$ 은 TGF β 기능의 게이트키퍼(gatekeeper)가 된다. 인테그린 $\alpha v\beta 8$ 은 정상적인 상피 (예컨대, 기도 상피), 중간엽 세포, 및 뉴런 조직에서 발현된다. 본원에서 밝혀진 결과를 통해 TGF β 의 인테그린 $\alpha v\beta 8$ -매개 활성화가 COPD, 폐 섬유증, 관절염, 염증성 장 질환, 간 및 신장 섬유증, 염증성 뇌 자가 면역 질환 및 탈수초성 질환 (예컨대, MS, 횡단 척수염, 데빅병(Devic's disease), 길랭-바레(Guillain-Barre)증후군), 신경염증, 신장 질환, 및 암 성장 및 전이를 일으킬 수 있는 것으로 나타났다.

[0028]

II. 정의

[0029]

달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 기술 및 과학 용어는 당업계의 숙련가가 통상 이해하고 있는 것과 같은 의미를 가진다. 예컨대, 문헌 [Lackie, DICTIONARY OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier (4th ed.

2007)]; [Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989)]를 참조할 수 있다. 본원에 기술된 것과 유사하거나, 등가인 임의의 방법, 장치 및 물질이 본 발명을 실시하는 데 사용될 수 있다. 하기 정의는 본원에서 빈번하게 사용되는 특정 용어가 쉽게 이해될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이며, 본 개시내용의 범주를 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0030] "항- α v β 8 항체," " α v β 8 특이적 항체," " α v β 8 항체," 및 "항- α v β 8"이라는 용어는 본원에서 동의어로 사용되며, 이는 α v β 8에 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 유사하게, 항- β 8 항체 (및 유사 용어)는 β 8에 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본원에 기술된 항- α v β 8 항체 및 항- β 8 항체는 α v β 8 발현 세포 상에서 발현된 단백질에 결합한다.

[0031] 고정된 세포는 특정 규명을 위해 세포 대사를 억제시키고, 세포를 보존하기 위하여 처리된 것이다. 고정은 예컨대 조직학적 방법에 의해 세포학적 특징을 관찰하거나, 면역염색법 및/또는 유세포 측정법에 의해 세포 표면마커 발현을 관찰하기 위해서 당업계에서 통상 실시되는 것이다. 당업자는 예컨대, 포르말린, 포름알데히드, 파라포름알데히드, 메탄올, 아세톤 등을 포함하는 다수의 공지 고정액 중 임의의 것에서 고정될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 조직도 유사한 방식으로 고정될 수 있다.

[0032] α v β 8-관련 장애란 정상적인, 비-이환 대조군과 비교하여 α v β 8를 증가된 수준으로 발현하는 세포, 또는 α v β 8-발현 세포의 수가 증가되어 있는 것인 α v β 8-발현 세포의 존재를 특징으로 하는 병증이다. TGF β -관련 장애 (정상적인 TGF β 활성보다 더 높은 것을 특징으로 하는 장애)는, 본원에 기술되어 있는 바와 같이, α v β 8이 특정 환경하에서는 TGF β 를 활성화시키는 데 관여하기 때문에, α v β 8-관련 장애도 포함한다.

[0033] "핵산"은 단일 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 및 그의 중합체, 및 그의 상보체를 의미한다. "폴리뉴클레오티드"라는 용어는 선형의 뉴클레오티드 서열을 의미한다. "뉴클레오티드"라는 용어는 전형적으로 폴리뉴클레오티드의 단일 유닛, 즉, 단량체를 의미한다. 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 또는 그의 변형된 버전일 수 있다. 본원에서 고려되는 폴리뉴클레오티드의 예로는 단일 및 이중 가닥 DNA, 단일 및 이중 가닥 RNA (siRNA 포함), 및 단일 및 이중 가닥 DNA 및 RNA의 혼합물을 갖는 하이브리드 분자를 포함한다.

[0034] "상보적" 또는 "상보성"이라는 단어는 폴리뉴클레오티드 중의 핵산이 제2 폴리뉴클레오티드 중의 또 다른 핵산과 염기쌍을 형성할 수 있는 능력을 의미한다. 예를 들어, 서열 A-G-T는 서열 T-C-A와 상보적이다. 상보성은 염기쌍 형성에 따라 핵산 중 단지 일부만이 매칭되는 부분적인 상보성일 수 있거나, 또는 염기쌍 형성에 따라 핵산 모두가 매칭되는 완전한 상보성일 수 있다.

[0035] 핵산 하이브리드화 기법을 사용하는 각종의 구체적인 DNA 및 RNA 측정 방법은 당업자에게 공지되어 있다 (문헌 [Sambrook, 상기 문헌과 동일] 참조). 일부 방법은 전기영동 분리 (예컨대, DNA를 검출하기 위한 써던 블롯, 및 RNA를 검출하기 위한 노던 블렛)를 포함하지만, DNA 및 RNA 측정은 또한 전기영동 분리 없이도 수행될 수 있다 (예컨대, 정량적 PCR, 도트 블롯, 또는 어레이).

[0036] "단백질," "펩티드," 및 "폴리펩티드"라는 단어는 상호교환적으로 사용되며, 이는 아미노산 중합체, 또는 2개 이상의 상호작용 또는 결합 아미노산 중합체로 이루어진 한 세트를 의미한다. 상기 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 천연적으로 발생된 아미노산 중합체 뿐만 아니라, 변형된 잔기를 함유하는 상응하는 천연적으로 발생된 아미노산의 인공 화학적 모방체, 및 비-천연적으로 발생된 아미노산 중합체에도 적용된다.

[0037] "아미노산"이라는 용어는 천연적으로 발생된 아미노산 및 합성 아미노산 뿐만 아니라, 천연적으로 발생된 아미노산과 유사하게 작용하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 의미한다. 천연적으로 발생된 아미노산은 유전자 코드에 의해 코딩된 것 뿐만 아니라, 후에 변형되는 아미노산, 예컨대 히드록시프롤린, γ -카르복시글루타메이트, 및 O-포스포세린이다. 아미노산 유사체는 천연적으로 발생된 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 갖는 화합물, 예컨대 a 탄소가 수소, 카르복실 기, 아미노기, 및 R 기, 예컨대 호모세린, 노르류신, 메티오닌 술록시드, 메티오닌 메틸 술포늄에 결합되어 있는 것을 의미한다. 상기 유사체는 변형된 R 기 (예컨대, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 골격을 가질 수 있지만, 천연적으로 발생된 아미노산과 동일한 기본 화학 구조는 유지한다. 아미노산 모방체는 아미노산의 일반 화학 구조와는 상이한 구조를 가지지만, 천연적으로 발생된 아미노산과 유사하게 작용하는 화학 화합물을 의미한다.

[0038] 아미노산은 본원에서 그에 대해 통상적으로 알려져 있는 3문자 기호에 의해, 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명 위원회(Biochemical Nomenclature Commission)에 의해 권고되는 1문자 기호로 언급될 수 있다. 유사하게, 뉴클레오티드는 그에 대해 통상적으로 허용되는 1문자 코드에 의해 언급될 수 있다.

- [0039] "보존적으로 변형된 변이체"는 아미노산 및 핵산 서열 둘 모두에 적용된다. 특정 핵산 서열과 관련하여, 보존적으로 변형된 변이체란 동일하거나 또는 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산, 또는 핵산이 아미노산 서열을 본질적으로 동일하거나 화합된, 예컨대 천연적으로 인접한 서열로 코딩하지 않는 핵산을 의미한다. 유전자 코드의 축퇴성에 기인하여, 다수의 기능적으로 동일한 핵산이 대부분의 단백질을 코딩하게 된다. 예를 들어, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU, 이들은 모두 아미노산 알라닌을 코딩한다. 따라서, 코돈에 의해 알라닌으로 명시된 모든 위치에서 코돈은 코딩된 폴리펩티드를 변경시키지 않고, 기술된 상응하는 코돈 중 또 다른 것으로 변경될 수 있다. 상기 핵산 변이는 보존적으로 변형된 변이 중 한 종인 "침묵 변이"이다. 폴리펩티드를 코딩하는 본원의 모든 핵산 서열은 또한 핵산의 침묵 변이를 기술한다. 당업자는 특정 정황에서 핵산 중의 각 코돈 (보통 메티오닌에 대한 유일의 코돈인 AUG, 및 보통 트립토판에 대한 유일의 코돈인 TGG는 예외)이 변형될 수 있고, 이로써 기능상 동일한 분자를 수득할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 침묵 변이는 실제 프로트 서열이 아닌, 발현 생성물과 관련하여 기술된 서열에 내포되어 있다.
- [0040] 아미노산 서열과 관련하여, 당업자는 코딩된 서열 중 단일 아미노산 또는 소수의 아미노산을 변경, 부가 또는 결실시키는, 핵산, 웨티드, 폴리펩티드 또는 단백질 서열에 대한 개별 치환, 결실, 또는 부가가, 그러한 변경을 통해 아미노산이 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환되는 "보존적으로 변형된 변이체"라는 것을 이해할 것이다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환표는 당업계에 주지되어 있다. 상기 보존적으로 변형된 변이체는 추가로 본 발명의 다형체 변이체, 중간 상동체, 및 대립유전자이며, 그를 배제시키지 않는다. 하기 아미노산은 전형적으로 서로에 대하여 보존적 치환을 이룬다: 1) 알라닌 (A), 글리신 (G); 2) 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E); 3) 아스파라진 (N), 글루타민 (Q); 4) 아르기닌 (R), 리신 (K); 5) 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V); 6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W); 7) 세린 (S), 트레오닌 (T); 및 8) 시스테인 (C), 메티오닌 (M) (예컨대, 문헌 [Creighton, *Proteins* (1984)] 참조).
- [0041] 2가지 이상의 핵산 또는 2가지 이상의 폴리펩티드와 관련하여 "동일한" 또는 "동일성(%)"이라는 용어는, 디폴트 파라미터를 이용하는 BLAST 또는 BLAST 2.0 서열 비교 알고리즘을 사용함으로써 측정되거나, 또는 수동 정렬 및 시각적 검사에 의하면, 2가지 이상의 서열 또는 서브서열이 동일하거나, 또는 동일한 명시된 비율의 뉴클레오티드 또는 아미노산 (즉, 비교창 또는 지정된 영역에 걸쳐서 비교되고 최대 일치하도록 정렬되었을 때, 명시된 영역에 걸쳐 약 60% 동일성, 바람직하게 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%)을 가진다는 것을 의미한다. 예컨대, NCBI 웹 사이트 ncbi.nlm.nih.gov/BLAST를 참조할 수 있다. 이어서, 서열은 "실질적으로 동일하다"라고 말할 수 있다. 이러한 정의는 또한 뉴클레오티드 시험 서열의 보체를 의미하거나, 그에도 적용될 수 있다. 상기 정의는 또한 결실 및/또는 부가를 갖는 서열 뿐만 아니라, 치환을 갖는 것도 포함한다. 하기 기술하는 바와 같이, 알고리즘은 캡 등을 처리할 수 있다. 전형적으로, 동일성은 항체 에피토프, 또는 길이가 약 25개 이상의 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이인 서열을 포함하는 영역에 걸쳐, 또는 길이가 50-100개 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이인 영역에 걸쳐, 또는 전장의 참조 서열에 걸쳐 존재한다.
- [0042] "재조합"이라는 용어는 예컨대 세포, 또는 핵산, 단백질 또는 벡터에 대한 언급과 함께 사용되는 경우에, 이러한 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이종성 핵산 또는 단백질의 도입 또는 천연 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 이러한 세포가 이렇게 변형된 세포로부터 유래된다는 것을 가리킨다. 따라서, 예를 들어, 재조합 세포는 천연 (비-재조합) 형태의 세포에서 발견되지 않는 유전자를 발현하거나, 또는 다르게는 비정상적으로 발현되거나 저발현되거나 전혀 발현되지 않는 천연 유전자를 발현한다.
- [0043] "이종성"이라는 용어는 핵산의 일부분에 대한 언급과 함께 사용되는 경우에, 이러한 핵산이 천연에서는 서로에 대해 이와 동일한 관계로 발견되지 않는 2개 이상의 서브서열을 포함한다는 것을 가리킨다. 예를 들어, 이러한 핵산은 전형적으로 새로운 기능적 핵산이 제조되도록 배열된 비관련 유전자들로부터의 2개 이상의 서열, 예컨대 한 공급원으로부터의 프로모터 및 또 다른 공급원으로부터의 코딩 영역을 가지도록 재조합적으로 제조된다. 유사하게, 이종성 단백질은 이러한 단백질이 천연에서는 서로에 대해 이와 동일한 관계로 발견되지 않는 2개 이상의 서브서열을 포함한다는 것을 가리킨다 (예를 들어, 융합 단백질).
- [0044] "항체"라는 용어는 항원, 예컨대 β 8, 특정 세포 표면 마커, 또는 임의의 원하는 표적에 특이적으로 결합하고 이를 인식하는, 면역글로불린 유전자로부터의 프레임워크 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 그의 단편을 의미한다. 전형적으로, "가변 영역"은 항체의 항원-결합 영역 (또는 그의 기능적 등가물)을 포함하고, 결합 특이성 및 친화도에 있어서 가장 중요하다. 문헌 [Paul, *Fundamental Immunology* (2003)]을 참조할 수 있다.
- [0045] 예시적인 면역글로불린 (항체) 구조 단위는 사량체를 포함한다. 각 사량체는 2개의 동일한 폴리펩티드 쇄 쌍으로

로 이루어지는데, 각 쌍은 하나의 "경쇄" (약 25 kD)와 하나의 "중쇄" (약 50-70 kD)를 가진다. 각 쇄의 N-말단은 주로 항원 인식을 담당하는, 약 100 내지 110개 이상의 아미노산으로 이루어진 가변 영역을 정의한다. 가변 경쇄 (V_L) 및 가변 중쇄 (V_H)라는 용어는 각각 이를 경쇄 및 중쇄를 의미한다.

[0046] "이소형"은 중쇄 불변 영역에 의해 정의되는 항체 부류이다. 면역글로불린 유전자는 카파, 람다, 알파, 감마, 델타, 엡실론 및 뮤 불변 영역 유전자를 포함한다. 경쇄는 카파 또는 람다로 분류된다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 엡실론으로 분류되고, 이는 결과적으로 각각 이소형 부류 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 정의한다.

[0047] 항체는 무손상 면역글로불린으로서, 또는 특이적 항원-결합 활성을 포함하는, 다수의 특징이 잘 규정된 단편들 중 임의의 것으로서 존재할 수 있다. 상기 단편은 각종 웨티다제에 의한 분해에 의해 생산될 수 있다. 웨신은 힌지 영역 내의 이황화 결합 아래에서 항체를 분해시켜, Fab 그 자체가 이황화 결합에 의해 V_H -C_H1에 연결된 경쇄인 Fab의 이량체, $F(ab)'_2$ 를 생산한다. $F(ab)'_2$ 는 경미한 조건하에 환원되어 힌지 영역 내의 이황화 결합이 파괴됨으로써 $F(ab)'_2$ 이량체가 Fab' 단량체로 전환될 수 있다. Fab' 단량체는 본질적으로 힌지 영역의 일부를 포함하는 Fab이다 (문헌 [Fundamental Immunology (Paul ed., 3d ed. 1993)] 참조). 다양한 항체 단편이 무손상 항체의 분해에 의해 정의되지만, 당업자는 이같은 단편들을 화학적으로 또는 재조합 DNA 방법을 사용함으로써 새로 합성할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본원에서 사용되는 바, 항체라는 용어는 전체 항체의 변형에 의해 제조된 항체 단편, 또는 재조합 DNA 방법을 사용하여 새로 합성된 것 (예컨대, 단일 쇄 Fv) 또는 과자디스플레이 라이브러리를 사용하여 확인된 것 (예컨대, 문헌 [McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990)] 참조)을 또한 포함한다.

[0048] "모노클로날 항체"란 항원 상의 주어진 에피토프에 대하여 단일의 결합 특이성 및 친화도를 갖는 클로날 항체 시료를 의미한다. "폴리클로날 항체"란 단일 항원에 대한 것이지만, 상이한 결합 특이성 및 친화도를 갖는 항체 시료를 의미한다.

[0049] 본원에서 사용되는 바, "V-영역"은 프레임워크 1, CDR1, 프레임워크 2, CDR2, 프레임워크 3, CDR3, 및 프레임워크 4의 세그먼트를 포함하는 항체 가변 영역 도메인을 의미한다. 이들 세그먼트는 B-세포 분화 동안 중쇄 및 경쇄 V-영역의 재배열의 결과로서 V-세그먼트 내에 포함된다.

[0050] 본원에서 사용되는 바, "상보성-결정 영역 (CDR)"은 경쇄 및 중쇄 가변 영역에 의해 확립된 4개의 "프레임워크" 영역 사이에 개입되어 중단시키는, 각 쇄 내의 존재하는 3개의 초가변 영역을 의미한다. CDR은 주로 항원의 에피토프에의 결합을 담당한다. 각 쇄의 CDR은 전형적으로 N-말단으로부터 출발하여 번호상 순차적으로 CDR1, CDR2, 및 CDR3으로 지칭되며, 이는 또한 전형적으로 특정 CDR이 위치하는 쇄에 의해 식별된다. 따라서, V_H CDR3은 그가 발견되는 항체의 중쇄의 가변 도메인 중에 위치하는 반면, V_L CDR1은 그가 발견되는 항체의 경쇄의 가변 도메인으로부터 CDR1인 것이다.

[0051] 상이한 경쇄 및 중쇄의 프레임워크 영역의 서열은 종내에서 상대적으로 보존된다. 구성 요소인 경쇄 및 중쇄의 조합된 프레임워크 영역인, 항체의 프레임워크 영역은 3차원 공간에서 CDR을 배치하고 정렬하는 역할을 한다.

[0052] CDR 및 프레임워크 영역의 아미노산 서열은 당업계의 주지된 다양한 정의, 예컨대 카바트(Kabat), 코티아(Chothia), 국제 이뮤노진텍스 데이터베이스(ImmunoGeneTics database: IMGT), 및 AbM을 사용하여 측정될 수 있다 (예컨대, 문헌 [Johnson et al., 상기 문헌 동일]; [Chothia & Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196, 901-917]; [Chothia et al., (1989) *Nature* 342, 877-883]; [Chothia et al., (1992) *J. Mol. Biol.* 227, 799-817]; [Al-Lazikani et al., *J. Mol. Biol.* 1997, 273(4)] 참조). 항원 조합 부위의 정의는 또한 하기에 기술되어 있다: 문헌 [Ruiz et al., *Nucleic Acids Res.*, 28, 219-221 (2000)]; 및 [Lefranc *Nucleic Acids Res.* Jan 1;29(1):207-9 (2001)]; [MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 262: 732-745 (1996)]; 및 [Martin et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86, 9268-9272 (1989)]; [Martin, et al., *Methods Enzymol.*, 203: 121-153, (1991)]; [Pedersen et al., *Immunomethods*, 1, 126, (1992)]; 및 [Rees et al., In Sternberg M.J.E. (ed.), *Protein Structure Prediction*. Oxford University Press, Oxford, 141-172 1996] 참조.

[0053] "키메라 항체"는 (a) 불변 영역 또는 그의 일부가 변경, 치환 또는 교환되어 항원 결합 부위 (가변 영역, CDR, 또는 그의 일부)가 상이하거나 변경된 부류, 이펙터 기능 및/또는 종의 불변 영역, 또는 키메라 항체에 새로운 특성을 부여하는 전적으로 상이한 문자 (예컨대, 효소, 독소, 호르몬, 성장 인자, 약물 등)에 연결되거나, 또는 (b) 가변 영역, 또는 그의 일부가 상이하거나 변경된 항원 특이성을 갖는 가변 영역 (예컨대, 상이한 종으로부

터의 CDR 및 프레임워크 영역)으로 변경, 치환 또는 교환된 항체 분자이다.

[0054] 항체는 항원 상의 "에피토프"에 결합한다. 에피토프는 항원 상의 특이적 항체 결합 상호작용 부위이고, 이는 수개의 아미노산 또는 수개의 아미노산의 일부, 예컨대 5 또는 6개 이상, 예컨대 20개 이상의 아미노산, 또는 이들 아미노산의 일부를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 에피토프는 예컨대, 탄수화물, 핵산, 또는 지질로부터의 비-단백질 성분을 포함한다. 일부 경우에서, 에피토프는 3차원 모이어티이다. 따라서, 예를 들어, 표적이 단백질인 경우, 에피토프는 연속적인 아미노산들, 또는 단백질 풀딩에 의해 근접하게 되는, 단백질의 상이한 부분들로부터의 아미노산들 (예를 들어, 불연속 에피토프)로 이루어질 수 있다. 이는 3차원 구조를 형성하는 다른 유형의 표적 분자에 대해서도 마찬가지이다.

[0055] "~에 특이적으로 결합한다"라는 용어는 분자 (예컨대, 항체 또는 항체 단편)가 비-표적 화합물보다 2배 이상 더 큰 친화도로, 예컨대 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 25배, 50배, 또는 100배 이상 더 큰 친화도로 표적에 결합한다는 것을 의미하는 것이다. 예를 들어, β 8에 특이적으로 결합하는 항체는 전형적으로 비- β 8 표적 (예컨대, 상이한 인테그린 서브유닛, 예컨대 β 6)보다 2배 이상 더 큰 친화도로 β 8에 결합하게 될 것이다.

[0056] (예컨대, 항체가 섬유화 세포, 간세포, 연골세포 등에 결합하는 경우와 같이) 세포 유형과 관련하여 "결합한다"라는 용어는 전형적으로 작용제가 세포로 이루어진 순 집단 중의 대다수의 상기 세포에 결합한다는 것을 의미한다. 예를 들어, 주어진 세포 유형에 결합하는 항체는 전형적으로 명시된 세포로 이루어진 집단 중 세포의 2/3 이상에 결합한다 (예컨대, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100%). 당업자는 결합을 결정하는 방법 및/또는 역치에 따라 일부 변동이 일어날 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0057] 본원에서 사용되는 바, 제1 항체의 존재하에서의 표적과 제2 항체의 결합이 제1 항체의 부재하에서의 제2 항체의 결합과 비교하여 검출가능할 정도로 감소되었다면, 제1 항체 또는 그의 항원-결합부는 표적에의 결합에 대하여 제2 항체 또는 그의 항원-결합부와 "경쟁"한다고 본다. 별개로, 제2 항체의 존재하에서의 표적에의 제1 항체의 결합 또한 검출가능할 정도로 감소되는 경우도 있을 수 있지만, 반드시 상기 경우일 필요는 없다. 즉, 제2 항체는 표적에의 제2 항체의 결합을 억제하는 제1 항체 없이도 표적에의 제1 항체의 결합을 억제시킬 수 있다. 그러나, 각 항체가 다른 항체의 그의 동족 에피토프 또는 리간드에의 결합을 검출가능할 정도로 억제시키는 경우, 동일하든 그보다 더 크든 더 작은 상관없이, 항체는 그의 각 에피토프(들)의 결합에 대하여 서로 "교차 경쟁한다"고 말할 수 있다. 경쟁 및 교차-경쟁 항체 둘 모두 본 발명에 포함된다. 당업자에 의해 결정될 수 있는 바와 같이, "경쟁자" 항체라는 용어는 제1 또는 제2 항체에 적용될 수 있다. 일부 경우에서, 경쟁자 항체 (예컨대, 제1 항체)가 존재할 경우, 제2 항체의 표적에의 결합은 적어도 10%, 예컨대 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 이상만큼 감소되고, 이로써, 예컨대 제2 항체의 표적에의 결합은 제1 (경쟁자) 항체의 존재하에서는 검출되지 않을 수 있다.

[0058] "차별적으로 발현된" 또는 "차별적으로 조절된"이라는 용어는 일반적으로 단백질 또는 핵산 바이오마커가 하나 이상의 다른 샘플과 비교하여 한 샘플에서 과다발현 (상향조절)되거나, 과소발현 (하향조절)되었다는 것을 의미한다. 본 발명과 관련하여, 상기 용어는 일반적으로 정상적인 세포와 비교하여 이환 세포 상의 바이오마커 (예컨대, α v β 8)가 과다발현되었음을 의미한다.

[0059] 예를 들어, "과다발현된" 또는 "상향조절된"이라는 용어는 상호교환적으로 단백질 또는 핵산, 일반적으로 바이오마커가 대조군 수준과 비교하여 검출가능한 정도로 더 크게 전사 또는 번역되었다는 것을 의미한다. 상기 용어는 전사, 전사 후 프로세싱, 번역, 번역 후 프로세싱, 세포 국소화 (예컨대, 세포 기관, 세포질, 핵, 세포 표면), RNA, 및 단백질 안정성에 기인한 과다발현을 포함한다. 과다발현은 mRNA (즉, RT-PCR, 하이브리드화)인지 또는 단백질 (즉, 유세포 측정법, 영상화, ELISA, 면역조직화학적 기법)인지와는 상관없이, 바이오마커를 검출하는 종래 기법을 사용하여 검출될 수 있다. 과다발현은 정상적인 세포와 비교하여 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상일 수 있다.

[0060] "효능제," "활성제," "유도제" 등의 용어는 대조군과 비교하여 활성 또는 발현을 증가시키는 분자를 의미한다. 효능제는 예컨대 표적에 결합하거나, 그를 자극시키거나, 활성화시키거나, 활성화를 증진시키거나, 감작시키거나, 또는 표적의 활성을 상향조절하는 작용제이다. 발현 또는 활성은 대조군에서의 것보다 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 100% 이상으로 증가될 수 있다. 특정 경우에서, 활성화는 대조군과 비교하여 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배 이상이다.

[0061] "억제제," "저해제," 또는 "길항체" 또는 "하향조절인자"라는 용어는 상호교환적으로, 대조군과 비교하였을 때

발현 또는 활성 수준을 검출가능할 정도로 저하시키는 물질을 의미한다. 억제된 발현 또는 활성은 대조군에서의 것보다 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 더 적을 수 있다. 특정 경우에서, 억제는 대조군과 비교하여 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배 이상이다.

[0062] "대조군" 샘플 또는 값은 시험 샘플과의 비교를 위해 참조로서, 일반적으로 공지된 참조로서의 역할을 하는 샘플을 의미한다. 예를 들어, 시험 샘플은 예컨대 시험 화합물의 존재하에서 시험 병증으로부터 채취될 수 있고, 예컨대 시험 화합물의 부재하에서 (음성 대조군), 또는 공지된 화합물의 존재하에서 (양성 대조군) 공지된 병증으로부터 채취된 샘플과 비교될 수 있다. 대조군은 또한 다수의 시험 또는 결과로부터 수집된 평균값을 나타낼 수 있다. 대조군은 임의의 개수의 파라미터를 평가할 수 있도록 디자인될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 예를 들어, 약리학적 데이터 (예컨대, 반감기) 또는 치료학적 척도 (예컨대, 이점 및/또는 부작용 비교)에 기초하여 치료학적 이점을 비교할 수 있도록 대조군을 고안할 수 있다. 시험관내 적용을 위해 대조군을 디자인할 수 있다. 어떤 대조군이 주어진 상황하에서 가치가 있는지, 및 대조군 값과의 비교에 기초하여 데이터를 분석할 수 있는지를 당업자는 이해할 것이다. 대조군은 또한 데이터의 유의도를 측정하는 데에도 가치가 있다. 예를 들어, 대조군에서 주어진 파라미터에 대한 값이 광범위하게 다르게 나타날 경우, 시험 샘플에서의 편차는 유의적인 것으로 간주되지 않을 것이다.

[0063] "표지" 또는 "검출가능한 모이어티"는 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적, 화학적 또는 다른 물리적 수단에 의해 검출가능한 조성물이다. 예를 들어, 유용한 표지로는 ^{32}P , 형광 염료, 전자 고밀도 시약, 효소 (예컨대, 통상 ELISA에서 사용되는 것과 같은 것), 비오틴, 디옥시게닌, 또는 예컨대 방사성 표지를 표적 웨티드와 특이적으로 반응성인 웨티드 또는 항체 내로 혼입시킴으로써 검출가능하게 만들 수 있는 합텐 및 단백질 또는 다른 엔티티를 포함한다. 당업계에 공지된, 항체를 표지에 접합시키는 임의의 방법이 사용될 수 있으며, 예컨대 문헌 [Hermanson, *Bioconjugate Techniques* 1996, Academic Press, Inc., San Diego]에 기술되어 있는 방법이 사용될 수 있다.

[0064] "표지화된" 분자 (예컨대, 핵산, 단백질, 또는 항체)는 분자의 존재가 분자에 결합된 표지의 존재를 검출함으로써 검출될 수 있도록, 링커 또는 화학 결합을 통해 공유적으로, 또는 이온, 반 데르 발스, 정전기 또는 수소 결합을 통해 비공유적으로 표지에 결합되어 있는 것이다.

[0065] "진단"이라는 용어는 장애, 예컨대 암 또는 염증성 병증이 대상체에 존재할 수 있다는 상대적 개연성을 의미한다. 유사하게, "예후"라는 용어는 특정의 미래 결과가 대상체에서 발생할 수 있다는 상대적 개연성을 의미한다. 예를 들어, 예후는 개체가 TGF β 또는 $\alpha\text{v}\beta 8$ 관련 장애를 앓을 수 있거나, 상기 질환의 재발 또는 유망한 중증도 (예컨대, 증상의 중증도, 기능 쇠퇴율, 생존율 등)를 가지게 될 가능성을 의미할 수 있다. 의료 진단 분야의 임의의 당업자가 이해하는 바와 같이, 상기 용어는 절대 용어인 것으로 하지 않는다.

[0066] 본원에서 사용되는 바, "생검" 또는 "환자로부터의 생물학적 샘플"은 TGF β 또는 $\alpha\text{v}\beta 8$ 관련 장애를 앓고 있거나 앓을 것으로 의심되는 환자로부터 수득된 샘플을 의미한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 조직 생검, 예컨대 침생검, 세침생검, 외과적 생검 등일 수 있다. 샘플은 또한 혈액 샘플 또는 혈액 분획, 예컨대 백혈구 분획, 혈청 또는 혈장일 수 있다. 비록 생물학적 샘플은 또한 또 다른 부위, 예컨대 의심되는 전이 부위, 림프절로부터 또는 혈액으로부터 유래될 수 있지만, 샘플은 병변 또는 의심되는 병변을 포함하는 조직 샘플일 수 있다. 일부 경우에서, 생물학적 샘플은 또한 병변 또는 의심되는 병변에 인접한 영역으로부터의 것일 수 있다.

[0067] "생물학적 샘플"은 환자, 예컨대 생검으로부터, 동물, 예컨대 동물 모델로부터, 또는 배양된 세포, 예컨대 세포 주 또는 환자로부터 채취되고, 관찰을 위해 배양물 중에서 성장시킨 세포로부터 수득될 수 있다. 생물학적 샘플은 조직 및 체액, 예컨대 혈액, 혈액 분획, 림프, 타액, 뇨, 대변 등을 포함한다.

[0068] "요법," "치료," 및 "호전"이라는 용어는 증상의 중증도의 임의의 감소를 의미한다. 염증성 병증을 치료하는 경우, 치료는 예컨대 염증성 시토카인의 혈액 수준, 활성인 성숙 TGF β 의 혈액 수준, 통증, 팽윤, 면역 세포 동원 등을 감소시키는 것을 의미할 수 있다. 암을 치료하는 경우, 치료는 예컨대 종양 크기, 암 세포 개수, 성장 속도, 전이성 활성, 비-암 세포의 세포 사멸 등을 감소시키는 것을 의미할 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "치료하다" 및 "예방하다"라는 용어는 절대 용어인 것으로 하지 않는다. 치료 및 예방은 임의의 발병 지연, 증상 호전, 환자 생존율 개선, 생존 기간 또는 생존율 증가 등을 의미할 수 있다. 치료 및 예방은 완전한 것이거나 (검출가능한 증상이 남아있지 않은 경우) 부분적인 것일 수 있고, 이로써 증상은 본원에 기술된 치료를 받지 않은 환자에서도 더 빈번하게 일어나거나, 중증도는 더 감소된 상태가 된다. 치료 효과를 치료를 받지 않은 개체 또는 개체의 풀과, 또는 치료받기 전 또는 치료 동안 다른 시점에서의 동일 환자와 비교할 수 있다. 일부 측면에서, 질환의 중증도는 예컨대 투여 이전의 개체, 또는 치료를 받지 않은 대조군 개체와 비교하여 10% 이상

만큼 감소된다. 일부 측면에서, 질환의 중증도는 25%, 50%, 75%, 80%, 또는 90% 이상만큼 감소되거나, 일부 경우에서는, 표준 진단학적 기법을 사용할 경우, 더 이상 검출되지 않을 수도 있다.

[0069] "유효량," "유효 용량," "치료 유효량" 등의 용어는 상기 기술된 바와 같은 장애를 호전시키는 데 충분한 치료제의 양을 의미한다. 예를 들어, 주어진 파라미터에서, 치료 유효량은 치료학적 효과를 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90% 이상, 또는 100% 이상 증가 또는 감소시킬 것이다. 치료학적 효능은 또한 "~배" 증가 또는 감소로 표현될 수 있다. 예를 들어, 치료 유효량은 대조군에 비하여 적어도 1.2배, 1.5배, 2배, 5배 이상의 효과를 발휘할 수 있다.

[0070] 본원에서 사용되는 바, "제약상 허용되는"이라는 용어는 생리학상 허용되는 및 약리학상 허용되는이라는 것과 동의어로 사용된다. 제약 조성물은 일반적으로 완충제 및 보관용 보존제를 포함할 것이며, 투여 경로에 따라 적절한 전달을 위한 담체 및 완충제를 포함할 수 있다.

[0071] "용량" 및 "투여량"이라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 용량은 각 투여시 개체에게 제공되는 활성 성분의 양을 의미한다. 본 발명에서, 용량이란 항체 또는 관련 성분의 농도, 예컨대 치료제의 양 또는 방사성표지의 투여량을 의미할 수 있다. 용량은 투여 빈도; 개체의 크기 및 내성; 병증의 중증도; 부작용의 위험; 투여 경로; 및 (존재할 경우) 검출가능한 모이어티의 영상화 방식을 비롯한, 다수의 인자에 따라 달라질 것이다. 용량은 상기 인자에 따라, 또는 치료 진행 정도에 기초하여 달라질 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. "투여 형태"라는 용어는 제약의 특정 포맷을 의미하며, 이는 투여 경로에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 투여 형태는 액체, 예컨대 주사용 식염수일 수 있다.

[0072] "대상체," "환자," "개체" 등의 용어는 상호교환적으로 사용되고, 별도로 명시되는 것을 제외하고는, 포유동물, 예컨대 인간 및 비-인간 영장류 뿐만 아니라, 토끼, 래트, 마우스, 염소, 돼지 및 다른 포유동물 종을 의미한다. 상기 용어는 대상체가 특정 질환에 대하여 진단을 받은 상태임을 반드시 나타내는 것은 아니며, 이는 전형적으로 의료 관리하에 있는 개체를 의미한다. 환자는 현 치료 요법 등의 처치, 모니터링, 조절 또는 변형을 필요로 하는 개체일 수 있다.

[0073] "염증성 병증"은 개체에서의 임의의 염증을 의미하고, 이는 일시적인 것 (예컨대, 병원체 또는 알레르겐에의 노출에 대한 반응으로 나타나는 것) 또는 만성적인 것일 수 있다. 염증은 대식세포 및 다른 백혈구를 동원하고 활성화시키는 염증성 시토카인, 예컨대 IFN-γ, IL-6 및 TNF-알파를 특징으로 한다. 일부 경우에서, 염증은 만성의 유해한 병증 또는 자가면역 병증 (예컨대, MS, 루푸스, 류마티스 관절염, 크론병)으로 발전할 수 있다. 염증은 국소적으로 (예컨대, 국소화된 감염 또는 노출 부위) 또는 전신 (예컨대, 죽상동맥경화증, 고혈압)에 뿐만 아니라 나타날 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 항체 조성물 및 방법은 염증성 병증을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0074] "암," "종양," "형질전환된" 등의 용어는 전암성, 신생물성, 형질전환 및 암성 세포를 포함하고, 고형 종양 또는 비-고형 암을 의미할 수 있다 (예컨대, 문헌 [Edge et al., *AJCC Cancer Staging Manual* (7th ed. 2009)]; [Cibas and Ducatman *Cytology: Diagnostic principles and clinical correlates* (3rd ed. 2009)] 참조). 암은 양성 및 악성 신생물 (비정상적인 성장) 둘 모두를 포함한다. "형질전환"이란 자발적 또는 유도성 표현형 변화, 예컨대 세포의 불멸화, 형태학적 변화, 비정상적인 세포 성장, 접촉 억제 및 부착 감소, 및/또는 암성 종양을 의미한다 (문헌 [Freshney, *Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique* (3rd ed. 1994)] 참조). 비록 형질전환은 형질전환 바이러스에 의한 감염 및 새로운 게놈 DNA의 혼입, 또는 외래 DNA의 흡수로부터 유발될 수 있지만, 이는 또한 자발적으로, 또는 발암 물질에의 노출 이후에 유발될 수도 있다.

[0075] "암"이라는 용어는 암종, 육종, 선암종, 림프종, 백혈병, 고형 및 림프계 암 등을 의미할 수 있다. 상이한 유형의 암의 예로는 폐암 (예컨대, 비-소세포 폐암 또는 NSCLC), 난소암, 전립선암, 직장결장암, 간암 (즉, 간 암종), 신장암 (즉, 신장 세포 암종), 방광암, 유방암, 갑상선암, 늑막암, 췌장암, 자궁암, 자궁경부암, 고환암, 항문암, 췌장암, 담관암, 위장관 카르시노이드 종양, 식도암, 담낭암, 충수암, 소장암, 위암(stomach cancer) (위암(gastric cancer)), 중추 신경계 암, 피부암, 음모암종; 두부경부암, 혈액암, 골원성 육종, 섬유육종, 신경아세포종, 신경교종, 흑색종, B-세포 림프종, 비-호지킨 림프종, 베킷 림프종, 소세포 림프종, 거대 세포 림프종, 단핵구성 백혈병, 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병 (AML), 만성 골수성 백혈병 (CML), 및 다발성 골수종을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 항체 조성물 및 방법은 암을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0076] III. $\alpha v\beta 8$ 에 특이적인 항체

A. 인간화된 37E1B5

마우스 모노클로날 항체 37E1 (IgG2a)은 인간 인테그린 $\alpha v\beta 8$ 과 그의 리간드인 형질전환 성장 인자- β (TGF β) 사이의 상호작용을 선택적으로 차단시킨다. 항체는 TGF β 의 $\alpha v\beta 8$ -매개 활성화 (성숙 TGF β 폴리펩티드의 방출)는 선택적으로 차단시키지만, $\alpha v\beta 8$ 의 고정화된 또는 분비된 TGF β 에의 결합은 막지 못한다는 점에서 차이를 보인다. $\alpha v\beta 8$ 의 세포 부착 특성이 아닌, 오직 TGF β 활성화만을 변화시키는 고도의 선택성을 제공한다. 추가로, 일부 경우에는 TGF β 의 전체 불활성화가 바람직하지 못하다. 37E1 항체의 특이적인 활성이 TGF β 수준을 감소시키는 표적화된 치료 도구를 제공한다.

보다 높은 친화도를 가진 항체를 제조하기 위하여 37E1의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 정제하였다. 도 1에는 $\beta 8$ 상의 같은 에피토프에 대하여 보다 높은 친화도를 부여하는 특이적인 아미노산 치환을 보여주는 것이다. 개선된 (보다 높은 친화도를 갖는) 항체를 37E1B5라고 명명하였다. 이는 시험관내에서 증가된 친화도를 보였고, 배양된 세포에서 TGF β 의 인테그린 $\alpha v\beta 8$ -매개 활성화를 억제시키는 데 있어서 더욱 강력한 효능을 보였다. 시험관내에서 37E1B5 항체의 효과적인 치료 용량은 피코몰 범위이다. 도 1에 제시되어 있는 바와 같은, $\beta 8$ 의 높은 친화도의 결합을 보유하는 37E1B5의 인간화된 버전을 생성하였다. 모체 37E1 및 37E1B5 항체와 관련하여, 인간화된 37E1B5는 TGF β 의 $\alpha v\beta 8$ -매개 활성화를 차단하지만, $\alpha v\beta 8$ 의 고정화된 또는 분비된 TGF β 에의 결합은 막지 못한다.

따라서, 서열 4, 6, 및 8의 가변 중쇄 서열에서 발견되는 중쇄 CDR 1-3을 갖는 항체를 제공한다. 중쇄 CDR 1-3의 서열은 각각 RYWMS (서열 94), EINPDSSTINYTSSLKD (서열 95), 및 LITTEDY (서열 96)이다. 추가로, 가변 경쇄 서열 서열 5, 또는 서열 7 및 9에서 발견되는 경쇄 CDR 1-3을 갖는 항체를 제공한다. 서열 5로부터의 경쇄 CDR 1-3의 서열은 KASQDINSY (서열 97), RANRLVD (서열 98), 및 LQYDEFPYT (서열 99)이다. 서열 7 및 9의 경쇄 가변 영역 서열은 서열 5와 동일한 CDR1 및 CDR3 서열을 가지지만, CDR2는 상이하다 (YANRLVD, 서열 100).

[0081] 일부 실시양태에서,

[0082] 서열 94, 95, 및 96을 포함하는 중쇄 가변 영역 서열, 및 서열 97, 98, 및 99를 포함하는 경쇄 가변 영역 서열;

[0083] 서열 94, 95, 및 96을 포함하는 중쇄 가변 영역 서열, 및 서열 97, 100, 및 99를 포함하는 경쇄 가변 영역 서열; 또는

[0084] 임의의 조합으로, 서열 4, 6, 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 서열, 및 서열 5, 7, 및 9로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 가변 영역 서열

[0085] 을 포함하는 항체를 제공한다.

[0086] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 8의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 9의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

B. 11E8

11E8 항체는 37E1B5와 유사한 $\alpha v\beta 8$ 상의 에피토프에 결합할 뿐만 아니라, (예컨대, 포르말린으로 고정된) 고정된 세포에 결합한다. 37E1B5와 유사하게, 11E8은 $\alpha v\beta 8$ 에 특이적으로 결합하고, $\alpha v\beta 8$ 에의 잠재성 TGF β 의 부착은 억제시키지 않으면서, 활성인 성숙 TGF β 펩티드의 방출은 억제시킨다. 11E8이 고정되지 않은 세포 및 포르말린-고정된 세포 둘 모두 위의 $\alpha v\beta 8$ 에 결합할 수 있고, 성숙한 TGF β 의 방출을 감소시킬 수 있으며, 11E8은 검출 (예컨대, 진단 또는 모니터링), 요법, 및 조합 검출/치료 적용에 유용하다.

[0089] 항체 11E8에 대한 중쇄 및 경쇄 가변 영역 (CDR은 밑줄로 표시)이 하기에 기재되어 있다:

[0090] 서열 10 - 11E8에 대한 중쇄 가변 영역 (CDR 1-3은 밑줄로 표시; 각각 서열 48-50)

EVQLQQSGPELMKGTGASVKISCKATGYTFSSYWIIEWVKQRPGHGLEWIGDILPGSGTTNYNEKFKGRATVTADRSSN
TAYMQLSSLTYGDSAVYYCATWGWDTYWDQGTSVTVSS

[0092] 서열 11 - 11E8에 대한 경쇄 가변 영역 (CDR 1-3은 밑줄로 표시; 각각 서열 51-53)

DIVMTQSPSSLSASLGDRVTISCASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISN
LEPEDIATYYCQQYSNLPYTFGGGTKLEIKR

[0094] 따라서, 중쇄 CDR 서열 48, 49, 및 50, 및 경쇄 CDR 서열 51, 52, 및 53을 포함하는 항체를 제공한다. 일부

실시양태에서, 항체는 중쇄 가변 영역 서열 10 및/또는 경쇄 가변 영역 서열 11을 포함한다.

[0095] 도 11a-b 및 12a-b에 제시되어 있는 바와 같은, 11E8의 친화도 성숙된 항체가 발견되었고, 이를 11E8Mut28, 11E8Mut94, 및 11E839로 명시하였다.

[0096] 11E8Mut28 친화도 성숙된 항체는 중쇄 CDR3에 변이 (WGWD~~S~~Y; 서열 54) 및 경쇄 CDR3에 변이 (QQ~~F~~SNLPYT; 서열 55)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서,

[0097] 중쇄 CDR 서열 48, 49, 및 54, 및 경쇄 CDR 서열 51, 52, 및 53; 또는

[0098] 중쇄 CDR 서열 48, 49, 및 50, 및 경쇄 CDR 서열 51, 52, 및 55; 또는

[0099] 중쇄 CDR 서열 48, 49, 및 54, 및 경쇄 CDR 서열 51, 52, 및 55를 포함하는 항체를 제공한다.

[0100] 11E8Mut28은 또한 중쇄 FR3에 변이 (~~K~~AAITAD~~T~~SSNT~~S~~YQLSSL~~T~~SE~~D~~SAVYYCAR; 서열 56) 및 중쇄 FR4에 변이 (~~W~~GQGT~~L~~VT~~V~~SS; 서열 57)를 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항체는 서열 56 또는 57를 포함하는 중쇄 가변 영역 (예컨대, 서열 32), 및 임의로 서열 23을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0101] 11E8Mut94 친화도 성숙된 항체는 중쇄 CDR2 및 CDR3에 변이를 포함한다 (각각 DILPGSGTTNYNEKFEG, 서열 90, 및 WGWD~~S~~Y, 서열 54). 따라서, 일부 실시양태에서, 중쇄 CDR 서열 48, 90, 및 54, 및 경쇄 CDR 서열 51, 52, 및 53을 포함하는 항체를 제공한다.

[0102] 11E8Mut94는 또한 중쇄 FR2에 변이 (WVKQRP~~G~~HGF~~E~~WIG, 서열 91), 중쇄 FR3에 변이 (RAAITAD~~T~~SSNT~~S~~YQLSSL~~T~~SE~~D~~SAVYYCAR, 서열 92) 및 중쇄 FR4에 변이 (WGQGT~~L~~VT~~V~~SS; 서열 57)를 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항체는 서열 91, 92, 또는 57를 포함하는 중쇄 가변 영역 (예컨대, 서열 88), 및 임의로 서열 89를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 11E8Mut94는 또한 경쇄 FR1에 변이 (DI~~K~~MTQ~~T~~PSSLSASLGDRVT~~I~~SC, 서열 93)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 93을 포함하는 경쇄 가변 영역, 예컨대 서열 89, 및 임의로, 서열 88의 중쇄를 포함한다.

[0103] 11E8Mut39 친화도 성숙된 항체는 중쇄 CDR1에 변이 (TWIE; 서열 112), 중쇄 CDR2에 변이 (HTPGSGTTNYNEKF~~K~~G; 서열 113), 경쇄 CDR1에 변이 (STSQ~~D~~V~~S~~YLN; 서열 105) 및 경쇄 CDR2에 변이 (YASNLHS; 서열 107)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서,

[0104] 중쇄 CDR 서열 112, 113, 및 50, 및 경쇄 CDR 서열 51, 52, 및 53;

[0105] 중쇄 CDR 서열 48, 49, 및 50, 및 경쇄 CDR 서열 105, 107, 및 53; 또는

[0106] 중쇄 CDR 서열 112, 113, 50, 및 경쇄 CDR 서열 105, 107, 및 53을 포함하는 항체를 제공한다.

[0107] 11E8Mut39는 또한 중쇄 FR1에 변이 (QVQLQQSGPELMK~~T~~GASVKISCKATGYTFS; 서열 106), 중쇄 FR3에 변이 (RAT~~I~~AD~~R~~PSNT~~S~~YQLSSL~~T~~Y~~G~~DSAV~~F~~YCAT; 서열 114), 및 중쇄 FR4에 변이 (WD~~H~~GTS~~V~~TV~~S~~; 서열 108)를 가진다. 11E8Mut39는 경쇄 FR1에 변이 (DIM~~M~~TQ~~T~~PSSLSASLGDRVT~~I~~SC; 서열 115) 및 경쇄 FR4에 변이 (FGGG~~T~~KLEIKA; 서열 111)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항체는 서열 106, 114, 또는 108을 포함하는 중쇄 가변 영역 (예컨대, 서열 102), 및 임의로 서열 104를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 115 또는 111을 포함하는 경쇄 가변 영역 (예컨대, 서열 104), 및 임의로 서열 102를 포함하는 중쇄 가변 영역을 가진다.

[0108] C. 14E5

[0109] 14E5 항체는 37E1B5와 유사한 α v β 8 상의 에피토프에 결합한다. 37E1B5와 유사하게, 14E8은 α v β 8에 특이적으로 결합하지만, 37E1B5와 달리, 14E5는 활성인 성숙 TGF β 웨პ티드의 방출, 또는 잠재성 TGF β 의 α v β 8에의 부착을 억제시키지 않는다. 14E5는 α v β 8에는 특이적이지만, 활성은 차단시키지 못하기 때문에, 검출을 위해, 예컨대 생체내 진단 또는 모니터링 적용에 있어 유용하다.

[0110] 항체 14E5에 대한 중쇄 및 경쇄 가변 영역 (CDR은 밑줄로 표시)이 하기에 기재되어 있다:

[0111] 서열 12 - 14E5에 대한 중쇄 가변 영역 (CDR 1-3은 밑줄로 표시; 각각 서열 58-60)

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTF~~S~~TYWIE~~W~~IKQRP~~G~~HGLEWIGHILPGSVITNYNEKF~~K~~GKAAITADTSSN
TSYMLQ~~S~~LTSE~~D~~SAVYYCAR~~W~~GWD~~S~~YWGQGT~~L~~VT~~V~~SS

- [0113] 서열 13 - 14E5에 대한 경쇄 가변 영역 (CDR 1-3은 밑줄로 표시; 각각 서열 61-63)
- DIEMTQSPSSLSASILGDRVТИССTSQDISSSLNWYQQKPDGTVTLLI~~Y~~TSNLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISN
LEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGTKEIKR
- [0114]
- [0115] 따라서, 중쇄 CDR 서열 58, 59, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 61, 62 및 63을 포함하는 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 가변 영역 서열 12 및/또는 경쇄 가변 영역 서열 13을 포함한다.
- [0116] 도 11a-b 및 12a-b에 제시되어 있는 바와 같은, 14E5의 7가지의 친화도 성숙된 항체가 발견되었고, 이를 14E5Mut 11, 14E5Mut 42, 14E5Mut 54, 14E5Mut 68, 14E5Mut 65, 14E5Mut 83 및 14E5Mut 95로 명시하였다. 이들 친화도 성숙된 항체는 하기 기재되는 바와 같이 CDR 및 FR 서열에 변이를 가진다. 일부 실시양태에서, 14E5로부터의 CDR 및 FR을 포함하는 항체 및 다양한 조합의 14E5의 친화도 성숙된 형태를 제공한다.
- [0117] 14E5Mut 11은 중쇄 CDR1에 변이 (TNWIE, 서열 64), 경쇄 CDR1에 변이 (SASQGISNYLN, 서열 65), 경쇄 CDR2에 변이 (YTSSLHS, 서열 66), 및 경쇄 CDR3에 변이 (QQYSNLPYT, 서열 67)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서, 14E5 및 14E5Mut 11로부터의 CDR의 조합을 포함하는 항체, 예를 들어,
- [0118] 중쇄 CDR 서열 64, 59, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 61, 62, 및 63; 또는
- [0119] 중쇄 CDR 서열 58, 59, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 65, 66, 및 67; 또는
- [0120] 중쇄 CDR 서열 64, 59, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 65, 66, 및 67을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0121] 14E5Mut 11은 또한 경쇄 FR1 및 FR2에 변이 (각각 DILMTQSPSSLSASLGDRVТИС, 서열 68 및 WYQQKPDGTВKLЛTY, 서열 69)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항체는 서열 68 또는 69를 포함하는 경쇄 가변 영역 (예컨대, 서열 24), 및 임의로 서열 33을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0122] 14E5Mut 42는 경쇄 CDR1에 변이 (SASQGISNYLN, 서열 70), 경쇄 CDR2에 변이 (YTSSLHS, 서열 66), 및 경쇄 CDR3에 변이 (QQYSNLPYT, 서열 71)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서, 14E5 및 14E5Mut 42로부터의 CDR의 조합을 포함하는 항체, 예를 들어:
- [0123] 중쇄 CDR 서열 58, 59, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 70, 66, 및 71을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0124] 14E5Mut 42는 또한 중쇄 FR1에 변이 (EVPLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFS, 서열 72), 경쇄 FR1 및 FR2에 변이 (각각 DIVMTQTPSSLSASLGDRVТИС, 서열 73 및 WYQQKPDGTВKLЛTY, 서열 69)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항체는 임의로 서열 25를 포함하는 경쇄와 함께 서열 72를 포함하는 중쇄 가변 영역 (예컨대, 서열 34)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 73 또는 69를 포함하는 경쇄 가변 영역 (예컨대, 서열 25), 및 임의로 서열 34를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0125] 14E5Mut 54는 중쇄 CDR1에 변이 (TNWIE, 서열 64), 경쇄 CDR1에 변이 (SASQGISNYLN, 서열 70), 경쇄 CDR2에 변이 (YTSSLHS, 서열 66), 및 경쇄 CDR3에 변이 (QQYSNLPYT, 서열 67)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서, 14E5 및 14E5Mut 54로부터의 CDR의 조합을 포함하는 항체, 예를 들어:
- [0126] 중쇄 CDR 서열 64, 59, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 61, 62, 및 63; 또는
- [0127] 중쇄 CDR 서열 58, 59, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 70, 66, 및 67; 또는
- [0128] 중쇄 CDR 서열 64, 59, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 70, 66, 및 67을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0129] 14E5Mut 54는 또한 중쇄 FR3에 변이 (KAAITADTSSNTSYMLQTSLTSEDSAVYYCAR, 서열 74) 및 경쇄 FR1 및 FR2에 변이 (각각 DILMTQTPSSLSASLGDRVТИС, 서열 75 및 WYQQKPDGTВKLЛTY, 서열 69)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항체는 임의로 서열 26을 포함하는 경쇄와 함께 서열 74를 포함하는 중쇄 가변 영역 (예컨대, 서열 35)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 75 또는 69를 포함하는 경쇄 가변 영역 (예컨대, 서열 26), 및 임의로 서열 35를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0130] 14E5Mut 68은 중쇄 CDR2에 변이 (DILPGSGTTNYNEKFKG, 서열 76), 경쇄 CDR1에 변이 (SASQGISNYLN, 서열 70), 경쇄 CDR2에 변이 (YTSSLHS, 서열 66), 및 경쇄 CDR3에 변이 (QQYSELPYT, 서열 77)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서, 14E5 및 14E5Mut 68로부터의 CDR의 조합을 포함하는 항체, 예를 들어,
- [0131] 중쇄 CDR 서열 58, 76, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 61, 62, 및 63; 또는

- [0132] 중쇄 CDR 서열 58, 59, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 70, 66, 및 77; 또는
- [0133] 중쇄 CDR 서열 58, 76, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 70, 66, 및 77을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0134] 14E5Mut68은 또한 중쇄 FR3에 변이 (RATVTADRSSNTSYMLQLSSLTSEDSAVYYCAR, 서열 78) 및 경쇄 FR1 및 FR2에 변이 (각각 DIKMTQSPSSLSASLGDRVTC, 서열 79 및 WYQQKPDGTVKLLTY, 서열 69)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항체는 임의로 서열 27을 포함하는 경쇄와 함께 서열 78을 포함하는 중쇄 가변 영역 (예컨대, 서열 36)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 79 또는 69를 포함하는 경쇄 가변 영역 (예컨대, 서열 27), 및 임의로 서열 36을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0135] 14E5Mut65는 중쇄 CDR1에 변이 (TNWIE, 서열 64), 경쇄 CDR1에 변이 (SASQGISNYLN, 서열 70), 경쇄 CDR2에 변이 (YTSSLHS, 서열 66), 및 경쇄 CDR3에 변이 (QQFSNLPYT, 서열 80)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서, 14E5 및 14E5Mut65로부터의 CDR의 조합을 포함하는 항체, 예를 들어:
- [0136] 중쇄 CDR 서열 64, 59, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 61, 62, 및 63; 또는
- [0137] 중쇄 CDR 서열 58, 59, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 70, 66, 및 80; 또는
- [0138] 중쇄 CDR 서열 64, 59, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 70, 66, 및 80을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0139] 14E5Mut65는 또한 중쇄 FR1 및 FR3에 변이 (QVQLQQSGAELMKGASVKISCKATGYSFS, 서열 81 및 KAAITADTSSNTSYMLQLSSLTSDSAVYYCAR, 서열 82) 및 경쇄 FR1 및 FR2에 변이 (각각 DIKMTQSPSSLSASLGDRVTC, 서열 79 및 WYQQKPDGTVKLLTY, 서열 69)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항체는 임의로 서열 28을 포함하는 경쇄와 함께 서열 81 또는 82를 포함하는 중쇄 가변 영역 (예컨대, 서열 37)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 79 또는 69를 포함하는 경쇄 가변 영역 (예컨대, 서열 28), 및 임의로 서열 37을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0140] 14E5Mut83은 중쇄 CDR1에 변이 (THWIE, 서열 83), 경쇄 CDR1에 변이 (SASQGISNYLN, 서열 70), 경쇄 CDR2에 변이 (YTSSLHS, 서열 66), 및 경쇄 CDR3에 변이 (QQYSDLPYT, SEQ ID NO:71)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서, 14E5 및 14E5Mut83으로부터의 CDR의 조합을 포함하는 항체, 예를 들어:
- [0141] 중쇄 CDR 서열 83, 59, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 61, 62, 및 63; 또는
- [0142] 중쇄 CDR 서열 58, 59, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 70, 66, 및 71; 또는
- [0143] 중쇄 CDR 서열 83, 59, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 70, 66, 및 71을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0144] 14E5Mut83은 또한 중쇄 FR1에 변이 (EVQLQQSGAVLMKPGASVKISCKATGYTFS, 서열 84) 및 경쇄 FR1 및 FR2에 변이 (각각 DILMTQSPSSLSASLGDRVTC, 서열 68 및 WYQQKPDGTVKLLTY, 서열 69)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항체는 임의로 서열 29를 포함하는 경쇄와 함께 서열 84를 포함하는 중쇄 가변 영역 (예컨대, 서열 38)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 68 또는 69를 포함하는 경쇄 가변 영역 (예컨대, 서열 29), 및 임의로 서열 38을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0145] 14E5Mut95는 경쇄 CDR1에 변이 (SASQGISNYLN, 서열 70), 경쇄 CDR2에 변이 (YTSSLHS, 서열 66), 및 경쇄 CDR3에 변이 (QQYSDLPYT, 서열 71)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서, 14E5 및 14E5Mut95로부터의 CDR의 조합을 포함하는 항체, 예를 들어:
- [0146] 중쇄 CDR 서열 58, 59, 및 60, 및 경쇄 CDR 서열 70, 66, 및 71을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0147] 14E5Mut95는 또한 중쇄 FR1 및 FR3에 변이 (EVQLQQTGAELMKGASVKISCKATGYTFS, 서열 85 및 KAVITADTSSNTSYMLQLSSLTSEDSAVYYCAR, 서열 86) 및 경쇄 FR1 및 FR2에 변이 (각각 DILEMTQSPSSLSASLGDRVTC, 서열 87 및 WYQQKPDGTVKLLTY, 서열 69)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항체는 임의로 서열 30을 포함하는 경쇄와 함께 서열 86을 포함하는 중쇄 가변 영역 (예컨대, 서열 39)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 87 또는 69를 포함하는 경쇄 가변 영역 (예컨대, 서열 30), 및 임의로 서열 29를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0148] D. 6B9
- [0149] 6B9 항체는 인간 β 8의 아미노산 61-105 (서열 17에 제시된 전장의 β 8 서열에 대하여 상대적인 아미노산 위치)에 포함된 β 8 상의 에피토프에 결합하고, 뮤린 β 8과 유의하게 상호작용하지 않는다. 실시예에 제시되어

있는 바와 같이, 세린 95는, 상기 위치의 세린을 프롤린으로 치환시키면 본질적으로 결합은 제거되는 바, 이는 에피토프에 포함되어 있는 것이다 (직접적으로 결합, 또는 간접적으로 에피토프 구조에 포함). 6B9 항체는 37E1B5, 11E8, 또는 14E5와 경쟁에 대하여 경쟁하지 않는다. 추가로, 6B9 항체는 비고정된 및 포르말린-고정된 세포 및 조직 상의 β 8을 검출할 수 있고, 예컨대 β 8을 상이한 수준으로 발현하는 세포 상에서 β 8 발현 수준을 구별지을 수 있다 (실시예, 및 도 6 및 8 참조). 발현 수준은 또한 세포 중 β 8의 계놈 복제수 및 발병을 나타낼 수 있다.

[0150] 항체 6B9에 대한 중쇄 및 경쇄 가변 영역 (CDR은 밑줄로 표시)이 하기에 기재되어 있다:

[0151] 서열 18 - 6B9에 대한 중쇄 가변 영역 (CDR 1-3은 밑줄로 표시; 각각 서열 40-42)

QVQLQQSGAELVPRPGTSVKVSCKASGYAFTDYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPETGGTNYNAKFKKG
KATLTADKSSSSAYMQLSSLTSGDSAVYFCAREAGNYIYAMDYWGQGTSVTVSS

[0153] 서열 19 - 6B9에 대한 경쇄 가변 영역 (CDR 1-3은 밑줄로 표시; 각각 서열 43-45)

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASVNISYLVWYQQKQGKSPQLLVHNAKTLAEGVPSRFSGSGGTQFSLKINS
LQPEDFGSYYCQHHHGTPYTFGGGTKLEIKR

[0155] 따라서, 중쇄 CDR 서열 40, 41, 및 42, 및 경쇄 CDR 서열 43, 44, 및 45를 포함하는 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 가변 영역 서열 18 및/또는 경쇄 가변 영역 서열 19를 포함한다.

[0156] 도 11a-b 및 12a-b에 제시되어 있는 바와 같은, 6B9Mut1로 명시된, 6B9의 친화도 성숙된 항체가 발견되었다. 특히, 상기 친화도 성숙된 항체는 중쇄 CDR2에 변이 (VINPETGGTNYNAKFKR; 서열 46)를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서, 중쇄 CDR 서열 40, 46, 및 42, 및 경쇄 CDR 서열 43, 44, 및 45를 포함하는 항체를 제공한다.

[0157] 6B9Mut1은 또한 경쇄 FR1에 변이 (DIMTQSPASLSASVGETVTITC; 서열 47)를 가진다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 47을 포함하는 경쇄 가변 영역 (예컨대, 가변 영역은 서열 23을 포함할 수 있다), 및 임의로 서열 18을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

E. 4F1

[0159] 4F1 항체는 또한 β 8의 아미노산 61-105 (서열 17에 제시된 전장의 β 8 서열에 대하여 상대적인 아미노산 위치)에 포함된 β 8 상의 에피토프에 결합하고, 뮤린 β 8과 유의하게 상호작용하지 않는다. 실시예에 제시되어 있는 바와 같이, 세린 95는, 상기 위치의 세린을 프롤린으로 치환시키면 본질적으로 결합은 제거되는 바, 이는 에피토프에 포함되어 있는 것이다. 4F1 항체는 37E1B5, 11E8, 또는 14E5와의 결합에 대하여 경쟁하지 않는다. 추가로, 4F1 항체는 비고정된 및 포르말린-고정된 세포 및 조직 상의 β 8을 검출할 수 있고, 예컨대 β 8을 상이한 수준으로 발현하는 세포 상에서 β 8 발현 수준을 구별지을 수 있다 (실시예, 및 도 6, 7, 9, 및 10 참조). 발현 수준은 또한 세포 중 β 8의 계놈 복제수 및 발병을 나타낼 수 있다.

[0160] 항체 4F1에 대한 중쇄 및 경쇄 가변 영역 (CDR은 밑줄로 표시)이 하기에 기재되어 있다:

[0161] 서열 20 - 4F1에 대한 중쇄 가변 영역 (CDR 1-3은 밑줄로 표시; 각각 서열 116-118)

QVQLQQSGAELVPRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGTGGTNYNKKFKV
KATLTADKSSSTAYMQLGGLTFDDSAVYFCAREGNARTYYAMDYWGQGTSVTVSS

[0163] 서열 21 - 4F1에 대한 경쇄 가변 영역 (CDR 1-3은 밑줄로 표시; 각각 서열 119-121)

DIEMTQTPASLSASVGETVTITCRASENISYLVWYQQKQGKSPQVLVNAKTLAEGVPSRFSGSGGTQFSLKINS
LQPEDFGSYYCQHHNGTPYTFGGGTKLEIKR

[0165] 따라서, 중쇄 CDR 서열 116, 117, 및 118, 및 경쇄 CDR 서열 119, 120, 및 121을 포함하는 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 가변 영역 서열 20 및/또는 경쇄 가변 영역 서열 21을 포함한다.

F. 항- α v β 8 항체

[0167] 본원에서는 인테그린 α v β 8에는 특이적으로 결합하지만, 다른 인테그린 (예컨대, α v β 6, α v β 3 등)에는 유의하게 결합하지 않는 항체를 제공한다. 본 항체는 α v β 8 내의 특이적 에피토프 또는 에피토프 영역에 결합한다. 에피토프는 입체형태적 (비선형) 또는 비입체형태적 에피토프일 수 있다. 상기 항체는 β 8에만 단독으로 결합할 수 있고, 즉, 에피토프는 β 8 내에 위치하거나, 또는 두 서브유닛 모두의 일부를 포함하는 비-선형 에피토프에, 또는 α v 및 β 8의 상호작용에 의존하는 에피토프에 결합할 수 있다. 본 항체는 상기 기술된

$\alpha\beta\gamma\delta$ 특이적 항체 뿐만 아니라, 그의 인간화된, 키메라, 및/또는 표지화된 버전, 및 그의 $\alpha\beta\gamma\delta$ 결합 단편 및/또는 변이체를 포함한다.

[0168] 일부 실시양태에서, 항체는 β 에 결합하고, 예컨대 항체 부재하의 TGF β 활성화와 비교하여 TGF β 활성화를 억제시킨다. 일부 실시양태에서, 항체는 $\alpha\beta\gamma\delta$ 을 발현하는 세포의 TGF β 에의 부착을 감소시키지는 않고, 즉, 항체는 TGF β 에의 $\alpha\beta\gamma\delta$ -매개 세포 부착을 감소시키지는 못한다. 일부 실시양태에서, 항체는 항체 부재하의 $\alpha\beta\gamma\delta$ 결합과 비교하여 가용성 $\alpha\beta\gamma\delta$ 의 TGF β 에의 결합을 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 11 내의 β 상의 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 인간 β 의 아미노산 R79, I85, S95, P100, I108, P109, R128, H140, 및 F179로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 인간 β 의 아미노산 I74, N88, I107, T110, I125, R175, 및 F180으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 인간 β 의 아미노산 I125, R128, R175, F179, 및 F180으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 마우스 β 에 아닌 인간 β 에 결합한다.

[0169] 주어진 항원에 대한 항체의 결합 부위, 즉, 에피토프는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 공지된 에피토프와 함께 항체를 사용함으로써 경쟁 검정법 (예컨대, 경쟁적 ELISA)을 수행할 수 있다. 시험 항체가 항원 결합에 대하여 경쟁할 경우, 이때, 시험 항체는 동일한 에피토프의 적어도 일부를 공유할 가능성이 있다. 또한 항원의 도메인 치환 또는 선택적 돌연변이 유발법을 사용함으로써 에피토프의 위치를 알아낼 수 있다. 즉, 항원의 각 영역 또는 각각의 아미노산을 시험 항체와 상호작용하지 않는 것으로 알려져 있는 아미노산 또는 성분으로 "교환"하거나 치환시킬 수 있다. 주어진 영역 또는 아미노산의 치환이 비치환된 항원과 비교하여 치환된 항원에의 시험 항체의 결합을 감소시켰다면, 이때 상기 영역 또는 아미노산은 에피토프에 포함될 가능성이 높다.

[0170] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 8을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 9를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 인간화된 37E1B5 항체이다. 항체의 이소형은 IgG1, IgG2, IgG2a, IgG3 또는 IgG4일 수 있다.

[0171] 본원에 기술된 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날일 수 있다. 폴리클로날 혈청은 전형적으로 $\alpha\beta\gamma\delta$ 의 길이를 따라 여러 에피토프에 특징적으로 결합하는 혼합된 항체 집단을 포함한다. 그러나, 폴리클로날 혈청은 $\alpha\beta\gamma\delta$ 의 특정 세그먼트에 대하여 특이적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 키메라 항체, 인간화된 항체 (문헌 [Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033 (1989)] 및 WO 90/07861, US 5693762, US 5693761, US 5585089, US 5530101 및 Winter, US 5225539 참조), 및 인간 항체 (문헌 [Lonberg et al., WO93/12227 (1993)]; US 5877397, US 5874299, US 5814318, US 5789650, US 5770429, US 5661016, US 5633425, US 5625126, US 5569825, US 5545806, [Nature 148, 1547-1553 (1994)], [Nature Biotechnology 14, 826 (1996)], Kucherlapati, WO 91/10741 (1991) EP1481008, Bleck, Bioprocessing Journal 1 (Sept/Oct. 2005), US2004132066, US2005008625, WO2004072266, WO2005065348, WO2005069970, 및 WO2006055778)이다. 일부 실시양태에서, 항체는 37E1B5, 11E8, 또는 14E5의 인간화된 형태 또는 키메라 형태이다. 인간 이소형 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4가 인간화된 항체 또는 키메라 항체로 사용될 수 있다. 일부 항체는 약 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 또는 10^{12} M⁻¹ (하나 이상의 결합 친화도로 (예컨대, 마이크로몰 (10^{-6}), 나노몰 (10^{-9}), 피코몰 (10^{-12}) 이하인 범위의 Kd로) $\alpha\beta\gamma\delta$ 에 특이적으로 결합한다.

G. TGF β 활성 검출 및 항- $\alpha\beta\gamma\delta$ 항체의 효과

[0173] 항체가 TGF β 활성에 미치는 효과를 측정하는 데, 다수의 TGF β 생체검정법이 이용될 수 있다. 예를 들어, TGF β 활성화를 공동 배양 검정법으로 시험할 수 있다. $\alpha\beta\gamma\delta$ 를 발현시키는 시험 세포를 TMLC 세포, 즉, 루시퍼라제 유전자를 구동시키는 TGF β 반응성 프로모터 단편으로 안정하게 형질감염된 링크 폐 상피 세포와 함께 공동 배양한다 (문헌 [Abe et al., (1994) *Annal Biochem* 216:276]). TMLC 세포는 TGF β 에 대하여 고도로 반응성이며, 극도로 낮은 배경의 TGF β 활성화를 보인다. 따라서, TMLC 세포는 판독치로서 발광을 사용하는 활성 TGF β 의 존재에 대하여 시험하는 데 다른 세포주 또는 무세포 분획과의 공동 배양에 사용될 수 있다. 기술된 바와 같이 항 TGF β -차단 항체 (10 μ g/ml, 1D11; R&D 시스템즈(R&D Systems)), 항-B8 (20 μ g/ml, 37E1B5) 또는 항-B6 (150 μ g/ml, 10D5)의 존재 또는 부재하에서 검정을 수행할 수 있다 (문헌 [Abe (1994)]; [Munger (1999)]).

[0174] 종양 조직 중 활성 TGF β 를 측정하기 위하여 동일 중량의 종양 조직을 분쇄하고, 4°C에서 30 min 동안 멸균 DME 중에서 인큐베이션시킬 수 있다. 4°C에서 원심분리 (20 g)한 후, 활성 TGF β 를 함유하는 상청액을 수거할 수

있다. 이어서, 펠릿을 80°C에서 20 min 동안 무혈청 DME 중에서 인큐베이션시켜 SLC를 활성화시키고, 이어서, 상청액을 수거할 수 있다. 이어서, 활성 또는 열-활성화된 (잠재성) TGF β 를 함유하는 상청액을 사전에 플레이팅된 TMLC 세포에, 1D11을 포함하거나 또는 포함하지 않는 상태로 첨가한다. 프로테아제 억제제 검정법을 위해, 억제제를 공동 배양 개시 시점에 첨가한다. 각 억제제의 최대 용량을, 재조합 활성 TGF β 에 대하여 반응할 수 있는 TMLC 세포의 능력을 억제시키지 않는 최대 농도로서 정의한다. 배양된 세포로부터 가용성 TGF β 활성을 측정하기 위하여, 세포를 가볍게 회전시키면서, 37°C에서 1 h시간 동안 37E1 또는 10D5를 포함하거나 또는 포함하지 않는 상태로 100 μ l의 완전 배지 중에서 인큐베이션시킨다. 4°C에서 5 min 동안 원심분리 (20 g)하여 무세포 상청액을 수거한 후, 1D11의 존재 또는 부재하에서 사전에 플레이팅된 TMLC 세포에 첨가한다. 가용성 수용체 검정법을 위해, 밤새도록 배양된 세포 배양물로부터 수득된 조절 배지를 사용한다. 상대적인 루시퍼라제 단위는 활성 - TMLC 리포터 세포의 배경 활성인 것으로 정의된다.

IV. 항체를 생성하는 방법

[0175] 본원에 기술된 적합한 항체, 예컨대 재조합, 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 제조 및 사용하기 위해, 당업계에 공지된 다수의 기법이 사용될 수 있다 (예컨대, 문헌 [Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975)]; [Kozbor et al., *Immunology Today* 4: 72 (1983)]; [Cole et al., pp. 77-96 in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985)]; [Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991)]; [Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988)]; 및 [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2d ed. 1986)] 참조). 관심의 대상이 되는 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자를 세포로부터 클로닝할 수 있고, 예컨대 모노클로날 항체를 코딩하는 유전자를 하이브리도마로부터 클로닝할 수 있고, 이를 사용하여 재조합 모노클로날 항체를 제조할 수 있다. 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자 라이브러리 또한 하이브리도마 또는 혈장 세포로부터 제조할 수 있다. 중쇄 및 경쇄 유전자 생성물의 무작위 조합을 통해 상이한 항원 특이성을 가진 거대 항체 풀을 제작할 수 있다 (예컨대, 문헌 [Kuby, *Immunology* (3rd ed. 1997)] 참조). 단일 쇄 항체 또는 재조합 항체를 제조하는 기법 (미국 특허 4,946,778, 미국 특허 번호 4,816,567)을 적합화시켜 본 발명의 폴리펩티드에 대한 항체를 제조할 수 있다. 또한, 트랜스제닉 마우스, 또는 다른 유기체, 예컨대 다른 포유동물을 사용하여 인간화된 또는 인간 항체를 발현시킬 수 있다 (예컨대, 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, 문헌 [Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)]; [Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994)]; [Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994)]; [Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996)]; [Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996)]; 및 [Lonberg & Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)] 참조). 별법으로, 파지 디스플레이 기법을 사용하여 선택된 항원에 특이적으로 결합하는 항체 및 헤테로머 Fab 단편을 확인할 수 있다 (예컨대, 문헌 [McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990)]; [Marks et al., *Biotechnology* 10:779-783 (1992)] 참조). 항체는 또한 이중특이성인 것으로 제조될 수 있으며, 즉, 상이한 두 항원을 인식할 수 있는 것으로 제조될 수 있다 (예컨대, WO 93/08829, 문헌 [Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991)]; 및 [Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121 :210 (1986)] 참조). 항체는 또한 헤테로접합체, 예컨대 2개가 공유적으로 연결된 항체, 또는 면역 독소일 수 있다 (예컨대, 미국 특허 번호 4,676,980, WO 91/00360; WO 92/200373; 및 EP 03089 참조).

[0177] 항체는 원핵 및 진핵 발현 시스템을 비롯한 임의의 다수의 발현 시스템을 사용하여 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, 발현 시스템은 포유동물 세포 발현 시스템, 예컨대 하이브리도마, 또는 CHO 세포 발현 시스템이다. 상기와 같은 시스템 다수는 상업적 공급업체로부터 널리 이용가능하다. 항체가 V_H 및 V_L 영역 둘 모두를 포함하는 실시양태에서, V_H 및 V_L 영역은 단일 벡터를 사용하여, 예컨대 디-시스트론 발현 단위로, 또는 상이한 프로모터의 제어하에 발현될 수 있다. 다른 실시양태에서, V_H 및 V_L 영역은 별개의 벡터를 사용하여 발현될 수 있다. 본원에 기술된 V_H 또는 V_L 영역은 임의로 N-말단에 메티오닌을 포함할 수 있다.

[0178] 본원에 기술된 항체는 또한 Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, 또는 dAB를 비롯한, 다양한 포맷으로 제조될 수 있다. 항체 단편은 무손상 항체를 효소, 예컨대 패신으로 처리하여 ((Fab')₂ 단편 생성), 또는 파파인으로 처리하여 (Fab 단편 생성) 분해하는 방법; 또는 새로 합성하는 방법을 비롯한, 다양한 방법에 의해 수득될 수 있다. 항체 단편은 또한 재조합 DNA 방법을 사용하여 합성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항- β 8 항체는 β 8에 특이적으로 결합하는 F(ab')₂ 단편을 포함한다. 본 발명의 항체는 또한 인간 불변 영역도 포함하 수 있다. 예컨대, 문헌 [Fundamental Immunology (Paul ed., 4d ed. 1999)]; [Bird, et al., *Science* 242:423 (1988)]; 및

[Huston, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879 (1988)]을 참조할 수 있다.

[0179] 비-인간 항체를 인간화 또는 영장류화시키는 방법 또한 당업계에 주지되어 있다. 일반적으로, 인간화된 항체에는 비-인간 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입되어 있다. 이러한 비-인간 아미노산 잔기는 종종 이입 잔기로 지칭되고, 이는 전형적으로 이입 가변 도메인으로부터 취해진다. 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 인간 항체의 상응하는 서열을 치환함으로써, 인간화를 본질적으로 원터(Winter) 및 동료의 방법에 따라 수행할 수 있다 (예컨대, 문헌 [Jones et al., *Nature* 321 :522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988)]; [Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988)]; 및 [Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)] 참조). 상기 인간화된 항체는 무순상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 서열이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체이다 (미국 특허 번호 4,816,567). 실제로, 전형적으로 인간화된 항체는 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체 내의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

[0180] 일부 경우에서, 항체 또는 항체 단편은 또 다른 분자, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG화) 또는 혈청 알부민에 접합될 수 있고, 이로써 생체내 반감기는 연장될 수 있다. 항체 단편의 PEG화에 대한 문헌 [Knight et al., *Platelets* 15:409, 2004] (암식시맙의 경우); [Pedley et al., *Br. J. Cancer* 70: 1126, 1994] (항-CEA 항체의 경우); [Chapman et al., *Nature Biotech.* 17:780, 1999]; 및 [Humphreys, et al., *Protein Eng. Des.* 20: 227, 2007]에 제공되어 있다. 항체 또는 항체 단편은 또한 하기 기술되는 바와 같이, 표지화될 수 있거나, 또는 치료제에 접합될 수 있다.

[0181] 항체 결합 특이성은 일반적으로 환경 또는 비관련 분자 중의 항체 및 다른 물질에 관한 해리 상수와의 비교로, 표적 (예컨대, β 8)에 대한 항체의 상대적인 해리 상수 (K_d)로 정의될 수 있다. 전형적으로, 비관련 물질에 관한 항체에 대한 K_d 는 표적에 관한 K_d 보다 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배, 200배 이상 더 높을 것이다.

[0182] 항체에 대해 바람직한 친화도, 예컨대 높거나 (pM 내지 낮은 nM), 중간 정도이거나 (낮은 nM 내지 100 nM), 또는 낮은 (약 100 nM 이상) 친화도는 항체가 진단제로서 또는 치료제로서 사용되는지에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 원하는 조작으로 국소화시키는 데 있어서 중간 정도의 친화도를 갖는 항체가 높은 친화도를 갖는 것과 비교하여 더 성공적일 수 있다. 따라서, 상이한 친화도를 갖는 항체가 진단학적 및 치료학적 적용을 위해 사용될 수 있다.

[0183] 표적화 모이어티는 전형적으로 약 1,000 nM 미만, 예컨대 250, 100, 50, 20 nM 미만, 또는 그보다 더 낮은 값의 K_d 로 결합할 것이다. 일부 실시양태에서, 친화도 작용제의 K_d 는 15, 10, 5, 또는 1 nM 미만이다. 일부 실시양태에서, K_d 는 1-100 nM , 0.1-50 nM , 0.1-10 nM , 또는 1-20 nM 이다. 해리 상수 (K_d) 값은 주지된 방법에 의해 측정될 수 있고, 예컨대 문헌 [Caceci et al., *Byte* (1984) 9:340-362]에 개시된 바와 같은 방법에 의해 심지어는 복합체 혼합물에 대해서도 산정될 수 있다.

[0184] 표적에 대한 항체, 또는 임의의 표적화제의 친화도는 당업계에 공지된 방법에 따라, 예컨대 문헌 [Ernst et al., *Determination of Equilibrium Dissociation Constants, Therapeutic Monoclonal Antibodies* (Wiley & Sons ed. 2009)]에 검토되어 있는 바와 같이 측정될 수 있다.

[0185] 정량적 ELISA, 및 유사한 어레이-기반 친화도 방법이 사용될 수 있다. ELISA (효소 결합 면역 흡착 신호전달 측정법)이 항체 기반 방법이다. 일부 경우에서, 관심의 대상이 되는 표적에 대해 특이적인 항체를 기판에 고정시키고, 표적을 함유할 것으로 의심되는 샘플과 접촉시킨다. 이어서 표면을 세척하여 비결합 물질을 제거한다. 다양한 방법으로, 예컨대 표지화된 항체를 이용하는 2단계, 표적의 직접적인 표지화, 또는 항원 결합시 겹출 가능한 표지로 1차 항체를 표지화하는 것을 사용하여 표적 결합을 겹출할 수 있다. 일부 경우에서, (예컨대, 단백질에 대하여 높은 친화도를 갖는 기판, 또는 스트렙타비딘-비오틴 상호작용을 이용하여) 항원을 기판에 고정시키고, 표지화된 항체 (또는 다른 표적화 모이어티)를 사용하여 겹출한다. 원래의 ELISA 방법에 대한 여러가지 순열 방법이 개발되었고, 이는 당업계에 공지되어 있다 (검토를 위해, 문헌 [Lequin (2005) *Clin. Chem.* 51:2415-18] 참조).

[0186] K_d , K_{on} (Kon) 및 K_{off} (Koff)는 또한, 예컨대 비아코어(Biacore) T100 시스템을 사용함으로써 측정되는 바와 같이, 표면 플라즈몬 공명 (SPR)을 사용함으로써 측정될 수 있다. SPR 기법은 예컨대 문헌 [Hahnfeld et al., *Determination of Kinetic Data Using SPR Biosensors, Molecular Diagnosis of Infectious Diseases* (2004)]에 검토되어 있다. 전형적인 SPR 실험에서, 한 상호반응물 (표적 또는 표적화제)를 유세포 중의 SPR-활성,

금으로 코팅된 유리 슬라이드 상에 고정화시키고, 나머지 다른 한 상호반응물을 함유하는 샘플을 도입하여 표면을 가로질러 유동할 수 있게 한다. 주어진 주파수의 광을 표면 상에 조사하였을 때, 금의 광학적 반사도의 변화가 결합, 및 결합의 동역학적 성질을 나타낸다.

[0187] 결합 친화도는 또한 비오티닐화된 상호반응물을 스트렙타비덴 (SA) 센서 칩에 부착시킴으로써 측정될 수 있다. 이어서, 다른 상호반응물을 칩과 접촉시키고, 예컨대 문헌 [Abdessamad et al., (2002) *Nuc. Acids Res.* 30:e45]에 기술된 바와 같이 검출한다.

V. 제약 적용 및 조성물

[0189] 본원에 기술된 항- $\alpha v\beta 8$ 항체 (그의 $\alpha v\beta 8$ 결합 단편, 표지화된 항체, 면역접합체, 제약 조성물 등 포함)는 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD) 및 천식을 검출, 치료, 호전 또는 예방시키는 데 사용될 수 있다.

[0190] 본원에 기술된 항- $\alpha v\beta 8$ 항체 (그의 $\alpha v\beta 8$ 결합 단편, 표지화된 항체, 면역접합체, 제약 조성물 등 포함)는 염증성 장 질환을 검출, 치료, 호전 또는 예방시키는 데 사용될 수 있다.

[0191] 본원에 기술된 항- $\alpha v\beta 8$ 항체 (그의 $\alpha v\beta 8$ 결합 단편, 표지화된 항체, 면역접합체, 제약 조성물 등 포함)는 염증성 뇌 자가면역 질환, 다발성 경화증, 탈수초성 질환 (예컨대, 횡단 척수염, 데비병, 길랭-바雷 증후군), 신경염증, 신장 질환, 또는 신경교종을 검출, 치료, 호전 또는 예방시키는 데 사용될 수 있다.

[0192] 본원에 기술된 항- $\alpha v\beta 8$ 항체 (그의 $\alpha v\beta 8$ 결합 단편, 표지화된 항체, 면역접합체, 제약 조성물 등 포함)는 관절염을 검출, 치료, 호전 또는 예방시키는 데 사용될 수 있다.

[0193] 본원에 기술된 항- $\alpha v\beta 8$ 항체 (그의 $\alpha v\beta 8$ 결합 단편, 표지화된 항체, 면역접합체, 제약 조성물 등 포함)는 다양한 섬유화 장애, 예컨대 기도 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 비-특이 간질성 폐렴, 감염 후 폐 섬유증, 미만성 폐포 손상, 콜라겐-혈관 질환 관련 폐 섬유증, 약물 유도성 폐 섬유증, 규폐증, 석면증-관련 폐 섬유증, 호흡 세기관지염, 호흡 세기관지염 간질성 폐 질환, 박리성 간질성 섬유증, 특발성 기질화 폐렴, 만성 과민성 폐렴, 약물-관련 폐 또는 간 섬유증, 신장 섬유증, 및 간 섬유증 (예컨대, 알콜, 약물 남용, 지방간염, 바이러스성 감염 (예컨대, B형 및 C형 간염), 담즙 정체 등에 의해 유도된 것)을 검출, 치료, 호전 또는 예방시키는 데 사용될 수 있다.

[0194] 본원에 기술된 항- $\alpha v\beta 8$ 항체 (그의 $\alpha v\beta 8$ 결합 단편, 표지화된 항체, 면역접합체, 제약 조성물 등 포함)는 선암종, 편평세포 암종, 유방 암종, 및 암 성장 및 전이를 검출, 치료, 호전 또는 예방시키는 데 사용될 수 있다.

[0195] 제약 조성물의 성질, 및 투여 경로는 부분적으로는 치료하는 병증에 따라 달라질 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0196] 경구 투여에 적합한 제제로는 (a) 액체 액제, 희석제, 예컨대 물, 염수 또는 PEG 400 중에 혼탁된 유효량의 폐 키지된 핵산; (b) 액체, 고체, 과립 또는 젤라틴으로서 각각 미리 정해진 양의 활성 성분을 함유하는 캡슐제, 사세 또는 정제; (c) 적절한 액체 중의 혼탁제; 및 (d) 적합한 에멀젼으로 이루어질 수 있다. 정제 형태는 락토스, 수크로스, 만니톨, 소르비톨, 인산칼슘, 옥수수 전분, 감자 전분, 미세결정질 셀룰로스, 젤라틴, 콜로이드성 이산화규소, 활석, 스테아르산마그네슘, 스테아르산 및 다른 부형제, 착색제, 충전제, 결합제, 희석제, 완충제, 보습제, 보존제, 향미제, 염료, 봉해제, 및 제약상 화합성인 담체 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 로젠지 형태는 향미제, 예컨대 수크로스 중 활성 성분을 포함할 수 있을 뿐만 아니라, 파스틸은 불활성 기재, 예컨대 젤라틴 및 글리세린 또는 수크로스 및 아카시아 내의 활성 성분을 포함하며, 에멀젼, 젤 등은 활성 성분 이외에도 당업계에 공지된 담체를 함유한다.

[0197] 본원에 기술된 항체 (또는 그의 $\alpha v\beta 8$ 결합 단편)를 포함하는 제약 조성물은 단독으로 또는 다른 적합한 성분과 함께 투여될 수 있고, 흡입을 통해 투여하고자 하는 에어로졸 제제로 제조될 수 있다 ("분무될 수 있다"). 에어로졸 제제를 허용되는 가압형 추진제, 예컨대 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소 등 안에 배치시킬 수 있다.

[0198] 직장 투여용으로 적합한 제제로는 예를 들어, 폐키지된 핵산과 좌제 기재로 이루어진 좌제를 포함한다. 적합한 좌제 기재로는 천연 또는 합성 트리글리세리드 또는 파라핀 탄화수소를 포함한다. 추가로, 선택된 화합물과, 예를 들어, 액체 트리글리세리드, 폴리에틸렌 글리콜 및 파라핀 탄화수소를 비롯한 기재의 조합물로 이루어진 직장용 젤라틴 캡슐제를 사용하는 것 또한 가능하다.

[0199]

비경구 투여, 예컨대 관절내 (관절안으로), 정맥내, 근육내, 종양내, 진피내, 복강내, 및 피하 경로에 의한 투여에 적합한 제제는 항산화제, 완충제, 정균제, 및 제제를 의도하는 수용자의 혈액과 등장성이 되도록 하는 용질을 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 등장성 멸균 주사액, 및 혼탁화제, 가용화제, 증점제, 안정화제 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 혼탁제를 포함한다. 본 발명의 실시에서, 조성물은 예를 들어, 정맥내 주입에 의해, 경구적으로, 국부적으로, 복강내로, 방광내로 또는 경막내로 투여될 수 있다. 항체는 전형적으로 비경구 투여, 또는 정맥내 투여에 의해 투여된다. 화합물로 이루어진 제제는 단위-용량 또는 다중-용량의 밀봉 용기, 예컨대 앰플 및 바이알로 제공될 수 있다.

[0200]

상기 기술된 종류의 멸균 분제, 과립제, 및 정제로부터 주사액 및 혼탁액이 제조될 수 있다. 비경구적으로 투여될 수 있는 조성물을 제조하는 방법은 공지되어 있거나, 또는 당업자에게 자명하고, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980)]과 같은 공개 문헌에 더욱 상세하게 기술되어 있다.

[0201]

투여용 조성물은 전형적으로 제약상 허용되는 담체, 예컨대 수성 담체 중에 용해된, 본원에 기술된 항체 (예컨대, 항- $\alpha v\beta 8$ 항체 또는 그의 $\alpha v\beta 8$ 결합 단편 또는 면역접합체)를 포함한다. 다양한 수성 담체, 예컨대 완충처리된 염수가 사용될 수 있다. 이러한 용액은 멸균성이고, 일반적으로 바람직하지 못한 물질은 함유하지 않는다. 상기 조성물은 종래의 주지된 멸균화 기법에 의해 멸균 처리될 수 있다. 조성물은 생리학적 조건에 근접하도록 하는 데 필요한 제약상 허용되는 보조 무질, 예컨대 pH 조절제 및 완충제, 예를 들어, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 락트산나트륨 등을 함유할 수 있다. 상기 제제 중의 활성 작용제의 농도는 광범위하게 달라질 수 있으며, 선택된 특정 투여 모드 및 환자의 필요에 따라, 주로 유체부피, 점도, 체중 등에 기초하여 선택될 것이다.

[0202]

제제는 또한 화학요법제, 세포독성제, 시토카인, 성장 억제제, 및 항호르몬제를 비롯한, 추가의 활성 화합물을 제공할 수 있다. 활성 성분은 지속 방출형 제제 (예컨대, 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스 (예컨대, 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드))로서 또한 제조될 수 있다. 항체 및 면역접합체는 또한 예를 들어, 코아세르베이션 기법에 의해, 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐) 내에, 또는 마크로에멀젼 내에 포획될 수 있다.

[0203]

VI. 진단학적 조성물 및 적용

[0204]

인테그린 $\alpha v\beta 8$ 는 섬유모세포, 성상 세포, 연골세포, 활성화된 대식세포 및 T 및 B 세포의 서브세트 상에서 발현된다. 인테그린 $\alpha v\beta 8$ 은 COPD 및 폐 섬유증에서 섬유모세포에서의 발현이 증가되어 있고, 이는 섬유모세포 세포과 증가에 대한 대체 마커로서 사용될 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 항체는 섬유염증성 과정을 검출하는 생체영상 전략법에 광범위하게 적용될 수 있다. 본원에 기술된 치료학적 및 진단학적 항체는 염증성 장 질환 (IBD), 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 천식, 관절염, 간 섬유염증성 장애, 알콜 유도성 간 손상, 비-알콜성 지방간염 (NASH), 바이러스성 간염, 및 원발성 담즙성 간경변증 (PBC), 간 이식 후 이식편 거부 반응, 자가면역 간염, 자가면역 장애, 홍반성 루푸스, 공피증, 피부근염, 수포성 유천포창, 심상성 천포창, 폐 섬유화 장애, 염증성 뇌 자가면역 질환, 다발성 경화증, 탈수초성 질환, 신경염증, 신장 질환, 사구체신염, 간세포 암종 (HCC), 선암종, 편평세포 암종, 신경교종, 흑색종, 전립선 암종, 난소 암종, 자궁 암종 및 유방 암종에 적용될 수 있다.

[0205]

상기 설명된 바와 같이, 본원에 기술된 항- $\alpha v\beta 8$ 항체 (그의 $\alpha v\beta 8$ 결합 단편, 친화도 성숙된 변이체, 및 50 또는 25 kD 미만의 항체 변이체 또는 scFv 포함)는 (예컨대, 개체로부터 수득된 생물학적 샘플을 사용하는) 생체내 또는 시험관내 진단에 사용될 수 있다. 항체는 전형적으로 검출가능한 표지에 접합되거나, 또는 다르게는 그와 회합된다. 회합은 직접적인 회합, 예컨대 공유 결합이거나, 간접적인 회합, 예컨대 제2 결합체, 퀄레이터 또는 링커를 사용하는 것일 수 있다.

[0206]

의도된 요법의 적용가능성을 측정하기 위해 표지화된 항체를 개체에게 제공할 수 있다. 예를 들어, 표지화된 항체를 사용하여 이환부 내의 인테그린 $\beta 8$ 의 밀도를 검출할 수 있다. TGF β 또는 $\alpha v\beta 8$ 활성을 표적화하는 것 (TGF β 또는 $\alpha v\beta 8$ 활성을 감소시키는 것)을 목적으로 하는 요법의 경우, 전형적으로 $\beta 8$ 의 밀도는 비-이환 조직에 비하여 높다. 표지화된 항체는 또한 이환부에 요법이 이용될 수 있는지 여부를 나타낼 수 있다. 따라서, 환자는 영상화 결과에 기초하여 요법에 대하여 선택될 수 있다. 해부학적 특징 규명, 예컨대 암의 정화한 경계를 결정짓는 것은 표준 영상화 기법 (예를 들어, CT 스캐닝, MRI, PET 스캐닝 등)을 사용하여 달성될 수 있

다. 상기와 같은 생체내 방법은 본원에 개시된 항체 중 임의의 것을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, TGF β 수준에 어떤 영향도 주지 않는 바, 표지화된 14E5가 사용된다.

[0207] 본원에 개시된 항체 중 임의의 것은 또한 예컨대, 환자 샘플로부터의 세포 또는 조직을 사용하는 시험관내 진단학적 또는 모니터링 방법에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 고정된 세포 뿐만 아니라, 비-고정된 세포에도 결합할 수 있는 바, 표지화된 11E8 (또는 β 8 결합 단편 또는 친화도 성숙된 변이체)이 사용된다. 일부 실시양태에서, 고정된 세포 뿐만 아니라, 비-고정된 세포에도 결합할 수 있고, β 8 결합에 대하여 치료학적 항체, 예컨대 11E8, 37E1, 또는 37E1B5와 경쟁하지 않는 바, 표지화된 6B9 (또는 β 8 결합 단편 또는 친화도 성숙된 변이체)가 사용된다. 일부 실시양태에서, 고정된 세포 뿐만 아니라, 비-고정된 세포에도 결합할 수 있고, β 8 결합에 대하여 치료학적 항체, 예컨대 11E8, 37E1, 또는 37E1B5와 경쟁하지 않는 바, 표지화된 4F1 (또는 β 8 결합 단편 또는 친화도 성숙된 변이체)이 사용된다.

[0208] 일부 실시양태에서, 진단학적 항체는 단일 쇄 가변 단편 (scFv)이다. 무손상 항체 (예컨대, IgG)는 높은 흡수 및 체류를 보이는 바, 방사성면역요법 또는 치료제의 표적화된 전달을 위해 사용될 수 있다. 일부 경우에서, 무손상 mAb의 순환이 지속되면 배경은 높아질 수 있다 (문헌 [Olafsen et al., (2012) *Tumour Biol.* 33:669-77]; [Cai et al., (2007) *J Nucl Med.* 48:304-10]). 전형적으로 분자량이 ~25 kD인 ScFv는 신장에 의해 빠르게 배출되지만, 1가이고, 보다 낮은 친화도를 가질 수 있다. 1가인 것이 갖는 문제는 (본원에 제시된 것과 같은) 진보된 항체 조작을 통해 극복될 수 있고, 여기서 친화도는 낮은 nM 내지 pM 범위로까지 개선될 수 있다. 상기 항체는 영상화제로서 유용한 충분히 짧은 반감기를 가지며, 조직 표적화에 적합한 결합 특징을 가진다 (문헌 [Cortez-Retamozo et al., (2004) *Cancer Res.* 64:2853-7]). 본원에 제시되어 있는 바와 같이, 본 발명자들은 인간화된 scFv 플랫폼으로 전환될 수 있는, 매우 높은 친화도를 갖는, 4F1, 6B9 및 14E5의 scFv 항체 유도체 다수를 생성하였다. 상기의 개선된 항체는 기능을 차단시키지 않으며, 따라서, β 8을 표적화하는 치료제와 함께 병용하여 사용될 수 있다.

[0209] 본원에 기술된 항체를 포함하는 진단제로는 예를 들어, 하기 참고 문헌: [Armstrong et al., *Diagnostic Imaging*, 5th Ed., Blackwell Publishing (2004)]; [Torchilin, V. P., Ed., *Targeted Delivery of Imaging Agents*, CRC Press (1995)]; [Vallabhajosula, S., *Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT*, Springer (2009)]에 제공되어 있는 것과 같은, 당업계에 공지된 임의의 진단제를 포함할 수 있다. "검출가능한 작용제," "검출가능한 모이어티," "표지," "영상화제" 등의 용어는 본원에서 동의어로 사용된다. 진단제는 검출가능한 신호를 제공하고/거나 증강시키는 작용제로서 사용되는 것을 비롯한, 다양한 방식에 의해 검출될 수 있다. 검출가능한 신호로는 감마-방출 신호, 방사성 신호, 에코 발생 신호, 광학 신호, 형광 신호, 흡수성 신호, 자기 신호 또는 단층촬영술 신호를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 진단제를 영상화하는 기법으로는 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영술 (SPECT), 자기 공명 영상화 (MRI), 광학적 영상화, 양전자 방출 단층촬영술 (PET), 컴퓨터 단층촬영술 (CT), x선 영상화, 감마선 영상화 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. PET는 특히 고감도이고, 정량적이며, 따라서, 생체내 섬유화 과정을 특징 규명하는 데 가치가 있다 (문헌 [Olafsen et al., (2012) *Tumour Biol.* 33:669-77]; [Cai et al., (2007) *J Nucl Med.* 48:304-10]). 이는 동반 진단제 이상으로 유용하며, 일반적으로는 임의의 치료 요법 동안 섬유화 환자를 진단하고, 임상적 병历来 결정하고, 추적 조치하는 데 유용할 것이다.

[0210] 방사성 동위원소가 본원에 기술된 진단제 내로 혼입될 수 있고, 감마선, 양전자, 베타 및 알파 입자, 및 X선을 방출하는 방사성 핵종을 포함할 수 있다. 적합한 방사성 핵종으로는 ^{225}Ac , ^{72}As , ^{211}At , ^{11}B , ^{128}Ba , ^{212}Bi , ^{75}Br , ^{77}Br , ^{14}C , ^{109}Cd , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^3H , ^{166}Ho , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{130}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{13}N , ^{15}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{212}Pb , ^{103}Pd , ^{186}Re , ^{47}Sc , ^{153}Sm , ^{89}Sr , ^{99m}Tc , ^{88}Y 및 ^{90}Y 를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정 실시양태에서, 방사성 작용제로는 $^{111}\text{In-DTPA}$, $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DTPA}$, $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-ENPy2}$, $^{62/64/67}\text{Cu-TETA}$, $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-IDA}$, 및 $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-트리아민}$ (시클릭 또는 선형)을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 작용제로는 ^{111}In , ^{177}Lu , ^{153}Sm , $^{88/90}\text{Y}$, $^{62/64/67}\text{Cu}$, 또는 $^{67/68}\text{Ga}$ 를 포함하는 DOTA 및 그의 다양한 유사체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 나노입자는 하기의 참고 문헌: 문헌 [Phillips et al., *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(1): 69-83 (2008)]; [Torchilin, V.P. & Weissig, V., Eds. *Liposomes 2nd Ed.*: Oxford Univ. Press (2003)]; [Elbayoumi, T.A. & Torchilin, V.P., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 33: 1196-1205 (2006)]; [Mougin-Degraef, M. et al., *Int'l J. Pharmaceutics* 344: 110-117 (2007)]에서 제공된

바와 같이, 칼레이트에 부착된 지질, 예컨대 DTPA-지질의 혼입에 의해 표지화될 수 있다.

[0211] 일부 실시양태에서, 진단제는 예컨대, 금속 이온에 결합하여 다양한 진단학적 영상화 기법에 사용되는 칼레이터를 포함할 수 있다. 칼레이터의 예로는 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA), [4-(1,4,8,11-테트라아자시클로테트라에-1-일)메틸] 벤조산 (CPTA), 시클로헥산디아민테트라아세트산 (CDTA), 에틸렌비스(옥시에틸렌니트릴로)테트라아세트산 (EGTA), 디에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA), 시트르산, 헤드록시에틸 에틸렌디아민 트리아세트산 (HEDTA), 이미노디아세트산 (IDA), 트리에틸렌 테트라아민 헥사아세트산 (TTHA), 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라(메틸렌 포스폰산) (DOTP), 1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸-1,4,8,11-테트라아세트산 (TETA), 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 (DOTA), N¹,N¹-비스(파리딘-2-일메틸)에탄-1,2-디아민 (ENPy2) 및 그의 유도체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0212] 일부 실시양태에서, 진단제는 발색 기질과의 접촉시 유색 생성물을 생성시키는 효소 (효소 태그)에 또는 2차 결합 리간드와 회합될 수 있다. 적합한 효소의 예로는 우레아제, 알칼리성 포스파타제, (호스래디쉬) 수소 퍼옥시다제 및 글루코스 옥시다제를 포함한다. 2차 결합 리간드로는, 예컨대 당업계에 공지된 바와 같은 비오틴 및 아비딘 또는 스트렙타비딘 화합물을 포함한다.

[0213] 일부 실시양태에서, 진단제로는 광학 작용제, 예컨대 형광 작용제, 인광 작용제, 화학발광 작용제 등을 포함할 수 있다. 다수의 작용제 (예컨대, 염료, 프로브, 표지 또는 지시약)가 당업계에 공지되어 있고, 본 발명에서 사용될 수 있다 (예컨대, [Invitrogen, The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Tenth Edition (2005)] 참조). 형광 작용제로는 다양한 유기 및/또는 무기 소형 분자 또는 다양한 형광 단백질 및 그의 유도체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 형광 작용제로는 시아닌, 프탈로시아닌, 포르피린, 인도시아닌, 로다민, 페녹사진, 페닐크산텐, 페노티아진, 페노셀레나진, 플루오레세인, 벤조포르피린, 스쿠아레인, 디페롤로 피리미돈, 테트라센, 퀴놀린, 피라진, 코린, 크로코늄, 아크리돈, 페난트리딘, 로다민, 아크리딘, 안트라퀴논, 칼코제노피릴륨 유사체, 클로린, 나프탈로시아닌, 메틴 염료, 인돌레늄 염료, 아조화합물, 아줄렌, 아자아줄렌, 트리페닐 메탄 염료, 인돌, 벤조인돌, 인도카르보시아닌, 벤조인도카르보시아닌, 및 보디피(BODIPY)™ 유도체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

VII. 치료 방법

[0215] 본원에 기술된 항- $\alpha v\beta 8$ 항체 및 그의 $\alpha v\beta 8$ -결합 단편 또는 면역접합체는 공지된 방법을 사용하여, 예컨대 정맥내 투여를 사용하여, 예컨대 볼루스로서, 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입에 의해, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 폐하, 관절내, 활막내, 경막내, 경구, 국부 (예컨대, 경피), 또는 흡입 경로에 의해 개체에게 투여될 수 있다. 투여는 국소 또는 전신 투여될 수 있다.

[0216] 조성물은 치료학적 또는 예방학적 치료를 위해 투여될 수 있다. 치료학적 적용에서, 조성물은 "치료학상 유효 용량으로" 질환 (예컨대, IBD, 암, 섭유증 (폐 또는 간), COPD, 천식, 관절염 등)을 앓는 환자에게 투여된다. 상기 용도에 효과적인 양은 치료하고자 하는 장애, 투여 경로, 병증의 중증도, 및 환자의 일반적인 건강 상태에 따라 달라질 것이다. 환자의 요구대로, 및 환자가 허용하는 대로, 투여량 및 빈도에 따라 조성물은 단일 또는 다중 투여로 투여될 수 있다. 본원에 기술된 조성물은 인간 및 다른 동물, 특히 포유동물에게 투여될 수 있다. 따라서, 본 방법은 인간 요법 및 수의학적 적용 둘 모두에 적용될 수 있다. 다른 공지된 암 요법이 본 발명의 방법과 함께 병용하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 용도로 사용되는 조성물은 또한 세포를 다른 암 치료제, 예컨대 5FU, 빈블라스틴, 악티노마이신 D, 시스플라틴, 메토트렉세이트 등에 표적화시키거나 또는 감작화시키는 데 사용될 수 있다. 본원에 기술된 조성물은 또한 방사선요법 또는 면역요법 뿐만 아니라, 현재 개발 중에 있는 치료제와 함께 병용될 수 있다.

[0217] 병용 요법은 별개의 제제 또는 단일 제약 제제를 사용하는 공동 투여, 및 임의의 순서대로 투여하는 연속 투여를 고려한다.

[0218] 치료학상 유효 용량을 결정하기 위해, 먼저 저용량의 항- $\alpha v\beta 8$ 항체 (또는 그의 $\alpha v\beta 8$ 결합 단편 또는 면역접합체)를 개체에게 투여할 수 있으며, 개체의 병증이 호전될 때까지, 상기 용량을 증분식으로 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 초기 투여량은 1일당 약 0.001 mg/kg 내지 약 1 mg/kg일 수 있다. 최저 용량일 때 개체의 병증에 변함이 없다면, 추후 시점에는 약 0.01 mg/kg 내지 약 500 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 200 mg/kg, 또는 약 1 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 또는 약 10 mg/kg 내지 약 50 mg/kg의 1일 용량 범위가 사용될 수 있다. 상기 언급한 바와 같이, 당업자는 치료학상 유효 용량을 결정할 때, 다수의 변수가 고려되어야 한다는 점을 이해할 것이다. 환자에게 투여되는 용량은 시간이 경과함에 따라 환자에서 유익한 치료학적 반응을 발휘하는 데 충분

하여야 한다. 용량 크기 또한 특정 환자에서 특정 조성물 (또는 병용 요법) 투여를 동반하는 임의의 유해한 부작용의 존재, 성질 및 정도에 의해 결정될 것이다.

VIII. 실시예

A. 실시예 1: 37E1B5 항체

37E1, 37E1B5, 및 인간화된 37E1B5 (h37E1B5 또는 Hu37E1B5)의 중쇄 및 경쇄 V 영역 서열은 도 1에 제시되어 있다. 프레임워크 및 CDR 영역도 제시되어 있다. 인간화된 37E1B5 항체는 37E1B5의 높은 친화도 및 활성을 유지한다.

시험관내 배양물 중 약 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 37E1은 활성인 성숙 TGF β 펩티드의 방출을 억제시킨다. 상기 설명된 바와 같이, 37E1B5는 훨씬 더 높은 친화도를 가지며, 피코몰 범위로 활성을 띤다. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 37E1B5는 시험관내 배양물 중에서 활성인 성숙 TGF β 펩티드의 방출을 억제시키는 데 매우 효과적이다.

B. 실시예 2: 11E8 및 14E5 항체 생성

SP2/0 골수종 세포를, 특별히 면역화된 마우스로부터의 램프구와 융합시켜 생성된 하이브리도마 세포에서 11E8 및 14E5 항체를 제조하였다. 분비된, 정제된 인테그린 $\alpha\text{v}\beta 8$ 의 조작된 버전을 피하 주사함으로써 마우스를 면역화시켰다.

C. 실시예 3: $\beta 8$ 에피토프 특징 규명

마우스 서열을 인간 ITGB8로 치환해 넣은 키메라 인테그린 $\beta 8$ 구축물을 사용하여 37E1B5, 11E8, 및 14E5 항체에 대한 결합 에피토프의 위치를 알아내었다. 항체 결합, 세포 표면 염색, 및 유세포 측정법에 의한 검출에 의해 에피토프의 위치를 알아내었다. 에피토프는 (서열 17에 제시된 $\beta 8$ 서열에 상대적으로) 인간 인테그린 $\beta 8$ 의 아미노산 121-180 내에 포함되어 있다. 상기 3가지 항체 모두 인간 $\beta 8$ 에 결합하였지만, 마우스 $\beta 8$ 에는 결합하지 않았다. 그러므로, 9개의 비-보존적 아미노산 차이 또는 7개의 작은 아미노산 차이 (중간선의 서열에서 +로 표시) 중 하나 이상이 결합 에피토프에 포함되어 있거나, 또는 마우스와 인간 단백질을 구별 짓게 하는 방식으로 도메인의 3차원 구조에 영향을 준다고 볼 수 있다. 에피토프는 Psi 하이브리드, 및 인테그린 $\beta 8$ 서브유닛의 베타-I 도메인의 알파1 나선형 및 알파1 링커 영역으로 알려져 있는 것에 포함되며, 이는 분자의 표면에서 발견된다.

```

M itgb8 121 GEVSVQLHPGALEANFMLKVRPLKKYPVDLYYLVDVSASMHNNIEKLNSVGNDLSKKMALLY 180
          GEVS+QL PGAEEANFMLKV PLKKYPVDLYYLVDVSASMHNNIEKLNSVGNDLS+KMA +
H ITGB8 121 GEVSIQLRPGAEANFMLKVKHPLKKYPVDLYYLVDVSASMHNNIEKLNSVGNDLSRKMAFF 180

```

서열 1은 37E1B5 에피토프 (아미노산 121-180)를 포함하는 인간 인테그린 $\beta 8$ 의 영역을 나타낸다. 서열 2는 상동성인 뮤린 서열을 나타내는 것으로서, 37E1B5 항체는 그에 결합하지 않는다. 뮤린 서열의 140번 위치의 R은 다형성이고, 이는 또한 H일 수 있다. 정렬 서열은 서열 3으로 제시되어 있다.

인간을 대신하여 뮤린 서열로 치환하는 것인 상기 영역 내의 추가의 도메인 치환 연구를 수행함으로써 37E1B5 에피토프 중에 어떤 아미노산(들)이 포함되어 있는지 측정하였다. 뮤린의 인테그린 $\beta 8$ 의 아미노산 125-180을 치환시킨 결과, 37E1B5의 결합은 유의하게 감소하였다. 따라서, 인간 인테그린 $\beta 8$ 상의 에피토프는 I125, R128, R175, F179, 및 F180으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산을 포함한다.

D. 실시예 4: 11E8 항체의 특징 규명

11E8 항체는 분비된 $\alpha\text{v}\beta 8$ 을 면역침전시키고, 모의-형질감염된 세포를 제외한 $\beta 8$ 형질감염된 인간 293 배아신장 세포 및 SW480 결장 암종 세포 상에 존재하는 $\beta 8$ 서브유닛의 에피토프를 인식한다.

11E8은 ITGB8 형질감염된 SW480 세포에서 $\alpha\text{v}\beta 8$ -매개 TGF β 활성화를 특이적으로 차단시킨다. 37E1B5와 유사하게, 11E8은 높은 친화도 항체이고, 초저농도 (시험관내에서 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 시험된 최저 농도였다)에서 TGF β 차단 활성을 가진다. 11E8은 기타 다른 비- $\beta 8$ 매개 기전에 의해 매개되는 TGF β 활성화를 차단시키지 않는다.

추가로, 11E8은 포르말린-고정된 세포 상에 존재하는 $\beta 8$ 에피토프를 인식함에 따라, 인간 조직에서의 위치 측정 연구에 맞게 잘 적합화된다. 11E8 항체는 시험관내 및 생체내에서 활성을 띠며, $\alpha\text{v}\beta 8$ -매개 TGF β 활성을 감소시키는 치료제로서 사용될 수 있다. 11E8이 고정된 세포에 결합할 수 있는 능력은 규제 승인을 가속화시키는 데, (개치 치료 이전에 관심의 대상이 되는 조직에서의 $\alpha\text{v}\beta 8$ 발현을 확인하기 위하여) 환자군을 선별하는데, 환자 집단의 특징을 규명하는 데 (예컨대, $\alpha\text{v}\beta 8$ 발현의 위치 측정에 따라, 각종 치료제에 대한 반응 등),

및 (예전대, 11E8 항체 또는 또 다른 치료제로 치료받는 중인 동안) 질환 진행 상태를 모니터링하는 데 도움이 된다.

[0234] 11E8의 에피토프를 더욱 잘 정의하기 위하여, 37E1B5와의 경쟁 검정법을 수행하였다. 비표지화된 37E1B5를 첨가하자, ITGB8 (인간 인테그린 β 8) 형질감염된 SW480 세포 및 $\alpha\beta\beta$ -발현 puro 세포에 결합하는 표지화된 11E8 항체의 결합은 억제되었다. 이러한 결과는 상기 항체의 에피토프가 상당부 중복된다는 것을 나타낸다.

[0235] 서열 10 및 11에 제시되어 있는 바와 같이, 11E8에 대한 가변 영역 서열을 수득하였다. 11E8 중쇄의 CDR 1-3은 각각 SYWIE, DILPGSGTTNYNEKFKG, 및 WGWDTY이다. 11E8 경쇄의 CDR 1-3은 각각 SASQGISNYLN, YTSSLHS, QQYSNLPYT이다.

E. 실시예 5: 14E5 항체의 특징 규명

[0237] 상기에서 논의된 바와 같이, 14E5 항체는 인간 인테그린 β 8은 인식하지만, 마우스 인테그린 β 8은 인식하지 않고, 아미노산 120-180 내의 에피토프에 결합한다. 14E5 항체는 시험관내 및 생체내 둘 모두에서 $\alpha\beta\beta$ -발현 세포 상의 $\alpha\beta\beta$ 에 결합하지만, 활성인 성숙 TGF β 의 방출을 억제시키지 못한다. 14E5 항체는 높은 친화도로 결합하고, FACS 검정법에서 잘 작동하는 바, 진단 적용 또는 환자 집단 선별에 유용하다.

[0238] 14E5 항체의 에피토프를 더욱 잘 정의하기 위하여, 37E1B5와의 경쟁 검정법을 수행하였다. 비표지화된 37E1B5 항체를 첨가하자, ITGB8 형질감염된 SW480 세포 및 $\alpha\beta\beta$ -발현 puro 세포에 결합하는 표지화된 14E5 항체의 결합은 억제되었다. 상기 결과는 이들 항체의 에피토프가 중복된다는 것을 시사한다.

[0239] 서열 12 및 13에 제시되어 있는 바와 같이, 14E5에 대한 가변 영역 서열을 수득하였다. 14E5 중쇄의 CDR 1-3은 각각 TYWIE, HILPGSVITNYNEKFKG, WGWDY이다. 14E5 경쇄의 CDR 1-3은 각각 STSQDISSSLN, YTSNLHS, QQYSKLPYT이다.

F. 실시예 6: 기도 리모델링에서 인테그린 $\alpha\beta\beta$ 의 역할

[0241] TGF β 는 염증성 및 섬유화 반응에 관여한다. IL-1 β 가 β 8의 발현을 상향조절시킴에 따라, β 8은 COPD 환자의 기도에서 과다발현된다. 생체내에서의 β 8, TGF β , 및 IL-1 β 의 상호작용을 측정하기 위해 β 8-매개 기도 리모델링의 마우스 모델을 디자인하였다. 그 결과, TGF β 의 IL-1- β 유도성의, β 8-매개 활성화가 기도 리모델링에서 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다.

[0242] Cre/LoxP 시스템을 사용하여 C57BL/6 마우스에서 β 8을 결실시켰다. 기관내 아데노바이러스 IL-1 β 를, 하나의 floxed 인테그린 β 8 대립유전자 및 하나의 녹아웃 대립유전자 (Floxed/-)를 갖는 6- 내지 9주령된 마우스에서의 염증에 대한 모델로서 사용하였다. Ad-Cre와 함께 또는 그를 포함하지 않고, 아데노바이러스 인간 IL-1 β (Ad-hIL-1 β) 또는 대조군 아데노바이러스를 기관내로 투여하였다.

[0243] 콜라겐 I α 2 프로모터의 제어하에 Cre-ER(T) 융합 리콤비나제를 발현하는 마우스를 사용하여, 섬유모세포가 블레오마이신 유도성 폐 섬유증, 오브알부민 유도성 기도 리모델링, 및 Ad-IL18-유도성 기도 리모델링에서의 TGF β 의 $\alpha\beta\beta$ -매개 활성화에서 중요한 역할을 한다는 것을 밝혀냈다. 기도의 형태학적 변화는 조직학적 방법에 의해 평가하였다. Ad-hIL-1 β 투여 후 다중 시점에서의 여러 염증성 시토카인의 유전자 발현으로 염증성 반응을 특징으로 하는 유전자가 순차적으로 유도되었다는 것이 밝혀졌다.

[0244] β 8 조건부 녹아웃 마우스로부터 얻은 결과를 통해, β 8은 IL-1 β 유도성의 일과성 기도 염증 및 섬유증에 필요하다는 것이 밝혀졌다. β 8을 발현하는 마우스에 인간 IL-1 β 를 투여한 결과, TGF β 의 β 8-매개 활성화, 마우스 cc12 및 cc120 유전자 (CC 케모카인 리간드 2 및 20, 이는 염증성 반응에 관여)의 유도, 수지상 세포의 동원, 및 적응 면역 반응의 개시 및 영구화를 일으켰다.

[0245] 조건부 인테그린 β 8 녹아웃으로부터의 결과를 통해 Ad-hIL-1 β 및 오브알부민 둘 모두에 대한 염증 및 섬유화 반응은 감소하였고, 이로써, 기도 리모델링으로부터의 보호가 이루어진 것으로 나타났다. 따라서, β 8을 표적화하는 것이 기도 리모델링에서의 IL-1b 유도성 및 오브알부민-유도성 TGF- β 활성화, 및 블레오마이신-유도성 급성 폐 손상을 감소시켰다.

G. 실시예 7: 항-인테그린 β 8이 ColI 발현을 감소시킨다.

[0247] ECM 생산 증가 및 섬유모세포 수축력 증가는 기도벽 비후, 및 I형 콜라겐 (ColI) 증가 및 평활근 액틴 (α -SMA)에서 관찰되는 섬유화 반응의 흔적이다. 중화 항- β 8을 사용하여 자가분비 $\alpha\beta\beta$ -매개 TGF β 활성화가 섬유증 유발성 반응에 기여하는 바를 평가하였다. 기도 섬유모세포를 β 8 차단 항체로 처리한 결과, α -SMA 발

현 및 ColI 분비는 억제되었고, 이는 TGF β 의 $\alpha\text{v}\beta 8$ -매개 활성화가 근섬유모세포 표현형에 영향을 준다는 것을 시사한다. 기도 섬유모세포를 화생성 인간 기관지 편평 상피 세포와 공동 배양한 결과, 기도 섬유모세포에 의한 ColI 단백질 발현은 증가하였는데, 이는 IL-1 β - 및 섬유모세포 $\beta 8$ -의존성이었다. ColI 발현 증가는 기도 섬유모세포를 $\beta 8$ siRNA로 형질감염시킴으로써 거의 완전하게 억제시킬 수 있었으며, 이는 TGF β 의 $\beta 8$ 매개 활성화를 억제시키면, 섬유증 유발성 반응을 감소시킬 수 있고, 섬유화 병증을 호전시킬 수 있다는 것을 시사한다.

[0248] H. 실시예 8: COPD 섬유모세포에서의 인테그린 $\beta 8$ 발현

[0249] 조직 염색 및 1차 배양을 사용하여 인간 COPD 환자의 폐로부터의 섬유모세포에서 인테그린 $\beta 8$ 발현을 검출하였는데, 이는 비-COPD 조직에서보다 더 높았다. 인테그린 $\beta 8$ 발현 또한 정상적인 환자로부터의 섬유모세포와 비교하여, 특발성 폐 섬유증 환자로부터 단리된 섬유모세포에서 증가되어 있었다. COPD 섬유모세포 또한 정상적인 폐 섬유모세포와 비교하여 IL-1 β -의존성 인테그린 $\alpha\text{v}\beta 8$ 단백질 발현이 증가되어 있었다. 이러한 데이터는 $\alpha\text{v}\beta 8$ 이 하류 표적이자, IL-1 β 활성의 병적 매개 인자라는 것을 입증한다.

[0250] 본원에 기술된 항- $\beta 8$ 항체 (예컨대, 37E1B5, 14E5, 및 11E8)는 인테그린 $\beta 8$ 이 발현되고 IL-1 β 및/또는 TGF β 가 병적으로 중요한 역할을 하는 질환에서 치료학적 및/또는 진단학적으로 사용될 수 있다.

[0251] I. 실시예 9: 인테그린 $\beta 8$ 중화 항체가 유도된 기도 염증을 감소시킨다.

[0252] 인간 BAC 클론 RP11-431K20을 사용하여 인간 인테그린 $\beta 8$ (ITGB8)을 발현하는 트랜스제닉 마우스를 생성하였다. 이들 마우스를 마우스 *itgb8*의 한 기능성 대립유전자를 갖는 마우스와 교배시켜 인간 ITGB8 및 마우스 *itgb8*의 한 기능성 복제물을 갖는 F1 세대 마우스를 생성하였다. 상기 마우스를 이종 교배시켜 생존가능한 BAC ITGB8을 생성하는 F2 세대, 즉, 오직 유전자의 인간 복제물만을 갖는 *itgb8* $-/-$ 마우스를 생성하였고, 이를 통해 인간 ITGB8을 이용한 *itgb8* $-/-$ 치사의 구제가 입증되었다.

[0253] 상기 마우스를 사용하여 기관내 아데노바이러스-IL-1 β 전달 모델을 이용함으로써 기도 리모델링을 유도하였다. 상기 모델에서, 면역학적 프로파일이 인간 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD)과 유사한 강력한 기도 리모델링이 재현 가능하게 유도되었다.

[0254] 7 mg/kg 용량의 37E1B5 항체는 기관지 폐포 세척액 중의 호중구를 유의하게 감소시키면서, 기도 염증을 유의하게 차단시켰다. 조직학적으로, 기도벽 염증 및 섬유증은 37E1B5에 의해 유의하게 감소하였다. 추가로, *itgb8*의 섬유모세포-특이적 결실은 아데노바이러스-IL-1 β -유도성 기도 리모델링을 유의하게 억제시킬 수 있었다.

[0255] 또한, *itgb8*의 섬유모세포-특이적 결실을 갖는 마우스를 사용하여 알레르기성 기도 리모델링 (오브알부민-유도성 기도 염증, 섬유증 및 점액성 화생)을 연구하였다. 야생형과 비교하여 *itgb8* $-/-$ 마우스에서 리모델링은 현저하게 감소하였다. 알레르기성 모델은 또한 IL-1 β 및 TGF β 둘 모두에 의존성이다. 이러한 데이터를 통해 *itgb8* $-/-$ IL-1 β 및 TGF β 에 의해 매개되는 선천성 및 적응성 면역 반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. IL-1 β 는 기도 및 폐로부터의 섬유모세포 및 성상세포를 비롯한, 다중의 세포 유형에서 인테그린 $\beta 8$ 을 증가시켰고, IL-1 β 유도성 $\beta 8$ 발현은 마우스 및 인간 둘 모두에서 관찰되었다.

[0256] J. 실시예 10: 인간 관절 연골세포는 인테그린 $\alpha\text{v}\beta 8$ 을 발현한다.

[0257] 만성 골관절염으로 인해 무릎에 대해 예정 수복을 받은 환자로부터 유래된 무릎의 관절강로부터 성인 관절 연골을 수거하였다. 1차 연골세포를 70% 컨플루언스까지 성장시키고, 세포 염색 및 유세포 측정법에 의해 인테그린 수용체 발현을 측정하였다. 사용된 항체는 항- $\beta 8$ (37E1B5) 및 항- $\beta 6$ (E7P6)이었다. 37E1B5의 경우, 강하게 염색된 것이 검출되었고, E7P6의 경우에는 어떤 염색도 관찰되지 않았다. 1차 연골세포를 항- $\beta 8$ (37E1B5) 또는 항- $\beta 6$ 의 존재 또는 부재하에서 TGF β 생체검정법에서 TMLC TGF β 리포터 세포 (문헌 [Annes et al., (2004) *J. Cell Biol.* 165:723])와 함께 공동 배양하였다. 항- $\beta 8$ 은 TGF β 활성화를 강력하게 차단시킨 반면, 항- $\beta 6$ 은 어떤 영향도 미치지 않았다.

[0258] 상기 결과는 $\alpha\text{v}\beta 8$ 이 연골세포에서 발현된다는 것 뿐만 아니라, 발현을 통해 TGF β 활성화가 일어난다는 것도 시사한다. 따라서, $\alpha\text{v}\beta 8$ 억제는 활성화된 TGF β 와 관련된 연골 장애, 예컨대 관절염 및 활막성 섬유증을 치료하는 데 사용될 수 있다 (예컨대, 문헌 [Bakker et al., (2001) *Osteoarthritis and Cartilage* 9: 128] 참조).

[0259] K. 실시예 11: 간 성상 세포가 $\alpha\text{v}\beta 8$ 을 발현한다.

[0260] 간 성상 세포는 활성화된 TGF β 에 대한 반응으로 콜라겐을 생산할 수 있는 수축성 세포이자, 간 섬유증에 관여하는 실질 세포 유형이다. 간 섬유증은 알콜, 약물, 및 마취제, 감염 (예컨대, B형 및 C형 간염), 자가면역, 담즙 정체 (담즙 과다), 및 비-알콜성 지방간염을 비롯한 많은 유발 인자를 가지고 있다.

[0261] 상기 기술된 트랜스제닉 마우스에서 인테그린 β 8 발현을 검출하고 (마우스 igtb8이 아닌 인간 IGTB8), 간에서의 TGF β 활성이 본원에 기술된 β 8 특이적 항체를 사용하여 표적화될 수 있는지 여부를 측정하였다.

[0262] 도 2에는 14E5 항체를 사용하여 측정된 바, 상당 비율의 간 성상 세포가 β 8을 발현시킨다는 것이 제시되어 있다.

L. 실시예 12: 항- β 8 항체는 소장 염증을 감소시킨다.

[0264] 마우스 igtb8이 아닌 인간 IGTB8을 발현하는 상기 기술된 트랜스제닉 마우스에서 염증성 장 질환 (IBD) 증상을 관찰하였다. 증상으로는 체중 감소 및 소장 비대 및 염증 뿐만 아니라, 척추측만증을 포함한다. 도 3에는 상기 마우스의 장내 면역 세포의 게이팅이 제시되어 있다. 도 3A는 일반 게이팅 파라미터를 보여주는 반면, 도 3B-3E는 각각 CD4+, CD8+, B 세포, 및 NK 세포 상의 β 8의 발현 패턴을 보여주는 것이다. NK 세포는 검출 가능한 수준으로 β 8을 발현하지 못했다. IGTB8 마우스의 장으로부터의 수지상 세포 또한 β 8 발현을 보였다.

[0265] 따라서, IGTB8 마우스를 사용하여 생체내에서 항- β 8 항체 37E1B5의 효과를 측정하였다. IGTB8 트랜스제닉 마우스에 8주 동안 주당 2회에 걸쳐 IP 투여함으로써 3 mg 37E1B5/kg로 처리하였다. 도 4에는 37E1B5 항체로 처리한 결과, 염증과 관련된 소장 비대가 현저하게 감소하였다는 것이 제시되어 있다. 도 5에는 추가로 IGTB8, 대조군 (비처리) 마우스로부터 채취된 장 세그먼트와 항체로 처리된 (B5) 마우스의 것을 비교한, 항체 처리 효과가 도시되어 있다.

M. 실시예 13: 4F1 및 6B9 항체는 고정된 세포 및 조직 상의 인간 β 8에 결합한다.

[0266] 하이브리도마 클론 4F1 및 6B9는 ITGB8로 형질감염된 포르말린-고정된, 파라핀-포매된 293 인간 배아 신장 세포, 및 ITGB8 BAC 트랜스제닉 (Tg) 마우스의 뇌를 특이적으로 염색시켰다. 인간 인테그린 α v β 8을 발현시키는 (293 B8), 또는 발현시키지 못하는 (293 WT) 안정하게 형질감염된 293 세포를 밤새도록 10% 완충처리된 포르말린 중에 고정시키고, 웰링화한 후, 아가로스 플리그에 포매시키고, 통상적으로 조직을 프로세싱하고, 파라핀에 포매시키고, 절편으로 만들었다. ITGB8 BAC Tg 마우스로부터의 뇌 샘플을 유사한 방식으로 프로세싱하였다. 항원 열 회수를 사용하여 면역염색을 수행하고, 시판용 키트 (다코)를 사용하여 항체를 검출하였다. 10분 동안 102°C 항원 열 회수하면서 25 ug/ml의 6B9를 사용하였다. 10분 동안 95°C 항원 열 회수하면서 50-100 ug/ml의 4F1을 사용하였다. 도 6에 제시된 결과를 통해 항체는 β 8에 특이적이고, 고정된 조직 상의 β 8에 결합할 수 있는 것으로 나타났다.

[0268] 하이브리도마 클론 4F1의 경우, ITGB8 BAC Tg 또는 야생형(WT) 마우스의 뇌 또는 폐를 밤새도록 10% 완충처리된 포르말린 중에 고정시키고, 조직을 프로세싱하고, 파라핀에 포매시키고, 절편으로 만들었다. 상기와 동일한 방식으로 항원 열 회수를 사용하여 면역염색을 수행하고, 시판용 키트를 사용하여 항체를 검출하였다. 결과는 도 7에 제시되어 있다.

N. 실시예 14: 항체 6B9 및 4F1은 β 8의 계놈 복제수가 다른 세포를 구별지을 수 있다.

[0270] 하이브리도마 클론 6B9는 고정된 조직 상의 β 8에 결합할 수 있고, 복제수 변이를 검출할 수 있다. 도 8에는 포르말린-고정된, 파라핀-포매된 ITGB8 BAC 트랜스제닉 (Tg) 마우스 뇌의 면역염색이 제시되어 있다. ITGB8 BAC Tg 또는 WT 마우스의 뇌를 밤새도록 10% 완충처리된 포르말린 중에 고정시키고, 통상적으로 조직을 프로세싱하고, 파라핀에 포매시키고, 절편으로 만들었다. 상기 기술된 바와 같이 면역염색을 수행하였다. WT와 비교하여, 1개의 복제물 (D-계통 BAC/WT), 2개의 복제물 (B 및 C-계통 BAC/WT; D-계통 BAC/BAC) 또는 4개의 복제물 (B 및 C-계통 BAC/BAC)을 발현하는 3종의 Tg 마우스 계통 (B, C, 및 D)이 제시되어 있다.

[0271] 유사하게, 4F1의 가변 도메인으로부터 유래된 재조합 모노클로날 토키 IgG는 복제수 변이를 검출할 수 있다. 도 9에는 포르말린-고정된, 파라핀-포매된 ITGB8 BAC 트랜스제닉 (Tg) 마우스 폐의 면역염색 결과가 제시되어 있다. ITGB8 BAC Tg 또는 WT 마우스의 폐를 밤새도록 10% 완충처리된 포르말린 중에 고정시키고, 조직을 프로세싱하고, 파라핀에 포매시키고, 절편으로 만들었다. 상기 기술된 바와 같이 면역염색을 수행하였다. WT와 비교하여, 1개의 복제물 (D-계통 BAC/WT), 2개의 복제물 (B 및 C-계통 BAC/WT; D-계통 BAC/BAC) 또는 4개의 복제물 (B 및 C-계통 BAC/BAC)을 발현하는 3종의 Tg 마우스 계통 (B, C, 및 D)이 제시되어 있다.

[0272] 항체 4F1 및 6B9는 BAC ITGB8 마우스로부터 단리된 포르말린-고정된, 파라핀-포매된 조직 중 ITGB8의 1 및 2개

의 복제물 사이의 발현차를 검출할 수 있다. 따라서, 상기 항체는 잠재적으로, 치료학적 항체 (예컨대, 37E1B5, 11E8 및 그의 b8-결합 단편 및 친화도 성숙된 변이체)에 대한 동반 진단제로서, b8의 발현 증가를 검출할 수 있는 진단제로서 유용하다.

0. 실시예 15: 고정된 인간 병적 폐 조직 상의 β 8 검출

클론 4F1의 가변 도메인으로부터 유래된 재조합 모노클로날 토끼 IgG는 포르말린-고정된, 파라핀-포매된 인간 섬유화 폐의 면역염색에 의해 α v β 8 발현을 검출할 수 있었다. 기종 및 늑막하 반흔을 앓는 환자로부터의 수술 병리 검사용 조직으로부터 인간 폐 표본을 수득하였다. 조직을 밤새도록 10% 원충처리된 포르말린 중에 고정시키고, 조직을 프로세싱하고, 파라핀에 포매시키고, 절편으로 만들었다. 상기 기술된 바와 같이 면역염색을 수행하였다. 결과는 도 10에 제시되어 있다. 화살표 표시는 방추상 세포의 염색부를 가리키는 것으로서, 이는 조밀한 섬유 결합 조직에 포매된 섬유모세포를 나타내는 것이다.

P. 실시예 16: 6B9 및 4F1 항체에 대한 에피토프 지도화

마우스 서열을 인간 ITGB8로 치환해 넣은 키메라 인테그린 β 8 구축물을 사용하여 6B9 및 4F1 항체에 대한 결합 에피토프의 위치를 알아내었다. 항체 결합, 세포 표면 염색, 및 유세포 측정법에 의한 검출에 의해 에피토프의 위치를 알아내었다. 에피토프는 인간 인테그린 β 8의 아미노산 61-105 내에 포함되어 있다. 6B9 및 4F1 항체는 인간 β 8에 결합하였지만, 마우스 β 8에는 결합하지 않았다. 3개의 비-보존적 아미노산 차이 또는 2개의 작은 아미노산 차이 (정렬 서열에서 +로 표시) 중 하나 이상이 결합 에피토프에 포함되어 있거나, 또는 마우스와 인간 단백질을 구별 짓게 하는 방식으로 도메인의 3차원 구조에 영향을 준다고 볼 수 있다.

마우스	61	LGPECGVQEDFVSGGSGSERCDTVSSLISKGCPVDSIEYLSVH	105
		LGPECGVQEDF+SGGS SERCD VS+LISKGC VDSIEY SVH	
인간	61	LGPECGVQEDFISGGSRSERCDIVSNLISKGCSVDSIEYPSVH	105

서열 14는 에피토프 (아미노산 61-105)를 포함하는 인간 인테그린 β 8의 영역을 나타낸다. 서열 15는 상동성인 뮤린 서열을 나타내는 것으로서, 4F1 또는 6B9 항체는 그에 결합하지 않는다. 정렬 서열은 서열 16으로 제시되어 있다.

상기 영역에서의 아미노산 치환을 수행하여 어떤 아미노산(들)이 β 8 에피토프에 포함되어 있는지를 측정하였다. 하기 표에는 인간 β 8 서열의 95번 위치의 세린 잔기가 6B9 및 4F1 에피토프에 포함되어 있다는 것이 제시되어 있다.

	양성 4F1(%)	양성 6B9(%)
마우스 (서열 122)	3	6
인간 (서열 123)	100	100
V R I N S		
(서열 124)	92	102
I G I N P	0	1
(서열 125)		
I G I N S (서열 126)	101	104

[0280]

Q. 실시예 17: 6B9 및 4F1 항체의 특징 규명

서열 18 및 19에 제시되어 있는 바와 같은, 6B9에 대한 가변 영역 서열을 수득하였다. 6B9 중쇄의 CDR 1-3은 각각 서열 40-42의 DYLINE, VINPETGGTNYNAFKKG, 및 EAGNYIYAMDY이다. 6B9 경쇄의 CDR 1-3은 각각 서열 43-45의 RASVNIYSYLV, NAKTLAE, 및 QHHHGTPYT이다.

서열 20 및 21에 제시되어 있는 바와 같은, 4F1에 대한 가변 영역 서열을 수득하였다. 4F1 중쇄의 CDR 1-3은 각각 서열 116-118의 NYLIE, VINPGTGGTNYNKKFKV, 및 EGNARTYYYAMDY이다. 4F1 경쇄의 CDR 1-3은 각각 서열 119-121의 RASENIYSYLV, NAKTLAE, 및 QHHNGTPYT이다.

R. 실시예 18: 37E1B5, 14E5, 및 11E8 항체 에피토프의 특징 규명

상기 제시된 바와 같이, 서열 1은 37E1B5, 14E5, 및 11E8 항체에 대한 β 8 에피토프 (아미노산 120-180)를 포함하는 인간 인테그린 β 8의 영역을 나타낸다. 서열 2는 상동성인 뮤린 서열을 나타내는 것으로서, 이는 유의하게 결합하지는 않는다.

상기 영역에서의 아미노산 치환을 수행하여 어떤 아미노산(들)이 β 8 에피토프에 포함되어 있는지를 측정하였다. 하기 표에는 서열 1의 아미노산 175-180 중 어느 것이 각 항체에 대한 에피토프에 포함되어 있는

지 제시되어 있다.

	양성 37E1B5 (%)	양성 14E5 (%)	양성 11E8 (%)
RKMAFF (인간) 서열 127	108	112	97
KKMALLY (마우스) 서열 128	0	0	0
RKMALLY 서열 129	14	1	4
RKMAFY 서열 130	89	6	108
KKMIFY 서열 131	3	6	31
KKMALF 서열 132	31	1	3
KKMAFF 서열 133	116	9	115
RKMALF 서열 134	131	150	125

[0287]

S. 실시예 19: 단일 쇄 Fv 항체에 대한 친화도 측정

[0289]

본 발명자들은 또한 친화도 성숙된 버전을 비롯한, 개시된 항체의 친화도를 측정하였다. 전형적으로, 단일 쇄 항체의 친화도 Kd는 상응하는 Ig의 것보다 10-100배 더 높았다 (즉, 단일 쇄 항체는 상응하는 Ig보다 10-100배 더 낮은 친화도를 가졌다).

항체	scFv의 Kd(nM)
4F1	>100
6B9	14.83
6B9Mut1	9.34
11E8	>250
11E8Mut28	3.52
11E8Mut94	3.2
11E8Mut39	21.07
14E5	13.96
14E5Mut11	3.85
14E5Mut42	3.35
14E5Mut54	2.09
14E5Mut65	3.04
14E5Mut68	1.42
14E5Mut83	1.79
14E5Mut93	2.31
14E5Mut95	1.83

[0290]

본원에 기술된 실시예 및 실시양태는 단지 예시적인 목적으로 기술된 것이고, 그를 고려하여 다양한 수정 또는 변형이 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게 제안될 것이며, 이는 본 출원의 취지 및 범위, 및 첨부된 특허청구 범위의 범주내 포함시키고자 한다. 본원에서 인용된 모든 공개 문헌, 웹사이트, 수탁 번호, 특허, 및 특허 출원은 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에서 참조로 포함된다.

도면

도면1

VH

프레임부크 1

CDR1

프레임부크 2

CDR2

프레임부크 3

CDR3

프레임부크 4

VL

프레임부크 1

CDR1

프레임부크 2

CDR2

프레임부크 3

CDR4

프레임부크 4

37E1 (서울 4)

EVQLVESGGGLVQPGGLNLSCAASGTVFVSRWMSWRQAPKGKIEWIGEINPDSSTINYTSLKDFITISRDNAKNTLYLQNKVRSDDTALYCACLITTEDYWGQGTSVTVSS

37E1B5 (서울 6)

EVQLVESGGGLVQPGGLNLSCAASGTVFVSRWMSWRQAPKGKIEWIGEINPDSSTINYTSLKDFITISRDNAKNTLYLQNKVRSDDTALYCACLITTEDYWGQGTSVTVSS

Hu37E1B (서울 8)

EVQLVESGGGLVQPGGLNLSCAASGTVFVSRWMSWRQAPKGKIEWIGEINPDSSTINYTSLKDFITISRDNAKNTLYLQNKVRSDDTALYCACLITTEDYWGQGTSVTVSS

EVQLVESGGGLVQPGGLNLSCAASGTVFVSRWMSWRQAPKGKIEWIGEINPDSSTINYTSLKDFITISRDNAKNTLYLQNKVRSDDTALYCACLITTEDYWGQGTSVTVSS

EVQLVESGGGLVQPGGLNLSCAASGTVFVSRWMSWRQAPKGKIEWIGEINPDSSTINYTSLKDFITISRDNAKNTLYLQNKVRSDDTALYCACLITTEDYWGQGTSVTVSS

EVQLVESGGGLVQPGGLNLSCAASGTVFVSRWMSWRQAPKGKIEWIGEINPDSSTINYTSLKDFITISRDNAKNTLYLQNKVRSDDTALYCACLITTEDYWGQGTSVTVSS

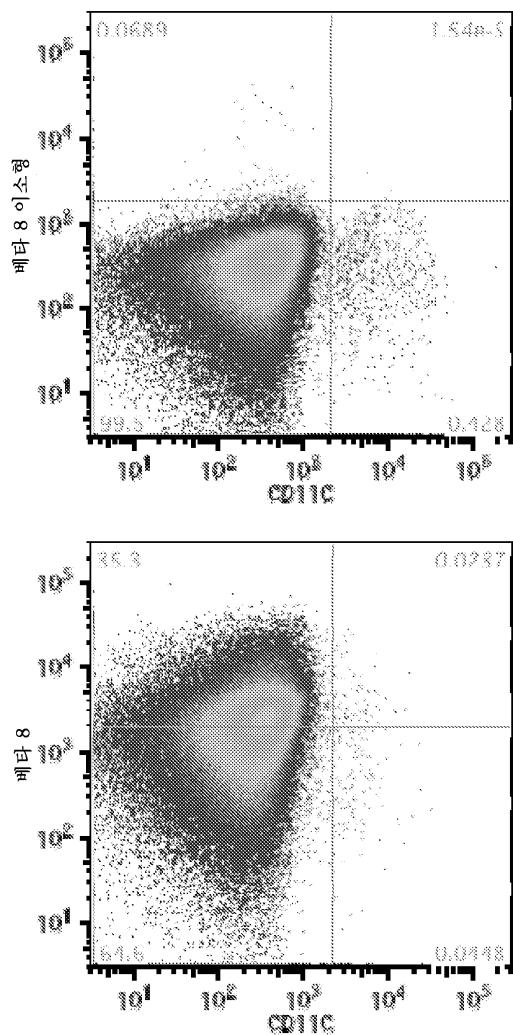
EVQLVESGGGLVQPGGLNLSCAASGTVFVSRWMSWRQAPKGKIEWIGEINPDSSTINYTSLKDFITISRDNAKNTLYLQNKVRSDDTALYCACLITTEDYWGQGTSVTVSS

EVQLVESGGGLVQPGGLNLSCAASGTVFVSRWMSWRQAPKGKIEWIGEINPDSSTINYTSLKDFITISRDNAKNTLYLQNKVRSDDTALYCACLITTEDYWGQGTSVTVSS

EVQLVESGGGLVQPGGLNLSCAASGTVFVSRWMSWRQAPKGKIEWIGEINPDSSTINYTSLKDFITISRDNAKNTLYLQNKVRSDDTALYCACLITTEDYWGQGTSVTVSS

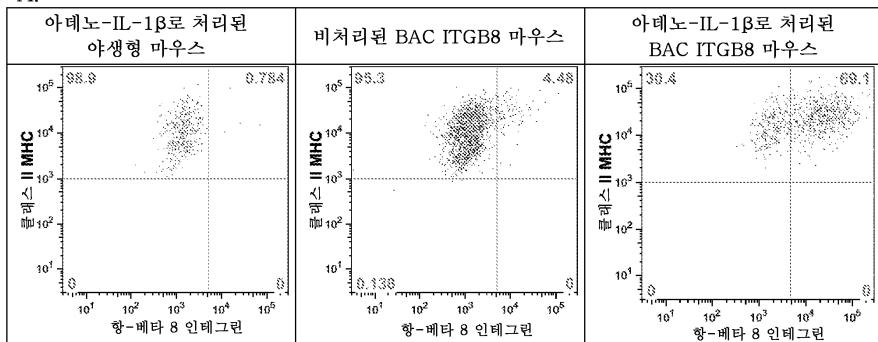
EVQLVESGGGLVQPGGLNLSCAASGTVFVSRWMSWRQAPKGKIEWIGEINPDSSTINYTSLKDFITISRDNAKNTLYLQNKVRSDDTALYCACLITTEDYWGQGTSVTVSS

도면2

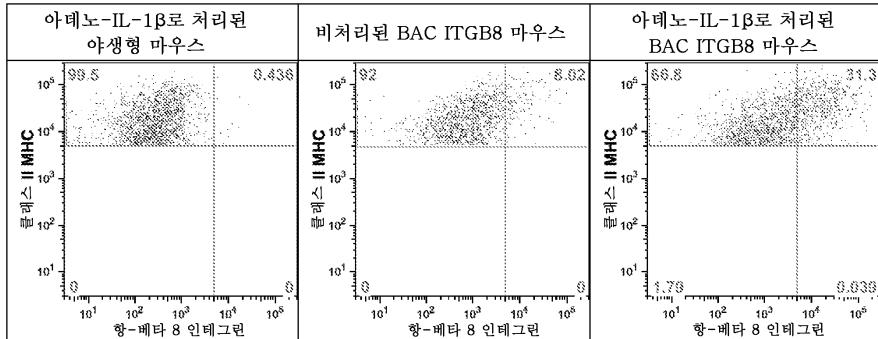


도면3a

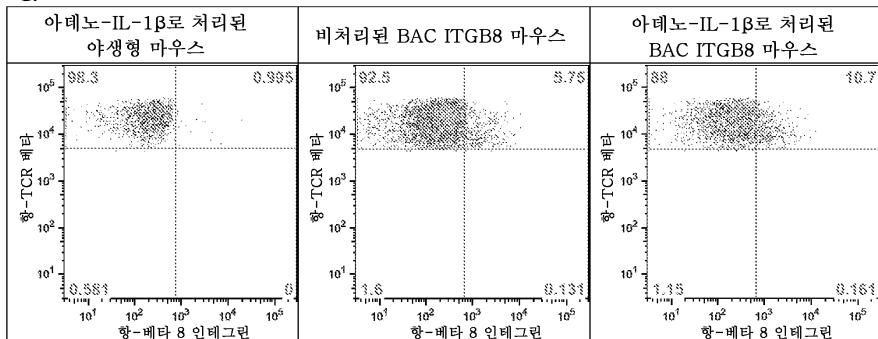
A:



B:

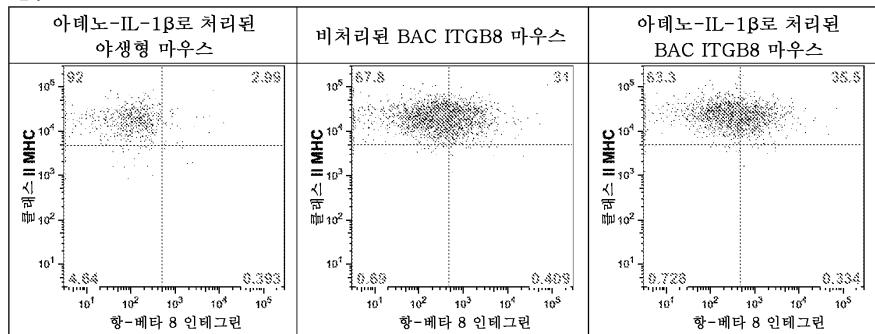


C:

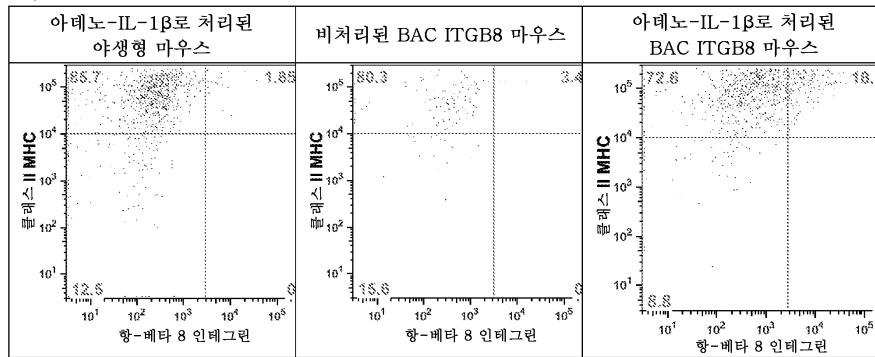


도면3d

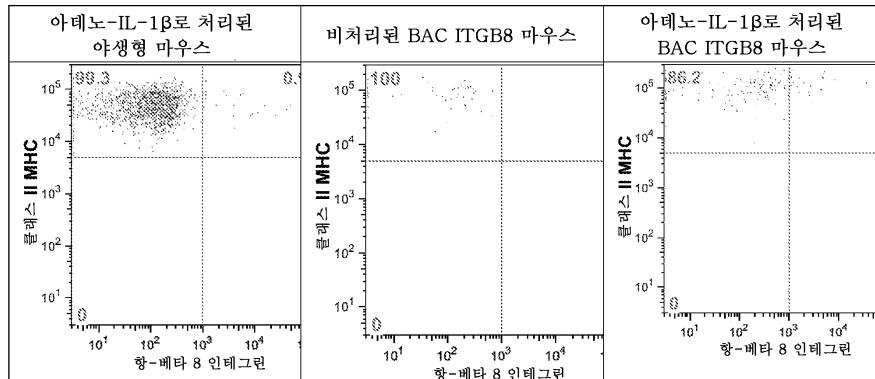
D:



E:



F:

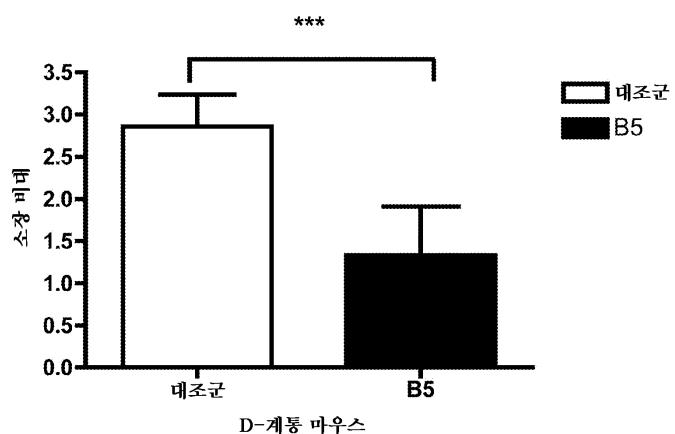


도면3g

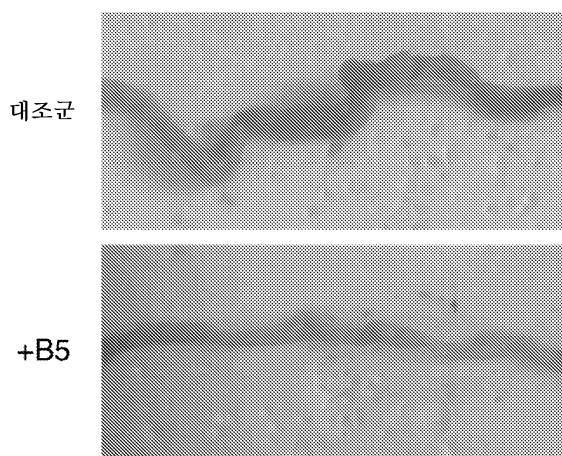
G: 요약표

세포 집단	폐	간	립프구	비장	소장
T 세포	+		+	-	+
B 세포	+		+	-	+
대식세포	+		+	-	+
수지상 세포	+		+	-	+
성상 세포	NA	+	NA	NA	NA

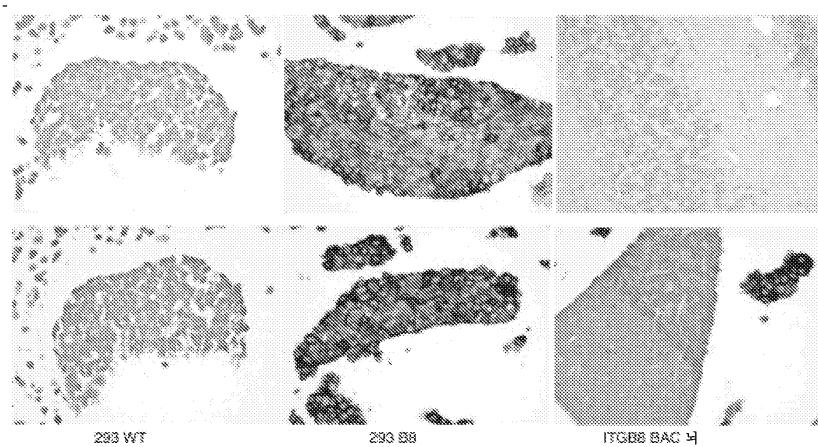
도면4



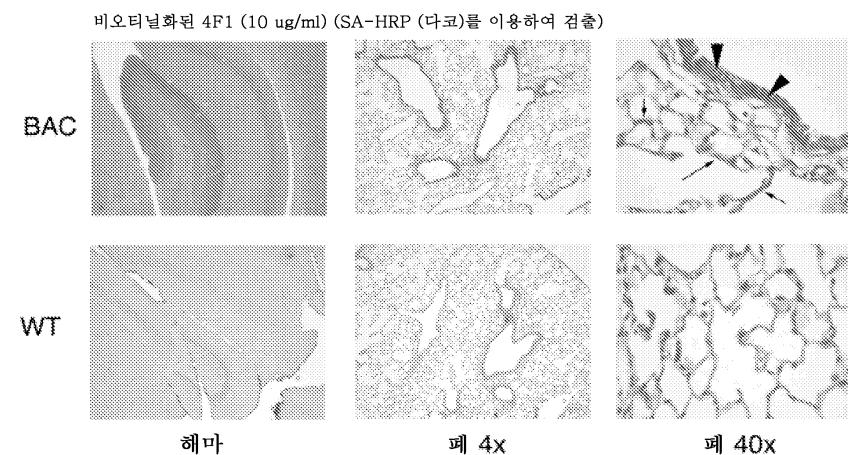
도면5



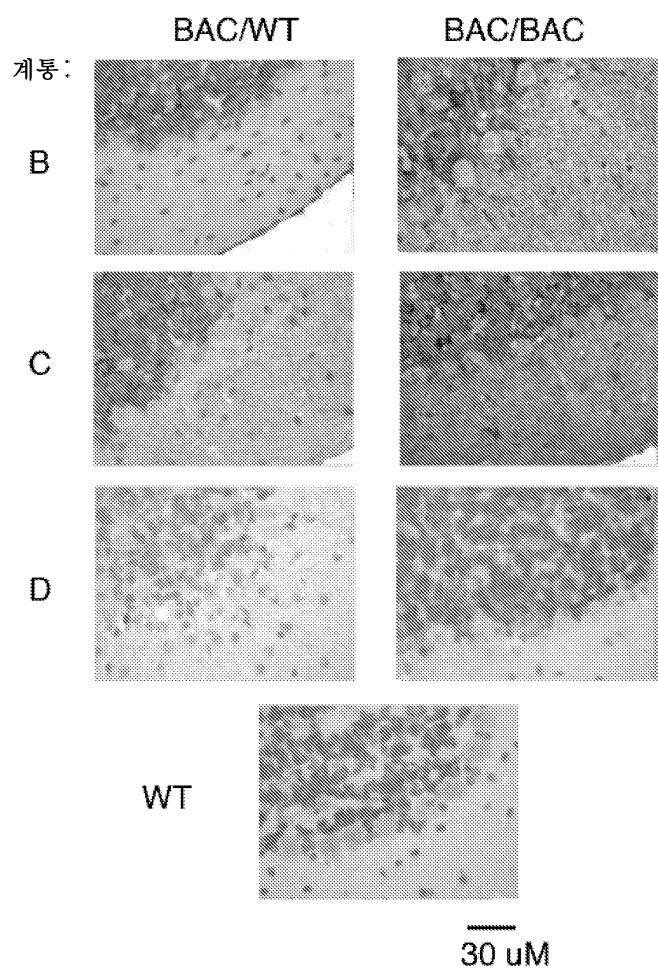
도면6



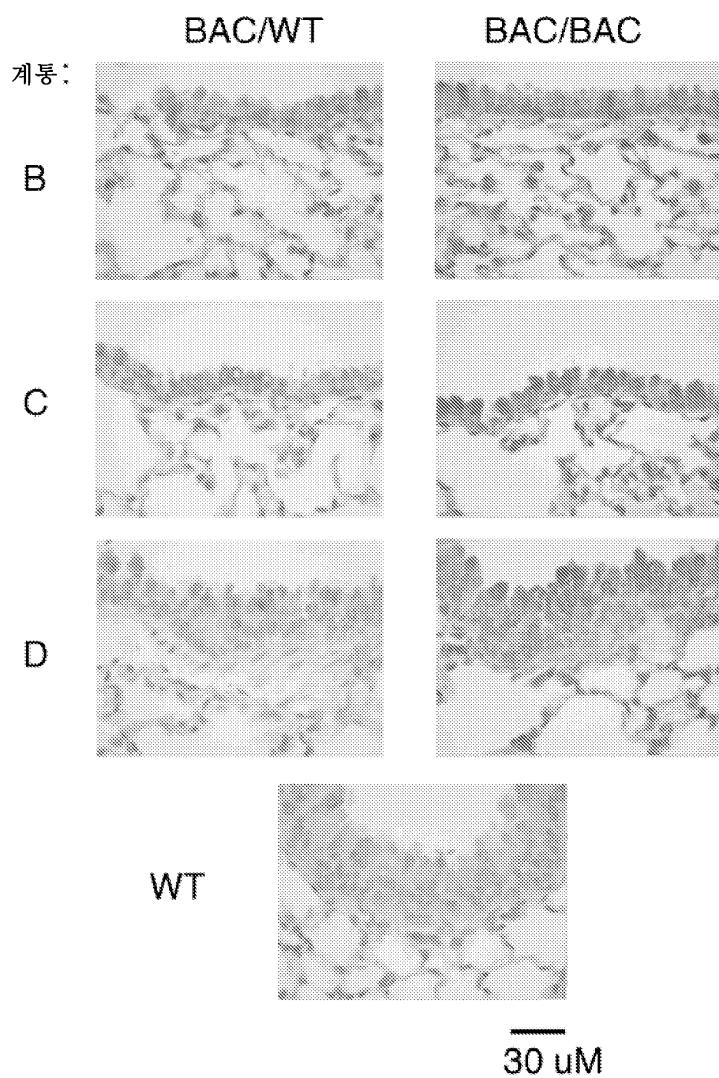
도면7



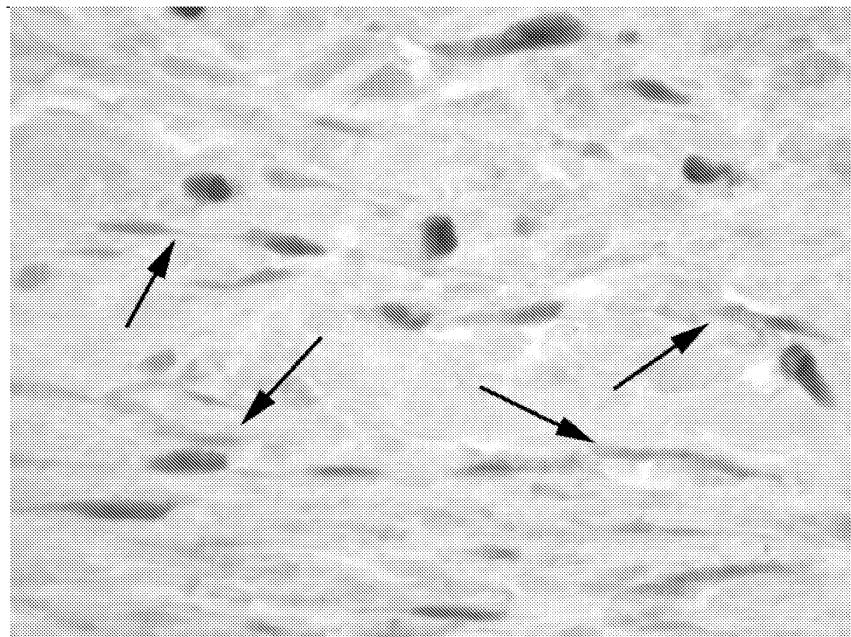
도면8



도면9



도면10



도면11a

VH (증쇄)		프레임 카드 1	프레임 카드 2	CDR1	프레임 카드 2	CDR2
wt	4F1	서열 20 QVQLOQSGAELVVRPGTSVKVSKASGYAFT	NYLIE	WVKORPGQGLEWIG	VINPCTGGTNYNKKFKV	
wt	6B9	서열 18 QVQLOQSGAELVVRPGTSVKVSKASGYAFT	DYLIE	WVKORPGQGLEWIG	VINPCTGGTNYNKAFKG	
6B9Mut1		서열 31 QVQLOQSGAELVVRPGTSVKVSKASGYAFT	DYLIE	WVKORPGQGLEWIG	VINPCTGGTNYNKAFKG	
wt	11E8	서열 10 EVQLOQSGPELMKIGASVKISCKATGTYFS	SYWIE	WVKORPGHGLEWIG	DILPGSGTTNYNEKFKG	
11E8Mut28		서열 32 EVQLOQSGPELMKIGASVKISCKATGTYFS	SYWIE	WVKORPGHGLEWIG	DILPGSGTTNYNEKFKG	
11E8Mut94		서열 88 EVQLOQSGPELMKIGASVKISCKATGTYFS	SYWIE	WVKORPGHGF EWIG	DILPGSGTTNYNEKFKG	
11E8Mut39		서열 102 EVQLOQSGPELMKIGASVKISCKATGTYFS	TYWIE	WVKORPGHGLEWIG	<u>DILPGSGTTNYNEKFKG</u>	
wt	14E5	서열 12 EVOLQQSGAELMKPGASVKISCKATGTYFS	TYWIE	WIKORPGHGLEWIG	HILPGSVITNYNEKFKG	
14E5Mut11		서열 33 EVOLQQSGAELMKPGASVKISCKATGTYFS	TNWIE	WIKORPGHGLEWIG	HILPGSVITNYNEKFKG	
14E5Mut42		서열 34 EVPLQQSGAELMKPGASVKISCKATGTYFS	TYWIE	WIKORPGHGLEWIG	HILPGSVITNYNEKFKG	
14E5Mut54		서열 35 EVOLQQSGAELMKPGASVKISCKATGTYFS	TNWIE	WIKORPGHGLEWIG	HILPGSVITNYNEKFKG	
14E5Mut68		서열 36 EVOLQQSGAELMKPGASVKISCKATGTYFS	TYWIE	WIKORPGHGLEWIG	<u>DILPGSGTTNYNEKFKG</u>	
14E5Mut65		서열 37 QVQLOQSGAELMKPGASVKISCKATGTYFS	TNWIE	WIKORPGHGLEWIG	HILPGSVITNYNEKFKG	
14E5Mut83		서열 38 EVOLQQSGAELMKPGASVKISCKATGTYFS	THWIE	WIKORPGHGLEWIG	HILPGSVITNYNEKFKG	
14E5Mut93		서열 135 EVQLOQSGAELMKPGSSVKISCKATGTYFS	TYWIE	WIKORPGHGLEWIG	HILPGSVITNYNEKFKG	
14E5Mut95		서열 39 EVQLOQSGAELMKPGSSVKISCKATGTYFS	TYWIE	WIKORPGHGLEWIG	HILPGSVITNYNEKFKG	

도면11b

VH (증쇄)		프레임워크 3	CDR3	프레임워크 4
wt	4F1	서열 20 KATLTADKSSTAYMQLGGLTFDDSAVYFCAR	EGNARTYYAMDY	WGQGTSVTWSS
wt	6B9	서열 18 KATLTADKSSTAYMQLGGLTFDDSAVYFCAR	EAGNYIYAMDY	WGQGTSVTWSS
	6B9Mut1	서열 31 KATLTADKSSTAYMQLGGLTFDDSAVYFCAR	EAGNYIYAMDY	WGQGTSVTWSS
wt	11E8	서열 10 RATVTADRSNTAQMQLSSLTGDSAVYYCAT	WGWDTY	WDQGTSVTWSS
	11E8Mut28	서열 32 <u>K</u> AITADTSSNTSYQLSSLT <u>S</u> EDSAVYYCAR	WGWD S Y	WGQGT <u>L</u> VTWSS
	11E8Mut94	서열 88 <u>R</u> AITADTSSNTSYQLSSLT <u>S</u> EDSAVYYCAR	WGWD <u>S</u> Y	WGQGT <u>E</u> VTWSS
	11E8Mut39	서열 102 RAT <u>T</u> ADRSNTSYQLSSLTGDSAVYYCAT	WGWDTY	WDHGTSVTWSS
wt	14E5	서열 12 KAAITADTSSNTSYQLSSLTSEDASAVYYCAR	WGWDSY	WGQGTLVTWSS
	14E5Mut11	서열 33 KAAITADTSSNTSYQLSSLTSEDASAVYYCAR	WGWDSY	WGQGTLVTWSS
	14E5Mut42	서열 34 KAAITADTSSNTSYQLSSLTSEDASAVYYCAR	WGWDSY	WGQGTLVTWSS
	14E5Mut54	서열 35 KAAITADTSSNTSYQLSSLTSEDASAVYYCAR	WGWDSY	WGQGTLVTWSS
	14E5Mut68	서열 36 <u>R</u> AITADTSSNTSYQLSSLTSEDASAVYYCAR	WGWD S Y	WGQGTLVTWSS
	14E5Mut65	서열 37 KAAITADTSSNTSYQLSSLTSEDASAVYYCAR	WGWD S Y	WGQGTLVTWSS
	14E5Mut83	서열 38 KAAITADTSSNTSYQLSSLTSEDASAVYYCAR	WGWD S Y	WGQGTLVTWSS
	14E5Mut93	서열 135 KAAITADTSSNTSYQLSSLTSEDASAVYYCAR	WGWD S Y	WGQGTLVTWSS
	14E5Mut95	서열 39 KAVITADTSSNTSYQLSSLTSEDASAVYYCAR	WGWD S Y	WGQGTLVTWSS

도면12a

VK (경쇄)		프레임워크 1		CDR1		프레임워크 2		CDR2	
wt	4F1	서열 21	DIEMTQTPASILSASVGETVTITC	RASENIYSSYLV	WYQQKQGKSPQVLYV	NAKTLAE			
wt	6B9	서열 19	DIQMTQSPASILSASVGETVTITC	RASVNIYSSYLV	WYQQKQGKSPQLLVH	NAKLLAE			
	6B9Mut1	서열 22	<u>DI</u> QMTQSPASILSASVGETVTITC	RASVNIYSSYLV	WYQQKQGKSPQLLVH	NAKLLAE			
wt	11E8	서열 11	DIVMTQSPSSILSASIGDRVTISC	SASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS			
	11E8Mut28	서열 23	DIVMTQSPSSILSASIGDRVTISC	SASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS			
	11E8Mut94	서열 89	DIKMTQTPSSILSASIGDRVTISC	SASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS			
	11E8Mut39	서열 104	<u>DI</u> EMTQSPSSILSASIGDRVTISC	<u>S</u> TSQDVSSYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	<u>Y</u> TSNLHS			
wt	14E5	서열 13	DIEMTQSPSSILSASIGDRVTISC	STSQDISSSLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS			
	14E5Mut11	서열 24	DILMTQSPSSILSASIGDRVTISC	<u>S</u> ASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS			
	14E5Mut42	서열 25	<u>D</u> IVMTQTPSSILSASIGDRVTISC	<u>S</u> ASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS			
	14E5Mut54	서열 26	<u>D</u> IVMTQTPSSILSASIGDRVTISC	<u>S</u> ASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS			
	14E5Mut68	서열 27	DIKMTQTPSSILSASIGDRVTISC	<u>S</u> ASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS			
	14E5Mut65	서열 28	DIKMTQTPSSILSASIGDRVTISC	<u>S</u> ASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS			
	14E5Mut83	서열 29	<u>D</u> ILMTQSPSSILSASIGDRVTISC	<u>S</u> ASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS			
	14E5Mut93	서열 136	DIMMTQSPSSILSASIGDRVTISC	SASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS			
	14E5Mut95	서열 30	<u>D</u> IMTQSPSSILSASIGDRVTISC	<u>S</u> BSQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS			

도면12b

VK (경쇄)	프 케 임 와크 3	CDR3	프 케 임 와크 4
wt 4F1	서열 21	GVPSRFSGSGSGTQFSLIKINSLOPEDFGSYVC	FGGGTKELEIKR
wt 6B9	서열 19	GVPSRFSGSGSGTQFSLIKINSLOPEDFGSYVC	QHHNGTPYT
6B9Mut1	서열 22	GVPSRFSGSGSGTQFSLIKINSLOPEDFGSYVC	QHHHGTPYT
wt 11E8	서열 11	GVPSRFSGSGSGTQFSLIKINSLOPEDFGSYVC	FGGGTKELEIKR
11E8Mut28	서열 23	GVPSRFSGSGSGTQFSLIKINSLOPEDFGSYVC	QQYSNLPPYT
11E8Mut94	서열 89	GVPSRFSGSGSGTQFSLIKINSLOPEDFGSYVC	QQFSNLPYT
11E8Mut39	서열 104	GVPSRFSGSGSGTQFSLIKINSLOPEDFGSYVC	QQYSNLPPYT
wt 14E5	서열 13	GVPSRFSGSGSGTQFSLIKINSLOPEDFGSYVC	FGGGTKELEIKR
14E5Mut11	서열 24	GVPSRFSGSGSGTQFSLIKINSLOPEDFGSYVC	QQYSNLPPYT
14E5Mut42	서열 25	GVPSRFSGSGSGTQFSLIKINSLOPEDFGSYVC	FGGGTKELEIKR
14E5Mut54	서열 26	GVPSRFSGSGSGTQFSLIKINSLOPEDFGSYVC	QQYSNLPPYT
14E5Mut68	서열 27	GVPSRFSGSGSGTQFSLIKINSLOPEDFGSYVC	FGGGTKELEIKR
14E5Mut65	서열 28	GVPSRFSGSGSGTQFSLIKINSLOPEDFGSYVC	QQFSNLPYT
14E5Mut83	서열 29	GVPSRFSGSGSGTQFSLIKINSLOPEDFGSYVC	FGGGTKELEIKR
14E5Mut93	서열 136	GVPSRFSGSGSGTQFSLIKINSLOPEDFGSYVC	QQYSNLPPYT
14E5Mut95	서열 30	GVPSRFSGSGSGTQFSLIKINSLOPEDFGSYVC	FGGGTKELEIKR

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> The Regents of the University of California

Nishimura, Stephen

Lou, Jianlong

Baron, Jody

Marks, James

<120> Antibodies That Bind Integrin Alpha-V Beta-8

<130> 81906-848664

<140> WO PCT/US12/51373

<141> 2012-08-17

<150> US 61/524708

<151> 2011-08-17

<150> US 61/646111

<151> 2012-05-11

<160> 136

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic region of human integrin beta8 including 37E1B5 epitope, amino acids 121-180

<400> 1

Gly Glu Val Ser Ile Gln Leu Arg Pro Gly Ala Glu Ala Asn Phe Met

1 5 10 15

Leu Lys Val His Pro Leu Lys Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu

20 25 30

Val Asp Val Ser Ala Ser Met His Asn Asn Ile Glu Lys Leu Asn Ser

35 40 45

Val Gly Asn Asp Leu Ser Arg Lys Met Ala Phe Phe

50 55 60

<210> 2

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic homologous murine region of human integrin beta8

including 37E1B5 epitope

<400> 2

Gly Glu Val Ser Val Gln Leu His Pro Gly Ala Glu Ala Asn Phe Met

1 5 10 15

Leu Lys Val Arg Pro Leu Lys Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu

20 25 30

Val Asp Val Ser Ala Ser Met His Asn Asn Ile Glu Lys Leu Asn Ser

35 40 45

Val Gly Asn Asp Leu Ser Lys Lys Met Ala Leu Tyr

50 55 60

<210> 3

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic alignment sequence of human integrin beta8 including

37E1B5 epitope and mouse homologous region

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> Xaa = Val or Ile

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> Xaa = His or Arg

<220><221> VARIANT

<222> (20)..(20)

<223> Xaa = Arg or His

<220><221> VARIANT

<222> (55)..(55)

<223> Xaa = Lys or Arg

<220><221> VARIANT

<222> (59)..(59)

<223> Xaa = Leu or Phe

<220><221> VARIANT

<222> (60)..(60)

<223> Xaa Tyr or Phe

<400> 3

Gly Glu Val Ser Xaa Gln Leu Xaa Pro Gly Ala Glu Ala Asn Phe Met

1 5 10 15

Leu Lys Val Xaa Pro Leu Lys Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu

20 25 30

Val Asp Val Ser Ala Ser Met His Asn Asn Ile Glu Lys Leu Asn Ser

35 40 45

Val Gly Asn Asp Leu Ser Xaa Lys Met Ala Xaa Xaa

50 55 60

<210> 4

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain (VH) of 37E1 monoclonal antibody

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Asn Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Cys Leu Ile Thr Thr Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 5

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain (VL) of 37E1 monoclonal antibody

<400> 5

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr			
65	70	75	80
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala			
100	105		

<210> 6

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain (VH) of 37E1B5 monoclonal antibody

<400> 6

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

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

100	105	110
Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 7		
<211> 108		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> synthetic light chain (VL) of 37E1B5 monoclonal antibody		

<400> 7			
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Val Thr Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr			
20	25	30	
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Tyr Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr			
65	70	75	80
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala			
100	105		

<210> 8			
<211> 116			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220><223> synthetic heavy chain (VH) of humanized 37E1B5 (Hu37E1B5)			
monoclonal antibody			

<400> 8			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Val Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Ser Ser Leu
 50 55 60

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

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

Ala Ser Leu Ile Thr Thr Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain (VL) of humanized 37E1B5 (Hu37E1B5)

monoclonal antibody

<400> 9

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr

85 90 95

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

100 105

<210> 10

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region of 11E8 monoclonal antibody

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Val Thr Ala Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Tyr Gly Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Thr Trp Gly Trp Asp Thr Tyr Trp Asp Gln Gly Thr Ser Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region of 11E8 monoclonal antibody

<400> 11

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

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

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

<210> 12

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region of 14E5 monoclonal antibody

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly His Ile Leu Pro Gly Ser Val Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ala Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Gly Trp Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100	105	110
Val Ser Ser		
115		
<210> 13		
<211> 108		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> synthetic light chain variable region of 14E5 monoclonal antibody		

<400> 13			
Asp Ile Glu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Thr Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ser			
20	25	30	
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Thr Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg			
100	105		
<210> 14			
<211> 45			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220><223> synthetic region of human integrin beta8 including 6B9 and 4F1			
epitope, amino acids 61-105			

<400> 14			
Leu Gly Pro Glu Cys Gly Trp Cys Val Gln Glu Asp Phe Ile Ser Gly			
1	5	10	15

Gly Ser Arg Ser Glu Arg Cys Asp Ile Val Ser Asn Leu Ile Ser Lys

20 25 30

Gly Cys Ser Val Asp Ser Ile Glu Tyr Pro Ser Val His

35 40 45

<210> 15

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic homologous murine region of human integrin beta8

including 6B9 and 4F1 epitope

<400> 15

Leu Gly Pro Glu Cys Gly Trp Cys Val Gln Glu Asp Phe Val Ser Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Glu Arg Cys Asp Thr Val Ser Ser Leu Ile Ser Lys

20 25 30

Gly Cys Pro Val Asp Ser Ile Glu Tyr Leu Ser Val His

35 40 45

<210> 16

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic alignment sequence of human integrin beta8 including

6B9 and 4F1 epitope and mouse homologous region

<220><221> VARIANT

<222> (14)..(14)

<223> Xaa = Val or Ile

<220><221> VARIANT

<222> (19)..(19)

<223> Xaa + Gly or Arg

<220><221> VARIANT

<222> (25)..(25)

<223> Xaa = Thr or Ile

<220><221> VARIANT

<222> (28)..(28)

<223> Xaa = Ser or Asn

<220><221> VARIANT

<222> (35)..(35)

<223> Xaa = Pro or Ser

<220><221> VARIANT

<222> (42)..(42)

<223> Xaa = Leu or Pro

<400> 16

Leu Gly Pro Glu Cys Gly Trp Cys Val Gln Glu Asp Phe Xaa Ser Gly

1 5 10 15

Gly Ser Xaa Ser Glu Arg Cys Asp Xaa Val Ser Xaa Leu Ile Ser Lys

20 25 30

Gly Cys Xaa Val Asp Ser Ile Glu Tyr Xaa Ser Val His

35 40 45

<210> 17

<211> 769

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(769)

<223> human integrin beta8 full length sequence

<400> 17

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

1 5 10 15

Gln Asn Asp Arg Arg Gly Pro Ala Ser Phe Leu Trp Ala Ala Trp Val

20 25 30

Phe Ser Leu Val Leu Gly Leu Gly Gln Gly Glu Asp Asn Arg Cys Ala

35 40 45

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

50 55 60

Cys Gly Trp Cys Val Gln Glu Asp Phe Ile Ser Gly Gly Ser Arg Ser

65	70	75	80
Glu Arg Cys Asp Ile Val Ser Asn Leu Ile Ser Lys Gly Cys Ser Val			
85	90	95	
Asp Ser Ile Glu Tyr Pro Ser Val His Val Ile Ile Pro Thr Glu Asn			
100	105	110	
Glu Ile Asn Thr Gln Val Thr Pro Gly Glu Val Ser Ile Gln Leu Arg			
115	120	125	
Pro Gly Ala Glu Ala Asn Phe Met Leu Lys Val His Pro Leu Lys Lys			
130	135	140	
Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Val Asp Val Ser Ala Ser Met His			
145	150	155	160
Asn Asn Ile Glu Lys Leu Asn Ser Val Gly Asn Asp Leu Ser Arg Lys			
165	170	175	
Met Ala Phe Phe Ser Arg Asp Phe Arg Leu Gly Phe Gly Ser Tyr Val			
180	185	190	
Asp Lys Thr Val Ser Pro Tyr Ile Ser Ile His Pro Glu Arg Ile His			
195	200	205	
Asn Gln Cys Ser Asp Tyr Asn Leu Asp Cys Met Pro Pro His Gly Tyr			
210	215	220	
Ile His Val Leu Ser Leu Thr Glu Asn Ile Thr Glu Phe Glu Lys Ala			
225	230	235	240
Val His Arg Gln Lys Ile Ser Gly Asn Ile Asp Thr Pro Glu Gly Gly			
245	250	255	
Phe Asp Ala Met Leu Gln Ala Ala Val Cys Glu Ser His Ile Gly Trp			
260	265	270	
Arg Lys Glu Ala Lys Arg Leu Leu Leu Val Met Thr Asp Gln Thr Ser			
275	280	285	
His Leu Ala Leu Asp Ser Lys Leu Ala Gly Ile Val Val Pro Asn Asp			
290	295	300	
Gly Asn Cys His Leu Lys Asn Asn Val Tyr Val Lys Ser Thr Thr Met			
305	310	315	320

Glu His Pro Ser Leu Gly Gln Leu Ser Glu Lys Leu Ile Asp Asn Asn

325 330 335

Ile Asn Val Ile Phe Ala Val Gln Gly Lys Gln Phe His Trp Tyr Lys

340 345 350

Asp Leu Leu Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ile Ala Gly Glu Ile Glu Ser

355 360 365

Lys Ala Ala Asn Leu Asn Asn Leu Val Val Glu Ala Tyr Gln Lys Leu

370 375 380

Ile Ser Glu Val Lys Val Gln Val Glu Asn Gln Val Gln Gly Ile Tyr

385 390 395 400

Phe Asn Ile Thr Ala Ile Cys Pro Asp Gly Ser Arg Lys Pro Gly Met

405 410 415

Glu Gly Cys Arg Asn Val Thr Ser Asn Asp Glu Val Leu Phe Asn Val

420 425 430

Thr Val Thr Met Lys Lys Cys Asp Val Thr Gly Gly Lys Asn Tyr Ala

435 440 445

Ile Ile Lys Pro Ile Gly Phe Asn Glu Thr Ala Lys Ile His Ile His

450 455 460

Arg Asn Cys Ser Cys Gln Cys Glu Asp Asn Arg Gly Pro Lys Gly Lys

465 470 475 480

Cys Val Asp Glu Thr Phe Leu Asp Ser Lys Cys Phe Gln Cys Asp Glu

485 490 495

Asn Lys Cys His Phe Asp Glu Asp Gln Phe Ser Ser Glu Ser Cys Lys

500 505 510

Ser His Lys Asp Gln Pro Val Cys Ser Gly Arg Gly Val Cys Val Cys

515 520 525

Gly Lys Cys Ser Cys His Lys Ile Lys Leu Gly Lys Val Tyr Gly Lys

530 535 540

Tyr Cys Glu Lys Asp Asp Phe Ser Cys Pro Tyr His His Gly Asn Leu

545 550 555 560

Cys Ala Gly His Gly Glu Cys Glu Ala Gly Arg Cys Gln Cys Phe Ser

565 570 575

Gly Trp Glu Gly Asp Arg Cys Gln Cys Pro Ser Ala Ala Ala Gln His

580 585 590

Cys Val Asn Ser Lys Gly Gln Val Cys Ser Gly Arg Gly Thr Cys Val

595 600 605

Cys Gly Arg Cys Glu Cys Thr Asp Pro Arg Ser Ile Gly Arg Phe Cys

610 615 620

Glu His Cys Pro Thr Cys Tyr Thr Ala Cys Lys Glu Asn Trp Asn Cys

625 630 635 640

Met Gln Cys Leu His Pro His Asn Leu Ser Gln Ala Ile Leu Asp Gln

645 650 655

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

660 665 670

Thr Ser Glu Cys Phe Ser Ser Pro Ser Tyr Leu Arg Ile Phe Phe Ile

675 680 685

Ile Phe Ile Val Thr Phe Leu Ile Gly Leu Leu Lys Val Leu Ile Ile

690 695 700

Arg Gln Val Ile Leu Gln Trp Asn Ser Asn Lys Ile Lys Ser Ser Ser

705 710 715 720

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

725 730 735

Val Cys Thr Arg Ala Val Thr Tyr Arg Arg Glu Lys Pro Glu Glu Ile

740 745 750

Lys Met Asp Ile Ser Lys Leu Asn Ala His Glu Thr Phe Arg Cys Asn

755 760 765

Phe

<210> 18

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region of 6B9 monoclonal antibody

<400> 18

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Glu Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ala Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Gly Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Ala Gly Asn Tyr Ile Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 19

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region of 6B9 monoclonal antibody

<400> 19

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Val Asn Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

35 40 45

His Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His His Gly Thr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105
 <210> 20
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> synthetic heavy chain variable region of 4F1 monoclonal antibody
 <400> 20

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

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

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 21
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region of 4F1 monoclonal antibody

<400> 21

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Val Leu Val

35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Asn Gly Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 22

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region (VK) of 6B9Mut1 monoclonal

antibody

<400> 22

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Val Asn Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

35 40 45

His Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His His Gly Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 23

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region (VK) of 11E8Mut28
monoclonal antibody

<400> 23

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Ser Asn Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 24

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region (VK) of 14E5Mut11
monoclonal antibody

<400> 24

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Tyr

85 90 95

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

100 105

<210> 25

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region (VK) of 14E5Mut42

monoclonal antibody

<400> 25

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asp Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 26

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region (VK) of 14E5Mut54

monoclonal antibody

<400> 26

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Arg Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region (VK) of 14E5Mut68

monoclonal antibody

<400> 27

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Tyr

85 90 95

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

100 105

<210> 28

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region (VK) of 14E5Mut65

monoclonal antibody

<400> 28

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Ser Asn Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 29

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region (VK) of 14E5Mut83

monoclonal antibody

<400> 29

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asp Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 30

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region (VK) of 14E5Mut95

monoclonal antibody

<400> 30

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

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr			
20	25	30	

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

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

<210> 31

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region (VH) of 6B9Mut1 monoclonal antibody

<400> 31

1	5	10	15
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr			
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Tyr			
20	25	30	

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

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

85 90 95

Ala Arg Glu Ala Gly Asn Tyr Ile Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 32

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region (VH) of 11E8Mut94
monoclonal antibody

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ala Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Trp Gly Trp Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 33

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region (VH) of 14E5Mut11
monoclonal antibody

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly His Ile Leu Pro Gly Ser Val Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ala Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Gly Trp Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 34

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region (VH) of 14E5Mut42

monoclonal antibody

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly His Ile Leu Pro Gly Ser Val Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Ala Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr

65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Gly Trp Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser

115

<210> 35

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region (VH) of 14E5Mut54
 monoclonal antibody

<400> 35
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Thr Asn
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly His Ile Leu Pro Gly Ser Val Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

115

<210> 36

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region (VH) of 14E5Mut68

monoclonal antibody

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Val Thr Ala Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Gly Trp Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 37

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region (VH) of 14E5Mut65

monoclonal antibody

<400> 37

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

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

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

115

<210> 38

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region (VH) of 14E5Mut83

monoclonal antibody

<400> 38

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Val Leu Met Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Thr His			
20	25	30	

Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly His Ile Leu Pro Gly Ser Val Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe			
50	55	60	

Lys Gly Lys Ala Ala Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr			
65	70	75	80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Gly Trp Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 39

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region (VH) of 14E5Mut95

monoclonal antibody

<400> 39

Glu Val Gln Leu Gln Gln Thr Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly His Ile Leu Pro Gly Ser Val Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Val Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Gly Trp Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR1 of 6B9 monoclonal

antibody

<400> 40

Asp Tyr Leu Ile Glu

1 5

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR2 of 6B9 monoclonal

antibody

<400> 41

Val Ile Asn Pro Glu Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ala Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR3 of 6B9 monoclonal

antibody

<400> 42

Glu Ala Gly Asn Tyr Ile Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR1 of 6B9 monoclonal

antibody

<400> 43

Arg Ala Ser Val Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Val

1 5 10

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR2 of 6B9 monoclonal

antibody

<400> 44

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR3 of 6B9 monoclonal

antibody

<400> 45

Gln His His His Gly Thr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR2 of affinity matured

6B9 monoclonal antibody (6B9Mut1)

<400> 46

Val Ile Asn Pro Glu Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ala Lys Phe Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 47

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain framework region FR1 of affinity matured

6B9 monoclonal antibody (6B9Mut1)

<400> 47

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR1 of 11E8 monoclonal

antibody

<400> 48

Ser Tyr Trp Ile Glu

1 5

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR2 of 11E8 monoclonal

antibody

<400> 49

Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR3 of 11E8 monoclonal

antibody

<400> 50

Trp Gly Trp Asp Thr Tyr

1 5

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR1 of 11E8 monoclonal

antibody

<400> 51

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR2 of 11E8 monoclonal

antibody

<400> 52

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR3 of 11E8 monoclonal

antibody

<400> 53

Gln Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 54

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR3 of affinity matured
11E8 monoclonal antibody (11E8Mut28 and 11E8Mut94)

<400> 54

Trp Gly Trp Asp Ser Tyr

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR3 of affinity matured
11E8 monoclonal antibody (11E8Mut28)

<400> 55

Gln Gln Phe Ser Asn Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 56

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain framework region FR3 of affinity matured
11E8 monoclonal antibody (11E8Mut28)

<400> 56

Lys Ala Ala Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain framework region FR4 of affinity matured

11E8 monoclonal antibody (11E8Mut28 and 11E8Mut94)

<400> 57

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR1 of 14E5 monoclonal antibody

<400> 58

Thr Tyr Trp Ile Glu

1 5

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR2 of 14E5 monoclonal antibody

antibody

<400> 59

His Ile Leu Pro Gly Ser Val Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 60

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR3 of 14E5 monoclonal antibody

<400> 60

Trp Gly Trp Asp Ser Tyr

1 5

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR1 of 14E5 monoclonal

antibody

<400> 61

Ser Thr Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ser Leu Asn

1 5 10

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR2 of 14E5 monoclonal

antibody

<400> 62

Tyr Thr Ser Asn Leu His Ser

1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR3 of 14E5 monoclonal

antibody

<400> 63

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR1 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut11, 14E5Mut54 and 14E5Mut65)

<400> 64

Thr Asn Trp Ile Glu

1 5

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR1 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut11)

<400> 65

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Lys Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR2 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut11, 14E5Mut42, 14E5Mut54,

14E5Mut68, 14E5Mut65 and 14E5Mut83)

<400> 66

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR3 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut11)

<400> 67

Gln Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 68

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain framework region FR1 of affinity matured
14E5 monoclonal antibody (14E5Mut11 and 14E5Mut83)

<400> 68

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys

20

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain framework region FR2 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut11, 14E5Mut42, 14E5Mut54,
14E5Mut68, 14E5Mut65, 14E5Mut83 and 14E5Mut95)

<400> 69

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Thr Tyr

1 5 10 15

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR1 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut42, 14E5Mut54, 14E5Mut68,
14E5Mut65, 14E5Mut83 and 14E5Mut95)

<400> 70

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR3 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut42, 14E5Mut83 and 14E5Mut95)

<400> 71

Gln Gln Tyr Ser Asp Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 72

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain framework region FR1 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut42)

<400> 72

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 73

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain framework region FR1 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut42)

<400> 73

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys

20

<210> 74

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain framework region FR3 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut54)

<400> 74

Lys Ala Ala Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr Met Gln

1 5 10 15

Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 75

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain framework region FR1 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut54)

<400> 75

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Arg Cys

20

<210> 76

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR2 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut68)

<400> 76

Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213>

> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR3 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut68)

<400> 77

Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 78

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain framework region FR3 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut68)

<400> 78

Arg Ala Thr Val Thr Ala Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ser Tyr Met Gln

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 79

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain framework region FR1 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut68)

<400> 79

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys

20

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR3 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut65)

<400> 80

Gln Gln Phe Ser Asn Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 81

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain framework region FR1 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut65)

<400> 81

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 82

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain framework region FR3 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut65)

<400> 82

Lys Ala Ala Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr Met Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 83

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR1 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut83)

<400> 83

Thr His Trp Ile Glu

1 5

<210> 84

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain framework region FR1 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut83)

<400> 84

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 85

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain framework region FR1 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut95)

<400> 85

Glu Val Gln Leu Gln Gln Thr Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 86

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain framework region FR3 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut95)

<400> 86

Lys Ala Val Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr Met Gln

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 87

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain framework region FR1 of affinity matured

14E5 monoclonal antibody (14E5Mut95)

<400> 87

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys

20

<210> 88

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region (VH) of 11E8Mut94

monoclonal antibody

<400> 88

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Glu Gly Arg Ala Ala Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Gly Trp Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 89

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region (VK) of 11E8Mut94

monoclonal antibody

<400> 89

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 90

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR2 of affinity matured

11E8 monoclonal antibody (11E8Mut94)

<400> 90

Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 91

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain framework region FR2 of affinity matured

11E8 monoclonal antibody (11E8Mut94)

<400> 91

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Glu Phe Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 92

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain framework region FR3 of affinity matured

11E8 monoclonal antibody (11E8Mut94)

<400> 92

Arg Ala Ala Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr Met Gln

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 93

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain framework region FR1 of affinity matured

11E8 monoclonal antibody (11E8Mut94)

<400> 93

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys

20

<210> 94

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR1 of 37E1, 37E1B5 and
Hu37E1B5 monoclonal antibody

<400> 94

Arg Tyr Trp Met Ser

1 5

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR2 of 37E1, 37E1B5 and
Hu37E1B5 monoclonal antibody

<400> 95

Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Ser Ser Leu Lys

1 5 10 15

Asp

<210>

> 96

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR3 of 37E1, 37E1B5 and
Hu37E1B5 monoclonal antibody

<400> 96

Leu Ile Thr Thr Glu Asp Tyr

1 5

<210> 97

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR1 of 37E1, 37E1B5 and
Hu37E1B5 monoclonal antibody

<400> 97

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu
1 5 10

<210> 98

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR2 of 37E1 monoclonal
antibody

<400> 98

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp

1 5

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR3 of 37E1, 37E1B5 and
Hu37E1B5 monoclonal antibody

<400> 99

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 100

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR2 of 37E1B5 and Hu37E1B5
monoclonal antibody

<400> 100

Tyr Ala Asn Arg Leu Val Asp

1 5

<210> 101

<400> 101

000

<210> 102

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region (VH) of 11E8Mut39

monoclonal antibody

<400> 102

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly His Thr Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Tyr Gly Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 103

<400> 103

000

<210> 104

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region (VK) of 11E8Mut39

monoclonal antibody

<400> 104

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Thr Ser Gln Asp Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Thr Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Ala Ile Ser Asn Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Tyr

85 90 95

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

100 105

<210> 105

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR1 of affinity matured

11E8 monoclonal antibody (11E8Mut39)

<400> 105

Ser Thr Ser Gln Asp Val Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 106

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain framework region FR1 of affinity matured

11E8 monoclonal antibody (11E8Mut39)

<400> 106

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR2 of affinity matured

11E8 monoclonal antibody (11E8Mut39)

<400> 107

Tyr Ala Ser Asn Leu His Ser

1 5

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain framework region FR4 of affinity matured

11E8 monoclonal antibody (11E8Mut39)

<400> 108

Trp Asp His Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 109

<400> 109

000

<210> 110

<400> 110

000

<210> 111

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 111

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala

1 5 10

<210> 112

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR1 of affinity matured

11E8 monoclonal antibody (11E8Mut39)

<400> 112

Thr Tyr Trp Ile Glu

1 5

<210> 113

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR2 of affinity matured

11E8 monoclonal antibody (11E8Mut39)

<400> 113

His Thr Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 114

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain framework region FR3 of affinity matured

11E8 monoclonal antibody (11E8Mut39)

<400> 114

Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Arg Pro Ser Asn Thr Ser Tyr Met Gln

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Tyr Gly Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys Ala Thr

20 25 30

<210> 115

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain framework region FR1 of affinity matured

11E8 monoclonal antibody (11E8Mut39)

<400> 115

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys

20

<210> 116

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR1 of 4F1 monoclonal
antibody

<400> 116

Asn Tyr Leu Ile Glu

1 5

<210> 117

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR2 of 4F1 monoclonal
antibody

<400> 117

Val Ile Asn Pro Gly Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys

1 5 10 15

Val

<210> 118

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region CDR3 of 4F1 monoclonal antibody

<400> 118

Glu Gly Asn Ala Arg Thr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR1 of 4F1 monoclonal

antibody

<400> 119

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Val

1 5 10

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR2 of 4F1 monoclonal

antibody

<400> 120

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu

1 5

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region CDR3 of 4F1 monoclonal

antibody

<400> 121

Gln His His Asn Gly Thr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 122

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic homologous murine region of human integrin beta8

including 6B9 and 4F1 epitope

<400> 122

Val Gly Thr Ser Pro

1 5

<210> 123

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic region of human integrin beta8 including 6B9 and 4F1

epitope

<400> 123

Ile Arg Ile Asn Ser

1 5

<210> 124

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic region of human integrin beta8 including 6B9 and 4F1

epitope with amino acid swapping

<400> 124

Val Arg Ile Asn Ser

1 5

<210> 125

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic region of human integrin beta8 including 6B9 and 4F1

epitope with amino acid swapping

<400> 125

Ile Gly Ile Asn Pro

1 5

<210

> 126

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic region of human integrin beta8 including 6B9 and 4F1

epitope with amino acid swapping

<400> 126

Ile Gly Ile Asn Ser

1 5

<210> 127

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic region of human integrin beta8 including 37E1B5, 14E5

and 11E8 epitope

<400> 127

Arg Lys Met Ala Phe Phe

1 5

<210> 128

<211> 6

<212> PRT

<

213> Artificial sequence

<220><223> synthetic homologous murine region of human integrin beta8

including 37E1B5, 14E5 and 11E8 epitope

<400> 128

Lys Lys Met Ala Leu Tyr

1 5

<210> 129

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic region of human integrin beta8 including 37E1B5, 14E5
and 11E8 epitope with amino acid swapping

<400> 129

Arg Lys Met Ala Leu Tyr

1 5

<210> 130

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic region of human integrin beta8 including 37E1B5, 14E5
and 11E8 epitope with amino acid swapping

<400> 130

Arg Lys Met Ala Phe Tyr

1 5

<210> 131

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic region of human integrin beta8 including 37E1B5, 14E5
and 11E8 epitope with amino acid swapping

<400> 131

Lys Lys Met Ala Phe Tyr

1 5

<210> 132

<211> 6

<212>

> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic region of human integrin beta8 including 37E1B5, 14E5
and 11E8 epitope with amino acid swapping

<400> 132

Lys Lys Met Ala Leu Phe

1 5

<210> 133

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic region of human integrin beta8 including 37E1B5, 14E5
and 11E8 epitope with amino acid swapping

<400> 133

Lys Lys Met Ala Phe Phe

1 5

<210> 134

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic region of human integrin beta8 including 37E1B5, 14E5
and 11E8 epitope with amino acid swapping

<400> 134

Arg Lys Met Ala Leu Phe

1 5

<210> 135

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic heavy chain variable region (VH) of 14E5Mut93
monoclonal antibody

<400> 135

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly His Ile Leu Pro Gly Ser Val Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ala Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Gly Trp Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 136

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic light chain variable region (VK) of 14E5Mut93

monoclonal antibody

<400> 136

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105