



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0025174
(43) 공개일자 2022년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7004383(분할)

(22) 출원일자(국제) 2014년08월01일
심사청구일자 2022년02월09일

(62) 원출원 특허 10-2016-7005677
원출원일자(국제) 2014년08월01일

심사청구일자 2019년08월01일

(85) 번역문제출일자 2022년02월09일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2014/066650

(87) 국제공개번호 WO 2015/015003

국제공개일자 2015년02월05일

(30) 우선권주장
13178958.8 2013년08월01일
유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인

위니베르시트카슬리끄드루뱅

벨기에왕국루뱅-라-누브베-1348플라스드뤼니베르
시테1올르위니베르시테르

루드비히 인스티튜트 포 캔서 리서치 리미티드
스위스 취리히 체하-8001 슈타델호퍼슈트라세 22
아르제넥스 비브이비에이

벨기에, 주에나르트 9052, 인터스트리파크 7

(72) 발명자

루카스, 소피

벨기에, 티뷰런 비-3080, 뒤스버그, 158썬, 비웨이
더스트라트

쿠리, 피에르

벨기에, 크레이넴 비-1950, 호네킨버그, 58
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

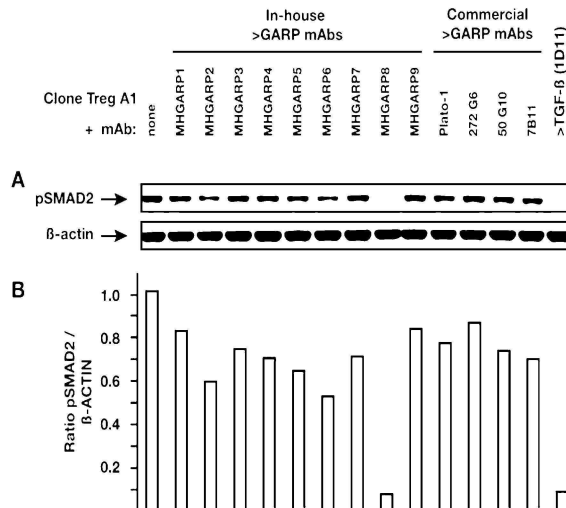
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 항GARP 단백질 항체와 그 용도

(57) 요약

본 발명은 TGF-β의 존재시 GARP 결합 단백질 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

쿠엔데 비야수르, 줄리아

벨기에, 루베인 비-3001, 헤버리, 버스 501, 328, 남스테틴웨그

두모티어, 라우레

벨기에, 오르바이스 비-1360, 루 트레모록스, 129

르놀드, 장-크리스토프

벨기에, 크라이넴 비-1950, 애비뉴 르네 아스트리드, 148

벤 데르 오닝, 세바스티앙

벨기에, 백제-마리아-리어느 비-9800, 바시엘 더 크래네스트라트 18

손더스, 마이클

벨기에, 브뤼셀 비-1190, 정선 38

더 하드, 한스

네덜란드, 오텔란드 엔엘-4436엔에이, 티 진트 1

더 부크, 지테

벨기에, 말데런 비-1840, 리머스웨그 14

(30) 우선권주장

61/861,008 2013년08월01일 미국(US)

14167425.9 2014년05월07일

유럽특허청(EPO)(EP)

명세서

청구범위

청구항 1

우세한 항-인간 당단백질 A 반복체(anti-human glycoprotein A repetitions predominant, hGARP) 항체인데, 하기 CDR들을 포함하는 중쇄(heavy chain)의 가변 영역:

VH-CDR1: GYGIN (서열번호 52);

VH-CDR2: MIWSDGSTDYNSVLTS (서열번호 3); 및

VH-CDR3: DRNYDYDGAMDY (서열번호 4), 및

하기 CDR들을 포함하는 경쇄(light chain)의 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체:

VL-CDR1: KASDHIKNWLA (서열번호 5);

VL-CDR2: GATSLEA (서열번호 6);

VL-CDR3: QQYWSTPWT (서열번호 7).

청구항 2

2013년 5월 30일에 기탁번호 LMBP 10246CB로 등록된 하이브리도마(Hybridomas)에 의해 생성된 단편을 연결하는 항체 또는 항원.

청구항 3

2013년 5월 30일에 기탁번호 LMBP 10246CB로 등록된 GARP에 대응하는 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주 (cell line).

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항체는 인간화된 항체인 것을 특징으로 하는, 항체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 TGF-β 신호를 억제하는 기능을 가진 사람의 항GARP 단백질에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 암과 같은 질병 및 면역 질환의 치료와 관련된 것이다.

배경 기술

[0002] 1990년대 초 사람의 종양항원 분자가 처음 알려진 이후 종양특이적인공동항원을 가지고 있는 암환자를 대상으로 치료백신의 임상적 효과를 평가 하려는 시도가 몇 번 있었다(Boon, T. et al. Annu. Rev. Immunol. 2006, 24:175-208). 이 중 20%의 환자에서 5-10% 정도의 객관적인 임상적 반응을 보이는 종양억제 현상을 보였다. 그러므로 종양특이적인 항원에 대한 백신접종은 암을 치료하는 데 새로운 유망한 방법인 것으로 제시 되고있다.

[0003] 백신접종에 대해 반응하는 환자의 비율을 높이는 전략이 필요하다. 그러나 현존하는 암치료 백신의 임상 효력에 대한 주 문제점은 백신 자체에 있는 것이 아니라 항암 작용에 주 역할을 하는 T-세포가 활성화하고 있는 종양

주변환경을 조절하고 있는 주변의 여러 요소들에 의해 정해 진다.

- [0004] 조절 T-세포(Regulatory T cells)들 또는 T-regs은 면역반응을 억제하는 역할을 하는 CD4+ T 임파구의 일종이다. 이 조절T-세포들의 기능이 충분하지 않으면 자가면역 독성이 생기며, 한편 과도한 기능은 암 환자들의 항종양면역반응(anti-tumor immune responses)을 방해한다. 조절T-세포가 어떻게 면역반응을 억제하는지에 대한 정확한 기전은 아직 잘 알려 지지 않고 있다.
- [0005] 조절 T-세포(Tregs)의 면역억제기능 때문에 이들은 자가 또는 백신에 의해 유도된 항종양 면역 반응을 억제하는 잠재력이 있는 대표적인 물질이다. 마우스 모델동물에서 Tregs를 없애면 실험적으로 유도된 종양에 대해 면역 반응이 좋아질 수 있다는 보고가 있다(Colombo et al. Nat. Rev. Cancer 2007, 7:880-887). 그러므로 사람에서도 Tregs를 타겟으로 하면 암에 대한 면역요법의 효과를 개선할 수 있다.
- [0006] 발명자들이 일전에 이미 다른 타입의 인간 T 임파구가 아닌 인간 Tregs에 의해 활성화된 TGF-β가 생산된다는 것을 보였기 때문에(Stockis, J. et al. Eur. J. Immunol. 2009, 39:869-882) TGF-β는 좋은 타겟이 될 수 있다.
- [0007] 그러나 인간TGF-β에 대한 항체는 별로 전망이 좋지 않은 것으로 밝혀졌다. focal segmental glomerulosclerosis(FSGS)나 특발성폐섬유화(idiopathic pulmonary fibrosis(IPF)) 나 악성 피부흑색종(advanced malignant melanoma) 또는 신장세포암(renal cell carcinoma) 대한 TGF-β 항체의 임상 제1상이 진행되었다.(Lonning S et al. Current Pharmaceutical Biotechnology 2011, 12:2176-2189). 임상시험에 따라 일부 환자에서는 역효과적이 반응이 보였다. 보고된 주 역반응은 흑색종환자에서는 케라토아칸토마(keratoacanthoma, KA) 와 편평상피암(squamous cell carcinoma, SCC)이었다. 흑색종환자에서 KA 와 SCC 손상은 종양 전단계 세포가 내분비 되는 TGF-β 에 의해 성장이 억제되면서 시작되는 것으로 본다(Lonning S et al. Current Pharmaceutical Biotechnology 2011, 12:2176-2189). 그러므로 종양분야에서 TGF-β 항원에 대한 항체의 사용에 대하여 주로 고려해야 할 점은 내분비 되는 TGF-β에 의해 종양 전 단계 세포들에 대해 가지고 있는 종양억제효과가 방해받기 때문에 TGF-β 항체는 손상된 새로운 종양세포에서 작용이 더 잘 할 수도 있을 것이다.
- [0008] 이 발명의 한 목적은 Tregs의 TGF-β 생산과정을 통해 Tregs를 타겟으로 암치료 효과를 증강시키는 전략을 제공하는 것이다.
- [0009] TGF-β의 생산은 여러 과정을 거쳐 아주 잘 조절됨이 이미 잘 알려져 있다. TGF-β1 전구체인 pro-TGF-β1는 전단백질 convertase FURIN에 의해 쪼개지기 전에 동중이배체가 된다. 이를 잠재적(후기) TGF-β (latent TGF-β1)라고 하며 이것에서 성숙된 TGF-β1부분인 C-말단 쪽은 LAP 라고 불리우는(잠재 성관련 펩타이드 Latency Associated Peptide) N- 말단쪽과 비공유결합으로 연결되어 있다. 이 잠재적 복합체는 LAP이 성숙된 TGF-β1가 수용체에 결합하는 것을 방해하므로 활성이 있지않다.
- [0010] 이 발명에서는 발명자들은 잠재적 TGF-β가 세포막통과 단백질인 GARP (glycoprotein A repetitions predominant)을 통해 Tregs의 표면에 결합함을 보여주고 있다
- [0011] 그러므로 이 발명은 항GARP 단백질이 TGF-β 세포 신호 전달과정을 억제하는데 기여하는 Treg를 타겟으로 하는 새로운 전략을 보여 주는 것을 목표로 하고 있다.

발명의 내용

- [0013] ***[요약]**
- [0014] 본 발명의 대상은 TGF-β가 있을 때 당단백질 A 반복 우세 단백질(Glycoprotein A repetitions predominant, GARP)에 결합하는 한 단백질에 관한 것이다. 구체적으로 상기 단백질은 TGF-β 단백질이 있을 때만 GARP 단백질에 결합한다. 또 한편으로는 상기 단백질은 GARP 단백질이 TGF-β와 결합체를 구성하고 있을 때 만이 GARP 단백질과 결합한다. 다시 말하면 상기 단백질은 GARP와 TGF-β의 복합체에 결합하는 단백질이다.
- [0015] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 단백질은 항체 단백질분자로서 전체 항체(whole antibody), 인간화항체(humanized antibody), 단일사슬항체(single chain antibody), 단일사슬항체이배체(dimeric single chain antibody), Fv, Fab, F(ab)'2, 후코실당쇄가 제거된 항체(defucosylated antibody), 두가지특이성함유항체(bi-specific antibody), 이중항체(diabody), 삼중항체(tribody), 사중항체(tetradody) 들로 구성된 군에서부터 선

택되는 항체 분자이다.

- [0016] 다른 실시예에서, 상기 단백질은 유일항체(unibody), 도메인항체(domain antibody), 나노항체(nanobody)들로 구성된 항체그룹으로부터 선택된 항체의 일부 조각이다.
- [0017] 다른 실시예에서, 상기 단백질은 항체모사체로서 애프피바디(affibody), 애프피린(affilin), 애프피틴(affitin), 아드넥틴(adnectin), 아트리머(atrimer), 이바신(evasin), 다르핀(DARPin), 안티칼린(anticalin), 아비머(avimer), 피노머(fynomer), 베르사바디(versabody) 및 두오칼린(duocalin)으로 구성된 그룹으로부터 선택된 것이다.
- [0018] 또 다른 발명의 대상은 상기 서술한 단백질 또는 그 외의 단백질로서 GARP 단백질과 결합해서 TGF- β 신호 전달 체계를 억제하는 단백질이다.
- [0019] 발명의 실시예에서, 상기 단백질은 항체 또는 항원에 결합하는 단백질조각으로서 GARP 단백질을 구성하고 있는 아미노산 중의 한 개 또는 몇 개로 구조가 형성된 에피통에 결합하거나 잠재된(후기) TGF- β (latent TGF- β)와 결합체를 이룬 GARP에서 보이는 변형된 GARP의 에피통과 결합한다.
- [0020] 다른 실시예에서, 상기 항체 또는 항원에 결합하는 단백질조각은 성숙된 TGF- β 의 한 개 또는 몇 개의 아미노산과 결합한다. 다른 실시예에서, 상기 항체 또는 항원에 결합하는 단백질조각은 아미노산 서열 번호(SEQ ID) NO: 1. 에서 보여주는 것과 같이 GARP 단백질의 아미노산 서열 101에서 141 번째에 있는 아미노산 중 한 개 또는 몇 개의 아미노산으로 구성된 에피통과 결합하는 단백질이다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 대상은 하기 열거한 CDR 중에 적어도 한 개 이상으로 구성된 변화가 많은 부분을 함유하는 헤비 체인(heavy chain) 단백질이다;
- [0022] **VH-CDR1:** GFSLTGYGIN(서열 번호: 2) 또는 GYGIN(서열 번호: 52);
- [0023] **VH-CDR2:** MIWSDGSTDYNSVLTS(서열 번호: 3); 및
- [0024] **VH-CDR3:** DRNYDYDGAMDY(서열 번호 : 4),
- [0025] 또는, 서열 번호 NO: 2 내지 4 또는 52와 적어도 60% 이상 아미노산 서열을 공유하고 있는 CDR;
- [0026] 또는, 하기의 CDR 중 적어도 하나를 가지고 있는 변화부분(variable region)을 가진 라이트 체인(light chain) 항체;
- [0027] **VL-CDR1:** KASDHIKNWLA(서열 번호: 5);
- [0028] **VL-CDR2:** GATSLEA(서열 번호: 6); 및
- [0029] **VL-CDR3:** QQYWSTPWT(서열 번호: 7),
- [0030] 또는, 아미노산 서열 번호: 5 내지 7중에서 적어도 60% 이상을 공유하는 서열을 가진 CDR;
- [0031] 또는, 하기 열거한 CDR들 중 적어도 한 개를 포함하고 있는 헤비체인 변이 부분;
- [0032] **VH-CDR1:** SYYID(서열 번호: 13);
- [0033] **VH-CDR2:** RIDPEDGGTKYAQKFQG(서열 번호: 14);
- [0034] **VH-CDR3:** 또는 NEWETVVVGDLMEYEEY(서열 번호: 15),
- [0035] 또는, 아미노산 서열 번호 NO: 13-15 와 적어도 60% 이상 서열을 공유하고 있는 어느 CDR;
- [0036] 또는, 하기의 CDR들 중 적어도 하나를 포함하고 있는 라이트 체인의 변화부분;
- [0037] **VL-CDR1:** QASQX₁I X₂S X₃LA(서열 번호: 16) 여기서 X₁은 S 또는 T이고; X₂ 는 S 또는 V, X₃는 Y 또는 F이다;
- [0038] **VL-CDR2:** X₁X₂SX₃X₄X₅T(서열 번호: 17), 여기서 X₁는 G 또는 R; X₂는 A 또는 T; X₃는 R 또는 I; X₄는L 또는 P; X₅는 Q 또는 K이다;
- [0039] **VL-CDR3:** QQYX₁SX₂PX₃T(서열 번호: 18);여기서 X₁ 는 D, A, Y 또는 V이고; X₂는 A, L 또는 V; X₃는 V 또는 P이다;
- [0040] 또는, 서열 번호 16 내지 18(서열 번호: 16-18)의 아미노산 서열과 60% 이상 같은 아미노산 서열을 가지고 있

는 어느 CDR.

- [0041] 실시예에서, 상기 헤비체인의 변이 부분은 적어도 하기 CDRs의 하나를 가지고 있다;
- [0042] **VH-CDR1:** GFSLTGYGIN (서열 번호: 2) 또는 GYGIN (서열 번호: 52);
- [0043] **VH-CDR2:** MIWSDGSTDYNSVLTS (서열 번호: 3); 및
- [0044] **VH-CDR3:** DRNYDYDGAMDY (서열 번호: 4),
- [0045] 또는 서열 번호 2 내지 4 또는 52의 서열과 적어도 60% 이상 같은 아미노산 서열을 가지고 있는 어느 CDR.
- [0046] 및 라이트체인의 변이 부분은 적어도 하기 CDRs의 하나를 가지고 있다;
- [0047] **VL-CDR1:** KASDHIKNWLA (서열 번호: 5);
- [0048] **VL-CDR2:** GATSLEA (서열 번호: 6); 및
- [0049] **VL-CDR3:** QQYWSTPWT (서열 번호: 7),
- [0050] 또는 서열동정번호 5 내지 7의 서열과 적어도 60% 이상의 공통 아미노산 서열을 가지고 있는 CDR;
- [0052] *또는 헤비체인의 변이 부분이 하기 CDRs 중 적어도 하나를 가지고 있다;
- [0053] **VH-CDR1:** SYIID (서열 번호: 13);
- [0054] **VH-CDR2:** RIDPEDGGTKYAQKFQG (서열 번호: 14);
- [0055] **VH-CDR3:** 또는 NEWETVVVGDLMEYEY (서열 번호: 15);
- [0056] 또는 서열 번호 13 내지 15의 아미노산 서열과 60% 이상의 공통 아미노산을 함유하는 어떤 CDR,
- [0057] 및 라이트체인의 변이 부분은 하기 CDRs중 적어도 어느 하나를 포함한다;
- [0058] **VL-CDR1:** QASQX₁I X₂S X₃LA (서열 번호: 16), 여기서 X₁는 S 또는 T, X₂는 S 또는 V, X₃는 Y 또는 F;
- [0059] **VL-CDR2:** X₁X₂SX₃X₄X₅T (서열 번호: 17), 여기서 X₁는 G 또는 R; X₂는 A 또는 T; X₃는 R 또는 I; X₄는 L 또는 P; X₅는 Q 또는 K;
- [0060] **VL-CDR3:** QQYX₁SX₂PX₃T, 여기서 X₁는 D, A, Y 또는 V; X₂는 A, L 또는 V; X₃는 V 또는 P (서열 번호: 18);
- [0061] 또는 서열동정번호 16 내지 18과 적어도 60% 이상의 공통된 아미노산을 가지고있는 어떤 CDR.
- [0062] 다른 실시예에서, GFSLTGYGIN(서열 번호: 2), MIWSDGSTDYNSVLTS(서열 번호: 3), DRNYDYDGAMDY(서열 번호: 4) CDRs로 구성된 헤비체인의 변이부위 및 KASDHIKNWLA(서열 번호: 5), GATSLEA(SEQ ID NO: 6), QQYWSTPWT(서열 번호: 7) CDR 을 갖고 있는 라이트체인(light chain)의 변이 부위 또는 상기 서열 번호 2 내지 7의 아미노산 서열과 적어도 60% 이상 공통된 아미노산 서열을 갖거나;
- [0063] 또는, GYGIN(서열 번호: 52), MIWSDGSTDYNSVLTS(서열 번호: 3), DRNYDYDGAMDY(서열 번호: 4) 서열을 갖는 헤비체인의 변이 부위와 KASDHIKNWLA(서열 번호: 5), GATSLEA(SEQ ID NO: 6), QQYWSTPWT(서열 번호: 7) 서열을 가지고 있는 라이트체인 변이 부위 또는 상기 서열 번호 52 또는 3 내지 7의 아미노산 서열과 적어도 60% 이상 공통된 아미노산 서열을 갖거나;
- [0064] 또는, SYIID(서열 번호: 13), RIDPEDGGTKYAQKFQG(서열 번호: 14), 또는 NEWETVVVGDLMEYEY(서열 번호: 15)의 CDR을 포함하는 헤비체인 변이 부위; 및 QASQX₁I X₂S X₃LA(서열 번호: 16), 여기서 X₁는 S 또는 T, X₂는 S 또는 V, X₃는 Y 또는F); X₁X₂SX₃X₄X₅T(서열 번호: 17), 여기서 X₁는 G 또는 R; X₂는 A 또는 T; X₃는 R 또는 I; X₄는 L 또는 P; X₅는 Q 또는 K; QQYX₁SX₂PX₃T, 여기서 X₁는 D, A, Y 또는 V; X₂는 A, L 또는 V; X₃는 V 또는 P(서열 번호: 18)인 서열을 가지고 있는 CDR로 구성된 라이트 체인의 변이 부위; 또는 서열 번호 16 내지 18(SEQ ID NO: 16-18) 과 적어도 60% 이상 공통된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0065] 다른 실시예에서, 헤비체인 변이 부위의 아미노산 서열이 서열 번호 8(서열 번호: 8) 또는 50(서열 번호: 50)과

같고 라이트 체인 변이 부위서열이 서열 번호 9(서열 번호: 9) 또는 51(서열 번호: 51)이거나, 헤비체인 변이 부분의 아미노산 서열이 서열 번호 34(서열 번호: 34)이고, 라이트체인 변이 부위서열이 서열 번호 35 내지 39번(서열 번호: 35-39) 중 하나이거나, 또는 상기 열거한 서열 번호 8 내지 9, 50 내지 51, 또는 34 내지 39(서열 번호: 8-9, 50-51 또는 34-39)와 적어도 60% 이상의 공통된 아미노산 서열을 갖는다.

[0066] 본 발명의 또 다른 목적은 헤비체인 변이 부위는 서열 번호 8(서열 번호: 8) 또는 50번(서열 번호: 50)으로 구성되어 있고, 라이트체인 변이 부위는 서열동정번호 9(서열 번호: 9) 또는 51(서열 번호: 51)을 가지고 있거나 헤비체인 변이 부위가 서열동정번호 34(서열 번호: 34), 1라이트체인 변이 부위는 서열동정번호 35-39(서열 번호: 34)를 가진 항체 단백질로서, 상기 정의한 대로 아미노산 서열 동정번호 1(서열 번호: 1)을 가진 폴리 펩타이드의 에피톱에 결합하는 능력이 있는 단백질이다.

[0067] 본 발명의 다른 목적은 2013년 5월 30일자 등록번호 LMBP10246CB로 등록된 하이브리도마에 의해 생성된 항체 또는 항원 결합 단편이다.

[0068] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 서술한 바와 같은 항원 결합 단편 또는 항체를 암호화하는 핵산 (polynucleotide) 서열이다.

[0069] 또한, 본 발명의 목적은 상기 서술된 청구항의 핵산을 포함하는 발현 벡터이다.

[0070] 또한, 본 발명의 목적은 2013년 5월 30일자로 등록된 등록번호 LMBP10246CB 를 가진 GARP에 대한 항체를 생산할 수 있는 능력이 있는 하이브리도마 세포주이다.

[0071] 또한, 본 발명의 목적은 상기 서술한 단백질을 포함하고 있는 약학적 조성물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 부형제이다.

[0072] 또한, 본 발명의 목적은 TGF-β 관련하여 문제가 있는 사람이 필요 시 치료목적으로 상기 서술한 약학적 조성물 사용에 관한 것이다. 구체적으로는 TGF-β 관련 질환으로는 염증질환, 만성감염, 암, 섬유화, 심혈관질환, 뇌혈관질환(예, 허혈성 뇌졸중) 및 신경변성질환(neurodegenerative diseases)으로 구성된 군으로부터 선택되는 질병이다.

[0073] 다른 실시예에서, 상기 서술한 약물제제를 암치료의 한 방법으로 다른 제제와 함께 병행 투여하거나, 또는 종양 백신이나 면역항진용 항체 등과 같은 면역요법제와 병행 투여하는 것에 관한 것이다.

[0074] 다른 실시예에서, 상기 서술한 약물제제를 암환자 치료에 면역촉진항체로써 투여한다는 것이다.

[0075] **[용어 정의]**

[0076] 본 발명에서 다음의 용어들은 각각 다음과 같이 정의한다.

[0077] "**항체**" 또는 "**면역글로불린**"- 여기서 "면역글로불린(immunoglobulin)" 이란 특이적인 면역 반응성을 가지든 가지지 않든 간에 2개의 헤비체인(heavy chain)과 두 개의 라이트 체인(light chain)을 다 가지고 있는 폴리펩타이드(polypeptide, 단백질)를 포함한다. "항체"란 위의 구성으로 되어 있는 폴리펩타이드 중 특정한 항원(예를 들면 인간 GARP 단백질)에 대한 잘 알려진 특이한 면역반응력을 가진 폴리펩타이드를 말한다. "GARP 항체(GARP antibodies)" 라는 용어는 여기서 인간 GARP 단백질항원에 대한 면역특이성을 보이는 항체를 말한다. 다른 곳에서도 언급한대로 인간 GARP 단백질에 대한 특이성이란 다른 종의 GARP단백질과의 교차반응을 제외하지 않는다. 또한, GARP 단백질 잔기와 TGF-β 단백질 잔기 사이에 걸쳐 있는 에피톱을 인식하는 항체를 제외하지 않는다. 항체와 면역글로불린은 라이트체인과 헤비체인으로 구성되어 있으며 이들 간에는공유결합으로 서로 엮여 있기도 하고 아니기도 하다. 척추동물의 면역글로불린의 기본적인 구조는 이미 잘 알려져 있다. "면역글로불린"이라는 일반적인 용어는 생화학적으로 구별될 수 있는 다섯 가지 종류의 항체로 구성되어 있다. 이 모든 다섯 종류의 항체가 다 본 발명의 범위에 들어가며, 이 다섯 가지의 면역글로불린 중에서 이후에는 주로 IgG 에 대해 논의를 할 것이다. IgG 면역글로불린은 분자량이 대략 각각 23,000 Daltons되는 두 개의 똑같은 라이트 폴리펩타이드체인(light polypeptide chain) 과 분자량이 53,000에서 70,000 정도 되는 동일한 두개의 헤비폴리펩타이드체인(heavy polypeptide chain) 으로 구성되어 있다. 이 네 개의 폴리펩타이드 체인(chain)은 이중 황화결합(disulfide bond)으로 Y 형자 모양으로 결합되어 있으며 라이트체인은 Y 모양의 입모양 입구쪽에서 시작하여 변이부위까지 포함하여 헤비체인을 감싸고 있다. 라이트체인 항체는 카파(kappa[λ]) 또는 람다(lambda[λ])로 분류된다. 헤비체인 항체 각각은 라이트체인의 카파 또는 람다와 결합 한다. 일반적으로 라이트체인과 헤비체인은 서로 공유 결합으로 결합 되어 있으며, 헤비체인 두개는 꼬리부분이 서로 이황화 공유결합으로 붙어 있거나, 하이브리도마, B세포, 또는 유전공학적으로 만들어진 숙주세포에서 만들어진 면역글로불린은

비공유 결합으로 연결 되어 있다. 헤비체인에서는 Y-형의 갈라진 쪽에서 N-말단아미노산이 시작하여 체인의 아래쪽으로 C- 말단이 이어진다. 예술적인 감각이 있는 사람은 헤비체인이 일부 아형(예를 들어, $\gamma 1 - \gamma 4$) 과 함께, 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 입실론(γ), μ (μ), α (α), δ (δ), or ϵ (ϵ))으로 분류되는 것에 감사할 것이다. 왜냐하면 항체가 IgG, IgM, IgA IgG, 또는 IgE 로 분류되는 기준은 이 헤비체인이기 때문이다. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 등과 같은 번역글로불린 아형(isotype)은 잘 알려져 있고 기능적으로도 특성화 되어있다. 이들 아형들이 일부가 변형된 것과 동종(isotype)들은 숙련된 사람에게는 노출되는 대로 즉시 구별할 수 있고 그래서 바로 본 발명의 범위 내에 있는 것이다. 상기 나타낸 바와 같이, 항체의 변이 부위는 항체가 항원의 에피토프 부위를 특이적으로 잘 인식하고 특이적으로 결합하도록 한다. 즉 항체의 VL 도메인 부위와 VH 도메인 부위가 결합하여 3차원적 항원결합 자리 구성하면서 변이부위를 만들도록 한다. 이 4차원적인 항체구조는 Y형의 각 손 부위 끝에 해당하는 곳에 항원이 결합하는 자리를 구성하게 한다. 좀 더 구체적으로는 항원결합 자리는 VH 및 VL 체인 각각에 세 곳의 보완성결정부위(complementarity determining regions, CDR)에 의해 결정된다.

[0078] "**분리된 항체(isolated antibody)**" - 여기서 사용된 분리된 항체란 자연적인 환경에서 분리되거나 회수된 것을 의미한다. 자연적 환경에서 오염된 성분이란 항체를 진단이나 치료 목적으로 사용할 때 이를 방해하는 물질을 의미하며 여기에는 효소, 호르몬, 그의 단백질성 또는 비단백질성 물질을 포함하기도 한다. 바람직한 실시예에서, 상기 항체는 정제되었다: (1) 로리(Lowry) 분석방법에 의해 항체가 무게로 95% 이상, 더 좋게는 무게로 99%를 포함하거나; (2) 스피닝컵(spinning cup) 방법의 아미노산 서열분석에서 적어도 N-말단 또는 중간의 15개 아미노산을 분석해 낼 수 있는 정도; 또는 (3) 환원조건에서 또는 비환원조건에서 SDS-PAGE 분석에서 쿠마시블루, 더 바람직하게는 실버 스테이닝 방법으로 염색했을 때 항체가 균일하게 나올 때를 의미한다. 원래 항체 구성 성분 중 적어도 하나는 없을 수도 있으므로 분리된 항체에는 재조합 세포 그 자체 안에 있는 항체도 포함된다. 그러나 일반적으로는 분리된 항체는 적어도 한 단계 과정을 거쳐 정제된다.

[0079] "**친화도 변이종(Affinity variants)**"- 상기 친화도 변이종(Affinity variant)이란 표준이 되는 GARP항체와 비교했을 때 한 개 또는 몇 개의 아미노산이 바뀌어 있는 항체들로서, 표준 GARP항체와 비교했을 때 인간 GARP 단백질이나 GARP/TGF- β 복합체단백질에 대한 친화력이 변화된 종을 의미한다. 대개는 친화도 변이종은 원래의 표준 GARP항체와 비교했을 인간 GARP 단백질이나 GARP/TGF- β 복합체단백질에 대한 친화력이 증강되어 있음을 보여준다. 화력 증강도는 인간 GARP 단백질에 대한 KD가 낮거나, 인간 GARP 단백질에서 빨리 떨어지거나 (faster off- rate), 인간이 아닌 다른 종의 GARP 유사단백질에 대한 교차반응력 패턴이 변화된 것일 수 있음을 의미한다. 친화력변이종은 보통 표준 GARP항체와 비교했을 CDR 부위에 한 개 또는 몇 개의 아미노산 서열이 바뀐 것으로 나타난다. 이런 아미노산 대체는 CDR의 원래 제 위치에 있었던 아미노산이 본래 있는 다른 아미노산이나 또는 본래 있지 않은 다른 아미노산으로 바뀌게 되는 결과를 가져온다. 이 아미노산 대체는 보존적 (conservative)이기도 하고 비보존적(non-conservative)이기도 하다.

[0080] "**결합자리(binding site)**"- 결합자리라는 용어는 여기서 관심 대상이 되는 표적 항원(예, 인간GARP단백질)에 선택적으로 결합하는데 관여하는 폴리펩타이드 부위를 의미한다. 결합도메인 또는 결합 부위는 적어도 한 개의 결합 자리로 구성된다. 대표적인 결합도메인은 항체 변이부분도메인(variable domain)이다. 발명된 항체분자는 한 개 또는 몇 개의 항원결합자리를 포함하기도 한다.

[0081] "**보수적 아미노산 대체(Conservative amino acid substitution)**"- 여기서 사용되는 "보수적 아미노산 대체"란 아미노산이 바뀔 때 옆가지 잔기가 비슷한 아미노산으로 바뀌는 것을 의미한다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 패밀리는 당 업계에 정의되어 있으며, 염기성결가지(예, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성결가지(예, 아스파르긴산, 그루타민산), 비이온성극성결가지(예, 글라이신, 아스파라긴, 그루타민, 세린, 트레오닌, 타이로신, 시스테인), 비극성결가지(예, 알라닌, 발린, 루이신, 아이소루이신, 프로린, 페닐알라닌, 메타이오인, 트립토판), 베타가지결가지(예, 트레오닌, 발린, 아이소루이신) 및 방향족결가지(예, 타이로신, 페닐알라닌, 트립토판)을 포함한다. 그러므로 번역글로불린 폴리펩타이드에서 필수적이지 않은 아미노산은 같은 그룹에 속하는 옆잔기를 가진 다른 아미노산과 대체할 수 있다. 다시 서술하면, 일련의 아미노산이 서열이나 또는 옆가지 아미노산 군이 다르지만 구조적으로 비슷한 일련의 아미노산으로 대체될 수 있다.

[0082] "**키메라(chimeric)**" - 여기서 사용된 "키메라" 단백질이란 첫 번째 아미노산 서열이 원래 자연에서는 연결되어 있지 않은 두 번째 아미노산에 연결되어 생긴 단백질을 의미한다. 이 두 아미노산은 정상적으로는 서로 다른 단백질에 존재하지만 폴리펩타이드가 융합이 될 때 서로 연결이 되거나 또는 정상적으로는 같은 단백질 안에 존재하지만 융합폴리펩타이드가 될 때 새로운 구조가 생기면서 연결될 수 있다. 예를 들어, 화학적인 합성 또는 원하는 반응이 일어날수 있는 펩타이드 영역을 가진 폴리펩타이드를 번역해내서 만들 수 있다. 그 예로 키메라

GARP 항체로 카멜리드에서 유래된 VH 와 VL 도메인(camelid-derived VH and VL domains)으로 구성된 융합 단백질이나, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 와 같은 변하지 않는 도메인(constant domain)을 가진 인간항체에 융합된 인간화변이체 단백질 들 수 있다.

[0083] "CDR" - 본문에서, "CDR" 또는 "complementarity determining region(보완성결정부위)" 이란 용어는 헤비체인이나 라이트체인 폴리펩타이드의 변이부위 내에 비연속적으로 존재하고 있는 항원결합자리 라고 정의한다. 이 특별한 부분은 Kabat 등에 의해 1977년 생화학저널(J. Biol. Chem. 252, 6609-6616), 1991년 "면역학적으로 흥미있는 단백질 서열(Sequences of protein of immunological interest)" 에 서술되어 있고, 그리고 1987년 Chothia 에 의해 분자생물학회지(J. Mol. Biol. 196:901-917)에 1996년 MacCallum 등에 의해 분자생물학회지(J. Mol Biol. 262:732-745)에 서술되었으며 여기에서는 서로 비교했을 때 겹치거나 부속 그룹의 아미노산 잔기일 경우도 포함하는 것으로 정의했다. 상기 인용한 각 참고문헌에서 정의한대로 CDR 에 포함되는 아미노산 잔기를 비교대상으로 한다. "CDR"이라는 용어는 서열비교에 근거해 볼 때, Kabat에 의해 정의한 대로 하는 편이 더 바람직하다.

표 1

[0084] CDR 정의

| | CDR 정의(CDR definitions) | | |
|---------|--------------------------|-------------|---------------|
| | Kabat (1) | Chothia (2) | MacCallum (3) |
| VH CDR1 | 31-35 | 26-32 | 30-35 |
| VH CDR2 | 50-65 | 53-55 | 47-58 |
| VH CDR3 | 95-102 | 96-101 | 93-101 |
| VL CDR1 | 24-34 | 26-32 | 30-36 |
| VL CDR2 | 50-56 | 50-52 | 46-55 |
| VL CDR3 | 89-97 | 91-96 | 89-96 |

[0085] (1) 잔기번호는 상기의 Kabat 등에 의한 명명에 따른다.(2) 잔기번호는 상기의 Chothia 등에 의한 명명에 따른다.(3) 잔기번호는 상기의 MacCallum 등에 의한 명명에 따른다.

[0086] "CH2 도메인(CH2 domain)"- 본문에서 사용되는 용어 "CH2 도메인"은 연장된 헤비체인의 영역을 포함하는, 예를 들어, 기존의 명명법에 따라 항체의 244번에서 360까지를 포함하는 헤비체인 분자 영역을 포함한다(잔기 244에서 360 은 Kabat에 따른 번호 체계이며, 잔기 231-340은 EU 번호체계, Kabat" 등에 의한 1991년 Bethesda, US Department of Health and Human Services, NIH 에서 발표한 "면역학적으로 흥미있는 단백질 서열(Sequences of protein of immunological interest)" 에 서술한 표기이다). CH2 도메인은 다른 도메인과 가깝게 쌍을 이루지 않는다는 점에서 독특하다. N-결합으로 가지를 친 탄수화물 체인 두 개가 온전한 자연형태의 IgG 분자의 두 개의 CH2 도메인 사이에 끼어 있다. CH3 도메인은 CH2 도메인으로부터 IgG 분자의 C-말단 까지 확장되어 있으며 약 108 잔기로 이루어져 있다.

[0087] "카멜리드-유래(Camelid-Derived)" - 바람직한 실시예에서, GARP 항체분자는 어떤 범위에 있는 아미노산 서열 및/또는 GARP 항원단백질을 카멜리드(camelid)에 면역반응 일으키게 하여 얻은 고전적인 카멜리드 항체로부터 나온 CDR 아미노산 서열을 포함하기도 한다. 그러나 카멜리드 유래 아미노산 서열로 구성된 GARP 항체는 어떤 특정한 형태 및/또는 인간이나 인간이 아닌 다른 포유동물의 항체의 고정영역의 아미노산 서열로부터 유래 된 서열을 갖을 수 있도록 만들 수 조작할수 있다. 구체적인 실시예에서, 카멜리드에서 유래된GARP 항체의 형태 부위에 카멜리드에서 유래 되지 않은 아미노산 서열을 한 개 또는 몇 개를 포함시킬 수 있다, 예를 들면 카멜리드의 형태부위 아미노산 서열 한 개 또는 몇 개는 인간 또는 인간이 아닌 원숭이 류에 있는 것과 같은 아미노산으로 변이시켜 대체 할수 있다. 또한, 카멜리드에서 유래된VH 및 VL 도메인, 또는 이로부터 인간화된 변이체는 다른 곳에서 좀 더 자세히 서술되는 바와 같이 키메라분자를 생산하기 위해 인간 항체의 고정부위(constant domain)에 연결 될 수 있다.

[0088] "유래된(Derived From)"- 본문에서 사용되는 용어 특정 단백질(예, GARP 항체, 이의 항원결합 조각)로부터 "유래된"이란 용어는 원래의 폴리펩타이드란 의미이다. 구체적으로는 특정한 최초의 폴리펩타이드로부터 유래한 폴리펩타이드나 아미노산서열은 CDR 서열이나 그와 연관된 서열이다. 특정한 최초의 폴리 펩타이드로부터 유래된 아미노산 서열은 인접해 있지 않다. 예를 들어, 실시예에서, 한 개, 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개 또는 여섯 개의 CDR은 초기 항체로부터 유래 되었다. 실시예에서, 특정한 초기의 폴리펩타이드나 아미노산으로부터

터 유래된 폴리펩타이드나 아미노산은 해당하는 초기 폴리펩타이드의 서열이나 적어도 3-5개, 5-10개, 10-20개, 20-30개, 또는 30-50개의 아미노산으로 구성된 부위의 서열, 또는 시작 서열 기원을 갖는 것으로 당 분야의 당업자에게 인식된다. 실시예에서, 초기 항체로부터 유래한 한 개 또는 몇 개의 CDR 서열은 GARP 에 대한 결합력을 유지하는 변이CDR인 친화력변이체에서 보는 바와 같이 변이체 CDR서열을 생산하도록 바뀐다.

[0089] "**다이아바디(diabodies)**" - 본문에서 사용된 용어 "다이아바디"는 작은 항체 단편을 의미하며, 이것은 VH 와 VL 도메인 사이에 5-10개의 잔기의 짧은 링커에 의해 만들어진 sFv 조각이며 이로써 V 도메인 내부간의 결합이 아닌 V 도메인 상호 체인간에 쌍을 이루도록 하여 결과적으로 항원 결합자리가 두 개 있는 이가조각(bivalent) 되도록 한 것이다. 이중특이성 다이아바디는 두 항체의 VH와 VL 도메인이 다른 폴리펩타이드 체인에 있는 두 개가 교차된 sFv 조각으로 된 혼성이베체(heterodimers)이다. 다이아바디에 대해서는, EP 404,097; WO 93/11161; 및 Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 90:6444-6448 (1993)에 좀 더 상세하게 서술되어 있다.

[0090] "**조작(설계)되었다(engineered)**" - 본 발명서에서 사용된 "조작되었다(설계되었다)" 라는 용어에는 합성방법(예; 재조합기술, in vitro 펩타이드 합성, 효소로나 화학적방법으로 펩타이드를 잇는 방법, 또는 이들 기술을 몇 개 조합한 방법)에 의해 핵산이나 폴리펩타이드 분자가 수정 된 것을 포함한다. 더 좋게는 본 발명의 항체들은 조작된 것으로 예를 들면 인간화/키메라항체들과 항원결합력, 안정성/반감기, 또는 작동제기능(effector function)과 같은 하나 또는 두가지 성질을 향상시키기 위해 조작된 항체를 포함한다.

[0091] "**에피톱(epitope)**"- 본문에서 사용된 용어 "에피톱"은 펩타이드, 단백질, 또는 단백질들에 위치한 특별한 모양을 이루고 있는 아미노산들로 항체가 결합하는 곳을 의미한다. 에피톱은 때로는 아미노산이나 당 옆가지와 같은 화학적으로 활성이 있는 표면에 모여 있는 분자들로 구성되기도 하며, 특이적인 3차구조성질과 특이적인 전기적 성질을 가진다. 에피톱은 직선적이거나 또는 반드시 연속적이지는 않은 항원의 여러 부위에 있는 두 개 또는 몇 개의 아미노산서열들이 관여하여 어떤 형태를 갖기도 한다.

[0092] "**뼈대(프레임워크) 부위(framework region)**" - 본 발명에서 사용한 "뼈대부위" 또는 "FR 부위(FR region)" 라는 용어는 변이부분의 일부 아미노산을 포함하지만 CDR의 일부는 포함하지 않는다(Kabat 의 CDR 정의를 사용). 그러므로 변이부위 뼈대는 아미노산 길이 약 100-120 개 사이이지만 CDR들 밖에 있는 아미노산만 포함한다. 헤비체인 변이부위 와 Kabat 등이 정의한대로의 CDR 을 특별히 한 예로 보면, 뼈대부위1 은 아미노산 1-30 을 포함한 변이부위 도메인에 해당하고, 뼈대부위 2는 아미노산 서열 36-49를 포함한 변이부위 도메인에 해당하고, 뼈대부위3은 아미노산 서열 66-94를 포함한 변이부위 도메인에 해당하고, 뼈대부위 4는 변이부위 도메인 아미노산 103 에서 변위 부위 끝까지 해당한다. 라이트체인의 뼈대부위도 각 라이트체인 변이부위 CDR 에 의해 비슷하게 분리되어 있다. 마찬가지로 Chothia 등이나, McCallum 등이 정의한 대로 CDR에서 보면 뼈대부위경계는 위에서 서술한대로 해당하는CDR 끝에 의해 분리되어 있다. 여기서 CDR은 Kabat가 정의한 것을 따르도록 한다. 자연에 존재하는 항체에서 각 단일 항체에 있는 6개의 CDR은 항체가 물이 있는 환경에서 3차원적 구조를 가지므로 항원결합자리가 생길 수 있도록 위치한 짧고, 비연속적인 아미노산으로 되어 있다. 헤비체인, 라이트체인 변이부위 도메인의 나머지 부분은 분자간의 변이도가 적은 아미노산 서열로 구성되어 있어 뼈대부위라고 한다. 뼈대 부위는 주로 베타시트([beta]-sheet) 구조를 취하고 있고 CDR들은 루프를 형성하고 있어 때로는 베타시트 구조의 일부분이기도 하지만 베타시트 구조와 연결된다. 그러므로 이 뼈대부위들은 6개의 CDR들이 체인간 비공유적상호작용을 통해 제자리를 잡을 수 있는 구조를 만들어 주는 역할을 한다. 제 위치에 자리한 CDR들에 의해 형성된 항원결합자리는 면역반응능력이 있는 항원에피톱의 보완적인표면(complementary surface)을 지정한다. 이 보완적표면은 면역반응능력이 있는 항원에피톱에 항체가 비공유결합으로 결합하는 것을 도와 준다. CDRs의 자리는 당 업자에 의해 용이하게 확인될 수 있다.

[0093] "**단편(fragment)**"- 본 발명에서 사용한 "단편"이란 용어는 항체나 항체체인의 일부 또는 일부 영역을 말하는 것으로 전체 또는 완전한 항체나 항체체인에 있는 아미노산 보다 아미노산 잔기가 적은것을 의미한다. 항원결합 단편(antigen-binding fragment)이란 항원에 결합하거나 전체항원(즉 조각이 나온 원래 항체)과 항원결합(즉, 인간GARP 에 특이적으로 결합)에 있어 경쟁력을 가진 면역글로불린 또는 항체의 폴리펩타이드 단편을 의미한다. 본 발명에서 사용한 항체분자 "단편"이라는 용어는 항체의 항원 결합력 있는 부위의 단편을 의미하는 것으로 항체의 라이트체인 변이도메인(VL), 헤비체인 변이도메인(VH), 단일체인항체(scFv), F(ab')₂ 조각, Fab 단편, Fd 단편, Fv 단편, 단일도메인항체단편(DAb), 일가항체 (monovalent), 다이아바디(diabodies) 또는 항원결합력이 있는 단편들이 서로 조합되거나, 모이거나, 융합되어 생긴 항원결합분자들이 그 예이다. 이 단편들은 본래의 항체 또는 완전항체 또는 항체체인을 화학적 방법, 효소처리 또는 재조합방법으로 얻을 수 있다.

- [0094] "Fv" - 본 발명에서 사용된 "Fv" 라는 용어는 완전한 항원인식력과 결합자리를 포함하고 있는 최소한의 항체 단편이다. 이 단편은 한 개의 헤비체인 변이부분도메인과 한 개의 라이트체인 변이부분 도메인이 단단하게 비공유결합으로 연결된 이배체(dimer)이다. 이 두 도메인이 접혀서 아주 변이가 쉬운 6개의 루프(헤비체인[H]에서 3개, 라이트체인[L]에서 3개)가 생기며 이 루프들은 항원결합력이 있는 아미노산 잔기를 제공하게 되어 항체의 항원결합특이성을 부여하는 역할을 한다. 그러나 온전한 결합자리보다 친화력은 낮은 하더라도 단 한 개의 변이도메인(Fv) (또는 항원에 특이적인 CDR3개로만 구성된 반쪽Fv) 만으로도 항원을 인식하고 결합할 수 있는 능력이 있다.
- [0095] "헤비체인부위(heavy chain region)"- 본 발명에서 사용되는 "헤비체인부위"라는 용어는 면역글로불린 헤비체인의 고정도메인으로부터 유래된 아미노산 서열을 포함한다. 헤비체인 부위를 구성하고 있는 폴리펩타이드는 적어도 CH1 도메인, 힌지도메인(hinge domain [힌지도메인의 상, 중, 하, 부위]), CH2 도메인, CH3 도메인, 또는 이들의 변이체 또는 조각으로 구성된다. 실시예에서, 본 발명의 결합 분자는 면역글로불린 헤비체인(즉, 힌지부분, CH2 도메인, CH3 도메인)의 Fc 부위를 포함한다. 또한 발명된 결합분자는 적어도 고정도메인(예: CH2 도메인 전체 혹은 일부)의 한 부분이 결손 되어있다. 어떤 경우에는 고정도메인 중 적어도 한 개 또는 모두가 인간 면역글로불린 헤비체인으로부터 유래 되었다. 예를 들어, 바람직한 실시예에서, 헤비체인 부위가 모두 인간 힌지도메인으로 구성될 수 있다. 다른 바람직한 실시예에서, 헤비체인 부위가 전부 인간 Fc 부위(예; 인간면역글로빈의 힌지, CH2 도메인, CH3 도메인 서열)로 구성될 수 있다. 다른 실시예에서, 헤비체인부위의 고정도메인 구성인자는 각기 다른 면역글로불린 분자로부터 오기도 한다. 그 예로 헤비체인 부위의 폴리펩타이드가 IgG1 분자로부터 유래된 CH2 도메인과 IgG3 분자 또는 IgG4 분자로부터 유래된 힌지부위로 구성되기도 한다. 다른 실시예에서, 고정도메인은 서로 다른 면역글로부린분자 부위들이 조합되어 이루어진 키메라 도메인이기도 하다. 첫 번째 부위는 IgG1 분자에서 두 번째 부위는IgG3 또는 IgG4 분자에서 온 부분으로 힌지부위가 구성된 예도 있다. 상기 상술한 바와 같이, 이는 당업자에게 이해될 수 있으며, 헤비체인 부위의 고정도메인은 자연에 존재하는 면역글로불린 분자의 아미노산과 다른 아미노산으로 수정될 수 있다. 즉 본 발명에서 보여주는 폴리펩타이드는 헤비체인 고정부위 도메인(CH1, 힌지, CH2 CH3) 및/또는 라이트체인 고정부위도메인(CL) 중 한 개 또는 몇 개가 변경되거나 수정되어 있다. 전형적인 수정 예로는 한 개 혹은 몇 개의 도메인에 한 개 또는 몇 개의 아미노산이 첨가되거나, 빠지거나, 대체된 경우를 포함한다.
- [0096] "힌지 부위(hinge region 경첩부위)"- 본 발명에서 "힌지부위"란 용어는 CH1도메인을 CH2 도메인에 연결시키는 헤비체인 분자 부위를 포함한다. 힌지(경첩)부위는 약 25개의 잔기로 되어 있으며 유연하여 두 개의 N-말단의 항원결합 부위가 서로 독립적으로 움직일 수 있도록 한다. 힌지(경첩)부위는 상부, 중부, 하부 도메인의 3개의 뚜렷한 영역으로 나눌 수 있다(1998년 Roux 등이. J. Immunol. 1998 161 :4083).
- [0097] "변이가 심한 루프(hypervariable loop)"라는 용어와 "보완성 결정하는 부위 (complementarity determining region)" 라는 용어는 엄밀히 말하면 동일하지 않다, 왜냐하면 변이가 심한 루프(HVs)는 구조에 근거하여 정의한 것이며 보완성을 결정하는부위(CDRs)는 서열의 변이정도에 근거하여 정의한 것이기 때문이며 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1983), HVs 및 CDRs의 경계는 몇몇 VH 및 VL 도메인에서는 다를 수 있다. VL 및 VH 도메인의 CDR들은 전형적으로 다음과 같은 아미노산 잔기로 구성되었다고 수 있다: 라이트체인 변이 도메인에서는 24-34(CDRL1), 50-56(CDRL2) 과 89-97(CDRL3) 잔기, 헤비체인 변이 도메인에서는 31-35 또는 31-35b(CDRH1), 50-65 (CDRH2) 및 95-102 (CDRH3) 잔기이다(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). 그러므로 HVs는 해당하는 CDRs 내에 포함될 수 있으며 특별히 따로 제시하지 않으면 VH 및 VL 도메인의 "변이가 심한 루프(hypervariable loops)" 라고 여기서 언급하는 것은 해당하는 CDR을 포함한다고 해석해야 하며 그 반대도 마찬가지이다. 변이 도메인 중 조금 더 잘 보존 되어 있는 부위는 다음에 정의한대로 뼈대부위(framework region (FR)) 라고 불린다. 원래의 헤비, 라이트체인의 변이 도메인은 각각 4개의 FRs(FR1, FR2, FR3 및 FR4)로 구성되어 있으며 주로 베타시트 ([beta]-sheet) 구조를 가지고 있으며 3개의 "변이가 심한 루프"로 연결되어 있다. 각 체인의 '변이가 심한루프'는 FR들에 의해 서로 가까이 묶여 있고 다른 체인의 "변이가 심한루프" 과 함께 항체의 항원결합 자리를 구성하는데 기여한다. 항체의 구조 분석에 의하면 보완성결정부위(CDR, complementarity determining regions)로 구성된 결합자리는 그 서열과 모양 사이에 서로 관련이 있음을 보여 주고 있다(Chothia et al., J. Mol. Biol. 227: 799-817 (1992)); Tramontano et al., J. Mol. Biol, 215: 175-182 (1990)). 이들의 서열의 변이가 심해도, 6개 루프 중 5개는 기준구조(canonical structure)라고 불리는 몇 개의 안되는 '주-체인형태'를 취하고 있다. 이 구조들은 제일 먼저 루프의 길이에의

정해지고, 두 번째는 팩킹(packing), 수소결합, 혹은 일반적이지 않은 주-체인형태를 이루는 힘으로 형태를 결정하는 루프나 뼈대 부위의 특정 위치에 있는 몇 개의 주요 잔기에 의해 정해진다.

[0098] "인간화형 대체(Humanising substitutions)" - 본 발명에서 사용되는 "인간화형대체" 라는 용어는 VH 또는 VL 도메인 항체 GARP항체(예를 들어, 카멜리드-유래 GARP 항체)의 특정위치에 존재하는 아미노산 잔기가 참조하는 인간 VH 또는 VL 도메인의 해당위치에 있는 아미노산 잔기와 같은 것으로 대체되는 것을 의미한다. 참조하는 인간 VH 또는 VL 도메인이 인간의 생식세포라인에서 온 것인 경우 VH 또는 VL 도메인의 대체된 잔기는 생식세포 라인화 된 대체라고 할 수 있다. 인간화형/생식세포라인화형 대체는 이곳에서 정의 한대로 뼈대 부위 및/또는 GARP 항체의 CDRs에 만들어질 수 있다.

[0099] "높은 인간 동일성(High human homology)"- 헤비체인 VH 도메인(heavy chain variable domain) 및 라이트체인 VL 도메인(light chain variable domain)으로 구성된 항체는 만약, VH 도메인 및 VL 도메인이 함께, 사람의 생식 세포라인의 VH 및 VL 서열과 적어도 90% 이상 동일하다면, 높은 인간 동일성을 갖는 것으로 간주될 수 있다, 인간과 높은 동일성을 가지고 있는 항체에는 전통적인 카멜리드 항체의 VH 및 VL 도메인, 특히 인간화로 조작된 항체변이체 및 완전히 인간화된 항체들과 같이 사람의 생식세포라인 서열과 충분히 높은 퍼센트의 서열을 보여주는 자연형 비인간항체의 VH 및 VL 도메인을 포함 시킬 수 있다. 실시예에서, 인간과 유사성이 높은 항체 VH 도메인은 뼈대(프레임워크) 부위 FR1, FR2, FR3 과 FR4 전역 걸쳐 인간 VH도메인 중 한 개 또는 몇 개에서 아미노산 서열 동일성을 보이거나 80% 또는 그 이상의 서열의 유사성을 보이기도 한다. 다른 실시예에서, 본 발명의 폴리펩타이드의 VH 도메인과 이 와 가장 가까운 인간생식세포라인 VH 도메인 서열 사이에 아미노산 서열의 동일성이나 서열의 유사성은 85% 또는 그 이상, 90% 또는 그 이상 95% 또는 그 이상 97% 또는 그 이상, 99% 또는 100퍼센트까지 될 수 있다. 실시예에서, 인간과 유사성이 높은 항체 VH 도메인은 가장 가까운 인간VH 서열에 비해 뼈대부위 FR1, FR2, FR3 과 FR4에 걸쳐 하나 또는 몇 개(예를 들어, 1 내지 10)의 아미노산이 다른 (mis-match)수도 있다. 다른 실시예에서, 인간과 유사성이 높은 항체 VL 도메인은 하나 또는 몇 개의 인간 VL 도메인의 뼈대부위 FR1, FR2, FR3 과 FR4에 걸쳐 하나 또는 몇 개의 인간 VL 도메인과 서열이 동일하거나 80퍼센트 이상 서열 유사성이 있음을 보여준다. 다른 실시예에서, 다른 실시 예에서 본 발명의 폴리펩타이드의 VL 도메인과 가장 일치하는 인간 생식선 VL 도메인 서열 사이의 아미노산 서열 동일성 또는 서열 유사성은 85% 이상 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상이 될 수 있고 또는 99% 또는 100%까지이다.

[0100] 실시예에서, 인간과 유사성이 높은 항체 VL 도메인은 그 도메인은 해당하는 가장 가까운 인간VL 서열에 비해 뼈대부위 FR1, FR2, FR3 과 FR4에 걸쳐 하나 또는 몇 개(1에서 10개)의 아미노산이 다른(mis-match) 서열을 가질 수도 있다. 인간과 유사성을 가진 항체와 인간 생식세포라인의 VH 및 VL와의 서열동일성 퍼센트율을 분석하기 전에 기준 배수를 정할 수 있으며, 이로 인해 인간 생식세포라인 일부분군이, H1 및 H2 또는 L1 및 L2(및 L3)의 기준배수와 동일한 조합인지 여부를 알 수 있게 한다. 따라서 서열 유사성 점수를 정하기 위해 해당 항체의 변이부분과 가장 서열 유사성이 높은 인간생식세포라인 군을 선택한다. 변이가 잘되는 루프 L1, L2, L3, H1 및 H2에 대한 Chothia 방법의 배수는 웹페이지 www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html에서 보여 주는 것과 같은 공공 사이트에 있는 생물정보학 방법을 이용해 정할 수 있다. 이 프로그램의 결과는 필수적으로 요구되는 잔기가 어떤 것 인지를 데이터파일로 보여준다. 이 데이터 파일들에는 이 위치에 대체될 수 있는 아미노산을 포함한 주요한 아미노산 잔기들의 위치를 보여준다. 해당하는 항체의 변이부분서열이 입력(input) 데이터로 주어지고 Kabat 에 따른 번호를 주기 위해 제일 먼저 공통항체서열과 대조해(aligned)본다. 기준배수 분석에는 마틴(Martin)과 톰슨(Thornton)에 의해서 개발된 자동화 방법(Martin et al., J. Mol. Biol. 263:800-815 (1996))에서 보여주는 주요한 잔기를 표본으로 하는 셋트를 사용한다. H1 및 H2 또는 L1 및 L2 (및 L3)에 대해 동일한 기준배수 조합을 사용하고 있는 잘 알려진 인간 생식세포라인 V 조각을 특히 보면 서열 유사성면에서 가장 잘 맞는 부류의 그룹을 정할 수 있다. 생물정보학방법으로 해당 항체의 VH 및 VL 도메인 뼈대 아미노산 서열과 인간 생식세포라인에 의해 지정되는 해당 서열간에 서열동일성 퍼센트율을 정할 수 있다, 그러나 실제로는 수동으로도 서열 대조를 할 수 있다. 인간면역글로부린서열은 부이베이스(VBase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)) 또는 플럭턴/호네거 데이터베이스 (Pluckthun/Honegger (<http://www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germlines>))와 같은 몇 개의 단백질 데이터베이스프로그램들에서 동정할 수 있다. 인간서열을 관심 대상항체의 VH 또는 VL 도메인의 V 부위와 비교하기 위해 www.expasy.ch/tools/#align 과 같이 사용이 가능한 웹사이트를 통해 서열 대조 알고리즘을 활용할 수 있다. 그러나 일부 한정된 서열 셋트와도 메뉴얼로 대조할 수도 있다. 같은 기준배수의 조합과 각 체인의 뼈대부위 1, 2, 및 3과 가장 유사한 서열을 가진 인간 생식세포라인 라이트 및 헤비체인 서열들을 선택하여 관심이 있는 변이부위와 비교되었으며, FR4도 인간 생식세포라인 JH 와 JK 또는 JL 부위와도 비교되었다. 전체적으로 서열 유사성퍼센트를 계산하는데 있어 FR1, FR2 와 FR3의 잔기들은 인간 생식세포라인 군의 서열과 기준배수의 동일

한 조합과 가장 잘 맞는 서열을 사용하여 평가된다. 가장 가까운 대조에서 다른 잔기만이 또는 같은 기준배수의 조합을 가진 같은 부류중의 다른 멤버 들만이 기록된다(NB- 프라이머에 의해 암호화되어 생기는 차이는 제외). 그러나 인간화를 목적으로 할 때는 위에 서술한 엄격한 조건에 따르면 "부정적인(negative)" 스코어로 나오에도 불구하고, 같은 기준배수의 조합을 갖고있지 않은 인간 생식세포라인의 멤버와 동일한 뼈대 부위에 있는 잔기는 "인간"이라고 여겨질 수 있다. 이 가정은 인간화하는데 "섞은후대조(mix and match)"라는 방법에 근거하며, 여기서는 FR1, FR2, FR3 및 FR4 각각은 가장 잘 대조 되는 인간 생식세포라인과 각각 비교 된다. 그러므로 인간화된 분자는 쿼(Qu)와 그의 동료(Qu et al., Clin. Cancer Res. 5:3095-3100 (1999)) 또는 오노(Ono)와 그의 동료(Ono et al., Mol. Immunol. 36:387-395 (1999))가 실시한 대로 다른 FR들의 조합을 포함하고 있다. 각 뼈대부위의 경계는 초티아(Chothia (Lefranc et al., NAR 27: 209-212 (1999); <http://im.gt.cines.fr>))의 번호체계를 적용한 IMGT의 번호체계를 사용하여 부여 할 수 있다. 인간과 유사성이 매우 높은 항체는 아래에서 논의한대로 인간 또는 인간과 비슷한 기준배수를 가진 초고도변이루프나 CDR 들과 비교할 수 있다. 한 예로 VH나 VL 도메인에 적어도 인간과 유사성이 높은 한 개의 초고도변이루프나 CDR를 가지고 있는 항체는 인간항체에서 보여 주고 있는 기준배수 구조와 거의 동일한 기준배수 구조를 갖고 있거나 갖을 것으로 예상되는 전형적인 카메리다(Camelidae) 종의 항체와 같은 비인간항체의 VH 또는 VL 도메인에서 얻을 수 있거나 유도될 수 있다. 인간 생식세포라인에서 암호화되어 나오는 VH 와 VL도메인에 있는 초고도변이루프나 CDR의 초기 아미노산 서열들은 정의상 변이가 높고 다고 해도, 모든 초고도변이루프는 CDR H3의 VH 도메인을 제외하고 초고도변이루프의 길이와 소위 말하는 기준 아미노산 잔기 여부 따른(Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)) 기준 배수라 (Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Tramontano et al. Proteins 6:382- 94 (1989))는 용어에 해당하는 몇 가지 뚜렷한 구조만 변한다. VH 또는 VL도메인 전체의 초고도변이루프의 실제 기준구조는(예; X-선결정학과 같은) 구조 분석으로 정할 수 있으며, 또한 특정한 구조적 특징을 가지게 하는 몇 개의 주 아미노산잔기에 근거한 기준구조의 예측으로도 가능하다. 요약하면, 기본구조를 결정하는 잔기들의 특이한 패턴은 잘 알려지지 않은 구조 를 가진 VH 또는 VL도메인의 초고도변이루프에서 이 기본구조들이 인식이 될 수 있도록 하는 "형태(signature)"를 형성한다; 그러므로 기본구조는 일차 아미노산 서열에만 근거해서도 예측 할 수 있다. 인간과 유사성이 높은 항체에 있는 주어진 어떤 VH나 VL도메인의 초고도변이루프에서의 기준배수 구조를 예측하는 것은 공공으로 사용 가능한 www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html, www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/antibodies.html 및 www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germlines/Vbase_hVk.html과 같은 알고리즘을 이용하여 분석할 수 있다. 이 방법들은 조사하고자 하는 VH 또는 VL 서열을 알려진 기본구조를 가지고 있는 인간의 VH 나 VL 도메인의 서열과 대조할 수 있게 하며, 조사하고자 하는 서열을 가진 초고도변이루프의 기준구조 예측을 가능하게 한다. VH 도메인의 경우, H1 및 H2루프들은 다음의 기준들을 적어도 한 개나 좋게는 두 개 다를 만족 시키면 인간항체에 있다고 알려진 기준배수 구조와 거의 동일한(substantially identical)" 구조의 기준배수 구조를 가진다고 점수를 매길 수 있다.

- [0101] 1. 잔기의 수에 따라 결정되는 길이가 인간기준구조그룹과 가장 가깝게 맞는 동일한 길이 일 때.
- [0102] 2. 해당하는 인간 H1 과 H2의 기준구조그룹에서 서술된 주요한 아미노산 잔기와 적어도 33% 동일성, 바람직하게는 적어도 50% 동일성을 가질 때 (앞으로의 분석을 위해, H1 및 H2 루프는 별도로 다루어지며 각각은 인간기준구조그룹과 가장 잘 맞는 것과 비교된다).
- [0103] 앞으로의 분석은 관심 있는 항체의H1 및 H2 루프의 기준구조의 예측에 의존한다. 관심 있는 항체의 H1 및 H2 루프의 실제구조가 X-선 결정 구조학에 등 의해 알려 졌을 경우 만약 루프의 길이가 그와 가장 가까운 인간의 기준구조그룹의 루프와(일반적으로, +1또는 +2 아미노산 잔기에 의해) 다르지만 실제 항체의 H1 및 H2 루프의 구조가 인간기준배수의구조와 맞을 때는 인간항체에서 보이는 기준배수 구조와 "거의 동일한" 기준배수구조를 가진다고 점수를 매길 수 있다. 인간VH 도메인(H1 및 H2) 의 첫 번째와 두 번째 초고도변이루프들에 대한 인간 기준구조그룹에서 발견된 주요 아미노산 잔기들이 초티아(Chothia) 등에 의해 J. Mol. Biol. 227:799 -817 (1992), 서술되었으며, 그 내용이 온전히 여기 참고문헌에 포함되어 있다. 특히 여기서 참고로 한 초티아(Chothia) 등의 문헌 802페이지에 나온 표에는, 인간생식세포라인에서 발견되는 H1 기준구조의 주요자리에 자주 나오는 아미노산 잔기들을 표시했고, 803페이지의 표 4 에서는 인간생식세포라인에서 발견되는 CDR H2 기준구조의 주요자리에 주로 있는 아미노산 잔기들이 표시되어 있다. 실시예에서, 인간항체와 유사성이 높은 VH도메인의 H1 및 H2은 인간항체들에서 나타나는 기준배수 구조와 거의 같은 예상기준배수구조나 실제기준배수를 보여준다. 인간과 유사성이 높은 항체는 초고도변이루프 H1 및 H2가 적어도 한개의 인간생식세포라인의 VH 도메인에 있는 것과 같은 기준배수구조의 조합과 동일한 기준배수구조의 조합으로 구성되어 있는 VH로 구성되어 있을 수도 있다. 실제로 H1 및 H2에는 특정한 조합으로 된 기준배수구조만이 인간생식세포라인에 의해 암호화되는 VH

도메인에 나타난다는 것이 관찰되었다. 한 예로 인간과 유사성이 높은 VH 도메인의 HI 및 H2는 카메라다와 같은 비인간종의 VH 도메인에서부터 얻을 수도 있다. 그럼에도 인간생식세포라인에서나 체세포적으로 변이된 VH 도메인에서 나타나는 것으로 알려진 기준배수구조의 조합과 동일한 예측 기준배수구조나 실제 기준배수구조를 형성한다. 비제한적인 예에서는 인간과 유사성이 높은 VH도메인의 HI 및 H2는 카메라다 와 같은 비인간종의 VH 도메인에서 얻을 수 있으며; 1-1, 1-2, 1-3, 1-6, 1-4, 2-1, 3-1 과 3-5 중 하나의 기준배수조합을 형성한다. 인간과 유사성이 높은 항체는 인간 VH 와 서열이 매우 같거나 유사성이 높은 서열을 가지고 있고 인간 VH와 구조적으로 유사한 초고도변이루프를 갖기도 한다. 항체 VH 도메인 HI 및 H2에 있는 기준배수가 인간과 유사성이 높다는 것은 유리 할 수도 있고, 전체적인 일차아미노산서열 동일성 측면에서 인간과 유사성이 높은 VH 도메인 항체와 가장 잘 일치함을 보여주는 인간VH 생식세포라인 서열에서 기준배수의 조합이 제대로 된다는 것 (correct)도 유리한 점이기도 하다. 한 예로 가장 잘 맞는 서열이 인간생식세포라인의 VH3 도메인에 있다면 HI 및 H2이 인간 VH3 도메인에 자연적으로 존재하는 기준배수의 조합으로 이루어진다면 유리하기도 할 것이다. 예를 들면 카멜리드의 전형적인 항체로부터 유래된 VH 및 VL, 특히 인간화된 카멜리드의 VH 및 VL도메인을 가진 항체로부터 유래된 비인간종으로부터 얻어진 항체가 인간과 유사성이 높일 경우 특히 더 중요 할 것이다. 그러므로, 한 예로 인간과 유사성이 높은 GARP 항체의 VH 도메인은 인간항체의 뼈대 부위 FR1, FR2, FR3 및 FR4를 포함한 VH 도메인과 동일한 서열을 갖거나, 80% 또는 그 이상, 85% 또는 그 이상, 90% 또는 그 이상, 95% 또는 그 이상, 97% 또는 그 이상 또는 99%까지 또는 100%까지 유사성을 보여준다. 더불어 이 항체의 HI 및 H2은 비인간(예; 카메라다종에서 유래) VH도메인으로부터 얻어지지만, 인간 VH 도메인에 자연적으로 존재하는 것으로 알려진 기준배수의 조합과 같은 구조인 예측 또는 실제 기준배수구조의 조합을 형성한다. 다른 예로는, 인간과 높은 유사성을 가진 항체 VL 도메인의 L1 및 L2는 카메라다의 VL 도메인 에서 유래한 것과 같이 비인간종의 VL도메인으로부터 각각 얻어지며, 각각은 인간항체에 존재하는 기준배수의 조합과 상당히 동일한 예측되는 또는 실제 기준배수구조를 보여준다. VH 도메인과 마찬가지로, V람다(VLambd) 및 V카파(VKappa)형 VL 도메인의 초고도변이루프는 제한적인 수의 조합이나 기준배수구조를 취할 수 있는데 이는 일부는 길이에 의해서 결정되거나 또는 특정한 기준 위치에 주요한 아미노산 잔기의 유무에 의해 결정된다. 인간과 높은 유사성을 가진 관심대상의 항체 내에서는 카메라다종과 같은 비인간종 VL 도메인으로부터 얻어진 L1, L2 및 L3 루프들은 적어도 다음의 첫번째, 바람직하게 첫번째, 두번째 모두의 기준을 충족시키면 인간 항체에서 나타난다고 알려진 기준배수구조와 거의 동일한 기준배수구조를 가졌다고 점수 매길 수 있다;

- [0104] 1. 잔기의 수에 의해 결정되는 길이가 가장 잘 맞는 인간구조중의 한 그룹과 동일할 때.
- [0105] 2. V람다(VLambd) 또는 V카파(VKappa) 류 중에서 해당하는 인간 L1 및 L2 의 기준구조그룹에서 서술된 주요한 아미노산 잔기와 적어도 33% 동일성, 총계는 적어도 50% 동일성을 가질 때(앞으로의 분석을 위해, L1 과 L2 루프는 별도로 다루어지며 각각은 인간기준구조그룹과 가장 잘 맞는 것과 비교된다).
- [0106] 앞으로의 분석은 관심 있는 항체의 VL 도메인에 있는 L1, L2, 및 L3 루프의 기준구조의 예측에 의존한다. 만약 X-선 결정학 등에 근거하여 L1, L2, 및 L3 루프의 실제구조가 알려진다면 만약 루프의 길이가 그와 가장 가까운 인간기준구조그룹의 루프와(아미노산 잔기 하나 또는 두 개 정도의 만) 다르지만 실제 카메라다 루프의 구조가 인간기준배수구조와 맞을 때는 관심 대상 항체에서 유래된 L1, L2, 및 L3 루프는 인간 항체에 있다고 알려진 기준배수구조와 "거의 동일한" 기준배수구조를 가졌다고 점수매길 수 있다. 인간 V람다(VLambd) 및 V카파(VKappa) 도메인 CDRs 의 인간기준구조그룹에서 발견된 주요 아미노산 잔기는 모레아(Morea)등에 의해 Methods, 20: 267-279 (2000) 에 그리고 마틴등(Martin)에 의해 J. Mol. Biol., 263:800-815 (1996)에 서술되었다. 인간 V카파(VKappa) 도메인의 구조 목록도 톰린슨 등(Tomlinson)에 의해 EMBO J. 14:4628-4638 (1995)에 그리고 인간 V람다(VLambd)도메인의 구조 목록은 윌리엄스(Williams)등에 의해 J. Mol. Biol., 264:220-232 (1996)에 서술되었다. 이 서류들에 있는 내용 들은 여기서 참고 문헌으로서 포함시켰다. 인간과 높은 유사성을 보이는 항체의 VL 도메인에 있는 L1 및 L2은 인간생식세포라인 VL 도메인에서 보이는 기준배수구조의 조합과 동일한 예상되는 기준배수 구조 또는 실제 기준배수 구조의 조합을 형성할 수 있다. 비제한적인 실시예에서, 인간과 높은 유사성을 보이는 V람다(VLambd) 항체의 L1 및 L2는(예: 카메라드에서 유래된 VL 도메인을 지닌 항체 또는 이것에서 인간화된 변이체를 지닌 항체) 다음의 기준배수조합을 갖을 수 있다: 11-7, 13-7(A,B,C), 14-7(A,B), 12-11, 14- 11 과 12- 12. (윌리엄 등과 (Williams). J. Mol. Biol. 264:220 -32 (1996), 사이트 http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase_hVL.html). 에서 보여 준대로). 비제한적인 실시예에서, V카파(VKappa) 도메인의 L1 및 L2는 다음의 기준배수조합중 하나를 형성할 수 있다: 2-1, 3-1, 4-1 및 6-1(톰린슨등(Tomlinson). EMBO J. 14:4628-38 (1995) 및 on http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase_hVK.html 에서 보여준대로)). 다른 실시예에서, 인간과 높은 유사성을 보이는 항체의 VL 도메인에 있는 L1, L2 및 L3는 인간구조와 매우 닮은 구조를 보여 줄

수도 있다. 인간과 높은 유사성을 보이는 항체의 VL 도메인은 인간의 VL과 서열 동일성이나 유사성이 높고 또한 VL 도메인에 있는 초고도변이루프는 인간의 VL과 구조적 유사성을 보인다고 하는 편이 바람직하다.

[0107] 실시예에서, 인간과 유사성이 높은 GARP 항체의 VL 도메인은 인간항체의 뼈대 부위 FR1, FR2, FR3 및 FR4를 포함한 VL 도메인과, 80% 또는 그 이상, 85% 또는 그 이상, 90% 또는 그 이상, 95% 또는 그 이상, 97% 또는 그 이상 또는 99%까지 또는 100%까지 서열동일성을 보여 줄 수 있고, 더불어 초고도변이루프 L1 나 초고도변이루프L2 는 같은 인간VL 도메인에서 자연적으로 존재하는 것으로 알려진 기준배수의 조합과 같은 구조인 예측 또는 실제 기준배수구조의 조합을 형성할 수 있다. 그러므로, 인간의 VH 도메인과 매우 동일하거나 유사한 서열을 보이고 인간VH의 초고도 변이루프와 구조적인 유사성을 가진 VH 도메인들은 인간 VL 도메인과 매우 동일하거나 유사한 서열을 보이고 인간 VL의 초고도 변이루프와 구조적인 유사성을 가진 VL 도메인들과 결합하여 인간에서 만들어 지는 VH/VL쌍과 서열과 구조적으로 최대한 유사성을 가진 VH/VL쌍(예:카멜리드에서 유래한 VH/VL 쌍)을 지닌 인간과 매우 유사한 항체를 제공할 것 이라고 예상할 수 있다.

[0108] "면역특이적", "특이적" 또는 "특이적으로 결합"- 여기서 사용된대로 항원과의 친화력 정도 항수인, K_a ,가 $10^4 M^{-1}$ 보다 크거나 같을 때, $10^5 M^{-1}$ 보다 크거나 같을때, $10^6 M^{-1}$ 보다 크거나 같을 때, $10^7 M^{-1}$ 보다 크거나 같을 때, $10^8 M^{-1}$ 보다 크거나 같을때, $10^9 M^{-1}$ 보다 크거나 같을 때, $10^{10} M^{-1}$ 보다 크거나 같아 항원과의 반응하여 검출 될 정도를 보일 때를 그 항체는 항원에 "면역특이적" , "특이적"이다 또는 "특이적으로 결합"한다 라고 한다. 해당하는 항원에 대한 항체의 친화도는 또한 보통 해리항수 K_d , 로도 표현되며, 어떤 경우에는 항체-항원 K_d 가 $10^{-4} M$ 보다 작거나 같거나, 또는 $10^{-5} M$, 보다 작거나 같거나, 또는 $10^{-6} M$ 보다 작거나 같거나, 또는 $10^{-7} M$ 보다 작거나 같을때, 또는 $10^{-8} M$ 보다 작거나 같을때, 또는 $5 \cdot 10^{-9} M$ 보다 작거나 같을때, 또는 $10^{-9} M$ 보다 작거나 같을때, 또는 $5 \cdot 10^{-10}$ 보다 작거나 같을때, 또는 $10^{-10} M$. 보다 작거나 같거나 한정도일때, 항체가 항원에 특별히 결합한다. 항체의 친화력은 스케차드등이 서술한 예(The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci 1949;51:660-672*) 에서 같이 일반적인 방법을 사용하여 결정할 수 있다. 항원이나 세포 또는 그의 조직에 대한 항체의 결합성질은 일반적으로 면역-조직화학법(IHC) 및/또는 형광-활성화세포분류(FACS) 등을 포함한 면역검출방법들을 사용하여 측정하여 정해질 수 있다.

[0109] 여기서 사용한다로, "분리된 핵산" 은 다른 유전체 DNA서열로부터 잘분리된 핵산 뿐만 아니라 원래 핵산서열을 가지고있는 라이보솜과 폴리머라제와 같은 단백질이나 혼합체로부터 잘분리된 핵산이다. 이 용어는 자연에 있는 상태에서부터 제거된 핵산서열을 포함하며, 제조합되거나 클론된DNA, 화학적으로 합성된 유사서열 또는 다른 시스템에 의해 생물학적으로 합성된 유사서열을 다 포함한다. 상당히 순수한 핵산은 분리된 핵산을 포함한다. 물론, 이것은 원래 분리된 핵산을 의미하며 후에 이 분리된 서열에 첨가된 유전자나 서열을 제외하는 것은 아니다. "폴리펩타이드" 라는 용어는 전통적인 의미 즉, 아미노산 서열이라는 의미로 사용된다. 폴리펩타이드는 생성되는 산물의 특정한 길이에 국한하는 것은 아니다. 펩타이드, 올리고펩타이드 및 단백질은 폴리펩타이드라는 정의에 포함되며, 이 용어는 여기서는 특별히 언급하지 않는한 서로 바뀌가면서 사용할 수 있다. 이 용어는 폴리펩타이드의 후-발현 변경(modifications), 예를 들어, 당화, 아세틸화, 인산화 및 기타 등, 뿐만 아니라, 자연적으로나 비자연적으로 일어나는 모든, 당 업계의 알려진 변경은 배제하는 것을 의미하는 것은 아니다. 폴리펩타이드는 한 개의 전체 단백질, 또는 그의 부속서열일 수 있다. 본 발명의 의미에서 특별히 관심있는 폴리펩타이드는 CDR들을 구성하고 있는 부속 아미노산서열이며 이의 항원결합 능력이다. "분리된 폴리펩타이드"는 자연환경에서 존재하는 성분으로부터 동정되어 분리되고 얻어진것이다. 바람직한 실시예에서, 분리된 폴리펩타이드는 (1) 우리(Lowry)방법으로 측정했을때 무게로 95% 이상 더 좋게는 99% 이상 순도를 가지고 분리되었거나, (2) spinning cup sequenator 를 사용하여 적어도 N-말단이나 내부 아미노산서열간기 15개를 얻을수 있을 정도로 정제 되었을 때, (3) 환원상태나 비환원조건에서 SDS-PAGE분석에서 코마시블루(Coomassie blue) 또는, 바람직하게 실버스테이닝(silver stainin)으로 균일하게 보일 정도로 순수하게 분리된 것 이다. 분리된 폴리펩타이드에는 제조합 세포 내에 있는 폴리펩타이드 그 자체도 포함된다. 왜냐하면 적어도 자연에 존재하는 폴리펩타이드 중 한 구성성분은 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나 보통은 분리된 폴리펩타이드는 적어도 1단계의 정제단계를 거쳐 정제된다.

[0110] "동일성(identity)" 또는 "동일한(identical)" - "동일성(identity)" 또는 "동일한(identical)" 이라는 용어는 두 개 또는 몇 개의 폴리펩타이드서열 사이 관계에 사용될 때는 두 개 또는 몇 개의 아미노산 잔기들간에 일치하는 잔기가 몇 개 인지에 따라 결정되는 두 폴리펩타이드 사이 서열 관련성 정도를 의미한다. "동일성"은 갭(GAP) 정렬을 가지는(만약, 있다면) 유사한 두개 또는 그 이상의 서열 사이의 동일한 조합 퍼센트를 특정 수

학적 모델 또는 컴퓨터 프로그램(예를 들어, 알고리즘)에 의해 측정하는 것이다. 관련이 있는 폴리펩타이드의 동일성은 알려진 방법으로 쉽게 계산될 수 있다. 관련되는 방법에는 계산분자생물학 (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988); 생물계산학(Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993); 서열데이터의 컴퓨터분석(Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994); 분자생물학에서의 서열분석(Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987); 서열분석프라이머 (Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991); 과 카릴로(Carillo)등에 의한 SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988)에 서술되어 있는 것을 포함되며 그 외 다른것도 포함될 수 있다. 동일성을 결정하는데 좋은 방법은 검사하는 두 서열이 서로 가장 많이 맞을 수 있도록 디자인하는 것이다. 동일성을 결정하는 방법이 공공으로 사용될 수 있는 컴퓨터프로그램에 서술되어 있다. 두 서열 사이에 동일성을 결정하는 좋은 컴퓨터 프로그램방법에는 GAP을 포함하는 GCG 프로그램패키지(Devereux et al., Nucl. Acid. Res. #2, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, 과 FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)) 등이 있다. BLASTX프로그램은 미국국립바이오정보센터(National Center for Biotechnology Information (NCBI)나 다른곳(BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., supra)으로부터 공공적으로 얻을 수 있다. 잘 알려진 스미스 워트만 알고리즘(Smith Waterman algorithm)도 동일성을 결정하는데 사용될 수 있다.

[0111] "수정된 항체(Modified antibody)"- 여기서 사용된 "수정된항체"에는 합성형태의 항체를 포함한다. 여기에는 자연에 존재하지 않는 형태로 변경된 것으로 적어도 두 개의 헤비체인부분으로 구성되어 있긴 하나 완벽하지 않은 헤비체인을 가진 항체 (도메인이 결손된항체, 또는 미니바디(minibodies)); 두 개 또는 몇 개의 다른 항원에 결합할 수 있거나 한 개의 항원에 있는 서로 다른 에피토프에 결합할 수 있도록 변경된 다중특이성(예; 이중 또는 삼중특이성)을 가진 항체; scFv분자 또는 그 와 비슷한 분자에 결합된 헤비체인분자 등이 있다. scFv분자들은 기존에 알려져 있고 미국특허 US patent 5,892,019에 서술되어 있다. 그 외에 "수정된 항체"에는 다중가를 가진 형태(예; 같은 항원에 세 개 또는 그 이상의 항체가 붙는3가, 4가항체)의 항체들도 포함된다. 다른 예를 들면 본 발명의 수정된 항체는 적어도CH2 도메인이 없는 한 개의 헤비체인부위를 가지고 있고 수용체 리간드쌍의 하나에 결합부위를 가지고 있는 폴리펩타이드의 결합부위로 구성된 융합 단백질이다.

[0112] "포유류"- 여기서 사용된 "포유류"란 사람과 개, 고양이, 말, 양, 돼지, 산양, 토끼 등과 같은 국내 농장의 동물, 동물원 동물, 스포츠용, 애완용 동물을 포함한다. 바람직하게는, 포유류는 사람을 의미한다.

[0113] "단일클론 항체(Monoclonal antibody)"- 단일클론 항체란 대체적으로 균일한 항체집단으로부터 얻어진 항체를 의미한다. 즉 그 집단을 구성하고 있는 각각의 항체가 자연적으로 일어날 수 있는 변이를 조금 가지고 있는것을 제외하고는 동일한 것을 의미한다. 단일클론 항체는 단일항원 사이트에 대한 것이므로 매우 특이성이 있다. 더욱이 각각 다른 결정인자들(예:에피토프들)에 대해 생기는 각각 다른 항체를 포함하는 다중클론 항체 체계와는 달리 단일클론 항체 각각은 한 개의 항원의 결정인자 대해 생기는 항체이다. 특이성 이외에 단일클론 항체는 다른 항체들에 의해 오염되지 않도록 합성된다는 점이 유리한 점이다. "단일클론"이라는 수식어는 어떤 특정방법으로 항체를 생산해야 한다는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어본 발명에서 유용한 단일클론 항체들은 콜러(Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)) 등이 처음 서술한 대로 하이브리도마(hybridoma) 방법으로 만들거나, 박테리아, 진핵 동물 또는 식물 세포에서 재조합DNA 방법으로도 만들 수 있다. 또한 "단일클론 항체들"은 예를 들어 크락슨(Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) and Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991))등이 서술한 기술을 사용하여 파지항체라이브러리로부터 분리할 수 도있다.

[0114] "본래의 서열(Native sequence)"- 여기서 사용한 것처럼 "본래의 서열"이라는 용어는 자연으로부터 유래된 폴리뉴클레오타이드와 같은 핵산 서열을 가지고 있는 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. "본래의 서열" 폴리펩타이드는 자연에서 유래된(어떤종이든) 폴리펩타이드(예;항체)와 같은 아미노산을 가지고 있는 폴리펩타이드이다. 이런 본래 서열을 지닌 폴리뉴클레오타이드와 폴리펩타이드는 자연에서 분리될 수 있고 또는 재조합방법이나 합성방법에 의해 만들어질 수 도있다. 여기서 사용된 폴리뉴클레오타이드 "변이"라는 용어는 여기서 특별히 보여주는 폴리뉴클레오타이드와 대체(substitutions), 삭제(deletions), 추가(additions) 및/또는 삽입(insertions) 중 한 가지 또는 몇 가지 방법에 의해 전형적으로 달라진 폴리뉴클레오타이드이다. 이런 변이체는 자연적으로 일어나기도 하고, 여기서 서술된대로 또는 잘 알려진 많은 방법을 사용하여 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 서열 한 개 또는 몇 개를 수식하고 이 폴리뉴클레오타이드로부터 암호화되는 폴리펩타이드의 생물학적기능 한, 두 개를 검증하는 방법을 통해 합성적으로 만들어지기도 한다. 여기서 사용된 대로 폴리펩타이드 "변이

체"라는 용어는 한 폴리펩타이드와 대체 (substitutions), 삭제(deletions), 추가(additions) 및/또는 삽입(insertions) 중 한 가지 또는 몇 가지 방법에 의해 전형적으로 달라진 한 폴리펩타이드를 뜻한다. 이런 변이체는 자연적으로 일어나기도 하고, 여기서 서술된대로 또는 잘 알려진 많은 방법을 사용하여 위에서 언급한 본 발명의 폴리펩타이드의 서열 한 개 또는 몇 개를 수식하고 폴리펩타이드의 생물학적기능 한, 두 개를 검증한다. 변형은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드의 구조 내에서 만들어질 수 있으며, 기대하는 성질을 갖는 폴리펩타이드의 변이체나 유도체를 암호화하는 기능분자를 얻기도 한다. 동등하거나 또는 개선점을 만들기 위해 폴리펩타이드의 아미노산 서열의 변경을 원할 때, 본 발명의 폴리펩타이드의 부위 또는 변이체는, 당업자에게 통상적인, 전형적인 DNA를 암호화하는 코돈의 하나 또는 그 이상으로 변경될 수 있다. 한 예로 다른 폴리펩타이드에 결합하는 능력의 뚜렷한 손실 없이도 한 단백질구조에 특정한 아미노산을 다른 아미노산으로 대체할 수 있다. 단백질의 생물학적 기능력을 결정하는 것은 단백질의 결합력과 본래 특성이므로 단백질 서열내에, 물론 이를 코딩하는 DNA서열에, 특정 아미노산서열을 대체할 수 있으며 그럼에도 비슷한 단백질성질을 갖는 단백질을 얻을 수 있다. 그러므로 알려진 구성을 가진 펩타이드에 또는 그 펩타이드를 지정하는 해당하는 DNA 서열에 생물학 적용도나 활성을 상당히 잃지 않고도 여러가지로 변경할 수 있다고 생각할 수 있다. 많은 경우에 폴리펩타이드변이체는 한 개 또는 ?p 개의 보전적 대체인 경우다. "보전적대체(conservative substitution)"란 아미노산 한 개가 비슷한 성질을 가지는 다른 아미노산으로 바뀌는것을 의미하며, 펩타이드 화학의 당업자는 폴리펩타이드의 2차 구조나 친수성 성질은 대체로 바뀌지 않을 것으로 예측할 것이다. 위에서 대체로 설명한대로 아미노산 대체는 일반적으로, 예를 들어, 아미노산 곁가지의 소수성, 친수성, 전기가(charge), 크기 등과 같은 성질이 상대적으로 비슷한 것으로 대체되는 것을 근거로 한다. 앞으로 몇 가지 성질에 대해 고려해볼만한 아미노산 대체의 본보기는 당업자에게는 잘 알려져 있으며 다음과 같은 것이 포함된다: 아르기닌 및 라이신; 글루타민산 및 아스파르틱산; 세린 및 트레오닌; 글루타민 및 아스파라긴; 및 발린, 루이신 및 이소루이신. 아미노산 대체는 잔기들의 극성, 전기가(charge), 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성이 비슷한데 근거하여 더 만들어질 수 있다. 그 예로 마이너스 전기가(negatively charged)를 가진 아미노산으로는 아스파르틱산과 글루타민산; 플러스전기가 (positively charged)를 가진 아미노산으로는 라이신과 아르기닌; 비슷한 친수성을 가지고 있으며 전기적 성질을 갖지 않은 극성 헤드그룹을 가진 아미노산으로는 루이신, 이소루이신 및 발린; 글라인신 및 알라닌; 아스파라긴 및 글루타민; 그리고 세린, 트레오닌, 페닐알라닌, 및 타이로신이다. 보전적 변화(conservative changes)를 대표하는 다른 아미노산군에는(1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; and (5) phe, tyr, trp, his 이 있다. 다른 한편으로 변이체는 비보존적인 변화를 포함하기도 한다. 좋게 말하면, 변이폴리펩타이드는 본래의 서열에서 다섯 개 이내의 아미노산이 대체, 삭제, 또는 추가 삽입되어 본래의 폴리펩타이드와 다른 것을 의미한다. 한편으로는 변이체는 본래의 폴리펩타이드의 면역성, 2차구조와 친수성등에 최소의 영향을 주는, 예를 들어, 삭제, 또는 추가삽입 등으로 아미노산이 수정되기도 한다.

[0115] "약학적으로 허용 가능한 부형제"- 본문에 사용된 대로 "제약학적으로 수용 가능한 부형제"라는 용어에는 용매, 분산 미디어, 코팅, 항생제와 항곰팡이제, 등장액과 흡수연기제 중 어떤것과 모두를 포함한다. 언급한 부형제는 동물에게 더 좋게는 사람에게 투여했을 때 부작용, 알려지, 또는 그 외 다른 온당하지 않은 반응을 보이지 않는다. 사람에게 투여하기 위해 제제는 멸균성, 발열성, 그리고 일반적인 안정성과 순도의 기준이 FDA의 "Office of Biologics standards? 에서 요구 되는 기준과 맞는 것이어야 한다.

[0116] "특이성(Specificity)"- 여기서 사용된대로 "특이성(specificity)" 이라는 용어는 주어진 타겟, 예를 들면, GARP에 특이적으로 결합 (예;면역반응)하는것을 의미한다. 폴리펩타이드는 단일특이성(monospecific)일 수 있으며 그의 타겟에 특이적으로 결합하는 하나 또는 몇 개의 결합자리를 가진다, 또는 폴리펩타이드는 다중특이성(multispecific)일 수 있으며 같은 타겟에 또는 다른 타겟에 특이적으로 결합하는 두 개 또는 그 이상의 결합자리를 가진다. 한 예로 본 발명의 항체는 한 개 이상의 타겟에 대해 특이성을 가진다. 예를 들면 본 발명의 다중특이성 (multispecific) 결합분자는 GARP에 결합하며 종양세포에서 발현되는 두 번째 분자에도 결합한다. 종양세포에서 발현되는 항원에 결합하는 결합자리를 가진 항체의 예는 잘 알려져 있으며, 이런 항체의 한 개 또는 몇 개의 CDR들은 본 발명의 항체에 포함될 수 있다.

[0117] "합성적(Synthetic)"- 여기서 사용된 대로 폴리펩타이드에 대하여 "합성적(synthetic)"이란 용어는 자연에는 존재하지 않는 아미노산서열로 구성된 폴리펩타이드를 포함한다. 한 예로, 자연에 존재하지 않는 폴리펩타이드는 자연적으로 존재하는 폴리펩타이드의 수정된 형태이거나(예; 추가삽입, 대체, 또는 삭제와 같은 돌연변이로 구성), 일련의 아미노산에 연결되어있는 첫 번째 아미노산이(자연적으로 있을수도 있고 아닐수도 있다) 자연에서는 연결되어있지 않은 두 번째 아미노산 서열에(자연적으로 있을수도 있고 아닐수도 있다) 연결되어있는 폴리펩

타이드들을 의미한다.

[0118] "단쇄 Fv(Single-chain Fv)" 또한 약자로 "sFv" 또는 "scFv" 여기서 사용된대로 "단쇄Fv", "sFv" 또는 "scFv" 는 단일 폴리펩타이드체인과 연결된 VH 및 VL 항체도메인으로 구성된 항체 단편이다. 더 바람직하게는 sFv 폴리펩타이드는 VH 및 VL 도메인사이에 sFv가 항원과 결합하는데 바람직한 구조를 형성할 수 있도록 폴리펩타이드 링커를 가지고 있다. sFv 에 대한 리뷰로 "단일클론항체의 약리학"에 있는 플럭턴(Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, infra.)을 참조하시오.

[0119] "변이 부위(Variable region)" 또는 "변이 도메인(variable domain)"- 여기서 사용된대로 "변이" 라는 용어는 변이도메인 VH 및 VL 의 어떤 부위가 항체들 사이에서 그 서열이 특히 많이 다르다는 사실을 의미하며 각각의 항체가 그의 타겟 항원에 대한 결합력과 특이성을 나타내는데 사용된다. 그러나, 변이성은 항체의 변이도 메인 전체에 고루 분포되어 있는 것은 아니다. 이는 항원결합자리 일부를 구성하고있는 각각의 VL 도메인과 VH 도메인에 있는 "초고도변이루프(hypervariable loops)"라고 불리는 세 부분에 집중되어 있다. V람다(VLambda) 라이트 체인도메인의 첫 번째, 두 번째, 세 번째 초고도변이루프(hypervariable loops)는 여기서는 L1(λ), L2(λ) 및 L3(λ) 이라고 언급하고, VL 도메인에 있는 잔기 24-33 (L1(λ), 9, 10 또는 11 아미노산잔기), 49-53 L2 (λ), 3 잔기로 구성 및 90-96 (L3(λ), 6 잔기로 구성)(Morea et al., Methods 20:267-279 (2000))로 구성된다고 정의할 수 있다. V 카파(VKappa) 라이트체인 도메인의 첫 번째, 두 번째, 세 번째 "초고도변이루프(hypervariable loops)"는 여기서는 L1(λ), L2(λ) 과 L3(λ)라고 언급하고 VL 도메인에 있는 잔기 25-33(L1(λ), 6, 7, 8, 11, 12 또는 13 잔기), 49-53 (L2(λ), 3 잔기로 구성) 그리고 90-97(L3(λ), 6 잔기로 구성) (Morea et al., Methods 20:267-279 (2000)). 로 구성된다고 정의할 수 있다. VH 도메인의 첫 번째, 두 번째, 세 번째 "초고도변이루프(hypervariable loops)"는 여기서는 H1, H2 and H3 를 말하며VH도메인에 있는 잔기 25-33 (H1, 7, 8 또는 9 잔기), 52-56(H2, 3 또는 4 잔기) 그리고 91-105 (H3, 길이에서 높은 변이)(Morea et al., Methods 20:267-279 (2000))로 구성된다고 정의할 수 있다. 별도로 표시하지 않으면, L1, L2 과L3 라는 용어는 VL 도메인의 첫 번째, 두 번째, 세 번째 "초고도변이루프를 각각 말하며, V카파와 V람다 동류로부터 얻은 초고도변이루프를 포함한다. H1, H2 과H3 라는 용어는 VH도메인의 첫 번째, 두 번째, 세 번째 "초고도변이루프를 각각 말하며, 감마[gamma], 임실론[epsilon], 델타[delta], 또는 뮤[mu]를 포함한 알려진 헤비체인 동류로부터 얻은 초고도변이루프를 포함한다. "초고도변이루프 L1, L2, L3, H1, H2 및 H3는 아래 정의한 대로 "보완성 결정부위" 또는 "CDR"라고 하는 부분을 일부 구성하기도 한다.

[0120] "결합가(Valency)"- 여기서 사용된 대로 "결합가(valency)" 라는 용어는 한 폴리펩타이드에서 잠재적인 타겟 결합자리의 수를 의미한다. 각 타겟 결합자리는 한 개의 타겟분자와 특이적으로 결합하거나 타겟분자의 특별한 자리에 결합한다. 한 폴리펩타이드가 한 개 이상의 결합자리를 가지고 있을때, 각, 타겟 결합자리는 같은 또는 다른 분자와 특이적으로 결합할 수 있다(즉, 다른 리간드나 다른 항원, 또는 같은 항원에 있는 다른 에피톱에 결합할 수 있다.). 주체의 결합 분자는 인간 GARP 분자에 결합하는 적어도 한 개의 결합자리를 가지고 있을 것 이라고 하는 편이 좋을 것이다.

[0121] "치료하는(Treating)" 또는 "치료(치치)(treatment)" 또는 "완화(alleviation)"- 여기서 사용된대로 "치료하는" 또는 "치치" 또는 "완화"라는 용어는 치료목적의 치치와 예방적 또는 방어적 치치를 모두 말한다; 여기서 목적은 대상하는 병적인 상황이나 질병을 예방하거나 천천히(경감) 일어나게 한다. 치료를 필요로 하는 사람은 이미 질병이 있는 사람이나 질병을 갖기 쉬운 사람, 또는 질병이 예방될 것 같은 사람 다 포함한다. 한 대상 또는 포유류가 감염에 대해 성공적으로 "치료되었다"라는 것은, 만약 현 발명에서 보여주는 방법에 따라 치료적인 양 만큼의 항체를 투여받은 후, 환자가 관찰할 만하고 및/또는 측정할 만한 정도의 다음의 증상이 감소되거나 없어질 때를 말한다: 독성세포의 수 감소; 전체 세포중 에서 독성세포의 퍼센트가 줄어들 때; 및/또는 특정질병이나 컨디션과 관련되는 증상 한 개 또는 몇 개가 어느 정도 경감 되었을 때; 사망률과 치사률이 감소 되었을 때; 삶의 질이 향상 되었을 때. 성공적인 치료와 질병의 개선 정도를 측정하는 상기의 요건들은 내과의 사들에게 익숙한 일반적인 과정으로 쉽게 측정할 수 있다.

[0122] "TGF- β " - 여기서 사용된 대로 TGF- β 는 세 가지 동일체 (isoforms),TGF- β 1, TGF- β 2 과 TGF- β 3를 의미 한다. TGF- β 동일체의 펩타이드 구조는 매우 비슷하다(유사성이 70-80 % 정도). 이들은 모두 커다란 전구체 단백질로 암호화되어 만들어진다; TGF- β 1(GenBank Access No: NM_000660 390 아미노산을 갖고 있으며, TGF- β 2(GenBank Access No: NM_001135599 및 NM_003238) 및 TGF- β 3 (GenBank Access No: XM_005268028)는 각각 412 아미노산을 갖고 있다. 이들 각각은세포로부터 분비되는데 필요로 하는 N-말단 신호펩타이드 20-30개의 아미노산과, 전-부위(pro-region, 잠복기 관련 펩타이드 또는 LAP)와, 프로테아제에 의해 전-부위에서부터 쪼개져

나온 후 성숙된 TGF-β 분자에서 C-말단부위가 되는 112-114 아미노산을 가지고 있다.

[0123] **[상세한 설명]**

[0124] 발명의 한 목적은 TGF-β가 있을 때 GARP 에 결합하는 단백질이다.

[0125] 발명의 다른 목적은 항원결합 도메인으로 구성된 단백질이며, 이 항원결합 도메인은 TGF-β가 있을 때 GARP 에 특이적으로 결합한다.

[0126] 한 예로 언급된 단백질은 TGF-β 이 있을때만 GARP에 결합한다.

[0127] GARP는 “루이신 풍부 반복 32(LRRC32) 라고도 불리우며 “루이신 풍부 반복그룹” 에 속한다. 본 발명의 인간 GARP 단백질 전사체변이2의 완전한 아미노산서열은(SEQ ID NO: 1) (GenBank Accession NM_001128922) 다음과 같다.

[0128] MRPQILLLLALLTLGLAAHQDKVPCKMVDKVKVSCQVGLLQVPSVLPDTEITLDL SGNQLRSILASPLGFYALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALTHLEHL SLAHNRLAMATALSAGGLGPLRVTSLDL SGNLSYGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSNVMDIEDGAFEGLPRLTHLNL SRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNLI RLPPTGPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPS GNASGRPLSQLLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSPLCLMLLDL SHNALETLELGARALGSLRTRLLQGNALRDLPPYTFAN LASLQRLNLQGNRVSPCGPDEPGSPGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFHLPTLELDLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQGNLMLVQVDL PCFICKRLNLAENRSLHLPQAVSLEVLDRNNSFSLPGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAQLHQGRVDV DATQDLICRFSSQEEVSLSH VRPEDCEKGLKNINLI I ILTFILVSAILLTTLAACCCVRRQKFNQYKA.

[0129] 한 실시예에서, 본 발명의 단백질은 GARP이 TGF-β와 복합체를 형성했을 때 결합한다.

[0130] 다른 실시예에서, 본 발명의 단백질은 GARP이 잠재적 TGF-β와 복합체를 형성했을 때 결합한다.

[0131] 다른 실시예에서, 본 발명의 단백질은 GARP 와 TGF-β의 복합체에 결합한다

[0132] 다른 실시예에서, 본 발명의 단백질은GARP 와 TGF-β 1, TGF-β 2, 동종체 1; TGF-β 2, 동종체 2; TGF-β 3와의 복합체에 결합한다. 바람직하게, 본 발명의 단백질은 GARP 및 TGF-β 1의 복합체에 결합한다.

[0133] 다른 실시예에서, 본 발명의 단백질은 GARP 와 잠재적 TGF-β의 복합체에 결합한다

[0134] 여기서 사용되는 "잠재적 TGF-β (latent TGF-β)"라는 용어는 C-말단조각 또는 성숙된 TGF-β 1이 LAP이라고 알려진 N-말단조각에 비공유결합적으로 되어있는 복합체를 포함한다.

[0135] 다른 실시예에서, 본 발명의 단백질은 GARP 과 잠재적 TGF-β의 복합체에 KD (항체와 그의 항원 사이의 평형해 리상수) 10^{-10} M 이하에서 결합한다.

[0136] 다른 실시예에서, 상기 단백질은 전체 항체, 인간화항체, 단쇄항체, 단쇄항체 이배체, Fv, Fab, F(ab)', 후코 실기가 제거된 항체, 두가지 특이성 지닌항체 (bi-specific antibody), 디아바디 (diabody), 트리아바디 (triabody), 테트라바디(tetrabody)로 구성된 그룹으로부터 선별된 항체분자이다.

[0137] 다른 예로는 상기 단백질은 유니바디(unibody), 도메인항체(domain antibody)와 나노바디(nanobody)로 구성된 그룹으로부터 선별된 항체 단편이다.

[0138] 다른 예로는 상기 단백질은 아피바디(affibody), 아필린(affilin), 아피틴(affitin), 아드넥틴(adnectin), 아 트리머(atrimer), 이바신(evasin), 다르핀(DARPin), 안티칼틴(anticalin), 아비머(avimer), 휘노머(fynomer), 베르사바디(versabody), 및 두우오칼린(duocalin) 으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 항체모방체이다.

[0139] 도메인 항체는 잘 알려져 있으며 항체의 가장 작은 결합기능단위이고, 헤비체인이나 라이트체인 항체의 변이부 위에 해당한다.

[0140] 나노바디는 당업계에 잘 알려져 있는 항체로부터 유래된 치료 단백질을 뜻하며 자연에 있는 헤비체인 항체의 특 특한 구조와 기능적 성질을 가지고 있다. 이 헤비체인 항체는 한 개의 변이도메인(VHH) 과 두 개의 일정불변도 메인(CH2 및 CH3)을 가지고 있다.

[0141] 유니바디는 당업계에 잘 알려져 있는 IgG4 항체의 힌지(경첩)부위가 없는 항체 단편을 의미한다. 힌지 부위의 삭제는 본질적으로 전형적인 IgG4 항체 크기의 반 만한 분자가 나오게 하며 IgG4 항체가 지닌 이가의 (bivalent) 결합부위보다는 한 개의(univalent)결합 부위를 가진다.

- [0142] 아피바디(affibody) 당업계에 잘 알려져 있는 스타필로 코쿠스단백질A(staphylococcal protein A)의 IgG 결합 도메인 중의 하나로부터 유래된 58개 아미노산잔기 단백질 도메인에 근거한 결합 단백질을 의미한다.
- [0143] DARPs(디자인된 앵키린 반복 단백질, Designed Ankyrin Repeat Proteins) 은 당업계에 잘 알려져 있는 비항체 폴리펩타이드의 결합능력을 개발하기 위해 개발된 항체모사DRP(디자인된 반복 단백질, designed repeat protein) 기술을 의미한다.
- [0144] 안티칼린(anticalin)은 당업계에 잘 알려져 있는 다른 항체모사기술을 의미한다. 여기서는 결합특이성은 리포칼린(lipocalin)에서 유래 된다. 안티칼린은 두우오칼린(Duocalins) 이라고 불리는 이중 타겟팅 단백질로 형성화 될 수도 있다.
- [0145] 아비머(avimer)는 당업계에 잘 알려져 있는 또 다른 항체모사기술을 의미한다. 베르사바디(versabodies)는 잘 알려졌으며 또 다른 항체모사기술을 의미한다. 이들은 시스테인을 15%이상 가진 3-5 kDa의 작은 단백질이며, 전형적인 단백질이 가지고 있는 소수성코아를 대체하는 이황화밀도 스케폴드가 높은 구조를 이룬다.
- [0146] 다른 실시예에서, 상기 단백질은 항체 또는 치료제에 융합된 항체의 단편으로 구성된 면역융합체이다.
- [0147] 다른 실시예에서, 상기 단백질은 이미징 시약에 융합된 본 발명 단백질로 구성된 융합체이다. 상기 단백질은 이미징에 활용할 수 있다.
- [0148] 본 발명의 다른 목적은 GARP에 결합하여 TGF-β 신호체계를 억제하는 단백질이다.
- [0149] 다른 실시예에서, 상기 단백질은 GARP 이 TGF-β와 결합체로 있을 때 GARP에 결합한다.
- [0150] 다른 실시예에서, 상기 단백질은 GARP 와TGF-β의 결합체에 결합한다.
- [0151] 다른 실시예에서, 상기 단백질은 GARP 와 잠재적 TGF-β의 결합체에 결합한다.
- [0152] 다른 실시예에서, 상기 단백질은 전체 항체, 인간화항체, 단쇄항체, 단쇄항체이배체, Fv, Fab, F(ab)', 후코실기가 제거된 항체, 두가지 특이성 지닌 항체(bi-specific antibody), 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody), 테트라바디(tetrabody)로 구성된 그룹으로부터 선택된 항체 분자이다
- [0153] 다른 실시예에서, 상기 단백질은 유니바디(unibody), 도메인항체(domain antibody)및 나노바디(nanobody) 로 구성된 그룹으로부터 선택된 항체 단편이다.
- [0154] 다른 실시예에서, 상기 단백질은 아피바디(affibody), 아필린(affilin), 아피틴(affitin), 아드넥틴(adnectin), 아트리머(atrimer), 이바신(evasin), 다르핀(DARPin), 안티칼린(anticalin), 아비머(avimer), 휘노머(fynomer), 베르사바디(versabody), 및 두우오칼린(duocalin)으로 구성된 그룹으로부터 선택된 항체모방체이다
- [0155] 실시예에서, 상기 단백질은 TGF-β 신호체계를 억제하는 항원-hGARP(anti-hGARP, 인간GARP대한 항체)의 항체이거나 이의 항원결합 단편이다
- [0156] 실시예에서, 상기 단백질은 활성화된 TGF-β가 방출되는 것을 방해하거나 억제하고 또는 Tregs 으로부터 성숙된 TGF-β가 방출 되는 것을 억제한다.
- [0157] 다른 실시예에서, 상기 단백질은 성숙된 TGF-β가 TGF-β 수용체에 결합하는 것을 억제하거나 방해한다.
- [0158] 다른 실시예에서, 상기 단백질은 TGF-β 활성을 억제 및/또는 TGF-β 수용체 신호체계로부터 분자들이 활성화되는 것을 억제한다.
- [0159] 여기서 사용한대로 "억제(inhibit)" 라는 용어는 단백질이 TGF-β 신호체계를 막든지, 감소시키든지, 예방하든지, 또는 중화 시키는 능력을 가진 것을 의미하거나, Tregs 으로부터 성숙된 TGF-β가 방출 것, 또는 성숙된 TGF-β가 TGF-β 수용체에 결합하는 및/또는 TGF-β 수용체 신호체계로부터 분자들이 활성화되는 것을 막든지, 감소시키든지, 예방하든지, 또는 중화시키는 능력을 가진 것을 의미한다.
- [0160] 실시예에서, 상기 단백질은 단일클론항체이다.
- [0161] 다른 실시예에서, 상기 단백질은 폴리 항체이다.
- [0162] 실시예에서, 상기 단백질은 형태적인 에피톱에 결합한다.
- [0163] 실시예에서, 상기 형태적 에피톱(conformational epitope)에는 hGAR의 한 개 또는 몇 개의 아미노산을

포함한다.

- [0164] 다른 실시예에서, 상기 형태적 에피톱은 잠재적 TGF-β를 가진 GARP 복합체의 결과로 GARP 변형 에피톱을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 형태적 에피톱은 잠재적 TGF-β의 아미노산 및 hGARP의 아미노산을 포함한다.
- [0165] 다른 실시예에서, 상기 형태적 에피톱에는 혼합된 형태적 에피톱이며 GARP 과 TGF-β으로부터 온 아미노산으로 구성된다.
- [0166] 다른 실시예에서, 상기 형태적 에피톱은 결합으로 인해 유도된 형태적 에피톱이며 GARP 으로부터에서만 온 아미노산들로 구성되지만 TGF-β가 있을 때는 다른 구조를 취한다.
- [0167] 실시예에서, 상기 에피톱은 hGARP 아미노산서열(서열 번호: 1)의 잔기 101부터 141까지에 있는 잔기 중 하나 또는 몇 개의 잔기로 구성된다.
- [0168] 상기 101부터 141까지 잔기는 서열 번호 12에 보여 준 대로이다: HLSLAHNRLAMATALSAGGLGPLRVTSLDLSGNSLYSGLL.
- [0169] 발명의 다른 실시예에서, 상기 에피톱은 hGARP 아미노산서열(서열 번호: 1)의 잔기137, 138 및 139: YSG로 구성된다.
- [0170] 발명의 다른 실시예에서, 상기 에피톱은 hGARP 아미노산서열 (서열 번호: 1)의 잔기 137, 138 및 139: YSG로 구성되고 TGF-β의 존재를 필요로 한다.
- [0171] 발명의 다른 실시예에서, 상기 에피톱은 hGARP 아미노산서열(서열 번호: 1)의 잔기137, 138 및 139: YSG로 구성되고 N- 말단에는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20의 연속적인 잔기 및/또는 C- 말단에는 서열 서열번호: 1의 137, 138 및 139: YSG 잔기로 구성된다.
- [0172] 발명의 다른 실시예에서, 상기 에피톱은 hGARP 아미노산서열(서열 번호: 1)의 잔기 137, 138 및 139: YSG로 구성되고 N- 말단에는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20의 연속적인 잔기 및/또는 C- 말단에는 서열 번호: 1의 137, 138 및 139: YSG 잔기로 구성되며 TGF-β의 존재를 필요로 한다.
- [0173] 본 발명의 실시예에서, 이 발명의 단백질은 hGARP의 101-141 부위 내에 있는 에피톱에 선호적으로 결합하고 GARP으로부터 잠재적 TGF-β가 방출되는 것을 억제한다.
- [0174] 당업자는 TGF-β 신호전달을 억제하는 단백질의 능력을 측정하여 결정할 수 있으며, 예를 들어, TGF-β 수용체 신호체계에서부터 분자의 활성이다. 이러한 실험의 한 전형적인 예는 SMAD2(본 발명의 실시예 2에서 보여진)의 인산화를 측정하는 것이다.
- [0175] 발명의 한 목적은 인간 GARP에대한 항체이거나 이의 항원 결합 조각이며 여기서는 헤비체인의(heavy chain) 변이 부위는 적어도 다음의 CDR중하나로 구성된다.
- [0176] **VH-CDR1:** GFSLTGYGIN (서열 번호: 2) 또는 GYGIN (서열 번호: 52);
- [0177] **VH-CDR2:** MIWSDGSTDYNSVLTS (서열 번호: 3); 및
- [0178] **VH-CDR3:** DRNYDYDGAMDY (서열 번호: 4).
- [0179] 발명의 한 목적은 항원-hGARP의 항체이거나 이의 항원 결합조각이며 여기서 라이트 체인(light chain)의 변이 부위는 적어도 다음의 CDR들 중 하나로 구성된다:
- [0180] **VL-CDR1:** KASDHIKNWLA (서열 번호: 5);
- [0181] **VL-CDR2:** GATSLEA (서열 번호: 6); 및
- [0182] **VL-CDR3:** QQYWSIPWT (서열 번호: 7).
- [0183] 발명의 다른 목적은 인간 GARP에대한 항체이거나 이의 항원 결합 조각이며 여기서는 헤비체인의 변이 부위는 적어도 다음의 CDR중 하나로 구성된다:
- [0184] **VH-CDR1:** SYYID (서열 번호: 13);
- [0185] **VH-CDR2:** RIDPEDGGTKYAQKFQG (서열 번호: 14); and
- [0186] **VH-CDR3:** NEWETVVVGDLMYEY (서열 번호: 15).
- [0187] 발명의 다른 대상은 항원-hGARP에 대한 항체이거나 이의 항원 결합 조각이며 여기서는 라이트 체인의 변이 부위

는 적어도 다음의 CDR들 중 하나로 구성된다:

- [0188] **VL-CDR1:** QASQX₁I X₂S X₃LA (서열 번호: 16), 여기서 X₁ 는 S 또는 T, X₂ 는 S 또는V, X₃ 는 Y 또는F;
- [0189] **VL-CDR2:** X₁X₂SX₃X₄X₅T (서열 번호: 17), 여기서 X₁ 는 G 또는 R; X₂ 는 A 또는 T; X₃ 는 R 또는 I; X₄ 는 L 또는 P; X₅ 는 Q 또는 K; 그리고
- [0190] **VL-CDR3:** QQYX₁SX₂PX₃T, 여기서 X₁ 는 D, A, Y 또는 V; X₂ 는 A, L 또는 V; X₃ 는 V 또는 P (서열 번호: 18).
- [0191] 발명의 다른 대상은 항원-hGARP에 대한 항체이거나 이의 항원 결합 조각이며 여기서 헤비체인 (heavy chain)의 변이 부위는 서열 번호: 13의 VH-CDR1, 서열 번호: 14의 VH-CDR2 그리고 서열 번호: 15의 VH-CDR3 로 구성되고, 그리고 라이트체인의 변이부위는 적어도 서열 번호: 19; 서열 번호: 22; 서열 번호: 25; 서열 번호: 28; 또는 서열 번호: 31에 정해진 VL-CDR1 중에 하나로, 적어도 서열 번호: 20; 서열 번호: 23; 서열 번호: 26; 서열 번호: 29; 또는 서열 번호: 32에 놓여있는 VL-CDR2 중 하나로, 적어도 서열 번호: 21; 서열 번호: 24; 서열 번호: 27; 서열 번호: 30; 또는 서열 번호: 33. 에 정해진 VL-CDR3 중 하나로 구성된다.
- [0192] 또 다른 발명의 목적은 항원-hGARP에 대한 항체이거나 이의 항원 결합 절편을 제공하는 것이며, 여기서 라이트체인의 변이부위는 적어도 다음 CDR 중 하나로 구성된다.
- [0193] **VL-CDR1:** QASQSISSYLA (서열번호: 19);
- [0194] **VL-CDR2:** GASRLQT (서열번호: 20); 및
- [0195] **VL-CDR3:** QQYDSLPT (서열번호: 21).
- [0196] 또 다른 발명의 목적은 항원-hGARP에 대한 항체이거나 이의 항원 결합 절편을 제공하는 것이며, 여기서 라이트체인의 변이부위는 적어도 다음 CDR 들 중 하나로 구성된다.
- [0197] **VL-CDR1:** QASQIVSYLA (서열번호: 22);
- [0198] **VL-CDR2:** GASRLQT (서열번호: 23); 및
- [0199] **VL-CDR3:** QQYASAPVT (서열번호: 24).
- [0200] 또 다른 발명의 목적은 항원-hGARP에 대한 항체이거나 이의 항원 결합 절편을 제공하는 것이며, 여기서 라이트체인의 변이부위는 적어도 다음 CDR들 중 하나로 구성된다.
- [0201] **VL-CDR1:** QASQSISSYLA (서열번호: 25);
- [0202] **VL-CDR2:** GTSRLKT (서열번호: 26); 및
- [0203] **VL-CDR3:** QQYYSAPVT (서열번호: 27).
- [0204] 또 다른 발명의 목적은 항원-hGARP에 대한 항체이거나 이의 항원 결합 절편을 제공하는 것이며, 여기서 라이트체인의 변이부위는 적어도 다음 CDR들 중 하나로 구성된다.
- [0205] **VL-CDR1:** QASQTISSFLA (서열번호: 28);
- [0206] **VL-CDR2:** RASIPQT (서열번호: 29); and
- [0207] **VL-CDR3:** QQYVSAPPT (서열번호: 30).
- [0208] 또 다른 발명의 목적은 항원-hGARP에 대한 항체이거나 이의 항원 결합 절편을 제공하는 것이며, 여기서 라이트체인의 변이부위는 적어도 다음 CDR들 중 하나로 구성된다.
- [0209] **VL-CDR1:** QASQSISSYLA (서열번호: 31);
- [0210] **VL-CDR2:** GASRLKT (서열번호: 32); 및
- [0211] **VL-CDR3:** QQYASVPVT (서열번호: 33).
- [0212] 본 발명의 실시예에서 항원-hGARP에 대한 항체나 이의 항원 결합절편은 인간항체, 특히 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 CH1 도메인, 힌지 (경첩)부위, CH2 도메인과 CH3 도메인으로 구성 될 수 있다.
- [0213] 본 발명의 실시예에서 항원-hGARP에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 헤비체인에 다음과 같은 CDR 들을 포

함 한다; VH-CDR1 GFSLTGGIN (서열번호: 2), VH-CDR2 MIWSDGSTDYNVSLTS (서열번호: 3) 및 VH-CDR3 DRNYDYDGAMDY (서열번호: 4).

- [0214] 본 발명의 또 다른 실시예에서 항원-hGARP에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 헤비체인에 다음과 같은 CDR 들을 포함 한다: VH-CDR1 GYGIN (서열번호: 52), VH-CDR2 MIWSDGSTDYNVSLTS (서열번호: 3) 및 VH-CDR3 DRNYDYDGAMDY (서열번호: 4).
- [0215] 본 발명의 또 다른 실시예에서 항원-hGARP에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 라이트체인에 다음과 같은 CDR 들을 포함 한다: VL-CDR1 KASDHIKNWLA (서열번호: 5), VL-CDR2 GATSLEA (서열번호: 6) 및 VL-CDR3 QQYWSTPWT (서열번호: 7).
- [0216] 본 발명의 실시예에서 항원-hGARP에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 그의 헤비체인에 다음과 같은 CDR 들을 포함 한다 :VH-CDR1 SYYID (서열번호: 13), VH-CDR2 RIDPEDGGTKYAQKFQG (서열번호: 14) 및 VH-CDR3 NEWETVVVGDLMYEY (서열번호: 15).
- [0217] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 항원-hGARP에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 그의 라이트체인에 다음과 같은 CDR 들을 포함 한다: VL-CDR1 QASQX1I X2SX3LA (서열번호: 16), 여기서 X1 는 S 또는 T, X2 는 S 또는 V, X3 는 Y 또는 F; VL-CDR2 X1X2SX3X4X5T (서열번호: 17), 여기서 X1 는 G 또는 R; X2는 A 또는T; X3 는R 또는 I; X4 는 L 또는 P; X5 는 Q 또는 K; 그리고 VL-CDR3 QQYX1SX2PX3T, 여기서 X1 는D, A, Y 또는 V; X2 는 A, L 또는V; X3 는V 또는 P (서열번호: 18).
- [0218] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 항원-hGARP에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 그의 라이트체인에 다음과 같은 CDR 들을 포함 한다: VL-CDR1 QASQSISSYLA (서열번호: 19), VL-CDR2 GASRLQT (서열번호: 20), 그리고 VL-CDR3 QQYDSLPT (서열번호: 21).
- [0219] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 항원-hGARP에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 그의 라이트체인에 다음과 같은 CDR 들을 포함 한다: VL-CDR1 QASQSIVSYLA (서열번호: 22); VL-CDR2 GASRLQT (서열번호: 23); 및 VL-CDR3: QQYASAPVT (서열번호: 24).
- [0220] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 항원-hGARP에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 그의 라이트체인에 다음과 같은 CDR 들을 포함 한다: VL-CDR1 QASQSISSYLA (서열번호: 25); VL-CDR2 GTSRLKT (서열번호: 26); 및 VL-CDR3 QQYASAPVT (서열번호: 27).
- [0221] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 항원-hGARP에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 그의 라이트체인에 다음과 같은 CDR 들을 포함 한다: VL-CDR1 QASQTISSFLA (서열번호: 28); VL-CDR2 RASIPQT (서열번호: 29); 그리고VL-CDR3 QQYVSAPPT (서열번호: 30).
- [0222] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 항원-hGARP에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 그의 라이트체인에 다음과 같은 CDR 들을 포함 한다: VL-CDR1 QASQSISSYLA (서열번호: 31); VL-CDR2 GASRLKT (서열번호: 32); 그리고VL-CDR3 QQYASVPVT (서열번호: 33).
- [0223] 본 발명에 의하면, 헤비체인과 라이트체인의 CDR 1, 2 와 3 중 어느 것이든 해당하는 서열 등록번호 (서열번호)에 나와 있는 특정 CDR 또는 특정 CDR 셋트 들과 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 가 공통인 아미노산을 가진 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0224] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 항원-hGAR에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 하기의 항체로 구성된 그룹 으로부터 선별 될 수 있다:
- [0225] (i) 서열번호: 2, 3, 및 4에 나타나 있는 헤비체인 CDR 1, 2 및 3 (VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3) 의 아미노산 서열, 및
- [0226] (ii) 서열번호: 5, 6 및 7 에서 각각 보여주는 라이트체인 CDR 1, 2 과 3 (VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3)의 아미노산 서열.
- [0227] 선택적으로 해당하는 곳에서 상기 언급한 서열 중 어떤 것에서도 한 개, 두 개, 세 개 또는 몇 개의 아미노산이 다른 아미노산으로 대체 될 수도 있다
- [0228] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 항원-hGAR에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 다음 같은 것을 갖고 있는 항체로 구성된 그룹으로부터 선별될 수 있다:

- [0229] (i) 서열번호: 52, 3 및 4 에서 보여주는 바와 같은 헤비체인CDR 1, 2 과 3 (VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3) 의 아미노산 서열; 및
- [0230] (ii) 서열번호: 5, 6 및 7 에서 각각 보여주는 바와 같이 라이트체인 CDR 1, 2 과 3 (VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3) 의 아미노산 서열;
- [0231] 선택적으로 해당하는 곳에서 상기 언급한 서열 중 어떤 것에서도 한 개, 두 개, 세 개 또는 몇 개의 아미노산이 다른 아미노산으로 대체 될 수도 있다.
- [0232] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 항원-hGAR에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 다음 같은 것을 갖고 있는 항체로 구성된 그룹으로부터 선별될 수 있다:
- [0233] (i) 서열번호: 13, 14 과 15에서 보여준 것과 같이 헤비체인CDR 1, 2 과 3 (VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3) 의 아미노산 서열; 및
- [0234] (ii) 서열번호: 16, 17 과 18에서 각각 보여 주는 것과 같이 라이트체인의 CDR 1, 2 와3 (VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3) 아미노산 서열;
- [0235] 선택적으로, 해당하는 곳에 상기 언급한 서열 중 어떤 것에서도 한 개, 두 개, 세 개 또는 몇 개의 아미노산이 다른 아미노산으로 대체될 수도 있다.
- [0236] 본 발명의 또 다른 실시예에서 항원-hGAR에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 다음으로 구성된다;
- [0237] (i) 서열번호: 13, 14 과 15 에서 보여준 것과 같은 헤비체인 CDR 1, 2 과 3 (VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3) 의 아미노산 서열; 및
- [0238] (ii) 서열번호: 19, 20 에서 21 각각 보여준대로 라이트체인의 CDR 1, 2 과3 (VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3) 아미노산 서열;
- [0239] 선택적으로, 해당하는 곳에 상기 언급한 서열 중 어떤 것에서도 한 개, 두 개, 세 개 또는 몇 개의 아미노산이 다른 아미노산으로 대체될 수 있다.
- [0240] 본 발명의 또 다른 실시예에서 항원-hGAR에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 다음으로 구성된다;
- [0241] (i) 서열번호: 13, 14 과 15 에서 보여준 것과 같은 헤비체인 CDR 1, 2 과 3 (VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3) 의 아미노산 서열; 및
- [0242] (ii) 서열번호: 22, 23 과 24에서 각각 보여준 대로 라이트체인 CDR 1, 2 과3 (VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3) 아미노산 서열;
- [0243] 선택적으로, 해당하는 곳에 상기 언급한 서열 중 어떤 것에서도 한 개, 두 개, 세 개 또는 몇 개의 아미노산이 다른 아미노산으로 대체될 수 있다.
- [0244] 본 발명의 또 다른 실시예에서 항원-hGAR에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 다음으로 구성된다;
- [0245] (i) 서열번호: 13, 14 과 15 에서 보여준 것과 같은 헤비체인 CDR 1, 2 과 3 (VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3) 의 아미노산 서열; 및
- [0246] (ii) 서열번호: 25, 26 과 27 각각에서 보여준 대로 라이트체인 CDR 1, 2 과 3 (VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3) 아미노산 서열;
- [0247] 선택적으로, 해당하는 곳에 상기 언급한 서열 중 어떤 것에서도 한 개, 두 개, 세 개 또는 몇 개의 아미노산이 다른 아미노산으로 대체될 수 있다.
- [0248] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 항원-hGAR에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 다음으로 구성된다;
- [0249] (i) 서열번호: 13, 14 과 15 에서 보여준 것과 같은 헤비체인 CDR 1, 2 과 3 (VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3) 의 아미노산 서열; 및
- [0250] (ii) 서열번호: 28, 29 와 30 각각에서 보여준 대로 라이트체인 CDR 1, 2 과 3 (VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3)의 아미노산 서열;
- [0251] 선택적으로, 해당하는 곳에 상기 언급한 서열 중 어떤 것에서도 한 개, 두 개, 세 개 또는 몇 개의 아미노산이

다른 아미노산으로 대체될 수 있다.

- [0252] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 항원-hGAR에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 다음으로 구성된다;
- [0253] (i) 서열번호: 13, 14 과 15 에서 보여준 것과 같은 헤비체인 CDR 1, 2 과 3 (VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3) 의 아미노산 서열; 및
- [0254] (ii) 서열번호: 31, 32 와 33 각각에서 보여준 대로 라이트체인 CDR 1, 2 과 3 (VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3) 아미노산 서열;
- [0255] 선택적으로, 해당하는 곳에 상기 언급한 서열 중 어떤 것에서도 한 개, 두 개, 세 개 또는 몇 개의 아미노산이 다른 아미노산으로 대체될 수 있다.
- [0256] 한 실시예에서, 항원-hGAR에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 서열번호: 4 (DRNYYDYGAMDY)의 아미노산으로 구성된 변이 헤비체인 CDR3 로 구성되거나 이의 서열 변이체로 구성된다. 여기서 서열 변이는 다른 자리의 서열 한 개, 두 개, 세 개 또는 몇 개의 아미노산이 다른 것으로 대체된 것이다.
- [0257] 한 실시예에서, 항원-hGAR에 대한 항체 또는 이의 항원 결합절편은 서열번호: 15의 아미노산 서열로 구성된 변이 헤비체인 CDR3, 또는 이의 서열 변이체로 구성된다. 이 서열 변이에는 다른 자리의 서열에 한 개, 두 개, 세 개 또는 몇 개의 아미노산이 다른 것으로 대체되는 것이다.
- [0258] 본 발명의 또 다른 목적은 항원-hGARP에 대한 항체 MHGARP8 또는 헤비 체인 변이 부위서열 서열번호: 8 와 라이트 체인 변이 부위서열 서열번호: 9 로 구성된 이의 항원 결합절편을 제공하는 것이다.
- [0259] MAVLALLFCLVTFPSCILSQVQLKESGPGLVAPSSLSITCTVSGFSLTGYGINWVRQPP
- [0260] GKGLEWLGMIWSDGSTDYNVLSRLRISKDNSNSQVFLKMNSLQVDDTARYYCAR
- [0261] DRNYYDYGAMDYWGQTSVTSS(서열 번호: 8).
- [0262] MKFPSQLLLFLLFRITGIICDIQVTQSSSYLSVSLGDRVITICKASDHKLNWLAWYQQ
- [0263] PGIAPRLLVSGATSLEAGVPSRFSGSGGKNFTLSITSLQTEDVATYYCQYWSTPWTF
- [0264] GGGTTLEIR(서열 번호: 9).
- [0265] 본 발명의 또 다른 목적은 항원-hGARP에 대한 항체 MHGARP8 또는 헤비 체인 변이 부위서열 서열번호: 50 와 라이트체인 변이부위서열 서열번호: 51으로 구성된 이의 항원 결합절편을 제공하는 것이며, 여기서 서열번호: 50 와 서열번호: 51는 각각 신호 펩티드 (signal peptide)서열이 제거된 서열번호: 8 과 서열번호: 9에 대응된다.
- [0266] QVQLKESGPGLVAPSSLSITCTVSGFSLTGYGINWVRQPPGKGLEWLGMIWSDGST
- [0267] DYNVLSRLRISKDNSNSQVFLKMNSLQVDDTARYYCARDNYYDYGAMDYWG
- [0268] QGTSVTSS(서열 번호 50).
- [0269] DIQVTQSSSYLSVSLGDRVITICKASDHKLNWLAWYQQKPGIAPRLLVSGATSLEAGV
- [0270] PSRFSGSGGKNFTLSITSLQTEDVATYYCQYWSTPWTFGGGTTLEIR(서열 번호 51).
- [0271] 본 발명의 또 다른 목적은 항원-hGARP에 대한 항체 LHG10 또는 헤비체인 변이부위서열 서열번호: 34 와 라이트 체인 변이부위서열 서열번호: 35로 구성된 이의 항원 결합절편을 제공하는 것이다.
- [0272] EVQLVQPGAELRNSGASVKVSKASGYRFTSYIDWVRQAPGQGLEWMGRIDPEDG
- [0273] GTKYAKFKQGRVFTADTSTSTAYVELSSLRSEDTAVYYCARNEWETVVVGDLMYE
- [0274] YEYWGQGTQVTSS(서열 번호 34).
- [0275] DIQMTQSPTSLASLGLDRVITTCQASQSISSYLAWYQQKPGAPKLLIYGASRLQTV
- [0276] PSRFSGSGGTSFTLTISGLEAEDAGTYCQYDSLPTVTFGQGTKVELK(서열 번호 35).
- [0277] 본 발명의 또 다른 목적은 항원-hGARP에 대한 항체 LHG10.3 또는 헤비체인 변이부위서열 서열번호: 34 와 라이트 체인 변이부위서열 서열번호: 36으로 구성된 이의 항원 결합절편을 제공하는 것이다.

- [0278] DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCQASQSIIVSYLAWYQQKPGQAPKLLIYGASRLQTVPSRFSGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYICQQYASAPVTFGQGT GVELK (서열 번호: 36).
- [0279] 본 발명의 또 다른 목적은 항원-hGARP에 대한 항체 LHG10.4 또는 헤비체인 변이부위서열 서열번호: 34 와 라이트체인 변이부위서열 서열번호: 37로 구성된 이의 항원 결합절편을 제공하는 것이다.
- [0280] DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCQASQSISSYLAWYQQKPGQAPKLLIYGTSRLKTVPSRFSGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYICQQYASAPVTFGQGT KVELK (서열 번호: 37).
- [0281] 본 발명의 또 다른 목적은 항원-hGARP에 대한 항체 LHG10.5 또는 헤비체인 변이부위서열 서열번호: 34 와 라이트체인 변이부위서열 서열번호: 38로 구성된 이의 항원 결합절편을 제공하는 것이다.
- [0282] DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCQASQTISSFLAWYHQKPGQPPLLIRASIPQTVPSRFSGSGSGTSFTLTIGGLEAEDAGTYICQQYASAPVTFGQGT KVELK (서열 번호: 38).
- [0283] 본 발명의 또 다른 목적은 헤비체인 변이부위서열 서열번호: 34 와 라이트체인 변이부위서열 서열번호: 39을 포함하는 항원-hGARP에 대한 항체 LHG10.6을 제공하는 것이다.
- [0284] DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCQASQSISSYLAWYQQKPGQAPNLLIYGASRLKTVPSRFSGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYICQQYASVPTVTFGQGT KVELK (서열 번호: 39).
- [0285] 본 발명의 실시예에서, 위에서 서술 한대로 헤비체인과 라이트체인 변이부위의 아미노산 한 개, 두 개, 세 개 또는 몇 개는 다른 아미노산으로 대체될 수 있다.
- [0287] *또 다른 실시예에서, 본 발명의 항체는 여기서 서술한 MHGARP8 항체의 아미노산 서열과 유사한 아미노산 서열로 구성된 헤비 체인과 라이트 체인 변이부위로 되어 있으며, 이런 항체들은 발명된 단백질의 필요로 하는 기능적 성질을 그대로 가지고 있다.
- [0288] 본 발명의 실시예에서, 본 발명의 항원-hGARP에 대한 항체의 헤비 체인 변이 부위서열에는 서열번호: 8 또는 서열번호: 50와 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일한 서열을 포함한다.
- [0289] 본 발명의 실시예에서, 본 발명의 항원-hGARP 에 대한 항체의 라이트체인 변이 부위서열에는 서열번호: 9 또는 서열번호: 51과 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 의 동일한 서열을 포함한다.
- [0290] 또 다른 예에서 본 발명의 항체는 여기서 서술한 LHG10 항체의 아미노산 서열과 유사한 아미노산 서열로 구성된 헤비 체인과 라이트 체인 변이부위로 되어 있으며, 이런 항체들은 발명된 단백질의 필요로 하는 기능적 성질을 그대로 가지고 있다.
- [0291] 본 발명의 실시예에서, 본 발명의 항원-hGARP 에 대한 항체의 헤비 체인 변이 부위서열에는 서열번호: 34와 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 의 동일한 서열을 포함한다.
- [0292] 본 발명의 실시예에서, 본 발명의 항원-hGARP 에 대한 항체의 라이트체인 변이 부위서열은 서열번호: 35; 36; 37; 38 또는 39와 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일한 서열을 포함한다.
- [0293] MHGARP8 또는 LHG10와 같이 본 발명의 항체 중 어느 것에서나, 특별히 지정된 변이부위나 CDR 서열들은 보수적으로 서열이 수정 (conservative sequence modifications) 되기도 한다. 보존적인 서열 변형(conservative sequence modification)이란 그 아미노산 서열을 가진 항체의 결합성질에 별로 많은 영향을 주지 않거나 변하게 하지 않는 것을 의미한다; 이런 보수적인 서열 수정에는 아미노산 대체, 추가삽입과 삭제가 있다. 자리지정돌연변이제조기술(site-directed mutagenesis), PCR 매개 돌연변이제조기술(PCR-mediated mutagenesis) 과 같은 잘 알려진 표준기술로 발명된 항체에 수정된 서열을 도입할 수 있다. 보존적인 아미노산 대체는 전형적으로 비슷한 물리화학적 성질을 가진 곁가지 체인을 함유하는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 특정된 변이부위와 CDR 서열은 한 개, 두 개, 세 개, 네 개, 또는 몇 개의 아미노산 삽입, 삭제, 또는 대체로 이루어질 수 있다. 비슷한 곁가지 체인을 가진 아미노산 그룹들이 당 업계에 잘 정의가 되어있다. 이 그룹들에는 염기성 곁가지들 가진 아미노산(예, 라이신, 알기닌, 히티딘), 산성 곁가지 (예; 아스파르긴산, 글루타민산), 비이온성 극성 곁가지 (예:글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 타이로신, 시스테인), 비극성 곁가지(예, 알라닌, 발린, 루이신, 아이소루이신, 프로린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분기(branched) 곁가지(예;트레오닌, 발린, 아이소루이신)와 방향족 곁가지 (예; 타이로신, 페닐알라닌, 트립토판) 를 가진 아미노산 그룹들로

되어 있다. 그러므로 발명의 항체CDR 부위내의 한 개 또는 몇 개의 아미노산이 같은 그룹의 결가지를 가지는 다른 아미노산으로 대체될 수 있으며 변경된 항체는 여기서 정해진 검정방법으로 기능이(즉 여기서 정해진) 유지되고 있는지 검사할 수 있다. hGARP 에 대한 항체들은 CDR이 이식된 항체일 수도 있으며 여기서 CDR은 예를 들어 hGARP로 번역력을 가지게 하여 생긴 카멜리드 항- hGARP 항체와 같은 카멜리드 항체로부터 유래 될 수 있는데, 예를 들면, 카멜리드에 hGAPR로 번역성을 갖게 하여 얻은 카멜리드 항- hGARP 항체 CDR 카멜리드 항체로부터 유래된 CDR이 이식된 항체일 수도 있다.

[0294] 한 실시예에서, 본 발명은 MHGARP8 또는 LHG10 항체의 에피토프와 거의 같은 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다.

[0295] 본 발명의 일부 실시예에서, 이들의 VH 및 VL 도메인 또는 CDR을 포함한 항-hGARP 항체는 완전히 또는 부분적으로 인간 아미노산 서열이 있는 CH1 도메인 및/또는 CL 도메인을 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리 펩타이드 항원 결합은 인간의 치료 용도를 위한 항체인 경우, 이는 그 항체의 전체 불변 영역(constant region)을 위한 전형적인 또는 적어도 그 일부, 완전히 또는 일부 인간 아미노산 서열이다. 따라서, CH1 도메인, 힌지 부위, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CL 도메인(및 존재하는 경우 CH4 도메인)의 하나 또는 그 이상의 임의의 조합은 그 아미노산 서열에 대해 완전하게 또는 상당히 관계될 수 있다. 바람직하게는, CH1 도메인, 힌지 부위, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CL 도메인(및 존재하는 경우 CH4 도메인)은 완전히 또는 상당한 인간 아미노산 서열을 모두 가질 수 있다. 인간화 또는 키메라 항체의 불변 영역 및 항체 단편의 맥락에서, "상당한 인간(substantially human)"이라는 용어는, 아미노산 서열 동일성이 인간 불변 영역과 적어도 90% 또는, 적어도 95%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 99%인 것을 말한다. 이 문맥에서 용어 "인간 아미노산 서열(human amino acid sequence)"은 생식계, 재배열 및 체세포 변이 유전자를 포함하는 인간 면역 글로불린 유전자에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 말한다. 또한, 본 발명은 이들 실시예를 제외하고 인간 서열과 관련하여 하나 이상의 아미노산 첨가, 결실 또는 치환에 의해 변형된 "인간" 서열의 불변 도메인을 포함하는 폴리펩타이드는 "완전한 인간(fully human)" 힌지 영역(hinge region)의 존재가 필요함을 고려한다. 본 발명의 항-hGARP 항체의 "완전한 인간" 힌지 영역의 존재는 면역 원성(immunogenicity)을 최소화하고, 항체의 안정성을 최적화하기에 유용할 수 있다. 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입, 또는 삭제가 특히 Fc 영역 내에 헤비체인 및/또는 라이트체인의 불변 부위 내에서 이루어질 수 있다. 아미노산 치환은 자연적으로 일어나는 아미노산의 대체 및 치환과 다른 또는 비천연 또는 변형된 아미노산의 결과일 수 있다. 다른 구조 변경은 또한 허용되며, 예를 들어 당화 패턴(glycosylation pattern)의 변화와 같다(예로, N- 또는 O- 결합 글리코실화 부위의 첨가 또는 삭제와 같은). 항체의 의도된 용도에 따라, 본 발명의 항체의 Fc 수용체에 대한 결합 특성에 대해 수정하는 것이 바람직하며, 예로 이펙터(effecto) 기능을 조절하는 것이다. 예를 들면, 시스테인 잔기(들)은 Fc 영역에 도입될 수 있고, 이들은 이 영역에서 이황화 결합(disulfide bond) 형성을 허용한다. 이렇게 생성된 동중이량체(homodimeric) 항체는 이펙터 기능을 개선할 수 있다. Caron et al., J. Exp. Med. 176: 1191 - 1195 (1992) 및 Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992) 논문을 참조할 수 있다. 대안적으로, GARP 항체는 이중 Fc 영역을 갖게 설계될 수 있고, ADCC 및 보체(complement) 용해 능력(capabilities)이 향상될 수 있다. Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989) 참조. 또한, 본 발명은 화학 치료제(chemotherapeutic agent), 독소(예로, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물, 또는 이들 단편의 효소학적 활성 독소) 또는 방사성 동위 원소(즉, 방사접합체(radioconjugate))로 본 명세서에 기재된 세포 독성 제제에 결합된 항체를 포함하는 면역결합체를 의미한다. Fc 영역은 또한 반감기 연장을 위해 설계될 수 있으며, 하기 인용문헌에 의해 참조된다 Chan and Carter, 2010 Nature Reviews: Immunology, 10:301-316, incorporated herein by reference. 본 발명에 기술된 바와 같이, Fc 영역의 변종 항-hGART 항체는 단백질 공학에 의해 변형될 수 있으며, 또한 Fc 개선 없이 등가 항체(즉, 동등한 항원-결합 특성)와 비교하여 효율(예로, 치료제/진단제로) 향상을 보일 수 있다.

[0296] 또 다른 실시예에서, Fc 영역은 항체 의존적 세포 독성(antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)을 매개 및/또는 하나 이상의 아미노산을 수정하여 Fc γ 수용체에 대한 항체의 친화성을 증가시키는 항체의 능력을 증가시키기 위해 변형된다. 또 다른 실시예에서, 항체의 글리코실화(glycosylation)는 변경된다. 예를 들어, 아글리코실화된 항체(aglycosylated antibody)가 만들어질 수 있다(즉, 상기 항체는 글리코실화가 결여됨). 글리코실화는 예를 들어, GARP 표적 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시키기 위해 변경될 수 있다. 어떤 탄수화물 변형에 의해 달성될 수 있다; 예를 들어, 항체 서열 내의 하나 또는 그 이상의 글리코실화(glycosylation) 위치 변경. 예를 들어, 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환은 하나 또는 그 이상의 변이 부위(variable region) 프레임워크(framework) 글리코실화 부위를 제거하여 클리코실화 부위가 제거된 결과를 만들 수 있다. 이러한 글리코실화는 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시킬 수 있다. 또한, 변이 항-hGARP 항체가 글리코실화

의 변화된 타입을 갖는 것을 구상하였으며, 이와 같은 hypofucosylated 항체는 fucosyl 잔기의 양이 감소거나 비-fucosylated 항체(Natsume et al., 2009 Drug Design Development and Therapy, 3:7-16 에 묘사된 바와 같이) 또는 이등분(bisecting) GlcNac 구조가 증가된 항체를 갖는다. 이러한 변형된 글리코실화 패턴은 "천연" 인간 Fc 영역을 포함하는 등가 항체에 일반적으로 ADCC에 대하여 10배의 향상을 나타냄으로, 항체의 ADCC 활성이 증가하는 것으로 입증되었다. 이러한 탄수화물 변형은 예를 들어, 숙주 세포에서 발현되는 항체의 글리코실화 효소가 변경되어 달성될 수 있다(Yamane-Ohnuki and Satoh, 2009 mAbs 1(3):230-236 에 기술된 바와 같이).

- [0297] 본 발명의 실시예에서, 항-hGARP 항체는 서열 번호 47의 서열을 갖는 Fc 영역을 포함한다.
- [0298] PKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSPGK (서열 번호: 47).
- [0299] 본 발명의 다른 실시예에서, 항-hGARP 항체는 서열 번호 48의 서열을 갖는 헤비체인 불변 도메인 부위를 포함하며, 여기서 X는 N 또는 ADCC 억제제를 위해 Q로 변이된다.
- [0300] ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGLCLVKDYFPEPVTWNSWGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYXSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSPGK (서열 번호: 48).
- [0301] 본 발명의 실시예에서, 서열번호 48의 297 잔기는 아글리코실화되었다(aglycosylated).
- [0302] 본 발명의 다른 실시예에서, 서열 번호 48의 297 위치의 N 잔기는 Q로 변이되었다.
- [0303] 본 발명의 다른 실시예에서, 항-hGARP 항체는 서열 번호 49를 갖는 라이트체인 불변 도메인 부위를 포함한다.
- [0304] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 49).
- [0305] 본 발명의 다른 실시예에서, 항-hGARP 항체는 이펙터 기능이 결여될 수도 있고, 예를 들어, 항체의 Fc 영역은 인간에 대한 자연적 이펙터 기능 부족의 아형이기 때문이며, 또는 인간의 IgG1보다 훨씬 덜 강력한 이펙터 기능을 발휘하는 아형이며, 예를 들어, 인간 IgG2 또는 IgG4 이고, 항체의 Fc 영역을 감소시키거나 실질적 이펙터 기능을 제거하기 위해 설계되었기 때문이며, Armour KL, et al., Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624 에 기술된 바와 같다.
- [0306] 다른 실시예에서, 항-hGARP의 Fc 영역은 이중특이성 항체의 우선적 형성이 용이하게 설계될 수 있으며, 여기서 두 항체 헤비체인은 이중특이성 항체의 Fc 부위로부터 다른 가변 도메인 쌍을 포함한다. 이러한 변형의 예는 Ridgway JB, Presta LG, Carter P., 1996 Protein Eng. Jul; 9(7):617-21 및 Merchant AM, et al. 1998 Nat Biotechnol. Jul; 16(7):677-81에 기술된 "knobs-into-hole" 변형을 포함한다.
- [0307] 본 발명의 실시예에서, 본 발명의 항-hGARP 항체는 항체-의존 세포-매개 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), 보체 의존 독성(complement dependent cytotoxicity, CDC) 및 항체-의존 세포-매개 식균작용(antibody-dependent cell-mediated phagocytosis, ADCP)에 대해 세포 표면에 발현된 인간 GARP 단백질로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 이펙터 기능을 나타낼 수 있다. 상기 항체는 ADCC에 대한 GARP-관련 기능 장애 세포(dysfunctional cells)를 나타낼 수 있다. 상기 항체는 천연 인간 Fc 영역을 포함하는 상응하는 항체 기준 항체에 비해 개선된 ADCC 기능을 나타낼 수 있다. 비제한적 실시예에서, ADCC 기능은 적어도 10배 천연 인간 Fc 영역을 포함하는 참조 항체에 비해 향상 될 수 있다. 이 문맥에서 "동등한()"은 ADCC 기능이 향상된 항체가 향상된 ADCC의 목적을 위한 변형(천연 인간 Fc와 관련된)을 제외하고 실질적으로 동일한 항체-결합 특이성 및/또는 참조 항체와 동일한 아미노산 서열을 공유하는 것을 나타낸다. 상기 항체는 인간 IgG1의 힌지 부위, CH1 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함할 수 있으며, 가장 바람직하게는 인간 IgG1이다. 상기 항체는 Fc 부위에서의 변형을 포함할 수 있으며, 예를 들어, Fc-의존 기능을 향상 또는 제거시킬 수 있는, 치환, 결실 또는 삽입 또는 다른 구조적 변경이다.
- [0308] 본 발명의 하나의 목적은 TGF-β 신호 전달을 억제하는 항-hGARP 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 관한 것으로, 그 항체 이펙터 기능의 혜택 치료 응용에 특히 적합 할 수 있으며, 즉 ADCC. CDC. ADCP. 및 특히 강화된 이펙터 기능이다. 따라서, GARP 항체는 여기서 이펙터 기능(또는 향상된 이펙터 기능) 및 TGF-β 억제를 나타내고, 특정 치료 응용에 유리할 수 있으며, 예로, 암, 만성 감염, 항체 이펙터 기능으로부터 유리한 섬유증

치료이다.

[0309] 본 발명의 다른 목적은 서열 번호 8 또는 서열 번호 50 서열의 헤비체인 변이 부위를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열의 분리이다. 바람직하게 핵산 서열은 서열 번호 10이다:

[0310] ATGGCTGTCTGGCATTACTCTTCTGCCTGGTAACATTCCTCCAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCTGGTGGCGCCCTCA CAGAGCTGTCCATCACATGCACCGTCTCAGGGTCTCATTAAACCGGTATGGTATAAACTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGA ATGATATGGAGTGATGGAAGCACAGACTATAATTCAGTTCTCACATCCAGACTGAGGATCAGTAAGGATAATTCGAATAGCCAGGTTTCTAAAAATGAAC AGTCTGCAAGTTGATGACACAGCCAGTACTATTGTGCCAGAGATCGAACTACTATGATTACGACGGGGCTATGGACTACTGGGTCAGGAACCTCAGTC ACCGTCTCCTCA.

[0311] 본 발명의 다른 목적은 서열 번호 9 또는 서열 번호 51 서열의 라이트 체인 변이 부위를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열의 분리이다. 바람직하게, 상기 핵산 서열은 서열 번호 11이다:

[0312] ATGAAGTTTCCTTCTCAACTTCTGCTCTTCTGCTGTTTCCAGGATAATATGTGACATCCAGGTGACACAATCTTCATCTACTTGTCTGTATCT CTAGGAGACAGGGTACCATTACTTGAAGGCAAGTGACCATTAAAAATGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGAATGCTCCTAGGCTCTTAGTT TCTGGTGCAACCAGTTTGAAGCTGGGGTTCCTTCAAGATTAGTGGCAGTGGATCTGGAAAGAATTTCACTCTCAGCATTACCAGTCTTCAGACTGAAGAT GTTGCTACTTATTACTGTCAACAGTATGGAGTACACCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCACTCTGGAGATCAGA.

[0313] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 항-hGARP 항체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터이다. 실시예에서, 본 발명의 발현 벡터는 서열 번호 10 및 서열 번호 11 또는 상기 서열 번호 10 및 서열 번호 11와 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 핵산 서열을 갖는 어느 서열 중 적어도 하나를 포함하고 있다.

[0314] 본 발명의 다른 목적은 상기 벡터를 포함하는 분리된 숙주 세포이다. 상기 숙주 세포는 본 발명의 항체의 재조합 생산을 위해 사용될 수 있다. 실시예에서, 숙주세포는 원핵 생물, 효모 또는 진핵 세포 바람직하게 동물 세포이며, 예를 들어 이와 같다; SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 라인(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 라인(부유 배양에서 성장을 위해 서브 클로닝된 293 또는 293 세포, Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)); 아기 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 중국어 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); 마우스 세르톨리(Sertoli) 세포 (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); 마우스 골수종 세포 SP2/0-AG14(ATCC CRL 1581 ; ATCC CRL 8287) 또는 NSO(HPA 배양 collections no. 85110503); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁 경부 암종 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개파의 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양(MMT 060562, ATCC CCL 51); TRIO 세포(Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 종 세포주(Hep G2), 뿐만 아니라, DSM의 PERC6 세포주. 발현 벡터는 일반적으로 당 업계에 공지되어 상기 각각의 숙주 세포에 용이하게 사용가능하다. 용어 "숙주 세포(host cell)"는 일반적으로 배양된 세포주들을 지칭한다. 본 발명에 따라서 항원 결합 폴리 펩타이드를 암호화하는 발현 벡터를 갖는 전체 인간은 "숙주 세포"의 정의로부터 도입이 완전히 제외된다.

[0315] 본 발명의 다른 목표는 항-hGARP 항체 또는 이의 항원 결합 단편 생산 방법이며, 이는 항-hGARP 항체의 발현에 적합한 조건하에서 항-hGARP 항체를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 숙주 세포 배양을 포함하고, 발현된 항-hGARP 항체를 재생한다. 재조합 과정은 본 발명에 따라서 단일클론 항체를 포함하는 GARP 항체의 대량 생산에 이요될 수 있으며, 시험관 내, 생체 외, 생체 내 치료, 진단을 목적으로 한다. 이러한 과정은 단 업계의 기술 분야에서 이용 가능하며, 당업자에 의해 공지된 것이다.

[0316] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 항체를 생산하는 하이브리도마(hybridoma) 세포주이다.

[0317] 본 발명에 따르면 바람직한 하이브리도마는 BCCM/LMBP Plasmid Collection, Department of Biomedical Molecular Biology, Ghent University, 'Fiers-Schell-Van Montagu' building, Technologiepark 927, B-9052 Gent - Zwijnaarde BELGIUM에 기탁하였다(표 2).

표 2

| 세포주 | 기탁번호 | 기탁일자 |
|-------------------|--------------|-------------|
| MHGARP8 hybridoma | LMBP 10246CB | 30 May 2013 |

[0319] 본 발명의 항체의 단편 및 유도체(달리 언급하거나 문맥 상 명백하게 부인되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 용어 "항체" 또는 "항체들"에 포함된다)는, 바람직하게 MHGARP8-유사 항체(MHGARP8-like antibody)이며, 당업계에서 공지된 기술로 제조될 수 있다. "단편(Fragments)"은 본래 항체 영역, 일반적으로 항원 결합 부위 또는 변이 지역을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, 및 Fv 단편; 다이바디; 연속되는 아미노산 잔기의 하나의 중단되지 않은 서열의 1차 구조를 갖는 폴리펩타이드인 어느 항체 단편("단일 쇠 항체 단편(single-chain antibody fragment)" 또는 "단일 쇠 폴리 펩타이드(single chain polypeptide)"로 지칭)를 포함하며, 제한없이 (1) 단일 사슬 Fv 분자 (2) 오직 하나의 라이트체인 변이 도메인, 또는 이의 단편을 포함하는 단일 사슬 폴리펩타이드, 이는 관련된 헤비 체인 모이어메티(moiety) 없이 라이트체인 변이 도메인의 3 CDRs를 포함하며, (3) 오직 하나의 헤비체인 변이 도메인, 또는 이의 단편을 포함하는 단일 사슬 폴리펩타이드, 이는 관련된 라이트체인 모이어티없이 헤비체인 변이 부분의 3 CDRs를 포함하고; 다중 특이성 항체는 항체 단편으로부터 형성된다. 본 발명의 항체 단편은 표준 방법으로 얻을 수 있다. 예로, Fab 또는 F(ab')₂ 단편은 종래 기술에 따라 분리된 항체의 프로테아제(protease) 소화에 의해 생성될 수 있다. 면역 반응성 단편(immune-reactive fragments)은 알려진 방법에 의해 변형될 수 있으며, 예로 생체 내 간극을 느리게 하고, 더 바람직한 약동학(pharmacokinetic) 프로파일을 얻을 수 있게 PEG(polyethylene glycol)와 함께 변형될 수 있다. Fab' 단편과 PEG 위치-특이적 결합 및 커플링 방법은 예를 들어, Leong et al, Cytokines 16 (3): 106-119 (2001) 및 Delgado et al, Br. J. Cancer 73 (2): 175- 182 (1996)에 묘사되며, 상기 개시 내용은 본 명세서에 참고로 인용된다. 대안적으로, 본 발명의 항체를 생산하는 하이브리도마의 DNA는, 바람직하게 MHGARP8-유사 또는 LHG10-유사 항체이며, 본 발명의 암호화된 단편으로서 변형될 수 있다. 변형된 DNA는 발현 벡터 내로 삽입하고, 원하는 단편을 발현하는 적절한 세포를 형질전환 또는 형질도입하는데 사용된다. 어떤 실시예에서, 본 발명의 항체를 생산하는 하이브리도마의 DNA는, 바람직하게 MHGARP8-유사 또는 LHG10-유사 항체이며, 이는 발현 벡터로 삽입되기 이전에 변형될 수 있으며, 예를 들어, 동일한 비-인간 서열 부분에 인간 헤비- 및 라이트- 체인 불변 도메인을 암호화하는 서열을 치환함으로써(예로, Morrison et al., PNAS pp. 6851 (1984)), 또는 비-면역 글로불린 폴리펩타이드를 암호화하는 서열의 전체 또는 일부 서열을 암호화하는 면역글로불린 서열을 공유 결합하는 것이다. 상기 방법으로, "키메라(chimeric)" 또는 "하이브리드" 항체는 본래 항체의 결합 특이성을 갖도록 제조된다. 전형적으로, 이러한 비-면역 글로불린 폴리 펩타이드는 본 발명의 항체의 불변 도메인으로 대체된다.

[0320] 따라서, 다른 실시 예에 따르면, 본 발명의 항체는, 바람직하게 MHGARP8 또는 LHG10 같은 항체는 인간화된다. 본 발명에 따른 항체의 "인간화(Humanized)" 형태는 쥐의 면역 글로불린으로부터 유래된 최소한의 서열을 포함하는 특정한 키메라 면역 글로불린, 면역 글로불린 사슬 또는 그의 단편(예 FV, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원-결합된 보조 서열)이다. 대부분의 경우, 인간화된 항체는 인간 면역 글로불린(수용자 항체(recipient antibody))이며, 이는 원래 항체의 특이성, 친화성 및 능력을 유지하는 동시에, 공여체의 CDR(complementary-determining region)로부터의 잔기가 원래 항체(공여 항체)의 CDR로부터의 잔기로 치환되는 것이다.

[0321] 일부 예에서, 인간 면역 글로불린의 Fv 프레임워크(FR)은 비-인간 잔기와 상응하게 치환될 수 있다. 또한, 인간화된 항체는 수용자 항체 또는 유입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서 모두 발견되지 않은 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 최적화하고 추가적으로 수정하기 위해 만들어진다. 일반적으로, 인간화된 항체는 실질적으로 모두 적어도 하나, 및 전형적으로 2개, 변이 도메인, 이는 CDR 부위의 전부 또는 대부분에 해당하며 이는 원래 항체 및 FR 부위의 전부 또는 대부분이 인간 면역 글로불린과 일치하는 서열이다. 인간화된 항체는 또한 최적으로 인간 면역 글로불린의 전형적인, 면역 글로불린 불변 영역(constant region, Fc)의 적어도 한 부분을 포함할 수 있다. 더 구체적인 내용은 Jones et al., Nature, 321, pp. 522 (1986); Reichmann et al, Nature, 332, pp. 323 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 3, pp. 394 (1992); Verhoeyen et al. Science, 239, pp. 1534; and U.S. Patent No. 4,816,567,에서 확인할 수 있으며, 상기 전체 개시 내용은 본원에 참조로 인용된다. 본 발명의 항체를 인간화하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0322] 인간 변이 도메인의 선택, 라이트 및 헤비 모두는 인간화된 항체 제조에 사용될 수 있고, 항원성을 줄이는데 매우 중요하다. "최적" 방법이라 불리는 방법에 따라, 본 발명의 항체의 변이 도메인의 서열은 알려진 인간 변이-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝된다. 마우스 서열에 한정된(closed) 인간 서열은 인간화된 항체의 인간 프레임워크(FR)로서 인정된다(Sims et al., J. Immunol. 151, pp. 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, pp. 901). 다른 방법은 라이트 또는 헤비 체인의 특정 하위그룹의 모든 인간 항체의 일치된 서열로부터 특정 프레임워크로 사용한다. 동일한 프레임 워크는 다른 몇몇이 인간화된 항체에 사용될 수 있다(Carter et al., PNAS 89, pp. 4285 (1992); Presta et al. J. Immunol., 151 (1993)). 더 중요

한 것은, 이 항체는 GARP 및 기타 유리한 생물학적 특성에 대해 높은 친화성을 보존하며 인간화되는 것이다. 바람직한 방법에 따르면, 이 목적을 달성하기 위해, 인간화된 항체는 모체의(parental) 및 인간화된 서열의 3차원-입체 모델을 사용하여 다양한 개념의 인간화된 생산물 및 모체 서열의 분석 과정을 통해 준비될 수 있다. 3차원-입체 번역글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하며, 당업자에게 친숙하다. 컴퓨터 프로그램은 선택된 후보 번역 글로불린 서열의 3차원-입체 구조를 설명하고 디스플레이하는 것이 가능하다. 이 디스플레이 검사는 후보 번역 글로불린 서열의 기능에서 잔기의 가능한 역할의 분석을 허용하며, 즉, 항원에 결합하는 후보 번역 글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기를 분석한다. 이러한 방법으로, FR 잔기는 표적 항원(들)에 대한 친화도가 증가되는 것과 같은 원하는 항체 특성의 일치 또는 유입으로부터 선택되고 조합되어 성취될 수 있다. 일반적으로, 상기 CDR 잔기는 항원 결합에 영향을 미치는데 가장 관여되며 직접적이다. "인간화된" 단일클론 항체를 만드는 다른 방법은 번역화에 사용되는 마우스로서 Xenomouse(Abgenix, Fremont, CA)를 사용하는 것이다. Xenomouse는 본 발명에 따르면 쥐의 숙주이며, 이는 번역 글루블린 유전자가 기능적 인간 번역 글루블린 유전자로 치환된 것이다. 따라서, 이 마우스 또는 이 마우스의 B 세포로부터 제조된 하이브리 도마에서 생산되는 항체는, 이미 인간화된다. XENOMOUSE는 본원에 참고로 전체가 인용된 미국 특허 번호 6,162,963에 개시된다.

- [0323] 인간 항체는 또한 다양한 다른 기술에 따라 생산될 수 있으며, 예로 번역을 위해 다른 형질전환 동물(transgenic animals)을 이용하며, 이는 인간 항체 레파토리(repertoire)의 발현을 조작(Jakobovitz et al. Nature 362 (1993) 255), 또는 파지 디스플레이 방법(phage display methods)을 사용하여 항체 레파토리의 선택에 의한 것이다. 이러한 기술은 당업자에게 공지되어 있으며, 본원에 개시된 바와 같은 단일 클론 항체부터 구현될 수 있다.
- [0324] 실시예에서, 카멜리드 초가변 루프(Camelidae hypervariable loops)(또는 CDRs)는 원하는 표적 항원을 갖는 카멜리드 패밀리 종의 활성 번역에 의해 얻을 수 있다. 본 명세서에서 자세히 기술되고 예시된바, 표적 항원, 원하는 항원에 대한 특이성을 가진 B 세포 생산 항체를 갖는 카멜리드(원래의 동물 또는 카멜리드 종의 번역 글로불린이 발현되도록 설계된 변형질전환 동물)의 번역에 따라 VH 및 VL 도메인을 암호화하는 폴리 뉴클레오티드를 규명할 수 있고, 이런 항체는 잘 알려진 방법에 따라 분리될 수 있다.
- [0325] 실시예에서, 본 발명은 VH 도메인 및 VL 도메인에서 적어도 하나 이상의 초가변부위 루프() 또는 상보성 결합 영역을 갖는 VH 도메인 및 VL 도메인으로 구성된 폴리펩타이드, 타겟 항원을 갖는 재조합 항원 결합 폴리펩타이드 번역 활성을 제공하며, 이는 카멜리드 패밀리 종의 VH 또는 VL 도메인으로부터 얻어질 수 있고, 이의 항원 결합 폴리펩타이드는 하기 과정의 구성으로 얻어질 수 있다;
- [0326] (a) 표적 항원 또는 상기 표적 항원을 암호화하는 폴리 뉴클레오티드 카멜리드 패밀리 종의 번역 및 상기 표적 항원에 대한 항체의 상승;
- [0327] (b) 적어도 하나의 상기 표적 항원을 갖는 카멜리드 원래의 항체의 번역 반응성의 VH 및/또는 VL 도메인의 초가변 루프 또는 상보적 결정 영역(complementarity determining region, CDR)을 암호화하는 핵산 서열의 결정; 및
- [0328] (c) 상기 표적 항원을 갖는 항원 결합 폴리 펩타이드 번역 반응성의 발현, 상기 항원 결합 폴리펩타이드는 VH 및 VL 도메인으로 구성되며, 이는 VH 도메인 또는 VL 도메인에서 적어도 하나의 초가변 루프 또는 CDR을 갖으며, 이는 단계 (a)에서 결정된 핵산 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는다.
- [0329] 능동 면역화(active immunization)에 의해 얻어진 분리된 카멜리드 VH 및 VL 도메인은 본 발명에 따라서 항원 결합 폴리펩타이드 설계를 위한 기초로 이용될 수 있다. 본래 카멜리드 VH 및 VL 도메인으로부터 시작되어, 하나 또는 그 이상의 아미노산 서열 치환, 삽입 또는 결실 이는 카멜리드 서열 시작 부터 출발한, 설계가 가능하다.
- [0330] 실시예에서, 치환, 삽입 또는 결실은 VH 도메인 및/또는 VL 도메인의 프레임워크 부위에서 존재할 수 있다. 일차 아미노산 서열의 이러한 변화 목적은 잠재적으로 좋지 않은 성질 감소(예로, 인간 숙주에서 면역원성(인간화로 불리는), 잠재적 생산물 이질성 및 또는 불안정성(글리코실레이션, 탈아미드화, 이성화 등의) 부위 또는 분자의 다른 좋은 성질(예로, 용해도, 안정성, 생체 이용률 등)을 향상시키기 위해서 이다.
- [0331] 다른 실시 예에서, 일차 아미노산 서열의 변경은 활성 면역화시킨 카멜리드 VH 및/또는 VL 도메인의 초가변루프(또는 CDR들) 중 하나 이상에서 설계될 수 있다. 이러한 변화는 항원 결합 친화도 및/또는 특이성을 향상시키거나, 또는 잠재적으로 좋지 않은 성질 감소(예로, 인간 숙주에서 면역원성(인간화로 불리는), 잠재적 생산물 이질성 및 또는 불안정성(글리코실레이션, 탈아미드화, 이성화 등의) 부위 또는 분자의 다른 좋은 성질(예로,

용해도, 안정성, 생체 이용률 등)을 향상시키기 위해서 이다.

- [0332] 본 발명의 항체는, 바람직하게 MHGARP8 또는 LHG10-유사 항체이며, "키메릭" 항체(면역 글로불린)에서 유래될 수 있고, 이는 헤비/라이트 체인의 부위가 원래 항체의 대응하는 서열과 유사하거나 동일하며, 나머지 사슬은 다른 종 또는 다른 항체의 분류 또는 소분류로부터 유래된 항체의 동일하거나 유사한 서열이거나, 뿐만 아니라 이러한 항체의 단편이며, 원하는 생물학적 활성 및 결합 특이성을 나타내는 동안이다(Cabilly et al., supra; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., pp. 6851 (1984)).
- [0333] 본 발명의 목적은 상기 서술된 단백질 중 적어도 하나를 포함하는 조성물이다.
- [0334] 본 발명의 또 다른 목적은, 적어도 상기에 서술된 본 발명의 단백질 중 하나 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물이다.
- [0335] 약학적으로 허용가능한 부형제는 하기 조성물을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다, 이온 교환제, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 예로 인간 혈청 알부민과 같은, 예로 인산염, 글리신, 소르브산, 포타슘 소르베이트, 포화 식물성 지방산, 물, 염 또는 전해질의 글리세라이드 혼합물과 같은 완충물질, 예로, 프로타민 설페이트, 인산수소이온아트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨, 아연염, 콜로이드성 실리카, 마크네슘트리실리케이드, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스계 물질(예로 나트륨 카복시메틸셀룰로오스), 폴리에틸렌 글리콜, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 폴리머, 폴리에틸렌 글리콜 및 올렛.
- [0336] 본 발명의 다른 목적은 이를 필요로 하는 대상에서 TGF- β 저해를 위한 본 발명의 단백질이다.
- [0337] 본 발명의 다른 목적은, 이를 필요로 하는 대상체에서 TGF- β 활성을 억제하는 환자에게 본 발명의 단백질의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 방법이다.
- [0338] 본 발명의 다른 목적은, 이를 필요로 하는 대상체에서 TNF- β -관련 장애를 치료하기 위해 상기에 정의된 바와 같은 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명 또는 약제학적 조성물의 단백질이다.
- [0339] 본 발명의 또 다른 목적은, 이를 필요로 하는 대상체에서 TGF- β -관련 장애를 치료 대상에게 본 발명의 단백질의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 방법이다.
- [0340] 본 발명의 방법이 사용될 수 질환 또는 장애는 TGF- β 억제가 유의 할 수 있는 모든 질환이 포함된다.
- [0341] 상기 TGF- β -관련 질환은 염증 질환, 만성 감염, 암, 섬유증, 심장혈관질환, 뇌혈관질환(예를 들면, 허혈성 뇌졸중) 및 퇴행성 신경질환을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0342] 환자의 투여에 사용하기 위한 조성물은 환자에게 투여하기 위해 제형화될 것이다. 본 발명의 조성물은 흡입 분무에 의해, 비경 경구 투여될 수 있고, 국소, 직장, 비강, 협측, 질내 또는 이식 된 저장소를 통하여 투여될 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어는 투여는 피하, 정맥 내, 근육 내, 관절 내, 활액 내, 흉골 내, 수 막강 내, 간내, 병소 내 및 두개 내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.
- [0343] 본 발명의 조성물의 멸균 주사 형태는 수성 또는 유성 현탁액 일 수 있다. 이러한 현탁액은 당업계에 공지된 기술에 따라 적절한 분산제 또는 습윤제 제제 및 현탁 제제를 사용하여 제형화될 수 있다. 멸균 주사 제제는 또한 비 독성 비경 구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액 일 수 있다. 사용될 수 있는 비허클 및 용매는 물, 링거액 및 등장성 염화나트륨 용액이다. 또한, 멸균 고정 오일은 통상적으로 용매 또는 현탁 매질로서 사용된다. 이를 위해, 임의의 부드러운 고정된 오일이 합성 모노- 또는 디글리세라이드를 포함하여 사용될 수 있다. 올레산 및 이의 글리세리드 유도체와 같은 지방산은 주사제 제조에 유용하며, 이는 올리브 오일 또는 피마지유, 특히 이들의 폴리옥시에틸레이트와 같은 천연 약학적으로 허용가능한 오일이다. 이들 오일 용액 또는 현탁액은 또한 에멀전과 현탁액을 포함하는 약학적으로 허용가능한 형태의 제형에 일반적으로 사용하는 카복시메틸 셀룰로오스 또는 이와 유사한 분산제 제제와 같은 장쇄 알콜 희석제 또는 분산제를 포함할 수 있다. 일반적으로 약학적으로 허용 가능한 고체, 액체 또는 기타 투여 형태의 제조에 사용되는 이러한 트윈, 스펠 및 기타 유화제 또는 생체 이용성 강화제와 같은 다른 통상적으로 사용되는 계면 활성제도 제형의 목적으로 사용될 수 있다.
- [0344] 본 발명의 약학적 조성물의 항체의 투여 일정 및 투여량은 제조자의 지침을 사용하여, 예를 들어 이러한 제품에 대한 공지된 방법에 따라 결정될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물에 존재하는 항체는 100 mg(10 ml) 또는 500 mg(50 ml) 일회용 바이알에서 10 mg/ml 농도로 공급 될 수 있다. 생성물은 정맥내(IV) 투여를 위해 9.0 mg/ml 염화나트륨, 7.35 mg/ml 구연산나트륨이수화물, 0.7 g/ml 폴리소르베이트 80, 및 멸균수를 주사액

으로 제형화할 수 있다. pH는 6.5로 조정된다. 상기 일정은 모범적이며, 최적 일정 및 요법은 임상 시험에서 반드시 결정되어야 하는 약학적 조성물의 특정 항체의 친화성 및 내성을 가지고 적용하여 이해될 수 있다.

- [0345] 본 발명의 다른 목적은, 이를 필요로 하는 환자의 종양 환경에서 면역 억제 감소 방법이며, 이는 본 발명의 단백질의 약학적으로 유효한 양을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0346] 본 발명의 다른 목적은 이를 필요로 하는 환자의 면역 체계 강화를 위한 방법이며, 이는 본 발명의 단백질의 약학적으로 유효한 양을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0347] 본 발명의 다른 목적은 이를 필요로 하는 환자의 인간 Tregs의 면역 억제 기능일 저해하는 방법이며, 이는 본 발명의 단백질의 유효한 양을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0348] 본 발명의 다른 목적은, 이를 필요로 하는 환자에서 암을 치료 대상에게 본 발명의 단백질의 치료학적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 방법이다.
- [0349] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 약학적 조성물은 암 환자의 치료를 위한 면역 항체로 투여되는 것을 특징으로, 이를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법이다.
- [0350] 본 발명의 다른 목적은 이를 필요로 하는 환자에게 암 치료를 위한 방법이며, 이는 환자에게 약학적으로 유효한 양의 본 발명의 단백질을 암 또는 면역 요법제의 다른 치료와 조합하여 투여하는 것을 포함한다.
- [0351] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 단백질 또는 암의 치료 또는 암 치료에 사용하기 위한 또 다른 면역 제제에 대한 다른 치료의 조합이다.
- [0352] 본 발명의 실시예에서, 상기 면역 요법제는 종양 백신이다.
- [0353] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 면역 요법제는 면역 항체(immunostimulatory antibody)이다.
- [0354] 이론에 구속될 의지 없이, 본 발명자들은 본 발명의 단백질이 종양 환경에서 면역억제를 예방할 것이며, 이는 면역 요법제의 효과를 증가시키는 것이다.
- [0355] 다양한 암이 본 발명에 의해 치료될 수 있으며, 예로, 심피질 암종, 향문암, 방광암, 뇌종양, 신경 교종, 유방암, 카르시노이드 종양, 자궁 경부암, 대장암, 자궁 내막 암, 식도암, 간외담도암, 유잉 조양, 두개 외 생식 세포 종양, 눈 암, 담낭암, 위암, 생식세포 종양, 임신성 용모암, 두경부암, 하인두암, 췌도세포암종, 신장암, 후두암, 백혈병, 입술구강암, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 중피종, 메르켈세포암, 전이성 편평 머리 및 목암, 골수종, 종양, 인두암, 신경 아세포종, 구강암, 인두암, 골육종, 난소암, 암, 췌장암, 부비동 및 비강암, 갑상샘암, 음경암, 갈색 세포종 폐암, 뇌하수체암, 형질세포 종양, 전립선암, 횡문근육종, 대장암, 신세포암, 타액선암, 피부암, 카포시 육종, T 세포 림프종, 연조직육종, 위암, 고환암, 흉선, 갑성선암, 요도암, 자궁암, 질암, 외음부암, 또는 윌름스 종양이다.
- [0356] 당 업계에 공지된 종양 백신으로 사용하기 적합 종양 항원은, 예를 들어 하기를 포함한다: (a) 암-고환 항원 예를 들어, NY-ESO-1, SSX2, SCP1 뿐만 아니라, RAGE, BAGE, GAGE 및 MAGE 패밀리를 포함하는 폴리펩타이드, 예를 들어, GAGE-1, GAGE-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, 및 MAGE-12(이는 흑색종, 폐암, 머리 및 목, 비소 세포 폐암, 유방암, 위장, 방광 종양을 해결하는데 사용될 수 있다.), (b) 돌연변이된 항원, 예를 들어, p53(다양한 고형 종양 관련, 예를 들어 대장암, 폐암, 두경부암), p21/Ras(예를 들면, 흑색종, 췌장암, 대장암과 관련된), CD4(예를 들면, 흑색종과 관련된), MUM1(예를 들어 흑색종과 관련된), caspase-8(예를 들어 두경부암과 관련된), CIA 0205(예를 들어 방광암과 관련된), HLA-A2-R1701, 베타 카테닌(예를 들어, 흑색종과 관련된), TCR(예를 들어, T 세포 비-호지킨 림프종과 관련된), BCR-abl(예를 들어 만성 골수성 백혈병과 관련된), triosephosphate isomerase, IA 0205, CDC-27, 및 LDLR- FUT, (c) 항원 과발현, 예를 들면, Galectin 4(예를 들어 대장암과 관련된), Galectin 9(예를 들어 호지킨 질환과 관련된), proteinase 3(예를 들어 만성 골수성 백혈병과 관련된), WT 1(예를 들어 다양한 백혈병과 관련된), 탄산 탈수효소(예를 들어 신장암과 관련된), aldolase A(예를 들어 폐암과 관련된), PRAME(예를 들어 흑색종과 관련된), HER-2/neu(예를 들어, 유방, 결장 폐 및 난소암과 관련된), 알파페토프로테인(예를 들어 간암과 관련된), SA(예를 들어 대장암과 관련된), 가스 트린(예를 들어 췌장암 및 위암과 관련된), 텔로머라제 촉매 단백질, MUC-1(예를 들어 유방 및 난소암과 관련된), G-250(예를 들어 신장세포암종과 관련된), 및 암배항원(예를 들어 유방암, 폐암 alv 대장암과 같은 위장관 암 관련된), (d) 항원에 공유, 예를 들어, 흑색종-멜라노 분화 항원, 예를 들어 MART-1/Melan A, gp100, MC1R, 멜라닌 세포 자극 호르몬 수용체, 티로시나아제, 티로시나아제 관련 단백질- 1/TRP1 및 티로시나아제 관련 단백질-2/TRP/2(예를 들어 흑색종과 관련된), (e) 전립선과 관련된 항원 예를 들어, PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-

P1, PSM-P2, 예를 들어 전린선 암과 관련된, (f) 면역 글로불린 유전자형(예를 들어, 골수종 및 B 세포 림프종과 관련된), 및 (g) 다른 종양 항원, 예를 들어 폴리펩타이드- 및 사카라이드-포함 항원을 포함하는 (i) 당단백 예를 들어, sialyl Tn 및 sialyl Le^x(예를 들어, 유방암 및 대장암과 관련된), 뿐만 아니라 다양한 무친(mucins); 당단백질은 담체 단백질에 결합될 수 있다(예를 들어 MUC-1은 LH에 결합될 수 있다); (ii) lipopolypeptides(예를 들어, MUC-1 지질은 지질 모이어티와 관련된); (iii) 다당류(예를 들면, 글로보 H 합성 헥사사카라이드), 이는 담체 단백질에 결합될 수 있다(예를 들어, KLH에), (iv) 강글리오사이드 예를 들어, GM2, GM12, GD2, GD3(예를 들어, 뇌, 폐암, 흑색종과 관련된), 이는 담체 단백질에 결합될 수 있다(예를 들어, KLH에). 다른 종양 항원, 하기를 포함하는 pi 5, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH- IGK, MYL-RAR, 엡스타인 바 바이러스 항원, EBNA, 인간 유두종 바이러스 (HPV) 항원, E6 및 E7, 간염 B 및 C 바이러스 항원을 포함, 인간 T-세포 림프친화 바이러스 항원, TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, mn-23H 1, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, p 16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29#BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68#WKP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV 18, NB/70K, NY-CO- 1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90(Mac-2 결합 단백질/시클로필린의 C-관련 단백질), TAAL6, TAG72, TLP, TPS, 및 기타.

- [0357] 적합한 면역조절성(immunostimulatory) 항체는 하기를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다: 항-CTLA-4, 항-PD1, 항-PDL1 및 항-KIR 항체.
- [0358] 본 발명의 실시예에서, 암 치료가 필요한 개체를 위한 방법은, 또 다른 항암제 또는 화학요법 치료와 같은 암치료 이전에, 동시에 및/또는 후에, 본 발명의 단백질을 개체에 투여하는 것을 포함한다.
- [0359] 또 다른 본 발명의 목적은 본 발명의 치료적으로 효과적인 양의 단백질을 개체에 투여하는 것을 포함하며, HIV, 말라리아, 또는 에볼라와 같은 질병의 감염을 막거나 또는 이러한 감염에 대한 백신화(vaccination)를 증가시키기 위한 방법을 제공하는 것이다.
- [0360] 본 발명의 실시예에서, 본 발명의 단백질은 실험관 내 또는 생체 내에서 GARP를 발현시키는 샘플, 조직, 기관을 확인하기 위해 사용될 수 있다.
- [0361] 본 발명의 단백질에 사용될 수 있는 시험의 예는 ELISA, 샌드위치 ELISA, RIA, FACS, 면역조직화학, 웨스턴 블롯, 및 면역침강법을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0362] 본 발명의 실시예에서, 샘플은 생물학적 샘플이다. 생물학적 샘플의 예로는 체액, 바람직하게 혈액, 더 바람직하게 혈액 혈청, 혈장, 포화 유체(synovial fluid), 기관지 폐포 세척액(bronchoalveolar lavage fluid), 가래(sputum), 림프액(lymph), 복수액(ascitic fluids), 소변, 양수(amniotic fluid), 복막액(peritoneal fluid), 뇌척수액(cerebrospinal fluid), 흉수(pleural fluid), 심낭액(pericardial fluid), 및 폐포 대식세포(alveolar macrophages), 조직 용리물 및 질병에 걸린 조직으로부터 준비된 추출물을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0363] 본 발명의 실시예에서, 용어 "샘플(sample)"은 어떠한 분석의 전에 개체로부터 수득한 샘플을 의미한다.
- [0364] 또 다른 실시예에서, 본 발명의 단백질은 진단 또는 검출의 목적으로 표지될 수 있다. 표지(labeled)는 화합물의 검출을 하도록 최소 하나의 요소, 동위원소 또는 화학적 화합물에 결합하는 화합물을 의미한다. 표지의 예로, 방사성 또는 헤비 동위원소; 자기성, 전자성 또는 열성 표지 및 컬러 또는 발광성 염료를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 예를 들면: lanthanide complexes, quantum dots, fluorescein, rhodamine, tetramethylrhodamine, eosin, erythrosin, coumarin, methyl-coumarins, pyrene, malachite green, stilbene, Lucifer yellow, cascade blue, texas red, alexa dyes, cy dyes이다.
- [0365] 본 발명의 하나의 목적은 본 발명의 단백질의 용도에 기초한 샘플에서 활성화된 Tregs를 확인하기 위한 방법을 제공하는 것이다.
- [0366] 또 다른 본 발명의 목적은 본 발명의 단백질의 용도에 기초한 수용성 또는 복합된 잠재적인(latent) TGFβ를 확인하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0367] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 최소 하나의 단백질을 포함하는 키트를 제공하는 것이다.
- [0368] "키트"는 최소 하나의 시약을 포함하는 어떠한 제작(예를 들면, 패키지 또는 컨테이너)을 의미하는데, 즉, 예를 들면 항체, 구체적으로 GARP의 발현을 검출하는 것이다. 상기 키트는 본 발명의 방법을 수행하기 위한 유닛으로서 개선되고, 배포되거나, 구매될 수 있다. 게다가, 키트 시약의 일부 또는 전부는 봉합된 컨테이너와 같

이 외부적인 환경으로부터 이를 보호하는 컨테이너의 형태로 제공될 수 있다. 상기 키트는 이의 사용을 위하여 키트 및 방법을 설명하는 패키지 삽입물을 포함할 수 있다.

[0369] 본 발명의 샌드위치 ELISA 방법을 수행하기 위한 키트는 일반적으로 캡처 항체, 선택적으로 고체 지지대(예를 들면, microtiter 플레이트)에 고정된, 및 HRP, 형광 표지, 방사성동위원소, 베타-갈락토시다제, 및 알카라인 포스파타제와 같은 검출이 가능한 물질에 연결된 적절한 항체를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0370] **도 1. 세포 표면에서 인간 GARP를 인식하는 새로운 단일클론 항체**

인간 GARP(hGARP)로 형질전환 되거나 되지 않은, 쥐과 BS5147 세포는 바이오티화 in-house >hGARP 항체 (MHGARP1 내지 9) 및 스트렙타비딘-PE(SA-PE, 위쪽 패널), 또는 상업적인 항-hGARP 항체(클론 Plato-1), AlexaFluor 488(AF488, 아래쪽 패널)에 결합된 이차 항-마우스 IgG2b로 염색되었다.

도 2. MHGARP8은 인간 Treg 클론에 의한 활성 TGFβ 생성을 저해함.

클론 Treg A1은 >CD3/CD28 항체 단독 또는 표시된 >hGARp mAbs(20 μg/ml)의 존재에서 24시간 동안 자극되었다:

- (A) >pSMAD2 및 >β-ACTIN 항체로 WB에 의해 분석된 세포 용리물;
- (B) A에 나타난 WB의 ECL 결과의 정량.

도 3. (A) >hGARP 항체에 의한 결합을 위해 필요한 hGARP 단백질의 영역.

왼쪽에 도식화된 HA-태그된 단백질을 발현하는 쥐과 BW5147 T 세포는 >hGARP(MHGARP1 내지 9, 도면의 위쪽에 표시된 것으로) 또는 >HA 항체로 염색되었고, 유동 세포분석법(flow cytometry)으로 분석되었다. 히스토그램은 살아있는 세포에서 측정되었다. FACS 결과에 기초하여, 다양한 MHGARP mAbs에 의한 결합에 필요한 영역들이 확인되었고 HA-태그된 키메라의 대표를 넘어서는 수평적인 바(horizontal bar)에 의해 표시되었다.

(B) MHGARP-8에 의해 인식되는 에피토프의 존재도는 TGF-β1의 과발현에 따라 증가함.

모체 BW5127 T 세포(형질전환되지 않은 BW 세포) 또는 hGARP 단독(BW+hGARP) 또는 hTGFβ1(BW+hGARP+hTGFβ1)으로 안정적으로 형질전환된 클론들은 A, 또는 >mLAP-AF647 또는 >hLAP-APC 항체에서 염색되었고, 유동 세포 분석법으로 분석되었다.

(C) MHGARP-1, -2, -3, -4 및 -5는 자유 hGARP를 인식하지만, TGF-β1에 결합하기 위한 hGARP는 인식하지 않음.

모체 BW5147 T 세포 또는 hGARp 및 hTGFβ1으로 안정적으로 형질전환된 클론으로부터의 세포 용리물은 >hGARP mAbs(MHGARP 1 내지 9, 도면의 위쪽에 표시된)으로 면역침강되었다. 세포 용리물(30% 인풋) 또는 IP 생성물은 상업적으로 이용가능한 >hGARP mAb(클론 Plato-1, 위쪽 패널) 및 pro-TGF-β1을 50 kDa 밴드에서 검출하고 성숙한 TGF-β1을 13 kDa 밴드에서 검출하는(아래쪽 패널), TGF-β1의 C-말단 에피토프에 직접적인 항체를 이용하여 웨스턴 블롯으로 분석되었다. *비특이적인 생성물은 형질전환되지 않은 세포에서 검출되었다.

(D) hGARP-형질전환된 293T 세포에서 hTGFβ1의 과발현은 MHGARP-1, -2, -3, -4, 및 -5의 결합을 감소시켰으나, MHGARP-8의 결합을 증가시킴.

293T 세포는 hGARP-암호화하는 플라스미드(0.25 μg)으로 공동-형질전환 되었고, 상기 hTGFβ1-암호화하는 플라스미드의 표시된 양, 및 모든 조건에서 형질전환된 DNA의 총 양을 2.5 μg이 되도록 공(empty) 플라스미드를 첨가하였다. 형질전환된 세포는 >hGARP mAbs(MHGARP1 내지 9, 도면의 위쪽에 표시된대로)로 염색되었고, 유동 세포 분석법으로 분석하였다.

(E) hGARP-형질유도된 JURKAT 세포에서 hTGFβ1의 발현억제는 MHGARP-8의 결합을 감소시킴.

hGARP로 형질유도되거나 되지 않은 JURKAT 세포는 TGFβ1 mRNA에 특이적인 siRNA(siTGFβ1) 또는 스크램블 siRNA 대조군으로 형질전환하였다. 형질전환된 세포는 >hGARP mAbs(MHGARP1 내지 9, 도면의 위쪽에 표시된대로) 또는 >hLAP 항체로 염색하여, 유동 세포분석법으로 분석하였다.

도 4. 세포 표면에서 hTGFβ1의 제시는 MHGARP8에 의한 결합을 위해 충분하지 않음.

293T 세포는 하기와 같이 형질전환하였고, >hLAP 항체 또는 MGARP8로 염색한 후, 유동 세포분석법으로 분석하였다:

- (A) hTGFβ1 구조체 없이, 왼쪽에 도식한 HA-태그된 단백질을 암호화하는 구조체로 형질전환;
- (B) hTGFβ1 구조체와 함께, 왼쪽에 도식한 HA-태그된 단백질을 암호화하는 구조체로 공동-형질전환.

도 5. MHGARP-2, -3, 및 -8의 결합은 hGARP의 137-138-139 아미노산이 필요함.

모체 BW5147 T 세포(형질전환되지 않은 BW) 또는 hGARP의 HA-태그된 형태를 암호화하는 플라스미드로 안정적으로 형질전환된 클론들은 표시된 >hGARP 또는 >HA 항체로 염색하였고, 유동 세포분석기로 분석하였다. 여기서 시험된 hGARP의 HA-태그된 형태는 hGARP의 20-662 aa(아미노산)(야생형, WT), 또는 101-141의 영역에 위치하는 3개의 아미노산이 mGARP에서 이에 대응되는 아미노산으로 치환된 그룹(Mut I, Mut II 및 Mut III)인 hGARP의 20-662 aa를 포함한다. hGARP-WT, -Mut I, -Mut II, -Mut III 및 mGAP의 101-141 영역의 아미노산 서열은 왼쪽에 표시하였다. 인간 및 마우스 GARP간에 차이가 있는 아미노산은 회색 수직적 박스로 표시되었고, Mut I, Mut II 및 Mut III에서 변형된 아미노산은 검은색 수평적 박스로 표시되었다.

도 6. MHGARP8은 생체 내에서 Treg 기능을 저해함.

0일째에, NSG 마우스의 표시된 그룹은 인간 Tregs와 조합된 형태거나 아닌 형태를 정맥 주사로 주입받았다. 그룹 III 및 IV의 마우스들은 -1일부터 시작하여 일주일에 한번 복강내로, MHGARP8 항체로 처리되었다. 수용체 마우스에서 GvHD 발달의 주목할 만한 증상은 이주 간격으로 모니터링 하였다. GvHD 점수는 무게 감소(0: <10%; 1: 10%-20%; 2: >20%; 3: >30%), 빈혈(0: red or pink tail; 1: white tail), 자세(0: 정상; 1: 혹(hump)), 일반적인 활동성(0: 정상; 1: 제한된), 탈모 (0: 없음; 1: 있음) 및 황달(icterus) (0: white or red tail; 1: yellow tail)에 기초하여 확립하였다. 최대한의 질병 심각성 또는 죽음은 7의 점수에 상응하였다.

- (A) 실험 1. 수치는 평균 점수를 나타낸다;
- (B) 실험 2. 수치는 평균 점수+SEM을 나타낸다.

도 7. 새로운 항-hGARP mAbs.

- (A) 항-hGARP mAbs를 얻기 위해 사용된 실험적 전략의 개략적인 표현.
- (B) 클론 ThA2(hGARP를 발현하지 않는 인간 CD4+ Th 세포) 또는 바이오틴화된 MHG-1 내지 -14 mAbs 및 PE에 결합된 스트렙타비딘(SA-PE), LHG-1 내지 -17 mAbs, PE에 결합된 이차 항-hIgG1 항체, 또는 상업적으로 이용가능한 항-hGARP mAb(클론 Plato-1) 및 AF647에 결합된 이차 항-mIgG2b 항체로 염색로 염색된 후 hGARP로 형질유도된 ThA2 세포의 유동 세포분석법.

도 8. 면역화된 라마의 면역 반응.

- (A) 면역화된 라마의 DNA로부터의 면역 반응을 나타냄.
- (B) hGARP/hTGFβ를 발현하는 BW 세포로 면역화된 라마의 면역 반응을 나타냄.

도 9. FACS를 이용한 세포에서 시노몰구스(cynomolgus) GARP-TGFβ에 대한 교차-반응성 측정.

293E 세포는 인간/시노 GARP 및 인간/시노 TGFβ로 형질전환되었다. LHG-10-D 및 친화도가 최적화된 변이체들은 시노몰구스 GARP-TGFβ 과 교차-반응성이 있었다.

도 10. LHG-10 항체의 서열 및 그것의 셔플 변이종(shuffle variants).

도 11. MHGARP8 및 LHG-10는 인간 트레그(human Tregs)에 의해 활성화 TGF-β의 생성을 억제한다. 짧은 시험관 내(in vitro) 증폭 후에, 인간 CD4+CD25hiCD127lo 세포 트레그(Tregs)를 지적된 mAbs (10 μg/ml)의 존재 또는 부재에서, 24시간 동안 항-CD3/CD28 코팅된 비드로 재-자극하였다. 세포 용해물을 활성화 TGF-β 생성을 위해 읽는 것으로서, 인산화된 SMAD2 (pSMAD2), 또는 β-ACTIN (로딩 컨트롤(loadng control))에 대한 항체로 웨스턴 블랏하여 분석하였다.

도 12. MHGARP8 및 LHG-10는 시험관 내(in vitro) 인간 트레그(Tregs)의 억제 활성을 억제하였다. (A) 신선하게 분리된 인간 CD4+CD25-CD127hi 세포 (Th; 마이크로 웰 당 2x10⁴)를 1/1 트레그 대 Th 비율로 단독 또는 클론 트레그 A1 (Stockis, J. et al. Eur. J. Immunol. 2009, 39:869-882)로 분주하였다. 세포를 지적된 항-hGARP

mAbs (10 µg/ml)의 존재 또는 부재하에서, 코팅된 항-CD3 및 수용성 항-CD28로 자극하였다. 3H-티미딘 (Thymidine)(3H-Thy)를 4일 배양의 마지막 16 시간동안에 첨가하였고 결합(incorporation)을 증식에 대하여 읽는 신틸레이션 계수기(scintillation counter)로 측정하였다. 바 히스토그램(Bar histogram)은 kcpm (3회 (triplicates)의 평균 + SD)를 나타낸다. 클론 트레그 A1은 Th 세포 (Treg 단독: 0,5±0,04 kcpm)의 부재에서 증식하지 않았다. 트레그(Tregs)의 존재에서 Th 증식의 억제는 상기 각각의 검은색 바(black bar)로 나타내고 하기와 같이 계산된다: % 억제 = 1- (kcpm (Th 단독) / kcpm (Th + Treg)). (B) 클론 ThA2 세포 (Th; 마이크로 웰 당 1x10⁴)를 MHGARP8 (MHG-8), 항-hTGF-β1 mAb (클론 1D11) 또는 an 동형(isotype) control (mIgG1)의 존재 또는 부재하에서, 지적된 트레그 대 Th 비율에서 클론 트레그 A1로 분주하였다. 자극, 증식의 측정 및 억제 계산을 A에서와 같이 수행하였다.

도 13. 항서-GARP mAbs에 의해 결합된 GARP의 형태 및 영역. (A) GARP 및 GARP/TGF-β 복합체의 도식도. 단백질 GARP은 두꺼운 회색 곡선으로 대표된다. 숫자는 아미노산 위치를 나타낸다. TGF-β는 두꺼운 검은색 선으로 Latency Associated Peptide(LAP), 및 두꺼운 직선 회색으로서 성숙 TGF-β1 펩타이드를 대표한다. 가는 검은색 선은 체인간 이황화 결합(inter-chain disulfide bonds)를 대표한다. (B) 그그들의 결합 요구에 기초한 항-hGARP mAbs의 분류.

도 14. 항-hGARP mAbs의 3개의 균은 각각 자유 GARP 단독, 자유 GARP 및 GARP/TGF-β1 복합체, 또는 GARP/TGF-β1 복합체 단독에 결합한다. (A) hGARP 및 hTGFβ1로 형질감염된 BW 세포의 세포 용해물은 지적된 항-hGARP mAbs로 면역침전되었다. 총 용해물 (BW+hGARP+hTGFβ1 또는 비형질감염된 대조군) 및 IP 생성물을 hGARP (클론 Plato-1), LAP 또는 성숙 TGF-β 펩타이드에 대한 항체로 웨스턴 블랏하여 분석하였다. (B) hGARP, hTGFβ1 또는 모두로 비형질감염된 또는 형질감염된, 항-LAP-APC, 바이오티닐된 MHG mAbs 및 스트렙타비딘(streptavidin)-PE, 클론 Plato-1 및 >mIgG2b-AF647, 또는 LHG mAbs 및 >hIgG1-PE로 염색된, 293T 세포의 세포유동 분석.

도 15. MHG 및 LHG mAbs에 의한 결합에 요구되는 hGARP의 아미노산. (A) 왼쪽에 도식화된 HA-태그된 mGARP/hGARP 키메라를 암호화하는 플라스미드로 형질감염된 293T 세포의 세포유동 분석(숫자는 hGARP에서 아미노산 위치를 대표한다). 세포를 바이오티닐된 MHG mAbs 및 스트렙타비딘-PE, LHG mAbs 및 >hIgG1-PE, 또는 항-HA 및 >mIgG1-AF647로 염색하였다. hTGFβ1을 hGARP/hTGF-β1 복합체 단독 (LHG-3, MHGARP8 (MHG-8), LHG-10)에 결합하는 mAbs의 분석을 위하여 mGARP/hGARP 키메라로 공동-형질감염시켰다. (B) 상기에서와 같이, 293T 세포를 제외하고 전장 HA-태그된 hGARP의 돌연변이된 형태를 암호화하는 플라스미드로 형질감염되었다. 왼쪽 정렬에서 설명된 바와 같이, 각각 돌연변이에서, hGARP의 3 아미노산은 mGARP에서 발견된 3 아미노산에 의해 대체되었다(숫자는 hGARP에서 아미노산 위치를 대표한다).

도 16. 항-hGARP 생체내(in vivo)에 의한 인간 트레그 기능의 억제. (A) 는 인간 트레그(Tregs)로 조합되거나 또는 조합되지 않은, 인간 PBMCs의 i.v. 주사된 NSG 마우스의 지적된 군, 0일째에 프로토콜을 나타낸다. (B)는 군 (n) 당 지적된 수의 마우스가 있는, 기준자 A, B 또는 C로부터의 세포로 수행되는, 4 독립된 실험 (I 내지 IV)의 결과를 나타낸다. 질병 시작은 평균 질병 점수가 ≥1이 될 때 일(day)이고, 마우스가 PBMCs 단독 (군 a), PBMCs 및 트레그(Tregs) (군 b), 또는 PBMCs 및 트레그(Tregs) 및 MHGARP8 (MHG-8)(군 c)로 처리된 이식된 3 실험군에 대하여 지적된다. (C) 실험 IV로부터 자세한 결과는 마우스의 지적된 군에서 평균 질병 점수 (왼쪽) 및 생존 커브 (오른쪽)의 진화를 나타낸다. 군 b (PBMCs + 트레그(Tregs))과 c (PBMCs + 트레그(Tregs) + MHG-8)의 사이의 통계적 유의성 차이는 질병 점수 (p = 0.0001) 진행에 대하여 2-way 아노바 분석을 사용하고, 생존 (p = 0.0027)을 위해서는 Log-rank (Mantel-Cox) 테스트를 사용하여 계산하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0371]

[실시예]

[0372]

본 발명은 하기의 실시예에 의해 추가적으로 설명된다.

[0373]

실시예 1: 인간 GARP (>hGARP 단일항체)에 대한 신규 단일항체

[0374]

DBA/2 또는 Balb/c 마우스는 인간 GARP로 형질감염된 마우스 P1HTR 세포로 면역을 갖게되었다. 면역된 마우스로부터 혈청은 FACS에 의한 hGARP-나타내는 BW 세포에 결합을 위한 스크리닝에 의해, >hGARP 항체의 존재를 위해 테스트되었다. >hGARP 항체의 높은 타이터(titers)를 가지는 마우스로부터 비장세포(Splenocytes)를 SP2/neo 세포로 융합되었다. 하이브리도마(Hybridomas)는 HAT 배지에서 선별되었고 한계희석(limiting dilution)하에서 클론되었다. +/- 1600 하이브리도마클론의 상등액은 hGARP-나타내는 BW 세포에 항체 결합의 존재를 위하여

FACS에 의해 스크리닝되었다. 상기 스크리닝에서 >hGARP 단일항체를 생성하는 38 클론을 확인하였다. 9개 클론은 9 신규 >hGARP 단일항체 (MHGARP1 내지 9)의 대량 규모-생성 및 정제를 위하여 선별되었고 증폭되었다.

[0375] 도 1에서 나타난 바와 같이, MHGARP1 내지 9는 비형질감염된 세포에 결합하는 것이 아니라, hGARP로 형질감염된 마우스 BW5147 세포에 결합한다. MHGARP1 내지 9는 또한 hGARP로 형질감염된 293T 세포에 결합하고 3개의 인간 T 세포 주 (클론 Th A2 및 Jurkat)는 해당하는 부모 세포가 아니라(나타내지 않음), hGARP-암호화하는 렌티바이러스로 변환된다. 상기 인식 패턴은 양성 대조군(positive control)로서 여기에서 사용된 상업적으로 활용가능한 >hGARP mAb (클론 Plato-1)의 것과 일치한다. 상기 결과는 MHGARP1 내지 9가 세포 표면에서 hGARP를 인식하는 것을 나타낸다.

[0376] 도 7에서 나타난 바와 같이, 5개 추가 MHGARP 항체를 생성하고 및 정제하였다. MHGARP 항체 (도에서 MHG-1 내지 -14)는 결합 클론 ThA2 (hGARP를 나타내지 않는, 인간 CD4+ T 헬퍼(helper) 세포)에 결합하지 않고, hGARP로 형질변환(형질변환된(transduced))된 ThA2에 결합한다.

[0377] 실시예 2: 12개의 다른 >hGARP 단일항체의 아무것도 억제하지 않으나, MHGARP8는 인간 트레그 세포에 의해 활성 TGF-β 생성을 억제한다

[0378] 20 μg/ml의 >hGARP 단일클론 항체의 존재 또는 부재에서, 인간 트레그 클론 (1E+06 세포/ml)을 코팅된 항-CD3 (1 μg/ml) 및 수용성 항-CD28 (1 μg/ml) 항체가 있는 혈청-없는 배지에서 자극하였다. 13개 >hGARP 단일항체를 이러한 분석에서 테스트하였다: 본 발명의 9 개 신규 단일항체 (MHGARP1 내지 9), 및 상업적으로 활용가능한 항체 클론 Plato-1 (Enzo Life Sciences, catalog No. ALX-804-867), 272G6 (Synaptic Systems, catalog No. 221 111), 50G10 (Synaptic Systems, catalog No. 221 011) 및 7B11 (BioLegend, catalog No. 352501). 세포를 24 시간 후에 수득하였고, 용해(lyse)하였고 환원조건하에서 SDS-PAGE를 하였다. 젤(Gels)을 iBlot 시스템 (Life Technologies)으로 니트로셀룰로오스멤브린에 블랏하였다. 차단(blocking)후에, 멤브린을 인산화된 SMAD2 (pSMAD2, Cell Signaling Technologies) 또는 β-ACTIN (SIGMA)에 대한 1차 항체로 하이브리드화(hybridize)한 후, 2차 HRP-결합 항체로 하이브리드화하고 증강 화학발광(Enhanced ChemiLuminescent) (ECL) 기질 (ThermoFisher Scientific)으로 나타냈다. pSMAD2의 존재는 자극된 트레그 클론에 의해 활성 TGF-β 1의 생성을 나타낸다. ECL 신호를 이미지 J 소프트웨어를 사용하여, 방사능사진에 있는 55 kDa pSMAD2 및 40 kDa β-ACTIN 밴드의 농도를 측정하여 측정하였다.

[0379] hGARP가 TCR-자극된 트레그 세포에 의한 활성 TGF-β 생성에 요구되는지 조사하기 위하여 본 발명의 T 세포 수용체 (TCR), 단독 또는 >hGARP mAbs의 존재에서, T 세포 receptor (TCR)을 통하여 인간 트레그 클론을 자극하였다. 자극된 트레그(Tregs)에 의해 생성된 활성 TGF-β는 SMAD2 및 SMAD3 전사인자의 인산화 및 활성을 유도하는, 자가분비 신호를 시작한다. 웨스턴 블랏 (WB)에 의하여 인산화된 SMAD2 (pSMAD2)의 존재를 측정하였고, 이것은 자극된 트레그 클론에 의한 활성 TGF-β 생성을 나타낸다. 도 2에서 나타난 바와 같이, pSMAD2는 MHGARP8의 존재에서 10 배(fold) 이상 감소되었다. 이러한 감소는 여기에서 양성 대조군으로서 사용된 것처럼, 항-TGF-β mAb의 존재에서 관찰된 것과 유사하다. 12개의 다른 >hGARP mAbs (8개의 다른 내부 생성된 MHGARP 및 4개의 상업적으로 활용가능한 항-GARP 항체)는 트레그 클론에 의해 활성 TGF-β 생성을 억제하지 않았다. 모두 합하면, 본 발명의 데이터는 GARP가 hGARP에 대한 항체인 MHGARP8으로서, 인간 트레그(Tregs)에 의한 활성 TGF-β 생성을 요구하고, 활성 TGF-β 생성을 방지한다는 것을 나타낸다.

[0380] 실시예 3: 다른 >hGARP mAbs가 아닌, MHGARP8은 TGF-β의 존재를 요구하는 형태의 항원결정기(conformational epitope)를 인식한다.

[0381] **>hGARP 단일항체에 의한 인식된 영역을 맵핑**

[0382] 마우스 BW5147 T 세포를 hGARP, mGARP 또는 mGARP/hGARP 키메라에 해당하는, 도 3A에 도식화된 HA-태그된 단백질질을 암호화하는 플라스미드로 전기천공하였다. 네오마이신(neomycin)으로 선별된 안정적 클론(stable clone)을 바이오티닐된 항-hGARP 항체 (>hGARP1 내지 9) 및 스트렙타비딘(streptavidin)-PE으로, 상업용 항-hGARP 항체 (클론 Plato-1) 및 2차 항-mIgG2b-AF488, 또는 항-HA 항체 및 2차 항-마우스 IgG1-AF488으로 염색하였다. 히스토그램은 살아있는 세포에 열려있다. 검은색 히스토그램은 비형질감염된 BW 세포에 대해 신호를 나타내고, 흰색 히스토그램은 HA-태그된 hGARP를 표현하는 BW 세포에 대한 신호를 나타내고, 회색 히스토그램은 HA-태그된 mGARP 또는 mGARP/hGARP 키메라를 표현하는 BW 세포에서 신호를 나타낸다.

[0383] hGARP 단독 (BW + hGARP) 또는 hTGFβ1 (BW + hGARP + hTGF-β 1)으로 안정적으로 형질감염된 부모 BW5147 T 세포 (BW 비-형질감염된) 또는 클론을 바이오티닐된 항-hGARP 항체 (>hGARP1 내지 9) 및 스트렙타비딘

(streptavidin)-PE, 상업용 항-hGARP 항체 (클론 Plato-1) 및 2차 항-mIgG2b-AF488, 또는 >mLAP-AF647 또는 >hLAP-APC 항체로 염색하였다.

- [0384] 다른 >hGARP mAbs가 아닌, MHGARP8이 트레그(Tregs)에 의해 활성 TGF-β 생성을 억제하는, 기전을 조사하였다. MHGARP8은 다른 >hGARP mAbs에 의해 인식된 항원결정기로부터 구별되는 hGARP에서 항원결정기를 인식할 수도 있다고 예측하였다.
- [0385] MHGARP-1을 배제하고, 본 발명의 MHGARP mAbs는 마우스 GARP (mGARP)를 인식하지 않는다. 따라서 본 발명의 mAbs에 의해 인식된 hGARP 영역을 인식하기 위하여 HA-태그된 hGARP, mGARP 또는 hGARP/mGARP 키메라를 암호화하는 플라스미드를 만들었다. 출원인은 마우스 BW 세포를 형질감염시켰고 HA-태그된 단백질을 나타내는 안정적 클론을 유래하였다(도 3에서 도식적으로 대표한다). >HA mAb으로 염색한 후에 유사한 형광 강도로 나타낸 바와 같이, 모든 클론은 표면 상에서 HA-태그된 단백질의 유사한 수준을 나타냈다(도 3A). 예상된 바와 같이, 모든 MHGARP mAbs는 HA-태그된 hGARP를 나타내는 클론에 결합한 반면에, MHGARP-1을 제외한, 나머지 모두는 HA-태그된 mGARP를 나타내는 클론에 결합하지 않는다. mAbs의 4개의 군은 HA-태그된 hGARP/mGARP 키메라에 대한 결합 분석으로부터 출현되었다(도 3A). 첫번째 군(MHGARP-6, -7 및 -9)에 있는 단일클론 항체는 키메라의 어느것에도 결합하지 않고, 이것은 이들이 aa 20과 hGARP (영역 20-101)의 101 사이에 위치한 항원결정기를 인식한다는 것을 나타낸다. 두번째 군(MHGARP-2, -3 및 -8)에 있는 mAbs는 5개의 키메라의 단독 1개에 결합하고 따라서 영역 101-141에서 항원결정기를 인식한다. 세번째 군은 키메라의 2개에 결합하는, MHGARP-5을 포함하고, 따라서 영역 141-207을 인식한다. 또한 상기 군은 아마도 교차-재활성(cross-reactive)이지만 mGARP 또는 3개 다른 키메라보다 더욱 효과적으로 상기 2개 키메라에 결합하는, MHGARP-1을 포함한다. 최종적으로, 4번째 군(MHGARP-4 및 Plato-1)에 있는 mAbs는 5개 키메라 중 4개에 결합하고, 따라서 영역 265-333을 인식한다.
- [0386] 상기에 기초하여, 발명자는 hGARP 단백질의 4개의 구별되는 영역을 인식하는 4 페밀리의 항체로 >hGARP mAbs를 그룹화한다. 중화 활성을 나타내는, MHGARP-8은 영역 101-141에 결합한다. 또한 상기 영역은 중화되지 않은, MHGARP-2 및 -3에 의해 인식된다. 따라서, 영역 101-141에 결합하는 능력은 중화 활성을 수여하는데 충분하지 않다.
- [0387] MHGARP-2, -3 및 -8에 의해 인식된 항원결정기를 추가적으로 정의하기 위해서, 발명자는 hGARP 단독(BW+hGARP), 또는 hGARP 및 hTGF-β1 (BW+hGARP+hTGF-β1)을 나타내는 BW 세포의 클론에 >hGARP 항체의 결합을 비교하였다. MHGARP8의 주목할만한 예외로, 모든 >hGARP 항체를 BW+hGARP로서 동일한 강도를 가지는 BW+hGARP+hTGF-β1으로 염색하였고, 이는 2개의 클론은 세포 표면에서 hGARP의 동일한 수준을 나타낸다. 반대로 MHGARP8 항체는, BW+hGARP보다 더 강하게 BW+hGARP+hTGF-β1을 염색하였다(도 3B). 이는 비록 hGARP 수준이 2개의 클론에서 유사하지만, MHGARP8에 의해 인식된 항원결정기는 BW+hGARP 세포보다 BW+hGARP+hTGF-β1에서 더 풍부하다는 것을 나타낸다.
- [0388] 이러한 관찰에 대한 그럴듯한 설명은 hGARP가 마우스 (m) 또는 인간 (h) TGF-β1에 결합할 때 MHGARP8에 의해 인식된 항원결정기는 단독으로 나타낸다는 것이다. 이것은 2개의 기전 중 하나에 기인한 것이다: 항원결정기는 모두 hGARP 및 TGF-β1 (혼합된 형태의 항원결정기(epitope))로부터 아미노산을 포함하거나, 또는 이것은 hGARP 단독으로부터 아미노산을 포함하거나, TGF-β1 (결합-유도된 형태의 항원결정기)의 존재에서 상이한 형태를 적용한다. BW 세포는 마우스 TGF-β1을 표현하고, 마우스 TGF-β1은 hGARP에 결합한다(도 3B). 따라서, BW+hGARP (형질감염된 hTGF-β1의 부재에서)에 대한 MHGARP8의 결합은 hGARP/mTGF-β1 복합체의 인식에 기인할 수 있다.
- [0389]
- [0390] TGF-β1에 결합할 때 MHGARP8이 GARP를 인식한다는 가설을 탐험하기 위해서, 발명자는 공동-면역침강 실험을 수행하였다. 발명자는 BW+hGARP+hTGF-β1 세포로부터 GARP를 면역침전하기 위해서 상이한 항-GARP 항체를 사용하였고, 그런 다음 TGF-β가 GARP로 공동-면역침전하였다. 도 3C에서 나타낸 바와 같이, 모든 항-GARP 항체는 GARP를 효과적으로 면역침전하였다(도 3C, top panels). TGF-β1의 공동-면역침강은 MHGARP-6, -7, -8, 및 -9 mAbs으로 관찰되었고, 이는 상기 항체가 TGF-β1에 결합된 GARP에 결합한다는 것을 나타낸다. 반대로, HGARP-1, -2, -3, -4 및 -5는 다른 항-GARP mAbs만큼 효과적으로 GARP를 면역침전시켰으나, 이들은 TGF-β를 공동-면역침전하지 않았다(도 3C, 맨아래 패널). 이것은 MHGARP-1, -2, -3, -4 및 -5가 TGF-β에 결합하는 GARP이 아닌 자유 GARP를 인식한다는 것을 나타낸다. 이것은 결합을 위하여 GARP101-141 영역을 요구하는, MHGARP-2 및 -3가 자유 GARP를 인식하나, 반면에 GARP101-141을 또한 요구하는, 중화 MHGARP8은 TGF-β에 결합하는 GARP를 인식한다는 것을 나타내는 것이 중요하다.

- [0391] 이러한 관찰을 확인하기 위하여, 발명자는 증가하는 양의 hTGF β 1로 hGARP를 공동-형질감염(co-transfect) 하기 위하여, 낮은 수준의 내생(endogenous) TGF- β 1을 나타내는, 293T 세포를 사용하였다(도 3D). MHGARP-1, -2, -3, -4 및 -5의 결합은 hTGF β 1가 hGARP로 공동-형질감염되었을 때 농도-의존적(dose-dependently)으로 감소시켰다. 이것은 가장 높은 용량의 hTGF β 1에서 완전히 소멸되었다. 이것은 MHGARP-1 내지 -5가 단독 자유 GARP에 결합한다는 것을 확인한다. MHGARP-6, -7, 및 -9의 결합은 hTGF β 1의 공동-형질감염에 의해 수정되지 않고, 이는 이것이 TGF- β 1 (즉, 이것들은 자유 GARP 및 TGF- β 1에 결합된 GARP 모두에 결합)에 결합하는지 안하는지 상기 mAbs가 hGARP에 결합한다는 것을 나타낸다. 정반대로, MHGARP8에 결합은 hTGF β 1가 hGARP로 공동-형질감염되었을 때 농도-의존적(dose-dependently)으로 증가된다. 이는 모든 다른 항체에 반대로, 단지 GARP이 TGF- β 1에 결합하는 것이 아니라, MHGARP8이 자유 GARP에 결합하지 않는다는 것을 다시 제안한다.
- [0392] MHGARP8 결합이 TGF- β 1의 존재를 요구한다는 것을 나타내기 위하여, 발명자는 hGARP로 형질변환된(transduced) Jurkat 세포에서 TGF β 1의 발현을 침묵시키기 위해 siRNAs를 사용하였다(도 3E). TGF β 1 mRNA에 대한 siRNA는 Jurkat+hGARP 세포에서 검출된 표면 LAP에서 감소하여 설명된 것과 같이, TGF- β 1의 발현을 효과적으로 감소시켰다(도 3E, 오른쪽 panel). Jurkat+hGARP에서 TGF- β 1의 감소된 발현은 MHGARP8 항체의 결합을 감소시켰으나, 다른 항-GARP 항체의 결합을 수정하지 않았다(도 3E, 전경 히스토그램). 이것은 다른 항-GARP 항체에 반대로, MHGARP8는 자유 GARP에 결합하지 않으나, TGF- β 1의 존재에서 GARP에 단독 결합한다.
- [0393] 최종적으로, 발명자는, hGARP 발현에 관계 없이, 세포 표면에서 TGF- β 의 배출이 MHGARP8에 의한 결합에 충분하다는 가설과 같지 않다는 것을 제외하도록 노력해야 한다. 달리 말하면, 발명자는 MHGARP8가 hGARP 및 TGF- β 모두의 발현을 요구하는 혼합되거나 또는 결합-유도된 형태의 항원결정기를 인식한다는 것을 나타내도록 노력해야 한다. 그러기 위해서는, 발명자는 hTGF- β 1을 암호화하는 구성체이거나 또는 없이, 상기에서 언급된 hGARP, mGARP 또는 the hGARP/mGARP 키메라를 암호화 하는 구성체로 형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 MHGARP8 항체의 결합, 및 >hLAP 항체로 세포 표면 상에 hTGF- β 1의 존재를 측정하기 위하여 FACS로 분석하였다(도 4). 비형질감염된 세포와 비교하여, hGARP의 형질감염(transfection), mGARP 또는 hGARP/mGARP 구성물 단독 (hTGF β 1가 아님)은 내생(endogenous) hTGF β 1 발현의 낮은 수준에 기인하여, 표면 LAP의 낮은 수준을 유도하였다(도 4A, 왼쪽). 표면 LAP 수준은 hGARP, mGARP, 또는 임의의 hGARP/mGARP 구성체로 형질감염된 세포에서 hTGF β 1의 형질감염에 극적으로 증가되었다(도 4B, 왼쪽 히스토그램). 상기는 hTGF- β 1이 hGARP, mGARP 및 모든 hGARP/mGARP 키메라에 의해, 세포 표면에 존재된다는 것을 나타낸다. 중요하게, MHGARP8은 hGARP, 또는 hGARP의 아미노산 101 내지 141을 암호화하는 hGARP/mGARP 구성체로 단지 형질감염된 세포 표면에 결합한다(도 4A 및 4B, 오른쪽). 비록 상기 세포는 자체의 표면에 LAP의 높은 수준을 제시하지만(도 4B, 왼쪽), hGARP101-141을 암호화하지 않는 hTGF β 1 및 hGARP/mGARP 구성체로 형질감염된 세포나, hTGF β 1 및 mGARP로 형질감염된 세포에 결합하지 않는다(도 4B, 오른쪽). 상기는 세포 표면 (mGARP 또는 hGARP/mGARP 키메라에 의해)에 TGF- β 1의 발현은 MHGARP8에 의해 결합에 충분하지 않다는 것을 나타낸다. MHGARP8의 결합은 세포 표면 상에 hGARP (영역 101-141) 및 TGF- β 1 모두의 존재를 요구한다.
- [0394] 상기 지적된 바와 같이, MHGARP8은 mGARP에 결합하지 않는다. 이것은 아미노산 101 내지 141을 포함하는 영역을 요구하는 hGARP에 결합한다. MHGARP8에 의해 인식된 항원결정기를 추가적으로 정의하기 위하여, 발명자는 인간 및 마우스 GARP에서 영역 101-141의 서열을 비교한다. 상기 영역에서, 단지 13개의 아미노산은 hGARP과 mGARP 사이에서 상이하다(도 5, 회색 박스에 의해 하이라이트된 아미노산). 발명자는 hGARP의 3개 HA-태그된 돌연변이 형태를 만들었다. 각각 돌연변이 (Mut I, Mut II 및 Mut III)에서, 3개 연이은 아미노산은 mGARP 단백질의 해당하는 아미노산에 의해 대체되었다(도 5, 검은색 박스). 발명자는 야생형(WT) 또는 돌연변이 hGARP의 HA-태그된 형태로 형질감염된 BW 세포의 안정적 클론을 유래하였다. >HA 항체로 염색에 의해 나타낸 바와 같이, 모든 클론은 표면에 HA-태그된 단백질의 유사한 수준을 나타냈다(도 5, 히스토그램 on the 오른쪽). 그런 다음 발명자는 MHGARP-2, -3 및 -8, 즉, 결합을 위하여 hGARP의 영역 101-141을 요구하는 항체로 염색 후에 클론을 분석하였다. 세개의 항체는 WT, Mut I 및 Mut II 형태의 hGARP을 나타내는 세포에 결합한다. 반대로, 결합은 Mut III 형태의 hGARP을 나타내는 세포에서 크게 감소되었고, 이는 MHGARP-2, -3 및 -8은 결합을 위하여 hGARP의 아미노산 137-138-139을 요구한다는 것을 나타낸다.
- [0395] 모두 합하여, 본 발명의 데이터는 MHGARP8가 인간 트레그에 의해 활성 TGF- β 1 생성을 억제하는 단지 활용가능한 항-GARP 항체이다라는 것을 나타낸다. 이러한 중화 활성은 모든 다른 항-GARP 항체에 의해 결합하는 것으로부터 구별하는 항원결정기에 MHGARP8의 결합에 관련된다: MHGARP8의 결합은 hGARP의 영역 101-141 및 hTGF- β 의 존재 모두를 요구하는 반면에, 비-중화 항체의 결합은 hGARP (MHGARP-1, -4, -5, -6, -7 및 -9을 위하여)의 다른 영역을 요구하거나, 또는 TGF- β 1 (MHGARP-2 및 -3을 위하여)의 부재에서 단지 발생한다. 영역 hGARP101-

141에서, 아미노산 137 내지 139는 MHGARP-2, -3 및 -8의 결합을 위하여 요구된다.

[0396] 고정된 shGARP-TGFβ에 MHGARP8 항체의 친화도는 BIACOR 분석으로 측정되었다: 상기 항체의 Kd는 0.2 nM이다.

[0397] 실시예 4: MHGARP8는 생체내(in vivo) 인간 트레그 세포 기능을 억제한다

[0398] MHGARP8가 생체내(in vivo) 인간 트레그(Tregs)를 억제하는지를 조사하기 위하여, 발명자는 면역 반응 따위가 제대로 발휘되지 못하는 NOD-Scid-IL2Rg^{-/-} (NSG) 마우스로 인간 PBMCs의 운반에 의해 유도되는 이종(xenogeneic) GvHD의 모델을 사용하였다. NSG 마우스는 기능적 T, B 및 NK 세포가 부족하다. 이것은 수취인 마우스(recipient mice)에서 기능적 인간 면역 시스템을 증식하고 발생시키는, 인간 조혈 줄기 세포(HSCs)의 효율적 접종을 허용한다. 인간 PBMCs가 HSCs 대신에 사용될 때, T 세포의 효율적 접종이 발생하나, 이종(xenogeneic) 이식편대 숙주(Graft-versus-Host) 질병(GvHD) 발달에 의해 곧 동반된다. 이러한 모델에서, GvHD는 외부요인으로서 수취인 NSG 마우스의 조직을 인식하는 인간 기증자 세포독성 T 림프구의 활성으로부터 초래된다(Shultz, et al. Nature 2012, 12:786-798). GvHD의 심각성은 인간 PBMCs로 공동-운반하는 인간 트레그 세포에 의해 감소될 수 있다(Hannon et al. Transfusion 2014).

[0399] 인간 PBMCs는 농도 변화(gradients) (Lymphoprep™)에서 원심분리로 혈액소침착증 기증자의 총 혈액으로부터 분리되고, 나중에 사용을 위해서 냉동하였다. 자가유래 트레그(Tregs)는 하기와 같이 생성되었다: CD4⁺ T 세포를 osetteSep™ 인간 CD4⁺ T 세포 풍부 각테일(줄기세포 기술)을 사용하여 동일한 기증자의 혈액으로부터 분리하였고 플루오로크롬(fluorochromes)에 연결된 항-CD4, 항-CD25 및 항-CD127 항체로 염색하였다. CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} 세포를 유동세포분석(>99% 순도)로 분급(sorted)한 후 14 일 동안 IL-2 (120 IU/ml)의 존재에서 항-CD3/CD28 코팅된 비드(T-세포 확대 및 활성을 위한 Dyna비드® 인간 T-Activator CD3/CD28, Life Technologies)로 자극하였다. 상기 확대된 트레그 세포를 나중에 사용을 위해 냉동하였다.

[0400] NSG 마우스를 -1 일에 방사능치료를 (2.5 Gy)한 후, 인간 PBMCs (2.7x10⁶ per 마우스) 단독으로 꼬리 정맥에 주사하거나, 또는 0일에 확대된 인간 트레그(Tregs) (1.4x10⁶ per 마우스)로 혼합하였다. 마우스는 -1일에 MHGARP8 항체(일 -1 (일 minus 1)에 400 μg, 나중에 200 μg), 대조군 PBS의 i.p. 주사를 매주 받았다. 마우스를 본문에서 지적된 것처럼 GvHD 발달을 위하여 격주(bi-weekly)로 모니터하였다.

[0401] 발명자는 NSG 마우스에서 트레그(Tregs)가 있거나 없이 인간 PBMCs를 옮겼고, 마우스를 MHGARP8 항체 또는 대조군 PBS의 i.p. 주사로 처리하였다. 운반을 위한 많은 수의 인간 트레그 세포는 세포 유동 분석에 의해 인간 PBMCs로부터 분급된 CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} 세포의 짧은 시험관 내(in vitro) 증폭을 통하여 얻었다. 수취인 마우스에 있는 GvHD 발달의 목적 징후를 격주 모니터하였다. 발명자는 유사한 결과를 산출하는, 2개의 독립된 실험을 수행하였다. 실험 1 (도 6A)에서, GvHD의 징후(평균 점수 ≥1)은 인간 PBMCs의 주사 후에 29 일에 나타났다(군 I; n=2). 질병 심각성이 신속히 증가되었고, 2마리 마우스 중 하나를 55일에 윤리적 이유로 안락사시켰다. PBMCs 및 트레그(Tregs) (군 II; n=3)으로 주사된 마우스에서, GvHD의 외모는 PBMCs 단독과 비교하여 지연되었다(평균 점수 ≥1 reached after 58 일). 상기는 예상한 바와 같이, 트레그(Tregs)가 GvHD에 대하여 NSG 마우스를 부분적으로 보호한다는 것을 나타낸다. 중요하게, PBMCs 및 MHGARP8 항체(군 III, n=6)를 가지는 트레그(Tregs)를 받는 마우스의 치료는 질병을 가중시켰다: GvHD의 징후는 군 II로부터 마우스보다 일찍(36 일) 나타났다. MHGARP8의 효능은 질병 점수가 PBMCs 단독(군 I) 또는 PBMCs 및 MHGARP8(군 IV; n=4)를 받는 마우스 사이에서 관찰되지 않은 것처럼, 트레그의 존재에 의존하여 나타났다. 발명자는 군 당 많은 수의 마우스로 상기 실험을 반복하였다(도 6B). 다시, PBMCs를 가지는 트레그의 공동-주사는 PBMCs 단독(군 II에서 46일 대 군 I에서 28일)과 비교하여 GvHD의 외모를 지연시켰고, MHGARP8 항체로 치료는 처리되지 않은 마우스(군 II에서 46일)와 비교하여 PBMCs 및 트레그(Tregs)(군 III에서 28일)를 받는 마우스에서 GvHD를 악화시켰다. 모두 합하여, 상기는 MHGARP8가 생체 내 인간 트레그(Tregs)의 면역억제기능을 억제한다는 것을 나타낸다.

[0402] 실시예 5: 라마(Llamas) 접근의 면역화를 이용한 새로운 항-hGARP 단일클론 항체(mAbs)

[0403] **제조합 수용성 GARP-TGFβ1 복합체의 제조**

[0404] 인간 및 쥐과의 GARP-TGFβ1 복합체는 잘려진 GARP 발현 구조체(construct)를 이용하여 제조되었다. 인간 GARP 단백질 서열은 절단가능한 TEV-3x 스트랩 태그(EAAENLYFQGAWSHPQFEKGAWSHPQFEKGAWSHPQFEKGA*) (서열번호 40)가 뒤따르는 Leucine 628 후에 절단되었다. 쥐과의 GARP 단백질 서열은 상기와 같은 절단가능한 TEV-3x 스트랩 태그를 따르는 Leucine 629 이후에 절단되었다. GARP-TGFβ1 복합체는 Strep-태그를 통한 정제 후에, HEK293E 세포에서 절단된 GARP와 TGFβ1의 공동 발현으로 제조되었다.

[0405] 라마의 면역화

[0406] 라마의 면역화 및 말초 혈액 림프구(peripheral blood lymphocytes; PBLs)의 수득뿐만아니라 RNA 추출 및 항체 절편의 증폭은 De Haard 등(De Haard H, et al., J. Bact. 187:4531-4541, 2005)에 기재된 대로 수행하였다. 네 마리의 라마는 본 발명에 기재된 MHGARP8(MHG-8) 단일클론 항체를 사용한 유세포 분석기(flow cytometry)로 확인된 인간 GARP 및 TGFβ1을 과발현 하는 BW 세포로 면역화되었다(도 7A). 라마는 여섯 주 동안 일주일에 한 번 목에 근육내 주사로 면역화되었다. 약 10⁷개의 세포를 목 근육에 주입하고, 세포를 주입한 자리로부터 몇 센티미터 떨어진 두 번째의 영역에 프로인트 불완전 어주번트(Freund' s incomplete adjuvant)를 주입하였다. 또 다른 네 마리의 라마는 인간 GARP cDNA 및 인간 TGFβ1 cDNA 발현 벡터의 혼합물로, 네 번의 반복적인 주입을 2 주에 한번 주입하여 면역화하였다.

[0407] 10 ml의 혈액 샘플은 면역 반응을 조사하기 위하여 면역화 전 및 후에 수집하였다. 마지막 면역화 후 3-4일 후에, 400 ml의 혈액은 Chomczynski P 등, Anal. Biochem. 162: 156-159, 1987에 기재된 방법으로, Ficoll-Paque gradient를 사용하여 준비된 PBLs로부터 총 RNA를 추출하기 위하여 수득하였다. 평균적으로, 450 μg의 RNA를 수득하였고, 이는 무작위 cDNA 합성 및 De Haard H 등(J Biol Chem. 1999 Jun 25; 274(26): 18218-30)에 기재된 바와 같은 Fab 포함 파지미드(phagemid) 라이브러리의 제작을 위한 헤비 및 라이트 체인(Vλ 및 Vκ)의 V-영역의 PCR 증폭을 위해 사용되어, 좋은 다양성(1-7×10⁸)의 다양한 라이브러리를 얻었다.

[0408] GARP-TGFβ1 복합체에 대한 면역 반응은 코팅된 재조합 수용성 GARP-TGFβ1 복합체(1 μg/ml)에서 ELISA에 의해 조사되었다. 10% 혈청으로부터 시작한 혈청(sera)의 다섯 배의 순차적인 희석물을 준비하였고 희석된 혈청의 100 μl를 코팅된 웰에 첨가하여 실온(RT)에서 1시간 동안 배양하였다. 3x PBS/Tweem으로 세척한 후, 플레이트는 1% 카제인(casein)이 첨가된 PBS로 블로킹하였다(도 8). 종래의 라마 IgG1의 이의 타겟인 GARP-TGFβ1로의 결합은 검출을 위하여 마우스 항 라마 IgG1 항체(클론 27E10, Daley LP, 등, Clin. Diagn Lab Immunol. 12, 2005) 및 HRP-결합된 당나귀 항-마우스 항체(Jackson)를 사용하는 ELISA로 측정하였다.

[0409] GARP-TGFβ1 특이적인 Fabs의 선별 및 스크리닝

[0410] Fabs를 발현하는 파지(phage)는 기본적인 프로토콜을 따라 제조하였고, 기본적인 파지 표시(display) 프로토콜을 따라 트립신으로 총 GARP-TGFβ1 결합 파지 용리물을 갖는 고정된 재조합 수용성 GARP-TGFβ1에서 선별을 수행하였다.

[0411] 두 번 내지 세 번의 선별과정은 파지에 의해 발현되는 Fabs 특이적인 인간 GARP-TGFβ1를 농축하기 위해 수행되었다. hGARP 및 hTGFβ1(LAP) 반대의 선별은 hGARP-TGFβ1 복합체에 결합하는 Fabs를 농축하기 위해 수행되었다. 기본적인 프로토콜을 따라서 모든 라이브러리에 대해 IPTG 유도(induction)을 수행하여, 개별적인 클로니들을 분리하였고, 96-웰 플레이트에 주변세포질 분획(peris)을 제조하였다.

[0412] Fab에 특이적인 hGARP-TGFβ1의 스크리닝은 ELISA를 사용하여 수행하였다. hGARP-TGFβ1는 maxisorb 플레이트에 고정되었다. 1% 카제인을 포함한 PBS로 한시간 동안 블로킹한 후, 20μl의 주변세포질 추출물로부터의 Fab를 hGARP-TGFβ1에 결합하였다.

[0413] 단일클론 항체의 특징

[0414] GARP-TGFβ1/GARP 특이적인 클론은 VH 및 VL 영역에서 서열분석되었고, VH에 존재하는 CDR3의 서열에 기초하여 VH 과(family)로 나누었다. 18개의 과가 확인되었다. 확인된 각각의 VH과에서 최소 하나의 대표되는 클론을 전체(full) 인간 IgG1(LHG1-LHG17)로 클로닝하였다. 이러한 단일클론 항체는 수용성 인간 GARP-TGFβ1 복합체에 결합하는 그들의 특성에 대하여 Biacore로 분석하였다. 재조합 수용성 인간 GARP-TGFβ1은 CM5 칩(GE Healthcare)에 대략 4,000 RU에 고정되었다.

[0415] HEK-293 세포에 발현하는 인간 및 시노몰구스(cynomolgus) GARP-TGFβ1 복합체에 단일클론 항체의 결합은 FACS로 분석하였다. 시노몰구스 GARP 및 시노몰구스 TGFβ1 암호화 서열은 시노몰구스 말초 혈액 림프구(peripheral blood lymphocytes, PBMCs)로부터 cDNA 샘플로 클로닝하였다. 프라이머는 전체 서열의 겹치는 부분의 증폭에 의해 시노몰구스 GARP (XM_005579140.1; 서열번호 41) 및 시노몰구스 TGFβ1 (XM_005589338.1; 서열번호 42)의 예상되는 서열에 기초하였다. 시노몰구스 GARP 및 시노몰구스 TGFβ1 모두에 대한 세 번의 나뉜 PCR 앰플리콘(amplicon)은 DNA 서열 분석되었다. 이들은 예상되는 서열로 완전히 정렬되었다. 시노몰구스 GARP 및 시노몰구스 TGFβ1는 HEK293E 세포에 일시적인(transient) 과-발현을 위해 pCDNA3.1에 클로닝하였다. 시노몰구스 GARP-TGFβ1으로의 결합은 FACS를 이용하여 인간 GARP-TGFβ1로의 결합과 비교하였다. LHG-10

및 임의적 변이체(LHG-10.3 내지 LHG-10.6)는 시노몰구스 GARP-TGF β 1과의 교차-반응성으로 고려되었다(도 9).

- [0416] 사용된 프라이머는 하기와 같다:
- [0417] >cyno TGFB S1: gcctc CCCCATGCCG ccctccg (서열번호 43)
- [0418] >cyno TGFB S2: acaattctcg gcgatacctc (서열번호 44)
- [0419] >cyno TGFB AS1: CTCAACCACTGCCGCACAAC (서열번호 45)
- [0420] >cyno TGFB AS2: TCAGCTGCATTGTCAGGAGC (서열번호 46).

[0421] **친화도(affinity) 증가를 위한 VK 셔플링(shuffling)**

[0422] VK 체인 셔플링은 mAb LHG-10의 친화도를 증가시키기 위해 사용되었다(도 10). 본 방법에서, 모체 클론의 헤비 체인(LHG-10의 VHCH1)은 파지미드-라이트 체인 라이브러리에 재도입되었다. 헤비 체인은 발현 벡터로부터 추출되었는데, 선별 과정에서 모체 라이트 체인의 오염을 피하기 위하여, 표시(display)를 위해 필요한 유전자 3로부터 유래된 박테리오파지(bacteriophage)가 결합되어 있다. 헤비 체인은 파지미드-라이트 체인 라이브러리에 클로닝하였고 결합된 DNA는 라이트 체인 셔플된 라이브러리를 생성하기 위하여 *E.coli* TG1 세포로 전기천공법(electroporation)으로 삽입하였다. 라이브러리의 크기는 10⁸이 넘었다.

[0423] 오프-레이트(off-rate) 세척과 결합된 친화성 선별은 인간 GARP-TGF β 1에 대해 증가된 친화성을 갖는 셔플된 Fabs 체인에 대한 선별을 위하여 수행되었다. 셋업(set-up)은 microorb 플레이트에 직접적으로 코팅된 재조합 수용성 인간 GARP-TGF β 1의 다양한 농도와 함께 배양되고 있는 Fab 발현 파지에서 선택되었다.

[0424] 코팅된 재조합 수용성 인간 GARP-TGF β 1에 대해 과도한 양의 재조합 수용성 인간 GARP-TGF β 1을 첨가하여, 더 높은 친화성 파지의 결합이 선호되었다. 세척의 각 단계는 낮은 친화성 변이체를 세척하여 떨어트리는 것으로 더 나은 오프-레이트를 갖는 파지를 선별하기 위하여 증가되었다(표 3). 파지는 트립신으로 용리되었고 *E.coli* TG1 세포로의 감염을 위해 사용되었다. 최종적으로, 5번의 선별과정이 수행되었다. 게다가, 그 후의 과정에서 투입(input) 파지의 양은 한편으로 백그라운드를 줄이기 위해, 다른 한편으로 선별의 엄격성(stringency)을 증가시키는 mAb 농도를 줄이기 위해 감소되었다.

표 3

[0425] **VK 셔플링에 대한 선별의 각 단계를 위해 다양화된 변수**

| | RI | RII | RIII | RIV | RV |
|------------------|----------------------------------|--|--|--|--|
| rhGARP-TGF β의 농도 | 10 μg/ml 1 μg/ml 0.1 μg/ml | 10 μg/ml 1 μg/ml 0.1 μg/ml | 10 μg/ml 1 μg/ml 0.1 μg/ml | 10 μg/ml 1 μg/ml 0.1 μg/ml | 10 μg/ml 1 μg/ml 0.1 μg/ml |
| 파지 부피 | 10 μl | 1 μl | 1 μl | 1 μl | 1 μl |
| 세척 시간 | 0 h | 2 h | 0/N | 0/3N | 0/6N |
| 조건 | - | 37° C, 100 μg/ml rhGARP-TGF β in 1% casein | 37° C, 100 μg/ml rhGARP-TGF β in 1% casein | 37° C, 100 μg/ml rhGARP-TGF β in 1% casein | 37° C, 100 μg/ml rhGARP-TGF β in 1% casein |

[0426] 선별 과정 III, IV 및 V로부터 최소 24개의 클론의 스크리닝을 수행하였다. 상기 클론은 깊은 웰 플레이트(1 ml 발현)에서 배양되었고 주변세포질 분획을 준비하였다. 이러한 주변세포질 추출물은 off-rate를 증가시키기 위해 Biacore로 분석되었다. hIgG1(LHG-10 계열), 또한 Fc 영역에 N297Q 대체를 갖는 작동인자가 없는 (effector-dead) 변이체 hIgG1, 및 그 결과로 생긴(resultant) IgGs로 클로닝된 증가된 off-rate를 갖는 상위 네 개의 Fab 클론들은 Biacore에서의 증가된 결합 특성을 위해 분석되었다(표 4). 게다가, LHG-10-D IgGs는 cyno GARP/cyno TGF β 1 또는 인간 GARP/인간 TGF β 1으로 형질전환된 HEK-293E 세포를 사용하는 FACS-기반 분석에서 cyno GARP/cyno TGF β 1에서의 교차-반응성에 대해 확인하였다. MHGARP8 또한 교차-반응성 분석으로 시험되었다. 모든 LHG-10-D 및 MHG-8은 cyno GARP/cyno TGF β 1에 대해 교차-반응성이 있었다(도 9).

표 4

[0427]

서플된 클론의 결합 특성

| | | 연관성 | | 분리성(dissociation) | | 친화성(affinity) | |
|-----------------|------------|-----------|------------------|-------------------|------------------|---------------|------------------|
| | | ka (1/Ms) | fold improvement | kd (1/s) | Fold improvement | KD | fold improvement |
| mIgG1 | MHGARP8 | 1.25E+05 | N/A | 3.39E-05 | N/A | 2.64E-10 | N/A |
| hIgG1-N 297Q | LHG-10-D | 1.42E+05 | 1.0 | 2.62E-05 | 1.0 | 1.85E-10 | 1.0 |
| | LHG-10.3-D | 2.31E+05 | 0.6 | 5.18E-06 | 5.1 | 2.24E-11 | 8.3 |
| | LHG-10.4-D | 3.71E+05 | 0.4 | 1.21E-05 | 2.2 | 3.27E-11 | 5.7 |
| | LHG-10.5-D | 3.83E+05 | 0.4 | 1.07E-05 | 2.4 | 2.80E-11 | 6.6 |
| | LHG-10.6-D | 2.84E+05 | 0.5 | 6.15E-06 | 4.3 | 2.16E-11 | 8.6 |
| hIgG1 | LHG-10 | 2.39E+05 | 1.0 | 3.12E-05 | 1.0 | 1.31E-10 | 1.0 |
| | LHG-10.3 | 2.87E+05 | 0.8 | 6.38E-06 | 4.9 | 2.22E-11 | 5.9 |
| | LHG-10.4 | 4.48E+05 | 0.5 | 1.30E-05 | 2.4 | 2.91E-11 | 4.5 |
| | LHG-10.5 | 4.15E+05 | 0.6 | 1.37E-05 | 2.3 | 3.31E-11 | 4.0 |
| | LHG-10.6 | 2.76E+05 | 0.9 | 4.40E-06 | 7.1 | 1.59E-11 | 8.2 |

[0428]

실험예 6: 두 개의 항-hGARP mAbs(MHGARP8 및 LHG-10)은 인간 Tregs에 의해 생성된 활성 TGF β1을 억제함. 자극된 인간 Tregs는 그들의 세포 표면 근처에 활성 TGF β1을 생성한다. 자가분비(autocrine) 및 주변분비(paracrine) TGF β1 활성은 Tregs 그들 자체, 및 Tregs와 함께 공동-배양된 Th 세포에 SMAD2 인산화를 유도한다(Stockis, J. 등. Eur. J. Immunol. 2009, 39:869-882). Tregs에 의한 TGF β1 활성에 GARP가 필요한지 확인하기 위하여, 본 발명자들은 항-hGARP mAbs의 존재 또는 부재 상태에서 인간 Tregs를 자극하였고, 웨스턴 블롯으로 SMAD2의 인산화를 측정하였다. 인간 Tregs의 원천(source)로서, CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} 세포를 PBMCs로부터 분류하였고, 12-14일 동안 실험관 내에서 증폭하였다(Gauthy E et al PLoS One. 2013 Sep 30;8(9):e76186). 메틸-특이적인 qPCR에 의해 결정된 바로, 증폭된 세포 군집은 탈메틸화된(demethylated) *FOXP3i1* 대립 유전자(allele)를 갖는 44 내지 82% 세포를 포함하였고, 이는 이들이 Tregs에 여전히 높게 농축되어 있음을 나타낸다. 예측한 바와 같이, 인산화된 SMAD2는 자극된 Tregs에서 검출되었으나, 비-자극된 Tregs, 중성화된 항-TGF β1 항체의 존재에서 자극된 Tregs에서는 검출되지 않았다(도 11). 인산화된 SMAD2는 MHGARP8(도 11A에서 MHG-8로 명명된) 또는 LHG-10(도 11B)의 존재에서 자극된 Tregs에서는 현저하게 감소되었는데, 이는 이러한 두 개의 항-hGARP mAbs가 활성 TGF-β1 생성을 억제함을 나타낸다. 29개의 다른 새로운 항-hGARP mAbs 뿐만 아니라, 4개의 상업적으로 이용가능한 항-hGARP mAbs는 Tregs에 의한 TGF-β의 생성을 억제하지 못하였다(도 11).

[0429]

MHGARP8 및 LHG-10의 억제 활성은 GARP가 인간 Tregs에 의한 활성 TGF-β1 생성에 필요하다는 것을 나타낸다.

[0430]

실험예 7: MHGARP8 및 LHG-10은 실험관 내에서 인간 Tregs의 억제적 활성을 저해함.

[0431]

본 발명자들은 이전에 인간 Tregs가 최소한 부분적으로 활성 TGF-β1의 생성을 통해 다른 T 세포를 억제한다는 것을 밝혔다(Stockis, J. et al. Eur. J. Immunol. 2009, 39:869-882). 그러므로, MHGARP8(MHG-8) 및 LHG-10 또한 실험관 내의 억제 시험에서 Treg의 기능을 저해하는지 확인하였다. Tregs의 원천으로써 Treg 클론을 사용하였고, 억제를 위한 타겟으로 갖 분리된 CD4⁺CD25⁺CD127^{hi} 세포 또는 CD4⁺ T 세포 클론(Th 세포)을 사용하였다. Tregs 및 Th 세포는 다양한 추가적인 mAbs의 존재 또는 부재하에서 >CD3 및 >CD28로 자극되었다. 도 12에 나타난 바와 같이, 클론 Treg A1은 항-hGARP mAb의 존재에서 CD4⁺CD25⁺CD127^{hi} 세포의 증식을 66%까지 억제하였다. 억제는 MHG-8 또는 LHG-10의 존재에서 각각 36%, 32%로 감소되었으나, 6개의 다른 항-hGARP mAbs의 존재에서는 감소되지 않았다. 본 발명자들은 또한 항-hTGF-β1 mAb 또는 동형표본(isotype) 대조군, MHGARP8의 존재에서 또 다른 Th 타겟(클론 Th A2)에 대한 클론 Treg A1의 억제를 측정하였다. MHGARP8(MHG-8)은 항-TGF-β1 항체의 것과 비슷한 수준으로 Treg A1의 실험관 내 억제 활성을 저해하였으나, 동형표본 대조군은 효과를 나타내지 않았다(도 12).

[0432]

실험예 8: 저해성(inhibitory) 항-hGARP mAbs에 의해 인식되는 에피토프(epitopes)

[0433]

항-hGARP mAbs의 적은 양(2/35)만이 활성 TGF-β 생성 및 Tregs에 의한 억제를 막았다. 이는 비-저해성 mAbs에 의해 결합되는 것들로부터 구별되는 에피토프에 결합하는 이들의 능력때문인 것으로 보인다. 본 발명자들은 저해성 및 비-저해성 mAbs에 의한 결합에 필요한 영역을 매핑(map)하였다.

[0434]

GARP는 이황화-결합된(disulfide-linked) GARP/TGF-β1 복합체를 형성하기 위해 전- 또는 잠재적인 TGF-β와

결합한다(도 13 및 Stockis 2009b Eur. J. Immunol. 2009. 39: 3315?3322 및 Gauthy E 등). 본 발명자들은 먼저 *hGARP* 및 *hTGF-β1*으로 형질전환된 쥐과 BW 세포에서 공동-면역침강(co-immunoprecipitation, IP) 실험을 이용하여, 항-*hGARP* mAbs 또한 *GARP/TGF-β1* 복합체에 결합하는지 결정하였다. 이를 위해, 32개의 항-*hGARP* mAbs를 시험하였다: 이는 본 발명의 31개의 새로운 mAbs 및 상업적으로 이용가능한 Plato-1 mAb이다. 모든 mAbs는 효과적으로 *GARP*를 면역침강시켰다(showing IPs 12개의 대표적인 mAbs의 IPs를 나타내는 도 14A의 위쪽 패널). Pro-*TGF-β1*, 뿐만 아니라 LAP 및 성숙한 *TGF-β1* (즉, 잠재적인 *TGF-β1*)은 24개의 mAbs와 함께 공동-면역침강되었는데, 이는 이들이 *GARP/TGF-β1* 복합체에 결합함을 나타낸다(도 14A에 나타난 6개의 mAbs, 중간 및 아래쪽 패널). 반면, 8개의 mAbs(도 14A에 나타난 3개)는 pro- 또는 잠재적인 *TGF-β1*를 공동-면역침강시키지 않았는데, 이는 이들이 자유 *GARP*에는 결합하지만 *GARP/TGF-β1* 복합체에는 결합하지 않음을 나타낸다.

[0435] 본 발명자들은 상기 내용을 형질전환된 293T 세포의 FACS 분석으로 확인하였다(도 14B). 비형질전환된 293T는 *GARP*를 발현하지 않았고, 매우 낮은 수준의 내재적인(endogenous) *TGF-β1*을 발현하였다. 항-LAP 항체를 갖는 그들의 표면에서 잠재적인 *TGF-β*은 검출되지 않았다. *GARP* 또는 *TGF-β1* 단독의 형질전환은 각각 없거나 낮은 표면 LAP을 유도하였고, 반면 *GARP* 및 *TGF-β1*의 공동 형질전환은 잠재적인 *TGF-β1* 결합 및 *GARP*에 의한 제시의 결과로서 높은 표면 LAP을 유도하였다(도 14B, 왼쪽 히스토그램). 세개의 그룹의 항-*hGARP* mAbs는 형질전환된 293T 세포의 분석으로부터 나타났고, 도 13B에 3개의 열에 분류되었다. 첫번째 그룹(왼쪽 열)은 pro- 또는 잠재적인 *TGF-β1*을 공동-면역침강시키지 않는 8개의 mAbs이다: 이들은 *hGARP* 단독으로 형질전환된 293T 세포에 결합하였으나, *hGARP* 및 *hTGF-β1*로 형질전환된 세포에는 결합하지 않았다. 이는 이러한 mAbs가 *TGF-β1*의 존재에서는 표면 *GARP*로의 결합을 할 수 없어, 자유 *GARP*에만 결합함을 나타낸다(도 14B는 이러한 그룹의 3개의 대표적인 mAbs를 나타낸다). 두 번째 그룹은 대부분의 다른 mAbs를 포함한다(19개의 mAbs, 도 13B의 중간 열): 이들은 *hGARP* 단독 또는 *hGARP* 및 *hTGF-β1*로 형질전환된 293T 세포에 동등하게 결합하였는데, 이는 이들이 자유 *GARP* 및 *GARP/TGF-β1* 복합체 모두에 결합함을 나타낸다(도 14B는 이러한 그룹의 6개의 mAbs를 나타낸다). 흥미롭게도, 세 번째 그룹의 5개의 mAbs는 *hGARP* 및 *hTGF-β1*로 형질전환된 293T 세포에는 결합하였으나, *hGARP* 단독으로 형질전환된 세포에는 결합하지 않았다(도 13B의 오른쪽 열). 이러한 mAbs는 *GARP/TGF-β1* 복합체에는 결합하였으나 자유 *GARP*, 저해성 MHGARP8(MHG-8) 및 LHG-10에는 결합하지 않았다(도 14B는 이러한 그룹의 3개의 mAbs를 나타낸다).

[0436] 상기에서, 본 발명자들은 대부분의 mAbs가 자유 *GARP* 단독(8/32) 또는 *GARP* 및 *GARP/TGF-β1* 복합체(19/32)에 결합한다고 결론내렸다. 저해성 MHGARP8(MHG-8) 및 LHG-10, 또한 3개의 비-저해성 mAbs를 포함하는 오직 5개의 mAbs가 *GARP/TGF-β1* 복합체에 결합하고, 자유 *GARP*에는 결합하지 않았다. 이러한 인식의 패턴은 오직 MHGARP8 및 LHG-10 만이 저해성을 갖는 이유를 설명하지는 않는다.

[0437] 다음으로, 다양한 mAbs에 의한 결합에 필요한 *hGARP*의 영역을 정의하였다. 항-*hGARP* mAbs의 막대한 다수는 마우스 *GARP*(mGARP)에 대해 교차-반응성이 없었다. 그러므로, HA-표지된 mGARP/hGARP 키메라를 암호화하는 플라스미드(도 15A, 왼쪽 패널)를 제작하였고, 이들은 상기에서 결정된 결합 조건에 따라 *hTGF β1*이 있거나 없는 상태에서 293T 세포에 형질전환하였다. 모든 키메라는 293T 세포의 표면에서 비슷한 수준으로 발현됨을 항-HA mAb로 염색으로 확인되었다(도 15A, 오른쪽의 히스토그램). mGARP/hGARP 키메라에 대한 결합 패턴(도 15A, 10개의 대표적인 mAbs)은 각각의 항-*hGARP* mAb에 의한 결합에 필요한 *hGARP*의 영역을 확인할 수 있도록 했다. 상기 내용은 mAbs가 *hGARP*의 다양한 영역에 대응하는 열에 분포되어 있는 도 15B에 요약되었다: 첫 번째 열에 있는 mAbs는 20 내지 101 아미노산(*hGARP*₂₀₋₁₀₁)을 포함하는 영역, 두 번째 열의 mAbs는 *hGARP*₁₀₁₋₁₄₁, 세 번째 열의 mAbs는 *hGARP*₁₄₁₋₂₀₇, 네 번째 열의 mAbs는 *hGARP*₂₆₅₋₃₃₂, 및 다섯 번째 열의 mAbs는 *hGARP*₃₃₂₋₆₂₈가 필요했다. 그러나, 결합을 위해 필요한 영역을 고려할 때, 저해성 MHGARP8(도면에서 MHG-8로 명시된) 및 LHG-10에 의해 인식되는 에피토프는 비-저해성 mAbs의 그것과 구별되지 않았다: MHGARP8 및 LHG-10, LHG-3, -12 및 -13처럼, *hGARP*₁₀₁₋₁₄₁를 포함하는 *GARP/TGF-β* 복합체에 결합하였다.

[0438] 마우스 및 인간 *GARP*₁₀₁₋₁₄₁의 서열은 3개의 근접한 위치의 3개의 클러스터를 포함하는, 14개의 아미노산(amino-acid, aa) 위치에서 차이가 있었다(도 15B, 왼쪽 패널). 본 발명자들은 *hGARP*의 3개의 변형된 버전을 제작하였다. 각각의 변형체에서, 101-141의 영역으로부터 3개의 근접한 aa의 시리즈는 mGARP에서 발견되는 aa에 의해 대체되었다. 그 후, 시험된 mAbs의 결합 조건에 기초하여 단독 또는 *hTGF-β*와 함께 HA-표지된 변이체를 293T 세포에 형질전환하였다. 변이체에 대한 결합 패턴으로 mAbs의 3개의 종류를 밝혔는데, 이는 결합을 위해 각각 아미노산 *hGARP*₁₁₁₋₁₁₃, *hGARP*₁₂₆₋₁₂₇, 또는 *hGARP*₁₃₇₋₁₃₉이 필요한 것이다. MHGARP8(도면에서 MHG-8로 명시된) 및 LHG-10을 포함하는 여섯개의 mAbs는 *hGARP*₁₃₇₋₁₃₉가 필요했다(도 13B). 반면 6개 중 4개는 자유 *hGARP*에 결합하

였고, MHG-8 및 LHG-10 만이 GARP/TGF β 1 복합체의 맥락에서 hGARP₁₃₇₋₁₃₉가 필요한 mAbs였다.

[0439] 상기로부터, 본 발명자들은 MHGARP8 및 LHG-10에 의한 TGF β 생성의 저해는 모든 다른, 비-저해성, 항-hGARP mAbs에 의해 인식되는 것들과는 다른 에피토프에 결합하는 능력과 연관됨을 확인하였다.

[0440] 실험예 9: 생체 내에서 항-hGARP에 의한 인간 Tregs 기능의 저해

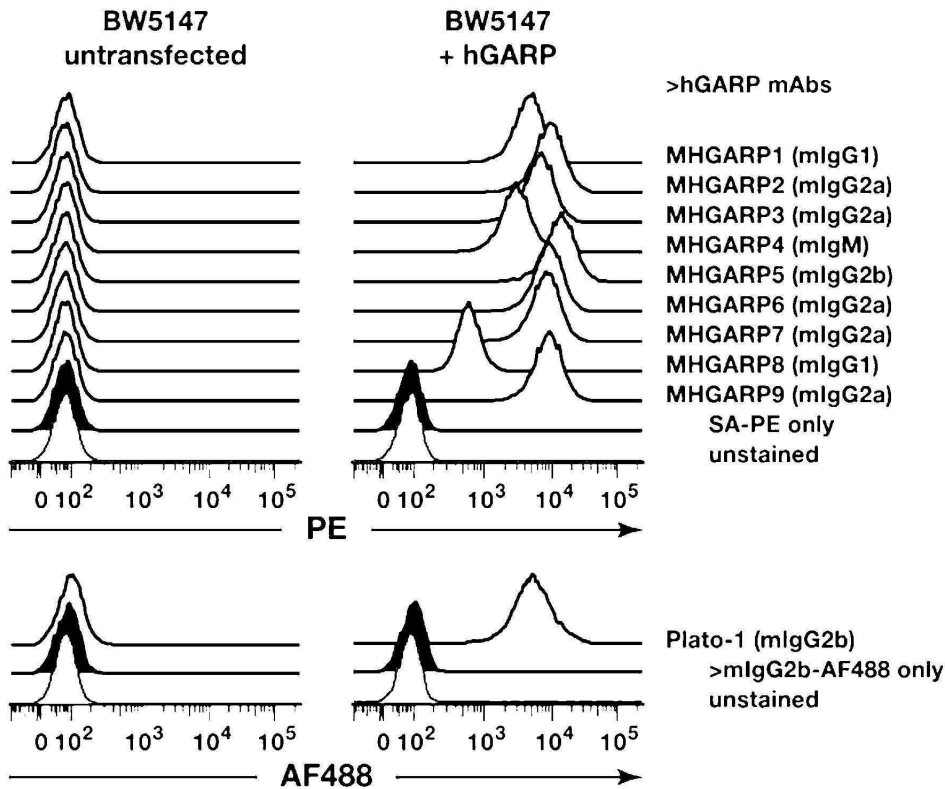
[0441] 본 발명자들은 다음으로, 생체 내에서 항-hGARP mAbs가 인간 Treg 기능을 억제할 수 있는지 확인하였다. 면역 시스템이 손상된(immuno-compromised) *NOD/Scid/IL2Rg^{-/-}* (NSG) 마우스에 인간 말초 혈액 단핵구 세포(PBMCs)의 이동으로 유도된 xenoigeneic graft-versus-host disease(GVHD)의 모델을 사용하였다. NSG 마우스는 사이토카인 신호가 손상되었고, 기능적인 T, B 및 NK 세포가 결여되어, PBMCs의 정맥 투여로 인간 T 세포의 매우 효율적인 접종을 가능하게 한다. PBMC 이동 30 내지 40일 후, 수용체(recipient) 마우스는 쥐과 조직에 대한 인간 독성 T 림프구의 활성화 때문에, xenogeneic GVHD를 생성하였다(Shultz, Nat Rev Immunol. 2012 Nov;12(11):786-98). 상기 모델에서, 인간 PBMCs를 갖는 인간 Tregs의 공동-이동은 GVHD를 중지시켰고(Hannon et al. Transfusion. 2014 Feb;54(2):353-63), 이는 생체 내에서 인간 Tregs에서 항-hGARP mAbs의 저해 활성을 시험하도록 제공하였다.

[0442] 본 발명자들은 자가조직의 Tregs를 갖는 또는 없는 인간 PBMCs(3×10^6 / 마우스)를 NSG 마우스에 이동시켰다(도 16A). 인간 Tregs의 원천으로, 본 발명자들은 상기에 기술된 바와 같이, 실험관 내에서 짧게 증폭된 혈액 CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} 세포를 사용하였다. 또한, 마우스는 이식 하루 전 및 그 후 매주, MHGAR8(도면에 MHG-8으로 명시된), 항-TGF-β1, 동형표본 대조군 또는 PBS로 주입되었다. GVHD의 주입 증후는 몸무게 손실, 이동성 감소, 빈혈증 또는 황달(icterus), 및 탈모에 기초한 질병 점수를 입증하기 위하여, 이주 마다 모니터링하였다. 네 개의 독립적인 실험을 수행하였고(도 16B), 한 개의 실험에 대한 자세한 결과를 나타내었다(도 16C). 상기 실험에 기초하여, 질병의 개시는(평균 GVHD 점수 ≥ 1) mAb를 받지 않거나, 동형표본 대조군을 받은 마우스의 그룹에서 PBMC 이동의 28 내지 41일 후에 관찰되었다. Tregs의 공동-이동은 질병을 지연시켰는데, 이동 후 46 내지 72일 후에 발생되었고, 이는 인간 Treg가 xenogeneic 항원에 대한 인간 T 세포 반응을 억제할 수 있음을 나타낸다. PBMCs 및 Tregs로 이동된 마우스에 MHGARP8의 투여는 Tregs의 보호적인 효과를 제거하였다: 질병은 PBMCs만을 받은 마우스에서 빠르게 발생하였다(이동 후 28 내지 44일 후). MHGARP8에 의한 Treg 억제 기능의 저해는 중성화 항-TGF-β1 항체로 관찰된 것과 비슷하였다. 동형표본 대조군은 효과가 없었다.

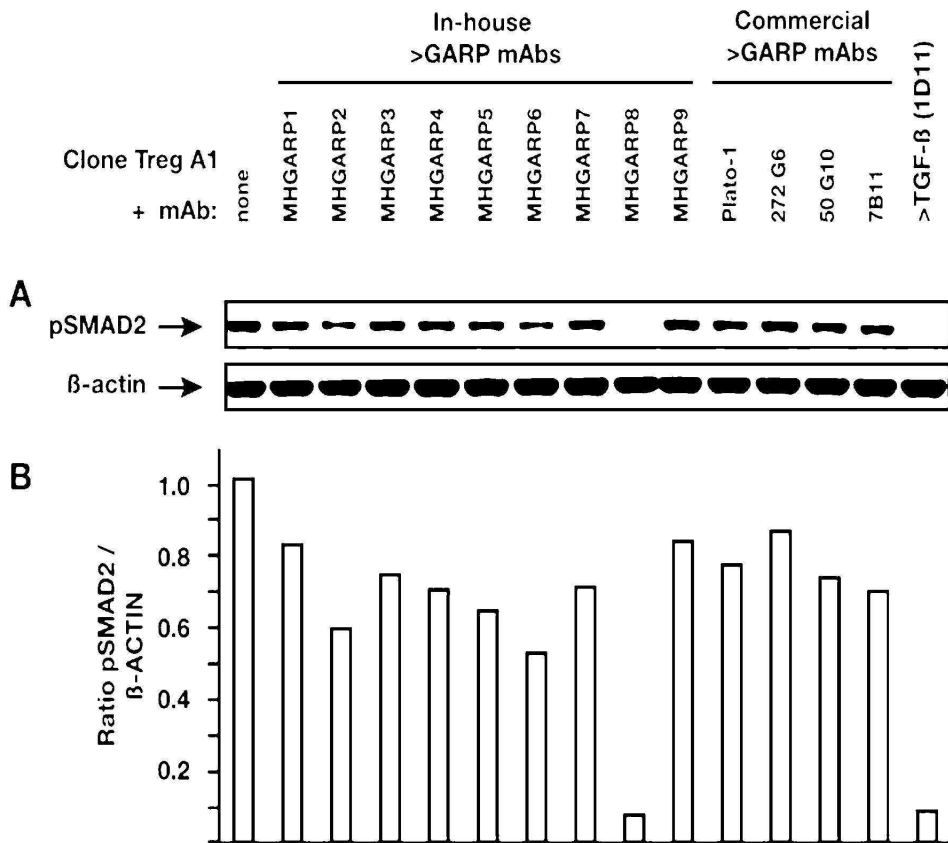
[0443] 모두 종합하여, 상기 내용은 MHGARP8가 생체 내에서 인간 Tregs의 면역-억제적인 기능을 저해함을 나타낸다.

도면

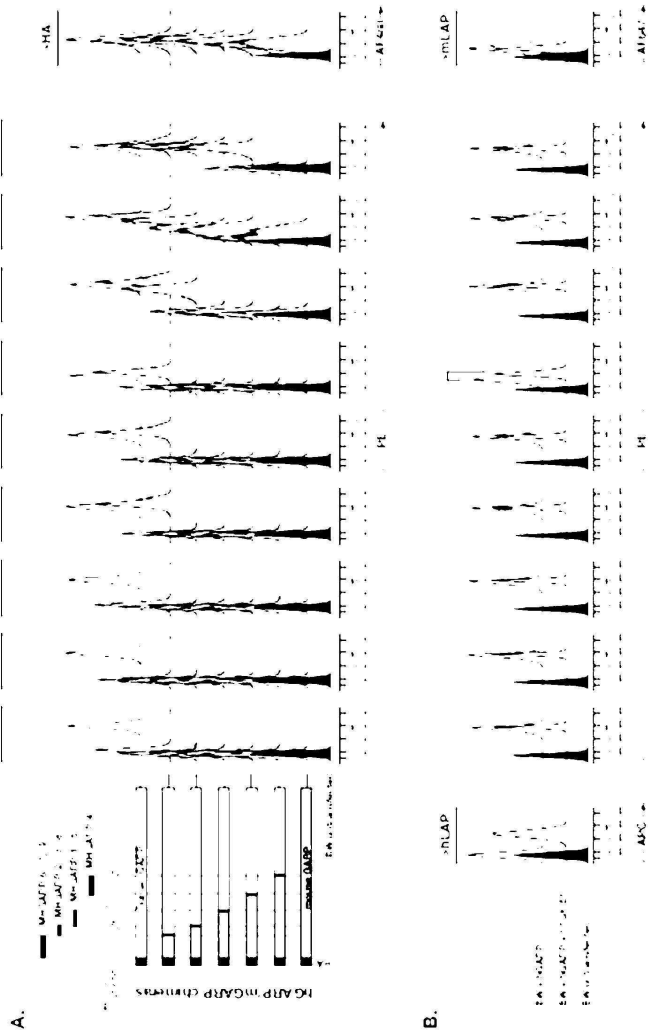
도면1



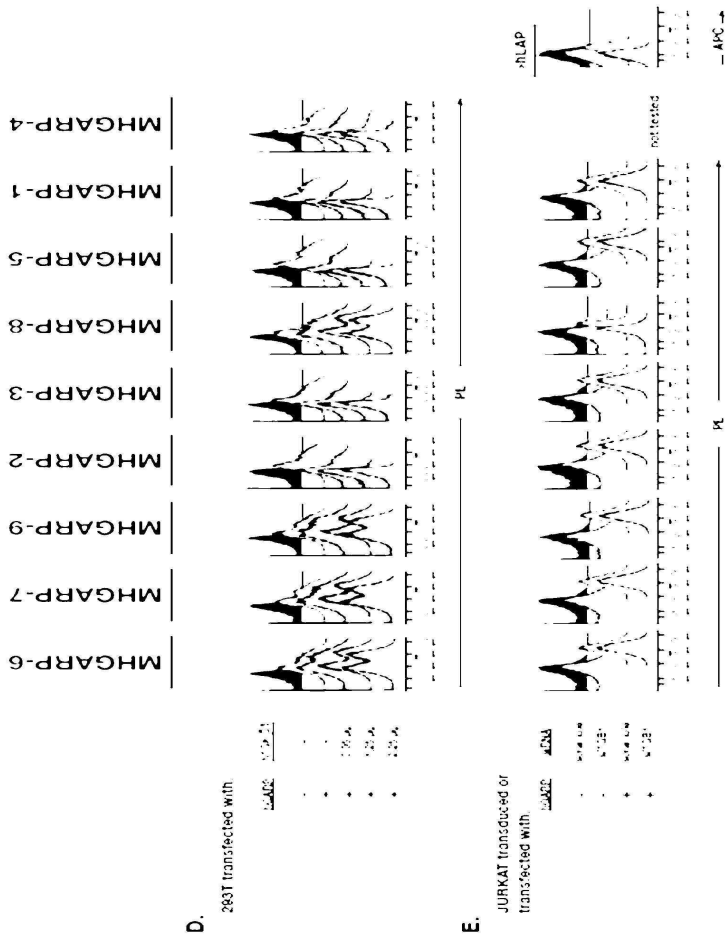
도면2



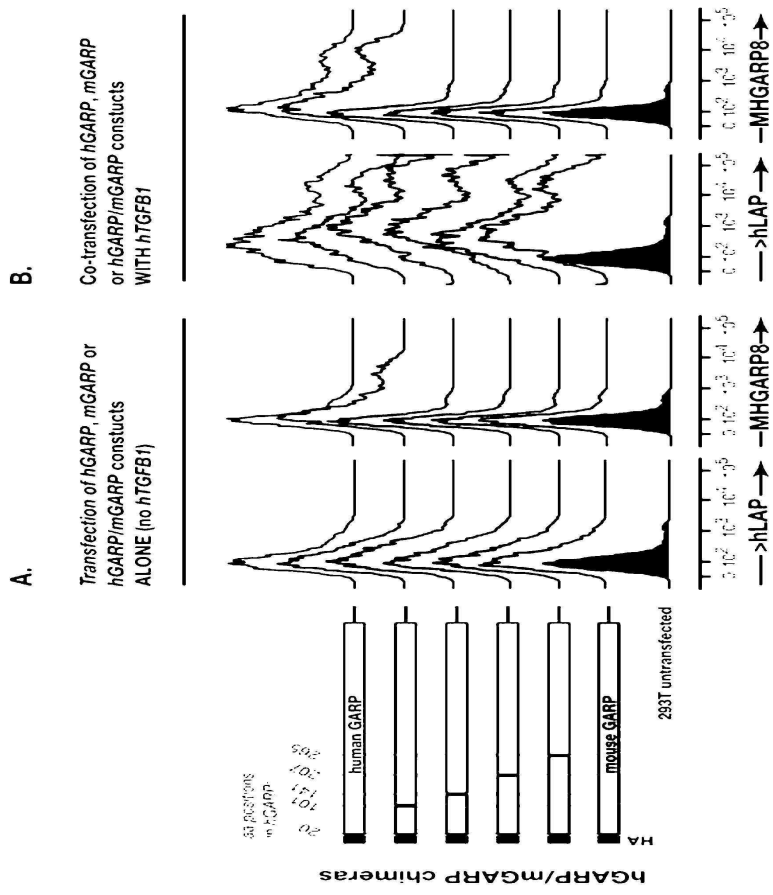
도면3a



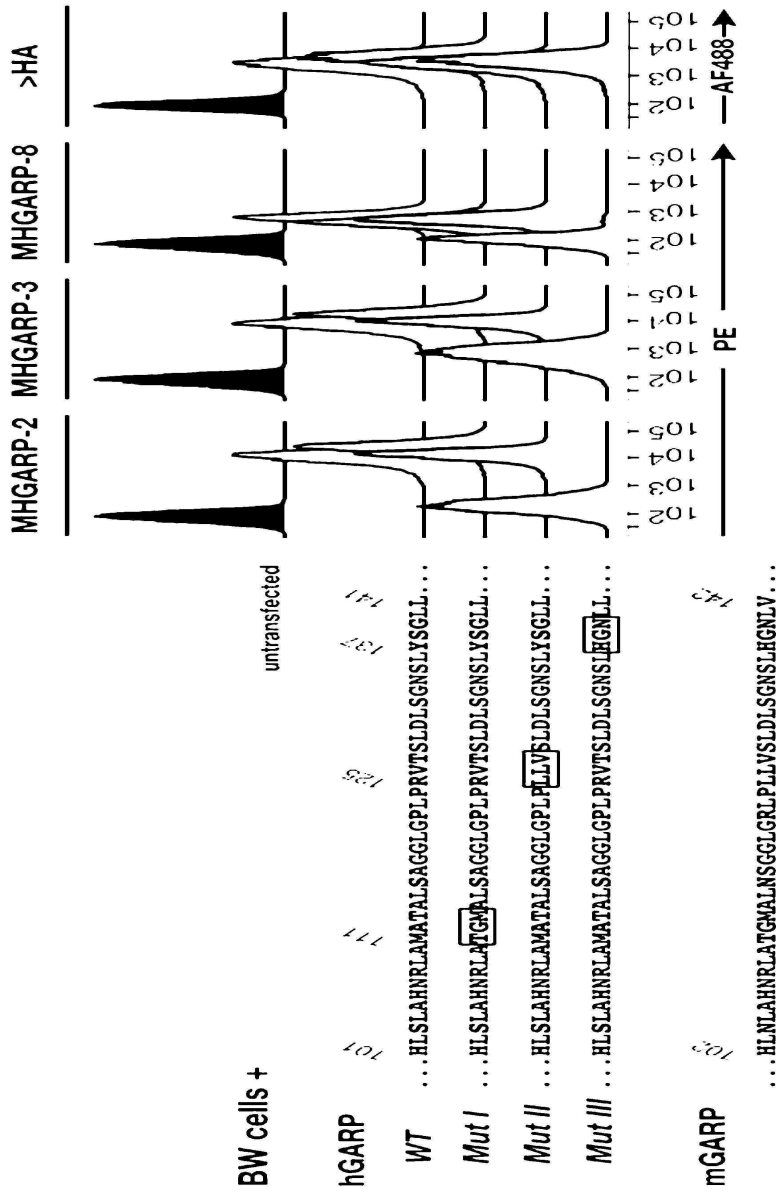
도면3d



도면4



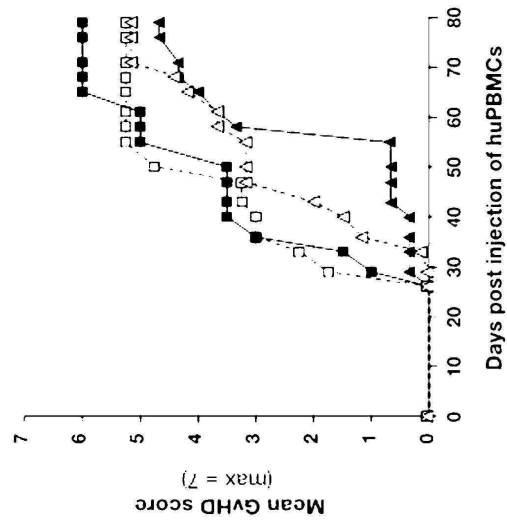
도면5



도면6

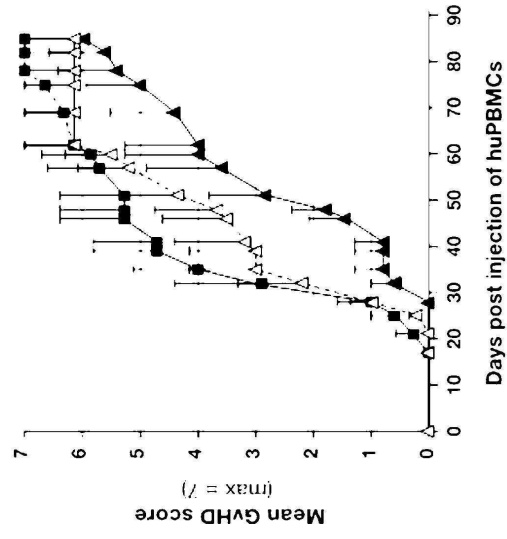
A. Experiment 1

| Group | Hu. cells injected | Treatment | n |
|-------|--------------------|-----------|---|
| I | PBMCs | - | 2 |
| II | PBMCs + Tregs | - | 3 |
| III | PBMCs + Tregs | MHGARP8 | 6 |
| IV | PBMCs | MHGARP8 | 4 |

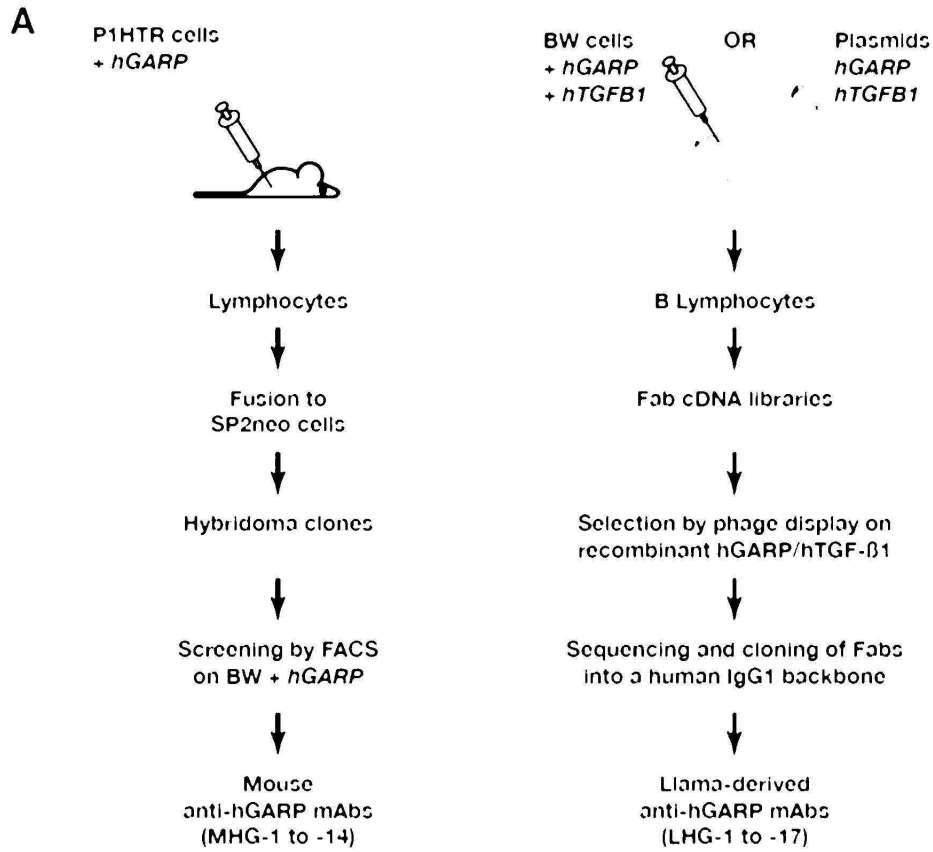


B. Experiment 2

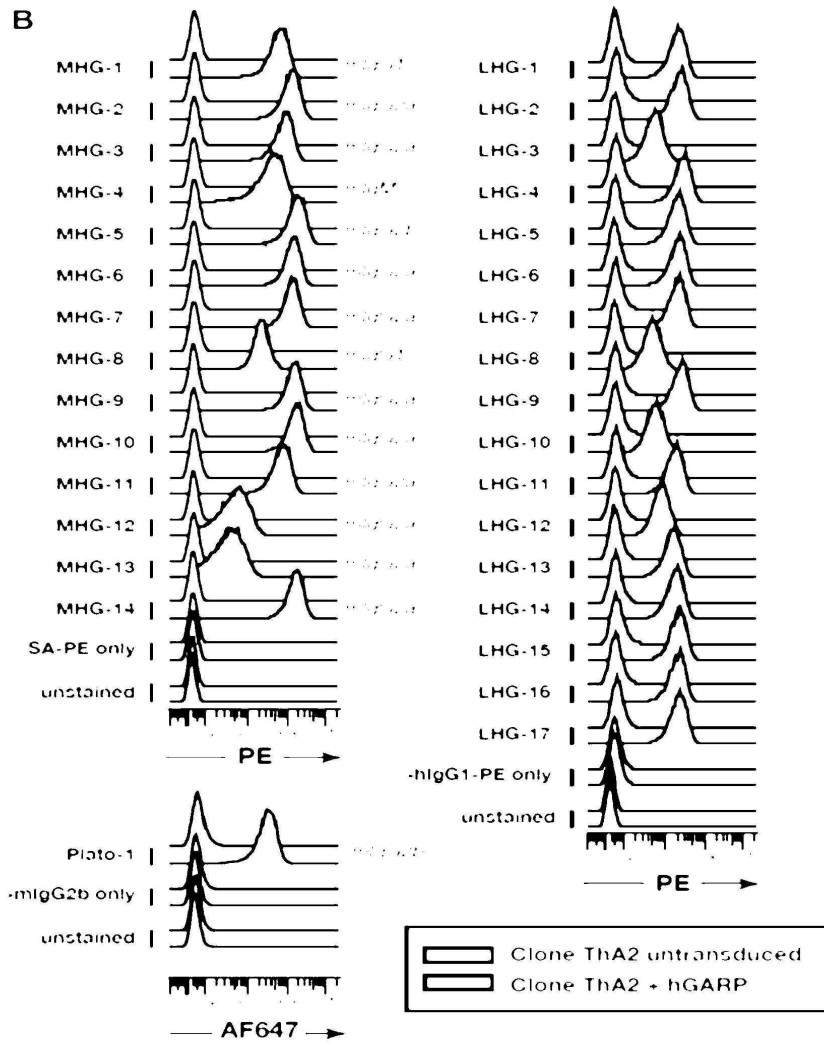
| Group | Hu. cells injected | Treatment | n |
|-------|--------------------|-----------|---|
| I | PBMCs | - | 7 |
| II | PBMCs + Tregs | - | 5 |
| III | PBMCs + Tregs | MHGARP8 | 6 |



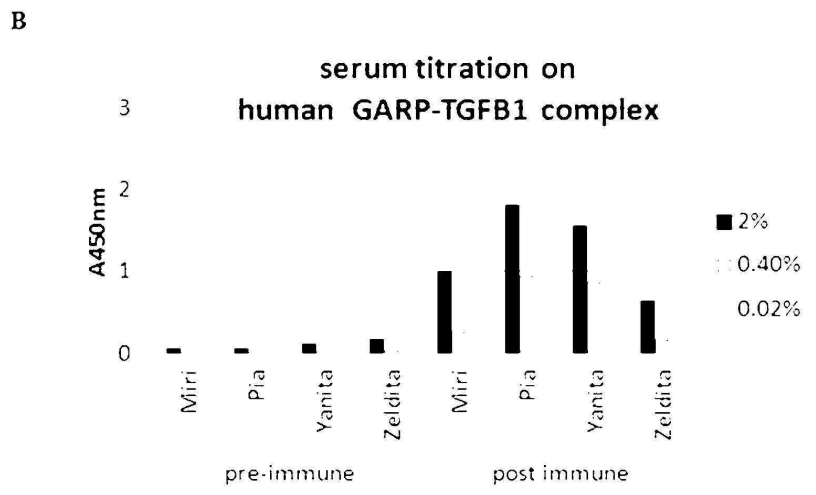
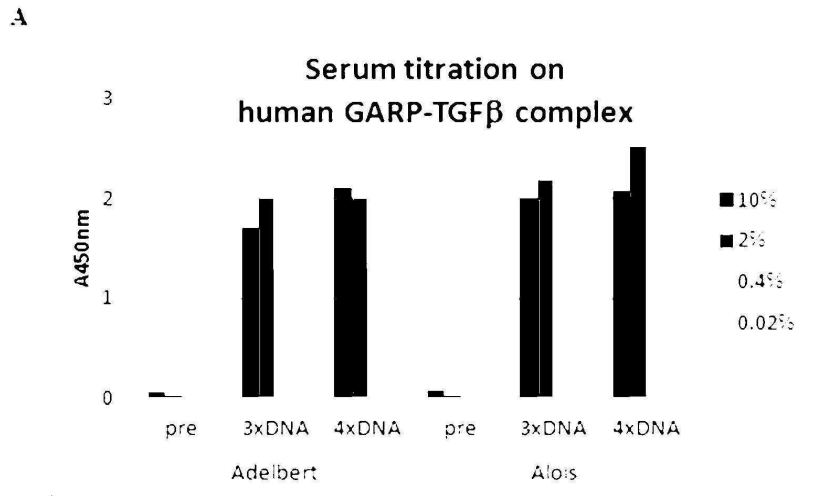
도면7a



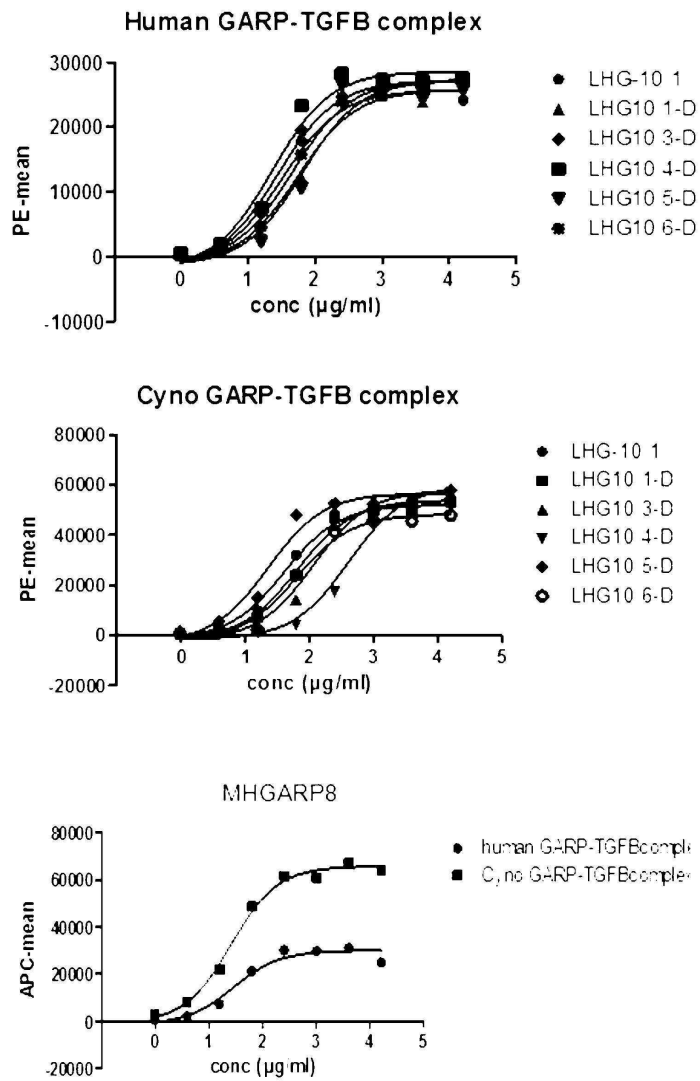
도면7b



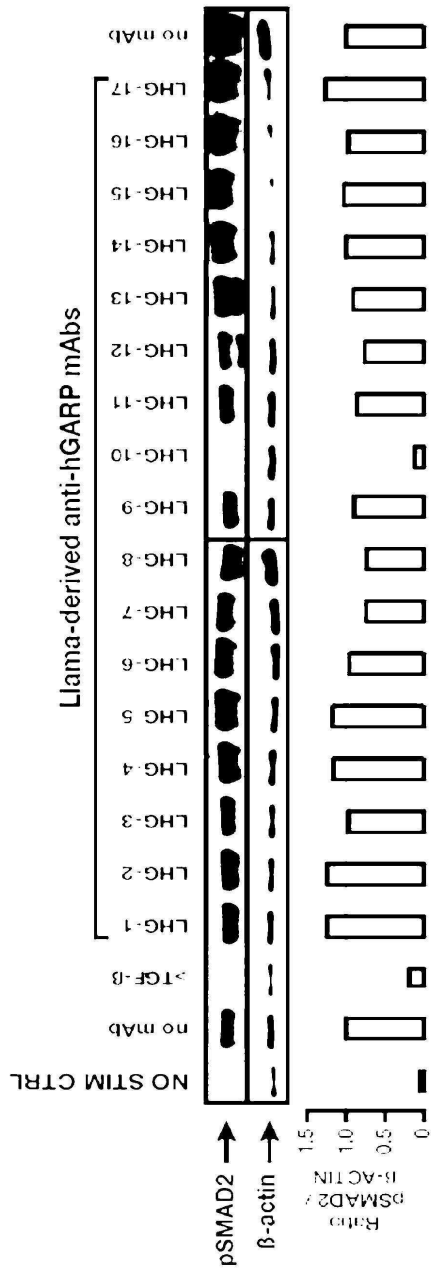
도면8



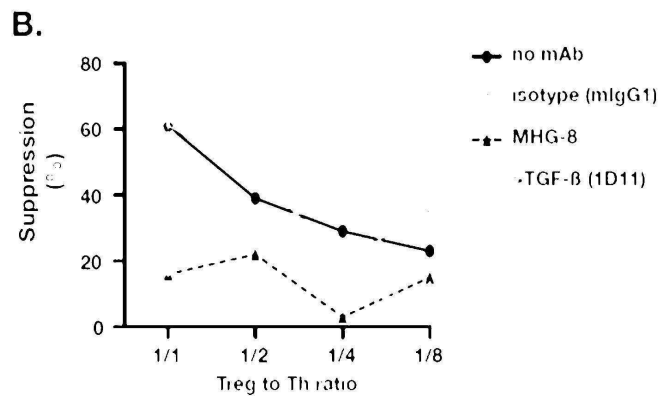
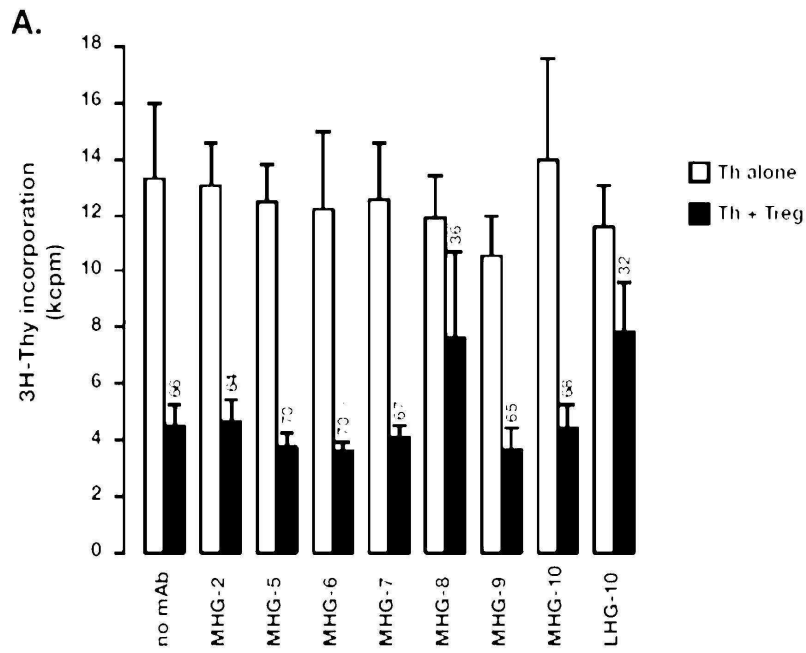
도면9



도면11b

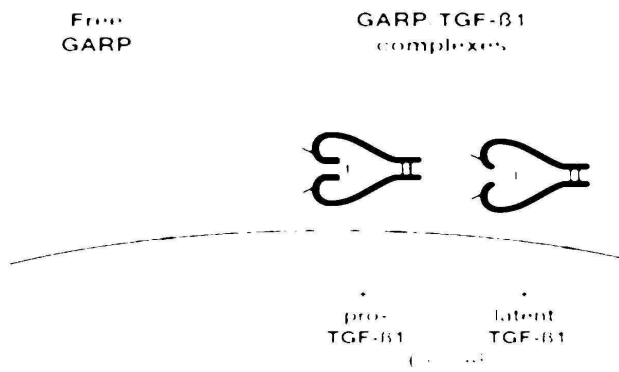


도면12



도면13

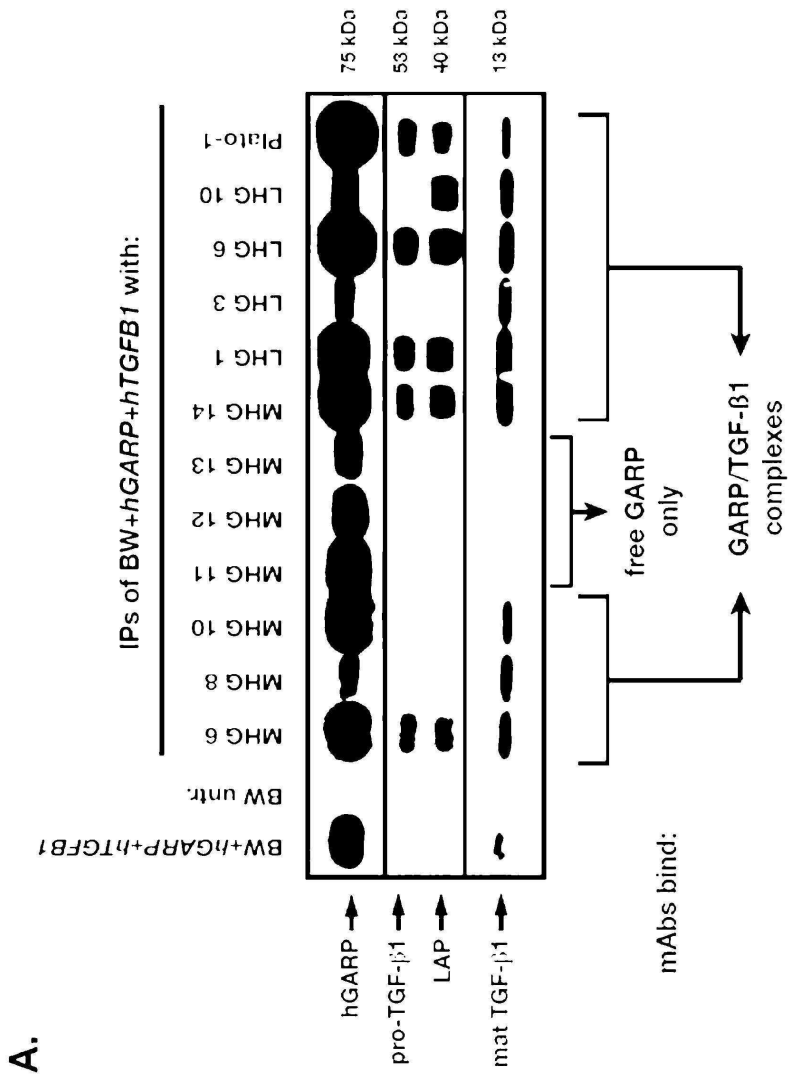
A. Forms of hGARP



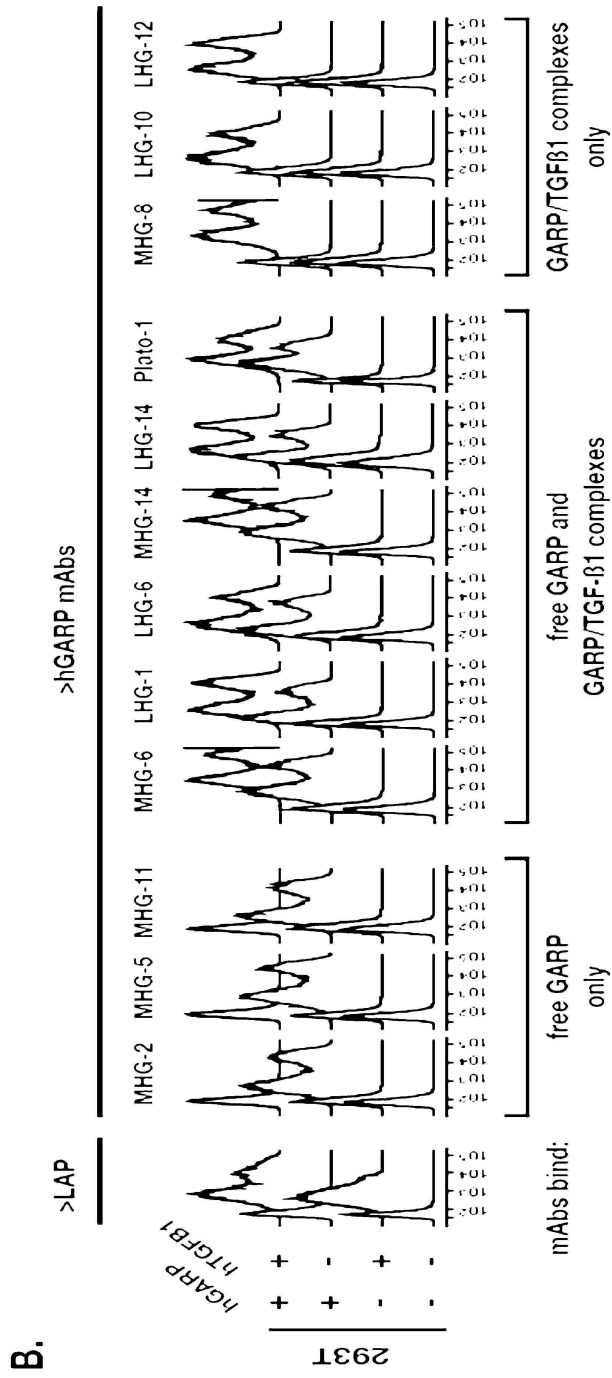
B. Anti-hGARP mAbs

| | Form of hGARP bound | | |
|---------|---------------------|----------------|-------------|
| | Free | Free Complexes | Complexes |
| 205-101 | | ++ | |
| 101-141 | ++ | | Medium Dose |
| 141-207 | ++ | ++ | |
| 207-265 | | | |
| 265-332 | ++ | | |
| 332-628 | ++ | | |

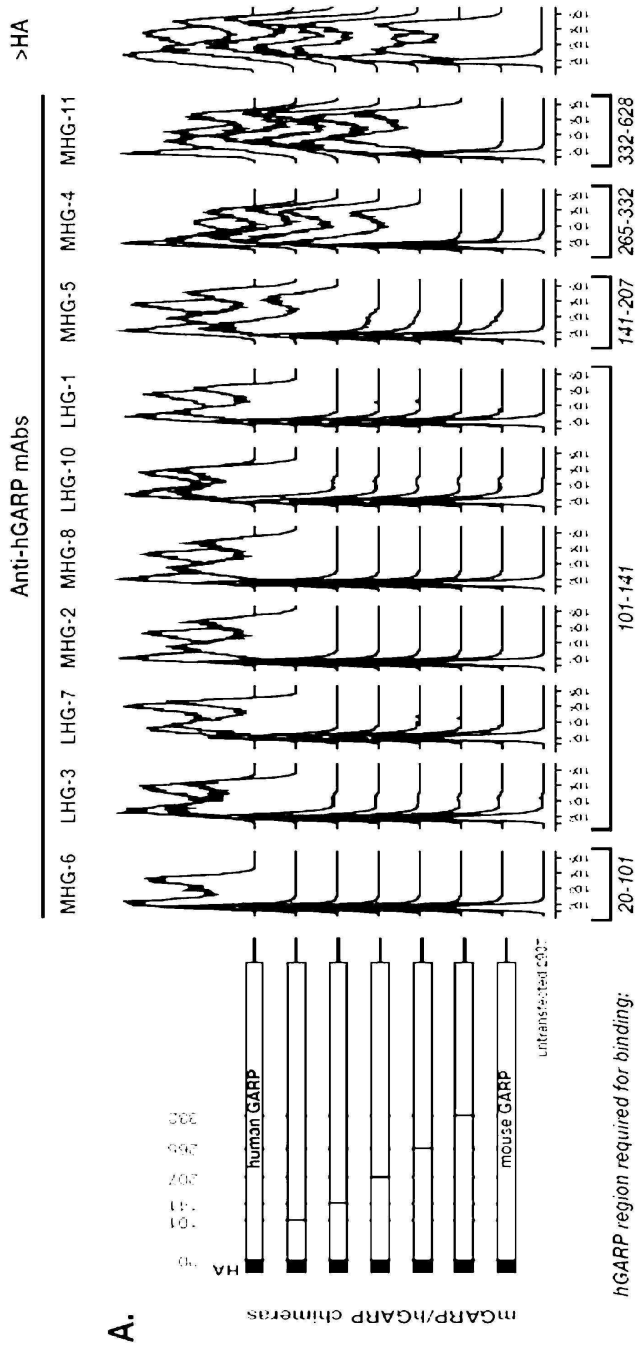
도면14a



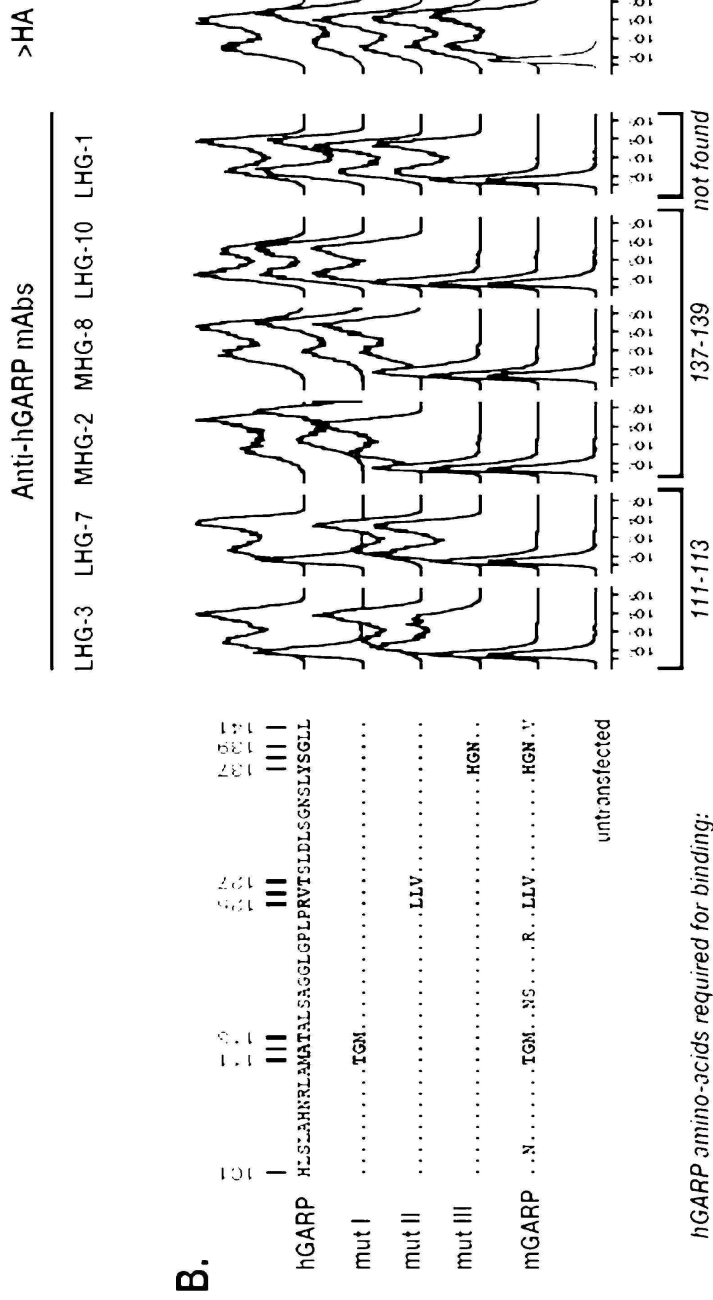
도면14b



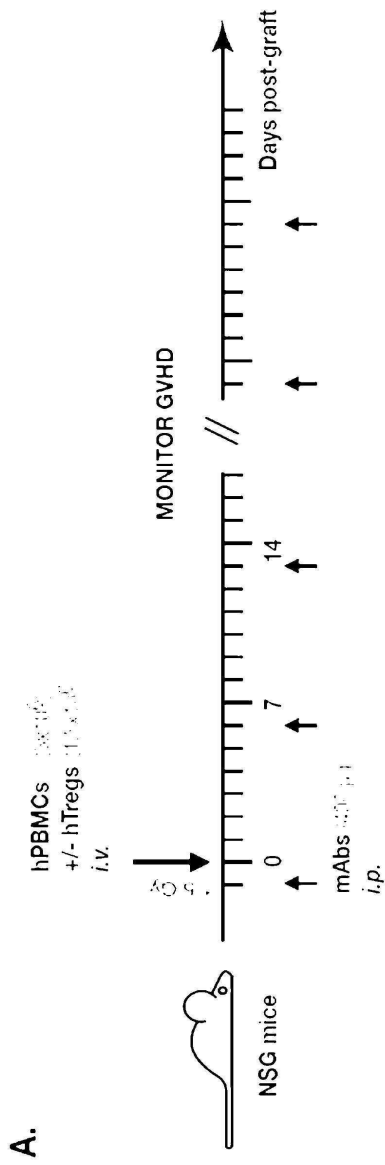
도면15a



도면15b



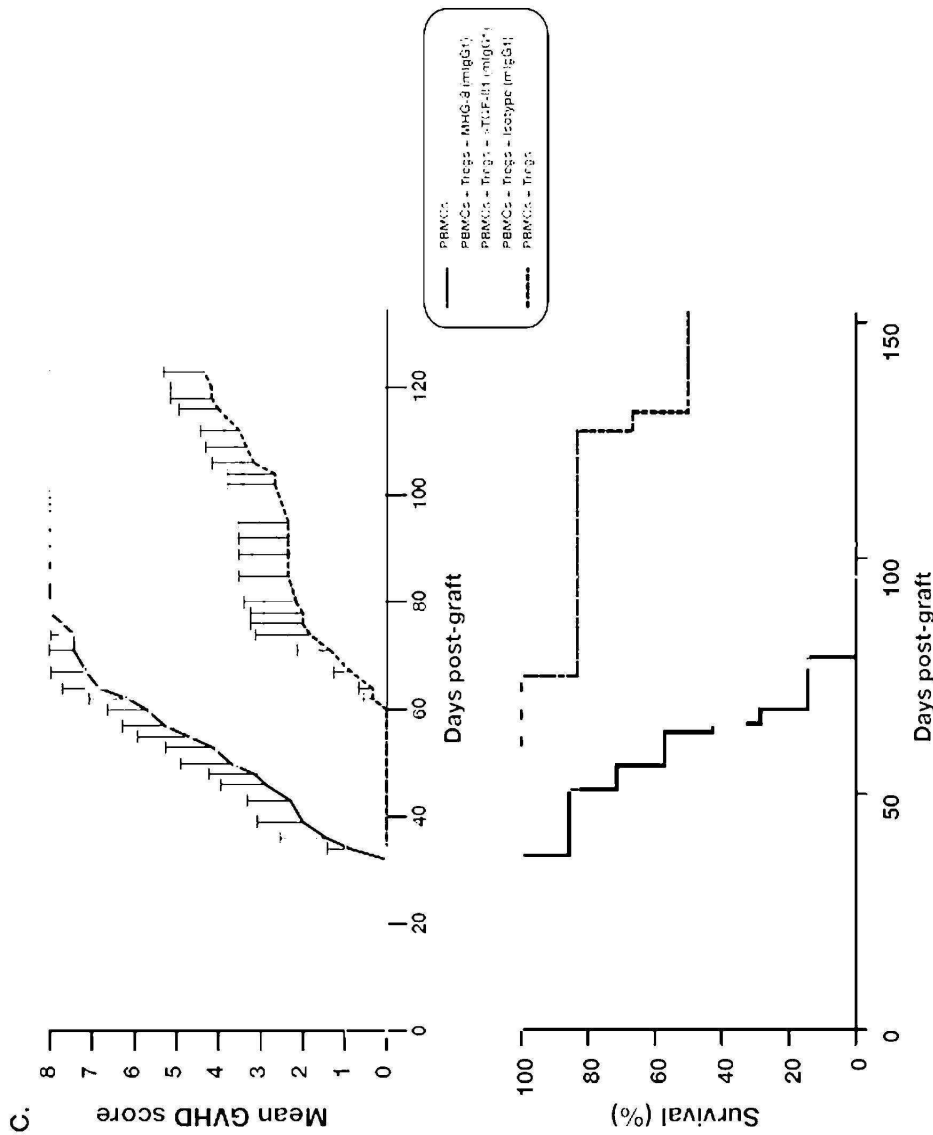
도면16a



B.

| Expt | Donor | Day of disease onset | | |
|------|-------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| | | PBMCs - Tregs | PBMCs + Tregs + MHG-8 | Day of disease onset |
| I | A | a | b | c |
| | | 29 (n=2) | 58 (n=3) | 36 (n=5) |
| II | B | a | b | c |
| | | 28 (n=2) | 46 (n=2) | 28 (n=2) |
| III | B | a | b | c |
| | | 41 (n=2) | 57 (n=2) | 41 (n=2) |
| IV | C | a | b | c |
| | | 37 (n=2) | 72 (n=2) | 44 (n=2) |

도면16c



서열목록

- <110> Universite Catholique de Louvain LUCAS Sophie
- <120> ANTI-GARP PROTEIN AND USES THEREOF
- <130> 2015FPI-12-007
- <150> EP 13178958.8
- <151> 2013-08-01
- <150> EP 14167425.9
- <151> 2014-05-07
- <150> US 61/861,008
- <151> 2013-08-01
- <160> 52
- <170> KopatentIn 2.0

<210> 1
 <211> 662
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Arg Pro Gln Ile Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Thr Leu Gly Leu
 1 5 10 15

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

 85 90 95
 Thr His Leu Glu His Leu Ser Leu Ala His Asn Arg Leu Ala Met Ala
 100 105 110
 Thr Ala Leu Ser Ala Gly Gly Leu Gly Pro Leu Pro Arg Val Thr Ser
 115 120 125
 Leu Asp Leu Ser Gly Asn Ser Leu Tyr Ser Gly Leu Leu Glu Arg Leu
 130 135 140
 Leu Gly Glu Ala Pro Ser Leu His Thr Leu Ser Leu Ala Glu Asn Ser
 145 150 155 160

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

210 215 220
 Leu Ser Cys Asn Ser Ile Glu Ala Phe Gln Thr Ala Ser Gln Pro Gln

 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Gln Leu Thr Trp Leu Asp Leu Arg Glu Asn Lys Leu Leu

 245 250 255
 His Phe Pro Asp Leu Ala Ala Leu Pro Arg Leu Ile Tyr Leu Asn Leu

 260 265 270
 Ser Asn Asn Leu Ile Arg Leu Pro Thr Gly Pro Pro Gln Asp Ser Lys

 275 280 285
 Gly Ile His Ala Pro Ser Glu Gly Trp Ser Ala Leu Pro Leu Ser Ala

 290 295 300

 Pro Ser Gly Asn Ala Ser Gly Arg Pro Leu Ser Gln Leu Leu Asn Leu
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Tyr Asn Glu Ile Glu Leu Ile Pro Asp Ser Phe Leu Glu

 325 330 335
 His Leu Thr Ser Leu Cys Phe Leu Asn Leu Ser Arg Asn Cys Leu Arg

 340 345 350
 Thr Phe Glu Ala Arg Arg Leu Gly Ser Leu Pro Cys Leu Met Leu Leu

 355 360 365
 Asp Leu Ser His Asn Ala Leu Glu Thr Leu Glu Leu Gly Ala Arg Ala

 370 375 380
 Leu Gly Ser Leu Arg Thr Leu Leu Leu Gln Gly Asn Ala Leu Arg Asp
 385 390 395 400
 Leu Pro Pro Tyr Thr Phe Ala Asn Leu Ala Ser Leu Gln Arg Leu Asn

 405 410 415
 Leu Gln Gly Asn Arg Val Ser Pro Cys Gly Gly Pro Asp Glu Pro Gly

 420 425 430
 Pro Ser Gly Cys Val Ala Phe Ser Gly Ile Thr Ser Leu Arg Ser Leu

 435 440 445

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

 450 455 460

His Thr Pro Leu Thr Glu Leu Asp Leu Ser Ser Asn Pro Gly Leu Glu
 465 470 475 480
 Val Ala Thr Gly Ala Leu Gly Gly Leu Glu Ala Ser Leu Glu Val Leu
 485 490 495
 Ala Leu Gln Gly Asn Gly Leu Met Val Leu Gln Val Asp Leu Pro Cys
 500 505 510
 Phe Ile Cys Leu Lys Arg Leu Asn Leu Ala Glu Asn Arg Leu Ser His
 515 520 525
 Leu Pro Ala Trp Thr Gln Ala Val Ser Leu Glu Val Leu Asp Leu Arg
 530 535 540
 Asn Asn Ser Phe Ser Leu Leu Pro Gly Ser Ala Met Gly Gly Leu Glu
 545 550 555 560
 Thr Ser Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Gln Gly Asn Pro Leu Ser Cys Cys
 565 570 575
 Gly Asn Gly Trp Leu Ala Ala Gln Leu His Gln Gly Arg Val Asp Val
 580 585 590
 Asp Ala Thr Gln Asp Leu Ile Cys Arg Phe Ser Ser Gln Glu Glu Val
 595 600 605
 Ser Leu Ser His Val Arg Pro Glu Asp Cys Glu Lys Gly Gly Leu Lys
 610 615 620
 Asn Ile Asn Leu Ile Ile Ile Leu Thr Phe Ile Leu Val Ser Ala Ile
 625 630 635 640
 Leu Leu Thr Thr Leu Ala Ala Cys Cys Cys Val Arg Arg Gln Lys Phe
 645 650 655
 Asn Gln Gln Tyr Lys Ala

660

- <210> 2
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> VH-CDR1
- <400> 2

Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Ile Asn

1 5 10

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH-CDR2

<400> 3

Met Ile Trp Ser Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Val Leu Thr Ser

1 5 10 15

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH-CDR3

<400> 4

Asp Arg Asn Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR1

<400> 5

Lys Ala Ser Asp His Ile Lys Asn Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR2

<400> 6

Gly Ala Thr Ser Leu Glu Ala

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR3

<400> 7

Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 8

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable region

<400> 8

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu

 35 40 45

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

 50 55 60

Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Ser Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser

 65 70 75 80

Val Leu Thr Ser Arg Leu Arg Ile Ser Lys Asp Asn Ser Asn Ser Gln

 85 90 95

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

 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Asn Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Ala Met Asp

 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

<210> 9

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable region

<400> 9

Met Lys Phe Pro Ser Gln Leu Leu Leu Phe Leu Leu Phe Arg Ile Thr

1 5 10 15

Gly Ile Ile Cys Asp Ile Gln Val Thr Gln Ser Ser Ser Tyr Leu Ser

20 25 30

Val Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His

35 40 45

Ile Lys Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ile Ala Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Thr Leu Glu Ile Arg

115 120 125

<210> 10

<211> 420

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable region

<400> 10

atggctgtcc tggcattact cttctgctg gtaacattcc caagctgtat cttttccag 60

gtgcagctga aggagt cagg acctggcctg gtggcgcct cacagagcct gtccatcaca 120

tgcaccgtct cagggttctc attaaccggc tatggtataa actgggttcg ccagcctcca 180

ggaaagggtc tggagtggct gggaatgata tggagtgatg gaagcacaga ctataattca 240
 gttctcatat ccagactgag gatcagtaag gataattcca atagccaggt tttcttaaaa 300
 atgaacagtc tgcaagttga tgacacagcc aggtactatt gtgccagaga tcgaaactac 360
 tatgattacg acggggctat ggactactgg ggcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 420
 420

<210> 11
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> light chain variable region
 <400> 11

atgaagtttc ctctcaact tctgctcttc ctgctgttca gaatcacagg cataatatgt 60
 gacatccagg tgacacaatc ttcacctac ttgtctgtat ctctaggaga cagggtcacc 120
 attacttga aggcaagtga ccacattaaa aattggtttag cctggtatca gcagaaacca 180
 ggaattgctc ctaggctctt agtttctggt gcaaccagtt tggaagctgg ggttccttca 240
 agattcagtg gcagtggatc tggaagaat ttactctca gcattaccag tcttcagact 300
 gaagatgttg ctacttatta ctgtcaacag tattggagta caccgtggac gttcgggtgga 360
 ggcaccactc tggagatcag a 381

<210> 12
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> conformational epitope
 <400> 12

His Leu Ser Leu Ala His Asn Arg Leu Ala Met Ala Thr Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Gly Gly Leu Gly Pro Leu Pro Arg Val Thr Ser Leu Asp Leu Ser
 20 25 30
 Gly Asn Ser Leu Tyr Ser Gly Leu Leu
 35 40

<210> 13
 <211> 5

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH-CDR1 LHG-10
 <400> 13
 Ser Tyr Tyr Ile Asp
 1 5
 <210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH-CDR2 LHG-10
 <400> 14
 Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

 <210> 15
 <211>
 > 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH-CDR3 LHG-10
 <400> 15
 Asn Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Met Tyr Glu Tyr Glu
 1 5 10 15
 Tyr

 <210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL-CDR1 LHG-10
 <220><221> SITE
 <222> (5)
 <223> X is S or T

<220><221> SITE

<222> (7)

<223> X is S or V

<220><221> SITE

<222> (9)

<223> X is Y or F

<400> 16

Gln Ala Ser Gln Xaa Ile Xaa Ser Xaa Leu Ala

1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR2 LHG-10

<220><221> SITE

<222> (1)

<223> X is S or T

<220><221> SITE

<222> (2)

<223> X is A or T

<220><221> SITE

<222> (4)

<223> X is R or I

<220><221> SITE

<222> (5)

<223> X is L or P

<220><221> SITE

<222> (6)

<223> X is Q or K

<400> 17

Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Thr

1 5

<210> 18

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR3 LHG-10
 <220><221> SITE

<222> (4)
 <223> X is D, A, Y or V
 <220><221> SITE

<222> (6)
 <223> X is A, L or V
 <220><221> SITE

<222> (8)
 <223> X is V or P
 <400> 18

Gln Gln Tyr Xaa Ser Xaa Pro Xaa Thr

1 5

<210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR1 LHG-10
 <400> 19

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR2 LHG10
 <400> 20

Gly Ala Ser Arg Leu Gln Thr

1 5

<210> 21
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL-CDR3 LHG10
 <400> 21
 Gln Gln Tyr Asp Ser Leu Pro Val Thr

1 5
 <210> 22

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL-CDR1 LHG10.3

<400> 22
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Val Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL-CDR2 LHG10.3

<400> 23
 Gly Ala Ser Arg Leu Gln Thr
 1 5

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL-CDR3 LHG10.3

<400> 24
 Gln Gln Tyr Ala Ser Ala Pro Val Thr
 1 5

<210> 25
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> VL-CDR1 LHG10.4
 <400> 25
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 26
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> VL-CDR2 LHG10.4
 <400> 26
 Gly Thr Ser Arg Leu Lys Thr
 1 5

<210> 27
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> VL-CDR3 LHG10.4
 <400> 27
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Ala Pro Val Thr
 1 5

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> VL-CDR1 LHG10.5
 <400> 28
 Gln Ala Ser Gln Thr Ile Ser Ser Phe Leu Ala
 1 5 10

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> VL-CDR2 LHG10.5

<400> 29

Arg Ala Ser Ile Pro Gln Thr

1 5

<210> 30

<211> 9

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR3 LHG10.5

<400> 30

Gln Gln Tyr Val Ser Ala Pro Pro Thr

1 5

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR1 LHG10.6

<400> 31

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR2 LHG10.6

<400> 32

Gly Ala Ser Arg Leu Lys Thr

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR3 LHG10.6

<400> 33

Gln Gln Tyr Ala Ser Val Pro Val Thr

1 5

<210> 34

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable region of sequence of LHG10

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Met Tyr Glu

100 105 110

Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region of sequence LHG10

<400> 35

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Leu Pro Val

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
 100 105

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region of sequence of LHG10.3

<400> 36

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

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

100 105

<210> 37
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light chain variable region of sequence of LHG10.4
 <400> 37
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Thr Ser Arg Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Ala Pro Val
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
 100 105

<210> 38
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light chain variable region of sequence of LHG10.5
 <400> 38
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Pro Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Thr Ile Ser Ser Phe
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Ile Pro Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Gly Gly Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Val Ser Ala Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
 100 105

<210> 39

<211> 107

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region of sequence of LHG10.6

<400> 39

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

<210> 40

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human GARP truncated and tagged

<400> 40

Glu Ala Ala Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala Ala Trp Ser His Pro

1 5 10 15

Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly

20 25 30

Ala Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ala

35 40 45

<210> 41

<211> 4216

<212> RNA

<213> *Macaca fascicularis*

<220><221> unsure

<222> (1)..(4216)

<223> predicted cynomolgus GARP

<400> 41

ggtggggcag ctgagtggcc tgcgectect cgggccgtga ccccggggtc tggcgcgggg 60

tgggacccgg gggcgggttt gcgcaaatg tgccgagact gcccgggaga ggaactgcgg 120

ccgcgctgag ccagagccat gagccccag atcctgctgc tectggcct gctgacccta 180

ggcctggctg cacaacacca agacaaagt gcatgtaaga tggtaggaaa gaaggctctg 240

tgccagggtc tggcctgct ccaggtcccc ttggtgctcc cgccggacac tgagaccctt 300

gatctctctg ggaaccagct gcgagatc ctggcctcac ccctgggctt ctacacggca 360

cttcgtcacc tggacctgag caccaatgag atcaacttc tccagccagg agccttccag 420

gcctgacc acctggagca cctcagcctg gctcacaacc ggctggcgat ggccactgcg 480

ctgagtgccg gtggtctggg cccctgcca cgtgtgacct ccctggacct gtctgggaac 540

agcctgtaca gcggcctgct ggagcggctg ctaggggagg caccagcct gcatacctc 600

tactggcgg agaacagtct gactcgctc acccgccaca ccttccggga catgctgcg 660

ctggagcagc ttgacctgca tagcaactg ctgatggaca ttaggatgg cgccttcgag 720

ggcctgcccc acctgacca tctcaactt tccaggaatt ccctcacctg catctccgac 780

ttcagccttc agcagctgcg ggtgctggac ctgagctgca acagattga ggcccttcag 840

acggcctccc agccccaggc cgagttccag ctcacctggc ttgacctgcg ggagaacaaa 900

ctgctccatt tccccgacct ggccgcgctc ccgagactca tctacctgaa ctgtccaac 960
 aacctcatcc ggctccccac agggccaccc caggacagca agggcatcca cgcgccttcc 1020
 gagggctggt cagccctgcc cctctcaacc cccaatggga atgtcagtgc cgcgccctt 1080
 tcccagctct tgaatctgga tttagactac aatgagattg aactcatccc cgacagcttt 1140
 cttgagcacc tgacctcctt gtgttctctg aacctcagca gaaactgctt gcggaccttt 1200
 gaggcccggc gctcaggctc cctgccttgc ctgatgctcc ttgatttaag ccacaatgcc 1260

 ctggagacac tggaaactggg cgccagagcc ctggggctct tgcggacact gtcctacag 1320
 ggcaatgccc tgcgggacct gcctccatac acctttgcca acctggccag cctgcagcgg 1380
 ctcaacctgc aggggaaccg ggtcagcccc tgtggggggc cgaatgagcc cggccccgcc 1440
 agctgtgtgg ccttctctgg catcgcctcc ctccgcagcc tgagcctggt ggataatgag 1500
 atagagctgc tcagggcagg ggcttctctc catacccccac tgactgagct ggacctttct 1560
 tccaacctg ggctggagggt ggccacaggg gccttgacag gcctggaggc ctcttggaa 1620
 gtcttggcac tgcagggcaa tgggttgacg gtcttcagcagg tggacctgcc ctgcttcac 1680

 tgctcaage ggetcaatct tgccgagaac cgctgagcc acctccccgc ctggacacag 1740
 gctgtgtcac tggagggtct ggacctgcga aacaacagct tcagcctcct gccaggcagt 1800
 gccatgggtg gcctggagac cagcctccgg cgctctacc tgcaggggaa tccactcagc 1860
 tgcttggca atggctggct ggcagcccag ctgcaccagg gccgtgtgga cgtggacgcc 1920
 acccaggacc tgatctgcc cttcagctcc caggaggagg tgtccctgag ccacgtgcgt 1980
 cccgaggact gtgagaaggg ggggctcaag aacatcaacc tcatcatcat cctcaccttc 2040
 aactggctct ctgccatcct cctcaccacg ctggccacct gctgctgtgt ccgccggcag 2100

 aagttaacc aacagtataa agcctaaaga agccgggaga cactctaggt caatggggga 2160
 gcctgaggta cagagaagag tgaggactga ctcaaggtca cacagtgacc caggatccca 2220
 gaactctggt ctccaaattg caaccggga cacctttctc tgccgcctgc tgcactcagc 2280
 ggtgaccccc ttccccggct gcactttggg tccagctgtg gaagccagaa gtggggcgg 2340
 ttcagggaca gcaggaata atgttgacct atcagatcaa caaatcttca ctgagcatct 2400
 actttgtgcc aactctgct ctgggcactg ggaatgctgg gaaataagat aactcccgc 2460
 cctcaagaat ctccagctct ggtaggaggg agtctacag agcccgctgg tgaccacgca 2520

 gtgtgcttag ggctgagggt gtgaaagccc gggactccgg agctcggcag gccccctgg 2580
 ttcgatgca agagtctgc cccagccatg ccagggtgag agagggccaa gcctgggagg 2640
 atttgtctga gacatttcca agcagactgt ttgtcacatc ttctgataat gactttcagt 2700
 ctctctgaaa atgaaaagct tatgaccgga agagagaatt ggagccatac gactgtgtct 2760

tggatctggt gctgttaggc gggcccgccg gcctccagca gggctctggtt aaggggtcca 2820
 gcccggcact ggaccattcc gtctctctgt ctggacaggc cgtctccctg cctggcactc 2880
 tcatgttaca cagcctgata ccagctactgc tctaagcgcc gtccttgccc agcccttctc 2940

 catcgagcc ccgccttggc tgctaagcca agagctaaaa ccttagatat ctgattctgt 3000
 tttgcaccca gcttggcaga tgtggatgtg aatccaagcc tgtgtctgcc cctatatgac 3060
 agcccttggg ggttggattt ttatecccat ttataaaaag aggaaactga agttctacaa 3120
 atctccttc agggccccag ctaactaatg ccttaggtga gattcaaacc ctcatcttc 3180
 tgtctccagg gcctgatctt tgccactgca ggggctgcag gccgttaagt ggacaggaag 3240
 tggctccaca tagccccagc agggctctga agtatcctgt gctatgcata cctgctctct 3300
 cctctctccc aggcaggcag ctgcaggcgc tctctctctc ctctgcctta gtttcctcc 3360

 ttccatcctt tccacctgg tgtgggttct cctgttctct ctgtgctctt gcattctctc 3420
 attccctttt cctctattga gcagagcctg gagtttgaga ctattgaatc caacctcccc 3480
 attgcacaga tggggaaact gaggcttagg aagagaatga aacttgtgga gagctataca 3540
 gagcctctgg ggaaaaaaaa gagagcccta tttggggatg agattagggg ttggaccata 3600
 gtgatgtcct ctcttggctg tcacatcaca agataatgct ggctccaaac ttcctttctg 3660
 tgctctctca tgcaggattt ttttttccc tcttggaaaa ataggtagaa aggctcacc 3720
 agataacccc ctatccctca tagcatggag tcatgagctg tctgggaaga atggacacgc 3780

 tgggaccaac tcaagacctt gtgttctgt cttcatcctc ttacctgtgc ttggcccaca 3840
 gtctggctca tgatgtgggc tcagtaatgt gcaagaaaat gaaaatgcca ctctctccac 3900
 cccattttac agaggagaac accgagggcc agaggaagt aaggagagt caatgggcag 3960
 agccagggt agcccttgg gatgtgtgga gcaccaggc agaccagtc ctggttggga 4020
 tcacaaccac aggtgctact gcacgtgaca ctcttctta ggctggagg ccaaggtgtg 4080
 ggtcctcag ccgatcttt gaaaacacta cacaatgctg ctgtcagttc ccaggacca 4140
 ggccgcagcc caggcctcgg gaccaactct ttgtataacc tacctgaatg tattaaaaac 4200

 taattttgga gaagca 4216
 <210> 42
 <211> 2188
 <212> RNA
 <213> *Macaca fascicularis*
 <220><221> unsure
 <222> (1)..(2188)

<223> cynomolgus TGF beta 1

<400> 42

ccgccgccct tcgcgccctg ggccatctcc ctcccacctc cctccgcgga tcagccagac 60
 tgcgagggcc ccggccgggg gcagggggga cgcctcgtcc ggggcacccc cccggctctg 120
 agccgccgc ggggccggcc tcggcccgga gcggaggaag gagtgcgga ggagcagcct 180
 gagggcccag agtctgagac gagccgccgc cgcctccgcc actgcgggga ggagggggag 240

 gaggagcggg aggagggacg agctggtcgg gagaagagga aaaaaacttt tgagactttt 300
 ccgttgccgc tgggagccgg aggcgcgggg acctcttggc gcgacgctgc cccgcgagga 360
 ggcaggaactt ggggacccca gaccgcctcc ctttgccgcc ggggacgctt gctccctccc 420
 tgccccctac acggcgtccc tcaggcgcgc ccattccgga ccagccctcg ggagtgcgag 480
 acccggcctc ccgcaaatac ttttccccag acctcgggag caccctcgc acgccgctt 540
 catccccggc ctgtctctg agccccgcgc catcctagac cttttctctt ccaggagacg 600
 gatctctctc cgacctgcca cagatccct attcaagacc acccacttc tggtagcaga 660

 tctcgcccat ctagttatt tccgtgggat actgagacac ccccgtcca agcctccct 720
 ccaccactgc gcccttctcc ctgaggacct caacttccc tcgaggccct cctacctttt 780
 cccgggagac cccagcccc tgcaggggag gggcctccc accacgctag cctgttgc 840
 cctctcgca gtgccgggg gcgcgcctc cccatgccc cctccgggc tgcggctgct 900
 gccgctgctg ctaccgctgc tgtggctact ggtgctgacg cctggccggc cggcccgagg 960
 actatccacc tgcaagacta tcgacatgga gctggtgaag cggaagcga tcgaggccat 1020
 ccgcggccag atctgtcca agctcgggct cgcagcccc ccgagccagg gggaggtgcc 1080

 gccccgccc ctgcccagg ccgtgctgc cctgtacaac agcaccgag accgggtggc 1140
 cggggagagt ggggagccgg aaccgaacc ggaggccgac tactacgcca aggaggtcac 1200
 ccgctgcta atggtgaaa cccacaacga aatctatgac aagtcaagc agagcacaca 1260
 cagcatatat atgttctca acacatcaga gctccgagaa gcagtacctg aacctgtgtt 1320
 gctctcccgg gcagagctgc gtctgctgag gctcaagtta aaagtggagc agcatgtgga 1380
 gctgtaccag aaatacagca acaattcctg gcgatactc agcaaccggc tgctggcgcc 1440
 cagcgactcg ccggagtgtg tgtcttttga tgtaccgga gttgtgcggc agtgggtgag 1500

 ccgcggagg gaaattgagg gctttcgcct tagcgcaccac tgctccttg acagcaaaga 1560
 taacacactg caagtggaca tcaacgcagg gttcactacc ggccgccgag gtgacctggc 1620
 caccattcat ggcatgaacc ggccttctc gcttctcatg gccacccgc tggagagggc 1680
 ccaacatctg caagctccc ggcaccgagc agccctggac accaactact gcttcagctc 1740

cacggagaag aactgctgcg tgcggcagct gtatattgac ttccgcaagg acctcggctg 1800
 gaagtggatc cacgagccca agggctacca tgccaacttc tgccctgggac cctgccccta 1860
 catttggagc ctggacacgc agtacagcaa ggtcctggcc ctgtacaacc agcataaacc 1920

ggcgccctcg gcggcgccgt gctgctgccc gcaggcctg gagccgctgc ccatcgtgta 1980
 ctacgtgggc cgcaagccca aggtggagca gctgtccaac atgatcgtgc gctcctgcaa 2040
 atgcagctga ggccccgtcc cgccccgccc cccccggca ggccccggccc cgccccgccc 2100
 cgccccgct gccttgcct tgggggctgt atttaaggac acccgtgccc caagcccacc 2160
 tggggcccca ttaaagatgg agagagga 2188

<210> 43
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cyno TGFB S1
 <400> 43
 cgctcccc atgccgcct ccg 23

<210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cyno TGFB Sens 2
 <400> 44
 acaattcctg gcgatacctc 20

<210> 45
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cyno TGFB Anti-Sens 1
 <400> 45
 ctcaaccact gccgacaac 20

<210> 46
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> cyno TGFB Anti-Sens 2

<400> 46

tcagctgcat ttgcaggagc

20

<210> 47

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human IgG1; Fc region of LHG-10

<400> 47

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

1 5 10 15

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

115 120 125

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

130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

165 170 175

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 195 200 205
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 48
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Heavy chain constant domain of LHG-10
 <220><221> SITE
 <222> (297)

 <223> wherein X is N or Q
 <400> 48
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

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

115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Xaa Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

- <210> 49
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain constant domain of LHG-10

<400> 49

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

<210> 50

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable region

<400> 50

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

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

85 90 95

Arg Asp Arg Asn Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 51

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable region

<400> 51

Asp Ile Gln Val Thr Gln Ser Ser Ser Tyr Leu Ser Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Lys Asn Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ile Ala Pro Arg Leu Leu Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Thr Leu Glu Ile Arg

100 105

<210> 52

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH-CDR1

<400> 52

Gly Tyr Gly Ile Asn

1

5