

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(10) 国際公開番号

WO 2011/102483 A1

PCT

(43) 国際公開日  
2011 年 8 月 25 日(25.08.2011)

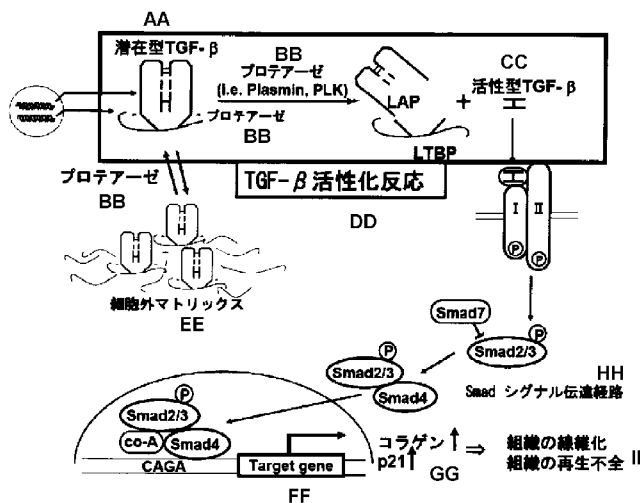
- (51) 国際特許分類:  
C12N 15/09 (2006.01) A61P 13/12 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/22 (2006.01)  
A61P 1/16 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)  
A61P 9/10 (2006.01) C12N 15/02 (2006.01)  
A61P 11/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/053559
- (22) 国際出願日: 2011 年 2 月 18 日(18.02.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2010-034449 2010 年 2 月 19 日(19.02.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 助永 義和 (SUKENAGA Yoshikazu) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 小嶋 聡一 (KOJIMA Soichi) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 原詳子 (HARA Mitsuko) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人セントクレスト国際特許事務所 (CENTCREST IP ATTORNEYS); 〒1040031 東京都中央区京橋 2 - 8 - 2 1 金鳳堂ビル 9 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,

[続葉有]

(54) Title: HUMAN LAP TGF- $\beta$  BINDING ANTIBODY

(54) 発明の名称: ヒト TGF- $\beta$  の LAP に結合する抗体

[図1]



AA Latent TGF- $\beta$   
BB Protease  
CC Active TGF- $\beta$   
DD TGF- $\beta$  activation reaction  
EE Extracellular matrix  
FF Target gene  
GG Collagen  
HH Smad signal transduction pathway  
II Cell filamentation, cell regeneration failure

(57) Abstract: Monoclonal antibodies against a peptide corresponding to LAP TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 are prepared, and monoclonal antibodies which specifically bind with the isoform of LAP TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 are selected from among the prepared monoclonal antibodies. The epitope region on the LAP of the selected antibodies is identified. Moreover, a plurality of antibodies which exert antigenicity against the LAP cleavage caused by protease, and an antibody which exerts an activity of inhibiting liver and kidney fibrosis were discovered in the selected antibodies.

(57) 要約: TGF- $\beta$ 1 および TGF- $\beta$ 2 の LAP に相当するペプチドに対するモノクローナル抗体を調製し、その中から、いずれかのアイソフォームに特異的に結合するモノクローナル抗体を選抜した。選抜した抗体の LAP 上のエпитープ領域を同定した。さらに、選抜した抗体の中に、プロテアーゼによる LAP の切断に対する抑制活性を示す複数の抗体、並びに肝臓または腎臓の線維化を抑制する活性を有する抗体を見出した。



LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i)及び 48.2(a)(viii))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

## 明 細 書

**発明の名称：** ヒトTGF- $\beta$  のLAPに結合する抗体

### 技術分野

[0001] 本発明は、ヒトTGF- $\beta$  のLAPに結合する抗体およびその用途に関する。より詳しくは、ヒトTGF- $\beta$  の特定のアイソフォームのLAPに特異的に結合し、かつ、当該TGF- $\beta$  アイソフォームの活性化を抑制する活性を持つ抗体に関する。

### 背景技術

[0002] TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) は、間葉系細胞の細胞外マトリックス産生を強力に促すとともに上皮系細胞の増殖を抑制することにより、肝線維化／肝硬変、肺線維化、腎線維化／腎不全、皮膚線維症、動脈硬化などの硬化性疾患の病態を形成する一方、免疫担当細胞の働きを抑制するなど、多彩な生物活性を示す分子量25kDのホモダイマー多機能性サイトカインである。

[0003] TGF- $\beta$  は、受容体に結合できない分子量約300kDの不活性な潜在型として産生され、標的細胞表面やその周囲で活性化されて受容体に結合できる活性型となる。これにより、始めてその作用を発揮できるようになる(図1)。TGF- $\beta$  1は、まず、391個のアミノ酸からなる前駆体タンパク質として生成される。その後、ゴルジにおいてフューリン様プロテアーゼの働きで、前駆体タンパク質の279Argと280Alaの間が切断される。そして、カルボキシル末端側の12個のアミノ酸からなる部分がジスルフィド結合により2量体化することにより、分子量25 kDの活性型TGF- $\beta$  1が生成する。TGF- $\beta$  2とTGF- $\beta$  3も同じ構造で、Arg-Ala配列は共通している。切断された残りのアミノ末端側の部分は、LAP (latency associated protein) と呼ばれる。LAPもまた2量体化し(分子量75kD)、活性型TGF- $\beta$  から切り離された後も非共有結合で活性型TGF- $\beta$  をトラップして、潜在型TGF- $\beta$  小複合体 (small latent TGF- $\beta$  complex ; SLC) を形成する。こうしてLAPは、活性型TGF- $\beta$  を受容体に結合できない構造、すなわち潜在型に留めている。さらに多くの場合、LAPダイマーの端に

は、LTBP (latent TGF- $\beta$  binding protein) という分子量約200kDのタンパク質が結合して、潜在型TGF- $\beta$  大複合体 (Large latent TGF- $\beta$  complex; LLC) を形成する。TGF- $\beta$  2とTGF- $\beta$  3も同様の構造をとっている。LTBPは、細胞外マトリックスタンパク質の1種であるフィブリリンと構造が似ており、LLCは、LTBPを介して細胞外マトリックスにプールされている (図1)。

[0004] TGF- $\beta$  の活性化は、なんらかの方法でLAPと活性型TGF- $\beta$  間の非共有結合による会合を妨げることによってLLCにトラップされている活性型TGF- $\beta$  を解離、放出する反応である。TGF- $\beta$  の活性化は、マトリックスからLLCが放出されたのちに、標的細胞表面やその近傍において起こる (図1)。生理的なTGF- $\beta$  活性化反応には、トロンボスポンジンやインテグリンと結合することによってLAPの構造が変化する結果、活性型TGF- $\beta$  を放出する接着活性化反応と、プロテアーゼによってLAPが限定分解されて、保持していた活性型TGF- $\beta$  を放出する切断活性化反応とが知られている (図1)。

[0005] このようにTGF- $\beta$  の活性化の機構が徐々に解明されてきたことに伴い、TGF- $\beta$  が関連する上記疾患の診断、治療あるいは予防などの目的で、TGF- $\beta$  の活性化を検出するための抗体の開発やTGF- $\beta$  の活性化を抑制する抗体の開発が試みられてきた。

[0006] 例えば、TGF- $\beta$  の活性化過程における、潜在型TGF- $\beta$  のプラスミンと血漿カリクレインによる切断面 (それぞれ、潜在型TGF- $\beta$  の56Lys-57Leuの間、58Arg-59Leuの間) を認識する抗体が開発されている (特許文献1)。この抗体は、インタクトなLAPには結合せず、その切断面に特異的に結合するという性質を有していることから、これを用いることにより、TGF- $\beta$  活性化反応の検出が可能であるとされているが、TGF- $\beta$  活性化反応自体は抑制しない。

[0007] 一方、LAPに結合し、TGF- $\beta$  の活性化を抑制する抗体の開発もなされている (特許文献2)。疑似創傷状態にしたウシ大動脈内皮細胞とウシ大動脈平滑筋細胞との共存培養において、TGF- $\beta$  が活性化した場合、ウシ大動脈平滑筋細胞の遊走が抑制されるが、この抗体は、ウシ大動脈平滑筋細胞の遊走を回復させる活性を持つとされている。

[0008] しかしながら、TGF- $\beta$ には、ほとんど同じ生物活性を示すTGF- $\beta$  1からTGF- $\beta$  3までのアイソフォームが存在する。このため、TGF- $\beta$ を標的として病気の治療や予防を行う場合、副作用低減等の観点から、病態形成時に異常産生される特定のTGF- $\beta$ アイソフォームの生成のみを抑制することが極めて重要である。

[0009] これまでに、ヒトTGF- $\beta$ の特定のアイソフォームのみを認識する抗体は知られているが（例えば、特許文献3）、このような特異性を有するとともに、当該特定のアイソフォームの活性化を抑制する活性をも持つ抗体については、いまだ開発されていない。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0010] 特許文献1：国際公開第2005/023870号パンフレット

特許文献2：特許第3452946号公報

特許文献3：特公平7-68278号公報

#### 非特許文献

[0011] 非特許文献1：F. Okada, et al., J. Biochem. 106:304-310(1989)

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、TGF- $\beta$ の特定のアイソフォームに特異的に結合し、かつ、当該アイソフォームの活性化を抑制する活性を有する抗体を提供することにある。さらなる本発明の目的は、このような抗体を有効成分とする、TGF- $\beta$ の活性化に起因する疾患、例えば、肝線維化／肝硬変、肺線維化、腎線維化／腎不全、皮膚線維症、動脈硬化などの硬化性疾患、を治療または予防するための薬剤を提供することにある。

#### 課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、潜在型TGF- $\beta$ におけるLAPが、プラスミンや血漿カリクレイ

ンによる切断を受け、これにより活性型TGF- $\beta$ を生成することに着目し、まず、TGF- $\beta$ の特定のアイソフォームのLAPに特異的に結合するモノクローナル抗体の調製を試みた。

[0014] 具体的には、TGF- $\beta$  1およびTGF- $\beta$  2のLAPに相当するペプチドを遺伝子組み換えまたは合成により調製し、これを免疫原としてハイブリドーマを調製した。次いで、調製したハイブリドーマから、ELISA法により、TGF- $\beta$  1およびTGF- $\beta$  2のいずれかのLAPにのみ結合するモノクローナル抗体を産生するクローンを選抜した。さらに、これらクローンが産生するアイソフォーム特異的モノクローナル抗体について、プラスミンや血漿カリクレインにより切断を受けるLAP上の部位およびその近傍領域に対する反応性を評価し、それらのLAP上のエピトープ領域を特定した。

[0015] 次に、こうして得られたアイソフォーム特異的モノクローナル抗体について、TGF- $\beta$  活性化に与える影響を検討した。具体的には、血漿カリクレインによるLAPの切断に対する、これらモノクローナル抗体の抑制活性を評価した。その結果、本発明者らは、アイソフォーム特異的モノクローナル抗体の中から、当該アイソフォームの活性化を抑制する活性を有する複数の抗体、並びに肝臓または腎臓の線維化を抑制する活性を有する抗体を見出すことに成功した。さらに、これら抗体のエピトープとTGF- $\beta$  の活性化の抑制活性との相関を詳細に分析した結果、TGF- $\beta$  の活性化の抑制に有用なエピトープを見出すことに成功した。

[0016] 従って、本発明は、TGF- $\beta$  の特定のアイソフォームのLAPに特異的に結合し、かつ、当該アイソフォームの活性化を抑制する活性を有する抗体、およびその利用に関し、より詳しくは、下記発明を提供するものである。

(1) ヒトTGF- $\beta$  の特定のアイソフォームのLAPに特異的に結合し、かつ、当該アイソフォームの活性化を抑制する活性を有する抗体。

(2) ヒトTGF- $\beta$  1のLAPに実質的に結合し、ヒトTGF- $\beta$  2のLAPに実質的に結合しない、(1)に記載の抗体。

(3) ヒトTGF- $\beta$  1のLAPにおける配列番号：5に記載のアミノ酸配列から

なる領域に実質的に結合する、(2)に記載の抗体。

(4) 配列番号：7に記載のアミノ酸配列からなるペプチドに実質的に結合し、配列番号：9～11に記載のアミノ酸配列からなるペプチドに実質的に結合しない、(2)に記載の抗体。

(5) 肝臓または腎臓の線維化を抑制する活性を有する、(1)または(2)に記載の抗体。

(6) ヒトTGF- $\beta$ 2のLAPに実質的に結合し、ヒトTGF- $\beta$ 1のLAPに実質的に結合しない(1)に記載の抗体。

(7) ヒトTGF- $\beta$ 2のLAPにおける配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなる領域に実質的に結合する、(6)に記載の抗体。

(8) 受託番号NITE BP-873、受託番号NITE BP-881、または受託番号NITE BP-882で特定されるハイブリドーマにより産生される抗体。

(9) (8)に記載の抗体が結合するヒトTGF- $\beta$ 1のLAP上のエピトープに結合する抗体。

(10) (1)から(9)のいずれかに記載の抗体をコードするDNA。

(11) (1)から(9)のいずれかに記載の抗体を産生する、または、(10)に記載のDNAを含む、ハイブリドーマ。

(12) 受託番号NITE BP-873、受託番号NITE BP-881、または受託番号NITE BP-882で特定されるハイブリドーマ。

(13) (1)から(9)のいずれかに記載の抗体を有効成分とする、TGF- $\beta$ の活性化に起因する疾患の治療または予防のための薬剤。

## 発明の効果

[0017] 本発明により、TGF- $\beta$ の特定のアイソフォームのLAPに特異的に結合し、かつ、当該アイソフォームの活性化を抑制する活性を有する抗体が提供された。本発明の抗体を用いれば、TGF- $\beta$ の活性化に起因する疾患、例えば、肝線維化／肝硬変、肺線維化、腎線維化／腎不全、皮膚線維症、動脈硬化などの硬化性疾患の治療や予防が可能となる。本発明の抗体は、TGF- $\beta$ の特定のアイソフォームに特異的であるため、生体に投与した場合に、低い副作用が期

待できる。また、活性型TGF- $\beta$ を標的とするのではなく、不活性潜在型TGF- $\beta$ から活性型TGF- $\beta$ が生成する段階を阻害するため、より早い段階での治療・予防が期待できる。

## 図面の簡単な説明

[0018] [図1] TGF- $\beta$  活性化LAPの反応機構を示す図である。

[図2] TGF- $\beta$  1およびTGF- $\beta$  2のアミノ酸配列の比較を示す図である。

[図3] 抗体作成に用いた組み換えTGF- $\beta$  1および組み換えTGF- $\beta$  2のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンブロッティング解析の結果を示す写真である。図中、レーン1と2はTGF- $\beta$  1を、レーン3と4はTGF- $\beta$  2を検出した結果である。

[図4] 血漿カリクレイン (PLK) によるLAP (TGF- $\beta$  1) の切断に対する各モノクローナル抗体の効果を、ウェスタンブロット解析した結果を示す写真である。図中、レーン1はLAPのみ、レーン2はLAP+PLK、レーン3はLAP+PLK+アプロチニン、レーン4はLAP+PLK+クローン476、レーン5はLAP+PLK+クローン727、レーン6はLAP+PLK+クローン736、レーン7はLAP+PLK+クローン467、レーン8はLAP+PLK+クローン481、レーン9はLAP+PLK+抗LAP抗体を示す。また、「←」は、LAP断片を示し、「\*」は、用いた抗体の断片を示す。

[図5] 各モノクローナル抗体のエピトープ解析の模式図である。

[図6A] 各モノクローナル抗体のエピトープ解析の結果を示す図である。TGF- $\beta$  1のLAPに対するモノクローナル抗体を用いた実験の結果を示す。

[図6B] 各モノクローナル抗体のエピトープ解析の結果を示す図である。TGF- $\beta$  2のLAPに対するモノクローナル抗体を用いた実験の結果を示す。

[図7] クローン481と536のエピトープ解析の結果を示す図である。

[図8] メチオニン・コリン欠乏食 (MCDD) を給与した非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) のモデルマウスを用いて、クローン1196の抗線維化作用を検出した結果を示す顕微鏡写真である。

[図9] コリン欠乏アミノ酸置換食 (CDAA diet) を給与した非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) のモデルマウスを用いて、各モノクローナル抗体の抗線維化



作用を検出した結果を示すグラフである。

[図10] 片側尿管結紮（UUO）腎線維化モデルマウスを用いて、各モノクローナル抗体の抗線維化作用を検出した結果を示すグラフである。

[図11] 片側尿管結紮（UUO）による腎線維化モデルマウスを用いて、クローン481と536の腎組織中コラーゲン遺伝子発現に対する影響を検出した結果を示すグラフである。

### 発明を実施するための形態

[0019] 本発明は、ヒトTGF- $\beta$ の特定のアイソフォームのLAPに特異的に結合し、かつ、当該アイソフォームの活性化を抑制する活性を有する抗体を提供する。ここで「特異的」とは、ヒトTGF- $\beta$ の特定のアイソフォームのLAPに実質的に結合し、他のアイソフォームのLAPに実質的に結合しないことを意味する。

[0020] 本発明における「抗体」は、免疫グロブリンのすべてのクラスおよびサブクラスを含む。「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体が含まれ、また、抗体の機能的断片の形態も含む意である。「ポリクローナル抗体」は、異なるエピトープに対する異なる抗体を含む抗体調製物である。また、「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体（抗体断片を含む）を意味する。ポリクローナル抗体とは対照的に、モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を認識するものである。本発明の抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。本発明の抗体は、自然環境の成分から分離、および／または回収された抗体、すなわち、「単離された」抗体である。

[0021] TGF- $\beta$ は、間葉系細胞の細胞外マトリックス産生を強力に促すとともに上皮系細胞の増殖を抑制することにより、肝線維化／肝硬変、肺線維化、腎線維化／腎不全、皮膚線維症、動脈硬化などの硬化性疾患の病態を形成する一方、免疫担当細胞の働きを抑制するなど、多彩な生物活性を示す分子量25kDのホモダイマー多機能性サイトカインである。本発明の抗体が結合する「ヒトTGF- $\beta$ 1」および「ヒトTGF- $\beta$ 2」については、既にその一次構造が公知である。本発明における「ヒトTGF- $\beta$ 1」の典型的なアミノ酸配列を配列番号：

2に、当該アミノ酸配列をコードするDNAの典型的な塩基配列を配列番号：1に示す。また、本発明における「ヒトTGF- $\beta$ 2」の典型的なアミノ酸配列を配列番号：4に、当該アミノ酸配列をコードするDNAの典型的な塩基配列を配列番号：3に示す。「ヒトTGF- $\beta$ 1」および「ヒトTGF- $\beta$ 2」については、このような典型的なアミノ酸配列を有するもの以外に、天然においてアミノ酸が変異したものも存在しうる。本発明の「ヒトTGF- $\beta$ 1」および「ヒトTGF- $\beta$ 2」には、このような変異体が含まれる。このような変異体は、配列番号：2または4で表されるアミノ酸配列において、1もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるものである。天然において生じる変異数は、一般的には、10アミノ酸以内（例えば、5アミノ酸以内、3アミノ酸以内、1アミノ酸）であると考えられる。

[0022] 本発明において「LAP」とは、潜在型TGF- $\beta$ 分子中において、活性型TGF- $\beta$ と非共有結合的に会合している二量体のプレペプチド領域を意味する。

[0023] 本発明において、TGF- $\beta$ の「活性化」とは、TGF- $\beta$ が、その受容体に結合し、作用を発揮できる状態になることを意味する。典型的には、潜在型TGF- $\beta$ のLAPが、プロテアーゼによる切断を受けて、LAPと活性型TGF- $\beta$ の会合が阻害され、不活性潜在型TGF- $\beta$ 複合体から活性型TGF- $\beta$ が遊離して、活性型TGF- $\beta$ が生成することを意味する。

[0024] 本発明の抗体の一つの好ましい態様は、ヒトTGF- $\beta$ 1のLAPに実質的に結合し、ヒトTGF- $\beta$ 2のLAPに実質的に結合しない抗体である。より好ましくは、ヒトTGF- $\beta$ 1のLAPにおけるプロテアーゼ（プラスミン、血漿カリクレイン）により切断される部位または近傍の領域（以下、単に「プロテアーゼ切断領域」と称する）に実質的に結合する抗体であり、例えば、ヒトTGF- $\beta$ 1のLAPにおける配列番号：5に記載のアミノ酸配列からなる領域（図5における「TGF- $\beta$ 1-LAP」）に実質的に結合する抗体である。

なお、本発明において「実質的に結合する」とは、本実施例におけるELISA実験において、490nmの吸光度の値が0.2以上となることを意味する（図6、7参照）。

[0025] 本発明においては、TGF- $\beta$ 1-LAPに特異的に結合する抗体のうち、配列番号：7に記載のアミノ酸配列からなるペプチド（図5における「LAP1-1」）には実質的に結合するが、配列番号：9～11に記載のアミノ酸配列からなるペプチド（図5における「LAP1-3～LAP1-5」）には実質的に結合しない抗体が、血漿カリクレインによるTGF- $\beta$ 1-LAPの切断、すなわちTGF- $\beta$ 1の活性化反応の抑制効果が高いことが見出された（表1、図4、図6A）。従って、ヒトTGF- $\beta$ 1のLAPにおける配列番号：5に記載のアミノ酸配列からなる領域（図5における「TGF- $\beta$ 1-LAP」）に実質的に結合する抗体のうち、特に、このようなペプチド特異性を有する抗体は、本発明において好適に用いることができる。

[0026] 本発明の抗体の他の好ましい態様は、TGF- $\beta$ 1-LAPに特異的に結合する抗体であって、肝臓または腎臓の線維化を抑制する活性を有する抗体である。肝臓の線維化を抑制する活性を有する抗体は、例えば、配列番号：7に記載のアミノ酸配列からなるペプチド（図5における「LAP1-1」）には実質的に結合するが、配列番号：9～11に記載のアミノ酸配列からなるペプチド（図5における「LAP1-3～LAP1-5」）には実質的に結合しない抗体である。また、腎臓の線維化を抑制する活性を有する抗体は、例えば、配列番号：17および18に記載のアミノ酸配列からなるペプチド（図7における「LAP1-0」および「LAP1-6」）には実質的に結合するが、配列番号：7～11に記載のアミノ酸配列からなるペプチド（図7における「LAP1-1～LAP1-5」）には実質的に結合しない抗体である。肝臓の線維化を抑制する活性は、例えば、実施例10に記載のメチオニン・コリン欠乏食（MCDD）を給与した非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）のモデルマウスを用いた実験や実施例11に記載のてコリン欠乏アミノ酸置換食（CDAA diet）を給与した非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）のモデルマウスを用いた実験により評価することができる。また、腎臓の線維化を抑制する活性は、例えば、実施例12に記載の片側尿管結紮（UUO）腎線維化モデルマウスを用いた実験や実施例13に記載の片側尿管結紮（UUO）による腎線維化モデルマウスを用いた実験により評価することがで

きる。

[0027] 本発明の抗体の他の好ましい態様は、ヒトTGF- $\beta$  2のLAPに実質的に結合し、ヒトTGF- $\beta$  1のLAPに実質的に結合しない抗体である。より好ましくは、上記ヒトTGF- $\beta$  1のプロテアーゼ切断領域に対応するヒトTGF- $\beta$  2上の領域に実質的に結合する抗体であり、例えば、ヒトTGF- $\beta$  2のLAPにおける配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなる領域（図5における「TGF- $\beta$  2-LAP」）に実質的に結合する抗体である。

[0028] 本発明の抗体の最も好ましい態様は、受託番号NITE BP-873、受託番号NITE BP-881、または受託番号NITE BP-882で特定されるハイブリドーマにより産生される抗体である。これら抗体は、ヒトTGF- $\beta$  1のLAPに特異的に結合するとともに、血漿カリクレインによるヒトTGF- $\beta$  1のLAPの切断を抑制する活性を有し、かつ、肝臓または腎臓の線維化を抑制する活性を有する（表1、図4、図5、図6A、図7～11）。

[0029] 一旦、これら特定のハイブリドーマが産生する抗体が得られれば、当業者であれば、その抗体が認識するLAP上のペプチド領域（エピトープ）を特定して、その領域に結合し、かつ、同様にLAPの切断を抑制する活性を示す種々の抗体を作製することができる。従って、本発明は、上記ハイブリドーマが産生する抗体のエピトープに結合し、かつ、血漿カリクレインによるヒトTGF- $\beta$  1のLAPの切断を抑制する活性を有する抗体が含まれる。抗体のエピトープは、LAPのアミノ酸配列から得られたオーバーラップする合成オリゴペプチドへの結合を調べるなどの周知の方法によって決定することができる（例えば、本願実施例、Ed Harlow and D.Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press、米国特許4708871号、を参照のこと）。ファージディスプレイによるペプチドライブラリーをエピトープマッピングに用いることもできる。二つの抗体が同一または立体的に重なり合ったエピトープと結合するかどうかは、競合アッセイ法により決定することができる。抗体における、LAPの切断を抑制する活性は、実施例8に示す方法で評価することが可能である。実施例8においては、プロテ

アーゼとして血漿カリクレインを用いているが、他のプロテアーゼを用いる場合にも、実施例 8 に準じた方法で評価することが可能である。

[0030] 本発明の抗体には、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、および、これら抗体の機能的断片が含まれる。本発明の抗体を医薬としてヒトに投与する場合は、副作用低減の観点から、キメラ抗体、ヒト化抗体、あるいはヒト抗体が望ましい。

[0031] 本発明において「キメラ抗体」とは、ある種の抗体の可変領域とそれとは異種の抗体の定常領域とを連結した抗体である。キメラ抗体は、例えば、抗原をマウスに免疫し、そのマウスモノクローナル抗体の遺伝子から抗原と結合する抗体可変部（可変領域）を切り出して、ヒト骨髄由来の抗体定常部（定常領域）遺伝子と結合し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入して産生させることにより取得することができる（例えば、特開平8-280387号公報、米国特許第4816397号公報、米国特許第4816567号公報、米国特許第5807715号公報）。また、本発明において「ヒト化抗体」とは、非ヒト由来の抗体の抗原結合部位（CDR）の遺伝子配列をヒト抗体遺伝子に移植（CDRグラフトリング）した抗体であり、その作製方法は、公知である（例えば、EP239400、EP125023、W090/07861、W096/02576参照）。本発明において、「ヒト抗体」とは、すべての領域がヒト由来の抗体である。ヒト抗体の作製においては、免疫することで、ヒト抗体のレパートリーを生産することが可能なトランスジェニック動物（例えばマウス）を利用することが可能である。ヒト抗体の作製手法は、公知である（例えば、Nature, 362: 255-258(1992)、Intern. Rev. Immunol, 13: 65-93(1995)、J. Mol. Biol, 222: 581-597(1991)、Nature Genetics, 15: 146-156(1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 722-727(2000)、特開平10-146194号公報、特開平10-155492号公報、特許2938569号公報、特開平11-206387号公報、特表平8-509612号公報、特表平11-505107号公報）。

[0032] 本発明における抗体には、抗体の一部分（部分断片）であって、ヒトTGF- $\beta$ の特定のアイソフォームのLAPを特異的に認識するもの（機能的断片）が含

まれる。具体的には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、可変領域断片(Fv)、ジスルフィド結合Fv、一本鎖Fv(scFv)、sc(Fv)<sub>2</sub>、ダイアボディー、多特異性抗体、およびこれらの重合体などが挙げられる。

[0033] ここで「Fab」とは、1つの軽鎖および重鎖の一部からなる免疫グロブリンの一価の抗原結合断片を意味する。抗体のパパイン消化によって、また、組換え方法によって得ることができる。「Fab'」は、抗体のヒンジ領域の1つまたはそれより多いシステインを含めて、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端でのわずかの残基の付加によって、Fabとは異なる。「F(ab')<sub>2</sub>」とは、両方の軽鎖と両方の重鎖の部分からなる免疫グロブリンの二価の抗原結合断片を意味する。

[0034] 「可変領域断片(Fv)」は、完全な抗原認識および結合部位を有する最少の抗体断片である。Fvは、重鎖可変領域および軽鎖可変領域が非共有結合により強く連結されたダイマーである。「一本鎖Fv(sFv)」は、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、これらの領域は、単一のポリペプチド鎖に存在する。「sc(Fv)<sub>2</sub>」は、2つの重鎖可変領域および2つの軽鎖可変領域をリンカー等で結合して一本鎖にしたものである。「ダイアボディー」とは、二つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片であり、この断片は、同一ポリペプチド鎖の中に軽鎖可変領域に結合した重鎖可変領域を含み、各領域は別の鎖の相補的領域とペアを形成している。「多特異性抗体」は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。例えば、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現により調製することができる。

[0035] 本発明の抗体には、望ましい活性(TGF- $\beta$ の特定のアイソフォームのLAPに特異的に結合する活性、プロテアーゼによるLAPの切断を抑制する活性、および／または他の生物学的特性)を減少させることなく、そのアミノ酸配列が修飾された抗体が含まれる。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体鎖をコードするDNAへの変異導入によって、またはペプチド合成によって作製することができる。そのような修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の置換

、欠失、付加および／または挿入を含む。抗体のアミノ酸配列が改変される部位は、改変される前の抗体と同等の活性を有する限り、抗体の重鎖または軽鎖の定常領域であってもよく、また、可変領域（フレームワーク領域およびCDR）であってもよい。CDR以外のアミノ酸の改変は、抗原との結合親和性への影響が相対的に少ないと考えられるが、現在では、CDRのアミノ酸を改変して、抗原へのアフィニティーが高められた抗体をスクリーニングする手法が公知である（PNAS, 102: 8466-8471(2005)、Protein Engineering, Design & Selection, 21: 485-493(2008)、国際公開第2002/051870号、J. Biol. Chem., 280: 24880-24887(2005)、Protein Engineering, Design & Selection, 21: 345-351(2008)）。

[0036] 改変されるアミノ酸数は、好ましくは、10アミノ酸以内、より好ましくは5アミノ酸以内、最も好ましくは3アミノ酸以内（例えば、2アミノ酸以内、1アミノ酸）である。アミノ酸の改変は、好ましくは、保存的な置換である。本発明において「保存的な置換」とは、化学的に同様な側鎖を有する他のアミノ酸残基で置換することを意味する。化学的に同様なアミノ酸側鎖を有するアミノ酸残基のグループは、本発明の属する技術分野でよく知られている。例えば、酸性アミノ酸（アスパラギン酸およびグルタミン酸）、塩基性アミノ酸（リシン・アルギニン・ヒスチジン）、中性アミノ酸においては、炭化水素鎖を持つアミノ酸（グリシン・アラニン・バリン・ロイシン・イソロイシン・プロリン）、ヒドロキシ基を持つアミノ酸（セリン・トレオニン）、硫黄を含むアミノ酸（システイン・メチオニン）、アミド基を持つアミノ酸（アスパラギン・グルタミン）、イミノ基を持つアミノ酸（プロリン）、芳香族基を持つアミノ酸（フェニルアラニン・チロシン・トリプトファン）で分類することができる。

[0037] 本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であれば、抗原で免疫動物を免疫し、その抗血清から、従来手段（例えば、塩析、遠心分離、透析、カラムクロマトグラフィーなど）によって、精製して取得することができる。また、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法や組換えDNA法によって作製するこ

とができる。抗原としては、遺伝子組み換えにより調製された、または、合成されたLAPまたはその部分ペプチド、またはこれらを発現する細胞などを用いることができる。抗原は、高純度で精製されたペプチドであることが好ましい。ヒスチジンタグ等のアフィニティタグを融合したペプチドとして調製する場合には、精製過程においては、このタグに対するアフィニティカラムを用いることができる。

[0038] ハイブリドーマ法としては、代表的には、コーラーおよびミルスタインの方法 (Kohler & Milstein, Nature, 256: 495 (1975)) が挙げられる。この方法における細胞融合工程に使用される抗体産生細胞は、抗原で免疫された動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、サル、ヤギ）の脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血白血球などである。免疫されていない動物から予め単離された上記の細胞またはリンパ球などに対して、抗原を培地中で作用させることによって得られた抗体産生細胞も使用することが可能である。ミエローマ細胞としては公知の種々の細胞株を使用することが可能である。抗体産生細胞およびミエローマ細胞は、それらが融合可能であれば、異なる動物種起源のものでもよいが、好ましくは、同一の動物種起源のものである。ハイブリドーマは、例えば、抗原で免疫されたマウスから得られた脾臓細胞と、マウスミエローマ細胞との間の細胞融合により産生される。その後、得られたハイブリドーマクローンのスクリーニングにより、TGF- $\beta$  の特定のアイソフォームのLAPに特異的なモノクローナル抗体を産生するクローンを得ることができる。スクリーニングにおいては、例えば、得られたハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体（例えば、培養上清、精製抗体）について、TGF- $\beta$  の各アイソフォームのLAP（例えば、TGF- $\beta$  1のLAP、TGF- $\beta$  2のLAP）への反応性を評価し、いずれかのアイソフォームのLAPに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するクローンを選抜すればよい。さらに、アイソフォーム特異的モノクローナル抗体については、LAPにおけるプロテアーゼにより切断を受ける部位およびその近傍領域に対する反応性を評価し、それら抗体のLAP上のエピトープ領域を同定することができる。モノクローナル抗



体は、ハイブリドーマを培養することにより、また、ハイブリドーマを投与した哺乳動物の腹水から、取得することができる。

[0039] 免疫原およびスクリーニング用の合成ペプチドの具体例としては、TGF- $\beta$ 1-LAPとして「EAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLAL（配列番号：5）」が、TGF- $\beta$ 2-LAPとして「EAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEEVPPEVISI（配列番号：6）」が挙げられる。エピトープ解析用の合成ペプチドの具体例としては、TGF- $\beta$ 1-LAPとして「LSKLRLASPP（配列番号：7）」、「KLRLASPPSQ（配列番号：8）」、「RLASPPSQEVPPGP（配列番号：9）」、「ASPPSQGEVPPG（配列番号：10）」、「PPSQGEVPPGPL（配列番号：11）」、「EAIRGQIL（配列番号：17）」、および「PEAVLAL（配列番号：18）」が挙げられる。TGF- $\beta$ 2-LAPとして「KLKLTSPPED（配列番号：12）」、「KLTSPPEDYP（配列番号：13）」、「TSPPEDYPEP（配列番号：14）」、「PPEDYPEPEE（配列番号：15）」、および「EDYPEPEEVP（配列番号：16）」が挙げられる。本実施例に示すように、これらペプチドのN末端にシステインを付加したペプチドを、Fmoc固相合成法により合成することが可能である。

[0040] 組換えDNA法は、上記本発明の抗体をコードするDNAをハイブリドーマやB細胞等からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主細胞（例えば哺乳類細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞など）に導入し、本発明の抗体を組換え抗体として産生させる手法である（例えば、P. J. Delves, Antibody Production: Essential Techniques, 1997 WILEY、P. Shepherd and G. Dean Monoclonal Antibodies, 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS、Vandamme A.M. et al., Eur. J. Biochem. 192:767-775(1990)）。本発明の抗体をコードするDNAの発現においては、重鎖または軽鎖をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換してもよく、重鎖および軽鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換してもよい（W094/11523号公報参照）。本発明の抗体は、上記宿主細胞を培養し、宿主細胞内または培養液から分離・精製し、実質的に純粋で均一な形態で取得することができる。抗体の分離・精製は、

通常のポリペプチドの精製で使用されている方法を使用することができる。  
トランスジェニック動物作製技術を用いて、抗体遺伝子が組み込まれたトランスジェニック動物（ウシ、ヤギ、ヒツジまたはブタなど）を作製すれば、そのトランスジェニック動物のミルクから、抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である。

[0041] 本発明は、上記本発明の抗体をコードするDNA、当該DNAを含むベクター、当該DNAを保持する宿主細胞、および当該宿主細胞を培養し、抗体を回収することを含む抗体の生産方法をも提供するものである。

[0042] 本発明の抗体は、アイソフォーム特異的にTGF- $\beta$ の活性化を抑制することから、例えば、肝線維化／肝硬変、肺線維化、腎線維化／腎不全、皮膚線維症、動脈硬化などの硬化性疾患の治療または予防に利用することができる。従って、本発明は、本発明の抗体を有効成分とするTGF- $\beta$ の活性化に起因する疾患の治療または予防のための薬剤、および、本発明の抗体の治療上または予防上の有効量を、患者に投与する工程を含む、TGF- $\beta$ の活性化に起因する疾患の治療または予防の方法をも提供するものである。

[0043] 本発明の抗体を有効成分とする薬剤は、本発明の抗体と任意の成分、例えば生理食塩水、葡萄糖水溶液または燐酸塩緩衝液などを含有する組成物の形態で使用することができる。本発明の薬剤は、必要に応じて液体または凍結乾燥した形態で製形化しても良く、任意に薬学的に許容される担体もしくは媒体、例えば、安定化剤、防腐剤、等張化剤などを含有させることもできる。

[0044] 薬学的に許容される担体としては、凍結乾燥した製剤の場合、マンニトール、ラクトース、サッカロース、ヒトアルブミンなどを例として挙げることができ、液状製剤の場合には、生理食塩水、注射用水、燐酸塩緩衝液、水酸化アルミニウムなどを例として挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

[0045] 本発明の薬剤の投与方法は、投与対象の年齢、体重、性別、健康状態などにより異なるが、非経口投与（例えば、静脈投与、皮下投与、動脈投与、局

所投与)、経口投与のいずれかの投与経路で投与することができる。好ましい投与方法は、非経口投与である。本発明の薬剤の投与量は、患者の年齢、体重、性別、健康状態、病気の進行の程度および投与する薬剤の成分により変動しうるが、一般的に静脈内投与の場合、成人には体重1kg当たり1日0.001~1000mg、好ましくは0.01~10mgである。通常、1週間から1ヶ月間隔で投与するが、この投与間隔に限定されるものではない。

[0046] 本発明の抗体は、上記疾患の治療や予防のみならず、診断への応用も考えられる。本発明の抗体を診断に用いる場合あるいはTGF- $\beta$ の特定のアイソフォームの検出に用いる場合、本発明の抗体は、標識したものであってもよい。標識としては、例えば、放射性物質、蛍光色素、化学発光物質、酵素、補酵素を用いることが可能であり、具体的には、ラジオアイソトープ、フルオレセイン、ローダミン、ダンシルクロリド、ルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、リゾチーム、ビオチン/アビジンなどが挙げられる。本発明の抗体を診断剤として調剤するには、合目的な任意の手段を採用して任意の剤型でこれを得ることができる。例えば、精製した抗体についてその抗体価を測定し、適当にPBS(生理食塩を含むリン酸緩衝液)等で希釈した後、0.1%アジ化ナトリウム等を防腐剤として加えることができる。また、例えば、ラテックス等に本発明の抗体を吸着させたものについて抗体価を求め、適当に希釈し、防腐剤を添加して用いることもできる。

## 実施例

[0047] 以下、本発明を実施例により、さらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[0048] [実施例1] 組み換え抗原TGF- $\beta$ 1-LAPおよびTGF- $\beta$ 2-LAPの組換え大腸菌による調製

pGEX-6P-1/TGF- $\beta$ 1(プラスミド1)とpGEX-6P-1/TGF- $\beta$ 2(プラスミド2)をそれぞれ100ng用いて、ヒートショック法により、Rosetta-gamiB(DE3)(Novagen社)の形質転換を実施した。形質転換体の選抜には、LB培地+Amp50寒天培地を使用した。形質転換体のコロニーを、LB培地+Amp50において12~15時間

培養を行って増殖させた（前培養）。培養液200  $\mu$ Lを10mLのLB+Amp50培地に添加し（2%植菌）、培養開始から4時間後、イソプロピル $\beta$ -チオガラクトピラノシド（IPTG）を終濃度0.3mMとなるように添加した。さらに3時間37°Cにて培養し、培養菌体を回収した。回収した菌体を菌体破碎用緩衝液（0.1m MEDTA、1% Triton-X100、1mg/mL リゾチーム、DNaseIを含むPBS緩衝液）500  $\mu$ Lに懸濁し、1時間振とう攪拌することで、水溶性のタンパク質を抽出した。その後、SDS-PAGEを実施した（DRC社、Perfect NT Gel 15~25%、泳動条件500V、50mA、60分）。簡易的にタンパク質の発現を確認した結果、TGF- $\beta$ 1およびTGF- $\beta$ 2ともに、Rosetta-gamiB(DE3)における発現が確認された。このため、組み換えタンパク質の調製においては、プラスミド1またはプラスミド2を保有するRosetta-gamiB(DE3)形質転換体（以降、それぞれ「形質転換体1」、「形質転換体2」と称する）を用いた。

[0049] 形質転換体1と形質転換体2を、5mLのLB培地+Amp50において、12~15時間培養し（前培養）、この培養液全量を500mLのLB培地+Amp50に添加した（1%植菌）。培養開始から3時間後（OD600が0.2~0.3に到達した段階）、形質転換体1には終濃度0.1mMのIPTGを添加し、形質転換体2には終濃度0.05mMのIPTGを添加した。その後、培養温度を16°Cにして、12~15時間培養を継続した。

[0050] 培養菌体を3000rpm、4°C、15分の遠心分離で集菌し、滅菌水などで洗浄した。回収した形質転換体1は約3gの湿菌体（1.5L培養分）に、回収した形質転換体2は約8gの湿菌体（4L培養分）に、それぞれ量を調製し、凍結融解処理を2~3回実施した。その後、前記の菌体破碎用緩衝液を湿菌体量1gに対して5mL添加し、ボルテックスミキサーなどで15分間振とうした。振とう終了後、21000rpm、4°C、15分の遠心分離を実施して、溶液画分を回収した。この画分を、GST融合タンパク質精製用ゲル（GEヘルスケア社など）を用いた分離・精製に供した。分離・精製は、製品に添付されているマニュアルのプロトコルに従って実施した。精製度の確認においては、Perfect NT Gel 15-25%（DRC社など）を用い、500V、50mA、60分の条件で電気泳動を実施した。その結果、TGF- $\beta$ 1-LAPについては、元の分子量41.2kDa（ただし30番目の残基から390番目の

残基までの361アミノ酸)にGSTタグの分子量を加算した約66kDaの位置にメインバンドが検出された(図3(A)、レーン1と2)。TGF- $\beta$ 2-LAPにおいても、元の分子量47.7kDaにGSTタグの分子量を加算した約73kDaの位置に、バンドが検出された(図3(A)、レーン3と4)。

[0051] また、TGF- $\beta$ 1-LAPおよびTGF- $\beta$ 2-LAPについては、ウェスタンブロッティングによる検出も試みた。各タンパク質を200ng/レーンとなるように濃度を調製し、SDS-PAGEを実施した。メタノールで活性化したPVDF膜をTransfer buffer (4.79mM Tris、3.86mM グリシン、0.128mM SDS) に、振とうしながら、10分間浸した。TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIORAD社) を用い、14V、最高アンペア、120分の条件で、PVDF膜への転写を行なった。転写されたPVDF膜をTBS-T (2.48mM Tris-HCl、137mM 塩化ナトリウム、0.27mM 塩化カリウム、0.05% Tween20 (pH7.4)) で10分間振とうして平衡化し、5%のスkimミルクを含むTBS-Tでブロッキング(30分~1時間)を行った。その後、PVDF膜をTBS-Tで十分に洗浄した。抗ヒトTGF- $\beta$ 2抗体(SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY社、型番sc-90)を1 $\mu$ g/mLの濃度に調製し、これを1次抗体として、PVDF膜に、37°Cで1時間、反応させた。その後、ブロッキング溶液にて15000倍に希釈したパーオキシターゼ結合抗ウサギIgG抗体を2次抗体として用い、一次抗体が結合したPVDF膜に対し、37°Cで30分反応させた。Immobilon<sup>TM</sup> western chemiluminescent HRP substrate (ミリポア社) を2次抗体反応後のPVDF膜に作用させ、その発色を、LAS3000 (富士フイルム社) を用いて検出した。その結果、TGF- $\beta$ 1-LAPにおいては、ほぼ目的の位置にシグナルが検出された(図3(B)、レーン1と2)。しかしながら、30kDa超の位置にもシグナルが検出されていることから、調製過程でTGF- $\beta$ 1-LAPが分解を受けている可能性が示唆された。TGF- $\beta$ 2-LAPにおいても、目的のシグナル以外に、複数のシグナルが検出された(図3(B)、レーン3)。調製過程でTGF- $\beta$ 2-LAPが分解を受けている可能性が示唆された。しかしながら、SDS-PAGEの結果と併せて考察すると、目的のペプチドがサンプル中に含まれていることが明らかであることから、これらサンプルは、免疫原として十分に使用できると考

えた。そこで、これらサンプルを用いて抗体作製を試みた。

[0052] [実施例 2] ペプチド抗原TGF- $\beta$  1-LAPおよびTGF- $\beta$  2-LAPの固相合成法による調製 TGF- $\beta$  1-LAPの47番目のグルタミン酸残基から79番目のアラニン残基までのアミノ酸配列、およびTGF- $\beta$  2-LAPの47番目のグルタミン酸残基から79番目のイソロイシン残基までのアミノ酸配列は、活性化LAP切断配列を含む可能性がある。これら配列のN末端にシステイン残基が付加された配列からなる種々のペプチドを、Fmoc固相合成法（アプライドバイオシステムズ社製）にて合成した。最終的なペプチドは、95% TFAを含むクリベージカクテルによって、脱保護およびレジンからの切り出しを行い、調製した。合成ペプチドに対して抗原性を付与するために、キャリアタンパク質としてmcKLH（PIERCE社製）を結合させた。

[0053] [実施例 3] エピトープ解析用ペプチド $\beta$  1-LAPおよび $\beta$  2-LAPの固相合成による調製

TGF- $\beta$  1-LAPとして「LSKLRLASPP（配列番号：7）」、「KLRLASPPSQ（配列番号：8）」、「RLASPPSQEVPPGP（配列番号：9）」、「ASPPSQGEVPPG（配列番号：10）」、「PPSQGEVPPGPL（配列番号：11）」のN末端にシステイン残基が付与された配列からなるペプチドを、TGF- $\beta$  2-LAPとして、「KLKLTSPPED（配列番号：12）」、「KLTSPPEDYP（配列番号：13）」、「TSPPEDYPEP（配列番号：14）」、「PPEDYPEPEE（配列番号：15）」、「EDYPEPEEVP（配列番号：16）」のN末端にシステイン残基が付与された配列からなるペプチドを、上記と同様にして調製した。合成ペプチドに対し、抗原性を付与するために、キャリアタンパク質としてOVA（PIERCE社製）を結合させた。

[0054] [実施例 4] 組み換えTGF- $\beta$  1-LAPおよび組み換えTGF- $\beta$  2-LAPに対するモノクローナル抗体の作製

#### （1）ハイブリドーマの作製

アフィニティ精製した組み換えTGF- $\beta$  1-LAPまたは組み換えTGF- $\beta$  2-LAPを用いて、メスのBalb/cマウスを腹腔注射により免疫した。初回は、一匹あたりFreundの完全アジュバント中の50ugの組み換えタンパク質を投与し、以降

は、RIBIアジュバント中の、25ug~50ugの組み換えタンパク質もしくはKLH結合合成ペプチドを投与した。免疫はそれぞれ2~3週間隔で行った。最後の免疫から14日後に、50ugの組み換えタンパク質を含む食塩加リン酸バッファー(PBS)で追加免疫した。追加免疫から3日後にマウスから脾臓を取り出し、抗体価の高いマウスの脾臓細胞をポリエチレングリコール4000を用いてP3. X63-Ag 8. 653マウス骨髓腫細胞と融合させた。公知のKohlerおよびMilsteinの技術を用いて、ハイブリドーマ細胞をHAT培地中のマイクロタイタープレートで選択した。

[0055] 血清中の抗体価の決定には、ELISA法を用いた。この検定においては、まず、マイクロタイタープレートを、組み換えタンパク質または合成ペプチドでコートした。次いで1% BSA/TBS-0.05% Tween20でブロッキングしたウェルに、連続希釈した血清を添加し、インキュベートした。プレートに結合した抗体をマウス免疫グロブリンに対するパーオキシターゼ結合抗体で検出した。

#### (2) ハイブリドーマのスクリーニング

組み換えTGF- $\beta$  1-LAPを免疫原として調製したハイブリドーマについて、その培養上清の組み換えTGF- $\beta$  1-LAPおよび組み換えTGF- $\beta$  2-LAPとの反応性を評価し、組み換えTGF- $\beta$  1-LAPのみに反応する培養上清を産生するハイブリドーマを選抜した。一方、組み換えTGF- $\beta$  2-LAPを免疫原として調製したハイブリドーマについて、その培養上清の組み換えTGF- $\beta$  1-LAPおよび組み換えTGF- $\beta$  2-LAPとの反応性を評価し、組み換えTGF- $\beta$  2-LAPのみに反応する培養上清を産生するハイブリドーマを選抜した。この選抜には、下記の通り、ELISA法および免疫沈降を利用した免疫沈降ELISA法を用いた。

[0056] 組み換えTGF- $\beta$  1-LAPまたは組み換えTGF- $\beta$  2-LAP (50mM 炭酸バッファー中で、1ug/mlの濃度) を96ウェルマイクロタイタープレート (NUNC社) に室温で2時間固定処理を行った。次いで、プレートをTBS/0.05% Tween 20で洗浄し、プレート表面のフリーの吸着部分を0.25% スキムミルク リン酸Buffer/0.05% Tween20を用いてブロックし (室温で30分)、再び、TBS/0.05% T

ween20で洗浄した。それぞれのハイブリドーマの培養上清をウェルに加え、室温で1時間反応させた。その後、プレートをTBS/0.05% Tween20で洗浄し、次いで、リン酸Buffer/0.05% Tween20中に希釈したパーオキシターゼ結合マウス抗IgG抗体を50uL/ウェルで加えた。室温で1時間インキュベートした後、プレートをTBS/0.05% Tween20で洗浄し、基質溶液（クエン酸バッファー（pH 5）、0.05% 0-フェニレンジアミン、0.03%  $H_2O_2$ ）をウェルに100uL/ウェルで加えた。10～15分後、2N硫酸で反応を停止させ、了解分光光度計で490nmの吸光度を測定した。免疫沈降ELISA法では、抗原、Sepharose4Bビーズ、およびハイブリドーマの培養上清の混合液（各50  $\mu$ L）を30分間攪拌し、これにより得られた上清をサンプルとした。

[0057] [実施例5] 合成ペプチドTGF- $\beta$ 1-LAPおよびTGF- $\beta$ 2-LAPに対するモノクローナル抗体の作製

（1）免疫

KLHと結合した合成ペプチドTGF- $\beta$ 1-LAPもしくはTGF- $\beta$ 2-LAPを用いて、メスのBalb/cマウスを腹腔注射により免疫した。初回は、一匹あたり、Freundの完全アジュバント中の50ugのKLH結合合成ペプチドを投与し、以降は、RIBIアジュバント中の25ug～50ugのKLH結合合成ペプチドを投与した。免疫は、それぞれ2～3週間隔で行った。最後の免疫から14日後に、50ugのKLH結合合成ペプチドを含む食塩加リン酸バッファー（PBS）で追加免疫した。追加免疫から3日後にマウスから脾臓を取り出し、抗体価の高いマウスの脾臓細胞をポリエチレングリコール4000を用いてP3.X63-Ag8.653マウス骨髓腫細胞と融合させた。公知のKohlerおよびMilsteinの技術を用いて、ハイブリドーマ細胞をHAT培地中のマイクロタイタープレートで選択した。

[0058] 血清中の抗体価の決定には、ELISA法を用いた。この検定においては、まず、マイクロタイタープレートを、組み換えタンパク質または合成ペプチドでコートした。次いで1% BSA/TBS-0.05% Tween20でブロッキングしたウェルに、連続希釈した血清を添加し、インキュベートした。プレートに結合した抗体をマウス免疫グロブリンに対するパーオキシターゼ結合抗体で検出した



。

## (2) スクリーニング

KLH結合合成ペプチドTGF- $\beta$  1-LAPを免疫原として調製したハイブリドーマについて、その培養上清のOVA結合合成ペプチドTGF- $\beta$  1-LAPまたはOVA結合合成ペプチドTGF- $\beta$  2-LAPとの反応性を評価し、OVA結合合成ペプチドTGF- $\beta$  1-LAPのみに反応する培養上清を産生するハイブリドーマを選抜した。一方、KLH結合合成ペプチドTGF- $\beta$  2-LAPを免疫原として調製したハイブリドーマについて、その培養上清のOVA結合合成ペプチドTGF- $\beta$  1-LAPまたはOVA結合合成ペプチドTGF- $\beta$  2-LAPとの反応性を評価し、OVA結合合成ペプチドTGF- $\beta$  2-LAPのみに反応する培養上清を産生するハイブリドーマを選抜した。この選抜には、ELISA法を用いた。ELISA法の詳細は、実施例4と同様である。

[0059] [実施例6] TGF- $\beta$  1-LAPおよびTGF- $\beta$  2-LAPに対するモノクローナル抗体の選択性の解析（その1）

実施例4において調製されたハイブリドーマのうち、組み換えTGF- $\beta$  1-LAPを免疫原として調製したハイブリドーマについて、その培養上清のOVA結合TGF- $\beta$  1-LAP合成ペプチドまたはOVA結合TGF- $\beta$  2-LAP合成ペプチドとの反応性を評価し、OVA結合TGF- $\beta$  2-LAP合成ペプチドと反応する株を、ELISA法により選別し、廃棄した。一方、実施例4において調製されたハイブリドーマのうち、組み換えTGF- $\beta$  2-LAPを免疫原として調製したハイブリドーマについて、その培養上清のOVA結合TGF- $\beta$  1-LAP合成ペプチドまたはOVA結合TGF- $\beta$  2-LAP合成ペプチドとの反応性を評価し、OVA結合TGF- $\beta$  1-LAP合成ペプチドと反応する株を、ELISA法により選別し、廃棄した。これにより、免疫原に特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞を得た。

[0060] OVA結合TGF- $\beta$  1-LAP合成ペプチドまたはOVA結合TGF- $\beta$  2-LAP合成ペプチド（50mM 炭酸バッファー中で、1 $\mu$ g/mlの濃度）を96ウェルマイクロタイタープレート（NUNC社）に室温で2時間固定処理を行った。次いで、プレートをTBS/0.05% Tween20で洗浄し、プレート表面のフリーの吸着部分を0.25% スキムミルク リン酸Buffer/0.05% Tween20を用いてブロックし（室温で30分）

、再び、TBS/0.05% Tween20で洗浄した。1 $\mu$ g/mlの濃度のハイブリドーマ上清または抗体溶液をそれぞれウェルに加え、室温で1時間反応させた。その後、プレートをTBS/0.05% Tween20で洗浄し、次いで、リン酸Buffer/0.05% Tween20中に希釈したパーオキシターゼ結合マウス抗IgG抗体を50 $\mu$ L/ウェルで加えた。室温で1時間インキュベートした後、プレートをTBS/0.05% Tween20で洗浄し、基質溶液（クエン酸バッファー（pH5）、0.05% 0-フェニレンジアミン、0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）をウェルに100 $\mu$ L/ウェルで加えた。10～15分後、2N硫酸で反応を停止させ、分光光度計で490nmの吸光度を測定した。

[0061] 選別されたハイブリドーマについて、さらにエピトープ解析用ペプチドを用いて同様にELISA法にて解析した。組み換えTGF- $\beta$ 1-LAPを免疫原として調製したハイブリドーマの培養上清については、TGF- $\beta$ 1-LAPエピトープ解析用ペプチドおよびTGF- $\beta$ 2-LAPエピトープ解析用ペプチドとの反応性を評価し、TGF- $\beta$ 2-LAPエピトープ解析用ペプチドと反応しないものを選択した。一方、組み換えTGF- $\beta$ 2-LAPを免疫原として調製したハイブリドーマの培養上清については、TGF- $\beta$ 1-LAPエピトープ解析用ペプチドおよびTGF- $\beta$ 2-LAPエピトープ解析用ペプチドとの反応性を評価し、TGF- $\beta$ 1-LAPエピトープ解析用ペプチドと反応しないものを選択した。

[0062] また、実施例5で調製されたハイブリドーマのうち、KLH結合合成ペプチドTGF- $\beta$ 1-LAPを免疫原として調製したハイブリドーマについて、その培養上清の組み換えTGF- $\beta$ 1-LAPまたは組み換えTGF- $\beta$ 2-LAPとの反応性を評価し、組み換えTGF- $\beta$ 2-LAPと反応するハイブリドーマを選別し、廃棄した。一方、実施例5で調製されたハイブリドーマのうち、KLH結合合成ペプチドTGF- $\beta$ 2-LAPを免疫原として調製したハイブリドーマについて、その培養上清の組み換えTGF- $\beta$ 1-LAPまたは組み換えTGF- $\beta$ 2-LAPとの反応性を評価し、組み換えTGF- $\beta$ 1-LAPと反応するハイブリドーマを選別し、廃棄した。これにより、免疫原に特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞を得た。この選抜には、下記の通り、ELISA法および免疫沈降を利用した免疫沈降ELISA法を用いた。

[0063] 組み換えTGF- $\beta$ 1-LAPまたは組み換えTGF- $\beta$ 2-LAP（50mM 炭酸バッファー

中で、1 $\mu$ g/mlの濃度)を96ウェルマイクロタイタープレート(NUNC社)に室温で2時間固定処理を行った。次いで、プレートをTBS/0.05% Tween20で洗浄し、プレート表面のフリーの吸着部分を0.25% スキムミルク リン酸Buffer/0.05% Tween20を用いてブロックし(室温で30分)、再び、TBS/0.05% Tween20で洗浄した。1 $\mu$ g/mlの濃度のハイブリドーマ上清または抗体溶液をそれぞれウェルに加え、室温で1時間反応させた。その後、プレートをTBS/0.05% Tween20で洗浄し、次いで、リン酸Buffer/0.05% Tween20中に希釈したパーオキシターゼ結合マウス抗IgG抗体を50 $\mu$ L/ウェル加えた。室温で1時間インキュベートした後、プレートをTBS/0.05% Tween20で洗浄し、基質溶液(クエン酸バッファー(pH5)、0.05% 0-フェニレンジアミン、0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)をウェルに100 $\mu$ L/ウェルで加えた。10~15分後、2N硫酸で反応を停止させ、了解分光光度計で490nmの吸光度を測定した。免疫沈降ELISA法では、抗原、Sepharose4Bビーズ、およびハイブリドーマの培養上清の混合液(各50 $\mu$ L)を30分間攪拌し、これにより得られた上清をサンプルとした。

[0064] 選別されたハイブリドーマについて、さらにエピトープ解析用ペプチドを用いて同様にELISA法にて解析した。KLH結合合成ペプチドTGF- $\beta$ 1-LAPを免疫原として調製したハイブリドーマの培養上清については、TGF- $\beta$ 1-LAPおよびTGF- $\beta$ 2-LAPエピトープ解析用ペプチドとの反応性を評価し、TGF- $\beta$ 2-LAPエピトープ解析用ペプチドと反応しないものを選択した。一方、KLH結合合成ペプチドTGF- $\beta$ 2-LAPを免疫原として調製したハイブリドーマの培養上清については、TGF- $\beta$ 1-LAPおよびTGF- $\beta$ 2-LAPエピトープ解析用ペプチドとの反応性を評価し、TGF- $\beta$ 1-LAPエピトープ解析用ペプチドと反応しないものを選択した。

[0065] [実施例7] アイソマー選択的なモノクローナル抗体の精製

抗体産生ハイブリドーマ培養上清の100mLを0.22 $\mu$ mフィルターでろ過して不溶物を除去した。ろ過した培養上清を、常法に従って、ProteinG-sepharose4B(GE Healthcare)1mLを充填したカラムに通し、抗体成分をカラムに吸着させた。カラムから、非特異吸着分を除去し、その後、カラムを酸性条件に

おくことで、モノクローナル抗体を遊離させた。こうして回収したモノクローナル抗体を精製抗体とした。得られた精製抗体は、100倍量のPBS緩衝液で透析した。

[0066] なお、以上の実施例により得られたクローンのエピトープ解析の模式図を図5に、各クローンの結合特異性のまとめを図6に示す。

[0067] [実施例8] TGF- $\beta$ 1-LAPに対するモノクローナル抗体の選択性の解析（その2）

さらに、TGF- $\beta$ 1-LAPとして「EAIRGQIL（配列番号：17）」および「PEAVLAL（配列番号：18）」のN末端にシステイン残基が付与された配列からなるペプチド（それぞれ「LAP1-0」および「LAP1-6」と称する）を調製し、実施例6と同様に、得られたモノクローナル抗体についてTGF- $\beta$ 1-LAPエピトープ解析用ペプチドとの反応性を評価した。その結果、クローン481は、LAP1-0およびLAP1-6に対して反応性を示した（図7）。

[0068] [実施例9] 得られたモノクローナル抗体の生化学的試験

得られたモノクローナル抗体について、血漿カリクレインによるヒト組換えLAP（TGF- $\beta$ 1）の切断（TGF- $\beta$ 1の活性化）に対する阻害活性を検討した。ヒト組換えLAP（TGF- $\beta$ 1）（R&D社製、終濃度3.3  $\mu$ g/ml）と各モノクローナル抗体（終濃度10  $\mu$ g/ml）（LAPモノマー：抗体のモル比=1:0.7）をリン酸緩衝生理食塩水中で、37度で10分間インキュベーションした。その後、血漿カリクレイン（Sigma社製）を添加し（終濃度33  $\mu$ g/ml）、37度で45分間切断反応を行った。次に、この反応溶液を13.5%のポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。その後、53mAで2時間の条件で、メタノールで活性化したPVDF膜（Millipore社製）への転写処理を行った。転写されたPVDF膜を5%のスキムミルクを含むリン酸緩衝生理食塩水で30分間ブロッキング処理した。その後、血漿カリクレインによるヒト組換えLAP（TGF- $\beta$ 1）分解産物（L<sup>59</sup>〜）を特異的に検出する抗L59抗体（1  $\mu$ g/ml）を一次抗体として用い、PVDF膜と4℃で一晩反応させた。反応後、ブロッキング溶液に希釈したパーオキシターゼ結合抗マウスIgG抗体（終濃度 0.4  $\mu$ g/ml）を2次抗体として用い、一次抗体が結合したPVD

F膜に対し、25°Cで1時間反応させた。抗体の検出には、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare社製) を用いた。なお、プラスミンおよび血漿カリクレインの阻害剤であるアプロチニン (Sigma社製) (終濃度200  $\mu$ g/ml) を陽性対照、市販のモノクローナル抗LAP抗体 (R&D社製) (終濃度10  $\mu$ g/ml) を陰性対照として用いた。モノクローナル抗体の阻害活性は、各対照との比較で評価した。

[0069] 図4に5種類のモノクローナル抗体について、ウエスタンブロットにより評価した結果を示す。ヒト組換えLAP (レーン1) を血漿カリクレインで切断すると30kDのLAP断片が観察される (レーン2)。血漿カリクレインの阻害剤であるアプロチニンは、この切断を完全に阻害した (レーン3)。市販の抗LAP抗体には、阻害活性は全く見られなかった (レーン9)。試した5種類の抗体 (レーン4-8) の中では、クローン467 (レーン7) に中程度の阻害効果、クローン481 (レーン8) に弱い阻害効果が観察された。表1に、同様の方法を用いて各抗体について評価した結果をまとめた。クローン94、クローン467、クローン1196、クローン1329に中程度の阻害活性が認められた。表中、「+++」は強い阻害を、「++」は中程度の阻害を、「+」は弱い阻害を、「-」は阻害なし、それぞれ示す。

[0070]

[表1]

| Clone #                    | IgG Isotype | 阻害活性 |
|----------------------------|-------------|------|
| 94                         | IgG1        | ++   |
| 189                        | IgG2a       | -    |
| 467                        | IgG2a       | ++   |
| 476                        | IgG1        | -    |
| 481                        | IgG2a       | +    |
| 536                        | IgG1        | +    |
| 700                        | IgG2a       | -    |
| 727                        | IgG2b       | -    |
| 736                        | IgG1        | -    |
| 759                        | IgG2b       | +    |
| 1196                       | IgG2b       | ++   |
| 1212                       | IgG1        | -    |
| 1300                       | IgG2b       | -    |
| 1329                       | IgG1        | ++   |
| 1333                       | IgG1        | -    |
| 1434                       | IgG2b       | -    |
| 1575                       | IgG1        | -    |
| 1604                       | IgG2a       | -    |
| アプロチニン                     |             | +++  |
| 市販抗LAP抗体<br>(R&D社製 MAB246) |             | -    |

[0071] なお、TGF- $\beta$ 1の活性化に対する阻害活性が認められたクローンについては、2010年1月26日（原寄託日）に、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（NPM D）（郵便番号292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）に寄託した。寄託したクローンのクローン番号と付与された受託番号は、下記の通りである。

クローン481／受託番号NITE BP-881

クローン536／受託番号NITE BP-882

クローン1196／受託番号NITE BP-873

[実施例10] メチオニン・コリン欠乏食（MCDD）を給与した非アルコール

性脂肪性肝炎(NASH)のモデルマウスを用いたクローン1196の抗線維化作用の検討

メチオニン・コリン欠乏食(MCDD)負荷による、非アルコール性の脂肪性肝炎(NASH)のモデル動物における脂肪性肝炎の進展に伴う肝線維化に対する、クローン1196の抑制効果を評価した。C57BL/6系マウス(雄性、9週齢、日本チャールス・リバー株式会社)を約1週間の馴化期間の後、体重により2群(各群12匹)に分け、一方をクローン1196の投与群とし、他方を溶媒コントロール群(クローン1196の非投与群)として、12週間、MCDD給餌を行った。その後、各群のマウスから肝臓を摘出し、組織切片を作製し、シリウスレッド染色を行い、肝線維化の程度を評価した。具体的には、以下の通りである。

[0072] 実験動物は、飼育ケージ(W188mm×D297mm×H128mm)当たり3~4匹で、温度が20~25℃、湿度が45~70%、換気回数が13回以上/時間、照明時間が12時間(7:00~19:00)の環境に調節された動物飼育室で飼育した。馴化期間は固形資料CRF-1(オリエンタル酵母工業)を、実験開始後はMCDDとしてF2MCD(オリエンタル酵母工業)を自由摂取させた。飲水はフィルター濾過水を自由摂取させた。クローン1196は、投与時1mg/5mlになるようにCa<sup>2+</sup>とMg<sup>2+</sup>フリーのリン酸緩衝生理食塩水(PBS;phosphate buffered saline;シグマ社)に希釈し、MCDD給餌開始時を1回目として、以後1週間ごとに12回、1mg/kgとなるよう尾静脈内投与した。溶媒コントロール群には、Ca<sup>2+</sup>とMg<sup>2+</sup>フリーのPBSを尾静脈内投与(5ml/kg)した。12回目の投与から1週間後に動物をイソフルラン(フォーレン;アボットジャパン株式会社)麻酔下で開腹した。放血死後、外側左葉の肝外胆管の起始部より下の部分を約5mmの幅で切り取り、4%パラホルムアルデヒド溶液中で4℃で一晩固定した後、パラフィン包埋標本作製した。パラフィン包埋肝組織標本より4μlに薄切した切片を用いて染色を行った。HE染色には2倍法マイヤー・ヘマトキシリン液と1%エオジン液(武藤化学)を用いた。シリウスレッドによる線維染色は、0.1%シリウスレッドを含む飽和ピクリン酸溶液に脱パラフィンした切片を30分間浸漬した。

[0073] その結果、クローン1196は、MCDD食負荷により誘導される小葉周囲の線維

化（図8、右上）を顕著に抑制した（図8、右下）。このとき、肝臓の脂肪滴形成には、クローン1196投与による影響は見られなかった（図8、左上、左下）。また、MCDD食負荷による体重減少（MCDD食給餌開始後1週間で約4g減、以後も実験終了時までかけてさらに緩やかに約6g減）に対しても、クローン1196の影響は認められなかった。

[0074] [実施例11] コリン欠乏アミノ酸置換食（CDAA diet）を給与した非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）のモデルマウスを用いた各モノクローナル抗体の抗線維化作用の検討

KK-Ayマウスは、肥満・耐糖能異常を自然発症するKKマウスに肥満遺伝子Ayを導入することにより、早期から高血糖を発現するII型糖尿病モデルマウスである。このモデルマウスは、インスリン抵抗性に加えてレプチン抵抗性や低アディポネクチン血症など、ヒトのメタボリックシンドロームに極めて類似した病態を呈する。KK-Ayマウスは、通常の餌で飼育しても軽度の脂肪性肝炎を自然発症するが、コリン欠乏アミノ酸置換食（CDAA diet: choline-deficient L-amino acid-defined diet）などの食餌性負荷をかけることにより高度の脂肪性肝炎が惹起される。この比較的新しい非アルコール性の脂肪性肝炎（NASH）モデルを用いて、脂肪性肝炎の進展に伴う肝線維化に対するTGF- $\beta$ 1活性化抑制抗体クローン6種の抑制効果を評価した。KK-Ay/Ta Jcl系マウス（雄性、6週齢、日本クレア株式会社）を1週間の馴化期間の後、体重により8群（各群8匹）に分け、7群にはCDAA飼料を、1群にはネガティブコントロールとしてコリン添加アミノ酸置換食（CSAA diets: choline-supplemented L-amino acid-defined diets）飼料を、15週間、摂餌させた。実験動物は、飼育ケージ（W110mm×D260mm×H140mm）当たり1匹で、温度が23.6～25.7℃、湿度が45～70%、換気回数が10～20回/時間、照明時間が12時間（7:00～19:00）の環境に調節された動物飼育室で飼育した。馴化期間は固形資料CRF-1（オリエンタル酵母工業）を、実験開始後はCDAA食としてA09042101（Research Diets Inc.）、CSAA食としてD09042003（Research Diets Inc.）を自由摂取させた。飲水は次亜塩素酸ソーダを添加した（約2ppm）井戸水を自由摂



取させた。TGF- $\beta$  1活性化抑制抗体は、投与時1mg/5mlになるように日本薬局方生理食塩水に希釈し、CDAA飼料摂餌9週目より6週間に渡って尾静脈内投与した。具体的には、クローン94、467、1196については週2回、クローン481、536、759については週1回、1mg/kgで投与した。溶媒コントロール群には、日本薬局方生理食塩水を尾静脈内投与（5ml/kg）した。被験抗体の最終投与から1週間後に動物をペントバルビタールナトリウム（イムノペンチル；約50mg/kg, i. p. ; 共立製薬株式会社）麻酔下で開腹し、放血死後、外側左葉の肝外胆管の起始部より下の部分を約1mmの幅で切り取り、液体窒素で凍結後、-20℃で保存した。

[0075] CDAA群マウスのNASHに伴う肝線維化に及ぼす抑制効果は、肝臓中のハドロキシプロリン量によって評価した。具体的には、以下の通りである。氷上で解凍した肝組織に2N NaOH 1mlを加え、65℃の温浴中で10分間加温し、組織を完全に溶解した。500  $\mu$ lを新しいチューブに移し、オートクレーブにて加水分解を行った（121℃、20分間）。6N HCLを等量加え、さらにオートクレーブにて加水分解を行った（121℃、20分間）。10mg/ml活性炭入りの4NのKCL、酢酸（2.2M）-クエン酸（0.48M）緩衝液（pH6.5）を各等量加え、よく混和した。遠心分離（12000rpmで10分間）した後、上清400  $\mu$ lを日比色定量用のサンプルとして新しいチューブに分取し、市販のtrans-4-Hydroxy-L-prolineを用いてスタンダードを調製し、以下の通り、定色反応を行った。0.1M クロラミンT試薬（和光純薬工業株式会社）をサンプルと等量加え、室温で25分間放置した後、エールリッヒ試薬をサンプルと等量加え、65℃の温浴で20分間加温した。氷中にて急速に冷却した。その後、遠心分離（12000rpm、10分間）し、上清の吸光度を590nmの波長で測定し、スタンダードから検量線を描き、組織中のハイドロキシプロリン量を算出した。また、2N NaOHに溶解した組織液を1/50に希釈した後、BCAassayキット（Thermo Scientific）を用いてタンパク量を定量し、ハイドロキシプロリン量をタンパク量で補正した値を求めた。

[0076] その結果、先にウエスタンブロットにより、血漿カリクレインによるLAP切

断に対して強い抑制効果を示したクローン94、467、1196のうち、クローン467がCDAA食負荷による肝ハイドロキシプロリンの増加量 $5.3 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質[CSAA食群( $3.3 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質) (レーン1)とCDAA食負荷溶媒コントロール群( $8.6 \pm 0.9 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質) (レーン2)との差]を約20%減の $4.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質[CSAA食群( $3.3 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質) (レーン1)とCDAA食負荷クローン467群( $7.4 \pm 0.9 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質) (レーン4)との差]に、クローン1196が約30%減の $3.7 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質[CSAA食群( $3.3 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質) (レーン1)とCDAA食負荷クローン1196群( $6.9 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質) (レーン5)との差]までに抑制した(図9)。これに対して、クローン94(レーン3)を含め他の被験抗体クローンは、抑制効果を示さなかった。CDAA食負荷による体重減少(15週目において、CSAA群が56gであるのに比べて、CDAA溶媒コントロール群では約8g減の48g)に対しては、すべての被験抗体で有意な影響を認められなかった(15週目において、45~49g)。

[0077] [実施例12] 片側尿管結紮(UUO)腎線維化モデルマウスを用いた各モノクローナル抗体の抗線維化作用の検討

片側尿管結紮(UUO)モデルは、片側の尿管を結紮することで水腎盂内に尿が貯積して水腎症となり、腎間質性線維化を引き起こすモデルである。本試験では、マウスの左側尿管を結紮することによりUUOモデルを作製し、腎間質性線維化に対するTGF- $\beta$ 1活性化抑制抗体クローン6種の抑制効果を評価した。Crlj:CD1(ICR)系マウス(雄性、8週齢、日本チャールス・リバー株式会社)を1週間の馴化期間の後、体重により8群(各群8~10匹)に分け、モデル作製後1、6および11日に、被験抗体もしくはコントロール抗体(ネガティブIgG)(ChromPure Mouse IgG, whole molecule)を静脈内に投与した。実験動物は、入荷以降モデル作製前は、ポリメチルペンテン製飼育ケージ(W154mm×D259mm×H137mm)を用い、1ケージ当たり3~4匹飼育し、モデル作製以降はポリメチルペンテン製飼育ケージ(W110×D260×H140mm)を用い、1ケージ当たり1匹で飼育した。飼育は、温度が23.9~25.1℃、湿度が54~65%、換気回数が10~20回/時間、照明時間が12時間(7:00~19:00)の環境に調節された

動物飼育室で行った。飼料としては、固形資料CRF-1（オリエンタル酵母工業）を自由摂取させた。飲水は次亜塩素酸ソーダを添加した（約2ppm）井戸水を自由摂取させた。片側尿管結紮(UUO)モデルは、以下の通り作製した。マウス（9週齢）を2%イソフルラン（麻酔背景；笑気：酸素=7：3）による吸入麻酔下で背位に固定して開腹し、左側の尿管を露出させた。尿管の腎臓側と膀胱側の2箇所を5-0の絹糸で結紮し、結紮した尿管の腎臓から膀胱の間を切断し、術野を縫合した。その後、注射用ビクシリン<sup>(R)</sup> S（アンピシリンナトリウム・クロキシリンナトリウム 各50mg力価）を1mlの日本薬局方注射用水に溶解したものを、切開部（縫合部）に注射筒を用いて1～2滴滴下した。擬手術（Shamオペ）動物は開腹のみを実施して縫合した。TGF- $\beta$ 1活性化抑制抗体およびコントロール抗体は、投与時1mg/5mlになるように日本薬局方生理食塩水に希釈し、モデル作製後1、6および11日に、1mg/kgとなるよう尾静脈内投与した。Sham群には、日本薬局方生理食塩水を尾静脈内投与（5ml/kg）した。モデル作製後14日に動物を2%イソフルラン（麻酔背景；笑気：酸素=7：3）による吸入麻酔下で開腹し、放血死後、左右の腎臓を摘出した。摘出した左腎臓の1/4を液体窒素にて凍結処理し、腎臓中ハドロキシプロリン量測定用サンプルとした。氷上で解凍した腎組織に、2N NaOH 1mlを加え、65℃の温浴中で10分間加温し、組織を完全に溶解した。500 $\mu$ lを新しいチューブに移し、オートクレーブにて加水分解を行った（121℃、20分間）。6N HCLを等量加え、さらにオートクレーブにて加水分解を行った（121℃、20分間）。10mg/ml活性炭入りの4NのKCL、酢酸（2.2M）ークエン酸（0.48M）緩衝液（pH6.5）を各等量加え、よく混和した。遠心分離（12000rpmで10分間）した後、上清400 $\mu$ lを日比色定量用のサンプルとして新しいチューブに分取し、市販のtrans-4-Hydroxy-L-prolineを用いてスタンダードを調製し、以下の通り、定色反応を行った。0.1M クロラミンT試薬（和光純薬工業株式会社）をサンプルと等量加え、室温で25分間放置した後、エールリッヒ試薬をサンプルと等量加え、65℃の温浴で20分間加温した。氷中にて急速に冷却した後、遠心分離（12000rpm、10分間）し、上清の吸光度を590nmの波長で測定し、スタンダード

から検量線を描き、組織中のヒドロキシプロリン量を算出した。また、2N NaOHに溶解した組織液を1/50に希釈した後、BCAassayキット (Thermo Scientific) を用いてタンパク量を定量し、ヒドロキシプロリン量をタンパク量で補正した値を求めた。

[0078] その結果、Sham群における左腎臓（尿管結紮側）中の腎臓中ヒドロキシプロリン量は、 $2.5 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質であった。これに対して、UUOモデルネガティブIgG群では、 $22.3 \pm 1.8 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質と、Sham群と比較して $19.8 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質の有意な増加が認められ、腎線維化が進行していることが確認された。被験抗体のうち、クローン481がUUOモデル作製による腎ヒドロキシプロリンの増加量 $19.8 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質 [Sham群 ( $2.5 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質) (レーン1) とUUOモデルネガティブIgG群 ( $22.3 \pm 1.8 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質) (レーン2) との差] を約24%減の $15.0 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質 [Sham群 ( $2.5 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質) (レーン1) とUUOクローン481群 ( $17.5 \pm 1.3 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質) (レーン7) との差] に、クローン536が約41%減の $11.7 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質 [Sham群 ( $2.5 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質) (レーン1) とUUOクローン536群 ( $14.2 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質) (レーン8) との差] に、それぞれ有意に抑制した (図10)。これに対して、他の被験抗体クローンは、有意な抑制効果を示さなかった。各抗体投与群はいずれの群も、コントロール抗体群と比較して、UUOモデル作製による右腎臓（非尿管結紮側）での有意な腎重量増加、および左腎臓（尿管結紮側）での有意な腎重量減少に対して影響を与えなかった。

[0079] [実施例13] 片側尿管結紮 (UUO) による腎線維化モデルマウスを用いたクローン481と536の腎組織中コラーゲン遺伝子発現に対する影響の検討

RNA Later中で保存した腎組織から、RNA精製キットRneasy Mini Kit (QIAGEN社製) を用いてmRNAを抽出し、濃度を分光光度計 (Nano Drop) を用いて求めた。次いでこのmRNAをテンプレートとして、PrimeScript™ RT reagent Kit (TAKARA社製) を用い、添付文書に従ってRT反応を行った。さらにSYBR<sup>(R)</sup> Premix EX Taq™R (TAKARA社製) を用い、添付文書に従って反応液を調製し

、I型コラーゲン (Collagen I  $\alpha 1$ ) および内部標準であるGAPDHの各プライマー (インビトロジェン社製) を用いてqPCR反応を行い、mRNA発現量を定量した。I型コラーゲンmRNA発現量をGAPDH遺伝子発現量で補正し、グラフ化した。

[0080] その結果、Sham群における左腎臓 (尿管結紮側) 中の腎臓中I型コラーゲン mRNA相対量は、 $0.01 \pm 0.01$ であるときに、UUOモデルネガティブIgG群では、 $2.30 \pm 0.29$ と、Sham群と比較して有意な増加が認められ、腎線維化が進行していることが確認された。被験抗体のうち、クローン481がUUOモデル作製による腎I型コラーゲンmRNA相対量の増加量 $2.29$ [Sham群 ( $0.01 \pm 0.01$ ) (レーン1)] とUUOモデルネガティブIgG群 ( $2.30 \pm 0.29$ ) (レーン2) との差]を約11%減の $2.03$ [Sham群 ( $0.01 \pm 0.01$ ) (レーン1) とUUOクローン481群 ( $2.04 \pm 0.24$ ) (レーン3) との差]に、クローン536が約16%減の $1.93$ [Sham群 ( $0.01 \pm 0.01$ ) (レーン1) とUUOクローン536群 ( $1.94 \pm 0.27$ ) (レーン4) との差]に、それぞれ抑制し、両抗体の抗腎線維化抑制活性が確認された (図11)。

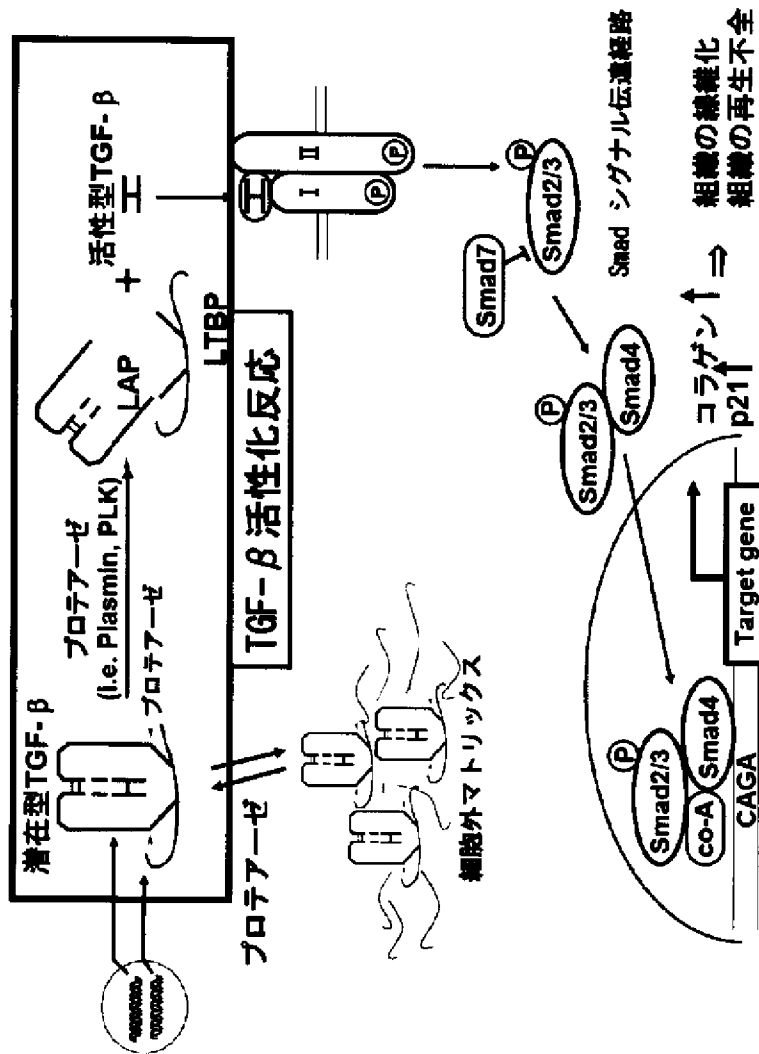
### 産業上の利用可能性

[0081] 本発明のモノクローナル抗体は、TGF- $\beta$ の特定のアイソフォームのLAPに特異的に結合し、かつ、当該アイソフォームの活性化を抑制する活性を有する。このため、TGF- $\beta$ の活性化に起因する疾患、例えば、肝線維化／肝硬変、肺線維化、腎線維化／腎不全、皮膚線維症、動脈硬化などの硬化性疾患の治療または予防に用いることができる。本発明の抗体におけるアイソフォーム特異性は、医薬として患者に投与した場合における、副作用の低減につながる。また、本発明の抗体は、活性型TGF- $\beta$ を標的とするのではなく、不活性潜在型TGF- $\beta$ から活性型TGF- $\beta$ が生成する段階を阻害するため、より早い段階での治療・予防が期待できる。このように本発明の抗体は、医療上有用である。また、本発明のモノクローナル抗体は、診断薬として、あるいは、アイソフォーム特異的なTGF- $\beta$ の検出・選別などのための研究用試薬としての応用も可能である。

### 請求の範囲

- [請求項1] ヒトTGF- $\beta$ の特定のアイソフォームのLAPに特異的に結合し、かつ、当該アイソフォームの活性化を抑制する活性を有する抗体。
- [請求項2] ヒトTGF- $\beta$ 1のLAPに実質的に結合し、ヒトTGF- $\beta$ 2のLAPに実質的に結合しない、請求項1に記載の抗体。
- [請求項3] ヒトTGF- $\beta$ 1のLAPにおける配列番号：5に記載のアミノ酸配列からなる領域に実質的に結合する、請求項2に記載の抗体。
- [請求項4] 配列番号：7に記載のアミノ酸配列からなるペプチドに実質的に結合し、配列番号：9～11に記載のアミノ酸配列からなるペプチドに実質的に結合しない、請求項2に記載の抗体。
- [請求項5] 肝臓または腎臓の線維化を抑制する活性を有する、請求項1または2に記載の抗体。
- [請求項6] ヒトTGF- $\beta$ 2のLAPに実質的に結合し、ヒトTGF- $\beta$ 1のLAPに実質的に結合しない請求項1に記載の抗体。
- [請求項7] ヒトTGF- $\beta$ 2のLAPにおける配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなる領域に実質的に結合する、請求項6に記載の抗体。
- [請求項8] 受託番号NITE BP-873、受託番号NITE BP-881、または受託番号NITE BP-882で特定されるハイブリドーマにより産生される抗体。
- [請求項9] 請求項8に記載の抗体が結合するヒトTGF- $\beta$ 1のLAP上のエピトープに結合する抗体。
- [請求項10] 請求項1から9のいずれかに記載の抗体をコードするDNA。
- [請求項11] 請求項1から9のいずれかに記載の抗体を産生する、または、請求項10に記載のDNAを含む、ハイブリドーマ。
- [請求項12] 受託番号NITE BP-873、受託番号NITE BP-881、または受託番号NITE BP-882で特定されるハイブリドーマ。
- [請求項13] 請求項1から9のいずれかに記載の抗体を有効成分とする、TGF- $\beta$ の活性化に起因する疾患の治療または予防のための薬剤。

[図1]

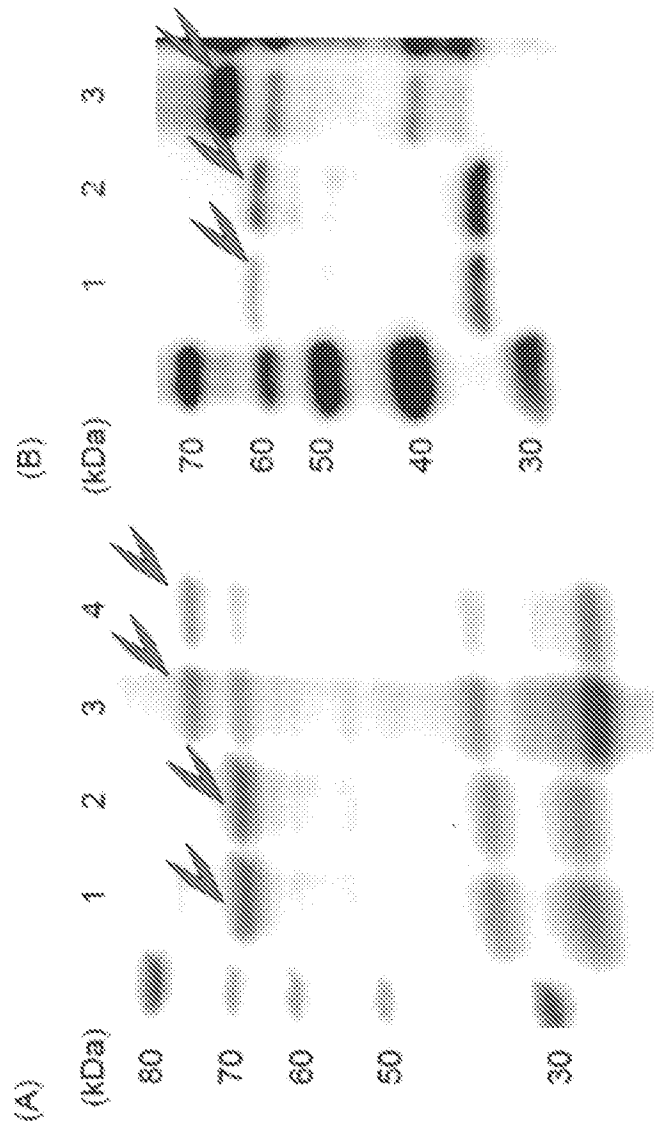


[2]

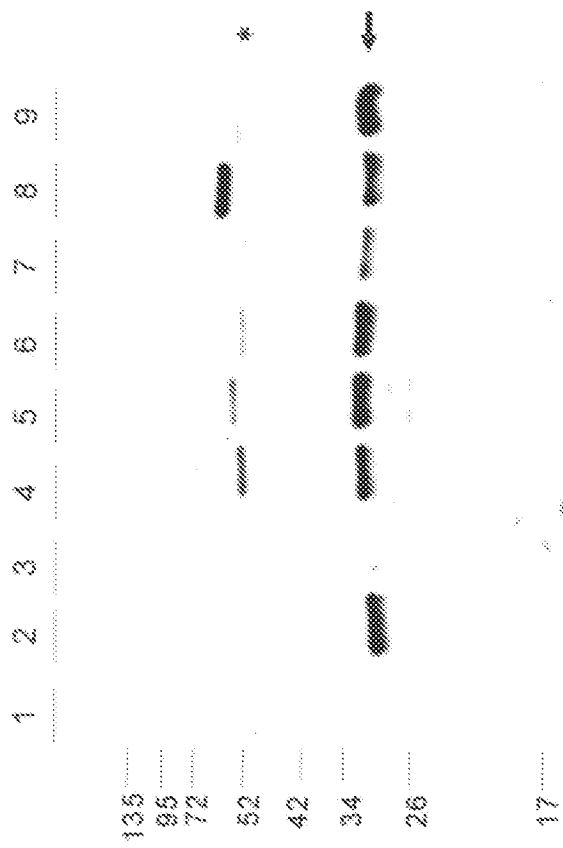
1 21 41 61 81  
 Human TGF-β1 MPPSGLRLLPLLPLLWLLVLTGPRPAAGLSTCKTIDMELVKKRRIEATRGQILSKLRLASPPSQGE-VP-PGPLPEAVLALYNSTRDRVAGE  
 Human TGF-β2 MHYCVLSAFELILHLVTVAL-----SLSTCSTLDMDQFMKKRIEATRGQILSKKLTSP-----EDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLL--Q  
  
 101 121 141 161  
 SAEPE-PEP-----EADYYAKEVTRVLWV-----ETHNEYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLSSRAELRLRLKL---KV-EQHVELYQ-----KYSNNS  
 EKASR-RAACERERSDEEYAKEVYKIDMPPFFPS-ENAIPTTFYRPY-FRIVRFDYSA-----MEKNASNLVKAERFVFRLONPKARVPEQRIEL YQILKSKDLTSPT  
  
 181 201 221 241 261  
 WRYLSNRL LAPSDEWLSFDVTGVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSC-----DSRONTLQVDIN-GFTTGR-----RGDLATI-----HGMNRPFLLLMA  
 QRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDVAHWEHLHKDRNLGFKISLHCPCCCTFVPSNNYIIPNKSEELERFA-GIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNNGKT---PHILLMLL  
  
 281 301 321 341 361  
 TPLERAQH-LQSS---RHRR ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGKKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLP  
 PSYRL-ESQ---QTNRRKKR ALDAAYCFRNVDNCCLRPLYIDFKRDLGKKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVL SL YNTINPEASASPCCVSQDLEPLT  
  
 381  
 IVYVYGRKPKVEQLSNMIVRSCKGS  
 ILYYIGKTPKTEQLSNMIVKSKKGS



[図3]



[図4]





[図6A]

## 抗TGFβ1-LAPモノクローナル抗体クロームンの特徴

| Fusion Mouse # | CLONE # | Mouse Ig isotype | 精製抗体 1μg/ml |           |           |                                   |           |           |           |        |           |        |        |        |           |        |        |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |     |
|----------------|---------|------------------|-------------|-----------|-----------|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|--------|-----------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
|                |         |                  | Recombinant |           | Peptide   | Peptide Ag-ELISA Epitope Analysis |           |           |           |        |           |        |        |        |           |        |        |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |     |
|                |         |                  | P-Ag-ELISA  |           |           | P-ELISA                           |           | TGFβ1-LAP |           |        |           |        |        |        |           |        |        |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |     |
|                |         |                  | CHLINSYS(%) |           | TGFβ1-LAP |                                   | TGFβ2-LAP |           | TGFβ3-LAP |        | TGFβ2-LAP |        |        |        | TGFβ1-LAP |        |        |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |     |
|                |         |                  | TGFβ1-LAP   | TGFβ2-LAP | TGFβ1-LAP | TGFβ2-LAP                         | TGFβ1-LAP | TGFβ2-LAP | LAP1-3    | LAP1-3 | LAP1-4    | LAP1-5 | LAP1-6 | LAP2-1 | LAP2-2    | LAP2-3 | LAP2-4 | LAP2-5 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |     |
| P1-i           | 94      | IgG1             | 12          | 3         | 0.161     | 0.046                             | 0.040     | 0.040     | 0.145     | 0.043  | 0.072     | 0.045  | 0.044  | 0.043  | 0.045     | 0.045  | 0.045  | 0.045  | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.045 | 0.0 |

WB

TGFβ1-LAP

TGFβ2-LAP

TGFβ1-LAP

TGFβ2-LAP

TGFβ1-LAP

TGFβ2-LAP

TGFβ1-LAP

TGFβ2-LAP

TGFβ1-LAP

TGFβ2-LAP

TGFβ1-LAP

TGFβ2-LAP

TGFβ1-LAP

TGFβ2-LAP

TGFβ1-LAP

TGFβ2-LAP

TGFβ1-LAP

TGFβ2-LAP

TGFβ1-LAP

TGFβ2-LAP

TGFβ1-LAP

TGFβ2-LAP

TGFβ1-LAP

TGFβ2-LAP

TGFβ1-LAP

TGFβ2-LAP

TGFβ1-LAP

TGFβ2-LAP

**[図6B]**

# 抗TGFβ2-LAPモノクローナル抗体の特徴

[illegible]

プロテアーゼによる TGF- $\beta$ 1 LAP 活性化  $\alpha$  Helix 領域の部分アミノ酸配列

➤ LAPI-0 C-EAIRGOL

➤ LAPI-1 C-LSKLRLASPP

➤ LAPI-2  
C-KLRASPQS

➤ LAPI-3 C-RLASPPSOGE

➤ **LAP1-4**  
**C-ASPPSQGEVPPG**

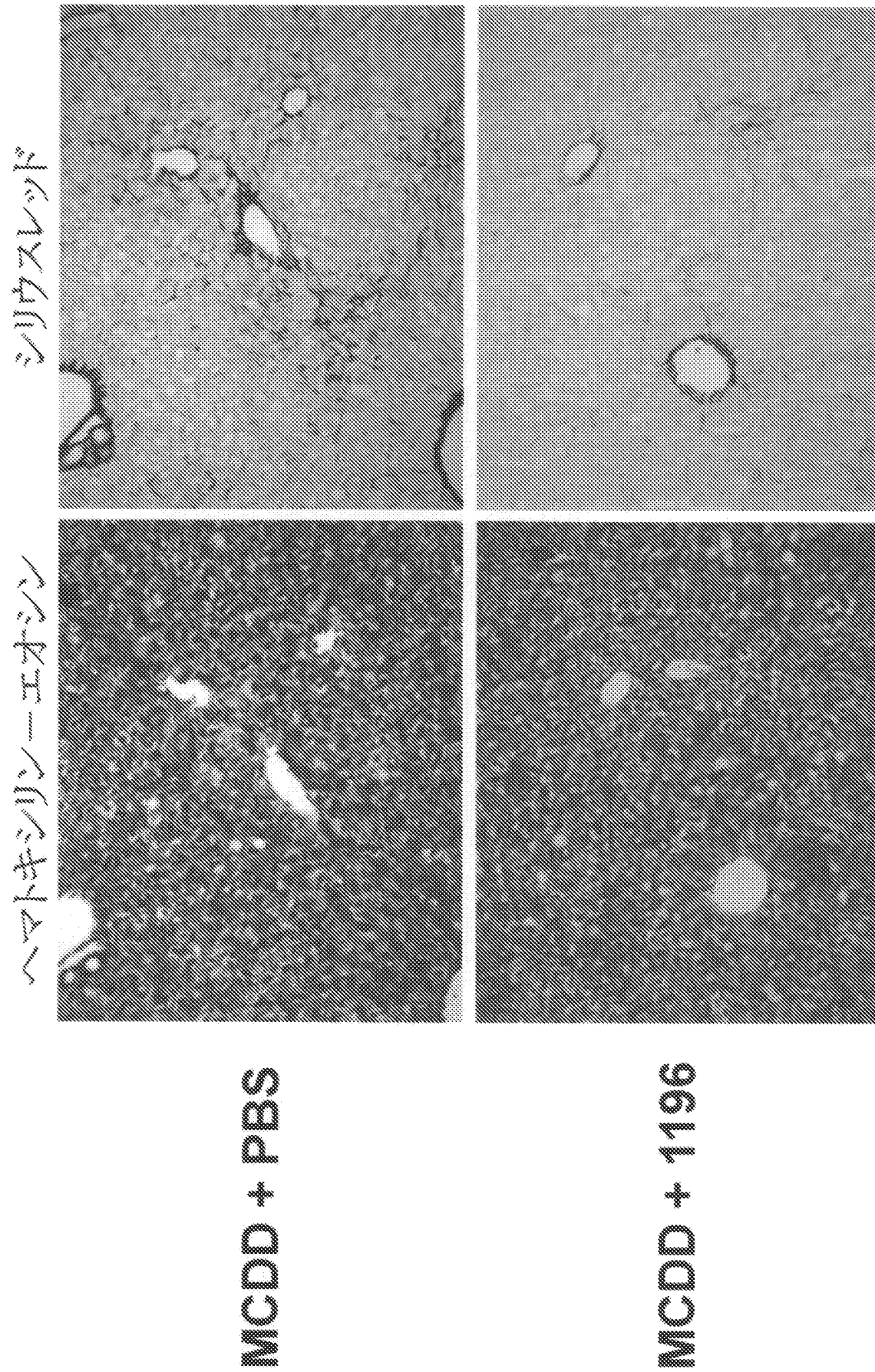
► LAPI-5 C-PPSQGEVPPGPL

➤ LAPI-6 C-PEAVLAL

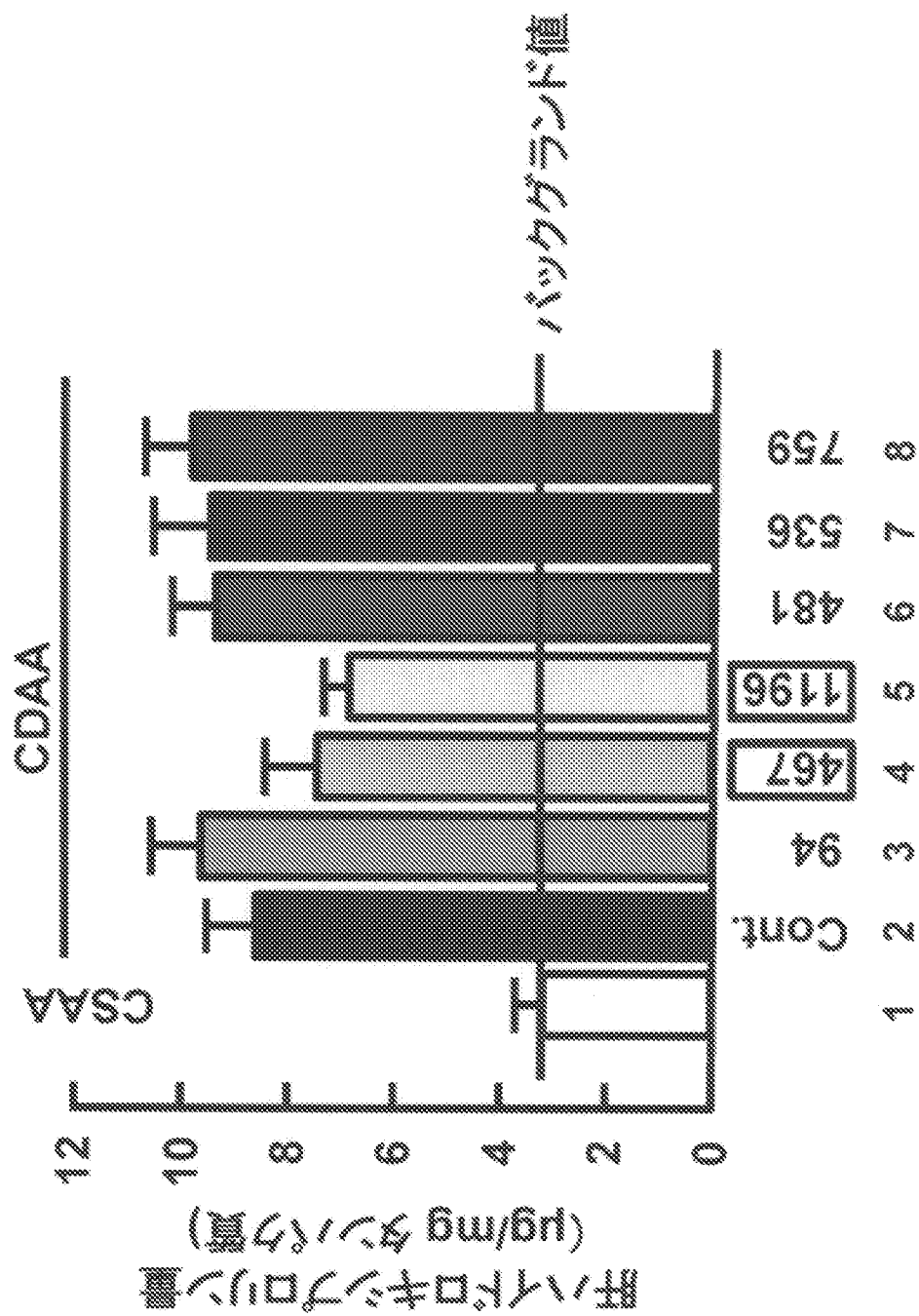
R: C:\WINDOWS\SYSTEM32\cmd.exe

| Clone No. | Recombinant           |                       | Peptide               |                       | Peptide Ag-ELISA Epitope Analysis |           |           |           |           |           |                   |           |           |           |           |           |
|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|           | CELIXSYS(%)           |                       | P-ELISA               |                       |                                   |           |           |           |           |           |                   |           |           |           |           |           |
|           | TGF $\beta$ 1<br>-LAP | TGF $\beta$ 2<br>-LAP | TGF $\beta$ 1<br>-LAP | TGF $\beta$ 2<br>-LAP | TGF $\beta$ 1-LAP                 |           |           |           |           |           | TGF $\beta$ 2-LAP |           |           |           |           |           |
|           |                       |                       |                       |                       | LAP1<br>+                         | LAP1<br>- | LAP1<br>+ | LAP1<br>- | LAP1<br>+ | LAP1<br>- | LAP1<br>+         | LAP1<br>- | LAP2<br>+ | LAP2<br>- | LAP2<br>+ | LAP2<br>- |
| 4536      |                       | 0.261                 | 0.162                 |                       | 0.038                             | 0.071     | 0.033     | 0.033     | 0.030     | 0.050     | 0.059             | 0.032     | 0.054     | 0.050     | 0.032     | 0.063     |
| 4481      |                       |                       |                       |                       | 0.211                             | 0.105     | 0.096     | 0.113     | 0.136     | 0.127     | 0.218             | 0.094     | 0.114     | 0.121     | 0.126     | 0.126     |

[図8]

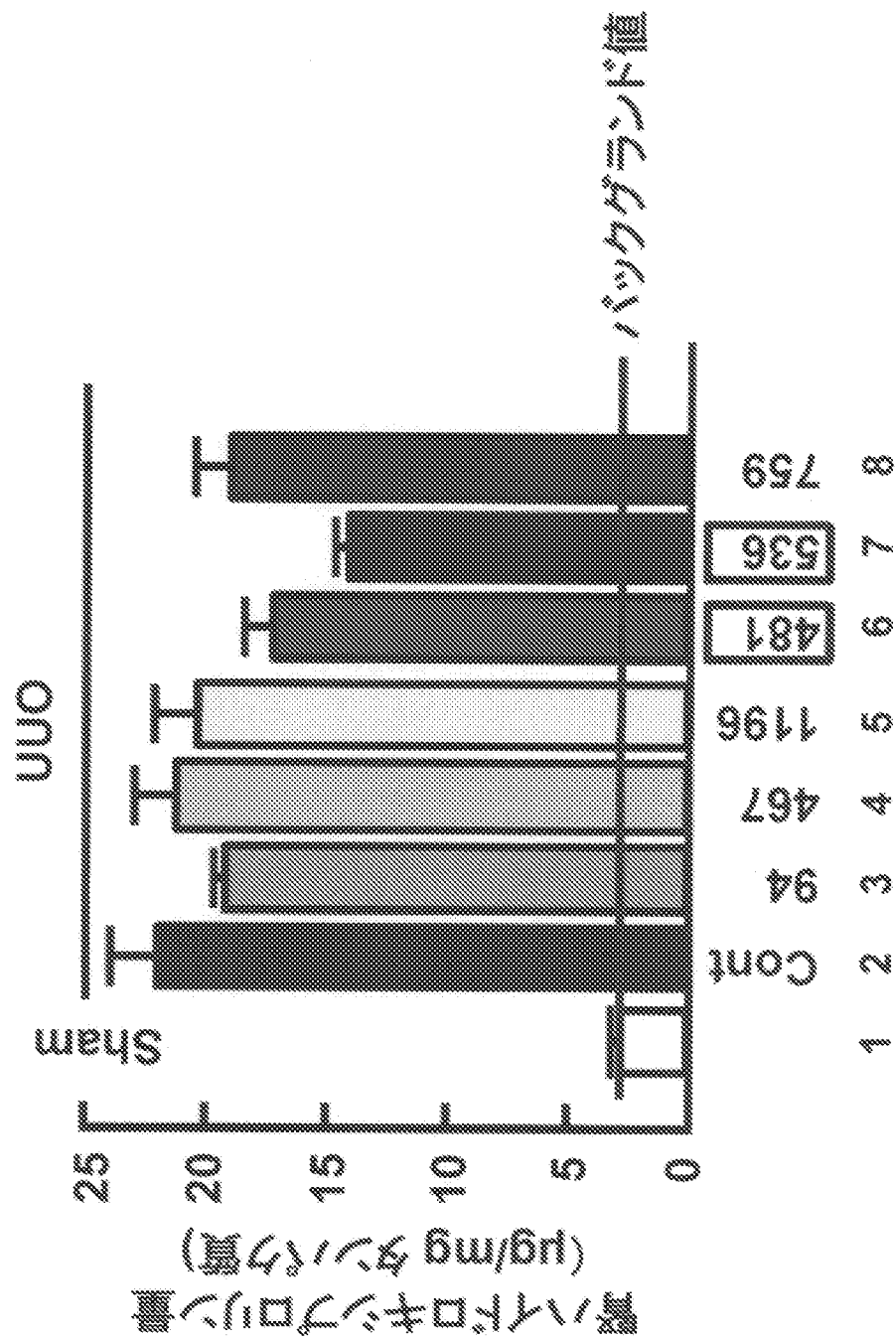


[図9]

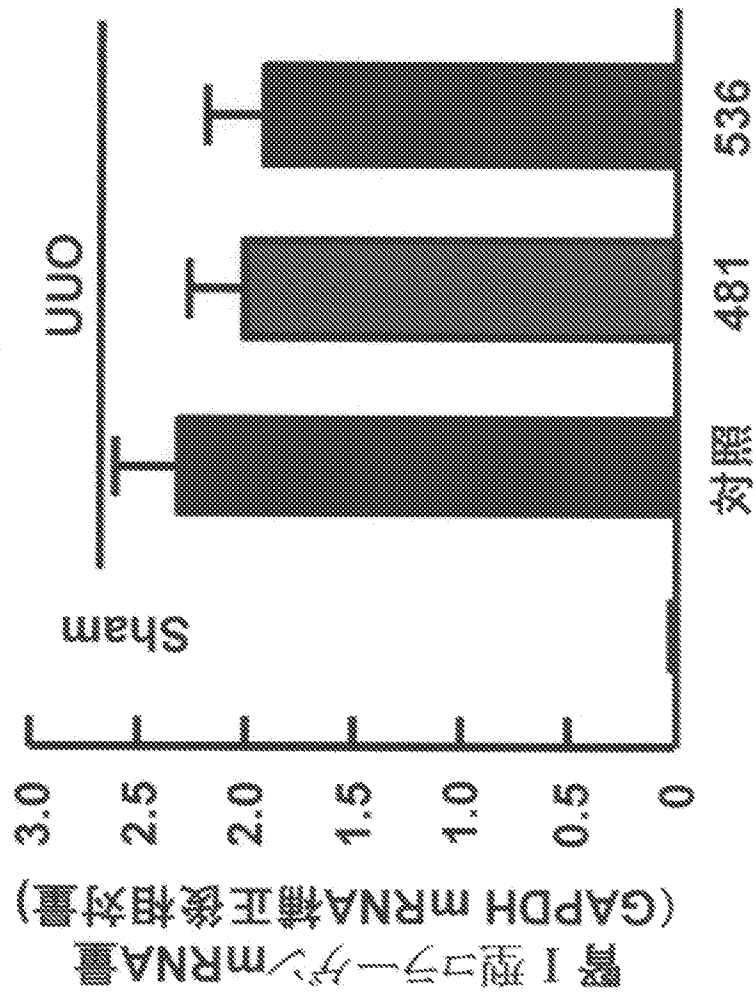




[図10]



[図11]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/053559

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, C07K16/22(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K39/395, A61P1/16, A61P9/10, A61P11/00, A61P13/12, C07K16/22, C12N5/10, C12N15/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2011 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2011 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2011 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                            | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | JP 2008-247900 A (Riken, Japan),<br>16 October 2008 (16.10.2008),<br>paragraphs [0001] to [0016]<br>& US 2008/0280827 A1 & EP 1967526 A1<br>& CN 101525373 A                                  | 1-13                  |
| Y         | WO 2009/119455 A1 (Tohoku University),<br>01 October 2009 (01.10.2009),<br>paragraph [0007]<br>(Family: none)                                                                                 | 1-13                  |
| Y         | JP 2008-289478 A (The Johns Hopkins<br>University),<br>04 December 2008 (04.12.2008),<br>paragraph [0114]<br>& WO 1999/006559 A1 & US 2002/157126 A1<br>& US 2004/0077053 A1 & CN 101402955 A | 1-13                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
31 March, 2011 (31.03.11)

Date of mailing of the international search report  
12 April, 2011 (12.04.11)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/053559

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | JP 2006-523179 W (Yale University),<br>12 October 2006 (12.10.2006),<br>paragraph [0168]<br>& US 6884619 B1 & EP 1554405 A1<br>& WO 2004/013356 A1                                                  | 1-13                  |
| A         | JP 2003-252792 A (The Institute of Physical<br>and Chemical Research, President of Gifu<br>University),<br>10 September 2003 (10.09.2003),<br>entire text<br>(Family: none)                         | 1-13                  |
| A         | WO 2005/023870 A1 (Riken, Japan),<br>17 March 2005 (17.03.2005),<br>entire text<br>& US 2008/038748 A1 & EP 1674480 A1                                                                              | 1-13                  |
| A         | WO 2005/039570 A1 (Riken, Japan),<br>06 May 2005 (06.05.2005),<br>entire text<br>(Family: none)                                                                                                     | 1-13                  |
| A         | MURPHY-ULLRICH, J. E. POZATEK, M., Activation<br>of latent TGF- $\beta$ by thrombospondin-1: mechanisms<br>and physiology., Cytokine and Growth Factor<br>Reviews, 2000, Vol.11 No.1-2, pages 59-69 | 1-13                  |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i,  
A61P11/00(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, C07K16/22(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i,  
C12N15/02(2006.01)i

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, A61K39/395, A61P1/16, A61P9/10, A61P11/00, A61P13/12, C07K16/22, C12N5/10, C12N15/02

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
日本国公開実用新案公報 1971-2011年  
日本国実用新案登録公報 1996-2011年  
日本国登録実用新案公報 1994-2011年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), WPI

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                       | 関連する<br>請求項の番号 |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Y               | JP 2008-247900 A (独立行政法人理化学研究所) 2008.10.16,<br>段落[0001]-[0016] & US 2008/0280827 A1 & EP 1967526 A1<br>& CN 101525373 A | 1-13           |
| Y               | WO 2009/119455 A1 (国立大学法人東北大学) 2009.10.01,<br>段落[0007] (ファミリーなし)                                                        | 1-13           |

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31.03.2011

国際調査報告の発送日

12.04.2011

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

4670

| C (続き). 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                  |                |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*      | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                | 関連する<br>請求項の番号 |
| Y                    | JP 2008-289478 A (ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティー)<br>2008.12.04, 段落[0114] & WO 1999/006559 A1 & US 2002/157126 A1<br>& US 2004/0077053 A1 & CN 101402955 A                                                | 1-13           |
| Y                    | JP 2006-523179 W (イエール・ユニバーシテイ) 2006.10.12,<br>段落[0168] US 6884619 B1 & EP 1554405 A1 & WO 2004/013356 A1                                                                                        | 1-13           |
| A                    | JP 2003-252792 A (理化学研究所, 岐阜大学長) 2003.09.10, 全文<br>(ファミリーなし)                                                                                                                                     | 1-13           |
| A                    | WO 2005/023870 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2005.03.17, 全文<br>& US 2008/038748 A1 & EP 1674480 A1                                                                                                           | 1-13           |
| A                    | WO 2005/039570 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2005.05.06, 全文<br>(ファミリーなし)                                                                                                                                     | 1-13           |
| A                    | MURPHY-ULLRICH, J. E. POZATEK, M., Activation of latent TGF- $\beta$<br>by thrombospondin-1: mechanisms and physiology., Cytokine and<br>Growth Factor Reviews, 2000, Vol.11 No.1-2, pages 59-69 | 1-13           |