

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7157744号
(P7157744)

(45)発行日 令和4年10月20日(2022.10.20)

(24)登録日 令和4年10月12日(2022.10.12)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/24 (2006.01)	C 0 7 K	16/24 Z N A
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
		請求項の数 24 (全169頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2019-536919(P2019-536919)	(73)特許権者	515120006
(86)(22)出願日	平成30年1月5日(2018.1.5)		スカラー ロック インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2020-503362(P2020-503362 A)		SCHOLAR ROCK, INC.
(43)公表日	令和2年1月30日(2020.1.30)		アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチュー
(86)国際出願番号	PCT/US2018/012601		セッツ州 ケンブリッジ ビニー・ストリ
(87)国際公開番号	WO2018/129329	(74)代理人	100113376
(87)国際公開日	平成30年7月12日(2018.7.12)		弁理士 南条 雅裕
審査請求日	令和2年12月22日(2020.12.22)	(74)代理人	100179394
(31)優先権主張番号	62/452,866		弁理士 瀬田 あや子
(32)優先日	平成29年1月31日(2017.1.31)	(74)代理人	100185384
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 伊波 興一朗
(31)優先権主張番号	62/558,311	(74)代理人	100137811
(32)優先日	平成29年9月13日(2017.9.13)		弁理士 原 秀貢人
最終頁に続く		(72)発明者	シュルブフ トーマス
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容 T G F β 1 阻害剤およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体であって、

配列番号 9 5 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変領域ポリペプチド、および、配列番号 9 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖可変領域ポリペプチドを含んでおり、

前駆体／潜在型 T G F β 1 を含むタンパク質複合体に結合し、そこからの成熟 T G F β 1 増殖因子の放出を阻害し、

以下の C D R - L 1 配列： R A S Q S I S S Y L N (配列番号 8 8) を含む、
抗体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の抗体であって、

前記重鎖可変領域ポリペプチドは、配列番号 9 5 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一であり、

前記軽鎖可変領域ポリペプチドは、配列番号 9 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一である、

抗体。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の抗体であって、

配列番号 9 5 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域ポリペプチド、および

配列番号 97 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域ポリペプチド、を含む、抗体。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の抗体であって、

配列番号 95 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域ポリペプチド、および配列番号 97 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域ポリペプチド、を含む、抗体。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の抗体であって、

前記抗体は、配列番号 99 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド、および配列番号 100 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド、を含む、抗体。

10

【請求項 6】

請求項 5 に記載の抗体であって、

前記抗体は、配列番号 99 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ポリペプチド、および配列番号 100 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ポリペプチド、を含む、抗体。

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の抗体であって、

前記抗体はモノクローナル抗体である、

20

抗体。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の抗体であって、

前記抗体は、完全なヒト抗体またはヒト化抗体である、

抗体。

【請求項 9】

請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の抗体であって、

前記抗体はヒト IgG4 抗体であり、当該ヒト IgG4 抗体は主鎖置換を含んでよい、

抗体。

【請求項 10】

30

請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の抗体であって、

前記抗体は、前駆体／潜在型 TGFβ1 を含むタンパク質複合体に結合し、

前記タンパク質複合体は、LTBP1、LTBP3、GARP および LRRC33 からなる群から選択される提示分子をさらに含む、

抗体。

【請求項 11】

請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む医薬組成物。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の医薬組成物であって、

少なくとも 1 つの追加の治療薬をさらに含む、

40

医薬組成物。

【請求項 13】

線維症の徴候または状態をそのような治療を必要とするヒト対象において治療するための医薬の製造における、請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の抗体または請求項 11 または 12 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の使用であって、

前記線維症の徴候または状態は、特発性肺線維症 (IPF)、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、アレルギー性喘息、急性肺損傷、好酸球性食道炎、肺動脈性高血圧、糖尿病性糸球体硬化症、巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS)、慢性腎疾患 (CKD)、腎臓移植お

50

よび慢性拒絶と関連する線維症、I g A腎障害、および溶血性尿毒症症候群、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、慢性ウイルス肝炎、寄生虫血症、アルコール性線維症、非アルコール性脂肪性肝炎－肝細胞癌腫（NASH－HCC）、原発性胆汁性肝硬変、硬化性胆管炎、心血管系線維症、全身性硬化症、びまん性皮膚全身性硬化症、強皮症、病理学的皮膚瘢痕、ケロイド、手術後の瘢痕、瘢痕修正外科的処置、および放射線によって誘導される瘢痕からなる群から選択される、
使用。

【請求項 15】

請求項 13 に記載の使用であって、
前記線維症の徴候または状態は、IPF、COPD、肺動脈性高血圧、CKD、NASH、NASH－HCC、原発性胆汁性肝硬変および全身性硬化症からなる群から選択される、
使用。

10

【請求項 16】

請求項 13 に記載の使用であって、
前記ヒト対象は、臓器線維症を有し、
前記臓器線維症は、肝線維症、肺線維症、腎臓線維症、皮膚線維症、および／または心臓線維症であってよく、
さらに前記対象は臓器線維症を有してもよいが、臓器移植のための候補者でない、
使用。

20

【請求項 17】

請求項 16 に記載の使用であって、
前記対象は慢性炎症を伴う線維性障害を有する、
使用。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の使用であって、
前記繊維性障害は、筋ジストロフィーであり、
前記筋ジストロフィーはDMDであってよい、
使用。

【請求項 19】

請求項 13 から 18 のいずれか 1 項に記載の使用であって、
前記抗体は、少なくとも 1 つの追加の治療薬と組み合わせて使用される、
使用。

30

【請求項 20】

請求項 19 に記載の使用であって、
前記追加の治療薬は、ミオスタチン阻害剤、VEGFアゴニスト、IGF1アゴニスト、FXRアゴニスト、CCR2阻害剤、CCR5阻害剤、デュアルCCR2／CCR5阻害剤、リジルオキシダーゼ様2阻害剤、ASK1阻害剤、アセチル－CoAカルボキシラーゼ（ACC）阻害剤、p38キナーゼ阻害剤、ピルフェニドン、ニンテダニブ、GDF11阻害剤、またはJAK阻害剤を含む、
使用。

40

【請求項 21】

請求項 19 に記載の使用であって、
前記追加の治療薬は、ASK1阻害剤、FXRアゴニスト、またはACC阻害剤を含む、
使用。

【請求項 22】

請求項 12 に記載の医薬組成物であって、
前記追加の治療薬は、ミオスタチン阻害剤、VEGFアゴニスト、IGF1アゴニスト、FXRアゴニスト、CCR2阻害剤、CCR5阻害剤、デュアルCCR2／CCR5阻害剤、リジルオキシダーゼ様2阻害剤、ASK1阻害剤、アセチル－CoAカルボキシラ

50

ーゼ（ACC）阻害剤、p38キナーゼ阻害剤、ピルフェニドン、ニンテダニブ、GDF11阻害剤、またはJAK阻害剤を含む、
医薬組成物。

【請求項23】

請求項12に記載の医薬組成物であって、

前記追加の治療薬は、ASK1阻害剤、FXRアゴニスト、またはACC阻害剤を含む、
医薬組成物。

【請求項24】

請求項1から10のいずれか1項に記載の抗体をコードする核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この国際出願は、合衆国法典第35巻第119条（e）の下で、以下の出願：2017年1月6日に提出された米国仮出願番号62/443,615；2017年1月31日に提出された米国仮出願番号62/452,866；2017年6月2日に提出された米国仮出願番号62/514,417；2017年7月7日に提出された米国仮出願番号62/529,616；2017年8月24日に提出された米国仮出願番号62/549,767；2017年9月13日に提出された米国仮出願番号62/558,311；2017年11月13日に提出された米国仮出願番号62/585,227；2017年11月17日に提出された米国仮出願番号62/587,964；および、2017年11月20日に提出された米国仮出願番号62/588,626に対する優先権および利益を主張するものであり、それぞれの内容は、それらの全体で参照により本明細書中に明示的に援用される。

【0002】

配列リスト

本出願は、ASCII形式で電子的に提出されている配列リストを含み、その全体で参照により本明細書中に援用される。2018年1月5日に作成された前記ASCIIのコピーは、127036-02020__ST25.txtと名付けられて、221,821バイトのサイズである。

【背景技術】

【0003】

増殖因子の形質転換増殖因子β（TGFβ）スーパーファミリーは、制限されないが：細胞増殖の阻害、組織恒常性、細胞外マトリックス（ECM）再構築、内皮間葉転換（EMT）、細胞の遊走および侵襲、および免疫調節／抑制、ならびに、間葉上皮転換を含む、様々な生物学的プロセスを調節する多くのシグナル伝達カスケードに関与する。ECM再構築に関して、TGFβシグナル伝達は、線維芽細胞集団およびECM沈着（例えば、コラーゲン）を増大させ得る。免疫系において、TGFβリガンドは、制御性T細胞の機能および免疫前駆細胞の増殖および恒常性の維持を調整する。正常な上皮細胞において、TGFβは、強力な増殖阻害剤および細胞分化のプロモーターである。しかしながら、腫瘍が発生して進行するにつれて、それらは頻繁に、TGFβに対するそれらの陰性の増殖応答を失う。この状況において、TGFβは、血管新生を刺激、間質環境を変更、および、局所および全身性の免疫抑制を誘導するその能力に起因して、腫瘍発生のプロモーターとなり得る。これらおよび他の応答に関して、TGFβは、多くの臨床的徴候（indication）のための治療的標的となっている。多くのグループによって現在までになされた多くの努力にもかかわらず、TGFβ治療の成功的な臨床開発はチャレンジングである。

【0004】

ラットおよびイヌにおけるものを含む前臨床試験による観察は、インビボでのTGFβ阻害と関連する特定の毒性を明らかにした。さらに、いくつかのTGFβ阻害剤が現在ま

10

20

30

40

50

でに開発されているが、 $TGF\beta$ をターゲットとしたほとんどの臨床プログラムは、副作用のせいで中止されている（例えば、WO2017/156500において要約される）。したがって、癌および線維症のような疾患の進行における $TGF\beta$ シグナル伝達の関与を示す直接および間接的な証拠のラインにもかかわらず、市場において利用可能な安全かつ効き目のある $TGF\beta$ 治療は存在しない。

【0005】

増殖性疾患のうち、 $TGF\beta$ の調節不全は、骨髄線維症にも関与していて、クローン性骨髄激増、異常なサイトカイン産生、髄外造血、および骨髄線維症によって特徴付けられる骨髄障害である。 $JAK2$ 、 MPL および $CALR$ における体細胞突然変異は、疾患の病因において同定されているが、骨髄線維症の治療に関してFDAによって承認された $JAK1/JAK2$ 阻害剤であるルキソリチニブ（JAKafi）は、患者において実証された骨髄線維症を寛解させるのに有効性が示されていない。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、例えば、増殖性疾患（例えば癌）、線維症および炎症を含む、 $TGF\beta1$ に関与する疾患および障害を効果的かつ安全に治療するために用いられ得る、 $TGF\beta$ シグナル伝達を阻害するための改善された方法および組成物が必要である。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、多数の由来における $TGF\beta$ 活性化の阻害が、 $TGF\beta$ 調節不全のECM態様および免疫態様の両方に関与する多くの疾患の治療において、より大きな臨床効果を提供し得るという認識を包含する。したがって、それらのアイソフォーム選択性、疾患ニッチ内の分子標的の幅、効果および安全性の耐久性に関して、従来の $TGF\beta$ 拮抗薬よりも優れた、 $TGF\beta1$ 阻害剤を用いたそのような疾患の治療のための改善された方法が、本明細書において提供される。

20

【0008】

証拠は、多くの疾患が $TGF\beta$ シグナル伝達の複雑な混乱を示すという見解を支持し、 $TGF\beta$ 機能の異なる効果を提供する異種細胞型の関与を伴うと考えられて、それは、いわゆる提示分子とその相互作用によって仲介される。少なくとも4つのそのような提示分子が同定されていて、様々な細胞外ニッチにおいて $TGF\beta$ を「提示する」ことができ、局所刺激に応答してその活性化を可能にする。1つのカテゴリーでは、 $TGF\beta$ は、 $LTBP1$ および $LTBP3$ のようなECM関連の提示分子と関連してECM内に沈着されて、ECM関連の $TGF\beta$ 活性を仲介する。別のカテゴリーでは、 $TGF\beta$ は、 $GARP$ および $LRRC33$ のような提示分子を介して免疫細胞の表面上につながれて、特定の免疫機能を仲介する。これらの提示分子は、様々な組織および細胞型における示差的発現、局在化および／または機能を示し、 $TGF\beta$ 活性化の成果および事象をトリガーすることは、微小環境に応じて異なることを示す。多くの $TGF\beta$ 効果が疾患進行と相互作用して、それに寄与し得るという見解に基づき、 $TGF\beta$ 機能の多数の面に拮抗し得る治療的薬剤は、より大きな有効性を提供し得る。

30

【0009】

以前に、本発明者らは、（pan-阻害とは逆に） $TGF\beta$ のアイソフォーム特異的な阻害が、インビボで $TGF\beta$ に拮抗する改善された安全特性を与え得ることを認めた（WO2017/156500を参照）。これを考慮して、発明者らは、i) アイソフォーム特異的であり；かつ、ii) 多面的な $TGF\beta1$ 効果およびその調節不全によって駆動される状態のための治療的薬剤として、異なる提示分子と関連する多数の $TGF\beta1$ シグナル伝達複合体を幅広く標的化することが可能な、 $TGF\beta1$ 阻害剤を開発することを探求している。

40

【0010】

したがって、本開示は、ECM関連の $TGF\beta1$ および免疫細胞関連の $TGF\beta1$ の両

50

方を標的化して、それにより、多数のコンテキストにおいて提示される多数の由来の TGFβ1 をブロックすることが可能なアイソフォーム特異的な阻害剤を提供する。そのような阻害剤は、本明細書において、TGFβ1 の「アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容」阻害剤と呼ばれる。本発明はまた、TGFβ1 機能の多数の態様と関連する TGFβ1 シグナル伝達の調節不全によって特徴付けられる状態の処置における治療としてのこれらの薬剤の使用を提供する。そのような阻害剤は、線維症、骨髄線維症、癌、および他の状態との文脈における臨床効果を高めるために、多数の TGFβ1 活性（例えば、多数の由来またはコンテキストからの TGFβ1）と拮抗するための多機能薬剤として機能し得る。

【0011】

特定の疾患（本明細書においてさらに詳述される）を処置するための治療として、TGFβ1 のコンテキスト特異的阻害剤よりも TGFβ1 のコンテキスト寛容（例えば、コンテキスト非依存性）阻害剤の有利な使用に関する理論的根拠は、以下を含む。

【0012】

疾患環境における異種 TGFβ1 複合体の関与：第一に、様々な疾患は、全体として疾患の病因および／または進行に寄与する、多数の由来の TGFβ1 として細胞の異種集団に関与する。1 よりも多いタイプの TGFβ1 含有複合体（「コンテキスト」）は、同一の疾患微小環境内に共存する可能性がある。特に、そのような疾患は、TGFβ1 シグナル伝達の ECM 構成要素および TGFβ1 シグナル伝達の免疫構成要素の両方に関与し得る。そのような状況では、単一の TGFβ1 コンテキスト（例えば、1 つのタイプの提示分子と関連する TGFβ1）の選択的標的化は、制限された安堵を提供し得る。対照的に、TGFβ1 のコンテキスト寛容阻害剤は、不活性（前駆体／潜在型）TGFβ1 複合体をより幅広く標的化することを有利に目的としていて、毒性を最小限にするためにアイソフォーム選択性を維持しながら、下流のシグナル伝達をトリガーする受容体結合に向けて成熟 TGFβ1 が放出され得る前に、多数の由来における増殖因子の活性化を防ぐ。

【0013】

様々な疾患の根底となる一般的なメカニズム：第二に、組織／細胞特性における顕著な類似性が、腫瘍間質と線維性組織との間に観察される。多くの病状において観察される、i) TGFβ1 依存性の線維促進性表現型；ii) TGFβ1 依存性の腫瘍促進性表現型；および、iii) TGFβ1 依存性の免疫抑制性表現型の間のクロストークを示す。したがって、これらの構成要素の多くに対して幅広く作用するコンテキスト寛容阻害剤の使用は、さまざまなタイプの疾患状態にわたって最適な治療的效果を提供し得る。例えば、原発性骨髄線維症の臨床兆候（manifestation）は、骨髄における線維症および特定の細胞集団の異常な激増を含む。

【0014】

薬物耐性に対抗する：第三に、多くの研究が、免疫チェックポイント阻害剤のような抗癌治療に対して耐性である癌／腫瘍を報告している。場合によっては、そのような耐性は、患者のバックグラウンドに対して特定の癌／腫瘍タイプに内因性に現れる（典型的に、先天性耐性、原発性耐性、内因性耐性、または、生来耐性と呼ばれ；これらの用語は明細書において相互交換可能に用いられる）。そのような耐性は、免疫チェックポイント阻害剤のような抗癌治療に対する応答が乏しい患者の対象（subject）において示され得て、場合により、免疫除外環境を反映する。これは、少なくとも部分的に TGFβ1 依存性パスウェイによって仲介されると考えられる。したがって、本明細書において記載されるアイソフォーム選択的阻害剤は、耐性の癌を、そのような治療に対してより反応性にさせ得る。

【0015】

あるいは、耐性は、治療に対して物質的な（material）臨床反応性を示す患者の応答が乏しくなるように経時的に進行し得る（すなわち、適応または獲得耐性）。例えば、PD-1 治療は、他の T 細胞抗原（例えば、TCR 構成要素）の上方調節と関連する適応耐性をもたらし得ることが報告されていて、癌細胞は、他のメカニズムを介して PD

10

20

30

40

50

ー1ブロックを回避するように進化することを示唆する。続いて、TIM3のような異なるT細胞受容体構成要素を標的化する第二のチェックポイント阻害剤は、免疫療法に対する反応性を回復させることができる。これらの観察は、癌細胞の適応反応に対抗するために多数のパスウェイをブロックすることが、宿主免疫を回避する癌細胞の能力の可能性を減少させ得ることを示唆する。多数のTGFβ1コンテキストを標的化することのできるTGFβ1のコンテキスト寛容阻害剤は、TGFβ1機能の多数の点においてブロックを提供することによって、獲得された薬物耐性を有利に迂回し得る。

【0016】

発現適応性に耐える：最後に、様々な提示分子の発現が、経時的に、例えば、局所的きっかけ（local cue）（例えば、サイトカイン、ケモカイン、ECM環境など）に
10 応答して、および／または、疾患微小環境における変化とともに、変化し得るという見解に基づき、本明細書において記載されるもののようなTGFβ1のコンテキスト寛容阻害剤が、そのような適応性に耐えるため、および、提示分子の発現における異常な変化が発生した場合でさえも幅広い永続性のある阻害効果を提供するために用いられ得ることは、理にかなっている。

【0017】

任意のこれらのシナリオにおいて、TGFβ1のコンテキスト寛容阻害剤は、様々な提示分子と関連したTGFβ1の前駆体／潜在型形態を標的化するために有利に目的にされて、その全てまたはその異なる組み合わせは、疾患微小環境（単数または複数）内に存在する。より具体的には、1つのモダリティにおいて、阻害剤は、ECM関連TGFβ1（
20 LTBP1／3-TGFβ1複合体）を標的化する。別のモダリティでは、阻害剤は、免疫細胞関連TGFβ1を標的化する。これは、Treg細胞上に発現されるGARP-TGFβ1複合体のようなGARPによって提示されるTGFβ1、および、マクロファージおよび他の骨髄性／リンパ系細胞、ならびに特定の癌細胞上に発現されるLRRC33-TGFβ1複合体を含む。

【0018】

そのような抗体は、コンテキスト寛容（またはコンテキスト非依存性）の様式で、前駆体／潜在型TGFβ1複合体からの成熟TGFβ1増殖因子に結合して活性化（または放出）を阻止するTGFβ1のアイソフォーム特異的阻害剤を含み、したがって、抗体は、多数のタイプの提示分子と関連したTGFβ1の活性化（または放出）を阻害することが
30 できる。特に、本発明は、ECM関連TGFβ1（LTBPによって提示される、および／または、LTBP3によって提示される）の少なくとも1つのコンテキスト、および、細胞関連TGFβ1（GARPによって提示される、および／または、LRRC33によって提示される）の少なくとも1つのコンテキストを、ブロックすることが可能な抗体を提供する。

【0019】

様々な疾患状態は、寄与因子としてのTGFβシグナル伝達の調節不全に関与することが示唆されている。実際に、特定のヒト状態の病因および／または進行は、TGFβ1活性によって優勢に駆動され、またはそれに依存性であると考えられる。特に、多くのそのような疾患および障害は、TGFβ1機能のECM構成要素および免疫構成要素の両方に
40 関与すると考えられて、多数のコンテキストにおけるTGFβ1活性化（例えば、1よりも多いタイプの提示分子によって仲介される）が関与することを示唆する。さらに、TGFβ1応答細胞間のクロストークが存在すると考えられる。場合によっては、TGFβ1軸の多面的な活性間の相互作用は、疾患進行、悪化、および／または疾患と戦う宿主の能力の抑制をもたらし得る。例えば、特定の疾患微小環境、例えば、腫瘍微小環境（TME）は、多数の異なる提示分子、例えば、LTBP1-proTGFβ1、LTBP3-proTGFβ1、GARP-proTGFβ1、LRRC33-proTGFβ1、およびそれらの任意の組み合わせによって提示されるTGFβ1と関連し得る。1つのコンテキストのTGFβ1活性は次々に、別のコンテキストのTGFβ1活性を調節または影響し得て、調節不全になった場合に、疾患状態の激化をもたらし得る可能性を高める。した
50

がって、そのような阻害効果をTGFβ1アイソフォームに選択的に制限しながら、TGFβ1機能の多数のモード（すなわち、多数のコンテキスト）にわたって幅広く阻害することが望ましい。目的は、創傷治癒（wound healing）において重要な役割を果たすTGFβ3を含む他のアイソフォームによって仲介される恒常性TGFβシグナル伝達を混乱させないことである。

【0020】

これに対処するために、本開示の発明者らは、TGFβ1シグナル伝達またはその調節不全によって駆動されるまたはそれに依存性の疾患の治療における治療的使用のために特に有利であり得る、TGFβ1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤を生産することを求めた。そのような阻害剤に関する基準に見合うために取られた手法は：i）アイソフォーム特異的な様式で（TGFβ2および／またはTGFβ3活性と干渉せずに）TGFβ1シグナル伝達を阻害する能力；および、ii）ECM関連および免疫細胞関連TGFβ1の両方のシグナル伝達を阻害する能力である。この手法に関する合理的根拠は、潜在的毒性に対するTGFβ1阻害の有効性（それ故に、臨床有効性）を平衡化することである。より具体的には、他のアイソフォームよりも、治療的用量でTGFβ1に向かう選択性を達成することは、インビボでのTGFβのpan-阻害と関連する、可能性のある毒性（例えば、不要な副作用および有害事象）を減少または最小限にすることを目的としていて、その一部は、正常な生物学的機能（例えば創傷治癒）のために必要とされ得る。一方で、治療的標的としてTGFβ1の多数のコンテキストを包含することは、多数の態様のTGFβ1シグナル伝達の調節不全に関連する疾患における臨床有効性を確実または最適化することを目的とする。臨床適用および治療レジメンの様々な実施態様が、本発明によって包含される。

【0021】

したがって、一態様では、TGFβ1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤が本明細書において提供されて、そのような阻害剤は、ECM関連のTGFβ1シグナル伝達および免疫細胞関連のTGFβ1シグナル伝達の両方を阻害する能力を有することで特徴付けられる。特に、そのような阻害剤は、TGFβ2およびTGFβ3活性を損なわずに維持しながら、多数のコンテキストにおいて提示されるTGFβ1（すなわち、2以上のタイプの提示分子によって仲介されるTGFβ1活性）をブロックすることができる。したがって、そのような阻害剤によって阻害され得るTGFβ1活性は、以下：i）GARPによって提示されるTGFβ1と関連するTGFβ1シグナル伝達；ii）LRRC33によって提示されるTGFβ1と関連するTGFβ1シグナル伝達；iii）LTBP1によって提示されるTGFβ1と関連するTGFβ1シグナル伝達；および、iv）LTBP3によって提示されるTGFβ1と関連するTGFβ1シグナル伝達の2以上を含む。一部の実施態様では、そのような阻害剤は、以下の複合体：i）TGFβ1-GARP；ii）TGFβ1-LRRC33；iii）TGFβ1-LTBP1；および、iv）TGFβ1-LTBP3の少なくとも2つ、または、少なくとも3つのプロタンパク質形態を標的化する。一部の実施態様では、そのような阻害剤は、i）TGFβ1-GARP；ii）TGFβ1-LTBP1；および、iv）TGFβ1-LTBP3に特異的に結合して阻害するモノクローナル抗体である。一部の実施態様では、そのようなモノクローナル抗体は、ii）TGFβ1-LRRC33；iii）TGFβ1-LTBP1；および、iv）TGFβ1-LTBP3に特異的に結合して阻害する。一部の実施態様では、そのようなモノクローナル抗体は、i）TGFβ1-GARP；ii）TGFβ1-LRRC33；およびiii）TGFβ1-LTBP1に特異的に結合して阻害する。一部の実施態様では、そのようなモノクローナル抗体は、以下：i）TGFβ1-GARP；ii）TGFβ1-LRRC33；iii）TGFβ1-LTBP1；および、iv）TGFβ1-LTBP3の全てを特異的に阻害する。一部の実施態様では、そのようなモノクローナル抗体は、フリーのTGFβ1（例えば、提示

10

20

30

40

50

分子から放出される、またはそれと複合体化されない増殖因子)である成熟 TGFβ1 に結合しない。本発明の態様は、そのような阻害剤を含む組成物を含み、例えば、治療されるべきヒトおよび非ヒト対象における投与に適切な医薬組成物を含む。そのような医薬組成物は、典型的に滅菌される。一部の実施態様では、そのような医薬組成物は、少なくとも1つの薬学的に許容できる賦形剤、例えば、バッファーおよび界面活性剤(例えば、ポリソルベート)を含んでもよい。そのような医薬組成物を含むキットもまた、本発明によって包含される。

【0022】

本明細書において記載される、アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤は、TGFβ1の多数の生物学的機能およびその調節不全に関連する疾患または障害の治療での使用に適切である。特に、そのような疾患または障害は、TGFβ1機能のECM構成要素およびTGFβ1機能の免疫構成要素の両方に関連する。そのような阻害剤の投与は、したがって、インビボでのTGFβ1シグナル伝達パスウェイのそれぞれの軸、例えば、疾患または障害と関連する多数のTGFβ1標的を阻害して、治療的効果を高めることができる。したがって、別の態様では、本発明は、TGFβ1調節不全と関連する疾患を患う対象を治療するための方法におけるそのような阻害剤の治療的使用を含む。TGFβ1シグナル伝達のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容またはコンテキスト非依存性阻害剤は、TGFβ1の多数の機能(例えば、ECM構成要素および免疫構成要素の両方)によって駆動されるまたはそれに依存性の疾患を治療するのに特に適切である。典型的に、そのような疾患は、TGFβ1が多数のタイプの提示分子(例えば、多数のコンテキスト)によって提示される多数の細胞型または細胞状態に関連する。

【0023】

関連する態様では、本発明は、改善された安全プロファイル(例えば、減少したインビボ毒性)を有する、アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容TGFβ1阻害剤に関する、スクリーニング、生産および製造方法を提供する。そのような方法は、候補薬剤がTGFβ1アイソフォーム特異性に関して試験および選択されることを必要として、例えば、候補薬剤は、TGFβ2および/またはTGFβ3シグナル伝達ではなくTGFβ1シグナル伝達に対する阻害活性について選択される。本発明によれば、そのようなTGFβ1活性のアイソフォーム特異的阻害剤は、TGFβ1機能の多数のコンテキストを阻害することができる(以下参照)。

【0024】

一部の実施態様では、そのような薬剤は、TGFβ1に特異的に結合してその活性をブロックするが、TGFβ2および/またはTGFβ3にはそのようにしない、抗体またはその抗原結合フラグメントである。一部の実施態様では、そのような抗体またはその抗原結合フラグメントは、前駆体/潜在型複合体と関連しないフリーの成熟TGFβ1増殖因子に結合しない。したがって、関連のある生産方法は、候補薬剤(例えば、候補抗体またはそのフラグメント)が、特定の提示分子、例えば、GARP、LRRC33、LTBP1、および/またはLTBP3と関連するTGFβ1を阻害するそれらの能力に関して評価されるスクリーニングステップを含んでよい。一部の実施態様では、不活性の(例えば、潜在型)前駆体複合体、例えば、GARP-proTGFβ1、LRRC33-proTGFβ1、LTBP1-proTGFβ1およびLTBP3-proTGFβ1は、成熟した活性のTGFβ1増殖因子の活性化に関してアッセイするために使用され得る。試験薬剤(すなわち、候補阻害剤)の存在または不存在でのTGFβ1活性化は、制限されないが、インビトロアッセイおよび細胞に基づくアッセイを含む任意の適切な手段によって測定され得る。同様のスクリーニングステップは、TGFβ2および/またはTGFβ3相対物の使用によって、アイソフォーム特異性を試験するために使用され得る。そのようなスクリーニングステップは、i)アイソフォーム特異的な様式;および、ii)コンテキスト寛容またはコンテキスト非依存性の様式で、TGFβ1シグナル伝達を阻害するそれらの能力に関する候補薬剤(例えば、候補抗体またはそのフラグメント)を同定するために行なわれ得る。

【0025】

特定の疾患は、TGFβ機能の単一のコンテキストに制限されないTGFβシグナル伝達の多数の生物学的役割の調節不全と関連する。そのような状況では、発症および／または疾患進行の過程に関与する多数のコンテキストにわたってTGFβ効果を調整することが有益であり得る。したがって、一部の実施態様では、本発明は、アイソフォーム特異的な様式ではあるが多数のTGFβ1コンテキストを標的化して幅広く阻害する方法を提供する。そのような薬剤は、本明細書において、「アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容」TGFβ1阻害剤と呼ばれる。したがって、コンテキスト寛容TGFβ1阻害剤は、多数のコンテキスト（例えば、多数のタイプの前駆体／潜在型-TGFβ1複合体）を標的化する。好ましくは、そのような阻害剤は、ECMと関連するTGFβ1プレ活性化複合体（すなわち、ECM関連の提示分子によって提示される前駆体／潜在型TGFβ1複合体）の少なくとも1つのタイプ（または「コンテキスト」）、および加えて、細胞表面につながれたTGFβ1プレ活性化複合体（すなわち、細胞または膜関連提示分子によって提示される前駆体／潜在型TGFβ1複合体）の少なくとも1つのタイプ（または「コンテキスト」）を標的化する。一部の実施態様では、コンテキスト寛容TGFβ1モジュレーターは、特定の提示分子（単数または複数）を問わず全てのコンテキストを包含するように、全てのタイプの前駆体／潜在型TGFβ1複合体（例えば、GARP関連、LRRC33関連、LTBP関連など）を標的化する。

10

【0026】

コンテキスト寛容TGFβ1阻害剤は、1よりも多いタイプの前駆体／潜在型-TGFβ1複合体（すなわち、異なる提示分子を有する）を標的化することが可能であるが、一部の実施態様では、そのような阻害剤は、他（単数または複数）よりも1つまたは複数のコンテキストを好み得る（またはそれに向かうバイアスを示し得る）。したがって、一部の実施態様では、TGFβ1の活性化を阻害するコンテキスト寛容抗体は、一方の提示分子によって仲介されるTGFβ1活性化を、別の提示分子よりも優先的に阻害し得る（そのような抗体が両方のタイプの前駆体／潜在型複合体に結合することが可能である場合であっても）。一部の実施態様では、そのような抗体は、LTBP1／3関連TGFβ1、GARP関連TGFβ1、およびLRRC33関連TGFβ1に結合して活性化を阻害するが、LTBP1／3関連TGFβ1に向かう選択的阻害活性を有するモノクローナル抗体である。一部の実施態様では、そのような抗体は、LTBP1関連TGFβ1、LTBP3関連TGFβ1、GARP関連TGFβ1、およびLRRC33関連TGFβ1に結合して活性化を阻害するが、LTBP1およびLTBP-3関連TGFβ1に向かう選択的阻害活性を有するモノクローナル抗体である。一部の実施態様では、そのような抗体は、LTBP1関連TGFβ1、LTBP3関連TGFβ1、GARP関連TGFβ1、およびLRRC33関連TGFβ1に結合して活性化を阻害するが、GARP関連TGFβ1およびLRRC33関連TGFβ1に向かう選択的阻害活性を有するモノクローナル抗体である。一部の実施態様では、そのような抗体は、GARP関連TGFβ1およびLRRC33関連TGFβ1に結合して活性化を阻害するが、GARP関連TGFβ1に向かう選択的阻害活性を有するモノクローナル抗体である。一部の実施態様では、そのような抗体は、GARP関連TGFβ1およびLRRC33関連TGFβ1に結合して活性化を阻害するが、LRRC33関連TGFβ1に向かう選択的阻害活性を有するモノクローナル抗体である。

20

30

40

【0027】

したがって、本発明によれば、異なる程度の選択性が、TGFβ効果のサブセットを標的化するために生産され得る。TGFβのアイソフォーム特異的阻害剤（TGFβの単一アイソフォームを標的化する）は、いわゆるpan-TGFβ阻害剤（TGFβの多数または全てのアイソフォームを標的化する）よりも大きな選択性を提供する。

【0028】

本発明は、TGFβ1調節不全と関連する疾患を治療するための方法における、そのようなTGFβ1阻害剤の使用を含む。そのような阻害剤の使用は、疾患の駆動においてT

50

G F β 1 アイソフォームが (T G F β 2 / 3 よりも) 優勢な役割を果たす状態、および、疾患が T G F β 1 シグナル伝達の E C M 構成要素および免疫構成要素の両方に関与する状態において、特に有利である。この手法は、疾患関連の T G F β 機能を優先的に標的化しながら、正常または恒常性 T G F β 機能を保つことを目的とする。

【0029】

そのような阻害剤は、好ましくは T G F β 1 活性化阻害剤 (すなわち、T G F β 1 活性化ステップの阻害剤) である。好ましい実施態様では、そのような阻害剤は、活性化に優先して T G F β 1 の不活性形態 (例えば、前駆体 / 潜在型 - T G F β 1 複合体) を標的化することができて、一過的な、既に活性化された、潜在型複合体から放出された増殖因子の可溶性 / フリー形態を標的化するのとは比べて、より持続性の阻害をもたらす。疾患関連 T G F β 1 の由来 / コンテキストの決定は、目的の特定の提示分子 (例えば、G A R P、L R R C 3 3、L T B P 1、L T B P 3 など) を含む T G F β 1 潜在型複合体に特異的に結合する抗体の使用によって行われ得る。

10

【0030】

本開示の態様は、以下の複合体: G A R P - T G F β 1 複合体、L T B P 1 - T G F β 1 複合体、L T B P 3 - T G F β 1 複合体および L R R C 3 3 - T G F β 1 複合体の少なくとも3つに特異的に結合する、免疫グロブリン、例えば抗体、またはその抗原結合部分に関する。本発明によれば、そのような免疫グロブリンは、少なくとも1つのタイプの E C M 関連 (例えば、E C M につながれた) T G F β 1 複合体 (例えば、L T B P 1 および / または L T B P 3 関連 T G F β 1 複合体) および少なくとも1つのタイプの細胞関連 (例えば、細胞表面につながれた) T G F β 1 複合体 (例えば、G A R P および / または L R R C 3 3 関連 T G F β 1 複合体) に特異的に結合して、多数のコンテキストに対して幅広い阻害作用をもたらす。本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分は、T G F β 1 が、G A R P - T G F β 1 複合体、L T B P 1 - T G F β 1 複合体、L T B P 3 - T G F β 1 複合体および / または L R R C 3 3 - T G F β 1 において存在する場合に、抗体、またはその抗原結合部分による結合に利用可能な、T G F β 1 (例えば、L A P) を含むタンパク質複合体の構成要素 (単数または複数) または T G F β 1 (例えば、L A P) のエピトープに特異的に結合する。

20

【0031】

一部の実施態様では、エピトープは、T G F β 1 が以下のタンパク質複合体: G A R P - T G F β 1 複合体、L T B P 1 - T G F β 1 複合体、L T B P 3 - T G F β 1 複合体、および L R R C 3 3 - T G F β 1 複合体の2以上において存在する場合に、抗体による結合に利用可能であり; ここで抗体は、前駆体 / 潜在型複合体と関連しないフリーの成熟 T G F β 1 増殖因子には結合しない。

30

【0032】

一部の実施態様では、T G F β 1 は、前駆体 T G F β 1 および / または潜在型 T G F β 1 (例えば、前駆体 / 潜在型 T G F β 1) である。一部の実施態様では、T G F β 1 は潜在型 T G F β 1 である。一部の実施態様では、T G F β 1 は前駆体 T G F β 1 である。

【0033】

本発明に係るアイソフォーム特異的な T G F β 1 阻害剤は、結合 T G F β 2 に結合しない。本発明に係るアイソフォーム特異的な T G F β 1 阻害剤は、T G F β 3 に結合しない。一部の実施態様では、そのような阻害剤は、前駆体 / 潜在型 T G F β 2 に結合しない。一部の実施態様では、そのような阻害剤は、前駆体 / 潜在型 T G F β 3 に結合しない。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、インテグリンに結合する T G F β 1 の能力を妨げない。

40

【0034】

一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合は、配列番号 87 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含む重鎖可変領域および配列番号 90 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号 86 のアミノ酸配列を有する C D R 2 を含む重鎖可変領域および配列番号 89 のアミ

50

ノ酸配列を有する C D R 2 を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号 8 5 のアミノ酸配列を有する C D R 1 を含む重鎖可変領域および配列番号 8 8 のアミノ酸配列を有する C D R 1 を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 0 3 5 】

一部の実施態様では、抗体は、配列番号 9 9 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖ポリペプチド配列を含む。一部の実施態様では、抗体は、配列番号 1 0 0 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖ポリペプチド配列を含む。一部の実施態様では、抗体は、配列番号 9 9 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖ポリペプチド配列および配列番号 1 0 0 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖ポリペプチド配列を含む。一部の実施態様では、そのような抗体は、配列番号 8 5 ~ 9 0 に示される C D R を含む。一部の実施態様では、抗体は、配列番号 9 9 の 2 つのポリペプチドおよび配列番号 1 0 0 の 2 つのポリペプチドからなる。

10

【 0 0 3 6 】

一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号 9 5 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号 9 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【 0 0 3 7 】

一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号 9 5 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号 9 7 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

20

【 0 0 3 8 】

一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、T G F β 1 活性化を阻害するが、T G F β 2 活性化または T G F β 3 活性化を阻害しない。

【 0 0 3 9 】

一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、G A R P - T G F β 1 複合体、L T B P 1 - T G F β 1 複合体、L T B P 3 - T G F β 1 複合体、および／または L R R C 3 3 - T G F β 1 複合体からの成熟 T G F β 1 の放出を阻害する。

30

【 0 0 4 0 】

一態様では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分、および薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物が、本明細書において提供される。そのような医薬組成物は、典型的に滅菌されて、ヒト対象への投与に適切である。一部の実施態様では、そのような医薬組成物は、本発明に包含されるキットとして提供され得る。

【 0 0 4 1 】

別の態様では、T G F β 1 活性化を阻害する方法が本明細書において提供されて、当該方法は、G A R P - T G F β 1 複合体、L T B P 1 - T G F β 1 複合体、L T B P 3 - T G F β 1 複合体、または L R R C 3 3 - T G F β 1 複合体を、本明細書に記載の抗体、その抗原結合部分、または医薬組成物に曝露するステップを含む。

40

【 0 0 4 2 】

一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、G A R P - T G F β 1 複合体、L T B P 1 - T G F β 1 複合体、L T B P 3 - T G F β 1 複合体、または L R R C 3 3 - T G F β 1 複合体からの、成熟 T G F β 1 の放出を阻害する。

【 0 0 4 3 】

一部の実施態様では、当該方法はインビトロで行なわれる。一部の実施態様では、当該方法はインビボで行なわれる。

【 0 0 4 4 】

したがって、本発明は、ヒト対象における T G F β 1 シグナル伝達の調節不全と関連する疾患を治療するための方法を含む。そのような方法は、それを必要とするヒト対象に、

50

本明細書において提供される医薬組成物を、疾患を治療するのに効果的な量で投与するステップを含み、当該量は、疾患を有する患者集団へ投与された場合に、統計的に有意な臨床有効性および安全性を達成する。

【0045】

さらに別の態様では、対象における副作用を減少させるのに使用するためのTGFβ阻害剤が本明細書において提供されて、TGFβ阻害剤は、アイソフォーム選択的である。一部の実施態様では、TGFβ阻害剤は、多数のコンテキストを幅広く標的化しながらTGFβ1を特異的に阻害する抗体である。

【0046】

一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体またはLRRC33-TGFβ1複合体を発現している細胞は、T細胞、線維芽細胞、筋線維芽細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、抗原提示細胞、好中球、骨髄系由来サプレッサー細胞(MDSC)、リンパ球、肥満細胞、巨核球、ナチュラルキラー(NK)細胞、ミクログリア、またはそのような細胞のいずれか1つの前駆細胞である。一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体またはLRRC33-TGFβ1複合体を発現している細胞は、造血幹細胞である。一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体またはLRRC33-TGFβ1複合体を発現している細胞は、神経堤由来細胞である。T細胞は、制御性T細胞(例えば、免疫抑制T細胞)であってよい。T細胞は、CD4陽性(CD4+)T細胞および/またはCD8陽性(CD8+)T細胞であってよい。好中球(neutrophil)は、活性化された好中球であってよい。マクロファージは、線維促進性および/または腫瘍関連マクロファージ(TAM)、例えば、M2cサブタイプおよびM2dサブタイプマクロファージを含む極性化マクロファージであってよい。マクロファージは、1つまたは複数の可溶性因子、例えば、増殖因子、サイトカイン、ケモカインおよび/または特定の疾患微小環境(例えば、TME)内に存在する他の分子によって活性化され得て、オートクリン、パラクリン、および/または内分泌の様式で作用し得る。一部の実施態様では、マクロファージは、M-CSF、例えば、固形腫瘍によって分泌されるM-CSFによって活性化される。一部の実施態様では、マクロファージは、TGFβ1によって活性化される。

【0047】

一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体またはLRRC33-TGFβ1複合体を発現している細胞は、癌細胞、例えば、循環癌細胞および腫瘍細胞である。一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体またはLRRC33-TGFβ1複合体を発現している細胞は、TMEのような疾患部位へ動員される(例えば、腫瘍浸潤)。一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体またはLRRC33-TGFβ1複合体の発現は、疾患微小環境(例えば、TME)によって誘導される。一部の実施態様では、固形腫瘍は、高められた白血球浸潤、例えば、CD45+を含む。腫瘍関連CD45+細胞は、GARP発現および/またはLRRC33発現細胞を含むと考えられる。

【0048】

一部の実施態様では、LTBP1-TGFβ1複合体またはLTBP3-TGFβ1複合体は、細胞外マトリックス(すなわち、ECMの構成要素)に結合される。一部の実施態様では、細胞外マトリックスは、フィブリンおよび/またはフィブロネクチンを含む。一部の実施態様では、細胞外マトリックスは、RGDモチーフを含むタンパク質を含む。一部の実施態様では、LTBP1-TGFβ1複合体またはLTBP3-TGFβ1複合体を生産して沈着させる細胞は、癌細胞および間質細胞のような固形腫瘍内に存在する。一部の実施態様では、LTBP1-TGFβ1複合体またはLTBP3-TGFβ1複合体を生産して沈着させる細胞は、線維性組織内に存在する。一部の実施態様では、LTBP1-TGFβ1複合体またはLTBP3-TGFβ1複合体を生産して沈着させる細胞は、骨髄内に存在する。一部の実施態様では、LTBP1-TGFβ1複合体またはLTBP3-TGFβ1複合体を生産して沈着させる細胞は、筋線維芽細胞または筋線維芽細胞様細胞であり、例えば、癌関連線維芽細胞(CAF)を含む。

【0049】

別の態様では、対象においてTGFβ1活性化を減少させるための方法が本明細書において提供されて、当該方法は、有効量の本明細書に記載の抗体、その抗原結合部分、または医薬組成物を、対象に投与するステップを含み、それにより、対象においてTGFβ1活性化を減少させる。

【0050】

一部の実施態様では、対象は、線維性障害を有する、または有するリスクがある。一部の実施態様では、線維性障害は、影響を受けた組織／臓器の慢性炎症を含む。一部の実施態様では、対象は筋ジストロフィーを有する。一部の実施態様では、対象はデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）を有する。一部の実施態様では、対象は、肝線維症、腎臓線維症、肺線維症（例えば、特発性肺線維症）、子宮内膜症または子宮線維症を有する、または有するリスクがある。一部の実施態様では、対象は、癌（例えば、固形腫瘍、血液癌、および骨髄線維症）を有する、または有するリスクがある。一部の実施態様では、対象は、認知症を有する、または有するリスクがある。

10

【0051】

一部の実施態様では、対象は、追加の治療をさらに受ける。一部の実施態様では、追加の治療は、ミオスタチン阻害剤、VEGFアゴニスト、IGF1アゴニスト、FXRアゴニスト、CCR2阻害剤、CCR5阻害剤、デュアルCCR2／CCR5阻害剤、リジルオキシダーゼ様2阻害剤、ASK1阻害剤、アセチルCoAカルボキシラーゼ（ACC）阻害剤、p38キナーゼ阻害剤、ピルフェニドン、ニンテダニブ、GDF11阻害剤、JAK阻害剤（例えば、JAK2阻害剤）、またはそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

20

【0052】

一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、制御性T細胞（Treg）の抑制活性を減少させる。

【0053】

一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、対象において臓器毒性を誘導しない。一部の実施態様では、臓器毒性は、心血管系毒性、胃腸毒性、免疫毒性、骨毒性、軟骨毒性、生殖系毒性、または腎毒性を含む。

【0054】

一態様では、それを必要とする対象において癌を治療する方法が本明細書において提供されて、当該方法は、有効量の本明細書に記載の抗体、その抗原結合部分、または医薬組成物を、対象に投与するステップを含み、それにより、対象において癌を治療する。

30

【0055】

別の態様では、それを必要とする対象において腫瘍増殖を減少させる方法が本明細書において提供されて、当該方法は、有効量の本明細書に記載の抗体、その抗原結合部分、または医薬組成物を、対象に投与するステップを含み、それにより、対象における腫瘍増殖を減少させる。

【0056】

一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、追加の薬剤または追加の治療と組み合わせて投与される。一部の実施態様では、追加の薬剤はチェックポイント阻害剤である。一部の実施態様では、追加の薬剤は、PD-1拮抗薬、PDL1拮抗薬、PD-L1またはPDL2融合タンパク質、CTLA4拮抗薬などからなる群より選択される。そのような併用療法は、より低用量の投与される治療的薬剤を有利に使用し得て、したがって、本発明によって達成される選択性／特異性の程度がない様々な単剤療法または従来の併用療法と関連する有り得る毒性または合併症を避ける。

40

【0057】

一部の実施態様では、当該方法は、TGFβ2およびTGFβ3と比較して、疾患におけるTGFβ1の関与を判定（例えば試験または確認）するステップをさらに含む。一部の実施態様では、当該方法は、疾患関連TGFβ1の由来（またはコンテキスト）を同定するステップをさらに含む。一部の実施態様では、由来／コンテキストは、患者から得ら

50

れた臨床サンプルにおける、 $TGF\beta$ 提示分子、例えば、 $LTBP1$ 、 $LTBP3$ 、 $GARP$ および $LRRC33$ の発現を判定することによって評価される。

【0058】

さらに別の態様では、 $TGF\beta$ シグナル伝達を阻害するための医薬組成物を作製（例えば、生産、製造）するための方法が本明細書において提供されて、当該方法は、 $TGF\beta$ の少なくとも1つのアイソフォームのシグナル伝達を阻害する1つまたは複数の薬剤を提供するステップ； $TGF\beta$ の全てのアイソフォームに向かう1つまたは複数の薬剤の活性を測定するステップ； $TGF\beta 1$ に関して選択的な薬剤を選択するステップ；アイソフォーム特異的な $TGF\beta 1$ 阻害剤および薬学的に許容できる賦形剤、例えば適切なバッファーを含む医薬組成物へ処方するステップを含む。そのような方法によって生産される医薬組成物も提供される。一部の実施態様では、当該方法は、1つまたは複数の薬剤のコンテキスト依存性の阻害活性を判定（例えば測定、評価）するステップをさらに含む。

10

【0059】

本開示の要旨は、2013年11月6日出願されたPCT/US2013/068613；2014年5月6日出願されたPCT/US2014/036933；および、2017年3月10日出願されたPCT/US2017/021972の要旨にも関し、それぞれの内容全体は参照により本明細書中に援用される。

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】組織微小環境における潜在型複合体内の $TGF\beta 1$ を示す概略を提供する。

20

【図2A-2C】 $TGF\beta 1$ 機能の多数のコンテキストを示す： $GARP$ によって提示される $TGF\beta 1$ は、制御性T細胞上に発現されて、免疫制御に関与する（図2A）； $LTBP1/3$ によって提示される $TGF\beta 1$ は、線維芽細胞および他の細胞によってECM内に沈着されて（図2B）； $LRRC33$ によって提示される $TGF\beta 1$ は、マクロファージを含む骨髄性細胞上に発現される（図2C）。

【図3】 $GARP-TGF\beta 1$ 複合体および $LTBP-TGF\beta 1$ 複合体を作製するためのタンパク質発現プラットフォームを示す。HEK293に基づく発現系は、Ni-NTA親和性精製およびゲル濾過を用いてマルチミリグラム量の精製タンパク質を得る。野生型 $proTGF\beta 1$ 、 $LTPB1$ 、 $sGARP$ 、および $proTGF\beta 1 C4S$ の概要が示される。

30

【図4】図4Aは、潜在型 $TGF\beta 1$ へのAb3の特異的結合を示す。図4Bは、例示的なモノクローナル抗体の結合特異性を示す。図4Bは、Ab1およびAb2が、ELISAによって測定されるように $proTGF\beta 1$ に特異的に結合するが、 $proTGF\beta 2$ 、 $proTGF\beta 3$ 、または成熟 $TGF\beta 1$ は結合しないことを示す。図4Cは、 $LTBP1-proTGF\beta 1$ 複合体に特異的に結合する（ELISAによって測定される）抗体の例を示す。

【図5】成熟 $TGF\beta$ 増殖因子に対して作製された従来技術の抗体のパネル、および、全ての3つのアイソフォームに関するそれらのそれぞれの結合プロファイルを提供する。

【図6A-6B】Octetによって測定された、Ab1、Ab2およびAb3の結合プロファイルを提供し、それらは、アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容／非依存性 $TGF\beta 1$ 阻害剤である。

40

【図7A-7H】細胞に基づく阻害アッセイを提供する。

【図8】インビトロでの $TGF\beta 1$ のカリクレインによって誘導される活性化に対するAb3の阻害効果を示す。

【図9A-9B】エフェクターT細胞増殖の制御性T細胞依存性抑制に対するAb1およびAb3の阻害効果を示す。

【図10A-10C】極性化マクロファージにおける細胞表面 $LRRC33$ 発現の上方調節を示す。

【図11】T細胞共移行大腸炎モデルからの結果を提供する。

【図12A-12K】UUOの $TGF\beta 1$ 依存の機構疾患モデルに対するAb2の阻害効

50

果を示す。

【図13A-13C】UUOのTGF β 1依存の機構疾患モデルに対するAb3の阻害効果を示す。

【図14】四塩化炭素によって誘導される線維症モデルに対するAb3の阻害効果を示す。

【図15】アルポートマウスにおける線維症のトランスレーショナルモデル (translational model) に対するAb3の阻害効果を提供する。

【図16】MC38癌腫における腫瘍増殖に対するAb2の阻害効果を示す。

【図17】EMT-6腫瘍モデルにおける生存に対するPD-1拮抗薬と組み合わせたAb3の効果を提供する。

【図18A-18F】ラットにおけるAb2の改善された安全性プロファイルを示す毒物学／耐容性データを提供する。

【図19A-19B】ラットにおけるAb3の改善された安全性プロファイルを示す毒物学／耐容性データを提供する。

【図20】恒常性ラットBAL細胞におけるAb3のインビボでのアイソフォーム選択性を示すデータを提供する。

【図21A-21D】TGF β アイソフォームの相対的発現を提供する。図21Aは、正常コンパレータに対するTGF β アイソフォーム発現を示す（癌タイプごと）。図21Bは、ヒト癌タイプごとのTGF β アイソフォーム発現の頻度を示す。図21Cは、癌タイプごとの個々の腫瘍サンプルにおけるTGF β アイソフォーム発現を示す。図21Dは、マウス同一遺伝子型癌細胞モデル株におけるTGF β アイソフォーム発現を示す。

【図22】1週間の試験によるpan-TGF β 抗体からの顕微鏡的な心臓知見を示す。

【発明を実施するための形態】

【0061】

哺乳類では、形質転換増殖因子 β (TGF β) スーパーファミリーは、少なくとも33個の遺伝子産物からなる。これらは、骨形態形成タンパク質 (BMP)、アクチビン、増殖および分化因子 (GDF)、および、TGF β ファミリーの3つのアイソフォーム：TGF β 1、TGF β 2、およびTGF β 3を含む。TGF β は、細胞増殖の阻害、細胞外マトリックス (ECM) 再構築、および免疫の恒常性のような様々なプロセスにおいて重要な役割を果たすと考えられる。T細胞恒常性のためのTGF β 1の重要性は、TGF β 1-/-マウスが3〜4週しか生存せず、大きな免疫活性化に起因して多臓器不全で死ぬという観察によって証明される (Kulkarni, A. B., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1993. 90 (2) : p. 770-4; Shull, M. M., et al., Nature, 1992. 359 (6397) : p. 693-9)。TGF β 2およびTGF β 3の役割はあまり明らかでない。3つのTGF β アイソフォームは、別個の時間的および空間的発現パターンを有するが、それらは、同一の受容体、TGF β RIおよびTGF β RIIを通してシグナル伝達し、しかしながら場合によっては、例えばTGF β 2シグナル伝達に関しては、ペータグリカンのようなタイプIII受容体も必要とされる (Feng, X. H. and R. Derynck, Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. 21 : p. 659-93; Massague, J., Annu Rev Biochem, 1998. 67 : p. 753-91)。リガンド誘導性のTGF β RI/IIのオリゴマー化は、SMAD転写因子のリン酸化をトリガーして、Col1a1、Col3a1、ACTA2、およびSERPINE1のような標的遺伝子の転写をもたらす (Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton, Genes Dev, 2005. 19 (23) : p. 2783-810)。SMAD非依存性TGF β シグナル伝達経路は、例えばマルファンマウスの癌または大動脈病変においても説明されている (Derynck, R. and Y. E. Zhang, Nature, 2003. 425 (6958) : p. 577-84; Holm, T. M., et al., Science, 2011. 332 (6027) : p. 358-61)。

【0062】

ヒトにおけるTGFβパスウェイの生物学的重要性は、遺伝子疾患によって確認されている。カムラチ・エンゲルマン病は、TGFβ1遺伝子における常染色体優性の突然変異に起因して骨形成異常をもたらす、TGFβ1シグナル伝達の構成的活性化をもたらす（Janssens, K., et al., J Med Genet, 2006. 43 (1) : p. 1-11）。Loeys/Dietz症候群を有する患者は、TGFβシグナル伝達経路の構成要素内に常染色体優性の突然変異を保有し、大動脈瘤、隔離症、および二分口蓋垂を引き起こす（Van Laer, L., H. Dietz, and B. Loeys, Adv Exp Med Biol, 2014. 802 : p. 95-105）。TGFβパスウェイ調節不全は多数の疾患に関与しているので、TGFβパスウェイを標的化するいくつかの薬物が開発されて患者において試験されているが、成功は制限されている。

10

【0063】

TGFβシグナル伝達の調節不全は、広範囲なヒト疾患と関連している。実際に、多くの疾患状態において、そのような調節不全は、TGFβ機能の多数の面に関与し得る。病変組織、例えば線維性および／または炎症性組織および腫瘍は、TGFβ活性化が疾患の悪化または進行を引き起こし得る局所環境を作り得て、それは、特定の疾患状況において役割を果たす多くの他のサイトカイン、ケモカインおよび増殖因子とともに、オートクリンおよび／またはパラクリン様式で活性化された多数のTGFβ応答細胞間の相互作用によって少なくとも部分的に仲介され得る。例えば、腫瘍微小環境（TME）は、癌（すなわち、悪性）細胞に加えて、TGFβ1を発現している多数の細胞型、例えば、活性化された筋線維芽細胞様線維芽細胞、間質細胞、浸潤性マクロファージ、MDSCおよび他の免疫細胞を含む。したがって、TMEは、ニッチにおいてTGFβ1を発現および／または応答性であるが、1よりも多いタイプの提示分子、例えばLTBP1、LTBP3、LRRC33およびGARPと関連する細胞の異種集団を表わす。

20

【0064】

多数の細胞型およびシグナル伝達「コンテキスト」に関与する、調節不全または疾患駆動のTGFβ1活性を効果的に阻害するために、本開示の発明者らは、アイソフォーム特異的な様式であるが多数のTGFβ1機能を阻害する能力を有する薬剤のクラスを開発することを探求した。そのような薬剤は、本明細書において定義されるように、TGFβ1の「アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容」阻害剤と呼ばれる。一部の実施態様では、そのような阻害剤は、TGFβ1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト非依存性阻害剤である。TGFβ1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容またはコンテキスト非依存性阻害剤の使用は、TGFβ1シグナル伝達を発現および／または応答する様々な細胞型の相互作用に関わる疾患における多数のモデルのTGFβ1機能に対してその阻害効果を与えることができ、それにより、多数のタイプのTGFβ1前駆体複合体を標的化することによって治療的効果を高めると考えられる。したがって、そのような阻害剤の治療的標的は、以下の複合体：i) GARPによって提示されるproTGFβ1；ii) LRRC33によって提示されるproTGFβ1；iii) LTBP1によって提示されるproTGFβ1；およびiv) LTBP3によって提示されるproTGFβ1の少なくとも3つを含む。典型的に、上記複合体(i)および(ii)は、GARPおよびLRRC33の両方とも細胞外面上にTGFβ1を提示することが可能な膜貫通タンパク質であるので細胞表面上に提示されて、一方で、複合体(iii)および(iv)は、細胞外マトリックスの構成要素である。多くの研究は、TGFβ1活性化のメカニズムを解明している。3つのインテグリン、αVβ6、αVβ8、およびαVβ1は、潜在型TGFβ1の主要なアクチベーターであることが証明されている（Reed, N. I., et al., Sci Transl Med, 2015. 7 (288) : p. 288ra79；Travis, M. A. and D. Sheppard, Annu Rev Immunol, 2014. 32 : p. 51-82；Munger, J. S., et al., Cell, 1999. 96 (3) : p. 319-28）。αVインテグリンは、TGFβ1およびTGFβ1 LAP内に存在するRGD配列と高い親和性で結合する（Dong, X., et al., Nat Struct Mol Biol, 2014. 21 (1

30

40

50

2) : p. 1091-6)。TGF β 1 RGD部位内に突然変異を有するトランスジェニックマウスは、インテグリン結合を妨げるが、分泌はそうではなく (but not secretion)、TGF β 1-/-マウスを表現型模写する (Yang, Z., et al., J Cell Biol, 2007. 176 (6) : p. 787-93)。 β 6および β 8インテグリンの両方を欠損したマウスは、多臓器炎症および口蓋裂を含む、TGF β 1およびTGF β 3ノックアウトマウスの全ての本質的な表現型を再現し、発生および恒常性におけるTGF β 1活性化に関するこれらの2つのインテグリンの本質的な役割を確認する (Aluwihare, P., et al., J Cell Sci, 2009. 122 (Pt 2) : p. 227-32)。潜在型TGF β 1のインテグリン依存性活性化のために重要なことは、提示分子への共有係留であり；突然変異誘発によるGARPおよびTGF β 1 LAPの間のジスルフィド結合の分裂は、複合体形成を損なわないが、 α V β 6によるTGF β 1活性化を完全に止める (Wang, R., et al., Mol Biol Cell, 2012. 23 (6) : p. 1129-39)。潜在型TGF β 1の最近の構造は、インテグリンがどのようにして活性TGF β 1を潜在型複合体から放出するのを可能にするのかを解明し：その提示分子への潜在型TGF β 1の共有結合は、LTBPを介してECMへ、または、GARPまたはLRRC33を通して細胞骨格へ、潜在型TGF β 1を固定する。RGD配列へのインテグリン結合は、LAPの構造において力依存性の変化をもたらし、活性のTGF β 1が放出されて近くの受容体に結合するのを可能にする (Shi, M., et al., Nature, 2011. 474 (7351) : p. 343-9)。疾患におけるインテグリン依存性のTGF β 1活性化の重要性も十分に立証されている。 α V β 1の小分子阻害剤は、ブレオマイシンによって誘導される肺線維症および四塩化炭素によって誘導される肝線維症に対して保護して (Reed, N. I., et al., Sci Transl Med, 2015. 7 (288) : p. 288ra79)、抗体による α V β 6ブロックまたはインテグリン β 6発現の損失は、ブレオマイシンによって誘導される肺線維症および放射線によって誘導される線維症を抑制する (Munger, J. S., et al., Cell, 1999. 96 (3) : p. 319-28) ; Horan, G. S., et al., Am J Respir Crit Care Med, 2008. 177 (1) : p. 56-65)。インテグリンに加えて、トロンボスポンジン-1、および、例えばマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP)、カテプシンDまたはカリクレインのようなプロテアーゼによる活性化を含む、TGF β 1活性化の他のメカニズムが暗示されている。しかしながら、これらの研究の大部分は、精製タンパク質を用いてインビトロで行なわれ；インビボ研究からはこれらの分子の役割についてほとんど証拠がない。トロンボスポンジン-1のノックアウトは、一部の組織においてTGF β 1-/-表現型の一部の態様を再現するが、TGF β 依存性であると知られるブレオマイシンによって誘導される肺線維症において保護しない (Ezzie, M. E., et al., Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. 44 (4) : p. 556-61)。加えて、候補プロテアーゼのノックアウトは、TGF β 1表現型をもたらさなかった (Worthington, J. J., J. E. Klementowicz, and M. A. Travis, Trends Biochem Sci, 2011. 36 (1) : p. 47-54)。このことは、多重度によって、または、発生および恒常性よりむしろ特異的な疾患において重要なこれらのメカニズムによって、説明され得る。

【0065】

したがって、本明細書に記載されるTGF β 1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容な阻害剤は、TGF β 1活性化のステップを妨げることによって作用する阻害剤を含む。一部の実施態様では、そのような阻害剤は、TGF β 1のインテグリン依存性 (例えば、機械的または力によって駆動される) 活性化を阻害することができる (図2を参照)。一部の実施態様では、そのような阻害剤は、TGF β 1のプロテアーゼ依存性またはプロテアーゼによって誘導される活性化を阻害することができる。後者は、TGF β 1活性化ステップをインテグリン非依存的な様式で阻害する阻害剤を含む。一部の実施態様で

は、そのような阻害剤は、活性化のモードを問わずに TGFβ1 活性化を阻害することができ、例えば、TGFβ1 のインテグリン依存性活性化およびプロテアーゼ依存性活性化の両方を阻害する。TGFβ1 を活性化し得るプロテアーゼの非限定的な例は、セリンプロテアーゼ、例えば、カリクレイン、ケモトリプシン、トリプシン、エラスターゼ、プラスミン、ならびに、亜鉛メタロプロテアーゼ（MMP ファミリー）、例えば、MMP-2、MMP-9 および MMP-13 を含む。カリクレインは、血漿カリクレインおよび組織カリクレイン、例えば、KLK1、KLK2、KLK3、KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK9、KLK10、KLK11、KLK12、KLK13、KLK14 および KLK15 を含む。図 8 は、TGFβ1 のアイソフォーム特異的な、コンテキスト非依存性の阻害剤の一例を提供し、TGFβ1 のカリクレイン依存性活性化をインビトロで阻害することができる。一部の実施態様では、本発明の阻害剤は、潜在型複合体からの活性の（成熟）TGFβ1 増殖因子の放出または解離を妨げる。一部の実施態様では、そのような阻害剤は、複合体の不活化（例えば、潜在型）立体構造を安定化することによって作用し得る。

【0066】

TGFβ は、線維症、免疫調節および癌進行を含む多くの生物学的プロセスに関与している。TGFβ1 は、タンパク質の TGFβ スーパーファミリーの最初に同定されたメンバーであった。TGFβ スーパーファミリーの他のメンバーと同様に、TGFβ1 およびアイソフォーム TGFβ2 および TGFβ3 は、不活性の前駆体プロタンパク質形態（proTGFβ と呼ばれる）として初めに発現される。TGFβ タンパク質（例えば、TGFβ1、TGFβ2 および TGFβ3）は、プロタンパク質転換酵素（例えば、フューリン）によってタンパク分解性に切断されて、潜在型形態（潜在型 TGFβ と呼ばれる）を生じる。一部の実施態様では、TGFβ タンパク質（例えば、TGFβ1、TGFβ2 および TGFβ3）のプロタンパク質形態または潜在型形態は、「前駆体／潜在型 TGFβ タンパク質」と呼ばれて得る。TGFβ1 は、例えば、GARP（GARP-TGFβ1 複合体を形成する）、LRRC33（LRRC33-TGFβ1 複合体を形成する）、LTBP1（LTBP1-TGFβ1 複合体を形成する）、および／または、LTBP3（LTBP3-TGFβ1 複合体を形成する）を含む多数の分子との複合体で、他の分子に対して提示され得る。これらの複体内に存在する TGFβ1 は、潜在型形態（潜在型 TGFβ1）または前駆体形態（proTGFβ1）のいずれかであってよい。

【0067】

本発明は、TGFβ1 機能の単一のコンテキストに制限されない TGFβ1 シグナル伝達の多数の生物学的役割と関連する特定の疾患のための治療的使用に特に有用である。そのような状況において、多数のコンテキストにわたって TGFβ1 効果を阻害することが有益であり得る。したがって、一部の実施態様では、本発明は、コンテキスト特異的な様式よりむしろアイソフォーム特異的な様式で TGFβ1 を標的化および阻害する方法を提供する。そのような薬剤は、「アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容」TGFβ1 モジュレーターと呼ばれ得る。一部の実施態様では、コンテキスト寛容 TGFβ1 モジュレーターは、多数のコンテキスト（例えば、多数のタイプの前駆体／潜在型-TGFβ1 複合体）を標的化する。一部の実施態様では、コンテキスト寛容 TGFβ1 モジュレーターは、全てのコンテキストを包含するように、全てのタイプの前駆体／潜在型 TGFβ1 複合体（例えば、GARP 関連、LRRC33 関連、LTBP 関連など）を標的化する。

【0068】

コンテキスト寛容 TGFβ1 阻害剤は、1 よりも多いタイプの前駆体／潜在型-TGFβ1 複合体（すなわち、異なる提示分子を有する）を標的化することが可能であるが、一部の実施態様では、そのような阻害剤は、他よりも 1 つまたは複数のコンテキストを好み得る。したがって、一部の実施態様では、TGFβ1 の活性化を阻害するコンテキスト寛容抗体は、そのような抗体が前駆体／潜在型複合体の両方のタイプに結合することが可能だとしても、別の提示分子よりも一方の提示分子によって仲介される TGFβ1 活性化を、優先的に阻害し得る。一部の実施態様では、そのような抗体は、LTBP 関連 TGFβ

10

20

30

40

50

1、GARP関連TGFβ1、およびLRRC33関連TGFβ1に結合して活性化を阻害するが、LTBP関連TGFβ1に向かう選択的阻害活性を有するモノクローナル抗体である。一部の実施態様では、そのような抗体は、LTBP1関連TGFβ1、LTBP3関連TGFβ1、GARP関連TGFβ1、およびLRRC33関連TGFβ1に結合して活性化を阻害するが、LTBP1およびLTBP-3関連TGFβ1に向かう選択的阻害活性を有するモノクローナル抗体である。一部の実施態様では、そのような抗体は、LTBP1関連TGFβ1、LTBP3関連TGFβ1、GARP関連TGFβ1、およびLRRC33関連TGFβ1に結合して活性化を阻害するが、GARP関連TGFβ1およびLRRC33関連TGFβ1に向かう選択的阻害活性を有するモノクローナル抗体である。一部の実施態様では、そのような抗体は、GARP関連TGFβ1およびLRRC33関連TGFβ1に結合して活性化を阻害するが、GARP関連TGFβ1に向かう選択的阻害活性を有するモノクローナル抗体である。一部の実施態様では、そのような抗体は、GARP関連TGFβ1およびLRRC33関連TGFβ1に結合して活性化を阻害するが、LRRC33関連TGFβ1に向かう選択的阻害活性を有するモノクローナル抗体である。

10

【0069】

したがって、本発明によれば、TGFβ効果のサブセットを標的化するために異なる程度の選択性が生産され得る。TGFβ1のアイソフォーム特異的阻害剤（TGFβの単一アイソフォーム、例えば、TGFβ1を標的化する）は、pan-TGFβ阻害剤（TGFβの多数または全てのアイソフォームを標的化する）よりも優れた選択性を提供する。TGFβ1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤（TGFβ1の単一のアイソフォームの多数のコンテキストを標的化する）は、アイソフォーム特異的阻害剤よりも優れた選択性を提供する。TGFβ1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト非依存性阻害剤（どの提示分子が関連されるかにかかわらず、TGFβ1機能を標的化して阻害する）は、TGFβ1の多数の活性にわたる阻害効果のより広範なカバーを可能にしながら、アイソフォーム特異性を提供する。

20

【0070】

〔定義〕

本開示がより容易に理解され得るために、特定の用語が最初に定義される。これらの定義は、本開示の残部に照らして読まれるべきであり、当業者によって理解されたとおりである。別段の定義がされない限り、本明細書において用いられる全ての技術的および科学的用語は、当業者によって一般に理解されるのと同じの意味を有する。さらなる定義は、詳細な説明全体にわたって示される。

30

【0071】

抗体：用語「抗体」は、本明細書における他のどこかにさらに説明されるように、任意の天然起源、組み換え、改変または操作された免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様構造またはそれらの抗原結合フラグメントまたは部分、またはそれらの誘導体を包含する。したがって、用語は、標的抗原に特異的に結合する免疫グロブリン分子を指し、例えば、キメラ、ヒト化、完全なヒト、および二重特異性抗体を含む。無傷の抗体は、少なくとも2つの全長重鎖および2つの全長軽鎖を一般に含むが、場合によっては、重鎖のみを含み得るラクダ科において天然に生じる抗体のように、より少ない鎖を含んでよい。抗体は、単一の由来からのみ得られてよく、または、「キメラ」であってよく、すなわち、抗体の異なる部分は、2つの異なる抗体から得られてよい。抗体、またはその抗原結合部分は、組み換えDNA技術によって、または、無傷の抗体の酵素的または化学的切断によって、ハイブリドーマにおいて生産されてよい。本明細書において用いられる用語「抗体」は、それぞれ、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、ミニボディ、ドメイン抗体、合成抗体（本明細書において「抗体模倣物」と呼ばれることがある）、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体融合（本明細書において「抗体コンジュゲート」と呼ばれることがある）を含む。一部の実施態様では、用語は、ペプチボディも包含する。

40

【0072】

50

抗原：用語「抗原」は、抗原結合タンパク質（例えば抗体を含む）のような選択的結合剤によって結合されることが可能な、エピトープ、例えば、分子または分子部分、または、分子または分子部分の複合体を提供する分子構造を指す。したがって、選択的結合剤は、複合体内の2以上の構成要素によって形成される抗原に特異的に結合し得る。一部の実施態様では、抗原は、その抗原に結合することが可能な抗体を生産するために、動物において用いられることが可能である。抗原は、異なる抗原結合タンパク質、例えば、抗体と相互作用することが可能な、1つまたは複数のエピトープを保有することができる。抗原結合部分／フラグメント：本明細書において用いられる用語、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合フラグメント」は、抗原（例えば、 $\text{TGF}\beta 1$ ）に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つまたは複数のフラグメントを指す。抗原結合部分は、限定されないが、

抗原に特異的に結合して複合体を形成する、任意の天然起源の、酵素的に獲得可能な、合成、または遺伝学的に操作されたポリペプチドまたは糖タンパク質を含む。一部の実施態様では、抗体の抗原結合部分は、例えば、抗体可変および任意選択で定常ドメインをコードするDNAの操作および発現を含む、タンパク質分解または組み換え遺伝子操作技術のような任意の適切な標準的技術を用いて、完全な抗体分子から得てよい。抗原結合部分の非限定的な例は：(i) Fabフラグメント、VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価フラグメント；(ii) F(ab')₂フラグメント、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって結合された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメント；(iii) VHおよびCH1ドメインからなるFdフラグメント；(iv) 抗体の単一アームのVLおよびVHドメインからなるFvフラグメント；(v) 単鎖Fv(scFv)分子（例えば、Bird et al. (1988) SCIENCE 242:423-426；および、Huston et al. (1988) PROC. NAT'L. ACADE. SCI. USA 85:5879-5883を参照）；(vi) dAbフラグメント（例えば、Ward et al. (1989) NATURE 341:544-546を参照）；および(vii) 抗体の超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位（例えば、単離された相補性決定領域(CDR)）を含む。単鎖抗体の他の形態、例えば、ダイアボディも包含される。用語、抗体の抗原結合部分は、「単鎖Fabフラグメント」（他に「scFab」として知られる）を含み、抗体重鎖可変ドメイン(VH)、抗体定常ドメイン1(CH1)、抗体軽鎖可変ドメイン(VL)、抗体軽鎖定常ドメイン(CL)およびリンカーを含み、ここで前記抗体ドメインおよび前記リンカーは、以下の順番の1つをN末端からC末端へ方向で有する：a) VH-CH1-リンカー-VL-CL、b) VL-CL-リンカー-VH-CH1、c) VH-CL-リンカー-VL-CH1またはd) VL-CH1-リンカー-VH-CL；ここで前記リンカーは、少なくとも30個のアミノ酸、好ましくは32～50個のアミノ酸のポリペプチドである。

【0073】

癌：本明細書において用いられる用語「癌」は、調節されない細胞激増および悪性腫瘍によって典型的に特徴付けられる、多細胞真核生物における生理学的状態を指す。したがって、その用語は、固形腫瘍、血液癌（例えば、白血病）、ならびに、骨髄線維症および多発性骨髄腫を広く包含する。

【0074】

細胞関連 $\text{TGF}\beta 1$ ：用語は、膜に結合された（例えば、細胞表面につながれた）、 $\text{TGF}\beta 1$ またはそのシグナル伝達複合体(complex)（例えば、前駆体／潜在型 $\text{TGF}\beta 1$ ）を指す。典型的に、そのような細胞は、免疫細胞である。GARPまたはLRRC33によって提示される $\text{TGF}\beta 1$ は、細胞関連 $\text{TGF}\beta 1$ である。

【0075】

チェックポイント阻害剤：本開示の文脈における、チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイント阻害剤を指し、当該分野において理解される意味を有する。典型的に、標的は、T細胞またはNK細胞上の受容体分子、または、抗原提示細胞(APC)または腫瘍細胞上の対応する細胞表面リガンドである。免疫チェックポイントは、免疫細胞において活性化されて、「自己」に対する炎症性の免疫発生を避ける。したがって、チェックポイ

10

20

30

40

50

ント阻害を介した免疫系のバランスの変更は、癌を検出して除去するために完全に活性化されるのを可能にすべきである。免疫応答の制御に關与する最も知られた阻害受容体は、細胞傷害性Tリンパ球抗原-4 (CTLA-4)、プログラム細胞死タンパク質1 (PD-1)、T細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン3 (TIM3)、リンパ球活性化遺伝子3 (LAG3)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR)、グルコシルチコイドによって誘導される腫瘍壊死因子受容体 (GITR) およびVドメイン免疫グロブリン (Ig) を含むT細胞活性化抑制因子 (VISTA) である。チェックポイント阻害剤の非限定的な例は：ニボルマブ、ペンブロリズマブ、BMS-936559、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、IMP-321、BMS-986016、およびリリルマブを含む。

10

【0076】

臨床利益：本明細書において用いられる用語「臨床利益」は、治療の有効性および安全性の両方を含むことが意図される。したがって、望ましい臨床利益を達成する治療は、効果的および安全の両方である（例えば、毒性または有害事象に耐容または許容可能である）。

【0077】

併用療法：「併用療法」は、2以上の治療的薬剤を含む臨床的徴候のための治療レジメンを指す。したがって、その用語は、第一の組成物（例えば、活性成分）を含む第一の治療が、第二の組成物（活性成分）を含む第二の治療とともに患者へ投与される治療的レジメンを指し、同一または重複する疾患または臨床状態を治療することが意図される。第一および第二の組成物は両方とも、同一の細胞標的、または別個の細胞標的に対して作用し得る。併用療法の文脈における語句「〜とともに」は、第一の治療の治療的効果が、併用療法を受ける対象において、一時的および／または空間的に第二の治療の治療的効果と重複することを意味する。したがって、併用療法は、同時的な投与のために単一の製剤として、または、治療の連続的投与のために別個の製剤として、製剤化され得る。

20

【0078】

組み合わせまたはコンビナトリアルエピトープ：一部の実施態様では、本発明の阻害抗体は、前駆体／潜型TGFβ1複合体の2以上の構成要素（例えば、部分またはセグメント）によって形成されるエピトープに結合し得る。そのようなエピトープは、組み合わせまたはコンビナトリアルエピトープと呼ばれる。したがって、組み合わせエピトープは、複合体の第一の構成要素由来のアミノ酸残基（単数または複数）、および、複合体の第二の構成要素由来のアミノ酸残基（単数または複数）などを含んでよい。それぞれの構成要素は、抗原性複合体の単一のタンパク質または2以上のタンパク質からなってもよい。組み合わせエピトープへの抗体の結合は、抗原の一次アミノ酸配列に単に依存しない。むしろ、組み合わせエピトープは、抗原または抗原複合体の2以上の構成要素（例えば、アミノ酸残基のような部分またはセグメント）からの構造寄与によって形成される。

30

【0079】

競合または交差競合：用語「競合」は、同一エピトープに関して競合する抗原結合タンパク質（例えば、抗体またはその抗原結合部分）の文脈において用いられる場合、アッセイによって判定されるように、試験される抗原結合タンパク質が、共通の抗原（例えば、TGFβ1またはそのフラグメント）に対する参照抗原結合タンパク質の特異的な結合を防止または阻害する（例えば減少させる）、抗原結合タンパク質間の競合を意味する。非常に多くのタイプの競合結合アッセイが、一方の抗原結合タンパク質が他方と競合するかどうか決定するために用いられ得る（例えば：固相直接または間接ラジオイムノアッセイ (RIA)、固相直接または間接酵素免疫測定法 (EIA)、サンドイッチ競合アッセイ；固相直接ビオチン-アビジンEIA；固相直接標的アッセイ、および固相直接標的サンドイッチアッセイ）。通常、競合する抗原結合タンパク質が過剰に存在する場合は、共通の抗原に対する参照抗原結合タンパク質の特異的な結合を、少なくとも40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、または75%以上阻害する（例えば減少させる）。場合によっては、結合は、少なくとも

40

50

80～85%、85～90%、90～95%、95～97%、または97%以上阻害される。一部の実施態様では、例えば製造元の説明書に従って標準的な試験条件を用いて（例えば、結合は室温、約20～25℃で分析される）、例えばBiacorまたはOctetによって分析されるように、第一の抗体またはその抗原結合部分および第二の抗体またはその抗原結合部分は、同一抗原に関して互いに交差ブロックする。一部の実施態様では、第一の抗体またはそのフラグメントおよび第二の抗体またはそのフラグメントは、同一のエピトープを有してよい。他の実施態様では、第一の抗体またはそのフラグメントおよび第二の抗体またはそのフラグメントは、同一でないが重複するエピトープを有してよい。さらなる実施態様では、第一の抗体またはそのフラグメントおよび第二の抗体またはそのフラグメントは、抗体結合が立体障害を介して交差ブロックされるように、三次元空間においてきわめて接近している別個の（異なる）エピトープを有してよい。「交差ブロック」は、抗原に対する第一の抗体の結合が、同一の抗原に対する第二の抗体の結合を妨げて、同様に、抗原に対する第二の抗体の結合が、同一の抗原に対する第一の抗体の結合を妨げることを意味する。

【0080】

相補性決定領域：本明細書において用いられる、用語「CDR」は、抗体可変配列内の相補性決定領域を指す。重鎖および軽鎖の可変領域のそれぞれにおいて3つのCDRが存在し、可変領域のそれぞれに関して、CDR1、CDR2およびCDR3と指定される。本明細書において用いられる用語「CDRセット」は、抗原に結合することのできる単一の可変領域を生じさせる3つのCDRのグループを指す。これらのCDRの正確な境界は、異なるシステムによって異なって定義されている。Kabatによって説明されるシステム（Kabat et al. (1987; 1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md.) は、抗体の任意の可変領域に適用可能な明白な残基ナンバリングシステムを提供するだけでなく、3つのCDRを定義する正確な残基境界も提供する。これらのCDRは、Kabat CDRと呼ばれ得る。Chothiaおよび共同研究者（Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; および Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883）は、Kabat CDR内の特定のサブ部分が、アミノ酸配列レベルで非常に多様性を有するにもかかわらず、ほぼ同一のペプチド主鎖立体構造を取ることを見いだした。これらのサブ部分は、L1、L2およびL3またはH1、H2およびH3と指定された（ここで「L」および「H」は、それぞれ軽鎖および重鎖領域を指定する）。これらの領域は、Chothia CDRと呼ばれ得て、Kabat CDRと重複する境界を有する。Kabat CDRと重複するCDRを定義する他の境界は、Padlan (1995) FASEB J. 9: 133-139 および MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262 (5): 732-45 によって説明されている。さらに他のCDR境界の定義は、本明細書におけるシステムの1つに厳密に従わなくてよいが、それでもなお、Kabat CDRと重複するが、特定の残基または残基群または実にCDR全体が抗原結合に著しく影響を与えないという予測または実験的知見に照らすと、それらは短くまたは長くされ得る。本明細書において用いられる方法は、任意のこれらのシステムに従って定義されるCDRを利用し得るが、特定の

【0081】

立体構造的エピトープ：一部の実施態様では、本発明の阻害抗体は、立体構造特異的なエピトープに結合し得る。そのようなエピトープは、立体構造的エピトープ、立体構造特異的なエピトープ、立体構造依存性エピトープ、または立体構造感受性エピトープと呼ばれる。そのようなエピトープに特異的に結合する、対応する抗体またはそのフラグメントは、立体構造特異的な抗体、立体構造選択的な抗体、または立体構造依存性抗体と呼ばれ得る。立体構造的エピトープへの抗原の結合は、抗原または抗原複合体の三次元構造（立体構造）に依存する。

【0082】

定常領域：免疫グロブリン定常ドメインは、重鎖または軽鎖定常ドメインを指す。ヒトIgG重鎖および軽鎖定常ドメインアミノ酸配列は、当技術分野で知られている。

【0083】

コンテキスト寛容；コンテキスト非依存性：「コンテキスト寛容」および「コンテキスト非依存性」TGFβ阻害剤は、1より多いモードのTGFβ機能に対して作用し得る幅広いコンテキスト阻害剤である。TGFβの「コンテキスト寛容阻害剤」は、TGFβ機能の多数のコンテキスト、例えば、以下：GARP（LRRC32とも呼ばれる）、LRRC33、LTBP1、およびLTBP3の少なくとも2つと関連するTGFβ活性を阻害することが可能な薬剤である。コンテキスト寛容阻害剤のうち、薬剤が、特異的な提示分子に関係なくTGFβ活性を阻害することが可能な場合、そのような阻害剤は、「コンテキスト非依存性」阻害剤と呼ばれる。したがって、TGFβのコンテキスト非依存性阻害剤は、以下：GARP、LRRC33、LTBP1、およびLTBP3の全てと関連するTGFβ活性を阻害することができる。一部の実施態様では、コンテキスト寛容およびコンテキスト非依存性阻害剤は、他よりも1つまたは複数のコンテキストに向かう選択的または偏った阻害活性を及ぼし得る。

10

【0084】

ECM関連のTGFβ1：用語は、細胞外マトリックスの構成要素である（例えばそれに沈着される）、TGFβ1またはそのシグナル伝達複合体（例えば、前駆体／潜在型TGFβ1）を指す。LTBP1またはLTBP3によって提示されるTGFβ1は、ECM関連のTGFβ1である。

20

【0085】

有効量：「有効量」（または治療的有效量）は、患者集団において、統計的に有意な臨床利益を達成する用量または投与レジメンである。

【0086】

エピトープ：用語「エピトープ」は、結合剤、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に特異的に結合することのできる任意の分子決定因子（例えば、ポリペプチド決定因子）を含む。特定の実施態様では、エピトープ決定因子は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル、またはスルホニルのような分子の化学的に活性の表面グループを含み、特定の実施態様では、特異的な三次元構造特性、および／または特異的な電荷特性を有してよい。エピトープは、結合タンパク質によって結合される抗原の領域である。エピトープは、したがって、特異的な結合パートナー上の相補部位に結合することが知られる抗原（またはそのフラグメント）の領域のアミノ酸残基からなる。抗原性フラグメントは、1より多いエピトープを含んでよい。特定の実施態様では、抗体は、タンパク質および／または高分子の複合体混合物内でその標的抗原を認識する場合、抗原に特異的に結合する。例えば、抗体は、抗体が交差競合する（一方が他方の結合または調節効果を妨げる）場合、「同一エピトープに結合する」と言われる。加えて、エピトープの構造的定義（重複、同様、同一）は、情報を与えるが、機能的定義は、構造的（結合）および機能的（調節、競合）パラメーターを包含するので、しばしば、より関連がある。

30

【0087】

線維症：用語「線維症」または「線維性状態／障害」は、組織または臓器内の、コラーゲンのような細胞外マトリックス（ECM）構成要素の病理学的蓄積によって特徴付けられるプロセスまたは兆候を指す。

40

【0088】

GARP-TGFβ1複合体：本明細書において用いられる、用語「GARP-TGFβ1複合体」は、形質転換増殖因子β1（TGFβ1）タンパク質および糖タンパク質A反復優位タンパク質（GARP）またはそれらのフラグメントまたは変異体のプロタンパク質形態または潜在型形態を含む、タンパク質複合体を指す。一部の実施態様では、TGFβ1タンパク質のプロタンパク質形態または潜在型形態は、「前駆体／潜在型TGFβ1タンパク質」と呼ばれ得る。一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体は、1つ

50

または複数のジスルフィド結合を介して前駆体／潜在型 TGFβ1 と共有結合された GARP を含む。他の実施態様では、GARP-TGFβ1 複合体は、前駆体／潜在型 TGFβ1 と非共有結合した GARP を含む。一部の実施態様では、GARP-TGFβ1 複合体は、天然起源の複合体、例えば細胞内の GARP-TGFβ1 複合体である。例示的な GARP-TGFβ1 複合体を図 3 に示す。

【0089】

ヒト抗体：本明細書において用いられる用語「ヒト抗体」は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列由来の変可および定常領域を有する抗体を含むことが意図される。本開示のヒト抗体は、例えば CDR および特に CDR3 内に、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基を含んでよい（例えば、インビトロでランダムまたは部位特異的突然変異誘発によって、またはインビボで体細胞突然変異によって、導入された突然変異）。しかしながら、本明細書において用いられる用語「ヒト抗体」は、マウスのような別の哺乳類種の生殖細胞系に由来する CDR 配列が、ヒトフレームワーク配列中にグラフトされている抗体を含むことを意図しない。

【0090】

ヒト化抗体：用語「ヒト化抗体」は、非ヒト種（例えば、マウス）由来の重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、VH および／または VL 配列の少なくとも一部は、より「ヒト様」に、すなわち、ヒト生殖細胞系可変配列により似ているように変更されている抗体を指す。ヒト化抗体の 1 つのタイプは、CDR グラフト抗体であり、ヒト CDR 配列が非ヒト VH および VL 配列内に導入されて、対応する非ヒト CDR 配列を置き換える。また、「ヒト化抗体」は、目的の抗原に免疫特異的に結合する抗体、またはその変異体、誘導体、アナログまたはフラグメントでもあり、実質的にヒト抗体のアミノ酸配列を有する FR 領域および実質的に非ヒト抗体のアミノ酸配列を有する CDR 領域を含む。本明細書において用いられる、CDR の文脈における用語「実質的に」は、非ヒト抗体 CDR のアミノ酸配列と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一のアミノ酸配列を有する CDR を指す。ヒト化抗体は、少なくとも 1 つの、典型的に 2 つの、可変ドメイン（Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv）の実質的に全てを含み、非ヒト免疫グロブリン（すなわち、ドナー抗体）のものに対応する CDR 領域の全てまたは実質的に全ておよび FR 領域の全てまたは実質的に全ては、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。一実施態様では、ヒト化抗体は、免疫グロブリン Fc 領域（典型的にヒト免疫グロブリンのもの）の少なくとも一部も含む。一部の実施態様では、ヒト化抗体は、軽鎖、ならびに、重鎖の少なくとも可変ドメインを含む。抗体はまた、重鎖の CH1、ヒンジ、CH2、CH3、および CH4 領域も含んでよい。一部の実施態様では、ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖のみを含む。一部の実施態様では、ヒト化抗体は、ヒト化重鎖のみを含む。特定の実施態様では、ヒト化抗体は、軽鎖のヒト化可変ドメインおよび／またはヒト化重鎖のみを含む。

【0091】

アイソフォーム特異的：用語「アイソフォーム特異性」は、一方のアイソフォームを、他の構造的に関連するアイソフォームに対して区別する薬剤の能力（すなわち、選択性）を指す。アイソフォーム特異的な TGFβ 阻害剤は、所定の濃度で、TGFβ の一方のアイソフォームに向けてその阻害活性を与えるが、TGFβ の他のアイソフォームには与えない。例えば、アイソフォーム特異的な TGFβ1 抗体は、TGFβ1 に選択的に結合する。TGFβ1 特異的阻害剤（抗体）は、実質的により大きな親和性で、TGFβ2 または TGFβ3 よりも TGFβ1 アイソフォームを優先的に標的化する（結合し、それにより阻害する）。例えば、このコンテキストにおける選択性は、Octet および Biacore のようなインビトロ結合アッセイによって測定される、それぞれの親和性における少なくとも 500 ~ 1000 倍の違いを指し得る。一部の実施態様では、選択性は、阻害剤が、インビボで TGFβ1 を阻害するのに効果的な用量で用いられた場合に TGFβ2 および TGFβ3 を阻害しないようなものである。例えば、抗体は、約 1 pM の親和性で TGFβ1 に優先的に結合してよく、一方で、同一の抗体は、TGFβ2 および／または TGFβ3

Fβ3に、約0.5～50nMで結合してよい。そのような阻害剤が治療として有用であるためには、望ましい効果を達成するための用量（例えば、治療的有效量）は、阻害剤が、TGFβ2またはTGFβ3を阻害せずにTGFβ1アイソフォームを効果的に阻害することのできるウィンドウ内に入らなければならない。

【0092】

単離される：本明細書において用いられる「単離された」抗体は、異なる抗原性特異性を有する他の抗体から実質的にフリーである抗体を指す。一部の実施態様では、単離された抗体は、他の意図しない細胞物質および／または化学物質から実質的にフリーである。

【0093】

局在化される：本開示の文脈における用語「局在化される」（「局在化された腫瘍」など）は、全身性疾患とは対照的に、解剖上単離されたまたは単離可能な、異常、例えば固形悪性腫瘍を指す。特定の白血病などは、疾患に対する、局在化された構成要素（例えば骨髓）および全身性の構成要素（例えば循環血液細胞）の両方を有してよい。

【0094】

LRRC33-TGFβ1複合体：本明細書において用いられる、用語「LRRC33-TGFβ1複合体」は、形質転換増殖因子β1（TGFβ1）タンパク質のプロタンパク質形態または潜在型形態およびロイシンリッチリピート含有タンパク質33（LRRC33；活性酸素種の負の調節因子またはNRROSとしても知られる）の間の複合体またはそのフラグメントまたは変異体を指す。一部の実施態様では、LRRC33-TGFβ1複合体は、1つまたは複数のジスルフィド結合を介して前駆体／潜在型TGFβ1と共有結合されたLRRC33を含む。他の実施態様では、LRRC33-TGFβ1複合体は、前駆体／潜在型TGFβ1と非共有結合されたLRRC33を含む。一部の実施態様では、LRRC33-TGFβ1複合体は、天然起源の複合体、例えば細胞内のLRRC33-TGFβ1複合体である。

【0095】

LTBP1-TGFβ1複合体：本明細書において用いられる、用語「LTBP1-TGFβ1複合体」は、形質転換増殖因子β1（TGFβ1）タンパク質のプロタンパク質形態または潜在型形態および潜在型TGF-β結合タンパク質1（LTBP1）を含むタンパク質複合体またはそれらのフラグメントまたは変異体を指す。一部の実施態様では、LTBP1-TGFβ1複合体は、1つまたは複数のジスルフィド結合を介して前駆体／潜在型TGFβ1に共有結合されたLTBP1を含む。他の実施態様では、LTBP1-TGFβ1複合体は、前駆体／潜在型TGFβ1に非共有結合されたLTBP1を含む。一部の実施態様では、LTBP1-TGFβ1複合体は、天然起源の複合体、例えば、細胞内のLTBP1-TGFβ1複合体である。例示的なLTBP1-TGFβ1複合体を図3に示す。

【0096】

LTBP3-TGFβ1複合体：本明細書において用いられる、用語「LTBP3-TGFβ1複合体」は、形質転換増殖因子β1（TGFβ1）タンパク質のプロタンパク質形態または潜在型形態および潜在型TGF-β結合タンパク質3（LTBP3）を含むタンパク質複合体またはそれらのフラグメントまたは変異体を指す。一部の実施態様では、LTBP3-TGFβ1複合体は、1つまたは複数のジスルフィド結合を介して前駆体／潜在型TGFβ1に共有結合されたLTBP3を含む。他の実施態様では、LTBP3-TGFβ1複合体は、前駆体／潜在型TGFβ1に非共有結合されたLTBP1を含む。一部の実施態様では、LTBP3-TGFβ1複合体は、天然起源の複合体、例えば、細胞内のLTBP3-TGFβ1複合体である。例示的なLTBP3-TGFβ1複合体を図3に示す。

【0097】

骨髓線維症：「骨髓線維症」は、骨骨髓線維症としても知られ、相対的に稀な骨髓増殖性疾患（例えば、癌）であり、骨髓増殖性障害と呼ばれる疾患グループに属する。骨髓線維症は、骨髓増殖性新生物のPhiladelphia染色体陰性（-）ブランチに分類さ

10

20

30

40

50

れる。骨髓線維症は、骨髓および他の部位における造血幹細胞の異常なクローンの激増によって特徴付けられて、線維症、または、瘢痕組織による髄質の置換をもたらす。用語、骨髓線維症は、別段の定めのない限り、原発性骨髓線維症（PMF）を指す。これは、慢性特発性骨髓線維症（cIMF）とも呼ばれ得る（用語、特発性および原発性は、これらの場合、疾患が未知または自発的起源であることを意味する）。これは、真性多血症または本質的な血小板血症の次に発生する骨髓線維症と対照的である。骨髓線維症は、骨髓性異形成の形態であり、それは骨髓の血液形成組織内の細胞型における変化を指し、しばしば2つの用語は同義的に用いられる。用語、突発性骨髓性異形成および骨髓性異形成を有する骨髓線維症（MMM）は、原発性骨髓線維症を指すためにも用いられる。

【0098】

Pan-TGFβ阻害剤：用語「pan-TGFβ阻害剤」は、TGFβの多数のアイソフォームを阻害または拮抗することが可能な任意の薬剤を指す。そのような阻害剤は、TGFβアイソフォームの小分子阻害剤であってよい。その用語は、TGFβの1よりも多いアイソフォーム、例えば、TGFβ1、TGFβ2、およびTGFβ3の少なくとも2つに結合することが可能な任意の薬剤を指すpan-TGFβ抗体を含む。一部の実施態様では、pan-TGFβ抗体は、3つの全てのアイソフォーム、すなわち、TGFβ1、TGFβ2、およびTGFβ3に結合する。一部の実施態様では、pan-TGFβ抗体は、3つの全てのアイソフォーム、すなわち、TGFβ1、TGFβ2、およびTGFβ3に結合して中和する。

【0099】

提示分子：用語、TGFβの「提示分子（presenting molecule）」または「提示分子（presentation molecule）」は、TGFβの不活性形態（単数または複数）に結合（binding）／結合（linking）することが可能なタンパク質体であり、それにより、細胞外ドメインにおいてプロタンパク質を「提示」する。4つのTGFβ提示分子が現在までに同定されていて：潜在型TGFβ結合タンパク質-1（LTBP1）およびLTBP3は、細胞外マトリックスの中に沈着されて（すなわち、ECMの構成要素）、一方で、糖タンパク質A反復優位（GARP／LRRC32）およびロイシンリッチリピート含有タンパク質33（LRRC33）は、膜貫通ドメインを含み、免疫細胞のような特定の細胞の表面上に潜在型TGFβ1を提示する。TGFβ1アイソフォームは単独で、正常および疾患の状態の両方において、多くの生物学的プロセスに関与している。これらは、限定されないが、組織恒常性の維持、炎症応答、ECM認識、例えば創傷治癒、および免疫応答の調節、ならびに、臓器線維症、癌、および自己免疫を含む。

【0100】

ProTGFβ1：本明細書において用いられる用語「proTGFβ1」は、複合体内にTGFβ1のプロドメイン配列を含む不活性のTGFβ1複合体の前駆体形態を包含することが意図される。したがって、その用語は、TGFβ1の前駆体、ならびに、潜在型-形態を含んでよい。「前駆体／潜在型TGFβ1」の表現は、相互交換可能に用いられてよい。TGFβ1の「前駆体」形態は、フーリン部位でのタンパク質分解性の切断の前に存在する。いったん切断されると、生じる形態は、TGFβ1の「潜在型」と呼ばれる。「潜在型」複合体は、さらなる活性化が、インテグリンによって駆動される活性化イベントなどをトリガーするまで、関連したままである。図3に示されるように、proTGFβ1複合体は、ジスルフィド結合によって結合された二量体TGFβ1プロタンパク質ポリペプチドからなる。形容詞「潜在型」は、インテグリンが介在するまたは他の活性化イベントの前の、TGFβ1の「不活性」状態を説明するために一般に用いられ得ることに注意すべきである。

【0101】

制御性T細胞：「制御性T細胞」またはTregは、バイオマーカーCD4、FOXP3、およびCD25の発現によって特徴付けられる。Tregは、抑制性T細胞と呼ばれることがあり、免疫系を調整する、自己抗原に対する耐性を維持する、および、自己免疫疾

10

20

30

40

50

患を防ぐ、T細胞の亜集団を表わす。Tregは免疫抑制であり、一般に、エフェクターT (Teff) 細胞の誘導および激増を抑制または下方調節する。Tregは、胸腺において発生し得て（いわゆる、CD4+Foxp3+「内在性」Treg）、または、例えば、TGFBまたはレチノイン酸に対する曝露後に、抹消においてナイーブCD4+T細胞から分化する。

【0102】

固形腫瘍：用語「固形腫瘍」は、嚢胞または液体領域を通常は含まない組織の異常な増殖または塊をもたらす増殖性障害を指す。固形腫瘍は、良性（非癌性）、または悪性（癌性）であってよい。固形腫瘍は、癌性（悪性）細胞、CAFを含む間質細胞、および浸潤白血球、例えばマクロファージおよびリンパ球からなるとよい。

【0103】

特異的な結合：本明細書において用いられる、用語「特異的な結合」または「特異的に結合する」は、抗原と抗体、またはその抗原結合部分の相互作用が、特定の構造（例えば、抗原性決定因子またはエピトープ）の存在に依存することを意味する。例えば、抗体、またはその抗原結合部分は、一般的なタンパク質よりもむしろ、特異的なタンパク質に結合する。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、抗体が、少なくとも約 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 10^{-13} M、またはそれ未満の、標的に関するKDを有するならば、標的、例えば、TGFBに特異的に結合する。一部の実施態様では、本明細書において用いられる用語「TGFB1のエピトープに対する特異的な結合」、「TGFB1のエピトープに特異的に結合する」、「TGFB1に対する特異的な結合」、または「TGFB1に特異的に結合する」は、TGFB1に結合して、表面プラズモン共鳴によって決定される 1.0×10^{-7} M以下の解離定数（KD）を有する、抗体、またはその抗原結合部分を指す。一実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、TGFB1のヒトおよび非ヒト（例えば、マウス）オルソログの両方に特異的に結合することができる。

【0104】

対象：治療的適用の文脈における用語「対象」は、臨床ケアまたは介入、例えば治療、診断などを受ける個体を指す。適切な対象は、制限されないが哺乳類（例えば、ヒトおよび非ヒト哺乳類）を含む、脊椎動物を含む。対象がヒト対象である場合、用語「患者」は、相互交換可能に用いられてよい。臨床文脈では、用語「患者集団」または「患者亜集団」は、臨床基準のような基準（例えば、疾患提示、疾患ステージ、特定の状態に対する感受性、治療に対する反応性など）、病歴、健康状態、性別、年齢群、遺伝子基準（例えば、特定の突然変異、多型、遺伝子重複、DNA配列反復などのキャリア）およびライフスタイル因子（例えば、喫煙、アルコール消費量、運動など）のセットに入る個体の群を指すために用いられる。

【0105】

TGFB1関連障害：「TGFB1関連障害」は、病因および／または進行の少なくとも一部をTGFB1シグナル伝達またはその調節不全に帰すことのできる、任意の疾患または障害を意味する。

【0106】

TGFB阻害剤：用語「TGFB阻害剤」は、TGFB増殖因子（例えば、TGFB1、TGFB2および／またはTGFB3）の生物学的活性または機能を拮抗することが可能な任意の薬剤を指す。用語は、その作用機序を制限することを意図せず、例えば、中和阻害剤、受容体拮抗薬、可溶性リガンドトラップ、およびTGFBの活性化阻害剤を含む。

【0107】

「TGFBファミリー」は、TGFBスーパーファミリー内のクラスであり、構造的に似ている3つのアイソフォーム：TGFB1、TGFB2、およびTGFB3を含む。

【0108】

毒性：本明細書において用いられる用語「毒性（単数または複数）」は、望ましくない副作用および有害事象のような、患者に投与される治療と関連する患者における不要なイン

10

20

30

40

50

ビボ効果を指す。「耐容性」は、毒性のせいで治療を中止することなく患者によって合理的に許容され得る治療または治療的レジメンと関連する毒性のレベルを指す。

【0109】

治療する (Treat) / 治療 (treatment) : 用語「治療する」または「治療」は、治療的治療、予防的治療、および対象が障害または他の危険因子を発生するリスクを減少させる適用を含む。したがって、その用語は、例えば、体の免疫を高めるまたはブーストすることによって；免疫抑制を減少または反転させることによって；体から有害な細胞または物質を減少、除去または根絶させることによって；疾患負荷（例えば、腫瘍負荷）を減少させることによって；再発またはぶり返しを防止することによって；不応期を延長させることによって、および／または、他の方法で生存を改善することによって、患者において治療的利益を引き起こすことを広く意味することが意図される。その用語は、治療的治療、予防的治療、および対象が障害または他の危険因子を発生するリスクを減少させる適用を含む。治療は、障害の完全な治療を必要とせず、症候 (symptom) または根底にある危険因子を減少させる実施態様を包含する。併用療法の文脈において、その用語は、i) 副作用を減少させて耐容性を増大させるように、第二の治療的が第一の治療的の効果的な用量を減少させる能力；ii) 第二の治療が患者を第一の治療により反応性にさせる能力；および／またはiii) 相加的または相乗的な臨床利益を果たす能力を指してもよい。

10

【0110】

腫瘍関連マクロファージ : 「腫瘍関連マクロファージ (TAM)」は、腫瘍促進性表現型を有する極性化／活性化されたマクロファージである。TAMは、赤血球－骨髓性前駆細胞に由来する組織常在性マクロファージまたは腫瘍部位へ動員される髄質由来の単球／マクロファージであってよい。TAMへの単球／マクロファージの分化は、局所的な化学的シグナル、例えば、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、および、リガンドとして作用する他の分子、ならびに、ニッチ（腫瘍微小環境）内に存在する単球／マクロファージ間の細胞間相互作用を含む、多くの因子によって影響される。一般に、単球／マクロファージは、いわゆる「M1」または「M2」サブタイプに極性化され得て、後者は、より腫瘍促進性の表現型と関連する。固形腫瘍では、腫瘍量の50%までが、優先的にM2極性化であるマクロファージに対応し得る。

20

【0111】

腫瘍微小環境 : 用語「腫瘍微小環境 (TME)」は、腫瘍（例えば、固形腫瘍）がインビボに存する局所的な疾患ニッチを指す。

30

【0112】

可変領域 : 用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体の軽鎖および／または重鎖の部分の指し、典型的に、重鎖内のおよそアミノ末端120～130アミノ酸および軽鎖内の約100～110アミノ末端アミノ酸を含む。特定の実施態様では、異なる抗体の可変領域は、同一種の抗体の間でさえ、アミノ酸配列が広範囲にわたって異なる。抗体の可変領域は典型的に、その標的に関する特定の抗体の特異性を決定する。

【0113】

実施例 (operating example) 以外では、または、別段の指示がない場合は、本明細書において用いられる反応条件または成分量を表わす全ての数は、用語「約」によって全ての例において修飾されると理解されるべきである。用語「約」は、パーセンテージに関して用いられる場合、±1%を意味してよい。

40

【0114】

明細書および特許請求の範囲において、本明細書において用いられる不定冠詞「a」および「an」は、明確に逆が指示されない限り、「少なくとも1つ」を意味すると理解されるべきである。

【0115】

明細書および特許請求の範囲において、本明細書において用いられる語句「および／または」は、そのように結合されたエレメントの「いずれかまたは両方」、すなわち、ある

50

場合には結合的に存在し、他の場合では分離して存在するエレメントを意味すると理解されるべきである。「および／または」節によって明確に特定されるエレメント以外の他のエレメントは、明確に逆が指示されない限り、具体的に特定されるこれらのエレメントと関係するまたは関係しないにかかわらず、任意選択で存在してよい。したがって、非限定的な例として、「Aおよび／またはB」という言及は、「含む (comprising)」のようなオープンエンド言語とともに用いられる場合、一実施態様では、Bを伴わずにAを指してよく（任意選択でB以外のエレメントを含んでよい）；別の実施態様では、Aを伴わずにBを指してよく（任意選択でA以外のエレメントを含んでよい）；さらに別の実施態様では、AおよびBの両方を指してよい（任意選択で他のエレメントを含んでよい）；などである。

10

【0116】

明細書および特許請求の範囲において、本明細書において用いられるように、1つまたは複数のエレメントのリストに対する言及における語句「少なくとも1つ」は、エレメントのリスト内の任意の1つまたは複数のエレメントから選択される少なくとも1つのエレメントを意味すると理解されるべきであるが、エレメントのリスト内に具体的に挙げられるそれぞれおよび全てのエレメントの少なくとも1つを必ずしも含まず、エレメントのリスト内のエレメントの任意の組み合わせを除外しない。この定義は、語句「少なくとも1つ」が指すエレメントのリスト内に具体的に特定されるエレメント以外のエレメントが（具体的に特定されるこれらのエレメントに関係するまたは関係しないにかかわらず）任意選択で存在してよいことも許容する。したがって、非限定的な例として、「AおよびBの少なくとも1つ」（または同等に、「AまたはBの少なくとも1つ」、または同等に、「Aおよび／またはBの少なくとも1つ」）は、一実施態様では、少なくとも1つの（任意選択で、1つよりも多くを含んでよい）Aを、Bは存在せずに指してよく（任意選択で、B以外のエレメントを含んでよい）；別の実施態様では、少なくとも1つの（任意選択で、1つよりも多くを含んでよい）Bを、Aは存在せずに指してよい（任意選択で、A以外のエレメントを含んでよい）；さらに別の実施態様では、少なくとも1つの（任意選択で、1つよりも多くを含んでよい）A、および、少なくとも1つの（任意選択で、1つよりも多くを含んでよい）B（任意選択で、他のエレメントを含んでよい）；などを指してよい。

20

【0117】

クレームエレメントを修飾するための特許請求の範囲における、順序を表わす用語、例えば、「第一」、「第二」、「第三」などの使用は、それ自体では、方法の行為が行なわれる一方のクレームエレメントの他方に対するいかなる優先、先行、または順序、または時間的順序を含意しないが、クレームエレメントを区別するために、特定の名称を有する一方のクレームエレメントを、（順序を表わす用語を使用しなければ）同一の名称を有する別のエレメントから、区別するためのラベルとして単に用いられる。

30

【0118】

本明細書において提供される範囲は、範囲内の全ての値に関する省略表現であると理解される。例えば、1～50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50からなる群からの任意の数、数の組み合わせ、または、サブ範囲、例えば、10～20、1～10、30～40などを含むと理解される。

40

【0119】

[TGFβ1のアイソフォーム選択的、コンテキスト寛容／コンテキスト非依存性抗体]

本発明は、前駆体／潜在型-TGFβ1を含む以下の複合体：GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、およびLRRC33-TGFβ1複合体の2以上に結合する抗体、およびその抗原結合部分を提供する。したがって、本発明の一部の態様は、そのようなTGFβ1複合体内のエピトープに特異

50

的に結合する抗体、またはその抗原結合部分に関し、エピトープは、 $TGF\beta 1$ が、 $GARP-TGF\beta 1$ 複合体、 $LTBP1-TGF\beta 1$ 複合体、 $LTBP3-TGF\beta 1$ 複合体、および／または $LRRC33-TGF\beta 1$ 複体内に存在する場合、抗体、またはその抗原結合部分による結合に利用可能である。一部の実施態様では、エピトープは、 $GARP$ 、 $LTBP1$ 、 $LTBP3$ 、および／または $LRRC33$ との複合体の場合、 $TGF\beta 1$ における立体構造的な変化に起因して、利用可能である。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分が結合する $TGF\beta 1$ 内のエピトープは、 $TGF\beta 1$ が、 $GARP$ 、 $LTBP1$ 、 $LTBP3$ 、および／または $LRRC33$ と複合体でない場合、利用可能でない。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、 $TGF\beta 2$ に特異的に結合しない。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、 $TGF\beta 3$ に特異的に結合しない。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、 $TGF\beta 1$ がインテグリンに結合するのを妨げない。例えば、一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、 $TGF\beta 1$ のインテグリン結合部位をマスクしない。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、 $TGF\beta 1$ の活性化を阻害する。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、 $GARP-TGF\beta 1$ 複合体、 $LTBP1-TGF\beta 1$ 複合体、 $LTBP3-TGF\beta 1$ 複合体、および／または $LRRC33-TGF\beta 1$ 複合体からの成熟 $TGF\beta 1$ の放出を阻害する。

【0120】

本明細書において提供される抗体、またはその抗原結合部分は、多数の（すなわち2以上の） $TGF\beta 1$ 複合体のエピトープに特異的に結合し、エピトープは、 $TGF\beta 1$ が、 $GARP-TGF\beta 1$ 複合体、 $LTBP1-TGF\beta 1$ 複合体、 $LTBP2-TGF\beta 1$ 複合体、 $LTBP3-TGF\beta 1$ 複合体、 $LTBP4-TGF\beta 1$ 複合体および／または $LRRC33-TGF\beta 1$ 複体内に存在する場合、抗体、またはその抗原結合部分による結合に関し利用可能である。一部の実施態様では、 $TGF\beta 1$ は、天然起源の哺乳類アミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、 $TGF\beta 1$ は、天然起源のヒトアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、 $TGF\beta 1$ は、ヒト、サル、ラットまたはマウスのアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分は、 $TGF\beta 2$ に特異的に結合しない。一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分は、 $TGF\beta 3$ に特異的に結合しない。一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分は、 $TGF\beta 2$ または $TGF\beta 3$ に特異的に結合しない。一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号21に示されるアミノ酸配列を含む $TGF\beta 1$ に特異的に結合する。 $TGF\beta 2$ のアミノ酸配列、および $TGF\beta 3$ アミノ酸配列は、配列番号22および23にそれぞれ示される。一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分は、非天然起源のアミノ酸配列を含む $TGF\beta 1$ （他には本明細書において非天然起源 $TGF\beta 1$ と呼ばれる）に特異的に結合する。例えば、非天然起源 $TGF\beta 1$ は、天然起源 $TGF\beta 1$ アミノ酸配列に対して1つまたは複数の組み換えによって生産された突然変異を含んでよい。一部の実施態様では、 $TGF\beta 1$ 、 $TGF\beta 2$ 、または $TGF\beta 3$ アミノ酸配列は、表1に示される配列番号24～35に記載のアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、 $TGF\beta 1$ 、 $TGF\beta 2$ 、または $TGF\beta 3$ アミノ酸配列は、表2に示される配列番号36～43に記載のアミノ酸配列を含む。

【0121】

$TGF\beta 1$

LSTCKTIDMELVKRKRIEAI R G Q I L S K L R L A S P P S Q G E V P
 P G P L P E A V L A L Y N S T R D R V A G E S A E P E P E P E A D Y Y A K E V T
 R V L M V E T H N E I Y D K F K Q S T H S I Y M F F N T S E L R E A V P E P V L
 L S R A E L R L L R L K L K V E Q H V E L Y Q K Y S N N S W R Y L S N R L L A P
 S D S P E W L S F D V T G V V R Q W L S R G G E I E G F R L S A H C S C D S R D
 N T L Q V D I N G F T T G R R G D L A T I H G M N R P F L L L M A T P L E R A Q
 H L Q S S R H R R A L D T N Y C F S S T E K N C C V R Q L Y I D F R K D L G W K

W I H E P K G Y H A N F C L G P C P Y I W S L D T Q Y S K V L A L Y N Q H N P G
A S A A P C C V P Q A L E P L P I V Y Y V G R K P K V E Q L S N M I V R S C K C
S (配列番号 21)

【0122】

T G F β 2

S L S T C S T L D M D Q F M R K R I E A I R G Q I L S K L K L T S P P E D Y P E
P E E V P P E V I S I Y N S T R D L L Q E K A S R R A A A C E R E R S D E E Y Y
A K E V Y K I D M P P F F P S E N A I P P T F Y R P Y F R I V R F D V S A M E K
N A S N L V K A E F R V F R L Q N P K A R V P E Q R I E L Y Q I L K S K D L T S
P T Q R Y I D S K V V K T R A E G E W L S F D V T D A V H E W L H H K D R N L G
F K I S L H C P C C T F V P S N N Y I I P N K S E E L E A R F A G I D G T S T Y
T S G D Q K T I K S T R K K N S G K T P H L L L M L L P S Y R L E S Q Q T N R R
K K R A L D A A Y C F R N V Q D N C C L R P L Y I D F K R D L G W K W I H E P K
G Y N A N F C A G A C P Y L W S S D T Q H S R V L S L Y N T I N P E A S A S P C
C V S Q D L E P L T I L Y Y I G K T P K I E Q L S N M I V K S C K C S (配列番号
22)

【0123】

T G F β 3

S L S L S T C T T L D F G H I K K K R V E A I R G Q I L S K L R L T S P P E P T
V M T H V P Y Q V L A L Y N S T R E L L E E M H G E R E E G C T Q E N T E S E Y
Y A K E I H K F D M I Q G L A E H N E L A V C P K G I T S K V F R F N V S S V E
K N R T N L F R A E F R V L R V P N P S S K R N E Q R I E L F Q I L R P D E H I
A K Q R Y I G G K N L P T R G T A E W L S F D V T D T V R E W L L R R E S N L G
L E I S I H C P C H T F Q P N G D I L E N I H E V M E I K F K G V D N E D D H G
R G D L G R L K K Q K D H H N P H L I L M M I P P H R L D N P G Q G G Q R K K R
A L D T N Y C F R N L E E N C C V R P L Y I D F R Q D L G W K W V H E P K G Y Y
A N F C S G P C P Y L R S A D T T H S T V L G L Y N T L N P E A S A S P C C V P
Q D L E P L T I L Y Y V G R T P K V E Q L S N M V V K S C K C S (配列番号 23)

10

20

30

40

50

表 1. 例示的な TGF β 1、TGF β 2、および TGF β 3 アミノ酸配列

タンパク質	配列	配列番号
proTGF β 1	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIKRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPE AVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHN EIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLV EQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQ WLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATI HGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNC CVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQY SKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLS NMIVRSCKCS	24
proTGF β 1 C4S	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIKRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPE AVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHN EIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLV EQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQ WLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATI HGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNC CVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQY SKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLS NMIVRSCKCS	25

10

20

30

40

50

proTGFβ1 D2G	LSTCKTIDMELVKKRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPE AVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHN EIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLV EQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQ WLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATI HGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHGALDNTNYCFSSTEKNCC VRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSK VLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNM IVRSCKCS	26
proTGFβ1 C4S D2G	LSTCKTIDMELVKKRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPE AVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHN EIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLV EQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQ WLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATI HGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHGALDNTNYCFSSTEKNCC VRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSK VLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNM IVRSCKCS	27
proTGFβ2	SLSTCSTLDMQDMRKRIEAIKQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVP PEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYAKEVYKIDMP PFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFR QNPKEARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWL SFDVTDVAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCTFVPSNNYIIPNKSE ELEARFAGIDGTSTYTSQDQTIKSTRKKNSGKTPHLLMLLPSY RLESQQTNRKKRALDAAYCFRNVDNCCLRPLYIDFKRDLGW KWIHEPKGYANFACAGACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASA SPCCVSDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS	28
proTGFβ2 C5S	SLSTSSTLDMQDMRKRIEAIKQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVP PEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYAKEVYKIDMP PFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFR QNPKEARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWL SFDVTDVAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCTFVPSNNYIIPNKSE ELEARFAGIDGTSTYTSQDQTIKSTRKKNSGKTPHLLMLLPSY RLESQQTNRKKRALDAAYCFRNVDNCCLRPLYIDFKRDLGW KWIHEPKGYANFACAGACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASA SPCCVSDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS	29

10

20

30

40

50

proTGFβ2 C5S D2G	SLSTSSTLDMQFMRKRIEAIHQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVP PEVISIYNSTRDLLQEASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMP PFFPSENAIPPTFYRPFYFRIVRFDVSAEKNASNLVKAEFRVRL QNPKEARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTAEGEWL SFDVTDVHEWHLHKKDRNLGFKISLHCPCTFVPSNNYIIPNKSE ELEARFAGIDGTSTYTSQDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLMLLPSY RLESQQTNRKRGALDAAYCFRNVQDNCCRLPLYIDFKRDLGWK WIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSTYNTINPEASAS PCCVSDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS	30
proTGFβ2 D2G	SLSTCSTLDMQFMRKRIEAIHQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVP PEVISIYNSTRDLLQEASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMP PFFPSENAIPPTFYRPFYFRIVRFDVSAEKNASNLVKAEFRVRL QNPKEARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTAEGEWL SFDVTDVHEWHLHKKDRNLGFKISLHCPCTFVPSNNYIIPNKSE ELEARFAGIDGTSTYTSQDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLMLLPSY RLESQQTNRKRGALDAAYCFRNVQDNCCRLPLYIDFKRDLGWK WIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSTYNTINPEASAS PCCVSDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS	31
proTGFβ3	SLSLSTCTLDLFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPEPTVMTHVP YQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDM IQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLR VPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWL SFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEV MEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHNNPHLILMMIPPHRLD NPGQGGQRKKRALDTNYCFRNLNCCVRPLYIDFRQDLGWK WVHEPKGYNANFCGSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASA SPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSKCS	32
proTGFβ3 C7S	SLSLSTSTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPEPTVMTHVP YQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDM IQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLR VPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWL SFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEV MEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHNNPHLILMMIPPHRLD NPGQGGQRKKRALDTNYCFRNLNCCVRPLYIDFRQDLGWK WVHEPKGYNANFCGSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASA SPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSKCS	33

10

20

30

40

50

proTGFβ3 C7S D2G	SLSLSTSTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVP YQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDM IQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLR VPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWL SFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEV MEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLD NPGQGGQRKGALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKW VHEPKGYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASP CCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCCKCS	34
proTGFβ3 D2G	SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVP YQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDM IQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLR VPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWL SFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEV MEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLD NPGQGGQRKGALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKW VHEPKGYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASP CCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCCKCS	35

表 2. 例示的な非ヒトアミノ酸配列

タンパク質	種	配列	配列番号
proTGFβ1	マウス	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIKRGQILSKLRLASPPSQGEVPPG PLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVL MVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPPLSRAE LRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRLTPTDTPE WLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGFSAHCSCDSKDNKLH VEINGISPKRRGDLGTIHDNMRPFLMATPLERAQHLHSS RHRRALDTNYCFSSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASASP CCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	36
proTGFβ1	Cyno	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIKRGQILSKLRLASPPSQGEVPPG PLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNLT	37

10

20

30

40

50

		QVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQS SRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHE PKGYPHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAA PCCVPQALEPLPIVYYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	
TGFβ1 LAP C4S	マウス	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIARGQILSKLRLASPPSQGEVPPG PLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVL MVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPPLSRAE LRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRLTPTDTPE WLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGRFSAHCSCDSKDNKLH VEINGISPKRRGDLGTIHDNMRPFLLMATPLERAQHLHSS RHRR	38
TGFβ1 LAP C4S	Cyno	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIARGQILSKLRLASPPSQGEVPPG PLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNLT QVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQS SRHRR	39
proTGFβ1 C4S D2G	マウス	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIARGQILSKLRLASPPSQGEVPPG PLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVL MVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPPLSRAE LRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRLTPTDTPE WLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGRFSAHCSCDSKDNKLH VEINGISPKRRGDLGTIHDNMRPFLLMATPLERAQHLHSS RHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPK GYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASASPC CVPQALEPLPIVYYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	40
proTGFβ1 C4S	マウス	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIARGQILSKLRLASPPSQGEVPPG PLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVL MVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPPLSRAE LRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRLTPTDTPE WLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGRFSAHCSCDSKDNKLH VEINGISPKRRGDLGTIHDNMRPFLLMATPLERAQHLHSS RHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASASP CCVPQALEPLPIVYYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	41

10

20

30

40

50

proTGFβ1 C4S	Cyno	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIKQILSKRLASPPSQGEVPPG PLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSKNTL QVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQS SRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHE PKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAA PCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCCKS	42
proTGFβ1 C4S D2G	Cyno	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIKQILSKRLASPPSQGEVPPG PLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSKNTL QVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQS SRHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAP CCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCCKS	43
LTBP3	CYNO	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCRD SCQQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSFVRVVCPLPCMNGG QCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAGGAGGGTGGSGPGLS RAGALSTGALPLAPEGDSVASKHAIYAVQVIADPPGPGE PPAQHAFLVPLGPGQISAEVQAPPPVNVVRVHHPPEASV QVHRIESSNAEGAAPSQHLLPHPKPSHPRPPTQKPLGRCF QDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKCHKC PQLQYTGVCQKPGPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINE CAMPGVCRHGDCLNPNPGSYRCVCPGHSGLGPSRTQCIAD KPEEKSLCFRLVSPEHQCQHPLTTRLTRQLCCCSVGKAWG ARCQRCPADGTAAAFKEICPAGKGYHILTSHQTLTIQGESDF SLFLHPDGPQKQQLPESPSQAPPPEDTEEERGVTTDSPV SEERSVQQSHPTATTSPARPYPELISRPSPTMRWFLPDLP PSRSAVEIAPTQVTETDECRLNQNICGHGECVPGPPDYSC HCNPGYRSHQHRVCVDVNECEAEPCGPGRGICMNTGG SYNCHCNRGYRLHVAGAGGRSCVDLNECAKPHLCGDGGF CINFPGHYKNCNYPGYRLKASRPPVCEDIDECRDPSSCPD GKCENKPGSFKCIACQPGYRSQGGGACRDVNECAEGSPC	44

10

20

30

40

50

		SPGWCENLPGSFRCTCAQGYAPAPDGRSCVDVDECEAG DVCDNGICTNTPGSFQCQCLSGYHLSRDRSHCEDIDECDF PAACIGGDCINTNGSYRCLCPQGHRLVGGRKCQDIDECTQ DPGLCLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFTPTQDQHGCEEVE QPHHKKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQCECCSLGAGW GDHCEIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAH RDIDECMLFGAEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNL LECVDVDECLDESNCRNGVCENTRGGYRCACPPAEYSP AQRQCLSPEEMDVDECQDPAACRPGRCVNLPGSYRCEC RPPWVPGPSGRDCQLPESPAERAPERRDVCWSQRGEDG MCAGPQAGPALTFDDCCCRQGRGWGAQCRPCPPRGAG SQCPTSQSESNSFWDTSPLLLKGPRRDEDSSEEDSDECR CVSGRCVPRPGGAVCECPGGFQLDASRARCVDIDECREL NQRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCKAGFARSRPHGACVPQ RRR	
LTBP3	マウス	GPAGERGTGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCRD SCQQGSNMTLIGENGHSTDLTGSAFRVVVCLPCMNGG QCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAAGTGAGTGSSGPGLAR TGAMSTGPLPLAPEGESVASKHAIYAVQVIADPPGPGEGP PAQHAFLVPLGPGQISAEVQAPPPVNVVRVHHPPEASVQ VHRIECPNAEGPASSQHLLPHPKPPHPRPPTQKPLGRCFQ DTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKCHKCP QLQYTGVCQKVPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINEC AMPGNVCHGDCLNNPGSYRCVCPGHSGLPLAAQCIADK PEEKSLCFRLVSTEHQCQHPLTTRLTRQLCCCSVGKAWGA RCQRCPADGTAAFKEICPGKGYHILTSHTLTIQGESDFSLE LHPDGPPKPQQLPESPSRAPPLEDTEEERGVMTDPPVSE ERSVQQSHPTTTTSPPRPYPELISRPSPTFHRFLDLPPS RSAVEIAPTQVTETDECRLNQNICGHGQCVPGPSDYSCHC NAGYRSHQHYRCVDVNECEAEPCGPGKGICMNTGGSY NCHCNRGYRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCGDGGFCIN FPGHYKCNCYPGYRLKASRPICEDIDECRDPSTCPDGKC ENKPGSFKCIACQPGYRSQGGGACRDVNECSEGTCPSPG WCENLPGSYRCTCAQYEPAQDGLSCIDVDECEAGKVCQD GICTNTPGSFQCQCLSGYHLSRDRSRCEDIDECDFPAACIG GDCINTNGSYRCLCPLGHRLVGGRKCKKDIDECSDQDGLC	45

10

20

30

40

50

		LPHACENLQGSYVCVCDEGFTLTQDQHGCCEEVEQPHHKK ECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCCSLGAGWGDHCEIY PCPVYSSAEFHSLVPDGKRLHSGQQHCELCIPAHRDIDECI LFGAEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLLECVDVD ECLDESNCRNGVCENTRGGYRCACPPAEYSPAQAQCLIP ERWSTPQRDVKCAGASEERTACVWGPWAGPALTFDDCC CRQPRLGTQCRPCPPRGTSQCPTSQSESNSFWDTSPLL LGKSPRDEDSSEEDSDECRCVSGRCVPRPGGAVCECPG GFQLDASRARCVDIDECRELNQRGLLCKSERCVNTSGSFR CVCKAGFTRSRPHGPACLSAAADDAIAHTSVIDHRGYFH	
LTBP1S	Cyno	NHTGRIKVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTTISENG HAADTLTATNFRVVLCHLPCMNGGQCSSRDKCQCPNFT GKLCQIPVHGASVPKLYQHSQQPGKALGTHVIHSTHTLPLT VTSQQGVKVKFPPNIVNIHVKHPPPEASVQIHQVSRIDGPTG QKTKEAQPGQSQVSYQGLPVQKTQTIHSTYSHQQVIPHY PVAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSKQEDCCGTGTS WGFNKCQKCPKKPSYHGYNQMMECPLPGYKRVNNTFCQD INECQLQGVCNPGECNLTMGSYRCTCKIGFGPDPTFSSCV PDPPVISEEKGPCYRLVSSGRQCMHPLSVHLTKQLCCCSV GKAWGPHCEKCPLPGTAAFKEICPGMGYTVSGVHRRRPI HHHVGKGPVFKPKNTQPVAKSTHPPPLPAKEEPVEALTF SREHGPVGAPEVATAPPEKEIPSLDQEKTKLEPGQPQLSP GISTIHLHPQFPVIEKTSPPVPVEVAPEASTSSASQVIAPT QVTEINECTVNPDICGAGHCINLPVRYTCICYEGYKFSEQQ RKCVDIDECTQVQHLCSSQGRCENTEGSFLCICPAGFMASE EGTNCIDVDECLRPDVCGEHCVNTVGAFRCEYCDSGYR MTQRGRCEDIDECLNPSTCPDEQCVNSPGSYQCVPCTEG FRGWNGQCLDVDECLPNVCTNGDCSNLEGSYMCCHK GYTRTPDHKHCKDIDECQQGNLCVNGQCKNTEGSFRCTC GQGYQLSAAKDQCEDIDECQHHLCAHGQCRNTEGSFQC VCDQGYRASGLGDHCEINECLEDKSVCQRGDCINTAGSY DCTCPDGFQLDDNKTCQDINECEHPGLCGPQGECLNTEG SFHCVCQQGFSISADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCDNT AGSFRCLCYQGFAQPDGQGCVDVNECELLSGVCGEAFC ENVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCRSRTSTDLDVEQPK EEKKECYYNLNDASLCDNVLAPNVTQCECCCTSGAGWGD	46

10

20

30

40

50

		NCEIFPCPVLGTAEFTMCPKGKGFVPAGESSEAGGENY KDADECLLFGQEICKNGFCLNTRPGYECYCKQGTYYDPVK LQCFDMDECQDPSSCIDGQCVNTEGSYNCFCTHPMVLDA SEKRCIRPAESNEQIEETDVYQDLCWEHLSDEYVCSRPLV GKQTTYTECCCLYGEAWGMQCALCPMKDSDDYAQLCNIP VTGRRQPYGRDALVDFSEQYAPEADPYFIQDRFLNSFEEL QAECEGILNGCENGRCVRVQEGYTCDCFDGYHLD TAKMT CVDVNECDELNNRMSLCKNAKCINTEGSYKCLCLPGYVPS DKPNYCTPLNTALNLEKDSLE	
LTBP1S	マウス	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGNCQNSCQKGN TTTLISENG HAADTLTATNFRVVICH LPCMNGGQCSSRD KCQCPPNFTG KLCQIPVLGASMPKLYQHAQQQGKALGSHVIHSTHTLPLTM TSQQGVKVKFPPNIVNIHV KHPPEASVQIHQVSRIDSPGGQ KVKEAQPQGSQVSYQGLPVQKTQTVHSTYSHQQLIPHVYP VAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSKQEDCCGTVGTS WGFNKCQKCPKKQSYHGYTQMMECLQGYKRVNNTFCQD INECQLQGVCPNGECLNTMG SYRCCKMGFGPDPTFSSC VPDPPVISEEKGPCYRLVSPGRHCMHPLSVHLTKQICCCSV GKAWGPHCEKCP LPGA AFKEICPGMGYTVSGVHRRRPI HQHIGKEAVYVKPNTQPVAKSTHPPPLPAKEEPVEALTSS WEHGPRGAEP EVVTAPPEKEIPSLDQEKTRLEPGQPQLSP GVSTIHLHPQFPVVVEKTSPPVPVEVAPEASTSSASQVIAP TQVTEINECTVNP DICGAGHCINLPVRYTCICYEGYKFSEQL RKCVDIDECAQVRHLCSQGRCENTEGSFLCVC PAGFMAS EEGTNCIDVDECLRPDMCRDGR CINTAGAFRCEYCDSGYR MSRRGYCEDIDECLKPSTCPEEQCVNTPGSYQCV PCTEG FRGWNGQCLDVDECLQPKVCTNGSCTNLEGSYMC SCHR GYSPTPDHRHCQDIDECQQGNLCMNGQCRNTDGSFRCT CGQGYQLSAAKDQCEDIDECEHHHLCSHGQCRNTEGSFQ CVCNQGYRASVLGDHCE DINECLEDSSVCQGGDCINTAGS YDCTCPDGFQLNDNKG CQDINECAQPGLCGSHGECLNTQ GSFHCVC EQGFSISADGR TCEDIDECVNNTVCDSHGFCDN TAGSFRCLCYQG FQAPQDGQGCVDVNECELLSGVCGEAF CENVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCRSRVTEDSGVDR QPREEKKECYYNLDASLCDNV LAPNVTKECCCTSGAG WGDNCEIFPCPVQGTAEFTMCPRGKGLVPAGESSYDTG	47

10

20

30

40

50

		GENYKDADECLLFGEIECKNGYCLNTQPGYECYCKQGTY DPVKLQCFDMDDECQDPNSCIDGQCVNTEGSCYNCFCTHPM VLDASEKRCVQPTESNEQIEETDVYQDLCWEHLSEEYVCS RPLVGKQTTYTECCCLYGEAWGMQCALCPMKDSDDYAQL CNIPVTGRRRPYGRDALVDFSEQYGPETDPYFIQDRFLNSF EELQAECEGILNGCENGRCVRVQEGYTCDCFDGYHLDMA KMTCDVDVNECSELNNRMSLCKNAKCINTEGSYKCLCLPGY IPSDKPNYCTPLNSALNDKESDLE	
GARP	マウス	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQALYLS GNQLQSILVSPLGFYTALRHLDLSDNQISFLQAGVFQALPYL EHLNLAHNRLATGMALNSGGLGRLPLLVSLLDLSGNSLHGN LVERLLGETPRLRTLSLAENSLTRLARHTFWGMPAVEQLDL HSNVLMIEDGAFEALPHLTHLNLNRSLTCLSDFLQQLQ VLDLSCNSIEAFQTAPEPQAQFQLAWLDLRENKLLHFPDLA VFPRLIYNVSNLIQLPAGLPRGSEDLHAPSEGWSASPLS NPSRNASTHPLSLLNLDLSYNEIELVPASFLEHLTSLRFLN LSRNCLRSFEARQVDSLPCVLDDLSHNVLEALELGTKVLG SLQTLQLQDNALQELPPYTFASLASLQRLNLQGNQVSPCG GPAEPGPPGCVDFSGIPTLHVLMAGNSMGMLRAGSFLH TPLTELDLSTNPGLDVATGALVGLASLEVLELQGNGLTVLR VDLPCFLRLKRLNLAENQLSHLPWTRAVSLEVLDLRNNSF SLLPGNAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQ GRVDVDATQDLICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKGGLKNVN LILLSFTLVSAIVLTTLATICFLRRQKLSQQYKA	48
sGARP	マウス	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQALYLS GNQLQSILVSPLGFYTALRHLDLSDNQISFLQAGVFQALPYL EHLNLAHNRLATGMALNSGGLGRLPLLVSLLDLSGNSLHGN LVERLLGETPRLRTLSLAENSLTRLARHTFWGMPAVEQLDL HSNVLMIEDGAFEALPHLTHLNLNRSLTCLSDFLQQLQ VLDLSCNSIEAFQTAPEPQAQFQLAWLDLRENKLLHFPDLA VFPRLIYNVSNLIQLPAGLPRGSEDLHAPSEGWSASPLS NPSRNASTHPLSLLNLDLSYNEIELVPASFLEHLTSLRFLN LSRNCLRSFEARQVDSLPCVLDDLSHNVLEALELGTKVLG SLQTLQLQDNALQELPPYTFASLASLQRLNLQGNQVSPCG GPAEPGPPGCVDFSGIPTLHVLMAGNSMGMLRAGSFLH TPLTELDLSTNPGLDVATGALVGLASLEVLELQGNGLTVLR	49

		VDLPCFLRLKRLNLAENQLSHLPWTRAVSLEVLDLRNNSF SLLPGNAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQ GRVDVDATQDLICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKGGLKNVN	
--	--	---	--

【 0 1 2 4 】

一部の実施態様では、抗原性タンパク質複合体（例えば、LTBP-TGFβ1複合体）は、1つまたは複数のLTBPタンパク質（例えば、LTBP1、LTBP2、LTB

P 3、および L T B P 4) またはそれらのフラグメント (単数または複数) を含んでよい。一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分は、L T B P 1-T G F β 1 複合体に結合することが可能である。一部の実施態様では、L T B P 1 タンパク質は、天然起源タンパク質またはそのフラグメントである。一部の実施態様では、L T B P 1 タンパク質は、非天然起源タンパク質またはそのフラグメントである。一部の実施態様では、L T B P 1 タンパク質は、組み換えタンパク質である。そのような組み換え L T B P 1 タンパク質は、L T B P 1、あるいはそのスプライス変異体および／またはそのフラグメントを含んでよい。組み換え L T B P 1 タンパク質は、1 つまたは複数の検出可能ラベルを含むように改変されてもよい。一部の実施態様では、L T B P 1 タンパク質は、リーダー配列 (例えば、ネイティブまたは非ネイティブのリーダー配列) を含む。一部の実施態様では、L T B P 1 タンパク質は、リーダー配列を含まない (すなわち、リーダー配列は、処理または切断されている)。そのような検出可能ラベルは、限定されないが、ビオチンラベル、ポリヒスチジンタグ、m y c タグ、H A タグおよび／または蛍光タグを含んでよい。一部の実施態様では、L T B P 1 タンパク質は、哺乳類の L T B P 1 タンパク質である。一部の実施態様では、L T B P 1 タンパク質は、ヒト、サル、マウス、またはラット L T B P 1 タンパク質である。一部の実施態様では、L T B P 1 タンパク質は、表 2 の配列番号 4 6 および 4 7 に記載のアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、L T B P 1 タンパク質は、表 3 の配列番号 5 0 に記載のアミノ酸配列を含む。

【0125】

一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分は、L T B P 3-T G F β 1 複合体に結合することが可能である。一部の実施態様では、L T B P 3 タンパク質は、天然起源タンパク質またはそのフラグメントである。一部の実施態様では、L T B P 3 タンパク質は、非天然起源タンパク質またはそのフラグメントである。一部の実施態様では、L T B P 3 タンパク質は、組み換えタンパク質である。そのような組み換え L T B P 3 タンパク質は、L T B P 3、あるいはそのスプライス変異体および／またはそのフラグメントを含んでよい。一部の実施態様では、L T B P 3 タンパク質は、リーダー配列 (例えば、ネイティブまたは非ネイティブのリーダー配列) を含む。一部の実施態様では、L T B P 3 タンパク質は、リーダー配列を含まない (すなわち、リーダー配列は、処理または切断されている)。組み換え L T B P 3 タンパク質は、1 つまたは複数の検出可能ラベルを含むように改変されてもよい。そのような検出可能ラベルは、限定されないが、ビオチンラベル、ポリヒスチジンタグ、m y c タグ、H A タグおよび／または蛍光タグを含んでよい。一部の実施態様では、L T B P 3 タンパク質は、哺乳類の L T B P 3 タンパク質である。一部の実施態様では、L T B P 3 タンパク質は、ヒト、サル、マウス、またはラットの L T B P 3 タンパク質である。一部の実施態様では、L T B P 3 タンパク質は、表 2 の配列番号 4 4 および 4 5 に記載のアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、L T B P 1 タンパク質は、表 3 の配列番号 5 1 に記載のアミノ酸配列を含む。

【0126】

一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分は、G A R P-T G F β 1 複合体に結合することが可能である。一部の実施態様では、G A R P タンパク質は、天然起源タンパク質またはそのフラグメントである。一部の実施態様では、G A R P タンパク質は、非天然起源タンパク質またはそのフラグメントである。一部の実施態様では、G A R P タンパク質は、組み換えタンパク質である。そのような G A R P は、組み換えであってよく、本明細書において、組み換え G A R P と呼ばれる。一部の組み換え G A R P は、野生型 G A R P と比較して、1 つまたは複数の改変、トランケートおよび／または突然変異を含んでよい。組み換え G A R P は、可溶性であるように改変されてよい。一部の実施態様では、G A R P タンパク質は、リーダー配列 (例えば、ネイティブまたは非ネイティブのリーダー配列) を含む。一部の実施態様では、G A R P タンパク質は、リーダー配列を含まない (すなわち、リーダー配列は、処理または切断されている)。他の実施態様では、組み換え G A R P は、1 つまたは複数の検出可能ラベルを含むように改変される。さらなる実施態様では、そのような検出可能ラベルは、限定されないが、ビオチ

ンラベル、ポリヒスチジンタグ、f l a g タグ、m y c タグ、H A タグおよび／または蛍光タグを含んでよい。一部の実施態様では、G A R P タンパク質は、哺乳類の G A R P タンパク質である。一部の実施態様では、G A R P タンパク質は、ヒト、サル、マウス、またはラットの G A R P タンパク質である。一部の実施態様では、G A R P タンパク質は、表 2 の配列番号 4 8 ～ 4 9 に記載のアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、G A R P タンパク質は、表 4 の配列番号 5 2 および 5 3 に記載のアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分は、コンテキスト依存性（例えば、T G F β 1 に対する結合は、T G F β 1 分子が、特異的な提示分子、例えば G A R P と複合体になった場合にのみ生じる）の様式で T G F β 1 に結合しない。その代わりに、抗体、およびその抗原結合部分は、コンテキスト非依存性の様式で T G F β 1 に結合する。換言すれば、抗体、またはその抗原結合部分は、任意の提示分子：G A R P、L T B P 1、L T B P 3、および／または L R C C 3 3 に結合された場合に、T G F β 1 に結合する。

【 0 1 2 7 】

一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分は、L R R C 3 3 - T G F β 1 複合体への結合が可能である。一部の実施態様では、L R R C 3 3 タンパク質は、天然起源タンパク質またはそのフラグメントである。一部の実施態様では、L R R C 3 3 タンパク質は、非天然起源タンパク質またはそのフラグメントである。一部の実施態様では、L R R C 3 3 タンパク質は、組み換えタンパク質である。そのような L R R C 3 3 は、組み換えであってよく、本明細書において組み換え L R R C 3 3 と呼ばれる。一部の組み換え L R R C 3 3 タンパク質は、野生型 L R R C 3 3 と比較して、1 つまたは複数の改変、トランケートおよび／または突然変異を含んでよい。組み換え L R R C 3 3 タンパク質は、可溶性であるように改変されてよい。例えば、一部の実施態様では、L R R C 3 3 の外部ドメインは、可溶性 L R R C 3 3 タンパク質（s L R R C 3 3；例えば、配列番号 8 4 を参照）を発現するために C 末端 H i s タグとともに発現されてよい。一部の実施態様では、L R R C 3 3 タンパク質は、リーダー配列（例えば、ネイティブまたは非ネイティブのリーダー配列）を含む。一部の実施態様では、L R R C 3 3 タンパク質は、リーダー配列を含まない（すなわち、リーダー配列は、処理または切断されている）。他の実施態様では、組み換え L R R C 3 3 タンパク質は、1 つまたは複数の検出可能ラベルを含むように改変される。さらなる実施態様では、そのような検出可能ラベルは、限定されないが、ビオチンラベル、ポリヒスチジンタグ、f l a g タグ、m y c タグ、H A タグおよび／または蛍光タグを含んでよい。一部の実施態様では、L R R C 3 3 タンパク質は、哺乳類の L R R C 3 3 タンパク質である。一部の実施態様では、L R R C 3 3 タンパク質は、ヒト、サル、マウス、またはラットの L R R C 3 3 タンパク質である。一部の実施態様では、L R R C 3 3 タンパク質は、表 4 の配列番号 8 3、8 4、および 1 0 1 に記載のアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

表 3. 例示的な L T B P アミノ酸配列

タンパク質	配列	配列 番号
LTBP1S	NHTGRIKVFTSPICKVTCTKGSCQNSCEKGNNTTLISENGHA	50
	ADTLTATNFRVICHLPCLMNGGQCSSRDKCQCPNFTGKLCQ	
	IPVHGASVPKLYQHSQQPGKALGTHVIHSTHTLPLTVTSQQGV	
	KVKFPPNIVNIHVKHPPEASVQIHQVSRIDGPTGQKTKEAQP	
	QSQVSYQGLPVQKTQTIHSTYSHQQVIPHVYPVAAKTQLGRC	
	FQETIGSQCGKALPGLSKQEDCCGTGTVGTSWGFNKCQKCPK	
	PSYHGYNQMMELPGYKRVNNTFCQDINECQLQGVCPNGEC	
	LNTMGSYRCTCKIGFGPDPTFSSCVDPDPVISEEKGPCYRLVS	
	SGRQCMHPLSVHLTKQLCCCSVGKAWGPHCEKCPPLGTA	
	KEICPGMGYTVSGVHRRRIHHHVGKGPVFKPKNTQPVAK	
	STHPPPLPAKEEPVEALTFSREHGPVGAEPVATAPPEKEIPS	
	LDQEKTKLEPGQPLSPGISTIHLPQFPVIEKTSPPVPVEVA	
	PEASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAGHCINLPVRYTC	
	ICYEGYRFSEQQRKCVDIDECTQVQHLCSQGRCENTEGSFLC	
	ICPAGFMASEEGTNCIDVDECLRPDVCGEHCVNTVGAFRCE	
	YCDSGYRMTQGRCEDIDECLNPSTCPDEQCVNSPGSYQCV	
	PCTEGFRGWNGQCLDVDECLPNVCANGDCSNLEGSYMC	
	CHKGYTRTPDHKHCRDIDECCQGNLCVNGQCKNTEGSFRCT	
	CGQGYQLSAAKDQCEDIDECCQHRHLCAHGQCRNTEGSFQCV	
	CDQGYRASGLGDHCEIDINECLEDKSVCQRGDCINTAGSYDCT	
	CPDGFQLDDNKTCQDINECEHPGLCGPQGECLNTEGSFHC	
	CQQGFSISADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCNTAGSFRCL	
	CYQGFQAPQDGGQCVDVNECELLSGVCGEAFCEVNEGSFLC	
	VCADENQEYSPMTGQCRSRTSTDLDVDVDQPKKEKKECYN	30
	LNDASLCDNVLAPNVTKECCCTSGVGVWGDNCEIFPCPVLT	
	AEFTMCPKKGKGFVPAGESSEAGGENYKDADECLLFGQEIC	
	KNGFCLNTRPGYECYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPSSC	
	IDGQCVNTEGSYNCFCTHPMVLDASEKRCIRPAESNEQIEETD	
	VYQDLCWEHLSDEYVCSRPLVGKQTTYTECCCLYGEAWGMQ	
	CALCPLKDSDDYAQLCNIPVTGRRQPYGRDALVDFSEQTYPE	
	ADPYFIQDRFLNSFEELQAECEGILNGCENGRCVRVQEGYTC	
	DCFDGYHLDATAKMTCDVNECELDNNRMSLCKNAKCINTDGS	
	YKCLCLPGYVPSDKPNYCTPLNTALNLEKDSLE	

10

20

30

40

50

LTBP3	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCRDSC QQGSNMTLIGENGHSTDLTGSGFRVVCPLPCMNGGQCSS RNQCLCPPDFTGRFCQVPAGGAGGGTGGSGPGLSRTGALST GALPPLAPEGDSVASKHAIYAVQVIADPPGPGEPPAQHA AFL VPLGPGQISAEVQAPPPVVNVRVHHPPEASVQVHRIESSNAE SAAPSQHLLPHPKPSHPRPPTQKPLGRFCQDTLPKQPCGSNP LPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKCHKCPQLQYTG VQKPGPVR GEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINECAMPGVCRHGDCLNNPG SYRCVCPPGHS LGPSRTQCIADKPEEKSLCFRLVSPEHQ CQH PLTTRLTRQLCCCSVGKAWGARCQRCPTDGTAAFKEICPAGK GYHILTSHQTLTIQGESDFSLFLHPDGPPKQQLPESPSQAPP PEDTEEERGVT TDS PVSEERSVQQSHPTATTT PARPYELISR PSPPTMRWFLPDLPSSRSVEIAPTQVTETDECRLNQNICGH GECVPGPPDYSCHCNPGYRSH PQHRYCVDVNECEAEPCGP GRGICMNTGGSYNCHCNRGYRLHVGAGGRSCVDLNECAKP HLCGDGGFCINFP GHYKCNCYPGYRLKASRPPVCE DIDECD PSSCPDGKCENKPGSFKCIACQPGYRSQGGGACRDVNECAE GSPCSPGWCENLPGSFRCTCAQGYAPAPDGRSCLDVDECEA GDVCDNGICSNTPGSFQCQCLSGYHLSRDRSHCEDIDECD FP AACIGGDCINTNGSYRCLCPQGHRLVGGRKCDIDECSQDPS LCLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFTPTQDQHGCEEVEQPHHK KECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCCSLGAGWGDHCEIYP CPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDECMLFG SEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLLECVDVDECLDE SNCRNGVCENTRGGYRCACTPPAEYSPAQRQCLSPEEMDVD ECQDPAACRPGRCVNLPGSYRCECRPPWVPGPSGRDCQLP ESPAERAPER RDVCWSQRGEDGMCAGPLAGPALTFDDCCC RQGRGWGAQCRPCPPRGAGSHCPTSQSESNSFWDTSPLLL GKPPRDEDSSEEDSDECRCVSGRCVPRPGGAVCECPGGFQ LDASRARCVDIDECRELNQRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCKA GFARSRPHGACVPQRRR	51
-------	--	----

10

20

30

40

50

表 4－例示的な G A R P および L R R C 3 3 アミノ酸配列

タンパク質	配列	配列 番号
GARP	AQH QDKVPCKMVDKKVSCQVLG LLQVPSVLPPDTETLDLSGNQ LRSILASPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALHLEHLSLAH NRLAMATALSAGGLGPLPRVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPS LHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSNVLM DIEDGA FE GLPRLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQP QAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRIYLNLSNNLIRLPTGPP QDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLS QLLNLDLSYNEIE LIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGS L PCLMLLDLSHN ALETLELGARALGSLRTLLLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLNLQ GNRVSPCGGPDEPGPSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGA FLHTPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVL QVDLPCFICLKRLNLAENRLSHLPAWTQAVSLEVLDRNNSFSLL PGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVD ATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEKGGLKNINLIILTFILVSAIL LTTLAACCCVRRQKFNNQYKA	52
sGARP	AQH QDKVPCKMVDKKVSCQVLG LLQVPSVLPPDTETLDLSGNQ LRSILASPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALHLEHLSLAH NRLAMATALSAGGLGPLPRVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPS LHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSNVLM DIEDGA FE GLPRLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQP QAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRIYLNLSNNLIRLPTGPP QDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLS QLLNLDLSYNEIE LIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGS L PCLMLLDLSHN ALETLELGARALGSLRTLLLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLNLQ GNRVSPCGGPDEPGPSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGA FLHTPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVL QVDLPCFICLKRLNLAENRLSHLPAWTQAVSLEVLDRNNSFSLL PGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVD ATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEKGGLKNIN	53
LRRC33 (NRROS とし ても知られる; Uniprot アクセッションナンバ	MELLPLWLCLGFHFLTVGWRNRSGTATAASQGVCKLVGGAAD CRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYPLESL SLHSCHLERISRGAFQEQGHLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHA	83

10

20

30

40

50

—Q86YC3)	LPGLRRDLDSGNALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDD SVFEGLERLRELDLQRNYIFEIEGGAFFDGLAELRHLNLAFFNNLPCI VDFGLTRLRLVNLVSYNVLEWFLATGGEEAAFELETDLDSHNQLLF FPLLPQYSKLRTLLLRDNNMGFYRDLYNTSSPREMVAQFLLVDG NVTNITTVSLWEEFSSSDLAFLRFLDMSQNFQYLPDGFRLKMP SLSHNLHQNCLMTLHIREHEPPGALTELDLSHNQSELHLAPGL ASCLGSLRLFNLSNQLLGVPPLFANARNITTLDMSHNQISLCP LPAASDRVGPPSCVDFRNMASLRSLSEGCGLGALPDCPFQGT SLTYLDLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMGLHSSFM ALDFSGFGNLRDLDSGNCLTTFPRFGGSLALETDLRRNSLTA LPQKAVSEQLSRGLRTIYLSQNPYDCCGVDGWGALQHGQTVD WAMVTCNLSSKIIRVTELPGGVPRDCKWERLDLGLLYLVILPSC LTLLVACTVIVLTFKKPLLQVIKSRCHWSSVY * ネイティブのシグナルペプチドは、太字で示される。	
可溶性 LRRC33 (sLRRC33)	MDMRVPAQLLGLLLLWFSGLGWRNRSGTATAASQGVCKLVG GAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYP LLESLSLHSCHELRISRGAFQEQGHLRSLVLGDNCLSENYEETA AALHALPGLRRDLDSGNALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTI MRLLDSSVFEGLERLRELDLQRNYIFEIEGGAFFDGLAELRHLNLAFF NNLPCIVDFGLTRLRLVNLVSYNVLEWFLATGGEEAAFELETDLDSH NQLLFFPLLPQYSKLRTLLLRDNNMGFYRDLYNTSSPREMVAQF LLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDLAFLRFLDMSQNFQYLPDGF LRKMPSLSHNLHQNCLMTLHIREHEPPGALTELDLSHNQSEL HLAPGLASCLGSLRLFNLSNQLLGVPPLFANARNITTLDMSH NQISLCP LPAASDRVGPPSCVDFRNMASLRSLSEGCGLGALPD CPFQGTSLTYLDLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMG LHSSFMALDFSGFGNLRDLDSGNCLTTFPRFGGSLALETDLR RNSLTALPQKAVSEQLSRGLRTIYLSQNPYDCCGVDGWGALQH GQTVADWAMVTCNLSSKIIRVTELPGGVPRDCKWERLDLGL<u>HH</u> <u>HHH</u> * 変更されたヒトκ軽鎖シグナルペプチドは、太字で示される。 ** ヒスチジンタグは、下線である。	84
ヒト LRRC33-GARP カメラ	MDMRVPAQLLGLLLLWFSGLGWRNRSGTATAASQGVCKLVG <u>GAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYP</u>	101

10

20

30

40

50

	<u>LL</u>ESLSLHSCHLERISRGAFQEQGHLRSLVLGDNCLSENYEETA <u>AALHALPGLRRLDLSGNALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTI</u> <u>MRLDDSVFEGLERLRELDLQRNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLA</u> <u>NNLPCIVDFGLTRLRLVNVSYNVLEWFLATGGEEAFELETDL</u> <u>SH</u> <u>NQLLFFPLLPQYSKLR</u>TLLLRDNNMGFYRDLYNTSSPREMVAQF <u>LLVDGNVTNITT</u>VSLWEEFSSSDLAFLRFLDMSQNQFQYLPDGF <u>LRKMPSLSHLNLHQNC</u>MTLHIREHEPPGALTELDLSHNQSEL <u>HLAPGLASCLGSLR</u>LFNLSSNQLLGVPPGLFANARNITLDMSh <u>NQISLCPLPAASDRVGPPSCVDFRNMASLRSLSLEGCGLGALPD</u> <u>CPFQGTSLTYLDLSSNWGV</u>LNGLAPLQDVAPMLQVLSLRNMG <u>LHSSFMALDFSGFGNLRDL</u>DLSGNCLTTFPFRGGSLALETDLR <u>RNSLTALPQKAVSEQLSRGLRTIYLSQNPYDCCGV</u>DGWGALQH <u>GQTVADWAMVTCNLSSKIIRVTE</u>LPGGVPRDCKWERLDLGLL/// <u>LTFILVSAILLTTLAACCCVRRQKF</u>NQQYKA * 改変されたヒトα軽鎖シグナルペプチドは、太字で示される。 ** LRRC33外部ドメインは、下線である。 # GARP膜貫通ドメインは、イタリック体である。 ## GARP細胞内テールは、二重下線である。	
--	--	--

10

20

【0128】

[TGF β 1拮抗薬]

本発明の方法を行なうために、任意の適切なTGF β 1の阻害剤が、そのような薬剤が多数の生物学的効果にわたるTGF β 1（例えば、多数の細胞由来からのTGF β 1）をTGF β 1アイソフォームに関して十分な選択性で阻害または拮抗するという条件で、用いられてよい。好ましくは、TGF β 1のそのような阻害剤は、ヒト対象に投与された場合に臨床利益（例えば、治療的有効性および許容できる毒性プロファイル）を提供する用量で、TGF β 2およびTGF β 3に向けた測定可能な阻害活性を有さない。適切な阻害剤は、小分子、核酸に基づく薬剤、生物製剤（例えば、ポリペプチドに基づく薬剤、例えば、抗体および他の検出剤（*finding-agent*））、およびそれらの任意の組み合わせを含む。一部の実施態様では、そのような薬剤は、以下にさらに説明される抗体またはそのフラグメントである。これらは、TGF β 1増殖因子に結合して、それによってその作用を中和する中和抗体を含む。

30

【0129】

[TGF β 1を選択的に阻害する機能性抗体]

40

【0130】

本発明は、一態様では、機能性抗体の使用を包含する。本明細書において用いられる「機能性抗体」は、抗原に結合するその能力のおかげで1つまたは複数の生物学的活性を与える。機能性抗体は、したがって、標的分子（すなわち抗原）の活性／機能を調整することが可能なものを含む。そのような調整抗体は、阻害（*inhibiting*）抗体（または阻害（*inhibitory*）抗体）および活性化抗体を含む。本開示は、TGF β 1の多数のコンテキストと関連するTGF β 1シグナル伝達によって仲介される生物学的プロセスを阻害することのできるTGF β 抗体を含む。本明細書に記載の抗体のような、本発明を行なうために用いられる阻害剤は、TGF β 1選択的であること、および、治療的に効果的な投与量（許容できる毒性レベル内で十分な有効性が達成される投与量）で投

50

与された場合に T G F β 2 および T G F β 3 を標的化または干渉しないことが意図される。

【0131】

従来の T G F β 拮抗薬のアイソフォーム特異性の欠如が、T G F β 阻害と関連する毒性の由来の根底にあり得るという、本開示の出願人による、より初期の認識に基づき（P C T / U S 2 0 1 7 / 0 2 1 9 7 2 を参照）、本発明者らは、アイソフォーム選択的阻害剤の安全性／耐容性態様を維持しながら、多面的な T G F β 1 調節不全を示す様々な疾患を治療するための広域 T G F β 1 阻害をさらに達成することを探求した。

【0132】

広い意味において、用語「阻害抗体」は、標的機能、例えば、増殖因子活性に拮抗または中和する抗体を指す。有利に、本開示の好ましい阻害抗体は、潜在型複合体からの成熟増殖因子の放出を阻害することが可能であり、それにより、増殖因子のシグナル伝達を減少させる。阻害抗体は、そのような抗体と関連した場合に、増殖因子の放出または活性を減少させる任意のエピトープを標的化する抗体を含む。そのようなエピトープは、T G F β タンパク質（例えば T G F β 1）、増殖因子、または、抗体によって結合された場合に増殖因子活性の減少をもたらす他のエピトープのプロドメイン上に存在してよい。本発明の阻害抗体は、限定されないが、T G F β 1 阻害抗体を含む。一部の実施態様では、本開示の阻害抗体は、組み合わせエピトープ、すなわち、抗原または抗原複合体の 2 以上の構成要素／部分によって形成されたエピトープに特異的に結合する。例えば、コンビナトリアルエピトープは、単一のタンパク質の多数の部分、すなわち、同一タンパク質の 1 つよりも多い非隣接セグメント由来のアミノ酸残基からの寄与によって形成され得る。あるいは、コンビナトリアルエピトープは、抗原複合体の多数のタンパク質構成要素からの寄与によって形成され得る。一部の実施態様では、本開示の阻害抗体は、立体構造的エピトープ（または立体構造特異的エピトープ）、例えば、抗原または抗原複合体の三次構造（すなわち、立体構造）に感受性のエピトープに特異的に結合する。

【0133】

T G F β シグナル伝達に拮抗するための伝統的な手法は、i) 受容体結合に利用可能な（例えば、その潜在型前駆体複合体から放出された）フリーのリガンドを使い果たすように、既に活性になった後に成熟増殖因子を直接中和する；ii) フリーのリガンドを隔離することが可能な可溶性受容体フラグメントを利用する（例えば、いわゆるリガンドトラップ）；または、iii) その細胞表面受容体（単数または複数）を標的化して、リガンド-受容体相互作用をブロックすることであった。これらの従来の手法のそれぞれは、拮抗薬が内因性相対物に対して競合するのを必要とする。さらに、上記の最初の 2 つの手法（i および ii）は、活性リガンドを標的化して、それは遷移種である。したがって、そのような拮抗薬は、短い時間的ウインドウの間に内因性受容体を動力学的に打ち負かすことが可能でなければならない。3 番目の手法は、比較すると永続性の効果を提供し得るが、多くの増殖因子（例えば、約 20 まで）が同一の受容体（単数または複数）を介してシグナル伝達するので、不要な阻害効果（それ故に、あり得る毒性）を不注意にもたらす。

【0134】

これらの欠点に対する解決策を提供するために、および、より優れた選択性および局在化された作用をさらに可能にするために、本明細書に記載されるもののような阻害抗体の根底にある作用の好ましいメカニズムは、T G F β 1 活性化およびリガンド-受容体相互作用の上流で作用する。したがって、本発明を行なうのに適切な、T G F β 1 のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤は、その由来における（例えば疾患微小環境内の）活性化ステップをブロックするために、その活性化の前に、不活性の（例えば、潜在型）前駆体 T G F β 1 複合体（例えば、前駆体／潜在型 T G F β 1 を含む複合体）を好ましくは標的化すべきであると考えられる。本発明の好ましい実施態様によれば、そのような阻害剤は、受容体結合のために一時的に利用可能であるフリーのリガンドよりむしろ、E C M 関連および／または細胞表面につながれた前駆体／潜在型 T G F β 1 複合体を標的化する。

【0135】

したがって、本発明の一部の実施態様は、 $TGF\beta 1$ 含有複合体に特異的に結合して、それにより、アイソフォーム選択的な様式で $TGF\beta 1$ の機能を阻害する薬剤を用いる。そのような薬剤は、好ましくは、前駆体／潜在型 $TGF\beta 1$ （例えば、不活性の $TGF\beta 1$ 前駆体）を含むタンパク質複合体内のエピトープに結合する抗体である。一部の実施態様では、エピトープは、 $TGF\beta 1$ が、以下： $GARP-TGF\beta 1$ 複合体、 $LTBP1-TGF\beta 1$ 複合体、 $LTBP3-TGF\beta 1$ 複合体、および $LRRRC33-TGF\beta 1$ 複合体の2以上において存在する場合、抗体による結合のために利用可能である。一部の実施態様では、そのような抗体は、上記に提供される $TGF\beta 1$ 含有複合体の2つ以上に結合し（例えば、「コンテキスト寛容」）、一方で、他の実施態様では、そのような抗体は、上記に提供される $TGF\beta 1$ 含有複合体の4つ全てに結合する（例えば、「コンテキスト非依存性」）。一部の実施態様では、任意のそのような抗体は、示差的な種選択性を示し得る。エピトープは、 $TGF\beta 1$ 複合体のプロドメイン内であってよい。エピトープは、エピトープが複合体の1つまたは複数の構成要素（単数または複数）の2以上の部分／セグメント（例えば、アミノ酸残基）によって形成されるように、組み合わせエピトープであってよい。エピトープは、エピトープが抗原（例えば、 $TGF\beta 1$ 複合体）の特定の三次元構造に感受性であるように、立体構造的エピトープであってよい。立体構造的エピトープに特異的に結合する抗体またはそのフラグメントは、立体構造的抗体または立体構造特異的抗体と呼ばれる。

【0136】

本開示の実施態様は、増殖因子シグナル伝達を改変するために、溶液内、細胞培養内および／または対象内で阻害抗体を用いる方法を含み、患者に臨床利益を与える目的を含む。

【0137】

本発明を行なうのに有用な例示的な抗体および抗体をコードする対応する核酸配列は、表5に示される1つまたは複数のCDRアミノ酸配列を含む。

表5. Kabatナンバリングスキームを用いて決定される重鎖（CDRH）および軽鎖（CDRL）の相補性決定領域を、抗体Ab1、Ab2およびAb3に関して示す。

抗体	Ab1	Ab2	Ab3
CDRH1	SYGMH (配列番号 1)	SDWIG (配列番号 2)	NYAMS (配列番号 85)
CDRH2	VISYDGSNKYYADSVKG (配列番号 3)	VIYPGDSSTRYSASFQG (配列番号 4)	SISGSGGATYYADSVKG (配列番号 86)
CDRH3	DIRPYGDYSAAFDI (配列番号 5)	AAGIAAAGHVTAFDI (配列番号 6)	ARVSSGHWDFDY (配列番号 87)
CDRL1	TGSSGSIASNYVQ (配列番号 7)	KSSQSVLYSSNNKNYLA (配列番号 8)	RASQSISSYLN (配列番号 88)
CDRL2	EDNQRPS (配列番号 9)	WASTRES (配列番号 10)	SSLQS (配列番号 89)
CDRL3	QSYDSSNHGGV (配列番号 11)	QQYYSTPVT (配列番号 12)	QQSYSAPFT (配列番号 90)

【0138】

一部の実施態様では、 $GARP-TGF\beta 1$ 複合体、 $LTBP1-TGF\beta 1$ 複合体、 $LTBP3-TGF\beta 1$ 複合体、および／または $LRRRC33-TGF\beta 1$ 複合体に特異的に結合する本発明の抗体は、表5に示される抗体のいずれか1つに関して提供される、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、またはCDRL3、ま

たはそれらの組み合わせを含む、任意の抗体、またはその抗原結合部分を含む。一部の実施態様では、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体に特異的に結合する抗体は、表5に示される抗体のいずれか1つのCDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む。本発明はまた、表5に示される抗体のいずれか1つに関して提供される、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、またはCDRL3を含む分子をコードする任意の核酸配列も提供する。抗体重鎖および軽鎖CDR3ドメインは、抗原に関する抗体の結合特異性／親和性において特に重要な役割を果たし得る。したがって、本開示のGARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体に特異的に結合する抗体、または、これらの抗体またはその抗原結合部分をコードする核酸分子は、表5に示される抗体の少なくとも重鎖および／または軽鎖CDR3を含んでよい。

10

【0139】

本発明の態様は、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体に特異的に結合する、および、6つの相補性決定領域(CDR)：CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む、モノクローナル抗体、またはその抗原結合部分に関する。

【0140】

一部の実施態様では、CDRH1は、配列番号1、2および85のいずれか1つに記載の配列を含む。一部の実施態様では、CDRH2は、配列番号3、4および86のいずれか1つに記載の配列を含む。一部の実施態様では、CDRH3は、配列番号5、6および87のいずれか1つに記載の配列を含む。CDRL1は、配列番号7、8および88のいずれか1つに記載の配列を含む。一部の実施態様では、CDRL2は、配列番号9、10および89のいずれか1つに記載の配列を含む。一部の実施態様では、CDRL3は、配列番号11、12および90のいずれか1つに記載の配列を含む。

20

【0141】

一部の実施態様では(例えば、表5に示される抗体Ab1について)、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分は：配列番号1に記載のアミノ酸配列を含むCDRH1、配列番号3に記載のアミノ酸配列を含むCDRH2、配列番号5に記載のアミノ酸配列を含むCDRH3、配列番号7に記載のアミノ酸配列を含むCDRL1、配列番号9に記載のアミノ酸配列を含むCDRL2、および、配列番号11に記載のアミノ酸配列を含むCDRL3を含む。

30

【0142】

一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号5のアミノ酸配列を有する相補性決定領域3(CDR3)を含む重鎖可変領域および配列番号11のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号3のアミノ酸配列を有する相補性決定領域2(CDR2)を含む重鎖可変領域および配列番号9のアミノ酸配列を有するCDR2を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号1のアミノ酸配列を有する相補性決定領域1(CDR1)を含む重鎖可変領域および配列番号7のアミノ酸配列を有するCDR1を含む軽鎖可変領域を含む。

40

【0143】

一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号13に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号14に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一性を有するアミノ酸配列を含む

50

軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号 13 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号 14 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0144】

一部の実施態様では、GARP-TGFβ1 複合体、LTBP1-TGFβ1 複合体、LTBP3-TGFβ1 複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1 複合体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分は、配列番号 91 に示される核酸配列と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一性を有する核酸配列によってコードされる重鎖可変ドメインアミノ酸配列、および、配列番号 92 に示される核酸配列と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一性を有する核酸配列によってコードされる軽鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、抗体またはその抗原結合部分は、配列番号 91 に示される核酸配列によってコードされる重鎖可変ドメインアミノ酸配列、および、配列番号 92 に示される核酸配列によってコードされる軽鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む。

【0145】

一部の実施態様では（例えば、表 5 に示される抗体 Ab2 について）、GARP-TGFβ1 複合体、LTBP1-TGFβ1 複合体、LTBP3-TGFβ1 複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1 複合体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分は、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含むCDRH1、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を含むCDRH2、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含むCDRH3、配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を含むCDRL1、配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を含むCDRL2、および、配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を含むCDRL3を含む。

【0146】

一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号 6 のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域および配列番号 12 のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号 4 のアミノ酸配列を有するCDR2を含む重鎖可変領域および配列番号 10 のアミノ酸配列を有するCDR2を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するCDR1を含む重鎖可変領域および配列番号 8 のアミノ酸配列を有するCDR1を含む軽鎖可変領域を含む。

【0147】

一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号 15 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号 16 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号 15 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0148】

一部の実施態様では、GARP-TGFβ1 複合体、LTBP1-TGFβ1 複合体、LTBP3-TGFβ1 複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1 複合体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分は、配列番号 93 に示される核酸配列と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一性を有する核酸配列によってコードされる重鎖可変ドメインアミノ酸配列、および、配列番号 94 に示される核酸配列と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一性を有する核酸配列によってコードされる軽鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、抗体またはその抗原結合部分は、配列番号 93 に示される核酸配列によってコードされる重鎖可変

ドメインアミノ酸配列、および、配列番号 94 に示される核酸配列によってコードされる軽鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む。

【0149】

一部の実施態様では（例えば、表 5 に示される抗体 Ab3 について）、GARP-TGFβ1 複合体、LTBP1-TGFβ1 複合体、LTBP3-TGFβ1 複合体、および／または LRRC33-TGFβ1 複合体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分は、配列番号 85 に記載のアミノ酸配列を含む CDRH1、配列番号 86 に記載のアミノ酸配列を含む CDRH2、配列番号 87 に記載のアミノ酸配列を含む CDRH3、配列番号 88 に記載のアミノ酸配列を含む CDRL1、配列番号 89 に記載のアミノ酸配列を含む CDRL2、および、配列番号 90 に記載のアミノ酸配列を含む CDRL3 を含む。

10

【0150】

一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号 87 のアミノ酸配列を有する CDR3 を含む重鎖可変領域および配列番号 90 のアミノ酸配列を有する CDR3 を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号 86 のアミノ酸配列を有する CDR2 を含む重鎖可変領域および配列番号 89 のアミノ酸配列を有する CDR2 を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号 85 のアミノ酸配列を有する CDR1 を含む重鎖可変領域および配列番号 88 のアミノ酸配列を有する CDR1 を含む軽鎖可変領域を含む。

【0151】

一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号 95 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号 97 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、配列番号 95 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号 97 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

20

【0152】

一部の実施態様では、GARP-TGFβ1 複合体、LTBP1-TGFβ1 複合体、LTBP3-TGFβ1 複合体、および／または LRRC33-TGFβ1 複合体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分は、配列番号 96 に示される核酸配列と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一性を有する核酸配列によってコードされる重鎖可変ドメインアミノ酸配列、および、配列番号 98 に示される核酸配列と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一性を有する核酸配列によってコードされる軽鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、抗体またはその抗原結合部分は、配列番号 96 に示される核酸配列によってコードされる重鎖可変ドメインアミノ酸配列、および、配列番号 98 に示される核酸配列によってコードされる軽鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む。

30

【0153】

一部の例では、GARP-TGFβ1 複合体、LTBP1-TGFβ1 複合体、LTBP3-TGFβ1 複合体、および／または LRRC33-TGFβ1 複合体に特異的に結合する本開示の任意の抗体は、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、および／または CDRL3 と実質的に似ている 1 つまたは複数の CDR（例えば、CDRH または CDRL）配列を有する任意の抗体（その抗原結合部分を含む）を含む。例えば、抗体は、配列番号 1～12 および 85～90 のいずれか 1 つにおける対応する CDR 領域と比較して 5、4、3、2、または 1 個までのアミノ酸残基変動を含む、表 5（配列番号 1～12 および 85～90）に示される 1 つまたは複数の CDR 配列を含んでよい。表 5 に挙げた抗体（例えば、Ab1、Ab2 および Ab3）の重鎖可変領域および軽鎖可変領域に関する完全なアミノ酸配列、ならびに、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可

40

50

変領域をコードする核酸配列は、以下に提供される：

【0154】

Ab1－重鎖可変領域アミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFSSYGMHWVRQ
APGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTL
YLQMNSLR AEDTAVYYCARDIRPYGDYSAAFDIWGQGT LV
TVSS (配列番号13)

【0155】

Ab1－重鎖可変領域核酸配列

GAGGTGCAACTCGTGGAGTCAGGCGGTGGACTTGTTCAG
CCTGGGCGAAGTCTGAGACTCTCATGTGCAGCAAGTGGAT
TCACTTTCTCCAGTTACGGCATGCACTGGGTGAGACAGGC
GCCTGGAAAGGGTTTGGAATGGGTCTGCTGTGATCTCTTAC
GACGGGTCAAACAATAATTACGCGGATTTCAGTGAAAGGGC
GGTTCACATAATTCACGGGATAACTCCAAGAACACCCTGTA
TCTGCAGATGAATAGCCTGAGGGCAGAGGACACCGCTGTG
TACTATTGTGCCCGGGACATAAGGCCTTACGGCGATTACA
GCGCCGCATTTGATATTTGGGGACAAGGCACCCTTGTGAC
AGTATCTTCT (配列番号91)

【0156】

Ab1－軽鎖可変領域アミノ酸配列

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSSGSIASNYVQWYQQR
PGSAPSIVIFEDNQRPSGAPDRFSGSIDSSSNSASLTISG
LKTEDEADYYCQSYDSSNHGGVFGGGTQLTVL (配列番号14)

【0157】

Ab1－軽鎖可変領域核酸配列

AATTTTATGCTTACCCAACCACATAGTG TGAGTGAGTCT
CCCGGCAAGACTGTAAACAATTTTCATGTACCGGCAGCAGTG
GCTCCATCGCTAGCAATTATGTGCAATGGTACCAACAGCG
CCCCGGGAGCGCACCTTCAATAGTGATATTTCGAGGATAAC
CAACGGCCTAGTGGGGCTCCCGATAGATTTAGTGGGAGTA
TAGATAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCTCTCACCATTAGCGG
GCTGAAAACAGAGGATGAAGCCGACTATTACTGCCAAAGC
TATGATTCTAGCAACCACGGCGGAGTGTTTGGCGGAGGAA
CACAGCTGACAGTCCTAGG (配列番号92)

【0158】

Ab1－重鎖アミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFSSYGMHWVRQ
APGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTL
YLQMNSLR AEDTAVYYCARDIRPYGDYSAAFDIWGQGT LV
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPCPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLG (配列番号15)

【0159】

Ab1－軽鎖アミノ酸配列

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQ
RPGSAPSIVIFEDNQRPSGAPDRFSGSIDSSSNSASLTIS
GLKTEDEADYYCQSYDSSNHGGVFGGGTQLTVLGGPKAAP
SVTLFPPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS
PVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC
QVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号16)

【0160】

Ab2－重鎖可変領域アミノ酸配列

EVQLVQSGAEMKKPGESLKISCKGSGYNFASDWIGWVRQ
TPGKGLEWMGV IYPGDS DTRY SASFQGGQVTISADKSINTA
YLQWSSSLKASDTAMY YCASAAGIAAAGHVTAFDIWGQGTM
VTVSS (配列番号17)

【0161】

Ab2－重鎖可変領域核酸配列

GAGGTGCAACTGGTGCAATCCGGAGCCGAGATGAAAAAG
CCAGGGGAGAGCCTGAAGATCTCTTGTAAGGGCTCTGGCT
ATAACTTCGCTAGTGATTGGATCGGATGGGTGAGGCCAAC
CCCCGGAAAGGGCCTCGAGTGGATGGGCGTGATCTACCCC
GGCGACTCCGACACACGCTATAGCGCCTCATTCAGGGCC
AGGTCACCATAAGTGCTGATAAATCAATAAATACAGCCTA
CTTGCAATGGTCAAGTCTGAAAGCCTCAGATACTGCCATG
TACTATTGTGCCTCTGCCGCGCGGCATTGCCGCGGGCCGGTC
ACGTCACCGCCTTCGACATTTGGGGTCAAGGGCACTATGGT
CACTGTAAGCTCC (配列番号93)

【0162】

Ab2－軽鎖可変領域アミノ酸配列

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYL
AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTL
TISSSLQAEDVAVYYCQQYYSTPVTFGQGTKLEIK (配列番号18)

【0163】

Ab2－軽鎖可変領域核酸配列

GACATAGTCATGACCCAGTCACCTGACTCTTTGGCCGTG
TCTCTGGGGGAGAGAGCCACAATAAATTGCAAGTCATCAC
AGAGCGTCCCTGTACTCCTCCAATAAATAAATAATTACCTGGC
CTGGTACCAGCAAAAGCCCCGGGCAACCCCCCAAATTGTTG
ATTTACTGGGCTAGTACAAGGGAATCTGGAGTGCCAGACC
GGTTTTCTGGTTCTGGATCTGGTACTGACTTCACCCCTGAC
AATCAGCTCCCTGCAGGCCGAAGACGTGGCTGTGTACTAT
TGTCAGCAGTACTATAGTACACCAGTTACTTTTCGGCCAAG
GCACTAAACTCGAAATCAAG (配列番号94)

【0164】

Ab2－重鎖アミノ酸配列

EVQLVQSGAEMKKPGESLKISCKGSGYNFASDWIGWVRQT
PGKGLEWMGV IYPGDS DTRY SASFQGGQVTISADKSINTAY
YLQWSSSLKASDTAMY YCASAAGIAAAGHVTAFDIWGQGTMV
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLG

10

20

30

40

50

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLG (配列番号19)

【0165】

Ab2 - 軽鎖アミノ酸配列

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLA
WYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT
ISSQLQAEDVAVYYCQQYYSTPVTFTGQGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVKQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号20)

【0166】

Ab3 - 重鎖可変領域アミノ酸配列

EVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQ
APGKGLEWVSSISGSGGATYYADSVKGRFTISRDN SKNTL
YLQMNSLR AEDTAVYYCARVSSGHWD FDYWGQGT LVT VSS
(配列番号95)

【0167】

Ab3 - 重鎖可変領域核酸配列

GAGGTTTCAGCTTCTGGAGAGCGGCGGTGGTCTTGTAACAAC
CTGGAGGATCACTCAGGTTGT CATGTGCCGCAAGCGGGTT
TACATTTCAGGA ACTATGCAATGAGCTGGGTCAGACAGGCT
CCCGGCAAGGGACTTGAGTGGGTATCTTCCATCAGCGGAT
CTGGAGGAGCAACATATTATGCAGATAGTGTCAAAGGCAG
GTTTCAACAATAAGCCGCGACAATTCTAAAATACTCTTTAT
CTTCAAATGAATAGCCTTAGGGCTGAGGATACGGCGGGTGT
ATTATTGTGCCCCGCGTCTCAAGCGGGCATTGGGACTTCGA
TTATTGGGGGCAGGGTACTCTGGTTACTGTTTCTCTCC (配列
番号96)

【0168】

Ab3 - 軽鎖可変領域アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKP
GKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQSYSA PFTFTGQGTKVEIK (配列番号97)

【0169】

Ab3 - 軽鎖可変領域核酸配列

GACATCCAAATGACACAGAGCCCGTCTTCCCTCTCAGCT
TCAGTCGGTGATCGAGTGACGATTACGTGCCGCGCCAGCC
AAAGCATCTCCTCCTATCTTA ACTGGTATCAGCAGAAACC
CGGAAAGGCCCCCAAAGTTGCTTATTTACGACGCATCCTCC
CTTCAATCTGGTG TGCC CAGCAGGTTCTCAGGCAGCGGTT
CAGGAACGGATTTTACTCTTACCATTTCTAGTCTTCAACC
TGAGGATTTTGCGACGTATTACTGTCAACAGAGCTACAGT
GCGCCGTTTACCTTTGGGCAGGGTACTAAGGTTGAGATAA
AGC (配列番号98)

【0170】

Ab3 - 重鎖アミノ酸配列

10

20

30

40

50

EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F R NYAMSWVRQ
APGKGLEWVSSISGSGGATYYADSVKGRFTISRDN SKNTL
YLQMNSLR AEDTAVYYC ARVSSGHWD F DYWGQGT L V T V S S
ASTKGPSV F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
WNSGAL T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T
YTCNV D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G P S V
F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D
G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K
C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K
N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
L S L S L G (配列番号 99)

【0171】

Ab3-軽鎖アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITC RASQSISSYL NWYQQK
PGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYC QQSYSA PFTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFI F P
PSDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKS FNRGEC (配列番号 100)

【0172】

一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、およびLRRC33-TGFβ1複合体に特異的に結合する本開示の抗体は、配列番号13、17または95の重鎖可変ドメイン、または、配列番号14、18または97の軽鎖可変ドメインを含む任意の抗体を含む。一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、およびLRRC33-TGFβ1複合体に特異的に結合する本開示の抗体は、配列番号13および14；17および18；および95および97の重鎖可変および軽鎖可変ペアを含む任意の抗体を含む。

【0173】

本開示の態様は、以下の複合体：本明細書に記載の任意のものと相同の重鎖可変および／または軽鎖可変アミノ酸配列を有するGARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、およびLRRC33-TGFβ1複合体の2以上に特異的に結合する抗体を提供する。一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、およびLRRC33-TGFβ1複合体に特異的に結合する抗体は、配列番号13、17または95の重鎖可変アミノ酸配列、または配列番号14、18または97の軽鎖可変配列と、少なくとも75%（例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）同一の重鎖可変配列または軽鎖可変配列を含む。一部の実施態様では、相同の重鎖可変および／または軽鎖可変アミノ酸配列は、本明細書において提供される任意のCDR配列内で変化しない。例えば、一部の実施態様では、配列変動の程度（例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）は、本明細書において提供される任意のCDR配列を除いて重鎖可変および／または軽鎖可変アミノ酸配列内で生じ得る。

【0174】

一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、およびLRRC33-TGFβ1複合体の2以上に特異的に結合する本開示の抗体は、配列番号15または19の重鎖または配列番号16または

10

20

30

40

50

20の軽鎖を含む任意の抗体、またはその抗原結合部分を含む。一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複合体に特異的に結合する本開示の抗体は、配列番号15および16；または19および20の重鎖および軽鎖ペアを含む任意の抗体を含む。

【0175】

本開示の態様は、本明細書に記載の任意のものと相同の重鎖および／または軽鎖アミノ酸配列を有するGARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、およびLRRC33-TGFβ1複合体の2以上に特異的に結合する抗体を提供する。一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複合体に特異的に結合する抗体は、配列番号15、または19の重鎖配列、または配列番号16、または20の軽鎖アミノ酸配列と、少なくとも75%（例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）同一の重鎖配列または軽鎖配列を含む。一部の実施態様では、相同の重鎖および／または軽鎖アミノ酸配列は、本明細書において提供される任意のCDR配列内で変化しない。例えば、一部の実施態様では、配列変動の程度（例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）は、本明細書において提供される任意のCDR配列を除いて重鎖および／または軽鎖アミノ酸配列内で生じ得る。

【0176】

一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複合体の2以上に特異的に結合する本開示の抗体は、配列番号15または19の重鎖または配列番号16または20の軽鎖を含む任意の抗体、またはその抗原結合部分を含む。一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複合体に特異的に結合する本開示の抗体は、配列番号15および16；または19および20の重鎖および軽鎖ペアを含む任意の抗体を含む。

【0177】

本開示の態様は、本明細書に記載の任意のものと相同の重鎖および／または軽鎖アミノ酸配列を有するGARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複合体の2以上に特異的に結合する抗体を提供する。一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複合体に特異的に結合する抗体は、配列番号15または19の重鎖配列または配列番号16または20の軽鎖アミノ酸配列と、少なくとも75%（例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）同一の重鎖配列または軽鎖配列を含む。一部の実施態様では、相同の重鎖および／または軽鎖アミノ酸配列は、本明細書において提供される任意のCDR配列内で変化しない。例えば、一部の実施態様では、配列変動の程度（例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）は、本明細書において提供される任意のCDR配列を除いて重鎖および／または軽鎖アミノ酸配列内で生じ得る。

【0178】

一部の実施態様では、2つのアミノ酸配列の「同一性パーセント」は、Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990 (Karlin and Altschul Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993で改変)のアルゴリズムを用いて決定される。そのようなアルゴリズムは、Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990のNBLASTおよびXBLASTプログラム(バージョン2.0)に組み込まれる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラム、score=50、ワード長=3で行なわれ得て、目的のタンパク質分子と相同のアミノ酸配列を得る。2つの配列間にギャップが存在する場合は、Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997に記載のようにGapped BLASTが使用され得る。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合は、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメーターが用いられ得る。
【0179】

10

本明細書に記載の任意の抗体または抗原結合フラグメントにおいて、1つまたは複数の保存的突然変異が、残基が抗体-抗原相互作用に関与する可能性がない位置においてCDRまたはフレームワーク配列内に導入され得る。一部の実施態様では、そのような保存的突然変異(単数または複数)は、結晶構造に基づいて決定されるように、残基が、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、およびLRRC33-TGFβ1複合体との相互作用に関与する可能性がない位置(単数または複数)においてCDRまたはフレームワーク配列内に導入され得る。一部の実施態様では、同様の界面(例えば、抗原-抗体相互作用に関与する残基)は、構造類似性を共有する別の抗原上の公知の構造情報から推定され得る。

20

【0180】

本明細書において用いられる「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸置換がなされるタンパク質の相対的な電荷またはサイズ特性を変更しないアミノ酸置換を指す。変異は、そのような方法を集める参考文献(例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989、または、Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York)に見られるような、当業者に公知のポリペプチド配列を変更するための方法に従って調製され得る。アミノ酸の保存的置換は、以下の群:(a) M、I、L、V;(b) F、Y、W;(c) K、R、H;(d) A、G;(e) S、T;(f) Q、N;および(g) E、D内のアミノ酸の間でなされる置換を含む。

30

【0181】

一部の実施態様では、本明細書において提供される抗体は、望ましい特性を抗体に与える突然変異を含む。例えば、Fabアーム交換(ネイティブIgG4 mAbで生じることが知られる)に起因する潜在的合併症を避けるために、本明細書において提供される抗体は、安定化「Adair」突然変異を含んでよく(Angal et al., 「A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody」, Mol Immunol 30, 105-108; 1993)、ここで、セリン228(EUナンバリング; 残基241 Kabatナンバリング)は、プロリンに転換されて、IgG1様(CPPCP(配列番号54))ヒンジ配列をもたらす。したがって、任意の抗体は、安定化「Adair」突然変異またはアミノ酸配列CPPCP(配列番号54)を含んでよい。

40

【0182】

本開示のTGFβ1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤(コンテキスト非依存性阻害剤を包含する)、例えば、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、およびLRRC33-TGFβ1複合体の2以上に特異的に結合する抗体は、任意選択で、抗体定常領域またはその部分を含ん

50

でもよい。例えば、VLドメインは、そのC末端において、C κ またはC λ のような軽鎖定常ドメインに付着されてよい。同様に、VHドメインまたはその部分は、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、および任意のアイソタイプサブクラスのような重鎖の全てまたは一部に付着してよい。抗体は、適切な定常領域を含んでよい（例えば、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md. (1991)を参照）。したがって、この開示の範囲内の抗体は、任意の適切な定常領域と組み合わせて、VHおよびVLドメイン、またはその抗原結合部分を含んでよい。

【0183】

追加してまたは代替して、そのような抗体は、配列番号13～20の抗体のフレームワーク領域を含んでよく、または含まなくてよい。一部の実施態様では、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体に特異的に結合する抗体は、ミューリン抗体であり、ミューリンフレームワーク領域配列を含む。

【0184】

一部の実施態様では、そのような抗体は、相対的に高い親和性（例えば、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M未満のKDまたはそれよりも低い）で、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体に結合する。例えば、そのような抗体は、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体に、5 pM～500 nM、例えば、50 pM～100 nM、例えば、500 pM～50 nMの親和性で結合してよい。本開示はまた、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体に対する結合に関して本明細書に記載の任意の抗体と競合して、50 nM以下（例えば、20 nM以下、10 nM以下、500 pM以下、50 pM以下、または5 pM以下）の親和性を有する、抗体または抗原結合フラグメントも含む。GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体に特異的に結合する抗体の親和性および結合カインेटクスは、制限されないが、バイオセンサー技術（例えば、OCTETまたはBIACORE）を含む任意の適切な方法を用いて試験され得る。

【0185】

一部の実施態様では、本発明に係る、細胞関連TGF β 1（例えば、GARPによって提示されるTGF β 1およびLRRC33によって提示されるTGF β 1）の阻害剤は、そのような複合体（例えば、GARP-前駆体／潜在型TGF β 1およびLRRC33-前駆体／潜在型TGF β 1）に特異的に結合して、複合体の内在化をトリガーする抗体またはそのフラグメントを含む。この作用モードは、細胞表面から不活性のTGF β 1複合体の除去または枯渇をもたらす（例えば、Treg、マクロファージなど）、それ故に、活性化に利用可能なTGF β 1を減少させる。一部の実施態様では、そのような抗体またはそのフラグメントは、中性または生理学的pHで結合が生じるが、酸性pHで抗体がその抗原から解離するように、pH依存性な様式で標的複合体に結合する。そのような抗体またはそのフラグメントは、再生抗体として機能し得る。

【0186】

[ポリペプチド]

本開示の一部の態様は、配列番号13、配列番号17、配列番号95、配列番号15、および配列番号19からなる群より選択される配列を有するポリペプチドに関する。一部の実施態様では、ポリペプチドは、可変重鎖ドメインまたは重鎖ドメインである。一部の実施態様では、ポリペプチドは、配列番号13、配列番号17、配列番号95、配列番号15、および配列番号19に示されるアミノ酸配列のいずれか1つと少なくとも75%（

10

20

30

40

50

例えば、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％）同一である。

【０１８７】

本開示の一部の態様は、配列番号１４、配列番号１８、配列番号９７、配列番号１６、および配列番号２０からなる群より選択される配列を有するポリペプチドに関する。一部の実施態様では、ポリペプチドは、可変の軽鎖ドメインまたは軽鎖ドメインである。一部の実施態様では、ポリペプチドは、配列番号１４、配列番号１８、配列番号９７、配列番号１６、および配列番号２０に示されるアミノ酸配列のいずれか１つと少なくともとも７５％（例えば、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％）同一である。

【０１８８】

【ＴＧＦβ１のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容な阻害抗体と競合する抗体】

本開示の態様は、本明細書において提供される任意の抗体と競合または交差競合する抗体に関する。抗体に関して本明細書において用いられる用語「競合する」は、第一の抗体が、エピトープ（例えば、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、および／またはＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体のエピトープ）に、そのエピトープと第一の抗体の結合の結果が第二の抗体の不存在における第一の抗体の結合と比較して第二の抗体の存在下で検出可能に低減されるように、第二の抗体の結合と十分に似ている様式で、結合することを意味する。第二の抗体のそのエピトープに対する結合もまた第一の抗体の存在下で検出可能に低減される代替は、必要ではないが、同様であってよい。すなわち、第一の抗体は、第二の抗体のそのエピトープに対する結合を、その第二の抗体が第一の抗体のそのそれぞれのエピトープに対する結合を阻害せずに、阻害し得る。しかしながら、それぞれの抗体が、そのエピトープまたはリガンドと他方の抗体の結合を検出可能に阻害する場合、同一、より大きい、またはより小さい程度であれ、抗体は、それらのそれぞれのエピトープ（単数または複数）の結合に関して互いと「交差競合する」と言われる。競合および交差競合抗体の両方とも、本開示の範囲内である。そのような競合または交差競合が生じるメカニズムにかかわらず（例えば、立体障害、立体構造的変化、または、共通するエピトープまたはその一部への結合）、当業者は、そのような競合および／または交差競合抗体が包含されて、本明細書において提供される方法および／または組成物に有用であり得ることを理解するだろう。

【０１８９】

本開示の態様は、本明細書において提供される任意の特異的抗体、またはその抗原結合部分と競合または交差競合する抗体に関する。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、本明細書において提供される任意の抗体と同一のエピトープにおいて、またはその近くに結合する。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、エピトープの１５個以下のアミノ酸残基内で結合するならば、エピトープの近くに結合する。一部の実施態様では、本明細書において提供される任意の抗体、またはその抗原結合部分は、本明細書において提供される任意の抗体によって結合されるエピトープの１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５アミノ酸残基内で結合する。

【０１９０】

別の実施態様では、 10^{-6} M未満の抗体とタンパク質との間の平衡解離定数（ＫＤ）で、本明細書において提供される任意の抗原（例えば、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、および／またはＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体）に対する結合に関して競合または交差競合する、抗体、またはその抗原結合部分が、本明細書において提供される。他の実施態様では、抗体は、 10^{-11} M～ 10^{-6} Mの範囲内のＫＤで、本明細書において提供される任意の抗原に対する結合に関して競合または交差競合する。一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、また

はその抗原結合部分と結合に関して競合する、抗-TGFβ1抗体、またはその抗原結合部分が、本明細書において提供される。一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分と同一のエピトープに結合する、抗-TGFβ1抗体、またはその抗原結合部分が、本明細書において提供される。

【0191】

本明細書において提供される任意の抗体は、任意の適切な方法を用いて特徴付けられ得る。例えば、1つの方法は、抗原が結合するエピトープ、または「エピトープマッピング」を特定することである。タンパク質上のエピトープの位置をマッピングおよび特徴付けるための多くの適切な方法が存在し、抗体-抗原複合体の結晶構造解析、競合アッセイ、遺伝子フラグメント発現アッセイ、および合成ペプチドに基づくアッセイ（例えば、Chapter 11 of Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1999に記載）を含む。さらなる例では、エピトープマッピングは、抗体が結合する配列を決定するために用いられ得る。エピトープは、線形エピトープであってよく、すなわち、単一の連続のアミノ酸内に含まれてよく、または、単一の連続（一次構造の線形配列）内に必ずしも含まれなくてよい、アミノ酸の三次元相互作用によって形成された立体構造的エピトープであってよい。一部の実施態様では、TGFβ1がGARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複体内である場合、エピトープは、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分による結合にのみ利用可能であるTGFβ1エピトープである。異なる長さ（例えば、少なくとも4〜6アミノ酸長）のペプチドは、単離または合成（例えば、組み換え）されてよく、抗体による結合アッセイに用いられ得る。別の例では、抗体が結合するエピトープは、標的抗原配列に由来する重複するペプチドを用いることによって、そして、抗体による結合を決定することによって、体系的なスクリーニングにおいて決定され得る。遺伝子フラグメント発現アッセイによれば、標的抗原をコードするオープンリーディングフレームは、無作為に、または特異的な遺伝子構築のいずれかによってフラグメント化されて、試験されるべき抗体と抗原の発現されたフラグメントの反応度が決定される。遺伝子フラグメントは、例えば、PCRによって生産されてよく、それから、放射性アミノ酸の存在下で、インビトロでタンパク質に転写および翻訳されてよい。放射能標識された抗原フラグメントに対する抗体の結合は、それから、免疫沈降およびゲル電気泳動によって決定される。特定のエピトープは、ファージ粒子の表面上にディスプレイされたランダムペプチド配列の大きなライブラリー（ファージライブラリー）を用いることによって同定されてもよい。あるいは、重複ペプチドフラグメントの定義されたライブラリーは、単純な結合アッセイにおいて試験抗体に対する結合に関して試験されてよい。さらなる例では、抗原結合ドメインの突然変異誘発、ドメインスワップ実験およびアラニンスキャニング突然変異誘発を行なって、エピトープ結合に必要な、十分な、および／または必須の、残基を同定することができる。例えば、ドメインスワップ実験は、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複合体の様々なフラグメントが、関係が近いが抗原的に区別されるタンパク質、例えばTGFβタンパク質ファミリーの別のメンバー（例えばGDF11）由来の配列と置換（スワップ）されている標的抗原の突然変異体を用いて行なわれ得る。GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複合体の突然変異体に対する抗体の結合を評価することによって、抗体結合に対する特定の抗原フラグメントの重要性が評価され得る。

【0192】

あるいは、競合アッセイは、抗体が他の抗体と同一のエピトープに結合するかどうか決定するために、同一抗原に結合することが知られる他の抗体を用いて行なわれ得る。競合アッセイは、当業者によく知られている。

10

20

30

40

50

【0193】

さらに、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複体内の1つまたは複数の残基と本明細書において提供される任意の抗体の相互作用は、日常的な技術によって決定され得る。例えば、結晶構造が決定され得て、それに従って、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複体内の残基と抗体内の1つまたは複数の残基との間の距離が決定され得る。そのような距離に基づいて、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複体内の特異的な残基が、抗体内の1つまたは複数の残基と相互作用するかどうか、決定され得る。さらに、競合アッセイおよび標的突然変異誘発アッセイのような適切な方法を用いて、候補抗体の選択的結合を決定することができる。

10

【0194】

[抗体の様々な改変および変動]

本開示によって包含される任意の抗体またはその抗原結合フラグメントの非限定的な変動、改変、および特性を以下に簡単に述べる。関連する分析方法の実施態様もまた提供される。

【0195】

天然起源の抗体構造単位は、典型的に四量体を含む。それぞれのそのような四量体は、典型的に、2つの同一ペアのポリペプチド鎖からなり、それぞれのペアは、1つの全長「軽」(特定の実施態様では、約25kDa)および1つの全長「重」鎖(特定の実施態様では、約50～70kDa)を有する。それぞれの鎖のアミノ末端部分は、典型的に抗原認識を担う、約100～110またはそれよりも多くのアミノ酸の可変領域を典型的に含む。それぞれの鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能を担い得る定常領域を典型的に規定する。ヒト抗体軽鎖は、 κ および λ 軽鎖として典型的に分類される。重鎖は、 μ 、 δ 、 γ 、 α 、または ϵ として典型的に分類されて、抗体のアイソタイプを規定する。抗体は、任意のタイプ(例えば、IgM、IgD、IgG、IgA、IgY、およびIgE)およびクラス(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgM₁、IgM₂、IgA₁、およびIgA₂)であってよい。全長の軽鎖および重鎖内で、典型的に、可変および定常領域は、約12またはそれよりも多いアミノ酸の「J」領域によって結合(join)されて、重鎖は約10よりも多いアミノ酸の「D」領域も含む(例えば、Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989)を参照)(その全体で参照により援用される))。それぞれの軽鎖／重鎖ペアの可変領域は、典型的に、抗原結合部位を形成する。

20

30

【0196】

可変領域は、典型的に、相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる3つの超可変領域によって結合(join)された、相対的に保存されたフレームワーク領域(FR)の同一の一般的構造を示す。それぞれのペアの2つの鎖由来のCDRは、典型的に、フレームワーク領域によって並べられて、特異的なエピトープに結合することを可能にし得る。N末端からC末端まで、軽鎖および重鎖可変領域の両方とも、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を典型的に含む。それぞれのドメインに対するアミノ酸の割り当ては、典型的に、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987および1991))、または、Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:878-883の定義に従う。軽鎖のCDRは、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3とも呼ばれ得て、重鎖のCDRは、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3とも呼ばれ得る。一部の実施態様では、抗体は、重鎖(単数または複数)の

40

50

カルボキシ末端からの少数のアミノ酸欠失を含んでよい。一部の実施態様では、抗体は、重鎖のカルボキシ末端内に1～5個のアミノ酸欠失を有する重鎖を含む。特定の実施態様では、CDRの決定的な描写および抗体の結合部位を含む残基の同定は、抗体の構造を解析することによって、および／または、抗体－リガンド複合体の構造を解析することによって、達成される。特定の実施態様では、それは、当業者に公知の任意の様々な技術、例えば、X線結晶解析によって達成され得る。一部の実施態様では、分析の様々な方法を用いて、CDR領域を同定または見積もることができる。そのような方法の例は、限定されないが、Kabat定義、Chothia定義、AbM定義、および接触（contact）定義を含む。

【0197】

「親和性成熟」抗体は、その1つまたは複数のCDR内に1つまたは複数の変更を有する抗体であり、これらの変更（単数または複数）を保有しない親抗体と比較して、抗原に関する抗体の親和性の改善をもたらす。例示的な親和性成熟抗体は、標的抗原に関してナノモルまたは更にピコモルの親和性を有する。親和性成熟抗体は、当技術分野で知られている手順によって生産される。Marks et al. (1992) Bio/Technology 10: 779-783は、VHおよびVLドメインのシャッフルによる親和性成熟を記載する。CDRおよび／またはフレームワーク残基のランダム突然変異誘発は、Barbas, et al. (1994) Proc Nat. Acad. Sci. USA 91: 3809-3813; Schier et al. (1995) Gene 169: 147-155; Yelton et al., (1995) J. Immunol. 155: 1994-2004; Jackson et al. (1995) J. Immunol. 154 (7): 3310-9; および、Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226: 889-896によって記載されて；選択的突然変異誘発位置、活性を高めるアミノ酸残基による接触または超変異位置における選択的突然変異は、米国特許番号6,914,128に記載される。

【0198】

用語「CDRグラフト抗体」は、1つの種由来の重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、VHおよび／またはVLの1つまたは複数のCDR領域の配列が別の種のCDR配列によって置き換えられている抗体、例えば、ミューリンCDRの1つまたは複数（例えば、CDR3）がヒトCDR配列によって置き換えられているミューリン重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体を指す。

【0199】

用語「キメラ抗体」は、1つの種由来の重鎖および軽鎖可変領域配列および別の種由来の定常領域配列を含む抗体、例えば、ヒト定常領域に結合されたミューリン重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体を指す。

【0200】

本明細書において用いられる用語「フレームワーク」または「フレームワーク配列」は、可変領域マイナスCDRの残りの配列を指す。CDR配列の正確な定義は異なるシステムによって決定され得るので、フレームワーク配列の意味は、それに相応して異なる解釈に供せられる。6個のCDR（軽鎖のCDR-L1、-L2、および-L3および重鎖のCDR-H1、-H2、および-H3）もまた、軽鎖および重鎖上のフレームワーク領域を、それぞれの鎖上の4つのサブ領域（FR1、FR2、FR3およびFR4）に分けて、CDR1はFR1およびFR2の間に位置し、CDR2はFR2およびFR3の間に位置し、CDR3はFR3およびFR4の間に位置する。特定のサブ領域をFR1、FR2、FR3またはFR4と特定せずに、フレームワーク領域は、他によって呼ばれるように、単一の、天然起源の免疫グロブリン鎖の可変領域内の組み合わせられたFR'sを表わす。本明細書において用いられるFRは、4つのサブ領域のうちの1つを表わし、FRsは、フレームワーク領域を構成する4つのサブ領域のうちの2以上を表わす。

【0201】

一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、ヒトIgM定常ドメイン、ヒ

トIgG定常ドメイン、ヒトIgG1定常ドメイン、ヒトIgG2定常ドメイン、ヒトIgG2A定常ドメイン、ヒトIgG2B定常ドメイン、ヒトIgG2定常ドメイン、ヒトIgG3定常ドメイン、ヒトIgG3定常ドメイン、ヒトIgG4定常ドメイン、ヒトIgA定常ドメイン、ヒトIgA1定常ドメイン、ヒトIgA2定常ドメイン、ヒトIgD定常ドメイン、またはヒトIgE定常ドメインの重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、ヒトIgG1定常ドメインまたはヒトIgG4定常ドメインの重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、ヒトIgG4定常ドメインの重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。一部の実施態様では、抗体、またはその抗原結合部分は、IgG1様ヒンジを生じさせて鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にするSerからProへの主鎖置換を有するヒトIgG4定常ドメインの重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。

10

【0202】

一部の実施態様では、抗体またはその抗原結合部分は、ヒトIgλ定常ドメインまたはヒトIgκ定常ドメインを含む軽鎖免疫グロブリン定常ドメインをさらに含む。

【0203】

一部の実施態様では、抗体は、2つの重鎖および2つの軽鎖である4つのポリペプチド鎖を有するIgGである。

【0204】

一部の実施態様では、抗体は、ヒト化抗体、ダイアボディ、またはキメラ抗体である。一部の実施態様では、抗体はヒト化抗体である。一部の実施態様では、抗体は、ヒト抗体である。一部の実施態様では、抗体は、ヒト生殖細胞系アミノ酸配列を有するフレームワークを含む。

20

【0205】

一部の実施態様では、抗原結合部分は、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、scFabフラグメント、またはscFvフラグメントである。

【0206】

本明細書において用いられる用語「生殖細胞系抗体遺伝子」または「遺伝子フラグメント」は、特定の免疫グロブリンの発現のための突然変異および遺伝子再配列をもたらす成熟プロセスを受けていない非リンパ系細胞によってコードされる免疫グロブリン配列を指す（例えば、Shapiro et al. (2002) Crit. Rev. Immunol. 22 (3): 183-200; Marchalonis et al. (2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484: 13-30を参照）。本開示の様々な実施態様によって提供される利点の1つは、生殖細胞系抗体遺伝子は、成熟抗体遺伝子よりも、種における個々の本質的なアミノ酸配列構造特性を保存する可能性が高く、それ故に、その種において治療的に用いられる場合、外来源由来として認識される可能性がより低いという認識から生じている。

30

【0207】

本明細書において用いられる用語「中和」は、結合タンパク質が抗原に特異的に結合する場合に、抗原の生物学的活性に対抗することを指す。一実施態様では、中和結合タンパク質は、抗原／標的、例えば、サイトカイン、キナーゼ、増殖因子、細胞表面タンパク質、可溶性タンパク質、ホスファターゼ、または受容体リガンドに結合して、その生物学的活性を、少なくとも約20%、40%、60%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれよりも多く減少させる。

40

【0208】

本明細書において用いられる用語「結合タンパク質」は、抗原（例えば、TGFβ1）に特異的に結合する任意のポリペプチドを含み、制限されないが、抗体、またはその抗原結合部分、DVD-IgTM、TVD-Ig、RAb-Ig、二重特異性抗体およびデュアル特異的抗体を含む。

【0209】

用語「モノクローナル抗体」または「mAb」は、それを含む組成物の文脈において用

50

いられる場合、実質的に同種の抗体の集団から得られた抗体製剤を指してよく、すなわち、集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る、可能性のある天然に生じる突然変異を除き同一である。モノクローナル抗体は、非常に特異的であり、単一抗原に対して向けられる。さらに、異なる決定因子（エピトープ）に対して向けられる異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体製剤と対照的に、それぞれのmAbは、抗原上の単一の決定因子に対して向けられる。修飾語句「モノクローナル」は、任意の特定の方法による抗体の生産を必要とすると解釈されるべきでない。

【0210】

本明細書において用いられる用語「組み換えヒト抗体」は、組み換え手段によって調製、発現、作製または単離される全てのヒト抗体、例えば、宿主細胞内にトランスフェクトされた組み換え発現ベクターを用いて発現される抗体（以下のセクションIICにおいてさらに説明される）、組み換え体から単離された抗体、コンビナトリアルヒト抗体ライブラリー（Hoogenboom, H. R. (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy, H. and Highsmith, W. E. (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; GaviLondo, J. V. and Larrick, J. W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom, H. and Chames, P. (2000) Immunol. Today 21:371-378、参照により本明細書中に援用される）、ヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックである動物（例えば、マウス）から単離される抗体（Taylor, L. D. et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann, S-A. and Green, L. L. (2002) Cur. Opin. in Biotechnol. 13:593-597; Little, M. et al. (2000) Immunol. Today 21:364-370を参照）、または、他のDNA配列へのヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングを含む任意の他の手段によって調製、発現、作製または単離される抗体を含むことが意図される。そのような組み換えヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変および定常領域を有する。しかしながら、特定の実施態様では、そのような組み換えヒト抗体は、インビトロ突然変異誘発（または、ヒトIg配列に関する動物トランスジェニックが用いられる場合は、インビボ体細胞突然変異誘発）に供されて、したがって、組み換え抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系VHおよびVL配列に由来し、それに関するが、インビボでヒト抗体生殖細胞系レパートリー内に天然で存在し得ない配列である。

【0211】

本明細書において用いられる「デュアル可変ドメイン免疫グロブリン」または「DVD-IgTM」などは、ペアの重鎖DVDポリペプチドおよび軽鎖DVDポリペプチドを含む結合タンパク質を含み、それぞれのペアの重鎖および軽鎖は、2つの抗原結合部位を与える。それぞれの結合部位は、抗原結合部位あたり、抗原結合に関与する合計6個のCDRを含む。DVD-IgTMは、CH3ドメインの二量体化によって少なくとも部分的に互いに結合された2つのアームを典型的に有し、DVDのそれぞれのアームは二重特異性であり、4つの結合部位を免疫グロブリンに提供する。DVD-IgTMは、米国特許公開番号2010/0260668および2009/0304693において提供されて、配列リストを含んでそれぞれ参照により本明細書中に援用される。

【0212】

本明細書において用いられる「三重可変ドメイン免疫グロブリン」または「TVD-Ig」などは、ペアの重鎖TVD結合タンパク質ポリペプチドおよび軽鎖TVD結合タンパク質ポリペプチドを含む結合タンパク質であり、それぞれのペアの重鎖および軽鎖は、3つの抗原結合部位を提供する。それぞれの結合部位は、抗原結合部位あたり、抗原結合に関与する合計6個のCDRを含む。TVD結合タンパク質は、CH3ドメインの二量体化によって少なくとも部分的に互いに結合された2つのアームを有してよく、TVD結合タンパク質のそれぞれのアームは三重特異性であり、結合タンパク質に6個の結合部位を提

供する。

【0213】

本明細書において用いられる「受容体－抗体免疫グロブリン」または「R A b－I g」などは、重鎖R A bポリペプチドおよび軽鎖R A bポリペプチドを含む結合タンパク質であり、それらは一緒に、合計して3個の抗原結合部位を形成する。1つの抗原結合部位は、重鎖R A bポリペプチドおよび軽鎖R A bポリペプチドのそれぞれに存在する重および軽の抗体可変ドメインのペアによって形成されて、第一の抗原結合部位を提供する合計6個のC D Rを有する単一の結合部位を形成する。重鎖R A bポリペプチドおよび軽鎖R A bポリペプチドのそれぞれは、リガンドに独立に結合する受容体配列を含み、第二および第三の「抗原」結合部位を提供する。R A b－I gは、C H 3ドメインの二量体化によって少なくとも部分的に互いに結合された2つのアームを典型的に有し、R A b－I gのそれぞれのアームは三重特異性であり、免疫グロブリンに6個の結合部位を提供する。R A b－I g sは、米国特許出願公開番号2002/0127231において記載されて、配列リストを含むその内容全体は、参照により本明細書中に援用される。

【0214】

本明細書において用いられる用語「二重特異性抗体」は、「二重特異性h a l f－I g結合タンパク質」または「二重特異性(h a l f－I g)結合タンパク質」から区別されて、2つの異なるモノクローナル抗体の化学的コンジュゲートによる(S t a e r z, U. D. e t a l. (1985) N a t u r e 314 (6012): 628-631を参照)、または、k n o b－i n t o－h o l eまたは同様の手法による(C H 3－C H 3二量体化を阻害しないF c領域において突然変異を導入する)(H o l l i g e r, P. e t a l. (1993) P r o c. N a t l. A c a d. S c i U S A 90 (14): 6444-6448を参照)、クアドローマ技術によって生産される全長抗体を指し(M i l s t e i n, C. a n d C u e l l o, A. C. (1983) N a t u r e 305 (5934): p. 537-540を参照)、多数の異なる免疫グロブリン種をもたらす、そのうち1つのみが機能性二重特異性抗体である。分子機能によって、二重特異性抗体は、その2つの結合アームのうちの1つ(H C/L Cの1つのペア)上で1つの抗原(またはエピトープ)に結合して、その第二のアーム(H C/L Cの異なるペア)上で異なる抗原(またはエピトープ)に結合する。この定義により、二重特異性抗体は、2つの別個の抗原結合アームを有し(特異性およびC D R配列の両方において)、それが結合するそれぞれの抗原に関して一価である。

【0215】

本明細書において用いられる用語「デュアル特異的抗体」は、二重特異性h a l f－I g結合タンパク質または二重特異性結合タンパク質から区別されて、その2つの結合アーム(H C/L Cのペア)のそれぞれにおいて2つの異なる抗原(またはエピトープ)に結合することのできる全長抗体を指す(P C T公開番号W O 0 2/0 2 7 7 3を参照)。したがって、デュアル特異的結合タンパク質は、2つの同一の抗原結合アームを有し、同一の特異性および同一のC D R配列を有し、それが結合するそれぞれの抗原に関して二価である。

【0216】

本明細書において用いられる用語「K o n」は、例えば当技術分野で知られているように、抗体／抗原複合体を形成するための、抗原に対する結合タンパク質(例えば、抗体)の会合に関するオン速度定数(o n r a t e c o n s t a n t)を指すことが意図される。「K o n」はまた、本明細書において交換可能に用いられるように、用語「会合速度定数」または「k a」によっても知られる。抗体のその標的抗原に対する結合速度または抗体と抗原との間の複合体形成の速度を示すこの値は、等式：抗体(「A b」) + 抗原(「A g」) → A b－A gによっても示される。

【0217】

本明細書において用いられる用語「K o f f」は、例えば当技術分野で知られているように、抗体／抗原複合体からの結合タンパク質(例えば、抗体)の解離に関するオフ速度

10

20

30

40

50

定数 (off rate constant) を指すことが意図される。「Koff」はまた、本明細書において交換可能に用いられるように、用語「解離速度定数」または「kd」によっても知られる。この値は、その標的抗原からの抗体の解離速度または等式： $A b + A g \leftarrow A b - A g$ によって示されるように、フリーの抗体および抗原への経時的な $A b - A g$ 複合体の分離を示す。

【0218】

本明細書において交換可能に用いられる用語「平衡解離定数」または「KD」は、平衡での滴定測定において得られた値、または、解離速度定数 (koff) を会合速度定数 (kon) で割った値を指す。会合速度定数、解離速度定数、および、平衡解離定数は、結合タンパク質の結合親和性を表わすために用いられる (例えば、抗原に対する抗体)。会合および解離速度定数を決定するための方法は、当技術分野でよく知られている。蛍光に基づく技術の使用は、平衡での生理学的バッファーにおいてサンプルを試験する高い感度および能力を提供する。他の実験的手法および機器、例えば BIAcore (登録商標) (生体分子の相互作用分析) アッセイを用いることができる (例えば、BIAcore International AB, GEヘルスケア社, Uppsala, Sweden から入手可能な機器)。加えて、Sapidyne Instruments (Boise, Idaho) から入手可能な KinExA (登録商標) (Kinetic Exclusion Assay) アッセイを用いてもよい。

【0219】

本明細書において用いられる用語「結晶」および「結晶化」は、結晶の形態で存在する結合タンパク質 (例えば、抗体)、またはその抗原結合部分を指す。結晶は、物質の固形状態の1つの形態であり、非晶質の固形状態または液体の結晶状態のような他の形態と異なる。結晶は、原子、イオン、分子 (例えば、抗体のようなタンパク質)、または分子の集合 (例えば、抗原/抗体複合体) の規則的な反復する三次元アレイからなる。これらの三次元アレイは、当該分野において十分に理解されている特異的な数学的關係に従って並べられる。結晶内で反復される基本単位、またはビルディングブロックは、非対称ユニットと呼ばれる。所定の十分に定義された結晶学的対称に従った配列における非対称ユニットの反復は、結晶の「単位セル」を提供する。三次元全体における規則的な並進 (translation) による単位セルの反復は、結晶を提供する。Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ed., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999) を参照。用語「リンカー」は、ペプチド結合によって結合 (join) される2以上のアミノ酸残基を含むポリペプチドを示すために用いられて、1つまたは複数の抗原結合部分を連結 (link) させるために用いられる。そのようなリンカーポリペプチドは、当技術分野でよく知られている (例えば、Holliger, P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J. et al. (1994) Structure 2:1121-1123 を参照)。例示的なリンカーは、限定されないが、ASTKGPSVFPLAP (配列番号55)、ASTKGP (配列番号56); TVAAPS VFIFPP (配列番号57); TVAAP (配列番号58); AKTTTPKLEEGEFSEAR (配列番号59); AKTTTPKLEEGEFSEARV (配列番号60); AKTTTPKLG (配列番号61); SAKTTTPKLG (配列番号62); SAKTTTP (配列番号63); RADAAP (配列番号64); RADAAPTVS (配列番号65); RADAAAAGGPGS (配列番号66); RADAAA (G4S) 4 (配列番号67); SAKTTTPKLEEGEFSEARV (配列番号68); ADAAP (配列番号69); ADAAPT VSI FPP (配列番号70); QPKAAP (配列番号71); QPKAAPSVTLFPP (配列番号72); AKTTTPP (配列番号73); AKTTTPPSVTPLAP (配列番号74); AKTTAP (配列番号75); AKTTAPSVYPLAP (配列番号76); GGGGSGG

10

20

30

40

50

GGSGGGGS (配列番号77) ; GENKVEYAPALMALS (配列番号78) ; GPAKELTPLKEAKVS (配列番号79) ; GHEAAAVMQVQYPAS (配列番号80) ; TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (配列番号81) ; およびASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (配列番号82) を含む。

【0220】

「ラベル」および「検出可能ラベル」または「検出可能部分」は、例えば、特定の結合ペア (例えば抗体および分析物) のメンバー間の反応を検出可能にさせるために、特定の結合パートナー (例えば抗体または分析物) に付着された部分を意味し、そのようにラベルされた特定の結合パートナー (例えば抗体または分析物) は、「検出可能にラベルされる」と呼ばれる。したがって、本明細書において用いられる用語「ラベルされた結合タンパク質」は、結合タンパク質の同定を提供する取り込まれたラベルを有するタンパク質を指す。一実施態様では、ラベルは、視覚または機器手段 (例えば、放射性標識アミノ酸の取り込み、または、マーク付きアビジン (例えば、光学または比色法によって検出することのできる蛍光マーカーまたは酵素活性を含むストレプトアビジン) によって検出することのできるビオチニル部分のポリペプチドへの付着) によって検出可能なシグナルを生じることが可能な検出可能マーカーである。ポリペプチドに関するラベルの例は、限定されないが、以下: 放射性同位体または放射性核種 (例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 、および ^{153}Sm) ; 色素原; 蛍光ラベル (例えば、FITC、ローダミン、およびランタニド蛍光体) ; 酵素ラベル (例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、およびアルカリフォスファターゼ) ; 化学発光マーカー; ビオチニル基; 二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ (例えば、ロイシンジッパーペア配列、二次抗体に関する結合部位、金属結合ドメイン、およびエピトープタグ) ; およびガドリニウムキレートのような磁性剤を含む。免疫測定法に一般的に用いられるラベルの代表的な例は、アクリジニウム化合物のような光を生じる部分、および、フルオレセインのような蛍光を生じる部分を含む。他のラベルは本明細書に記載される。この点について、部分自体は検出可能にラベルされ得ないが、さらに別の部分との反応の際に検出可能になり得る。「検出可能にラベルされた」の使用は、検出可能なラベルの後者タイプを包含することが意図される。

【0221】

一部の実施態様では、抗原 (例えば、タンパク質複合体)、例えばGARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および/またはLRRC33-TGF β 1複合体に対する、抗体またはその抗原結合部分の結合親和性は、Octetアッセイを用いて決定される。一部の実施態様では、Octetアッセイは、抗体と抗原との間の結合を示す1つまたは複数の反応速度パラメーターを決定するアッセイである。一部の実施態様では、Octet (登録商標) システム (ForteBio, Menlo Park, CA) を用いて、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および/またはLRRC33-TGF β 1複合体に対する、抗体、またはその抗原結合部分の結合親和性を決定する。例えば、抗体の結合親和性は、バイオレイヤー干渉法を利用するforteBio Octet QKディップおよびリードラベルフリーアッセイシステムを用いて決定され得る。一部の実施態様では、抗原は、バイオセンサー (例えば、ストレプトアビジンによってコーティングされたバイオセンサー) に固定化されて、抗体および複合体 (例えば、ビオチン化GARP-TGF β 1複合体およびビオチン化LTBP-TGF β 1複合体) は、結合の相互作用を測定するために高濃度 ($50\text{ }\mu\text{g/mL}$) で溶液中に存在する。一部の実施態様では、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および/またはLRRC33-TGF β 1複合体に対する、抗体、またはその抗原結合部分の結合親和性は、表6に概説されるプロトコルを用いて決定される。本明細書において用いられる用語「表面プラズモン共鳴」は、例えば、BIAco

re (登録商標) システム (BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden および Piscataway, NJ) を用いて、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を検出することによって、リアルタイムの二重特異性相互作用の分析を可能にする光学現象を指す。さらなる説明については、Jonsson, U. et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson, U. et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B. et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; および、Johnsson, B. et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277 を参照。

10

【0222】

[TGF β 1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤の同定および生産／製造]

本発明は、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体の2以上に結合する抗体またはそのフラグメントのスクリーニング方法、生産方法および製造プロセス、および、それを含む医薬組成物および関連するキットを包含する。

【0223】

非常に多くの方法は、本開示の抗体、またはその抗原結合フラグメントを得るために用いられ得る。例えば、抗体は、組み換えDNA方法を用いて生産され得る。モノクローナル抗体は、公知の方法に従ってハイブリドーマの発生によって生産されてもよい（例えば、Kohler and Milstein (1975) Nature, 256:495-499を参照）。この様式で形成されたハイブリドーマは、それから、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) および表面プラズモン共鳴（例えば、OCTETまたはBIAcore）分析のような標準的な方法を用いてスクリーニングされて、特定の抗原に特異的に結合する抗体を生産する1つまたは複数のハイブリドーマを同定する。特定の抗原の任意の形態、例えば、組み換え抗原、天然起源の形態、任意の変異体またはそのフラグメント、ならびに、その抗原性ペプチド（例えば、立体構造的エピトープとしての足場内または線形エピトープとして本明細書に記載される任意のエピトープ）は、免疫原として用いられ得る。抗体を作製する1つの例示的な方法は、抗体またはそのフラグメント（例えば、scFv）を発現するスクリーニングタンパク質発現ライブラリー、例えば、ファージまたはリボソームディスプレイライブラリーを含む。ファージディスプレイは、例えば、Ladner et al.、米国特許番号5,223,409; Smith (1985) Science 228:1315-1317; Clackson et al. (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597; WO92/18619; WO91/17271; WO92/20791; WO92/15679; WO93/01288; WO92/01047; WO92/09690; およびWO90/02809に記載される。

20

30

【0224】

ディスプレイライブラリーの使用に加えて、特定の抗原（例えば、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体）を用いて、非ヒト宿主、例えば、ウサギ、モルモット、ラット、マウス、ハムスター、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ラクダ、ならびに、サメのような非哺乳類宿主を免疫化することができる。一実施態様では、非ヒト動物はマウスである。

40

【0225】

別の実施態様では、モノクローナル抗体は非ヒト動物から得られて、それから、適切な組み換えDNA技術を用いて改変される（例えば、キメラ）。キメラ抗体を作製するための様々な手法が説明されている。例えば、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81:6851, 1985; Takeda et

50

al., Nature 314:452, 1985, Cabilly et al., 米国特許番号4,816,567; Boss et al., 米国特許番号4,816,397; Tanaguchi et al., 欧州特許公報EP171496; 欧州特許公報0173494、英国特許GB2177096Bを参照。

【0226】

さらなる抗体生産技術については、Antibodies: A Laboratory Manual, eds. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照。本開示は、抗体の任意の特定の由来、生産方法、または他の特別な特徴に必ずしも制限されない。

【0227】

本開示の一部の態様は、ポリヌクレオチドまたはベクターによって形質転換された宿主細胞に関する。宿主細胞は、原核生物または真核生物細胞であってよい。宿主細胞内に存在するポリヌクレオチドまたはベクターは、宿主細胞のゲノム中に組み込まれてよく、または、染色体外に維持されてよい。宿主細胞は、任意の原核生物または真核生物細胞、例えば、細菌、昆虫、真菌、植物、動物またはヒト細胞であってよい。一部の実施態様では、真菌細胞は、例えば、Saccharomyces属のもの、特にS. cerevisiae種のものである。用語「原核生物」は、抗体または対応する免疫グロブリン鎖の発現のためにDNAまたはRNA分子によって形質転換またはトランスフェクトされ得る全ての細菌を含む。原核生物宿主は、グラム陰性ならびにグラム陽性細菌、例えば、E. coli、S. typhimurium、Serratia marcescensおよびBacillus subtilisを含んでよい。用語「真核生物」は、酵母、高等植物、昆虫および脊椎動物細胞、例えば、NSOおよびCHO細胞のような哺乳類細胞を含む。組み換え生産手順に用いられる宿主に応じて、ポリヌクレオチドによってコードされる抗体または免疫グロブリン鎖は、グリコシル化であってよく、または、非グリコシル化であってよい。抗体または対応する免疫グロブリン鎖は、最初のメチオニンアミノ酸残基を含んでもよい。

【0228】

一部の実施態様では、ベクターが適切な宿主内に組み込まれた時点で、宿主は、ヌクレオチド配列の高レベルの発現に適切な条件下で維持されてよく、望みどおりに、免疫グロブリン軽鎖、重鎖、軽／重鎖ダイマーまたは無傷の抗体、抗原結合フラグメントまたは他の免疫グロブリン形態の収集および精製が続いてよい; Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N. Y., (1979)を参照。したがって、ポリヌクレオチドまたはベクターは、細胞内に導入されて、次々に、抗体または抗原結合フラグメントを生産する。さらに、トランスジェニック動物、好ましくは前述の宿主細胞を含む哺乳類は、抗体または抗体フラグメントの大スケールの生産のために用いられてよい。

【0229】

形質転換された宿主細胞は、発酵槽内で増殖され得て、任意の適切な技術を用いて培養され得て、最適な細胞増殖を達成する。発現された時点で、抗体全体、それらのダイマー、個々の軽鎖および重鎖、他の免疫グロブリン形態、または抗原結合フラグメントは、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む当該分野の標準的な手順に従って精製されてよい; Scopes, 「Protein Purification», Springer Verlag, N. Y. (1982)を参照。抗体または抗原結合フラグメントは、それから、増殖培地、細胞溶解物、または細胞膜画分から単離されてよい。例えば、微生物によって発現された抗体または抗原結合フラグメントの単離および精製は、例えば抗体の定常領域に対して方向付けられたモノクローナルまたはポリクローナル抗体の使用を伴うもののような免疫学的分離および予備クロマトグラフィー分離のような任意の従来の手段によるものであってよい。

【0230】

本開示の態様は、モノクローナル抗体の無期限に延長された由来を提供するハイブリド

10

20

30

40

50

ーマに関する。ハイブリドーマの培養物から直接的に免疫グロブリンを得る代わりとして、不死化ハイブリドーマ細胞が、その後の発現および／または遺伝子操作のための再配列された重鎖および軽鎖座の由来として用いられ得る。再配列された抗体遺伝子を適切なmRNAから逆転写して、cDNAが生産され得る。一部の実施態様では、重鎖定常領域は、異なるアイソタイプのものに交換または完全に除去されてよい。可変領域は、単鎖Fv領域をコードするように結合されてよい。多数のFv領域は、1よりも多い標的に対する結合能力を与えるように結合され得て、またはキメラ重鎖と軽鎖の組み合わせが用いられ得る。任意の適切な方法が、抗体可変領域のクローニングおよび組み換え抗体の産生に用いられ得る。

【0231】

一部の実施態様では、重鎖および／または軽鎖の可変領域をコードする適切な核酸が得られて、標準的な組み換え宿主細胞内にトランスフェクトされ得る発現ベクター内に挿入される。様々なそのような宿主細胞が用いられ得る。一部の実施態様では、哺乳類宿主細胞は、効率的なプロセッシングおよび生産のために有利であり得る。この目的に有用である典型的な哺乳類細胞株は、CHO細胞、293細胞、またはNSO細胞を含む。抗体または抗原結合フラグメントの生産は、宿主細胞の増殖およびコード配列の発現に適切な培養条件下で、改変された組み換え宿主を培養することによって行われ得る。抗体または抗原結合フラグメントは、培養物からそれらを単離することによって回収され得る。発現系は、生じる抗体が培地中に分泌されるようにシグナルペプチドを含むように設計され得るが；細胞内生産も可能である。

【0232】

本開示はまた、本明細書に記載の抗体の免疫グロブリン鎖の少なくとも可変領域をコードするポリヌクレオチドを含む。一部の実施態様では、ポリヌクレオチドによってコードされる可変領域は、上述のハイブリドーマの任意の1つによって生産される抗体の可変領域のVHおよび／またはVLの少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含む。

【0233】

抗体または抗原結合フラグメントをコードするポリヌクレオチドは、例えば、DNA、cDNA、RNAまたは合成的に生産されたDNAまたはRNAまたは組み換えによって生産されたキメラ核酸分子(任意のこれらのポリヌクレオチドを単独または組み合わせのいずれかで含む)であってよい。一部の実施態様では、ポリヌクレオチドは、ベクターの一部である。そのようなベクターは、適切な宿主細胞内および適切な条件下でベクターの選択を可能にするマーカー遺伝子のようなさらなる遺伝子を含んでよい。

【0234】

一部の実施態様では、ポリヌクレオチドは、原核生物または真核生物細胞における発現を可能にする発現制御配列に作動可能に結合している。ポリヌクレオチドの発現は、翻訳可能なmRNAへのポリヌクレオチドの転写を含む。真核生物細胞、好ましくは哺乳類細胞における発現を確実にする調節エレメントは、当業者によく知られている。それらは、転写開始を促進する調節配列および任意選択で転写終結および転写安定化を促進するポリ-Aシグナルを含んでよい。さらなる調節エレメントは、転写ならびに翻訳エンハンサー、および／または、天然に関係があるまたは異種のプロモーター領域を含んでよい。原核生物宿主細胞における発現を可能にする、あり得る調節エレメントは、例えば、E. coliにおけるPL、Lac、TrpまたはTacプロモーターを含み、真核生物宿主細胞における発現を可能にする調節エレメントの例は、酵母におけるAOX1またはGAL1プロモーター、または、哺乳類および他の動物細胞におけるCMVプロモーター、SV40プロモーター、RSVプロモーター(ラウス肉腫ウイルス)、CMVエンハンサー、SV40エンハンサーまたはグロビンイントロンである。

【0235】

転写開始を担うエレメントの他に、そのような調節エレメントはまた、ポリヌクレオチドの下流に、SV40-ポリ-A部位またはtk-ポリ-A部位のような転写終結シグナルを含んでもよい。さらに、用いられる発現系に応じて、ポリペプチドを細胞区画へ向け

10

20

30

40

50

ること、または、培地中へにそれを分泌することが可能なリーダー配列が、ポリヌクレオチドのコード配列に追加されてよく、以前に説明されている。リーダー配列（単数または複数）は、翻訳、開始および終結配列と共に適切なフェーズにおいて集められて、および好ましくは、リーダー配列は、翻訳されたタンパク質、またはその一部を、例えば細胞外培地へ分泌するように指示することが可能である。任意選択で、所望の特性、例えば、発現された組み換え産物の単純化された精製または安定化を与えるCまたはN末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードする異種ポリヌクレオチド配列が用いられ得る。

【0236】

一部の実施態様では、軽鎖および／または重鎖の少なくとも可変ドメインをコードするポリヌクレオチドは、免疫グロブリン鎖の両方または片方のみの可変ドメインをコードしてよい。同様に、ポリヌクレオチドは、同一プロモーターの制御下であってよく、発現に関して別々に制御されてよい。さらに、一部の態様は、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン鎖の可変ドメインをコードするポリヌクレオチドを含む、遺伝子操作において慣習的に用いられるベクター、特にプラスミド、コスミド、ウイルスおよびバクテリオファージに関し；任意選択で抗体の他方の免疫グロブリン鎖の可変ドメインをコードするポリヌクレオチドと組み合わせる。

【0237】

一部の実施態様では、発現制御配列は、真核生物宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトすることが可能なベクター内に真核生物プロモーター系として提供されるが、原核生物宿主に関する制御配列が用いられてもよい。レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、またはウシ乳頭腫ウイルスのようなウイルス由来の発現ベクターは、標的化された細胞集団へのポリヌクレオチドまたはベクターの送達のために用いられ得る（例えば、抗体または抗原結合フラグメントを発現するように細胞を改変するため）。様々な適切な方法を用いて、組み換えウイルスベクターを構築することができる。一部の実施態様では、ポリヌクレオチドおよびベクターは、標的細胞への送達のためにリポソーム内に再構成され得る。ポリヌクレオチド（例えば、免疫グロブリン鎖をコードする配列および発現制御配列の重および／または軽可変ドメイン（単数または複数））を含むベクターは、細胞の宿主のタイプに応じて異なる適切な方法によって宿主細胞内に移行され得る。

【0238】

スクリーニング方法は、抗体またはそのフラグメントの所望の活性を評価または確認するステップを含んでよい。一部の実施態様では、ステップは、標的機能を阻害する能力、例えば、潜在型複合体からの成熟TGFβ1の放出の阻害に関して選択するステップを含む。一部の実施態様では、ステップは、内部移行およびその後の細胞表面からの抗体-抗原複合体の除去を促進する抗体またはそのフラグメントに関して選択するステップを含む。一部の実施態様では、ステップは、ADCCを誘導する抗体またはそのフラグメントに関して選択するステップを含む。一部の実施態様では、ステップは、インビボの所望の部位（例えば、細胞型、組織または臓器）（単数または複数）へ蓄積する抗体またはそのフラグメントに関して選択するステップを含む。一部の実施態様では、ステップは、血液脳関門を閉じる能力を有する抗体またはそのフラグメントに関して選択するステップを含む。当該方法は、安定性、結合親和性、機能性（例えば、阻害活性、Fc機能など）、免疫原性、pH感受性および発展性（例えば、高い溶解度、低い自己関連性など）のような、基準によって判定される望ましいプロファイルを保有する変異相対物を提供するように、1つまたは複数の抗体またはそのフラグメントを最適化するステップを任意選択で含んでもよい。そのようなステップは、抗体またはそのフラグメントの親和性成熟を含んでよい。生じる最適化抗体は、好ましくはヒト投与に適切な完全なヒト抗体またはヒト化抗体である。そのような抗体またはそのフラグメントを含む医薬組成物のための製造プロセスは、精製、製剤化、滅菌濾過、パッケージングなどのステップを含んでよい。例えば滅菌濾過のような特定のステップは、FDAのような関連のある規制機関によって示されるガイドラインに従って行なわれる。そのような組成物は、プリフィルドシリンジのような単使

10

20

30

40

50

用コンテナ、またはバイアルのような多用量コンテナの形態で利用可能にされ得る。

【0239】

〔改変〕

本開示の抗体、またはその抗原結合部分は、制限されないが、酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射活性材料、陽電子放出金属、非放射活性常磁性金属イオン、および、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複合体の検出および単離のための親和性ラベルを含む検出可能ラベルまたは検出可能部分によって改変され得る。検出可能物質または部分は、本開示のポリペプチドに直接的に、または、適切な技術を用いて中間体（例えばリンカーなど（例えば、切断可能なリンカー））を通して間接的に、連結またはコンジュゲートされてよい。適切な酵素の非限定的な例は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、L-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを含み；適切な補欠分子族複合体の非限定的な例は、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンを含み；適切な蛍光の非限定的な例は、ビオチン、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、またはフィコエリトリンを含み；発光材料の例は、ルミノールを含み；生物発光材料の非限定的な例は、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンを含み；適切な放射活性材料の例は、放射活性金属イオン、例えば、α-エミッターまたは他の放射性同位体、例えば、ヨウ素（¹³¹I、¹²⁵I、¹²³I、¹²¹I）、炭素（¹⁴C）、硫黄（³⁵S）、トリチウム（³H）、インジウム（^{115m}In、^{113m}In、¹¹²In、¹¹¹In）、およびテクネチウム（⁹⁹Tc、^{99m}Tc）、タリウム（²⁰¹Tl）、ガリウム（⁶⁸Ga、⁶⁷Ga）、パラジウム（¹⁰³Pd）、モリブデン（⁹⁹Mo）、キセノン（¹³³Xe）、フッ素（¹⁸F）、¹⁵³Sm、Lu、¹⁵⁹Gd、¹⁴⁹Pm、¹⁴⁰La、¹⁷⁵Yb、¹⁶⁶Ho、⁹⁰Y、⁴⁷Sc、⁸⁶Rb、¹⁸⁸Re、¹⁴²Pr、¹⁰⁵Rh、⁹⁷Ru、⁶⁸Ge、⁵⁷Co、⁶⁵Zn、⁸⁵Sr、³²P、¹⁵³Gd、¹⁶⁹Yb、⁵¹Cr、⁵⁴Mn、⁷⁵Se、およびスズ（¹¹³Sn、¹¹⁷Sn）を含む。検出可能な物質は、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複合体に特異的に結合する本開示の抗体に直接的に、または、適切な技術を用いて中間体（例えばリンカーなど）を通して間接的に、連結またはコンジュゲートされてよい。検出可能な物質にコンジュゲートされる本明細書において提供される任意の抗体は、本明細書に記載されるもののような任意の適切な診断アッセイに用いられ得る。

【0240】

加えて、本開示の抗体、またはその抗原結合部分は、薬物によって改変されてもよい。薬物は、本開示のポリペプチドに直接的に、または、適切な技術を用いて中間体（例えばリンカーなど（例えば切断可能なリンカー））を通して間接的に、連結またはコンジュゲートされてよい。

【0241】

〔標的化剤〕

一部の実施態様では、本開示の方法は、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複合体からの成熟TGFβ放出を調整する目的のために、対象内の特定の部位へ、本明細書において開示される抗体、またはその抗原結合部分を標的化するための1つまたは複数の標的化剤の使用を含む。例えば、LTBP1-TGFβ1およびLTBP3-TGFβ1複合体は、典型的に細胞外マトリックスに局在化される。したがって、一部の実施態様では、本明細書において開示される抗体は、LTBP1-TGFβ1およびLTBP3-TGFβ1複合体が存在する部位へ抗体を局在化させる目的のために、細胞外マトリックス標的化剤にコンジュゲートされ得る。そのような実施態様では、抗体の選択的標的化は、LTBP1-TGFβ1および／またはLTBP3-TGFβ1複合体の選択的調

10

20

30

40

50

整を導く。一部の実施態様では、抗体の選択的標的化は、LTBP1-TGFβ1および／またはLTBP3-TGFβ1複合体の選択的阻害を導く（例えば、線維症を治療する目的のため）。一部の実施態様では、細胞外マトリックス標的化剤は、ヘパリン結合剤、マトリックスメタロプロテイナーゼ結合剤、リジルオキシダーゼ結合ドメイン、フィブリリン結合剤、ヒアルロン酸結合剤、およびその他を含む。

【0242】

同様に、GARP-TGFβ1複合体は、典型的に、活性化されたFOXP3+制御性T細胞（Treg）のような細胞の表面に局在化される。したがって、一部の実施態様では、本明細書において開示される抗体は、GARP-TGFβ1複合体が存在する部位へ抗体を局在化させる目的のために、免疫細胞（例えば、Treg細胞）結合剤にコンジュゲートされ得る。そのような実施態様では、抗体の選択的標的化は、GARP-TGFβ1複合体の選択的調整を導く。一部の実施態様では、抗体の選択的標的化は、GARP-TGFβ1複合体の選択的阻害（例えば癌治療における免疫調整の目的のための成熟TGFβ1の放出の選択的阻害など）を導く。そのような実施態様では、Treg細胞標的化剤は、例えば、CCL22およびCXCL12タンパク質またはそのフラグメントを含んでよい。

【0243】

一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体およびLTBP-TGFβ1複合体に選択的に結合する第一の部分、および、標的部位の構成要素、例えば、ECMの構成要素（例えば、フィブリリン）またはTreg細胞の構成要素（例えば、CTLA-4）に選択的に結合する第二の部分を含む、二重特異性抗体が用いられてよい。

【0244】

〔医薬組成物〕

本発明はさらに、ヒトおよび非ヒト対象における投与に適切な薬品として用いられる医薬組成物を提供する。GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複合体に特異的に結合する1つまたは複数の抗体は、例えばバッファーを含む薬学的に許容できる担体（賦形剤）によって製剤化または混合され得て医薬組成物を形成する。そのような製剤は、TGFβシグナル伝達に関与する疾患または障害の治療のために用いられ得る。一部の実施態様では、TGFβシグナリングと関連するそのような疾患または障害は、1つまたは複数のコンテキストを含み、すなわち、TGFβは、特定のタイプ（単数または複数）の提示分子と関連する。一部の実施態様では、そのようなコンテキストは、細胞型特異的および／または組織特異的な様式で生じる。一部の実施態様では、例えば、TGFβシグナル伝達のそのようなコンテキスト依存性作用は、GARP、LRRC33、LTBP1および／またはLTBP3を介して部分的に仲介される。

【0245】

一部の実施態様では、本発明の抗体は、GARP、LRRC33、LTBP1およびLTBP3の2以上から選択される提示分子との複合体で抗体がTGFβに結合するように、TGFβの2以上のコンテキストに特異的に結合する。したがって、そのような医薬組成物は、TGFβ関連の徴候（例えば、線維症、免疫疾患、および／または癌）を緩和するために患者へ投与され得る。「許容できる」は、担体が組成物の活性成分と適合し（および好ましくは、活性成分を安定化することが可能である）、治療される対象にとって有害でないことを意味する。バッファーを含む薬学的に許容できる賦形剤（担体）の例は、当業者に明らかであり、以前に説明されている。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hooverを参照。一例では、本明細書に記載の医薬組成物は、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複合体に特異的に結合する1つよりも多い抗体を含み、抗体は、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-

10

20

30

40

50

TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体の異なるエピトープ／残基を認識する。

【0246】

この方法で用いられる医薬組成物は、薬学的に許容できる担体、賦形剤、または安定剤（凍結乾燥された製剤または水溶液の形態）を含んでよい（Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover）。許容できる担体、賦形剤、または安定剤は、用いられる用量および濃度でレシipientに対して非毒性であり、リン酸、クエン酸、および他の有機酸のようなバッファー；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化；防腐剤（例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジンのようなアミノ酸；単糖類、二糖類、および、グルコース、マンノース、またはデキストランを含む他の炭水化物；EDTAのようなキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールのような糖類；ナトリウムのような塩形成対イオン；金属錯体（例えばZn-タンパク質錯体）；および／または、TWEEN（商標）、PLURONICS（商標）またはポリエチレングリコール（PEG）のような非イオン性界面活性剤を含んでよい。薬学的に許容できる賦形剤は、本明細書においてさらに説明される。

【0247】

一部の例では、本明細書に記載の医薬組成物は、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体に特異的に結合する抗体を含むリポソームを含み、それは、Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985)；Hwang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980)；および米国特許番号4,485,045および4,544,545に記載されるもののような任意の適切な方法によって調製され得る。増強された循環時間を有するリポソームは、米国特許番号5,013,556に開示される。特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法によって生産され得る。リポソームは、規定されたポアサイズのフィルターを通して押し出されて、所望の直径を有するリポソームを生じさせる。

【0248】

一部の実施態様では、本発明の医薬組成物は、アジュバントを含んでよく、またはそれとともに用いられてよい。特定のアジュバントは、例えば腫瘍抗原に対する対象の免疫応答をブーストすることができ、Teffector機能、単球からのDC分化、高い抗原取り込み、およびAPCによる提示などを促進することができると考えられる。適切なアジュバントは、限定されないが、レチノイン酸に基づくアジュバントおよびその誘導体、水中油エマルジョンに基づくアジュバント、例えばMF59および他のスクアレン含有アジュバント、Toll様受容体（TRL）リガンド、 α -トコフェロール（ビタミンE）およびそれらの誘導体を含む。

【0249】

GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体に特異的に結合する抗体は、コロイド状薬物輸送系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）またはマクロエマルジョン中の、例えばコア

セルベーション技術または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ（メタクリル酸メチル（methy l meth acy late））マイクロカプセル中にトラップされてもよい。例示的な技術は、以前に説明されていて、例えば、Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000) を参照。

【0250】

他の例では、本明細書に記載の医薬組成物は、徐放性形式で製剤化され得る。徐放性製剤の適切な例は、抗体を含む固形疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、そのマトリックスは、成形品、例えばフィルム、またはマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許番号3,773,919）、L-グルタミン酸および7エチル-L-グルタメートの共重合体、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸共重合体、例えば、LUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸共重合体およびリユプロリドアセテートからなる注入可能なマイクロスフェア）、スクロースアセテートイソブチレート、およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸を含む。

10

【0251】

インビボ投与のために用いられる医薬組成物は、滅菌されなければならない。これは、例えば、滅菌濾過膜を通して濾過することによって容易に達成される。治療的抗体組成物は、一般的に、滅菌アクセスポートを有するコンテナ、例えば、皮下注入針によって突き刺すことが可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアルの中に置かれる。

20

【0252】

本明細書に記載の医薬組成物は、経口、非経口または直腸投与、または、吸入またはガス注入による投与のための、単位投与形態、例えば、錠剤、丸薬、カプセル、粉末、顆粒、溶液または懸濁液、または坐薬中であってよい。

【0253】

錠剤のような固形組成物を調製するために、主な活性成分は、調剤担体、例えば、従来の打錠用成分のようなコーンスターチ、ラクトース、スクロース、ソルビトール、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、リン酸二カルシウムまたはガム、および、本開示の化合物の同種の混合物、または非毒性のそれらの薬学的に許容できる塩を含む、固形予備処方組成物を形成するための他の調剤希釈剤（例えば水）と混合されてよい。これらの予備処方組成物を同種と呼ぶ場合、等しく効果的な単位投与形態、例えば、錠剤、丸薬およびカプセルに組成物が容易に細分され得るように、活性成分が組成物全体を通じて均等に分散されることを意味する。この固形予備処方組成物は、それから、本開示の0.1mg～約500mgの活性成分を含む上述のタイプの単位投与形態に細分化される。新規の組成物の錠剤または丸薬は、延長された作用の利益を与える剤形を提供するようにコーティングまたは他の方法で調合され得る。例えば、錠剤または丸薬は、内側用量および外側用量の構成要素を含んでよく、後者は前者の上のエンベロープの形状である。2つの構成要素は、胃内での崩壊に抵抗する役割を果たして、内側の構成要素が無傷で十二指腸へ通過すること、または放出が遅延されることを可能にする腸溶性の層によって分離され得る。様々な材料がそのような腸溶性の層またはコーティングに用いられ得て、そのような材料は、多くの高分子酸およびシェラック、セチルアルコールおよび酢酸セルロースのような材料と高分子酸の混合物を含む。

30

40

【0254】

適切な表面活性剤は、特に、非イオン性剤、例えば、ポリオキシエチレンソルビタン（例えばTween（商標）20、40、60、80または85）および他のソルビタン（例えばSpan（商標）20、40、60、80または85）を含む。表面活性剤を有する組成物は、0.05～5%の表面活性剤を好適に含み、0.1～2.5%であってよい。他の成分、例えばマンニトールまたは他の薬学的に許容できるビヒクルが、必要ならば

50

添加されてよいことが理解される。

【0255】

適切なエマルションは、Intralipid（商標）、Liposyn（商標）、Infonutrol（商標）、Lipofundin（商標）およびLipiphysan（商標）のような市販される脂肪エマルションを用いて調製され得る。活性成分は、予混合エマルション組成物内に溶解されてよく、またはあるいは、油（例えば大豆油、サフラワー油、綿実油、ゴマ油、コーン油またはアーモンド油）およびリン脂質（例えば卵リン脂質、大豆リン脂質または大豆レシチン）および水との混合の際に形成されるエマルション中に溶解されてよい。エマルションの張性を調節するために、グリセロールまたはグルコースのような他の成分が添加されることが理解される。適切なエマルションは、20%までの油（例えば5～20%）を典型的に含む。

10

【0256】

エマルション組成物は、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体に特異的に結合する抗体を、Intralipid（商標）またはその構成要素（大豆油、卵リン脂質、グリセロールおよび水）と混合することによって調製されたものであってよい。

【0257】

吸入またはガス注入のための医薬組成物は、薬学的に許容できる、水性または有機溶媒中の溶液および懸濁液、またはそれらの混合物、および粉末を含む。液体または固形組成物は、上記に示された適切な薬学的に許容できる賦形剤を含んでよい。一部の実施態様では、組成物は、局所または全身性効果のために経口または経鼻呼吸経路によって投与される。

20

【0258】

好ましく滅菌された薬学的に許容できる溶媒中の組成物は、ガスの使用によって霧状化されてよい。霧状化された溶液は、霧状化デバイスから直接吸われてよく、または、霧状化デバイスは、フェイスマスク、テントまたは断続的な陽圧呼吸器に取り付けられてよい。溶液、懸濁液または粉末組成物は、適切な様式で製剤を送達するデバイスから、好ましくは経口でまたは鼻腔に投与されてよい。

【0259】

〔治療的徴候および／またはTGF β 1選択的な広範囲に阻害する薬剤を含む治療に応答する可能性がある対象の選択〕

30

本明細書に記載されるもののようなTGF β 1のアイソフォーム特異的なコンテキスト寛容阻害剤が有利な効果を有する可能性のある、適切な徴候および／または患者集団の同定／選択に関して、2つ：i) 疾患が、ヒトにおいて他のアイソフォームよりも優勢にTGF β 1アイソフォームによって駆動され、または依存性であるかどうか；および、ii) 疾患が、TGF β 1機能の多数の態様の調節不全に関与するかどうか、の質問がされ得る。

【0260】

3つの公知のTGF β アイソフォーム、すなわち、TGF β 1、TGF β 2、およびTGF β 3の示差的発現は、様々な組織において、正常（健康；恒常性）ならびに疾患状態の下で観察されている。それにもかかわらず、アイソフォーム選択性の概念は、多数のアイソフォームにわたってTGF β のpan-阻害を好む従来の手法によって、完全に利用されておらず、達成もされていない。さらに、アイソフォームの発現パターンは、異常（病理学的）状態に対する正常（恒常性）においてだけでなく、患者の異なる亜集団においても、示差的に調節され得る。ほとんどの前臨床試験は制限された数の動物モデルにおいて行なわれるので、そのようなモデルの使用によって得られるデータは偏りがあり得て、ヒト状態に対する適用性に関してデータの誤った解釈または紛らわしい結論をもたらす。

40

【0261】

したがって、本発明は、TGF β アイソフォームの示差的発現が、特定の阻害剤の有効性の予測、ならびに、ヒト状態への移行可能性（translatability

50

）に関する前臨床データの解釈において考慮されなければならないという認識を含む。図 21 に例示されるように、TGFβ1 および TGFβ3 は、前臨床試験において広く用いられる特定のミューリン同一遺伝子型の癌モデル（例えば、EMT-6 および 4T1）において共優勢である。対照的に、非常に多くの他の癌モデル（例えば、S91、B16 および MBT-2）は、ほぼ例外なく TGFβ1 を発現し、多くのヒト腫瘍において観察されるのと同様であり、TGFβ1 は、TGFβ2 / 3 よりも頻繁に優勢のアイソフォームであると考えられる。さらに、恒常性状態下で優勢に発現される TGFβ アイソフォーム（単数または複数）は、疾患関連アイソフォーム（単数または複数）でなくてよい。例えば、健康なラットにおける正常な肺組織では、持続性（tonic）TGFβ シグナル伝達は、主に TGFβ3 によって仲介されると考えられる。しかしながら、TGFβ1 は、肺線維症のような疾患状態において著しく上方調節になると考えられる。合わせると、患者が応答する可能性がある適切な治療を選択するように、臨床サンプル内の TGFβ アイソフォームの相対的発現を試験または確認することが有益である。

10

【0262】

本明細書に記載されるように、アイソフォーム選択的 TGFβ1 阻害剤は、他のアイソフォームと比較して TGFβ1 アイソフォームが優勢に発現される疾患の治療に特に有利である。例として、図 21D は、相対的発現レベルの TGFβ1（左）、TGFβ2（中央）および TGFβ3（右）を有するヒト癌臨床サンプルの非限定的なリストを提供する。3つのアイソフォームにわたるそれぞれの水平な線（line）は、単一患者を表わす。見ることができるように、TGFβ1 発現全体は、多くの腫瘍型にわたって他の2つのアイソフォームよりもこれらのヒト腫瘍の大部分において有意に高く、TGFβ1 選択的阻害が有益であり得ることを示唆する。しかしながら、特定の例外に注目すべきである。第一に、そのような傾向は、特定の個々の患者において常に適用可能なわけではない。すなわち、TGFβ2 / 3 よりもほぼ均一に TGFβ1 優勢を示す癌のタイプでさえ、この一般的規則に従わないいくつかの個体が存在する。少数派の亜集団に入る患者は、したがって、患者の多数派に関して作用する方法でアイソフォーム特異的阻害剤療法に応答し得ない。第二に、TGFβ1 が別のアイソフォームと共優勢である、または、TGFβ2 および / または TGFβ3 発現が TGFβ1 よりも有意に大きい、いくつかの癌タイプが存在する。これらの状況では、本明細書において記載されるもののような TGFβ1 選択的阻害剤は、有効（effective）でない可能性がある。したがって、個々の患者から集められた臨床サンプル中の3つの TGFβ アイソフォーム（すなわち、TGFβ1、TGFβ2 および TGFβ3）の相対的発現レベルを試験または確認することが有益である。そのような情報は、個々の患者における特定の治療の有効性に関するより良好な予測を提供し得て、臨床応答の可能性を増大させるために、適切な治療（例えば、個別化された治療）の選択を確実にするのに助けることができる。

20

30

【0263】

したがって、本発明は、アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容 TGFβ1 阻害剤を含む治療に応答する可能性がある患者集団または対象を選択する方法を含む。そのような方法は、対象から集められた生物学的サンプル（例えば、臨床サンプル）を提供するステップ、サンプル中の TGFβ1、TGFβ2 および TGFβ3 の相対的レベルを決定（例えば、測定または分析）するステップ、および、TGFβ1 が TGFβ2 および TGFβ3 よりも優勢のアイソフォームである；および / または、TGFβ1 がコントロールと比較して有意に過剰発現または上方調節される場合は、アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容 TGFβ1 阻害剤を含む組成物を対象に投与するステップを含む。アイソフォームの相対的レベルは、RNA に基づくアッセイおよび / またはタンパク質に基づくアッセイによって決定され得て、当技術分野でよく知られている。一部の実施態様では、投与ステップは、免疫チェックポイント阻害剤、または本明細書における他のどこかに提供される他の薬剤のような、別の治療を含んでもよい。そのような方法は、2以上の時点での TGFβ1、TGFβ2 および TGFβ3 の相対的レベルにおける変化を監視することによって、治療的応答を評価するステップを任意選択で含んでもよい。一部の実施態様では

40

50

、臨床サンプル（例えばバイオブシー）は、投与の前および後の両方で集められる。一部の実施態様では、臨床サンプル（例えばバイオブシー）は、経時的なインビボ効果を評価するために、治療に続いて多数回集められる。

【0264】

アイソフォーム選択性 (s e p e c t i v i t y) の態様に引き付けられた第一の質問に加えて、第二の質問は、特定の疾患に關与する T G F β 1 機能の幅を質問する。これは、T G F β 1 コンテキストの数（すなわち、どの提示分子（単数または複数）が疾患関連 T G F β 1 機能を仲介するか）によって示され得る。T G F β 1 特異的な、幅広いコンテキスト阻害剤、例えば、コンテキスト寛容およびコンテキスト非依存性阻害剤は、T G F β 1 機能の免疫構成要素および E C M 構成要素の両方に関わる疾患の治療に関して有利である。そのような疾患 (d i s a e a s e) は、E C M における調節不全ならびに免疫応答または免疫細胞機能における混乱と関連し得る。したがって、本明細書に記載の T G F β 1 阻害剤は、E C M 関連の T G F β 1（例えば、L T B P 1 または L T B P 3 によって提示される）ならびに免疫細胞関連の T G F β 1（例えば、G A R P または L R R C 3 3 によって提示される）を標的化することが可能である。一部の実施態様では、そのような阻害剤は、以下の治療的標的（例えば、「コンテキスト寛容」阻害剤）：G A R P 関連前駆体／潜在型 T G F β 1；L R R C 3 3 関連前駆体／潜在型 T G F β 1；L T B P 1 関連前駆体／潜在型 T G F β 1；および、L T B P 3 関連前駆体／潜在型 T G F β 1 の少なくとも3つを標的化する。一部の実施態様では、そのような阻害剤は、これらのコンテキストにおける T G F β 1 機能を幅広く阻害するように、治療的標的（例えば、「コンテキスト非依存性」阻害剤）：G A R P 関連前駆体／潜在型 T G F β 1；L R R C 3 3 関連前駆体／潜在型 T G F β 1；L T B P 1 関連前駆体／潜在型 T G F β 1；および、L T B P 3 関連前駆体／潜在型 T G F β 1 の4つ全てを阻害する。

【0265】

患者の特定の状態が、T G F β 1 機能の多数の態様を含むかどうか、またはそれによって駆動されるかどうかは、患者から集められた臨床サンプル中の提示分子の発現プロファイルを評価することによって評価され得る。様々なアッセイは当技術分野で知られていて、RNAに基づくアッセイおよびタンパク質に基づくアッセイを含み、発現プロファイルを獲得する (o b r t a i n) ために行われ得る。サンプル（単数または複数）中の L T B P 1、L T B P 3、G A R P、および L R R C 3 3 の相対的発現レベル（および／またはそれらの変化／変更）は、状態と関連する T G F β 1 活性の由来および／またはコンテキストを示し得る。例えば、固形腫瘍から取得されたバイオブシーサンプルは、4つの提示分子全ての高い発現を示し得る。例えば、L T B P 1 および L T B P 3 は、腫瘍間質内の C A F において高く発現され得るが、一方で、G A R P および L R R C 3 3 は、それぞれ T r e g および白血球浸潤のような腫瘍関連免疫細胞によって高く発現され得る。

【0266】

したがって、本発明は、T G F β 2 および T G F β 3 と比較して、疾患における T G F β 1 の関与を判定（例えば、試験または確認）するための方法を含む。一部の実施態様では、当該方法は、疾患関連 T G F β 1 の由来（またはコンテキスト）を同定するステップをさらに含む。一部の実施態様では、由来／コンテキストは、患者から取得された臨床サンプルにおける、T G F β 提示分子、例えば、L T B P 1、L T B P 3、G A R P および L R R C 3 3 の発現を決定することによって評価される。

【0267】

本明細書に記載されるもののようなアイソフォーム選択的 T G F β 1 阻害剤は、ヒト対象 (s u b h e c t) における T G F β 1 調節不全（すなわち、T G F β 1 関連の徴候）と関連する多種多様の疾患、障害および／または状態を治療するために用いられ得て、本明細書において用いられる「T G F β 1 調節不全と関連する疾患（障害または状態）」または「T G F β 1 - 関連の徴候」は、T G F β 1 の発現、活性および／または代謝と関連する任意の疾患、障害および／または状態または T G F β 1 の活性および／またはレベルの阻害によって利益を受け得る任意の疾患、障害および／または状態を意味する。

【0268】

したがって、本発明は、ヒト対象においてTGFβ1調節不全と関連する疾患を治療するための方法における、アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容TGFβ1阻害剤の使用を含む。そのような阻害剤は、薬学的に許容できる賦形剤をさらに含む医薬組成物へ典型的に製剤化される。有利に、阻害剤は、インビボで、ECM関連のTGFβ1および免疫細胞関連のTGFβ1の両方を標的化するが、TGFβ2またはTGFβ3を標的化しない。一部の実施態様では、阻害剤は、TGFβ1の活性化ステップを阻害する。疾患は、以下の属性：a) 制御性T細胞(Treg)；b) エフェクターT細胞(Teff)の激増または機能；c) 骨髄性細胞の激増または分化；d) 単球の動員または分化；e) マクロファージ機能；f) 上皮間葉転換(EMT) および／または内皮間葉転換(EndMT)；g) PAI-1、ACTA2、CCL2、Col1a1、Col3a1、FN-1、CTGF、およびTGFβ1からなる群より選択される1つまたは複数のマーカー遺伝子における遺伝子発現；h) ECM構成要素または機能；i) 線維芽細胞分化の少なくとも2つにおける調節不全または機能障害によって特徴付けられる。治療的有効量のそのような阻害剤は、疾患を患っているまたは診断される対象に投与される。

10

【0269】

一部の実施態様では、ECM構成要素または機能の調節不全または機能障害を含む疾患は、コラーゲンI沈着の増大を示すものを含む。

【0270】

一部の実施態様では、線維芽細胞の分化の調節不全または機能障害は、筋線維芽細胞または筋線維芽細胞様細胞の増大を含む。一部の実施態様では、筋線維芽細胞または筋線維芽細胞様細胞は、癌関連線維芽細胞(CAF)である。一部の実施態様では、CAFは、腫瘍間質と関連し、CCL2/MCP-1および／またはCXCL12/SDF-1を生産し得る。

20

【0271】

一部の実施態様では、制御性T細胞の調節不全または機能障害は、Treg活性の増大を含む。

【0272】

一部の実施態様では、エフェクターT細胞(Teff)の激増または機能の調節不全または機能障害は、CD4+/CD8+細胞激増の抑制を含む。

30

【0273】

一部の実施態様では、骨髄性細胞激増または分化の調節不全または機能障害は、骨髄性前駆細胞の激増の増大を含む。骨髄性細胞の激増の増大は、骨髄内で生じ得る。

【0274】

一部の実施態様では、単球の分化の調節不全または機能障害は、線維性組織および／または固形腫瘍のような疾患(disease)部位における骨髄由来および／または組織常在単球のマクロファージへの分化の増大を含む。

【0275】

一部の実施態様では、単球の動員の調節不全または機能障害は、TMEのような疾患部位への骨髄由来単球動員の増大を含み、増大したマクロファージ分化およびM2極性化をもたらし、TAMの増大が続く。

40

【0276】

一部の実施態様では、マクロファージ機能の調節不全または機能障害は、M2表現型へのマクロファージの極性化の増大を含む。

【0277】

一部の実施態様では、骨髄性細胞の激増または分化の調節不全または機能障害は、Treg、MDSCおよび／またはTANの数の増大を含む。

【0278】

TGFβ関連の徴候は、エフェクター免疫細胞(例えば、CD4+および／またはCD8+T細胞)を除くことによって部分的に体の正常な防御機構/免疫を抑制する、免疫が

50

除外された疾患微小環境、例えば、腫瘍または癌性組織を含む状態を含んでよい。一部の実施態様では、そのような免疫が除外された状態は、治療に対する乏しい反応性と関連する。特定の理論によって拘束されることを意図せずに、本明細書に記載されるもののような TGFβ 阻害剤は、T 細胞のアクセスを回復させることにより、抗癌免疫を排除する腫瘍の能力に対抗するのを助け得ると考えられる。

【0279】

TGFβ 関連の徴候の非限定的な例は：臓器線維症（例えば、腎臓線維症、肝線維症、心臓／心血管系線維症および肺線維症）を含む線維症、強皮症、アルポート症候群、癌（制限されないが：白血病などの血液癌、骨髄線維症、多発性骨髄腫、結腸癌、腎癌、乳癌、悪性黒色腫、膠芽腫を含む）、固形腫瘍と関連する線維症（例えば、癌線維増生、例えば線維形成性黒色腫、膀胱癌関連線維増生および乳癌腫線維増生）、間質線維症（例えば、胸部の間質線維症）、放射線によって誘導される線維症（例えば、放射線線維症候群）、化学療法後の迅速造血の促進、骨治療、創傷治療、認知症、骨髄線維症、脊髄形成異常（例えば、骨髄異形成症候群または MDS）、腎疾患（例えば、末期腎疾患または ESRD）、片側尿管閉塞（UUO）、歯の欠損および／または変性、内皮激増症候群、喘息およびアレルギー、胃腸障害、加齢の貧血、大動脈瘤、オーファン（orphan）徴候（例えばマルファン症候群およびカムラチ・エンゲルマン病）、肥満、糖尿病、関節炎、多発性硬化症、筋ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、骨粗鬆症、変形性関節症、骨減少症、メタボリック症候群、栄養病、臓器萎縮、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、および食欲不振を含む。さらなる徴候は、米国公開番号 2013/0122007、米国特許番号 8,415,459 または国際公開番号 WO2011/151432 に開示される任意のものを含んでよく、それぞれの内容は、それらの全体で参照により本明細書中に援用される。

【0280】

好ましい実施態様では、本開示の抗体、その抗原結合部分、および組成物は、TGFβ 1 シグナル伝達と関連する多種多様の疾患、障害および／または状態を治療するために用いられ得る。一部の実施態様では、標的組織／細胞は、他のアイソフォームよりも優先的に TGFβ 1 アイソフォームを発現する。したがって、本発明は、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合部分を含む医薬組成物を用いて、TGFβ 1 発現と関連するそのような状態（例えば、TGFβ 1 シグナル伝達の調節不全および／または TGFβ 1 発現の上方調節）を治療するための方法を含む。

【0281】

一部の実施態様では、疾患は、多数の細胞由来と関連する（例えば、その上に提示される、またはそれによって沈着される）TGFβ 1 を含む。一部の実施態様では、そのような疾患は、TGFβ 1 機能の免疫構成要素および ECM 構成要素の両方を含む。一部の実施態様では、そのような疾患は：i) ECM の調節不全（例えば、コラーゲンおよびプロテアーゼのような ECM 構成要素の過剰生産／沈着；ECM 基質の変更された剛性；筋線維芽細胞および CAF のような線維芽細胞の異常または病理学的活性化または分化）；ii) Treg の増大および／またはエフェクター T 細胞（Teff）の抑制、例えば、Treg/Teff 比の上昇に起因する免疫抑制；CD4 および／または CD8 T 細胞の抑制を引き起こす白血球浸潤（例えば、マクロファージおよび MDS C）の増大；および／または iii) 骨髄性細胞、例えば、マクロファージ（例えば、骨髄由来単球性／マクロファージおよび組織常在マクロファージ）、単球、骨髄性由来抑制細胞（MDS C）、好中球、樹状細胞、および NK 細胞の異常または病理学的活性化、分化、および／または動員を含む。

【0282】

一部の実施態様では、状態は、1 よりも多いタイプの提示分子（例えば、GAPR、LRR C33、LTBP1 および／または LTBP3 の 2 以上）によって提示される TGFβ 1 を含む。一部の実施態様では、多数の細胞由来からの TGFβ 1 を含む影響を受けた組織／臓器／細胞。一例だが提供するために、固形腫瘍（骨髄に關与する増殖性疾患、例

10

20

30

40

50

例えば、骨髄線維症および多発性骨髄腫を含んでもよい)は、多数の由来、例えば、癌細胞、間質細胞、周囲の健康な細胞、および／または浸潤性免疫細胞(例えば、CD45+白血球)由来のTGFβ1を含んでよく、異なるタイプの提示分子に関与する。関連のある免疫細胞は、限定されないが、骨髄性細胞およびリンパ系細胞、例えば、好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球(例えば、B細胞、T細胞、およびNK細胞)、および単球を含む。TGFβ1のコンテキスト非依存性またはコンテキスト寛容阻害剤は、そのような状態の治療に有用であり得る。

【0283】

本明細書に記載の抗体またはそのフラグメントのような、TGFβ1のアイソフォーム特異的なコンテキスト寛容阻害剤によって治療され得る状態または障害の非限定的な例を以下に提供する。

【0284】

異常な遺伝子発現を有する疾患：

様々な疾患状態におけるTGFβ1シグナル伝達経路の異常な活性化は、多くのマーカーの変更された遺伝子発現と関連することが観察されている。これらの遺伝子発現マーカー(例えばmRNAによって測定される)は、限定されないが：Serpine1(PAI-1をコードする)、MCP-1(CCL2としても知られる)、Col1a1、Col3a1、FN1、TGFβ1、CTGF、およびACTA2(α-SMAをコードする)を含む。興味深いことに、これらの遺伝子の多くは、様々なタイプの臓器線維症を含む様々なセットの疾患状態において、ならびに骨髄線維症を含む多くの癌において、役割を果たすことが暗示される。実際に、線維性状態と、異常な細胞増殖、腫瘍形成および転移との間の病態生理学的関係が示唆されている。例えば、Cox and Erler (2014) *Clinical Cancer Research* 20 (14) : 3637-43 「Molecular pathways: connecting fibrosis and solid tumor metastasis」; Shiga et al. (2015) *Cancers* 7 : 2443-2458 「Cancer-associated fibroblasts: their characteristics and their roles in tumor growth」; Wynn and Barron (2010) *Semin. Liver Dis.* 30 (3) : 245-257 「Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis」を参照し、その内容は参照により本明細書中に援用される。特定の理論によって拘束されることを望まずに、本開示の発明者は、TGFβ1シグナル伝達経路が、実際にこれらの幅広い病理間の重要な関係であり得ることを検討する。

【0285】

例えば、MCP-1/CCL2は、線維症および癌の両方において役割を果たすと考えられる。MCP-1/CCL2は、線維促進性ケモカインとして特徴付けられて、単球化学誘引物質であり、証拠は、癌の開始および進行の両方に関与し得ることを示唆する。線維症では、MCP-1/CCL2は、線維症の炎症性段階において重要な役割を果たすことが示されている。例えば、MCP-1の中和は、糸球体半月形成およびI型コラーゲンの沈着の劇的な低減をもたらした。

【0286】

MCP-1/CCL2が単球/マクロファージを動員する能力は、癌進行においてきわめて重要な結論を有する。腫瘍由来MCP-1/CCL2は、マクロファージにおいて「癌促進性」表現型を促進することができる。例えば、肺癌では、MCP-1/CCL2は、間質細胞によって生産されて転移を促進することが示されている。ヒト膀胱癌では、腫瘍はCCL2を分泌して、免疫抑制CCR2陽性マクロファージはこれらの腫瘍に浸潤する。高いCCL2発現/低いCD8 T細胞浸潤を示す腫瘍を有する患者は、生存が有意に低減される。

【0287】

同様に、PAI-1/Serpine1の関与が、様々な癌、血管新生、炎症、神経変

10

20

30

40

50

性疾患（例えば、アルツハイマー病）において関係付けられている。腫瘍および／または血清におけるPAI-1の発現の上昇は、乳癌および膀胱癌（例えば、移行細胞癌腫）のような様々な癌ならびに骨髄線維症における予後不良（例えば、より短い生存、転移の増大）と相関する。線維性状態の文脈において、PAI-1は、TGFβ1によって誘導される線維症の重要な下流エフェクターとして認識されていて、PAI-1発現の増大は、肺線維症（例えばIPF）、腎臓線維症、肝臓線維症および強皮症を含む様々な形態の組織線維症において観察されている。

【0288】

一部の実施態様では、TGFβ1阻害剤療法のインビボ効果は、遺伝子マーカーにおける変化を測定することによって評価され得る。適切なマーカーは、TGFβ（例えば、TGFβ1、TGFβ2、およびTGFβ3）を含む。一部の実施態様では、適切なマーカーは、間葉転換遺伝子（例えば、AXL、ROR2、WNT5A、LOXL2、TWIST2、TAGLN、および／またはFAP）、免疫抑制遺伝子（例えば、IL10、VEGFA、VEGFC）、単球およびマクロファージ走化性遺伝子（例えば、CCL2、CCL7、CCL8およびCCL13）、および／または、本明細書において議論される様々な線維性マーカーを含む。好ましいマーカーは、血漿マーカーである。

【0289】

本明細書における実施例に示されるように、本明細書に記載のTGFβ1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト非依存性阻害剤は、TGFβ1依存であることが示されているUUOのような機械論的動物モデルにおいて、多くのこれらのマーカーの発現レベルを減少させることができる。したがって、そのような阻害剤は、遺伝子発現マーカーの1つまたは複数の異常な発現（例えば、過剰発現／上方調節または過小発現／下方調節）によって特徴付けられる疾患または障害を治療するために用いられ得る。

【0290】

したがって、一部の実施態様では、TGFβ1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容またはコンテキスト非依存性阻害剤は、以下：PAI-1（Serpine1としても知られる）、MCP-1（CCL2としても知られる）、Col1a1、Col3a1、FN1、TGFβ1、CTGF、α-SMA、ITGA11、およびACTA2の1つまたは複数の過剰発現と関連する疾患の治療において用いられて、治療は、疾患を治療するのに効果的な量の阻害剤を、疾患を患っている対象に投与するステップを含む。一部の実施態様では、阻害剤は、PAI-1、MCP-1／CCL2、CTGF、および／またはα-SMAの過剰発現と関連する疾患を治療するために用いられる。一部の実施態様では、疾患は骨髄線維症である。一部の実施態様では、疾患は癌であり、例えば、癌は固形腫瘍を含む。一部の実施態様では、疾患は、臓器線維症、例えば、肝臓、腎臓、肺および／または心臓または心血管系組織の線維症である。

【0291】

プロテアーゼに関与する疾患：

その潜在型複合体からのTGFβの活性化は、力依存性の様式でインテグリンによって、および／または、プロテアーゼによってトリガーされ得る。証拠は、特定のクラスのプロテアーゼ（限定されないが、Ser／Thrプロテアーゼ、例えば、カリクレイン、ケモトリプシン、エラスターゼ、プラスミン、ならびに、MMPファミリーの亜鉛メタロプロテアーゼ、例えばMMP-2、MMP-9およびMMP-13を含む）が、プロセスに関与し得ることを示唆する。MMP-2は、基底膜の最も大量の構成要素、コラーゲンIVを分解して、ECM関連のTGFβ1制御において役割を果たし得るという可能性を引き起こす。MMP-9は、腫瘍進行、血管新生、間質再構築および転移において中心的な役割を果たすことが暗示されている。したがって、ECMにおけるTGFβ1のプロテアーゼ依存性活性化は、癌の治療に重要であり得る。

【0292】

カリクレイン（KLK）は、トリプシンまたはキモトリプシン様のセリンプロテアーゼであり、血漿カリクレインおよび組織カリクレインを含む。ECMは、構造的およびシグ

10

20

30

40

50

ナル伝達の足場、および、悪性増殖物を抑制するためのバリアとして作用する、組織恒常性において役割を果たす。K L Kは、腫瘍の拡張および侵襲を促進し得るE C Mタンパク質および他の構成要素の分解において役割を果たし得る。例えば、K L K 1は、特定の乳癌において高く上方調節されて、p r o - M M P - 2およびp r o - M M P - 9を活性化することができる。K L K 2は、潜在型T G F β 1を活性化して、線維芽細胞に隣接する前立腺癌を、癌増殖に許容的にさせる。K L K 3は、前立腺癌（P S A）に関する診断マーカーとして幅広く研究されている。K L K 3は、プラスミノゲンをプラスミンにプロセッシングすることによってT G F β 1を直接的に活性化し得て、L A Pをタンパク質分解性に切断する。K L K 6は、アルツハイマー病に関する潜在的マーカーであり得る。

【0293】

さらに、実施例8に提供されるデータは、そのようなプロテアーゼがカリクレインであってよいことを示す。したがって、本発明は、カリクレインまたはカリクレイン様プロテアーゼと関連する疾患を治療するための方法における、T G F β のアイソフォーム特異的な、コンテキスト非依存性または許容的な阻害剤の使用を包含する。

【0294】

T G F β 1の公知のアクチベーター、例えば、プラスミン、T S P - 1および α V β 6インテグリンは全て、L A Pと直接的に相互作用する。L A Pのタンパク質分解の切断は、L A P - T G F β 相互作用を不安定化させ得て、それにより、活性のT G F β 1を放出すると仮定される。54 - L S K L R L - 59を含む領域は、T G F β 1潜在性を維持するために重要であることが示唆されている。したがって、L A Pのタンパク質分解性の切断をブロックする、または、相互作用を安定化する薬剤（例えば、抗体）は、T G F β 活性化を妨げ得る。

【0295】

上皮間葉転換（E M T）に關与する疾患：

E M T（上皮間葉転換）は、タイトジャンクションを有する上皮細胞が、緩んだ細胞間接触のような間葉特性（表現型）にスイッチするプロセスである。そのプロセスは、多くの正常な生物学的プロセスならびに胚形成、創傷治癒、癌転移および線維症を含む病理学的状況において観察される（例えば、Shiga et al. (2015) 「Cancer - Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth」Cancers, 7: 2443 - 2458に概説される）。一般に、E M Tシグナルは、主にT G F β によって誘導されと考えられる。多くのタイプの癌は、例えば、乏しい予後と相關する間葉表現型（例えばC A F）に向かう細胞の分化転換に關与すると考えられる。したがって、本明細書において記載される藻のようなT G F β 1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤は、E M Tによって開始または駆動される疾患を治療するために用いられ得る。実際に、本明細書に例示されるデータ（例えば、図12および13）は、そのような阻害剤が、インビボで、 α - S M A、C o l 1（I型コラーゲン）、およびF N（フィブロネクチン）のようなC A Fマーカーの発現を抑制する能力を有することを示す。

【0296】

内皮間葉転換（E n d M T）に關与する疾患：

同様に、T G F β はまた、心臓形成のような正常な発達において観察される内皮間葉転換（E n d M T）の重要なレギュレーターでもある。しかしながら、同一または同様の現象が、癌間質のような多くの疾患においても見られる。一部の疾患プロセスでは、C D 31のような内皮マーカーは、T G F β 1曝露の際に下方調節されるようになり、その代わり、F S P - 1、 α - S M Aおよびフィブロネクチンのような間葉マーカーの発現が誘導されるようになる。実際に、間質C A Fは、血管内皮細胞に由来し得る。したがって、本明細書において記載されるもののようなT G F β 1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤は、E n d M Tによって開始または駆動される疾患を治療するために用いられ得る。

【0297】

マトリックス硬化および再構築に關与する疾患：

線維性状態の進行は、ECMへ沈着されるマトリックス構成要素のレベルの増大および／またはECMの維持／再構築に關与する。TGFβ1は、このプロセスに少なくとも部分的に貢獻する。このことは、例えば、コラーゲンのようなECM構成要素の沈着の増大によって、ECMの機械的物性（例えば、マトリックス／基質の剛性）を変更することができるという観察によって支持されて、この現象はTGFβ1シグナル伝達と關連する。この見解を確認するために、本發明者らは、proTGFβおよびLTBP1によってトランスフェクトされた一次線維芽細胞におけるTGFβのインテグリン依存性の活性化の影響におけるマトリックス剛性の役割を評価していて、規定された剛性（例えば、5 kPa、15 kPaまたは100 kPa）を有するシリコン系基質上で増殖させている。以下の実施例セクションに要約されるように、より大きな剛性を有するマトリックスは、TGFβ1活性化を高めて、これは、本明細書において記載されるもののようなTGFβ1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤によって抑制され得る。この観察は、TGFβ1がECM特性（例えば剛性）に影響を及ぼすことを示唆し、次々に、TGFβ1活性化をさらに誘導することができる（疾患進行を反映）。したがって、本明細書において記載されるもののようなTGFβ1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤は、このプロセスをブロックするために用いられ得て、線維症、腫瘍増殖、侵襲、転移および線維増生のようなECM変更に關与する疾患進行に対抗する。そのような阻害剤のLTBPアームは、LTBP1および／またはLTBP3によって提示されるECM關連の前駆体／潜在型TGFβ複合体を直接的にブロックすることができて、それにより、疾患ニッチ内の複合体からの増殖因子の放出／活性化を防止する。一部の実施態様では、本明細書において記載されるもののようなアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容TGFβ1阻害剤は、インテグリン依存性のシグナル伝達に關与する疾患を治療するために、ECM剛性を標準化し得る。一部の実施態様では、インテグリンは、α11鎖、β1鎖、または両方を含む。

【0298】

線維症：

本發明によれば、本明細書において記載されるもののようなアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤TGFβ1は、対象における線維症（例えば、線維性徴候、線維性状態）の治療において用いられる。本發明を行なうための適切な阻害剤は、線維症を変更または寛解させるのに有用であり得る本開示に係る抗体および／または組成物を含む。より具体的には、そのような抗体および／または組成物は、様々なタイプの提示分子によって提示されるTGFβ1を標的化することが可能なTGFβ1の選択的拮抗薬である。TGFβ1は、線維性応答の中心的なオーケストレーター（orchestrator）として認識される。TGFβを標的化する抗体は、非常に多くの前臨床モデルにおいて線維症を低減させる。そのような抗体および／または抗体に基づく化合物は、LY2382770（Eli Lilly, Indianapolis, IN）を含む。米国特許番号US6,492,497、US7,151,169、US7,723,486および米国出願公開番号2011/0008364に記載されるものも含まれて、それぞれの内容は、それら全体で参照により本明細書中に援用される。従来技術のTGFβ拮抗薬は、例えば、TGFβのインテグリン依存性の活性化を標的化してブロックする薬剤を含む。

【0299】

しかしながら、証拠は、そのような従来技術の薬剤が、アイソフォーム特異的な阻害を仲介し得ず、TGFβ2および／またはTGFβ3の正常な機能を不注意にブロックすることによって不要な効果を引き起こし得ることを示唆する。実際に、本明細書において提供されるデータは、この見解を支持する。正常（非疾患）肺組織は、相対的に低い測定可能なレベルのTGFβ2およびTGFβ3を含むが、とりわけTGFβ1がより少ない。比較して、線維症のような特定の疾患状態では、TGFβ1が他のアイソフォームと比較して優先的に上方調節になる。好ましくは、そのような状態の治療における使用のため

の TGFβ 拮抗薬は、それらの阻害活性を、疾患誘導性または疾患関連アイソフォームにのみ向けて与えて、一方で、通常は発現されて組織における持続性 (tonic) シグナル伝達を仲介する他のアイソフォームの機能を妨げる。有利に、以下の実施例 20 に示されるように、本開示によって包含されるアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容 TGFβ 1 阻害剤は、健康なラットの気管支肺胞洗浄 (BAL) においてほとんど効果を示さず、持続性 (tonic) TGFβ シグナル伝達 (例えば、TGFβ 2 および / または TGFβ 3) は混乱しないという見解を支持する。対照的に、従来技術の阻害剤 (LY2109761、小分子 TGFβ 受容体拮抗薬、および αVβ6 インテグリンを標的化するモノクローナル抗体) は両方とも、非疾患ラット BAL において TGFβ 下流の持続性 (tonic) シグナル伝達を阻害することが示されて、これらの阻害剤が不要な副作用を引き起こし得る可能性を上げる。これに代え又はこれに加えて、TGFβ のインテグリン依存性の活性化を標的化してブロックする薬剤は、様々な細胞型によって発現されて病因における役割を果たす非常に多くのインテグリン型の中でも、疾患関連 TGFβ 1 活性化を担うインテグリンのサブセットのみのブロックが可能であり得る。さらに、そのような拮抗薬が、インテグリンが介在する TGFβ 1 アイソフォームの活性化を選択的にブロックし得る場合でさえ、プロテアーゼ依存性の活性化のような他のモードによってトリガーされる TGFβ 1 活性化のブロックには効果的でないかもしれない。対照的に、本明細書において記載されるもののような TGFβ 1 のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤は、アイソフォーム選択性を維持しながら、特定のモードの活性化にかかわらず TGFβ 1 の活性化ステップを妨げることを目的とする。

【0300】

本開示の抗体および / または組成物が治療的に用いられ得る線維性徴候は、限定されないが、肺の徴候 (例えば特発性肺線維症 (IPF)、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、アレルギー性喘息、急性肺損傷、好酸球性食道炎、肺動脈性高血圧および化学的ガス障害)、腎臓の徴候 (例えば、糖尿病性糸球体硬化症、巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS)、慢性腎疾患 (CKD)、腎臓移植および慢性拒絶と関連する線維症、IgA 腎障害、および溶血性尿毒症症候群)、肝線維症 (例えば、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、慢性ウイルス肝炎、寄生虫血症、代謝の先天異常、毒素が介在する線維症、例えばアルコール性線維症、非アルコール性脂肪性肝炎 - 肝細胞癌腫 (NASH-HCC)、原発性胆汁性肝硬変、および硬化性胆管炎)、心血管系線維症 (例えば、心筋症、肥大性心筋症、アテローム性動脈硬化症および再狭窄、) 全身性硬化症、皮膚線維症 (例えば、全身性硬化症、びまん性皮膚全身性硬化症、強皮症、病理学的皮膚瘢痕、ケロイド、手術後の瘢痕、瘢痕修正外科的処置、放射線によって誘導される瘢痕および慢性創傷における、皮膚線維症) および癌または二次線維症 (例えば骨髄線維症、頭頸部癌、M7 急性巨核芽球白血病および粘膜炎) を含む。本開示の化合物および / または組成物を用いて治療され得る線維症 (変性障害を含む) に関する他の疾患、障害または状態は、限定されないが、腺筋症、子宮内膜症、マルファン症候群、皮膚硬化症候群、強皮症、関節リウマチ、骨髄線維症、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、筋ジストロフィー (例えば DM1)、パーキンソン病、ALS、デュピュイトラン拘縮、カムラチ・エンゲルマン病、神経瘢痕、認知症、増殖性硝子体網膜症、角膜負傷、緑内障ドレーナージ外科的処置後の合併症、および多発性硬化症を含む。そのような線維性徴候の多くは、影響を受けた組織 (単数または複数) の炎症とも関連し、免疫構成要素の関与を示す。

【0301】

一部の実施態様では、本明細書に記載の組成物および / または方法によって治療され得る線維性徴候は、臓器線維症、例えば肺の線維症 (例えば、IPF)、腎臓の線維症 (例えば、CKD と関連する線維症)、肝臓の線維症、心臓または心臓組織の線維症、皮膚の線維症 (例えば、強皮症)、子宮 (例えば、子宮内膜、子宮筋) の線維症、および、骨髄の線維症を含む。一部の実施態様では、そのような治療は、患者における臓器移植に関する必要性を減少または遅延させ得る。一部の実施態様では、そのような治療は、患者の生存を延長させ得る。

【0302】

IPFを治療するために、治療の利益を受け得る患者は、家族性IPFを有する者および孤発性IPFを有する者を含む。治療的有効量のTGFβ1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤の投与は、肺組織内の筋線維芽細胞蓄積を減少させ得て、コラーゲン沈着を減少させ得て、IPF症候を減少させ得て、肺機能を改善または維持し得て、生存を延長させ得る。一部の実施態様では、阻害剤は、IPFの線維性環境内のECM関連のTGFβ1（例えば、LTBP1／3によって提示される前駆体／潜在型TGFβ1）の活性化をブロックする。阻害剤は、任意選択でマクロファージ関連TGFβ1（例えば、LRRC33によって提示される前駆体／潜在型TGFβ1）、例えば、肺マクロファージの活性化をさらにブロックしてもよい。結果として、阻害剤は、フィブロネクチン放出および他の線維症関連因子を抑制し得る。

10

【0303】

本明細書において提供されるもののようなアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容TGFβ1阻害剤は、脂肪肝（例えば、NASH）のような肝臓の線維性状態を治療するために用いられ得る。脂肪肝は、炎症を起こしてよく、または起こしてなくてもよい。脂肪肝に起因する肝臓の炎症（すなわち、脂肪性肝炎）は、瘢痕（線維症）に発達し得て、その結果、しばしば、硬変（肝臓の構造を歪めてその機能を損なわせる瘢痕）に進行する。阻害剤は、したがって、そのような状態を治療するために用いられ得る。一部の実施態様では、阻害剤は、肝臓の線維性環境内のECM関連のTGFβ1（例えば、LTBP1／3によって提示される前駆体／潜在型TGFβ1）の活性化をブロックする。阻害剤は、マクロファージ関連TGFβ1（例えば、LRRC33によって提示される前駆体／潜在型TGFβ1）、例えば、クッパー細胞（星状マクロファージとしても知られる）ならびに浸潤性単球由来マクロファージおよびMDS Cの活性化を任意選択でさらにブロックしてもよい。結果として、阻害剤は、線維症関連因子を抑制し得る。そのような状態を有する対象における阻害剤の投与は、1つまたは複数の症候を減少させ得て、疾患の進行を防止または妨害し得て、肝臓内の脂肪蓄積を減少または安定化させ得て、疾患関連バイオマーカー（例えば血清コラーゲンフラグメント）を減少させ得て、肝臓瘢痕を減少させ得て、肝臓剛性を減少させ得て、および／または、阻害剤によって治療されないコントロール集団と比較して阻害剤によって治療される患者集団において臨床的に意義のある成果を他の方法で生産し得る。一部の実施態様では、有効量の阻害剤は、NASH患者において肝脂肪の減少および線維症（例えば、瘢痕）の減少の両方を達成し得る。一部の実施態様では、有効量の阻害剤は、NASH患者において脂肪性肝炎を悪化させることなく、少なくとも1段階、線維症の改善を達成し得る。一部の実施態様では、有効量の阻害剤は、NASH患者において肝不全および／または肝臓癌の発生率を減少させ得る。一部の実施態様では、有効量の阻害剤は、治療の開始後、例えば12～36週に評価されるように、多数の炎症性または線維性血清バイオマーカーのレベルを、コントロールと比較して標準化し得る。NASH患者における一部の実施態様では、アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容TGFβ1阻害剤は、1つまたは複数のさらなる治療（限定されないがミオスタチン阻害剤を含む）を受ける患者において投与され得て、NASHを含むメタボリック症候群の臨床兆候を有する患者において代謝調節を一般に高め得る。

20

30

40

【0304】

本明細書において記載されるもののようなアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容TGFβ1阻害剤は、腎臓の線維性状態、例えば、糸球体および尿細管間質におけるTGFβの有意に増大した発現が観察されている細胞外マトリックス蓄積（IgA腎障害、限局性および分節性糸球体硬化症、半月体性糸球体腎炎、ループス腎炎および糖尿病性腎障害）によって特徴付けられる疾患を治療するために用いられ得る。TGFβ、フィブロネクチンEDA+およびPAI-1によって誘導される2つのマトリックス構成要素の糸球体および尿細管間質性の沈着は、マトリックス蓄積を伴う全ての疾患において有意に上昇されたが、相関分析は、主にTGFβ1アイソフォームとの近い関係性を明らかにしている。したがって、アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容TGFβ1阻害剤は、TG

50

Fβが細胞外マトリックスの病理学的蓄積と関連する様々なヒト系球体障害に関する治療として有用である。

【0305】

一部の実施態様では、腎臓の線維性状態は、慢性腎疾患（CKD）と関連する。CKDは、高血圧または糖尿病によって主に引き起こされて、毎年100万よりも多い命を奪う。CKD患者は、嚴重食および薬剤から透析および移植にわたる寿命メディカルケアを必要とする。一部の実施態様では、本明細書に記載のTGFβ1阻害剤療法は、透析および／または移植の必要性を減少または遅延させ得る。一部の実施態様では、そのような治療は、他の治療の必要性（例えば、用量、頻度）を減少させ得る。一部の実施態様では、アイソフォーム特異的な、コンテクスト寛容TGFβ1阻害剤は、限定されないがミオスタチン阻害剤（CKDを有する患者において代謝調節を一般に高め得る）を含む1つまたは複数のさらなる治療を受ける患者内に投与され得る。

10

【0306】

本明細書において提供される方法によって治療され得る臓器線維症は、心臓（例えば、心血管系）線維症を含む。一部の実施態様において、心臓線維症は、慢性心不全（CHF）のような心不全と関連する。一部の実施態様では、心不全は、心筋疾患および／または代謝疾患と関連し得る。一部の実施態様では、アイソフォーム特異的な、コンテクスト寛容TGFβ1阻害剤は、1つまたは複数のさらなる治療を受ける患者において投与され得る（限定されないが、心臓線維症および代謝障害を含む心機能不全を有する患者においてミオスタチン阻害剤を含む）。

20

【0307】

一部の実施態様では、本明細書に記載の組成物および／または方法によって治療され得る線維性状態は、線維増生を含む。線維増生は、新生物の周りに生じ得て、腫瘍の周りの高密度の線維症（例えば、線維形成性間質）、または、腹部の外科的処置後の腹部内の瘢痕組織を生じさせる。一部の実施態様では、線維増生は、悪性腫瘍と関連する。悪性腫瘍を取り囲むその高密度の形成に起因して、従来の抗癌治療（例えば、化学療法）は、臨床効果のために癌性細胞に届くように効果的に突き抜け得ない。本明細書に記載されるもののようなTGFβ1のアイソフォーム特異的な、コンテクスト寛容阻害剤は、線維性形成が緩められて抗癌治療の効果を助けることができるように、線維増生を破壊するために用いられ得る。一部の実施態様では、TGFβ1のアイソフォーム特異的な、コンテクスト寛容阻害剤は、単剤療法として用いられ得る（さらに以下）。

30

【0308】

線維性状態を有する患者を治療するために、TGFβ1アイソフォーム特異的な、コンテクスト寛容阻害剤は、線維症を治療するのに効果的な量で対象に投与される。そのような抗体の有効量は、対象において治療的有效性および臨床安全性の両方を達成するのに効果的な量である。一部の実施態様では、阻害剤は、ECM内に局在化された（例えば、つながれた）、LTBPが介在するTGFβ1、および、免疫細胞内に局在化された（例えば、その上につながれた）GARPが介在するTGFβ1の、活性化をブロックすることができるコンテクスト寛容抗体である。一部の実施態様では、抗体は、ECM内に局在化されたLTBPが介在するTGFβ1、および、単球／マクロファージ内に局在化された（例えば、その上につながれた）LRRC33が介在するTGFβ1の活性化をブロックすることのできるコンテクスト寛容抗体である。一部の実施態様では、LTBPは、LTBP1および／またはLTBP3である。一部の実施態様では、線維性微小環境において、線維促進性、M2様マクロファージ上にLRRC33によって提示されるTGFβ1の標的化および阻害は、有益であり得る。

40

【0309】

線維症の変更に關して本開示の抗体および／または組成物の有効性を決定するのに有用なアッセイは、限定されないが、線維芽細胞を数えるための組織学的アッセイおよび当技術分野で知られている基礎的な免疫組織化学分析を含む。

【0310】

50

骨髄線維症：

骨髄線維症は、骨髄線維症としても知られ、相対的に稀な骨髄増殖性疾患（癌）であり、骨髄増殖性障害と呼ばれる疾患グループに属する。骨髄線維症は、骨髄増殖性新生物の Philadelphia 染色体陰性（-）ブランチに分類される。骨髄線維症は、クローン骨髄増殖、異常なサイトカイン産生、髄外造血、および骨髄線維症によって特徴付けられる。骨髄および他の部位における造血幹細胞の異常なクローンの増殖は、線維症、または、瘢痕組織による髄質の置換をもたらす。用語、骨髄線維症は、別段の定めのない限り、原発性骨髄線維症（PMF）を指す。これは、慢性特発性骨髄線維症（cIMF）とも呼ばれ得る（用語、特発性および原発性は、これらの場合、疾患が未知または自発的起源であることを意味する）。これは、真性多血症または本質的な血小板血症の次に発生する骨髄線維症と対照的である。骨髄線維症は、骨髄性異形成の形態であり、それは骨髄の血液形成組織内の細胞型における変化を指し、しばしば2つの用語は同義的に用いられる。用語、突発性骨髄性異形成および骨髄性異形成を有する骨髄線維症（MMM）は、原発性骨髄線維症を指すためにも用いられる。一部の実施態様では、本発明に従って治療され得る血液学的増殖性障害は、骨髄線維症のような骨髄増殖性障害を含む。BCR-ABL (Ph) 陰性の慢性骨髄増殖性障害のいわゆる「古典的なグループ」は、本態性血小板血症（ET）、真性多血症（PV）および原発性骨髄線維症（PMF）を含む。

【0311】

骨髄線維症は、血液細胞の体の正常な生産を破壊する。結果は骨髄内の広範囲の瘢痕であり、重い貧血、虚弱、疲労、および、しばしば脾臓肥大をもたらす。異常な造血細胞クローンによる（特に巨核球による）線維芽細胞増殖因子のようなサイトカインの生産は、コラーゲン線維症を介して結合組織による骨髄の造血性組織の置換をもたらす。造血性組織の低減は、新たな血液細胞を生産する患者の能力を損ない、進行性汎血球減少症（全ての血液細胞型の欠乏）をもたらす。しかしながら、線維芽細胞の増殖およびコラーゲンの沈着は、二次現象であると考えられて、線維芽細胞自体は、異常な細胞クローンの一部でなくてよい。

【0312】

骨髄線維症は、骨髄内の異常な血液幹細胞によって引き起こされ得る。異常な幹細胞は、迅速に増殖して骨髄を乗っ取る（take over）成熟および低分化細胞を生産して、線維症（瘢痕組織形成）および慢性炎症の両方をもたらす。

【0313】

原発性骨髄線維症は、Janusキナーゼ2（JAK2）、トロンボポエチン受容体（MPL）およびカルレチクリン（CALR）における突然変異と関連し、生じる骨髄の、JAK-STAT経路の構成的活性化、進行性瘢痕、または線維症をもたらす。造血細胞は他のエリア（特に肝臓および脾臓）へ遊走させられるので、患者は、髄外造血、すなわち、骨髄以外の部位において生じる血液細胞形成を発生し得る。これは、これらの臓器の肥大を生じさせる。肝臓では、異常なサイズは肝腫大と呼ばれる。脾臓の肥大は脾腫大と呼ばれ、汎血球減少症、特に血小板減少症および貧血を引き起こすのにも寄与する。髄外造血の別の合併症は、変形赤血球症、または、異常な形状をした赤血球の存在である。

【0314】

骨髄線維症における髄外造血の主な部位は脾臓であり、通常、骨髄線維症を患っている患者において著しく肥大している。脾臓の大きな肥大の結果として、多数の被膜下梗塞が脾臓においてしばしば生じ、脾臓への遮られた酸素供給に起因して部分的または完全な組織死が起きることを意味する。細胞レベルでは、脾臓は、赤血球前駆体、顆粒球前駆体および巨核球を含み、巨核球がそれらの数およびそれらの異常な形状において顕著である。巨核球は、この状態において見られる二次線維症を引き起こすのに関与し得る。

【0315】

TGFβは、骨髄線維症の病因の線維性態様に関与し得ることが示唆されている（例えば、Agarwal et al., 「Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms」）。

10

20

30

40

50

ms and the role of TGF β 」(2016) Stem Cell Investig 3:5を参照)。原発性骨髄線維症における骨髄病理は、線維症、血管新生(neoangiogenesis)および骨硬化症によって特徴付けられて、線維症は、ECM内に沈着されるコラーゲンの生産の増大と関連する。

【0316】

多くのバイオマーカーが説明されていて、その変更は、疾患を示す、または疾患と関連する。一部の実施態様では、バイオマーカーは、細胞バイオマーカーである。そのような疾患関連バイオマーカーは、疾患進行ならびに治療の有効性(例えば、治療に対する患者の反応性)の診断および/または監視に有用である。これらのバイオマーカーは、多くの線維性マーカー、ならびに細胞マーカーを含む。肺癌では、例えば、気管支肺胞洗浄(BAL)液中のTGF β 1濃度は、良性疾患を有する患者と比較して肺癌を有する患者において有意により高いことが報告されていて(約2+倍の増大)、肺癌の進行または治療効果を診断および/または監視するためのバイオマーカーとしての役割も果たし得る。

10

【0317】

原発性骨髄線維症は、異常な巨核球発達と関連するので、巨核球ならびに幹細胞系統のそれらの前駆細胞の特定の細胞マーカーは、疾患進行ならびに治療の有効性を診断および/または監視するためのマーカーとしての役割を果たし得る。一部の実施態様では、有用なマーカーは、限定されないが：分化巨核球の細胞マーカー(例えば、CD41、CD42およびTpoR)、巨核球-赤血球前駆細胞の細胞マーカー(例えば、CD34、CD38、およびCD45RA)、一般的な骨髄性前駆細胞の細胞マーカー(例えば、IL-3 α /CD127、CD34、SCFR/c-kitおよびFlt-3/Flk-2)、および造血幹細胞の細胞マーカー(例えば、CD34、CD38、Flt-3/Flk-2)を含む。一部の実施態様では、有用なバイオマーカーは、線維性マーカーを含む。これらは、制限されずに：TGF β 1、PAI-1(Serpine1としても知られる)、MCP-1(CCL2としても知られる)、Col1a1、Col3a1、FN1、CTGF、 α -SMA、ACTA2、Timp1、Mmp8、およびMmp9を含む。一部の実施態様では、有用なバイオマーカーは、血清マーカー(例えば、血清サンプル中に見られて検出されるタンパク質またはフラグメント)である。

20

【0318】

TGF β が白血病性骨髄ニッチの構成要素であるという知見に基づき、TGF β 阻害剤による骨髄微小環境の標的化は、影響を受けた組織における局所的なTGF β 利用率を調節する提示分子を発現している白血病細胞を減少させるための有望なアプローチであり得ると考えられる。

30

【0319】

実際に、骨髄増殖性および線維性態様の両方におけるTGF β 依存性調節不全を示す病理の多面的な性質に起因して(用語「骨髄線維症」自体が示唆するように)、本明細書において記載されるもののようなTGF β 1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤は、骨髄線維症を患っている患者に特に有利な治療的效果を提供し得る。そのような阻害剤のLTBPアームは、骨髄内のECM関連のTGF β 1複合体を標的化することができて、一方で、阻害剤のLRRC33アームは、骨髄性細胞関連TGF β 1をブロックすることができると考えられる。加えて、骨髄線維症と関連する異常な巨核球の生物学は、GARPおよびLTBPが介在するTGF β 1活性の両方に関与し得る。TGF β 1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤は、そのような複合体を標的化することが可能であり、したがって、ニッチにおける活性のTGF β 1の放出を阻害することが可能である。

40

【0320】

したがって、そのようなTGF β 1阻害剤は、他(または標準治療)の療法、例えば、ヒドロキシ尿素およびJAK阻害剤に対する応答が不十分な、または、それに耐えられない、真性多血症を有する患者の治療に有用である。そのような阻害剤は、原発性MF、真性多血症後のMFおよび本態性血小板血症後のMFを含む、中間またはハイリスクの骨髄

50

線維症（MF）を有する患者の治療にも有用である。

【0321】

したがって、本発明の一態様は、原発性骨髄線維症を治療するための方法に関する。当該方法は、原発性骨髄線維症を患っている患者に、治療的有効量の、TGFβ利用率の減少を引き起こすTGFβ阻害剤を含む組成物を投与するステップを含む。一部の実施態様では、TGFβ1活性化のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容モノクローナル抗体阻害剤は、骨髄線維症を有する患者に投与される。そのような抗体は、0.1～100 mg/kgの範囲、例えば、1～30 mg、例えば、1 mg/kg、3 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg、20 mg/kgなどの用量で投与され得る。抗体を含む医薬組成物の好ましい投与経路は、静脈内または皮下投与である。組成物が静脈内に投与される場合、患者は、適切な持続時間（例えば、治療あたり、およそ60分）にわたって治療を与えられ得て、それから、数週間（例えば、3週、4週、6週など）ごとに、合計で数サイクル（例えば、4サイクル、6、サイクル、8サイクル、10サイクル、12サイクルなど）繰り返される。一部の実施態様では、患者は、静脈内投与を介して1～10 mg/kg（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10 mg/kg）の投与レベルで、28日（4週）ごとに、6サイクルまたは12サイクル、阻害剤を含む組成物によって治療される。一部の実施態様では、そのような治療は、投与のサイクルのセット数の後に、中止する代わりに慢性の（長期）治療として投与される（例えば、有益とみなされる限り無期限に続けられる）。

10

【0322】

一部の実施態様では、TGFβ阻害剤は、不活性の（例えば、潜在型）proTGFβ複合体に結合する抗体またはその抗原結合部分であり、それにより、複合体からの活性または成熟TGFβの放出を防止して、活性化ステップを効率的に阻害する。一部の実施態様では、そのような抗体または抗原結合部分は、LRRC33、GARP、LTBP1、LTBP3またはそれらの任意の組み合わせと関連するproTGFβ複合体に、特異的に結合する。一部の実施態様では、そのような抗体または抗原結合部分は、細胞によってつながられたproTGFβ複合体に特異的に結合する。一部の実施態様では、抗体またはそれらの部分は、LRRC33および／またはGARPと関連する（しかしLTBP1またはLTBP3とは関連しない）proTGFβ複合体に選択的に結合する。一部の実施態様では、抗体またはその部分は、LRRC33と関連するproTGFβ複合体に特異的に結合する。一部の実施態様では、抗体またはその部分は、GARPと関連するproTGFβ複合体に特異的に結合する。一部の実施態様では、抗体またはその部分は、LRRC33と関連するproTGFβ複合体ならびにGARPと関連するproTGFβ複合体に特異的に結合する。

20

30

【0323】

上述の実施態様に代え又はそれに加えて、TGFβ阻害剤は、LRRC33および／またはGARPに結合する抗体またはその抗原結合部分であり、さらなるエフェクター機能のためのドメインを含む。一部の実施態様では、さらなるエフェクター機能のためのドメインは、標的細胞においてADCCを仲介するFcまたはFc様ドメインであってよい。好ましくは、ADCCを誘導する抗体は、ADCCが介在する標的細胞死を十分に可能にするように内部移行をトリガーまたは促進しない。

40

【0324】

上述の実施態様に代え又はそれに加えて、抗体またはその抗原結合部分は、目的の「ペイロード」（例えば、抗体-薬物コンジュゲート、またはADC）を保有するためのさらなる部分を含んでよい。適切なペイロードの例は、限定されないが：治療剤／薬物、毒素、マーカーおよび検出／イメージングラベルなどを含む。そのようなペイロードは、化学物質、小分子、ポリペプチド、核酸、放射性同位体などであってよい。好ましくは、ADCが介在する作用機序に適切な抗体は、細胞表面標的への結合の際に、ペイロードを細胞内へ送達するように抗原抗体複合体の効果的な内部移行をトリガーすることができる。

【0325】

50

骨髄線維症は、多数の影響を受けた組織または臓器における病理学の多くの面を示す進行性の疾患であるので、治療的アプローチは、疾患進行に応じて変化し得る。例えば、疾患の一次部位（骨髄）では、適切な治療は、LRRC33を発現している造血細胞を標的化することができる本明細書に記載のLRRC33阻害剤を含むと考えられる。これは、LRRC33によって提示されるproTGFβ複合体に結合して患者におけるTGFβの活性化を阻害する抗体を含む組成物の投与によって達成され得る。また、LRRC33に結合して患者内の標的細胞の死を誘導する抗体を含む組成物の投与によっても達成され得る。あるいは、これらのアプローチを組み合わせ、TGFβ活性化阻害剤であって細胞の細胞毒性を仲介するためのさらなる部分も含む抗体を用いてよい。例えば、さらなる部分は、ペイロードとして抗体にコンジュゲートされた毒素またはADCCを誘導するためのFcまたはFc様ドメインであってよい（例えば、抗体-薬物コンジュゲート、またはADC）。

10

【0326】

骨髄線維症は、白血病の1つのタイプであると考えられ得るが、線維症の兆候によって特徴付けられる。TGFβは、ECM恒常性の面を調節することが知られているので、その調節不全は組織線維症をもたらし得て、一部の実施態様では、ECMと関連するTGFβ活性を阻害することが望ましいと考えられる。したがって、LTBP（例えばLTBP1およびLTBP3）によって提示されるproTGFβに結合して阻害する抗体またはそのフラグメントが、本発明によって包含される。一部の実施態様では、骨髄線維症の治療に適切な抗体またはそのフラグメントは、LRRC33、GARP、LTBP1、LTBP3、またはそれらの任意の組み合わせと関連するもののようなproTGFβ複合体の多数のコンテキストに結合することができるという点で、「コンテキスト寛容」である。一部の実施態様では、そのような抗体は、TGFβ活性化のコンテキスト非依存性阻害剤であり、抗体が、以下の潜在型複合体：LTBP1-proTGFβ、LTBP3-proTGFβ、GARP-proTGFβおよびLRRC33-proTGFβのいずれかに結合して阻害することができるという点で特徴付けられる。一部の実施態様では、そのような抗体は、TGFβの1つを含むそのような潜在型複合体に結合して阻害する（他のアイソフォームではそうではないが）、アイソフォーム特異的な抗体である。これらは、例えば、LTBP1-proTGFβ1、LTBP3-proTGFβ1、GARP-proTGFβ1およびLRRC33-proTGFβ1を含む。一部の実施態様では、そのような抗体は、TGFβの1つまたは複数のアイソフォームに優先的に結合して阻害するアイソフォーム選択的抗体である。コンテキスト寛容またはコンテキスト非依存性の様式でTGFβ1活性化を阻害することのできる抗体は、骨髄線維症の治療における使用に有利であると考えられる。

20

30

【0327】

本明細書に記載の組成物および方法によって治療され得る骨髄増殖性新生物の適切な患者集団は、限定されないが：a) Philadelphia (+)である患者集団；b) Philadelphia (-)である患者集団；c) 「古典的」(PV、ETおよびPMF)に分類される患者集団；d) 突然変異JAK2V617F (+)を保有する患者集団；e) JAK2V617F (-)を保有する患者集団；f) JAK2エクソン12 (+)を有する患者集団；g) MPL (+)を有する患者集団；およびh) CALR (+)を有する患者集団を含んでよい。

40

【0328】

一部の実施態様では、患者集団は、中間-2またはハイリスク骨髄線維症を有する患者を含む。一部の実施態様では、患者集団は、利用可能な治療に難治性である、または候補でない、骨髄線維症を有する患者を含む。一部の実施態様では、対象は、 $100 \sim 200 \times 10^9 / L$ の血小板数を有する。一部の実施態様では、対象は、治療を受ける前に $> 200 \times 10^9 / L$ の血小板数を有する。

【0329】

一部の実施態様では、アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容TGFβ1阻害剤療

50

法を受ける（およびそれを受けることによって利益を受け得る）対象は、中間-1またはより高度の原発性骨髄線維症（PMF）、または後期（post）真性多血症／本態性血小板血症骨髄線維症（後期（post）PV／ETMF）と診断される。一部の実施態様では、対象は、治療前に骨髄線維症と記録されている。一部の実施態様では、対象は、治療前に、ヨーロッパで一致しているグレードスコアによって評価されるMF-2またはそれよりも高く、改変Bauermeisterスケールによってグレード3またはそれよりも高い。一部の実施態様では、対象は、治療前に、1のECOGパフォーマンス状態を有する。一部の実施態様では、対象は、治療前に、5～120の範囲の白血球数（ $10^9/L$ ）を有する。一部の実施態様では、対象は、10～100%の範囲のJAK2V617F対立遺伝子負荷を有する。

10

【0330】

一部の実施態様では、アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容TGFβ1阻害剤療法を受ける（およびそれを受けることによって利益を受け得る）対象は、輸血依存性（治療前）であり、対象は、臨床的に明白な出血と関係しない $8.5 g/dL$ 未満のヘモグロビンレベルのために、最後の月に少なくとも2ユニットの赤血球輸血の経歴を有することで特徴付けられる。

【0331】

一部の実施態様では、アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容TGFβ1阻害剤療法を受ける（およびそれを受けることによって利益を受け得る）対象は、骨髄線維症を治療するための治療を以前に受けた者である。一部の実施態様では、対象は、限定されないが：AZD1480、パノビノスタット、EPO、IFNα、ヒドロキシ尿素、ペグ化インターフェロン、サリドマイド、プレドニゾン、およびJAK2阻害剤（例えば、レスタウルチニブ、CEP-701）を含む1つまたは複数の治療によって治療されている。

20

【0332】

一部の実施態様では、患者は髄外造血を有する。一部の実施態様では、髄外造血は、肝臓、肺、脾臓、および／またはリンパ節におけるものである。一部の実施態様では、本発明の医薬組成物は、疾患兆候の局所的部位の1つまたは複数の局所的に投与される。

【0333】

アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容TGFβ1阻害剤は、骨髄線維症を治療するのに効果的な量で患者に投与される。治療の有効量は、患者における骨髄線維症の1つまたは複数の症候および／または合併症（限定されないが：骨髄間質におけるECMの過剰な沈着、血管新生、骨硬化症、脾腫大、肝腫大（hematomegaly）、貧血、出血、骨の痛み、および他の骨に関する病的状態、髄外造血、血小板増加症、白血球減少症、カヘキシー、感染、血栓および死を含む）を緩和するのに十分な量である。

30

【0334】

一部の実施態様では、量は、患者における（例えば巨核球細胞の）TGFβ1発現および／または分泌を減少させるのに効果的である。そのような阻害剤は、したがって、治療された患者においてTGFβ1 mRNAレベルを減少させ得る。一部の実施態様では、そのような阻害剤は、骨髄において、例えば単核細胞において、TGFβ1 mRNAを減少させる。PMF患者は典型的に、（ELISAによって測定して約600～2,000 pg/mLの正常な範囲と対照的に）約2,500 pg/mLよりも上、例えば、3,000、3,500、4,000、4,500、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、および10,000 pg/mLよりも上の血漿TGFβ1レベルの上昇を示す（例えば、Mascarell et al. (Leukemia & Lymphoma, 2014, 55 (2) : 450-452) を参照）。Zingarillo (Blood, 2013, 121 (17) : 3345-3363) は、PMF患者およびコントロール個体の血漿中の生体活性および合計TGFβ1含有量を定量化した。この参考文献によれば、PMF患者におけるメジアン生体活性TGFβ1は43 ng/mL（4～218 ng/mLの範囲）であり、合計TGFβ1は153 ng/mL（32～1000 ng/mL）であり、一方で、コントロール相対物では、値はそれぞれ18（0

40

50

．05～144）および52（8～860）であった。したがって、これらの報告に基づき、PMF患者における血漿TGFβ1含有量は、コントロールまたは健康な血漿サンプルと比較して、数倍（例えば、2倍、3倍、4倍、5倍など）上昇する。本明細書に記載される、例えば4～12サイクルの投与（例えば、2、4、6、8、10、12サイクル）または慢性または長期の治療（例えば0.1～100mg/kg、例えば1～30mg/kgのモノクローナル抗体の用量で、4週ごと）に続く、阻害剤による治療は、対応するベースライン（治療前）と比較して少なくとも10%、例えば少なくとも15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、および50%、血漿TGFβ1レベルを減少させ得る。

【0335】

一部の治療的効果は、治療の開始後、相対的に急速に、例えば、1週、2週、3週、4週、5週または6週後に、観察され得る。例えば、阻害剤は、1～8週以内に、阻害剤によって治療された患者の骨髄内の幹細胞および／または前駆細胞の数を効果的に増大させ得る。これらは、造血幹細胞および血液前駆細胞を含む。骨髄バイオプシーは、髄質細胞の頻度／数の変化を評価するために行なわれ得る。相応して、患者は、骨の痛みおよび疲労のような症候の改善を示し得る。

【0336】

骨髄線維症の形態学的ハロマークの1つは、骨髄（例えば、髄質間質）内の線維症であり、異常なECMによって部分的に特徴付けられる。一部の実施態様では、量は、例えば間葉間質細胞による、過剰なコラーゲン沈着を減少させるのに効果的である。一部の実施態様では、阻害剤は、治療を受けないコントロール対象と比較して、治療された対象において、CD41陽性細胞（例えば巨核球）の数を減少させるのに効果的である。一部の実施態様では、PMF骨髄内の巨核球のベースライン頻度は、無作為に選択された断面で決定して、PMF脾臓において、平方ミリメートル（mm²）あたり200～700細胞および平方ミリメートル（mm²）あたり40～300巨核球の範囲であってよい。対照的に、正常ドナーの骨髄および脾臓における巨核球頻度は、それぞれ140未満および10未満である。阻害剤による治療は、骨髄および／または脾臓内の巨核球の数（例えば、頻度）を減少させ得る。一部の実施態様では、阻害剤による治療は、SMAD2/3のリン酸化のような下流エフェクターのシグナル伝達のレベルの減少を引き起こし得る。

【0337】

骨髄線維症を有する患者は、肥大した脾臓により悩まされ得る。したがって、治療の臨床効果は、脾臓サイズの変化を監視することによって評価され得る。脾臓サイズは、触診による脾臓長の評価および／または超音波による脾臓体積の評価のような公知技術によって試験され得る。一部の実施態様では、TGFβ1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤によって治療される対象は、触診によって評価すると、5cm以上、例えば、5～30cmの範囲のベースラインの脾臓長（治療前）を有する。一部の実施態様では、TGFβ1のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤によって治療される対象は、超音波によって評価すると、300mL以上、例えば、300～1500mLの範囲のベースラインの脾臓体積（治療前）を有する。本明細書に記載される、例えば4週ごとに、0.1～30mg/kgのモノクローナル抗体の用量での、例えば、4～12サイクル（例えば、2、4、6、8、10、12サイクル）の投与後の、阻害剤による治療は、対象において脾臓サイズを減少させ得る。一部の実施態様では、有効量の阻害剤は、対応するベースラインの値と比較して、阻害剤治療を受ける患者集団において、少なくとも10%、20%、30%、35%、40%、50%、および60%、脾臓サイズを減少させるのに十分である。例えば、治療は、プラセボコントロールと比較して、MRIまたはCTスキャンによって測定すると12～24週においてベースラインから脾臓体積の≥35%減少を達成するのに効果的である。一部の実施態様では、治療は、最良の利用可能な治療のコントロールと比較して、MRIまたはCTスキャンによって測定すると24～48週におけるベースラインから脾臓体積の≥35%減少を達成するのに効果的である。最良の利用可能な治療は、ヒドロキシ尿素、グルココルチコイド、ならびに、非薬剤、

10

20

30

40

50

アナグレリド、エポエチン α 、サリドマイド、レナリドマイド、メルカプトプリン、チオグアニン、ダナゾール、ペグインターフェロン $\alpha-2a$ 、インターフェロン α 、メルファラン、アセチルサリチル酸、シタラビン、およびコルヒチンを含んでよい。

【0338】

一部の実施態様では、本明細書において記載されるもののようなアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容TGF β 1阻害剤によって治療される患者集団は、例えば、International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT) 基準によって測定される統計的に改善された治療応答、治療後（例えば、4、6、8、または12サイクル）に改変Bauermeisterスケールおよびヨーロッパで一致しているグレードシステムによって測定される骨髓線維症グレードにおける変化の度合い、Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF) を用いた症候応答を示す。

10

【0339】

一部の実施態様では、本明細書において記載されるもののようなアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容TGF β 1阻害剤による治療は、例えば、改変Myelofibrosis Symptom Assessment Form (MFSAF) によって評価される統計的に改善された治療応答を達成し、症候は、MFSAFツール（例えばv2.0）、0～10のスケールを用いて骨髓線維症の衰弱性症候（腹部の不快感、早期満腹、左肋骨の下の痛み、掻痒症、寝汗、および骨／筋肉痛）をキャプチャーするdauktダイアリーによって測定されて、ここで0は存在なしであり、10は想像可能な最悪である。一部の実施態様では、治療は、例えば、12～24週以内に、ベースラインから合計MFSAFスコアの50% $\geq$ の減少を達成するのに効果的である。一部の実施態様では、治療を受ける患者の有意なフラクシオンは、プラセボを受ける患者と比較して、Total Symptom Scoreにおいて $\geq$ 50%の改善を達成する。例えば、 $\geq$ 50%の改善を達成する患者プールのフラクシオンは、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%または80%よりも上であってよい。

20

【0340】

一部の実施態様では、治療的有効量の阻害剤は、貧血応答によって評価して、臨床改善を獲得するのに十分な量である。例えば、改善された貧血応答は、4～12サイクル（例えば、6サイクル）の治療後の、輸血非依存性のより長い持続時間（例えば、8週以上）を含んでよい。

30

【0341】

一部の実施態様では、治療的有効量の阻害剤は、永続性のある疾患を、6週間、8週間、12週間、6ヶ月間のような持続時間、維持するのに十分な量である。一部の実施態様では、疾患の進行は、骨髓の全体的な細胞充実性、レチクリンまたはコラーゲン線維症の程度の変化、および／または、JAK2V617F対立遺伝子負荷の変化によって評価され得る。

【0342】

一部の実施態様では、本明細書において記載されるもののようなアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容TGF β 1阻害剤によって治療される患者集団は、治療を受けないコントロール集団と比較して、統計的に改善された生存を示す。例えば、コントロール群では、PMF患者のメジアン生存は、およそ6年（ハイリスク患者ではおよそ16ヶ月）であり、診断後10年以上生存することが期待されるのは患者の20%未満である。本明細書において記載されるもののようなアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容TGF β 1阻害剤による治療は、少なくとも6ヶ月、12ヶ月、18ヶ月、24ヶ月、30ヶ月、36ヶ月、または48ヶ月、生存時間を延長させ得る。一部の実施態様では、治療は、プラセボを受ける患者と比較して、26週、52週、78週、104週、130週、144週、または156週における改善された全生存を達成するのに効果的である。

40

【0343】

50

上記に例示されるもののような治療の臨床利益は、新たな発症の貧血を有するまたは有さない患者において見られ得る。

【0344】

アイソフォーム特異的な、コンテクスト寛容 TGFβ1 阻害剤の有利な特徴の1つは、選択性がない従来の TGFβ 拮抗薬と比較して、アイソフォーム選択性によって可能にされる改善された安全性プロファイルを維持することである。したがって、本明細書において記載されるもののようなアイソフォーム特異的な、コンテクスト寛容阻害剤による治療は、患者集団における有害事象を、そのような事象の頻度および／または重症度に関して、従来の TGFβ 拮抗薬によって治療される同等の患者集団と比較して減少させ得ることが期待される。したがって、アイソフォーム特異的な、コンテクスト寛容 TGFβ1 阻害剤は、治療の用量および／または持続時間に関してより大きな治療的ウィンドウを提供し得る。

10

【0345】

有害事象は、Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) バージョン4のような当該分野で認識される適切な方法によってグレード付けされ得る。GC1008のようなTGFβ拮抗薬を受けたヒト患者において以前に報告された有害事象は：白血球増多症（グレード3）、疲労（グレード3）、低酸素症（グレード3）、心停止（グレード5）、白血球減少症（グレード1）、再発性の、一過的な、触ると痛い（tender）紅斑性、節のある（nodular）皮膚病変、化膿性皮膚炎、および帯状疱疹を含む。

20

【0346】

アイソフォーム特異的な、コンテクスト寛容 TGFβ1 阻害剤療法は、例えば、貧血、血小板減少症、好中球減少、高コレステロール血症、上昇したアラニントランスアミナーゼ（ALT）、上昇したアスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）、打撲傷、眩暈、および頭痛に関して、骨髄線維症患者における JAK 阻害剤療法に比べて、より頻度の低い、および／または、より重症でない、有害事象（副作用）を生じさせ得て、したがって、より安全な治療選択肢を提供する。

【0347】

TGFβ1シグナル伝達の阻害剤は、併用療法として、骨髄線維症の治療のための1つまたは複数の治療とともに用いられ得ると考えられる。一部の実施態様では、本明細書に記載の TGFβ1 活性化の阻害剤は、JAK1 阻害剤、JAK2 阻害剤または JAK1/JAK2 阻害剤を受けている、骨髄線維症を患っている患者に投与される。一部の実施態様では、そのような患者は、JAK1 阻害剤、JAK2 阻害剤または JAK1/JAK2 阻害剤阻害剤療法に対して応答性であり、一方で、他の実施態様では、そのような患者は、JAK1 阻害剤、JAK2 阻害剤または JAK1/JAK2 阻害剤療法に対する応答性が乏しく、または応答性でない。一部の実施態様では、本明細書に記載の TGFβ1 のアイソフォーム特異的な阻害剤の使用は、JAK1 阻害剤、JAK2 阻害剤または JAK1/JAK2 阻害剤療法に対する応答性が乏しい、または応答性でない者を、より応答性にさせ得る。一部の実施態様では、本明細書に記載の TGFβ1 のアイソフォーム特異的な阻害剤の使用は、JAK1 阻害剤、JAK2 阻害剤または JAK1/JAK2 阻害剤の減少した用量を可能にし得て、より少ないまたはより低い程度の薬物関連の毒性または有害事象（例えば上記にあげたもの）であるが同等の臨床有効性を、患者において、それでもなお生じさせる。一部の実施態様では、JAK1 阻害剤、JAK2 阻害剤または JAK1/JAK2 阻害剤阻害剤療法とともに用いられる本明細書に記載の TGFβ1 活性化阻害剤による治療は、相乗または相加的治療的効果を患者において生じさせ得る。一部の実施態様では、本明細書に記載の TGFβ1 活性化阻害剤による治療は、JAK1 阻害剤、JAK2 阻害剤または JAK1/JAK2 阻害剤または骨髄線維症を治療するために与えられる他の治療の利益をブーストし得る。一部の実施態様では、患者は、骨髄線維症と関連する貧血を対処するための治療を追加で受けてよい。

30

40

【0348】

50

癌：

様々な癌が、 $TGF\beta 1$ 活性に関与し、本開示の抗体および／または組成物によって治療され得る。本明細書において用いられる用語「癌」は、周囲組織を侵襲して新たな体の部位へ転移する傾向のある退形成性細胞の激増によって特徴付けられる任意の様々な悪性新生物を指し、そのような悪性腫瘍性の増殖によって特徴付けられる病状も指す。癌は、局所的（例えば、固形腫瘍）または全身的であってよい。本開示の文脈における用語「局所的」（「局所的腫瘍」など）は、全身性疾患とは違い、解剖上単離された、または単離可能な異常（例えば固形悪性腫瘍）を指す。特定の癌、例えば、特定の白血病（例えば、骨髓線維症）および多発性骨髓腫などは、疾患に対して、局所的構成要素（例えば骨髓）および全身的構成要素（例えば循環血液細胞）の両方を有してよい。一部の実施態様では、癌は、全身的（血液学的悪性腫瘍など）であってよい。本開示に従って治療され得る癌は、限定されないが、全てのタイプのリンパ腫／白血病、癌腫および肉腫、例えば、肛門、膀胱、胆管、骨、脳、胸部、頸部、結腸／直腸、子宮内膜、食道、眼、胆嚢、頭頸部、肝臓、腎臓、喉頭、肺、縦隔（胸郭）、口、卵巣、膵臓、ペニス、前立腺、皮膚、小腸、胃、脊椎の髄質、尾てい骨、睾丸、甲状腺および子宮に見られる癌または腫瘍を含む。癌では、 $TGF\beta$ （例えば、 $TGF\beta 1$ ）は、成長促進または増殖阻害のいずれかであってよい。例として、膵癌では、 $SMAD4$ 野生型腫瘍は、 $TGF\beta$ に応答して増殖阻害を経験し得るが、疾患が進行すると、構成的に活性化された II 型受容体が典型的に存在する。加えて、 $SMAD4$ -null 膵癌が存在する。一部の実施態様では、本開示の抗体、その抗原結合部分、および／または組成物は、癌の1つまたは複数の形態において独自に機能する $TGF\beta$ シグナル伝達経路の構成要素を選択的に標的化するように設計される。白血病、または、白血球（white blood cell）（すなわち白血球（leukocyte））の異常な激増によって特徴付けられる血液または骨髓の癌は、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性骨髄性白血病または急性骨髄性白血病（AML）（染色体10および11[t(10;11)]、染色体8および21[t(8;21)]、染色体15および17[t(15;17)]の間の転座、および染色体16内の反転[inv(16)]を有するAML；多系列の形成異常を有するAML（AMLに転換する以前の骨髓異形成症候群（MDS）または骨髓増殖性疾患を有したことがある患者を含む）；AMLおよび骨髓異形成症候群（MDS）（治療関連であり、そのカテゴリーは、以前に化学療法および／または放射線を有したことがあり、その後にAMLまたはMDSを発症する患者を含む）；d）その他の方法で分類されないAML（上記のカテゴリーに入らないAMLのサブタイプを含む）；およびe）曖昧な系統の急性白血病（白血病細胞が骨髄性またはリンパ系細胞のいずれかとして分類され得ない場合または両方のタイプの細胞が存在する場合に生じる）；および慢性骨髄性白血病（CML）を含む、4つの主な分類に分けられ得る。

【0349】

本明細書において記載されるもののような $TGF\beta 1$ のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤は、多発性骨髓腫を治療するために用いられ得る。多発性骨髓腫は、Bリンパ球（例えば、血漿細胞、形質芽球、メモリーB細胞）の癌であり、骨髓において発生して膨張し、破壊的な骨病変（すなわち、溶骨性病変）を生じさせる。典型的に、疾患は、高い破骨細胞骨吸収、抑制された骨芽細胞分化（例えば、分化阻止）、および、損なわれた骨形成、（部分的に、溶骨性病変、骨減少症、骨粗鬆症、高カルシウム血症、ならびに形質細胞腫、血小板減少症、好中球減少および神経障害によって特徴付けられる）を示す。本明細書に記載の $TGF\beta 1$ 選択的な、コンテキスト寛容阻害剤療法は、患者において、1つまたは複数のそのような臨床兆候または症候を寛解させるのに効果的であり得る。 $TGF\beta 1$ 阻害剤は、さらなる治療または本明細書の他のどこかに挙げられるものを含む多発性骨髓腫を治療するための治療を受ける患者に投与されてよい。一部の実施態様では、多発性骨髓腫は、ミオスタチン阻害剤または $IL-6$ 阻害剤と組み合わせて、 $TGF\beta 1$ 阻害剤（例えば、アイソフォーム特異的なコンテキスト寛容阻害剤）によって治療され得る。一部の実施態様では、 $TGF\beta 1$ 阻害剤は、ボルテゾミブ、レナリドマイド

、カーフィルゾミブ、ポマリドマイド、サリドマイド、ドキソルビシン、コルチコステロイド（例えば、デキサメタゾンおよびプレドニゾン）、化学療法（例えば、メルファラン）、放射線療法、幹細胞移植、ブリチデプシン、エロツズマブ、イキサゾミブ、マシチニブ、および／またはパノビノスタットのような、伝統的な多発性骨髄腫治療とともに用いられ得る。

【0350】

本発明の方法によって治療され得る癌腫のタイプは、限定されないが、乳頭腫／癌腫、絨毛癌、内胚葉洞腫瘍、奇形腫、腺腫／腺癌、黒色腫、維腺腫、脂肪腫、平滑筋腫、横紋筋腫、中皮腫、血管腫、骨腫、軟骨腫、神経膠腫、リンパ腫／白血病、扁平上皮細胞癌腫、小細胞癌腫、大細胞未分化癌腫、基底細胞癌および副鼻腔未分化癌腫を含む。

10

【0351】

肉腫のタイプは、限定されないが、軟組織肉腫、例えば、胞巣状軟部肉腫、血管肉腫、皮膚線維肉腫、類腱腫瘍、線維形成性小円形細胞腫瘍、骨外性軟骨肉腫、骨外性骨肉腫、線維肉腫、血管外皮腫、血管肉腫、カポシ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、リンパ肉腫、悪性線維性組織球腫、神経線維肉腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫、およびアスキ腫瘍、ユーイング肉腫（原始神経外胚葉性腫瘍）、悪性血管内皮腫、悪性神経鞘腫、骨肉腫、および軟骨肉腫を含む。

【0352】

本明細書に記載されるもののような、 $TGF\beta 1$ 活性化のアイソフォーム選択的な、コンテキスト寛容／非依存性阻害剤は、神経堤起源の細胞に関与する悪性腫瘍を治療するために適切であり得る。神経堤系統の癌（すなわち、神経堤由来の腫瘍）は、限定されないが：黒色腫（メラニン形成細胞の癌）、神経芽細胞腫（交感神経副腎前駆体の癌）、神経節細胞腫（末梢神経系神経節の癌）、髄質甲状腺癌腫（甲状腺C細胞の癌）、褐色細胞腫（副腎髄質のクロマフィン細胞の癌）、およびMPNST（シュワン細胞の癌）を含む。一部の実施態様では、本開示の抗体および方法は、限定されないが、結腸癌、腎癌、乳癌、悪性黒色腫およびグリア芽腫を含んでよい、1つまたは複数のタイプの癌または癌関連の状態を治療するために用いられ得る（Schlingensiepen et al., 2008; Ouhitt et al., 2013）。

20

【0353】

証拠の増加するラインは、腫瘍／癌進行におけるマクロファージの役割を示唆する。本発明は、TMEのような疾患環境において、これが $TGF\beta 1$ 活性化によって部分的に仲介されるという見解を包含する。骨髄由来単球（例えば、CD11b+）は、腫瘍由来のサイトカイン／ケモカインに応答して腫瘍部位へ動員されて、そこで単球は分化および極性化を受けて、癌促進性表現型（例えば、M2-バイアス、TAMまたはTAM-様細胞）を獲得する。本開示において提供される実施例に示されるように、ヒトPBMCから単離された単球は、マクロファージの異なるサブタイプ、例えば、M1（線維促進性、抗癌）およびM2（癌促進性）へ極性化するように誘導され得る。多くの腫瘍におけるTAMの大部分は、M2-バイアスである。M2様マクロファージの中でも、M1ではなくM2cおよびM2dサブタイプは、細胞表面上に増強されたLRRC33を発現することが見いだされている。さらに、マクロファージは、M-CSF曝露によってさらに歪められ（skewed）、または活性化され得て、LRRC33発現の顕著な増大をもたらし、 $TGF\beta 1$ 発現と一致する。骨髄増殖性疾患（例えば、骨髄線維症）を有する患者における循環M-CSF（すなわち、血清M-CSF濃度）の増大も観察されている。一般に、高いマクロファージを有する腫瘍（TAM）および／またはMDSC浸潤は、予後不良と関連する。同様に、上昇したレベルのM-CSFもまた、予後不良を示す。

30

40

【0354】

上述のように、 $TGF\beta 1$ 活性化のコンテキスト寛容／非依存性阻害剤は、黒色腫の治療に用いられ得る。そのような阻害剤によって治療され得る黒色腫のタイプは、限定されないが：悪性黒子；悪性黒子黒色腫；表在拡大型黒色腫；末端黒子型黒色腫；粘膜黒色腫；結節型黒色腫；ポリープ状黒色腫および線維形成性黒色腫を含む。一部の実施態様では

50

、黒色腫は、転移黒色腫である。

【0355】

最近では、免疫チェックポイント阻害剤は、進行性黒色腫患者を効果的に治療するために用いられている。特に、抗－プログラム死（PD）－1抗体（例えば、ニボルマブおよびペンブロリズマブ）が、今では特定のタイプの癌（例えば進行性黒色腫）に関する治療の標準になっていて、扱いやすい毒性プロファイルとともに重大な活性および持続性の応答を示している。しかしながら、PD－1拮抗薬の効果的な臨床適用は、高率の先天性の耐性によって妨げられて（約60～70%）（Hugo et al. (2016) Cell 165:35–44を参照）、現在進行中のチャレンジが、応答性および耐性の予測因子および患者選択ならびに最適化の組み合わせ戦略の疑問を含み続けることを示す（Perrot et al. (2013) Ann Dermatol 25(2):135–144）。さらに、研究は、抗－PD－1治療に最初に応答した黒色腫患者のおよそ25%が、獲得耐性を最終的に発症することを示唆している（Ribas et al. (2016) JAMA 315:1600–9）。

10

【0356】

PD－1および／またはCTLA－4を発現している腫瘍浸潤CD8＋T細胞の数は、チェックポイント阻害による成功の重要な示度であると考えられて、PD－1およびCTLA－4のブロックの両方とも、浸潤T細胞を増大させ得る。しかしながら、より高いマクロファージ浸潤を有する患者では、CD8細胞の抗癌効果は抑制され得る。

【0357】

骨髄性前駆体、MDS CおよびTAMを含む骨髄性細胞のようなLRRC33発現細胞は、CD4および／またはCD8T細胞のようなT細胞の阻害（例えば、T細胞枯渇）によって免疫抑制環境（例えばTMEおよび骨髄線維性骨髄）を作製または支持し得て、特定の患者集団における観察される抗－PD－1耐性を少なくとも部分的に強調し得ると考えられる。実際に、証拠は、CD8＋細胞傷害性T細胞の蓄積ができないこと、および、低減した（resuced）Teff／Treg比によって、抗－PD－1単剤療法に対する耐性が明らかであったことを示唆する。とりわけ、本発明者らは、LRRC33発現レベルに関して、黒色腫患者集団のような特定の癌患者の間に分岐点が存在することを認識していて：一方の群は高いLRRC33発現を示し（LRRC33^{high}）、一方で、他方の群は、相対的に低いLRRC33発現（LRRC33^{low}）を示す。したがって、本発明は、LRRC33^{high}患者集団は、免疫チェックポイント阻害剤療法に対して応答が乏しいまたは耐性である者を示し得るという見解を含む。したがって、本明細書に記載されるもののようなLRRC33を阻害する薬剤は、チェックポイント阻害剤療法（例えば、抗－PD－1）に対して耐性である黒色腫、リンパ腫、および骨髄増殖性障害のような癌の治療に特に有益であり得る。

20

30

【0358】

一部の実施態様では、癌／腫瘍は、免疫チェックポイント阻害剤に対して本質的に（intrinsically）耐性であり、または非応答性である。一例だが提供すると、特定のリンパ腫は、抗－PD－1治療のような免疫チェックポイント阻害に対する応答性（responsive）が乏しいと考えられる。同様に、黒色腫患者集団のサブセットは、免疫チェックポイント阻害剤に対する耐性を示すことが知られている。特定の理論によって拘束されることを意図せずに、本開示の発明者らは、これはTGFβ1シグナル伝達経路の上方調節に少なくとも部分的に起因し得て、チェックポイント阻害剤がそれらの効果を及ぼすことのできない免疫抑制の微小環境を作り出し得ると考える。TGFβ1阻害は、そのような癌を、チェックポイント阻害剤療法に対してより応答性にさせ得る。免疫チェックポイント阻害剤とTGFβ1阻害剤の組み合わせにより利益を受け得る癌タイプの非限定的な例は、骨髄線維症、黒色腫、腎細胞癌、膀胱癌、結腸癌、血液系悪性腫瘍、非小細胞癌腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、リンパ腫（古典的ホジキンおよび非ホジキン）、頭頸部癌、尿路上皮癌、高い微小サテライト不安定性を有する癌、ミスマッチ修復が欠陥している癌、胃癌、腎癌、および肝細胞癌を含む。しかしながら、例えばバイオプ

40

50

シーによって決定されるように、 $TGF\beta 2/3$ よりも $TGF\beta 1$ が過剰発現されるまたは優勢のアイソフォームである任意の癌（例えば、そのような癌を有する患者）は、本開示に従って $TGF\beta 1$ のアイソフォーム選択的阻害剤によって治療され得る。

【0359】

一部の実施態様では、癌／腫瘍は、経時的に耐性になる。この現象は、獲得耐性または適応耐性と呼ばれる。内因性耐性と同様に、一部の実施態様では、獲得耐性は、 $TGF\beta 1$ 依存性の経路によって少なくとも部分的に仲介されて、本明細書に記載のアイソフォーム特異的な $TGF\beta 1$ 阻害剤は、これらの場合において抗癌免疫を回復するのに効果的であり得る。

【0360】

一部の実施態様では、免疫チェックポイント阻害剤およびLRRC33阻害剤（本明細書に記載されるものなど）を含む併用療法は、そのような癌を治療するのに効果的であり得る。加えて、腫瘍内の高いLRRC33陽性細胞浸潤物、または異常な細胞増殖を有するその他の部位／組織は、宿主免疫抑制および免疫チェックポイント耐性に関するバイオマーカーとしての役割を果たし得る。同様に、エフェクターT細胞は、免疫抑制ニッチによって妨げられ得て、癌と戦う体の能力を制限する。さらに、以下の実施例セクションにおいて説明されるように、GARPによって提示される $TGF\beta 1$ を発現するTregは、エフェクターT細胞の増殖を抑制する。合わせると、 $TGF\beta 1$ は、免疫阻害疾患の微小環境（例えばTME）の発生および維持における主要な駆動体であると考えられて、多数の $TGF\beta 1$ 提示コンテキストは、腫瘍に関連する。一部の実施態様では、併用療法は、より好適なTeff/Treg比を達成し得る。

【0361】

一部の実施態様では、本明細書に記載の、GARP- $TGF\beta 1$ 複合体、LTBP1- $TGF\beta 1$ 複合体、LTBP3- $TGF\beta 1$ 複合体、および／またはLRRC33- $TGF\beta 1$ 複合体に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合部分は、それを必要とする対象において癌を治療するための方法において用いられ得て、前記方法は、抗体、またはその抗原結合部分を、癌が治療されるように対象に投与するステップを含む。特定の実施態様では、癌は結腸癌である。

【0362】

一部の実施態様では、本明細書に記載の、GARP- $TGF\beta 1$ 複合体、LTBP1- $TGF\beta 1$ 複合体、LTBP3- $TGF\beta 1$ 複合体、および／またはLRRC33- $TGF\beta 1$ 複合体に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合部分は、固形腫瘍を治療するための方法において用いられ得る。一部の実施態様では、固形腫瘍は、線維形成性腫瘍であってよく、典型的に高密度であって治療分子が貫通するのが困難である。そのような腫瘍のECM構成要素を標的化することによって、そのような抗体は、高密度の腫瘍組織を「緩め」て崩壊させ得て、治療的アクセスを促進してその抗癌効果を与える。したがって、さらなる治療、例えば任意の公知の抗腫瘍薬物を組み合わせて用いてよい。

【0363】

追加してまたは代替して、本明細書において開示されるもののような、 $TGF\beta 1$ 活性化を阻害することが可能な、アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容抗体または（for）そのフラグメントは、癌と戦うために、癌免疫療法のような細胞に基づく免疫療法として、キメラ抗原受容体T細胞（「CAR-T」）技術とともに用いられ得る。

【0364】

一部の実施態様では、本明細書に記載の、GARP- $TGF\beta 1$ 複合体、LTBP1- $TGF\beta 1$ 複合体、LTBP3- $TGF\beta 1$ 複合体、および／またはLRRC33- $TGF\beta 1$ 複合体に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合部分は、固形腫瘍を有する対象において、固形腫瘍増殖を阻害または低減させるための方法において用いられ得て、前記方法は、固形腫瘍増殖が阻害または低減されるように、対象に、抗体、またはその抗原結合部分を投与するステップを含む。特定の実施態様では、固形腫瘍は、結腸癌腫瘍である。一部の実施態様では、癌を治療するのに有用な抗体、またはその抗原結合部分は、

TGFβ1 活性化のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容阻害剤である。一部の実施態様では、そのような抗体は、GARP-TGFβ1 複合体、LTBP1-TGFβ1 複合体、LTBP3-TGFβ1 複合体、およびLRRC33-TGFβ1 複合体を標的化する。一部の実施態様では、そのような抗体は、GARP-TGFβ1 複合体、LTBP1-TGFβ1 複合体、および、LTBP3-TGFβ1 複合体を標的化する。一部の実施態様では、そのような抗体は、LTBP1-TGFβ1 複合体、LTBP3-TGFβ1 複合体、および、LRRC33-TGFβ1 複合体を標的化する。一部の実施態様では、そのような抗体は、GARP-TGFβ1 複合体およびLRRC33-TGFβ1 複合体を標的化する。

【0365】

本発明は、対象における固形腫瘍を含む癌の治療における、TGFβ1のコンテキスト寛容（コンテキスト非依存性）、アイソフォーム特異的阻害剤の使用を含む。一部の実施態様では、そのようなコンテキスト許容的な（コンテキスト非依存性）、アイソフォーム特異的阻害剤は、TGFβ1の活性を阻害し得る。好ましい実施態様では、そのような活性化阻害剤は、proTGFβ1 複合体に結合する抗体またはその抗原結合部分である。結合は、複合体が、提示分子、例えば、LTBP1、LTBP3、GARPまたはLRRC33のいずれか1つと関連する場合に生じ得て、それにより、複合体からの成熟TGFβ1増殖因子の放出を阻害する。一部の実施態様では、固形腫瘍は、CD8+T細胞で富化された間質を有すること、CAFおよびコラーゲン繊維と直接接触すること、によって特徴づけられる。そのような腫瘍は、抗腫瘍免疫細胞（例えば、エフェクターT細胞）が腫瘍に効果的に浸潤するのを妨げる免疫抑制環境を作り出し得て、癌と戦う体の能力を制限する。その代わりに、そのような細胞は、腫瘍間質内またはその付近に蓄積し得る。これらの特徴は、そのような腫瘍を、免疫チェックポイント阻害剤療法に対する応答を乏しくさせ得る。以下により詳細に述べられるように、本明細書において開示されるTGFβ1阻害剤は、エフェクター細胞が癌細胞に到達して死滅させるのを可能にするように、抑制のブロックを解除し得て、例えば、免疫チェックポイント阻害剤とともに用いられる。

【0366】

TGFβ1は、腫瘍増殖、宿主免疫の抑制、悪性細胞激増、血管分布、血管新生、遊走、侵襲、転移、およびケモ耐性を含む、腫瘍微小環境において多面的な役割を果たすと考えられる。環境におけるTGFβ1提示のそれぞれの「コンテキスト」は、したがって、疾患進行の調節（または調節不全（dysregulation））に参加し得る。例えば、GARP軸は、癌細胞と戦うために宿主免疫応答を仲介するためのエフェクターT細胞応答を調節するTreg応答において特に重要である。LTBP1/3軸は、ECM（間質を含む）を調節し得て、癌関連線維芽細胞（CAF）は、癌の病因および進行において役割を果たす。LRRC33軸は、腫瘍微小環境への循環単球の動員、腫瘍関連マクロファージ（TAM）へのその後の分化、腫瘍組織への浸潤、および、疾患の悪化において、極めて重要な役割を果たし得る。

【0367】

一部の実施態様では、TGFβ1発現細胞は、腫瘍に浸潤して、免疫抑制の局所的環境を作り出す。そのような浸潤が観察される程度は、より悪い予後と相関し得る。一部の実施態様では、より高い浸潤は、免疫チェックポイント阻害剤のような別の癌治療に対する、より低い治療応答を示す。一部の実施態様では、腫瘍微小環境内のTGFβ1発現細胞は、Tregおよび／または骨髄性細胞を含む。一部の実施態様では、骨髄性細胞は、限定されないが：マクロファージ、単球（組織常在または骨髄由来）、およびMDSCを含む。

【0368】

一部の実施態様では、TME内のLRRC33発現細胞は、骨髄系由来サプレッサー細胞（MDSC）である。MDSC浸潤（例えば、固形腫瘍浸潤）は、宿主の抗腫瘍免疫細胞が排除される免疫抑制ニッチを作り出すことによって、免疫回避の少なくとも1つの機構を強調し得る。証拠は、腫瘍関連炎症性因子のような炎症関連シグナルによってMDSC

10

20

30

40

50

Cが動かされることを示唆し、動かされる際に、MDSCは、CD8+T細胞およびNK細胞のような疾患と戦う細胞を害することによって、免疫抑制効果に影響を及ぼし得る。加えて、MDSCは、TGFβおよびIL-10を分泌することによってTregの分化を誘導し得る。したがって、本明細書において記載されるもののような、アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容TGFβ1阻害剤は、疾患（例えば腫瘍）と戦う体の能力を回復またはブーストするために、免疫忌避（例えば、易感染性の免疫監視）を有する患者に投与されてよい。本明細書においてより詳細に説明されるように、これは、癌治療のような別の治療に対する体の反応性または感受性をさらに上昇（例えば、回復または増強）させ得る。

【0369】

一部の実施態様では、患者における循環MDSCの頻度（例えば、数）の上昇は、PD-1拮抗薬およびPD-L1拮抗薬のようなチェックポイントブロック治療に対する乏しい反応性の予測となる。例えば、バイオマーカー試験は、循環する前治療HLA-DR α /CD14+ / CD11b+骨髄系由来サプレッサー細胞（MDSC）が、進行およびより悪いOS（ $p=0.0001$ および 0.0009 ）と関連することを示した。加えて、炎症を起こした頭頸癌腫（HNC）におけるPD-1チェックポイントブロックに対する耐性は、GM-CSFおよび骨髄系由来サプレッサー細胞（MDSC）マーカーの発現と関連する。この観察は、化学療法のようなMDSCを枯渇させる戦略は、抗-PD-1と組み合わせてまたは連続して考慮されるべきであることを示唆した。LRRC33またはLRRC33-TGFβ複合体は、免疫抑制骨髄性細胞上の選択的発現に起因して、癌免疫療法のための新規の標的を示す。したがって、特定の理論によって拘束されることを意図せずに、この複合体の標的化は、患者集団における標準治療のチェックポイント阻害剤治療の有効性を高め得る。

【0370】

したがって、本発明は、固形腫瘍を含む癌の治療のための、本明細書に記載のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容またはコンテキスト非依存性TGFβ1阻害剤の使用を提供する。そのような治療は、少なくとも1つの局所的腫瘍（固形腫瘍）を含む癌と診断された対象に、癌を治療するのに効果的な量で、アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容またはコンテキスト非依存性TGFβ1阻害剤を投与するステップを含む。

【0371】

証拠は、癌進行（例えば、腫瘍激増／増殖、侵襲、血管新生および転移）が、腫瘍-間質相互作用によって少なくとも部分的に駆動され得ることを示唆する。特に、CAFは、様々なサイトカインおよび増殖因子の分泌およびECM再構築によって、このプロセスに寄与し得る。このプロセスに関与する因子は、限定されないが、ストロマ細胞由来因子1（SCD-1）、MMP2、MMP9、MMP3、MMP-13、TNF-α、TGFβ1、VEGF、IL-6、M-CSFを含む。加えて、CAFは、CCL2/MCP-1およびSDF-1/CXCL12のような分泌因子によって、TAMを腫瘍部位へ動員し得る；続いて、pro-TAMニッチ（例えば、ヒアルロン酸が富化された間質領域）が作り出されて、そこにTAMが優先的に付着する。TGFβ1は、筋線維芽細胞様CAFへの正常な線維芽細胞の活性化を促進することが示唆されているので、本明細書に記載されるもののようなアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容またはコンテキスト非依存性TGFβ1阻害剤の投与は、CAFの癌促進活性に対抗するのに効果的であり得る。実際に、本明細書において提供されるデータは、TGFβ1の活性化をブロックするアイソフォーム特異的なコンテキスト非依存性抗体は、UUOによって誘導されるCCL2/MCP-1、α-SMA、FN1およびCOL1のようなマーカー遺伝子の上方調節を阻害し得ることを示唆し、それらは多くの癌にも関与する。

【0372】

特定の実施態様では、本明細書に記載の、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複合体に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合部分は、単独で、または、抗

10

20

30

40

50

ーPD-1抗体（例えば、抗PD-1拮抗薬）のようなさらなる薬剤と組み合わせて、癌または腫瘍を有する対象に投与される。本発明に含まれる他の併用療法は、放射線、または化学療法剤との、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分の投与である。例示的なさらなる薬剤は、限定されないが、PD-1拮抗薬、PDL1拮抗薬、PD-L1またはPDL2融合タンパク質、CTLA4拮抗薬、GITRアゴニスト、抗ICOS抗体、抗ICOSL抗体、抗B7H3抗体、抗B7H4抗体、抗TIM3抗体、抗LAG3抗体、抗OX40抗体、抗CD27抗体、抗CD70抗体、抗CD47抗体、抗41BB抗体、抗PD-1抗体、抗CD20抗体、腫瘍溶解性ウイルス、およびPARP阻害剤を含む。

【0373】

一部の実施態様では、特定の癌タイプまたは患者集団に合う併用療法に関する治療的アプローチの決定または選択は、以下：a) 標準治療の療法が利用可能な癌タイプに関する考察（例えば、免疫療法が承認された適応症（*indication*））；b) 治療耐性の亜集団（*subpopulation*）に関する検討；およびc) 「TGFβ1経路活性」または他の点で少なくとも部分的にTGFβ1依存性（例えば、TGFβ1阻害感受性）である癌／腫瘍に関する検討を含んでよい。例えば、多くの癌サンプルは、例えば、TCGA RNAseq分析によって、TGFβ1が優勢のアイソフォームであることを示す。一部の実施態様では、それぞれの腫瘍タイプ由来のサンプルの50%よりも上（例えば、50%、60%、70%、80%および90%よりも上）は、TGFβ1アイソフォーム発現に関して陽性である。一部の実施態様では、「TGFβ1経路活性」または他の点で少なくとも部分的にTGFβ1依存性（例えば、TGFβ1阻害感受性）である癌／腫瘍は、K-ras、N-rasおよび／またはH-ras内の突然変異のような、少なくとも1つのRas突然変異を含む。一部の実施態様では、癌／腫瘍は、少なくとも1つのK-ras突然変異を含む。

【0374】

一部の実施態様では、アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容TGFβ1阻害剤は、1つまたは複数のチェックポイント阻害剤治療が承認されている癌と診断された患者に、チェックポイント阻害療法とともに投与される。これらは、限定されないが：膀胱尿路上皮癌腫、扁平上皮細胞癌腫（例えば頭頸）、腎臓明細胞癌腫、腎臓乳頭細胞癌腫、肝臓肝細胞癌腫、肺腺癌、皮膚の皮膚黒色腫、および胃腺癌を含む。好ましい実施態様では、そのような患者は、チェックポイント阻害剤療法に対して応答が乏しく、または応答しない。

【0375】

筋骨格状態におけるTGFβの役割：

骨格の骨、筋肉、軟骨、腱、靱帯、関節、および、組織と臓器と一緒に支持して結合する他の結合組織からなる筋骨格系では、TGFβは、激増および分化の阻害、萎縮の誘導、および線維症の進行を含む、様々な役割を果たす。TGFβは、サテライト細胞激増を減少させて、分化を妨げる（MyoDおよびミオゲニンの阻害を介する）（Allen, R. E. and L. K. J. *Cell Physiol*, 1987. 133 (3) : p. 567-72; Brennan, T. J., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991. 88 (9) : p. 3822-6; Massague, J., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986. 83 (21) : p. 8206-10; Olson, E. N., et al., *J Cell Biol*, 1986. 103 (5) : p. 1799-805)。TGFβのアイソフォーム（すなわち、TGFβ1、2、または3）は、これらの初期の論文では特定されていないが、TGFβ1であると推定される。TGFβはまた、筋線維症にも寄与し；組み換えTGFβ1の直接注入は骨格筋線維症をもたらし、pan-TGFβ阻害は、急性および慢性的に負傷した筋肉における線維症を低減させる（Li, Y., et al., *Am J Pathol*, 2004. 164 (3) : p. 1007-19; Mendias, C. L., et al., *Muscle Nerve*, 2012. 45 (1) : p. 55-9; Nelso

n, C. A., et al., *Am J Pathol*, 2011. 178 (6) : p. 2611-21)。TGF β 1は、骨格筋内で、筋線維、マクロファージ、制御性T細胞、線維芽細胞、および線維細胞によって発現されて (Li, Y., et al., *Am J Pathol*, 2004. 164 (3) : p. 1007-19; Lemos, D. R., et al., *Nat Med*, 2015. 21 (7) : p. 786-94; Villalta, S. A., et al., *Sci Transl Med*, 2014. 6 (258) : p. 258ra142; Wang, X., et al., *J Immunol*, 2016. 197 (12) : p. 4750-4761) ; 発現は、負傷時および疾患中に増大する (Li, Y., et al., *Am J Pathol*, 2004. 164 (3) : p. 1007-19; Nelson, C. A., et al., *Am J Pathol*, 2011. 178 (6) : p. 2611-21; Bernasconi, P., et al., *J Clin Invest*, 1995. 96 (2) : p. 1137-44; Ishitobi, M., et al., *Neuroreport*, 2000. 11 (18) : p. 4033-5)。TGF β 2およびTGF β 3もmdx筋肉中で上方調節されるが (mRNAレベル)、TGF β 1よりも低い程度である (Nelson, C. A., et al., *Am J Pathol*, 2011. 178 (6) : p. 2611-21; Zhou, L., et al., *Neuromuscul Disord*, 2006. 16 (1) : p. 32-8)。Pessinaらは最近、系統追跡実験を用いて、ジストロフィー筋内の多数の起源の細胞が、TGF β 依存性経路を介して線維形成の宿命を採用することを示した (Pessina, P., et al., *Stem Cell Reports*, 2015. 4 (6) : p. 1046-60)。

【0376】

骨は、体内のTGF β の最も大きな貯蔵所である。実際に、TGF β 経路は、骨芽細胞の分化および／または破骨細胞の骨吸収を調節することによって少なくとも部分的に骨の恒常性および再構築において重要な役割を果たすと考えられる。このプロセスは、正常および異常な状況の両方に関与し、それは、調節不全になると、骨に関連する状態および癌のような疾患を引き起こし得て、または悪化させ得る。したがって、本明細書に記載のもののようなTGF β 1選択的阻害剤は、そのような状態を治療するために用いられ得る。一部の実施態様では、そのような阻害剤の投与は、骨形成－再吸収バランスを回復または標準化するために効果的である。一部の実施態様では、TGF β 1阻害剤は、ミオスタチン阻害剤および／または骨増強剤のような別の治療とともに、併用療法として対象に投与される。

【0377】

骨の状態 (例えば、骨格の疾患) は、骨粗鬆症、形成異常および骨癌を含む。骨で始まる原発性の骨癌に加えて、多くの悪性腫瘍は骨に転移することが知られ；これらは、限定されないが、乳癌、肺癌 (例えば、扁平上皮細胞癌腫)、甲状腺癌、精巣癌、腎細胞癌、前立腺癌、および多発性骨髄腫を含む。

【0378】

一部の実施態様では、そのような状態は、筋力低下と関連する。

【0379】

TGF β 1は、ヒト筋ジストロフィーのような影響を受けた組織の慢性炎症を伴う線維性状態において役割を果たし得る。デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、重度の、進行性で、最終的に致命的な疾患であり、ジストロフィンの不存在によって引き起こされる (Bushby, K., et al., *Lancet Neurol*, 2010. 9 (1) : p. 77-93)。ジストロフィン欠如は、収縮によって誘導される負傷に対する増大した感受性をもたらし、継続的な筋肉の変性を導く (Petrof, B. J., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993. 90 (8) : p. 3710-4; Dellorusso, C., et al., *J Muscle Res Cell Motil*, 2001. 22 (5) : p. 467-75; Pratt, S. J., et al., *Cell Mol Life Sci*, 2015. 72 (1) : p. 1

53-64)。何回もの修復の繰り返しは、慢性の炎症、線維症、サテライト細胞プールの枯渇、可動性の結局の喪失および死に寄与する (Bushby, K., et al., *Lancet Neurol*, 2010. 9 (1) : p. 77-93; McDonald, C. M., et al., *Muscle Nerve*, 2013. 48 (3) : p. 343-56)。TGF β 1の発現は、DMDを有する患者において有意に増大し、これらの患者において観察される線維症の程度と相関する (Bernasconi, P., et al., *J Clin Invest*, 1995. 96 (2) : p. 1137-44; Chen, Y. W., et al., *Neurology*, 2005. 65 (6) : p. 826-34)。過剰なECM沈着は、筋肉の収縮特性に対して有害な効果を有し、筋線維がそれらの血液供給から単離されると、栄養に対するアクセスを制限し得る (Klingler, W., et al., *Acta Myol*, 2012. 31 (3) : p. 184-95)。最近では、さらなるデータは、筋ジストロフィーにおいてさらに関連付けられたTGF β 1を有する。LTBP4における変異は、マウスおよびヒトにおいて疾患重症度を改変することが見いだされている。マウスでは、LTBP4の変異は、ジストロフィンまたは γ -サルコグリカンに欠損したマウスにおいて保護的である (Coley, W. D., et al., *Hum Mol Genet*, 2016. 25 (1) : p. 130-45; Heydemann, A., et al., *J Clin Invest*, 2009. 119 (12) : p. 3703-12)。ヒトでは、DMDにおいてLTBP4の変異を保護的であるとして独立に同定された2つの群は、歩行の喪失を数年遅らせる (Flanigan, K. M., et al., *Ann Neurol*, 2013. 73 (4) : p. 481-8; van den Bergen, J. C., et al., *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2015. 86 (10) : p. 1060-5)。マウスとヒトでの遺伝子変異の性質は異なるが、両方の種において、保護的変異は、TGF β シグナル伝達の低減をもたらす (Heydemann, A., et al., *J Clin Invest*, 2009. 119 (12) : p. 3703-12; Ceco, E., et al., *Sci Transl Med*, 2014. 6 (259) : p. 259ra144)。骨格筋生物学におけるTGF β 1の機能の多くは、精製された活性の増殖因子が動物中に注入されてまたは培地中の細胞に添加される実験から、推測されている (Massague, J., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986. 83 (21) : p. 8206-10; Li, Y., et al., *Am J Pathol*, 2004. 164 (3) : p. 1007-19; Mendias, C. L., et al., *Muscle Nerve*, 2012. 45 (1) : p. 55-9)。TGF β 1の特定の機能に関する細胞状況の重要性を考慮すれば (例えば、Hink et al., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*, 2016. 8 (12) を参照)、これらの実験において観察される効果の一部は、インビボでのサイトカインの内因性の役割 (単数または複数) を反映しない可能性がある。例えば、組み換えTGF β 1、ミオスタチン、またはGDF11によるヒト真皮線維芽細胞の治療は、これらの細胞における遺伝子発現においてほぼ同一の変化をもたらすが、インビボでは、これらのタンパク質の役割はかなり異なる (Tanner, J. W., Khalil, A., Hill, J., Franti, M., MacDonnell, S. M., *Growth Differentiation Factor 11 Potentiates Myofibroblast Activation, in Fibrosis: From Basic Mechanisms to Targeted therapies*. 2016: Keystone, CO)。

【0380】

多数の研究者は、インビボでの増殖因子の役割を解明するためにTGF β の阻害剤を用いている。pan-TGF β 中和抗体1D11によるmdxマウスの治療は、線維症の減少 (組織学およびヒドロキシプロリン含有量による)、筋肉損傷の減少 (減少した血清クレアチンキナーゼおよびより大きな筋線維密度)、および、筋肉機能の改善 (プレチスモグラフィー、単離されたEDL筋肉の力発生、および前肢握力の増大による) を明らかに

もたらす (Nelson, C. A., et al., Am J Pathol, 2011. 178 (6) : p. 2611-21; Andreetta, F., et al., J Neuroimmunol, 2006. 175 (1-2) : p. 77-86; Gumucio, J. P., et al., J Appl Physiol (1985), 2013. 115 (4) : p. 539-45)。加えて、ドミナントネガティブのTGFβ II型受容体の筋線維特異的な発現は、δ-サルコグリカン-/-マウスにおいて、心臓毒の負傷後の筋肉損傷に対して保護する (Accornero, F., et al., Hum Mol Genet, 2014. 23 (25) : p. 6903-15)。プロテオグリカンであるデコリンは、骨格筋に大量にあり、TGFβ活性を阻害して、mdxマウスにおいて筋線維症およびその後の裂傷負傷を低減させる (Li, Y., et al., Mol Ther, 2007. 15 (9) : p. 1616-22; Gosselin, L. E., et al., Muscle Nerve, 2004. 30 (5) : p. 645-53)。TGFβ阻害活性を有する他の分子、例えばスラミン (抗新生物剤) およびロサルタン (アンジオテンシン受容体ブロッカー) は、負傷、マルファン症候群、および筋ジストロフィーのマウスモデルにおいて、筋肉病理の改善および線維症の減少に効果的であった (Spurney, C. F., et al., J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011. 16 (1) : p. 87-95; Taniguti, A. P., et al., Muscle Nerve, 2011. 43 (1) : p. 82-7; Bedair, H. S., et al., Am J Sports Med, 2008. 36 (8) : p. 1548-54; Cohn, R. D., et al., Nat Med, 2007. 13 (2) : p. 204-10)。上述の治療剤の全ては、TGFβ1またはそのシグナル伝達を阻害するが、それらのいずれも、TGFβ1アイソフォームに関して特異的ではない。例えば、1D11は、TGFβ1、2、および3アイソフォームに結合して阻害する (Dasch, J. R., et al., J Immunol, 1989. 142 (5) : p. 1536-41)。スラミンは、多数の増殖因子が、TGFβ1に加えてPDGF、FGF、およびEGFを含むそれらの受容体に結合する能力を阻害する (Hosang, M., J Cell Biochem, 1985. 29 (3) : p. 265-73; Olivier, S., et al., Eur J Cancer, 1990. 26 (8) : p. 867-71; Scher, H. I. and W. D. Heston, Cancer Treat Res, 1992. 59 : p. 131-51)。デコリンはまた、直接結合およびホリスタチン (ミオスタチン阻害剤) の上方調節の両方によって、ミオスタチン活性を阻害する (Miura, T., et al., Biochem Biophys Res Commun, 2006. 340 (2) : p. 675-80; Brandan, E., C. Cabello-Verrugio, and C. Vial, matrix Biol, 2008. 27 (8) : p. 700-8; Zhu, J., et al., J Biol Chem, 2007. 282 (35) : p. 25852-63)。ロサルタンは、IGF-1/AKT/mTOR経路を含むレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系に対するその効果を介してさらなるシグナル伝達経路に影響を及ぼす (Burks, T. N., et al., Sci Transl, Med, 2011. 3 (82) : p. 82ra37; Sabharwal, R. and M. W. Chapleau, Exp Physiol, 2014. 99 (4) : p. 627-31; McIntyre, M., et al., Pharmacol Ther, 1997. 74 (2) : p. 181-94)。したがって、これらの治療は全て、それらの治療的効果、ならびに毒性に寄与し得るさらなる分子を阻害する。

【0381】

筋肉の恒常性、修復、および再生におけるTGFβの仮定される役割を考慮すると、TGFβ1シグナル伝達を選択的に調整する本明細書に記載のモノクローナル抗体のような薬剤は、現在までに開発された、より幅広く作用するTGFβ阻害剤と関連する毒性を伴わずに、例えば、慢性/遺伝子筋ジストロフィーおよび急性筋肉損傷において、損傷した筋線維を治療するのに効果的であり得る。

【0382】

したがって、本発明は、インビボでTGFβ効果の全てではないがサブセットを優先的に調整する試薬を用いて、損傷した筋線維を治療するための方法を提供する。そのような薬剤は、TGFβ1シグナル伝達を選択的に調整することができる（「アイソフォーム特異的な調整」）。

【0383】

慢性筋肉疾患における筋線維修復：

本発明は、線維症を制限して筋肉形態および機能の正常化に寄与することによって、DMD患者における筋肉の質および機能を改善するための方法を包含する。TGFβ1は筋形成も阻害するので、TGFβ1のブロックは、ジストロフィー筋における再生を促進し得て、さらなる治療的利益を加える。TGFβ1阻害剤は、Exondys 51（エテプリルセン）のようなジストロフィン上方調節治療と組み合わせて用いられ得る。筋ジストロフィーにおけるTGFβ1阻害の潜在的な治療的利益を考慮すると、（1）TGFβ1の役割（単数または複数）をTGFβ2およびTGFβ3のものから区別すること、および（2）どの分子コンテキスト（単数または複数）において、TGFβ1阻害が最も有益であるか明らかにすることが重要である。上述のとおり、pan-TGFβ阻害剤は、重大な毒性と関連していて、これらの化合物の臨床使用を制限する（Anderton, M. J., et al., *Toxicol Pathol*, 2011. 39 (6) : p. 916-24; Stauber, A., et al., *Clinical Toxicology*, 2014. 4 (3) : p. 1-10)。TGFβアイソフォーム（単数または複数）のどれが、これらの毒性を引き起こすのか明らかでない。一部の記載された毒性は、免疫系におけるTGFβ1阻害に起因し得る。例えば、1D11は、横隔膜において線維症のレベルを有意に減少させたが、治療は筋肉内のCD4+およびCD8+T細胞の数も増大させて、pan-TGFβ阻害の際の炎症性応答の増大を示唆し、長期の治療によって有害であり得る（Andreetta, F., et al., *J Neuroimmunol*, 2006. 175 (1-2) : p. 77-86)。実際に、筋肉からのT細胞の枯渇は、mdxマウスの筋肉病理を改善させて、T細胞によって仲介される炎症性応答がジストロフィー筋に有害であることを示唆する（Spencer, M. J., et al., *Clin Immunol*, 2001. 98 (2) : p. 235-43)。1D11投与の際のT細胞の数の増大は、制御性T (Treg) 細胞に対するTGFβ1の効果に起因すると考えられる。Tregは、GARPを介してそれらの細胞表面上にTGFβ1を提示し、この複合体からのTGFβ1の放出は、Treg抑制活性を高めて、したがって、T細胞が仲介する炎症を制限する（Wang, R., et al., *Mol Biol Cell*, 2012. 23 (6) : p. 1129-39; Edwards, J. P., A. M. Thornton, and E. M. Shevach, *J Immunol*, 2014. 193 (6) : p. 2843-9; Nakamura, K., et al., *J Immunol*, 2004. 172 (2) : p. 834-42; Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *J Exp Med*, 2001. 194 (5) : p. 629-44)。実際に、PC61抗体を用いたTregの枯渇は、mdxマウスの横隔膜における炎症および筋肉損傷の増大をもたらしたが、一方で、Treg数および活性の増大は、筋肉損傷を減少させた（Villalta, S. A., et al., *Sci Transl Med*, 2014. 6 (258) : p. 258ra142)。興味深いことに、免疫抑制T細胞のさらなる集団（Tr1細胞）が、最近になって同定されている。これらの細胞は、大量のTGFβ3を生産し、それは、それらの抑制活性に必要である（Gagliani, N., et al., *Nat Med*, 2013. 19 (6) : p. 739-46; Okamura, T., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009. 106 (33) : p. 13974-9; Okamura, T., et al., *Nat Commun*, 2015. 6 : p. 6329)。骨格筋におけるTr1細胞の役割は知られていないが、1D11によるTGFβ1およびTGFβ3の両方の阻害は、TregおよびTr1細胞の両方を阻害することによって相加的な炎症促

10

20

30

40

50

進性効果を有し得る可能性がある。

【0384】

TGFβ1 潜在性および活性化に関する上述の構造的な洞察は、TGFβ1 の活性化を特異的に標的化する薬物発見に対する新規のアプローチを可能にする (Shi, M., et al., Nature, 2011. 474 (7351) : p. 343-9)。3つの成熟TGFβ増殖因子の間で共有される高度の配列同一性は、潜在型複合体によって共有されず、proTGFβ1に対して精巧に特異的である抗体の発見を可能にする。抗体発見のための独占アプローチを用いて、本発明者らは、proTGFβ1に特異的に結合する抗体 (Ab1、Ab2およびAb3) を同定している (例えば図4Bを参照)。インビトロ共培養系を用いて、これらの抗体は、インテグリンが介在するTGFβ1の放出を阻害することが示された。この系では、ヒト皮膚またはマウス骨格筋から採取された線維芽細胞は、潜在型TGFβ1の由来であり、αVβ6を発現している細胞株は、活性TGFβ1の放出を可能にし、それはそれから、SMAD2/3応答性ルシフェラーゼレポーターを発現している第三の細胞株を用いて測定される (図7G~7H)。これらの抗体の1つ、Ab1は、インビボで試験されていて、腎臓線維症のUUO (片側尿管閉塞) マウスモデルにおいて有効性が示されている。このモデルでは、9mg/kg/週のAb1によるマウス (n=10) の治療は、TGFβ1応答性遺伝子の上方調節を妨げて (図12A~12J)、負傷後の線維症の程度を減少させた (ピクロシリウスレッド染色による) (図12K)。TGFβ1特異的な治療は、pan-TGFβ阻害剤と比較して、改善された有効性および安全性プロファイルを有し得て、DMD集団内のように長期に用いられる治療に関する決定的な態様である。TGFβ1阻害抗体は、特異的なTGFβ1阻害がDMDまたは他の筋肉疾患に関する治療として潜在性を有するかどうか決定するため、および骨格筋再生におけるTGFβ1の役割を明らかにするため用いられ得る。

【0385】

急性に対する慢性の筋線維損傷および最適な治療の選択：

通常は、急性の負傷 (例えば、それ以外の点では健康な筋肉または運動ニューロンに対する外傷性負傷) 後に筋肉を再生するが、炎症性マクロファージの最初の浸潤は、損傷した組織を除去してサテライト細胞の活性化に必要な因子 (例えば、サイトカイン) を分泌するために必要であると考えられる。続いて、これらの細胞は、M2表現型にスイッチして、創傷解決を駆動する。

【0386】

対照的に、DMDを含む疾患のような慢性の状態では、炎症促進性マクロファージが全ての時点において優勢であり、M2へのそのスイッチは発生せず (または少なくとも、十分に効率的でない)、炎症促進性マクロファージは、炎症および筋肉損傷を駆動し続ける。DMDでは、NFκB経路は永続的に活性であり、構成的な炎症をもたらす。したがって、一部の実施態様では、NFκB阻害剤は、慢性の炎症を減少させるためにDMD患者へ投与され得る。

【0387】

したがって、DMDのような慢性の状態では、治療的焦点は、筋肉再生とは逆に筋肉修復に当てられ得る。これは、DMD筋線維は欠損しているが破壊されてなく—それらは膜内の裂け目、カルシウムトランジェント (transient) の調節不全、およびマクロファージからのROS損傷によって損傷しているからである。これと比べて、健康な筋肉に対する損傷の場合は、治療的焦点は再生に当てられ得る。例えば、心臓毒モデルでは、筋線維は死滅し、再生されなければならない。これは、圧挫負傷のような外傷性負傷後の回復プロセスを模擬する。

【0388】

証拠は、LRRc33が、チオグリコレートによって誘導される腹膜マクロファージにおいて発現されることを示唆し、それは、M2様表現型 (高レベルのアルギナーゼを発現する、iNOSを発現しない (no iNOS)、および、高レベルのCD206を発現することで特徴付けられる) を有する。

【0389】

L R R C 3 3 が主に M 2 細胞上に発現されて、T G F β 1 のその提示（「コンテキスト」）が、これらの細胞の創傷治癒促進の効果に重要である状況では、L R R C 3 3 が介在する T G F β 1 を活性化して、修復および／または筋形成を促進することが有益であり得る。一方で、L R R C 3 3 が炎症促進性 M 1 細胞上にも発現される状況では、特に D M D のようなジストロフィー状況において炎症が線維症を駆動することを考慮すると、L R R C 3 3 が介在する T G F β 1 を阻害することが有益であり得る。したがって、疾患関連 T G F β 1 の由来／コンテキストの同定は、T G F β シグナル伝達の適切なモジュレーターの選択において重要なステップであり得て、どのレベルの選択性を考慮すべきかについて情報を与える（例えば、アイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容 T G F β 1 モジュレーター、または、コンテキスト特異的な T G F β 1 モジュレーター；T G F β 1 阻害剤またはアクチベーターなど）。

10

【0390】

慢性の炎症とは別に、D M D のハロマークは、過剰で進行性の線維症である。進行性疾患では、線維症はとても重症なので、個々の筋線維をそれらの血液供給から実際に単離することができる。それはまた、筋肉の収縮特性も変える。ヒト患者では、T G F β 1 上方調節の程度と線維症の間に強い相関、および、線維症の程度と負の可動性の成果の間の強いリンクがある。したがって、一部の実施態様では、L T B P - p r o T G F β 1 阻害剤は、疾患における E C M 関連の T G F β 1 効果を選択的に標的化するために、線維症の予防および／または減少のためにジストロフィー患者に投与され得る。一部の実施態様では、本明細書に記載の、様々なアイソフォームおよび／またはコンテキスト選択的薬剤は、T G F β 1 シグナル伝達の阻害を達成して、線維症を防止して筋形成を促進するために用いられ得るが、（例えば、G A R P または L R R C 3 3 を通して）免疫系に対して不要な効果を有さない。

20

【0391】

治療、投与

本明細書に開示される方法を実行するために、有効量の上述の医薬組成物は、例えばボーラスとして適切な経路（例えば静脈内投与）を介して、または、長年にわたる連続的なインフュージョンによって、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、関節滑液嚢内、髄腔内、経口、吸入または局所経路により、治療を必要とする対象（例えばヒト）に投与され得る。ジェット噴霧器および超音波噴霧器を含む、液体製剤のための市販される噴霧器が、投与に有用である。液体製剤は、直接噴霧されてよく、凍結乾燥された粉末は、再構成後に噴霧されてよい。あるいは、G A R P - T G F β 1 複合体、L T B P 1 - T G F β 1 複合体、L T B P 3 - T G F β 1 複合体、および／または L R R C 3 3 - T G F β 1 複合体に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合部分は、フッ化炭素製剤および定量吸入器を用いてエアロゾル化されてよく、または、凍結乾燥および製粉された粉末として吸入されてよい。

30

【0392】

本明細書に記載の方法によって治療される対象は、哺乳類、より好ましくはヒトであってよい。哺乳類は、限定されないが、家畜、競技動物、ペット、霊長類、ウマ、イヌ、ネコ、マウスおよびラットを含む。治療が必要なヒト対象は、上記に記載したもののような T G F β 関連の徴候を有する、そのリスクがある、または有する疑いがある、ヒト患者であってよい。T G F β 関連の徴候を有する対象は、日常的な医学的検査、例えば、検査試験、臓器機能性試験、C T スキャン、または超音波によって同定され得る。任意のそのような徴候を有する疑いがある対象は、徴候の 1 つまたは複数の症候を示す。徴候に関するリスクがある対象は、その徴候に関する 1 つまたは複数の危険因子を有する対象であり得る。

40

【0393】

本明細書において用いられる用語「有効量」および「効果的な投与量」は、その意図される目的（単数または複数）、すなわち、許容できる利益／リスク比で、組織または対象

50

において所望の生物学的または医学的応答を満たすのに、十分な化合物または組成物の任意の量または投与量を指す。例えば、本発明の特定の実施態様では、意図される目的は、 $TGF\beta-1$ 阻害と関連する臨床的に意義のある成果を達成するために、インビボで $TGF\beta-1$ 活性化を阻害することであり得る。有効量は、当業者に認識されるように、治療される特定の状態、状態の重症度、年齢、健康状態、サイズ、性別および体重を含む個々の患者パラメーター、治療の持続時間、同時的な治療の性質（ある場合）、特定の投与経路、および、健全な熟練者の知識及び経験内の同様の因子に応じて変化する。これらの因子は当業者によく知られていて、ルーチン実験を超えない範囲内で対処され得る。個々の構成要素またはその組み合わせの最大投与量、すなわち、十分な医学的判断に従って最高の安全投与量が用いられることが一般に好ましい。しかしながら、医学的理由、心理的理由または実質的に任意の他の理由のために、患者が、より低い投与量または許容できる投与量を要求してよいことを、当業者は理解している。

10

【0394】

半減期のような経験的考察は、一般に、用量の決定に寄与する。例えば、ヒト化抗体または完全なヒト抗体のようなヒト免疫系と適合する抗体は、抗体の半減期を延長させるため、および抗体が宿主の免疫系によって攻撃されるのを防ぐために用いられ得る。投与頻度は、治療工程にわたって決定および調節されてよく、一般に、必ずしもではないが、 $TGF\beta$ 関連の徴候の治療および／または抑制および／または寛解および／または遅延に基づく。あるいは、 $GARP-TGF\beta 1$ 複合体、 $LTBP1-TGF\beta 1$ 複合体、 $LTBP3-TGF\beta 1$ 複合体、および／または $LRRC33-TGF\beta 1$ 複合体に特異的に結合する抗体の維持された連続的な放出製剤が適切であり得る。徐放性を達成するための様々な製剤およびデバイスが当業者に明らかであり、本開示の範囲内である。

20

【0395】

一例では、本明細書に記載の、 $GARP-TGF\beta 1$ 複合体、 $LTBP1-TGF\beta 1$ 複合体、 $LTBP3-TGF\beta 1$ 複合体、および／または $LRRC33-TGF\beta 1$ 複合体に特異的に結合する抗体に関する用量は、抗体の1または複数の投与（単数または複数）が与えられている個体において経験的に決定され得る。個体は、徐々に増加する用量の拮抗薬を与えられる。有効性を評価するために、 $TGF\beta$ 関連の徴候の指標がフォローされてよい。例えば、筋線維損傷、筋線維修復、筋肉における炎症レベル、および／または筋肉における線維症レベルについて測定するための方法は、当業者によく知られている。

30

【0396】

本発明は、アイソフォーム特異的な様式で $TGF\beta$ の活性化ステップを調整することのできる薬剤が、薬品として用いられた場合に改善された安全プロファイルを提供し得るという認識を包含する。したがって、本発明は、 $TGF\beta 1$ に特異的に結合してその活性化を阻害するが、 $TGF\beta 2$ または $TGF\beta 3$ ではそうでない抗体およびその抗原結合フラグメントを含み、それにより、不要な副作用が $TGF\beta 2$ および／または $TGF\beta 3$ シグナル伝達に影響を及ぼすのを最小限にしながら、インビボでの $TGF\beta 1$ シグナル伝達の特異的な阻害を与える。

【0397】

一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分は、対象に投与された場合に毒性でない。一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分は、 $TGF\beta 1$ および $TGF\beta 2$ の両方に特異的に結合する抗体と比較して、対象に投与された場合に減少した毒性を示す。一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分は、 $TGF\beta 1$ および $TGF\beta 3$ の両方に特異的に結合する抗体と比較して、対象に投与された場合に減少した毒性を示す。一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分は、 $TGF\beta 1$ 、 $TGF\beta 2$ および $TGF\beta 3$ に特異的に結合する抗体と比較して、対象に投与された場合に減少した毒性を示す。

40

【0398】

一般に、本明細書に記載の任意の抗体の投与のために、最初の候補用量は、約 2 mg/kg であってよい。本開示の目的に関して、典型的な日々の用量は、上述した因子に応じ

50

て、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ まで $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ まで $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ まで $3 \text{mg}/\text{kg}$ まで、 $30 \text{mg}/\text{kg}$ まで $100 \text{mg}/\text{kg}$ まで、またはそれよりも上のいずれかの範囲である。数日またはそれよりも長くにわたる繰り返し投与に関して、状態に応じて、治療は、症候の所望の抑制が生じるまで、または、 $\text{TGF}\beta$ 関連の徴候、またはその症候を緩和するのに十分な治療的レベルが達成されるまで、維持される。例示的な投与レジメンは、約 $2 \text{mg}/\text{kg}$ の最初の投与量を投与するステップを含み、その後、約 $1 \text{mg}/\text{kg}$ の抗体の投与量を一週間維持し、または、隔週で約 $1 \text{mg}/\text{kg}$ の投与量を維持する。しかしながら、熟練者が達成を望む薬物動態の衰退のパターンに応じて、他の投与レジメンが有用であり得る。例えば、1週間に1～4回の投与が検討される。一部の実施態様では、約 $3 \mu\text{g}/\text{mg}$ ～約 $2 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲（例えば、約 $3 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、約 $10 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、約 $30 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、約 $100 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、約 $300 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、約 $1 \text{mg}/\text{kg}$ 、および約 $2 \text{mg}/\text{kg}$ ）の投与が用いられてよい。薬物動態実験は、本明細書において開示される抗体（例えば、Ab2）の血清濃度が、前臨床動物モデル（例えば、マウスモデル）に対する投与後、少なくとも7日間安定したままであることを示している。任意の特定の理論によって拘束されることを望まずに、この投与後の安定性は、抗体が投与される対象（例えばヒト対象）において臨床的に効果的な血清濃度を維持しながら、抗体がより低い頻度で投与され得るので、有利であり得る。一部の実施態様では、投与頻度は、1週毎、2週毎、4週毎、5週毎、6週毎、7週毎、8週毎、9週毎、または10週毎に1回；または1ヶ月毎、2ヶ月毎、または3ヶ月毎、またはそれよりも長くに1回である。この治療の進行は、従来の技術およびアッセイによって簡単に監視される。投与レジメン（用いられる抗体を含む）は、経時的に変化してよい。

【0399】

一部の実施態様では、正常体重の成人患者について、約 $0.3 \sim 5.00 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲の投与量が投与され得る。特定の投与レジメン、例えば、投与量、タイミングおよび反復は、特定の個体およびその個体の病歴、ならびに個々の薬剤の特性（例えば、薬剤の半減期、および他の関連のある考慮）に依存する。

【0400】

本開示の目的のために、 $\text{GARP-TGF}\beta 1$ 複合体、 $\text{LTBP1-TGF}\beta 1$ 複合体、 $\text{LTBP3-TGF}\beta 1$ 複合体、および／または $\text{LRRC33-TGF}\beta 1$ 複合体に特異的に結合する抗体の適切な用量は、用いられる特異的な抗体（またはその組成）、徴候のタイプおよび重症度、予防または治療目的のために抗体が投与されるかどうか、以前の治療、患者の病歴および拮抗薬に対する応答、および主治医の裁量に依存する。一部の実施態様では、臨床医は、 $\text{GARP-TGF}\beta 1$ 複合体、 $\text{LTBP1-TGF}\beta 1$ 複合体、 $\text{LTBP3-TGF}\beta 1$ 複合体、および／または $\text{LRRC33-TGF}\beta 1$ 複合体に特異的に結合する抗体を、所望の結果を達成する用量に到達するまで投与する。 $\text{GARP-TGF}\beta 1$ 複合体、 $\text{LTBP1-TGF}\beta 1$ 複合体、 $\text{LTBP3-TGF}\beta 1$ 複合体、および／または $\text{LRRC33-TGF}\beta 1$ 複合体に特異的に結合する抗体の投与は、例えば、レシピエントの生理学的状態、投与の目的が治療的または予防的であるかどうか、および、技術のある熟練者に公知の他の因子に依存して、連続的なまたは断続的であり得る。 $\text{GARP-TGF}\beta 1$ 複合体、 $\text{LTBP1-TGF}\beta 1$ 複合体、 $\text{LTBP3-TGF}\beta 1$ 複合体、および／または $\text{LRRC33-TGF}\beta 1$ 複合体に特異的に結合する抗体の投与は、事前に選択された期間にわたって本質的に連続的であってよく、または、例えば、 $\text{TGF}\beta$ 関連の徴候の発生前、発生中、または発生後、一連の間隔があいた投与量であってよい。

【0401】

本明細書において用いられる用語「治療」は、徴候、徴候の症候、または徴候に向かう体質を、治療する（cure）、治癒する（heal）、緩和する（alleviate）、解放する（relieve）、変更する（alter）、修復する（remedy）、寛解させる（ameliorate）、改善する（improve）、または影響を及ぼす（affect）目的での、 $\text{TGF}\beta$ 関連の徴候、徴候の症候、または徴候に向かう体質を有する対象への、1つまたは複数の活性の薬剤を含む組成物の適用または投与を指

す。

【0402】

GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複合体に特異的に結合する抗体を用いてTGFβ関連の徴候を緩和するステップは、徴候の発生または進行を遅延させるステップ、または、徴候の重症度を減少させるステップを含む。徴候を緩和させるステップは、治療的な結果を必ずしも必要としない。本明細書において用いられる、TGFβ関連の徴候と関連する徴候の発生の「遅延」は、徴候の進行を、延ばす(defer)、妨げる(hinder)、遅らせる(slow)、妨害する(retard)、安定化させる(stabilize)、および／または、延期する(postpone)ことを意味する。この遅延は、治療される徴候および／または個体の経歴に応じて、時間の長さが変化してよい。徴候の発生を「遅延させる」または「緩和する」方法、または、徴候の発症を遅延させる方法は、その方法を用いない場合に比べて、所定の時間枠内で徴候の1つまたは複数の症候が発生する可能性を減少させる、および／または、所定の時間枠内で症候の程度を減少させる方法である。そのような比較は典型的に、統計的に有意な結果を与えるのに十分多くの対象を用いて、臨床試験に基づく。

10

【0403】

DBA2/Jマウスは、LTBP4対立遺伝子内に40bpの欠失を有する。潜在型TGFβ1が関連するECMの調節不全は、Ab1が結合するエピトープを露出させ得る。Ab1が結合するエピトープが露出する疾患が存在し得て、これらの疾患は、TGFβ1阻害が示される場合、Ab1に関する治療的機會であり得る。

20

【0404】

併用療法

本開示は、インビボでTGFβ阻害によって利益を受け得る対象を治療するための併用療法として用いられる、医薬組成物および関連方法をさらに包含する。任意のこれらの実施態様では、そのような対象は、少なくとも1つのTGFβ阻害剤、例えば、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合部分を含む第一の組成物を、同一または重複する疾患または臨床状態を治療することが意図される少なくとも1つのさらなる治療を含む第二の組成物とともに含む、併用療法を受け得る。第一および第二の組成物は両方とも、同一の細胞標的、または別個の細胞標的に対して作用し得る。一部の実施態様では、第一および第二の組成物は、疾患または臨床状態の症候または態様の同一または重複するセットを治療または緩和し得る。一部の実施態様では、第一および第二の組成物は、疾患または臨床状態の症候または態様の別個のセットを治療または緩和し得る。一例であるが提供すると、第一の組成物は、TGFβシグナル伝達と関連する疾患または状態を治療し得て、一方で、第二の組成物は、同一の疾患と関連する炎症または線維症などを治療し得る。そのような併用療法は、互いとともに投与されてよい。併用療法の文脈における語句「とともに」は、第一の治療の治療的効果が、併用療法を受ける対象において、第二の治療の治療的効果と時間的および／または空間的に重複することを意味する。したがって、併用療法は、同時的な投与のための単一製剤、または治療の連続的投与のための別個の製剤として、処方され得る。

30

40

【0405】

好ましい実施態様では、併用療法は、疾患の治療において相乗効果を生じる。用語「相乗」は、凝集体でのそれぞれの単剤療法の相加的效果よりも大きな効果(例えば、より大きな有効性)を指す。

【0406】

一部の実施態様では、本明細書に記載の医薬組成物を含む併用療法は、別の治療(例えば、第二の薬剤の単剤療法)によって生じるものと全体的に同等であるが、第二の薬剤の単剤療法と比較して、第二の薬剤と関連するより少ない不要な副作用またはより低い重度の毒性と関連する有効性を生じる。一部の実施態様では、そのような併用療法は、より少ない用量の第二の薬剤を可能にするが、全体的な有効性を維持する。そのような併用療法

50

は、長期の治療が是認される、および／または、小児科の患者を含む患者集団に、特に適切であり得る。

【0407】

したがって、本発明は、本明細書に記載の、TGFβ1タンパク質活性化の減少のための併用療法での使用のための医薬組成物および方法、および、TGFβ1シグナル伝達と関連する疾患または状態の治療または予防を提供する。したがって、当該方法または医薬組成物は、第二の治療をさらに含む。一部の実施態様では、第二の治療は、TGFβ1シグナル伝達と関連する疾患または状態を治療または予防するのに有用であり得る。第二の治療は、標的の疾患と関連する少なくとも1つの症候（単数または複数）を低下または治療し得る。第一および第二の治療は、同様または関係のない作用機序によってそれらの生物学的効果を及ぼし得る；または、第一および第二の治療の一方または両方は、作用機序の多様性によってそれらの生物学的効果を及ぼし得る。

10

【0408】

本明細書に記載の医薬組成物は、それぞれの記載される実施態様に関して、同一の薬学的に許容できる担体または異なる薬学的に許容できる担体中に、第一および第二の治療を有してよいことが理解されるべきである。第一および第二の治療は、記載される実施態様において、同時に、または連続して投与されてよいことが、さらに理解されるべきである。

【0409】

本発明の1つまたは複数の抗-TGFβ抗体、またはその抗原結合部分は、1つまたは複数のさらなる治療的薬剤と組み合わせて用いられてよい。本発明の抗-TGFβ抗体とともに用いられ得るさらなる治療的薬剤の例は、限定されないが：TGFβスーパーファミリーのメンバーのモジュレーター、例えば、ミオスタチン阻害剤およびGDF11阻害剤；VEGFアゴニスト；IGF1アゴニスト；FXRアゴニスト；CCR2阻害剤；CCR5阻害剤；デュアルCCR2／CCR5阻害剤；リジロキシダーゼ様2阻害剤；ASK1阻害剤；アセチル-CoAカルボキシラーゼ（ACC）阻害剤；p38キナーゼ阻害剤；ピルフェニドン；ニンテダニブ；M-CSF阻害剤（例えば、M-CSF受容体拮抗薬およびM-CSF中和剤）；MAPK阻害剤（例えば、Erk阻害剤）、免疫チェックポイントアゴニストまたは拮抗薬；IL-11拮抗薬；およびIL-6拮抗薬などを含む。TGFβ阻害剤とともに用いられ得るさらなる治療的薬剤の他の例は、限定されないが、インドールアミン2，3-ジオキシゲナーゼ（IDO）阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、Ser／Thrキナーゼ阻害剤、デュアル特異的キナーゼ阻害剤を含む。一部の実施態様では、そのような薬剤は、PI3K阻害剤、PKC阻害剤、またはJAK阻害剤であってよい。

20

【0410】

一部の実施態様では、さらなる薬剤は、チェックポイント阻害剤である。一部の実施態様では、さらなる薬剤は、PD-1拮抗薬、PDL1拮抗薬、PD-L1またはPDL2融合タンパク質、CTLA4拮抗薬、GITRアゴニスト、抗-ICOS抗体、抗-ICOSL抗体、抗-B7H3抗体、抗-B7H4抗体、抗-TIM3抗体、抗-LAG3抗体、抗-OX40抗体、抗-CD27抗体、抗-CD70抗体、抗-CD47抗体、抗-41BB抗体、抗-PD-1抗体、腫瘍溶解性ウイルス、およびPARP阻害剤からなる群より選択される。

30

40

【0411】

一部の実施態様では、さらなる薬剤は、阻害同時刺激分子および活性化同時刺激分子のような、T細胞同時刺激分子に結合する。一部の実施態様では、さらなる薬剤は、抗-CD40抗体、抗-CD38抗体、抗-KIR抗体、抗-CD33抗体、抗-CD137抗体、および抗-CD74抗体からなる群より選択される。

【0412】

一部の実施態様では、さらなる治療は、放射線である。一部の実施態様では、さらなる薬剤は、化学療法剤である。一部の実施態様では、化学療法剤は、タキソールである。一部の実施態様では、さらなる薬剤は、抗-炎症性薬剤である。一部の実施態様では、さら

50

なる薬剤は、単球／マクロファージ動員および／または組織浸潤のプロセスを阻害する。一部の実施態様では、さらなる薬剤は、肝星細胞活性化の阻害剤である。一部の実施態様では、さらなる薬剤は、ケモカイン受容体拮抗薬、例えば、CCR2拮抗薬およびCCR5拮抗薬である。一部の実施態様では、そのようなケモカイン受容体拮抗薬は、デュアル特異的拮抗薬、例えば、CCR2／CCR5拮抗薬である。一部の実施態様では、併用療法として投与されるさらなる薬剤は、増殖因子のTGFβスーパーファミリーのメンバーまたはそのレギュレーターであり、またはそれを含む。一部の実施態様では、そのような薬剤は、GDF8／ミオスタチンおよびGDF11のモジュレーター（例えば、阻害剤およびアクチベーター）から選択される。一部の実施態様では、そのような薬剤は、GDF8／ミオスタチンシグナル伝達の阻害剤である。一部の実施態様では、そのような薬剤は、前駆体／潜在型ミオスタチン複合体に特異的に結合して、ミオスタチンの活性化をブロックする、モノクローナル抗体である。一部の実施態様では、前駆体／潜在型ミオスタチン複合体に特異的に結合して、ミオスタチンの活性化をブロックするモノクローナル抗体は、フリーの成熟ミオスタチンに結合しない。

【0413】

一部の実施態様では、さらなる治療は、CAR-T療法を含む。

【0414】

そのような併用療法は、より低い用量の、投与される治療的薬剤を有利に利用し得て、したがって、様々な単剤療法と関連する、あり得る毒性または合併症を回避する。一部の実施態様では、本明細書に記載のTGFβ1のアイソフォーム特異的阻害剤の使用は、治療（例えば、標準治療）に対する応答性が乏しい、または応答性でない者を、より応答性にさせ得る。一部の実施態様では、本明細書に記載のTGFβ1のアイソフォーム特異的阻害剤の使用は、治療（例えば、標準治療）の用量の減少を可能にし得て、より少ないまたはより低い程度の薬物に関する毒性または有害事象であるが患者において同等の臨床有効性をなおも生じさせる。

【0415】

TGFβ1活性の阻害

本開示の方法は、1つまたは複数の生体系においてTGFβ1増殖因子活性を阻害する方法を含む。そのような方法は、本開示の抗体および／または組成物と、1つまたは複数の生体系を接触させるステップを含んでよい。場合によっては、これらの方法は、生体系（例えば細胞ニッチまたは対象）における、フリーの増殖因子のレベルを改変するステップを含む。そのような方法による抗体および／または組成物は、限定されないが生体分子を含んでよく、制限されないが、本明細書に記載の組み換えタンパク質、タンパク質複合体および／または抗体、またはその抗原部分を含む。

【0416】

一部の実施態様では、本開示の方法は、増殖因子活性を減少または低下させるために用いられてよく、本明細書において、「阻害する方法」と呼ばれる。一部のそのような方法は、TGFβ複合体（例えば、GARP、LTBP1、LTBP3および／またはLRRC33と複合体化されたTGFβ1）における成熟増殖因子の保持、および／または、TGFβ複合体への増殖因子の再会合の促進を含んでよい。場合によっては、阻害する方法は、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複合体に特異的に結合する抗体の使用を含んでよい。一部の阻害する方法によれば、1つまたは複数の阻害抗体が提供される。

【0417】

一部の実施態様では、本開示の抗体、その抗原結合部分、および組成物は、TGFβ1活性化を阻害するために用いられてよい。一部の実施態様では、GARP-TGFβ1複合体、LTBP1-TGFβ1複合体、LTBP3-TGFβ1複合体、および／またはLRRC33-TGFβ1複合体を、本明細書に記載の抗体、その抗原結合部分、または医薬組成物に曝露するステップを含む、TGFβ1活性化を阻害するための方法が本明細

書において提供される。一部の実施態様では、抗体、その抗原結合部分、または医薬組成物は、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体からの、成熟TGF β 1の放出を阻害する。一部の実施態様では、当該方法はインビトロで行なわれる。一部の実施態様では、当該方法はインビボで行なわれる。一部の実施態様では、当該方法はエクスピボで行なわれる。

【0418】

一部の実施態様では、GARP-TGF β 1複合体またはLRRC33-TGF β 1複合体は、細胞の外側表面に存在する。

【0419】

一部の実施態様では、GARP-TGF β 1複合体またはLRRC33-TGF β 1複合体を発現している細胞は、T細胞、線維芽細胞、筋線維芽細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、抗原提示細胞、好中球、骨髄系由来サブレッサー細胞(MDSC)、リンパ球、肥満細胞、またはミクログリアである。T細胞は、制御性T細胞(例えば、免疫抑制T細胞)であってよい。好中球(neutrophil)は、活性化された好中球であってよい。マクロファージは、線維促進性および／または腫瘍関連マクロファージ(TAM)、例えば、M2cサブタイプおよびM2dサブタイプマクロファージを含む、活性化(例えば、極性化)マクロファージであってよい。一部の実施態様では、マクロファージは、腫瘍由来因子(例えば、サイトカイン、増殖因子など)に曝されて、マクロファージ内で癌促進性表現型をさらに誘導し得る。一部の実施態様では、そのような腫瘍由来因子は、CSF-1/M-CSFである。

【0420】

一部の実施態様では、GARP-TGF β 1複合体またはLRRC33-TGF β 1複合体を発現している細胞は、癌細胞、例えば、循環癌細胞および腫瘍細胞である。

【0421】

一部の実施態様では、LTBP1-TGF β 1複合体またはLTBP3-TGF β 1複合体は、細胞外マトリックス(すなわち、ECMの構成要素)に結合される。一部の実施態様では、細胞外マトリックスは、フィブリンおよび／またはフィブロネクチンを含む。一部の実施態様では、細胞外マトリックスは、RGDモチーフを含むタンパク質を含む。

【0422】

LRRC33は、選択的な細胞型、特に、単球およびマクロファージを含む骨髄性系列のものにおいて発現される。骨髄内の前駆細胞由来の単球は、血流中を循環して末梢組織に到達する。循環する単球はそれから、組織の中へ遊走することができて、サイトカインおよびケモカインのような様々な因子のパネルを含む局所環境(例えば、組織特異的、疾患関連など)に曝されるようになり、マクロファージ、樹状細胞などへの単球の分化をトリガーする。これらは、例えば、肺内の肺泡マクロファージ、骨髄内の破骨細胞、CNS内のミクログリア、結合組織内の組織球、肝臓内のクッパー細胞、および褐色脂肪組織内の褐色脂肪組織マクロファージを含む。固形腫瘍では、浸潤マクロファージは、腫瘍関連マクロファージ(TAM)、腫瘍関連好中球(TAN)、および骨髄系由来サブレッサー細胞(MDSC)などであってよい。そのようなマクロファージは、活性化された線維芽細胞、例えば癌腫関連(または癌関連)線維芽細胞(CAF)および／または間質を活性化して、および／または、それらと関連し得る。したがって、LRRC33含有複合体からの成熟TGF β 1の放出を阻害する本明細書に記載のTGF β 1活性化の阻害剤は、細胞表面上にLRRC33-proTGF β 1を発現している任意の細胞を標的化することができる。

【0423】

一部の実施態様では、LRRC33-TGF β 1複合体は、線維促進性(M2様)マクロファージの外側表面に存在する。一部の実施態様では、線維促進性(M2様)マクロファージは、線維性微小環境内に存在する。一部の実施態様では、線維促進性(M2様)マクロファージの外側表面におけるLRRC33-TGF β 1複合体の標的化は、LTBP

10

20

30

40

50

1-TGF β 1および／またはLTBP1-TGF β 1複合体を単に標的化すると比較して、優れた効果を提供する。一部の実施態様では、M2様マクロファージは、M2cおよびM2d TAM様マクロファージのような、示差的表現型 (phenotype) を有する多数のサブタイプにさらに分極化される。一部の実施態様では、マクロファージは、限定されないがTGF β 1、CCL2 (MCP-1)、CCL22、SDF-1/CXCL12、M-CSF (CSF-1)、IL-6、IL-8、IL-10、IL-11、CXCR4、VEGF、PDGF、プロスタグランジン調節薬、例えば、アラキドン酸およびシクロオキシゲナーゼ2 (COX-2)、副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP)、RUNX2、HIF1 α 、およびメタロプロテイナーゼを含む、腫瘍微小環境内に存在する様々な因子 (例えば、増殖因子、ケモカイン、サイトカインおよびECM再構築分子) によって活性化され得る。1つまたは複数のそのような因子に対する曝露は、単球／マクロファージを、腫瘍促進性表現型へさらに駆動し得る。次々に、これらの活性化された腫瘍関連細胞は、腫瘍促進性細胞、例えば、CAF、TAN、MDSCなどへの、他の細胞の動員および／または分化も促進し得る。間質細胞はまた、マクロファージ活性化にも反応し得て、ECM再構築、および最終的に、血管新生、侵襲、および転移に影響を及ぼし得る。

10

【0424】

一部の実施態様では、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体は、細胞外マトリックスに結合される。一部の実施態様では、細胞外マトリックスは、フィブリリンを含む。一部の実施態様では、細胞外マトリックスは、RGDモチーフを含むタンパク質を含む。

20

【0425】

一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、その抗原結合部分、または医薬組成物を、対象に投与するステップを含む、対象におけるTGF β 1タンパク質活性化を減少させる方法が本明細書において提供されて、それにより、対象におけるTGF β 1タンパク質活性化を減少させる。一部の実施態様では、対象は、線維症を有する、または有するリスクがある。一部の実施態様では、対象は、癌を有する、または有するリスクがある。一部の実施態様では、対象は、認知症を有する、または有するリスクがある。

【0426】

一部の実施態様では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合部分は、制御性T細胞 (Treg) の抑制活性を減少させる。

30

【0427】

TGF β 関連の徴候と関連する疾患／障害の緩和での使用のためのキット

本開示はまた、TGF β 関連の徴候と関連する疾患／障害の緩和での使用のためのキットも提供する。そのようなキットは、本明細書に記載の任意のもののような、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合部分を含む、1つまたは複数のコンテナを含んでよい。

【0428】

一部の実施態様では、キットは、本明細書に記載の任意の方法に従った使用のための説明書を含んでよい。含まれる説明書は、本明細書に記載されるもののような標的疾患を治療、発症遅延、または緩和するための、GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β 1複合体、および／またはLRRC33-TGF β 1複合体に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合部分の投与の説明を含んでよい。キットは、治療に適切な個体を、その個体が標的疾患を有するかどうかの同定に基づき選択する説明をさらに含んでよい。さらに他の実施態様では、説明書は、標的疾患のリスクがある個体への、抗体、またはその抗原結合部分の投与の説明を含む。

40

【0429】

GARP-TGF β 1複合体、LTBP1-TGF β 1複合体、LTBP3-TGF β

50

1 複合体、および／または L R R C 3 3 - T G F β 1 複合体に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合部分の使用に関する説明書は、一般に、意図される治療のための、用量、投与スケジュール、および投与経路に関する情報を含む。コンテナは、単位用量、バルクパッケージ（例えば、複数投与パッケージ）またはサブ単位用量であってよい。本開示のキットにおいて供給される説明書は、典型的に、ラベルまたは添付文書（例えば、キット内に含まれるペーパーシート）上の文書の説明書であるが、機械可読な説明書（例えば、磁気または光保存ディスク上に保有された説明書）も許容できる。

【0430】

ラベルまたは添付文書は、組成物が、T G F β 関連の徴候と関連する疾患または障害を治療、発症遅延、および／または、軽減するために用いられることを示す。説明書は、本明細書に記載の任意の方法を実施するために提供され得る。

【0431】

本開示のキットは、適切なパッケージ内である。適切なパッケージは、制限されないが、バイアル、ボトル、ジャー、フレキシブルパッケージ（例えば、密封マイラまたはプラスチックバッグ）などを含む。特定のデバイス、例えば、吸入器、経鼻投与デバイス（例えば、噴霧器）またはミニポンプのようなインフュージョンデバイスと組み合わせた使用のためのパッケージも検討される。キットは、滅菌アクセスポートを有してよい（例えば、コンテナは、皮下注入針によって突き刺すことが可能なストッパーを有するバイアルまたは静脈内溶液バッグであってよい）。コンテナは、滅菌アクセスポートを有してもよい（例えば、コンテナは、皮下注入針によって突き刺すことが可能なストッパーを有するバイアルまたは静脈内溶液バッグであってよい）。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、本明細書に記載されるもののような、G A R P - T G F β 1 複合体、L T B P 1 - T G F β 1 複合体、L T B P 3 - T G F β 1 複合体、および／または L R R C 3 3 - T G F β 1 複合体に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合部分である。

【0432】

キットは、バッファーおよび解釈上の情報のような、さらなる構成要素を任意選択で提供してもよい。通常キットは、コンテナ、および、コンテナ上のまたはそれと関連するラベルまたは添付文書（単数または複数）を含む。一部の実施態様では、本開示は、上述のキットの内容を含む製造物を提供する。

【0433】

G A R P - T G F β 1 複合体、L T B P 1 - T G F β 1 複合体、L T B P 3 - T G F β 1 複合体、および／または L R R C 3 3 - T G F β 1 複合体を検出するためのアッセイ

一部の実施態様では、本明細書において提供される方法および組成物は、対象から得られたサンプル中の、G A R P - T G F β 1 複合体、L T B P 1 - T G F β 1 複合体、L T B P 3 - T G F β 1 複合体、および／または L R R C 3 3 - T G F β 1 複合体を検出するための方法に関する。本明細書において用いられる「対象」は、個々の生物、例えば、個々の哺乳類を指す。一部の実施態様では、対象はヒトである。一部の実施態様では、対象は非ヒト哺乳類である。一部の実施態様では、対象は非ヒト霊長類である。一部の実施態様では、対象は齧歯類である。一部の実施態様では、対象は、ヒツジ、ヤギ、ウシ、家禽、ネコ、またはイヌである。一部の実施態様では、対象は、脊椎動物、両生類、爬虫類、魚類、昆虫、ハエ、または線虫である。一部の実施態様では、対象は研究動物である。一部の実施態様では、対象は、遺伝学的に操作された、例えば、遺伝学的に操作された非ヒト対象である。対象は、いずれかの性別および発生の任意の段階であってよい。一部の実施態様では、対象は患者または健常者である。

【0434】

一部の実施態様では、対象から得られたサンプル中の、G A R P - T G F β 1 複合体、L T B P 1 - T G F β 1 複合体、L T B P 3 - T G F β 1 複合体、および／または L R R C 3 3 - T G F β 1 複合体を検出する方法は、（a）サンプルを、G A R P - T G F β 1 複合体、L T B P 1 - T G F β 1 複合体、L T B P 3 - T G F β 1 複合体、および／または L R R C 3 3 - T G F β 1 複合体と特異的に結合する抗体と、抗原に対する抗体

の結合に適切な条件下で接触させるステップ（抗原がサンプル中に存在するならば、それによって結合複合体を形成する）；および、（b）抗原に結合した抗体のレベルを決定するステップ（例えば、結合複合体のレベルを決定するステップ）を含む。

【0435】

一実施態様では、表面上に固定化されたビオチン化潜在型TGFβ1複合体を利用するスクリーニングアッセイは、テザーを提供することによって、インテグリンによる潜在型TGFβの活性化を可能にする。他には、非インテグリンアクチベーターもまた、そのシステムにおいて試験され得る。読み出しは、レポーター細胞または他のTGFβ依存性細胞の応答を通してなされ得る。

【0436】

TGFβ活性化を測定するための、細胞に基づくアッセイ

TGFβの活性化（および、抗体のようなTGFβ試験阻害剤によるその阻害）は、当技術分野で知られている任意の適切な方法によって測定され得る。例えば、インテグリンが介在するTGFβの活性化は、本明細書においてより詳細に説明される、「CAGA12」ルシフェラーゼアッセイのような細胞に基づくアッセイにおいて使用され得る。示されるように、そのようなアッセイ系は、以下の構成要素：i) TGFβの由来（組み換え、内因性またはトランスフェクト）；ii) インテグリンのようなアクチベーターの由来（組み換え、内因性、またはトランスフェクト）；およびiii) TGFβ活性化に応答するレポーター系、例えば、TGFβに対して応答可能なTGFβ受容体を発現して、読み取り可能なアウトプット（例えば、CAGA12細胞または他のレポーター細胞株におけるルシフェラーゼ活性）にシグナルを翻訳する細胞を含んでよい。一部の実施態様では、レポーター細胞株は、TGFβ応答性プロモーター（例えば、PAI-1プロモーター）の制御下のレポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子）を含む。一部の実施態様では、感受性を与える特定のプロモーターエレメントは、レポーター系の中に取り込まれてよい。一部の実施態様では、そのようなプロモーターエレメントは、CAGA12エレメントである。アッセイで用いられ得るレポーター細胞株は、例えば、Abel et al. (1994) Anal Biochem. 216 (2) : 276-84に記載されていて、参照により本明細書中に援用される。一部の実施態様では、前述のアッセイ構成要素のそれぞれは、同一由来（例えば、同一細胞）から提供される。一部の実施態様では、前述のアッセイ構成要素の2つは同一由来から提供されて、3つめのアッセイ構成要素は異なる由来から提供される。一部の実施態様では、全ての3つのアッセイ構成要素は異なる由来から提供される。例えば、一部の実施態様では、インテグリンおよび潜在型TGFβ複合体（proTGFβおよび提示分子）は、同一由来（例えば、同一のトランスフェクト細胞株）から、アッセイのために提供される。一部の実施態様では、インテグリンおよびTGFβは、別個の由来（例えば、2つの異なる細胞株、精製されたインテグリンおよびトランスフェクトされた細胞の組み合わせ）から、アッセイのために提供される。アッセイ構成要素の1つまたは複数の由来として細胞が用いられる場合、アッセイのそのような構成要素は、細胞に内因性であってよく、細胞において安定して発現されてよく、一時的にトランスフェクトされてよく、またはそれらの任意の組み合わせであってよい。抗体Ab1およびAb2を用いた、GARP-proTGFβ1複合体またはLRRC33-proTGFβ1複合体のいずれかの阻害を示すTGFβ活性化の測定のための細胞に基づくアッセイの非限定的な例示的な実施態様による結果が、本明細書に開示される。この例示的なアッセイでは、GARP-TGFβ1複合体に関するAb1のIC50 (μg/mL) は0.445であり、LRRC33-TGFβ1複合体に関するAb1のIC50 (μg/mL) は1.325であった。

【0437】

当業者は、そのようなアッセイを、様々な適切な構成に容易に適用することができる。例えば、TGFβの様々な由来が検討され得る。一部の実施態様では、TGFβの由来は、TGFβを発現して沈着する細胞である（例えば、一次細胞、繁殖細胞、不死化細胞または細胞株など）。一部の実施態様では、TGFβの由来は、適切な手段を用いてアッセ

10

20

30

40

50

イ系内に固定化された、精製および／または組み換え TGFβ である。一部の実施態様では、アッセイ系内に固定化された TGFβ は、脱細胞とともにまたは伴わずに、アッセイプレート上の細胞外マトリックス (ECM) 組成物内に提示されて、それは、線維芽細胞由来の TGFβ を模倣する。一部の実施態様では、TGFβ は、アッセイに用いられる細胞の細胞表面上に提示される。加えて、選択の提示分子は、アッセイ系内に含まれてよく、適切な潜在型 TGFβ 複合体を提供する。当業者は、どの提示分子 (単数または複数) が特定の細胞または細胞型において存在または発現され得るか、容易に決定することができる。そのようなアッセイ系を用いて、試験薬剤 (例えば抗体) の存在または不存在における TGFβ 活性化の相対的变化が容易に測定されて、インビトロで TGFβ 活性化に対する試験薬剤の効果を評価し得る。例示的な細胞に基づくアッセイによるデータは、以下の実施例セクションに提供される。

10

【0438】

そのような細胞に基づくアッセイは、試験される TGFβ アイソフォーム、潜在型複合体 (例えば提示分子) のタイプなどに応じて、多くの方法において改変または仕立てられ得る。一部の実施態様では、TGFβ を活性化することが可能なインテグリンを発現することが知られる細胞は、アッセイにおいてインテグリンの由来として用いられ得る。そのような細胞は、SW480/β6 細胞 (例えば、クローン 1E7) を含む。一部の実施態様では、インテグリン発現細胞は、目的の提示分子 (例えば、GARP、LRR33、LTBP (例えば、LTBP1 または LTBP3) など) をコードするプラスミドおよび目的の TGFβ アイソフォーム (例えば proTGFβ1) のプロ形態をコードするプラスミドによって、共トランスフェクトされ得る。トランスフェクション後に、細胞は、トランスフェクトされた遺伝子の発現を可能にするのに十分な時間 (例えば、約 24 時間) インキュベートされて、細胞は洗浄されて、試験薬剤 (例えば、抗体) の段階希釈とともにインキュベートされる。それから、レポーター細胞株 (例えば、CAGA12 細胞) がアッセイ系に加えられて、TGFβ シグナル伝達を可能にするために適切なインキュベーション時間が続けられる。試験薬剤の添加に続いて、インキュベーション期間 (例えば、約 18~20 時間) の後、シグナル/読み出し (例えば、ルシフェラーゼ活性) が、適切な手段を用いて検出される (例えば、ルシフェラーゼ発現レポーター細胞株に関して、Bright-Glo 試薬 (Promega) が用いられ得る)。一部の実施態様では、ルシフェラーゼ蛍光は、オートゲイン設定によって Biotek (Synergy H1) プレートリーダーを用いて検出され得る。

20

30

【0439】

細胞に基づく TGFβ アッセイの代表的な結果を、本明細書において図 7 に提供する。データは、本発明の例示的な抗体が、コンテキスト非依存性の様式で TGFβ1 の活性化を選択的に阻害することのできることを示す。

【0440】

核酸

一部の実施態様では、本開示の抗体、その抗原結合部分、および／または組成物は、核酸分子によってコードされ得る。そのような核酸分子は、制限されずに、DNA 分子、RNA 分子、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、mRNA 分子、ベクター、プラスミドなどを含む。一部の実施態様では、本開示は、本開示の化合物および／または組成物をコードする核酸分子を発現するようにプログラムまたは生産された細胞を含んでよい。場合によっては、本開示の核酸は、コドン最適化核酸を含む。コドン最適化核酸を生産する方法は当技術分野で知られていて、限定されないが、米国特許番号 5,786,464 および 6,114,148 に記載されるものを含んでよく、それぞれの内容は、それらの全体で参照により本明細書中に援用される。

40

【0441】

本発明は、以下の実施例によってさらに説明され、いかなる方法でも制限されることを意図しない。本出願全体にわたって挙げられる全ての参考文献、特許および公開された特許出願の内容全体ならびに図面は、参照により本明細書中に援用される。

50

【0442】

本発明は、以下の実施例によってさらに説明されて、制限と解釈されるべきでない。

【実施例】

【0443】

【実施例1：TGFβ1の阻害】

TGFβスーパーファミリーは、活性の増殖因子と複合体化されたプロペプチドを含む（図1）。複合体を安定化させて、より選択的で強力な阻害をもたらす抗体を得るための選択戦略が開発された。

【0444】

HEK293に基づく発現系を用いて、NINTA親和性およびゲル濾過を行なって、マルチミリグラム量の精製されたタンパク質を得て、LTBPに複合体化されたTGFβ1（LTBP-TGFβ1複合体）およびGARPに複合体化されたTGFβ1（GARP-TGFβ1複合体）を生産するために用いた（図3）。製造されたタンパク質の多様性は、種交差反応性の試験およびエピトープマッピングを可能にした。

【0445】

インビトロ発光アッセイを用いて、候補抗体を試験した。スクリーニングでは、増殖因子の放出を阻害した抗体は、正常な活性化のための刺激に面された場合に、レポーター細胞を「オフ」にした。Ab1およびAb2は、潜在型TGFβ1複合体の活性化の阻害剤であることが示されて、マウスに対して交差反応性であった。

【0446】

ヒトTGFβ1を発現している細胞における、Ab1の最初の投与量応答分析曲線は、TGFβ1活性阻害を示した。より感受性のCAGA12レポーター細胞株を用いて、Ab1は、ヒトproTGFβ1活性の同様な阻害を示した。さらに、GARP複合体の阻害は、健康なドナー血液から単離されたT細胞における、分裂している（dividing）エフェクターT細胞（Teff）のパーセントによって測定されるように、制御性T細胞（Treg）の抑制活性をブロックすることが示された（図9A）。同様の結果がAb3に関して見られた。ヒト肝星細胞およびヒト皮膚線維芽細胞におけるAb3の投与量応答分析曲線は、TGFβ1活性阻害を示し（図7F）、Ab3は、抑制Treg活性を阻害することも示された（図9B）。

【0447】

GARP-proTGFβ1阻害剤の親和性を、ヒトGARP-proTGFβ1細胞に対するOctetアッセイによって測定して、一方で、活性は、ヒトGARP-proTGFβ1阻害を測定するCAGA12レポーター細胞によって測定した。本明細書において提供される複合体に対する抗体Ab1およびAb2の親和性を測定するために用いたプロトコルを表6に要約する。結果を表7に示す。

10

20

30

40

50

表6：Octet結合アッセイを行なうためのプロトコル

材料： －96ウェルのブラックポリプロピレンプレート －Octetのためにストレプトアビジンによってコーティングされたチップ －10x反応速度バッファー（PBS中に1：10希釈）	
1. 必要量のストレプトアビジンチップを1X反応速度バッファー中に浸す；機械の中に置いて平衡化する	
2. サンプルプレートをロードする： －それぞれのウェルに対して、200 μlのバッファーまたは抗体希釈 a. カラム1－ベースライン（バッファー） b. カラム2－ビオチン化タンパク質（例えば、sGARP－proTGFβ1またはLTBP1－proTGFβ1）；5 μg/mLに希釈 c. カラム3－ベースライン2（バッファー） d. カラム4－Ab1に関する抗体会合 e. カラム5－Ab2に関する抗体会合 f. カラム6－解離Ab1（バッファー） g. カラム7－解離Ab2（バッファー）	10
3. 96ウェルプレート内に希釈を作製する： a. 列Aにおいて、300 μlの1xバッファー中50 μg/mLまで、両方の抗体を希釈する。 b. 残りのそれぞれのカラムに200 μlのバッファーを加える c. 3倍希釈を作製するために、カラムの下に100 μlを移す	20
4. チッププレートの隣に、機械の中にサンプルプレートを置く	
5. ソフトウェアを設定する a. バッファー、ロード、サンプルを示す（試験される抗体あたり1アッセイ） b. 設定量の時間、プロトコルのステップを示す（ベースライン、ロード、会合、解離）： ・ベースライン：60秒 ・ロード：300秒 ・ベースライン2：60秒 ・会合：300秒 ・解離：600秒	30
6. データを分析する a. 参照ウェルからベースラインを差し引く b. ベースラインの最後の5秒に対して標準化を設定する c. 解離に対して並べる	40

- d. 会合および解離に対して分析する（1：1結合モデル、フィット曲線）
- e. 最良のR²値を決定する；最良のR²値での濃度を含む
- f. グローバルフィットを選択する
- g. センサータイプによってサンプルの色を設定する
- h. 分析する
- i. テーブルを保存してエクスポートする

10

20

30

40

50

表 7 : GARP-proTGFβ1 阻害剤の親和性及び活性

クローン	GARP-proTGFβ1 に関する親和性 (nM±SEM)	GARP-proTGFβ1 の阻害 (IC50) (nM; 95%CI)	最大効果 (%阻害)
Ab1	0.046 ± 0.043	3.4 (2.1-5.4)	75%
Ab2	0.561 ± 0.014	3.9 (1.5-10.3)	50%

10

【 0 4 4 8 】

クローンを、結合選択性 (表 8) および種交差反応性 (表 9) に関してさらにスクリーニングした。Ab1 および Ab2 は、TGFβ1、TGFβ2、または TGFβ3 に結合しなかったが、proTGFβ1 複合体には結合して、種交差反応性を示した。

表 8 : GARP-proTGFβ1 阻害剤の選択性

クローン	GARP-proTGFβ1	LTBP1-proTGFβ1	LTBP3-proTGFβ1
Ab1	+++	+++	+++
Ab2	+++	+++	+++

20

表 9 : GARP-proTGFβ1 阻害剤の種交差反応性

クローン	huGARP-proTGFβ1	muGARP-proTGFβ1	cyGARP-proTGFβ1
Ab1	+++	++	+++
Ab2	+++	+++	+++

30

+++ KD < 1 nM
 ++ KD 1 – 10 nM
 + KD 10 – 100 nM
 – 結合せず*

【 0 4 4 9 】

40

Ab3 に関する結合特性を、Octet 結合アッセイによってさらに試験した。図 4 A に示されるように、Ab3 は、潜在型 TGFβ1 に特異的に結合したが、潜在型 TGFβ2 または潜在型 TGFβ3 には結合せず、一方で、pan-TGFβ 抗体は、アイソフォーム特異的でなかった (図 5)。これらのデータは、Ab3 が、アイソフォーム特異的な様式で TGFβ に結合することを示す。

【 0 4 5 0 】

[実施例 2 : Ab1、Ab2 および Ab3 は、多数の種由来の proTGFβ1 複合体に特異的に結合する]

Ab1、Ab2 および Ab3 が、多数の種由来の proTGFβ1 複合体に特異的に結合することが可能であるかどうか決定するために、表 6 に記載のように、Octet 結合

50

アッセイを行なった。表 10（以下）に示されるように、全ての 3 つの抗体（すなわち、Ab1、Ab2 および Ab3）は、ヒトおよびミューリン LTBP1-proTGFβ1 複合体、ヒト LTBP3-proTGFβ1 複合体、およびヒト GARP-proTGFβ1 複合体に特異的に結合した。しかしながら、Ab2 および Ab3 のみが、ラット LTBP1-proTGFβ1 複合体に特異的に結合した。

表 10. 多数の種由来の proTGFβ1 複合体に関する、Ab1、Ab2 および Ab3 の親和性

	Ab1 (K _D)	Ab2 (K _D)	Ab3 (K _D)
ヒト LTBP1-proTGFβ1	16 ± 1.3	5.8 ± 0.6	1.1 ± 0.07
ヒト LTBP3-proTGFβ1	85 ± 5.0	122 ± 3.9	0.12 ± 0.04
マウス LTBP1-proTGFβ1	203 ± 13	61 ± 4.0	0.68 ± 0.06
ラット LTBP1-proTGFβ1	結合は検出されず	38 ± 6.8	0.93 ± 0.03
ヒト GARP-proTGFβ1	293 ± 22	58 ± 6.2	4.9 ± 0.11

【0451】

【実施例 3：LRRC33-proTGFβ1 に対する Ab2 および Ab3 結合】

Ab1、Ab2 および Ab3 が、LRRC33 と複合体化された proTGFβ1 に結合するかどうか決定するために、Octet 結合アッセイを行なった。図 12C に示されるように、Ab1、Ab2 および Ab3 は、LRRC33-proTGFβ1 タンパク質複合体に結合することが可能である。しかしながら、Ab1 は、LRRC33-proTGFβ1 タンパク質複合体の結合に関して、遅いオン速度 (on-rate) を示す。LRRC33-proTGFβ1 タンパク質複合体に対する Ab1、Ab2 および Ab3 の結合を、ELISA を用いてさらに確認した。

【0452】

【実施例 4：Ab1、Ab2 および Ab3 は、GARP-proTGFβ1 および LRRC33-proTGFβ1 の両方の活性を阻害する】

Ab1、Ab2 および Ab3 が、GARP-proTGFβ1 および／または LRRC33-proTGFβ1 の活性を阻害するかどうか決定するために、インビトロで細胞に基づくアッセイを行なった。このアッセイ系では、β6 インテグリンによって安定的にトランスフェクトされた改変されたヒト結腸癌細胞株 (SW480/β6 細胞) を、proTGFβ1 を発現するための構築物および提示分子を発現するための構築物（すなわち、GARP または LRRC33）によって共トランスフェクトした。提示分子を発現するために、キメラ LRRC33-GARP（配列番号 101）または GARP をコードする構築物を用いた。トランスフェクトされた細胞を、構成要素（それぞれの提示分子と複合体化されたインテグリンおよび proTGFβ1）の十分な発現および沈着を可能にするためにインキュベートした。その下流のシグナル伝達経路に結び付く、TGFβ 受容体を発現しているレポーター細胞 (CAGA12 細胞) を用いて、Ab1 または Ab2 または Ab3 の存在または不存在における TGFβ1 の活性化を評価して、抗体の阻害活性を測定した。図 7A および 7B に示されるように、Ab1、Ab2 および Ab3 は、GARP-proTGFβ1 および LRRC33-proTGFβ1 の両方を阻害した。

【0453】

さらなる細胞に基づくアッセイを行なって、抗体 Ab1 および Ab2 を用いて GARP

—*proTGFβ1*複合体または*LRRC33-proTGFβ1*複合体のいずれかの阻害を検出した。*Ab1*および*Ab2*は、*GARP-proTGFβ1*および*LRRC33-proTGFβ1*の両方を阻害した。このアッセイでは、*GARP-TGFβ1*複合体に関する*Ab1*の*IC50* ($\mu\text{g}/\text{mL}$)は0.445であり、*LRRC33-TGFβ1*複合体に関する*Ab1*の*IC50* ($\mu\text{g}/\text{mL}$)は1.325であった。

【0454】

〔実施例5：*LTBP-TGFβ1*特異的な活性化を検出するためのアッセイ〕

一部の実施態様では、本明細書において提供される方法および組成物は、サンプル中の*LTBP-TGFβ1*複合体、例えば、*LTBP1*—または*LTBP3-TGFβ1*複合体を検出するための方法に関する。

【0455】

A. ECM内に沈着された潜在型*TGFβ1*の活性化

このアッセイでは、提示分子は、インテグリン発現細胞において*proTGFβ1*と共トランスフェクトされる。一時的にトランスフェクトされた細胞は、阻害剤の存在下でアッセイプレート内に蒔かれる。潜在型*LTBP-proTGFβ1*複合体は、ECM内に埋め込まれる。*TGFβ*レポーター細胞がそれから系に添加されて；フリーの増殖因子（インテグリンによって放出される）がシグナル伝達をして、ルシフェラーゼアッセイによって検出される。

【0456】

以下のプロトコルは、インテグリン細胞による細胞外マトリックス（*LTBP*によって提示される）活性化を測定する一例である。材料は：*MvLu1-CAGA12*細胞（クローン4A4）；*SW480/β6*細胞（クローン1E7）（ αV サブユニットは高レベルで内因的に発現されて； $\beta6$ サブユニットは安定的に過剰発現される）；*LN229*細胞株（高レベルの内因性 $\alpha\text{V}\beta8$ インテグリン）；*Costar white walled TC*によって処理された96ウェルアッセイプレート#3903；*Greiner Bio-One High Binding white uclear* 96ウェルアッセイプレート#655094；ヒトフィブロネクチン（*Corning* #354008）；滅菌フィルターチップをそれぞれ備えたP200マルチチャネルピペット；P20、P200、およびP1000ピペット；滅菌微量遠心管チューブおよびラック；滅菌試薬リザーバー；0.4%トリパンブルー；2mL、5mL、10mL、および25mL滅菌ピペット；組織培養処理された100mmまたは150mmプレート；70%エタノール；*Opti-MEM*減少血清培地（*Life Tech* #31985-070）；リポフェクタミン3000（*Life Tech* #L3000015）；*Bright-Glo*ルシフェラーゼアッセイ試薬（*Promega* #E2620）；0.25%トリプシン（*Trypsin*）+0.53mM EDTA；*proTGFβ1*発現プラスミド、ヒト（*SR005*）；*LTBP1S*発現プラスミド、ヒト（*SR044*）；*LTBP3*発現プラスミド、ヒト（*SR117*）；*LRRC32*（*GARP*）発現プラスミド、ヒト（*SR116*）；および*LRRC33*発現プラスミド、ヒト（*SR386*）を含む。使用される機器は：*BioTek Synergy H1*プレートリーダー；TCフード；ベンチトップ遠心分離機； CO_2 インキュベーター37°C 5% CO_2 ；37°C水／ビードバス；プラットフォームシェイカー；顕微鏡；および血球計数器／countessを含む。

【0457】

「*CAGA12 4A4*細胞」は、*MvLu1*細胞（ミンク肺上皮細胞）の誘導体であり、*CAGA12*合成プロモーターによって安定的にトランスフェクトされて、ルシフェラーゼ遺伝子発現を駆動する。「*DMEM-0.1%BSA*」はアッセイ培地であり；ベース培地は*DMEM*（*Gibco Cat* #11995-065）であり、培地は、0.1%w/vに希釈されたBSA、ペニシリン／ストレプトマイシン（*streptomycin*）、および4mMグルタミンも含む。「*D10*」は、*DMEM 10% FBS*、*P/S*、4mMグルタミン、1%*NEAA*、1×*GlutaMAX*（*Gibco Cat* #35050061）を指す。「*SW480/β6*培地」は、*D10*+1000ug／

10

20

30

40

50

mL G-418を指す。「CAGA12 (4A4) 培地」は、D10+0.75 µg/mLピューロマイシンを指す。

【0458】

0日目に、細胞を、トランスフェクションのために蒔く。SW480/β6 (クローン1E7) 細胞をトリプシンによって引き離して、ペレット化する(200×gでスピン5分)。細胞ペレットをD10培地中に再懸濁して、mLあたりの生存細胞を数える。細胞を5.0e6細胞/12mL/100mmでTCディッシュに蒔く。CAGA12細胞については、細胞をdT75フラスコあたり100万の密度で継代培養して、3日目のアッセイのために用いる。培養を37℃および5%CO₂でインキュベートする。

【0459】

1日目に、インテグリンを発現している細胞をトランスフェクトする。リポフェクタミン3000試薬を用いたトランスフェクションに関する製造元のプロトコルに従う。手短に言うと、以下をOptiMEM I (ウェルあたり125 µL) に希釈する：7.5 µg DNA (提示分子) + 7.5 µg DNA (proTGFβ1)、30 µL P3000、および、OptiMEM Iによって125 µL。DNAと一緒にピペッティングすることによってウェルを混合して、それから、OptiMEMを加える。P3000を加えて、全てをピペッティングにより十分に混合する。リポフェクタミン3000のマスターミックスを作製して、DNAミックスに加える：LTBP1アッセイに関して：15 µLリポフェクタミン3000 (ウェルあたりOptiMEM I中に125 µLまで)；LTBP3アッセイに関して：45 µLリポフェクタミン3000 (ウェルあたりOptiMEM I中に125 µLまで)。希釈したリポフェクタミン3000をDNAに加えて、ピペッティングによって十分に混合して、室温で15分間インキュベートする。インキュベーション後に、溶液をピペッティングによって数回混合して、それから、ディッシュあたり、250 µLのDNA：リポフェクタミン3000 (2×125 µL) を滴下で加える。それぞれのディッシュを穏やかに旋回して混合して、ディッシュを約24時間、組織培養インキュベーターに戻す。

【0460】

同等量のそれぞれのプラスミドは、典型的に、共トランスフェクションに最適である。しかしながら、共トランスフェクションは、proTGFβ1および提示分子に関するプラスミドDNAの比を変更することによって最適化され得る。

【0461】

1～2日目に、アッセイプレートにヒトフィブロネクチンでコーティングする。具体的には、凍結乾燥されたフィブロネクチンを、超高純度の蒸留水 (滅菌) 中1mg/mLに希釈する。1mg/mLのストック溶液を、PBS (滅菌) 中19.2 µg/mLに希釈する。50 µL/ウェルをアッセイプレート (高結合) に添加して、組織培養インキュベーター内でO/Nインキュベートする (37℃および5%CO₂)。最終濃度は3.0 µg/cm²である。

【0462】

2日目に、トランスフェクトされた細胞を、アッセイおよび阻害剤添加のためにプレーティングする。最初に、アッセイプレート中に既にあるフィブロネクチン溶液に200 µL/ウェルのPBSを添加することによって、フィブロネクチンコーティングを洗浄する。洗浄は、マルチチャンネルピペットを用いて手作業で除去する。洗浄を合計2洗浄繰り返す。細胞を加える前に、プレートを、蓋を取って室温で乾燥させる。細胞をそれから、トリプシンを用いて引き離すことによってプレーティングして、ペレット化する(200×gで5分スピンする)。ペレットをアッセイ培地中に再懸濁して、mLあたりの生存細胞を数える。LTBP1アッセイのために、細胞を0.10e6細胞/mLに希釈して、ウェルあたり50 µL蒔く (ウェルあたり5,000細胞)。LTBP3アッセイのために、細胞を0.05e6細胞/mLに希釈して、ウェルあたり50 µL蒔く (ウェルあたり2,500細胞)。機能性抗体希釈を調製するために、抗体をビヒクル中に、一貫した作業濃度に前希釈する。ストック抗体を、ビヒクル中に段階希釈する (PBSが最適であり

10

20

30

40

50

、クエン酸ナトリウムバッファーを避ける)。段階希釈のそれぞれのポイントを、抗体の4×最終濃度のためにアッセイ培地中に希釈する。ウェルあたり25 µlの4×抗体を加えて、培養物を、37℃および5%CO₂で24時間インキュベートする。

【0463】

3日目に、TGFβレポーター細胞を添加する。アッセイのためにCAGA12 (クローン4A4) 細胞をトリプシンによって引き離して、ペレット化する(200×gで5分スピンする)。ペレットをアッセイ培地中に再懸濁して、mlあたりの生存細胞を数える。細胞を0.4×10⁶細胞/mlに希釈して、ウェルあたり50 µl蒔く(ウェルあたり20,000細胞)。細胞をインキュベーターに戻す。

【0464】

4日目に、アッセイを読み取る(抗体および/またはレポーター細胞添加の16~20時間後)。読み取り前に、Bright-Glo試薬および試験プレートを室温にする。BioTek Synergy H1の読み取り設定を、TMLC_stdプロトコルを用いて設定する—この方法は、オートゲイン設定を有する。陽性コントロールのウェルをオートスケール(高)に選択する。100 µlのBright-Glo試薬をウェルあたり添加する。室温で浸透させながら2分間インキュベートして;プレートを光から保護する。プレートをBioTek Synergy H1で読み取る。

【0465】

このアッセイによって生産されるデータは、細胞上清におけるLTBP1-TGFβ1および/またはLTBP3-TGFβ1結合活性を反映する。

【0466】

B. 細胞表面上に提示された潜在型TGFβ1の活性化

細胞表面上に存在する潜在型TGFβ1の活性化を検出するために、提示分子をインテグリン発現細胞内でproTGFβ1と共トランスフェクトする。潜在型TGFβ1は、GARPまたはLRRC33によって細胞表面上に発現される。それから、TGFβレポーター細胞および阻害剤を系に添加して;フリーの増殖因子(インテグリンによって放出される)がシグナル伝達して、ルシフェラーゼアッセイによって検出される。このアッセイ、または「直接トランスフェクション」プロトコルは、インテグリン細胞による細胞表面に提示されるTGFβ1(GARPまたはLRRC33提示因子)の活性化に最適である。

【0467】

用いられる材料は:MvLu1-CAGA12細胞(クローン4A4);SW480/β6細胞(クローン1E7)(αVサブユニットは高レベルで内因的に発現される;β6サブユニットは安定的に過剰発現される);LN229細胞株(高レベルの内因性αVβ8インテグリン);Costar white walled TCによって処理された96ウェルアッセイプレート#3903;Greiner Bio-One High Binding white nuclear 96ウェルアッセイプレート#655094;ヒトフィブロネクチン(Corning #354008);P200マルチチャネルピペット;滅菌フィルターをそれぞれ備えたP20、P200、およびP1000ピペット;滅菌微量遠心管チューブおよびラック;滅菌試薬リザーバー;0.4%トリパンブルー;2 mL、5 mL、10 mL、および25 mL滅菌ピペット;組織培養処理された100 mmまたは150 mmプレート;70%エタノール;Opti-MEM減少血清培地(Life Tech #31985-070);リポフェクタミン3000(Life Tech #L3000015);Bright-Gloルシフェラーゼアッセイ試薬(Promega #E2620);0.25%トリプシン(Trypsin)+0.53 mM EDTA;proTGFβ1発現プラスミド、ヒト(SR005);LTBP1S発現プラスミド、ヒト(SR044);LTBP3発現プラスミド、ヒト(SR117);LRRC32(GARP)発現プラスミド、ヒト(SR116);およびLRRC33発現プラスミド、ヒト(SR386)を含む。

【0468】

10

20

30

40

50

用いられる機器は：BioTek Synergy H1プレートリーダー；TCフード；ベンチトップ遠心分離機；CO₂インキュベーター37℃ 5%CO₂；37℃水／ビードバス；プラットフォームシェイカー；顕微鏡；血球計数器／countessを含む。

【0469】

用語「CAGA12 4A4細胞」は、MvLu1細胞（ミンク肺上皮細胞）の誘導体を指し、CAGA12合成プロモーターによって安定的にトランスフェクトされて、ルシフェラーゼ遺伝子発現を駆動する。「DMEM-0.1%BSA」は、アッセイ培地を指し；ベース培地はDMEM（Gibco Cat#11995-065）であり、培地は、0.1%w/vに希釈されたBSA、ペニシリン／ストレプトマイシン（streptomycin）、および4mMグルタミンも含む。「D10」は、DMEM 10% FBS、P/S、4mMグルタミン、1% NEAA、1×GlutaMAX（Gibco Cat#35050061）を指す。「SW480/β6培地」は、D10+1000ug/mL G-418を指す。「CAGA12（4A4）培地」は、D10+0.75ug/mLピューロマイシンを指す。

【0470】

0日目に、インテグリンを発現している細胞を、トランスフェクションのために蒔く。細胞をトリプシンによって引き離して、ペレット化する（200×gで5分スピンする）。細胞ペレットをD10培地中に再懸濁して、mLあたりの生存細胞を数える。細胞を0.1e⁶細胞/mLに希釈して、アッセイプレート中に、ウェルあたり100uL蒔く（ウェルあたり10,000細胞）。CAGA12細胞については、T75フラスコあたり150万の密度で継代培養して、2日目にアッセイのために用いる。培養物を、37℃および5%CO₂でインキュベートする。

【0471】

1日目に、細胞をトランスフェクトする。リポフェクタミン3000試薬を用いたトランスフェクションに関する製造元のプロトコルに従う。手短に言うと、以下をOptiMEM I（ウェルあたり5uL）に希釈する：0.1ug DNA（提示分子）+0.1ug DNA（proTGFB1）、0.4uL P3000、および5uLまでのOptiMEM I。DNAと一緒にピペティングすることによってウェルを混合して、それから、OptiMEMを加える。P3000を加えて、全てをピペティングにより十分に混合する。リポフェクタミン3000を含むマスターを作製して、DNAミックスに添加する：ウェルあたりOptiMEM I中に、0.2uLリポフェクタミン3000、5uLまで。希釈したリポフェクタミン3000をDNAに加えて、ピペティングによって十分に混合して、室温で15分間インキュベートする。インキュベーション後、ピペティングによって溶液を数回混合して、それから、DNAのウェルあたり10uL；リポフェクタミン3000（2×5uL）を加える。細胞プレートを約24時間、組織培養インキュベーターに戻す。

【0472】

2日目に、抗体およびTGFBレポーター細胞を加える。機能性抗体希釈を調製するために、ビヒクル（PBSが最適である）中のストック抗体を段階希釈する。それから、それぞれのポイントを、2×最終濃度の抗体のためにアッセイ培地に希釈する。抗体を調製した後に、吸引（真空吸引器）によって細胞プレートをアッセイ培地で2回洗浄して、その後ウェルあたり100uLのアッセイ培地を添加する。2回目の洗浄後に、アッセイ培地をウェルあたり50uLの2×抗体で置き換える。細胞プレートを約15～20分間インキュベーターに戻す。

【0473】

アッセイのためにCAGA12（クローン4A4）細胞を調製するために、細胞をトリプシンによって引き離して、ペレット化する（200×gで5分間スピンする）。ペレットをアッセイ培地中に再懸濁して、mLあたりの生存細胞あたりを数える。細胞を0.3e⁶細胞/mLに希釈して、ウェルあたり50uL（ウェルあたり15,000細胞）蒔く。細胞をインキュベーターに戻す。

10

20

30

40

50

【0474】

3日目に、アッセイを、抗体および／またはレポーター細胞の添加後、約16～20時間に読み出す。Bright-Glo試薬および試験プレートを、読み取り前に室温にさせる。BioTek Synergy H1での読み取り設定は、TMLC_stdプロトコルを用いるように設定して—この方法はオートゲイン設定を有する。陽性コントロールウェルをオートスケール（高）に選択する。100 μ LのBright-Glo試薬をウェルあたり添加する。室温で浸透させながら2分間インキュベートして；プレートを光から保護する。プレートをBioTek Synergy H1で読み取る。

【0475】

このアッセイによって生産されるデータは、細胞上清におけるTGF β 1活性を反映する。生データ単位は、相対的な光単位である（RLU）。高RLU値を有するサンプルは、多量のフリーのTGF β 1を含み、低RLU値を有するサンプルは、低レベルのTGF β 1を含む。

10

【0476】

[実施例6：Ab1およびAb2は、ヒトおよびミューリン線維芽細胞において内因性TGF β 1を阻害する。]

Ab1およびAb2が、初代培養した異なる起源の線維芽細胞によって分泌される内因性TGF- β 1を阻害することができるかどうか決定するために、定量インビトロアッセイを行ない、CAGA12合成プロモーターに融合されたルシフェラーゼレポーター遺伝子を含む核酸によって安定的にトランスフェクトされて、Ab1またはAb2のいずれかで処理された線維芽細胞と共培養された、ミンク肺上皮細胞によって生産されるルシフェラーゼレベルを測定することによって、分泌TGF- β 1の活性を決定した。図7Gおよび7Hに示されるように、Ab1およびAb2の両方とも、正常なヒト真皮線維芽細胞、ミューリンC57BL/6J肺線維芽細胞、およびDBA2/J筋線維芽細胞によって分泌される内因性TGF- β 1を阻害した。それぞれの抗体で観察された最大阻害の違いは、細胞株特異的であった。

20

【0477】

[実施例7：インビトロでの、インテグリンによって誘導されるTGF β 1の活性化に対する、TGF β 1特異的な、コンテクスト非依存性抗体の効果およびマトリックス剛性の役割]

30

異なる程度の剛性を有する基質がTGF β 1活性化を調整することができるかどうか試験するために、制御された剛性（5 kPa、15 kPa、および100 kPa）のシリコン系基質を用いて、その上にプレーティングされた一次線維芽細胞におけるTGF β 1のインテグリン依存性の活性化を測定した。手短に言うと、SW480細胞を、proTGF β 1およびLTBP1によって共トランスフェクトして、潜在型TGF β 1複合体の細胞外提示を可能にした。 α v β 6インテグリンを過剰発現している細胞をアッセイ系に添加して、TGF β 1の活性化をトリガーした。TGF β 1活性化は、TGF β 応答性レポーター遺伝子活性化を測定することによって決定された。この状況では、 α v β 6インテグリンは、試験された高剛性（100 kPa）のシリコン基質上にプレーティングされた細胞において、その他の点では同一の条件下でより低い（5または15 kPa）剛性を有するシリコン基質上で培養された細胞と比較して、LTBP1が介在するTGF β 1活性化のおよそ2倍の増大を引き起こした。本発明者らは、本明細書に記載されるもののような、TGF β 1活性化のアイソフォーム特異的な、コンテクスト寛容阻害剤は、この効果を抑制することができて、試験される全ての剛性で、抗体なしコントロールと比較して、TGF β 1活性化をおよそ半分のレベルに減少させることを見いだした。

40

【0478】

[実施例8：インビトロでの、プロテアーゼによって誘導されるTGF β 1活性化に対する、TGF β 1特異的な、コンテクスト非依存性抗体の効果]

インビトロでの、TGF β 1のインテグリン非依存性、プロテアーゼ依存性活性化を試験するために、精製された組み換えLTBP3-proTGF β 1複合体をカリクレイン

50

(K L K)とともにインキュベートして、記載されるレポーター細胞系を用いてT G F β 1活性化を測定した。T G F β 1は、K L Kとのインキュベーション後に潜在型複合体から放出されたが、ビヒクル単独では放出されず、E C M関連のT G F β 1活性が、プロテアーゼ依存性の様式でトリガーされ得ることを示唆した。

【0479】

アイソフォーム特異的な、コンテキスト非依存性阻害抗体が、T G F β 1活性化の代替モード（例えば、インテグリン非依存性）を阻害する能力をさらに試験するために、インビトロアッセイを確立してT G F β 1のカリクレイン活性化を評価した。

【0480】

手短に言うと、C A G Aレポーター細胞を、アッセイの開始の24時間前に蒔いた。P r o T G F β - C 4 Sを、C A G A細胞上に滴定した。m Lあたり1マイクログラムまたはm Lあたり500ナノグラムの固定された濃度で血漿K L Kプロテアーゼを加えた。アッセイ混合物をおよそ18時間インキュベートした。T G F β 活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。データを図8に示す。K L K存在下で、p r o T G F β 1は活性化された（ポジティブコントロール）。このT G F β 活性化は、A b 3の添加によって効果的に阻害されて、T G F β 1のインテグリン依存性活性化に加えて、アイソフォーム特異的な、コンテキスト非依存性の阻害抗体もまた、インビトロでT G F β 1のK L K依存性活性化をブロックすることができることを示した。同様に、K L Kによって活性化されるT G F β 1の阻害は、A b 1の添加によっても観察された（データ示さず）。

【0481】

[実施例9：極性化および活性化されたマクロファージにおけるL R R C 3 3発現。]

T G F β シグナル伝達が、マクロファージの成熟および最終的な表現型の分化に関与することが以前に説明された。単球由来マクロファージは、L R R C 3 3を発現することが示唆されている。極性化マクロファージのさらなる研究は、全ての極性化マクロファージがL R R C 3 3を発現するわけではないことを明らかにしている。我々は、いわゆる古典的M 1型マクロファージが、L R R C 3 3の低発現を示し、一方で、M 2マクロファージは、上昇したL R R C 3 3発現を示すことを見いだした。予期せずに、M 2マクロファージのサブタイプの中で、M 2 cおよびM 2 d、T A M様マクロファージにおいてのみ、L R R C 3 3発現を観察した。前者はいわゆる「線維促進性」マクロファージであり、後者は「T A M様」であり、または腫瘍関連表現型を模倣する。これらの結果は、L R R C 3 3発現が、極性化マクロファージの選択的サブセットに制限されることを示す。

【0482】

証拠は、腫瘍細胞および／または周囲腫瘍間質細胞が、多くのサイトカイン、増殖因子およびケモカインを分泌し、T M Eにおける様々な細胞の表現型（例えば、活性化、分化）に影響し得ることを示唆する。例えば、マクロファージコロニー刺激因子（M - C S F、C S F - 1とも呼ばれる）は、公知の腫瘍由来因子であり、T A M活性化および表現型を調節し得る。

【0483】

蛍光活性化セルソーティング（F A C S）分析を行なって、マクロファージにおけるL R R C 3 3発現に対するM - C S F曝露の効果を試験した。手短に言うと、ヒトP B M Cを健康なドナーから集めた。10%ヒト血清、プラスG M - C S FまたはM - C S Fを含む培地中で、初代細胞を1週間培養した。様々なM 2マクロファージ表現型を誘導するために、細胞を、M 2 cサブタイプに関してI L - 1 0およびT G F β、およびM 2 dサブタイプに関してI L - 6の存在下で、さらに2〜3日培養した。図に示した細胞表面マーカーに対する抗体を、F A C S分析において用いた。C D 1 4 +免疫磁気選択は、単球を示す。

【0484】

驚くべきことに、結果は、マクロファージ上の細胞表面L R R C 3 3の上方調節が、M - C S F（C S F - 1としても知られる）に対する曝露の際に有意に増加することを示した。図10Aは、M - C S Fによって処理されたマクロファージが、均一に、M 2極性化

10

20

30

40

50

マクロファージのものであることを示す。さらに、M-CSF曝露は、マクロファージが細胞表面上にLRRC33を均一に発現するようにさせる（図10Bを参照）。図10Cに要約されるように、M-CSFによって活性化されたマクロファージ上の力強いLRRC33発現が観察された。これらの結果は、M-CSFのような腫瘍由来因子が、局所的なマクロファージ活性化を誘導し得て、腫瘍増殖を支持することを示唆する。

【0485】

〔実施例10：インビボでの制御性T（Treg）細胞活性に対するAb3の効果〕

GARPは、制御性T細胞上に発現されることが示されている。インビボでの制御性T細胞活性に対するAb3の効果、T細胞移行大腸炎モデル（Powrie et al., 1993 International Immunology, 5 (11): 1464-1474; Powrie et al., 1994 Immunity, 1: 553-562; Powrie et al., 1996 J. Exp. Med., 186: 2669-2674）を用いて評価した。重度複合免疫不全（SCID）マウスへのCD45Rb^{hi} T細胞の移行は、大腸炎を誘導することが知られていて、CD45Rb^{lo} CD25⁺制御性T細胞（Treg）の共移行は、大腸炎発生を阻害して、マウスに対して保護的效果を示す。図11に示されるように、30mg/kg Ab3を受け取ったマウスは、CD45Rb^{lo} CD25⁺ Tregの共移行によって示された保護的效果がなくなる。具体的には、30mg/kg Ab3を受け取ったマウスは、IgGコントロールと比較して体重増加の有意な減少、および、近位結腸炎症スコアおよび結腸重量対長さの比の有意な増大を示した。これらのデータは、Ab3が、インビボで制御性T細胞活性を抑制することが可能であることを示す。

【0486】

〔実施例11：MC38ミューリン結腸癌腫同一遺伝子型マウスモデルにおける腫瘍進行に対する、Ab1およびAb2単独または抗-PD-1抗体と組み合わせた効果〕

Ab1およびAb2が、単独または抗-PD-1抗体と組み合わせて結腸癌腫腫瘍の進行を低減させる効果を評価するために、MC38ミューリン結腸癌腫C57BL/6マウス同一遺伝子型モデルを用いた。

【0487】

腫瘍細胞培養

MC38ミューリン結腸癌腫細胞を、10%ウシ胎児血清、100ユニット/mLペニシリンGナトリウム、100μg/mL硫酸ストレプトマイシン、25μg/mLゲンタマイシン、および2mMグルタミンを含むダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）中で増殖させた。細胞培養を、5%CO₂および95%空気の雰囲気において、37℃で湿潤インキュベーター内の組織培養フラスコ中に維持した。

【0488】

インビボ移植および腫瘍増殖

移植に用いたMC38細胞は、対数期増殖中に採取して、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中に再懸濁した。腫瘍移植の日に、それぞれの試験マウスに、右脇腹の皮下に5×10⁵細胞（0.1mL細胞懸濁液）を注入して、平均サイズが80～120mm³の標的範囲に近づいたときに腫瘍増殖を監視した。11日後に、試験の1日目と指定されて、マウスを、計算された腫瘍サイズに従って、63～196mm³の範囲の個々の腫瘍体積および95～98mm³のグループ平均腫瘍体積を有する12匹の動物からそれぞれ構成されるグループに分類した。カリパスを用いて二次元で腫瘍を測定して、以下の式を用いて体積を計算した：

10

20

30

40

50

$$\text{腫瘍体積}(\text{mm}^3) = \frac{w^2 \times l}{2}$$

ここで、 w は腫瘍の幅であり l は腫瘍の長さ（mm）である。腫瘍重量は、1mgが腫瘍体積の 1mm^3 と同等であるという仮定によって概算され得る。

【0489】

治療

手短に言うと、1日目に皮下MC38腫瘍（ $63 \sim 172\text{mm}^3$ ）を保有する8週齢雌C57BL/6マウス（ $n=12$ ）に、1週間に2回、4週間、Ab1、Ab2、ミューリンIgG1コントロール抗体のいずれかを（ 10mL/kg の投与容量中、それぞれ 30mg/kg で）腹腔内（i.p.）投与した。コントロール群において腫瘍が 150mm^3 に到達したときに（6日目）、マウスに、ラット抗マウスPD-1抗体（RMP1-14）またはラットIgG2Aコントロール抗体のいずれかを、1週間に2回、2週間（ 10mL/kg の投与容量中、それぞれの抗体を 5mg/kg で）i.p.投与した。

【0490】

グループ1は、腫瘍増殖コントロールとしての役割を果たし、ミューリンIgG1アイソタイプコントロール抗体をラットIgG2aコントロール抗体と組み合わせて受け取った。グループ2は、Ab1をラットIgG2aコントロール抗体と組み合わせて受け取った。グループ3は、Ab2をラットIgG2aコントロール抗体と組み合わせて受け取った。グループ3は、ミューリンIgG1コントロール抗体を抗PD-1抗体と組み合わせて受け取った。グループ4は、Ab1を抗PD-1抗体と組み合わせて受け取った。グループ5は、Ab2を抗PD-1抗体と組み合わせて受け取った。グループ6（ $n=16$ ）は、処置されず、サンプリングコントロール群としての役割を果たした。

【0491】

エンドポイントおよび腫瘍増殖遅延（TGD）分析

1週間あたり2回、カリパスを用いて腫瘍を測定して、それぞれの動物を、その腫瘍が、 $1,000\text{mm}^3$ のエンドポイント体積または試験の終わり（60日目）のいずれかより早く生じた方に到達したときに安楽死させた。腫瘍体積エンドポイントに関して試験を終えたマウスは、腫瘍進行（TP）のために安楽死されるように、安楽死の日とともに文書記録された。分析に関するエンドポイントまでの時間（TTE）は、2017年9月13日に出版された米国仮出願番号62/558,311に記載の方法に従って、それぞれのマウスに関して計算された。

【0492】

回帰応答に関するMTVおよび基準

治療有効性は、最終日に試験に残っている動物の腫瘍体積から決定され得る。MTV（ n ）は、腫瘍がエンドポイント体積に到達していない、残っている動物の数（ n ）における試験の最終日のメジアン腫瘍体積として定義した。

【0493】

治療有効性はまた、試験中に観察される発生率および回帰応答の大きさから決定されてもよい。治療は、動物において腫瘍の部分回帰（PR）または完全回帰（CR）を生じさせ得る。PR応答では、腫瘍体積は、試験の経過中の3つの連続する測定に関して、その1日目の体積の50%以下であり、これらの3つの測定の1つまたは複数に関して、 13.5mm^3 以上であった。CR応答では、腫瘍体積は、試験の経過中の3つの連続する測定に関して、 13.5mm^3 未満であった。試験の最後にCR応答を有する動物は、腫瘍フリー生存者（TFS）としてさらに分類された。動物は、回帰応答に関して監視された。

【0494】

腫瘍増殖阻害

腫瘍増殖阻害 (TGI) 分析は、処置およびコントロールマウスのメジアン腫瘍体積 (MTV) における違いを評価する。この試験のために、TGI を決定するためのエンドポイントは 29 日目であり、それは、コントロールマウスが 1500 mm^3 の平均腫瘍体積に到達した日であった。MTV (n) は、TGI 分析の日における動物の数 (n) に関するメジアン腫瘍体積であり、それぞれの群に関して決定された。パーセント腫瘍増殖阻害 (%TGI) は、指定のコントロール群の MTV および薬物によって処置された群の MTV の間の違いとして定義されて、コントロール群の MTV のパーセンテージとして表した：

【0495】

TGI 分析に関するデータセットは、TGI 分析の日前の非処置関連 (NTR) または処置関連 (TR) の原因に起因して死亡したものを除いて、グループ内の全てのマウスを含んだ。

【0496】

この試験では、Ab1 および Ab2 は、単独および MC38 ミューリン結腸癌腫 C57BL/6 マウス同一遺伝子型モデルにおける抗-PD-1 と組み合わせて評価された。Ab2 を抗-PD-1 と組み合わせて投与されたマウスは、有意な 29 日目の TGI ($P < 0.05$ 、マンホイットニーの U 検定) をもたらし、ログランク生存分析を用いて、ビヒクルによって処置されたコントロールとは統計的に有意に異なる生存利益 ($P < 0.05$ 、ログランク) を生じた (図 16 を参照)。Ab1 または Ab2 をラット IgG2a コントロール抗体と組み合わせて受け取ったマウスは、それぞれ、1CR および 1PR の回帰応答を有した。抗-PD-1 と組み合わせて、Ab1 および Ab2 の回帰応答は、それぞれ、1PR および 1CR、および 4CR であった。Ab2 は、抗-PD-1 と組み合わせて、29 日目に有意な短期の有効性を生じて、MC38 ミューリン結腸癌腫 C57BL/6 マウス同一遺伝子型モデルにおけるこの 60 日 TGD 試験において、全生存の利益を生じさせた。

【0497】

[実施例 12：TGFB β 1/3 モデルでの、PD-1 阻害剤と組み合わせた、生存に対する Ab3 のインビボ効果]

EMT-6 は、免疫チェックポイント阻害剤処置単独が、腫瘍増殖および生存に対して制限された効果を示している、同所性マウス腫瘍モデルである。本発明者らは、特定の同一遺伝子型腫瘍モデルにおいて、RNAseq によって評価されるように TGFB β の多数のアイソフォームが発現されることを認識している。TGFB β 1 および TGFB β 3 の両方とも、EMT-6 内で共優勢であり (図 21 を参照)、ほぼ同量で発現される。本発明者らは、したがって、この特定のモデルでは、TGFB β アイソフォームの pan-阻害剤は、アイソフォーム選択的阻害剤と比較して、より広範なインビボ有効性を提供し得ると推論した。

【0498】

試験設計

この仮説を試験するために、8~12 週齢雌 Balb/c マウスに、0% マトリゲル中に 5×10^6 EMT6 乳癌細胞を含む 0.1 mL を腹腔内に皮下注入した。重量および腫瘍カリパス測定に関して、隔週で試験全体を通して動物を監視した。30~80 mm^3 の体積に腫瘍が到達したときに、動物を 6 つのグループに無作為化して、以下のとおり投与を始めた：グループ 1：HuNeg-rIgG1/HuNeg-mIgG1；グループ 2：抗-PD1-rIgG1/HuNeg-mIgG1；グループ 3：抗-PD1-rIgG1/pan-TGFB β Ab-mIgG1；グループ 4：抗-PD1-rIgG1/Ab3-mIgG1；グループ 5：HuNeg-rIgG1/pan-TGFB β Ab-mIgG1；および、グループ 6：HuNeg-rIgG1/Ab3-mIgG1。抗-PD1 クローンは RMP1-14 (BioXCell) であり、1 週間に 2 回、5 mg/kg で投与した。HuNeg-rIgG1 をアイソタイプコントロールとして用いて、同様に

10

20

30

40

50

投与した。Ab3-mIgG1は30mg/kgで1週間に1回投与されて、HuNeg-mIgG1は同様に投与された。Pan-TGFβAb-mIgG1は、5mg/kgで1週間に2回投与された。全ての投与は、10mL/kgで腹腔内にされた。腫瘍が2000mm³を超えたときに、動物を殺して、血清を集めて、腫瘍を取り出して、結局の分析のために急速冷凍した。重大な体重喪失のせいで殺された動物はなく、グループ2内の1匹の動物は死んだことが分かった（処置関連と判定されず）。

【0499】

結果

EMT6は、迅速に進行する同一遺伝子型腫瘍モデルである。グループ1およびグループ6の動物は、18日のメジアン生存を有し、このモデルにおける処置効果なしの典型である。抗-PD1は、このモデルにおいて制限された効果を有することが知られていて、したがって、単独で投与された場合に、メジアン生存を19.5日まで増大させた（グループ2）。グループ5もまた、メジアン生存を21日まで小さく増大させた。グループ4は、25日まで生存を控えめに増大させて、2匹の動物は34日目はまだ生存していた。グループ3は、34日目までに3つの死亡イベントのみを有し、この組み合わせの有意な生存効果を示した。Ab3-mIgG1単独の投与を介したTGFβ1阻害は、腫瘍体積増殖に効果がなかったが、抗-PD1と組み合わせると、5匹の動物はより遅い腫瘍増殖を示して、1匹の動物は完全な応答を示した。Pan-TGFβAb単独は、3匹の動物において腫瘍増殖を遅らせたが、抗-PD1と組み合わせると、4匹の動物は、有意により遅い腫瘍増殖を示し、5匹の動物は完全な応答を示した。これらの知見は、公共に利用可能な情報、例えば、全腫瘍RNAseqデータベース（Crown Bioscience MuBase）と一致し、EMT6腫瘍が、ほぼ同等レベルのTGFβ1およびTGFβ3発現を示すことを示す。

【0500】

【実施例13：片側尿管閉塞（UUO）マウスモデルにおける、腎臓バイオマーカーおよび線維症に対するAb2およびAb3の効果】

片側尿管閉塞マウスモデルは、間質線維症（末期の腎臓疾患をもたらす得る一般的な病理学的プロセス）を研究するために幅広く用いられている（Isaka et al. (2008) Contrib. Nephrol. 159:109-21、および、Chevalier (1999) Pediatr. Nephrol. 13:612-9を参照）。UUOマウスは、腎臓筋線維芽細胞活性化、管状萎縮および間質線維症（最小限の糸球体病変を伴う）によって特徴付けられる（Lian et al. (2011) Acta Pharmacol. Sin. 32:1513-21を参照）。TGFβ1の発現の増大は、UUOマウスで観察される表現型において役割を果たすと考えられる。UUOマウスモデルにおける間質線維症の提示に対するAb2の効果を評価するために、以下の実験を行なった。

【0501】

手短に言うと、7～8週齢雄CD-1マウス（Charles River Laboratories）は、4群のマウス（n=10）であり、Ab2（3mg/kgまたは30mg/kg；10mL/kgの投与容量）、ミューリンIgG1コントロール抗体（30mg/kg；10mL/kgの投与容量）、またはPBSを、外科的介入の前にビヒクルコントロール腹腔内（i.p.）として投与した。処置は、外科的処置の1日前（d-1）、外科的処置の1日後（d1）、および、外科的処置の3日後（d3）に投与された。0日目（d0）に、マウスをノーゾコーン上にイソフルラン麻酔で麻痺させて、開腹術を行なって、その後に永久右片側（permanent right unilateral）UUO外科的処置を続けた。マウスのさらなるコントロール群（n=8）には上述のとおりPBSを投与したが、シャム外科的処置のみを受けた（すなわち、尿管の閉塞をしない開腹術）。外科的手順の完了のすぐ後に、全てのマウスは、0.001mg/kgブプレノルフィンの1回の皮下注入を受けた。外科的処置の5日後にマウスを殺して、組織を分析のために摘出した。摘出後に、両方の腎臓を氷冷0.9%NaCl内に置いて、

脱カプセル化して、計量した。腎臓組織のコラーゲン含有量を評価するためのヒドロキシプロリンレベルを評価した。腎臓ヒドロキシプロリンレベル（組織線維症およびコラーゲン沈着のマーカー）は、シャム外科的処置を受けたマウスと比較して、外科的介入を受けたマウスにおいて有意に増大した。

【0502】

それぞれの右腎臓の中央を横切る断面を、10%中性緩衝化ホルマリン中で48時間、浸漬固定して、それから、組織学的処理および分析のために70%エタノールへ移した。固定された腎臓断面をパラフィン包埋して、切片化して（3つの5 μ mの連続した切片を、動物腎臓あたり200~250 μ m離れて取得して、より大きなサンプリングおよび腎臓負傷の表現を可能にした）、ピクロシリウスレッドで染色して、色スペクトルセグメンテーションを用いて定量組織学的分析に供して、皮質性コラーゲン体積分率（CVF）を決定した。3つの連続する切片のそれぞれに関して平均CVFスコアを決定することにより、1つの混成CVFスコアをそれぞれの動物について計算した。独立t検定を用いて統計分析を行なった。図12Kに示されるように、腎臓皮質性線維症は、CVFによって決定されるように、コントロールのシャム処置マウスと比較して、UUO閉塞腎臓において増大した。3mg/kgまたは30mg/kgのいずれかのAb2を受け取ったマウスは、ビヒクルコントロール（PBS）またはIgGコントロールのいずれかを受け取ったマウスと比較して、UUOによって誘導されるCVFの増大の有意な減衰を示した。

【0503】

採取された腎臓組織中の、プラスミノゲンアクチベーター阻害剤-1（PAI-1）、結合組織増殖因子（CTGF）、TGF β 1、フィブロネクチン-1、 α -平滑筋アクチン（ α -SMA）、単球走化性タンパク質1（MCP-1）、コラーゲンI型 α 1（Col1a1）、およびコラーゲンIII型 α 1鎖（Col3a1）の相対的mRNA発現レベルを決定した（図12A~12H）。ハウスキーピング遺伝子ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1（HPRT1）mRNAレベルを用いてmRNAレベルを標準化した。さらに、外科的介入前に3mg/kgまたは30mg/kgのいずれかのAb2を受け取ったマウスでは、PAI-1、CTGF、TGF β 1、フィブロネクチン1、Col1a1、およびCol3a1のmRNAレベルは、30mg/kgのIgG1コントロールを受け取ったマウスと比較して有意に低減した。外科的介入前に3mg/kgのAb2を受け取ったマウスでは、30mg/kgのIgG1コントロールを受け取ったマウスと比較して、 α -SMAのmRNAが有意に低減した。さらに、外科的介入前に30mg/kgのAb2を受け取ったマウスでは、30mg/kgのIgG1コントロールを受け取ったマウスと比較して、MCP-1のmRNAレベルが有意に低減した。

【0504】

公知の線維症マーカーのmRNA発現レベルに対するAb3の効果も評価した。図12Iおよび12Jに示されるように、外科的介入前に3mg/kgまたは30mg/kgのAb3を受け取ったマウスでは、IgG1コントロールを受け取ったマウスと比較して、PAI-1およびCol1a1のmRNAレベルが有意に低減した。

【0505】

要するに、ヒドロキシプロリンレベルを除外して、UUOマウスモデルにおいてAb2またはAb3で処置されたマウスにおける有意な効果が観察された。図12A~12Hおよび12Kに示されるように、Ab2処置は、UUOによって誘導されるCVFの増大を有意に弱めて、PAI-1、CTGF、TGF β 1、フィブロネクチン1、Col1a1、およびCol3a1のような公知の線維症マーカーの遺伝子発現を有意に低減させた。同様に、図12I~12Jに示されるように、Ab3処置は、PAI-1およびCol1a1のような公知の線維症マーカーの遺伝子発現を有意に低減させた。これらのデータは、TGF β 1が、腎疾患において役割を果たすTGF β の主な形態であること、および、驚くべきことに、TGF β 2およびTGF β 3が、病因に関与しないと考えられることを示す。

【0506】

【実施例 14：腎臓線維症のミューリンアルポートモデルに対する、 $TGF\beta 1$ 特異的な、コンテキスト非依存性抗体の効果】

ミューリン $Col4a3-/-$ モデルは、常染色体劣性アルポート症候群の確立された遺伝子モデルである。アルポートマウスは、機能性コラーゲン 4 A3 が欠損して ($Col4A3-/-$)、したがって、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、および $\alpha 5$ 鎖を必要とする IV 型コラーゲンを形成することができない。 $Col4a3-/-$ マウスは、糸球体硬化症、間質線維症、および管状萎縮を含むヒト患者における腎臓線維症と一致する腎臓における線維症を発症して、全ての $Col4a3-/-$ マウスは、マウスの遺伝的背景に応じて 10~30 週齢に末期の腎臓疾患 (ESRD) を発症する。 $Col4a3-/-$ マウスにおける腎臓病理の構造上および機能上の兆候は、ESRD への進行と組み合わせて、 $Col4a3-/-$ マウスを、腎臓線維症を理解するための理想的なモデルにさせる。以前の報告は、このプロセスにおける $TGF\beta$ シグナル伝達経路の重要性を指摘して、 $\alpha v\beta 6$ インテグリン ($TGF\beta$ の公知のアクチベーター)、または $TGF\beta$ リガンドトラップによる処置は、アルポートマウスにおいて腎臓線維症および炎症を防ぐことが報告されている (Hahm et al. (2007) The American Journal of Pathology, 170 (1): 110-125)。

10

【0507】

Ab3 は、 $TGF\beta 1$ 活性化のアイソフォーム特異的な、コンテキスト非依存性阻害剤であり、以下のようにアルポートマウスの腎臓線維症を阻害または緩和するその能力に関して試験された。

20

【0508】

129: B16 ヘテロ接合 (heterozygous) X ヘテロ接合交配種由来の F1 子孫 (中度進行 (medium progressing) モデル) をこの試験に用いた。Ab3 に関する抗体投与は、6 週の試験持続期間、 $5\text{mg}/\text{kg}$ で 1 週間に 2 回 (すなわち、 $10\text{mg}/\text{kg}/\text{週}$)、誕生の 6 週後に始めた。pan- $TGF\beta$ 中和抗体をポジティブコントロールとして用いて ($5\text{mg}/\text{kg}$ で、1 週間に 2 回投与した)、一方で、IgG をネガティブコントロールとして用いた。全ての抗体は、腹腔内注入を介して投与された。抗体治療の 6 週間後 (誕生の 12 週間後)、動物を殺して、分析のために腎臓を集めた。

【0509】

30

$TGF\beta$ 受容体活性化は、 $Smad2/3$ のリン酸化を含む細胞内イベントの下流シグナル伝達カスケードをもたらすことが、十分に立証されている。したがって、Ab3 抗体治療の効果は、製造元の説明書に従って ELISA (Cell Signaling) によって分析されるように、 $Smad2/3$ の相対的リン酸化レベルを測定することによって、腎臓溶解サンプルにおいて評価された。図 15 は、全体 (リン酸化および非リン酸化) $Smad2/3$ に対するリン酸化の相対的な比を示すグラフを提供する。Ab3 で処置された動物のサンプルから調製された全腎臓溶解物は、ネガティブコントロールと比較して、 $Smad2/3$ の相対的なリン酸化における有意な減少を示した。平均の比は、ヘテロ接合コントロールのものと同等であった。

【0510】

40

上述の 12 週齢アルポート F1 マウスは、コラーゲン沈着 (ピクロシリウスレッド定量化) および血液尿素窒素 (BUN) の蓄積の両方によって測定されるように (それぞれ、線維症を示す)、試験完了の時点で腎臓線維症の早期の証拠を示した。下流 $TGF\beta$ 受容体シグナル伝達において観察される Ab3 の阻害活性と一致して、Ab3 によって処理された組織は、線維症の減少した前兆 (sign) を示した。例えば、Ab3 処置を受けなかったコントロールのアルポート動物に関する平均 BUN レベルは、 $50\text{mg}/\text{dL}$ よりも上であり、一方で、Ab3 によって処置された動物における平均 BUN レベルは、 $30\text{mg}/\text{dL}$ 未満まで減少して、Ab3 が、線維症を寛解させることが可能であり得ることを示唆した。

【0511】

50

【実施例 15：四塩化炭素によって誘導される肝線維症に対する、 $TGF\beta 1$ 特異的な、コンテキスト非依存性抗体の効果】

$TGF\beta$ 活性は、肝線維症のような臓器線維症の病理における役割を果たすことが暗示されている。可溶性 $TGF\beta RI$ 薬剤が、肝線維症の四塩化炭素 (CCl_4) モデルにおいて肝線維症を防ぐことが以前に報告された (Yata et al., Hepatology, 2002)。同様に、(アデノウイルス送達を介した) $TGF\beta 1$ のアンチセンス阻害は、管結さつに起因する肝線維症を寛解させる (Arias et al., BMC Gastroenterology, 2003)。加えて、 $1D11$ 、 $TGF\beta$ の全てのアイソフォームを中和する pan- $TGF\beta$ 抗体は、TAA によって処置されたラットにおいて肝線維症および胆管細胞癌を減少させることが示されている (Ling et al., PLoS ONE, 2013)。

10

【0512】

ここで、マウスにおける四塩化炭素 (CCl_4) によって誘導される肝線維症モデルを用いて、インビボでの線維症に対する $TGF\beta 1$ 活性化のコンテキスト非依存性阻害剤の効果を評価した。肝線維症は、 CCl_4 (i.p を介して 6 週間、1 週間に 2 回与えられる) によって、雄 BALB/c マウスにおいて誘導された。 CCl_4 処置の最初の 2 週間後、動物を、Ab3 (30 mg/kg) の治療的な毎週の投与によって処置した。抗体による治療的投与は、2 週間後に開始されて、4 週間続けられた。

【0513】

動物を、血液化学データに基づいて無作為化した。試験の Ab3 投与の 4 週間、血液サンプルを、血清 AST/ALT および全ビリルビン分析のために吸引した。動物を 1 週間に 2 回計量して、試験の間、体重を監視した。6 週の試験の後に、肝臓および脾臓を集めて、計量して、肝臓：脾臓重量比を決定した。肝臓病理は、ピクロシリウスレッドによって染色された肝臓スライス上の組織学によって評価した。肝線維症の程度を、マッソンまたはピクロシリウスレッドによって染色された切片に従って、以下に挙げた基準を用いて切片全体に対して 10 または 20 × 対物レンズの下で観察しながらスコア化した。

20

表 14. 線維症スコア基準

スコア	中央静脈の肥大	類洞内	門脈	線維症
	(CLV)	(PS)	(PT)	関与の領域 (NS) 線維の層(WS)
0	正常	なし	なし	なし
1	わずかに肥大	限局性	軽度な量	≤6 層 薄くて、結合されていない
2	適度に肥大	適度な量	適度な量	>6 層 厚くて、結合されている
3	区別がつかない	広範な量	硬変	小結節形成 高密度の線維性組織
4	—	—	—	切片の >2/3

30

40

【0514】

50

それから、線維性スコアが、式 $SSS = CLV + PS + PT + 2 \times (NS \times WS)$ を用いて計算されて、中央静脈の肥大、類洞内、門脈、および影響を受けた領域および組織の層を考慮する。

【0515】

図14に要約されるように、Ab3治療の4回の毎週の投与は、CCl4によって誘導される肝線維症を有意に減少させた。

【0516】

同様に、多数の投与量（3、10および30 mg / kg）でのAb2およびAb3の抗線維性効果を、肝臓の単一葉のホルマリン固定されたパラフィン包埋切片におけるピクロシウスレッド染色の組織学的定量化（%領域）によって試験した。定量化は、盲目様式で病理学者によって行なわれた。上記に提供された観察と一致して、抗体によって処置された動物由来の肝臓切片は、組織コラーゲンの相対量に相当するピクロシウスレッド染色によって測定されるように、CCl4によって誘導される線維症の有意な減少を示した。結果は、Ab2およびAb3のそれぞれが、試験された最も少ない投与量（3 mg / kg）でさえ、肝線維症の減少に効果的であることを示した。より具体的には、Ab2処置を3 mg / kgで受けた、CCl4によって処置された動物は、コラーゲン体積分率（%領域）を、IgGコントロール（3.356%）と比較して、2.03%まで減少させた（ $p < 0.0005$ ）。同様に、Ab3処置を3 mg / kgで受けた、CCl4によって処置された動物は、コラーゲン体積分率（%領域）を、IgGコントロール（3.356%）と比較して、1.92%まで減少させた（ $p < 0.0005$ ）。CCl4処置を受けなかったダブルネガティブコントロール動物は、1.14%のバックグラウンドコラーゲン体積分率を示した。

【0517】

さらに、予備データは、Ab3処置が、リン酸化一対一全体のSMAD2 / 3の比としてELISAによって測定されるように、リン酸化SMAD2 / 3のレベルの有意な減少を引き起こしたことを示し、TGFβ下流シグナル伝達経路が、インビボで、TGFβ1のコンテキスト非依存性阻害剤の投与によって抑制されたことを示す。

【0518】

【実施例16：筋ジストロフィーにおけるTGFβ1の役割】

TGFβは、骨格筋機能において、筋形成の阻害、炎症および筋肉修復の調節、および線維症の促進を含む多数の役割を果たす。筋ジストロフィーを含む広範な疾患のための治療としてTGFβ阻害にかなりの興味が存在するが、これらの治療は、分子コンテキストにかかわらずTGFβ1、TGFβ2、およびTGFβ3を阻害する。これらの阻害剤の特異性／選択性の欠如は、不要な副作用をもたらし得て、不十分な有効性での臨床投与量を導く。pan-TGFβ阻害分子は、mdxマウスにおいて、筋肉機能を改善して、線維症を減少させることが報告されているが、これらの効果がTGFβ1、β2、またはβ3の不活性化に起因するかどうかは、未だ対処されていない。

【0519】

その目的のために、TGFβ2およびβ3を割愛して（sparing）、インテグリンが介在する潜在型TGFβ1の活性化を特異的にブロックする抗体が生産されている。ジストロフィー筋における筋肉修復に特異的なTGFβ1の役割を確認するために、D2・mdxマウスを、proTGFβ1特異的抗体によって処置する。収縮によって誘導される負傷からの保護、ならびに、同一の方法の負傷からの回復に対するTGFβ1阻害の機能性効果を評価する。組織学的評価は、処置が、筋肉損傷、線維症、および炎症に影響を及ぼすかどうかを含む。加えて、筋肉におけるpan-TGFβ阻害で報告される、観察される負の効果（例えば、炎症の増大、筋肉機能における長期損失）が、TGFβ1またはTGFβ2 / 3の阻害に起因するかどうか決定するために、有り得る毒性が評価され得る。特異的な分子コンテキストでのTGFβ1の阻害がより有効であり、および／または、より少ない負の効果（副作用）を有するかどうか理解するために、このモデルにおけるLTBP-proTGFβ1阻害剤の有効性は、免疫細胞によって提示されるTGFβ

1の役割を、細胞外マトリックス（ECM）において提示されるものから、絡まりを解く（*deconvolute*）ために評価され得て、より安全、および／または、より効果的な抗線維性治療を潜在的に導く。

【0520】

ジストロフィー筋は、収縮によって誘導される負傷を非常に起こしやすい。負傷後に、mdxマウス由来の筋肉は、力発生の有意な減少およびエバンスブルー色素の取り込みの増大を示し、WTと比較して、筋線維に対する物理的負傷／損傷を示す（*Lowering, R. M., et al., Arch Phys Med Rehabil, 2007. 88 (5) : p. 617-25*）。収縮によって誘導される負傷の程度を減少する、または、負傷後の回復を改善する治療的薬剤は、筋ジストロフィー患者にとって重大な臨床利益である（*Bushby, K., et al., Lancet Neurol, 2010. 9 (1) : p. 77-93*）。Ab1、Ab2およびAb3のような試験阻害剤は、i) 収縮によって誘導される負傷を防ぐ、ならびに、ii) 負傷からの回復を促進する、それらの能力に関して評価され得る。B10バックグラウンドに対する伝統的なmdx株と対照的に、D2.mdx株が我々の実験に関して用いられ得る。これらのマウスは、DBA2/Jバックグラウンドに対してmdxを交差することによって生産されて、上述のLTBP4の非保護的変異を有し、したがって、標準的なmdx株よりも重度で、進行性で、ヒト疾患に似た疾患病理を示す（*Coley, W. D., et al., Hum Mol Genet, 2016. 25 (1) : p. 130-45*）。D2.mdxマウスが用いられるので、DBA2/Jマウスは、野生型コントロールとしての役割を果たし得る。DM Dは主に雄に影響するので、研究は、雄マウスに焦点を当ててよい。

【0521】

Ab1およびAb2が、収縮によって誘導される負傷を予防／制限する能力を試験するために、6週齢雄D2.mdxマウス（ $n=10$ ）を、 10mg/kg/週 のIgGコントロール、Ab1、またはAb2で6週間処置する。pan-TGF β 阻害剤を用いた公開ワークとの比較を可能にするために、4番目のグループに 10mg/kg/週 の1D11を投与する。全ての抗体はmIgG1アイソタイプであり、この投与量は、UUOモデルにおいて効果的であることが以前に示されている（図12A～12K）。IgGコントロールを投与されたWT群も含まれる。殺する24時間前に、マウスにPBS中1%エバンスブルー色素（EBD）（体重の1体積%）を投与して、蛍光顕微鏡による筋線維損傷の評価を可能にする。処置の最後に、マウスをインビボでの偏心収縮プロトコルに供する。腓腹筋の偏心負傷は、記載されるように（*Khairallah, R. J., et al., Sci Signal, 2012. 5 (236) : p. ra56*）、305B筋肉レバーシステム（*Aurora Scientific*）によって行われ得る。手短に言うと、合間に1分の休止がある20回の偏心収縮が行なわれて、偏心段階の前のピークの等尺性の力の低減は、筋肉損傷の示度（*indication*）としてとられ得る。力の喪失の程度およびEBD陽性線維のパーセントが決定され得る。このプロトコルに供せられるDBA2/Jマウスは、20回の偏心収縮後、最初の力の30～40%を失う。対照的に、D2.mdxマウスは、以前に説明されたように、同一プロトコル後に最初の力の80%を失う（*Pratt, S. J., et al., Cell Mol Life Sci, 2015. 72 (1) : p. 153-64*; *Khairallah, R. J., et al., Sci Signal, 2012. 5 (236) : p. ra56*）。Ab1およびAb2が、負傷後に力の喪失を減少させる能力が評価され得る。マウスを実験の最後に殺して、負傷したおよび負傷していない腓腹筋の両方とも、組織学的分析のために集められ得る。EBD取り込みは、両方の筋肉から評価され得る。筋線維断面積および線維症の程度が測定され得る。断面積の決定のために、筋肉の中央腹部由来の切片が、フルオロフォアにコンジュゲートされた小麦胚芽アグルチニンによって染色され得て、細胞膜を可視化する。切片は、蛍光顕微鏡を用いてデジタル化され得て、細胞境界は予測ソフトウェアを用いてトレースされて、断面積はバイアスのない自動測定を介して決定される。線維症の分析のために、切片はピクロシリウスレッド（PSR）で染色され得て、スライドあ

たりの P S R + の領域が計算される。

【0522】

A b 1、A b 2 または A b 3 が、収縮によって誘導される負傷からの回復を加速する能力が評価される。12週齢 D B A 2 / J および D 2 . m d x マウスは、上述の同一の偏心収縮プロトコルを受け得る。負傷後に、マウスは処置群 (n = 10) に分けられて、I g G コントロール (W T および D 2 . m d x マウスについて)、1 D 1 1、A b 1、A b 2 または A b 3 (D 2 . m d x のみ) が投与される。抗体は、実験の持続時間、10mg / kg / 週で投与され得る。負傷の7および14日後、負傷からの回復に対する処置の効果を評価するために、最大ピークの等尺性の力、単収縮 (t w i t c h) - 対 - 強収縮 (t e t a n i c) 比、および、力と頻度の関係が測定され得る。A b 1、A b 2 および A b 3 は、提示分子にかかわらず T G F β 1 の放出を阻害するが、細胞外マトリックス (すなわち、L T B P によって提示される) からの T G F β 1 の選択的放出は、T G F β 1 によって駆動される T r e g 活性の保存に起因して、D M D においてより大きな利益を有し得る。この疑問に対処するために、特異的な L T B P - p r o T G F β 1 阻害抗体もまた、収縮によって誘導される負傷を予防する、および、負傷からの回復を加速する、能力の両方に関して評価され得る。

【0523】

[実施例 17: 急性の負傷後の骨格筋における T G F β 1 の役割]

筋肉負傷後の筋線維再生において特異的な T G F β 1 の役割が研究され得る。T G F β 1 特異的抗体は、特に筋線維再生中の T G F β 1 の役割を決定するために、心臓毒の負傷モデルにおいて用いられ得る。再生は組織学的に評価され得て、筋肉の質および強度の機能的評価が行われ得る。筋肉再生に関する T G F β 1 阻害の潜在的利益を考慮すると、p a n - T G F β 阻害で観察される毒性を伴わずに有益な効果を有する治療は、大きな利益である。このことは、サテライト細胞機能に対する T G F β 1 特異的な阻害の効果の調査を可能にして、サテライト細胞移植試験に対する見識を提供し得る。

【0524】

上述のように、T G F β は、筋芽細胞激増および分化の阻害、ならびに、萎縮および線維症の促進を含む、筋肉生物学に対する多数の効果を有すると考えられる (A l l e n , R . E . and L . K . B o x h o r n , J C e l l P h y s i o l , 1987 . 133 (3) : p . 567 - 72 ; B r e n n a n , T . J . , et al . , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 1991 . 88 (9) : p . 3822 - 6 ; M a s s a g u e , J . , et al . , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 1986 . 83 (21) : p . 8206 - 10 ; O l s o n , E . N . , et al . , J C e l l B i o l , 1986 . 103 (5) : p . 1799 - 805 ; L i , Y . , et al . , A m J P a t h o l , 2004 . 164 (3) : p . 1007 - 19 ; M e n d i a s , C . L . , et al . , M u s c l e N e r v e , 2012 . 45 (1) : p . 55 - 9 ; N e l s o n , C . A . , et al . , A m J P a t h o l , 2011 . 178 (6) : p . 2611 - 21) 。しかしながら、これらの試験は、培地中で組み換え T G F β 1 を用いた、または、増殖因子がその分子コンテキストから除去されているので非生理学的な結果を有し得るマウスに注入した。あるいは、研究者は、T G F β 1 に関して選択的でない T G F β 阻害剤を用いた。

【0525】

T G F β 1 のアイソフォーム特異的な、コンテキスト寛容効果を評価するために、多数の p r o T G F β 1 抗体 (例えば、A b 3) は、C T X によって誘導される負傷後の筋肉再生に影響するそれらの能力に関して試験され得る。これらの抗体は T G F β 1 活性化の「アイソフォーム特異的」および「コンテキスト寛容」阻害剤であるので、任意の提示分子からの、(T G F β 2 または T G F β 3 と対照的に) T G F β 1 の放出を特異的に阻害し、成熟増殖因子に結合しない (図 4 B) 。

【0526】

筋肉再生は、右腓腹筋への C T X 注入を介して雄 D B A 2 / J マウス (n = 10) にお

いて誘導され得る。負傷の1日前に、マウスに10mg/kgのIgGコントロール、1D11、Ab1、またはAb2が投与され得る。抗体は、試験の終わりまで毎週、投与が続けられる。負傷後7日目および14日目に、筋力測定が、305C筋肉レバーシステム（Aurora Scientific Inc., Aurora, CAN）を用いてインビボで測定され得る。手短に言うと、底屈筋（plantar flexor muscle）のグループについては、収縮は、麻酔されたマウスにおいて坐骨神経の経皮電気刺激によって誘発されて、それから、一連の刺激は、増加する頻度の刺激（0.2msのパルス、500msの一連の（train）持続時間）で：1、10、20、40、60、80、100、150Hzの後に、1Hzでの最終刺激が行なわれる。最大ピークの等尺性の力、単収縮（twitch）-対-強縮（tetanic）比、および、力と頻度の関係が測定され得る。力の測定の後に、負傷した腓腹筋およびヒラメ筋が集められて、組織学のために調製される。筋線維断面積および%PSR+領域は、上記の実施例8に記載のとおり決定され得る。

【0527】

Ab3による処置は、線維症の減少および筋肉機能の改善をもたらし得る。しかしながら、免疫活性化の調節におけるTGFβ1の役割を考慮すれば、1D11処置（Andreotta, F., et al., J Neuroimmunol, 2006. 175（1-2）：p. 77-86）で報告されているように、我々は、抗体による炎症の増大を観察し得る可能性がある。炎症の増大がTGFβ1阻害の治療的効果を制限し得る場合、その後にコンテキスト特異的な抗体が評価され得て、特異性のさらなる程度を提供して、毒性を制限し得る。例えば、読み出しおよび上述の方法を用いて、LTBPからのTGFβ1の放出を阻害する抗体のみが用いられてよい。これらの抗体は、Tregまたはマクロファージからの放出に影響せずに、ECMからのTGFβ1の放出のみを制限し得る。

【0528】

〔実施例18：筋肉障害における適切なTGFβ1阻害剤の選択〕

健康、再生、および疾患筋肉におけるproTGFβ1およびその提示分子の発現分析は、最適な治療的アプローチの選択を助けるための有用な情報を提供し得る。筋肉再生および修復におけるTGFβ1阻害の潜在的利益を考慮すると、異なる条件下（健康、急性に負傷、および慢性的に負傷）の骨格筋における、proTGFβ1提示（例えば、ECM内または免疫細胞上）のコンテキストを理解することは、抗体の治療的有用性に関する情報を与えるのを助けることができ、最終的に、臨床有効性および安全性の両方を達成するために必要とされる特異性／選択性の程度に対する見識を提供する。TGFβ1提示の性質は、筋肉の健康状態に応じて、および、疾患の過程にわたって変化し得て、任意のTGFβ1標的化治療に関する関与を有し得る。これらの分子の発現プロファイルを理解することは、潜在的治療的分子に関する投与の適切な時間の選択も助ける。ウエスタンブロット、免疫組織化学、および免疫沈降を用いて、proTGFβ1およびその提示分子の発現が、正常、急性に負傷した（心臓毒負傷）、および慢性的に再生する（D2.mdxマウス）筋肉において評価され得る。これらの分子の発現は、上述の異なる状態における主要な細胞型または細胞型のサブセット（例えば、サテライト細胞、マクロファージ、線維脂肪生成前駆細胞など）において特に研究され得る。

【0529】

TGFβアイソフォームの発現は、mdxマウス由来の筋肉において試験されているが、以前の研究は、成熟増殖因子の発現に焦点を当てた（Nelson, C. A., et al., Am J Pathol, 2011. 178（6）：p. 2611-21；Zhou, L., et al., Neuromuscul Disord, 2006. 16（1）：p. 32-8）。本明細書に記載のTGFβ1抗体の標的特異性を考慮すると、発現パターンは、成熟およびproTGFβ1に関してだけでなく、提示分子のものに関しても試験されることが必須であり、目的のTGFβ1のプールの由来および／またはコンテキストに関する情報を提供すべきである。理想的には、単に各構成要素ではなく潜在型複合体の発現パターンの理解を得ることが望ましい。

【0530】

抗体は、目的の標的に関するウエスタンブロットおよびIHCのためにスクリーニングされる。マウスTGFβ1-LAP、LTBP1、LTBP3、およびLTBP4に対する抗体は、市販される。TGFβ1-LAP（クローンTW7-16B4）に対する抗体は、広く特徴付けられていて、フローサイトメトリーおよびウエスタンブロットの両方において効果的である（Oida, T. and H. L. Weiner, PLoS One, 2010. 5 (11) : p. e15523）。LTBP1（ProteinTech #22065-1-AP）およびLTBP3（Millipore #ABT316）に対する抗体は、LTBP1-proTGFβ1またはLTBP3-proTGFβ1によってトランスフェクトされたSW480細胞を用いて内部で確認されていて、それらの標的に関して特異的であることが示されている。IHCに関するこれらの抗体の有用性が決定され得る。健康およびD2.mdxマウス由来の筋肉を切片化して、抗体が冷凍およびFFPE切片上で試験される。抗体は、100×過剰の精製された標的タンパク質または複合体（自家製）による条件を含むことによって確認され得て、観察されるシグナルが特異的であることが確認される。

10

【0531】

以前の研究は、所定の潜在型複合体に特異的に結合するが阻害活性を持たない抗体を同定している。これらの抗体による抗原結合は、ELISA（図4C）によって確認されていて、IHCにおけるそれらの有用性に関しても評価され得る（これらのエピトープの三次元構造を考慮すると、これらの抗体はウエスタンブロット試薬として効果的でないと思われる）。バルク組織由来の潜在型TGFβ1複合体の存在もまた、ウエスタンブロットまたは免疫沈降によって評価され得る。潜在型複合体は、還元および非還元条件下で同一サンプルを行なうことによって、ウエスタンブロットによって同定され得る。還元条件下では、TGFβ1、LAPおよび提示分子は分離して、3つの分子は、デュアルカラーのウエスタンブロット方法を用いるが、同一ブロット上に同定され得る。非還元条件下では、LAP：提示分子複合体は関連したままであるが、TGFβ1は解放されて；複合体は、空の提示分子よりもゆっくりと移動して、TGFβ1-LAPと共に移動する。様々な抗体が、特異的な提示分子に対するTGFβ1の直接結合を示すために、筋肉由来の潜在型複合体を免疫沈降させるそれらの能力に関しても評価される。

20

【0532】

適切な抗体が同定された時点で、利用可能な抗体に応じてウエスタンおよび／またはIHCによって、健康な、再生している、および、ジストロフィー筋における発現が評価される。前脛骨筋（TA）および横隔膜筋は、DBA2/JおよびD2.mdxマウスから、4、8、および12週齢に集められ得る。筋肉を再生するために、心臓毒が12週齢DBA2/JマウスのTAへ注入され得て、筋肉が負傷の3、7、および14日後に集められる。少なくとも4匹のマウス由来の組織が、それぞれの状態／時点に関して用いられ得る。共染色実験もまた、様々な分子（例えば：マクロファージに関してCD11b、Tregに関してFoxP3、筋原細胞に関してMyoD）を発現している細胞集団を同定するために行なわれ得る。

30

【0533】

[実施例19：Ab2およびAb3は、ALK5キナーゼ阻害剤LY2109761およびPan-TGFβ抗体と比較して減少された毒性を示す]

40

小分子TGFβ I型受容体（ALK5）キナーゼ阻害剤LY2109761およびPan-TGFβ抗体（hIgG4）と比較して、Ab2およびAb3の毒性を評価するために、毒性試験をラットにおいて行なった。ラットはマウスと比較してTGFβ阻害に対してより感受性であるという以前の報告に基づいて、ラットが、この安全性試験に関する種として選択された。ラットにおいて観察される同様の毒性は、イヌ、非ヒト霊長類、ならびにヒトのような、他の哺乳類種においても観察されている。

【0534】

A. 試験のフェーズI

50

手短に言うと、雌F344/NHsdラットに、Ab2を3mg/kg（1グループ、n=5）、30mg/kg（1グループ、n=5）、または100mg/kg（1グループ、n=5）；pan-TGFβ抗体を3mg/kg（1グループ、n=5）、30mg/kg（1グループ、n=5）、または100mg/kg（1グループ、n=5）；LY2109761を200mg/kg（1グループ、n=5）または300mg/kg（1グループ、n=5）；またはPBS（pH7.4）ビヒクルコントロール（1グループ、n=5）を投与した。Ab2、pan-TGFβ抗体、またはビヒクルコントロールを受け取った動物は、1回、静脈内投与されて（1日目）、LY2109761を受け取ったラットは、7日間1日1回（7投与量）、経口で経管栄養によって投与された。動物体重を、投与フェーズの1、3、および7日目に決定した。8日目に動物を殺して、剖検を行なった。

10

【0535】

図17Aに示される生存データに示されるように、Ab2は、他の処置群と比較して減少した毒性を示した。300mg/kgのALK5キナーゼ阻害剤LY2109761を投与された全ての動物は、瀕死状態で殺されて、または、試験の3、6、または7日目に死んでいることが分かった。200mg/kgのLY2109761を投与された動物のうち2匹は、試験の7日目に死んでいることが分かった。100mg/kgのpan-TGFβ抗体を投与された1匹の動物は、試験の6日目に死んでいることが分かった。100mg/kgまでのAb2を投与された全ての動物は、最終的に殺されるまで生存した。

20

【0536】

同様に、図19Aに示される生存データに示されるように、Ab3によって処置されたラットは、他の処置群と比較して減少した毒性を示した。100mg/kgのpan-TGFβ抗体を投与された動物は、試験の6日目に死んでいることが分かった。100mg/kgまでのAb3を投与された全ての動物は、最終的に殺されるまで生存した。

【0537】

さらに、処置の毒性を、投与フェーズ中に動物の体重を監視することによって評価した。図18B～18Eに示されるように、LY2109761を200mg/kgまたは300mg/kgで受け取った動物は、試験の工程中に体重の低減を示した。

【0538】

動物臓器重量もまた、死後に評価した。表11に示されるように、心臓重量の増大が、 ≥ 200 mg/kgのLY2109761を投与された動物において観察された。心臓重量の増大は、 ≥ 30 mg/kgのpan-TGFβ抗体を投与された動物においても観察された。臓器重量に対する効果は、100mg/kgまでのAb2またはAb3を投与した動物において観察されなかった。

30

40

50

表 1 1. 処置群における臓器重量変化

投与量レベル (mg/kg/日)	処置群					
	ビヒクルコントロール ^a	LY2109761		Pan-TGFβ 抗体		
	0	200	300	3	30	100
心臓						
絶対重量 (g)	0.4084	112	NE	99	123	119
体重比 (%)	0.3952	132	NE	96	122	122
脳重量比 (%)	26.3420	113	NE	98	123	116

NE = 早期死亡率のせいで評価されず

注: それぞれの処置群に関する臓器重量 (体または脳と比較して) の比および絶対重量に関する値は、パーセンテージのコントロール平均値として表される。

^a ビヒクルコントロール = リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、pH 7.4。

【0539】

100 mg/kg までの Ab2 または pan-TGFβ 抗体が投与された動物では肉眼的知見は観察されなかったが、異常な形状をした胸骨は、200 mg/kg または 300 mg/kg のいずれかの LY2109761 を受け取ったそれぞれの処置群の 4 匹の動物において観察された。胸部空洞中の 2.5 mL の透明な流体、および、過剰な流体に起因する肥大した胸腺 (すなわち、浮腫) が、300 mg/kg の LY2109761 を投与された 1 匹の動物において観察されて、それは試験の 3 日目に死んでいることが分かった。

【0540】

表 12 に示されるように、顕微鏡的レベルで、 ≥ 200 mg/kg の LY2109761 を投与された動物は、心臓弁知見 (すなわち、弁膜症) を示した。弁膜症は、出血、内皮過形成、混合炎症性細胞浸潤、および/または間質過形成に起因する心臓弁肥大によって特徴付けられた (図 18F、上側右パネルを参照)。大部分の動物は、影響を受けた多数の弁を有した。加えて、最小限～軽度の混合炎症性細胞浸潤、最小限の出血、および/または最小限の内皮 (心内膜) 過形成を含む心房知見が観察されて、ヘマトキシリンおよびエオシンによって染色された切片における心房の好塩基性染色の増大をもたらした。心筋知見はまた、心臓基底において主に観察されて、最小限～軽度の変性/壊死、軽度の出血、および/または軽度の混合炎症性細胞浸潤から構成された。300 mg/kg の LY2109761 を投与された 1 匹の動物は、冠動脈の炎症を有する軽度のネクロシスを有した。さらに、200 mg/kg の LY2109761 を投与された 2 匹の動物は、最小限の混合炎症性細胞浸潤または大動脈根内の出血を有した。

10

20

30

40

50

表 12. LY2109761 を受け取った動物における顕微鏡的心臓知見

		LY2109761			
投与量 (mg / kg / 日)		0	200	300	
心臓					
心臓弁					
弁膜症					
最小限	0	1	2	10	
軽度	0	3	3		
中度	0	1	0		
心房					
浸潤、混合細胞					
最小限	0	2	3		
軽度	0	0	1		
過形成、内皮					
最小限	0	1	3		
出血					
最小限	0	1	2	20	
心筋					
変性／壊死					
最小限	0	0	1		
軽度	0	1	1		
出血					
軽度	0	1	0		
浸潤、混合細胞					
軽度	0	0	1	30	
冠動脈					
炎症を有するネクロシス					
軽度	0	0	1		
大動脈根					
出血					
最小限	0	1	0		
浸潤、混合細胞					
最小限	0	1	0	40	

【0541】

表 13 および図 22 に示されるように、 $\geq 3 \text{ mg/kg}$ の pan-TGF β 抗体を投与された動物は、上述の LY2109761 を投与された動物で説明されたものと同様に、心臓弁知見（すなわち、弁膜症）を示した（同じく図 17 F、下側左パネルを参照）。 $\geq 30 \text{ mg/kg}$ の pan-TGF β 抗体を投与された動物は、LY2109761 を投与された動物において説明したものと同様の心房知見を示した。 100 mg/kg の pan-TGF β 抗体を投与された動物は、LY2109761 を投与された動物において説明したものと同様の心房知見を示し、 30 mg/kg の pan-TGF β 抗体を投与された動物は、心筋内に出血があった。 100 mg/kg の pan-TGF β 抗体を投与された

最小限または軽度の心臓弁知見は、A b 2を投与された動物の少数において生じたが、これらの知見は、低い発生率（動物および動物内の心臓弁の数）、投与量応答の欠如、および／または、同時的な骨知見の欠如に起因して、試験品目関連ではないと考えられた。

【0543】

B. 試験のフェーズII

試験の第二フェーズでは、雌ラットがグループに割り当てられて、上述のように、A b 2を3mg/kg（1グループ、n=5）、30mg/kg（1グループ、n=5）、または100mg/kg（1グループ、n=5）；A b 3を3mg/kg（1グループ、n=5）、30mg/kg（1グループ、n=5）、100mg/kg（1グループ、n=5）、または60mg/kg（1グループ、n=5）；LY2109761を200mg/kg（1グループ、n=5）；または、PBS（pH7.4）（1グループ、n=5）を投与された。A b 2、A b 3、またはビヒクルコントロールを受け取った動物は、10mL/kgの容量で4週、1週間に1回、静脈内に投与されて、LY2109761を受け取ったラットは、経口で経管栄養によって1日に1回、5日間投与された。動物を殺して、剖検を行なった。

【0544】

試験の第一フェーズにおける観察と同様に、試験品目関連の心臓知見は、200mg/kgのLY2109761を投与された動物において、より短い持続時間（すなわち、7日の代わりに5日）生じた。顕微鏡的心臓知見は、200mg/kgのLY2109761または ≥ 3 mg/kgのpan-TGF β 抗体を投与された動物に関する心臓重量の増大と関連した。

【0545】

最小限または軽度の心臓弁知見は、A b 2またはA b 3を投与されたフェーズII動物の少数において生じたが、これらの知見は、低い発生率（動物および動物内の心臓弁の数）、投与量応答の欠如、および／または、同時的な骨知見の欠如に起因して、試験品目関連ではないと考えられた。

【0546】

さらなる組織がフェーズIIにおいて評価された；顕微鏡的知見は、A b 2またはA b 3に起因しなかった。しかしながら、顕微鏡的知見は、200mg/kgのLY2109761を投与されたフェーズII動物の骨（胸骨、大腿骨、および脛骨）、肝臓、脾臓（動脈）、胸腺、甲状腺、雌生殖組織（卵巣、子宮、頸部、および膣）、および乳腺において生じた。胸腺知見は、最小限～軽度に低減した皮質内リンパ球から構成されて、それは、肉眼的に（macroscopically）小さな胸腺および低減した胸腺重量と相関した。胸腺リンパ球の低減は、一次試験品目の効果と一致し、または、二次応力の効果（すなわち、内因性グルココルチコイドの増大）であった。最小限の甲状腺小胞細胞肥大（甲状腺重量の増大と相関する）は、肝臓酵素の導入と一致して、チロキシン代謝の増大をもたらした。LY2109761を投与された動物に関する肝臓重量の増大は、肝臓酵素導入を示唆するが、それらは、顕微鏡的な相互関連がなかった。雌生殖組織および乳腺における顕微鏡的知見は、発情周期の低減と一致し、子宮重量の低減と相関した。一部の動物はまた、管の上皮細胞および／または肺胞の小葉過形成／肥大（すなわち、雄性化）によって特徴付けられる乳腺知見も有し、エストロゲンの低減と一致した。

【0547】

C. 研究の結論

要するに、試験された全ての投与量（3mg/kg、30mg/kgまたは100mg/kg）で、4週の期間にわたってA b 2およびA b 3によって処置された動物は、以下：心筋変性（degeneration）または壊死、心房出血、心筋出血、弁出血、弁内皮過形成、弁間質過形成、心臓弁内の混合炎症性細胞浸潤、石灰化、冠動脈内の出血を有するネクロシス、大動脈根（aortic root）内の炎症を有するネクロシス、心筋細胞内のネクロシスまたは炎症性細胞浸潤、および弁膜症の、いずれのパラメーターにおいても、バックグラウンドよりも上の毒性作用を示さなかった。したがって、T

G F β 1 活性化のアイソフォーム特異的阻害剤による処置は、驚くべきことに、著しく改善された安全性プロファイル、例えば、p a n - T G F β 阻害剤処置（例えば、A L K 5 キナーゼ阻害剤 L Y 2 1 0 9 7 6 1 または p a n - T G F β 抗体）と比較して死亡率の減少および心臓毒性の減少をもたらした。

【0548】

〔実施例20：インビボでのA b 3のアイソフォーム選択性〕

インビボでのT G F β 1のアイソフォーム選択的な阻害を確認するために、薬力学試験を行ない、健康なラットから回収した気管支肺胞洗浄（B A L）細胞における持続性（t o n i c）リン酸化－S M A D 2 / 3 レベルに対するA b 3の効果を評価した。恒常性条件下では、B A L細胞はT G F β 2 / 3を優勢に発現するが、T G F β 1をほとんど発現せず、一方で、後者は病理学的条件において優先的に上昇することが、文献で報告されている。

10

【0549】

健康なS p r a g u e D a w l e yラット（試験の開始において、およそ6～8週齢、200～250gの重量；C h a r l e s R i v e r）を、体重によって試験群に無作為化して、以下に記載のとおり投与した。

【0550】

動物は、試験抗体（h u N E G - m I g G 1、抗－インテグリン β 6抗体、またはA b 3）を1、8、および15日目に腹腔内注入によって受け取った。動物は、B A Lおよび血清回収のために16日目に安楽死させる。コントロール動物の1グループは、単一の経口の経管栄養（P O）投与量のL Y 2 1 0 9 7 6 1（小分子A L K 5阻害剤）を100mg / kgで投与されて、B A L回収のために投与後2時間（+ / - 20分）に安楽死させた。

20

【0551】

B A Lサンプルを集めるために、肺全体を5.0mLの氷冷ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄した。洗浄液（L a v a g a t e）をプールして、以下のように処理するまで、濡れた氷の上に直ちに置いた。それぞれのサンプル由来の小さな部分（100～150 μ L）を、細胞計数のために氷上のわきにセットした。残りのサンプルを1,300g（2～8 $^{\circ}$ C）で $\geq$ 10分間遠心分離した。細胞ペレットを直ちに氷上に置いた。250 μ Lの、調製されたばかりの氷冷p S M A D溶解バッファーを用いてペレットを溶解させた。溶解したサンプルを14,000gで10分間（2～8 $^{\circ}$ C）遠心分離した。生じた上清を等分して、液体窒素中または乾燥した氷の上で直ちに急速冷凍した。

30

【0552】

血清サンプルを、2,500g、2～8 $^{\circ}$ Cで、10分間、遠心分離によって処理した。血清サンプルを－70～－90 $^{\circ}$ Cで凍らせた。

【0553】

リン酸化－S M A D 2 / 3アッセイを、製造元の説明書に従ってE L I S A（C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g i e s）によって行なった。結果を、リン酸化－対－全S M A D 2 / 3比によって評価した。表20に示されるように、持続性（t o n i c）S M A D 2 / 3シグナル伝達は、小分子p a n - T G F β 阻害剤、L Y 2 1 0 9 7 6 1、または、インテグリンの β 6鎖に対するモノクローナル抗体（インテグリンが介在するT G F β 1 / 3の活性化をブロックする）のいずれかによって処置された動物において有意に抑制された。比較すると、T G F β 1アイソフォーム特異的な抗体、A b 3によって処置された動物は、B A L細胞における持続性（t o n i c）リン酸化レベルを維持し、A b 3が、インビボで、T G F β 2またはT G F β 3の恒常性機能を混乱させずに、T G F β 1活性化を選択的に阻害することが可能であるという見解を支持した。

40

【0554】

〔実施例21：A b 3：抗線維形成活性を有する、新規で非常に特異的なT G F β 1阻害抗体〕

形質転換増殖因子－ β 1（T G F β 1）は、組織恒常性および免疫応答の調節を含む様

50

々な生物学的機能を有する。調節不全のTGFβ1活性化は、腎臓線維症を含む多くの疾患と関連していて、慢性の活性化が主に疾患を駆動する。しかしながら、TGFβ1増殖因子と、その近い類似体TGFβ2およびTGFβ3との間の高いホモロジーのため、真にTGFβ1特異的な阻害剤は、理解しにくいままである。Pan-TGFβ阻害は、一方で、投与量を制限する心臓弁膜症を引き起こし得て、長期の投与と関連する毒性をもたらす。TGFβは、N末端プロドメインおよびC末端増殖因子にシグナル分解性に切断されるプロタンパク質として発現される。プロドメインは、増殖因子と非共有的に結合したままであり、受容体結合を妨げる。この潜在型TGFβ複合体は、複合体がインテグリンによって活性化されるまで、細胞上または細胞外マトリックス内に存在して、増殖因子をフリーにして、受容体結合を可能にする。TGFβ1特異的な抗体を同定するために、TGFβ2およびTGFβ3に対して、増殖因子よりもいっそう低いホモロジーを共有するプロドメインを標的化した。潜在型TGFβ2またはTGFβ3に対して検出可能な結合はせず、潜在型TGFβ1に特異的に結合するモノクローナル抗体Ab3が同定された。Ab3は、αVβ6またはαVβ8インテグリンによる潜在型TGFβ1活性化をブロックすることが示されて、TGFβ1増殖因子／受容体相互作用を標的化する生物製剤によって達成されない特異性を提供した。Ab3は、全ての4つの公知のTGFβ提示分子との複合体で潜在型TGFβ1に結合および阻害し、多数の組織において潜在型TGFβ1の標的化を可能にする。Ab3は、皮膚筋線維芽細胞および肝星細胞を含む多くの初代細胞において内因性TGFβ1の活性化をブロックする。最後に、この新規のメカニズムを介したTGFβ1阻害のインビボでの有効性を、腎臓線維症のUUOモデルにおいて試験して、Ab3が、pan-TGFβ抗体によって処置された動物において達成されたものと同様のレベルまで線維症マーカーを抑制することを示した。合わせると、これらのデータは、潜在型TGFβ1活性化の阻害が前臨床線維症モデルにおいて効果的であり、pan-TGFβ阻害と比較して優れた安全性プロファイルを有することを示す。

【0555】

〔実施例22：抗線維形成活性を有する抗体であるAb1による、TGFβ1活性化の非常に特異的な阻害〕

形質転換増殖因子-β1 (TGFβ1) は、組織恒常性および免疫応答の調節を含む、極めて重要かつ様々な生物学的機能を有するサイトカインである。TGFβは、N末端プロドメインおよびC末端増殖因子にシグナル分解性に分解されるプロタンパク質として発現される。分泌された増殖因子は、プロドメインと非共有的に結合したままであり、受容体結合およびシグナル伝達を妨げる。潜在型TGFβ1は、潜在型TGFβ1を、細胞外マトリックスまたは細胞表面に連結するジスルフィド結合を介して提示分子と共有結合する。現在までに、4つのTGFβ提示分子 (LTBP1、LTBP3、GARP、およびLRRC33) が同定されている。これらの提示分子は、潜在型TGFβ1に対して牽引力を与えるためのインテグリンに関するアンカーを提供し、したがって、活性の増殖因子を解放するので、潜在型複合体の活性化において重要な役割を果たす。調節不全のTGFβ1活性化は、線維性疾患を含む多くの病理と関連していて、慢性のTGFβ1活性化は、筋線維芽細胞の分化転換および細胞外マトリックスタンパク質の過剰発現を駆動する。線維症を駆動するTGFβ1の役割は、その活性を阻害するための多数の治療薬の開発を導いている。しかしながら、強力な抗-pan-TGFβ抗体による阻害は、投与量を制限する心臓弁膜症を引き起こすことが見いだされて、この治療的アプローチの毒性に関する懸念をもたらした。TGFβ1を特異的に標的化する代替の戦略は、TGFβ1増殖因子とその近い類似体TGFβ2およびTGFβ3との間の高いホモロジーによって複雑化される。TGFβ1プロドメイン (TGFβ2およびTGFβ3のプロドメインに対してよりいっそう低いホモロジーを有する) が標的化されて、Ab3 (潜在型TGFβ1に特異的に結合して活性化を阻害し、潜在型TGFβ2またはTGFβ3に対して検出可能に結合しない、完全なヒトモノクローナル抗体) が同定された。この新規のメカニズムは、TGFβ1増殖因子／受容体相互作用に結合およびブロックする生物製剤によって達成されないアイソフォーム特異性を可能にして、αVβ6およびαVβ8インテグリン

10

20

30

40

50

ンの両方による潜在型 TGFβ1 活性化を妨げる。Ab3 は、全ての 4 つの公知の TGFβ 提示分子との複合体で潜在型 TGFβ1 に結合および阻害して、多数の組織において潜在型 TGFβ1 の標的化を可能にする。Ab3 は、皮膚筋線維芽細胞および肝星細胞を含む多くの初代細胞において、インビトロで内因性 TGFβ1 を阻害する。加えて、この新規のメカニズムを介した TGFβ1 阻害のインビボ有効性を、腎臓線維症の片側尿管閉塞モデルにおいて試験した。Ab3 は、pan-TGFβ 抗体によって処置された動物において達成されたものと同様のレベルまで、線維促進性遺伝子の誘導を抑制することが分かった。合わせると、これらのデータは、潜在型 TGFβ1 活性化の阻害が、前臨床線維症モデルにおいて効果的であり、pan-TGFβ 阻害と比較して潜在的に優れた安全性プロファイルを有することを示す。

【0556】

[実施例 23：TGFβ1、TGFβ2 および TGFβ3 の相対的発現の生物情報学分析]

癌性腫瘍における TGFβ アイソフォームの発現を評価するために、公共に利用可能なデータベースからの遺伝子発現 (RNAseq) データを試験した。公共に利用可能オンラインインターフェイスツール (Firebrowse) を用いて、The Cancer Genome Atlas (TCGA) において TGFβ アイソフォームの発現を試験して、正常および癌性組織の両方における TGFβ アイソフォームをコードする RNA の示差的発現を最初に試験した。TCGA データベース内の全ての腫瘍 RNAseq データセットは、正常組織コンパレータが選択されて、TGFB1、TGFB2、および TGFB3 遺伝子の発現が試験された (図 21A)。Firebrowse インターフェイスからのデータは、キロベースミリオンあたりのリード (reads per kilobase million) (RPKM) の log2 として表される。

【0557】

これらのデータは、大部分の腫瘍型 (灰色) において、TGFB1 が、TGFβ アイソフォームの最も多量に発現される転写産物であることを示唆し、log2 (RPKM) 値は一般に、0~2 (TGFB2) および 2~4 (TGFB3) に対して、4~6 の範囲である。我々はまた、いくつかの腫瘍型において、TGFB1 および TGFB3 発現の両方の平均レベルが、正常コンパレータサンプル (黒) と比較して上昇することに注目し、これらの TGFβ アイソフォームの発現の増大が、癌性細胞と関連し得ることを示唆する。癌微小環境内の宿主免疫系の抑制における TGFβ シグナル伝達の潜在的役割のため、我々は、TGFB1 転写が、抗-PD1 または抗-PDL1 治療が認められている癌タイプにおいて上昇することに注意することに興味を持った。これらの適応症 (indication) は、図 21A において灰色でラベルされる。

【0558】

RPKM > 1 は一般に、生物学的に関連のある遺伝子発現と関連する最小値であると考えられるが (Hebenstreit et al., 2011; Wagner et al., 2013)、その後の分析に関して、よりストリンジントな RPKM (または関連する測定 FPKM (Conesa et al., 2016 を参照)) のカットオフ > 10 または > 30 が、偽陽性を避けるために用いられたことに注目する。比較のために、これらの閾値の 3 つ全てを図 21A に示す。

【0559】

図 21A における大きな四分位間範囲は、個々の患者間の TGFβ アイソフォーム発現における有意な可変性を示す。患者集団の少なくともサブセットが TGFB1 アイソフォームを示差的に発現する腫瘍を有する癌を同定するために、TCGA データセット内の個々の腫瘍サンプル由来の RNAseq データを分析して、キロベースミリオンあたりのフラグメント (fragments per kilobase million) (FPKM) の数を計算した。RPKM および FPKM は、ほぼ同等であるが、FPKM は、同一の転写の逆末端におけるダブル計測リード (double-counting reads) に関して修正する (Conesa et al., 2016)。腫瘍サンプルは、転写

10

20

30

40

50

のFPKM値 (FPKM value the transcript) が >30 であるならば、TGFB1、TGFB2、またはTGFB3発現に関して陽性としてスコアされて、それぞれのTGFBアイソフォームを発現するそれぞれの癌タイプの患者の割合(%)として表される)が計算された。(we calculated) (図21B)。

【0560】

図21Bに示されるように、TGCAデータセット内の腫瘍タイプの大部分が、TGFB1陽性である個々のサンプルの有意なパーセンテージを示し、急性骨髄性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、および頭頸部扁平上皮細胞癌腫を含む一部の癌タイプは、全ての腫瘍サンプルの80%よりも多くにおいてTGFB1を発現する。図21Aにおけるデータと一致して、より少ない癌タイプがTGFB2またはTGFB3に関して陽性であるが、胸部侵襲性癌腫、中皮腫、および肉腫を含むいくつかの癌は、TGFB3陽性である腫瘍サンプルの等しいまたはより大きなパーセントを示す。これらのデータは、癌タイプが、TGFBアイソフォーム発現に関して階層化され得ること、および、そのような階層化が、TGFBアイソフォーム特異的阻害剤による治療の候補者である患者を同定するのに有用であり得ることを示唆する。

【0561】

この仮説をさらに検討するために、個々の腫瘍サンプルのサブセット由来の $\log_2$ (FPKM) RNAseqデータを、ヒートマップ内にプロットして(図21C)、FPKM >30 を反映する色閾値を、TGFBアイソフォーム陽性とスコア化される最小転写レベルとして設定した。

【0562】

それぞれのサンプルは、ヒートマップにおいて単列として表されて、サンプルは、TGFB1発現のレベルによって並べられる(最も高い発現レベルが上)。図21Bにおける分析と一致して、それぞれの癌タイプにおける有意な数のサンプルが、TGFB1発現に関して陽性である。しかしながら、この表現は、多くの腫瘍が単にTGFB1転写を発現するという事実も強調する(特に食道癌腫、膀胱尿路上皮、肺腺癌、および皮膚黒色腫癌タイプにおいて)。興味深いことに、胸部侵襲性癌腫由来のサンプルは、TGFB1陽性よりもTGFB3陽性である、よりいっそう大きな数のサンプルを示すので、そのようなTGFB1スキューイング(skewing)は、全ての癌の特徴ではない。それにもかかわらず、この分析は、 $\beta 1$ アイソフォームが優勢であり、ほとんどの場合において、数多くの癌患者由来の腫瘍内に存在する唯一のTGFBファミリーメンバーであることを示す。TGFBシグナル伝達が癌微小環境内の免疫抑制において重大な役割を果たすことを示唆するデータと合わせると、これらの知見は、これらの腫瘍の治療におけるTGFB1特異的な阻害の有用性も指摘する。

【0563】

癌治療としてのTGFB1特異的な阻害の有効性を試験するためのマウスモデルを同定するために、マウス同一遺伝子型腫瘍モデルにおいて用いられた様々な細胞株由来のRNAseqデータにおけるTGFBアイソフォーム発現を分析した。この分析のために、データの2つの表現を作成した。第一に、図3におけるデータと同様に、我々は、それぞれの細胞株由来の腫瘍に関する $\log_2$ (FPKM) 値のヒートマップを作成した(図21D、左)。TGFB2およびTGFB3陰性である、高いTGFB1を発現している同一遺伝子型モデルを同定するためにこの分析が用いられたので、我々は主に偽陰性を避けることを心掛けて、図21Bおよび21Cでの表現におけるものより十分下のFPKM >1 に、我々の「陽性」閾値を設定した。

【0564】

図21D(左)におけるデータ表現が明らかにするように、MC-38、4T-1、およびEMT6を共通して含む多くの同一遺伝子型腫瘍は、有意なレベルのTGFB1およびTGFB3の両方を発現する。対照的に、A20およびEL4モデルは、ほぼ例外なくTGFB1を発現し、S91およびP815腫瘍は、TGFB1発現に関する強いバイアスを示す。

【0565】

TGFB1対TGFB2および／またはTGFB3の示差的発現をさらに評価するために、 $\min \Delta TGFB1$ を計算して、 $\log 2 (FPKM_{TGFB1}) - \log 2 (FPKM_{TGFB2})$ または $\log 2 (FPKM_{TGFB1}) - \log 2 (FPKM_{TGFB3})$ のより小さな値として定義した。それぞれのモデルに関する $\min \Delta TGFB1$ を図21D（右）にヒートマップとして示し、A20、EL4、S91、および／またはP815細胞株由来の同一遺伝子型腫瘍が、TGFB1特異的な阻害剤の有効性を試験するための優れたモデルを示し得るという図21D（左）からの結論を強調する。

【0566】

上記の個々のセクションにおいて言及される本発明の様々な特徴および実施態様は、必要な変更を加えて、必要に応じて他のセクションに適用する。その結果として、あるセクションにおいて規定される特徴は、必要に応じて、他のセクションにおいて規定される特徴と組み合わせられ得る。

【0567】

当業者は、本明細書に記載される本発明の特定の実施態様に対する多くの等価物を認識し、または、ほんのルーチン実験を用いて確認することができる。そのような等価物は、以下の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

10

20

30

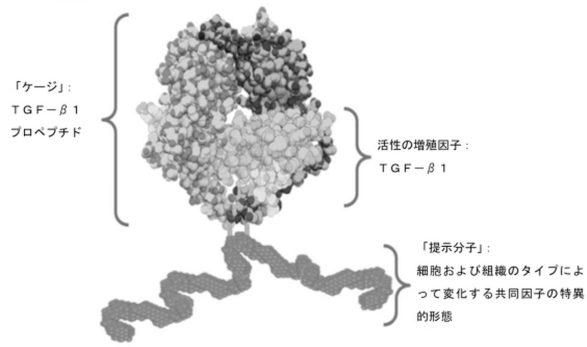
40

50

【図面】

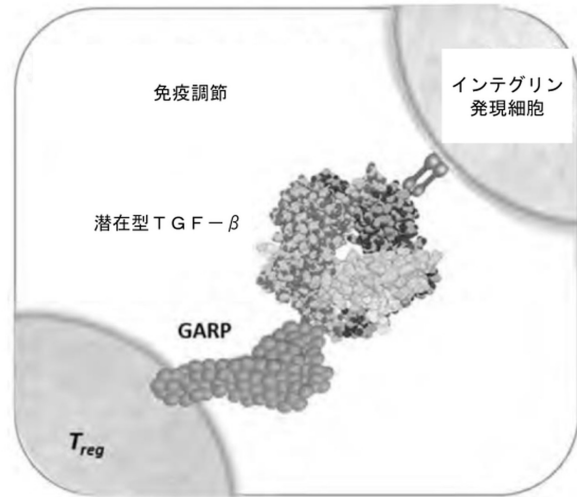
【図 1】

FIG. 1



【図 2 A】

FIG. 2A

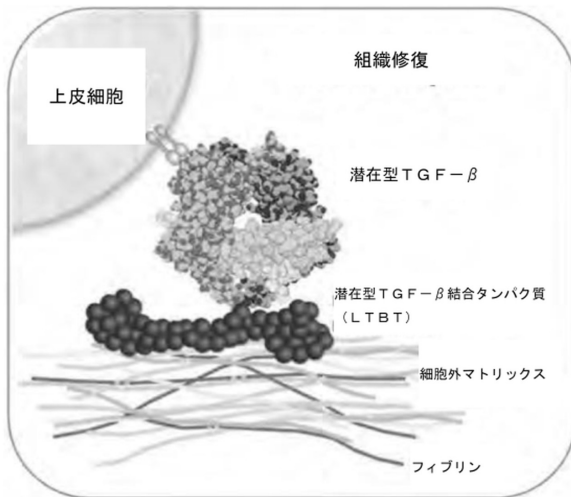


10

20

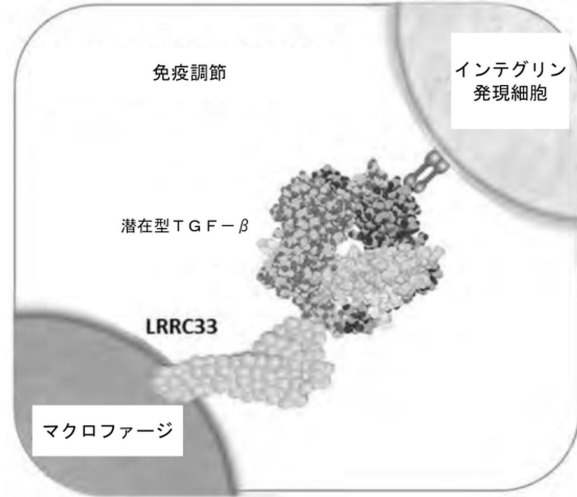
【図 2 B】

FIG. 2B



【図 2 C】

FIG. 2C



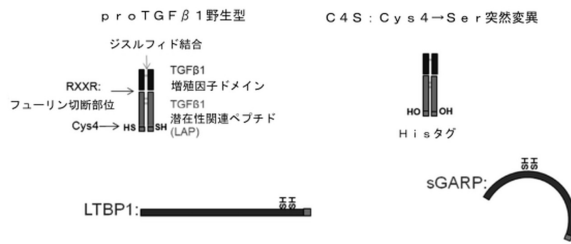
30

40

50

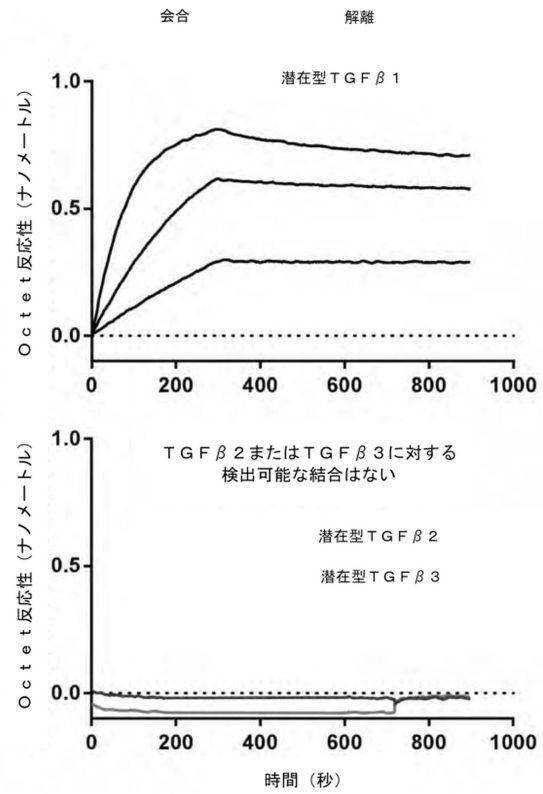
【図 3】

FIG. 3



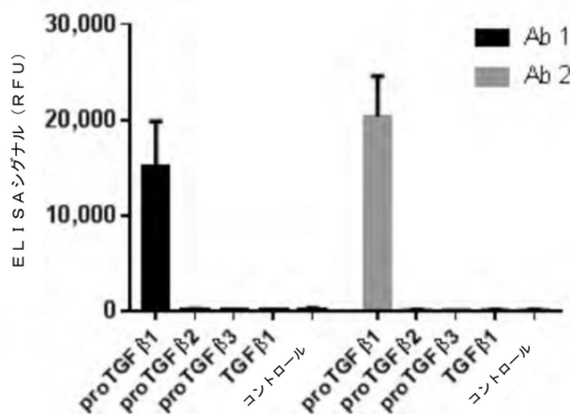
【図 4 A】

FIG. 4A



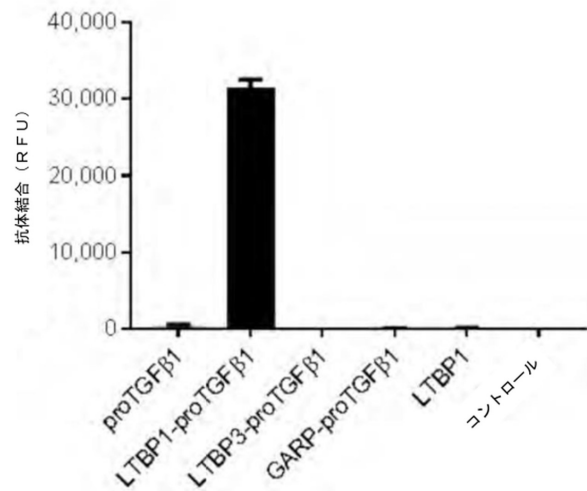
【図 4 B】

FIG. 4B



【図 4 C】

FIG. 4C



10

20

30

40

50

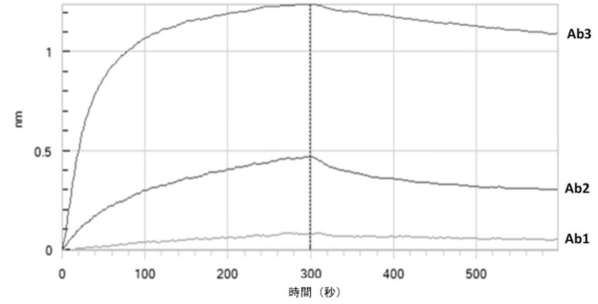
【図 5】

FIG. 5

	TGF β 1	TGF β 2	TGF β 3
C2	< 1 pM	結合なし	15.2 nM
C3	< 1 pM	23.4 nM	5.6 nM
C4	< 1 pM	< 1 pM	18.7 nM
C5	< 1 pM	< 1 pM	< 1 pM
C6	< 1 pM	1.7 nM	< 1 pM
C1	< 1 pM	2.8 nM	< 1 pM

【図 6 A】

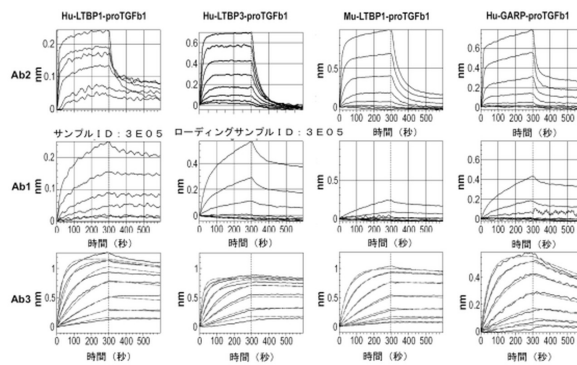
FIG. 6A



10

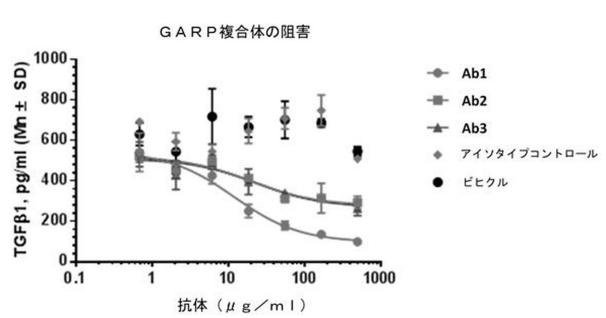
【図 6 B】

FIG. 6B 滴定曲線: Fc キャプチャー-mAb-Ag



【図 7 A】

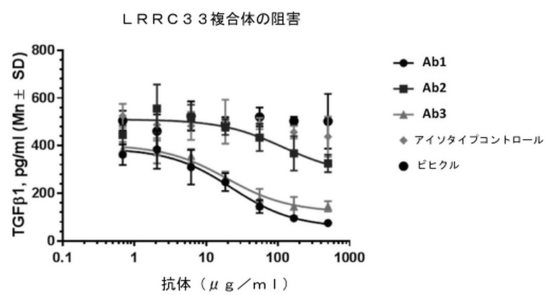
FIG. 7A



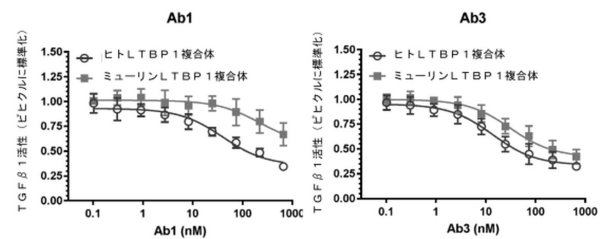
20

【図 7 B】

FIG. 7B



【図 7 C】

図 7C: LTBP1-proTGF β 1 活性化の阻害 (LN229アッセイ)

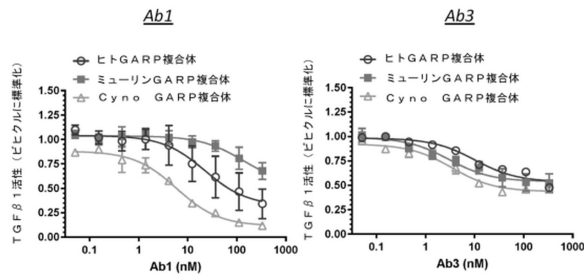
Ab2によるGARPおよびLRR33複合体の阻害は図7Aおよび7Bにある。

30

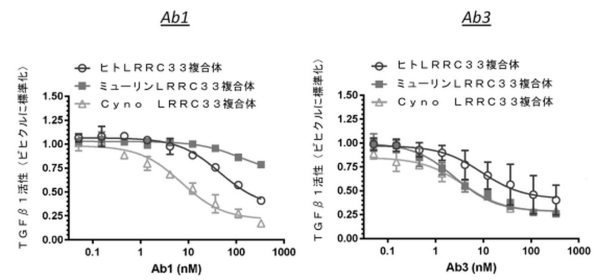
40

50

【図 7 D】

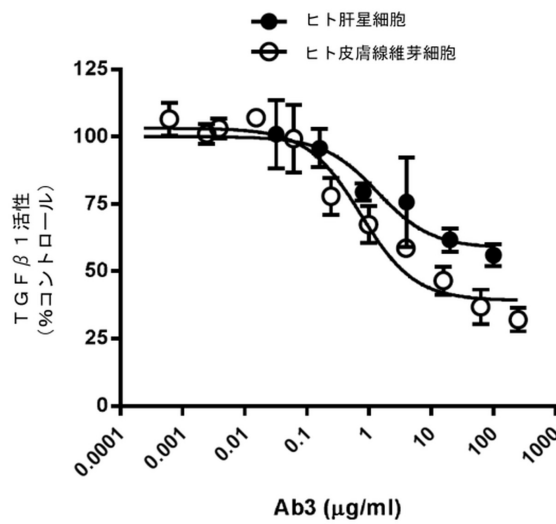
図 7 D: GARP-proTGF β 1 活性化の阻害 (SW480b6 アッセイ)

【図 7 E】

図 7 E: LRRC33-proTGF β 1 活性化の阻害 (SW480b6 アッセイ)

【図 7 F】

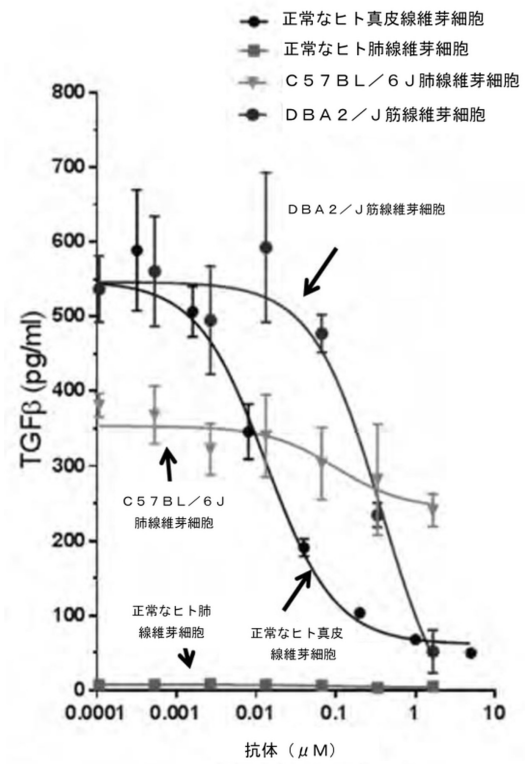
FIG. 7F



【図 7 G】

FIG. 7G

Ab1



10

20

30

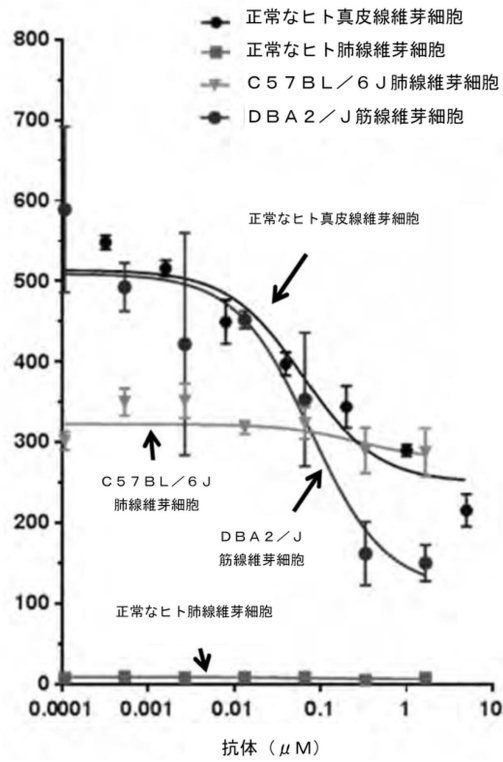
40

50

【図 7 H】

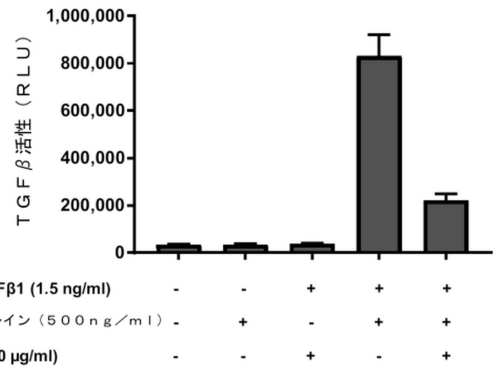
FIG. 7H

Ab2



【図 8】

図 8 : TGFβ1 のプロテアーゼ依存性活性化の阻害

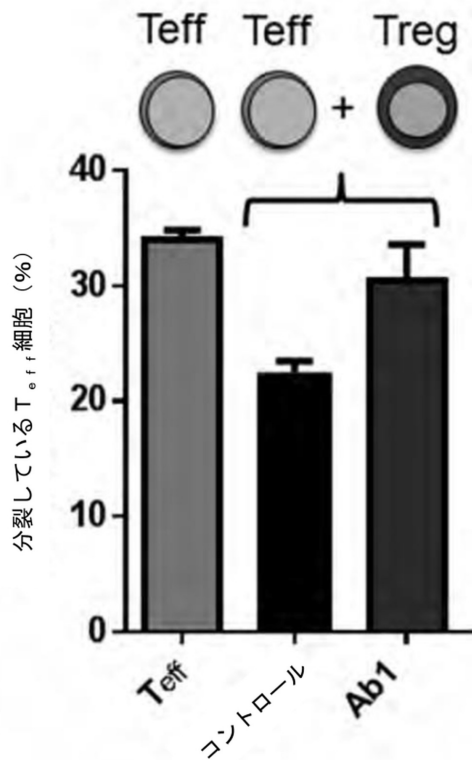


10

20

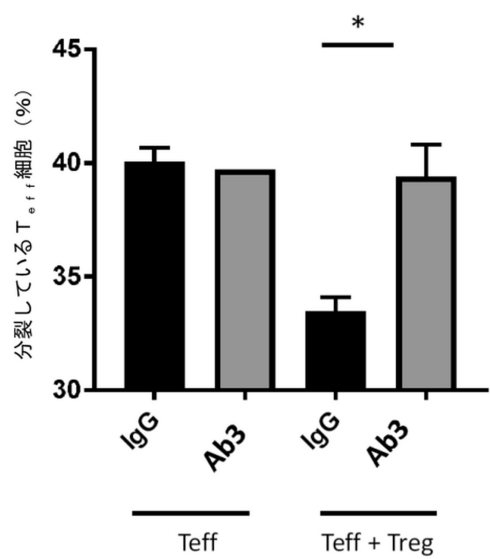
【図 9 A】

FIG. 9A



【図 9 B】

FIG. 9B



* P < 0.05 (両側 T 検定)

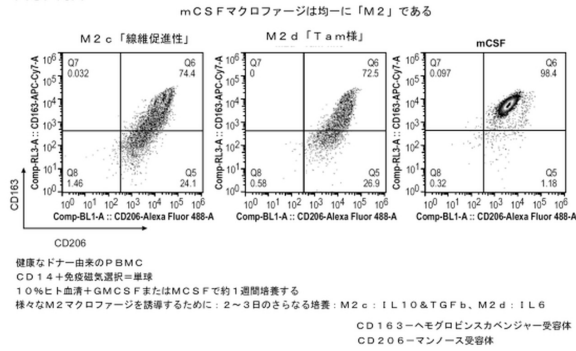
30

40

50

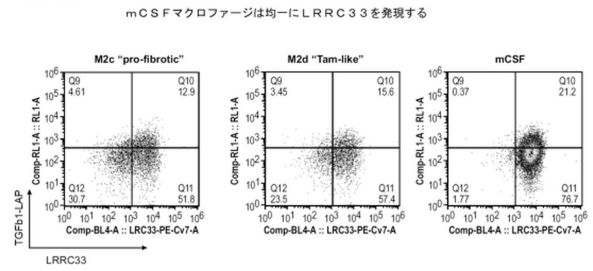
【図 10 A】

FIG. 10A



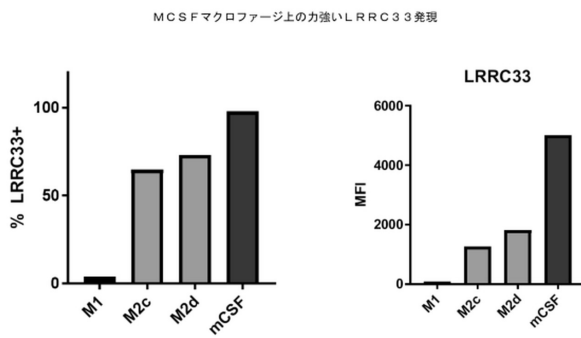
【図 10 B】

FIG. 10B



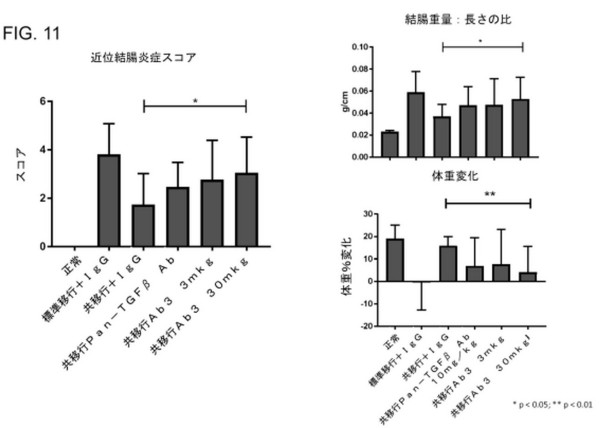
【図 10 C】

FIG. 10C



【図 11】

FIG. 11



10

20

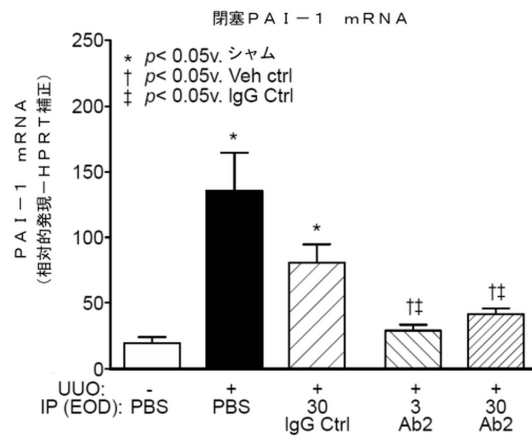
30

40

50

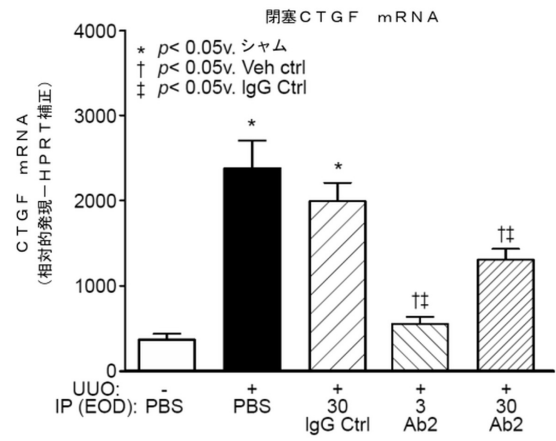
【図 1 2 A】

FIG. 12A



【図 1 2 B】

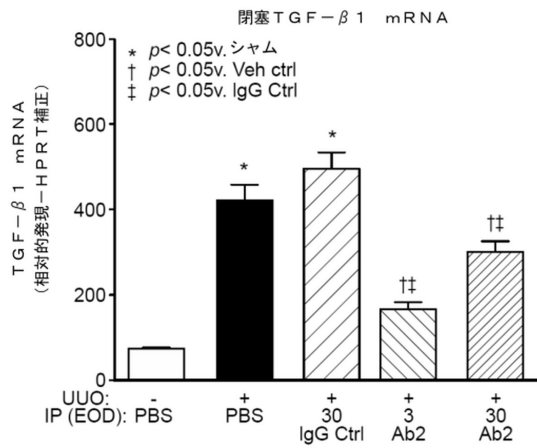
FIG. 12B



10

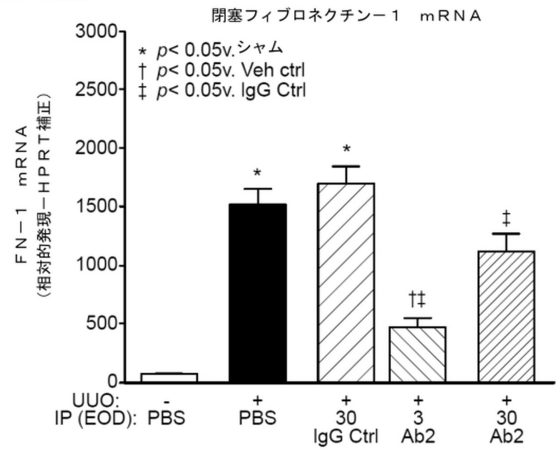
【図 1 2 C】

FIG. 12C



【図 1 2 D】

FIG. 12D



20

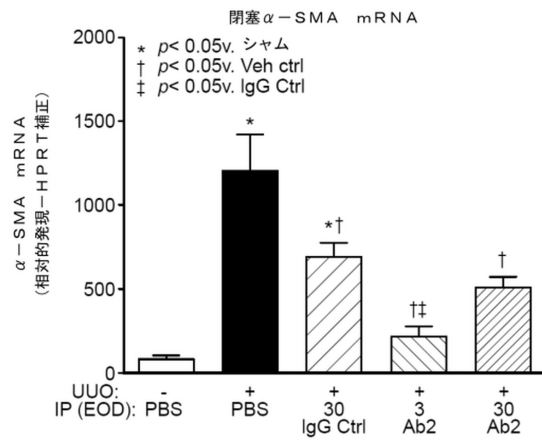
30

40

50

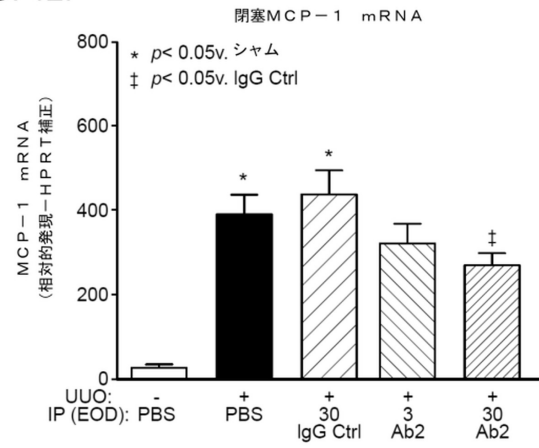
【図 12 E】

FIG. 12E



【図 12 F】

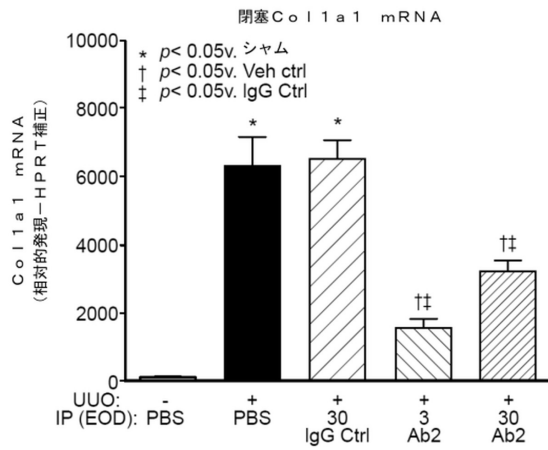
FIG. 12F



10

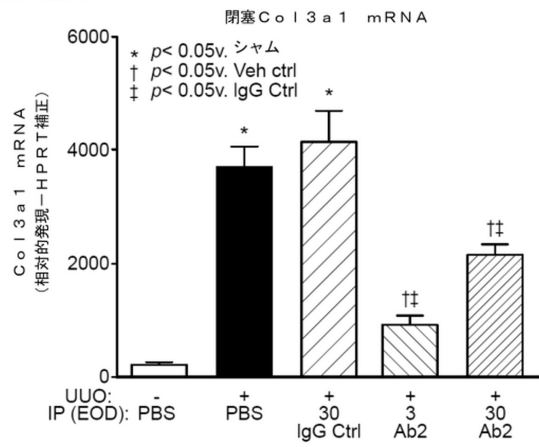
【図 12 G】

FIG. 12G



【図 12 H】

FIG. 12H



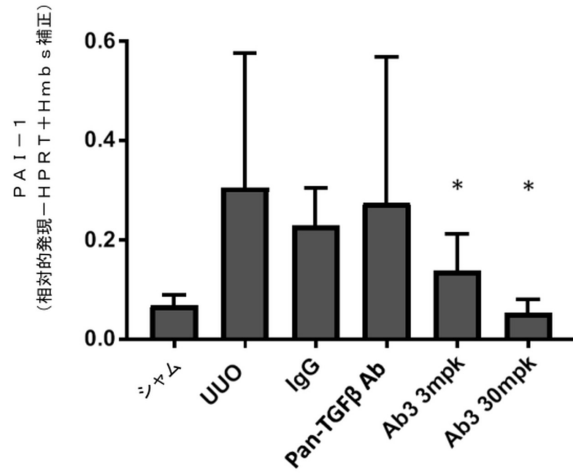
20

30

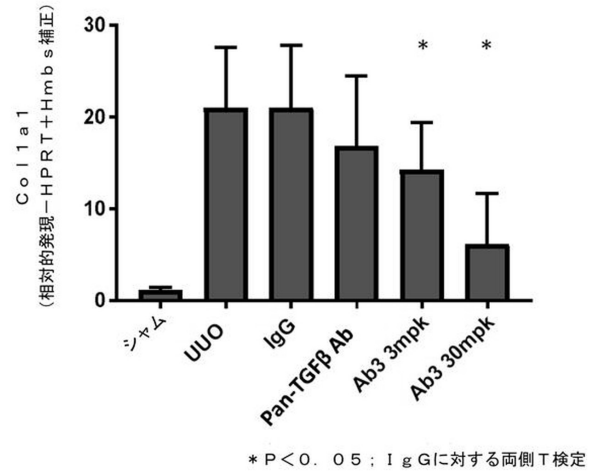
40

50

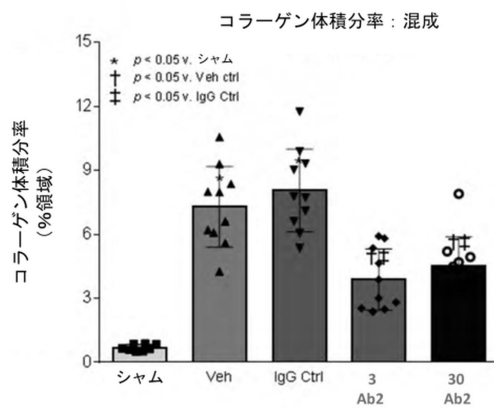
【図 1 2 I】
FIG. 12I



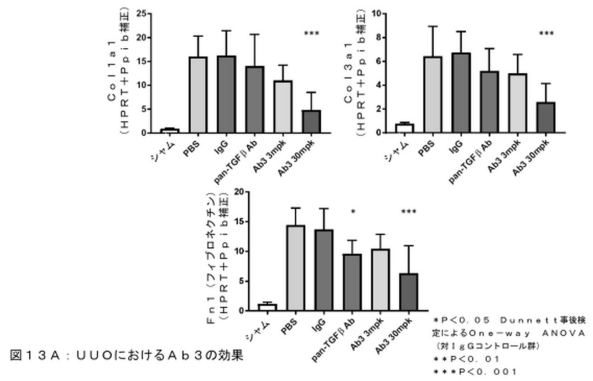
【図 1 2 J】
FIG. 12J



【図 1 2 K】
FIG. 12K



【図 1 3 A】



10

20

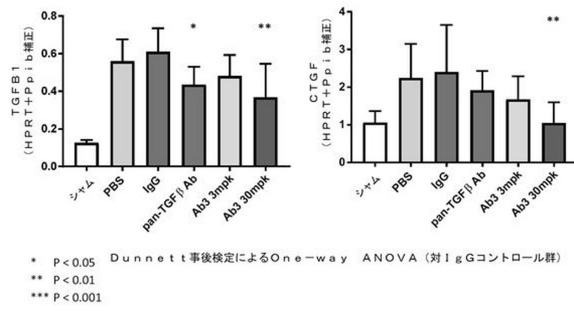
30

40

50

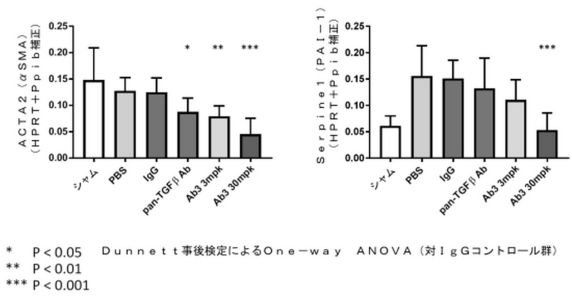
【図 13 B】

FIG. 13B



【図 13 C】

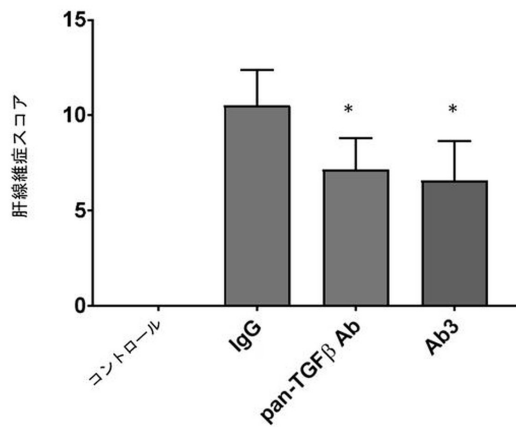
FIG. 13C



10

【図 14】

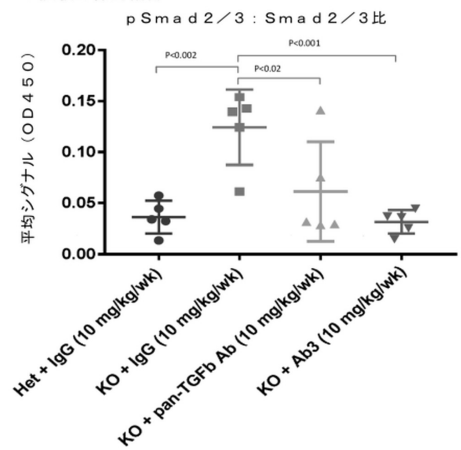
FIG. 14



* P < 0.0001 (One-way ANOVA 対 IgG)

【図 15】

図 15 : アルボート試験の標的結合



20

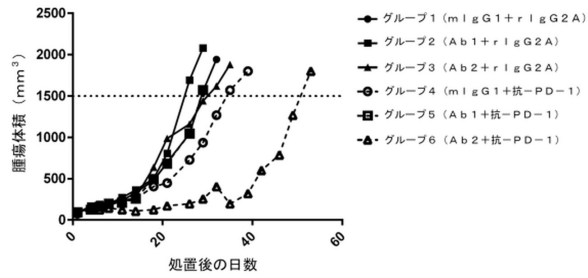
30

40

50

【図 16】

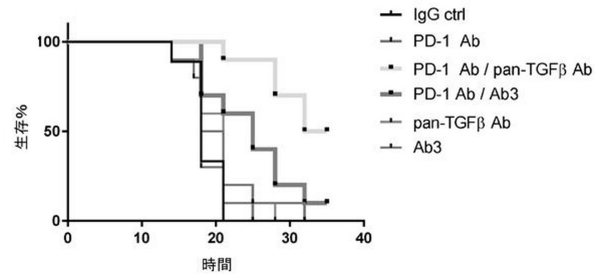
FIG. 16



【図 17】

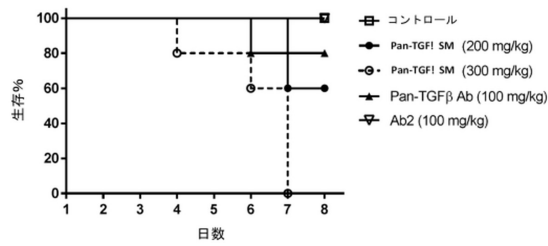
FIG. 17

ミューリンEMT6腫瘍モデルにおける生存に対するAb3の効果



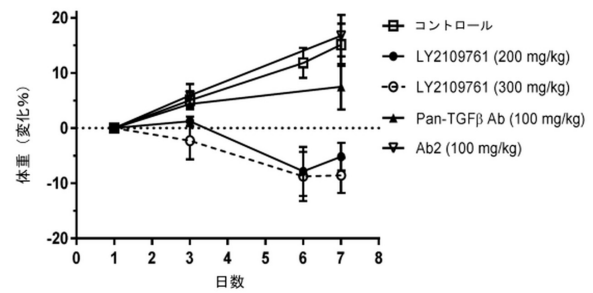
【図 18 A】

FIG. 18A



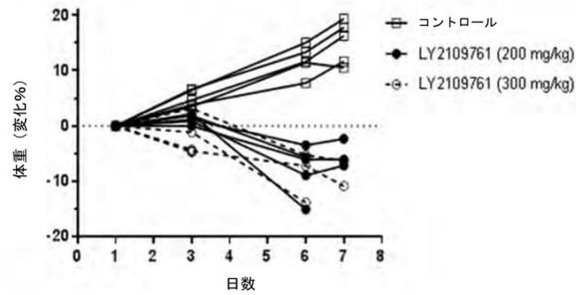
【図 18 B】

FIG. 18B



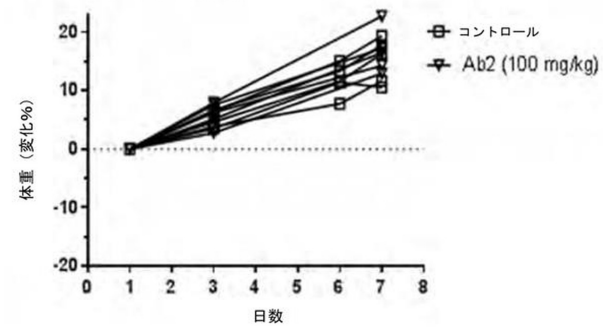
【図 18 C】

FIG. 18C



【図 18 D】

FIG. 18D



10

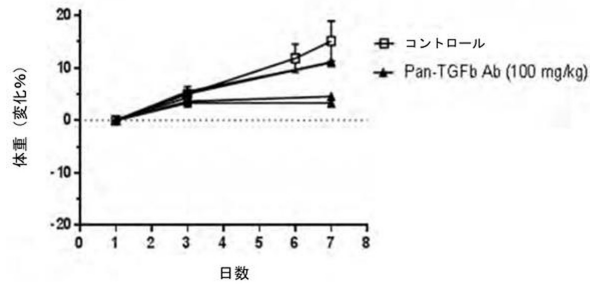
20

30

40

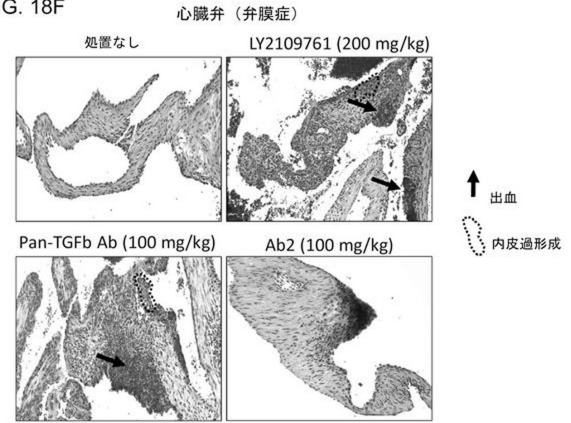
50

【図 18 E】
FIG. 18E



【図 18 F】

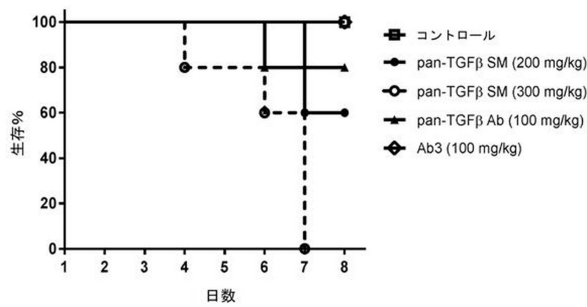
FIG. 18F



10

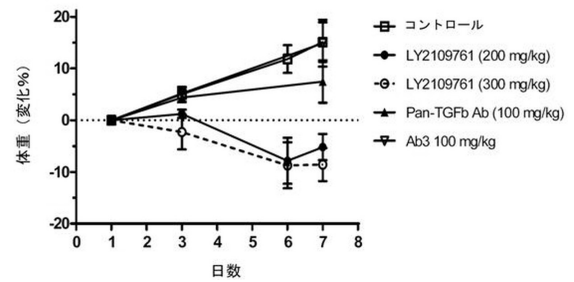
【図 19 A】

FIG. 19A



【図 19 B】

FIG. 19B



20

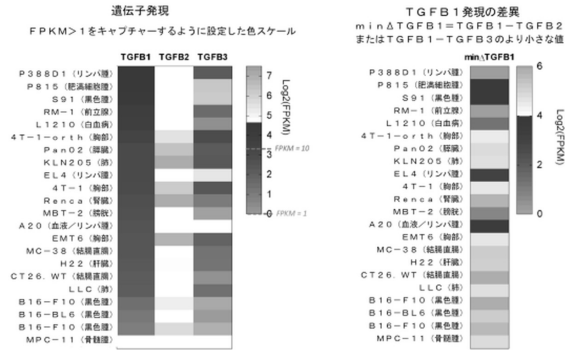
30

40

50

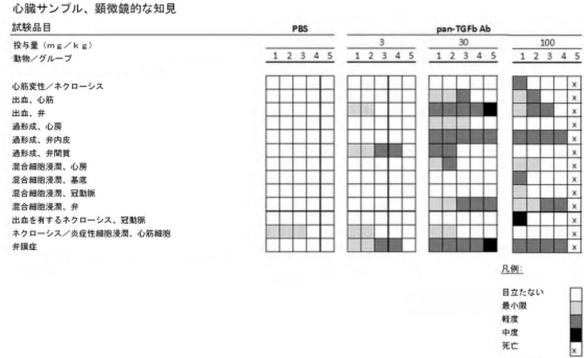
【図 2 1 D】

FIG. 21D マウス同一遺伝子型癌細胞モデル株におけるTGFβアイソフォーム発現



【図 2 2】

FIG. 22 1週間の安全性試験によるPan-TGFβ抗体データ



【配列表】

0007157744000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/585,227

(32)優先日 平成29年11月13日(2017.11.13)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/443,615

(32)優先日 平成29年1月6日(2017.1.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/588,626

(32)優先日 平成29年11月20日(2017.11.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/529,616

(32)優先日 平成29年7月7日(2017.7.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/587,964

(32)優先日 平成29年11月17日(2017.11.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/549,767

(32)優先日 平成29年8月24日(2017.8.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/514,417

(32)優先日 平成29年6月2日(2017.6.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

アメリカ合衆国 0 2 1 4 0 マサチューセッツ州, ケンブリッジ コテージ パーク アベニュー 1 8

(72)発明者 ダッタ アビシエーク

アメリカ合衆国 0 2 1 3 1 マサチューセッツ州, ボストン ヘマン ストリート 4 8

(72)発明者 カルヴェン グレゴリー ジェイ.

アメリカ合衆国 0 1 7 5 4 マサチューセッツ州, メイナード ブルックス ストリート 8 9

(72)発明者 マーティン コンスタンス

アメリカ合衆国 0 2 4 7 4 マサチューセッツ州, アーリントン ダートマス ストリート 1 9

(72)発明者 カルラ アシシュ

アメリカ合衆国 0 2 4 7 8 マサチューセッツ州, ベルмонт バーナム ストリート ユニット
ディー 2 1 9

(72)発明者 ロング キンバリー

-
- アメリカ合衆国 02130 マサチューセッツ州, ボストン ジャマイカ プレイス 2
(72)発明者 バックラー アラン
アメリカ合衆国 02476 マサチューセッツ州, アーリントン ハイランド アベニュー 81
審査官 池上 京子
(56)参考文献 国際公開第2011/102483 (WO, A1)
国際公開第2013/134365 (WO, A1)
国際公開第2014/182676 (WO, A2)
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C07K 1/00-19/00
C12N 15/00-15/90
C12P 21/00-21/08
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)