(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-511255
(P2023-511255A)
(43)公表日　令和5年3月17日(2023.3.17)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*45/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		４Ｃ０７６
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ	*35/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/04		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ	*45/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/06		４Ｈ０４５

審査請求　未請求　予備審査請求　有　（全353頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-539654(P2022-539654)
(86)(22)出願日　令和3年1月11日(2021.1.11)
(85)翻訳文提出日　令和4年8月25日(2022.8.25)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/012969
(87)国際公開番号　WO2021/142448
(87)国際公開日　令和3年7月15日(2021.7.15)
(31)優先権主張番号　62/704,915
(32)優先日　令和2年6月3日(2020.6.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/705,134
(32)優先日　令和2年6月12日(2020.6.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/111,530
最終頁に続く

(71)出願人　515120006
スカラー ロック インコーポレイテッド
ＳＣＨＯＬＡＲ ＲＯＣＫ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国 ０２１４２ マサチューセッツ州 ケンブリッジ ビニー・ストリート ３０１ ３階
(74)代理人　100113376
弁理士　南条 雅裕
(74)代理人　100179394
弁理士　瀬田 あや子
(74)代理人　100185384
弁理士　伊波 興一朗
(74)代理人　100137811
弁理士　原 秀貢人
(72)発明者　カルラ アシッシュ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＴＧＦ－β阻害剤及びその使用

(57)【要約】
本開示は、癌などの免疫抑制状態を治療するためのＴＧＦｐ阻害剤療法を提供する。好適な療法及びこのような療法から利益を得る可能性が高い患者の選択、並びに癌を治療する方法並びに治療反応を予測及び監視する方法も開示される。関連する組成物、方法及び治療的使用も開示される。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象における癌の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤であって、前記治療は、前記対象から採取された血液サンプル（例えば、全血又は血液成分）からの循環ＭＤＳＣレベルを測定することと、ＴＧＦβ阻害剤療法を前記対象に投与することとを含み、
ａ）上昇したレベルの循環ＭＤＳＣは、前記対象が、前記ＴＧＦβ阻害剤療法から利益を得る可能性が高いことを示し；及び／又は
ｂ）前記ＴＧＦβ阻害剤治療後の低下したレベルの循環ＭＤＳＣは、前記対象における治療反応を示す、ＴＧＦβ阻害剤。
【請求項２】
前記対象は、前記治療前に測定されるとき、健常な対象における循環ＭＤＳＣレベルより少なくとも２倍高い循環ＭＤＳＣレベルを有する、請求項１に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。
【請求項３】
前記低下した循環ＭＤＳＣは、Ｇ－ＭＤＳＣであり、任意選択で、前記Ｇ－ＭＤＳＣは、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１５、ＬＯＸ－１、ＣＤ６６ｂ及びＨＬＡ－ＤＲ^{lo}／－の１つ以上を発現する、請求項１又は２に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。
【請求項４】
前記対象は、癌療法で治療され、任意選択で、前記癌療法は、免疫チェックポイント阻害剤を含み、さらに任意選択で、前記ＴＧＦβ阻害剤及び前記免疫チェックポイント阻害剤は、併用して（例えば、同時に）、別々に又は連続して前記対象に投与される、請求項１～３のいずれか一項に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。
【請求項５】
対象における癌の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤であって、前記治療は、
ｉ）前記対象から得られた腫瘍組織サンプルからの間質区画、腫瘍区画及び辺縁区画中のＣＤ８陽性細胞のレベルを測定することと；ＣＤ８陽性細胞の前記レベルが前記腫瘍区画に対して前記間質区画及び／又は前記辺縁区画においてより高い（例えば、少なくとも５％だけ）場合、
ｉｉ）前記ＴＧＦβ阻害剤を免疫チェックポイント阻害剤と共に前記対象に投与することであって、任意選択で、前記免疫チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－１抗体、ＰＤ－Ｌ１抗体又はＣＴＬＡ－４抗体である、投与することと
を含む、ＴＧＦβ阻害剤。
【請求項６】
対象における癌の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤であって、前記治療は、
ｉ）前記対象から得られた腫瘍組織サンプルからの少なくとも１つの腫瘍巣中のＣＤ８陽性細胞のレベルを測定することと；測定されたサンプル領域の５０％超が、腫瘍巣であって、前記腫瘍巣の外部のＣＤ８陽性細胞のレベルに対して、前記腫瘍巣の内部のより低いレベルのＣＤ８陽性細胞（例えば、前記腫瘍巣の内部の５％未満のＣＤ８＋細胞及び前記腫瘍巣の外部の５％超のＣＤ８＋細胞）を含む腫瘍巣を含む場合、
ｉｉ）前記ＴＧＦβ阻害剤を免疫チェックポイント阻害剤と共に前記対象に投与することであって、任意選択で、前記免疫チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－１抗体、ＰＤ－Ｌ１抗体又はＣＴＬＡ－４抗体である、投与することと
を含む、ＴＧＦβ阻害剤。
【請求項７】
ヒト対象における癌の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤であって、前記治療は、
ｉ）ＴＧＦβ阻害剤であって、
ａ）少なくとも４週間にわたり、少なくとも１０倍の治療濃度域で投与されるとき、ラット、マウス、イヌ又は非ヒト霊長類毒性試験において心毒性を引き起こさず；
ｂ）少なくとも１０倍の治療濃度域で投与されるとき、ヒト血小板中における血小板凝集及び／又は活性化を引き起こさず；及び

ｃ）少なくとも１０倍の治療濃度域で投与されるとき、標準的なサイトカイン放出アッセイにおいて、許容されないレベルのサイトカイン放出を引き起こさない（例えば、対照と比較してサイトカイン放出の１０倍以下の増加、例えばサイトカイン放出の２．５倍以内の増加）、ＴＧＦβ阻害剤を選択することであって、

任意選択で、前記サイトカイン放出は、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）、インターロイキン２（ＩＬ－２）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）、インターロイキン１β（ＩＬ－１β）及びケモカインＣ－Ｃモチーフリガンド２（ＣＣＬ２）／単球走化性タンパク質１（ＭＣＰ－１）から選択される１つ以上のサイトカインの放出を含み；

任意選択で、前記治療濃度域は、１つ以上の前臨床モデルに基づいて決定される、選択することと；

ｉｉ）（ｉ）において選択された前記ＴＧＦβ阻害剤を前記対象に投与することと

を含む、ＴＧＦβ阻害剤。

【請求項８】

前記対象は、免疫チェックポイント阻害剤で治療され、任意選択で、前記免疫チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－１抗体、ＰＤ－Ｌ１抗体又はＣＴＬＡ－４抗体である、請求項７に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

【請求項９】

（ｉ）前記対象から得られた腫瘍組織サンプルからの間質区画、腫瘍区画及び辺縁区画中のＣＤ８陽性細胞のレベルを測定すること；及びＣＤ８陽性細胞の前記レベルが前記腫瘍区画に対して前記間質区画及び／又は前記辺縁区画においてより高い（例えば、少なくとも５％だけ）場合、前記ＴＧＦβ阻害剤及び免疫チェックポイント阻害剤を前記対象に投与することであって、任意選択で、前記免疫チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－１抗体、ＰＤ－Ｌ１抗体又はＣＴＬＡ－４抗体である、投与すること；並びに／又は

（ｉｉ）前記対象から得られた腫瘍組織サンプルからの少なくとも１つの腫瘍巣中のＣＤ８陽性細胞のレベルを測定すること；及び測定されたサンプル領域の５０％超が、腫瘍巣であって、前記腫瘍巣の外部のＣＤ８陽性細胞のレベルに対して、前記腫瘍巣の内部のより低いレベルのＣＤ８陽性細胞（例えば、前記腫瘍巣の内部の５％未満のＣＤ８＋細胞及び前記腫瘍巣の外部の５％超のＣＤ８＋細胞）を含む腫瘍巣を含む場合、前記ＴＧＦβ阻害剤を免疫チェックポイント阻害剤と共に前記対象に投与することであって、任意選択で、前記免疫チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－１抗体、ＰＤ－Ｌ１抗体又はＣＴＬＡ－４抗体である、投与すること

をさらに含む、請求項１に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

【請求項１０】

前記治療は、前記ＴＧＦβ阻害剤の投与前及び後、前記対象における循環潜在型ＴＧＦβレベルを測定することをさらに含み、前記循環潜在型ＴＧＦβレベルは、前記対象から得られた血液サンプル（例えば、全血又は血液成分）中で測定され、前記投与前の循環潜在型ＴＧＦβレベルと比較した前記投与後の循環潜在型ＴＧＦβレベルの増加（例えば、少なくとも１倍、少なくとも１．２倍、少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍又はそれを超える増加）は、治療効果を示し、任意選択で、前記治療は、循環潜在型ＴＧＦβレベルが増加される場合に継続される、請求項１～９のいずれか一項に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

【請求項１１】

前記癌は、固形腫瘍を含み、任意選択で、前記固形腫瘍は、黒色腫（例えば、転移性黒色腫）、腎細胞癌、トリプルネガティブ乳癌、ＨＥＲ２陽性乳癌、結腸直腸癌（例えば、マイクロサテライト安定性結腸直腸癌）、肺癌（例えば、転移性非小細胞肺癌、小細胞肺癌）、食道癌、膵臓癌、膀胱癌、腎臓癌、子宮癌、前立腺癌、胃癌（例えば、胃癌）、頭頸部扁平上皮細胞癌、尿路上皮癌、肝細胞癌又は甲状腺癌から選択される、請求項１～１０のいずれか一項に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

【請求項１２】

前記癌は、骨髄増殖性疾患であり、前記骨髄増殖性疾患は、任意選択で、原発性骨髄線維症である、請求項１～１０のいずれか一項に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。
【請求項１３】
免疫療法、化学療法、放射線療法、組み換え免疫細胞療法（例えば、ＣＡＲ－Ｔ療法）、癌ワクチン療法及び／又は腫瘍溶解性ウイルス療法から選択される少なくとも１つのさらなる療法と併用される、請求項１～１２のいずれか一項に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。
【請求項１４】
ＰＤ－１アンタゴニスト（例えば、ＰＤ－１抗体）、ＰＤＬ１アンタゴニスト（例えば、ＰＤＬ１抗体）、ＰＤ－Ｌ１若しくはＰＤＬ２融合タンパク質、ＣＴＬＡ４アンタゴニスト（例えば、ＣＴＬＡ４抗体）、ＧＩＴＲアゴニスト、例えばＧＩＴＲ抗体）、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（ＯＸ４０アゴニスト）、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、抗ＣＤ３抗体、抗ＰＤ－１／抗ＰＤＬ１二重特異性若しくは多重特異性抗体、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２０二重特異性若しくは多重特異性抗体、抗ＨＥＲ２抗体、抗ＣＤ７９ｂ抗体、抗ＣＤ４７抗体、Ｔ細胞免疫グロブリン及びＩＴＩＭドメインタンパク質（ＴＩＧＩＴ）に結合する抗体、抗ＳＴ２抗体、抗β７インテグリン（例えば、抗α４－β７インテグリン及び／若しくはαＥβ７インテグリン）、ＣＤＫ阻害剤、腫瘍溶解性ウイルス、インドールアミン２，３－ジオキシゲナーゼ（ＩＤＯ）阻害剤並びに／又はＰＡＲＰ阻害剤から選択される少なくとも１つのさらなる療法と併用される、請求項１～１３のいずれか一項に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。
【請求項１５】
対象における癌の治療に使用するための、ＴＧＦβ３を阻害しないＴＧＦβ阻害剤であって、ｉ）前記患者は、線維性疾患若しくは心血管疾患を有するか若しくはそれを発症するリスクがあり；ｉｉ）前記患者は、高転移性若しくは侵襲性であると特徴付けられる腫瘍を有し；及び／又はｉｉｉ）前記患者は、骨髄増殖性疾患を有するか若しくはそれを発症するリスクがあり、任意選択で、前記骨髄増殖性疾患は、骨髄線維症であり、さらに任意選択で、前記骨髄線維症は、原発性骨髄線維症である、ＴＧＦβ阻害剤。
【請求項１６】
ＴＧＦβ１選択的阻害剤であり、任意選択で、前記ＴＧＦβ１選択的阻害剤は、成熟ＴＧＦβ１に結合する中和抗体又はｐｒｏＴＧＦβ１に結合する活性化阻害剤である、請求項１～１５のいずれか一項に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。
【請求項１７】
前記ＴＧＦβ１選択的阻害剤は、
ａ）本明細書においてＡｂ６と示されるモノクローナル抗体、その変異体若しくはその抗原結合断片；又は
ｂ）Ａｂ６と結合について競合し、且つ／又はＡｂ６と同じエピトープに結合する抗体若しくはその抗原結合断片
である、請求項１６に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。
【請求項１８】
前記ＴＧＦβ１選択的阻害剤は、アミノ酸配列の配列番号７を含む重鎖可変領域及びアミノ酸配列の配列番号８を含む軽鎖可変領域を含む単離抗体又はその抗原結合断片を含み、任意選択で、前記ＴＧＦβ阻害剤は、ＩＭＴＧ付番方式によって定義されるとき、配列番号１（Ｈ－ＣＤＲ１）、配列番号２（Ｈ－ＣＤＲ２）及び配列番号３（Ｈ－ＣＤＲ３）のアミノ酸配列を含む３つの重鎖相補性決定領域並びに配列番号４（Ｌ－ＣＤＲ１）、配列番号５（Ｌ－ＣＤＲ２）及び配列番号６（Ｌ－ＣＤＲ３）のアミノ酸配列を含む３つの軽鎖相補性決定領域を含む単離抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項１６又は１７に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。
【請求項１９】

ＴＧＦβ１／３阻害剤である、請求項１～１４のいずれか一項に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。
【請求項２０】
ＴＧＦβ１／２阻害剤である、請求項１～１５のいずれか一項に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。
【請求項２１】
ヒト対象における癌の治療に使用するための免疫チェックポイント阻害剤であって、前記治療は、
（ｉ）前記対象から得られた腫瘍組織サンプルからの間質区画、腫瘍区画及び辺縁区画中のＣＤ８陽性細胞のレベルを測定すること；及びＣＤ８陽性細胞の前記レベルが前記腫瘍区画に対して前記間質区画及び／又は前記辺縁区画においてより高い（例えば、少なくとも５％だけ）場合、前記免疫チェックポイント阻害剤を前記対象に投与すること；並びに／又は
（ｉｉ）前記対象から得られた腫瘍組織サンプルからの少なくとも１つの腫瘍巣中のＣＤ８陽性細胞のレベルを測定すること；及び測定されたサンプル領域の５０％超が、腫瘍巣であって、前記腫瘍巣の外部のＣＤ８陽性細胞のレベルに対して、前記腫瘍巣の内部のより低いレベルのＣＤ８陽性細胞（例えば、前記腫瘍巣の内部の５％未満のＣＤ８＋細胞及び前記腫瘍巣の外部の５％超のＣＤ８＋細胞）を含む腫瘍巣を含む場合、前記免疫チェックポイント阻害剤を前記対象に投与すること
を含む、免疫チェックポイント阻害剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、それぞれ「ＴＧＦ－ＢＥＴＡ　ＩＮＨＩＢＩＴＯＲＳ　ＡＮＤ　ＵＳＥ　ＴＨＥＲＥＯＦ」という名称の、２０２０年１月１１日に出願された米国仮特許出願第６２／９５９，９０９号明細書、２０２０年２月２５日に出願された同第６２／９８１，０８３号明細書；２０２０年６月３日に出願された同第６２／７０４，９１５号明細書；２０２０年６月１２日に出願された同第６２／７０５，１３４号明細書；及び２０２０年１１月９日に出願された同第６３／１１１，５３０号明細書の利益及びそれらに対する優先権を主張するものであり、それらの内容は、その全体が参照により本明細書に明示的に組み込まれる。
【０００２】
本出願は、ＴＧＦβ阻害剤及びその治療的使用並びに癌を含む障害を診断、モニター、予後判定及び治療するための関連するアッセイに関する。
【０００３】
配列表
本出願は、ＡＳＣＩＩフォーマットで電子提出された配列表を含み、これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。２０２１年１月１１日に作成された前記ＡＳＣＩＩコピーは、１５０９４．００１１－００３０４＿ＳＲ３８ＰＣＴ＿Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｌｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔという名称であり、サイズが２３５，０８７バイトである。
【背景技術】
【０００４】
トランスフォーミング増殖因子β１（ＴＧＦβ１）は、２つの他の構造的に関連するアイソフォーム、即ちＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３と共に増殖因子のＴＧＦβスーパーファミリーのメンバーであり、これらは、それぞれ別の遺伝子によりコードされる。これらのＴＧＦβアイソフォームは、細胞増殖、分化、免疫調節（例えば、適応免疫応答）並びにホメオスタシス及び疾患状況の両方における他の多様な生物学的プロセスを調節する多相発現性サイトカインとして機能する。３つのＴＧＦβアイソフォームは、同じ細胞表面受容体を介してシグナル伝達し、ＳＭＡＤ２／３経路を含む類似する標準的な下流シグナル伝

達事象をトリガーする。

【０００５】

ＴＧＦβは、癌、線維症及び免疫疾患などの様々な疾患状態の病因及び進行に関与しているとされている。多くの場合、こうした状態は、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）の調節不全と関連している。これら及び他の理由から、ＴＧＦβは、免疫障害、様々な増殖障害及び線維症に対する魅力的な治療標的であった。しかしながら、ラット及びイヌにおけるものを含む前臨床試験からの観察結果から、インビボでのＴＧＦβの全身阻害に伴う重大な毒性が明らかにされ、今日まで安全且つ有効と見なされるＴＧＦβ治療薬は市販されていない。

【０００６】

ＴＧＦβ経路の阻害によって指摘される用量制限毒性は、抗ＴＧＦβ療法の開発において主要な懸念となったままである。こうしたものとして、心血管異常、皮膚病変、口腔上皮過形成及び歯肉出血が挙げられる（Ｖｉｔｓｋｙ　２００９；Ｌｏｎｎｉｎｇ　２０１１；Ｓｔａｕｂｅｒ　２０１４；Ｍｉｔｒａ　２０２０）。これらの毒性の多くは、可逆性又は管理可能のいずれかであるが、心臓の弁、大動脈弓及び関連動脈における炎症、出血又は過形成などの心血管病変は、可逆性ではないため、依然としてＴＧＦβ阻害剤を開発する際の重要な安全課題である（Ｓｔａｕｂｅｒ　２０１４；Ａｎｄｅｒｔｏｎ　２０１１；Ｍｉｔｒａ　２０２０）。

【０００７】

以前に、本出願人は、増殖因子シグナル伝達を調節するための新規の作用機構を有するモノクローナル抗体を記載した（例えば、国際公開第２０１４／１８２６７６号パンフレットを参照されたく；その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。これらの抗体は、ＴＧＦβ１が、プロドメイン及び増殖因子からなる潜在型プロタンパク質複合体として発現され、これは、潜在型複合体からの増殖因子を放出する活性化工程を必要とすることを利用するために設計された。活性化後の成熟増殖因子自体を直接標的化する従来の手法（例えば、中和抗体）を採るのではなく、新規のクラスの阻害抗体は、リガンド－受容体相互作用の上流において、活性化工程を先制してブロックするように不活性プロ－プロタンパク質複合体自体を特異的に標的化した。理論に縛られるものではないが、このユニークな作用機構は、それらが供給源で作用する点において、即ち活性化が起こる前に疾患微小環境内の潜在型ｐｒｏＴＧＦβ１複合体を標的化することにより、空間及び時間的利益の両方を達成するための利点を提供するであろうと推論された。

【０００８】

この手法を用いて、ＴＧＦβ１に特異的に結合して、その活性化工程（即ち潜在型複合体からの成熟増殖因子の放出）をアイソフォーム選択的に阻害するさらなるモノクローナル抗体が作製された（国際公開第２０１７／１５６５００号パンフレットを参照されたく；その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。そうした抗体について提示されたデータは、ＴＧＦβのアイソフォーム特異的阻害（汎阻害とは反対に）が、ＴＧＦβにインビボで拮抗する向上した安全なプロファイルをもたらし得るという見解を支持している。これを考慮して、本発明者らは、多面的なＴＧＦβ１作用及びそれらの調節不全により駆動される状態のための治療薬として、ｉ）アイソフォーム特異的であり；且つｉｉ）異なる提示分子に関連する複数のＴＧＦβ１シグナル伝達複合体を広範に標的化することができるＴＧＦβ１阻害剤を開発しようと努めてきた。このようなアイソフォーム特異的阻害剤の非限定的な例は、ＴＧＦβ１選択的抗体、例えば本明細書に開示されるＡｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６、Ａｂ２１、Ａｂ２２、Ａｂ２３、Ａｂ２４、Ａｂ２５、Ａｂ２６、Ａｂ２７、Ａｂ２８、Ａｂ２９、Ａｂ３０、Ａｂ３１、Ａｂ３２、Ａｂ３３又はＡｂ３４である。

【０００９】

このような抗体の例は、後に、国際公開第２０１８／１２９３２９号パンフレット及びＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１９／０４１３７３号明細書（その各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載された。これらのアイソフォーム特異

的阻害剤は、インビボでの有効性及び安全性の両方が実証された。

【００１０】

例えば、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１９／０４１３７３号明細書は、ＴＧＦβ１の大型潜在型複合体（ＬＬＣ）を標的化することができる、アイソフォーム選択的な高親和性抗体がＴＧＦβ１関連適応症、例えば異常な遺伝子発現（例えば、ＴＧＦＢ１、Ａｃｔａ２、Ｃｏｌ１ａ１、Ｃｏｌ３ａ１、Ｆｎ１、Ｉｔｇａ１１、Ｌｏｘ、Ｌｏｘｌ２、ＣＣＬ２及びＭｍｐ２）に関与する疾患、ＥＣＭ調節不全に関連する疾患（例えば、線維症、骨髄線維症及び固形腫瘍）、免疫抑制細胞（例えば、Ｔｒｅｇ、ＭＤＳＣ及び／又はＭ２マクロファージ）の増加を特徴とする疾患、間葉移行に関与する疾患、プロテアーゼに関与する疾患、異常な幹細胞増殖及び／又は分化に関与する疾患を治療するのに有効となり得ることを開示している。

【００１１】

複数の前臨床腫瘍モデルにおいて、こうしたＴＧＦβ１阻害剤は、免疫療法（例えば、チェックポイント阻害剤）に対する腫瘍一次耐性（即ち治療開始前に存在する）を解消することが明らかにされ、この場合、腫瘍は、調節Ｔ細胞、Ｍ２型マクロファージ及び／又は骨髄由来抑制細胞（腫瘍関連ＭＤＳＣ）などの免疫抑制細胞型に浸潤される。治療時、腫瘍関連免疫抑制細胞（例えば、ＭＤＳＣ）の数の減少及び抗腫瘍エフェクターＴ細胞数の対応する増加が観察された。複数の前臨床モデル（ＴＧＦβ１／３アイソフォームを同時発現する腫瘍を含む）において、チェックポイント阻害療法と一緒に使用した場合、生存率利益と共に有意且つ持続的な抗腫瘍効果が達成されたが、これは、ＴＧＦβ１の阻害剤が単独でチェックポイント阻害剤などの癌免疫療法薬に対して免疫抑制腫瘍を感作するのに十分であったことを示唆している。Ｍａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（２０２０），１２（５３６）：ｅａａｙ８４５６を参照されたい。

【００１２】

本出願の出願日現在、当技術分野の一般的見解は、全体として、慎重な投与レジメンにより毒性を管理しながら、治療効果を達成するために、ＴＧＦβの複数のアイソフォームを阻害することが必要又は有利であると考えられる。この前提と一致して、多数のグループは、２つ以上のアイソフォームを標的化するＴＧＦβ１阻害剤を開発している。こうしたものとして、以下のものが挙げられる：ＴＧＦβ受容体の低分子量アンタゴニスト、例えばＡＬＫ５アンタゴニスト、例えばガルニセルチブ（ＬＹ２１５７２９９一水和物など）；３つのアイソフォームを全て阻害するモノクローナル抗体（中和抗体など）（「汎阻害剤」抗体）（例えば、国際公開第２０１８／１３４６８１号パンフレットを参照されたい）；３つのアイソフォームの２つを優先的に阻害するモノクローナル抗体（例えば、ＴＧＦβ１／２に対する抗体（例えば、国際公開第２０１６／１６１４１０号パンフレット）及びＴＧＦβ１／３に対する抗体（例えば、国際公開第２００６／１１６００２号パンフレット及び同第２０２０／０５１３３３号パンフレット））；インテグリン阻害剤、例えばαＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３又はα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害（例えば、ＰＬＮ－７４８０９）並びにリガンドトラップなどの操作分子（例えば、融合タンパク質）（例えば、国際公開第２０１８／０２９３６７号パンフレット；同第２０１８／１２９３３１号及び同第２０１８／１５８７２７号パンフレット）。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１３】

免疫チェックポイント阻害剤は、近年、癌治療法の最も顕著な成功例の１つとなっているが、これらの治療法は、患者集団のごく一部でのみ有効である（Ｈｅｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．２０２０ Ｊａｎ １４；５２（１）：１７－３５）。単剤として、多くの免疫チェックポイント阻害剤は、典型的には、約１０～３５％のみの応答率

を示す。癌免疫療法におけるアンメットニーズは、信頼できる予測可能なバイオマーカの限定的な利用可能性であった（例えば、以下を参照されたい：Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｆｒｏｎｔ．Ｍｅｄ．２０１９，１３（１）：３２－４４，“Ｍｏｎｉｔｏｒｉｎｇ ｃｈｅｃｋｐｏｉｎｔ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ：ｐｒｅｄｉｃｔｉｖｅ ｂｉｏｍａｒｋｅｒｓ ｉｎ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ”及びＡｒｏｒａ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ．Ｔｈｅｒ．２０１９，３６：２６３８－２６７８，“Ｅｘｉｓｔｉｎｇ ａｎｄ ｅｍｅｒｇｉｎｇ ｂｉｏｍａｒｋｅｒｓ ｆｏｒ ｉｍｍｕｎｅ ｃｈｅｃｋｐｏｉｎｔ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｉｎ ｓｏｌｉｄ ｔｕｍｏｒｓ）。従来の腫瘍生検は、疾患に関する有益な情報を提供するが、生検について考えられる制限事項として、侵襲的であること、サンプルの採取／アクセスが常に実現可能ではないこと及び潜在的に腫瘍領域全体を代表するものではないことが挙げられる。生検に代わるものが活発に探究されており、そうしたものとして、遺伝子発現プロファイリング及び非侵襲的イメージング技術が挙げられる。特定の血清マーカは、診断目的で有用であるが、予後判定目的のためにそれほど有用ではない（例えば、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．を参照されたい）。このことから、血液に基づく評価は、どのようなことが腫瘍微小環境（ＴＭＥ）で起こっているかを表すには不十分であることが示唆される（Ｇａｌｏｎ＆Ｂｒｕｎｉ，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ，２０１９ Ｍａｒ；１８（３）：１９７－２１８“Ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ ｔｏ ｔｒｅａｔ ｉｍｍｕｎｅ ｈｏｔ，ａｌｔｅｒｅｄ ａｎｄ ｃｏｌｄ ｔｕｍｏｒｓ ｗｉｔｈ ｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｉｅｓ”）。特定の患者集団に適合させた好適なＴＧＦβ阻害剤の選択及び改善された癌治療法を提供し得る関連治療レジメンの両方に関して、より良好なガイダンスが依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【００１４】

本開示は、ＴＧＦβ阻害剤を含む組成物及び特定の患者集団を治療するための好適なＴＧＦβ阻害剤を選択するための方法並びにＴＧＦβ阻害剤を用いた関連する治療に関する。本開示は、治療の候補、例えばＴＧＦβ阻害剤療法から利益を得る可能性が高い患者若しくは患者集団を同定し、且つ／又は治療有効性を監視する改良された方法を含む、より良好且つより標的化された治療及び治療法を提供する。治療計画を含む関連する方法及びこのような阻害剤を製造するための方法が本明細書に包含される。治療的使用のための特定のＴＧＦβ阻害剤の選択は、潜在的リスク、例えばＴＧＦβの汎阻害に関連することが知られている毒性を制御しながら、インビボ有効性を達成することを目的としている。

【００１５】

一態様において、本開示は、少なくとも部分的には、ＴＧＦβ１／３アイソフォームの同時の阻害が、例えば無調節なＥＣＭ（例えば、ＥＣＭ調節異常、例えばＥＣＭ構造及び／又は組成の変化を含む）を有する病態におけるインビボでのＴＧＦβ１選択的阻害剤の有効性を低下させる（これは、ＴＧＦβ３阻害が有害であり得ることを示唆している）という予想外の知見に基づいている。特定の実施形態において、ＥＣＭ調節異常は、コラーゲンＩ（Ｃｏｌ１ａ１）、コラーゲンＩＩＩ（Ｃｏｌ３ａ１）、フィブロネクチン１（Ｆｎ１）、リシルオキシダーゼ（Ｌｏｘ）、リシルオキシダーゼ様２（Ｌｏｘｌ２）、平滑筋アクチン（Ａｃｔａ２）、マトリックスメタロプロテアーゼ（Ｍｍｐ２）及びインテグリンα１１（Ｉｔｇａ１１）から選択される１つ以上の遺伝子マーカの変化を含み得る。特定の実施形態において、ＥＣＭ調節異常は、単独で又は１つ以上のマーカ、例えば上述されるマーカと組み合わせてＡｃｔａ２の増加によって同定され得る。特定の実施形態において、ＥＣＭ調節異常を伴う障害は、特定の癌（例えば、転移性癌）、線維性状態及び／又は心血管疾患を含み得る。特定の実施形態において、線維性状態及び／又は心血管疾患としては、限定はされないが、ＮＡＦＬＤ、ＮＡＳＨ、肥満及び２型糖尿病などの代謝異常が挙げられる。特定の実施形態において、ＥＣＭ調節異常を伴う障害は、骨髄線維症を含み得る。ＥＣＭ調節異常は、疾患進行、例えば増加した侵襲性及び転移並びに腫瘍間質によく見られる増加した線維性特徴に関連付けられている。ＴＧＦβ３阻害が実際にイ

ンビボでのＥＣＭ調節異常を悪化させ得るという観察は、いくつかのＴＧＦβアンタゴニストに見られるＴＧＦβ３阻害活性が癌患者に対するリスクを増加させ得る可能性を提起する。

【００１６】

従って、本開示は、いくつかの実施形態において、治療的使用のためにＴＧＦβ３シグナル伝達を標的にしないＴＧＦβ阻害剤を選択及び／又は投与することを含む方法を含む。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、治療有効用量でＴＧＦβ２シグナル伝達を阻害しない。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、治療有効用量でＴＧＦβ３シグナル伝達を阻害しない。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、治療有効用量でＴＧＦβ２シグナル伝達及びＴＧＦβ３シグナル伝達を阻害しない。好ましい実施形態において、このような阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的である。

【００１７】

関連する実施形態は、薬剤を生成するために、ＴＧＦβ３を阻害しないＴＧＦβ阻害剤を選択することを含む製造方法を含む。いくつかの実施形態において、薬剤は、癌療法のためのものであり得る。好ましい実施形態において、このような阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的である。

【００１８】

本開示によれば、治療的使用のためのＴＧＦβ阻害剤の選択は、免疫安全性について候補のＴＧＦβ阻害剤を試験することを含み得る。このような試験は、サイトカイン放出アッセイを含み得、血小板アッセイをさらに含み得る。

【００１９】

いくつかの実施形態において、大規模に製造され、例えば癌治療に使用されるように選択される候補のＴＧＦβ阻害剤は、サイトカイン放出（本明細書に記載される）又は血小板凝集（本明細書に記載される）を引き起こさない。好ましい実施形態において、このような阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的である。いくつかの実施形態において、本開示は、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物を製造する方法を提供し、本方法は、ｉ）インビトロサイトカイン放出アッセイ及び／又はこのようなサイトカインの血清濃度がＴＧＦβ阻害剤の投与に応答して測定されるインビボ試験において、対照（ＩｇＧなど）と比較したとき、引き起こされる有意なサイトカイン放出がないこと；及び／又はヒト血小板への有意な結合、ヒト血小板の有意な凝集／活性化がないことによって特徴付けられる免疫安全性基準を満たすＴＧＦβ阻害剤を選択する工程であって、ＴＧＦβ阻害剤は、前臨床毒性試験において決定されるＭＴＤ又はＮＯＡＥＬ未満の用量で１つ以上の前臨床動物モデルにおいて有効である、工程；ｉｉ）２５０Ｌ以上の体積を有する培養物（例えば、バイオリアクター）中でＴＧＦβ阻害剤、例えば本明細書に記載されるように選択される阻害剤を生成する工程を含み、ｉｉｉ）ＴＧＦβ阻害剤及び賦形剤を含む医薬組成物に製剤化する工程を任意選択でさらに含む。

【００２０】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される医薬組成物及び／又は治療計画は、別々に投与される別個の分子的実体として、単一の製剤（例えば、混合物）として又は単一の分子的実体、例えばチェックポイント阻害剤及びＴＧＦβ阻害剤の両方として機能する組み換え多機能性構築物の一部としてチェックポイント阻害剤（例えば、癌治療剤として、例えばＰＤ－１抗体、ＰＤ－Ｌ１抗体又はＣＴＬＡ－４抗体）をさらに含み得る。癌治療剤（例えば、チェックポイント阻害剤）及びＴＧＦβ阻害剤を参照して本明細書に記載される方法及び治療計画において、これらの成分は、単一の分子的実体として提供され得る。

【００２１】

様々な実施形態において、本明細書に提供される本開示は、循環ＭＤＳＣレベルを監視することにより、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤、例えばＡｂ６などのＴＧＦβ１選択的阻害剤）を投与される対象の診断、監視、患者の選択、予後及び／又は継続的治療を改善するための、予測バイオマーカとしての循環ＭＤＳＣレベルの使用を含む。

いくつかの実施形態において、本開示は、循環ＭＤＳＣのレベルを測定することにより、癌に罹患した対象において使用するための治療効果及び治療剤（例えば、組成物）又は投薬計画を決定する方法も包含する。理論によって制約されるものではないが、本発明者らは、ＴＧＦβ阻害剤の投与による、例えばＥＣＭの調節異常を発現する癌又は関連する病態における免疫抑制表現型の好転又は克服が、例えば腫瘍体積又は他のバイオマーカの減少が治療有効性を確認するために使用され得る時点前に、例えば対象から得られたサンプル中、例えば血液又は血液成分中の循環ＭＤＳＣレベルを分析することによって示され得ることを発見した。循環及び血中（「循環ＭＤＳＣ」及び「血中ＭＤＳＣ」のような）という用語は、同義的に使用され得る。

【００２２】

腫瘍に関連するＭＤＳＣ細胞は、腫瘍微小環境におけるＴＧＦβ１媒介性免疫抑制に寄与し得る。以前に、本出願人は、ＭＤＳＣが固形腫瘍中で実際に富化されていたこと、チェックポイント阻害剤治療と併用してＴＧＦβ１の阻害が腫瘍内ＭＤＳＣを有意に減少させ、これが、減速された腫瘍成長と相関し、ある場合には複数の前臨床腫瘍モデルにおいて完全な退縮を達成したことを示した（ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１９／０４１３７３号明細書）。これらの有効性試験において、このような組合せ療法の有効性は、腫瘍成長を監視することにより、数週間～数ヶ月（例えば、６～１２週）にわたって観察された。腫瘍生検は、腫瘍微小環境（ＴＭＥ）の免疫プロファイルを明らかにし得るが；侵襲的であることに加えて、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）が腫瘍全体中に均一に存在していないことがあり、従って腫瘍が生検によって採取される部分に応じて結果が変化し得るため、生検に基づく情報は、不正確又は偏っていることがある。生検に基づく分析の制限（例えば、欠点）を克服するために、本明細書に示されるデータは、腫瘍に関連する（例えば、腫瘍内）ＭＤＳＣレベルと循環ＭＤＳＣレベルとの間の相関関係を確立し、血液サンプル（例えば、全血又は血液成分、例えばＰＢＭＣ）中で測定されるＭＤＳＣが、特定の治療計画から利益を得る可能性が高い患者集団をより正確に予測するための代理としての役割を果たし得る可能性を提起している。さらに、エビデンスは、腫瘍量の程度（例えば、腫瘍のサイズ）が、腫瘍を有する対象における循環ＭＤＳＣの相対的レベルと相関することを示唆している。従って、療法を受けた後に対象における循環ＭＤＳＣレベルを監視することにより、療法に対する反応（例えば、治療効果）は、痛みを伴う生検の必要なく且つ従来の方法より早く評価され得る。

【００２３】

様々な実施形態において、本発明者らは、ＴＧＦβ阻害剤を含む組合せ療法の有効性を予測するための早期バイオマーカとして循環ＭＤＳＣを同定する。本明細書に開示されるデータは、ＴＧＦβ１阻害剤治療後、例えば血液又は血液成分中で測定されるとき、循環ＭＤＳＣレベルの顕著な低下があることを示し、これは、抗腫瘍有効性転帰が容易に得られるよりかなり前に検出され得、ある場合には、予定を数週間短縮する。従って、本開示は、癌療法、例えば組合せ療法に対する患者の反応性の予測バイオマーカとしての循環ＭＤＳＣの使用を提供する。本明細書に提供される本開示の関連する対応において、循環ＭＤＳＣ細胞のレベルは、ある用量のＴＧＦβ阻害剤の投与後、１～１０週間以内、例えば３～６週間以内、任意選択でＴＧＦβ阻害剤の用量の投与後、３週間以内又は約３週間の時点で決定され得る。いくつかの実施形態において、循環ＭＤＳＣ細胞のレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の用量の投与後、２週間以内に決定され得る。いくつかの実施形態において、循環ＭＤＳＣ細胞のレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の用量の投与後、約１０日の時点で決定され得る。

【００２４】

癌免疫療法は、癌に対処するために、身体の免疫を利用又は強化し得る。理論によって制約されるものではないが、癌に罹患した対象における低レベルの循環ＭＤＳＣは、身体が、疾患と闘う免疫（例えば、抗腫瘍活性）、より具体的にはＣＤ８＋　Ｔ細胞などのリンパ球を保持又は回復していることを示し、これは、悪性細胞を攻撃するように動員され得ると考えられる。従って、ＴＧＦβ阻害剤治療後の循環ＭＤＳＣの低下したレベルは、

ＴＧＦβ阻害（例えば、ＴＧＦβ１阻害）の薬力学的効果を示し、チェックポイント阻害剤などの癌療法で治療されるときの治療効果の早期予測バイオマーカとしての役割を果たし得る。

【００２５】

有利には、癌免疫療法に対する患者の反応性の可能性は、ＴＧＦβ（例えば、ＴＧＦβ１）媒介性免疫抑制の指標として例えば血液又は血液成分中の循環ＭＤＳＣを測定することによって評価され得る。いくつかの実施形態において、循環ＭＤＳＣは、以下のマーカ：ＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１４、ＣＤ１５、ＬＯＸ－１、ＣＤ６６ｂ及びＨＬＡ－ＤＲ$^{lo/-}$の１つ以上の発現によって特徴付けられる。いくつかの実施形態において、循環ＭＤＳＣは、Ｇ－ＭＤＳＣである。

【００２６】

癌患者が、癌療法（チェックポイント阻害剤など）及びＴＧＦβ１に対して選択的でないＴＧＦβ阻害剤（非選択的ＴＧＦβ阻害剤）を含む組合せ療法を受ける場合、毒性のより高いリスクがあり得る。このようなリスクを軽減又は管理するために、非選択的ＴＧＦβ阻害剤は、例えば、「必要に応じて」低い頻度で又は断続的に投与され得る。例えば、循環ＭＤＳＣレベルは、癌療法の抗腫瘍効果を確実にするように、免疫抑制を克服する効果が十分に維持されることを決定するために定期的に監視され得る。癌治療の過程でＭＤＳＣが上昇する場合、これは、患者がＴＧＦβ阻害剤のさらなる用量から利益を受け得ることを示し得る。このような手法は、ＴＧＦβ阻害剤、特に非ＴＧＦβ１選択的阻害剤への過剰曝露に関連する不必要なリスク及び有害事象を軽減するのに役立ち得る。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１／２シグナル伝達を標的とする。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１／３シグナル伝達を標的とする。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１／２／３シグナル伝達を標的とする。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１シグナル伝達を選択的に標的とする。いくつかの実施形態において、第２のＴＧＦβ１選択的阻害剤は、非ＴＧＦβ１選択的阻害剤への曝露の頻度をさらに減少させるために使用される。

【００２７】

理論によって制約されるものではないが、いくつかの実施形態において、抗ＴＧＦβ３活性を有するＴＧＦβ阻害剤の回避は、高転移性、骨髄線維症であることが知られているタイプの癌と診断された患者及び／又は線維性状態を有するか若しくはそれを発生するリスクがある患者を治療するのに特に有用であり得る。特定の実施形態において、ＴＧＦβ３を標的としないＴＧＦβ阻害剤は、無調節なＥＣＭに関与する状態と診断された患者又はそれを発生するリスクがある患者を治療するのに有用であり得る。特定の実施形態において、無調節なＥＣＭに関与する状態は、癌であり得る。特定の実施形態において、無調節なＥＣＭを有する状態は、骨髄線維症などの線維性状態であり得る。従って、本明細書における本開示は、癌の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤を含み、阻害剤は、ＴＧＦβ３を阻害せず、患者は、転移性癌若しくは骨髄線維症を有するか、又は患者は、線維性状態を有するか若しくはそれを発生するリスクがあり、任意選択で、線維性状態は、非アルコール性脂肪性肝炎（ＮＡＳＨ）である。実際に、本明細書に記載される実施形態が癌の治療のためのＴＧＦβ阻害剤の使用を含む場合（組合せ療法であり得る）、阻害剤は、ＴＧＦβ３を阻害し得ず、患者（対象）は、転移性癌若しくは骨髄線維症を有し得、又は患者は、線維性状態を有するか若しくはそれを発生するリスクがあり得、任意選択で、線維性状態は、ＮＡＳＨである。従って、これらの患者又は患者集団を治療するための、ＴＧＦβ３を阻害しないＴＧＦβ阻害剤の選択は、本発明によって包含される。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ３を阻害しないＴＧＦβ阻害剤は、Ａｂ６又はＩＭＴＧ付番方式によって定義される配列番号１（Ｈ－ＣＤＲ１）、配列番号２（Ｈ－ＣＤＲ２）、配列番号３（Ｈ－ＣＤＲ３）のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）並びに配列番号４（Ｌ－ＣＤＲ１）、配列番号５（Ｌ－ＣＤＲ２）及び配列番号６（Ｌ－ＣＤＲ３）のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲを含む抗体であり得る。

【００２８】

本明細書に記載される実施形態のいずれかにおいて、好ましいＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的であり得る。それは、ＳＰＲによって測定されるとき、１０．０Ｅ－４（１／ｓ）以下の解離速度で０．５ｎＭ以上（K_D＜０．５ｎＭ）の親和性を有する標的に結合し得る。より好ましくは、このようなＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１の活性化阻害剤であり得る。例えば、活性化阻害剤は、潜在型ＴＧＦβ１複合体の潜在的投げ縄領域に結合するモノクローナル抗体又はその抗原結合断片であり得る。最も好ましくは、抗体は、Ａｂ６又はその変異体である（例えば、本明細書において使用される際のＡｂ６の変異体は、Ａｂ６に対する少なくとも８０％、９０％、９５％若しくはそれを超える配列類似性を保持し、且つ／又は所望の治療効果を達成するように、Ａｂ６の１つ以上の結合及び／若しくは治療特性を保持するものである）。

【００２９】

いくつかの実施形態において、癌を治療する方法（癌を治療すること又は癌治療に使用するための組成物に関連しても本明細書に記載される）が本明細書に開示される。また、癌に罹患した対象における治療効果を予測、決定又は監視する方法、例えば治療に対する患者の反応性を監視し、且つ／又は監視されるパラメータに基づいて継続的治療を決定する方法も開示される。いくつかの実施形態において、癌は、免疫除去癌及び／又は骨髄増殖性疾患であり、骨髄増殖性疾患は、骨髄線維症であり得る。いくつかの実施形態において、癌は、ＴＧＦβ１陽性癌である。ＴＧＦβ１陽性癌は、ＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２及び／又はＴＧＦβ３を共発現し得る。ＴＧＦβ１陽性癌は、ＴＧＦβ１優勢腫瘍であり得る。ＴＧＦβ１陽性癌は、ＴＧＦβ１優勢腫瘍であり得、ＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２及び／又はＴＧＦβ３を共発現し得る。例えば、ＴＧＦβ１陽性癌は、ＴＧＦβ１優勢腫瘍であり得、ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ２を共発現し得る。別の例として、ＴＧＦβ１陽性癌は、ＴＧＦβ１優勢腫瘍であり得、ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３を共発現し得る。このような癌は、進行癌、例えば転移性癌（例えば、転移性固形腫瘍）及び局所進行腫瘍（例えば、局所進行固形腫瘍）を伴う癌を含む。いくつかの実施形態において、治療は、循環ＭＤＳＣレベルを低下させるのに十分な量のＴＧＦβ阻害剤を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤である。

【００３０】

いくつかの実施形態において、本開示は、癌を有する対象における治療効果を予測又は決定する方法であって、ＴＧＦβ阻害剤を（単独で又は癌療法と組み合わせて）投与する前に、対象における循環ＭＤＳＣレベルを決定する工程と、治療有効量のＴＧＦβ阻害剤を（単独で又は癌療法と組み合わせて）対象に投与する工程と、投与後に対象における循環ＭＤＳＣレベルを決定する工程とを含み、投与前の循環ＭＤＳＣレベルと比較した投与後の循環ＭＤＳＣレベルの低下は、治療効果を予測する、方法を包含する。

【００３１】

いくつかの実施形態において、本開示は、対象における癌治療の治療効果を決定する方法であって、治療は、ある用量のＴＧＦβ阻害剤及び癌療法を含む組合せ療法を対象に投与することを含み、方法は、（ｉ）ＴＧＦβ阻害剤を投与する前に、対象から得られたサンプル中の循環ＭＤＳＣレベルを決定する工程と、（ｉｉ）ＴＧＦβ阻害剤の投与後に対象から得られたサンプル中の循環ＭＤＳＣレベルを決定する工程と、（ｉｉｉ）工程（ｉｉ）において決定されたレベルが、工程（ｉ）において決定されたレベルと比較して低下されたかどうかを決定する工程とを含み、このような低下は、癌治療の治療効果を示す、方法を包含する。いくつかの実施形態において、組合せ療法におけるＴＧＦβ阻害剤及び癌療法の投与は、併用（例えば、同時）、別個の又は連続投与のためのものである。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６、Ａｂ２１、Ａｂ２２、Ａｂ２３、Ａｂ２４、Ａｂ２５、Ａｂ２６、Ａｂ２７、Ａｂ２８、Ａｂ２９、Ａｂ３０、Ａｂ３１、Ａｂ３２、Ａｂ３３及びＡｂ３４である。好ましい実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、Ａｂ６である。

【００３２】

いくつかの実施形態において、本開示は、対象における癌を治療する方法であって、Ｔ

ＧＦβ阻害剤を投与する前に、対象における循環ＭＤＳＣレベルを決定する工程と、第１の治療有効用量のＴＧＦβ阻害剤を対象に投与する工程と、ＴＧＦβ阻害剤を投与した後、対象における循環ＭＤＳＣレベルを決定する工程と、第１の治療有効用量のＴＧＦβ阻害剤を投与した後に測定された循環ＭＤＳＣレベルが、第１の治療有効用量のＴＧＦβ１阻害剤を投与する前に測定された循環ＭＤＳＣレベルと比較して低下される場合、第２の治療有効用量のＴＧＦβ阻害剤又は組合せ療法を対象に投与する工程とを含む方法を含む。いくつかの実施形態において、第１の治療有効用量の組合せ療法を投与した後に測定された循環ＭＤＳＣレベルが、第１の治療有効用量を投与する前に測定された循環ＭＤＳＣレベルと比較して低下される場合、第２の癌療法（例えば、チェックポイント阻害剤療法）を含む組合せ療法は、第１の治療有効用量のＴＧＦβ阻害剤及び組合せ療法と併用して、連続して又は同時に投与される。

【００３３】

いくつかの実施形態において、本開示は、対象における癌の治療に使用するための癌治療剤であって、対象は、ある用量のＴＧＦβ阻害剤を投与されており、ＴＧＦβ阻害剤の投与後に測定された対象における循環ＭＤＳＣレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の用量を投与する前に対象に測定された循環ＭＤＳＣレベルと比較して低下されたことが決定されている、癌治療剤を包含する。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６、Ａｂ２１、Ａｂ２２、Ａｂ２３、Ａｂ２４、Ａｂ２５、Ａｂ２６、Ａｂ２７、Ａｂ２８、Ａｂ２９、Ａｂ３０、Ａｂ３１、Ａｂ３２、Ａｂ３３及びＡｂ３４である。好ましい実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、Ａｂ６である。

【００３４】

いくつかの実施形態において、本開示は、癌の治療に使用するためのある用量のＴＧＦβ阻害剤及び癌治療剤を含む組合せ療法であって、治療は、ＴＧＦβ阻害剤及び癌治療剤の用量の、対象への併用（例えば、同時）、別個の又は連続投与を含み、ＴＧＦβ阻害剤の投与後に測定された対象における循環ＭＤＳＣレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の用量を投与する前に、対象において測定された循環ＭＤＳＣレベルと比較して低下されたことが決定されている、組合せ療法を包含する。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６、Ａｂ２１、Ａｂ２２、Ａｂ２３、Ａｂ２４、Ａｂ２５、Ａｂ２６、Ａｂ２７、Ａｂ２８、Ａｂ２９、Ａｂ３０、Ａｂ３１、Ａｂ３２、Ａｂ３３及びＡｂ３４である。好ましい実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、Ａｂ６である。

【００３５】

いくつかの実施形態において、本開示は、対象における癌の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤であって、対象は、少なくとも第１の用量のＴＧＦβ阻害剤を投与されており、治療は、さらなる用量のＴＧＦβ阻害剤を投与することを含み、但し、少なくとも第１の用量のＴＧＦβ阻害剤の投与後に測定された対象における循環ＭＤＳＣレベルは、ある用量のＴＧＦβ阻害剤を投与する前に対象において測定された循環ＭＤＳＣレベルと比較して低下される、ＴＧＦβ阻害剤を包含する。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６、Ａｂ２１、Ａｂ２２、Ａｂ２３、Ａｂ２４、Ａｂ２５、Ａｂ２６、Ａｂ２７、Ａｂ２８、Ａｂ２９、Ａｂ３０、Ａｂ３１、Ａｂ３２、Ａｂ３３及びＡｂ３４である。好ましい実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、Ａｂ６である。

【００３６】

いくつかの実施形態において、本開示は、対象における癌の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤であって、対象は、ある用量のＴＧＦβ阻害剤を投与され、ＴＧＦβ阻害剤は、癌における免疫抑制を軽減するか又は逆転させ、前記軽減又は逆転された免疫抑制は、ＴＧＦβ阻害剤の用量を投与する前に対象において測定された循環ＭＤＳＣレベルと比較して、ＴＧＦβ阻害剤の投与後に測定された対象における循環ＭＤＳＣレベルの低下によって決定されている、ＴＧＦβ阻害剤を包含する。いくつかの実施形態において、ＴＧＦ

β阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６、Ａｂ２１、Ａｂ２２、Ａｂ２３、Ａｂ２４、Ａｂ２５、Ａｂ２６、Ａｂ２７、Ａｂ２８、Ａｂ２９、Ａｂ３０、Ａｂ３１、Ａｂ３２、Ａｂ３３及びＡｂ３４である。好ましい実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、Ａｂ６である。

【００３７】

いくつかの実施形態において、本開示は、ヒト対象における進行癌を治療する方法であって、チェックポイント阻害剤療法に対する一次耐性を有する局所進行腫瘍及び／又は転移性癌を含む進行癌に罹患した対象を選択する工程と、ＴＧＦβ阻害剤を投与する工程と、チェックポイント阻害剤療法を対象に投与する工程とを含む方法を包含する。本明細書に記載される癌治療に使用するための方法及び組成物において、癌は、進行癌であり得る。癌は、チェックポイント阻害剤療法に対する一次耐性を有する局所進行腫瘍及び／又は転移性癌を含み得る。癌療法は、チェックポイント阻害剤療法を含み得る。対象は、ヒト対象であり得る。いくつかの実施形態において、癌は、上昇した循環ＭＤＳＣレベルを有する。いくつかの実施形態において、治療は、循環ＭＤＳＣのレベルを低下させる。いくつかの実施形態において、継続的治療は、循環ＭＤＳＣの観察される低下を条件とする。

【００３８】

いくつかの実施形態において、本開示は、単独で又は別の癌療法（例えば、チェックポイント阻害剤）と組み合わせてＴＧＦβ阻害剤を投与された対象における癌治療の治療効果を治療、予測、決定及び／又は監視する方法を包含する。本方法は、治療を投与する前に対象における腫瘍関連免疫細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞及び腫瘍関連マクロファージ）のレベルを決定する工程と、対象に治療を投与する工程と、治療を投与した後に対象における腫瘍関連免疫細胞のレベルを決定する工程とを含み、投与前の腫瘍関連免疫細胞のレベルと比較した阻害剤投与後の１つ以上の腫瘍関連免疫細胞集団のレベルの変化は、治療効果を示す。いくつかの実施形態において、治療は、腫瘍関連免疫細胞のレベルを変化させる。いくつかの実施形態において、継続的治療は、腫瘍関連免疫細胞の観察される変化を条件とする。いくつかの実施形態において、腫瘍関連免疫細胞レベルは、循環ＭＤＳＣレベル及び治療有効性を監視することと組み合わせて監視され、及び／又は継続的治療は、バイオマーカの両方の組の観察される変化を条件とする。

【００３９】

いくつかの実施形態において、本開示は、対象における癌治療の治療効果を治療、予測、決定及び／又は監視する方法を包含する。いくつかの実施形態において、本方法は、腫瘍中（又は腫瘍内の１つ以上の腫瘍巣中）並びに対象から得られた１つ以上の腫瘍サンプル中の周囲間質及び／又は辺縁区画中のＣＤ８＋細胞のレベルを測定することを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、腫瘍又は腫瘍巣の外部（例えば、周囲間質及び／又は辺縁区画）のＣＤ８＋細胞のレベルと比較した腫瘍又は腫瘍巣の内部のＣＤ８＋細胞のレベルに基づいて、対象の癌の免疫表現型を同定することを含む。特定の実施形態において、癌治療は、ＴＧＦβ阻害剤、例えばＴＧＦβ１阻害剤、例えばＡｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６、Ａｂ２１、Ａｂ２２、Ａｂ２３、Ａｂ２４、Ａｂ２５、Ａｂ２６、Ａｂ２７、Ａｂ２８、Ａｂ２９、Ａｂ３０、Ａｂ３１、Ａｂ３２、Ａｂ３３又はＡｂ３４を含む。特定の実施形態において、癌治療は、Ａｂ６を含む。特定の実施形態において、癌治療は、免疫チェックポイント阻害剤を含む。特定の実施形態において、癌治療は、ＴＧＦβ１阻害剤（例えば、Ａｂ６）及び免疫チェックポイント阻害剤（例えば、ＰＤ－１抗体、ＰＤ－Ｌ１抗体又はＣＴＬＡ－４抗体）を含む。

【００４０】

いくつかの実施形態において、本開示は、単独で又は別の癌療法（例えば、チェックポイント阻害剤）と組み合わせてＴＧＦβ阻害剤を投与された対象における癌治療の治療効果を治療、予測及び／又は監視する方法を提供する。本方法は、治療を投与する前に、対象における循環潜在型ＴＧＦβのレベルを決定する工程と、対象に治療を投与する工程と、治療を投与した後、対象における循環潜在型ＴＧＦβのレベルを決定する工程とを含み、投与前の循環潜在型ＴＧＦβと比較した阻害剤投与後の循環潜在型ＴＧＦβの変化（例

えば、増加）は、治療効果を示す。いくつかの実施形態において、治療は、循環潜在型ＴＧＦβのレベルを変化させる。いくつかの実施形態において、継続的治療は、循環潜在型ＴＧＦβの観察される変化（例えば、増加）を条件とする。いくつかの実施形態において、循環潜在型ＴＧＦβは、循環ＭＤＳＣレベル及び／又は腫瘍関連免疫細胞レベルを監視することと組み合わせて監視される。いくつかの実施形態において、治療有効性及び／又は継続的治療は、バイオマーカの２つ以上の組の観察される変化を条件とする。様々な実施形態において、循環ＭＤＳＣレベルの決定（及びまた任意選択で１つ以上の腫瘍関連免疫細胞集団のレベルの変化の評価）を含む、癌を治療するのに使用するための本明細書に開示される方法及び組成物は、本明細書に記載されるように、循環潜在型ＴＧＦβのレベルの評価をさらに含み得る。癌を治療するのに使用するための治療有効用量のＴＧＦβ阻害剤を含む組成物も開示され、ＴＧＦβ阻害剤は、循環ＭＤＳＣレベルの低下が前の用量のＴＧＦβ阻害剤の投与後に決定される場合に（単独で又は循環潜在型ＴＧＦβの変化と組み合わせて）投与される。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ６である。いくつかの実施形態において、継続的治療は、循環潜在型ＴＧＦβの観察される変化を条件とする。いくつかの実施形態において、循環潜在型ＴＧＦβは、循環ＭＤＳＣレベル及び／又は腫瘍関連免疫細胞レベルを監視することと組み合わせて監視される。いくつかの実施形態において、治療有効性及び／又は継続的治療は、バイオマーカの２つ以上の組の観察される変化を条件とする。

【００４１】

いくつかの実施形態において、本開示は、癌を治療する方法であって、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）、インターロイキン２（ＩＬ－２）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）、インターロイキン１β（ＩＬ－１β）及びケモカインＣ－Ｃモチーフリガンド２（ＣＣＬ２）／単球走化性タンパク質１（ＭＣＰ－１）から選択される１つ以上のサイトカインの有意な放出を引き起こさない治療有効量のＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）を対象に投与することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、本方法は、血小板結合、活性化及び／又は凝集の有意な増加を誘発しない。いくつかの実施形態において、癌は、上昇した循環ＭＤＳＣレベルを有する。いくつかの実施形態において、治療有効量のＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）による治療は、循環ＭＤＳＣのレベルを低下させる。いくつかの実施形態において、継続的治療は、循環ＭＤＳＣの観察される低下を条件とする。

【００４２】

いくつかの実施形態において、本開示は、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）が患者において忍容性があるかどうかを確認するための方法であって、細胞培養物又は流体サンプルをＴＧＦβ阻害剤と接触させることと、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）、インターロイキン２（ＩＬ－２）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）、インターロイキン１β（ＩＬ－１β）及びケモカインＣ－Ｃモチーフリガンド２（ＣＣＬ２）／単球走化性タンパク質１（ＭＣＰ－１）から選択される１つ以上のサイトカインの有意な放出をそれが引き起こすかどうかを決定することとを含み、有意な放出は、ＴＧＦβ阻害剤が忍容性良好にならないことを示す、方法を提供する。本方法は、インビトロサイトカイン放出アッセイにおいてサイトカイン放出を監視することを含み得る。いくつかの実施形態において、このアッセイは、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）又は全血において行われ、任意選択で、ＰＢＭＣ又は全血は、ＴＧＦβ阻害剤療法を投与する前に対象から得られる。いくつかの実施形態において、本開示は、ある用量の前記ＴＧＦβ阻害剤を対象に投与することによる、癌の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１選択的阻害剤）を包含し、前記ＴＧＦβ阻害剤は、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）、インターロイキン２（ＩＬ－２）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）、インターロイキン１β（ＩＬ－１β）及びケモカインＣ－Ｃモチーフリガンド２（ＣＣＬ２）／単球走化性タンパク質１（ＭＣＰ－１）から選択される１つ以上のサイトカインの有意な放出を引き起こさない。いくつかの実施形態において、本開示は、癌の治療に使用するためのある用量のＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害

剤）及び癌治療剤（例えば、チェックポイント阻害剤療法）を含む組合せ療法を包含し、治療は、ある用量のＴＧＦβ阻害剤及び癌治療剤の、対象への同時、併用又は連続投与を含み、前記ＴＧＦβ阻害剤は、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）、インターロイキン２（ＩＬ－２）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）、インターロイキン１β（ＩＬ－１β）及びケモカインＣ－Ｃモチーフリガンド２（ＣＣＬ２）／単球走化性タンパク質１（ＭＣＰ－１）から選択される１つ以上のサイトカインの有意な放出を引き起こさない。いくつかの実施形態において、癌の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤は、循環ＭＤＳＣを低下させるのに十分な治療有効量で投与される。

【００４３】

いくつかの実施形態において、本開示は、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）が、前記ＴＧＦβ阻害剤へのサンプルの曝露後、血小板結合、活性化及び／又は凝集の有意な増加を引き起こすかどうかを決定するための方法であって、血漿又は全血サンプル中の血小板結合、活性化及び／又は凝集を測定することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、本開示は、ある用量の前記ＴＧＦβ阻害剤を対象に投与することによる、癌の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）を包含し、前記ＴＧＦβ阻害剤は、血小板結合、活性化及び／又は凝集の有意な増加を引き起こさない。いくつかの実施形態において、本開示は、癌の治療のためのある用量のＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）及び癌治療剤（例えば、チェックポイント阻害剤療法）を含む組合せ療法であって、治療は、ＴＧＦβ阻害剤及び癌治療剤の用量の、対象への併用（例えば、同時）、別個の又は連続投与を含み、前記ＴＧＦβ阻害剤は、血小板結合、活性化及び／又は凝集の有意な増加を引き起こさない、組合せ療法を包含する。いくつかの実施形態において、使用のためのＴＧＦβ阻害剤は、循環ＭＤＳＣを低下させるのに十分な治療有効量で投与される。

【００４４】

対象が循環ＭＤＳＣレベルについて評価される、本明細書に開示される方法及び組成物の様々な実施形態において、対象は、癌、例えば高転移性癌を有し得る。いくつかの実施形態において、対象は、黒色腫、腎細胞癌、トリプルネガティブ乳癌、ＨＥＲ２陽性乳癌結腸直腸癌（例えば、マイクロサテライト安定性結腸直腸癌、肺癌（例えば、非小細胞肺癌又は小細胞肺癌）、膵臓癌、膀胱癌、腎臓癌、子宮癌、前立腺癌、胃癌（ｓｔｏｍａｃｈ　ｃａｎｃｅｒ）（例えば、胃癌（ｇａｓｔｒｉｃ　ｃａｎｃｅｒ））又は甲状腺癌を有する。

【００４５】

いくつかの実施形態において、本開示は、対象における癌を治療するためのＴＧＦβ阻害剤を作製する方法であって、以下の基準：ａ）ＴＧＦβ阻害剤が１つ以上の前臨床モデルにおいて有効であること、ｂ）ＴＧＦβ阻害剤が、少なくとも最小有効用量より多い用量において、１つ以上の動物種における毒性試験で弁膜症又は上皮過形成を引き起こさないこと、ｃ）ＴＧＦβ阻害剤が、（ａ）の１つ以上の前臨床モデルで決定される最小有効用量において、インビトロサイトカイン放出アッセイでヒトＰＢＭＣ又は全血からの有意なサイトカイン放出を誘導しないこと、ｄ）ＴＧＦβ阻害剤が、（ａ）の１つ以上の前臨床モデルで決定される最小有効用量において、血小板結合、活性化及び／又は凝集の有意な増加を誘発しないこと、及びｅ）ＴＧＦβ阻害剤が、（ａ）の１つ以上の前臨床モデルで決定される最小有効用量において、循環ＭＤＳＣを低下させることの１つ以上又は例えば全てを満たすＴＧＦβ阻害剤を選択する工程を含み、ＴＧＦβ阻害剤及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を製造することをさらに含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、選択されたＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤である。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、ｐｒｏ－ＴＧＦβ１及び／又は潜在型ＴＧＦβ１に対して選択的である。

【００４６】

いくつかの実施形態において、本開示の方法は、免疫療法、例えばチェックポイント阻害剤療法に対する耐性を示す患者を選択及び治療するために使用され得る。本明細書に開

示される使用のための方法及び組成物において言及される患者又は対象は、免疫療法、例えばチェックポイント阻害剤療法に対する耐性を有し得る。本開示によって包含される患者集団は、治療未経験であり得る（例えば、以前の癌療法を受けたことがなくてもよい）か、一次耐性（即ち治療開始前に存在する）を有するか、又は免疫療法、例えばチェックポイント阻害剤療法に対する獲得耐性を有し得る。

【００４７】

いくつかの実施形態において、本開示は、癌の治療に使用するためのＴＧＦβ１選択的阻害剤を包含し、治療は、癌が高転移性である対象を選択する工程と、アイソフォーム選択的ＴＧＦβ１阻害剤を対象に投与する工程とを含む。いくつかの実施形態において、高転移性癌は、黒色腫、腎細胞癌、トリプルネガティブ乳癌、ＨＥＲ２陽性乳癌、結腸直腸癌（例えば、マイクロサテライト安定性結腸直腸癌）、肺癌（例えば、非小細胞肺癌、小細胞肺癌）、膀胱癌、腎臓癌、子宮癌、前立腺癌、胃癌（例えば、胃癌）又は甲状腺癌を含む。

【００４８】

いくつかの実施形態において、本開示は、対象における癌の治療に使用するためのＴＧＦβ１選択的阻害剤を包含し、治療は、骨髄線維症疾患を有するか、又は骨髄線維症疾患を発症するリスクがある対象を選択する工程と、癌を治療するのに有効な量のＴＧＦβ１選択的阻害剤を対象に投与する工程とを含む。

【００４９】

いくつかの実施形態において、本開示は、対象における癌を治療する方法であって、対象は、例えば、チェックポイント阻害剤と共に、ＴＧＦβ３を阻害するＴＧＦβ阻害剤で以前に治療されたか、現在治療されているか、又は治療される予定である、方法を包含する。これらの患者は、循環ＭＤＳＣレベルを監視し、ＭＤＳＣレベルが上昇したときにのみ治療を投与することにより、減少した投与量又は治療頻度を有し得る。これらの患者は、ＴＧＦβ１又はＴＧＦβ１／２阻害剤の１回以上の用量を加えることにより、減少した投与量又は治療頻度も有し得る。いくつかの実施形態において、患者は、チェックポイント阻害剤と共に、ＴＧＦβ３を阻害するＴＧＦβ阻害剤で以前に治療されていてもよい。ある実施形態において、対象における癌を治療するのに使用するためのＴＧＦβ１又はＴＧＦβ１／２阻害剤が提供され、対象は、例えば、チェックポイント阻害剤と共に、ＴＧＦβ３を阻害するＴＧＦβ阻害剤で以前に治療されたか、現在治療されているか、又は治療される予定である。いくつかの実施形態において、癌は、転移性癌、線維形成性腫瘍又は骨髄線維症である。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ６又はその変異体、例えばＡｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６、Ａｂ２１、Ａｂ２２、Ａｂ２３、Ａｂ２４、Ａｂ２５、Ａｂ２６、Ａｂ２７、Ａｂ２８、Ａｂ２９、Ａｂ３０、Ａｂ３１、Ａｂ３２、Ａｂ３３及びＡｂ３４である。好ましい実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、Ａｂ６である。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、アイソフォーム非選択的であり、ＴＧＦβ１／２／３又はＴＧＦβ１／３を阻害する。

【００５０】

いくつかの実施形態において、本開示は、癌の治療のためのアイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤を包含し、治療は、線維性疾患と診断されていないか又は線維性疾患を発症する高いリスクがない対象、例えば対照サンプルと比較して上昇したＭＤＳＣレベルを示さない対象を選択する工程と、癌を治療するのに有効な量のアイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤を対象に投与する工程とを含む。いくつかの実施形態において、アイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１／２／３又はＴＧＦβ１／３を阻害する抗体（又は薬剤）である。いくつかの実施形態において、アイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ受容体リガンド結合部分を含む組み換え構築物である。

【００５１】

いくつかの実施形態において、本開示は、患者における癌免疫療法のための断続的な投与計画に使用するためのＴＧＦβ阻害剤であって、断続的な投与計画は、以下の工程：ＴＧＦβ阻害剤治療前に患者から採取された第１のサンプル中の循環ＭＤＳＣを測定する工

程と；癌療法で治療される患者にＴＧＦβ阻害剤を投与する工程であって、癌療法は、任意選択で、チェックポイント阻害剤療法である、工程と；ＴＧＦβ阻害剤治療後に患者から採取された第２のサンプル中の循環ＭＤＳＣを測定する工程と；第２のサンプルが、第１のサンプルと比較して低下したレベルの循環ＭＤＳＣを示す場合、癌療法を継続する工程と；第３のサンプル中の循環ＭＤＳＣを測定する工程と；第３のサンプルが、第２のサンプルと比較して上昇したレベルの循環ＭＤＳＣレベルを示す場合、さらなる用量のＴＧＦβ阻害剤を患者に投与する工程とを含む、ＴＧＦβ阻害剤を包含する。ＴＧＦβ阻害剤は、アイソフォーム－非選択的阻害剤である。いくつかの実施形態において、アイソフォーム－非選択的阻害剤は、ＴＧＦβ１／２／３、ＴＧＦβ１／２又はＴＧＦβ１／３を阻害する。いくつかの実施形態において、サンプルは、血液サンプル又は血液成分である。

【００５２】

本明細書に記載される実施形態のいずれかにおいて、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えば以下に開示される配列を有する抗ＴＧＦβ１抗体、例えばＡｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６、Ａｂ２１、Ａｂ２２、Ａｂ２３、Ａｂ２４、Ａｂ２５、Ａｂ２６、Ａｂ２７、Ａｂ２８、Ａｂ２９、Ａｂ３０、Ａｂ３１、Ａｂ３２、Ａｂ３３及びＡｂ３４であり得る。好ましい実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、Ａｂ６である。

【００５３】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるＴＧＦβ阻害剤は、少なくとも４週間にわたって週に１回投与される場合、１００、２００又は３００ｍｇ／ｋｇ以下の用量で前臨床安全性／毒性試験において忍容性良好である。このような試験は、ＴＧＦβ阻害に対して感受性であることが知られている動物モデル、例えばラット及び非ヒト霊長類において行われ得る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβの汎阻害に関連する観察可能な毒性を引き起こさない。観察可能な毒性は、心血管系毒性（例えば、心臓弁膜症）を含み得る。他の観察可能な毒性は、上皮過形成を含む。さらに他の観察可能な毒性が当技術分野において公知である。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるＴＧＦβ阻害剤は、有意なサイトカイン放出又は血小板凝集、結合又は活性化を誘発しない。ＴＧＦβ阻害剤は、有意なサイトカイン放出（例えば、本明細書に記載される方法によって決定される）を誘発しない可能性がある。ＴＧＦβ阻害剤は、血小板結合、活性化及び／又は凝集の有意な増加（例えば、本明細書に記載される方法によって決定される）を引き起こさない可能性がある。ＴＧＦβ阻害剤は、本明細書に記載される方法によって決定されるとき、有意なサイトカイン放出を誘発しないか又は誘発しなかった可能性があり、血小板結合、活性化及び／又は凝集の有意な増加を引き起こさないか又は引き起こさなかった可能性がある。

【００５４】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるＴＧＦβ阻害剤は、インビボ有効性試験によって示される阻害剤の有効量が、観察可能な毒性を引き起こす量又は濃度をはるかに下回る（少なくとも３倍、少なくとも６倍又は少なくとも１０倍など）ことから、十分な治療濃度域を達成する。いくつかの実施形態において、阻害剤の治療有効量は、週に約１ｍｇ／ｋｇ～約３０ｍｇ／ｋｇである。いくつかの実施形態において、阻害剤の治療有効量は、３週間毎に投与される約１ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇである。いくつかの実施形態において、阻害剤の治療有効量は、３週間毎に投与される約２ｍｇ／ｋｇ～約７ｍｇ／ｋｇである。

【００５５】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるＴＧＦβ阻害剤は、インビボ有効性試験によって示される阻害剤の有効量が、用量制限毒性（ＤＬＴ）を引き起こす量又は濃度をはるかに下回る（少なくとも３倍、少なくとも６倍又は少なくとも１０倍など）ことから、十分な治療濃度域を達成する。ＤＬＴは、一般に、療法中（例えば、癌療法の第１のサイクル中）の重篤な毒性の発生によって定義される。このような毒性は、米国国立癌研究所有害事象共通用語規準（ＣＴＣＡＥ）分類に従って評価され得、通常、グレード３非熱性好中球減少症及び脱毛症を除く、全てのグレード３以上の毒性を含む。いくつか

の実施形態において、ＤＬＴは、特定の推測的な治療不可能又は不可逆的グレード２毒性（例えば、神経毒性、眼毒性又は毒性）、延長されたグレード２毒性（例えば、特定の期間より長く持続するグレード２毒性）及び／又はＤＬＴ期間の延長も含み得る。典型的には、ＤＬＴの定義は、疾患自体に明らかに関連する毒性（例えば、疾患進行又は併発疾患）を除く。いくつかの実施形態において、阻害剤の治療有効量は、週に約１ｍｇ／ｋｇ～約３０ｍｇ／ｋｇである。いくつかの実施形態において、阻害剤の治療有効量は、３週間毎に投与される約１ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇである。いくつかの実施形態において、阻害剤の治療有効量は、３週間毎に投与される約２ｍｇ／ｋｇ～約７ｍｇ／ｋｇである。

【００５６】

様々な実施形態において、本明細書に開示されるＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６、Ａｂ２１、Ａｂ２２、Ａｂ２３、Ａｂ２４、Ａｂ２５、Ａｂ２６、Ａｂ２７、Ａｂ２８、Ａｂ２９、Ａｂ３０、Ａｂ３１、Ａｂ３２、Ａｂ３３又はＡｂ３４）は、少なくとも１つのさらなる療法と共に使用される。いくつかの実施形態において、少なくとも１つのさらなる療法は、癌療法、例えば免疫療法、化学療法、放射線療法（放射線治療剤を含む）、組み換え免疫細胞療法（例えば、ＣＡＲ－Ｔ療法）、癌ワクチン療法及び／又は腫瘍溶解性ウイルス療法である。癌療法は、例えば、癌治療剤（例えば、免疫療法剤、化学療法剤、放射線治療剤、組み換え免疫細胞（例えば、ＣＡＲ－Ｔ細胞））、癌ワクチン及び／又は治療用腫瘍溶解性ウイルス（それらの任意の組合せを含む）を含み得る。いくつかの実施形態において、癌療法は、チェックポイント阻害剤療法を含む免疫療法である。チェックポイント阻害剤は、プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）又はプログラム細胞死タンパク質１リガンド（ＰＤ－Ｌ１）を標的とする薬剤を含み得る。例えば、チェックポイント阻害剤は、抗ＰＤ－１又は抗ＰＤ－Ｌ１抗体を含み得る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６、Ａｂ２１、Ａｂ２２、Ａｂ２３、Ａｂ２４、Ａｂ２５、Ａｂ２６、Ａｂ２７、Ａｂ２８、Ａｂ２９、Ａｂ３０、Ａｂ３１、Ａｂ３２、Ａｂ３３又はＡｂ３４）は、ＰＤ－１アンタゴニスト（例えば、ＰＤ－１抗体）、ＰＤＬ１アンタゴニスト（例えば、ＰＤＬ１抗体）、ＰＤ－Ｌ１又はＰＤＬ２融合タンパク質、ＣＴＬＡ４アンタゴニスト（例えば、ＣＴＬＡ４抗体）、ＧＩＴＲアゴニスト、例えばＧＩＴＲ抗体）、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（ＯＸ４０アゴニスト）、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、抗ＣＤ３抗体、抗ＰＤ－１／抗ＰＤＬ１二重特異性又は多重特異性抗体、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２０二重特異性又は多重特異性抗体、抗ＨＥＲ２抗体、抗ＣＤ７９ｂ抗体、抗ＣＤ４７抗体、Ｔ細胞免疫グロブリン及びＩＴＩＭドメインタンパク質（ＴＩＧＩＴ）に結合する抗体、抗ＳＴ２抗体、抗β７インテグリン（例えば、抗α４－β７インテグリン及び／又はαＥβ７インテグリン）、ＣＤＫ阻害剤、腫瘍溶解性ウイルス、インドールアミン２，３－ジオキシゲナーゼ（ＩＤＯ）阻害剤及び／又はＰＡＲＰ阻害剤から選択される少なくとも１つのさらなる療法と共に使用され得る。

【００５７】

ＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１選択的阻害剤又はアイソタイプ非選択的ＴＧＦβ阻害剤）の投与後の循環ＭＤＳＣレベルの決定に言及するものを含む方法及び組成物、例えば本開示に係る使用のための組成物において、対象は、以前の癌療法を受けていなくてもよく、例えば治療未経験であってもよいか、以前の癌療法を受けたことがあってもよいか、又は癌療法を受けていてもよい。以前の癌療法は、本発明に従って投与される同じ癌療法であり得る。癌療法は、チェックポイント阻害剤（ＣＰＩ）療法であり得る。癌は、進行癌であり得る。癌は、局所進行腫瘍及び／又は転移性癌を含み得る。さらに、対象は、免疫抑制を示すか又は免疫抑制を示す疑いのある癌（例えば、免疫除去又は免疫抑制表現型を有する腫瘍）を有し得る。例えば、ＴＧＦβ阻害剤を投与される又は投与された対象は、チェックポイント阻害剤療法に対する高い奏効率（例えば、３０％、４０％超、５

０％超又はそれを超える全奏効率）を有する癌を有し得、チェックポイント阻害剤療法に対する耐性があり得る。チェックポイント阻害剤療法に対する高い奏効率を有する癌の例としては、限定はされないが、マイクロサテライト不安定性結腸直腸癌（ＭＳＩ－ＣＲＣ）、腎細胞癌（ＲＣＣ）、黒色腫（例えば、転移性黒色腫）、ホジキンリンパ腫、ＮＳＣＬＣ、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）を伴う癌、原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＣＬ）及びメルケル細胞癌が挙げられる（例えば、Ｈａｓｌａｍ ｅｔ ａｌ．，ＪＡＭＡ Ｎｅｔｗｏｒｋ Ｏｐｅｎ．２０１９；２（５）：ｅ１９２５３５において報告されるように）。いくつかの実施形態において、対象は、チェックポイント阻害剤療法に対する低い奏効率（例えば、３０％以下、２０％以下若しくは１０％又はそれを超える全奏効率）を有する癌を有し得、治療未経験であり得る。いくつかの実施形態において、対象は、チェックポイント阻害剤療法に対する低い奏効率（例えば、３０％以下、２０％以下若しくは１０％又はそれを超える全奏効率）を有する癌を有し得、チェックポイント阻害剤療法に対する耐性があり得る。チェックポイント阻害剤療法に対する低い奏効率を有する癌の例としては、限定はされないが、卵巣癌、胃癌及びトリプルネガティブ乳癌が挙げられる。

【００５８】

いくつかの実施形態において、本開示のＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６、Ａｂ２１、Ａｂ２２、Ａｂ２３、Ａｂ２４、Ａｂ２５、Ａｂ２６、Ａｂ２７、Ａｂ２８、Ａｂ２９、Ａｂ３０、Ａｂ３１、Ａｂ３２、Ａｂ３３又はＡｂ３４）は、癌療法のレスポンダーの中における部分奏効に対する完全奏効の率又は比率を改善するのに使用され得る。典型的には、癌療法（例えば、チェックポイント阻害剤療法）に対する奏効率が比較的高い（例えば、≧３０％のレスポンダー）癌型でも、完全奏効率が低い。従って、本開示のＴＧＦβ阻害剤は、レスポンダー集団中の完全レスポンダーの割合を増加させるのに使用され得る。好ましい実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、Ａｂ６である。

【００５９】

いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、治療有効用量でＴＧＦβ２シグナル伝達を阻害しない。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、治療有効用量でＴＧＦβ３シグナル伝達を阻害しない。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、治療有効用量でＴＧＦβ２シグナル伝達及びＴＧＦβ３シグナル伝達を阻害しない。いくつかの実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６、Ａｂ２１、Ａｂ２２、Ａｂ２３、Ａｂ２４、Ａｂ２５、Ａｂ２６、Ａｂ２７、Ａｂ２８、Ａｂ２９、Ａｂ３０、Ａｂ３１、Ａｂ３２、Ａｂ３３及びＡｂ３４である。好ましい実施形態において、ＴＧＦβ１選択的阻害剤は、Ａｂ６である。

【図面の簡単な説明】

【００６０】

【図１】インビトロでのＴＧＦβ１のカリクレイン誘導性活性化に対するＡｂ３及びＡｂ６の阻害効果を示す。

【図２】インビトロでのＴＧＦβ１のプラスミン誘導性活性化に対するＡｂ３及びＡｂ６の阻害効果を示す。

【図３】ＬＲＲＣ３３及びｐｒｏＴＧＦβ１でトランスフェクトした異種細胞におけるＡｂ６結合時のＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１の急速なインターナリゼーションを示すグラフを提供する。

【図４】ＵＵＯマウスにおけるコラーゲン遺伝子（Ｃｏｌ１ａ１及びＣｏｌ３ａ１）の発現に対するＡｂ６又はＡｂ３の効果を示す２つのグラフを提供する。マウスを３、１０若しくは３０ｍｇ／ｋｇ／週のＡｂ３又は３若しくは１０ｍｇ／ｋｇ／週のＡｂ６で処置した。ＩｇＧ単独を対照として用いた。

【図５】ＵＵＯマウスにおけるＦｎ１及びＬｏｘｌ２遺伝子の発現に対するＡｂ３又はＡｂ６の効果を示す２つのグラフを提供する。マウスを３、１０若しくは３０ｍｇ／ｋｇ／週のＡｂ３又は３若しくは１０ｍｇ／ｋｇ／週のＡｂ６で処置した。ＩｇＧ単独を対照と

して用いた。
【図６】ＵＵＯモデルにおける処置後の遺伝子発現の変化（ＵＵＯ＋ＩｇＧに対して）の統計的有意性を要約する。
【図７】それぞれ抗ＰＤ－１と組み合わせて、３０ｍｇ／ｋｇ若しくは１０ｍｇ／ｋｇでＡｂ３又はＡｂ６を投与した後の経時的に（日数）測定された、クラウドマン（Ｃｌｏｕｄｍａｎ）Ｓ９１メラノーマモデルにおける腫瘍進行の中央値として表される腫瘍増殖の変化（腫瘍体積mm^3）を示す５つのグラフを提供する。抗ＰＤ－１単独を対照として用いた。破線は、腫瘍潰瘍化のために２０００mm^3のエンドポイント基準に達する前に犠牲にしなければならなかった動物を表す。
【図８】抗ＰＤ－１と組み合わせて、Ａｂ３（左）又はＡｂ６（右）を３０ｍｇ／ｋｇ又は１０ｍｇ／ｋｇで投与した後の時間の関数としてのクラウドマンＳ９１腫瘍体積の中央値を示す２つのグラフを提供する。抗ＰＤ－１単独、Ａｂ３単独、Ａｂ６単独及びＩｇＧ単独を対照として用いた。
【図９】（１）対照ＩｇＧ；（２）Ａｂ６のみ；（３）抗ＰＤ１のみ；（４）抗ＰＤ１／Ａｂ６（３ｍｇ／ｋｇ）；（５）抗ＰＤ１／Ａｂ６（１０ｍｇ／ｋｇ）；及び（６）抗ＰＤ１／Ａｂ６（３０ｍｇ／ｋｇ）で処置したマウスにおける時間の関数としてのＳ９１腫瘍体積の変化を示す６つのグラフを提供する。２，０００mm^3のエンドポイント腫瘍体積が上方の点線で示され；５００mm^3の２５％の閾値体積が下方の点線に示される。応答動物は、エンドポイント体積の２５％未満の腫瘍サイズを達成したものと定義した。
【図１０】３つの用量レベル（３、１０及び３０ｍｇ／ｋｇ）での抗ＰＤ－１及びＡｂ６の組み合わせで処置されたマウスにおける時間の関数としてのＳ９１腫瘍体積の変化を示す３つのグラフを提供する。持続性抗腫瘍効果が処置後に示される。
【図１１】図９からの腫瘍体積の中央値として表されるデータをまとめたグラフを提供する。
【図１２】図９から経時的な各処置群における動物の生存率を示すグラフを提供する。
【図１３】ＭＢＴ２同系膀胱癌モデルにおける抗ＰＤ－１と組み合わせたＡｂ６の効果を示す５つのグラフを提供する。応答動物は、試験終了時にエンドポイント体積の２５％未満の腫瘍サイズを達成したものと定義される。
【図１４】ＭＢＴ２同系膀胱癌モデルにおいて、抗ＰＤ－１と組み合わせて、１０ｍｇ／ｋｇでＡｂ３を、又は３ｍｇ／ｋｇ若しくは１０ｍｇ／ｋｇでＡｂ６を投与した後の経時的（日数）生存率を示すグラフである。抗ＰＤ－１単独を対照として用いた。
【図１５】腫瘍再チャレンジ試験において経時的に（日数）測定された腫瘍増殖（腫瘍体積mm^3）の変化を示す一連のグラフを提供する。以前に抗ＰＤ－１／Ａｂ３又は抗ＰＤ－１／Ａｂ６で処置した、腫瘍を排除した動物（完全な退縮を達成した完全奏功動物）をＭＢＴ２腫瘍細胞で再チャレンジした。ナイーブ、即ち未処置の動物を対照として使用した。破線は、腫瘍潰瘍のために１２００mm^3エンドポイント基準に達する前に犠牲にしなければならなかった動物を表す。
【図１６】統計分析後の３つの結合領域（領域１、領域２及び領域３）の同定を示す。領域１は、ｐｒｏＴＧＦβ１のプロドメイン内のいわゆる「潜在型ラッソ」と重複するのに対して、領域２及び３は、増殖因子ドメイン内にある。
【図１７】Ａｂ６結合に関与する３つの結合領域に関して、ｐｒｏＴＧＦβ１の様々なドメイン及びモチーフを示す。３つのアイソフォーム間の配列アラインメントも提供される。
【図１８】潜在型ＴＧＦβ１に結合するＡｂ６及びインテグリンαＶβ６を示す。
【図１９】正常な比較基準に対する様々なヒト癌組織におけるＴＧＦβアイソフォームの相対ＲＮＡ発現（癌タイプ別）を示す。
【図２０】３３の腫瘍型の１０，０００を超えるサンプルからの分析に基づくヒト癌タイプによるＴＧＦβアイソフォーム発現（相対ＲＮＡ発現）の頻度を示す。
【図２１Ａ】個々の腫瘍サンプルにおけるＴＧＦβアイソフォームのＲＮＡ発現を癌タイプ別に示す。

【図２１Ｂ】マウス同系癌細胞モデル株におけるＴＧＦβアイソフォームのＲＮＡ発現を示す。
【図２２】全ての提示分子（ＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３、ＧＡＲＰ及びＬＲＲＣ３３）がほとんどのヒト癌タイプにおいて高度に発現されていることを示す４つの遺伝子発現パネルを提供する。
【図２３Ａ】同系マウス腫瘍モデル、クラウドマンＳ９１、ＭＢＴ－２及びＥＭＴ－６からのＴＧＦβ及び関連シグナル伝達経路遺伝子の発現解析を提供する。
【図２３Ｂ】ＥＬＩＳＡによる、クラウドマンＳ９１、ＭＢＴ－２及びＥＭＴ－６腫瘍モデルにおける３つのＴＧＦβアイソフォームのタンパク質発現を比較する３つのグラフを提供する。
【図２３Ｃ】クラウドマンＳ９１、ＭＢＴ－２及びＥＭＴ－６腫瘍モデルにおける提示分子の全腫瘍溶解物ｑＰＣＲによるＲＮＡ発現レベルを比較したグラフを提供する。
【図２４Ａ】１週間の毒性試験からの汎ＴＧＦβ抗体からの顕微鏡的心臓所見を示す。
【図２４Ｂ】４週間のラット毒性試験からのＡＬＫ５阻害剤又は汎ＴＧＦβ抗体と比較した、Ａｂ６からの顕微鏡的所見を示す。
【図２５】Ｓ９１腫瘍体積の中央値を時間の関数として示すグラフを提供する。併用アームは、各々抗ＰＤ－１処置と組み合わせた、２つの用量レベルでの４つの異なるアイソフォーム選択的なコンテキスト非依存的ＴＧＦβ１阻害剤を表す。
【図２６Ａ】末梢ヒト調節Ｔ細胞におけるＧＡＲＰのＣＤ３／ＣＤ２８誘導性上方制御を示すＦＡＣＳデータを提供する。
【図２６Ｂ】Ｔｅｆｆ増殖のＴｒｅｇ媒介性阻害に対するＡｂ３又はＡｂ６の効果を示すグラフである。ＩｇＧを対照として用いた。
【図２７Ａ】ＭＢＴ２腫瘍におけるＴ細胞亜集団を選別するためのゲーティング戦略を示す。
【図２７Ｂ】ＣＤ４５＋細胞のパーセントとして表される、１３日目のＴ細胞亜集団を示す一連のグラフを提供する。
【図２７Ｃ】ＭＢＴ２腫瘍由来の腫瘍内Ｔ細胞のＩＦＮγ発現を示す。
【図２８Ａ】ＭＢＴ２腫瘍における骨髄系亜集団を選別するためのゲーティング戦略を提供する。
【図２８Ｂ】１３日目の骨髄系細胞亜集団を示す一連のグラフを提供する。
【図２８Ｃ】ＭＢＴ－２中の腫瘍関連マクロファージが細胞表面ＬＲＲＣ３３を発現することを示すＦＡＣＳデータを提供する。
【図２８Ｄ】ＭＢＴ－２腫瘍浸潤性ＭＤＳＣが細胞表面ＬＲＲＣ３３を発現することを示す。
【図２９Ａ－２９Ｃ】ＭＢＴ２腫瘍におけるＡｂ６及び抗ＰＤ－１処置の効果を示す追加のＦＡＣＳデータ分析を提供する。
【図３０Ａ－３０Ｄ】腫瘍内ＣＤ８陽性Ｔ細胞を示す代表的なＭＢＴ２腫瘍切片のＩＨＣ画像を提供する。
【図３０Ｅ】各処置群におけるＣＤ８陽性細胞の割合として表される、図３０Ａ～３０ＤからのＩＨＣデータの定量化を提供する。切片の壊死領域は、分析から除外した。
【図３０Ｆ】ＭＢＴ２腫瘍におけるＡｂ６及び抗ＰＤ－１処置の効果のＩＨＣ解析を提供する。腫瘍切片を、図示されるように３つの処置群からの動物におけるホスホ－ＳＭＡＤ３（上パネル）又はＣＤ８及びＣＤ３１（下パネル）について視覚化した。
【図３０Ｇ】Ａｂ６と抗ＰＤ－１との組み合わせがＣＤ３１＋血管からＭＢＴ２腫瘍へのＣＤ８＋Ｔ細胞動員及び浸潤を誘発すると思われることを実証するデータを提供する。
【図３１Ａ－３１Ｄ】図示されるように４つの処置群からのＭＢＴ２腫瘍から採取された免疫応答マーカ、Ｐｔｐｒｃ（図３１Ａ）；ＣＤ８ａ（図３１Ｂ）；ＣＤ４（図３１Ｃ）及びＦｏｘｐ３（図３１Ｄ）の遺伝子発現を提供する。
【図３２Ａ－３２Ｃ】表示されているように、１０日目及び／又は１３日目におけるエフェクター機能マーカ、Ｉｆｎｇ（図３２Ａ）；Ｇｚｍｂ（図３２Ｂ）；及びＰｒｆ１（図

３２Ｃ）の遺伝子発現を提供する。
【図３２Ｄ】１０日目にＭＢＴ２腫瘍サンプルにおいてｑＰＣＲにより測定された４つの遺伝子マーカ（グランザイムＢ、パーフォリン、ＩＦＮγ及びＫｌｒｋ１）の発現を示す一連のグラフを提供する。各グラフは、３つの処置群：抗ＰＤ－１単独（左）；Ａｂ６単独（中央）；及び抗ＰＤ－１とＡｂ６の組合せ（右）における発現の倍率変化を提供する。
【図３３Ａ】溶液平衡滴定ベースのアッセイ（ＭＳＤ－ＳＥＴ）によって測定した、図示される４つの大型潜在型複合体に対するＡｂ６のインビトロ結合を示す。測定されたK_D値（ピコモル）を右側に示す。
【図３３Ｂ】ＬＮ２２９細胞ベースの効力アッセイを示し、表示されるように４つの大型潜在型複合体に対するＡｂ６の濃度依存的効力を示すグラフを提供する。また、Ａｂ６がｐｒｏＴＧＦβ３を阻害しないことも示す。
【図３３Ｃ】潜在型ＴＧＦβ１複合体及び３つの活性／成熟ＴＧＦβ増殖因子に対するＡｂ６の結合を示す。
【図３４Ａ】ＥＭＴ６における経時的な腫瘍増殖／退縮に対する抗ＰＤ１及び／若しくは抗ＴＧＦβ３と組み合わせた、又はそれらを含まないＡｂ６の効果を示す９つの一連のグラフを提供する（試験１）。各グラフ内上方の点線は、２０００mm^3のエンドポイント腫瘍体積を表し、各グラフ内の下方の点線は、エンドポイント体積の２５％（即ち５００mm^3）を表す。
【図３４Ｂ】ＥＭＴ６における経時的生存率（処置開始後の日数）を示すグラフを提供する（試験１）。抗ＰＤ－１及びＡｂ６の両方を含む処置群は、抗ＰＤ－１単独と比較して有意な生存利益を示した。
【図３４Ｃ】ＥＭＴ６における経時的生存率（処置開始後数日）を示すデータを提供する（試験２）。抗ＰＤ－１及びＡｂ６の両方を含む処置群は、抗ＰＤ－１単独と比較して有意な生存利益を示し、抗腫瘍効果は、処置終了後も持続性である。
【図３４Ｄ】ＥＭＴ６乳癌モデルにおける生存率に対する抗ＰＤ－１及びＡｂ６組合せの効果を提供する。
【図３４Ｅ】処置開始から１０日後の抗ＰＤ１／Ａｂ６（ｍＩｇＧ１）処置ＥＭＴ－６腫瘍のＣＤ８及びＣＤ３１免疫蛍光染色を提供する。
【図３４Ｆ】図３４Ｅに基づき、ＣＤ３１＋対象に関連してＣＤ８＋対象を示すヒストグラムを提供する。
【図３５】ｍＲＮＡレベル（左）及びタンパク質レベル（右）で測定されたＥＭＴ６腫瘍における３つのＴＧＦβアイソフォームの相対発現を示す２つのグラフを提供する。
【図３６Ａ】マウス骨髄増殖性障害モデルにおける骨髄の線維性表現型のマーカとしてのレチクリンの銀染色を示す一連の組織像を提供する。
【図３６Ｂ】２つの個別の反復試験からの疾患負荷が高いMPL^{W515L}マウスにおける骨髄線維症の組織病理学的分析及びＴＧＦβ１阻害の効果を示す２つのグラフを提供する。
【図３６Ｃ】Ａｂ６又は対照ＩｇＧで処置したMPL^{W515L}マウスにおける血液学的パラメータを示す一連のグラフを提供する。
【図３６Ｄ】Ａｂ６又は対照ＩｇＧで処置したMPL^{W515L}マウスにおける追加の血液学的パラメータを示す一連のグラフを提供する。
【図３７Ａ】ＴＧＦβアイソフォーム発現とＩＰＲＥＳ遺伝子セットとの間の相関を示す遺伝子セット変異解析（ＧＳＶＡ）を提供する。
【図３７Ｂ】ＴＧＦβアイソフォーム発現とＰｌａｓａｒｉ遺伝子セットとの間の相関を示す遺伝子セット変異解析（ＧＳＶＡ）を提供する。ＴＧＦＢ１アイソフォーム発現は、ＴＧＦβ経路活性化と相関する。ＴＧＦβ応答性遺伝子のＰｌａｓａｒｉ遺伝子セットは、多くのＴＣＧＡアノテート腫瘍タイプ全体でＴＧＦＢ１　ＲＮＡアイソフォーム発現と有意に且つ強く相関する。ＴＧＦＢ１　ｍＲＮＡとＴＧＦβシグナル伝達シグネチャとの相関。

【図３８Ａ】プレート結合アッセイフォーマットからのサイトカイン放出を示すグラフを提供する。
【図３８Ｂ】可溶性アッセイフォーマットからのサイトカイン放出を示すグラフを提供する。
【図３９Ａ】ＡＤＰアゴニストを用いたヒトＰＲＰにおける血小板凝集の増幅を示す。
【図３９Ｂ】ＡＤＰアゴニストを用いたヒトＰＲＰにおける血小板凝集の曲線下面積を示す。
【図４０】ＭＢＴマウスで測定された循環Ｇ－ＭＤＳＣ及びＭ－ＭＤＳＣのパーセントを示す。
【図４１】例示的なＴＧＦβ阻害剤治療レジメンの概略図を示す。
【図４２】ＭＢＴ－２マウスにおける循環ＴＧＦβ１レベル（ｐｇ／ｍＬ）を示す。
【図４３Ａ】Ａｂ６（μｇ／ｍＬ、左）及びＴＧＦβ１（ｐｇ／ｍＬ、右）の血漿レベルを示す。
【図４３Ｂ】ＡＢ６単独又は抗ＰＤ１抗体との併用で処置したＭＢＴ－２マウスにおけるＡｂ６（μｇ／ｍＬ）及びＴＧＦβ１（ｐｇ／ｍＬ）の血漿レベルの相関を示す。
【図４４Ａ】ＭＢＴ－２マウスにおける血漿血小板因子４レベル（ｎｇ／ｍＬ）を示す。
【図４４Ｂ】四分位範囲によって決定されるサンプル外れ値を示す。
【図４４Ｃ】循環ＴＧＦβ１の同定されたサンプル外れ値（左）及び外れ値補正レベル（ｐｇ／ｍＬ）（右）を示す。
【図４５Ａ】膀胱癌サンプルの組織区画データを示す。
【図４５Ｂ】黒色腫サンプルの組織区画データを示す。
【図４６Ａ】膀胱癌サンプルにおける代表的なＣＤ８＋染色を示す。
【図４６Ｂ】腫瘍縁部区画におけるＣＤ８＋染色の細分化を示す。
【図４６Ｃ】膀胱サンプルの腫瘍縁部区画におけるＣＤ８＋染色の細分化を示す。
【図４７】コンパートメントＣＤ８＋比とＣＤ８陽性率の絶対パーセントとの比較を示す。
【図４８】ＣＤ８＋細胞密度とＣＤ８陽性率の絶対パーセントとの比較を示す。
【図４９】処置群全体のＭＢＴ－２マウスにおける腫瘍体積を示す。
【図５０】非腫瘍担持マウスにおける循環ＭＤＳＣのベースラインレベルを示す。
【図５１】腫瘍担持マウスにおける循環ＭＤＳＣのレベルを示す。
【図５２】非腫瘍担持マウス及び腫瘍担持マウスにおける循環ＭＤＳＣレベルの比較を示す。
【図５３Ａ】３～１０日目における循環Ｍ－ＭＤＳＣレベル及びＧ－ＭＤＳＣレベルの比較を示す。
【図５３Ｂ】３日目から１０日目までの循環Ｍ－ＭＤＳＣ及びＧ－ＭＤＳＣレベルの経時変化を示す。
【図５４】処置群全体での１０日目の循環ＭＤＳＣレベル及び腫瘍体積のプロットである。
【図５５】異なる処置群における腫瘍ＭＤＳＣレベルを示す。
【図５６】処置群全体での１０日目の循環Ｇ－ＭＤＳＣレベル及び腫瘍ＭＤＳＣレベルの比較を示す。
【図５７】循環ＭＤＳＣレベルと腫瘍ＭＤＳＣレベルとの相関を示す。
【図５８】全処置群にわたる腫瘍Ｇ－ＭＤＳＣ及び腫瘍ＣＤ８＋細胞のレベルのプロットである。
【図５９】Ａｂ６の単回投与後のＮＨＰ中の循環ＴＧＦβレベルを示す。
【図６０】Ａｂ６の単回投与後のラットにおける循環ＴＧＦβレベルを示す。
【図６１】膀胱サンプルの腫瘍深達度を示す。
【図６２】黒色腫サンプル中のＣＤ８密度を示す。
【図６３】腫瘍組織サンプルの例示的な病理分析の概略を示す。
【図６４】腫瘍組織サンプルの例示的な病理分析の概略を示す。

【図６５】ヒト、ラット及びカニクイザル由来の潜在型ＴＧＦβに対するＡｂ６の結合親和性を示す。
【図６６】Ｃ５７ＢＬ／６マウス、スプレーグ・ドーリーラット及びカニクイザルへの単回投与後の平均Ａｂ６血清濃度時間プロファイルを示す。
【図６７】スプレーグ・ドーリーラット及びカニクイザルへの複数回投与後の血清濃度時間プロファイルを示す。
【図６８】腫瘍巣に基づいて分析された膀胱癌サンプル中のＣＤ８＋細胞の密度を示す。
【図６９】腫瘍巣内で測定されたＣＤ８＋細胞の密度に基づく単一の膀胱癌サンプルの免疫表現型分析を示す。
【図７０Ａ】腫瘍区画（左）及び腫瘍巣（右）によって分析された膀胱癌及び黒色腫サンプルにおけるＣＤ８＋細胞及び免疫表現型の平均パーセンテージを示す。
【図７０Ｂ】腫瘍区画（左）及び腫瘍巣（右）によって分析された膀胱癌及び黒色腫サンプルにおけるＣＤ８＋細胞及び免疫表現型の平均パーセンテージを示す。
【発明を実施するための形態】
【００６１】
定義
本開示がより容易に理解され得るように、初めに特定の用語を定義する。これらの定義は、本開示の残りの部分に照らして、また当業者によって理解されるとおりに解釈されるべきである。別途定義のない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。追加の定義は、詳細な説明全体を通して記載される。
【００６２】
進行癌、進行悪性腫瘍：本明細書で使用される「進行癌」又は「進行悪性腫瘍」という用語は、関連する技術分野において理解される意味を有し、例えば癌を有する対象／患者を診断又は治療する状況において腫瘍学者により理解される。固形腫瘍を伴う進行性悪性腫瘍は、局所進行又は転移性であり得る。「局所進行癌」という用語は、それが始まった器官の外側に成長したが、依然として身体の遠位部分に転移していない癌（例えば、腫瘍）を表すために使用される。従って、この用語には、それが始まった場所から近傍の組織又はリンパ節に転移した癌が含まれる。対照的に、「転移性癌」は、それが始まった身体の部分（原発部位）から身体の他の部分（例えば、遠位部分）に転移した癌である。
【００６３】
親和性：親和性は、分子（抗体など）とそのリガンド（抗原など）への結合の強さである。これは、典型的には、平衡解離定数（K_D）によって測定及び記録される。抗体－抗原相互作用に関連して、K_Dは、抗体の解離速度（「ｏｆｆ速度」又はK_{off}）、即ち抗体がその抗原から解離する速さと、抗体の抗体会合速度（「ｏｎ速度」又はK_{on}）、即ち抗体がその抗原に結合する速さの比である。例えば、≦５ｎＭの親和性を有する抗体は、適切なインビトロ結合アッセイによって決定される５ｎＭ以下のK_D値（即ち５ｎＭ以上の親和性）を有する。適切なインビトロアッセイは、バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）及び溶液平衡滴定（例えば、ＭＳＤ－ＳＥＴ）など、その抗原に対する抗体のK_D値を測定するために使用することができる。好ましい実施形態では、親和性は、表面プラズモン共鳴（例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ（登録商標））によって測定される。表面プラズモン共鳴アッセイにおいて適切な親和性を有する抗体は、例えば、最大約１ｎＭ、例えば、最大約０．５ｎＭ、例えば、最大約０．５、０．４、０．３、０．２、０．１５ｎＭ又はそれ未満のK_Dを有し得る。
【００６４】
抗体：「抗体」という用語は、本明細書の他の箇所でさらに詳細に記載されるように、任意の天然に存在する、組換え、修飾若しくは操作された免疫グロブリン若しくは免疫グロブリン様構造又は抗原結合性断片若しくはその一部或いはそれらの誘導体を包含する。従って、この用語は、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、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体及び多重特異性抗体（二重特異性抗体など）を含

む。インタクトな抗体は、一般に、少なくとも２つの完全長重鎖と２つの完全長軽鎖を含むが、いくつかの事例では、より少ない鎖、例えば重鎖のみを含み得るラクダ科動物に天然に存在する抗体なども含み得る。抗体は、単一の供給源のみに由来するものであり得、又は「キメラ」であり得る（即ち、抗体の異なる部分は、２つの異なる抗体から誘導され得る）。抗体又はその抗原結合部分は、ハイブリドーマにおいて、組換えＤＮＡ技術により、又はインタクトな抗体の酵素的若しくは化学的切断によって生成され得る。本明細書で使用される抗体という用語は、モノクローナル抗体、二重特異性抗体などの多重特異性抗体、ミニボディ、ドメイン抗体、合成抗体（本明細書では「抗体ミメティック」と呼ばれる場合もある）、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体融合物（本明細書では「抗体複合体」と称する場合もある）をそれぞれ含む。一部の実施形態では、この用語は、ペプチボディも包含する。

【００６５】

抗原：「抗原」という用語は、抗体又は断片が特異的に結合する結合領域内に抗原決定基を含む任意の分子を広く包含する。抗原は、単一単位分子（タンパク質モノマー又は断片など）又は複数の成分から構成される複合体であり得る。抗原は、エピトープ、例えば抗原結合タンパク質（例えば、抗体を含む）などの選択的結合因子によって結合され得る分子若しくは分子の一部又は分子若しくは分子の複合体を提供する。従って、選択的結合因子は、複合体中の２つ以上の成分によって形成される抗原に特異的に結合し得る。一部の実施形態では、抗原は、動物に使用して、その抗原に結合し得る抗体を産生することができる。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できる１つ以上のエピトープを有することができる。本開示に関連して、好適な抗原は、提示分子と会合したｐｒｏＴＧＦ二量体を含む複合体（例えば、会合した複数の成分からなる多量体複合体）である。ｐｒｏＴＧＦ二量体の各モノマーは、プロドメイン及び増殖因子ドメインを含み、フーリン切断配列によって分離される。２つのそのようなモノマーがｐｒｏＴＧＦ二量体複合体を形成する（図１９を参照されたい）。これは、次に、ジスルフィド結合を介して提示分子と共有結合し、これは、ｐｒｏＴＧＦモノマー各々のＮ末端付近に存在するシステイン残基を含む。提示分子に結合したｐｒｏＴＧＦ二量体によって形成されるこの多重複合体は、一般に、大型潜在型複合体と呼ばれる。抗体又は抗原結合断片をスクリーニングするのに適した抗原複合体は、例えば、大型潜在型複合体の提示分子成分を含む。このような提示分子成分は、完全長提示分子又はその断片であり得る。提示分子の最低限必要な部分は、典型的には、ｐｒｏＴＧＦβ１二量体との共有結合を形成することができる２つのシステイン残基を含む提示分子ポリペプチドの少なくとも５０個のアミノ酸を含むが、より好ましくは少なくとも１００個のアミノ酸を含む。

【００６６】

抗原結合部分／断片：本明細書で使用される抗体の「抗原結合部分」又は「抗原結合断片」という用語は、抗原（例えば、ＴＧＦβ１）に特異的に結合する能力を保持する抗体の１つ以上の断片を指す。抗原結合部分には、限定はされないが、任意の天然に存在する、酵素的に取得可能な、合成された又は遺伝子操作されたポリペプチド若しくは糖タンパク質が含まれ、それらは、抗原と特異的に結合して複合体を形成する。一部の実施形態では、抗体の抗原結合部分は、例えば、抗体可変ドメイン及び任意選択で定常ドメインをコードするＤＮＡの操作及び発現を含むタンパク質分解消化又は組換え遺伝子工学的技術などの任意の好適な標準技術を用いて、完全抗体分子から誘導され得る。抗原結合部分の非限定的な例としては、以下のものが挙げられる：（ｉ）Ｆａｂ断片、ＶＬ、ＶＨ、ＣＬ及びＣＨ１ドメインから構成される１価断片；（ｉｉ）Ｆ（ａｂ’）２断片、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋により連結された２つのＦａｂ断片を含む２価断片；（ｉｉｉ）ＶＨドメイン及びＣＨ１ドメインから構成されるＦｄ断片；（ｉｖ）抗体の単一アームのＶＬドメイン及びＶＨドメインから構成されるＦｖ断片；（ｖ）一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）分子（例えば、Ｂｉｒｄ ｅｔ ａｌ．，（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３－４２６；及びＨｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：５８７９－５８８３を参照されたい）；（ｖｉ）ｄＡｂ断

片（例えば、Ｗａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ　３４１：５４４－５４６を参照されたい）；並びに（ｖｉｉ）抗体の超可変領域を模倣するアミノ酸残基から構成される最小認識単位（例えば、単離された相補性決定領域（ＣＤＲ））。また、ダイアボディなどの他の形態の一本鎖抗体も包含される。抗体の抗原結合部分という用語は、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）及びリンカーを含む、「ｓｃＦａｂ」としても知られる「一本鎖Ｆａｂ断片」を含み、前記抗体ドメイン及び前記リンカーは、Ｎ末端からＣ末端の方向に以下の序列の１つを有する：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、又はｄ）ＶＬ－ＣＨ１－リンカー－ＶＨ－ＣＬ；この場合、前記リンカーは、少なくとも３０アミノ酸、好ましくは３２～５０アミノ酸のポリペプチドである。

【００６７】

バイアス：本開示に関連して、「バイアス」（「バイアスを有する結合」のように）という用語は、抗体が特異的に結合することができる抗原のサブセットに向かうか若しくは抗原のサブセットに対する歪んだ又は不均一な親和性を指す。例えば、ある抗原複合体に対する親和性と別の抗原複合体に対する親和性が同等でない場合、抗体はバイアスを有すると言える。本開示に従うコンテキスト非依存性抗体は、このような抗原複合体に対して同等の親和性（即ち不偏又は均一）を有する。

【００６８】

結合領域：本明細書で使用される場合、「結合領域」は、抗体又はその断片に結合したとき、抗体－抗原相互作用の界面を形成することができる抗原の一部分である。抗体が結合すると、結合領域は表面露出から保護され、ＨＤＸ－ＭＳなどの適切な技術によって検出することができる。抗体－抗原相互作用は、複数の（例えば、２つ以上の）結合領域を介して媒介され得る。結合領域は、抗原決定基、又はエピトープを含むことができる。

【００６９】

バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）：ＢＬＩは、例えば、バイオセンサーチップの表面に固定化されたリガンドと溶液中の分析物との間の生体分子相互作用を光学的に測定するためのラベルフリー技術である。ＢＬＩは、結合特異性、会合及び解離の速度、又は濃度を正確且つ精密にモニターする能力を提供する。ＢＬＩプラットフォーム計器は、例えば、ＦｏｒｔｅＢｉｏから市販されており、一般にＯｃｔｅｔ（登録商標）Ｓｙｓｔｅｍと呼ばれている。

【００７０】

癌：本明細書で使用される「癌」という用語は、典型的には、異常細胞増殖及び悪性腫瘍を特徴とする多細胞真核生物における生理学的状態を指す。この用語は、腫瘍、血液癌（例えば、白血病、リンパ腫及び骨髄腫）並びに骨髄線維症を含む固形及び液体悪性腫瘍を広く包含する。

【００７１】

細胞関連ｐｒｏＴＧＦβ１：この用語は、膜結合した（例えば、細胞表面にテザリングされた）ＴＧＦβ１又はそのシグナル伝達複合体（例えば、ｐｒｏ／潜在型ＴＧＦβ１）を指す。典型的には、このような細胞は、免疫細胞である。ＧＡＲＰ又はＬＲＲＣ３３によって提示されるＴＧＦβ１は、細胞関連ＴＧＦβ１である。ＧＡＲＰ及びＬＲＲＣ３３は、特定の細胞の細胞表面に発現される膜貫通提示分子である。ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－は、「細胞関連」（又は「細胞表面」）ｐｒｏＴＧＦβ１複合体と総称される場合もあり、これらは、細胞ｐｒｏＴＧＦβ１結合（例えば、免疫細胞関連）ＴＧＦβ１活性化／シグナル伝達を媒介する。この用語は、溶液中における、細胞膜に物理的に結合していない組換え、精製ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体も含む（例えば、インビトロアッセイ）。ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に対する抗体（又はその断片）の平均ＫＤ値を計算して、細胞関連（例えば、免疫細胞関連）ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に対する親和性を集合的に表すことができる。例えば、表５の列（Ｇ）を参照されたい。提示

分子又は提示分子複合体のヒト対応物は、タンパク質又はタンパク質複合体に先行する「ｈ」、例えば、「ｈＧＡＲＰ」、「ｈＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１」、「ｈＬＲＲＣ３３」及び「ｈＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１」によって示され得る。細胞連結複合体からの活性ＴＧＦβ１増殖因子の放出遮断に加えて、細胞関連ｐｒｏＴＧＦβ１は、そうした細胞表面複合体を発現する標的細胞のインターナリゼーション（例えば、エンドサイトーシス）及び／又はＡＤＣＣ、ＡＤＣＰ、又はＡＤＣ媒介性枯渇などの細胞殺傷の標的であり得る。

【００７２】

チェックポイント阻害剤：本開示に関連して、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、当技術分野で理解されるとおりの意味を有する。「チェックポイント阻害剤療法」又は「チェックポイント阻害療法」は、チェックポイント分子を標的にして、その機能を部分的又は完全に改変するものである。典型的には、チェックポイントは、Ｔ細胞若しくはＮＫ細胞上の受容体分子又は抗原提示細胞（ＡＰＣ）又は腫瘍細胞上の対応する細胞表面リガンドである。理論に束縛されるものではないが、免疫チェックポイントは、免疫細胞内で活性化されて、「自己」に対する炎症性免疫の発生を阻止する。従って、チェックポイント阻害を介して免疫系のバランスを変化させれば、免疫系を完全に活性化して、癌を検出して、排除することが可能になり得る。免疫応答の制御に関与する最もよく知られている阻害性受容体は、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）、プログラム細胞死受容体リガンド１（ＰＤ－Ｌ１）、Ｔ細胞免疫グロブリンドメイン及びムチンドメイン－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）、グルココルチコイド誘発性腫瘍壊死因子受容体（ＧＩＴＲ）及びＴ細胞活性化のＶドメイン免疫グロブリン（Ｉｇ）含有抑制因子（ＶＩＳＴＡ）である。チェックポイント阻害剤の非限定的な例としては、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ＢＭＳ－９３６５５９、アテゾリズマブ、アベルマブ、ダルバルマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、ＩＭＰ－３２１（エフチラギモドα又はＩｍｍｕＦａｃｔ（登録商標））、ＢＭＳ－９８６０１６（レラチマブ）及びリリルマブが挙げられる。Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標）は、抗ＰＤ－１抗体の一例であり、Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標）は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体の一例である。１種以上の免疫チェックポイント阻害剤を使用する療法は、チェックポイント阻害療法（ＣＢＴ）又はチェックポイント阻害剤療法（ＣＰＩ）と呼ばれることもある。

【００７３】

臨床的利益：本明細書で使用される場合、「臨床的利益」という用語は、治療の有効性及び安全性の両方を含むことが意図される。従って、望ましい臨床的利益を達成する治療的処置は、有効（例えば、治療的に有益な効果を達成する）且つ安全（例えば、許容できる若しくは許容可能なレベルの毒性又は有害事象を伴う）である。

【００７４】

組合せ療法：「組合せ療法」は、２種以上の治療薬を含む、臨床適応症に対する治療レジメンを指す。従って、この用語は、同一又は重複する疾患又は臨床状態を治療する目的で、第１の組成物（例えば、活性成分）を含む第１の治療薬が、第２の組成物（活性成分）を含む少なくとも１つの第２の治療薬と一緒に患者に投与される治療レジメンを指す。この用語は、第１の組成物（例えば、活性成分）を含む第１の治療薬が、第２の組成物（例えば、チェックポイント阻害剤などの活性成分）を含む第２の治療薬、第３の組成物（例えば、化学療法薬などの活性成分）を含む第３の治療薬又はそれを超えるもの（例えば、追加の異なる有効成分）と一緒に投与される治療レジメンをさらに包含し得る。第１、第２及び（任意選択で追加の）組成物は、同じ細胞標的、又は別個の細胞標的に作用し得る。組合せ療法に関連して「と一緒に」という語句は、組合せ療法を受けている対象において、第１の治療薬の治療効果が、第２及び追加治療薬の治療効果と時間的及び／又は空間的に重複することを意味する。第１、第２及び／又は追加の組成物は、同時期に（例えば、同時に）、個別に又は順次投与され得る。従って、組合せ療法は、同時投与のための単一の製剤として、又は治療薬の連続的、同時期若しくは同時投与のための別個の製剤と

して製剤化され得る。疾患を治療するために第１の療法で治療を受けた対象が、同じ疾患を治療するための第２の及び追加の治療薬を投与される場合、第２の及び追加の治療薬は、アドオン（ａｄｄ－ｏｎ）療法又は補助療法と呼ばれる場合もある。

【００７５】

コンビナトリー又はコンビナトリアルエピトープ：コンビナトリアルエピトープは、抗原の１若しくは複数の成分の非連続部分によって形成される部位（即ち抗原決定基）においてコンビナトリアル抗体により認識及び結合されるエピトープであり、これは、三次元構造で、近接して一体となり、エピトープを形成する。従って、本開示の抗体は、ｐｒｏ／潜在型ＴＧＦβ１複合体の２つ以上の成分（例えば、部分又はセグメント）によって形成されるエピトープに結合することができる。コンビナトリーエピトープは、複合体の第１成分からのアミノ酸残基、及び複合体の第２成分からのアミノ酸残基などを含み得る。各成分は、抗原複合体の単一のタンパク質又は２つ以上のタンパク質のいずれであり得る。コンビナトリーエピトープは、抗原又は抗原複合体の２つ以上の成分（例えば、アミノ酸残基などの部分又はセグメント）からの構造的寄与によって形成される。

【００７６】

競合又は交差競合；交差ブロック：同じエピトープについて競合する抗原結合タンパク質（例えば、抗体又はその抗原結合部分）に関連して使用される場合、「競合」という用語は、試験対象の抗原結合タンパク質が、共通抗原（例えば、ＴＧＦβ１又はその断片）に対する標準抗原結合タンパク質の特異的結合を防止又は阻害（例えば、低減）するアッセイによって決定される抗原結合タンパク質間の競合を意味する。様々なタイプの競合結合アッセイを使用して、１つの抗原結合タンパク質が別の抗原結合タンパク質と競合するかどうかを決定することができ、そうしたものとして、例えば、固相直接又は間接ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、固相直接又は間接酵素免疫アッセイ（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；固相直接標識アッセイ、及び固相直接標識サンドイッチアッセイがある。通常、競合する抗原結合タンパク質が過剰に存在すると、共通抗原に対する標準抗原結合タンパク質の特異的結合を少なくとも４０～４５％、４５～５０％、５０～５５％、５５～６０％、６０～６５％、６５～７０％、７０～７５％又は７５％以上阻害する（例えば、低減する）であろう。いくつかの事例では、競合抗体が過剰に存在するとき、結合は、少なくとも８０～８５％、８５～９０％、９０～９５％、９５～９７％、又は９７％以上阻害される。一部の実施形態では、ＳＰＲ（例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ）アッセイを用いて、競合を決定する。一部の実施形態では、ＢＬＩ（例えば、Ｏｃｔｅｔ（登録商標））アッセイを用いて、競合を決定する。

【００７７】

一部の実施形態では、例えば、標準的な試験条件を使用し、例えば、製造業者の指示に従って（例えば、結合は室温、約２０～２５℃で検定する）、バイオレイヤー干渉法（Ｏｃｔｅｔ（登録商標）など）又は表面プラズモン共鳴（Ｂｉａｃｏｒｅ系など）によりアッセイして、第１の抗体又はその抗原結合部分及び第２の抗体又はその抗原結合部分は、同じ抗原に対して互いに「交差ブロック」する。一部の実施形態では、第１の抗体又はその断片及び第２の抗体又はその断片は、同じエピトープを有し得る。他の実施形態では、第１の抗体又はその断片及び第２の抗体又はその断片は、同一ではないが、重複するエピトープを有し得る。また別の実施形態において、第１の抗体又はその断片及び第２の抗体又はその断片は、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、３次元空間において近接している別個の（異なる）エピトープを有し得る。「交差ブロック」は、１抗原に対する第１の抗体の結合が、同じ抗原に対する第２の抗体の結合を妨げ、同様に、１抗原に対する第２の抗体の結合は、同じ抗原に対する第１の抗体の結合を妨げることを意味する。

【００７８】

抗体ビニング（エピトープビニング又はエピトープマッピングと呼ばれることもある）を実施して、標的タンパク質又はタンパク質複合体（即ち抗原）に対して作製されたモノクローナル抗体のセット（例えば、「ライブラリー」）を特徴付け、それを分類すること

ができる。同じ標的に対するこうした抗体を、ライブラリー中の他の全ての抗体に対してペアワイズ方式で試験して、抗体が抗原に対する互いの結合をブロックするかどうかを評価する。密接に関連するビニングプロファイルは、抗体が同じ又は密接に関連する（例えば、重複する）エピトープを有し、一緒に「ビニング」されていることを示す。標的に対する抗体の結合によって発生する生物学的活性（例えば、介入；効力）は、同じビン内の別の抗体に引き継がれる可能性が高いことから、ビニングは、同じ抗原内で類似の結合領域を共有する抗体の有用な構造機能プロファイルを提供する。このように、同じエピトープビン内の抗体のうち、より高い親和性（より低いＫＤ）を有する抗体は、一般的に、より大きい効力を有する。

【００７９】

一部の実施形態では、Ａｂ６と同じエピトープに結合する抗体は、抗体のエピトープがＡｂ６の結合領域として同定される領域１、領域２及び領域３の１つ以上のアミノ酸残基を含むように、ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合する。

【００８０】

相補性決定領域：本明細書で使用される場合、「ＣＤＲ」という用語は、抗体可変配列内の相補性決定領域を指す。重鎖及び軽鎖の可変領域の各々に３つのＣＤＲがあり、これらは、可変領域の各々についてＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３と称される。本明細書で使用される「ＣＤＲセット」という用語は、抗原に結合することができる単一の可変領域に生じる３つのＣＤＲの１群を指す。これらのＣＤＲの厳密な境界は、様々なシステムに従って異なる方式で画定されている。Ｋａｂａｔ（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，（１９８７； １９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．）に記載されるシステムは、抗体の任意の可変領域に適用可能な明確な残基付番方式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と呼ばれる場合もある。Ｃｈｏｔｈｉａら（Ｃｈｏｔｈｉａ＆Ｌｅｓｋ（１９８７）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７；及びＣｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ ３４２：８７７－８８３）は、Ｋａｂａｔ ＣＤＲ内の特定のサブ部分が、アミノ酸配列のレベルで大きい多様性を有するにもかかわらず、ほぼ同一のペプチド骨格立体構造を採用することを見出した。これらのサブ部分は、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３又はＨ１、Ｈ２及びＨ３、又はＬ－ＣＤＲ１、Ｌ－ＣＤＲ２及びＬ－ＣＤＲ３又はＨ－ＣＤＲ１、Ｈ－ＣＤＲ２及びＨ－ＣＤＲ３と称され、ここで、「Ｌ」及び「Ｈ」は、それぞれ軽鎖及び重鎖領域を示す。これらの領域は、Ｃｈｏｔｈｉａ ＣＤＲと呼ばれる場合もあり、それは、Ｋａｂａｔ ＣＤＲと重複する境界を有する。Ｋａｂａｔ ＣＤＲと重複するＣＤＲを画定する他の境界は、Ｐａｄｌａｎ（１９９５）ＦＡＳＥＢ Ｊ．９：１３３－１３９及びＭａｃＣａｌｌｕｍ（１９９６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２（５）：７３２－４５により記載されている。さらに別のＣＤＲ境界の画定は、本明細書のシステムの１つに厳密に従わないことがあり得るが、それでもＫａｂａｔ ＣＤＲと重複するであろう（但し、特定の残基若しくは残基の群又はＣＤＲ全体が抗原結合に有意に影響を及ぼさないという予測又は実験的知見を考慮して、それらは、短縮又は延長され得る）（例えば、Ｌｕ Ｘ ｅｔ ａｌ．，ＭＡｂｓ．２０１９ Ｊａｎ；１１（１）：４５－５７を参照されたい）。本明細書で使用される方法は、これらのシステムのいずれかに従って画定されたＣＤＲを利用し得るが、特定の実施形態では、Ｋａｂａｔ又はＣｈｏｔｈｉａで画定されたＣＤＲを使用する。

【００８１】

立体構造エピトープ：立体構造エピトープは、立体構造抗体により、三次元立体構造において認識及び結合されるが、同じアミノ酸配列の折り畳まれていないペプチドにおいて認識及び結合されないエピトープである。立体構造エピトープは、立体構造特異的エピトープ、立体構造依存的エピトープ、又は立体構造感受性エピトープと呼ばれ得る。このようなエピトープに特異的に結合する対応する抗体又はその断片は、立体構造特異的抗体、

立体構造選択的抗体又は立体構造依存的抗体と呼ばれ得る。立体構造エピトープに対する抗原の結合は、抗原又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とは、重鎖又は軽鎖定常ドメインを指す。ヒトＩｇＧ重鎖及び軽鎖定常ドメインアミノ酸配列は、当技術分野で公知である。

【００８３】

コンテキストバイアス：本明細書で使用される場合、「コンテキストバイアス抗体」は、抗原が相互作用タンパク質又はその断片と会合している（即ち結合又は付着している）とき、差次的親和性で抗原に結合する１タイプの立体構造抗体を指す。従って、ｐｒｏＴＧＦβ１内のエピトープに特異的に結合するコンテキストバイアス抗体は、異なる親和性でＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１に結合することができる。例えば、抗体が、細胞関連ｐｒｏＴＧＦβ１複合体（例えば、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１）よりもマトリックス結合型ｐｒｏＴＧＦβ１複合体（例えば、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１）に対してより高い親和性を有する場合、抗体は「マトリックスバイアス」であると言える。［マトリックス結合型複合体］：［細胞関連複合体］の相対親和性は、本明細書に例示するように、前者の平均K_D値を取得し、後者の平均K_D値を取得した後、両者の比を計算することによって得ることができる。

【００８４】

コンテキスト非依存性：本開示によれば、ｐｒｏＴＧＦβ１に結合する「コンテキスト非依存性抗体」は、４つの既知提示分子－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、即ちＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１で同等の親和性を有する。本出願に開示されるコンテキスト非依存性抗体は、非バイアスとしても特徴付けられ得る。典型的には、コンテキスト非依存性抗体は、マトリックス結合型複合体と細胞関連複合体との間の測定ＫＤ値の相対比が、表面プラズモン共鳴、バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）及び／又は溶液平衡滴定（例えば、ＭＳＤ－ＳＥＴ）などの適切なインビトロ結合アッセイによって測定して、５以下となるような、同等の（即ち５倍以下のバイアスの）親和性を示す。好ましい実施形態では、表面プラズモン共鳴が使用される。

【００８５】

ＥＣＭ関連ＴＧＦβ１／ｐｒｏＴＧＦβ１：この用語は、細胞外マトリックスの構成要素である（例えば、細胞マトリックス中に沈着した）ＴＧＦβ１又はそのシグナル伝達複合体（例えば、ｐｒｏ／潜在型ＴＧＦβ１）を指す。ＬＴＢＰ１又はＬＴＢＰ３によって提示されるＴＧＦβ１は、ＥＣＭ結合型ＴＧＦβ１、即ちそれぞれＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１である。ＬＴＢＰは、ＥＣＭにおけるＴＧＦβの正しい沈着及びその後のバイオアベイラビリティにとって重要であり、フィブリリン（Ｆｂｎ）及びフィブロネクチン（ＦＮ）は、ＬＴＢＰとＥＣＭとの会合を担う主要なマトリックスタンパク質であると考えられている。このようなマトリックス結合潜在型複合体は、結合組織並びに腫瘍間質及び線維性組織などの特定の疾患関連組織中で富化される。提示分子又は提示分子複合体のヒト対応物は、タンパク質又はタンパク質複合体に先行する「ｈ」、例えば、「ｈＬＴＢＰ１」、「ｈＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１」、「ｈＬＴＢＰ３」及び「ｈＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１」によって示され得る。

【００８６】

有効量：「有効な」及び「治療に有効な」という用語は、疾患のパラメータにおける検出可能な変化、例えば、疾患の症状又は下流効果における緩徐化、休止、逆転、縮小、又は改善を十分にもたらす能力又は量を指す。この用語は、疾患を完全に治癒する量の使用を包含するが、それを要求するわけではない。「有効量」（又は治療有効量若しくは治療用量）は、患者集団において統計的に有意な臨床的利益（例えば、有効性）を達成する用量又は投与レジメンであり得る。例えば、Ａｂ６は、前臨床モデルにおいて３ｍｇ／ｋｇ

という低い用量及び３０ｍｇ／ｋｇという高い用量で有効であることが証明されている。「最小有効用量」又は「最小有効量」という用語は、疾患のパラメータにおける検出可能な変化、例えば統計的に有意な臨床的利益を達成する最低量、投与量又は投与レジメンを指す。本明細書において、薬剤の用量（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤の用量）と言うとき、それは、本明細書に記載されるように、治療に有効な用量であり得る。ヒト臨床試験などの臨床現場において、「薬理学的活性用量（ＰＡＤ）」という用語は、有効用量を指すために使用され得る。有効量は、投与される用量又は投与の結果として達成される曝露レベル（例えば、血清濃度）に関して表され得る。

【００８７】

有効な腫瘍制御：「有効な腫瘍制御」という用語は、治療に応答して達成される腫瘍退縮の程度を指すために使用することができ、例えば、腫瘍は、エンドポイント腫瘍体積の定義された割合（例えば＜２５％）だけ退縮する。例えば、特定のモデルにおいて、エンドポイント腫瘍体積が２，０００ｍｍ^{3}に設定されている場合、閾値を＜２５％と仮定すると、腫瘍が５００ｍｍ^{3}未満に縮小すれば、有効な腫瘍制御が達成される。従って、有効な腫瘍制御は、完全な退縮を包含する。臨床的には、有効な腫瘍制御は、ＲＥＣＩＳＴｖ１．１及び対応するｉＲＥＣＩＳＴ（ｉＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１）などの当技術分野で認められた基準によって決定される部分奏功（ＰＲ）及び完全奏功（ＣＲ）を含む客観的奏功によって測定することができる。一部の実施形態では、臨床現場における有効な腫瘍制御は、安定した疾患も含み、この場合、一定の速度で増殖することが一般的に予想される腫瘍が、縮小は達成されなくても、治療によってそのような増殖が阻止される。

【００８８】

エフェクターＴ細胞：本明細書で使用される場合、エフェクターＴ細胞は、共刺激などの刺激に直ちに積極的に応答するＴリンパ球であり、こうしたものとして、限定するものではないが、ＣＤ４＋Ｔ細胞（Ｔヘルパー又はＴｈ細胞とも呼ばれる）及びＣＤ８＋Ｔ細胞（細胞傷害性Ｔ細胞とも呼ばれる）が挙げられる。Ｔｈ細胞は、Ｂ細胞の形質細胞及び記憶Ｂ細胞への成熟並びに細胞傷害性Ｔ細胞及びマクロファージの活性化をはじめとする免疫学的プロセスにおいて他の白血球を補助する。これらの細胞は、その表面にＣＤ４糖タンパク質を発現するため、ＣＤ４＋Ｔ細胞としても知られている。ヘルパーＴ細胞は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面に発現するＭＨＣクラスＩＩ分子によりペプチド抗原と共に提示されると活性化される。活性化されると、それらは急速に分裂し、活性免疫応答を調節又は補助するサイトカインと呼ばれる小さいタンパク質を分泌する。これらの細胞は、Ｔｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ３、Ｔｈ１７、Ｔｈ９、又はＴＦｈを含むいくつかのサブタイプの１つに分化することができ、これらは、様々なサイトカインを分泌して、異なるタイプの免疫応答を促進する。ＡＰＣからのシグナル伝達は、Ｔ細胞を特定のサブタイプに向かわせる。細胞傷害性（キラー）。これに対し、細胞傷害性Ｔ細胞（ＴＣ細胞、ＣＴＬ、Ｔキラー細胞、キラーＴ細胞）は、ウイルス感染細胞及び癌細胞を破壊し、移植拒絶反応にも関与している。これらの細胞は、その表面でＣＤ８糖タンパク質を発現することから、ＣＤ８＋Ｔ細胞としても知られている。これらの細胞は、全ての有核細胞の表面に存在するＭＨＣクラスＩ分子に関連する抗原に結合することによってその標的を認識する。細胞傷害性エフェクター細胞（例えば、ＣＤ８＋細胞）マーカとして、例えば、パーフォリン及びグランザイムＢが挙げられる。

【００８９】

上皮過形成：「上皮過形成」という用語は、上皮細胞の増殖から生じる組織増殖の増加を指す。本明細書で使用される場合、上皮過形成は、ＴＧＦβ阻害によって起こる望ましくない毒性を指し、こうしたものとして、限定するものではないが、口腔、食道、乳房、及び卵巣における上皮細胞の異常な増殖を挙げることができる。

【００９０】

エピトープ：「エピトープ」という用語は、抗原決定基とも呼ばれる場合もあり、結合剤、免疫グロブリン、又はＴ細胞受容体によって特異的に結合することができる分子決定基（例えば、ポリペプチド決定基）である。エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホ

スホリル、又はスルホニルなどの分子の化学的に活性な表面群を含み、特定の実施形態では、特定の三次元構造特性、及び／又は特定の電荷特性を有し得る。抗体又は抗体の抗原結合性断片によって認識されるエピトープは、抗体又は断片のＣＤＲ（例えば、相補性部位）と相互作用する抗原の構造要素である。エピトープは、いくつかのアミノ酸残基からの寄与によって形成され得、これは、抗体のＣＤＲと相互作用して特異性をもたらす。抗原断片は、２つ以上のエピトープを含有し得る。特定の実施形態では、抗体は、タンパク質及び／又は巨大分子の複雑な混合物中でその標的抗原を認識するとき、抗原に特異的に結合し得る。例えば、抗体が交差競合する場合（一方が他方の結合又は調節作用を妨げる場合）、抗体は「同じエピトープに結合する」と言える。

【００９１】

同等の親和性：本開示に関連して、１つ又は複数の「同等の親和性」という用語は、ｉ）抗体が、溶液平衡滴定（ＭＳＤ－ＳＥＴなど）、バイオレイヤー干渉法（Ｏｃｔｅｔ（登録商標）など）又は表面プラズモン共鳴（Ｂｉａｃｏｒｅ系など）といった適切なインビトロ結合アッセイによって測定して、５倍未満の親和性バイアスで、マトリックス結合型ｐｒｏＴＧＦβ１複合体及び細胞関連ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合すること；及び／又はｉｉ）４つの抗原複合体に対する抗体の相対親和性は、４つの抗原複合体の中で抗体が示す最も低い親和性（最も高いＫＤ数値）が、残りの３つの親和性から計算された平均値の５倍以下であるか；又は４つの抗原複合体の中で抗体が示す最も高い親和性（最も低いＫＤ数値）は、残りの３つの親和性から計算された平均値の５倍以下であることを意味することが意図される。同等の親和性を有する抗体は、ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に関連する特定の提示分子とは関係なく（従って「コンテキスト非依存性」）、より均一な阻害効果を達成し得る。一部の実施形態では、マトリックス関連複合体と細胞関連複合体との間の平均親和性に観察されるバイアスは、３倍以下である。好ましい実施形態において、親和性は、表面プラズモン共鳴（例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ系）によって測定される。このような方法は、標準的な試験条件を用いて、例えば、製造業者の指示に従って実施されるべきである。

【００９２】

伸長潜在型ラッソ：本明細書で使用される「伸長潜在型ラッソ」という用語は、潜在型ラッソ及びα－２ヘリックス、例えばＬＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬＰＥＡＶＬＡＬＹＮＳＴＲ（配列番１２７）を含むプロドメインの一部を指す。一部の実施形態では、伸長潜在型ラッソは、α－１ヘリックスの一部、例えばＬＶＫＲＫＲＩＥＡ（配列番号１３２）又はその一部をさらに含む。

【００９３】

線維症：「線維症」又は「線維性状態／障害」という用語は、コラーゲンなどの細胞外マトリックス（ＥＣＭ）成分が組織又は器官内に病理学的に蓄積することを特徴とするプロセス又は症状を指す。

【００９４】

フィンガー－１（ＴＧＦβ１増殖因子の）：本明細書で使用される場合、「フィンガー－１」は、ＴＧＦβ１増殖因子ドメイン内のドメインである。その変異していない形態において、ヒトｐｒｏＴＧＦβ１のフィンガー－１は、以下のアミノ酸配列：ＣＶＲＱＬＹＩＤＦＲＫＤＬＧＷＫＷＩＨＥＰＫＧＹＨＡＮＦＣ（配列番号１２４）を含む。３Ｄ構造では、フィンガー－１ドメインは、潜在型ラッソに近接している。

【００９５】

フィンガー－２（ＴＧＦβ１増殖因子の）：本明細書で使用される場合、「フィンガー－２」は、ＴＧＦβ１増殖因子ドメイン内のドメインである。その変異していない形態において、ヒトｐｒｏＴＧＦβ１のフィンガー－２は、以下のアミノ酸配列：ＣＶＰＱＡＬＥＰＬＰＩＶＹＹＶＧＲＫＰＫＶＥＱＬＳＮＭＩＶＲＳＣＫＣＳ（配列番号１２５）を含む。フィンガー－２は、「結合領域６」を含み、これは空間的に潜在型ラッソに近接して位置する。

【００９６】

ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体：本明細書で使用される場合、「ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体」という用語は、形質転換増殖因子－β１（ＴＧＦβ１）タンパク質及び糖タンパク質－Ａ反復優位型タンパク質（ＧＡＲＰ）又はその断片若しくは変異体のプロタンパク質形態若しくは潜在形態を含むタンパク質複合体を指す。一部の実施形態では、ＴＧＦβ１タンパク質のプロタンパク質形態又は潜在形態は、「ｐｒｏ／潜在型ＴＧＦβ１タンパク質」と呼ばれる場合もある。一部の実施形態では、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体は、１つ以上のジスルフィド結合を介してｐｒｏ／潜在型ＴＧＦβ１と共有結合で連結されたＧＡＲＰを含む。自然界において、このような共有結合は、ｐｒｏＴＧＦβ１二量体複合体のＮ末端付近（例えば、アミノ酸位置４）に存在するシステイン残基と共に形成される。他の実施形態において、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体は、ｐｒｏ／潜在型ＴＧＦβ１と非共有結合で連結されたＧＡＲＰを含む。一部の実施形態では、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体は、天然に存在する複合体、例えば細胞内のＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体である。「ｈＧＡＲＰ」という用語は、ヒトＧＡＲＰを意味する。

【００９７】

高親和性：本明細書で使用される場合、「高親和性ｐｒｏＴＧＦβ１抗体」におけるような「高親和性」という用語は、≦５ｎＭ、より好ましくは≦１ｎＭのK_D値を有するインビトロ結合活性を指す。従って、本明細書の開示に包含される高親和性の、コンテキスト非依存性ｐｒｏＴＧＦβ１抗体は、以下の抗原複合体：ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１の各々に対して、≦５ｎＭ、より好ましくは≦１ｎＭのK_D値を有する。

【００９８】

ヒト抗体：本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域及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及び特にＣＤＲ３中において、ヒト生殖細胞系列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（例えば、インビトロでのランダム若しくは部位特異的突然変異誘発又はインビボでの体細胞突然変異により導入された突然変異）を含み得る。しかしながら、本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系列に由来するＣＤＲ配列がヒトフレームワーク配列に移植された抗体を含むことを意図しない。

【００９９】

ヒト化抗体：「ヒト化抗体」という用語は、ヒト以外の種（例えば、マウス）由来の重鎖可変領域配列及び軽鎖可変領域配列を含むが、ＶＨ及び／又はＶＬ配列の少なくとも一部がより「ヒト様」である、即ちヒト生殖細胞系列可変配列に、より類似するように改変された抗体を指す。１タイプのヒト化抗体は、ＣＤＲ移植抗体であり、この場合、ヒトＣＤＲ配列を非ヒトＶＨ及びＶＬ配列に導入して、対応する非ヒトＣＤＲ配列を置換する。また、「ヒト化抗体」は、目的の抗原に免疫特異的に結合し、ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するＦＲ領域と、非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するＣＤＲ領域とを含む抗体又はその変異体、誘導体、類似体若しくは断片である。本明細書で使用される場合、ＣＤＲに関連する「実質的に」という用語は、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％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を有するＣＤＲを指す。ヒト化抗体は、ＣＤＲ領域の全部又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリン（即ちドナー抗体）のそれらに対応し、ＦＲ領域の全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである少なくとも１つ、典型的には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む。実施形態では、ヒト化抗体は、免疫グロブリンＦｃ領域の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部も含む。一部の実施形態では、ヒト化抗体は、軽鎖並びに重鎖の少なくとも可変ドメインを含有する。抗体は、重鎖のＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、ＣＨ３及びＣＨ４領域も含み得る。一部の実施形態では、ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖のみを含有する。一部の実施形態では、ヒト化抗体は、ヒト化重鎖のみを含有する。特定の実施形態では、ヒト化抗体は、軽鎖及び

／又はヒト化重鎖のヒト化可変ドメインのみを含む。

【０１００】

免疫（ｉｍｍｕｎｅ－）排除又は免疫（ｉｍｍｕｎｏ－）排除腫瘍：本明細書で使用される場合、「免疫排除」を特徴とする腫瘍は、腫瘍内抗腫瘍リンパ球が欠損しているか又は実質的に欠損している。例えば、浸潤が不十分なＴ細胞を有する腫瘍は、腫瘍、例えば、腫瘍塊の外周及び／又は腫瘍の血管系の近傍付近（「血管周囲」）を取り囲むＴ細胞有し得るが、それにもかかわらず、Ｔ細胞は、腫瘍内に効果的に集まって癌細胞に対して細胞傷害性機能を発揮することができない。他の状況では、腫瘍は、強い免疫応答を引き起こすことができず（いわゆる「免疫砂漠」腫瘍）、その結果、腫瘍環境付近及び腫瘍環境内にはほとんどＴ細胞が存在しない。免疫排除腫瘍とは対照的に、抗腫瘍リンパ球が浸潤した腫瘍は、時として、「高免疫原性」又は「炎症性」腫瘍として特徴付けられ；このような腫瘍は、免疫チェックポイント阻害療法（「ＣＢＴ」）に対してより応答性が高い傾向があることから、その標的となる。しかし、典型的には、腫瘍をＣＢＴに対して耐性にする免疫排除のためにＣＢＴに応答するのは、患者のごく一部に過ぎない。

【０１０１】

免疫安全性（評価）：本明細書で使用される場合、この用語は、免疫応答（免疫活性化）に関する安全性評価を指し、許容可能な免疫安全性基準は、以下のものを含む：インビトロ又はインビボサイトカイン放出試験（例えば、アッセイ）により決定して、有意なサイトカイン放出がないこと；及びヒト血小板を用いて決定して、有意な血小板凝集、活性化がないこと。これらの試験における統計的有意性は、基準となる適切な対照に対して決定され得る。例えば、ヒトモノクローナル抗体である試験分子の場合、適切な対照は、同じサブタイプの免疫グロブリン、例えば、ヒトにおいて良好な安全性プロファイルを有することが分かっている同じサブタイプの抗体であり得る。

【０１０２】

免疫抑制（Ｉｍｍｕｎｏｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ）、免疫抑制（ｉｍｍｕｎｅ　ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ）、免疫抑制性：これらの用語は、Ｔ細胞、ＮＫ細胞及びＢ細胞などの免疫細胞を抑制する能力を指す。免疫抑制機能を評価するための至適基準は、Ｔ細胞活性の阻害であり、これには抗原特異的抑制及び非特異的抑制が含まれ得る。調節Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）及びＭＤＳＣは、免疫抑制細胞と見なすことができる。Ｍ２極性化マクロファージ（例えば、ＴＡＭ及びＦＡＭなどの疾患限局性マクロファージ）も免疫抑制性として特徴付けられ得る。

【０１０３】

免疫記憶：免疫記憶は、身体が過去に遭遇した抗原を迅速且つ特異的に認識し、対応する免疫応答を開始する免疫系の能力を指す。一般に、これらは、同じ抗原に対する二次、三次及びそれ以外の後の免疫応答である。免疫記憶は、免疫系、特殊なＴ細胞及びＢ細胞（いわゆる記憶Ｔ及びＢ細胞）の適応要素を担っている。抗原ナイーブＴ細胞は、プロフェッショナル抗原提示細胞（例えば樹状細胞）の表面上のＭＨＣ分子の環境内で同族抗原に遭遇した後、拡大し、記憶及びエフェクターＴ細胞に分化する。全てのメモリーＴ細胞サブタイプに対する単一の統一テーマは、それらが長命であり、それらの同族抗原に再曝露されると多数のエフェクターＴ細胞に迅速に拡大できることである。この機構により、それらは、以前に遭遇した病原体に対する「記憶」を免疫系に提供する。メモリーＴ細胞は、ＣＤ４＋又はＣＤ８＋のいずれでもあり得、通常、ＣＤ４５ＲＯを発現する。前臨床環境において、免疫記憶は、腫瘍再チャレンジパラダイムで試験することができる。

【０１０４】

阻害又は～の阻害：本明細書で使用される場合、「阻害」又は「～の阻害」という用語は、測定可能な量だけ低減することを意味し、完全な予防又は阻害を含み得るが、それを要求するわけではない。

【０１０５】

アイソフォーム非特異的：「アイソフォーム非特異的」という用語は、２つ以上の構造的に関連するアイソフォームに結合する薬剤の能力を指す。アイソフォーム非特異的ＴＧ

ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１／３、ＴＧＦβ１／２、ＴＧＦβ２／３及びＴＧＦβ１／２／３などのＴＧＦβの２つ以上のアイソフォームに対して阻害活性を発揮する。

【０１０６】

アイソフォーム特異的：「アイソフォーム特異性」という用語は、１つ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から識別する薬剤の能力を指す。アイソフォーム特異的ＴＧＦβ阻害剤は、所与の濃度で、ＴＧＦβの一方のアイソフォームに対してその阻害活性を発揮するが、ＴＧＦβの他のアイソフォームに対しては発揮しない。例えば、アイソフォーム特異的ＴＧＦβ１抗体は、ＴＧＦβ１に選択的に結合する。ＴＧＦβ１特異的阻害剤（抗体）は、ＴＧＦβ２又はＴＧＦβ３よりもＴＧＦβ１アイソフォームを、実質的により高い親和性で優先的に標的化する（結合し、それにより阻害する）。例えば、この状況での選択性は、ＢＬＩ（Ｏｃｔｅｔ（登録商標））又は好ましくはＳＰＲ（Ｂｉａｃｏｒｅ（登録商標））などのインビトロ結合アッセイによって測定して、それぞれの親和性の少なくとも１０倍、１００倍、５００倍、１０００倍又はそれを超える差を示し得る。一部の実施形態では、選択性は、インヒビターがインビボでＴＧＦβ１を阻害するのに有効な用量で使用される場合、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３を阻害しないようにするものである。このような阻害剤が治療薬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投与量（例えば、治療有効量）は、阻害剤が、ＴＧＦβ２又はＴＧＦβ３を阻害することなく、ＴＧＦβ１アイソフォームを有効に阻害することができる治療濃度域内に入っていなければならない。一部の実施形態では、ＴＧＦβ１選択的阻害剤は、作用機序にかかわらず、ＴＧＦβ１の機能若しくは活性を妨害するが、ＴＧＦβ２及び／又はＴＧＦβ３の機能若しくは活性を妨害しない薬剤である。

【０１０７】

単離：本明細書で使用される場合、「単離された」抗体とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指す。一部の実施形態では、単離された抗体は、他の意図しない細胞材料及び／又は化学物質を実質的に含まない。

【０１０８】

大型潜在型複合体：本開示に関して、「大型潜在型複合体」（「ＬＬＣ」）という用語は、いわゆる提示分子に結合したｐｒｏＴＧＦβ１二量体からなる複合体を指す。従って、大型潜在型複合体は、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１などの提示分子－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体である。こうした複合体は、複合体を形成し得る組換え精製成分を用いてインビトロで形成することができる。スクリーニングの目的で、そのようなＬＬＣの形成に使用される提示分子は、完全長ポリペプチドである必要はない。しかし、典型的には、そのＮ末端領域付近のシステイン残基を介してｐｒｏＴＧＦβ１二量体複合体とジスルフィド結合を形成し得るタンパク質の部分が必要とされる。

【０１０９】

潜在型関連ペプチド（ＬＡＰ）：ＬＡＰは、ｐｒｏＴＧＦβ１のいわゆる「プロドメイン」である。本明細書でより詳細に記載されるように、ＬＡＰは、「ストレートジャケット」ドメイン及び「アーム」ドメインから構成される。ストレートジャケット自体は、さらにアルファ－１ヘリックスドメインと潜在型ラッソドメインに区分される。

【０１１０】

潜在型ラッソ：本明細書で使用される場合、「潜在型ラッソ」は、潜在型ループとも呼ばれることもあり、ｐｒｏＴＧＦｂ１のプロドメイン内でα－１ヘリックス及びアームにフランキングされたドメインである。その非変異形態において、ヒトｐｒｏＴＧＦβ１の潜在型ラッソは、アミノ酸配列：ＬＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬ（配列番号１２６）を含み、そこには、図１６で同定される領域１が延びている。本明細書で使用される場合、「伸長潜在型ラッソ領域」という用語は、プロドメインのアルファ－２ヘリックス（α２－ヘリックス）と呼ばれるその隣接Ｃ末端モチーフを含む潜在型ラッソを指す。潜在型ラッソのＣ末端にあるプロリン残基は、ラッソループをα２－ヘリックスとつなげる「肘」様の垂直な「曲がり」を提供する。特定の高親和性ＴＧＦβ１活性化阻害剤は、阻害能力

（例えば、活性化を阻止する能力）を付与するために、潜在型ラッソ又はその１部分に少なくとも一部が結合し、任意選択で、潜在型ラッソの上記部分は、ＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬ（配列番号１７０）である。一部の実施形態では、本開示の抗体は、ｐｒｏＴＧＦβ１複合体を、ＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬ（配列番号１７０）又はその１部分に結合させる。特定の高親和性ＴＧＦβ１活性化阻害剤は、伸長潜在型ラッソ又はその１部分に少なくとも一部が結合して、阻害能力（例えば、活性化を阻止する能力）を付与するが、この場合、任意選択で、伸長潜在型ラッソの上記部分は、ＫＬＲＬＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬＰＥＡＶＬ（配列番号１４２）である。

【０１１１】

限局性：本開示に関連して、「限局性」（「限局性腫瘍」、「疾患限局性」などのように）という用語は、全身性疾患とは対照的に、固形悪性腫瘍などの解剖学的に単離された又は単離可能な異常を指す。特定の白血病は、例えば、疾患に対する局在性成分（例えば骨髄）及び全身性成分（例えば、循環血球）の両方を有し得る。

【０１１２】

ＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体：本明細書で使用される場合、「ＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体」という用語は、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又は潜在形態と、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又はＮＲＲＯＳとしても知られる）又はその断片若しくは変異体との複合体を指す。一部の実施形態では、ＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体は、１つ以上のジスルフィド結合を介してｐｒｏ／潜在型ＴＧＦβ１と共有結合で連結されたＬＲＲＣ３３を含む。自然界において、このような共有結合は、ｐｒｏＴＧＦβ１二量体複合体のＮ末端付近（例えば、アミノ酸位置４）に存在するシステイン残基と共に形成される。他の実施形態において、ＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体は、ｐｒｏ／潜在型ＴＧＦβ１と非共有結合で連結されたＬＲＲＣ３３を含む。一部の実施形態では、ＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体は、天然に存在する複合体、例えば細胞内のＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体である。「ｈＬＲＲＣ３３」という用語は、ヒトＬＲＲＣ３３を意味する。インビボで、細胞表面上のＬＲＲＣ３３及びＬＲＲＣ３３含有複合体をインターナライズし得る。ＬＲＲＣ３３は、Ｍ２極性化マクロファージ（ＴＡＭなど）及びＭＤＳＣをはじめとする骨髄系細胞のサブセット上に発現される。

【０１１３】

ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体：本明細書で使用される場合、「ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体」という用語は、形質転換増殖因子－β１（ＴＧＦβ１）タンパク質及び潜在型ＴＧＦ－β結合タンパク質１（ＬＴＢＰ１）又はその断片若しくは変異体のプロタンパク質形態又は潜在形態を含むタンパク質複合体を指す。一部の実施形態では、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体は、１つ以上のジスルフィド結合を介してプロ／潜在ＴＧＦβ１と共有結合で連結されたＬＴＢＰ１を含む。自然界において、このような共有結合は、ｐｒｏＴＧＦβ１二量体複合体のＮ末端付近（例えば、アミノ酸位置４）に存在するシステイン残基と共に形成される。他の実施形態において、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体は、プロ／潜在ＴＧＦβ１と非共有結合で連結されたＬＴＢＰ１を含む。一部の実施形態では、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体は、天然に存在する複合体、例えば細胞内のＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体である。「ｈＬＴＢＰ１」という用語は、ヒトＬＴＢＰ１を意味する。

【０１１４】

ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体：本明細書で使用される場合、「ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体」という用語は、形質転換増殖因子－β１（ＴＧＦβ１）タンパク質及び潜在型ＴＧＦ－β結合タンパク質３（ＬＴＢＰ３）又はその断片若しくは変異体のプロタンパク質形態又は潜在形態を含むタンパク質複合体を指す。一部の実施形態では、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体は、１つ以上のジスルフィド結合を介してプロ／潜在ＴＧＦβ１と共有結合で連結されたＬＴＢＰ３を含む。自然界において、このような共有結合は、ｐｒｏＴＧＦβ１二量体複合体のＮ末端付近（例えば、アミノ酸位置４）に存在するシステ

インＴＧＦβ１と非共有結合で連結されたＬＴＢＰ１を含む。一部の実施形態では、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体は、天然に存在する複合体、例えば細胞内のＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体である。「ｈＬＴＢＰ３」という用語は、ヒトＬＴＢＰ３を意味する。

【０１１５】

Ｍ２又はＭ２様マクロファージ：Ｍ２マクロファージは、活性化又は極性化マクロファージのサブセットを表し、線維性及び腫瘍性微小環境の両方における疾患関連マクロファージを含む。Ｍ２極性化マクロファージの細胞表面マーカとして、典型的には、ＣＤ２０６及びＣＤ１６３（即ちＣＤ２０６＋／ＣＤ１６３＋）が挙げられる。Ｍ２極性化マクロファージは、細胞表面ＬＲＲＣ３３も発現し得る。Ｍ２マクロファージの活性化は、主にＩＬ－４、ＩＬ－１３、ＩＬ－１０及びＴＧＦβによって促進され；Ｍ２マクロファージは、それらを活性化するのと同じサイトカイン（ＩＬ－４、ＩＬ－１３、ＩＬ－１０及びＴＧＦβ）を分泌する。これらの細胞は、高い貪食能力を有し、ＥＣＭ成分、血管新生及び走化因子を産生する。マクロファージによるＴＧＦβの放出は、線維性組織及び腫瘍間質などの疾患組織における筋線維芽細胞活性化、ＥＭＴ及びＥｎｄＭＴ誘導を永続させ得る。例えば、Ｍ２マクロファージは、ＴＧＦβ駆動肺線維症において特定の役割を果たし、また多くの腫瘍中で富化される。

【０１１６】

マトリックス関連ｐｒｏＴＧＦβ１：ＬＴＢＰ１及びＬＴＢＰ３は、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）の成分である分子を提示する。ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１は、ＥＣＭ関連ＴＧＦβ１活性化／シグナル伝達を媒介する「ＥＣＭ関連」（又は「マトリックス関連」）ｐｒｏＴＧＦβ１複合体と総称され得る。この用語は、マトリックス又は基質に物理的に結合していない、溶液中における組換え、精製ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体も含む（例えば、インビトロアッセイ）。

【０１１７】

最大耐用量（ＭＴＤ）：ＭＴＤという用語は、一般に、安全性／毒物学上の考慮事項に関連して、無有害作用量（ＮＯＡＥＬ）で評価された被験物質（ＴＧＦβ１阻害剤など）の最高量を指す。例えば、４週間の毒性試験に基づき、ラットのＡｂ６に対するＮＯＡＥＬは、評価された最高用量（１００ｍｇ／ｋｇ）であったが、これは、Ａｂ６のＭＴＤが＞１００ｍｇ／ｋｇであることを示唆している。非ヒト霊長類におけるＡｂ６のＮＯＡＥＬは、４週間の毒性試験に基づき、評価された最高用量（３００ｍｇ／ｋｇ）であったが、これは、非ヒト霊長類におけるＡｂ６のＭＴＤが＞３００ｍｇ／ｋｇであることを示唆している。

【０１１８】

メソスケールディスカバリー：「メソスケールディスカバリー」又は「ＭＳＤ」は、検出技術として電気化学発光（ＥＣＬ）を使用するイムノアッセイの一種である。典型的には、高結合性炭素電極を使用して、タンパク質（例えば、抗体）を捕捉する。抗体を特定の抗原と一緒にインキュベートすることができ、電気化学発光標識に共役させた二次抗体を用いて、その結合を検出することができる。電気信号が得られたら、光強度を測定して、サンプル中の分析物を定量化することができる。

【０１１９】

骨髄線維症：「骨髄線維症」は、骨髄線維症（ｏｓｔｅｏｍｙｅｌｏｆｉｂｒｏｓｉｓ）としても知られ、比較的稀有な骨髄増殖性障害（例えば、癌）であり、骨髄線維症は、一般に、骨髄及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を特徴とし、線維症、又は瘢痕組織による骨髄の置換を引き起こす。骨髄線維症という用語は、慢性特発性骨髄線維症（ｃＩＭＦ）とも呼ばれる原発性骨髄線維症（ＰＭＦ）（特発性及び原発性という用語は、上記の場合、疾患が未知の又は自発的起源のものであることを意味する）並びに続発性タイプの骨髄線維症、例えば、真性赤血球増加症（ＰＶ）又は本態性血小板血

球減少症（ＥＴ）に続いて起こる骨髄線維症を包含する。骨髄線維症は、骨髄様化生の一形態であり、これは、骨髄の造血組織における細胞型の変化を指し、多くの場合、２つの用語は同義で使用される。原因不明性骨髄様化生及び骨髄様化生を伴う骨髄線維症（ＭＭＭ）という用語は、原発性骨髄線維症を指すためにも使用される。骨髄線維症は、下流ＪＡＫ経路の上方制御又は過剰活性化を引き起こす変異を特徴とする。

【０１２０】

骨髄系細胞：造血において、骨髄系細胞は、顆粒球、単球、赤血球又は血小板の前駆細胞（一般的な骨髄系前駆細胞、即ちＣＭＰ又はＣＦＵ－ＧＥＭＭ）から生じる血液細胞であるか、又はリンパ系細胞、即ちＢ細胞及びＴ細胞を生じる一般的なリンパ系前駆細胞に由来するリンパ球から区別されて、狭義でも多くの場合に使用され、特に骨髄芽球の系統（骨髄細胞、単球及びそれらの娘型）由来の血液細胞である。特定の骨髄系細胞型、それらの一般的な形態、典型的な細胞表面マーカ及びマウス及びヒトの両方におけるそれらの免疫抑制能力を以下に要約する。

【０１２１】

【表１】

骨髄系細胞	典型的な形態	選択表面表現型	免疫抑制
マウス			
好中球	分葉核を有する丸い形状	$CD11b^{+}$ $Ly6G^{hi}$ $Ly6C^{lo}$	-
単球	くぼんだ核を有する丸い形状	$CD11b^{+}$ $Ly6G^{-}$ $Ly6C^{hi}$	-
マクロファージ	仮足を有する丸い形状	$CD11b^{+}$ $F4/80^{hi}$ $Ly6G^{-}$ $Ly6C$ $CD80^{+}$ (M1)	-
		$F4/80^{+}$ $CD206^{+}$ $CD163^{+}$ (M2)	-
樹状細胞	多足を有する樹枝状	$CD11b^{+}$ $CD11c^{+}$ $Ly6G^{-}$ $Ly6C^{-lo}$ (古典的)	-
		$CD11b^{-}$ $CD11c^{+}$ $Ly6G^{-}$ $Ly6C^{-}$ (古典的)	-
		$CD11b^{-}$ $CD11c^{lo}$ $Ly6G^{-}$ $Ly6C^{+}$ $PDCA\text{-}1^{+}$ (形質細胞様)	-
線維細胞	紡錘状	$CD11b^{+}$ $Coll^{+}$ $Ly6G^{-}$ $Ly6C^{+}$	-
G-MDSC (PMN-MDSC)	縞模様の核を有する丸い形状	$CD11b^{+}$ $Ly6G^{+}$ $Ly6C$	+
M-MDSC	くぼんだ核を有する丸い形状	$CD11b^{+}$ $Ly6G^{-}$ $Ly6C^{hi}$	+
ヒト			
好中球	分葉核を有する丸い形状	$CD11b^{+}$ $CD14^{-}$ $CD15^{+}$ $CD66b^{+}$ $LOX\text{-}1^{-}$	-
単球	くぼんだ核を有する丸い形状	$CD14^{+}$ $CD15^{-}$ $CD16^{-}$ $HLA\text{-}DR^{+}$ (古典的)	-
		$CD14^{+}$ $CD15^{-}$ $CD16^{+}$ $HLA\text{-}DR^{+}$ (中間体)	-
		$CD14^{-}$ $CD15^{-}$ $CD16^{+}$ $HLA\text{-}DR^{+}$ (非古典的)	-
マクロファージ	仮足を有する丸い形状	$CD15^{-}$ $CD16^{+}$ $CD80^{+}$ $HLA\text{-}DR^{+}$ $CD33^{+}$ (M1)	-
		$CD11b^{+}$ $CD15^{-}$ $CD206^{+}$ $CD163^{+}$ $HLA\text{-}DR^{+}$ (M2)	+/-
樹状細胞	多足を有する樹枝状	$CD14^{-}$ $CD16^{-}$ $CD1C^{+}$ $CD83^{+}$ (古典的)	-
		$CD14^{-}$ $CD16^{-}$ $CD141^{+}$ $CD83^{+}$ (古典的)	-
		$CD14^{-}$ $CD16^{-}$ $CD303^{+}$ $CD83^{+}$ (形質細胞様)	-
線維細胞	紡錘状	$CD11b^{+}$ $Coll^{+}$ $CD13^{+}$ $CD34^{+}$ $CD45RO^{+}$ $HLA\text{-}DR^{+}$	-
G-MDSC (PMN-MDSC)	環状核を有する丸い形状	$CD11b^{+}$ $CD33^{+}$ $CD14^{-}$ $CD15^{+}$ $CD66b^{+}$ $LOX\text{-}1^{+}$ $HLA\text{-}DR^{-lo}$	+
M-MDSC	くぼんだ核を有する丸い形状	$CD11b^{+}$ $CD33^{+}$ $CD14+$ $CD15^{-}$ $HLA\text{-}DR^{-lo}$	+

【０１２２】

骨髄由来抑制細胞：骨髄由来抑制細胞（ＭＤＳＣ）は、様々な病的状態の過程で産生される細胞の不均一な集団である。ＭＤＳＣは、ｉ）「顆粒球」（Ｇ－ＭＤＳＣ）又は多形核（ＰＭＮ－ＭＤＳＣ）（これらは表現型的及び形態学的に好中球と類似する）；並びにｉｉ）表現型的及び形態学的に単球と類似する単球（Ｍ－ＭＤＳＣ）と呼ばれる少なくとも２つのカテゴリーの細胞を含む。ＭＤＳＣは、明確に異なる一連のゲノム及び生化学的特徴を特徴とし、特定の表面分子によって識別することができる。例えば、ヒトＧ－ＭＤＳＣ／ＰＭＮ－ＭＤＳＣは、典型的には、細胞表面マーカＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１５及びＣＤ６６ｂを発現する。ヒトＧ－ＭＤＳＣ／ＰＭＮ－ＭＤＳＣは、ＬＯＸ－１及び／又はアルギナーゼも発現し得る。これに対して、ヒトＭ－ＭＤＳＣは、典型的には、細胞表面マーカＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３及びＣＤ１４を発現する。さらに、ヒトＧ－ＭＤＳＣ／ＰＭＮ－ＭＤＳＣ及びＭ－ＭＤＳＣはいずれも、低レベル又は検出不可能なレベルのＨ

ＬＡ－ＤＲを示す場合もある。特定の実施形態では、ＭＤＳＣを同定するための適切な細胞表面マーカは、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１４、ＣＤ１５、ＨＬＡ－ＤＲ及びＣＤ６６ｂの１つ以上を含み得る。特定の実施形態では、Ｇ－ＭＤＳＣは、特定の細胞表面マーカ（例えば、ＣＤ１４）の存在又は非存在に基づいてＭ－ＭＤＳＣから分化され得る。一部の実施形態では、Ｇ－ＭＤＳＣは、表面マーカＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１５、ＣＤ６６ｂ及び／又はＬＯＸ－１の存在若しくは発現増大及びＣＤ１４の非存在によって同定され得るが、Ｍ－ＭＤＳＣは、表面マーカＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３及び／又はＣＤ１４の存在若しくは発現増大並びにＣＤ１５の非存在によって同定され得る。こうした細胞表面マーカに加えて、ＭＤＳＣは、Ｔ細胞、ＮＫ細胞及びＢ細胞などの免疫細胞を抑制する能力を特徴とし得る。ＭＤＳＣの免疫抑制機能は、抗原非特異的機能の阻害及び抗原特異的機能の阻害を含み得る。ＭＤＳＣは、細胞表面ＬＲＲＣ３３及び／又はＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１を発現することができる。

【０１２３】

筋線維芽細胞：筋線維芽細胞は、線維芽細胞及び平滑筋細胞の特定の表現型を有する細胞であり、一般にビメンチン、α－平滑筋アクチン（α－ＳＭＡ；ヒト遺伝子ＡＣＴＡ２）及びパラジンを発現する。細胞外マトリックス調節不全（マトリックスの硬度増大など）を伴う多くの疾患状態において、正常な線維芽細胞は、ＴＧＦβ依存的に筋線維芽細胞に脱分化する。ＴＧＦβの異常な過剰発現は、筋線維芽細胞駆動型病態間で一般的である。ＴＧＦβは、筋線維芽細胞の分化、細胞増殖、及びマトリックス産生を促進することが知られている。線維性微小環境内の筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞は、線維症関連線維芽細胞（又は「ＦＡＦ」）と呼ばれることもあり、また、腫瘍微小環境内の筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞は、癌関連線維芽細胞（又は「ＣＡＦ」）と呼ばれることもある。

【０１２４】

汎ＴＧＦβ阻害剤／ＴＧＦβの汎阻害：「汎ＴＧＦβ阻害剤」という用語は、ＴＧＦβの３つのアイソフォーム全てを阻害するか、又はそれらと拮抗することができる任意の薬剤を指す。このような阻害剤は、当技術分野で公知のものなどのＴＧＦβアイソフォームの小分子阻害剤であり得る。この用語は、汎ＴＧＦβ抗体を含み、これは、ＴＧＦβアイソフォーム、即ちＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３の各々に結合し得るあらゆる抗体を指す。一部の実施形態では、汎ＴＧＦβ抗体は、３つのアイソフォーム、即ちＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３の全てに結合して、その活性を中和する。抗体１Ｄ１１（又はヒト類似体フレソリムマブ（ＧＣ１００８））は、ＴＧＦβの３つのアイソフォーム全てを中和する汎ＴＧＦβ抗体の周知の１例である。小分子汎ＴＧＦβ阻害剤の例としては、３つのＴＧＦβアイソフォーム全てのシグナル伝達を媒介するＴＧＦβ受容体Ｉキナーゼ／ＡＬＫ５のアンタゴニストであるガルニセルチブ（ＬＹ２１５７２９９一水和物）が挙げられる。

【０１２５】

血管周囲（浸潤）：接頭辞「周囲」は、「周辺」、「周囲」又は「付近」を意味するため、「血管周囲」は、文字どおり血管の周囲と解釈される。腫瘍細胞浸潤に関連して本明細書で使用される場合、「血管周囲浸潤」という用語は、固形腫瘍の血管系を介した腫瘍浸潤免疫細胞（例えば、リンパ球）のための侵入様式を指す。

【０１２６】

効力：本明細書で使用される「効力」という用語は、定義された効果をもたらす薬物の濃度又は量に関して、阻害活性を有する阻害抗体（又は断片）などの薬物の活性を指す。例えば、所与の用量で特定の効果をもたらすことができる抗体は、同等の効果をもたらすためにその２倍の量（投与量）を必要とする別の抗体よりも強力である。効力は、ＴＧＦβ活性化／阻害アッセイなどの細胞ベースのアッセイで測定することができ、それにより、インテグリン結合によって引き起こされる活性化などのＴＧＦβ活性化の程度は、細胞ベースのシステムにおいて被験物質（例えば、阻害抗体）の存在下又は非存在下で測定することができる。典型的には、抗原の同一又は重複する結合領域に結合することができる

もの（例えば、交差ブロッキング抗体）のうち、より高い親和性（より低いK_D値）を有する抗体は、より低い親和性（より高いK_D値）を有する抗体よりも高い効力を示す傾向がある。

【０１２７】

前臨床モデル：「前臨床モデル」という用語は、ヒトに対して試験される前に薬物、処置、又は治療の作用機序、有効性、薬理、及び毒性を試験するために使用されるヒト疾患の特定の特徴を示す細胞株又は動物を指す。典型的には、細胞ベースの前臨床試験は「インビトロ」試験と呼ばれ、動物ベースの前臨床試験は「インビボ」試験と呼ばれる。例えば、本開示に包含されるインビボマウス前臨床モデルとしては、ＭＢＴ２膀胱癌モデル、クラウドマンＳ９１メラノーマモデル、及びＥＭＴ６乳癌モデルが挙げられる。

【０１２８】

予測バイオマーカ：予測バイオマーカは、特定の療法に対する応答の確率又は可能性に関する情報を提供する。典型的には、予測バイオマーカは、治療の前後に測定され、対象から採取されたサンプル中のマーカの変化又は相対レベルは、治療的利益を示すか、又は予測する。

【０１２９】

提示分子：本開示に関連する提示分子は、潜在型プロタンパク質（例えば、ｐｒｏＴＧＦβ１）との共有結合を形成して、不活性複合体を細胞外ニッチ（例えば、ＥＣＭ又は免疫細胞表面など）にテザリングし（「提示し」）、これにより活性化事象が起こるまでその潜在性を維持するタンパク質を指す。ｐｒｏＴＧＦβ１について公知の提示分子としては、ＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３、ＧＡＲＰ及びＬＲＲＣ３３が挙げられ、それらの各々は、提示分子－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体（即ちＬＬＣ）、即ちＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１をそれぞれ形成することができる。自然界では、ＬＴＢＰ１及びＬＴＢＰ３は、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）の成分であり；従って、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１は、ＥＣＭ関連ＴＧＦβ１シグナル伝達／活性を媒介する「ＥＣＭ関連」（又は「マトリックス関連」）ｐｒｏＴＧＦβ１複合体と総称され得る。他方で、ＧＡＲＰ及びＬＲＲＣ３３は、特定の細胞の細胞表面上で発現される膜貫通タンパク質であり；従って、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１は、細胞関連（例えば、免疫細胞関連）ＴＧＦβ１シグナル伝達／活性を媒介する「細胞関連」（又は「細胞表面」）ｐｒｏＴＧＦβ１複合体と総称され得る。

【０１３０】

ｐｒｏＴＧＦβ１：本明細書で使用される「ｐｒｏＴＧＦβ１」という用語は、複合体内のＴＧＦβ１のプロドメイン配列を含む不活性ＴＧＦβ１複合体の前駆体形態を包含することが意図される。従って、この用語は、ＴＧＦβ１のプロ型並びに潜在型を含み得る。「ｐｒｏ／潜在型ＴＧＦβ１」という表現は、互換的に使用され得る。ＴＧＦβ１の「プロ」形態は、フーリン部位におけるタンパク質分解的切断前に存在する。切断されると、得られる形態は、ＴＧＦβ１の「潜在」形態であると言える。「潜在型」複合体は、インテグリン駆動型活性化事象などのさらなる活性化トリガーまで、非共有結合で結合したままである。ｐｒｏＴＧＦβ１複合体は、ジスルフィド結合で連結された二量体ＴＧＦβ１プロタンパク質ポリペプチドからなる。潜在型二量体複合体は、それぞれのｐｒｏＴＧＦβ１ポリペプチドの４位のシステイン残基（Ｃｙｓ４）を介して単一の提示分子に共有結合で連結される。形容詞「潜在型」は、インテグリン媒介性又は他の活性化事象前に、ＴＧＦβ１の「不活性」状態を表すために、一般的に／広義に使用され得る。ｐｒｏＴＧＦβ１ポリペプチドは、プロドメイン（ＬＡＰ）及び増殖因子ドメイン（配列番号１１９）を含有する。

【０１３１】

退縮（腫瘍退縮）：腫瘍の退縮又は腫瘍増殖は、インビボ有効性の尺度として使用することができる。例えば、前臨床現場において、腫瘍体積の中央値（ＭＴＶ）及び退縮応答治療有効性の基準は、最終日に試験に残った動物の腫瘍体積から決定することができる。

治療有効性は、試験中に観察された退縮応答の発生率及び程度からも決定され得る。治療は、動物において腫瘍の部分退縮（ＰＲ）又は完全退縮（ＣＲ）をもたらし得る。治療法（例えば、薬物の投与）に応答して達成される完全退縮は、「完全奏功」と呼ぶことができ、完全奏功を達成する対象は、「完全奏功者」と呼ぶことができる。従って、完全奏功は、自然完全退縮を除外する。前臨床腫瘍モデルの一部の実施形態において、ＰＲ応答は、試験期間中３回の連続した測定値が、その１日目体積の５０％以下であり、且つこれら３回の測定値の１つ以上が１３．５ｍｍ^{3}以上である腫瘍体積として定義される。一部の実施形態では、ＣＲ応答は、試験期間中３回の連続した測定値が、１３．５ｍｍ^{3}未満である腫瘍体積として定義される。前臨床モデルにおいて、試験の終了時にＣＲ応答を有する動物は、腫瘍のない生存動物（ＴＦＳ）として別に分類され得る。「有効な腫瘍制御」という用語は、治療に応答して達成される腫瘍退縮の程度を指すために使用することができ、この場合、例えば、腫瘍体積は、治療に応答してエンドポイント腫瘍体積の＜２５％に減少する。例えば、特定のモデルにおいて、エンドポイント腫瘍体積が２，０００ｍｍ^{3}である場合、腫瘍が５００ｍｍ^{3}未満に縮小すれば、有効な腫瘍制御が達成される。従って、有効な腫瘍制御は、完全な退縮並びに閾値縮小に到達する部分退縮も包含する。

【０１３２】

調節Ｔ細胞：「調節Ｔ細胞」又はＴｒｅｇは、バイオマーカＣＤ４、ＦＯＸＰ３及びＣＤ２５の発現を特徴とする免疫細胞の一種である。Ｔｒｅｇは、抑制性Ｔ細胞と呼ばれることもあり、免疫系を調節し、自己抗原に対する寛容性を維持し、自己免疫疾患を予防するＴ細胞の亜集団を表す。Ｔｒｅｇは免疫抑制性であり、一般にエフェクターＴ（Ｔｅｆｆ）細胞の誘導及び増殖を抑制又は下方制御する。Ｔｒｅｇは、胸腺（いわゆるＣＤ４＋Ｆｏｘｐ３＋「天然」Ｔｒｅｇ）で発生するか、又は周辺のナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞から、例えばＴＧＦβ又はレチノイン酸への曝露後に分化し得る。Ｔｒｅｇは、細胞表面ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１を発現することができる。

【０１３３】

耐性（治療に対する）：特定の治療（ＣＢＴなど）に対する耐性は、癌などの疾患の先天的な特徴（「一次耐性」、即ち治療開始前に存在する）又は治療後に経時的に発生する獲得表現型（「獲得耐性」）に起因する可能性がある。治療に対して治療応答を示さない患者（例えば、非応答者である患者又は治療法に対して応答性が低い患者）は、その治療法に対して一次耐性を有すると言える。最初は治療に対して治療応答を示すが、後に効果が消失する（例えば、治療法を継続したにもかかわらず進行又は再発する）患者は、その治療法に対する耐性を獲得したと言える。免疫療法に関連して、そのような耐性は免疫逃避を示す可能性がある。

【０１３４】

固形腫瘍の治療効果判定基準（ＲＥＣＩＳＴ）及びｉＲＥＣＩＳＴ：ＲＥＣＩＳＴは、癌患者の腫瘍が治療中に改善する（「応答する」）か、同じままである（「安定化する」）か、又は悪化する（「進行する」）ときを定義する一連の公表された規則である。この基準は、欧州癌研究治療機構（ＥＯＲＴＣ）、米国国立癌研究所、カナダ国立癌研究所臨床試験グループを含む国際的協力によって２０００年２月に発表された。その後、ＲＥＣＩＳＴガイドラインの改訂版（ＲＥＣＩＳＴ ｖ １．１）が広く適応されている（以下を参照されたい：Ｅｉｓｅｎｈａｕｅｒａ ｅｔ ａｌ．，（２００９），“Ｎｅｗ ｒｅｓｐｏｎｓｅ ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｃｒｉｔｅｒｉａ ｉｎ ｓｏｌｉｄ ｔｕｍｏｕｒ：Ｒｅｖｉｓｅｄ ＲＥＣＩＳＴ ｇｕｉｄｅｌｉｎｅ（ｖｅｒｓｉｏｎ １．１）” Ｅｕｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ４５：２２８－２４７；これらは、本明細書に組み込まれる）。

【０１３５】

治療効果判定基準は、以下のとおりである：完全奏功（ＣＲ）：全ての標的病変の消失；部分奏功（ＰＲ）：ベースライン合計ＬＤを基準として、標的病変のＬＤの合計の少なくとも３０％の減少；安定（ＳＤ）：治療開始以降の最小の合計ＬＤを基準として、ＰＲに適格であるのに十分な縮小も、ＰＤに適格であるのに十分な増加もない；進行性疾患（

ＰＤ）：治療開始以降に記録されたＬＤの最小合計又は１つ以上の新しい病変の出現を基準として、標的病変のＬＤの合計の少なくとも２０％の増加。

【０１３６】

これに対して、ｉＲＥＣＩＳＴは、免疫関連応答を考慮に入れた修正された一連の基準を提供する（以下を参照されたい：ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｐｍｃ／ａｒｔｉｃｌｅｓ／ＰＭＣ５６４８５４４／；その内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。ＲＥＣＩＳＴ及びｉＲＥＣＩＳＴ基準は標準化されており、より多くのデータが利用可能になるにつれて随時改訂される可能性があり、当技術分野において十分に理解されている。

【０１３７】

固形腫瘍：「固形腫瘍」という用語は、通常、嚢胞又は液体領域を含まない組織の異常な成長又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）又は悪性（癌性）であり得る。固形腫瘍には、局所進行固形腫瘍及び転移性癌などの進行性悪性腫瘍の腫瘍が含まれる。固形腫瘍は、典型的には、癌性（悪性）細胞、ＣＡＦなどの間質細胞及びマクロファージ、ＭＤＳＣ、リンパ球などの浸潤白血球を含むがこれらに限定されない複数の細胞型からなる。ＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的阻害剤で治療しようとする固形腫瘍は、本明細書に記載されるものなど、典型的にはＴＧＦβ１陽性（ＴＧＦβ１＋）腫瘍であり、これは、ＴＧＦβ１を産生する複数の細胞型を含み得る。特定の実施形態では、ＴＧＦβ１＋腫瘍は、ＴＧＦβ３も共発現し得る（即ちＴＧＦβ３陽性）。例えば、ある種の腫瘍は、ＴＧＦβ１／３－共優性である。一部の実施形態では、このような腫瘍は、上皮細胞の癌、例えば癌腫によって引き起こされる。

【０１３８】

特異的結合：本明細書で使用される場合、「特異的結合」又は「特異的に結合する」という用語は、抗体又はその抗原結合部分が、抗原中の特定の構造（例えば、抗原決定基又はエピトープ）に対して特定の親和性（例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ（登録商標）によって測定されるK_D）を示すことを意味する。一部の実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、その抗体が標的に対して少なくとも約10^{-8}Ｍ、10^{-9}Ｍ、10^{-10}Ｍ、10^{-11}Ｍ、10^{-12}Ｍ又はそれ未満のK_Dを有する場合、標的、例えば、ＴＧＦβ１に特異的に結合する。一部の実施形態では、「ｐｒｏＴＧＦβ１のエピトープに特異的に結合すること」、「ｐｒｏＴＧＦβ１のエピトープに特異的に結合する」、「ｐｒｏＴＧＦβ１に特異的に結合すること」又は「ｐｒｏＴＧＦβ１に特異的に結合する」という用語は、本明細書で使用される場合、ｐｒｏＴＧＦβ１に結合し、且つ表面プラズモン共鳴及びバイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）などの好適なインビトロ結合アッセイによって決定して、1.0×10^{-8}Ｍ以下の解離定数（K_D）を有する抗体又はその抗原結合部分を指す。好ましい実施形態において、運動速度定数（例えば、K_D）は、表面プラズモン共鳴（例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ系）によって決定される。一実施形態において、抗体又はその抗原結合部分は、ｐｒｏＴＧＦβ１のヒト及び非ヒト（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。一部の実施形態では、抗体はまた、他の抗原に対して示される結合の強さよりも比較的大きい強度、例えば非標的抗原（例えば、ＴＧＦβ２及び／又はＴＧＦβ３）に対するものと比べて、標的抗原（例えば、ＴＧＦβ１）に対して１０倍、１００倍、１０００倍又はそれを超える相対親和性でその標的に結合する場合、標的抗原に「選択的に」（即ち「優先的に」）結合し得る。好ましい実施形態において、アイソフォーム選択的阻害剤は、他のアイソフォーム又は対応物に対して検出可能な結合又は効力を示さない。

【０１３９】

対象：治療用途に関連して「対象」という用語は、治療、診断などの臨床ケア又は介入を受けるか、又はそれを必要としている個体を指す。適切な対象としては、限定されないが、哺乳動物（例えば、ヒト及びヒト以外の哺乳動物）を含む脊椎動物が挙げられる。対象がヒト対象である場合、「患者」という用語が互換的に使用され得る。臨床に関連して、「患者集団」又は「患者亜集団」という用語は、臨床基準（例えば、症状、病期、特定

の状態に対する感受性、治療に対する応答性など）、病歴、健康状態、性別、年齢層、遺伝的基準（例えば、特定の変異、多型、遺伝子重複、ＤＮＡ配列反復などの保有者）及びライフスタイル因子（例えば、喫煙、アルコール消費、運動など）といった一連の基準に該当する個体の１群を示すために使用される。

【０１４０】

表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）：表面プラズモン共鳴は、標識されていない相互作用物質をリアルタイムで検出することを可能にする光学現象である。Ｂｉａｃｏｒｅから市販されているものなどのＳＰＲベースのバイオセンサーを使用して、抗原－抗体結合などのタンパク質相互作用をはじめとする生体分子相互作用を測定することができる。この技術は当技術分野で広く知られており、結合親和性、運動速度定数及び熱力学などのパラメータの決定に有用である。

【０１４１】

標的結合：本明細書で使用される場合、標的結合という用語は、分子（例えば、ＴＧＦβ阻害剤）がインビボでその意図された標的（例えば、内因性ＴＧＦβ）に結合する能力を指す。活性化阻害剤の場合、意図される標的は、大型潜在型複合体であり得る。

【０１４２】

ＴＧＦβ１関連適応症：「ＴＧＦβ１関連適応症」とは、ＴＧＦβ１関連障害であり、病因及び／又は進行の少なくとも一部がＴＧＦβ１シグナル伝達若しくはその調節不全に起因する任意の疾患若しくは障害及び／又は状態を意味する。特定のＴＧＦβ１関連障害は、主にＴＧＦβ１アイソフォームによって駆動される。ＴＧＦβ１関連適応症を有する対象は、ＴＧＦβ１の活性及び／又はレベルの阻害から利益を得ることができる。特定のＴＧＦβ１関連適応症は、主にＴＧＦβ１アイソフォームによって駆動される。ＴＧＦβ１関連適応症として、限定されないが、以下のものが挙げられる：線維症（例えば、臓器線維症及び慢性炎症を伴う組織の線維症）、増殖性障害（癌、例えば、固形腫瘍及び骨髄線維症など）、ＥＣＭ調節不全に関連する疾患（例えば、マトリックス硬化及びリモデリングを含む状態）、間葉転換を伴う疾患（例えば、ＥｎｄＭＴ及び／又はＥＭＴ）、プロテアーゼに関与する疾患、本明細書に記載の特定のマーカの異常な遺伝子発現を有する疾患。これらの疾患カテゴリーは、相互に排他的であることを意図するものではない。

【０１４３】

ＴＧＦβ阻害剤：「ＴＧＦβ阻害剤」という用語は、ＴＧＦβ増殖因子（例えば、ＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２及び／若しくはＴＧＦβ３）の生物学的活性、シグナル伝達又は機能に拮抗することができる任意の薬剤を指す。この用語は、その作用機序を限定することを意図するものではなく、例えば、中和阻害剤、受容体アンタゴニスト、可溶性リガンドトラップ、ＴＧＦβ活性化阻害剤並びにインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３又はα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／又はＴＧＦβ３の選択的阻害）を含む。この用語は、アイソフォーム選択的及び非選択的阻害剤であるＴＧＦβ阻害剤を包含する。後者としては、例えば、小分子受容体キナーゼ阻害剤（例えば、ＡＬＫ５阻害剤）、２つ以上のアイソフォームに優先的に結合する抗体（中和抗体など）及びリガンド結合部分を含む操作された構築物（例えば、融合タンパク質）が挙げられる。ＴＧＦβ阻害剤は、例えば、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）及び／又は抗体依存性細胞貪食作用（ＡＤＰＣ）を誘導することにより、ニッチにおいて活性化され得る潜在型ｐｒｏＴＧＦβの利用可能性を低下させることができる抗体並びに潜在型ｐｒｏＴＧＦβを含む細胞表面複合体のインターナリゼーションをもたらし、それにより細胞自体を枯渇させることなく原形質膜から前駆体を除去することができる抗体も含む。インターナリゼーションは、細胞表面にＬＲＲＣ３３含有タンパク質複合体を発現する細胞のレベルの低下をもたらす、ＬＲＲＣ３３含有タンパク質複合体（ヒトＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１など）の好適な作用機序であり得る。

【０１４４】

「ＴＧＦβファミリー」は、ＴＧＦβスーパーファミリー内の１クラスであり、ヒトの

場合、構造的に類似する３つのメンバー：ＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３を含む。これら３つの増殖因子は、同じ受容体を介してシグナル伝達することが分かっている。

【０１４５】

ＴＧＦβ１陽性癌／腫瘍：本明細書で使用される場合、この用語は、異常なＴＧＦβ１発現（過剰発現）を有する癌／腫瘍を指す。多くのヒト癌／腫瘍型は、ＴＧＦβ１（「ＴＧＦＢ」は、タンパク質とは対照的に遺伝子を指すために用いられる場合があることに留意されたい）アイソフォームの優勢な発現を示す。場合により、そのような癌／腫瘍は、ＴＧＦβ３などの別のアイソフォームの共優性発現を示し得る。いくつかの上皮癌（例えば、癌腫）は、ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３を共発現し得る。ＴＧＦβ１陽性腫瘍の腫瘍環境内では、ＴＧＦβ１は、例えば、癌細胞、腫瘍関連マクロファージ（ＴＡＭ）、癌関連線維芽細胞（ＣＡＦ）、調節Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、骨髄系由来抑制細胞（ＭＤＳＣ）及び周囲の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）を含む複数の供給源から生じ得る。本開示に関連して、ヒトの状態を再現する前臨床癌／腫瘍モデルは、ＴＧＦβ１陽性癌／腫瘍である。

【０１４６】

治療濃度域：「治療濃度域」という用語は、対象において有意／観察可能／許容できない有害作用（例えば、許容可能又は許容可能な有害作用の範囲内）を引き起こすことなく、治療応答を生じる用量範囲を指す。治療濃度域は、最小有効濃度（ＭＥＣ）と最小毒性濃度（ＭＴＣ）との比として計算することができる。例示すると、１０ｍｇ／ｋｇの投与量でインビボ有効性を達成し、且つ１００ｍｇ／ｋｇで忍容性又は許容毒性を示すＴＧＦβ１阻害剤は、少なくとも１０倍（例えば、１０×）の治療濃度域を提供する。対照的に、１０ｍｇ／ｋｇで有効であるが、有効用量未満で有害作用を引き起こすＴＧＦβの汎阻害剤は、「用量制限毒性」を有すると言える。一般に、最大耐用量（ＭＴＤ）が、治療濃度域の上限を設定し得る。例えば、Ａｂ６は、約３～３０ｍｇ／ｋｇ／週の範囲の用量で有効であることが判明し、またラット又は非ヒト霊長類において少なくとも１００又は３００ｍｇ／ｋｇ／週の用量で４週間にわたり、ＴＧＦβの汎阻害に伴う観察可能な毒性がないことも証明された。これに基づいて、Ａｂ６は、少なくとも３．３倍及び最大１００倍の治療濃度域を示す。一部の実施形態では、治療濃度域の概念は、安全係数に関して表現され得る（例えば、本明細書の実施例２６を参照されたい）。

【０１４７】

毒性：本明細書で使用される場合、１つ又は複数の「毒性」という用語は、対象（例えば、患者）に投与される療法に関連する、対象（例えば、患者）における望ましくないインビボ作用、例えば望ましくない副作用及び有害事象を指す。「忍容性」は、毒性のために治療を中止することなく、患者により妥当に忍容され得る、治療又は治療レジメンに関連する毒性のレベルを指す。典型的には、毒性／毒性学試験は、薬物候補の安全性プロファイルを評価するために、臨床開発前に１つ以上の前臨床モデルで実施される（例えば、モノクローナル抗体療法）。毒性／毒性学試験は、被験物質の「無毒性量（ＮＯＡＥＬ）」及び「最大耐用量（ＭＴＤ）」を決定するのに役立ち、それに基づいて治療濃度域が推定され得る。好ましくは、特定の介入に対して感受性であることが示された種を、安全性／毒性試験が行われる前臨床動物モデルとして選択すべきである。ＴＧＦβ阻害の場合、好適な種として、ラット、イヌ及びカニクイザルが挙げられる。マウスはＴＧＦβの薬理学的阻害に対して感受性が低く、ヒトを含む他の種において潜在的に危険な毒性を明らかにしない可能性があると報告されているが、特定の試験では、マウスにおいてＴＧＦβの汎阻害で観察された毒性が報告されている。本開示に関連して例示するために、ラットにおいてＡｂ６に対するＮＯＡＥＬは、４週間の毒性試験に基づいて、評価された最も高い用量（１００ｍｇ／ｋｇ）であったが、これは、ＭＴＤが＞１００ｍｇ／ｋｇであることを示唆している。非ヒト霊長類におけるＡｂ６のＭＴＤは、４週間の毒性試験に基づいて＞３００ｍｇ／ｋｇである。

【０１４８】

ＮＯＡＥＬ及びＭＴＤを決定するために、好ましくは、特定の介入に対して感受性であることが証明された種を、安全性／毒性試験が行われる前臨床動物モデルとして選択すべ

きである。ＴＧＦβ阻害の場合、好適な種として、限定はされないが、ラット、イヌ、及びカニクイザルが挙げられる。マウスはＴＧＦβの薬理学的阻害に対する感受性が低いことが報告されており、ヒトを含む他の種において潜在的に重篤又は危険な毒性を明らかにしない可能性がある。

【０１４９】

翻訳可能性：創薬及び臨床開発に関連して、「翻訳可能性」又は「翻訳可能な」という用語は、ヒトの状態を再現する前臨床モデル又はデータの特定の品質又は特性を指す。本明細書で使用される場合、ＴＧＦβ１適応症を再現する前臨床モデルは、典型的には、ＴＧＦＢ２（又はＴＧＦβ２）及びＴＧＦＢ３（又はＴＧＦβ３）に対してＴＧＦＢ１（又はＴＧＦβ１）の優勢な発現を示す。例えば、組合せ療法パラダイムにおいて、翻訳可能性は、活性物質の組合せがそのモデルにおいて達成しようとするのと同じ基本的な作用機序を必要とし得る。一例として、多くのヒト腫瘍は、免疫排除されたＴＧＦβ１陽性腫瘍であり、これは、チェックポイント阻害療法（ＣＢＴ）に対して一次耐性を示す。第２の療法（ＴＧＦβ１阻害剤など）を併用して、ＣＢＴに対する耐性を克服することができる。このシナリオにおいて、好適な翻訳可能な前臨床モデルは、チェックポイント阻害療法（ＣＢＴ）に対して一次耐性を示すＴＧＦβ１陽性腫瘍を含む。

【０１５０】

治療する／治療：「治療する」又は「治療」という用語は、治療的処置、予防的処置、及び対象が障害又は他の危険因子を発症するリスクを低減する適用を含む。従って、この用語は、広義に意味することが意図される：例えば、身体の免疫を増強するか若しくは高めること；免疫抑制を低下若しくは逆転させること；身体から有害な細胞若しくは物質を低減、除去若しくは根絶すること；疾患負荷（例えば、腫瘍負荷）を低減すること；再発若しくは再発を予防すること；不応期を延長すること；及び／又は他に生存率を改善することによって患者に治療利益をもたらすこと。この用語は、治療的処置、予防的処置、及び対象が障害又は他の危険因子を発生するリスクを低減する適用を含む。治療は、障害の完全な治癒を必要とするわけではなく、症状又は根底にある危険因子を低減する実施形態を包含する。組合せ療法に関連して、この用語は、以下を指す場合もある：ｉ）第２の治療薬が、副作用を軽減し、忍容性を高めるように、第１の治療薬の有効用量を減少させる能力；ｉｉ）第２の治療薬が、第１の治療薬に対して患者をより応答性にする能力；及び／又はｉｉｉ）相加的又は相乗的な臨床的利益をもたらす能力。

【０１５１】

腫瘍関連マクロファージ（ＴＡＭ）：ＴＡＭは、腫瘍促進表現型（Ｍ２様マクロファージ）を有する極性化／活性化マクロファージである。ＴＡＭは、腫瘍部位に動員された骨髄起源の単球／マクロファージ又は赤血球骨髄系前駆細胞に由来する組織常駐マクロファージのいずれかであり得る。単球／マクロファージのＴＡＭへの分化は、多くの要因により影響されるが、そうしたものとして、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子及びリガンドとして作用する他の分子などの局所化学シグナル並びにニッチ（腫瘍微小環境）に存在する単球／マクロファージ同士の細胞間相互作用が挙げられる。一般に、単球／マクロファージは、いわゆる「Ｍ１」又は「Ｍ２」サブタイプに極性化することができ、後者は、より腫瘍促進性の表現型と関連している。固形腫瘍では、腫瘍塊の最大５０％が、優先的にＭ２極性化しているマクロファージに一致し得る。腫瘍関連単球及び骨髄系細胞集団間では、Ｍ１マクロファージは、典型的には細胞表面ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ６８及びＣＤ８６を発現するのに対し、Ｍ２マクロファージは、典型的には細胞表面ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ６８、ＣＤ１６３及びＣＤ２０６を発現する。腫瘍関連、Ｍ２様マクロファージ（Ｍ２ｃ及びＭ２ｄサブタイプなど）は、細胞表面ＬＲＲＣ３３及び／又はＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１を発現することができる。

【０１５２】

腫瘍微小環境：「腫瘍微小環境（ＴＭＥ）」という用語は、腫瘍（例えば、固形腫瘍）がインビボで常在する局所疾患ニッチを指す。ＴＭＥは、疾患関連分子シグネチャ（ケモカイン、サイトカインなどの集合）、疾患関連細胞集団（ＴＡＭ、ＣＡＦ、ＭＤＳＣなど

）並びに疾患関連ＥＣＭ環境（ＥＣＭ成分及び／又は構造の変化）を含み得る。

【０１５３】

弁膜症：「弁膜症」という用語は、心臓の４つの弁の１つ以上に影響を及ぼす疾患、障害、又は状態を指し、多くの場合、心臓弁における病変を特徴とする。これは、一般的に、弁膜性心疾患又は心臓弁膜症としても知られる。弁膜症の種類としては、限定するものではないが、大動脈弁膜症（例えば、大動脈狭窄症）、僧帽弁形成症、三尖弁膜症及び肺弁膜症が挙げられる。

【０１５４】

可変領域：「可変領域」又は「可変ドメイン」という用語は、抗体の軽鎖及び／又は重鎖の１部分を指し、典型的には、重鎖に約１２０～１３０個のアミノ酸を、軽鎖に約１００～１１０個のアミノ末端アミノ酸を含む。特定の実施形態では、異なる抗体の可変領域は、同じ種の抗体間でもアミノ酸配列において大幅に異なる。抗体の可変領域は、典型的には、その標的に対する特定の抗体の特異性を決定する。

【０１５５】

実施例、又は別段の指示がある場合以外は、本明細書で使用される成分又は反応条件の量を表すあらゆる数値は、全ての例において「約」という用語により修正されたものとして理解されるべきである。パーセンテージに関連して使用される場合の「約」という用語は、±１％を意味し得る。

【０１５６】

本明細書及び特許請求の範囲において本明細書で使用される不定冠詞「１つの（ａ）」及び「１つの（ａｎ）」は、明確に反対のことが指示されない限り、「少なくとも１つ」を意味すると理解すべきである。

【０１５７】

本明細書及び特許請求の範囲において本明細書で使用される場合、「及び／又は」という語句は、そのように結合された要素の「一方又は両方」、即ちある場合には接続的に存在し、他の場合には離接的に存在する要素を意味すると理解すべきである。「及び／又は」節によって具体的に明示される要素以外の他の要素が、明確に反対の指示がない限り、具体的に明示される要素に関連するか無関係であるかにかかわらず、任意選択で存在し得る。従って、非限定的な例として、「Ａ及び／又はＢ」への言及が「含む」といった制約のない用語と組み合わせて使用される場合、これは、一実施形態では、Ｂを含まないＡ（任意選択で、Ｂ以外の要素を含む）；別の実施形態では、Ａを含まないＢ（任意選択で、Ａ以外の要素を含む）；さらに別の実施形態では、Ａ及びＢの両方（任意選択で他の要素を含む）、等を示し得る。

【０１５８】

本明細書及び特許請求の範囲において本明細書で使用される場合、１つ以上の要素のリストに関して「少なくとも１つ」という語句は、要素のリスト内のいずれか１つ以上の要素から選択される少なくとも１つの要素を意味すると理解すべきであるが、必ずしも要素のリスト内に具体的に列挙された各及び全ての要素の少なくとも１つを含むとは限らず、また要素のリスト内の要素のあらゆる組合せを排除しない。この定義は、「少なくとも１つ」という語句が指す要素のリスト内において、具体的に明示される要素に関係するか又は関係しないかにかかわらず、具体的に識別された要素以外の要素が任意選択で存在し得ることも可能にする。従って、非限定的な例として、「Ａ及びＢの少なくとも１つ」（又は同様に「Ａ又はＢの少なくとも１つ」又は同様に「Ａ及び／又はＢの少なくとも１つ」）は、一実施形態では、Ｂは存在せず、少なくとも１つ（任意選択で２つ以上を含む）のＡ（及び任意選択でＢ以外の要素を含む）；別の実施形態では、Ａは存在せず、少なくとも１つ（任意選択で２つ以上を含む）のＢ（及び任意選択でＡ以外の要素を含む）；さらに別の実施形態では、少なくとも１つ（任意選択で２つ以上）のＡと、少なくとも１つ（任意選択で２つ以上を含む）のＢ（及び任意選択で他の要素を含む）、等を示し得る。

【０１５９】

請求項要素を修正するための、請求項における「第１」、「第２」、「第３」などの序

数用語の使用は、それ自体で、ある請求項要素の別の要素に対する優先順位、先行若しくは順序又は１方法の行為が実施される時間的順序を意味するものではなく、請求項要素を区別する目的で、特定の名称を有する１つの請求項要素を同じ名称を有する別の要素から区別するためのあくまでもラベルとして使用されるに過ぎない（但し、序数用語の使用を除く）。

【０１６０】

本明細書に提供される範囲は、その範囲内の全ての値を簡略化したものと理解される。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又は５０、例えば１０～２０、１～１０、３０～４０等からなる群からのあらゆる数値、数値の組合せ又は部分範囲を包含すると理解される。

【０１６１】

トランスフォーミング増殖因子β（ＴＧＦβ）

トランスフォーミング増殖因子β（ＴＧＦβ）活性及びそれに続く可溶性増殖因子の部分精製は、１９７０年代後半から１９８０年代初頭に初めて記載され、それと共にＴＧＦβの分野が約４０年前に始まった。現在までに、大きいＴＧＦβスーパーファミリーを構成する３３の遺伝子産物が同定されている。ＴＧＦβスーパーファミリーは、構造的類似性によって少なくとも３つのサブクラス：ＴＧＦβ、増殖分化因子（ＧＤＦ）及び骨形成タンパク質（ＢＭＰ）に分類することができる。ＴＧＦβサブクラスは、高度に保存された３つのアイソフォーム、即ちＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３からなり、これらは、ヒトの場合、３つの個別の遺伝子によってコードされる。

【０１６２】

ＴＧＦβは、細胞増殖の阻害、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）リモデリング、免疫恒常性などの多様なプロセスにおいて重要な役割を果たすと考えられている。Ｔ細胞恒常性維持のためのＴＧＦβ１の重要性は、ＴＧＦβ１－／－マウスが３～４週間のみ生存し、強度の免疫活性化による多臓器不全のために死ぬという観察結果によって実証されている（Ｋｕｌｋａｒｎｉ，Ａ．Ｂ．，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ，１９９３．９０（２）：ｐ．７７０－４；Ｓｈｕｌｌ，Ｍ．Ｍ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，１９９２．３５９（６３９７）：ｐ．６９３－９）。ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３の役割は、それほど明確でない。３つのＴＧＦβアイソフォームは、異なる時間的及び空間的発現パターンを有するが、それらは同じ受容体ＴＧＦβＲＩ及びＴＧＦβＲＩＩを介してシグナル伝達するものの、場合により、例えば、ＴＧＦβ２シグナル伝達のために、βグリカンなどのＩＩＩ型受容体も必要とする（Ｆｅｎｇ，Ｘ．Ｈ． ａｎｄ Ｒ．Ｄｅｒｙｎｃｋ，Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖ Ｂｉｏｌ，２００５．２１：ｐ．６５９－９３；Ｍａｓｓａｇｕｅ，Ｊ．，Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ，９９８．６７：ｐ．７５３－９１）。ＴＧＦβＲＩ／ＩＩのリガンド誘導オリゴマー化は、ＳＭＡＤ転写因子のリン酸化をトリガーし、その結果、Ｃｏｌ１ａ１、Ｃｏｌ３ａ１、ＡＣＴＡ２及びＳＥＲＰＩＮＥ１などの標的遺伝子の転写を招く（Ｍａｓｓａｇｕｅ，Ｊ．，Ｊ．Ｓｅｏａｎｅ，ａｎｄ Ｄ．Ｗｏｔｔｏｎ，Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ，２００５．１９（２３）：ｐ．２７８３－８１０）。ＳＭＡＤ非依存性ＴＧＦβシグナル伝達経路は、例えば、癌において、又はマルファン症候群マウスの大動脈病変においても記載されている（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）。

【０１６３】

ヒトにおけるＴＧＦβ経路の生物学的重要性は、遺伝性疾患によって検証されている。カムラチ・エンゲルマン（Ｃａｍｕｒａｔｉ－Ｅｎｇｅｌｍａｎ）病は、ＴＧＦＢ１遺伝子の常染色体優性変異に起因する骨形成異常をもたらし、ＴＧＦβ１シグナル伝達の構成

的活性化を引き起こす（Ｊａｎｓｓｅｎｓ，Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｍｅｄ　Ｇｅｎｅｔ，２００６．４３（１）：ｐ．１－１１）。ロイス・ディーツ症候群の患者は、ＴＧＦβシグナル伝達経路の構成要素に常染色体優性変異を有し、これが、大動脈瘤、隔離症及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経路調節不全は複数の疾患に関与しているとして、ＴＧＦβ経路を標的化するいくつかの薬物が開発され、患者において試験されてきたが、成功は限定的である。

【０１６４】

ＴＧＦβシグナル伝達の調節不全は、多種多様なヒト疾患と関連している。実際、多くの疾患状態において、このような調節不全は、ＴＧＦβ機能の複数の側面に関与し得る。線維性及び／又は炎症を起こした組織及び腫瘍などの罹患組織は、ＴＧＦβ活性化が疾患の悪化又は進行を引き起こし得る局所環境を形成する可能性があり、これは、特定の疾患設定に役割を果たす他のいくつかのサイトカイン、ケモカイン及び増殖因子と一緒に、オートクリン及び／又はパラクリン様式で活性化される複数のＴＧＦβ応答性細胞同士の相互作用によって少なくとも部分的に媒介される可能性がある。

【０１６５】

例えば、腫瘍微小環境（ＴＭＥ）は、癌（即ち悪性）細胞に加えて、活性化筋線維芽細胞様線維芽細胞、間質細胞、浸潤マクロファージ、ＭＤＳＣ及び他の免疫細胞などのＴＧＦβ１を発現する複数の細胞型を含む。従って、ＴＭＥは、ニッチ内で、ＴＧＦβ１を発現し、且つ／又はそれに応答するが、複数のタイプの提示分子、例えばＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３、ＬＲＲＣ３３及びＧＡＲＰと関連している細胞の異種集団を表す。

【０１６６】

免疫療法の進歩は、数が増加していく癌患者に有効な治療環境を変えた。最も顕著なのはチェックポイント阻害療法（ＣＢＴ）であり、これは、現在では増え続ける癌の標準治療レジメンの一部となっている。ＣＢＴに対する強力且つ持続的な応答が、益々多くの癌タイプで観察されているが、ここで、腫瘍のかなりの部分が治療開始時でさえＣＢＴに不応答性であると思われることは、明らかであり、従って、多くの患者の免疫系が腫瘍細胞を標的化して排除することを可能にするための主要な課題として一次耐性が提示されている。ＣＢＴに一次耐性を付与する根本的なメカニズムを理解し、それに対処する努力が、より多くの患者の治療有効性を広げるために為されてきた。しかし、この熱意は、ＣＢＴを同じ腫瘍タイプに影響を与えることが知られる薬剤又は免疫系の一見関連性の高い構成要素を調節することが知られる薬剤と組み合わせた場合、精彩を欠いた臨床試験結果及び失敗によって制限されてきた。考えられる理由は、所与の組合せの明確な機構的根拠が臨床的に得られたデータに根ざしていないことが多く、従って承認された単剤療法を強化することを意図した試験において不確実であり、混乱させるアウトカムをもたらしているからである。併用免疫療法の設計は、基本的な腫瘍及び免疫系生物学との関連性の科学的証拠に根ざすべきであることが明らかになった。

【０１６７】

近年、「免疫排除」と呼ばれる現象が、抗腫瘍エフェクターＴ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）が免疫抑制ローカルキューによって遠ざけられる（従って「排除される」）腫瘍環境を表現するために造り出された。さらに近年では、臨床由来の腫瘍の多くのレトロスペクティブ分析は、ＣＢＴに対する一次耐性の媒介にＴＧＦβ経路活性化が関与するとしている。例えば、治療前の黒色腫生検の転写プロファイリング及び分析は、抗ＰＤ－１ＣＢＴに非応答性の腫瘍におけるＴＧＦβ関連経路及び生物学的プロセスの富化を明らかにした。免疫排除腫瘍では、そうでなければ細胞表面腫瘍抗原を認識することによって癌細胞を攻撃することができるエフェクター細胞は、癌細胞の部位に接近することが妨害される。このようにして、癌細胞は、宿主免疫を回避すると共に、そのような免疫を利用及び依存するチェックポイント阻害剤などの免疫腫瘍学的治療薬を回避する。実際、このような腫瘍は、抗ＰＤ－１抗体及び抗ＰＤ－Ｌ１抗体などのチェックポイント阻害に対して耐性を示すが、これは、恐らく、標的Ｔ細胞が腫瘍に侵入するのを阻止され、従って抗癌

効果を発揮することができないためである。

【０１６８】

臨床由来腫瘍のいくつかのレトロスペクティブ分析は、ＣＢＴに対する一次耐性の媒介におけるＴＧＦβ経路活性化を指摘している。例えば、治療前の黒色腫生検の転写プロファイリング及び分析は、抗ＰＤ－１　ＣＢＴに非応答の腫瘍におけるＴＧＦβ関連経路及び生物学的プロセスの富化を明らかにした。より近年では、転移性尿路上皮癌患者由来の腫瘍の同様の分析により、アテゾリズマブによるＰＤ－Ｌ１遮断に対する応答の欠如は、特にＣＤ８＋Ｔ細胞が腫瘍への侵入から排除されると思われる腫瘍において、ＴＧＦβシグナル伝達の転写シグネチャと関連していることが判明した。抗ＰＤ－（Ｌ）１耐性をもたらす免疫排除を媒介する上でのＴＧＦβシグナル伝達の重要な役割が、乳癌のＥＭＴ－６同系マウスモデルにおいて確認されている。ＥＭＴ－６腫瘍は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体による治療に対する応答性は弱いが、このチェックポイント阻害剤を、全てのＴＧＦβアイソフォームの活性を阻止する抗体である１Ｄ１１と組み合わせると、個々の阻害剤による治療と比較して、完全奏功の頻度が大幅に増加した。相乗的な抗腫瘍活性は、癌関連線維芽細胞（ＣＡＦ）表現型の変化及び免疫排除表現型の分解によるものであり、活性化ＣＤ８＋Ｔ細胞の腫瘍への浸潤をもたらすことが示唆される。同様の結果は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体と、Ｉ型ＴＧＦβ受容体ＡＬＫ５キナーゼの小分子阻害剤であるガルニセルチブとの組合せを用いた結腸直腸癌及び転移のマウスモデルにおいても見出された。まとめると、これらの知見は、ＣＢＴ耐性腫瘍におけるＴＧＦβ経路を阻害することが、ＣＢＴに対する臨床応答の数を改善又は増加させるための有望なアプローチとなり得ることを示唆している。近年の研究は、ＴＧＦβ経路活性化と一次ＣＢＴ耐性との関係を示唆しているが、ＴＧＦβシグナル伝達は長い間、癌の病因の特徴と関連してきた。強力な免疫抑制因子として、ＴＧＦβは抗腫瘍性Ｔ細胞活性を阻止すると共に、免疫抑制性マクロファージを促進する。悪性細胞は、多くの場合、その増殖を回避するメカニズムとしてのＴＧＦβシグナル伝達及び腫瘍抑制効果に対して耐性になる。ＴＧＦβはＣＡＦを活性化し、細胞外マトリックス産生及び腫瘍進行の促進を誘導する。最後に、ＴＧＦβは、ＥＭＴを誘導し、従って組織浸潤及び腫瘍転移を支持する。

【０１６９】

哺乳動物は、３つのＴＧＦβ増殖因子ＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３をコード及び発現する別個の遺伝子を有し、それらは全て同じヘテロマーＴＧＦβ受容体複合体を介してシグナル伝達する。共通のシグナル伝達経路にもかかわらず、各ＴＧＦβアイソフォームは、非重複ＴＧＦβノックアウトマウス表現型によって証明されるとおり、別個の生物学的機能を有すると思われる。３つのＴＧＦβアイソフォームは全て、不活性プロドメイン－増殖因子複合体として表され、ＴＧＦβプロドメインは、潜在関連ペプチド（ＬＡＰ）とも呼ばれ、その増殖因子を包み込み、それを潜在性の、非シグナル伝達状態に保持する。さらに、潜在型ＴＧＦβは、潜在型ＴＧＦβ結合タンパク質と一緒に共発現し、ジスルフィド結合を介して大きい潜在型複合体（ＬＬＣ）を形成する。潜在型ＴＧＦβと潜在型ＴＧＦβ結合タンパク質－１（ＬＴＢＰ１）又はＬＴＢＰ３との結合は、細胞外マトリックスへのテザリングを可能にするのに対して、膜貫通タンパク質ＧＡＲＰ又はＬＲＲＣ３３との結合は、それぞれＴｒｅｇ又はマクロファージの表面上での同化を可能にする。インビボでは、潜在型ＴＧＦβ１及び潜在型ＴＧＦβ３は、αＶインテグリンのサブセットによって活性化され、ＬＡＰ上のコンセンサスＲＧＤ配列に結合し、立体構造変化をトリガーして増殖因子を放出する。潜在型ＴＧＦβ２が活性化されるメカニズムは、コンセンサスＲＧＤモチーフが欠如しているため、それほど明確ではない。ＬＡＰのタンパク質分解性切断によるＴＧＦβ１放出も活性化機構として関与しているが、その生物学的関連性はそれほど明確ではない。

【０１７０】

ＴＧＦβ活性化の病因としての役割は、いくつかの病態において明らかであるが、ＴＧＦβ経路の治療標的化が、広範且つ持続的な経路阻害から生じる多面的効果のために困難であったことも同様に明らかである。例えば、ＴＧＦβＩ型受容体キナーゼＡＬＫ５（Ｔ

ＧＦＢＲ１）の小分子媒介性阻害、又は高親和性抗体による３つの高度に関連したＴＧＦβ増殖因子全ての遮断が、マウス、ラット及びイヌにおいて重度の心弁膜症を引き起こしたことがいくつかの研究によって明らかにされている。従って、全てのＴＧＦβシグナル伝達を遮断するこれらの「汎」ＴＧＦβアプローチは、非常に狭い治療濃度域を有し、これは、非常に高いアンメットメディカルニーズを有する多数の疾患関連プロセスの治療に対する障害であることが証明されている。ＴＧＦβ標的化療法は今日まで承認されておらず、そのような様式を用いた臨床試験の結果は、大部分が期待外れであったが、これは、恐らく安全性の懸念に対応するために必要とされたが、それが無効の投与レジメンであると証明されたものを使用したためであろう。

【０１７１】

本明細書で引用される全ての参考文献は、任意の目的のために参照により組み込まれる。参照文献と本明細書が矛盾する場合、本明細書が優先される。開示された組成物及び方法の特定の特徴は、明瞭化のために、個別の実施形態に関連して本明細書に記載されるが、単一の実施形態に組み合わせて提供され得ることは理解されたい。逆に、開示された組成物及び方法の様々な特徴は、簡略化のために、単一の実施形態に関して説明されるが、これらは、個別に又は任意の部分組合せで提供することもできる。

【０１７２】

治療方法と治療効果のバイオマーカ

バイオマーカとしての循環／循環型ＭＤＳＣ

ＭＤＳＣは、その骨髄系起源及びそれらの主な免疫抑制機能にちなんで命名された細胞の異種集団である（Ｇａｂｒｉｌｏｖｉｃｈ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｒｅｓ．２０１７ Ｊａｎ；５（１）：３－８）。ＭＤＳＣは一般に、Ｔ細胞及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞の細胞傷害機能を低下させる高い可塑性及び強力な能力を呈示し、これは、Ｔ調節細胞（Ｔｒｅｇ）増殖を促進し、ひいてはＴエフェクター細胞機能を抑制する能力を含む（Ｇａｂｒｉｌｏｖｉｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ．（２０１２）１２：２５３－６８）。ＭＤＳＣは、典型的には、表面マーカの発現に基づいて、単球性（ｍ－ＭＤＳＣ）及び顆粒球性（Ｇ－ＭＤＳＣ又はＰＭＮ－ＭＤＳＣ）の２つのサブセットに分類される（Ｃｏｎｓｏｎｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｆｒｏｎｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１９ Ｍａｙ ３；１０：９４９）。抑制性Ｇ－ＭＤＳＣは、免疫抑制の主要なメカニズムとしての活性酸素種（ＲＯＳ）の産生により特徴付けることができる。これに対し、Ｍ－ＭＤＳＣは、主に誘導性一酸化窒素合成酵素遺伝子（ｉＮＯＳ）を上方制御することによって免疫抑制を媒介し、一酸化窒素（ＮＯ）及び免疫抑制性サイトカインの配列を産生する（Ｙｏｕｎ ａｎｄ Ｇａｒｉｌｏｖｉｃｈ，Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１０ Ｎｏｖ；４０（１１）：２９６９－２９７５）。

【０１７３】

ＭＤＳＣは、慢性炎症、感染、自己免疫疾患、及び移植片対宿主病などの様々な疾患に関与するとされている。近年、ＭＤＳＣは、プログラム細胞死リガンド１（ＰＤ－Ｌ１）及び細胞傷害性Ｔリンパ球抗原４（ＣＴＬＡ４）などのチェックポイント阻害分子を介してＴ細胞寛容を誘導する役割により、癌において注目すべき免疫集団となっている（Ｔｒｏｖａｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ Ｃａｎｃｅｒ．２０１９ Ｓｅｐ １８；７（１）：２５５）。さらに、ＭＤＳＣは、一般に、腫瘍血管新生の促進を含む免疫抑制に加えて、機序により腫瘍進行を支持するものとして特徴付けられてきた。これまでの研究は、炎症性組織の周囲で富化する傾向があるため、腫瘍生検に存在するＭＤＳＣに焦点を当てている。（Ｐａｓｓｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｔｒａｎｓｌ Ｏｎｃｏｌ．２０１９ Ｊｕｎ ２８．；Ａｉ ｅｔ ａｌ．，ＢＭＣ Ｃａｎｃｅｒ．２０１８ Ｄｅｃ ５；１８（１）：１２２０；Ｎａｋａｍｕｒａ．Ｆｒｏｎｔ Ｍｅｄ（Ｌａｕｓａｎｎｅ）．２０１９；６：１１９）。しかし、こうした研究が、ＭＤＳＣレベルと治療反応との間の明確な関係を解明したと文献に報告したことはなかった。例えば、ベースライン単球性ＭＤＳＣ頻度が低いと、治療利益との相関が乏しいことが証明された（Ｐｉｃｏ ｄｅ Ｃｏａｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｏｎｃｏｔａｒｇｅｔ．２０１７ Ｍ

ａｒ　２８；８（１３）：２１５３９－２１５５３）。

【０１７４】

多くのヒト癌（例えば、固形腫瘍）は、健康な対照と比較して、患者からの生検においてＭＤＳＣのレベルの上昇を示すことが知られている（例えば、Ｅｌｌｉｏｔｔ　ｔ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１７）Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．８，Ａｒｔｉｃｌｅ　８６にレビューされている）。これらのヒト癌として、限定するものではないが、膀胱癌、結腸直腸癌、前立腺癌、乳癌、膠芽腫、肝細胞癌、頭頸部扁平上皮癌、肺癌、黒色腫、ＮＳＣＬＣ、卵巣癌、膵臓癌、及び腎細胞癌が挙げられる。本開示による組成物及び方法は、これらの癌の１つ以上に適用され得る。

【０１７５】

以前に、本出願人により、免疫抑制性腫瘍が、腫瘍関連ＭＤＳＣとも呼ばれる腫瘍浸潤性又は腫瘍内ＭＤＳＣのレベルの上昇を含むことが実証され、このエビデンスは、これが、ＴＧＦβ１依存的に抗腫瘍免疫と逆相関していることを明示している。例えば、ＭＢＴ２腫瘍において、Ａｂ６（ＴＧＦβ１選択的阻害剤）及びＰＤ－１抗体の組合せで処置されたマウスは、細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔ細胞の着実な流入及び対応する腫瘍関連ＭＤＳＣ集団の減少（例えば、ＣＤ４５＋細胞の約１１％～１．４％；図２８Ｂ）をトリガーした。これらのデータは、腫瘍関連免疫細胞を、例えば、生検により厳密に調べることが、癌患者における抗腫瘍効果を特性決定するのに有用であり得ることを示唆した。ここで、本出願人は、比較的単純であり、且つ非侵襲的な血液検査が同等の情報を提供し得るという驚くべき発見をした。従って、本開示は、免疫抑制性表現型を克服する上でのＴＧＦβ１阻害の薬理学的効果が、循環ＭＤＳＣレベルを測定することによって決定され得るという認識を包含する。

【０１７６】

様々な実施形態において、本開示は、ＴＧＦβ阻害剤、例えばＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えば、選択的プロ又は潜在型ＴＧＦβ１阻害剤、例えばＡｂ６など）、アイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤（例えば、低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８及び変異体、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤）並びに／又はインテグリン阻害剤（及びインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）を受ける患者から得られるサンプル中（例えば、血液中又は患者の血液成分中）の循環ＭＤＳＣのレベルをモニターすることにより、癌を治療し、有効性を予測若しくは決定し、且つ／又は薬理学的反応を確認する方法を提供する。例示的なインテグリン阻害剤としては、国際公開第２０２００５１３３３号パンフレットに提供される抗αＶβ８インテグリン抗体が挙げられ、その開示内容は、参照により組み込まれる。本明細書に開示される様々な実施形態において、循環ＭＤＳＣは、対象への治療薬の投与、例えば、治療用量のＴＧＦβ阻害剤の投与後、１、２、３、４、５、６若しくは７日以内又は１、２、３、４、５、６、７、８、９若しくは１０週間以内（例えば、好ましくは６週間未満）に測定することができる。

【０１７７】

特定の実施形態では、ＴＧＦβ治療薬は、単独で、又は追加の癌療法と組み合わせて投与され得る。治療薬は、免疫抑制性癌又は骨髄増殖性障害を有する対象に投与され得る。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、本開示に包含されるＴＧＦβ１選択的抗体又はその抗原結合断片（例えば、Ａｂ６）である。一部の実施形態では、ＴＧＦβ１選択的抗体又は抗原結合断片は、治療に有効な用量でＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３を阻害しない。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、アイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤（例えば、低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８及び変異体、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体及びリガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤）である。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、イン

テグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／又はＴＧＦβ３の選択的阻害）である。例示的なインテグリン阻害剤としては、国際公開第２０２００５１３３３号パンフレットに提供される抗αＶβ８インテグリン抗体が挙げられ、その開示内容は、参照により組み込まれる。一部の実施形態では、追加の癌療法は、化学療法、放射線療法（放射線治療薬を含む）、癌ワクチン、又は抗ＰＤ－１、抗ＰＤ－Ｌ１、及び抗ＣＴＬＡ－４抗体などのチェックポイント阻害剤療法を含む免疫療法を含み得る。一部の実施形態では、チェックポイント阻害剤療法は、イピリムマブ（例えば、Ｙｅｒｖｏｙ（登録商標））；ニボルマブ（例えば、Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））；ペムブロリズマブ（例えば、Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標））；アベルマブ（例えば、Ｂａｖｅｎｃｉｏ（登録商標））；セミプリマブ（例えば、Ｌｉｂｔａｙｏ（登録商標））；アテゾリズマブ（例えば、Ｔｅｃｅｎｔｒｉｑ（登録商標））；及びデュルバルマブ（例えば、Ｉｍｆｉｎｚｉ（登録商標））からなる群から選択される。好ましい実施形態において、併用癌療法は、Ａｂ６及び少なくとも１つのチェックポイント阻害剤（上に列挙したものなど）を含む。従って、一部の実施形態では、Ａｂ６とチェックポイント阻害剤との組合せは、癌を治療するのに有効な量でヒト患者の癌の治療に使用される。一部の実施形態では、組合せ療法は、第２のチェックポイント阻害剤及び／又は化学療法をさらに含み得る。

【０１７８】

本開示は、ＴＧＦβ阻害剤を単独で又は免疫療法と一緒に投与される対象の癌を治療する際に循環ＭＤＳＣの測定を使用する方法も提供する。さらに、本明細書に提示される記載は、例えば、腫瘍体積の減少などの治療有効性の他のマーカが検出され得る前の時点で、特にＴＧＦβ阻害剤及びチェックポイント阻害剤組合せ療法で治療される癌対象において、有効性の早期予測マーカとしての循環ＭＤＳＣ集団に関する裏付けも提供する。

【０１７９】

特定の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤、例えばＡｂ６などのＴＧＦβ１選択的阻害剤、アイソフォーム非選択的阻害剤、例えば低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８及び変異体、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）は、投与されるＴＧＦβ１阻害の量（例えば、用量）が、ベースラインＭＤＳＣレベルと比較して、循環ＭＤＳＣレベルを少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％又はそれを超えて減少させるのに十分であるように、チェックポイント阻害剤療法と同時期に（例えば、同時に）、個別に又は順次投与される。循環ＭＤＳＣレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の各処置若しくは各用量前又は後に測定され得、その結果、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％又はそれを超える循環ＭＤＳＣレベルの減少は、治療有効性を示すか若しくは予測し得る。一部の実施形態では、循環ＭＤＳＣのレベルを用いて、疾患負荷を決定することができる（例えば、治療レジメンの前後の相対腫瘍体積の変化によって測定して）。特定の実施形態では、循環ＭＤＳＣレベルの低下は、疾患負荷の減少（例えば、相対腫瘍体積の減少）を示し得る。例えば、循環ＭＤＳＣレベルは、ある用量のＴＧＦ阻害剤（アイソフォーム選択的阻害剤、例えばＡｂ６、アイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤、例えば低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８及び変異体、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）の投与前及び後に測定することができ、循環ＭＤＳＣレベルの低下は、薬理学的効果、例えば、疾

患負荷の減少（例えば、相対的腫瘍サイズの減少）を示すか、又は予測し得る。特定の実施形態では、循環ＭＤＳＣレベルは、１回目用量のＴＧＦβ阻害剤、例えばＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ６、アイソフォーム非選択的阻害剤、例えば低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８及び変異体、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）の投与前及び後に測定され得る。一部の実施形態では、１回目用量のＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６、アイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤、例えば低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８及び変異体、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）の投与を用いて、腫瘍体積を減少させることができ、その結果、ＴＧＦβ阻害剤の投与により、投与前の循環ＭＤＳＣレベルと比較して、循環ＭＤＳＣレベルを少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％又はそれを超えて低下させる。一部の実施形態では、循環ＭＤＳＣレベルの低下は、薬理学的効果を示すか、又は予測し得るものであり、さらに、ＴＧＦβ阻害剤の２回目又はそれ以降の用量の投与の根拠にもなる。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤の１回目用量は、患者が受けるＴＧＦβ阻害剤の正に最初の用量である。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤の１回目用量は、ＴＧＦβ阻害剤の２回用量以上を含む所与の治療レジメンの１回目用量である。別の実施形態では、同時期に（例えば、同時に）、個別に又は順次投与される、循環ＭＤＳＣレベルは、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）とチェックポイント阻害剤療法とを含む併用治療の前後に測定され得、循環ＭＤＳＣレベルの低下は、治療有効性を示すか又は予測する。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤、例えばＴＧＦβ１阻害剤、例えばＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ６、アイソフォーム非選択的阻害剤、例えば低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８及び変異体、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）と、チェックポイント阻害剤療法との併用治療後の循環ＭＤＳＣレベルの低下は、治療の継続の根拠となり得る。

【０１８０】

本開示の特定の実施形態では、循環ＭＤＳＣのレベルを用いて、単独で又はチェックポイント阻害剤などの別の癌療法と組み合わせて投与される、ある用量のＴＧＦβ阻害剤、例えばＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ６、アイソフォーム非選択的阻害剤、例えば低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８及び変異体、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）を含む治療薬の薬理学的効果を予測、決定及びモニターすることができる。特定の実施形態では、循環ＭＤＳＣは、初期治療（例えば、ＴＧＦβ阻害剤の（１回目）用量）の投与から６週間以内に測定され得る。特定の実施形態では、循環ＭＤＳＣレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の初期用量の投与から３０日以内に測定され得る。一部の実施形態では、ＭＤＳＣレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の初期用量の投与から３週間以内又は約３週間後に測定され得る。一部の実施形態では、ＭＤＳＣレベルは、ＴＧＦβ阻害

剤の初期用量の投与から２週間以内又は約２週間後に測定され得る。一部の実施形態では、ＭＤＳＣレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の初期用量の投与から１０日以内又は約１０日後に測定され得る。

【０１８１】

特定の実施形態では、循環ＭＤＳＣレベルを用いて、過去にチェックポイント阻害剤治療を受けていない患者の治療を選択し、治療を通知し、及び／又は応答を予測することができる。過去にチェックポイント阻害剤治療を受けていない患者で、チェックポイント阻害剤療法に対する高い奏効率（例えば、当技術分野に報告されているように、３０％超、４０％超、５０％超又はそれを超える全奏功率）が報告された癌タイプと診断された患者を試験して、その腫瘍が免疫排除又は免疫抑制性表現型を示すかどうかを最初に決定することができる。一部の実施形態では、循環ＭＤＳＣを、免疫組織化学、フローサイトメトリー及び／又は当技術分野で公知のインビボイメージング法と組み合わせて使用して、腫瘍の免疫表現型を決定することができる。免疫排除又は免疫抑制性表現型を示す癌を有する患者は、ＴＧＦβ阻害剤、例えばＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ６、アイソフォーム非選択的阻害剤、例えば低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８及び変異体、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）とチェックポイント阻害剤との組合せ療法（例えば、抗ＰＤ１又は抗ＰＤ－Ｌ１抗体）を受けるために選択され得る。さらに、循環ＭＤＳＣレベルを治療反応の早期予測因子としてモニターし得る。特定の実施形態では、過去にチェックポイント阻害剤治療を受けていない患者で、チェックポイント阻害剤療法に対する低い奏効率（例えば、当技術分野に報告されているように、３０％以下、２０％以下又は１０％以下の全奏効率）が報告された癌タイプと診断された患者は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ６、アイソフォーム非選択的阻害剤、例えば低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８及び変異体、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）などのＴＧＦβ阻害剤と、チェックポイント阻害剤療法との併用で治療され得る。一部の実施形態では、これらの患者における治療反応は、循環ＭＤＳＣレベルをモニターすることによって予測することができる。

【０１８２】

特定の実施形態では、循環ＭＤＳＣレベルを用いて、チェックポイント阻害剤療法に耐性である患者、又はチェックポイント阻害剤療法を忍容しない患者（例えば、有害作用のために）における治療を選択、通知し、その応答を予測することができる。これらの患者は、一次耐性を有する（即ちチェックポイント阻害剤療法に対する応答を一度も示していない）か、又は耐性を獲得した（即ちチェックポイント阻害剤療法に初め応答し、時間の経過と共に耐性を形成した）可能性がある。一部の実施形態では、患者におけるチェックポイント阻害剤療法に対する耐性は、免疫抑制又は排除を示し、従って、これらの患者は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ６、アイソフォーム非選択的阻害剤、例えば低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８及び変異体、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体及びリガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）などのＴＧＦβ阻害剤療法を受ける候補として選択され得る。特定の実施形態では、チェックポイント阻害剤に対する一次耐性又は獲得耐性のいずれか

を有する患者に、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ６、アイソフォーム非選択的阻害剤、例えば低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８及び変異体、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）などのＴＧＦβ阻害剤を投与することができ、治療に対するその応答は、循環ＭＤＳＣレベルによりモニター及び／又は予測することができる。一部の実施形態では、循環ＭＤＳＣレベルの少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％又はそれを超える低下は、ＴＧＦβ阻害剤療法に対する応答を示し得る。一部の実施形態では、循環ＭＤＳＣレベルの少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％又はそれを超える減少は、例えば、ＴＧＦβ阻害剤による治療の薬理学的効果を示し得る。特定の実施形態では、循環ＭＤＳＣレベルの低下は、腫瘍サイズの減少を示し得る。例示的な治療レジメンを要約したチャートを図４１に表示する。

【０１８３】

現在開発中のＴＧＦβ阻害剤のほとんどは、アイソフォーム選択的ではない。これらには、ＴＧＦβの汎阻害剤並びにＴＧＦβ１／２及びＴＧＦβ１／３を標的化する阻害剤が含まれる。このような阻害剤に関連する可能性のある毒性を管理するために採られる手法は、有効性及び許容可能な安全性プロファイルの両方を達成することができるわずかな機会を捉えるための慎重な投与レジメンを含む。こうしたものとして、アイソフォーム非選択的阻害剤の減量を挙げることができ、これは、低頻度の投与及び／又は１投与当たりの用量の減少を含み得る。例えば、生物学的製剤ＴＧＦβ阻害剤を毎週の投与するのではなく、毎月の投与を検討することができる。別の例は、ＴＧＦβ阻害に関連する毒性を回避又は最小限に抑えるように、併用免疫療法の初期段階でのみ投与することである。

【０１８４】

癌療法（チェックポイント阻害剤療法など）とアイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤とを含む組合せ療法は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えばＡｂ６）と比較して高い毒性をもたらし得るため、そのようなリスクを軽減又は管理するために、アイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤は、例えば「必要に応じて」、低頻度で又は間欠的に投与され得る。このような治療パラダイムでは、癌治療の抗腫瘍効果を確実にするように、免疫抑制を克服する効果が十分に維持されていることを決定する目的のために、循環ＭＤＳＣレベルを定期的にモニターし得る。癌治療の過程で、ＭＤＳＣが増加する場合、それは、患者が、ＴＧＦβ阻害剤の追加投与から利益を受けることを示している。このような手法は、ＴＧＦβ阻害、特に非アイソフォーム選択的阻害剤に関連する不必要なリスク及び有害事象の低減に役立ち得る。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１／２を標的化する。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１／３を標的化する。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１／２／３を標的化する。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１を選択的に標的化する。

【０１８５】

従って、本開示は、患者の癌免疫療法を目的とする間欠的投与レジメンに使用するためのＴＧＦβ阻害剤を提供し、間欠的投与レジメンは、以下の工程：ＴＧＦβ阻害剤治療前に患者から収集された第１のサンプル中の循環ＭＤＳＣを測定する工程；ＴＧＦβ阻害剤を癌療法で治療された患者に投与する工程であって、癌療法は、任意選択でチェックポイント阻害剤療法である、工程；ＴＧＦβ阻害剤治療後に患者から採取した第２のサンプル中の循環ＭＤＳＣを測定する工程；第２のサンプルが第１のサンプルと比較して循環ＭＤＳＣのレベル低下を示した場合、癌治療を継続する工程；第３のサンプル中の循環ＭＤＳＣを測定する工程；並びに第３のサンプルが第２のサンプルと比較して循環ＭＤＳＣのレベル上昇を示した場合、ＴＧＦβ阻害剤の追加用量を患者に投与する工程を含む。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、アイソフォーム非選択的阻害剤である。一部の実施形

態では、サンプルは、血液又は血液成分サンプルである。一部の実施形態では、アイソフォーム非選択的阻害剤は、ＴＧＦβ１／２／３、ＴＧＦβ１／２又はＴＧＦβ１／３を阻害する。ベースライン循環ＭＤＳＣレベルは、健常な個体と比較して癌患者では上昇する可能性が高く、免疫抑制性癌を有する対象は、さらに高い循環ＭＤＳＣレベルを有する可能性がある。このように、ＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えば、Ａｂ６）、アイソフォーム非選択的阻害剤（例えば、低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト）、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体（例えば、ＧＣ１００８及び変異体）、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ（例えば、ＴＧＦβ１／３阻害剤）並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）などのＴＧＦβ阻害剤療法を、単独で又はチェックポイント阻害剤療法と組み合わせて用いて治療した患者の循環ＭＤＳＣレベル低下は、癌における免疫抑制の低下又は逆転を示し得る。特定の実施形態では、ＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えば、Ａｂ６）、アイソフォーム非選択的阻害剤（例えば、低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト）、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体（例えば、ＧＣ１００８及び変異体）、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ（例えば、ＴＧＦβ１／３阻害剤）並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）などのＴＧＦβ阻害剤は、投与前に測定されたレベルと比較して、ＴＧＦβ阻害剤治療の投与後に測定される、循環ＭＤＳＣレベルの低下及び／又は腫瘍関連免疫細胞のレベルの変化によって示されるとおり、ＴＧＦβ阻害剤の用量が、癌の免疫抑制を低下又は逆転させるのに十分であるように、癌を有する対象に投与される。一部の実施形態では、循環ＭＤＳＣ及び／又は腫瘍関連免疫細胞のレベルは、ＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えば、Ａｂ６）、アイソフォーム非選択的阻害剤（例えば、低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト）、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体（例えば、ＧＣ１００８及び変異体）、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ（例えば、ＴＧＦβ１／３阻害剤）並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）などのＴＧＦβ阻害剤療法をチェックポイント阻害剤療法と組み合わせて投与する前及び投与後に測定し、治療前に測定されたレベルと比較して、治療後に測定された循環ＭＤＳＣレベルの低下及び／又は腫瘍関連免疫細胞のレベルの変化は、癌の免疫抑制の低減又は逆転を示す。

【０１８６】

循環ＭＤＳＣレベルは、全血サンプル又は血液成分（例えば、ＰＢＭＣ）などのサンプル中で決定され得る。一部の実施形態では、サンプルは、新鮮な全血又は以前に凍結されていないサンプルの血液成分である。特定の実施形態では、循環ＭＤＳＣは、末梢血をヘパリン処理チューブに引き込むことによって収集され得る。例えば、当技術分野で既知の水簸法、磁気ビーズ分離法又は密度勾配遠心分離法（例えば、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ（登録商標））を用いて、末梢血から末梢血単核細胞を単離することができる。一部の実施形態では、ＣＤ１１ｂ＋マーカ選択によって（例えば、ＣＤ１１ｂ＋マイクロビーズ又は抗体を使用して）末梢血単核細胞からＭＤＳＣを分離することができる。Ｇ－ＭＤＳＣ及びＭ－ＭＤＳＣは、例えば、表面マーカ発現に基づくフローサイトメトリー／ＦＡＣＳ分析により、ＣＤ１１ｂ＋細胞からさらに識別され得る。例えば、ヒトＧ－ＭＤＳＣは、細胞表面マーカＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１５及びＣＤ６６ｂの発現により同定され得る。一部の実施形態では、ヒトＧ－ＭＤＳＣは、ＬＯＸ－１、アルギナーゼ及び／又は低レベルのＨＬＡ－ＤＲも発現し得る。ヒトＭ－ＭＤＳＣは、細胞表面マーカＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３及びＣＤ１４並びに一部の実施形態では低レベルのＨＬＡ－ＤＲの発現によって同定され得る。循環ＭＤＳＣの定量は、全ＣＤ４５＋細胞に対するパーセンテージとして

表すことができる。

【０１８７】

腫瘍関連免疫細胞マーカ

免疫細胞マーカは、癌が免疫排除表現型を有するかどうかを決定するために使用することができ、且つ／又は単独で若しくは循環ＭＤＳＣなどの他の循環バイオマーカと組み合わせて治療有効性又は治療レジメンを決定するのに使用することもできる。腫瘍が免疫排除表現型を有すると判定された場合、癌治療（ＣＢＴなど）だけでは有効ではない可能性がある。理論に束縛されるものではないが、腫瘍は、効果的なＣＢＴ治療単独の場合、腫瘍環境内に十分な細胞傷害性細胞がない可能性がある。従って、ＴＧＦβ阻害剤（本明細書に記載されるものなど）を用いた代替及び／又はアドオン療法は、免疫抑制を低減し、それにより単独で改善された治療を提供するか、又は耐性腫瘍を癌治療に対してより応答性にすることができる。一部の実施形態では、免疫細胞マーカは、生検（例えば、コア針生検）で測定される。一部の実施形態では、免疫排除腫瘍を有する患者は、１つ以上のＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤、例えばＡｂ６）を含む治療薬を投与される。一部の実施形態では、免疫排除腫瘍を有する患者は、１つ以上のＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤、例えばＡｂ６）阻害剤を含む治療薬を投与され、状態の改善（例えば、腫瘍への免疫細胞浸透の増加、腫瘍体積の減少など）についてモニターされる。一部の実施形態では、第１ラウンドの治療後に病状の改善を示す患者は、１回以上の追加ラウンドの治療薬を投与される。一部の実施形態では、対象は、１つ以上のＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤、例えばＡｂ６）と組み合わせて１つ以上の追加の治療薬を投与される。

【０１８８】

腫瘍／癌微小環境の免疫コンテクスチャを示すために使用され得る腫瘍関連免疫細胞として、限定されないが、細胞傷害性Ｔ細胞及び腫瘍関連マクロファージ（ＴＡＭ）並びに腫瘍関連ＭＤＳＣが挙げられる。細胞傷害性Ｔ細胞レベルを検出するためのバイオマーカとして、限定されないが、ＣＤ８糖タンパク質、グランザイムＢ、パーフォリン、及びＩＦＮγが挙げられ、このうちの後者の３つのマーカは、活性化された細胞傷害性Ｔ細胞も示し得る。ＴＡＭのレベルを測定するために、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ６８、ＣＤ１６３、ＣＤ２０６、及び他のバイオマーカなどのタンパク質マーカ、当技術分野で公知の任意の方法を使用することができる。特定の実施形態では、腫瘍微小環境内で検出された細胞傷害性Ｔ細胞、例えば活性化細胞傷害性Ｔ細胞のレベル増加は、免疫抑制の低減又は逆転を示し得る。例えば、腫瘍関連免疫細胞によるＣＤ８発現及びパーフォリン、グランザイムＢ、及び／又はＩＦＮγ発現の増加は、癌における免疫抑制の低減又は逆転を示し得る。特定の実施形態では、腫瘍微小環境内で検出されたＴＡＭ又は腫瘍関連ＭＤＳＣのレベル低下は、免疫抑制の減少又は逆転を示し得る。例えば、腫瘍関連免疫細胞によるＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ６８、ＣＤ１６３及びＣＤ２０６発現の低減は、癌における免疫抑制の低減又は逆転を示し得る。

【０１８９】

様々な実施形態では、細胞傷害性Ｔ細胞は、例えば、患者サンプル中で癌が免疫排除表現型を有するかどうかを決定するために使用することができ、且つ／又は単独で若しくは循環ＭＤＳＣなどの他のバイオマーカと組み合わせて治療有効性又は治療レジメンを決定するために使用することができる。例えば、腫瘍サンプル中のＣＤ８発現及び／又はＣＤ８発現の分布を使用することができる。例えば、ＣＤ８発現は、腫瘍中の分布（即ち腫瘍区画）、間質（即ち間質区画）及び縁部（即ち縁部区画；例えば、腫瘍と間質との間の約１０～１００μｍ、又は２５～７５μｍ、又は３０～６０μｍ、例えば５０μｍの領域を評価することにより決定される）を決定するために、サンプル中で検査され得る。特定の実施形態では、腫瘍、腫瘍内の間質、及び／又は縁部区画は、組織学的方法（例えば、病理学者評価、病理学者訓練機械学習アルゴリズム、及び／又は免疫組織化学）を用いて決定され得る。特定の実施形態では、腫瘍区画内のＣＤ８＋Ｔ細胞は、「腫瘍関連ＣＤ８＋細胞」と呼ばれることがある。特定の実施形態では、間質区画内のＣＤ８＋Ｔ細胞は、「

間質関連ＣＤ８＋細胞」と呼ばれることがある。特定の実施形態では、縁部区画内のＣＤ８＋Ｔ細胞は、「縁部関連ＣＤ８＋細胞」と呼ばれることがある。一部の実施形態では、ＣＤ８分布は、腫瘍巣（例えば、癌性増殖に見られる共通中心から延びる細胞の塊）、腫瘍巣を囲む間質、及び腫瘍巣とその周囲の間質との間の縁部において決定され得る（例えば、腫瘍巣と周囲の間質との間の約１０～１００μｍ、又は２５～７５μｍ、又は３０～６０μｍ、例えば５０μｍの領域を評価することによって決定される）。特定の実施形態では、腫瘍巣は、組織学的方法（例えば、病理学者評価、病理学者訓練機械学習アルゴリズム、及び／又は免疫組織化学）を用いて識別され得る。特定の実施形態では、１つ以上の腫瘍巣が腫瘍区画内に見出され得る。特定の実施形態では、腫瘍は、複数の（例えば、少なくとも５個、少なくとも１０個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも５０個又はそれを超える）の腫瘍巣を含み得る。デフォルトでは、文脈から別に指示されない限り、「間質」又は「間質区画」という用語は、腫瘍を取り囲む間質を指し、「縁部」又は「縁部区画」という用語は、腫瘍と腫瘍を取り囲む間質との間の縁部を指す。一部の実施形態では、腫瘍／腫瘍巣と周囲の間質との間の構造的界面は、イメージング分析によって決定される。従って、縁部は、いずれかの方向における界面を所定の距離、例えば１０～１００μｍだけ取り囲む領域として定義することができる（実施例３０を参照されたい）。一部の実施形態では、ＴＧＦβ１阻害剤（例えば、Ａｂ６）などのＴＧＦβ阻害剤を投与する前に、この分布を使用して、治療のために患者を選択し、及び／又は抗ＴＧＦβ阻害剤を含む抗癌療法に対する治療反応（例えば、抗腫瘍反応）の可能性を予測及び／又は決定することができる。例えば、間質及び縁部を含む腫瘍サンプル中に細胞傷害性Ｔ細胞が全く又はほとんど見られない（例えば、５％未満のＣＤ８＋Ｔ細胞）場合、これは、ＴＧＦ阻害剤療法から利益を受けない患者を示す可能性がある（理論に束縛されるものではないが、これは腫瘍に動員される免疫細胞がほとんどないためと考えられる）。同様に、高密度の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、５％を超えるＣＤ８＋Ｔ細胞）が腫瘍並びに間質及び縁部に観察される場合、この患者も、ＴＧＦ阻害剤療法からの利益が限定的である可能性がある（理論に束縛されるものではないが、これは、免疫細胞がすでに腫瘍に浸潤しているためと考えられる）。対照的に、特定の実施形態では、対象の癌は、免疫排除表現型を提示する可能性があり、その場合、細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）は、主に縁部内又はその付近、例えば、縁部と腫瘍との境界でクラスター化して観察され、腫瘍自体に有意に浸潤しない（例えば、腫瘍区画内で５％未満のＣＤ８＋Ｔ細胞並びに縁部及び／又は間質区画において１０％を超えるＣＤ８＋Ｔ細胞）。患者からのこのパターンを有する腫瘍サンプルは、ＴＧＦ阻害剤療法から利益を受ける可能性が高い患者を示し得る（理論に束縛されるものではないが、これは、腫瘍が免疫応答を積極的に抑制し、細胞傷害性Ｔ細胞の十分な侵入を阻止しているためであり、ＴＧＦ阻害剤によって部分的又は完全に逆転され得る）。

【０１９０】

一部の実施形態では、免疫排除表現型は、腫瘍関連区画内、例えば腫瘍内、腫瘍塊の外周付近の縁部内及び／又は腫瘍血管系の近傍における細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）のクラスタースコアを決定することによって特性決定される。一部の実施形態では、細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）のクラスタースコアは、特定の腫瘍関連区画における免疫細胞の均質性に基づいて決定することができ、その結果、細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）の高度に均一な分布を含む区画が、高いクラスタースコアを取得する。特定の実施形態では、免疫排除表現型を示す腫瘍は、腫瘍の外側（例えば、腫瘍塊の外周及び／又は腫瘍の血管系近傍）の密度と比較して、腫瘍の内部で低い密度の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）を特徴とし得る。一部の実施形態では、免疫排除表現型は、腫瘍に近接して（例えば、１００μｍ未満）位置する腫瘍間質中の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）を特徴とする。一部の実施形態では、免疫排除表現型は、腫瘍巣に浸潤し、腫瘍から近接距離（例えば、１００μｍ未満）に位置することができる細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）を特徴とする。一部の実施形態では、ＣＤ８＋Ｔ細胞は、例えば内皮マーカによって決定されるように、腫瘍内血

管付近の腫瘍内のクラスター内で観察することができる。比較すると、ＴＧＦベータ阻害剤によって免疫抑制を解消すれば、ＣＤ８＋細胞が血管周囲領域から浸潤し、恐らく腫瘍内で増殖することができるために、腫瘍内のＣＤ８＋Ｔ細胞のより均一な分布が観察され得る。

【０１９１】

特定の実施形態では、腫瘍浸潤性細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）のレベル及びそれらの活性化状態は、対象から得られた腫瘍生検サンプルから決定することができる。一部の実施形態では、腫瘍生検サンプル、例えばコア針生検は、治療薬投与の少なくとも２８日前及び少なくとも１００日後に取得され得る。一部の実施形態では、腫瘍生検サンプル、例えばコア針生検は、治療薬投与の約２１日～約４５日後に取得され得る。一部の実施形態では、腫瘍生検サンプルは、コア針生検を介して取得され得る。一部の実施形態では、増加が検出された場合、治療を継続する。

【０１９２】

特定の実施形態では、対象の癌の免疫表現型は、腫瘍生検サンプル中の細胞傷害性Ｔ細胞の細胞密度（例えば、平方ミリメートル又は他の定義される距離の２乗当たりのＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセント）を測定することによって決定され得る。特定の実施形態では、対象の癌の免疫表現型は、腫瘍内の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）の密度を腫瘍の外側の密度（例えば、縁部内の細胞、例えば、腫瘍塊の外周及び／又は腫瘍の血管系の近傍の細胞）と比較することによって決定され得る。一部の実施形態では、対象の癌の免疫表現型は、腫瘍内のＣＤ８＋リンパ球の割合を腫瘍の外部のものと比較することによって決定され得る。特定の実施形態では、対象の癌の免疫表現型は、腫瘍、間質、又は縁部における細胞傷害性Ｔ細胞のクラスター又は分散（例えば、他のＣＤ８＋Ｔ細胞を取り囲むＣＤ８＋Ｔ細胞の平均数）を比較することによって決定され得る。特定の実施形態では、対象の癌の免疫表現型は、間質における細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）から腫瘍までの平均距離を測定することによって決定され得る。特定の実施形態では、対象の癌の免疫表現型は、腫瘍巣への細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）浸透の平均深達度を測定することによって決定され得る。細胞数及び密度は、免疫染色、及びコンピュータ化された又は手動の測定プロトコルを用いて決定され得る。特定の実施形態では、細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）のレベルは、腫瘍生検サンプルの免疫組織化学的分析を用いて測定され得る。特定の実施形態では、細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）のレベルは、ＴＧＦβ療法を投与する少なくとも２８日前及び／又は少なくとも１００日後に決定され得る。特定の実施形態では、細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）のレベルは、ＴＧＦβ療法薬の投与から最大約４５日（例えば、約２１日～約４５日）後に決定され得る。一部の実施形態では、細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）のレベルは、ＴＧＦβ療法薬の投与から５、１０、１５、２０、２５、３０日若しくはそれを超える前及び／又は少なくとも５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０若しくは１５０日後（又はそれらの間の任意の時点）に決定される。

【０１９３】

一部の実施形態では、腫瘍の外部（例えば、腫瘍の外周及び／又は腫瘍の血管系の近傍）の細胞傷害性Ｔ細胞レベル（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）と比較して、腫瘍の内部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）のレベルが低い腫瘍は、免疫排除腫瘍として識別することができる。一部の実施形態では、免疫排除腫瘍は、腫瘍の内部と比較して、腫瘍間質中により高いレベルの細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）も有し得る。特定の実施形態では、免疫排除腫瘍は、腫瘍の内部と腫瘍の外部との細胞傷害性Ｔ細胞密度（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）の比を決定することにより識別することができ、この場合、上記比は１未満である。特定の実施形態では、免疫排除腫瘍は、腫瘍の内部の細胞傷害性Ｔ細胞密度と腫瘍縁部内の密度の比を決定することにより識別することができ、この場合、上記比は１未満である。特定の実施形態では、免疫排除腫瘍は、腫瘍の内部の細胞密度と腫瘍間質中の密度の比を決定することにより識別することができ、この場合、上記比

は１未満である。特定の実施形態では、免疫排除腫瘍は、腫瘍の内部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）の絶対数、パーセンテージ及び／又は密度を腫瘍の外部（例えば、縁部及び／又は間質）と比較することにより識別することができる。一部の実施形態では、免疫排除腫瘍において、腫瘍の外部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）の絶対数、パーセンテージ及び／又は密度は、腫瘍の内部の少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、７倍又は１０倍である。一部の実施形態では、免疫排除腫瘍は、腫瘍の内部に５％未満のＣＤ８＋Ｔ細胞を、また腫瘍縁部及び／又は間質中に１０％を超えるＣＤ８＋Ｔ細胞を含む。一部の実施形態では、免疫排除腫瘍は、区画別の細胞傷害性Ｔ細胞密度（例えば、腫瘍縁部及び／又は間質中の密度に対する腫瘍の内部のＣＤ８＋細胞の密度）の割合と、組織全体の細胞傷害性Ｔ細胞密度（例えば、腫瘍組織全体又は生検中のＣＤ８＋細胞に対する腫瘍の内部のＣＤ８＋細胞）の割合を比較することにより識別することができ、この場合、区画別の割合は、組織全体の割合より大きい。一部の実施形態では、腫瘍の外部の約１００μｍ以下の平均距離で細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）の細胞密度が増加した腫瘍を、免疫排除腫瘍として識別することができる。一部の実施形態では、細胞傷害性Ｔ細胞密度（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）を平均ＣＤ８＋クラススコアなどの１つ以上のパラメータと組み合わせて使用し得る。一部の実施形態では、腫瘍中５０％以下の平均ＣＤ８＋クラススコアは、免疫排除を示す。

【０１９４】

一部の実施形態では、腫瘍の外部（例えば、腫瘍の外周及び／又は腫瘍の血管系の近傍、例えば腫瘍縁部及び／又は間質内）のＣＤ８＋Ｔ細胞と比較して、腫瘍の内部に高いレベルのＣＤ８＋Ｔ細胞を有する腫瘍を、免疫炎症性腫瘍として識別することができる。一部の実施形態では、免疫炎症性腫瘍は、腫瘍内に５％を超えるＣＤ８＋Ｔ細胞を含む。

【０１９５】

一部の実施形態では、腫瘍の内側及び外側の両方に低レベルのＣＤ８＋Ｔ細胞を有する腫瘍は、免疫砂漠腫瘍として同定され得る。一部の実施形態では、免疫砂漠腫瘍は、腫瘍の内部に５％未満のＣＤ８＋Ｔ細胞を、また腫瘍縁部及び／又は間質に１０％未満のＣＤ８＋Ｔ細胞を含む。

【０１９６】

特定の実施形態では、対象の癌の免疫表現型は、腫瘍（例えば、１つ以上の腫瘍生検サンプル中の）の複数（例えば、少なくとも５個、少なくとも１５個、少なくとも２５個、少なくとも５０個又はそれを超える）の腫瘍巣について測定される平均パーセントＣＤ８陽性率（即ちＣＤ８＋リンパ球のパーセンテージ）により決定され得る。特定の実施形態では、所与の腫瘍巣の免疫表現型は、腫瘍巣の内部のＣＤ８陽性率を腫瘍巣の外部（例えば、腫瘍巣縁部及び／又は腫瘍巣間質内）のＣＤ８陽性率と比較することによって決定することができる。特定の実施形態では、腫瘍巣の内部のＣＤ８陽性率が５％を超える場合、腫瘍巣を免疫炎症性として識別することができる。特定の実施形態では、腫瘍巣の内部のＣＤ８陽性率が５％未満であり、且つ腫瘍巣縁部内のＣＤ８陽性率が５％を超える場合、腫瘍巣を免疫排除として識別することができる。特定の実施形態では、腫瘍巣の内部のＣＤ８陽性率が５％未満であり、且つ腫瘍巣縁部中のＣＤ８陽性率が５％未満である場合、腫瘍巣を免疫砂漠として識別することができる。特定の実施形態では、対象の癌は、分析される総腫瘍面積の５０％超が、免疫炎症性表現型を呈示する腫瘍巣を含む場合、免疫炎症性と識別され得る。特定の実施形態では、対象の癌は、分析される総腫瘍面積の５０％超が、免疫排除表現型を示す腫瘍巣を含む場合、免疫排除として識別され得る。特定の実施形態では、対象の癌は、分析される総腫瘍面積の５０％超が、免疫砂漠表現型を示す腫瘍巣を含む場合、免疫砂漠として識別され得る。特定の実施形態では、対象の癌は、同じ腫瘍から採取された２つ以上のサンプル（例えば、少なくとも３つのサンプル、例えば、４つのサンプル）からのＣＤ８陽性率の決定に基づいて識別することができる。

【０１９７】

特定の実施形態では、腫瘍生検サンプルは、コア針生検によって得ることができる。特定の実施形態では、３～５つのサンプル（例えば、４つのサンプル）を同じ腫瘍から採取

し得る。特定の実施形態では、針は、単一の軌道に沿って挿入され得、複数のサンプル（例えば、３～５つのサンプル、例えば４つのサンプル）は、同じ針軌道に沿った異なる腫瘍深達度で採取され得る。特定の実施形態では、異なる腫瘍深達度で採取されたサンプルを使用して、複数の腫瘍巣についての合計ＣＤ８陽性率を分析することができる。特定の実施形態では、これらのサンプルで決定された合計ＣＤ８陽性率は、腫瘍の残りの部分におけるＣＤ８陽性率を表し得る。特定の実施形態では、これらのサンプルで決定された合計ＣＤ８陽性率を使用して、対象の癌の免疫表現型を識別することができる。

【０１９８】

特定の実施形態では、対象の腫瘍の免疫表現型は、腫瘍中のＣＤ８＋細胞の絶対数、パーセンテージ、比、及び／又は密度と、腫瘍全体にわたる腫瘍巣についての合計ＣＤ８陽性率（即ちＣＤ８＋リンパ球のパーセンテージ）の複合的分析によって決定され得る。

【０１９９】

特定の実施形態では、癌が免疫排除表現型を呈示する対象は、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）の投与を含む治療に対してより応答性であり得る。一部の実施形態では、このような対象を、治療のために識別する。一部の実施形態では、このような対象に、ＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えば、Ａｂ６）、アイソフォーム非選択的阻害剤（例えば、低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト）、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体（例えば、ＧＣ１００８及び変異体）、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ（例えば、ＴＧＦβ１／３阻害剤）並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）などのＴＧＦ阻害剤を含む治療薬を投与する。

【０２００】

特定の実施形態では、癌が免疫排除表現型を示す対象は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えば、Ａｂ６）、アイソフォーム非選択的阻害剤（例えば、低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト）、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体（例えば、ＧＣ１００８及び変異体）、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ（例えば、ＴＧＦβ１／３阻害剤）並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）などのＴＧＦβ阻害剤と、追加の癌療法、例えばチェックポイント阻害剤を含む組合せ療法に対してより応答性であり得る。一部の実施形態では、追加の癌療法は、化学療法、放射線療法（放射線治療薬を含む）、癌ワクチン又はチェックポイント阻害剤、例えば抗ＰＤ－１、抗ＰＤ－Ｌ１若しくは抗ＣＴＬＡ－４抗体を含む免疫療法を含み得る。一部の実施形態では、チェックポイント阻害剤療法は、イピリムマブ（例えば、Ｙｅｒｖｏｙ（登録商標））；ニボルマブ（例えば、Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））；ペムブロリズマブ（例えば、Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標））；アベルマブ（例えば、Ｂａｖｅｎｃｉｏ（登録商標））；セミプリマブ（例えば、Ｌｉｂｔａｙｏ（登録商標））；アテゾリズマブ（例えば、Ｔｅｃｅｎｔｒｉｑ（登録商標））；及びデュルバルマブ（例えば、Ｉｍｆｉｎｚｉ（登録商標））からなる群から選択される。特定の実施形態では、癌が免疫排除表現型を示す対象は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えば、Ａｂ６）などのＴＧＦβ阻害剤と、追加の癌療法、例えばチェックポイント阻害剤とを含む組合せ療法を投与される。

【０２０１】

特定の実施形態では、癌が免疫排除表現型を示す対象は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えば、Ａｂ６）などのＴＧＦβ阻害剤と、チェックポイント阻害剤療法（例えば、ＰＤ１又はＰＤＬ１抗体）を含む組合せ療法に対してより応答性であり得る。一部の実施形態では、このような対象を、組合せ療法の施療のために識別する。一部の実施形態では、このような対象は、チェックポイント阻害剤療法を単独で受ける前に組合せ療法を施療するために識別される。一部の実施形態では、このような対象は、チェックポイント阻害剤療法

又はＴＧＦβ阻害剤のいずれかを単独で受ける前に組合せ療法を施療するために識別される。一部の実施形態では、このような対象は、治療未経験である。一部の実施形態では、このような対象は、以前にチェックポイント阻害剤療法を受けており、チェックポイント阻害剤療法に対して不応答性である。一部の実施形態では、このような対象は、免疫排除表現型を呈示する癌を有する。一部の実施形態では、このような対象は、以前にチェックポイント阻害剤療法を受けており、組合せ療法を直接実施される（例えば、チェックポイント阻害剤単独での治療を最初に試みる必要性を回避する）。一部の実施形態では、このような対象に、ＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えば、Ａｂ６）などのＴＧＦβ阻害剤と、追加の癌療法、例えば、ＰＤ１又はＰＤＬ１抗体を含む組合せ療法を実施する。

【０２０２】

一部の実施形態では、癌が免疫排除表現型を示す対象は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えばＡｂ６）などのＴＧＦβ阻害剤を含む治療のために選択され、且つ／又はそれらを含む治療薬の投与中及び／若しくは投与後にモニターされ得る。一部の実施形態では、患者の選択及び／又は治療有効性は、腫瘍の外部（例えば、縁部内）の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）のレベルと比較して、腫瘍の内部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）のレベルを測定することにより決定される。特定の実施形態では、単独又は追加の療法（例えば、チェックポイント阻害剤療法）と組み合わせたＴＧＦβ阻害剤療法薬（例えば、Ａｂ６）の投与後の腫瘍の外部（例えば、縁部及び／又は間質）に対する、腫瘍の内部の腫瘍浸潤性細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）のレベルの増加は、治療反応（例えば、抗腫瘍反応）を示し得る。例えば、治療前の腫瘍浸潤性細胞傷害性Ｔ細胞レベルと比較して、ＴＧＦβ阻害剤治療（例えば、Ａｂ６）後の腫瘍浸潤性細胞傷害性Ｔ細胞レベルの少なくとも１０％、１５％、２０％、２５％又はそれを超える増加は、治療反応（例えば、抗腫瘍反応）を示し得る。一部の実施形態では、免疫炎症性腫瘍巣を含む総腫瘍面積の少なくとも１０％、１５％、２０％、２５％又はそれを超える増加は、治療反応を示し得る。一部の実施形態では、腫瘍浸潤性細胞傷害性Ｔ細胞により発現されるパーフォリン若しくはグランザイムＢなどの細胞溶解タンパク質又はＩＦＮγなどの炎症誘発性サイトカインのレベルを測定して、腫瘍浸潤性細胞傷害性Ｔ細胞の活性化状態を決定することもできる。一部の実施形態では、細胞溶解タンパク質レベルの少なくとも１．５倍、又は２倍、又は５倍以上の増加は、治療反応（例えば、抗腫瘍反応）を示し得る。一部の実施形態では、ＩＦＮγレベルの少なくとも１．５倍、２倍、５倍又は１０倍以上の増加の変化は、治療反応（例えば、抗腫瘍反応）を示し得る。一部の実施形態では、腫瘍浸潤性細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）の増加が検出された場合、治療を継続する。

【０２０３】

特定の実施形態では、対象の腫瘍の免疫表現型は、腫瘍生検サンプル（例えば、コア針生検サンプル）から、例えば組織学的に、限定されないが、細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）の分布、間質区画に対する腫瘍区画中の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）のパーセンテージ、及び腫瘍縁部内の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）のパーセンテージなどの１つ以上のパラメータを用いて決定され得る。

【０２０４】

従来の針生検プロトコルによって採取されたサンプルは、針が挿入された腫瘍内の場所により、不注意なバイアスのリスクを有することを認識して、本開示は、腫瘍分析のために針生検を使用する改善された方法も提供する。本開示によれば、針生検に固有のバイアスのリスクは、隣接する腫瘍サンプル、例えば、隣接する腫瘍組織から（例えば、同じ腫瘍から）採取された少なくとも３つ、好ましくは４つのサンプルを収集することによって有意に低減することができる。これは、例えば、挿入の角度及び／又は深さを変更することにより、単一の針挿入点から行うことができる。針生検サンプルから調製されたいくつかの組織切片が、サンプル処理中にインタクトのまま維持されない可能性があること、及び腫瘍表現型を正確に表さない腫瘍組織の部分に針が挿入される可能性を考慮すれば、４つのサンプルの収集は、そのような制約事項を緩和するのに役立つと考えられ、精度向上

のためのより代表的な腫瘍表現型を提供する。

【０２０５】

特定の実施形態では、ＣＤ８免疫染色などの方法を用いて、細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）のその分布についてサンプルを分析し得る。特定の実施形態では、細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）の分布は、比較的均一であり得る（例えば、分布は、サンプル全体にわたって均質であり、例えば、腫瘍巣全体にわたるＣＤ８密度は、１０％以下の分散を有する）。一部の実施形態では、腫瘍巣（又は癌巣）は、癌性増殖の共通中心から延びる細胞の塊を指す。一部の実施形態では、腫瘍巣は、間質に散在する細胞を含み得る。特定の実施形態では、細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８Ｔ細胞）の均一な分布を有するサンプルなどのサンプルを分析して、腫瘍及び間質内の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）のパーセンテージを決定することができる。特定の実施形態では、腫瘍内の高いパーセンテージ（例えば、５％超）の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）及び間質内の低いパーセンテージ（例えば、５％未満）の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）は、炎症性腫瘍表現型を示し得る。特定の実施形態では、腫瘍及び間質の両方における低いパーセンテージ（例えば、腫瘍及び間質の合計ＣＤ８パーセンテージが５％未満）の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）は、低免疫原性腫瘍表現型（例えば、免疫砂漠表現型）を示し得る。特定の実施形態では、腫瘍内の低いパーセンテージ（例えば、５％未満）の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）及び間質内の高いパーセンテージ（例えば、５％超）の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）は、免疫排除腫瘍表現型を示し得る。特定の実施形態では、腫瘍：間質ＣＤ８比は、腫瘍内のＣＤ８パーセンテージを間質内のパーセンテージで割ることによって決定され得る。特定の実施形態では、１を超える腫瘍：間質ＣＤ８比は、炎症性腫瘍表現型を示し得る。特定の実施形態では、１未満の腫瘍：間質ＣＤ８比は、免疫排除腫瘍を示し得る。特定の実施形態では、細胞傷害性Ｔ細胞のパーセンテージは、ＣＤ８免疫染色の免疫組織化学的解析によって決定され得る。

【０２０６】

特定の実施形態では、サンプル、例えば、細胞傷害性Ｔ細胞の不均一な分布を有するサンプル（例えば、腫瘍巣全体のＣＤ８密度が１０％を超える分散を有する）を分析して、縁部：間質ＣＤ８比を決定することができる。特定の実施形態では、このような比は、腫瘍縁部内のＣＤ８密度を腫瘍間質内のＣＤ８密度で割ることにより算出され得る。特定の実施形態では、免疫排除腫瘍は、０．５を超え、且つ１．５未満の縁部：間質ＣＤ８比を示す。

【０２０７】

特定の実施形態では、１．５を超える縁部：間質ＣＤ８比を有するサンプルをさらに分析して、腫瘍深達度を評価することにより、免疫表現型を決定及び／又は確認する（例えば、腫瘍が免疫排除表現型を有するかどうかを決定及び／又は確認する）ことができる。特定の実施形態では、腫瘍深達度は、２０μｍ～２００μｍ（例えば、１００μｍ）単位で測定され得る。特定の実施形態では、腫瘍深達度は、病理学的分析及び／又はデジタル画像解析によって決定され得る。特定の実施形態では、有意な腫瘍深達度は、腫瘍縁部の深達度の約２倍又はそれより大きい距離により示され得る。特定の実施形態では、腫瘍サンプルは、１００μｍの腫瘍縁部深達度及び２００μｍを超える腫瘍深達度測定値を有し得、そのようなサンプルは、２を超える腫瘍深達度スコアを有し、従って、有意な腫瘍深達度を有することになる。特定の実施形態では、有意な腫瘍深達度は、腫瘍深達度を腫瘍縁部の深達度で割ることによって決定される２以上の比によって示され得る。特定の実施形態では、腫瘍深達度は、腫瘍縁部の深達度に対応する単位の増分で測定され得る。例えば、１００μｍの腫瘍縁部を有する腫瘍巣の腫瘍深達度は、１００μｍ単位の増分で測定され得る。特定の実施形態では、有意な腫瘍深達度を有する腫瘍サンプルは、細胞傷害性Ｔ細胞による浅い浸透を示し得る（例えば、５％を超えるＣＤ８Ｔ細胞を有する腫瘍サンプルは、１腫瘍深達度単位の増分を超える腫瘍浸透を示さない）。特定の実施形態では、浅いＣＤ８浸透を示す、腫瘍深達度が有意な腫瘍サンプルは、免疫排除腫瘍を示し得る。

【０２０８】
特定の実施形態では、腫瘍表現型分析は、図６３に示す例示的なフローチャートの任意の部分に従って、例えば、同図に示す全ての工程を用いて実施され得る。
【０２０９】
特定の実施形態では、癌が免疫排除表現型を示す対象を、ＴＧＦβ阻害剤療法（例えば、Ａｂ６などのＴＧＦβ１阻害剤）のために選択することができる。特定の実施形態では、癌が免疫排除表現型を示す対象は、ＴＧＦβ阻害剤療法（例えば、Ａｂ６などのＴＧＦβ１阻害剤）に対してより応答性であり得る。特定の実施形態では、癌が免疫排除表現型を示す対象は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えば、Ａｂ６）などのＴＧＦβ阻害剤と、第２の癌療法、例えば、チェックポイント阻害剤療法（例えば、ＰＤ１又はＰＤＬ１抗体）を含む組合せ療法に対して、より応答性であり得る。
【０２１０】
特定の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤療法（例えば、Ａｂ６などのＴＧＦβ１阻害剤）に対する応答は、前述したいずれかなどのパラメータを用いてモニター及び／又は決定され得る。特定の実施形態では、対応する腫瘍由来の対応する治療後サンプルと比較した、治療前腫瘍サンプルにおける細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）の分布の変化は、治療に対する治療反応を示し得る。特定の実施形態では、治療前及び治療後腫瘍サンプル間の腫瘍：間質ＣＤ８密度比の少なくとも１倍（例えば、１．１倍、１．２倍、１．３倍、１．４倍、１．５倍、１．６倍、１．７倍、１．８倍、１．９倍、２倍又はそれを超える）の変化（例えば、増加）は、治療反応を示し得る。特定の実施形態では、治療前及び治療後の腫瘍サンプル間の腫瘍：間質ＣＤ８密度比の１．５倍以上の変化（例えば、増加）は、治療反応を示し得る。特定の実施形態では、腫瘍：間質ＣＤ８密度比は、腫瘍巣内のＣＤ８細胞密度を腫瘍間質内のＣＤ８細胞密度で割ることによって決定され得る。特定の実施形態では、治療前及び治療後の腫瘍サンプル間の腫瘍縁部内の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）の密度の１．５倍以上の変化（例えば、増加）は、治療反応を示し得る。特定の実施形態では、治療前及び治療後の腫瘍サンプルの腫瘍深達度スコアの１．５倍以上の変化（例えば、増加）は、治療反応を示し得る。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤療法（例えば、Ａｂ６などのＴＧＦβ１阻害剤）は、例えば、ＰＤ－（Ｌ）１抗体などのチェックポイント阻害剤と組み合わせて使用した場合、治療前と比べて、少なくとも２倍、例えば、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍、２０倍又はそれを超える腫瘍内Ｔ細胞の数の増加を達成する。特定の実施形態では、治療反応が観察されれば、ＴＧＦβ阻害剤療法（例えば、Ａｂ６などのＴＧＦβ１阻害剤）による治療を、例えば、単独で、又は１つ以上の追加の癌療法薬と組み合わせて継続することができる。
【０２１１】
特定の実施形態では、治療前及び治療後のサンプルは、同等の腫瘍深達度スコア（例えば、治療前及び治療後の腫瘍サンプルの腫瘍深達度スコアの０．２５未満の分散）を有し、サンプルを分析して、前述したパラメータの１つ以上に従って治療反応を決定することができる。特定の実施形態では、治療前及び治療後サンプルは、同等の総及び区画面積（例えば、治療前及び治療後腫瘍サンプルの分析可能な総及び区画面積の０．２５未満の分散）を有し、サンプルを分析して、前述したパラメータの１つ以上に従って治療反応を決定することができる。
【０２１２】
一部の実施形態では、腫瘍サンプルの壊死パーセントは、組織学的及び／又はデジタル画像解析によって評価することができ、これは、腫瘍中の細胞傷害性細胞の存在又は活性を表している可能性がある。一部の実施形態では、腫瘍サンプルの壊死パーセントは、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）を投与された対象から採取した治療前及び治療後腫瘍サンプルで比較され得る。一部の実施形態では、治療前及び治療後サンプル間で壊死パーセント（例えば、腫瘍サンプル中の総組織面積に対する壊死面積の割合）の１０％を超える増加は、ＴＧＦβ阻害剤療法、例えば、Ａｂ６などのＴＧＦβ１阻害剤に対する治療反応

を示し得る。一部の実施形態では、腫瘍の中心又はその近傍における壊死パーセント（例えば、腫瘍縁部内部の壊死面積の割合）の１０％以上の増加は、治療反応を示し得る。

【０２１３】

特定の実施形態では、治療反応は、図６４に示す例示的なフローチャートの任意の部分に従って決定することができる。

【０２１４】

一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤療法後の腫瘍浸潤性細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）、特に活性化細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、Ａｂ６などのＴＧＦβ１阻害剤）のレベルの増加は、免疫浸潤又は「炎症性」微小環境への免疫排除腫瘍微小環境の転換を示し得る。例えば、治療前の腫瘍関連細胞傷害性Ｔ細胞レベルと比較して、ＴＧＦβ阻害剤治療（例えば、Ａｂ６）後の腫瘍関連細胞傷害性Ｔ細胞レベルの少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１５％、２０％、２５％又はそれを超える増加は、癌における免疫抑制の低減又は逆転を示し得る。一部の実施形態では、免疫炎症性腫瘍巣を含む腫瘍面積の少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１５％、２０％、２５％又はそれを超える増加は、癌における免疫抑制の低減又は逆転を示し得る。一部の実施形態では、腫瘍関連細胞傷害性Ｔ細胞によって発現されるパーフォリン若しくはグランザイムＢなどの細胞溶解タンパク質又はＩＦＮγなどの炎症誘発性サイトカインのレベルを測定して、腫瘍関連細胞傷害性Ｔ細胞の活性化状態を決定することができる。一部の実施形態では、細胞溶解タンパク質レベルの少なくとも１倍、１．１倍、１．２倍、１．３倍、１．４倍、１．５倍若しくは２倍又は５倍以上の増加は、癌における免疫抑制の低減又は逆転を示し得る。一部の実施形態では、ＩＦＮγレベルの少なくとも１．５倍、２倍、５倍又は１０倍以上の増加の変化は、癌における免疫抑制の低減又は逆転を示し得る。一部の実施形態では、癌においてこうした免疫抑制の低減又は逆転が検出されれば、ＴＧＦβ阻害剤療法（例えば、Ａｂ６などのＴＧＦβ１阻害剤）による治療を継続する。

【０２１５】

ＴＭＥに関連する免疫抑制性リンパ球には、ＴＡＭ及びＭＤＳＣが含まれる。腫瘍関連マクロファージのかなりの割合は、いわゆる「Ｍ２」型であり、免疫抑制性表現型を有する。これらの細胞のほとんどは、骨髄を起源とする単球由来細胞である。また、腫瘍内（例えば、腫瘍関連）のＴＡＭ及びＭＤＳＣなどの免疫抑制性細胞のレベルを測定して、癌における免疫抑制の状態を決定することもできる。一部の実施形態では、ＴＡＭのレベルの少なくとも１０％、１５％、２０％、２５％又はそれを超える低下は、免疫抑制の低減又は逆転を示し得る。特定の実施形態では、腫瘍関連免疫細胞は、ＴＧＦβ阻害剤治療（例えば、Ａｂ６）の前及び後に対象からの生検サンプルから測定され得る。特定の実施形態では、生検サンプルは、治療投与から２８日～１３０日後に取得され得る。

【０２１６】

「免疫コンテクスチャ」の概念は、腫瘍浸潤リンパ球（即ち腫瘍免疫微小環境又はＴＩＭＥ）の観点からＴＭＥを考察する。腫瘍免疫コンテクスチャは、ＴＭＥにおける免疫浸潤の局在化（例えば、空間的構成）及び／又は密度を指す。ＴＩＭＥは、通常、癌患者の臨床転帰と関連しており、癌の予後を推定するために使用されてきた（例えば、Ｆｒｉｄｍａｎ ｅｔ ａｌ．，（２０１７）Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ．１４（１２）：７１７－７３４）“Ｔｈｅ ｉｍｍｕｎｅ ｃｏｎｔｅｘｔｕｒｅ ｉｎ ｃａｎｃｅｒ ｐｒｏｇｎｏｓｉｓ ａｎｄ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ”を参照されたい）。典型的には、腫瘍からの組織サンプルをＴＩＬ分析のために収集する（例えば、コア針生検などの生検）。一部の実施形態では、ＴＩＬは、ＦＡＣＳに基づく方法によって分析される。一部の実施形態では、ＴＩＬは、免疫組織化学的（ＩＨＣ）法によって分析される。一部の実施形態では、ＴＩＬは、いわゆるデジタルパソロジーによって分析される（例えば、以下を参照されたい：Ｓａｌｔｚ ｅｔ ａｌ．，（２０１８）Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ ２３，１８１－１９３．“Ｓｐａｔｉａｌ ｏｒｇａｎｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｏｒｒｅｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｕｍｏｒ－ｉｎｆｉｌｔｒａｔｉｎｇ

lymphocytes using deep learning on pathology images.”）；（Scientific Reports 9：13341（2019）“A novel digital score for abundance of tumor infiltrating lymphocytes predicts disease free survival in oral squamous cell carcinoma”）。一部の実施形態では、腫瘍生検サンプルを様々なＤＮＡ及び／又はＲＮＡベースのアッセイ（例えばＲＮＡｓｅｑ又はＮａｎｏｓｔｒｉｎｇ）で使用して、腫瘍免疫コンテクスチャを評価することができる。理論に束縛されることは望まないが、細胞傷害性Ｔ細胞の増加及びＴＡＭの減少によって示されるような、癌／腫瘍における免疫抑制の低減又は逆転は、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）を単独で、又はチェックポイント阻害剤療法と組み合わせて投与された対象における治療有効性を予測し得る。

【０２１７】

循環／循環潜在型ＴＧＦβ

本開示によれば、循環潜在型ＴＧＦβは、標的結合バイオマーカとして使用され得る。活性化阻害剤が治療候補として選択される場合、例えば、そのようなバイオマーカを使用して、投与前及び投与後の循環潜在型ＴＧＦβのレベルをモニターすることにより、インビボ標的結合を評価又は確認することができる。一部の実施形態では、血液サンプル（例えば、血漿及び／又は血清）中の循環ＴＧＦβ１は、潜在型及び成熟形態の両方を含み、前者は、循環ＴＧＦβ１の大部分を表す。一部の実施形態では、全循環ＴＧＦβ（例えば、全循環ＴＧＦβ１）、即ち潜在型ＴＧＦβ及び成熟ＴＧＦβの両方を含むＴＧＦβを測定し得、これは、例えば、酸処理工程を用いて、その潜在型複合体から成熟増殖因子（例えばＴＧＦβ１）を遊離させ、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ＥＬＩＳＡ）アッセイを用いて検出することにより実施される。一部の実施形態では、ＴＧＦβの潜在型（例えばＴＧＦβ１）に特異的に結合する抗体などの試薬を使用して、循環潜在型ＴＧＦβ１を明確に測定することができる。一部の実施形態では、測定された循環ＴＧＦβ（例えば、循環ＴＧＦβ１）の大部分は、潜在型複合体から放出される。一部の実施形態では、測定される全循環ＴＧＦβ（例えば、循環ＴＧＦβ１）は、酸処理前に存在するあらゆる遊離ＴＧＦβ（例えば、ＴＧＦβ１）に加えて、解離した潜在型ＴＧＦβ（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）と同等であり、これは循環ＴＧＦβ１のごく一部にすぎないことが分かっている。一部の実施形態では、循環潜在型循環ＴＧＦβ（例えば、循環潜在型ＴＧＦβ１）のみが検出可能である。一部の実施形態では、循環潜在型ＴＧＦβ（例えば、循環潜在型循環ＴＧＦβ１）を測定する。

【０２１８】

様々な実施形態において、本開示は、ＴＧＦβ関連障害を治療する方法を提供し、ＴＧＦβ阻害剤を受ける患者から得られたサンプル中（例えば、患者の血液、例えば、血漿及び／又は血清中）の循環ＴＧＦβのレベル、例えば、循環潜在型ＴＧＦβ（例えば、ＴＧＦβ１）のレベルをモニターすることを含む。特定の実施形態では、循環ＴＧＦβ、例えば、循環潜在型ＴＧＦβ（例えば、ＴＧＦβ１）は、対象から採取された血漿サンプル中で測定され得る。特定の実施形態では、血漿からのＴＧＦβ、例えば、循環潜在型ＴＧＦβ（例えば、ＴＧＦβ１）を測定することにより、血清調製及び／又は処理中に観察されるようなＴＧＦβを不注意に活性化するリスクを低減し得る。従って、本開示は、対象の癌、骨髄線維症及び線維症などの疾患の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤を含み、前記治療は、対象から採取された血漿サンプルからの循環ＴＧＦβレベルを測定する工程を含む。このようなサンプルは、こうした疾患を治療するためのＴＧＦβ阻害剤の投与前及び／又は投与後に採取され得る。

【０２１９】

循環潜在型ＴＧＦβのレベルは、単独で、又は本明細書に開示される１つ以上のバイオマーカ（例えば、ＭＤＳＣ）と一緒にモニターすることができる。特定の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、単独で、又は追加の癌療法と一緒に投与することができる。一部の実

施形態では、治療薬は、ＴＧＦβ関連癌又は骨髄増殖性障害に罹患している対象に投与することができる。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、本開示に包含されるＴＧＦβ１選択的抗体又はその抗原結合断片（例えば、Ａｂ６）である。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、アイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤（例えば、低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８及び変異体、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体及びリガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤）である。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、インテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／又はＴＧＦβ３の選択的阻害）である。一部の実施形態では、追加の癌療法は、化学療法、放射線療法（放射線治療薬を含む）、癌ワクチン又はチェックポイント阻害剤療法、例えば、抗ＰＤ－１、抗ＰＤ－Ｌ１若しくは抗ＣＴＬＡ－４抗体などの免疫療法を含み得る。一部の実施形態では、チェックポイント阻害剤療法は、イピリムマブ（例えば、Ｙｅｒｖｏｙ（登録商標））；ニボルマブ（例えば、Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））；ペムブロリズマブ（例えば、Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標））；アベルマブ（例えば、Ｂａｖｅｎｃｉｏ（登録商標））；セミプリマブ（例えば、Ｌｉｂｔａｙｏ（登録商標））；アテゾリズマブ（例えば、Ｔｅｃｅｎｔｒｉｑ（登録商標））；及びデュルバルマブ（例えば、Ｉｍｆｉｎｚｉ（登録商標））からなる群から選択される。

【０２２０】

様々な実施形態において、循環潜在型ＴＧＦβ（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）は、対象から得られたサンプル（例えば、全血又は血液成分）中で測定され得る。様々な実施形態において、循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）は、対象へのＴＧＦβ阻害剤の投与後１、２、３、４、５、６、７、８、１０、１２、１４、１６、１８、２１、２２、２５、２８、３０、３５、４０、４５、４８、５０又は５６日以内、例えば治療用量のＴＧＦβ阻害剤の投与から最大５６日後に測定することができる。様々な実施形態において、循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）は、治療用量のＴＧＦβ阻害剤の投与から約８～約６７２時間後に測定され得る。様々な実施形態において、循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）は、治療用量のＴＧＦβ阻害剤の投与から約７２～約２４０時間（例えば、約７２～約１６８時間、約８４～約１５６時間、約９６～約１４４時間、約１０８～約１３２時間）後に測定され得る。様々な実施形態において、循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）は、治療用量のＴＧＦβ阻害剤の投与から約１２０時間後に測定され得る。一部の実施形態では、循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）は、当技術分野で公知の任意の方法（例えば、ＥＬＩＳＡ）によって測定され得る。好ましい実施形態では、循環ＴＧＦβレベルは、血漿サンプルから測定される。

【０２２１】

様々な実施形態において、癌又は他のＴＧＦ関連障害を治療する方法は、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、抗ＴＧＦβ１抗体）を、それが必要な患者に投与する工程と、阻害剤による標的結合のレベルを確認する工程とを含む。一部の実施形態では、標的結合のレベルの決定は、ＴＧＦβ阻害剤を受けている患者（例えば、患者の血液中又は血液成分中）から得られたサンプル中の循環潜在型ＴＧＦβ（例えば、ＴＧＦβ１）のレベルを決定することを含む。一部の実施形態では、ＴＧＦ阻害剤の投与後の循環潜在型ＴＧＦβ（例えば、ＴＧＦβ１）の増加は、標的結合を示す。一部の実施形態では、ＴＧＦ阻害剤の投与後の循環潜在型ＴＧＦβ（例えば、ＴＧＦβ１）の、少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、少なくとも１０倍又はそれを超える増加は、標的結合を示す。様々な実施形態において、本開示は、循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、ＴＧＦβ１レベル）を用いて、治療反応を予測すると共に、さらなる治療決定を通知する（例えば、増加が観察された場合に治療の継続により）方法も提供する。一部の実施形態では、標的結合が検出された場合、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、抗ＴＧＦβ１抗体）の追加用量を

投与する。好ましい実施形態では、循環ＴＧＦβレベルは、血漿サンプルから測定する。

【０２２２】

本開示の一態様では、循環潜在型ＴＧＦβのレベルを決定して、本明細書に記載されるＴＧＦβ１選択的阻害剤などのＴＧＦβ阻害剤を投与された対象における治療を通知し、また治療有効性を予測する。特定の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）は、投与されるＴＧＦβ１阻害の量が、ベースライン循環潜在型ＴＧＦβレベルと比較して、循環潜在型ＴＧＦβ（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）のレベルを増加させるのに十分であるように、単独で、又は追加の癌療法、例えば、チェックポイント阻害剤療法と同時期に（例えば、同時に）、個別に又は順次投与される。循環潜在型ＴＧＦβレベルは、各治療前又は後に測定され得、その結果、治療後の循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）の増加は、治療有効性を示す。例えば、循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）は、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）の投与前及び後に測定することができ、治療後の循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）の増加は、治療有効性を予測する。一部の実施形態では、増加が検出された場合に治療を継続する。特定の実施形態では、循環潜在型ＴＧＦβレベルは、本明細書に記載されるＴＧＦβ１阻害剤などのＴＧＦβ阻害剤の１回目用量の投与前及び後に測定することができ、投与後の循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）の増加は、治療有効性を予測し、さらにＴＧＦβ阻害剤の２回目又はそれ以降の用量の投与の根拠となる。一部の実施形態では、循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）は、同時期に（例えば、同時に）、個別に又は順次投与されるＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えば、Ａｂ６）などのＴＧＦβ阻害剤と追加の治療（例えば、チェックポイント阻害剤療法）の併用治療前及び後に測定され得、治療後の循環潜在型ＴＧＦβレベルの変化は、治療有効性を予測する。一部の実施形態では、増加が検出された場合に治療を継続する。一部の実施形態では、併用治療後の循環潜在型ＴＧＦβレベルの増加は、治療の継続の根拠となり得る。好ましい実施形態では、循環ＴＧＦβレベルは、血漿サンプルから測定する。

【０２２３】

様々な実施形態において、本開示は、ＴＧＦβ関連障害を有する対象に治療有効量のＴＧＦβ阻害剤を投与することを含む、ＴＧＦβ関連障害の治療方法を包含し、治療有効量は、循環潜在型ＴＧＦβ（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）のレベルを増加させるのに十分な量である。特定の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ活性化阻害剤である。特定の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１阻害剤（例えば、Ａｂ６）である。特定の実施形態では、循環潜在型ＴＧＦβは、潜在型ＴＧＦβ１である。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）の治療有効量は、１用量当たり０．１～３０ｍｇ／ｋｇである。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）の治療有効量は、１用量当たり１～３０ｍｇ／ｋｇである。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）の治療有効量は、１用量当たり５～２０ｍｇ／ｋｇである。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）の治療有効量は、１用量当たり３～１０ｍｇ／ｋｇである。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）の治療有効量は、１用量当たり１～１０ｍｇ／ｋｇである。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）の治療有効量は、１用量当たり２～７ｍｇ／ｋｇである。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）の治療有効量は、１用量当たり約２～６ｍｇ／ｋｇである。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）の治療有効量は、１用量当たり約１ｍｇ／ｋｇである。一部の実施形態では、用量は、約３週間毎に投与される。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）は、毎週、２週間毎、３週間毎、４週間毎、毎月、６週間毎、８週間毎、隔月、１０週間毎、１２週間毎、３ヶ月毎、４ヶ月毎、６ヶ月毎、８ヶ月毎、１０ヶ月毎、又は年に１回、投与される。好ましい実施形態では、循環ＴＧＦβレベルは、血漿サンプルから測定する。

【０２２４】

様々な実施形態において、患者から採取された血液サンプル中の総循環ＴＧＦβ１（例えば、循環潜在型ＴＧＦβ１）は、ベースライン時に約２～２００ｎｇ／ｍＬの範囲であ

り得るが、測定量は、個体、健康状態及び採用されている具体的なアッセイにより変動する。特定の実施形態では、患者から採取された血液サンプル中の総循環ＴＧＦβ１（例えば、循環潜在型ＴＧＦβ１）は、約１ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ（例えば、約１０００ｐｇ／ｍＬ～約７０００ｐｇ／ｍＬ）の範囲であり得る。特定の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）の投与後の循環潜在型ＴＧＦβ（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）のレベルは、投与前の循環潜在型ＴＧＦβレベルと比較して少なくとも１．５倍（例えば、少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、少なくとも１０倍又はそれを超えて）増加する。好ましい実施形態では、循環ＴＧＦβレベルは、血漿サンプルから測定する。

【０２２５】

特定の実施形態では、循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）を用いて、ＴＧＦβ阻害剤療法（例えば、ＴＧＦβ活性化阻害剤、例えばＡｂ６）を受けている対象におけるＴＧＦβ阻害剤の標的結合及び薬理学的活性をモニターすることができる。特定の実施形態では、循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、潜在型ＴＧＦβ１レベル）は、ＴＧＦβ阻害剤の１回目用量（例えば、Ａｂ６）の投与前及び投与後に測定され得、その結果、投与後の循環潜在型ＴＧＦβレベルの少なくとも１．５倍（例えば、少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、少なくとも１０倍又はそれを超える）の増加は、標的結合（例えば、ヒト大型潜在型ｐｒｏＴＧＦｂ１複合体へのＴＧＦβ阻害剤の結合）を示す。特定の実施形態では、循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）は、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）の１回目用量投与前及び後に測定され得、その結果、投与後の循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）の増加は、治療有効性を示す。特定の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）の投与後に循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）の増加が検出されれば、治療を継続する。好ましい実施形態では、循環ＴＧＦβレベルは、血漿サンプルから測定する。

【０２２６】

一部の実施形態では、循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）は、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）の１回目用量の投与前及び後に測定され得、投与後の循環潜在型ＴＧＦβレベル（例えば、潜在型ＴＧＦβ１）の増加は、標的結合及び／若しくは治療反応を示し、且つ／又はさらにＴＧＦβ阻害剤の２回目若しくはそれ以降の用量の投与の根拠となる。別の実施形態では、循環潜在型ＴＧＦβレベルは、チェックポイント阻害剤療法とＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えばＡｂ６）などのＴＧＦβ阻害剤を含む併用治療の１回目用量の投与前及び後に測定することができ、投与後の循環潜在型ＴＧＦβレベルの増加は、標的結合及び／若しくは治療反応を示し、且つ／又はさらに治療の継続の根拠となる。様々な実施形態において、組合せ療法は、チェックポイント阻害剤療法と、ＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えば、Ａｂ６）、アイソフォーム非選択的阻害剤（例えば、低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト）、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体（例えば、ＧＣ１００８及び変異体）、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）などのＴＧＦβ阻害剤と、を含む。好ましい実施形態では、循環ＴＧＦβレベルは、血漿サンプルから測定する。

【０２２７】

免疫安全性

サイトカインは正常な免疫応答において重要な役割を果たすが、免疫系が過活動になるようにトリガーされると、サイトカイン産生の正のフィードバックループが「サイトカインストーム」又は高サイトカイン血症を招き得るが、これは、過剰なサイトカイン産生が

免疫応答を引き起こし、それが、臓器、特に肺及び腎臓に損傷を与え、さらに死に至る状況である。このような状態は、血清中で著しく増加した炎症誘発性サイトカインを特徴とする。過去には、健康なボランティアにおける抗ＣＤ２８モノクローナル抗体ＴＧＮ１４１２の第１相試験は、炎症誘発性サイトカインの予想外の全身性及び迅速な誘導により、生命を脅かす「サイトカインストーム」応答をもたらした（Ｓｕｎｔｈａｒａｌｉｎｇａｍ Ｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ．２００６ Ｓｅｐ ７；３５５（１０）：１０１８－２８）。この事例は、Ｔ細胞の薬理学的刺激に伴う潜在的な危険性に対する認識を高めるきっかけとなった。

【０２２８】

ＴＧＦβ指向療法は、特定のＴ細胞受容体又はそのリガンドを標的化しないが、本開示の出願人は、例えば、インビトロサイトカイン放出アッセイ、ＴＧＦβ阻害剤で処置された非ヒト霊長類の血漿サンプルからのインビボサイトカイン測定、及びヒト血小板を用いた血小板アッセイを含む免疫安全性評価を実施することが賢明であると判断した。例示的なこうしたアッセイを本明細書の実施例２３に記載する。

【０２２９】

一部の実施形態では、サイトカインＩＬ－２、ＴＮＦα、ＩＦＮγ、ＩＬ－１β、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）及びＩＬ－６の１つ以上は、例えば、健康なドナーからの末梢血単核球（ＰＢＭＣ）構成成分に対する曝露によってアッセイすることができる。本明細書に開示される抗体、例えば、Ａｂ６に対する曝露後のサイトカイン応答を、対照、例えばＩｇＧアイソタイプ陰性対照抗体への曝露後の放出と比較することができる。サイトカイン活性化は、プレート結合及び／又は可溶性アッセイフォーマットで評価することができる。ＩＦＮγ、ＩＬ－２、ＩＬ－１β、ＴＮＦα、ＩＬ－６及びＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）のレベルは、陰性対照における活性化の１０倍、例えば８、６、４又は２倍を超えるべきではない。一部の実施形態では、また陽性対照を用いて、サンプル中の、例えば、ＰＢＭＣ中のサイトカイン活性化を確認することもできる。一部の実施形態では、これらのインビトロサイトカイン放出結果を、インビボで、例えば、サル毒物学試験、例えば、実施例２４に記載されるような４週間ＧＬＰ反復投与サル試験などの動物モデルでさらに確認することができる。

【０２３０】

ヒト血小板は、ＧＡＲＰを発現することが報告されており、これは、ＴＧＦβ１ ＬＬＣを形成することができる（Ｔｒａｎ ｅｔ ａｌ．，２００９．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．１０６（３２）：１３４４５－１３４５０）。一部の実施形態では、本明細書に開示される抗体、例えば、Ａｂ６は、血小板に有意に結合せず、且つ／又はそれを有意に活性化しない。一部の実施形態では、血小板活性化は、実施例２３に記載されるように、インビトロで評価される。一部の実施形態では、血小板凝集、結合及び活性化は、健康なドナーからのヒト全血又は血小板が豊富な血漿中で評価することができる。本明細書に開示される抗体、例えばＡｂ６に対する曝露後の血小板凝集及び結合を陰性対照、例えば生理食塩水又は参照サンプル、例えば緩衝溶液に対する曝露と比較し得る。特定の実施形態では、血小板凝集及び結合は、陰性対照における凝集の１０％以下である。一部の実施形態では、本明細書に開示される抗体、例えばＡｂ６に対する曝露後の血小板活性化を陽性対照、例えばアデノシン二リン酸（ＡＤＰ）に対する曝露と比較し得る。血小板の活性化状態は、フローサイトメトリーにより検出可能な活性化マーカ、例えばＣＤ６２Ｐ（Ｐ－セレクチン）及びＧＡＲＰの表面発現によって決定され得る。血小板活性化は、陰性対照における活性化の１０％以下であるべきである。一部の実施形態では、インビトロ血小板応答結果は、インビボで、例えば、サル毒物学試験、例えば、４週間ＧＬＰ反復投与サル試験などの動物モデルでさらに確認することができる。

【０２３１】

一部の実施形態では、治療用途のための抗体又はその抗原結合断片の選択は、本明細書に記載の１つ以上の基準を満たす抗体又は抗原結合断片を識別する工程と；抗体又は断片の有効量を決定するために好適な前臨床モデルにおけるインビボ有効性試験を実施する工

程と；安全又は有毒な抗体の量（例えば、ＭＴＤ、ＮＯＡＥＬ、又は安全性／毒性を評価するための当技術分野で認められた任意のパラメータ）を決定するために、好適なモデルにおいてインビボ安全性／毒性試験を実施する工程と；少なくとも３倍の治療濃度域（好ましくは６倍、より好ましくは１０倍の治療濃度域、さらに好ましくは１５倍の治療濃度域）をもたらす抗体又は断片を選択する工程とを含み得る。特定の実施形態では、インビボ有効性試験は、ヒトの状態を再現する２つ以上の好適な前臨床モデルにおいて実施される。一部の実施形態では、このような前臨床モデルは、ＴＧＦβ１陽性癌を含み、これは任意選択で、免疫抑制性腫瘍を含み得る。免疫抑制性腫瘍は、ＣＢＴ、化学療法及び放射線療法（放射線治療薬を含む）などの癌療法に対して耐性であり得る。一部の実施形態では、前臨床モデルは、ＭＢＴ－２、クラウドマンＳ９１及びＥＭＴ６腫瘍モデルから選択される。

【０２３２】

治療用途のための抗体又はその抗原結合断片の識別は、免疫安全性アッセイの実施をさらに含み得、これは、限定するものではないが、サイトカイン放出の測定並びに／又は血小板結合、活性化及び／若しくは凝集に対する抗体若しくは抗原結合断片の影響の決定を含み得る。特定の実施形態では、サイトカイン放出は、ＰＢＭＣを用いてインビトロで、又は非ヒト霊長類などの前臨床モデルを用いてインビボで測定することができる。特定の実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、免疫安全性評価におけるＩｇＧ対照サンプル中のレベルと比較して１０倍以下のＩＬ－６、ＩＦＮγ及び／又はＴＮＦαレベルの放出のみを誘導する。特定の実施形態では、血小板結合、活性化及び凝集の評価は、ＰＢＭＣを用いてインビトロで実施され得る。一部の実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、免疫安全性評価におけるバッファー又はアイソタイプ対照と比較して１０％以下の血小板結合、活性化及び／又は凝集の増加のみを誘導する。

【０２３３】

選択された抗体又は断片を、抗体又は断片を含む医薬組成物の製造に使用することができる。このような医薬組成物は、本明細書に記載される対象におけるＴＧＦβ適応症の治療に使用され得る。例えば、ＴＧＦβ適応症は、増殖性障害、例えば、ＴＧＦβ１陽性癌であり得る。従って、本発明は、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物の製造方法を含み、この方法は、ＴＧＦβ阻害剤を選択する工程を含み、ＴＧＦβ阻害剤は、免疫安全性について試験され、これは、サイトカイン放出アッセイを含み、任意選択で血小板アッセイをさらに含む免疫安全性評価により評価される。本方法により選択されたＴＧＦβ阻害剤は、許容できないレベルのサイトカイン放出をトリガーしない（例えば、ＩｇＧ対照などの対照と比較して、１０倍以下、より好ましくは２．５倍以内）。同様に、本方法により選択されたＴＧＦβ阻害剤は、許容できないレベルの血小板凝集、血小板活性化及び／又は血小板結合を引き起こさない。続いて、こうしたＴＧＦβ阻害剤を、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物の商業的生産のために、例えば２５０Ｌ以上、例えば、１０００Ｌ、２０００Ｌ、３０００Ｌ、４０００Ｌ以上の大規模で製造する。

【０２３４】

癌／悪性腫瘍

多様な癌が、ＴＧＦβ活性、例えば、ＴＧＦβ１活性を伴うため、本開示の抗体、組成物、及び方法で治療することができる。本明細書で使用される場合、「癌」という用語は、種々の悪性新生物、任意選択でＴＧＦβ１陽性細胞と関連する悪性新生物のいずれかを含む。このような悪性新生物は、周囲の組織に侵入し、新たな身体部位に転移する傾向がある未分化細胞の増殖を特徴とし、またそうした悪性新生物の増殖を特徴とする病的状態も指す。ＴＧＦβ１の供給源は、多様であると考えられ、悪性（癌）細胞自体並びにそれらの周囲又は支持細胞／組織（例えば、細胞外マトリックス、種々の免疫細胞及びそれらの任意の組合せなど）を含み得る。

【０２３５】

本開示に従って治療することができる癌の例として、限定するものではないが、癌腫、リンパ腫、芽球腫、肉腫、白血病又はリンパ系悪性腫瘍が挙げられる。こうした癌のより

具体的な例として、限定するものではないが、以下のものが挙げられる：膀胱癌（例えば、尿路上皮癌（ＵＣ）、転移性ＵＣ（ｍＵＣ）を含む；筋肉浸潤性膀胱癌（ＭＩＢＣ）及び非筋肉浸潤性膀胱癌（ＮＭＩＢＣ））；腎臓又は腎癌（例えば、腎細胞癌（ＲＣＣ））；小細胞肺癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、転移性ＮＳＣＬＣ、肺の腺癌、及び肺の扁平上皮癌などの肺癌；尿路の癌；乳癌（例えば、ＨＥＲ２＋乳癌並びにエストロゲン受容体（ＥＲ－）、プロゲステロン受容体（ＰＲ－）及びＨＥＲ２（ＨＥＲ２－）陰性であるトリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ））；去勢抵抗性前立腺癌（ＣＲＰＣ）などの前立腺癌；腹膜の癌；肝細胞癌；胃腸癌及び胃腸間質癌を含む胃癌；食道癌、膵臓癌（例えば、膵管腺癌（ＰＤＡＣ））；膠芽腫；子宮頸癌；卵巣癌；肝臓癌（例えば、肝細胞癌（ＨＣＣ））；ヘパトーマ；結腸癌；直腸癌；大腸癌；子宮内膜又は子宮癌；唾液腺癌；前立腺癌；外陰癌；甲状腺癌；肝癌；肛門癌；陰茎癌；表在性拡大型黒色腫、悪性黒子型黒色腫、末端黒子型黒色腫、結節型黒色腫、及び転移性黒色腫などの黒色腫；多発性骨髄腫及びＢ細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）を含む；小リンパ球（ＳＬ）ＮＨＬ；中悪性度／濾胞性ＮＨＬ；中悪性度びまん性ＮＨＬ；高悪性度免疫芽球性ＮＨＬ；高悪性度リンパ芽球ＮＨＬ；高悪性度小型非切れ込み核細胞性ＮＨＬ；巨大腫瘤病変ＮＨＬ；マントル細胞リンパ腫；ＡＩＤＳ関連リンパ腫；及びワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症）；慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）；急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）；急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）；有毛細胞白血病；慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）；移植後リンパ増殖性障害（ＰＴＬＤ）；及び骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）並びに神経皮膚症候群に関連する血管増殖異常、浮腫（脳腫瘍に関連するものなど）、メイグス症候群、脳腫瘍、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）及び関連する転移を含む頭頸部癌。一部の実施形態では、癌は、膀胱癌（例えば、ＵＣ、例えば、ｍＵＣ）である。特定の実施形態では、本開示に従って治療され得る癌は、高い腫瘍変異負荷を有するものを含む。

【０２３６】

「ＴＧＦβ１陽性」としての癌の断定的判定は、本明細書に記載の治療方法を実施するために必要ではないが、いくつかの実施形態に包含される。典型的には、特定の癌タイプは、信頼できるエビデンスに基づいて、ＴＧＦβ１シグナル伝達と関連していることが分かっているか又は疑われる。

【０２３７】

癌は、限局性（例えば、固形腫瘍）又は全身性であり得る。本開示に関連して、「限局性」（「限局性腫瘍」のように）という用語は、全身性疾患（例えば、いわゆる液体腫瘍又は血液癌）とは対照的に、固形悪性腫瘍などの解剖学的に単離された又は単離可能な異常／病変を指す。ある種の白血病（例えば、骨髄線維症）及び多発性骨髄腫などの特定の癌は、例えば、疾患に対して限局性要素（例えば骨髄）と全身性要素（例えば循環血球）の両方を有し得る。一部の実施形態では、癌は、血液悪性腫瘍などの全身性であり得る。本開示に従って治療され得る癌は、ＴＧＦβ１陽性であり、限定はされないが、肛門、膀胱、胆管、骨、脳、乳房、子宮頸部、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（胸部）、口腔、卵巣、膵臓、陰茎、前立腺、皮膚、小腸、胃、脊髄、尾骨、睾丸、甲状腺及び子宮に見出される癌又は腫瘍など、あらゆるタイプのリンパ腫／白血病、癌腫及び肉腫を含む。一部の実施形態では、癌は、局所進行固形腫瘍及び転移性癌などの進行癌であり得る。

【０２３８】

本開示に包含される抗体又はその抗原結合断片は、限定されないが、以下を含む癌の治療に使用することができる：骨髄線維症、黒色腫、アジュバント黒色腫、腎細胞癌（ＲＣＣ）、膀胱癌、大腸癌（ＣＲＣ）（例えば、マイクロサテライト安定性ＣＲＣ）、結腸癌、直腸癌、肛門癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ）、ＨＥＲ２陰性乳癌、ＨＥＲ２陽性乳癌、ＢＲＣＡ変異乳癌、血液悪性腫瘍、非小細胞癌、非小細胞肺癌／癌腫（ＮＳＣＬＣ）、小細胞肺癌／癌腫（ＳＣＬＣ）、進展型小細胞肺癌（ＥＳ－ＳＣＬＣ）、リンパ腫（古典的ホジキン及び非ホジキン）、原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＣＬ）、Ｔ細胞リンパ腫、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、組織球性肉腫、濾胞樹状

細胞肉腫、指状嵌入樹状細胞肉腫、骨髄腫、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、頭頸部癌、尿路上皮癌、メルケル細胞癌（例えば、転移性メルケル細胞癌）、メルケル細胞皮膚癌、高いマイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）を有する癌、ミスマッチ修復機能欠損（ｄＭＭＲ）を有する癌、中皮腫、胃癌、胃食道接合部癌（ＧＥＪ）、胃腺癌、神経内分泌腫瘍、胃腸間質腫瘍（ＧＩＳＴ）、胃噴門部腺癌、腎癌、胆道癌、胆管癌、膵臓癌、前立腺癌、腺癌、扁平上皮癌、非扁平上皮癌、皮膚扁平上皮癌（ＣＳＣＣ）、卵巣癌、子宮内膜癌、卵管癌、子宮頸癌、腹膜癌、胃癌、脳腫瘍、悪性神経膠腫、膠芽腫、膠肉腫、神経芽細胞腫、甲状腺癌、副腎皮質癌、口腔上皮内新生物、食道癌、鼻腔及び副鼻腔扁平上皮癌、鼻咽頭癌、唾液腺癌、肝臓癌、及び肝細胞癌（ＨＣＣ）。しかしながら、例えば生検によって決定されるように、ＴＧＦβ１が過剰発現しているか、又は少なくとも優勢なアイソフォームであるいずれの癌（例えば、そのような癌を有する患者）も、本開示に従うＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的阻害剤を用いて治療され得る。

【０２３９】

癌の場合、ＴＧＦβ（例えば、ＴＧＦβ１）は、増殖促進性又は増殖阻害性のいずれであり得る。一例として、膵臓癌の場合、ＳＭＡＤ４野生型腫瘍は、ＴＧＦβに応答して阻害された増殖を経験し得るが、疾患が進行するにつれて、典型的には、構成的に活性化されたＩＩ型受容体が存在する。加えて、ＳＭＡＤ４－ヌル膵臓癌もある。一部の実施形態では、本開示の抗体、その抗原結合部分、及び／又は組成物は、癌の１つ以上の形態においてユニークに機能するＴＧＦβシグナル伝達経路の成分を選択的に標的化するように設計される。白血病又は白血球（ｗｈｉｔｅ　ｂｌｏｏｄ　ｃｅｌｌ）、即ち白血球（ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ）の異常な増殖を特徴とする血液又は骨髄の癌は、以下を含む４つの主要な分類に分けることができる：急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、急性骨髄性白血病又は急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）（１０番染色体と１１番染色体［ｔ（１０，１１）］、８番染色体と２１番染色体［ｔ（８；２１）］、１５番染色体と１７番染色体［ｔ（１５；１７）］との間の転座並びに１６番染色体における逆位［ｉｎｖ（１６）］を伴うＡＭＬ；多系統異形成を有するＡＭＬ（過去に骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）又はＡＭＬに転換する骨髄増殖性疾患を有していた患者を含む）；治療関連のＡＭＬ及び骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）（このカテゴリーには、これまで化学療法及び／又は放射線を受けたことがあり、その後、ＡＭＬ又はＭＤＳを発症した患者を含む）；ｄ）上記のカテゴリーに該当しないＡＭＬのサブタイプを含む、特に分類されていないＡＭＬ；及びｅ）白血病細胞が骨髄系又はリンパ系細胞のいずれかとして分類できない場合、又は両方の細胞型が存在する場合に起こる、分化系統不明瞭な急性白血病）；並びに慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）。

【０２４０】

一部の実施形態では、上に挙げたＴＧＦβ１陽性癌のいずれか１つは、ＴＧＦβ３陽性でもあり得る。一部の実施形態では、ＴＧＦβ１陽性及びＴＧＦβ３陽性の両方である腫瘍は、ＴＧＦβ１／ＴＧＦβ３共優性であり得る。一部の実施形態では、このような癌は、固形腫瘍を含む癌腫である。一部の実施形態では、このような腫瘍は、乳癌である。一部の実施形態では、乳癌は、トリプルネガティブ遺伝子型（トリプルネガティブ乳癌）のものであり得る。一部の実施形態では、ＴＧＦβ１陽性癌を有する対象は、ＭＤＳＣのレベルが上昇している。例えば、そのような腫瘍は、ＭＤＳＣ浸潤の数の増加をもたらす腫瘍部位に動員されたＭＤＳＣを含み得る。一部の実施形態では、上昇したレベルのＭＤＳＣは、血液中に検出され得る（即ち循環ＭＤＳＣ）。一部の実施形態では、乳癌を有する対象は、再発及び予後不良に関連する炎症マーカであるＣ反応性タンパク質（ＣＲＰ）のレベルの上昇を示す。一部の実施形態では、乳癌を有する対象は、ＩＬ－６のレベルの上昇を示す。

【０２４１】

本開示のＴＧＦβ阻害剤を用いて、ＢＣＲ／ＡＢＬ癌タンパク質が新生物細胞の異常な増殖及び蓄積に不可欠であると考えられる幹細胞疾患である、慢性骨髄性白血病に罹患し

ている患者を治療することができる。イマチニブは、この状態を治療するための承認された治療法であるが；骨髄性白血病患者のかなりの割合がイマチニブ耐性を示す。本明細書に記載されるような阻害剤により達成されるＴＧＦβ阻害は、ＢＣＲ／ＡＢＬ駆動による新生物細胞の異常な増殖及び蓄積に対抗するために再増殖／拡大を増強し、それによって臨床的利益をもたらし得る。

【０２４２】

本明細書に記載されるものなどのＴＧＦβ阻害剤は、多発性骨髄腫を治療するために使用され得る。多発性骨髄腫は、骨髄内で発生及び拡大し、破壊的骨病変（即ち骨溶解病変）を引き起こすＢリンパ球（例えば、形質細胞、形質芽細胞、メモリーＢ細胞）の癌である。典型的には、この疾患は、破骨細胞骨吸収の増強、骨芽細胞分化の抑制（例えば、分化停止）及び骨形成の障害を発現し、一部には、骨溶解性病変、骨減少症、骨粗鬆症、高カルシウム血症並びに形質細胞腫、血小板減少症、好中球減少症及び神経障害を特徴とする。本明細書に記載のＴＧＦβ阻害剤療法は、患者における１つ以上のそのような臨床症状又は症状を改善するのに有効であり得る。ＴＧＦβ１阻害剤は、本明細書の他の箇所に列挙されているものを含む、多発性骨髄腫を治療するための追加の治療又は療法を受ける患者に投与され得る。一部の実施形態では、多発性骨髄腫は、ミオスタチン阻害剤（例えば、国際公開第２０１７／０４９０１１号パンフレットに開示されている抗体、例えば、ＳＲＫ－０１５としても知られるアピテグロマブ）又はＩＬ－６阻害剤と組み合わせて、アイソフォーム特異的コンテキスト非依存性阻害剤（例えば、Ａｂ６）などのＴＧＦβ阻害剤により治療され得る。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、ボルテゾミブ、レナリドマイド、カルフィルゾミブ、ポマリドミド、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、デキサメタゾン及びプレドニゾン）、化学療法（例えば、メルファラン）、放射線療法（放射線治療薬を含む）、幹細胞移植、プリチデプシン、エロツズマブ、イキサゾミブ、マシチニブ及び／又はパノビノスタットなどの従来の多発性骨髄腫療法と組み合わせて使用され得る。

【０２４３】

本開示の方法によって治療され得る癌腫のタイプとしては、限定されないが、乳頭腫／癌腫、絨毛癌腫、内胚葉洞腫瘍、奇形腫、腺腫／腺癌、黒色腫、線維腫、脂肪腫、平滑筋腫、横紋筋腫、中皮腫、血管腫、骨腫、軟骨腫、グリオーマ、リンパ腫／白血病、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞未分化癌、基底細胞癌及び篩鼻腔未分化癌が挙げられる。

【０２４４】

肉腫のタイプとして、限定されないが、胞巣状軟部肉腫などの軟部組織肉腫、血管肉腫、皮膚線維肉腫、デスモイド腫瘍、線維形成性小細胞腫瘍、骨外軟骨肉腫、骨外骨肉腫、線維肉腫、血管外細胞腫、血管肉腫、カポジ肉腫、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、及びアスキン腫瘍、ユーイング肉腫（未分化神経外胚葉性腫瘍）、悪性血管内皮腫、悪性神経鞘腫、骨肉腫、及び軟骨肉腫が挙げられる。

【０２４５】

本明細書に記載されるものなどのＴＧＦβ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のに適していると考えられる。神経堤系統の癌（即ち神経堤由来腫瘍）としては、限定されないが、黒色腫（メラノサイトの癌）、神経芽細胞腫（交感神経副腎前駆細胞の癌）、神経節細胞腫（末梢神経系神経節の癌）、甲状腺髄様癌（甲状腺Ｃ細胞の癌）、褐色細胞腫（副腎髄質のクロム親和性細胞の癌）及びＭＰＮＳＴ（シュワン細胞の癌）が挙げられる。一部の実施形態では、本開示の抗体及び方法を用いて、１つ以上のタイプの癌又は癌関連状態を治療することができ、そうしたものとして、限定されないが、結腸癌、腎癌、乳癌、悪性黒色腫、尿路上皮癌腫、及び膠芽腫を挙げることができる（Ｓｃｈｌｉｎｇｅｎｓｉｅｐｅｎ ｅｔ ａｌ．，２００８．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１７７：１３７－５０；Ｏｕｈｔｉｔ ｅｔ ａｌ．，２０１３．Ｊ Ｃａｎｃｅｒ．４（７）：５６６－５７２。

【０２４６】

免疫学的特徴

通常の条件下では、調節Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）は、ＣＤ４陽性リンパ球集団全体の小さいサブセットを表し、免疫系をホメオスタシスに維持する上で重要な役割を果たしている。しかし、ほぼ全ての癌において、Ｔｒｅｇの数は著しく増加している。Ｔｒｅｇは、健康な個体の免疫応答を抑制するのに重要な役割を果たすが、癌におけるＴｒｅｇの数の増加は予後不良と関連している。癌におけるＴｒｅｇの増加は、宿主の抗癌免疫を弱め、腫瘍の進行、転移、腫瘍の再発及び／又は治療抵抗性に寄与し得る。例えば、ヒト卵巣癌腹水は、Ｆｏｘｐ３＋ＧＡＲＰ＋Ｔｒｅｇで浸潤される（Ｄｏｗｎｓ－Ｃａｎｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ．２０１７，８：１４６４９）。同様に、Ｔｒｅｇは、進行肝細胞癌において、より免疫抑制的であり、且つより攻撃的な表現型と正の相関を示した（Ｋａｌａｔｈｉｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１３，７３（８）：２４３５－４４）。Ｔｒｅｇは、エフェクターＴ細胞の増殖を抑制することができる（図２６Ｂ）。加えて、Ｔｒｅｇは、ＴＧＦβ１の産生を介して免疫細胞（例えば、ナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞）の接触依存性阻害を発揮する（例えば、図２６Ａを参照されたい）。従って、腫瘍を治療するためには、抗腫瘍効果を発揮するのに十分なエフェクターＴ細胞が利用可能になるように、Ｔｒｅｇを阻害することが有利である。

【０２４７】

増加する一連のエビデンスは、腫瘍／癌の進行におけるマクロファージの役割を示唆するものである。本開示は、これが腫瘍微小環境におけるＴＧＦβ活性化、特にＴＧＦβ１活性化によって部分的に媒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、腫瘍由来サイトカイン／ケモカイン（ＣＣＬ２、ＣＣＬ３及びＣＣＬ４など）に応答して腫瘍部位に動員され、そこで、単球は分化及び分極を経て、癌促進性表現型（例えば、Ｍ２バイアス又はＭ２様マクロファージ、ＴＡＭ）を獲得する。これまでに実証されているように（国際公開第２０１８／１２９３２９号パンフレット）、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（線維化促進性、抗癌性）及びＭ２（癌促進性）に分極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に偏っている。Ｍ２様マクロファージのうち、Ｍ２ｃ及びＭ２ｄサブタイプは、細胞表面上で増加したＬＲＲＣ３３を発現することが見出されているが、Ｍ１は、そうではない。さらに、マクロファージは、Ｍ－ＣＳＦなどの特定のサイトカイン曝露によってさらに歪曲又は活性化されて、その結果、ＴＧＦβ１発現と同時に起こるＬＲＲＣ３３発現の顕著な増大をもたらすことができる。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のレベル増加（即ち血清Ｍ－ＣＳＦ濃度）も観察されている。一般に、高マクロファージ（ＴＡＭ）及び／又はＭＤＳＣ浸潤を有する腫瘍は、予後不良と関連している。同様に、Ｍ－ＣＳＦのレベル増加も予後不良を示すものである。従って、一部の実施形態では、本明細書に包含されるものなどのＴＧＦβ阻害剤は、癌促進性マクロファージ及び／又はＭＤＳＣのレベル増加を特徴とする癌の治療に使用することができる。一部の実施形態では、本明細書に包含されるものなどのＴＧＦβ阻害剤は、他のマクロファージのレベルにかかわらず、ＭＤＳＣのレベル増加を特徴とする癌の治療に使用することができる。阻害剤のＬＲＲＣ３３アームは、疾患関連免疫抑制性骨髄系細胞、例えば、Ｍ２－マクロファージ及びＭＤＳＣに対するその阻害効果を少なくとも部分的に媒介し得る。

【０２４８】

腫瘍関連Ｍ２様マクロファージの高い罹患率は、本明細書に記載のマウス同系腫瘍モデルにおいて再現される。ＭＢＴ－２腫瘍の場合、例えば、定着した腫瘍から単離されたＣＤ４５陽性細胞のほぼ４０％がＭ２マクロファージである（図２８Ｂ）。これは、アイソフォーム選択的ＴＧＦβ１及び抗ＰＤ－１の組合せで処置した動物において半減する。比較すると、腫瘍関連Ｍ１マクロファージの数の有意な変化は、同じ動物において観察されない。Ｍ２マクロファージと同様に、腫瘍関連ＭＤＳＣも定着腫瘍中で増加し（ＣＤ４５＋細胞の約１０～１２％）、処置動物においてＰＤ－１及びＴＧＦβ１の両方を阻害することにより著しく（無視できるレベルまで）減少する（図２８Ｂ）。本明細書に開示され

るように、腫瘍浸潤性Ｍ２マクロファージ及びＭＤＳＣの大部分は、細胞表面ＬＲＲＣ３３及び／又はＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体を発現する（図２８Ｃ及び２８Ｄ）。興味深いことに、ＬＲＲＣ３３（又はＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体）の細胞表面発現は高度に調節されているようである。本明細書に記載のＴＧＦβ阻害剤、例えばＡｂ６は、ＬＲＲＣ３３及びｐｒｏＴＧＦβ１を発現する細胞において急速にインターナライズされる可能性があり、ＴＧＦβ阻害剤により達成されるインターナリゼーション速度は、細胞表面ＬＲＲＣ３３を認識する参照抗体で達成されるものより有意に高い（図３）。同様の結果が、初代ヒトマクロファージからも得られる。これらの観察結果は、Ａｂ６がその標的であるＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１に結合すると、インターナリゼーションを促進し、それによりＬＲＲＣ３３含有複合体を細胞表面から除去し得ることを示している。従って、本開示のＴＧＦβ阻害剤、例えばＡｂ６による標的結合は、標的タンパク質（例えば、細胞関連ｐｒｏＴＧＦβ１複合体）の抗体依存性下方制御を誘導し得る。疾患遺伝子座において、これは、活性化可能な潜在型ＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１レベルの利用可能性を低下させる可能性がある。従って、本開示のＴＧＦβ阻害剤は、下記の二重の作用機序を介してＴＧＦβ１のＬＲＲＣ３３アームを阻害し得る：ｉ）潜在型複合体からの成熟増殖因子の放出の阻害；及びｉｉ）インターナリゼーションによる細胞表面からのＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体の除去。腫瘍微小環境において、抗体は、細胞関連潜在型ｐｒｏＴＧＦβ１複合体を標的化すると考えられ、Ｍ２マクロファージ（例えば、ＴＡＭ）、ＭＤＳＣ、及びＴｒｅｇなどの標的細胞に対する阻害効果を増強し得る。表現型としては、これらは免疫抑制性細胞であり、免疫抑制性腫瘍微小環境に寄与し、これは、ＴＧＦβ１経路によって少なくとも部分的に媒介される。多くの腫瘍がこれらの細胞で富化されていることを考慮すると、本明細書に記載されるものなど、ＴＧＦβ１機能の複数のアームを標的化することができる抗体は、特定の機能的利点を提供するはずである。

【０２４９】

多くのヒト癌は、健康な対照と比較して、患者においてＭＤＳＣのレベル増加を引き起こすことが知られている（例えば、Ｅｌｌｉｏｔｔ ｅｔ ａｌ．，（２０１７）“Ｈｕｍａｎ ｔｕｍｏｒ－ｉｎｆｉｌｔｒａｔｉｎｇ ｍｙｅｌｏｉｄ ｃｅｌｌｓ：ｐｈｅｎｏｔｙｐｉｃ ａｎｄ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｄｉｖｅｒｓｉｔｙ”Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．８，Ａｒｔｉｃｌｅ ８６にレビューされている）。これらのヒト癌として、限定されないが、膀胱癌、大腸癌、前立腺癌、乳癌、膠芽腫、肝細胞癌、頭頸部扁平上皮癌、肺癌、黒色腫、ＮＳＣＬ、卵巣癌、膵臓癌、及び腎細胞癌が挙げられる。ＭＤＳＣのレベル増加は、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）及び組織サンプル（例えば、腫瘍生検）などの生物学的サンプル中に検出され得る。例えば、ＭＤＳＣの頻度又は数の変化は、好適な細胞表面マーカ（表現型）を用いて、全ＰＢＭＣのパーセント（％）、ＣＤ１４＋細胞のパーセント（％）、ＣＤ４５＋細胞のパーセント（％）；単核細胞のパーセント（％）、全細胞のパーセント（％）、ＣＤ１１ｂ＋細胞のパーセント（％）、単球のパーセント（％）、非リンパ球性ＭＮＣのパーセント（％）、ＫＬＡ－ＤＲ細胞のパーセント（％）として測定され得る。

【０２５０】

他方で、腫瘍へのマクロファージ浸潤も治療の有効性を意味し得る。本明細書に例示されるように、腫瘍は、チェックポイント阻害剤及びコンテキスト非依存性ＴＧＦβ１阻害剤の組合せによる治療後、エフェクターＴ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）により効果的に浸透される。腫瘍内エフェクターＴ細胞は、細胞残屑を排除する貪食単球／マクロファージの動員をもたらし得る。

【０２５１】

抗ＰＤ－１とＴＧＦβ阻害剤の組合せは、抗ＰＤ－１単独治療と比較して、腫瘍全体に堅固なＣＤ８Ｔ細胞流入／拡大をもたらすことが観察された。それに対応して、併用治療によりＣＤ８エフェクター遺伝子の堅固な増加が達成され得る。従って、本開示のＴＧＦβ１阻害剤を用いて、腫瘍へのエフェクターＴ細胞浸潤を促進することができる。

【０２５２】
さらに、Ｆ４／８０陽性マクロファージによる腫瘍の大幅な浸潤／拡大が観察される。これは、細胞傷害性細胞によって生成された癌細胞残屑を排除するＭ１（抗腫瘍）マクロファージを示すと考えられ、これは、恐らくＴＧＦβ１阻害の直接の結果である。本明細書の実施例にさらに詳細に記載されるように、これらの腫瘍浸潤性マクロファージは、それらがＣＤ１６３発現を欠失しているために、主に非Ｍ２マクロファージとして同定されるが、これは、循環単球がチェックポイント阻害剤及びＴＧＦβ１阻害剤治療時に腫瘍部位に動員されて、Ｍ１マクロファージに分化することを示すものであり、この観察結果には、腫瘍部位へのＣＤ８＋Ｔ細胞の顕著な流入が付随する。従って、本開示のＴＧＦβ１阻害剤を用いて、腫瘍に関連する非Ｍ２マクロファージを増加させることができる。

【０２５３】
近年、チェックポイント阻害療法（ＣＢＴ）は、多くの癌タイプを治療するための標準治療となっている（例えば、図２０を参照されたい）。癌免疫療法の著しい進歩にもかかわらず、ＣＢＴに対する一次耐性は依然として患者にとって主要なアンメットニーズである。患者の癌の大部分は、依然としてＰＤ－（Ｌ）１阻害に反応しない。近年、尿路上皮癌及び黒色腫腫瘍のレトロスペクティブ分析から、一次耐性の潜在的な促進因子としてＴＧＦβ活性化の関与が示されたが、これは、腫瘍からの細胞傷害性Ｔ細胞の排除並びに腫瘍微小環境内でのそれらの拡大（免疫排除）を含む複数のメカニズムを介したものである可能性が高い。これらの観察及びその後の前臨床的検証は、ＣＢＴに対する一次耐性を解決するための有望な手段としてＴＧＦβ経路阻害を指摘している。しかしながら、ＴＧＦβ経路の治療的標的化は、恐らく１つ以上のＴＧＦβアイソフォームからのシグナル伝達の阻害に起因する用量制限前臨床心毒性によって妨げられている。

【０２５４】
多くの腫瘍にはＣＢＴに対する一次応答が欠如している。このシナリオでは、ＣＤ８＋Ｔ細胞は、一般に腫瘍実質から排除されており、腫瘍がＴＧＦβシグナル伝達の免疫調節機能を取り込んで免疫抑制性微小環境を生成する可能性があることを示唆している。レトロスペクティブ臨床腫瘍サンプル分析からのこれらの見識は、ＣＢＴに対する一次耐性におけるＴＧＦβシグナル伝達の役割を検証するための理論的根拠を提供した。

【０２５５】
ＴＧＦβ及びＣＢＴに対する応答に関して、本発明者らは、本明細書において、多くのヒト腫瘍におけるＴＧＦβ１の優勢な発現を観察するが、これは、このファミリーメンバーが、この経路の一次耐性への寄与の重要な促進因子であり得ることを示唆している。

【０２５６】
増加するエビデンスは、ＴＧＦβが、免疫排除腫瘍環境を含む疾患組織における免疫抑制をもたらし、且つ／又は維持する上での主要な作用因子であり得ることを示唆している。従って、ＴＧＦβ阻害は、免疫抑制のブロックを解除し、エフェクターＴ細胞（特に細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔ細胞）が標的癌細胞に到達し、殺傷することを可能にし得る。腫瘍浸潤に加えて、ＴＧＦβ阻害は、ＣＤ８＋Ｔ細胞増殖も促進し得る。このような拡大は、リンパ節及び／又は腫瘍中（腫瘍内）において起こり得る。このプロセスの根底にある正確なメカニズムは、依然として解明されていないが、免疫抑制は、調節Ｔ細胞及び活性化マクロファージを含む免疫細胞関連ＴＧＦβ１活性化によって少なくとも部分的に媒介されると考えられる。ＴＧＦβは、ＣＤ４＋Ｔ細胞におけるＦｏｘｐ３発現を直接促進し、それによりそれらを調節性（免疫抑制性）表現型（即ちＴｒｅｇ）に変換することが報告されている。さらに、ＴｒｅｇはエフェクターＴ細胞増殖を抑制し（例えば、図２６Ｂを参照されたい）、それにより免疫応答を低下させる。このプロセスは、ＴＧＦβ１依存性であることが証明されており、ＧＡＲＰ関連ＴＧＦβ１シグナル伝達を伴う可能性が高い。ヒト及び動物モデルの両方での観察結果は、ＴＭＥにおけるＴｒｅｇの増加が、複数のタイプの癌において予後不良と関連していることを示すものであった。さらに、本出願人は、これまでに、Ｍ－ＣＳＦなどの腫瘍由来因子に曝露されたＭ２極性化マクロファージが、ＴＧＦβ１の提示分子であるＬＲＲＣ３３の細胞表面発現を著しく上方制御することを

明らかにしている（例えば、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０３１７５９号明細書を参照されたい）。これらのいわゆる腫瘍関連マクロファージ（又はＴＡＭ）は、ＴＭＥにおいて観察されたＴＧＦβ１依存性免疫抑制に寄与し、腫瘍増殖を促進すると考えられている。

【０２５７】

いくつかの固形腫瘍は、筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞が富化した腫瘍間質を有することを特徴とする。これらの細胞は、腫瘍を取り囲むか、又は腫瘍を包み込むコラーゲン性マトリックスを産生する（線維化など）が、これは少なくとも部分的に過活動ＴＧＦβ１シグナル伝達によって引き起こされ得る。ＴＧＦβ１活性化は、ＥＣＭ関連提示分子、例えば腫瘍間質中のＬＴＢＰ１及びＬＴＢＰ３により媒介されると考えられる。

【０２５８】

ＴＧＦβ１阻害などのＴＧＦβ活性化の選択的阻害は、ＣＢＴに対する一次耐性を解決するのに十分であり得る。潜在型ＴＧＦβ１のプロドメインを標的化することにより、ＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的阻害剤は、アイソフォーム特異性を獲得し、潜在型ＴＧＦβ１活性化を阻害し得る。

【０２５９】

ＴＧＦβ１経路などのＴＧＦβ経路の選択的阻害は、全てのアイソフォーム活性の広範な阻害に対して有意に改善された前臨床安全性をもたらし得る。広範なＴＧＦβ経路阻害に関連する多面発現効果は、ＴＧＦβ経路の治療標的化を妨げてきた。現在までのほとんどの実験治療薬（例えば、ガルニセルチブ、ＬＹ３２００８８２、フレソリムマブ）は、単一のＴＧＦβアイソフォームに対する選択性がないため、非臨床及び臨床試験で観察される用量制限毒性に寄与している可能性がある。ＴＧＦβ２又はＴＧＦβ３遺伝子におけるノックアウトマウス及びヒトの機能喪失変異からの遺伝子データは、非特異的ＴＧＦβ阻害剤を用いて観察される心毒性が、ＴＧＦβ２又はＴＧＦβ３の阻害に起因する可能性があることを示唆している。本開示は、このような抗体によるＴＧＦβ１活性化の選択的阻害が、改善された安全性プロファイルを有し、ＰＤ－１阻害と組み合わせた場合に頑健な抗腫瘍応答を誘発するのに十分であり、臨床的に扱いやすい用量レベルでのＴＧＦβ１阻害剤の有効性の評価を可能にすることを教示するものである。

【０２６０】

本明細書に提示された前臨床試験及び結果は、ＴＧＦβ１阻害剤（例えば、Ａｂ６）とチェックポイント阻害剤との併用治療が、腫瘍内免疫コンテクスチャに重大な影響（例えば、腫瘍関連ＣＤ８＋Ｔ細胞のレベルの増加）を及ぼし得ることを実証している。これらには、抗ＰＤ－１／ＴＧＦβ１阻害剤との併用治療によるＴｒｅｇ細胞の予想外の富化が含まれ得る。

【０２６１】

腫瘍内の細胞傷害性Ｔ細胞の配置に関して予想及び観察される影響に加えて、ＴＧＦβ阻害剤／抗ＰＤ－１併用治療は、免疫抑制性骨髄系区画にも有益な影響を与え得る。従って、これらの重要な免疫抑制性細胞型の標的化を含む治療戦略は、腫瘍微小環境において単一の免疫抑制性細胞型（即ちＴｒｅｇ細胞のみ）の標的化よりも大きい効果を有し得る。従って、本開示のＴＧＦβ１阻害剤は、Ｍ２マクロファージ及びＭＤＳＣなどの腫瘍関連免疫抑制性細胞を減少させるために使用され得る。

【０２６２】

本明細書に提示される前臨床試験及び結果は、ＴＧＦβ１活性化の高度に特異的な阻害が、宿主免疫系がチェックポイント阻害療法に対する一次耐性の重要なメカニズムを解決することを可能にし得ると共に、臨床応用に際して主要な制限であった広範なＴＧＦβ阻害についてこれまでに認識されている毒性を回避することを実証する。

【０２６３】

従って、選択的ＴＧＦβ１阻害剤などのＴＧＦβ阻害剤を用いて、ＣＢＴに対する一次耐性に対抗し、それにより腫瘍／癌をＣＢＴに対してより感受性にすることができる。このような効果は、癌／腫瘍がＴＧＦβ１陽性である多種多様な悪性腫瘍タイプの治療に適

用可能と考えられる。一部の実施形態では、こうした腫瘍／癌は、ＴＧＦβ３などのさらなるアイソフォームをさらに発現し得る。後者の非限定的な例は、乳癌などの特定のタイプの癌腫を含み得る。

【０２６４】

従って、本開示は、一部の実施形態において、ＴＧＦβ１阻害剤が臨床的利益を達成する可能性が高い患者又は患者集団／亜集団を識別又は選択するための選択基準を提供する。一部の実施形態では、ヒト腫瘍の好適な表現型は、以下を含む：ｉ）サブセットがＣＢＴに応答することが示されている（例えば、ＰＤ－（Ｌ）系阻害）；ｉｉ）免疫排除のエビデンス；及び／又はｉｉｉ）ＴＧＦＢ１発現及び／又はＴＧＦβシグナル伝達のエビデンス。様々な癌タイプが、例えば、黒色腫及び膀胱癌を含む、プロファイルと一致する。

【０２６５】

前述したように、本明細書に記載のものなどのＴＧＦβ阻害剤は、黒色腫の治療に使用され得る。このような阻害剤で治療され得る黒色腫の種類として、限定されないが、黒子型悪性腫瘍、悪性黒子型黒色腫、表在性拡大型黒色腫、末端黒子型黒色腫、粘膜黒色腫、結節型黒色腫、ポリープ型黒色腫、及び線維形成性黒色腫が挙げられる。一部の実施形態では、黒色腫は、転移性黒色腫である。一部の実施形態では、黒色腫は、皮膚黒色腫である。

【０２６６】

さらに近年では、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使用されている。特に、抗プログラム死（ＰＤ）－１抗体（ニボルマブ及びペムブロリズマブなど）は、現在、進行性黒色腫などの特定のタイプの癌の標準治療となっており、管理可能な毒性プロファイルで有意な活性及び持続的な応答を実証している。しかしながら、ＰＤ－１アンタゴニストの効果的な臨床応用は、高い割合の先天性耐性（約６０～７０％）によって妨げられており（Ｈｕｇｏ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１６）Ｃｅｌｌ　１６５：３５－４４を参照されたい）、進行中の課題には、患者の選択及び応答及び耐性の予測因子の問題並びに組合せ戦略の最適化が引き続き含まれることを説明している（Ｐｅｒｒｏｔ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１３）Ａｎｎ　Ｄｅｒｍａｔｏｌ　２５（２）：１３５－１４４）。さらに、研究から、抗ＰＤ－１療法に最初に反応した黒色腫患者の約２５％が最終的に獲得耐性を形成したことも示唆されている（Ｒｉｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１６）ＪＡＭＡ　３１５：１６００－９）。

【０２６７】

ＰＤ－１及び／又はＣＴＬＡ－４を発現する腫瘍浸潤性ＣＤ８＋Ｔ細胞の数は、チェックポイント阻害の成功の重要な指標であると思われ、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４阻害の両方が浸潤Ｔ細胞を増加させ得る。しかし、腫瘍関連マクロファージの存在がより高い患者では、ＣＤ８細胞の抗癌効果が抑制され得る。

【０２６８】

骨髄系前駆体、ＭＤＳＣ及びＴＡＭを含む骨髄系細胞などのＬＲＲＣ３３発現細胞は、ＣＤ４及び／又はＣＤ８Ｔ細胞などのＴ細胞を阻害すること（例えば、Ｔ細胞枯渇）により、免疫抑制環境（ＴＭＥ及び骨髄線維性骨髄など）を生成又は支持し得ると考えられ、これは、特定の患者集団において観察された抗ＰＤ－１耐性を少なくとも部分的に明示している可能性がある。実際、エビデンスは、抗ＰＤ－１単独療法に対する耐性が、ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔ細胞の蓄積の失敗及びＴｅｆｆ／Ｔｒｅｇ比の低下を特徴とすることを示唆している。特に、本発明者らは、ＬＲＲＣ３３発現レベルに関して、黒色腫患者集団などの特定の癌患者が二分される（即ち、一方の群は、高いＬＲＲＣ３３発現（ＬＲＲＣ３３^{high}）を示すのに対し、他方の群は、比較的低いＬＲＲＣ３３発現（ＬＲＲＣ３３^{low}）を示す）ことを認めた。従って、本開示は、ＬＲＲＣ３３^{high}患者集団が、免疫チェックポイント阻害剤療法に対して応答性が低いか、又は耐性である人を表し得るという見解を含む。従って、本明細書に記載のものなど、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）に耐性である、黒色腫、リンパ腫、及び骨髄増殖性障害などの癌の治療に特に有益となり得る。

【０２６９】
一部の実施形態では、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耐性であるか、又は不応性である（例えば、一次耐性）。特定の理論に束縛されることは意図しないが、本開示の発明者らは、これが、少なくとも部分的にＴＧＦβ１シグナル伝達経路の上方制御に起因し、それによりチェックポイント阻害剤がその効果を発揮できない免疫抑制性微小環境が形成され得ると考える。ＴＧＦβ１阻害は、こ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することができる。免疫チェックポイント阻害剤とＴＧＦβ１阻害剤の組合せから利益を受けることができる癌タイプの非限定的な例として、骨髄線維症、黒色腫、腎細胞癌、膀胱癌、結腸癌、血液悪性腫瘍、非小細胞癌、非小細胞肺癌／癌腫（ＮＳＣＬＣ）、リンパ腫（古典的ホジキン及び非ホジキン）、頭頸部癌、尿路上皮癌、高いマイクロサテライト不安定性を有する癌、ミスマッチ修復機能欠損を有する癌、胃癌、腎癌、及び肝細胞癌が挙げられる。しかし、例えば生検によって決定して、ＴＧＦβ１が過剰発現されている、ＴＧＦβ３と共発現している、又はＴＧＦβ２／３に対して優性アイソフォームであるいずれの癌（例えば、そのような癌を有する患者）も、本開示に従うＴＧＦβ阻害剤で治療することができる。

【０２７０】
一部の実施形態では、癌／腫瘍は、時間の経過と共に耐性になる。この現象は、獲得耐性と呼ばれる。一次耐性と同様に、一部の実施形態では、獲得抵抗は、ＴＧＦβ１依存性経路によって少なくとも部分的に媒介される。本明細書に記載のＴＧＦβ阻害剤は、これらの場合において抗癌免疫を回復させるのに有効であり得る。本開示のＴＧＦβ阻害剤を用いて、腫瘍の再発を低減することができる。本開示のＴＧＦβ阻害剤を用いて、ＣＢＴなどの癌治療の持続性を高めることができる。治療に関連して使用される「持続性」という用語は、臨床効果（例えば、腫瘍制御）と腫瘍再増殖（例えば、再発）との間の時間を指す。恐らく、持続性及び再発は、患者が最初に反応した治療が機能しなくなる二次耐性又は獲得耐性と相関すると考えられる。従って、本開示のＴＧＦβ阻害剤を用いて、癌治療が有効である期間を延長することができる。本開示のＴＧＦβ阻害剤を用いて、治療の応答者間で獲得耐性を形成する確率を低減することができる。本開示のＴＧＦβ阻害剤を用いて、患者における無増悪生存期間を延長することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載のＴＧＦβ阻害剤を用いて、患者の無病生存期間を向上させることができる。一部の実施形態では、本開示のＴＧＦβ阻害剤は、患者が報告した転帰の改善、合併症の軽減、治療完了までの時間の短縮、より持続性の治療、再治療までの時間延長などに有効となり得る。一部の実施形態では、本開示のＴＧＦβ阻害剤を用いて、患者における全生存期間を向上させることができる。

【０２７１】
一部の実施形態では、本開示のＴＧＦβ阻害剤を用いて、癌治療の応答者間での完全奏功：部分奏功の割合又は比を改善することができる。典型的には、癌治療（ＣＢＴなど）に対する奏効率が比較的高い（例えば、≧３５％）癌タイプであっても、ＣＲ率はかなり低い。そのため、本開示のＴＧＦβ阻害剤を用いて、応答者集団内の完全奏功者の割合を高める。

【０２７２】
加えて、ＴＧＦβ阻害剤は、部分奏功者間で部分奏功の程度を増強又は増加するのにも有効であり得る。

【０２７３】
一部の実施形態では、本明細書に記載のＴＧＦβ阻害剤の臨床エンドポイントは、２０１８ Ｆｏｏｄ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ Ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ ｆｏｒ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｔｒｉａｌ Ｅｎｄｐｏｉｎｔｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ａｐｐｒｏｖａｌ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇｓ ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓに記載のものを含み、その内容はその全体が本明細書に組み込まれる。

【０２７４】
一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤及びＬＲＲＣ３３阻害剤（本明細書

に記載されるものなど）を含む組合せ療法は、本明細書に開示される方法と一緒に使用され得、そのような癌を治療するのに有効となり得る。さらに、腫瘍又は異常な細胞増殖を有する部位／組織における高ＬＲＲＣ３３陽性細胞浸潤は、宿主免疫抑制及び免疫チェックポイント耐性のバイオマーカとして役立ち得る。同様に、エフェクターＴ細胞は、癌と闘う身体の能力を制限する免疫抑制ニッチから除外され得る。

【０２７５】

以下の実施例のセクションで実証されるように、ＧＡＲＰ提示ＴＧＦβ１を発現するＴｒｅｇは、エフェクターＴ細胞増殖を抑制する。共同して、ＴＧＦβ１は、免疫阻害性疾患微小環境（ＴＭＥなど）の生成及び維持において重要な促進因子である可能性があり、複数のＴＧＦβ１提示コンテキストが腫瘍に関連している。一部の実施形態では、組合せ療法は、より好ましいＴｅｆｆ／Ｔｒｅｇ比を達成し得る。

【０２７６】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるようなＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／若しくはＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分は、それを必要とする対象の癌を治療するための方法に使用することができ、前記方法は、抗体又はその抗原結合部分を対象に投与することを含み、それにより癌が治療される。特定の実施形態では、癌は結腸癌である。特定の実施形態では、癌は黒色腫である。特定の実施形態では、癌は膀胱癌である。特定の実施形態では、癌は頭頸部癌である。特定の実施形態では、癌は肺癌である。

【０２７７】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるような、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分を、固形腫瘍を治療する方法に使用することができる。一部の実施形態では、固形腫瘍は、線維形成性腫瘍であり得、これは、典型的には、治療分子が浸透するには高密度であり且つ硬質である。このような腫瘍のＥＣＭ成分を標的化することにより、そうした抗体は、高密度の腫瘍組織を「緩めて」崩壊させ、その抗癌効果を発揮するための治療的アクセスを容易にすることができる。従って、任意の公知の抗腫瘍薬などの追加の治療薬を組み合わせて用い得る。

【０２７８】

加えて又は代わりに、本明細書に開示されるものなど、ＴＧＦβ１活性化を阻害することができるアイソフォーム特異的、コンテキスト非依存性抗体又はその断片は、癌を治療するための癌免疫療法などの細胞ベースの免疫療法としてのキメラ抗原受容体Ｔ細胞（「ＣＡＲ－Ｔ」）技術と一緒に使用され得る。

【０２７９】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるような、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分は、固形腫瘍を有する対象の固形腫瘍増殖を阻害又は低減する方法に使用することができ、前記方法は、抗体又はその抗原結合部分を対象に投与することを含み、それにより固形腫瘍増殖を阻害又は低減する。特定の実施形態では、固形腫瘍は、結腸癌腫瘍である。一部の実施形態では、癌を治療するのに有用な抗体又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、コンテキスト非依存性阻害剤である。一部の実施形態では、このような抗体は、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及びＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体を標的化する。一部の実施形態では、このような抗体は、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、及びＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体を標的化する。一部の実施形態では、このような抗体は、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及びＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体を標的化する。一部の実施形態では、このような抗体は、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体及びＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体を標的化する。

【０２８０】
本開示は、対象の固形腫瘍を含む癌の治療におけるＴＧＦβ１のコンテキスト非依存性、アイソフォーム特異的阻害剤などのＴＧＦβ阻害剤の使用を含む。一部の実施形態では、このようなＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１の活性化を阻害し得る。一部の実施形態では、このようなＴＧＦβ阻害剤は、ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合する抗体又はその抗原結合部分を含む。この結合は、複合体が提示分子のいずれか１つ、例えばＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３、ＧＡＲＰ又はＬＲＲＣ３３と結合するときに起こり、それにより複合体からの成熟ＴＧＦβ１増殖因子の放出を阻害し得る。一部の実施形態では、固形腫瘍は、ＣＡＦ及びコラーゲン線維と直接接触するＣＤ８＋Ｔ細胞が富化した間質を有することを特徴とする。このような腫瘍は、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、癌と闘う身体の能力を制限する免疫抑制環境を作り出す可能性がある。その代わりに、そうした細胞は腫瘍間質の内部又は付近に蓄積し得る。これらの特徴は、このような腫瘍を免疫チェックポイント阻害剤療法に対して不応性にする恐れがある。以下により詳細に論じるように、本明細書に開示されるＴＧＦβ１阻害剤は、例えば、免疫チェックポイント阻害剤と一緒に使用されて、エフェクター細胞が癌細胞に到達して、癌細胞を殺傷することを可能にするように、抑制をブロック解除し得る。

【０２８１】
ＴＧＦβ、特にＴＧＦβ１は、腫瘍増殖、宿主免疫抑制、悪性細胞増殖、血管分布、血管新生、遊走、浸潤、転移、及び化学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。従って、環境におけるＴＧＦβ１提示の各「コンテキスト」は、疾患進行の調節（又は調節不全）に関与し得る。例えば、ＧＡＲＰ系は、癌細胞と闘うために宿主免疫応答を媒介するエフェクター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系は、間質を含むＥＣＭを調節すると考えられ、この場合、癌関連線維芽細胞（ＣＡＦ）は、癌の病因及び進行に役割を果たす。ＬＲＲＣ３３系は、腫瘍微小環境への循環単球の動員、その後の腫瘍関連マクロファージ（ＴＡＭ）への分化、腫瘍組織への浸潤及び疾患の悪化に重要な役割を果たし得る。

【０２８２】
一部の実施形態では、ＴＧＦβ１発現細胞は、腫瘍に浸潤し、免疫抑制的な局所環境を作り出すか、又はそれに寄与する。このような浸潤が観察される程度は、より不良な予後と相関し得る。一部の実施形態では、浸潤が高いほど、免疫チェックポイント阻害剤などの別の癌療法に対する治療反応が劣っていることを示す。一部の実施形態では、腫瘍微小環境におけるＴＧＦβ１発現細胞は、Ｔｒｅｇ及び／又は骨髄系細胞などの免疫抑制性免疫細胞を含む。一部の実施形態では、骨髄系細胞は、限定されないが、マクロファージ、単球（常在又は骨髄由来の組織）及びＭＤＳＣを含む。

【０２８３】
一部の実施形態では、ＴＭＥ中の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ている免疫抑制ニッチを作り出すことにより、免疫逃避の少なくとも１つのメカニズムを明らかに示し得る。エビデンスは、ＭＤＳＣが腫瘍関連炎症因子、Ｏｐｏｎ動員などの炎症関連シグナルによって動員されることを示唆しており、ＭＤＳＣは、ＣＤ８＋Ｔ細胞及びＮＫ細胞などの疾患と闘う細胞を障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及びＩＬ－１０を分泌することによってＴｒｅｇの分化を誘導し、さらに免疫抑制効果を増大し得る。従って、本明細書に記載されるものなどのＴＧＦβ阻害剤を、免疫回避（例えば、免疫監視の低下）を有する患者に投与して、疾患（癌又は腫瘍など）と闘う身体の能力を回復又は増強することができる。本明細書により詳細に記載されるように、これは、癌治療などの別の治療に対する身体の応答性又は感受性をさらに増強（例えば、回復又は向上）し得る。

【０２８４】
一部の実施形態では、患者における循環ＭＤＳＣの頻度（例えば、数）の増加は、ＰＤ－１アンタゴニスト及びＰＤ－Ｌ１アンタゴニストなどのチェックポイント阻害療法に対

する応答性の低下を予測する。例えば、バイオマーカ研究から、治療前の循環ＨＬＡ－ＤＲˡᵒ／ＣＤ１４＋／ＣＤ１１ｂ＋骨髄由来抑制細胞（ＭＤＳＣ）が、進行及び悪化したＯＳと関連していることが明らかにされた（ｐ＝０．０００１及び０．０００９）。加えて、炎症性頭頸部癌（ＨＮＣ）におけるＰＤ－１チェックポイント阻害に対する耐性は、ＧＭ－ＣＳＦ及び骨髄系由来抑制細胞（ＭＤＳＣ）マーカの発現と関連している。この観察結果は、化学療法などのＭＤＳＣを枯渇させる戦略が、抗ＰＤ－１と組み合わせて（例えば、同時期（例えば、同時）に、個別に又は順次）考慮されるべきであることを示唆した。ＬＲＲＣ３３又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ複合体は、免疫抑制性骨髄細胞上での選択的発現のために、癌免疫療法の新たな標的を呈示している。従って、特定の理論に束縛されることは意図しないが、この複合体を標的化すれば、患者集団における標準治療チェックポイント阻害剤療法の有効性を高めることができる。

【０２８５】

従って、本開示は、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ＴＧＦβ１阻害剤などのＴＧＦβ阻害剤の使用を提供する。このような治療は、少なくとも１つの限局性腫瘍（固形腫瘍）を含む癌と診断された対象に、本開示に包含されるＴＧＦβ阻害剤、例えばＡｂ６を、癌を治療するのに有効な量で投与することを含む。好ましくは、対象は、さらに、ＣＢＴなどの癌療法、化学療法及び／又は放射線療法（放射線治療薬など）による治療を受ける。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、癌治療に対する一次応答者患者集団の比率／割合を増加させる。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、癌治療に対する一次応答者の応答性の程度を高める。一部の実施形態では、ＴＧＦ１阻害剤は、癌治療への部分奏功者に対する完全奏功者の比率を高める。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、再発前及び／又は癌療法が無効になる前の期間が延長されるように、癌治療の持久性を増加させる。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、一次応答者間で癌治療に対する獲得耐性の発生率又は確率を低減する。

【０２８６】

一部の実施形態では、癌の進行（例えば、腫瘍の増殖（ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ）／増殖（ｇｒｏｗｔｈ）、浸潤、血管新生及び転移）は、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。特に、ＣＡＦは、種々のサイトカイン及び増殖因子の分泌並びにＥＣＭリモデリング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として、限定するものではないが、間質細胞由来因子１（ＳＣＤ－１）、ＭＭＰ２、ＭＭＰ９、ＭＭＰ３、ＭＭＰ－１３、ＴＮＦ－α、ＴＧＦβ１、ＶＥＧＦ、ＩＬ－６、Ｍ－ＣＳＦが挙げられる。さらに、ＣＡＦは、ＣＣＬ２／ＭＣＰ－１及びＳＤＦ－１／ＣＸＣＬ１２などの因子を腫瘍部位に分泌することによってＴＡＭを動員することができ；続いて、ＴＡＭが優先的に付着するｐｒｏ－ＴＡＭニッチ（例えば、ヒアルロン酸が豊富な間質領域）が形成される。ＴＧＦβ１は、正常な線維芽細胞の筋線維芽細胞様ＣＡＦへの活性化を促進することが示唆されていることから、本明細書に記載されるようなアイソフォーム特異的、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有効となり得る。本明細書に提示されるデータは、ＴＧＦβ１の活性化を阻止するアイソフォーム特異的コンテキスト非依存性抗体が、多くの癌にも関与しているＣＣＬ２／ＭＣＰ－１、α－ＳＭＡ、ＦＮ１及びＣｏｌ１などのマーカ遺伝子のＵＵＯ誘導性上方制御を阻害し得ることを示唆している。

【０２８７】

特定の実施形態では、本明細書に記載されるようなＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分は、単独で又は追加の薬剤、例えば抗ＰＤ－１抗体（例えば、抗ＰＤ－１アンタゴニスト）と組み合わせて、癌又は腫瘍を有する対象に投与される。本開示に含まれる他の組合せ療法は、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合部分を、放射線（放射線治療薬を含め、放射線療法）又は化学療法薬（化学療法）と一緒に投与するものである。抗ＴＧＦβ阻害剤と一緒に使用される例示的な追加の薬剤として、限定されないが、ＰＤ－１アンタゴニスト（例えば、ＰＤ－１

抗体）、ＰＤＬ１アンタゴニスト（例えば、ＰＤＬ１抗体）、ＰＤ－Ｌ１又はＰＤＬ２融合タンパク質、ＣＴＬＡ４アンタゴニスト（例えば、ＣＴＬＡ４抗体）、ＧＩＴＲアゴニスト、例えばＧＩＴＲ抗体）、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（ＯＸ４０アゴニスト）、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、抗ＣＤ３抗体、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２０二重特異性抗体又は多重特異性抗体、抗ＨＥＲ２抗体、抗ＣＤ７９ｂ抗体、抗ＣＤ４７抗体、Ｔ細胞免疫グロブリン及びＩＴＩＭドメインタンパク質（ＴＩＧＩＴ）に結合する抗体、抗ＳＴ２抗体、抗β７インテグリン（例えば、抗α４－β７インテグリン及び／又はαＥ　β７インテグリン）、ＣＤＫ阻害剤、腫瘍溶解性ウイルス、インドールアミン２，３－ジオキシゲナーゼ（ＩＤＯ）阻害剤、及び／又はＰＡＲＰ阻害剤が挙げられる。有用な腫瘍溶解性ウイルスの例としては、アデノウイルス、レオウイルス、麻疹、単純ヘルペス、ニューカッスル病ウイルス、セネカウイルス、エンテロウイルス及びワクシニアが挙げられる。特定の実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍選択性のために操作される。

【０２８８】

一部の実施形態では、特定の癌タイプ又は患者集団に適した組合せ療法のための治療アプローチの決定又は選択は、以下を含み得る：ａ）標準治療が利用可能である癌タイプに関する考慮（例えば、免疫療法承認適応症）；ｂ）治療耐性亜集団（例えば、免疫排除）に関する考察；及びｃ）「ＴＧＦβ１経路活性」であるか、又はそうでなければ少なくとも部分的にＴＧＦβ１依存性（例えば、ＴＧＦβ１阻害感受性）であるか若しくは概してそれが疑われる癌／腫瘍に関する考察。例えば、多くの癌サンプルは、例えば、ＴＣＧＡＲＮＡｓｅｑにより、ＴＧＦβ１が、優勢なアイソフォームであることを示している。一部の実施形態では、ＤＮＡ及び／又はＲＮＡベースのアッセイ（例えば、ＲＮＡｓｅｑ又はＮａｎｏｓｔｒｉｎｇ）を使用して、腫瘍サンプル中のＴＧＦβシグナル伝達（例えば、ＴＧＦβ１シグナル伝達）のレベルを評価することができる。一部の実施形態では、各腫瘍タイプからのサンプルの５０％超（例えば、５０％、６０％、７０％、８０％及び９０％超）が、ＴＧＦβ１アイソフォーム発現に対して陽性である。一部の実施形態では、「ＴＧＦβ１経路活性」であるか、又はそうでなければ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及び／又はＨ－ｒａｓの変異などの少なくとも１つのＲａｓ変異を含む。一部の実施形態では、癌／腫瘍は、少なくとも１つのＫ－ｒａｓ変異を含む。

【０２８９】

患者から採取された臨床サンプル（生検サンプルなど）におけるＴＧＦβ１発現の確認は、ＴＧＦβ１阻害療法の前提条件ではなく、この療法では、特定の状態が、ＴＧＦβ経路に関与することが一般的に知られているか、又は疑われている。

【０２９０】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるものなどのＴＧＦβ阻害剤は、１つ以上のチェックポイント阻害剤療法が承認されているか、又は有効であることが証明された癌と診断された患者にチェックポイント阻害療法と一緒に投与される。こうした癌には、限定されないが、膀胱尿路上皮癌、扁平上皮癌（頭頸部など）、腎臓透明細胞癌、腎臓乳頭細胞癌、肝臓肝細胞癌、肺腺癌、皮膚黒色腫、及び胃腺癌が含まれる。特定の実施形態では、このような患者は、チェックポイント阻害剤療法対する応答性が低いか、又は不応性である。一部の実施形態では、この低応答性は、一次耐性によるものである。一部の実施形態では、チェックポイント阻害に耐性である癌は、ＴＣＦ７発現の下方制御を示す。一部の実施形態では、チェックポイント阻害耐性腫瘍におけるＴＣＦ７下方制御は、腫瘍内ＣＤ８＋Ｔ細胞の数が少ないことと相関し得る。

【０２９１】

本明細書に記載されるものなどのＴＧＦβ阻害剤は、化学療法又は放射線療法耐性癌の治療に使用することができる。従って、一部の実施形態では、ＴＧＦβ１阻害剤、例えばＡｂ６は、化学療法及び／若しくは放射線療法（放射線治療薬など）を受けているか、又

は受けたことがある、癌と診断された患者に投与することができる。特に、ＴＧＦβ１阻害剤の使用は、癌（患者）がそのような治療に対して耐性である場合に有利である。一部の実施形態では、このような癌は、静止腫瘍増殖癌細胞（ＴＰＣ）を含み、ＴＧＦβシグナル伝達は、成長停止状態へのそれらの可逆的侵入を制御するが、これは、化学療法又は放射線療法（放射線治療薬など）からＴＰＣを保護する。ＴＧＦβ１の薬理学的阻害により、損なわれたＴＰＣは静止状態に入ることができず、従って、化学療法及び／又は放射線療法（放射線治療薬など）に対して感受性になることが企図される。このような癌には、種々の癌腫、例えば、扁平上皮癌が含まれる。例えば、Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．，（２０１７）“ＴＧＦ－β－Ｉｎｄｕｃｅｄ Ｑｕｉｅｓｃｅｎｃｅ Ｍｅｄｉａｔｅｓ Ｃｈｅｍｏｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ ｏｆ Ｔｕｍｏｒ－Ｐｒｏｐａｇａｔｉｎｇ Ｃｅｌｌｓ ｉｎ Ｓｑｕａｍｏｕｓ Ｃｅｌｌ Ｃａｒｃｉｎｏｍａ．”Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ．２１（５）：６５０－６６４を参照されたい。

【０２９２】

一部の実施形態では、アイソフォーム選択的ＴＧＦβ１阻害剤（例えば、Ａｂ６）などのＴＧＦβ阻害剤を用いて、対象、例えば、癌患者における貧血を治療（例えば、軽減）することができる。一部の実施形態では、アイソフォーム選択的ＴＧＦβ１阻害剤などのＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）を、ＢＭＰ阻害剤（例えば、ＢＭＰ６阻害剤、例えばＲＧＭｃ阻害剤）と組み合わせて使用して、例えば、対象の貧血を治療（例えば、軽減）することができる。一部の実施形態では、貧血は、赤血球産生の減少又は障害（例えば、骨髄線維症又は癌の結果として）、鉄制限（例えば、癌又は化学療法誘発性貧血などの治療誘発性貧血の結果として）又はその両方に起因する。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤とＢＭＰ阻害剤（アンタゴニスト）との組合せは、対象、例えば、癌患者における１つ以上の貧血関連症状及び／又は合併症を緩和するのに十分な治療有効量又は量で投与され得る。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤とＢＭＰ阻害剤（アンタゴニスト）との組合せは、赤血球産生を増加又は正常化し、及び／又は鉄制限を低減するのに十分な治療有効量で投与され得る。理論に束縛されることを望まないが、ＴＧＦβ１阻害剤（例えば、Ａｂ６）は、それらの造血促進作用を介して貧血に関連する症状及び／又は合併症を緩和する可能性があり、ＢＭＰ阻害剤（アンタゴニスト）（例えば、ＢＭＰ６阻害剤、例えばＲＧＭｃ阻害剤）は、鉄欠乏性貧血（例えば、化学療法誘発性貧血）を改善し得ると考えられる。一部の実施形態では、貧血の治療は、１つ以上のＪＡＫ阻害剤（例えば、Ｊａｋ１／２阻害剤、Ｊａｋ１阻害剤、及び／又はＪａｋ２阻害剤）を投与することをさらに含む。

【０２９３】

一部の実施形態では、ＢＭＰ阻害剤は、ＢＭＰ受容体（例えば、Ｉ型受容体及び／又はＩＩ型受容体）に関連するキナーゼのアンタゴニストである。

【０２９４】

一部の実施形態では、ＢＭＰ阻害剤は、ＢＭＰ６などのＢＭＰ増殖因子に結合（又は隔離）する「リガンドトラップ」である。

【０２９５】

一部の実施形態では、ＢＭＰ阻害剤は、ＢＭＰ６などのＢＭＰ増殖因子を中和する抗体である。例としては、抗ＢＭＰ６抗体が挙げられる（例えば、国際公開第２０１６／０９８０７９号パンフレット、Ｎｏｖａｒｔｉｓ；及びＫＹ－１０７０、ＫｙＭａｂ）。

【０２９６】

一部の実施形態では、ＢＭＰ阻害剤は、ＲＧＭｃなどのＢＭＰ６共受容体の阻害剤である。例えば、そうした阻害剤は、ＲＧＭａ／ｃに結合する抗体を含み得る（Ｂｏｅｓｅｒ ｅｔ ａｌ．ＡＡＰＳ Ｊ．２０１５ Ｊｕｌ；１７（４）：９３０－９３８）。より好ましくは、このような阻害剤は、ＲＧＭｃに選択的に結合する抗体である（例えば、国際公開第２０２０／０８６７３６号パンフレットを参照されたい）。

【０２９７】

ＴＧＦβ阻害剤を含む治療から利益を受ける可能性がある治療適応症及び／又は対象

本開示は、癌を治療し、ＴＧＦβ阻害剤、例えばＡｂ６を用いて治療有効性を予測又はモニターする方法を包含する。一部の実施形態では、本明細書に記載されるものなどのＴＧＦβ阻害剤が、有利な治療上の利益を有する可能性が高い好適な適応症及び／又は患者集団の識別／スクリーニング／選択は、ｉ）疾患が、ヒトにおける他のアイソフォームと比べて、ＴＧＦβ１アイソフォームにより駆動されるか、又はＴＧＦβ１アイソフォームに主に依存する（又は少なくとも共優性である）か否か；ｉｉ）状態（又は罹患組織）が免疫抑制性表現型（例えば、免疫排除腫瘍）と関連しているか否か；並びにｉｉｉ）疾患が、マトリックス関連及び細胞関連ＴＧＦβ１機能の両方を伴うか否かを含む。

【０２９８】

３つの既知ＴＧＦβアイソフォーム、即ちＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３の差次的発現が様々な組織において正常（健康；恒常性）並びに疾患条件下で観察されている。それにもかかわらず、複数のアイソフォームにわたるＴＧＦβの汎阻害を支持する従来の手法では、アイソフォーム選択性のコンセプトは、十分に利用されておらず、また確実に達成されてもいない。さらに、アイソフォームの発現パターンは、正常（恒常的）状態及び異常（病理学的）状態だけでなく、異なる患者の亜集団でも差次的に調節され得る。ほとんどの前臨床試験は、限られた数の動物モデルで実施されており、ヒトの状態を再現する場合も又はしない場合もあるため、そうしたモデルを用いて得られたデータは、偏っている可能性があり、その結果、データの誤った解釈又は治療薬開発のための翻訳可能性に関して誤った結論を導く恐れがある。

【０２９９】

ヒト腫瘍サンプルの以前の分析では、ＴＧＦβシグナル伝達が、様々なタイプの悪性腫瘍に対するチェックポイント阻害療法（「ＣＢＴ」）を含め、疾患進行及び治療反応に対する一次耐性への重要な寄与因子として関与しているとされた。文献で報告された試験から、ＴＧＦＢ遺伝子発現は、治療耐性に特に関連している可能性があることが判明しており、これは、このアイソフォームの活性が、これらの疾患におけるＴＧＦβシグナル伝達を駆動している可能性があることを示唆している。実施例１１に詳述するように、Ｔｈｅ Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｏｍｅ Ａｔｌａｓ（ＴＣＧＡ）でプロファイリングされたヒト腫瘍タイプの大部分に、ＴＧＦＢ１発現が最も優性であると思われ、これは、ＴＧＦβアイソフォームのヒト疾患発現パターンをより忠実に再現する前臨床モデルの選択が有益となり得ることを示唆している。

【０３００】

理論に束縛されるものではないが、ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３は、前臨床試験で広く使用されている特定のマウス同系癌モデル（例えば、ＥＭＴ－６及び４Ｔ１）において、多くの場合に共優性である（同様のレベルで共発現される）（図２１Ｂを参照されたい）。対照的に、多数の他の癌モデル（例えば、Ｓ９１、Ｂ１６及びＭＢＴ－２）は、ＴＧＦβ１が、ＴＧＦβ２／３よりも高頻度で優性アイソフォームであると思われる多くのヒト腫瘍で観察されるものと同様に、ほぼ独占的にＴＧＦβ１を発現する（図２０及び２１Ａを参照されたい）。さらに、恒常性条件下で主に発現されるＴＧＦβアイソフォームは、疾患関連アイソフォームではない可能性がある。例えば、健康なラットの正常な肺組織において、持続性ＴＧＦβシグナル伝達は、主にＴＧＦβ３によって媒介されると思われる。しかし、ＴＧＦβ１は、肺線維症などの疾患状態では顕著に上方制御されるようである。総合すると、前提条件ではないが、患者が応答する可能性が高い好適な治療薬を選択するために、臨床サンプル中のＴＧＦβアイソフォームの相対発現を試験又は確認することが有益となり得る。一部の実施形態では、相対アイソフォーム発現の決定は、治療後に実施され得る。このような状況下では、ＴＧＦβ１阻害療法に応答する患者の応答性（例えば、臨床応答／利益）は、ＴＧＦβアイソフォームの相対発現レベルと相関し得る。一部の実施形態では、事後に示されるＴＧＦβ１アイソフォームの過剰発現は、治療に対するより大きい応答性と相関する。

【０３０１】

ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３の両方を発現する腫瘍モデルにおいて実証されるように（本

明細書の実施例を参照されたい）、ＴＧＦβ１単独の阻害は癌免疫療法に対する一次耐性を解決するのに十分であるように思われるが、本明細書に開示される知見は、ＴＧＦβ３の阻害が実際に有害となり得ることを示唆している。驚くべきことに、マウス肝線維症モデルにおいて、ＴＧＦβ３のアイソフォーム選択的阻害剤で処置されたマウスは、線維症の悪化を発現する。これらの動物の肝臓切片におけるコラーゲン沈着の有意な増加は、ＴＧＦβ３の阻害が実際にＥＣＭのより大きい調節不全をもたらし得ることを示唆している。理論に束縛されるものではないが、これは、ＴＧＦβ３阻害が線維化促進性表現型を促進し得ることを示唆している。

【０３０２】

線維化促進性表現型の特徴は、ＥＣＭにおけるコラーゲンの沈着及び／又は蓄積の増加であり、これは、組織ＥＣＭの硬度の増加と関連している。これは、癌、線維症及び心血管疾患の病理学的進行中に観察されている。これと一致して、本出願人は、規定された硬度（例えば、５ｋＰａ、１５ｋＰａ又は１００ｋＰａ）を有するシリコンベースの基質上で増殖した初代線維芽細胞を用いて、ＴＧＦβのインテグリン依存性活性化に対するマトリックス硬度の役割を以前実証している（国際公開第２０１８／１２９３２９号パンフレットを参照されたい）。より大きい硬度を有するマトリックスは、ＴＧＦβ１活性化を増強したが、これは、ＴＧＦβ１のアイソフォーム特異的阻害剤によって抑制された。これらの観察結果は、ＴＧＦβ３の薬理学的阻害が、組織マトリックスのより大きい硬度が癌の進行を支持し得る腫瘍促進性微小環境を形成することにより、ＴＧＦβ１阻害に拮抗作用を及ぼす可能性があることを示唆している。

【０３０３】

線維性表現型に関与する共通の経路並びに浸潤性及び転移の増大などの癌進行の多くの側面を考慮すれば（例えば、Ｃｈａｋｒａｖａｒｔｈｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｃｏｍ（２０１８）９：４６９２．“ＴＧＦ－β－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｍａｔｒｉｘ ｇｅｎｅｓ ｌｉｎｋ ｃａｎｃｅｒ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔｓ ｔｏ ｉｍｍｕｎｅ ｅｖａｓｉｏｎ ａｎｄ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｆａｉｌｕｒｅ”を参照されたい）、線維症モデルにおいて観察されるＴＧＦβ３阻害の線維化促進効果は、癌コンテキストに適用可能であろう。

【０３０４】

従って、前述した知見は、ＴＧＦβ３に対する阻害効力を有するＴＧＦβ阻害剤が、癌の治療に無効であるだけでなく、実際には有害となり得る可能性を提起する。一部の実施形態では、ＴＧＦβ３阻害は、統計的に高度に転移性の癌タイプに罹患している患者において回避される。典型的に高度に転移性と考えられる癌タイプとして、限定されないが、大腸癌、肺癌、膀胱癌、腎臓癌、子宮癌、前立腺癌、胃癌、及び甲状腺癌が挙げられる。さらに、ＴＧＦβ３阻害は、線維性状態及び／又は心血管疾患を有するか、又は発症するリスクがある患者において最も良く回避され得る。線維性状態及び／又は心血管疾患を発症するリスクのあるそうした患者には、ＮＡＦＬＤ及びＮＡＳＨなどの代謝障害、肥満、及び２型糖尿病を有する患者が含まれるが、これらに限定されない。同様に、ＴＧＦβ３阻害は、骨髄線維症と診断された又は骨髄線維症を発症するリスクがある患者において最もよく回避され得る。骨髄線維症を発症するリスクのある患者には、骨髄線維症の病因に関与する１つ以上の遺伝子変異を有する者が含まれる。

【０３０５】

前述したＴＧＦβ３を阻害する可能性のある懸念のほかに、Ｔａｋａｈａｓｈｉ ｅｔ ａｌ．（Ｎａｔ Ｍｅｔａｂ．２０１９，１（２）：２９１－３０３）は、近年、代謝の調節におけるＴＧＦβ２の有益な役割を報告した。上記著者らは、ＴＧＦβ２を運動誘発性アディポカインとして同定し、これは、インビトロでのグルコース及び脂肪酸の取込み並びにインビボでの組織グルコース取込みを刺激した。しかし、これにより、肥満マウスの代謝が改善すると共に；高脂肪食誘発性炎症が軽減した。さらに、上記著者らは、運動中に筋肉から放出される代謝産物である乳酸塩がヒト脂肪細胞におけるＴＧＦβ２発現を刺激したこと並びに乳酸塩低下剤が循環ＴＧＦβ２レベルを低下させ、運動刺激による耐

糖能の改善を低下させたことを観察した。従って、一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ２アイソフォームに対する阻害活性がない対象の治療に使用して、例えば、治療を受ける対象の１つ以上の代謝機能に対する潜在的に有害な影響を回避することができる。

【０３０６】

より近年では、癌と様々な代謝状態との間の潜在的な関連性が認識されている。例えば、Ｂｒａｕｎ　ｅｔ　ａｌ．によってレビューされているように、癌死亡率のリスク増加は、男性のメタボリックシンドロームと関連している（Ｂｒａｕｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｉｎｔ　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｓｃｉ．２０１１；７（７）：１００３－１０１５）。同様に、著者らは、「代謝調節不全は、特定の癌タイプの病因及び進行に重要な役割を果たし、一部の癌の転帰を悪化させ得る。肥満及び糖尿病は、各々、乳癌、子宮内膜癌、結腸直腸癌、膵臓癌、肝臓癌及び腎癌と関連している」と指摘している（Ｂｒａｕｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｉｎｔ　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｓｃｉ．２０１１；７（７）：１００３－１０１５）。

【０３０７】

従って、様々な実施形態において、ＴＧＦβ阻害剤は、対象におけるＴＧＦβ関連適応症（例えば、癌）の治療に使用することができ、ＴＧＦβ阻害剤は、投与される治療有効用量でＴＧＦβ１を阻害するが、ＴＧＦβ２は阻害しない。一部の実施形態では、対象は、このような治療後の代謝の改善から利益を受け、この場合、任意選択で、対象は、代謝性疾患、例えば肥満、高脂肪食誘発性炎症及びグルコース調節不全（例えば、糖尿病）を有するか、又は発症するリスクがある。一部の実施形態では、ＴＧＦβ関連適応症は癌であり、この場合、任意選択で、癌は、局所進行癌及び転移性癌などの固形腫瘍を含む。

【０３０８】

一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的である（例えば、治療有効用量でＴＧＦβ２及び／又はＴＧＦβ３シグナル伝達を阻害しない）。特定の実施形態では、ＴＧＦβ１選択的阻害剤は、癌患者の治療に使用するために選択される。一部の実施形態では、このような治療は、ｉ）ＴＧＦβ３阻害を回避して、ＥＣＭ調節不全（腫瘍増殖及び浸潤性に寄与し得る）を悪化させるリスクを低減すると共にｉｉ）ＴＧＦβ２阻害を回避して、患者の代謝負荷を増加させるリスクを低減する。治療用途のＴＧＦβ阻害剤を選択するための関連方法も本明細書に包含される。

【０３０９】

本開示は、癌の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤を選択するための方法を含み、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ３に対する阻害効力がないか、又はほとんどない（例えば、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ３を標的化しない）。特定の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えば、治療上有効な用量でＴＧＦβ２及び／又はＴＧＦβ３シグナル伝達を阻害しない抗体又は抗原結合断片）である。この選択戦略は、癌患者におけるＥＣＭ調節不全を悪化させるリスクを低減しながら、ＴＧＦβ１阻害の利益をもたらして、癌を治療することが企図される。一部の実施形態では、癌患者は、免疫チェックポイント阻害剤などの癌療法による治療も受ける。一部の実施形態では、癌患者は、代謝性疾患、例えば脂肪肝、肥満、高脂肪食誘発性炎症及びグルコース又はインスリン調節不全（例えば、糖尿病）を発症するリスクがある。

【０３１０】

本開示は、ＴＧＦβ３を阻害することができるＴＧＦβ阻害剤を受ける候補となり得る適切な患者集団を選択及び／又は治療するための関連方法も含む。このような方法は、線維性障害（臓器線維症など）と診断されていない対象、骨髄線維症と診断されていない対象、心血管疾患と診断されていない対象、及び／又はそのような状態を発症するリスクがない対象の癌の治療のためにＴＧＦβ３を阻害することができるＴＧＦβ阻害剤の使用を含む。同様に、そのような方法は、対象の癌の治療のためにＴＧＦβ３を阻害することができるＴＧＦβ阻害剤の使用を含み、この場合、癌は、高度に転移性であると見なされない。ＴＧＦβ３を阻害することができるＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβの汎阻害剤（例えば、ＴＧＦβ受容体の低分子量アンタゴニスト、例えばＡＬＫ５阻害剤及びＴＧＦβ１／２

／３に結合する中和抗体）、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体及びＴＧＦβ１／３に結合することができる操作された融合タンパク質などのアイソフォーム非選択的阻害剤、例えばリガンドトラップ並びにインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／又はＴＧＦβ３の選択的阻害）を含み得る。

【０３１１】

ＴＧＦβ３阻害が実際に疾患促進性となり得るという驚くべき見解は、ＴＧＦβ３に対する阻害活性を有するＴＧＦβ阻害剤による治療を以前受けたことがあるか、又は現在その治療を受けている患者が、ＴＧＦβ３阻害剤の考えられる線維化促進作用に対抗するためのＴＧＦβ１選択的阻害剤による追加治療から利益を得ることができることを示唆している。従って、本開示は、対象の癌の治療に使用するためのＴＧＦβ１選択的阻害剤を含み、この場合、対象は、チェックポイント阻害剤と一緒にＴＧＦβ３を阻害するＴＧＦβ阻害剤により治療を受けたことがあり、この方法は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤を前記対象に投与する工程を含み、任意選択で、癌は、転移性癌、線維形成性腫瘍、骨髄線維症であり、且つ／或いは対象は、線維性障害及び／若しくは心血管疾患を有するか、又は発症するリスクがあり、任意選択で、線維性障害又は心血管疾患を発症するリスクのある対象は、代謝性疾患に罹患しており、任意選択で、代謝性疾患は、ＮＡＦＬＤ、ＮＡＳＨ、肥満又は糖尿病である。

【０３１２】

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、ＴＧＦβ１アイソフォームが、他のアイソフォームに対して優勢に発現する（例えば、ＴＧＦβ１優性と呼ばれる）疾患の治療に特に有利である。一例として、ＴＧＦＢ１（左）、ＴＧＦＢ２（中央）及びＴＧＦＢ３（右）の相対発現レベルを有するヒト癌臨床サンプルの非限定的なリストが、図２０及び図２１Ａに提供される。３つのアイソフォームにわたる各水平線は、１人の患者を表す。図から分かるように、全体的なＴＧＦβ１発現（ＴＧＦＢ１）は、これらのヒト腫瘍／癌のほとんどにおいて、多くの腫瘍／癌タイプで他の２つのアイソフォームよりも有意に高く、ＴＧＦβ１選択的阻害がこれらの疾患タイプにおいて有益であり得ることを示唆している。総合すると、これらの一連のエビデンスは、ＴＧＦβ１活性の選択的阻害が、ＣＢＴに対する一次耐性を解決し得るという見解を支持するものである。高度に選択的なＴＧＦβ１阻害剤の作製は、そのような手法が、汎ＴＧＦβ阻害で観察される主要な安全性問題に対処するかどうかの評価も可能にするため、これは、それらの治療的有用性の評価にとって重要であろう。

【０３１３】

ＴＧＦβ１阻害剤は、これまで、特にＴＧＦβ１が別のアイソフォームと共優性であるか、又はＴＧＦβ２及び／又はＴＧＦβ３発現が、ＴＧＦβ１よりも有意に高い癌タイプにおいて、有効ではない可能性があると考えられていた。しかし、より近年では、本出願の発明者らは、ＴＧＦβ阻害剤、例えばＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えば、Ａｂ６）などのＴＧＦβ１阻害剤が、チェックポイント阻害剤（例えば、抗ＰＤ－１抗体）と一緒に使用されると、ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３の両方を同様のレベルで発現することが分かっているＥＭＴ－６モデルにおいて有意な腫瘍退縮を引き起こすことができるという予想外の発見をした。共優性は、ＲＮＡ測定及びＥＬＩＳＡアッセイの両方により確認されている（図３５を参照されたい）。この観察結果は、チェックポイント阻害に関連して、ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３を共発現する腫瘍に必須の効果を達成するためには、共優性アイソフォームの両方が特異的に阻害されなければならないとこれまで仮定されていたことから、驚くべきことであった。従って、本明細書に開示される治療方法は、腫瘍退縮を促進するためのＴＧＦβ１阻害剤の使用を含み、腫瘍は、ＴＧＦβ１＋／ＴＧＦβ３＋である。このような腫瘍は、例えば、上皮起源の癌、即ち癌腫（例えば、基底細胞癌、扁平上皮癌、腎細胞癌、非浸潤性乳管癌（ＤＣＩＳ）、浸潤性乳管癌及び腺癌）を含み得る。一部の実施形態では、ＴＧＦβ１は、主に疾患関連アイソフォームであるのに対し、ＴＧＦβ３は

、上皮などの組織における恒常性機能を支持する。

【０３１４】

ＴＧＦβシグナル伝達経路の異常な活性は、線維化及び癌プロセスの両方に関与する遺伝子発現に影響を及ぼすことが報告されている。例えば、ＴＧＦβ１シグナル伝達経路の調節不全は、ＳＮＡＩ１、ＭＭＰ２、ＭＭＰ９、及びＴＩＭＰ１などの遺伝子を改変することが判明しており、これらは全て、接着及び細胞外マトリックスリモデリングなどの細胞プロセスに重要であり、癌における線維症及び上皮間葉転換（ＥＭＴ）プロセスに関与している。従って、一部の実施形態では、例えば、線維症関連癌適応症の、本明細書に記載の治療方法は、ＴＧＦβ３を阻害しないＴＧＦβ阻害剤の投与、例えば、ＴＧＦβ１選択的抗体、例えばＡｂ６の使用を含む。様々な癌腫など、特定の腫瘍は、低変異負荷腫瘍（ＭＢＴ）を特徴とする。このような腫瘍は、免疫原性が低いことが多く、十分なＴ細胞応答を誘発することができない。化学療法、放射線療法（放射線治療薬など）、癌ワクチン及び／又は腫瘍溶解性ウイルスを含む癌療法は、そのような腫瘍においてＴ細胞免疫を誘発するのに有用であり得る。従って、本明細書で詳述するＴＧＦβ１阻害療法は、抗腫瘍効果を高めるためにこれらの癌療法の１つ以上と一緒に使用することができる。本質的に、このような組合せ療法は、ネオアンチゲンを促進して、エフェクター細胞が腫瘍を攻撃するのを容易にすることにより、「低免疫原性」腫瘍（例えば、免疫原性の低い腫瘍）を「高免疫原性」腫瘍に変換することを目的とする。このような腫瘍の例としては、乳癌、卵巣癌、及び膵臓癌、例えば、膵管腺癌（ＰＤＡＣ）が挙げられる。従って、本明細書に記載の抗体又はその断片のいずれか１つ以上を用いて、Ｔ細胞免疫を促進することを目的する癌療法で感作させる低免疫原性腫瘍（例えば、「免疫排除」腫瘍）を治療することができる。

【０３１５】

エフェクターＴ細胞が腫瘍の部位から遠ざけられる（従って「排除される」）免疫排除腫瘍の場合、免疫抑制性腫瘍環境は、ＴＧＦβ１依存性様式で媒介され得る。これらは、典型的には免疫原性である腫瘍であるが；Ｔ細胞は、免疫抑制された環境のために十分に浸潤し、増殖し、細胞傷害作用を誘発することができない。典型的には、そのような腫瘍は、ＣＢＴなどの癌治療に対して応答性が低い。本明細書に提供されるデータが示唆するように、ＴＧＦβ１阻害剤を含む補助療法は、免疫抑制性表現型を克服して、Ｔ細胞浸潤、増殖、及び抗腫瘍機能を可能にし、それによりそうした腫瘍をＣＢＴなどの癌療法に対してより応答性にする。

【０３１６】

従って、第２の研究は、免疫抑制性腫瘍を有する患者で、ＴＧＦβ阻害剤療法、例えばＡｂ６などのＴＧＦβ１阻害剤の恩恵を受ける可能性がある患者の識別又は選択に導かれる。腫瘍におけるエフェクターＴ細胞の存在又は頻度の程度は、抗腫瘍免疫を示すものである。そのため、腫瘍内のＣＤ８＋細胞などの抗腫瘍細胞を検出することは、患者が、ＣＢＴ及び／又はＴＧＦβ１阻害剤療法から恩恵を受け得るかどうかを評価する上で有用な情報を提供する。

【０３１７】

検出は、デジタル病理法を含む腫瘍生検サンプルの免疫組織化学的分析などの公知の方法によって行うことができる。より近年では、インビボで目的の細胞（例えば、細胞傷害性Ｔ細胞）の検出を可能にする非侵襲的イメージング法が開発されている。例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｍａｇｉｎａｂ．ｃｏｍ／ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ／；Ｔａｖａｒｅ ｅｔ ａｌ．，（２０１４）ＰＮＡＳ，１１１（３）：１１０８－１１１３；Ｔａｖａｒｅ ｅｔ ａｌ．，（２０１５）Ｊ Ｎｕｃｌ Ｍｅｄ ５６（８）：１２５８－１２６４；Ｒａｓｈｉｄｉａｎ ｅｔ ａｌ．，（２０１７） Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ ２１４（８）：２２４３－２２５５；Ｂｅｃｋｆｏｒｄ Ｖｅｒａ ｅｔ ａｌ．，（２０１８）ＰＬｏＳ ＯＮＥ １３（３）：ｅ０１９３８３２；及びＴａｖａｒｅ ｅｔ ａｌ．，（２０１５）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ７６（１）：７３－８２（その各々は、参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。典型的には、検出部分（例えば、放射性標識

）で操作した抗体又は抗体様分子を患者に注入することができ、続いて、これらは、特定のマーカ（例えばＣＤ８＋）の部位に分布し、局在化する。このようにして、腫瘍が免疫排除表現型を有するか否かを判定することができる。腫瘍が免疫排除表現型を有すると判定された場合、腫瘍は、腫瘍環境内に十分な細胞傷害性細胞を欠いているため、癌療法（ＣＢＴなど）単独では有効ではない可能性がある。本明細書に記載されるようなＴＧＦβ阻害剤によるアドオン療法は、免疫抑制を低減させ、それにより癌療法耐性腫瘍を癌療法に対してより応答性にすることができる。

【０３１８】

非侵襲的インビボイメージング技術は、患者を診断し；ＴＧＦβ阻害剤療法、例えばＴＧＦβ阻害剤療法から利益を受ける可能性がある患者を選択又は識別し；且つ／又は治療時の治療反応について患者をモニターする目的で種々の好適な方法に適用され得る。既知の細胞表面マーカを有する任意の細胞は、細胞マーカに特異的に結合する抗体又は類似の分子を使用することにより検出／局在化することができる。典型的には、このような技術を用いて検出しようとする細胞は、免疫細胞、例えば、細胞傷害性Ｔリンパ球、調節Ｔ細胞、ＭＤＳＣ、腫瘍関連マクロファージ、ＮＫ細胞、樹状細胞、及び好中球である。こうしたマーカを認識する抗体又は操作された抗体様分子を、検出部分とカップリングすることができる。

【０３１９】

適切な免疫細胞マーカの非限定的な例としては、単球マーカ、マクロファージマーカ（例えば、Ｍ１及び／又はＭ２マクロファージマーカ）、ＣＴＬマーカ、抑制性免疫細胞マーカ、ＭＤＳＣマーカ（例えば、Ｇ－及び／又はＭ－ＭＤＳＣのマーカ）があり、ＣＤ８、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１６３、ＣＤ２０６、ＣＤ６８、ＣＤ１４、ＣＤ１５、ＣＤ６６ｂ、ＣＤ３４、ＣＤ２５及びＣＤ４７を含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、インビボイメージングは、細胞傷害性ＣＤ８陽性Ｔ細胞などのＴ細胞追跡を含む。従って、本開示のＴＧＦβ阻害剤のいずれか１つは、固形腫瘍を有する対象における癌の治療に使用することができ、治療は、ｉ）対象においてＴ細胞を検出するためのインビボイメージング分析を実施する工程（任意選択で、Ｔ細胞はＣＤ８＋Ｔ細胞である）と、固形腫瘍が、（ｉ）のインビボイメージング解析に基づいて免疫排除された固形腫瘍であると判定された場合、次に治療有効量のＴＧＦβ阻害剤、例えばＡｂ６を対象に投与する工程とを含む。一部の実施形態では、対象は、ＣＢＴを受けており、この場合、任意選択で、固形腫瘍は、ＣＢＴに対して耐性である。一部の実施形態では、対象は、組合せ療法として、ＴＧＦβ１阻害剤と一緒にＣＢＴを投与される。この組合せは、チェックポイント阻害剤とＴＧＦβ阻害剤の両方を含む単一の製剤の投与を含み得る。ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ６、アイソフォーム非選択的阻害剤、例えば低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８及び変異体、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合し、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）などのＴＧＦβ１阻害剤であり得る。代わりに、組合せ療法は、チェックポイント阻害剤を含む第１の製剤と、ＴＧＦβ阻害剤を含む第２の製剤との投与を含み得、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ６、アイソフォーム非選択的阻害剤、例えば低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８及び変異体、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合し、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）などのＴＧＦβ１阻害剤であり得る。

【０３２０】

一部の実施形態では、インビボイメージングは、Ｇ－ＭＤＳＣ及びＭ－ＭＤＳＣなどのＭＤＳＣ追跡を含む。例えば、ＭＤＳＣは、ベースライン時に疾患部位（線維性組織及び固形腫瘍など）で富化されている可能性がある。治療（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤療法）時、標識（放射性同位元素及び蛍光など）の強度の低下により測定して、ＭＤＳＣの減少が観察され得るが、これは、治療効果を示すものである。

【０３２１】

一部の実施形態では、インビボイメージングは、ＬＲＲＣ３３陽性細胞の追跡又は局在化を含む。ＬＲＲＣ３３陽性細胞は、例えば、ＭＤＳＣ及び活性化Ｍ２様マクロファージ（例えば、線維性組織に関連するＴＡＭ及び活性化マクロファージ）を含む。例えば、ＬＲＲＣ３３陽性細胞は、ベースライン時の疾患部位（線維性組織及び固形腫瘍など）に富化されている可能性がある。治療（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤療法）時、標識（放射性同位元素及び蛍光など）の強度の低下により測定して、細胞表面ＬＲＲＣ３３を発現する細胞の減少が観察され得るが、これは、治療効果を示すものである。

【０３２２】

一部の実施形態では、インビボイメージングは、目的の標的（例えば、標識試薬によって結合され得る分子又は実体、例えば、適切なマーカを発現する細胞及び組織など）を検出するために、ＰＥＴ－ＳＰＥＣＴ、ＭＲＩ及び／又は蛍光／生物発光の使用を含む。

【０３２３】

一部の実施形態では、検出部分を有する抗体又は抗体様分子の標識は、直接標識又は間接標識を含み得る。

【０３２４】

一部の実施形態では、検出部分は、トレーサーであり得る。一部の実施形態では、トレーサーは、放射性同位体であり得、この場合、任意選択で、放射性同位体は、陽電子放出同位体であり得る。一部の実施形態では、放射性同位体は、^{18}Ｆ、^{11}Ｃ、^{13}Ｎ、^{15}Ｏ、^{68}Ｇａ、^{177}Ｌｕ、^{18}Ｆ及び^{89}Ｚｒからなる群から選択される。

【０３２５】

従って、このような方法を使用して、免疫－ＰＥＴに標識抗体を用いるインビボイメージングを実施することができる。

【０３２６】

一部の実施形態では、このようなインビボイメージングは、対象においてＴＧＦβ１阻害療法に対する治療反応をモニターするために行われる。例えば、治療反応は、免疫排除された腫瘍から炎症性腫瘍への転換を含み得、これは、腫瘍への免疫細胞浸潤の増加と相関する。これは、腫瘍内免疫細胞の頻度又はシグナル（放射性標識及び蛍光など）の検出度の増加によって視覚化され得る。

【０３２７】

従って、本開示は、癌を治療する方法を含み、この方法は、ｉ）固形腫瘍を含む癌と診断された患者を選択する工程であって、固形腫瘍は、免疫排除腫瘍であるか、又は免疫排除腫瘍であると疑われる工程と；ｉｉ）癌を治療するのに有効な量の本明細書に包含される抗体又はその断片を患者に投与する工程とを含み得る。一部の実施形態では、患者は、免疫チェックポイント阻害療法（例えば、ＰＤ－（Ｌ）１抗体）、化学療法、放射線療法、操作免疫細胞療法及び癌ワクチン療法などの癌療法を受けたことがあるか、又はそうした療法を受ける候補である。一部の実施形態では、選択工程（ｉ）は、免疫細胞又はその１つ以上のマーカの検出を含み、この場合、任意選択で、検出は、腫瘍生検分析、血清マーカ分析、及び／又はインビボイメージングを含む。

【０３２８】

一部の実施形態では、患者は、ＣＢＴが承認されている癌を有すると診断され、この場合、任意選択で、統計的に、特定の癌を有する類似の患者集団は、承認されたＣＢＴに対して比較的低い奏功率、例えば、２５％未満を示す。例えば、ＣＢＴに対する奏功率は、約１０～２５％、例えば約１０～１５％であり得る。このような癌として、例えば、卵巣癌、胃癌、及びトリプルネガティブ乳癌などを挙げることができる。本開示のＴＧＦβ阻

害剤をそうした癌の治療に使用することができ、この場合、対象は、依然としてＣＢＴを受けたことがない。ＴＧＦβ１阻害剤をＣＢＴと組み合わせて対象に投与し得る。一部の実施形態では、対象は、化学療法及び放射線療法（放射線治療薬を含む）などの追加の癌療法を受けていても又は受けたことがあってもよい。

【０３２９】

前述したインビボイメージング技術を使用して、癌などのＴＧＦβ関連疾患と診断された患者における特定のＭＤＳＣを検出、局在化及び／又は追跡することができる。健康な個体は、循環中にＭＤＳＣが全くないか、又はその頻度が低い。このような疾患の発症又は進行に伴って、循環及び／又は疾患局在化ＭＤＳＣのレベル増加が検出され得る。例えば、ＣＣＲ２陽性Ｍ－ＭＤＳＣは、炎症を伴う組織に蓄積することが報告されており、組織の線維化（肺線維症など）の進行を引き起こす恐れがあり、これは、ＴＧＦβ１発現と相関することが明らかにされている。同様に、ＭＤＳＣは、いくつかの固形腫瘍（トリプルネガティブ乳癌を含む）中で富化され、ＴＭＥの免疫抑制性表現型に一部が寄与している。従って、本開示に従い、ＴＧＦβ１阻害などのＴＧＦβ阻害に対する治療反応は、循環ＭＤＳＣを局在化又は追跡することによってモニターすることができる。循環ＭＤＳＣレベルの低下又は低頻度は、典型的には、治療利益又はより良好な予後を示すものである。従って、本開示は、対象の血液中又は血液成分中の循環ＭＤＳＣを測定することにより、ＴＧＦβ阻害剤療法、例えばＴＧＦβ１阻害剤とチェックポイント阻害剤との組合せ療法の治療有効性を予測及びモニターする方法を提供する。本開示は、患者、例えば免疫抑制性癌を有する患者を選択し、測定された循環ＭＤＳＣのレベルに基づいて治療レジメンを決定する方法も提供する。ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ６、アイソフォーム非選択的阻害剤、例えば低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８又は変異体、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）などのＴＧＦβ１阻害剤であり得る。

【０３３０】

本開示のＴＧＦβ阻害剤は、対象の癌の治療に使用することができ、癌は免疫抑制を特徴とし、この場合、癌は、任意選択で、ＴＧＦβ１陽性及びＴＧＦβ３陽性である固形腫瘍を含む。このような対象は、癌腫を有すると診断され得る。一部の実施形態では、癌腫は、乳癌であり、この場合、任意選択で、乳癌は、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ）である。こうした治療は、限定されないが、化学療法、放射線療法、癌ワクチン、操作免疫細胞療法（ＣＡＲ－Ｔなど）及び抗ＰＤ（Ｌ）－１抗体などの免疫チェックポイント阻害療法を含む癌療法をさらに含むことができる。ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ６、アイソフォーム非選択的阻害剤、例えば低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８又は変異体、ＴＧＦβ１／３に結合する抗体、リガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合して、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）などのＴＧＦβ１阻害剤であり得る。

【０３３１】

一部の実施形態では、腫瘍の内側及び外側の両方にエフェクター細胞がほとんど存在しないか、又は免疫原性が低いことを特徴とする癌の一種であることが分かっている、低免疫原性腫瘍（例えば、免疫砂漠として特徴付けられる腫瘍）が識別される。このような腫瘍を有する対象／患者は、腫瘍抗原（例えば、ネオアンチゲン）に対するより強力なＴ細胞応答を誘発するために、化学療法、放射線療法（放射線治療薬など）、腫瘍溶解性ウイルス療法及び癌ワクチンなどの免疫感作癌療法で治療される。この工程は、低免疫原性腫

瘍を「免疫排除」腫瘍に転換し得る。対象は、任意選択で、抗ＰＤ－（Ｌ）１などのＣＢＴをさらに受ける。対象は、本明細書に開示される抗体などのＴＧＦβ１阻害剤でさらに治療される。これにより、低免疫原性又は免疫排除腫瘍を「炎症性」又は「高免疫原性」腫瘍に転換することができ、その結果、免疫療法に対する応答性を付与する。免疫原性の低い癌の非限定的な例としては、乳癌（ＴＮＢＣなど）、前立腺癌（去勢抵抗性前立腺癌（ＣＲＰＣ）など）及び膵臓癌（膵臓腺癌（ＰＤＡＣ）など）が挙げられる。

【０３３２】

図２に示すように、本開示のＴＧＦβ１の高親和性アイソフォーム選択的阻害剤、例えばＡｂ６は、ＴＧＦβ１のプラスミン誘導活性化を阻害することができる。プラスミン－プラスミノーゲン系は、様々な癌タイプ、特に乳癌などの癌腫の特定の腫瘍形成、浸潤及び／又は転移に関与している。従って、本明細書に記載されるものなどのＴＧＦβ阻害剤は、上皮に関与するＥＭＴ６などの腫瘍又は腫瘍モデルにおいて、このメカニズムを介して阻害効果を発揮し得る可能性がある。実際、上皮のプラスミン依存性の破壊又はリモデリングは、上皮損傷及び癌腫の浸潤／播種を伴う疾患の病因に寄与すると考えられる。後者は、上皮間葉転換（「ＥＭＴ」）によってトリガーされ得る。プラスミノーゲン活性化及びプラスミノーゲン依存性浸潤は、上皮様細胞においてより顕著であり、一部は、Ｓ１００Ａ１０及びＰＡＩ－１の発現によって指令されることが報告されている（Ｂｙｄｏｕｎ ｅｔ ａｌ．，（２０１８）Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ，：１４０９１）。

【０３３３】

本開示のＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤、例えばＡｂ６）は、それを必要とする対象の貧血の治療に使用することができる。一部の実施形態では、対象は、癌と診断される。一部の実施形態では、対象は、骨髄増殖性障害（例えば、骨髄線維症）と診断される。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）は、貧血を治療するために単独で使用される。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、追加の薬剤、例えばＢＭＰアンタゴニスト（例えば、ＢＭＰ６阻害剤、例えばＲＧＭｃ阻害剤）と組み合わせて使用される。一部の実施形態では、ＴＧＦβ１阻害剤（例えば、Ａｂ６）及びＢＭＰアンタゴニスト（例えば、ＢＭＰ６阻害剤、例えばＲＧＭｃ阻害剤）を含む組合せは、不十分な赤血球産生、鉄欠乏症及び／又は化学療法から生じる貧血を改善するために使用される。一部の実施形態では、貧血の治療は、１つ以上のＪＡＫ阻害剤（例えば、Ｊａｋ１／２阻害剤、Ｊａｋ１阻害剤及び／又はＪａｋ２阻害剤）を投与することをさらに含む。

【０３３４】

本開示は、本明細書に記載のものなどのＴＧＦβ阻害剤を含む治療に応答する可能性が高い患者集団又は対象を選択するための方法を含む。このような方法に従って選択される対象は、本開示の様々な態様に従って治療を受ける対象であり得る。このような方法は、対象から採取した生体サンプル（例えば、臨床サンプル）を提供する工程と、サンプル中のＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３の相対レベルを決定（例えば、測定又はアッセイ）する工程と、ＴＧＦβ１が、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３に対して優性アイソフォームである場合；及び／又はＴＧＦβ１が対照と比較して有意に過剰発現若しくは上方制御されている場合、本明細書に記載のＴＧＦβ１阻害剤などのＴＧＦβ阻害剤を含む組成物を対象に投与する工程とを含み得る。一部の実施形態では、このような方法は、事前に決定されたＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３の相対発現レベルに関する情報を取得する工程と；ＴＧＦβ１陽性（好ましくはＴＧＦβ１優性）疾患を有する対象を識別する工程と；本明細書に開示されるＴＧＦβ阻害剤を含む組成物を対象に投与する工程とを含む。一部の実施形態では、そうした対象は、治療（癌療法など）に対して耐性である疾患（癌など）を有する。一部の実施形態では、そうした対象は、治療に対して不耐容性を示すため、治療を中止しなければならないか、又は中止する可能性がある。治療レジメンへのＴＧＦβ阻害剤の追加は、最初の治療の投与量を低減することを可能にし、それでも併用の臨床的利益を達成し得る。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、手術の必要性を遅延又は減少させ得る。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、本明細書に記載のＴＧＦβ１阻害剤、例えばＡｂ６である。

【０３３５】
アイソフォームの相対レベルは、当技術分野で周知であるＲＮＡベースのアッセイ及び／又はタンパク質ベースのアッセイによって決定することができる。一部の実施形態では、投与の工程は、免疫チェックポイント阻害剤又は本明細書の他の箇所に提供される他の薬剤などの別の療法も含み得る。このような方法は、任意選択で、２つ以上の時点で、ＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３の相対レベルの変化をモニターすることにより治療反応を評価する工程を含み得る。一部の実施形態では、臨床サンプル（生検など）は、投与前及び投与後の両方に収集される。一部の実施形態では、臨床サンプル（生検など）を治療後に複数回収集して、インビボ効果を経時的に評価する。

【０３３６】
上記の研究に加えて、第３の研究では、特定の疾患に関与するＴＧＦβ１機能などのＴＧＦβ機能の範囲を調べる。特に、これは、ＴＧＦβ１コンテキストの数、即ち提示分子が疾患関連ＴＧＦβ１機能を媒介するＴＧＦβ１コンテキストの数によって表され得る。ＴＧＦβ１特異的で、コンテキスト非依存性阻害剤などの広義の阻害剤は、ＴＧＦβ１機能のＥＣＭ成分及び免疫成分の両方を含む疾患の治療に有利である。このような疾患は、ＥＣＭにおける調節不全並びに免疫細胞機能又は免疫応答における摂動と関連すると考えられる。従って、本明細書に記載のＴＧＦβ１阻害剤は、ＥＣＭ関連ＴＧＦβ１（例えば、ＬＴＢＰ１又はＬＴＢＰ３により提示される）並びに免疫細胞関連ＴＧＦβ１（例えば、ＧＡＲＰ又はＬＲＲＣ３３により提示される）を標的化することができる。こうした阻害剤は、治療標的（例えば、「コンテキスト非依存性」阻害剤）：ＧＡＲＰ関連ｐｒｏ／潜在型ＴＧＦβ１；ＬＲＲＣ３３関連ｐｒｏ／潜在型ＴＧＦβ１；ＬＴＢＰ１関連ｐｒｏ／潜在型ＴＧＦβ１；並びにＬＴＢＰ３関連ｐｒｏ／潜在型ＴＧＦβ１の４つ全てを阻害して、これらのコンテキストにおいてＴＧＦβ１機能を広範囲に阻害するようにする。

【０３３７】
患者の特定の状態が、複数の態様のＴＧＦβ１機能を伴うか、又はそれらにより駆動されるか否かは、患者から収集さ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することができる。ＲＮＡベースのアッセイ及びタンパク質ベースのアッセイをはじめとする様々なアッセイが当技術分野で公知であり、これらを実施して、発現プロファイルを取得することができる。サンプル中のＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３、ＧＡＲＰ、及びＬＲＲＣ３３の相対発現レベル（及び／又はその変化／改変）は、状態に関連するＴＧＦβ１活性の供給源及び／又はコンテキストを示し得る。例えば、固形腫瘍から採取された生検サンプルは、４つの提示分子全ての高い発現を示し得る。例えば、ＬＴＢＰ１及びＬＴＢＰ３は、腫瘍間質内のＣＡＦで高度に発現され得るのに対し、ＧＡＲＰ及びＬＲＲＣ３３は、それぞれＴｒｅｇ及び白血球浸潤物などの腫瘍関連免疫細胞によって高度に発現され得る。

【０３３８】
従って、本開示は、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３に対する疾患におけるＴＧＦβ１の関与を決定（例えば、試験又は確認）するための方法を含む。一部の実施形態では、この方法は、疾患関連ＴＧＦβ１の供給源（又はコンテキスト）を同定する工程をさらに含む。一部の実施形態では、供給源／コンテキストは、患者から採取された臨床サンプル中のＴＧＦβ提示分子、例えば、ＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３、ＧＡＲＰ及びＬＲＲＣ３３の発現を決定することによって評価される。一部の実施形態では、このような方法は、事後に実施される。

【０３３９】
ＬＲＲＣ３３陽性細胞に関して、本開示の出願人は、ＬＲＲＣ３３のＲＮＡ発現とタンパク質発現との間に有意な不一致があり得ることを認めた。特に、選択された細胞型は、ＲＮＡレベルでＬＲＲＣ３３を発現すると思われるが、そのような細胞のサブセットのみが細胞表面上でＬＲＲＣ３３タンパク質を発現する。ＬＲＲＣ３３発現は、例えば、原形質膜挿入及び迅速なインターナリゼーションに関して、タンパク質トラフィッキング／局在化を介して高度に調節され得ると考えられる。従って、特定の実施形態では、ＬＲＲＣ

３３タンパク質発現は、例えば、活性化／Ｍ２様マクロファージ及びＭＤＳＣで富化された罹患組織（腫瘍組織など）に関連するマーカとして使用することができる。

【０３４０】

関連する態様において、本開示は、免疫チェックポイント阻害剤、例えばＰＤ－（Ｌ）１抗体を含む治療的使用及び関連する治療方法を提供する。有用なチェックポイント阻害剤の非限定的な例として、イピリムマブ（例えば、Ｙｅｒｖｏｙ（登録商標））；ニボルマブ（例えば、Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））；ペムブロリズマブ（例えば、Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標））；アベルマブ（例えば、Ｂａｖｅｎｃｉｏ（登録商標））；セミプリマブ（例えば、Ｌｉｂｔａｙｏ（登録商標））；アテゾリズマブ（例えば、Ｔｅｃｅｎｔｒｉｑ（登録商標））；及びデュルバルマブ（例えば、Ｉｍｆｉｎｚｉ（登録商標））などを挙げることができる。

【０３４１】

本開示によれば、癌治療方法は、対象の癌の治療に使用するためのチェックポイント阻害剤を含み得、この場合、治療は、ＴＧＦβ阻害剤による治療を受ける対象へのチェックポイント阻害剤の投与を含み、前記ＴＧＦβ阻害剤の治療時、治療前と比較して、前記対象から採取されるサンプル中の循環ＭＤＳＣレベルが低下する。サンプルは、血液サンプルであり得るか、又は血液成分のサンプルであり得る。チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－１抗体であり得る。チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－Ｌ１抗体であり得る。チェックポイント阻害剤は、ＣＴＬＡ４抗体であり得る。一部の実施形態では、チェックポイント阻害剤は、イピリムマブ（例えば、Ｙｅｒｖｏｙ（登録商標））；ニボルマブ（例えば、Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））；ペムブロリズマブ（例えば、Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標））；アベルマブ（例えば、Ｂａｖｅｎｃｉｏ（登録商標））；セミプリマブ（例えば、Ｌｉｂｔａｙｏ（登録商標））；アテゾリズマブ（例えば、Ｔｅｃｅｎｔｒｉｑ（登録商標））；及びデュルバルマブ（例えば、Ｉｍｆｉｎｚｉ（登録商標））からなる群から選択される。

【０３４２】

本開示によれば、癌治療方法は、チェックポイント阻害剤に対して応答性が低い対象における癌、又は対象が、前記チェックポイント阻害剤に対して一次耐性を有する癌を有する場合の癌の治療に使用するためのチェックポイント阻害剤を含むことができ、上記治療は、ＴＧＦβ阻害剤を対象に投与する工程と、ＴＧＦβ阻害剤の投与前及び投与後の循環ＭＤＳＣレベルを測定する工程と、ＴＧＦβ阻害剤投与後に循環ＭＤＳＣが減少している場合、癌を治療するのに十分な量のチェックポイント阻害剤を対象にさらに投与する工程とを含む。チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－１抗体であり得る。チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－Ｌ１抗体であり得る。前記チェックポイント阻害剤は、ＣＴＬＡ４抗体であり得る。一部の実施形態では、チェックポイント阻害剤は、イピリムマブ（例えば、Ｙｅｒｖｏｙ（登録商標））；ニボルマブ（例えば、Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））；ペムブロリズマブ（例えば、Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標））；アベルマブ（例えば、Ｂａｖｅｎｃｉｏ（登録商標））；セミプリマブ（例えば、Ｌｉｂｔａｙｏ（登録商標））；アテゾリズマブ（例えば、Ｔｅｃｅｎｔｒｉｑ（登録商標））；及びデュルバルマブ（例えば、Ｉｍｆｉｎｚｉ（登録商標））からなる群から選択される。任意選択で、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的阻害剤であり、この場合、任意選択で、阻害剤は、ＴＧＦβ１の活性化阻害剤又はＴＧＦβ１に選択的に結合する中和抗体；又はアイソフォーム非選択的阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１／２／３、ＴＧＦβ１／３、ＴＧＦβ１／２の阻害剤）である。

【０３４３】

組合せ療法

本明細書には、ＴＧＦβ阻害剤の医薬組成物、例えば、本明細書に記載される抗体又はその抗原結合部分、及びインビボでＴＧＦβ阻害から利益を受けると考えられる対象を治療するための組合せ療法として使用される、又はそれと関係する関連方法が開示される。これらの実施形態のいずれかにおいて、こうした対象は、少なくとも１つのＴＧＦβ阻害

剤を含む第１の組成物、例えば、Ａｂ６を含む第１の組成物を、同じ若しくは重複する疾患又は臨床状態の治療を目的とする少なくとも１つのさらなる治療を含む少なくとも１つの第２の組成物と一緒に含む組合せ療法を受け得る。一部の実施形態では、そうした対象は、同一又は重複する疾患又は臨床状態を治療することを目的とする少なくとも１つの追加の治療を含む追加の第３の組成物を受け得る。ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えば、治療有効用量でＴＧＦβ２及び／又はＴＧＦβ３シグナル伝達を阻害しないもの）、例えば、Ａｂ６、又はアイソフォーム非選択的阻害剤、例えば低分子量ＡＬＫ５アンタゴニスト、ＴＧＦβ１／２／３の２つ以上に結合する中和抗体、例えばＧＣ１００８又は変異体、ＴＧＦβ１／３、リガンドトラップ、例えばＴＧＦβ１／３阻害剤並びに／又はインテグリン阻害剤（例えば、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３若しくはα８β１インテグリンに結合し、ＴＧＦβの下流活性化を阻害する抗体、例えばＴＧＦβ１及び／若しくはＴＧＦβ３の選択的阻害）などのＴＧＦβ１阻害剤であり得る。第１、第２及び第３の組成物は、いずれも、同じ細胞標的、又は別個の細胞標的に作用し得る。一部の実施形態では、第１、第２及び第３の組成物は、疾患又は臨床状態の同じ若しくは重複する一連の症状又は態様を治療又は緩和し得る。一部の実施形態では、第１、第２及び第３の組成物は、疾患又は臨床状態の個別の一連の症状又は態様を治療又は緩和し得る。一部の実施形態では、組合せ療法は、同じ標的又は別個の細胞標的に作用することができ、且つ疾患又は臨床状態の同じ若しくは重複する一連の症状又は態様を治療又は緩和し得る、４つ以上の組成物を含み得る。一例を挙げれば、第１の組成物は、ＴＧＦβシグナル伝達に関連する疾患又は状態を治療することができるのに対し、第２の組成物は、同じ疾患に関連する炎症又は線維症などを治療することができる。別の例として、第１の組成物は、ＴＧＦβシグナル伝達に関連する疾患又は状態を治療することができるのに対し、第２及び第３の組成物は、抗腫瘍作用を有し、且つ／又は免疫抑制を逆転させることを促進する。特定の実施形態では、第１の組成物は、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、本明細書に記載のＴＧＦβ１阻害剤）であり得、第２の組成物は、チェックポイント阻害剤であり得、第３の組成物は、第２の組成物と異なるチェックポイント阻害剤であり得る。特定の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、本明細書に記載のＴＧＦβ１阻害剤）を含む第１の組成物を、チェックポイント阻害剤及び化学療法薬と組み合わせる。特定の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、本明細書に記載のＴＧＦβ１阻害剤）を含む第１の組成物を、２つの異なるチェックポイント阻害剤及び化学療法薬と組み合わせる。このような組合せ療法は、互いに併用して投与され得る。前述したように、組合せ療法に関連して「と併用して」という語句は、組合せ療法を受ける対象における第１の治療効果が、第２の治療の治療効果と時間的及び／又は空間的に重なることを意味する。第１、第２及び／又は追加の組成物は、同時期（例えば、同時）に、個別に又は順次投与され得る。従って、組合せ療法は、同時期若しくは同時投与のための単一の製剤として、又は同時期（例えば、同時）、個別の又は順次投与のための個別の製剤として製剤化され得る。本明細書で使用されるように、組合せ療法は、単一のボーラス若しくは投与で、又は単回の患者外来で（例えば、医療従事者に対して若しくはその立会いの下）但し２回以上の個別のボーラス若しくは投与で又は個別の患者外来で（且つ例えば２回以上の個別のボーラス若しくは投与で）提供される２つ以上の療法（例えば、組成物）を含み得る。例えば、治療薬は、約５分未満の間隔で、又は１分間隔で投与することができる。治療薬は、約３０分未満又は１時間間隔で（例えば、１回の患者外来で）投与され得る。一部の実施形態では、治療薬は、約１分、約２分、約５分、約１０分、約１５分、約３０分、約４５分、約１時間、約２時間、約４時間、約６時間、約８時間、約１０時間、約１日、約２日、約３日、約５日、約１週間、約２週間、約３週間、約１ヶ月又はそれを超える間隔で投与され得る。一部の実施形態では、治療薬は、約１日以上の間隔で（例えば、個別の外来で）投与され得る。治療薬は、互いに３ヶ月以内（例えば、１ヶ月以内）に投与され得る。一部の実施形態では、治療薬は、状態を治療するための１つ以上の承認済治療薬の投与スケジュールに従って投与され得る（例えば、承認済チェックポイント阻害剤又は他の化学療法薬の場合と同じ頻度で投与される）。

【０３４４】
特定の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、本明細書に記載のＴＧＦβ１阻害剤）は、約３０００ｍｇ、２４００ｍｇ、１６００ｍｇ、８００ｍｇ、２４０ｍｇ、８０ｍｇ又はそれ未満の量で投与され得る。
【０３４５】
特定の実施形態では、組合せ療法は、疾患の治療に相乗効果をもたらす。「相乗的」という用語は、集合体中の各単剤の相加効果よりも大きい効果（例えば、より大きい有効性）を指す。
【０３４６】
一部の実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物を含む組合せ療法は、別の療法（第２の薬剤の単独療法など）によって生成されるものと全体的に同等である有効性をもたらすが、第２の薬剤の単独療法と比較して、付随する第２の薬剤関連の望ましくない有害作用が少ないか、又は毒性の重症度が低い。一部の実施形態では、このような組合せ療法は、第２の薬剤の投薬量の低減を可能にし、且つ全体的な有効性を維持する。こうした組合せ療法は、長期治療が必要とされ、且つ／又は小児患者を含む患者集団に特に適している可能性がある。
【０３４７】
本開示は、本明細書に記載されるように、ＴＧＦβ１タンパク質活性化の低減及びＴＧＦβ１シグナル伝達に関連する疾患若しくは状態の治療又は予防のための組合せ療法において、及び組合せ療法として使用するための医薬組成物及び方法を提供する。従って、本方法又は医薬組成物は、第２の療法をさらに含み得る。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法又は医薬組成物は、第３の療法をさらに含み得る。一部の実施形態では、第２の療法及び／又は第３の療法は、ＴＧＦβ１シグナル伝達に関連する疾患若しくは状態を治療又は予防するのに有用であり得る。第２の治療及び／又は第３の治療は、標的疾患に関連する少なくとも１つの症状を軽減又は治療し得る。第１、第２及び第３の療法は、類似した若しくは無関係の作用機序によって生物学的効果を発揮し得るか；又は第１及び第２の療法のいずれか一方若しくは両方は、多数の作用機序によってそれらの生物学的効果を発揮し得る。一部の実施形態では、第２の療法と本明細書に開示されるＴＧＦβ阻害剤（例えば、本明細書に開示されるＴＧＦβ１選択的阻害剤）は、単一の製剤中又は単一のパッケージ若しくはキット内に含まれる個別の製剤中に存在する。一部の実施形態では、第２の療法、第３の療法及び本明細書に開示されるＴＧＦβ阻害剤（例えば、本明細書に開示されるＴＧＦβ１選択的阻害剤）は、単一の製剤中又は単一のパッケージ若しくはキット内に含まれる別個の製剤中に存在する。一部の実施形態では、第２の療法と、本明細書に開示されるＴＧＦβ阻害剤（例えば、本明細書に開示されるＴＧＦβ１選択的阻害剤）とは、単一の分子中、例えば二重特異性抗体又は他の多重特異性構築物中に含まれるか、又はこの場合、チェックポイント阻害剤は、抗体薬物複合体中の小分子である。一部の実施形態では、第２の療法、第３の療法及び本明細書に開示されるＴＧＦβ阻害剤（例えば、本明細書に開示されるＴＧＦβ１選択的阻害剤）は、単一分子、例えば二重特異性抗体若しくは他の多重特異性構築物中に含まれるか、又はこの場合、チェックポイント阻害剤は、抗体薬物複合体中の小分子である。ＴＧＦβ阻害活性を有する操作された構築物の例としては、Ｍ７８２４（ビントラファスプアルファ（Ｂｉｎｔｒａｆｕｓｐ ａｌｆａ））及びＡＶＩＤ２００が挙げられる。Ｍ７８２４は、ＰＤ－Ｌ１に対するヒトＩｇＧ１モノクローナル抗体に融合したＴＧＦ－βＲＩＩ（ＴＧＦ－β「トラップ」）の２つの細胞外ドメインからなる二機能融合タンパク質である。ＡＶＩＤ２００は、ヒトＦｃドメインに融合したＴＧＦ－β受容体エクトドメインからなる操作ＴＧＦ－βリガンドトラップである。
【０３４８】
本明細書に記載の医薬組成物は、記載される実施形態各々について、同じ薬学的に許容される担体中、又は異なる薬学的に許容される担体中に第１及び第２の治療薬を含有し得ることを理解すべきである。さらに、第１及び第２の療法薬は、記載される実施形態にお

いて、同時期（例えば、同時）に、個別に又は順次に投与され得ることも理解すべきである。

【０３４９】

本開示の１つ以上の抗ＴＧＦβ抗体又はその抗原結合部分は、１つ以上の追加の治療薬と一緒に使用され得る。本開示の抗ＴＧＦβ抗体と一緒に使用することができる追加の治療薬の例として、限定されないが、癌ワクチン、操作免疫細胞療法、化学療法薬、放射線療法（例えば、放射線治療薬）、ミオスタチン阻害剤及びＧＤＦ１１阻害剤などのＴＧＦβスーパーファミリーのメンバーのモジュレータ；ＶＥＧＦアゴニスト；ＶＥＧＦ阻害剤（ベバシズマブなど）；ＩＧＦ１アゴニスト；ＦＸＲアゴニスト；ＣＣＲ２阻害剤；ＣＣＲ５阻害剤；二重ＣＣＲ２／ＣＣＲ５阻害剤；ＣＣＲ４阻害剤、リシルオキシダーゼ様－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；Ｍ－ＣＳＦ阻害剤（例えば、Ｍ－ＣＳＦ受容体アンタゴニスト及び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又はアンタゴニスト；ＩＬ－１１アンタゴニスト；及びＩＬ－６アンタゴニストなどが挙げられる。ＴＧＦβ阻害剤と一緒に使用することができる追加の治療薬の他の例として、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、アルギナーゼ阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、Ｓｅｒ／Ｔｈｒキナーゼ阻害剤、二重特異的キナーゼ阻害剤が挙げられる。一部の実施形態では、こうした薬剤は、ＰＩ３Ｋ阻害剤、ＰＫＣ阻害剤又はＪＡＫ阻害剤であり得る。

【０３５０】

チェックポイント阻害剤（ＣＰＩ）療法は、固形腫瘍の治療に変化をもたらしたが、承認済ＣＰＩによる治療を受けるのに適格な癌患者は半数未満であり、そのうち、ＣＰＩ療法に応答するのは、＜１３％である（Ｈａｓｌａｍ　２０１９）。これらのデータを考慮すると、承認済治療法及び未承認の治療法による固形腫瘍の適応症全体に、依然として相当のアンメットニーズがある。

【０３５１】

近年のデータは、免疫調節戦略の有効性にはベースライン免疫応答の存在が必要であることを示唆している。既存の免疫応答が欠如している腫瘍又は腫瘍コアにＴ細胞の数が少なく、浸潤縁部又は間質（例えば、免疫排除腫瘍中の）にＴ細胞が豊富である腫瘍は、ＣＰＩに対する乏しい応答と関連している（Ｇａｌｏｎ　ａｎｄ　Ｂｒｕｎｉ　２０１９．Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｄｒｕｇ　Ｄｉｓｃｏｖ．１８（３）：１９７－２１８）。ＴＧＦβ経路は、ＣＰＩ療法に対する一次耐性の媒介に関与しており、そのため、抗潜在型ＴＧＦβモノクローナル抗体との組合せ療法は、ＣＰＩ単独療法に対する応答が不十分な患者において有効性を高める可能性がある。

【０３５２】

本開示は、ＴＧＦβシグナル伝達調節不全が疾患プロセスの媒介因子として関与している固形腫瘍及び稀有な血液学的悪性腫瘍を治療するための潜在的な抗癌療法として、例えばＡｂ６を単独で、又は他の療法と組み合わせて使用することを含む。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤、例えばＡｂ６と、少なくとも１つの追加の薬剤を含む組合せ療法は、進行した固形腫瘍、例えば皮膚黒色腫、尿路上皮癌（ＵＣ）、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）及び頭頸部癌などの患者において有効となり得る。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤、例えばＡｂ６と、少なくとも１つの追加の薬剤を含む組合せ療法は、免疫排除腫瘍、例えば、非小細胞肺癌、黒色腫、腎細胞癌、トリプルネガティブ乳癌、胃癌、マイクロサテライト安定性大腸癌、膵臓癌、小細胞肺癌、ＨＥＲ２陽性乳癌又は前立腺癌を有する患者において有効であり得る。

【０３５３】

一部の実施形態では、本明細書に開示される方法又は組成物で使用される少なくとも１つの追加の薬剤（例えば、癌治療薬）は、チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態では、少なくとも１つの追加の薬剤は、ＰＤ－１アンタゴニスト、ＰＤ－Ｌ１アンタゴニスト、ＰＤ－Ｌ１又はＰＤ－Ｌ２融合タンパク質、ＣＴＬＡ４アンタゴニスト、ＧＩＴ

Ｒ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（ＯＸ４０アゴニスト）、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、及びＰＡＲＰ阻害剤からなる群から選択される。例示的なチェックポイント阻害剤として、限定するものではないが、ニボルマブ（例えば、Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標）、抗ＰＤ－１抗体）、ペムブロリズマブ（Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標）、抗ＰＤ－１抗体）、ＢＭＳ－９３６５５９（抗ＰＤ－Ｌ１抗体）、アテゾリズマブ（例えば、Ｔｅｃｅｎｔｒｉｑ（登録商標）、抗ＰＤ－Ｌ１抗体）、アベルマブ（例えば、Ｂａｖｅｎｃｉｏ（登録商標）、抗ＰＤ－Ｌ１抗体）、デュルバルマブ（例えば、Ｉｍｆｉｎｚｉ（登録商標）、抗ＰＤ－Ｌ１抗体）、イピリムマブ（例えば、Ｙｅｒｖｏｙ（登録商標）、抗ＣＴＬＡ４抗体）、トレメリムマブ（抗ＣＴＬＡ４抗体）、ＩＭＰ－３２１（エフチラギモドα又は「ＩｍｍｕＦａｃｔ（登録商標）」、抗ＬＡＧ３大分子）、ＢＭＳ－９８６０１６（レラトリマブ、抗ＬＡＧ３抗体）及びリリルマブ（抗ＫＩＲ２ＤＬ－１、－２、－３抗体）が挙げられる。一部の実施形態では、本明細書に開示されるＴＧＦβ阻害剤は、本明細書に列挙されるものなどのチェックポイント阻害療法に対する低応答者又は非応答者である対象の癌の治療に使用される。一部の実施形態では、チェックポイント阻害剤及びＴＧＦβ阻害剤（例えば、本明細書に開示されるＴＧＦβ１選択的阻害剤）は、単一分子、例えば、二重特異性抗体若しくは他の多重特異性構築物中に、又はチェックポイント阻害剤が小分子である場合、抗体薬物複合体中に含まれる。

【０３５４】

一部の実施形態では、本開示は、ＴＧＦβシグナル伝達調節不全が疾患プロセスの媒介因子として関与している固形腫瘍及び／又は血液学的悪性腫瘍の治療のための少なくとも１つのチェックポイント阻害剤療法と組み合わせた、ＴＧＦβ阻害剤、例えばＡｂ６の使用を包含する。特定の実施形態では、組合せ療法は、チェックポイント阻害剤療法（例えば、抗ＰＤ－１又は抗ＰＤ－Ｌ１療法）に応答しない患者に投与することができる。こうした患者には、限定されないが、非小細胞肺癌、尿路上皮膀胱癌、黒色腫、トリプルネガティブ乳癌又は他の進行固形癌と診断された患者が含まれ得る。特定の実施形態では、組合せ療法は、ＴＧＦβ阻害剤、例えばＡｂ６、及びチェックポイント阻害剤療法（例えば、ペムブロリズマブ）を含み得る。特定の実施形態では、組合せ療法は、チェックポイント阻害剤療法によるＦＤＡの承認を受けている癌と診断された免疫療法未経験患者（例えば、過去にチェックポイント阻害剤療法を受けたことがない患者）に投与することができる。こうした癌は、胃癌（例えば、転移性胃癌）、尿路上皮膀胱癌、肺癌、トリプルネガティブ乳癌、腎細胞癌、子宮頸部癌又は頭頸部扁平上皮癌であり得る。特定の実施形態では、組合せ療法は、ＴＧＦβ阻害剤、例えばＡｂ６及びチェックポイント阻害剤療法（例えば、ペムブロリズマブ）を含み得る。特定の実施形態では、組合せ療法は、追加の薬剤、例えば追加のチェックポイント阻害剤及び／又は別の化学療法薬をさらに含み得る。特定の実施形態では、組合せ療法は、チェックポイント阻害剤療法によるＦＤＡの承認を受けていない癌と診断された免疫療法未経験患者（例えば、過去にチェックポイント阻害剤療法を受けたことがない患者）に投与することができる。こうした癌は、マイクロサテライト安定性大腸癌又は膵臓癌であり得る。特定の実施形態では、組合せ療法は、ＴＧＦβ阻害剤、例えばＡｂ６、チェックポイント阻害剤療法（例えば、ペムブロリズマブ）及び少なくとも１つの化学療法薬（例えば、アキシチニブ、パクリタキセル、シスプラチン及び／又は５－フルオロウラシル）を含み得る。特定の実施形態では、チェックポイント阻害剤療法は、ペムブロリズマブ、ニボルマブ及び／又はアテゾリズマブであり得る。特定の実施形態では、組合せ療法は、免疫排除表現型を呈示することを特徴とする癌を有する患者に投与される。特定の実施形態では、治療についてさらなる情報を提供するために患者の癌の追加的分析を実施し得、そうした分析は、マイクロサテライト不安定性レベル、ＰＤ－１及び／若しくはＰＤ－Ｌ１発現レベル並びに／又はＥＧＦＲ、ＡＬＫ、ＲＯＳ１、ＢＲＡＦなどの既知の癌ドライバー遺伝子における変異の存在を含む既知の癌特異的マーカを使用し得る。特定の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤、例

えばＡｂ６は、約３０００ｍｇ、２４００ｍｇ、１６００ｍｇ、８００ｍｇ、２４０ｍｇ、８０ｍｇ又はそれ未満の量で投与され得る。

【０３５５】

一部の実施形態では、少なくとも１つの追加の薬剤は、阻害性共刺激分子及び活性化共刺激分子などのＴ細胞共刺激分子と結合する。一部の実施形態では、少なくとも１つの追加の薬剤は、抗ＣＤ４０抗体、抗ＣＤ３８抗体、抗ＫＩＲ抗体、抗ＣＤ３３抗体、抗ＣＤ１３７抗体、及び抗ＣＤ７４抗体からなる群から選択される。

【０３５６】

一部の実施形態では、少なくとも１つの追加の療法は放射線である。一部の実施形態では、少なくとも１つの追加の薬剤は、放射線治療薬である。一部の実施形態では、少なくとも１つの追加の薬剤は、化学療法薬である。一部の実施形態では、化学療法薬はタキソールである。一部の実施形態では、少なくとも１つの追加の薬剤は、抗炎症薬である。一部の実施形態では、少なくとも１つの追加の薬剤は、単球／マクロファージ動員及び／又は組織浸潤のプロセスを阻害する。一部の実施形態では、少なくとも１つの追加の薬剤は、肝星状細胞活性化の阻害剤である。一部の実施形態では、少なくとも１つの追加の薬剤は、ケモカイン受容体アンタゴニスト、例えばＣＣＲ２アンタゴニスト及びＣＣＲ５アンタゴニストである。一部の実施形態では、このようなケモカイン受容体アンタゴニストは、ＣＣＲ２／ＣＣＲ５アンタゴニストなどの二重特異的アンタゴニストである。一部の実施形態では、組合せ療法として投与される少なくとも１つの追加の薬剤は、増殖因子若しくはその調節因子のＴＧＦβスーパーファミリーのメンバーであるか、又はそれを含む。一部の実施形態では、このような薬剤は、ＧＤＦ８／ミオスタチン及びＧＤＦ１１のモジュレータ（例えば、阻害剤及び活性化剤）から選択される。一部の実施形態では、このような薬剤は、ＧＤＦ８／ミオスタチンシグナル伝達の阻害剤である。一部の実施形態では、このような薬剤は、ｐｒｏ／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阻止するモノクローナル抗体である。一部の実施形態では、ｐｒｏ／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阻止するモノクローナル抗体は、遊離成熟ミオスタチンとは結合しない；例えば、国際公開第２０１７／０４９０１１号パンフレットを参照されたい。

【０３５７】

一部の実施形態では、追加の療法は、ＣＡＲ－Ｔ療法及びＣＡＲ－ＮＫ療法などの細胞療法を含む。

【０３５８】

一部の実施形態では、さらなる療法は、ＶＥＧＦ阻害剤、例えばベバシズマブなどの抗ＶＥＧＦ療法薬を投与することを含む。一部の実施形態では、本明細書で企図されるＴＧＦβの阻害剤は、固形癌（例えば、卵巣癌）の治療のために、ＶＥＧＦ阻害剤（例えば、ベバシズマブ）と一緒に使用され得る（例えば、組合せ療法、アドオン療法など）。一部の実施形態では、本明細書で企図されるＴＧＦβの阻害剤は、造血器癌の治療のために、ＶＥＧＦ阻害剤（例えば、ベバシズマブなど）と一緒に使用され得る（例えば、組合せ療法、アドオン療法など）。

【０３５９】

一部の実施形態では、追加の療法は、癌ワクチンである。ペプチド癌ワクチンを検証した多くの臨床試験は、血液悪性腫瘍（血液癌）、黒色腫（皮膚癌）、乳癌、頭頸部癌、胃食道癌、肺癌、膵臓癌、前立腺癌、卵巣癌、及び大腸癌を標的化している。抗原には、ＨＥＲ２、テロメラーゼ（ＴＥＲＴ）、サバイビン（ＢＩＲＣ５）及びウィルムス腫瘍１（ＷＴ１）からのペプチドが含まれた。いくつかの試験では、１２～１５個の異なるペプチドの「個別化された」混合物も使用された。即ち、それらは、患者が免疫応答を示す患者の腫瘍からのペプチドの混合物を含有する。いくつかの試験は、固形腫瘍、グリオーマ、膠芽腫、黒色腫、及び乳癌、子宮頸部癌、卵巣癌、大腸癌、及び非小肺細胞癌を標的化しており、ＭＵＣ１、ＩＤＯ１（インドールアミン２，３－ジオキシゲナーゼ）、ＣＴＡＧ１Ｂ、及び２つのＶＥＧＦ受容体、ＦＬＴ１及びＫＤＲからの抗原を含む。特に、ＩＤＯ

１ワクチンは、免疫チェックポイント阻害剤イピリムマブ及びＢＲＡＦ（遺伝子）阻害剤ベムラフェニブと組み合わせて、黒色腫患者において試験される。

【０３６０】

癌ワクチンとして有用な腫瘍抗原の非限定的な例には、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＨＥＲ２、ＨＰＶ１６　Ｅ７（パピローマウイルス科（Ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｉｄａｅ）＃Ｅ７）、ＣＥＡ（癌胎児性抗原）、ＷＴ１、ＭＡＲＴ－１、ｇｐ１００、チロシナーゼ、ＵＲＬＣ１０、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２、サバイビン（ｓｕｒｖｉｖｉｎｇ）、ＭＵＣ１及びＭＵＣ２が含まれる。

【０３６１】

しかしながら、このような癌ワクチンによってプライミングされた活性化免疫細胞は、部分的にＴＧＦβ１依存性機構を介してＴＭＥから排除され得る。免疫抑制を解決する目的で、ワクチンの潜在力を解放するために本開示のＴＧＦβ１阻害剤の使用を考えることができる。

【０３６２】

本明細書で企図される組合せ療法は、投与される、より低用量の治療薬を有利に利用し得るため、様々な単剤療法に関連する毒性又は合併症の可能性を回避することができる。一部の実施形態では、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）に対して低応答性であるか又は非応答性の者をより応答性にし得る。一部の実施形態では、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、治療薬（例えば、標準治療）の投与量の減少を可能にするが、それでも患者において同等の臨床的効果をもたらし、且つ付随する薬物関連毒性若しくは有害事象が減少するか又はそれらの程度が低減する。

【０３６３】

一部の実施形態では、本明細書で企図されるＴＧＦβの阻害剤は、ミオスタチン（ＧＤＦ８）の選択的阻害剤と一緒に使用され得る（例えば、組合せ療法、アドオン療法など）。一部の実施形態では、ミオスタチンの選択的阻害剤は、ｐｒｏ／潜在型ミオスタチン活性化の阻害剤である。例えば、アピテグロマブなど、国際公開第２０１７／０４９０１１号パンフレットに開示されている抗体を参照されたい。

【０３６４】

治療薬としてのＴＧＦβ１阻害剤の利点

様々な疾患が、疾患の病因及び／又は進行に集合的に寄与するＴＧＦβ１の供給源として、不均一な細胞集団を含むことが認識されている。複数のタイプのＴＧＦβ１含有複合体（「コンテキスト」）は、同じ疾患微小環境内に共存する可能性がある。特に、このような疾患は、ＴＧＦβ１シグナル伝達のＥＣＭ（又は「マトリックス」）成分（例えば、ＥＣＭ調節不全）及びＴＧＦβ１シグナル伝達の免疫成分の両方を伴い得る。こうした状況では、単一のＴＧＦβ１コンテキスト（例えば、１つの特定のタイプの提示分子に関連するＴＧＦβ１）のみを選択的に標的化することは、限定的な軽減をもたらし得る。従って、広範に阻害性のＴＧＦβ１アンタゴニストが、治療的使用のために望ましい。ＴＧＦβ１の複数の潜在型複合体を広範に標的化した既述の阻害抗体は、標的複合体間で歪んだ結合プロファイルを示した（例えば、国際公開第２０１８／１２９３２９号及び同第２０１９／０７５０９０号パンフレットを参照されたい）。そのため、本発明者らは、ＴＧＦβ１活性化を選択的に阻害する阻害抗体を、それに連結した具体的な提示分子とは関係なく、より一様に同定することに着手した。特に免疫腫瘍学用途の場合、マトリックス関連ＴＧＦβ１と免疫細胞関連ＴＧＦβ１の両方を強力に阻害することが有利であると推論された。

【０３６５】

様々な実施形態において、ＴＧＦβ１のコンテキスト非依存性阻害剤は、ＴＧＦβ１のｐｒｏ／潜在型形態を標的化するために、本明細書に開示される治療及び方法で使用される。より具体的には、ある様式において、阻害剤は、ＥＣＭ関連ＴＧＦβ１（ＬＴＢＰ１／３－ＴＧＦβ１複合体）を標的化する。別の様式では、阻害剤は、免疫細胞関連ＴＧＦ

β１を標的化する。これには、ＧＡＲＰ提示ＴＧＦβ１、例えば、Ｔｒｅｇ細胞上に発現されるＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体並びにマクロファージ及び他の骨髄系／リンパ系細胞、さらに特定の癌細胞上に発現されるＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体が含まれる。

【０３６６】

このような抗体は、抗体が、複数のタイプの提示分子に関連するＴＧＦβ１の活性化（又は放出）を阻害することができるように、コンテキスト非依存的様式でｐｒｏ／潜在型ＴＧＦβ１複合体からの成熟ＴＧＦβ１増殖因子に結合して、その活性化（又は放出）を阻止するＴＧＦβ１のアイソフォーム特異的阻害剤を含み得る。特に、本開示は、ＥＣＭ関連ＴＧＦβ１（ＬＴＢＰ提示複合体及びＬＴＢＰ３提示複合体）並びに細胞関連ＴＧＦβ１（ＧＡＲＰ提示複合体及びＬＲＲＣ３３提示複合体）をブロックすることができる抗体を提供する。

【０３６７】

様々な疾患状態が、寄与因子としてＴＧＦβシグナル伝達の調節不全を伴うことが示唆されている。実際、特定のヒト状態の病因及び／又は進行は、主にＴＧＦβ１活性によって駆動されるか、又はＴＧＦβ１活性に依存すると思われる。特に、こうした疾患及び障害の多くは、ＴＧＦβ１機能のＥＣＭ成分及び免疫成分の両方を伴い、これは、複数のコンテキストにおけるＴＧＦβ１活性化が関与している（例えば、複数のタイプの提示分子によって媒介される）ことを示唆している。さらに、ＴＧＦβ１応答性細胞間にクロストークがあると考えられる。場合により、ＴＧＦβ１系の多面的な活性同士の相互作用は、疾患の進行、悪化及び／又は疾患と闘う宿主の能力の抑制を招く事象のカスケードをトリガーし得る。例えば、腫瘍微小環境（ＴＭＥ）及び線維性微小環境（ＦＭＥ）などの特定の疾患微小環境は、複数の異なる提示分子、例えば、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１、及びこれらのいずれかの組合せによって提示されるＴＧＦβ１と関連し得る。あるコンテキストのＴＧＦβ１活性は、次に、別のコンテキストのＴＧＦβ１活性を調節するか、又はそれに影響を与え得るが、調節不全の場合、これが疾患状態の悪化を引き起こす可能性を高める。従って、阻害効果をＴＧＦβ１アイソフォームに選択的に限定しながら、ＴＧＦβ１機能の複数のモード（即ち複数のコンテキスト）にわたって広範に阻害することが望ましい。その目的は、創傷治癒に重要な役割を果たすＴＧＦβ３などの他のアイソフォームにより媒介される恒常性ＴＧＦβシグナル伝達を摂動させないことである。

【０３６８】

ＴＧＦβ１活性の免疫成分は、主に細胞関連ＴＧＦβ１（例えば、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１）によって媒介される。ＴＧＦβ１機能のＧＡＲＰ－及びＬＲＲＣ３３アームの両方が、多くの疾患の進行に寄与する免疫抑制的特徴と関連している。従って、本明細書に記載のＴＧＦβ１阻害剤などのＴＧＦβ阻害剤を用いて、免疫抑制性細胞に関連するＴＧＦβ１を阻害することができる。免疫抑制性細胞としては、調節Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、Ｍ２マクロファージ／腫瘍関連マクロファージ、及びＭＤＳＣが挙げられる。本開示のＴＧＦβ阻害剤は、腫瘍微小環境などの疾患部位における免疫抑制性表現型を阻害、低減、又は逆転させ得る。

【０３６９】

一部の実施形態では、ＴＧＦβ１阻害剤は、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体を発現する細胞に関連するＴＧＦβ１を阻害し、この場合、任意選択で、上記細胞は、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、骨髄由来抑制細胞（ＭＤＳＣ）、リンパ球、肥満細胞又はミクログリアであり得る。Ｔ細胞は、調節Ｔ細胞（例えば、免疫抑制性Ｔ細胞）であり得る。好中球は、活性化好中球であり得る。マクロファージは、活性化された（例えば、極性化）マクロファージであり得、プロ線維化及び／又は腫瘍関連マクロファージ（ＴＡＭ）、例えばＭ２ｃサブタイプ及びＭ２ｄサブタイプマクロファージを含む。一部の実施形態では、マクロファージは、マクロファージにおいて癌前表現型をさらに誘導し得る腫瘍由来因子（例えば、サイトカイン、増殖因子など）に曝露される。一部の実施形態では、

このような腫瘍由来因子は、ＣＳＦ－１／Ｍ－ＣＳＦである。
【０３７０】
一部の実施形態では、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体を発現する細胞は、癌細胞、例えば循環癌細胞及び腫瘍細胞である。
【０３７１】
本発明を実施するのに有用なＴＧＦβ阻害剤
本明細書に開示される治療的使用及び関連方法に好適なＴＧＦβ阻害剤は、小分子（即ち低分子量）アンタゴニスト及び生物製剤を含む。こうした阻害剤は、アイソフォーム選択的阻害剤及びアイソフォーム非選択的阻害剤を含む。生物製剤阻害剤としては、抗体、その抗原結合断片、抗体ベースの分子又は免疫グロブリン様分子並びに他の操作された構築物、典型的には融合タンパク質、例えばリガンドトラップが挙げられる。リガンドトラップは、典型的には、ＴＧＦβ受容体の１若しくは複数のリガンド結合部分に由来するリガンド結合部分を含む。このような生物製剤は、二機能性融合タンパク質及び二重特異性抗体などの多機能構築物であり得る。
【０３７２】
一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、ＴＧＦβ受容体の低分子量アンタゴニスト、例えばＡＬＫ５アンタゴニスト、例えばガルニセルチブ（ＬＹ２１５７２９一水和物）；３つのアイソフォーム全てを阻害するモノクローナル抗体（中和抗体など）（「汎阻害剤」抗体）（例えば、国際公開第２０１８／１３４６８１号パンフレットを参照されたい）；３つのアイソフォームの２つを優先的に阻害するモノクローナル抗体（例えば、ＴＧＦβ１／２（例えば、国際公開第２０１６／１６１４１０号パンフレット）及びＴＧＦβ１／３（例えば、国際公開第２００６／１１６００２号パンフレット）に対する抗体；及びリガンドトラップなどの操作分子（例えば、融合タンパク質）（例えば、国際公開第２０１８／０２９３６７号パンフレット；同第２０１８／１２９３３１号パンフレット及び同第２０１８／１５８７２７号パンフレット）の１つ以上を使用することができる。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、Ｂａｔｌｌｅ ａｎｄ Ｍａｓｓａｇｕｅ（Ｉｍｍｕｎｉｔｙ，２０１９．Ａｐｒ １６；５０（４）：９２４－９４０）（その内容はその全体が本明細書に組み込まれる）に開示されているＴＧＦβ阻害剤の１つ以上を使用することができる。
【０３７３】
一部の実施形態では、ＴＧＦβ受容体の低分子量アンタゴニストは、バクトセルチブ（ＴＥＷ－７１９７、ＥＷ－７１９７）、ＬＹ３２００８８２、ＰＦ－０６９５２２２９、ＡＺ １２６０１０１１、及び／又はＡＺ １２７９９７３４を含み得る。
【０３７４】
一部の実施形態では、中和汎ＴＧＦβ抗体は、ＧＣ１００８又はその誘導体である。一部の実施形態では、このような抗体は、国際公開第２０１８／１３４６８１号パンフレットの開示に従う配列を含む。一部の実施形態では、汎ＴＧＦβ抗体は、ＳＡＲ４３９４５９又はその誘導体である。
【０３７５】
一部の実施形態では、ＴＧＦβ１／２抗体は、ＸＰＡ－４２－０８９又はその誘導体を含む。
【０３７６】
一部の実施形態では、抗体は、ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３の両方に特異的に結合する中和抗体である。一部の実施形態では、このような抗体は、ＴＧＦβ３よりもＴＧＦβ１に優先的に結合する。例えば、抗体は、国際公開第２００６／１１６００２号パンフレットの開示に従う配列を含む。一部の実施形態では、抗体は、２１Ｄ１である。
【０３７７】
一部の実施形態では、抗体は、ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ２の両方に特異的に結合する中和抗体である。一部の実施形態では、抗体は、国際公開第２０１６／１６１４１０号パンフレットの開示に従う配列を含む。一部の実施形態では、抗体は、ＸＯＭＡ－０８９、又

はＮＩＳ－７９３である。
【０３７８】
一部の実施形態では、抗体は、ＴＧＦβ１に対して選択的である活性化阻害抗体である。一部の実施形態では、抗体は、国際公開第２０１５／０１５００３号パンフレット、同第２０１９／０７５０９０号パンフレット又は同第２０１６／１１５３４５号パンフレットの開示に従う配列を含む。
【０３７９】
一部の実施形態では、抗体は、ＴＧＦβ１に対して選択的である中和抗体である。一部の実施形態では、抗体は、国際公開第２０１３／１３４３６５号パンフレット又は同第２０１８／０４３７３４号パンフレットの開示に従う配列を含む。
【０３８０】
一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、リガンドトラップである。一部の実施形態では、リガンドトラップは、国際公開第２０１８／１５８７２７号パンフレットの開示に従う構造を含む。一部の実施形態では、リガンドトラップは、国際公開第２０１８／０２９３６７号パンフレット；同第２０１８／１２９３３１号パンフレットの開示に従う構造を含む。一部の実施形態では、リガンドトラップは、ＣＴＬＡ４－ＴＧＦｂＲＩＩとして知られる構築物である。一部の実施形態では、リガンドトラップは、チェックポイント阻害剤機能及びＴＧＦβ阻害剤機能を含む二機能性融合タンパク質である。一部の実施形態では、二機能性融合タンパク質は、Ｍ７８２４又はＰＤＬ１－ＴＧＦｂＲＩＩとして知られる構築物である。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、受容体ベースのＴＧＦβトラップ、例えば、ＡＶＩＤ２００である。
【０３８１】
一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、インテグリン阻害剤である。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、αＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３及び／又はα８β１などのインテグリンの阻害剤である。インテグリン阻害剤は、インテグリンに結合し、且つ／又はインテグリンとｐｒｏＴＧＦβ１及び／若しくはｐｒｏＴＧＦβ３のＲＧＤモチーフとの結合を阻害する小分子阻害剤及び抗体を含む。
【０３８２】
一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、潜在型ＴＧＦβ（例えば、潜在型ＴＧＦβ１又は潜在型ＴＧＦβ３）の阻害剤である。一部の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、ｐｒｏＴＧＦβ１及び／又はｐｒｏＴＧＦβ３のＲＧＤモチーフに結合する阻害剤である。
【０３８３】
ｐｒｏＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的抗体
好ましくは、本開示に従う治療的使用及び関連方法は、ＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的阻害剤、例えばＡｂ６（その配列は、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１９／０４１３７３号明細書に開示されるとおりであり、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を用いて実施される。
【０３８４】
本出願人は、以下の特徴の全部又は大部分を具体化する改良された抗体を以前開示した：１）ＴＧＦβ１に対する選択性を維持して、汎阻害に関連する不要な毒性を最小化する（「アイソフォーム選択性」）（例えば、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１７／０２１９７２号明細書を参照されたい）；２）様々な生物学的コンテキスト又はマトリックス関連及び細胞関連カテゴリーの両方にわたって広範な結合活性を示す（「コンテキスト非依存性」）を示す（例えば、国際公開第２０１８／１２９３２９号パンフレットを参照されたい）；３）複数の抗原複合体にわたってより均一又はバイアスのない親和性を達成する（「均一性」）；４）抗原複合体の各々に対して強い結合活性を示し（「高親和性」）、且つ各コンテキストに対して確実な阻害活性を有する（「効力」）（例えば、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１９／０４１３７３号明細書を参照されたい）；並びに５）好ましい作用機序は、活性化工程を阻害して、阻害剤が、組織にテザリングした潜在型ＴＧＦβ

１複合体を標的化し、それにより可溶性／遊離増殖因子を直接標的化するのではなく、下流の活性化事象を先制的に防止して持続性効果を達成することである（「持続性」）。ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１９／０４１３７３号明細書に開示されているように、こうしたＴＧＦβ１阻害剤は、潜在型ＴＧＦβ１活性化の高度に強力且つ高度に選択的な阻害剤である。そこに示されるデータは、とりわけ、アイソフォーム選択的阻害のこのメカニズムが、ヒト癌に認められるＣＢＴに対する一次耐性の特徴のいくつかを厳密に再現する同系マウスモデルにおいて、抗ＰＤ－１に対する一次耐性を解決するのに十分であることを実証した。加えて、６）こうした阻害剤は、ＴＧＦβの汎阻害剤又は他のアイソフォーム非選択的阻害剤と比較して、改善された安全性プロファイルを有する。総合すると、これらの有効性及び安全性データは、癌免疫療法におけるチェックポイント阻害に対する臨床応答の拡大及び増強を目的とし、さらに多数の別のＴＧＦβ１関連適応症の治療を目的とする、選択的ＴＧＦβ１阻害の治療的使用を探求するための理論的根拠を提供する。

【０３８５】

特定のＴＧＦβ１阻害剤の一般的な特徴

本開示を実行するために使用され得る例示的な抗体は、内容が全体として参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２０２００１４４６０号パンフレットに開示される。

【０３８６】

本開示を実行するのに有用な好ましい抗体及びそのような抗体をコードする対応する核酸配列は、表１及び２に示されるＣＤＲアミノ酸配列の１つ以上を含む。表１に列挙されるＨ－ＣＤＲ（Ｈ－ＣＤＲ１、Ｈ－ＣＤＲ２及びＨ－ＣＤＲ３）の各セットは、表２で提供されるＬ－ＣＤＲ（Ｌ－ＣＤＲ１、Ｌ－ＣＤＲ２及びＬ－ＣＤＲ３）と組み合わせられ得る。

【０３８７】

従って、本開示は、６つのＣＤＲ（例えば、Ｈ－ＣＤＲ１、Ｈ－ＣＤＲ２、Ｈ－ＣＤＲ３、Ｌ－ＣＤＲ１、Ｌ－ＣＤＲ２及びＬ－ＣＤＲ３）を含む単離された抗体又はその抗原結合断片を提供し、Ｈ－ＣＤＲ１、Ｈ－ＣＤＲ２及びＨ－ＣＤＲ３は、表１に列挙される抗体のＨ－ＣＤＲのセットから選択され、且つＬ－ＣＤＲ１は、ＱＡＳＱＤＩＴＮＹＬＮ（配列番号７８）を含み、Ｌ－ＣＤＲ２は、ＤＡＳＮＬＥＴ（配列番号７９）を含み、且つＬ－ＣＤＲ３は、ＱＱＡＤＮＨＰＰＷＴ（配列番号６）を含み、任意選択で、Ｈ－ＣＤＲ１は、ＦＴＦＳＳＦＳＭＤ（配列番号８０）を含み得；Ｈ－ＣＤＲ－２は、ＹＩＳＰＳＡＤＴＩＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号７６）を含み得；且つ／又はＨ－ＣＤＲ３は、ＡＲＧＶＬＤＹＧＤＭＬＭＰ（配列番号３）を含み得る。いくつかの実施形態では、抗体又は断片は、アミノ酸配列ＦＴＦＳＳＦＳＭＤ（配列番号８０）を有するＨ－ＣＤＲ１、アミノ酸配列ＹＩＳＰＳＡＤＴＩＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号７６）を有するＨ－ＣＤＲ２及びアミノ酸配列ＡＲＧＶＬＤＹＧＤＭＬＭＰ（配列番号３）を有するＨ－ＣＤＲ－３；アミノ酸配列ＱＡＳＱＤＩＴＮＹＬＮ（配列番号７８）を有するＬ－ＣＤＲ１、アミノ酸配列ＤＡＳＮＬＥＴ（配列番号７９）を有するＬ－ＣＤＲ２及びアミノ酸配列ＱＱＡＤＮＨＰＰＷＴ（配列番号６）を有するＬ－ＣＤＲ３を含む。

【０３８８】

【表２】

表 1. Lu et al.において記載される付番スキームを使用して決定されるとおりの例示的な抗体の重鎖の相補性決定領域

Ab	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
Ab4	FTFSSYSMN (配列番号 81)	YISSSSSTIYYADSVKG (配列番号 82)	ARGVLDYGDMLDP (配列番号 83)
Ab5	FTFSSFSMD (配列番号 80)	YISPDASTIYYADSVKG (配列番号 84)	ARGVLDYGDMLDP (配列番号 83)
Ab6	FTFSSFSMD (配列番号 80)	YISPSADTIYYADSVKG (配列番号 76)	ARGVLDYGDMLMP (配列番号 3)
Ab21	FTFSSFSMD (配列番号 80)	YISPDASTIYYADSVKG (配列番号 84)	ARGVLDYGDMLDP (配列番号 83)
Ab22	FTFGSFSMN (配列番号 88)	YIHSDASTIYYADSVKG (配列番号 86)	ARGVLDYGDMLDP (配列番号 83)
Ab23	FTFSSFSMN (配列番号 87)	YISPSADTIYYADSVKG (配列番号 76)	ARGVLDYGDMLDP (配列番号 83)
Ab24	FTFSSFAMY (配列番号 88)	YISPDASTIYYADSVKG (配列番号 84)	ARGVLDYGDMLDP (配列番号 83)
Ab25	FTFGSFSMD (配列番号 88)	YISPDASTIYYADSVKG (配列番号 84)	ARGVLDYGDMLDP (配列番号 83)
Ab26	FTFSSFSMD (配列番号 80)	YISPDASTIYYADSVKG (配列番号 84)	ARGVLDYGDMLDP (配列番号 83)
Ab27	FTFSFYAMN (配列番号 90)	YISPDASTIYYADSVKG (配列番号 84)	ARGVLDYGDMLDP (配列番号 83)
Ab28	FTFSSFSMD (配列番号 80)	YISPDASTIYYADSVKG (配列番号 84)	VRGVLDYGDMLDP (配列番号 91)
Ab29	FTFSSFAMN (配列番号 92)	YISPDASTIYYAGSVKG (配列番号 93)	VRAVLDYGDMLDP (配列番号 94)
Ab30	FTFSSFSMD (配列番号 80)	YISPDASTIYYADSVKG (配列番号 84)	ARGTLDYGDMLDP (配列番号 95)
Ab31	FTFSSFSMD (配列番号 80)	YISPDASTIYYADSVKG (配列番号 84)	ARAVLDYGDMLDP (配列番号 96)
Ab32	FTFSSFSMN (配列番号 87)	YISPSADTIYYADSVKG (配列番号 76)	ARGVWDMGDMLDP (配列番号 97)
Ab33	FTFSSFSMN (配列番号 87)	YISPSADTIYYADSVKG (配列番号 76)	AHGVLDYGDMLDP (配列番号 98)
Ab34	FTFAFYSMN (配列番号 99)	YISPDASTIYYADSVKG (配列番号 84)	ARGVLDYGDMLDP (配列番号 83)

【０３８９】

【表３】

表 2. Kabat 付番スキーム又は Lu et al.の付番方式を使用して決定されるとおりの例示的な抗体の軽鎖の相補性決定領域

L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
QASQDITNYLN (配列番号 78)	DASNLET (配列番号 79)	QQADNHPPWT (配列番号 6)

【０３９０】

抗体内のＣＤＲ配列の決定は、利用されている特定の付番スキームに依存する。一般的に使用される方式としては、Ｋａｂａｔ付番方式、ＩＭＴＧ付番方式、Ｃｈｏｔｈｉａ付番方式、及びＬｕ　ｅｔ　ａｌ．，（Ｌｕ　Ｘ　ｅｔ　ａｌ．，ＭＡｂｓ．２０１９　Ｊａｎ；１１（１）：４５－５７）によって記載される付番方式などの他の方式が挙げられるが、これらに限定されない。説明するために、４種の異なる付番方式によって定義されるとおりのＡｂ６の６つのＣＤＲ配列が下に例示される。当技術分野で認められる任意のＣＤＲ付番方式が、本開示の抗体のＣＤＲ配列を定義するために使用され得る。

【０３９１】

【表４】

表 3. 4 種の付番スキームに基づく例示的な抗体(Ab6)の6つの CDR

	IMTG 付番	Kabat 付番	Chothia 付番	Lu et al.の方式
H-CDR1	GFTFSSFS (配列番号 1)	SFSMD (配列番号 75)	GFTFSSF (配列番号 168)	FTFSSFSMD (配列番号 80)
H-CDR2	ISPSADTI (配列番号 2)	YISPSADTIYYADSVKG (配列番号 76)	SPSADT (配列番号 169)	YISPSADTIYYADSVKG (配列番号 76)
H-CDR3	ARGVLDYGDMLMP (配列番号 3)	GVLDYGDMLMP (配列番号 77)	GVLDYGDMLMP (配列番号 77)	ARGVLDYGDMLMP (配列番号 3)
L-CDR1	QDITNY (配列番号 4)	QASQDITNYLN (配列番号 78)	QASQDITNYLN (配列番号 78)	QASQDITNYLN (配列番号 78)
L-CDR2	DAS (配列番号 5)	DASNLET (配列番号 79)	DASNLET (配列番号 79)	DASNLET (配列番号 79)
L-CDR3	QQADNHPPWT (配列番号 6)	QQADNHPPWT (配列番号 6)	QQADNHPPWT (配列番号 6)	QQADNHPPWT (配列番号 6)

【０３９２】

本開示の例示的な抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列が、表４で提供される。従って、いくつかの実施形態では、本開示のアイソフォーム選択的なＴＧＦβ１阻害剤は、重鎖可変ドメイン（V_H）及び軽鎖可変ドメイン（V_L）を含む抗体又はその抗原結合断片であり得、V_H及びV_L配列は、下の表４に列挙されるV_H及びV_L配列のセットのいずれか１つから選択される。

【０３９３】

【表５】

表 4. 例示的な抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメイン

	重鎖可変ドメイン(V_H)	軽鎖可変ドメイン(V_L)
Ab4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (配列番号 100)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (配列番号 8)
Ab5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPDASTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (配列番号 101)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (配列番号 8)
Ab6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPSADTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLMPWGQGTLVTVSS (配列番号 7)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (配列番号 8)
Ab21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPDASTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (配列番号 102)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (配列番号 8)
Ab22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGS FSMNWVRQAPGKGLEWVSYIHSDASTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (配列番号 103)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (配列番号 8)
Ab23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMNWVRQAPGKGLEWVSYISPSADTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (配列番号 104)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (配列番号 8)
Ab24	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSS FAMYWVRQAPGKGLEWVSYISPDASTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (配列番号 105)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (配列番号 8)
Ab25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPDASTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (配列番号 106)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (配列番号 8)
Ab26	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPDASTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (配列番号 107)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (配列番号 8)
Ab27	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSF YAMNWVRQAPGKGLEWVSYISPDASTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (配列番号 108)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (配列番号 8)
Ab28	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPDASTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCVRGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (配列番号 109)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (配列番号 8)
Ab29	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSS FAMNWVRQAPGKGLEWVSYISPDASTIYYAG SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCVRAVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (配列番号 110)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (配列番号 8)

【０３９４】

【表６】

Ab30	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPDASTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGTLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (配列番号 111)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (配列番号 8)
Ab31	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPDASTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARAVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (配列番号 112)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (配列番号 8)
Ab32	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMNWVRQAPGKGLEWVSYISPSADTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVWDMGDMLDPWGQGTLVTVSS (配列番号 113)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (配列番号 8)
Ab33	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMNWVRQAPGKGLEWVSYISPSADTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAHGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (配列番号 114)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (配列番号 8)
Ab34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAF YSMNWVRQAPGKGLEWVSYISPDAST IYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVT VSS (配列番号 115)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (配列番号 8)

【０３９５】

いくつかの実施形態では、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む抗体又はその抗原結合断片が開示され、重鎖可変ドメインは、Ａｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６、Ａｂ２１、Ａｂ２２、Ａｂ２３、Ａｂ２４、Ａｂ２５、Ａｂ２６、Ａｂ２７、Ａｂ２８、Ａｂ２９、Ａｂ３０、Ａｂ３１、Ａｂ３２、Ａｂ３３及びＡｂ３４からなる群から選択される配列のいずれか１つと少なくとも９０％（例えば、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％及び１００％）の配列同一性を有し；且つ軽鎖可変ドメインは、Ａｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６、Ａｂ２１、Ａｂ２２、Ａｂ２３、Ａｂ２４、Ａｂ２５、Ａｂ２６、Ａｂ２７、Ａｂ２８、Ａｂ２９、Ａｂ３０、Ａｂ３１、Ａｂ３２、Ａｂ３３及びＡｂ３４から選択される配列のいずれか１つと少なくとも９０％の同一性を有し、任意選択で、重鎖可変ドメインは、任意選択で、少なくとも９５％の配列同一性を有し得、且つ／又は軽鎖可変ドメインは、少なくとも９５％（例えば、少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％及び１００％）の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、抗体又は断片の重鎖可変ドメインは、配列番号７と少なくとも９０％の配列同一性を有し、且つ任意選択で、抗体又は断片の軽鎖可変ドメインは、配列番号８と少なくとも９０％の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、抗体又は断片の重鎖可変ドメインは、配列番号７と少なくとも９５％の配列同一性を有し、且つ任意選択で、抗体又は断片の軽鎖可変ドメインは、配列番号８と少なくとも９５％の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、抗体又は断片の重鎖可変ドメインは、配列番号７と少なくとも９８％の配列同一性を有し、且つ任意選択で、抗体又は断片の軽鎖可変ドメインは、配列番号８と少なくとも９８％の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、抗体又は断片の重鎖可変ドメインは、配列番号７と１００％の配列同一性を有し、且つ任意選択で、抗体又は断片の軽鎖可変ドメインは、配列番号８と１００％の配列同一性を有する。

【０３９６】

様々な実施形態では、本明細書で開示される抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号７及び８の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインに由来する６つのＣＤＲ又はその完全な配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ

配列番号７及び８と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９５％の同一性）を有する重鎖可変ドメイン配列及び軽鎖可変ドメイン配列を含む。例えば、抗体又はその抗原結合断片は、上の表１及び２に記載されるものから選択される６つの対応するＨ－ＣＤＲ及びＬ－ＣＤＲを含み得る。いくつかの特定の実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、（例えば、Ｌｕ　ｅｔ　ａｌ．の方式を使用する）表３に記載される６つの対応するＨ－ＣＤＲ及びＬ－ＣＤＲのセットを含む。

【０３９７】

代わりに又は加えて、本開示に関連して使用される抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号７及び８と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９５％の同一性）を有する重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み得、且つ（ｉ）潜在型ラッソ（配列番号１２６）の少なくとも一部を含む第１の結合領域；及びｉｉ）フィンガー－１（配列番号１２４）の少なくとも一部を含む第２の結合領域でｐｒｏＴＧＦβ１複合体に特異的に結合し；溶液中でｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合するとき、抗体又は断片は、水素重水素交換質量分析（ＨＤＸ－ＭＳ）によって決定されるとおり、溶媒暴露から結合領域を保護するという点で特徴付けられる。第１の結合領域は、ＰＧＰＬＰＥＡＶ（配列番号１３４）又はその一部を含み得、第２の結合領域は、ＲＫＤＬＧＷＫＷ（配列番号１４３）又はその一部を含み得る。本明細書で使用する場合、結合領域の保護は、タンパク質－タンパク質相互作用のＨＤＸ－ＭＳ系アッセイによって評価されるとおりのタンパク質（例えば、エピトープを含有するタンパク質の領域）が溶媒に暴露される程度である抗体－抗原結合などのタンパク質－タンパク質相互作用を指す。結合の保護は、結合／相互作用の程度と逆相関する結合部位で起こるプロトン交換のレベルによって判断され得る。従って、本明細書に記載される抗体が抗原の領域に結合するとき、タンパク質－タンパク質相互作用は、結合領域が周囲の溶媒によって接触可能になることを妨げるため、結合領域は、溶媒への暴露から「保護される」。従って、保護される領域は、相互作用の部位を意味している。抗体又は断片は、以下の結合領域又はその一部の１つ以上でｐｒｏＴＧＦβ１複合体にさらに結合し得る：ＬＶＫＲＫＲＩＥＡ（配列番号１３２）；ＬＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬ（配列番号１２６）；ＬＡＬＹＮＳＴＲ（配列番号１３５）；ＲＥＡＶＰＥＰＶＬ（配列番号１３６）；ＹＱＫＹＳＮＮＳＷＲ（配列番号１３７）；ＲＫＤＬＧＷＫＷＩＨＥ（配列番号１４４）；ＨＥＰＫＧＹＨＡＮＦ（配列番号１４５）；ＬＧＰＣＰＹＩＷＳ（配列番号１３９）；ＡＬＥＰＬＰＩＶ（配列番号１４０）；及びＶＧＲＫＰＫＶＥＱＬ（配列番号１４１）。

【０３９８】

いくつかの実施形態では、抗体又は抗原結合断片は、配列番号７の重鎖可変ドメイン、及び配列番号８の軽鎖可変ドメインを有する抗体によるＴＧＦβ１（例えば、プロ－及び／又は潜在型－ＴＧＦβ１）への結合に関して交差遮断する（交差競合する）という点でさらに特徴付けられ得る。いくつかの実施形態では、交差遮断するか又は交差競合する抗体は、それぞれ配列番号７及び８のものと少なくとも約９０％（例えば、９５％又は９９％）同一である重鎖及び軽鎖可変ドメインを含む。

【０３９９】

いくつかの実施形態では、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分は、配列番号７に記載される核酸配列と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の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、及び配列番号８に記載される核酸配列と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の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。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号７に記載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、及び配列番号８に記載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。

【０４００】

いくつかの例では、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する本開示の抗体のいずれかは、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及び／又はＣＤＲＬ３と実質的に同様な１つ以上のＣＤＲ（例えば、ＣＤＲＨ又はＣＤＲＬ）配列を有する抗体（その抗原結合部分を含む）を含む。例えば、抗体は、配列番号３、６、７６、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８及び９９のいずれか１つにおける対応するＣＤＲ領域と比較して、最大５、４、３、２又は１つのアミノ酸残基変異を含有する表１に示されるとおりの１つ以上のＣＤＲ配列を含み得る。いくつかの実施形態では、６つのＣＤＲ配列の１つ以上は、表１で提供される配列と比較して最大３つのアミノ酸変化を含有する。１ＣＤＲ当たり最大３つのアミノ酸変化を含むそのような抗体バリアントが、本開示によって包含される。いくつかの実施形態では、そのようなバリアント抗体は、親和性成熟などの最適化のプロセスによって作製される。表４に列挙される抗体（例えばＡｂ６）の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域に関する完全なアミノ酸配列並びに特定の抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードする核酸配列が以下に提供される。

Ａｂ６－重鎖可変領域アミノ酸配列

【化１】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSFSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPSADTIYYADSVKGRFTISRDN
AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGVLDYGDMLMPWGQGTLVTVSS (配列番号7)

Ａｂ６－軽鎖可変領域アミノ酸配列

【化２】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS
SLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGGGTKVEIK (配列番号8)

Ａｂ６－重鎖アミノ酸配列

【化３】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSFSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPSADTIYYADSVKGRFTISRDN
AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGVLDYGDMLMPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK
YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SLG (配列番号9)

Ａｂ６－重鎖核酸配列

【化４】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAG
CCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTTCAGCATGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG
GGTTTCATACATTAGTCCCAGTGCAGACACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTC
CAGAGACAATGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTACT
ACTGCGCCAGAGGGGTGCTCGACTACGGAGACATGTTAATGCCATGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGT
CTCCTCAGCGTCGACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCCA
CCGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACTCTGGCGC
CCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGG
TGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACC
AAGGTGGACAAGCGGGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTCCCTGCCCTGCCCCTGAGTTCCTGG
GCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTG
ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAAGATCCTGAGGTCCAGTTCAATTGGTACGTGGATGGCGTGG
AGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCT
GACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCAGCAACAAGGGCCTGCCC
TCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCC
TAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACATGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATA
TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTT
CCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGC
(配列番号10)

Ａｂ６－軽鎖アミノ酸配列

【化５】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS
SLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号11)

Ａｂ６－軽鎖核酸配列（ヒトカッパ）

【化６】

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAG
GCGAGTCAGGACATTACCAACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATC
TACGATGCATCCAATTTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACT
TTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTCAGCAGGCCGACAATCACCCTCCT
TGGACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA
GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAG
GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA
AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
TGT (配列番号12)

【０４０１】

いくつかの実施形態では、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 ９０：５８７３－７７，１９９３の場合のように修正されたＫａｒｌｉｎ ａｎｄ Ａｌｔｓｃｈｕｌ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：２２６４－６８，１

９９０のアルゴリズムを使用して決定される。そのようなアルゴリズムは、Ａｌｔｓｃｈｕｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－１０，１９９０のＮＢＬＡＳＴ及びＸＢＬＡＳＴプログラム（バージョン２．０）に組み込まれる。ＢＬＡＳＴによるタンパク質探索を、ＸＢＬＡＳＴプログラム、スコア＝５０、ワード長＝３で実施して、目的のタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。２つの配列間にギャップが存在する場合、ギャップ入りＢＬＡＳＴが、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５（１７）：３３８９－３４０２，１９９７に記載されるとおりに利用され得る。ＢＬＡＳＴ及びギャップ入りＢＬＡＳＴプログラムを利用する場合、各プログラムのデフォルトパラメーター（例えば、ＸＢＬＡＳＴ及びＮＢＬＡＳＴ）が使用され得る。

【０４０２】

本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片のいずれかにおいて、１つ以上の保存的変異が、残基が抗体－抗原相互作用に関与する可能性がない位置でＣＤＲ又はフレームワーク配列に導入され得る。いくつかの実施形態では、そのような保存的変異は、残基が結晶構造に基づいて決定されるとおりのＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及びＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体との相互作用に関与する可能性がない位置でＣＤＲ又はフレームワーク配列に導入され得る。いくつかの実施形態では、可能性のある相互作用（例えば、抗原－抗体相互作用に関与する残基）は、構造的類似性を共有する別の抗原に対する既知の構造情報から推定され得る。

【０４０３】

本明細書で使用する場合、「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又はサイズの特徴を変えないアミノ酸置換を指す。バリアントは、そのような方法をまとめた参考文献、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、又はＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋに見出されるような、当業者に知られるポリペプチド配列を改変するための方法に従って作製され得る。アミノ酸の保存的置換は、以下の群内のアミノ酸の中でなされる置換を含む：（ａ）Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｖ；（ｂ）Ｆ、Ｙ、Ｗ；（ｃ）Ｋ、Ｒ、Ｈ；（ｄ）Ａ、Ｇ；（ｅ）Ｓ、Ｔ；（ｆ）Ｑ、Ｎ；及び（ｇ）Ｅ、Ｄ。

【０４０４】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、抗体に望ましい特性を付与する変異を含む。例えば、天然のＩｇＧ４ ｍＡｂで発生することが知られるＦａｂ－アーム交換に起因する潜在的な複雑化を回避するために、本明細書で提供される抗体は、安定化「Ａｄａｉｒ」変異を含み得（Ａｎｇａｌ ｅｔ ａｌ．，“Ａ ｓｉｎｇｌｅ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｕｂｓｔｉｔｕｔｉｏｎ ａｂｏｌｉｓｈｅｓ ｔｈｅ ｈｅｔｅｒｏｇｅｎｅｉｔｙ ｏｆ ｃｈｉｍｅｒｉｃ ｍｏｕｓｅ／ｈｕｍａｎ（ＩｇＧ４）ａｎｔｉｂｏｄｙ，”Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ ３０，１０５－１０８；１９９３）、セリン２２８（ＥＵ付番；残基２４１ Ｋａｂａｔ付番）は、ＩｇＧ１様（ＣＰＰＣＰ（配列番号４３））ヒンジ配列をもたらすプロリンに変換される。従って、抗体のいずれかは、安定化「Ａｄａｉｒ」変異又はアミノ酸配列（ＣＰＰＣＰ（配列番号４３））を含み得る。

【０４０５】

本開示のＴＧＦβ１のアイソフォーム特異的なコンテキストに依存しない阻害剤は、任意選択で、抗体定常領域又はその部分を含み得る。例えば、ＶＬドメインは、そのＣ末端で軽鎖定常ドメイン様Ｃκ又はＣλに結合され得る。同様に、ＶＨドメイン又はその部分は、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ及びＩｇＭ並びに任意のアイソタイプサブクラスのような重鎖の全て又は一部に結合され得る。抗体は、好適な定常領域を含み得る（例えば、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉ

mmunological Interest，No．９１－３２４２，National Institutes of Health Publications，Bethesda，Md．（１９９１）を参照されたい）。従って、本開示の範囲内の抗体は、任意の好適な定常領域と組み合わせられたＶＨ及びＶＬドメイン、又はその抗原結合部分を含み得る。

【０４０６】

加えて又は代わりに、そのような抗体は、配列番号１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、及び８の抗体のフレームワーク領域を含んでも又は含まなくてもよい。いくつかの実施形態では、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及びＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体は、ネズミ抗体であり、ネズミフレームワーク領域配列を含む。

【０４０７】

いくつかの実施形態では、そのような抗体は、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及びＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に、相対的に高い親和性、例えば、10^{-9}Ｍ未満、10^{-10}Ｍ、10^{-11}Ｍ以下のＫＤを有して結合する。例えば、そのような抗体は、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に、５ｐＭ～１ｎＭ、例えば１０ｐＭ～１ｎＭ、例えば１０ｐＭ～５００ｐＭの親和性を有して結合し得る。本開示は、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体への結合に関して本明細書に記載される抗体のいずれかと競合し、１ｎＭ以下（例えば、１ｎＭ以下、５００ｐＭ以下、１００ｐＭ以下）のＫＤ値を有する抗体又は抗原結合断片も含む。ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体の親和性及び結合動態は、バイオセンサーに基づく技術（例えば、ＯＣＴＥＴ（登録商標）又はＢｉａｃｏｒｅ（登録商標））及び溶液平衡滴定に基づく技術（例えば、ＭＳＤ－ＳＥＴ）を含むがこれらに限定されない任意の好適な方法を使用して試験され得る。いくつかの実施形態では、親和性及び結合動態は、Ｂｉａｃｏｒｅ系などのＳＰＲによって測定される。好ましい実施形態では、そのような抗体は、１０ｅ－４以下のＯＦＦ速度で前述の大きい潜在型複合体の各々から解離する。

【０４０８】

いくつかの実施形態では、本開示による細胞結合ＴＧＦβ１（例えば、ＧＡＲＰ提示ＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３提示ＴＧＦβ１）の阻害剤は、そのような複合体（例えば、ＧＡＲＰ－プロ／潜在型ＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－プロ／潜在型ＴＧＦβ１）に特異的に結合し、複合体のインターナリゼーションを誘発する抗体又はその断片を含む。この作用機序は、細胞表面（例えば、Ｔｒｅｇ、マクロファージなど）からの不活性型ＴＧＦβ１複合体（例えば、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１）の除去又は枯渇を引き起こし、従って、活性化に利用可能なＴＧＦβ１を減少させる。いくつかの実施形態では、そのような抗体又はその断片は、結合が中性又は生理的ｐＨで発生するが、抗体が酸性ｐＨでその抗原から解離するか；又は解離速度が、中性ｐＨより酸性ｐＨでより高くなるようにｐＨ依存的な様式で標的複合体に結合する。そのような抗体又はその断片は、リサイクリング抗体として機能し得る。

【０４０９】

ＴＧＦβ１の好ましい抗体と競合する抗体

本開示の態様は、本明細書で提供される抗体のいずれかと競合するか又は交差競合する抗体に関する。本明細書で使用する場合、抗体に関する「競合する」という用語は、第１の抗体が、第２の抗体の結合と十分に類似しているか又は重複する様式でエピトープ（例えば、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体のエピト

ープ）に結合することを意味し、そのため、そのエピトープと第１の抗体の結合の結果は、第２の抗体の非存在下での第１の抗体の結合と比較して、第２の抗体の存在下で検出できるほどに減少される。代わりに、そのエピトープへの第２の抗体の結合も第１の抗体の存在下で検出できるほどに減少される場合があるが、そうである必要はない。即ち、第１の抗体は、第２の抗体が第１の抗体のそれぞれのエピトープへの結合を阻害することなく、そのエピトープへの第２の抗体の結合を阻害することができる。しかしながら、各抗体が他の抗体のエピトープ又はリガンドとの結合を、同じ程度であるか、より大きいか又はより小さいかにかかわらず、検出できるほどに阻害する場合、抗体は、それぞれのエピトープの結合について互いに「交差競合」すると言われる。競合抗体及び交差競合抗体の両方が本開示の範囲内である。そのような競合又は交差競合が起こる機構（例えば、立体障害、立体構造変化又は共通のエピトープ若しくはその部分への結合）に関係なく、当業者であれば、そのような競合抗体及び／又は交差競合抗体が、本明細書で提供される方法及び／又は組成物に包含され且つ有用であり得ることを認めるであろう。「交差遮断」という用語は、互換的に使用され得る。

【０４１０】

同じ抗原に結合する２つの異なるモノクローナル抗体（又は抗原結合断片）は、結合部位が、各結合が他の結合と干渉しないように三次元空間で十分に離れている場合、抗原に同時に結合できる場合がある。対照的に、２つの異なるモノクローナル抗体は、同じであるか又は重複している抗原の結合領域を有する場合があり、この場合、第１の抗体の結合により、第２の抗体が抗原と結合できなくなることがあるか、又はその逆の場合もある。後者の場合、２つの抗体は、同じ抗原に関して互いに「交差遮断する」と言われる。

【０４１１】

抗体「ビニング」実験は、同じ抗原に対して作製された複数の抗体を相対的な交差遮断活性に基づいて様々な「ビン」に分類するのに有用である。従って、それぞれの「ビン」は、抗原の別個の結合領域を表す。同じビンの抗体は、定義上互いに交差遮断する。ビニングは、標準的な試験条件を使用して、例えば、製造業者の指示書に従って（例えば、室温、約２０～２５℃でアッセイされる結合）、Ｂｉａｃｏｒｅ又はＯｃｔｅｔ（登録商標）などの標準的なインビトロ結合アッセイによって試験され得る。

【０４１２】

本開示の態様は、本明細書で提供されるとおりの特定の抗体又はその抗原結合部分のいずれかと競合するか又は交差競合する抗体に関する。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、本明細書で提供される抗体のいずれかと同じエピトープ又はその近傍で結合する。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、それがエピトープの１５以下のアミノ酸残基内で結合する場合、エピトープの近傍に結合する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるとおりの抗体又はその抗原結合部分のいずれかは、本明細書で提供される抗体のいずれか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又は１５アミノ酸残基以内に結合する。

【０４１３】

別の実施形態では、本明細書では、抗体とタンパク質との間で10^{-8}Ｍ未満の平衡解離定数、K_Dを有して本明細書で提供される抗原（例えば、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体）のいずれかへの結合に関して競合するか又は交差競合する抗体又はその抗原結合部分が提供される。他の実施形態では、抗体は、10^{-12}Ｍ～10^{-9}Ｍの範囲のＫＤを有して本明細書で提供される抗原のいずれかへの結合に関して競合するか又は交差競合する。いくつかの実施形態では、本明細書では、本明細書に記載される抗体又はその抗原結合部分との結合に関して競合する抗ＴＧＦβ１抗体又はその抗原結合部分が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書では、本明細書に記載される抗体又はその抗原結合部分と同じエピトープに結合する抗ＴＧＦβ１抗体又はその抗原結合部分が提供される。

【０４１４】
本明細書で提供される抗体のいずれかは、任意の好適な方法を使用し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を同定すること又は「エピトープマッピング」である。例えば、Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９９９の第１１章において記載されるとおりの抗体－抗原複合体の結晶構造を解くこと、競合アッセイ、遺伝子断片発現アッセイ及び合成ペプチドに基づくアッセイを含む、タンパク質上のエピトープの位置をマッピングし、特徴付けるための多くの好適な方法がある。追加の例において、エピトープマッピングを使用して、抗体が結合する配列を決定することができる。エピトープは線状エピトープであり得る、即ち一続きのアミノ酸に含有され得るか、又は必ずしも一続きの（一次構造線状配列）に含有されない場合があるアミノ酸の三次元相互作用によって形成される立体構造エピトープであり得る。いくつかの実施形態では、エピトープは、ＴＧＦβ１がＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体又はＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体中にあるとき、本明細書に記載される抗体又はその抗原結合部分による結合においてのみ利用可能なＴＧＦβ１エピトープである。様々な長さ（例えば、少なくとも４～６つのアミノ酸長）のペプチドが単離されるか又は合成され得（例えば、組換え的に）、抗体との結合アッセイのために使用され得る。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ペプチドを使用すること及び抗体による結合を決定することによる体系的な選別において決定され得る。遺伝子断片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、無作為に又は特定の遺伝的構成毎に断片化され、抗原の発現された断片と試験されることになる抗体の反応性が決定される。遺伝子断片は、例えば、ＰＣＲによって生成され得、続いて放射性アミノ酸の存在下にてインビトロで転写され、タンパク質に翻訳され得る。次に、抗体の放射性標識された抗原断片への結合は、免疫沈降及びゲル電気泳動によって決定される。特定のエピトープも、ファージ粒子の表面に表示される無作為のペプチド配列の大規模なライブラリー（ファージライブラリー）を使用することによって同定され得る。代わりに、重複するペプチド断片の規定されたライブラリーが、単純な結合アッセイにおいて試験抗体への結合について試験され得る。追加の例において、抗原結合ドメインの変異誘発、ドメインスワッピング実験及びアラニンスキャニング変異誘発を実施して、エピトープ結合に要求される、十分な、及び／又は必要な残基を同定することができる。例えば、ドメインスワッピング実験は、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、及び／又はｐｒｏＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体の様々な断片が、ＴＧＦβファミリーの別のメンバー（例えば、ＧＤＦ１１）などの密接に関係するが抗原性において異なるタンパク質からの配列と置き換えられている（交換されている）標的抗原の変異体を使用して実施され得る。

【０４１５】
代わりに、競合アッセイは、抗体が他の抗体と同じエピトープに結合するかどうかを決定するために同じ抗原に結合することが知られる他の抗体を使用して実施され得る。競合アッセイは、当業者によく知られている。

【０４１６】
いくつかの実施形態では、医薬組成物は、ＴＧＦβ１（例えば、プロ－ＴＧＦβ１及び／又は潜在型ＴＧＦβ１）への結合に関して配列番号７の重鎖可変ドメイン及び配列番号８の軽鎖可変ドメインを有する抗体と交差競合する抗体又はその抗原結合断片を選択する工程を含むプロセスによって作製され得る。

【０４１７】
いくつかの実施形態では、医薬組成物は、Ａｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６、Ａｂ２１、Ａｂ２２、Ａｂ２３、Ａｂ２４、Ａｂ２５、Ａｂ２６、Ａｂ２７、Ａｂ２８、Ａｂ２９、Ａｂ３０、Ａｂ３１、Ａｂ３２、Ａｂ３３及びＡｂ３４からなる群から選択される抗体と交差競

合する抗体又はその抗原結合断片を選択する工程；並びに医薬組成物に製剤化する工程を含むプロセスによって作製され得る。

【０４１８】

好ましくは、そのプロセスによって選択される抗体は、抗体又は抗原結合断片が、溶液平衡滴定によって測定されるとおり、ヒトＬＬＣ（例えば、ｈＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びｈＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１）の各々に≦１ｎＭのK_Dを有して結合することができるという点で特徴付けられる高親和性バインダーである。そのような交差競合抗体は、本開示に従って対象におけるＴＧＦβ１関連徴候の治療において使用され得る。

【０４１９】

抗体の様々な改変及びバリエーション

本開示によって包含される抗体又はその抗原結合断片のいずれかの非限定的なバリエーション、改変、及び特徴が、以下で簡潔に論じられる。関連する分析方法の実施形態も提供される。

【０４２０】

天然に存在する抗体の構造単位は、通常、四量体を構成する。それぞれのそのような四量体は、通常、ポリペプチド鎖の２つの同一の対で構成され、各対は、１つの全長「軽」鎖（特定の実施形態では、約２５ｋＤａ）及び１つの全長「重」鎖（特定の実施形態では、約５０～７０ｋＤａ）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、通常、典型的には抗原認識に関与する約１００～１１０以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、通常、エフェクター機能に関与することができる定常領域を規定する。ヒト抗体軽鎖は、通常、カッパ及びラムダ軽鎖として分類される。重鎖は、通常、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファ、又はイプシロンとして分類され、抗体のアイソタイプを規定する。抗体は、任意の型（例えば、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＹ、及びＩｇＥ）及びクラス（例えば、IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgM_1、IgM_2、IgA_1、及びIgA_2）のものであり得る。全長の軽鎖及び重鎖では、典型的には、可変領域及び定常領域は、約１２以上のアミノ酸の「Ｊ」領域によって連結され、重鎖は、約１０以上のアミノ酸の「Ｄ」領域も含む（例えば、Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｃｈ．７（Ｐａｕｌ，Ｗ．，ｅｄ．，２ｎｄ ｅｄ．Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８９））（全体が参照により組み込まれる）を参照されたい）。各軽／重鎖対の可変領域は、通常、抗原結合部位を形成する。

【０４２１】

可変領域は、通常、相補性決定領域又はＣＤＲとも呼ばれる３つの超可変領域によって連結される相対的に保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）の同じ一般的な構造を示す。各対の２つの鎖に由来するＣＤＲは、通常、フレームワーク領域によって整列させられ、特定のエピトープへの結合を可能にする。Ｎ末端からＣ末端までに、軽鎖及び重鎖の可変領域の両方は、通常、ドメインＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３及びＦＲ４を含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、通常、Ｋａｂａｔ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９８７及び１９９１））又は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及びＣＤＲ－Ｌ３としても参照され得、重鎖のＣＤＲは、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２及びＣＤＲ－Ｈ３としても参照され得る。いくつかの実施形態では、抗体は、重鎖のカルボキシ末端から少数のアミノ酸欠失を含み得る。いくつかの実施形態では、抗体は、重鎖のカルボキシ末端において１～５つのアミノ酸欠失を有する重鎖を含む。特定の実施形態では、ＣＤＲの最終的な標示及び抗体の結合部位を含む残基の同定は、抗体の構造を解くこと及び／又は抗体－リガンド複合体の構造を解くことによって達成される。特定の実施形態では、それは、Ｘ線結晶構造解析などの当業者に知られる様々な技

術のいずれかによって達成され得る。いくつかの実施形態では、分析の様々な方法は、ＣＤＲ領域を同定するか又は近似するために利用され得る。そのような方法の例としては、Ｋａｂａｔ定義、Ｃｈｏｔｈｉａ定義、ＡｂＭ定義、Ｌｕらによって記載される定義（上記を参照されたい）及びｃｏｎｔａｃｔ定義が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４２２】

「親和性成熟した」抗体は、１つ以上のそのＣＤＲにおいて１つ以上の改変を有し、それらの改変を有しない親抗体と比較して抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす抗体である。例示的な親和性成熟した抗体は、標的抗原に対してナノモル濃度又はピコモル濃度の親和性（例えば、約10^{-9}Ｍ～10^{-12}Ｍの範囲のK_D）を有することになる。親和性成熟した抗体は、当技術分野で知られる手順によって生成される。Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，（１９９２）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：７７９－７８３は、ＶＨ及びＶＬのドメインシャッフリングによる親和性成熟を記載する。ＣＤＲ及び／又はフレームワーク残基のランダム変異誘発は、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；及びＨａｗｋｉｎｓ ｅｔ ａｌ．，（１９９２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２６：８８９－８９６；によって記載され；活性を増強するアミノ酸残基による選択的な変異誘発位置、接触又は超変異位置での選択的な変異は、米国特許第６，９１４，１２８号明細書に記載される。通常、親抗体及びその親和性成熟した子孫（例えば、誘導体）は、抗原内の同じ結合領域を保持するが、分子レベルでの一定の相互作用は、親和性成熟によって導入されるアミノ酸残基の改変に起因して変化させられ得る。

【０４２３】

「ＣＤＲがグラフトされた抗体」という用語は、ネズミＣＤＲの１つ以上（例えば、ＣＤＲ３）がヒトＣＤＲ配列で置き換えられているネズミ重鎖及び軽鎖可変領域を有する抗体など、ある種に由来する重鎖及び軽鎖可変領域配列を含むが、ＶＨ及び／又はＶＬのＣＤＲ領域の１つ以上の配列が別の種のＣＤＲ配列と置き換えられている抗体を指す。

【０４２４】

「キメラ抗体」という用語は、ヒト定常領域に連結されたネズミ重鎖及び軽鎖可変領域を有する抗体など、ある種に由来する重鎖及び軽鎖可変領域配列並びに別の種に由来する定常領域配列を含む抗体を指す。

【０４２５】

本明細書で使用する場合、「フレームワーク」又は「フレームワーク配列」という用語は、可変領域からＣＤＲを引いて残存している配列を指す。ＣＤＲ配列の正確な定義は、異なる方式によって決定される場合があるため、フレームワーク配列の意味は、対応して異なる解釈によって決まる。６つのＣＤＲ（軽鎖のＣＤＲ－Ｌ１、－Ｌ２及び－Ｌ３並びに重鎖のＣＤＲ－Ｈ１、－Ｈ２及び－Ｈ３）はまた、軽鎖及び重鎖上のフレームワーク領域を各鎖の４つの下位領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４）に分割し、その中でＣＤＲ１は、ＦＲ１とＦＲ２との間に位置し、ＣＤＲ２は、ＦＲ２とＦＲ３との間に位置し、ＣＤＲ３は、ＦＲ３とＦＲ４との間に位置する。特定の下位領域がＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３又はＦＲ４と特定されなければ、フレームワーク領域は、他で参照されるとおり、単一の天然に存在する免疫グロブリン鎖の可変領域内の組み合わせられたＦＲを表す。本明細書で使用する場合、ＦＲは、４つの下位領域の１つを表し、ＦＲｓは、フレームワーク領域を構成する４つの下位領域の２つ以上を表す。

【０４２６】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、任意選択で、１、２又は３つのアミノ酸変化を伴う以下のアミノ酸配列を有する重鎖フレームワーク領域１（Ｈ－ＦＲ１）を含む。

【化７】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG (配列番号147)

例えば、１６位のＧｌｙ残基はＡｒｇ（Ｒ）で置き換えられ得；且つ／又は２３位のＡｌａ残基は、Ｔｈｒ（Ｔ）で置き換えられ得る。

【０４２７】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、任意選択で、１、２又は３つのアミノ酸変化を伴う以下のアミノ酸配列を有する重鎖フレームワーク領域２（Ｈ－ＦＲ２）を含む：ＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＳ（配列番号１４８）。

【０４２８】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、任意選択で、１、２又は３つのアミノ酸変化を伴う以下のアミノ酸配列を有する重鎖フレームワーク領域３（Ｈ－ＦＲ３）を含む：ＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＳＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣ（配列番号１４９）。例えば、１２位のＳｅｒ残基は、Ｔｈｒ（Ｔ）で置き換えられ得る。

【０４２９】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、任意選択で、１、２又は３つのアミノ酸変化を伴う以下のアミノ酸配列を有する重鎖フレームワーク領域４（Ｈ－ＦＲ４）を含む：ＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１５０）。

【０４３０】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、任意選択で、１、２又は３つのアミノ酸変化を伴う以下のアミノ酸配列を有する軽鎖フレームワーク領域１（Ｌ－ＦＲ１）を含む：ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣ（配列番号１５１）。

【０４３１】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、任意選択で、１、２又は３つのアミノ酸変化を伴う以下のアミノ酸配列を有する軽鎖フレームワーク領域２（Ｌ－ＦＲ２）を含む：ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹ（配列番号１５２）。

【０４３２】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、任意選択で、１、２又は３つのアミノ酸変化を伴う以下のアミノ酸配列を有する軽鎖フレームワーク領域３（Ｌ－ＦＲ３）を含む：ＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＦＴＩＳＳＬＱＰＥＤＩＡＴＹＹＣ（配列番号１５３）。

【０４３３】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、任意選択で、１、２又は３つのアミノ酸変化を伴う以下のアミノ酸配列を有する軽鎖フレームワーク領域４（Ｌ－ＦＲ４）を含む：ＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号１５４）。

【０４３４】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、ヒトＩｇＭ定常ドメインの重鎖免疫グロブリン定常ドメイン、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、又はヒトＩｇＥ定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、ヒトＩｇＧ１定常ドメイン又はヒト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。いくつかの実施形態では、抗体又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。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、ＩｇＧ１様ヒンジを生成し、鎖内ジスルフィド結合の形成を可能にするＳｅｒからＰｒｏへの骨格置換を有するヒト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。

【０４３５】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、ヒトＩｇラムダ定常ドメイン又はヒトＩｇカッパ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。

【０４３６】

いくつかの実施形態では、抗体は、２つの重鎖及び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。

【０４３７】

いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト化抗体、ダイアボディ、又はキメラ抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト化抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト生殖系列アミノ酸配列を有するフレームワークを含む。

【０４３８】

いくつかの実施形態では、抗原結合部分は、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、ｓｃＦａｂ断片又はｓｃＦｖ断片である。

【０４３９】

本明細書で使用する場合、「生殖系列抗体遺伝子」又は「遺伝子断片」という用語は、特定の免疫グロブリンの発現のための遺伝的再構成及び変異をもたらす成熟プロセスを経ていない非リンパ球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を参照されたい）。本開示の様々な実施形態によって提供される利点の１つは、生殖系列抗体遺伝子は成熟抗体遺伝子よりも種内の個体に特徴的な必須アミノ酸配列構造を保存する可能性が高く、従ってその種において治療的に使用された場合に外来供給源に由来するものと認識される可能性がより低いという認識から生じる。

【０４４０】

本明細書で使用する場合、「中和すること」という用語は、結合タンパク質が抗原に特異的に結合するとき、抗原（例えば、標的タンパク質）の生物活性を相殺することを指す。ある実施形態では、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、ホスファターゼ又は受容体リガンドに結合し、その生物活性を少なくとも約２０％、４０％、６０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％以上低減する。いくつかの実施形態では、増殖因子に対する中和抗体は、潜在型複合体から放出された可溶性の成熟増殖因子に特異的に結合し、それにより下流のシグナル伝達を誘発するその受容体に結合する能力を妨げる。いくつかの実施形態では、成熟増殖因子は、ＴＧＦβ１又はＴＧＦβ３である。「結合タンパク質」という用語は、本明細書で使用する場合、抗原（例えば、ＴＧＦβ１）に特異的に結合し、抗体又はその抗原結合部分を含むがこれらに限定されない任意のポリペプチド並びに抗原結合領域（例えば、ＴＧＦβ１に結合できる領域）及び１つ以上の追加の抗原又は単一抗原上の追加のエピトープに結合できる領域を含む二重特異性又は多重特異性コンストラクトを含む。例としては、ＤＶＤ－ＩｇＴＭ、ＴＶＤ－Ｉｇ、ＲＡｂ－Ｉｇ、二重特異性抗体及び二特異性抗体が挙げられる。結合タンパク質は、抗体－薬物コンジュゲートも含み得、例えば、第２の薬剤（例えば、小分子チェックポイント阻害剤）は、ＴＧＦβ１に結合できる（例えば、プロ－及び／又は潜在型－ＴＧＦβ１に結合できる）抗体又はその抗原結合断片に連結される。

【０４４１】

「モノクローナル抗体」又は「ｍＡｂ」という用語は、それを含む組成物に関連して使用されるとき、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体調製物を指し得、即ち、集団を構成する個々の抗体は、わずかに存在し得る可能性のある天然に存在する変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原に対して向けられる。さらに、一般的に異なる決定基（エピトープ）に対して向けられる異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各ｍＡｂは、抗原上の単一の決定基に対して向

けられる。修飾語「モノクローナル」は、任意の特定の方法による抗体の生成を必要とすると解釈されるべきではない。

【０４４２】

「組換えヒト抗体」という用語は、本明細書で使用する場合、宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使用して発現される抗体（下の節ＩＩ　Ｃでさらに記載される）、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離される抗体（参照により本明細書に組み込まれる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）、ヒト免疫グロブリン遺伝子に関して遺伝子導入された動物（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を参照されたい）又はヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のＤＮＡ配列へ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、作製又は単離される抗体などの組換え手段によって調製、発現、作製又は単離される全てのヒト抗体を含むことが意図される。このような組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列の免疫グロブリン配列に由来する可変及び定常領域を有する。しかしながら、特定の実施形態では、そのような組換えヒト抗体は、インビトロ変異誘発（又はヒトＩｇ配列が遺伝子導入された動物が使用される場合、インビボ体細胞変異誘発）にかけられ、従って、組換え抗体のＶＨ領域及びＶＬ領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列ＶＨ配列及びＶＬ配列に由来し、それらと関係するが、インビボにおいてヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然に存在しない場合がある配列である。

【０４４３】

本明細書で使用する場合、「二重可変ドメイン免疫グロブリン」又は「ＤＶＤ－ＩｇＴＭ」などは、対形成した重鎖ＤＶＤポリペプチド及び軽鎖ＤＶＤポリペプチドを含む結合タンパク質を含み、それぞれの対形成した重鎖及び軽鎖は、２つの抗原結合部位を提供する。それぞれの結合部位は、抗原結合部位毎に抗原結合に関与する合計で６つのＣＤＲを含む。ＤＶＤ－ＩｇＴＭは、通常、少なくとも部分的にＣＨ３ドメインの二量体化によって互いに結合される２つのアームを有し、ＤＶＤのそれぞれのアームは、二重特異性であり、４つの結合部位を有する免疫グロブリンを提供する。ＤＶＤ－ＩｇＴＭは、配列表を含む各々が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２０１０／０２６０６６８号明細書及び同第２００９／０３０４６９３号明細書において提供される。

【０４４４】

本明細書で使用する場合、「三重可変ドメイン免疫グロブリン」又は「ＴＶＤ－Ｉｇ」などは、対形成した重鎖ＴＶＤ結合タンパク質ポリペプチド及び軽鎖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、それぞれの対形成した重鎖及び軽鎖は、３つの抗原結合部位を提供する。それぞれの結合部位は、抗原結合部位毎に抗原結合に関与する合計で６つのＣＤＲを含む。ＴＶＤ結合タンパク質は、少なくとも部分的にＣＨ３ドメインの二量体化によって互いに結合される２つのアームを有し、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、６つの結合部位を有する結合タンパク質を提供し得る。

【０４４５】

本明細書で使用する場合、「受容体－抗体免疫グロブリン」又は「ＲＡｂ－Ｉｇ」などは、重鎖ＲＡｂポリペプチド、及び軽鎖ＲＡｂポリペプチドを含む結合タンパク質であり、合わせて合計で３つの抗原結合部位を形成する。１つの抗原結合部位は、単一の結合部位を形成する重鎖ＲＡｂポリペプチド及び軽鎖ＲＡｂポリペプチドの各々に存在する重及

び軽抗体可変ドメインの対形成によって形成され、合計で６つのＣＤＲが第１の抗原結合部位を提供する。それぞれの重鎖ＲＡｂポリペプチド及び軽鎖ＲＡｂポリペプチドは、リガンドに独立して結合する受容体配列を含み、第２及び第３の「抗原」結合部位を提供する。ＲＡｂ－Ｉｇは、通常、少なくとも部分的にＣＨ３ドメインの二量体化によって互いに結合される２つのアームを有し、ＲＡｂ－Ｉｇのそれぞれのアームは、三重特異性であり、６つの結合部位を有する免疫グロブリンを提供する。ＲＡｂ－Ｉｇは、米国特許出願公開第２００２／０１２７２３１号明細書に記載され、配列表を含む全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

【０４４６】

様々な実施形態では、本開示は、単独で、１つ以上の追加の薬剤（例えば、ＡＤＣとして）に連結されて、又はより大きい高分子（例えば、二重特異性抗体、二特異性抗体若しくは多重特異性抗体又はリガンドトラップをさらに含む、例えばＭ７８２４（Ｍｅｒｃｋ）及びＡＶＩＤ２００（Ｆｏｒｂｉｕｓ）などのＴＧＦＢリガンドトラップと組み合わせたコンストラクトの一部として）又は二機能性若しくは多機能性の操作されたコンストラクト（例えば、融合タンパク質及びリガンドトラップ）の一部として使用され得、且つ医薬組成物又は組み合わせ療法の一部として投与され得る部分的に新規の抗体及び抗原結合断片を提供する。

【０４４７】

「二重特異性抗体」という用語は、本明細書で使用する場合及び「二重特異性半Ｉｇ結合タンパク質」又は「二重特異性（半Ｉｇ）結合タンパク質」から区別される場合、クアドローマ技術（Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｃ．ａｎｄ Ｃｕｅｌｌｏ，Ａ．Ｃ．（１９８３）Ｎａｔｕｒｅ ３０５（５９３４）：ｐ．５３７－５４０を参照されたい）、２つの異なるモノクローナル抗体の化学的抱合（Ｓｔａｅｒｚ，Ｕ．Ｄ．ｅｔ ａｌ．，（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ ３１４（６０１２）：６２８－６３１を参照されたい）又はＣＨ３－ＣＨ３二量体化を阻害しないＦｃ領域における変異を導入して、１つのみが機能性二重特異性抗体である複数の異なる免疫グロブリン種をもたらすノブイントゥホール若しくは同様の手法（Ｈｏｌｌｉｇｅｒ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．，（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ９０（１４）：６４４４－６４４８を参照されたい）によって作製される全長抗体を指す。分子機能により、二重特異性抗体は、その２つの結合アーム（ＨＣ／ＬＣの１つの対）の１つの上で１つの抗原（又はエピトープ）に結合し、その第２のアーム（ＨＣ／ＬＣの異なる対）上で異なる抗原（又はエピトープ）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（特異性及びＣＤＲ配列の両方における）、それが結合する各抗原に対して一価である。例えば、ＴＧＦβ１及びＰＤ－１に向けられる２つの結合アームを含む二重特異性抗体は、ＴＧＦβ１阻害剤（Ａｂ６又はＡｂ６由来結合部分）及びチェックポイント阻害剤（例えば、抗ＰＤ１抗体又は部分）を組み合わせて使用され得る。そのような二重特異性抗体は、ＴＧＦβ１阻害剤及びチェックポイント阻害剤の組み合わせ療法を受容するように選択された患者に関する治療の例示的な形態として使用され得る。

【０４４８】

「二特異性抗体」という用語は、本明細書で使用する場合及び二重特異性半Ｉｇ結合タンパク質又は二重特異性結合タンパク質から区別される場合、その２つの結合アーム（一対のＨＣ／ＬＣ）の各々において２つの異なる抗原（又はエピトープ）に結合することができる全長抗体を指す（国際公開第０２／０２７７３号パンフレットを参照されたい）。従って、二特異性結合タンパク質は、同一の特異性及び同一のＣＤＲ配列を有する２つの同一の抗原結合アームを有し、それが結合する各抗原に対して二価である。

【０４４９】

「多重特異性抗体」という用語は、２つ以上のエピトープに対する結合特異性を示す抗体又は抗原結合断片を指し、各結合部位は、異なり、（同じ又は異なる抗原上の）異なるエピトープを認識する。二重特異性抗体は、多重特異性抗体の例示的な型である。より高次の多重特異性抗体（即ち３つ以上の特異性を示す抗体）としては、ＴｒｉＭＡｂにおけ

る三重特異性抗体、トリプルボディ及びトリボディが挙げられるが、これらに限定されない。多重特異性抗体の例示的な型及び／又はそれを作製する方法に関しては、例えば、そのような型及び方法に関して全てが参照により本明細書に組み込まれるＣａｓｔｏｌｄｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ Ｄｅｓ Ｓｅｌ ２０１２；２５：５５１－９；Ｓｃｈｕｂｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，ＭＡｂｓ ２０１１；３：２１－３０；Ｋｕｅｇｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｒ Ｊ Ｈａｅｍａｔｏｌ ２０１０；１５０：５７４－８６；Ｓｃｈｏｏｎｊａｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２０００；１６５：７０５０－７；及びＥｇａｎ ｅｔ ａｌ．，ＭＡｂｓ ２０１７；９（１）：６８－８４を参照されたい。

【０４５０】

「Ｋｏｎ」という用語は、本明細書で使用する場合、当技術分野で知られるとおり、例えば抗体／抗原複合体を形成するための結合タンパク質（例えば、抗体）の抗原への結合に関するｏｎ速度定数を指すことが意図される。「Ｋｏｎ」は、本明細書で互換的に使用される「結合速度定数」又は「ｋａ」という用語によっても知られる。抗体のその標的抗原への結合速度又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、式：抗体（「Ａｂ」）＋抗原（「Ａｇ」）→Ａｂ－Ａｇによっても示される。

【０４５１】

「Ｋｏｆｆ」という用語は、本明細書で使用する場合、当技術分野で知られるとおり、例えば抗体／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ｏｆｆ速度定数を指すことが意図される。「Ｋｏｆｆ」は、本明細書で互換的に使用される「解離速度定数」又は「ｋｄ」という用語によっても知られる。この値は、式Ａｂ＋Ａｇ←Ａｂ－Ａｇによって示されるとおりの抗体のその標的抗原からの解離速度又はＡｂ－Ａｇ複合体の遊離抗体及び抗原への経時的な分離を示す。

【０４５２】

本明細書で互換的に使用される「平衡解離定数」又は「K_D」という用語は、平衡時の滴定測定において得られる値又は解離速度定数（ｋｏｆｆ）を結合速度定数（ｋｏｎ）によって割ることによって得られる値を指す。結合速度定数、解離速度定数及び平衡解離定数は、抗原に対する結合タンパク質、例えば抗体の結合親和性を表すために使用される。結合及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。蛍光に基づく技術を使用することにより、平衡時の生理的緩衝液中のサンプルを試験するための高い感受性及び能力がもたらされる。Ｂｉａｃｏｒｅ（登録商標）（生体分子相互作用分析）アッセイなどの他の実験手法及び機器が使用され得る（例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＡＢ、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ ｃｏｍｐａｎｙ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎから入手可能な機器）。さらに、Ｓａｐｉｄｙｎｅ機器（Ｂｏｉｓｅ、Ｉｄａｈｏ）から入手可能なＫｉｎＥｘＡ（登録商標）（結合平衡除外法）アッセイも使用され得る。

【０４５３】

「結晶」及び「結晶化された」という用語は、本明細書で使用する場合、結晶の形態で存在する結合タンパク質（例えば、抗体）又はその抗原結合部分を指す。結晶は、物質の固体状態の一形態であり、非晶質固体状態又は液体結晶性状態などの他の形態と異なる。結晶は、原子、イオン、分子（例えば、抗体などのタンパク質）又は分子集合体（例えば、抗原／抗体複合体）の規則的な繰り返しの三次元配列で構成される。これらの三次元配列は、当分野でよく理解されている特定の数学的関係に従って配置される。結晶中で繰り返される基本的な単位、又は構成単位は、非対称ユニットと呼ばれる。所与の十分に規定された結晶学的対称性に従う配置における非対称ユニットの繰り返しは、結晶の「単位格子」をもたらす。全ての三次元における規則的な平行移動による単位格子の繰り返しが結晶をもたらす。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 Ｙ

ｏｒｋ，（１９９９）を参照されたい。「リンカー」という用語は、ペプチド結合によって結合される２つ以上のアミノ酸残基を含むポリペプチドを意味するために使用され、１つ以上の抗原結合部分を連結するために使用される。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を参照されたい）。例示的なリンカーとしては、ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰ（配列番号４４）、ＡＳＴＫＧＰ（配列番号４５）；ＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ（配列番号４６）；ＴＶＡＡＰ（配列番号４７）；ＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲ（配列番号４８）；ＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲＶ（配列番号４９）；ＡＫＴＴＰＫＬＧＧ（配列番号５０）；ＳＡＫＴＴＰＫＬＧＧ（配列番号５１）；ＳＡＫＴＴＰ（配列番号５２）；ＲＡＤＡＡＰ（配列番号５３）；ＲＡＤＡＡＰＴＶＳ（配列番号５４）；ＲＡＤＡＡＡＡＧＧＰＧＳ（配列番号５５）；ＲＡＤＡＡＡＡ（Ｇ４Ｓ）４（配列番号５６）；ＳＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲＶ（配列番号５７）；ＡＤＡＡＰ（配列番号５８）；ＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰ（配列番号５９）；ＱＰＫＡＡＰ（配列番号６０）；ＱＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰ（配列番号６１）；ＡＫＴＴＰＰ（配列番号６２）；ＡＫＴＴＰＰＳＶＴＰＬＡＰ（配列番号６３）；ＡＫＴＴＡＰ（配列番号６４）；ＡＫＴＴＡＰＳＶＹＰＬＡＰ（配列番号６５７６）；ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号６６）；ＧＥＮＫＶＥＹＡＰＡＬＭＡＬＳ（配列番号６７）；ＧＰＡＫＥＬＴＰＬＫＥＡＫＶＳ（配列番号６８）；ＧＨＥＡＡＡＶＭＱＶＱＹＰＡＳ（配列番号６９）；ＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ（配列番号７０）；及びＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰ（配列番号７１）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４５４】

「標識」及び「検出可能な標識」又は「検出可能な部分」は、例えば、抗体及び分析物などの特定の結合対のメンバーと特定の結合パートナー、例えば、抗体又は分析物間の反応を検出可能にする、抗体又は分析物などの特定の結合パートナーに結合された部分を意味し、そのため、標識されたは、「検出できるほどに標識された」と称される。従って、「標識された結合タンパク質」という用語は、本明細書で使用する場合、結合タンパク質の同定を可能にする組み込まれた標識を有するタンパク質を指す。ある実施形態では、標識は、目視又は機器による手段によって検出可能なシグナルを生成することができる検出可能なマーカ、例えば、放射性標識されたアミノ酸の組み込み又は印を付けられたアビジン（例えば、光学的又は比色分析の方法によって検出され得る蛍光マーカ又は酵素活性を含有するストレプトアビジン）によって検出され得るビオチニル部分のポリペプチドへの結合である。ポリペプチドのための標識の例としては、放射性同位体又は放射性核種（例えば、^{18}Ｆ、^{11}Ｃ、^{13}Ｎ、^{15}Ｏ、^{68}Ｇａ、^{18}Ｆ、^{89}Ｚｒ、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{35}Ｓ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{177}Ｌｕ、^{166}Ｈｏ、及び^{153}Ｓｍ）；色素原；蛍光標識（例えば、ＦＩＴＣ、ローダミン、及びランタニド蛍光体）；酵素的標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、及びアルカリホスファターゼ）；化学発光マーカ；ビオチニル基；二次レポーターによって認識される既定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体のための結合部位、金属結合ドメイン、及びエピトープタグ）；及びガドリニウムキレート化合物などの磁性薬剤が挙げられるが、これらに限定されない。イムノアッセイのために一般的に利用される標識の代表例としては、光を生成する部分、例えば、アクリジニウム化合物、及び蛍光を生成する部分、例えば、フルオレセインが挙げられる。他の標識は本明細書に記載される。この点に関して、部分自体は、検出できるほどに標識されなくてもよいが、さらに別の部分との反応時に検出可能になる場合がある。「検出できるほどに標識された」の使用は、後者の検出可能な標識を包含することが意図される。

【０４５５】

いくつかの実施形態では、提示分子－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体などの抗原（例えば、タンパク質複合体）に対する抗体又はその抗原結合部分の結合親和性は、ＢＬＩ（例えば、

Ｏｃｔｅｔ（登録商標）アッセイ）を使用して決定される。ＢＬＩ（例えば、Ｏｃｔｅｔ（登録商標））アッセイは、抗体と抗原との間の結合を示す１つ以上の動態パラメータを決定するアッセイである。いくつかの実施形態では、Ｏｃｔｅｔ（登録商標）システム（ＦｏｒｔｅＢｉｏ（登録商標）、Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ、ＣＡ）を使用して、提示分子－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に対する抗体又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、ＦｏｒｔｅＢｉｏ　Ｏｃｔｅｔ（登録商標）ＱＫｅディップ及びバイオレイヤー干渉法を利用する読み取りラベルフリーアッセイシステムを使用して決定され得る。いくつかの実施形態では、抗原は、バイオセンサー（例えば、ストレプトアビジンで覆われたバイオセンサー）に固定化され、抗体及び複合体（例えば、ビオチン化された提示分子－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体）は、結合相互作用を測定するために高濃度（５０μｇ／ｍＬ）で溶液中に提示される。いくつかの実施形態では、提示分子－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に対する抗体又はその抗原結合部分の結合親和性は、本明細書で概説されるプロトコルを使用して決定される。

【０４５６】

ｐｒｏＴＧＦβ１に対する例示的な抗体の特徴付け

結合プロファイル

本開示による例示的な抗体は、増強された結合活性（例えば、ナノモル濃度以下のＫＤ）を有するものを含む。ＴＧＦβ１活性化を選択的に阻害することができる高親和性の文脈に依存しない抗体のクラスが含まれる。「コンテキストに依存しない」という用語は、従来のより一般的な用法と比較して、より厳密な意味で本明細書において使用される。本開示によれば、その用語は、抗体が異なる抗原複合体に対して発揮することができる相対的親和性においてあるレベルの均一性を与える（即ち偏りがない）。従って、本開示のコンテキストに依存しない抗体は、ＴＧＦβ１前駆体複合体（例えば、提示分子－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体）の複数の型を標的化することができ、且つ例えばＭＳＤ－ＳＥＴによって測定されるとおり、１０ｎＭ未満、好ましくは５ｎＭ未満、より好ましくは１ｎＭ未満、さらにより好ましくは１００ｐＭ未満のK_D値を有する同等の親和性でそれぞれのそのような複合体に結合することができる（即ち複合体間の相対的親和性において３倍以下の差）。下で示されるとおり、本開示に包含される多くの抗体は、ナノモル濃度以下の範囲のK_D値を有する。

【０４５７】

従って、抗体は、ヒト提示分子－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体（単一の提示分子に結合したｐｒｏＴＧＦβ１二量体で構成される三成分複合体である「大きい潜在型複合体」と称される場合もある）、即ちＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１の各々に特異的に結合することができる。通常、組換えにより生成され、精製されたタンパク質複合体が、抗体の好適なインビトロ結合アッセイにおいて抗原複合体に結合する能力を評価するか又は確認するために抗原（例えば、抗原複合体）として使用される。そのようなアッセイは、当技術分野でよく知られており、バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）に基づくアッセイ（Ｏｃｔｅｔ（登録商標）など）及び溶液平衡滴定に基づくアッセイ（ＭＳＤ－ＳＥＴなど）を含むが、これらに限定されない。

【０４５８】

ＢＬＩに基づく結合アッセイは、抗原に対する抗体の親和性及び動態を測定するために当技術分野で広く知られる。それは、生体分子相互作用が光干渉に基づいて分析されるラベルフリー技術である。タンパク質、例えば、試験されている抗体の１つは、バイオセンサーチップ上に固定化され得る。溶液中の他のタンパク質、例えば、抗原が、固定化された抗体に結合されるとき、それは、実時間で測定され得る干渉パターンの変化を引き起こす。これは、結合特異性、結合及び解離の速度並びに濃度依存性のモニタリングを可能にする。従って、ＢＬＩは、系の動態を明らかにする動態学的尺度である。使用の容易さ及び迅速な結果に起因して、Ｏｃｔｅｔ（登録商標）システム（ＦｏｒｔｅＢｉｏ（登録商標）／Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ（登録商標）、Ｆｒｅｍｏｎｔ　Ｃａｌｉｆ

ｏｒｎｉａから入手可能）などのＢＬＩに基づくアッセイは、スクリーニングプロセスにおける「非バインダー」又は「弱いバインダー」のプールから「バインダー」のプールを同定し、分離する初期のスクリーニング方法として使用されるときに特に便利である。

【０４５９】

ＢＬＩに基づく結合アッセイは、新規の抗体が、結合親和性がＯｃｔｅｔ（登録商標）によって測定されるときに「コンテキストに偏りのない／コンテキストに依存しない」抗体として特徴付けられることを明らかにした。抗体の非限定的な例のＢＬＩに基づく結合プロファイルを要約する表５から分かるとおり、これらの抗体は、４つの標的複合体間でナノモル濃度以下の相対的に均一なＫＤ値を示し、相対的に低いマトリックスと細胞の差を有する（５倍以下の偏り）（列（Ｈ）を参照されたい）。これは、細胞結合複合体よりマトリックス結合複合体に対して著しく高い相対的親和性（２７倍以上の偏り）を示す参照抗体として提供された以前に特定された抗体Ａｂ３に対して対比させられ得る。

【０４６０】

下の表５は、本開示によって包含されるコンテキストに依存しないｐｒｏＴＧＦβ１抗体の非限定的な例を提供する。表は、Ｏｃｔｅｔ（登録商標）によって測定されるとおりのインビトロ結合アッセイからの代表的な結果を提供する。同様の結果は、ＳＰＲに基づく技術（Ｂｉａｃｏｒｅ（登録商標）系）によっても得られる。

【０４６１】

表の列（Ａ）は、別々のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体を列挙する。Ａｂ３（太字で示される）は、細胞に基づくアッセイにおいて強力であることが示された以前に特定された参照抗体であり；様々な動物モデルにおいて効果的であり；且つ安全な毒性学プロファイルを有する（国際公開第２０１８／１２９３２９号パンフレットで開示される）。列（Ｂ）、（Ｄ）、（Ｅ）及び（Ｆ）は、K_Dにおいて測定される列挙された抗体の各々の親和性を提供する。列（Ｂ）は、抗体の各々の組換えヒトＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に対する親和性を示し；列（Ｃ）は、抗体の各々の組換えヒトＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に対する親和性を示し；（Ｅ）は、抗体の各々の組換えヒトＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に対する親和性を示し；且つ（Ｆ）は、抗体の各々の組換えヒトＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に対する親和性を示す。（Ｂ）及び（Ｃ）の平均K_D値は、対応する列（Ｄ）において示され、ＥＣＭ又はマトリックス結合ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に対する抗体の親和性を一括して表す。同様に、（Ｅ）及び（Ｆ）の平均K_D値は、対応する列（Ｇ）において示され、細胞表面又は細胞結合ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に対する抗体の親和性を一括して表す。最終的に、列（Ｄ）及び（Ｇ）からの平均K_D値間の相対的な比率は、列（Ｈ）において「～倍の偏り」として表される。従って、マトリックス結合複合体及び細胞表面複合体に関する抗体の結合優先度を比較するとき、列（Ｈ）の数が大きくなるほど、特定の抗体に関してより大きい偏りが存在する。これは、抗体のそれらの標的複合体に対する固有の偏りを定量的に表し、比較する方法の１つである。そのような分析は、特定の治療的使用のための候補抗体に関する選択プロセスを導く際に有用であり得る。

【０４６２】

【表７】

表 5. コンテキストに依存しない TGFβ1 抗体の非限定的な例及び BLI によって測定される KD 値

(A) Ab Ref	マトリックス結合 proTGFb1			細胞結合 proTGFb1			(H) G/D (偏りの倍率)
	(B) hLTBP1	(C) hLTBP3	(D) ECM AVRG (nM)	(E) hGARP	(F) hLRRC33	(G) 細胞 AVRG (nM)	
Ab3	**4.70E-10**	**4.59E-10**	**0.4645**	**1.73E-08**	**8.52E-09**	**12.91**	**27.79**
Ab21	2.25E-10	2.68E-10	0.2465	8.33E-10	4.55E-10	0.644	2.613
Ab22	3.18E-10	3.29E-10	0.3235	9.74E-10	4.15E-10	0.6945	2.147
Ab23	4.17E-10	4.68E-10	0.4425	1.34E-09	4.55E-10	0.8975	2.028
Ab24	2.46E-10	1.98E-10	0.222	6.65E-10	4.10E-10	0.5375	2.421
Ab25	2.17E-10	1.52E-10	0.1845	4.88E-10	4.09E-10	0.4485	2.431
Ab26	2.21E-10	1.73E-10	0.197	6.25E-10	3.60E-10	0.4925	2.500
Ab27	1.78E-10	2.38E-10	0.208	4.24E-10	2.99E-10	0.3615	1.738
Ab28	3.40E-10	3.16E-10	0.328	7.97E-10	4.09E-10	0.603	1.838
Ab29	1.89E-10	1.21E-10	0.155	3.07E-10	3.02E-10	0.3045	1.965
AB30	3.32E-10	2.61E-10	0.2965	8.33E-10	5.35E-10	0.684	2.307
Ab31	2.36E-10	1.81E-10	0.2085	5.81E-10	4.10E-10	0.4955	2.376
Ab6	2.07E-10	1.23E-10	0.165	4.04E-10	3.36E-10	0.37	2.242
Ab32	2.69E-10	2.15E-10	0.242	4.96E-10	6.98E-10	0.597	2.467
Ab33	1.79E-10	1.11E-10	0.145	2.65E-10	3.39E-10	0.302	2.083

【０４６３】

本開示は、一群の高親和性のコンテキストに依存しない抗体を提供し、その各々は、４種の既知の提示分子－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、即ちＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１、及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１の各々に同等の親和性で結合することができる。いくつかの実施形態では、抗体は、以前に記載された参照抗体であるＡｂ３と比較して同等又はより高い親和性を有して提示分子－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体の各々に結合する。本開示によれば、そのような抗体は、バイオレイヤー干渉法及び表面プラズモン共鳴などの好適なインビトロ結合アッセイによって測定されるとおり、≦５ｎＭの親和性（K_Dによって決定される）を有して前述の複合体の各々に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、抗体又は断片は、≦５ｎＭ、≦４ｎＭ、≦３ｎＭ、≦２ｎＭ、≦１ｎＭ、≦５ｎＭ又は≦０．５ｎＭの親和性を有してヒトＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合する。いくつかの実施形態では、抗体又は断片は、≦５ｎＭ、≦４ｎＭ、≦３ｎＭ、≦２ｎＭ、≦１ｎＭ、≦５ｎＭ又は≦０．５ｎＭの親和性を有してヒトＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合する。いくつかの実施形態では、抗体又は断片は、≦５ｎＭ、≦４ｎＭ、≦３ｎＭ、≦２ｎＭ、≦１ｎＭ、≦５ｎＭ又は≦０．５ｎＭの親和性を有してヒトＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合する。いくつかの実施形態では、抗体又は断片は、≦５ｎＭ、≦４ｎＭ、≦３ｎＭ、≦２ｎＭ、≦１ｎＭ又は≦０．５ｎＭの親和性を有してヒトＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合する。

【０４６４】

特定の実施形態では、そのような抗体は、ヒト－及びネズミ－交差反応性である。従って、いくつかの実施形態では、抗体又は断片は、≦５ｎＭ、≦４ｎＭ、≦３ｎＭ、≦２ｎＭ、≦１ｎＭ、≦５ｎＭ又は≦０．５ｎＭの親和性を有してネズミＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合する。いくつかの実施形態では、抗体又は断片は、≦５ｎＭ、≦４ｎＭ、≦３ｎＭ、≦２ｎＭ、≦１ｎＭ又は≦０．５ｎＭの親和性を有してネズミＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合する。いくつかの実施形態では、抗体又は断片は、≦５ｎＭ、≦４ｎＭ、≦３ｎＭ、≦２ｎＭ、≦１ｎＭ又は≦０．５ｎＭの親和性を有してネズミＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合する。いくつかの実施形態では、抗体又は断片は、≦５ｎＭ、≦４ｎＭ、≦３ｎＭ、≦２ｎＭ、≦１ｎＭ又は≦０．５ｎＭの親和性

を有してネズミＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合する。
【０４６５】
示されるとおり、本開示のｐｒｏＴＧＦβ１抗体は、マトリックス結合ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に対して特に高い親和性を有する。いくつかの実施形態では、マトリックス結合複合体（即ちＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１）の平均K_D値は、≦１ｎＭ又は≦０．５ｎＭである。
【０４６６】
示されるとおり、本開示のｐｒｏＴＧＦβ１抗体は、細胞結合ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に対して高い親和性を有する。いくつかの実施形態では、細胞結合複合体（即ちＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１）の平均K_D値は、≦２ｎＭ又は≦１ｎＭである。
【０４６７】
本開示の高親和性ｐｒｏＴＧＦβ１抗体は、４種全ての抗原複合体に対してそれらの均一な（偏りのない）親和性によって特徴付けられる（例えば、Ａｂ３と比較する）。本明細書に記載される４種の既知の提示分子－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体間のいずれの単一抗原複合体も、K_Dにおいて著しく逸脱しない。換言すれば、それぞれのそのような抗体が４種の抗原複合体にわたって同等の親和性を示す点において、以前に記載されたｐｒｏＴＧＦβ１抗体（Ａｂ３を含む）と比較してより均一な結合活性が、本開示によって達成された。いくつかの実施形態では、抗体又は断片は、４種のｐｒｏＴＧＦβ１抗原複合体にわたる抗体又は断片の親和性の差（又は範囲）が、最も低いK_D値と最も高いK_D値との間で５倍以下であるという点で特徴付けられる、偏りのない又は均一な結合プロファイルを示す。いくつかの実施形態では、親和性の相対的な差（又は範囲）は、３倍以下である。
【０４６８】
「均一性」又は偏りの欠如の概念は、表５においてさらに示される。２つのマトリックス結合複合体と細胞結合複合体との間の平均K_D値がそれぞれ計算される（列（Ｄ）及び（Ｇ）を参照されたい）。次に、これらの平均K_D値は、結合活性における偏りがマトリックスと結合した複合体と、細胞表面（例えば、免疫細胞）と結合した複合体との間に存在するかどうかを問うために使用され得る。偏りは、表５に示されるとおり、平均K_Dの「倍率の差」として表され得る。以前に記載された抗体であるＡｂ３と比較して、本開示によって包含される高親和性のコンテキストに依存しないｐｒｏＴＧＦβ１抗体は、多くがマトリックス結合複合体と細胞結合複合体との間の平均K_D値において３倍以下の差を示すという点で著しく偏っていない（これをＡｂ３における２５倍以上の偏りと比較する）。
【０４６９】
従って、一群のコンテキストに依存しないモノクローナル抗体又は断片が提供され、その各々は、バイオレイヤー干渉法又は表面プラズモン共鳴によって測定されるとおりの≦１ｎＭの親和性を有する以下の提示分子－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体の各々に対して同等の親和性で結合することができる：ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１、及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１。そのような抗体は、バイオレイヤー干渉法又は表面プラズモン共鳴によって測定されるとおりの≦５ｎＭの親和性で前述の複合体の各々に特異的に結合し、モノクローナル抗体又は断片は、他の複合体と比較して上の複合体のいずれか１つに対して親和性において３倍以下の偏りを示し、且つモノクローナル抗体又は断片は、ｐｒｏＴＧＦβ１複合体の各々からの成熟ＴＧＦβ１増殖因子の放出を阻害するが、ｐｒｏＴＧＦβ２複合体又はｐｒｏＴＧＦβ３複合体からのものは阻害しない。
【０４７０】
ＢＬＩに基づくアッセイから得られる結合プロファイル（例えば、「ｏｎ」及び「ｏｆｆ」速度）の動態は、有用な情報を提供する一方、本開示の出願人は、繋ぎ止められた（例えば、組織に局在化された）不活性（例えば、潜在型）標的に結合することによってその活性化を妨げることにより機能する本明細書で開示される活性化阻害剤、即ち抗体の作

用機序に基づいて、平衡時に測定される結合特性が、それらのインビボでの挙動及び効力をより正確に反映する可能性があることを企図した。これを踏まえて、例として、ＢＬＩによって得られる結合測定値において反映されることになる速い「ｏｎ」速度（「Ｋｏｎ」）を有する抗体は、中和抗体（例えば、効果的な阻害剤として機能するために活性の可溶性増殖因子自体をそれらのために直接的に標的化し、迅速に捕捉しなければならない抗体）を評価するための適切なパラメータを提供し得る。しかしながら、それは、必ずしも本明細書で開示されるものなどの活性化阻害剤として機能する抗体に適用されなくてもよい。記載されるとおり、本開示の新規のＴＧＦβ１阻害剤の作用機序は、活性化段階の阻害を介するものであり、可溶性の活性化後の増殖因子の捕捉とは対照的に、組織／細胞に繋ぎ止められた潜在型複合体を標的化することによって達成される。これは、ＴＧＦβ１の活性化阻害剤が、それぞれの組織（例えば、ＥＣＭ内、免疫細胞表面など）に局在化した不活性前駆体を標的化することにより、成熟増殖因子が複合体から放出されることを予防的に妨げるためである。この作用機序は、従来の中和阻害剤によって必要とされるような内在性受容体に対する一過性増殖因子分子を迅速に競合させる必要を伴わずに、阻害剤にインビボで標的飽和（例えば、平衡）を達成させると考えられる。

【０４７１】

作用機序におけるこの相違を考慮して、結合特性のさらなる評価が、平衡時の親和性の決定を可能にするインビトロ結合アッセイの別の様式の使用によって実行された。

【０４７２】

これを鑑みて、平衡時のそのような抗体の結合親和性を測定するアッセイは、インビボでの標的結合の様式をより正確に表す可能性があると考えられる。従って、ＭＳＤ－ＳＥＴに基づく結合アッセイ（又は他の好適なアッセイ）が、下の表６において例示されるとおりに実施され得る。

【０４７３】

溶液平衡滴定（「ＳＥＴ」）は、２つの分子（抗原及び抗原に結合する抗体など）間の結合が溶液中で平衡時に測定され得るアッセイである。例えば、Ｍｅｓｏ－Ｓｃａｌｅ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ（「ＭＳＤ」）に基づくＳＥＴ、又はＭＳＤ－ＳＥＴは、平衡時に特に高親和性のタンパク質－タンパク質相互作用に関する解離定数を決定する有用な様式である（例えば、Ｄｕｃａｔａ ｅｔ ａｌ．，（２０１５）Ｊ Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ２０（１０）：１２５６－１２６７を参照されたい）。ＳＥＴに基づくアッセイは、ナノモル濃度以下（例えば、ピコモル濃度）の親和性を有する抗体のＫＤ値を決定するのに特に有用である。

【０４７４】

【表８】

表 6. 高親和性のコンテキストに依存しない TGFβ1 抗体 (hIgG4)の非限定的な例及び MSD-SET によって測定される KD 値(“h”はヒト複合体を意味する)

(A) Ab Ref	マトリックス結合proTGFβ1			細胞結合proTGFβ1			(H) G/D (偏りの倍率)
	(B) hLTBP1	(C) hLTBP3	(D) ECM AVRG (nM)	(E) hGARP	(F) hLRRC33	(G) 細胞 AVRG (nM)	
C1	3.30E-08	1.40E-08	23.2	5.10E-09	2.20E-09	3.65	0.16
C2	2.10E-08	1.20E-08	16.5	8.80E-09	6.10E-09	7.45	0.48
Ab3	1.30E-08	1.62E-08	14.6	2.80E-08	3.50E-08	31.5	2.16
Ab6	1.8E-11	2.9E-11	0.024	2.7E-11	6.3E-11	0.045	1.88
Ab22	5.00E-11	3.30E-11	0.042	2.70E-11	2.00E-10	0.114	2.71
Ab24	2.40E-11	2.10E-11	0.023	1.90E-11	1.80E-10	0.100	4.35
Ab26	2.80E-11	2.30E-11	0.026	1.40E-11	1.30E-10	0.072	2.77
Ab29	1.20E-11	1.10E-11	0.012	5.50E-12	4.30E-11	0.024	2.00
Ab30	3.10E-11	2.60E-11	0.029	2.20E-11	1.40E-10	0.081	2.80
Ab31	1.90E-11	1.40E-11	0.017	1.90E-11	9.60E-11	0.058	3.41
Ab32	3.70E-11	2.60E-11	0.032	1.50E-11	8.70E-11	0.051	1.60
Ab33	1.10E-11	7.00E-12	0.009	7.80E-12	4.60E-11	0.027	3.00
Ab4	4.6E-9	5.5E-9	5.05	2.5E-9	2.1E-9	2.3	0.42

【０４７５】

表６は、参照抗体としての３種の以前に記載されたＴＧＦβ１選択的抗体（Ｃ１、Ｃ２及びＡｂ３）も含む。Ｃ１及びＣ２は、国際公開第２０１７／１５６５００号パンフレットとして公開されたＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１７／０２１９７２号明細書において最初に開示され（そこでは「Ａｂ１」及び「Ａｂ２」に対応する）、Ａｂ３は、国際公開第２０１８／１２９３２９号パンフレットとして公開されたＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６０１号明細書において記載された（そこでは「Ａｂ３」に対応する）。

【０４７６】

表６で提供される親和性データから分かるとおり、本開示による新規の抗体の結合活性は、以前に同定された参照抗体より著しく高い。さらに、新規のＴＧＦβ１抗体は、それらが同等の親和性（例えば、およそナノモル濃度以下の範囲、例えば、＜１ｎＭのK_Dを有する）でヒトＬＬＣ複合体の各々に結合するという点で「コンテキストに依存しない」。高親和性のコンテキストに依存しない結合プロファイルは、これらの抗体が、癌などのＥＣＭに関連する構成成分及び免疫構成成分の両方の調節不全を伴うＴＧＦβ１関連徴候の治療における使用に有利である可能性があることを示唆している。

【０４７７】

溶液平衡滴定に基づく結合アッセイのために、上で示されるものなどの提示分子の１つを含むタンパク質複合体が、抗原（提示分子－ＴＧＦβ１複合体又はＬＬＣ）として利用され得る。試験抗体は、溶液中で抗原－抗体複合体を形成させる。抗原－抗体反応混合物は、平衡に達するようにインキュベートされ；アッセイ反応中に存在する抗原－抗体複合体の量は、当技術分野でよく知られる好適な手段によって測定され得る。ＢＬＩに基づくアッセイと比較して、ＳＥＴに基づくアッセイは、抗原－抗体複合体のｏｎ／ｏｆｆ速度によって影響されにくいため、非常に高い親和性相互作用の繊細な検出を可能にする。表６に示されるとおり、本開示において、ＴＧＦβ１の特定の高親和性阻害剤は、ＳＥＴに基づくアッセイによって決定されるとおり、試験される全ての大きい潜在型複合体にわた

ってナノモル濃度以下（例えば、ピコモル濃度）範囲の親和性を示す。

【０４７８】

従って、一群のコンテキストに依存しないモノクローナル抗体又は断片が提供され、その各々は、溶液平衡滴定アッセイによって測定されるとおりの≦１ｎＭのK_Dを有する以下のヒト提示分子－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、例えば、ＭＳＤ－ＳＥＴ：ｈＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１、及びｈＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１の各々に対して同等の親和性で結合することができる。そのような抗体は、ＭＳＤ－ＳＥＴによって測定されるとおり≦１のK_Dで前述の複合体の各々に特異的に結合し、モノクローナル抗体又は断片は、ｐｒｏＴＧＦβ１複合体の各々に由来する成熟ＴＧＦβ１増殖因子の放出を阻害するが、ｐｒｏＴＧＦβ２又はｐｒｏＴＧＦβ３複合体由来のものは阻害しない。特定の実施形態では、そのような抗体又は断片は、５００ｐＭ以下（即ち≦５００ｐＭ）、２５０ｐＭ以下（即ち≦２５０ｐＭ）又は２００ｐＭ以下（即ち≦２００ｐＭ）のK_Dで前述の複合体の各々に結合する。さらにより好ましくは、そのような抗体又は断片は、１００ｐＭ以下（即ち≦１００ｐＭ）のK_Dで前述の複合体の各々に結合する。いくつかの実施形態では、抗体又は断片は、プロドメイン複合体と結合していない遊離ＴＧＦβ１増殖因子に結合しない。いくつかの実施形態では、抗体又は断片は、ＬＴＢＰ１／ＴＧＦβ２又はＬＴＢＰ３／ＴＧＦβ３　ＬＬＣに結合しない。これは、バイオレイヤー干渉法などの当技術分野で知られる好適なインビトロ結合アッセイによって試験され得るか又は確認され得る。

【０４７９】

さらなる実施形態では、そのような抗体又は断片は、ネズミ（例えば、ラット及び／又はマウス）及び／又は非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）対応物とも交差反応性である。一例を挙げると、Ａｂ６は、以下の表７及び実施例９に例示されるとおり、ヒト、ネズミ、ラット、及びカニクイザルを含む複数の種の大きい潜在型複合体の各々に高い親和性で結合することができる。

【０４８０】

【表９】

表 7. MSD-SET によって測定されるとおりの異種間反応性を有する TGFβ1 抗体の非限定的な例(“h” はヒトを意味し; “m”はネズミを意味する)

Ag 複合体	hLTBP1-proTGFβ1	hLTBP3-proTGFβ1	hGARP-proTGFβ1	hLRRC33-proTGFβ1	mLTBP1-proTGFβ1	mLTBP3-proTGFβ1	mGARP-proTGFβ1	mLRRC33-proTGFβ1
Ab6	1.80E-11	2.90E-11	2.70E-11	6.30E-11	2.40E-11	2.80E-11	2.10E-11	4.80E-11

【０４８１】

表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）は、実時間での非標識の生体分子相互作用（抗体－抗原相互作用など）の検出を可能にする良好な分解能及び感受性を有する有用な結合動態情報を提供する。ＳＰＲに基づくバイオセンサー（Ｂｉａｃｏｒｅ系など）は、活性濃度の決定並びに親和性及び化学的動態の両方に関する分子相互作用の特徴付けにおいて使用され得る。高い全体的な親和性（通常、平衡解離定数又はK_Dとして表される）を有することに加えて、潜在型プロドメイン複合体を標的化し、潜在型複合体に由来する増殖因子の活性化段階を阻害する抗体に関して、遅いｏｆｆ速度、又はK_{OFF}を有することが特に有利であり得る。下の実施例１において例示されるとおり、ＴＧＦβ１の活性化阻害剤であるＡｂ６は、ＳＰＲによって測定されるとおり、０．５ｎＭ未満のK_Dと１０．０Ｅ－４（１／ｓ）未満のK_{OFF}で各ＬＬＣに結合する。従って、抗体のｏｆｆ速度は、製造されることになる治療抗体のための選択の考慮事項及び本明細書に記載されるヒト療法における使用のための重要な結合動態の判定基準であり得る。

【０４８２】
従って、本発明は、（本開示による）対象における癌の治療における使用のための抗体又はその抗原結合断片であるＴＧＦβ阻害剤を含み、１０．０Ｅ－４（１／ｓ）未満のK_{OFF}を有する抗体又は断片が選択され、任意選択で、選択された抗体は、ＳＰＲによって測定されるとおり、０．５ｎＭ未満のK_Dを有する。
【０４８３】
本発明は、（本開示による）対象における癌の治療における使用のための抗体又はその抗原結合断片であるＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物を製造するための方法であって、１０．０Ｅ－４（１／ｓ）未満のK_{OFF}を有し且つ任意選択で、ＳＰＲによって測定されるとおり、０．５ｎＭ未満のK_Dを有する抗体又は抗原結合断片を選択する工程を含む方法をさらに含む。
【０４８４】
効力
本明細書で開示される抗体は、ＴＧＦβ１シグナル伝達を阻害するそれらの能力に関して「機能性抗体」として幅広く特徴付けられ得る。本明細書で使用する場合、「機能性抗体」は、標的タンパク質（例えば、抗原）に、その機能を調節するように結合するその能力によって１つ以上の生物学的活性を与える。従って、機能性抗体は、標的分子（即ち抗原）の活性／機能を調節することができるものを広範に含む。そのような調節抗体は、阻害抗体（又は阻害性抗体）及び活性化抗体を含む。本開示は、ＴＧＦβ１の複数のコンテキストと関連するＴＧＦβシグナル伝達によって媒介される生物学的プロセスを阻害することができる抗体に関する。本明細書に記載される抗体などの本開示を実行するために使用される阻害性薬剤は、治療有効用量（十分な有効性が許容される毒性レベル内で達成される用量）で投与されるとき、ＴＧＦβ１に選択的であり、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３を標的化しないか又はそれらに支障をきたさないことが意図される。本開示の新規の抗体は、以前に同定されたＴＧＦβ１の活性化阻害剤と比較して、増強された阻害活性（効力）を有する。
【０４８５】
いくつかの実施形態では、阻害性抗体の効力は、本明細書に記載されるＣＡＧＡレポーター細胞アッセイなどの好適な細胞ベースのアッセイにおいて測定され得る。一般に、異種細胞及び初代細胞などの培養された細胞が、細胞ベースの効力アッセイを実行するために使用され得る。目的の内在性ＴＧＦβ１並びに／又はＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３、ＧＡＲＰ及びＬＲＲＣ３３などの提示分子を発現する細胞が使用され得る。代わりに、ＴＧＦβ１並びに／又はＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３、ＧＡＲＰ及びＬＲＲＣ３３などの目的の提示分子などの目的のタンパク質をコードする内在性核酸が、例えば、トランスフェクション（例えば、安定なトランスフェクション又は一過性トランスフェクション）による又はウイルスベクターに基づく感染による発現のためにそのような細胞に導入され得る。いくつかの実施形態では、ＬＮ２２９細胞が、そのようなアッセイのために利用される。目的のＴＧＦβ１及び提示分子（例えば、ＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３、ＧＡＲＰ及びＬＲＲＣ３３）を発現する細胞は、培養物中で増殖され、細胞表面上に（ＧＡＲＰ又はＬＲＲＣ３３と結合するとき）大きい潜在型複合体を「提示する」か又はＥＣＭ中に蓄積させる（ＬＴＢＰと結合するとき）。ＴＧＦβ１の活性化は、別の細胞表面上で発現されるインテグリンによって誘発され得る。インテグリン発現細胞は、大きい潜在型複合体を共発現する同じ細胞又は別の細胞型であり得る。レポーター細胞が、ＴＧＦβ応答エレメントを組み込んでいるアッセイ系に加えられる。このように、ＴＧＦβ活性化の程度は、ＴＧＦβ活性化時のレポーター細胞（例えば、ＴＧＦβ応答プロモーターエレメントに結合されたルシフェラーゼなどのＴＧＦβ応答レポーター遺伝子）からのシグナルを検出することによって測定され得る。そのような細胞ベースのアッセイ系を使用して、抗体の阻害活性は、試験抗体の存在下又は非存在下のいずれかでレポーターシグナル（例えば、蛍光の読み取りによって測定されるとおりのルシフェラーゼ活性）における変化（低減）又は差を測定することによって決定され得る。そのようなアッセイは、本明細書の実施例２において例示され

る。

【０４８６】

従って、いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１活性化を測定するための細胞ベースのレポーターアッセイ（本明細書の別の箇所で記載されるＬＮ２２９細胞アッセイなど）に基づいて計算された本開示の新規の抗体の阻害効力（ＩＣ$_{50}$）は、ｈＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びｈＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体の各々に対して測定されて、５ｎＭ以下であり得る。いくつかの実施形態では、抗体は、ＬＬＣの各々に対して測定されて２ｎＭ以下（即ち≦２ｎＭ）のＩＣ$_{50}$を有する。特定の実施形態では、ＬＬＣ複合体の各々に対して測定された抗体のＩＣ$_{50}$は、１ｎＭ以下である。いくつかの実施形態では、抗体は、ｈＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びｈＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体の各々に対して１ｎＭ未満のＩＣ$_{50}$を有する。

【０４８７】

【表１０】

表 8. レポーター細胞アッセイによって測定されるとおりの選択された抗体の阻害効力(IC50)

Ab Ref.	IC_{50} (nM)			
	hLTBP1-プロTGFβ1	hLTBP3-プロTGFβ1	hGARP-プロTGFβ1	hLRRC33-プロTGFβ1
Ab4	5.2	5.6	0.8	3.5
Ab5	1.3	1.0	0.1	0.6
Ab6	1.0-2.7	0.8-2.7	0.3-1.6	0.5-1.9
Ab21	1.6	0.8	0.4	0.6
Ab23	0.8	0.9	0.3	0.6
Ab25	6.1	0.51	0.4	0.7
Ab26	0.7	0.7	0.3	0.3
Ab29	0.5	0.8	0.3	0.5
Ab33	1.6	1.1	0.2	0.7

【０４８８】

ＴＧＦβ１の活性化は、インテグリン依存的な機構又はプロテアーゼ依存的な機構によって誘発され得る。本開示による抗体の阻害活性（例えば、効力）は、活性化の様式の一方又は両方によって誘導されるＴＧＦβ１活性化を遮断する能力について評価され得る。上記のレポーター細胞アッセイは、ＴＧＦβ１活性化のインテグリン依存的な活性化を遮断するか又は阻害する抗体の能力を測定するように設計される。阻害効力は、ＴＧＦβ１のプロテアーゼ誘導性の活性化を遮断する抗体の能力を測定することによっても評価され得る。本開示の実施例３は、そのようなアッセイの非限定的な実施形態を提供する。結果は、図１及び２において要約される。従って、本開示のいくつかの実施形態では、本開示によるアイソフォーム選択的な阻害剤は、ＴＧＦβ１のインテグリン依存的な活性化及びＴＧＦβ１のプロテアーゼ依存的な活性化を阻害することができる。そのような阻害剤は、プロテアーゼ活性を含むＥＤＭ調節不全によって特徴付けられるＴＧＦβ１関連徴候を治療するために使用され得る。例えば、そのようなＴＧＦβ１関連徴候は、筋線維芽細胞の増加、ＥＣＭの硬化度の増大、過剰な若しくは異常なコラーゲン沈着、又はその任意の組み合わせと関連し得る。そのような状態は、例えば、線維性障害及び固形腫瘍又は骨髄線維症を含む癌（転移性癌腫など）を含む。

【０４８９】

いくつかの実施形態では、効力は、有効性及び／又は薬物動力学効果の尺度としての好

適なインビボモデルにおいて評価され得る。例えば、第１の抗体が特定の濃度でインビボモデルにおいて効果的であり、且つ第２の抗体が同じインビボモデルにおいて第１の抗体より低い濃度で同等に効果的である場合、第２の抗体は、第１の抗体より強力であると言われ得る。当技術分野で知られる任意の好適な疾患モデルが、目的の特定の徴候、例えば、癌モデル及び線維症モデルに応じて、ＴＧＦβ１阻害剤の相対的な効力を評価するために使用され得る。好ましくは、各試験抗体の複数の用量又は濃度が、そのような試験に含まれる。

【０４９０】

同様に、薬物動力学（ＰＤ）効果は、阻害性抗体の相対的な効力を決定するために測定され得る。ＴＧＦβシグナル伝達経路のための一般的に使用されるＰＤ尺度としては、ＳＭＡＤ２／３のリン酸化及び下流のエフェクター遺伝子の発現、ＴＧＦβ応答プロモーターエレメント（例えば、Ｓｍａｄ結合エレメント）を有するものなどのＴＧＦβ活性化に感受性である転写が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、動物が３ｍｇ／ｋｇ以下の用量で投与されるとき、前臨床線維症モデルにおける疾患に誘導されるＳＭＡＤ２／３リン酸化を完全に遮断することができる。いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、疾患に誘導されるＳＭＡＤ２／３リン酸化を低減し且つ／又は完全に遮断することができる。いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、疾患に誘導されるＳＭＡＤ２リン酸化を低減し且つ／又は完全に遮断することができる（例えば、ＳＭＡＤ３におけるいずれの変化とも無関係に）。いくつかの実施形態では、低減は、全ＳＭＡＤ２／３に対するリン酸化ＳＭＡＤ２／３の比として測定される。いくつかの実施形態では、低減は、全ＳＭＡＤ２に対するリン酸化ＳＭＡＤ２の比として測定される。いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、例えば、ＩＨＣによって測定されるとおり、リン酸化ＳＭＡＤ２の核局在化を低減することができる。理論に束縛されることなく、いくつかの実施形態では、ＳＭＡＤ２リン酸化を測定すること（ＳＭＡＤ３の測定を伴わない）は、治療関連効果の正確な検出を向上させ得る。Ｄｅｎｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ １４３：３４８１－９０（２０１６）；Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７８：１１７２１－８（２００３）；Ｄａｖｉｄ ｅｔ ａｌ．，Ｏｎｃｏｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ６：ｅ１３４９５８９（２０１７）。いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、動物が腎線維症のＵＵＯモデルにおいて１０ｍｇ／ｋｇ以下の用量で投与されるとき、Ａｃｔａ２、Ｃｏｌ１ａ１、Ｃｏｌ３ａ１、Ｆｎ１、Ｉｔｇａ１１、Ｌｏｘ、Ｌｏｘｌ２を含む一連のマーカ遺伝子の線維症に誘導される発現を著しく抑制することができる。

【０４９１】

従って、いくつかの実施形態では、治療上の使用のための抗体又はその抗原結合断片の選択プロセスは、十分な阻害効力を示す抗体又は断片を同定することを含む。例えば、選択プロセスは、１つ以上の試験抗体又はその断片の効力（例えば、IC_{50}）を測定するための細胞ベースのＴＧＦβ１活性化アッセイを実行する工程と、望ましい効力を示す候補抗体又はその断片を選択する工程とを含み得る。いくつかの実施形態では、ヒトＬＬＣの各々に関するIC_{50}は、５ｎＭ以下である。次に、選択された抗体又は断片は、本明細書に記載されるＴＧＦβ１関連徴候の治療において使用され得る。

【０４９２】

結合領域

本開示に関連して、抗原の「結合領域」は、抗体－抗原相互作用のための構造的基盤を提供する。本明細書で使用する場合、「結合領域」は、水素重水素交換質量分析（ＨＤＸ－ＭＳ）などの好適な技術によって決定されるとおり、生理的溶液中でｐｒｏＴＧＦβ１複合体（「抗原」）に結合されるとき、抗体又は断片が、溶媒暴露から結合領域を保護するような抗体と抗原との間の界面の領域を指す。結合領域の同定は、抗原－抗体相互作用及び特定の抗体に関する作用機序への洞察を得る際に有用である。同様の又は重複する結合領域を有する追加の抗体の同定は、エピトープビニングを可能にする交差遮断実験によって円滑化され得る。任意選択で、Ｘ線結晶解析が、抗原－抗体相互作用を媒介するエピ

トープの正確なアミノ酸残基を同定するために利用され得る。

【０４９３】

その技術は、タンパク質立体構造又は溶液中のタンパク質－タンパク質相互作用を探索するための広く使用される技術であるＨＤＸ－ＭＳでよく知られている。この方法は、タンパク質骨格のアミド中の水素の溶液中に存在する重水素による交換に依拠する。水素重水素交換速度を測定することにより、タンパク質の動力学及び立体構造についての情報を得ることができる（参照により組み込まれるＷｅｉ ｅｔ ａｌ．，（２０１４）“Ｈｙｄｒｏｇｅｎ／ｄｅｕｔｅｒｉｕｍ ｅｘｃｈａｎｇｅ ｍａｓｓ ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ ｆｏｒ ｐｒｏｂｉｎｇ ｈｉｇｈｅｒ ｏｒｄｅｒ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ：ｍｅｔｈｏｄｏｌｏｇｙ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ．”Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ Ｔｏｄａｙ．１９（１）：９５－１０２において概説される）。この技術の適用は、抗体－抗原複合体が生じるとき、結合パートナー間の界面が、溶媒を排除することによって溶媒の立体排除により交換速度を低減するか又は妨げる可能性があるという前提に基づく。

【０４９４】

本開示は、潜在型ラッソ又はその部分を含む領域（「結合領域」）でヒトＬＬＣに結合する抗体又はその抗原結合断片を含む。潜在型ラッソは、プロドメイン内のタンパク質モジュールである。多くの強力な活性化阻害剤は、抗体結合が増殖因子を「ロックイン」することによってその放出を妨げることになるような様式でｐｒｏＴＧＦβ１複合体のこの領域に結合し得ると考えられる。興味深いことに、これは、増殖因子の蝶様の細長い領域（例えば、フィンガー－１及びフィンガー－２に対応する）が、プロドメインのケージ様構造と密接に相互作用する複合体の区間である。本明細書で提示されるデータに基づいて、同定された結合領域（図１６～１８を参照されたい）の周りを堅固に包む抗体は、ｐｒｏＴＧＦβ１複合体が離脱する（即ち増殖因子を放出する）のを効果的に妨げることにより、活性化を遮断し得ることが予想される。

【０４９５】

ＨＤＸ－ＭＳ技術を使用して、ｐｒｏＴＧＦβ１の結合領域が決定され得る。いくつかの実施形態では、抗体又は断片に結合する際に重要であると同定されたｐｒｏＴＧＦβ１上の部分は、プロドメインの少なくとも一部及び増殖因子ドメインの少なくとも一部を含む。潜在型ラッソの少なくとも一部を含む第１の結合領域（図１６における「領域１」）に結合する抗体又は断片が好ましい。より好ましくは、そのような抗体又は断片は、増殖因子ドメインのフィンガー－１で増殖因子ドメインの少なくとも一部を含む第２の結合領域（図１６における「領域２」）にさらに結合する。そのような抗体又は断片は、増殖因子ドメインのフィンガー－２の少なくとも一部を含む第３の結合領域（図１６における「領域３」）にさらに結合し得る。

【０４９６】

ｐｒｏＴＧＦβ１内の追加の領域は、本明細書で開示されるこれらの抗体の高親和性相互作用にも直接的又は間接的に寄与し得る。抗体のｐｒｏＴＧＦβ１複合体への高親和性の結合を媒介するのに重要であると見なされる領域は、ＬＶＫＲＫＲＩＥＡ（配列番号１３２）；ＬＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰ（配列番号１３３）；ＰＧＰＬＰＥＡＶ（配列番号１３４）；ＬＡＬＹＮＳＴＲ（配列番号１３５）；ＲＥＡＶＰＥＰＶＬ（配列番号１３６）；ＹＱＫＹＳＮＮＳＷＲ（配列番号１３７）；ＲＫＤＬＧＷＫＷＩＨＥＰＫＧＹＨＡＮＦ（配列番号１３８）；ＬＧＰＣＰＹＩＷＳ（配列番号１３９）；ＡＬＥＰＬＰＩＶ（配列番号１４０）；及びＶＧＲＫＰＫＶＥＱＬ（配列番号１４１）（ヒトｐｒｏＴＧＦβ１の天然配列に基づく）を含み得るが、これらに限定されない。

【０４９７】

抗体－抗原相互作用に寄与し得る領域の中で、いくつかの実施形態では、本開示の高親和性抗体は、アミノ酸配列ＫＬＲＬＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬＰＥＡＶＬ（「領域１」）（配列番号１４２）の少なくとも１つの残基を含むエピトープに結合し得る。

【０４９８】

いくつかの実施形態では、本開示の高親和性抗体は、アミノ酸配列ＲＫＤＬＧＷＫＷＩＨＥＰＫＧＹＨＡＮＦ（「領域２」）（配列番号１３８）の少なくとも１つの残基を含むエピトープに結合し得る。

【０４９９】

いくつかの実施形態では、本開示の高親和性抗体は、アミノ酸配列ＶＧＲＫＰＫＶＥＱＬ（「領域３」）（配列番号１４１）の少なくとも１つの残基を含むエピトープに結合し得る。

【０５００】

いくつかの実施形態では、本開示の高親和性抗体は、アミノ酸配列ＫＬＲＬＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬＰＥＡＶＬ（「領域１」）（配列番号１４２）の少なくとも１つの残基及びアミノ酸配列ＲＫＤＬＧＷＫＷＩＨＥＰＫＧＹＨＡＮＦ（「領域２」）（配列番号１３８）の少なくとも１つの残基を含むエピトープに結合し得る。

【０５０１】

いくつかの実施形態では、本開示の高親和性抗体は、アミノ酸配列ＫＬＲＬＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬＰＥＡＶＬ（「領域１」）（配列番号１４２）の少なくとも１つの残基及びアミノ酸配列ＶＧＲＫＰＫＶＥＱＬ（「領域３」）（配列番号１４１）の少なくとも１つの残基を含むエピトープに結合し得る。

【０５０２】

いくつかの実施形態では、本開示の高親和性抗体は、アミノ酸配列ＫＬＲＬＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬＰＥＡＶＬ（「領域１」）（配列番号１４２）の少なくとも１つの残基、アミノ酸配列ＲＫＤＬＧＷＫＷＩＨＥＰＫＧＹＨＡＮＦ（「領域２」）（配列番号１３８）の少なくとも１つの残基、及びアミノ酸配列ＶＧＲＫＰＫＶＥＱＬ（「領域３」）（配列番号１４１）の少なくとも１つの残基を含むエピトープに結合し得る。

【０５０３】

領域１、２及び／又は３からの寄与に加えて、そのようなエピトープは、ＬＶＫＲＫＲＩＥＡ（配列番号１３２）；ＬＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰ（配列番号１３３）；ＰＧＰＬＰＥＡＶ（配列番号１３４）；ＬＡＬＹＮＳＴＲ（配列番号１３５）；ＲＥＡＶＰＥＰＶＬ（配列番号１３６）；ＹＱＫＹＳＮＮＳＷＲ（配列番号１３７）；ＲＫＤＬＧＷＫＷＩＨＥＰＫＧＹＨＡＮＦ（配列番号１３８）；ＬＧＰＣＰＹＩＷＳ（配列番号１３９）；ＡＬＥＰＬＰＩＶ（配列番号１４０）；及びＶＧＲＫＰＫＶＥＱＬ（配列番号１４１）からなる群から選択される配列に由来する少なくとも１つのアミノ酸残基をさらに含み得る。

【０５０４】

注目すべきことに、４つの代表的なアイソフォーム選択的なＴＧＦβ１抗体を使用する構造試験において同定された結合領域の多くは、重複していることが見出され、ｐｒｏＴＧＦβ１複合体の潜在性の維持に特に重要であり得るｐｒｏＴＧＦβ１複合体内の特定の領域を指す。従って、有利には、抗体又はその断片は、本明細書に記載される複数の阻害剤にわたって同定された重複部分を含むそれらの結合領域に少なくとも部分的に基づいて選択され得る。結合領域のこれらの重複部分としては、例えば、ＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬＰＥＡＶＬ（配列番号１６５）、ＷＫＷＩＨＥＰＫＧＹＨＡＮＦ（配列番号１６６）及びＰＧＰＬＰＥＡＶＬ（配列番号１６７）が挙げられる。従って、本開示による高親和性のアイソフォーム選択的なＴＧＦβ１阻害剤は、ＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬＰＥＡＶＬ（配列番号１６５）、ＷＫＷＩＨＥＰＫＧＹＨＡＮＦ（配列番号１６６）及び／又はＰＧＰＬＰＥＡＶＬ（配列番号１６７）の１つ以上のアミノ酸残基を含むエピトープでｐｒｏＴＧＦβ１複合体（例えば、ヒトＬＬＣ）に結合し得る。

【０５０５】

従って、本明細書で開示されるカテゴリー１～５の抗体又は断片などの本開示によって包含される抗体又は抗原結合断片のいずれかは、本明細書で同定される結合領域の１つ以上に結合し得る。そのような抗体は、本明細書に記載されるとおりの対象のＴＧＦβ１徴候の治療において使用され得る。従って、本開示に従う治療上の使用に好適な抗体又はその抗原結合断片の選択は、ＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬＰＥＡＶＬ（配列番号１６５）、

ＷＫＷＩＨＥＰＫＧＹＨＡＮＦ（配列番号１６６）、ＰＧＰＬＰＥＡＶＬ（配列番号１６７）又はそのいずれかの部分に結合する抗体又はその断片を同定すること又は選択することを含み得る。

【０５０６】

以前に記載されるとおりの（国際公開第２０１４／１８２６７６号パンフレット）ヒトｐｒｏＴＧＦβ１のタンパク質ドメイン又はモチーフの非限定的な例は、表９において提供される。

【０５０７】

【表１１】

表 9. ヒト TGFβ1 関連ポリペプチドの選択されたタンパク質ドメイン/モチーフ

ヒト TGFβ1 ドメイン/モジュール	アミノ酸配列	配列番号
潜在型関連ペプチド (LAP) (プロドメイン)	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLA LYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQS THSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYS NNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAH CSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQH LQSSRHRR (*"第 1 の結合領域" は下線が引かれる*)	119
直鎖状ジャケット	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLP (*"潜在型ラッソ" は下線が引かれる*)	120
増殖因子ドメイン	ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGP CPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGR KPKVEQLSNMIVRSCKCS (*"フィンガー-1" 及び "フィンガー-2" はそれぞれ下線が引かれる*)	121
ファスナー	残基 74-76, YYA	n/a
フューリン切断部位	RHRR	122
アーム	EAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYD KFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELY QKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFR LSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLE RAQHLQSSRHRR	123
フィンガー-1	CVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFC (*"第 2 の結合領域" は下線が引かれる*)	124
フィンガー-2	CVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS (*"第 3 の結合領域" は下線が引かれる*)	125
提示分子結合のための残基	Cys 4	n/a
潜在型ラッソ	LASPPSQGEVPPGPL (*4 種の異なるアイソフォーム選択的な proTGFβ1 抗体にわたって共有される結合領域の部分は下線が引かれる*)	126
拡張された潜在型ラッソ	LASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTR (*4 種の異なるアイソフォーム選択的な proTGFβ1 抗体にわたって共有される結合領域の部分は下線が引かれる*)	127
アルファ-1 ヘリックス	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLR	128
アルファ-2 ヘリックス	AVLALYNSTR	129
トリガーループ	NGFTTGRRGDLATIHGMNRP	130
インテグリン結合	残基 215-217, RGD	n/a
ボウタイ	CSCDSRDNTLQVD	131

【０５０８】

安全性／毒性

ＴＧＦβ阻害剤の開発は、オンターゲット毒性も排除する所望の薬理学的効果及び十分な治療域を有する療法を同定する必要性のために課題のままである。モノクローナル抗体及び小分子キナーゼ阻害剤（ＳＭＩ）を含むＴＧＦβ阻害剤の大部分は、３種全てのＴＧＦβアイソフォームからのシグナル伝達を媒介する複数のＴＧＦβアイソフォーム又はＴＧＦβ受容体のいずれかを非選択的に標的化する。残念ながら、これらの阻害剤は、主に、有効性がないこと（Ａｋｈｕｒｓｔ　２０１７；Ｃｏｈｎ　２０１４；Ｖｏｅｌｋｅｒ　２０１７）、好ましくない安全性プロファイル、又はその両方（Ｔｏｌｃｈｅｒ　２０１７；Ｖｏｌｋｅｒ　２０１７；Ｃｏｈｎ　２０１４）に起因して癌患者において有望な臨床データを実証しなかった。これらの分子と関連する毒性としては、心血管異常、上皮肥厚化、胃腸管異常、及び皮膚病変が挙げられる。これらの毒性の各々は、１～２週から６ヶ月の期間の範囲の試験において複数の動物種（例えば、齧歯類、イヌ、及びカニクイザル）において特徴付けられている（Ｌｏｎｎｉｎｇ　２０１１；Ｓｔａｕｂｅｒ　２０１４；Ｍｉｔｒａ　２０２０）。これらの毒性の中で、不可逆的な心血管炎症性病変、心臓弁における出血及び肥厚化並びに大動脈及び冠状動脈を含む動脈病変が主要な懸念である。

【０５０９】

複数のアイソフォームを弱めることができるＴＧＦβの従来の汎阻害剤は、例えば、イヌ及びラットを含む複数の種にわたって報告される心血管毒性（心病変、最も注目すべきは弁膜症）を含むいくつかの毒性を引き起こすことが知られている。これらは、大動脈弁、右ＡＶ弁、及び左ＡＶ弁における肥厚化；大動脈弁、左ＡＶ弁、及び上行大動脈における炎症；上行大動脈、大動脈弁及び左ＡＶ弁における出血；上行大動脈における結合組織変性（例えば、Ｓｔｒａｕｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１４）“Ｎｏｎｃｌｉｎｉｃａｌ ｓａｆｅｔｙ ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｏｆ ａ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ β ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ｉ ｋｉｎａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｉｎ Ｆｉｓｃｈｅｒ ３４４ ｒａｔｓ ａｎｄ ｂｅａｇｌｅ ｄｏｇｓ”Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｐｒａｃｔ　４（３）：１０００１９６を参照されたい）。図２４Ａも参照されたい。

【０５１０】

加えて、３種全てのＴＧＦβアイソフォームに結合する中和抗体は、複数の種にわたって観察される特定の上皮毒性と関連しており、その一部は、下で要約される。

【０５１１】

【表１２】

表 10. TGFβの汎阻害剤と関連する上皮毒性

	マウス	カニクイザル	ヒト
毒性	• 舌、歯肉、及び食道の肥厚化及び炎症. • 所見は元に戻らない（12週間で回復）	• 歯肉、鼻粘膜上皮、及び膀胱の肥厚化 • 貧血は治療の休止を引き起こす • 変化は可逆的であった（膀胱を除く）	• 歯肉出血 • 鼻出血 • 頭痛 • 疲労 • 角化棘細胞腫(KA)、角化症、皮膚SCC、及び基底細胞癌腫を含む様々な皮膚障害
薬物/用量/期間	1D11 投与: 50 mg/kg (3x/週) 期間: 9-12週	GC1008 投与: 10及び50 mg/kg 期間: 6ヶ月	GC1008 用量: 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 15 mg/kg 期間: 4ヶ月の投与
暴露	血清濃度 = 1-2 mg/mL (4-12週間にわたる)	開示されない	半減期: 21.7日 DN Cmax 約(350 ng/mL)mg
*Vitsky et. al., *Am. J Pathology* vol. 174, 2009; 及びLonning et. al., *Current Pharmaceutical Biotech* 12, 2176-2189, 2011			

【０５１２】

従来のＴＧＦβアンタゴニストのアイソフォーム特異性の欠如がＴＧＦβ阻害と関連する毒性の原因の根底にある可能性があるという本開示の出願人による以前の認識（ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１７／０２１９７２号明細書を参照されたい）に基づいて、本発明者らは、アイソフォーム選択的な阻害剤の安全性／忍容性の態様を維持しながら、多面的なＴＧＦβ１調節不全を示す様々な疾患を治療するための広域性のＴＧＦβ１阻害をさらに達成しようとした。

【０５１３】

臨床現場において、治療効果は、薬物（例えば、モノクローナル抗体）の最小有効濃度（ＭＥＣ）が、薬物の最小毒性濃度（ＭＴＣ）未満であるときのみ達成される。これは、ＴＧＦβの従来の汎阻害剤の全てではないが、大半のものでは達成されず、実際、用量規制毒性を引き起こすと思われた。本出願人の以前の研究は、小分子受容体アンタゴニスト及び中和抗体などの従来の汎阻害剤と比較して顕著に改善された安全性プロファイルを示したＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的な阻害剤を記載した。国際公開第２０１７／１５６５００号パンフレットは、ＴＧＦβ１活性化のアイソフォーム選択的な阻害剤を開示し、ラットにおいて１週間当たり最大１００ｍｇ／ｋｇの用量で４週間投与されるとき、試験物品に関連する毒性は観察されず、抗体に関するＮＯＡＥＬを、試験された最高用量、即ち１００ｍｇ／ｋｇとして確立した。本出願人のその後の研究は、増強された機能を有する抗体も同等の安全性プロファイルを示すことも示した。本明細書では、目的の１つは、さらに高い親和性及び効力を有するが、少なくとも同じ又は同等のレベルの安全性を有する抗体を同定することであった。

【０５１４】

４週間のラット毒性試験の結果は、図２４Ｂにおいて提供される。対照としての小分子ＡＬＫ５阻害剤及びモノクローナル中和抗体と共に２つのアイソフォーム選択的なＴＧＦβ１阻害剤（Ａｂ３及びＡｂ６）が、別々の試験において試験された。試験物品に関連する毒性は、アイソフォーム選択的な抗体のいずれによっても認められなかった一方、予想されるとおり、非選択的な阻害剤は、公開された試験と一致して様々な有害事象を引き起こした。ＴＧＦβシグナル伝達を広範に遮断する治療とは対照的に、Ａｂ６は、ラットに

おける４週間の非ＧＬＰの試験的な毒性試験において心臓毒性を示さなかったが、これは、ＴＧＦβ１アイソフォームの選択的な阻害が汎ＴＧＦβ阻害剤と比較して改善された安全性プロファイルを有し得ることを示唆している。さらに、Ａｂ６は、４週間毎週投与されるとき、カニクイザルにおいて３００ｍｇ／ｋｇの高い用量レベルで安全であることが示された（例えば、有害事象が観察されなかった）。Ａｂ６は、３ｍｇ／ｋｇの低い用量レベルのいくつかのインビボモデルにおいて効果的であることが示されたため、これは、最大１００倍の治療域を提供する。重要なこととして、これは、高い効力が毒性のより大きいリスクを必ずしも意味しないことを実証している。特定の理論に束縛されることなく、本明細書で開示される抗体の高度に選択的な性質は、観察される毒性の欠如の理由である可能性が高いと考えられる。

【０５１５】

従って、いくつかの実施形態では、本開示による新規の抗体は、少なくとも４週間毎週投与されるとき、＞１００ｍｇ／ｋｇの最大耐容量（ＭＴＤ）を有する。いくつかの実施形態では、本開示による新規の抗体は、少なくとも４週間毎週投与されるとき、最大１００ｍｇ／ｋｇの最大無毒性量（ＮＯＡＥＬ）を有する。ＴＧＦβ阻害剤及びＴＧＦβ１阻害剤のための安全性／毒性試験を実行するために使用されることになる好適な動物モデルとしては、ラット、イヌ、カニクイザル、及びマウスが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、好適な前臨床有効性試験に基づく抗体の最小有効量は、ＮＯＡＥＬ未満である。より好ましくは、抗体の最小有効量は、ＮＯＡＥＬの約３分の１以下である。特定の実施形態では、抗体の最小有効量は、ＮＯＡＥＬの約６分の１以下である。いくつかの実施形態では、抗体の最小有効量は、ＮＯＡＥＬの約１０分の１以下である。

【０５１６】

いくつかの実施形態では、本開示は、ＴＧＦβ１シグナル伝達を阻害することができるアイソフォーム選択的な抗体を包含し、対象に投与されるとき、ＴＧＦβ１関連徴候を治療するのに有効な用量で心血管又は既知の上皮毒性を引き起こさない。いくつかの実施形態では、抗体は、毎週、隔週又は毎月投与される約３～１０ｍｇ／ｋｇの最小有効量を有する。好ましくは、抗体は、最小有効量の少なくとも６倍である用量（例えば、６倍の治療域）で無毒性から最小限の毒性を引き起こす。より好ましくは、抗体は、最小有効量の少なくとも１０倍である用量（例えば、１０倍の治療域）で無毒性から最小限の毒性を引き起こす。さらにより好ましくは、抗体は、最小有効量の少なくとも１５倍である用量（例えば、１５倍の治療域）で無毒性から最小限の毒性を引き起こす。

【０５１７】

免疫細胞に結合する治療剤は、患者に投与されるときに免疫細胞を活性化する潜在的なリスクをもたらす。従って、治療上の使用のためのＴＧＦβ阻害剤を選択する際、候補阻害剤が、ヒト末梢血単核球（ＰＢＭＣ）において炎症促進性サイトカイン応答（例えば、サイトカイン放出）を誘発しないことを決定するか又は確認することが重要である。炎症性サイトカインとしては、例えば、ＩＦＮγ、ＩＬ－２、ＩＬ－１β、ＴＮＦα、ＣＣＬ２及びＩＬ－６が挙げられる。いくつかの実施形態では、試験薬剤（候補阻害剤）によって誘発されるサイトカイン放出の許容されるレベルは、溶媒対照（例えば、ＩｇＧ）と比較して２．５倍以内の応答である。

【０５１８】

従って、本開示は、ｉ）ヒトＰＢＭＣにおいて危険なレベルの炎症促進性サイトカイン放出を誘発することを示さなかったＴＧＦβ阻害剤の選択；及びｉｉ）状態を治療するための患者への治療有効量のＴＧＦβ阻害剤を含む組成物の投与を含む、ヒト患者におけるＴＧＦβ関連状態（例えば、癌、骨髄線維症、線維症など）の治療における使用のためのＴＧＦβ阻害剤を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、治療有効量の少なくとも３倍である量でヒトＰＢＭＣからの危険なレベルのサイトカイン放出を誘発しない。好ましくは、治療有効量の少なくとも５倍のＴＧＦβ阻害剤は、ヒトＰＢＭＣにおける危険なレベルのサイトカイン放出を引き起こさない。

【０５１９】
ヒト血小板は、潜在型ＴＧＦβ１を発現することが報告されている。血小板を標的化する薬理学的介入は、血小板凝集及び活性化などの血小板機能に対して望まれない影響を引き起こす場合があり、血液凝固調節不全を引き起こす可能性がある。従って、候補阻害剤が、望まれない血小板活性化を引き起こさないか又は血小板の正常な機能に支障をきたさないことを決定するか又は確認することが重要である。
【０５２０】
従って、本開示は、ｉ）血小板凝集又は活性化を引き起こさないことが示されているＴＧＦβ阻害剤の選択；及びｉｉ）状態を治療するための患者への治療有効量のＴＧＦβ阻害剤を含む組成物の投与を含む、ヒト患者におけるＴＧＦβ関連状態（例えば、癌、骨髄線維症、線維症など）の治療における使用のためのＴＧＦβ阻害剤を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、治療有効量の少なくとも３倍である量で用量依存的な様式で自発性又はＡＤＰ誘導性血小板活性化を引き起こさない。好ましくは、治療有効量の少なくとも５倍のＴＧＦβ阻害剤は、血小板活性化を引き起こさない。特定の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、治療有効量の少なくとも３倍である量で用量依存的な様式でＡＤＰ誘導性血小板活性化を阻害しない。好ましくは、治療有効量の少なくとも５倍のＴＧＦβ阻害剤は、血小板活性化を阻害しない。
【０５２１】
本開示は、ヒト患者における癌の治療における使用のためのＴＧＦβ阻害剤を含み、治療は、ｉ）前臨床モデルにおいて効果的であり且つ安全であることが示されるＴＧＦβ阻害剤を選択すること、及びｉｉ）有効用量のＴＧＦβ阻害剤をヒト患者に投与することを含み、任意選択で、ＴＧＦβ阻害剤は、チェックポイント阻害剤と組み合わせて使用されるとき、腫瘍量を減少させるのに有効であり、さらに任意選択で、ＴＧＦβ阻害剤は、ヒト血液サンプルにおいて血小板活性化を誘発せず、最小有効用量より大きい用量でＰＢＭＣにおける炎症性サイトカイン放出を引き起こさず；且つさらに任意選択で、ＴＧＦβ阻害剤は、ＮＯＡＥＬが最小有効用量の少なくとも１０倍である１つ以上の前臨床モデルにおける標準的な毒性試験において評価されるとおり、許容されない有害事象を引き起こさない。
【０５２２】
従って、治療上の使用のための抗体又はその抗原結合断片の選択は、本明細書に記載されるカテゴリー１～５の１つ以上の判定基準を満たす抗体又は抗原結合断片を選択すること；抗体又は断片の有効量を決定するための好適な前臨床モデルにおいてインビボ有効性試験を実行すること；安全であるか又は毒性である抗体の量を決定するための好適なモデルにおいてインビボ安全性／毒性試験を実行すること（例えば、安全性／毒性を評価するためのＭＴＤ、ＮＯＡＥＬ、サイトカイン放出、血小板に対する影響、又は当技術分野で認められる任意のパラメータ）；及び少なくとも３倍の治療域（好ましくは６倍、より好ましくは１０倍の治療域、さらにより好ましくは１５倍の治療域）を提供する抗体又は断片を選択することを含み得る。好ましい実施形態では、インビボ有効性試験は、ヒトの状態を再現する２つ以上の好適な前臨床モデルにおいて実行される。いくつかの実施形態では、そのような前臨床モデルは、ＴＧＦβ１陽性癌を含み、任意選択で、免疫抑制性腫瘍を含み得る。免疫抑制性腫瘍は、ＣＢＴ、化学療法及び放射線療法（放射線治療剤など）などの癌療法に抵抗性であり得る。いくつかの実施形態では、前臨床モデルは、ＭＢＴ－２、クラウドマンＳ９１及びＥＭＴ６腫瘍モデルから選択される。
【０５２３】
選択された抗体又は断片は、抗体又は断片を含む医薬組成物の製造において使用され得る。そのような医薬組成物は、本明細書に記載されるとおりの対象のＴＧＦβ１徴候の治療において使用され得る。例えば、ＴＧＦβ１徴候は、増殖性障害及び／又は線維性障害であり得る。
【０５２４】
作用機序

治療薬として有用な本開示の抗体は、ＴＧＦβ１の阻害性抗体である。さらに、抗体は、活性化阻害剤であり、即ち、抗体は、既に増殖因子を活性化した後に直接的に追跡するのではなく、ＴＧＦβ１の活性化段階を遮断する。

【０５２５】

広義では、「阻害抗体」という用語は、標的機能、例えば増殖因子活性を弱めるか又は中和する抗体を指す。有利には、本開示の特定の阻害性抗体は、潜在型複合体からの成熟増殖因子放出を阻害することができ、それにより増殖因子のシグナル伝達を低減する。阻害抗体は、そのような抗体と結合するときに増殖因子放出又は活性を低減す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、抗体によって結合されるときに増殖因子活性の低減をもたらすＴＧＦβタンパク質（例えば、ＴＧＦβ１）、増殖因子又は他のエピトープのプロドメイン上にあり得る。本開示の阻害抗体としては、ＴＧＦβ１－阻害抗体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本開示の阻害性抗体は、組み合わせエピトープ、即ち抗原又は抗原複合体の２つ以上の構成要素／部分によって形成されるエピトープに特異的に結合する。例えば、組み合わせエピトープは、単一のタンパク質の複数の部分、即ち同じタンパク質の２つ以上の非連続的な区画に由来するアミノ酸残基からの寄与によって形成され得る。代わりに、組み合わせエピトープは、抗原複合体の複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。いくつかの実施形態では、本開示の阻害性抗体は、立体構造エピトープ（又は立体構造特異的エピトープ）、例えば、抗原又は抗原複合体の三次元構造（即ち立体構造）に影響されやすいエピトープに特異的に結合する。

【０５２６】

ＴＧＦβシグナル伝達を弱める従来の手法は、ｉ）受容体結合に利用可能な遊離リガンド（例えば、その潜在型前駆体複合体から放出される）を減少させるために、既に活性になった後に成熟増殖因子を直接的に中和すること；ｉｉ）遊離リガンドを捕捉することができる可溶性受容体断片（例えば、いわゆるリガンドトラップ）を利用すること；又はｉｉｉ）その細胞表面受容体を標的化してリガンド－受容体相互作用を遮断することであった。これらの従来の手法の各々は、内在性の対応物に対して競合するアンタゴニストを必要とする。さらに、上の最初の２つの手法（ｉ及びｉｉ）は、過渡種である活性リガンドを標的化する。従って、そのようなアンタゴニストは、短期の時間枠中に内在性受容体を動力学的に排除することができる必要がある。第３の手法は、多くの増殖因子（例えば、最大約２０）が同じ受容体を介してシグナル伝達するため、比較的長続きする効果をもたらし得るが、意図せずに望まれない阻害効果（従って、起こり得る毒性）をもたらす。

【０５２７】

これらの欠点に対する解決策を提供し、且つより大きい選択性及び限局性の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などの阻害性抗体の根底にある作用機序は、ＴＧＦβ１活性化及びリガンド－受容体相互作用の上流で作用する。従って、本開示を実行するのに好適なＴＧＦβ１の高親和性のアイソフォーム特異的なコンテキストに依存しない阻害剤は、好ましくは、活性化段階をその出所で（疾患微小環境、例えば、ＴＭＥ中など）遮断するために、不活性型（例えば、潜在型）前駆体ＴＧＦβ１複合体（例えば、プロ／潜在型ＴＧＦβ１を含む複合体）をその活性化前に標的化するはずであると考えられる。本開示の特定の実施形態によれば、そのような阻害剤は、受容体結合に一過的に利用可能な遊離リガンドではなく、ＥＣＭ結合及び細胞表面に繋ぎ止められたプロ／潜在型ＴＧＦβ１複合体の両方に同等の親和性を有して標的化する。

【０５２８】

可溶性活性種（即ち供給源から放出された後の成熟増殖因子）とは対照的に、供給源で組織／細胞に繋ぎ止められた複合体を局所的に標的化する利点は、近年の研究によってさらに支持される。Ｉｓｈｉｈａｒａ ｅｔ ａｌ．，（Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．１１，ｅａａｕ３２５９ （２０１９）“Ｔａｒｇｅｔｅｄ ａｎｔｉｂｏｄｙ ａｎｄ ｃｙｔｏｋｉｎｅ ｃａｎｃｅｒ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｉｅｓ ｔｈｒｏｕｇｈ ｃｏｌｌａｇｅｎ ａｆｆｉｎｉｔｙ”）は、全身的に投与された薬物が、コラーゲン結

合部分と結合することによって腫瘍部位に標的化されるとき、それらは、非標的化対応物と比較して、抗腫瘍免疫を増強し、治療関連毒性を低減することができたことを報告した。

【０５２９】

本開示の抗体によって達成される作用機序は、効果の耐久性並びに全体的なより大きい効力及び安全性の増強にさらに寄与し得る。

【０５３０】

興味深いことに、これらの抗体は、細胞結合ＴＧＦβ１（ＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１）に対して追加の阻害活性を発揮し得る。本出願人は、ＬＲＲＣ３３結合抗体が、細胞表面ＬＲＲＣ３３への結合時にインターナライズする傾向があることを見出した。インターナリゼーションが抗体結合によって能動的に誘導されるかどうか、又は代わりにこの現象がマクロファージの天然の（例えば、受動的な）エンドサイトーシス活性に起因するかどうかは、不明である。しかしながら、高親和性のアイソフォーム選択的なＴＧＦβ１阻害剤のＡｂ６は、ＬＲＲＣ３３及びｐｒｏＴＧＦβ１でトランスフェクトされた細胞中に迅速にインターナライズすることができ、Ａｂ６で達成されるインターナリゼーションの速度は、細胞表面ＬＲＲＣ３３を認識する参照抗体によるものより著しく高い（図３）。同様の結果は、初代ヒトマクロファージから得られる。これらの観察は、Ａｂ６がその標的であるＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１への結合時にインターナリゼーションを誘導することができ、それによりＬＲＲＣ３３を含有する複合体を細胞表面から除去することができる可能性を高める。疾患部位では、これは、活性化できる潜在型ＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１レベルの利用能を低減し得る。従って、アイソフォーム－選択的なＴＧＦβ１阻害剤は、２つの並行した作用機序：ｉ）潜在型複合体からの成熟増殖因子の放出；及びｉｉ）インターナリゼーションを介して細胞表面からＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体を除去することを介してＴＧＦβ１のＬＲＲＣ３３アームを阻害し得る。同様の阻害性の作用機序がＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１に適用され得る可能性がある。

【０５３１】

いくつかの実施形態では、抗体は、酸性ｐＨ（およそ５のｐＨなど）より中性ｐＨ（およそ７のｐＨなど）でより高い親和性を有してその抗原に結合するｐＨ感受性抗体である。そのような抗体は、中性又は生理条件より酸性条件でより高い解離速度を有し得る。例えば、酸性ｐＨで測定される解離速度と、中性ｐＨで測定される解離速度との間の比（例えば、ｐＨ７でのK_{off}に対するｐＨ５でのK_{off}）は、少なくとも１．２であり得る。任意選択で、その比は、少なくとも１．５である。いくつかの実施形態では、比は、少なくとも２である。そのようなｐＨ感受性抗体は、リサイクリング抗体として有用であり得る。細胞表面上での標的結合時、抗体は、膜結合型ｐｒｏＴＧＦβ１複合体（ＬＲＲＣ３３又はＧＡＲＰと結合される）の抗体依存的なインターナリゼーション（従ってその除去）を誘発し得る。その後、リソソームなどの酸性細胞内区画において、抗体－抗原複合体は解離し、遊離抗体は、細胞外ドメインに輸送され得る。

【０５３２】

従って、いくつかの実施形態では、治療上の使用のための抗体又は抗原結合断片の選択は、抗体依存的なインターナリゼーションを誘導する能力及び／又は抗体のｐＨ依存性に部分的に基づき得る。

【０５３３】

抗原複合体及びその構成要素

本開示の新規の抗体は、４種の既知のヒトの大きい潜在型複合体（例えば、ｈＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びｈＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１）の各々に特異的に結合し、ＴＧＦβ１活性化を特異的に阻害する。

【０５３４】

そのような抗体のスクリーニング（例えば、同定及び選択）は、典型的には組換えによ

り生成される好適な抗原複合体の使用を含む。ＴＧＦβアイソフォーム及び関連ポリペプチド、断片及びバリアント、提示分子（例えば、ＬＴＢＰ、ＧＡＲＰ、ＬＲＲＣ３３）及び関連ポリペプチド、断片及びバリアントを含むそのような抗原複合体を含み得る有用なタンパク質構成要素が提供される。これらの構成要素が発現され、精製され、抗体スクリーニングのプロセスにおいて使用され得るタンパク質複合体（大きい潜在型複合体など）を形成させられ得る。スクリーニングは、望ましいバインダーがバインダー及び非バインダーのプール又はライブラリーから選択される陽性選択並びに望ましくないバインダーがプールから除去される陰性選択を含み得る。通常、少なくとも１つのマトリックス結合複合体（例えば、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１及び／又はＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１）及び少なくとも１つの細胞結合複合体（例えば、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及び／又はＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１）が、陽性スクリーニングのために含まれて、選択されているバインダーがそのような生物学的コンテキストの両方に対する親和性を有することを確実にする。

【０５３５】

いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１は、天然に存在する哺乳動物アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１は、天然に存在するヒトアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１は、ヒト、サル、ラット又はマウスアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体又はその抗原結合部分は、ＴＧＦβ２に特異的に結合しない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体又はその抗原結合部分は、ＴＧＦβ３に特異的に結合しない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体又はその抗原結合部分は、ＴＧＦβ２又はＴＧＦβ３に特異的に結合しない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２３に記載されるアミノ酸配列を含むＴＧＦβ１に特異的に結合する。ＴＧＦβ２のアミノ酸配列、及びＴＧＦβ３アミノ酸配列は、それぞれ配列番号２７及び２１に記載される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体又はその抗原結合部分は、天然に存在しないアミノ酸配列を含むＴＧＦβ１（他の場合、本明細書で天然に存在しないＴＧＦβ１と称される）に特異的に結合する。例えば、天然に存在しないＴＧＦβ１は、天然に存在するＴＧＦβ１アミノ酸配列に対して１つ以上の組換えにより生成された変異を含み得る。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２、又はＴＧＦβ３アミノ酸配列は、表１１に示されるとおりの配列番号１３～２４に記載されるとおりのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２、又はＴＧＦβ３アミノ酸配列は、表１２に示されるとおりの配列番号２５～３２に記載されるとおりのアミノ酸配列を含む。

【０５３６】

ＴＧＦβ１（プロドメイン＋増殖因子ドメイン）

【化８】

LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYA
KEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRY
LSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNR
PFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYI
WSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS (配列番号13)

【０５３７】

ＴＧＦβ２（プロドメイン＋増殖因子ドメイン）

【化９】

SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDE
EYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIELYQILK
SKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSEELEAR
FAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRRKKRALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYI
DFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKI
EQLSNMIVKSCKCS (配列番号17)

【０５３８】

ＴＧＦβ３（プロドメイン＋増殖因子ドメイン）

【化１０】

SLSLSTCTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENT
ESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIELFQI
LRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKF
KGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPGQGGQRKKRALDTNYCFRNLEENCCVRPLYID
FRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPK
VEQLSNMVVKSCKCS (配列番号21)

【０５３９】

【表１３】

表11. 例示的なTGFβ1、TGFβ2、及びTGFβ3のアミノ酸配列

タンパク質	配列	配列番号
proTGFβ1	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLAL YNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQST HSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNS WRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSC DSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFC LGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVG RKPKVEQLSNMIVRSCKCS	13
proTGFβ1 C4S	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLAL YNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQST HSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNS WRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSC DSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFC LGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVG RKPKVEQLSNMIVRSCKCS	14
proTGFβ1 D2G	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLAL YNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQST HSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNS WRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSC DSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCL GPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGR KPKVEQLSNMIVRSCKCS	15
proTGFβ1 C4S D2G	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLAL YNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQST HSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNS WRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSC DSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCL GPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGR KPKVEQLSNMIVRSCKCS	16
proTGFβ2	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISI YNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIP PTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIEL YQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDAVHEWLHHKDRN LGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSEELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIK STRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRRKKRALDAAYCFRNVQDN CCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVL SLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS	17
proTGFβ2 C5S	SLSTSSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISI YNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIP PTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIEL YQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDAVHEWLHHKDRN	18

【０５４０】

【表１４】

	LGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSEELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIK STRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRRKKRALDAAYCFRNVQDN CCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVL SLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS	
proTGFβ2 C5S D2G	SLSTSSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISI YNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIP PTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIEL YQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDAVHEWLHHKDRN LGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSEELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIK STRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRRKGALDAAYCFRNVQDNC CLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLS LYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS	19
proTGFβ2 D2G	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISI YNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIP PTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIEL YQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDAVHEWLHHKDRN LGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSEELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIK STRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRRKGALDAAYCFRNVQDNC CLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLS LYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS	20
proTGFβ3	SLSLSTCTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLA LYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNEL AVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIE LFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESN LGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLK KQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPGQGGQRKKRALDTNYCFRNLEENCC VRPLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGL YNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	21
proTGFβ3 C7S	SLSLSTSTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLA LYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNEL AVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIE LFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESN LGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLK KQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPGQGGQRKKRALDTNYCFRNLEENCC VRPLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGL YNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	22
proTGFβ3 C7S D2G	SLSLSTSTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLA LYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNEL AVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIE LFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESN LGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLK KQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPGQGGQRKGALDTNYCFRNLEENCCV RPLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLY NTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	23
proTGFβ3 D2G	SLSLSTCTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLA LYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNEL AVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIE LFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESN LGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLK KQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPGQGGQRKGALDTNYCFRNLEENCCV RPLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLY NTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	24

【０５４１】

【表１５】

表12. 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	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKT KDISHSIYMFFNTSDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQ KYSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGF RFSAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHDMNRPFLLLMATP LERAQHLHSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWK WIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASASPC CVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	25

【０５４２】

【表１６】

proTGFβ1	カニクイザル	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFK QSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQK YSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFR LSAHCSCDSKDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPL ERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWI HEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCV PQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	26
TGFβ1 LAP C4S	マウス	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKT KDISHSIYMFFNTSDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQ KYSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGF RFSAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHDMNRPFLLLMATP LERAQHLHSSRHRR	27
TGFβ1 LAP C4S	カニクイザル	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFK QSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQK YSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFR LSAHCSCDSKDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPL ERAQHLQSSRHRR	28
proTGFβ1 C4S D2G	マウス	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKT KDISHSIYMFFNTSDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQ KYSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGF RFSAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHDMNRPFLLLMATP LERAQHLHSSRHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWI HEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASASPCCV PQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	29
proTGFβ1 C4S	マウス	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKT KDISHSIYMFFNTSDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQ KYSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGF RFSAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHDMNRPFLLLMATP LERAQHLHSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWK WIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASASPC CVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	30
proTGFβ1 C4S	カニクイザル	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFK QSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQK YSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFR LSAHCSCDSKDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPL ERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWI HEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCV PQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	31
proTGFβ1 C4S D2G	カニクイザル	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFK QSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQK YSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFR LSAHCSCDSKDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPL ERAQHLQSSRHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIH EPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVP QALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	32
LTBP3	カニクイザル	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCRDSCQQGS NMTLIGENGHSTDTLTGSGFRVVVCPLPCMNGGQCSSRNQCLCPP DFTGRFCQVPAGGAGGGTGGSGPGLSRAGALSTGALPPLAPEGDS VASKHAIYAVQVIADPPGPGEGPPAQHAAFLVPLGPGQISAEVQAPP PVVNVRVHHPPEASVQVHRIESSNAEGAAPSQHLLPHPKPSHPRPP TQKPLGRCFQDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKC HKCPQLQYTGVQKPGPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINECAM PGVCRHGDCLNNPGSYRCVCPPGHSLGPSRTQCIADKPEEKSLCF RLVSPEHQCQHPLTTRLTRQLCCCSVGKAWGARCQRCPADGTAAF KEICPAGKGYHILTSHQTLTIQGESDFSLFLHPDGPPKPQQLPESPS QAPPPEDTEEERGVTTDSPVSEERSVQQSHPTATTSPARPYPELIS RPSPPTMRWFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTETDECRLNQNICGHGEC VPGPPDYSCHCNPGYRSHPQHRYCVDVNECEAEPCGPGRGICMN TGGSYNCHCNRGYRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCGDGGFCINF	33

【０５４３】

【表１７】

		PGHYKCNCYPGYRLKASRPPVCEDIDECRDPSSCPDGKCENKPGS FKCIACQPGYRSQGGGACRDVNECAEGSPCSPGWCENLPGSFRC TCAQGYAPAPDGRSCVDVDECEAGDVCDNGICTNTPGSFQCQCLS GYHLSRDRSHCEDIDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPQGHRLV GGRKCQDIDECTQDPGLCLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFTPTQDQ HGCEEVEQPHHKKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCCSLGAG WGDHCEIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDE CMLFGAEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLLECVDVDECL DESNCRNGVCENTRGGYRCACTPPAEYSPAQRQCLSPEEMDVDE CQDPAACRPGRCVNLPGSYRCECRPPWVPGPSGRDCQLPESPAE RAPERRDVCWSQRGEDGMCAGPQAGPALTFDDCCCRQGRGWGA QCRPCPPRGAGSQCPTSQSESNSFWDTSPLLLGKPRRDEDSSEED SDECRCVSGRCVPRPGGAVCECPGGFQLDASRARCVDIDECRELN QRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCKAGFARSRPHGACVPQRRR	
LTBP3	マウス	GPAGERGTGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCRDSCQQGS NMTLIGENGHSTDTLTGSAFRVVVCPLPCMNGGQCSSRNQCLCPP DFTGRFCQVPAAGTGAGTGSSGPGLARTGAMSTGPLPPLAPEGES VASKHAIYAVQVIADPPGPGEGPPAQHAAFLVPLGPGQISAEVQAPP PVVNVRVHHPPEASVQVHRIEGPNAEGPASSQHLLPHPKPPHPRPP TQKPLGRCFQDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKC HKCPQLQYTGVQKPVPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINECAM PGNVCHGDCLNNPGSYRCVCPPGHSLGPLAAQCIADKPEEKSLCFR LVSTEHQCQHPLTTRLTRQLCCCSVGKAWGARCQRCPADGTAAFK EICPGKGYHILTSHQTLTIQGESDFSLFLHPDGPPKPQQLPESPSRAP PLEDTEEERGVTMDPPVSEERSVQQSHPTTTTSPPRPYPELISRPSP PTFHRFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTETDECRLNQNICGHGQCVPGPS DYSCHCNAGYRSHPQHRYCVDVNECEAEPCGPGKGICMNTGGSY NCHCNRGYRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCGDGGFCINFPGHYK CNCYPGYRLKASRPPICEDIDECRDPSTCPDGKCENKPGSFKCIAC QPGYRSQGGGACRDVNECSEGTPCSPGWCENLPGSYRCTCAQYE PAQDGLSCIDVDECEAGKVCQDGICTNTPGSFQCQCLSGYHLSRDR SRCEDIDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPLGHRLVGGRKCKKDI DECSQDPGLCLPHACENLQGSYVCVCDEGFTLTQDQHGCEEVEQP HHKKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCCSLGAGWGDHCEIYP CPVYSSAEFHSLVPDGKRLHSGQQHCELCIPAHRDIDECILFGAEICK EGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLLECVDVDECLDESNCRNGVC ENTRGGYRCACTPPAEYSPAQAQCLIPERWSTPQRDVKCAGASEE RTACVWGPWAGPALTFDDCCCRQPRLGTQCRPCPPRGTGSQCPT SQSESNSFWDTSPLLLGKSPRDEDSSEEDSDECRCVSGRCVPRPG GAVCECPGGFQLDASRARCVDIDECRELNQRGLLCKSERCVNTSG SFRCVCKAGFTRSRPHGPACLSAAADDAAIAHTSVIDHRGYFH	34
LTBP1S	カニクイザル	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTTLISENGHAADTLT ATNFRVVLCHLPCMNGGQCSSRDKCQCPPNFTGKLCQIPVHGASV PKLYQHSQQPGKALGTHVIHSTHTLPLTVTSQQGVKVKFPPNIVNIH VKHPPEASVQIHQVSRIDGPTGQKTKEAQPGQSQVSYQGLPVQKTQ TIHSTYSHQQVIPHVYPVAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSKQE DCCGTVGTSWGFNKCQKCPKKPSYHGYNQMMECLPGYKRVNNTF CQDINECQLQGVCPNGECLNTMGSYRCTCKIGFGPDPTFSSCVPDP PVISEEKGPCYRLVSSGRQCMHPLSVHLTKQLCCCSVGKAWGPHC EKCPLPGTAAFKEICPGGMGYTVSGVHRRRPIHHHVGKGPVFVKPK NTQPVAKSTHPPPLPAKEEPVEALTFSREHGPGVAEPEVATAPPEK EIPSLDQEKTKLEPGQPQLSPGISTIHLHPQFPVVIEKTSPPVPVEVAP EASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAGHCINLPVRYTCICYEG YKFSEQQRKCVDIDECTQVQHLCSQGRCENTEGSFLCICPAGFMAS EEGTNCIDVDECLRPDVCGEGHCVNTVGAFRCEYCDSGYRMTQRG RCEDIDECLNPSTCPDEQCVNSPGSYQCVPCTEGFRGWNGQCLDV DECLEPNVCTNGDCSNLEGSYMCSCHKGYTRTPDHKHCKDIDECQ QGNLCVNGQCKNTEGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECQHHHL CAHGQCRNTEGSFQCVCDQGYRASGLGDHCEDINECLEDKSVCQR GDCINTAGSYDCTCPDGFQLDDNKTCQDINECEHPGLCGPQGECL NTEGSFHCVCQQGFSISADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCDNTAG SFRCLCYQGFQAPQDGQGCVDVNECELLSGVCGEAFCENVEGSFL CVCADENQEYSPMTGQCRSRTSTDLDVEQPKEEKKECYYNLNDAS LCDNVLAPNVTKQECCCTSGAGWGDNCEIFPCPVLGTAEFTEMCPK GKGFVPAGESSSEAGGENYKDADECLLFGQEICKNGFCLNTRPGYE CYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPSSCIDGQCVNTEGSYNCFCT HPMVLDASEKRCIRPAESNEQIEETDVYQDLCWEHLSDEYVCSRPL	35

【０５４４】

【表１８】

		VGKQTTYTECCCLYGEAWGMQCALCPMKDSDDYAQLCNIPVTGRR QPYGRDALVDFSEQYAPEADPYFIQDRFLNSFEELQAEECGILNGCE NGRCVRVQEGYTCDCFDGYHLDTAKMTCVDVNECDELNNRMSLCK NAKCINTEGSYKCLCLPGYVPSDKPNYCTPLNTALNLEKDSDLE	
LTBP1S	マウス	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGNCQNSCQKGNTTTLISENGHAADTL TATNFRVVICHLPCMNGGQCSSRDKCQCPPNFTGKLCQIPVLGASM PKLYQHAQQQGKALGSHVIHSTHTLPLTMTSQQGVKVKFPPNIVNIH VKHPPEASVQIHQVSRIDSPGGQKVKEAQPGQSQVSYQGLPVQKT QTVHSTYSHQQLIPHVYPVAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSK QEDCCGTVGTSWGFNKCQKCPKKQSYHGYTQMMECLQGYKRVN NTFCQDINECQLQGVCPNGECLNTMGSYRCSCKMGFGPDPTFSSC VPDPPVISEEKGPCYRLVSPGRHCMHPLSVHLTKQICCCSVGKAWG PHCEKCPLPGTAAFKEICPGGMGYTVSGVHRRRPIHQHIGKEAVYV KPKNTQPVAKSTHPPPLPAKEEPVEALTSSWEHGPRGAEPEVVTAP PEKEIPSLDQEKTRLEPGQPQLSPGVSTIHLHPQFPVVVEKTSPPVP VEVAPEASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAGHCINLPVRYTC ICYEGYKFSEQLRKCVDIDECAQVRHLCSQGRCENTEGSFLCVCPA GFMASEEGTNCIDVDECLRPDMCRDGRCINTAGAFRCEYCDSGYR MSRRGYCEDIDECLKPSTCPEEQCVNTPGSYQCVPCTEGFRGWNG QCLDVDECLQPKVCTNGSCTNLEGSYMCSCHRGYSPTPDHRHCQ DIDECQQGNLCMNGQCRNTDGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDE CEHHHLCSHGQCRNTEGSFQCVCNQGYRASVLGDHCEDINECLED SSVCQGGDCINTAGSYDCTCPDGFQLNDNKGCQDINECAQPGLCG SHGECLNTQGSFHCVCEQGFSISADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGF CDNTAGSFRCLCYQGFQAPQDGQGCVDVNECELLSGVCGEAFCE NVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCRSRVTEDSGVDRQPREEKKEC YYNLNDASLCDNVLAPNVTKQECCCTSGAGWGDNCEIFPCPVQGT AEFTEMCPRGKGLVPAGESSYDTGGENYKDADECLLFGEEICKNGY CLNTQPGYECYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPNSCIDGQCVNT EGSYNCFCTHPMVLDASEKRCVQPTESNEQIEETDVYQDLCWEHLS EEYVCSRPLVGKQTTYTECCCLYGEAWGMQCALCPMKDSDDYAQL CNIPVTGRRRPYGRDALVDFSEQYGPETDPYFIQDRFLNSFEELQAE ECGILNGCENGRCVRVQEGYTCDCFDGYHLDMAKMTCVDVNECSE LNNRMSLCKNAKCINTEGSYKCLCLPGYIPSDKPNYCTPLNSALNLD KESDLE	36
GARP	マウス	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQALYLSGNQLQSI LVSPLGFYTALRHLDLSDNQISFLQAGVFQALPYLEHLNLAHNRLAT GMALNSGGLGRLPLLVSLDLSGNSLHGNLVERLLGETPRLRTLSLAE NSLTRLARHTFWGMPAVEQLDLHSNVLMDIEDGAFEALPHLTHLNLS RNSLTCISDFSLQQLQVLDLSCNSIEAFQTAPEPQAQFQLAWLDLRE NKLLHFPDLAVFPRLIYLNVSNNLIQLPAGLPRGSEDLHAPSEGWSA SPLSNPSRNASTHPLSQLLNLDLSYNEIELVPASFLEHLTSLRFLNLS RNCLRSFEARQVDSLPCLVLLDLSHNVLEALELGTKVLGSLQTLLLQ DNALQELPPYTFASLASLQRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFS GIPTLHVLNMAGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVATGALV GLEASLEVLELQGNGLTVLRVDLPCFLRLKRLNLAENQLSHLPAWTR AVSLEVLDLRNNSFSLLPGNAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGW LAAQLHQGRVDVDATQDLICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKGGLKNV NLILLLSFTLVSAIVLTTLATICFLRRQKLSQQYKA	37
sGARP	マウス	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQALYLSGNQLQSI LVSPLGFYTALRHLDLSDNQISFLQAGVFQALPYLEHLNLAHNRLAT GMALNSGGLGRLPLLVSLDLSGNSLHGNLVERLLGETPRLRTLSLAE NSLTRLARHTFWGMPAVEQLDLHSNVLMDIEDGAFEALPHLTHLNLS RNSLTCISDFSLQQLQVLDLSCNSIEAFQTAPEPQAQFQLAWLDLRE NKLLHFPDLAVFPRLIYLNVSNNLIQLPAGLPRGSEDLHAPSEGWSA SPLSNPSRNASTHPLSQLLNLDLSYNEIELVPASFLEHLTSLRFLNLS RNCLRSFEARQVDSLPCLVLLDLSHNVLEALELGTKVLGSLQTLLLQ DNALQELPPYTFASLASLQRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFS GIPTLHVLNMAGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVATGALV GLEASLEVLELQGNGLTVLRVDLPCFLRLKRLNLAENQLSHLPAWTR AVSLEVLDLRNNSFSLLPGNAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGW LAAQLHQGRVDVDATQDLICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKGGLKNV N	38

【０５４５】

いくつかの実施形態では、抗原性タンパク質複合体（例えば、ＬＴＢＰ－ＴＧＦβ１複合体）は、ＬＴＢＰタンパク質（例えば、ＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ２、ＬＴＢＰ３及びＬＴＢＰ４）、ＧＡＲＰタンパク質、ＬＲＲＣ３３タンパク質、又はその断片などの１つ以上の提示分子を含み得る。通常、本明細書で開示される実施形態を実行するのに好適な最小限必要とされる断片は、ｐｒｏＴＧＦβ１複合体とジスルフィド結合を形成することができる少なくとも２つのシステイン残基を含む少なくとも５０個のアミノ酸、好ましくは少なくとも１００個のアミノ酸の提示分子タンパク質を含む。具体的には、これらのＣｙｓ残基は、ｐｒｏＴＧＦβ１複合体の各単量体のＮ末端近傍に存在するシステイン残基と共

有結合を形成する。ｐｒｏＴＧＦβ１二量体複合体の三次元構造において、各単量体のＮ末端のいわゆる「アルファ－１ヘリックス」は、互いに非常に近接した状態になり、提示分子中に存在するシステインの対応する対と生産的な共有結合を形成するのに必要となる２つのシステイン残基（各ヘリックス由来のもの）間の距離を整える（例えば、Ｃｕｅｎｄｅ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１５）Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓ．Ｍｅｄ．７：２８４ｒａ５６を参照されたい）。従って、提示分子の断片を使用して、スクリーニングプロセス（例えば、免疫化、ライブラリースクリーニング、同定、及び選択）においてＬＬＣを形成するとき、そのような断片は、適切な距離によって隔てられたシステイン残基を含むべきであり、得られるＬＬＣの正確な立体構造を保存するために、ｐｒｏＴＧＦβ１複合体との適切なジスルフィド結合形成を可能にすることになる。例えば、ＬＴＢＰ（例えば、ＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３及びＬＴＢＰ４）は、ｐｒｏＴＧＦβ１との共有結合性の相互作用を媒介する「システインに富むドメイン」を含有し得る。

【０５４６】

本明細書に記載されるとおりの抗体又はその抗原結合部分は、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体に結合することができる。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ１タンパク質は、天然に存在するタンパク質又はその断片である。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ１タンパク質は、天然に存在しないタンパク質又はその断片である。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ１タンパク質は、組換えタンパク質である。そのような組換えＬＴＢＰ１タンパク質は、ＬＴＢＰ１、代わりに、スプライスされたそのバリアント及び／又はその断片を含み得る。組換えＬＴＢＰ１タンパク質は、１つ以上の検出可能な標識を含むようにも修飾され得る。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ１タンパク質は、リーダー配列（例えば、天然又は非天然リーダー配列）を含む。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ１タンパク質は、リーダー配列を含まない（即ち、リーダー配列は、プロセシングされたか又は切断された）。そのような検出可能な標識は、ビオチン標識、ポリヒスチジンタグ、ｍｙｃタグ、ＨＡタグ及び／又は蛍光タグを含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ１タンパク質は、哺乳動物ＬＴＢＰ１タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ１タンパク質は、ヒト、サル、マウス、又はラットＬＴＢＰ１タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ１タンパク質は、表１２において配列番号３５及び３６に記載されるとおりのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ１タンパク質は、表１４において配列番号３９に記載されるとおりのアミノ酸配列を含む。

【０５４７】

本明細書に記載されるとおりの抗体又はその抗原結合部分は、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体に結合することができる。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ３タンパク質は、天然に存在するタンパク質又はその断片である。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ３タンパク質は、天然に存在しないタンパク質又はその断片である。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ３タンパク質は、組換えタンパク質である。そのような組換えＬＴＢＰ３タンパク質は、ＬＴＢＰ３、代わりに、スプライスされたそのバリアント及び／又はその断片を含み得る。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ３タンパク質は、リーダー配列（例えば、天然又は非天然リーダー配列）を含む。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ３タンパク質は、リーダー配列を含まない（即ち、リーダー配列は、プロセシングされたか又は切断された）。組換えＬＴＢＰ３タンパク質は、１つ以上の検出可能な標識を含むようにも修飾され得る。そのような検出可能な標識は、ビオチン標識、ポリヒスチジンタグ、ｍｙｃタグ、ＨＡタグ及び／又は蛍光タグを含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ３タンパク質は、哺乳動物ＬＴＢＰ３タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ３タンパク質は、ヒト、サル、マウス、又はラットＬＴＢＰ３タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ３タンパク質は、表１２において配列番号３３及び３４に記載されるとおりのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ１タンパク質は、表１４において配列番号４０に記載されるとおりのアミノ酸配列を含む。

【０５４８】
本明細書に記載されるとおりの抗体又はその抗原結合部分は、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体に結合することができる。いくつかの実施形態では、ＧＡＲＰタンパク質は、天然に存在するタンパク質又はその断片である。いくつかの実施形態では、ＧＡＲＰタンパク質は、天然に存在しないタンパク質又はその断片である。いくつかの実施形態では、ＧＡＲＰタンパク質は、組換えタンパク質である。そのようなＧＡＲＰは、本明細書で組換えＧＡＲＰと呼ばれる組換え体であり得る。いくつかの組換えＧＡＲＰは、野生型ＧＡＲＰと比較して１つ以上の修飾、短縮化及び／又は変異を含み得る。組換えＧＡＲＰは、可溶性になるように修飾され得る。いくつかの実施形態では、ＧＡＲＰタンパク質は、リーダー配列（例えば、天然又は非天然リーダー配列）を含む。いくつかの実施形態では、ＧＡＲＰタンパク質は、リーダー配列を含まない（即ち、リーダー配列は、プロセシングされたか又は切断された）。他の実施形態では、組換えＧＡＲＰタンパク質は、１つ以上の検出可能な標識を含むように修飾される。さらなる実施形態では、そのような検出可能な標識は、ビオチン標識、ポリヒスチジンタグ、ｆｌａｇタグ、ｍｙｃタグ、ＨＡタグ及び／又は蛍光タグを含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＧＡＲＰタンパク質は、哺乳動物ＧＡＲＰタンパク質である。いくつかの実施形態では、ＧＡＲＰタンパク質は、ヒト、サル、マウス、又はラットＧＡＲＰタンパク質である。いくつかの実施形態では、ＧＡＲＰタンパク質は、表１２において配列番号３７～３８に記載されるとおりのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＧＡＲＰタンパク質は、表１４において配列番号４１及び４２に記載されるとおりのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体又はその抗原結合部分は、コンテキストに依存する様式でＴＧＦβ１に結合せず、例えば、ＴＧＦβ１への結合は、ＴＧＦβ１分子がＧＡＲＰなどの特定の提示分子と複合体を形成したときにのみ生じることになる。代わりに、抗体、及びその抗原結合部分は、コンテキストに依存しない様式でＴＧＦβ１に結合する。換言すれば、抗体又はその抗原結合部分は、いずれかの提示分子：ＧＡＲＰ、ＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３及び／又はＬＲＲＣ３３に結合されるとき、ＴＧＦβ１に結合する。

【０５４９】
本明細書に記載されるとおりの抗体又はその抗原結合部分は、ＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に結合することができる。いくつかの実施形態では、ＬＲＲＣ３３タンパク質は、天然に存在するタンパク質又はその断片である。いくつかの実施形態では、ＬＲＲＣ３３タンパク質は、天然に存在しないタンパク質又はその断片である。いくつかの実施形態では、ＬＲＲＣ３３タンパク質は、組換えタンパク質である。そのようなＬＲＲＣ３３は、本明細書で組換えＬＲＲＣ３３と呼ばれる組換え体であり得る。いくつかの組換えＬＲＲＣ３３タンパク質は、野生型ＬＲＲＣ３３と比較して１つ以上の修飾、短縮化及び／又は変異を含み得る。組換えＬＲＲＣ３３タンパク質は、可溶性になるように修飾され得る。例えば、いくつかの実施形態では、ＬＲＲＣ３３の外部ドメインは、可溶性ＬＲＲＣ３３タンパク質（ｓＬＲＲＣ３３；例えば、配列番号７３を参照されたい）を発現するためにＣ末端Ｈｉｓタグと共に発現され得る。いくつかの実施形態では、ＬＲＲＣ３３タンパク質は、リーダー配列（例えば、天然又は非天然リーダー配列）を含む。いくつかの実施形態では、ＬＲＲＣ３３タンパク質は、リーダー配列を含まない（即ち、リーダー配列は、プロセシングされたか又は切断された）。他の実施形態では、組換えＬＲＲＣ３３タンパク質は、１つ以上の検出可能な標識を含むように修飾される。さらなる実施形態では、そのような検出可能な標識は、ビオチン標識、ポリヒスチジンタグ、ｆｌａｇタグ、ｍｙｃタグ、ＨＡタグ及び／又は蛍光タグを含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＬＲＲＣ３３タンパク質は、哺乳動物ＬＲＲＣ３３タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＬＲＲＣ３３タンパク質は、ヒト、サル、マウス又はラットＬＲＲＣ３３タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＬＲＲＣ３３タンパク質は、表１４において配列番号７２、７３及び７４に記載されるとおりのアミノ酸配列を含む。

【０５５０】

【表１９】

表13. 例示的なLTBPアミノ酸配列

タンパク質	配列	配列番号
LTBP1S	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTTLISENGHAADTLT ATNFRVVICHLPCMNGGQCSSRDKCQCPPNFTGKLCQIPVHGASVP KLYQHSQQPGKALGTHVIHSTHTLPLTVTSQQGVKVKFPPNIVNIHVK HPPEASVQIHQVSRIDGPTGQKTKEAQPGQSQVSYQGLPVQKTQTIH STYSHQQVIPHVYPVAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSKQEDCC GTVGTSWGFNKCQKCPKKPSYHGYNQMMECLPGYKRVNNTFCQDI NECQLQGVCPNGECLNTMGSYRCTCKIGFGPDPTFSSCVPDPPVISE EKGPCYRLVSSGRQCMHPLSVHLTKQLCCCSVGKAWGPHCEKCPL PGTAAFKEICPGGMGYTVSGVHRRRPIHHHVGKGPVFVKPKNTQPV AKSTHPPPLPAKEEPVEALTFSREHGPGVAEPEVATAPPEKEIPSLDQ EKTKLEPGQPQLSPGISTIHLHPQFPVVIEKTSPPVPVEVAPEASTSSA SQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAGHCINLPVRYTCICYEGYRFSEQQ RKCVDIDECTQVQHLCSQGRCENTEGSFLCICPAGFMASEEGTNCID VDECLRPDVCGEGHCVNTVGAFRCEYCDSGYRMTQRGRCEDIDECL NPSTCPDEQCVNSPGSYQCVPCTEGFRGWNGQCLDVDECLEPNVC ANGDCSNLEGSYMCSCHKGYTRTPDHKHCRDIDECQQGNLCVNGQ CKNTEGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECQHRHLCAHGQCRNT EGSFQCVCDQGYRASGLGDHCEDINECLEDKSVCQRGDCINTAGSY DCTCPDGFQLDDNKTCQDINECEHPGLCGPQGECLNTEGSFHCVCQ QGFSISADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCDNTAGSFRCLCYQGFQ APQDGQGCVDVNECELLSGVCGEAFCENVEGSFLCVCADENQEYSP MTGQCRSRTSTDLDVDVDQPKEEKKECYYNLNDASLCDNVLAPNVT KQECCCTSGVGWGDNCEIFPCPVLGTAEFTEMCPKGKGFVPAGESS SEAGGENYKDADECLLFGQEICKNGFCLNTRPGYECYCKQGTYYDP VKLQCFDMDECQDPSSCIDGQCVNTEGSYNCFCTHPMVLDASEKRC IRPAESNEQIEETDVYQDLCWEHLSDEYVCSRPLVGKQTTYTECCCL YGEAWGMQCALCPLKDSDDYAQLCNIPVTGRRQPYGRDALVDFSEQ YTPEADPYFIQDRFLNSFEELQAEECGILNGCENGRCVRVQEGYTCD CFDGYHLDTAKMTCVDVNECDELNNRMSLCKNAKCINTDGSYKCLCL PGYVPSDKPNYCTPLNTALNLEKDSDLE	39
LTBP3	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCRDSCQQGS NMTLIGENGHSTDTLTGSGFRVVVCPLPCMNGGQCSSRNQCLCPPD FTGRFCQVPAGGAGGGTGGSGPGLSRTGALSTGALPPLAPEGDSVA SKHAIYAVQVIADPPGPGEGPPAQHAAFLVPLGPGQISAEVQAPPPVV NVRVHHPPEASVQVHRIESSNAESAAPSQHLLPHPKPSHPRPPTQKP LGRCFQDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKCHKCPQ LQYTGVQKPGPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINECAMPGVCR HGDCLNNPGSYRCVCPPGHSLGPSRTQCIADKPEEKSLCFRLVSPEH QCQHPLTTRLTRQLCCCSVGKAWGARCQRCPTDGTAAFKEICPAGK GYHILTSHQTLTIQGESDFSLFLHPDGPPKPQQLPESPSQAPPPEDTE EERGVTTDSPVSEERSVQQSHPTATTTPARPYPELISRPSPPTMRWF LPDLPPSRSAVEIAPTQVTETDECRLNQNICGHGECVPGPPDYSCHC NPGYRSHPQHRYCVDVNECEAEPCGPGRGICMNTGGSYNCHCNRG YRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCGDGGFCINFPGHYKCNCYPGYR LKASRPPVCEDIDECRDPSSCPDGKCENKPGSFKCIACQPGYRSQG GGACRDVNECAEGSPCSPGWCENLPGSFRCTCAQGYAPAPDGRSC LDVDECEAGDVCDNGICSNTPGSFQCQCLSGYHLSRDRSHCEDIDE CDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPQGHRLVGGRKCQDIDECSQDPSL CLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFTPTQDQHGCEEVEQPHHKKECYL NFDDTVFCDSVLATNVTQQECCCSLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEF HSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDECMLFGSEICKEGKCVNTQ PGYECYCKQGFYYDGNLLECVDVDECLDESNCRNGVCENTRGGYR CACTPPAEYSPAQRQCLSPEEMDVDECQDPAACRPGRCVNLPGSY RCECRPPWVPGPSGRDCQLPESPAERAPERRDVCWSQRGEDGMC AGPLAGPALTFDDCCCRQGRGWGAQCRPCPPRGAGSHCPTSQSES NSFWDTSPLLLGKPPRDEDSSEEDSDECRCVSGRCVPRPGGAVCEC PGGFQLDASRARCVDIDECRELNQRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCK AGFARSRPHGACVPQRRR	40

【０５５１】

【表２０】

表14. 例示的なGARP及びLRRC33のアミノ酸配列

タンパク質	配列	配列番号
GARP	AQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTETLDLSGNQLRSILA SPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALTHLEHLSLAHNRLAMATALS AGGLGPLPRVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTR HTFRDMPALEQLDLHSNVLMDIEDGAFEGLPRLTHLNLSRNSLTCISDFS LQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALP RLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLS QLLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLM LLDLSHNALETLELGARALGSLRTLLLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLN LQGNRVSPCGGPDEPGPSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFLH TPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVLQVDLPCFIC LKRLNLAENRLSHLPAWTQAVSLEVLDLRNNSFSLLPGSAMGGLETSLR RLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICRFSSQEEVSLSH VRPEDCEKGGLKNINLIIILTFILVSAILLTTLAACCCVRRQKFNQQYKA	41

【０５５２】

【表２１】

sGARP	AQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTETLDLSGNQLRSILA SPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALTHLEHLSLAHNRLAMATALS AGGLGPLPRVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTR HTFRDMPALEQLDLHSNVLMDIEDGAFEGLPRLTHLNLSRNSLTCISDFS LQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALP RLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLS QLLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLM LLDLSHNALETLELGARALGSLRTLLLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLN LQGNRVSPCGGPDEPGPSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFLH TPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVLQVDLPCFIC LKRLNLAENRLSHLPAWTQAVSLEVLDLRNNSFSLLPGSAMGGLETSLR RLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICRFSSQEEVSLSH VRPEDCEKGGLKNIN	42
LRRC33(NRROSとしても知られる; Uniprot受入番号Q86YC3)	**MELLPLWLCLGFHFLTVG**WRNRSGTATAASQGVCKLVGGAADCRGQ SLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSCHLERI SRGAFQEQGHLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRLDLSGNAL TEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERLRELDLQRNYI FEIEGGAFDGLAELRHLNLAFNNLPCIVDFGLTRLRVLNVSYNVLEWFLA TGGEAAFELETLDLSHNQLLFFPLLPQYSKLRTLLLRDNNMGFYRDLYN TSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDLADLRFLDMSQNQF QYLPDGFLRKMPSLSHLNLHQNCLMTLHIREHEPPGALTELDLSHNQLS ELHLAPGLASCLGSLRLFNLSSNQLLGVPPGLFANARNITTLDMSHNQIS LCPLPAASDRVGPPSCVDFRNMASLRSLSLEGCGLGALPDCPFQGTSL TYLDLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMGLHSSFMALDFSGF GNLRDLDLSGNCLTTFPRFGGSLALETLDLRRNSLTALPQKAVSEQLSR GLRTIYLSQNPYDCCGVDGWGALQHGQTVADWAMVTCNLSSKIIRVTE LPGGVPRDCKWERLDLGLLYLVLILPSCLTLLVACTVIVLTFKKPLLQVIK SRCHWSSVY *天然のシグナルペプチドは太字で示される。	72
可溶性LRRC33 (sLRRC33)	**MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLG**WRNRSGTATAASQGVCKLVGGAAD CRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSC HLERISRGAFQEQGHLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRLDLS GNALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERLRELDLQ RNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLAFNNLPCIVDFGLTRLRVLNVSYNVLE WFLATGGEAAFELETLDLSHNQLLFFPLLPQYSKLRTLLLRDNNMGFYR DLYNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDLADLRFLDMSQ NQFQYLPDGFLRKMPSLSHLNLHQNCLMTLHIREHEPPGALTELDLSHN QLSELHLAPGLASCLGSLRLFNLSSNQLLGVPPGLFANARNITTLDMSH NQISLCPLPAASDRVGPPSCVDFRNMASLRSLSLEGCGLGALPDCPFQ GTSLTYLDLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMGLHSSFMALD FSGFGNLRDLDLSGNCLTTFPRFGGSLALETLDLRRNSLTALPQKAVSE QLSRGLRTIYLSQNPYDCCGVDGWGALQHGQTVADWAMVTCNLSSKII RVTELPGGVPRDCKWERLDLGLHHHHHH *改変されたヒトカッパ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が引かれる。	73
ヒトLRRC33-GARPキメラ	**MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLG**WRNRSGTATAASQGVCKLVGGAAD CRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSC HLERISRGAFQEQGHLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRLDLS GNALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERLRELDLQ RNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLAFNNLPCIVDFGLTRLRVLNVSYNVLE WFLATGGEAAFELETLDLSHNQLLFFPLLPQYSKLRTLLLRDNNMGFYR DLYNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDLADLRFLDMSQ NQFQYLPDGFLRKMPSLSHLNLHQNCLMTLHIREHEPPGALTELDLSHN QLSELHLAPGLASCLGSLRLFNLSSNQLLGVPPGLFANARNITTLDMSH NQISLCPLPAASDRVGPPSCVDFRNMASLRSLSLEGCGLGALPDCPFQ GTSLTYLDLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMGLHSSFMALD FSGFGNLRDLDLSGNCLTTFPRFGGSLALETLDLRRNSLTALPQKAVSE QLSRGLRTIYLSQNPYDCCGVDGWGALQHGQTVADWAMVTCNLSSKII RVTELPGGVPRDCKWERLDLGL*LIIILTFILVSAILLTTLAACCC*VRRQKFN QQYKA *改変されたヒトカッパ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が引かれる。 # 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の下線である。	74

【０５５３】

医薬組成物及び製剤

本開示は、ヒト及び非ヒト対象における投与に好適な医薬として使用される医薬組成物をさらに提供する。本開示によって包含される１つ以上の高親和性のコンテキストに依存しない抗体は、例えば、緩衝液を含む薬学的に許容される担体（賦形剤）と共に製剤化又は混合されて、医薬組成物を形成し得る。そのような製剤は、ＴＧＦβシグナル伝達を含む疾患又は障害の治療のために使用され得る。特定の実施形態では、そのような製剤は、癌免疫の適用のために使用され得る。

【０５５４】

本開示の医薬組成物は、ＴＧＦβ関連徴候（例えば、線維症、免疫不全、及び／又は癌）を軽減するために患者に投与され得る。「許容される」は、担体が組成物の活性成分と適合性であり（且つ好ましくは、活性成分を安定化することができる）、治療されることになる対象に有害ではないことを意味する。緩衝液を含む薬学的に許容される賦形剤（担体）の例は、当業者に明らかであり、以前に記載されているであろう。例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ２０ｔｈ Ｅｄ．（２０００）Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ａｎｄ Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｅｄ．Ｋ．Ｅ．Ｈｏｏｖｅｒを参照されたい。一例において、本明細書に記載される医薬組成物は、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する２つ以上の抗体を含有し、抗体は、複合体の異なるエピトープ／残基を認識する。

【０５５５】

本方法において使用されることになる医薬組成物は、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で薬学的に許容される担体、賦形剤又は安定剤を含み得る（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ２０ｔｈ Ｅｄ．（２０００）Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ａｎｄ Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｅｄ．Ｋ．Ｅ．Ｈｏｏｖｅｒ）。許容される担体、賦形剤又は安定剤は、使用される投与量及び濃度でレシピエントに対して毒性がなく、そしてそれらには、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（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、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；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；及びｍ－クレゾールなど）；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、又は免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；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、又はリシンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、又はデキストランを含む他の炭水化物；ＥＤＴＡなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、又はソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Ｚｎタンパク質錯体）；並びに／又はＴＷＥＥＮ（商標）、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（登録商標）又はポリエチレングリコール（ＰＥＧ）などの非イオン性界面活性剤が含まれ得る。薬学的に許容される賦形剤は、本明細書にさらに記載される。

【０５５６】

本開示は、本開示による抗体又はその断片及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物も含む。

【０５５７】

従って、そのような抗体の抗原結合断片を含む抗体又は分子は、ヒト投与に適した医薬組成物に製剤化され得る。

【０５５８】

医薬製剤は、１つ以上の賦形剤を含み得る。いくつかの実施形態では、賦形剤は、ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ａｃｃｅｓｓｄａｔａ．ｆｄａ．ｇｏｖ／ｓｃｒｉｐｔｓ／ｃｄｅｒ／ｉｉｇ／ｉｎｄｅｘ．Ｃｆｍ？ｅｖｅｎｔ＝ｂｒｏｗｓｅＢｙＬｅｔｔｅｒ．ｐａｇｅ＆Ｌｅｔｔｅｒ＝Ａにおいて提供されるリストから選択され得る。

【０５５９】

医薬組成物は、通常、約２０ｍｇ／ｍＬ～約２００ｍｇ／ｍＬになる活性生物製剤（例えば、モノクローナル抗体、抗原結合断片を含む操作された結合分子など）の最終濃度に製剤化される。例えば、製剤の最終濃度（ｗｔ／ｖｏｌ）は、約２０～２００、２０～１８０、２０～１６０、２０～１５０、２０～１２０、２０～１００、２０～８０、２０～７０、２０～６０、２０～５０、２０～４０、３０～２００、３０～１８０、３０～１６

０、３０～１５０、３０～１２０、３０～１００、３０～８０、３０～７０、３０～６０、３０～５０、３０～４０、４０～２００、４０～１８０、４０～１６０、４０～１５０、４０～１２０、４０～１００、４０～８０、４０～７０、４０～６０、４０～５０、５０～２００、５０～１８０、５０～１６０、５０～１５０、５０～１２０、５０～１００、５０～８０、５０～７０、５０～６０、６０～２００、６０～１８０、６０～１６０、６０～１５０、６０～１２０、６０～１００、６０～８０、６０～７０、７０～２００、７０～１８０、７０～１６０、７０～１５０、７０～１２０、７０～１００、７０～８０ｍｇ／ｍＬの範囲であり得る。いくつかの実施形態では、製剤中の生物製剤の最終濃度は、約１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０又は２００ｍｇ／ｍＬである。

【０５６０】

本開示の医薬組成物は、好ましくは、好適な緩衝液で製剤化される。好適な緩衝液としては、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、及びヒスチジン緩衝液が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５６１】

製剤の最終ｐＨは、通常、ｐＨ５．０～８．０である。例えば、医薬組成物のｐＨは、約５．０、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７．０、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７又は７．８であり得る。

【０５６２】

本開示の医薬組成物は、医薬製剤における使用のために承認された非イオン性洗剤などの界面活性剤を含み得る。そのような界面活性剤としては、例えば、ポリソルベート２０（Ｔｗｅｅｎ（商標）－２０）、ポリソルベート８０（Ｔｗｅｅｎ－８０）及びＮＰ－４０などのポリソルベートが挙げられる。

【０５６３】

本開示の医薬組成物は、安定剤を含み得る。液体－タンパク質調製に関して、安定性は、ｐＨ緩衝塩の選択によって増強される場合があり、多くの場合、アミノ酸も使用され得る。多くの場合、それは、タンパク質の吸着及びアンフォールディング後に凝集を引き起こす液／気界面又は液／固界面（詰め込みを伴う）での相互作用である。好適な安定剤としては、スクロース、マルトース、ソルビトール並びにヒスチジン、グリシン、メチオニン及びアルギニンなどの特定のアミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５６４】

本開示の医薬組成物は、以下の賦形剤の１つ又は任意の組み合わせを含有し得る：リン酸ナトリウム、アルギニン、スクロース、塩化ナトリウム、トロメタミン、マンニトール、ベンジルアルコール、ヒスチジン、スクロース、ポリソルベート８０、クエン酸ナトリウム、グリシン、ポリソルベート２０、トレハロース、ポロクサマー１８８、メチオニン、トレハロース、ヒアルロニダーゼ、コハク酸ナトリウム、リン酸カリウム、エデト酸二ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、マルトース、酢酸ヒスチジン、ソルビトール、ペンテト酸、ヒト血清アルブミン、ペンテト酸。

【０５６５】

いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、保存剤を含有し得る。

【０５６６】

本開示の医薬組成物は、通常、液体又は凍結乾燥形態として提供される。通常、製品は、バイアル（例えば、ガラスバイアル）中に提供され得る。シリンジ、ペン、又は自動注入装置において利用可能な製品は、これらの容器／閉鎖系中において事前に充填された液体として提供され得る。

【０５６７】

いくつかの例では、本明細書に記載される医薬組成物は、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１

複合体、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体を含有するリポソームを含み、これはＥｐｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：３６８８ （１９８５）；Ｈｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：４０３０（１９８０）；並びに米国特許第４，４８５，０４５号明細書及び同第４，５４４，５４５号明細書に記載されるものなどの任意の好適な方法によって調製され得る。循環時間が長くなったリポソームは、米国特許第５，０１３，５５６号明細書に開示されている。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、及び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て逆相蒸発法によって作製することができる。所望の直径を有するリポソームを得るために、リポソームを所定の孔径のフィルターを通して押し出す。

【０５６８】

いくつかの実施形態では、標的化特性を有するリポソームは、特定の組織又は細胞型に医薬組成物を優先的に送達するか又は局在化させるように選択される。例えば、骨髄標的化特性を有する特定のナノ粒子系担体、例えば、脂質系ナノ粒子又はリポソームが利用され得る。例えば、Ｓｏｕ（２０１２）“Ａｄｖａｎｃｅｄ ｄｒｕｇ ｃａｒｒｉｅｒｓ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｂｏｎｅ ｍａｒｒｏｗ”，ＲｅｓｅａｒｃｈＧａｔｅ ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ２３２７２５１０９を参照されたい。

【０５６９】

いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、アジュバントを含み得るか又はアジュバントと組み合わせて使用され得る。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、且つＴエフェクター機能、単球からのＤＣ分化、増強された抗原取り込み及び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。好適なアジュバントとしては、レチノイン酸系アジュバント及びその誘導体、ＭＦ５９及び他のスクアレン含有アジュバントなどの水中油エマルション系アジュバント、トール様受容体（ＴＲＬ）リガンド（例えば、ＣｐＧ）、α－トコフェロール（ビタミンＥ）及びその誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５７０】

本明細書に記載される抗体はまた、例えば、コアセルベーション手法によって又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル（それぞれ例えばヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン－マイクロカプセル及びポリ（メタクリル酸メチル）マイクロカプセル）に取り込まれ得るか、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル）に取り込まれ得るか、又はマクロエマルションに取り込まれ得る。例示的な手法は、以前に記載されており、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ，Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ２０ｔｈ Ｅｄ．Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ（２０００）を参照されたい。

【０５７１】

他の例において、本明細書に記載される医薬組成物は、徐放性の形式において製剤化され得る。徐放性製剤の好適な例としては、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは成形品、例えば、フィルム、又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としては、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）又はポリ（ビニルアルコール））、ポリ乳酸（米国特許第３，７７３，９１９号明細書）、Ｌ－グルタミン酸と７エチル－Ｌ－グルタメートとのコポリマー、非分解性エチレン－酢酸ビニルコポリマー、ＬＵＰＲＯＮ ＤＥＰＯＴ（商標）（乳酸－グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なマイクロスフェア）などの分解性乳酸－グリコール酸コポリマー、スクロース酢酸塩イソ酪酸塩並びにポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

【０５７２】

インビボでの投与に使用されることになる医薬組成物は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通して、例えば濾過することにより容易に達成される。治療抗体組成物は、一般に、例えば、静脈注射用溶液バッグ又は皮下注射針によって貫通可能な栓を有するバイアルである無菌のアクセスポートを有する容器に充填される。

【０５７３】

本明細書に記載される医薬組成物は、経口、非経口若しくは直腸投与、又は吸入若しくは吹送法による投与のための錠剤、丸剤、カプセル、粉末、顆粒、溶液若しくは懸濁液、又は坐剤などの単位剤形中に存在し得る。

【０５７４】

好適な界面活性剤としては、特に、ポリオキシエチレンソルビタン（例えば、Ｔｗｅｅｎ（商標）２０、４０、６０、８０又は８５）及び他のソルビタン（例えば、Ｓｐａｎ（商標）２０、４０、６０、８０又は８５）などの非イオン性薬剤が挙げられる。界面活性剤を伴う組成物は、０．０５～５％の界面活性剤を好都合に含むことになり、０．１～２．５％で存在し得る。必要に応じて、例えば、マンニトール又は他の薬学的に許容されるビヒクルなどの他の成分が加えられ得ることが理解されるであろう。

【０５７５】

好適なエマルションは、Ｉｎｔｒａｌｉｐｉｄ（商標）、Ｌｉｐｏｓｙｎ（商標）、Ｉｎｆｏｎｕｔｒｏｌ（商標）、Ｌｉｐｏｆｕｎｄｉｎ（商標）及びＬｉｐｉｐｈｙｓａｎ（商標）などの市販の脂肪乳剤を使用して調製され得る。活性成分は、事前に混合されたエマルション組成物中で溶解され得るか、又は代わりに、それは、油（例えば、ダイズ油、ベニバナ油、綿実油、ゴマ油、トウモロコシ油又はアーモンド油）及びリン脂質（例えば、卵リン脂質、ダイズリン脂質又はダイズレシチン）と水との混合時に形成されるエマルション中で溶解され得る。エマルションの浸透圧を調整するために、例えば、グリセロール又はグルコースなどの他の成分が加えられ得ることが理解されるであろう。好適なエマルションは、通常、最大２０％、例えば５～２０％で含有することになる。

【０５７６】

エマルション組成物は、Ｉｎｔｒａｌｉｐｉｄ（商標）又はその構成要素（ダイズ油、卵リン脂質、グリセロール及び水）と本開示の抗体を混合することによって調製されるものであり得る。

【０５７７】

ＴＧＦβ関連徴候を検出、モニター又は軽減する際の使用のためのキット

本開示は、ＴＧＦβ関連徴候と関連する疾患／障害を軽減する際の使用のためのキットも提供する。そのようなキットは、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体、例えば、本明細書に記載されるもののいずれかに特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分を含む１つ以上の容器を含み得る。

【０５７８】

いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載される方法のいずれかによる使用のための指示書を含み得る。含まれる指示書は、本明細書に記載されるもののような標的疾患を治療するか、その発症を遅らせるか、又は軽減するための、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分の投与の説明を含み得る。キットは、個体が標的疾患を有するかどうかの同定に基づいて治療に好適な個体を選択する説明をさらに含み得る。さらに他の実施形態では、指示書は、標的疾患のリスクのある個体に抗体又はその抗原結合部分を投与する説明を含む。

【０５７９】

ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分の使用に関する指示書は一般に、意図される治療のための投与量、投与スケジュール、及び投与経路に関する情報を含む。容器は、単位用量、バルクパッケージ（例

えば、複数用量パッケージ）又は副単位用量であり得る。本開示のキットにおいて提供される指示書は、通常、ラベル又は添付文書（例えば、キットに含まれる用紙）上に記載される指示書であるが、機械で読み取り可能な指示書（例えば、磁気又は光学記憶ディスク上の保有される指示書）も許容される。

【０５８０】

ラベル又は添付文書は、組成物が、ＴＧＦβ関連徴候と関連する疾患又は障害を治療し、その発症を遅らせ且つ／又は軽減するために使用されることを示す。指示書は、本明細書に記載される方法のいずれかを実践するために提供され得る。

【０５８１】

本開示のキットは、好適な包装の中にある。好適な包装としては、バイアル、ボトル、ジャー、柔軟な包装（例えば、密封されたマイラー又はプラスチックバッグ）などが挙げられるが、これらに限定されない。吸入器、鼻腔投与器具（例えば、アトマイザー）又はミニポンプなどの注入器具などの特定の器具と組み合わせて使用するための包装も考えられる。キットは、無菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射針によって貫通可能な栓を有する静注液バッグ又はバイアルであり得る）。容器は、無菌アクセスポートも有し得る（例えば、容器は、皮下注射針によって貫通可能な栓を有する静注液バッグ又はバイアルであり得る）。組成物中の少なくとも１つの活性薬剤は、本明細書に記載されるもののようなＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分である。

【０５８２】

キットは、任意選択で、緩衝液及び解説情報などの追加の構成要素を提供し得る。通常、キットは、容器及び容器上の又は容器に付随したラベル又は添付文書を含む。いくつかの実施形態では、本開示は、上記のキットの内容物を含む製造物品を提供する。

【０５８３】

ＴＧＦβ１の好ましいアイソフォーム特異的な阻害剤のスクリーニング、同定及び製造のプロセス

本開示は、スクリーニング／選択方法、生成方法並びに同等の親和性を有するＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体の各々に結合することができる抗体又はその断片並びにそれを含む医薬組成物及び関連するキットの製造プロセスを包含する。いくつかの実施形態では、スクリーニングのために、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体の少なくとも１つ並びにＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体の少なくとも１つが含まれる。スクリーニングプロセスにおいて同定される抗体又はその断片は、好ましくは、高親和性で目的のＬＬＣの各々に結合するその能力を確認するためにさらに試験される。

【０５８４】

多数の方法が、本開示の抗体又はその抗原結合断片を得るために使用され得る。例えば、抗体は、組換えＤＮＡ法を使用して生成され得る。モノクローナル抗体は、既知の方法に従うハイブリドーマの作製（例えば、Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ（１９７５）Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５－４９９）によっても生成され得る。次に、この様式で形成されるハイブリドーマを、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）及び表面プラズモン共鳴（例えば、ＯＣＴＥＴ（登録商標）又はＢＩＡＣＯＲＥ）分析などの標準的な方法を使用してスクリーニングして、指定の抗原に特異的に結合する抗体を産生する１つ以上のハイブリドーマを同定する。指定の抗原の任意の形態は、免疫原、例えば組換え抗原、天然に存在する形態、その任意のバリアント又は断片並びにその抗原性ペプチド（例えば、線状エピトープとしての本明細書に記載されるエピトープ又は立体構造エピトープとしての骨格内の本明細書に記載されるエピトープのいずれか）として使用され得る。抗体を作製する１つの例示的な方法は、抗体又はその断片（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、ファージ又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．，米国特許第５，２２３，４０９号明細書；Ｓｍｉｔｈ（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ２２８：１３１５－１３１７；Ｃｌａｃｋｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４－６２８；Ｍａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１－５９７；国際公開第９２／１８６１９号パンフレット；国際公開第９１／１７２７１号パンフレット；国際公開第９２／２０７９１号パンフレット；国際公開第９２／１５６７９号パンフレット；国際公開第９３／０１２８８号パンフレット；国際公開第９２／０１０４７号パンフレット；国際公開第９２／０９６９０号パンフレット；及び国際公開第９０／０２８０９号パンフレットに記載される。

【０５８５】

ディスプレイライブラリーの使用に加えて、指定の抗原（例えば、提示分子－ＴＧＦβ１複合体）は、非ヒト宿主、例えばウサギ、テンジクネズミ、ラット、マウス、ハムスター、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ラクダ科動物並びにサメなどの非哺乳動物宿主を免疫化するために使用され得る。一実施形態では、非ヒト動物は、マウスである。

【０５８６】

非ヒト宿主の免疫化は、ｐｒｏＴＧＦβ１などの免疫原としてそれに結合される提示分子（又はその断片）を伴うか又は伴わない精製された組換えタンパク質複合体の使用により実行され得る。これらとしては、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１が挙げられるが、これらに限定されない。結合される提示分子は、全長の対応物である必要はないが、好ましくは、ｐｒｏＴＧＦβ１二量体複合体と共有結合を形成する２つのシステイン残基を含む。

【０５８７】

代わりに、非ヒト宿主の免疫化は、細胞系の抗原の使用により実行され得る。細胞系の抗原という用語は、ｐｒｏＴＧＦβ１タンパク質複合体を発現する細胞（例えば、異種細胞）を指す。これは、提示分子の共発現を任意選択で伴うｐｒｏＴＧＦβ１の過剰発現によって達成され得る。いくつかの実施形態では、内在性の対応物は、細胞系の抗原として利用され得る。ｐｒｏＴＧＦβ１含有タンパク質複合体を形成するタンパク質の細胞表面発現は、ＦＡＣＳなどの既知の方法によって確認され得る。そのような細胞（細胞系の抗原）による宿主の免疫化時、抗原に対する免疫応答は、宿主において誘発され、抗体産生及びその後のスクリーニングを可能にする。いくつかの実施形態では、好適なノックアウト動物は、抗原に対するより強力な免疫応答を促進するために使用される。代わりに、異なる種間の構造的相違は、宿主において抗体産生を誘発するのに十分であり得る。

【０５８８】

別の実施形態では、モノクローナル抗体は、非ヒト動物から得られ、続いて改変され、例えば、好適な組換えＤＮＡ手法を使用するキメラである。キメラ抗体を作製するための様々な手法が記載されている。例えば、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８１：６８５１，１９８５；Ｔａｋｅｄａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３１４：４５２，１９８５、Ｃａｂｉｌｌｙ　ｅｔ　ａｌ．，米国特許第４，８１６，５６７号明細書；Ｂｏｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，米国特許第４，８１６，３９７号明細書；Ｔａｎａｇｕｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，欧州特許出願公開第１７１４９６号明細書；欧州特許出願公開第０１７３４９４号明細書、英国特許第２１７７０９６Ｂ号明細書を参照されたい。

【０５８９】

追加の抗体生成技術に関しては、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，ｅｄｓ．Ｈａｒｌｏｗ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１９８８を参照されたい。本開示は、必ずしも任意の特定の供給源、生成の方法又は抗体の他の特別な特徴に限定されない。

【０５９０】

本開示のいくつかの態様は、ポリヌクレオチド又はベクターで形質転換される宿主細胞

に関する。宿主細胞は、原核細胞又は真核細胞であり得る。宿主細胞中に存在するポリヌクレオチド又はベクターは、宿主細胞のゲノムに組み込まれ得るか又はそれは、染色体外で維持され得る。宿主細胞は、細菌、昆虫、真菌、植物、動物又はヒト細胞などの任意の原核細胞又は真核細胞であり得る。いくつかの実施形態では、真核細胞は、例えば、サッカロマイセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）のもの、特にＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）種のものである。「原核」という用語は、抗体又は対応する免疫グロブリン鎖の発現のためにＤＮＡ又はＲＮＡ分子で形質転換され得るか又はトランスフェクトされ得る全ての細菌を含む。原核宿主は、例えば、Ｅ．コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）、Ｓ．チフィリウム（Ｓ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）、セラチア・マルセセンス（Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｃｅｎｓ）及びバチルス・サブチリス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）などのグラム陰性並びにグラム陽性細菌を含み得る。「真核」という用語は、酵母、高等植物、昆虫及び脊椎動物細胞、例えばＮＳＯ及びＣＨＯ細胞などの哺乳動物細胞を含む。組換え生成手順において利用される宿主に応じて、ポリヌクレオチドによってコードされる抗体又は免疫グロブリン鎖は、グリコシル化されても又はされなくてもよい。抗体又は対応する免疫グロブリン鎖は、開始メチオニンアミノ酸残基も含み得る。

【０５９１】

いくつかの実施形態では、ベクターが適切な宿主に組み込まれると、宿主は、ヌクレオチド配列の高レベルの発現に好適な条件下で維持され得、必要に応じて免疫グロブリン軽鎖、重鎖、軽／重鎖二量体又はインタクトな抗体、抗原結合断片又は他の免疫グロブリン形態の回収及び精製が続き得る；Ｂｅｙｃｈｏｋ，Ｃｅｌｌｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．，（１９７９）を参照されたい。従って、ポリヌクレオチド又はベクターは、続いて、抗体又は抗原結合断片を生成する細胞に導入される。抗体又は抗体断片の大規模な生成（例えば、約２５０Ｌ以上、例えば、１０００Ｌ、２０００Ｌ、３０００Ｌ、４０００Ｌ以上）は、抗体を含む医薬組成物の商業規模の製造に好適であり、典型的には、懸濁細胞培養物などの培養系において実行される。そのような培養物は、真核細胞培養物であり得、任意選択で、真核細胞培養物は、哺乳動物細胞培養物、植物細胞培養物又は昆虫細胞培養物である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞培養物は、ＣＨＯ細胞、ＭＤＣＫ細胞、ＮＳ０細胞、Ｓｐ２／０細胞、ＢＨＫ細胞、マウスＣ１２７細胞、Ｖｅｒｏ細胞、ＨＥＫ２９３細胞、ＨＴ－１０８０細胞又はＰＥＲ．Ｃ６細胞を含む。

【０５９２】

形質転換された宿主細胞は、発酵槽において増殖され得、最適な細胞増殖を達成するための任意の好適な手法を使用して培養され得る。発現されてから、完全抗体、それらの二量体、個々の軽鎖及び重鎖、他の免疫グロブリン形態又は抗原結合断片は、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む当技術分野の標準的な手段に従って精製され得る；Ｓｃｏｐｅｓ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ，Ｎ．Ｙ．（１９８２）を参照されたい。次に、抗体又は抗原結合断片は、増殖培地、細胞ライセート、又は細胞膜画分から単離され得る。例えば、微生物で発現された抗体又は抗原結合断片の単離及び精製は、例えば、分取クロマトグラフィー分離及び例えば、抗体の定常領域に対して向けられるモノクローナル又はポリクローナル抗体の使用を含むものなどの免疫学的分離などの任意の従来の手段によるものであり得る。

【０５９３】

本開示の態様は、ハイブリドーマに関し、これはモノクローナル抗体の無期限に延ばされた供給源を提供する。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に、不死化ハイブリドーマ細胞が、その後の発現及び／又は遺伝子操作のための再構成された重鎖及び軽鎖部位の供給源として使用され得る。再構成された抗体遺伝子は、ｃＤＮＡを生成するために適切なｍＲＮＡから逆転写され得る。いくつかの実施形態では、重鎖定常領域は、異なるアイソタイプのものと交換され得るか又は全体的に除去され得る。可変領域は、一本鎖Ｆｖ領域をコードするように連結され得る。複数のＦｖ領域は、２つ

以上の標的に対する結合能を与えるように連結され得るか又はキメラ重鎖及び軽鎖の組み合わせが利用され得る。任意の適切な方法が、抗体可変領域のクローニング及び組換え抗体の作製のために使用され得る。

【０５９４】

いくつかの実施形態では、重鎖及び／又は軽鎖の可変領域をコードする適切な核酸が得られ、標準的な組換え宿主細胞にトランスフェクトされ得る発現ベクターに挿入される。様々なそのような宿主細胞が使用され得る。いくつかの実施形態では、哺乳動物宿主細胞は、効率的なプロセシング及び生成に有利であり得る。この目的に有用な典型的な哺乳動物細胞株としては、ＣＨＯ細胞、２９３細胞又はＮＳＯ細胞が挙げられる。抗体又は抗原結合断片の生成は、宿主細胞の増殖及びコード配列の発現に適した培養条件下で改変された組換え宿主を培養することによって行われ得る。抗体又は抗原結合断片は、培養物からそれを単離することによって回収され得る。発現系は、得られる抗体が培地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；細胞内生成も可能である。

【０５９５】

本開示は、本明細書に記載される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も含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドによってコードされる可変領域は、上記のハイブリドーマのいずれか１つによって生成される抗体の可変領域のV_H及び／又はV_Lの少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む。

【０５９６】

抗体又は抗原結合断片をコードするポリヌクレオチドは、例えば、ＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＲＮＡ又は合成的に生成されたＤＮＡ若しくはＲＮＡ又は単独で若しくは組み合わせてそれらのポリヌクレオチドのいずれかを含む組換えにより生成されたキメラ核酸分子であり得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ベクターの部分である。そのようなベクターは、好適な宿主細胞において好適な条件下でベクターの選択を可能にするマーカ遺伝子などの遺伝子をさらに含み得る。

【０５９７】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、原核又は真核細胞において発現を可能にする発現制御配列に作動可能に連結される。ポリヌクレオチドの発現は、ポリヌクレオチドの翻訳可能なｍＲＮＡへの転写を含む。真核細胞、好ましくは哺乳動物細胞において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、転写の開始を促進する調節配列並びに任意選択で転写の終結及び転写物の安定化を促進するポリ－Ａシグナルを含み得る。追加の調節エレメントは、転写及び翻訳エンハンサー並びに／又は天然に結合される領域若しくは異種プロモーター領域を含み得る。原核宿主細胞における発現を可能にする適切な調節エレメントとしては、例えば、Ｅ．コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）におけるＰＬ、Ｌａｃ、Ｔｒｐ又はＴａｃプロモーターが挙げられ、真核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若しくはＧＡＬ１プロモーター又は哺乳動物及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－エンハンサー若しくはグロビンイントロンである。

【０５９８】

転写の開始に関与するエレメントに加えて、そのような調節エレメントは、転写終結シグナル、例えばポリヌクレオチドの下流のＳＶ４０－ポリ－Ａ部位又はｔｋ－ポリ－Ａ部位も含み得る。さらに、利用される発現系に応じて、ポリペプチドを細胞内区画に方向付けることができるか又はそれを培地に分泌させることができるリーダー配列が、ポリヌクレオチドのコード配列に加えられ得、以前に記載されている。リーダー配列は、翻訳、開始及び終結配列並びに好ましくは翻訳されたタンパク質又はその部分の分泌を例えば細胞外培地に方向付けることができるリーダー配列と共に適切な時期に集合される。任意選択で、所望の特徴、例えば安定化又は発現される組換え産物の単純化された精製をもたらすＣ末端又はＮ末端識別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使用され得る。

【０５９９】
いくつかの実施形態では、軽鎖及び／又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又は一方のみの可変ドメインをコードし得る。同様に、ポリヌクレオチドは、同じプロモーターの制御下であり得、発現のために別々に制御され得る。さらに、いくつかの態様は、抗体又は抗原結合断片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含む；任意選択で抗体の他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た遺伝子操作において慣習的に使用されるベクター、特にプラスミド、コスミド、ウイルス及びバクテリオファージに関する。

【０６００】
いくつかの実施形態では、発現制御配列は、真核宿主細胞を形質転換するか又はトランスフェクトできるベクターにおける真核プロモーター系として提供されるが、原核宿主のための制御配列も使用され得る。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、又はウシパピローマウイルスなどのウイルスに由来する発現ベクターは、標的化される細胞集団にポリヌクレオチド又はベクターの送達のために使用され得る（例えば、抗体又は抗原結合断片を発現する細胞を操作するため）。様々な適切な方法を使用して、組換えウイルスベクターを構築することができる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド及びベクターは、標的細胞への送達のためにリポソーム中に再構成され得る。ポリヌクレオチド（例えば、免疫グロブリン鎖の重及び／又は軽可変ドメインをコードする配列及び発現制御配列）を含有するベクターは、細胞宿主の型に応じて変化する好適な方法によって宿主細胞に導入され得る。

【０６０１】
スクリーニング方法は、抗体又はその断片の所望の活性を評価するか又は確認する工程を含み得る。いくつかの実施形態では、その工程は、標的機能を阻害する、例えば、潜在型複合体から成熟／可溶性増殖因子（例えば、ＴＧＦβ１）の放出の阻害の能力に関して選択することを含む。特定の実施形態では、そのような工程は、細胞ベースの効力アッセイを含み、その中で、１つ又は複数の試験抗体の阻害活性は、ｐｒｏＴＧＦβ複合体が細胞表面上で発現されるとき、活性化時に培地（例えば、アッセイ溶液）に放出される増殖因子のレベルを測定することによってアッセイされる。培地／溶液中に放出される増殖因子のレベルは、例えば、ＴＧＦβ活性を測定することによってアッセイされ得る。有用な細胞ベースの効力アッセイの非限定的な例は、本明細書の実施例２において記載される。

【０６０２】
いくつかの実施形態では、望ましい抗体又は断片をスクリーニングする工程は、インターナリゼーション及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又はその断片に関して選択することを含む。いくつかの実施形態では、工程は、ＡＤＣＣを誘導する抗体又はその断片に関して選択することを含む。いくつかの実施形態では、工程は、インビボの所望の部位（例えば、細胞型、組織又は器官）に蓄積する抗体又はその断片に関して選択することを含む。いくつかの実施形態では、工程は、血液脳関門を通過する能力を有する抗体又はその断片に関して選択することを含む。方法は、任意選択で、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感受性及び開発可能性（例えば、高い可溶性、低い自己会合など）などの判定基準によって決定されるとおり、望ましいプロファイルを有するバリアント対応物をもたらすように１つ以上の抗体又はその断片を最適化する工程を含み得る。

【０６０３】
本開示による抗体又は断片を含む組成物を作製するためのプロセスは、望ましい結合及び機能性（例えば、阻害性）特性を有すると同定される１つ又は複数の抗体の最適化を含み得る。最適化は、抗体又はその断片の親和性成熟を含み得る。さらなる最適化工程は、治療用組成物に有利な物理化学的特性をもたらすために実行され得る。そのような工程は、可溶性の改善、自己凝集の欠如、安定性、ｐＨ感受性、Ｆｃ機能などをもたらす変異誘発又は操作を含み得るが、これらに限定されない。得られる最適化された抗体は、好まし

くは、ヒト投与に好適な完全ヒト抗体又はヒト化抗体である。

【０６０４】

そのような抗体又はその断片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、包装などの工程を含み得る。滅菌濾過などの特定の工程は、例えば、ＦＤＡなどの関連する規制当局によって記載されるガイドラインに従って実施される。そのような組成物は、プレフィルドシリンジなどの単回使用容器、又はバイアルなどの複数投与量容器の形態で利用可能に作製され得る。

【０６０５】

修飾

本開示の抗体又はその抗原結合部分は、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体の検出及び単離のための酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、陽電子放出金属、非放射性常磁性金属イオン、及びアフィニティーラベルを含むがこれらに限定されない検出可能な標識又は検出可能な部分で修飾され得る。検出可能な物質又は部分は、本開示のポリペプチドに直接的に又は好適な手法を使用して、中間部（例えば、リンカー（例えば、切断可能なリンカー）など）を介して間接的に結合され得るか又はコンジュゲートされ得る。好適な酵素の非限定的な例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；好適な補欠分子族複合体の非限定的な例としては、ストレプトアビジン／ビオチン及びアビジン／ビオチンが挙げられ：好適な蛍光材料の非限定的な例としては、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、又はフィコエリトリンが挙げられ；発光材料の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光材料の非限定的な例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが挙げられ；且つ好適な放射性材料の例としては、放射性金属イオン、例えば、アルファ－放射体又は例えばヨウ素（１３１Ｉ、１２５Ｉ、１２３Ｉ、１２１Ｉ）、炭素（１４Ｃ）、硫黄（３５Ｓ）、トリチウム（３Ｈ）、インジウム（１１５ｍＩｎ、１１３ｍＩｎ、１１２Ｉｎ、１１１Ｉｎ）及びテクネチウム（９９Ｔｃ、９９ｍＴｃ）、タリウム（２０１Ｔｉ）、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（１７７Ｌｕ）、１５９Ｇｄ、１４９Ｐｍ、１４０Ｌａ、１７５Ｙｂ、１６６Ｈｏ、９０Ｙ、４７Ｓｃ、８６Ｒ、１８８Ｒｅ、１４２Ｐｒ、１０５Ｒｈ、９７Ｒｕ、６８Ｇｅ、５７Ｃｏ、６５Ｚｎ、８５Ｓｒ、３２Ｐ、１５３Ｇｄ、１６９Ｙｂ、５１Ｃｒ、５４Ｍｎ、７５Ｓｅ、ジルコニウム（^{89}Ｚｒ）及びスズ（１１３Ｓｎ、１１７Ｓｎ）などの他の放射性同位体が挙げられる。いくつかの実施形態では、放射性標識は、^{11}Ｃ、^{13}Ｎ、^{15}Ｏ、^{68}Ｇａ、^{177}Ｌｕ、^{18}Ｆ及び^{89}Ｚｒからなる群から選択され得る。いくつかの実施形態では、有用な標識は、陽電子放出断層撮影によって検出され得る陽電子放出同位体である。検出可能な物質は、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する本開示の抗体に直接的に、又は好適な手法を使用して、中間部（例えば、リンカーなど）を介して間接的に結合され得るか又はコンジュゲートされ得る。検出可能な物質にコンジュゲートされる本明細書で提供される抗体のいずれかは、本明細書に記載されるものなどの任意の好適な診断アッセイのために使用され得る。

【０６０６】

加えて、本開示の抗体又はその抗原結合部分も薬物で修飾され得る。薬物は、本開示のポリペプチドに直接的に、又は好適な手法を使用して、中間部（例えば、リンカー（例えば、切断可能なリンカー）など）を介して間接的に結合され得るか又はコンジュゲートされ得る。

【０６０７】

標的化薬剤

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体から成熟ＴＧＦβ放出を調節するために対象の特定の部位に、本明細書で開示されるとおりの抗体又はその抗原結合部分を標的化する１つ以上の標的化薬剤の使用を含む。例えば、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体は、通常、細胞外マトリックスに局在化される。従って、いくつかの実施形態では、本明細書で開示される抗体は、抗体を、ＬＴＢＰ結合ＴＧＦβ１複合体が存在する部位に局在化させるために細胞外マトリックス標的化薬剤にコンジュゲートされ得る。そのような実施形態では、抗体の選択的な標的化は、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体の選択的な調節をもたらす。いくつかの実施形態では、細胞外マトリックス標的化薬剤としては、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などが挙げられる。

【０６０８】

同様に、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体は、通常、細胞の表面に局在化され、繋留される。前者は、活性化されたＦＯＸＰ３＋制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）上に発現される一方、後者は、特定の骨髄細胞及びＡＭＬなどのいくつかの癌細胞上で発現される。従って、いくつかの実施形態では、本明細書で開示される抗体は、抗体を、これらの細胞結合ｐｒｏＴＧＦβ１複合体が存在する部位に局在化させるために免疫細胞（例えば、Ｔｒｅｇ細胞、活性化マクロファージなど）結合剤にコンジュゲートされ得る。そのような実施形態では、抗体の選択的標的化は、細胞結合ｐｒｏＴＧＦβ１複合体の選択的阻害（例えば、癌の治療における、例えば、免疫調節のための成熟ＴＧＦβ１の放出の選択的阻害）をもたらす。そのような実施形態では、免疫細胞標的化薬剤は、例えば、ＣＣＬ２２及びＣＸＣＬ１２タンパク質又はその断片を含み得る。

【０６０９】

いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に選択的に結合する第１の部分及び標的部位の構成要素、例えば、ＥＣＭ（例えば、フィブリリン）の構成要素又はＴｒｅｇ細胞（例えば、ＣＴＬＡ－４）の構成要素に選択的に結合する第２の部分を有して使用され得る。

【０６１０】

本明細書でさらに詳述されるとおり、本開示は、本明細書に記載されるものなどのアイソフォーム選択的なＴＧＦβ１阻害剤が、骨髄において造血を促進するか又は回復させるために使用され得ることを意図する。従って、いくつかの実施形態では、そのような阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１の高親和性のアイソフォーム選択的な阻害剤）を含む組成物は、骨髄に標的化され得る。骨髄標的化を達成する１つの様式は、骨髄局在化又は蓄積を優先的に標的化する特定の担体の使用である。例えば、骨髄標的化特性を有する特定のナノ粒子系担体、例えば、脂質系ナノ粒子又はリポソームが利用され得る。例えば、Ｓｏｕ（２０１２）“Ａｄｖａｎｃｅｄ ｄｒｕｇ ｃａｒｒｉｅｒｓ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｂｏｎｅ ｍａｒｒｏｗ”，ＲｅｓｅａｒｃｈＧａｔｅ ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ２３２７２５１０９を参照されたい。

【０６１１】

いくつかの実施形態では、標的化薬剤は、スクアレン及び／又はα－トコフェロールを含むアジュバント並びにＴＬＲリガンド／アゴニスト（ＴＬＲ３リガンド／アゴニストなど）を含むアジュバントなどの免疫増強剤を含む。例えば、スクアレン含有アジュバントは、単球、マクロファージ及び抗原提示細胞などの特定の免疫細胞を優先的に標的化して、プライミング、宿主免疫をブーストする抗原プロセシング及び／又は免疫細胞分化を増強し得る。いくつかの実施形態では、そのようなアジュバントは、Ｔ細胞活性化のためのネオ－エピトープに対する宿主免疫応答を刺激し得る。

【０６１２】

治療標的及びインビボでの作用機序
従って、本明細書で開示されるＴＧＦβ阻害剤（例えば、高親和性のアイソフォーム選択的なＴＧＦβ１阻害剤）は、インビトロ、エクスビボ及び／又はインビボ系などの任意の好適な生物システムにおいてＴＧＦβ１を阻害するために使用され得る。関連する方法は、生物システムをＴＧＦβ１阻害剤と接触させることを含み得る。生物システムは、アッセイ系、生体サンプル、細胞培養物などであり得る。いくつかの場合において、これらの方法は、生物システムにおける遊離増殖因子のレベルを改変することを含む。
【０６１３】
従って、そのような医薬組成物及び製剤は、インビボで阻害剤によって到達可能なＴＧＦβ含有潜在型複合体を標的化するために使用され得る。従って、本開示の抗体は、疾患部位（例えば、ＴＭＥ）において以下の複合体を標的化することを目的とし、それは、予防的に潜在型複合体に結合することにより、増殖因子の放出を妨げる：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；及びｉｖ）ＬＴＢＰ３によって提示されるｐｒｏＴＧＦβ１。通常、上の複合体（ｉ）及び（ｉｉ）は、ＧＡＲＰ及びＬＲＲＣ３３の両方がＬＲＲＣ３３を発現する細胞の細胞外面上の潜在型ｐｒｏＴＧＦβ１を繋留するか又は繋ぎ止めることができる膜貫通タンパク質であるため細胞表面上に存在する一方、複合体（ｉｉｉ）及び（ｉｖ）は、細胞外マトリックスの構成要素である。このように、本明細書で具体化される阻害剤は、阻害効果を発揮するために内在性の高親和性受容体との結合を完了させる必要がない。さらに、リガンド／受容体の相互作用の上流の標的化は、潜在型複合体から放出された後にのみ一過性の可溶性増殖因子を標的化する従来の阻害剤よりも、標的到達性の期間が長くなり、関連組織にさらに局在化するため、より持続的な効果を可能にし得る。従って、特定の微小環境に繋ぎ止められた潜在型複合体を標的化することは、潜在型複合体から放出されてから可溶性（遊離）増殖因子としてのその短い半減期、例えば、約２分間内在性受容体との結合と競合することになっている従来の中和抗体と比較して、インビボで標的結合の改善を促進し得る。
【０６１４】
いくつかの研究が、ＴＧＦβ１活性化の機構を解明した。３種のインテグリンであるαＶβ１、αＶβ６、αＶβ８及びαＶβ１は、潜在型ＴＧＦβ１の重要な活性化因子であることが実証されている（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；Ｓｈｅｐｐａｒｄ．Ｃａｎｃｅｒ Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ Ｒｅｖ，２００５．２４（３）：３９５－４０２）。αＶインテグリンは、高い親和性でＴＧＦβ１及びＴＧＦβ１ ＬＡＰに存在するＲＧＤ配列に結合する（Ｄｏｎｇ，Ｘ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｓｔｒｕｃｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ，２０１４．２１（１２）：ｐ．１０９１－６）。インテグリン結合を妨げるが分泌を妨げないＴＧＦβ１ ＲＧＤ部位における変異を有するトランスジェニックマウスは、ＴＧＦβ１－／－マウスの表現型を模写する（Ｙａｎｇ，Ｚ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ，２００７．１７６（６）：ｐ．７８７－９３）。β６及びβ８インテグリンの両方を欠損しているマウスは、多臓器炎症及び口蓋裂を含むＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３ノックアウトマウスの全ての必須表現型を再現し、発生及び恒常性におけるＴＧＦβ１活性化に対するこれら２種のインテグリンの重要な役割を確認した（Ａｌｕｗｉｈａｒｅ，Ｐ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｅｌｌ Ｓｃｉ，２００９．１２２（Ｐｔ ２）：ｐ．２２７－３２）。潜在型ＴＧＦβ１のインテグリン依存的な活性化の要諦は、提示分子の共有結合性の拘束であり；変異誘発によるＧＡＲＰとＴＧＦβ１ ＬＡＰとの間のジスルフィド結合の破壊は、複合体形成を障害しないが、αＶβ６によるＴＧＦβ１活性化を完全に消失させる（Ｗａｎｇ，Ｒ．，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ Ｃｅｌｌ，２０１２．２３（６）：ｐ．１１２９－３９）。潜在型ＴＧＦβ１の最近の構造研究は、インテグリンが活性型ＴＧＦβ１の潜在型複合体から

の放出をどのように可能にするかを明らかにしている：潜在型ＴＧＦβ１のその提示分子への共有結合は、ＬＴＢＰを介してＥＣＭに、又はＧＡＲＰ若しくはＬＲＲＣ３３を介して細胞骨格に潜在型ＴＧＦβ１を繋留する。ＲＧＤ配列に結合するインテグリンは、ＬＡＰの構造において力に依存的な変化をもたらし、活性型ＴＧＦβ１の放出及び近くの受容体への結合を可能にする（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的なＴＧＦβ１活性化の重要性もよく検証されている。αＶβ１の小分子阻害剤は、ブレオマイシン誘導性肺線維症及び四塩化炭素誘導性肝線維症から保護し（Ｒｅｅｄ，Ｎ．Ｉ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉ　Ｔｒａｎｓｌ　Ｍｅｄ，２０１５．７（２８８）：ｐ．２８８ｒａ７９）、抗体によるαＶβ６遮断又はインテグリンβ６発現の消失は、ブレオマイシン誘導性肺線維症及び放射線誘導性線維症を抑制する（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）。

【０６１５】

インテグリンに加えて、トロンボスポンジン－１並びにプラスミン、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ、例えば、ＭＭＰ２、ＭＭＰ９及びＭＭＰ１２）、カテプシンＤ、カリクレイン、トロンビン及びジンクプロテアーゼのＡＤＡＭファミリー（例えば、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２及びＡＤＡＭ１７）などのプロテアーゼによる活性化を含む、ＴＧＦβ１活性化の他の機構が関係付けられている。トロンボスポンジン－１のノックアウトは、いくつかの組織においてＴＧＦβ１－／－表現型のいくつかの態様を再現するが、ＴＧＦβ依存的であることが知られるブレオマイシン誘導性肺線維症において保護的ではない（Ｅｚｚｉｅ，Ｍ．Ｅ．，ｅｔ　ａｌ．，Ａｍ Ｊ Ｒｅｓｐｉｒ Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ，２０１１．４４（４）：ｐ．５５６－６１）。さらに、候補プロテアーゼのノックアウトは、ＴＧＦβ１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）。これは、冗長性又はこれらの機構が発生及び恒常性ではなく特定の疾患において重要であることによって説明できるであろう。

【０６１６】

従って、本明細書に記載されるＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１の高親和性のアイソフォーム特異的な阻害剤）は、ＴＧＦβ１活性化の段階を妨げることによって作用する阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、そのような阻害剤は、ＴＧＦβ１のインテグリン依存的な（例えば、力学的又は力により駆動される）活性化を阻害することができる。いくつかの実施形態では、そのような阻害剤は、ＴＧＦβ１のプロテアーゼ依存的な又はプロテアーゼ誘導性の活性化を阻害することができる。後者は、インテグリン非依存的な様式でＴＧＦβ１活性化段階を阻害する阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、そのような阻害剤は、活性化の様式にかかわらずＴＧＦβ１活性化を阻害することができる、例えば、ＴＧＦβ１のインテグリン依存的な活性化及びプロテアーゼ依存的な活性化の両方を阻害することができる。ＴＧＦβ１を活性化し得るプロテアーゼの非限定的な例としては、カリクレイン、ケモトリプシン（Ｃｈｅｍｏｔｒｙｐｓｉｎ）、トリプシン、エラスターゼ、プラスミン、トロンビン並びにＭＭＰ－２、ＭＭＰ－９及びＭＭＰ－１３などのジンクメタロプロテアーゼ（ＭＭＰファミリー）などのセリンプロテアーゼが挙げられる。カリクレインとしては、ＫＬＫ１、ＫＬＫ２、ＫＬＫ３、ＫＬＫ４、ＫＬＫ５、ＫＬＫ６、ＫＬＫ７、ＫＬＫ８、ＫＬＫ９、ＫＬＫ１０、ＫＬＫ１１、ＫＬＫ１２、ＫＬＫ１３、ＫＬＫ１４及びＫＬＫ１５などの血漿－カリクレイン及び組織カリクレインが挙げられる。本明細書で提示されるデータは、インビトロでのＴＧＦβ１のカリクレイン依存的な活性化を阻害することができるアイソフォーム特異的なＴＧＦβ１阻害剤の例を実証している。いくつかの実施形態では、本開示の阻害剤は、潜在型複合体からの活性型（成熟）ＴＧＦβ１増殖因子の放出又は解離を妨げる。いくつかの実施形態では、そのような阻害

剤は、複合体の不活性型（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。データは、高親和性のコンテキストに依存しないＴＧＦβ１阻害剤（例えば、Ａｂ６）もプラスミン依存的なＴＧＦβ１活性化を阻害することができることをさらに実証している。しかしながら、驚くべきことに、コンテキストに偏ったＴＧＦβ１阻害剤（Ａｂ３）は、このプロセスを阻害する効果が低かった。Ａｂ３及びＡｂ６の両方が、マトリックス結合ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に対して同様の親和性を有する。しかしながら、Ａｂ３は、細胞結合ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に対して著しく弱い結合親和性を有する。２つのカテゴリー間の相対的な差は、２０倍を超える（「偏り」）である。比較して、Ａｂ６は、抗原複合体の両方のカテゴリーに対して同等の高親和性を示す。観察される機能的な差がＡｂ３の偏りの特徴から生じ得ることが１つの可能な説明である。エピトープ又は結合領域における差によって媒介されることも別の可能な説明である。

【０６１７】

本開示は、ＴＧＦβ機能の単一のコンテキストに限定されないＴＧＦβシグナル伝達の複数の生物学的役割と関連する特定の疾患のための治療上の使用に特に有用である。そのような状況において、複数のコンテキストにわたるＴＧＦβ１効果を阻害することが有益であり得る。従って、本開示は、コンテキストに特異的な様式ではなくアイソフォーム特異的な様式でＴＧＦβ１を標的化し、阻害するための方法を提供する。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に依存しない」ＴＧＦβ１修飾因子とも称され得る。

【０６１８】

多数の証拠は、多くの疾患がＴＧＦβシグナル伝達の複雑な撹乱を示しており、いわゆる提示分子との相互作用によって媒介されるＴＧＦβ機能の異なる効果を与える異種細胞型の関与を含む可能性があるという考えを支持している。少なくとも４種のそのような提示分子が同定されており、局所的な刺激に応答してその活性化を可能にする様々な細胞外微小環境においてＴＧＦβを「提示」することができる。あるカテゴリーにおいて、ＴＧＦβは、ＥＣＭ結合ＴＧＦβ活性を媒介するＬＴＢＰ１及びＬＴＢＰ３などのＥＣＭ結合提示分子に関連してＥＣＭに蓄積される。別のカテゴリーにおいて、ＴＧＦβは、特定の免疫機能を媒介するＧＡＲＰ及びＬＲＲ３３などの提示分子を介して免疫細胞の表面に繋ぎ止められる。これらの提示分子は、異なる組織及び細胞型において異なる発現、局在化及び／又は機能を示し、誘発している事象及びＴＧＦβ活性化の結果は、微小環境に依存して変動することになることを示している。多くのＴＧＦβ効果が相互作用し、疾患進行に寄与し得るという考えに基づいて、ＴＧＦβ機能の複数の面を弱めることができる治療剤は、より大きい有効性を提供し得る。

【０６１９】

標的としてのＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１

制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）は、ＣＤ４陽性Ｔリンパ球の小さいサブセットを表し、恒常性を維持する免疫応答を弱める際の「中断」として作用する重要な役割を果たす。疾患状態（癌など）において、Ｔｒｅｇのレベルの上昇が報告され、これは、より芳しくない予後と関連する。ドナーの末梢血液細胞から単離されたヒトＴｒｅｇは、ＣＤ３／ＣＤ２８刺激によって活性化され得る。Ｔｒｅｇ活性化は、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１細胞表面発現において顕著な増加を誘導することが示される（図２６Ａ）。以前に報告されるとおり、Ｔｒｅｇは、エフェクターＴ細胞（Ｔｅｆｆ）増殖の強力な抑制を含む免疫抑制性の活性を発揮する。本明細書に示されるとおり（図２６Ｂ）、大部分のＴｅｆｆが細胞分裂を経る標準的な実験条件下で、共培養されたＴｒｅｇは、これを少ない割合まで減少させる。また、このＴｒｅｇによるＴｅｆｆ増殖の阻害は、ＴｅｆｆとＴｒｅｇの共培養をＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的な阻害剤で処理することにより、効果的に克服（即ち抑制解除）できることから、本明細書で開示されるアイソフォーム選択的なＴＧＦβ１がＴＧＦβ１機能のＧＡＲＰ－アームを阻害するのに有効であることが実証される。疾患環境（腫瘍微小環境及び線維性環境など）において、これは、Ｔｒｅｇ媒介性免疫抑制を遮断するこれらの阻害剤の能力に相当するであろう。その結果、これは、エフェクターＴ細胞

の増殖の増強を引き起こして、免疫をブーストするはずである。ＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的な阻害剤のＧＡＲＰ－アームは、ＴＧＦβ１機能のこの面を標的化し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるとおりの抗体又はその抗原結合部分は、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）の抑制性の活性を低減し得る。

【０６２０】

標的としてのＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１

ＬＲＲＣ３３は、選択的な細胞型、特に単球及びマクロファージを含む骨髄系列のものにおいて発現される。単球は、骨髄中の前駆細胞から得られ、血流を循環し、末梢組織に到達する。次に、循環単球は、それらが、サイトカイン及びケモカインなどの一連の様々な因子を含む局所環境（例えば、組織特異的、疾患に関連するなど）に暴露される組織に遊走して、単球からマクロファージ、樹状細胞などへの分化を誘発することができる。これらは、例えば、肺における肺胞マクロファージ、骨髄における破骨細胞、ＣＮＳにおけるミクログリア、結合組織における組織球、肝臓におけるクッパー細胞、及び褐色脂肪組織における褐色脂肪組織マクロファージを含む。固形腫瘍において、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）及び骨髄系由来サプレッサー細胞（ＭＤＳＣ）などであり得る。そのようなマクロファージは、活性化し、且つ／又は癌腫関連（又は癌関連）線維芽細胞（ＣＡＦ）及び／又は角膜実質などの活性化線維芽細胞と結合され得る。従って、ＬＲＲＣ３３含有複合体からの成熟ＴＧＦβ１の放出を阻害する本明細書に記載されるＴＧＦβ１活性化の阻害剤は、細胞表面上でＬＲＲ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１を発現するこれらの細胞のいずれかを標的化することができる。線維性微小環境で、ＬＲＲＣ３３発現細胞は、Ｍ２マクロファージ、組織常在性マクロファージ、及び／又はＭＤＳＣを含み得る。

【０６２１】

いくつかの実施形態では、ＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体は、線維化促進（Ｍ２様）マクロファージの外表面に存在する。いくつかの実施形態では、線維化促進（Ｍ２様）マクロファージは、線維性微小環境中に存在する。いくつかの実施形態では、線維化促進（Ｍ２様）マクロファージの外表面でのＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体の標的化は、単にＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１及び／又はＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体を標的化することと比較してより優れた効果をもたらす。いくつかの実施形態では、Ｍ２様マクロファージは、Ｍ２ｃ及びＭ２ｄ　ＴＡＭ様マクロファージなどの異なる表現型を有する複数のサブタイプにさらに極性化される。いくつかの実施形態では、マクロファージは、ＴＧＦβ１、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ２２、ＳＤＦ－１／ＣＸＣＬ１２、Ｍ－ＣＳＦ（ＣＳＦ－１）、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＣＸＣＲ４、ＶＥＧＦ、ＰＤＧＦ、アラキドン酸及びシクロオキシゲナーゼ－２（ＣＯＸ－２）などのプロスタグランジン調節薬剤、副甲状腺ホルモン関連タンパク質（ＰＴＨｒＰ）、ＲＵＮＸ２、ＨＩＦ１α、及びメタロプロテアーゼを含むがこれらに限定されない、腫瘍微小環境中に存在する様々な因子（例えば、増殖因子、ケモカイン、サイトカイン及びＥＣＭ再構築分子）によって活性化され得る。そのような因子の１種以上の暴露は、単球／マクロファージを腫瘍促進性の表現型にさらに推進し得る。一例を挙げると、腫瘍におけるＣＣＬ２及びＶＥＧＦの共発現は、ＴＡＭの増加及び不十分な診断と相関することが示されている。さらに、活性化された腫瘍関連細胞は、腫瘍促進性の細胞、例えばＣＡＦ、ＴＡＮ、ＭＤＳＣなどへの他の細胞の動員及び／又は分化も促進し得る。間質細胞もマクロファージ活性化に応答し、ＥＣＭ再構築、及び最終的に血管新生、浸潤及び転移に影響を及ぼし得る。例えば、ＣＣＬ２は、単球誘引物質として機能するだけでなく、活性化された内皮において発現されるＩＣＡＭ－１のための受容体であるＭＡＣ－１を上方制御することによる細胞接着も促進する。これは、ＣＣＬ２依存的な動脈形成及び癌進行をもたらし得る。従って、本明細書に記載されるＴＧＦβ１阻害剤は、ＣＣＬ２シグナル伝達系を妨害することによって動脈形成を阻害するための方法において使用され得る。

【０６２２】

両方が免疫抑制性の表現型を有し、疾患環境（例えば、ＴＭＥ及びＦＭＥ）で濃縮され

るＭ２－極性化マクロファージ及び骨髄系由来サプレッサー細胞（ＭＤＳＣ）を含む骨髄細胞のサブセットは、細胞表面ＬＲＲＣ３３を発現する。骨髄由来循環単球は、細胞表面ＬＲＲＣ３３を発現しているようには見えない。ＬＲＲＣ３３の限定的な発現は、これを特に魅力的な治療標的にする。文献において利用可能な研究の大部分は、癌におけるエフェクターＴ細胞の生物学（例えば、ＣＤ８＋細胞傷害性細胞）に焦点を当てているが、疾患における抑制性骨髄細胞集団の重要な役割を指摘する証拠（本明細書で提示されるデータなど）も増加している。重要なこととして、本明細書で開示される高度に選択的なＴＧＦβ１阻害性抗体は、インビボでＴＧＦβ１機能のこのアームを標的化することができる。より具体的には、本明細書で提示されるデータは、腫瘍関連Ｍ２マクロファージ及びＭＤＳＣが、疾患進行と強力な相関を有して細胞表面ＬＲＲＣ３３を発現することを示す。本明細書で開示される高親和性のＴＧＦβ１選択的抗体は、複数の薬理学的モデルにおいて腫瘍のチェックポイント遮断薬療法（ＣＢＴ）に対する初期抵抗性を克服することができる。実際に、抗腫瘍有効性は、腫瘍関連マクロファージ及びＭＤＳＣレベルにおける著しい低減と一致し、これは、ＴＧＦβ１機能のこの面を標的化することが治療上有益な効果に寄与し得ることを示唆している。これは、これらの免疫抑制性の細胞が濃縮されている他の疾患にも適用できる可能性がある。いくつかの線維性の状態もこれらの細胞集団の局所的な頻度の上昇と関連する。従って、高親和性のＴＧＦβ１選択的抗体は、そのような徴候において同様のインビボ効果を発揮すると予想される。

【０６２３】

標的としてのＬＴＢＰ１／３－ｐｒｏＴＧＦβ１

細胞外マトリックスは、細胞、組織、器官、及び全身レベルでの複雑なシグナル伝達事象が組織化される部位である。ＥＣＭの調節不全は、いくつかの病態において観察される。ＴＧＦβ１増殖因子の貯蔵所は、潜在型ｐｒｏＴＧＦβ１複合体の形態でＥＣＭ中に存在する。潜在型ｐｒｏＴＧＦβ１複合体は、ＥＣＭ構成要素、ＬＴＢＰ１及び／又はＬＴＢＰ３との共有結合性の相互作用を介してマトリックスに繋留される。フィブロネクチン及びフィブリリン（例えば、フィブリリン－１）などの他のＥＣＭタンパク質は、ＥＣＭ沈着及びＬＴＢＰの局在化を媒介する際に重要であると考えられる。ＥＣＭに対するＬＬＣの標的化は、ＴＧＦβ１活性化プロセスにおいて必須の段階である。全てではないが、大半のＴＧＦβ１関連徴候はＴＧＦβ１依存的であるＥＣＭ機能のいくつかの態様を含む可能性があるため、治療のために検討されるＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１シグナル伝達のこのプールを標的化できることが至上命題である。実際に、本開示によるＴＧＦβ１の高親和性のアイソフォーム選択的な阻害剤は、ヒトＬＴＢＰ１／３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に対して著しく高い親和性及び効力を示す。これらの抗体は活性化前の状態でＥＣＭ局在化複合体を直接的に標的化するため、この作用機序は、リガンド結合に対して内在性の高親和性受容体と競合する必要がないであろう。さらに、これらの抗体の阻害活性は、ＴＧＦβ１活性化の増大と関連する疾患の部位（例えば、ＥＣＭ内の調節不全の微小環境）で局在化されるため、これらの抗体は、副作用を制限しながら有効性の増強を達成することが想定される。

【０６２４】

いくつかの実施形態では、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体又はＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体は、細胞外マトリックスの構成要素である。ＬＴＢＰのＮ末端は、イソペプチド結合を介してＥＣＭに共有結合され得るが、その形成はトランスグルタミナーゼによって触媒され得る。ＥＣＭの構造的完全性は、ＬＴＢＰ結合ＴＧＦβ１活性を媒介する際に重要であると考えられる。例えば、マトリックスの硬化度は、ＴＧＦβ１活性化に著しく影響を及ぼす可能性がある。加えて、足場においてフィブロネクチン及び／又はフィブリリンを組み込むことにより、ＬＴＢＰ媒介性ＴＧＦβ１活性化を著しく増大させ得る。同様に、ＬＴＢＰアッセイ（例えば、細胞ベースの効力アッセイ）におけるフィブロネクチン及び／又はフィブリリンの存在は、アッセイウィンドウを増大させ得る。いくつかの実施形態では、細胞外マトリックスは、フィブリリン及び／又はフィブロネクチンを含む。いくつかの実施形態では、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。

【０６２５】
従って、本明細書で提供されるＴＧＦβ１の高親和性のアイソフォーム選択的な阻害剤は、ＴＧＦβ１機能の生物学的コンテキスト、即ちＧＡＲＰ－アーム、ＬＲＲＣ３３－アーム及びＬＴＢＰ１／３－アームの各々の強力な阻害を可能にする。
【０６２６】
ＴＧＦβ１関連徴候
ＴＧＦβ１関連徴候の一般的特徴
本明細書に記載されるアイソフォーム選択的阻害剤などのＴＧＦβ１阻害剤は、ヒト対象におけるＴＧＦβ１調節不全（即ち「ＴＧＦβ１関連徴候」）と関連する多種多様の疾患、障害及び／又は状態を治療するために使用され得る。本明細書で使用する場合、「ＴＧＦβ１調節不全と関連する疾患（障害又は状態）」又は「ＴＧＦβ１関連徴候」は、ＴＧＦβ１の発現、活性及び／若しくは代謝に関連する任意の疾患、障害及び／若しくは状態又はＴＧＦβ１の活性及び／若しくはレベルの阻害から恩恵を被る場合がある任意の疾患、障害及び／若しくは状態を意味する。癌及び線維症などの病態におけるＴＧＦβシグナル伝達経路の調節不全に向けられる文献において、大量の証拠が存在する。
【０６２７】
ＴＧＦβ１が支配的な疾患関連アイソフォームであるように見えるという本発明者らの認識に基づいて、本開示は、ヒト対象においてＴＧＦβ１関連徴候を治療するための方法におけるアイソフォーム選択的なコンテキストに依存しないＴＧＦβ１阻害剤の使用を含む。そのような阻害剤は、通常、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む医薬組成物に製剤化される。有利には、阻害剤は、ＥＣＭ結合ＴＧＦβ１及び免疫細胞結合ＴＧＦβ１の両方を標的化するが、インビボでＴＧＦβ２又はＴＧＦβ３を標的化しない。いくつかの実施形態では、阻害剤は、ＴＧＦβ１の活性化段階を阻害する。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）増殖又は機能；ｃ）骨髄細胞増殖又は分化；ｄ）単球動員又は分化；ｅ）マクロファージ機能；ｆ）上皮間葉転換（ＥＭＴ）及び／又は内皮間葉転換（ＥｎｄＭＴ）；ｇ）ＰＡＩ－１、ＡＣＴＡ２、ＣＣＬ２、Ｃｏｌ１ａ１、Ｃｏｌ３ａ１、ＦＮ－１、ＣＴＧＦ、及びＴＧＦＢ１からなる群から選択されるマーカ遺伝子の１つ以上における遺伝子発現；ｈ）ＥＣＭ構成要素又は機能；ｉ）線維芽細胞分化の少なくとも２つにおける調節不全又は障害によって特徴付けられ得る。治療有効量のそのような阻害剤が、疾患に罹患しているか又は疾患を有すると診断された対象に投与される。
【０６２８】
いくつかの実施形態では、そのような治療上の使用は、本明細書で詳述されるとおりの治療応答を診断する工程及び／又はモニターする工程を組み込む。例えば、循環ＭＤＳＣ及び／又は循環潜在型ＴＧＦβ１は、本開示に従ってバイオマーカとして使用され得る。そのような治療上の使用は、療法として好適なＴＧＦβ阻害剤を選択する工程及び／又はそのような療法から恩恵を被る可能性がある患者又は患者集団を選択する工程をさらに含み得る。
【０６２９】
いくつかの実施形態では、本明細書で治療される疾患は、コラーゲンＩ沈着の増加を示すＥＣＭ構成要素又は機能の調節不全又は障害を含み得る。いくつかの実施形態では、ＥＣＭの調節不全は、マトリックスの硬化度の増大を含む。いくつかの実施形態では、ＥＣＭの調節不全は、フィブロネクチン及び／又はフィブリリンを伴う。
【０６３０】
いくつかの実施形態では、線維芽細胞分化の調節不全又は障害は、筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞の増加を含む。いくつかの実施形態では、筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞は、癌関連線維芽細胞（ＣＡＦ）である。いくつかの実施形態では、ＣＡＦは、腫瘍間質と結合され、ＣＣＬ２／ＭＣＰ－１及び／又はＣＸＣＬ１２／ＳＤＦ－１を生成し得る。いくつかの実施形態では、筋線維芽細胞又は筋線維芽細胞様細胞は、線維性組織に局在化される。

【０６３１】
いくつかの実施形態では、制御性Ｔ細胞の調節不全又は障害は、Ｔｒｅｇ活性の増大を含む。
【０６３２】
いくつかの実施形態では、エフェクターＴ細胞（Ｔｅｆｆ）増殖又は機能の調節不全又は障害は、ＣＤ４＋／ＣＤ８＋細胞増殖の抑制を含む。
【０６３３】
いくつかの実施形態では、骨髄細胞増殖又は分化の調節不全又は障害は、骨髄前駆細胞の増殖の増大を含む。骨髄細胞の増殖の増大は、骨髄において生じ得る。
【０６３４】
いくつかの実施形態では、単球分化の調節不全又は障害は、線維性組織及び／又は固形腫瘍などの疾患部位での骨髄由来及び／又は組織常在性単球のマクロファージへの分化の増加を含む。
【０６３５】
いくつかの実施形態では、単球動員の調節不全又は障害は、骨髄由来単球の、ＴＭＥなどの疾患部位への動員の増加を含み、マクロファージ分化及びＭ２極性化の増加に続いてＴＡＭの増加をもたらす。
【０６３６】
いくつかの実施形態では、マクロファージ機能の調節不全又は障害は、マクロファージのＭ２表現型への極性化の増大を含む。
【０６３７】
いくつかの実施形態では、骨髄細胞増殖又は分化の調節不全又は障害は、Ｔｒｅｇ、ＭＤＳＣ及び／又はＴＡＮの数の増加を含む。
【０６３８】
ＴＧＦβ関連徴候は、エフェクター免疫細胞（例えば、ＣＤ４＋及び／又はＣＤ８＋Ｔ細胞）を排除することによって身体の正常な防御機構／免疫を部分的に抑制する腫瘍又は癌性組織などの免疫が排除された疾患微小環境を含む状態を含み得る。いくつかの実施形態では、そのような免疫を排除する状態は、治療（例えば、癌療法）に対する不十分な応答性と関連する。不十分に応答する患者に対する癌療法の非限定的な例としては、チェックポイント阻害剤療法、癌ワクチン、化学療法及び放射線療法（放射線治療剤など）が挙げられるが、これらに限定されない。特定の理論によって束縛されることを意図するものではないが、本明細書に記載されるものなどのＴＧＦβ阻害剤は、免疫細胞の接近、例えば、Ｔ細胞増殖及び／又は腫瘍への浸潤を促進することによるＴ細胞（例えば、ＣＤ８＋細胞）及びマクロファージ（例えば、Ｆ４／８０＋細胞、Ｍ１極性化マクロファージ）の接近を再構築することによって抗癌免疫を逃れるか又は排除する腫瘍の能力に対抗することを促進する可能性があると考えられる。
【０６３９】
従って、ＴＧＦβの阻害は、エフェクターＴ細胞の接近及び細胞傷害性エフェクター機能の障害を取り除き、再構築することにより、免疫が排除された疾患環境（ＴＭＥなど）における治療抵抗性（例えば、免疫チェックポイント抵抗性、癌ワクチン抵抗性、ＣＡＲ－Ｔ抵抗性、化学療法抵抗性、放射線療法抵抗性（放射線治療剤に対する抵抗性など）など）を克服し得る。ＴＧＦβの阻害のそのような硬化は、例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞によって媒介される持続性の免疫記憶をさらにもたらし得る。
【０６４０】
いくつかの実施形態では、腫瘍は、免疫原性が乏しい（例えば、「砂漠」又は「非炎症性」腫瘍）。患者は、ネオ－抗原を誘発するか又は免疫応答を促進する癌療法から恩恵を被り得る。そのような療法としては、化学療法、放射線療法（放射線治療剤など）、腫瘍溶解性ウイルス療法、腫瘍溶解性ペプチド、チロシンキナーゼ阻害剤、ネオ－エピトープワクチン、抗ＣＴＬＡ４、不安定性誘発剤、ＤＤＲ剤、ＮＫ細胞活性化剤、及びＴＬＲリガンド／アゴニストなどの様々なアジュバントが挙げられるが、これらに限定されない。

本明細書に記載されるものなどのＴＧＦβ１阻害剤が、癌療法の効果をブーストすることと組み合わせて使用され得る。ＴＧＦβ１阻害剤の１つの作用機序は、ＭＨＣ発現を標準化するか又は再構築することにより、Ｔ細胞免疫を促進することであり得る。

【０６４１】

ＴＧＦβ関連徴候の非限定的な例としては、臓器線維症（例えば、腎線維症、肝線維症、心臓／心血管線維症、筋線維症、皮膚線維症、子宮線維症／子宮内膜症及び肺線維症）を含む線維症、強皮症、アルポート症候群、癌（白血病などの血液癌、骨髄線維症、多発性骨髄腫、結腸癌、腎臓癌、乳癌、悪性黒色腫、神経膠芽腫を含むがこれらに限定されない）、固形腫瘍と関連する線維症（例えば、線維増生黒色腫、膵臓癌関連線維増生及び乳癌線維増生などの癌線維増生）、間質性線維症（例えば、乳房の間質性線維症）、放射線誘導性線維症（例えば、放射線線維症症候群）、化学療法後の迅速な造血発生の促進、骨治癒、創傷治癒、認知症、骨髄線維症、骨髄形成異常（例えば、骨髄異形成症候群又はＭＤＳ）、腎疾患（例えば、末期腎疾患又はＥＳＲＤ）、片側尿管結紮（ＵＵＯ）、歯牙欠損及び／又は退化、内皮増殖症候群、喘息及びアレルギー、胃腸管障害、加齢の貧血、大動脈瘤、オーファン徴候（マルファン症候群及びカムラチ・エンゲルマン病など）、肥満、糖尿病、関節炎、多発性硬化症、筋ジストロフィー、骨障害、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、栄養障害、臓器萎縮症、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）及び食欲不振が挙げられる。

【０６４２】

証拠は、エクトヌクレオチダーゼＣＤ３９及びＣＤ７３が、疾患状態においてアデノシンのレベルの上昇に少なくとも部分的に寄与し得ることを示唆する。注目すべきことに、ＣＤ３９／ＣＤ７３－ＴＧＦβ軸は、Ｔｒｅｇ及びＭＤＳＣを含むＴＧＦβシグナル伝達において関係付けられる免疫細胞を調節する際に役割を果たし得る。制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）及び骨髄由来の抑制性の細胞（ＭＤＳＣ）の両方は一般に、免疫抑制性の表現型を示す。多くの病態（例えば、癌、線維症）において、これらの細胞は、疾患部位で濃縮され、免疫抑制性の環境を生成すること及び／又は維持することに寄与し得る。これは、ＡＴＰをヌクレオシドであるアデノシンへの分解に合わせて関与するエクトヌクレオチダーゼであるＣＤ３９及びＣＤ７３によって少なくとも部分的に媒介され、腫瘍微小環境及び線維性環境などの疾病環境におけるアデノシンの局所濃度の上昇をもたらす可能性がある。アデノシンは、Ｔ細胞及びＮＫ細胞などの標的細胞上で発現されるその受容体に結合することができ、その結果、これらの標的細胞の抗腫瘍機能を抑制する。

【０６４３】

遺伝子発現異常を伴う疾患；バイオマーカ

様々な疾患状態におけるＴＧＦβシグナル伝達経路の異常な活性化は、多くのマーカの遺伝子発現の変化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（例えば、ｍＲＮＡによって測定される）には、セルピン１（ＰＡＩ－１をコード）、ＭＣＰ－１（ＣＣＬ２としても知られる）、Ｃｏｌ１ａ１、Ｃｏｌ３ａ１、ＦＮ１、ＴＧＦＢ１、ＣＴＧＦ、ＡＣＴＡ２（α－ＳＭＡをコード）、ＳＮＡＩ１（Ｅ－カドヘリン（Ｃｄｈ１）を下方制御することにより、線維症及び転移においてＥＭＴを駆動する）、ＭＭＰ２（ＥＭＴに関連するマトリックスメタロプロテアーゼ）、ＭＭＰ９（ＥＭＴに関連するマトリックスメタロプロテアーゼ）、ＴＩＭＰ１（ＥＭＴに関連するマトリックスメタロプロテアーゼ）、ＦＯＸＰ３（Ｔｒｅｇ誘導のマーカ）、ＣＤＨ１（ＴＧＦβによって下方制御されるＥ－カドヘリン（上皮細胞のマーカ））及びＣＤＨ２（ＴＧＦβによって上方制御されるＮ－カドヘリン（間葉細胞のマーカ））が含まれるが、これらに限定されない。興味深いことに、これらの遺伝子の多くは、骨髄線維症を含む多くの癌だけでなく、様々な種類の臓器線維症を含む多様な一連の疾患状態に役割を果たすことが示唆されている。実際、線維性病態と細胞の異常増殖、腫瘍形成及び転移との間の病態生理学的関連が示唆されている。例えば、Ｃｏｘ ａｎｄ Ｅｒｌｅｒ（２０１４）Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２０（１４）：３６３７－４３“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｐａｔｈｗａｙｓ：ｃｏｎｎｅｃｔｉｎｇ ｆｉｂｒｏｓｉｓ ａｎｄ ｓｏｌｉｄ ｔｕｍ

ｏｒ 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”を参照されたい。これらの文献の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。特定の理論に拘束されることを望むものではないが、本開示の発明者らは、ＴＧＦβ１シグナル伝達経路が実際これらの広範な病理間の重要な関連であり得ると考えている。

【０６４４】

損傷組織又は疾患組織への白血球動員（例えば、単球／マクロファージ）を媒介する走化性サイトカイン（又はケモカイン）の能力は、疾患進行において極めて重要な結果をもたらす。ＣＣＬ２としても知られる単球走化性タンパク質１（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３としても知られるマクロファージ炎症性タンパク質１－アルファ（ＭＩＰ－１α）及びＣＣＬ４としても知られるＭＩＰ－１β及びＣＸＣＬ２としても知られるＭＩＰ－２αなどのＣ－Ｃケモカインファミリーのメンバーが、このプロセスに関与している。

【０６４５】

例えば、ＭＣＰ－１／ＣＣＬ２は、線維症及び癌の両方において役割を果たしていると考えられる。ＭＣＰ－１／ＣＣＬ２は、線維化促進性ケモカインとして特徴付けられ、単球走化性物質であり、エビデンスはそれが癌のイニシエーションと進行の両方に関与している可能性を示唆している。線維症では、ＭＣＰ－１／ＣＣＬ２が線維症の炎症期に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、糸球体半月体形成及びＩ型コラーゲンの沈着を劇的に減少させた。同様に、抗ＭＣＰ－１抗体又は抗ＭＩＰ－１アルファ抗体による受動免疫療法は、ブレオマイシンチャレンジマウスにおいて単核食細胞の蓄積を有意に減少させることが示され、これは、ＭＩＰ－１アルファ及びＭＣＰ－１が肺炎症反応中の白血球の動員に寄与することを示唆している（Ｓｍｉｔｈ，Ｂｉｏｌ Ｓｉｇｎａｌｓ．１９９６ Ｊｕｌ－Ａｕｇ；５（４）：２２３－３１，“Ｃｈｅｍｏｔａｃｔｉｃ ｃｙｔｏｋｉｎｅｓ ｍｅｄｉａｔｅ ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ ｒｅｃｒｕｉｔｍｅｎｔ ｉｎ ｆｉｂｒｏｔｉｃ ｌｕｎｇ ｄｉｓｅａｓｅ”）。嚢胞性線維症及び多発性骨髄腫を有する患者において、ＭＩＰ－１アルファレベルが上昇することが報告されており（例えば、Ｍｒｕｇａｃｚ ｅｔ ａｌ、Ｊ Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ｒｅｓ．２００７ Ｊｕｎ；２７（６）：４９１－５を参照されたい）、これは、ＭＩＰ－１αが限局性又は全身性炎症反応と関連しているという考えを支持するものである。

【０６４６】

一連のエビデンスは、腫瘍の進行／転移におけるＣ－Ｃケモカインの関与を示している。例えば、腫瘍由来のＭＣＰ－１／ＣＣＬ２は、マクロファージの「癌誘発」表現型を促進し得る。例えば、肺癌において、ＭＣＰ－１／ＣＣＬ２は、間質細胞によって産生され、転移を促進することが示されている。ヒト膵癌では、腫瘍がＣＣＬ２を分泌し、免疫抑制性ＣＣＲ２陽性マクロファージがこれらの腫瘍に浸潤する。ＣＣＬ２の高発現／ＣＤ８Ｔ細胞の低浸潤を示す腫瘍を有する患者は、生存が有意に減少している。特定の理論に拘束されることを望むものではないが、損傷又は病変組織環境に動員される単球は、その後、局所的な手がかりに応答して（例えば、腫瘍由来サイトカインに応答して）極性化され、それにより疾患をさらに進行させると考えられる。これらのＭ２様マクロファージは、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞などのエフェクター細胞を抑制することで、免疫回避に寄与している可能性が高い。いくつかの実施形態では、このプロセスは、活性化マクロファージによって発現されるＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１によって部分的に媒介される。いくつかの実施形態では、このプロセスは、Ｔｒｅｇによって発現されるＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１によって部分的に媒介される。

【０６４７】

同様に、乳癌（例えば、トリプルネガティブ乳癌）などの特定の癌腫において、ＭＤＳＣのＣＸＣＬ２／ＣＣＬ２２媒介動員は血管新生及び転移を促進することが示されている（例えば、Ｋｕｍａｒ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１８）Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ　１２８（１１）：５０９５－５１０９を参照されたい）。従って、このプロセスは少なくとも部分的に、ＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１などのＴＧＦβ１によって媒介されると考えられる。さらに、ＭＭＰ９などのプロテアーゼは、腫瘍の浸潤及び転移に寄与するマトリックスリモデリングの過程に関与していることから、同じ又は重複するシグナル伝達経路は線維症にも役割を果たしている可能性がある。

【０６４８】

ＰＡＩ－１／セルピン１は、様々な線維性病態、癌、血管新生、炎症及び神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病）に関与している。腫瘍及び／又は血清におけるＰＡＩ－１の発現上昇は、骨髄線維症だけでなく、乳癌及び膀胱癌（例えば、移行上皮癌）などの様々な癌における不良な予後（例えば、生存期間の短縮、転移の増加）と相関している。線維性病態との関連では、ＰＡＩ－１はＴＧＦβ１誘発性線維症の重要な下方制御エフェクターとして認識されており、ＰＡＩ－１発現の増加は肺線維症（ＩＰＦなど）、腎線維症、肝線維症及び強皮症を含む様々な形態の組織線維症で観察されている。いくつかの実施形態では、このプロセスは、ＥＣＭ関連ＴＧＦβ１、例えばＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１及び／又はＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１によって部分的に媒介される。

【０６４９】

いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１阻害剤療法のインビボでの効果は、好適な遺伝子マーカの発現レベルの変化を測定することによって評価され得る。好適なマーカとしては、ＴＧＦβ（例えば、ＴＧＦＢ１、ＴＧＦＢ２及びＴＧＦＢ３）が挙げられる。好適なマーカとしては、ＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３、ＧＡＲＰ（又はＬＲＲＣ３２）及びＬＲＲＣ３３など、ＴＧＦβ（例えば、ＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３）に対する１つ又は複数の提示分子も挙げることができる。いくつかの実施形態では、好適なマーカとして、間葉転換遺伝子（例えば、ＡＸＬ、ＲＯＲ２、ＷＮＴ５Ａ、ＬＯＸＬ２、ＴＷＩＳＴ２、ＴＡＧＬＮ、及び／若しくはＦＡＰ）、免疫抑制遺伝子（例えば、ＩＬ１０、ＶＥＧＦＡ、ＶＥＧＦＣ）、単球及びマクロファージ走化性遺伝子（例えば、ＣＣＬ２、ＣＣＬ３、ＣＣＬ４、ＣＣＬ７、ＣＣＬ８、ＣＣＬ１３及びＣＣＬ２２）並びに／又は本明細書で論じる様々な線維性マーカが挙げられる。例示的なマーカは、血漿／血清マーカである。

【０６５０】

本明細書の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、状況非依存的阻害剤は、ＴＧＦβ１依存性であることが示されているＵＵＯなどの機構的動物モデルを含む好適な前臨床モデルにおいて、これらのマーカの多くの発現レベルを低減するために使用することができる。従って、このような阻害剤は、疾患の遺伝子発現マーカの１つ又は複数の異常発現（例えば、過剰発現／上方制御又は過少発現／下方制御）を特徴とする疾患又は障害を治療するために使用され得る。

【０６５１】

従って、いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１のアイソフォーム特異的、状況非依存的阻害剤は、次の、ＰＡＩ－１（セルピン１によってコードされる）、ＭＣＰ－１（ＣＣＬ２としても知られる）、Ｃｏｌ１ａ１、Ｃｏｌ３ａ１、ＦＮ１、ＴＧＦＢ１、ＣＴＧＦ、α－ＳＭＡ、ＩＴＧＡ１１及びＡＣＴＡ２の１つ又は複数の過剰発現に関連する疾患の治療に使用され、この治療は、この阻害剤を、疾患を治療するのに有効な量で疾患に罹患している対象へ投与することを含む。いくつかの実施形態では、阻害剤は、ＰＡＩ－１、ＭＣＰ－１／ＣＣＬ２、ＣＴＧＦ、及び／又はα－ＳＭＡの過剰発現に関連する疾患を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、疾患は骨髄線維症である。いくつかの実施形態では、疾患は、癌、例えば、固形腫瘍を含む癌である。

【０６５２】

ＥＣＭ及び免疫成分の両方の重要な側面の制御におけるＴＧＦβ１経路の関与は、著しい数の調節不全遺伝子が増殖性障害及び線維性障害などの広範囲の病態にわたって共有さ

れているという観察を説明し得る。これは、ＴＧＦβ１シグナル伝達に関係する遺伝子における発現パターンの異常が一般化可能な現象である可能性が高いという考え方を支持するものである。これらのマーカ遺伝子は、以下のようないくつかのカテゴリーに分類される：間葉転換に関与する遺伝子（例、ＥｎｄＭＴ及びＥＭＴ）、血管新生に関与する遺伝子、低酸素に関与する遺伝子、創傷治癒に関与する遺伝子；及び組織傷害誘発性炎症反応に関与する遺伝子。

【０６５３】

Ｈｕｇｏ ｅｔ ａｌ．，（Ｃｅｌｌ，１６５（１）：３５－４４）により実施された包括的研究により、転移性黒色腫においてこれらのクラスのマーカの差次的遺伝子発現パターンとチェックポイント阻害療法（ＣＢＴ）に対する反応性との相関が見事に示された。著者らは「ＩＰＲＥＳシグネチャ」と造語された一連の遺伝子のコエンリッチメント解析により、黒色腫だけでなく、解析された全ての主要な一般的ヒト悪性腫瘍内のトランスクリプトームサブセットが定義されることを見出した。実際、この研究は、腫瘍細胞表現型可塑性（即ち間葉転換）及び微小環境に対し結果として生じる影響（例えば、ＥＣＭリモデリング、細胞接着、及び免疫抑制性創傷治癒の血管新生機能）を、ＣＢＴ耐性に結び付ける。ＩＰＲＥＳに加えて、ＴＩＤＥ（Ｊｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ．２０１８ Ｏｃｔ；２４（１０）：１５５０－１５５８）、ＴＩＳ（Ｄａｎａｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ Ｃａｎｃｅｒ．２０１８ Ｊｕｎ ２２；６（１）：６３）、Ｆ－ＴＢＲＳ（Ｍａｒｉａｔｈａｓａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ．２０１８ Ｆｅｂ ２２；５５４（７６９３）：５４４－５４８）、ＩＭＰＲＥＳ（Ａｕｓｌａｎｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ．２０１８ Ｏｃｔ；２４（１０）：１５４５－１５４９）及びｘＣｅｌｌ（Ａｒａｎ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｉｏｌ．２０１７ Ｎｏｖ １５；１８（１）：２２０）などの他の遺伝子シグネチャも、腫瘍免疫微小環境を評価するために使用され得る。

【０６５４】

本出願人は、これらのＩＰＲＥＳ遺伝子カテゴリーのそれぞれが、ＴＧＦβ調節不全を含む疾患に関与していると認識し、ＴＧＦβ１アイソフォームが特に疾患状態においてこれらのプロセスを媒介する可能性があると以前に考えた（例えば、国際公開第２０１７／１５６５００号パンフレットを参照されたい）。本明細書に開示する研究は、この考えをさらに支持し（例えば、実施例１１、図３７Ａ）、ＴＧＦβ１を選択的に標的とする治療法が（非選択的な代替法とは対照的に）、有効性と安全性の両方に関して利点をもたらす可能性があることをさらに確認するものである。

【０６５５】

従って、本開示は、ＴＧＦβ１阻害療法に応答する可能性がある候補患者又は候補患者集団を選択又は特定し、ＴＧＦβ１の高親和性アイソフォーム選択的阻害剤の有効量を患者に投与する方法／プロセスを含む。ＣＢＴに対する患者の応答性の欠如（例えば、耐性）の観察は、患者が本明細書に記載のＴＧＦβ１阻害療法の候補であることを示し得る。従って、Ａｂ６などのＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的阻害剤は、対象の癌の治療に使用し得、対象はＣＢＴに対する応答性が不良である。対象は、局所的に進行した固形腫瘍又は転移性癌などの進行癌を有し得る。特定の治療法の有意な治療効果を示すのに十分であると予想される期間後、有意な治療効果が得られないか又はほとんど得られない（例えば、ＲＥＣＩＳＴ及びｉＲＥＣＩＳＴなどの標準的なガイドラインに基づく部分奏効又は完全奏効の基準を満たさない）場合、患者は「応答性が不良」であると言われる。典型的には、ＣＢＴのためのそのような期間は、化学療法などの両方の追加の有無にかかわらず、少なくとも約３ヶ月の治療である。このような患者は、「難治性」又は「非応答者」と呼ばれることがある。このような患者は、最初のＣＢＴに対する応答性が不良である場合、患者は「一次非応答者」と呼ばれることがある。このカテゴリーに属する癌（又はそのような癌を有する患者）は、ＣＢＴに対し「一次耐性」を有すると特徴付けられ得る。いくつかの実施形態では、対象は、少なくとも約３ヶ月のＣＢＴ治療を受けた後の（任意選択で、少なくとも約４ヶ月のＣＢＴ治療を受けた後の）一次非応答者である。いくつかの

実施形態では、対象は、化学療法などの追加療法もＣＢＴと組み合わせて受けている。

【０６５６】

ＣＢＴの非応答者として対象を特定したなら、ＴＧＦβ１の高親和性アイソフォーム選択的阻害剤を、ＣＢＴと併せて対象に投与することができる。この場合、ＣＢＴは、対象が応答しなかった最初のＣＢＴと同じチェックポイント阻害剤を含んでも含まなくてもよい。任意の好適な免疫チェックポイント阻害剤、例えば承認されているチェックポイント阻害剤を使用することができる。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１の高親和性アイソフォーム選択的阻害剤は、抗ＰＤ－１抗体又は抗ＰＤ－Ｌ１抗体を含むＣＢＴと併せて対象に投与される。ＴＧＦβ１の高親和性アイソフォーム選択的阻害剤は、癌のＣＢＴに対する感受性を高めることにより、耐性を克服することを目的としている。

【０６５７】

ＴＧＦβ１阻害療法に応答する可能性があるか、又はさもなければそれから利益を受ける可能性がある候補患者又は候補患者集団を選択又は特定するプロセスは、患者（又は患者集団）から集めた生検サンプルなどの生物学的サンプルを、本明細書で考察するマーカの１つ又は複数の発現について試験する工程を含み得る。同様に、そのような遺伝子マーカは、患者の治療法に対する応答性をモニターする目的のために使用され得る。モニタリングは、患者から収集した２つ以上の生物学的サンプルを、例えば、治療を施す前及び後、また治療レジメンの経過中に経時的に試験して、治療応答又は有効性を示す１つ以上のマーカの遺伝子発現レベルの変化を評価することを含み得る。いくつかの実施形態では、液体生検が使用され得る。

【０６５８】

いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１阻害療法に応答する可能性がある候補患者又は候補患者集団を選択する方法は、本明細書に記載されるものなどの遺伝子マーカについて以前に試験され、その異常な発現を示した患者又は患者集団を特定する工程を含み得る。これらの同じ方法は、後に患者の治療に対する応答を確認したり、相関させたりするのにも適用できる。

【０６５９】

いくつかの実施形態では、マーカの異常発現は、次の、ＴＧＦβ１、ＬＲＲＣ３３、ＧＡＲＰ、ＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３、ＣＣＬ２、ＣＣＬ３、ＰＡＩ－１／セルペン１の少なくとも１つのレベルの上昇を含む。いくつかの実施形態では、患者又は患者集団（例えば、そこから採取された生物学的サンプル）は、ＴＧＦβ１活性化、ホスホ－Ｓｍａｄ２、ホスホ－Ｓｍａｄ２／３、又はそれらの組み合わせの上昇を示す。いくつかの実施形態では、患者又は患者集団（例えば、そこから採取された生物学的サンプル）は、ＭＤＳＣの上昇を示す。いくつかの実施形態では、このような患者又は患者集団は、ＴＧＦβ１陽性である固形腫瘍を含む可能性のある癌を有する。固形腫瘍は、ＴＧＦβ１優勢腫瘍であり、腫瘍中、ＴＧＦβ１が他のアイソフォームと比較して優勢に発現するアイソフォームである。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、ＴＧＦβ１が腫瘍において発現される共優性アイソフォーム、例えばＴＧＦβ１＋／ＴＧＦβ３＋であるＴＧＦβ１－共優勢腫瘍であり得る。いくつかの実施形態では、このような患者又は患者集団は、化学療法、放射線療法（放射線治療薬など）並びに／又は免疫チェックポイント療法、例えば抗ＰＤ－１（例えば、ペムブロリズマブ及びニボルマブ）、抗ＰＤ－Ｌ１（例えば、アテゾリズマブ）、抗ＣＴＬＡ４（例えば、イピリムマブ）、遺伝子操作免疫細胞療法（例えば、ＣＡＲ－Ｔ）及び癌ワクチンなどの癌治療に抵抗性を示す。本開示によれば、Ａｂ６などの本明細書で提供されるＴＧＦβ１阻害剤は、免疫抑制を解除して、エフェクター細胞を癌細胞に侵入させ、それによって抗腫瘍効果を得ることにより、抵抗性を克服する。従って、ＴＧＦβ１阻害剤療法は、腫瘍におけるエフェクター細胞の浸潤及び／又は拡大を促進し得る。さらに、ＴＧＦβ１阻害剤療法は、腫瘍におけるＴｒｅｇ及びＭＤＳＣなどの免疫抑制性免疫細胞の頻度を減少させ得る。

【０６６０】

いくつかの態様では、マーカの異常発現として、以下のような遺伝子の１つ又は複数の

パネルが挙げられる：間葉転換マーカ（例えば、ＡＸＬ、ＲＯＲ２、ＷＮＴ５Ａ、ＬＯＸＬ２、ＴＷＩＳＴ２、ＴＡＧＬＮ、ＦＡＰ）、免疫抑制遺伝子（例えば、ＩＬ１０、ＶＥＧＦＡ、ＶＥＧＦＣ）、単球及びマクロファージ走化性遺伝子（例えば、ＣＣＬ２、ＣＣＬ７、ＣＣＬ８、ＣＣＬ１３）、血管新生及び創傷治癒に関与する遺伝子（例えば、抑制性Ｔ細胞）、細胞接着マーカ、ＥＣＭリモデリング；骨格系及び骨発生マーカ並びに組織損傷誘発炎症反応に関与する遺伝子。

【０６６１】

いくつかの実施形態では、ＭＨＣ発現の欠如又は下方制御（ＭＨＣクラス１など）が、本開示に包含される抗体又は抗原結合断片を治療に使用し得るＴＧＦβ１関連病態のバイオマーカとして役立ち得る。ＭＨＣレベルの低下は免疫逃避のシグナルであり得、これはＣＢＴなどの免疫療法に対する患者の応答性の不良と相関し得る。従って、ＴＧＦβ１を選択的に阻害すると、少なくとも部分的にエフェクター細胞の機能が回復する可能性がある。

【０６６２】

本開示は、患者における（例えば、本明細書に記載されるような）遺伝子の異常発現を伴うＴＧＦβ関連障害の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６などのＴＧＦβ１選択的阻害剤）を提供し、治療は、その免疫安全性プロファイルに少なくとも部分的に基づいて選択されたＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）を含む組成物を投与することを含む。ＴＧＦβ阻害剤の好適な免疫安全性プロファイルは、ｉ）許容できないレベルのサイトカイン放出を誘発しない（例えば、対照の２．５倍以内）；ｉｉ）許容できないレベルの血小板凝集を促進しない；又はこの分野で認められている細胞ベースのアッセイ及び／若しくはインビボアッセイ（本明細書に記載のものなど）においてその両方を特徴としている。

【０６６３】

間葉転換を伴う疾患

間葉転換は、上皮細胞及び内皮細胞などの細胞の表現型が間葉の表現型（筋線維芽細胞など）に移行するプロセスである。間葉転換を示す遺伝子マーカの例としては、ＡＸＬ、ＲＯＲ２、ＷＮＴ５、ＬＯＸＬ２、ＴＷＩＳＴ２、ＴＡＧＬＮ及びＦＡＰが挙げられる。例えば、癌において、間葉転換（例えば、ＥｎｄＭＴ及びＥＭＴシグネチャの増加）は、腫瘍細胞の表現型可塑性を示す。従って、ＴＧＦβの阻害剤、例えばＡｂ６などのＴＧＦβ１阻害剤は、ＥＭＴ及びＥｎｄＭＴなどの間葉転換によって開始又は駆動される疾患を治療するために使用され得る。

【０６６４】

ＥＭＴ（上皮間葉転換）は、密着結合している上皮細胞が緩み細胞間接触などの間葉の特性（表現型）に変わるプロセスである。このプロセスは、胚発生、創傷治癒、癌転移及び線維症を含む、多くの正常な生物学的プロセス及び病的状態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において概説）。一般に、ＥＭＴシグナルは主にＴＧＦβによって誘導されると考えられている。例えば、多くのタイプの癌は、より不良な予後と相関する間葉表現型（筋線維芽細胞及びＣＡＦなど）に向かう細胞の分化転換を含むようである。従って、本明細書に記載のものなどのＴＧＦβ１のアイソフォーム特異的、状況非依存的阻害剤は、ＥＭＴによって開始又は駆動される疾患の治療に使用することができる。実際、本明細書に例示されるデータ（例えば、図４～６）は、そのような阻害剤が、α－ＳＭＡ、ＬＯＸＬ２、Ｃｏｌ１（Ｉ型コラーゲン）及びＦＮ（フィブロネクチン）などの筋線維芽細胞／ＣＡＦマーカのインビボでの発現を抑制する能力を有することを示している。従って、ＴＧＦβ阻害剤、例えばＡｂ６などのＴＧＦβ１阻害剤は、ＥＭＴを特徴とする疾患の治療に使用することができる。阻害剤の治療有効量は、α－ＳＭＡ／ＡＣＴＡ２、ＬＯＸＬ２、Ｃｏｌ１（Ｉ型コラーゲン）及びＦＮ（フィブロネクチン）などのマーカの発現を減少

させるのに十分な量であり得る。いくつかの実施形態では、疾患は、癌などの増殖性疾患である。

【０６６５】

同様に、ＴＧＦβは、心臓形成などの正常な発生で観察される内皮間葉転換（ＥｎｄＭＴ）の重要な調節因子でもある。しかし、癌間質及び線維化部位など、多くの疾患関連組織でも同じ又は類似の現象が見られる。いくつかの疾患プロセスでは、ＣＤ３１などの内皮マーカはＴＧＦβ１曝露時に下方制御され、代わりにＦＳＰ－１、α－ＳＭＡ／ＡＣＴＡ２及びフィブロネクチンなどの間葉マーカの発現が誘導されるようになる。実際、間質ＣＡＦは血管内皮細胞に由来する可能性がある。従って、ＴＧＦβ阻害剤、例えばＡｂ６などのＴＧＦβ１阻害剤は、ＥｎｄＭＴを特徴とする疾患の治療に使用することができる。阻害剤の治療有効量は、ＦＳＰ－１、α－ＳＭＡ／ＡＣＴＡ２及びフィブロネクチンなどのマーカの発現を減少させるのに十分な量であり得る。いくつかの実施形態では、疾患は、癌などの増殖性疾患である。

【０６６６】

本開示は、患者における（例えば、本明細書に記載されるような）間葉転換を伴うＴＧＦβ関連障害の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６などのＴＧＦβ１選択的阻害剤）を提供し、治療は、その免疫安全性プロファイルに少なくとも部分的に基づいて選択されたＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）を含む組成物を投与することを含む。ＴＧＦβ阻害剤の好適な免疫安全性プロファイルは、ｉ）許容できないレベルのサイトカイン放出を誘発しない（例えば、対照の２．５倍以内）；ｉｉ）許容できないレベルの血小板凝集を促進しない；又はこの分野で認められている細胞ベースのアッセイ及び／若しくはインビボアッセイ（本明細書に記載のものなど）においてその両方を特徴としている。

【０６６７】

マトリックスの硬化及びリモデリングを伴う疾患

線維性病態及び癌などの様々なＴＧＦβ１関連適応症の進行（例えば、腫瘍増殖及び転移）は、ＥＣＭに沈着したマトリックス成分のレベルの増加及び／又はＥＣＭの維持／リモデリングを含む。コラーゲンなどのＥＣＭ成分の沈着の増加はＥＣＭの機械物理学的特性（例えば、マトリックス／基質の硬さ）を変化させる可能性があり、この現象は、ＴＧＦβ１シグナル伝達に関連することが報告されている。本出願人は以前に、ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＴＢＰ１でトランスフェクトされ、所定の硬さ（例えば、５ｋＰａ、１５ｋＰａ又は１００ｋＰａ）を有するシリコンベースの基材上で成長させた一次線維芽細胞を使用して、ＴＧＦβのインテグリン依存性活性化に対するマトリックス剛性の役割を実証した。国際公開第２０１８／１２９３２９号パンフレットに開示されているように、より高い硬さを有するマトリックスはＴＧＦβ１活性化を増強し、これは、ＴＧＦβ１のアイソフォーム特異的阻害剤によって抑制することができる。これらの観察は、ＴＧＦβ１がＥＣＭ特性（硬さなど）に影響を与え、これは、次に、疾患進行を反映するＴＧＦβ１活性化をさらに誘導し得ることを示唆している。

【０６６８】

従って、Ａｂ６などのＴＧＦβ１阻害剤は、このプロセスをブロックして、線維症、腫瘍増殖、浸潤、転移及び線維形成などのＥＣＭ変化を伴う疾患進行に対抗するために使用され得る。このような阻害剤のＬＴＢＰアームは、ＬＴＢＰ１及び／又はＬＴＢＰ３によって提示されるＥＣＭ関連ｐｒｏ／潜在型ＴＧＦβ１複合体を直接標的とすることができ、それにより疾患ニッチにおける複合体からの成長因子の活性化／放出を妨げる。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１阻害剤がインテグリン依存性シグナル伝達を含む疾患を治療するためにＥＣＭ硬さを正常化し得る。いくつかの実施形態では、インテグリンがα１１鎖、β１鎖、又はその両方を含む。ＥＣＭの構造、例えば、ＥＣＭ構成要素及び組織は、マトリックス関連プロテアーゼによっても変更され得る。従って、いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１阻害剤がＥＣＭ硬さを正常化して、疾患関連ＥＣＭに関連する、例えば、腫瘍及び線維性組織におけるプロテアーゼ依存性シグナル伝達を伴う疾患を治療するこ

とができる。

【０６６９】

Ｌａｍｐｉ ａｎｄ Ｒｅｉｎｈａｒｔ－Ｋｉｎｇ（Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、１０（４２２）：ｅａａｏ０４７５，“Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｍａｔｒｉｘ ｓｔｉｆｆｎｅｓｓ ｔｏ ａｔｔｅｎｕａｔｅ ｄｉｓｅａｓｅ：Ｆｒｏｍ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ｔｏ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｔｒｉａｌｓ”）で概説されているように、組織ＥＣＭの硬さの増加は、癌、線維症及び心血管疾患の病理学的進行中に起こる。このプロセスに関連する機械的特性には、表現型的に変換された筋線維芽細胞、ＴＧＦβ及びマトリックス架橋が関与する。癌及び線維性疾患におけるＥＣＭ硬さの増加の主な原因は、筋線維芽細胞（例えば、ＣＡＦ及びＦＡＦ）に脱分化した活性化線維芽細胞によるマトリックス合成及びリモデリングの調節不全である。腫瘍間質のリモデリング及び臓器線維症は、病理学的状態において反応が持続することを除いて、創傷治癒反応と著しい類似性を示す。筋線維芽細胞は、骨髄由来細胞及び組織常在細胞などの複数の細胞源に由来する病理特異的前駆細胞を有する異種細胞集団である。よく用いられる筋線維芽細胞マーカとしては、アルファ平滑筋アクチン（α－ＳＭＡ）が挙げられる。本明細書に示されるように、高親和性アイソフォーム特異的ＴＧＦβ１阻害剤は、インビボ試験において、ＡＣＴＡ２発現（α－ＳＭＡをコードする）、コラーゲン、及びＦＮ（フィブロネクチン）を減少させることができる。フィブロネクチンはＬＴＢＰ関連ｐｒｏＴＧＦβ１複合体のマトリックス構造への固定において重要である。

【０６７０】

ＥＣＭ調節におけるＴＧＦβ経路の重要性は十分に確立されている。ＴＧＦβ１（及びＴＧＦβ３）は特定のインテグリン（例えば、αｖインテグリン）によって機械的に活性化され得るため、インテグリン－ＴＧＦβ１相互作用は、治療の標的となっている。例えば、αｖβ６に対するモノクローナル抗体が、特発性肺線維症について研究されている。しかしながら、このようなアプローチは、同じインテグリン結合モチーフのＲＧＤを共有するＴＧＦβ３シグナル伝達にも干渉すると予想され、さらに、このような抗体は、プロテアーゼ誘導活性化など、他の方法で活性化されるＴＧＦβ１を遮断するのに有効ではないであろう。対照的に、Ａｂ６などの高親和性のアイソフォーム特異的ＴＧＦβ１阻害剤は、プロテアーゼ依存性のＴＧＦβ１（ＦＩＧ）の活性化も（図１及び２）、ＴＧＦβ１のインテグリン依存性活性化も（図３３Ｂ）遮断することができる。従って、このようなＴＧＦβ１阻害剤は、優れた特性を提供し得る。本明細書に示すデータは、本出願人の以前の研究と共に、ＴＧＦβ１の高親和性アイソフォーム選択的阻害剤が、ＥＣＭ硬化に関連する疾患の治療に有効であり得ることを支持する。

【０６７１】

従って、本開示は、対象の、マトリックス硬化に関連する疾患の治療、又はマトリックス硬さを低下させる方法における、ＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的阻害剤の治療的使用を含む。このような使用は、Ａｂ６などのＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的阻害剤を治療有効量投与することを含む。

【０６７２】

本開示は、患者における（例えば、本明細書に記載されるような）マトリックス硬化及びリモデリングを伴うＴＧＦβ関連障害の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６などのＴＧＦβ１選択的阻害剤）を提供し、治療は、その免疫安全性プロファイルに少なくとも部分的に基づいて選択されたＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）を含む組成物を投与することを含む。ＴＧＦβ阻害剤の好適な免疫安全性プロファイルは、ｉ）許容できないレベルのサイトカイン放出を誘発しない（例えば、対照の２．５倍以内）；ｉｉ）許容できないレベルの血小板凝集を促進しない；又はこの分野で認められている細胞ベースのアッセイ及び／若しくはインビボアッセイ（本明細書に記載のものなど）においてその両方を特徴としている。

【０６７３】

プロテアーゼが関与する疾患

その潜在型複合体からのＴＧＦβの活性化は、インテグリンによって力依存的に且つ／又はプロテアーゼによって機械的に誘発され得る。特定のクラスのプロテアーゼ、例えば、以下に限定されないが、カリクレイン、ケモトリプシン、エラスターゼ、プラスミン、トロンビンなどのＳｅｒ／Ｔｈｒプロテアーゼ並びにＭＭＰ－２、ＭＭＰ－９及びＭＭＰ－１３などのＭＭＰファミリーの亜鉛金属プロテアーゼ並びにＡｄａｍ１０及びＡｄａｍ１７などのＡｄａｍファミリーのプロテアーゼは、このプロセスに関与し得ることがエビデンスにより示唆される。ＭＭＰ－２は、基底膜の最も豊富な成分であるコラーゲンＩＶを分解し、ＥＣＭ関連ＴＧＦβ１調節に役割を果たす可能性を高めている。ＭＭＰ－９は、乳癌などの癌に含まれる腫瘍の進行、血管新生、間質リモデリング及び転移に中心的役割を果たしていると示唆されている。従って、ＥＣＭにおけるＴＧＦβ１のプロテアーゼ依存性活性化は、線維症及び癌などのＥＣＭ関連疾患の治療に重要であり得る。

【０６７４】

カリクレイン（ＫＬＫ）は、血漿カリクレイン及び組織カリクレインを含むトリプシン様又はキモトリプシン様セリンプロテアーゼである。ＥＣＭは、悪性の増殖を抑制する構造的及びシグナル伝達の足場及び障壁として作用する組織恒常性において役割を果たす。ＫＬＫは、ＥＣＭタンパク質及び腫瘍の拡大及び浸潤を促進し得る他の成分の分解において役割を果たし得る。例えば、ＫＬＫ１は、特定の乳癌において大きく上方制御され、ｐｒｏＭＭＰ－２及びｐｒｏＭＭＰ－９を活性化することができる。ＫＬＫ２は、潜在型ＴＧＦβ１を活性化し、前立腺癌を線維芽細胞に隣接させて癌の増殖を許容する。ＫＬＫ３は、前立腺癌の診断マーカ（ＰＳＡ）として広く研究されている。ＫＬＫ３は、プラスミノーゲンをプラスミンにプロセシングし、このプラスミンがタンパク質分解的にＬＡＰを切断し、それによってＴＧＦβ１増殖因子を潜在型複合体から放出させることにより、ＴＧＦβ１を直接活性化し得る。ＫＬＫ６は、アルツハイマー病の潜在的マーカである可能性がある。

【０６７５】

さらに、実施例８で提供されるデータは、このようなプロテアーゼがカリクレインであり得ることを示している。従って、本開示は、カリクレイン又はカリクレイン様プロテアーゼに関連する疾患を治療する方法における、ＴＧＦβ１のアイソフォーム特異的、状況非依存的阻害剤の使用を包含する。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１阻害剤は、Ａｂ６又はその誘導体である。

【０６７６】

プラスミン、ＴＳＰ－１及びαＶβ６インテグリンなどのＴＧＦβ１の既知の活性化因子は、全てＬＡＰと直接的に相互作用する。ＬＡＰのタンパク質分解性切断がＬＡＰ－ＴＧＦβ相互作用を不安定化し、それによって活性ＴＧＦβ１（増殖因子ドメイン）を潜在型複合体から放出し得ると仮定される。アミノ酸ストレッチ５４－ＬＳＫＬＲＬ－５９を含む領域がＴＧＦβ１の潜在性維持に重要であることが示唆されている。従って、相互作用を安定化するか、又はＬＡＰのタンパク質分解性切断を遮断する薬剤（例えば、抗体）は、ＴＧＦβ１の活性化を防止し得る。

【０６７７】

病的状態（例えば、癌）に関連するこれらのプロテアーゼの多くは、異なる作用機序によって機能する。従って、特定のプロテアーゼ、又はプロテアーゼの組み合わせの標的化阻害は、プロテアーゼ－ＴＧＦβ軸を含む病態の治療に治療的利益を提供し得る。従って、ＴＧＦβ１のプロテアーゼ誘導活性化を選択的に阻害する阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１抗体）は、そのような疾患（例えば、癌）の治療に有利であり得ると考えられる。同様に、別のプロテアーゼに対する１つのプロテアーゼによるＴＧＦβ１活性化の選択的阻害も、治療する病態によって治療的利益を提供し得る。

【０６７８】

プラスミンは、プラスミノーゲンと呼ばれる前駆体形態として産生されるセリンプロテアーゼである。放出されると、プラスミンは血液循環系に入り、従って血清中で検出され

る。血清プラスミン濃度の上昇は、恐らく腫瘍細胞の運動性、浸潤、及び転移を促進する細胞外マトリックス（例えば、基底膜及び間質バリア）の破壊を含む機序により、癌の進行と相関するようである。プラスミンは、接着、増殖、アポトーシス、癌の栄養、酸素供給、血管の形成及びＶＥＧＦの活性化にも影響を及ぼし得る（Ｄｉｄｉａｓｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｓｃｉ，２０１４，１５，２１２２９－２１２５２）。さらに、プラスミンは、マクロファージの腫瘍微小環境への移動を促進し得る（Ｐｈｉｌｉｐｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１１ Ｎｏｖ １；７１（２１）：６６７６－８３及びＣｈｏｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｏｒｔｈｏｐ．Ｒｅｌａｔ．Ｒｅｓ．２００３，４１５Ｓ，Ｓ４６－Ｓ５８）。実際、腫瘍関連マクロファージ（ＴＡＭ）は、腫瘍増殖、浸潤、転移、及び血管新生を促進するそれらの能力により、腫瘍形成の十分に特徴付けられた駆動因子である。

【０６７９】

プラスミン活性は、主にＥＣＭの破壊に関連している。しかし、プラスミンは、下流のＭＭＰ及びＴＧＦβの活性化も調節するというエビデンスが増えている。具体的には、プラスミンはＴＧＦβ遺伝子産物のＮ末端領域に由来する潜在型関連ペプチド（ＬＡＰ）のタンパク質分解性切断によってＴＧＦβの活性化を引き起こし（Ｈｏｒｉｇｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｃｈｅｍ．２０１２ Ｏｃｔ；１５２（４）：３２１－９）、活性増殖因子の放出をもたらすことが示唆されている。ＴＧＦβ１は癌の進行を促進し得るため、これは、ＴＧＦβのプラスミン誘導活性化が少なくとも部分的にこのプロセスを媒介する可能性を高める。

【０６８０】

ＴＧＦβ１は、プラスミノーゲンのプラスミンへの変換に重要な役割を果たすｕＰＡの発現も調節することが示されている（Ｓａｎｔｉｂａｎｅｚ，Ｊｕａｎ Ｆ．，ＩＳＲＮ Ｄｅｒｍａｔｏｌｏｇｙ，２０１３：５９７９２７）。ｕＰＡは、その細胞表面受容体（ｕＰＡＲ）に結合し、プラスミノーゲンのプラスミンへの変換を促進することにより、独立して、癌の進行（例えば、接着、増殖、移動）を促進することが示されている。さらに、ｕＰＡ及び／又はプラスミノーゲン活性化抑制因子－１（ＰＡＩ－１）の発現が、大腸癌（Ｄ．Ｑ．Ｓｅｅｔｏｏ，ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｓｕｒｇｉｃａｌ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．８２，ｎｏ．３，ｐｐ．１８４－１９３，２００３）、乳癌（Ｎ．Ｈａｒｂｅｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ，ｖｏｌ．５，ｎｏ．５，ｐｐ．３４８－３５２，２００４）及び皮膚癌（Ｓａｎｔｉｂａｎｅｚ，Ｊｕａｎ Ｆ．，ＩＳＲＮ Ｄｅｒｍａｔｏｌｏｇｙ，２０１３：５９７９２７）の予後不良の予測因子であることが、研究により示されている。従って、特定の理論に拘束されることを望むものではないが、プラスミン、ＴＧＦβ１及びｕＰＡ間の相互作用は、癌の進行を促進する方向への正のフィードバックループを形成する可能性がある。従って、プラスミン依存性ＴＧＦβ１活性化を選択的に阻害する阻害剤は、プラスミン／ＴＧＦβ１シグナル伝達軸に依存する癌の治療に特に好適であり得る。

【０６８１】

本開示の一態様では、本明細書に記載のＴＧＦβ１のアイソフォーム特異的阻害剤などのＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１のプロテアーゼ依存性活性化を阻害することができる。いくつかの実施形態では、阻害剤は、インテグリンに非依存的にプロテアーゼ依存性ＴＧＦβ１活性化を阻害することができる。いくつかの実施形態では、そのような阻害剤は、活性化の様式を問わず、ＴＧＦβ１の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及びプロテアーゼ依存性活性化の両方を阻害することができる。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、カリクレイン、ケモトリプシン、トリプシン、エラスターゼ、プラスミンなどのセリンプロテアーゼ並びにＭＭＰ－２、ＭＭＰ－９及びＭＭＰ－１３などの亜鉛メタロプロテアーゼ（ＭＭＰファミリー）からなる群から選択される。

【０６８２】

いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１抗体）は、ＴＧＦβ１

のプラスミン誘導性活性化を阻害することができる。いくつかの実施形態では、阻害剤は、プラスミン及びインテグリン誘導性ＴＧＦβ１活性化を阻害することができる。いくつかの実施形態では、抗体は、ｐｒｏＴＧＦβ１に特異的に結合するモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗体が潜在型ｐｒｏＴＧＦβ１に結合し、それによって潜在型複合体からの成熟成長因子の放出を阻害する。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１のプラスミン依存性活性化を阻害する方法での使用に好適なＴＧＦβ１活性化の高親和性、状況依存性阻害剤は、Ａｂ６又はその誘導体若しくはバリアントである。

【０６８３】

いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１抗体）は癌細胞の遊走を阻害する。いくつかの実施形態では、阻害剤は、マクロファージの遊走を阻害する。いくつかの実施形態では、阻害剤は、ＴＡＭの蓄積を阻害する。

【０６８４】

別の態様では、癌の治療を必要とする対象の癌を治療する方法であって、有効量のＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１抗体）をその対象に投与することを含み、阻害剤はＴＧＦβ１のプロテアーゼ誘導性活性化を阻害し（例えば、プラスミン）、それによって対象の癌を治療する方法が、本明細書において提供される。

【０６８５】

別の態様では、癌の増殖の低減を必要とする対象の癌の増殖を低減する方法であって、有効量のＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１抗体）をその対象に投与することを含み、阻害剤はＴＧＦβ１のプロテアーゼ誘導性活性化を阻害し（例えば、プラスミン）、それによって対象の癌の増殖を低減する方法が、本明細書において提供される。

【０６８６】

本開示は、患者における（例えば、本明細書に記載されるような）プロテアーゼと関係するＴＧＦβ関連障害の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６などのＴＧＦβ１選択的阻害剤）を提供し、治療は、その免疫安全性プロファイルに少なくとも部分的に基づいて選択されたＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）を含む組成物を投与することを含む。ＴＧＦβ阻害剤の好適な免疫安全性プロファイルは、ｉ）許容できないレベルのサイトカイン放出を誘発しない（例えば、対照の２．５倍以内）；ｉｉ）許容できないレベルの血小板凝集を促進しない；又はこの分野で認められている細胞ベースのアッセイ及び／若しくはインビボアッセイ（本明細書に記載のものなど）においてその両方を特徴としている。

【０６８７】

骨髄増殖性疾患／骨髄線維症

本開示は、骨髄増殖性疾患の治療における、Ａｂ６などのＴＧＦβ１阻害剤の治療的使用を提供する。これらには、例えば、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）及び骨髄線維症（例えば、原発性骨髄線維症及び続発性骨髄線維症）が含まれる。

【０６８８】

骨骨髄線維症としても知られる骨髄線維症は、比較的稀な骨髄増殖性疾患（ｂｏｎｅ ｍａｒｒｏｗ ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｖｅ ｄｉｓｏｒｄｅｒ）（癌）であり、骨髄増殖性疾患（ｍｙｅｌｏｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｖｅ ｄｉｓｏｒｄｅｒ）と呼ばれる疾患群に属する。骨髄線維症は、骨髄増殖性腫瘍のフィラデルフィア染色体陰性（－）ブランチに分類される。骨髄線維症は、クローン性骨髄増殖、異常なサイトカイン産生、髄外造血、及び骨髄の線維症を特徴とする。骨髄及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、又は瘢痕組織による骨髄の置換を生じる。骨髄線維症という用語は、他に特に指定のない限り、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）とも呼ばれることがある（特発性及び原発性という用語は、これらの症例の場合、疾患の原因が不明であるか又は疾患が自然発生的であることを意味する）。これは、真性赤血球増加症又は本態性血小板血症に続発して発症する骨髄線維症とは対照的である。骨髄線維症は骨髄様化生の一形態であり、骨髄の造血組織における細胞型の変化を指し、多くの場合、この２つの用語は、同義的に用いられる。原因不明の骨髄化生

及び骨髄化生（ＭＭＭ）を伴う骨髄線維症という用語は、原発性骨髄線維症を指すためにも使用される。いくつかの実施形態では、本開示に従って治療され得る血液増殖性障害として、骨髄線維症などの骨髄増殖性疾患が挙げられる。いわゆる「古典的」なＢＣＲ－ＡＢＬ（Ｐｈ）陰性慢性骨髄増殖性疾患群には、本態性血小板血症（ＥＴ）、真性赤血球増加症（ＰＶ）及び原発性骨髄線維症（ＰＭＦ）が含まれる。

【０６８９】

骨髄線維症は、体の正常な血液細胞の産生を阻害する。その結果、骨髄に広範な瘢痕化が起こり、重度の貧血、衰弱、疲労、多くの場合に脾腫が起こる。異常な造血細胞クローン（特に巨核球による）による線維芽細胞増殖因子などのサイトカインの産生は、コラーゲン線維症を介して結合組織による骨髄の造血組織の置換につながる。造血組織が減少すると、患者が新しい血球を産生する能力が損なわれ、進行性の汎血球減少症（全ての血球型が不足する）が生じる。しかし、線維芽細胞の増殖及びコラーゲンの沈着は、続発現象と考えられており、線維芽細胞自体は、異常な細胞クローンの一部ではない可能性がある。

【０６９０】

骨髄線維症は、骨髄中の血液幹細胞の異常によって引き起こされ得る。異常な幹細胞は成熟した低分化細胞を作り、それらは増殖が速く骨髄を引き継ぎ、線維症（瘢痕組織の形成）と慢性炎症の両方を引き起こす。

【０６９１】

原発性骨髄線維症は、ＪＡＫ－ＳＴＡＴ経路の構成的活性化、進行性の瘢痕化、又は骨髄の線維化をもたらし得る、ヤヌスキナーゼ２（ＪＡＫ２）、トロンボポイエチン受容体（ＭＰＬ）及びカルレティクリン（ＣＡＬＲ）の変異と関連している。患者は、造血細胞が他の領域、特に肝臓及び脾臓に移動することを余儀なくされるため、髄外造血、即ち骨髄以外の部位での血球形成を発症することがある。これにより、これらの臓器が肥大する。肝臓では、異常な大きさは肝腫脹と呼ばれる。脾臓の肥大は脾腫と呼ばれ、これも汎血球減少症、特に血小板減少症及び貧血を引き起こす一因となる。髄外造血のもう１つの合併症は、変形赤血球症、又は異形赤血球の存在である。

【０６９２】

骨髄線維症における髄外造血の主な部位は脾臓であり、骨髄線維症に罹患している患者では、通常、著しく肥大している。脾臓が極めて大きく肥大する結果、脾臓に多発性の被膜下梗塞が多くの場合に起こる。これは、脾臓への酸素供給が遮断されるため、部分的な又は完全な組織死が起こることを意味する。細胞レベルでは、脾臓は赤血球前駆細胞、顆粒球前駆細胞及び巨核球を含み、巨核球はその数及びその異常な形状が顕著である。巨核球は、この病態で見られる続発性線維症を引き起こすのに関与している可能性がある。

【０６９３】

ＴＧＦβは骨髄線維症の病因の線維化の面に関与している可能性が示唆されている（例えば、Ａｇａｒｗａｌ ｅｔ ａｌ．，“Ｂｏｎｅ ｍａｒｒｏｗ ｆｉｂｒｏｓｉｓ ｉｎ ｐｒｉｍａｒｙ ｍｙｅｌｏｆｉｂｒｏｓｉｓ：ｐａｔｈｏｇｅｎｉｃ ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ａｎｄ ｔｈｅ ｒｏｌｅ ｏｆ ＴＧＦβ”（２０１６）Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｉｎｖｅｓｔｉｇ ３：５を参照されたい）。原発性骨髄線維症における骨髄の病変は、線維化、血管新生及び骨硬化を特徴とし、線維化はＥＣＭに沈着したコラーゲンの産生増加と関連している。

【０６９４】

多数のバイオマーカが記載されており、それらの変化は、疾患を示すか、又は疾患と相関する。いくつかの実施形態では、バイオマーカは細胞マーカである。このような疾患関連バイオマーカは、疾患の進行及び治療の有効性（例えば、治療に対する患者の応答性）の診断及び／又はモニタリングに有用である。これらのバイオマーカには、多数の線維性マーカ、及び細胞マーカが含まれる。例えば、肺癌では、気管支肺胞洗浄（ＢＡＬ）液中のＴＧＦβ１濃度が良性疾患患者と比較して肺癌患者で有意に高い（約２＋倍の増加）ことが報告されており、これは、肺癌の進行又は治療効果を診断及び／又はモニターするた

めのバイオマーカとしても役立つ可能性がある。

【０６９５】

骨髄線維症は巨核球の異常な発達と関連しているため、巨核球の特定の細胞マーカ及び幹細胞系列のそれらの前駆細胞は、疾患の進行及び治療の有効性を診断及び／又はモニターするマーカとして役立つ可能性がある。いくつかの実施形態では、有用なマーカとして、分化巨核球の細胞マーカ（例えば、ＣＤ４１、ＣＤ４２及びＴｐｏ　Ｒ）、巨核球－赤血球前駆細胞の細胞マーカ（例えば、ＣＤ３４、ＣＤ３８及びＣＤ４５ＲＡ－）、一般的な骨髄前駆細胞の細胞マーカ（例えば、ＩＬ－３α／ＣＤ１２７、ＣＤ３４、ＳＣＦ　Ｒ／ｃ－ｋｉｔ及びＦｌｔ－３／Ｆｌｋ－２）並びに造血幹細胞の細胞マーカ（例えば、ＣＤ３４、ＣＤ３８－、Ｆｌｔ－３／Ｆｌｋ－２）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、有用なバイオマーカとして、線維性マーカが挙げられる。線維性マーカとしては、以下に限定されないが、ＴＧＦβ１／ＴＧＦＢ１、ＰＡＩ－１（セルピン１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及びＭｍｐ９が挙げられる。いくつかの実施形態では、有用なバイオマーカは、血清マーカ（例えば、血清サンプル中に見出され、検出されるタンパク質又は断片）である。

【０６９６】

ＴＧＦβ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、ＴＧＦβ阻害剤で骨髄微小環境を標的とすることは、効果的な組織における局所的ＴＧＦβ利用能を調節する分子を発現する白血病細胞を減少させる有望なアプローチであり得ると考えられる。

【０６９７】

実際、（「骨髄線維症」という用語自体が示唆するように）骨髄増殖性及び線維性の両面においてＴＧＦβ依存性調節不全を発現する病理の多面的性質のために、本明細書に記載されているようなアイソフォーム特異的ＴＧＦβ阻害剤は、骨髄線維症に罹患している患者に対して特に有利な治療効果を提供し得る。そのような阻害剤のＬＴＢＰアームは、骨髄中のＥＣＭ関連ＴＧＦβ１複合体を標的とすることができる一方、阻害剤のＬＲＲＣ３３アームは、骨髄細胞関連ＴＧＦβ１をブロックすることができると考えられる。さらに、骨髄線維症に関連する巨核球の生物学的異常には、ＧＡＲＰ媒介ＴＧＦβ１活性及びＬＴＢＰ媒介ＴＧＦβ１活性の両方が関与している可能性がある。従って、本明細書に開示されるＴＧＦβ１のアイソフォーム特異的、状況非依存的阻害剤などのＴＧＦβ阻害剤は、そのような複合体を標的とし、それによってニッチにおける活性ＴＧＦβ１の放出を阻害することができ得る。

【０６９８】

本明細書に記載されるＴＧＦβ１選択的阻害剤などのＴＧＦβ阻害剤は、ヒドロキシ尿素及びＪＡＫ阻害剤などの他の（又は標準治療の）治療に十分な反応を示さなかったか、又は不耐容であった原発性及び続発性骨髄線維症患者の治療に有用である。このような阻害剤は、中リスク又は高リスクの骨髄線維症（ＭＦ）、例えば原発性ＭＦ、真性赤血球増加症後ＭＦ及び本態性血小板血症後ＭＦの患者の治療にも有用である。

いくつかの実施形態では、そのようなＴＧＦβ阻害剤は、チェックポイント阻害剤療法と組み合わせて使用され得る。

【０６９９】

従って、本開示の一態様は、原発性骨髄線維症を治療する方法に関する。この方法は、原発性骨髄線維症に罹患している患者に、ＴＧＦβ利用能の低下を引き起こすＴＧＦβ阻害剤を含む組成物を治療有効量投与することを含む。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１活性化のアイソフォーム特異的、状況依存的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。このような抗体は、０．１～１００ｍｇ／ｋｇ、例えば、１～３０ｍｇの範囲の用量、例えば、１ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ、１５ｍｇ／ｋｇ、２０ｍｇ／ｋｇ、３０ｍｇ／ｋｇなどの用量で投与され得る。例えば、好適な投薬レジメンは、毎週、１～３０ｍｇ／ｋｇを投与することを含む。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１阻害剤は、約１０ｍｇ／ｋｇ／週で投与される。任意

選択で、投与頻度は、初期段階後、例えば１週間に約１回（初期段階中）から１ヶ月に１回（維持段階中）に調整され得る。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）は、チェックポイント阻害剤療法と組み合わせて投与され得る。

【０７００】

抗体を含む医薬組成物の例示的な投与経路は、静脈内又は皮下投与である。組成物が静脈内投与される場合、患者は、例えば、治療毎に適切な時間にわたって、例えば、約３０～１２０分（例えば、３０分、６０分、７５分、９０分、及び１２０分）にわたって治療薬を投与され、次いで、数週毎に、例えば、３週毎、４週毎、６週毎などに、合計数サイクル、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、反復され得る。いくつかの実施形態では、患者は、６サイクル又は１２サイクル中、２８日（４週間）毎に静脈内投与により、１～１０ｍｇ／ｋｇの用量レベル（例えば、１回の投薬当たり１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０ｍｇ／ｋｇ）の阻害性抗体を含む組成物で治療される。いくつかの実施形態では、このような治療は、設定された投与サイクル数後に中止する代わりに、慢性（長期）治療（例えば、有益であると見なされる限り、無期限に継続される）として投与される。

【０７０１】

骨髄線維症は白血病の一種と考えられているが、線維症の発現によっても特徴付けられる。ＴＧＦβは、その調節不全が組織線維症をもたらし得るＥＣＭホメオスタシスの側面を調節することが知られているため、ＥＣＭに関連するＴＧＦβ活性を阻害することが望ましい。従って、ＬＴＢＰ（ＬＴＢＰ１及びＬＴＢＰ３など）によって提示されるｐｒｏＴＧＦβに結合し、それを阻害する抗体又はその断片は、本開示に包含される。いくつかの実施形態では、骨髄線維症の治療に好適な抗体又はその断片は、ＬＲＲＣ３３、ＧＡＲＰ、ＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３、又はそれらの任意の組み合わせに関連するものなど、ｐｒｏＴＧＦβ複合体の多くの状況に結合することができるという点で「状況非依存性」である。いくつかの実施形態では、そのような抗体はＴＧＦβ活性化の状況非依存性阻害剤であり、それは抗体が以下の潜在型複合体のいずれかに結合し、それらを阻害することができることを特徴としている：ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ。いくつかの実施形態では、そのような抗体は、ＴＧＦβの他のアイソフォームではなく１つを含むそのような潜在型複合体に結合し、それを阻害するアイソフォーム特異的抗体である。このような抗体には、例えば、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１が含まれる。いくつかの実施形態では、このような抗体は高い親和性をもって優先的に結合し、ＴＧＦβ１シグナル伝達を阻害するアイソフォーム選択的抗体である。

【０７０２】

初期のインビボデータは、本明細書に記載されるＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的な状況非依存的阻害剤などのＴＧＦβ阻害剤は、原発性骨髄線維症の変換可能なマウスモデルにおける骨髄線維症を治療するために使用し得ることを示している。症状緩和をもたらすのみであり、臨床上又は生存上の利益をもたらさない、現行の標準的なケアＪＡＫ２阻害剤と異なり、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、本明細書に記載されるＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的状況非依存的阻害剤）は、罹患マウスの骨髄において有意な抗線維化作用をもたらし、また生存期間も延長し、ＴＧＦβ１阻害剤がヒト患者の骨髄増殖性疾患の治療に有効であり得るという考えを支持する。

【０７０３】

本明細書に記載される組成物及び方法で治療され得る骨髄増殖性新生物の好適な患者集団には、以下に限定はされないが、ａ）フィラデルフィア（＋）である患者集団、ｂ）フィラデルフィア（－）である患者集団、ｃ）「古典的」に分類される患者集団（ＰＶ、ＥＴ及びＰＭＦ）、ｄ）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、及びｈ）ＣＡＬＲ（＋）を有する患者集団が含

まれる。

【０７０４】

いくつかの実施形態では、患者集団として、中等度－２又は高リスク骨髄線維症の患者が含まれる。いくつかの実施形態では、患者集団には、利用可能な治療に対して不応性であるか、又は利用可能な治療の候補でない骨髄線維症を有する対象が含まれる。いくつかの実施形態では、対象は、１００～２００×10^9／Ｌの血小板数を有する。いくつかの実施形態では、対象は、治療を受ける前の血小板数が＞２００×10^9／Ｌである。

【０７０５】

いくつかの実施形態では、アイソフォーム特異的、状況非依存的ＴＧＦβ１阻害剤療法を受ける（また、受けることにより利益を得る）対象は、中等度－１以上の原発性骨髄線維症（ＰＭＦ）又は真性赤血球増加症後／本態性血小板血症後骨髄線維症（ＰＶ／ＥＴ後ＭＦ）と診断される。いくつかの実施形態では、対象は治療前に骨髄線維症が確認されている。いくつかの実施形態では、対象は、治療前、ヨーロッパコンセンサス等級付けスコアによる評価でＭＦ－２以上、修正されたバウアーマイスタースケールでグレード３以上である。いくつかの実施形態では、対象は、治療前のＥＣＯＧパフォーマンスステータスが１である。いくつかの実施形態では、対象は、治療前、５～１２０の範囲の白血球数（10^9／Ｌ）を有する。いくつかの実施形態では、対象は、ＪＡＫ２Ｖ６１７Ｆのアレルバーデンが１０～１００％の範囲である。

【０７０６】

いくつかの実施形態では、アイソフォーム特異的、状況非依存的ＴＧＦβ１阻害剤療法を受ける（また、受けることから利益を得ることができる）対象は、臨床的に明白な出血と関連しない８．５ｇ／ｄＬ未満のヘモグロビンレベルのために対象が過去１ヶ月間に少なくとも２単位の赤血球輸血の病歴を有することを特徴とする輸血依存性（治療前）である。

【０７０７】

いくつかの実施形態では、アイソフォーム特異的、状況非依存的ＴＧＦβ１阻害剤療法を受ける（また、受けることから利益を得ることができる）対象は、骨髄線維症の治療を以前に受けている。いくつかの実施形態では、対象は、以下に限定されないが、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、及びＪＡＫ２阻害剤（例えば、レスタウルチニブ、ＣＥＰ－７０１）を含む、１つ又は複数の療法で治療されている。

【０７０８】

いくつかの実施形態では、患者は髄外造血を有する。いくつかの実施形態では、髄外造血は、肝臓、肺、脾臓、及び／又はリンパ節におけるものである。いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、疾患発現の局所部位の１つ又は複数に局所的に投与される。

【０７０９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアイソフォーム特異的、状況非依存的ＴＧＦβ１阻害剤などのＴＧＦβ阻害剤は、単独で、又はチェックポイント阻害剤療法と組み合わせて、骨髄線維症の治療に有効な量で患者に投与される。治療有効量は、患者における骨髄線維症の１つ以上の症状及び／又は合併症、例えば、以下に限定されないが、骨髄間質におけるＥＣＭの過剰蓄積（骨髄の線維症）、血管新生、骨硬化症、脾腫、肝腫、貧血、出血、骨痛及び他の骨に関連した病態、髄外造血、血小板増加症、白血球減少症、悪液質、感染症、血栓症並びに死亡を軽減するのに十分な量である。従って、本開示の抗体又は抗原結合断片を含むＴＧＦβ阻害療法は、臨床的利益、とりわけ抗線維化効果及び／又は血球数の正常化を含む臨床的利益を得ることができる。このような治療法は、生存期間を延長し、且つ／又は骨髄移植の必要性を減少させ得る。

【０７１０】

いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤の量は、患者における（例えば、巨核球細胞の）ＴＧＦβ１の発現及び／又は分泌を減少させるのに有効である。従って、このような阻害剤は、治療された患者のＴＧＦβ１ｍＲＮＡレベルを低下させ得る。いくつかの実施

形態では、このような阻害剤は、単核細胞などの骨髄中のＴＧＦβ１ｍＲＮＡレベルを低下させる。ＰＭＦ患者は、典型的には、約２，５００ｐｇ／ｍＬ超、例えば、３，０００、３，５００、４，０００、４，５００、５，０００、６，０００、７，０００、８，０００、９，０００、及び１０，０００ｐｇ／ｍＬ超の血漿ＴＧＦβ１レベルの上昇を示す（ＥＬＩＳＡによって測定される約６００～２，０００ｐｇ／ｍＬの正常範囲とは対照的）（例えば、Ｍａｓｃａｒｅｍｈａｓ　ｅｔ　ａｌ．，（Ｌｅｕｋｅｍｉａ＆Ｌｙｍｐｈｏｍａ，２０１４，５５（２）：４５０－４５２）を参照されたい）。Ｚｉｎｇａｒｉｅｌｌｏ（Ｂｌｏｏｄ，２０１３、１２１（１７）：３３４５－３３６３）は、ＰＭＦ患者及び対照者の血漿中の生理活性及び総ＴＧＦβ１含量を定量した。この参照文献によれば、ＰＭＦ患者の生理活性ＴＧＦβ１の中央値は４３ｎｇ／ｍＬ（４～２１８ｎｇ／ｍＬの範囲）であり、総ＴＧＦβ１は１５３ｎｇ／ｍＬ（３２～１０００ｎｇ／ｍＬ）であったが、対応する対照者では、それらの値は、それぞれ１８（０．０５～１４４）及び５２（８～８６０）であった。従って、これらの報告に基づくと、ＰＭＦ患者における血漿ＴＧＦβ１含量は、対照又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。例えば、４週間毎に、本明細書に記載のモノクローナル抗体を０．１～１００ｍｇ／ｋｇ、例えば、１～３０ｍｇ／ｋｇの用量で例えば４～１２サイクル投与（例えば、２、４、６、８、１０、１２サイクル）した後の、又は慢性若しくは長期の治療をした後の阻害剤による治療は、血漿ＴＧＦβ１レベルを、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％、及び５０％低下させ得る。

【０７１１】

治療効果のいくつかは、治療の開始後、比較的迅速に、例えば、１週間、２週間、３週間、４週間、５週間又は６週間後に観察され得る。例えば、阻害剤は、１～８週間以内に阻害剤で治療された患者の骨髄内の幹細胞及び／又は前駆細胞の数を効果的に増加させることができる。このような細胞としては、造血幹細胞及び血液前駆細胞などが挙げられる。骨髄細胞の頻度／数の変化を評価するために、骨髄生検が行われ得る。それに応じて、患者は、骨の痛み及び倦怠感などの症状の改善を示し得る。

【０７１２】

骨髄増殖性疾患（例えば、骨髄線維症）に罹患している対象は、白血球数のレベルの上昇（例えば、白血病）を示し得る。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）の治療有効量は、血球数を正常化するのに有効な量である。いくつかの実施形態では、この量は、治療前と比較して、対象の総白血球数を減少させるのに有効である。いくつかの実施形態では、この量は、治療前と比較して、対象の総血小板数を減少させるのに有効である。いくつかの実施形態では、この量は、治療前と比較して、対象のヘモグロビンレベルを増加させる（例えば、正常化又は回復させる）のに有効である。いくつかの実施形態では、この量は、治療前と比較して、対象のヘマトクリット値を増加させる（例えば、正常化又は回復させる）のに有効である。

【０７１３】

骨髄線維症の形態学的特徴の１つは、骨髄（例えば、骨髄間質）の線維化であり、一部には異常ＥＣＭを特徴とする。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）の量は、例えば間葉系間質細胞による、過剰なコラーゲン沈着を特徴とする線維症を低減するのに有効である。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、治療された対象のＣＤ４１陽性細胞、例えば巨核球の数を、治療を受けていない対照対象と比較して減少させるのに有効である。いくつかの実施形態では、ＰＭＦ骨髄中の巨核球のベースライン頻度は、無作為に選択された切片で測定した場合、１平方ミリメートル（mm^2）当たり２００～７００細胞の範囲であり、ＰＭＦ脾臓において１平方ミリメートル（mm^2）当たり４０～３００巨核球の範囲であり得る。対照的に、正常ドナーの骨髄及び脾臓における巨核球の頻度は、それぞれ１４０未満及び１０未満である。ＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）による治療は、骨髄及び／又は脾臓における巨核球の数（例えば、頻度）を減少させ得る。いくつかの実施形態では、阻害剤による治療は、巨核球

における自己分泌ＴＧＦβ１シグナル伝達を低減又は阻害し得る。いくつかの実施形態では、阻害剤による治療は、ＳＭＡＤ２／３のリン酸化、例えば、ＳＭＡＤ２のリン酸化などの下流エフェクターシグナル伝達のレベルの低下を引き起こし得る。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）は、本明細書に記載のものなどの線維性マーカの発現レベルを低下させるのに有効である。骨髄線維症の患者は、脾腫を患っている可能性がある。従って、治療の臨床効果は、脾臓サイズの変化をモニターすることによって評価し得る。脾臓の大きさは、触診による脾臓の長さの評価及び／又は超音波による脾臓容積の評価などの既知の技術によって検査し得る。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１のアイソフォーム特異的、状況非依存的阻害剤で治療される対象は、触診による評価で、５ｃｍ以上、例えば、５～３０ｃｍの範囲のベースライン脾臓長さ（治療前）を有する。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１のアイソフォーム特異的、状況非依存的阻害剤で治療される対象は、超音波による評価で、３００ｍＬ以上、例えば、３００～１５００ｍＬの範囲のベースライン脾臓容積（治療前）を有する。例えば、４週間毎に、本明細書に記載のモノクローナル抗体を０．１～３０ｍｇ／ｋｇの用量で例えば４～１２サイクル投与（例えば、２、４、６、８、１０、１２サイクル）した後の阻害剤による治療は、対象の脾臓サイズを減少させ得る。いくつかの実施形態では、阻害剤の有効量は、阻害剤処置を受ける患者集団における脾臓サイズを、対応するベースライン値と比較して、少なくとも１０％、２０％、３０％、３５％、４０％、５０％、及び６０％減少させるのに十分である。例えば、この治療は、１２～２４週間で、プラセボ対照と比較して、ＭＲＩ又はＣＴスキャンによる測定で、脾臓容積をベースラインから≧３５％減少させるのに有効である。いくつかの実施形態では、この治療は、２４～４８週間で、最良の利用可能な治療対照と比較して、ＭＲＩ又はＣＴスキャンによる測定で、脾臓容積をベースラインから≧３５％減少させるのに有効である。利用可能な最良の治療法としては、ヒドロキシ尿素、グルココルチコイド並びに投薬なし、アナグレリド、エポエチンアルファ、サリドマイド、レナリドミド、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アルファ－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、シタラビン及びコルヒチンを挙げることができる。

【０７１４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるアイソフォーム特異的、状況非依存的ＴＧＦβ１阻害剤などのＴＧＦβ阻害剤で治療された患者集団は、例えば、骨髄線維症の研究と治療のための国際的作業部会（Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｗｏｒｋｉｎｇ Ｇｒｏｕｐ ｆｏｒ Ｍｙｅｌｏｆｉｂｒｏｓｉｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）（ＩＷＧ－ＭＲＴ）基準、治療（例えば、４、６、８、又は１２サイクル）後の修正されたバウアーマイスタースケール及びヨーロッパコンセンサス等級付けスコアによって測定される骨髄線維症グレードの変化の程度、骨髄増殖性腫瘍症状評価フォーム（ＭＰＮ－ＳＡＦ）を使用する症状に対する反応による評価で、統計的に改善された治療反応を示す。

【０７１５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるものなどのアイソフォーム特異的、状況非依存的ＴＧＦβ１阻害剤による治療は、例えば、修正された骨髄線維症症状評価フォーム（ＭＦＳＡＦ）による評価で、統計的に改善された治療反応を達成する。この場合、症状はＭＦＳＡＦツール（ｖ２．０）である、０～１０のスケール（０は症状なし、１０は考え得る最悪の症状）を使用して、骨髄線維症の衰弱症状（腹部不快感、早期満腹感、左肋骨下の痛み、掻痒、寝汗、及び骨／筋肉痛）を捕捉するダクト（ｄａｕｋｔ）日誌によって測定される。いくつかの実施形態では、この治療は、例えば、１２～２４週間で、総ＭＦＳＡＦスコアをベースラインから≧５０％低下させるのに有効である。いくつかの実施形態では、治療を受ける患者のかなりの割合で、プラセボを受ける患者と比較して、総症状スコアが≧５０％改善する。例えば、≧５０％の改善を達成する患者プールの割合は、４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％又は８０％を超え得る。

【０７１６】

いくつかの実施形態では、阻害剤の治療有効量は、貧血反応によって評価される臨床的改善を達成するのに十分な量である。例えば、貧血反応の改善は、４～１２サイクル、例えば６サイクルの治療後、より長い期間、例えば８週間以上の輸血非依存性を含み得る。

【０７１７】

いくつかの実施形態では、阻害剤の治療有効量は、ある期間、例えば６週間、８週間、１２週間、６ヶ月などの期間、安定な疾患を維持するのに十分な量である。いくつかの実施形態では、この疾患の進行は、骨髄細胞性全体の変化、レチクリン若しくはコラーゲン線維化の程度、及び／又はＪＡＫ２Ｖ６１７Ｆアレルバーデンの変化によって評価され得る。

【０７１８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるものなどのアイソフォーム特異的、状況非依存的ＴＧＦβ１阻害剤で治療された患者集団は、治療を受けない対照集団と比較して、統計的に改善された（延長された）生存期間を示す。例えば、対照群では、ＰＭＦ患者の生存期間の中央値は、約６年（高リスク患者では、約１６ヶ月）であり、診断後１０年以上生存すると予測される患者は２０％未満である。本明細書に記載のものなどのアイソフォーム特異的、状況非依存的ＴＧＦβ１阻害剤による治療は、生存期間を少なくとも６ヶ月、１２ヶ月、１８ヶ月、２４ヶ月、３０ヶ月、３６ヶ月、又は４８ヶ月延長することができる。いくつかの実施形態では、治療がプラセボを受けた患者と比較して、２６週間、５２週間、７８週間、１０４週間、１３０週間、１４４週間、又は１５６週間で全生存の改善を達成するのに有効である。

【０７１９】

上記に例示したものなどの治療の臨床的利益は、新たに貧血が発症した患者でも発症しなかった患者でも見られ得る。

【０７２０】

アイソフォーム特異的、状況非依存的ＴＧＦβ１阻害剤の有利な特徴の１つは、それらが、選択性を欠く従来のＴＧＦβアンタゴニストと比較して、アイソフォーム選択性によって可能にな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。従って、本明細書に記載されるものなどのアイソフォーム特異的、状況非依存的阻害剤による治療は、そのような事象の頻度及び／又は重症度に関して、従来のＴＧＦβアンタゴニストで治療された同等の患者集団と比較して、患者集団における有害事象を低減し得ると予想される。従って、アイソフォーム特異的、状況非依存的ＴＧＦβ１阻害剤は、投与量及び／又は治療期間に関してより大きい治療域を提供し得る。

【０７２１】

有害事象は、当技術分野で認識されている適切な方法、例えば、有害事象共通用語基準（ＣＴＣＡＥ）バージョン４によって等級分けすることができる。ＧＣ１００８などのＴＧＦβアンタゴニストを投与されたヒト患者において以前に報告された有害事象としては、白血球の増加（グレード３）、倦怠感（グレード３）、低酸素状態（グレード３）、心停止（グレード５）、白血球減少（グレード１）、再発性、一過性、圧痛を伴う紅斑性、結節性皮膚病変、化膿性皮膚炎、及び帯状疱疹が挙げられる。

【０７２２】

骨髄線維症患者において、ＴＧＦβ１阻害剤療法は、例えば、貧血、血小板減少、好中球減少、高コレステロール血、アラニントランスアミナーゼ（ＡＬＴ）上昇、アスパラギン酸トランスアミナーゼ（ＡＳＴ）上昇、打撲、めまい、及び頭痛に関して、ＪＡＫ阻害剤療法と比較して、有害事象（副作用）を引き起こす頻度及び／又は重症度が低く、より安全な治療選択肢を提供し得る。

【０７２３】

ＴＧＦβシグナル伝達の阻害剤は、併用（例えば、「アドオン」）療法として、骨髄線維症を治療する１つ以上の治療剤と併せて使用し得ると考えられる。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ活性化、例えば、ＴＧＦβ１活性化の阻害剤、例えばＡｂ６であり、骨髄線維症に罹患している患者に、本明細書に開示される１つ以上のチェ

ックポイント阻害剤と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態では、Ａｂ６などのＴＧＦβ阻害剤は、ＪＡＫ１阻害剤、ＪＡＫ２阻害剤又はＪＡＫ１／ＪＡＫ２阻害剤を投与されているか、又は投与の候補である骨髄線維症に罹患している患者に投与される。いくつかの実施形態では、このような患者は、ＪＡＫ１阻害剤、ＪＡＫ２阻害剤又はＪＡＫ１／ＪＡＫ２阻害剤療法に応答する一方、他の実施形態では、このような患者は、ＪＡＫ１阻害剤、ＪＡＫ２阻害剤又はＪＡＫ１／ＪＡＫ２阻害剤療法に対して応答性が低いか又は応答しない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるＴＧＦβ１のアイソフォーム特異的阻害剤などのＴＧＦβ阻害剤の使用は、ＪＡＫ１阻害剤、ＪＡＫ２阻害剤又はＪＡＫ１／ＪＡＫ２阻害剤療法に対して応答性が低いか又は応答しない患者の応答性を高め得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるＴＧＦβ１のアイソフォーム特異的阻害剤などのＴＧＦβ阻害剤の使用は、ＪＡＫ１阻害剤、ＪＡＫ２阻害剤又はＪＡＫ１／ＪＡＫ２阻害剤の用量を減少させることができ、これは依然として、患者に同等又は意味のある臨床的有効性又は利益をもたらすが、薬物関連毒性又は有害事象（上記したものなど）の程度はより少ないか又はより低い。いくつかの実施形態では、ＪＡＫ１阻害剤、ＪＡＫ２阻害剤又はＪＡＫ１／ＪＡＫ２阻害剤療法と併用される本明細書に記載のＴＧＦβ活性化阻害剤による治療は、患者に相乗的又は相加的な治療効果をもたらし得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるＴＧＦβ活性化阻害剤による治療は、ＪＡＫ１阻害剤、ＪＡＫ２阻害剤若しくはＪＡＫ１／ＪＡＫ２阻害剤又は骨髄線維症を治療するために与えられる他の療法の利益を増強し得る。いくつかの実施形態では、患者は、骨髄線維症に関連する貧血に対処するための治療をさらに受け得る。

【０７２４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるＴＧＦβ１選択的阻害剤（例えば、Ａｂ６）などの本明細書に記載されるＴＧＦβ阻害剤は、骨髄線維症の治療のためのチェックポイント阻害剤療法と併せて治療的利益を提供するために使用され得る。ＪＡＫ２変異を有する患者から単離された初代細胞は、健康なドナー由来の初代細胞と比較してより高いＰＤ－Ｌ１発現を示す。これは、巨核球及び血小板におけるＪＡＫ２／ＳＴＡＴ経路の構成的活性化が、ＰＤ－Ｌ１を介したＴ細胞の活性化、代謝活性及びＴ細胞の細胞周期進行の低下による免疫逃避の一因である可能性を示している（Ｐｒｅｓｔｉｐｉｎｏ ｅｔａｌ．，Ｓｃｉ Ｔｒａｎｓｌ Ｍｅｄ ２０１８；１０（４２９））。さらに、ＴＧＦβシグナル伝達経路の活性化が、細胞傷害性Ｔ細胞上のＰＤ－１発現を増加させ、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１を介したチェックポイント阻害に対する感受性を低下させることも示されている（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ２０１８；１４３：２５６１）。理論に拘束されるものではないが、これらの知見は、骨髄線維症患者で観察されるチェックポイント阻害薬療法（例えば、抗ＰＤ－１療法）に対する低い奏効率と共に、チェックポイント阻害薬療法に対する臨床的耐性を媒介する上でのＴＧＦβシグナル伝達の潜在的な重要性を支持するものである。

【０７２５】

いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１阻害剤（例えば、Ａｂ６）などのＴＧＦβ阻害剤は、骨髄線維症などの骨髄増殖性疾患を有する患者の貧血を治療するために、ＢＭＰアンタゴニスト（例えば、ＢＭＰ６阻害剤、例えばＲＧＭｃ阻害剤）と併用され得る。理論に拘束されることを望むものではないが、ＴＧＦβ１阻害剤（例えば、Ａｂ６）は、造血を促進するのに有用であり得る一方、ＢＭＰアンタゴニスト（例えば、ＢＭＰ６阻害剤、例えばＲＧＭｃ阻害剤）は、鉄欠乏（例えば、癌及び／又は化学療法から生じる欠乏）を低減し得ると考えられる。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１阻害剤（例えば、Ａｂ６）及びＢＭＰアンタゴニスト（例えば、ＢＭＰ６阻害剤、例えばＲＧＭｃ阻害剤）を含む治療は、１つ又は複数の貧血関連症状及び／又は合併症を軽減するのに十分な治療有効量で投与され得る。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１阻害剤（例えば、Ａｂ６）及びＢＭＰアンタゴニスト（例えば、ＢＭＰ６阻害剤、例えばＲＧＭｃ阻害剤）を含む治療は、骨髄増殖性疾患（例えば、骨髄線維症）を有する患者において、赤血球産生を増加させ、且つ／又は鉄制限を減少させる治療有効量で投与され得る。いくつかの実施形態では、貧血

の治療は、１つ以上のＪＡＫ阻害剤（例えば、Ｊａｋ１／２阻害剤、Ｊａｋ１阻害剤、及び／又はＪａｋ２阻害剤）を投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、貧血反応の改善には、輸血非依存性のより長い持続期間、例えば４～１２サイクル、例えば６サイクルの治療後、例えば８週間以上持続することが含まれ得る。いくつかの実施形態では、治療には、抗ＰＤ１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、及び／又は抗ＣＴＬＡ－４抗体などの１つ以上のチェックポイント阻害剤がさらに含まれる。

【０７２６】

従って、本開示は、患者における原発性骨髄線維症などの骨髄増殖性疾患の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６などのＴＧＦβ１選択的阻害剤）を提供し、治療は、その免疫安全性プロファイルに少なくとも部分的に基づいて選択されたＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）を含む組成物を投与することを含む。ＴＧＦβ阻害剤の好適な免疫安全性プロファイルは、ｉ）許容できないレベルのサイトカイン放出を誘発しない（例えば、対照の２．５倍以内）；ｉｉ）許容できないレベルの血小板凝集を促進しない；又はこの分野で認められている細胞ベースのアッセイ及び／若しくはインビボアッセイ（本明細書に記載のものなど）においてその両方を特徴としている。

【０７２７】

ＭＨＣの下方制御又は変異が関与する病態

ＴＧＦβ関連の適応症には、主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスＩが欠失又は欠損している（例えば、下方制御されている）病態も含まれ得る。このような病態には、ＭＨＣを介したシグナル伝達の１つ以上の構成要素が障害される遺伝性疾患並びに癌、感染症、線維症及び医薬などの他の因子によってＭＨＣ発現が変化する病態が含まれる。

【０７２８】

例えば、腫瘍におけるＭＨＣ　Ｉの下方制御は、免疫監視からの腫瘍回避と関連している。実際、腫瘍のＭＨＣクラスＩ発現の喪失を含むＴ細胞認識を回避することを目的とした免疫回避戦略は、悪性細胞によく見出される。腫瘍免疫回避は、免疫チェックポイント分子を遮断する抗体による治療を含む、癌免疫療法の臨床転帰に負の効果を有することが観察されている（例えば、Ｇａｒｒｉｄｏ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１７）Ｃｕｒｒ　Ｏｐｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　３９：４４－５１．“Ｔｈｅ　ｕｒｇｅｎｔ　ｎｅｅｄ　ｔｏ　ｒｅｃｏｖｅｒ　ＭＨＣ　ｃｌａｓｓ　Ｉ　ｉｎ　ｃａｎｃｅｒｓ　ｆｏｒ　ｅｆｆｅｃｔｉｖｅ　ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ”に概説されており、この文献は、参照により本明細書に組み込まれる）。従って、本開示に包含されるアイソフォーム選択的な状況非依存的ＴＧＦβ１阻害剤は、抗癌免疫を解放若しくは増強し、且つ／又は他の療法に対する応答性若しくは有効性を高めるため、単剤療法として、又は別の療法（チェックポイント阻害剤、化学療法、放射線療法（放射線治療薬など）など）と組み合わせて投与され得る。

【０７２９】

いくつかの実施形態では、ＭＨＣ下方制御は、ＣＢＴなどの癌治療に対する獲得耐性と関連している。ＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的阻害剤は、獲得耐性を発現する確率を低下させるために、ＣＢＴなどの癌治療の一次応答者である患者を治療するために使用され得ると考えられる。従って、癌治療の一次応答者であるＴＧＦβ１阻害薬で治療された患者では、癌治療に対する二次耐性又は獲得耐性の経時的な発生が減少する可能性がある。

【０７３０】

ＭＨＣクラスＩタンパク質の下方制御は、ＨＩＶなどのウイルス感染を含む特定の感染症にも関連している。例えば、Ｃｏｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９９）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　１０（６）：６６１－６７１“Ｔｈｅ　ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ　ｄｏｗｎｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｃｌａｓｓ　Ｉ　ｍａｊｏｒ　ｈｉｓｔｏｃｏｍｐａｔｉｂｉｌｉｔｙ　ｃｏｍｐｌｅｘ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｂｙ　ＨＩＶ－１　ｐｒｏｔｅｃｔｓ　ＨＩＶ－ｉｎｆｅｃｔｅｄ　ｃｅｌｌｓ　ｆｒｏｍ　ＮＫ　Ｃｅｌｌｓ”を参照されたい。この文献は、参照により本明細書に組み込まれる。従って、本開示に包含されるアイソフォーム選択的な状況非依存的ＴＧＦβ１阻害剤は、宿主免疫を解放若しくは増強し、且つ／又は他の

療法に対する応答性若しくは有効性を高めるため、単剤療法として、又は別の療法（抗ウイルス療法、プロテアーゼ阻害剤療法など）と組み合わせて投与され得る。

【０７３１】

本開示は、患者における（例えば、本明細書に記載されるような）ＭＨＣ下方制御又は変異が関与するＴＧＦβ関連障害の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６などのＴＧＦβ１選択的阻害剤）を提供し、治療は、その免疫安全性プロファイルに少なくとも部分的に基づいて選択されたＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）を含む組成物を投与することを含む。ＴＧＦβ阻害剤の好適な免疫安全性プロファイルは、ｉ）許容できないレベルのサイトカイン放出を誘発しない（例えば、対照の２．５倍以内）；ｉｉ）許容できないレベルの血小板凝集を促進しない；又はこの分野で認められている細胞ベースのアッセイ及び／若しくはインビボアッセイ（本明細書に記載のものなど）においてその両方を特徴としている。

【０７３２】

幹細胞の自己複製、組織再生及び幹細胞の再増殖が関与する病態

ＴＧＦβ経路が、様々な幹細胞集団の恒常性、及び組織内でのそれらの分化／再増殖を調節する役割を果たしていることを示唆するエビデンスがある。恒常性が維持されている間、組織特異的幹細胞の大部分は静止状態に保たれているが、特定のストレスを受けると、細胞周期に入るように誘発される。ＴＧＦβ１は、幹細胞の分化及び再構成を厳密に調節するプロセスの「遮断器」として機能していると考えられており、細胞周期に入ることを誘発するストレスは、「遮断器」を除去するＴＧＦβ１阻害と一致する。従って、本明細書に記載されるものなどのＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的阻害剤を使用して、特定の組織内の幹細胞／前駆細胞の細胞周期及びＧ０期への進入決定をスキュー又は補正することができると考えられる。

【０７３３】

従って、本開示の発明者らは、以下の病態においてアイソフォーム選択的ＴＧＦβ１阻害剤を使用することを企図する：ｉ）幹細胞／前駆細胞の分化／再構成が疾患に起因して停止若しくは攪乱されるか、又は治療／媒介の副作用として誘導される；ｉｉ）患者が健康な細胞を死滅又は枯渇させる治療又は媒介を受けている；ｉｉｉ）患者が幹細胞／前駆細胞の分化／再構成が増大することによって利益を受ける可能性がある；ｉｖ）疾患が幹細胞の分化／再構成の異常に関連している。

【０７３４】

骨髄（血液細胞産生）及び上皮などの自己再生組織では、生涯にわたって幹細胞集団が確実に維持されるように、増殖プロセスと分化プロセスのバランスが厳密に調節されている。Ｄ’Ａｒｃａｎｇｅｌ ｅｔ ａｌ．，（２０１７）Ｉｎｔ．Ｊ Ｍｏｌ Ｓｃｉ．１８（７）：１５９１に概説されている。ＴＧＦβ１は、一部にはサイクリン依存性キナーゼ阻害剤のｐ１５／ＩＮＫ４ｂ、ｐ２１及びｐ５７の誘導により、細胞周期及び腫瘍抑制因子の強力な負の調節因子として作用する。ＴＧＦβ１がｐ１６／ＩＮＫ４ａ及びｐ１９／ＡＲＦの誘導に寄与して、特定の細胞型の増殖停止及び老化を媒介することを示唆するエビデンスがある。従って、いくつかの実施形態では、本明細書に記載のものなどのＴＧＦβ１活性化のアイソフォーム選択的阻害剤を使用して、様々な幹細胞集団におけるｐ１６／ＩＮＫ４ａ依存性細胞老化及び幹細胞動態を調節する。

【０７３５】

例えば、間葉系間質／幹細胞（ＭＳＣ）は、骨髄、脂肪組織、及び臍帯血などの成人結合組織のほとんどに存在する間質細胞の小さい集団である。ＭＳＣはインビボでは相対的な静止状態に維持されるが、種々の生理学的及び病理学的刺激に応答して増殖し、次いで骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞又は平滑筋細胞（ＳＭＣ）及び心筋細胞のような他の中胚葉型系統に分化することができる。複数のシグナル伝達ネットワークはＭＳＣを機能的な間葉系統に分化させるように調整し、その中で、ＴＧＦ－β１は重要なプレーヤーとして出現している（例えば、Ｚｈａｏ＆Ｈａｎｔａｓｈ（２０１１．Ｖｉｔａｍ Ｈｏｒｍ ８７：１２７－４１）によって概説されている）。

【０７３６】
同様に、生涯にわたる血液細胞産生には造血幹細胞が必要であり、消失を防ぐために、造血幹細胞の大部分は、定常状態の造血中に静止状態のままである。しかし、血液学的ストレス時には、これらの細胞は急速に細胞周期に動員され、造血要求の増大に応じるために大規模な自己複製と分化を行う。ＴＧＦβ１は、静止－再増殖の転換／バランスを制御するための「スイッチ」として作用し得る。
【０７３７】
従って、ＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的阻害剤は、造血幹細胞の欠損及び骨髄不全が関与する病態の治療に使用することができる。いくつかの実施形態では、造血幹細胞リザーバーの枯渇又は障害は、造血不全又は血液悪性腫瘍をもたらす。いくつかの実施形態では、このような病態は、進行性骨髄不全を特徴とするＤＮＡ修復障害である。いくつかの実施形態では、このような病態は、幹細胞及び前駆細胞の摩耗によって引き起こされる。いくつかの実施形態では、このような状態は貧血に関連する。いくつかの実施形態において、そのような病態は、ファンコニ貧血（ＦＡ）である。いくつかの実施形態では、このような病態は、ＤＮＡ損傷時に特定の細胞型の生存を抑制する過活性ＴＧＦβ経路を特徴とする。従って、ＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的阻害剤は、ＦＡを有する対象のＦＡ造血幹細胞の増殖欠損及び／又は骨髄不全を救済するために使用することができると考えられる。例えば、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，（２０１６），Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ，１８：６６８－６８１，“ＴＧＦ－β ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｒｅｓｃｕｅｓ ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ ｄｅｆｅｃｔｓ ａｎｄ ｂｏｎｅ ｍａｒｒｏｗ ｆａｉｌｕｒｅ ｉｎ Ｆａｎｃｏｎｉ Ａｎｅｍｉａ”を参照されたい
【０７３８】
本開示は、患者における（例えば、本明細書に記載されるような）幹細胞の自己複製、組織再生及び／又は幹細胞の再増殖が関与するＴＧＦβ関連障害の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６などのＴＧＦβ１選択的阻害剤）を提供し、治療は、その免疫安全性プロファイルに少なくとも部分的に基づいて選択されたＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）を含む組成物を投与することを含む。ＴＧＦβ阻害剤の好適な免疫安全性プロファイルは、ｉ）許容できないレベルのサイトカイン放出を誘発しない（例えば、対照の２．５倍以内）；ｉｉ）許容できないレベルの血小板凝集を促進しない；又はこの分野で認められている細胞ベースのアッセイ及び／若しくはインビボアッセイ（本明細書に記載のものなど）においてその両方を特徴としている。
【０７３９】
治療により誘発された造血調節不全が関与する病態
様々な疾患状態を治療するために設計されたある種の薬物が、治療されている患者において、多くの場合に貧血を誘発又は悪化させることが確認されている（例えば、化学療法誘発性貧血及び放射線療法誘発性貧血などの治療又は薬物誘発性貧血）。いくつかの実施形態では、患者は、貧血を含む副作用を引き起こし得る骨髄抑制薬で治療される。このような患者は、造血を強化するために、薬理学的ＴＧＦβ１阻害の恩恵を受ける可能性がある。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ１阻害剤は、静止状態への進入を妨げることにより、患者の造血を促進することができる。いくつかの実施形態では、患者は、Ｇ－ＣＳＦ療法（例えば、フィルグラスチム）を受けることができる。
【０７４０】
従って、本開示は、骨髄抑制療法（例えば、骨髄抑制効果を含む副作用を伴う療法）を受ける患者に投与される、本明細書に開示されるものなどのＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的阻害剤の使用を含む。骨髄抑制療法の例としては、ペグインターフェロンアルファ－２ａ、インターフェロンアルファ－ｎ３、ペグインターフェロンアルファ－２ｂ、アルデスロイキン、ゲムツズマブオゾガマイシン、インターフェロンアルファ－１、リツキシマブ、イブリツモマブチウキセタン、トシツモマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、Ｌ－フェニルアラニン、ボルテゾミブ、クラドリビン、カルムスチン、アムサクリン、クロラムブシル、ラルチトレキセド、マイトマイシン、ベキサロテン、ビンデシン、フロクス

ウリジン、チオグアニン、ビノレルビン、デクスラゾキサン、ソラフェニブ、ストレプトゾシン、ゲムシタビン、テニポシド、エピルビシン、クロラムフェニコール、レナリドミド、アルトレタミン、ジドブジン、シスプラチン、オキサリプラチン、シクロホスファミド、フルオロウラシル、プロピルチオウラシル、ペントスタチン、メトトレキサート、カルバマゼピン、ビンブラスチン、リネゾリド、イマチニブ、クロファラビン、ペメトレキセド、ダウノルビシン、イリノテカン、メチマゾール、エトポシド、ダカルバジン、テモゾロミド、タクロリムス、シロリムス、メクロレタミン、アザシチジン、カルボプラチン、ダクチノマイシン、シタラビン、ドキソルビシン、ヒドロキシ尿素、ブスルファン、トポテカン、メルカプトプリン、サリドマイド、メルファラン、フルダラビン、フルシトシン、カペシタビン、プロカルバジン、三酸化ヒ素、イダルビシン、イホスファミド、ミトキサントロン、ロムスチン、パクリタキセル、ドセタキセル、ダサチニブ、デシタビン、ネララビン、エベロリムス、ボリノスタット、チオテパ、イキサベピロン、ニロチニブ、ベリノスタット、トラベクテジン、トラスツズマブエムタンシン、テムシロリムス、ボスチニブ、ベンダムスチン、カバジタキセル、エリブリン、ルキソリチニブ、カルフィルゾミブ、トファシチニブ、ポナチニブ、ポマリドミド、オビヌツズマブ、テジゾリドリン酸エステル、ブリナツモマブ、イブルチニブ、パルボシクリブ、オラパリブ、ジヌツキシマブ及びコルヒチンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０７４１】

さらなるＴＧＦβ関連適応症には、米国特許出願公開第２０１３／０１２２００７号明細書、米国特許第８，４１５，４５９号明細書、又は国際公開第２０１１／１５１４３２号パンフレットに開示されているもののいずれかが含まれ得る。これらの各文献の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０７４２】

特定の実施形態では、本開示の抗体、その抗原結合部分、及び組成物は、ＴＧＦβ１シグナル伝達に関連する多種多様な疾患、障害及び／又は病態を治療するために使用され得る。いくつかの実施形態では、標的組織／細胞は、他のアイソフォームよりもＴＧＦβ１アイソフォームを優先的に発現する。従って、本開示は、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合部分を含む医薬組成物を使用して、ＴＧＦβ１発現に関連するそのような病態（例えば、ＴＧＦβ１シグナル伝達の調節不全及び／又はＴＧＦβ１発現の上方制御）を治療するための方法を含む。

【０７４３】

いくつかの実施形態では、疾患は、複数の細胞源に関連する（例えば、その上に提示された又はそれから産出された）ＴＧＦβ１を含む。いくつかの実施形態では、このような疾患は、ＴＧＦβ１機能の免疫成分及びＥＣＭ成分の両方を含む。いくつかの実施形態では、このような疾患は、ｉ）ＥＣＭの調節不全（例えば、コラーゲン及びプロテアーゼなどのＥＣＭ成分の過剰産生／沈着；ＥＣＭ基質の硬さの変化；筋線維芽細胞、線維細胞及びＣＡＦなどの線維芽細胞の異常な又は病理学的活性化又は分化）；ｉｉ）Ｔｒｅｇの増加及び／又はエフェクターＴ細胞（Ｔｅｆｆ）の抑制、例えばＴｒｅｇ／Ｔｅｆｆ比の増加による免疫抑制；ＣＤ４及び／又はＣＤ８　Ｔ細胞の抑制を引き起こす白血球浸潤（例えば、マクロファージ及びＭＤＳＣ）の増加；並びに／或いはｉｉｉ）マクロファージ（例えば、骨髄由来単球／マクロファージ及び組織常在マクロファージ）、単球、骨髄由来抑制細胞（ＭＤＳＣ）、好中球、樹状細胞及びＮＫ細胞などの骨髄細胞の異常な又は病理学的活性化、分化及び／又は動員を含む。

【０７４４】

いくつかの実施形態では、病態は、２つ以上のタイプの提示分子（例えば、ＧＡＲＰ、ＬＲＲＣ３３、ＬＴＢＰ１及び／又はＬＴＢＰ３の２つ以上）によって提示されるＴＧＦβ１を含む。いくつかの実施形態では、複数の細胞源からのＴＧＦβ１を含む罹患組織／器官／細胞。一例を挙げると、固形腫瘍（骨髄が関与する増殖性疾患、例えば、骨髄線維症及び多発性骨髄腫も含み得る）は、異なるタイプの提示分子を含む、癌細胞、間質細胞、周囲の健常細胞、及び／又は浸潤性免疫細胞（例えば、ＣＤ４５＋白血球）などの複数

の供給源由来のＴＧＦβ１を含み得る。関連する免疫細胞には、骨髄系細胞及びリンパ系細胞、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、及びＮＫ細胞）及び単球が含まれるが、これらに限定されない。ＴＧＦβ１の状況非依存的阻害剤は、そのような病態の治療に有用であり得る。

【０７４５】

いくつかの実施形態では、癌に関連する造血調節不全は、貧血を引き起こし得る。ＴＧＦβ療法は、ＲＧＭｃ阻害剤などのＢＭＰ６阻害剤をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、癌関連貧血は疾患自体によって引き起こされ得るが、いくつかの実施形態では、貧血は癌治療（化学療法など）によって引き起こされ得る。

【０７４６】

本開示は、患者における（例えば、本明細書に記載されるような）治療により誘発された造血調節不全が関与するＴＧＦβ関連障害の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６などのＴＧＦβ１選択的阻害剤）を提供し、治療は、その免疫安全性プロファイルに少なくとも部分的に基づいて選択されたＴＧＦβ阻害剤（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤）を含む組成物を投与することを含む。ＴＧＦβ阻害剤の好適な免疫安全性プロファイルは、ｉ）許容できないレベルのサイトカイン放出を誘発しない（例えば、対照の２．５倍以内）；ｉｉ）許容できないレベルの血小板凝集を促進しない；又はこの分野で認められている細胞ベースのアッセイ及び／若しくはインビボアッセイ（本明細書に記載のものなど）においてその両方を特徴としている。

【０７４７】

本明細書に記載される抗体又はその断片などのＴＧＦβ１のアイソフォーム特異的、状況非依存的阻害剤で治療され得る病態又は障害の非限定的な例を、以下に提供する。

【０７４８】

治療レジメン、投与

本明細書に開示される方法を実施するために、上記の医薬組成物の有効量を、治療を必要としている対象（例えば、ヒト）に、好適な経路、例えば、静脈内投与により、例えばボーラスとして若しくはある時間にわたる持続注入により、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節腔内、関節滑液嚢内、髄腔内、経口、吸入又は局所経路により投与することができる。ジェットネブライザー及び超音波ネブライザーを含む液体製剤のための市販のネブライザーは、投与に有用である。液体製剤は直接霧化することができ、凍結乾燥粉末は、再構成後に霧化することができる。代わりに、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分は、フルオロカーボン製剤及び定量吸入器を使用してエアロゾル化するか、又は凍結乾燥粉砕粉末として吸入することができる。

【０７４９】

本明細書中に記載される方法によって治療される対象は、哺乳動物、より好ましくはヒトであり得る。哺乳類としては、家畜、スポーツ動物、ペット、霊長類、ウマ、イヌ、ネコ、マウス及びラットが挙げられるが、これらに限定されない。治療を必要とするヒト対象は、上記のようなＴＧＦβ関連の適応症を有するか、そのリスクがあるか、又はその疑いがあるヒト患者であり得る。ＴＧＦβ関連の適応症を有する対象は、日常的な医学的検査、例えば、臨床検査、臓器機能検査、ＣＴスキャン、又は超音波によって特定することができる。そのような適応症のいずれかを有する疑いのある対象は、その適応症の１つ以上の症状を示すであろう。適応症のリスクがある対象は、その適応症のリスク因子の１つ以上を有する対象であり得る。

【０７５０】

本明細書で使用される場合、「有効量」及び「有効用量」という用語は、その意図する目的、即ち許容されるベネフィット／リスク比での組織又は対象における所望の生物学的又は薬物に対する応答を満たすのに十分な化合物又は組成物の量又は用量を指す。例えば、本発明の特定の実施形態では、意図する目的は、インビボでのＴＧＦβ－１の活性化を

阻害し、ＴＧＦβ－１阻害に関連する臨床的に有意な転帰を達成することであり得る。当業者に認識されているように、有効量は、治療される特定の病態、病態の重症度、年齢、身体的状態、大きさ、性別及び体重を含む個々の患者のパラメータ、治療期間、併用療法の性質（存在する場合）、具体的な投与経路並びに医療従事者の知識及び専門知識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おり。日常的な実験のみで対処することができる。一般に、個々の成分又はそれらの組み合わせの最大用量、即ち健全な医学的判断に従い最も高く安全な用量を使用することが好ましい。しかしながら、患者は医学的理由、心理学的理由又は事実上任意の他の理由のために、より低用量又は耐用量を要求し得ることは、当業者は理解するであろう。

【０７５１】

半減期などの経験的考察は、一般に、投与量の決定に寄与するであろう。例えば、ヒト化抗体又は完全ヒト抗体などのヒト免疫系と適合する抗体を使用して、抗体の半減期を延長し、抗体が宿主の免疫系によって攻撃されるのを防止することができる。投与頻度は治療の経過に応じて決定し調整することができ、一般的には（必ずしもそうであるとは限らないが）、ＴＧＦβ関連適応症の治療及び／又は抑制及び／又は改善及び／又は遅延に基づく。代わりに、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体の徐放性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及び機器は当業者に明らかであり、本開示の範囲内である。

【０７５２】

一例では、本明細書に記載の抗体の投与量は、抗体の１回以上の投与を受けた個体において経験的に決定され得る。個体には、アンタゴニストの漸増用量が与えられる。有効性を評価するために、ＴＧＦβ関連適応症の指標に従うことができる。例えば、筋線維損傷、筋線維修復、筋肉における炎症レベル、及び／又は筋肉における線維化レベルを測定するための方法は、当業者によく知られている。

【０７５３】

本開示は、アイソフォーム特異的にＴＧＦβの活性化工程を調節することができる薬剤を医薬として使用した場合、良好な安全性プロファイルを提供し得るという認識を包含している。従って、本開示には、ＴＧＦβ１に特異的に結合し、その活性化を阻害するが、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３には結合せず、それによってインビボでＴＧＦβ１シグナル伝達を特異的に阻害するが、ＴＧＦβ２及び／又はＴＧＦβ３シグナル伝達に影響を及ぼすことによる望ましくない副作用は最小限に抑える抗体及びその抗原結合断片が含まれる。

【０７５４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体又はその抗原結合部分は、対象に投与されても毒性はない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体又はその抗原結合部分は、対象に投与された場合、ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ２の両方に特異的に結合する抗体と比較して毒性が低い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体又はその抗原結合部分は、対象に投与された場合、ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３の両方に特異的に結合する抗体と比較して毒性が低い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体又はその抗原結合部分は、対象に投与された場合、ＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３に特異的に結合する抗体と比較して毒性が低い。

【０７５５】

一般に、本明細書に記載される抗体のいずれかの投与について、最初の候補投与量は、１回の投与当たり約１～２０ｍｇ／ｋｇであり得、投与頻度は、例えば、週１回（ＱＷ）、２週間に１回（Ｑ２Ｗ）、３週間に１回（Ｑ３Ｗ）、４週間に１回（Ｑ４Ｗ）、月１回などである。例えば、患者は、１週間当たり、２週間当たり、３週間当たり、又は４週間当たりなど、約１～１０ｍｇ／ｋｇの注入を、疾患（例えば、癌）を治療するのに有効な量で受けることができ、その量は、十分に耐容される（許容される毒性又は有害事象の範囲内である）。

【０７５６】

本開示の目的のために、典型的な投薬量（注射及び注入などの１投与当たり）は、上記の因子に応じて、約０．１ｍｇ／ｋｇ～３０ｍｇ／ｋｇの範囲であり得る。病態に応じ数日又はそれを超えて反復投与される場合、治療は、症状の所望の抑制が起こるまで、又はＴＧＦβ関連適応症若しくはその症状を緩和するのに十分な治療レベルが達成されるまで持続される。例えば、Ａｂ６の好適な有効投薬量は、１ｍｇ／ｋｇ～３０ｍｇ／ｋｇ（例えば、１～１０ｍｇ／ｋｇ、１～１５ｍｇ／ｋｇ、３～２０ｍｇ／ｋｇ、５～３０ｍｇ／ｋｇなど）の週２回、週１回、２週間毎、４週間毎、又は月１回の投与であり得る。Ａｂ６の好適な有効用量は、約１ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約１０ｍｇ／ｋｇの、例えば毎週の投与を含む。

【０７５７】

例示的な投薬レジメンは、初回用量を投与し、続いて１回以上の維持用量の投与を含む。例えば、初回用量は、約１～３０ｍｇ／ｋｇを、例えば週１回又は週２回であり得る。その後、例えば約０．１～２０ｍｇ／ｋｇを例えば週１回、隔週、月１回などの維持用量が続き得る。しかし、医師が達成を希望する薬物動態の減衰パターンによっては、他の投薬レジメンが有用であり得る。薬物動態の実験結果は、本明細書に開示される抗体（例えば、Ａｂ３）の血清濃度が、前臨床動物モデル（例えば、マウスモデル）への投与後少なくとも７日間安定なままであることを示した。特定の理論に拘束されることを望むものではないが、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）において臨床的に有効な血清濃度を維持しながら、より少ない頻度で抗体が投与され得るため、有利であり得る。いくつかの実施形態では、投薬頻度は、毎週、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、６週間毎、７週間毎、８週間毎、９週間毎又は１０週間毎に１回或いは毎月、２ヶ月毎若しくは３ヶ月毎又はそれを超える期間毎に１回である。この治療の前進は、従来的な技術及びアッセイにより容易にモニターされる。投薬レジメン（使用される抗体を含む）は、経時的に変化し得る。

【０７５８】

いくつかの実施形態では、正常体重の成人患者で、約１ｍｇ／ｋｇ～３０ｍｇ／ｋｇ、又は８０ｍｇ～３０００ｍｇ、例えば、３０、５０、１００、５００、１０００、２０００又は３０００ｍｇの範囲の用量が投与され得る。特定の投薬レジメン、例えば用量、タイミング及び反復は、特定の個体及びその個体の病歴並びに個々の薬剤の特性（薬剤の半減期、及び他の関連する考慮事項など）に依存する。

【０７５９】

本開示によるＴＧＦβ１関連適応症を治療するのに治療的に有効であるＴＧＦβ阻害剤抗体の血清濃度は、少なくとも約１０μｇ／ｍＬ、例えば、約１０μｇ／ｍＬ～１．０ｍｇ／ｍＬであり得る。いくつかの実施形態では、血清濃度によって測定される抗体の有効量は、約２０～４００μｇ／ｍＬである。いくつかの実施形態では、血清濃度によって測定される抗体の有効量は、約１００～８００μｇ／ｍＬである。いくつかの実施形態では、血清濃度によって測定される抗体の有効量は、少なくとも約２０μｇ／ｍＬ、例えば、少なくとも約５０μｇ／ｍＬ、１００μｇ／ｍＬ、１５０μｇ／ｍＬ、又は２００μｇ／ｍＬである。本明細書の実施例２５に示されるように、１、３、１０、３０又は３７．５ｍｇ／ｋｇで静脈内投与されたＡｂ６の単回用量は、約２５μｇ／ｍＬ～約９００μｇ／ｍＬのＣｍａｘ値をもたらした。さらに、非ヒト霊長類では、少なくとも８週間、約２，０００～３，０００μｇ／ｍＬの血清濃度レベルを維持した後、Ａｂ６に関連する毒性（例えば、心毒性、過形成及び炎症、歯及び歯肉所見）は観察されなかった（本明細書の実施例１２を参照されたい）。従って、約１０～１００倍の治療域が達成され得る。

【０７６０】

本開示の目的のためには、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体の適切な投与量は、使用される特異的抗体（又はその組成物）、適応症の種類及び重症度、抗体が予防目的で投与されるか治療目的で投与されるか、以前の治療、患者の臨床歴及びアンタゴニストに対する反応並びに主治医の裁量に依存するであろう

。いくつかの実施形態では、臨床医は、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体を、所望の結果が得られる用量に達するまで投与する。ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体は、例えば、レシピエントの生理学的状態、投与の目的が治療であるか予防であるか、及び熟練した医師に知られている他の因子に応じて、連続的又は間欠的に投与され得る。ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体は、事前に選択された期間にわたって実質的に連続して投与され得、また例えばＴＧＦβ関連の適応症を発症する前、発症中又は発症後、間隔を置いた一連の用量で投与され得る。

【０７６１】

ＴＧＦβ阻害に関連する潜在的なリスク及び有害事象を最小限にするために、ＴＧＦβ阻害剤、例えば本明細書に開示される抗体のいずれか１つを、間欠的に投与することができる。例えば、ＴＧＦβ阻害剤は、臨床的利益（例えば、腫瘍体積の減少及び／又は免疫抑制の逆転若しくは減少）を獲得し維持するのに十分な治療有効量で「必要に応じて」投与され得る。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤、例えば本明細書に開示される抗体のいずれか１つ（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤、例えばＡｂ６）の投与は、治療有効性を決定又はモニターする（例えば、循環ＭＤＳＣを測定する）方法と組み合わせて使用され得る。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ阻害剤のさらなる用量による臨床的利益が決定された場合にのみ、例えば、循環ＭＤＳＣの上昇が検出された場合にのみ、患者に投与される。

【０７６２】

本明細書で使用される場合、「治療する」という用語は、ＴＧＦβ関連の適応症、適応症の症状、又は適応症に罹患しやすい素因を有する対象に対し、適応症、適応症の症状、又は適応症に罹患しやすい素因を治癒、修復、緩和、軽減、変更、除去、改善、改良する、又はそれらに影響を及ぼす目的で、１つ又は複数の活性薬剤を含む組成物を適用又は投与することを指す。

【０７６３】

ＴＧＦβ関連の適応症を、ＧＡＲＰ－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ１複合体、ＬＴＢＰ３－ＴＧＦβ１複合体、及び／又はＬＲＲＣ３３－ＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する抗体で緩和することには、適応症の発症又は進行を遅らせること、又は適応症の重症度を低下させることが含まれる。適応症の緩和には、必ずしも治癒的結果を必要としない。本明細書で使用される場合、ＴＧＦβ関連適応症に関連する適応症の発症を「遅延させる」とは、適応症の進行を遅延させる、妨げる、遅らせる、遅延させる、安定させる、及び／又は先に延ばすことを意味する。この遅延は、適応症の履歴及び／又は治療されている個体に応じて、様々な長さの時間であり得る。適応症の進行を「遅延させる」若しくは緩和する、又は適応症の発症を遅延させる方法は、本方法を使用しない場合と比較して、所与の時間枠内で適応症の１つ又は複数の症状が進行する確率を低下させ、且つ／又は所与の時間枠内で症状の程度を低減する方法である。このような比較は、通常、統計学的に有意な結果を得るのに十分な数の対象を用いた臨床試験に基づく。

【０７６４】

診断、患者の選択、モニタリング

ＴＧＦβ阻害療法を含む治療方法は、ＴＧＦβ適応症の診断及び／又はそのような治療に応答する可能性が高い患者の選択を含み得る。さらに、ＴＧＦβ阻害剤を受ける患者は、治療効果についてモニターされ得、それは、一般に、病態を示し、治療の前後に測定され得る（例えば、アッセイされ得る）１つ以上の好適なパラメータを測定することと、治療に関連したパラメータの変化を評価することとを含む。例えば、そのようなパラメータには、患者から採取した生体サンプル中に存在するバイオマーカのレベルを含み得る。バイオマーカは、ＲＮＡ、タンパク質、細胞、及び／又は組織をベースとしたものであり得

る。例えば、特定の疾患状態において過剰発現する遺伝子は、疾患又は治療に対する応答を診断及び／又はモニターするためのバイオマーカとして機能し得る。疾患関連細胞集団の細胞表面蛋白質は、バイオマーカとして機能し得る。このような方法は、腫瘍のサイズ／体積などの特定の疾患の程度を示す疾患パラメータを直接測定することを含み得る。血清／血液サンプル、生検、及びイメージングなどの好適なサンプリング方法を使用することができる。生検には、組織生検（例えば、腫瘍生検、例えば、コア針生検）及び液体生検が含まれ得る。

【０７６５】

生検は、従来、増殖性障害（例えば、癌）などの様々な疾患を診断及びモニターするための標準であったが、侵襲性のより低い代替法が好ましい場合がある。例えば、多くの非侵襲的なインビボイメージング技術を使用して、治療を受ける患者を診断し、モニターし、選択することができる。従って、本開示は、患者又は対象の疾患を診断及び／又はモニターするためのインビボイメージング技術の使用を含む。いくつかの実施形態では、患者又は対象は、本明細書に記載のアイソフォーム特異的ＴＧＦβ１阻害剤を受けている。他の実施形態では、インビボイメージング技術を使用して、アイソフォーム特異的ＴＧＦβ１阻害剤による治療を受ける患者を選択することができる。いくつかの実施形態では、そのような技術を使用して、患者が治療、例えば、ＴＧＦβ１阻害治療に応答するか否か、又はどのように応答するかを決定することができる。

【０７６６】

本方法に使用される例示的なインビボイメージング技術としては、Ｘ線ラジオグラフィー、磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）、医療用超音波検査（ｕｌｔｒａｓｏｎｏｇｒａｐｈｙ）又は超音波検査（ｕｌｔｒａｓｏｕｎｄ）、内視鏡検査、エラストグラフィー、触覚イメージング、サーモグラフィー、医療写真が挙げられるが、これらに限定されない。他のイメージング技術としては、例えば、陽電子放出断層撮影（ＰＥＴ）及び単一光子放出断層撮影（ＳＰＥＣＴ）などの核医学機能イメージングが挙げられる。これらの技術を実施し、結果を分析する方法は、当技術分野で知られている。

【０７６７】

癌の診断及びモニタリングに一般に使用される非侵襲的イメージング技術としては、磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）、コンピュータ断層撮影法（ＣＴ）、超音波、陽電子放出断層撮影法（ＰＥＴ）、単一光子放出断層撮影法（ＳＰＥＣＴ）、蛍光反射率撮像法（ＦＲＩ）及び蛍光断層撮影法（ＦＭＴ）などが挙げられるが、これらに限定されない。ハイブリッドイメージングプラットフォームも癌の診断及びモニタリングに使用され得る。例えば、ハイブリッド技術としては、ＰＥＴ－ＣＴ、ＦＭＴ－ＣＴ、ＦＭＴ－ＭＲＩ、及びＰＥＴ－ＭＲＩが挙げられるが、これらに限定されない。ダイナミック造影ＭＲＩ（ＤＣＥ－ＭＲＩ）は、乳癌の検出によく使用される別のイメージング技術である。これらの技術を実施し、結果を分析する方法は、当技術分野で知られている。

【０７６８】

さらに最近では、インビボで目的の細胞（例えば、細胞傷害性Ｔ細胞、マクロファージ、及び癌細胞）の検出を可能にする非侵襲的イメージング方法が開発されている。例えば、ｗｗｗ．ｉｍａｇｉｎａｂ．ｃｏｍ／ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ／；Ｔａｖａｒｅ ｅｔ ａｌ．，（２０１４）ＰＮＡＳ，１１１（３）：１１０８－１１１３；Ｔａｖａｒｅ ｅｔ ａｌ．，（２０１５）Ｊ Ｎｕｃｌ Ｍｅｄ ５６（８）：１２５８－１２６４；Ｒａｓｈｉｄｉａｎ ｅｔ ａｌ．，（２０１７）Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ ２１４（８）：２２４３－２２５５；Ｂｅｃｋｆｏｒｄ Ｖｅｒａ ｅｔ ａｌ．，（２０１８）ＰＬｏＳ ＯＮＥ１３（３）：ｅ０１９３８３２；及びＴａｖａｒｅ ｅｔ ａｌ．，（２０１５）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ７６（１）：７３－８２を参照されたい。これらの文献は、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる。いわゆる「Ｔ細胞トラッキング」は抗腫瘍エフェクターＴ細胞をインビボで検出し、局在化させることを目的とする。これは、固形腫瘍の免疫抑制表現型を理解するための有用な洞察を提供し得る。細胞傷害性Ｔ細胞がよく浸潤している腫瘍（「炎症性」又は「熱い」腫瘍）は、チェックポイント阻害療法（ＣＢＴ

）などの癌治療に反応する可能性が高い。一方、免疫抑制表現型を示す腫瘍は、抗腫瘍免疫応答がある場合でもＴ細胞浸潤が乏しい傾向がある。これらのいわゆる「免疫排除」腫瘍は、ＣＢＴなどの癌治療に応答しない可能性が高い。Ｔ細胞トラッキング技術は、これらの異なる表現型を明らかにし、患者に利益をもたらすと思われる治療アプローチの指針となる情報を提供し得る。例えば、「免疫排除」腫瘍を有する患者は、免疫抑制表現型を逆転させることを促進するＴＧＦβ１阻害剤療法などのＴＧＦβ阻害剤療法から恩恵を受ける可能性が高い。同様の技術が他の疾患、例えば線維症を診断しモニターするために使用され得ると考えられる。典型的には、検出部分（例えば、放射性標識、蛍光など）で操作された抗体又は抗体様分子を患者に注入することができ、これは、その後、特定のマーカ（例えば、ＣＤ８＋及びＭ２マクロファージ）の部位に分布し、局在化する。

【０７６９】

非侵襲的インビボイメージング技術は、患者を診断すること；ＴＧＦβ１阻害剤療法などのＴＧＦβ阻害剤療法から恩恵を受ける可能性が高い患者を選択又は特定すること；及び／又は治療時に患者の治療反応をモニターすることを目的とした様々な好適な方法に適用され得る。既知の細胞表面マーカを有する細胞は、細胞マーカに特異的に結合する抗体又は類似の分子を用いることによって検出／局在化され得る。典型的には、このような技術の使用によって検出される細胞は、細胞傷害性Ｔリンパ球、制御性Ｔ細胞、ＭＤＳＣ、疾患関連マクロファージ（ＴＡＭ及びＦＡＭなどのＭ２マクロファージ）、ＮＫ細胞、樹状細胞、及び好中球などの免疫細胞である。

【０７７０】

好適な免疫細胞マーカの非限定的な例としては、単球マーカ、マクロファージマーカ（例えば、Ｍ１及び／又はＭ２マクロファージマーカ）、ＣＴＬマーカ、抑制性免疫細胞マーカ、ＭＤＳＣマーカ（例えば、Ｇ－ＭＤＳＣ及び／又はＭ－ＭＤＳＣに対するマーカ）、例えば、以下に限定されないが、ＣＤ８、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１６３、ＣＤ２０６、ＣＤ６８、ＣＤ１４、ＣＤ１５、ＣＤ６６ｂ、ＣＤ３４、ＣＤ２５及びＣＤ４７が挙げられる。

【０７７１】

上記のインビボイメージング技術を用いて、癌及び線維症などのＴＧＦβ１関連疾患と診断された患者における特定のＭＤＳＣを検出、局在化及び／又は追跡することができる。健康な個体は、循環中のＭＤＳＣの頻度が全くないか、又は低い。このような疾患の発症又は進行に伴って、循環ＭＤＳＣ及び／又は疾患関連ＭＤＳＣのレベルの上昇が検出され得る。例えば、ＣＣＲ２陽性Ｍ－ＭＤＳＣは、炎症を伴う組織に蓄積することが報告されており、組織における線維症の進行（肺線維症など）を引き起こす可能性があり、これはＴＧＦβ１発現と相関することが示されている。同様に、ＭＤＳＣは多くの固形腫瘍（トリプルネガティブ乳癌を含む）に多く含まれ、部分的にＴＭＥの免疫抑制表現型に寄与している。従って、本開示によるＴＧＦβ１阻害剤療法などのＴＧＦβ阻害療法に対する治療応答は、ＭＤＳＣを局在化又は追跡することによってモニターし得る。検出可能なＭＤＳＣの減少又は低頻度は、一般的に、治療的利益又は良好な予後を示す。

【０７７２】

従って、本開示は、ＴＧＦβ１関連疾患又は病態を治療するための方法であって、以下の工程を含み得る方法も含む：ｉ）ＴＧＦβ１関連疾患又は病態と診断された患者を選択する工程；及びｉｉ）疾患又は病態を治療するのに有効な量で、本明細書に包含される抗体又はその断片をその患者に投与する工程。いくつかの実施形態では、選択工程（ｉ）は、疾患マーカ（例えば、本明細書に記載の線維症又は癌のマーカ）の検出を含み、任意選択で、検出は生検分析、血清マーカ分析、及び／又はインビボイメージングを含む。いくつかの実施形態では、選択工程（ｉ）は、本明細書に記載のインビボイメージング技術を含む。

【０７７３】

本開示は、癌を治療するための方法であって、以下の工程を含み得る方法も含む：ｉ）固形腫瘍を含む癌と診断された患者を選択する工程であって、固形腫瘍は免疫排除腫瘍で

あるか、又は免疫排除腫瘍である疑いのある、工程；及びｉｉ）癌を治療するのに有効な量で、本明細書に包含される抗体又はその断片をその患者に投与する工程。好ましくは、患者は、免疫チェックポイント阻害療法（例えば、ＰＤ－（Ｌ）１抗体）、化学療法、放射線療法、遺伝子操作免疫細胞療法及び癌ワクチン療法などの癌治療を受けているか、又は受ける候補である。いくつかの実施形態では、選択工程（ｉ）は、免疫細胞又はその１つ若しくは複数のマーカの検出を含み、任意選択で、検出は、腫瘍生検分析、血清マーカ分析、及び／又はインビボイメージングを含む。いくつかの実施形態では、選択工程（ｉ）は、本明細書に記載のインビボイメージング技術を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、本明細書に記載される治療応答をモニターする工程をさらに含む。特定の実施形態では、Ｇ－ＭＤＳＣ及びＭ－ＭＤＳＣなどの循環ＭＤＳＣが、治療有効量のＴＧＦβ阻害剤、例えば本明細書に記載のＴＧＦβ１阻害剤を、治療効果の指標及び／又は応答の予測因子として投与する前及び後（例えば、１～７日又は１～１０週間前又は後）に測定される。

【０７７４】

いくつかの実施形態では、インビボイメージングは、対象におけるＴＧＦβ１阻害療法に対する治療応答をモニターするために実施される。インビボイメージングは、本明細書に記載のイメージング技術のいずれか１つを含むことができ、本明細書に記載のマーカ及び／又はパラメータのいずれか１つを測定することができる。癌の場合、治療応答は、免疫排除腫瘍の炎症性腫瘍への転換（腫瘍への免疫細胞浸潤の増加と相関する）、腫瘍サイズの減少、及び／又は疾患進行の減少を含み得る。免疫細胞浸潤の増加は、腫瘍内免疫細胞頻度又は放射標識及び蛍光などの検出シグナルの程度の増大によって可視化され得る。

【０７７５】

いくつかの実施形態では、患者を診断、選択、治療、又はモニターするために使用されるインビボイメージングは、Ｇ－ＭＤＳＣ（ＰＭＮ－ＭＤＳＣとしても知られる）及びＭ－ＭＤＳＣなどのＭＤＳＣトラッキングを含む。例えば、ＭＤＳＣは、ベースラインの疾患部位（線維性組織及び固形腫瘍など）に多く含まれ得る。治療（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤療法）時、標識（放射性同位体及び蛍光など）の強度の低下によって測定されるＭＤＳＣの低下が観察され得、それは治療効果を示す。いくつかの実施形態では、循環Ｇ－ＭＤＳＣ及びＭ－ＭＤＳＣを含む循環ＭＤＳＣは、ＴＧＦβ阻害剤、例えばＡｂ６を受けている対象の血液又は血液成分中で検出され得る。

【０７７６】

特定の実施形態では、ＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）で治療された対象における有効性及び／又は治療応答を決定するのに有用なアッセイとしては、循環ＭＤＳＣ（例えば、Ｇ－ＭＤＳＣ及びＭ－ＭＤＳＣ）のレベルを測定するための当技術分野で知られた特定の免疫細胞マーカ（例えば、フローサイトメトリー）の免疫組織化学的分析又は免疫蛍光分析が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ヒトＧ－ＭＤＳＣは、表面マーカＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１５及びＣＤ６６ｂの発現によって同定され得る。いくつかの実施形態では、ヒトＧ－ＭＤＳＣは、ＨＬＡ－ＤＲ、ＬＯＸ－１及び／又はアルギナーゼも発現し得る。いくつかの実施形態では、Ｍ－ＭＤＳＣは、表面マーカＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３及びＣＤ１４の発現によって同定され得る。いくつかの実施形態では、Ｍ－ＭＤＳＣは、ＨＬＡ－ＤＲも発現し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に包含されるものなどのＴＧＦβ阻害剤は、それを必要とする患者への投与後、循環ＭＤＳＣの減少を検出するために使用され得るが、他の循環単球レベルの検出には使用されない。

【０７７７】

いくつかの実施形態では、インビボイメージングは、ＬＲＲＣ３３陽性細胞のトラッキング又は局在化を含む。ＬＲＲＣ３３陽性細胞には、例えば、ＭＤＳＣ及び活性化Ｍ２様マクロファージ（例えば、ＴＡＭ及び線維組織に関連する活性化マクロファージ）が含まれる。例えば、ＬＲＲＣ３３陽性細胞は、ベースラインの疾患部位（固形腫瘍など）に多く含まれ得る。治療（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤療法）時、標識（放射性同位体及び蛍光

など）の強度の低下によって測定される細胞表面ＬＲＲＣ３３を発現する細胞の減少が観察され得、それは治療効果を示す。

【０７７８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるインビボイメージング技術は、目的の細胞を検出するために、ＰＥＴ－ＳＰＥＣＴ、ＭＲＩ、及び／又は光学的蛍光／生物発光の使用を含み得る。

【０７７９】

いくつかの実施形態では、検出部分による抗体又は抗体様分子の標識は、直接標識又は間接標識を含み得る。

【０７８０】

いくつかの実施形態では、検出部分はトレーサーであり得る。いくつかの実施形態では、トレーサーは放射性同位体であり得、任意選択で、放射性同位体は陽電子放出同位体であり得る。いくつかの実施形態では、放射性同位体は、１８Ｆ、１１Ｃ、１３Ｎ、１５Ｏ、６８Ｇａ、１７７Ｌｕ、１８Ｆ及び８９Ｚｒからなる群から選択される。

【０７８１】

従って、そのような方法は、免疫－ＰＥＴにおける標識抗体の使用によるインビボイメージングを実施するために使用され得る。

【０７８２】

従って、本開示は、対象におけるＴＧＦβ１適応症を治療するための方法も含み、この方法は、イメージング技術を使用して、診断、患者選択、及び／又は治療効果をモニターする工程を含む。いくつかの実施形態では、本開示によるアイソフォーム選択的ＴＧＦβ１阻害剤などのＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１適応症の治療に使用され、その治療は、適応症の治療に有効な量のＴＧＦβ阻害剤（例えば、Ａｂ６）を投与することを含み、さらに、インビボイメージングによって対象における治療効果をモニターする工程を含む。任意選択で、対象は、インビボイメージングを含む診断又は選択工程により、ＴＧＦβ阻害剤療法（例えば、ＴＧＦβ１阻害剤療法）を受ける候補として選択され得る。ＴＧＦβ１適応症は、増殖性疾患（固形腫瘍を伴う癌及び骨髄線維症など）であり得る。

【０７８３】

いくつかの実施形態では、対象は癌を有し、この方法は、以下の工程を含む：ｉ）固形腫瘍を含む癌と診断された患者を選択する工程であって、固形腫瘍は免疫排除腫瘍であるか、又は免疫排除腫瘍である疑いのある、工程；及びｉｉ）その患者に、本明細書に包含される抗体又は断片を、癌を治療するのに有効な量で投与する工程。好ましくは、患者は、免疫チェックポイント阻害療法（例えば、ＰＤ－（Ｌ）１抗体）、化学療法、放射線療法、遺伝子操作免疫細胞療法及び癌ワクチン療法などの癌治療を受けているか、又は受ける候補である。いくつかの実施形態では、選択工程（ｉ）は、免疫細胞又はその１つ若しくは複数のマーカの検出を含み、任意選択で、検出は、腫瘍生検分析、血清マーカ分析、及び／又はインビボイメージングを含む。いくつかの実施形態では、選択工程（ｉ）は、本明細書に記載のインビボイメージング技術を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、本明細書に記載される治療応答をモニターする工程をさらに含む。

【０７８４】

ＴＧＦβ活性化を測定するための細胞ベースのアッセイ

ＴＧＦβの活性化（及び抗体などのＴＧＦβ試験阻害剤によるその阻害）は、当技術分野で知られる任意の好適な方法によって測定することができる。例えば、インテグリンを介したＴＧＦβの活性化は本明細書においてより詳細に記載される「ＣＡＧＡ１２」レポーター（例えば、ルシフェラーゼ）アッセイなどの細胞ベースの効力アッセイに利用することができる。示すように、このようなアッセイ系は以下の成分を含み得る：ｉ）ＴＧＦβの供給源（組換え、内因性又はトランスフェクト）；ｉｉ）インテグリンなどの活性化因子の供給源（組換え、内因性、又はトランスフェクト）；及びｉｉｉ）ＴＧＦβに応答し、シグナルを可読出力（例えば、ＣＡＧＡ１２細胞又は他のレポーター細胞株におけるルシフェラーゼ活性）に翻訳することができるＴＧＦβ受容体を発現する細胞など、ＴＧ

Ｆβ活性化に応答する受容体系。いくつかの実施形態では、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）の制御下にレポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子）を含む。いくつかの実施形態では、感受性を付与する特定のプロモーターエレメントをレポーター系に組み込むことができる。いくつかの実施形態では、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。アッセイに使用することができるレポーター細胞株は、例えば、Ａｂｅ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９４）Ａｎａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．２１６（２）：２７６－８４に記載されており、この文献は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、前述のアッセイ成分のそれぞれは、同じ供給源（例えば、同じ細胞）から提供される。いくつかの実施形態では、前述のアッセイ成分の２つは、同じ供給源から提供され、第３のアッセイ成分は異なる供給源から提供される。いくつかの実施形態では、３つのアッセイ成分は全て異なる供給源から提供される。例えば、いくつかの実施形態では、インテグリン及び潜在型ＴＧＦβ複合体（ｐｒｏＴＧＦβ及び提示分子）は同じ供給源（例えば、同じ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。いくつかの実施形態では、インテグリン及びＴＧＦは、別々の供給源（例えば、２つの異なる細胞株、精製インテグリンとトランスフェクト細胞との組み合わせ）からアッセイのために提供される。細胞が１つ以上のアッセイ成分の供給源として使用される場合、そのようなアッセイ成分は、細胞に対して内因性であえるか、細胞において安定に発現されるか、一過性にトランスフェクトされるか、又はそれらの任意の組み合わせであり得る。

【０７８５】

当業者は、このようなアッセイを様々な好適な構成に容易に適合させることができるであろう。例えば、ＴＧＦβの様々な供給源が考えられ得る。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβの供給源は、ＴＧＦβを発現し沈着させる細胞（例えば、初代細胞、増殖細胞、不死化細胞又は細胞株など）である。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβの供給源は、好適な手段を使用してアッセイ系に固定化された精製及び／又は組換えＴＧＦβである。いくつかの実施形態では、アッセイ系に固定化されたＴＧＦβは、脱細胞化の有無にかかわらず、線維芽細胞由来ＴＧＦβを模倣する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る。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβは、アッセイに使用される細胞の細胞表面に提示される。さらに、好適な潜在型ＴＧＦβ複合体を提供するために、選択される提示分子をアッセイ系に含めることができる。当業者は、どの提示分子が特定の細胞又は細胞型に存在又は発現され得るかを容易に決定することができる。このようなアッセイ系を使用して、試験薬剤（抗体など）の存在下又は非存在下でのＴＧＦβ活性化の相対的変化を容易に測定して、インビトロでのＴＧＦβ活性化に対する試験薬剤の効果を評価することができる。例示的な細胞ベースのアッセイからのデータは、以下の実施例のセクションにおいて提供する。

【０７８６】

そのような細胞ベースのアッセイは、研究されているＴＧＦβアイソフォーム、潜在型複合体のタイプ（例えば、提示分子）などに応じて、多くの方法で変更又は調整することができる。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβを活性化することができるインテグリンを発現することが知られている細胞を、アッセイにおいてインテグリンの供給源として使用することができる。そのような細胞としては、ＳＷ４８０／β６細胞（例えば、クローン１Ｅ７）が含まれる。いくつかの実施形態では、インテグリン発現細胞は、目的の提示分子（例えば、ＧＡＲＰ、ＬＲＲＣ３３、ＬＴＢＰ（例えば、ＬＴＢＰ１又はＬＴＢＰ３）など）をコードするプラスミド、及び目的のＴＧＦβアイソフォームのｐｒｏ型（例えば、ｐｒｏＴＧＦβ１）をコードするプラスミドで同時トランスフェクトされ得る。トランスフェクション後、細胞を、トランスフェクトされた遺伝子を発現させるのに十分な時間（例えば、約２４時間）インキュベートし、細胞を洗浄し、試験薬剤（例えば、抗体）の連続希釈物と共にインキュベートする。次いで、レポーター細胞株（例えば、ＣＡＧＡ１２細胞）をアッセイ系に添加した後、適切なインキュベーション時間をかけてＴＧＦβシグナル伝達を可能にする。試験薬剤の添加後のインキュベーション期間（例えば、約１８

～２０時間）後、シグナル／読み出し（例えば、ルシフェラーゼ活性）を、好適な手段を用いて検出する（例えば、ルシフェラーゼ発現レポーター細胞株では、Ｂｒｉｇｈｔ－Ｇｌｏ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用することができる）。いくつかの実施形態では、ルシフェラーゼ蛍光は、Ｂｉｏ　Ｔｅｋ（Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｈ１）プレートリーダーを使用し、オートゲインを設定して、検出され得る。

【０７８７】

データは、本開示の例示的な抗体が状況に依存しない方法でＴＧＦβ１の活性化を選択的に阻害することができることを示す。

【０７８８】

核酸

いくつかの実施形態では、本開示の抗体、その抗原結合部分及び／又は組成物は、核酸分子によってコードされ得る。このような核酸分子としては、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、プラスミドなどが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本開示は、本開示の化合物及び／又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又は生成された細胞を含み得る。いくつかの例では、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成する方法は、当技術分野で知られており、米国特許第５，７８６，４６４号明細書及び同６，１１４，１４８号明細書（これらの各文献の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている方法を挙げ得るが、これらに限定されない。

【０７８９】

特定の実施形態のリスト

本開示の非限定的な実施形態を以下に列挙する：

１．溶液平衡滴定ベースのアッセイによる測定で≦１０ｎＭ、任意選択で≦５ｎＭのＫＤで以下の抗原複合体：

ｉ）ｈＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１；

ｉｉ）ｈＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１；

ｉｉｉ）ｈＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１；及び

ｉｖ）ｈＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１

のそれぞれに結合する抗体又はその抗原結合断片であって、完全ヒト抗体若しくはヒト化抗体又はその断片である、抗体又はその断片。

２．ｉ）ｈＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１及びｉｉ）ｈＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体のそれぞれに、溶液平衡滴定ベースのアッセイによる測定で≦５ｎＭのＫＤで結合する、実施形態１に記載の抗体又は抗原結合断片であって、任意選択で、溶液平衡滴定ベースのアッセイによる測定で≦１ｎＭのＫＤで複合体のそれぞれに結合する、抗体又は断片。

３．溶液平衡滴定ベースのアッセイによる測定で≦２００ｐＭ、任意選択で≦１００ｐＭのＫＤで以下の抗原複合体：

ｉ）ｈＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１；

ｉｉ）ｈＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１；

ｉｉｉ）ｈＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１；及び

ｉｖ）ｈＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１

のそれぞれに結合する抗体又はその抗原結合断片であって、完全ヒト抗体若しくはヒト化抗体又はその断片である、抗体又はその断片。

４．ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２及びＣＤＲ－Ｌ３を含み、

ＣＤＲ－Ｈ１は、ＦＴＦ（X_1）（X_2）（X_3）（X_4）Ｍ（X_5）によって表されるアミノ酸配列（ここで、任意選択で、X_1はＳ、Ｇ若しくはＡであり；X_2はＳ若しくはＦであり；X_3はＦ若しくはＹであり；X_4はＳ若しくはＡであり；且つ／又はX_5はＤ、Ｎ若しくはＹである）（配列番号１１６）を有し；

ＣＤＲ－Ｈ２は、ＹＩ（Ｘ$_1$）（Ｘ$_2$）（Ｘ$_3$）Ａ（Ｘ$_4$）ＴＩＹＹＡ（Ｘ$_5$）ＳＶＫＧによって表されるアミノ酸配列（ここで、任意選択で、Ｘ$_1$はＳ若しくはＨであり；Ｘ$_2$はＰ若しくはＳであり；Ｘ$_3$はＳ若しくはＤであり；Ｘ$_4$はＤ若しくはＳであり；且つ／又はＸ$_5$はＤ若しくはＧである）（配列番号１１７）を有し；

ＣＤＲ－Ｈ３は、（Ｘ$_1$）Ｒ（Ｘ$_2$）（Ｘ$_3$）（Ｘ$_4$）Ｄ（Ｘ$_5$）ＧＤＭＬ（Ｘ$_6$）Ｐによって表されるアミノ酸配列（ここで、任意選択で、Ｘ$_1$はＡ若しくはＶであり；Ｘ$_2$はＧ若しくはＡであり；Ｘ$_3$はＶ若しくはＴであり；Ｘ$_4$はＬ若しくはＷであり；Ｘ$_5$はＹ若しくはＭであり；且つ／又はＸ$_6$はＭ若しくはＤである）（配列番号１１８）を有し；

ＣＤＲ－Ｌ１は、アミノ酸配列ＱＡＳＱＤＩＴＮＹＬＮ（配列番号７８）（任意選択で、１又は２つのアミノ酸変化を有する）を有し；

ＣＤＲ－Ｌ２は、アミノ酸配列ＤＡＳＮＬＥＴ（配列番号７９）（任意選択で、１又は２つのアミノ酸変化を有する）を有し；及び

ＣＤＲ－Ｌ３は、アミノ酸配列ＱＱＡＤＮＨＰＰＷＴ（配列番号６）（任意選択で、１又は２つのアミノ酸変化を有する）を有する、実施形態１～３のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合断片。

５．ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２及びＣＤＲ－Ｌ３を含み、

ＣＤＲ－Ｈ１は、アミノ酸配列ＦＴＦＳＳＦＳＭＤ（配列番号８０）（任意選択で、４つまでのアミノ酸変化又は２つまでのアミノ酸変化を有する）を有し；

ＣＤＲ－Ｈ２は、アミノ酸配列ＹＩＳＰＳＡＤＴＩＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号７６）（任意選択で、４つまでのアミノ酸変化を有する）を有し；

ＣＤＲ－Ｈ３は、アミノ酸配列ＡＲＧＶＬＤＹＧＤＭＬＭＰ（配列番号３）（任意選択で、３つまでのアミノ酸変化を有する）を有し；

ＣＤＲ－Ｌ１は、アミノ酸配列ＱＡＳＱＤＩＴＮＹＬＮ（配列番号７８）（任意選択で、１又は２つのアミノ酸変化を有する）を有し；

ＣＤＲ－Ｌ２は、アミノ酸配列ＤＡＳＮＬＥＴ（配列番号７９）（任意選択で、１又は２つのアミノ酸変化を有する）を有し；及び

ＣＤＲ－Ｌ３は、アミノ酸配列ＱＱＡＤＮＨＰＰＷＴ（配列番号６）（任意選択で、１又は２つのアミノ酸変化を有する）を有する、実施形態１～４のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合断片。

６．ＣＤＲ－Ｈ１はＧＦＴＦＳＳＦＳ（配列番号１）を含み；ＣＤＲ－Ｈ２はＩＳＰＳＡＤＴＩ（配列番号２）を含み；ＣＤＲ－Ｈ３はＡＲＧＶＬＤＹＧＤＭＬＭＰ（配列番号３）を含み；ＣＤＲ－Ｌ１はＱＤＩＴＮＹ（配列番号４）を含み；ＣＤＲ－Ｌ２はＤＡＳ（配列番号５）を含み；且つＣＤＲ－Ｌ３はＱＱＡＤＮＨＰＰＷＴ（配列番号６）を含む、実施形態１～５のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合断片。

７．潜在型ラッソの１つ又は複数のアミノ酸残基を含むエピトープに結合し、任意選択で、エピトープはコンビナトリアルエピトープであり、さらに任意選択で、コンビナトリアルエピトープは、成長因子ドメインのフィンガー１及び／又はフィンガー２の１つ以上のアミノ酸残基を含む、実施形態１～６のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合断片。

８．エピトープは、ＫＬＲＬＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬＰＥＡＶＬ（配列番号１４２）の１つ以上のアミノ酸残基を含み、任意選択で、エピトープは、ＲＫＤＬＧＷＫＷＩＨＥＰＫＧＹＨＡＮＦ（配列番号１３８）及び／又はＶＧＲＫＰＫＶＥＱＬ（配列番号１４１）の１つ以上のアミノ酸残基をさらに含む、実施形態７に記載の抗体又は抗原結合断片。

９．エピトープは、ＫＬＲＬＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬＰＥＡＶＬ（配列番号１４２）の１つ以上のアミノ酸残基及びＲＫＤＬＧＷＫＷＩＨＥＰＫＧＹＨＡＮＦ（配列番号１３８）の１つ以上のアミノ酸残基を含む、実施形態８に記載の抗体又は抗原結合断片。

１０．エピトープは、ＫＬＲＬＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬＰＥＡＶＬ（配列番号１４２）の１つ以上のアミノ酸残基及びＶＧＲＫＰＫＶＥＱＬ（配列番号１４１）の１つ以

上のアミノ酸残基を含む、実施形態８に記載の抗体又は抗原結合断片。
１１．エピトープは、ＫＬＲＬＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬＰＥＡＶＬ（配列番号１４２）の１つ以上のアミノ酸残基、ＲＫＤＬＧＷＫＷＩＨＥＰＫＧＹＨＡＮＦ（配列番号１３８）の１つ以上のアミノ酸残基及びＶＧＲＫＰＫＶＥＱＬ（配列番号１４１）の１つ以上のアミノ酸残基を含む、実施形態７に記載の抗体又は抗原結合断片。
１２．完全ヒト抗体若しくはヒト化抗体又はその抗原結合断片である、実施形態１～１１のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合断片。
１３．ヒト及びマウスのｐｒｏＴＧＦβ１複合体と交差反応する、実施形態１～１２のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合断片。
１４．ヒトＩｇＧ４又はＩｇＧ１サブタイプである、実施形態１～１３のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合断片。
１５．ＩｇＧ１様ヒンジを生成するＳｅｒからＰｒｏへの骨格置換を含む、実施形態１～１４のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合断片。
１６．細胞ベースのレポーターアッセイによる測定で、以下の複合体：
ｉ）ｈＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１；
ｉｉ）ｈＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１；
ｉｉｉ）ｈＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１；及び
ｉｖ）ｈＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１
のそれぞれに対して≦２ｎＭのＩＣ５０を有する、実施形態１～１５のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合断片。
１７．バイオレイヤー干渉法又は表面プラズモン共鳴による測定で≦１ｎＭの親和性で以下の抗原：
ａ）ヒトＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体；
ｂ）ヒトＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体；
ｃ）ヒトＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体；及び
ｄ）ヒトＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体
のそれぞれに特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその断片であって、
モノクローナル抗体は、他の複合体よりも上記複合体のいずれか１つに対して３倍以下の親和性バイアスを示し、
モノクローナル抗体は、ｐｒｏＴＧＦβ１複合体のそれぞれからの成熟ＴＧＦβ１成長因子の放出を阻害するが、ｐｒｏＴＧＦβ２複合体からの放出もｐｒｏＴＧＦβ３複合体からの放出も阻害しない、単離されたモノクローナル抗体又はその断片。
１８．アミノ酸配列ＰＧＰＬＰＥＡＶ（配列番号１３４）又はその一部を有する結合領域でｐｒｏＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体又はその断片であって、
溶液中のｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合すると、水素－重水素交換質量分析（ＨＤＸ－ＭＳ）によって決定されるように、抗体又は断片が溶媒曝露から結合領域を保護することを特徴とし、
バイオレイヤー干渉法又は表面プラズモン共鳴による測定で≦５ｎＭの親和性で以下の複合体：ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１のそれぞれに特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその断片。
１９．アミノ酸配列ＬＶＫＲＫＲＩＥＡ（配列番号１３２）又はその一部を有する結合領域でｐｒｏＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体又はその断片であって、
溶液中のｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合すると、水素－重水素交換質量分析（ＨＤＸ－ＭＳ）によって決定されるように、抗体又は断片が溶媒曝露から結合領域を保護することを特徴とし、
バイオレイヤー干渉法又は表面プラズモン共鳴による測定で≦５ｎＭの親和性で以下の複合体：ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＧＡＲＰ－ｐ

ｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１のそれぞれに特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその断片。

２０．ｉ）潜在型ラッソの少なくとも一部を含む第１の結合領域（配列番号１２６）；及び

ｉｉ）フィンガー１の少なくとも一部を含む第２の結合領域（配列番号１２４）

でｐｒｏＴＧＦβ１複合体に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体又はその断片であって、

溶液中のｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合すると、水素－重水素交換質量分析（ＨＤＸ－ＭＳ）によって決定されるように、抗体又は断片が溶媒曝露から結合領域を保護することを特徴とする、単離されたモノクローナル抗体又はその断片。

２１．第１の結合領域はＰＧＰＬＰＥＡＶ（配列番号１３４）又はその一部を含み、第２の結合領域はＲＫＤＬＧＷＫＷ（配列番号１４３）又はその一部を含む、実施形態４５に記載の抗体又は断片。

２２．抗体は、バイオレイヤー干渉法又は表面プラズモン共鳴による測定で５倍未満の親和性バイアスで、マトリックス関連のｐｒｏＴＧＦβ１複合体及び細胞関連のｐｒｏＴＧＦｂ１複合体に結合するような状況非依存的抗体である、実施形態１～２１のいずれか１つに記載の抗体又は断片。

２３．以下の複合体：ｍＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｍＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｍＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びｍＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１のそれぞれに≦１ｎＭの親和性で特異的に結合する、実施形態４３～４７のいずれか１つに記載の抗体又は断片。

２４．ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に、以下の結合領域又はその一部：

ＬＶＫＲＫＲＩＥＡ（配列番号１３２）；

ＬＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬ（配列番号１２６）；

ＰＧＰＬＰＥＡＶ（配列番号１３４）；

ＬＡＬＹＮＳＴＲ（配列番号１３５）；

ＲＥＡＶＰＥＰＶＬ（配列番号１３６）；

ＹＱＫＹＳＮＮＳＷＲ（配列番号１３７）；

ＲＫＤＬＧＷＫＷＩＨＥ（配列番号１４４）；

ＨＥＰＫＧＹＨＡＮＦ（配列番号１４５）；

ＬＧＰＣＰＹＩＷＳ（配列番号１３９）；

ＡＬＥＰＬＰＩＶ（配列番号１４０）；及び

ＶＧＲＫＰＫＶＥＱＬ（配列番号１４１）

の１つ以上で結合する、実施形態１～２３のいずれか１つに記載の抗体又は断片。

２５．ＧＦＴＦＳＳＦＳ（配列番号１）

ＩＳＰＳＡＤＴＩ（配列番号２）

ＡＲＧＶＬＤＹＧＤＭＬＭＰ（配列番号３）

ＱＤＩＴＮＹ（配列番号４）

ＤＡＳ及び（配列番号５）

ＱＱＡＤＮＨＰＰＷＴ（配列番号６）

からなる群から選択されるＣＤＲ配列を有する、実施形態１～２４のいずれか１つに記載の抗体又は断片。

２６．全てのＣＤＲを含む、実施形態２５に記載の抗体。

２７．以下の抗原：

ｈＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１

ｈＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１

ｈＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１、及び

ｈＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１

のそれぞれに結合する抗体又はその抗原結合断片であって、

溶液平衡滴定ベースのアッセイによる測定で≦１ｎＭのK_DでｈＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴ

ＧＦβ１及びｈＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１のそれぞれに結合し、
ＬＲＬＡＳＰＰＳＱＧＥＶＰＰＧＰＬＰＥＡＶ（配列番号１４６）の１つ又は複数のアミノ酸残基を含むエピトープに結合し、任意選択で、エピトープは、ＲＫＤＬＧＷＫＷＩＨＥＰＫＧＹＨＡＮＦ（配列番号１３８）の１つ又は複数のアミノ酸残基をさらに含む、抗体又は断片。
２８．≦１ｎＭの親和性でＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１のそれぞれに結合し、
細胞関連ｐｒｏＴＧＦβ１複合体よりも少なくとも１０倍高い親和性でマトリックス関連ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合する、実施形態１～２７のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合断片。
２９．インビトロ結合ＩＣ$_{50}$は≦５ｎＭであり、任意選択で、ＩＣ$_{50}$は≦１ｎＭである、実施形態１～２８のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合断片。
３０．ＴＧＦβ１のインテグリン依存性活性化を阻害することができる、実施形態１～２９のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合断片。
３１．ＴＧＦβ１のプロテアーゼ依存性活性化を阻害することができる、実施形態１～３０のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合断片。
３２．ＴＧＦβ１のインテグリン依存性活性化及びＴＧＦβ１のプロテアーゼ依存性活性化を阻害することができる、実施形態１～３１のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合断片。
３３．ｐｒｏＴＧＦβ２又はｐｒｏＴＧＦβ３に特異的に結合しない、実施形態１～３２のいずれか１つに記載の抗体又はその断片。
３４．ｐｒｏＴＧＦβ１複合体と結合していない遊離ＴＧＦβ１増殖因子と特異的に結合しない、実施形態１～３３のいずれか１つに記載の抗体又はその断片。
３５．実施形態１～３３のいずれか１つに記載の抗体又は断片とクロスブロックする、抗体又はその抗原結合断片。
３６．実施形態１～３４のいずれか１つに記載の抗体又は断片を含むキット。
３７．実施形態１～３５のいずれか１つに記載の抗体又は断片及び薬学的に許容される賦形剤を含む組成物。
３８．対象におけるＴＧＦβ関連適応症の治療に使用するための、実施形態３７に記載の組成物。
３９．ＴＧＦβ関連適応症は、癌、骨髄線維症、幹細胞障害及び／又は線維性障害である、実施形態３８に記載の使用のための組成物。
４０．ＴＧＦβ関連適応症は、以下から選択される、実施形態３８に記載の使用のための組成物：
ｉ）ＴＧＦβ１が過剰発現するか、又はＴＧＦβ１シグナル伝達が調節不全である疾患；
ｉｉ）任意選択で、
ａ）幹細胞／前駆細胞の分化／再構成が疾患に起因して停止若しくは攪乱されるか、又は治療／媒介の副作用として誘導される；
ｂ）患者が健康な細胞を死滅又は枯渇させる治療又は媒介を受けている；
ｃ）患者が幹細胞／前駆細胞の分化／再構成が増大することによって利益を受ける可能性がある；
ｄ）疾患が幹細胞の分化／再構成の異常に関連している
幹細胞の異常な分化又は再増殖に関連する疾患；
ｉｉｉ）治療により誘発された造血調節不全が関与する病態；
ｉｖ）セルピン１（ＰＡＩ－１をコードする）、ＭＣＰ－１（ＣＣＬ２としても知られる）、ＣＣＬ３、Ｃｏｌ１ａ１、Ｃｏｌ３ａ１、ＦＮ１、ＴＧＦＢ１、ＣＴＧＦ、ＡＣＴＡ２（α－ＳＭＡをコードする）、ＩＴＧＡ１１、ＳＮＡＩ１、ＭＭＰ２、ＭＭＰ９、ＴＩＭＰ１、ＦＯＸＰ３、ＣＤＨ１（Ｅカドヘリン）及びＣＤＨ２からなる群から選択される１つ以上の遺伝子の異常な遺伝子発現を伴う疾患；

ｖ）プロテアーゼが関与する疾患
ｖｉ）上皮間葉転換（ＥＭＴ）及び／又は内皮間葉転換（ＥｎｄＭＴ）などの間葉転換が関与する疾患；
ｖｉｉ）免疫抑制が関係する疾患であって、任意選択で、免疫抑制は疾患部位における免疫抑制細胞の増加を含み、さらに任意選択で、免疫抑制細胞はＭ２マクロファージ及び／又はＭＤＳＣである疾患；
ｖｉｉｉ）マトリックス硬化及びリモデリングを伴う疾患であって、任意選択で、ＥＣＭ硬化を含む疾患；
ｉｘ）臓器線維症、任意選択で、進行した臓器線維症
ｘ）原発性及び続発性骨髄線維症
ｘｉ）悪性腫瘍／癌
ａ）固形腫瘍、任意選択で、進行した固形腫瘍又は転移性腫瘍；
ｂ）血液癌。
４１．癌は固形腫瘍を含むか、又は癌は血液癌である、実施形態４０に記載の使用のための組成物。
４２．固形腫瘍は、癌療法に対する応答性が不良であり、任意選択で、癌療法は、チェックポイント阻害剤療法、癌ワクチン、化学療法、放射線療法、腫瘍溶解性ウイルス療法、ＩＤＯ阻害剤療法及び／又は遺伝子操作免疫細胞療法である、実施形態４１に記載の使用のための組成物。
４３．固形腫瘍は免疫排除腫瘍である、実施形態４１に記載の使用のための組成物。
４４．固形腫瘍は、Ｔｒｅｇ、腫瘍内Ｍ２マクロファージ及び／又はＭＤＳＣを含む、実施形態４１に記載の使用のための組成物。
４５．固形腫瘍は、ＣＡＦ及び／又は筋線維芽細胞を多く含む間質を含む、実施形態４１に記載の使用のための組成物。
４６．対象は、化学療法、放射線療法、ＣＡＲ－Ｔ、癌ワクチン、腫瘍溶解性ウイルス療法及びチェックポイント阻害剤療法からなる群から選択される癌療法を受けているか、又は受ける候補である、実施形態４１に記載の使用のための組成物。
４７．癌は、癌療法に対する獲得耐性又は一次耐性を特徴とする、実施形態４１に記載の使用のための組成物。
４８．癌の治療は、固形腫瘍の増殖を減少させる組成物を治療有効量投与することを含み、任意選択で、組成物の投与は、生存を増加させる、実施形態３８～４７のいずれか１つに記載の使用のための組成物。
４９．治療は、１～３０ｍｇ／ｋｇの範囲の用量で組成物を投与することを含む、実施形態３８～４８のいずれか１つに記載の使用のための組成物。
５０．ＴＧＦβ１阻害療法に応答する可能性が高い対象を選択する方法であって、
癌と診断された対象を特定する工程であって、ｉ）癌は、癌療法に対する耐性が生じやすいことが知られているタイプの癌であり、且つ／又はｉｉ）対象は、癌療法に対し耐性があり、任意選択で、対象は、癌療法に対する一次無反応者であり、任意選択で、癌療法は、化学療法、放射線療法及び／又は免疫チェックポイント阻害療法である、工程と；
ＴＧＦβ１阻害療法の候補として対象を選択する工程と
を含む方法。
５１．癌を治療する方法であって、
ｉ）固形腫瘍を含む癌と診断された患者を選択する工程であって、固形腫瘍は、免疫排除腫瘍であるか又はその疑いがある、工程と、
ｉｉ）癌を治療するのに有効な量で実施形態１～１０のいずれか１つに記載の抗体又は断片を患者に投与する工程と
を含み、
（ａ）患者は、免疫チェックポイント阻害療法（ＣＢＴ）、化学療法、放射線療法、遺伝子操作免疫細胞療法及び癌ワクチン療法からなる群から選択される癌治療を受けているか若しくは受ける候補であるか、又は（ｂ）患者は、統計的に低い一次応答率を有する癌

を有し、且つ患者はＣＢＴを受けていない、方法。
５２．免疫チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－１阻害剤又はＰＤ－Ｌ１阻害剤である、実施形態５１に記載の方法。
５３．選択工程（ｉ）は、免疫細胞又はその１つ若しくは複数のマーカの検出を含む、実施形態５２に記載の方法。
５４．検出は、腫瘍生検分析、血清マーカ分析及び／又はインビボイメージングを含む、実施形態５３に記載の方法。
５５．免疫細胞は、細胞傷害性Ｔリンパ球、制御性Ｔ細胞、ＭＤＳＣ、腫瘍関連マクロファージ、ＮＫ細胞、樹状細胞及び好中球からなる群から選択される、実施形態５３又は５４に記載の方法。
５６．免疫細胞マーカは、ＣＤ８、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１６３、ＣＤ６８、ＣＤ１４、ＣＤ３４、ＣＤ２５、ＣＤ４７からなる群から選択される、実施形態５３～５５のいずれか１つに記載の方法。
５７．インビボイメージングはＴ細胞トラッキングを含む、実施形態５４に記載の方法。
５８．インビボイメージングは、ＰＥＴ－ＳＰＥＣＴ、ＭＲＩ及び／又は光学蛍光／生物発光の使用を含む、実施形態５４又は５７に記載の方法。
５９．インビボイメージングは、免疫細胞又は免疫細胞の細胞表面マーカに結合する抗体の、直接的又は間接的標識を含む、実施形態５７又は５８に記載の方法。
６０．インビボイメージングは、トレーサーの使用を含む、実施形態５４～５９のいずれか１つに記載の方法。
６１．トレーサーは、放射性同位体である、実施形態６０に記載の方法。
６２．放射性同位体は、陽電子放出同位体である、実施形態６１に記載の方法。
６３．放射性同位体は、^{18}Ｆ、^{11}Ｃ、^{13}Ｎ、^{15}Ｏ、^{68}Ｇａ、^{177}Ｌｕ、^{18}Ｆ及び^{89}Ｚｒからなる群から選択される、実施形態６２に記載の方法。
６４．インビボイメージングは、免疫ＰＥＴにおける標識抗体の使用を含む、実施形態５４～６３のいずれか１つに記載の方法。
６５．インビボイメージングは、対象におけるＴＧＦβ１阻害療法に対する治療応答をモニターするために行われる、実施形態５４～６４のいずれか１つに記載の方法。
６６．治療応答は、免疫排除腫瘍の炎症性腫瘍への変換を含む、実施形態６５に記載の方法。
６７．治療的使用のためのＴＧＦβ１活性化のアイソフォーム選択的阻害剤を同定する方法であって、
ｉ）インビトロで、ｈＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びｈＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１のそれぞれに、溶液平衡滴定ベースのアッセイによる測定で≦１０ｎＭであるＫＤで結合することができる抗体又は抗原結合断片のプールを選択する工程と；
ｉｉ）ＴＧＦβ活性化を阻害することができる抗体又は抗原結合断片のプールを任意選択で細胞ベースのアッセイで選択する工程と；
ｉｉｉ）インビボ有効性試験で、工程ｉ）及びｉｉ）からの１つ又は複数の抗体又はその抗原結合断片を試験する工程と；
ｉｖ）インビボ毒性／安全性試験で、工程ｉ）～ｉｉｉ）からの１つ又は複数の抗体又はその抗原結合断片を試験する工程と；
ｖ）工程ｉ）～ｉｖ）からの１つ又は複数の抗体又は抗原結合断片を同定する工程であって、抗体又は断片は、インビボ毒性／安全性試験で決定されたＮＯＡＥＬ未満の、インビボ有効性試験で決定された有効用量を示す工程と
を含む方法。
６８．ＴＧＦβ１適応症の治療のための医薬の製造における、実施形態１～３５のいずれか１つに記載の抗体又は断片の使用。
６９．抗体又は断片を含む製剤の滅菌濾過の工程をさらに含む、実施形態６８に記載の

使用。
７０．バイアル又はシリンジに充填及び／又はパッケージングする工程をさらに含む、実施形態６８又は６９に記載の使用。
７１．アイソフォーム選択的ＴＧＦβ１阻害剤を含む医薬組成物の製造方法であって、
ｉ）ｈＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びｈＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１のそれぞれに、１ｎＭ以下のＫＤで結合することができる抗体を提供する工程と、
ｉｉ）工程（ｉ）の抗体を前臨床モデルに投与して有効量を決定するインビボ有効性試験を実施する工程と、
ｉｉｉ）ＴＧＦβ阻害に対して感受性があることが知られている動物モデルを用いて毒性試験を実施し、望ましくない毒性が観察される量を決定する工程と、
ｉｖ）工程（ｉｉ）及び（ｉｉｉ）に基づいて、十分な治療域を決定又は確認する工程と、
ｖ）抗体を含む医薬組成物を製造する工程と
を含む方法。
７２．ｉ）任意選択で、ＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３、ＧＡＲＰ、ＬＲＲＣ３３又はその断片の少なくとも２つを含むｐｒｏＴＧＦβ１複合体を含む抗原を提供する工程と、
ｉｉ）工程（ｉ）の抗原に結合する能力を有する抗体又は断片のプールを選択する工程と、
ｉｉｉ）任意選択で、望ましくない結合プロファイルを示す抗体又は断片をプールから除去する工程と、
ｉｖ）ＴＧＦβ１を阻害する能力を有する、工程（ｉｉ）及び／又は（ｉｉｉ）から選択される抗体又は断片のプールを選択する工程と、
ｖ）ヒト又はヒト化阻害剤を提供するために、任意選択で、工程（ｉｖ）から選択される完全ヒト若しくはヒト化抗体又は抗体断片、抗体群若しくは断片群を生成する工程と；
ｖｉ）ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１に対する親和性を決定するインビトロ結合アッセイを実施する工程と、
ｖｉｉ）ＴＧＦβ１並びに任意選択でＴＧＦβ２及び／又はＴＧＦβ３に対する阻害剤の活性を決定又は確認する機能アッセイを実施する工程と
を含む、実施形態１～３５のいずれか１つに記載の抗体又は断片を製造する方法。
７３．前臨床動物モデルにおけるインビボ有効性試験及びインビボ毒性試験で、候補抗体又はその断片を評価し、それにより有効性及び安全性又は耐容性の両方を有することが示された有効量を決定する工程をさらに含む、実施形態７２に記載の方法。
７４．医薬組成物に製剤化する工程をさらに含む、実施形態７２又は７３に記載の方法。
７５．ヒト対象の線維症の治療における治療的使用のための、実施形態７４に記載の組成物。
７６．ヒト対象の骨髄線維症の治療における治療的使用のための、実施形態７４に記載の組成物。
７７．ヒト対象の癌の治療における治療的使用のための、実施形態７４に記載の組成物。
７８．癌は、固形腫瘍を含む、実施形態７７に記載の使用のための組成物。
７９．固形腫瘍は、局所進行性固形腫瘍である、実施形態７８に記載の使用のための組成物。
８０．癌は、癌療法に対する応答性が不良であり、任意選択で、癌療法は、チェックポイント阻害剤療法、癌ワクチン、化学療法、放射線療法、ＩＤＯ阻害剤療法及び／又は遺伝子操作免疫細胞療法である、実施形態７７～７９のいずれか１つに記載の使用のための組成物。
８１．癌は、獲得耐性又は一次耐性を特徴とする、実施形態８０に記載の使用のための

組成物。
８２．腫瘍は、免疫排除を特徴とする、実施形態８１に記載の使用のための組成物。
８３．腫瘍は、腫瘍内Ｍ２マクロファージ及び／又はＭＤＳＣを含む、実施形態７８～８２のいずれか１つに記載の使用のための組成物。
８４．腫瘍は、ＣＡＦを多く含む間質を含む、実施形態７８～８２のいずれか１つに記載の使用のための組成物。
８５．対象は、化学療法、放射線療法、ＣＡＲ－Ｔ、癌ワクチン、腫瘍溶解性ウイルス療法及びチェックポイント阻害剤療法からなる群から選択される癌療法を受けているか、又は受ける候補である、実施形態８０に記載の使用のための組成物。
８６．対象は、ＴＧＦβ３阻害剤でさらに治療される、実施形態のいずれか１つに記載の使用のための組成物。
８７．対象はＴＧＦβ１陽性及びＴＧＦβ３陽性癌を有し、且つ対象はチェックポイント阻害剤療法を受けているか、又は受ける候補である、実施形態７０に記載の使用のための組成物。
８８．対象は、腫瘍の外科的切除を受ける候補ではない、実施形態７７～８４のいずれか１つに記載の使用のための組成物。
８９．ヒト対象における宿主免疫の増強に使用するための、実施形態３７に記載の組成物であって、
対象は癌を有し、
免疫応答は抗癌免疫を含む、組成物。
９０．宿主免疫の増強は、腫瘍からの免疫排除の低減又は腫瘍への免疫細胞浸潤の促進を含む、実施形態８９に記載の使用のための組成物。
９１．宿主免疫の増強は、ＴＧＦβ１のプラスミン依存性活性化の阻害を含む、実施形態８９に記載の使用のための組成物。
９２．対象は、サイトカインストームを発生するするリスクがある、実施形態３７に記載の使用のための組成物。
９３．対象は、遺伝子操作免疫細胞療法を受けているか、又は受ける候補である、実施形態３７に記載の使用のための組成物。
９４．対象は、癌ワクチンを受けているか、又は受ける候補である、実施形態３７に記載の使用のための組成物。
９５．対象は、免疫チェックポイント阻害剤療法を受けているか、又は受ける候補であり、任意選択で、対象は、免疫チェックポイント阻害剤療法に対する応答性が不良である、実施形態７６～９４のいずれか１つに記載の使用のための組成物。
９６．ヒト対象におけるサイトカイン放出症候群（例えば、サイトカインストーム又は敗血症）の予防に使用するための、実施形態３７に記載の組成物であって、任意選択で、対象は感染症又はＭＳに罹患している、組成物。
９７．対象におけるＴＧＦβ１のプラスミン依存性活性化を阻害する方法に使用するための、実施形態３７に記載の組成物。
９８．対象におけるＴＧＦβ１適応症を治療する方法であって、適応症を治療するために治療有効量のアイソフォーム選択的ＴＧＦβ１阻害剤を対象に投与する工程を含み、アイソフォーム選択的ＴＧＦβ１阻害剤は、溶液平衡滴定による測定で≦１０ｎＭのＫＤでｈＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びｈＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１のそれぞれに特異的に結合するモノクローナル抗体である、方法。
９９．抗体は、溶液平衡滴定による測定で≦１ｎＭのＫＤでｈＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１及びｈＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１のそれぞれに結合し、任意選択で、抗体は、≦１ｎＭのＫＤで、ｈＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１、ｈＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びｈＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体のそれぞれに結合する、実施形態９８に記載の方法。
１００．抗体は、潜在型ラッソ又はその一部に結合する、実施形態９８又は９９に記載

の方法。
１０１．抗体は、フィンガー１、フィンガー２又はその一部にさらに結合する、実施形態１００に記載の方法。
１０２．ＴＧＦβ１適応症は、癌及び骨髄増殖性疾患から選択される増殖性疾患である、実施形態９８～１０１のいずれか１つに記載の方法。
１０３．対象は癌療法の不良応答者であり、任意選択で、癌療法は、チェックポイント阻害療法、化学療法及び／又は放射線療法を含む、実施形態１０２に記載の方法。
１０４．対象は、アイソフォーム選択的ＴＧＦβ１阻害剤と併せて、癌療法でさらに治療される、実施形態１０２に記載の方法。
【０７９０】
本開示のさらなる非限定的な実施形態が以下に示される。
１．対象における癌を治療する方法であって、治療は、循環ＭＤＳＣレベルを低下させるのに十分な量のＴＧＦβ阻害剤を対象に投与することを含む、方法。
２．低下した循環ＭＤＳＣは、Ｇ－ＭＤＳＣである、実施形態１に記載の方法。
３．Ｇ－ＭＤＳＣは、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１５、ＬＯＸ－１、ＣＤ６６ｂ及びＨＬＡ－ＤＲˡᵒ／⁻の１つ以上を発現する、実施形態１又は２に記載の方法。
４．治療は、癌療法を投与することをさらに含む、実施形態１～３のいずれか１つに記載の方法。
５．ＴＧＦβ阻害剤及び癌療法は、併用して（例えば、同時に）、別々に又は連続して投与される、実施形態１～４のいずれか１つに記載の方法。
６．対象がＴＧＦβ阻害剤の投与後に循環ＭＤＳＣレベルの低下を有するかどうかを決定することと、ＭＤＳＣレベルが低下された場合、癌療法を投与することとを含む、実施形態４又は５に記載の方法。
７．癌療法は、チェックポイント阻害剤療法、任意選択でＰＤ－１又はＰＤ－Ｌ１を標的とする薬剤、任意選択で抗ＰＤ－１又は抗ＰＤ－Ｌ１抗体を含む、実施形態１～６のいずれか１つに記載の方法。
８．癌を有する対象における治療効果を予測する方法であって、
（ｉ）ＴＧＦβ阻害剤を（単独で又は癌療法と組み合わせて）投与する前に、対象における循環ＭＤＳＣレベルを決定することと；
（ｉｉ）治療有効量のＴＧＦβ阻害剤を（単独で又は癌療法と組み合わせて）対象に投与することと；
ｉｉｉ）投与後に対象における循環ＭＤＳＣレベルを決定することと
を含み、投与前の循環ＭＤＳＣレベルと比較した投与後の循環ＭＤＳＣレベルの低下は、薬理学的効果を予測する、方法。
９．対象における癌を治療する方法であって、
（ｉ）ＴＧＦβ阻害剤を投与する前に、対象における循環ＭＤＳＣレベルを決定する工程；
（ｉｉ）第１の治療有効用量のＴＧＦβ阻害剤を対象に投与する工程；
（ｉｉｉ）ＴＧＦβ阻害剤を投与した後、対象における循環ＭＤＳＣレベルを決定する工程；
（ｉｖ）第１の治療有効用量のＴＧＦβ阻害剤を投与した後に測定された循環ＭＤＳＣレベルが、第１の治療有効用量のＴＧＦβ１阻害剤を投与する前に測定された循環ＭＤＳＣレベルと比較して低下される場合、第２の治療有効用量のＴＧＦβ阻害剤を対象に投与する工程
を含む方法。
１０．ＴＧＦβ阻害剤と併用して（例えば、同時に）、別々に又は連続してチェックポイント阻害剤療法を投与することを含む、実施形態８又は実施形態９に記載の方法。
１１．対象における癌を治療する方法であって、
（ｉ）治療有効量のＴＧＦβ阻害剤及び治療有効量のチェックポイント阻害剤療法を含む組合せ療法を投与する前に、対象における循環ＭＤＳＣレベルを決定する工程；

（ｉｉ）組合せ療法を対象に投与する工程；
（ｉｉｉ）組合せ療法を投与した後、対象における循環ＭＤＳＣレベルを決定する工程；
（ｉｖ）第１の治療有効用量の組合せ療法を投与した後に測定された循環ＭＤＳＣレベルが、第１の治療有効用量を投与する前に測定された循環ＭＤＳＣレベルと比較して低下される場合、組合せ療法を継続する工程
を含む方法。
１２．組合せ療法は、チェックポイント阻害剤療法と併用して（例えば、同時に）、別々に又は連続してＴＧＦβ阻害剤を投与することを含む、実施形態１１に記載の方法。
１３．ヒト対象における進行癌を治療する方法であって、
ｉ）チェックポイント阻害剤療法に対する一次耐性を有する局所進行腫瘍及び／又は転移性癌を含む進行癌に罹患した対象を選択する工程と、
ｉｉ）ＴＧＦβ阻害剤を投与する工程と；
ｉｉ）チェックポイント阻害剤療法を対象に投与する工程と
を含む方法。
１４　チェックポイント阻害剤療法は、ＴＧＦβ阻害剤と併用して（例えば、同時に）、別々に又は連続して投与される、実施形態１３に記載の方法。
１５．ヒト対象における進行癌を治療するための方法であって、
ｉ）ＣＰＩ療法に対する一次耐性を有する局所進行腫瘍及び／又は転移性癌を含む進行癌に罹患した対象を選択する工程であって、対象は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤又はＴＧＦβ３を阻害しないＴＧＦβ阻害剤であるＴＧＦβ阻害剤を投与されている、工程と；
ｉｉ）任意選択で、ＴＧＦβ阻害剤と共にＣＰＩ療法を対象に投与する工程と
を含む方法。
１６　治療を投与する前及び投与した後に循環ＭＤＳＣレベルのレベルを測定することをさらに含み、循環ＭＤＳＣレベルの低下は、治療反応を示す、実施形態１３～１５のいずれか１つに記載の方法。
１７．循環ＭＤＳＣレベルの低下が決定される場合、治療を継続することをさらに含む、実施形態１６に記載の方法。
１８．低下した循環ＭＤＳＣは、Ｇ－ＭＤＳＣである、実施形態８～１７のいずれか１つに記載の方法。
１９．Ｇ－ＭＤＳＣは、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１５、ＬＯＸ－１、ＣＤ６６ｂ及びＨＬＡ－ＤＲ$^{lo/-}$の１つ以上を発現する、実施形態１８に記載の方法。
２０．循環ＭＤＳＣレベルは、対象から採取された全血又は血液成分から決定される、実施形態１～１９のいずれか１つに記載の方法。
２１　治療は、循環ＭＤＳＣレベルを少なくとも１０％だけ、任意選択で少なくとも１５％、２０％、２５％又はそれを超えて低下させる、実施形態１～２０のいずれか１つに記載の方法。
２２．ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１阻害剤、任意選択でＴＧＦβ１特異的阻害剤である、実施形態１～２１のいずれか１つに記載の方法。
２３　対象は、治療前に、健常な対象における循環ＭＤＳＣレベルより少なくとも２倍高い循環ＭＤＳＣレベルを有する、実施形態１～２１のいずれか１つに記載の方法。
２４　治療のための対象を選択する方法であって、対象は、治療前に、健常な対象における循環ＭＤＳＣレベルより少なくとも２倍高い循環ＭＤＳＣレベルを有する、方法。
２５　対象は、癌を有するか又は有する疑いがある、２４に記載の方法。
２６　治療前に、健常な対象における循環ＭＤＳＣレベルより少なくとも２倍高い循環ＭＤＳＣレベルを有する対象の癌を治療する方法であって、循環ＭＤＳＣレベルを低下させるのに十分な量のＴＧＦβ阻害剤を対象に投与することを含む方法。
２７　循環ＭＤＳＣ細胞のレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の投与後、３～６週間以内、例えば約３週間以内又は約３週間の時点で決定される、実施形態１～２６のいずれか１つに記載の方法。

２８　循環ＭＤＳＣ細胞のレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の投与後、２週間、例えば１０日以内に決定される、実施形態１～２７のいずれか１つに記載の方法。

２９．

（ｉ）治療を投与する前に対象における腫瘍関連免疫細胞のレベルを決定する工程と；

（ｉｉ）対象に治療を投与する工程と；

（ｉｉｉ）治療を投与した後に対象における腫瘍関連免疫細胞のレベルを決定する工程と

をさらに含み、投与前の腫瘍関連免疫細胞のレベルと比較した阻害剤投与後の１つ以上の腫瘍関連免疫細胞集団のレベルの変化は、治療効果を示す、実施形態１～２８のいずれか１つに記載の方法。

３０．工程（ｉｉｉ）における腫瘍関連免疫細胞のレベルの変化は、癌における免疫抑制の軽減又は好転を示す、実施形態２９に記載の方法。

３１．腫瘍関連免疫細胞は、ＣＤ８＋　Ｔ細胞及び／又は腫瘍関連マクロファージ（ＴＡＭ）を含む、実施形態２９又は３０に記載の方法。

３２．腫瘍関連免疫細胞のレベルの変化は、少なくとも１０％、任意選択で少なくとも１５％、２０％、２５％又はそれを超えるＣＤ８＋　Ｔ細胞レベルの増加を含む、実施形態２９～３１に記載の方法。

３３．腫瘍関連免疫細胞のレベルの変化は、少なくとも１０％、任意選択で少なくとも１５％、２０％、２５％又はそれを超えるＴＡＭのレベルの増加を含む、実施形態２９～３２に記載の方法。

３４．腫瘍関連免疫細胞のレベルは、免疫組織化学分析により、対象から採取されたサンプル中で決定される、実施形態２９～３３のいずれか１つに記載の方法。

３５．腫瘍関連免疫細胞のレベルは、インビボイメージングによって決定される、実施形態２９～３４のいずれか１つに記載の方法。

３６．サンプルは、腫瘍生検サンプルである、実施形態２９～３４のいずれか１つに記載の方法。

３７．１つ以上の腫瘍関連免疫細胞集団のレベルの変化が検出される場合、治療を投与することを継続することをさらに含む、実施形態２９～３６のいずれか１つに記載の方法。

３８．

（ｉ）治療を投与する前に、対象における循環潜在型ＴＧＦβのレベルを決定する工程と；

（ｉｉ）対象に治療を投与する工程と；

（ｉｉｉ）治療を投与した後、対象における循環潜在型ＴＧＦβのレベルを決定する工程と

をさらに含み、投与前の循環潜在型ＴＧＦβと比較した阻害剤投与後の循環潜在型ＴＧＦβの増加は、治療効果を示す、実施形態１～３７のいずれか１つに記載の方法。

３９．循環潜在型ＴＧＦβのレベルの変化が検出される場合、治療を投与することを継続することをさらに含む、実施形態３８に記載の方法。

４０　循環潜在型ＴＧＦβのレベルは、対象から得られたサンプル中で決定される、３８又は３９に記載の方法。

４１　サンプルは、全血サンプル又は血液成分である、４０に記載の方法。

４２　循環潜在型ＴＧＦβは、循環潜在型ＴＧＦβ１である、実施形態３９～４１のいずれか１つに記載の方法。

４３．癌を治療する方法であって、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）、インターロイキン２（ＩＬ－２）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）、インターロイキン１β（ＩＬ－１β）及びケモカインＣ－Ｃモチーフリガンド２（ＣＣＬ２）／単球走化性タンパク質１（ＭＣＰ－１）から選択される１つ以上のサイトカインの有意な放出を引き起こさない治療有効量のＴＧＦβ阻害剤を対象に投与することを含む方法。

４４．ＴＧＦβ阻害剤が患者において忍容性があるかどうかを確認するための方法であって、細胞培養物又は流体サンプルをＴＧＦβ阻害剤と接触させることと、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）、インターロイキン２（ＩＬ－２）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）、インターロイキン１β（ＩＬ－１β）及びケモカインＣ－Ｃモチーフリガンド２（ＣＣＬ２）／単球走化性タンパク質１（ＭＣＰ－１）から選択される１つ以上のサイトカインの有意な放出をそれが引き起こすかどうかを決定することとを含み、有意な放出は、ＴＧＦβ阻害剤が忍容性良好にならないことを示す、方法。

４５．サイトカイン放出は、インビトロサイトカイン放出アッセイにおいて、任意選択で末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）又は全血におけるアッセイにおいて評価され、任意選択で、ＰＢＭＣ又は全血は、ＴＧＦβ阻害剤療法を投与する前に対象から得られる、実施形態４３又は４４に記載の方法。

４６．サイトカイン放出は、健常な対象から得られた末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）又は全血のインビトロサイトカイン放出アッセイにおいて評価される、実施形態４３～４５のいずれか１つに記載の方法。

４７．サイトカイン放出アッセイは、可溶性相及び／又は固相アッセイ形式を含む、実施形態４５又は４６に記載の方法。

４８．サイトカイン放出アッセイは、ｉ）固相アッセイ、ｉｉ）高密度ＰＢＭＣ培養前アッセイ、及び／又はｉｉｉ）ＰＢＬ－ＨＵＶＥＣ共培養アッセイを含む、実施形態４５～４７のいずれか１つに記載の方法。

４９．サイトカイン放出アッセイは、多重アレイ、例えばＬｕｍｉｎｅｘ（登録商標）アレイシステムを含む、実施形態４５～４８のいずれか１つに記載の方法。

５０．サイトカイン放出アッセイは、ＴＧＦβ阻害剤からのサイトカイン放出を、抗ＣＤ３抗体及び抗ＣＤ２８抗体から選択される１つ以上の対照抗体からの放出と比較することを含み、任意選択で、ＣＤ２８抗体は、任意選択で、ＴＧＮ１４１２を含む、実施形態４５～４９のいずれか１つに記載の方法。

５１．ＴＧＦβ阻害剤は、阻害剤の非存在下又は対照抗体の存在下でのレベルと比較してＩＬ－６レベルの１０倍超の増加、任意選択でＩＬ－６レベルの２倍、４倍、６倍又は８倍未満の増加を誘発しない、実施形態４３～５０のいずれか１つに記載の方法。

５２．ＴＧＦβ阻害剤は、阻害剤の非存在下又は対照抗体の存在下でのレベルと比較してＩＦＮγレベルの１０倍超の増加、任意選択でＩＦＮγレベルの２倍、４倍、６倍又は８倍未満の増加を誘発しない、実施形態４３～５１のいずれか１つに記載の方法。

５３．ＴＧＦβ阻害剤は、阻害剤の非存在下又は対照抗体の存在下でのレベルと比較してＴＮＦαレベルの１０倍超の増加、任意選択でＴＮＦαレベルの２倍、４倍、６倍又は８倍未満の増加を誘発しない、実施形態４３～５２に記載の方法。

５４．ＴＧＦβ阻害剤は、非ヒト霊長類を含む動物モデルにおける１つ以上のサイトカインの有意な放出を引き起こさない治療有効量で投与される、実施形態４３～５３のいずれか１つに記載の方法。

５５．ＴＧＦβ阻害剤の治療有効量は、循環ＭＤＳＣレベルを低下させるのに十分な量である、実施形態４３～５４に記載の方法。

５６．低下したＭＤＳＣは、Ｇ－ＭＤＳＣである、実施形態５５に記載の方法。

５７．Ｇ－ＭＤＳＣは、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１５、ＬＯＸ－１、ＣＤ６６ｂ及びＨＬＡ－ＤＲ^{lo}／$^{-}$の１つ以上を発現する、実施形態５６に記載の方法。

５８．循環ＭＤＳＣレベルは、対象から採取された全血又は血液成分から決定される、実施形態５５～５７のいずれか１つに記載の方法。

５９．ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１阻害剤、任意選択でＴＧＦβ１特異的阻害剤、例えばＡｂ６である、実施形態４３～５８のいずれか１つに記載の方法。

６０．対象における癌の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤であって、治療は、癌を有する対象への、ある用量の前記ＴＧＦβ阻害剤の投与を含み、前記ＴＧＦβ阻害剤は、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）、インターロイキン２（ＩＬ－２）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）、インターロイキン１β（ＩＬ－１β）及

びケモカインＣ－Ｃモチーフリガンド２（ＣＣＬ２）／単球走化性タンパク質１（ＭＣＰ－１）から選択される１つ以上のサイトカインの有意な放出を引き起こさない、ＴＧＦβ阻害剤。

６１．癌の治療に使用するためのある用量のＴＧＦβ阻害剤及び癌治療剤を含む組合せ療法であって、治療は、ある用量のＴＧＦβ阻害剤及び癌治療剤の、対象への同時、別個の又は連続投与を含み、前記ＴＧＦβ阻害剤は、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）、インターロイキン２（ＩＬ－２）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）、インターロイキン１β（ＩＬ－１β）及びケモカインＣ－Ｃモチーフリガンド２（ＣＣＬ２）／単球走化性タンパク質１（ＭＣＰ－１）から選択される１つ以上のサイトカインの有意な放出を引き起こさない、組合せ療法。

６２．ＴＧＦβ阻害剤は、非ヒト霊長類を含む動物モデルにおける１つ以上のサイトカインの有意な放出を引き起こさない治療有効量で投与される、実施形態６０に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は実施形態６１に記載の使用のための組合せ療法。

６３．ＴＧＦβ阻害剤は、循環ＭＤＳＣレベルを低下させるのに十分な治療有効量で投与される、実施形態６０若しくは６２に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は実施形態６１に記載の使用のための組合せ療法。

６４　低下したＭＤＳＣは、Ｇ－ＭＤＳＣである、実施形態６３に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

６５　Ｇ－ＭＤＳＣは、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１５、ＬＯＸ－１、ＣＤ６６ｂ及びＨＬＡ－ＤＲˡᵒ／⁻の１つ以上を発現する、実施形態６４に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

６６　循環ＭＤＳＣレベルは、対象から採取された全血又は血液成分から決定される、実施形態６３～６５のいずれか１つに記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

６７．ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１阻害剤、任意選択でＴＧＦβ１特異的阻害剤である、実施形態４４若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の方法、実施形態６０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は実施形態６１若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ療法。

６８．ＴＧＦβ阻害剤は、実施形態４４又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の方法によって決定されるとき、１つ以上のサイトカインの有意な放出を引き起こさない、実施形態６０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は実施形態６１若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ療法。

６９．癌を治療する方法であって、血小板結合、活性化及び／又は凝集の有意な増加を誘発しない治療有効量のＴＧＦβ阻害剤を対象に投与することを含む方法。

７０．血小板結合、活性化及び／又は凝集は、血漿又は全血のサンプル中で測定される、実施形態６９に記載の方法。

７１．ＴＧＦβ阻害剤が前記ＴＧＦβ阻害剤へのサンプルの曝露後に血小板結合、活性化及び／又は凝集の有意な増加を引き起こすかどうかを決定するための方法であって、血液サンプル中の血小板結合、活性化及び／又は凝集を測定することを含む方法。

７２　サンプルは、ＴＧＦβ阻害剤療法を投与する前に対象から得られる、実施形態７０又は７１のいずれか１つに記載の方法。

７３．サンプルは、健常な対象から得られる、実施形態６９～７２のいずれか１つに記載の方法。

７４．ＴＧＦβ阻害剤を投与することは、ＴＧＦβ阻害剤の非存在下及び／又は緩衝液若しくはアイソタイプ対照の存在下での結合と比較して、血小板結合を、１０％を超えて増加させない、実施形態６９～７３のいずれか１つに記載の方法。

７５．ＴＧＦβ阻害剤を投与することは、阻害剤の非存在下での活性化と比較して、血小板活性化を、１０％を超えて増加させない、実施形態６９～７４のいずれか１つに記載

の方法。

７６．ＴＧＦβ阻害剤を投与することは、インビトロでの血小板凝集を、公知の血小板凝集アゴニスト、例えばアデノシン二リン酸（ＡＤＰ）によって誘発される活性化の１０％を超えて増加させない、実施形態６９～７５のいずれか１つに記載の方法。

７７．ＴＧＦβ阻害剤を投与することは、血小板凝集を、陰性対照によって引き起こされる凝集と比較して１０％を超えて増加させない、実施形態６９～７６のいずれか１つに記載の方法。

７８．ＴＧＦβ阻害剤の治療有効量は、循環ＭＤＳＣのレベルを低下させるのに十分な量である、実施形態６９～７７のいずれか１つに記載の方法。

７９．低下したＭＤＳＣは、Ｇ－ＭＤＳＣである、実施形態７８に記載の方法。

８０．Ｇ－ＭＤＳＣは、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１５、ＬＯＸ－１、ＣＤ６６ｂ及びＨＬＡ－ＤＲ$^{lo/-}$の１つ以上を発現する、実施形態７９に記載の方法。

８１．循環ＭＤＳＣレベルは、対象から採取された全血又は血液成分から決定される、実施形態７８～８０のいずれか１つに記載の方法。

８２．ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１阻害剤、任意選択でＴＧＦβ１特異的阻害剤である、実施形態６９～８１のいずれか１つに記載の方法。

８３．ある用量のＴＧＦβ阻害剤を対象に投与することによる癌の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤であって、血小板結合、活性化及び／又は凝集の有意な増加を引き起こさない、ＴＧＦβ阻害剤。

８４．癌の治療のためのある用量のＴＧＦβ阻害剤及び癌治療剤を含む組合せ療法であって、治療は、ある用量のＴＧＦβ阻害剤及び癌治療剤の、対象への同時、別個の又は連続投与を含み、前記ＴＧＦβ阻害剤は、血小板結合、活性化及び／又は凝集の有意な増加を引き起こさない、組合せ療法。

８５．ＴＧＦβ阻害剤は、循環ＭＤＳＣレベルを低下させるのに十分な治療有効量で投与される、実施形態８３に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は実施形態８４に記載の使用のための組合せ療法。

８６　低下したＭＤＳＣは、Ｇ－ＭＤＳＣである、実施形態８５に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

８７　Ｇ－ＭＤＳＣは、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１５、ＬＯＸ－１、ＣＤ６６ｂ及びＨＬＡ－ＤＲ$^{lo/-}$の１つ以上を発現する、実施形態８６に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

８８　Ｇ－ＭＤＳＣは、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１５、ＬＯＸ－１、ＣＤ６６ｂ及びＨＬＡ－ＤＲ$^{lo/-}$の１つ以上を発現する、実施形態８７に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

８９．ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１阻害剤、任意選択でＴＧＦβ１特異的阻害剤である、実施形態７１若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の方法、実施形態８３若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は実施形態８４若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ療法。

９０．ＴＧＦβ阻害剤は、実施形態７１若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の方法により、血小板結合、活性化及び／又は凝集の有意な増加を引き起こさないことが決定されている、実施形態８３若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は実施形態８４若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ療法。

９１．ＴＧＦβ阻害剤は、実施形態６０～６８のいずれか１つに記載のＴＧＦβ阻害剤である、実施形態８３若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は実施形態８４若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ療法。

９２．対象における癌を治療するためのＴＧＦβ阻害剤を作製する方法であって、以下の基準：

ａ）ＴＧＦβ阻害剤が１つ以上の前臨床モデルにおいて有効であること；
ｂ）ＴＧＦβ阻害剤が、少なくとも最小有効用量より多い用量において、１つ以上の動物種における毒性試験で弁膜症又は上皮過形成を引き起こさないこと；及び
ｃ）ＴＧＦβ阻害剤が、（ａ）の１つ以上の前臨床モデルで決定される最小有効用量において、インビトロサイトカイン放出アッセイでヒトＰＢＭＣ又は全血からの有意なサイトカイン放出を誘導しないこと
の１つ以上、例えば全てを満たすＴＧＦβ阻害剤を選択する工程を含む方法。
９３　対象における癌を治療するためのＴＧＦβ阻害剤を作製する方法であって、以下の基準：
ａ）ＴＧＦβ阻害剤が１つ以上の前臨床モデルにおいて有効であること；
ｂ）ＴＧＦβ阻害剤が、少なくとも最小有効用量より多い用量において、１つ以上の動物種における毒性試験で弁膜症又は上皮過形成を引き起こさないこと；
ｃ）ＴＧＦβ阻害剤が、（ａ）の１つ以上の前臨床モデルで決定される最小有効用量において、インビトロサイトカイン放出アッセイでヒトＰＢＭＣ又は全血からの有意なサイトカイン放出を誘導しないこと；
ｄ）ＴＧＦβ阻害剤が、（ａ）の１つ以上の前臨床モデルで決定される血小板結合、活性化及び／又は凝集の有意な増加を誘発しないこと；及び
ｅ）ＴＧＦβ阻害剤が、（ａ）の１つ以上の前臨床モデルで決定される最小有効用量において循環ＭＤＳＣを低下させること
の１つ以上、例えば全てを満たすＴＧＦβ阻害剤を選択する工程をさらに含み、
ＴＧＦβ阻害剤及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を製造することをさらに含む方法。
９４．ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１阻害剤、任意選択でＴＧＦβ１特異的阻害剤である、実施形態９２又は９３に記載の方法。
９５．対象における癌を治療する方法であって、実施形態９２～９４のいずれか１つに記載の方法に従って製造される治療有効量のＴＧＦβ阻害剤を投与することを含む方法。
９６．患者における癌免疫療法のための断続的な投与計画に使用するためのＴＧＦβ阻害剤であって、断続的な投与計画は、
（ｉ）ＴＧＦβ阻害剤治療前に、患者から採取された第１のサンプル、例えば血液サンプル中の循環ＭＤＳＣを測定することと、
（ｉｉ）癌療法で治療される患者にＴＧＦβ阻害剤を投与することであって、癌療法は、任意選択で、チェックポイント阻害剤療法である、投与することと、
（ｉｉｉ）ＴＧＦβ阻害剤治療後に患者から採取された第２のサンプル中の循環ＭＤＳＣを測定することと、
（ｉｖ）第２のサンプルが、第１のサンプルと比較して低下したレベルの循環ＭＤＳＣを示す場合、癌療法を継続することと；
（ｖ）患者からのさらなる血液サンプルが、上昇したレベルの循環ＭＤＳＣレベルを示した後、必要に応じてプロセスを繰り返すことと
を含む、ＴＧＦβ阻害剤。
９７　第３のサンプル中の循環ＭＤＳＣを測定することと、第３のサンプルが、第２のサンプルと比較して上昇したレベルの循環ＭＤＳＣレベルを示す場合、さらなる用量のＴＧＦβ阻害剤を患者に投与することとをさらに含む、実施形態９６に記載の方法。
９８．ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１シグナル伝達を阻害する、実施形態９６又は９７に記載の方法。
９９．ＴＧＦβ阻害剤は、治療有効用量でＴＧＦβ１シグナル伝達を阻害するが、ＴＧＦβ２シグナル伝達及び／又はＴＧＦβ３シグナル伝達を阻害しない、実施形態９６又は９７に記載の方法。
１００．ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的である、実施形態９６又は９７に記載の方法。
１０１．ＴＧＦβ阻害剤は、インテグリン阻害剤である、実施形態９６又は９７に記載

の方法。
１０２．インテグリン阻害剤は、インテグリンαＶβ１、αＶβ３、αＶβ５、αＶβ６、αＶβ８、α５β１、αＩＩｂβ３及び／又はα８β１を阻害する、１０１に記載の方法。
１０３．インテグリン阻害剤は、下流のＴＧＦβ１／３活性化を阻害する、１０１又は１０２に記載の方法。
１０４．対象における癌の治療に使用するためのＴＧＦβ１選択的阻害剤であって、対象は、チェックポイント阻害剤と共に、ＴＧＦβ３を阻害するＴＧＦβ阻害剤で治療されている、ＴＧＦβ１選択的阻害剤。
１０５．癌は、転移性癌、線維形成性腫瘍又は骨髄線維症である、１０４に記載の方法。
１０６．対象は、無調節な細胞外基質（ＥＣＭ）に関与する障害を有するか、又はこのような障害を発症するリスクがある、１０４又は１０５に記載の方法。
１０７．無調節なＥＣＭに関与する障害は、ＮＡＳＨである、１０６に記載の方法。
１０８．以前のＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１／２／３又はＴＧＦβ１／３を阻害する、実施形態１０４～１０７のいずれか１つに記載の使用のためのＴＧＦβ１選択的阻害剤。
１０９．対象における癌の治療に使用するための非アイソフォーム選択的ＴＧＦβ阻害剤であって、
（ｉ）線維性疾患と診断されていないか又は線維性疾患を発症する高いリスクがない対象を選択する工程と；
（ｉｉ）癌を治療するのに有効な量の非アイソフォーム選択的ＴＧＦβ阻害剤を対象に投与する工程と
を含む、非アイソフォーム選択的ＴＧＦβ阻害剤。
１１０．対象における癌の治療に使用するためのアイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤であって、治療は、癌が高転移性癌でない対象を選択する工程と、アイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤を対象に投与する工程とを含む、アイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤。
１１１．アイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１／２／３又はＴＧＦβ１／３を阻害する抗体である、１０９又は１１０に記載の方法。
１１２　アイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤は、インテグリンαＶβ１、αＶβ６、αＶβ８及び／又はαＶβ３に結合するインテグリン阻害剤である、実施形態１０９～１１１のいずれか１つに記載の方法。
１１３　インテグリン阻害剤は、ＴＧＦβ１／３活性化の阻害剤である、１１２に記載の方法。
１１４．アイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ受容体リガンド結合部分を含む組み換え構築物である、１１０に記載の方法。
１１５．実施形態１１０に記載の使用のためのアイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤であって、高転移性癌は、結腸直腸癌、肺癌（例えば、ＮＳＣＬＣ）、膀胱癌、腎臓癌、子宮癌、前立腺癌、胃癌又は甲状腺癌である、アイソフォーム非選択的ＴＧＦβ阻害剤。
１１６．対象における癌の治療に使用するためのＴＧＦβ１選択的阻害剤であって、治療は、
（ｉ）癌が高転移性癌である対象を選択する工程と、
（ｉｉ）アイソフォーム選択的ＴＧＦβ１阻害剤を対象に投与する工程と
を含み；
高転移性癌は、結腸直腸癌、肺癌、膀胱癌、腎臓癌、子宮癌、前立腺癌、胃癌又は甲状腺癌を含む、ＴＧＦβ１選択的阻害剤。
１１７．対象における癌の治療に使用するためのＴＧＦβ１選択的阻害剤であって、治療は、
（ｉ）骨髄線維症、線維性疾患を有するか、又は線維性疾患を発症するリスクがある対

象を選択する工程と、
（ｉｉ）癌を治療するのに有効な量のアイソフォーム選択的ＴＧＦβ１阻害剤を対象に投与する工程と
を含む、ＴＧＦβ１選択的阻害剤。
１１８．対象は、癌療法でさらに治療され、任意選択で、癌療法は、チェックポイント阻害剤を含む、実施形態１１７に記載の使用のためのＴＧＦβ１選択的阻害剤。
１１９．対象は、癌療法を受けたことがない患者である、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。
１２０．対象は、癌療法を受けている、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。
１２１．対象は、以前に癌療法を受けている、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。
１２２．対象は、癌療法を受けているか又は受ける予定である、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。
１２３．対象は、ＴＧＦβ阻害剤を含まない癌療法に耐性である癌を有する、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。
１２４．対象は、ＴＧＦβ阻害剤を含まない癌療法に対する反応性が低い、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。
１２５．対象は、ＴＧＦβ阻害剤を含まない癌療法を現在受けているか又は以前に受けている、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。
１２６．癌療法は、ＴＧＦβ阻害剤を含まない、実施形態１２１～１２５のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。
１２７．癌療法は、化学療法、放射線療法（例えば、放射線治療剤）、組み換え免疫細胞療法（例えば、ＣＡＲ－Ｔ療法）、腫瘍溶解性ウイルス療法及び／又は癌ワクチン療法を含む、実施形態１２１～１２６のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。
１２８．癌療法は、チェックポイント阻害剤療法を含む免疫療法を含む、実施形態１２１～１２７のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。
１２９．固形癌を有する対象を治療する方法であって、ＴＧＦβ阻害剤を投与する前に、対象から得られたサンプル中の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルを決定することであって、腫瘍の内部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルは、治療前に腫瘍の外部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルより低い、決定することと、治療有効量のＴＧＦβ阻害剤を対象に投与することであって、治療有効量は、腫瘍の外部のレベルと比べて、腫瘍の内部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルを増加させるのに十分な量である、投与することとを含む方法。
１３０．固形癌を有する対象を治療する方法であって、腫瘍の内部及び外部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）レベルを、対象から得られたサンプル中で決定することと、腫瘍の外部に対する腫瘍の内部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）レベルの比率が１未満である対象を選択することと、治療有効量のＴＧＦβ阻害剤を対象に投与することとを含む方法。
１３１．腫瘍の外部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルは、腫瘍辺縁及び／又は間質から決定される、実施形態１２９又は１３０に記載の方法。

１３２．腫瘍の外部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルは、辺縁から決定される、実施形態１２９～１３１のいずれか１つに記載の方法。
１３３．辺縁は、幅約１０～１００μｍ（例えば、幅５０μｍ）である、実施形態１３１又は実施形態１３２に記載の方法。
１３４．辺縁及び／又は間質中の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルは、腫瘍の内部のレベルより少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、７倍又は１０倍高い、実施形態１２９～１３３のいずれか１つに記載の方法。
１３５．固形癌を有する対象を治療する方法であって、対象から得られた少なくとも１つの腫瘍組織サンプルからの１つ以上の腫瘍巣中のＣＤ８＋細胞のレベルを測定することと、測定されるサンプルの面積の５０％超が、腫瘍巣であって、腫瘍巣の外部のＣＤ８陽性細胞のレベルに対して、腫瘍巣の内部のより低いレベルのＣＤ８陽性細胞（例えば、腫瘍巣の内部の５％未満のＣＤ８＋細胞及び腫瘍巣の外部の５％超のＣＤ８＋細胞）を含む腫瘍巣を含む場合、治療有効量のＴＧＦβ阻害剤を対象に投与することとを含む方法。
１３６．固形癌を有する対象を治療する方法であって、
（ｉ）第１のサンプル中の腫瘍の内部及び外部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞）レベルを決定し、且つ腫瘍の外部の密度に対する腫瘍の内部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）密度の比率が１未満である対象を選択することと；
（ｉｉ）第１の用量のＴＧＦβ阻害剤を対象に投与することと；
（ｉｉｉ）第２のサンプル中の腫瘍の内部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルを決定することと；
（ｉｖ）工程（ｉｉｉ）において決定された腫瘍の内部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルが、工程（ｉ）において決定された腫瘍の内部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルと比較して増加される場合、第２の用量のＴＧＦβ阻害剤を対象に投与することと
を含む方法。
１３７．対象における癌治療の治療効果を決定する方法であって、
（ｉ）第１のサンプル中の腫瘍の内部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルを決定することと；
（ｉｉ）ある用量のＴＧＦβ阻害剤を対象に投与することと；
（ｉｉｉ）第２のサンプル中の腫瘍の内部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルを決定することと；
（ｉｖ）工程（ｉｉｉ）において決定された細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルが工程（ｉ）と比較して増加されるかどうかを決定することであって、このような増加は、癌治療の治療効果を示す、決定することと
を含む方法。
１３８．工程（ｉｉ）は、ＴＧＦβ阻害剤と同時に、別々に又は連続してさらなる癌療法を対象に投与することをさらに含む、実施形態１３６又は実施形態１３７に記載の方法。
１３９．癌療法は、チェックポイント阻害剤療法（例えば、ＰＤ－１若しくはＰＤ－Ｌ１又は抗ＰＤ－１若しくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体を標的とする薬剤）を含む、実施形態１３８に記載の方法。
１４０．腫瘍中の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）レベルは、少なくとも１０％、１５％、２０％、２５％又はそれを超えて増加される、実施形態１３６～１３９のいずれか１つに記載の方法。
１４１．ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、例えばＡｂ６である、実施形態１２９～１４０のいずれか１つに記載の方法。
１４２．サンプルは、腫瘍生検サンプルである、実施形態１２９～１４１のいずれか１つに記載の方法。
１４３．腫瘍生検サンプルは、腫瘍のコア針生検サンプルである、実施形態１４２に記載の方法。

１４４．細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルは、免疫組織化学的分析によって決定される、実施形態１２９～１４３のいずれかに記載の方法。

１４５．第１の用量のＴＧＦβ阻害剤の投与前及び後、循環ＭＤＳＣのレベルを決定することをさらに含み、ＭＤＳＣレベルの低下は、第１の用量のＴＧＦβ阻害剤の投与後に決定され、工程（ｉｉｉ）において決定された腫瘍の内部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルが、工程（ｉ）において決定された腫瘍の内部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルと比較して増加される場合、第２の用量のＴＧＦβ阻害剤が投与される、実施形態１３６に記載の方法。

１４６．ＴＧＦβ阻害剤の投与前及び後、循環ＭＤＳＣのレベルを決定することをさらに含み、投与後の腫瘍の内部のＭＤＳＣレベルの低下及び／又は細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋ Ｔ細胞）レベルの増加は、治療効果を示す、実施形態１３７に記載の方法。

１４７　循環ＭＤＳＣは、Ｇ－ＭＤＳＣである、実施形態１４５又は１４６に記載の方法。

１４８．Ｇ－ＭＤＳＣは、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１５、ＬＯＸ－１、ＣＤ６６ｂ及びＨＬＡ－ＤＲ$^{lo/-}$の１つ以上を発現する、実施形態１４７に記載の方法。

１４９．循環ＭＤＳＣレベルは、対象から採取された全血又は血液成分から決定される、実施形態１４５～１４８のいずれか１つに記載の方法。

１５０．循環ＭＤＳＣレベルのレベルは、少なくとも１０％だけ、任意選択で少なくとも１５％、２０％、２５％又はそれを超えて低下される、実施形態１４５～１４９のいずれか１つに記載の方法。

１５１．腫瘍の内部の細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルは、少なくとも１０％、１５％、２０％、２５％又はそれを超えて増加され、循環ＭＤＳＣのレベルは、少なくとも１５％、２０％、２５％又はそれを超えて低下される、実施形態１４５～１５０のいずれか１つに記載の方法。

１５２．細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞）のレベルは、ＣＤ８＋　Ｔ細胞のパーセンテージ又はＣＤ８＋細胞密度（例えば、１平方ミリメートル当たりのＣＤ８＋　Ｔ細胞の数）である、実施形態１２９～１５１のいずれか１つに記載の方法。

１５３．ＴＧＦβ阻害剤の治療有効量は、１投与当たり０．１ｍｇ／ｋｇ～３０ｍｇ／ｋｇである、実施形態１２９～１５２のいずれか１つに記載の方法。

１５４．ＴＧＦβ阻害剤の治療有効量は、１投与当たり１ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇである、実施形態１２９～１５３のいずれか１つに記載の方法。

１５５．ＴＧＦβ阻害剤の治療有効量は、１投与当たり２ｍｇ／ｋｇ～７ｍｇ／ｋｇである、実施形態１２９～１５４のいずれか１つに記載の方法。

１５６．ＴＧＦβ阻害剤は、週に１回、２週間に１回、３週間に１回、４週間に１回、月に１回、６週間に１回、８週間に１回、２ヶ月に１回、１０週間に１回、１２週間に１回、３ヶ月に１回、４ヶ月に１回、６ヶ月に１回、８ヶ月に１回、１０ヶ月に１回又は年に１回投与される、実施形態１２９～１５５のいずれか１つに記載の方法。

１５７．ＴＧＦβ阻害剤は、約３週間に１回投与される、実施形態１２９～１５６のいずれか１つに記載の方法。

１５８．ＴＧＦβ阻害剤は、静脈内又は皮下に投与される、実施形態１２９～１５７のいずれか１つに記載の方法。

１５９．癌は、非小細胞肺癌、黒色腫、腎細胞癌、トリプルネガティブ乳癌、胃癌、マイクロサテライト安定性結腸直腸癌、膵臓癌、小細胞肺癌、ＨＥＲ２陽性乳癌又は前立腺癌である、実施形態１２９～１５８のいずれか１つに記載の方法。

１６０．対象における癌治療の治療効果を決定する方法であって、治療は、ある用量のＴＧＦβ阻害剤及び癌療法を含む同時、別個の又は連続投与のための組合せ療法を対象に投与することを含み、方法は、

（ｉ）ＴＧＦβ阻害剤を投与する前に、対象から得られたサンプル中の循環骨髄由来抑制細胞（ＭＤＳＣ）レベルを決定することと；

（ｉｉ）ＴＧＦβ阻害剤の投与後、対象から得られたサンプル中の循環ＭＤＳＣレベル

を決定することと；
（ｉｉｉ）工程（ｉｉ）において決定されたレベルが工程（ｉ）において決定されたレベルと比較して低下されたかどうかを決定することと
を含み、このような低下は、癌治療の治療効果を示す、方法。
１６１．循環ＭＤＳＣ細胞のレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の用量の投与後、３～６週間以内、任意選択でＴＧＦβ阻害剤の用量の投与後、３週間以内又は約３週間の時点で決定される、実施形態１６０に記載の方法。
１６２．循環ＭＤＳＣ細胞のレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の用量の投与後、２週間以内、任意選択でＴＧＦβ阻害剤の用量の投与後、約１０日の時点で決定される、実施形態１６０に記載の方法。
１６３．工程（ｉ）又は（ｉｉ）における対象は、以前の癌療法を受けたことがなく、任意選択で、工程（ｉ）及び（ｉｉ）における対象は、以前の癌療法を受けてことがない、実施形態１６０～１６２のいずれか１つに記載の方法。
１６４．循環ＭＤＳＣレベルが低下されたと決定される場合、対象は、癌療法を受けることになる、実施形態１６０～１６３のいずれか１つに記載の方法。
１６５．工程（ｉ）又は（ｉｉ）における対象は、以前の癌療法を受けたか又は癌療法を受けており、任意選択で、工程（ｉ）及び（ｉｉ）における対象は、以前の癌療法を受けたか又は癌療法を受けている、実施形態１６０～１６４のいずれか１つに記載の方法。
１６６．循環ＭＤＳＣレベルが低下されたと決定される場合、対象は、さらなる癌療法を受けることになる、実施形態１６５に記載の方法。
１６７．対象は、工程（ｉｉ）前にＴＧＦβ阻害剤の２回以上の投与を受ける、実施形態１６０～１６６のいずれか１つに記載の方法。
１６８．サンプルは、全血サンプル又は血液成分である、実施形態１６０～１６７のいずれか１つに記載の方法。
１６９．対象における癌の治療に使用するための癌治療剤であって、対象は、ある用量のＴＧＦβ阻害剤を受けており、ＴＧＦβ阻害剤の投与後に測定された対象における循環ＭＤＳＣレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の用量を投与する前に、対象において測定された循環ＭＤＳＣレベルと比較して低下されたことが決定されている、癌治療剤。
１７０．癌の治療に使用するためのある用量のＴＧＦβ阻害剤及び癌治療剤を含む組合せ療法であって、治療は、ある用量のＴＧＦβ阻害剤及び癌治療剤の対象への同時、別個の又は連続投与を含み、ＴＧＦβ阻害剤の投与後に測定された対象における循環ＭＤＳＣレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の用量を投与する前に、対象において測定された循環ＭＤＳＣレベルと比較して低下されたことが決定されている、組合せ療法。
１７１．実対象は、以前の癌療法を受けたことがなく、対象における循環ＭＤＳＣレベルは、癌治療剤の投与前に低下されたことが決定されている、実施形態１７０に記載の使用のための組合せ療法。
１７２．対象は、以前の癌療法を受けたことがなく、対象は、癌治療剤の前にＴＧＦβ阻害剤を投与される、実施形態１７０又は実施形態１７１に記載の使用のための組合せ療法。
１７３．対象は、ＴＧＦβ阻害剤の前に癌治療剤を投与される、実施形態１７０に記載の使用のための組合せ療法。
１７４．対象における癌の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤であって、対象は、少なくとも第１の用量のＴＧＦβ阻害剤を投与されており、治療は、さらなる用量のＴＧＦβ阻害剤を投与することを含み、但し、少なくとも第１の用量のＴＧＦβ阻害剤の投与後に測定された対象における循環ＭＤＳＣレベルは、ある用量のＴＧＦβ阻害剤を投与する前に対象において測定された循環ＭＤＳＣレベルと比較して低下される、ＴＧＦβ阻害剤。
１７５．対象における癌の治療に使用するためのＴＧＦβ阻害剤であって、対象は、ある用量のＴＧＦβ阻害剤を投与され、ＴＧＦβ阻害剤は、癌における免疫抑制を軽減するか又は逆転させ、前記軽減又は逆転された免疫抑制は、ＴＧＦβ阻害剤の用量を投与する

前に対象において測定された循環ＭＤＳＣレベルと比較して、ＴＧＦβ阻害剤の投与後に測定された対象における循環ＭＤＳＣレベルの低下によって決定されている、ＴＧＦβ阻害剤。

１７６．対象は、循環ＭＤＳＣレベルが低下されたという決定前にＴＧＦβ阻害剤の２回以上の投与を受けている、実施形態１６９に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ療法又は実施形態１７４若しくは実施形態１７５に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

１７７．循環ＭＤＳＣ細胞のレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の用量の投与後、３～６週間以内、任意選択でＴＧＦβ阻害剤の用量の投与後、３週間以内又は約３週間の時点で、任意選択で２週間以内又は約１０日の時点で決定され、任意選択で、ＴＧＦβ阻害剤の前記用量は、対象に投与されるＴＧＦβ阻害剤の第１の用量である、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ療法或いは実施形態１７４若しくは実施形態１７５又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

１７８．対象は、以前の癌療法を受けたことがない、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ或いは実施形態１７４若しくは実施形態１７５又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

１７９．対象は、癌療法を受けている、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ或いは実施形態１７４若しくは実施形態１７５又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

１８０．対象は、癌療法を受ける予定である、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ或いは実施形態１７４若しくは実施形態１７５又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

１８１．癌療法は、免疫療法、化学療法、放射線療法、組み換え免疫細胞療法（例えば、ＣＡＲ－Ｔ療法）、癌ワクチン療法及び／又は腫瘍溶解性ウイルス療法を含む、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ或いは実施形態１７８～１８０のいずれか１つに記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

１８２．癌療法は、チェックポイント阻害剤療法を含む免疫療法であり、任意選択で、チェックポイント阻害剤は、プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）又はプログラム細胞死タンパク質１リガンド（ＰＤ－Ｌ１）を標的とする薬剤を含み、任意選択で、チェックポイント阻害剤は、抗ＰＤ－（Ｌ）１抗体を含む、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ又は実施形態１７８～１８０のいずれか１つに記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

１８３．循環ＭＤＳＣは、Ｇ－ＭＤＳＣである、実施形態１６０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の治療効果を決定する方法、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ或いは実施形態１７４若しくは実施形態１７５又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

１８４．Ｇ－ＭＤＳＣは、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１５、ＬＯＸ－１、ＣＤ６６及びＨＬＡ－ＤＲ^{lo}／$^{-}$の１つ以上を発現する、実施形態１８３に記載の治療効果を決定する方法、使用のための癌治療剤、使用のための組合せ療法又は使用のためのＴＧＦβ阻

害剤。

１８５．循環ＭＤＳＣレベルは、少なくとも１０％だけ、任意選択で少なくとも１５％、２０％、２５％又はそれを超えて低下される、実施形態１６０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の治療効果を決定する方法、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ或いは実施形態１７４若しくは実施形態１７５又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

１８６．循環ＭＤＳＣレベルは、対象から得られた全血サンプル又は血液成分から決定されている、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ或いは実施形態１７４若しくは実施形態１７５又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

１８７．ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１阻害剤であり、任意選択で、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１特異的阻害剤である、実施形態１６０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の治療効果を決定する方法、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ或いは実施形態１７４若しくは実施形態１７５又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

１８８．対象は、治療前に、健常な対象における循環ＭＤＳＣレベルより少なくとも２倍高い循環ＭＤＳＣレベルを有する、実施形態１６０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の治療効果を決定する方法、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ或いは実施形態１７４若しくは実施形態１７５又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

１８９．対象は、癌を有するか又は有する疑いがある、実施形態１６０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の治療効果を決定する方法、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ或いは実施形態１７４若しくは実施形態１７５又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

１９０．第１の用量のＴＧＦβ阻害剤の投与後に測定された対象における腫瘍関連免疫細胞のレベルは、第１の用量のＴＧＦβ阻害剤の投与前に測定された対象における前記腫瘍関連免疫細胞のレベルと比較して変化される、実施形態１６０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の治療効果を決定する方法、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ或いは実施形態１７４若しくは実施形態１７５又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

１９１．実施形態１６０又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の治療効果を決定する方法であって、

（ｉｖ）ＴＧＦβ阻害剤を投与する前に、対象から得られたサンプル中の１つ以上の腫瘍関連免疫細胞のレベルを決定することと；

（ｖ）ＴＧＦβ阻害剤の投与後、対象から得られたサンプル中の１つ以上の腫瘍関連免疫細胞のレベルを決定することと；

（ｖｉ）工程（ｖ）において決定されたレベルが、工程（ｉｖ）において決定されたレベルと比較して変化されるかどうかを決定することであって、このような変化は、癌治療の治療効果を示す、決定することと

をさらに含む方法。

１９２．１つ以上の腫瘍関連免疫細胞のレベルの変化は、癌における免疫抑制の軽減又

は好転を示す、実施形態１９１に記載の方法。
１９３．腫瘍関連免疫細胞は、ＣＤ８＋　Ｔ細胞及び／又は腫瘍関連マクロファージ（ＴＡＭ）を含む、実施形態１９１又は実施形態１９２に記載の方法。
１９４．１つ以上の腫瘍関連免疫細胞のレベルの変化は、少なくとも１０％、任意選択で少なくとも１５％、２０％、２５％又はそれを超えるＣＤ８＋　Ｔ細胞レベルの増加を含む、実施形態１９１～１９３のいずれか１つに記載の方法。
１９５．１つ以上の腫瘍関連免疫細胞のレベルの変化は、少なくとも１０％、任意選択で少なくとも１５％、２０％、２５％又はそれを超えるＴＡＭのレベルの増加を含む、実施形態１９１～１９４のいずれか１つに記載の方法。
１９６．１つ以上の腫瘍関連免疫細胞のレベルは、免疫組織化学分析により、対象から得られたサンプル中で決定される、実施形態１９１～１９５のいずれか１つに記載の方法。
１９７．１つ以上の腫瘍関連免疫細胞のレベルは、インビボイメージングによって決定される、実施形態１９１～１９６のいずれか１つに記載の方法。
１９８．サンプルは、腫瘍生検サンプルであり、腫瘍生検サンプルは、任意選択で、腫瘍のコア針生検サンプルである、実施形態１９１～１９７のいずれか１つに記載の方法。
１９９．第１の用量のＴＧＦβ阻害剤の投与後に測定された対象における循環潜在型ＴＧＦβ（例えば、循環潜在型ＴＧＦβ１）のレベルは、第１の用量のＴＧＦβ阻害剤の投与前に測定された対象における前記循環潜在型ＴＧＦβのレベルと比較して変化される、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ或いは実施形態１７４若しくは実施形態１７５又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。
２００．実施形態１６０若しくは実施形態１９１又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の治療効果を決定する方法であって、
（ｖｉｉ）ＴＧＦβ阻害剤を投与する前に、対象から得られたサンプル中の循環潜在型ＴＧＦβのレベルを決定することと；
（ｖｉｉｉ）ＴＧＦβ阻害剤の投与後、対象から得られたサンプル中の循環潜在型ＴＧＦβのレベルを決定することと；
（ｉｘ）工程（ｖｉｉｉ）において決定されたレベルが、工程（ｖｉｉ）において決定されたレベルと比較して増加されるかどうかを決定することであって、このような増加は、癌治療の治療効果を示す、決定することと
をさらに含む方法。
２０１．循環潜在型ＴＧＦβのレベルは、対象から得られたサンプル中で決定され、サンプルは、全血サンプル又は血液成分である、実施形態２００に記載の方法。
２０２．循環潜在型ＴＧＦβは、循環潜在型ＴＧＦβ１である、実施形態２００に記載の方法。
２０３．対象は、ＴＧＦβ阻害剤を含まない癌療法に耐性である癌を有する、実施形態１６０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の治療効果を決定する方法、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ或いは実施形態１７４若しくは実施形態１７５又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。
２０４．対象は、ＴＧＦβ阻害剤を含まない癌療法に対する反応性が低い、実施形態１６０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の治療効果を決定する方法、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ或いは実施形態１７４若しくは実施形態１７５又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。
２０５．対象は、ＴＧＦβ阻害剤を含まない癌療法を現在受けているか又は以前に受け

ている、実施形態１６０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の治療効果を決定する方法、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ或いは実施形態１７４若しくは実施形態１７５又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

２０６．対象は、ＴＧＦβ阻害剤を含まない癌療法に耐性である癌を有する、実施形態１６０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の治療効果を決定する方法、実施形態１６９若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための癌治療剤、実施形態１７０若しくはそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のための組合せ或いは実施形態１７４若しくは実施形態１７５又はそれに従属するいずれかの実施形態に記載の使用のためのＴＧＦβ阻害剤。

２０７．ＴＧＦβ阻害剤は、対象に静脈内投与される、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２０８．ＴＧＦβ阻害剤は、約３７．５ｍｇ／ｋｇ、３０ｍｇ／ｋｇ、２０ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ、７ｍｇ／ｋｇ、６ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ、４ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、２ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ又はそれ未満の濃度で投与される、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２０９．ＴＧＦβ阻害剤は、約３０００ｍｇ、２４００ｍｇ、１６００ｍｇ、８００ｍｇ、２４０ｍｇ、８０ｍｇ又はそれ未満の量で投与される、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２１０．ＴＧＦβ阻害剤は、約３週間に１回投与される、実施形態２０４若しくは実施形態２０５に記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２１１．癌は、免疫除去腫瘍を含む、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２１２．癌は、骨髄増殖性疾患であり、任意選択で、骨髄増殖性疾患は、骨髄線維症である、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２１３．癌は、高転移性癌である、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２１４．癌は、結腸直腸癌、肺癌、膀胱癌、腎臓癌、子宮癌、前立腺癌、胃癌又は甲状腺癌である、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２１５．対象は、大動脈弁狭窄症を発症するリスクがある、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２１６．癌は、ＴＧＦβ１陽性である、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２１７．癌は、ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３を共発現する、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２１８．腫瘍は、ＴＧＦβ１優勢腫瘍である、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２１９．ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物を製造するための方法であって、
ｉ）以下の基準：
ａ）ＴＧＦβ阻害剤が、ＴＧＦβを結合することが可能なモノクローナル抗体、その抗原結合断片又は多重特異性構築物であること；
ｂ）ＴＧＦβ阻害剤が、ＳＰＲに基づくアッセイ（例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ）によって測定されるとき、＜１．０ｎＭのK_D、好ましくはK_D＜５００ｐＭでＴＧＦβに結合し、ＴＧＦβ１を阻害すること；
ｃ）ＴＧＦβ阻害剤が、動物モデルにおいて少なくとも４週間にわたって最小有効量の少なくとも１０倍を投与されるとき、ＴＧＦβの汎阻害に関連する毒性を引き起こさない用量で前臨床モデルにおいてインビボで有効であること
を満たすＴＧＦβ阻害剤を提供する工程と；
ｉｉ）以下：
ａ）サイトカイン放出アッセイ（インビトロ及び／若しくはインビボ）；及び／又は
ｂ）血小板アッセイ
を含む免疫安全性を行う工程と；
ｉｉｉ）２５０Ｌ以上の規模でＴＧＦβ阻害剤を生成する工程と；
ｉｖ）ＴＧＦβ阻害剤を１つ以上の賦形剤と共に医薬組成物に製剤化する工程と
を含む方法。
２２０．ＴＧＦβは、ＴＧＦβ１である、実施形態２１９に記載の方法。
２２１．ＴＧＦβは、ｐｒｏＴＧＦβ複合体、成熟ＴＧＦβ成長因子又はＴＧＦβ受容体のリガンド結合ドメインである、実施形態２１９に記載の方法。
２２２．ＴＧＦβ阻害剤は、腫瘍成長退縮、生存期間の延長並びに／又はＰＡＩ－１、ＣＣＬ２、ＦＮ－１、ＡＣＴＡ２、Ｃｏｌ１ａ１、Ｃｏｌ３ａ１、ＦＮ－１、ＣＴＧＦ及び／若しくはＴＧＦβ１の正規化された遺伝子発現を引き起こすのに有効である、実施形態２１９に記載の方法。
２２３．腫瘍は、ＴＧＦβ１優勢腫瘍であり、任意選択で、腫瘍は、ＴＧＦβ３をさらに発現する、実施形態２２２に記載の方法。
２２４．ＴＧＦβの汎阻害に関連する毒性は、心血管系毒性（例えば、心臓弁膜症）、上皮過形成、出血及び皮膚病変の１つ以上を含む、実施形態２１９に記載の方法。
２２５．免疫安全性評価は、インビトロサイトカイン放出アッセイを含む、実施形態２１９に記載の方法。
２２６．生成の規模は、少なくとも５００Ｌ、少なくとも１０００Ｌ、少なくとも２０００Ｌである、実施形態２１９に記載の方法。
２２７．生成は、真核細胞培養物を含み、任意選択で、真核細胞培養物は、哺乳動物細胞培養物、植物細胞培養物又は昆虫細胞培養物である、実施形態２１９～２２６のいずれか１つに記載の方法。
２２８．哺乳動物細胞培養物は、ＣＨＯ細胞、ＭＤＣＫ細胞、ＮＳ０細胞、Ｓｐ２／０細胞、ＢＨＫ細胞、マウスＣ１２７細胞、Ｖｅｒｏ細胞、ＨＥＫ２９３細胞、ＨＴ－１０８０細胞又はＰＥＲ．Ｃ６細胞を含む、実施形態２２７に記載の方法。
２２９．対象におけるＴＧＦβ関連疾患を治療する方法であって、この疾患を治療するために治療有効量のＴＧＦβ阻害剤を対象に投与することを含み、治療有効量は、投与後に循環潜在型ＴＧＦβのレベルを増加させるのに十分な量である、方法。
２３０．対象におけるＴＧＦβ関連疾患を治療する方法であって、ＴＧＦβ阻害剤を投与することと、投与後に循環潜在型ＴＧＦβのレベルを監視することとを含む方法。
２３１．ＴＧＦβ関連疾患は、ＴＧＦβ１関連疾患である、実施形態２２９又は２３０に記載の方法。
２３２．ＴＧＦβ１関連疾患は、癌である、実施形態２３１に記載の方法。
２３３．ＴＧＦβ１関連疾患は、免疫障害である、実施形態２３１に記載の方法。
２３４．ＴＧＦβ阻害剤の投与後の循環潜在型ＴＧＦβのレベルが、投与前のレベルと比べて例えば少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍又は

それを超えて増加される場合、さらなる用量のＴＧＦβ阻害剤が投与される、実施形態２２９～２３３のいずれか１つに記載の方法。

２３５．ＴＧＦβ阻害剤の投与後の循環潜在型ＴＧＦβのレベルは、最大で少なくとも１０００ｐｇ／ｍｌに増加される、実施形態２２９～２３４のいずれか１つに記載の方法。

２３６．ＴＧＦβ阻害剤の投与後の循環潜在型ＴＧＦβのレベルは、最大で約１０００ｐｇ／ｍｌ～約８０００ｐｇ／ｍｌに増加される、実施形態２２９～２３５のいずれか１つに記載の方法。

２３７．ＴＧＦβ阻害剤の投与後の循環潜在型ＴＧＦβのレベルは、最大で約２０００ｐｇ／ｍｌ～約６５００ｐｇ／ｍｌに増加される、実施形態２２９～２３６のいずれか１つに記載の方法。

２３８．ＴＧＦβ阻害剤の投与後の循環潜在型ＴＧＦβのレベルは、最小で約１．５倍増加される、２２９～２３７のいずれか１つに記載の方法。

２３９．循環潜在型ＴＧＦβのレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の投与の約８～約６７２時間後に測定される、実施形態２２９～２３８のいずれか１つに記載の方法。

２４０．循環潜在型ＴＧＦβのレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の投与の約２４時間～約３３６時間後に測定される、実施形態２２９～２３９のいずれか１つに記載の方法。

２４１．循環潜在型ＴＧＦβのレベルは、ＴＧＦβ阻害剤の投与の約７２時間～約２４０時間後に測定される、実施形態２２９～２４０のいずれか１つに記載の方法。

２４２．ＴＧＦβ阻害剤は、約１ｍｇ／ｋｇ～約３０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される、実施形態２２９～２４１のいずれか１つに記載の方法。

２４３．ＴＧＦβ阻害剤は、約５ｍｇ／ｋｇ～約２０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される、実施形態２２９～２４２のいずれか１つに記載の方法。

２４４．ＴＧＦβ阻害剤は、約２ｍｇ／ｋｇ～約７ｍｇ／ｋｇの用量で投与される、実施形態２２９～２４３のいずれか１つに記載の方法。

２４５．ＴＧＦβ阻害剤は、約３週間に１回投与される、実施形態２２９～２４５のいずれか１つに記載の方法。

２４６．対象における癌治療の有効性を決定する方法であって、対象からの第１のサンプル中の循環潜在型ＴＧＦβ１のレベルを決定することと、ある用量のＴＧＦβ１阻害剤を対象に投与することと、投与後に対象からの第２のサンプル中の循環潜在型ＴＧＦβのレベルを決定することとを含み、第１のサンプルと第２のサンプルとの間の循環潜在型ＴＧＦβレベルの少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍又はそれを超える増加は、治療有効性を示す、方法。

２４７．固形癌に罹患した対象を治療する方法であって、対象からの第１のサンプル中の循環潜在型ＴＧＦβ１のレベルを決定することと、ある用量のＴＧＦβ１阻害剤を対象に投与することと、投与後に対象からの第２のサンプル中の循環潜在型ＴＧＦβのレベルを決定することとを含む方法。

２４８．対象が、少なくとも１．２の、投与前に対する投与後の循環潜在型ＴＧＦβの比率を有する場合、さらなる用量のＴＧＦβ阻害剤が投与される、実施形態２４７に記載の方法。

２４９．第２のサンプルは、投与の２４時間～５６日後に対象から採取される、実施形態２４６～２４８のいずれか１つに記載の方法。

２５０．ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ活性化阻害剤、例えばＴＧＦβ１選択的阻害剤である、実施形態２２９～２４９のいずれか１つに記載の方法。

２５１．ＴＧＦβ阻害剤は、Ａｂ６である、実施形態２２５０に記載の方法。

２５２．ＴＧＦβ阻害剤の治療有効量は、１投与当たり０．１ｍｇ／ｋｇ～３０ｍｇ／ｋｇである、実施形態２２９～２５１のいずれか１つに記載の方法。

２５３．ＴＧＦβ阻害剤の治療有効量は、１投与当たり１ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇである、実施形態２２９～２５２のいずれか１つに記載の方法。

２５４．ＴＧＦβ阻害剤の治療有効量は、１投与当たり２ｍｇ／ｋｇ～７ｍｇ／ｋｇで

ある、実施形態２２９～２５３のいずれか１つに記載の方法。
２５５．ＴＧＦβ阻害剤は、週に１回、２週間に１回、３週間に１回、４週間に１回、月に１回、６週間に１回、８週間に１回、２ヶ月に１回、１０週間に１回、１２週間に１回、３ヶ月に１回、４ヶ月に１回、６ヶ月に１回、８ヶ月に１回、１０ヶ月に１回又は年に１回投与される、実施形態２２９～２５４のいずれか１つに記載の方法。
２５６．ＴＧＦβ阻害剤は、約３週間に１回投与される、実施形態２２９～２５５のいずれか１つに記載の方法。
２５７．ＴＧＦβ阻害剤は、静脈内又は皮下に投与される、実施形態２２９～２５６のいずれか１つに記載の方法。
２５８．潜在型ＴＧＦβは、潜在型ＴＧＦβ１である、実施形態２２９～２５７のいずれか１つに記載の方法。
２５９．循環潜在型ＴＧＦβのレベルは、血液サンプル中で測定される、実施形態２２９～２５８のいずれか１つに記載の方法。
２６０．血液サンプルは、血清サンプル又は血漿サンプルである、実施形態２２９～２５９のいずれか１つに記載の方法。
２６１．循環潜在型ＴＧＦβレベルは、ＥＬＩＳＡによって測定される、実施形態２２９～２６０のいずれか１つに記載の方法。
２６２．ＴＧＦβ阻害剤の投与前及び後、対象における循環ＭＤＳＣのレベルを決定することをさらに含む、実施形態２２９～２６１のいずれか１つに記載の方法。
２６３．投与前と比較した投与後の循環ＭＤＳＣのレベルの低下は、治療効果を示し、任意選択で、ＴＧＦβ阻害剤を含む１回以上のさらなる治療が投与される、実施形態２６２に記載の方法。
２６４．循環ＭＤＳＣは、Ｇ－ＭＤＳＣである、実施形態２６２に記載の方法。
２６５．Ｇ－ＭＤＳＣは、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１５、ＬＯＸ－１、ＣＤ６６ｂ及びＨＬＡ－ＤＲ$^{lo/-}$の１つ以上を発現する、実施形態２６４に記載の方法。
２６６．循環ＭＤＳＣレベルは、対象から採取された全血又は血液成分から決定される、実施形態２４３～２４６のいずれか１つに記載の方法。
２６７．ＴＧＦβ阻害剤の投与は、循環ＭＤＳＣレベルを少なくとも１０％だけ、任意選択で少なくとも１５％、２０％、２５％又はそれを超えて低下させる、実施形態２６２～２６６のいずれか１つに記載の方法。
２６８．循環潜在型ＴＧＦβレベルは、少なくとも５０％だけ増加され、循環ＭＤＳＣレベルは、少なくとも１５％、２０％、２５％又はそれを超えて低下される、実施形態２６２～２６７のいずれか１つに記載の方法。
２６９．ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１シグナル伝達を阻害する、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。
２７０．ＴＧＦβ阻害剤は、治療有効用量でＴＧＦβ１シグナル伝達を阻害するが、ＴＧＦβ３シグナル伝達を阻害しない、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。
２７１．ＴＧＦβ阻害剤は、治療有効用量でＴＧＦβ２シグナル伝達及びＴＧＦβ３シグナル伝達を阻害しない、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。
２７２．ＴＧＦβ阻害剤は、遊離ＴＧＦβ成長ホルモンに結合しない、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。
２７３．ＴＧＦβ阻害剤は、ｐｒｏ－ＴＧＦβ１及び／又は潜在型ＴＧＦβ１に結合する、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。
２７４．ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１中の潜在型ラッソの少なくとも一部に結合する

、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２７５．ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１中のフィンガー－１ドメインの少なくとも一部に結合する、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２７６．ＴＧＦβ阻害剤は、中和抗体又はリガンドトラップである、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２７７．ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβ１に選択的に結合し、任意選択でｐｒｏ－ＴＧＦβ１及び／又は潜在型ＴＧＦβ１に選択的に結合する、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２７８．ＴＧＦβ阻害剤は、（ｉ）潜在型ラッソ（配列番号１２６）の少なくとも一部を含む第１の結合領域；及びｉｉ）フィンガー－１（配列番号１２４）の少なくとも一部を含む第２の結合領域においてｐｒｏＴＧＦβ１複合体に特異的に結合することが可能な単離抗体又はその抗原結合断片である、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２７９．第１の結合領域は、配列番号１３４のアミノ酸配列又はその一部をさらに含む、実施形態２７８に記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２８０．第２の結合領域は、配列番号１４３のアミノ酸配列又はその一部をさらに含む、実施形態２７８に記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２８１．ＴＧＦβ阻害剤は、ＩＭＴＧ付番方式によって定義されるとき、配列番号１（Ｈ－ＣＤＲ１）、配列番号２（Ｈ－ＣＤＲ２）及び配列番号３（Ｈ－ＣＤＲ３）のアミノ酸配列を含む３つの重鎖相補性決定領域並びに配列番号４（Ｌ－ＣＤＲ１）、配列番号５（Ｌ－ＣＤＲ２）及び配列番号６（Ｌ－ＣＤＲ３）のアミノ酸配列を含む３つの軽鎖相補性決定領域を含む単離抗体又はその抗原結合断片を含む、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２８２．ＴＧＦβ阻害剤は、配列番号７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域からの３つの重鎖相補性決定領域（Ｈ－ＣＤＲ１、Ｈ－ＣＤＲ２及びＨ－ＣＤＲ３）並びに配列番号８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域からの３つの軽鎖相補性決定領域（Ｌ－ＣＤＲ１、Ｌ－ＣＤＲ２及びＬ－ＣＤＲ３）を含む単離抗体又はその抗原結合断片を含む、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２８３．ＴＧＦβ阻害剤は、配列番号７のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である重鎖可変領域からの３つの重鎖相補性決定領域（Ｈ－ＣＤＲ１、Ｈ－ＣＤＲ２及びＨ－ＣＤＲ３）並びに配列番号８のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である軽鎖可変領域からの３つの軽鎖相補性決定領域（Ｌ－ＣＤＲ１、Ｌ－ＣＤＲ２及びＬ－ＣＤＲ３）を含む単離抗体又はその抗原結合断片を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２８４．ＴＧＦβ阻害剤は、配列番号７のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である重鎖可変領域及び配列番号８のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である軽鎖可変領域を含む単離抗体又はその抗原結合断片を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２８５．ＴＧＦβ阻害剤は、配列番号７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番

号８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む単離抗体又はその抗原結合断片を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２８６．ＴＧＦβ阻害剤は、配列番号９のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号１１のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む単離抗体又はその抗原結合断片を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２８７．ＴＧＦβ阻害剤は、配列番号７の重鎖可変ドメイン、配列番号８の軽鎖可変ドメインを含む抗体又は抗原結合断片と、ＴＧＦβ１への結合について交差遮断及び／又は競合する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２８８．ＴＧＦβ阻害剤は、モノクローナル抗体、任意選択で完全ヒト若しくはヒト化抗体又はその抗原結合断片である、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２８９．ＴＧＦβ阻害剤は、多重特異性又は二重特異性構築物中に存在する、先行する実施形態のいずれか１つに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２９０．多重特異性又は二重特異性構築物は、免疫細胞表面抗原に結合することも可能である、実施形態２８９に記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２９１．免疫細胞表面抗原は、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ４又はＬＡＧ３である、実施形態２９０に記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２９２．免疫細胞表面抗原は、任意選択で、抗ＰＤ－１若しくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体又はその抗原結合断片を含むＰＤ－１又はＰＤ－Ｌ１である、実施形態２９０若しくは２９１に記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２９３．ＴＧＦβ阻害剤は、ヒトＩｇＧ$_4$又はＩｇＧ$_1$定常領域を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２９４．対象は、ヒト患者であり、患者は、転移性又は局所進行性であると過去に実証された固形腫瘍を有し、それに対する標準療法が存在しないか、患者において失敗しているか若しくは患者による耐容性がないか、又はそれに対して患者が標準療法の好適な候補でないか若しくは他に不適格であると評価されている、先行する実施形態のいずれかに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２９５．対象は、ヒト患者であり、患者は、その腫瘍型について承認された抗ＰＤ－（Ｌ）１抗体療法（任意選択で、単独で又は化学療法と組み合わせて）による少なくとも３サイクルの治療後、進行性疾患又は病状の安定（例えば、臨床的に又はＸ線写真上、改善しないが、悪化もしていない）のいずれかとして現れる一次抗ＰＤ－（Ｌ）１抗体の非応答の履歴を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２９６．対象は、ヒト患者であり、患者は、ＴＧＦβ阻害剤の投与の６ヶ月以内に抗ＰＤ－（Ｌ）１抗体療法の最近の投与を受けている、先行する実施形態のいずれかに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２９７．対象は、ヒト患者であり、患者は、ＮＳＣＬＣを有し、標的療法（任意選択で、標的療法は、未分化リンパ腫キナーゼ及び／又はＥＧＦＲを標的とする）が利用可能なゲノム腫瘍異常を有し、さらに任意選択で、患者は、これらの異常に対する承認された療

法で進行されるか若しくはこれらの異常に対する承認された療法に耐容性がないか、又はこれらの異常に対する承認された療法に対する好適な候補ではないと見なされるか若しくは他に不適格である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２９８．対象は、ヒト患者であり、患者は、固形腫瘍における反応評価基準（ＲＥＣＩＳＴ）ｖ１．１によって決定される測定可能な疾患を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

２９９．対象は、ヒト患者であり、患者は、米国東海岸癌臨床試験グループパフォーマンスステータス（ＰＳ）０－１を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

３００．対象は、ヒト患者であり、患者は、≧３ヶ月の予測平均余命を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法、医学的使用、使用のための癌治療剤、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は使用のための組合せ療法。

３０１．低下した循環ＭＤＳＣは、Ｍ－ＭＤＳＣである、実施形態１に記載の方法。

３０２．Ｍ－ＭＤＳＣは、ＣＤ１１ｂ＋ＣＤ３３＋ＣＤ１４＋ＣＤ１５－及びＨＬＡ－ＤＲ－／ｌｏの１つ以上を発現する、実施形態１又は実施形態２に記載の方法。

３０３．ＴＧＦβ阻害剤は、標準毒性分析によって又は本開示に従って評価されるとき、４週間、８週間又は最大で１２週間にわたって週に１回、最大で１００、２００又は３００μｇ／ｋｇを投与される場合、前臨床動物モデルにおいて有意な有害事象（例えば、用量制限毒性）を引き起こさないことが示される、先行する実施形態のいずれか１つに記載の組成物、使用のための組成物又は方法。

３０４．組成物又はＴＧＦβ阻害剤の選択は、インビボ有効性及び安全性基準を含み、安全性基準は、ｉ）本開示に従う条件下で評価される場合の血小板凝集、活性化及び／又は結合の欠如、並びにｉｉ）本開示に従う条件下で評価される場合の有意な（例えば、対照の２．５倍以内）サイトカイン放出の欠如を含む、先行する実施形態のいずれか１つに記載の使用のための組成物、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は方法。

３０５．ＴＧＦβ阻害剤の薬力学は、対象から採取された血液（血清）サンプル中において、ＴＧＦβ１阻害剤の投与前及び後に循環潜在型ＴＧＦβ１レベルを測定することによって評価される、先行する実施形態のいずれか１つに記載の使用のための組成物、使用のためのＴＧＦβ阻害剤又は方法。

【０７９１】

本明細書に記載される組成物及び方法の他の好適な変更形態及び改変形態は、本開示又は本明細書に開示される実施形態の範囲から逸脱せずに好適な均等物を用いてなされ得ることが当業者に容易に明らかになるであろう。本開示は、限定的であると解釈されるべきではない以下の実施例によってさらに例示される。

【実施例】

【０７９２】

実施例１：インビトロ結合プロファイル

１）ＢＬＩに基づくアッセイ：

Ａｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６及びＡｂ３の親和性を、ヒトｐｒｏＴＧＦβ１細胞におけるＯｃｔｅｔ（登録商標）アッセイによって測定した一方、活性を、ヒトｐｒｏＴＧＦβ１阻害を試験する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の親和性を測定するのに使用されるプロトコルが、以下の表１５に要約され、本開示の例示的な抗体の親和性プロファイルの要約リストが、本明細書における表５に示される。

【０７９３】

【表２２】

表 15. Octet®結合アッセイを実施するための例示的なプロトコル

材料: - 96ウェル黒色ポリプロピレンプレート - Octet®のためのストレプトアビジン被覆チップ - 10倍キネティクス緩衝液(PBS中で1:10に希釈された)
1. 必要な量のストレプトアビジンチップを、1倍キネティクス緩衝液に浸漬し; 機械に入れて平衡化する
2. サンプルプレートを充填する: - 各ウェルに200μlの緩衝液又は抗体希釈液 a) カラム1 -ベースライン(緩衝液) b) カラム2 - 5μg/mLに希釈したビオチン化タンパク質(*例えば*、sGARP-proTGFβ1又はLTBP1-proTGFβ1) c) カラム3 - ベースライン2 (緩衝液) d) カラム4 - Abのための抗体会合 e) カラム5 - Abのための抗体会合 f) カラム6 - 解離Ab(緩衝液) g) カラム7 - 解離Ab(緩衝液)
3. 96ウェルプレート中で希釈液を作製する: a) 両方の抗体を、行Aの300μlの1倍緩衝液中で50μg/mLに希釈する b) 200μlの緩衝液を、各カラムの残りに加える c) 100μlをカラムに移して、3倍希釈液を作製する
4. サンプルプレートを、チッププレートに隣接して機械に入れる
5. ソフトウェアをセットアップする a) 緩衝液、充填、サンプルを指示する(試験される抗体につき1つのアッセイ) b) 一定時間にわたるプロトコルの工程を指示する(ベースライン、充填、会合、解離): ベースライン: 60秒 充填: 300秒 ベースライン2: 60秒 結合: 300秒 解離: 600秒
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) 直近の5秒のベースラインに対して正規化を設定する c) 解離にアラインする d) 会合及び解離を分析する (1:1結合モデル、曲線を適合させる) e) 最良R^2値を決定し; 最良R^2値を有する濃度を含む f) 全体的適合を選択する 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 表を保存し、エクスポートする

【０７９４】

一例として、ＴＧＦβ抗原に対するＡｂ６の結合を、ポリスチレン９６ウェル黒色ハーフエリアプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ　Ｂｉｏ－Ｏｎｅ（登録商標））を用いて、ＦｏｒｔｅＢｉｏ（登録商標）Ｏｃｔｅｔ（登録商標）Ｒｅｄ３８４におけるバイオレイヤー干渉法によって測定した。ヒト成熟ＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３成長因子並びにヒト潜在型ＴＧＦβ１に対するＡｂ６の結合が、製造業者の仕様書に従って、アミン反応性第二世代（ＡＲ２Ｇ）試薬キット（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を用いて、抗原をアミン反応性第二世代（ＡＲ２Ｇ）バイオセンサ（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）にカップリングした後に行われた。ＡＲ２Ｇバイオセンサーを、まず、実験の開始前の少なくとも１０分間にわたってオフ

ラインで、水中で水和させた。実験の開始後、ＡＲ２Ｇチップを、１分間にわたって水中で平衡化した。次に、チップを、５分間にわたって新たに調製された活性化溶液（１８部の水、１部の４００ｍＭのＥＤＣ（１－エチル－３－［３－ジメチルアミノプロピル］カルボジイミド塩酸塩）及び１部の２００ｍＭのスルホ－ＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミド））中に移動した。組み換えＴＧＦβタンパク質（１０ｍＭの酢酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ５）中１０ｕｇ／ｍＬ）を、３分間にわたって活性化されたチップに結合してから、１５分間にわたってエタノールアミン（ｐＨ８．５）でクエンチした。ＥＫＢ緩衝液（２％のＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ）、０．５ＭのＮａＣｌ、及び０．０９％のＴｗｅｅｎ－２０（Ｓｉｇｍａ）が補充されたキネティクス緩衝液（Ｋｉｎｅｔｉｃｓ ｂｕｆｆｅｒ）（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）中での結合されたチップの２０分間のインキュベーションを用いて、ベースラインを決定した。次に、チップを、１０分間にわたってＥＫＢ中のＡｂ６の１５ｕｇ／ｍＬの溶液中で会合させてから、ＥＫＢ中で１０分間解離させた。ヒト大型潜在複合体に対するＡｂ６の結合を、５分間にわたって抗ヒトＦｃ捕捉バイオセンサー（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）（ＥＫＢ中１ｕｇ／ｍＬ）の表面にＡｂ６を固定した後、測定した。次に、さらに１分間のベースラインを行ってから、１０分間にわたってＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ２、又はＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ３（ＥＫＢ中１００ｎＭ）の会合を行った。最後に１０分間の解離を行った。

【０７９５】

２）溶液平衡化滴定に基づくアッセイ：

ＭＳＤ－ＳＥＴは、溶液相平衡化K_Dの決定に使用され得るよく特徴付けられた技術である。ＭＳＤ－ＳＥＴなどの溶液に基づく平衡化アッセイは、結合平衡除外（ｋｉｎｅｔｉｃ ｅｘｃｌｕｓｉｏｎ）の原理に基づき、リアルタイム会合及び解離速度ではなく平衡状態での遊離リガンド結合が、親和性を決定するために測定される。

【０７９６】

ＭＳＤ－ＳＥＴアッセイを、平衡状態での抗体の親和性を測定するために行った。簡潔に述べると、各試験抗体を、３～５倍に希釈し、サンプルを、４８ウェル皿中でビオチン化抗原と混合した。ＳＥＴサンプルを、室温で２０～２４時間にわたって平衡化した。一方、捕捉プレートを、ＩｇＧ（２０ｎＭ）で被覆し、４℃で一晩又は室温で３０分間インキュベートした後、５％のＢＳＡでのブロッキング工程を行った。捕捉プレートを３回洗浄した後、ＳＥＴサンプルを加え、１５０秒間インキュベートした。プレートを１回洗浄して、非結合複合体を除去した。２５０ｎｇ／ｍｌのＳＡ－スルホ－ＴＡＧ（商標）を加え、次に、３回洗浄した。２倍の読み取り緩衝液（Ｒｅａｄ Ｂｕｆｆｅｒ）を加え、標識した結合複合体からのシグナルを、ＱｕｉｃｋＰｌｅｘ（登録商標）ＳＱ １２０機器の使用によって読み取った。

【０７９７】

ＭＳＤ－ＳＥＴによって測定されるときの本開示の例示的な抗体の親和性プロファイルの要約リストが、本明細書における表６及び７に示される。

【０７９８】

一例として、ＭＳＤ標準プレート（ＭＳＤ）を、室温で３０分間又は４℃で一晩、ＰＢＳ中のモノクローナル抗体の２０ｎＭの溶液で被覆した。次に、コーティングに使用される、増加する濃度の同じモノクローナル抗体を、振とうせずに室温で一晩、ビオチン化抗原（Ａｂ６に対する結合の場合５０～４００ｐＭ；Ａｂ４に対する結合の場合０．８～１．６ｎＭ）と混合した。２０～２４時間の平衡化後、抗体被覆プレートを、室温で３０分間にわたってブロッキングバッファー（Ｂｌｏｃｋｉｎｇ Ｂｕｆｆｅｒ）Ａ（ＭＳＤ）でブロックし、洗浄緩衝液（ＰＢＳ、０．１％のＢＳＡ、０．０５％のＴｗｅｅｎ－２０）で洗浄してから、ちょうど２．５分間にわたって、平衡化抗体－抗原複合体をプレートに加えた。プレートを洗浄緩衝液で再度洗浄してから、０．１％のＢＳＡと共にＰＢＳ中２５０ｎｇ／ｍｌのスルホ－ＴＡＧ（商標）標識ストレプトアビジン二次試薬（ＭＳＤ）を加えた。洗浄緩衝液で洗浄した後、プレートを、ＭＥＳＯ ＱｕｉｃｋＰｌｅｘ（登録商標）ＳＱ １２０（ＭＳＤ）を用いて、ＭＳＤ読み取り緩衝液（ＭＳＤ）中で読み取っ

た。結合データを、Ｐｒｉｓｍ（登録商標）７ソフトウェア（ＧｒａｐｈＰａｄ（登録商標））における非線形曲線適合によって処理して、平衡結合ＫＤ値を計算した。

【０７９９】

３）表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）に基づくアッセイ：

Ｂｉａｃｏｒｅ（登録商標）系を用いて、Ａｂ６の抗原結合についての１価結合親和性及び動態パラメータを決定した。簡潔に述べると、結合速度を、Ｂｉａｃｏｒｅ　８Ｋ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて表面プラズモン共鳴によって評価した。ビオチンＣＡＰセンサーチップを用いて、ビオチン化抗原を捕捉した。様々な濃度（０ｎＭ、０．６２ｎＭ、１．２５ｎＭ、２．５ｎＭ、５ｎＭ及び１０ｎＭ）のＦａｂを、捕捉された抗原に注入した。多重サイクル動態を用い、各分析物濃度を別個のサイクルで注入し、センサーチップ表現を、各サイクル後に再生した。全てのアッセイを、新たに調製された１倍のＨＢＳ－ＥＰ＋緩衝液（１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、１５０ｍＭのＮａＣｌ、３ｍＭのＥＤＴＡ、０．０５％のＴｗｅｅｎ２０、ｐＨ７．４）中で行った。各相互作用についての全ての分析物濃度についてのデータを、１：１結合モデルに全体的に適合させて、動態パラメータを得た。０ｎＭの分析物濃度についてのセンサーグラムを参照として使用した。

【０８００】

抗原複合体、ヒトＬＴＢＰ１－ＰｒｏＴＧＦｂ１、ヒトＬＴＢＰ３－ＰｒｏＴＧＦｂ１、ヒトＧＡＲＰ－ＰｒｏＴＧＦｂ１、及びヒトＬＲＲＣ３３－ＰｒｏＴＧＦｂ１のそれぞれとのＡｂ６相互作用の結合速度を、表面プラズモン共鳴によって評価した。結合速度を、Ｂｉａｃｏｒｅ　８Ｋ（ＧＥ）機器を用いて、表面プラズモン共鳴によって評価した。ビオチン化抗原を、ビオチンＣＡＰチップにおいて捕捉し、抗体のＦａｂ断片を、分析物として使用した。可変濃度（０．６～１０ｎＭ）におけるＦａｂ結合についてのセンサーグラムを、全体的に適合させて、動態パラメータを得た。Ｆａｂについての結合速度を、４つのヒト抗原、ＬＴＢＰ１－ＰｒｏＴＧＦｂ１、ＬＴＢＰ３－ＰｒｏＴＧＦｂ１、ＧＡＲＰ－ＰｒｏＴＧＦｂ１、及びＬＲＲＣ３３－ＰｒｏＴＧＦｂ１のそれぞれに対して評価した。データを、Ｆａｂ濃度０．６２ｎＭ、１．２５ｎＭ、２．５ｎＭ、５ｎＭ及び１０ｎＭで収集し、１：１結合モデルに全体的に適合させて、各相互作用についての動態パラメータ及び結合親和性を得た。

【０８０１】

動態パラメータが、以下の表１６に示される。

【０８０２】

【表２３】

表 16: Ab6 Fab 結合キネティクス。

抗原	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
Hu LTBP1-ProTGFb1	2.05e+6	2.55e-4	0.124
Hu LTBP3-ProTGFb1	1.70e+6	8.31e-4	0.488
Hu GARP-ProTGFb1	2.10E+6	2.18e-4	0.104
Hu LRRC33-ProTGFb1	8.45e+5	1.23e-4	0.145

【０８０３】

実施例２：潜在型ＴＧＦβ１活性化の阻害を測定するための機能アッセイ

ＴＧＦβ１活性化の新規なコンテキスト依存的（ｃｏｎｔｅｘｔ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ）細胞ベースの効力アッセイの開発が、全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２０１９／０２３６６１号パンフレットに記載されている。以前のアッセイ形式は、内因性提示分子によって提示されるｐｒｏＴＧＦβ１の活性化と、外因性ＬＴＢＰによって提示されるｐｒｏＴＧＦβ１の活性化とを区別することができなかった。インテグリン発現細胞を直接トランスフェクトすることにより、国際公開第２０１９／０２３６６１号

パンフレットに開示され、且つ本明細書に使用される新規なアッセイは、内因性提示分子－ｐｒｏＴＧＦβ１活性と外因性ＬＴＢＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１活性との間の枠を確立する。ＬＴＢＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体が細胞外基質に埋め込まれる際、アッセイプレートコーティングもアッセイの重要な構成要素である。ＥＣＭタンパク質フィブロネクチンで被覆された高結合プレートの使用は、ＬＴＢＰアッセイをより堅固にした。

【０８０４】

Ａｂ４、Ａｂ５、Ａｂ６及びＡｂ３抗体が機能的である（例えば、阻害効力を有する）かどうかを決定するために、細胞ベースのアッセイが開発され、ここで、大型潜在複合体（ＬＬＣ）からのＴＧＦβ１成長因子のαＶβインテグリン依存的な放出が測定された。各アッセイは、ＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３、ＧＡＲＰ又はＬＲＲＣ３３を含むＬＬＣのそれぞれに対して特異的である。アッセイ開発及び最適化のプロセスを通して、フィブロネクチンが、ＬＴＢＰ提示ｐｒｏＴＧＦβ１のインテグリン依存的なインビトロ活性化にとって重要なＥＣＭタンパク質であることが分かった。

【０８０５】

アッセイＩ．ＥＣＭ中に沈着される潜在型ＴＧＦβ１の活性化

ＥＣＭに関連する潜在型ｐｒｏＴＧＦβ１複合体（ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１又はＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１）からのＴＧＦβ１のインテグリン依存的な放出を測定するのに最適である以下のプロトコルが開発された。

【０８０６】

材料：

・ＭｖＬｕ１－ＣＡＧＡ１２細胞（クローン４Ａ４）
・ＳＷ４８０／β６細胞（クローン１Ｅ７）（αＶサブユニットが、高いレベルで内因的に発現され；β６サブユニットが、安定的に過剰発現される）
・ＬＮ２２９細胞株（高いレベルの内因性αＶβ８インテグリン）
・Ｃｏｓｔａｒ白壁ＴＣ処理済９６ウェルアッセイプレート＃３９０３
・Ｇｒｅｉｎｅｒ　Ｂｉｏ－Ｏｎｅ　Ｈｉｇｈ　Ｂｉｎｄｉｎｇ　ｗｈｉｔｅμｃｌｅａｒ（登録商標）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
・それぞれ滅菌フィルタチップを備えたＰ２０、Ｐ２００、及びＰ１０００ピペット
・滅菌微量遠心管及びラック
・滅菌試薬槽
・０．４％のトリパンブルー
・２ｍＬ、５ｍＬ、１０ｍＬ、及び２５ｍＬの滅菌ピペット
・組織培養処理された１００ｍｍ又は１５０ｍｍプレート
・７０％のエタノール
・Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ還元血清培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈ　＃３１９８５－０７０）
・Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）３０００（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈ　＃Ｌ３０００００１５）
・Ｂｒｉｇｈｔ－Ｇｌｏ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ　＃Ｅ２６２０）
・０．２５％のトリプシン＋０．５３ｍＭのＥＤＴＡ
・ｐｒｏＴＧＦβ１発現プラスミド、ヒト
・ＬＴＢＰ１Ｓ発現プラスミド、ヒト
・ＬＴＢＰ３発現プラスミド、ヒト
・ＬＲＲＣ３２（ＧＡＲＰ）発現プラスミド、ヒト
・ＬＲＲＣ３３発現プラスミド、ヒト

【０８０７】

装置：

・ＢｉｏＴｅｋ（登録商標）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　３７Ｃ　５％のＣＯ２
・３７Ｃの水／ビーズ浴
・プラットフォームシェーカー
・顕微鏡
・血球計／カウンテス（ｃｏｕｎｔｅｓｓ）

【０８０８】

定義：

・ＣＡＧＡ１２　４Ａ４細胞：ルシフェラーゼ遺伝子発現を駆動する、ＣＡＧＡ１２合成プロモーターで安定してトランスフェクトされたＭｖＬｕ１細胞（ミンク肺上皮細胞）の誘導体

・ＤＭＥＭ－０．１％のＢＳＡ：アッセイ培地；ベース培地は、ＤＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ Ｃａｔ＃　１１９９５－０６５）であり、培地は、０．１％　ｗ／ｖまで希釈されたＢＳＡ、ペニシリン／ストレプトマイシン、及び４ｍＭのグルタミンも含有する

・Ｄ１０：ＤＭＥＭ　１０％のＦＢＳ、Ｐ／Ｓ、４ｍＭのグルタミン、１％のＮＥＡＡ、１×ＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｇｉｂｃｏ　Ｃａｔ＃　３５０５００６１）

・ＳＷ４８０／β６培地：Ｄ１０＋１０００ｕｇ／ｍＬのＧ－４１８

・ＣＡＧＡ１２（４Ａ４）培地：Ｄ１０＋０．７５ｕｇ／ｍＬのピューロマイシン

【０８０９】

手順：

０日目に、細胞を、トランスフェクションのために播種した。ＳＷ４８０／β６（クローン１Ｅ７）細胞を、トリプシンで脱離させ、ペレット化した（２００×ｇで５分間回転）。細胞ペレットを、Ｄ１０培地中で再懸濁させ、１ｍｌ当たりの生存細胞を計数した。細胞を、５．０×１０^{6}個の細胞／１２ｍｌ／１００ｍｍ組織培養皿で播種した。ＣＡＧＡ１２細胞については、細胞を、３日目のアッセイに使用するために、１つのＴ７５フラスコ当たり１００万個の密度で継代培養した。培養物を、３７℃及び５％のCO_2でインキュベートした。

【０８１０】

１日目に、インテグリン発現細胞をトランスフェクトした。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）３０００試薬によるトランスフェクションのための製造業者のプロトコルに従った。簡潔に述べると、以下のものを、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ（登録商標）Ｉ中で希釈した、１ウェル当たり１２５μｌの場合：７．５μｇのＤＮＡ（提示分子）＋７．５μｇのＤＮＡ（ｐｒｏＴＧＦβ１）、３０μｌのＰ３０００、及びＯｐｔｉ－ＭＥＭ　Ｉと共に１２５μｌまで。ウェルを、ＤＮＡを一緒にピペッティングすることによって混合し、次に、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭを加えた。Ｐ３０００を加え、ピペッティングによって全てを十分に混合した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）３０００のマスターミックスを作製し、ＤＮＡミックスに加えて：ＬＴＢＰ１アッセイの場合：１５μｌのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　３０００、１ウェル当たりＯｐｔｉ－ＭＥＭ　Ｉ中で１２５μｌまで；ＬＴＢＰ３アッセイの場合：４５μｌのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　３０００、１ウェル当たりＯｐｔｉ－ＭＥＭ　Ｉ中で１２５μｌまで。希釈されたＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　３０００をＤＮＡに加え、ピペッティングによって十分に混合し、室温で１５分間インキュベートした。インキュベーション後、溶液をピペッティングによって数回混合し、次に１皿当たり２５０μｌのＤＮＡ：Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　３０００（２×１２５μｌ）を滴下して加えた。各皿を穏やかに回転させて混合し、皿を約２４時間にわたって組織培養インキュベータに戻した。

【０８１１】

１～２日目に、アッセイプレートを、ヒトフィブロネクチンで被覆した。詳細には、凍結乾燥されたフィブロネクチンを、超高純度蒸留水（滅菌）中で１ｍｇ／ｍｌに希釈した。１ｍｇ／ｍｌのストック溶液を、ＰＢＳ（滅菌）中で１９．２μｇ／ｍｌに希釈した。

５０μｌ／ウェルをアッセイプレート（高結合）に加え、組織培養インキュベータ（３７℃及び５％のCO_2）中で一晩インキュベートした。最終濃度は、３．０μｇ／ｃｍ^{2}であった。

【０８１２】

２日目に、トランスフェクトされた細胞を、アッセイのために平板培養し、阻害剤を添加した。まず、フィブロネクチンコーティングを、２００μｌ／ウェルのＰＢＳを、アッセイプレート中で予めフィブロネクチン溶液に加えることによって洗浄した。マルチチャネルピペットを用いて洗浄液を手作業で除去した。洗浄を、合計２回の洗浄のために繰り返した。プレートを、細胞添加前に蓋を外して室温で乾燥させた。次に、細胞を、トリプシンで脱離させることによって平板培養し、ペレット化した（２００×ｇで５分間回転）。ペレットを、アッセイ培地中で再懸濁させ、１ｍｌ当たりの生存細胞を計数した。ＬＴＢＰ１アッセイの場合、細胞を、０．１０×１０^{6}個の細胞／ｍｌに希釈し、１ウェル当たり５０μｌで播種した（１ウェル当たり５，０００個の細胞）。ＬＴＢＰ３アッセイの場合、細胞を、０．０５×１０^{6}個の細胞／ｍｌに希釈し、１ウェル当たり５０μｌで播種した（１ウェル当たり２，５００個の細胞）。機能的抗体希釈液を調製するために、抗体を、ビヒクル中で一貫した作動濃度になるまで予め希釈した。ストック抗体を、ビヒクル（ＰＢＳが最適であり、クエン酸ナトリウム緩衝液を避ける）中で連続希釈した。連続希釈の各点を、抗体の４倍最終濃度のためにアッセイ培地中で希釈した。１ウェル当たり２５μｌの４倍抗体を加え、培養物を約２４時間にわたって３７℃及び５％のCO_2でインキュベートした。

【０８１３】

３日目に、ＴＧＦβレポーター細胞を加えた。アッセイのためのＣＡＧＡ１２（クローン４Ａ４）細胞を、トリプシンで脱離させ、ペレット化した（２００×ｇで５分間回転）。ペレットを、アッセイ培地中で再懸濁させ、１ｍｌ当たりの生存細胞を計数した。細胞を、０．４×１０^{6}個の細胞／ｍｌに希釈し、１ウェル当たり５０μｌで播種した（１ウェル当たり２０，０００個の細胞）。細胞をインキュベータに戻した。

【０８１４】

４日目に、アッセイを読み取った（抗体及び／又はレポーター細胞添加の１６－２０時間後）。Ｂｒｉｇｈｔ－Ｇｌｏ（商標）試薬及び試験プレートを、読み取り前に室温にした。ＢｉｏＴｅｋ（登録商標）Ｓｙｎｅｒｇｙ（商標）Ｈ１における読み取り設定を、ＴＭＬＣ＿ｓｔｄプロトコルを用いて設定した－この方法は、オートゲイン設定を有する。陽性対照ウェルをオートスケール（高）のために選択した。１ウェル当たり１００μｌのＢｒｉｇｈｔ－Ｇｌｏ試薬を加えた。室温で、振とうしながら２分間インキュベートし、プレートを光から保護した。プレートを、ＢｉｏＴｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｈ１において読み取った。

【０８１５】

アッセイＩＩ．細胞表面に提示される潜在型ＴＧＦβ１の活性化

以下のプロトコルを開発した。このアッセイ、又は「直接トランスフェクション」プロトコルは、細胞に関連する潜在型ｐｒｏＴＧＢβ１複合体からのＴＧＦβ１（ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＢβ１又はＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＢβ１）のインテグリン依存的放出（活性化）を測定するのに最適である。

【０８１６】

材料：

・ＭｖＬｕ１－ＣＡＧＡ１２細胞（クローン４Ａ４）

・ＳＷ４８０／β６細胞（クローン１Ｅ７）（αＶサブユニットが、高いレベルで内因的に発現され；β６サブユニットが、安定的に過剰発現される）

・ＬＮ２２９細胞株（高いレベルの内因性αＶβ８インテグリン）

・Ｃｏｓｔａｒ白壁ＴＣ処理済９６ウェルアッセイプレート＃３９０３

・Ｇｒｅｉｎｅｒ　Ｂｉｏ－Ｏｎｅ（登録商標）Ｈｉｇｈ　Ｂｉｎｄｉｎｇ　ｗｈｉｔｅ　ｃｌｅａｒ　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
・それぞれ滅菌フィルタチップを備えたＰ２０、Ｐ２００、及びＰ１０００ピペット
・滅菌微量遠心管及びラック
・滅菌試薬槽
・０．４％のトリパンブルー
・２ｍＬ、５ｍＬ、１０ｍＬ、及び２５ｍＬの滅菌ピペット
・組織培養処理された１００ｍｍ又は１５０ｍｍプレート
・７０％のエタノール
・Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ（登録商標）還元血清培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈ　＃３１９８５－０７０）
・Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　３０００（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈ　＃Ｌ３０００００１５）
・Ｂｒｉｇｈｔ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ　＃Ｅ２６２０）
・０．２５％のトリプシン＋０．５３ｍＭのＥＤＴＡ
・ｐｒｏＴＧＦβ１発現プラスミド、ヒト
・ＬＴＢＰ１Ｓ発現プラスミド、ヒト
・ＬＴＢＰ３発現プラスミド、ヒト
・ＬＲＲＣ３２（ＧＡＲＰ）発現プラスミド、ヒト
・ＬＲＲＣ３３発現プラスミド、ヒト

【０８１７】

装置：

・ＢｉｏＴｅｋ（登録商標）Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｈ１プレートリーダー
・組織培養フード
・ベンチトップ遠心分離機
・CO_2インキュベータ、３７℃、５％のCO_2
・３７℃の水／ビーズ浴
・プラットフォームシェーカー
・顕微鏡
・血球計／カウンテス（ｃｏｕｎｔｅｓｓ）

【０８１８】

定義：

・ＣＡＧＡ１２　４Ａ４細胞：ルシフェラーゼ遺伝子発現を駆動する、ＣＡＧＡ１２合成プロモーターで安定してトランスフェクトされたＭｖＬｕ１細胞（ミンク肺上皮細胞）の誘導体
・ＤＭＥＭ－０．１％のＢＳＡ：アッセイ培地；ベース培地は、ＤＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ　Ｃａｔ＃　１１９９５－０６５）であり、培地は、０．１％　ｗ／ｖまで希釈されたＢＳＡ、ペニシリン／ストレプトマイシン、及び４ｍＭのグルタミンも含有する
・Ｄ１０：ＤＭＥＭ　１０％のＦＢＳ、Ｐ／Ｓ、４ｍＭのグルタミン、１％のＮＥＡＡ、１×ＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｇｉｂｃｏ　Ｃａｔ＃　３５０５００６１）
・ＳＷ４８０／β６培地：Ｄ１０＋１０００ｕｇ／ｍＬのＧ－４１８
・ＣＡＧＡ１２（４Ａ４）培地：Ｄ１０＋０．７５ｕｇ／ｍＬのピューロマイシン

【０８１９】

方法：

０日目に、インテグリン発現細胞を、トランスフェクションのために播種した。細胞を、トリプシンで脱離させ、ペレット化した（２００×ｇで５分間回転）。細胞ペレットを、Ｄ１０培地中で再懸濁させ、１ｍｌ当たりの生存細胞を計数した。細胞を、０．１e^6個の細胞／ｍｌに希釈し、アッセイプレートにおいて１ウェル当たり１００ｕｌで播種した（１ウェル当たり１０，０００個の細胞）。ＣＡＧＡ１２細胞については、２日目のアッセイに使用するために、１つのＴ７５フラスコ当たり１５０万個の密度で継代培養した。培養物を、３７℃及び５％のCO_2でインキュベートした。

【０８２０】
１日目に、細胞をトランスフェクトした。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ３０００試薬によるトランスフェクションのための製造業者のプロトコルに従った。簡潔に述べると、以下のものをＯｐｔｉ－ＭＥＭ（登録商標）Ｉ中で希釈した、１ウェル当たり５μｌの場合：０．１μｇのＤＮＡ（提示分子）＋０．１μｇのＤＮＡ（ｐｒｏＴＧＦβ１）、０．４μｌのＰ３０００、及びＯｐｔｉ－ＭＥＭ Ｉと共に５μｌまで。ウェルを、ＤＮＡを一緒にピペッティングすることによって混合し、次に、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭを加えた。Ｐ３０００を加え、ピペッティングによって全てを十分に混合した。マスターミックスを、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）３０００を用いて作成し、ＤＮＡミックスに加えた：０．２μｌのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ３０００、１ウェル当たりＯｐｔｉ－ＭＥＭ Ｉ中で５μｌまで。希釈されたＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ３０００をＤＮＡに加え、ピペッティングによって十分に混合し、室温で１５分間インキュベートした。インキュベーション後、溶液をピペッティングによって数回混合し、次に１ウェル当たり１０ｕｌのＤＮＡ：Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ３０００（２×５μｌ）を加えた。細胞プレートを約２４時間にわたって組織培養インキュベータに戻した。

【０８２１】
２日目に、抗体及びＴＧＦβレポーター細胞を加えた。機能的抗体希釈液を調製するために、ビヒクル（ＰＢＳが最適である）中のストック抗体を連続希釈した。次に、各点を、抗体の２倍最終濃度のためにアッセイ培地中で希釈した。抗体を調製した後、細胞プレートを、陰圧（陰圧吸引器）、続いて１ウェル当たり１００μｌのアッセイ培地の添加により、アッセイ培地で２回洗浄した。２回目の洗浄後、アッセイ培地を１ウェル当たり５０μｌの２倍抗体と交換した。細胞プレートを約１５～２０分間にわたってインキュベータに戻した。

【０８２２】
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、トリプシンで脱離させ、ペレット化した（２００×ｇで５分間回転）。ペレットを、アッセイ培地中で再懸濁させ、１ｍｌ当たりの生存細胞を計数した。細胞を、０．３e^{6}個の細胞／ｍｌに希釈し、１ウェル当たり５０μｌで播種した（１ウェル当たり１５，０００個の細胞）。細胞を、インキュベータに戻した。

【０８２３】
３日目に、アッセイを、抗体及び／又はレポーター細胞添加の約１６－２０時間後に読み取った。Ｂｒｉｇｈｔ－Ｇｌｏ（商標）試薬及び試験プレートを、読み取り前に室温にした。ＢｉｏＴｅｋ（登録商標）Ｓｙｎｅｒｇｙ（商標）Ｈ１における読み取り設定を、ＴＭＬＣ＿ｓｔｄプロトコルを用いて設定した－この方法は、オートゲイン設定を有する。陽性対照ウェルをオートスケール（高）のために選択した。１ウェル当たり１００ｕＬのＢｒｉｇｈｔ－Ｇｌｏ試薬を加えた。室温で、振とうしながら２分間インキュベートし、プレートを光から保護した。プレートを、ＢｉｏＴｅｋ Ｓｙｎｅｒｇｙ Ｈ１において読み取った。

【０８２４】
図３３Ｂに示されるインビトロ効力データを得るのに使用される細胞ベースのレポーターアッセイは、以下のとおりである。

【０８２５】
アッセイの２日前に、１ウェル当たり１２，５００個のＬＮ２２９細胞を、白壁９６ウェル組織培養処理済アッセイプレート中で平板培養した。ＬＮ２２９細胞を、翌日、ｐｒｏＴＧＦβ１（ＬＴＢＰアッセイ）、ｐｒｏＴＧＦβ１ ｐｌｕｓ ＧＡＲＰ（ＧＡＲＰアッセイ）又はｐｒｏＴＧＦβ１ ｐｌｕｓ ＬＲＲＣ３３（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）３０００を用いてＧＡＲＰ膜貫通及び細胞質ドメインに融合されたＬＲＲＣ３３細胞外ドメインのキメラ構築物のいずれかをコードするプラスミドでトランスフェクトした。ＴＧＦβ１アイソフォーム特異性のための対照として、ＬＮ２２９細胞を、ｐｒｏＴＧＦβ３でトランスフェクトし、これは、そのプロドメイン中のＲＧＤ配列の存在

のためαＶインテグリンによってさらに活性化される。約２４時間後、Ａｂ６を連続希釈し、ＤＭＥＭ＋０．１％のＢＳＡ（１ウェル当たり１５，０００個の細胞）中で懸濁されたＣＡＧＡ１２レポーター細胞と一緒に形質転換体に加えた。共培養を設定した約１６～２０時間後、アッセイを、Ｂｒｉｇｈｔ－Ｇｌｏ（商標）ルシフェラーゼアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ（登録商標））を用いて２分間発色させ、発光を、プレートリーダーにおいて読み取った。抗体ビヒクルの存在下でのルシフェラーゼ活性は、１００％の活性を決定し、１６７ｎＭ（２５μｇ／ｍｌ）の高親和性ｐａｎＴＧＦβ抗体１２．７の存在下でのシグナルは、０％の活性として設定した。

【０８２６】

用量反応活性は、Ｐｒｉｓｍ　７を用いて、３パラメータｌｏｇ阻害剤対反応モデルに対する非線形適合であり、最良適合ＩＣ５０値を計算した。

【０８２７】

タンパク質分解ＴＧＦβ１活性化の阻害を試験するために、ＣＡＧＡ１２レポーター細胞を、白壁９６ウェル発光アッセイプレート（１ウェル当たり１２，５００個の細胞）中に播種した。２４時間後、細胞を、アッセイ培地（ＤＭＥＭ＋０．１％のＢＳＡ）で洗浄し、Ａｂ６（２．５μｇ／ｍｌ）及び小さい潜在型複合体ｐｒｏＴＧＦβ１　Ｃ４Ｓ（１．５ｎｇ／ｍｌ）を、アッセイ培地中でＣＡＧＡ細胞に加えた。この混合物を、３７℃で４時間インキュベートして、抗体結合を可能にした。このインキュベーション後、組み換えヒト血漿カリクレインプロテアーゼ（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を、５００ｎｇ／ｍｌの最終濃度で加えた。アッセイ混合物を、約１８時間にわたってＣＡＧＡ細胞と共にインキュベートし、その後、ＴＧＦβ１活性化を、上述される生物発光によって読み取った。

【０８２８】

実施例３：インビトロでのＴＧＦβ１のプロテアーゼ誘導性活性化に対するＴＧＦβ１特異的なコンテキスト依存的抗体の効果

以前に、本出願人は、Ａｂ３（アイソフォーム選択的なコンテキストバイアスされたＴＧＦβ１阻害剤）が、インビトロで及び細胞ベース／ＣＡＧＡアッセイにおいて、ＴＧＦβ１のインテグリン依存的及びカリクレイン依存的活性化の両方を阻害することが可能であったことを示した。

【０８２９】

Ａｂ６（アイソフォーム選択的ＴＧＦβ１阻害剤）が、ＴＧＦβ１のプロテアーゼ依存的活性化を阻害する能力を試験し、Ａｂ３及びＡｂ６の効果をさらに比較するために、２つの細胞ベース／ＣＡＧＡアッセイを確立した：ｉ）カリクレイン依存的ＴＧＦβ１活性化並びにＡｂ３及びＡｂ６の効果；並びにｉｉ）プラスミン依存的ＴＧＦβ１活性化並びにＡｂ３及びＡｂ６の効果。

【０８３０】

簡潔に述べると、ＣＡＧＡレポーター細胞を、アッセイの開始の２４時間前に播種した。ＰｒｏＴＧＦβ１－Ｃ４Ｓを、ＣＡＧＡ細胞上に滴定した。プロテアーゼ（血漿－ＫＬＫ又はプラスミン）を、示されるように固定濃度で加えた。アッセイ混合物を約１８時間インキュベートした。ＴＧＦβ活性化を、ルシフェラーゼアッセイによって測定した。

【０８３１】

第１の試験において、ＫＬＫの存在下で、ｐｒｏＴＧＦβ１を活性化した（陽性対照）。このＴＧＦβ活性化は、Ａｂ３の添加によって有効に阻害され、これは、以前の結果を裏付けている。同様に、Ａｂ６も、ＴＧＦβ１のカリクレイン誘導性活性化を阻害した。これらの結果は、ＴＧＦβ１のインテグリン依存的活性化に加えて、アイソフォーム特異的な、コンテキスト依存的阻害剤抗体（バイアスされた及びバイアスされない）が、インビトロでＴＧＦβ１のＫＬＫ依存的活性化をブロックすることができることを示した（図１）。

【０８３２】

第２の試験において、組み換えヒトプラスミンの存在下で、ｐｒｏＴＧＦβ１を活性化

した（陽性対照）。意外なことに、このＴＧＦβ活性化は、ＡＢ６のみによって有効に阻害され、Ａｂ３によって有効に阻害されなかった。これらの結果は、コンテキストバイアスされた阻害剤（Ａｂ３）とコンテキストバイアスされない阻害剤（Ａｂ６）との間の予想外の機能差を示す（図２）。

【０８３３】

実施例４：急性腎臓線維症の片側尿管閉塞（ＵＵＯ）モデルにおける抗ＴＧＦβ１抗体Ａｂ３及びＡｂ６による急性線維症の阻害

抗ＴＧＦβ１抗体による急性線維症の阻害を、急性腎臓線維症の片側尿管閉塞（ＵＵＯ）モデルにおいて試験した。このモデルでは、線維症が、試験０日目に左尿管の永続的な外科的結紮によって雄マウスにおいて誘導される。外科手術を行ったが尿管閉塞しなかったシャム処置マウスが、これらの実験において健常な対照として含まれていた。

【０８３４】

対照（ＩｇＧ）又は試験抗体（Ａｂ３、Ａｂ６）を、試験１及び４日目に腹腔内（ｉ．ｐ．）注入によってマウスに投与した。腎臓を、試験の終了時に採取し、外科手術の５日後にＲＮＡをこれらの組織から採取した。線維症誘導の程度を、コラーゲンＩ（Ｃｏｌ１ａ１）、コラーゲンＩＩＩ（Ｃｏｌ３ａ１）、フィブロネクチン１（Ｆｎ１）、リシルオキシダーゼ（Ｌｏｘ）、リシルオキシダーゼ様２（Ｌｏｘｌ２）、平滑筋アクチン（Ａｃｔａ２）、マトリックスメタロプロテアーゼ（Ｍｍｐ２）及びインテグリンα１１（Ｉｔｇａ１１）を含む一連の線維症関連遺伝子について定量的ポリメラーゼ連鎖反応（ｑＰＣＲ）によってその後評価した（Ｒｏｌｆｅ ｅｔ ａｌ．，２００７．Ｓｏｕｎｄ Ｒｅｐａｉｒ Ｒｅｇｅｎ．１５（６）：８９７－９０６）（Ｔａｍａｋｉ ｅｔ ａｌ．，１９９４．Ｋｉｄｎｅｙ Ｉｎｔ．４５（２）：５２５－５３６）（Ｂａｎｓａｌ ｅｔ ａｌ．，２０１７．Ｅｘｐ Ｍｏｌ Ｍｅｄ．４９（１１）：ｅ３９６）（Ｌｅａｆ＆Ｄｕｆｆｉｅｌｄ，２０１６．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．１２７（１）：３２１－３３４）。

【０８３５】

コラーゲン遺伝子発現に対するＡｂ３又はＡｂ６処置の効果

Ｃｏｌ１ａ１及びＣｏｌ３ａ１は、線維症の重要な要素である。Ｃｏｌ１ａ１は、閉塞された腎臓中で１０～４０倍誘導され、Ｃｏｌ３ａ１は、５～２５倍に上方制御される（Ｐ＜０．００５、シャム処置＋ＩｇＧ処置マウスを、ＵＵＯ＋ＩｇＧ群と比較する）。図４に示されるように、３、１０又は３０ｍｇ／ｋｇ／ｗｋのＡｂ３で処置されたＵＵＯマウスは、ＵＵＯ＋ＩｇＧと比較して、両方のコラーゲン遺伝子の低下した発現を示す（Ｐ＜０．０５）。３又は１０ｍｇ／ｋｇ／ｗｋのＡｂ６による処置も、ＵＵＯによる線維性遺伝子誘導を抑制した（ＵＵＯ＋ＩｇＧと比較してＰ＜０．０５）。総合すると、これらのデータは、Ａｂ３又はＡｂ６のいずれかによるＴＧＦβ１阻害が、ＵＵＯに関連するコラーゲン誘導を強力に改善することを示唆している。

【０８３６】

フィブロネクチン及びリシルオキシダーゼ様２遺伝子発現に対するＡｂ３又はＡｂ６処置の効果

Ｆｎ１及びＬｏｘｌ２は、線維症における細胞外基質の沈着及び剛性において役割を果たすタンパク質をコードする。図５に示されるように、両方の遺伝子が、ＵＵＯ＋ＩｇＧ群からのサンプル中で上方制御されるが（シャム＋ＩｇＧに対してＰ＜０．００５）、両方の遺伝子の遺伝子発現の倍率増加は、特にＬｏｘｌ２について、コラーゲン遺伝子についてより小さい。３、１０又は３０ｍｇ／ｋｇ／ｗｋのＡｂ３で処置されたサンプルにおいて、本発明者らは、（ＵＵＯ＋ＩｇＧに対して）Ｆｎ１及びＬｏｘｌ２の低下傾向を示すが、この治療効果は、Ｌｏｘｌ２発現について、及び３ｍｇ／ｋｇ／ｗｋの用量でのみ統計的に有意であるに過ぎない（１０ｍｇ／ｋｇ／ｗｋの用量のＦｎ１は、Ｐ＝０．０７で、統計的有意性に近い）。しかしながら、３又は１０ｍｇ／ｋｇ／ｗｋのＡｂ６のいずれかによる処置は、Ｆｎ１及びＬｏｘｌ２の両方の阻害をもたらす（ＵＵＯ＋ＩｇＧに対してＰ＜０．０５）。

【０８３７】
図６は、ＵＵＯモデルにおける処置後の（ＵＵＯ＋ＩｇＧに対する）遺伝子発現の変化の倍率増加を要約する。Ａｂ３は、試験される全ての用量でＣｏｌ１ａ１及びＣｏｌ３ａ１の低下を示した。統計的に有意な変化はまた、Ｉｔｇａ１１及びＬｏｘｌ２において、但し３ｍｇ／ｋｇ／ｗｋの用量でのみ観察された（両方のレベルが、ＵＵＯ＋ＩｇＧに対して低下された）。対照的に、Ａｃｔａ２を除く、調べられた全ての遺伝子が、１０ｍｇ／ｋｇ／ｗｋのＡｂ６による処置後、発現の統計的に有意な変化を示した（全てのレベルが、ＵＵＯ＋ＩｇＧと比べて低下された）。さらに、Ａｃｔａ２及びＬｏｘを除く、調べられた全ての遺伝子は、３ｍｇ／ｋｇ／ｗｋのＡｂ６で処置されたマウスにおいても統計的に有意な低下を示した。

【０８３８】
実施例５：クラウドマンＳ９１メラノーマモデルにおける腫瘍進行に対する、抗ＰＤ－１抗体と組み合わせたＡｂ３及びＡｂ６の効果
多くのヒト腫瘍が表現型によって特徴付けられるという認識に基づいて：ｉ）あるサブセットが、ＰＤ－（Ｌ）１軸遮断に対して反応性であること；ｉｉ）免疫除去のエビデンス；及びｉｉｉ）ＴＧＦＢ１発現及びＴＧＦβシグナル伝達のエビデンス並びに一般的に使用される同系免疫腫瘍学マウスモデルが、ＴＧＦβ１バイアス又は抗ＰＤ－（Ｌ）１耐性を再現しないという観察にもさらに基づいて、本発明者らは、改善された移行可能性（ｔｒａｎｓｌａｔａｂｉｌｉｔｙ）のためにヒト腫瘍と類似のプロファイルを示すインビボ前臨床モデルを特に選択しようとした（実施例１１を参照されたい）。これらの要因を考慮に入れて、好適なインビボモデルを、これらの試験において記載されるクラウドマンＳ９１メラノーマモデルを含む有効性試験を行うために選択した。

【０８３９】
黒色腫腫瘍進行を軽減する抗ＰＤ－１抗体と組み合わせたＡｂ３及びＡｂ６の効果を評価するために、クラウドマンＳ９１マウス黒色腫モデルを使用した。

【０８４０】
腫瘍細胞培養物
クローンＭ３［クラウドマンＳ９１メラノーマ］（ＡＴＣＣ（登録商標）ＣＣＬ－５３．１（商標））細胞は、米国培養細胞系統保存機関（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）（ＡＴＣＣ）から入手し、２．５％のウシ胎仔血清、１５％のウマ血清、２ｍＭのグルタミン、１００単位／ｍＬのペニシリンＧナトリウム、１００μｇ／ｍＬの硫酸ストレプトマイシン及び２５μｇ／ｍＬのゲンタマイシンが補充されたＫａｉｇｈｎ’ｓ　ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｈａｍ’ｓ　Ｆ１２培地中の指数関数的に増殖する懸濁液培養物としてＣＲ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓにおいて維持された。腫瘍細胞を、５％のCO_2及び９５％の空気の雰囲気中、３７℃の加湿されたインキュベータ内において組織培養フラスコ中で成長させた。

【０８４１】
インビボ移植及び腫瘍成長
腫瘍移植の当日に、各雌ＤＢＡ／２試験マウスの脇腹に、５０％のＭａｔｒｉｇｅｌ（登録商標）中の5×10^6個のクラウドマンＳ９１細胞を皮下注射し、腫瘍成長を監視した。腫瘍が１２５～１７５mm^3の体積に到達したとき、マウスを、同一の平均腫瘍体積を有する１２の群にランダムに分け、投与を開始した。腫瘍を、キャリパーを用いて２次元で測定し、体積を、下式を用いて計算した：
腫瘍体積（mm^3）＝$w^2\times l/2$
式中、腫瘍のｗ＝幅及びｌ＝長さ（単位ｍｍ）である。腫瘍重量は、１ｍｇが１mm^3の腫瘍体積に相当すると仮定して推定され得る。

【０８４２】
処置
１日目に皮下Ｃ９１腫瘍（１２５～１７５mm^3）を有するマウス（ｎ＝１２）に、１０ｍＬ／ｋｇの投与体積中１０ｍｇ／ｋｇのＡｂ３；１０ｍＬ／ｋｇの投与体積中３０ｍ

ｇ／ｋｇのＡｂ３；１０ｍＬ／ｋｇの投与体積中３ｍｇ／ｋｇのＡｂ６；又は１０ｍＬ／ｋｇの投与体積中１０ｍｇ／ｋｇのＡｂ６を、６０日間にわたって週に１回、腹腔内（ｉ．ｐ．）に投与した。ラット抗マウスＰＤ－１抗体（ＲＭＰ１－１４－ｒＩｇＧ２ａ、ＢｉｏＸＣｅｌ）を、６０日間にわたって１０ｍＬ／ｋｇの投与体積中１０ｍｇ／ｋｇで、週に２回、腹腔内（ｉ．ｐ．）に投与した。

【０８４３】

第１群に、抗ＰＤ－１抗体のみを投与した。第２群に、抗ＰＤ－１抗体と組み合わせてＡｂ３（１０ｍｇ／ｋｇ）を投与した。第３群に、抗ＰＤ－１抗体と組み合わせてＡｂ３（３０ｍｇ／ｋｇ）を投与した。第４群に、抗ＰＤ－１抗体と組み合わせてＡｂ６（１０ｍｇ／ｋｇ）を投与した。第５群に、抗ＰＤ－１抗体と組み合わせてＡｂ６（３０ｍｇ／ｋｇ）を投与した。非処置対照を使用し、データは示されていない。

【０８４４】

エンドポイント及び腫瘍成長遅延（ＴＧＤ）分析

腫瘍を、週に２回、キャリパーを用いて測定し、各動物を、その腫瘍が２，０００ｍｍ^{3}のエンドポイント体積に達したとき又は試験の終了時（６０日目）のいずれか早い方で安楽死させた。腫瘍体積エンドポイントのために試験を終了したマウスは、安楽死の日付と共に、腫瘍進行（ＴＰ）のため安楽死されたと報告された。分析のためのエンドポイントまでの時間（ＴＴＥ）が、国際公開第２０１８／１２９３２９号パンフレットに記載される方法に従って各マウスについて計算された。

【０８４５】

パーセント腫瘍成長遅延（％ＴＧＤ）が、非処置の対照と比較した処置群におけるエンドポイントまでのメジアン時間の増加として定義され、対照のエンドポイントまでのメジアン時間（ＴＴＥ）に対するパーセンテージとして表される。

Ｔ＝処置についての平均ＴＴＥ

Ｃ＝対照についての平均ＴＴＥ

％ＴＧＤ＝（（Ｔ－Ｃ）／Ｃ）＊１００

【０８４６】

抗ＰＤ１処置は、アイソタイプ対照処置と比較して２５％のＴＧＤをもたらした。１０ｍｇ／ｋｇの抗ＰＤ１／Ａｂ３は、１４％のＴＧＤを有していた一方、３０ｍｇ／ｋｇの抗ＰＤ１／Ａｂ３は、９２％のＴＧＤを有していた。抗ＰＤ１処置単独における２９．８日と比較して、４５．８日としての、３０ｍｇ／ｋｇの抗ＰＤ１／Ａｂ３についてのエンドポイントまでのメジアン時間。

【０８４７】

第２のクラウドマンＳ９１試験において、抗ＰＤ－１処置は、アイソタイプ対照処置と比較して４８％のＴＧＤをもたらした。１０ｍｇ／ｋｇの抗ＰＤ－１／Ａｂ３は、１２２％のＴＧＤを有していた一方、３０ｍｇ／ｋｇの抗ＰＤ－１／Ａｂ３は、２１７％のＴＧＤを有していた。１０ｍｇ／ｋｇ及び３０ｍｇ／ｋｇの両方の抗ＰＤ－１／Ａｂ６は、２１７％のＴＧＤを有していた。抗ＰＤ－１についてのエンドポイントまでのメジアン時間は、３４．６日であり、１０ｍｇ／ｋｇの抗ＰＤ－１／Ａｂ３では、５１．７日であり、３０ｍｇ／ｋｇは、７４日の試験終了時までであった。１０ｍｇ／ｋｇ及び３０ｍｇ／ｋｇの抗ＰＤ－１／Ａｂ６は両方とも、７４日の試験終了時にメジアン生存に達していなかった。

【０８４８】

試験からの結果は、抗ＰＤ－１と組み合わせた、３０ｍｇ／ｋｇのＡｂ３の投与が、処置されたマウスにおける生存期間を延長したことを示す。５０％の生存に到達するのに、３０ｍｇ／ｋｇの抗ＰＤ－１／Ａｂ３で処置されたマウスは、約４５日間かかった一方、１０ｍｇ／ｋｇのＡｂ３及びＰＤ－１単独で処置されたマウスは、約３０日未満で５０％の生存に達し、これは、ＰＤ－１及びＴＧＦβ１の同時の阻害が、生存利益をもたらしたことを示している。

【０８４９】

図７に示されるように、抗ＰＤ１と組み合わせた、１０ｍｇ／ｋｇ及び３０ｍｇ／ｋｇのＡｂ３又はＡｂ６の投与は、腫瘍成長を遅延させた。抗ＰＤ－１単独で処置された８匹のマウスが、２０００ｍｍ^{3}の腫瘍体積（点線によって示されるように）に達した一方、抗ＰＤ－１及び１０ｍｇ／ｋｇのＡｂ３で処置された６匹のみのマウス及び抗ＰＤ－１及び３０ｍｇ／ｋｇのＡｂ３で処置された４匹のマウスが、２０００ｍｍ^{3}の腫瘍体積に達した。抗ＰＤ－１及び１０ｍｇ／ｋｇのＡｂ６で処置された３匹のみのマウス及び抗ＰＤ－１及び３０ｍｇ／ｋｇのＡｂ６で処置された５匹のマウスが、２０００ｍｍ^{3}の腫瘍体積に達した。図８は、抗ＰＤ－１抗体と組み合わせたＡｂ３又はＡｂ６による処置後の平均腫瘍進行を示す。

【０８５０】

別個のＳ９１試験を、抗ＰＤ－１抗体及びＡｂ６（３、１０及び３０ｍｇ／ｋｇで）の組合せによって達成される有効な腫瘍制御を評価するために行った。抗腫瘍反応を定量するために、治療に応答する「有効腫瘍制御」が、２，０００ｍｍ^{3}生存閾値（例えば、エンドポイント腫瘍体積）の２５％未満の、試験終了時の腫瘍体積を達成した各試験群中の動物のパーセンテージとして定義された。結果が、以下に要約される（図９、１１及び１２を参照されたい）。

【０８５１】

【表２４】

表 17. クラウドマン S91 有効性の要約

治療群	クラウドマンS91腫瘍モデル (有効腫瘍制御: %、N)
対照	0% (0/11)
抗PD1単独療法	17% (2/12)
Ab6単独療法	0% (0/12)
抗PD1/ Ab6、3 mg/kg	83% (10/12)
抗PD1/ Ab6、10 mg/kg	78% (7/9)
抗PD1/ Ab6、30 mg/kg	73% (8/11)

【０８５２】

図９に示されるように、クラウドマンＳ９１モデルが、単独療法としてのＰＤ－１遮断に対して反応性が低いと認識されるにもかかわらず、全ての３つの用量（それぞれ８３％、７８％及び７３％）の組合せ治療を受けたほとんどの動物が、有効な腫瘍制御を達成し（例えば、腫瘍体積が、５００ｍｍ^{3}以下に減少される）、これは、Ａｂ６の堅固な相乗効果を実証している。従って、チェックポイント遮断療法（抗ＰＤ－（Ｌ）１など）に対するヒト一次耐性を反映する同系マウス腫瘍モデルにおいて、Ａｂ６による処置により、クラウドマンＳ９１（黒色腫）腫瘍が、抗ＰＤ１療法に耐えられなくなった。Ａｂ６（１週当たり３ｍｇ／ｋｇ程度）及び抗ＰＤ１抗体による組合せ治療は、有意な腫瘍退縮又は有効な腫瘍制御をもたらした。本明細書において達成される相乗的腫瘍成長遅延は、アイソフォーム選択的ＴＧＦβ１阻害剤が、チェックポイント阻害に耐性のあるＴＧＦβ１陽性腫瘍を有する対象の治療のためのチェックポイント遮断療法と共に使用され得ることを示す。組合せ処置群において、抗ＰＤ－１と共に、試験されるＡｂ６の全ての用量（３ｍｇ／ｋｇが黒色；１０ｍｇ／ｋｇが紺青色、及び３０ｍｇ／ｋｇが紫色）が、有意な腫瘍制御を達成した（それぞれ１２匹中９匹、９匹中４匹及び１１匹中８匹）。総合すると、これらの動物の６５％超が、エンドポイント腫瘍体積の２５％未満である、腫瘍体積の減

少を達成した。結果は、平均腫瘍体積としても示した（図１１）。全ての組合せ処置群（３、１０又は３０ｍｇ／ｋｇのＡｂ６は、試験される用量で同様の抗腫瘍効果を示し、これは、このモデルＡｂ６が、３ｍｇ／ｋｇ程度で有効であることを示唆している。これは、生存利益にも反映される（図１２を参照されたい）。

【０８５３】

ＴＧＦβ１及びＰＤ－１の組み合わされた阻害の持続的な抗腫瘍効果を、上記の有効性試験の終了時に処置を停止し、有意な腫瘍制御を達成した動物における腫瘍体積の変化の監視に及ぶことによって調べた。図９からのクラウドマンＳ９１腫瘍を経験したレスポンダーを、投与なしで６週間追跡した（灰色のボックス）。図１０に示されるように、Ａｂ６／抗ＰＤ－１組合せにより延長された腫瘍制御が達成された。報告される数値は、試験の終了時に制御された腫瘍を有する動物の数である。

【０８５４】

さらに、Ａｂ６（１投与当たり３ｍｇｋ、１０ｍｇｋ又は３０ｍｇｋで）が、抗ＰＤ１で処置された動物において評価されているＳ９１腫瘍モデルの進行中の研究において、組合せ治療は、図１２に示されるように、有意な生存利益をもたらす。３８日目に、抗ＰＤ１／Ａｂ６（３０ｍｇｋ）組合せを投与した動物は全て生存しており（例えば、３０ｍｇｋ投与群において３８日目に１００％の生存率）、組合せ群（３、１０及び３０ｍｇｋ）の動物のいずれも、メジアン生存に達していなかった（研究は進行中）。試験の終了時、組合せ処置群における動物の９０％が生存していた。これらのデータは、Ａｂ６などのアイソフォーム選択的阻害剤ＴＧＦβ１が、生存利益を得るためにチェックポイント遮断療法を受ける対象におけるチェックポイント阻害耐性腫瘍を処置するのに使用され得ることを示す。図９～１２について：緑色＝ＩｇＧ対照（３０ｍｇ／ｋｇを週に１回）；オレンジ色＝Ａｂ６（３０ｍｇ／ｋｇを週に１回）；赤色＝抗ＰＤ１（５ｍｇ／ｋｇを週に２回）；黒色＝抗ＰＤ１＋Ａｂ６（３ｍｇ／ｋｇ）；紺青色＝抗ＰＤ１＋Ａｂ６（１０ｍｇ／ｋｇ）；紫色＝抗ＰＤ１＋Ａｂ６（３０ｍｇ／ｋｇ）。

【０８５５】

実施例６：ＭＢＴ２同系膀胱癌モデルにおける抗ＰＤ－１と組み合わされたＡｂ３及びＡｂ５によるＴＧＦβホスホ－ＳＭＡＤ２／３経路の阻害

ＭＢＴ－２尿路上皮癌モデルを、チェックポイント阻害剤と組み合わせて、ＴＧＦβ１特異的阻害を試験するためにＴＧＦβ１優勢腫瘍として選択した。薬力学的試験において、下流のＴＧＦβシグナル伝達に対する抗ＰＤ１と組み合わせたＡｂ３又はＡｂ５の効果を、ＭＢＴ－２モデルにおいて評価した。ホスホ－ＳＭＡＤ２／３アッセイを、製造業者の説明書に従って、ＥＬＩＳＡ（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によって行った。

【０８５６】

インビボ移植及び腫瘍成長

腫瘍移植の当日に、各雌Ｃ３Ｈ／ＨｅＮ試験マウスの脇腹に、5×10^{5}個のＭＢＴ２腫瘍細胞を皮下注射し、腫瘍成長を監視した。腫瘍が、４０～８０mm^{3}の体積に達したとき、マウスを、同一の平均腫瘍体積を有する１０の群にランダムに分け、投与を開始した。腫瘍を、キャリパーを用いて２次元で測定し、体積を、下式を用いて計算した：

腫瘍体積（mm^{3}）＝$w^{2}\times l/2$

式中、腫瘍のｗ＝幅及びｌ＝長さ（単位ｍｍ）である。腫瘍重量は、１ｍｇが１mm^{3}の腫瘍体積に相当すると仮定して推定され得る。

【０８５７】

処置

簡潔に述べると、１日目に皮下ＭＢＴ２腫瘍（４０～８０mm^{3}）を有するマウス（ｎ＝１０）に、１０ｍＬ／ｋｇの投与体積中３ｍｇ／ｋｇのＡｂ５、１０ｍＬ／ｋｇの投与体積中１０ｍｇ／ｋｇのＡｂ５、１０ｍＬ／ｋｇの投与体積中１０ｍｇ／ｋｇのＡｂ３又は１０ｍＬ／ｋｇの投与体積中３０ｍｇ／ｋｇのＡｂ３を、１及び８日目に、腹腔内（ｉ．ｐ．）に投与した。ラット抗マウスＰＤ－１抗体（ＲＭＰ１－１４－ｒＩｇＧ２ａ、Ｂ

ｉｏ　Ｘ　Ｃｅｌｌ（登録商標））を、１０ｍＬ／ｋｇの投与体積中１０ｍｇ／ｋｇで、１、４及び８日目に、腹腔内（ｉ．ｐ．）に投与した。

【０８５８】

第１群に、抗ＰＤ－１抗体のみを投与した。第２群に、抗ＰＤ－１抗体と組み合わせてＡｂ５（３ｍｇ／ｋｇ）を投与した。第３群に、抗ＰＤ－１抗体と組み合わせてＡｂ５（１０ｍｇ／ｋｇ）を投与した。第４群に、抗ＰＤ－１抗体と組み合わせてＡｂ３（１０ｍｇ／ｋｇ）を投与した。第５群に、抗ＰＤ－１抗体と組み合わせてＡｂ３（３０ｍｇ／ｋｇ）を投与した。非処置の対照を使用した（示されていない）。

【０８５９】

ＳＭＡＤ　２／３シグナル伝達の抑制

動物を殺処分し、腫瘍を、８日目の最後の投与の８時間後に取り出し、急速冷凍した。腫瘍を、ドライアイス上で粉砕し、混入ホスファターゼ阻害剤の添加によりタンパク質溶解物を生成した。

【０８６０】

リン酸化ＳＭＡＤ２／３対全ＳＭＡＤ２／３の比率によって評価される結果は、持続性ＳＭＡＤ２／３シグナル伝達が、抗ＰＤ－１と組み合わされたＡｂ３及びＡｂ５の両方で処置された動物において有意に抑制されたことを示し、ここで、Ａｂ５（１０ｍｇ／ｋｇ）が、最も有意な抑制を示し、これは、下流のシグナル伝達の抑制をもたらす、ＴＧＦβ１活性化阻害剤の有効な標的エンゲージメント（ｔａｒｇｅｔ　ｅｎｇａｇｅｍｅｎｔ）を実証している（データは示されていない）。

【０８６１】

実施例７：ＭＢＴ２同系膀胱癌マウスモデルにおける腫瘍進行に対する、抗ＰＤ－１抗体と組み合わされたＡｂ３及びＡｂ６の効果

膀胱癌腫瘍進行を軽減する抗ＰＤ－１抗体と組み合わされたＡｂ３及びＡｂ６の能力を評価するために、ＭＢＴ２同系膀胱癌マウスモデルを使用した。これは、非常に侵襲性が高く、急激に成長する腫瘍モデルであり、腫瘍進行は、薬物治療により克服するのが非常に困難である。

【０８６２】

腫瘍細胞培養物

ＭＢＴ２は、雌Ｃ３Ｈ／ＨｅマウスにおけるＮ－［４－（５－ニトロ－２－フリル）－２－チアゾリル］ホルムアミド誘導性膀胱癌に由来する低分化マウス膀胱癌細胞株である。細胞を、３７℃で５％のCO_2雰囲気中で１０％のウシ胎仔血清及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシンを含むロズウェルパーク記念研究所（Ｒｏｓｗｅｌｌ　Ｐａｒｋ　Ｍｅｍｏｒｉａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）（ＲＰＭＩ）－１６００培地中で培養した。培養培地を、１日置きに交換し、細胞コンフルエンスが９０％に達したとき、継代培養を行った。細胞を、トリプシン処理によってサブコンフルエントな培養物から採取し、無血清培地中で洗浄した。＞９０％の細胞生存率を有する単一細胞懸濁液を、トリパンブルー色素排除によって測定した。細胞を、注入前にリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中で再懸濁させた。

【０８６３】

インビボ移植及び腫瘍成長

移植に使用されるＭＢＴ２細胞を、対数期増殖中に採取し、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中で再懸濁させた。腫瘍移植の当日に、各試験マウスの脇腹に、5×10^5個の細胞（０．１ｍＬの細胞懸濁液）を皮下注射し、腫瘍成長を監視した。腫瘍が、４０～８０mm^3の平均に達したとき、マウスを、１５の群にランダムに分けた。

【０８６４】

腫瘍を、キャリパーを用いて２次元で測定し、体積を、下式を用いて計算した：

腫瘍体積（mm^3）＝$w^2\times l/2$

式中、腫瘍のｗ＝幅及びｌ＝長さ（単位ｍｍ）である。腫瘍重量は、１ｍｇが１mm^3の腫瘍体積に相当すると仮定して推定され得る。

【０８６５】
処置
簡潔に述べると、１日目に皮下ＭＢＴ２腫瘍（４０～８０ｍｍ^3）を有するマウス（ｎ＝１５）に、１０ｍＬ／ｋｇの投与体積中１０ｍｇ／ｋｇのＡｂ３、１０ｍＬ／ｋｇの投与体積中３０ｍｇ／ｋｇのＡｂ３、１０ｍＬ／ｋｇの投与体積中３ｍｇ／ｋｇのＡｂ６又は１０ｍＬ／ｋｇのＡｂ６の投与体積中１０ｍｇ／ｋｇを、２９日間にわたって週に１回、腹腔内（ｉ．ｐ．）に投与した。ラット抗マウスＰＤ－１抗体（ＲＭＰ１－１４－ｒＩｇＧ２ａ、Ｂｉｏ Ｘ Ｃｅｌｌ（登録商標））を、２９日間にわたって１０ｍＬ／ｋｇの投与体積中１０ｍｇ／ｋｇで、週に２回、腹腔内（ｉ．ｐ．）に投与した。
【０８６６】
第１群に、抗ＰＤ－１抗体のみを投与した。第２群に、抗ＰＤ－１抗体と組み合わせてＡｂ３（１０ｍｇ／ｋｇ）を投与した。第３群に、抗ＰＤ－１抗体と組み合わせてＡｂ３（３０ｍｇ／ｋｇ）を投与した。第４群に、抗ＰＤ－１抗体と組み合わせてＡｂ６（３ｍｇ／ｋｇ）を投与した。第５群に、抗ＰＤ－１抗体と組み合わせてＡｂ６（１０ｍｇ／ｋｇ）を投与した。非処置の対照を使用した（示されていない）。
【０８６７】
エンドポイント及び腫瘍成長遅延（ＴＧＤ）分析
腫瘍を、週に２回、キャリパーを用いて測定し、各動物を、その腫瘍が１，２００ｍｍ^{3}のエンドポイント体積に達したとき又は試験の終了時に安楽死させた。腫瘍体積エンドポイントのために試験を終了したマウスは、安楽死の日付と共に、腫瘍進行（ＴＰ）のため安楽死されたと報告された。分析のためのエンドポイントまでの時間（ＴＴＥ）が、国際公開第２０１８／１２９３２９号パンフレットに記載される方法に従って各マウスについて計算された。
【０８６８】
１０ｍｇ／ｋｇの抗ＰＤ１／Ａｂ３は、１９１％のＴＧＤを有し、３０ｍｇ／ｋｇでは１９６％のＴＧＤであった。３ｍｇ／ｋｇの抗ＰＤ１／Ａｂ６は、６８％のＴＧＤであり、１０ｍｇ／ｍｋでは１９６％のＴＧＤであった。処置による部分奏効（ＰＲ）は、腫瘍体積が、試験の経過中の３つの連続した測定についてその１日目の体積５０％以下であり、これらの３つの測定の１つ以上について１３．５ｍｍ^{3}以上であることと定義される。完全奏功（ＣＲ）では、腫瘍体積は、試験の経過中の３つの連続した測定について１３．５ｍｍ^{3}未満であった。１０ｍｇ／ｋｇの抗ＰＤ－１／Ａｂ３は、試験の終了時に０ＰＲ及び４ＣＲを有していた。３０ｍｇ／ｋｇの抗ＰＤ－１／Ａｂ３は、試験の終了時に１ＰＲ及び１ＣＲを有していた。３ｍｇ／ｋｇの抗ＰＤ－１／Ａｂ６は、０ＰＲ及び３ＣＲを有していた。１０ｍｇ／ｋｇの抗ＰＤ－１／Ａｂ６は、０ＰＲ及び５ＣＲを有していた。
【０８６９】
抗ＰＤ－１と組み合わせた、１０ｍｇ／ｋｇ及び３０ｍｇ／ｋｇの用量の両方でのＡｂ３の投与は、腫瘍成長を遅延させた。一部の動物は、腫瘍の完全な退縮を示した。また、抗ＰＤ－１と組み合わせた、３ｍｇ／ｋｇ及び１０ｍｇ／ｋｇの用量の両方でのＡｂ６の投与は、腫瘍成長を遅延させた。一部の動物は、腫瘍の完全な退縮を示した。ＰＤ－１単独で処置されたマウスの大部分は、約８～１４日間で１０２４ｍｍ^{3}の腫瘍体積（点線で示されるように）に達した一方、１０ｍｇ／ｋｇのＡｂ３、３０ｍｇ／ｋｇのＡｂ３、３ｍｇ／ｋｇのＡｂ６、又は１０ｍｇ／ｋｇのＡｂ６で処置されたマウスは、１０２４ｍｍ^{3}の腫瘍体積に達するのに最大で２８日もかかった。抗ＰＤ－１抗体と組み合わせたＡｂ３又はＡｂ６による処置後のメジアン腫瘍進行。下側のグラフは、抗ＰＤ－１と組み合わせてＡｂ３又はＡｂ６を投与されたマウスにおける１５日目のメジアン腫瘍体積（ｍｍ^3）を要約する。抗ＰＤ－１と組み合わせて、Ａｂ３（１０ｍｇ／ｋｇ）、Ａｂ３（３０ｍｇ／ｋｇ）又はＡｂ６（１０ｍｇ／ｋｇ）で処置されたマウスにおける１５日目のメジアン腫瘍体積が、約５００ｍｍ^{3}以下であった一方、抗ＰＤ－１単独で処置されたマウスにおける１５日目のメジアン腫瘍体積は、１０００ｍｍ^{3}以上であった（下側のグラフ）。
【０８７０】

図１３は、ＭＢＴ２におけるＡｂ６の有効性を強調している。５つの処置群からのマウスにおける腫瘍進行が示される。対照ＩｇＧ、Ａｂ６単独又は抗ＰＤ－１単独を投与された動物のいずれも、エンドポイント体積（それぞれ下側及び上側の点線で示される）の２５％以下まで減少された腫瘍体積として定義される有効な腫瘍制御を達成しなかった。対照的に、Ａｂ６／抗ＰＤ－１組合せ治療を投与された２８匹中合わせて１２匹の動物（約４３％）が、２１％（１週当たり３ｍｇ／ｋｇ）及び３６％（１週当たり１０ｍｇ／ｋｇ）の無腫瘍生存体、及び試験期間を超える有意な生存利益を含む、有効な腫瘍制御を達成した。これらの結果は、ＰＤ－１及びＴＧＦβ１経路の同時の阻害が、腫瘍成長を有意に軽減（例えば、遅延又は退縮）し得ることを示す。

【０８７１】

さらに、組合せ治療は、抗ＰＤ－１単独と比較して、３つ全てで処置された群において生存期間を延長させるのに有効であった。図１４に示されるように、５０％の生存に到達するのに、１０ｍｇ／ｋｇのＡｂ３又は１０ｍｇ／ｋｇのＡｂ６で処置されたマウスは、２８日超かかった一方、ＰＤ－１単独で処置されたマウスは、約１６日で５０％の生存に到達した。総合すると、これらの結果は、組合せ治療の生存利益を実証する。

【０８７２】

結果及び説明の要約

腫瘍成長に対するＡｂ６－抗ＰＤ－１の相乗効果：Ａｂ６のこの発見は、ＴＧＦβ１活性化の選択的阻害が、ＣＢＴに対する腫瘍一次耐性を克服するのに十分であり得るという仮説の直接の評価を可能にする。前臨床試験のために、本発明者らは、ＣＢＴに対する一次耐性を示すヒト腫瘍の重要な特徴のいくつかを再現するマウス同系腫瘍モデルを同定しようとした。モデル選択の基準は、１）他の同系腫瘍モデルにおいて有効であることが示された用量での抗ＰＤ－（Ｌ）１単剤治療に対して反応性がほとんど乃至全くないこと、２）浸潤性ＣＤ３＋　Ｔ細胞の欠乏を伴う免疫除去のエビデンス、３）活性なＴＧＦβシグナル伝達のエビデンス、及び４）ＴＧＦβ１アイソフォーム発現のエビデンスを含んでいた。

【０８７３】

全腫瘍由来のＲＮＡの一般に公開されているＲＮＡｓｅｑデータセットを含む、腫瘍反応及び腫瘍プロファイリングデータの調査は、これらの基準を満たす３つの腫瘍モデルの選択をもたらした：ＭＢＴ－２膀胱癌モデル（ＭＢＴ－２）、クラウドマンＳ９１（Ｓ９１）黒色腫モデル、及びＥＭＴ－６乳癌モデル（ＥＭＴ－６）。全腫瘍ＲＮＡｓｅｑデータの分析は、ＴＧＦβ経路の活性化を示すＴＧＦβ反応遺伝子の上方制御及び免疫除去表現型と一致するエフェクターＴ細胞遺伝子の低発現を実証した（図２３Ａ）。総ＴＧＦβアイソフォームタンパク質発現を調べるためのＥＬＩＳＡによる全腫瘍溶解物の分析により、ＴＧＦβ１成長因子が３つ全てのモデルにおいてよく見られることが分かった。

【０８７４】

マウス同系モデルにおけるＡｂ６を評価するために、本発明者らは、免疫原性を最小限に抑えるためにマウスＩｇＧ１／κ定常ドメインに融合されたＡｂ６のヒトＶドメインを有するキメラ抗体としてＡｂ６を表した。Ａｂ６－ｍＩｇＧ１は、完全ヒトＡｂ６と同様の阻害活性を有する。本発明者らは、ＭＢＴ－２腫瘍担持動物が、治療レベルで投与されるときの抗ＰＤ－１（ＲＭＰ１－１４）並びにＡｂ６－ｍＩｇＧ１単独に対して耐性があることを確認した。しかしながら、１週当たり３ｍｇ／ｋｇ又は１週当たり１０ｍｇ／ｋｇのいずれかで投与される抗ＰＤ－１及びＡｂ６－ｍＩｇＧ１は、組み合わせて、それぞれ２１％及び３６％の無腫瘍生存体を含む、腫瘍量の有意な減少並びに各試験の期間を超える有意な生存利益をもたらした（図１３及び１４）。抗ＰＤ－１単独での０／１３と比較して、合計で、４／１４の動物が、抗ＰＤ－１／Ａｂ６－ｍＩｇＧ１（１週当たり３ｍｇ／ｋｇ）に反応し、８／１４が、抗ＰＤ－１／Ａｂ６－ｍＩｇＧ（１週当たり１０ｍｇ／ｋｇ）に反応した。本発明者らは、軽度に、抗ＰＤ－１反応性クラウドマンＳ９１メラノーマモデルにおける同様の反応を観察した。再度、抗ＰＤ－１／Ａｂ６－ｍＩｇＧ１組合せ治療が、全ての用量レベルで、最大で７５％の奏効率及び有意な生存利益を有する顕

著な腫瘍抑制をもたらした（実施例５を参照されたい）。

【０８７５】

次に、本発明者らは、ＭＢＴ－２無腫瘍生存体における抗腫瘍反応の持続性を評価した。処置を中断し、動物を７週間にわたって追跡した。本発明者らは、検出可能な腫瘍再発をいずれの動物にも観察しなかった（実施例８を参照されたい）。

【０８７６】

ＴＧＦβシグナル伝達が、ＣＢＴ有効性を損ねる免疫除去を駆動するという臨床的に導かれた仮説並びにｐａｎ－ＴＧＦβ阻害が、免疫系が、この耐性機構を克服し、ＣＢＴ有効性を促進するのを可能にし得るという、以前に報告された前臨床実証は、部分的に、本発明者らが、本開示の抗体で見られる有意な腫瘍反応及び生存利益が腫瘍免疫コンテキストの関連する変化に対応し得るかどうかを調べることを可能にする。

【０８７７】

単剤として又は組合せでの抗ＰＤ－１又はＡｂ６－ｍＩｇＧ１処置の免疫効果を試験するために、ＭＢＴ－２腫瘍を、治療開始の１０日後にマウスから採取し、次に、選択免疫細胞マーカの免疫組織化学的及びフローサイトメトリー分析に供した。フローサイトメトリー分析が、ＣＤ４５＋免疫区画の全パーセンテージが、処置により変化しなかったことを示した一方、抗ＰＤ－１及びＡｂ６－ｍＩｇＧ１の組合せは、アイソタイプ対照抗体処置（それぞれ３．５％に対して３４％の平均（図２７Ｂ）と比べて、この区画内のＣＤ８＋　Ｔ細胞提示の１０倍の増加を引き起こした。特に、抗ＰＤ－１による単剤治療が、ＣＤ８＋細胞提示の軽度の増加をもたらすようであるが、観察された増加は、この試験において有意性に達しなかった。さらに、これらの腫瘍に由来するＲＮＡの分析は、ＣＤ８＋細胞数の増加と一致し、これらの細胞の活性エフェクター機能を示す細胞傷害性Ｔ細胞活性化のマーカの増加を示した（図３２Ｄ）。ＣＤ４＋ＦｏｘＰ３＋　Ｔｒｅｇ細胞の提示の有意な増加も組合せ治療で観察されたことが特記される。Ｔｒｅｇ細胞のこの増加の関連性は、組合せ治療で観察される有意な抗腫瘍効果を考慮すると、不明である。しかしながら、Ｔｒｅｇ：ＣＤ８の比率は、組合せ治療に応答して変化されなかった。興味深いことに、抗ＰＤ－１／Ａｂ６－ｍＩｇＧ１組合せ治療は、ＭＢＴ－２腫瘍内の全ＣＤ１１ｂ＋細胞提示の有意な減少も誘導した。これは、ＣＤ１１ｂ＋ＣＤ２０６＋及びＣＤ１１ｂ＋Ｇｒ１＋亜集団の選択的な減少に起因するようであり、これは、それぞれ免疫抑制性Ｍ２様マクロファージ及び骨髄由来抑制細胞（ＭＤＳＣ）に対応する。総合すると、細胞のこれらの２つの集団の提示は、組合せ治療後、ＣＤ４５＋細胞集団の４７％の平均から１４％に低下される（図２８Ｂ）。Ｍ１様マクロファージ亜集団（ＣＤ１１ｂ＋ＣＤ２０６－）は、処置により変化するようであり、これは、ＰＤ－１／ＴＧＦβ１遮断が、選択的であるが、腫瘍内の免疫抑制性環境に広い影響を与え、リンパ球及び骨髄区画の両方に有益な影響を与えることを示す。

【０８７８】

組み合わされたＰＤ－１及びＴＧＦβ１阻害が、腫瘍微小環境中への有意なＣＤ８＋Ｔ細胞侵入及び／又は増殖をもたらす特異的機構は、明らかでない。従って、本発明者らは、ＴＧＦβ経路活性と免疫除去との間の関係にさらなる洞察を収集するために、より詳細な組織学的分析を行った。まず、本発明者らは、フローサイトメトリーデータと一致して、対照群ＭＢＴ－２腫瘍全体を通してＣＤ８＋染色の有意な増加を、免疫組織化学的分析によって確認した（図３０）。次に、本発明者らは、腫瘍微小環境中のどの細胞が活性化ＴＧＦβ１に反応しているかを決定するために、ＴＧＦβ反応性遺伝子の活性化を媒介する転写因子であるホスホ－Ｓｍａｄ３（ｐＳｍａｄ３）の免疫組織化学的分析を行った。

【０８７９】

意外なことに、抗ＰＤ－１処置された及び対照マウスからの腫瘍において、ｐＳｍａｄ３染色が、腫瘍血管内皮の核に主に限定されるようであり、このシグナルは、Ａｂ６－ｍＩｇＧによる処置後に大きく減少された（図３０Ｆ）。

【０８８０】

血管周囲のＴＧＦβシグナル伝達の関連性をさらに調べるために、本発明者らは、ＣＤ８＋　Ｔ細胞及びＣＤ３１＋血管内皮を共染色した。ＣＤ８＋　Ｔ細胞は、ＣＤ３１＋腫瘍血管に隣接する領域において豊富であるようである（図３０Ｆ及び３０Ｇ）。この観察は、腫瘍血管系がＴ細胞侵入の経路としての役割を果たし得る可能性を提起する。ＴＧＦβシグナル伝達が、腫瘍中へのＴ細胞侵入に対する障壁を形成する線維芽細胞富化腫瘍周辺間質の存在に関連することを報告した者もいるが、本発明者らの予備観察は、さらなるＴＧＦβ１依存的血管障壁も、腫瘍中へのＣＤ８＋　Ｔ細胞侵入の防止において大きい役割を果たし得ることを示唆する。

【０８８１】

実施例８：ＭＢＴ－２、クラウドマンＳ９１及びＥＭＴ－６腫瘍における抗ＰＤ１／Ａｂ３及び抗ＰＤ１／Ａｂ６完全レスポンダーにおける持続的な抗腫瘍適応免疫記憶応答の発生

１．ＭＢＴ－２腫瘍における抗腫瘍記憶

強力及び持続的な適応免疫応答が、以前に除去されたＭＢＴ２腫瘍を有していた完全レスポンダーにおいて生じたかどうかを確認するために、腫瘍再負荷実験を行った。

【０８８２】

方法

８～１２週齢雌Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスの脇腹に、５×１０^{5}個のＭＢＴ２腫瘍細胞を皮下移植した。４０～８０ｍｍ^{3}の平均サイズに達したとき、動物を、処置群にランダムに分けて、処置を開始した。開始平均腫瘍体積は、群間で等しかった。抗ＰＤ１（ＲＭＰ１－１４）を、１０ｍｇ／ｋｇで週に２回、腹腔内（ｉ．ｐ．）に投与し；Ａｂ３を、１０ｍｇ／ｋｇ又は３０ｍｇ／ｋｇで週に１回投与し、Ａｂ６を、５週間にわたって３ｍｇ／ｋｇ又は１０ｍｇ／ｋｇ投与した。５週間後、少なくとも３つの連続した測定について１３．５ｍｍ^{3}未満の腫瘍体積を有する全ての抗ＰＤ１／Ａｂ３及び抗ＰＤ１／Ａｂ６における動物を、「完全レスポンダー（ＣＲ）」と見なした。測定を、週に２回行った。抗ＰＤ１単独を投与したマウスにこのような完全レスポンダーは存在しなかった。再負荷実験のために、完全レスポンダー動物は、測定可能な腫瘍を有していなかった（例えば、０ｍｍ^{3}）。これらの完全レスポンダーを、以前に投与した化合物のウォッシュアウトを可能にするように、投与なしで（「ウォッシュアウト」期間）７週間にわたって追跡した（例えば、「休息させた」）。７週間の終了時、完全レスポンダー及び年齢を適合させた治療未経験対照動物の反対側脇腹に、５×１０^{5}個のＭＢＴ２腫瘍細胞を皮下注射した。動物を、２５日間にわたってか又は腫瘍体積が１２００ｍｍ^{3}を超えるまでのいずれか早い方で追跡した。エンドポイントは、１２００ｍｍ^{3}の腫瘍体積として定義された。エンドポイントに達した後、動物を殺処分した。

【０８８３】

結果

有効性試験からの完全レスポンダーの、元の移植と反対側の脇腹に、ＭＢＴ－２細胞を皮下に再移植した場合、さらなる処置なしで、完全レスポンダーマウスのいずれかに観察される検出可能な腫瘍成長はなかった一方、対照の、年齢を適合させた、腫瘍－治療未経験群マウスにおける全てのマウスは、移植の３週間以内に測定可能な腫瘍を生じた（図１５）。

【０８８４】

より詳細には、腫瘍再負荷モデルは、免疫記憶、及び転移又は腫瘍再発に対する免疫監視を実証する手段である。これらの場合、完全レスポンダー（治療に反応して完全腫瘍退縮を達成した動物）に、腫瘍細胞を再移植し、成長を、年齢を適合させた治療未経験マウスと比較した。治療未経験動物における腫瘍の出現は、２５日までに１００％（１２／１２）であり（図１５）、多くの動物は、エンドポイント基準に達した。上記の実施例７に記載される試験からの完全レスポンダーに、上述されるＭＢＴ２細胞を再負荷し、試験の終了時まで検出可能な腫瘍を有しておらず（０／９完全レスポンダーを合わせて）、これは、１００％の完全レスポンダーが、ＭＢＴ２腫瘍再負荷に対する堅固な免疫記憶を保持

することを示している。これらの結果は、腫瘍抗原に対する持続的及び強力な記憶応答が、腫瘍を経験した動物において生じたことを示し、初期曝露における腫瘍－クリアランスが、適応免疫応答に関連していたことを示唆する。この知見は、この適応免疫応答が、腫瘍細胞を破壊し、腫瘍定着を防ぎ、恐らくこれらの動物における転移又は腫瘍再発の抑制を持続させるのに十分であることをさらに示唆する。結果は、一次免疫応答中のＴＧＦβ１阻害がメモリーリンパ球集団の発生を妨げないことも実証する。

【０８８５】

ＭＢＴ－２腫瘍モデルからのこれらの再負荷結果は、ＴＧＦβ１及びＰＤ－１の組み合わされた阻害が、これらの動物において持続的及び強力な抗腫瘍免疫記憶を確立するのに十分であることを示す。

【０８８６】

２．クラウドマンＳ９１における持続的な抗腫瘍効果

特に、抗ＰＤ－１／Ａｂ６組合せ群中の数匹のクラウドマンＳ９１腫瘍担持マウスが、完全奏効を生じた一方、一部の動物は、残りの治療期間にわたって小さいが安定した、残存腫瘍量を担持していた。本発明者らは、ＭＢＴ－２におけるデータを有していたため、このモデルにおける腫瘍再負荷データを再現しようとした。しかしながら、腫瘍生着率は、このモデルにおいて可変であるため、この分析はより難題である。代わりに、本発明者らは、処置を停止し、数週間にわたって動物を追跡することを選択した。

【０８８７】

処置中止の６週間後、処置中止時に測定可能な腫瘍を有さないマウスは、腫瘍がないままであった。投与停止の時点で測定可能な腫瘍は、様々な応答を有し、多くは除去されたが、いくつかは安定したままであるか又はより大きくなった（図１０）。これらのデータは、完全な腫瘍クリアランスが達成されるまで処置を維持することの重要性を強調している（実施例５も参照されたい）。

【０８８８】

３．ＥＭＴ－６における持続的な抗腫瘍効果

驚くべきことに、本発明者らは、組合せ治療後の５０％の完全奏効率及び抗ＰＤ－１を上回る有意な生存利益と共に、ＥＭＴ－６乳癌モデルにおいて抗ＰＤ－１／Ａｂ６－ｍＩｇＧ１組合せに対する同様の応答を観察した（図３４Ａ及び３４Ｃ）。ＴＧＦβ１が主に発現されるアイソフォームである、ＭＢＴ－２及びクラウドマンＳ９１と対照的に、ＥＭＴ６は、ＲＮＡ及びタンパク質レベルの両方で、同様のレベルのＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３を発現する。この治療組合せは、抗ＰＤ－１／ｐａｎ－ＴＧＦβ阻害より有効であり、これは、複数のＴＧＦβアイソフォームの存在下でさえ、ＴＧＦβ１が、免疫除去及びひいては一次耐性の主要な駆動因子である可能性が高いことを示唆している。このモデルにおいて、本発明者らは、処置を停止し、投与停止の６週間後、完全レスポンダーが、腫瘍がないままであったことを再度確認しており、これは、応答の持続性を再度実証している（図３４Ｃ、右側）。

【０８８９】

実施例９：抗体スクリーニング、選択方法及び特性評価

成熟ＴＧＦβ１成長因子及びその密接に関連しているファミリーメンバー、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３間の高い配列及び構造類似性を所与として、本発明者らは、この活性形態のＴＧＦβ１成長因子を標的とする選択的で且つ十分に高い親和性の抗体ベース阻害剤の生成が、難題であることが判明するであろうと推論した。潜在型ＴＧＦβ１構造及び特定のインテグリンとの相互作用によるその活性化の機械的側面についての最近報告された洞察は、作用機序としての潜在型複合体の活性化を防ぐことを目的とした、潜在型ＴＧＦβ１複合体中のプロドメインを標的とする可能性を指摘した。

【０８９０】

結合及び活性化阻害の両方におけるアイソフォーム選択性の達成は、それぞれの成長因子ホモ二量体を制限し、不活性にする、ファミリーメンバープロドメイン間のより低い配列類似性を利用するであろう。ＴＧＦβ１活性化の選択的阻害剤の同定のためのさらなる

重要な考慮事項は、潜在型ＴＧＦβ１がジスルフィド結合大型潜在複合体（ＬＬＣ）に組み込まれ、これが、細胞外基質への不活性成長因子複合体の沈着又は細胞表面におけるそれらの同化を可能にすることである。複数のＴＧＦβ１　ＬＬＣが腫瘍微小環境中で発現され得る妥当性を所与として、ＴＣＧＡからのＲＮＡｓｅｑデータを分析した。実質的に全ての腫瘍型が、４つのｐｒｏＴＧＦβ１－提示分子ＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３、ＧＡＲＰ、及びＬＲＲＣ３３の発現のエビデンスを示す（図２２）。従って、本発明者らは、これらの局所コンテキストの全てにおいて潜在型ＴＧＦβ１に結合し、潜在型ＴＧＦβ１活性化を阻害し得る特定の抗体を同定しようとした。

【０８９１】

各ＴＧＦβ１　ＬＬＣの可溶性マウス及びヒト形態を設計し、発現し、精製し、特性評価し、酵母ベースの治療未経験ヒト抗体ディスプレイライブラリーの注意深く設計されたスクリーンにおける正の選択工程に使用した。選択的な潜在型ＴＧＦβ１結合剤の同定を確実にするために、非複合化ＬＬＣ－提示分子も、負の選択工程に使用した。

【０８９２】

正の選択抗原並びにヒト及びマウスＬＬＣ－提示分子（ＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３及びＧＡＲＰ）に対する対抗選択としてのＴＧＦβ１　ＬＬＣのヒト及びマウス形態（ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１）を用いて、酵母ベースの治療未経験完全ヒトＩｇＧ抗体ライブラリーの選択によって親抗体を同定した。選択は、２回の磁気ビーズによる細胞選別（Ｍａｇｎｅｔｉｃ　Ｂｅａｄ　Ａｓｓｉｓｔｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｓｏｒｔｉｎｇ）（ＭＡＣＳ）及びその後の数回の蛍光活性化細胞選別（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　Ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｓｏｒｔｉｎｇ）（ＦＡＣＳ）を含む複数回プロセスであった。ＭＡＣＳ回は、プレ清浄化（非特異的な結合剤を除去するため）、ビオチン化抗原を伴うインキュベーション、洗浄、溶離及び酵母増幅を含んでいた。ＦＡＣＳ選択回は、ビオチン化抗原を伴うインキュベーション、洗浄及びフローサイトメトリーによる結合（正の選択の場合）又は非結合（負の選択若しくは除外の場合）集団の選択、続いて、適切な酵母増殖培地における増殖による選択された酵母の増幅を含んでいた。全ての選択を、溶液相中で行った。

【０８９３】

数百の独自の抗体が、完全長ヒトＩｇＧ１ａｇｌｙ（非グリコシル化（ａｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｅｄ）Ｆｃ）モノクローナル抗体として発現された。次に、これらの抗体を、バイオレイヤー干渉法によって特性評価して、ヒト及びマウスＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１に結合するそれらの能力を決定した。これらのＴＧＦβ１　ＬＬＣに結合した抗体を試験し、細胞ベースの効力スクリーニングアッセイにおいてランク付けた（ＬＴＢＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１、及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１アッセイ）。阻害抗体が、ヒトＩｇＧ４ｓｄｋ　Ｆｃ（Ｓ２２８Ｐ突然変異によって安定されるヒンジ；Ａｎｇａｌ，１９９３）を用いて組み換えにより発現され、それらの阻害活性を、インテグリン媒介性ＴＧＦβ１活性化アッセイにおいて試験した（ＬＴＢＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１、ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１、及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１アッセイ；実施例２を参照されたい）。いくつかの抗体は、レポーター細胞アッセイにおいてｐｒｏＴＧＦβ１を有意に阻害することが可能であった。ヒト及びマウスｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合し、全てのヒト及びマウスｐｒｏＴＧＦβ１　ＬＬＣのインテグリン媒介性活性化を阻害するその能力に基づいて、親和性成熟のためのリード抗体として、抗体Ａｂ４を選択した。

【０８９４】

Ａｂ４の親和性成熟を、２つの異なる抗体操作手法を用いて２段階で行った。第１の段階において、抗体分子のライブラリーを生成し、ここで、親ＣＤＲＨ３を、ＣＤＲＨ１及びＣＤＲＨ２変異体（Ｈ１／Ｈ２シャッフル）を含む予め作製された抗体ライブラリーと組み合わせた。このライブラリーは、ヒト及びマウスｐｒｏＴＧＦβ１複合体への結合について選択された。次に、この段階の親和性成熟キャンペーンからの最も強力な結合剤を、第２の段階の親和性成熟に進め、ここで、親分子の重鎖ＣＤＲ３を、プライマー二量体

ウォーキング手法（Ｈ３オリゴ突然変異）を用いて突然変異誘発に供し、生成された変異体のライブラリーを、ヒト及びマウスｐｒｏＴＧＦβ１複合体への結合について選択した。

【０８９５】

両方の親和性成熟段階からのリード抗体Ａｂ４の親和性最適化子孫を示す合計で１４の抗体を、抗原結合及び潜在型ＴＧＦβ１　ＬＬＣの阻害について再度試験した。全ての４つの潜在型ＴＧＦβ１　ＬＬＣに対するその高い親和性、マウス、ラット及びカニクイザルタンパク質との交差反応性並びに細胞ベースのアッセイにおける増加した効力のため、Ａｂ６を選択した。

【０８９６】

Ａｂ６の結合特性をさらに特性評価するために、インビトロ結合活性を、ＭＳＤ－ＳＥＴアッセイにおいて測定した。Ａｂ６は、潜在型ＴＧＦβ１複合体に対して選択的であることが確認され（図３３Ａを参照されたい）；潜在型ＴＧＦβ２又は潜在型ＴＧＦβ３複合体に対する有意な結合は検出されなかった。さらに、Ａｂ６は、３つの活性／成熟ＴＧＦβ成長因子のいずれにも結合しなかった（図３３Ｃを参照されたい）。同様に、プロドメインに関連していない活性（成熟）ＴＧＦβ１成長因子自体に対する結合は検出されなかった。以下に示されるように、Ａｂ６は、全ての大きい潜在型ＴＧＦβ１複合体（即ち提示分子＋ｐｒｏＴＧＦβ１）に高い親和性で結合する。さらに、Ａｂ６は、望ましい種間の交差反応性を有することが示され；Ａｂ６は、ラット及びカニクイザルの同等物を認識し、高い親和性でそれに結合する。

【０８９７】

【表２５】

表 18. Ab6 異種間特異性

大型潜在複合体	ヒト K_D (pM)	マウス K_D (pM)	ラット K_D (pM)	カニクイザル K_D (pM)
LTBP1-proTGFβ1	18 ± 0	24 ± 0	35 ± 2	39 ± 2
LTBP3-proTGFβ1	29 ± 3	22 ± 0	不検出	不検出
GARP-proTGFβ1	27 ± 2	21 ± 3	不検出	不検出
LRRC33-proTGFβ1	63 ± 0	48 ± 0	86 ± 8	93 ± 10

【０８９８】

インテグリンによって潜在型ＴＧＦβ１活性化を阻害するＡｂ６の能力を試験するために、一連の細胞ベースの活性化アッセイが開発され、これは、ＴＧＦβ１提示及び活性化を可能にするＬＬＣコンテキストのそれぞれに対応する。ヒトＬＮ２２９膠芽細胞腫細胞は、αＶβ８インテグリンを発現し、これは、潜在型ＴＧＦβ１複合体を活性化し得る。これらの細胞は、ＬＴＢＰ１及びＬＴＢＰ３も内因的に発現し（ｑＰＣＲによって測定される）、これは、ＴＧＦβ１コードプラスミドでトランスフェクトされると、これらのＴＧＦβ１　ＬＬＣｓ（ＬＴＢＰ１－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＴＢＰ３－ｐｒｏＴＧＦβ１）の産生、及び細胞外基質中への沈着を可能にする。細胞に関連するＧＡＲＰ－又はＬＲＲＣ３３含有ＴＧＦβ１　ＬＬＣ（ＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１及びＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１）を産生するために、ＬＮ２２９細胞（ｑＰＣＲにより、これらの遺伝子を発現しない）を、ＴＧＦβ１発現構築物と共にこれらの提示分子の１つをコードする発現構築物で共トランスフェクトした。細胞外基質中に沈着され、又はＬＮ２２９細胞の細胞表面上で合成されると、ＴＧＦβ１　ＬＬＣは、その後、同じ細胞によって発現されるα

Ｖβ８インテグリンによって活性化され得る。次に、インテグリン活性化によって潜在型複合体から放出される成熟（活性）ＴＧＦβ１成長因子は、成長因子活性の測定を可能にするＣＡＧＡ１２－ルシフェラーゼプロモーター－レポーターを用いて操作された共培養細胞上でその同種受容体に自由に噛み合う。

【０８９９】

全てのＴＧＦβ１　ＬＬＣは、上記のアッセイ条件下で容易に活性化された。潜在型ＴＧＦβ１を発現するＬＮ２２９細胞中へのＧＡＲＰ又はＬＲＲＣ３３の共トランスフェクションは、有意に高いＴＧＦβシグナルをもたらし、これは、細胞表面におけるＴＧＦβ１　ＬＬＣの形成及び活性化並びに内因性ＬＴＢＰを克服したことと一致する。Ａｂ６は、１．１５～１．４２ｎＭのＩＣ５０値を有して、全ての複合体の活性化を、濃度依存的に阻害した。マウスＴＧＦβ１複合体の阻害効力は、Ａｂ６の種間交差反応性と一致して、同様であった。ＬＴＢＰ１－ＴＧＦβ３複合体へのＡｂ６の有意な結合の欠如と一致して、同様に設計されたアッセイにおいてインテグリン媒介性ＬＴＢＰ－ＴＧＦβ３　ＬＬＣ活性化複合体の阻害がほとんど乃至全く観察されず、従って、これは、ＴＧＦβ１活性化の阻害に対する選択性を実証している（図３３Ｂ）。

【０９００】

特に、Ａｂ６は、ヒト血漿カリクレインの及びプラスミンの潜在型ＴＧＦβ１の活性化も阻害し（図１及び２を参照されたい）、これは、活性化の複数の推定機構が抗体によって阻害され得ることを示している。

【０９０１】

ＴＧＦβ１活性化の生物学的に関連する結果を阻害するＡｂ６の能力をさらに評価するために、本発明者らは、初代ヒトＴｒｅｇ細胞の重要な抑制活性を阻害するこの抗体の能力を評価した。選別されたＣＤ４＋ＣＤ２５^{hi}ＣＤ１２７^{lo}　Ｔｒｅｇ細胞は、Ｔ細胞受容体刺激後にＴＧＦβ１－ＧＡＲＰ　ＬＬＣの表面発現を上方制御する（図２６Ａ）。これらの活性化Ｔｒｅｇ細胞は、自己エフェクターＣＤ４　Ｔ細胞の増殖を抑制し、Ａｂ６は、１μｇ／ｍｌ程度の濃度でこの抑制Ｔｒｅｇ活性をブロックした（図２６Ｂ）。これらの結果は、Ｔｒｅｇ細胞が、Ｔ細胞を抑制するＴＧＦβシグナル伝達を抑止するという過去の観察と一致している。

【０９０２】

実施例１０．ｐｒｏＴＧＦβ複合体Ａｂ５、Ａｂ６及びＡｂ３が結合する場所を決定するエピトープマッピング

ＴＧＦβ１活性化のアイソフォーム選択的阻害剤に対する阻害作用機序についての最初の洞察を得るために、本発明者らは、抗体との潜在型ＴＧＦβ１相互作用の可能な部位を同定するために水素－重水素交換質量分析法（Ｈ／ＤＸ－ＭＳ）分析を行った。水素／重水素交換質量分析法（ＨＤＸ－ＭＳ）は、溶液中でタンパク質構造を調べるための広く使用されている技術である。ＨＤＸ－ＭＳ方法が、全体が参照により本明細書に組み込まれるＷｅｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｒｕｇ　Ｄｉｓｃｏｖ　Ｔｏｄａｙ．２０１４　Ｊａｎｕａｒｙ；１９（１）：９５－１０２に記載されている。簡潔に述べると、ＨＤＸ－ＭＳは、溶液中での重水素とのタンパク質骨格アミド水素の交換に依拠する。弱い水素結合に関与し、又はタンパク質の表面に位置する骨格アミド水素は、容易に交換し得る一方、内部に埋め込まれたもの又は水素結合を安定させるのに関与するものは、よりゆっくりと交換する。骨格アミド水素のＨＤＸ率を測定することにより、タンパク質の動力学及び構造についての情報を得ることができる。

【０９０３】

潜在型ＴＧＦβ１（１５μＭ）及びｐｒｏＴＧＦβ１／Ａｂ　Ｆａｂ（１：３モル比）を、サンプル緩衝液（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．５）中で調製した。非重水素化実験において、各サンプルを、室温でサンプル緩衝液（１：１５、ｖ／ｖ）と混合し、次に、０℃で１：１（ｖ／ｖ）のクエンチ緩衝液（１００ｍＭのリン酸ナトリウム、４Ｍのグアニジン　ＨＣｌ、０．５ＭのＴＣＥＰ）と混合した。クエンチされたサンプルを、オンカラムペプシン消化のためのＨＤＸ技術（Ｗａｔｅｒｓ　Ｃｏｒｐ

．，Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＭＡ，ＵＳＡ）を用いてｎａｎｏＡＣＱＵＩＴＹ（登録商標）ＵＰＬＣ（商標）システム中に直ぐに注入した。溶離剤を、ＭＳＥモードで分析のためにＳＹＮＡＰＴ（登録商標）Ｇ２　ＨＤＭＳ質量分析計（Ｗａｔｅｒｓ　Ｃｏｒｐ．，Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＭＡ，ＵＳＡ）中に送った。Ｆｏｒ　Ｈ／Ｄ交換実験のために、各サンプルを、標識緩衝液（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ、重水中１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＤ　７．５）（１：１５、ｖ／ｖ）と混合して、２５℃で標識反応を開始させた。各サンプルの５つのアリコートを、様々な時間間隔で標識した：１０秒、１分、１０分、１時間、及び２時間。各標識時点の終了時、反応を、１：１（ｖ／ｖ）のクエンチ緩衝液を加えることによってクエンチし、クエンチされたサンプルを、分析のためにＷａｔｅｒｓ　Ｈ／ＤＸ－ＭＳシステム中に注入した。各サンプル実行中、ペプシン洗浄緩衝液（１．５Ｍのグアニジン　ＨＣｌ、４％のアセトニトリル、０．８％のギ酸）をＨ／ＤＸ－ＭＳシステムに注入することにより、除去ブランクを実行した。

【０９０４】

データ非依存型取得モード（ＭＳＥ）及びＰｒｏｔｅｉｎＬｙｎｘ　Ｇｌｏｂａｌ　Ｓｅｒｖｅｒ（ＰＬＧＳ）３．０ソフトウェア（Ｗａｔｅｒｓ　Ｃｏｒｐ．，Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＭＡ）における精密質量及び衝突誘起解離を用いて、Ｈ／ＤＸ－ＭＳ実験に使用される同じＵＰＬＣ－ＥＳＩ－ＱＴｏＦシステムにおいて分析される非重水素化タンパク質サンプル中の消化ペプチドを測定した。ＰＬＧＳから生成された消化ペプチドを、ＭＳ１シグナル強度≧１０００のペプチド品質閾値、及び１ｐｐｍの最大質量誤差で、ＤｙｎａｍＸ　３．０（Ｗａｔｅｒｓ　Ｃｏｒｐ．，Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＭＡ）中にインポートした。自動化された結果を、手動で検査して、様々な荷電状態における対応するｍ／ｚ及び同位体分布が適切な消化ペプチドに適切に割り当てられるのを確実にした。ＤｙｎａｍＸ　３．０を用いて、各消化ペプチドについての相対的重水素組み込みプロット及びＨ／ＤＸヒートマップを生成した。各ペプチドの相対的重水素組み込みを、非重水素化対照サンプルの同位体分布の重量平均セントロイド質量を、各標識時点での重水素標識サンプルの同位体分布の重量平均セントロイド質量のものから差し引くことによって決定した。全ての比較を、同一の実験条件下で行い、それにより重水素組み込みの測定における逆交換補正の必要性をなくした。従って、Ｈ／Ｄ交換レベルは、相対的であると報告される。分数の相対的重水素取り込みを、各消化ペプチドの相対的重水素取り込みを、その理論的最大取り込みで除算することによって計算した。全てのＨ／ＤＸ－ＭＳ実験を、デュプリケートで行い、平均相対的重水素取り込みの不確実性に対する９８％の信頼限界を、記載されるように計算した。０．５Ｄａを超える、非結合及びＦａｂ結合潜在型ＴＧＦβ１間の重水素取り込みの差は、有意であると見なされた。

【０９０５】

ＨＤＸ－ＭＳを行って、ｐｒｏＴＧＦβ複合体Ａｂ５及びＡｂ６が結合した場所を決定した。ＨＤＸ－ＭＳにおいて、抗体によって強固に結合された抗原の領域が、タンパク質間相互作用により、プロトン交換から保護される一方、溶媒に曝露される領域は、プロトン交換を容易に起こし得る。これに基づいて、抗原の結合領域を同定した。

【０９０６】

統計分析は、Ａｂ６　Ｆａｂ結合によって重水素交換から強力に保護されたｐｒｏＴＧＦβ１における３つの結合領域を示した（図１６）。領域１が、潜在型ＴＧＦβ１プロドメイン内である一方、領域２及び３は、ＴＧＦβ１成長因子に位置する。興味深いことに、領域１は、主に潜在型ラッソにわたり、プラスミン及びカリクレインプロテアーゼの両方についてタンパク質分解切断部位を含有し；この領域の保護は、Ａｂ６が潜在型ＴＧＦβ１ｎカリクレイン－及びプラスミン媒介性活性化を阻害するという本発明者らの観察と一致する（図１及び２）。Ａｂ６が、遊離形態（例えば、プロドメインと結合していない）の３つのＴＧＦβ成長因子二量体のいずれにも結合しないことを再現することも重要であり、これは、成長因子ドメイン上の部位との何らかの潜在的な相互作用が、プロドメイン相互作用に依存していることを示唆する。さらに、Ａｂ６及びインテグリンαＶβ６は、潜在型ＴＧＦβ１に同時に結合し得、Ａｂ６は、組み換えαＶβ６インテグリン細胞外

ドメインとの潜在型ＴＧＦβ１相互作用をブロックしない（図１８）。この観察は、抗体結合領域が、インテグリン認識部位を有するＴＧＦβ１プロドメイン中のトリガーループの遠位にあるため、インテグリン依存的ＴＧＦβ１活性化のアロステリック阻害機構を示唆する（ＲＧＤ；図１７）。さらに、推定エピトープ領域１～３（特に領域１及び２）の配列アラインメントは、３つのＴＧＦβアイソフォームにわたる有意な配列分散を示し、これは、ｐｒｏＴＧＦβ２及びｐｒｏＴＧＦβ３複合体と比べたｐｒｏＴＧＦβ１に対するＡｂ６の観察された選択性を説明する可能性が高い（図１７）。

【０９０７】

実施例１１：ＴＧＦＢ１、ＴＧＦＢ２及びＴＧＦＢ３の相対的発現のバイオインフォマティクス分析

ヒト腫瘍サンプルの以前の分析は、ＣＢＴに対する一次耐性への重要な寄与因子としてＴＧＦβシグナル伝達を示唆していた（Ｈｕｇｏ ｅｔ ａｌ．，２０１６）。これらの試験の１つは、尿路上皮癌におけるＴＧＦＢ１遺伝子発現が、抗ＰＤ－Ｌ１処置非レスポンダーに関連するトップスコアのＴＧＦβ経路遺伝子の１つであることを示し、これは、このアイソフォームの活性を、ＴＧＦβシグナル伝達を駆動している可能性があることを示唆している。

【０９０８】

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、一般に公開されているデータセットからの遺伝子発現（ＲＮＡｓｅｑ）データを調べた。Ｔｈｅ Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｏｍｅ Ａｔｌａｓ（ＴＣＧＡ）においてＴＧＦβアイソフォーム（ＴＧＦＢ１、ＴＧＦＢ２及びＴＧＦＢ３）の発現を調べるための一般に公開されているオンラインインターフェイスツール（Ｆｉｒｅｂｒｏｗｓｅ）を用いて、正常及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の示差的発現をまず調べた。ＴＧＦＢ１、ＴＧＦＢ２及びＴＧＦＢ３ ｍＲＮＡ発現を、ヒト癌型の集団にわたって且つ個々の腫瘍内で評価した。ＴＣＧＡデータベースにおける全ての腫瘍ＲＮＡｓｅｑデータセットでは、正常組織コンパレータが選択されて、ＴＧＦＢ１、ＴＧＦＢ２及びＴＧＦＢ３遺伝子の発現が調べられる（図１９）。Ｆｉｒｅｂｒｏｗｓｅインターフェイスからのデータは、キロベース１００万当たりの読み取り（ｒｅａｄｓ ｐｅｒ ｋｉｌｏｂａｓｅ ｍｉｌｌｉｏｎ）（ＲＰＫＭ）のｌｏｇ２として表される。

【０９０９】

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く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、ＴＧＦＢ２の０～２及びＴＧＦＢ３の２～４に対して、４～６の範囲である。本発明者らは、いくつかの腫瘍型において、ＴＧＦＢ１及び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（黒色）と比べて上昇されることも示し、これは、これらのＴＧＦβアイソフォームの増加した発現が癌性細胞に関連し得ることを示唆している。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な役割のため、本発明者らは、ＴＧＦＢ１転写産物が、抗ＰＤ－１又は抗ＰＤＬ１治療が承認されている癌型において上昇されたことを示すことに興味を有し、これらの適応症は、図１９において灰色でラベル付けされる。

【０９１０】

ＲＰＫＭ＞１が、一般に、生物学的に関連する遺伝子発現に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）、その後の分析では、よりストリンジェントなＲＰＫＭ（又は関連する測定ＦＰＫＭのカットオフ（Ｃｏｎｅｓａ ｅｔ ａｌ，２０１６を参照されたい））＞１０又は＞３０が、偽陽性を避けるために使用されたことに留意されたい。比較のために、それらの閾値の３つ全てが、図１９に示される。

【０９１１】

図１９における大きい四分位範囲は、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ＴＧＦβ１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データセットにおける個々の腫瘍サンプルからのＲＮＡｓｅｑデータを分析し、キロベース１００万当たりの断片（ＦＰＫＭ）の数を計算した。ＲＰＫＭ及びＦＰＫＭはほぼ同等であるが、ＦＰＫＭは、同じ転写産物の逆の末端における二重計数読み取り（ｄｏｕｂｌｅ－ｃｏｕｎｔｉｎｇ　ｒｅａｄ）を補正する（Ｃｏｎｅｓａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）。腫瘍サンプルは、転写産物のＦＰＫＭ値が＞３０である場合、ＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２、又はＴＧＦβ３発現について陽性と採点され、各ＴＧＦβアイソフォームを発現する各癌型の患者の割合（％として表される）を計算した（図２０）。

【０９１２】

Ｔｈｅ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ａｔｌａｓ（ＴＣＧＡ）からのＲＮＡｓｅｑデータの比較分析は、３つのファミリーメンバーの中で、ＴＧＦＢ１発現が、腫瘍型の大部分にわたって最も多く見られるようであったことを示した。明らかな例外は、乳癌、中皮腫、及び前立腺癌であり、ここで、他のファミリーメンバー、特にＴＧＦＢ３の発現は、ＴＧＦＢ１と比較して、少なくとも同等に多く見られる。図２０に示されるように、腫瘍型の大部分は、ＴＧＦβ１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、及び頭頸部扁平上皮細胞癌を含むいくつかの癌型は、全ての腫瘍サンプルの８０％超でＴＧＦβ１を発現する。図１９中のデータと一致して、より少ない癌型は、ＴＧＦβ２又はＴＧＦβ３について陽性であるが、いくつかの癌は、侵襲性乳癌、中皮腫、及び肉腫を含む、ＴＧＦβ３陽性である腫瘍サンプルの等しい又はより高いパーセンテージを示す。これらのデータは、癌型がＴＧＦβアイソフォーム発現について階層化され得ることと、このような階層化が、ＴＧＦβアイソフォーム特異的阻害剤による治療の候補である患者を同定するのに有用であり得ることとを示唆する。

【０９１３】

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からのｌｏｇ２（ＦＰＫＭ）ＲＮＡｓｅｑデータを分析し、ヒートマップ中にプロットして（図２１Ａ）、ＦＰＫＭ＞３０を反映する色閾値を、ＴＧＦβアイソフォーム陽性であると採点される最小転写レベルとして設定した。７つのＣＢＴ承認腫瘍型の中で個々の腫瘍サンプル中のＴＧＦＢ１　ｍＲＮＡ発現をランク付けすることは、やはり乳癌を明らかな例外として、ＴＧＦＢ２及びＴＧＦＢ３と比較してＴＧＦＢ１　ｍＲＮＡのより高い及びより高頻度の発現を確認した。これらの観察及び尿路上皮癌における以前に公開された観察は、ＴＧＦβ経路活性が、大部分のヒト腫瘍におけるＴＧＦβ１活性化によって駆動される可能性が高いことを示唆する。

【０９１４】

各サンプルは、ヒートマップにおいて単列として表され、サンプルは、ＴＧＦβ１発現のレベルによって配置される（最も発現レベルが上）。図２０中の分析と一致して、各癌型におけるかなりの数のサンプルが、ＴＧＦＢ１発現について陽性である。しかしながら、この表現は、多くの腫瘍がＴＧＦＢ１転写産物のみを発現することも強調する（特に食道癌腫、膀胱尿路上皮、肺腺癌及び皮膚黒色腫癌型において）。興味深いことに、侵襲性乳癌からのサンプルは、ＴＧＦＢ１陽性よりＴＧＦＢ３陽性のはるかに多い数のサンプルを示すため、このようなＴＧＦＢ１スキューイング（ｓｋｅｗｉｎｇ）は、全ての癌の特徴であるわけではない。それにもかかわらず、この分析は、β１アイソフォームが優勢であり、ほとんどの場合、多数の癌患者からの腫瘍中に存在する唯一のＴＧＦβファミリーメンバーであることを示す。ＴＧＦβシグナル伝達が、癌微小環境内の免疫抑制において大きい役割を果たすことを示唆するデータを合わせると、これらの知見は、これらの腫瘍の治療におけるＴＧＦβ１特異的阻害の潜在的な有用性を裏付ける。

【０９１５】

癌治療としてのＴＧＦβ１特異的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、マウス同系腫瘍モデルにおいて使用される様々な細胞株からのＲＮＡｓｅｑデータにおけるＴＧＦβ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

の表面を作成した。まず、本発明者らは、各細胞株に由来する腫瘍についてのｌｏｇ２（ＦＰＫＭ）値のヒートマップを生成した（図２１Ｂ、左側）。この分析を、ヒト腫瘍を再現し得る同系モデル（主にＴＧＦＢ１）を同定するために行ったため、本発明者らは、主に偽陰性を避けることに配慮して、図２０及び２１Ａ中の表現におけるものよりはるかに低いＦＰＫＭ＞１に「陽性」閾値を設定した。

【０９１６】

図２１Ｂ（左側）におけるデータ表現が明らかにするように、ＭＣ－３８、４Ｔ－１、及びＥＭＴ６を含むいくつかの同系腫瘍が、有意なレベルのＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３の両方を一般的に発現する。対照的に、Ａ２０及びＥＬ４モデルは、ほぼＴＧＦβ１のみを発現し、Ｓ９１及びＰ８１５腫瘍は、ＴＧＦＢ１発現に対する強いバイアスを示す。

【０９１７】

ＴＧＦＢ１対ＴＧＦＢ２及び／又はＴＧＦＢ３の示差的発現をさらに評価するために、ｍｉｎΔＴＧＦＢ１を計算し、ｌｏｇ２（$FPKM_{TGFB1}$）－ｌｏｇ２（$FPKM_{TGFB2}$）又はｌｏｇ２（$FPKM_{TGFB1}$）－ｌｏｇ２（$FPKM_{TGFB3}$）のより小さい値として定義した。各モデルのためのｍｉｎΔＴＧＦＢ１が、図２１Ｂ中にヒートマップとして示され（右側）、Ａ２０、ＥＬ４、Ｓ９１、及び／又はＰ８１５細胞株由来の同系腫瘍が、ＴＧＦβ１特異的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２１Ｂ（左側）からの結論を強調する。

【０９１８】

ＴＧＦβ２又はＴＧＦβ３を上回るＣＢＴに対する一次耐性とのＴＧＦβ１発現の関連性をさらに確認するために、本発明者らは、アイソフォーム発現を、先天性抗ＰＤ－１耐性シグネチャ（「ＩＰＲＥＳ」）と相関させた（Ｈｕｇｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ．２０１６　Ｍａｒ　２４；１６５（１）：３５－４４）。簡潔に述べると、ＩＰＲＥＳは、２６のトランスクリプトミクスシグネチャ（ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｉｃ　ｓｉｇｎａｔｕｒｅ）のコレクションであり、これは、集合的に、抗ＰＤ－１治療に対する腫瘍耐性を示す。ＩＰＲＥＳシグネチャは、間葉移行の調節、細胞付着、ＥＣＭリモデリング、血管新生、及び創傷治癒に関与する遺伝子の上方発現（ｕｐ－ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ）を示す。７つのＣＢＴ承認腫瘍型の中で、本発明者らは、他の２つのＴＧＦβアイソフォームのｍＲＮＡ発現より、ＴＧＦＢ１　ｍＲＮＡレベルとＩＰＲＥＳスコアとの間のより一貫して正の有意な相関を見出した（図３７Ａ）。総合すると、これらのデータは、ＴＧＦβ１活性の選択的阻害が、ＣＢＴに対する一次耐性を克服し得ることを示唆する。

【０９１９】

ＣＢＴ承認治療によるＴＣＧＡ規定腫瘍型にわたるＩＰＲＥＳ（先天性抗ＰＤ－１耐性）転写シグネチャの遺伝子セット変動分析（ＧＳＶＡ）は、ＴＧＦβ１　ＲＮＡ存在度と最も強く及び有意に相関し（ピアソン係数）、発現の存在についてのＦＰＫＭ≧３０のカットオフを有する。総合すると、これらのデータは、特定の実施形態において、ＴＧＦβ１活性の選択的阻害が、ＣＢＴに対する一次耐性を克服し得ることを示唆する。

【０９２０】

ＣＢＴ承認治療によるＴＣＧＡ規定腫瘍型にわたるＩＰＲＥＳ（先天性抗ＰＤ－１耐性）転写シグネチャの遺伝子セット変動分析（ＧＳＶＡ）は、ＴＧＦβ１　ＲＮＡ存在度と最も強く及び有意に相関し（ピアソン係数）、発現の存在についてのＦＰＫＭ≧３０のカットオフを有する。

【０９２１】

ＴＧＦβ１発現の、ＣＢＴに対する耐性との相関をさらに評価するために、ＴＧＦβ１ＲＮＡ存在度を、ＣＤＴ承認治療によるＴＣＧＡ規定腫瘍型にわたるＰｌａｓａｒｉ　ＴＧＦβ経路（先天性抗ＰＤ－１耐性）転写シグネチャの遺伝子セット変動分析（ＧＳＶＡ）と比較した。ｐｌａｓａｒｉ遺伝子セットを、ｍＳｉｇＤＢウェブポータル（ｈｔｔｐ：／／ｓｏｆｔｗａｒｅ．ｂｒｏａｄｉｎｓｔｉｔｕｔｅ．ｏｒｇ／ｇｓｅａ／ｍｓｉｇｄｂ／ｉｎｄｅｘ．ｊｓｐ）から入手し、遺伝子セットスコア計算を、ＲにおけるＧＳＶＡパッケージを用いて決定した（Ｈａｎｚｅｌｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＢＭＣ　Ｂｉｏ

ｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ２０１３１４：７，２０１３；及びＬｉｂｅｒｚｏｎ ｅｔａｌ．，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ．２０１１ Ｊｕｎ １５；２７（１２）：１７３９－１７４０）。図３７Ｂに示されるように、ＧＳＶＡは、ＴＧＦβ１ ＲＮＡ存在度と最も強く及び有意に相関し（ピアソン係数）、発現の存在についてのＦＰＫＭ≧３０のカットオフを有する。

【０９２２】

これらのデータは、ＴＧＦβ経路活性が、大部分のヒト腫瘍においてＴＧＦβ１活性化によって駆動される可能性が高いことを示唆する。

【０９２３】

以下のリソースを、上述されるバイオインフォマティクス分析に使用した：

ＴＧＦβアイソフォームＴＣＧＡ発現データを、ＵＣＳＣ Ｘｅｎａ Ｂｒｏｗｓｅｒデータセットリソースからダウンロードした（ｈｔｔｐｓ：／／ｘｅｎａｂｒｏｗｓｅｒ．ｎｅｔ／ｄａｔａｐａｇｅｓ／）。高い発現を決定するための発現カットオフを、ＴＧＦβアイソフォームデータのＦＰＫＭ値の分布を調べることによって確認した。ヒートマップ及び散布図を、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍを用いて作成した。Ｐｌａｓａｒｉ遺伝子セットを、ｍＳｉｇＤＢウェブポータル（ｈｔｔｐ：／／ｓｏｆｔｗａｒｅ．ｂｒｏａｄｉｎｓｔｉｔｕｔｅ．ｏｒｇ／ｇｓｅａ／ｍｓｉｇｄｂ／ｉｎｄｅｘ．ｊｓｐ）から入手し、遺伝子セットスコア計算を、Ｒにおけるｇｓｖａパッケージを用いて決定した。

【０９２４】

実施例１２：ＴＧＦβ１選択的阻害剤は、安全性／毒性試験においてＡＬＫ５キナーゼ阻害剤ＬＹ２１０９７６１及びＰａｎ－ＴＧＦβ抗体と比較して低下した毒性を示す

小分子ＴＧＦ－β Ｉ型受容体（ＡＬＫ５）キナーゼ阻害剤ＬＹ２１０９７６１及びｐａｎ－ＴＧＦβ抗体（ｈＩｇＧ４；中和）と比較して、Ａｂ３及びＡｂ６の潜在的インビボ毒性を評価するために、安全性／毒性試験を、ラットにおいて行った。ラットがマウスと比較して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、この安全性試験のための種の選択として選択された。ラットにおいて観察される同様の毒性は、イヌ、非ヒト霊長類及びヒトなどの他の哺乳動物種においても観察されている。

【０９２５】

簡潔に述べると、雌Ｆｉｓｈｅｒ３４４ラット（図２４Ａ）又はスプラーグドーリーラット（図２４Ｂ）に、Ａｂ６を１０ｍｇ／ｋｇ（１つの群、ｎ＝５）、３０ｍｇ／ｋｇ（１つの群、ｎ＝５）若しくは１００ｍｇ／ｋｇ（１つの群、ｎ＝５）で；ｐａｎ－ＴＧＦβ抗体を３ｍｇ／ｋｇ（１つの群、ｎ＝５）、３０ｍｇ／ｋｇ（１つの群、ｎ＝５）若しくは１００ｍｇ／ｋｇ（１つの群、ｎ＝５）で；ＬＹ２１０９７６１を２００ｍｇ／ｋｇ（１つの群、ｎ＝５）若しくは３００ｍｇ／ｋｇ（１つの群、ｎ＝５）で；又はＰＢＳ（ｐＨ７．４）ビヒクル対照（１つの群、ｎ＝５）を投与した。

【０９２６】

ｐａｎ－ＴＧＦβ抗体を投与される動物に、１０ｍＬ／ｋｇの体積で（１日目に）１回静脈内投与し、８日目に殺処分し、解剖を行った。Ａｂ３又はＡｂ６のいずれかを投与される動物に、１０ｍＬ／ｋｇの体積で４週間にわたって週に１回（１、８、１５及び２２日目に）静脈内（ｉ．ｖ．）投与した。ＬＹ２１０９７６１を投与される動物に、５日間又は７日間にわたって１日１回、強制経口投与によって投与した。動物を、２９日目に殺処分し、解剖を行った。

【０９２７】

動物の一般的臨床観察を、１日２回行い、ケージサイド観察を、急性毒性を評価するために投与後に行った。行われる他の観察は、食品消費の評価及び週に１回の体重の測定を含んでいた。これらは、臨床病理学（血液学、血清化学及び凝固）並びに解剖病理学（総合及び顕微鏡）評価も含んでいた。包括的な一連の組織を、顕微鏡評価のための解剖時に採取した。組織を、１０％の中性緩衝ホルマリン中で保存し、トリミングし、日常的に処理し、パラフィンに包埋した。パラフィンブロックをミクロトーム切断し、切片を、ヘマ

トキシリン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）で染色した。特に、心臓を、右房室、左房室、及び大動脈弁を露出するように、肺動脈の面に垂直な面に沿って長手方向に二等分することによってトリミングした。両方の半分を包埋に供した。各心臓片側切片を、切断面を下にしてパラフィンに包埋した。ブロックを切片化して、少なくとも３つの心臓弁を得た。組織切片を、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｏｌｌｅｇｅ ｏｆ Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｐａｔｈｏｌｏｇｉｓｔｓ（ＡＣＶＰ）の認定医によって光学顕微鏡法によって調べた。

【０９２８】

表１９及び図２４Ａ及び２４Ｂに示されるように、≧３ｍｇ／ｋｇのｐａｎ－ＴＧＦβ抗体を投与された動物は、ＬＹ２１０９７６１を投与された動物において記載されるものと同様の心臓弁所見（即ち心臓弁膜症）を示した。≧３０ｍｇ／ｋｇのｐａｎ－ＴＧＦβ抗体を投与された動物は、ＬＹ２１０９７６１を投与された動物と同様の心房所見を示した。１００ｍｇ／ｋｇのｐａｎ－ＴＧＦβ抗体を投与された動物は、ＬＹ２１０９７６１を投与された動物において記載されるものと同様の心筋所見を示し、３０ｍｇ／ｋｇのｐａｎ－ＴＧＦβ抗体を投与された動物は、心筋において出血を有していた。１００ｍｇ／ｋｇのｐａｎ－ＴＧＦβ抗体を投与された１匹の動物は、冠動脈における出血を伴う中等度壁内壊死を有し、これは、わずかな血管周囲混合炎症細胞浸潤を伴っていた。ｐａｎ－ＴＧＦβ抗体及びＬＹ２１０９７６１を投与された動物における骨所見は、肉眼で見える異常な形状の胸骨並びに胸骨の終板並びに大腿骨及び脛骨の骨端軟骨における肥大部位の顕微鏡的厚さの増加からなり；これらの所見は、ｐａｎ－ＴＧＦβ抗体と比較してＬＹ２１０９７６１を投与された動物においてより高い発生率及び／又は重症度を有していた。

【０９２９】

【表２６】

表 19. Pan-TGFβ 抗体を投与された動物における顕微鏡心臓所見

	Pan-TGFβ 抗体			
用量レベル (mg/kg/日)	0	3	30	100
心臓				
心臓弁				
心臓弁膜症				
最小	0	2	0	0
軽度	0	2	4	5
中等度	0	0	1	0
心房				
浸潤、混合細胞				
最小	0	0	1	2
軽度	0	0	1	1
過形成、内皮				
最小	0	0	3	1
出血				
最小	0	0	1	0
心筋				
変性/壊死				
軽度	0	0	0	2
出血				
最小	0	0	2	1
軽度	0	0	1	1
浸潤、混合細胞、塩基(base)				
軽度	0	0	0	1
冠動脈				
出血を伴う壊死				
中等度	0	0	0	1
浸潤、混合細胞、血管周囲				
軽度	0	0	0	1

【０９３０】

図２４Ａに示されるように、ｐａｎ－ＴＧＦβ抗体を投与された動物は、全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２０１８／１２９３２９号パンフレットに記載されるＬＹ２１０９７６１を投与された動物において記載されるものと同様の毒性を示した。詳細には、≧３ｍｇ／ｋｇのｐａｎ－ＴＧＦβ抗体を投与された動物は、ＬＹ２１０９７６１を投与された動物において記載されるものと同様の心臓弁所見（例えば、心臓弁膜症）を示した。≧３０ｍｇ／ｋｇのｐａｎ－ＴＧＦβ抗体を投与された動物は、ＬＹ２１０９７６１を投与された動物において記載されるものと同様の心房所見を示した。１００ｍｇ／ｋｇのｐａｎ－ＴＧＦβ抗体を投与された動物は、ＬＹ２１０９７６１を投与された動物において記載されるものと同様の心筋所見を示し、３０ｍｇ／ｋｇのｐａｎ－ＴＧＦβ抗体を投与された動物は、心筋において出血を有していた。１００ｍｇ／ｋｇのｐａｎ－ＴＧＦβ抗体を投与された１匹の動物は、冠動脈における出血を伴う中等度壁内壊死を有し、これは、わずかな血管周囲混合炎症細胞浸潤を伴っていた。ｐａｎ－ＴＧＦβ抗体及びＬＹ２１０９７６１を投与された動物における骨所見は、肉眼で見える異常な形状の胸骨並びに胸骨の終板並びに大腿骨及び脛骨の骨端軟骨の肥大部位における顕微鏡的厚さの増加からなっていた。図２４Ｂに示されるようなＬＹ２１０９７６１及びｐａｎ－ＴＧＦβによるその後の試験は、同様の毒性も実証した。出血による心臓弁肥厚、内皮過形成、混合炎症細胞浸潤、及び／又は間質過形成によって特徴付けられるＴＧＦβのｐａｎ－阻害剤で処置された動物における観察された心臓弁膜症は、以前に報告された所見と一致する。

【０９３１】
対照的に、ｐａｎ－ＴＧＦβ抗体又はＬＹ２１０９７６１で処置された動物と異なり、ＴＧＦβ１選択的阻害剤、即ちＡｂ３又はＡｂ６を投与されたラットでは、これらの試験におけるＡｂ６及びＡｂ３の両方の無有害作用レベル（ＮＯＡＥＬ）は、１００ｍｇ／ｋｇの週に１回の投与であり、これは試験される最高用量であった。示されるように、Ａｂ６で処置された動物における所見は発生しなかった（図２４Ｂ）。
【０９３２】
薬物動態分析は、Ａｂ６の血清濃度が、４週間にわたって１００ｍｇ／ｋｇで投与された動物において２，３００μｇ／ｍｌに達したことを示した。試験終了時（２９日目）の平均Ａｂ６血清濃度は、１００ｍｇ／ｋｇの最高評価用量について２．３ｍｇ／ｍｌに達した。これらの結果は、ＴＧＦβ１活性化の選択的阻害が、複数のインビボモデルにおいて観察されある治療効果に必要とされるものをはるかに超える用量で重要な用量制限毒性を回避するようであることを示唆する。
【０９３３】
要約すると、ラット（ＴＧＦβ阻害に対して感受性であることが知られている種）において４週間の期間にわたって試験される全ての用量（３ｍｇ／ｋｇ、３０ｍｇ／ｋｇ又は１００ｍｇ／ｋｇ）のＡｂ３又はＡｂ６で処置された動物は、以下のパラメータのいずれかのバックグラウンドを超える毒性作用を示さなかった：心筋変性又は壊死、心房出血、心筋出血、弁出血、弁内皮過形成、弁間質過形成、心臓弁における混合炎症細胞浸潤、石灰化、冠動脈における出血を伴う壊死、大動脈基部における炎症を伴う壊死、心筋細胞における壊死又は炎症細胞浸潤、及び心臓弁膜症。従って、ＴＧＦβ１活性化のアイソフォーム特異的阻害剤による処理は、意外なことに、ｐａｎ－ＴＧＦβ阻害剤処置（例えば、ＡＬＫ５キナーゼ阻害剤ＬＹ２１０９７６１又はｐａｎ－ＴＧＦβ抗体）と比較して、有意に改善された安全性プロファイル、例えば、低下した死亡率、低下した心毒性、及び減少した骨所見をもたらした。
【０９３４】
また、ＧＬＰ毒性試験を、ＴＧＦβ１選択的阻害剤Ａｂ６の安全性プロファイルを評価するために、非ヒト霊長類（カニクイザル）において行った。プロトコルは、１週当たり３０、１００及び３００ｍｇ／ｋｇの４週間の反復投与、続いて、４週間の回復を含んでいた。
【０９３５】
Ａｂ６は、３０、１００及び３００ｍｇ／ｋｇ／週で忍容性良好であった。有害なＡｂ６関連の所見は、主要及び回復コホートの両方において示されなかった。Ａｂ６関連の所見は、ｐａｎ－ＴＧＦβ阻害剤で観察された毒性の部位である標的器官において示されなかった（例えば：心毒性、過形成及び炎症、歯科及び歯肉所見がなかった）。
【０９３６】
Ａｂ６血清濃度が、３００ｍｇ／ｋｇの５回の毎週の投与後、１５，６００μｇ／ｍＬに達した。回復時間の終了時、Ａｂ６血清濃度レベルは、約２，０００～３，０００μｇ／ｍＬで高いままであった。
【０９３７】
これらのデータに基づいて、カニクイザルにおけるＡｂ６についてのＮＯＡＥＬは、３００ｍｇ／ｋｇ／週であり、これは、試験される最高用量である。
【０９３８】
実施例１３：腫瘍内免疫細胞に対する抗ＰＤ－１／Ａｂ３組合せの効果
以前の報告は、前臨床動物モデルにおける免疫抑制腫瘍からのエフェクターＴ細胞の排除を調べた。
【０９３９】
しかしながら、これらの報告は、マクロファージについての洞察を与えなかった。免疫抑制同系腫瘍モデルにおけるマクロファージ浸潤及びこれに関連してＴＧＦβ１阻害の効果の関係を評価するために、免疫組織化学を、上記の実施例７からの抗ＰＤ１及び３０ｍ

ｇ／ｋｇのＡｂ３で処置されたクラウドマンＳ９１腫瘍サンプルにおいて行った。

【０９４０】

抗ＰＤ１／Ａｂ３組合せを投与されなかった動物由来の対照腫瘍切片において、いくらかのＦ４／８０陽性細胞が検出され、これは、腫瘍がいくらかのマクロファージを含むことを示し、これは、Ｍ２型、いわゆる腫瘍関連マクロファージ、又はＴＡＭである可能性が高い。比較して、抗ＰＤ１／Ａｂ３組合せで処置された動物から調製された切片において、Ｆ４／８０陽性細胞の数の顕著な増加が、腫瘍内で観察された。抗ＰＤ１単独と比較した、抗ＰＤ－１／Ａｂ３処置動物におけるＦ４／８０陽性マクロファージによる腫瘍のこの広範囲の浸潤は、抗ＰＤ１単独ではなく、組合せ治療が、恐らく腫瘍を浸潤する循環単球の動員により細胞の大量の流入を誘発したことを示唆する。これらのマクロファージの表現型を同定するために、抗ＣＤ１６３を、Ｍ２マクロファージマーカとして使用した。これらの細胞の大部分は、ＣＤ１６３陰性であることが示され、これは、抗ＰＤ１／Ａｂ３組合せ治療に反応して腫瘍内に動員されたマクロファージが、Ｍ１型、従って抗腫瘍サブタイプである可能性が高いことを示唆している。これは、細胞傷害性細胞によって生成される癌細胞残屑を除去するマクロファージを示している可能性があり、恐らくＴＧＦβ１阻害の直接の結果である。

【０９４１】

実施例１４．ＭＢＴ２腫瘍における細胞傷害性細胞に対するＴＧＦβ１阻害剤の効果

顆粒エキソサイトーシスは、細胞傷害性Ｔ細胞が関与し、常在腫瘍細胞を殺滅する１つの機構である。活性化後、顆粒は、細胞膜と融合し、パーフォリン及びグランザイムＢなどの細胞毒素を含む、その内容物を放出し、これが、腫瘍細胞除去をもたらす。さらに、ＣＤ８抗原（ＣＤ８ａ）は、Ｔ細胞受容体との共受容体としての役割を果たす、大部分の細胞傷害性Ｔ細胞において見られる細胞表面糖タンパク質である。従って、ＣＤ８ａ、パーフォリン、及びグランザイムＢレベルを、それぞれ抗ＰＤ－１と組み合わせてＡｂ３又はＡｂ６で処置された腫瘍において測定して、エフェクターＴ細胞活性を評価した。

【０９４２】

方法

８～１２週齢Ｃ３Ｈ／ＨｅＮ雌マウスの脇腹に、５×１０^{5}個のＭＢＴ２腫瘍細胞を移植した。動物を、治療開始前に、４０～８０ｍｍ^{3}の平均腫瘍サイズを有する投与群にランダムに分けた。抗ＰＤ１（ＲＭＰ１－１４）を、１０ｍｇ／ｋｇで週に２回投与した。Ａｂ３を、３０ｍｇ／ｋｇで週に１回投与した。８日の投与後、最後の投与の８時間後（抗ＰＤ１の３回の総投与、Ａｂ３の２回の総投与）動物を殺処分し、腫瘍を切除した。Ａｂ６について、免疫コンテキストを、治療後１０日又は１３日の時点で分析した。抗ＰＤ－１を、週に２回、１０ｍｋｇで投与した。Ａｂ６を、１０ｍｋｇで週に１回投与した。腫瘍を、液体窒素中で急速冷凍し、ｃｒｙｏＰＲＥＰインパクタを用いてＣｏｖａｒｉｓバッグ中で粉砕し、ＲＮＡを、Ｔｒｉｚｏｌ／クロロホルムを用いて抽出した。ｃＤＮＡを、Ｔａｑｍａｎ　Ｆａｓｔ　Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘを用いて生成し、ＣＤＮＡを、対象とする遺伝子に向けたプライマー及びプローブを備えた特注Ｔａｑｍａｎ　Ａｒｒａｙ　Ｃａｒｄに充填した。ｑＰＣＲを、Ｖｉｉａ７サーモサイクラーにおいて実行した。ＣＴＬ遺伝子についての発現を、各サンプルにつきＨＰＲＴに対して正規化し、抗ＰＤ１単独に対する抗ＰＤ１／Ａｂ３又は抗ＰＤ１／Ａｂ６における倍率変化を表した。

【０９４３】

結果

抗ＰＤ１／Ａｂ３の組合せは、腫瘍内で抗ＰＤ１単独より、抗腫瘍反応に関連するＣＴＬ遺伝子の強力な上方制御を誘発した。ＭＢＴ２腫瘍モデルにおいて、抗ＰＤ１単独は、腫瘍成長及び抗腫瘍免疫のごくわずかな抑制をもたらした。従って、これらの結果は、抗ＴＧＦβ抗体の添加が、エフェクターＣＤ８　Ｔ細胞の完全な活性化及び浸潤を可能にすることを示す。

【０９４４】

実施例１５：インビトロでのＴｒｅｇ活性に対するＡｂ３及びＡｂ６の効果
方法
ヒトＰＢＭＣを、Ｆｉｃｏｌｌを用いて健常なドナーバフィーコートから単離した。ＣＤ４細胞を、磁気選択によって選択し、次に、ＣＤ２５$^{+}$ＣＤ１２７^{lo} Ｔｒｅｇを選別し、クローンＢＣ９６（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を、ＣＤ２５ｈｉに使用し、クローンＨＩＬ ７Ｒｍ２１（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を、Ｂｉｏｒａｄ Ｓ３Ｅを用いてＣＤ１２７ｌｏに使用した。選別されたＴｒｅｇを、ＴｅｘＭａｃｓ培地（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）中のプレート結合抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）及び可溶性抗ＣＤ２８（クローン２８．２、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）で１週間刺激した。一部の試験において、ＩＬ２を、さらに加えて、ＧＡＲＰ及びｐｒｏ－ＴＧＦβ発現を上方制御した。Ｔｒｅｇを、Ｃｅｌｌ Ｔｒａｃｅ Ｖｉｏｌｅｔ ９ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で染色された自己ＣＤ４ Ｔ細胞と１：１で共培養し、５日間にわたって抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８で再度刺激した。５日後、細胞分裂を、Ｃｅｌｌ Ｔｒａｃｅ Ｖｉｏｌｅｔ色素の希釈でゲーティングしながら、フローサイトメトリー（Ａｔｔｕｎｅフローサイトメーター、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によって測定し、ＦｌｏｗＪｏ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を用いて分析した。
【０９４５】
結果
培養物中で５日間にわたって、８０％のエフェクターＣＤ４ Ｔ細胞（Ｔｅｆｆ）を分裂させた。Ｔｒｅｇ １：１の添加は、Ｔｅｆｆ分裂をほぼ１５％に抑制し、１０ｕｇ／ｍｌのＡｂ３のさらなる添加は、Ｔ－エフェクター分裂のＴｒｅｇ媒介性阻害を完全に抑制した（図２６Ａを参照されたい）。１μｇ／ｍｌのＡｂ３は、Ｔｒｅｇ抑制をあまり強力に阻害しなかった。１μｇ／ｍｌ及び１０μｇ／ｍｌのＡｂ６の両方は、Ｔｒｅｇ由来ＴＧＦβを同等に阻害した。従って、Ａｂ６は、ＴｒｅｇにおけるＧＡＲＰ－ｐｒｏＴＧＦβ１複合体のＴＧＦβ１活性化のより強力な阻害剤であるようである。
【０９４６】
実施例１６：ＭＢＴ２腫瘍における腫瘍内免疫細胞集団／コンテキストに対するＡｂ６／抗ＰＤ－１組合せ治療の効果
抗ＰＤ－１及びＡｂ６の組合せで処置されたマウスにおける観察された腫瘍退縮効果を媒介し得る様々な免疫細胞集団の説明を開始するために、ＭＢＴ２腫瘍モデルを、ＦＡＣＳ試験に使用した。試験設計が、以下に要約される。
【０９４７】

【表２７】

表 20. MBT2 腫瘍免疫コンテキスト試験設計

群	群説明	投与スケジュール	サンプル採取及び分析
1	抗PD1対照IgG + Ab6対照IgG (n = 12)	第2群及び第3群と同じ (以下を参照)	各群についてi) フローサイトメトリーのために6匹の動物から腫瘍全体 (図27～29) 残っている6匹の動物について: ii) RNA分析のためにそれぞれ½腫瘍 (図31及び32) iii) IHCのためにそれぞれ½腫瘍 (図30A～D及びF)
2	Ab6 (n = 12)	1及び8日目に10 mgk (10 mg/kg/週)	
3	抗PD1 (n = 12)	1、4、8及び11日目に10 mgk (20 mg/kg/週)	
4	Ab6 + 抗PD1 (n = 12)	第2群及び第3群と同じ (上記を参照)	

【０９４８】

各試験群は、本明細書に記載されるＭＢＴ２腫瘍を有する１２匹のマウスを含んでいた。Ａｂ６処置群に、１０ｍｇ／ｋｇで週に１回、１日目及び８日目に抗体を投与した。抗ＰＤ１処置群を、１注入当たり１０ｍｇ／ｋｇで週に２回、１、４、８及び１１日目に、１週当たり合計で２０ｍｇ／ｋｇで処置した。各対照ＩｇＧ群を、抗ＰＤ１及びＡｂ６のＩｇＧサブタイプに適合するように相応して処置した。１３日目に、腫瘍を、上記に示されるようにマウスから採取した。

【０９４９】

フローサイトメトリー分析：腫瘍関連免疫細胞サブセットも、ＭＢＴ－２腫瘍における腫瘍フローサイトメトリーによって分析した。簡潔に述べると、腫瘍を切除し、ｇｅｎｔｌｅＭＡＣＳのための腫瘍解離キット（Ｔｕｍｏｒ　Ｄｉｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ）（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を用いた解離前に秤量した。サンプルを、７０μｍセルストレーナーに通して濾過して、凝集体を除去した。生きた単一細胞を、ＦＡＣｓ緩衝液で洗浄してから、ＭｕＴｒｕＳｔａｉｎ　ＦＣＸ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、抗ＦｃｙＲＩＶ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、Ｌｉｖｅ／Ｄｅａｄ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）、ＣＤ４５－ＡＦ７００クローン３０－Ｆ１１（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＣＤ３－ＰＥクローン１７Ａ２（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＣＤ４－ＢＵＶ３９５クローンＧＫ１．５（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＣＤ８－ＡＰＣ－Ｈ７クローン５３－６．７（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＣＤ１１ｂ－ＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５．５クローンＭ１／７０（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＧＲ－１－ＦＩＴＣクローンＲＢ６－８Ｃ５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＦｏｘＰ３－ＡＰＣクローンＦＪＫ－１６ｓ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）、Ｆ４／８０－ＰＥ－ＤａｚｚｌｅクローンＢＭ８（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＣＤ２０６－ＢＶ４２１クローンＣ０６８Ｃ２（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）を含有する染色混合液を適用した。フローサイトメトリーを、Ａｔｔｕｎｅ　ＮｘＴ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）において行い、ＦｌｏｗＪｏ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を用いて分析した。

【０９５０】

ＭＢＴ２腫瘍中のＴ細胞亜集団を説明するためのゲーティング手法が、図２７Ａに示される。結果が、図２７Ｂに要約され、治療開始の１３日後に採取された腫瘍において測定される。実証されるように、抗ＰＤ１と共に使用されるＡｂ６は、腫瘍におけるＣＤ８＋Ｔ細胞の浸潤及び増殖を可能にすることにより、免疫除去を克服することができた。詳細には、抗ＰＤ１／Ａｂ６組合せは、腫瘍内ＣＤ８＋　Ｔ細胞の数（頻度）の有意な増加を

誘導した一方、全生細胞における％ＣＤ４５＋細胞の変化は、処置群にわたって観察されなかった。抗ＰＤ１／Ａｂ６組合せは、Ｔｒｅｇの有意な増加を引き起こしたが；ＣＤ８＋：Ｔｒｅｇ比は、抗ＰＤ１処置と比べて、有意に変化されない。細胞内サイトカイン染色は、これらのＴｒｅｇ細胞が、ＩＦＮγを発現しなかった一方、ＣＤ８Ｔ細胞が発現したことを示し、これは、それらの活性化表現型を示す（図２７Ｃ）。しかしながら、抗ＰＤ－１及びＡｂ６による処置は、ＩＦＮγ＋　ＣＤ８　Ｔ細胞集団のサイズに対する効果を有さなかった（図２７Ｃ）。

【０９５１】

骨髄細胞亜集団を説明するためのゲーティング手法が、図２８Ａに示される。結果が、図２８Ｂに要約され、治療開始の１３日後に採取された腫瘍において測定される。１３日の骨髄浸潤は、全免疫細胞（例えば、ＣＤ４５＋）の数が、処置群にわたって安定したままであることを示す。全骨髄細胞（例えば、ＣＤ１１ｂ＋、Ｆ４／８０　$^{lo-hi}$）の数は、抗ＰＤ１／Ａｂ６処置によって有意に変化された。詳細には、対照群において、骨髄割合は、腫瘍中のマクロファージ集団のほぼ７５％を構成した。この割合は、組合せ治療群において半分未満に減少され、これは、Ｍ２型ｐｒｏ－腫瘍マクロファージの数（頻度）の顕著な減少並びにこの群におけるＭＤＳＣ割合のほぼ完全な除去と一致していた一方、Ｍ１型マクロファージは、比較的変化しないままであった。

【０９５２】

細胞の骨髄亜集団の中でも、ＭＢＴ－２腫瘍関連Ｍ２マクロファージは、ＬＲＲＣ３３の高い細胞表面発現を示した（図２８Ｃ）。ＭＤＳＣ亜集団は、強いＬＲＲＣ３３発現も示した。ＭＢＴ－２腫瘍から単離されたＧ－ＭＤＳＣサブタイプの大部分（６７．８％）は、細胞表面ＬＲＲＣを発現した一方、ＭＢＴ－２腫瘍から単離されたＭ－ＭＤＳＣサブタイプの約３分の１が、細胞表面ＬＲＲＣ３３を発現した（図２８Ｄ）。

【０９５３】

さらに、抗ＰＤ１／Ａｂ６処置群において観察されたＣＤ８＋　Ｔ細胞：Ｍ２マクロファージの比率の大幅な増加があった（図２９Ｃを参照されたい）。総合すると、データは、ＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的阻害剤が、チェックポイント遮断療法と併用されるとき、腫瘍免疫除去を克服するのに使用され得ることを実証した。これは、少なくとも部分的に、ＣＤ８＋　Ｔ細胞浸潤及び増殖を促進することによって媒介され得る一方、腫瘍環境における腫瘍促進性マクロファージ（Ｍ２）及び免疫抑制性ＭＤＳＣを減少させる。これらの効果が、それぞれＴＧＦβ１のＧＡＲＰアーム及びＬＲＲＣ３３アームによって媒介され得ることが可能である。

【０９５４】

免疫組織化学的分析のために、６匹の動物からの腫瘍を半分に切断し、固定した。切片を、ＩＨＣのために調製し、様々な免疫細胞マーカで染色した。図３０は、１０日目又は１３日目の代表的な画像を示す。示されるように、腫瘍内のＣＤ８＋　Ｔ細胞の頻度の顕著な増加が、抗ＰＤ１／Ａｂ６組合せ処置群において観察された（図３０Ｄ）。データは、Ａｂ６が、細胞傷害性Ｔ細胞の浸潤及び増殖を誘導することによって免疫除去を克服するために、チェックポイント遮断療法と併用され得ることを示す。図３０Ｅは、全核におけるＣＤ８陽性細胞の％として示されるＩＨＣデータの定量を示す。この腫瘍モデルにおいて、いくつかのベースラインＣＤ８＋細胞が存在していた（例えば、「非炎症性」腫瘍）。Ａｂ６単独又は抗ＰＤ－１単独のいずれかで処置された群において、ＣＤ８＋のパーセンテージのわずかな増加が観察された（それぞれ約１０％）。対照的に、組合せ処置群において、腫瘍内のＣＤ８＋細胞の頻度の顕著な増加が達成され、これは、チェックポイント阻害と組み合わせたＴＧＦβ１阻害が、免疫除去を克服することによって抗腫瘍効果を相乗的に引き起こし得ることを示している。データは、組合せが、「免疫除去」腫瘍を「炎症性／高免疫原性」腫瘍に有効に転化し得ることを示唆する。

【０９５５】

ＭＢＴ２腫瘍における観察された免疫応答に相関する遺伝子発現変化を確認するために、ＲＮＡ発現分析を行った。１３日のＭＢＴ２腫瘍からのＲＮＡ調製物を、ｑＰＣＲに基

づく遺伝子発現分析に供した。１群当たり５～６匹の動物から調製されたＲＮＡを、試験に使用した。分析は、示されるマーカとして使用される以下の遺伝子の発現レベルを含んでいた：Ｐｔｐｒｃ（ＣＤ４５）；Ｃｄ８ａ（ＣＤ８　Ｔ細胞）；Ｃｄ８ｂ１（ＣＤ８　Ｔ細胞）；Ｃｄ４（ＣＤ４　Ｔ細胞）；Ｃｄ３ｅ（Ｔ細胞）；Ｆｏｘｐ３（Ｔｒｅｇ）；Ｉｆｎｇ（Ｔｈ１免疫）；Ｐｒｆ１（ＣＴＬタンパク質）；Ｇｚｍｂ（ＣＴＬタンパク質）；Ｇｚｍａ（ＣＴＬタンパク質）；Ｋｌｒｋ１（ＮＫ／ＣＴＬ）；Ａｄｇｒｅ１（Ｆ４／８０マクロファージ）；Ｍｒｃ１（Ｍ２マクロファージ）；Ｃｄ１６３（Ｍ２マクロファージ）；Ｃｄ８０（ＡＰＣ　ｃｏ－ｓｔｉｍ／Ｍ１マクロファージ）；Ｐｔｇｅｒ２（腫瘍血管新生）；Ｎｒｒｏｓ（ＬＲＲＣ３３）；Ｔｇｆｂ１（免疫寛容）；１８Ｓ（ハウスキーパー）；及びＰｐｉｂ（ハウスキーパー）。

【０９５６】

図３１Ａ～３１Ｄは、Ｐｔｐｒｃ、ＣＤ８ａ、ＣＤ４及びＦｏｘｐ３のそれぞれの免疫応答遺伝子発現の変化を示す。抗ＰＤ１／Ａｂ６組合せ治療は、ＭＢＴ２腫瘍におけるこれらの転写産物のレベルの有意な増加を誘導した。これらの観察は、抗ＰＤ１／Ａｂ６処置が、パーフォリン及びグランザイムなどの細胞傷害性エフェクタータンパク質を備えて、ＣＤ８＋　Ｔ細胞の大量の流入を引き起こすことを確認する。

【０９５７】

図３２は、１０日目又は１３日目における免疫マーカ、Ｉｆｎｇ、Ｇｚｍｂ、Ｐｒｆ１及びＫｌｒｋ１の遺伝子発現変化を示す。示されるように、これらのマーカ遺伝子のｐＰＣＲ分析は、抗ＰＤ－１及びＴＧＦβ１阻害剤の組合せ治療が、腫瘍における細胞溶解タンパク質のマーカ（グランザイムＢ及びパーフォリン）、Ｔｈ１免疫（ＩＦＮγ）及びＣＴＬ／ＮＫ細胞マーカ（Ｋｌｒｋ１）の遺伝子発現を誘導することを実証する。これらのデータは、抗腫瘍効果を媒介するチェックポイント阻害及びＴＧＦβ１阻害の相乗効果を裏付けるさらなるエビデンスを提供する。

【０９５８】

要約すると、これらの結果は、チェックポイント遮断及びＴＧＦβ１阻害によって引き起こされる抗腫瘍免疫の堅固な動員を集合的に示す。詳細には、全腫瘍浸潤免疫細胞の割合が、処置群にわたって一定のままである一方、抗ＰＤ－１／Ａｂ６組合せが、ａ）腫瘍内ＣＤ８＋　Ｔ細胞の有意な増加（＊Ｐ＜０．０５、抗ＰＤ－１群に対する両側Ｔ検定）；ｂ）Ｔｒｅｇの有意な増加（＊Ｐ＜０．０５）を引き起こすが、ＣＤ８＋：Ｔｒｅｇ比は変化せず（ｎ．ｓ．、抗ＰＤ－１に対する有意差なし）；及びｃ）免疫抑制性Ｍ２マクロファージ及び骨髄由来抑制細胞（ＭＤＳＣ）集団の減少によって駆動される、いずれかの他の群と比較した骨髄細胞の有意な減少（＊Ｐ＜０．０５、抗ＰＤ－１群に対する両側Ｔ検定）。全腫瘍溶解物の定量的なＰＣＲ分析は、ＣＤ８エフェクター遺伝子の堅固な増加を確認する。同様に、抗ＰＤ－１及びＡｂ６の組合せは、免疫除去を克服する、腫瘍塊内のＣＤ８＋　Ｔ細胞の頻度の顕著な増加を誘導する。

【０９５９】

ＴＧＦβ１下流シグナル伝達に対する効果を確認するために、さらなる免疫組織化学的分析を行って、ＭＢＴ２腫瘍におけるリン酸化ＳＭＡＤ３を検出し、位置を特定した。図３０Ｆに示されるように、ホスホＳＭＡＤ３が、抗ＰＤ－１処置腫瘍内の血管内皮の近くで富化されていたことが分かった。Ａｂ６による処置は、このシグナルをなくし、これは、ＴＧＦβ１阻害が、腫瘍内免疫細胞浸潤を促進し得るという考えを裏付ける。

【０９６０】

抗ＰＤ－１処置動物は、腫瘍血管系に密接に関連するいくらかの浸潤ＣＤ８＋　Ｔ細胞を示す（ＣＤ３１染色；内皮マーカ）。組合せ治療は、さらなるＴ細胞浸潤を裏付ける。理論によって制約されるものではないが、血管内皮とのＣＤ８＋　Ｔ細胞の近接は、Ｔ細胞が、腫瘍内血管系からの腫瘍を浸潤し得ることを示唆する。腫瘍のＣＤ８陽性領域及びＣＤ３１陽性血管系からの距離間の関係が、図３０Ｇに示される。ヒストグラムは、組合せ治療（ＴＧＦβ１阻害及びチェックポイント遮断）が、特に、血管から遠位の領域におけるＣＤ８＋領域の割合を増加させることを実証し、これは、ＴＧＦβ１阻害が、血管系

を介して腫瘍内へのＣＤ８＋細胞浸潤を促進して、免疫抑制を有効に克服するか又は逆転させることを示唆している。同様の観察が、ＥＭＴ－６モデルにおいてなされた（図３４Ｅ及び３４Ｆ）。

【０９６１】

実施例１７：骨髄増殖性疾患のＭＰＬモデルに対するアイソフォーム選択的コンテキスト非依存的ＴＧＦβ１阻害剤の効果

骨髄線維症の前臨床ＭＰＬＷ５１５Ｌモデルは、以前に記載されている（例えば、Ｗｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ｖｏｌｕｍｅ ２１，ｐａｇｅｓ １４７３－１４８０（２０１５）を参照されたい）。簡潔に述べると、レシピエントマウスは、致死的な放射線を浴び、その後、Ｗ５１５Ｌにおける構成活性突然変異を有するヒトトロンボポエチン受容体ＭＰＬ（ＭＰＬＷ５１５Ｌ）を形質導入されたドナー骨髄細胞を移植された。このモデルにおけるレシピエントマウスは、２～３週間で白血球増加、多血症及び血小板増加を生じるであろう。

【０９６２】

骨髄線維症のマウスモデルにおけるＴＧＦβ１選択的阻害の効果を評価するために、ＴＧＦβ１（Ａｂ６）の高親和性、アイソフォーム特異的、コンテキスト依存的阻害剤を、ＭＰＬ^{Ｗ５１５Ｌ}モデルにおいて試験した。簡潔に述べると、５０万個のＭＰＬ＋ｃｋｉｔ＋細胞を、８～１０週齢雌ＢＡＬＢ／ｃマウスに移植した。３週間後、レシピエントマウスに、１０若しくは３０ｍｇ／ｋｇ／週のＡｂ６、又は陰性対照ＩｇＧ（３０ｍｇ／ｋｇ／週）の腹腔内（ｉ．ｐ．）注射を４週間にわたって週に１回投与した（合計で５回の投与）。マウスを、最後の投与の２４時間後に殺処分した。

【０９６３】

骨髄の組織病理学を、レチクリン染色によって評価されるＡｂ６の抗線維化効果を評価するために行った。予備データは、Ａｂ６で処置された動物から採取された骨髄切片が、抗線維化効果を示したことを示す。代表的な骨髄切片のレチクリン染色から収集した画像が、図３６Ａに示される。レチクリン線維（主にコラーゲンＩＩＩ）の明らかな減少が、１０及び３０ｍｇ／ｋｇのＡｂ６を週に１回投与されたマウスにおいて観察された。同様であるがより小さい程度の抗線維化効果も、試験される第２のＴＧＦβ１選択的阻害剤抗体で観察された（データは示されていない）。

【０９６４】

骨髄切片の病理学者が行った線維症採点に基づく定量分析では、レチクリン染色が、ＷＨＯによって公開された分類系を用いて採点された（Ｔｈｉｅｌｅ Ｊ，Ｋｖａｓｎｉｃｋａ ＨＭ，Ｔｅｆｆｅｒｉ Ａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｉｍａｒｙ ｍｙｅｌｏｆｉｂｒｏｓｉｓ Ｉｎ：Ｓｗｅｒｄｌｏｗ ＳＨ，Ｃａｍｐｏ Ｅ，Ｈａｒｒｉｓ ＮＬ，ｅｔ ａｌ（ｅｄｓ）．ＷＨＯ Ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｔｕｍｏｕｒｓ ｏｆ Ｈａｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ ａｎｄ Ｌｙｍｐｈｏｉｄ Ｔｉｓｓｕｅｓ ４ｔｈ ｅｄｎ．ＩＡＲＣ Ｐｒｅｓｓ：Ｌｙｏｎ，Ｆｒａｎｃｅ，２００８，ｐｐ ４４－４７）。簡潔に述べると、組織切片が、４階層システム（ＭＦ－０、ＭＦ－１、ＭＦ－２及びＭＦ－３）を用いて採点される。ＭＦ－０のスコアは、交差（クロスオーバー）を有さない散在している線状レチクリンを示し、これは、正常な骨髄に相当する。ＭＦ－１のスコアは、特に血管周囲領域における、多くの交差を有するレチクリンの緩いネットワークを示す。ＭＦ－２のスコアは、コラーゲンの限局性の束及び／又は限局性の骨硬化症を伴うことがある、広範囲の交差を有するレチクリンの拡散及び密度の増加を示す。ＭＦ－３のスコアは、多くの場合に骨硬化症を伴う、広範囲の交差及びコラーゲンの粗い束を有する拡散及び高密度レチクリンを示す。

【０９６５】

線維症スコアが、図３６Ｂに示され、これは、対照ＩｇＧを投与された動物と比較して、Ａｂ６の用量依存的抗線維化効果を示す。左側のグラフは、第１の試験（試験１）からの線維症スコアを示し、ここで、処置の開始時に高い疾病負担（＞５０％）を有する動物を、示されるようにＡｂ６又は対照ＩｇＧで処置した。試験を繰り返した（試験２）。対

応するコホートからのデータを組み合わせて、右側のグラフに示す（試験１＋２）。３０ｍｇ／ｋｇのＡｂ６の週に１回の投与は、線維症を有意に軽減した。

【０９６６】

また、動物を、標準的な技術を用いて、様々な血液学的パラメータ、例えば、骨髄移植後の完全血球算定（ＣＢＣ）（白血球（ＷＢＣ）、血小板（Ｐｌｔ）、ヘモグロビン（ＨＢ）及びヘマトクリット値（ＨＣＴ）を含む）について評価した（図３６Ｃ及び３６Ｄ）。驚くことでないが、治療開始の４週間後、ＩｇＧ対照で処置されたＭＰＬマウスは、ＷＢＣ及びＰｌｔのレベルの増加を含む、骨髄線維症に特徴的な血液学的異常を発現するようである。Ａｂ６で処置された動物は、対照ＩｇＧ動物と比較して、ＷＢＣ、Ｐｌｔ及びＨＢ濃度の正規化並びにベースラインに対する変化への用量依存的傾向を示した。さらに、Ａｂ６処置動物は、対照ＩｇＧ動物と比較して、ＨＣＴ濃度の統計的に有意な正規化並びにベースラインに対する変化を示し、ここで、Ｈｃｔレベルは、４週間までにベースラインに戻されるようであった。

【０９６７】

実施例１８：ＥＭＴ－６同系乳癌モデルに対するＴＧＦβ１阻害剤の効果

乳癌は、米国の女性間で最もよく見られる癌であり、癌による死亡の原因の第４位である。図２１Ｂ（左側）及び図３５に示されるように、ＥＭＴ６腫瘍は、ＴＧＦβ１を主に発現する多くの腫瘍と異なり、有意なレベルのＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３の両方を発現する（例えば、ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３共優勢（ｃｏ－ｄｏｍｉｎａｎｔ））。免疫除去及びＣＢＴ耐性に対するこれらの腫瘍におけるＴＧＦβ３の寄与は、不明であった。

【０９６８】

以前に、国際公開第２０１８／１２９３２９号パンフレットに記載されるように、Ａｂ３（ＴＧＦβ１のアイソフォーム選択的なコンテキストバイアスされた阻害剤）が、このモデルにおいて腫瘍成長及び生存に対する部分的な効果を示したことが示された。

【０９６９】

これらの試験において、アイソフォーム選択的ＴＧＦβ１阻害剤及びアイソフォーム選択的ＴＧＦβ３阻害剤の組合せの効果が、免疫チェックポイント阻害剤と共に、ＥＭＴ６モデルにおいて評価された。この腫瘍が、ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３アイソフォームの両方で共優勢であるため、このような組合せ治療は、腫瘍退縮における有効性を示し得ることが理由付けられた一方、チェックポイント阻害剤と共に、アイソフォーム選択的阻害剤単独のいずれか（ＴＧＦβ１又はＴＧＦβ３）が、腫瘍成長を阻害する部分的な効果を生じるはずであるという仮説が立てられた。

【０９７０】

ＥＭＴ６腫瘍を、皮下に移植した。ＥＭＴ６腫瘍が３０～８０mm^3に達したとき、処置を開始した。抗ＰＤ－１を、週に２回、１０ｍｋｇで投与した。Ａｂ６を、１０ｍｋｇで週に１回投与した。抗ＴＧＦβ３中和抗体を、週に１回３０ｍｋｇで投与した。

【０９７１】

レスポンダーが、試験終了時にエンドポイント体積の＜２５％の腫瘍サイズを達成するものと定義される。

【０９７２】

意外なことに、抗ＰＤ－１抗体と組み合わせた、Ａｂ６、ＴＧＦβ１の高親和性、アイソフォーム選択的阻害剤は、ＥＭＴ６におけるチェックポイント阻害耐性を克服するのに十分であった。図３４Ａは、腫瘍成長に対するＡｂ６及び／又は抗ＰＤ－１の効果を示す。いずれの抗体も、単独で使用されるとき、有意な腫瘍退縮を達成しなかった。しかしながら、組み合わせると、処置動物の５０％（１０匹中５匹）が、有意な腫瘍退縮を達成した（エンドポイント腫瘍体積の２５％以下への減少）。これらのデータは、組合せ治療群において、完全レスポンダー又は腫瘍成長遅延のいずれかによって明らかなように、相乗的抗腫瘍有効性を示す。予想外にも、ＴＧＦβ３のアイソフォーム選択的阻害剤の添加は、相加的効果を生じなかった。Ａｂ６によるＴＧＦβ１アイソフォームの阻害が、腫瘍内ＴＧＦβ３の存在下でさえ、腫瘍を抗ＰＤ－１に感作させるのに十分であったという観察

は、ＴＧＦβ１が、疾患関連ＴＧＦβシグナル伝達、免疫除去及びＣＢＴに対する一次耐性を駆動するアイソフォームであるという仮説を裏付ける。

【０９７３】

対応して、組合せ治療（ＴＧＦβ１＋抗ＰＤ－１）は、抗ＰＤ－１単独と比較して、処置された動物における有意な生存利益を達成した（＊＊＊、Ｐ＜０．００１　ログランク検定）（図３４Ｂを参照されたい）。治療開始の５６日後、動物の６０％が、組合せ群において生存していた一方、他の処置群では、全ての動物が死亡したか又は２８日までに安楽死させる必要があった。

【０９７４】

別個の試験（試験２）も、Ａｂ６及び抗ＰＤ－１の組合せで処置されたＴＧＦβ１／３陽性ＥＭＴ６腫瘍を有する動物における生存の有意な改善を示したが、いずれかの抗体単独で処置された動物では示さなかった（図３４Ｃ）。このモデルにおいて、本発明者らは、処置を停止し、ＥＭＴ－６無腫瘍生存体を、投与なしで６週間にわたって追跡した（灰色のボックス）。投与停止の６週間後、完全レスポンダーは、腫瘍がないままであり、これは、反応の持続性を再度実証している（図３４Ｃ、右側）。報告される数値は、試験終了時に測定可能な腫瘍を有さない動物の数である。抗ＰＤ－１単独で処置された動物と比較して、組合せ治療（Ａｂ６＋抗ＰＤ－１）の有意な生存利益が観察された（図３４Ｄ）。

【０９７５】

実施例１９：組み換えタンパク質発現

組み換えタンパク質が、対象とするｃＤＮＡを含有するｐＴＴ５プラスミド（ＮＲＣ　Ｃａｎａｄａ）で一過性にトランスフェクトされたＥｘｐｉ２９３Ｆ（商標）細胞（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）において発現された。大きい潜在型ＴＧＦβ複合体が、ｐｒｏＴＧＦβ１、ｐｒｏＴＧＦβ２又はｐｒｏＴＧＦβ３をコードするプラスミド、及びＬＬＣ提示タンパク質をコードするプラスミドでＥｘｐｉ２９３Ｆ（商標）細胞を共トランスフェクトすることによって生成された。ＴＧＦβ結合ＴＢ３ドメイン及び隣接するＥＧＦ様ドメインを含むＬＴＢＰ断片を用いて、完全長ＬＴＢＰ（ヒトＬＴＢＰ１についてはＥ８７３からＩ１５０７；ヒトＬＴＢＰ３についてはＤ８６６からＥ１０３９）より収量及びタンパク質品質を改善した。ＬＴＢＰ断片は、精製を容易にするためにＣ末端Ｈｉｓ－ｔａｇを有していた。Ｃ末端Ｈｉｓ－ｔａｇｇｅｄ　ＧＡＲＰ又はＬＲＲＣ３３細胞外ドメインを発現する安定したＥｘｐｉ２９３細胞株を作製した。これらの安定した細胞を、ｐｒｏＴＧＦβ１をコードするプラスミドで一過性にトランスフェクトして、潜在型ＴＧＦβ１とのＧＡＲＰ又はＬＲＲＣ３３複合体を生成した。小さい潜在型ＴＧＦβ複合体が、Ｎ末端Ｈｉｓ－ｔａｇ及びセリンに突然変異された大型潜在複合体形成システイン（ＴＧＦβ１におけるＣ４Ｓ、ＴＧＦβ２におけるＣ５Ｓ、及びＴＧＦβ３プロドメインにおけるＣ７Ｓ）により発現された。活性ＴＧＦβ成長因子は、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓから購入した。形質転換体を、５日間にわたってＥｘｐｉ２９３（商標）発現培地（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）中で培養してから、調整された上清を収集した。組み換えタンパク質を、Ｎｉ２＋親和性クロマトグラフィー、続いてサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によって精製した。タンパク質品質及びジスルフィド結合複合体の形成を、ＳＤＳ　ＰＡＧＥ及び分析ＳＥＣによって確認した。抗体が、対象とする重鎖及び軽鎖をコードするｐＴＴ５プラスミドによるＥｘｐｉ２９３Ｆ（商標）細胞の共トランスフェクションによって発現された。ヒトＩｇＧ４及びマウスＩｇＧ１抗体を、タンパク質Ａ捕捉、続いてＳＥＣによって精製した。動物モデルに使用された抗体の識別を、質量分析法によって確認した。

【０９７６】

実施例２０：同系マウスモデル

マウスモデルを、ＩＡＣＵＣに従って、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｌａｂｓ（Ｍｏｒｒｉｓｖｉｌｌｅ，ＮＣ）において実施した。ＭＢＴ－２モデルでは、８～１２週齢Ｃ３Ｈ／ＨｅＮ（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）雌マウスに、イソフ

ルランで麻酔をかけて、５×１０^{5}個のＭＢＴ－２腫瘍細胞を脇腹に皮下移植した。全ての群が等しい開始体積平均及び範囲を有するように、動物を、４０～８０ｍｍ^{3}の平均腫瘍体積の群に分けた。クラウドマンＳ９１では、８～１２週齢ＤＢＡ／２（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）雌マウスに、イソフルランで麻酔をかけて、５０％のマトリゲル中の５×１０^{5}個のクラウドマンＳ９１腫瘍細胞を脇腹に皮下移植した。平均腫瘍体積が１２５～１７５ｍｍ^{3}に達したとき、全ての群が等しい開始体積平均及び範囲を有するように、動物を群に分けた。ＥＭＴ－６モデルでは、８～１２週齢雌ＢＡＬＢ／ｃマウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）に、５×１０^{6}個のＥＭＴ－６腫瘍細胞を脇腹に皮下移植した。全ての群が等しい開始体積平均及び範囲を有するように、動物を、３０～６０ｍｍ^{3}の平均開始体積の群に分けた。対照ＨｕＮｅｇ－ｒＩｇＧ１又は抗ＰＤ－１（ＲＭＰ１－１４；ＢｉｏＸＣｅｌｌ）を、週に２回、１０ｍｇ／ｋｇで投与した。Ａｂ６－ｍＩｇＧ１又は対照抗体ＨｕＮｅｇ－ｍＩｇＧ１を、週に１回、示される用量レベルで投与した。全ての抗体を腹腔内投与した。腫瘍体積を、週に２回測定し、腫瘍が１，２００ｍｍ^{3}（ＭＢＴ－２、ＥＭＴ６）若しくは２，０００ｍｍ^{3}（クラウドマンＳ９１）に達したとき、又は潰瘍形成時、動物をCO_2窒息によって殺処分した。腫瘍体積をｍｍ^{3}＝（ｗ^{2}×ｌ）／２として計算した。レスポンダー又は奏効率が、そのモデルのためのエンドポイント体積の２５％以下の腫瘍体積として定義された。完全奏功を、３つ以上の連続した測定についての１３．５ｍｍ^{3}未満の腫瘍として分類した。無腫瘍生存体は、試験終了時に明らかな腫瘍を有していなかった。ＩＡＣＵＣに従って壊死により殺処分された動物は、分析から完全に取り除かれた。

【０９７７】

３つのＴＧＦβアイソフォーム及び提示分子の相対的発現は、ヒト臨床データを再現する前臨床薬理学モデルの選択のために考慮に入れられた。ＭＢＴ－２、Ｓ９１及びＥＭＴ６における３つのアイソフォームの相対的タンパク質発現のＥＬＩＳＡ分析が、図２３Ｂに示される。ＭＢＴ－２及びＳ９１腫瘍の両方において、ＴＧＦβ１が、大部分のヒト癌を反映する、優勢アイソフォームである。ＥＭＴ－６は、依然として優勢なＴＧＦβ１発現を示したが、程度は低いが、ＴＧＦβ３も共発現し、これは、特定のヒト癌腫において観察されるものとより類似している。

【０９７８】

全ての４つの提示分子（ＬＴＢＰ１、ＬＴＢＰ３、ＧＡＲＰ及びＬＲＲＣ３３）が、ＭＢＴ－２、Ｓ９１及びＥＭＴ－６腫瘍においてＲＮＡによって発現された（図２３Ｃ）。

【０９７９】

実施例２１：ＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１の抗体誘導性インターナリゼーション

本発明者らは、ＬＲＲＣ３３　ＲＮＡを発現する細胞型の中でも、あるサブセットのみが、細胞表面上でＬＲＲＣ３３タンパク質を発現するようであることを観察した。本発明者らは、ＬＲＲＣ３３が、細胞膜におけるタンパク質トラフィッキングによって調節され得るという仮説を立てた。この可能性を評価するために、本発明者らは、インターナリゼーションアッセイを設計した。

【０９８０】

細胞表面ＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１を発現するＥｘｐｉ２９３細胞株を生成した。Ｉｎｃｕｃｙｔｅシステムを用いて、細胞表面ＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１へのＡｂ６結合時のＬＲＲＣ３３のインターナリゼーションを測定した。簡潔に述べると、Ｉｎｃｙｃｙｔｅシステムは、標的が、酸性ｐＨを有する細胞内区画（例えば、リソソーム）中にインターナライズされるときに検出され得るｐＨ感受性検出レベルを用いる。ＬＲＲＣ３３及びｐｒｏＴＧＦβ１を発現する細胞におけるＡｂ６結合時のＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１の迅速なインターナリゼーションが観察されたが（図３）、Ｅｘｐｉ２９３親系統では観察されなかった（データは示されていない）。本明細書において観察されるインターナリゼーションは、初代ヒトマクロファージにおけるインターナリゼーションと同様であった。

【０９８１】

ＬＲＲＣ３３－ｐｒｏＴＧＦβ１インターナリゼーションは、Ｅｘｐｉ２９３細胞がＦｃ受容体を有さない（データは示されていない）ため、ＦｃＲ媒介性でない。これらの結果は、Ａｂ６の関与が、標的下方制御を促進し得ることを示す。これは、ＴＭＥ及びＦＭＥなど、疾患部位において得られるｐｒｏＴＧＦβ１レベルを減少させることにより、インビボでのＴＧＦβ１阻害の追加の又は代替的な機構を提供し得る。

【０９８２】

実施例２２：循環ＭＤＳＣの検出

インビボでの循環免疫細胞サブセットに対するＡｂ６処置の効果を、ＭＢＴ－２マウスモデルを用いて決定した。腫瘍担持マウスに、１及び８日目に１０ｍｇ／ｋｇのＡｂ６を単独で又は１０ｍｇ／ｋｇで１、４、及び８日目に投与される抗ＰＤ－１抗体と組み合わせて投与した。

【０９８３】

全血を、１０日目に採取し、フローサイトメトリー分析のために処理した。循環Ｇ－ＭＤＳＣｓ及びＭ－ＭＤＳＣのレベルを、Ｇ－ＭＤＳＣ（ＣＤ４５＋　ＣＤ１１ｂ＋　Ｌｙ６Ｇ＋　Ｌｙ６Ｃ^{low}）及びＭ－ＭＤＳＣ（ＣＤ４５＋　ＣＤ１１ｂ＋　Ｌｙ６Ｇ－　Ｌｙ６Ｃ^{high}）のための表面タンパク質マーカの発現に基づいて決定した。値を、血液中で検出された全ＣＤ４５＋細胞におけるパーセンテージとして表した。循環Ｇ－ＭＤＳＣレベルが、Ａｂ６単独及び組合せ治療（即ち抗ＰＤ－１と組み合わせたＡｂ６）の両方で処置された群において低下された一方、Ａｂ６処置群における循環Ｍ－ＭＤＳＣレベルは、ＩｇＧ対照又は抗ＰＤ－１治療単独で処置された群と比較して、異なっていなかった。結果が、図４０に示される。

【０９８４】

また、Ｔ細胞のフローサイトメトリー分析を、全血から治療開始の１０日後の時点で行った。循環Ｔ細胞レベルを、Ｔ細胞表面タンパク質マーカの発現に基づいて決定した。ＣＤ８＋及びＣＤ３＋　Ｔ細胞レベル及び値を、全血中で検出された総循環ＣＤ４５＋細胞に対して正規化した。Ａｂ６単独で処置された群は、ＩｇＧ対照と比較して、ＣＤ８＋及びＣＤ３＋循環Ｔ－細胞レベルの両方のわずかな増加を示した。Ａｂ６及び抗ＰＤ－１組合せ治療は、ＣＤ８＋又はＣＤ３＋循環Ｔ細胞レベルのいずれかの有意な変化をもたらさなかった。

【０９８５】

第２のインビボ試験を、循環及び腫瘍内ＭＤＳＣ集団に対するＡｂ６処置の効果をさらに評価するために行った。ＭＢＴ－２マウスを、ＩｇＧ対照、Ａｂ６単独（１０ｍｇ／ｋｇ）、抗ＰＤ－１抗体（１０ｍｇ／ｋｇ）又はＡｂ６（１ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ若しくは１０ｍｇ／ｋｇ）と抗ＰＤ－１抗体（１０ｍｇ／ｋｇ）との組合せで処置した。処置を、１及び８日目に投与した。全血を、処置の最初の用量を投与する１７日前並びに３、６及び１０日目に採取した。腫瘍体積を試験にわたって監視し、腫瘍内ＭＤＳＣ分析を１０日目に行った。

【０９８６】

１、４、７、及び１０日目の腫瘍体積の測定は、抗ＰＤ－１抗体単独で処置された動物並びに抗ＰＤ－１抗体及びＡｂ６の組合せで処置された全ての動物において統計的に有意な治療反応を示したが、１０日目の前にＡｂ６単独で処置された動物において示さなかった（図４９）。薬物動態結果は全ての動物が適切なＡｂ６投与量を投与されたことを確認したため、１０日目の前にＡｂ６単独で処置された動物において観察された治療反応の欠如は、不適切な投与の結果である可能性は低かった。これらの結果は、ＭＢＴ－２腫瘍の場合、ＰＤ－１及びＴＧＦβ１経路の同時の阻害が、ＰＤ－１又はＴＧＦβ１経路単独の阻害より腫瘍成長を大きく軽減（例えば、遅延又は退縮）し得ることを示す。

【０９８７】

循環免疫細胞集団のレベルを、ＦＡＣＳ分析によって全血サンプルから決定した。全ＣＤ１１ｂ＋骨髄細胞を、全血から同定し、次に、それに由来するＭ－ＭＤＳＣ集団を、細胞表面マーカＬｙ６Ｃ（Ｌｙ６Ｃ^{high}）の発現によって同定し、Ｇ－ＭＤＳＣ集団を

、細胞表面マーカＬｙ６Ｇ（Ｌｙ６Ｇ＋）の発現によって同定した。ベースライン循環ＭＤＳＣレベルは、非腫瘍担持マウスから採取され、１７．８％の骨髄細胞からなる全血サンプルから決定され、骨髄細胞は、３０％のＧ－ＭＤＳＣ及び２９．１％のＭ－ＭＤＳＣ（全骨髄集団におけるパーセンテージ）を含んでいた（図５０）。循環免疫細胞のレベルを、腫瘍担持マウスから１０日目に評価した。非腫瘍担持マウスのベースラインレベルと比較して、腫瘍担持マウスは、全骨髄集団及び循環Ｇ－ＭＤＳＣの顕著な増加したレベルを示したが、Ｍ－ＭＤＳＣ細胞では示さなかった（図５２）。腫瘍担持マウスからの血液サンプルは、６４．９％の骨髄細胞からなることが分かり、骨髄細胞は、７０％のＧ－ＭＤＳＣ及び６．９５のＭ－ＭＤＳＣを含んでいた。さらに、Ｇ－ＭＤＳＣは、非腫瘍担持マウスの血液中の全ＣＤ４５＋細胞の５．４５％と比較して、腫瘍担持マウスの血液中の全ＣＤ４５＋免疫細胞集団の４５．４％を構成することも分かった（図５１）。

【０９８８】

循環ＭＤＳＣ集団を、処置全体を通して腫瘍担持動物において評価した。図５２に示されるように、Ｍ－ＭＤＳＣのレベルは、処置全体を通して低いままであったが、Ｇ－ＭＤＳＣのレベルは、低下する傾向を示し、Ｇ－ＭＤＳＣレベルの統計的に有意な減少が、１０日までに全ての群において検出された。Ａｂ６単独で処置された動物における循環Ｇ－ＭＤＳＣレベルの低下が、１０日までに観察されなかった（図５３）。これは、Ａｂ６処置単独が、Ａｂ６及び抗ＰＤ－１処置の組合せと比較して遅い速度ではあるが、循環ＭＤＳＣレベルを低下させるのに十分であり得ることを示唆する。

【０９８９】

また、腫瘍体積との循環Ｇ－ＭＤＳＣレベルの関連を、１０日目に評価した。図５４は、全ての群において、循環Ｇ－ＭＤＳＣレベルと腫瘍体積との間の線形相関を示す。

【０９９０】

循環及び腫瘍内ＭＤＳＣのレベルを、１０日目に腫瘍体積測定と比較した。処置された動物における腫瘍内Ｍ－ＭＤＳＣレベルは、全ての処置群にわたって同様であり、対照動物と比較して低下しなかった。対照的に、抗ＰＤ－１抗体単独又は抗ＰＤ－１抗体及びＡｂ６の組合せで処置された動物における腫瘍内Ｇ－ＭＤＳＣレベルが、対照動物と比較して低下された（図５５）。Ａｂ６処置単独が、循環Ｇ－ＭＤＳＣレベルの低下をもたらした一方、腫瘍内ＭＤＳＣレベルは、Ａｂ６処置単独によって影響されなかった（図５６）。腫瘍及び循環における相対的ＭＤＳＣレベルの相関が、図５７に示される。さらに、１０日目の低下した腫瘍内Ｇ－ＭＤＳＣレベルは、全ての処置群にわたって増加した腫瘍ＣＤ８＋細胞と相関することが分かり（図５８）、これは、全腫瘍免疫抑制の低下を示唆している。

【０９９１】

実施例２３：Ａｂ６のインビトロ安全性評価

サイトカイン放出

免疫細胞に関与する薬理学的介入は、患者に投与される場合、免疫細胞を活性化する潜在的リスクを有し得；従って、炎症性サイトカイン反応がＡｂ６により引き起こされるかどうかを決定することが重要である（Ｓｕｎｔｈａｒａｌｉｎｇａｍ　２００６；Ｔｏｌｃｈｅｒ　２０１７）。プレート結合アッセイを用いて、免疫細胞の活性化を誘導するＡｂ６の可能性を決定し、ここで、ヒトＰＢＭＣを、アイソタイプ対照又はＡｂ６で予め被覆された組織培養ウェルに加え、３７℃で最大で４８時間インキュベートした。これらのインビトロ試験の結果に基づいて、Ａｂ６が、潜在型ＴＧＦβ１活性化を阻害することが示され、それは、自発的な又は誘導される血小板凝集及び活性化に対する効果を有さなかった。さらに、Ａｂ６は、健常なヒトＰＢＭＣにおいてインビトロサイトカイン放出を誘導しないようであった。

【０９９２】

５～８ドナーから採取された末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、０．８～１００μｇ／ｍＬの濃度で、アイソタイプ対照又はＡｂ６で予め被覆された組織プレートに加えた（プレート結合形式）。代わりに、抗体を、可溶性アッセイ形式で培養物中のＰＢＭＣに直接加

えた。細胞を、２００，０００個の細胞／ウェルの密度で播種し、３７℃で４８時間にわたって抗体と共にインキュベートした。５～８の健常なドナーから採取されたＰＢＭＣを、分析物及びアッセイ形式に応じて分析した。サイトカインＩＬ－２、ＴＮＦα、ＩＦＮγ、ＩＬ－１β、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）及びＩＬ－６は、いくつかのＰＢＭＣ成分によって生成される代表的な炎症性サイトカインとしてアッセイされ、細胞活性化を示す。次に、細胞を上清収集前に３７℃で４８時間インキュベートした。上清を、ＩＦＮγ、ＩＬ－２、ＩＬ－１β、ＴＮＦα、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）及びＩＬ－６についてＬｕｍｉｎｅｘ多重アッセイ（Ｌｕｍｉｎｅｘ，Ａｕｓｔｉｎ，ＴＸ）によってトリプリケートで測定した。細胞培養物上清をＬｕｍｉｎｅｘアッセイ緩衝液（Ｌｕｍｉｎｅｘ，Ａｕｓｔｉｎ，ＴＸ）中において１：１で希釈した。抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８又はＬＰＳを、陽性対照として使用した。ロジスティック適合標準曲線を用いて、１ウェル当たりの各サイトカインの濃度を計算し、最小で5ドナーを、各分析物について分析した。トリプリケート間の変動性が１０倍超であった場合、そのデータ点がフラグ化され、分析物が特定のドナーについて２つ以下のフラグ化データ点を有していた場合、それは、その分析物について分析から取り除かれた。

【０９９３】

いずれかのアッセイ形式（プレート結合又は可溶性）において及び試験される最高濃度（１００μｇ／ｍＬ）により、以下のサイトカインの測定は、ＩｇＧ対照：ＩＦＮγ、ＩＬ－２、ＩＬ－１β、ＴＮＦα、ＩＬ－６及びＣＣＬ－２（ＭＣＰ－１）に対する反応の２．５倍以内であった。陽性対照、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８混合液は、ＩｇＧ対照で見られたレベルより１０倍～１０００倍高いサイトカイン反応を生じた（図３８Ａ及び３８Ｂ）。大部分のドナーは、Ａｂ６及びＩｇＧ対照の両方に応答してほぼ定量下限又は定量下限未満のサイトカインレベルを生じた一方、陽性対照治療は、堅固なサイトカイン反応を誘導した。しかしながら、８ドナーのうちの１人は、２０ｐｇ／ｍＬ未満のＡｂ６に対する非用量依存的ＩＬ－２反応を有していた。他のサイトカインは、このドナーサンプル中で増加せず、いずれかの他のドナーにおいても顕著なＩＬ－２反応はなかった。これらのデータは、Ａｂ６が、健常なヒトＰＢＭＣにおいてインビトロサイトカイン放出を誘導しなかったことを示す。

【０９９４】

血小板凝集、活性化及び結合

ヒト血小板は、潜在型ＴＧＦβ１を発現することが報告され、これは、ＴＧＦβ提示タンパク質、ＧＡＲＰによって細胞表面にテザーされる（Ｔｒａｎ　２００９）。Ａｂ６が、組み換えＧＡＲＰ／ＴＧＦβ１潜在型複合体に結合し、ヒト調節Ｔ（Ｔｒｅｇ）細胞におけるＧＡＲＰ／ＴＧＦβ１複合体の活性化を阻害するため（Ｍａｒｔｉｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（２０２０），１２（５３６）：ｅａａｙ８４５６）、ヒト血小板に結合するＡｂ６の可能性を調べ、インビトロでのヒト血小板の凝集及び活性化に対するＡｂ６の影響を決定した。血小板活性化及びＡｂ６結合評価を、ＣＤ６１発現血小板におけるＣＤ６２Ｐ（Ｐ－セレクチン）、ＧＡＲＰ及びＡｂ６抗体の表面レベル発現を測定することによって決定した。ヒト全血サンプルを、絶食したドナー、２人の男性及び２人の女性から採取し、それを使用して、２００及び３００×１０^{3}個の細胞／μＬの目標濃度で血小板富化血漿（ＰＲＰ）を調製した。これらのサンプルを、生理食塩水（０．９％のＮａＣｌ）、ビヒクル対照（２０ｍＭのシトレート、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ５．５）又はＡｂ６（１０００μｇ／ｍＬの最終濃度まで）を添加されるまで、採取日に室温に維持した。サンプルを３７℃にし、血小板形状及び凝集の変化を開始させるアゴニストであるＡＤＰを、１０μＭの最終濃度になるまで加えてから、一定の波長の血小板凝集計（Ｃｈｒｏｎｏ－Ｌｏｇ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｈａｖｅｒｔｏｗｎ，ＰＡ）に充填した。次に、血小板凝集を、ＰＲＰ及びＡＤＰを通る光透過率の変動を、６分間にわたって乏血小板血漿と比較することによって測定した。インキュベーション後、サンプルを２０分間にわたってフローサイトメトリー抗体で染色した後、ＰＦＡで固定した。サンプルを、ＦＡＣＳＣａｎｔｏ　ＩＩフローサイト

メーターを用いて取得した。活性化マーカＣＤ６２Ｐ（Ｐ－セレクチン）（マウスｌｇＧ１　Ｋ抗ヒトＣＤ６２Ｐ　ＰＥ；ＢＤ　ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）、ＧＡＲＰ（マウスｌｇＧ２ｂ　Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ　Ｖｉｏｌｅｔ　４２１抗ヒトＧＡＲＰ（ＬＲＲＣ３２）；Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）の表面発現のレベル及びＡｂ６への結合を、フローサイトメトリーによってＣＤ６１発現血小板において測定した。

【０９９５】

血小板凝集測定を、ヒトドナー全血サンプルから調製された血小板富化血漿において行った。クエン酸全血サンプルを、２１℃で１０分間（その最長減速時間に設定される）にわたって２００相対遠心力（ＲＣＦ）で遠心分離した。各サンプルの血漿分画を単離し、プールし、キャップし、室温に保持し、多血小板血漿（ＰＲＰ）プールとして同定した。並行して、採取された第１のクエン酸全血チューブを、２１℃で１０分間にわたって２４００ＲＣＦで遠心分離した。血漿分画を単離し、プールし、キャップし、室温に保持した。このサンプルを、乏血小板血漿（ＰＰＰ）プールとして同定した。ＰＲＰプールを、血小板濃度についてＡＤＶＩＡ　１２０　Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔにおいて分析した。ＰＲＰサンプルを、２００～３００×１０^{3}個の細胞／μＬの最終血小板濃度を得るように標準化した。従って、ＰＲＰプールにおける血小板数に基づいて、ＰＰＰプールによる希釈を行った。標準化ＰＲＰ（Ｓｔｄ　ＰＲＰ）が得られたら、サンプルを、２００～３００×１０^{3}個の細胞／μＬの血小板濃度の確認のためにＡＤＶＩＡ　１２０　Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔにおいて分析した。サンプル及び対照調製が、以下の表２１に要約される。

【０９９６】

【表２８】

表 21. 血小板凝集サンプル及び対照調製物

群番号	治療	試験項目のストック濃度 (μg/mL)	試験及び参照項目体積 (μL)	標準PRP体積 (μL)	最終体積 (mL)	試験用の複製サンプル体積 (mL)	ADP体積 (μL)
1	陰性対照 (0.9%の NaCl)*	0	24	1176	1.2	0.495	5
2	参照項目	0	24	1176	1.2		
3	Ab6 (0.01μg/mL)	0.5	24	1176	1.2		
4	Ab6 (0.1μg/mL)	5	24	1176	1.2		
5	Ab6 (1.0μg/mL)	50	24	1176	1.2		
6	Ab6 (10μg/mL)	500	24	1176	1.2		
7	Ab6 (100μg/mL)	5000	24	1176	1.2		
8	Ab6 (1000μg/mL)	50000	24	1176	1.2		

*参照項目体積 = 第１群についての NaCl 体積

* サンプルを単一のアリコートとして処理した

【０９９７】

ＰＰＰ及びＰＲＰ標準化サンプルの調製後、分析群を、上述されるように調製した。アリコート番号１（アリコート＃１）とラベル付けされるサンプルを用いて、アゴニストとしてのＡＤＰによる血小板凝集を監視した。アリコート＃１サンプルを、３７℃で１５分間インキュベートし、血小板凝集計においてデュプリケートで充填した（各キュベット当たり４９５μＬの血漿）。２分の計器校正後、１ｍＭにおける５μＬのアゴニストＡＤＰを１０μＭの最終濃度になるように各アリコート＃１サンプルに加えた。血小板凝集を６分間にわたって測定した。振幅（％）及び曲線下面積（％／分）を分析した。

【０９９８】

陰性対照（例えば、０．９％のＮａＣｌ）、参照項目（クエン酸緩衝液２０ｍＭのシトレート、１５０ｍＭの塩化ナトリウム、ｐＨ＝５．５）又は０．０１、０．１、１、１０、１００及び１０００μｇ／ｍＬのＡｂ６を添加されたＰＲＰサンプル間で血小板凝集の大きさの関連する差はなかった。結果が、図３９Ａ及び３９Ｂに示される。

【０９９９】

血小板活性化アッセイでは、採取された血液の最初の１．８ｍＬを廃棄し、残りの血液を、ＢＤ　Ｖａｃｕｔａｉｎｅｒ（登録商標）３．２％クエン酸ナトリウムチューブに収集した。血液サンプルを、収集の直後に処理した。試験及び参照溶液を、全血サンプル添加手順中、室温に保持した。各群からの試験サンプルを適切なサンプルプレート中においてデュプリケートで分析した。対照及びサンプルの調製が以下の表２２に要約される。

【１０００】

【表２９】

表 22. 血小板活性化及び結合制御並びにサンプル調製物

群番号	治療	試験項目のストック濃度 (μg/mL)	ADP 体積 (μL)	試験及び参照項目体積 (μL)	全血体積 (μL)	最終体積 (mL)
1	陰性対照(0.9%の NaCl)*	0	0	4	196	0.2
2	参照項目	0	0	4	196	0.2
3	Ab6 (0.01μg/mL)	0.5	0	4	196	0.2
4	Ab6 (0.1μg/mL)	5	0	4	196	0.2
5	Ab6 (1.0μg/mL)	50	0	4	196	0.2
6	Ab6 (10μg/mL)	500	0	4	196	0.2
7	Ab6 (100μg/mL)	5000	0	4	196	0.2
8	Ab6 (1000μg/mL)	50000	0	4	196	0.2
9	ADP (20μM)	0	4	0	196	0.2
10	参照項目 + ADP (20μM)	0	4	4	192	0.2
11	Ab6 (0.01μg/mL) + ADP (20μM)	0.5	4	4	192	0.2
12	Ab6 (0.1μg/mL) + ADP (20μM)	5	4	4	192	0.2
13	Ab6 (1μg/mL) + ADP (20μM)	50	4	4	192	0.2
14	Ab6 (10μg/mL) + ADP (20μM)	500	4	4	192	0.2
15	Ab6 (100μg/mL) + ADP (20μM)	5000	4	4	192	0.2
16	Ab6 (1000μg/mL) + ADP (20μM)	50000	4	4	192	0.2

*参照項目体積 ＝ 第 1 群についての NaCl 体積

【１００１】

試験サンプルを、周囲温度で１５分間にわたって様々な濃度のＡｂ６と共にインキュベートした後、適用可能な場合、２分間にわたってＡＤＰを添加した。インキュベーション後、サンプルを２０分間にわたってフローサイトメトリー抗体で染色した後、ＰＦＡで固定した。活性化マーカＣＤ６２Ｐ（Ｐ－セレクチン）及びＧＡＲＰの表面発現を、ＦＡＣＳＣａｎｔｏ　ＩＩフローサイトメーターを用いてフローサイトメトリーによってＣＤ６１発現血小板において測定した。ＣＤ６２Ｐ$^{+}$血小板（ＣＤ６２$^{+}$）及びＧＡＲＰ$^{+}$血小板（ＧＡＲＰ$^{+}$）の平均パーセンテージを、評価される各実験条件のために報告した。

【１００２】

最大で１０００μｇ／ｍＬのＡｂ６添加サンプル中の非活性化又は活性化血小板によるＡｂ６結合のエビデンスはなく、Ａｂ６は、血小板ＧＡＲＰ発現に対する効果を有していなかった。血小板凝集測定を、ヒトドナー全血サンプルから調製された血小板富化血漿（

ＰＲＰ）において行った。ビヒクル対照（クエン酸緩衝液）又は生理食塩水のいずれかを添加された対照サンプルと比較して、０．０１、０．１、１、１０、１００及び１０００μｇ／ｍＬのＡｂ６による血小板凝集の大きさの関連する差はなかった。血小板活性化評価を、ヒトドナーから採取された全血サンプルと共にフローサイトメトリーを用いて行い、最大で１０００μｇ／ｍＬのＡｂ６と共にインキュベートした。Ａｂ６は、いずれの濃度でも自発的な血小板活性化を誘導せず、Ａｂ６は、ビヒクル対照又は生理食塩水と比較したとき、ＡＤＰ誘導性血小板活性化も減少させなかった。これらのインビトロ結果は、４週間のＧＬＰ反復投与サル毒性試験においてさらに確認され、ここで、処置関連効果のエビデンスは、血小板数及び凝固において観察されなかった。結論として、Ａｂ６は、ＡＤＰアゴニズムによる血小板凝集及び活性化に影響を与えず、Ａｂ６は、自発的な血小板活性化を誘導せず、又は血小板に結合しない。

【１００３】

実施例２４：Ａｂ６のインビボ安全性評価

Ａｂ６の４週間のＧＬＰ毒性評価を、ラット及びカニクイザルにおいて行った。ラット及びカニクイザルの両方におけるＡｂ６による４週間のＧＬＰ毒性試験からの結果は、Ａｂ６が、それぞれ最大で２００ｍｇ／ｋｇ又は３００ｍｇ／ｋｇの用量を４週間にわたって週に１回、静脈内（ＩＶ）ボーラス注射として投与されるとき、忍容性良好であったことを示した。特に、試験される任意の用量でいずれの種においても、Ａｂ６で心血管系病変は観察されず、上皮過形成、歯の形成異常、歯肉炎、又は口腔内若しくは鼻腔内出血などの他のｐａｎ－ＴＧＦβ阻害関連毒性が観察されなかった。これらの知見は、ｐａｎ－ＴＧＦβ　ｍＡｂについて公開されたもの（これらの有害なオンターゲット毒性が発生し、動物死亡率につながる）と対照的である（Ｌｏｎｎｉｎｇ　２０１１；Ｓｔａｕｂｅｒ　２０１４；Ｍｉｔｒａ　２０２０）。さらに、Ａｂ６が複数回投与後にカニクイザルのサイトカインプロファイルに変化をもたらしたというエビデンスはなかった。これらの前臨床データは、有望であり、抗ＴＧＦβＲＩＩ受容体ｍＡｂによる第１相試験に観察された無制御のサイトカイン放出と対照的である（Ｔｏｌｃｈｅｒ　２０１７）。４週間ＧＬＰ毒性試験のためのＮＯＡＥＬは、ラット及びカニクイザルのそれぞれにおける、２００ｍｇ／ｋｇ及び３００ｍｇ／ｋｇの、試験される最高用量であった。

【１００４】

スプラーグドーリーラット（ＧＬＰ）における４週間毒性試験

Ａｂ６の毒性プロファイルを、最大で１００ｍｇ／ｋｇを投与されたラットにおける４週間のパイロット試験において依然に測定し、ここで、Ａｂ６は、被験物質に関連する有害作用が観察されず、忍容性良好であることが決定された（Ｍａｒｔｉｎ　２０２０）。次に、４週間ＧＬＰ毒性試験を、ラット及びカニクイザルの両方において行って、所見を確認し、投与される最大用量を拡大した（実験設計が表２８に示される）。両方の試験において、全てのＡｂ６処置動物を、Ａｂ６に全身曝露させた。Ａｂ６を、雄及び雌ラットへの４週間にわたって週１回（合計５回の投与）のビヒクルと比べて、３０、１００、及び２００ｍｇ／ｋｇの用量の静脈内（ＩＶ）ボーラス投与によって投与し、続いて４週間の回復期間が続いた。

【１００５】

試験３０日目（最後の投与の１日後）に予定された解剖まで全ての動物が生存しており、主要群及び回復群のそれぞれに５９匹であった。臨床観察、体重、体重増加、食品消費、眼科検査、血液学、凝固、又は尿検査に対するＡｂ６関連効果はなかった。≧３０ｍｇ／ｋｇ／週で、全タンパク質の最小の増加が、雄において観察され、平均アルブミン－グロブリン（Ａ／Ｇ）比の対応する最小の減少と共にグロブリン濃度の最小の増加が、≧１００ｍｇ／ｋｇ／週で両方の性別において観察された。これらの効果は、それらの小さい程度のため有害であると見なされず、Ａｂ６（ＩｇＧ４免疫グロブリン）の投与に関連していた。Ａｂ６関連効果が、全体的な肉眼で見える病変において観察されなかった。統計的に有意な器官重量変化は、≧１００ｍｇ／ｋｇ／週で投与された雄及び≧３０ｍｇ／ｋｇ／週で投与された雌において胸腺重量の増加に限定された（絶対値及び身体若しくは脳

と比べて）。これらの変化は、対照と形態学的に同様である皮膚リンパ球のわずかな増加と顕微鏡的に相関していた。他のＡｂ６関連の有害な顕微鏡所見は観察されなかった。Ａｂ６関連器官重量差及び非有害顕微鏡的所見は持続し、又は休薬期間終了時の殺処分の時点で可逆性の兆候を示した。評価されるいずれかのエンドポイントについて観察される治療関連有害所見は存在せず、無有害作用レベル（ＮＯＡＥＬ）は、２００ｍｇ／ｋｇ／週であり、これは、試験される最高用量であった。

【１００６】

結論として、静脈内（ＩＶ）注入による週に１回のＡｂ６の投与（合計５回の投与）は、３０、１００、及び２００ｍｇ／ｋｇの用量を週に１回でスプラーグドーリーラットにおいて忍容性良好であった。評価されるいずれかのエンドポイントについて観察される治療関連有害所見は存在せず、無有害作用レベル（ＮＯＡＥＬ）は、２００ｍｇ／ｋｇ／週であり、これは、試験される最高用量であった。

【１００７】

カニクイザル（ＧＬＰ）における４週間毒性試験

Ａｂ６を、雄及び雌カニクイザルへの４週間にわたって週に１回の静脈内（ＩＶ）ボーラス投与（合計５回の投与）によるビヒクルと比べて３０、１００、及び３００ｍｇ／ｋｇの用量で投与した後、４週間の回復期間が続いた。試験３０日目（最後の投与の１日後）に予定された解剖まで全ての動物が生存しており、主要群及び回復群のそれぞれに５９匹であった。高用量動物（３００ｍｇ／ｋｇ／週）における平均Ａ／Ｇ比の最小の減少を除いて、臨床観察、体重、体重増加、食品消費、眼科及び歯科検査、血液学、凝固、尿検査、又は臨床化学についてのＡｂ６関連効果はなかったが；この効果は、組織病理学的相関を欠き、Ａｂ６（ＩｇＧ４免疫グロブリン）の投与に関連していた可能性がある。群間及び群内サイトカイン測定の差は、高度に可変性であり、用量反応性でなかったため、Ａｂ６に関連すると見なされなかった。さらに、Ａｂ６関連効果が、安全性薬理学エンドポイント又は全体的な肉眼で見える又は顕微鏡的病変において観察されなかった。統計的に有意でない器官重量変化は、高用量（３００ｍｇ／ｋｇ／週）雄における平均心臓重量の最小の増加及び一部の処置群における生殖器重量の減少を含んでいた。平均心臓重量に対する効果は、正常な群間変動と一致し、組織病理学的相関を欠いていた。生殖器重量に対する効果は、月経周期の変動及び／又は性成熟に続発すると考えられた。器官重量変化のいずれも、Ａｂ６に関連していると見なされなかった。要約すると、静脈内（ＩＶ）注入による週に１回のＡｂ６の投与（合計５回の投与）は、３０、１００及び３００ｍｇ／ｋｇの週に１回の用量でカニクイザルにおいて忍容性良好であった。評価されるいずれかのエンドポイントにおいて観察されるＡｂ６処置関連有害所見は存在せず、ＮＯＡＥＬは、３００ｍｇ／ｋｇ／週であり、これは、試験される最高用量であった。

【１００８】

種間のＡｂ６の結合親和性

Ａｂ６は、ヒト、マウス、ラット及びカニクイザルを含む様々な種にわたって潜在型ＴＧＦβ１に対する同様の結合親和性を有する（Ｍａｒｔｉｎ　２０２０）。同様の結合が、ヒト、ラット、及びカニクイザルＴＧＦβ１タンパク質にわたるＡｂ６の同様の阻害活性をもたらしたことを確認するために、ヒト膠芽細胞腫細胞が、種特異的ｐｒｏＴＧＦβ１をコードするプラスミドでトランスフェクトされる、上述される細胞ベースのアッセイを使用し、発現及び活性化された潜在型ＴＧＦβ１のＡｂ６阻害を測定した（Ｍａｒｔｉｎ　２０２０）。Ａｂ６の阻害活性を、Ｍａｒｔｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０において既に記載されるように測定した。簡潔に述べると、ＬＮ２２９細胞（ＡＴＣＣ）を、ヒト、ラット、又はカニクイザルｐｒｏＴＧＦβ１のいずれかをコードするプラスミドでトランスフェクトした。細胞トランスフェクションの約２４時間後、Ａｂ６を、ＣＡＧＡ１２レポーター細胞と一緒に形質転換体に加えた（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）。共培養を設置した約１６～２０時間後、アッセイを発色させ、発光をプレートリーダーにおいて読み取った。用量反応活性は、Ｐｒｉｓｍ　８を用いて３パラメータｌｏｇ阻害剤対反応モデルに対する非線形適合であり、最良適合ＩＣ５０値を計算した。Ａｂ６は、

ヒト、ラット、及びカニクイザルからの潜在型ＴＧＦβ１の活性化を阻害し、ＩＣ５０値は、１．０２ｎＭ～１．１１ｎＭであった（図６５Ａ及び６５Ｂ）。

【１００９】

方法

複数分析物プロファイル（ＭＡＰ）プラットフォームのための一般的プロトコルは以下のとおりであった。抗原、抗体、受容体、ペプチド、酵素基質などのアッセイ特異的捕捉試薬を、分析物特異的な、色分けされたミクロスフェアの各固有の組に共有結合的にコンジュゲートした。異なる組のミクロスフェアを、９６ウェル又は３８４ウェルマイクロタイタープレートの単一のウェル中で組み合わせた。小さいサンプル体積を、ウェルに加え、ミクロスフェアと反応させ、その後、アッセイ特異的なビオチン化検出試薬（例えば、抗原、抗体、リガンドなど）の混合液をミクロスフェア混合物、続いてストレプトアビジン標識蛍光レポーター分子と反応させた。洗浄工程は、非結合検出試薬の除去に進む。ミクロスフェア混合物が、Ｌｕｍｉｎｅｘ　１００／２００ＴＭ機器を用いて分析される。

【１０１０】

Ｌｕｍｉｎｅｘアッセイのための一般的プロトコルは以下のとおりであった。各サンプルからの小さい体積のアリコートを、試験のために捕捉ミクロスフェアと組み合わせた。サンプル及び捕捉ミクロスフェアの混合物を、十分に混合し、室温で１時間インキュベートした。次に、各マルチプレックスのためのビオチン化レポーター抗体の多重混合液を加え、混合物を、室温でさらに１時間インキュベートした。ＭＡＰアッセイを、過剰なストレプトアビジン－フィコエリトリン溶液を用いて調製し、ビーズ－レポーター組合せと十分に混合し、室温で１時間インキュベートした。各多重反応の体積を、真空濾過によって減少させ、Ｌｕｍｉｎｅｘ機器における分析のためにマトリックス緩衝液中での希釈によって増加させた。アッセイを、高密度多重パネルにおいて実行し、最小検出可能用量（ＬＤＤ）を、２０ブランク（サンプル希釈剤）読み取りの平均＋３標準偏差として決定した。定量の下限（ＬＬＯＱ）を、濃度を用いることによって決定し、ここで、分析物の測定は、３０％の変動係数（ＣＶ）を実証する。適切な希釈を行って、アッセイの限度内の定量的測定を確実にした。ＬＤＤ及びＬＬＯＱ値を、アッセイに使用される多くの試薬のそれぞれについて生成した。

【１０１１】

インビボでのサイトカイン放出に対するＡｂ６の効果を、カニクイザルにおける４週間ＧＬＰ毒性試験から採取された血漿を用いて評価した。２２の標的分析物の濃度を、ヒトＣｕｓｔｏｍＭＡＰ（登録商標）（Ｍｙｒｉａｄ　ＲＢＭ）アッセイを用いて定量的に測定し、Ｌｕｍｉｎｅｘ（登録商標）機器（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）において分析した。個々のサイトカインレベルを、群平均として以下に報告し、時間及び処置群にわたって要約した。

【１０１２】

血漿を、静脈内ボーラス投与によって０、３０、１００、及び３００ｍｇ／ｋｇで４週間にわたって週に１回投与されたカニクイザルにおいて採取した。開始時に２７～３８月齢の合計で３２匹の動物を試験に使用し；各性別の６匹の動物を、高用量群に使用し、各性別の４匹の動物を、低用量群に使用した。カニクイザルからの血漿サンプルを、投与段階（投与前並びにサンプルの実の投与の約１及び２４時間後）の１及び２２日目に採取し、サイトカイン分析のためにＭｙｒｉａｄ　ＲＢＭ，Ｉｎｃ．（Ａｕｓｔｉｎ，Ｔｅｘａｓ）に移した。アッセイされる分析物（ｎ＝２２）は、ＣＤ４０リガンド；顆粒球コロニー刺激因子；インターロイキン－２、４、５、６、８、１０、１３、１５、１７、及び１８；インターロイキン－１β；インターロイキン－１受容体拮抗薬；インターロイキン－１２サブユニットｐ４０；顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子；インターフェロンγ；マクロファージ炎症性タンパク質－１α及びβ；単球走化性タンパク質１；腫瘍壊死因子α；及び血管内皮成長因子であった。サンプルを、Ｍｙｒｉａｄ　ＲＢＭ　ＳＯＰに従って、Ｌｕｍｉｎｅｘ　ｘＭＡＰ（登録商標）技術を用いて、種特異的アッセイにおいて実行した。

【１０１３】
Ｍｙｒｉａｄ　ＲＢＭからのＭＳ　Ｅｘｃｅｌスプレッドシートの形態の生の分析物濃度データを用いて、時点及び投与群によって各標的分析物についての平均濃度値を計算した。データの個々の値が、アッセイの定量下限（ＬＬＯＱ）より小さかった場合、その分析物のＬＬＯＱの５０％の値が、分析目的のために代用された。倍率変化を、対応する時点の平均濃度を取り、平均投与前分析物濃度で除算することによって各分析物についての１時間及び２４時間の時点について計算したが；ある時点の群中の全ての分析物濃度が、ＬＬＯＱ未満である場合、倍率変化は計算されなかった。
【１０１４】
カニクイザルの血漿中で定量された可溶性サイトカインは、全ての群にわたる個々のサイトカインにおいて全体的な変化をほとんど乃至全く示さなかった。１日目又は２２日目のいずれかに検出されるサイトカインレベルの小さい差は、用量反応性ではなく、性別間で一貫して観察されなかった。全体的に、Ａｂ６投与後の循環サイトカインレベルの変化は、１０倍未満であり；ほとんどの場合、Ａｂ６投与後のサイトカインレベルの変化は、２倍未満であった。これらの結果は、Ａｂ６が、インビボでの用量制限サイトカイン放出を引き起こさないことを示す。結果が、以下の表２３～２６に要約される。
【１０１５】

【表３０】

表23. 1日目の雄カニクイザルにおけるサイトカイン濃度

1日目 - 雄											
	第1群 - 0mg/kg			第2群 - 30mg/kg			第3群 - 100mg/kg			第4群 - 300mg/kg		
分析物名(LLQQ)	投与前平均	倍率変化(1時間)	倍率変化(24時間)	投与前平均	倍率変化(1時間)	倍率変化(24時間)	投与前平均	倍率変化(1時間)	倍率変化(24時間)	投与前平均	倍率変化(1時間)	倍率変化(24時間)
G-CSF (9.9 pg/mL)	<LLOQ	---	---	7.71	0.64	0.81	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---
IL-1 β(5.9pg/mL)	<LLOQ	---	1.18	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---
IL-1ra(46 pg/mL)	129.83	1.65	0.81	82.5	1.85	1.18	83.75	1.83	1.19	105	1.37	1.31
IL-6(5.4 pg/mL)	<LLOQ	2.98	---	<LLOQ	3.01	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	1.88	---
IL-8 (3.7 pg/mL)	75.67	1.44	0.75	48.5	1.94	1.37	70.25	1.30	0.65	44.5	1.75	0.94
IL-10 (7.4 pg/mL)	<LLOQ	---	---	5.78	0.91	0.64	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---
IL-12p40 (0.21 ng/mL)	0.32	0.62	0.71	0.34	0.59	0.64	0.28	0.38	0.51	0.27	0.55	0.51
IL-15 (0.87 ng/mL)	<LLOQ	1.2	1.2	<LLOQ	---	---	0.70	0.62	0.62	<LLOQ	---	---
IL-17 (2.6 pg/mL)	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	2	0.65	0.65	<LLOQ	---	---
IL-18 (48 pg/mL)	62.67	0.86	0.82	31.5	0.76	0.76	<LLOQ	---	---	53	0.69	0.67
MIP-1 α (69 pg/mL)	<LLOQ	---	1.18	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---
MIP-1 β (85 pg/mL)	92.25	0.80	0.61	196.75	1.25	1.88	144.13	0.65	0.52	161.17	0.74	0.73
MCP-1 (92 ng/mL)	140.83	1.17	1.25	570.5	1.27	0.91	134	1.19	1.54	151.17	1.22	1.63
VEGF (44 pg/mL)	35.83	0.85	0.85	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	1.24

---は、倍率変化が計算されなかったことを示し、全ての値はLLOQ未満である

【１０１６】

【表３１】

表24. 1日目の雌カニクイザルにおけるサイトカイン濃度

1日目 - 雌												
	第1群 - 0mg/kg			第2群 - 30mg/kg			第3群 - 100mg/kg			第4群 - 300mg/kg		
分析物名 (LLOQ)	投与前平均	倍率変化 (1時間)	倍率変化 (24時間)	投与前平均	倍率変化 (1時間)	倍率変化 (24時間)	投与前平均	倍率変化 (1時間)	倍率変化 (24時間)	投与前平均	倍率変化 (1時間)	倍率変化 (24時間)
IL-1ra (46 pg/mL)	93.83	1.76	1.09	89.75	1.41	0.89	98.25	1.30	1.79	69.17	2.02	2.11
IL-2 (130 pg/mL)	<LLOQ	---	1.38	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---
IL-5 (9.1 pg/mL)	38.45	0.89	0.55	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---
IL-6 (5.4 pg/mL)	<LLOQ	2.64	---	2.7	2.31	1.38	<LLOQ	---	---	<LLOQ	8.18	1.21
IL-8 (5.7 pg/mL)	43.67	2.15	0.78	69.75	1.02	0.55	61	1.08	0.88	42.833	1.63	1.41
IL-12p40 (0.21 ng/mL)	0.28	0.93	0.63	0.26	0.41	0.68	0.27	0.38	0.38	0.26	0.41	0.62
IL-15 (0.87 ng/mL)	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	1.50	---	<LLOQ	---	1.25
IL-18 (48 pg/mL)	<LLOQ	---	---	58.75	0.91	0.54	51	0.70	0.95	51.5	0.84	0.83
MIP-1 β (85 pg/mL)	188.67	0.82	0.64	167.5	1.28	1.25	167	1.38	0.71	99	1.15	1.11
MCP-1 (92 ng/mL)	156.5	0.93	0.91	267.25	0.91	1.85	222.25	0.83	1.24	164.17	0.89	1.13
TNF-α (39 pg/mL)	<LLOQ	---	---	48.13	1.88	0.67	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---
VEGF (44 pg/mL)	29.67	0.87	0.78	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---

---は、倍率変化が計算されなかったことを示し、全ての値はLLOQ未満である

【１０１７】

【表３２】

表25. 22日目の雄カニクイザルにおけるサイトカイン濃度

22日目 - 雄											
	第1群 - 0mg/kg			第2群 - 30mg/kg			第3群 - 100mg/kg			第4群 - 300mg/kg		
分析物名 (LLOQ)	投与前平均	倍率変化(1時間)	倍率変化(24時間)	投与前平均	倍率変化(1時間)	倍率変化(24時間)	投与前平均	倍率変化(1時間)	倍率変化(24時間)	投与前平均	倍率変化(1時間)	倍率変化(24時間)
CD40L (0.064 ng/mL)	0.66	18.83	0.55	<LLOQ	2.40	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---
G-CSF (9.9 pg/mL)	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	6.29	0.79	0.79
IL-1ra (46 pg/mL)	76.67	1.54	1.46	137	1.27	0.91	68.75	1.73	1.48	124.5	1.03	1.60
IL-5 (9.1 pg/mL)	<LLOQ	---	1.24	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---
IL-6 (5.4 pg/mL)	<LLOQ	1.17	1.27	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	1.19	7.87
IL-8 (5.7 pg/mL)	124.33	14.00	0.26	61.5	6.43	0.89	80	2.53	0.56	36.67	1.09	1.17
IL-12p40 (0.21 ng/mL)	0.27	0.85	1.04	0.28	0.52	1.08	<LLOQ	---	1.35	0.18	0.72	1.24
IL-15 (0.87 ng/mL)	<LLOQ	---	---	0.69	0.72	0.72	<LLOQ	---	1.38	<LLOQ	---	---
IL-18 (48 pg/mL)	35.83	1.00	0.96	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	1.25	1.49
MIP-1a (60 pg/mL)	35.33	0.85	0.85	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---
MIP-1b (85 pg/mL)	91.5	0.56	0.59	194	0.71	0.66	179	0.92	1.29	241.92	0.88	0.89
MCP-1 (92 ng/mL)	194.17	0.84	0.70	287.5	0.77	1.04	244	0.80	1.26	272.33	0.95	1.44
TNF-a (59 pg/mL)	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	1.36	---
VEGF (44 pg/mL)	<LLOQ	---	1.17	30	0.94	0.73	<LLOQ	---	---	26.17	0.84	1.15

---は、倍率変化が計算されなかったことを示し、全ての値はLLOQ未満である

【１０１８】

【表３３】

表26. 22日目の雌カニクイザルにおけるサイトカイン濃度

22日目 - 雌													
	第1群 - 0mg/kg			第2群 - 30mg/kg			第3群 - 100mg/kg			第4群 - 300mg/kg		
分析物名 (LLOQ)	投与前平均	倍率変化 (1時間)	倍率変化 (24時間)	投与前平均	倍率変化 (1時間)	倍率変化 (24時間)	投与前平均	倍率変化 (1時間)	倍率変化 (24時間)	投与前平均	倍率変化 (1時間)	倍率変化 (24時間)
CD40-L (0.664 ng/mL)	<LLOQ	---	1.78	<LLOQ	3.01	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---
IL-1ra (46 pg/mL)	93.17	1.44	0.81	115.25	1.19	1.12	103.75	1.15	1.19	75.17	1.56	1.53
IL-2 (139 pg/mL)	99	0.94	0.72	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---
IL-5 (9.1 pg/mL)	44.46	0.73	0.84	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---
IL-6 (5.4 pg/mL)	<LLOQ	1.22	1.32	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	2.7	1.22	1.64
IL-8 (5.7 pg/mL)	68.17	0.62	0.46	65.25	3.60	0.91	37.25	1.57	1.11	33.5	0.84	1.12
IL-12p40 (0.21 ng/mL)	0.28	0.69	0.85	0.36	0.40	0.90	0.13	0.8	1.08	0.11	1.39	1.40
IL-15 (0.87 ng/mL)	<LLOQ	1.26	1.20	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---
IL-18 (48 pg/mL)	<LLOQ	---	---	33	1.19	1.37	<LLOQ	1.31	1.59	<LLOQ	---	1.21
MIP-1 α (60 pg/mL)	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---
MIP-1 β (85 pg/mL)	124.67	0.82	0.49	106.88	1.25	0.83	138	1.25	0.98	127.58	1.07	1.16
MCP-1 (82 ng/mL)	138.33	1.14	0.95	185	0.72	1.28	177.75	1.05	1.47	196.83	0.94	1.14
TNF-α (39 pg/mL)	<LLOQ	---	---	57.63	1.27	1.68	<LLOQ	---	---	<LLOQ	---	---

---は、倍率変化が計算されなかったことを示し、全ての値はLLOQ未満である

【１０１９】

実施例２５：Ａｂ６の単回投与及び複数回投与薬物動態

方法

薬物動態試験を、雌Ｃ５７ＢＬ／６マウス、ＳＤラット、及びカニクイザルにおいて行った。マウス、ラット及びカニクイザルにおいて行われた薬物動態試験では、Ａｂ６（又はＡｂ６－ｍＩｇＧ）を、１０ｍｇ／ｍＬの公称濃度で供給し、－７０℃～－８０℃で貯蔵した。非ＧＬＰ単回投与ＰＫ試験を、Ｇａｔｅｗａｙ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｃｈｅｓｔｅｒｆｉｅｌｄ，ＭＯ）においてＣ５７ＢＬ／６マウス（１０～１１週齢）において行った。さらなる薬物動態及び毒性試験を、治療未経験

若年成体スプラーグドーリーラット（７～１０週齢）及びカニクイザル（２～４歳）において行った。ラットにおいて、非ＧＬＰ薬物動態試験を、Ｇａｔｅｗａｙ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓにおいて行い、ＧＬＰ毒性試験を、Ｃｏｖａｎｃｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｇｒｅｅｎｆｉｅｌｄ，ＩＮ）において行った。カニクイザルにおいて、非ＧＬＰ薬物動態及びＧＬＰ毒性試験の両方を、Ｃｏｖａｎｃｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）において行った。試験は、ｔｈｅ Ｆｉｎａｌ Ｒｕｌｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ａｎｉｍａｌ Ｗｅｌｆａｒｅ Ａｃｔ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎｓ（Ｃｏｄｅ ｏｆ Ｆｅｄｅｒａｌ Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎｓ，Ｔｉｔｌｅ ９）、ｔｈｅ Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ Ｐｏｌｉｃｙ ｏｎ Ｈｕｍａｎｅ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌｓ ｆｒｏｍ ｔｈｅ Ｏｆｆｉｃｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌ Ｗｅｌｆａｒｅ、ａｎｄ ｔｈｅ Ｇｕｉｄｅ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌｓ ｆｒｏｍ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｕｎｃｉｌの全ての適用可能なセクションに準拠していた。

【１０２０】

血清サンプルを、抗原捕捉ＥＬＩＳＡ（アイソタイプ特異的検出を用いた）を用いてＡｂ６又はＡｂ６ ｍＩｇＧ１について評価した。非ＧＬＰアッセイのための定量下限（ＬＬＯＱ）は、マウス、ラット及びカニクイザルについてそれぞれ１２５、１２５、及び２５０ｎｇ／ｍＬであり；最適化された有効なＧＬＰアッセイ（ラット及びサル）について７５ｎｇ／ｍＬであった。吸光度対濃度の関係は、４－パラメータロジスティック曲線適合を用いて回帰され（毒物動態学的試験を支援する有効なアッセイのための１／Ｙ２の重み付け係数を用いて）、濃度を、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ又はＷａｔｓｏｎ ＬＩＭＳ（Ｔｈｅｒｍｏ，Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ，ＵＳＡ）データ整理ソフトウェアを用いて計算した。

【１０２１】

雌マウスを、制御された環境（１７．８～２６．７℃；３０～７０％の相対湿度；１２時間の明及び暗サイクル）において適切な寝床及び給水弁を含むポリカーボネートケージ中において集団で飼育し（３～５匹のマウス／ケージ）、標準的なげっ歯類の食餌（ＰｉｃｏＬａｂげっ歯類食餌２０）及び水道水を自由に与えた。マウスを、全ての試験のために処置群にランダムに割り当てた。試験の実験設計が以下の表２７に概説される。

【１０２２】

雄及び雌スプラーグドーリーラットを、制御された環境（２０～２６℃；３０～７０％の相対湿度；１２時間の明及び暗サイクル；１時間に１０回以上の換気）において適切な寝床及び給水弁を含むポリカーボネートケージ中において集団で飼育し、認定されたげっ歯類食餌＃２０１４Ｃ又はＰｉｃｏＬａｂげっ歯類食餌２０及び水道水を自由に与えた。ラットを全ての試験のために処置群にランダムに割り当てた。各ラット試験の実験設計が表２７及び表２８に概説される。

【１０２３】

雄及び雌カニクイザルを、制御された環境（１８～２６℃；３０％～７０％の相対湿度；１２時間の明及び暗サイクル；１００％の新鮮な空気による１時間に８回以上の換気）において、ステンレス鋼ケージ中において集団で飼育し、ケージエンリッチメントデバイス及び食餌、認定された霊長類食餌＃５Ｌ４Ｌ（ＰＭＩ Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｒｔｉｆｉｅｄ ＬａｂＤｉｅｔ（登録商標））を１日に１～２回与え、水道水を自由に与えた。カニクイザルを、ＧＬＰ毒性試験のために処置群にランダムに割り当てたが、ＰＫ試験のためにランダムに分けられず、ここで、動物は、全体的な健康及び体重に基づいて適格性のために選択された。カニクイザル試験の実験設計が表２７及び表２８に概説される。

【１０２４】

また、安全性評価を、ＧＬＰ動物のために行い、結果が、以下のセクションに記載される。動物の一般的な臨床観察を、ＧＬＰ毒性試験の両方において１日２回行った。ケージ

サイド観察を、投与の２～３時間後に行って、サルにおける急性毒性を及びラットにおいて１日１回評価した。全ての毒性試験のために行われる他の観察は、サルにおいて１日１回及びラットにおいて週に１回の、食品消費の評価並びに週に１回の体重の測定を含んでいた。４週間ＧＬＰ試験は、臨床病理学（血液学、血清化学、凝固及び尿検査）並びに解剖病理学（総合及び顕微鏡）評価（表２８）も含んでいた。４週間ＧＬＰ試験のために行われる他の安全性評価は、眼科検査（両方の種）；及びサルのみのために、バイタルサイン測定；心電図；神経学的検査；並びに呼吸数及び心拍数の測定を含んでいた。サイトカインレベルも、上述されるＧＬＰ４週間サル試験において測定された。

【１０２５】

血清サンプルを、抗原捕捉ＥＬＩＳＡ（アイソタイプ特異的検出を用いた）を用いてＡｂ６又はＡｂ６　ｍＩｇＧ１について評価した。非ＧＬＰアッセイのための定量下限（ＬＬＯＱ）は、マウス、ラット及びカニクイザルについてそれぞれ１２５、１２５及び２５０ｎｇ／ｍＬであり；最適化された有効なＧＬＰアッセイ（ラット及びサル）について７５ｎｇ／ｍＬであった。吸光度対濃度の関係は、４－パラメータロジスティック曲線適合を用いて回帰され（毒物動態学的試験を支援する有効なアッセイのための１／Ｙ２の重み付け係数を用いて）、濃度を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ又はＷａｔｓｏｎ　ＬＩＭＳ（Ｔｈｅｒｍｏ，Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ，ＵＳＡ）データ整理ソフトウェアを用いて計算した。

【１０２６】

Ａｂ６に対する抗薬物抗体（ＡＤＡ）を、酸解離による電気化学発光（ＥＣＬ）架橋アッセイを用いて検出した。ＡＤＡサンプルを、ラット及びカニクイザルＧＬＰ毒性試験の両方において分析した。ラットＡＤＡアッセイは、２０．２ｎｇ／ｍＬの測定された感度を有し、５０００ｎｇ／ｍＬの陽性対照抗体の検出に対する１．５ｍｇ／ｍＬのＡｂ６からの顕著な薬物干渉を有していなかった。カニクイザルアッセイは、４．６ｎｇ／ｍＬの測定された感度を有し、２０００ｎｇ／ｍＬの陽性対照抗体の検出に対する０．２ｍｇ／ｍＬのＡｂ６からの顕著な薬物干渉を有していなかった。

【１０２７】

ＰＫパラメータを、静脈内（ＩＶ）ボーラス注入と共にノンコンパートメント分析方法を用いて濃度－時間データからＰｈｏｅｎｉｘ（登録商標）ＷｉｎＮｏｎｌｉｎ（登録商標）（Ｃｅｒｔａｒａ　ＵＳＡ　Ｉｎｃ．）において計算した。公称用量及びサンプリング時間を使用した。定量下限未満の濃度値は、記述統計及び毒物動態学的分析のためにゼロとして処理した。濃度時間曲線下面積（ＡＵＣ）を、線形台形近似方法（ｌｉｎｅａｒ　ｔｒａｐｅｚｏｉｄａｌ　ａｐｐｒｏｘｉｍａｔｉｏｎ　ｍｅｔｈｏｄ）を用いて計算した。終末期半減期（$t_{1/2}$）を、時間プロファイルに対する平均濃度の終末期のｌｏｇ－線形回帰によって推定した。終末期に明らかに見える少なくとも３点、少なくとも０．８のr^2値、及び少なくとも３つの半減期の時間間隔（ＧＬＰ毒性試験のみにおいて）が、半減期を特徴付けるのに必要とされた。投与段階の１及び２２日目の投与頻度に対するゆっくりとした排出のため、$t_{1/2}$、ＣＬ、及びＶｓｓの推定は、２９日目の回復動物に限定された。

【１０２８】

【表３４】

表 27. C57BL/6 マウス、スプラーグドーリーラット、及びカニクイザルにおける Ab6 非 GLP 単回用量薬物動態試験

試験	動物の数	群	投与経路/体積	用量レベル	薬物動態のためのサンプル採取
C57BL/6 マウス	66 匹の雌	16 匹/群 [a]	静脈内(IV)ボーラス (3 mL/kg)	0.3、3、10、及び 30 mg/kg	Ab6-mIgG1 – 投与前並びに投与の 1、8、24、72、120、168、264、360、528、696、864、及び 1032 時間後に採取された血清
スプラーグドーリーラット	20 匹の雌	4 匹/群	静脈内(IV)ボーラス (3 mL/kg)	0.3、1、3、10、及び 30 mg/kg	Ab6 – 投与前並びに投与の 1、8、24、72、120、168、264、360、528、696、864、及び 1032 時間後に採取された血清
カニクイザル	12 匹の雌	3 匹/群	静脈内(IV)ボーラス(1 又は 3 mL/kg)	1 、 3 、 10 、 30 mg/kg	Ab6 – 投与の 1、4、8、24、72、120、168、240、336、504、672、840、1008、及び 1176 時間後に採取された血清

略語: IV、静脈内; GLP、医薬品安全性試験実施基準。
[a] 0.3 及び 3mg/kg 投与群における 16 匹の動物、10 及び 30mg/kg 投与群における 17 匹の動物。4 又は 5 匹の動物を、各時点でサンプル採取した。

【１０２９】

【表３５】

表 28. スプラーグドーリーラット及びカニクイザルにおける Ab6 GLP 毒性試験

試験	動物の数	群[a]	投与経路/体積	用量レベル	PK 及びサイトカイン分析のためのサンプル採取[b]	臨床病理学及び ADA のためのサンプル採取[c]
スプラーグドーリーラット	81 匹の雄 81 匹の雌	主要な試験: 10 匹/性別/群 PK 及び ADA: 3 匹/性別 (対照)及び 6 匹/性別(治療)	静脈内(IV)ボーラス (5.0 mL/kg)	4 週間にわたって 週 1 回、0、30[d]、 100、200 mg/kg	Ab6 – 試験 1 日目の投与前並びに投与の 1、24、96 時間後;試験 22 日目の投与前並びに投与の 1、24、96、及び 120 時間後、並びに試験 15 日目及び 29 日目の投与前及び投与の 1 時間後に採取された血清。	臨床化学: 臨床病理学、血液学、凝固、及び尿サンプル 30 日目 (投与段階)及び 29 日目(回復段階) ADA 採取: 1、15、及び 29 日目の投与前(投与段階)並びに 8、15、22、及び 29 日目に 1 回 (回復段階)
カニクイザル	20 匹の雄 20 匹の雌	対照及び高用量: 6 匹/性別/群 低及び中間用量: 4 匹/性別/群	静脈内(IV)ボーラス (6.0 mL/kg)	4 週間にわたって 週 1 回、0、30、 100、300 mg/kg	Ab6– 試験 1 日目及び 22 日目の投与前並びに投与の 1、24、48、96、及び 120 時間後;試験 8 及び 15 日目の投与前;試験 29 日目の投与前及び投与の 1 時間後;回復 8 日目、15 日目、22 日目、及び 29 日目に 1 回採取された血清	臨床化学: 臨床病理学、血液学、凝固、及び尿サンプル 30 日目 (投与段階)及び 29 日目(回復段階) ADA 採取: 1、15、22、及び 29 日目の投与前(投与段階)並びに 15 及び 29 日目に 1 回 (回復段階)

回復のために指定された動物について、回復段階 1 日目 = 試験 30 日目。
略語: ADA、抗薬物抗体; IV、静脈内; PD、薬力学; PK、薬物動態; GLP、医薬品安全性試験実施基準。
[a] 対照群に、ビヒクル: 20 mM のシトレート、150 mM の NaCl, pH 5.5 を投与した
[b] サイトカイン分析は、サル試験のみについて行った。投与段階の 1 及び 22 日目からのサンプル(投与前並びに投与の 1 及び 24 時間後のサンプルのみ)を、サイトカイン分析に送った。
[c] 臨床病理学(clin path)は、血液学(hem)、血清化学(chem)、凝固(coag)、及び尿検査(尿)を含んでいた。
[d] 1 日目に、30 mg/kg 群における動物に、約 70.0% (用量分析結果に基づいて公称 30 mg/kg 用量のうちの 21 mg/kg を投与した。動物に、残りの用量について 30 mg/kg/週で投与した。

【１０３０】

Ａｂ６（非ＧＬＰ）の単回投与薬物動態

単回投与ＰＫ試験を、Ｃ５７ＢＬ／６マウス、スプラーグドーリーラット、及びカニクイザルにおいて行った（実験設計が表２８に示され；結果が表２９～３１に示される）。Ａｂ６の最高濃度（Ｃｍａｘ）が、全ての群において１時間の最初のサンプリング時点で観察された。Ｃｍａｘは、用量の増加におよそ比例して増加した一方、ＡＵＣは、用量比以上に増加し、これは、標的依存的ＰＫを示唆している。Ａｂ６の非線形排除は、標的媒介性薬物沈着を示唆した。Ａｂ６は、マウス、ラット、及びカニクイザルにおいて交差反応性であり、従って、潜在的な標的依存的ＰＫが、全ての種において予測される。

【１０３１】
マウスにおける試験のために、Ａｂ６－ｍＩｇＧ１を用いて、長期間投与を必要とするマウス薬理学試験においてその潜在的免疫原性を低下させた。Ａｂ６－ｍＩｇＧ１は、ヒトＡｂ６　ＶドメインがマウスＩｇＧ１／κ定常ドメインに融合されたキメラ抗体である。Ａｂ６－ｍＩｇＧ１の単回投与ＰＫを、雌Ｃ５７ＢＬ／６マウス（ｎ＝４／群／用量レベル）への単回静脈内（ＩＶ）ボーラス用量の投与後の０．３、３、１０、及び３０ｍｇ／ｋｇの４つの用量レベルで評価した。Ａｂ６－ｍＩｇＧ１　Ｃｍａｘが、全ての群において１時間の最初のサンプリング時点で観察された（平均濃度は、７．４～６６４μｇ／ｍＬの範囲である）。Ａｂ６－ｍＩｇＧ１が、３３．４～７４．４時間（１．３９～３．１日）の範囲の$t_{1/2}$で血清から除去された。Ａｂ６－ｍＩｇＧ１で処置された試験における全ての動物を、Ａｂ６－ｍＩｇＧ１に全身曝露させた。平均（ＳＤ）ＰＫパラメータが、表２９に要約され、結果が、図６６に示される。最高血中濃度到達時間は、０．３ｍｇ／ｋｇ及び３ｍｇ／ｋｇを投与された群では８時間であり、１０ｍｇ／ｋｇ及び３０ｍｇ／ｋｇを投与された群では１時間であった。

【１０３２】
【表３６】

表 29: 用量 0.3、3、10 及び 30mg/kg における雌マウスにおける単回用量 PK の要約

分析物	種	用量 (mg/kg)	統計	$t_{1/2}$ (日)	C_{max} (μg/mL)	AUC_{last} (hr*mg/mL)	AUC_{0-inf} (hr*mg/mL)
Ab6-mIgG1	マウス	0.3	N	0	4	4	0
			平均	NC	7.4	0.104	NC
			SD	NC	1.07	0.0101	NC
		3	N	4	4	4	4
			平均	1.39	153	4.71	4.89
			SD	0.0768	27.9	0.332	0.331
		10	N	4	4	4	4
			平均	1.93	233	17.4	17.8
			SD	0.770	53.4	2.36	1.76
		30	N	4	4	4	4
			平均	3.10	664	64.1	64.2
			SD	0.49	119	6.39	6.42

NC、計算されていない。

【１０３３】
ラットにおける試験では、Ａｂ６の単回投与ＰＫを、０．３、１、３、１０、及び３０ｍｇ／ｋｇ（ｎ＝４／群／用量レベル）の単回静脈内（ＩＶ）ボーラス用量の投与後に評価した。試験における全てのＡｂ６処置動物を、Ａｂ６に全身曝露させた。平均（ＳＤ）ＰＫパラメータが、表３０に要約され、結果が、図６６に示される。最高血中濃度到達時間は、全てのＡｂ６濃度で投与された動物では１時間であった。Ａｂ６　Ｃｍａｘが、全ての群において全ての群において１時間の最初のサンプリング時点で観察された（平均濃度は、６．３１～８７３μｇ／ｍＬの範囲である）。Ａｂ６は、１～２．０３日（２４～４８．７時間）の範囲の$t_{1/2}$を示した。

【１０３４】

【表３７】

表 30: 用量 0.3、1、3、10、及び 30 mg/kg における雌ラットにおける単回用量 PK の要約

分析物	種	用量 (mg/kg)	統計	$t_{½}$ (日)	C_{max} (μg/mL)	AUC_{last} (hr*mg/mL)	AUC_{0-inf} (hr*mg/mL)
Ab6	ラット	0.3	N	4	4	4	4
			平均	1	6.31	0.221	0.238
			SD	0.181	0.48	0.0447	0.0417
		1	N	4	4	4	4
			平均	1.82	20.3	1.23	1.31
			SD	0.206	1.12	0.0152	0.0435
		3	N	4	4	4	4
			平均	2.03	78.4	5.83	6.31
			SD	0.835	3.59	0.246	0.496
		10	N	4	4	4	4
			平均	1.54	263	26	26.5
			SD	1.05	14.6	0.576	1.05
		30	N	4	4	4	4
			平均	1.31	873	135	135
			SD	0.507	38	27.6	27.6

【１０３５】

カニクイザルにおける試験では、Ａｂ６の単回投与ＰＫを、単回静脈内（ＩＶ）ボーラス用量（ｎ＝３／群／用量レベル）の投与後に４つの用量レベルの１、３、１０、及び３０ｍｇ／ｋｇで評価した。試験における全てのＡｂ６処置動物を、Ａｂ６に全身曝露させた。平均（ＳＤ）ＰＫパラメータが、表３１に要約され、結果が、図６６に示される。最高血中濃度到達時間は、全てのＡｂ６濃度で投与された動物では１時間であった。

【１０３６】

Ａｂ６　Ｃｍａｘが、全ての群において１時間の最初のサンプリング時点で観察された（２５．２～９０９μｇ／ｍＬの範囲である）。Ｃｍａｘは、１～３０ｍｇ／ｋｇで用量におよそ比例して増加した一方、ＡＵＣは、用量比以上に増加し、これは、標的依存的ＰＫを示唆している。Ａｂ６は、５３．８～１１９時間（２．２４～４．９５日）の範囲の$t_{1/2}$を示した。平均クリアランス（ＣＬ）は、０．２２３～０．５３５ｍＬ／ｈ／ｋｇの範囲の値を有する用量の増加と共に減少した（表２９～３１）。定常状態時の分布容積（ＶＳＳ）値は、４４．５～５６．３ｍＬ／ｋｇの範囲であり、サルにおける総体液量（６９３ｍＬ／ｋｇ）又は総血液量（７３．４ｍＬ／ｋｇ）を超えず、これは、Ａｂ６が、血液に限定される可能性が高く、投与後に組織に高度に分布されなかったことを示す（Ｄａｖｉｅｓ　１９９３）。この単回投与カニクイザルＰＫ試験からのデータを用いて、ヒトクリアランスをアロメトリースケーリングした。

【１０３７】

【表３８】

表31: 用量1、3、10、及び30 mg/kgにおける雌カニクイザルにおける単回用量PKの要約

投与群	用量レベル (mg/kg)	C_{max} (μg/mL)	AUC_{0-t} (h*μg/mL)	AUC_{0-inf} (h*μg/mL)	$t_{½}$ (h)	CL (mL/h/kg)	V_{SS} (mL/kg)
1	1	25.2	1760	1870	53.8	0.535	47.1
2	3	82.2	7850	8260	73.9	0.363	44.5
3	10	287	28800	32700	119	0.307	53.7
4	30	909	135000	136000	111	0.223	56.3

【１０３８】

スプラーグドーリーラットにおけるＡｂ６の複数回投与薬物動態及び毒物動態

Ａｂ６の複数回投与薬物動態（ＰＫ）及び毒物動態（ＴＫ）を、２つのスプラーグドーリーラット毒性試験（１つは非ＧＬＰであり、１つはＧＬＰである）において評価した。ＰＫ及びＴＫが特性評価される２つのＧＬＰ試験において、曝露量の用量比例的増加が、Ｃｍａｘ及びＡＵＣ０－１６８に基づいて観察された。曝露量の性差はなかった。Ａｂ６の沈着が、毎週の複数回の投与後に観察された。抗薬物抗体（ＡＤＡ）は、ラット試験の両方においてより低い用量に対する影響を有する可能性が高く（それぞれ１０及び３０ｍｇ／ｋｇ）、Ａｂ６のより速いクリアランスを引き起こす。

【１０３９】

Ａｂ６の単一の時点のＴＫを、雌スプラーグドーリーラット（ｎ＝５／群／用量レベル）への４つの毎週の静脈内（ＩＶ）ボーラス用量の投与後、１０、３０、及び１００ｍｇ／ｋｇの３つの用量レベルで評価した。完全なＰＫプロファイルは、動物のいずれにおいても収集されなかった。曝露量及び潜在的ＡＤＡを評価するために、血清を、最後の投与の７日後に１回のみ採取した。

【１０４０】

ＡＤＡが、１０ｍｇ／ｋｇ投与群では５匹中５匹の動物において観察され、３０ｍｇ／ｋｇ投与群では５匹中４匹の動物において観察された。ＡＤＡは、１００ｍｇ／ｋｇ投与群では測定されなかった。ＰＫプロファイルに対するＡＤＡの影響のため、１０ｍｇ／ｋｇ投与群の動物は全て、該当する時点で定量の下限未満で測定可能な曝露量を有していた。３０ｍｇ／ｋｇ／週及び１００ｍｇ／ｋｇ／週で達成される平均血清濃度は、それぞれ３３８μｇ／ｍＬ及び２２９２μｇ／ｍＬであった。

【１０４１】

スプラーグドーリーラットに、５つの毎週の用量のビヒクル対照（ｎ＝３／性別）又は３０、１００又は２００ｍｇ／ｋｇ（ｎ＝６／各性別）のＡｂ６の用量を投与した。３０ｍｇ／ｋｇ／週の投与群における動物に、１日目に投与し、２１ｍｇ／ｋｇの用量のみを投与した。混成の全動物の性別毎のＴＫプロファイル血液サンプルを、１日目及び２２日目の後にＡｂ６ＴＫの決定のために採取した（全ての動物）。回復段階サンプル（２９日目の後、１時間）を採取したが、データが、中間報告のために入手できなかった。試験における全てのＡｂ６処置動物を、Ａｂ６に全身曝露させた。対照動物において測定可能なＡｂ６はなかった。平均（ＳＤ）ＰＫパラメータが、表３２に要約され、結果が、図６７に示される。

【１０４２】

Ａｂ６　Ｃｍａｘ及びＡＵＣ０－１６８値において性差はなかった。Ａｂ６　Ｃｍａｘ及びＡＵＣ０－１６８値によって評価される曝露量は、１日目に２１．０～２００ｍｇ／ｋｇ／週及び２２日目に３０～２００ｍｇ／ｋｇ／週の用量レベルの増加と共に増加した。Ａｂ６　Ｃｍａｘ及びＡＵＣ０－１６８値の増加は、一般に、用量比例的であった。Ａ

ｂ６の沈着が、ラットにおいて１００又は２００ｍｇ／ｋｇ／週の複数回の毎週の投与後に観察された。

【１０４３】

ＡＤＡ反応と一致する曝露量の損失が、３０ｍｇ／ｋｇ／週で投与された任意の雄動物又は１００又は２００ｍｇ／ｋｇ／週で投与された任意の動物において観察されなかった。しかしながら、ＡＤＡ反応と一致する曝露量の損失が、３０ｍｇ／ｋｇ／週で投与された３匹の雌動物において観察された。

【１０４４】

【表３９】

表 32: 用量 30、100、及び 200 mg/kg における雄及び雌スプラーグドーリーラット血清中の Ab6 の総合した性別平均毒物動態学的パラメータ

投与群	公称 用量レベル (mg/kg/週)	実際 用量レベル (mg/kg/週)	パラメータ	1 日目	22 日目	29 日目
2	30	21.0/30[a]	C_{max} (µg/mL)	626	1310	1570
			T_{max} (h)	1.00	1.00	1.00
			$AUC_{0\text{-}168}$ (h*µg/mL)	61400	162000	477000
			CL (mL/h/kg)	NA	0.185	0.145
			$t_{1/2}$ (h)	NA	NA	322
			V_{ss} (mL/kg)	NA	NA	54.5
3	100	100	C_{max} (µg/mL)	2750	4640	5410
			T_{max} (h)	1.00	1.00	1.00
			$AUC_{0\text{-}168}$ (h*µg/mL)	252000	559000	1550000
			CL (mL/h/kg)	NA	0.179	0.147
			$t_{1/2}$ (h)	NA	NA	393
			V_{ss} (mL/kg)	NA	NA	60.3
4	200	200	C_{max} (µg/mL)	5250	9980	9730
			T_{max} (h)	1.00	1.00	1.00
			$AUC_{0\text{-}168}$ (h*µg/mL)	506000	1010000	2910000
			CL (mL/h/kg)	NA	0.197	0.157
			$t_{1/2}$ (h)	NA	NA	356
			V_{ss} (mL/kg)	NA	NA	62.3

総合した雄及び雌パラメータを、各間隔での各用量レベルにおける全ての動物 (雄及び雌)についての濃度データを組み合わせることによって計算し、これらのデータを、TK 分析のための別の複合プロファイルとして使用した。これらのパラメータは、雄及び雌について別々に計算された値の平均ではない。

[a] 1 日目に、第 2 群の動物に、公称用量の約 70.0%を投与した。21.0 mg/kg/週の実際用量レベルを用いて、TK 分析における TK パラメータを正確に決定した。これは、ラットにおける TK 分析又は Ab6 TK の特性評価に影響を与えなかった。

$AUC_{0\text{-}t}$ = 時間 0 から t_{last} までの曲線下面積; $AUC_{0\text{-}168}$ = 時間 0 から 168 時間までの曲線下面積; $AUC_{0\text{-}696}$ = 0～696 時間の AUC; CL = クリアランス; C_{max} = 最高血中濃度到達時間; NA = 該当なし; $t_{1/2}$ = 排出半減期; T_{max} = 最高血中濃度到達時間; V_{ss} = 定常状態における分布容積

【１０４５】

カニクイザルにおけるＡｂ６の複数回投与薬物動態及び毒物動態

Ａｂ６の複数回投与薬物動態（ＰＫ）及び毒物動態（ＴＫ）を、カニクイザルにおける

ＧＬＰ毒性試験において評価した。カニクイザルに、５つの、週に１回の、静脈内（ＩＶ）ボーラス用量のビヒクル対照（ｎ＝６／性別）又は３０ｍｇ／ｋｇのＡｂ６（ｎ＝４／性別）、１００ｍｇ／ｋｇ（ｎ＝４／性別）又は３００ｍｇ／ｋｇ（ｎ＝６／性別）を投与した。完全ＴＫプロファイル血液サンプルを、１日目及び２２日目の後（全ての動物）及び２９日目の後（３００ｍｇ／ｋｇ投与群、回復コホート）にＡｂ６　ＴＫの決定のために採取した。Ａｂ６で処置された試験における全ての動物を、Ａｂ６に全身曝露させた。対照動物において測定可能なＡｂ６はなかった。平均（ＳＤ）ＰＫパラメータが、表３３に要約される。

【１０４６】

Ｃｍａｘ及びＡＵＣ０－１６８によって評価される際、性差は観察されなかった。Ａｂ６　Ｃｍａｘが、全ての群において１時間の最初のサンプリング時点で及び試験される全ての用量後に観察された。Ｃｍａｘ及びＡＵＣ０－１６８によって測定される全曝露量は、３０～３００ｍｇ／ｋｇと用量におよそ比例して増加し、これは、標的が完全に飽和されたことを示唆している。沈着（Ｃｍａｘ及びＡＵＣ）が、１日目～２２日目（３００ｍｇ／ｋｇで２９日目）に全ての用量レベルで観察された。３００ｍｇ／ｋｇ／投与の反復投与後の回復段階中、Ａｂ６濃度が低下し、３７５時間（１５．６日）の平均$t_{1/2}$値及び採取された最後のサンプルを通して測定可能な平均濃度値（投与の６９６時間後）を有していた。平均ＣＬ値は、０．１８２～０．２５９ｍＬ／ｈ／ｋｇの範囲であった。６９．９ｍＬ／ｋｇの平均Ｖｓｓ値が、２９日目に３００ｍｇ／ｋｇの回復動物において観察された。単回投与試験と同様に、平均Ｖｓｓ値は、サルにおける総血液量に近似しており（７３．４ｍＬ／ｋｇ）、これは、Ａｂ６が、静脈内（ＩＶ）投与後、主に血流中に存在し得ることを示す（Ｄａｖｉｅｓ　１９９３）。

【１０４７】

確認された抗Ａｂ６抗体が、投与及び回復段階全体を通して３０、１００又は３００ｍｇ／ｋｇ／投与でＡｂ６を投与されたいずれの動物においても観察されなかった。さらに、ＡＤＡ反応と一致する減少した曝露量が、観察されなかった。

【１０４８】

【表４０】

表 33: 用量 30、100、及び 300 mg/kg における雄及び雌サル血清中の Ab6 の総合した性別平均毒物動態学的パラメータ

投与群	用量レベル (mg/kg/投与)	パラメータ	間隔 1 日目	間隔 22 日目	間隔 29 日目
2	30	C_{max} (µg/mL)	688	1150	NA
		T_{max} (h)	1.00 (1.00 - 1.00)	1.00 (1.00 - 24.0)	NA
		AUC_{0-168} (h*µg/mL)	61900	121000	NA
		CL (mL/h/kg)	NA	0.259	NA
3	100	C_{max} (µg/mL)	2290	3820	NA
		T_{max} (h)	1.00 (1.00 - 1.00)	1.00 (1.00 - 48.0)	NA
		AUC_{0-168} (h*µg/mL)	217000	454000	NA
		CL (mL/h/kg)	NA	0.226	NA
4	300	C_{max} (µg/mL)	6470	11200	13000
		T_{max} (h)	1.00 (1.00 - 1.00)	1.00 (1.00 - 1.00)	1.00 (1.00 - 1.00)
		AUC_{0-168} (h*µg/mL)	641000	1330000	1720000
		AUC_{0-696} (h*µg/mL)	NA	NA	3660000
		$t_{½}$ (h)	NA	NA	375
		CL (mL/h/kg)	NA	0.233	0.182
		V_{ss} (mL/kg)	NA	NA	69.9

NA 該当なし。
中央 (最小 – 最大) 値が、T_{max} について示される。1 及び 22 日目の投与頻度と比べてゆっくりとした排出により、λ_z-依存性パラメータ (CL 及び V_{ss}) の推定が、29 日目の回復動物のためにのみ試みられた。
AUC_{0-t} = 時間 0 から t_{last} までの曲線下面積; AUC_{0-168} = 時間 0 から 168 時間までの曲線下面積; AUC_{0-696} = 0～696 時間の AUC; CL = クリアランス; C_{max} = 最高血中濃度到達時間; NA = 該当なし; $t_{1/2}$ = 排出半減期; T_{max} = 最高血中濃度到達時間; V_{ss} = 定常状態における分布容積

【１０４９】
実施例２６：Ａｂ６のファーストインヒューマン臨床試験のための用量選択
ＩＣＨガイダンス（ＥＭＥＡ ２０１７；ＦＤＡ ２００５）に従って、Ａｂ６薬理学及び毒性評価を用いて、ファーストインヒューマン（ＦＩＨ）臨床試験のための用量選択手法を導き出した。インビボ薬理学データを用いて、ヒト薬理学的作用量（ＰＡＤ）及び推奨されるＦＩＨ用量を予測した。さらに、辺縁を、推奨されるＦＩＨ用量での予測される曝露量と毒性試験においてＮＯＡＥＬで達成される曝露量との間の安全マージンを決定した。

【１０５０】
Ａｂ６の薬理学的活性は、既に記載されている（Ｍａｒｔｉｎ ２０２０）。インビボ試験を、クラウドマンＳ９１メラノーマモデル（Ｓ９１）、ＭＢＴ－２膀胱癌モデル（ＭＢＴ－２）及びＥＭＴ－６乳房腫瘍モデル（ＥＭＴ－６）を含む３つの異なる同系腫瘍モデルにわたって行った。全ての試験にわたり、Ａｂ６－ｍＩｇＧ１は、抗プログラム細胞死－１（ＰＤ－１）と組み合わせて投与されるとき、顕著な抗腫瘍効果を示し、減少した腫瘍量及び改善された動物生存をもたらした。これらの試験に基づいて、Ａｂ６－ｍＩｇＧ１のための薬理学的作用量は、３～１０ｍｇ／ｋｇの範囲であった（表３４）。ＰＡＤで達成される推定平均Ａｂ６－ｍＩｇＧ１血清曝露量（Ｃａｖｇ）を、マウスにおける単回投与ＰＫ試験から得られたＰＫパラメータを用いて決定した（表２９）。３及び１０ｍ

ｇ／ｋｇのＰＡＤで達成される曝露量は、それぞれ２８．４及び８６．３μｇ／ｍＬであった。

【１０５１】

カニクイザルにおいて単回投与ＰＫ試験から生成されるＰＫパラメータ（表３１）を用いて、簡単なアロメトリースケーリング（Ｄｅｎｇ　２０１１）を行い、１１ｍＬ／ｈのヒトクリアランスを推定した。２８．４～８６．３μｇ／ｍＬの推定ヒトクリアランス及び予測ヒト曝露量範囲を用いて、３週間毎にＡｂ６を投与されるヒトにおける２～６．１ｍｇ／ｋｇの予測薬理学的作用量（ＰＡＤ）を計算した。

【１０５２】

最高潜在的臨床用量と比較してかなりの安全マージンを提供するために、２～６．１ｍｇ／ｋｇの予測ＰＡＤ用量を用いて、ファーストインヒューマン（ＦＩＨ）用量選択を導き出した一方、毒性試験において達成される曝露量を用いて、ＦＩＨ用量とＮＯＡＥＬ（無有害作用レベル）との間の安全マージンを決定した。患者腫瘍負荷の予測変動性のため及び複数回用量レベルでのヒトにおけるＡｂ６の安全性、薬物動態及び予備有効性を完全に特性評価することを意図して、２～６倍の安全係数を予測ＰＡＤに適用して、３週間毎に投与される１ｍｇ／ｋｇのＡｂ６の臨床開始用量を得た。Ａｂ６についての包括的な毒性評価は、ラット及びカニクイザルにおける４週間ＧＬＰ試験において有害な毒性を同定せず、それぞれ２００ｍｇ／ｋｇ及び３００ｍｇ／ｋｇのＮＯＡＥＬを有していた。これらの毒性試験において達成された曝露量に基づいて、提案されるヒト開始用量（１ｍｇ／ｋｇ）のための非臨床安全係数は、ＡＵＣに基づいて１３９～２３７倍であった一方、安全性マージンは、C_{max}に基づいて６２４～８１３倍の範囲であった（表３５）。

【１０５３】

【表４１】

表 34. マウスにおける薬理学的有効用量及び曝露

腫瘍モデル	用量範囲(mg/kg)	PAD	PADにおける予測される曝露(C_{avg})*
クラウドマンS91	3、10及び30 mg/kg	3 mg/kg	28.4 μg/mL
MBT-2	3及び10 mg/kg	10 mg/kg	86.3 μg/mL
EMT-6	10 mg/kg	10 mg/kg	86.3 μg/mL

* PADにおける曝露を、マウスにおける単回用量PKデータを用いて決定した。

【１０５４】

【表４２】

表 35: 提供されたAb6 ヒト開始用量についての非臨床安全係数

種	用量	AUC (μg*hr/mL)		C_{max} (μg/mL)	
		曝露	安全係数	曝露	安全係数
サル	300 mg/kg	1720000	237	13000	813
ラット	200 mg/kg	1010000	139	9980	624
予測されるヒト[a]	80 mg (1 mg/kg)	7273	1	16	1

[a] サルからの単一種アロメトリーから使用された相対的にスケーリングされた(allometrically scaled)ヒトクリアランス、11 mL/hr。

【１０５５】

ラット及びカニクイザルにおける安全性評価毒性試験は、それぞれ２００ｍｇ／ｋｇ及び３００ｍｇ／ｋｇのＮＯＡＥＬを同定した。薬理学及び毒性データの両方に基づいて、１ｍｇ／ｋｇ（８０ｋｇのヒトを基準にして８０ｍｇに相当する）を、第１相試験におけ

る提案されるヒト開始用量として３週間毎に投与されるように選択した。この用量は、予測ヒトＰＡＤより２～６倍少なく、より重要なことには、１３９～２３７倍（ＡＵＣに基づいて）及び６２４～８１３倍（Ｃｍａｘに基づいて）の非臨床安全係数を提供する。要約すると、これらの試験は、Ａｂ６が、ＴＧＦβシグナル伝達調節異常が疾患過程のメディエーターとして関与している固形腫瘍及び希少血液学的病変の治療における潜在的治療的有用性を有する、有効な、標的化された及び安全な潜在型ＴＧＦβ１阻害剤であることを実証する。

【１０５６】

実施例２７：骨髄線維症患者から単離された細胞におけるＭＫ分化に対するＴＧＦβ１阻害の効果

ＴＧＦβは、骨髄間質細胞の増殖及びコラーゲン沈着並びに内皮細胞増殖を促進することが可能であり、それによりＭＦ骨髄において観察されるものに類似した微小環境の変化を促進する。さらに、骨髄線維症患者におけるＴＧＦβのレベルの増加は、貧血及び血小板減少症の発症並びに骨髄線維症の患者における疾患発症の両方に関与している。従って、ＴＧＦβ阻害剤による処置は、骨髄線維症患者及び骨髄線維症癌における増加したＴＧＦβレベルに起因する望ましくない作用を逆転させることが可能であり得るという仮説が立てられる。巨核球（ＭＫ）及び血小板は、ＴＧＦβ１の主な源であるため（Ｂｌｏｏｄ２００７；１１０：９８６－９９３）、ＴＧＦβ１阻害剤Ａｂ６の治療可能性が、巨核球富化集団を生成する条件下で骨髄線維症患者由来の単核細胞又はＣＤ３４＋細胞を培養することによって探られる。

【１０５７】

ＭＫ富化集団を生成する培養条件は、Ｍｏｓｏｙａｎ ｅｔ ａｌ．（内容全体が、参照により本明細書に組み込まれるＬｅｕｋｅｍｉａ．２０１７ Ｎｏｖｅｍｂｅｒ；３１（１１）：２４５８－２４６７）によって記載されるとおりである。簡潔に述べると、細胞が、健常なドナー又は骨髄線維症患者（ＭＦ－ＭＮＣ）に由来する単核細胞又はＣＤ３４＋細胞のいずれかの２段階の液体培養系を用いて培養される。細胞が、１％のペニシリン／ストレプトマイシン、１％のＬ－グルタミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）、２０ｍＭのβ－メルカプトエタノール、１％のウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）分画Ｖ（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）、３０％の代替血清ＢＩＴ９５００、１００ｎｇ／ｍｌの組み換えヒト幹細胞因子（ｈＳＣＦ）、５０ｎＭ／ｍｌの組み換えヒトトロンボポエチン（ｈＴＰＯ）（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ，ＵＳＡ）（内容全体が、参照により本明細書に組み込まれるＩａｎｃｕ－Ｒｕｂｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐ Ｈｅｍａｔｏｌ．２０１２ Ｊｕｌ；４０（７）：５６４－７４）が補充されたＩＭＤＭ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）中で懸濁される。ＭＫコロニー形成単位（ＣＦＵ－ＭＫ）アッセイが、製造業者の説明書（Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ，ＢＣ，Ｃａｎａｄａ）に従ってＭｅｇａＣｕｌｔ Ｓｙｓｔｅｍ及びＤｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｋｉｔを用いることによって行われる。ＣＤ６１＋ ＭＫの単離が、製造業者の勧告（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｉｎｃ．，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ，ＵＳＡ）に従ってＩｍｍｕｎｏｍａｇｎｅｔｉｃ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｋｉｔを用いて行われる。

【１０５８】

健常な個体又は骨髄線維症患者に由来するＭＦ－ＭＮＣ又はＣＤ３４＋細胞が、７日間にわたってＳＣＦ及びＴＰＯと共に培養され、その後、細胞は、ＴＰＯ単独と共にさらに２～８日間にわたって培養される。Ａｂ６、陰性対照抗体（例えば、アイソタイプ対照）又はＴＧＦβＲ１キナーゼ阻害剤ガルニセルチブが、記載されるように細胞培養物の調整期間中、２４～７２時間にわたって加えられる。調整培地は、培養物のそれぞれから収集され、ＥＬＩＳＡによってＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２及びＴＧＦβ３のレベルについてアッセイされる。正常線維芽細胞及び内皮細胞増殖及びコラーゲン沈着に対する、陰性対照抗体、Ａｂ６、又はガルニセルチブで処置された調整培地の効果が評価される。サイトカイン組合せの存在下における正常及び骨髄線維症ＣＤ３４＋コロニー形成に対する調整培地

の効果も評価される。

【１０５９】

悪性造血に対する、陰性対照、Ａｂ６、又はガルニセルチブで処置された調整培地の効果を決定するために、骨髄線維症ＣＤ３４＋細胞からクローニングされた造血コロニーが、骨髄線維症駆動突然変異のための遺伝子型である。ＴＧＦβ１阻害が過剰なＴＧＦβシグナル伝達の下流の影響をなくすかどうかを決定するために、線維芽細胞、内皮細胞及び造血細胞などの標的細胞が、ＳＭＡＤ活性化について分析される。

【１０６０】

ＭＫ培養物が、フローサイトメトリーを用いて分析され、ＭＫ細胞が、ＣＤ４１及びＣＤ４２タンパク質マーカの発現に基づいて同定される。最大で１００ｎＭのＡｂ６によるＭＫ培養物の処置は、ＭＦ－ＭＮＣからのＭＫにおける自己分泌ＴＧＦβ１シグナル伝達を阻害するが、組み換えＴＧＦβ１によるｐＳＭＡＤ２活性化を阻害しない。Ｓｍａｄリン酸化が実証される患者細胞培養物において、ＴＧＦβ活性化が、細胞自律的に発生する。Ａｂ６によるリン酸化の抑制は、リン酸化が、ＴＧＦｂ１によって誘導されることを確認する。細胞培養物への外因性ＴＧＦβ１成長因子の添加が、培養物におけるＳｍａｄシグナル伝達能力を実証するのに使用される。

【１０６１】

実施例２８：ＴＧＦβ３阻害剤で処置されたマウスにおけるＥＣＭ調節異常の増悪

安全性の観点から、ＴＧＦβの汎阻害が毒性を引き起こし得ることが広く認識されており、これは、ＴＧＦβ阻害剤が今日に至るまで開発に成功していないという事実を裏付ける。潜在的に危険な有害作用を避けるために、多くのグループが、全てではないが、アイソフォームのサブセットを標的とし、有効性を保持したままである阻害剤の同定に最近乗り出し始めた。

【１０６２】

線維化促進表現型（例えば、ＥＣＭ中への増加したコラーゲン沈着）が、線維症だけでなく、浸潤及び転移などの癌進行の局面にも関連している。例えば、Ｃｈａｋｒａｖａｒｔｈｙ ｅｔ ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ，（２０１８）９：４６９２．“ＴＧＦ－β－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｍａｔｒｉｘ ｇｅｎｅｓ ｌｉｎｋ ｃａｎｃｅｒ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔｓ ｔｏ ｉｍｍｕｎｅ ｅｖａｓｉｏｎ ａｎｄ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｆａｉｌｕｒｅ”を参照されたい）。様々な癌型の間質を含む、無調節なＥＣＭを伴う病変組織は、ＴＧＦβ１及びＴＧＦβ３の両方を発現し得る。実際に、最近、２０１９年には、複数のグループが、リガンドトラップ及びインテグリン阻害剤など、これらのアイソフォームの両方を標的とするＴＧＦβ阻害剤の開発に取り組んでいる。

【１０６３】

以前に、本発明者らは、ＴＧＦβ１単独の阻害が、腫瘍モデルにおいてチェックポイント遮断療法に対する一次耐性を克服するのに十分であることを示した。ＥＣＭの調節におけるＴＧＦβ３のインビボでの役割をさらに調べるために、ＴＧＦβ１選択的阻害剤及びＴＧＦβ３選択的阻害剤を、食餌誘導性マウス肝線維症モデルにおいて試験した。

【１０６４】

通常食を与えられた対照動物において、組織学によってＰＳＲ陽性領域のパーセンテージによって測定されるベースライン線維症スコアが、２％未満であった。１２週間の線維症を引き起こす食餌後（食餌を持続しながら、最後の８週間で抗体処置）、ＩｇＧ単独で処置された対照動物は、組織学によって約６．５％のＰＳＲ陽性領域を示した。ＴＧＦβ１選択的阻害剤で処置された動物は、それを約４％のＰＳＲ陽性領域に減少させた（ＩｇＧ対照群に対してｐ＜０．００１）。ＴＧＦβ３選択的阻害剤で処置された動物は、約１２．５％のＰＳＲ陽性領域（ＩｇＧ対照群に対してｐ＜０．００１）を有する有意に悪化した線維症を発症することが分かった一方、ＴＧＦβ３選択的阻害剤及びＴＧＦβ１選択的阻害剤の組合せで処置された動物は、約８％のＰＳＲ陽性領域（ＩｇＧ対照群に対してｐ＜０．００１）を有するより軽度の線維症を示した。

【１０６５】
これらの結果は、ＴＧＦβ３の阻害が、増加したコラーゲン蓄積によって示されるようにＥＣＭ調節異常を悪化させたことを示唆する。データは、１／３アイソフォームの同時の阻害が実際にインビボでのＴＧＦβ１阻害の有効性を弱め、ＴＧＦβ３阻害がＥＣＭ調節に有害であり得る可能性を高めることも示す。
【１０６６】
実施例２９：Ａｂ６処置は、循環ＴＧＦβ１レベルを調節する
循環ＴＧＦβ１レベルを、ＭＢＴ－２マウスモデルにおいてＡｂ６及び／又は抗ＰＤ－１抗体による処理前及び後に評価した。腫瘍担持マウスに、１０ｍｇ／ｋｇのＡｂ６単独、１０ｍｇ／ｋｇのＰＤ－１抗体単独、又は１０ｍｇ／ｋｇの抗ＰＤ１抗体と組み合わせた１ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ若しくは１０ｍｇ／ｋｇのＡｂ６を、１及び８日目に投与した。対照動物にＩｇＧ対照を投与した。
【１０６７】
血液サンプルを腫瘍移植前、処置前並びに処置の３、６及び１０日後に採取した。酸処理工程を含め、サンプルを処理し、循環ＴＧＦβ１レベル（ｐｇ／ｍＬ）を、酵素結合免疫吸着法（ＥＬＩＳＡ、例えば、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ（登録商標）アッセイ）を用いて決定した。酸処理工程は、その潜在型複合体からＴＧＦβ１を遊離させ、理論によって制約されるものではないが、循環中のＴＧＦβ１の大部分が、潜在型複合体中に存在すると考えられる。結果は、移植前の及びＩｇＧ対照処置動物における循環ＴＧＦβ１レベルと比較して、Ａｂ６（単独で又は抗ＰＤ－１抗体と組み合わせて）で処置された動物における循環ＴＧＦβ１レベルの増加する傾向を示した。対照的に、抗ＰＤ１抗体単独で処置された動物は、対照と比較して、増加した循環ＴＧＦβ１レベルを示さなかった（図４２）。統計的に有意な相関が、各処置群について循環ＴＧＦβ１レベルとＡｂ６の血漿中濃度との間で見られた（R^2＝０．７１４）（図４３Ａ及び図４３Ｂ）。
【１０６８】
サンプル採取及び処理のアーチファクトとして放出されるさらなる循環ＴＧＦβ１の測定を避けるために、血漿血小板因子４（ＰＦ４）レベルを、ＥＬＩＳＡによって各サンプル中で決定し、得られたＰＦ４レベルを用いて、循環ＴＧＦβ１放出を正規化した。ＰＦ４レベルは、ＴＧＦβ１放出に寄与し得るサンプル採取中に誘導される血小板活性化の指標として使用され得る。ＰＦ４レベル（ｎｇ／ｍＬ）は、薬物処置及びＩｇＧ対照サンプルにわたって低いことが分かった。比較すると、移植前サンプルは、より高いＰＦ４レベルを示した（図４４Ａ）。サンプル外れ値を、四分位範囲を用いて同定し、６０．４５ｎｇ／ｍＬの上限ＰＦ４レベル及び４２．４１ｎｇ／ｍＬの下限を有していた（図４４Ｂ）。ＰＦ４外れ値について補正された結果は、Ａｂ６処置（単独で又は抗ＰＤ－１抗体と組み合わせて）後の循環ＴＧＦβ１レベルの統計的に有意な、用量依存的な増加を示した。さらに、外れ値－補正結果は、非腫瘍担持対照（移植前）と比較して、腫瘍担持動物において上昇した循環ＴＧＦβ１レベルも示した（図４４Ｃ）。図４４Ｃに示されるように、外れ値－補正全循環ＴＧＦβ１レベルは、移植前に約２０００ｐｇ／ｍＬであり、ＩｇＧ対照で処置されたマウスにおいて約３０００ｐｇ／ｍＬであり、抗ＰＤ－１単独で処置されたマウスにおいて約２５００ｐｇ／ｍＬであり、１０ｍｇ／ｋｇのＡｂ６単独で処置されたマウスにおいて約９０００ｐｇ／ｍＬであり、且つそれぞれ１ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ及び１０ｍｇ／ｋｇのＡｂ６を含む組合せ治療で処置されたマウスにおいて６０００ｐｇ／ｍＬ、７２００ｐｇ／ｍＬ及び９０００ｐｇ／ｍＬ超であった。理論に制約されるのを望むものではないが、ＰＦ４レベルは、サンプル採取及び処理中に血小板活性化によって汚染されたサンプルを同定し、除去するのに有用であり得る。
【１０６９】
循環ＴＧＦβ１レベルの用量依存的な増加の同様の傾向は、単回投与のＡｂ６で処置された非ヒト霊長類及びラットでも観察された。１ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ、又は３０ｍｇ／ｋｇのＡｂ６で処置された非ヒト霊長類において、循環ＴＧＦβ１

レベルの増加の程度及び持続時間は、用量依存的であった。循環ＴＧＦβ１レベルを、Ａｂ６投与の約７２～２４０後に測定し、ピーク循環ＴＧＦβ１レベルは、約２０００ｐｇ／ｍｌ～約４０００ｐｇ／ｍｌであった（図５９）。同様に、０．３ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ、又は３０ｍｇ／ｋｇのＡｂ６で処置されたラットは、循環ＴＧＦβ１レベルの用量依存的な増加も示した。循環ＴＧＦβ１レベルを、Ａｂ６投与の約２４～３６０時間後に検出し、検出されたピーク循環ＴＧＦβ１レベルは、約５０００ｐｇ／ｍｌ～約７５００ｐｇ／ｍｌであった。各処置群についての循環ＴＧＦβ１上昇の持続時間は、用量依存的であるようであった（図６０）。

【１０７０】

実施例３０：Ａｂ６処置腫瘍におけるＣＤ８陽性細胞の分析

生検組織におけるＣＤ８　Ｔ細胞状態の調査は、典型的には、３つの主な表現型：免疫枯渇、免疫除去又は炎症性の１つとして各組織を表す。免疫枯渇表現型は、組織にわたってかなりのレベルのＣＤ８を発現しない。免疫除去組織は、ＣＤ８発現を示すが、発現は、主に、間質又は腫瘍巣を囲む間質辺縁に限局される。炎症性組織は、組織の腫瘍巣内にかなりのレベルのＣＤ８発現又はＣＤ８陽性細胞を示す。この表現型分類が有益である一方、発現のこれらのパーセンテージは、組織を通した発現の平均として計算されることが多く、腫瘍生物学の不均一な性質を考慮に入れていない。これにより、１つの高炎症性腫瘍巣を含む腫瘍が、複数の枯渇した腫瘍巣と共に平均化されて、炎症が存在していても除去又は枯渇されていると組織を分類することがある。

【１０７１】

腫瘍組織内に存在する炎症の不均一性をよりよく表すために、画像分析に基づくアルゴリズムが開発され、これは、腫瘍、間質、及び腫瘍／間質辺縁を分けるだけでなく、組織内の各腫瘍巣を、それ自体別個の物体として同定した。この分析は、組織内の全ての腫瘍巣の数及びサイズの列挙を可能にし、各腫瘍巣内及び各腫瘍巣の外部のＣＤ８発現のパーセンテージをさらに定量した。各腫瘍巣が、炎症性、除去、又は枯渇のそれ自体の表現型分類を与えられ、各表現型を提示する腫瘍巣のパーセンテージを、腫瘍内の不均一な炎症を表すために計算した。

【１０７２】

コア針生検を用いて、膀胱癌又は黒色腫と診断された２８の対象からの腫瘍サンプルを得た。３～４つのコア生検サンプルを、１６～１８ゲージ針を用いて各腫瘍から採取した。サンプルを２４～４８時間にわたってホルマリン容器中において室温で固定した。固定が完了したら、生検を、ＰＢＳで予め浸漬させたスポンジ間のヒストカセットに移した。次に、ヒストカセットを、冷ＰＢＳに沈め、分析前の３～４日以下にわたって貯蔵した。

【１０７３】

ＣＤ８＋細胞のパーセンテージを、黒色腫及び膀胱癌のそれぞれの２８の全組織腫瘍切除サンプルにおける免疫組織化学的分析によって決定した。全組織並びに全組織の腫瘍、間質、及び辺縁（腫瘍／間質境界面から各方向に２５μｍ）区画からのデータを評価した。また、ＣＤ８＋細胞のパーセンテージを、各サンプル全体を通して個々の腫瘍巣について評価した。明確でない又は明確さを欠いた分析可能な腫瘍であるサンプルでは、全組織のみを分析した。区画分析からの結果は、膀胱癌（図４５Ａ）及び黒色腫（図４５Ｂ）サンプルにおける異なる区画間のＣＤ８＋細胞のパーセンテージの変動を実証した。細胞数、区画面積、ＣＤ８＋細胞密度（ＣＤ８＋細胞の平均数／mm^2）及びＣＤ８＋細胞クラスタリングを測定した。腫瘍巣分析からの結果が、図６８～７０に示される。

【１０７４】

免疫表現型を決定するために、腫瘍区画におけるＣＤ８＋細胞のパーセンテージを、間質及び辺縁区画のものと比較した。腫瘍区画におけるＣＤ８＋細胞の、間質又は辺縁区画のものに対する比率は、免疫表現型にわたって変化した。一例として、図４６Ａは、膀胱癌サンプル＃２６、＃３０、及び＃９が、区画にわたってＣＤ８＋細胞の異なるパーセンテージを示したことを示し、これは、これらの腫瘍が異なる免疫表現型を有していた可能性が高いことを示した。膀胱サンプル＃２６（図４６Ａ、左側）は、全ての３つの区画（

腫瘍中で０．８％のＣＤ８＋染色、間質中で１．９％、及び辺縁中で１．３％）にわたって低いＣＤ８＋染色によって実証されるように免疫枯渇表現型を示した。免疫炎症性表現型を示した膀胱サンプル＃９（図４６Ａ、右側）は、全ての３つの区画（腫瘍中で１１％のＣＤ８＋染色、間質中で８．７％、及び辺縁中で１２％）にわたってＣＤ８＋染色の同様に高いパーセンテージを示した。対照的に、免疫除去表現型を示した膀胱サンプル＃３０（図４６Ａ、真ん中）は、腫瘍と比較して間質及び辺縁中でＣＤ８＋細胞のより高いパーセンテージを示した（間質中で３９％及び辺縁中で２４％と比較して、腫瘍中で５．２％のＣＤ８＋染色）。ある場合には、辺縁区画を細分することによる、間質及び辺縁において発現するＣＤ８＋のさらなる分析は、免疫表現型検査についてのさらなる情報を提供し得る。例えば、図４６Ｂに示されるように、腫瘍の外部のＣＤ８＋細胞の１８．３％及び４．８％がそれぞれ間質及び辺縁区画に位置し、辺縁構成要素を細分すると、辺縁におけるＣＤ８＋細胞のほぼ全てが辺縁の間質に面する側にあり、腫瘍に面する側にはＣＤ８＋細胞がほとんど見られないことがさらに示される。同様に、図４６Ｃは、膀胱サンプル＃３０の腫瘍辺縁における強いＣＤ８染色を示し、辺縁構成要素を細分すると、ＣＤ８陽性のほぼ全てが辺縁区画の間質側に限局され、腫瘍側に限局されるＣＤ８陽性はほとんどないことがさらに実証される。これらの観察は、腫瘍が、免疫除去されている可能性が高いことを示す。

【１０７５】

腫瘍、間質、及び辺縁についてのＣＤ８＋発現の区画比率を、全組織における絶対パーセントＣＤ８陽性と比較した。図４７に実証されるように、ＣＤ８＋細胞の同様のパーセンテージを示す腫瘍は、各腫瘍区画において異なるＣＤ８＋発現プロファイルを提示し、これは、ＣＤ８＋発現の区画比率が、全腫瘍のみの絶対パーセントＣＤ８陽性データと比較して、免疫表現型検査についてのさらなる状況を提供し得ることを示唆している。同様に、１平方ミリメートル当たりのＣＤ８＋細胞の数によって決定される、各腫瘍区画におけるＣＤ８＋細胞密度を、全組織のパーセントＣＤ８＋発現と比較した。図４８におけるＩＨＣ染色データは、２つの異なる腫瘍間質切片が、ＣＤ８＋発現の同様の全体パーセンテージを示すにもかかわらず、ＣＤ８＋細胞密度の約１０倍の差を有することを示す（図４８）。これらの知見は、細胞密度が、絶対ＣＤ８陽性に追加の又は代替的な測定として使用され得ることと、ある場合には、細胞密度データが免疫表現型検査のための腫瘍免疫集団をより良好に表し得ることとを示唆する。

【１０７６】

所与のサンプルの腫瘍巣中のＣＤ８＋　Ｔ細胞浸透に利用可能な距離を決定することによって２つの膀胱サンプルについて腫瘍深達度を決定した。膀胱サンプル＃２２は、８を超える腫瘍深達度を有していた一方（測定は、腫瘍巣の反対側に向かって続けた）、膀胱サンプル＃３０は、２未満の腫瘍深達度を有していた（図６１）。これらのサンプルにおけるパーセントＣＤ８発現が同様であると分かっていることを所与として、これらの結果は、腫瘍深達度が、パーセントＣＤ８発現などの他のパラメータと組み合わせて使用される腫瘍免疫表現型検査を決定／確認するための有用なパラメータであり得る。

【１０７７】

限局されたＣＤ８発現を、黒色腫サンプル＃３０についてさらに分析し、これは、低い全体ＣＤ８パーセンテージを示した。ＣＤ８発現の限局された領域は、壊死領域の近くにＣＤ８細胞の濃度を示し、これは、潜在的な治療効果を示し得る（図６２）。

【１０７８】

ＣＤ８陽性（例えば、ＣＤ８＋細胞のパーセンテージ）を、個々の腫瘍巣について決定し、腫瘍区画において測定されるＣＤ８陽性と比較した。図６８に示されるように、腫瘍区画を腫瘍巣にさらに分解することは、腫瘍の異なる部分における様々な程度のＣＤ８陽性を示し、腫瘍の免疫表現型についてのさらなる洞察を与える。例えば、７４の腫瘍巣のＣＤ８陽性をまず測定し、次に、ＣＤ８陽性に基づいてそれぞれの個々の腫瘍巣に相対的表現型（例えば、免疫炎症性、免疫除去、又は免疫枯渇）を割り当て、各免疫表現型を示す組み合わされた腫瘍領域を最後に計算することにより、膀胱腫瘍サンプルの免疫表現型

を決定した（図６９）。ある場合には、腫瘍巣分析に基づいて決定される免疫表現型は、腫瘍区画のみの分析に基づいて決定される免疫表現型と異なっていた（図７０Ａ及び７０Ｂ）。

【１０７９】

実施例３１：潜在型ＴＧＦβ活性化の測定

Ａｂ６の阻害活性を、Ｍａｒｔｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０に既に記載されるように測定した。簡潔に述べると、ＬＮ２２９細胞（ＡＴＣＣ）を、ヒト、ラット、又はカニクイザルｐｒｏＴＧＦβ１のいずれかをコードするプラスミドでトランスフェクトした。細胞トランスフェクションの約２４時間後、Ａｂ６を、ＣＡＧＡ１２レポーター細胞と一緒に形質転換体に加えた（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）。共培養物の設置の約１６～２０時間後、アッセイを発色させ、発光をプレートリーダーにおいて読み取った。用量反応活性は、Ｐｒｉｓｍ　８を用いて３パラメータｌｏｇ阻害剤対反応モデルに対する非線形適合であり、最良適合ＩＣ５０値を計算した。

【１０８０】

実施例３２：ＭＢＴ－２モデルにおける循環潜在型ＴＧＦβ１のインビボ評価

循環潜在型ＴＧＦβ１に対するＡｂ６誘導性用量依存的効果を、非腫瘍担持及び腫瘍担持Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスにおいて評価する。腫瘍担持マウスに、抗体処置開始（０日目）の１４日前にＭＢＴ－２膀胱癌細胞を接種する。マウスに、１日目及び８日目にＩｇＧ対照又は１ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ若しくは３０ｍｇ／ｋｇのＡｂ６を投与する。血液サンプルを、腫瘍接種当日（－１４日目）、抗体投与の１日前、抗体投与の８日前、及び１０日目に採取する。血液サンプル中の循環潜在型ＴＧＦβレベルを、対照としてのＰＦ４を用いて分析する。腫瘍サイズの評価、標的エンゲージメント、及び免疫浸潤などの薬力学的読み取りを、腫瘍サンプルを用いて行う。

【１０８１】

実施例３３：ヒト血漿サンプルにおける循環潜在型ＴＧＦβ１のインビボ評価

循環潜在型ＴＧＦβレベルを、Ａｂ６投与前及びＡｂ６投与の１時間後の両方で、ヒト乏血小板血漿サンプル中で評価する。ＰＦ４レベルを、血小板活性化について対照として分析する。循環潜在型ＴＧＦβレベルを決定するための一般的な方法が上記の実施例２９に示される。

【１０８２】

均等物

上記の個々の項において言及される本開示の様々な特徴及び実施形態は、必要に応じて他の項に準用される。その結果、１つの項に記載される特徴は、必要に応じて、他の項に記載される特徴と組み合わされ得る。

【１０８３】

当業者は、単なる日常的な実験を用いて、本明細書に記載される本開示の特定の実施形態に対する多くの均等物を認識又は確認することが可能である。このような均等物は、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。

【図面】

【図１】

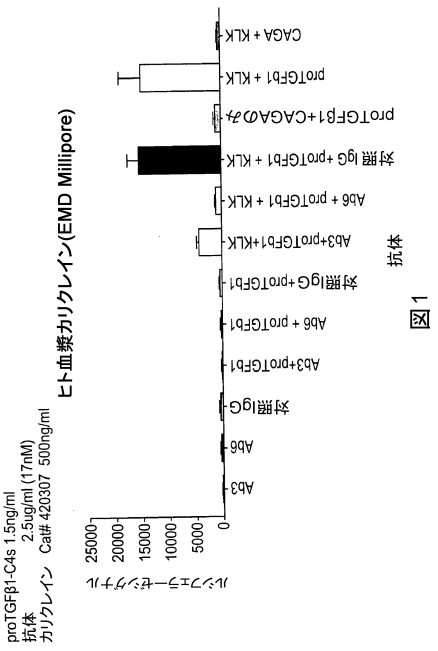


図1

【図２】

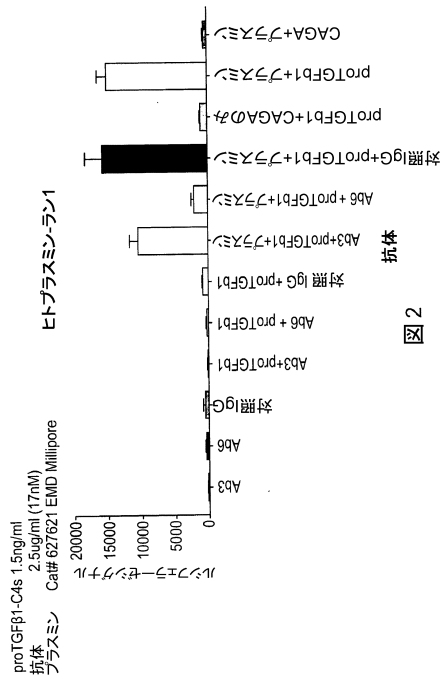


図２

【図３】

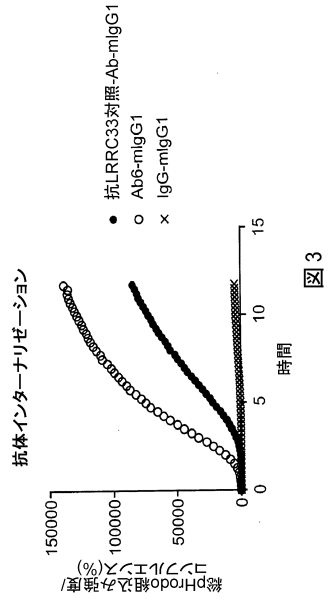


図３

【図４】

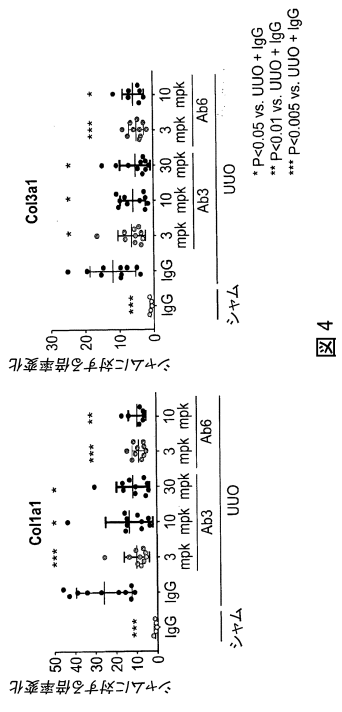


図４

【図５】

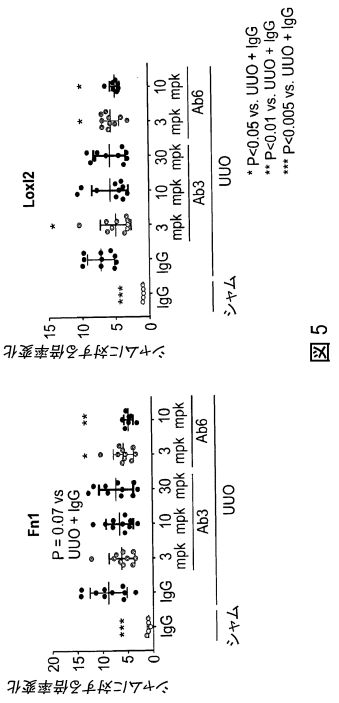


図５

【図６】

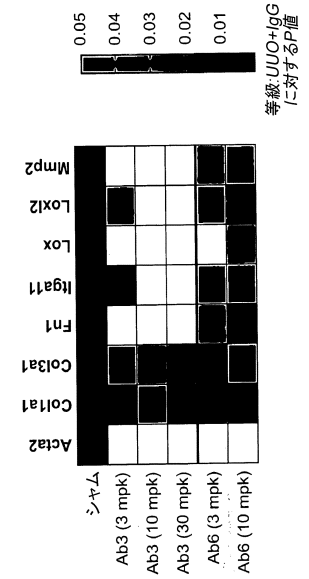


図６

【図７】

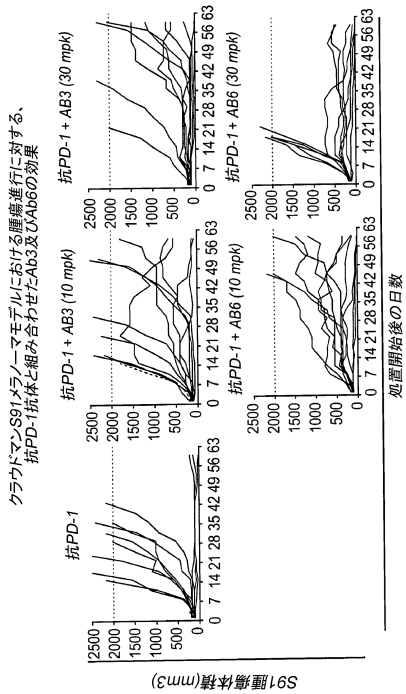


図７

【図８】

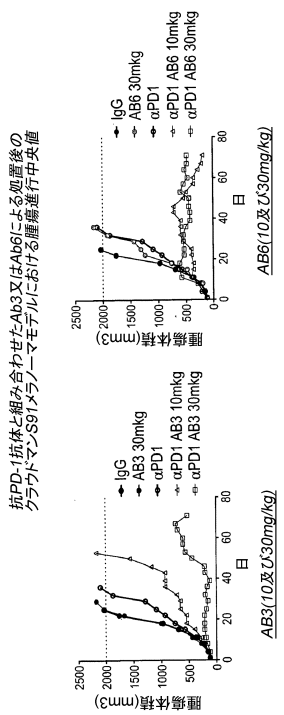


図８

【図９】

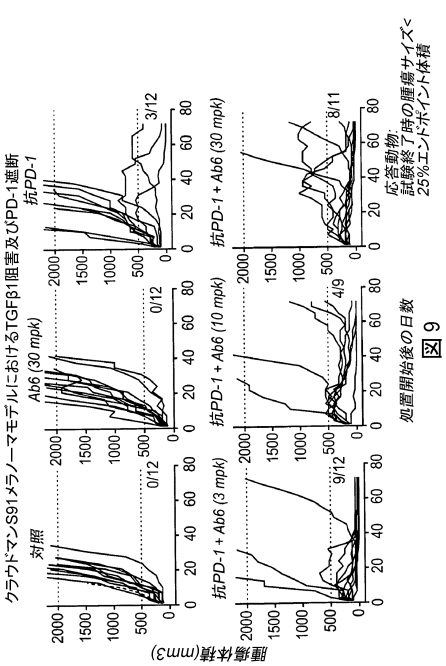


図９

【図１０】

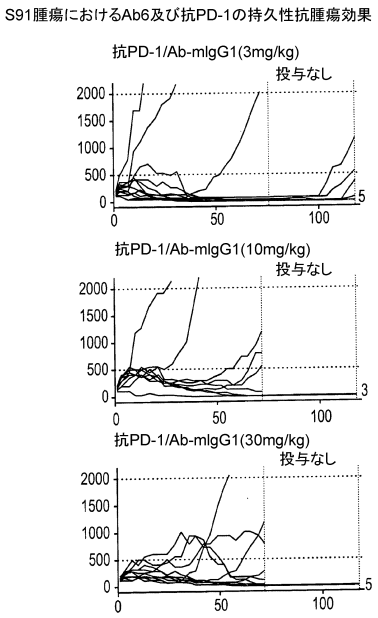


図10

【図１１】

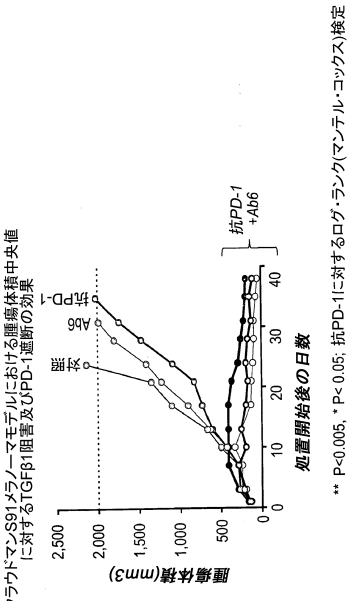


図11

【図１２】

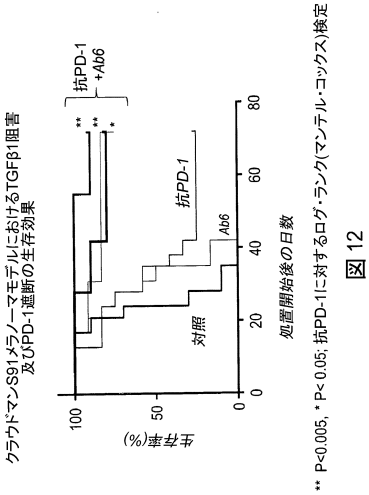


図12

【図１３】

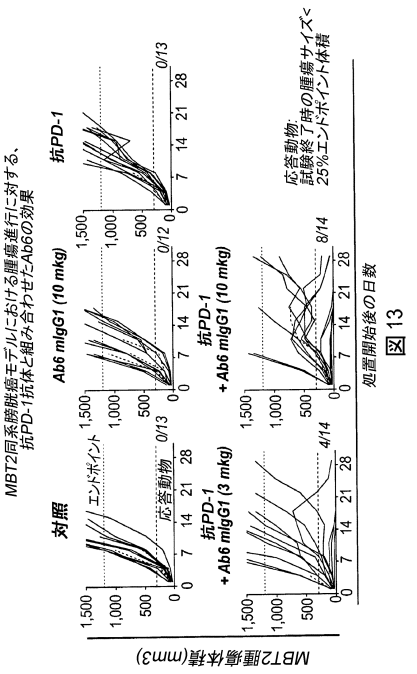


図 13

【図１４】

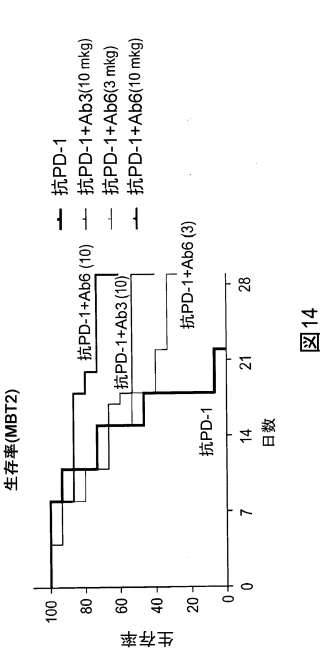


図14

【図１５】

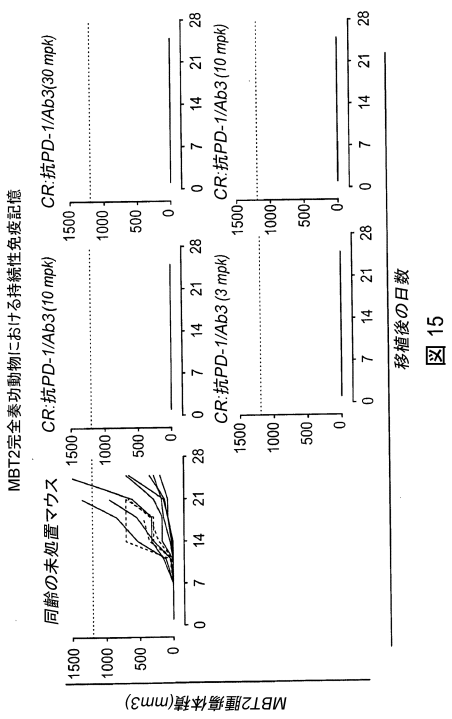


図 15

【図１６】

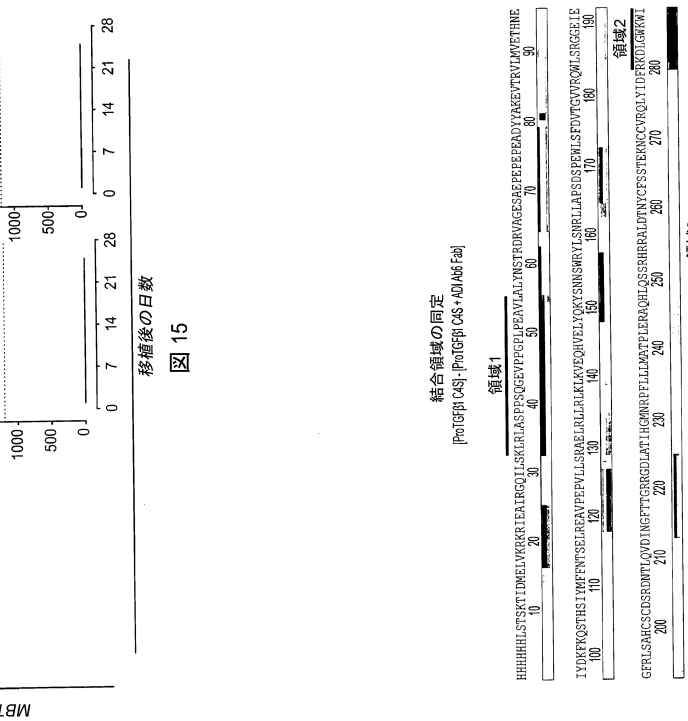


図 16

【図１７】

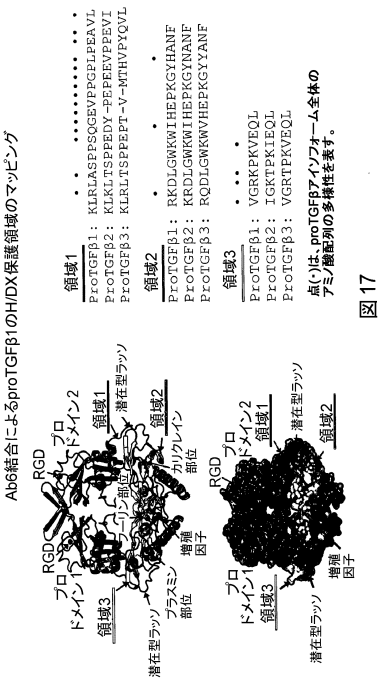


図 17

【図１８】

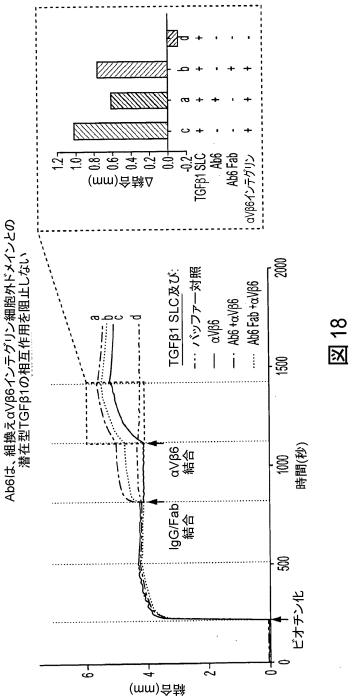


図 18

【図１９】

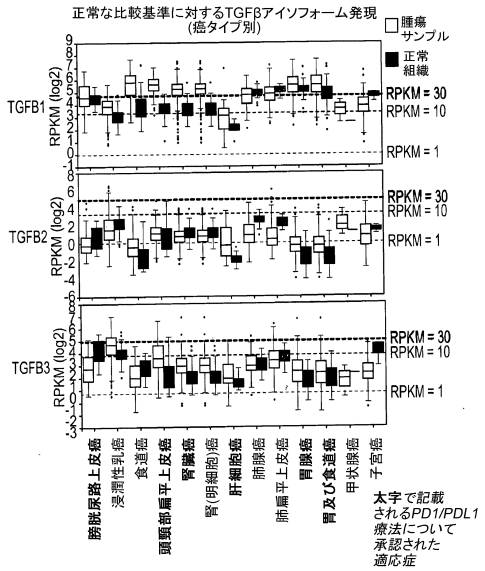


図 19

【図２０】

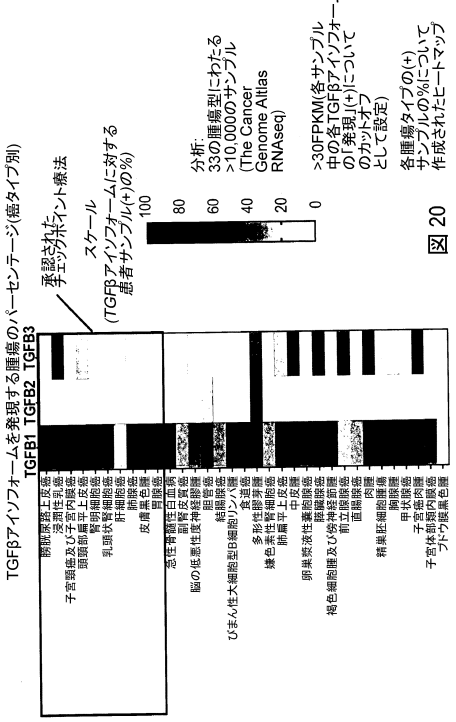


図 20

【図２１Ａ】

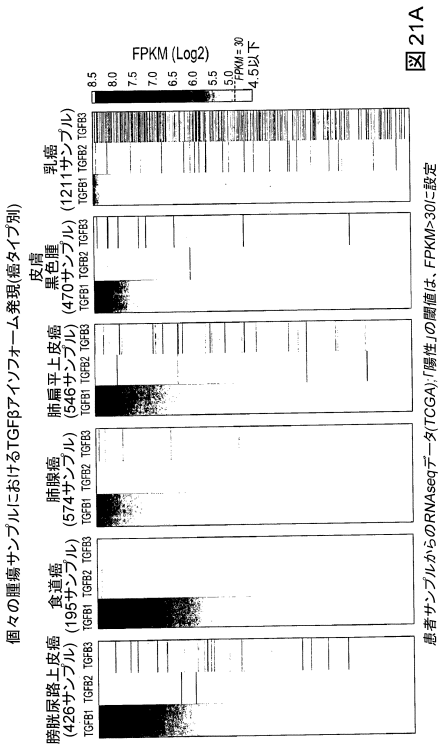


図21A

【図２１Ｂ】

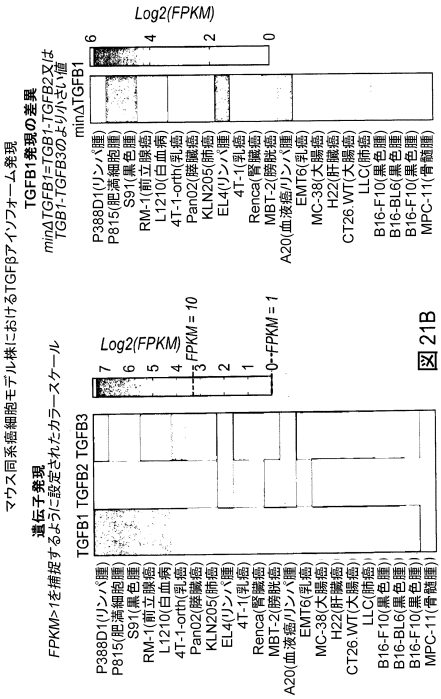


図21B

【図２２】

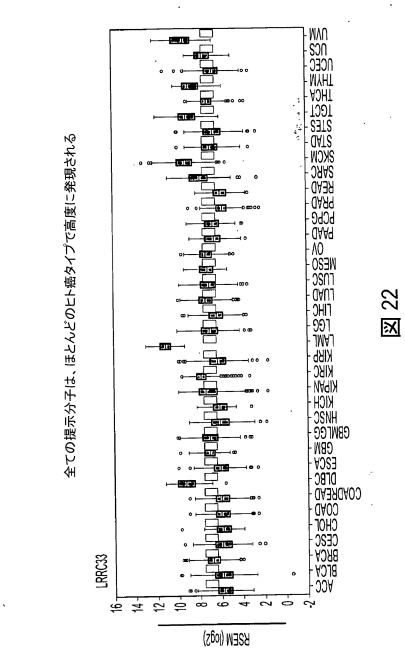


図22

【図２２－ＣＯＮＴ－１】

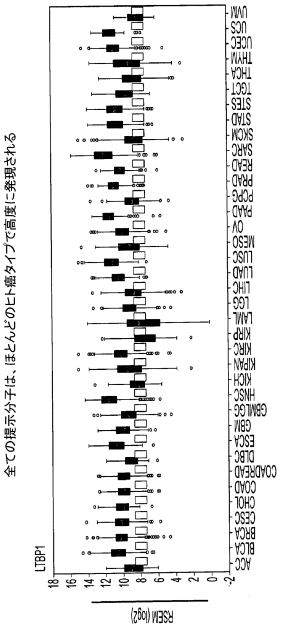


図22
続き

【図２２－ＣＯＮＴ－２】

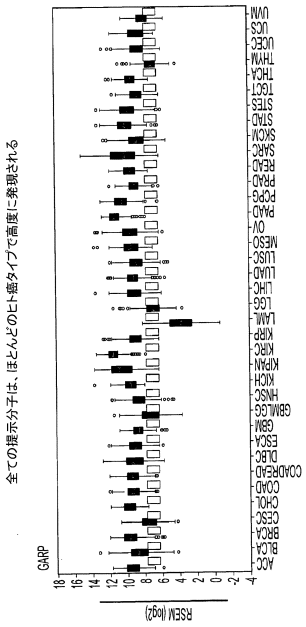


図22
続き

【図２２－ＣＯＮＴ－３】

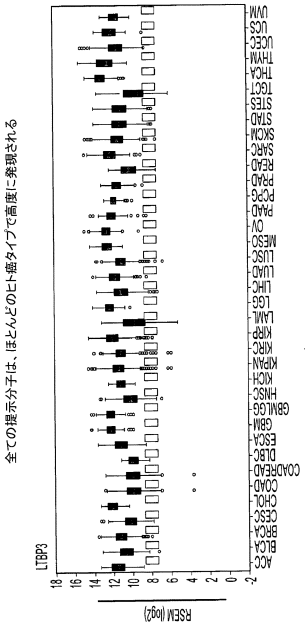


図22
続き

【図２３Ａ】

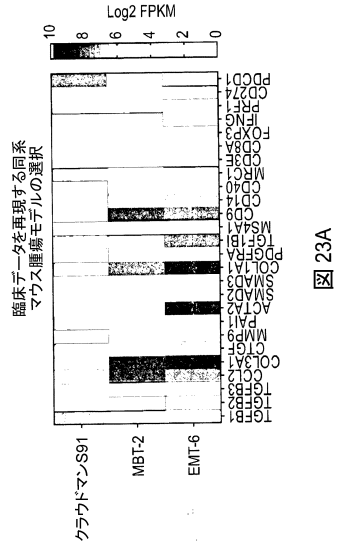


図 23A

【図２３Ｂ】

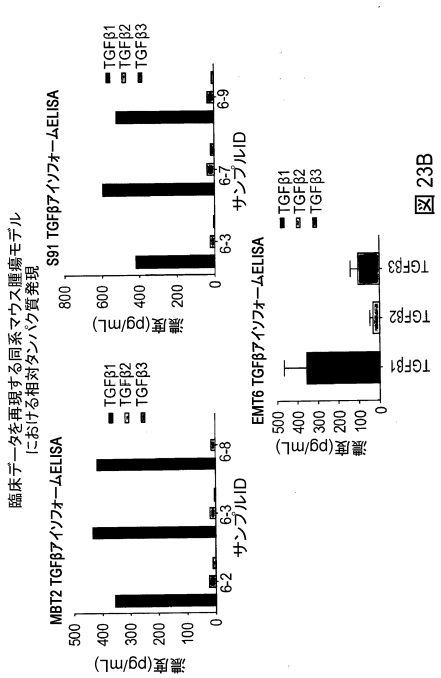


図 23B

【図２３Ｃ】

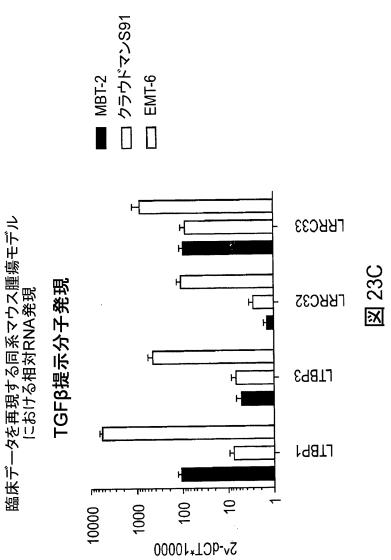


図 23C

【図２４Ａ】

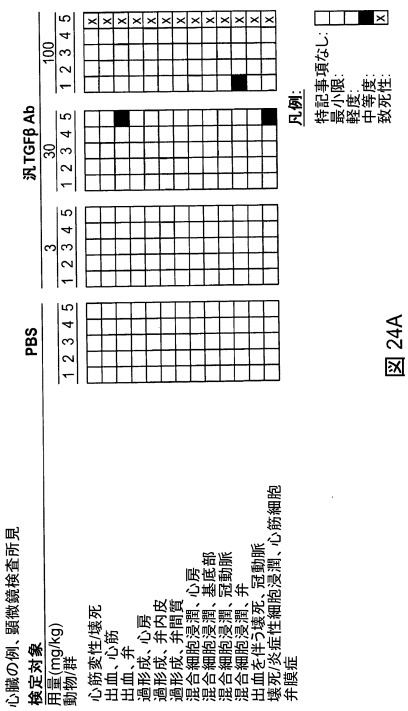


図 24A

【図２４Ｂ】

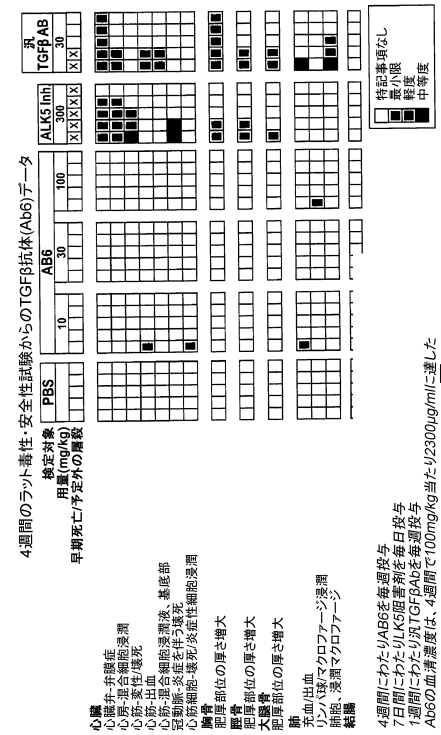


図 24B

【図２５】

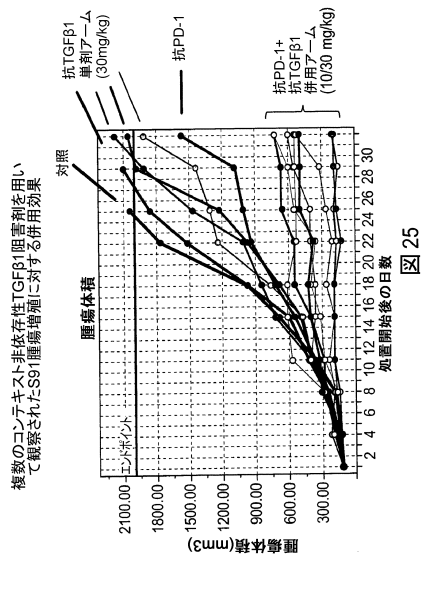


図 25

【図２６Ａ】

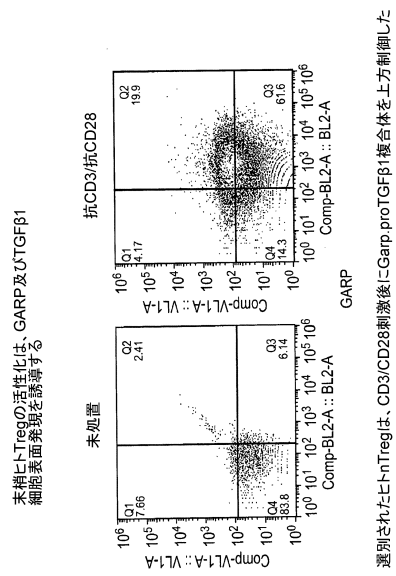


図 26A

【図２６Ｂ】

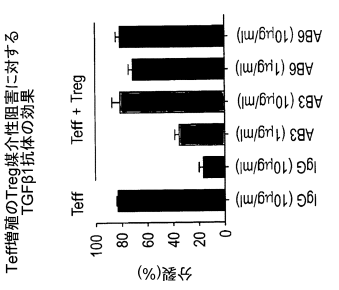


図 26B

【図２７Ａ】

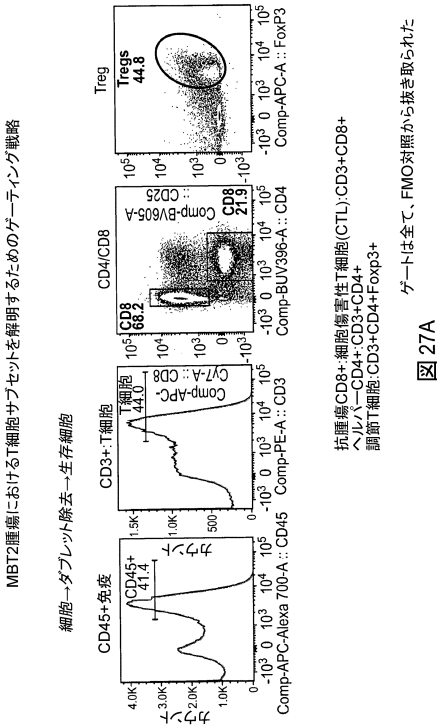


図 27A

【図２７Ｂ】

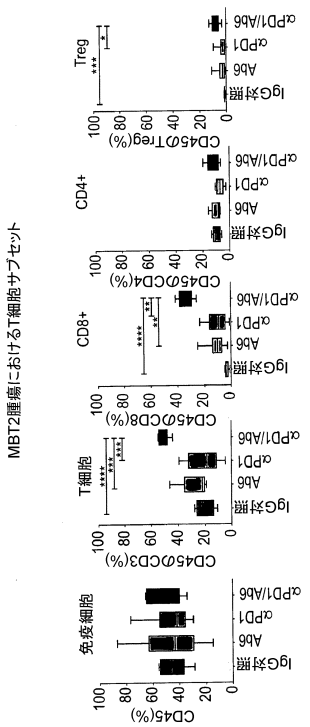


図 27B

【図２７Ｃ】

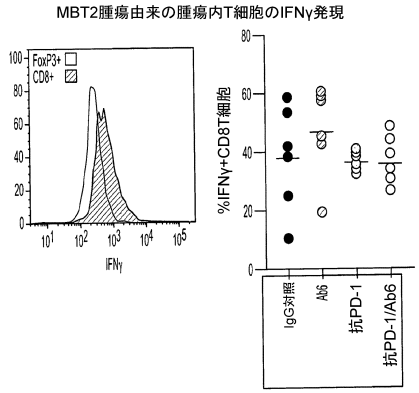


図 27C

【図２８Ａ】

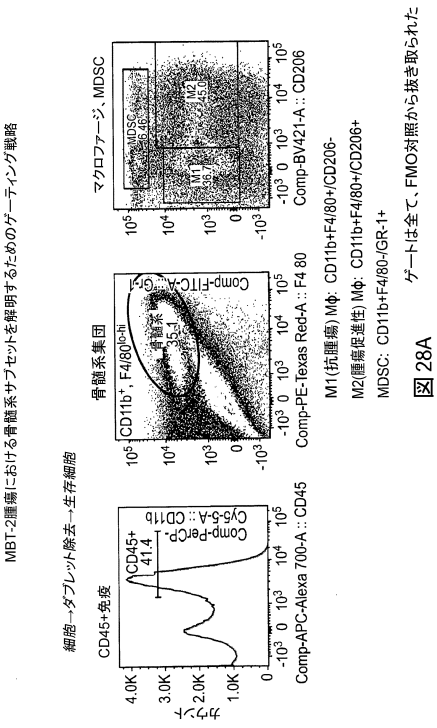


図 28A

【図２８Ｂ】

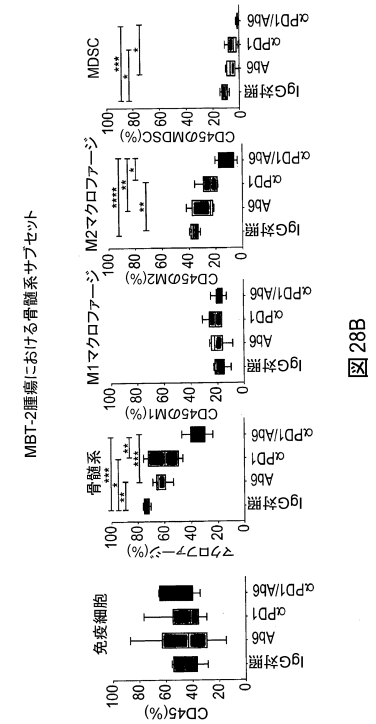


図 28B

【図２８Ｃ】

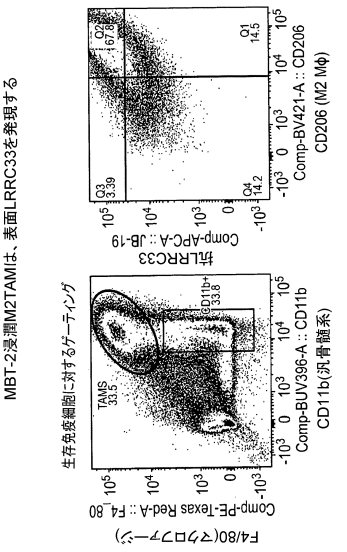


図 28C

【図２８Ｄ】

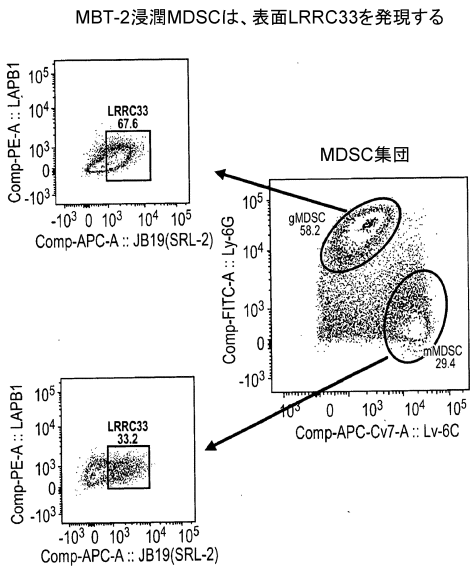


図28D

【図２９Ａ－２９Ｂ】

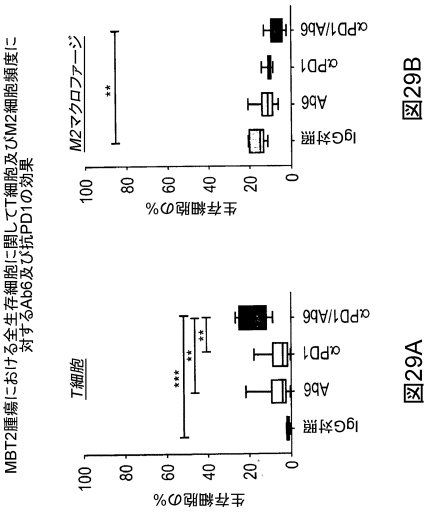
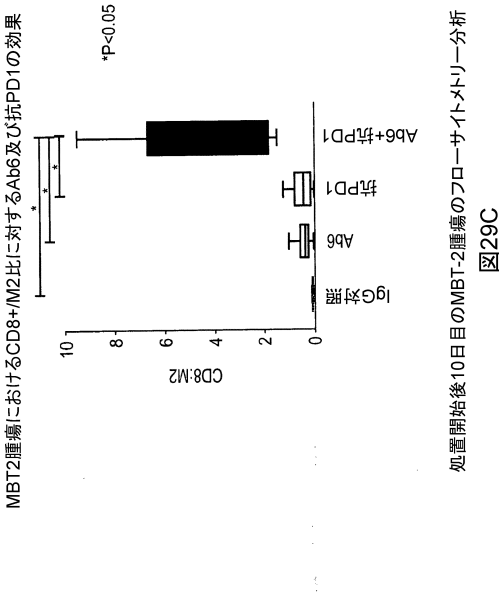


図29A及び29B

図29B

図29A

【図２９Ｃ】



処置開始後10日目のMBT-2腫瘍のフローサイトメトリー分析

図29C

【図３０Ａ－３０Ｂ】

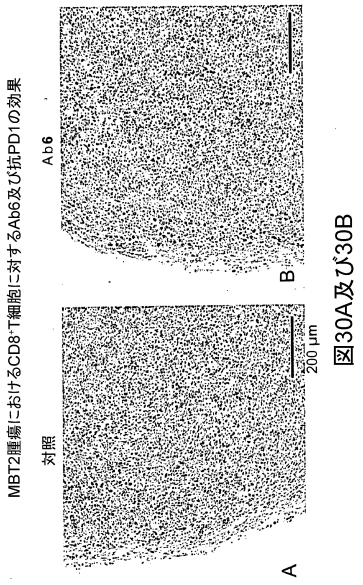


図30A及び30B

【図３０Ｃ－３０Ｄ】

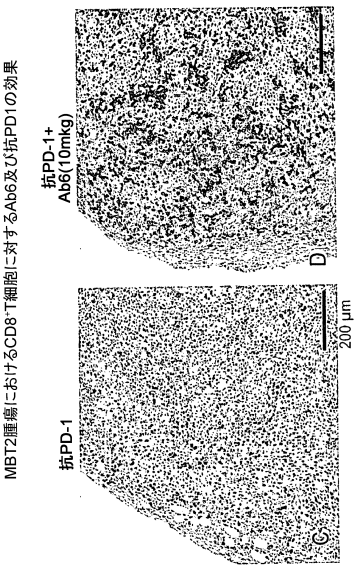


図30C及び30D

【図３０Ｅ】

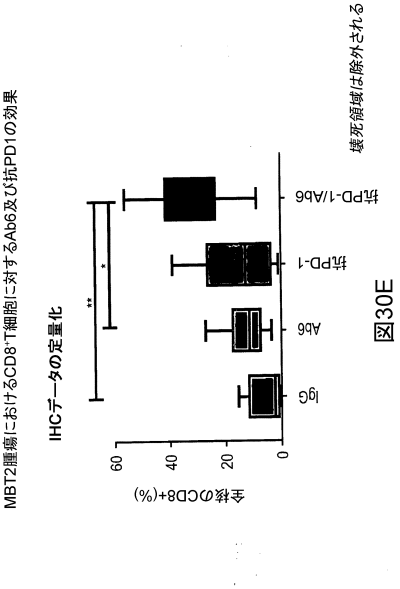


図30E

【図３０Ｆ】

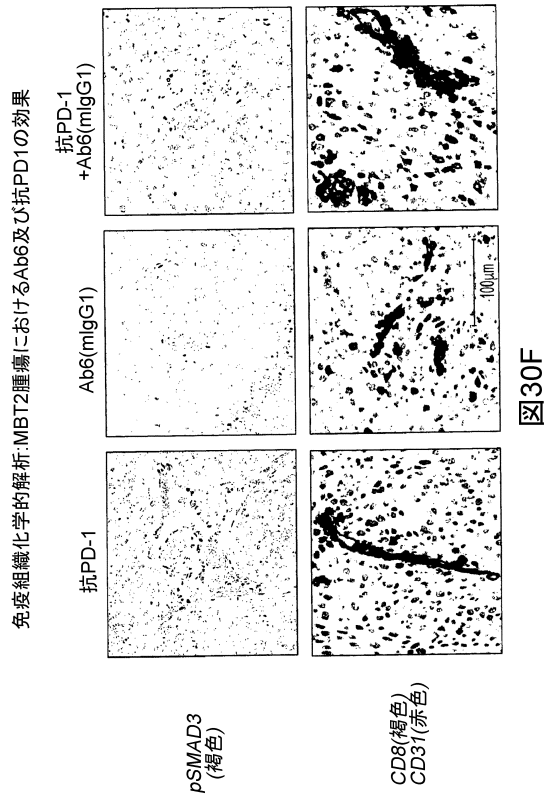


図30F

【図３０Ｇ】

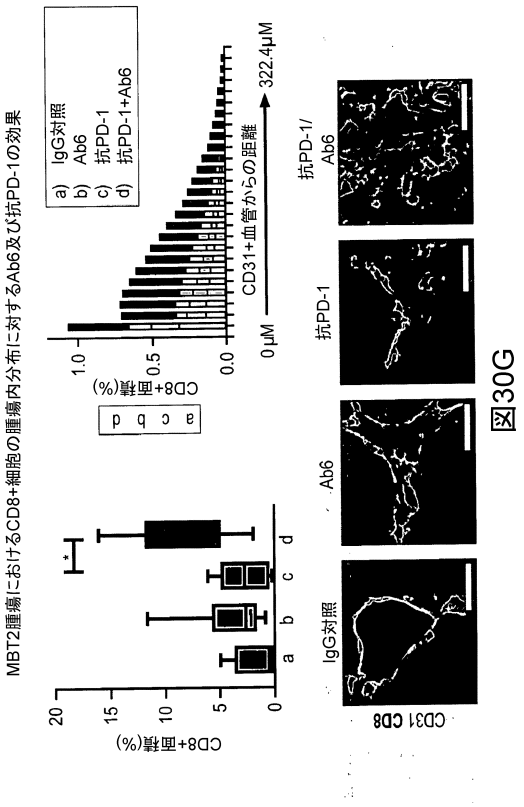


図30G

【図３１Ａ－３１Ｂ】

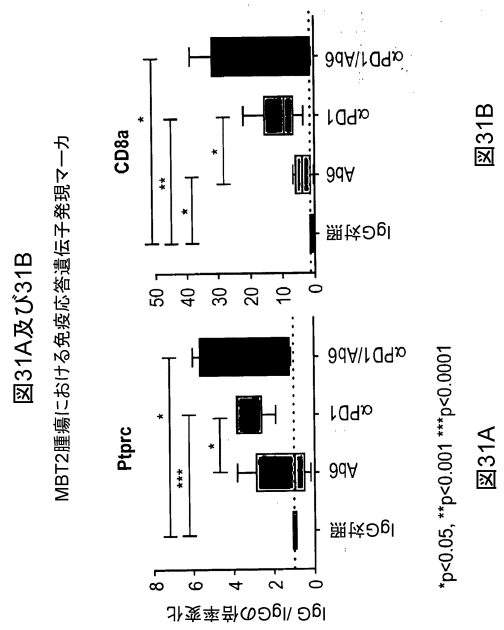


図31A

図31B

【図３１Ｃ－３１Ｄ】

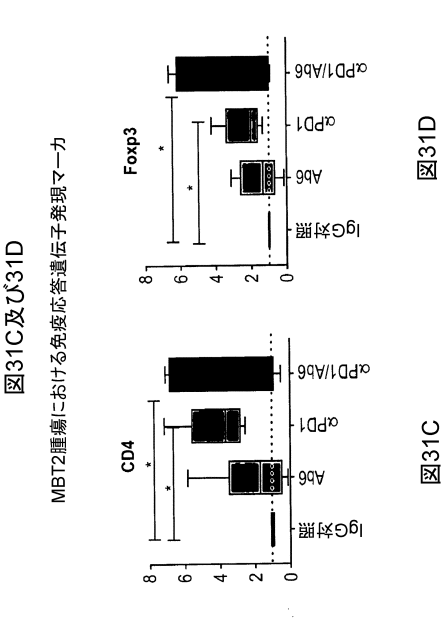


図31C

図31D

【図３２Ａ－３２Ｃ】

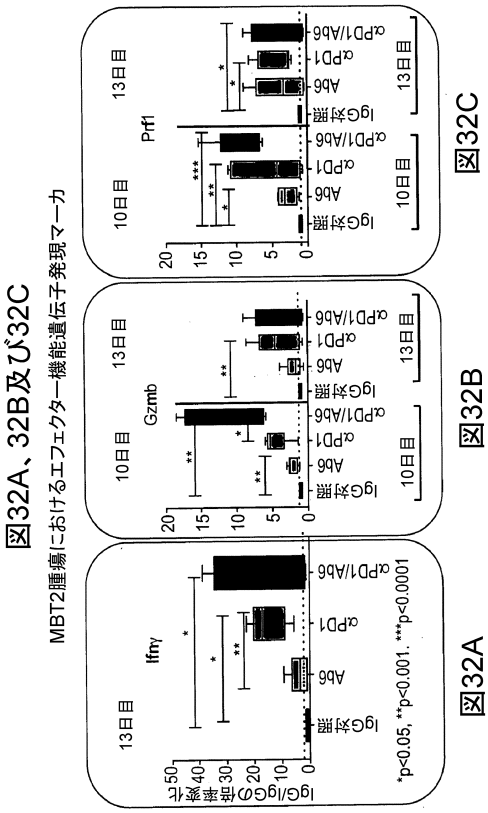
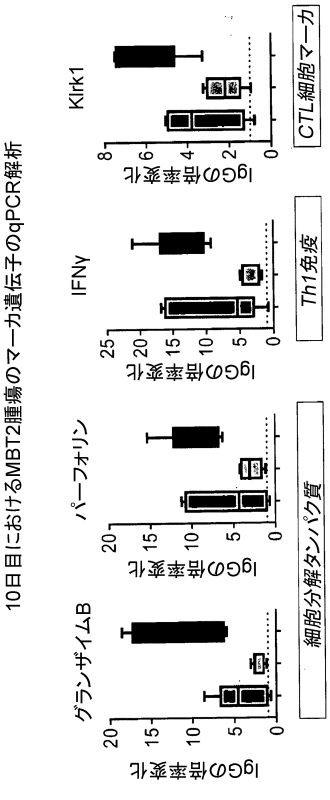


図32A

図32B

図32C

【図３２Ｄ】



・各パネルの左側のバー(赤):抗PD-1単独
・各パネルの中央のバー(オレンジ):Ab6 mIgG1単独
・各パネルの右側のバー(青):抗PD-1+Ab6 mIgG1

図32D

【図３３Ａ】

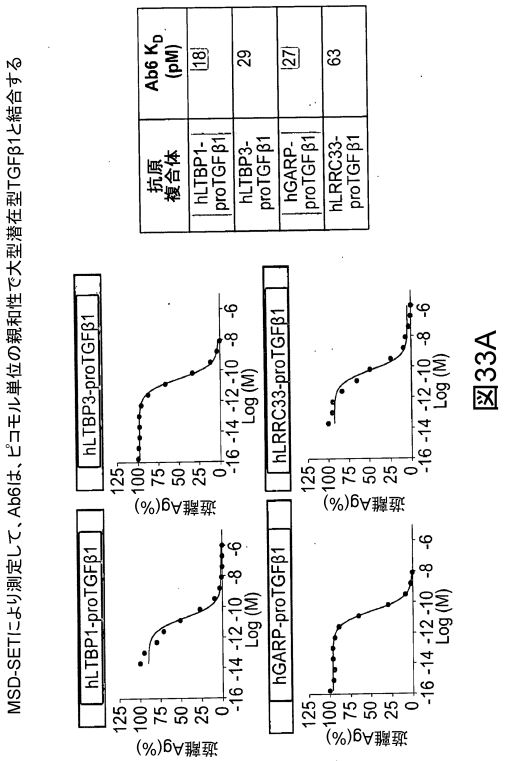


図33A

【図３３Ｂ】

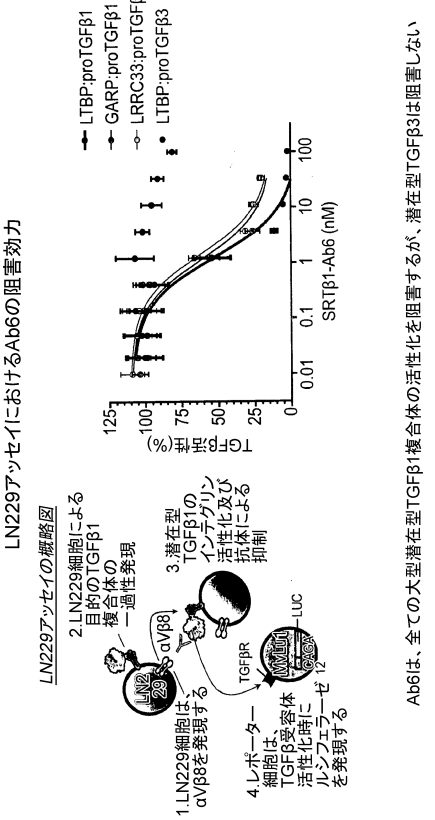


図33B

Ab6は、全ての大型潜在型TGFβ1複合体の活性化を阻害するが、潜在型TGFβ3は阻害しない

【図３３Ｃ】

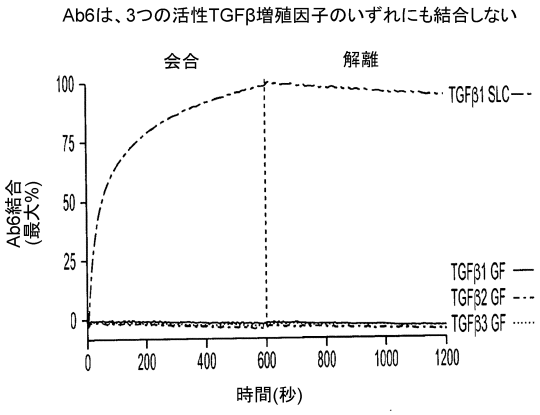


図33C

【図３４Ａ】

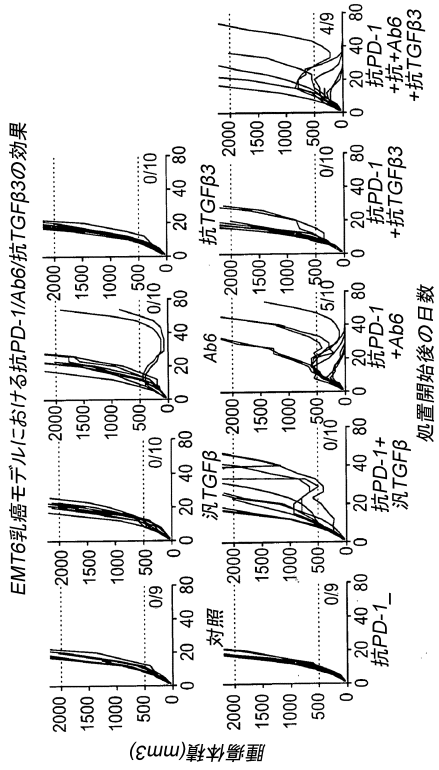


図34A

【図３４Ｂ】

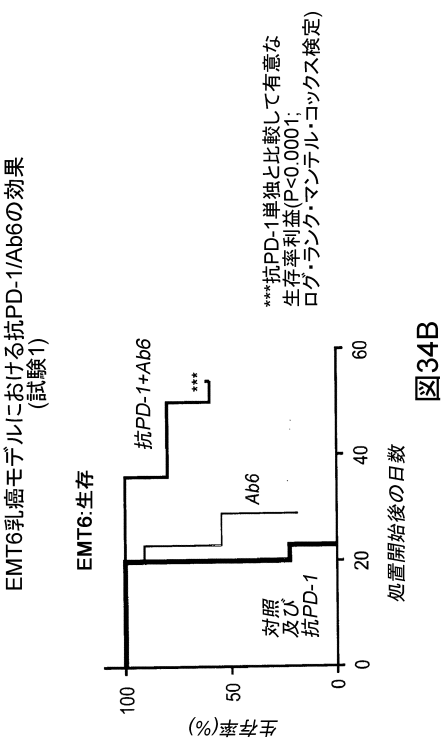


図34B

【図３４Ｃ】

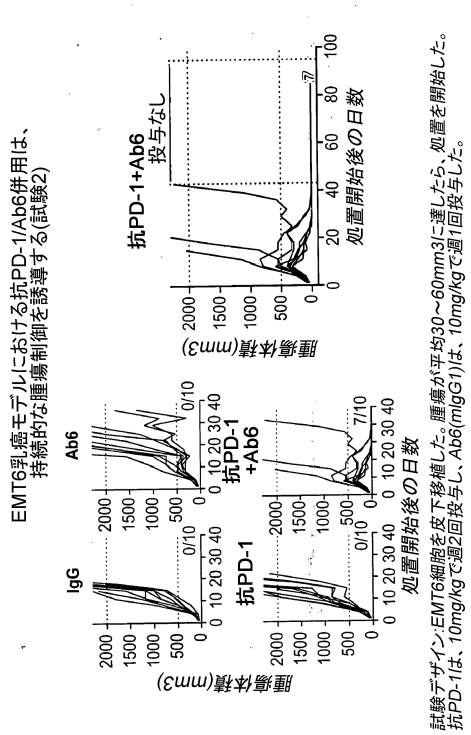


図34C

【図３４Ｄ】

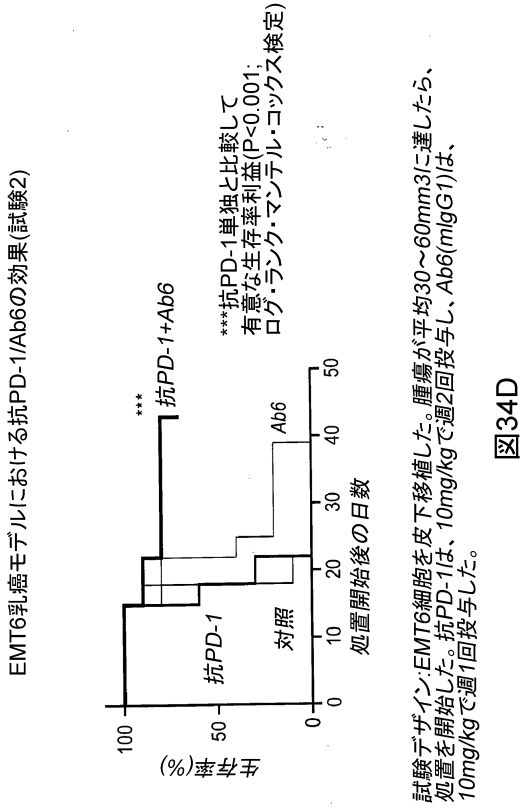


図34D

【図３４Ｅ】

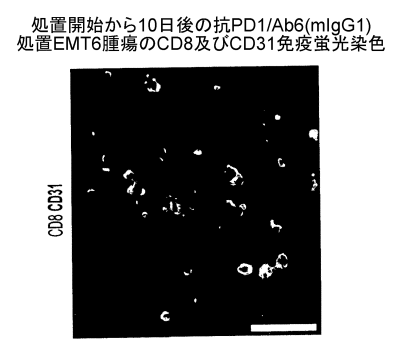


図34E

【図３４Ｆ】

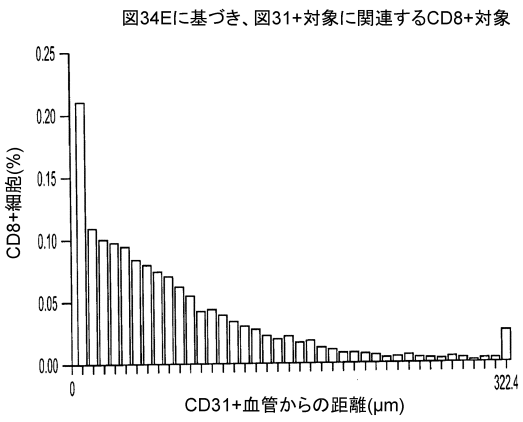


図34F

【図３５】

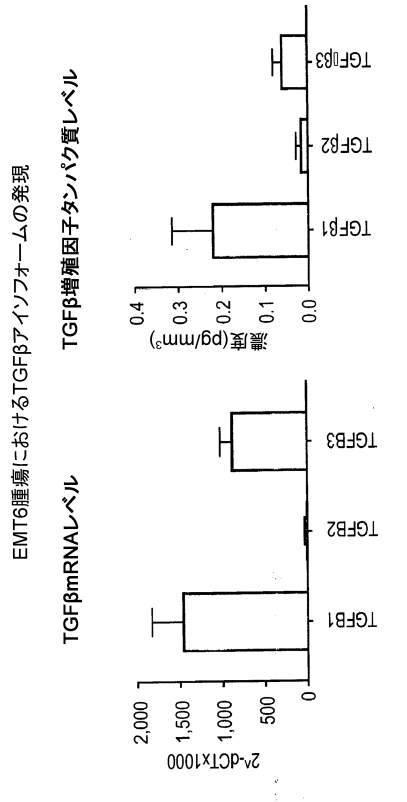


図35

【図３６Ａ】

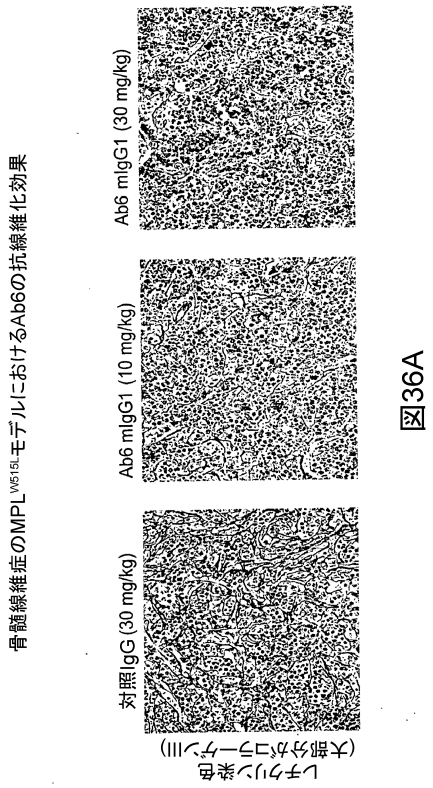


図36A

【図３６Ｂ】

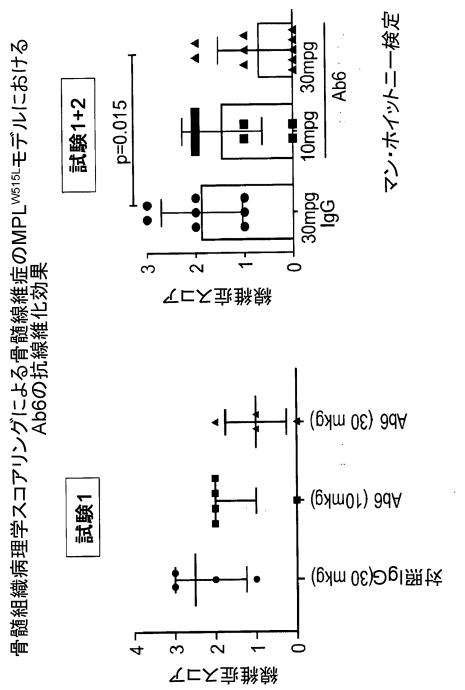


図36B

【図３６Ｃ】

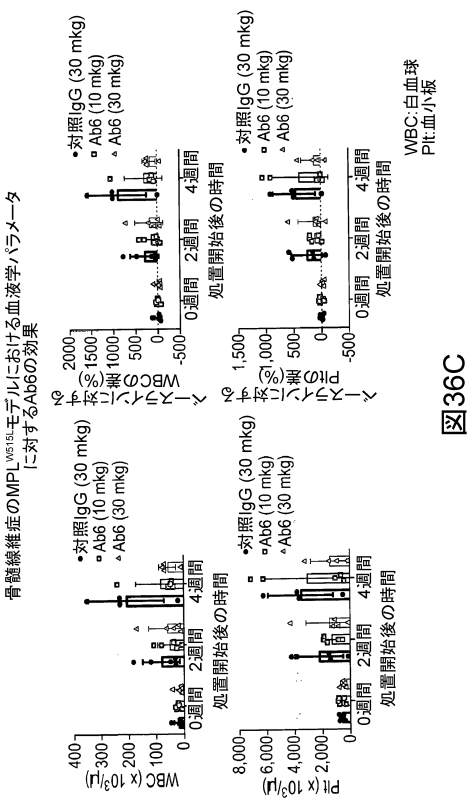


図36C

【図３６Ｄ】

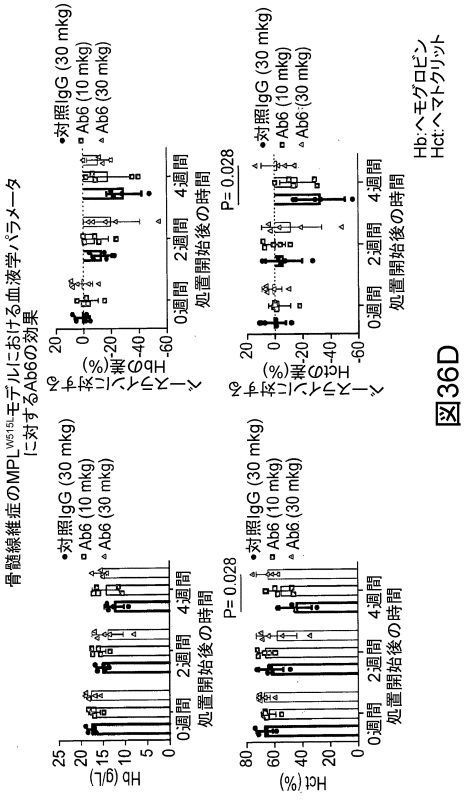


図36D

【図３７Ａ】

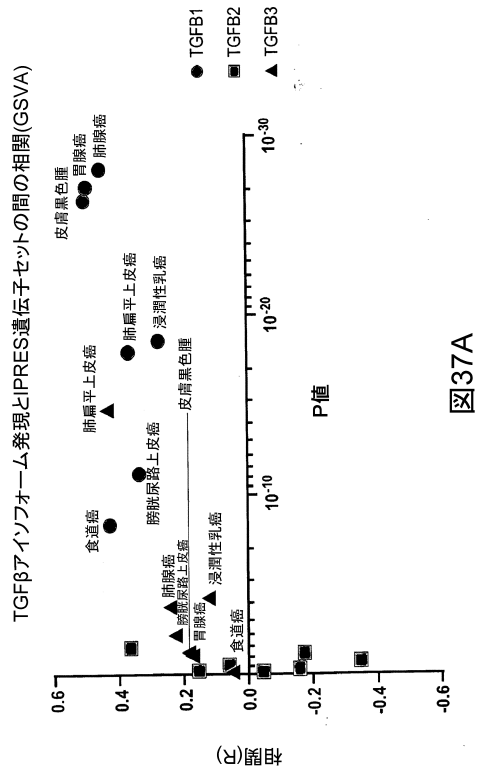


図37A

【図３７Ｂ】

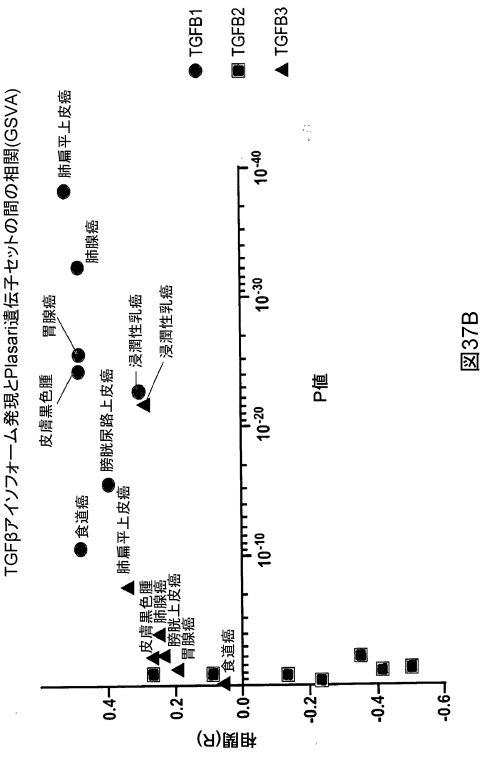


図37B

【図３８Ａ】

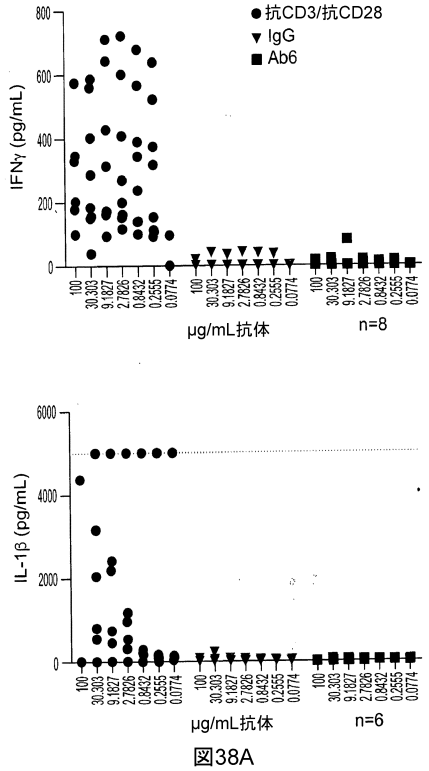


図38A

【図３８Ａ－ＣＯＮＴ－１】

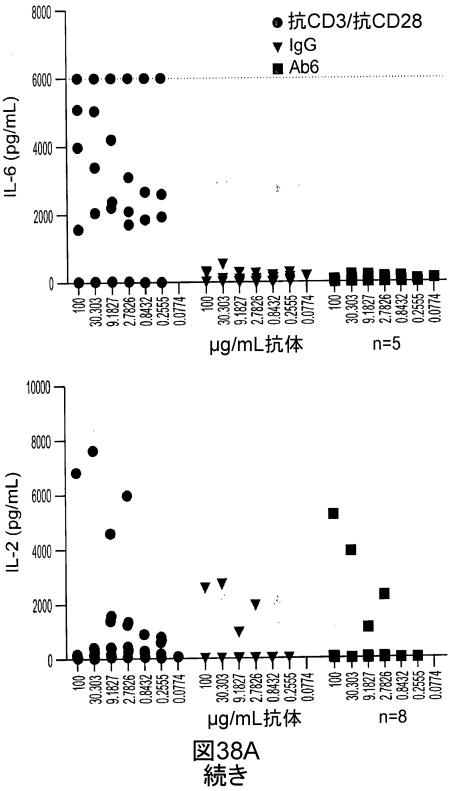


図38A
続き

【図３８Ａ－ＣＯＮＴ－２】

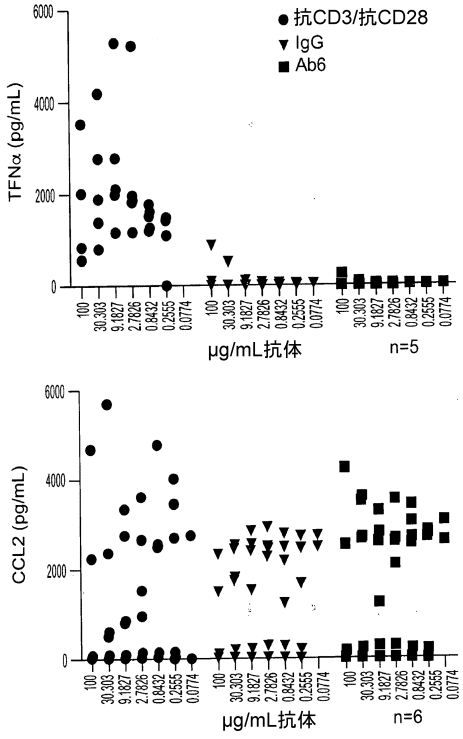


図38A
続き

【図３８Ｂ】

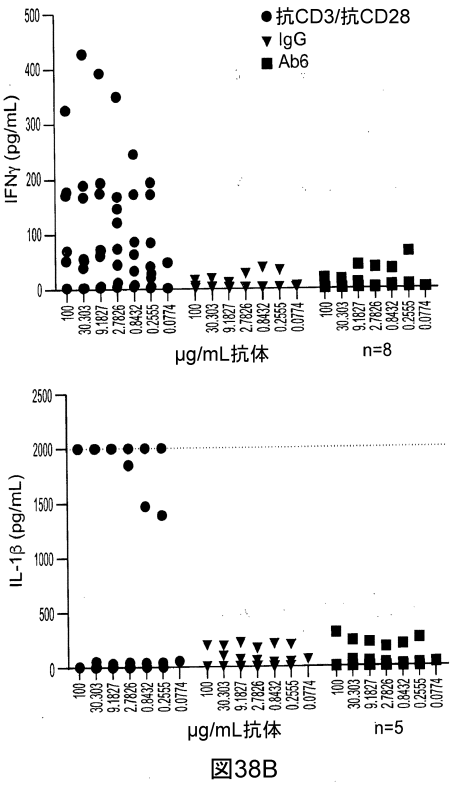


図38B

【図３８Ｂ－ＣＯＮＴ－１】

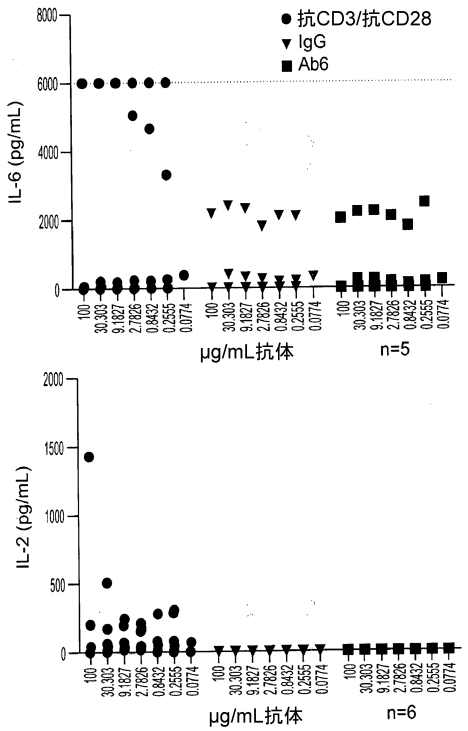


図38B
続き

【図３８Ｂ－ＣＯＮＴ－２】

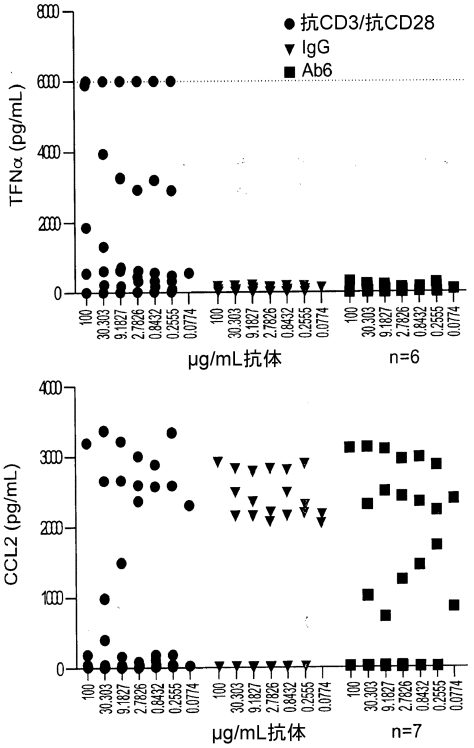


図38B
続き

【図３９Ａ】

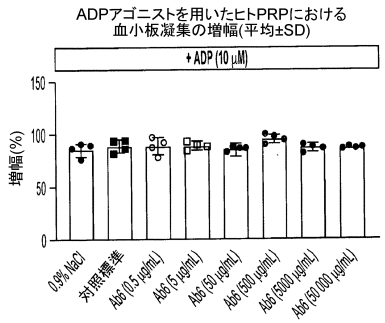


図39A

【図３９Ｂ】

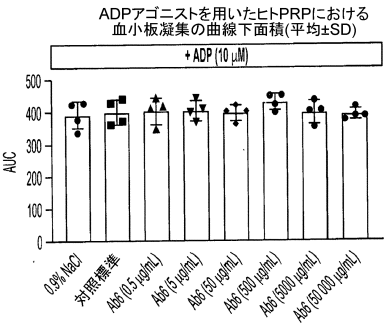


図39B

【図４０】

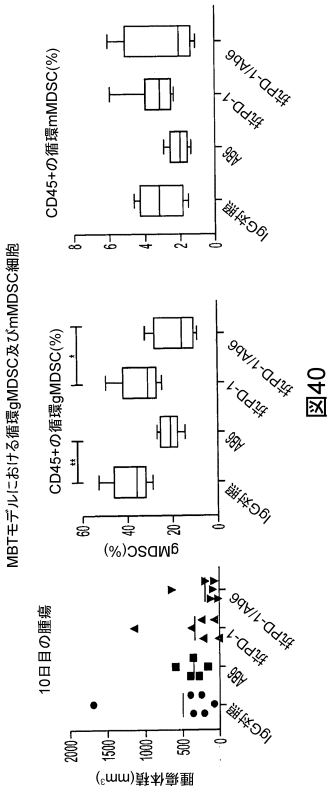


図40

【図４１】

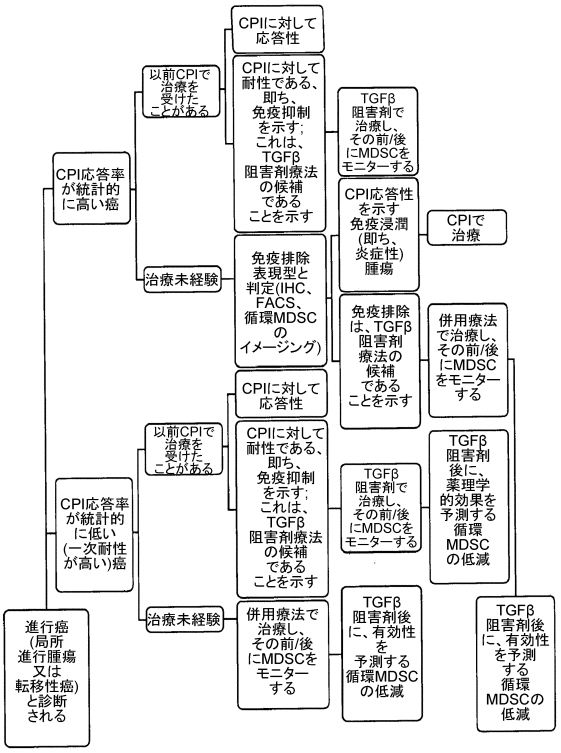


図41

【図４２】

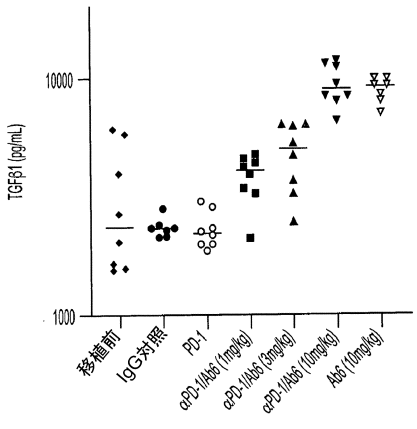


図42

【図４３Ａ】

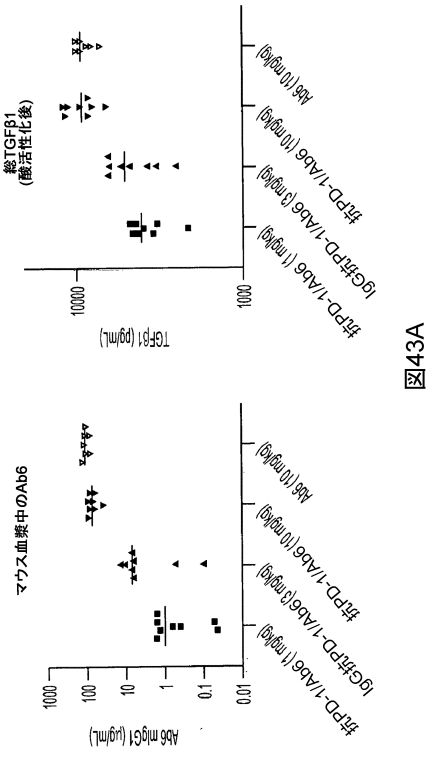


図43A

【図４３Ｂ】

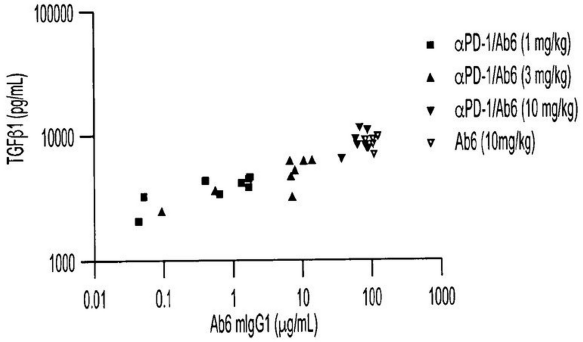


FIG. 43B

【図４４Ａ】

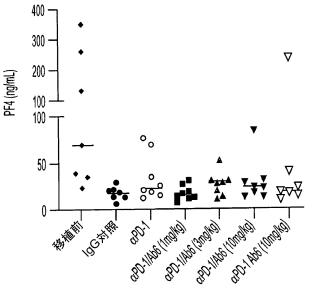


図44A

【図４４Ｂ】

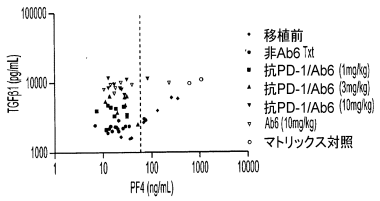


図44B

【図４４Ｃ】

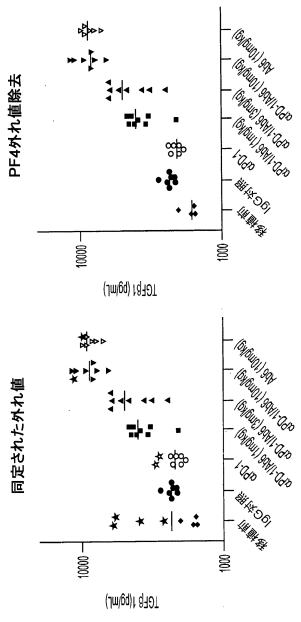


図44C

【図４５Ａ】

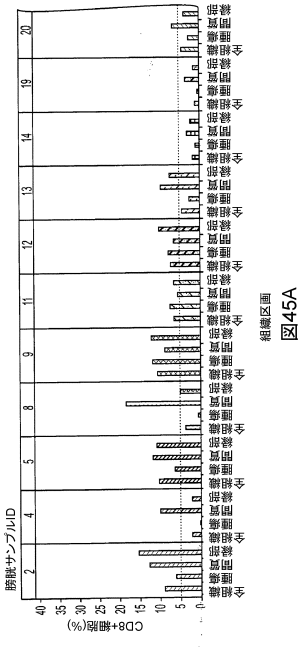


図45A

【図４５Ａ－ＣＯＮＴ】

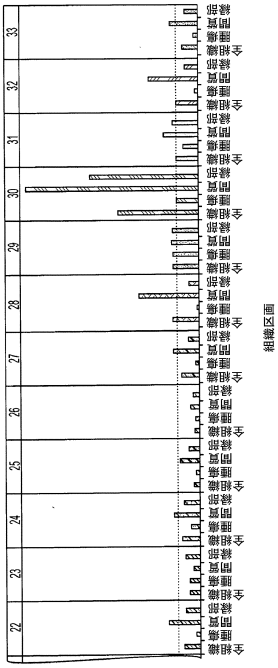


図45A
続き

【図４５Ｂ】

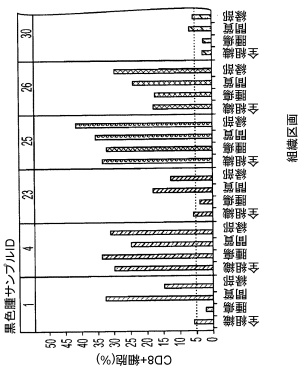


図45B

【図４５Ｂ－ＣＯＮＴ】

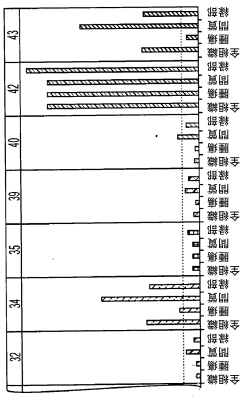


図45B
続き

【図４６Ａ】

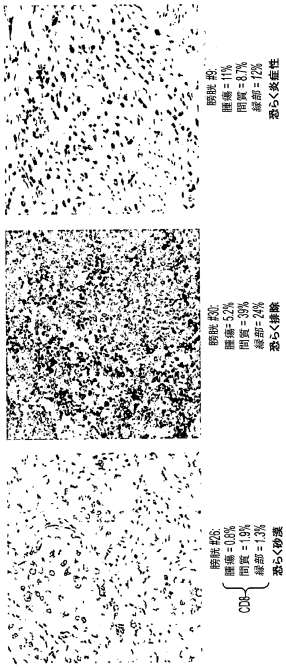


図46A

【図４６Ｂ】

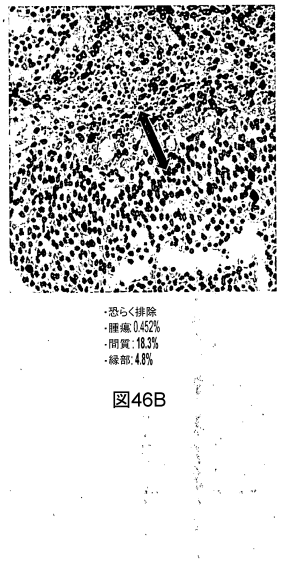


図46B

【図４６Ｃ】

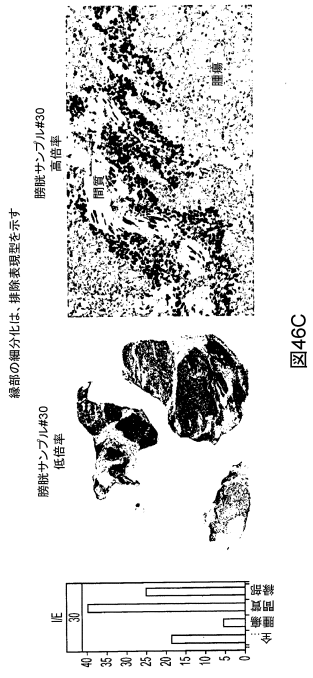


図46C

【図４７】

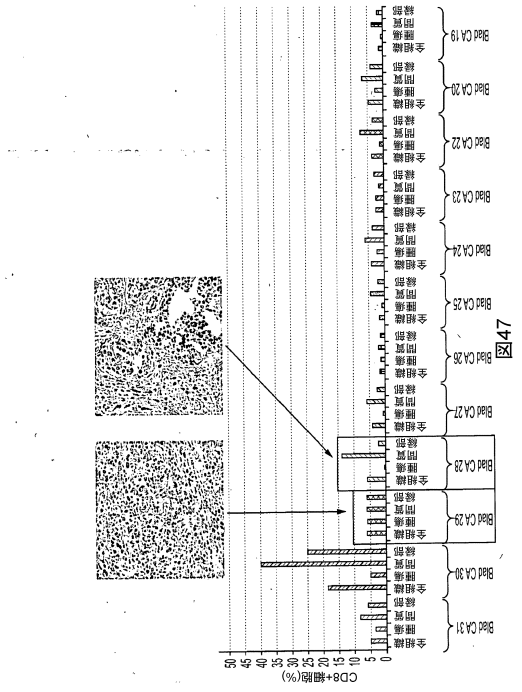


図47

【図４８】

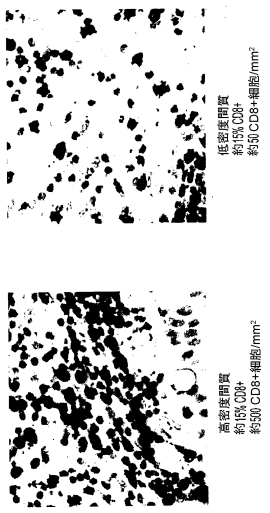


図48

【図４９】

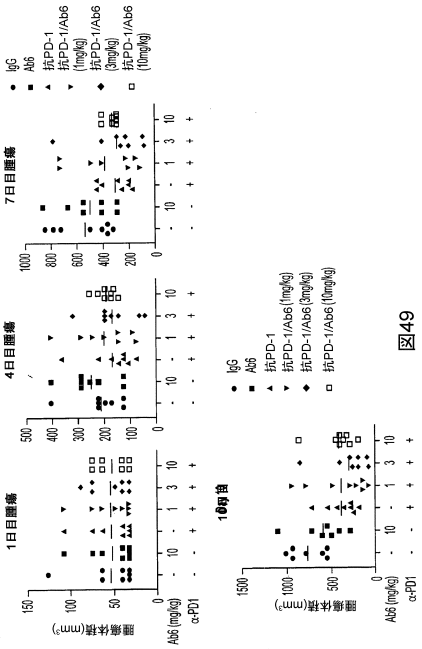


図49

【図５０】

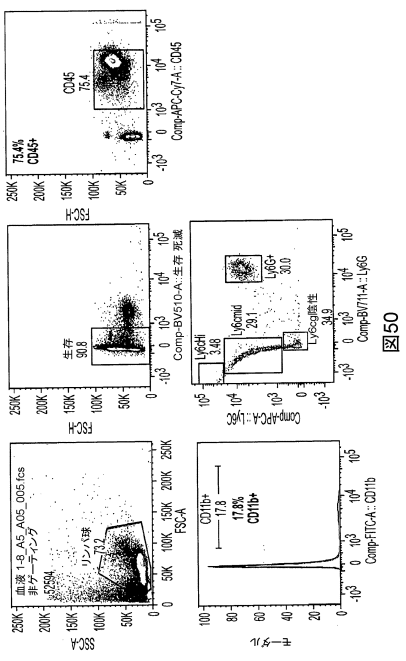


図50

【図５１】

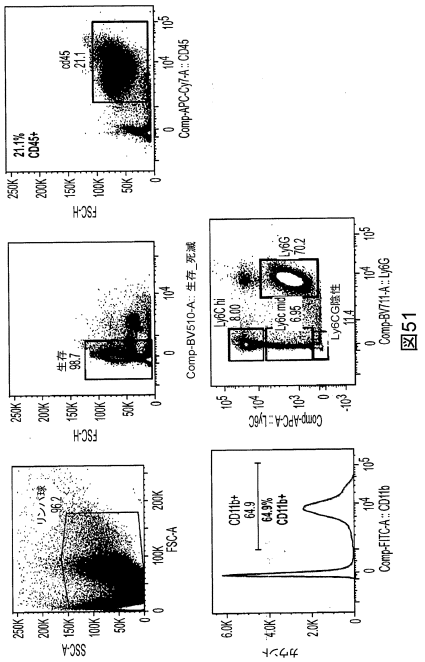


図51

【図５２】

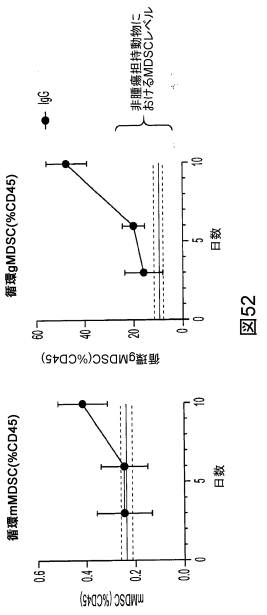


図52

【図５３Ａ】

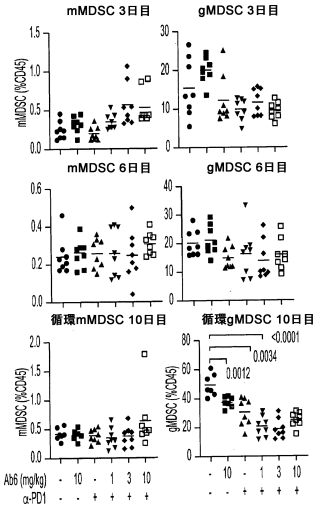


図53A

【図５３Ｂ】

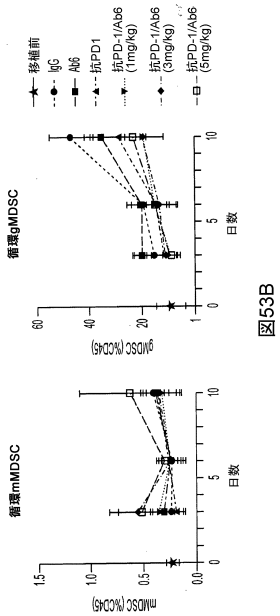


図53B

【図５４】

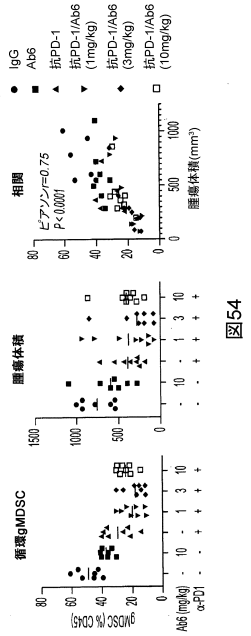


図54

【図５５】

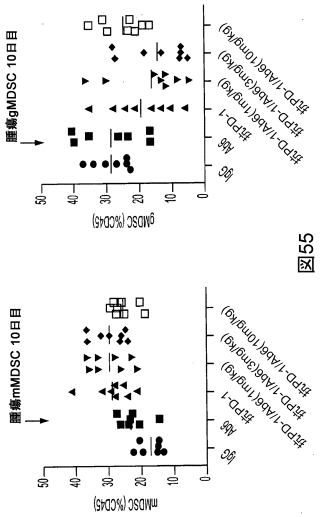


図55

【図５６】

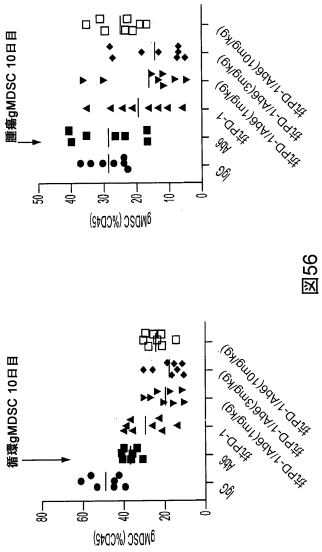


図56

【図５７】

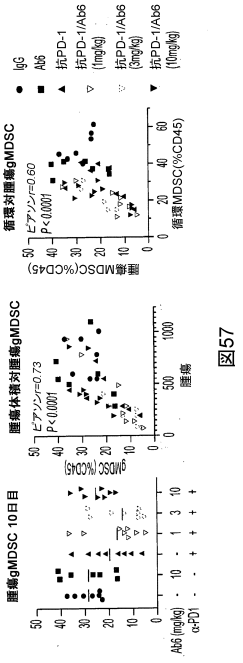


図57

【図５８】

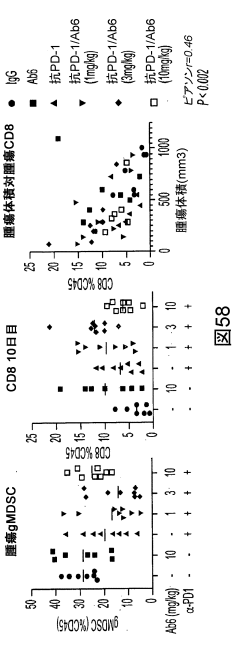


図58

【図５９】

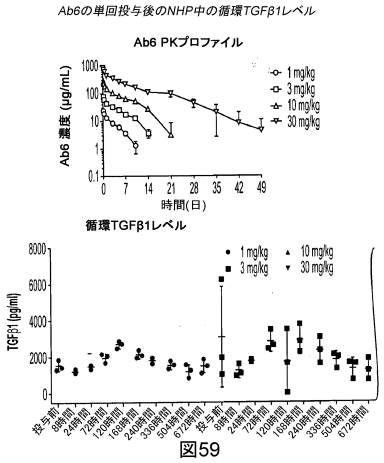


図59

【図５９－ＣＯＮＴ】

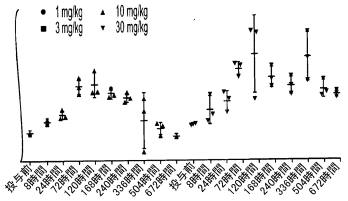


図59
続き

【図６０】

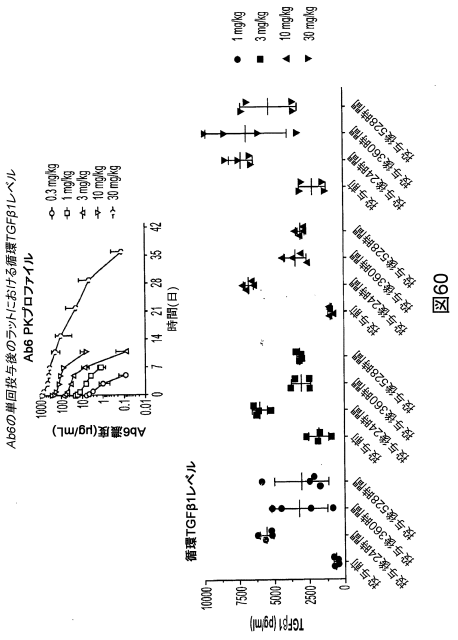
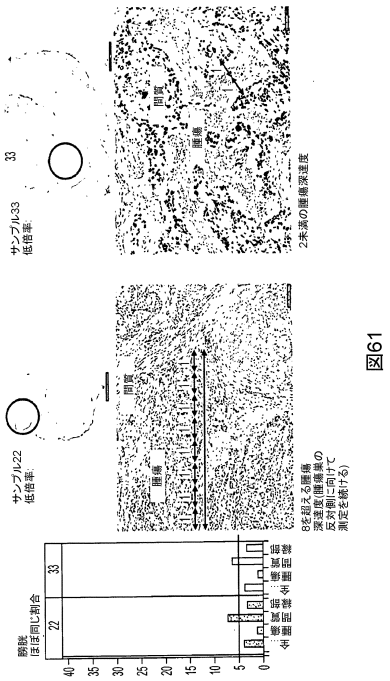


図60

【図６１】


サンプル33
低倍率
サンプル22
低倍率
間質
腫瘍
2本鎖の腫瘍深達度
β2を超える腫瘍
(反応細胞間隔が広くて
測定を続ける)
腫瘍
間質
腫瘍
間質
腫瘍
間質

【図６２】

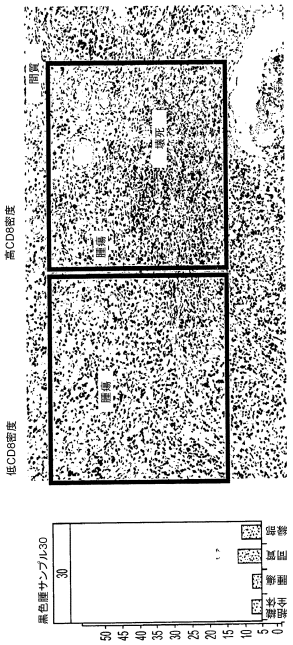


図62

【図６３】

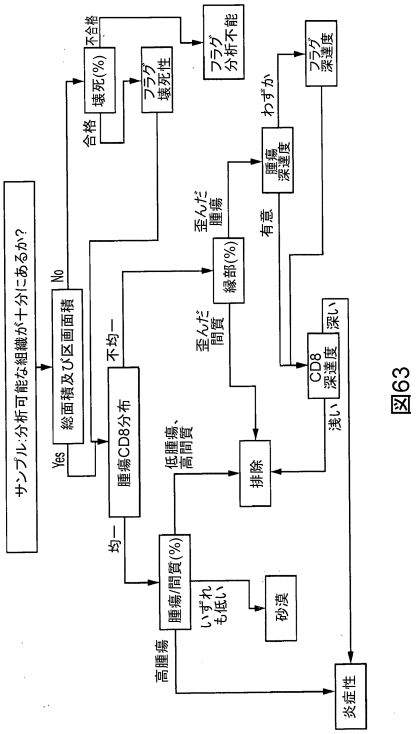


図63

【図６４】

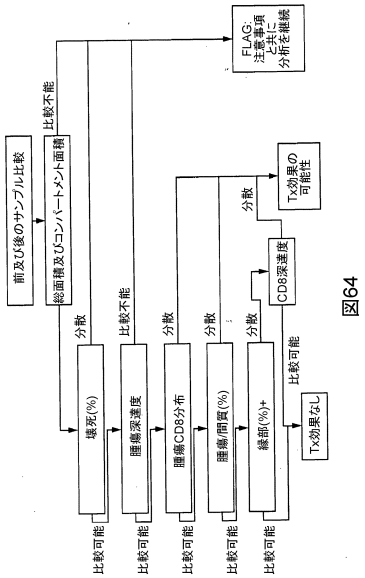
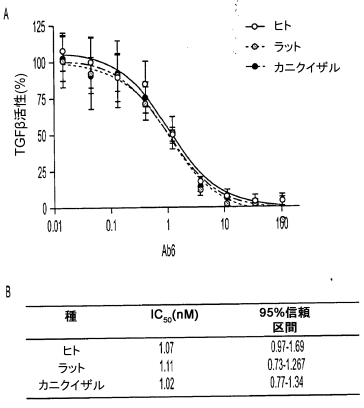


図64

【図６５】



B

種	IC_{50}(nM)	95%信頼区間
ヒト	1.07	0.97-1.69
ラット	1.11	0.73-1.267
カニクイザル	1.02	0.77-1.34

図65

【図６６】

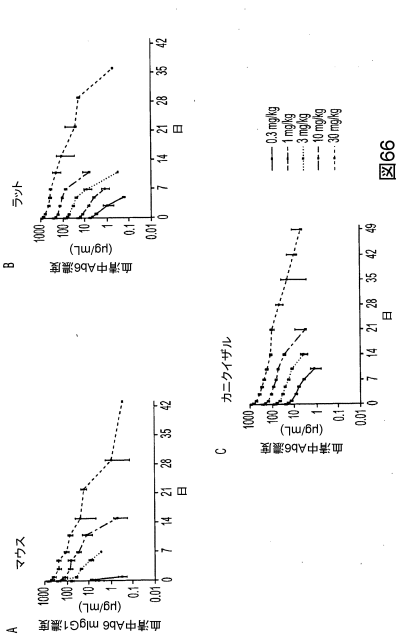


図66

【図６７】

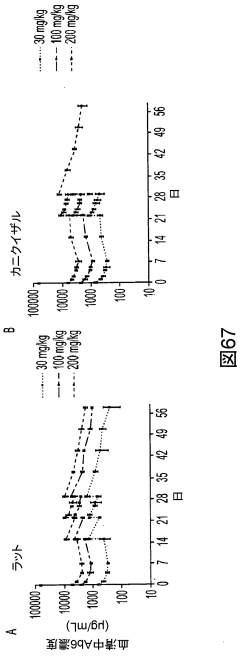


図67

【図６８】

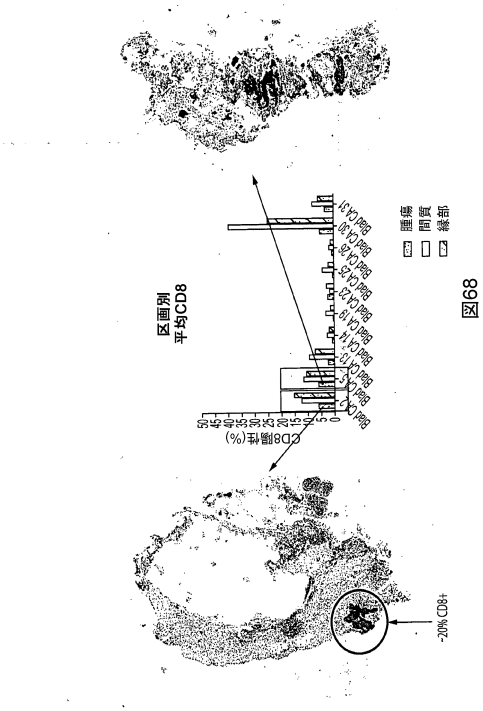


図68

【図６９】

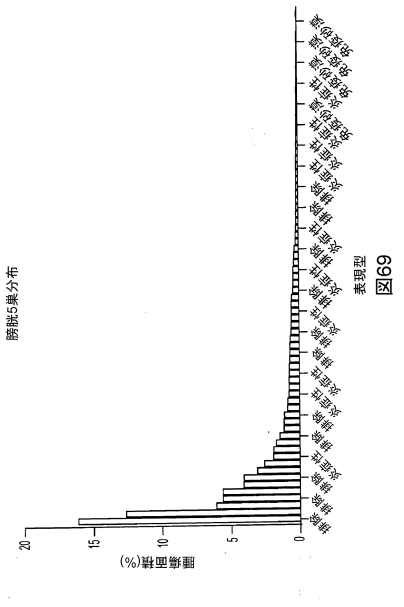


図69

【図６９－ＣＯＮＴ－１】

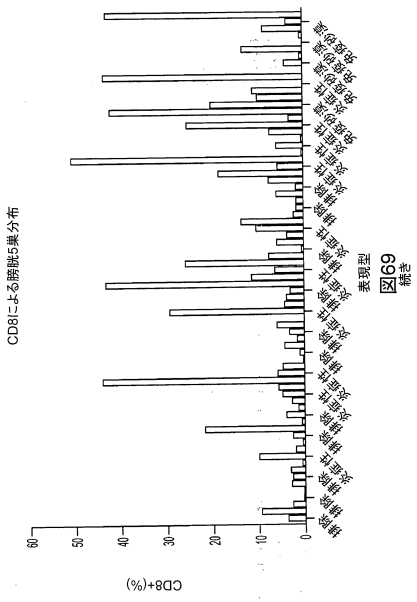


図69
続き

【図６９－ＣＯＮＴ－２】

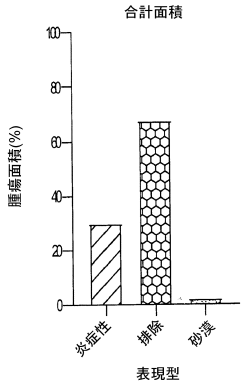


図69 続き

【図７０Ａ】

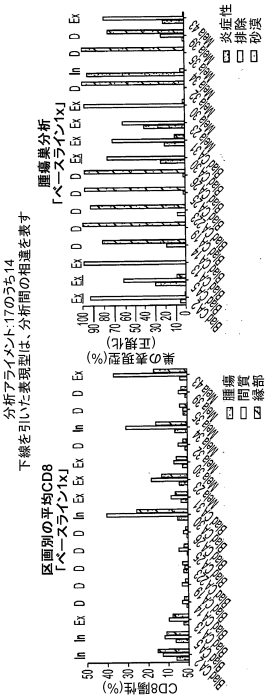
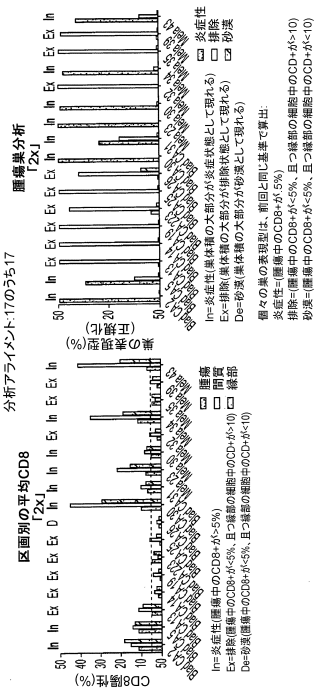


図70A

【図７０Ｂ】



下線を引いた表現型は、分析間の相違を表す

図70B

【配列表】
20235112550000001.app

【手続補正書】
【提出日】令和5年1月25日(2023.1.25)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象における癌の治療に使用するための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、
前記治療は、
ｉ）前記対象から得られた腫瘍組織サンプルからの間質区画、腫瘍区画及び辺縁区画中のＣＤ８陽性細胞のレベルを測定することと；ＣＤ８陽性細胞の前記レベルが前記腫瘍区画に対して前記辺縁区画において少なくとも５％高い場合、
ｉｉ）前記ＴＧＦβ阻害剤を免疫チェックポイント阻害剤と共に前記対象に投与すること、を含み、
前記辺縁区画は、前記腫瘍区画と前記間質区画の間の境界をいずれかの方向に１０～１００μｍ取り囲む領域を含む、
医薬組成物。
【請求項２】
請求項１に記載の使用のための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、
前記治療のステップｉｉ）が、前記のＣＤ８陽性細胞のレベルが前記腫瘍区画に対して前記間質区画及び前記辺縁区画において少なくとも５％高い場合に実施される、
医薬組成物。
【請求項３】
請求項１又は２に記載の使用のための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、
前記治療のステップｉｉ）が、前記腫瘍サンプルが前記腫瘍区画において５％未満のＣＤ８陽性細胞を含み、前記辺縁区画及び／又は前記間質区画において１０％より多くのＣＤ８陽性細胞を含む場合に実施される、
医薬組成物。
【請求項４】
請求項１～３のいずれか一項に記載の使用のための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、
前記辺縁区画は、前記腫瘍区画と前記間質区画の間の境界をいずれかの方向に２５μｍ取り囲む領域を含む、
医薬組成物。
【請求項５】
対象における癌の治療に使用するための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、前記治療は、
ｉ）前記対象から得られた腫瘍組織サンプルからの少なくとも１つの腫瘍巣中のＣＤ８陽性細胞のレベルを測定することと；測定されたサンプル領域の５０％超が、腫瘍巣の内部の５％未満のＣＤ８＋細胞及び前記腫瘍巣の外部の５％超のＣＤ８＋細胞を含む腫瘍巣を含む場合、
ｉｉ）前記ＴＧＦβ阻害剤を免疫チェックポイント阻害剤と共に前記対象に投与すること、
を含む、
医薬組成物。
【請求項６】
請求項１～５のいずれか一項に記載の使用のための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、前記治療は、

前記対象から採取された血液サンプル（例えば、全血又は血液成分）からの循環骨髄由来抑制細胞（ＭＤＳＣ）レベルを測定することと、ＴＧＦβ阻害剤療法を前記対象に投与することとをさらに含み、

ａ）前記治療前の測定における、健常な対象における循環ＭＤＳＣレベルより少なくとも２倍高い上昇したレベルの循環ＭＤＳＣは、前記対象が、前記ＴＧＦβ阻害剤療法から利益を得る可能性が高いことを示し；及び／又は

ｂ）前記ＴＧＦβ阻害剤治療後の低下したレベルの循環ＭＤＳＣは、前記対象における治療反応を示し、

前記循環ＭＤＳＣは、以下のマーカー：ＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１４、ＣＤ１５、ＬＯＸ－１、ＣＤ６６ｂ及びＨＬＡ－ＤＲ$^{lo/-}$、の１つ以上を発現することを特徴とする、

医薬組成物。

【請求項７】

請求項６に記載の使用のための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、

前記循環ＭＤＳＣは、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ１５、ＬＯＸ－１、ＣＤ６６ｂ及びＨＬＡ－ＤＲ$^{lo/-}$の１つ以上を発現する顆粒球ＭＤＳＣ（Ｇ－ＭＤＳＣ）である、

医薬組成物。

【請求項８】

請求項１～７のいずれか一項に記載の使用のための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、

前記免疫チェックポイント阻害剤が、ＰＤ－１抗体、ＰＤ－Ｌ１抗体又はＣＴＬＡ－４抗体である、

医薬組成物。

【請求項９】

請求項１～８のいずれか一項に記載の使用のための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、

前記免疫チェックポイント阻害剤が、ＰＤ－１抗体又はＰＤ－Ｌ１抗体である、

医薬組成物。

【請求項１０】

請求項１～９のいずれか一項に記載の使用のための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、

前記治療は、前記ＴＧＦβ阻害剤の投与前及び後、前記対象における循環潜在型ＴＧＦβレベルを測定することをさらに含み、前記循環潜在型ＴＧＦβレベルは、前記対象から得られた血液サンプル（例えば、全血又は血液成分）中で測定され、前記投与前の循環潜在型ＴＧＦβレベルと比較した前記投与後の循環潜在型ＴＧＦβレベルの増加（例えば、少なくとも１倍、少なくとも１．２倍、少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍又はそれを超える増加）は、治療効果を示し、任意選択で、前記治療は、循環潜在型ＴＧＦβレベルが増加される場合に継続される、

医薬組成物。

【請求項１１】

請求項１～１０のいずれか一項に記載の使用のための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、

前記癌は、固形腫瘍を含み、任意選択で、前記固形腫瘍は、黒色腫（例えば、転移性黒色腫）、腎細胞癌、トリプルネガティブ乳癌、ＨＥＲ２陽性乳癌、結腸直腸癌（例えば、マイクロサテライト安定性結腸直腸癌）、肺癌（例えば、転移性非小細胞肺癌、小細胞肺癌）、食道癌、膵臓癌、膀胱癌、腎臓癌、子宮癌、前立腺癌、胃癌（例えば、胃癌）、頭頸部扁平上皮細胞癌、尿路上皮癌、肝細胞癌又は甲状腺癌から選択される、

医薬組成物。

【請求項１２】

請求項１～１０のいずれか一項に記載の使用のための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物

であって、
前記癌は、骨髄増殖性疾患であり、前記骨髄増殖性疾患は、任意選択で、原発性骨髄線維症である、
医薬組成物。
【請求項１３】
請求項１～１２のいずれか一項に記載の使用のための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、
前記ＴＧＦβ阻害剤は、免疫療法、化学療法、放射線療法、組み換え免疫細胞療法（例えば、ＣＡＲ－Ｔ療法）、癌ワクチン療法及び／又は腫瘍溶解性ウイルス療法から選択される少なくとも１つのさらなる療法と併用される、
医薬組成物。
【請求項１４】
請求項１～１３のいずれか一項に記載の使用のための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、
前記ＴＧＦβ阻害剤は、ＰＤ－１アンタゴニスト（例えば、ＰＤ－１抗体）、ＰＤＬ１アンタゴニスト（例えば、ＰＤＬ１抗体）、ＰＤ－Ｌ１若しくはＰＤＬ２融合タンパク質、ＣＴＬＡ４アンタゴニスト（例えば、ＣＴＬＡ４抗体）、ＧＩＴＲアゴニスト、例えばＧＩＴＲ抗体）、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（ＯＸ４０アゴニスト）、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、抗ＣＤ３抗体、抗ＰＤ－１／抗ＰＤＬ１二重特異性若しくは多重特異性抗体、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２０二重特異性若しくは多重特異性抗体、抗ＨＥＲ２抗体、抗ＣＤ７９ｂ抗体、抗ＣＤ４７抗体、Ｔ細胞免疫グロブリン及びＩＴＩＭドメインタンパク質（ＴＩＧＩＴ）に結合する抗体、抗ＳＴ２抗体、抗β７インテグリン（例えば、抗α４－β７インテグリン及び／若しくはαＥβ７インテグリン）、ＣＤＫ阻害剤、腫瘍溶解性ウイルス、インドールアミン２，３－ジオキシゲナーゼ（ＩＤＯ）阻害剤並びに／又はＰＡＲＰ阻害剤から選択される少なくとも１つのさらなる療法と併用される、
医薬組成物。
【請求項１５】
請求項１～１４のいずれか一項に記載の使用のための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、
前記ＴＧＦβ阻害剤がＴＧＦβ１選択的阻害剤であり、任意選択で、前記ＴＧＦβ１選択的阻害剤は、成熟ＴＧＦβ１に結合する中和抗体又はｐｒｏＴＧＦβ１に結合する活性化阻害剤である、
医薬組成物。
【請求項１６】
請求項１５に記載の使用のための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、
前記ＴＧＦβ１選択的阻害剤が、
（ａ）ＩＭＴＧ付番方式によって定義される、配列番号１（Ｈ－ＣＤＲ１）、配列番号２（Ｈ－ＣＤＲ２）及び配列番号３（Ｈ－ＣＤＲ３）のアミノ酸配列を含む３つの重鎖相補性決定領域、並びに、配列番号４（Ｌ－ＣＤＲ１）、配列番号５（Ｌ－ＣＤＲ２）及び配列番号６（Ｌ－ＣＤＲ３）のアミノ酸配列を含む３つの軽鎖相補性決定領域、を含む、モノクローナル抗体；
（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、モノクローナル抗体；及び／又は、
（ｃ）配列番号９のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号１１のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、モノクローナル抗体；
である、
医薬組成物。
【請求項１７】

請求項１５に記載の使用のための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、
前記ＴＧＦβ１選択的阻害剤が、配列番号７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体と結合について競合する、及び／又は、同じエピトープに結合する、抗体若しくはその抗原結合断片であって、
前記の同じエピトープに結合する抗体若しくはその抗原結合断片は、前記抗体のエピトープが領域１（配列番号１４２）、領域２（配列番号１３８）及び／又は領域３（配列番号１４１）の１又は複数のアミノ酸残基を含むように、ｐｒｏＴＧＦβ１複合体に結合する、
医薬組成物。
【請求項１８】
請求項１～１４のいずれか一項に記載の使用のための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、前記ＴＧＦβ阻害剤がＴＧＦβ１／３阻害剤である、
医薬組成物。
【請求項１９】
請求項１～１４のいずれか一項に記載の使用のための、ＴＧＦβ阻害剤を含む医薬組成物であって、前記ＴＧＦβ阻害剤がＴＧＦβ１／２阻害剤である、
医薬組成物。
【請求項２０】
ヒト対象における癌の治療に使用するための、免疫チェックポイント阻害剤を含む医薬組成物であって、前記治療は、
（ｉ）前記対象から得られた腫瘍組織サンプルからの間質区画、腫瘍区画及び辺縁区画中のＣＤ８陽性細胞のレベルを測定すること；及び前記ＣＤ８陽性細胞のレベルが前記腫瘍区画に対して前記辺縁区画において少なくとも５％高い場合、前記免疫チェックポイント阻害剤を前記対象に投与すること；
ここで、前記辺縁区画は、前記腫瘍区画と前記間質区画の間の境界をいずれかの方向に１０～１００μｍ取り囲む領域を含む、並びに／又は
（ｉｉ）前記対象から得られた腫瘍組織サンプルからの少なくとも１つの腫瘍巣中のＣＤ８陽性細胞のレベルを測定すること；及び測定されたサンプル領域の５０％超が、腫瘍巣の内部の５％未満のＣＤ８＋細胞及び前記腫瘍巣の外部の５％超のＣＤ８＋細胞を含む腫瘍巣を含む場合、前記免疫チェックポイント阻害剤を前記対象に投与すること、
を含む、
医薬組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/012969

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61P35/00 C07K16/22 A61K39/395 C07K16/28
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61P A61K C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2018/129329 A1 (SCHOLAR ROCK INC [US]) 12 July 2018 (2018-07-12) paragraph [0416] - paragraph [0427] paragraph [0054] - paragraph [0055] paragraph [0349] - paragraph [0391] paragraph [0084] paragraph [0282] paragraph [0358] paragraph [0368] - paragraph [0369] ----- -/--	5-8, 10-21 1-4, 9-14, 16-20

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 July 2021	06/08/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Irion, Andrea

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/012969

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/012969

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/012969

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2016/089950 A1 (BETH ISRAEL HOSPITAL [US]) 9 June 2016 (2016-06-09) page 2, line 8 - line 14 claim 1 page 3, line 18 - line 26 page 4, line 23 - line 31 claim 2 claim 7	1-4, 9-14, 16-20
Y	WO 2017/023749 A1 (TARVEDA THERAPEUTICS INC [US]) 9 February 2017 (2017-02-09) paragraph [0018] paragraph [0071] paragraph [0079] - paragraph [0083] paragraph [0090] paragraph [0097] paragraph [0100] paragraph [0352] claims 28, 29	1-4, 9-14, 16-20
Y	WO 2019/075090 A1 (TILOS THERAPEUTICS INC [US]) 18 April 2019 (2019-04-18) page 5, paragraph 4 page 3, paragraph 2 - page 4, paragraph 1 page 28, paragraph 1 page 65, paragraph 3 - paragraph 4	1-4, 9-14, 16-20
Y	GONZALEZ-JUNCA ALBA ET AL: "Autocrine TGF[beta] Is a Survival Factor for Monocytes and Drives Immunosuppressive Lineage Commitment", CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, vol. 7, no. 2, 1 February 2019 (2019-02-01), pages 306-320, XP055797854, US ISSN: 2326-6066, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0310 Retrieved from the Internet: URL:https://cancerimmunolres.aacrjournals.org/content/7/2/306.full-text.pdf> abstract page 306, right-hand column, paragraph 2 page 318, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1	1-4, 9-14, 16-20
X,P	WO 2020/014473 A1 (SCHOLAR ROCK INC [US]) 16 January 2020 (2020-01-16) the whole document	1-4, 9-14, 16-20

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/012969

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2020/014460 A1 (SCHOLAR ROCK INC [US]) 16 January 2020 (2020-01-16) the whole document -----	1-4, 9-14, 16-20
X	WO 2017/156500 A1 (SCHOLAR ROCK INC [US]) 14 September 2017 (2017-09-14) page 3, paragraph 1 page 4, paragraph 2 claims 4, 5 claim 43 claims 47, 48 page 13, paragraph 8 - page 14, paragraph 1 page 100, paragraph 3 example 7 -----	7,8, 11-18,20
X	SANJEEV MARIATHASAN ET AL: "TGF[beta] attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells", NATURE, vol. 554, no. 7693, 14 February 2018 (2018-02-14), pages 544-548, XP055545131, London ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature25501 abstract page 5, paragraph 2 -----	5,6, 11-14, 16,17,21

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

International Application No. PCT/ US2021/ 012969

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-4, 9(completely); 10-14, 16-20(partially)

A TGFbeta inhibitor for use in the treatment of cancer wherein the treatment comprises measuring circulating MDSC levels, and subject-matter related thereto

---

2. claims: 5, 6, 21(completely); 10-14, 16-20(partially)

A TGFbeta inhibitor (in conjunction with an immune checkpoint inhibitor) for use in the treatment of cancer in a subject, wherein the treatment comprises measuring levels of CD8-positive cells, and subject-matter related thereto.

---

3. claims: 7, 8(completely); 10-14, 16-20(partially)

A TGFbeta inhibitor for use in the treatment of cancer in a human subject, wherein the treatment comprises selecting a TGFbeta inhibitor according to properties a) to c) of claim 7 (based on absence of adverse effect), and subject-matter related thereto.

---

4. claims: 15(completely); 16-18, 20(partially)

A TGFbeta inhibitor which does not inhibit TGFbeta3 for use in the treatment of cancer in a subject, wherein the patient is defined by features i) to iii) according to claim 15.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/012969

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018129329 A1	12-07-2018	AU 2018205231 A1	18-07-2019
		BR 112019013908 A2	04-02-2020
		CA 3049005 A1	12-07-2018
		CL 2019001874 A1	06-12-2019
		CN 110382530 A	25-10-2019
		CO 2019007298 A2	31-07-2019
		CR 20190350 A	15-11-2019
		DO P2019000180 A	15-09-2019
		EP 3551658 A1	16-10-2019
		JP 2020503362 A	30-01-2020
		KR 20190098255 A	21-08-2019
		PE 20191661 A1	11-11-2019
		PH 12019501575 A1	04-11-2019
		US 2018207267 A1	26-07-2018
		US 2019209682 A1	11-07-2019
		WO 2018129329 A1	12-07-2018
WO 2016089950 A1	09-06-2016	US 2017362320 A1	21-12-2017
		WO 2016089950 A1	09-06-2016
WO 2017023749 A1	09-02-2017	AU 2016303485 A1	01-03-2018
		CA 2993478 A1	09-02-2017
		EP 3328363 A1	06-06-2018
		US 2018221508 A1	09-08-2018
		WO 2017023749 A1	09-02-2017
WO 2019075090 A1	18-04-2019	EP 3694552 A1	19-08-2020
		US 2019144549 A1	16-05-2019
		WO 2019075090 A1	18-04-2019
WO 2020014473 A1	16-01-2020	EP 3820896 A1	19-05-2021
		TW 202019957 A	01-06-2020
		WO 2020014473 A1	16-01-2020
WO 2020014460 A1	16-01-2020	AU 2019302679 A1	11-02-2021
		CA 3105988 A1	16-01-2020
		CN 112996535 A	18-06-2021
		CO 2021000419 A2	29-01-2021
		EP 3820508 A1	19-05-2021
		KR 20210058811 A	24-05-2021
		SG 11202013231S A	28-01-2021
		TW 202005981 A	01-02-2020
		US 2021122814 A1	29-04-2021
		WO 2020014460 A1	16-01-2020
WO 2017156500 A1	14-09-2017	AU 2017230103 A1	06-09-2018
		BR 112018068340 A2	15-01-2019
		CA 3055555 A1	14-09-2017
		CN 109071646 A	21-12-2018
		EA 201891909 A1	28-02-2019
		EP 3365368 A1	29-08-2018
		JP 2019509737 A	11-04-2019
		KR 20180122397 A	12-11-2018
		SG 11201807176X A	27-09-2018
		US 2019071493 A1	07-03-2019
		WO 2017156500 A1	14-09-2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
A61K	*35/768(2015.01)*	A61K	35/768		
A61K	*39/395(2006.01)*	A61K	39/395	G	
A61K	*47/68 (2017.01)*	A61K	39/395	U	
A61K	*38/17 (2006.01)*	A61K	39/395	E	
C07K	*16/24 (2006.01)*	A61K	39/395	T	
C12N	*15/13 (2006.01)*	A61K	47/68		
C07K	*16/28 (2006.01)*	A61K	38/17		
		A61K	39/395	D	
		C07K	16/24	ZNA	
		C12N	15/13		
		C07K	16/28		

(32)優先日 令和2年11月9日(2020.11.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/959,909
(32)優先日 令和2年1月11日(2020.1.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/981,083
(32)優先日 令和2年2月25日(2020.2.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

アメリカ合衆国 ０２１４２ マサチューセッツ州 ケンブリッジ ビニー・ストリート ３階 ３０１ スカラー ロック インコーポレイテッド内
(72)発明者 シュルフ トーマス
アメリカ合衆国 ０２１４２ マサチューセッツ州 ケンブリッジ ビニー・ストリート ３階 ３０１ スカラー ロック インコーポレイテッド内
(72)発明者 フォーゲル アダム
アメリカ合衆国 ０２１４２ マサチューセッツ州 ケンブリッジ ビニー・ストリート ３階 ３０１ スカラー ロック インコーポレイテッド内
(72)発明者 ブルックナー クリストファー
アメリカ合衆国 ０２１４２ マサチューセッツ州 ケンブリッジ ビニー・ストリート ３階 ３０１ スカラー ロック インコーポレイテッド内
(72)発明者 バックラー アラン
アメリカ合衆国 ０２１４２ マサチューセッツ州 ケンブリッジ ビニー・ストリート ３階 ３０１ スカラー ロック インコーポレイテッド内
(72)発明者 マーティン コンスタンス
アメリカ合衆国 ０２１４２ マサチューセッツ州 ケンブリッジ ビニー・ストリート ３階 ３０１ スカラー ロック インコーポレイテッド内
(72)発明者 リー―ヘフリッヒ シ ツアン
アメリカ合衆国 ０２１４２ マサチューセッツ州 ケンブリッジ ビニー・ストリート ３階 ３０１

スカラー ロック インコーポレイテッド内

Fターム（参考） 4C076 CC27 CC41 EE59
4C084 AA02 AA17 AA20 BA41 BA42 DC50 MA02 NA05 ZB021 ZB022
ZB091 ZB092 ZB261 ZC412 ZC751
4C085 AA13 AA14 AA16 BB01 BB12 BB17 EE03 GG02 GG04
4C087 AA01 BC83 MA02 NA05 ZB26 ZC75
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA28 FA74