(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-537234
(P2024-537234A)
(43)公表日　令和6年10月10日(2024.10.10)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 14/495 (2006.01)		C07K	14/495	ZNA	4B065
C12N 15/12 (2006.01)		C12N	15/12		4C084
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z	4H045
C07K 19/00 (2006.01)		C07K	19/00		
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全37頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-521130(P2024-521130)
(86)(22)出願日　令和4年10月11日(2022.10.11)
(85)翻訳文提出日　令和6年5月9日(2024.5.9)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/077879
(87)国際公開番号　WO2023/064747
(87)国際公開日　令和5年4月20日(2023.4.20)
(31)優先権主張番号　63/254,249
(32)優先日　令和3年10月11日(2021.10.11)
(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,
最終頁に続く

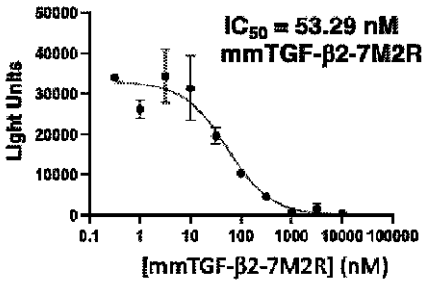
(71)出願人　504279968
ユニバーシティ オブ ピッツバーグ － オブ ザ コモンウェルス システム オブ ハイヤー エデュケイション
アメリカ合衆国 １５２６０ ペンシルバニア州，ピッツバーグ，サッカレイ アヴェニュー １３０，ガードナー スティール カンファレンス センター ファースト フロア
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　操作されたＴＧＦ－βモノマーおよび使用法

(57)【要約】
ダイマー化を防止し、ＴＧＦ－βシグナル伝達を遮断するように操作された組換えＴＧＦ－β２モノマーが記載される。上記操作されたモノマーは、ＴＧＦ－βＩ型レセプター（ＴβＲＩ）を結合および動員する能力を欠くが、高親和性ＴＧＦ－β　ＩＩ型レセプター（ＴβＲＩＩ）を結合する能力を保持する。上記ＴＧＦ－β２モノマーはまた、それらのＴβＲＩＩに対する親和性を増加させる、それらの凝集を低減する、および／またはそれらの折りたたみを改善するさらなる改変を含む。組換えＴＧＦ－β２モノマーをコードする核酸分子およびベクターがまた、記載される。

FIG. 6B



【特許請求の範囲】
【請求項１】
組換えトランスフォーミング成長因子（ＴＧＦ）－β２モノマーであって、
配列番号１の残基７７に相当するアミノ酸残基において、システインからセリンへの置換、またはシステインからアルギニンへの置換；
配列番号１のアミノ酸残基５２～７１に相当するα３ヘリックスの欠失；
配列番号１の残基２５に相当するアミノ酸残基において、リジンからアルギニンへの置換；
配列番号１の残基５１に相当するアミノ酸残基において、ロイシンからアルギニンへの置換；
配列番号１の残基７４に相当するアミノ酸残基において、アラニンからリジンへの置換；
配列番号１の残基９４に相当するアミノ酸残基において、リジンからアルギニンへの置換；
（ｉ）配列番号１の残基２６に相当するアミノ酸残基において、アルギニンからリジンへの置換；配列番号１の残基７９に相当するアミノ酸残基において、バリンからアルギニンへの置換；配列番号１の残基８９に相当するアミノ酸残基において、ロイシンからバリンへの置換；配列番号１の残基９２に相当するアミノ酸残基においてイソロイシンからバリンへの置換；配列番号１の残基９５に相当するアミノ酸残基においてスレオニンからリジンへの置換；および配列番号１の残基９８に相当するアミノ酸残基においてイソロイシンからバリンへの置換；
（ｉｉ）配列番号１の残基７に相当するアミノ酸残基においてシステインからバリンへの置換；および配列番号１の残基１６に相当するアミノ酸残基においてシステインからアラニンへの置換；または
（ｉｉｉ）配列番号１の残基７に相当するアミノ酸残基においてシステインからバリンへの置換；配列番号１の残基１６に相当するアミノ酸残基においてシステインからアラニンへの置換；配列番号１の残基２６に相当するアミノ酸残基においてアルギニンからリジンへの置換；配列番号１の残基７９に相当するアミノ酸残基においてバリンからアルギニンへの置換；配列番号１の残基８９に相当するアミノ酸残基においてロイシンからバリンへの置換；配列番号１の残基９２に相当するアミノ酸残基においてイソロイシンからバリンへの置換；配列番号１の残基９５に相当するアミノ酸残基においてスレオニンからリジンへの置換；および配列番号１の残基９８に相当するアミノ酸残基においてイソロイシンからバリンへの置換、
を含む、組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【請求項２】
配列番号１の残基７７に相当するアミノ酸残基においてシステインからアルギニンへの置換を含む、請求項１に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【請求項３】
前記ＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列は、配列番号４を含むかまたはそれからなる、請求項２に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【請求項４】
前記ＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列は、配列番号６を含むかまたはそれからなる、請求項２に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【請求項５】
配列番号１の残基７７に相当するアミノ酸残基においてシステインからセリンへの置換を含む、請求項１に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【請求項６】
前記ＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列は、配列番号５を含むかまたはそれからなる、請求項５に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【請求項７】

組換えトランスフォーミング成長因子（ＴＧＦ）－β２モノマーであって、前記ＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列は、配列番号７を含むかまたはそれからなる、組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【請求項８】
ＰＥＧ化されている、請求項１に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【請求項９】
グリコシル化または高グリコシル化されている、請求項１に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【請求項１０】
放射線治療剤、化学療法のための細胞傷害性薬剤、薬物、イメージング剤、蛍光色素、または蛍光性タンパク質タグをさらに含む、請求項１に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【請求項１１】
請求項１に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマーおよび異種タンパク質を含む、融合タンパク質。
【請求項１２】
前記異種タンパク質は、タンパク質タグ、Ｆｃドメイン、アルブミン、アルブミン結合ポリペプチド、抗体、抗体の抗原結合フラグメントまたは標的化部分を含む、請求項１１に記載の融合タンパク質。
【請求項１３】
前記融合タンパク質は、１本鎖ポリペプチドである、請求項１１に記載の融合タンパク質。
【請求項１４】
前記融合タンパク質は、ダイマーポリペプチドを形成する、請求項１１に記載の融合タンパク質。
【請求項１５】
前記融合タンパク質は、ヘテロダイマーのものである、請求項１１に記載の融合タンパク質。
【請求項１６】
前記融合タンパク質は、マルチマーのものである、請求項１１に記載の融合タンパク質。
【請求項１７】
請求項１に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマーをコードする、単離された核酸分子。
【請求項１８】
プロモーターに作動可能に連結されている、請求項１７に記載の核酸分子。
【請求項１９】
請求項１８に記載の核酸分子を含むベクター。
【請求項２０】
請求項１９に記載のベクターを含む単離された細胞。
【請求項２１】
前記細胞は、Ｔリンパ球である、請求項２０に記載の単離された細胞。
【請求項２２】
請求項１に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー；および
薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤、
を含む組成物。
【請求項２３】
細胞におけるＴＧＦ－βシグナル伝達を阻害する方法であって、前記細胞と、有効量の請求項１に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマーとを接触させることを包含する方法。
【請求項２４】
異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する疾患または障害を有する被験体においてＴＧＦ－βシグナル伝達を阻害する方法であって、前記被験体に、有効量の請求項１に記載の組

換えＴＧＦ－β２モノマーを投与することを包含する方法。
【請求項２５】
被験体において異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する疾患または障害を処置する方法であって、前記被験体に、治療上有効な量の請求項１に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマーを投与することを包含する方法。
【請求項２６】
異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する前記疾患または障害は、線維性障害である、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する前記疾患または障害は、乳がん、脳がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、膀胱がん、肝臓がん、卵巣がん、腎がん、子宮内膜がん、結腸直腸がん、胃がん、皮膚がんまたは甲状腺がんである、請求項２５に記載の方法。
【請求項２８】
異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する前記疾患または障害は、眼疾患である、請求項２５に記載の方法。
【請求項２９】
異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する前記疾患または障害は、結合組織の遺伝的障害である、請求項２５に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２１年１０月１１日出願の米国仮特許出願第６３／２５４，２４９号（これはその全体において本明細書に参考として援用される）の利益を主張する。
【０００２】
分野
本開示は、改善された特性を有するトランスフォーミング成長因子（ＴＧＦ）－βモノマー、およびＴＧＦ－βシグナル伝達を阻害し、異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する障害を処置するためのそれらの使用に関する。
【０００３】
政府支援の謝辞
本発明は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈによって授与された助成金番号ＣＡ２４７１２９の下で政府支援を得て行われた。政府は、本発明において一定の権利を有する。
【背景技術】
【０００４】
背景
ＴＧＦ－βは、がん免疫治療の重要な標的である。なぜならＴＧＦ－β媒介性免疫抑制は、調節性Ｔ（Ｔｒｅｇ）細胞が免疫抑制性サイトカインの分泌およびエフェクターＴ細胞の直接的阻害を通じて抗腫瘍免疫を抑制して、細胞傷害性が不十分な環境を引き起こす。腫瘍微小環境（ＴＭＥ）におけるＴＧＦ－βの過剰発現は、高い腫瘍負荷および不十分な臨床転帰と相関した。さらに、チェックポイント治療非応答患者は、ＴＧＦ－β媒介性免疫排除に起因して、Ｔ細胞枯渇表現型を有する。ＴＧＦ－β阻害剤は、ＰＤ－１およびＰＤ－Ｌ１治療の補助として、インビボでチェックポイント単剤療法を超越することがさらに示されており、このようなアプローチは、臨床試験で追求されている最中である。ＴＧＦ－βアイソフォームはまた、マトリクスタンパク質（例えば、コラーゲンおよびフィブロネクチン）の蓄積を強力に刺激し、線維性障害（例えば、特発性肺線維症（ＩＰＦ）、腎線維症、心臓線維症、および冠動脈再狭窄）を駆動し得る。ＩＰＦ（これは、高齢の成人において起こる進行性の肺機能喪失によって特徴づけられる）は、診断後５年という平均生存率を有する。種々の形態の線維症を誘発する機序は多様であるが、それらは、Ｔ

ＧＦ－βタンパク質のレベルの増加という共通する誘導を共有している。ＩＰＦおよび腎線維症では、ＴＧＦ－βタンパク質のレベルの増加が線維芽細胞の活性化および筋線維芽細胞への分化を刺激し、これは、細胞外マトリクス（ＥＣＭ）の異常な沈着を引き起こし、瘢痕化および器官機能の低下をもたらす。

【０００５】

中和抗体を使用する、がんおよび線維症両方の文脈におけるＴＧＦ－βの阻害は、有効性が限られている。なぜならＴＧＦ－βの大部分はおそらく、ＥＣＭ中で潜伏タンパク質として貯蔵され、阻害されにくくしているからである。ＴＧＦ－βレセプターキナーゼ阻害剤は、それらの標的であるＴＧＦ－β　Ｉ型およびＩＩ型レセプターのキナーゼドメインによりアクセスし易くするが、特異性を欠いており、他のＴＧＦ－βファミリー　Ｉ型レセプターのみならず、非ＴＧＦ－βレセプターキナーゼをも阻害する。キナーゼ阻害剤は、臨床試験においてフェーズＩＩを過ぎて進行しておらず、現在、ＦＤＡ承認のＴＧＦ－β阻害剤は存在しない。従って、異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する障害を処置するための改善された治療が必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００６】

概要

ダイマー化を防止し、ＴＧＦ－βシグナル伝達を遮断するように操作されたＴＧＦ－β２モノマーが、本明細書で記載される。上記操作されたモノマーは、ＴＧＦ－βＩ型レセプター（ＴβＲＩ）を結合および動員する能力を欠いているが、高親和性ＴＧＦ－β　ＩＩ型レセプター（ＴβＲＩＩ）を結合する能力を保持する。本開示のＴＧＦ－β２モノマーはまた、それらのＴβＲＩＩに対する親和性を増加させる、それらの凝集を低減する、および／またはそれらの折りたたみを改善するさらなる改変を含む。本開示のＴＧＦ－β２モノマーおよびその組成物は、例えば、異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する障害（例えば、線維性障害およびがん）を処置するために使用され得る。

【０００７】

野生型ヒトＴＧＦ－β２（配列番号１として示される）のアミノ酸残基５２～７１に相当するα３（ヒール（ｈｅｅｌ））ヘリックスの欠失、および配列番号１の残基７７に相当するアミノ酸残基において、システインからアルギニンもしくはセリンへの置換を含む組換えＴＧＦ－β２モノマーが本明細書で提供される；これらの改変は、上記モノマーのダイマー化を防止する。上記ＴＧＦ－β２モノマーは、配列番号１の残基５１に相当するアミノ酸残基においてロイシンからアルギニンへの置換、および配列番号１の残基７４に相当するアミノ酸残基においてアラニンからリジンへの置換をさらに含む；これらの改変は、上記モノマーの正味の電荷を増加させる。上記ＴＧＦ－β２モノマーはまた、配列番号１の残基２５に相当するアミノ酸残基においてリジンからアルギニンへの置換、および配列番号１の残基９４に相当するアミノ酸残基においてリジンからアルギニンへの置換を含み、これは、ＴβＲＩＩに対する上記モノマーの親和性を増加させる。いくつかの実装において、上記ＴＧＦ－β２モノマーは、ＴβＲＩＩに対する上記モノマーの親和性を増加させる、凝集を低減する、および／または折りたたみを改善する１またはこれより多くのさらなる改変をさらに含む。

【０００８】

ＤａｎおよびＣｅｒｂｅｒｕｓに関係するタンパク質（ＰＲＤＣ）のシスチンノット領域を含むように改変されている操作されたＴＧＦ－β２モノマーがまた、本明細書で提供され、これは、上記モノマーの折りたたみを増強する。

【０００９】

ＴＧＦ－β２モノマーおよび異種タンパク質を含む融合タンパク質がまた、提供される。いくつかの実装において、上記異種タンパク質としては、タンパク質タグ、Ｆｃドメイン、アルブミン、アルブミン結合ポリペプチド、抗体、抗体の抗原結合フラグメントまたは標的化部分が挙げられる。

【００１０】
本明細書で開示される組換えＴＧＦ－β２モノマーまたは融合タンパク質をコードする核酸分子およびベクターがまた、提供される。組換えＴＧＦ－β２モノマーまたは融合タンパク質をコードする核酸分子またはベクターを含む単離された細胞（例えば、単離されたＴ細胞）が、さらに提供される。
【００１１】
本明細書で開示される組換えＴＧＦ－β２モノマー、融合タンパク質、核酸分子、ベクターまたは単離された細胞および薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む組成物が、さらに提供される。
【００１２】
細胞と、本明細書で開示される組換えＴＧＦ－β２モノマー、融合タンパク質、核酸分子、ベクター、または組成物とを接触させることによって、上記細胞におけるＴＧＦ－βシグナル伝達を阻害する方法がまた、提供される。
【００１３】
異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する疾患または障害を有する被験体においてＴＧＦ－βシグナル伝達を阻害する方法が、さらに提供される。いくつかの実装において、上記方法は、上記被験体に、有効量の本明細書で開示される組換えＴＧＦ－β２モノマー、融合タンパク質、核酸分子、ベクター、単離された細胞（例えば、Ｔ細胞）または組成物を投与することを包含する。被験体において異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する疾患または障害を処置する方法が、さらに提供される。いくつかの実装において、上記方法は、上記被験体に、治療上有効な量の本明細書で開示される組換えＴＧＦ－β２モノマー、融合タンパク質、核酸分子、ベクター、単離された細胞（例えば、Ｔ細胞）または組成物を投与することを包含する。本開示の方法のうちのいくつかの例では、異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する上記疾患または障害は、線維性障害、がん、眼障害または結合組織の遺伝的障害である。
【００１４】
本開示の前述のおよび他の目的および特徴は、添付の図面を参照しながら進められる、以下の詳細な説明からより明らかになる。
【図面の簡単な説明】
【００１５】
図面の簡単な説明
【図１－１】図１Ａ～１Ｅ：　ＴＧＦ－β２（配列番号１）に対する操作されたＴＧＦ－β２モノマーｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ（配列番号３）（図１Ａ）、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒ（配列番号４）（図１Ｂ）、ｍｍＴＧＦ－β２－２Ｍ－Ｄｅｌ７＿１６（配列番号５）（図１Ｃ）、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＰＲＤＣ（配列番号７）（図１Ｄ）、およびｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒ－Ｄｅｌ７－１６（配列番号６）（図１Ｅ）の配列比較。配列の差異を、その２つの整列させた配列の下に数字で示し、その数字は、差異の性質が何であるかを示す。配列同一性は、アスタリスクによって示される。図１Ａ中の配列の下に示されているものは、ＴＧＦ－β３－（ＴβＲＩＩ）$_2$－（ＴβＲＩ）$_2$複合体（ＰＤＢ　２ＰＪＹ）（左）およびｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＴβＲＩＩ複合体（ＰＤＢ　５ＴＸ４）（右）の構造であり、主な構造特徴のうちのいくつかは強調されている。
【図１－２】同上。
【図１－３】同上。
【図１－４】同上。
【図１－５】同上。
【００１６】
【図２】図２Ａ～２Ｆ：　親タンパク質、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ（図２Ｄ～２Ｆ）と比較した、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒ（図２Ａ～２Ｃ）のアミド^{1}Ｈ－^{15}Ｎ　１結合シフト相関核磁気共鳴（Ａｍｉｄｅ　^{1}Ｈ－^{15}Ｎ　ｏｎｅ－ｂｏｎｄ　ｓｈｉｆｔ　ｃｏｒｒｅｌａｔｉｏｎ　ｎｕｃｌｅａｒ　ｍａｇｎｅｔｉｃ　ｒｅｓｏｎａｎｃｅ）（ＮＭ

Ｒ）スペクトル。スペクトルを、ｐＨ　４．６（図２Ａおよび２Ｄ）またはｐＨ７．２の１０ｍＭ　リン酸緩衝液において、緩衝液中のＣＨＡＰＳの非存在下（図２Ｂおよび２Ｅ）またはＣＨＡＰＳを最終濃度１０ｍＭへと添加（図２Ｃおよび２Ｆ）のいずれかで、３７℃で記録した。

【００１７】

【図３】図３Ａ～３Ｃ：　ｍｍＴＧＦ－β２－２Ｍ－Ｄｅｌ７－１６のアミド^{1}Ｈ－^{15}Ｎ　１結合シフト相関ＮＭＲスペクトル。スペクトルを、１０ｍＭ　リン酸緩衝液（ｐＨ６．０（図３Ｂ）、またはｐＨ４．５）において、緩衝液中のＣＨＡＰＳの非存在下（図３Ａ）またはＣＨＡＰＳを最終濃度１０ｍＭへと添加（図３Ｃ）のいずれかで、３７℃で記録した。

【００１８】

【図４】図４Ａ～４Ｄ：　ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＰＲＤＣのアミド^{1}Ｈ－^{15}Ｎ　１結合シフト相関ＮＭＲスペクトル（図４Ａ～４Ｃ）およびネイティブゲル電気泳動によって検出されるとおりのＴβＲＩＩへの結合（図４Ｄ）。スペクトルを、ｐＨ４．８（図４Ａ）またはｐＨ　６．０（図４Ｂ～４Ｃ）において１０ｍＭ　リン酸緩衝液中、３７℃で記録した。図４Ｂおよび図４Ｃは、シグナルがプロットされる等高線レベルにおいてのみ異なる（図４Ｂは、パネル図４Ｃと比較して、ノイズにより近い等高線レベルでプロットされる）。図７Ｄに示されるネイティブゲルは、２μｇのＴβＲＩＩ単独で（最も左側のレーン）または特定のモル比において添加された上記操作されたＴＧＦ－βモノマー（＋Ａおよび＋Ｂは、それぞれ、１：１または２：１モル比のいずれかでのＴβＲＩＩ：操作されたＴＧＦ－βモノマーを示す）のいずれかを泳動させることによって行った。

【００１９】

【図５】図５：　等温滴定熱量測定（ＩＴＣ）によって検出される場合の上記操作されたＴＧＦ－βモノマー（ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍは左；ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒは中央；およびｍｍＴＧＦ－β２－２Ｍ－Ｄｅｌ７－１６は右）の、ＴＧＦ－β　ＩＩ型レセプター（ＴβＲＩＩ）への結合。上側のパネルは、　３回の反復滴定についての生のサーモグラムを示す一方で、下側のパネルは、１：１結合等温線（滑らかな線）にグローバルフィットした３回の反復滴定に関する統合熱（データ点）を示す。フィットしたパラメーターを、下の表中に提供する。

【００２０】

【図６】図６Ａ～６Ｄ：　互いに対する上記操作されたＴＧＦ－βモノマーの阻害効力を評価するＨＥＫ－２９３細胞ベースのＣＡＧＡ－Ｌｕｃ　ＴＧＦ－βレポーターアッセイ。ＴＧＦ－β　ＣＡＧＡ－Ｌｕｃレポーターで安定したトランスフェクトされたＨＥＫ－２９３細胞を、特定した濃度で３０分間、その示した、操作されたＴＧＦ－βモノマーで処理し、次いで、１０ｐＭ　ＴＧＦ－β３の添加によって刺激した。細胞を、１４時間後に採取し、ルシフェラーゼ活性をアッセイした。（図６Ａ）　ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ（配列番号３）、IC_{50}は５８．２３ｎＭ。（図６Ｂ）　ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒ（配列番号４）、IC_{50}は５３．２９ｎＭ。（図６Ｃ）　ｍｍＴＧＦ－β２－２Ｍ－Ｄｅｌ７－１６（配列番号５）、IC_{50}は１１１．０ｎＭ。（図６Ｄ）　ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＰＲＤＣ（配列番号７）、IC_{50}は２８２．５ｎＭ。示されるデータ点およびエラーバーは、三連の測定の平均および標準偏差に相当する。滑らかな曲線は、標準的用量応答阻害等温線へのフィットに相当する。フィットしたIC_{50}値を示す。

【００２１】

配列表

　配列表は、８１２３－１０７０６２－０３という名称のＳＴ．２６配列表ＸＭＬファイル（作成日２０２２年１０月３日、サイズは７５６１バイトである）として提出されており、これは本明細書に参考として援用される。添付の配列表において：

【００２２】

　配列番号１は、野生型ヒトＴＧＦ－β２のアミノ酸配列である。

【００２３】

配列番号２は、ｍｍＴＧＦ－β２と称される、操作されたヒトＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列である。

【００２４】

配列番号３は、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍと称される、操作されたヒトＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列である。

【００２５】

配列番号４は、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒと称される、操作されたヒトＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列である。

【００２６】

配列番号５は、ｍｍＴＧＦ－β２－２Ｍ－Ｄｅｌ７－１６と称される、操作されたヒトＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列である。

【００２７】

配列番号６は、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒ－Ｄｅｌ７－１６と称される、操作されたヒト　ＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列である。

【００２８】

配列番号７は、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＰＲＤＣと称される、操作されたヒトＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列である。

【発明を実施するための形態】

【００２９】

詳細な説明

Ｉ．略語

ＣＫＧＦ　シスチンノット成長因子折りたたみ
ＥＣＭ　細胞以外マトリクス
ＥＲ　小胞体
ＧＦＤ　成長因子ドメイン
ＩＰＦ　特発性肺線維症
ＩＴＣ　等温滴定熱量測定
ＮＧＦ　神経成長因子
ＮＭＲ　核磁気共鳴
ＰＤＧＦ　血小板由来成長因子
ＰＲＤＣ　ＤａｎおよびＣｅｒｂｅｒｕｓに関係するタンパク質
ＴＧＦ－β　トランスフォーミング成長因子β
ＴβＲＩ　トランスフォーミング成長因子－β　Ｉ型レセプター
ＴβＲＩＩ　トランスフォーミング成長因子－β　ＩＩ型レセプター
ＴＭＥ　腫瘍微小環境
ＶＥＧＦ　血管内皮成長因子

【００３０】

ＩＩ．用語

別段注記されなければ、技術用語は、従来の使用法に従って使用される。分子生物学分野における一般的用語の定義は、Ｊｏｎｅｓ　＆　Ｂａｒｔｌｅｔｔ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，　２００９によって出版されたＢｅｎｊａｍｉｎ　Ｌｅｗｉｎ，　Ｇｅｎｅｓ　Ｘ；およびＷｉｌｅｙ－ＶＣＨによって１６巻で２００８年に出版されたＭｅｙｅｒｓら（編），　Ｔｈｅ　Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ　ｏｆ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ；ならびに他の類似の参考文献の中に見出され得る。

【００３１】

本明細書で使用される場合、単数形「ａ（１つの、ある）」「ａｎ（１つの、ある）」および「ｔｈｅ（上記、その、この）」は、文脈が別段明らかに示さなければ、単数形および複数形の両方に言及する。例えば、用語「１つの抗原（ａｎ　ａｎｔｉｇｅｎ）」とは、タンパク質数または複数の抗原を含み、語句「少なくとも１つの抗原（ａｔ　ｌｅａ

ｓｔ　ｏｎｅ　ａｎｎｔｇｅｎ）」に等しいと考えられ得る。本明細書で使用される場合、用語「含む、包含する（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」とは、「含む、包含する、が挙げられる（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」を意味する。任意のおよび全ての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、ならびに全ての分子量または分子質量の値は、核酸またはポリペプチドに関して与えられる場合、概算値であり、別段示されなければ、説明目的で提供されることがさらに理解されるべきである。本明細書で記載されるものに類似または等価な多くの方法および材料が使用され得るが、特定の適した方法および材料が本明細書で記載される。矛盾する場合、用語の説明を含め、本明細書が優先する。さらに、材料、方法、および例は、例証に過ぎず、限定することを意図しない。

種々の実装の精査を促進するために、以下の用語の説明が提供される：

【００３２】

異常な（ＴＧＦ－βシグナル伝達））：　異常なまたは調節不全のＴＧＦ－βシグナル伝達。本開示の文脈において、「異常なＴＧＦ－βシグナル伝達」とは、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の過剰な（病的な）活性化をいう。

【００３３】

投与：　被験体に薬剤（例えば、治療剤（例えば、ＴＧＦ－βモノマー））を任意の有効な経路によって提供または与えること。例示的な投与経路としては、注射または注入（例えば、腫瘍内、皮下、筋肉内、皮内、腹腔内、髄腔内、静脈内、前立腺内、脳室内、線条体内、頭蓋内および脊髄への）、経口、管内（ｉｎｔｒａｄｕｃｔａｌ）、舌下、直腸、経皮、鼻内、膣および吸入経路が挙げられるが、これらに限定されない。

【００３４】

接触する：　直接的な物理的関連のある状態に配置すること；　固体形態および液体形態の両方を含む。インビボでの方法の文脈において使用される場合、「接触する」はまた、投与を含む。

【００３５】

線維症：　修復プロセスまたは反応プロセスにおける器官または組織の中での過剰な線維性の結合組織の形成。線維症は、多くの異なる身体組織（例えば、心臓、肺および肝臓）において、代表的には炎症または損傷の結果として起こり得る。線維性障害としては、肺線維症、嚢胞性線維症、特発性肺線維症、間質性肺疾患、肝硬変、腎線維症（例えば、糖尿病によって引き起こされる損傷に由来する）、心房線維症、心内膜心筋線維症、アテローム動脈硬化症、再狭窄および強皮症が挙げられるが、これらに限定されない。線維症は、手術の合併症、化学療法薬、放射線、傷害または熱傷の結果としても起こり得る。

【００３６】

融合タンパク質：　２つの異なる（異種）タンパク質の部分を少なくとも含むタンパク質。本明細書中のいくつかの実装において、上記融合タンパク質は、タンパク質タグ、Ｆｃドメイン（例えば、ヒトＦｃドメイン）またはアルブミンに融合されたＴＧＦ－β２モノマーを含む。

【００３７】

グリコシル化：　アスパラギン（Ｎ－グリコシル化）、またはセリンもしくはスレオニン残基（Ｏ－グリコシル化）への炭水化物部分の共有結合のプロセス。グリコシル化のレベルおよびタイプは、組換え発現に使用される宿主生物が異なれば変動し得る。新規なグリコシル化部位は、タンパク質の溶媒露出領域の中にグリコシル化シークオンを導入することによって配列操作され得る。例えば、Ｎ－グリコシル化シークオン、ＮＸ［Ｓ／Ｔ］は、本明細書で開示されるある特定の実行の配列内の１またはこれより多くの場所で導入され得る。グリコシル化のタイプおよび程度の変動は、可溶性、機能および半減期を調節する、ならびに部位特異的化学的共役を可能にすることにおいて、実際的な適用を有する。

【００３８】

異種の：　別個の遺伝的供給源または種に由来すること。

【００３９】

単離された：　「単離された」生物学的構成成分（例えば、核酸、タンパク質（抗体を含む）、オルガネラ、または組換えウイルス）は、上記構成成分が存在する環境（例えば、細胞）中の他の生物学的構成成分（例えば、他の染色体および染色体外ＤＮＡおよびＲＮＡ、タンパク質ならびにオルガネラ）から離れて実質的に分離または精製されている。「単離され（isolated）」ている核酸およびタンパク質は、標準的な精製法によって精製された核酸およびタンパク質を含む。上記用語はまた、宿主細胞中での組換え発現によって調製される核酸およびタンパク質、ならびに化学合成される核酸またはタンパク質を包含する。単離された（isolated）は、絶対的な純度を要求せず、少なくとも５０％単離された（例えば、少なくとも７５％、８０％、９０％、９５％、９８％、９９％、またはさらには９９．９％単離された）タンパク質、ペプチド、核酸分子またはウイルスを含み得る。

【００４０】

改変：　核酸配列またはタンパク質配列の配列における変化。例えば、アミノ酸配列改変としては、例えば、置換、挿入および欠失、またはこれらの組み合わせが挙げられる。挿入としては、アミノ末端および／またはカルボキシル末端の融合、ならびに単一のもしくは複数のアミノ酸残基の配列内挿入が挙げられる。欠失は、タンパク質配列からの１またはこれより多くのアミノ酸残基の除去によって特徴づけられる。本明細書中のいくつかの実装において、改変（例えば、置換、挿入または欠失）は、機能の変化（例えば、特定のタンパク質活性の低減または増強（例えば、凝集の低減、折りたたみの改善または標的タンパク質の親和性の増加））を生じる。実質的な改変は、少なくとも１個の残基が除去され、異なる残基がその場所に挿入されたものである。アミノ酸置換は、代表的には、単一の残基のものであるが、一度に多くの異なる位置において起こり得る。置換、欠失、挿入またはこれらの任意の組み合わせは、最終変異体配列に達するように組み合わせられ得る。これらの改変は、そのタンパク質をコードするＤＮＡにおけるヌクレオチドの改変によって調製され得、それによって、上記改変をコードするＤＮＡを生成し得る。既知の配列を有するＤＮＡ中の所定の部位において挿入、欠失および置換変異を行うための技術は、公知である。「改変された」タンパク質または核酸は、上記で概説されるとおりの１またはこれより多くの改変を有するものである。

【００４１】

モノマー：　他の分子ユニットに結合して、ダイマーまたはポリマーを形成し得る単一の分子ユニット（例えば、タンパク質）。本開示の文脈において、「ＴＧＦ－β２モノマー」とは、単一のＴＧＦ－β２ポリペプチド鎖であり、その野生型バージョンは、他のＴＧＦ－β２モノマーを結合して、ダイマーを形成し得る。本明細書中のいくつかの実装において、上記組換えＴＧＦ－β２モノマーは、ダイマー化を防止するように操作されている。本明細書中の他の実装において、それらの直接的ダイマー化を防止するように操作されている上記組換えＴＧＦ－β２モノマーは、それ自体でダイマー化し得る異種タンパク質（例えば、ＩｇＧのＦｃドメイン）に融合され得る。

【００４２】

新生物、悪性腫瘍、がんまたは腫瘍：　新生物は、過剰な細胞分裂から生じる組織または細胞の異常な成長である。新生物性成長は、腫瘍を生じ得る。個体における腫瘍の量は、その腫瘍の数、容積、または重量として測定され得る「腫瘍負荷」である。転移しない腫瘍は、「良性」といわれる。周辺組織を侵襲するおよび／または転移し得る腫瘍は、「悪性（ｍａｌｉｇｎａｎｔ）」といわれる。

【００４３】

血液腫瘍の例としては、白血病（急性白血病（例えば、１１ｑ２３陽性急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病（ａｃｕｔｅ　ｍｙｅｌｏｃｙｔｉｃ　ｌｅｕｋｅｍｉａ）、急性骨髄性白血病（ａｃｕｔｅ　ｍｙｅｌｏｇｅｎｏｕｓ　ｌｅｕｋｅｍｉａ）および骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病および赤白血病）、慢性白血病（例えば、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病、慢性骨髄性白血病、および慢性リンパ性白血病）が挙げられる）、真性赤血球増加症、リンパ腫、ホジキン病

、非ホジキンリンパ腫（無症候性および高悪性度形態）、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症、重鎖病、骨髄異形成症候群、ヘアリー細胞白血病および骨髄異形成が挙げられる。

【００４４】

固形腫瘍（例えば、肉腫および癌）の例としては、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、および他の肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、悪性リンパ腫（ｌｙｍｐｈｏｉｄ　ｍａｌｉｇｎａｎｃｙ）、膵臓がん、乳がん（基底乳癌、乳管癌および小葉乳癌が挙げられる）、肺がん、卵巣がん、前立腺がん、肝細胞癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、褐色細胞腫　皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頚がん、精巣腫瘍、精上皮腫、膀胱癌、およびＣＮＳ腫瘍（例えば、神経膠腫、星細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫（ｃｒａｎｉｏｐｈａｒｙｒｇｉｏｍａ）、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽腫および網膜芽細胞腫）が挙げられる。

【００４５】

ＰＥＧ化：　共有結合および非共有結合の両方または分子およびマクロ構造（例えば、薬物、治療用タンパク質または小胞）へのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）ポリマー鎖の融合（ａｍａｌｇａｍａｔｉｏｎ）のプロセス。そうして、これは、ＰＥＧ化される（またはペグ化）といわれる。ＰＥＧ化は、ＰＥＧの反応性誘導体を標的分子とインキュベートすることによって慣用的に達成される。薬物または治療用タンパク質へのＰＥＧの共有結合は、上記薬剤を宿主の免疫系から隠し（免疫原性および抗原性の低減）、上記薬剤の流体力学的サイズ（溶液中のサイズ）を増加させることができ、これは、腎クリアランスを低減することによってその循環時間を延ばす。ＰＥＧ化はまた、疎水性薬物およびタンパク質に水溶性を提供し得る。

【００４６】

ペプチドまたはポリペプチド：　アミド結合を通じて一緒に結合される上記モノマーがアミノ酸残基であるポリマー。アミノ酸がα－アミノ酸である場合、Ｌ－光学異性体またはＤ－光学異性体のいずれかが使用され得る。用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、または「タンパク質」は、本明細書で使用される場合、任意のアミノ酸配列を包含し、改変された配列を含むことが意図される。用語「ペプチド」および「ポリペプチド」は、天然に存在するタンパク質、および組換え生成または合成して生成されるものをも網羅することが具体的に意図される。

【００４７】

保存的アミノ酸置換は、行われる場合、その元のタンパク質の特性に最小限に干渉する、すなわち、そのタンパク質の構造および特に機能が保存され、かつこのような置換によって有意に変化しないそれらの置換である。保存的置換の例は、以下に示される。

【表２－１】

元の残基	保存的置換
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser

【表２－２】

Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

【００４８】
保存的置換は一般に、（ａ）置換の領域中のポリペプチド骨格の構造（例えば、シートまたはらせんコンホメーションとして）、（ｂ）標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または（ｃ）側鎖のかさ高さを維持する。
【００４９】
タンパク質特性において最も大きな変化、例えば、（ａ）親水性残基（例えば、セリンまたはスレオニン）が、疎水性残基（例えば、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、バリンまたはアラニン）で置換される；（ｂ）システインまたはプロリンが任意の他の残基で置換される；（ｃ）正電荷の側鎖を有する残基（例えば、リジン、アルギニン、またはヒスチジン）が、負電荷の残基（例えば、グルタミン酸またはアスパラギン酸）で置換される；あるいは（ｄ）かさ高い側鎖を有する残基（例えば、フェニルアラニン）が、側鎖を有しないもの（例えば、グリシン）で置換される変化を生じると概して予測される置換は、非保存的である。
【００５０】
薬学的に受容可能なキャリア：　本開示において有用な薬学的に受容可能なキャリア（ビヒクル）は、従来どおりのものである。Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：　Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ，　Ｔｈｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　ｉｎ　Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ編，　Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，　Ｗｉｌｌｉａｍｓ，　＆　Ｗｉｌｋｉｎｓ，　Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，　ＰＡ，　第２１版（２００５）は、１またはこれより多くの治療用化合物、分子または薬剤（例えば、組換えＴＧＦ－β２モノマー）の医薬送達に適した組成物および製剤を記載する。
【００５１】
一般に、キャリアの性質は、使用しようとしている特定の投与様式に依存する。例えば、非経口製剤は通常、薬学的におよび生理学的に受容可能な流体（例えば、ビヒクルとして、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなど）を含む注射用の流体を含む。固体組成物（例えば、散剤、丸剤、錠剤またはカプセル剤形態）に関して、従来の非毒性固体キャリアとしては、例えば、製薬グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムが挙げられ得る。生物学的に中性のキャリアに加えて、投与されるべき医薬組成物は、少量の非毒性補助物質（例えば、湿潤剤もしくは乳化剤、保存剤、およびｐＨ緩衝剤など（例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレート））を含み得る。

【００５２】
疾患を防止、処置または改善する：　疾患を「防止する」とは、疾患の完全な発生を阻害することに言及する。「処置する」とは、疾患の徴候もしくは症状またはそれが発生してしまった後の病的状態を改善する（例えば、腫瘍負荷の低減（例えば、腫瘍の容積もしくはサイズの減少）または転移の数もしくはサイズの減少）治療的介入に言及する。「改善する」とは、疾患の徴候もしくは症状の数もしくは重篤度の低減に言及する。
【００５３】
組換え：　組換え核酸、タンパク質もしくはウイルスは、天然に存在しない配列を有するか、または配列の２つの別個のセグメントを人工的に組み合わせることによって作製される配列を有するものである。この人工的組み合わせはしばしば、化学合成によって、または核酸の単離されたセグメントの人工的操作によって、例えば、遺伝子操作技術によって達成される。用語、組換えは、天然の核酸分子またはタンパク質の一部の付加、置換、または欠失によって変化させている核酸、タンパク質およびウイルスを含む。
【００５４】
配列同一性／類似性：　２もしくはこれより多くの核酸配列、または２もしくはこれより多くのアミノ酸配列の間の同一性は、その配列の間の同一性または類似性に関して表される。配列同一性は、パーセンテージ同一性に関して測定され得る；そのパーセンテージが高いほど、配列はより同一である。配列類似性は、パーセンテージ類似性に関して測定され得る（これは、保存的アミノ酸置換を考慮している）；そのパーセンテージが高いほど、配列はより類似である。核酸またはアミノ酸配列のホモログまたはオルソログは、標準的方法を使用して整列させる場合、比較的高い程度の配列同一性／類似性を有する。この相同性は、上記オルソログのタンパク質またはｃＤＮＡが、より関係性が遠い種（例えば、ヒト配列およびＣ．ｅｌｅｇａｎｓ配列）と比較して、より関係性が近い種（例えば、ヒト配列およびマウス配列）に由来する場合、より有意である。
【００５５】
比較のための配列のアラインメント方法は、当該分野で周知である。種々のプログラムおよびアラインメントアルゴリズムは、以下に記載される：　Ｓｍｉｔｈ　＆　Ｗａｔｅｒｍａｎ，　Ａｄｖ．　Ａｐｐｌ．　Ｍａｔｈ．　２：４８２，　１９８１；　Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ　＆　Ｗｕｎｓｃｈ，　Ｊ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．　４８：４４３，　１９７０；　Ｐｅａｒｓｏｎ　＆　Ｌｉｐｍａｎ，　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　８５：２４４４，　１９８８；　Ｈｉｇｇｉｎｓ　＆　Ｓｈａｒｐ，　Ｇｅｎｅ，　７３：２３７－４４，　１９８８；　Ｈｉｇｇｉｎｓ　＆　Ｓｈａｒｐ，　ＣＡＢＩＯＳ　５：１５１－３，　１９８９；　Ｃｏｒｐｅｔら，　Ｎｕｃ．　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．　１６：１０８８１－９０，　１９８８；　Ｈｕａｎｇら　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ａｐｐｌｓ．　ｉｎ　ｔｈｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　８，　１５５－６５，　１９９２；およびＰｅａｒｓｏｎら，　Ｍｅｔｈ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏ．　２４：３０７－３１，　１９９４。Ａｌｔｓｃｈｕｌら，　Ｊ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．　２１５：４０３－１０，　１９９０は、配列アラインメント方法および相同性計算の詳細な考慮を示す。
【００５６】
ＮＣＢＩ　Ｂａｓｉｃ　Ｌｏｃａｌ　Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ　Ｓｅａｒｃｈ　Ｔｏｏｌ（ＢＬＡＳＴ）（Ａｌｔｓｃｈｕｌら，　Ｊ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．　２１５：４０３－１０，　１９９０）は、配列分析プログラム、ｂｌａｓｔｐ、ｂｌａｓｔｎ、ｂｌａｓｔｘ、ｔｂｌａｓｔｎおよびｔｂｌａｓｔｘに関連して使用するために、いくつかの情報源（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ　（ＮＣＢＩ）を含む）からおよびインターネット上で入手可能である。さらなる情報は、ＮＣＢＩウェブサイトで見出され得る。
【００５７】
被験体：　脊椎動物を含む、生きている多細胞生物（ヒトおよび非ヒト哺乳動物の両方を含むカテゴリー）。
【００５８】

タグ：　タンパク質または核酸に（例えば、標識、検出または精製目的のために）結合され得る分子。いくつかの実装において、上記タグは、タンパク質タグである。いくつかの実装において、上記タンパク質タグは、アフィニティータグ（例えば、Ａｖｉｔａｇ、ヘキサヒスチジン、キチン結合タンパク質、マルトース結合タンパク質、またはグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ）、エピトープタグ（例えば、Ｖ５、ｃ－ｍｙｃ、ＨＡまたはＦＬＡＧ）または蛍光タグ（例えば、ＧＦＰまたは別の周知の蛍光タンパク質）である。

【００５９】

治療上有効な量：　処置されている被験体において所望の効果を達成するために十分な、化合物または組成物、例えば、組換えＴＧＦ－β２モノマーの量。例えば、これは、細胞においてＴＧＦ－βシグナル伝達を阻害または遮断するために必要な量であり得る。他の場合には、これは、腫瘍の成長を阻害または抑制するために必要な量であり得る。１つの実装において、治療上有効な量は、例えば、処置の前のサイズ／容積／数と比較して、腫瘍を除去し、そのサイズを低減する、またはその転移を防止する（例えば、腫瘍サイズおよび／もしくは容積を、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも５０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、またはさらには１００％低減する、ならびに／または転移の数および／もしくはサイズ／容積を、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも５０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、またはさらには１００％低減する）ために必要な量である。１つの実装において、治療上有効な量は、例えば、上記組換えＴＧＦ－β２モノマーでの処置のない同じがんを有する被験体の生存時間と比較して、被験体の生存時間を、例えば、少なくとも３ヶ月、少なくとも４ヶ月、少なくとも５ヶ月、少なくとも６ヶ月、少なくとも９ヶ月、少なくとも１年、少なくとも１．５年、少なくとも２年、少なくとも３年、少なくとも４年、または少なくとも５年増加させるために必要な量である。他の場合には、上記治療上有効な量は、線維症を阻害または低減する、例えば、処置前と比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも５０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、またはさらには１００％低減するために必要な効果である。被験体に投与される場合、所望のインビトロでの効果を達成することが示されている標的組織濃度（例えば、腫瘍における）を達成する投与量が、一般に使用される。

【００６０】

トランスフォーミング成長因子－β（ＴＧＦ－β）：　増殖、細胞分化および多くの他の細胞機能を調節する，分泌型の多機能タンパク質。多くの細胞は、ＴＧＦ－βを合成し、ほぼ全ての細胞は、ＴＧＦ－βに対するレセプターを発現する。用語「ＴＧＦ－β」とは、遺伝子ＴＧＦＢ１、ＴＧＦＢ２、ＴＧＦＢ３によってそれぞれコードされる、３種の異なるタンパク質アイソフォーム、ＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２およびＴＧＦ－β３に言及する。

【００６１】

ＴＧＦ－βシグナル伝達経路：　多くの細胞プロセス（例えば、細胞増殖、分化およびアポトーシス）に関与するシグナル伝達経路。ＴＧＦ－β経路のメンバーとしては、ＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２、ＴＧＦ－β３、ＴＧＦ－βレセプターＩ型およびＴＧＦ－βレセプターＩＩ型が挙げられるが、これらに限定されない。

【００６２】

ＴＧＦ－βレセプター：　用語「ＴＧＦ－βレセプター」は、ＴＧＦ－βレセプターＩ型（ＴＧＦＢＲ１によってコードされるＴβＲＩ）およびＴＧＦ－βレセプターＩＩ型（ＴＧＦＢＲ２によってコードされるＴβＲＩＩ）を含む。ＴＧＦ－βレセプターは、セリン／スレオニンタンパク質キナーゼである。上記Ｉ型およびＩＩ型のＴＧＦ－βレセプターは、ＴＧＦ－βに結合した場合、ヘテロダイマー複合体を形成し、細胞表面から細胞質へとＴＧＦ－βシグナルを伝達する。

【００６３】

ＩＩＩ．組換えＴＧＦ－β２モノマー

ダイマー化を防止し、ＴＧＦ－βシグナル伝達を遮断するように操作されたＴＧＦ－β２モノマーが、本明細書で開示される。上記操作されたモノマーは、ＴＧＦ－βＩ型レセプター（ＴβＲＩ）を結合および動員する能力を欠いているが、高親和性ＴＧＦ－β　ＩＩ型レセプター（ＴβＲＩＩ）を結合する能力を保持する。本開示のＴＧＦ－β２モノマーはまた、それらのＴβＲＩＩに対する親和性を増加させる、それらの凝集を低減する、および／またはそれらの折りたたみを改善するさらなる改変を含む。本開示のＴＧＦ－β２モノマーおよびその組成物は、例えば、細胞または被験体においてＴＧＦ－βシグナル伝達を阻害するために、または異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する障害（例えば、線維性障害、がん、眼疾患または結合組織の遺伝的障害）を処置するために使用され得る。

【００６４】

野生型ヒトＴＧＦ－β２（配列番号１として示される）のアミノ酸残基５２～７１に相当するα３ヘリックスの欠失、および配列番号１の残基７７に相当するアミノ酸残基においてシステインからアルギニン（もしくはセリン）への置換を含む組換えＴＧＦ－β２モノマーが、本明細書で提供される；これらの改変は、上記モノマーのダイマー化を防止する。上記ＴＧＦ－β２モノマーはさらに、配列番号１の残基５１に相当するアミノ酸残基においてロイシンからアルギニンへの置換、および配列番号１の残基７４に相当するアミノ酸残基においてアラニンからリジンへの置換を含む；これらの改変は、上記モノマーの正味の電荷を増加させる。上記ＴＧＦ－β２モノマーはまた、配列番号１の残基２５に相当するアミノ酸残基においてリジンからアルギニンへの置換、および配列番号１の残基９４に相当するアミノ酸残基においてリジンからアルギニンへの置換を含み、これは、ＴβＲＩＩに対する親和性を増強する。上記ＴＧＦ－β２モノマーは、必要に応じてさらに、ＴβＲＩＩに対する上記モノマーの親和性を増加させる、凝集を低減する、および／または折りたたみを改善する１またはこれより多くのさらなる改変を含む。

【００６５】

いくつかの実装において、上記ＴＧＦ－β２モノマーは、配列番号１の残基２６に相当するアミノ酸残基においてアルギニンからリジンへの置換；配列番号１の残基７９に相当するアミノ酸残基においてバリンからアルギニンへの置換；配列番号１の残基８９に相当するアミノ酸残基においてロイシンからバリンへの置換；配列番号１の残基９２に相当するアミノ酸残基においてイソロイシンからバリンへの置換；配列番号１の残基９５に相当するアミノ酸残基においてスレオニンからリジンへの置換；および配列番号１の残基９８に相当するアミノ酸残基においてイソロイシンからバリンへの置換をさらに含む。いくつかの例では、上記ＴＧＦ－β２モノマーは、配列番号１の残基７７に相当するアミノ酸残基においてシステインからアルギニンへの置換を有する。特定の例において、上記ＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列は、配列番号４と（上記に列挙したアミノ酸置換を保持しながら）少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％同一である。具体的な非限定的例では、上記ＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列は、配列番号４として本明細書で示されるｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒのアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【００６６】

他の実装において、上記ＴＧＦ－β２モノマーは、配列番号１の残基７に相当するアミノ酸残基においてシステインからバリンへの置換；および配列番号１の残基１６に相当するアミノ酸残基においてシステインからアラニンへの置換をさらに含む。いくつかの例では、上記ＴＧＦ－β２モノマーは、配列番号１の残基７７に相当するアミノ酸残基においてシステインからセリンへの置換を有する。特定の例では、上記ＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列は、配列番号５と（上記に列挙したアミノ酸置換を保持しながら）少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％同一である。具体的な非限定的例では、上記ＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列は、配列番号５として本明細書で示されるｍｍＴＧ

Ｆ－β２－２Ｍ－Ｄｅｌ７－１６のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【００６７】

他の実装において、上記ＴＧＦ－β２モノマーは、配列番号１の残基７に相当するアミノ酸残基においてシステインからバリンへの置換；配列番号１の残基１６に相当するアミノ酸残基においてシステインからアラニンへの置換；配列番号１の残基２６に相当するアミノ酸残基においてアルギニンからリジンへの置換；配列番号１の残基７９に相当するアミノ酸残基においてバリンからアルギニンへの置換；配列番号１の残基８９に相当するアミノ酸残基においてロイシンからバリンへの置換；配列番号１の残基９２に相当するアミノ酸残基においてイソロイシンからバリンへの置換；配列番号１の残基９５に相当するアミノ酸残基においてスレオニンからリジンへの置換；および配列番号１の残基９８に相当するアミノ酸残基においてイソロイシンからバリンへの置換をさらに含む。いくつかの例では、上記ＴＧＦ－β２モノマーは、配列番号１の残基７７に相当するアミノ酸残基においてシステインからアルギニンへの置換を有する。特定の例では、上記ＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列は、配列番号６と（上記に列挙したアミノ酸置換を保持しながら）少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％同一である。具体的な非限定的例では、上記ＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列は、配列番号６として本明細書で示されるｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒ－Ｄｅｌ７－１６（「バリアント１」または「ｖａｒ１」）のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【００６８】

上記モノマーの折りたたみを増強するために、ＤａｎおよびＣｅｒｂｅｒｕｓに関係するタンパク質（ＰＲＤＣ）のシスチンノット領域を含むように改変されている組換えＴＧＦ－β２モノマーがまた、本明細書で提供される。いくつかの実装において、上記ＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列は、配列番号７と少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％同一である。特定の例では、上記ＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列は、配列番号７として本明細書で示されるｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＰＲＤＣのアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【００６９】

本明細書中のいくつかの実装において、上記組換えＴＧＦ－β２モノマーは、ＰＥＧ化、グリコシル化、高グリコシル化されるか、または循環時間を延ばす別の改変を含む。

【００７０】

いくつかの実装において、上記組換えＴＧＦ－β２モノマーは、放射線治療剤、化学療法のための細胞傷害性薬剤、薬物、イメージング剤、蛍光色素、または蛍光性タンパク質タグをさらに含む。

【００７１】

ＴＧＦ－β２モノマーおよび異種タンパク質を含む融合タンパク質がまた、本明細書で提供される。いくつかの実装において、上記異種タンパク質は、タンパク質タグである。いくつかの例では、上記タンパク質タグは、アフィニティータグ（例えば、Ａｖｉｔａｇ、ヘキサヒスチジン、キチン結合タンパク質、マルトース結合タンパク質、またはグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ）、エピトープタグ（例えば、Ｖ５、ｃ－ｍｙｃ、ＨＡまたはＦＬＡＧ）または蛍光タグ（例えば、ＧＦＰまたは別の周知の蛍光タンパク質）である。

【００７２】

他の実装において、上記異種タンパク質は、Ｆｃドメイン（例えば、マウスまたはヒトＦｃドメイン）を含む。具体的な実装において、上記異種タンパク質は、上記融合タンパク質のホモダイマー状態（例えば、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３に由来するＦｃドメイン）、ヘテロダイマー状態（例えば、操作されたＦｃドメイン、Ｅ／Ｋコイルドコイル）、またはマルチマー状態（例えば、ペンタボディ、ナノ粒子）への分子間会合を促進する。従って、いくつかの例では、上記融合タンパク質は、１本鎖ポリペプチドである。

他の例では、上記融合タンパク質は、ダイマーまたはマルチマーポリペプチドを形成する。具体的な例では、上記融合タンパク質は、ヘテロダイマーである。

【００７３】

他の実装において、上記異種タンパク質は、アルブミン、アルブミン結合タンパク質もしくは作用物質（ａｇｅｎｔ）、または上記ＴＧＦ－βモノマーの循環時間をインビボで増加させる別のタンパク質である。

【００７４】

本明細書で開示される組換えＴＧＦ－β２モノマーまたは融合タンパク質をコードする単離された核酸分子が、本明細書でさらに提供される。いくつかの実装において、上記核酸分子は、プロモーター、例えば、Ｔ細胞特異的プロモーターに作動可能に連結されている。

【００７５】

開示される核酸分子を含むベクターがまた、提供される。いくつかの例では、上記ベクターは、ウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター）である。本明細書で開示される核酸分子またはベクターを含む単離された細胞が、さらに提供される。いくつかの例では、上記細胞は、Ｔ細胞である。上記細胞は、上記被験体に対して自己であり得るか、またはそれらは、異種（同種異系）であり得る。

【００７６】

本明細書で開示される組換えＴＧＦ－β２モノマー、融合タンパク質、核酸分子、ベクター、または単離された細胞、および薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む組成物がさらに、本明細書で提供される。

【００７７】

細胞においてＴＧＦ－βシグナル伝達を阻害する方法がまた、本明細書で提供される。いくつかの実装において、上記方法は、上記細胞と、有効量の、本明細書で開示される組換えＴＧＦ－β２モノマー、融合タンパク質、核酸分子、ベクター、単離された細胞または組成物とを接触させることを包含する。いくつかの例では、上記方法は、インビトロでの方法である。他の例では、上記方法は、エキソビボでの方法である。さらに別の例では、上記方法は、インビトロでの方法である。

【００７８】

異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する疾患または障害を有する被験体においてＴＧＦ－βシグナル伝達を阻害する方法が、さらに提供される。いくつかの実装において、上記方法は、上記被験体に、有効量の本明細書で開示される組換えＴＧＦ－β２モノマー、融合タンパク質、核酸分子、ベクター、単離された細胞または組成物を投与することを包含する。いくつかの例では、異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する上記疾患または障害は、線維性障害（例えば、肺線維症、嚢胞性線維症、特発性肺線維症、間質性肺疾患、肝硬変、腎線維症（例えば、糖尿病によって引き起こされる損傷に由来する）、心房線維症、心内膜心筋線維症、アテローム動脈硬化症、再狭窄、強皮症、または手術の合併症、化学療法薬、放射線、傷害もしくは熱傷によって引き起こされる線維症が挙げられるが、これらに限定されない）である。他の例では、異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する上記疾患または障害は、乳がん、脳がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、膀胱がん、肝臓がん、卵巣がん、腎がん、子宮内膜がん、結腸直腸がん、胃がん、皮膚がん（例えば、悪性黒色腫）、または甲状腺がんである。他の例では、異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する上記疾患または障害は、眼疾患である。さらに他の例では、異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する上記疾患または障害は、結合組織の遺伝的障害である。

【００７９】

被験体において異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する疾患または障害を処置する方法が、さらに提供される。いくつかの実装において、上記方法は、上記被験体に、治療上有効な量の、本明細書で開示される組換えＴＧＦ－β２モノマー、融合タンパク質、核酸分子、ベクター、単離された細胞または組成物を投与することを包含する。いくつかの例では、異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する上記疾患または障害は、線維性障害（例

えば、肺線維症、嚢胞性線維症、特発性肺線維症、間質性肺疾患、肝硬変、腎線維症（例えば、糖尿病によって引き起こされる損傷に由来する）、心房線維症、心内膜心筋線維症、アテローム動脈硬化症、再狭窄、強皮症、または手術の合併症、化学療法薬、放射線、傷害もしくは熱傷によって引き起こされる線維症が挙げられるが、これらに限定されない）である。他の例では、異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する上記疾患または障害は、乳がん、脳がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、膀胱がん、肝臓がん、卵巣がん、腎がん、子宮内膜がん、結腸直腸がん、胃がん、皮膚がん（例えば、悪性黒色腫）、または甲状腺がんである。他の例では、異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する上記疾患または障害は、眼疾患である。さらに他の例では、異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する上記疾患または障害は、結合組織の遺伝的障害である。

【００８０】

ＩＶ．操作されたＴＧＦ－βモノマーの投与

組換えヒトＴＧＦ－β２モノマー、融合タンパク質、またはＴＧＦ－β２モノマーもしくは融合タンパク質をコードする核酸分子もしくはベクターを含む組成物（例えば、医薬組成物）が、本明細書で提供される。組換えヒトＴＧＦ－β２モノマー（もしくはその融合タンパク質）をコードするベクターを含む単離された細胞（例えば、Ｔ細胞）を含む組成物がまた、提供される。いくつかの実装において、上記組成物は、薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤または賦形剤を含む。

【００８１】

本開示において有用な薬学的に受容可能なキャリアおよび賦形剤は、従来どおりのものである。例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：　Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ，　Ｔｈｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　ｉｎ　Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，　編，　Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，　Ｗｉｌｌｉａｍｓ，　＆　Ｗｉｌｋｉｎｓ，　Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，　ＰＡ，　第２１版（２００５）を参照のこと。例えば、非経口製剤は通常、薬学的におよび生理学的に受容可能な流体ビヒクル（例えば、水、生理食塩水、他の平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなど）である注射用の流体を含む。固体組成物（例えば、散剤、丸剤、錠剤またはカプセル剤形態）に関して、従来の非毒性固体キャリアとしては、例えば、製薬グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムが挙げられ得る。生物学的に中性のキャリアに加えて、投与されるべき医薬組成物は、少量の非毒性補助物質（例えば、湿潤剤もしくは乳化剤、保存剤、およびｐＨ緩衝剤など（例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレート））を含み得る。含まれ得る賦形剤は、例えば、他のタンパク質（例えば、ヒト血清アルブミンまたは血漿調製物）である。

【００８２】

細胞の投与に関しては、上記細胞を導入するための種々の水性キャリアが使用され得る（例えば、緩衝食塩水など）。これらの溶液は無菌であり、概して望ましくない物質を含まない。これらの組成物は、従来の周知の滅菌技術によって滅菌され得る。上記組成物は、生理学的条件に近づけるために必要とされる場合の薬学的に受容可能な補助物質（例えば、ｐＨ調整剤および緩衝剤、張度調整剤（ｔｏｘｉｃｉｔｙ　ａｄｊｕｓｔｉｎｇ　ａｇｅｎｔ）など（例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなど））を含み得る。これらの製剤中での濃度は、広く変動し得、選択される特定の投与様式および被験体の必要性に応じて、主に、液量（fluid volume）、粘性、体重などに基づいて選択される。

【００８３】

上記組成物の投与形態は、選択される投与様式によって決定される。例えば、注射用流体に加えて、局所製剤、吸入製剤、経口製剤および坐剤製剤が使用され得る。局所的調製物としては、点眼剤、軟膏剤、スプレー、パッチなどが挙げられ得る。吸入調製物は、液体（例えば、液剤および懸濁剤）であり得、ミスト、スプレーなどを含み得る。経口製剤は、液体（例えば、シロップ剤、液剤または懸濁剤）、または固体（例えば、散剤、丸剤

、錠剤、またはカプセル剤）であり得る。坐剤調製物はまた、固体、ゲルであり得るか、または懸濁物形態にあり得る。固体組成物に関しては、従来の非毒性固体キャリアとしては、製薬グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムが挙げられ得る。このような投与形態を調製する実際の方法は、当業者に公知であるかまたは明らかである。

【００８４】

組換えヒトＴＧＦ－β２モノマーまたは融合タンパク質（またはＴＧＦ－β２モノマーもしくは融合タンパク質をコードする核酸分子／ベクター）を含む組成物（例えば、医薬組成物）が、正確な投与量の個々の投与に適した単位投与形態で製剤化され得る。投与されるＴＧＦ－β２モノマー、融合タンパク質、核酸分子またはベクターの量は、処置されている被験体、苦痛の重篤度、および投与様式に依存し、処方する臨床医の判断に委ねられるのが最良である。これらの範囲内で、投与されるべき製剤は、処置されている被験体において所望の効果を達成するために十分な量の活性な構成成分（複数可）の量を含み得る。

【００８５】

上記ＴＧＦ－β２モノマー、またはその組成物は、それらが種々の様式で（例えば、局所的に、経口的に、静脈内に、筋肉内に、腹腔内に、鼻内に、皮内に、髄腔内に、皮下に、吸入を介してまたは坐剤を介して）有効である組織に対して、ヒトまたは他の動物に投与され得る。特定の投与様式および投与レジメンは、その症例の詳細（例えば、被験体、疾患、関わっている疾患状態、および処置が予防的であるかどうか）を考慮に入れて、担当臨床医によって選択される。処置は、数日から数ヶ月、またはさらには数年の期間にわたって、化合物（複数可）の毎日の投与または毎日複数回投与を要し得る。

【００８６】

Ｖ．例示的条項

条項１．組換えトランスフォーミング成長因子（ＴＧＦ）－β２モノマーであって、

配列番号１の残基７７に相当するアミノ酸残基において、システインからセリンへの置換、またはシステインからアルギニンへの置換；

配列番号１のアミノ酸残基５２～７１に相当するα３ヘリックスの欠失；

配列番号１の残基２５に相当するアミノ酸残基において、リジンからアルギニンへの置換；

配列番号１の残基５１に相当するアミノ酸残基において、ロイシンからアルギニンへの置換；

配列番号１の残基７４に相当するアミノ酸残基において、アラニンからリジンへの置換；

配列番号１の残基９４に相当するアミノ酸残基において、リジンからアルギニンへの置換；

（ｉ）配列番号１の残基２６に相当するアミノ酸残基において、アルギニンからリジンへの置換；配列番号１の残基７９に相当するアミノ酸残基において、バリンからアルギニンへの置換；配列番号１の残基８９に相当するアミノ酸残基において、ロイシンからバリンへの置換；配列番号１の残基９２に相当するアミノ酸残基においてイソロイシンからバリンへの置換；配列番号１の残基９５に相当するアミノ酸残基においてスレオニンからリジンへの置換；および配列番号１の残基９８に相当するアミノ酸残基においてイソロイシンからバリンへの置換；

（ｉｉ）配列番号１の残基７に相当するアミノ酸残基においてシステインからバリンへの置換；および配列番号１の残基１６に相当するアミノ酸残基においてシステインからアラニンへの置換；または

（ｉｉｉ）配列番号１の残基７に相当するアミノ酸残基においてシステインからバリンへの置換；配列番号１の残基１６に相当するアミノ酸残基においてシステインからアラニンへの置換；配列番号１の残基２６に相当するアミノ酸残基においてアルギニンからリジンへの置換；配列番号１の残基７９に相当するアミノ酸残基においてバリンからアルギニ

ンへの置換；配列番号１の残基８９に相当するアミノ酸残基においてロイシンからバリンへの置換；配列番号１の残基９２に相当するアミノ酸残基においてイソロイシンからバリンへの置換；配列番号１の残基９５に相当するアミノ酸残基においてスレオニンからリジンへの置換；および配列番号１の残基９８に相当するアミノ酸残基においてイソロイシンからバリンへの置換、
を含む、組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【００８７】
条項２．配列番号１の残基７７に相当するアミノ酸残基においてシステインからアルギニンへの置換を含む、条項１に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【００８８】
条項３．前記ＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列は、配列番号４を含むかまたはそれからなる、条項２に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【００８９】
条項４．前記ＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列は、配列番号６を含むかまたはそれからなる、条項２に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【００９０】
条項５．配列番号１の残基７７に相当するアミノ酸残基においてシステインからセリンへの置換を含む、条項１に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【００９１】
条項６．前記ＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列は、配列番号５を含むかまたはそれからなる、条項５に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【００９２】
条項７．組換えトランスフォーミング成長因子（ＴＧＦ）－β２モノマーであって、前記ＴＧＦ－β２モノマーのアミノ酸配列は、配列番号７を含むかまたはそれからなる、組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【００９３】
条項８．ＰＥＧ化されている、条項１～７のいずれか一項に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【００９４】
条項９．グリコシル化または高グリコシル化されている、条項１～７のいずれか一項に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【００９５】
条項１０．放射線治療剤、化学療法のための細胞傷害性薬剤、薬物、イメージング剤、蛍光色素、または蛍光性タンパク質タグをさらに含む、条項１～９のいずれか一項に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー。
【００９６】
条項１１．条項１～１０のいずれか一項に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマーおよび異種タンパク質を含む、融合タンパク質。
【００９７】
条項１２．前記異種タンパク質は、タンパク質タグ、Ｆｃドメイン、アルブミン、アルブミン結合ポリペプチド、抗体、抗体の抗原結合フラグメントまたは標的化部分を含む、条項１１に記載の融合タンパク質。
【００９８】
条項１３．前記融合タンパク質は、１本鎖ポリペプチドである、条項１１または条項１２に記載の融合タンパク質。
【００９９】
条項１４．前記融合タンパク質は、ダイマーポリペプチドを形成する、条項１１または条項１２に記載の融合タンパク質。
【０１００】
条項１５．前記融合タンパク質は、ヘテロダイマーのものである、条項１１または条項

１２に記載の融合タンパク質。
【０１０１】
条項１６．前記融合タンパク質は、マルチマーのものである、条項１１または条項１２に記載の融合タンパク質。
【０１０２】
条項１７．　条項１～１０のいずれか１項に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマーまたは条項１１～１６のいずれか１項に記載の融合タンパク質をコードする、単離された核酸分子。
【０１０３】
条項１８．　プロモーターに作動可能に連結されている、条項１７に記載の核酸分子。
【０１０４】
条項１９．　条項１７または条項１８に記載の核酸分子を含む、ベクター。
【０１０５】
条項２０．　条項１７もしくは条項１８に記載の核酸分子、または条項１９に記載のベクターを含む、単離された細胞。
【０１０６】
条項２１．　前記細胞は、Ｔリンパ球である、条項２０に記載の単離された細胞。
【０１０７】
条項２２．
条項１～１０のいずれか１項に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー、条項１１～１６のいずれか１項に記載の融合タンパク質、条項１７もしくは条項１８に記載の核酸分子、条項１９に記載のベクター、または条項２０もしくは条項２１に記載の単離された細胞；および
薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤、
を含む、組成物。
【０１０８】
条項２３．　細胞におけるＴＧＦ－βシグナル伝達を阻害する方法であって、前記細胞と、有効量の、条項１～１０のいずれか１項に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー、条項１１～１６のいずれか１項に記載の融合タンパク質、条項１７もしくは条項１８に記載の核酸分子、条項１９に記載のベクター、条項２０もしくは条項２１に記載の単離された細胞、または条項２２に記載の組成物とを接触させることを包含する方法。
【０１０９】
条項２４．　異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する疾患または障害を有する被験体においてＴＧＦ－βシグナル伝達を阻害する方法であって、前記被験体に、有効量の条項１～１０のいずれか１項に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー、条項１１～１６のいずれか１項に記載の融合タンパク質、条項１７もしくは条項１８に記載の核酸分子、条項１９に記載のベクター、条項２０もしくは条項２１に記載の単離された細胞、または条項２２に記載の組成物を投与することを包含する方法。
【０１１０】
条項２５．　被験体において異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する疾患または障害を処置する方法であって、上記被験体に、治療上有効な量の条項１～１０のいずれか１項に記載の組換えＴＧＦ－β２モノマー、条項１１～１６のいずれか１項に記載の融合タンパク質、条項１７もしくは条項１８に記載の核酸分子、条項１９に記載のベクター、条項２０もしくは条項２１に記載の単離された細胞、または条項２２に記載の組成物を投与することを包含する方法。
【０１１１】
条項２６．　異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する前記疾患または障害は、線維性障害である、条項２４または条項２５に記載の方法。
【０１１２】
条項２７．　異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する前記疾患または障害は、乳がん

、脳がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、膀胱がん、肝臓がん、卵巣がん、腎がん、子宮内膜がん、結腸直腸がん、胃がん、皮膚がんまたは甲状腺がんである、条項２４または条項２５に記載の方法。

【０１１３】

条項２８．　異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する前記疾患または障害は、眼疾患である、条項２４または条項２５に記載の方法。

【０１１４】

条項２９．　異常なＴＧＦ－βシグナル伝達と関連する前記疾患または障害は、結合組織の遺伝的障害である、条項２４または条項２５に記載の方法。

【実施例】

【０１１５】

実施例

実施例１：　インビボでの投与のための改変されたＴＧＦ－β２モノマー

本実施例は、ＴＧＦ－β２モノマーのインビボでの送達を増強するための改変を評価する試験を記載する。

【０１１６】

ダイマー化を防止し、それによって、ＴＧＦ－βＩ型レセプター（ＴβＲＩ）への結合および動員を防止するように操作されたＴＧＦ－βモノマーは、ＷＯ　２０１８／０９４１７３（これは、その全体において本明細書に参考として援用される）に記載される。上記ＴＧＦ－β２モノマー、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍは、ダイマー化を防止するためにＣ７７Ｓ置換およびα３ヘリックスの欠失を含み、高親和性ＴβＲＩＩ結合を増強する７つのアミノ酸置換およびその電荷、従ってその溶解度を増加させるための２つの置換された塩基性残基をさらに含む（図１Ａ）。このモノマーの特性を改善するために、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍの４つのバリアントを生成した（配列番号４～７）。これらは、表１および図１Ｂ～１Ｅに記載される。単一のアミノ酸置換および欠失の位置は、配列番号１に示されるヒトＴＧＦ－β２に対するものである。

表１．　ＴＧＦ－βモノマーバリアント

【表１－１】

バリアント名	配列番号	バリアントの説明	モノマーの長さ	単一のアミノ酸置換	欠失
mmTGF-β2	2	ヒトTGF−β２ モノマー	112 a.a.	C77S	なし
mmTGF-β2-7M	3	α3がループで 置き換えられている ヒトTGF−β２モノマー	92 a.a.	K25R, R26K, L51R, A74K, C77S, L89V, I92V, K94R T95K, I98V	残基 52-71
mmTGF-β2- 7M2R	4	TβRIIに対する親和性が 増加し、凝集が低減した ヒトTGF−β２ミニモノマー	92 a.a.	K25R, R26K, L51R, A74K, C77R, V79R, L89V, I92V, K94R, T95K, I98V	残基 52-71
mmTGF-β2- 2M-Del7-16	5	TβRIIに対する親和性が 増加し、折りたたみが 改善された ヒトTGF−β２ミニモノマー	92 a.a.	C7V, C16A, K25R, L51R, A74K, C77S, K94R	残基 52-71

【表１－２】

バリアント名	配列番号	バリアントの説明	モノマーの長さ	単一のアミノ酸置換	欠失
mmTGF-β2-7M2R-Del7-16（「var1」ともいわれる）	6	TβRIIに対する親和性が増加し、凝集が低減し、折りたたみが改善されたヒトTGF－β2ミニモノマー	92 a.a.	C7V, C16A, K25R, R26K, L51R, A74K, C77R, V79R, L89V, I92V, K94R, T95K, I98V	残基52-71
mmTGF-β2-7M-PRDC	7	PRDCのシスチンノット領域を移植したフィンガー1～2およびフィンガー3～4を含むヒトTGF－β2ミニモノマー	115 a.a.	K25R, R26K, L89V, I92V, K94R, T95K, I98V	図1Dを参照のこと

【０１１７】

以下でより詳細に記載されるように、Ｃ７７のアルギニンでの置換は、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍにおけるとおりのセリンの代わりに、Ｖ７９のアルギニンでの置換とともに、モノマー形成を可能にし、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒの凝集を低減した（図１Ｂ）。誤った折りたたみの低減を、Ｃ７ＶおよびＣ１６Ａ置換のいずれかによって（ｍｍＴＧＦ－β２－２Ｍ－Ｄｅｌ７－１６；　図１Ｃ）、またはシスチンノット領域のＰＲＤＣのものでの置き換えによって（ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＰＲＤＣ；　図１Ｄ）、Ｃ７－Ｃ１６ジスルフィドの除去によって達成した。モノマー、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒ－Ｄｅｌ７－１６（図１Ｅ）は、凝集を低減しかつ折りたたみを改善する改変を含む。

配列番号１ － WT ヒト TGF-β2 ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSKVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS

配列番号２ － mmTGF-β２ ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS

配列番号３ － mmTGF-β2-7M ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCVSQDLEPLTIVYYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS

配列番号４ － mmTGF-β２-７Ｍ２Ｒ ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPRCRSQDLEPLTIVYYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS

配列番号５ － mmTGF-β２-２Ｍ-Ｄｅｌ７-１６ ALDAAYVFRNVQDNCALRPLYIDFRRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCVSQDLEPLTILYYIGRTPKIEQLSNMIVKSCKCS

配列番号６ － mmTGF-β２-７Ｍ２Ｒ-Ｄｅｌ７-１６ ALDAAYVFRNVQDNCALRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPRCRSQDLEPLTIVYYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS

配列番号７ － mmTGF-β２-７Ｍ-ＰＲＤＣ KEVLASSQEALVVTERKYLKSDWCKLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCYGQCNSFYIPRHVKKEEDSFQSSAFCVSQDLEPLTIVYYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCRCMSV

【０１１８】

いくつかの実装において、上記の配列のうちのいずれかは、Ｎ末端メチオニン（Ｍ）残基を含む。

【０１１９】

凝集する傾向の除去または低減

ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍが凝集する傾向を除去または低減する改変を、先ず調査した。

上記操作されたｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ　モノマーは、凝集する傾向が野生型ＴＧＦ－β２よりはるかに低いことは以前に示されたが、にもかかわらず、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍは、ある種の凝集する傾向を保持する（Ｋｉｍら，　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２９２（１７）：７１７３－７１８８，　２０１７）。これは、非変性洗浄剤　３－［（３－コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ］－１－プロパンスルホネート（ＣＨＡＰＳ）の非存在下（図２Ｄ、２Ｅ）またはその存在下（図２Ｆ）のいずれかで記録した場合に、二次元^{1}Ｈ－^{15}Ｎ　ＮＭＲシフト相関（ＨＳＱＣ，　ｈｅｔｅｒｏｎｕｃｌｅａｒ　ｓｉｎｇｌｅ－ｑｕａｎｔｕｍ　ｃｏｒｒｅｌａｔｉｏｎ）スペクトルによって検出されるように、アミド骨格^{1}Ｈ－^{15}Ｎシグナルの出現から明らかになった。ＣＨＡＰＳの非存在下では、骨格アミドシグナルは、非常に強度において変動性であり、いくらかは、特に、タンパク質の可溶性がｐＨ４．６でのものと比較して低減されることが公知であるｐＨ７．２では、ほとんど検出可能でなかった。シグナル強度におけるこの変動タイプは、より高次の凝集物の一過性の形成によって引き起こされる。このような凝集物の形成は、タンパク質の回転相関時間（τ_c）を長くし、従って、ＮＭＲシグナルを広くし、シグナル強度を減少させる。ｐＨ４．６または７．２のいずれかにおいてＣＨＡＰＳの漸増濃度を添加すると、多くのシグナルの強度において改善、および従って、観察されるスペクトルにおいてこれらの均質性の増加がもたらされことが観察された（図２Ｆ）。シグナル強度における改善は、ＣＨＡＰＳの濃度に依存し、実質的な改善は、約１０ｍＭの濃度まで起こった。

【０１２０】

ＣＨＡＰＳがｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍの凝集を低減するにあたって果たした役割は、野生型のＴＧＦ－β２ホモダイマーがダイマー境界の一部であったフィンガーの基部として最もよく記載される、分子の領域に残っているいくつかの疎水性残基を介した凝集物の一過性の形成に起因するという仮説が立てられた（図１Ａ）。凝集物形成に対してほとんど効果を有しないことが見出されたいくつかの置換を試験したが、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍにおける２つの残基のアルギニンへの置換、Ｓ５７ＲおよびＶ５９Ｒ（図１Ｂ）は、配列番号１の野生型ヒトＴＧＦ－β２に関するＣ７７ＳおよびＶ７９Ｒ置換に相当し、凝集する傾向を有意に低減した。アルギニンで置き換えられた２つの残基を有するｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍのこのバリアントは、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒ（配列番号４）と称される。凝集する傾向の低減に関する証拠は、ｐＨまたは非変性ＣＨＡＰＳが添加されたか否かにかかわらず、このバリアントに関して観察された遙かにより均一なＮＭＲシグナル強度であった（図２Ａ～２Ｃ）。

【０１２１】

折りたたみを改善する改変

ＴＧＦ－βタンパク質は、シスチンノット成長因子折りたたみ（ＣＫＧＦ）を有するとして分類されるモノマーから形成される（Ｈｉｎｃｋら，　Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂ　Ｐｒｏｓｐｅｃｔ　Ｂｉｏｌ　８（１２）：ａ０２２１０３，　２０１６）。この折りたたみは、ＴＧＦ－βファミリーの全てのタンパク質において存在するが、ヒトにおける多くの他のシグナル伝達タンパク質およびシグナル伝達タンパク質アンタゴニストにおいても見出される。これらとしては、シグナル伝達タンパク質である、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）、および神経成長因子（ＮＧＦ）ならびにアンタゴニスト（例えば、ノギン、スクレロスチン、およびＤａｎおよびＣｅｒｂｅｒｕｓに関係するタンパク質（ＰＲＤＣ）が挙げられる。ＴＧＦ－βファミリーのタンパク質は、ＣＫＧＦタンパク質の中でも、それらが全て、Ｎ末端プロドメインを有するという点で特有である。プロドメインの役割はなお調査されている最中であるが、それらは、上記ファミリーの多くのタンパク質に対して調節的な役割を有することが公知である（Ｈｉｎｃｋら，　Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂ　Ｐｒｏｓｐｅｃｔ　Ｂｉｏｌ　８（１２）：ａ０２２１０３，　２０１６）。この調節は、成長因子ドメイン（ＧＦＤ）へのプロドメインの結合からもたらされ、ときおり、十分な（ナノモル濃度からサブナノモル濃度までの）親和性が、ＧＦＤがＩ型およびＩＩ型レセプターを結合する能力を完全に

遮断する。いくつかのプロドメイン（例えば、ＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２、およびＴＧＦ－β３に関するもの）は、ＧＦＤと非常に高親和性で結合するのみならず、従って、それらが活性化されるまで不活性（潜伏性）形態を維持するが、ＧＦＤの適切な折りたたみのために必要とともされる。ＴＧＦ－βのＧＦＤは、他のＣＫＧＦタンパク質のものと同様に、シスチンノット（これは、３つのジスルフィドによって安定化された構造モチーフである）によって特徴づけられる（Ｓｃｈｗａｒｚ，　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　３９８（１２）：　１２９５－１３０８，　２０１７）。３つのジスルフィドは、空間中で互いに非常に近いので、それらの形成は複雑であり、正確なものに加えて、多くの可能な代替のトポロジー配置が存在する。

【０１２２】

これは、シスチンノット（ならびに１つのさらなるジスルフィド（８－１７ジスルフィド（配列番号１に関して残基７および１６でのシステインに相当し、従って本明細書中で「７－１６」といわれる）として公知）を保持することから、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍに関連している。ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍタンパク質を生成する１つの方法は、これを細菌において不溶性封入体の形態において発現し、そのタンパク質を再折りたたみして、ジスルフィドの天然の対を形成することである（Ｈｕａｎｇ　ａｎｄ　Ｈｉｎｃｋ，　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　１３４４：６３－９２，　２０１６）。全体的な折りたたみ収量は、にもかかわらず、誤った折りたたみおよびその８つのシステイン残基の不適切な対形成の結果として形成する凝集物によって限られている。ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍタンパク質はまた、分泌型タンパク質として（しかし、野生型ＴＧＦ－βホモダイマーとは異なり、プロドメインがない）真核生物宿主中でタンパク質を発現することによって生成され得る。しかし、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍの発現のためにこの方法を使用しようとする試みは、有意な誤って折りたたまれたジスルフィド結合凝集物の形成をもたらした。

【０１２３】

従って、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍの折りたたみを改善することを目的とした改変を調査した。折りたたみを改善するために、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍの４つのジスルフィドの各々を、一度に１つのジスルフィドずつ除去した。これを行うために、各ジスルフィドを形成する２つのシステインを、バリン－アラニン対で置換し、次いで、その改変したタンパク質を発現させ、再折りたたみし、以前の手順に従って精製した（Ｋｉｍら，　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２９２（１７）：７１７３－７１８８，　２０１７）。天然に折りたたまれたタンパク質を獲得する可能性を高めるために、上記置換を、上記操作されたＴＧＦ－β２モノマーの文脈で、しかしただ２つの本質的な残基、Ｋ２５およびＫ９４で生成し、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍにおけるとおりの７つの置換の代わりに、ＴＧＦ－β１のものに変化させた。これらのバリアントは、ＴβＲＩＩを高親和性で結合するが、改善された効率で折りたたまれるとなお予測された。なぜならＴＧＦ－β２は、ＴＧＦ－β１より遙かに高い効率で折りたたまれることが公知だからである（Ｈｕａｎｇ　ａｎｄ　Ｈｉｎｃｋ，　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　１３４４：６３－９２，　２０１６）。結果は、このバックグラウンドにおいて、７－１６ジスルフィドを形成するシステインをバリンおよびアラニンで置換したバリアント（ｍｍＴＧＦ－β２－２Ｍ－Ｄｅｌ７－１６と称される（配列番号５；図１Ｃ））が、天然に折りたたまれる（図３Ａ～３Ｃ）が、他の３つのジスルフィドを除去したバリアント（１５－７８、４４－１０９および４８－１１１）は、非天然であることを示した。ＣＨＡＰＳの非存在下でのＮＭＲシグナル強度には著しく有意な、凝集を示唆するバリエーションがあったが、これらの不均衡は、ＣＨＡＰＳを添加すると少なくなる（図３Ａ～３Ｃ）。７－１６ジスルフィドが、タンパク質の折りたたみを破壊することなく除去され得るという事実は、上記タンパク質が細菌中で生成され、インビトロで再折りたたまれようが、または分泌型タンパク質として真核生物中で上記タンパク質が生成されるとしても、これが折りたたみにおいて有意な改善をもたらし得ることを示す。

【０１２４】

調査した改変の第３のタイプはまた、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍの折りたたみを改善する

ことを目的とした。選択したストラテジーは、いくつかのＣＫＧＦタンパク質が存在する（例えば、天然にモノマーとして生成され、プロドメインを有さず、折りたたみに関してもプロドメインに依拠しない骨形成タンパク質（ＢＭＰ）アンタゴニストＰＲＤＣ）という事実を利用することであった。ＰＲＤＣの折りたたみにおける潜在的な改善を利用するが、高親和性ＴβＲＩＩ結合を保持するために、キメラｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ：ＰＲＤＣ構築物を生成し、ここでｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍのフィンガー１－２および３－４領域（これは、ＴβＲＩＩの結合を担う領域である）を、ＰＲＤＣのシスチンノット領域に移植した。この構築物は、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＰＲＤＣ（配列番号７；　図１Ｄ）と称され、これを、Ｅ．ｃｏｌｉ中で発現させ、ｍｍＴＧＦ－β２７Ｍに関して使用したもの（Ｋｉｍら，　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２９２（１７）：７１７３－７１８８，　２０１７）に類似の様式で再折りたたみし、高分解能カチオン交換クロマトグラフィーを使用して均質になるまで精製した。ＮＭＲ分析を介して、このタンパク質は、^{1}Ｈ次元において７．９～８．５ｐｐｍに相当するランダムコイル領域の十分外側にアミドシグナルが分散していることによって明らかにされるように、天然に折りたたまれることが示された（図４Ａ～４Ｃ）。これは、ＰＲＤＣのシスチンノット領域がｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍのフィンガー領域と十分に一体化されて、設計が成功したことを示す。

【０１２５】

ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍバリアントの結合特性

細胞の中およびインビボで機能的であるために、任意の設計されたｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍバリアントの必要条件は、これがＴβＲＩＩを高親和性で結合することである。本明細書で記載されるｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍバリアント（ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒ（配列番号４）、ｍｍＴＧＦ－β２－２Ｍ－Ｄｅｌ７－１６（配列番号５）、およびｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＰＲＤＣ（配列番号７））がＴβＲＩＩを結合する能力を評価するために、等温滴定熱量測定（ＩＴＣ）およびネイティブゲルを使用した。ＩＴＣ結合実験を、漸増量のＴβＲＩＩをｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒ（配列番号４）またはｍｍＴＧＦ－β２－２Ｍ－Ｄｅｌ７－１６（配列番号５）へと、参照コントロールとして使用されるｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ（配列番号３）とともに注入することによって行った。これらの滴定は、大きな負のエンタルピーおよびほぼ１：１結合化学量論を有する容易に検出可能な等温線を生じた（図５）。統合熱の１：１結合モデルへのフィットから、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２ＲおよびｍｍＴＧＦ－β２－２Ｍ－Ｄｅｌ７－１６に関して、それぞれ７５．１ｎＭおよび８０．１ｎＭというＴβＲＩＩの結合に関する解離定数（K_D）が生じた（図５）。これらのK_Dは、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ（６０．５ｎＭ）に関して決定されたものの実験誤差の範囲内であり、これは、凝集を低減するかまたは折りたたみを改善するために導入された置換が、上記タンパク質がＴβＲＩＩを結合する能力に対して有害な効果を有しなかったことを示す。

【０１２６】

ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＰＲＤＣ（配列番号７）の結合を、代わりにネイティブゲルを使用して評価した。これらは、K_Dの定量可能な測定値を提供しないが、高親和性結合を示す。なぜなら複合体の検出は、その２つのタンパク質が電気泳動の時間スケールに匹敵する時間スケール（これは、およそ１時間である）で結合したままであることを必要とするからである。ネイティブゲルは、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒ、およびｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＰＲＤＣが全て、ゲルの長さのおよそ１／４を移動するバンドを形成する一方で、ＴβＲＩＩがゲルのほぼ全長にわたって泳動することを示した（図４Ｄ）。これは、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒ、およびｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＰＲＤＣ単独ではゲルに入らないという以前の発見と合わせると、これらのタンパク質の３つ全てが、ＴβＲＩＩを高親和性で結合することを示唆する。これは、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍおよびｍｍ ＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒバリアントに関するＩＴＣ結果と一致し、これは、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＰＲＤＣにもあてはまることを示す。

【０１２７】

ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍバリアントの阻害特性

インビボで機能的であるために、任意の設計したｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍバリアントは、ＴＧＦ－βシグナル伝達を細胞中で阻害するべきである。本開示のｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍバリアントに関してこのことを評価するために、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒ（配列番号４）、ｍｍＴＧＦ－β２－２Ｍ－Ｄｅｌ７－１６（配列番号５）、およびｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＰＲＤＣ（配列番号７）、ＨＥＫ－２９３　ＴＧＦ－βルシフェラーゼレポーター細胞株（ここで上記細胞は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子に融合されたＴＧＦ－β　ＣＡＧＡエンハンサーエレメントで安定したトランスフェクトされている）を使用した。このアッセイで阻害能力を評価するために、上記細胞を、９６ウェルプレートにプレーティングし、種々の濃度のｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒ、ｍｍＴＧＦ－β２－２Ｍ－Ｄｅｌ７－１６、およびｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＰＲＤＣを、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍをコントロールとして使用して、添加した。３０分後、ＴＧＦ－βシグナル伝達を、ＴＧＦ－β３を最終濃度　１０ｐＭになるように添加することによって刺激し、１２時間後に、上記細胞を溶解し、ルシフェラーゼ活性を評価した。得られた結果は、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２Ｒ、ｍｍＴＧＦ－β２－２Ｍ－Ｄｅｌ７－１６、およびｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＰＲＤＣGA0の各々が、ＴＧＦ－β３によって誘導されるシグナル伝達を強力に阻害する（フィットしたＩＣ$_{50}$値は、それぞれ、５３ｎＭ、１１１ｎＭ、および２８３ｎＭ）ことを示した（図６Ｂ～６Ｄ）。ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ２ＲおよびｍｍＴＧＦ－β２－２Ｍ－Ｄｅｌ７－１６の値はともに、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ（図６Ａ）に関して測定されたものの２倍以内であった。これは、これらのタンパク質の両方が、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍとほぼ同程度に有効であることを示す（ＩＣ$_{50}$　５８ｎＭ）。なお強力ではあるが、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＰＲＤＣのＩＣ$_{50}$は、２８３ｎＭであり、これは、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍと比較して約５倍低減されている。これは、ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍ－ＰＲＤＣが機能的ＴＧＦ－β阻害剤であるが、その効力は、２つのフィンガー領域の配向におけるいくらかの小さな変化に起因して、わずかに損なわれ得ることを示す。

【０１２８】

概要

本明細書で開示されるｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍバリアントは、それらの凝集傾向を低減し、それらの折りたたみ傾向を増加させる置換を有する。上記ｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍバリアントは、ＴβＲＩＩを高親和性で結合し、培養された細胞においてＴＧＦ－β３シグナル伝達を強力に阻害する能力を保持することが各々示された。従って、本開示のｍｍＴＧＦ－β２－７Ｍバリアントは、それらがインビボで投与される能力を改善し、従って、治療的に介入してＴＧＦ－β媒介性疾患の進行を弱めるための新たな道筋を提供する属性を有する。

【０１２９】

開示される発明の原理が適用され得る多くの可能な実装に鑑みて、その例証される実装が、本発明の好ましい例に過ぎず、本発明の範囲を限定するとして解釈されるべきでないことは、認識されるべきである。むしろ、本発明の範囲は、以下の特許請求の範囲によって定義される。本発明者らは、従って、これらの請求項の範囲および趣旨内に入る全てを本発明者らの発明として特許請求する。

【図面】

【図１－１】

FIG. 1A

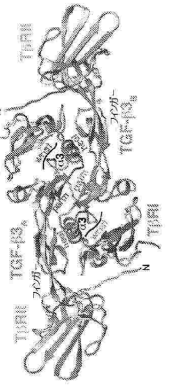
TGF-β2 (配列番号　1) 対 mmTGF-β2-7M (配列番号　3)

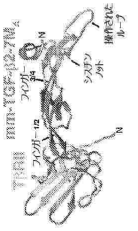
1．ヒールヘリックス欠失
2．鎖間ジスルフィド位置におけるシステインのセリンでの置換
3．ヒールヘリックス領域における塩基性残基の導入
4．TGF－β２配列をTGF－β１配列に部分的に変換する７つの改変

配列番号 1 ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHT 59
配列番号 3 ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYR------- 52
**********************44**********************3111111111

配列番号 1 KVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGNTPKIEQLSNMIVKSCKCS 112
配列番号 3 ----------ASKSPSCVSQDLEPLTILYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS 92
1111111111**3**2**********4**4**44**4**************

TGF-β3-(TβRII)$_2$-(TβRII)$_2$　　TGF-β3-TβRII





【図１－２】

FIG. 1B

mmTGF-β2-7M (配列番号　3) 対 mmTGF-β2-7M2R (配列番号　4)

5．鎖間ジスルフィド位置のアルギニンでの置換
6．ダイマー界面における塩基性残基の導入

57 59
| |
配列番号 3 ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCV 59
配列番号 4 ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPrCr 59
**5*6

配列番号 3 SQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS 92
配列番号 4 SQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS 92
****

【図１－３】

FIG. 1C

mmTGF-β2-7M（配列番号 3）対 mmTGF-β2-2M-Del7-16（配列番号 5）

7．7－16ジスルフィドを形成するシステインの排除
8．TGF－β1配列をTGF－β2配列に戻す改変

```
                                                  16
                                                  |
配列番号 3  ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCV  59
配列番号 5  ALDAAYVFRNVQDNCALRPLYIDFRRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCV  59
            *******7**********7**********8**************************

配列番号 3  SQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS  92
配列番号 5  SQDLEPLTILYYIGRTPKIEQLSNMIVKSCKCS  92
            **********8**8**8**8**************
```

【図１－４】

FIG. 1D

mmTGF-β2-7M（配列番号 3）対 mmTGF-β2-7M-PRDC（配列番号 7）

9．PRDCのシステインノット領域の移植による改変

```
                                フィンガー 1-2
                          ___________________
配列番号 3  ---------ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPY  50
配列番号 7  KEVLASSQEALVVTERKYLKSDWCKLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCYGQCNS  59
            999999999*999999999*9*9**********************9*9*99
                                フィンガー 3-4
                                ___________
配列番号 3  R----------ASKSPSCVSQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS--  92
配列番号 7  FYIPRHVKKEEDSFQSSAFCVSQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCRCMSV  115
            999999999999999999*************************9*999
```

【図１－５】

FIG. 1E

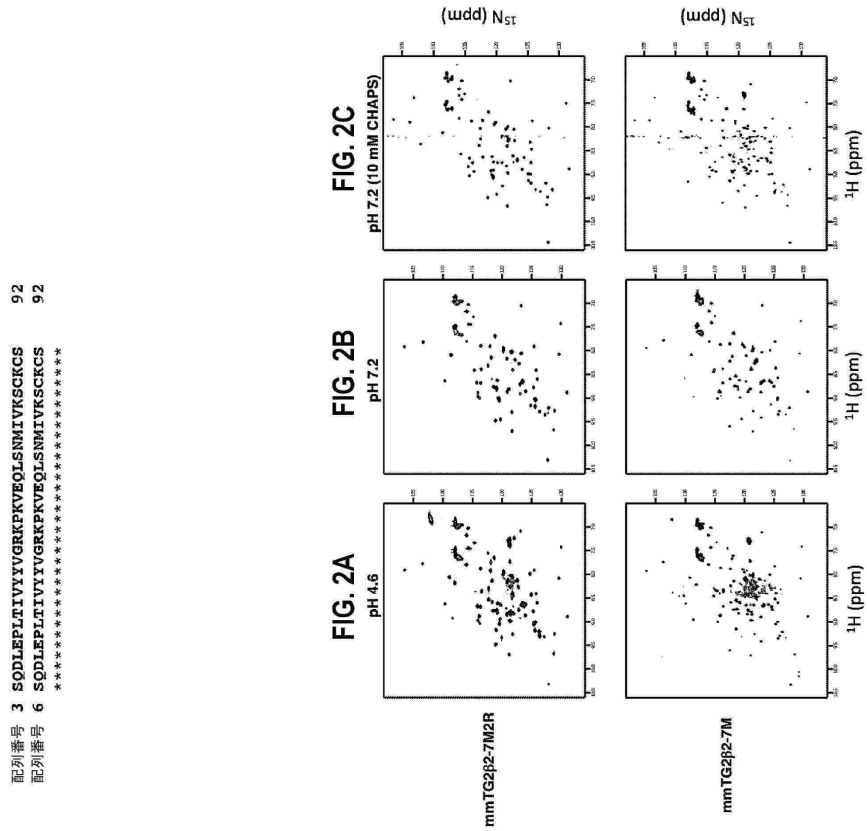
mmTGF-β2-7M（配列番号 3）対 mmTGF-β2-7M2R-Del7-16 または var1（配列番号 6）

5．鎖間ジスルフィド位置のアルギニンでの置換
6．ダイマー界面における塩基性残基の導入
7．7－16ジスルフィドを形成するシステインの除去

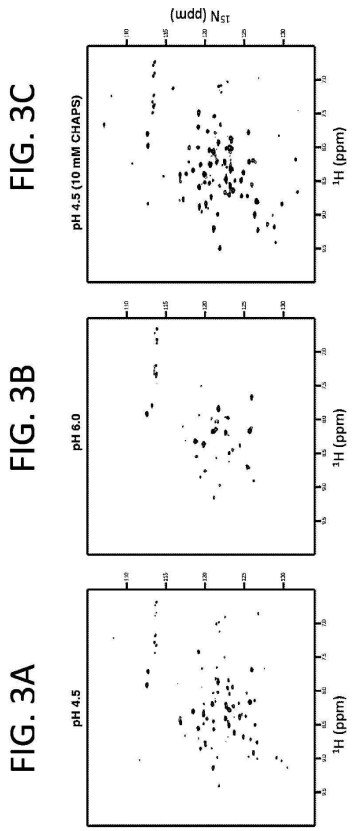
```
                                                  16
                                                  |
配列番号 3  ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCV  59
配列番号 6  ALDAAYVFRNVQDNCALRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPcCr  59
            *******7**********7**********************************5*6

配列番号 3  SQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS  92
配列番号 6  SQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS  92
            ********************************
```

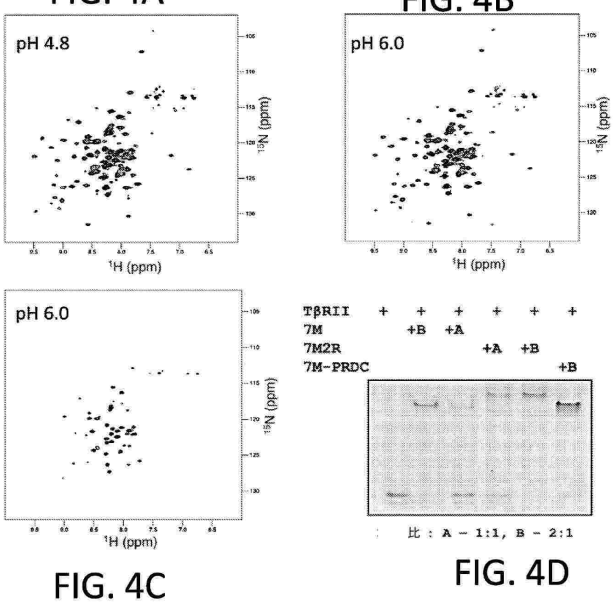
【図２】



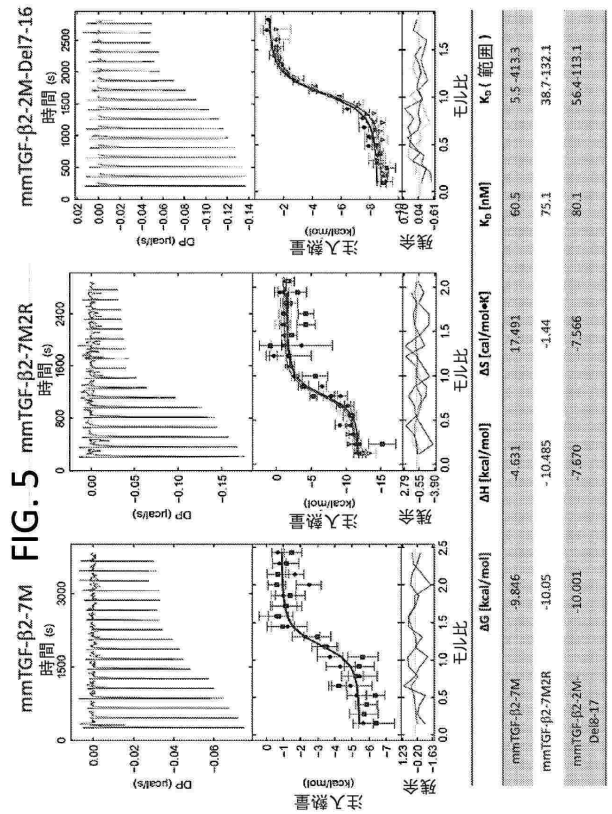
【図３】



【図４】

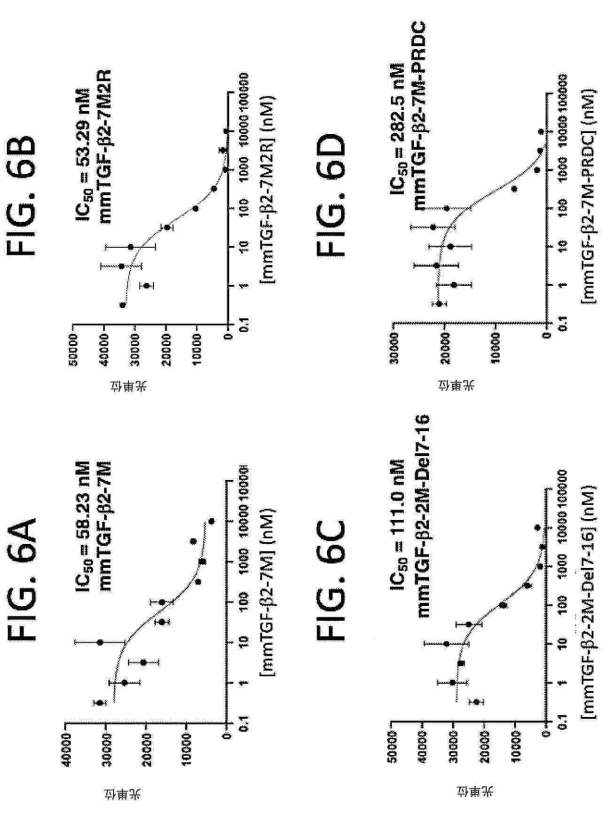


【図５】



	ΔG [kcal/mol]	ΔH [kcal/mol]	ΔS [cal/mol•K]	K_D [nM]	K_D (範囲)
mmTGF-β2-7M	-9.846	-4.631	17.491	60.5	5.5-413.3
mmTGF-β2-7M2R	-10.05	-10.485	-1.44	75.1	38.7-132.1
mmTGF-β2-2M-Del8-17	-10.001	-7.670	7.566	80.1	56.4-113.1

【図６】



【配列表】
20245372340000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/77879

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. C07K 14/495, A61K 38/00 (2023.01)
ADD. C07K 19/00, A61P 19/00 (2023.01)
CPC - INV. C07K 14/495, A61K 38/00
ADD. A61P 19/00, C07K 2319/30, C07K 2319/31
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)
See Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2019/0359667 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH-OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 28 November 2019 (28.11.2019). Especially para [0007], [0087], SEQ ID NO: 2	1-3, 5, 8-22
A	US 2002/0115834 A1 (CERLETTI) 22 August 2002 (22.08.2022). Especially SEQ ID NO: 4	1-3, 5, 8-22
X, P	WO 2022/047220 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH-OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 3 March 2022 (03.03.2022). Especially pg 15 ln 20 continued to pg 16 ln 10, claims 1-3, SEQ ID NO: 2	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
12 January 2023	FEB 28 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Karl Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/77879

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. ☒ forming part of the international application as filed.

   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/77879

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:
-----continued on Extra 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 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.:
Claims 1-3, 5, 8-22, limited to R26K, V79R, L89V, I92V, T95K, and I98V according to SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 4)

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/77879

Continuation of Box III: Observations where Unity of Invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+: Claims 1-22, drawn to a recombinant TGF-beta.2 monomer engineered to prevent dimerization and block TGF-beta signaling. The recombinant TGF-b2 monomer will be searched to the extent that it is the first named variant, having substitutions R26K, V79R, L89V, I92V, T95K, and I98V according to SEQ ID NO: 1 (claim 1 (i), as comprised by SEQ ID NO: 4 in instant application pg 20 Table 1). This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1-3, 5, 8-22 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass substitutions R26K, V79R, L89V, I92V, T95K, and I98V according to SEQ ID NO: 1, as comprised by SEQ ID NO: 4.
Additional recombinant TGF-b2 monomers will be searched upon payment of additional fees. Applicant must specify the claims that encompass any additional elected amino acid substitutions and/or deletions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be: having the substitutions C7V, C16A according to SEQ ID NO: 1 (claim 1(ii), SEQ ID NO: 5 in instant application Table 1) (claims 1, 2, 5, 6, 8-22).

Group II: Claims 23-29, drawn to a method comprising administering a recombinant TGF-B2 monomer.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:
Among the inventions listed as Groups I+ are the specific amino acid substitutions and deletions recited therein. Each invention requires specific substitution and/or deletions not required by any other inventions.

No technical features are shared between the polypeptide sequences of Group I+ and, accordingly, this groups lacks unity a priori.

Common Technical Feature:
Additionally, even if Groups I+ inventions and Group II were considered to share the technical features of:

Group I+ inventions share claim 1.

Group II claims 23, 24, 25 depend from Group I+ claim 1, so both Groups I+ and II share claim 1.

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art, and is disclosed by US 2019/0359667 A1 to University of Pittsburgh-Of the Commonwealth System of Higher Education (hereinafter "UPitt).

UPitt discloses [claim 1] a recombinant transforming growth factor (TGF)-beta.2 monomer, comprising:
a cysteine to serine substitution, or a cysteine to arginine substitution, at an amino acid residue
corresponding to residue 77 (para [0007]; "Provided herein is a recombinant TGF-b monomer that includes a cysteine to serine substitution at amino acid residue 77; a deletion of amino acid residues 52-71") of SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 2; AA 2-113 100% sequence identity)
a deletion of the alpha.3 helix corresponding to amino acid residues 52-71 of SEQ ID NO: 1 (para [0007]);
a lysine to arginine substitution at an amino acid residue corresponding to residue 25 of SEQ ID NO: 1 (para [0087]; "In specific examples, the at least one amino acid substitution that increases affinity of the human TGF-b2 monomer for TbRII includes a lysine to arginine at residue 25");
a leucine to arginine substitution at an amino acid residue corresponding to residue 51 of SEQ ID
NO: 1 (para [0086]; "In some embodiments, the TGF-b monomer is a human TGF-b2 monomer. In some examples, the at least one amino acid substitution that increases net charge of the human TGF-b2 monomer includes a leucine to arginine substitution at residue 51; an alanine to lysine substitution at residue 73; or both a leucine to arginine substitution at residue 51 and an alanine to lysine substitution at residue 73 (with reference to SEQ ID NO: 2)");
an alanine to lysine substitution at an amino acid residue corresponding to residue 74 of SEQ ID
NO: 1 (para [0086]);
a lysine to arginine substitution at an amino acid residue corresponding to residue 94 of SEQ ID
NO: 1 (para [0087]; an asparagine to arginine at residue 94 [not "asparagine" in text of UPitt is incorrect because SEQ ID NO: 2 in said document indicates that position 94 is a lysine residue, not an asparagine]).

---please see next sheet---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/77879

---continued from previous sheet---

As the common technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a common special technical feature that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I+ and II lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

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）
Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ　27/02　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	27/02	
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	43/00	１１１
Ａ６１Ｋ　38/18　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	38/18	
Ｃ１２Ｎ　5/0783(2010.01)		Ｃ１２Ｎ	5/0783	

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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,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

(74)代理人　100181641
弁理士　石川 大輔
(74)代理人　230113332
弁護士　山本 健策
(72)発明者　ヒンク， アンドリュー ピー.
アメリカ合衆国 ペンシルベニア １５２０８， ピッツバーグ， ヨークシャー ドライブ １２３
(72)発明者　デポー， クリスティン
アメリカ合衆国 ペンシルベニア １５２３２， ピッツバーグ， リーハイ アベニュー ３７５，アパートメント ２
(72)発明者　デルゴフ， グレッグ エム.
アメリカ合衆国 ペンシルベニア １５２１７， ピッツバーグ， ビーチウッド ブールバード ２７４７， ユニット １４

Ｆターム（参考）　4B065　AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C084　AA02 AA03 BA44 DB52 NA14 ZA33 ZB26 ZC41
4H045　AA10 AA20 AA30 BA71 BA72 CA40 EA20 FA74 GA23