(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0137126
(43) 공개일자 2024년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/22 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7030136(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년01월05일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2019-7022663
원출원일자(국제) 2018년01월05일
심사청구일자 2021년01월04일
(85) 번역문제출일자 2024년09월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/012601
(87) 국제공개번호 WO 2018/129329
국제공개일자 2018년07월12일
(30) 우선권주장
62/443,615 2017년01월06일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
스칼러 락, 인크.
미국 02142 매사추세츠주 케임브리지 빈니 스트리트 301 써드 플로어
(72) 발명자
슈르프, 토마스
미국 02140 매사추세츠주 케임브리지 코티지 파크 애비뉴 18
다타, 아비셰크
미국 02131 매사추세츠주 보스턴 헴먼 스트리트 48
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

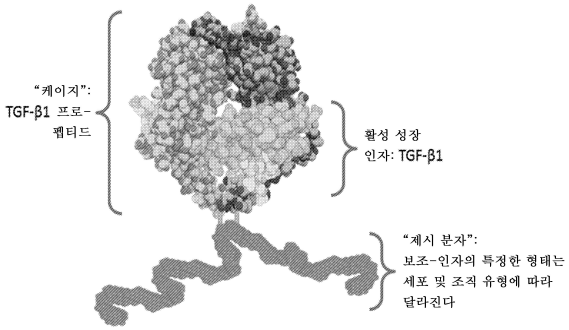
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제 및 그의 용도**

(57) 요 약

TGFβ1 조절이상을 수반하는 질환의 치료에서의 TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제의 치료 용도가 본원에 기재된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 35/04 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자
카르벤, 그레고리, 제이.
미국 01754 매사추세츠주 메이너드 브룩스 스트리트 89
마르틴, 콘스탄스
미국 02474 매사추세츠주 알링턴 다트머스 스트리트 19
칼라, 아시쉬
미국 02478 매사추세츠주 벨몬트 번햄 스트리트 19 유닛 디2
롱, 킴벌리
미국 02130 매사추세츠주 보스턴 자메이카 플레이스 2
버클러, 앨런
미국 02476 매사추세츠주 알링턴 하일랜드 애비뉴 81

(30) 우선권주장
62/452,866 2017년01월31일 미국(US)
62/514,417 2017년06월02일 미국(US)
62/529,616 2017년07월07일 미국(US)
62/549,767 2017년08월24일 미국(US)
62/558,311 2017년09월13일 미국(US)
62/585,227 2017년11월13일 미국(US)
62/587,964 2017년11월17일 미국(US)
62/588,626 2017년11월20일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

고형 종양의 치료방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 국제 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 하기 출원: 2017년 1월 6일에 출원된 미국 가출원 번호 62/443,615; 2017년 1월 31일에 출원된 미국 가출원 번호 62/452,866; 2017년 6월 2일에 출원된 미국 가출원 번호 62/514,417; 2017년 7월 7일에 출원된 미국 가출원 번호 62/529,616; 2017년 8월 24일에 출원된 미국 가출원 번호 62/549,767; 2017년 9월 13일에 출원된 미국 가출원 번호 62/558,311; 2017년 11월 13일에 출원된 미국 가출원 번호 62/585,227; 2017년 11월 17일에 출원된 미국 가출원 번호 62/587,964; 및 2017년 11월 20일에 출원된 미국 가출원 번호 62/588,626에 대한 우선권 및 그의 이익을 주장하며, 이들 각각의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 명백하게 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 함유하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 2018년 1월 5일에 생성된 상기 ASCII 카피는 127036-02020_ST25.txt로 명명되고, 221,821 바이트 크기이다.

배 경 기 술

[0005] 성장 인자의 형질전환 성장 인자 β (TGFβ) 슈퍼패밀리는 세포 성장의 억제, 조직 항상성, 세포외 매트릭스 (ECM) 재형성, 내피에서 중간엽으로의 이행 (EMT), 세포 이동 및 침습, 및 면역 조정/억제, 뿐만 아니라 중간엽에서 상피로의 이행을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 생물학적 과정을 조절하는 다수의 신호전달 캐스케이드에 수반된다. ECM 재형성과 관련하여, TGFβ 신호전달은 섬유모세포 집단 및 ECM 침착물 (예를 들어, 콜라겐)을 증가시킬 수 있다. 면역계에서, TGFβ 리간드는 T 조절 세포 기능, 및 면역 전구체 세포 성장 및 항상성의 유지를 조정한다. 정상 상피 세포에서, TGFβ는 강력한 성장 억제자 및 세포 분화의 촉진자이다. 그러나, 종양이 발생하고 진행됨에 따라, 이들은 빈번하게 TGFβ에 대한 그의 음성 성장 반응을 잃는다. 이러한 환경에서, TGFβ는 혈관신생을 자극하고, 기질 환경을 변경하고, 국부 및 전신 면역억제를 유발하는 그의 능력으로 인해 종양 발생의 촉진자가 될 수 있다. 이들 및 다른 이유로 인해, TGFβ는 다수의 임상 적응증에 대한 치료 표적이었다. 다수의 그룹에 의해 지금까지 많은 노력이 있었음에도 불구하고, TGFβ 치료제의 성공적인 임상 개발은 어려웠다.

[0006] 래트 및 개에서의 것을 포함하여 전임상 연구로부터의 관찰은 생체내 TGFβ의 억제와 연관된 특정 독성을 밝혀냈다. 더욱이, 여러 TGFβ 억제제가 지금까지 개발되었지만, TGFβ를 표적화하는 대부분의 임상 프로그램은 부작용으로 인해 중단되었다 (예를 들어, WO 2017/156500에 요약됨). 따라서, 질환 예컨대 암 및 섬유증의 진행에서의 TGFβ 신호전달의 수반을 가리키는 직접적 및 간접적 증거의 라인에도 불구하고, 시장에서 입수가능한 안전하고 효과적인 TGFβ 치료제가 존재하지 않는다.

[0007] 증식성 장애 중에서, TGFβ의 조절이상은 또한 클론 골수증식, 이상 시토카인 생산, 골수외 조혈, 및 골수 섬유증을 특징으로 하는 골수 장애인 골수섬유증에 연루되어 왔다. 질환의 발병기전에서 JAK2, MPL 및 CALR에서의 체세포 돌연변이가 확인되었지만, 골수섬유증의 치료를 위해 FDA에 의해 승인된 JAK1/JAK2 억제제인 룩솔리티닙 (자카피(Jakafi))은 환자에서 확립된 골수 섬유증을 호전시키는 데 있어서 효능이 입증되지 않았다.

[0008] 따라서, 예를 들어 증식성 장애 (예를 들어, 암), 섬유증 및 염증을 포함한 TGFβ1을 수반하는 질환 및 장애를 효과적으로 및 안전하게 치료하는 데 사용될 수 있는, TGFβ 신호전달을 억제하는 개선된 방법 및 조성물이 필요하다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은 다중 공급원에서의 TGFβ 활성화를 차단하는 것이 TGFβ 조절이상의 ECM 측면 및 면역 측면 둘 다를 수반하는 수많은 질환을 치료하는 데 있어서 더 큰 임상 효과를 제공할 수 있다는 인식을 포괄한다. 따라서, 그의 이소형 선택성, 질환 함요 내에서의 분자 표적의 너비, 효과의 지속성 및 안전성과 관련하여 종래의 TGFβ 길항제보다 우수한 TGFβ1 억제제로 이러한 질환을 치료하는 개선된 방법이 본원에 제공된다.

[0010] 일련의 증거는 많은 질환이 TGFβ 기능의 상이한 효과를 부여하는 이종 세포 유형의 참여를 수반할 가능성이 있는 TGFβ 신호전달의 복잡한 교란을 나타내며, 이는 소위 제시 분자와의 그의 상호작용에 의해 매개된다는 개념을 지지한다. 적어도 4종의 이러한 제시 분자가 확인되었으며, 이는 국부 자극에 반응하여 그의 활성화를 가능하게 하기 위해 다양한 세포외 함요에서 TGFβ를 "제시"할 수 있다. 한 카테고리에서, TGFβ는 ECM-연관 TGFβ 활성을 매개하는 ECM-연관 제시 분자, 예컨대 LTBP1 및 LTBP3과 연관되어 ECM 내로 침착된다. 또 다른 카테고리에서, TGFβ는 특정 면역 기능을 매개하는 제시 분자 예컨대 GARP 및 LRRC33을 통해, 면역 세포의 표면 상에 테더링된다. 이들 제시 분자는 다양한 조직 및 세포 유형에서 차등 발현, 국재화 및/또는 기능을 보여주며, 이는 TGFβ 활성화의 촉발 사건 및 결과가 미세환경에 따라 달라질 것임을 나타낸다. 많은 TGFβ 효과가 질환 진행과 상호작용하고 그에 기여할 수 있다는 개념에 기초하여, TGFβ 기능의 다중 양상에 길항할 수 있는 치료제는 더 큰 효능을 제공할 수 있다.

[0011] 이전에, 본 발명자들은 TGFβ의 이소형-특이적 억제가 (범-억제와는 달리) 생체내에서 TGFβ에 길항하는 개선된 안전성 프로파일을 렌더링할 수 있다는 것을 인식하였다 (WO 2017/156500 참조). 이를 고려하여, 본 발명자들은 i) 이소형-특이적이면서; 또한, ii) 상이한 제시 분자와 연관된 다중 TGFβ1 신호전달 복합체를 광범위하게 표적화할 수 있는, 다면적 TGFβ1 효과 및 그의 조절이상에 의해 유도되는 상태에 대한 치료제로서의 TGFβ1 억제제를 개발하는 것을 추구하였다.

[0012] 따라서, 본 개시내용은 ECM-연관 TGFβ1 및 면역 세포-연관 TGFβ1 둘 다를 표적화함으로써 다중 콘텍스트에서 제시되는 TGFβ1의 다중 공급원을 차단할 수 있는 이소형-특이적 억제제를 제공한다. 이러한 억제제는 본원에서 TGFβ1의 "이소형-특이적, 콘텍스트-허용성" 억제제로 지칭된다. 본 발명은 또한 TGFβ1 기능의 다중 측면과 연관된 TGFβ1 신호전달의 조절이상을 특징으로 하는 상태의 치료에서의 치료제로서의 이들 작용제의 용도를 제공한다. 이러한 억제제는 섬유증, 골수섬유증, 암, 및 다른 상태와 관련된 임상 효과를 증진시키기 위해 다중 TGFβ1 활성 (예를 들어, 다중 공급원 또는 콘텍스트로부터의 TGFβ1)에 길항하는 다중기능적 작용제로서 기능할 수 있다.

[0013] 특정 질환 (본원에 추가로 상세하게 기재된 바와 같음)을 치료하기 위한 치료제로서의 TGFβ1의 콘텍스트-특이적 억제제에 비한 TGFβ1의 콘텍스트-허용성 (예컨대 콘텍스트-비의존성) 억제제의 유리한 용도에 대한 근거는 하기를 포함한다:

[0014] 질환 환경에서의 이종 TGFβ1 복합체의 관여: 첫째로, 다양한 질환은 질환의 발병기전 및/또는 진행에 집합적으로 기여하는 TGFβ1의 다중 공급원으로서의 이종 세포 집단을 수반한다. 1종 이상의 유형의 TGFβ1-함유 복합체 ("콘텍스트")는 동일한 질환 미세환경 내에 공존할 가능성이 있다. 특히, 이러한 질환은 TGFβ1 신호전달의 ECM 성분 및 TGFβ1 신호전달의 면역 성분 둘 다를 수반할 수 있다. 이러한 상황에서, 단일 TGFβ1 콘텍스트 (예를 들어, 1종의 유형의 제시 분자와 연관된 TGFβ1)의 선택적 표적화는 제한된 완화를 제공할 수 있다. 대조적으로, TGFβ1의 콘텍스트-허용성 억제제는 유리하게는 불활성 (프로/잠복) TGFβ1 복합체를 보다 광범위하게 표적화하고, 독성을 최소화하기 위해 이소형 선택성을 유지하면서, 성숙 TGFβ1이 수용체 결합을 위해 방출되어 하류 신호전달을 촉발할 수 있기 전에 다중 공급원에서의 성장 인자의 활성화를 방지하는 것을 목표로 한다.

[0015] 다양한 질환을 예고하는 공통 메카니즘: 두번째로, 조직/세포 특징에서의 주목할 만한 유사성이 종양 기질과 섬유화 조직 사이에서 관찰된다. i) TGFβ1-의존성 섬유화유발 표현형; ii) TGFβ1-의존성 종양유발 표현형; 및, iii) TGFβ-의존성 면역억제 표현형 사이에서 및 이들 중에서의 교류를 나타내는 것이 다수의 병리학적 상태에서 관찰된다. 따라서, 이들 구성성분 다수에 광범위하게 작용하는 콘텍스트-허용성 억제제의 사용은 다양한 유형의 질환 상태에 걸쳐 최적의 치료 효과를 제공할 수 있다. 예를 들어, 원발성 골수섬유증의 임상 징후는 골수에서의 특정 세포 집단의 비정상적 증식 및 섬유증을 포함한다.

[0016] 약물 저항성에 대한 대응: 세번째로, 다수의 연구는 항암 요법, 예컨대 면역 체크포인트 억제제에 저항성인 암/종양을 보고하였다. 일부 경우에, 이러한 저항성은 환자의 배경에 대해 특정한 암/종양-유형에 대해 고유한 것

으로 보인다 (전형적으로 선천성 저항성, 1차 저항성, 고유 저항성, 또는 타고난 저항성으로 지칭됨; 이들 용어는 본원에서 상호교환가능하게 사용됨). 이러한 저항성은 암 요법 예컨대 면역 체크포인트 억제제에 불량하게 반응성인 환자 대상체에서 나타날 수 있고, 가능하게는 면역-배제된 환경을 반영할 수 있다. 이는 적어도 부분적으로 TGFβ1-의존성 경로에 의해 매개될 가능성이 있다. 따라서, 본원에 기재된 이소형-선택적 억제제는 저항성 암을 이러한 요법에 보다 반응성이도록 할 수 있다.

[0017] 대안적으로, 저항성은 치료에 대한 물질 임상 반응을 보여주는 환자가 불량하게 반응성이게 되도록 시간 경과에 따라 발달할 수 있다 (즉, 적응 또는 후천성 저항성). 예를 들어, PD-1 요법이 다른 T 세포 항원 (예를 들어, TCR 성분)의 상향조절과 상관관계가 있는 적응 저항성으로 이어질 수 있는 것으로 보고되었으며, 이는 암 세포가 또 다른 메카니즘을 통해 PD-1 차단을 피하도록 진화한다는 것을 시사한다. 후속적으로, 상이한 T 세포 수용체 성분 예컨대 TIM3을 표적화하는 제2 체크포인트 억제제는 면역요법에 대한 반응성을 회복할 수 있다. 이들 관찰은 암 세포의 적응 반응에 대항하는 다중 경로를 차단하는 것이 숙주 면역을 피하는 암 세포의 능력의 가능성을 감소시킬 수 있다는 것을 시사한다. 다중 TGFβ1 콘텍스트를 표적화할 수 있는 TGFβ1의 콘텍스트-허용성 억제제는 유리하게는 TGFβ1 기능의 다중 지점에서 차단을 제공함으로써 후천성 약물 저항성을 피할 수 있다.

[0018] 발현 가소성에 대한 감내: 또한 최종적으로, 다양한 제시 분자의 발현이 시간 경과에 따라, 예를 들어, 국부 신호 (예를 들어, 시토카인, 케모카인, ECM 환경 등)에 반응하여 및/또는 질환 미세환경의 변화에 의해 달라질 수 있다는 개념에 기초하여, 본원에 기재된 것과 같은 TGFβ1의 콘텍스트-허용성 억제제가 이러한 가소성을 견디는 데 사용될 수 있고 제시 분자의 발현에서 비정상적 변화가 발생할 때에도 광범위하고 지속적인 억제 효과를 제공할 수 있는 것으로 추론된다.

[0019] 이들 시나리오 중 임의의 것에서, TGFβ1의 콘텍스트-허용성 억제제는 유리하게는 다양한 제시 분자와 연관된 TGFβ1의 프로/잠복 형태를 표적화하는 것을 목표로 하며, 이들 및 이들의 상이한 조합 모두가 질환 미세환경(들)에 존재한다. 보다 구체적으로, 한 양식에서, 억제제는 ECM-연관 TGFβ1 (LTBP1/3-TGFβ1 복합체)을 표적화한다. 또 다른 양식에서, 억제제는 면역 세포-연관 TGFβ1을 표적화한다. 이는 GARP-제시된 TGFβ1, 예컨대 Treg 세포 상에 발현된 GARP-TGFβ1 복합체 및 대식세포 및 다른 골수 세포/림프성 세포, 뿐만 아니라 특정 암 세포 상에 발현된 LRRC33-TGFβ1 복합체를 포함한다.

[0020] 이러한 항체는 항체가 다중 유형의 제시 분자와 연관된 TGFβ1의 활성화 (또는 방출)를 억제할 수 있도록, 콘텍스트-허용성 (또는 콘텍스트-비의존성) 방식으로 프로/잠복 TGFβ1 복합체로부터의 성숙 TGFβ1 성장 인자에 결합하고 그의 활성화 (또는 방출)를 막는 TGFβ1의 이소형-특이적 억제제를 포함한다. 특히, 본 발명은 ECM-연관 TGFβ1 (LTBP-제시됨 및/또는 LTBP3-제시됨)의 적어도 1종의 콘텍스트 및 세포-연관 TGFβ1 (GARP-제시됨 및/또는 LRRC33-제시됨)의 적어도 1종의 콘텍스트를 차단할 수 있는 항체를 제공한다.

[0021] 다양한 질환 상태가 기여 인자로서 TGFβ 신호전달의 조절이상을 수반하는 것으로 제안되었다. 사실상, 특정 인간 상태의 발병기전 및/또는 진행은 TGFβ1 활성에 의해 우세하게 유도되거나 또는 그에 의존성인 것으로 보인다. 특히, 많은 이러한 질환 및 장애는 TGFβ1 기능의 ECM 성분 및 면역 성분 둘 다를 수반하는 것으로 보이며, 이는 다중 콘텍스트에서의 TGFβ1 활성화 (예를 들어, 1종 초과의 유형의 제시 분자에 의해 매개됨)가 수반된다는 것을 시사한다. 더욱이, TGFβ1-반응성 세포 간에 교류가 있는 것으로 고려된다. 일부 경우에, TGFβ1 축의 다면적 활성 사이의 상호작용은 질환 진행, 악화, 및/또는 질환에 대항하는 숙주의 능력의 억제로 이어질 수 있다. 예를 들어, 특정 질환 미세환경, 예컨대 종양 미세환경 (TME)은 다중 상이한 제시 분자에 의해 제시되는 TGFβ1, 예를 들어, LTBP1-프로TGFβ1, LTBP3-프로TGFβ1, GARP-프로TGFβ1, LRRC33-프로TGFβ1, 및 그의 임의의 조합과 연관될 수 있다. 하나의 콘텍스트의 TGFβ1 활성은 차례로 또 다른 콘텍스트의 TGFβ1 활성을 조절하거나 또는 그에 영향을 미칠 수 있으며, 이는 조절이상 시에 질환 상태를 악화시킬 수 있는 가능성을 높인다. 따라서, TGFβ1 이소형에 대한 이러한 억제 효과를 선택적으로 제한하면서 TGFβ1 기능의 다중 모드 (즉, 다중 콘텍스트)에 걸쳐 광범위하게 억제하는 것이 바람직하다. 목표는 상처 치유에서 중요한 역할을 하는 TGFβ3을 포함한 다른 이소형에 의해 매개되는 항상성 TGFβ 신호전달을 교란시키지 않는 것이다.

[0022] 이를 해결하기 위해, 본 개시내용의 발명자들은 TGFβ1 신호전달 또는 그의 조절이상에 의해 유도되거나 또는 그에 의존성인 질환의 치료에서의 치료 용도에 특히 유리할 수 있는 TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제를 생성하는 것을 추구하였다. 이러한 억제제를 위한 기준을 충족시키도록 취해진 접근법은 i) 이소형-특이적 방식으로 TGFβ1 신호전달을 억제하는 능력 (TGFβ2 및/또는 TGFβ3 활성을 방해하지 않음); 및, ii) ECM-연관 및 면역 세포-연관 TGFβ1 신호전달 둘 다를 억제하는 능력이다. 이러한 접근법에 대한 근거는 잠재

적 독성에 대한 TGFβ1 억제의 유효성 (그에 따른 임상 효능)의 균형을 이루는 것이다. 보다 구체적으로, 다른 이소형에 비해 치료 투여량에서 TGFβ1에 대한 선택성을 달성하는 것은, 그 중 일부는 정상 생물학적 기능 (예컨대 상처 치유)에 요구될 수 있는, 생체내 TGFβ의 범-억제와 연관된 가능한 독성 (예를 들어, 원치 않는 부작용 및 유해 사건)을 감소시키거나 또는 최소화하는 것을 목표로 한다. 다른 한편으로는, 치료 표적으로서의 TGFβ1의 다중 콘텍스트의 포함은 TGFβ1 신호전달의 다중 측면의 조절이상을 수반하는 질환에서의 임상 효능을 보장하거나 또는 그를 최적화하는 것을 목표로 한다. 임상 용도 및 치료 요법의 다양한 실시양태가 본 발명에 의해 포괄된다.

[0023] 따라서, 한 측면에서, TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제가 본원에 제공되며, 이러한 억제제는 ECM-연관 TGFβ1 신호전달 및 면역 세포-연관 TGFβ1 신호전달 둘 다를 억제하는 능력을 갖는 것을 특징으로 한다. 구체적으로, 이러한 억제제는, 다중 콘텍스트에 제시된 TGFβ1, 즉, 제시 분자 중 2종 이상의 유형에 의해 매개된 TGFβ1 활성을, TGFβ2 및 TGFβ3 활성을 무손상으로 유지하면서, 차단할 수 있다. 따라서, 이러한 억제제에 의해 억제될 수 있는 TGFβ1 활성은 하기 중 2종 이상을 포함한다: i) GARP-제시된 TGFβ1과 연관된 TGFβ1 신호전달; ii) LRRC33-제시된 TGFβ1과 연관된 TGFβ1 신호전달; iii) LTBP1-제시된 TGFβ1과 연관된 TGFβ1 신호전달; 및, iv) LTBP3-제시된 TGFβ1과 연관된 TGFβ1 신호전달. 일부 실시양태에서, 이러한 억제제는 하기 복합체의 프로-단백질 형태 중 적어도 2종, 또는, 적어도 3종을 표적화한다: i) TGFβ1-GARP; ii) TGFβ1-LRRC33; iii) TGFβ1-LTBP1; 및, iv) TGFβ1-LTBP3. 일부 실시양태에서, 이러한 억제제는 i) TGFβ1-GARP; iii) TGFβ1-LTBP1; 및, iv) TGFβ1-LTBP3에 특이적으로 결합하고 이를 억제하는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 이러한 모노클로날 항체는 ii) TGFβ1-LRRC33; iii) TGFβ1-LTBP1; 및, iv) TGFβ1-LTBP3에 특이적으로 결합하고 이를 억제한다. 일부 실시양태에서, 이러한 모노클로날 항체는 i) TGFβ1-GARP; ii) TGFβ1-LRRC33; 및 iii) TGFβ1-LTBP1에 특이적으로 결합하고 이를 억제한다. 일부 실시양태에서, 이러한 모노클로날 항체는 i) TGFβ1-GARP; ii) TGFβ1-LRRC33; 및 iv) TGFβ1-LTBP3에 특이적으로 결합하고 이를 억제한다. 일부 실시양태에서, 이러한 모노클로날 항체는 하기 복합체 모두를 특이적으로 억제한다: i) TGFβ1-GARP; ii) TGFβ1-LRRC33; iii) TGFβ1-LTBP1; 및, iv) TGFβ1-LTBP3. 일부 실시양태에서, 이러한 모노클로날 항체는 유리 TGFβ1 (예를 들어, 제시 분자로부터 방출되거나 또는 그와 복합체화되지 않은 성장 인자)인 성숙 TGFβ1에 결합하지 않는다. 본 발명의 측면은 이러한 억제제를 포함하는 조성물, 예컨대 예를 들어, 치료될 인간 및 비-인간 대상체에서의 투여에 적합한 제약 조성물을 포함한다. 이러한 제약 조성물은 전형적으로 멸균된다. 일부 실시양태에서, 이러한 제약 조성물은 또한 적어도 1종의 제약상 허용되는 부형제, 예컨대 완충제 및 계면활성제 (예를 들어, 폴리소르베이트)를 포함할 수 있다. 이러한 제약 조성물을 포함하는 키트가 또한 본 발명에 의해 포괄된다.

[0024] 본원에 기재된 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제는 TGFβ1의 다중 생물학적 기능 및 그의 조절이상을 수반하는 질환 또는 장애의 치료에 사용하기에 적합하다. 특히, 이러한 질환 또는 장애는 TGFβ1 기능의 ECM 성분 및 TGFβ1 기능의 면역 성분 둘 다를 수반한다. 이러한 억제제의 투여는 따라서 생체내에서 TGFβ1 신호전달 경로, 예를 들어 질환 또는 장애와 연관된 다중 TGFβ1 표적의 각각의 축을 억제하여 치료 효과를 증진시킬 수 있다. 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 TGFβ1 조절이상과 연관된 질환을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법에서의 이러한 억제제의 치료 용도를 포함한다. TGFβ1 신호전달의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 또는 콘텍스트-비의존성 억제제는 TGFβ1의 다중 기능 (예를 들어, ECM 성분 및 면역 성분 둘 다)에 의해 유도되거나 또는 그에 의존성인 질환을 치료하기에 특히 적합하다. 전형적으로, 이러한 질환은 TGFβ1이 다중 유형의 제시 분자 (예를 들어, 다중 콘텍스트)에 의해 제시되는 다중 세포 유형 및 세포 상태를 수반한다.

[0025] 관련 측면에서, 본 발명은 개선된 안전성 프로파일 (예를 들어, 감소된 생체내 독성)을 갖는 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제의 스크리닝, 생산 및 제조 방법을 제공한다. 이러한 방법은 후보 작용제가 TGFβ1 이소형 특이성에 대해 시험되고 선택될 것, 예를 들어, 후보 작용제가 TGFβ1 신호전달에 대한 억제 활성에 대해 선택되고 TGFβ2 및/또는 TGFβ3 신호전달에 대해서는 그렇지 않을 것을 필요로 한다. 본 발명에 따르면, TGFβ1 활성의 이러한 이소형-특이적 억제제는 TGFβ1 기능의 다중 콘텍스트를 억제할 수 있다 (하기 참조).

[0026] 일부 실시양태에서, 이러한 작용제는 TGFβ1에 특이적으로 결합하고 그의 활성화를 차단하며 TGFβ2 및/또는 TGFβ3에 대해서는 그렇지 않은 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 프로/잠복 복합체와 회합되지 않는 유리 성숙 TGFβ1 성장 인자에 결합하지 않는다. 따라서, 적절한 생산 방법은 후보 작용제 (예컨대 후보 항체 또는 그의 단편)가 특정한 제시 분자, 예를 들어, GARP, LRRC33, LTBP1, 및/또는 LTBP3과 연관된 TGFβ1을 억제하는 그의 능력에 대해 평가되는 스크리닝 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 불활성 (예를 들어, 잠복) 전구체 복합체, 예컨대 GARP-프로TGFβ1,

LRRC33-프로TGFβ1, LTBP1-프로TGFβ1 및 LTBP3-프로TGFβ1은 성숙, 활성 TGFβ1 성장 인자의 활성화에 대한 검정에 이용될 수 있다. 시험 작용제 (즉, 후보 억제제)의 존재 또는 부재 하의 TGFβ1 활성화는 시험관내 검정 및 세포-기반 검정을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 적합한 수단에 의해 측정될 수 있다. 유사한 스크리닝 단계가 TGFβ2 및/또는 TGFβ3 대응물의 사용에 의한 이소형 특이성을 시험하는 데 이용될 수 있다. 이러한 스크리닝 단계는 i) 이소형-특이적 방식으로; 및, ii) 콘텍스트-허용성 또는 콘텍스트-비의존성 방식으로 TGFβ1 신호전달을 억제하는 그의 능력에 대해 후보 작용제 (예컨대 후보 항체 또는 그의 단편)를 확인하기 위해 수행될 수 있다.

[0027] 특정 질환은 TGFβ 기능의 단일 콘텍스트에 제한되지 않는 TGFβ 신호전달의 다중 생물학적 역할의 조절이상과 연관된다. 이러한 상황에서, 질환 진행의 개시에 및/또는 그의 과정 동안에 수반되는 다중 콘텍스트에 걸쳐 TGFβ 효과를 조정하는 것이 유익할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명은 이소형-특이적 방식으로 다중 TGFβ1 콘텍스트를 표적화하고 광범위하게 억제하는 방법을 제공한다. 이러한 작용제는 본원에서 "이소형-특이적, 콘텍스트-허용성" TGFβ1 억제제로 지칭된다. 따라서, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제는 다중 콘텍스트 (예를 들어, 다중 유형의 프로/잠복-TGFβ1 복합체)를 표적화한다. 바람직하게는, 이러한 억제제는 ECM과 연관된 TGFβ1 활성화-전 복합체 (즉, ECM-연관 제시 분자에 의해 제시된 프로/잠복 TGFβ1 복합체) 중 적어도 1종의 유형 (또는 "콘텍스트") 및 추가적으로 세포 표면에 테더링된 TGFβ1 활성화-전 복합체 (즉, 세포 또는 막-연관 제시 분자에 의해 제시된 프로/잠복 TGFβ1 복합체) 중 적어도 1종의 유형 (또는 "콘텍스트")을 표적화한다. 일부 실시양태에서, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 조정제는 특정한 제시 분자(들)와 무관하게 모든 콘텍스트를 포괄하기 위해 모든 유형의 프로/잠복 TGFβ1 복합체 (예를 들어, GARP-연관, LRRC33-연관, LTBP-연관 등)를 표적화한다.

[0028] 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제가 1종 초과의 유형의 프로/잠복-TGFβ1 복합체 (즉, 상이한 제시 분자를 가짐)를 표적화할 수 있지만, 일부 실시양태에서, 이러한 억제제는 1종 이상의 콘텍스트를 다른 것(들)보다 선호할 수 있다 (또는 그에 대한 편향을 나타낼 수 있다). 따라서, 일부 실시양태에서, TGFβ1의 활성화를 억제하는 콘텍스트-허용성 항체는, 이러한 항체가 프로/잠복 복합체의 유형 둘 다에 결합할 수 있을지라도, 1종의 제시 분자에 의해 매개되는 TGFβ1 활성화를 또 다른 제시 분자에 비해 우선적으로 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 LTBP1/3-연관 TGFβ1, GARP-연관 TGFβ1 및 LRRC33-연관 TGFβ1에 결합하고 그의 활성화를 억제하지만, LTBP1/3-연관 TGFβ1에 대한 우선적인 억제 활성을 갖는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 LTBP1-연관 TGFβ1, LTBP3-연관 TGFβ1, GARP-연관 TGFβ1 및 LRRC33-연관 TGFβ1에 결합하고 그의 활성화를 억제하지만, LTBP1- 및 LTBP-3-연관 TGFβ1에 대한 우선적인 억제 활성을 갖는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 LTBP1-연관 TGFβ1, LTBP3-연관 TGFβ1, GARP-연관 TGFβ1 및 LRRC33-연관 TGFβ1에 결합하고 그의 활성화를 억제하지만, GARP-연관 TGFβ1 및 LRRC33-연관 TGFβ1에 대한 우선적인 억제 활성을 갖는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 GARP-연관 TGFβ1 및 LRRC33-연관 TGFβ1에 결합하고 그의 활성화를 억제하지만, GARP-연관 TGFβ1에 대한 우선적인 억제 활성을 갖는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 GARP-연관 TGFβ1 및 LRRC33-연관 TGFβ1에 결합하고 그의 활성화를 억제하지만, LRRC33-연관 TGFβ1에 대한 우선적인 억제 활성을 갖는 모노클로날 항체이다.

[0029] 따라서, 본 발명에 따르면, TGFβ 효과의 하위세트를 표적화하기 위해 다양한 정도의 선택성이 생성될 수 있다. TGFβ의 이소형-특이적 억제제 (TGFβ의 단일 이소형을 표적화함)는 소위 범-TGFβ 억제제 (TGFβ의 다중 또는 모든 이소형을 표적화함)보다 더 큰 선택성을 제공한다.

[0030] 본 발명은 TGFβ1 조절이상과 연관된 질환을 치료하는 방법에서의 이러한 TGFβ1 억제제의 용도를 포함한다. 이러한 억제제의 용도는 TGFβ1 이소형이 질환을 유도하는 데 있어서 (TGFβ2/3보다) 우세한 역할을 하는 상태에서 특히 유리하며, 여기서 질환은 TGFβ1 신호전달의 ECM 성분 및 면역 성분 둘 다를 수반한다. 이러한 접근법은 질환-연관 TGFβ 기능을 우선적으로 표적화하면서 정상 또는 항상성 TGFβ 기능을 보존하는 것을 목표로 한다.

[0031] 이러한 억제제는 바람직하게는 TGFβ1 활성화 억제제 (즉, TGFβ1 활성화 단계의 억제제)이다. 바람직한 실시양태에서, 이러한 억제제는 잠복 복합체로부터 방출된 성장 인자의 일시적인, 이미 활성화된, 가용성/유리 형태를 표적화하는 것과 비교하여, 보다 지속되는 억제를 유발하기 위한 활성화 전의 TGFβ1의 불활성 형태 (예를 들어, 프로/잠복-TGFβ1 복합체)를 표적화할 수 있다. 질환-연관 TGFβ1의 공급원/콘텍스트의 결정은 특정한 관심 제시 분자 (예를 들어, GARP, LRRC33, LTBP1, LTBP3 등)를 포함하는 TGFβ1 잠복 복합체에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하여 수행될 수 있다.

[0032] 본 개시내용의 측면은 하기 복합체: GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및 LRRC33-TGFβ1 복합체 중 적어도 3종에 특이적으로 결합하는 이뮤노글로불린, 예컨대 항체, 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 이러한 이뮤노글로불린은 다중 콘텍스트 상에서 광범위한 억제 작용을 유발하기 위해 적어도 1종의 유형의 ECM-연관 (예를 들어, ECM-테더링된) TGFβ1 복합체 (예를 들어, LTBP1- 및/또는 LTBP3-연관 TGFβ1 복합체) 및 적어도 1종의 유형의 세포-연관 (예를 들어, 세포 표면-테더링된) TGFβ1 복합체 (예를 들어, GARP- 및/또는 LRRC33-연관 TGFβ1 복합체)에 특이적으로 결합한다. 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 TGFβ1이 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1에 존재하는 경우에 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 의한 결합에 이용가능한 TGFβ1 (예를 들어, LAP)의 에피토프 또는 TGFβ1 (예를 들어, LAP)을 포함하는 단백질 복합체의 성분(들)에 특이적으로 결합한다.

[0033] 일부 실시양태에서, 에피토프는 TGFβ1이 하기 단백질 복합체: GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체, 및 LRRC33-TGFβ1 복합체 중 2종 이상에 존재하는 경우에 항체에 의한 결합에 이용가능하며; 여기서 항체는 프로/잠복 복합체와 연관되지 않은 유리 성숙 TGFβ1 성장 인자에 결합하지 않는다.

[0034] 일부 실시양태에서, TGFβ1은 프로TGFβ1 및/또는 잠복 TGFβ1 (예를 들어, 프로/잠복 TGFβ1)이다. 일부 실시양태에서, TGFβ1은 잠복 TGFβ1이다. 일부 실시양태에서, TGFβ1은 프로TGFβ1이다.

[0035] 본 발명에 따른 이소형-특이적 TGFβ1 억제제는 TGFβ2에 결합하지 않는다. 본 발명에 따른 이소형-특이적 TGFβ1 억제제는 TGFβ3에 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 이러한 억제제는 프로/잠복 TGFβ2에 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 이러한 억제제는 프로/잠복 TGFβ3에 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 인테그린에 결합하는 TGFβ1의 능력을 막지 않는다.

[0036] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 87의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 90의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 86의 아미노산 서열을 갖는 CDR2를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 89의 아미노산 서열을 갖는 CDR2를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 85의 아미노산 서열을 갖는 CDR1을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 88의 아미노산 서열을 갖는 CDR1을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0037] 일부 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 99에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 중쇄 폴리펩티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 100에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 경쇄 폴리펩티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 99에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 중쇄 폴리펩티드 서열 및 서열식별번호: 100에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 경쇄 폴리펩티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 서열식별번호: 85-90에 제시된 바와 같은 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 99의 2개의 폴리펩티드 및 서열식별번호: 100의 2개의 폴리펩티드로 이루어진다.

[0038] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 95에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 97에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0039] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 95에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 97에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0040] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 TGFβ1 활성화를 억제하고 TGFβ2 활성화 또는 TGFβ3 활성화를 억제하지는 않는다.

[0041] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 또는 LRRC33-TGFβ1 복합체로부터의 성숙 TGFβ1의 방출을 억제한다.

[0042] 한 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 항원 결합 부분, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 본원에 제공된다. 이러한 제약 조성물은 전형적으로 멸균되고, 인간 대상체에서의 투여에 적합하다. 일부 실시양태에서, 이러한 제약 조성물은 본 발명에 의해 포괄된 키트로서 제공될 수 있다.

[0043] 또 다른 측면에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 또는 LRRC33-TGFβ1 복합체를 본원에 기재된 항체, 그의 항원 결합 부분 또는 제약 조성물에 노출시키는 것을 포함하는, TGFβ1 활성화를 억제하는 방법이 본원에 제공된다.

[0044] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 또는 LRRC33-TGFβ1 복합체로부터의 성숙 TGFβ1의 방출을 억제한다.

[0045] 일부 실시양태에서, 방법은 시험관내에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 방법은 생체내에서 수행된다.

[0046] 따라서, 본 발명은 인간 대상체에서의 TGFβ1 신호전달의 조절이상과 연관된 질환을 치료하는 방법을 포함한다. 이러한 방법은 그를 필요로 하는 인간 대상체에게 본원에 제공된 제약 조성물을 질환을 치료하기에 효과적인 양으로 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 양은 질환을 갖는 환자 집단에게 투여되는 경우에 통계적으로 유의한 임상 효능 및 안전성을 달성한다.

[0047] 또 다른 측면에서, 대상체에서 유해 효과를 감소시키는 데 사용하기 위한 TGFβ 억제제가 본원에 제공되며, 여기서 TGFβ 억제제는 이소형-선택적이다. 일부 실시양태에서, TGFβ 억제제는 다중 콘텍스트를 광범위하게 표적화하면서 TGFβ1을 특이적으로 억제하는 항체이다.

[0048] 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체 또는 LRRC33-TGFβ1 복합체를 발현하는 세포는 T-세포, 섬유모세포, 근섬유모세포, 대식세포, 단핵구, 수지상 세포, 항원 제시 세포, 호중구, 골수성-유래 억제 세포 (MDSC), 림프구, 비만 세포, 거핵구, 자연 킬러 (NK) 세포, 소교세포, 또는 이러한 세포 중 어느 하나의 전구 세포이다. 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체 또는 LRRC33-TGFβ1 복합체를 발현하는 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체 또는 LRRC33-TGFβ1 복합체를 발현하는 세포는 신경 능선-유래 세포이다. T-세포는 조절 T 세포 (예를 들어, 면역억제 T 세포)일 수 있다. T 세포는 CD4-양성 (CD4+) T 세포 및/또는 CD8-양성 (CD8+) T 세포일 수 있다. 호중구는 활성화된 호중구일 수 있다. 대식세포는 섬유화유발 및/또는 종양-연관 대식세포 (TAM)를 포함한 분극화된 대식세포, 예를 들어, M2c 하위유형 및 M2d 하위유형 대식세포일 수 있다. 대식세포는 자가분비, 주변분비 및/또는 내분비 방식으로 작동할 수 있는, 1종 이상의 가용성 인자, 예컨대 성장 인자, 시토카인, 케모카인 및/또는 특정한 질환 미세환경 (예를 들어, TME)에 존재하는 다른 분자에 의해 활성화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 대식세포는 M-CSF, 예컨대 고형 종양에 의해 분비되는 M-CSF에 의해 활성화된다. 일부 실시양태에서, 대식세포는 TGFβ1에 의해 활성화된다.

[0049] 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체 또는 LRRC33-TGFβ1 복합체를 발현하는 세포는 암 세포, 예를 들어, 순환 암 세포 및 종양 세포이다. 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체 또는 LRRC33-TGFβ1 복합체를 발현하는 세포는 질환 부위, 예컨대 TME (예를 들어, 종양 침윤물)에 동원된다. 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체 또는 LRRC33-TGFβ1 복합체의 발현은 질환 미세환경 (예를 들어, TME)에 의해 유발된다. 일부 실시양태에서, 고형 종양은 상승된 백혈구 침윤물, 예를 들어, CD45+를 포함한다. 종양-연관 CD45+ 세포는 GARP-발현 및/또는 LRRC33-발현 세포를 포함하는 것으로 고려된다.

[0050] 일부 실시양태에서, LTBP1-TGFβ1 복합체 또는 LTBP3-TGFβ1 복합체는 세포외 매트릭스 (즉, ECM의 성분)에 결합된다. 일부 실시양태에서, 세포외 매트릭스는 피브릴린 및/또는 피브로넥틴을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 매트릭스는 RGD 모티프를 포함하는 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, LTBP1-TGFβ1 복합체 또는 LTBP3-TGFβ1 복합체를 생산하고 침착시키는 세포는 고형 종양에 존재하며, 예컨대 암 세포 및 기질 세포이다. 일부 실시양태에서, LTBP1-TGFβ1 복합체 또는 LTBP3-TGFβ1 복합체를 생산하고 침착시키는 세포는 섬유화 조직에 존재한다. 일부 실시양태에서, LTBP1-TGFβ1 복합체 또는 LTBP3-TGFβ1 복합체를 생산하고 침착시키는 세포는 골수에 존재한다. 일부 실시양태에서, LTBP1-TGFβ1 복합체 또는 LTBP3-TGFβ1 복합체를 생산하고 침착시키는 세포는 예를 들어 암-연관 섬유모세포 (CAF)를 포함한 근섬유모세포 또는 근섬유모세포-유사 세포이다.

[0051] 또 다른 측면에서, 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그의 항원 결합 부분 또는 제약 조성물 투여함으로써 대상체에서 TGFβ1 활성화를 감소시키는 것을 포함하는, 대상체에서 TGFβ1 활성화를 감소시키는 방법이 본원에 제공된다.

[0052] 일부 실시양태에서, 대상체는 섬유화 장애를 갖거나 또는 가질 위험이 있다. 일부 실시양태에서, 섬유화 장애는 이환 조직/기관의 만성 염증을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 근육 이영양증을 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 뒤시엔느 근육 이영양증 (DMD)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 간 섬유증, 신장 섬유증, 폐 섬유증 (예를 들어, 특발성 폐 섬유증), 자궁내막증 또는 자궁 섬유증을 갖거나 또는 가질 위험이

있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암 (예를 들어, 고형 종양, 혈액암, 및 골수섬유증)을 갖거나 또는 가질 위험이 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 치매를 갖거나 또는 가질 위험이 있다.

[0053] 일부 실시양태에서, 대상체는 추가의 요법을 추가로 받는다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 미오스타틴 억제제, VEGF 효능제, IGF1 효능제, FXR 효능제, CCR2 억제제, CCR5 억제제, 이중 CCR2/CCR5 억제제, 리실 옥시다제-유사-2 억제제, ASK1 억제제, 아세틸-CoA 카르복실라제 (ACC) 억제제, p38 키나제 억제제, 피르페니돈, 닌테다닙, GDF11 억제제, JAK 억제제 (예를 들어, JAK2 억제제), 또는 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0054] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 조절 T 세포 (Treg)의 억제 활성을 감소시킨다.

[0055] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 대상체에서 기관 독성을 유발하지 않는다. 일부 실시양태에서, 기관 독성은 심혈관 독성, 위장 독성, 면역독성, 골 독성, 연골 독성, 생식기계 독성 또는 신장 독성을 포함한다.

[0056] 한 측면에서, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그의 항원 결합 부분 또는 제약 조성물을 투여함으로써 대상체에서 암을 치료하는 것을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법이 본원에 제공된다.

[0057] 또 다른 측면에서, 종양 성장의 감소를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그의 항원 결합 부분 또는 제약 조성물을 투여함으로써 대상체에서 종양 성장을 감소시키는 것을 포함하는, 종양 성장의 감소를 필요로 하는 대상체에서 종양 성장을 감소시키는 방법이 본원에 제공된다.

[0058] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 추가의 작용제 또는 추가의 요법과 조합하여 투여된다. 일부 실시양태에서, 추가의 작용제는 체크포인트 억제제이다. 일부 실시양태에서, 추가의 작용제는 PD-1 길항제, PDL1 길항제, PD-L1 또는 PDL2 융합 단백질, CTLA4 길항제 등으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이러한 조합 요법은 유리하게는 투여된 치료제의 보다 낮은 투여량을 이용하여, 본 발명에 의해 달성되는 선택성/특이성 정도가 결여된 다양한 단독요법 또는 종래의 조합 요법과 연관된 가능한 독성 또는 합병증을 피할 수 있다.

[0059] 일부 실시양태에서, 방법은 TGFβ2 및 TGFβ3에 비한 질환에서의 TGFβ1의 수반을 결정 (예를 들어, 시험 또는 확인)하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 질환-연관 TGFβ1의 공급원 (또는 콘텍스트)을 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 공급원/콘텍스트는 환자로부터 채취된 임상 샘플에서의 TGFβ 제시 분자, 예를 들어, LTBP1, LTBP3, GARP 및 LRRC33의 발현을 결정함으로써 평가된다.

[0060] 또 다른 측면에서, TGFβ의 적어도 1종의 이소형의 신호전달을 억제하는 1종 이상의 작용제를 제공하는 단계; TGFβ의 모든 이소형에 대한 1종 이상의 작용제의 활성을 측정하는 단계; TGFβ1에 대해 선택적인 작용제를 선택하는 단계; 이소형-특이적 TGFβ1 억제제 및 제약상 허용되는 부형제, 예컨대 적합한 완충제를 포함하는 제약 조성물로 제제화하는 단계를 포함하는, TGFβ 신호전달을 억제하기 위한 제약 조성물을 조제 (예를 들어, 생산, 제조)하는 방법이 본원에 제공된다. 이러한 방법에 의해 생산되는 제약 조성물이 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, 방법은 1종 이상의 작용제의 콘텍스트-의존성 억제 활성을 결정 (예를 들어, 측정, 검정)하는 단계를 추가로 포함한다.

[0061] 본 개시내용의 대상은 또한 2013년 11월 6일에 출원된 PCT/US2013/068613; 2014년 5월 6일에 출원된 PCT/US2014/036933; 및 2017년 3월 10일에 출원된 PCT/US2017/021972의 것에 관한 것이며, 이들 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 조직 미세환경에서의 잠복 복합체 내의 TGFβ1을 도시하는 개략도를 제공한다.

도 2a-2c는 TGFβ1 기능의 다중 콘텍스트를 예시한다: GARP-제시된 TGFβ1은 조절 T 세포 상에 발현되며, 이는 면역 조절에 수반되고 (도 2a); LTBP1/3-제시된 TGFβ1은 섬유모세포 및 다른 세포에 의해 ECM 내로 침착되고 (도 2b); LRRC33-제시된 TGFβ1은 대식세포를 포함한 골수 세포 상에 발현된다 (도 2c).

도 3은 GARP-TGFβ1 복합체 및 LTBP-TGFβ1 복합체를 제조하기 위한 단백질 발현 플랫폼을 예시한다. HEK293-기반 발현 시스템은 멀티밀리그램 양의 정제된 단백질을 수득하기 위해 NiNTA 친화도 정제 및 겔 여과를 사용한다. 야생형 프로TGFβ1, LTPB1, sGARP 및 프로TGF β1 C4S의 개략도가 제시된다.

도 4a는 잠복 TGFβ1에 대한 Ab3의 특이적 결합을 도시한다. 도 4b는 예시적인 모노클로날 항체의 결합 특이성

을 보여준다. 도 4b는 Ab1 및 Ab2가 ELISA에 의해 측정 시, 프로TGFβ1에 특이적으로 결합하고 프로TGFβ2, 프로TGFβ3, 또는 성숙 TGFβ1에는 결합하지 않는 것을 도시한다. 도 4c는 (ELISA에 의해 측정 시) LTBP1-프로TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체의 예를 도시한다.

도 5는 성숙 TGFβ 성장 인자에 대해 제조된 선행 기술 항체의 패널, 및 모든 3종의 이소형에 대한 그의 각각의 결합 프로파일을 제공한다.

도 6a-6b는 옥테트에 의해 측정 시, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성/비의존성 TGFβ1 억제제인 Ab1, Ab2 및 Ab3의 결합 프로파일을 제공한다.

도 7a-7h는 세포-기반 억제 검정을 제공한다.

도 8은 시험관내에서 TGFβ1의 칼리크레인-유도된 활성화에 대한 Ab3의 억제 효과를 보여준다.

도 9a-9b는 이펙터 T 세포 증식의 조절 T 세포-의존성 억제에 대한 Ab1 및 Ab3의 억제 효과를 보여준다.

도 10a-10c는 분극화된 대식세포에서의 세포 표면 LRRC33 발현의 상향조절을 보여준다.

도 11은 T 세포 공동-전달 결장염 모델로부터의 결과를 제공한다.

도 12a-12k는 UUO의 TGFb1-의존성 기계론적 질환 모델에 대한 Ab2의 억제 효과를 보여준다.

도 13a-13c는 UUO의 TGFb1-의존성 기계론적 질환 모델에 대한 Ab3의 억제 효과를 보여준다.

도 14는 탄소 테트라클로라이드-유도된 섬유증 모델에 대한 Ab3의 억제 효과를 제공한다.

도 15는 알포트 마우스에서의 섬유증의 번역 모델에 대한 Ab3의 억제 효과를 제공한다.

도 16은 MC38 암종에서의 종양 성장에 대한 Ab2의 억제 효과를 보여준다.

도 17은 EMT-6 종양 모델에서의 생존에 대한 PD-1 길항제와 조합된 Ab3의 효과를 제공한다.

도 18a-18f는 래트에서의 Ab2의 개선된 안전성 프로파일을 보여주는 독성학/내약성 데이터를 제공한다.

도 19a-19b는 래트에서의 Ab3의 개선된 안전성 프로파일을 보여주는 독성학/내약성 데이터를 제공한다.

도 20은 항상성 래트 BAL 세포에서의 Ab3의 생체내 이소형-선택성을 보여주는 데이터를 제공한다.

도 21a-21d는 TGFβ 이소형의 상대 발현을 제공한다. 도 21a는 TGFβ 이소형 발현 vs. 정상 비교자 (암 유형에 의함)를 보여준다. 도 21b는 TGFβ 이소형 발현의 빈도 (인간 암 유형에 의함)를 보여준다. 도 21c는 개별 종양 샘플에서의 TGFβ 이소형 발현 (암 유형에 의함)을 보여준다. 도 21d는 마우스 동계 암 세포주 모델에서의 TGFβ 이소형 발현을 보여준다.

도 22는 1-주 연구에서의 범-TGFβ 항체로부터의 현미경적 심장 소견을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 포유동물에서, 형질전환 성장 인자-베타 (TGFβ) 슈퍼패밀리는 적어도 33종의 유전자 산물로 구성된다. 이들은 골 형태발생 단백질 (BMP), 액티빈, 성장 및 분화 인자 (GDF), 및 TGFβ 패밀리의 3종의 이소형: TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3을 포함한다. TGFβ는 다양한 과정, 예컨대 세포 증식의 억제, 세포외 매트릭스 (ECM) 재형성 및 면역 항상성에서 주요 역할을 하는 것으로 생각된다. T 세포 항상성을 위한 TGFβ1의 중요성은 TGFβ1-/- 마우스가 오직 3-4주 생존하고 대규모 면역 활성화로 인한 다기관 부전으로 사망한다는 관찰에 의해 입증된다 (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 및 TGFβ3의 역할은 덜 명확하다. 3종의 TGFβ 이소형이 구분되는 시간적 및 공간적 발현 패턴을 갖지만 이들은 동일한 수용체, TGFβRI 및 TGFβRII를 통해 신호전달하는데, 일부 경우에는, 예를 들어 TGFβ2 신호전달의 경우에는, 제III형 수용체 예컨대 베타글리칸이 또한 요구된다 (Feng, X.H. and R. Derynck, Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. 21: p. 659-93; Massague, J., Annu Rev Biochem, 1998. 67: p. 753-91). TGFβRI/II의 리간드-유발된 올리고머화는 SMAD 전사 인자의 인산화를 촉발하여 표적 유전자, 예컨대 Col1a1, Col3a1, ACTA2 및 세르핀1의 전사를 발생시킨다 (Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton, Genes Dev, 2005. 19(23): p. 2783-810). 예를 들어 암에서 또는 마르팡 마우스의 대동맥 병변에서의 SMAD-비의존성 TGFβ 신호전달 경로가 또한 기재되었다 (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).

[0064] 인간에서의 TGFβ 경로의 생물학적 중요성은 유전 질환에 의해 검증되었다. 카무라티-엥겔만 질환은 TGFB1 유전자에서의 상염색체 우성 돌연변이로 인한 골 이형성증을 발생시키며, 이는 TGFβ1 신호전달의 구성적 활성화로 이어진다 (Janssens, K., et al., J Med Genet, 2006. 43(1): p. 1-11). 로이스/디에츠 증후군을 갖는 환자는 대동맥류, 양안 격리증 및 갈라진 목젖을 유발하는 TGFβ 신호전달 경로의 성분에서 상염색체 우성 돌연변이를 보유한다 (Van Laer, L., H. Dietz, and B. Loeys, Adv Exp Med Biol, 2014. 802: p. 95-105). TGFβ 경로 조절이상이 다수의 질환에 연루됨에 따라, TGFβ 경로를 표적화하는 여러 약물이 개발되고 환자에서 시험되었으나, 성공은 제한적이었다.

[0065] TGFβ 신호전달의 조절이상은 광범위한 인간 질환과 연관되어 왔다. 사실상, 다수의 질환 상태에서, 이러한 조절이상은 TGFβ 기능의 다중 양상을 수반할 수 있다. 이환 조직, 예컨대 섬유화 및/또는 염증발생 조직 및 종양은 TGFβ 활성화가, 특정한 질환 환경에서 역할을 하는 다수의 다른 시토카인, 케모카인 및 성장 인자와 함께 자가분비 및/또는 주변분비 방식으로 활성화되는 다중 TGFβ-반응성 세포 사이의 상호작용에 의해 적어도 부분적으로 매개될 수 있는 질환의 악화 또는 진행을 유발할 수 있는 국부 환경을 생성할 수 있다. 예를 들어, 종양 미세환경 (TME)은 TGFβ1을 발현하는 다중 세포 유형, 예컨대 활성화된 근섬유모세포-유사 섬유모세포, 기질세포, 침윤 대식세포, MDSC 및 다른 면역 세포에 더하여 암 (즉, 악성) 세포를 함유한다. 따라서, TME는 함요내에서 TGFβ1을 발현하고/거나 그에 반응성이나 1종 초과의 유형의 제시 분자, 예를 들어, LTBP1, LTBP3, LRRC33 및 GARP와 연관된 세포의 이종 집단을 나타낸다.

[0066] 다중 세포 유형 및 신호전달 "콘텍스트"를 수반하는 조절이상 또는 질환-유도 TGFβ1 활성을 효과적으로 억제하기 위해, 본 개시내용의 발명자들은 이소형-특이적 방식으로 다중 TGFβ1 기능을 억제하는 능력을 갖는 작용제의 부류를 개발하는 것을 추구하였다. 이러한 작용제는 본원에 정의된 바와 같이 TGFβ1의 "이소형-특이적, 콘텍스트-허용성" 억제제로 지칭된다. 일부 실시양태에서, 이러한 억제제는 TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-비의존성 억제제이다. TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 또는 콘텍스트-비의존성 억제제의 사용은 TGFβ1 신호전달을 발현하고/거나 그에 반응성인 다양한 세포 유형의 상호작용을 수반하는 질환에서 TGFβ1 기능의 다중 모드에 대해 그의 억제 효과를 발휘하여, 다중 유형의 TGFβ1 전구체 복합체를 표적화함으로써 치료 효과를 증진시킬 수 있는 것으로 고려된다. 따라서, 이러한 억제제의 치료 표적은 하기 복합체 중 적어도 3종을 포함한다: i) GARP에 의해 제시된 프로TGFβ1; ii) LRRC33에 의해 제시된 프로TGFβ1; iii) LTBP1에 의해 제시된 프로TGFβ1; 및 (iv) LTBP3에 의해 제시된 프로TGFβ1. 전형적으로, 상기 복합체 (i) 및 (ii)는 GARP 및 LRRC33 둘 다가 세포외면에서 TGFβ1을 제시할 수 있는 막횡단 단백질이기 때문에 세포 표면 상에 존재하며, 한편 복합체 (iii) 및 (iv)는 세포외 매트릭스의 성분이다. 다수의 연구가 TGFβ1 활성화의 메카니즘을 밝혀냈다. 3종의 인테그린, αVβ6, αVβ8 및 αVβ1이 잠복 TGFβ1의 주요 활성화제인 것으로 입증되었다 (Reed, N.I., et al., Sci Transl Med, 2015. 7(288): p. 288ra79; Travis, M.A. and D. Sheppard, Annu Rev Immunol, 2014. 32: p. 51-82; Munger, J.S., et al., Cell, 1999. 96(3): p. 319-28). αV 인테그린은 TGFβ1 및 TGFβ1 LAP에 존재하는 RGD 서열에 높은 친화도로 결합한다 (Dong, X., et al., Nat Struct Mol Biol, 2014. 21(12): p. 1091-6). 인테그린 결합을 막지만 분비는 막지 않는 TGFβ1 RGD 부위 내의 돌연변이를 갖는 트랜스제닉 마우스는 TGFβ1-/- 마우스를 표현형모사한다 (Yang, Z., et al., J Cell Biol, 2007. 176(6): p. 787-93). β6 및 β8 인테그린 둘 다가 결여된 마우스는 다기관 염증 및 구개열을 포함한 TGFβ1 및 TGFβ3 녹아웃 마우스의 모든 본질적인 표현형을 재현하여 발생 및 항상성에서 TGFβ1 활성화에 대한 이들 2종의 인테그린의 본질적인 역할을 확인한다 (Aluwihare, P., et al., J Cell Sci, 2009. 122(Pt 2): p. 227-32). 잠복 TGFβ1의 인테그린-의존성 활성화를 위한 핵심은 제시 분자에 대한 공유 테더이고; 돌연변이유발에 의한 GARP와 TGFβ1 LAP 사이의 디술피드 결합의 파괴는 복합체 형성을 손상시키지 않으나, αVβ6에 의한 TGFβ1 활성화를 완전히 폐지한다 (Wang, R., et al., Mol Biol Cell, 2012. 23(6): p. 1129-39). 잠복 TGFβ1의 최근 구조는 인테그린이 어떻게 잠복 복합체로부터의 활성 TGFβ1의 방출을 가능하게 하는지를 조명하였다: 잠복 TGFβ1의 그의 제시 분자에 대한 공유 연결은 잠복 TGFβ1을 LTBP를 통해 ECM에, 또는 GARP 또는 LRRC33을 통해 세포골격에 앵커링시킨다. RGD 서열에 대한 인테그린 결합은 LAP의 구조에서 힘-의존성 변화를 발생시켜, 활성 TGFβ1이 방출되고 수용체 근처에 결합하게 한다 (Shi, M., et al., Nature, 2011. 474(7351): p. 343-9). 질환에서의 인테그린-의존성 TGFβ1 활성화의 중요성이 또한 잘 검증되어 있다. αVβ1의 소분자 억제제는 블레오마이신-유발된 폐 섬유증 및 탄소 테트라클로라이드-유발된 간 섬유증으로부터 보호하고 (Reed, N.I., et al., Sci Transl Med, 2015. 7(288): p. 288ra79), 항체에 의한 αVβ6 차단 또는 인테그린 β6 발현의 상실은 블레오마이신-유발된 폐 섬유증 및 방사선-유발된 섬유증을 억제한다 (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). 인테그린에 더하여, 트롬보스폰딘-1 및 프로테아제 예컨대 매트릭스 메탈로프로테이나제 (MMP), 카텝신 D 또는 칼리크레인에 의한

활성화를 포함한 TGFβ1 활성화의 다른 메카니즘이 연루되었다. 그러나, 대다수의 이들 연구는 정제된 단백질을 사용하여 시험관내에서 수행되었고; 생체내 연구로부터의 이들 분자의 역할에 대한 증거는 더 적다. 트롬보스폰딘-1의 녹아웃은 일부 조직에서 TGFβ1-/- 표현형의 일부 측면을 재현하지만, TGFβ-의존성인 것으로 알려져 있는 블레오마이신-유발된 폐 섬유증에서는 보호적이지 않다 (Ezzie, M.E., et al., Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. 44(4): p. 556-61). 추가적으로, 후보 프로테아제의 녹아웃은 TGFβ1 표현형을 발생시키지 않았다 (Worthington, J.J., J.E. Klementowicz, and M.A. Travis, Trends Biochem Sci, 2011. 36(1): p. 47-54). 이는 중복에 의해 또는 발생 및 항상성보다는 특정한 질환에서 결정적인 이들 메카니즘에 의해 설명될 수 있다.

[0067] 따라서, 본원에 기재된 TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트 허용성 억제제는 TGFβ1 활성화 단계를 막음으로써 작동하는 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 억제제는 TGFβ1의 인테그린-의존성 (예를 들어, 기계적 또는 힘-유도된) 활성화를 억제할 수 있다 (도 2 참조). 일부 실시양태에서, 이러한 억제제는 TGFβ1의 프로테아제-의존성 또는 프로테아제-유발된 활성화를 억제할 수 있다. 후자는 인테그린-비의존성 방식으로 TGFβ1 활성화 단계를 억제하는 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 억제제는 활성화 방식과 무관하게 TGFβ1 활성화를 억제할 수 있으며, 예를 들어, TGFβ1의 인테그린-의존성 활성화 및 프로테아제-의존성 활성화 둘 다를 억제할 수 있다. TGFβ1을 활성화시킬 수 있는 프로테아제의 비제한적 예는 세린 프로테아제, 예컨대 칼리크레인, 키모트립신, 트립신, 엘라스타제, 플라스민, 뿐만 아니라 아연 메탈로프로테아제 (MMP 패밀리) 예컨대 MMP-2, MMP-9 및 MMP-13을 포함한다. 칼리크레인은 혈장-칼리크레인 및 조직 칼리크레인, 예컨대 KLK1, KLK2, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK9, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13, KLK14 및 KLK15를 포함한다. 도 8은 시험관내에서 TGFβ1의 칼리크레인-의존성 활성화를 억제할 수 있는 TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-비의존성 억제제의 한 예를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 억제제는 잠복 복합체로부터의 활성 (성숙) TGFβ1 성장 인자의 방출 또는 해리를 막는다. 일부 실시양태에서, 이러한 억제제는 복합체의 불활성 (예를 들어, 잠복) 입체형태를 안정화시킴으로써 작동할 수 있다.

[0068] TGFβ는 섬유증, 면역-조정 및 암 진행을 포함한 다수의 생물학적 과정에 연루되었다. TGFβ1은 단백질의 TGFβ 슈퍼패밀리 중 최초로 확인된 구성원이었다. TGFβ 슈퍼패밀리의 다른 구성원과 같이, TGFβ1 및 이소형 TGFβ2 및 TGFβ3은 초기에 불활성 전구체 프로-단백질 형태 (프로TGFβ로 지칭됨)로서 발현된다. TGFβ 단백질 (예를 들어, TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3)은 프로단백질 컨버타제 (예를 들어, 푸린)에 의해 단백질분해적으로 절단되어 잠복 형태 (잠복 TGFβ로 지칭됨)를 생성한다. 일부 실시양태에서, TGFβ 단백질 (예를 들어, TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3)의 프로-단백질 형태 또는 잠복 형태는 "프로/잠복 TGFβ 단백질"로 지칭될 수 있다. TGFβ1은 예를 들어 GARP (GARP-TGFβ1 복합체를 형성함), LRRC33 (LRRC33-TGFβ1 복합체를 형성함), LTBP1 (LTBP1-TGFβ1 복합체를 형성함) 및/또는 LTBP3 (LTBP3-TGFβ1 복합체를 형성함)을 포함한 다중 분자와 복합체화되어 다른 분자에 제시될 수 있다. 이들 복합체로 제시되는 TGFβ1은 잠복 형태 (잠복 TGFβ1) 또는 전구체 형태 (프로TGFβ1)로 제시될 수 있다.

[0069] 본 발명은 TGFβ1 기능의 단일 콘텍스트로 제한되지 않는 TGFβ1 신호전달의 다중 생물학적 역할과 연관된 특정 질환에 대한 치료 용도에 특히 유용하다. 이러한 상황에서, 다중 콘텍스트에 걸친 TGFβ1 효과를 억제하는 것이 유익할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명은 콘텍스트-특이적 방식보다는 이소형-특이적 방식으로 TGFβ1을 표적화하고 조정하는 방법을 제공한다. 이러한 작용제는 "이소형-특이적, 콘텍스트-허용성" TGFβ1 조정제로 지칭될 수 있다. 일부 실시양태에서, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 조정제는 다중 콘텍스트 (예를 들어, 다수의 유형의 프로/잠복-TGFβ1 복합체)를 표적화한다. 일부 실시양태에서, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 조정제는 모든 콘텍스트를 포괄하기 위해 모든 유형의 프로/잠복 TGFβ1 복합체 (예를 들어, GARP-연관, LRRC33-연관, LTBP-연관 등)를 표적화한다.

[0070] 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제가 1종 초과의 유형의 프로/잠복-TGFβ1 복합체 (즉, 상이한 제시 분자를 가짐)를 표적화할 수 있지만, 일부 실시양태에서, 이러한 억제제는 1종 이상의 콘텍스트를 다른 것보다 선호할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, TGFβ1의 활성화를 억제하는 콘텍스트-허용성 항체는, 이러한 항체가 프로/잠복 복합체의 유형 둘 다에 결합할 수 있을지라도, 1종의 제시 분자에 의해 매개되는 TGFβ1 활성화를 또 다른 제시 분자에 비해 우선적으로 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 LTBP-연관 TGFβ1, GARP-연관 TGFβ1 및 LRRC33-연관 TGFβ1에 결합하고 그의 활성화를 억제하지만, LTBP-연관 TGFβ1에 대한 우선적인 억제 활성을 갖는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 LTBP1-연관 TGFβ1, LTBP3-연관 TGFβ1, GARP-연관 TGFβ1 및 LRRC33-연관 TGFβ1에 결합하고 그의 활성화를 억제하지만, LTBP1- 및 LTBP-3-연관 TGFβ1에 대한 우선적인 억제 활성을 갖는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 LTBP1-연관 TGFβ1, LTBP3-연관 TGFβ1, GARP-연관 TGFβ1 및 LRRC33-연관 TGFβ1에 결합하고 그의 활성화를 억제하지

만, GARP-연관 TGFβ1 및 LRRC33-연관 TGFβ1에 대한 우선적인 억제 활성을 갖는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 GARP-연관 TGFβ1 및 LRRC33-연관 TGFβ1에 결합하고 그의 활성화를 억제하지만, GARP-연관 TGFβ1에 대한 우선적인 억제 활성을 갖는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 GARP-연관 TGFβ1 및 LRRC33-연관 TGFβ1에 결합하고 그의 활성화를 억제하지만, LRRC33-연관 TGFβ1에 대한 우선적인 억제 활성을 갖는 모노클로날 항체이다.

[0071] 따라서, 본 발명에 따르면, TGFβ 효과의 하위세트를 표적화하기 위해 다양한 정도의 선택성이 생성될 수 있다. TGFβ1의 이소형-특이적 억제제 (TGFβ의 단일 이소형, 예를 들어, TGFβ1을 표적화함)는 범-TGFβ 억제제 (TGFβ의 다중 또는 모든 이소형을 표적화함)보다 더 큰 선택성을 제공한다. TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제 (TGFβ1의 단일 이소형의 다중 콘텍스트를 표적화함)는 이소형-특이적 억제제보다 더 큰 선택성을 제공한다. TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-비의존성 억제제 (어느 제시 분자가 연관되는지와 무관하게 TGFβ1 기능을 표적화하고 억제함)는 TGFβ1의 다중 활성에 걸친 억제 효과의 보다 넓은 적용범위를 가능하게 하면서 이소형 선택성을 제공한다.

[0072] 정의

[0073] 본 개시내용이 보다 용이하게 이해될 수 있도록, 특정 용어가 먼저 정의된다. 이들 정의는 본 개시내용의 나머지에 비추어 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이 판독되어야 한다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 추가의 정의는 상세한 설명 전반에 걸쳐 제시된다.

[0074] 항체: 용어 "항체"는 본원의 다른 곳에 추가로 기재된 바와 같은 임의의 자연-발생, 재조합, 변형된 또는 조작된 이뮤노글로불린 또는 이뮤노글로불린-유사 구조 또는 항원-결합 단편 또는 그의 부분, 또는 그의 유도체를 포괄한다. 따라서, 용어는 표적 항원에 특이적으로 결합하는 이뮤노글로불린 분자를 지칭하고, 예를 들어, 키메라, 인간화, 완전 인간 및 이중특이적 항체를 포함한다. 무손상 항체는 일반적으로 적어도 2개의 전장 중쇄 및 2개의 전장 경쇄를 포함할 것이지만, 일부 경우에 단지 중쇄만을 포함할 수 있는 낙타류 내에서 자연 발생하는 항체와 같이 보다 적은 쇄를 포함할 수 있다. 항체는 오로지 단일 공급원으로부터 유래될 수 있거나 또는 "키메라"일 수 있고, 즉, 항체의 상이한 부분들은 2종의 상이한 항체로부터 유래될 수 있다. 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 하이브리도마에서 재조합 DNA 기술에 의해, 또는 무손상 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생산될 수 있다. 본원에 사용된 용어 항체는 각각 모노클로날 항체, 이중특이적 항체, 미니바디, 도메인 항체, 합성 항체 (때때로 본원에서 "항체 모방체"로 지칭됨), 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 항체 융합체 (때때로 본원에서 "항체 접합체"로 지칭됨)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 용어는 또한 펩티바디를 포괄한다.

[0075] 용어 "항원"은 선택적 결합제, 예컨대 항원 결합 단백질 (예를 들어, 항체 포함)에 의해 결합될 수 있는 에피토프, 예를 들어, 분자 또는 분자의 부분, 또는 분자 또는 분자의 부분의 복합체를 제공하는 분자 구조를 지칭한다. 따라서, 선택적 결합제는 복합체 중 2종 이상의 성분에 의해 형성되는 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원은 그 항원에 결합할 수 있는 항체를 생산하기 위해 동물에 사용될 수 있다. 항원은 상이한 항원 결합 단백질, 예를 들어, 항체와 상호작용할 수 있는 1개 이상의 에피토프를 보유할 수 있다. 항원-결합 부분/단편: 본원에 사용된 용어 항체의 "항원 결합 부분" 또는 "항원 결합 단편"은 항원 (예를 들어, TGFβ1)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 1개 이상의 단편을 지칭한다. 항원 결합 부분은 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 임의의 자연 발생, 효소적으로 수득가능한, 합성, 또는 유전자 조작된 폴리펩티드 또는 당단백질을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 항체의 항원-결합 부분은 임의의 적합한 표준 기술 예컨대 단백질분해적 소화 또는 항체 가변 및 임의로 불변 도메인을 코딩하는 DNA의 조작 및 발현을 수반하는 재조합 유전 공학 기술을 사용하여, 예를 들어 전체 항체 분자로부터 유래될 수 있다. 항원-결합 부분의 비제한적 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디술피드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')2 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) 단일-쇄 Fv (scFv) 분자 (예를 들어, 문헌 [Bird et al. (1988) SCIENCE 242:423-426; 및 Huston et al. (1988) PROC. NAT'L. ACAD. SCI. USA 85:5879-5883] 참조); (vi) dAb 단편 (예를 들어, 문헌 [Ward et al. (1989) NATURE 341: 544-546] 참조); 및 (vii) 항체의 초가변 영역을 모방하는 아미노산 잔기로 이루어진 최소 인식 단위 (예를 들어, 단리된 상보성 결정 영역 (CDR))를 포함한다. 단일 쇄 항체의 다른 형태, 예컨대 디아바디가 또한 포괄된다. 용어 항체의 항원 결합 부분은 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 항체 불변 도메인 1 (CH1), 항체 경쇄 가변 도메인 (VL), 항체 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 링커를 포함하며, 여기서 상기 항체 도메인 및 상기 링

커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 하기 순서: a) VH-CH1-링커-VL-CL, b) VL-CL-링커-VH-CH1, c) VH-CL-링커-VL-CH1 또는 d) VL-CH1-링커-VH-CL 중 하나를 갖고; 여기서 상기 링커는 적어도 30개 아미노산, 바람직하게는 32 내지 50개 아미노산으로 된 폴리펩티드인, 달리 "scFab"로 알려져 있는 "단일 쇄 Fab 단편"을 포함한다.

[0076] 암: 본원에 사용된 용어 "암"은 전형적으로 비조절된 세포 증식 및 악성종양을 특징으로 하는 다세포 진핵생물에서의 생리학적 상태를 지칭한다. 따라서, 용어는 광범위하게 고형 종양, 혈액암 (예를 들어, 백혈병), 뿐만 아니라 골수섬유증 및 다발성 골수종을 포괄한다.

[0077] 세포-연관 TGFβ1: 용어는 막-결합된 (예를 들어, 세포 표면에 테더링된) TGFβ1 또는 그의 신호전달 복합체 (예를 들어, 프로/잠복 TGFβ1)를 지칭한다. 전형적으로, 이러한 세포는 면역 세포이다. GARP 또는 LRRC33에 의해 제시된 TGFβ1은 세포-연관 TGFβ1이다.

[0078] 체크포인트 억제제: 본 개시내용과 관련하여, 체크포인트 억제제는 면역 체크포인트 억제제를 지칭하고, 관련 기술분야에서 이해되는 바와 같은 의미를 보유한다. 전형적으로, 표적은 T 세포 또는 NK 세포 상의 수용체 분자, 또는 항원-제시 세포 (APC) 또는 종양 세포 상의 상응하는 세포 표면 리간드이다. 면역 체크포인트는 "자기"에 대해 염증성 면역이 발생하는 것을 막기 위해 면역 세포에서 활성화된다. 따라서, 체크포인트 억제를 통해 면역계의 균형을 변화시키는 것은 그것이 암을 검출 및 제거하기 위해 완전히 활성화되도록 해야 한다. 면역 반응의 제어에 연루된 가장 잘 알려진 억제 수용체는 세포독성 T-림프구 항원-4 (CTLA-4), 프로그램화된 세포 사멸 단백질 1 (PD-1), T-세포 이뮤노글로불린 도메인 및 뮤신 도메인-3 (TIM3), 림프구-활성화 유전자 3 (LAG3), 킬러 세포 이뮤노글로불린-유사 수용체 (KIR), 글루코코르티코이드-유발된 종양 괴사 인자 수용체 (GITR) 및 T-세포 활성화의 V-도메인 이뮤노글로불린 (Ig)-함유 억제제 (VISTA)이다. 체크포인트 억제제의 비제한적 예는 니볼루맙, 펨브롤리주맙, BMS-936559, 아테졸리주맙, 아벨루맙, 두르발루맙, 이필리무맙, 트레멜리무맙, IMP-321, BMS-986016, 및 리릴루맙을 포함한다.

[0079] 임상 이익: 본원에 사용된 용어 "임상 이익"은 요법의 효능 및 안전성 둘 다를 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, 바람직한 임상 이익을 달성하는 치유적 치료는 효과적이면서 안전하다 (예를 들어, 내약성 있거나 허용되는 독성 또는 유해 사건을 가짐).

[0080] 조합 요법: "조합 요법"은 2종 이상 치료제를 포함하는 임상 적응증에 대한 치료 요법을 지칭한다. 따라서, 용어는 제1 조성물 (예를 들어, 활성 성분)을 포함하는 제1 요법이 환자에게 제2 조성물 (활성 성분)을 포함하는 제2 요법과 함께 투여되는 치료 요법을 지칭하며, 동일하거나 중첩되는 질환 또는 임상 상태를 치료하는 것으로 의도된다. 제1 및 제2 조성물은 동일한 세포 표적, 또는 별개의 세포 표적 둘 다에 작용할 수 있다. 조합 요법과 관련된 어구 "와 함께"는, 조합 요법을 받는 대상체에서 제1 요법의 치료 효과가 제2 요법의 치료 효과와 시간적으로 및/또는 공간적으로 중첩된다는 것을 의미한다. 따라서, 조합 요법은 요법의 공동 투여를 위한 단일 제제로서, 또는 순차적 투여를 위한 개별 제제로서 제제화될 수 있다.

[0081] 조합 또는 조합적 에피토프: 일부 실시양태에서, 본 발명의 억제 항체는 프로/잠복 TGFβ1 복합체의 2종 이상의 성분 (예를 들어, 부분 또는 절편)에 의해 형성된 에피토프에 결합할 수 있다. 이러한 에피토프는 조합 또는 조합적 에피토프로 지칭된다. 따라서, 조합 에피토프는 복합체의 제1 성분으로부터의 아미노산 잔기(들), 및 복합체의 제2 성분으로부터의 아미노산 잔기(들) 등을 포함할 수 있다. 각각의 성분은 항원 복합체의 단일 단백질 또는 2종 이상의 단백질의 것일 수 있다. 조합 에피토프에 대한 항체의 결합은 항원의 1차 아미노산 서열에 거의 의존하지 않는다. 오히려, 조합 에피토프는 항원 또는 항원 복합체의 2종 이상의 성분 (예를 들어, 부분 또는 절편, 예컨대 아미노산 잔기)으로부터의 구조적 기여에 의해 형성된다.

[0082] 경쟁 또는 교차-경쟁: 용어 "경쟁한다"는 동일한 에피토프에 대해 경쟁하는 항원 결합 단백질 (예를 들어, 항체 또는 그의 항원 결합 부분)과 관련하여 사용되는 경우에, 시험되는 항원 결합 단백질이 공통 항원 (예를 들어, TGFβ1 또는 그의 단편)에 대한 참조 항원 결합 단백질의 특이적 결합을 막거나 억제하는 (예를 들어, 감소시키는) 검정에 의해 결정되는 바와 같은 항원 결합 단백질 사이의 경쟁을 의미한다. 수많은 유형의 경쟁적 결합 검정, 예를 들어: 고체 상 직접 또는 간접 방사선면역검정 (RIA), 고체 상 직접 또는 간접 효소 면역검정 (EIA), 샌드위치 경쟁 검정; 고체 상 직접 비오틴-아비딘 EIA; 고체 상 직접 표지된 검정, 및 고체 상 직접 표지된 샌드위치 검정이 1종의 항원 결합 단백질이 또 다른 것과 경쟁하는지 결정하는 데 사용될 수 있다. 통상적으로, 경쟁하는 항원 결합 단백질이 과량으로 존재하는 경우에, 이는 참조 항원 결합 단백질의 공통 항원에 대한 특이적 결합을 적어도 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% 또는 75% 또는 그 초과만큼 억제할 (예를 들어, 감소시킬) 것이다. 일부 경우에, 결합은 적어도 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97% 또는 97% 또는 그 초과만큼 억제된다. 일부 실시양태에서, 제1 항체 또는 그의 항원-결합 부분 및 제2 항체 또는

그의 항원-결합 부분은 예를 들어 제조업체의 지침에 따라, 예를 들어 표준 시험 조건을 사용하여 비아코어 또는 옥테트에 의해 검정 시 (예를 들어, 실온, ~20-25℃에서 결합 검정됨), 동일한 항원에 대해 서로 교차-차단한다. 일부 실시양태에서, 제1 항체 또는 그의 단편 및 제2 항체 또는 그의 단편은 동일한 에피토프를 가질 수 있다. 다른 실시양태에서, 제1 항체 또는 그의 단편 및 제2 항체 또는 그의 단편은 비-동일하지만 중첩되는 에피토프를 가질 수 있다. 또 다른 추가 실시양태에서, 제1 항체 또는 그의 단편 및 제2 항체 또는 그의 단편은 항체 결합이 입체 장애를 통해 교차-차단되도록 3차원 공간에서 매우 근접한 별개의 (상이한) 에피토프를 가질 수 있다. "교차-차단"은 항원에 대한 제1 항체의 결합이 동일한 항원에 대한 제2 항체의 결합을 막고, 유사하게, 항원에 대한 제2 항체의 결합이 동일한 항원에 대한 제1 항체의 결합을 막는다는 것을 의미한다.

[0083] 상보성 결정 영역: 본원에 사용된 용어 "CDR"은 항체 가변 서열 내의 상보성 결정 영역을 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 각각의 가변 영역에 3개의 CDR이 존재하며, 이는 각각의 가변 영역에 대해 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 지정된다. 본원에 사용된 용어 "CDR 세트"는 항원에 결합할 수 있는 단일 가변 영역에서 발생하는 3개의 CDR의 군을 지칭한다. 이들 CDR의 정확한 경계는 상이한 시스템에 따라 상이하게 정의되었다. 카바트에 의해 기재된 시스템 (Kabat et al. (1987; 1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md.))은 항체의 임의의 가변 영역에 적용가능한 명백한 잔기 넘버링 시스템을 제공할 뿐만 아니라, 3개의 CDR을 정의하는 정확한 잔기 경계를 제공한다. 이들 CDR은 카바트 CDR로 지칭될 수 있다. 코티아 및 동료들 (Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; 및 Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883)은 카바트 CDR 내의 특정 하위-부분이 아미노산 서열 수준에서 큰 다양성을 가짐에도 불구하고, 거의 동일한 펩티드 백본 입체형태를 채택하는 것을 발견하였다. 이들 하위-부분은 L1, L2 및 L3 또는 H1, H2 및 H3으로 지정되었으며, 여기서 "L" 및 "H"는 각각 경쇄 및 중쇄 영역을 지정한다. 이들 영역은 코티아 CDR로 지칭될 수 있으며, 이는 카바트 CDR과 중첩되는 경계를 갖는다. 카바트 CDR과 중첩되는 CDR을 정의하는 다른 경계는 문헌 [Padlan (1995) FASEB J. 9: 133-139 및 MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5): 732-45]에 의해 기재되어 있다. 또 다른 CDR 경계 정의는 본원의 시스템 중 하나를 엄격하게 따르지 않을 수 있으나 그럼에도 불구하고 카바트 CDR과 중첩될 것이며, 다만 그들은 특정한 잔기 또는 잔기의 군 또는 심지어 전체 CDR이 항원 결합에 유의하게 영향을 미치지 않는다는 예측 또는 실험적 발견에 비추어 짧아지거나 길어질 수 있다. 본원에 사용된 방법은 이들 시스템 중 임의의 것에 따라 정의된 CDR을 이용할 수 있지만, 특정 실시양태는 카바트 또는 코티아 정의된 CDR을 사용한다.

[0084] 입체형태적 에피토프: 일부 실시양태에서, 본 발명의 억제 항체는 입체형태-특이적 에피토프에 결합할 수 있다. 이러한 에피토프는 입체형태적 에피토프, 입체형태-특이적 에피토프, 입체형태-의존성 에피토프 또는 입체형태-민감성 에피토프로 지칭된다. 이러한 에피토프에 특이적으로 결합하는 상응하는 항체 또는 그의 단편은 입체형태-특이적 항체, 입체형태-선택적 항체 또는 입체형태-의존성 항체로 지칭될 수 있다. 입체형태적 에피토프에 대한 항원의 결합은 항원 또는 항원 복합체의 3차원적 구조 (입체형태)에 따라 달라진다.

[0085] 불변 영역: 이뮤노글로불린 불변 도메인은 중쇄 또는 경쇄 불변 도메인을 지칭한다. 인간 IgG 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 아미노산 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0086] 콘텍스트-허용성; 콘텍스트-비의존성: "콘텍스트-허용성" 및 "콘텍스트-비의존성" TGFβ 억제제는 TGFβ 기능의 1개 초과의 모드에 대해 작용할 수 있는 광범위한-콘텍스트 억제제이다. TGFβ의 "콘텍스트-허용성 억제제"는 TGFβ 기능, 예를 들어, 하기: GARP (LRRC32로도 지칭됨), LRRC33, LTBP1, 및 LTBP3 중 적어도 2종과 연관된 TGFβ 활성의 다중 콘텍스트를 억제할 수 있는 작용제이다. 콘텍스트-허용성 억제제 중에서, 작용제가 특정한 제시 분자와 무관하게 TGFβ 활성을 억제할 수 있는 경우에, 이러한 억제제는 "콘텍스트-비의존성" 억제제로 지칭된다. 따라서, TGFβ의 콘텍스트-비의존성 억제제는 하기: GARP, LRRC33, LTBP1, 및 LTBP3 모두와 연관된 TGFβ 활성을 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 콘텍스트-허용성 및 콘텍스트-비의존성 억제제는 다른 것에 비해 1종 이상의 콘텍스트에 대한 우선적인 또는 편향된 억제 활성을 발휘할 수 있다.

[0087] ECM-연관 TGFβ1: 용어는 세포외 매트릭스의 성분인 (예를 들어, 그에 침착된) TGFβ1 또는 그의 신호전달 복합체 (예를 들어, 프로/잠복 TGFβ1)를 지칭한다. LTBP1 또는 LTBP3에 의해 제시된 TGFβ1은 ECM-연관 TGFβ1이다.

[0088] 유효량: "유효량" (또는 치료 유효량)은 환자 집단에서 통계적으로 유의한 임상 이익을 달성하는 투여량 또는 투여 요법이다.

[0089] 용어 "에피토프"는 결합제, 이뮤노글로불린 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 분자 결정기 (예를 들어, 폴리펩티드 결정기)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 에피토프 결정기는 화학적으로 활성인 표

면 분자 군, 예컨대 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 또는 술포닐을 포함하고, 특정 실시양태에서, 특정한 3차원 구조 특징 및/또는 특정한 전하 특징을 가질 수 있다. 에피토프는 결합 단백질에 의해 결합되는 항원의 영역이다. 따라서, 에피토프는 특정한 결합 파트너 상의 상보성 부위에 결합하는 것으로 알려져 있는 항원 (또는 그의 단편)의 영역의 아미노산 잔기로 이루어진다. 항원 단편은 1개 초과의 에피토프를 함유할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체가 단백질 및/또는 거대분자의 복합체 혼합물 중에서 그의 표적 항원을 인식하는 경우에 항체는 항원에 특이적으로 결합한다. 예를 들어, 항체가 교차-경쟁하는 경우 (하나가 다른 것의 결합 또는 조정 효과를 막음)에 항체는 "동일한 에피토프에 결합한다"고 한다. 또한, 에피토프의 구조적 정의 (중첩, 유사, 동일)는 유익하지만, 기능적 정의는 구조적 (결합) 및 기능적 (조정, 경쟁) 파라미터를 포괄하므로 종종 보다 더 적절하다.

[0090] 섬유증: 용어 "섬유증" 또는 "섬유화 상태/장애"는 조직 또는 기관 내에서 세포외 매트릭스 (ECM) 성분, 예컨대 콜라겐의 병리학적 축적을 특징으로 하는 과정 또는 발현을 지칭한다.

[0091] GARP-TGFβ1 복합체: 본원에 사용된 용어 "GARP-TGFβ1 복합체"는 프로-단백질 형태 또는 잠복 형태의 형질전환 성장 인자-β1 (TGFβ1) 단백질 및 당단백질-A 반복 우세 단백질 (GARP) 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하는 단백질 복합체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, TGFβ1 단백질의 프로-단백질 형태 또는 잠복 형태는 "프로/잠복 TGFβ1 단백질"로 지칭될 수 있다. 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체는 1개 이상의 디술피드 결합을 통해 프로/잠복 TGFβ1과 공유 연결된 GARP를 포함한다. 다른 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체는 프로/잠복 TGFβ1과 비-공유 연결된 GARP를 포함한다. 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체는 자연-발생 복합체, 예를 들어 세포에서의 GARP-TGFβ1 복합체이다. 예시적인 GARP-TGFβ1 복합체가 도 3에 제시된다.

[0092] 인간 항체: 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 본 개시내용의 인간 항체는, 예를 들어 CDR, 특히 CDR3 내에, 인간 배선 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해, 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 또 다른 포유동물 종, 예컨대 마우스의 배선으로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 그라프팅된 것인 항체를 포함하는 것으로 의도되지는 않는다.

[0093] 용어 "인간화 항체"는 비-인간 종 (예를 들어, 마우스)으로부터의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하나, VH 및/또는 VL 서열의 적어도 한 부분이 보다 더 "인간-유사"하도록, 즉 인간 배선 가변 서열과 보다 더 유사하도록 변경된 항체를 지칭한다. 인간화 항체의 한 유형은 인간 CDR 서열이 상응하는 비-인간 CDR 서열을 대체하기 위해 비-인간 VH 및 VL 서열 내로 도입된 CDR-그라프트된 항체이다. 또한 "인간화 항체"는 관심 항원에 면역특이적으로 결합하고 인간 항체의 아미노산 서열을 실질적으로 갖는 FR 영역 및 비-인간 항체의 아미노산 서열을 실질적으로 갖는 CDR 영역을 포함하는 항체 또는 그의 변이체, 유도체, 유사체 또는 단편이다. CDR과 관련하여 본원에 사용된 용어 "실질적으로"는 비-인간 항체 CDR의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR을 지칭한다. 인간화 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역이 비-인간 이뮤노글로불린 (즉, 공여자 항체)의 것에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역이 인간 이뮤노글로불린 컨센서스 서열의 것인 적어도 1개, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인 (Fab, Fab', F(ab')2, FabC, Fv)을 실질적으로 모두 포함한다. 한 실시양태에서, 인간화 항체는 또한 이뮤노글로불린 Fc 영역, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 것의 적어도 한 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 경쇄뿐만 아니라 적어도 중쇄의 가변 도메인을 함유한다. 항체는 또한 중쇄의 CH1, 힌지, CH2, CH3 및 CH4 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 인간화 경쇄만을 함유한다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체 인간화 중쇄만을 함유한다. 구체적 실시양태에서, 인간화 항체는 경쇄의 인간화 가변 도메인 및/또는 인간화 중쇄만을 함유한다.

[0094] 이소형-특이적: 용어 "이소형 특이성"은 다른 구조적으로 관련된 이소형에 비해 1종의 이소형을 식별하는 작용제의 능력 (즉, 선택성)을 지칭한다. 이소형-특이적 TGFβ 억제제는 주어진 농도에서 TGFβ의 하나의 이소형에 대해 그의 억제 활성을 발휘하고 TGFβ의 다른 이소형에 대해서는 그렇지 않다. 예를 들어, 이소형-특이적 TGFβ1 항체는 TGFβ1에 선택적으로 결합한다. TGFβ1-특이적 억제제 (항체)는 TGFβ2 또는 TGFβ3보다 TGFβ1 이소형을 실질적으로 더 큰 친화도로 우선적으로 표적화한다 (결합하여 억제한다). 예를 들어, 이와 관련된 선택성은 시험관내 결합 검정 예컨대 옥테트 및 비아코어에 의해 측정 시 각각의 친화도에서의 적어도 500-1000-배 차이를 지칭할 수 있다. 일부 실시양태에서, 선택성은 TGFβ1을 억제하는 데 효과적인 투여량으로 사용한 경우에 억제제가 TGFβ2 및 TGFβ3을 억제하지 않도록 하는 것이다. 예를 들어, 항체는 ~1 pM의 친화도로 TGFβ1에 우선적으로 결합할 수 있으며, 반면 동일한 항체가 ~0.5-50 nM로 TGFβ2 및/또는 TGFβ3에 결합할 수 있다. 이

러한 억제제가 치료제로서 유용하기 위해서는, 바람직한 효과를 달성하기 위한 투여량 (예를 들어, 치료 유효량)은 억제제가 TGFβ2 또는 TGFβ3을 억제하지 않으면서 TGFβ1 이소형을 효과적으로 억제할 수 있는 범위 내에 속해야 한다.

[0095] 단리된: 본원에 사용된 "단리된" 항체는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 단리된 항체는 다른 의도되지 않은 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없다.

[0096] 국재화된: 본 개시내용과 관련하여, 용어 "국재화된"은 ("국재화된 종양"에서와 같음) 전신 질환과는 달리 해부학적으로 단리되거나 또는 단리가능한 이상, 예컨대 고형 악성종양을 지칭한다. 특정 백혈병은 예를 들어, 질환에 대해 국재화된 성분 (예를 들어 골수) 및 전신 성분 (예를 들어 순환 혈액 세포) 둘 다를 가질 수 있다.

[0097] LRRC33-TGFβ1 복합체: 본원에 사용된 용어 "LRRC33-TGFβ1 복합체"는 프로-단백질 형태 또는 잠복 형태의 형질전환 성장 인자-β1 (TGFβ1) 단백질과 류신-풍부 반복부-함유 단백질 33 (LRRC33; 반응성 산소 종의 음성 조절제 또는 NRROS로도 알려짐) 또는 그의 단편 또는 변이체 사이의 복합체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, LRRC33-TGFβ1 복합체는 1개 이상의 디술피드 결합을 통해 프로/잠복 TGFβ1과 공유 연결된 LRRC33을 포함한다. 다른 실시양태에서, LRRC33-TGFβ1 복합체는 프로/잠복 TGFβ1과 비-공유 연결된 LRRC33을 포함한다. 일부 실시양태에서, LRRC33-TGFβ1 복합체는 자연-발생 복합체, 예를 들어 세포에서의 LRRC33-TGFβ1 복합체이다.

[0098] LTBP1-TGFβ1 복합체: 본원에 사용된 용어 "LTBP1-TGFβ1 복합체"는 프로-단백질 형태 또는 잠복 형태의 형질전환 성장 인자-β1 (TGFβ1) 단백질 및 잠복 TGF-베타 결합 단백질 1 (LTBP1) 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하는 단백질 복합체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, LTBP1-TGFβ1 복합체는 1개 이상의 디술피드 결합을 통해 프로/잠복 TGFβ1과 공유 연결된 LTBP1을 포함한다. 다른 실시양태에서, LTBP1-TGFβ1 복합체는 프로/잠복 TGFβ1과 비-공유 연결된 LTBP1을 포함한다. 일부 실시양태에서, LTBP1-TGFβ1 복합체는 자연-발생 복합체, 예를 들어 세포에서의 LTBP1-TGFβ1 복합체이다. 예시적인 LTBP1-TGFβ1 복합체가 도 3에 제시된다.

[0099] LTBP3-TGFβ1 복합체: 본원에 사용된 용어 "LTBP3-TGFβ1 복합체"는 프로-단백질 형태 또는 잠복 형태의 형질전환 성장 인자-β1 (TGFβ1) 단백질 및 잠복 TGF-베타 결합 단백질 3 (LTBP3) 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하는 단백질 복합체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, LTBP3-TGFβ1 복합체는 1개 이상의 디술피드 결합을 통해 프로/잠복 TGFβ1과 공유 연결된 LTBP3을 포함한다. 다른 실시양태에서, LTBP3-TGFβ1 복합체는 프로/잠복 TGFβ1과 비-공유 연결된 LTBP1을 포함한다. 일부 실시양태에서, LTBP3-TGFβ1 복합체는 자연-발생 복합체, 예를 들어 세포에서의 LTBP3-TGFβ1 복합체이다. 예시적인 LTBP3-TGFβ1 복합체가 도 3에 제시된다.

[0100] 골수섬유증: "골수섬유증" (골-골수섬유증으로도 알려짐)은 골수증식성 장애로 불리는 질환 군에 속하는 비교적 드문 골수 증식성 장애 (예를 들어, 암)이다. 골수섬유증은 골수증식성 신생물의 필라델피아 염색체-음성 (-) 분지로 분류된다. 골수섬유증은 섬유증을 발생시키는 골수 및 다른 부위에서의 조혈 줄기 세포의 비정상적 클론의 증식, 또는 골수의 반흔 조직으로의 대체를 특징으로 한다. 용어 골수섬유증은 달리 명시되지 않는 한, 원발성 골수섬유증 (PMF)을 지칭한다. 이는 또한 만성 특발성 골수섬유증 (cIMF) (용어 특발성 및 원발성은 이들 경우에 질환의 기원이 알려지지 않거나 또는 동시적이라는 것을 의미함)으로 지칭될 수 있다. 이는 진성 다혈구혈증 또는 본태성 혈소판혈증에 속발성으로 발생하는 골수섬유증과 대조적이다. 골수섬유증은 골수의 혈액-형성 조직에서의 세포 유형의 변화를 지칭하는 골수 화생의 형태이고, 종종 2개의 용어는 동의어로 사용된다. 용어 원인불명 골수 화생 및 골수 화생을 동반한 골수섬유증 (MMM)은 또한 원발성 골수섬유증을 지칭하는 데 사용된다.

[0101] 범-TGFβ 억제제: 용어 "범-TGFβ 억제제"는 TGFβ의 다중 이소형을 억제하거나 그에 길항할 수 있는 임의의 작용제를 지칭한다. 이러한 억제제는 TGFβ 이소형의 소분자 억제제일 수 있다. 용어는 1종 초과의 TGFβ 이소형, 예를 들어, TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3 중 적어도 2종에 결합할 수 있는 임의의 항체를 지칭하는 "범-TGFβ 항체"를 포함한다. 일부 실시양태에서, 범-TGFβ 항체는 모든 3종의 이소형, 즉, TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3에 결합한다. 일부 실시양태에서, 범-TGFβ 항체는 모든 3종의 이소형, 즉, TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3에 결합하고 그를 중화시킨다.

[0102] 제시 분자: 용어 TGFβ의 "제시 분자" 또는 "제시 분자"는 TGFβ의 불활성 형태(들)에 결합/연결하여 세포외 도메인에서 프로-단백질을 "제시"할 수 있는 단백질 물질이다. 지금까지 4종의 TGFβ 제시 분자가 확인되었다: 잠복 TGFβ 결합 단백질-1 (LTBP1) 및 LTBP3은 세포외 매트릭스 (즉, ECM의 성분) 내로 침착되며, 당단백질-A 반복 우세 (GARP/LRRC32) 및 류신-풍부 반복부-함유 단백질 33 (LRRC33)은 막횡단 도메인을 함유하고, 특정 세포, 예컨대 면역 세포의 표면 상에 잠복 TGFβ1을 제시한다. TGFβ1 이소형은 단독으로 정상 및 질환 상태 둘

다에서 다수의 생물학적 과정에 연루되어 있다. 이들은 조직 항상성의 유지, 염증 반응, ECM 재조직화 예컨대 상처 치유, 및 면역 반응의 조절, 뿐만 아니라 기관 섬유증, 암, 및 자가면역을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0103] 프로TGFβ1: 본원에 사용된 용어 "프로TGFβ1"은 복합체 내에 TGFβ1의 프로도메인 서열을 포함하는 불활성 TGFβ1 복합체의 전구체 형태를 포괄하는 것으로 의도된다. 따라서, 용어는 TGFβ1의 전구-, 뿐만 아니라 잠복-형태를 포함할 수 있다. 표현 "프로/잠복 TGFβ1"은 상호교환가능하게 사용될 수 있다. TGFβ1의 "프로" 형태는 푸린 부위에서의 단백질분해적 절단 전에 존재한다. 절단되었을 때, 발생하는 형태가 TGFβ1의 "잠복" 형태라고 한다. "잠복" 복합체는 추가 활성화, 예컨대 인테그린-유발된 활성화 사건이 촉발될 때까지 연관된 채로 유지된다. 도 3에 예시된 바와 같이, 프로TGFβ1 복합체는 디술피드 결합으로 연결된 이량체 TGFβ1 프로-단백질 폴리펩티드로 구성된다. 형용사 "잠복"은 일반적으로, 인테그린-매개 또는 다른 활성화 사건 전의 TGFβ1의 "불활성" 상태를 기재하기 위해 사용될 수 있다는 것에 주목하여야 한다.

[0104] 조절 T 세포: "조절 T 세포" 또는 Treg은 바이오마커 CD4, FOXP3, 및 CD25의 발현을 특징으로 한다. Treg은 때때로 억제 T 세포로 지칭되며, 면역계를 조정하고 자기-항원에 대한 허용을 유지하고 자가면역 질환을 예방하는 T 세포의 하위집단을 나타낸다. Treg은 면역억제성이고, 일반적으로 이펙터 T (Teff) 세포의 유도 및 증식을 억제하거나 하향조절한다. Treg은 흉선에서 발달하거나 (소위 CD4+ Foxp3+ "천연" Treg) 또는 예를 들어 TGFβ 또는 레티노산에 대한 노출 후에 말초에서 나이브 CD4+ T 세포로부터 분화할 수 있다.

[0105] 고형 종양: 용어 "고형 종양"은 통상적으로 낭 또는 액체 영역을 함유하지 않는 비정상적 성장 또는 조직 덩어리를 생성하는 증식성 장애를 지칭한다. 고형 종양은 양성 (비암성) 또는 악성 (암성)일 수 있다. 고형 종양은 암성 (악성) 세포, CAF를 포함한 기질 세포, 및 침윤 백혈구, 예컨대 대식세포 및 림프구로 구성될 수 있다.

[0106] 특이적 결합: 본원에 사용된 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합한다"는 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 항원의 상호작용이 특정한 구조 (예를 들어, 항원 결정기 또는 에피토프)의 존재에 의존한다는 것을 의미한다. 예를 들어, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 일반적인 단백질보다는 특정한 단백질에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 항체가 적어도 약 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M, 또는 그 미만의 표적에 대한 KD를 갖는 경우에, 표적, 예를 들어, TGFβ1에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 사용된 용어 "TGFβ1의 에피토프에 대한 특이적 결합", "TGFβ1의 에피토프에 특이적으로 결합한다", "TGFβ1에 대한 특이적 결합", 또는 "TGFβ1에 특이적으로 결합한다"는 표면 플라즈몬 공명에 의한 결정 시, TGFβ1에 결합하고 1.0 x 10^{-7} M 이하의 해리 상수 (KD)를 갖는 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 지칭한다. 한 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 TGFβ1의 인간 및 비-인간 (예를 들어, 마우스) 오르토로그 둘 다에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0107] 대상체: 치료 용도와 관련하여 용어 "대상체"는 임상 관리 또는 개입, 예컨대 치료, 진단 등을 받는 개체를 지칭한다. 적합한 대상체는 포유동물 (예를 들어, 인간 및 비-인간 포유동물)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 척추동물을 포함한다. 대상체에 인간 대상체인 경우에, 용어 "환자"는 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 임상 상황에서, 용어 "환자 집단" 또는 "환자 하위집단"은 일련의 기준, 예컨대 임상 기준 (예를 들어, 질환 제시, 질환 단계, 특정 상태에 대한 감수성, 요법에 대한 반응성 등), 의료 병력, 건강 상태, 성별, 연령군, 유전적 기준 (예를 들어, 특정 돌연변이의 보유자, 다형성, 유전자 중복, DNA 서열 반복 등) 및 생활방식 요인 (예를 들어, 흡연, 알콜 소비, 운동 등)에 속하는 개체 군을 지칭하는 데 사용된다.

[0108] TGFβ1-연관 장애: "TGFβ1-연관 장애"는 발병기전 및/또는 진행의 적어도 일부가 TGFβ1 신호전달 또는 그의 조절이상에 기인하는 임의의 질환 또는 장애를 의미한다.

[0109] TGFβ 억제제: 용어 "TGFβ 억제제"는 TGFβ 성장 인자 (예를 들어, TGFβ1, TGFβ2 및/또는 TGFβ3)의 생물학적 활성 또는 기능에 길항할 수 있는 임의의 작용제를 지칭한다. 용어는 그의 작용 메카니즘을 제한하려는 의도가 아니며, 예를 들어 TGFβ의 중화 억제제, 수용체 길항제, 가용성 리간드 트랩, 및 활성화 억제제를 포함한다.

[0110] "TGFβ 패밀리"는 TGFβ 슈퍼패밀리 내의 부류이고, 3종의 이소형: TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3을 함유하며, 이는 구조적으로 유사하다.

[0111] 독성: 본원에 사용된 용어 "독성" 또는 "독성들"은 환자에게 투여된 요법과 연관된 환자에서의 원치 않는 생체내 효과, 예컨대 바람직하지 않은 부작용 및 유해 사건을 지칭한다. "내약성"은 독성으로 인한 요법을 중단하

지 않으면서 환자에 의해 합리적으로 허용될 수 있는 요법 또는 치료 요법과 연관된 독성의 수준을 지칭한다.

[0112] 치료하다/치료: 용어 "치료하다" 또는 "치료"는 대상체가 장애 또는 다른 위험 인자를 발생시킬 위험을 감소시키는 치유적 치료, 예방적 치료, 및 적용을 포함한다. 따라서 용어는 광범위하게 신체의 면역을 증진시키거나 부스팅하는 것; 면역 억제를 감소시키거나 역전시키는 것; 신체로부터 해로운 세포 또는 물질을 감소, 제거 또는 근절하는 것; 질환 부담 (예를 들어, 종양 부담)을 감소시키는 것; 재발생 또는 재발을 예방하는 것; 불응기를 연장시키는 것, 및/또는 달리 생존을 개선시키는 것에 의해 환자에서 치료 이익을 유발하는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 용어는 대상체가 장애 또는 다른 위험 인자를 발생시킬 위험을 감소시키는 치유적 치료, 예방적 치료, 및 적용을 포함한다. 치료는 장애의 완전한 치유를 필요로 하지 않으며, 증상 또는 기저 위험 인자를 감소시키는 실시양태를 포괄한다. 조합 요법과 관련하여, 용어는 또한 i) 제1 치료제의 유효 투여량을 감소시켜 부작용을 감소시키고 내약성을 증가시키는 제2 치료제의 능력; ii) 환자가 제1 요법에 보다 반응성이게 하는 제2 요법의 능력; 및/또는 iii) 상가적 또는 상승작용적 임상 이익을 유발하는 능력을 지칭할 수 있다.

[0113] 종양-연관 대식세포: "종양-연관 대식세포 (TAM)"는 종양-촉진 표현형을 갖는 분극화된/활성화된 대식세포이다. TAM은 종양 세포에 동원된 골수-유래 단핵구/대식세포 또는 적혈구-골수성 전구세포로부터 유래된 조직-상주 대식세포일 수 있다. 단핵구/대식세포의 TAM으로의 분화는 국부 화학 신호 예컨대 시토카인, 케모카인, 성장 인자 및 리간드로서 작용하는 다른 분자, 뿐만 아니라 함요 (종양 미세환경)에 존재하는 단핵구/대식세포 사이의 세포-세포 상호작용을 포함한 다수의 인자에 의해 영향을 받는다. 일반적으로, 단핵구/대식세포는 소위 "M1" 또는 "M2" 하위유형으로 분극화되며, 후자는 보다 종양-촉진 표현형과 연관된다. 고형 종양에서, 종양 질량의 최대 50%가 우선적으로 M2-분극화된 대식세포에 상응할 수 있다.

[0114] 종양 미세환경: 용어 "종양 미세환경 (TME)"은 종양 (예를 들어, 고형 종양)이 생체내에서 상주하는 국부 질환 함요를 지칭한다.

[0115] 가변 영역: 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 전형적으로 중쇄에서 대략 아미노-말단 120 내지 130개의 아미노산 및 경쇄에서 약 100 내지 110개의 아미노 말단 아미노산을 포함하는, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄의 부분을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 상이한 항체의 가변 영역은 동일한 종의 항체들 사이에서도 아미노산 서열이 광범위하게 상이하다. 항체의 가변 영역은 전형적으로 그의 표적에 대한 특정한 항체의 특이성을 결정한다.

[0116] 작업 실시예 이외에, 또는 달리 나타내지 않은 경우에, 본원에 사용된 성분의 양 또는 반응 조건을 표시하는 모든 수는 모든 경우에 용어 "약"으로 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 용어 "약"은 백분율과 관련하여 사용되는 경우에 ±1%를 의미할 수 있다.

[0117] 명세서 및 청구범위에서 본원에 사용된 단수 용어는 달리 명백하게 나타내지 않는 한, "적어도 하나"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0118] 명세서 및 청구범위에서 본원에 사용된 어구 "및/또는"은 결합된 요소, 즉, 일부 경우에는 결합하여 존재하고 다른 경우에는 분리되어 존재하는 요소 중 "어느 하나 또는 둘 다"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 다른 요소는 달리 명백하게 나타내지 않는 한, 구체적으로 식별된 이들 요소에 관련되든 관련되지 않든, "및/또는" 절에 의해 구체적으로 식별되는 요소 이외에도 임의로 존재할 수 있다. 따라서, 비제한적 예로서, "포함하는"과 같은 개방형 언어와 함께 사용되는 경우에, "A 및/또는 B"에 대한 언급은, 한 실시양태에서, B가 없는 A (임의로 B 이외의 요소 포함); 또 다른 실시양태에서, A가 없는 B (임의로 A 이외의 요소 포함); 또 다른 실시양태에서, A 및 B 둘 다 (임의로 다른 요소 포함); 등을 지칭할 수 있다.

[0119] 하나 이상의 요소의 목록과 관련하여 명세서 및 청구범위에서 본원에 사용된 어구 "적어도 하나"는 요소의 목록에 있는 요소 중 어느 하나 이상으로부터 선택되는 적어도 하나의 요소를 의미하나, 요소의 목록 내에 구체적으로 열거된 각각의 및 모든 요소 중 적어도 하나를 반드시 포함하는 것은 아니며, 요소의 목록에서 요소의 임의의 조합을 배제하는 것이 아님이 이해되어야 한다. 이러한 정의는 또한 어구 "적어도 하나"가 언급하는 요소의 목록 내에서 구체적으로 식별된 요소 이외의 요소가 이들 구체적으로 식별된 요소와 관련되든 관련되지 않든 임의로 존재할 수 있다는 것을 허용한다. 따라서, 비제한적 예로서, "A 및 B 중 적어도 하나" (또는, 동등하게, "A 또는 B 중 적어도 하나" 또는, 동등하게 "A 및/또는 B 중 적어도 하나")는, 한 실시양태에서, B가 존재하지 않는, 임의로 하나 초과를 포함하는 적어도 하나의 A (및 임의로 B 이외의 요소 포함); 또 다른 실시양태에서, A가 존재하지 않는, 임의로 하나 초과를 포함하는 적어도 하나의 B (및 임의로 A 이외의 요소 포함); 또 다른 실시양태에서, 임의로 하나 초과를 포함하는 적어도 하나의 A, 및 임의로 하나 초과를 포함하는 적어도 하나의 B (및 임의로 다른 요소 포함); 등을 지칭할 수 있다.

[0120] 청구범위에서 "제1", "제2", "제3" 등과 같은 서수 용어를 사용하여 청구항 요소를 수식하는 것은 그 자체에 의해 한 청구항 요소의 또 다른 하나의 청구항 요소에 대한 임의의 우선순위, 우위 또는 순서, 또는 방법을 수행하는 일시적인 순서를 내포하는 것이 아니라, 특정 명칭을 갖는 하나의 청구항 요소를 (서수 용어 사용을 제외하고는) 동일한 명칭을 갖는 또 다른 요소와 구별하여 청구항 요소를 구별하기 위한 라벨로만 사용된 것이다.

[0121] 본원에 제공된 범위는 범위 내의 모든 값에 대한 약칭인 것으로 이해된다. 예를 들어, 1 내지 50의 범위는 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 또는 50으로 이루어진 군으로부터의 임의의 숫자, 숫자의 조합 또는 하위-범위, 예를 들어, 10-20, 1-10, 30-40 등을 포함하는 것으로 이해된다.

[0122] TGFβ1의 이소형-선택적, 콘텍스트-허용성/콘텍스트-비의존성 항체

[0123] 본 발명은 프로/잠복-TGFβ1을 포함하는 하기 복합체: GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및 LRRC33-TGFβ1 복합체 중 2종 이상에 결합하는 항체 및 그의 항원 결합 부분을 제공한다. 따라서, 본 발명의 일부 측면은 이러한 TGFβ1 복합체 내의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이며, 여기서 에피토프는 TGFβ1이 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체로 제시되는 경우에 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 의한 결합에 이용가능하다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 GARP, LTBP1, LTBP3 및/또는 LRRC33과 복합체화된 경우에 TGFβ1에서의 입체형태적 변화로 인해 이용가능하다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 결합하는 TGFβ1의 에피토프는 TGFβ1이 GARP, LTBP1, LTBP3 및/또는 LRRC33과 복합체화되지 않은 경우에 이용가능하지 않다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 TGFβ2에 특이적으로 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 TGFβ3에 특이적으로 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 TGFβ1이 인테그린에 결합하는 것을 막지 않는다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 TGFβ1의 인테그린-결합 부위를 차폐하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 TGFβ1의 활성화를 억제한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체로부터의 성숙 TGFβ1의 방출을 억제한다.

[0124] 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 다중 (즉, 2종 이상의) TGFβ1 복합체의 에피토프에 특이적으로 결합하며, 여기서 에피토프는 TGFβ1이 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP2-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체, LTBP4-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체로 제시되는 경우에 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 의한 결합에 이용가능하다. 일부 실시양태에서, TGFβ1은 자연 발생 포유동물 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, TGFβ1은 자연 발생 인간 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, TGFβ1은 인간, 원숭이, 래트 또는 마우스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 TGFβ2에 특이적으로 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 TGFβ3에 특이적으로 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 TGFβ2 또는 TGFβ3에 특이적으로 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 21에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 TGFβ1에 특이적으로 결합한다. TGFβ2의 아미노산 서열, 및 TGFβ3 아미노산 서열은 각각 서열식별번호: 22 및 23에 제시된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 비-자연-발생 아미노산 서열을 포함하는 TGFβ1 (달리 본원에서 비-자연-발생 TGFβ1로 지칭됨)에 특이적으로 결합한다. 예를 들어, 비-자연-발생 TGFβ1은 자연-발생 TGFβ1 아미노산 서열에 비해 1개 이상의 재조합적으로 생성된 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, TGFβ1, TGFβ2 또는 TGFβ3 아미노산 서열은 표 1에 제시된 바와 같은, 서열식별번호: 24-35에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, TGFβ1, TGFβ2 또는 TGFβ3 아미노산 서열은 표 2에 제시된 바와 같은, 서열식별번호: 36-43에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

[0125] TGF β 1

LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPE
PEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQH
VELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQ
VDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYID
FRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVY
[0126] YVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS (SEQ ID NO: 21)

[0127] TGF β 2

SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAA
CERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRLQN
PKARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDAVHEWLHHKDRNLGFKISL
HCPCCTFVPSNNYIIPNKSEELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLES
QQTNRRKKRALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDT
[0128] QHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS (SEQ ID NO: 22)

[0129] TGF β 3

SLSLSTCTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREE
GCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVP
NPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIH
CPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPGQ
GGQRKKRALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTTH
[0130] STVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS (SEQ ID NO: 23)

[0131] 표 1. 예시적인 TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3 아미노산 서열

단백질	서열	SEQ ID NO
프로TGFβ1	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPE AVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHN EIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKV EQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQ WLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATI HGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNC CVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQY SKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLS NMIVRSCKCS	24
프로TGFβ1 C4S	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPE AVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHN EIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKV EQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQ WLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATI HGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNC CVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQY SKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLS NMIVRSCKCS	25
프로TGFβ1 D2G	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPE AVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHN EIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKV EQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQ WLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATI HGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHGALDTNYCFSSTEKNCC VRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSK VLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNM IVRSCKCS	26
프로TGFβ1 C4S D2G	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPE AVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHN EIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKV EQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQ WLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATI HGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHGALDTNYCFSSTEKNCC VRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSK VLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNM IVRSCKCS	27
프로TGFβ2	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVP PEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMP PFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRL QNPKARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWL SFDVTDAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSE ELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLMLLPSY RLESQQTNRRKKRALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGW KWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASA SPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS	28
프로TGFβ2 C5S	SLSTSSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVP PEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMP PFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRL QNPKARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWL SFDVTDAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSE ELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLMLLPSY RLESQQTNRRKKRALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGW KWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASA	29

[0132]

	SPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS	
프로TGFβ2 C5S D2G	SLSTSSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVP PEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMP PFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRL QNPKARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWL SFDVTDAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSE ELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLMLLPSY RLESQQTNRRKGALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWK WIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASAS PCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS	30
프로TGFβ2 D2G	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVP PEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMP PFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRL QNPKARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWL SFDVTDAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSE ELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLMLLPSY RLESQQTNRRKGALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWK WIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASAS PCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS	31
프로TGFβ3	SLSLSTCTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVP YQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDM IQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLR VPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWL SFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEV MEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLD NPGQGGQRKKRALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWK WVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASA SPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	32
프로TGFβ3 C7S	SLSLSTSTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVP YQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDM IQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLR VPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWL SFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEV MEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLD NPGQGGQRKKRALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWK WVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASA SPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	33
프로TGFβ3 C7S D2G	SLSLSTSTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVP YQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDM IQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLR VPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWL SFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEV MEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLD NPGQGGQRKGALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKW VHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASP CCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	34
프로TGFβ3 D2G	SLSLSTCTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVP YQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDM IQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLR VPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWL SFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEV MEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLD NPGQGGQRKGALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKW VHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASP CCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	35

[0133]

[0134] 표 2. 예시적인 비-인간 아미노산 서열

단백질	종	서열	SEQ ID NO
프로TGFβ1	마우스	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPL PEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMV DRNNAIYEKTKDISHSIYMFFNTSDIREAVPEPPLLSRAELRLQ RLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFD VTGVVRQWLNQGDGIQGFRFSAHCSCDSKDNKLHVEINGIS PKRRGDLGTIHDMNRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHRRALDT NYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCL GPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASASPCCVPQALEPL PIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	36
프로TGFβ1	시노	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPL PEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMV ETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRL LRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSF DVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNTLQVDINGF TTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRAL DTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANF CLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALE PLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	37
TGFβ1 LAP C4S	마우스	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPL PEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMV DRNNAIYEKTKDISHSIYMFFNTSDIREAVPEPPLLSRAELRLQ RLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFD VTGVVRQWLNQGDGIQGFRFSAHCSCDSKDNKLHVEINGIS PKRRGDLGTIHDMNRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHRR	38
TGFβ1 LAP C4S	시노	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPL PEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMV ETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRL LRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSF DVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNTLQVDINGF TTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRR	39
프로TGFβ1 C4S D2G	마우스	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPL PEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMV DRNNAIYEKTKDISHSIYMFFNTSDIREAVPEPPLLSRAELRLQ RLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFD VTGVVRQWLNQGDGIQGFRFSAHCSCDSKDNKLHVEINGIS PKRRGDLGTIHDMNRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHGALDT NYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCL GPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASASPCCVPQALEPL PIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	40
프로TGFβ1 C4S	마우스	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPL PEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMV DRNNAIYEKTKDISHSIYMFFNTSDIREAVPEPPLLSRAELRLQ RLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFD VTGVVRQWLNQGDGIQGFRFSAHCSCDSKDNKLHVEINGIS PKRRGDLGTIHDMNRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHRRALDT NYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCL GPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASASPCCVPQALEPL PIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	41
프로TGFβ1 C4S	시노	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPL PEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMV ETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRL LRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSF DVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNTLQVDINGF TTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRAL	42

[0135]

		DTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANF CLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALE PLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	
프로TGFβ1 C4S D2G	시노	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPL PEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMV ETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRL LRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSF DVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNTLQVDINGF TTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHGALDT NYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCL GPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPL PIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	43
LTBP3	시노	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCRDSC QQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSGFRVVVCPLPCMNGGQCS SRNQCLCPPDFTGRFCQVPAGGAGGGTGGSGPGLSRAGAL STGALPPLAPEGDSVASKHAIYAVQVIADPPGPGEGPPAQHA AFLVPLGPGQISAEVQAPPPVVNVRVHHPPEASVQVHRIESS NAEGAAPSQHLLPHPKPSHPRPPTQKPLGRCFQDTLPKQPC GSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKCHKCPQLQYTGVQK PGPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINECAMPGVCRHGD CLNNPGSYRCVCPPGHSLGPSRTQCIADKPEEKSLCFRLVS PEHQCQHPLTTRLTRQLCCCSVGKAWGARCQRCPADGTAA FKEICPAGKGYHILTSHQTLTIQGESDFSLFLHPDGPPKPQQL PESPSQAPPPEDTEEERGVTTDSPVSEERSVQQSHPTATTS PARPYPELISRPSPPTMRWFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTETD ECRLNQNICGHGECVPGPPDYSCHCNPGYRSHPQHRYCVD VNECEAEPCGPGRGICMNTGGSYNCHCNRGYRLHVGAGGR SCVDLNECAKPHLCGDGGFCINFPGHYKCNCYPGYRLKASR PPVCEDIDECRDPSSCPDGKCENKPGSFKCIACQPGYRSQG GGACRDVNECAEGSPCSPGWCENLPGSFRCTCAQGYAPAP DGRSCVDVDECEAGDVCDNGICTNTPGSFQCQCLSGYHLS RDRSHCEDIDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPQGHRLV GGRKCQDIDECTQDPGLCLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFT PTQDQHGCEEVEQPHHKKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQ ECCCSLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQD NNIVNYGIPAHRDIDECMLFGAEICKEGKCVNTQPGYECYCK QGFYYDGNLLECVDVDECLDESNCRNGVCENTRGGYRCAC TPPAEYSPAQRQCLSPEEMDVDECQDPAACRPGRCVNLPG SYRCECRPPWVPGPSGRDCQLPESPAERAPERRDVCWSQ RGEDGMCAGPQAGPALTFDDCCCRQGRGWGAQCRPCPPR GAGSQCPTSQSESNSFWDTSPLLLGKPRRDEDSSEEDSDE CRCVSGRCVPRPGGAVCECPGGFQLDASRARCVDIDECRE LNQRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCKAGFARSRPHGACVPQ RRR	44
LTBP3	마우스	GPAGERGTGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCRDSC QQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSAFRVVVCPLPCMNGGQCS SRNQCLCPPDFTGRFCQVPAAGTGAGTGSSGPGLARTGAM STGPLPPLAPEGESVASKHAIYAVQVIADPPGPGEGPPAQHA AFLVPLGPGQISAEVQAPPPVVNVRVHHPPEASVQVHRIEGP NAEGPASSQHLLPHPKPPHPRPPTQKPLGRCFQDTLPKQPC GSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKCHKCPQLQYTGVQK PVPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINECAMPGNVCHGD CLNNPGSYRCVCPPGHSLGPLAAQCIADKPEEKSLCFRLVST EHQCQHPLTTRLTRQLCCCSVGKAWGARCQRCPADGTAAF KEICPGKGYHILTSHQTLTIQGESDFSLFLHPDGPPKPQQLPE SPSRAPPLEDTEEERGVTMDPPVSEERSVQQSHPTTTTSPP RPYPELISRPSPPTFHRFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTETDECR LNQNICGHGQCVPGPSDYSCHCNAGYRSHPQHRYCVDVNE CEAEPCGPGKGICMNTGGSYNCHCNRGYRLHVGAGGRSCV DLNECAKPHLCGDGGFCINFPGHYKCNCYPGYRLKASRPPI	45

[0136]

		CEDIDECRDPSTCPDGKCENKPGSFKCIACQPGYRSQGGGA CRDVNECSEGTPCSPGWCENLPGSYRCTCAQYEPAQDGLS CIDVDECEAGKVCQDGICTNTPGSFQCQCLSGYHLSRDRSR CEDIDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPLGHRLVGGRKCK KDIDECSQDPGLCLPHACENLQGSYVCVCDEGFTLTQDQHG CEEVEQPHHKKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCCSLG AGWGDHCEIYPCPVYSSAEFHSLVPDGKRLHSGQQHCELCI PAHRDIDECILFGAEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGN LLECVDVDECLDESNCRNGVCENTRGGYRCACTPPAEYSPA QAQCLIPERWSTPQRDVKCAGASEERTACVWGPWAGPALT FDDCCCRQPRLGTQCRPCPPRGTGSQCPTSQSESNSFWDT SPLLLGKSPRDEDSSEEDSDECRCVSGRCVPRPGGAVCEC PGGFQLDASRARCVDIDECRELNQRGLLCKSERCVNTSGSF RCVCKAGFTRSRPHGPACLSAAADDAAIAHTSVIDHRGYFH	
LTBP1S	시노	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTTLISENGHA ADTLTATNFRVVLCHLPCMNGGQCSSRDKCQCPPNFTGKLC QIPVHGASVPKLYQHSQQPGKALGTHVIHSTHTLPLTVTSQQ GVKVKFPPNIVNIHVKHPPEASVQIHQVSRIDGPTGQKTKEAQ PGQSQVSYQGLPVQKTQTIHSTYSHQQVIPHVYPVAAKTQL GRCFQETIGSQCGKALPGLSKQEDCCGTVGTSWGFNKCQK CPKKPSYHGYNQMMECLPGYKRVNNTFCQDINECQLQGVC PNGECLNTMGSYRCTCKIGFGPDPTFSSCVPDPPVISEEKGP CYRLVSSGRQCMHPLSVHLTKQLCCCSVGKAWGPHCEKCP LPGTAAFKEICPGGMGYTVSGVHRRRPIHHHVGKGPVFVKP KNTQPVAKSTHPPPLPAKEEPVEALTFSREHGPGVAEPEVAT APPEKEIPSLDQEKTKLEPGQPQLSPGISTIHLHPQFPVVIEKT SPPVPVEVAPEASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAGH CINLPVRYTCICYEGYKFSEQQRKCVDIDECTQVQHLCSQGR CENTEGSFLCICPAGFMASEEGTNCIDVDECLRPDVCGEGH CVNTVGAFRCEYCDSGYRMTQRGRCEDIDECLNPSTCPDE QCVNSPGSYQCVPCTEGFRGWNGQCLDVDECLEPNVCTN GDCSNLEGSYMCSCHKGYTRTPDHKHCKDIDECQQGNLCV NGQCKNTEGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECQHHHLC AHGQCRNTEGSFQCVCDQGYRASGLGDHCEDINECLEDKS VCQRGDCINTAGSYDCTCPDGFQLDDNKTCQDINECEHPGL CGPQGECLNTEGSFHCVCQQGFSISADGRTCEDIDECVNNT VCDSHGFCDNTAGSFRCLCYQGFQAPQDGQGCVDVNECEL LSGVCGEAFCENVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCRSRTS TDLDVEQPKEEKKECYYNLNDASLCDNVLAPNVTKQECCCT SGAGWGDNCEIFPCPVLGTAEFTEMCPKGKGFVPAGESSSE AGGENYKDADECLLFGQEICKNGFCLNTRPGYECYCKQGTY YDPVKLQCFDMDECQDPSSCIDGQCVNTEGSYNCFCTHPM VLDASEKRCIRPAESNEQIEETDVYQDLCWEHLSDEYVCSRP LVGKQTTYTECCCLYGEAWGMQCALCPMKDSDDYAQLCNI PVTGRRQPYGRDALVDFSEQYAPEADPYFIQDRFLNSFEEL QAEECGILNGCENGRCVRVQEGYTCDCFDGYHLDTAKMTC VDVNECDELNNRMSLCKNAKCINTEGSYKCLCLPGYVPSDK PNYCTPLNTALNLEKDSDLE	46
LTBP1S	마우스	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGNCQNSCQKGNTTTLISENGH AADTLTATNFRVVICHLPCMNGGQCSSRDKCQCPPNFTGKL CQIPVLGASMPKLYQHAQQQGKALGSHVIHSTHTLPLTMTSQ QGVKVKFPPNIVNIHVKHPPEASVQIHQVSRIDSPGGQKVKE AQPGQSQVSYQGLPVQKTQTVHSTYSHQQLIPHVYPVAAKT QLGRCFQETIGSQCGKALPGLSKQEDCCGTVGTSWGFNKC QKCPKKQSYHGYTQMMECLQGYKRVNNTFCQDINECQLQG VCPNGECLNTMGSYRCSCKMGFGPDPTFSSCVPDPPVISEE KGPCYRLVSPGRHCMHPLSVHLTKQICCCSVGKAWGPHCE KCPLPGTAAFKEICPGGMGYTVSGVHRRRPIHQHIGKEAVYV KPKNTQPVAKSTHPPPLPAKEEPVEALTSSWEHGPRGAEPE VVTAPPEKEIPSLDQEKTRLEPGQPQLSPGVSTIHLHPQFPVV	47

[0137]

		VEKTSPPVPVEVAPEASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDIC GAGHCINLPVRYTCICYEGYKFSEQLRKCVDIDECAQVRHLC SQGRCENTEGSFLCVCPAGFMASEEGTNCIDVDECLRPDMC RDGRCINTAGAFRCEYCDSGYRMSRRGYCEDIDECLKPSTC PEEQCVNTPGSYQCVPCTEGFRGWNGQCLDVDECLQPKVC TNGSCTNLEGSYMCSCHRGYSPTPDHRHCQDIDECQQGNL CMNGQCRNTDGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECEHHH LCSHGQCRNTEGSFQCVCNQGYRASVLGDHCEDINECLED SSVCQGGDCINTAGSYDCTCPDGFQLNDNKGCQDINECAQP GLCGSHGECLNTQGSFHCVCEQGFSISADGRTCEDIDECVN NTVCDSHGFCDNTAGSFRCLCYQGFQAPQDGQGCVDVNEC ELLSGVCGEAFCENVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCRSR VTEDSGVDRQPREEKKECYYNLNDASLCDNVLAPNVTKQEC CCTSGAGWGDNCEIFPCPVQGTAEFTEMCPRGKGLVPAGE SSYDTGGENYKDADECLLFGEEICKNGYCLNTQPGYECYCK QGTYYDPVKLQCFDMDECQDPNSCIDGQCVNTEGSYNCFC THPMVLDASEKRCVQPTESNEQIEETDVYQDLCWEHLSEEY VCSRPLVGKQTTYTECCCLYGEAWGMQCALCPMKDSDDYA QLCNIPVTGRRRPYGRDALVDFSEQYGPETDPYFIQDRFLNS FEELQAEECGILNGCENGRCVRVQEGYTCDCFDGYHLDMAK MTCVDVNECSELNNRMSLCKNAKCINTEGSYKCLCLPGYIPS DKPNYCTPLNSALNLDKESDLE	
GARP	마우스	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQALYLSG NQLQSILVSPLGFYTALRHLDLSDNQISFLQAGVFQALPYLEH LNLAHNRLATGMALNSGGLGRLPLLVSLDLSGNSLHGNLVER LLGETPRLRTLSLAENSLTRLARHTFWGMPAVEQLDLHSNVL MDIEDGAFEALPHLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLQVLDLSCN SIEAFQTAPEPQAQFQLAWLDLRENKLLHFPDLAVFPRLIYLN VSNNLIQLPAGLPRGSEDLHAPSEGWSASPLSNPSRNASTH PLSQLLNLDLSYNEIELVPASFLEHLTSLRFLNLSRNCLRSFEA RQVDSLPCLVLLDLSHNVLEALELGTKVLGSLQTLLLQDNALQ ELPPYTFASLASLQRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFS GIPTLHVLNMAGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVA TGALVGLEASLEVLELQGNGLTVLRVDLPCFLRLKRLNLAEN QLSHLPAWTRAVSLEVLDLRNNSFSLLPGNAMGGLETSLRRL YLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICRFGSQE ELSLSLVRPEDCEKGGLKNVNLILLLSFTLVSAIVLTTLATICFL RRQKLSQQYKA	48
sGARP	마우스	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQALYLSG NQLQSILVSPLGFYTALRHLDLSDNQISFLQAGVFQALPYLEH LNLAHNRLATGMALNSGGLGRLPLLVSLDLSGNSLHGNLVER LLGETPRLRTLSLAENSLTRLARHTFWGMPAVEQLDLHSNVL MDIEDGAFEALPHLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLQVLDLSCN SIEAFQTAPEPQAQFQLAWLDLRENKLLHFPDLAVFPRLIYLN VSNNLIQLPAGLPRGSEDLHAPSEGWSASPLSNPSRNASTH PLSQLLNLDLSYNEIELVPASFLEHLTSLRFLNLSRNCLRSFEA RQVDSLPCLVLLDLSHNVLEALELGTKVLGSLQTLLLQDNALQ ELPPYTFASLASLQRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFS GIPTLHVLNMAGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVA TGALVGLEASLEVLELQGNGLTVLRVDLPCFLRLKRLNLAEN QLSHLPAWTRAVSLEVLDLRNNSFSLLPGNAMGGLETSLRRL YLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICRFGSQE ELSLSLVRPEDCEKGGLKNVN	49

[0138]

[0139] 일부 실시양태에서, 항원 단백질 복합체 (예를 들어, LTBP-TGFβ1 복합체)는 1종 이상의 LTBP 단백질 (예를 들어, LTBP1, LTBP2, LTBP3 및 LTBP4) 또는 그의 단편(들)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 LTBP1-TGFβ1 복합체에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, LTBP1 단백질은 자연-발생 단백질 또는 그의 단편이다. 일부 실시양태에서, LTBP1 단백질은 비-자연 발생 단백질 또는 그의 단편이다. 일부 실시양태에서, LTBP1 단백질은 재조합 단백질이다. 이러한 재조합 LTBP1 단백질은 LTBP1, 대안적으로 그의 스플라이싱된 변이체 및/또는 그의 단편을 포함할 수 있다. 재조합 LTBP1 단백질은 또한 1개 이상의 검출가능한 표지를 포함하도록 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, LTBP1 단백질은 리더 서열 (예를 들어, 천연 또는 비-천연 리더 서열)을 포함한다. 일부 실시양태에서, LTBP1 단백질은 리더 서열을 포함하지 않는다 (즉, 리더 서열이 프로세싱되거나 또는 절단됨). 이러한 검출가능한 표지는 비오틴 표지, 폴리히스티딘 태그, myc 태그, HA 태그 및/또는 형광 태그를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, LTBP1 단백질은 포유동물 LTBP1 단백질이다. 일부 실시양태에서, LTBP1 단백질은 인간, 원숭이, 마우스 또는 래트 LTBP1 단백질이다. 일부 실시양태에서, LTBP1 단백질은 표 2의 서열식별번호: 46 및 47에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, LTBP1 단백질은 표 3의 서열식별번호: 50에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

[0140] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 LTBP3-TGFβ1 복합체에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, LTBP3 단백질은 자연-발생 단백질 또는 그의 단편이다. 일부 실시양태에서, LTBP3 단백질은 비-자연 발생 단백질 또는 그의 단편이다. 일부 실시양태에서, LTBP3 단백질은 재조합 단백질

이다. 이러한 재조합 LTBP3 단백질은 LTBP3, 대안적으로 그의 스플라이싱된 변이체 및/또는 그의 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, LTBP3 단백질은 리더 서열 (예를 들어, 천연 또는 비-천연 리더 서열)을 포함한다. 일부 실시양태에서, LTBP3 단백질은 리더 서열을 포함하지 않는다 (즉, 리더 서열은 프로세싱되거나 또는 절단됨). 재조합 LTBP3 단백질은 또한 1개 이상의 검출가능한 표지를 포함하도록 변형될 수 있다. 이러한 검출가능한 표지는 비오틴 표지, 폴리히스티딘 태그, myc 태그, HA 태그 및/또는 형광 태그를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, LTBP3 단백질은 포유동물 LTBP3 단백질이다. 일부 실시양태에서, LTBP3 단백질은 인간, 원숭이, 마우스 또는 래트 LTBP3 단백질이다. 일부 실시양태에서, LTBP3 단백질은 표 2의 서열식별번호: 44 및 45에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, LTBP1 단백질은 표 3의 서열식별번호: 51에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

[0141] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 GARP-TGFβ1 복합체에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, GARP 단백질은 자연-발생 단백질 또는 그의 단편이다. 일부 실시양태에서, GARP 단백질은 비-자연 발생 단백질 또는 그의 단편이다. 일부 실시양태에서, GARP 단백질은 재조합 단백질이다. 이러한 GARP는 재조합일 수 있으며, 본원에서 재조합 GARP로 지칭된다. 일부 재조합 GARP는 야생형 GARP와 비교하여 1개 이상의 변형, 말단절단 및/또는 돌연변이를 포함할 수 있다. 재조합 GARP는 가용성이도록 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, GARP 단백질은 리더 서열 (예를 들어, 천연 또는 비-천연 리더 서열)을 포함한다. 일부 실시양태에서, GARP 단백질은 리더 서열을 포함하지 않는다 (즉, 리더 서열은 프로세싱되거나 또는 절단됨). 다른 실시양태에서, 재조합 GARP는 1개 이상의 검출가능한 표지를 포함하도록 변형된다. 추가 실시양태에서, 이러한 검출가능한 표지는 비오틴 표지, 폴리히스티딘 태그, flag 태그, myc 태그, HA 태그 및/또는 형광 태그를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, GARP 단백질은 포유동물 GARP 단백질이다. 일부 실시양태에서, GARP 단백질은 인간, 원숭이, 마우스 또는 래트 GARP 단백질이다. 일부 실시양태에서, GARP 단백질은 표 2의 서열식별번호: 48-49에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, GARP 단백질은 표 4의 서열식별번호: 52 및 53에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 TGFβ1에 콘텍스트-의존성 방식으로 결합하지 않으며, 예를 들어 TGFβ1에 대한 결합은 TGFβ1 분자가 특정한 제시 분자, 예컨대 GARP와 복합체화된 경우에만 발생할 것이다. 대신에, 항체 및 그의 항원-결합 부분은 TGFβ1에 콘텍스트-비의존성 방식으로 결합한다. 다시 말해서, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 임의의 제시 분자: GARP, LTBP1, LTBP3 및/또는 LRCC33에 결합된 경우에 TGFβ1에 결합한다.

[0142] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 LRRC33-TGFβ1 복합체에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, LRRC33 단백질은 자연-발생 단백질 또는 그의 단편이다. 일부 실시양태에서, LRRC33 단백질은 비-자연 발생 단백질 또는 그의 단편이다. 일부 실시양태에서, LRRC33 단백질은 재조합 단백질이다. 이러한 LRRC33은 재조합일 수 있으며, 본원에서 재조합 LRRC33으로 지칭된다. 일부 재조합 LRRC33 단백질은 야생형 LRRC33과 비교하여 1개 이상의 변형, 말단절단 및/또는 돌연변이를 포함할 수 있다. 재조합 LRRC33 단백질은 가용성이도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, LRRC33의 엑토도메인은 가용성 LRRC33 단백질 (sLRRC33; 예를 들어, 서열식별번호: 84 참조)을 발현하기 위해 C-말단 His-태그와 함께 발현될 수 있다. 일부 실시양태에서, LRRC33 단백질은 리더 서열 (예를 들어, 천연 또는 비-천연 리더 서열)을 포함한다. 일부 실시양태에서, LRRC33 단백질은 리더 서열을 포함하지 않는다 (즉, 리더 서열은 프로세싱되거나 또는 절단됨). 다른 실시양태에서, 재조합 LRRC33 단백질은 1개 이상의 검출가능한 표지를 포함하도록 변형된다. 추가 실시양태에서, 이러한 검출가능한 표지는 비오틴 표지, 폴리히스티딘 태그, flag 태그, myc 태그, HA 태그 및/또는 형광 태그를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, LRRC33 단백질은 포유동물 LRRC33 단백질이다. 일부 실시양태에서, LRRC33 단백질은 인간, 원숭이, 마우스 또는 래트 LRRC33 단백질이다. 일부 실시양태에서, LRRC33 단백질은 표 4의 서열식별번호: 83, 84 및 101에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

[0143] 표 3. 예시적인 LTBP 아미노산 서열

단백질	서열	SEQ ID NO
LTBP1S	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTTLISENGHA ADTLTATNFRVVICHLPCMNGGQCSSRDKCQCPPNFTGKLCQ IPVHGASVPKLYQHSQQPGKALGTHVIHSTHTLPLTVTSQQGV KVKFPPNIVNIHVKHPPEASVQIHQVSRIDGPTGQKTKEAQPG QSQVSYQGLPVQKTQTIHSTYSHQQVIPHVYPVAAKTQLGRC FQETIGSQCGKALPGLSKQEDCCGTVGTSWGFNKCQKCPKK PSYHGYNQMMECLPGYKRVNNTFCQDINECQLQGVCPNGEC LNTMGSYRCTCKIGFGPDPTFSSCVPDPPVISEEKGPCYRLVS SGRQCMHPLSVHLTKQLCCCSVGKAWGPHCEKCPLPGTAAF KEICPGGMGYTVSGVHRRRPIHHHVGKGPVFVKPKNTQPVAK STHPPPLPAKEEPVEALTFSREHGPGVAEPEVATAPPEKEIPS LDQEKTKLEPGQPQLSPGISTIHLHPQFPVVIEKTSPPVPVEVA PEASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAGHCINLPVRYTC ICYEGYRFSEQQRKCVDIDECTQVQHLCSQGRCENTEGSFLC ICPAGFMASEEGTNCIDVDECLRPDVCGEGHCVNTVGAFRCE YCDSGYRMTQRGRCEDIDECLNPSTCPDEQCVNSPGSYQCV PCTEGFRGWNGQCLDVDECLEPNVCANGDCSNLEGSYMCS CHKGYTRTPDHKHCRDIDECQQGNLCVNGQCKNTEGSFRCT CGQGYQLSAAKDQCEDIDECQHRHLCAHGQCRNTEGSFQCV CDQGYRASGLGDHCEDINECLEDKSVCQRGDCINTAGSYDCT CPDGFQLDDNKTCQDINECEHPGLCGPQGECLNTEGSFHCV CQQGFSISADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCDNTAGSFRCL CYQGFQAPQDGQGCVDVNECELLSGVCGEAFCENVEGSFLC VCADENQEYSPMTGQCRSRTSTDLDVDVDQPKEEKKECYYN LNDASLCDNVLAPNVTKQECCCTSGVGWGDNCEIFPCPVLGT AEFTEMCPKGKGFVPAGESSSEAGGENYKDADECLLFGQEIC KNGFCLNTRPGYECYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPSSC IDGQCVNTEGSYNCFCTHPMVLDASEKRCIRPAESNEQIEETD VYQDLCWEHLSDEYVCSRPLVGKQTTYTECCCLYGEAWGMQ CALCPLKDSDDYAQLCNIPVTGRRQPYGRDALVDFSEQYTPE ADPYFIQDRFLNSFEELQAEECGILNGCENGRCVRVQEGYTC DCFDGYHLDTAKMTCVDVNECDELNNRMSLCKNAKCINTDGS YKCLCLPGYVPSDKPNYCTPLNTALNLEKDSDLE	50
LTBP3	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCRDSC QQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSGFRVVVCPLPCMNGGQCSS RNQCLCPPDFTGRFCQVPAGGAGGGTGGSGPGLSRTGALST GALPPLAPEGDSVASKHAIYAVQVIADPPGPGEGPPAQHAAFL VPLGPGQISAEVQAPPPVVNVRVHHPPEASVQVHRIESSNAE SAAPSQHLLPHPKPSHPRPPTQKPLGRCFQDTLPKQPCGSNP LPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKCHKCPQLQYTGVQKPGPVR GEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINECAMPGVCRHGDCLNNPG SYRCVCPPGHSLGPSRTQCIADKPEEKSLCFRLVSPEHQCQH PLTTRLTRQLCCCSVGKAWGARCQRCPTDGTAAFKEICPAGK GYHILTSHQTLTIQGESDFSLFLHPDGPPKPQQLPESPSQAPP PEDTEEERGVTTDSPVSEERSVQQSHPTATTTPARPYPELISR PSPPTMRWFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTETDECRLNQNICGH GECVPGPPDYSCHCNPGYRSHPQHRYCVDVNECEAEPCGP GRGICMNTGGSYNCHCNRGYRLHVGAGGRSCVDLNECAKP HLCGDGGFCINFPGHYKCNCYPGYRLKASRPPVCEDIDECRD PSSCPDGKCENKPGSFKCIACQPGYRSQGGGACRDVNECAE GSPCSPGWCENLPGSFRCTCAQGYAPAPDGRSCLDVDECEA GDVCDNGICSNTPGSFQCQCLSGYHLSRDRSHCEDIDECDFP	51

[0144]

	AACIGGDCINTNGSYRCLCPQGHRLVGGRKCQDIDECSQDPS LCLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFTPTQDQHGCEEVEQPHHK KECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCCSLGAGWGDHCEIYP CPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDECMLFG SEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLLECVDVDECLDE SNCRNGVCENTRGGYRCACTPPAEYSPAQRQCLSPEEMDVD ECQDPAACRPGRCVNLPGSYRCECRPPWVPGPSGRDCQLP ESPAERAPERRDVCWSQRGEDGMCAGPLAGPALTFDDCCC RQGRGWGAQCRPCPPRGAGSHCPTSQSESNSFWDTSPLLL GKPPRDEDSSEEDSDECRCVSGRCVPRPGGAVCECPGGFQ LDASRARCVDIDECRELNQRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCKA GFARSRPHGACVPQRRR	

[0145]

[0146] 표 4 - 예시적인 GARP 및 LRRC33 아미노산 서열

단백질	서열	SEQ ID NO
GARP	AQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTETLDLSGNQ LRSILASPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALTHLEHLSLAH NRLAMATALSAGGLGPLPRVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPS LHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSNVLMDIEDGAFE GLPRLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQP QAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPTGPP QDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLSQLLNLDLSYNEIE LIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLMLLDLSHN ALETLELGARALGSLRTLLLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLNLQ GNRVSPCGGPDEPGPSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGA FLHTPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVL QVDLPCFICLKRLNLAENRLSHLPAWTQAVSLEVLDLRNNSFSLL PGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVD ATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEKGGLKNINLIIILTFILVSAIL LTTLAACCCVRRQKFNQQYKA	52
sGARP	AQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTETLDLSGNQ LRSILASPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALTHLEHLSLAH NRLAMATALSAGGLGPLPRVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPS LHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSNVLMDIEDGAFE GLPRLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQP QAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPTGPP QDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLSQLLNLDLSYNEIE LIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLMLLDLSHN ALETLELGARALGSLRTLLLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLNLQ GNRVSPCGGPDEPGPSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGA FLHTPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVL QVDLPCFICLKRLNLAENRLSHLPAWTQAVSLEVLDLRNNSFSLL PGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVD ATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEKGGLKNIN	53
LRRC33 (NRROS로도 알려짐; 유니프롯 수탁 번호 Q86YC3)	**MELLPLWLCLGFHFLTVG**WRNRSGTATAASQGVCKLVGGAAD CRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYPLLESL SLHSCHLERISRGAFQEQGHLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHA LPGLRRLDLSGNALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDD SVFEGLERLRELDLQRNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLAFNNLPCI VDFGLTRLRVLNVSYNVLEWFLATGGEAAFELETLDLSHNQLLF FPLLPQYSKLRTLLLRDNNMGFYRDLYNTSSPREMVAQFLLVDG NVTNITTVSLWEEFSSSDLADLRFLDMSQNQFQYLPDGFLRKMP SLSHLNLHQNCLMTLHIREHEPPGALTELDLSHNQLSELHLAPGL ASCLGSLRLFNLSSNQLLGVPPGLFANARNITTLDMSHNQISLCP LPAASDRVGPPSCVDFRNMASLRSLSLEGCGLGALPDCPFQGT SLTYLDLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMGLHSSFM ALDFSGFGNLRDLDLSGNCLTTFPRFGGSLALETLDLRRNSLTA LPQKAVSEQLSRGLRTIYLSQNPYDCCGVDGWGALQHGQTVAD WAMVTCNLSSKIIRVTELPGGVPRDCKWERLDLGLLYLVLILPSC LTLLVACTVIVLTFKKPLLQVIKSRCHWSSVY * 천연 신호 펩티드는 볼드체로 도시됨.	83
가용성 LRRC33 (sLRRC33)	**MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLG**WRNRSGTATAASQGVCKLVG GAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYP LLESLSLHSCHLERISRGAFQEQGHLRSLVLGDNCLSENYEETA AALHALPGLRRLDLSGNALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTI MRLDDSVFEGLERLRELDLQRNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLAF NNLPCIVDFGLTRLRVLNVSYNVLEWFLATGGEAAFELETLDLSH	84

[0147]

	NQLLFFPLLPQYSKLRTLLLRDNNMGFYRDLYNTSSPREMVAQF LLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDLADLRFLDMSQNQFQYLPDGF LRKMPSLSHLNLHQNCLMTLHIREHEPPGALTELDLSHNQLSEL HLAPGLASCLGSLRLFNLSSNQLLGVPPGLFANARNITTLDMSH NQISLCPLPAASDRVGPPSCVDFRNMASLRSLSLEGCGLGALPD CPFQGTSLTYLDLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMG LHSSFMALDFSGFGNLRDLDLSGNCLTTFPRFGGSLALETLDLR RNSLTALPQKAVSEQLSRGLRTIYLSQNPYDCCGVDGWGALQH GQTVADWAMVTCNLSSKIIRVTELPGGVPRDCKWERLDLGLHH HHHH * 변형된 인간 카파 경쇄 신호 펩티드는 볼드체로 도시됨. ** 히스티딘 태그는 밑줄표시됨.	
인간 LRRC33-GARP 키메라	**MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLG**WRNRSGTATAASQGVCKLVG GAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYP LLESLSLHSCHLERISRGAFQEQGHLRSLVLGDNCLSENYEETA AALHALPGLRRLDLSGNALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTI MRLDDSVFEGLERLRELDLQRNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLAF NNLPCIVDFGLTRLRVLNVSYNVLEWFLATGGEAAFELETLDLSH NQLLFFPLLPQYSKLRTLLLRDNNMGFYRDLYNTSSPREMVAQF LLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDLADLRFLDMSQNQFQYLPDGF LRKMPSLSHLNLHQNCLMTLHIREHEPPGALTELDLSHNQLSEL HLAPGLASCLGSLRLFNLSSNQLLGVPPGLFANARNITTLDMSH NQISLCPLPAASDRVGPPSCVDFRNMASLRSLSLEGCGLGALPD CPFQGTSLTYLDLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMG LHSSFMALDFSGFGNLRDLDLSGNCLTTFPRFGGSLALETLDLR RNSLTALPQKAVSEQLSRGLRTIYLSQNPYDCCGVDGWGALQH GQTVADWAMVTCNLSSKIIRVTELPGGVPRDCKWERLDLGL*LIII* *LTFILVSAILLTTLAACCC*VRRQKFNQQYKA * 변형된 인간 카파 경쇄 신호 펩티드는 볼드체로 도시됨. ** LRRC33 엑토도메인은 밑줄표시됨. # GARP 막횡단 도메인은 이탤릭체표시됨. ## GARP 세포내 꼬리는 이중 밑줄표시됨.	101

[0148]

[0149] TGFβ1 길항제

[0150] 본 발명의 방법을 수행하기 위해, TGFβ1의 임의의 적합한 억제제가 사용되며, 단 이러한 작용제는 TGFβ1 이소형에 대한 충분한 선택성을 가지면서 다중 생물학적 효과에 걸쳐 TGFβ1 (예를 들어, 다중 세포 공급원으로부터의 TGFβ1)을 억제하거나 그에 길항한다. 바람직하게는, TGFβ1의 이러한 억제제는 인간 대상체에게 투여되는 경우에 임상 이익 (예를 들어, 치료 효능 및 허용되는 독성 프로파일)을 제공하는 투여량에서 TGFβ2 및 TGFβ3에 대한 측정가능한 억제 활성을 갖지 않는다. 적합한 억제제는 소분자, 핵산-기반 작용제, 생물제제 (예를 들어, 폴리펩티드-기반 작용제 예컨대 항체 및 다른 발견제), 및 그의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 작용제는 하기 추가로 기재된 바와 같이 항체 또는 그의 단편이다. 이들은 TGFβ1 성장 인자에 결합함으로써 그의 작용을 중화시키는 중화 항체를 포함한다.

[0151] TGFβ1을 선택적으로 억제하는 기능적 항체

[0152] 본 발명은 한 측면에서 기능적 항체의 사용을 포함한다. 본원에 사용된 "기능적 항체"는 항원에 결합하는 그의 능력 때문에 1종 이상의 생물학적 활성을 부여한다. 기능적 항체는 따라서 표적 분자 (즉, 항원)의 활성/기능을 조정할 수 있는 것을 포함한다. 이러한 조정 항체는 억제 항체 (또는 억제 항체) 및 활성화 항체를 포함한다. 본 개시내용은 TGFβ1의 다중 콘텍스트와 연관된 TGFβ1 신호전달에 의해 매개되는 생물학적 과정을 억제할 수 있는 TGFβ 항체를 포함한다. 본 발명을 수행하는 데 사용되는 억제제, 예컨대 본원에 기재된 항체는 치료 유효 용량 (허용되는 독성 수준 내에서 충분한 효능이 달성되는 용량)으로 투여되는 경우에 TGFβ1-선택적이며 TGFβ2 및 TGFβ3을 표적화하거나 방해하지 않는 것으로 의도된다.

[0153] 통상적인 TGFβ 길항제의 이소형-특이성의 결여가 TGFβ 억제와 연관된 독성의 공급원의 기저를 이룰 수 있다는 본 개시내용의 출원인에 의한 이전의 인식을 기반으로 하여 (PCT/US2017/021972 참조), 본 발명자들은 이소형-선택적 억제제의 안전성/내약성 측면은 유지하면서, 다면적 TGFβ1 조절이상을 나타내는 다양한 질환을 치료하기 위한 광범위한 TGFβ1 억제를 추가로 달성하는 것을 추구하였다.

[0154] 넓은 의미에서, 용어 "억제 항체"는 표적 기능, 예를 들어, 성장 인자 활성에 길항하거나 그를 중화시키는 항체를 지칭한다. 유리하게는, 본 개시내용의 바람직한 억제 항체는 잠복 복합체로부터의 성숙 성장 인자 방출을 억제함으로써 성장 인자 신호전달을 감소시킬 수 있다. 억제 항체는 이러한 항체와 연관되는 경우에 성장 인자 방출 또는 활성을 감소시키는 임의의 에피토프를 표적화하는 항체를 포함한다. 이러한 에피토프는 TGFβ 단백질 (예를 들어 TGFβ1), 성장 인자, 또는 항체에 의해 결합되는 경우에 성장 인자 활성을 감소시키는 다른 에피

토프의 프로도메인 상에 위치할 수 있다. 본 발명의 억제 항체는 TGFβ1-억제 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 억제 항체는 조합 에피토프, 즉, 항원 또는 항원 복합체의 2종 이상의 성분/부분에 의해 형성된 조합 에피토프 즉, 에피토프에 특이적으로 결합한다. 예를 들어, 조합적 에피토프는 단일 단백질의 다중 부분, 즉, 동일한 단백질의 1개 초과의 비-인접 절편으로부터의 아미노산 잔기로부터의 기여에 의해 형성될 수 있다. 대안적으로, 조합적 에피토프는 항원 복합체의 다중 단백질 성분으로부터의 기여에 의해 형성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 억제 항체는 입체형태적 에피토프 (또는 입체형태-특이적 에피토프), 예를 들어, 항원 또는 항원 복합체의 3차원 구조 (즉, 입체형태)에 감수성인 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0155] TGFβ 신호전달에 길항하기 위한 전통적인 접근법은 i) 이미 활성이 된 후의 성숙 성장 인자를 직접적으로 중화시켜 수용체 결합에 이용가능한 유리 리간드 (예를 들어, 그의 잠복 전구체 복합체로부터 방출된 것)를 고갈시키는 것; ii) 유리 리간드를 격리시킬 수 있는 가용성 수용체 단편 (예를 들어, 소위 리간드 트랩)을 사용하는 것; 또는, iii) 그의 세포-표면 수용체(들)를 표적화하여 리간드-수용체 상호작용을 차단하는 것이었다. 이들 통상적인 접근법 각각은 길항제가 내인성 대응물과 경쟁할 것을 필요로 한다. 더욱이, 상기 처음 2개의 접근법 (i 및 ii)은 일시적 종인 활성 리간드를 표적화한다. 따라서, 이러한 길항제는 단기의 일시적 범위 동안 내인성 수용체를 동역학적으로 능가할 수 있어야 한다. 세번째 접근법은 비교적 더 지속적인 효과를 제공할 수 있으나, 많은 성장 인자 (예를 들어, 최대 ~20종)가 동일한 수용체(들)를 통해 신호전달하기 때문에 원치 않는 억제 효과 (그에 따른 가능한 독성)를 의도치않게 발생시킨다.

[0156] 이들 결점에 대한 해결책을 제공하기 위해, 및 추가로 더 큰 선택성 및 국재화된 작용을 가능하게 하기 위해, 억제 항체 예컨대 본원에 기재된 것을 따라가는 바람직한 작용 메카니즘이 TGFβ1 활성화 및 리간드-수용체 상호작용의 상류에서 작용한다. 따라서, 본 발명을 수행하기에 적합한 TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제는 바람직하게는 그의 공급원에서의 (예컨대 질환 미세환경에서의) 활성화 단계를 차단하기 위해, 그의 활성화 전의 불활성 (예를 들어, 잠복) 전구체 TGFβ1 복합체 (예를 들어, 프로/잠복 TGFβ1을 포함하는 복합체)를 표적화해야 한다. 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 이러한 억제제는 수용체 결합에 일시적으로 이용가능한 유리 리간드보다는 ECM-연관 및/또는 세포 표면-테더링된 프로/잠복 TGFβ1 복합체를 표적화한다.

[0157] 따라서, 본 발명의 일부 실시양태는 TGFβ1-함유 복합체에 특이적으로 결합함으로써 이소형-선택적 방식으로 TGFβ1의 기능을 억제하는 작용제를 사용한다. 이러한 작용제는 바람직하게는 프로/잠복 TGFβ1 (예를 들어, 불활성 TGFβ1 전구체)을 포함하는 단백질 복합체 내의 에피토프에 결합하는 항체이다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 TGFβ1이 하기: GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체, 및 LRRC33-TGFβ1 복합체 중 2종 이상에 존재하는 항체에 의한 결합에 이용가능하다. 일부 실시양태에서는, 이러한 항체는 상기 제공된 TGFβ1-함유 복합체 중 2종 이상에 결합하며 (예를 들어, "콘텍스트-허용성"), 다른 실시양태에서는, 이러한 항체는 상기 제공된 TGFβ1-함유 복합체 4종 모두에 결합한다 (예를 들어, "콘텍스트-비의존성"). 일부 실시양태에서, 이러한 항체 중 임의의 것은 차등 종 선택성을 나타낼 수 있다. 에피토프는 TGFβ1 복합체의 프로도메인 내에 있을 수 있다. 에피토프는 조합 에피토프일 수 있으며, 이 경우 에피토프는 복합체의 1종 이상의 성분(들)의 2개 이상의 부분/절편 (예를 들어, 아미노산 잔기)에 의해 형성된다. 에피토프는 입체형태적 에피토프일 수 있으며, 이 경우 에피토프는 항원 (예를 들어, TGFβ1 복합체)의 특정한 3차원 구조에 감수성이다. 입체형태적 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편은 입체형태적 항체 또는 입체형태-특이적 항체로 지칭된다.

[0158] 본 개시내용의 실시양태는 환자에게 임상 이익을 부여할 목적을 포함하여, 성장 인자 신호전달을 변형시키기 위해 용액에서, 세포 배양물에서 및/또는 대상체에서 억제 항체를 사용하는 방법을 포함한다.

[0159] 예시적인 항체 및 본 발명을 수행하는 데 유용한 항체를 코딩하는 상응하는 핵산 서열은 표 5에 제시된 CDR 아미노산 서열 중 1종 이상을 포함한다.

[0160] 표 5. 카바트 넘버링 스킴을 사용하여 결정된 중쇄 (CDRH) 및 경쇄 (CDRL)의 상보성 결정 영역이 항체 Ab1, Ab2 및 Ab3에 대해 제시된다

항체	Ab1	Ab2	Ab3
CDRH1	SYGMH (SEQ ID NO: 1)	SDWIG (SEQ ID NO: 2)	NYAMS (SEQ ID NO: 85)
CDRH2	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 3)	VIYPGDSDTRYSASFQG (SEQ ID NO: 4)	SISGSGGATYYADSVKG (SEQ ID NO: 86)
CDRH3	DIRPYGDYSAAFDI (SEQ ID NO: 5)	AAGIAAAGHVTAFDI (SEQ ID NO: 6)	ARVSSGHWDFDY (SEQ ID NO: 87)
CDRL1	TGSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO: 7)	KSSQSVLYSSNNKNYLA (SEQ ID NO: 8)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 88)
CDRL2	EDNQRPS (SEQ ID NO: 9)	WASTRES (SEQ ID NO: 10)	SSLQS (SEQ ID NO: 89)
CDRL3	QSYDSSNHGGV (SEQ ID NO: 11)	QQYYSTPVT (SEQ ID NO: 12)	QQSYSAPFT (SEQ ID NO: 90)

[0161]

[0162] 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체는 표 5에 제시된 항체 중 어느 하나에 대해 제공된 바와 같은 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 또는 CDRL3, 또는 그의 조합을 포함하는 임의의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체는 표 5에 제시된 항체 중 어느 하나의 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3을 포함한다. 본 발명은 또한 표 5에 제시된 항체 중 어느 하나에 대해 제공된 바와 같은 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 또는 CDRL3을 포함하는 분자를 코딩하는 임의의 핵산 서열을 제공한다. 항체 중쇄 및 경쇄 CDR3 도메인은 항원에 대한 항체의 결합 특이성/친화도에서 특히 중요한 역할을 할 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 이들 항체를 코딩하는 핵산 분자, 또는 그의 항원 결합 부분은 표 5에 제시된 바와 같은 항체의 적어도 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3을 포함할 수 있다.

[0163] 본 발명의 측면은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하고, 6개의 상보성 결정 영역 (CDR): CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3을 포함하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다.

[0164] 일부 실시양태에서, CDRH1은 서열식별번호: 1, 2 및 85 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CDRH2는 서열식별번호: 3, 4 및 86 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CDRH3은 서열식별번호: 5, 6 및 87 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다. CDRL1은 서열식별번호: 7, 8 및 88 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CDRL2는 서열식별번호: 9, 10 및 89 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CDRL3은 서열식별번호: 11, 12 및 90 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0165] 일부 실시양태에서 (예를 들어, 표 5에 제시된 항체 Ab1에 관해), GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 하기를 포함한다: 서열식별번호: 1에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRH1, 서열식별번호: 3에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2, 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3, 서열식별번호: 7에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1, 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2, 및 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3.

[0166] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역 3 (CDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역 2 (CDR2)를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 CDR2를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역 1 (CDR1)을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 CDR1을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0167] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 13에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%,

75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 14에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 14에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0168] 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 91에 제시된 핵산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열식별번호: 92에 제시된 핵산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 91에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열, 및 서열식별번호: 92에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함한다.

[0169] 일부 실시양태에서 (예를 들어, 표 5에 제시된 항체 Ab2에 관해), GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 2에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRH1, 서열식별번호: 3에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2, 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3, 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1, 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2, 및 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3을 포함한다.

[0170] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR2를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 CDR2를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR1을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 CDR1을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0171] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 15에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 16에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 16에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0172] 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 93에 제시된 핵산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열, 및 서열식별번호: 94에 제시된 핵산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 93에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열, 및 서열식별번호: 94에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함한다.

[0173] 일부 실시양태에서 (예를 들어, 표 5에 제시된 항체 Ab3에 관해), GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 85에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRH1, 서열식별번호: 86에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2, 서열식별번호: 87에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3, 서열식별번호: 88에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1, 서열식별번호: 89에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2, 및 서열식별번호: 90에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3을 포함한다.

[0174] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 87의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함

하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 90의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 86의 아미노산 서열을 갖는 CDR2를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 89의 아미노산 서열을 갖는 CDR2를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 85의 아미노산 서열을 갖는 CDR1을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 88의 아미노산 서열을 갖는 CDR1을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0175] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 95에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 97에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 95에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 97에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0176] 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 96에 제시된 핵산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열식별번호: 98에 제시된 핵산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 96에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열, 및 서열식별번호: 98에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함한다.

[0177] 일부 예에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 본 개시내용의 항체 중 임의의 것은 실질적으로 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및/또는 CDRL3과 유사한 1개 이상의 CDR (예를 들어, CDRH 또는 CDRL) 서열을 갖는 임의의 항체 (그의 항원 결합 부분 포함)를 포함한다. 예를 들어, 항체는 서열식별번호: 1-12 및 85-90 중 어느 하나의 상응하는 CDR 영역과 비교하여 최대 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 잔기 변동을 함유하는, 표 5에 제시된 바와 같은 1개 이상의 CDR 서열 (서열식별번호: 1-12 및 85-90)을 포함할 수 있다. 표 5에 열거된 항체 (예를 들어, Ab1, Ab2 및 Ab3)의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역에 대한 완전한 아미노산 서열, 뿐만 아니라 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산 서열이 하기에 제공된다.

[0178] Ab1 - 중쇄 가변 영역 아미노산 서열

[0179] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIRPYGDYSAAFDIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 13)

[0180] Ab1 - 중쇄 가변 영역 핵산 서열

[0181] GAGGTGCAACTCGTGGAGTCAGGCGGTGGACTTGTTCAGCCTGGGCGAAGTCTGAGACTCTCA TGTGCAGCAAGTGGATTCACTTTCTCCAGTTACGGCATGCACTGGGTGAGACAGGCGCCTGGAA AGGGTTTGGAATGGGTCGCTGTGATCTCTTACGACGGGTCAAACAAATATTACGCGGATTCAGT GAAAGGGCGGTTCACTATTTCACGGGATAACTCCAAGAACACCCTGTATCTGCAGATGAATAGCC TGAGGGCAGAGGACACCGCTGTGTACTATTGTGCCCGGGACATAAGGCCTTACGGCGATTACAG CGCCGCATTTGATATTTGGGGACAAGGCACCCTTGTGACAGTATCTTCT (SEQ ID NO: 91)

[0182] Ab1 - 경쇄 가변 영역 아미노산 서열

[0183] NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPSIVIFEDNQRPSGAPDRFSGSI DSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNHGGVFGGGTQLTVL (SEQ ID NO: 14)

[0184] Ab1 - 경쇄 가변 영역 핵산 서열

[0185] AATTTTATGCTTACCCAACCACATAGTGTGAGTGAGTCTCCCGGCAAGACTGTAACAATTTCATGT
ACCGGCAGCAGTGGCTCCATCGCTAGCAATTATGTGCAATGGTACCAACAGCGCCCCGGGAGC
GCACCTTCAATAGTGATATTCGAGGATAACCAACGGCCTAGTGGGGCTCCCGATAGATTTAGTG
GGAGTATAGATAGCTCCTCCAACTCTGCCTCTCTCACCATTAGCGGGCTGAAAACAGAGGATGA
AGCCGACTATTACTGCCAAAGCTATGATTCTAGCAACCACGGCGGAGTGTTTGGCGGAGGAACA
CAGCTGACAGTCCTAGG (SEQ ID NO: 92)

[0186] Ab1 - 중쇄 아미노산 서열

[0187] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVK
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIRPYGDYSAAFDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVF
PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 15)

[0188] Ab1 - 경쇄 아미노산 서열

[0189] NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPSIVIFEDNQRPSGAPDRFSGSI
DSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNHGGVFGGGTQLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQAN
KATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV
THEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 16)

[0190] Ab2 - 중쇄 가변 영역 아미노산 서열

[0191] EVQLVQSGAEMKKPGESLKISCKGSGYNFASDWIGWVRQTPGKGLEWMGVIYPGDSDTRYSASFQ
GQVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAMYYCASAAGIAAAGHVTAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID
NO: 17)

[0192] Ab2 - 중쇄 가변 영역 핵산 서열

[0193] GAGGTGCAACTGGTGCAATCCGGAGCCGAGATGAAAAAGCCAGGGGAGAGCCTGAAGATCTCT
TGTAAGGGCTCTGGCTATAACTTCGCTAGTGATTGGATCGGATGGGTGAGGCAAACCCCCGGAA
AGGGCCTCGAGTGGATGGGCGTGATCTACCCCGGCGACTCCGACACACGCTATAGCGCCTCAT
TCCAGGGCCAGGTCACCATAAGTGCTGATAAATCAATAAATACAGCCTACTTGCAATGGTCAAGT
CTGAAAGCCTCAGATACTGCCATGTACTATTGTGCCTCTGCCGCCGGCATTGCCGCGGCCGGTC
ACGTCACCGCCTTCGACATTTGGGGTCAGGGCACTATGGTCACTGTAAGCTCC (SEQ ID NO: 93)

[0194] Ab2 - 경쇄 가변 영역 아미노산 서열

[0195] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDR
FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPVTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)

[0196] Ab2 - 경쇄 가변 영역 핵산 서열

[0197] GACATAGTCATGACCCAGTCACCTGACTCTTTGGCCGTGTCTCTGGGGGAGAGAGCCACAATAA
ATTGCAAGTCATCACAGAGCGTCCTGTACTCCTCCAATAATAAAAATTACCTGGCCTGGTACCAG
CAAAAGCCCGGGCAACCCCCCAAATTGTTGATTTACTGGGCTAGTACAAGGGAATCTGGAGTGC
CAGACCGGTTTTCTGGTTCTGGATCTGGTACTGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGC
CGAAGACGTGGCTGTGTACTATTGTCAGCAGTACTATAGTACACCAGTTACTTTCGGCCAAGGCA
CTAAACTCGAAATCAAG (SEQ ID NO: 94)

[0198] Ab2 - 중쇄 아미노산 서열

EVQLVQSGAEMKKPGESLKISCKGSGYNFASDWIGWVRQTPGKGLEWMGVIYPGDSDTRYSASFQ
GQVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAMYYCASAAGIAAAGHVTAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSV
FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 19)

[0199]

[0200] Ab2 - 경쇄 아미노산 서열

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDR
FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPVTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 20)

[0201]

[0202] Ab3 - 중쇄 가변 영역 아미노산 서열

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGATYYADSVK
[0203] GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSSGHWDFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 95)

[0204] Ab3 - 중쇄 가변 영역 핵산 서열

GAGGTTCAGCTTCTGGAGAGCGGCGGTGGTCTTGTACAACCTGGAGGATCACTCAGGTTGTCAT
GTGCCGCAAGCGGGTTTACATTCAGGAACTATGCAATGAGCTGGGTCAGACAGGCTCCCGGCAA
GGGACTTGAGTGGGTATCTTCCATCAGCGGATCTGGAGGAGCAACATATTATGCAGATAGTGTC
AAAGGCAGGTTCACAATAAGCCGCGACAATTCTAAAAATACTCTTTATCTTCAAATGAATAGCCTT
AGGGCTGAGGATACGGCGGTGTATTATTGTGCCCGCGTCTCAAGCGGGCATTGGGACTTCGATT
[0205] ATTGGGGGCAGGGTACTCTGGTTACTGTTTCCTCC (SEQ ID NO: 96)

[0206] Ab3 - 경쇄 가변 영역 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS
[0207] GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSAPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 97)

[0208] Ab3 - 경쇄 가변 영역 핵산 서열

GACATCCAAATGACACAGAGCCCGTCTTCCCTCTCAGCTTCAGTCGGTGATCGAGTGACGATTA
CGTGCCGCGCCAGCCAAAGCATCTCCTCCTATCTTAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGAAAGGC
CCCAAAGTTGCTTATTTACGACGCATCCTCCCTTCAATCTGGTGTGCCCAGCAGGTTCTCAGGCA
GCGGTTCAGGAACGGATTTTACTCTTACCATTTCTAGTCTTCAACCTGAGGATTTTGCGACGTATT
ACTGTCAACAGAGCTACAGTGCGCCGTTCACCTTTGGGCAGGGTACTAAGGTTGAGATAAAGC
[0209] (SEQ ID NO: 98)

[0210] Ab3 - 중쇄 아미노산 서열

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGATYYADSVK
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSSGHWDFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK
TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 99)

[0211]

[0212] Ab3 - 경쇄 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSAPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
[0213] SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 100)

[0214] 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 본 개시내용의 항체는 서열식별번호: 13, 17 또는 95의 중쇄 가변 도메인, 또는 서열식별번호: 14, 18 또는 97의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 임의의 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 본 개시내용의 항체는 서열식별번호: 13 및 14; 17 및 18; 및 95 및 97의 중쇄 가변 쌍 및 경쇄 가변 쌍을 포함하는 임의의 항체를 포함한다.

[0215] 본 개시내용의 측면은 본원에 기재된 것들 중 임의의 것에 대해 상동인 중쇄 가변 및/또는 경쇄 가변 아미노산 서열을 갖는 하기 복합체: GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및 LRRC33-TGFβ1 복합체 중 2종 이상에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체는 서열식별번호: 13, 17 또는 95의 중쇄 가변 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 14, 18 또는 97의 경쇄 가변 서열과 적어도 75% (예를 들어, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 중쇄 가변 서열 또는 경쇄 가변 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상동 중쇄 가변 및/또는 경쇄 가변 아미노산 서열은 본원에 제공된 CDR 서열 중 임의의 것 내에서 달라지지 않는다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 서열 변동의 정도 (예를 들어, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)는 본원에 제공된 CDR 서열 중 임의의 것을 배제한 중쇄 가변 및/또는 경쇄 가변 아미노산 서열 내에서 발생할 수 있다.

[0216] 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및 LRRC33-TGFβ1 복합체 중 2종 이상에 특이적으로 결합하는 본 개시내용의 항체는 서열식별번호: 15 또는 19의 중쇄, 또는 서열식별번호: 16 또는 20의 경쇄를 포함하는 임의의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 본 개시내용의 항체는 서열식별번호: 15 및 16; 또는 19 및 20의 중쇄 및 경쇄 쌍을 포함하는 임의의 항체를 포함한다.

[0217] 본 개시내용의 측면은 본원에 기재된 것들 중 임의의 것에 대해 상동인 중쇄 및/또는 경쇄 아미노산 서열을 갖는 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및 LRRC33-TGFβ1 복합체 중 2종 이상에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체는 서열식별번호: 15 또는 19의 중쇄 서열, 또는 서열식별번호: 16 또는 20의 경쇄 아미노산 서열과 적어도 75% (예를 들어, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 중쇄 서열 또는 경쇄 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상동 중쇄 및/또는 경쇄 아미노산 서열은 본원에 제공된 CDR 서열 중 임의의 것 내에서 달라지지 않는다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 서열 변동의 정도 (예를 들어, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)는 본원에 제공된 CDR 서열 중 임의의 것을 배제한 중쇄 및/또는 경쇄 아미노산 서열 내에서 발생할 수 있다.

[0218] 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체 중 2종 이상에 특이적으로 결합하는 본 개시내용의 항체는 서열식별번호: 15 또는 19의 중쇄, 또는 서열식별번호: 16 또는 20의 경쇄를 포함하는 임의의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 본 개시내용의 항체는 서열식별번호: 15 및 16; 또는 19 및 20의 중쇄 및 경쇄 쌍을 포함하는 임의의 항체를 포함한다.

[0219] 본 개시내용의 측면은 본원에 기재된 것들 중 임의의 것에 대해 상동인 중쇄 및/또는 경쇄 아미노산 서열을 갖는 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체 중 2종 이

상에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체는 서열식별번호: 15 또는 19의 중쇄 서열, 또는 서열식별번호: 16 또는 20의 경쇄 아미노산 서열과 적어도 75% (예를 들어, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 중쇄 서열 또는 경쇄 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상동 중쇄 및/또는 경쇄 아미노산 서열은 본원에 제공된 CDR 서열 중 임의의 것 내에서 달라지지 않는다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 서열 변동의 정도 (예를 들어, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)는 본원에 제공된 CDR 서열 중 임의의 것을 배제한 중쇄 및/또는 경쇄 아미노산 서열 내에서 발생할 수 있다.

[0220] 일부 실시양태에서, 2개의 아미노산 서열의 "퍼센트 동일성"은 문헌 [Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993]에서와 같이 변형된 문헌 [Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990]의 알고리즘을 사용하여 결정된다. 이러한 알고리즘은 문헌 [Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 (버전 2.0) 내로 혼입된다. XBLAST 프로그램, 스코어=50, 워드 길이=3으로 BLAST 단백질 검색을 수행하여, 관심 단백질 분자에 대해 상동인 아미노산 서열을 수득할 수 있다. 2개의 서열 사이에 갭이 존재하는 경우에, 갭드(Gapped) BLAST가 문헌 [Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997]에 기재된 바와 같이 이용될 수 있다. BLAST 및 갭드 BLAST 프로그램을 이용하는 경우에, 각각의 프로그램 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다.

[0221] 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편 중 임의의 것에서, 1개 이상의 보존적 돌연변이는 잔기가 항체-항원 상호작용에 수반될 가능성이 없는 위치에서 CDR 또는 프레임워크 서열 내로 도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 보존적 돌연변이(들)는 잔기가 결정 구조에 기초하여 결정된 바와 같은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및 LRRC33-TGFβ1 복합체와 상호작용하는 데 수반될 가능성이 없는 위치(들)에서 CDR 또는 프레임워크 서열 내로 도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 가능성 있는 인터페이스 (예를 들어, 항원-항체 상호작용에 수반되는 잔기)는 구조적 유사성을 공유하는 또 다른 항원에 대한 알려진 구조적 정보로부터 추론될 수 있다.

[0222] 본원에 사용된 "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 치환이 이루어지는 단백질의 상대적 전하 또는 크기 특징을 변경시키지 않는 아미노산 치환을 지칭한다. 변이체는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 폴리펩티드 서열을 변경시키는 방법에 따라 제조될 수 있으며, 예컨대 이러한 방법을 컴파일링하는 참조문헌, 예를 들어, 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, 또는 Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York]에서 발견된다. 아미노산의 보존적 치환은 하기 군 내의 아미노산 중에서 이루어진 치환을 포함한다: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; 및 (g) E, D.

[0223] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 바람직한 특성을 항체에 부여하는 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 천연 IgG4 mAb와 함께 발생하는 것으로 알려져 있는 Fab-아암 교환으로 인한 잠재적 합병증을 피하기 위해, 본원에 제공된 항체는 세린 228 (EU 넘버링; 카바트 넘버링에서의 잔기 241)이 프롤린으로 전환되어 IgG1-유사 (CPPCP (서열식별번호: 54)) 힌지 서열을 생성하는 안정화 'Adair' 돌연변이를 포함할 수 있다 (Angal et al., "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody," Mol Immunol 30, 105-108; 1993). 따라서, 항체 중 임의의 것은 안정화 'Adair' 돌연변이 또는 아미노산 서열 CPPCP (서열식별번호: 54)를 포함할 수 있다.

[0224] 본 개시내용의 TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제 (콘텍스트-비의존성 억제제를 포괄함), 예를 들어, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및 LRRC33-TGFβ1 복합체 중 2종 이상에 특이적으로 결합하는 항체는 항체 불변 영역 또는 그의 부분을 임의로 포함할 수 있다. 예를 들어, VL 도메인은 그의 C-말단 끝부분에서 경쇄 불변 도메인 예컨대 Cκ 또는 Cλ에 부착될 수 있다. 유사하게, VH 도메인 또는 그의 부분은 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM, 및 임의의 이소형 하위부류와 같은 중쇄의 전체 또는 부분에 부착될 수 있다. 항체는 적합한 불변 영역을 포함할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md. (1991)] 참조). 따라서, 본 개시내용의 범주 내의 항체는 임의의 적합한 불변 영역과 조합된 VH 및 VL 도메인 또는 그의 항원 결합 부분을 포함할 수 있다.

[0225] 추가적으로 또는 대안적으로, 이러한 항체는 서열식별번호: 13-20의 항체의 프레임워크 영역을 포함할 수 있거나 또는 포함하지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체는 뮤린 항체이고, 뮤린 프레임워크 영역 서열을 포함한다.

[0226] 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 비교적 높은 친화도로, 예를 들어, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M 이하 미만의 KD로 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체, 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 결합할 수 있다. 예를 들어, 이러한 항체는 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체, 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 5 pM 내지 500 nM, 예를 들어, 50 pM 내지 100 nM, 예를 들어, 500 pM 내지 50 nM의 친화도로 결합할 수 있다. 본 개시내용은 또한 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 대한 결합에 대해 본원에 기재된 항체 중 임의의 것과 경쟁하고 50 nM 이하 (예를 들어, 20 nM 이하, 10 nM 이하, 500 pM 이하, 50 pM 이하 또는 5 pM 이하)의 친화도를 갖는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함한다. GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체의 친화도 및 결합 동역학은 바이오센서 기술 (예를 들어, 옥테트 또는 비아코어)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 적합한 방법을 사용하여 시험될 수 있다.

[0227] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 세포-연관 TGFβ1 (예를 들어, GARP-제시된 TGFβ1 및 LRRC33-제시된 TGFβ1) 억제제는 이러한 복합체 (예를 들어, GARP-프로/잠복 TGFβ1 및 LRRC33-프로/잠복 TGFβ1)에 특이적으로 결합하고 복합체의 내재화를 촉발하는 항체 또는 그의 단편을 포함한다. 이러한 작용 방식은 세포 표면 (예를 들어, Treg, 대식세포 등)으로부터의 불활성 TGFβ1 복합체의 제거 또는 고갈을 유발하여, 활성화에 이용가능한 TGFβ1을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체 또는 그의 단편은 pH-의존성 방식으로 표적 복합체에 결합하므로 중성 또는 생리학적 pH에서 결합이 발생하며, 산성 pH에서 항체가 그의 항원으로부터 해리된다. 이러한 항체 또는 그의 단편은 재순환 항체로서 기능할 수 있다.

[0228] 폴리펩티드

[0229] 본 개시내용의 일부 측면은 서열식별번호: 13, 서열식별번호: 17, 서열식별번호: 95, 서열식별번호: 15 및 서열식별번호: 19로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 폴리펩티드에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 도메인이다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열식별번호: 13, 서열식별번호: 17, 서열식별번호: 95, 서열식별번호: 15 및 서열식별번호: 19에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나와 적어도 75% (예를 들어, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일하다.

[0230] 본 개시내용의 일부 측면은 서열식별번호: 14, 서열식별번호: 18, 서열식별번호: 97, 서열식별번호: 16 및 서열식별번호: 20으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 폴리펩티드에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 도메인이다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열식별번호: 14, 서열식별번호: 18, 서열식별번호: 97, 서열식별번호: 16 및 서열식별번호: 20에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나와 적어도 75% (예를 들어, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일하다.

[0231] TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제 항체와 경쟁하는 항체

[0232] 본 개시내용의 측면은 본원에 제공된 항체 중 임의의 것과 경쟁 또는 교차-경쟁하는 항체에 관한 것이다. 항체와 관련하여 본원에 사용된 용어 "경쟁하다"는 제1 항체와 그의 에피토프의 결합의 결과가 제2 항체의 부재 하의 제1 항체의 결합과 비교하여 제2 항체의 존재 하에 검출가능하게 감소되도록, 제1 항체가 에피토프 (예를 들어, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체의 에피토프)에 제2 항체의 결합과 충분히 유사한 방식으로 결합하는 것을 의미한다. 제2 항체의 그의 에피토프에 대한 결합이 또한 제1 항체의 존재 하에 검출가능하게 감소되는 대안이 가능하지만, 그러할 필요는 없다. 즉, 제1 항체의 그의 각각의 에피토프에 대한 결합을 제2 항체가 억제하지 않으면서 제2 항체의 그의 에피토프에 대한 결합을 제1 항체가 억제할 수 있다. 그러나, 각각의 항체가 다른 항체의 그의 에피토프 또는 리간드와의 결합을 동일하거나, 더 크거나 또는 더 적은 정도로 검출가능하게 억제하는 경우에, 항체가 이들 각각의 에피토프(들)의 결합에 대해 서로 "교차-경쟁한다"고 한다. 경쟁 및 교차-경쟁 항체 둘 다는 본 개시내용의 범주 내에 있다. 이러한 경쟁 또는 교차-경쟁이 발생하는 메카니즘 (예를 들어, 입체 장애, 형상 변화, 또는 공통 에피토

프 또는 그의 부분에 대한 결합)과 관계없이, 통상의 기술자는 이러한 경쟁 및/또는 교차-경쟁 항체가 본원에 제공된 방법 및/또는 조성물을 위해 포괄되고, 이에 유용할 수 있음을 인지할 것이다.

[0233] 본 개시내용의 측면은 본원에 제공된 바와 같은 특정한 항체 또는 그의 항원 결합 부분 중 임의의 것과 경쟁 또는 교차-경쟁하는 항체에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 본원에 제공된 항체 중 임의의 것과 동일한 에피토프에서 또는 그 근처에서 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 그것이 에피토프의 15개 이하 아미노산 잔기 내에서 결합하는 경우에 에피토프 근처에서 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 바와 같은 항체 또는 그의 항원 결합 부분 중 임의의 것은 본원에 제공된 항체 중 임의의 것에 의해 결합된 에피토프의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 잔기 내에서 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항체와 단백질 사이에서 10^{-6} M 미만의 평형 해리 상수, K_D로 본원에 제공된 항원 (예를 들어, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체) 중 임의의 것에 대한 결합에 대해 경쟁 또는 교차-경쟁하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 본원에 제공된다. 다른 실시양태에서, 항체는 10^{-11} M 내지 10^{-6} M의 범위 내의 K_D로 본원에 기재된 항원 중 임의의 것에 대한 결합에 대해 경쟁 또는 교차-경쟁한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 결합에 대해 경쟁하는 항-TGFβ1 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 동일한 에피토프에 결합하는 항-TGFβ1 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 본원에 제공된다.

[0234] 본원에 제공된 항체 중 임의의 것은 임의의 적합한 방법을 사용하여 특징화될 수 있다. 예를 들어, 하나의 방법은 항원이 결합하는 에피토프를 확인하는 것, 또는 "에피토프 맵핑"이다. 예를 들어 문헌 [Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999]의 챕터 11에 기재된 바와 같이, 항체-항원 복합체의 결정 구조의 해석, 경쟁 검정, 유전자 단편 발현 검정, 및 합성 펩티드-기반 검정을 포함하여, 단백질 상의 에피토프의 위치를 맵핑 및 특징화하기 위한 많은 적합한 방법이 존재한다. 추가의 예에서, 에피토프 맵핑을 사용하여 항체가 결합하는 서열을 결정할 수 있다. 에피토프는 선형 에피토프일 수 있고, 즉 아미노산의 단일 스트레치 내에 함유될 수 있거나, 또는 반드시 단일 스트레치 (1차 구조 선형 서열) 내에 함유될 필요는 없을 수 있는 아미노산의 3차원 상호작용에 의해 형성된 입체형상 에피토프일 수 있다. 일부 실시양태에서, TGFβ1이 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체로 제시되는 경우에, 에피토프는 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 의한 결합에만 이용가능한 TGFβ1 에피토프이다. 다양한 길이 (예를 들어, 적어도 4-6개의 아미노산 길이)의 펩티드는 단리 또는 합성되고 (예를 들어, 재조합적으로), 항체와의 결합 검정에 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 항체가 결합하는 에피토프는 표적 항원 서열로부터 유래된 중첩 펩티드를 사용하고 항체에 의한 결합을 결정함으로써 체계적인 스크린에서 결정될 수 있다. 유전자 단편 발현 검정에 따르면, 표적 항원을 코딩하는 오픈 리딩 프레임은 무작위로 또는 특정한 유전자 구축물에 의해 단편화되고, 발현된 항원 단편과 시험될 항체의 반응성이 결정된다. 유전자 단편은, 예를 들어 PCR에 의해 생산된 다음, 방사성 아미노산의 존재 하에 시험관내에서 단백질로 전사 및 번역될 수 있다. 이어서, 방사성 표지된 항원 단편에 대한 항체의 결합은 면역침전 및 겔 전기영동에 의해 결정된다. 특정 에피토프는 또한 파지 입자의 표면 상에 디스플레이된 무작위 펩티드 서열의 대형 라이브러리 (파지 라이브러리)를 사용함으로써 확인될 수 있다. 대안적으로, 중첩 펩티드 단편의 규정된 라이브러리는 간단한 결합 검정에서 시험 항체에 대한 결합에 대해 시험될 수 있다. 추가의 예에서, 항원 결합 도메인의 돌연변이유발, 도메인 스와핑 실험 및 알라닌 스캐닝 돌연변이유발이 에피토프 결합에 요구되고/되거나, 충분하고/하거나, 필요한 잔기를 확인하기 위해 수행될 수 있다. 예를 들어, 도메인 스와핑 실험은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체의 다양한 단편이 밀접하게 관련되나 항원적으로 구분되는 단백질, 예컨대 TGFβ 단백질 패밀리의 또 다른 구성원 (예를 들어, GDF11)으로부터의 서열로 대체된 (스와핑된) 표적 항원의 돌연변이체를 사용하여 수행될 수 있다. GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체의 돌연변이체에 대한 항체의 결합을 평가함으로써, 항체 결합에 대한 특정한 항원 단편의 중요성이 평가될 수 있다.

[0235] 대안적으로, 경쟁 검정은 항체가 다른 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지 결정하기 위해 동일한 항원에 결합하는 것으로 알려져 있는 다른 항체를 사용하여 수행될 수 있다. 경쟁 검정은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다.

[0236] 추가로, 본원에 제공된 항체 중 임의의 것과 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체 내의 1개 이상의 잔기의 상호작용은 상용 기술에 의해 결정될 수 있다. 예를 들

어, 결정 구조가 결정될 수 있고, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체 내의 잔기와 항체 내의 1개 이상의 잔기 사이의 거리가 그에 따라 결정될 수 있다. 이러한 거리에 기초하여, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체 내의 특정한 잔기가 항체 내의 1개 이상의 잔기와 상호작용하는지가 결정될 수 있다. 추가로, 적합한 방법, 예컨대 경쟁 검정 및 표적 돌연변이유발 검정이 후보 항체의 우선적 결합을 결정하기 위해 적용될 수 있다.

[0237] 항체의 다양한 변형 및 변경

[0238] 본 개시내용에 의해 포괄되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중 임의의 것의 비제한적 변경, 변형, 및 특색이 하기에 간략하게 논의된다. 관련된 분석 방법의 실시양태가 또한 제공된다.

[0239] 자연-발생 항체 구조 단위는 전형적으로 사량체를 포함한다. 각각의 이러한 사량체는 전형적으로 2개의 동일한 쌍의 폴리펩티드 쇄로 구성되며, 각각의 쌍은 1개의 전장 "경쇄" (특정 실시양태에서, 약 25 kDa) 및 1개의 전장 "중쇄" (특정 실시양태에서, 약 50-70 kDa)를 갖는다. 각각의 쇄의 아미노-말단 부분은 전형적으로 항원 인식을 담당하는, 전형적으로 약 100 내지 110개 또는 그 초과의 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 각각의 쇄의 카르복시-말단 부분은 전형적으로 이펙터 기능을 담당할 수 있는 불변 영역을 규정한다. 인간 항체 경쇄는 전형적으로 카파 및 람다 경쇄로 분류된다. 중쇄는 전형적으로 뮤, 델타, 감마, 알파 또는 엡실론으로 분류되고, 항체의 이소형을 규정한다. 항체는 임의의 유형 (예를 들어, IgM, IgD, IgG, IgA, IgY 및 IgE) 또는 부류 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM1, IgM2, IgA1 및 IgA2)일 수 있다. 전장 경쇄 및 중쇄 내에서, 전형적으로, 가변 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산으로 된 "J" 영역에 의해 연결되며, 중쇄는 또한 약 10개 이상의 아미노산으로 된 "D" 영역을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (그 전문이 참조로 포함됨)] 참조). 각각의 경쇄/중쇄 쌍의 가변 영역은 전형적으로 항원 결합 부위를 형성한다.

[0240] 가변 영역은 전형적으로 상보성 결정 영역 또는 CDR로도 불리는 3개의 초가변 영역에 의해 연결되는 비교적 보존된 프레임워크 영역 (FR)의 동일한 일반적 구조를 나타낸다. 각각의 쌍의 2개의 쇄로부터의 CDR은 전형적으로 프레임워크 영역에 의해 정렬되며, 이는 특정한 에피토프에 결합하는 것을 가능하게 할 수 있다. N-말단에서 C-말단으로, 경쇄 및 중쇄 가변 영역 둘 다는 전형적으로 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 각각의 도메인에 대한 아미노산의 배정은 전형적으로 문헌 [Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 또는 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342: 878-883]의 정의에 따른다. 경쇄의 CDR은 또한 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3으로 지칭될 수 있고, 중쇄의 CDR은 또한 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3으로 지칭될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄(들)의 카르복시 말단으로부터의 소수의 아미노산 결실을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄의 카르복시 말단에서 1-5개의 아미노산 결실을 갖는 중쇄를 포함한다. 특정 실시양태에서, CDR의 한정적 묘사 및 항체의 결합 부위를 포함하는 잔기의 확인은 항체의 구조를 해석하고/거나 항체-리간드 복합체의 구조를 해석함으로써 달성된다. 특정 실시양태에서, 이는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 기술 중 임의의 것, 예컨대 X선 결정학에 의해 달성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 다양한 분석 방법이 CDR 영역을 확인하거나 근사화하는 데 사용될 수 있다. 이러한 방법의 예는 카바트 정의, 코티아 정의, AbM 정의 및 접촉 정의를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0241] "친화도 성숙" 항체는 그의 1개 이상의 CDR에서 1개 이상의 변경을 갖는 항체이며, 이는 이들 변경(들)을 보유하지 않는 모 항체와 비교하여 항원에 대한 항체의 친화도를 개선시킨다. 예시적인 친화도 성숙 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화도를 가질 것이다. 친화도 성숙 항체는 관련 기술분야에 공지된 절차에 의해 생산된다. 문헌 [Marks et al. (1992) Bio/Technology 10: 779-783]은 VH 및 VL 도메인 셔플링에 의한 친화도 성숙을 기재한다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이유발이 문헌 [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; 및 Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226: 889-896]에 의해 기재되고; 활성 증진 아미노산 잔기를 갖는 선택적 돌연변이유발 위치, 접촉 또는 과다돌연변이 위치에서의 선택적 돌연변이가 미국 특허 번호 6,914,128에 기재되어 있다.

[0242] 용어 "CDR-그라프트된 항체"는 하나의 종으로부터의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하나, VH 및/또는 VL의 CDR 영역 중 1개 이상의 서열이 또 다른 종의 CDR 서열로 대체된 항체, 예컨대 뮤린 CDR 중 1개 이상 (예를 들어, CDR3)이 인간 CDR 서열로 대체된 뮤린 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 지칭한다.

[0243] 용어 "키메라 항체"는 하나의 종으로부터 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열 및 또 다른 종으로부터 불변 영역 서열을 포함하는 항체, 예컨대 인간 불변 영역에 연결된 뮤린 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 지칭한다.

[0244] 본원에 사용된 용어 "프레임워크" 또는 "프레임워크 서열"은 CDR을 제외한 가변 영역의 나머지 서열을 지칭한다. CDR 서열의 정확한 정의는 상이한 시스템에 의해 결정될 수 있기 때문에, 프레임워크 서열의 의미는 상응하는 상이한 해석에 따른다. 6개의 CDR (경쇄의 CDR-L1, -L2, 및 -L3 및 중쇄의 CDR-H1, -H2, 및 -H3)은 또한 경쇄 및 중쇄 상의 프레임워크 영역을 각각의 쇄 상에서 4개의 하위-영역 (FR1, FR2, FR3 및 FR4)으로 분류하며, 여기서 CDR1은 FR1과 FR2 사이에, CDR2는 FR2와 FR3 사이에, CDR3은 FR3과 FR4 사이에 위치한다. 특정한 하위-영역을 FR1, FR2, FR3 또는 FR4로서 특정하지 않고, 다른 것으로 지칭되는 프레임워크 영역은 단일 자연 발생 이뮤노글로불린 쇄의 가변 영역 내의 조합된 FR을 나타낸다. 본원에 사용된 FR은 4개의 하위-영역 중 1개를 나타내고, FR들은 프레임워크 영역을 구성하는 4개의 하위-영역 중 2개 이상을 나타낸다.

[0245] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 인간 IgM 불변 도메인, 인간 IgG 불변 도메인, 인간 IgG_1 불변 도메인, 인간 IgG_2 불변 도메인, 인간 IgG_2A 불변 도메인, 인간 IgG_2B 불변 도메인, 인간 IgG_2 불변 도메인, 인간 IgG_3 불변 도메인, 인간 IgG_3 불변 도메인, 인간 IgG_4 불변 도메인, 인간 IgA 불변 도메인, 인간 IgA_1 불변 도메인, 인간 IgA_2 불변 도메인, 인간 IgD 불변 도메인 또는 인간 IgE 불변 도메인의 중쇄 이뮤노글로불린 불변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 인간 IgG_1 불변 도메인 또는 인간 IgG_4 불변 도메인의 중쇄 이뮤노글로불린 불변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 인간 IgG_4 불변 도메인의 중쇄 이뮤노글로불린 불변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 IgG_1-유사 힌지를 생산하고 쇄간 디술피드 결합의 형성을 허용하는 Ser에서 Pro로의 백본 치환을 갖는 인간 IgG_4 불변 도메인의 중쇄 이뮤노글로불린 불변 도메인을 포함한다.

[0246] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 인간 Ig 람다 불변 도메인 또는 인간 Ig 카파 불변 도메인을 포함하는 경쇄 이뮤노글로불린 불변 도메인을 추가로 포함한다.

[0247] 일부 실시양태에서, 항체는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄인 4개의 폴리펩티드 쇄를 갖는 IgG이다.

[0248] 일부 실시양태에서, 항체는 인간화 항체, 디아바디 또는 키메라 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 배선 아미노산 서열을 갖는 프레임워크를 포함한다.

[0249] 일부 실시양태에서, 항원 결합 부분은 Fab 단편, F(ab')2 단편, scFab 단편 또는 scFv 단편이다.

[0250] 본원에 사용된 용어 "배선 항체 유전자" 또는 "유전자 단편"은 특정한 이뮤노글로불린의 발현을 위한 유전자 재배열 및 돌연변이로 이어지는 성숙 과정을 거치지 않은 비-림프성 세포에 의해 코딩되는 이뮤노글로불린 서열을 지칭한다 (예를 들어, 문헌 [Shapiro et al. (2002) Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200; Marchalonis et al. (2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484: 13-30] 참조). 본 개시내용의 다양한 실시양태에 의해 제공되는 이점 중 하나는 배선 항체 유전자가 성숙 항체 유전자보다 종 내의 개체의 특징인 필수 아미노산 서열 구조를 보존할 가능성이 더 크며, 따라서 그 종에서 치료적으로 사용되는 경우에 외래 공급원으로부터의 것으로 인식될 가능성이 더 적다는 인식에서 유래된다.

[0251] 본원에 사용된 용어 "중화"는 결합 단백질이 항원에 특이적으로 결합하는 경우에 항원의 생물학적 활성을 상쇄시키는 것을 지칭한다. 한 실시양태에서, 중화 결합 단백질은 항원/ 표적, 예를 들어, 시토카인, 키나제, 성장 인자, 세포 표면 단백질, 가용성 단백질, 포스파타제 또는 수용체 리간드에 결합하고, 적어도 약 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과만큼 그의 생물학적 활성을 감소시킨다.

[0252] 본원에 사용된 용어 "결합 단백질"은 항체 또는 그의 항원 결합 부분, DVD-Ig™, TVD-Ig, RAb-Ig, 이중특이적 항체 및 이중 특이적 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 항원 (예를 들어, TGFβ1)에 특이적으로 결합하는 임의의 폴리펩티드를 포함한다.

[0253] 용어 "모노클로날 항체" 또는 "mAb"는 그를 포함하는 조성물과 관련하여 사용되는 경우에 실질적으로 동종 항체 집단, 즉 집단을 구성하는 개별 항체가 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일한 집단으로부터 수득된 항체 제제를 지칭할 수 있다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이며, 단일 항원에 대해 지시된다. 게다가, 전형적으로 상이한 결정기 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로

날 항체 제제와는 달리, 각각의 mAb는 항원 상의 단일 결정기에 대해 지시된다. 수식어 "모노클로날"은 어떠한 특정한 방법으로든 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0254] 본원에 사용된 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 인간 항체, 예컨대 숙주 세포 내로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체 (하기 섹션 II C에 추가로 기재됨), 재조합 조합적 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 (본원에 참조로 포함된 문헌 [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]), 인간 이뮤노글로불린 유전자에 대해 트랜스제닉인 동물 (예를 들어, 마우스)로부터 단리된 항체 (문헌 [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] 참조) 또는 다른 DNA 서열에 대한 인간 이뮤노글로불린 유전자 서열의 스플라이싱을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나, 특정 실시양태에서, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관내 돌연변이유발 (또는, 인간 Ig 서열에 대해 트랜스제닉인 동물이 사용되는 경우에, 생체내 체세포 돌연변이유발)에 적용될 수 있고, 따라서 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은, 인간 배선 VH 및 VL 서열로부터 유래되고 그와 관련되지만, 생체내 인간 항체 배선 레퍼토리 내에 자연적으로 존재할 수 없는 서열이다.

[0255] 본원에 사용된 "이중 가변 도메인 이뮤노글로불린" 또는 "DVD-Ig™" 등은 쌍형성된 중쇄 DVD 폴리펩티드 및 경쇄 DVD 폴리펩티드를 포함하며 각각의 쌍형성된 중쇄 및 경쇄가 2개의 항원 결합 부위를 제공하는 결합 단백질을 포함한다. 각각의 결합 부위는 항원 결합 부위당 항원 결합에 수반되는 총 6개의 CDR을 포함한다. DVD-Ig™는 전형적으로 적어도 부분적으로 CH3 도메인의 이량체화에 의해 서로 결합된 2개의 아암을 가지며, DVD의 각각의 아암은 이중특이적이므로, 4개의 결합 부위를 갖는 이뮤노글로불린을 제공한다. DVD-Ig™는 서열 목록을 포함하여 각각이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 공개 번호 2010/0260668 및 2009/0304693에 제공된다.

[0256] 본원에 사용된 "삼중 가변 도메인 이뮤노글로불린" 또는 "TVD-Ig" 등은 쌍형성된 중쇄 TVD 결합 단백질 폴리펩티드 및 경쇄 TVD 결합 단백질 폴리펩티드를 포함하며 각각의 쌍형성된 중쇄 및 경쇄가 3개의 항원 결합 부위를 제공하는 결합 단백질이다. 각각의 결합 부위는 항원 결합 부위당 항원 결합에 수반되는 총 6개의 CDR을 포함한다. TVD 결합 단백질은 적어도 부분적으로 CH3 도메인의 이량체화에 의해 서로 결합된 2개의 아암을 가질 수 있으며, TVD 결합 단백질의 각각의 아암은 삼중특이적이므로, 6개의 결합 부위를 갖는 결합 단백질을 제공한다.

[0257] 본원에 사용된 "수용체-항체 이뮤노글로불린" 또는 "RAb-Ig" 등은 함께 총 3개의 항원 결합 부위를 형성하는 중쇄 RAb 폴리펩티드 및 경쇄 RAb 폴리펩티드를 포함하는 결합 단백질이다. 1개의 항원 결합 부위는 각각의 중쇄 RAb 폴리펩티드 및 경쇄 RAb 폴리펩티드에 존재하는 중쇄 및 경쇄 항체 가변 도메인의 쌍형성에 의해 형성되어 제1 항원 결합 부위를 제공하는 총 6개의 CDR을 갖는 단일 결합 부위를 형성한다. 각각의 중쇄 RAb 폴리펩티드 및 경쇄 RAb 폴리펩티드는 독립적으로 제2 및 제3 "항원" 결합 부위를 제공하는 리간드에 결합하는 수용체 서열을 포함한다. RAb-Ig는 전형적으로 적어도 부분적으로 CH3 도메인의 이량체화에 의해 서로 결합된 2개의 아암을 가지며, RAb-Ig의 각각의 아암은 삼중특이적이므로, 6개의 결합 부위를 갖는 이뮤노글로불린을 제공한다. RAb-Ig는 서열 목록을 포함한 전체 내용이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 출원 공개 번호 2002/0127231에 기재되어 있다.

[0258] 본원에 사용되고, "이중특이적 절반-Ig 결합 단백질" 또는 "이중특이적 (절반-Ig) 결합 단백질"과 구별되는 용어 "이중특이적 항체"는 쿼드로마 기술 (문헌 [Milstein, C. and Cuello, A.C. (1983) Nature 305(5934): p. 537-540] 참조)에 의해, 2종의 상이한 모노클로날 항체의 화학적 접합 (문헌 [Staerz, U.D. et al. (1985) Nature 314(6012): 628-631])에 의해, 또는 CH3-CH3 이량체화를 억제하지 않는 Fc 영역에 돌연변이를 도입하여 오직 1종만이 기능적 이중특이적 항체인 다중 상이한 이뮤노글로불린 종을 생성하는 노브-인투-홀 또는 유사한 접근법 (문헌 [Holliger, P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90(14): 6444-6448] 참조)에 의해 생성되는 전장 항체를 지칭한다. 분자 기능에 의해, 이중특이적 항체는 그의 2개의 결합 아암 (한 쌍의 HC/LC) 중 1개 상의 1종의 항원 (또는 에피토프)에 결합하고, 그의 제2 아암 (상이한 쌍의 HC/LC) 상의 상이한 항원 (또는 에피토프)에 결합한다. 이러한 정의에 의해, 이중특이적 항체는 (특이성 및 CDR 서열 둘 다에서) 2개의 구분되는 항원 결합 아암을 갖고, 그가 결합하는 각각의 항원에 대해 1가이다.

[0259] 본원에 사용되고 이중특이적 절반-Ig 결합 단백질 또는 이중특이적 결합 단백질로부터 구별되는 용어 "이중-특

이적 항체"는 각각의 그의 2개의 결합 아암 (한 쌍의 HC/LC)에서 2종의 상이한 항원 (또는 에피토프)에 결합할 수 있는 전장 항체를 지칭한다 (PCT 공개 번호 WO 02/02773 참조). 따라서, 이중-특이적 결합 단백질은 동일한 특이성 및 동일한 CDR 서열을 갖는 2개의 동일한 항원 결합 아암을 갖고, 그가 결합하는 각각의 항원에 대해 2가이다.

[0260] 본원에 사용된 용어 "K_{on}"은, 예를 들어 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 항체/항원 복합체를 형성하기 위한 항원에 대한 결합 단백질 (예를 들어, 항체)의 회합에 대한 온 레이트 상수를 지칭하는 것으로 의도된다. "K_{on}"은 또한 본원에서 상호교환가능하게 사용되는 용어 "회합률 상수" 또는 "k_a"로도 알려져 있다. 항체의 그의 표적 항원에 대한 결합률 또는 항체와 항원 사이의 복합체 형성률을 나타내는 이 값은 또한 하기 식에 의해 제시된다: 항체 ("Ab") + 항원 ("Ag")→Ab-Ag.

[0261] 본원에 사용된 용어 "K_{off}"는, 예를 들어 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 항체/항원 복합체로부터의 결합 단백질 (예를 들어, 항체)의 해리에 대한 오프 레이트 상수를 지칭하는 것으로 의도된다. "K_{off}"는 또한 본원에서 상호교환가능하게 사용되는 용어 "해리율 상수" 또는 "k_d"로도 알려져 있다. 이 값은 하기 방정식에 의해 제시된 바와 같은, 항체의 그의 표적 항원으로부터의 해리율 또는 시간 경과에 따른 Ab-Ag 복합체의 유리 항체 및 항원으로의 분리를 나타낸다: Ab + Ag←Ab-Ag.

[0262] 본원에서 상호교환가능하게 사용되는 용어 "평형 해리 상수" 또는 "K_D"는 평형 시 적정 측정에서, 또는 해리율 상수 (k_{off})를 회합률 상수 (k_{on})로 나눔으로써 수득된 값을 지칭한다. 회합률 상수, 해리율 상수 및 평형 해리 상수는 항원에 대한 결합 단백질, 예를 들어, 항체의 결합 친화도를 나타내는 데 사용된다. 회합률 및 해리율 상수를 결정하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 형광-기반 기술을 사용하는 것은 평형 시 생리학적 완충제 중에서 샘플을 검사하기 위한 높은 감수성 및 능력을 제공한다. 다른 실험적 접근법 및 기기, 예컨대 비아코어(BIAcore)® (생체분자 상호작용 분석) 검정이 사용될 수 있다 (예를 들어, 비아코어 인터내셔널 아베(BIAcore International AB), 지이 헬스케어 캄파니(GE Healthcare company) (스웨덴 웁살라)로부터 입수가능한 기기). 추가적으로, 사피다인 인스트루먼츠(Sapidyne Instruments) (아이다호주 보이스)로부터 입수가능한 키넥사(KinExA)® (동역학적 배제 검정) 검정이 또한 사용될 수 있다.

[0263] 본원에 사용된 용어 "결정" 및 "결정화된"은 결정 형태로 존재하는 결합 단백질 (예를 들어, 항체) 또는 그의 항원 결합 부분을 지칭한다. 결정은 물질의 고체 상태의 한 형태이며, 다른 형태 예컨대 무정형 고체 상태 또는 액정질 상태와 구분된다. 결정은 원자, 이온, 분자 (예를 들어, 단백질 예컨대 항체), 또는 분자 조립체 (예를 들어, 항원/항체 복합체)의 규칙적이고 반복되는 3차원 어레이로 구성된다. 이들 3차원 어레이는 분야에서 널리 이해되는 특정한 수학적 관계에 따라 배열된다. 결정에서 반복되는 기본 단위 또는 빌딩 블록은 비대칭 단위로 불린다. 주어진, 널리 규정된 결정학적 대칭에 따른 배열에서의 비대칭 단위의 반복은 결정의 "단위 셀"을 제공한다. 모든 3차원에서의 규칙적 번역에 의한 단위 셀의 반복은 결정을 제공한다. 문헌 [Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)]을 참조한다. 용어 "링커"는 펩티드 결합에 의해 연결된 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하며 1개 이상의 항원 결합 부분을 연결하는 데 사용되는 폴리펩티드를 나타내는 데 사용된다. 이러한 링커 폴리펩티드는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Holliger, P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R.J. et al. (1994) Structure 2:1121-1123] 참조). 예시적인 링커는 ASTKGPSVFPLAP (서열식별번호: 55), ASTKGP (서열식별번호: 56); TVAAPSVFIFPP (서열식별번호: 57); TVAAP (서열식별번호: 58); AKTTPKLEEGEFSEAR (서열식별번호: 59); AKTTPKLEEGEFSEARV (서열식별번호: 60); AKTTPKLGG (서열식별번호: 61); SAKTTPKLGG (서열식별번호: 62); SAKTTP (서열식별번호: 63); RADAAP (서열식별번호: 64); RADAAPTVS (서열식별번호: 65); RADAAAAGGPGS (서열식별번호: 66); $RADAAA(G4S)_4$ (서열식별번호: 67); SAKTTPKLEEGEFSEARV (서열식별번호: 68); ADAAP (서열식별번호: 69); ADAAPTVSIFPP (서열식별번호: 70); QPKAAP (서열식별번호: 71); QPKAAPSVTLFPP (서열식별번호: 72); AKTTPP (서열식별번호: 73); AKTTPPSVTPLAP (서열식별번호: 74); AKTTAP (서열식별번호: 75); AKTTAPSVYPLAP (서열식별번호: 76); GGGGSGGGGSGGGGS (서열식별번호: 77); GENKVEYAPALMALS (서열식별번호: 78); GPAKELTPLKEAKVS (서열식별번호: 79); GHEAAAVMQVQYPAS (서열식별번호: 80); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (서열식별번호: 81); 및 ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (서열식별번호: 82)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0264] "표지" 및 "검출가능한 표지" 또는 "검출가능한 모이어티"는, 예를 들어 특정한 결합 쌍의 구성원들, 예컨대 항

체와 분석물 사이의 반응을 검출가능하게 하기 위한, 특정한 결합 파트너, 예컨대 항체 또는 분석물에 부착된 모이어티를 의미하고, 그와 같이 표지된 특정한 결합 파트너, 예를 들어, 항체 또는 분석물은 "검출가능하게 표지된"으로 지칭된다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "표지된 결합 단백질"은 결합 단백질의 확인을 제공하는 혼입된 표지를 갖는 단백질을 지칭한다. 한 실시양태에서, 표지는 시각적 또는 기기 수단, 예를 들어, 방사성표지된 아미노산의 혼입 또는 마킹된 아비딘에 의해 검출될 수 있는 비오티닐 모이어티를 갖는 폴리펩티드 (예를 들어, 광학 또는 비색 방법에 의해 검출될 수 있는 형광 마커 또는 효소 활성을 함유하는 스트렙타비딘)에 대한 부착에 의해 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 검출가능한 마커이다. 폴리펩티드에 대한 표지의 예는 하기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 방사성동위원소 또는 방사성핵종 (예를 들어, ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho 및 ^{153}Sm); 발색원; 형광 표지 (예를 들어, FITC, 로다민 및 란타나이드 인광체); 효소 표지 (예를 들어, 양고추냉이 퍼옥시다제, 루시퍼라제 및 알칼리성 포스파타제); 화학발광 마커; 비오티닐 기; 2차 리포터에 의해 인식되는 미리 결정된 폴리펩티드 에피토프 (예를 들어, 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인 및 에피토프 태그); 및 자성 작용제, 예컨대 가돌리늄 킬레이트. 면역검정에 통상적으로 사용되는 표지의 대표적인 예는 광을 생성하는 모이어티, 예를 들어 아크리디늄 화합물, 및 형광을 생성하는 모이어티, 예를 들어 플루오레세인을 포함한다. 다른 표지가 본원에 기재된다. 이와 관련하여, 모이어티는 그 자체는 검출가능하게 표지되지 않을 수 있지만, 또 다른 모이어티와의 반응 시에 검출가능해질 수 있다. "검출가능하게 표지된"의 사용은 검출가능한 표지의 후자 유형을 포괄하는 것으로 의도된다.

[0265] 일부 실시양태에서, 항원 (예를 들어, 단백질 복합체), 예컨대 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 결합 친화도는 옥테트 검정을 사용하여 결정된다. 일부 실시양태에서, 옥테트 검정은 항체와 항원 사이의 결합을 나타내는 1개 이상의 동역학적 파라미터를 결정하는 검정이다. 일부 실시양태에서, 옥테트® 시스템 (포르테바이오 (ForteBio), 캘리포니아주 멘로 파크)은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 결합 친화도를 결정하는 데 사용된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도는 생물층 간섭측정법을 이용하는 포르테바이오 옥테트 QK^{e} 딥 앤드 리드(dip and read) 무표지 검정 시스템을 사용하여 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원은 바이오센서 (예를 들어, 스트렙타비딘-코팅된 바이오센서)에 고정화되고, 항체 및 복합체 (예를 들어, 비오티닐화된 GARP-TGFβ1 복합체 및 비오티닐화된 LTBP-TGFβ1 복합체)는 결합 상호작용을 측정하기 위해 용액 중에 고농도 (50 μg/mL)로 존재한다. 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 결합 친화도는 표 6에 약술된 프로토콜을 사용하여 결정된다. 본원에 사용된 용어 "표면 플라즈몬 공명"은, 예를 들어 비아코어® 시스템 (비아코어 인터내셔널 아베, 지이 헬스케어 컴파니, 스웨덴 웁살라 및 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하여 바이오센서 매트릭스 내의 단백질 농도의 변경을 검출함으로써 실시간 이중특이적 상호작용의 분석을 가능하게 하는 광학 현상을 지칭한다. 추가 설명에 대해서는, 문헌 [Jonsson, U. et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26; Jonsson, U. et al. (1991) Biotechniques 11: 620-627; Johnsson, B. et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8: 125-131; 및 Johnnson, B. et al. (1991) Anal. Biochem. 198: 268-277]을 참조한다.

[0266] TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제의 확인 및 생산/제조

[0267] 본 발명은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체, 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체 중 2종 이상에 결합하는 항체 또는 그의 단편의 스크리닝 방법, 생산 방법 및 제조 공정, 및 그를 포함하는 제약 조성물 및 관련 키트를 포괄한다.

[0268] 본 개시내용의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 수득하는 데 수많은 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체는 재조합 DNA 방법을 사용하여 생산될 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 알려진 방법에 따라 하이브리도마의 생성에 의해 생산될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Kohler and Milstein (1975) Nature, 256: 495-499] 참조). 이어서, 이러한 방식으로 형성된 하이브리도마는 특정된 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 1개 이상의 하이브리도마를 확인하기 위해 표준 방법, 예컨대 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA) 및 표면 플라즈몬 공명 (예를 들어, 옥테트 또는 비아코어) 분석을 사용하여 스크리닝된다. 임의의 형태의 특정된 항원이 면역원, 예를 들어, 재조합 항원, 그의 자연 발생 형태, 임의의 변이체 또는 단편, 뿐만 아니라 그의 항원 펩티드 (예를 들어, 선형 에피토프로서 또는 스캐폴드 내에서 입체형상 에피토프로서 본원에 기재된 에피토프 중 임의의 것)로서 사용될 수 있다. 항체를 제조하는 하나의 예시적인 방법은 항체 또는 그의 단편 (예를 들어, scFv)을 발현하는 단백질 발현 라이브러리, 예를 들어, 파지 또는 리보솜 디스플레이 라이브러리를 스크리닝하는 것을 포

함한다. 파지 디스플레이는 예를 들어 미국 특허 번호 5,223,409 (라드너(Ladner) 등); 문헌 [Smith (1985) Science 228:1315-1317; Clackson et al. (1991) Nature, 352: 624-628; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222: 581-597]; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; 및 WO 90/02809에 기재되어 있다.

[0269] 디스플레이 라이브러리를 사용하는 것에 더하여, 특정된 항원 (예를 들어, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체)은 비-인간 숙주, 예를 들어, 토끼, 기니 피그, 래트, 마우스, 햄스터, 양, 염소, 닭, 낙타류, 뿐만 아니라 비-포유동물 숙주 예컨대 상어를 면역화하는 데 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 비-인간 동물은 마우스이다.

[0270] 또 다른 실시양태에서, 모노클로날 항체는 비-인간 동물로부터 수득된 다음, 적합한 재조합 DNA 기술을 사용하여 변형된, 예를 들어, 키메라이다. 키메라 항체를 제조하기 위한 다양한 접근법이 기재되어 있다. 예를 들어, [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda et al., Nature 314:452, 1985], 미국 특허 번호 4,816,567 (캐빌리(Cabilly) 등); 미국 특허 번호 4,816,397 (보스(Boss) 등); 유럽 특허 공개 EP171496 (타나구치(Tanaguchi) 등); 유럽 특허 공개 0173494, 영국 특허 GB 2177096B를 참조한다.

[0271] 추가의 항체 생산 기술에 대해서는, 문헌 [Antibodies: A Laboratory Manual, eds. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]을 참조한다. 본 개시내용은 항체의 임의의 특정한 공급원, 생산 방법, 또는 다른 특수한 특징에 반드시 제한될 필요는 없다.

[0272] 본 개시내용의 일부 측면은 폴리뉴클레오티드 또는 벡터로 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 진핵 또는 원핵 세포일 수 있다. 숙주 세포 내에 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있거나, 또는 염색체외에서 유지될 수 있다. 숙주 세포는 임의의 진핵 또는 원핵 세포, 예컨대 박테리아, 곤충, 진균류, 식물, 동물 또는 인간 세포일 수 있다. 일부 실시양태에서, 진균류 세포는, 예를 들어, 사카로미세스(Saccharomyces) 속의 것, 특히 에스. 세레비지아에(S. cerevisiae) 종의 것이다. 용어 "원핵"은 항체 또는 상응하는 이뮤노글로불린 쇄의 발현을 위한 DNA 또는 RNA 분자로 형질전환 또는 형질감염될 수 있는 모든 박테리아를 포함한다. 원핵 숙주는 그람 음성뿐만 아니라 그람 양성 박테리아 예컨대, 예를 들어, 이. 콜라이(E. coli), 에스. 티피뮤리움(S. typhimurium), 세라티아 마르세센스(Serratia marcescens) 및 바실루스 서브틸리스(Bacillus subtilis)를 포함할 수 있다. 용어 "진핵"은 효모, 고등 식물, 곤충 및 척추동물 세포, 예를 들어, 포유동물 세포, 예컨대 NSO 및 CHO 세포를 포함한다. 재조합 생산 절차에 사용되는 숙주에 따라, 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 항체 또는 이뮤노글로불린 쇄는 글리코실화될 수 있거나 또는 비-글리코실화될 수 있다. 항체 또는 상응하는 이뮤노글로불린 쇄는 또한 초기 메티오닌 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[0273] 일부 실시양태에서, 벡터가 적절한 숙주 내로 혼입되면, 숙주는 뉴클레오티드 서열의 높은 수준 발현에 적합한 조건 하에 유지될 수 있고, 원하는 경우, 이뮤노글로불린 경쇄, 중쇄, 경쇄/중쇄 이량체 또는 무손상 항체, 항원 결합 단편 또는 다른 이뮤노글로불린 형태의 수집 및 정제가 이어질 수 있으며; 문헌 [Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N.Y., (1979)]을 참조한다. 따라서, 폴리뉴클레오티드 또는 벡터가 세포 내로 도입되며, 이는 차례로 항체 또는 항원 결합 단편을 생산한다. 게다가, 상기 언급된 숙주 세포를 포함하는 트랜스제닉 동물, 바람직하게는 포유동물이 항체 또는 항체 단편의 대규모 생산에 사용될 수 있다.

[0274] 형질전환된 숙주 세포는 최적 세포 성장을 달성하기 위한 임의의 적합한 기술을 사용하여 발효기에서 성장되고 배양될 수 있다. 발현되면, 전체 항체, 그의 이량체, 개별 경쇄 및 중쇄, 다른 이뮤노글로불린 형태, 또는 항원 결합 단편은 황산암모늄 침전, 친화성 칼럼, 칼럼 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 포함한 관련 기술분야의 표준 절차에 따라 정제될 수 있으며; 문헌 [Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982)]을 참조한다. 이어서, 항체 또는 항원 결합 단편은 성장 배지, 세포 용해물, 또는 세포 막 분획으로부터 단리될 수 있다. 예를 들어, 미생물에 의해 발현된 항체 또는 항원 결합 단편의 단리 및 정제는 임의의 통상적인 수단 예컨대, 예를 들어, 정제용 크로마토그래피 분리 및 면역학적 분리 예컨대, 예를 들어 항체의 불변 영역에 대해 지시된 모노클로날 또는 폴리클로날 항체의 사용을 수반하는 것에 의할 수 있다.

[0275] 본 개시내용의 측면은 모노클로날 항체의 무기한 연장된 공급원을 제공하는 하이브리도마에 관한 것이다. 하이브리도마의 배양물로부터 직접적으로 이뮤노글로불린을 수득하는 것에 대한 대안으로서, 불멸화 하이브리도마 세포가 후속 발현 및/또는 유전자 조작을 위한 재배열된 중쇄 및 경쇄 유전자좌의 공급원으로서 사용될 수 있다. 재배열된 항체 유전자는 적절한 mRNA로부터 역전사되어 cDNA를 생산할 수 있다. 일부 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 상이한 이소형의 것으로 교환될 수 있거나 또는 전적으로 제거될 수 있다. 가변 영역은 단일

쇄 Fv 영역을 코딩하도록 연결될 수 있다. 다중 Fv 영역이 연결되어 1개 초과의 표적에 대한 결합 능력을 부여할 수 있거나, 또는 키메라 중쇄 및 경쇄 조합물이 사용될 수 있다. 임의의 적절한 방법이 항체 가변 영역의 클로닝 및 재조합 항체의 생성에 사용될 수 있다.

[0276] 일부 실시양태에서, 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 영역을 코딩하는 적절한 핵산이 수득되어, 표준 재조합 숙주 세포 내로 형질감염될 수 있는 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 다양한 이러한 숙주 세포가 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 포유동물 숙주 세포는 효율적인 프로세싱 및 생산에 유리할 수 있다. 이러한 목적에 유용한 전형적인 포유동물 세포주는 CHO 세포, 293 세포 또는 NSO 세포를 포함한다. 변형된 재조합 숙주를 숙주 세포의 성장 및 코딩 서열의 발현에 적절한 배양 조건 하에 배양함으로써 항체 또는 항원 결합 단편의 생산이 착수될 수 있다. 항체 또는 항원 결합 단편은 이들을 배양물로부터 단리함으로써 회수될 수 있다. 발현 시스템은 신호 펩티드를 포함하도록 설계되어 생성된 항체가 배지 내로 분비되도록 할 수 있으나; 세포내 생산이 또한 가능하다.

[0277] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 항체의 이뮤노글로불린 쇄의 적어도 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 가변 영역은 상기 기재된 하이브리도마 중 어느 하나에 의해 생산된 항체의 가변 영역의 VH 및/또는 VL의 적어도 1개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다.

[0278] 항체 또는 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, DNA, cDNA, RNA, 또는 합성적으로 생산된 DNA 또는 RNA, 또는 이들 폴리뉴클레오티드 중 임의의 것을 단독으로 또는 조합하여 포함하는 재조합적으로 생산된 키메라 핵산 분자일 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 벡터의 일부이다. 이러한 벡터는 추가 유전자 예컨대 적합한 숙주 세포 내에서 및 적합한 조건 하에 벡터의 선택을 가능하게 하는 마커 유전자를 포함할 수 있다.

[0279] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 원핵 또는 진핵 세포에서의 발현을 가능하게 하는 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결된다. 폴리뉴클레오티드의 발현은 폴리뉴클레오티드의 번역가능한 mRNA로의 전사를 포함한다. 진핵 세포, 바람직하게는 포유동물 세포에서의 발현을 보장하는 조절 요소는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 이는 전사의 개시를 용이하게 하는 조절 서열, 및 임의로 전사의 종결 및 전사체의 안정화를 용이하게 하는 폴리-A 신호를 포함할 수 있다. 추가의 조절 요소는 전사뿐만 아니라 번역 인핸서, 및/또는 자연적으로 회합된 또는 이종 프로모터 영역을 포함할 수 있다. 원핵 숙주 세포에서의 발현을 허용하는 가능한 조절 요소는 예를 들어, 이. 콜라이에서의 PL, Lac, Trp 또는 Tac 프로모터를 포함하고, 진핵 숙주 세포에서의 발현을 허용하는 조절 요소의 예는 효모에서의 AOX1 또는 GAL1 프로모터, 또는 포유동물 및 다른 동물 세포에서의 CMV-프로모터, SV40-프로모터, RSV-프로모터 (라우스 육종 바이러스), CMV-인핸서, SV40-인핸서 또는 글로빈 인트론이다.

[0280] 전사 개시를 담당하는 요소 이외에, 이러한 조절 요소는 또한 폴리뉴클레오티드의 하류의 전사 종결 신호, 예컨대 SV40-폴리-A 부위 또는 tk-폴리-A 부위를 포함할 수 있다. 게다가, 사용되는 발현 시스템에 따라, 폴리펩티드를 세포 구획으로 지시하거나 또는 이를 배지 내로 분비할 수 있는 리더 서열이 폴리뉴클레오티드의 코딩 서열에 부가될 수 있고, 이전에 기재되었다. 리더 서열(들)은 적절한 단계에서 번역, 개시 및 종결 서열과 조립되고, 바람직하게는 리더 서열은 번역된 단백질 또는 그의 부분의, 예를 들어 세포외 배지 내로의 분비를 지시할 수 있다. 임의로, 바람직한 특징, 예를 들어, 발현된 재조합 생성물의 안정화 또는 단순화된 정제를 부여하는 C- 또는 N-말단 식별 펩티드를 포함한 융합 단백질을 코딩하는 이종 폴리뉴클레오티드 서열이 사용될 수 있다.

[0281] 일부 실시양태에서, 경쇄 및/또는 중쇄의 적어도 가변 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 이뮤노글로불린 쇄 둘 다 또는 오직 하나의 가변 도메인을 코딩할 수 있다. 마찬가지로, 폴리뉴클레오티드는 동일한 프로모터의 제어 하에 있을 수 있거나, 또는 발현에 대해 개별적으로 제어될 수 있다. 게다가, 일부 측면은 항체 또는 항원 결합 단편의 한 이뮤노글로불린 쇄의 가변 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고; 임의로 항체의 다른 이뮤노글로불린 쇄의 가변 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 조합되는, 유전자 조작에서 통상적으로 사용되는 벡터, 특히 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지에 관한 것이다.

[0282] 일부 실시양태에서, 발현 제어 서열이 진핵 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시킬 수 있는 벡터 내의 진핵 프로모터 시스템으로서 제공되지만, 원핵 숙주에 대한 제어 서열이 또한 사용될 수 있다. 바이러스 예컨대 레트로바이러스, 백시니아 바이러스, 아데노-연관 바이러스, 포진 바이러스 또는 소 유두종 바이러스로부터 유래된 발현 벡터는 (예를 들어, 항체 또는 항원 결합 단편을 발현하도록 세포를 조작하기 위해) 폴리뉴클레오티드

또는 벡터를 표적화된 세포 집단 내로 전달하는 데 사용될 수 있다. 다양한 적절한 방법이 재조합 바이러스 벡터를 구축하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 및 벡터는 표적 세포로의 전달을 위해 리포솜 내로 재구성될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 이뮤노글로불린 쇄의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인(들)을 코딩하는 서열 및 발현 제어 서열)을 함유하는 벡터는 세포 숙주의 유형에 따라 달라지는 적합한 방법에 의해 숙주 세포 내로 이송될 수 있다.

[0283] 스크리닝 방법은 항체 또는 그의 단편의 바람직한 활성을 평가 또는 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계는 표적 기능을 억제하는 능력, 예를 들어, 잠복 복합체로부터의 성숙 TGFβ1의 방출을 억제하는 능력에 대해 선택하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계는 세포 표면으로부터의 항체-항원 복합체의 내재화 및 후속적인 제거를 촉진하는 항체 또는 그의 단편에 대해 선택하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계는 ADCC를 유발하는 항체 또는 그의 단편에 대해 선택하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계는 생체내에서 바람직한 부위(들) (예를 들어, 세포 유형, 조직 또는 기관)에 축적되는 항체 또는 그의 단편에 대해 선택하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계는 혈액 뇌 장벽을 가로지르는 능력을 갖는 항체 또는 그의 단편에 대해 선택하는 것을 포함한다. 방법은 안정성, 결합 친화도, 기능성 (예를 들어, 억제 활성, Fc 기능 등), 면역원성, pH 감수성 및 발생가능성 (예를 들어, 높은 가용성, 낮은 자기-연관 등)과 같은 기준에 의해 결정된 바람직한 프로파일을 보유하는 변이체 대응물을 제공하도록 1종 이상의 항체 또는 그의 단편을 최적화하는 단계를 포함한다. 이러한 단계는 항체 또는 그의 단편의 친화도 성숙을 포함할 수 있다. 생성된 최적화된 항체는 바람직하게는 인간 투여에 적합한 완전 인간 항체 또는 인간화 항체이다. 이러한 항체 또는 그의 단편을 포함하는 제약 조성물의 제조 공정은 정제, 제제화, 멸균 여과, 포장 등의 단계를 포함할 수 있다. 특정 단계 예컨대 멸균 여과는, 예를 들어 적절한 규제 기관, 예컨대 FDA에 의해 제시된 가이드라인에 따라 수행된다. 이러한 조성물은 일회용 용기, 예컨대 사전-충전된 시린지, 또는 다중-투여량 용기, 예컨대 바이알의형태로 이용가능하게 제조될 수 있다.

[0284] 변형

[0285] 본 개시내용의 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 효소, 보결분자단, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질, 방사성 물질, 양전자 방출 금속, 비방사성 상자성 금속 이온을 포함하나 이에 제한되지는 않는 검출가능한 표지 또는 검출가능한 모이어티, 및 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체의 검출 및 단리를 위한 친화성 표지로 변형될 수 있다. 검출가능한 물질 또는 모이어티는 본 개시내용의 폴리펩티드에 직접적으로, 또는 중간체 (예컨대, 예를 들어, 링커 (예를 들어, 절단가능한 링커))를 통해 간접적으로 적합한 기술을 사용하여 커플링되거나 또는 접합될 수 있다. 적합한 효소의 비제한적 예는 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, β-갈락토시다제, 글루코스 옥시다제 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하고; 적합한 보결분자단 복합체의 비제한적 예는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하고; 적합한 형광 물질의 비제한적 예는 비오틴, 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함하고; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고; 생물발광 물질의 비제한적 예는 루시페라제, 루시페린 및 에쿼린을 포함하고; 적합한 방사성 물질의 예는 방사성 금속 이온, 예를 들어, 알파-방출체 또는 다른 방사성동위원소 예컨대, 예를 들어, 아이오딘 (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, ^{121}I), 탄소 (^{14}C), 황 (^{35}S), 삼중수소 (^{3}H), 인듐 (^{115}mIn, ^{113}mIn, ^{112}In, ^{111}In), 및 테크네튬 (^{99}Tc, ^{99}mTc), 탈륨 (^{201}Ti), 갈륨 (^{68}Ga, ^{67}Ga), 팔라듐 (^{103}Pd), 몰리브데넘 (^{99}Mo), 크세논 (^{133}Xe), 플루오린 (^{18}F), ^{153}Sm, Lu, ^{159}Gd, ^{149}Pm, ^{140}La, ^{175}Yb, ^{166}Ho, ^{90}Y, ^{47}Sc, ^{86}R, ^{188}Re, ^{142}Pr, ^{105}Rh, ^{97}Ru, ^{68}Ge, ^{57}Co, ^{65}Zn, ^{85}Sr, ^{32}P, ^{153}Gd, ^{169}Yb, ^{51}Cr, ^{54}Mn, ^{75}Se, 및 주석 (^{113}Sn, ^{117}Sn)을 포함한다. 검출가능한 물질은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 본 개시내용의 항체에 직접적으로, 또는 중간체 (예컨대, 예를 들어, 링커)를 통해 간접적으로 적합한 기술을 사용하여 커플링되거나 또는 접합될 수 있다. 검출가능한 물질에 접합된 본원에 제공된 항체 중 임의의 것은 임의의 적합한 진단 검정, 예컨대 본원에 기재된 것들에 사용될 수 있다.

[0286] 또한, 본 개시내용의 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 또한 약물로 변형될 수 있다. 약물은 본 개시내용의 폴리펩티드에 직접적으로, 또는 중간체 (예컨대, 예를 들어, 링커 (예를 들어, 절단가능한 링커))를 통해 간접적으로 적합한 기술을 사용하여 커플링되거나 또는 접합될 수 있다.

[0287] 표적화제

[0288] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/

또는 LRRC33-TGFβ1 복합체로부터의 성숙 TGFβ 방출을 조정할 목적으로 대상체 내의 특정한 부위에 본원에 개시된 바와 같은 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 표적화하는 1종 이상의 표적화제를 사용하는 것을 포함한다. 예를 들어, LTBP1-TGFβ1 및 LTBP3-TGFβ1 복합체는 전형적으로 세포외 매트릭스에 국재화된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 LTBP1-TGFβ1 및 LTBP3-TGFβ1 복합체가 상주하는 부위에 항체를 국재화시킬 목적으로 세포외 매트릭스 표적화제에 접합될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 항체의 선택적 표적화는 LTBP1-TGFβ1 및/또는 LTBP3-TGFβ1 복합체의 선택적 조정으로 이어진다. 일부 실시양태에서, 항체의 선택적 표적화는 (예를 들어, 섬유증을 치료할 목적으로) LTBP1-TGFβ1 및/또는 LTBP3-TGFβ1 복합체의 선택적 억제로 이어진다. 일부 실시양태에서, 세포외 매트릭스 표적화제는 헤파린 결합제, 매트릭스 메탈로프로테이나제 결합제, 리실 옥시다제 결합 도메인, 피브릴린-결합제, 히알루론산 결합제 등을 포함한다.

[0289] 유사하게, GARP-TGFβ1 복합체는 전형적으로 세포, 예를 들어, 활성화된 $FOXP3^+$ 조절 T 세포 (Treg)의 표면에 국재화된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 GARP-TGFβ1 복합체가 상주하는 부위에 항체를 국재화시킬 목적으로 면역 세포 (예를 들어, Treg 세포) 결합제에 접합될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 항체의 선택적 표적화는 GARP-TGFβ1 복합체의 선택적 조정으로 이어진다. 일부 실시양태에서, 항체의 선택적 표적화는 GARP-TGFβ1 복합체의 선택적 억제 (예를 들어, 면역 조정의 목적으로, 예를 들어, 암의 치료에서의, 성숙 TGFβ1의 방출의 선택적 억제)로 이어진다. 이러한 실시양태에서, Treg 세포 표적화제는 예를 들어 CCL22 및 CXCL12 단백질 또는 그의 단편을 포함할 수 있다.

[0290] 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체 및 LTBP-TGFβ1 복합체에 선택적으로 결합하는 제1 부분 및 표적 부위의 성분, 예를 들어, ECM의 성분 (예를 들어, 피브릴린) 또는 Treg 세포의 성분 (예를 들어, CTLA-4)에 선택적으로 결합하는 제2 부분을 갖는 이중특이적 항체가 사용될 수 있다.

[0291] 제약 조성물

[0292] 본 발명은 인간 및 비-인간 대상체에서의 투여에 적합한 의약으로서 사용되는 제약 조성물을 추가로 제공한다. GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 1종 이상의 항체는, 예를 들어 완충제를 포함한 제약상 허용되는 담체 (부형제)와 함께 제제화되거나 또는 혼합되어 제약 조성물을 형성할 수 있다. 이러한 제제는 TGFβ 신호전달을 수반하는 질환 또는 장애의 치료에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, TGFβ 신호전달과 연관된 이러한 질환 또는 장애는 1개 이상의 콘텍스트를 수반하며, 즉, TGFβ는 제시 분자의 특정한 유형 또는 유형들과 회합된다. 일부 실시양태에서, 이러한 콘텍스트는 세포 유형-특이적 및/또는 조직-특이적 방식으로 발생한다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, TGFβ 신호전달의 이러한 콘텍스트-의존성 작용은 부분적으로 GARP, LRRC33, LTBP1 및/또는 LTBP3을 통해 매개된다.

[0293] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 TGFβ의 2개 이상의 콘텍스트에 특이적으로 결합하여, 항체가 GARP, LRRC33, LTBP1 및 LTBP3 중 2개 이상으로부터 선택되는 제시 분자와 복합체화된 TGFβ에 결합하도록 한다. 따라서, 이러한 제약 조성물은 TGFβ-관련 적응증 (예를 들어, 섬유증, 면역 장애 및/또는 암)을 완화시키기 위해 환자에게 투여될 수 있다. "허용되는"은 담체가 조성물의 활성 성분과 상용성이고 (및 바람직하게는, 활성 성분을 안정화시킬 수 있음) 치료될 대상체에게 해롭지 않음을 의미한다. 완충제를 포함한 제약상 허용되는 부형제 (담체)의 예가 통상의 기술자에게 명백할 것이고, 이전에 기재되었다. 예를 들어, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover]을 참조한다. 한 예에서, 본원에 기재된 제약 조성물은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 1종 초과의 항체를 함유하며, 여기서 항체는 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체의 상이한 에피토프/잔기를 인식한다.

[0294] 본 방법에 사용될 제약 조성물은 동결건조된 제제 또는 수용액 형태의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함할 수 있다 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover). 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및

글루코스, 만노스 또는 덱스트란을 포함한 다른 탄수화물; 킬레이트화제 예컨대 EDTA; 당 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비-이온성 계면활성제 예컨대 트윈(TWEEN)™, 플루로닉스(PLURONICS)™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함할 수 있다. 제약상 허용되는 부형제는 본원에 추가로 기재된다.

[0295] 일부 예에서, 본원에 기재된 제약 조성물은 문헌 [Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980)]; 및 미국 특허 번호 4,485,045 및 4,544,545에 기재된 바와 같은 임의의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있는 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체를 함유하는 리포솜을 포함한다. 증진된 순환 시간을 갖는 리포솜이 미국 특허 번호 5,013,556에 개시되어 있다. 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용한 역상 증발 방법에 의해 생성될 수 있다. 리포솜은 규정된 세공 크기의 필터를 통해 압출되어 바람직한 직경을 갖는 리포솜을 생성한다.

[0296] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 아주반트를 포함할 수 있거나 또는 그와 함께 사용될 수 있다. 특정 아주반트는 예를 들어 종양 항원에 대한 대상체의 면역 반응을 부스팅하고, T이펙터 기능, 단핵구로부터의 DC 분화, 증진된 항원 섭취 및 APC에 의한 제시 등을 용이하게 할 수 있다. 적합한 아주반트는 레티노산-기반 아주반트 및 그의 유도체, 수중유 에멀젼-기반 아주반트, 예컨대 MF59 및 다른 스쿠알렌-함유 아주반트, 톨-유사 수용체 (TRL) 리간드, α-토코페롤 (비타민 E) 및 그의 유도체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0297] GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 예를 들어 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀젼, 나노-입자 및 나노캡슐)에 또는 마크로에멀젼에 포획될 수 있다. 예시적인 기술은 이전에 기재되었으며, 예를 들어, 문헌 [Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)]을 참조한다.

[0298] 다른 예에서, 본원에 기재된 제약 조성물은 지속-방출 포맷으로 제제화될 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하며, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐 형태이다. 지속-방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산 및 7 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체 예컨대 루프론 데포(LUPRON DEPOT)™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능한 마이크로구체), 수크로스 아세테이트 이소부티레이트, 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다.

[0299] 생체내 투여에 사용될 제약 조성물은 멸균되어야 한다. 이는 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다. 치료 항체 조성물은 일반적으로 멸균 접근 포트를 갖는 용기, 예를 들어, 피하 주사 바늘에 의해 관통될 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알 내에 놓인다.

[0300] 본원에 기재된 제약 조성물은 경구, 비경구 또는 직장 투여, 또는 흡입 또는 취입에 의한 투여를 위한 단위 투여 형태 예컨대 정제, 환제, 캡슐, 분말, 과립, 용액 또는 현탁액, 또는 좌제로 존재할 수 있다.

[0301] 고체 조성물 예컨대 정제를 제조하기 위해, 주요 활성 성분을 제약 담체, 예를 들어, 통상적인 정제화 성분 예컨대 옥수수 전분, 락토스, 수크로스, 소르비톨, 활석, 스테아르산, 스테아르산마그네슘, 인산이칼슘 또는 검, 및 다른 제약 희석제, 예를 들어, 물과 혼합하여, 본 개시내용의 화합물 또는 그의 비-독성 제약상 허용되는 염의 균질 혼합물을 함유하는 고체 예비제제 조성물을 형성할 수 있다. 이들 예비제제 조성물을 균질한 것으로서 언급하는 경우에, 이는 조성물이 동등하게 효과적인 단위 투여 형태 예컨대 정제, 환제 및 캡슐로 용이하게 세분될 수 있도록 활성 성분이 조성물 전반에 걸쳐 균일하게 분산되는 것을 의미한다. 이어서, 이러한 고체 예비제제 조성물을 0.1 mg 내지 약 500 mg의 본 개시내용의 활성 성분을 함유하는 상기 기재된 유형의 단위 투여 형태로 세분한다. 신규 조성물의 정제 또는 환제를 코팅하거나 또는 달리 배합하여 장기 작용의 이점을 제공하는 투여 형태를 제공할 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 환제가 내부 투여 및 외부 투여 성분을 포함할 수 있으며, 후자는 전자의 외피 형태이다. 2종의 성분은 위에서의 붕해에 저항하는 역할을 하고 내부 성분이 무손상 상태로 십이지장 내로 통과하도록 또는 방출이 지연되도록 허용하는 장용 층에 의해 분리될 수 있다. 다양한 물질이 이러한 장용 층 또는 코팅에 사용될 수 있으며, 이러한 물질은 다수의 중합체 산, 및 중합체 산과 쉘락, 세틸 알콜 및 셀룰로스 아세테이트와 같은 물질의 혼합물을 포함한다.

[0302] 적합한 표면-활성제는 특히, 비-이온성 작용제, 예컨대 폴리옥시에틸렌소르비탄 (예를 들어, 트윈™ 20, 40, 60, 80 또는 85) 및 다른 소르비탄 (예를 들어, 스팬(Span)™ 20, 40, 60, 80 또는 85)을 포함한다. 표면-활성제를 갖는 조성물은 편리하게는 0.05 내지 5%의 표면-활성제를 포함할 것이고, 0.1 내지 2.5%일 수 있다. 필요한 경우, 다른 성분, 예를 들어 만니톨 또는 다른 제약상 허용되는 비히클이 첨가될 수 있음이 인지될 것이다.

[0303] 적합한 에멀젼은 상업적으로 입수가능한 지방 에멀젼, 예컨대 인트라리피드(Intralipid)™, 리포신(Liposyn)™, 인포누트롤(Infonutrol)™, 리포푼딘(Lipofundin)™ 및 리피피산(Lipiphysan)™을 사용하여 제조될 수 있다. 활성 성분은 사전-혼합된 에멀젼 조성물 중에 용해될 수 있거나, 또는 대안적으로 오일 (예를 들어 대두 오일, 홍화 오일, 목화씨 오일, 참깨 오일, 옥수수 오일 또는 아몬드 오일), 및 인지질 (예를 들어 난 인지질, 대두 인지질 또는 대두 레시틴) 및 물과 혼합 시 형성되는 에멀젼 중에 용해될 수 있다. 에멀젼의 긴장성을 조정하기 위해 다른 성분, 예를 들어 글리세롤 또는 글루코스가 첨가될 수 있음이 인지될 것이다. 적합한 에멀젼은 전형적으로 최대 20%의 오일, 예를 들어, 5 내지 20%를 함유할 것이다.

[0304] 에멀젼 조성물은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체와 인트라리피드™ 또는 그의 성분 (대두 오일, 난 인지질, 글리세롤 및 물)을 혼합함으로써 제조된 것들일 수 있다.

[0305] 흡입 또는 취입을 위한 제약 조성물은 제약상 허용되는 수성 또는 유기 용매 또는 그의 혼합물 내의 용액 및 현탁액, 및 분말을 포함한다. 액체 또는 고체 조성물은 상기 제시된 바와 같은 적합한 제약상 허용되는 부형제를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 국부 또는 전신 효과를 위해 경구 또는 비강 호흡 경로에 의해 투여된다.

[0306] 바람직하게는 멸균 제약상 허용되는 용매 중의 조성물은 기체 사용에 의해 연무화될 수 있다. 연무화된 용액은 연무화 장치로부터 직접적으로 호흡될 수 있거나, 또는 연무화 장치가 페이스 마스크, 텐트 또는 간헐성 양압 호흡 기계에 부착될 수 있다. 제제를 적절한 방식으로 전달하는 장치로부터, 바람직하게는 경구로 또는 비강으로, 용액, 현탁액 또는 분말 조성물이 투여될 수 있다.

[0307] TGFβ1-선택적, 광범위-억제제를 포함하는 요법에 반응할 가능성이 있는 치료 적응증 및/또는 대상체의 선택

[0308] TGFβ1의 이소형-특이적 콘텍스트-허용성 억제제, 예컨대 본원에 기재된 것이 유리한 효과를 가질 가능성이 있는 적합한 적응증 및/또는 환자 집단의 확인/선택에 대한 2개의 의문이 생길 수 있다: i) 질환이 인간에서 다른 이소형에 비해 우세하게 TGFβ1 이소형에 의해 유도되거나 그에 의존성인지; 및, ii) 질환이 TGFβ1 기능의 다중 측면의 조절이상을 수반하는지.

[0309] 3종의 알려져 있는 TGFβ 이소형, 즉, TGFβ1, TGFβ2, 및 TGFβ3의 차등 발현은 다양한 조직에서 정상 (건강; 항상성) 뿐만 아니라 질환 상태 하에 관찰되었다. 그럼에도 불구하고, 이소형 선택성의 개념은 다중 이소형에 걸쳐 TGFβ의 범-억제를 선호하는 통상적인 접근법에 의해 완전히 이용되지도 달성되지도 않았다. 더욱이, 이소형의 발현 패턴은 정상 (항상성) vs, 비정상 (병리학적) 상태, 뿐만 아니라 환자의 상이한 하위집단에서 차등 조절될 수 있다. 대부분의 전임상 연구가 제한된 수의 동물 모델에서 수행되기 때문에, 이러한 모델을 사용하여 수득된 데이터는 편향되어, 인간 상태에 대한 적용성에 관해 데이터의 오역 또는 잘못된 결론에 도달할 수 있다.

[0310] 따라서, 본 발명은 TGFβ 이소형의 차등 발현이 특정한 억제제의 유효성을 예측함에 있어서, 뿐만 아니라 인간 상태로의 번역가능성에 관한 전임상 데이터를 해석함에 있어서 고려되어야 한다. 도 21에 예시된 바와 같이, TGFβ1 및 TGFβ3은 전임상 연구에 널리 사용되는 특정 뮤린 동계 암 모델 (예를 들어, EMT-6 및 4T1)에서 공동-우세하다. 대조적으로, 수많은 다른 암 모델 (예를 들어, S91, B16 및 MBT-2)은 많은 인간 종양에서 관찰되는 것과 유사하게 거의 독점적으로 TGFβ1을 발현하며, 여기서 TGFβ1은 TGFβ2/3에 비해 보다 빈번하게 우세한 이소형인 것으로 보인다. 게다가, 항상성 조건 하에 우세하게 발현된 TGFβ 이소형(들)은 질환-연관 이소형(들)이 아닐 수 있다. 예를 들어, 건강한 래트에서의 정상 폐 조직에서, 긴장성 TGFβ 신호전달은 주로 TGFβ3에 의해 매개되는 것으로 보인다. 그러나, TGFβ1은 질환 상태, 예컨대 폐 섬유증에서 현저하게 상향조절되는 것으로 보인다. 종합하면, 환자가 반응할 가능성이 있는 적합한 치료제를 선택하도록 임상 샘플에서 TGFβ 이소형의 상대 발현을 시험 또는 확인하는 것이 유익하다.

[0311] 본원에 기재된 바와 같이, 이소형-선택적 TGFβ1 억제제는 TGFβ1 이소형이 다른 이소형에 비해 우세하게 발현되는 질환의 치료에 특히 유리하다. 한 예로서, 도 21d는 TGF1 (좌측), TGFβ2 (중앙) 및 TGFβ3 (우측)의 상

대 발현 수준을 갖는 인간 암 임상 샘플의 비제한적 목록을 제공한다. 3종의 이소형을 가로지르는 각각의 수평선은 단일 환자를 나타낸다. 볼 수 있는 바와 같이, 전반적 TGFβ1 발현은 많은 종양 유형에 걸쳐 다른 2종의 이소형보다 대부분의 이들 인간 종양에서 유의하게 더 높았으며, 이는 TGFβ1-선택적 억제가 유익할 수 있다는 것을 시사한다. 그러나, 특정 예외를 유의하여야 한다. 첫째로, 이러한 경향은 특정 개별 환자에서 항상 적용 가능하지는 않다. 즉, 거의 일관적으로 TGFβ2/3에 비한 TGFβ1 우세를 보여주는 암 유형에서도, 이 일반적 규칙을 따르지 않는 몇몇 개체가 존재한다. 따라서 소수 하위집단 내에 속하는 환자는 대다수의 환자에서 작동하는 방식으로 이소형-특이적 억제제 요법에 반응하지 않을 수 있다. 두번째로, TGFβ1이 또 다른 이소형과 공동-우세하거나 또는 TGFβ2 및/또는 TGFβ3 발현이 TGFβ1보다 유의하게 더 큰 몇몇 암 유형이 존재한다. 이들 상황에서, TGFβ1-선택적 억제제 예컨대 본원에 기재된 것들은 효과적일 가능성이 없다. 따라서, 개별 환자로부터 수집된 임상 샘플에서 3종의 TGFβ 이소형 (즉, TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3)의 상대 발현 수준을 시험 또는 확인하는 것이 유익하다. 이러한 정보는 개별 환자에서의 특정한 요법의 유효성에 관해 더 나은 예측을 제공할 수 있으며, 이는 임상 반응의 가능성을 증가시키기 위한 적절한 치료 (예를 들어, 개별화된 치료)의 선택을 보장하는 것을 도울 수 있다.

[0312] 따라서, 본 발명은 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제를 포함하는 요법에 반응할 가능성이 있는 환자 집단 또는 대상체를 선택하는 방법을 포함한다. 이러한 방법은 대상체로부터 수집된 생물학적 샘플 (예를 들어, 임상 샘플)을 제공하는 단계, 샘플에서 TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3의 상대 수준을 결정 (예를 들어, 측정 또는 검정)하는 단계, 및, TGFβ1이 TGFβ2 및 TGFβ3보다 우세한 이소형인 경우; 및/또는, TGFβ1이 대조군과 비교하여 유의하게 과다발현되거나 상향조절된 경우에 대상체에게 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 이소형의 상대 수준은 관련 기술분야에 널리 공지된 RNA-기반 검정 및/또는 단백질-기반 검정에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여 단계는 또한 또 다른 요법, 예컨대 면역 체크포인트 억제제, 또는 본원의 다른 곳에 제공된 다른 작용제를 포함할 수 있다. 이러한 방법은 2개 이상의 시점에서의 TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3의 상대 수준의 변화를 모니터링함으로써 치료 반응을 평가하는 단계를 임의로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 임상 샘플 (예컨대 생검)은 투여 전 및 후 둘 다에 수집된다. 일부 실시양태에서, 임상 샘플 (예컨대 생검)은 시간 경과에 따른 생체내 효과를 평가하기 위해 치료 후에 다수회 수집된다.

[0313] 이소형 특이성의 측면으로 도출된 첫번째 의문에 더하여, 두번째 의문은 특정한 질환에 수반되는 TGFβ1 기능의 폭을 조사한다. 이는 TGFβ1 콘텍스트, 즉, 제시 분자(들)가 질환-연관 TGFβ1 기능을 매개하는 것의 수에 의해 제시될 수 있다. TGFβ1-특이적, 광범위한-콘텍스트 억제제, 예컨대 콘텍스트-허용성 및 콘텍스트-비의존성 억제제는 TGFβ1 기능의 ECM 성분 및 면역 성분 둘 다를 수반하는 질환의 치료에 유리하다. 이러한 질환은 ECM에서의 조절이상뿐만 아니라 면역 세포 기능 또는 면역 반응에서의 교란과 연관될 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 TGFβ1 억제제는 ECM-연관 TGFβ1 (예를 들어, LTBP1 또는 LTBP3에 의해 제시됨)뿐만 아니라 면역 세포-연관 TGFβ1 (예를 들어, GARP 또는 LRRC33에 의해 제시됨)을 표적화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 억제제는 하기 치료 표적 (예를 들어, "콘텍스트-허용성" 억제제): GARP-연관 프로/잠복 TGFβ1; LRRC33-연관 프로/잠복 TGFβ1; LTBP1-연관 프로/잠복 TGFβ1; 및, LTBP3-연관 프로/잠복 TGFβ1 중 적어도 3종을 표적화한다. 일부 실시양태에서, 이러한 억제제는 치료 표적 (예를 들어, "콘텍스트-비의존성" 억제제): GARP-연관 프로/잠복 TGFβ1; LRRC33-연관 프로/잠복 TGFβ1; LTBP1-연관 프로/잠복 TGFβ1; 및, LTBP3-연관 프로/잠복 TGFβ1 중 4종 모두를 억제하여 이들 콘텍스트에서 TGFβ1 기능을 광범위하게 억제한다.

[0314] 환자의 특정한 상태가 TGFβ1 기능의 다중 측면을 수반하거나 또는 그에 의해 유도되는지 아닌지는 환자로부터 수집된 임상 샘플에서의 제시 분자의 발현 프로파일을 평가함으로써 평가될 수 있다. 발현 프로파일을 수득하기 위해 수행될 수 있는 다양한 검정, 예컨대 RNA-기반 검정 및 단백질 기반 검정이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 샘플(들)에서의 LTBP1, LTBP3, GARP, 및 LRRC33의 상대 발현 수준 (및/또는 그의 변화/변경)은 상태와 연관된 TGFβ1 활성의 공급원 및/또는 콘텍스트를 나타낼 수 있다. 예를 들어, 고형 종양으로부터 채취한 생검 샘플은 모든 4종의 제시 분자의 높은 발현을 나타낼 수 있다. 예를 들어, LTBP1 및 LTBP3은 종양 기질 내의 CAF에서 고도고 발현될 수 있으며, GARP 및 LRRC33은 종양-연관 면역 세포, 예컨대 각각 Treg 및 백혈구 침윤물에 의해 고도로 발현될 수 있다.

[0315] 따라서, 본 발명은 TGFβ2 및 TGFβ3에 비해 질환에서의 TGFβ1의 수반을 결정 (예를 들어, 시험 또는 확인)하는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 질환-연관 TGFβ1의 공급원 (또는 콘텍스트)을 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 공급원/콘텍스트는 환자로부터 채취한 임상 샘플에서의 TGFβ 제시 분자, 예를 들어, LTBP1, LTBP3, GARP 및 LRRC33의 발현을 결정함으로써 평가된다.

[0316] 이소형-선택적 TGFβ1 억제제, 예컨대 본원에 기재된 것들은 인간 대상체에서의 TGFβ1 조절이상 (즉, TGFβ1-관련 적응증)과 연관된 매우 다양한 질환, 장애 및/또는 상태를 치료하는 데 사용될 수 있다. 본원에 사용된 "TGFβ1 조절이상과 연관된 질환 (장애 또는 상태)" 또는 "TGFβ1-관련 적응증"은 TGFβ1의 발현, 활성 및/또는 대사와 관련된 임의의 질환, 장애 및/또는 상태, 또는 TGFβ1의 활성 및/또는 수준의 억제로부터 이익을 얻을 수 있는 임의의 질환, 장애 및/또는 상태를 의미한다.

[0317] 따라서, 본 발명은 인간 대상체에서의 TGFβ1 조절이상과 연관된 질환을 치료하는 방법에서의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제의 용도를 포함한다. 이러한 억제제는 전형적으로 제약상 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 제약 조성물로 제제화된다. 유리하게는, 억제제는 생체내에서 ECM-연관 TGFβ1 및 면역 세포-연관 TGFβ1 둘 다를 표적화하지만 TGFβ2 또는 TGFβ3을 표적화하지는 않는다. 일부 실시양태에서, 억제제는 TGFβ1의 활성화 단계를 억제한다. 질환은 하기 속성 중 적어도 2가지에서의 조절이상 또는 장애를 특징으로 한다: a) 조절 T 세포 (Treg); b) 이펙터 T 세포 (Teff) 증식 또는 기능; c) 골수 세포 증식 또는 분화; d) 단핵구 동원 또는 분화; e) 대식세포 기능; f) 상피-에서-중간엽 이행 (EMT) 및/또는 내피-에서-중간엽 이행 (EndMT); g) PAI-1, ACTA2, CCL2, Col1a1, Col3a1, FN-1, CTGF, 및 TGFβ1로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커 유전자 중 1종 이상에서의 유전자 발현; h) ECM 성분 또는 기능; i) 섬유모세포 분화. 치료 유효량의 이러한 억제제가 질환을 앓고 있거나 또는 질환으로 진단된 대상체에게 투여된다.

[0318] 일부 실시양태에서, 질환은 증가된 콜라겐 I 침착을 나타내는 ECM 성분 또는 기능 성분의 조절이상 또는 장애를 수반한다.

[0319] 일부 실시양태에서, 섬유모세포 분화의 조절이상 또는 장애는 증가된 근섬유모세포 또는 근섬유모세포-유사 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 근섬유모세포 또는 근섬유모세포-유사 세포는 암-연관 섬유모세포 (CAF)이다. 일부 실시양태에서, CAF는 종양 기질과 연관되고, CCL2/MCP-1 및/또는 CXCL12/SDF-1을 생산할 수 있다.

[0320] 일부 실시양태에서, 조절 T 세포의 조절이상 또는 장애는 증가된 Treg 활성을 포함한다.

[0321] 일부 실시양태에서, 이펙터 T 세포 (Teff) 증식 또는 기능의 조절이상 또는 장애는 억제된 CD4+/CD8+ 세포 증식을 포함한다.

[0322] 일부 실시양태에서, 골수 세포 증식 또는 분화의 조절이상 또는 장애는 골수 전구세포 세포의 증가된 증식을 포함한다. 골수 세포의 증가된 증식은 골수에서 발생할 수 있다.

[0323] 일부 실시양태에서, 단핵구 분화의 조절이상 또는 장애는 질환 부위, 예컨대 섬유화 조직 및/또는 고형 종양에서 골수-유래 및/또는 조직 상주 단핵구의 대식세포로의 증가된 분화를 포함한다.

[0324] 일부 실시양태에서, 단핵구 동원의 조절이상 또는 장애는 질환 부위 예컨대 TME로의 증가된 골수-유래 단핵구 동원을 포함하며, 이는 증가된 대식세포 분화 및 M2 분극에 이은 증가된 TAM으로 이어진다.

[0325] 일부 실시양태에서, 대식세포 기능의 조절이상 또는 장애는 대식세포의 M2 표현형으로의 증가된 분극을 포함한다.

[0326] 일부 실시양태에서, 골수 세포 증식 또는 분화의 조절이상 또는 장애는 증가된 수의 Treg, MDSC 및/또는 TAN을 포함한다.

[0327] TGFβ-관련 적응증은 부분적으로 이펙터 면역 세포 (예를 들어, CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포)를 배제함으로써 신체의 정상 방어 메카니즘/면역을 억제하는 면역-배제 질환 미세환경, 예컨대 종양 또는 암성 조직을 포함하는 상태를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 면역-배제 상태는 치료에 대한 불량한 반응성과 연관된다. 특정한 이론에 얽매이는 것을 의도하지는 않지만, TGFβ 억제제, 예컨대 본원에 기재된 것들은 T 세포 접근을 회복시킴으로써 항암 면역을 배제하는 종양의 능력에 대응하는 것을 도울 수 있다.

[0328] TGFβ-관련 적응증의 비제한적 예는 기관 섬유증 (예를 들어, 신장 섬유증, 간 섬유증, 심장/심혈관 섬유증 및 폐 섬유증)을 포함한 섬유증, 알포트 증후군, 암 (혈액암 예컨대 백혈병, 골수섬유증, 다발성 골수종, 결장암, 신암, 유방암, 악성 흑색종, 교모세포종을 포함하나 이에 제한되지는 않음), 고형 종양과 연관된 섬유증 (예를 들어, 암 결합조직형성, 예컨대 결합조직형성 흑색종, 췌장암-연관 결합조직형성 및 유방 암종 결합조직형성), 기질 섬유증 (예를 들어, 유방의 기질 섬유증), 방사선-유발된 섬유증 (예를 들어, 방사선 섬유증 증후군), 화학요법 후 급속 조혈의 촉진, 골 치유, 상처 치유, 치매, 골수섬유증, 골수이형성증 (예를 들어, 골수이형성 증후군 또는 MDS), 신질환 (예를 들어, 말기 신질환 또는 ESRD), 일측성 요관 폐쇄 (UUO), 치아 손실 및/또는 변성, 내피 증식 증후군, 천식 및 알레르기, 위장 장애, 노화의 빈혈, 대동맥류, 고아 적응증 (예컨대 마르팡 증

후군 및 카무라티-엥겔만 질환), 비만, 당뇨병, 관절염, 다발성 경화증, 근육 이영양증, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 파킨슨병, 골다공증, 골관절염, 골감소증, 대사 증후군, 영양 장애, 기관 위축, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 및 식욕부진을 포함한다. 추가의 적응증은 미국 공개 번호 2013/0122007, 미국 특허 번호 8,415,459 또는 국제 공개 번호 WO 2011/151432에 개시된 것들 중 임의의 것을 포함할 수 있으며, 이들 각각의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0329] 바람직한 실시양태에서, 본 개시내용의 항체, 그의 항원 결합 부분, 및 조성물은 TGFβ1 신호전달과 연관된 매우 다양한 질환, 장애 및/또는 상태를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 조직/세포는 다른 이소형보다 TGFβ1 이소형을 우선적으로 발현한다. 따라서, 본 발명은 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 제약 조성물을 사용하여 TGFβ1 발현 (예를 들어, TGFβ1 신호전달의 조절이상 및/또는 TGFβ1 발현의 상향조절)과 연관된 이러한 상태를 치료하는 방법을 포함한다.

[0330] 일부 실시양태에서, 질환은 다중 세포 공급원과 연관된 (예를 들어, 그에 제시된 또는 그로부터 침착된) TGFβ1을 수반한다. 일부 실시양태에서, 이러한 질환은 TGFβ1 기능의 면역 성분 및 ECM 성분 둘 다를 수반한다. 일부 실시양태에서, 이러한 질환은 i) ECM의 조절이상 (예를 들어, ECM 성분 예컨대 콜라겐 및 프로테아제의 과다생산/침착; ECM 기질의 변경된 강성; 섬유모세포, 예컨대 근섬유모세포 및 CAF의 비정상적 또는 병리학적 활성화 또는 분화); ii) 증가된 Treg 및/또는 억제된 이펙터 T 세포 (Teff), 예를 들어, Treg/Teff의 상승된 비로 인한 면역 억제; CD4 및/또는 CD8 T 세포의 억제를 유발하는 증가된 백혈구 침윤물 (예를 들어, 대식세포 및 MDSC); 및/또는 iii) 골수 세포, 예컨대 대식세포 (예를 들어, 골수-유래 단핵구/대식세포 및 조직 상주 대식세포), 단핵구, 골수-유래 억제제 세포 (MDSC), 호중구, 수지상 세포, 및 NK 세포의 비정상적 또는 병리학적 활성화, 분화, 및/또는 동원을 수반한다.

[0331] 일부 실시양태에서, 상태는 1종 초과의 유형의 제시 분자 (예를 들어, GAPR, LRRC33, LTBP1 및/또는 LTBP3 중 2종 이상)에 의해 제시된 TGFβ1을 수반한다. 일부 실시양태에서, 이환 조직/기관/세포는 다중 세포 공급원으로부터의 TGFβ1을 포함한다. 하나의 예를 들자면, 고형 종양 (이는 골수를 수반하는 증식성 질환, 예를 들어, 골수섬유증 및 다발성 골수종을 포함할 수 있음)은 상이한 유형의 제시 분자를 수반하는 다중 공급원, 예컨대 암 세포, 기질 세포, 주위 건강한 세포, 및/또는 침윤 면역 세포 (예를 들어, CD45+ 백혈구)로부터의 TGFβ1을 포함할 수 있다. 적절한 면역 세포는 골수 세포 및 림프성 세포, 예를 들어, 호중구, 호산구, 호염기구, 림프구 (예를 들어, B 세포, T 세포, 및 NK 세포), 및 단핵구를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. TGFβ1의 콘텍스트-비의존성 또는 콘텍스트-허용성 억제제는 이러한 상태를 치료하는 데 유용할 수 있다.

[0332] TGFβ1의 이소형-특이적 콘텍스트-허용성 억제제, 예컨대 본원에 기재된 항체 또는 그의 단편으로 치료될 수 있는 상태 또는 장애의 비제한적 예는 하기에 제공된다.

[0333] 이상 유전자 발현을 갖는 질환:

[0334] 다양한 질환 상태에서의 TGFβ1 신호 전달 경로의 비정상적 활성화는 다수의 마커의 변경된 유전자 발현과 연관되는 것으로 관찰되었다. 이들 유전자 발현 마커 (예를 들어, mRNA에 의해 측정 시)는 세르핀1 (PAI-1를 코딩함), MCP-1 (CCL2로도 알려짐), Col1a1, Col3a1, FN1, TGFβ1, CTGF, 및 ACTA2 (α-SMA를 코딩함)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 흥미롭게도, 이들 유전자 중 다수가 다양한 유형의 기관 섬유증을 포함한 다양한 세트의 질환 상태에서, 뿐만 아니라 골수섬유증을 포함하는 많은 암에서 역할을 하는 것으로 연루된다. 사실상, 섬유화 상태와 비정상적 세포 증식 사이, 종양발생과 전이 사이의 병리생리학적 연관성이 제안되었다. 예를 들어, 문헌 [Cox and Erler (2014) Clinical Cncer Research 20(14): 3637-43 "Molecular pathways: connecting fibrosis and solid tumor metastasis"; Shiga et al. (2015) Cancers 7:2443-2458 "Cancer-associated fibroblasts: their characteristics and their roles in tumor growth"; Wynn and Barron (2010) Semin. Liver Dis. 30(3): 245-257 "Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis"]을 참조하며, 이들 내용은 본원에 참조로 포함된다. 특정한 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, 본 개시내용의 발명자들은 TGFβ1 신호전달 경로가 사실 이들 광범위한 병리상태 사이의 주요 연관성일 수 있다는 것을 고려한다.

[0335] 예를 들어, MCP-1/CCL2는 섬유증 및 암 둘 다에서 역할을 하는 것으로 생각된다. MCP-1/CCL2는 섬유화유발 케모카인 및 단핵구 화학유인물질으로서 특징화되고, 증거는 그것이 암의 개시 및 진행 둘 다에 수반될 수 있다는 것을 시사한다. 섬유증에서, MCP-1/CCL2는 섬유증의 염증성 기에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, MCP-1의 중화는 제I형 콜라겐의 사구체 초승달 형성 및 침착에서 극적인 감소를 발생시켰다.

[0336] 단핵구/대식세포를 동원하는 MCP-1/CCL2의 능력은 암 진행에서 중대한 결과를 갖는다. 종양-유래 MCP-1/CCL2는

대식세포에서 "암-유발" 표현형을 촉진할 수 있다. 예를 들어, 폐암에서, MCP-1/CCL2는 기질 세포에 의해 생산되고 전이를 촉진하는 것으로 밝혀졌다. 인간 췌장암에서, 종양은 CCL2를 분비하고, 면역 억제 CCR2-양성 대식세포가 이들 종양을 침윤한다. 높은 CCL2 발현/낮은 CD8 T-세포 침윤을 나타내는 종양을 갖는 환자는 유의하게 감소된 생존을 갖는다.

[0337] 유사하게, PAI-1/세르핀1의 수반은 다양한 암, 혈관신생, 염증, 신경변성 질환 (예를 들어, 알츠하이머병)에 연루되어 왔다. 종양 및/또는 혈청에서의 PAI-1의 상승된 발현은 다양한 암, 예컨대 유방암 및 방광암 (예를 들어, 이행 세포 암종)뿐만 아니라 골수섬유증에서의 불량한 예후 (예를 들어, 보다 짧은 생존, 증가된 전이)와 상관관계가 있다. 섬유화 상태와 관련하여, PAI-1은 TGFβ1-유발된 섬유증의 중요한 하류 이펙터로서 인식되었고, 증가된 PAI-1 발현은 폐 섬유증 (예컨대 IPF), 신장 섬유증, 간 섬유증 및 경피증을 포함한 다양한 형태의 조직 섬유증에서 관찰되었다.

[0338] 일부 실시양태에서, TGFβ1 억제제 요법의 생체내 효과는 유전자 마커의 변화를 측정함으로써 평가될 수 있다. 적합한 마커는 TGFβ (예를 들어, TGFβ1, TGFβ2, 및 TGFβ3)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적합한 마커는 중간엽 이행 유전자 (예를 들어, AXL, ROR2, WNT5A, LOXL2, TWIST2, TAGLN, 및/또는 FAP), 면역억제 유전자 (예를 들어, IL10, VEGFA, VEGFC), 단핵구 및 대식세포 화학주성 유전자 (예를 들어, CCL2, CCL7, CCL8 및 CCL13), 및/또는 본원에 논의된 다양한 섬유화 마커를 포함한다. 바람직한 마커는 혈장 마커이다.

[0339] 본원의 실시예에 제시된 바와 같이, 본원에 기재된 TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-비의존성 억제제는 TGFβ1-의존성인 것으로 밝혀진 기계론적 동물 모델, 예컨대 UUO에서 이들 마커 중 다수의 발현 수준을 감소시킬 수 있다. 따라서, 이러한 억제제는 유전자 발현 마커 중 1종 이상의 비정상적 발현 (예를 들어, 과다발현/상향조절 또는 과소발현/하향조절)을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0340] 따라서, 일부 실시양태에서, TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 또는 콘텍스트-비의존성 억제제는 하기: PAI-1 (세르핀1로도 알려짐), MCP-1 (CCL2로도 알려짐), Col1a1, Col3a1, FN1, TGFβ1, CTGF, α-SMA, ITGA11, 및 ACTA2 중 1종 이상의 과다발현과 연관된 질환의 치료에 사용되며, 여기서 치료는 억제제를 질환을 앓고 있는 대상체에게 질환을 치료하기에 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 억제제는 PAI-1, MCP-1/CCL2, CTGF 및/또는 α-SMA의 과다발현과 연관된 질환을 치료하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 질환은 골수섬유증이다. 일부 실시양태에서, 질환은 암, 예를 들어, 고형 종양을 포함하는 암이다. 일부 실시양태에서, 질환은 기관 섬유증, 예를 들어, 간, 신장, 폐 및/또는 심장 또는 심혈관 조직의 섬유증이다.

[0341] 프로테아제를 수반하는 질환:

[0342] 그의 잠복 복합체로부터의 TGFβ의 활성화는 인테그린에 의해 힘-의존성 방식으로, 및/또는 프로테아제에 의해 촉발될 수 있다. 증거는 Ser/Thr 프로테아제 예컨대 칼리크레인, 키모트립신, 엘라스타제, 플라스민, 뿐만 아니라 아연 메탈로프로테아제인 MMP 패밀리, 예컨대 MMP-2, MMP-9 및 MMP-13을 포함하나 이에 제한되지는 않는 특정 부류의 프로테아제가 과정에 수반될 수 있다는 것을 시사한다. MMP-2는 기저막의 가장 풍부한 성분인 콜라겐 IV를 분해하여, 그것이 ECM-연관 TGFβ1 조절에서 역할을 할 수 있는 가능성을 높인다. MMP-9는 종양 진행, 혈관신생, 기질 재형성 및 전이에서 중추적 역할을 하는 것으로 연루되어 왔다. 따라서, ECM에서의 TGFβ1의 프로테아제-의존성 활성화는 암을 치료하기 위해 중요할 수 있다.

[0343] 칼리크레인 (KLK)은 혈장 칼리크레인 및 조직 칼리크레인을 포함하는 트립신- 또는 키모트립신-유사 세린 프로테아제이다. ECM은 악성 성장물을 억제하기 위한 구조적 및 신호전달 스캐폴드 및 장벽으로서 작용하는 조직 항상성에서 역할을 한다. KLK는 종양 확장 및 침습을 용이하게 할 수 있는 ECM 단백질 및 다른 성분을 분해함에 있어서 역할을 할 수 있다. 예를 들어, KLK1은 특정 유방암에서 고도로 상향조절되고, 프로-MMP-2 및 프로-MMP-9를 활성화시킬 수 있다. KLK2는 잠복 TGFβ1을 활성화시켜, 섬유모세포에 인접한 전립선암이 암 성장에 허용성이 되도록 한다. KLK3은 전립선암에 대한 진단 마커 (PSA)로서 널리 연구되었다. KLK3은 플라스미노겐을 플라스민으로 프로세싱함으로써 TGFβ1을 직접적으로 활성화시킬 수 있으며, 이는 LAP를 단백질분해적으로 절단한다. KLK6은 알츠하이머병에 대한 잠재적 마커일 수 있다.

[0344] 더욱이, 실시예 8에 제공된 데이터는 이러한 프로테아제가 칼리크레인일 수 있다는 것을 나타낸다. 따라서, 본 발명은 칼리크레인 또는 칼리크레인-유사 프로테아제와 연관된 질환을 치료하는 방법에서의 TGFβ의 이소형-특이적, 콘텍스트-비의존성 또는 허용성 억제제의 용도를 포괄한다.

[0345] TGFβ1의 알려져 있는 활성화제, 예컨대 플라스민, TSP-1 및 αVβ6 인테그린 모두는 LAP와 직접적으로 상호작용한다. LAP의 단백질분해적 절단은 LAP-TGFβ 상호작용을 탈안정화시킴으로써 활성 TGFβ1을 방출할 수 있는

것으로 상정된다. 54-LSKLRL-59를 함유하는 영역은 TGFβ1 잠복기를 유지하기 위해 중요한 것으로 시사되었다. 따라서, 상호작용을 안정화시키거나, 또는 LAP의 단백질분해적 절단을 차단하는 작용제 (예를 들어, 항체)는 TGFβ 활성화를 막을 수 있다.

[0346] 상피-에서-중간엽 이행 (EMT)을 수반하는 질환:

[0347] EMT (상피 중간엽 이행)는 치밀 접합부를 갖는 상피 세포가 중간엽 특성 (표현형) 예컨대 느슨한 세포-세포 접촉으로 전환되는 과정이다. 과정은 다수의 정상 생물학적 과정뿐만 아니라 배아발생, 상처 치유, 암 전이 및 섬유증을 포함한 병리학적 상황에서 관찰된다 (예를 들어, 문헌 [Shiga et al. (2015) "Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth." Cancers, 7: 2443-2458]에서 검토됨). 일반적으로, EMT 신호는 주로 TGFβ에 의해 유발되는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 많은 유형의 암은 보다 불량한 예후와 상관관계가 있는 중간엽 표현형 (예컨대 CAF)에 대한 세포의 전환분화를 수반하는 것으로 보인다. 따라서, TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제, 예컨대 본원에 기재된 것들은 EMT에 의해 개시 또는 유도되는 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다. 사실상, 본원에 예시된 데이터 (예를 들어, 도 12 및 13)는 이러한 억제제가 생체내에서 CAF 마커, 예컨대 α-SMA, Col1 (제I형 콜라겐)과 FN (피브로넥틴)의 발현을 억제하는 능력을 갖는다는 것을 보여준다.

[0348] 내피-에서-중간엽 이행 (EndMT)을 수반하는 질환:

[0349] 유사하게, TGFβ는 또한 정상 발생, 예컨대 심장 형성에서 관찰되는 내피-에서-중간엽 이행 (EndMT)의 주요 조절인자이다. 그러나, 동일하거나 유사한 현상이 또한 많은 질환, 예컨대 암 기질에서 관찰된다. 일부 질환 과정에서, 내피 마커 예컨대 CD31은 TGFβ1 노출 시에 하향조절되고, 대신에 중간엽 마커 예컨대 FSP-1, α-SMA 및 피브로넥틴의 발현이 유도된다. 사실상, 기질 CAF는 혈관 내피 세포로부터 유래될 수 있다. 따라서, TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제, 예컨대 본원에 기재된 것들은 EndMT에 의해 개시 또는 유도되는 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0350] 매트릭스 강성화 및 재형성을 수반하는 질환:

[0351] 섬유화 상태의 진행은 ECM 내로 침착된 매트릭스 성분의 증가된 수준 및/또는 ECM의 유지/재형성을 수반한다. TGFβ1이 적어도 부분적으로 이 과정에 기여한다. 이는 예를 들어 ECM 성분 예컨대 콜라겐의 증가된 침착이 ECM의 기계물리적 특성 (예를 들어, 매트릭스/기질의 강성)을 변경시킬 수 있고, 이 현상이 TGFβ1 신호전달과 연관된다는 관찰에 의해 지지된다. 이러한 개념을 확인하기 위해, 본 발명자들은 프로TGFβ 및 LTBP1로 형질감염되고 규정된 강성 (예를 들어, 5 kPa, 15 kPa 또는 100 kPa)을 갖는 실리콘-기반 기질 상에서 성장시킨 1차 섬유모세포에서의 TGFβ의 인테그린-의존성 활성화에 영향을 미침에 있어서 매트릭스 강성의 역할을 평가하였다. 하기 실시예 섹션에 요약된 바와 같이, 보다 큰 강성을 갖는 매트릭스는 TGFβ1 활성화를 증진시키고, 이는 TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제, 예컨대 본원에 기재된 것들에 의해 억제될 수 있다. 이들 관찰은 TGFβ1이 ECM 특성 (예컨대 강성)에 영향을 미치며, 차례로 질환 진행을 반영하여 TGFβ1 활성화를 추가로 유발할 수 있다는 것을 시사한다. 따라서, TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제, 예컨대 본원에 기재된 것들은 ECM 변경을 수반하는 질환 진행, 예컨대 섬유증, 종양 성장, 침습, 전이 및 결합조직형성에 대응하기 위한 이러한 과정을 차단하는 데 사용될 수 있다. 이러한 억제제의 LTBP-아암은 LTBP1 및/또는 LTBP3에 의해 제시된 ECM-연관 프로/잠복 TGFβ 복합체를 직접적으로 차단함으로써, 질환 함요에서 복합체로부터의 성장 인자의 활성화/방출을 막을 수 있다. 일부 실시양태에서, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제 예컨대 본원에 기재된 것들은 인테그린-의존성 신호전달을 수반하는 질환을 치료하기 위해 ECM 강성을 정상화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 인테그린은 α11 쇄, β1 쇄, 또는 둘 다를 포함한다.

[0352] 섬유증:

[0353] 본 발명에 따르면, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제 TGFβ1 예컨대 본원에 기재된 것들은 대상체에서 섬유증 (예를 들어, 섬유화 적응증, 섬유화 상태)의 치료에 사용된다. 본 발명을 수행하기에 적합한 억제제는 섬유증을 변경시키거나 또는 호전시키는 데 유용할 수 있는 본 개시내용에 따른 항체 및/또는 조성물을 포함한다. 보다 구체적으로, 이러한 항체 및/또는 조성물은 다양한 유형의 제시 분자에 의해 제시된 TGFβ1을 표적화할 수 있는 TGFβ1의 선택적 길항제이다. TGFβ1은 섬유화 반응의 중앙 조정장치로서 인식된다. TGFβ를 표적화하는 항체는 수많은 전임상 모델에서 섬유증을 감소시킨다. 이러한 항체 및/또는 항체-기반 화합물은 LY2382770 (일라이 릴리(Eli Lilly), 인디애나주 인디애나폴리스)을 포함한다. 미국 특허 번호 US 6,492,497, US 7,151,169, US 7,723,486 및 미국 출원 공개 번호 2011/0008364에 기재된 것들이 또한 포함되며, 이들 각각의

내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 선행 기술 TGFβ 길항제는 예를 들어 TGFβ의 인테그린-의존성 활성화를 표적화하고 차단하는 작용제를 포함한다.

[0354] 그러나, 증거는 이러한 선행 기술 작용제가 이소형-특이적 억제를 매개하지 않을 수 있고 TGFβ2 및/또는 TGFβ3의 정상 기능을 의도치않게 차단함으로써 원치 않는 효과를 유발할 수 있다고 시사한다. 사실상, 본원에 제시된 데이터는 이 개념을 지지한다. 정상 (비이환) 폐 조직은 비교적 낮으나 측정가능한 수준의 TGFβ2 및 TGFβ3을 함유하지만, 현저하게 더 적은 TGFβ1을 함유한다. 이와 비교하여, 특정 질환 상태 예컨대 섬유증에서, TGFβ1은 다른 이소형에 비해 우선적으로 상향조절된다. 바람직하게는, 이러한 상태의 치료에 사용하기 위한 TGFβ 길항제는 조직에서 긴장성 신호전달을 매개하도록 정상적으로 발현된 다른 이소형의 기능을 보존하면서 질환-유발 또는 질환-연관 이소형에 대해서만 그의 억제 활성을 발휘한다. 유리하게는, 하기 실시예 20에서 입증된 바와 같이, 본 개시내용에 의해 포괄되는 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제는 건강한 래트의 기관지폐포 세척 (BAL)에서 거의 효과를 나타내지 않으며, 이는 긴장성 TGFβ 신호전달 (예를 들어, TGFβ2 및/또는 TGFβ3)이 교란되지 않는다는 개념을 지지한다. 대조적으로, 선행 기술 억제제 (LY2109761, 소분자 TGFβ 수용체 길항제, 및 αVβ6 인테그린을 표적화하는 모노클로날 항체) 둘 다는 비-이환 래트 BAL에서의 TGFβ 하류 긴장성 신호전달을 억제하는 것으로 보이며, 이는 이들 억제제가 원치 않는 부작용을 유발할 수 있는 가능성을 높인다. 대안적으로 또는 추가적으로, TGFβ의 인테그린-의존성 활성화를 표적화하고 차단하는 작용제는 다양한 세포 유형에 의해 발현되고 발병기전에서 역할을 하는 수많은 인테그린 유형 중에서, 질환-연관 TGFβ1 활성화를 담당하는 인테그린의 하위세트만을 차단할 수 있다. 게다가, 이러한 길항체가 TGFβ1 이소형의 인테그린-매개 활성화를 선택적으로 차단할 수 있는 경우에도, 다른 방식에 의해 촉발되는 TGFβ1 활성화, 예컨대 프로테아제-의존성 활성화를 차단하는 데 있어서 효과적이지 않을 수 있다. 대조적으로, TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제 예컨대 본원에 기재된 것들은 이소형 선택성을 유지하면서, 특정한 활성화 방식과 무관하게 TGFβ1의 활성화 단계를 막는 것을 목표로 한다.

[0355] 본 개시내용의 항체 및/또는 조성물이 치료적으로 사용될 수 있는 섬유화 적응증은 폐 적응증 (예를 들어 특발성 폐 섬유증 (IPF), 만성 폐쇄성 폐 장애 (COPD), 알레르기성 천식, 급성 폐 손상, 호산구성 식도염, 폐동맥 고혈압 및 화학적 기체-손상), 신장 적응증 (예를 들어, 당뇨병성 사구체경화증, 초점성 분절성 사구체경화증 (FSGS), 만성 신장 질환 (CKD), 신장 이식 및 만성 거부와 연관된 섬유증, IgA 신병증, 및 용혈성 요독성 증후군), 간 섬유증 (예를 들어, 비-알콜성 지방간염 (NASH), 만성 바이러스성 간염, 기생충혈증, 대사의 선천성 이상, 독소-매개 섬유증, 예컨대 알콜 섬유증, 비-알콜성 지방간염-간세포 암종 (NASH-HCC), 원발성 담즙성 간경변증, 및 경화성 담관염), 심혈관 섬유증 (예를 들어, 심근병증, 비대성 심근병증, 아테롬성동맥경화증 및 재협착), 전신 경화증, 피부 섬유증 (예를 들어, 전신 경화증, 미만성 전신 피부 경화증, 경피증, 병리학적 피부 반흔형성, 켈로이드, 수술후 반흔형성, 반흔 교정 수술, 방사선-유발된 반흔형성 및 만성 상처에서의 피부 섬유증) 및 암 또는 속발성 섬유증 (예를 들어 골수섬유증, 두경부암, M7 급성 거핵모구성 백혈병 및 점막염)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본 개시내용의 화합물 및/또는 조성물을 사용하여 치료될 수 있는 섬유증 (변성 장애 포함)과 관련된 다른 질환, 장애 또는 상태는 자궁선근증, 자궁내막증, 마르팡 증후군, 강직 피부 증후군, 경피증, 류마티스 관절염, 골수 섬유증, 크론병, 궤양성 결장염, 전신 홍반성 루푸스, 근육 이영양증 (예컨대 DMD), 파킨슨병, ALS, 듀피트렌 구축, 카무라티-엥겔만 질환, 신경 반흔형성, 치매, 증식성 유리체망막병증, 각막 손상, 녹내장 배액 수술 후 합병증, 및 다발성 경화증을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 많은 이러한 섬유화 적응증은 또한 이환 조직(들)의 염증과 연관되며, 이는 면역 성분의 수반을 나타낸다.

[0356] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및/또는 방법으로 치료될 수 있는 섬유화 적응증은 기관 섬유증, 예컨대 폐의 섬유증 (예를 들어, IPF), 신장의 섬유증 (예를 들어, CKD와 연관된 섬유증), 간의 섬유증, 심장 또는 심장 조직의 섬유증, 피부의 섬유증 (예를 들어, 경피증), 자궁 (예를 들어, 자궁내막, 자궁근층)의 섬유증, 및 골수의 섬유증을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 요법은 환자에서의 기관 이식에 대한 필요를 감소 또는 지연시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 요법은 환자의 생존을 연장시킬 수 있다.

[0357] IPF를 치료하기 위해, 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 환자는 가족성 IPF를 갖는 자 및 산발성 IPF를 갖는 자를 포함한다. 치료 유효량의 TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제를 투여하는 것은 폐 조직에서의 근섬유모세포 축적을 감소시키고, IPF 증상을 감소시키고, 폐 기능을 개선시키거나 유지하고, 생존을 연장시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 억제제는 IPF의 섬유화 환경 내에서의 ECM-연관 TGFβ1 (예를 들어, LTBP1/3에 의해 제시된 프로/잠복 TGFβ1)의 활성화를 차단한다. 억제제는 대식세포-연관 TGFβ1 (예를 들어, LRRC33에 의해 제시된 프로/잠복 TGFβ1)의 활성화를 임의로 추가로 차단할 수 있다 (예를 들어, 폐포 대식세포). 그 결과, 억제제는 피브로넥틴 방출 및 다른 섬유증-연관 인자를 억제할 수 있다.

[0358] 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제 예컨대 본원에 제공된 것들은 간, 예컨대 지방간의 섬유화 상태(예를 들어, NASH)를 치료하는 데 사용될 수 있다. 지방간은 염증이 발생할 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 지방간으로 인한 간의 염증 (즉, 지방간염)은 반흔형성 (섬유증)으로 진행될 수 있으며 이는 이어서 종종 경변증 (간의 구조를 왜곡시키고 그의 기능을 손상시키는 반흔형성)으로 진행된다. 억제제는 따라서 이러한 상태를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 억제제는 간의 섬유화 환경 내에서의 ECM-연관 TGFβ1 (예를 들어, LTBP1/3에 의해 제시된 프로/잠복 TGFβ1)의 활성화를 차단한다. 억제제는 대식세포-연관 TGFβ1 (예를 들어, LRRC33에 의해 제시된 프로/잠복 TGFβ1)의 활성화를 임의로 추가로 차단할 수 있다 (예를 들어, 쿠퍼 세포 (성상 대식세포로도 알려짐)뿐만 아니라 침윤 단세포-유래 대식세포 및 MDSC). 그 결과, 억제제는 섬유증-연관 인자를 억제할 수 있다. 이러한 상태를 갖는 대상체에서의 억제제의 투여는 억제제로 치료되지 않은 대조군 집단과 비교하여, 1종 이상의 증상을 감소시키고/거나, 질환의 진행을 막거나 지연시키고/거나, 간에서의 지방 축적을 감소시키거나 안정화시키고/거나, 질환-연관 바이오마커 (예컨대 혈청 콜라겐 단편)를 감소시키고/거나, 간 반흔형성을 감소시키고/거나, 간 강성을 감소시키고/거나, 달리 억제제로 치료된 환자 집단에서 임상적으로 의미있는 결과를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 유효량의 억제제는 NASH 환자에서 감소된 간 지방 및 감소된 섬유증 (예를 들어, 반흔형성) 둘 다를 달성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 유효량의 억제제는 NASH 환자에서 지방간염을 악화시키지 않으면서 섬유증의 적어도 하나의 병기만큼의 개선을 달성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 유효량의 억제제는 NASH 환자에서 간부전 및/또는 간암의 발생률을 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 유효량의 억제제는 대조군과 비교하여, 요법의 시작 후 예를 들어 12-36주에 평가 시, 다중염증성 또는 섬유화 혈청 바이오마커의 수준을 정상화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서 NASH 환자에서, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제는 미오스타틴 억제제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 1종 이상의 추가의 요법을 받는 환자에서 투여될 수 있으며, 이는 일반적으로 NASH를 포함한 대사 증후군의 임상 징후를 갖는 환자에서 대사 조절을 증진시킬 수 있다.

[0359] 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제 예컨대 본원에 제공된 것들은 사구체 및 세관간질에서의 TGFβ의 유의하게 증가된 발현이 관찰된 신장의 섬유화 상태, 예를 들어, 세포외 매트릭스 축적을 특징으로 하는 질환 (IgA 신병증, 초점성 및 분절성 사구체경화증, 초승달 사구체신염, 루푸스 신염 및 당뇨병성 신병증)을 치료하는 데 사용될 수 있다. TGFβ에 의해 유발된 2종의 매트릭스 성분, 피브로넥틴 EDA+ 및 PAI-1의 사구체 및 세관간질성 침착이 매트릭스 축적을 갖는 모든 질환에서 유의하게 상승하였지만, 상관관계 분석은 주로 TGFβ1 이소형과의 밀접한 관계를 밝혀냈다. 따라서, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제는 TGFβ이 세포외 매트릭스의 병리학적 축적과 연관되는 인간 사구체 장애의 스펙트럼에 대한 치료제로서 유용하다.

[0360] 일부 실시양태에서, 신장의 섬유화 상태는 만성 신장 질환 (CKD)과 연관된다. CKD는 주로 고혈압 또는 당뇨병에 의해 유발되고 매년 백만명 초과의 목숨을 앗아 간다. CKD 환자는 엄격한 식이 및 의약에서 투석 및 이식에 이르는 평생의 의료 관리를 필요로 한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 TGFβ1 억제제 요법은 투석 및/또는 이식에 대한 필요를 감소 또는 지연시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 요법은 다른 치료에 대한 필요 (예를 들어, 투여량, 빈도)를 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제는 미오스타틴 억제제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 1종 이상의 추가의 요법을 받는 환자에서 투여될 수 있으며, 이는 일반적으로 CKD를 갖는 환자에서의 대사 조절을 증진시킬 수 있다.

[0361] 본원에 제공된 방법으로 치료될 수 있는 기관 섬유증은 심장 (예를 들어, 심혈관) 섬유증을 포함한다. 일부 실시양태에서, 심장 섬유증은 심부전, 예를 들어, 만성 심부전 (CHF)과 연관된다. 일부 실시양태에서, 심부전은 심근 질환 및/또는 대사 질환과 연관될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제는 심장 섬유증 및 대사 장애를 수반하는 심장 기능장애를 갖는 환자에서의 미오스타틴 억제제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 1종 이상의 추가의 요법을 받는 환자에서 투여될 수 있다.

[0362] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및/또는 방법으로 치료될 수 있는 섬유화 상태는 결합조직형성을 포함한다. 결합조직형성은 신생물 주위에서 발생하여, 종양 주위의 조밀한 섬유증 (예를 들어, 결합조직형성 기질), 또는 복부 수술 후 복부 내의 반흔 조직을 유발할 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합조직형성은 악성 종양과 연관된다. 악성종양을 둘러싼 그의 조밀한 형성으로 인해, 통상적인 항암 치료제 (예를 들어, 화학요법)는 임상 효과를 위해 암성 세포에 도달하도록 효과적으로 침투하지 않을 수 있다. TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제 예컨대 본원에 기재된 것들은 섬유화 형성이 느슨해져 항암 요법의 효과를 보조하도록 결합조직형성을 방해하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제는 단독요법으로서 사용될 수 있다 (하기 계속).

[0363] 섬유화 상태를 갖는 환자를 치료하기 위해, TGFβ1 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제는 섬유증을 치료하

는 데 효과적인 양으로 대상체에게 투여된다. 이러한 항체의 유효량은 대상체에서 치료 효능 및 임상적 안전성 둘 다를 달성하는 데 효과적인 양이다. 일부 실시양태에서, 억제제는 ECM에 국재화된 (예를 들어, 테더링된) LTBP-매개 TGFβ1 및 면역 세포에 국재화된 GARP-매개 TGFβ1의 활성화를 차단할 수 있는 콘텍스트-허용성 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 ECM에 국재화된 (예를 들어, 테더링된) LTBP-매개 TGFβ1 및 단핵구/대식세포에 국재화된 (예를 들어, 테더링된) LRRC33-매개 TGFβ1의 활성화를 차단할 수 있는 콘텍스트-허용성 항체이다. 일부 실시양태에서, LTBP는 LTBP1 및/또는 LTBP3이다. 일부 실시양태에서, LRRC33에 의해 섬유화 미세환경에서의 섬유화유발, M2-유사 대식세포 상에 제시된 TGFβ1을 표적화 및 억제하는 것이 유익할 수 있다.

[0364] 섬유증의 변경을 위한 본 개시내용의 항체 및/또는 조성물의 효능을 결정하는 데 유용한 검정은 섬유모세포를 계수하기 위한 조직학적 검정 및 관련 기술분야에 공지된 기본적인 면역조직화학적 분석을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0365] 골수섬유증:

[0366] 골-골수섬유증으로도 알려져 있는 골수섬유증은 골수증식성 장애로 불리는 질환 군에 속하는 비교적 드문 골수증식성 장애 (암)이다. 골수섬유증은 골수증식성 신생물의 필라델피아 염색체-음성 (-) 분지로 분류된다. 골수섬유증은 클론 골수증식, 이상 시토카인 생산, 골수외 조혈, 및 골수 섬유증을 특징으로 한다. 골수 및 다른 부위에서의 조혈 줄기 세포의 비정상적 클론의 증식은 섬유증, 또는 골수의 반흔 조직으로의 대체를 발생시킨다. 용어 골수섬유증은 달리 명시되지 않는 한, 원발성 골수섬유증 (PMF)을 지칭한다. 이는 또한 만성 특발성 골수섬유증 (cIMF)으로 지칭될 수 있다 (용어 특발성 및 원발성은 이들 경우에 질환의 기원이 알려지지 않거나 또는 동시적이라는 것을 의미함). 이는 진성 다혈구혈증 또는 본태성 혈소판혈증에 속발성으로 발생하는 골수섬유증과는 대조적이다. 골수섬유증은 골수 화생의 형태이며, 이는 골수의 혈액-형성 조직에서의 세포 유형의 변화를 지칭하고, 종종 2개의 용어는 동의어로 사용된다. 용어 원인불명 골수 화생 및 골수 화생을 동반한 골수섬유증 (MMM)은 또한 원발성 골수섬유증을 지칭하기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따라 치료될 수 있는 혈액 증식성 장애는 골수증식성 장애, 예컨대 골수섬유증을 포함한다. BCR-ABL (Ph) 음성 만성 골수증식성 장애의 소위 "전형적" 군은 본태성 혈소판혈증 (ET), 진성 다혈구혈증 (PV) 및 원발성 골수섬유증 (PMF)을 포함한다.

[0367] 골수섬유증은 신체의 혈액 세포 정상 생산을 방해한다. 결과는 골수에서의 광범위한 반흔형성이며, 이는 중증 빈혈, 쇠약, 피로 및 종종 비대 비장으로 이어진다. 비정상적 조혈 세포 클론에 의한 (특히 거핵구에 의한) 시토카인 예컨대 섬유모세포 성장 인자의 생산은 콜라겐 섬유증을 통한, 골수의 조혈 조직의 결합 조직으로의 대체로 이어진다. 조혈 조직의 감소는 새로운 혈액 세포를 생성하는 환자의 능력을 손상시켜, 모든 혈액 세포 유형이 부족해지는 진행성 범혈구감소증을 발생시킨다. 그러나, 섬유모세포의 증식 및 콜라겐의 침착은 2차 현상인 것으로 생각되고, 섬유모세포 자체는 비정상적 세포 클론의 일부가 아닐 수 있다.

[0368] 골수섬유증은 골수에서의 비정상적 혈액 줄기 세포에 의해 유발될 수 있다. 비정상적 줄기 세포는 빠르게 성장하고 골수를 차지하는 성숙 및 불량하게 분화된 세포를 생산하여, 섬유증 (반흔 조직 형성) 및 만성 염증 둘 다를 유발한다.

[0369] 원발성 골수섬유증은 야누스 키나제 2 (JAK2), 트롬보포이에틴 수용체 (MPL) 및 칼레티쿨린 (CALR)에서의 돌연변이와 연관되며, 이는 JAK-STAT 경로의 구성적 활성화로 이어질 수 있고, 골수의 진행성 반흔형성, 또는 섬유증이 발생한다. 조혈 세포가 다른 영역, 특히 간 및 비장으로 이동하도록 강요되므로, 환자는 골수외 조혈, 즉, 골수 이외의 부위에서 발생하는 혈액 세포 형성을 발생시킬 수 있다. 이는 이들 기관의 비대를 유발한다. 간에서, 비정상적 크기는 간비대로 불린다. 비장의 비대는 비장비대로 불리며, 이는 또한 범혈구감소증, 특히 혈소판감소증 및 빈혈을 유발하는 데 기여한다. 골수외 조혈의 또 다른 합병증은 변형적혈구증가증, 또는 비정상적 형상의 적혈구의 존재이다.

[0370] 골수섬유증에서의 골수외 조혈의 주요 부위는 비장이며, 이는 통상적으로 골수섬유증을 앓고 있는 환자에서 현저하게 비대해진다. 비장의 대규모 비대의 결과로서, 다중 피막하 경색이 종종 비장에서 발생하며, 이는 비장으로의 중단된 산소 공급으로 인해 부분적 또는 완전한 조직 사멸이 발생한다는 것을 의미한다. 세포 수준에서, 비장은 적혈구 전구체, 과립구 전구체 및 거핵구를 함유하며, 거핵구는 그의 수 및 그의 비정상적 형상에 있어서 현저하다. 거핵구는 이러한 상태에서 관찰되는 속발성 섬유증을 유발하는 데 수반될 수 있다.

[0371] TGFβ가 골수섬유증의 발병기전의 섬유화 측면에 수반될 수 있다는 것이 제안되었다 (예를 들어, 문헌 [Agarwal et al., "Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms and the role of TGFβ"

(2016) Stem Cell Investig 3:5] 참조). 원발성 골수섬유증에서의 골수 병리상태는 섬유증, 신혈관신생 및 골경화증을 특징으로 하고, 섬유증은 ECM에 침착되는 콜라겐 생산의 증가와 연관된다.

[0372] 다수의 바이오마커가 기재되었으며, 그의 대체는 질환을 나타내거나 또는 그와 상관관계가 있다. 일부 실시양태에서, 바이오마커는 세포 마커이다. 이러한 질환-연관 바이오마커는 질환 진행의 진단 및/또는 모니터링뿐만 아니라 요법의 유효성 (예를 들어, 요법에 대한 환자의 반응성)에 유용하다. 이들 바이오마커는 다수의 섬유화 마커, 뿐만 아니라 세포 마커를 포함한다. 폐암에서, 예를 들어, 기관지폐포 세척 (BAL) 액에서의 TGFβ1 농도는 양성 질환을 갖는 환자와 비교하여 폐암을 갖는 환자에서 유의하게 더 높은 것으로 보고되었으며 (~2+배 증가), 이는 또한 폐암의 진행 또는 치료 효과를 진단 및/또는 모니터링하기 위한 바이오마커로서의 역할을 할 수 있다.

[0373] 원발성 골수섬유증이 비정상적 거핵구 발생과 연관되기 때문에, 거핵구뿐만 아니라 줄기 세포 계통의 그의 전구 세포의 특정 세포 마커는 질환 진행뿐만 아니라 요법의 유효성을 진단 및/또는 모니터링하기 위한 마커로서의 역할을 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 유용한 마커는 분화된 거핵구의 세포 마커 (예를 들어, CD41, CD42 및 Tpo R), 거핵구-적혈구 전구 세포의 세포 마커 (예를 들어, CD34, CD38, 및 CD45RA-), 통상의 골수 전구 세포의 세포 마커 (예를 들어, IL-3α/CD127, CD34, SCF R/c-kit 및 Flt-3/Flk-2), 및 조혈 줄기 세포의 세포 마커 (예를 들어, CD34, CD38-, Flt-3/Flk-2)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 유용한 바이오마커는 섬유화 마커를 포함한다. 이들은 비제한적으로 TGFβ1, PAI-1 (세르핀1로도 알려짐), MCP-1 (CCL2로도 알려짐), Col1a1, Col3a1, FN1, CTGF, α-SMA, ACTA2, Timp1, Mmp8, 및 Mmp9를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유용한 바이오마커는 혈청 마커 (예를 들어, 혈청 샘플에서 발견 및 검출되는 단백질 또는 단편)이다.

[0374] TGFβ가 백혈병성 골수 함요의 성분이라는 발견에 기초하여, TGFβ 억제제로 골수 미세환경을 표적화하는 것이 이환 조직에서의 국부 TGFβ 이용가능성을 조절하는 제시 분자를 발현하는 백혈병성 세포를 감소시키기 위한 유망한 접근법일 수 있는 것으로 고려된다.

[0375] 사실상, (용어 "골수섬유증" 그 자체가 시사하는 바와 같이) 골수-증식성 및 섬유화 측면 둘 다에서 TGFβ-의존성 조절이상을 나타내는 병리상태의 다면적 성질로 인해, TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제, 예컨대 본원에 기재된 것들은 골수섬유증을 앓고 있는 환자에 대해 특히 유리한 치료 효과를 제공할 수 있다. 이러한 억제제의 LTBP-아암은 골수에서 ECM-연관 TGFβ1 복합체를 표적화할 수 있으며, 억제제의 LRRC33-아암은 골수 세포-연관 TGFβ1을 차단할 수 있는 것으로 고려된다. 또한, 골수섬유증과 연관된 비정상적 거핵구 생물학은 GARP- 및 LTBP-매개 TGFβ1 활성 둘 다를 수반할 수 있다. TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제는 이러한 복합체를 표적화함으로써 함요에서 활성 TGFβ1의 방출을 억제할 수 있다.

[0376] 따라서, 이러한 TGFβ1 억제제는 다른 (또는 관리 표준) 치료, 예컨대 히드록시우레아 및 JAK 억제제에 대한 부적절한 반응을 갖거나 또는 그에 대해 불내성인, 진성 다혈구혈증을 갖는 환자의 치료에 유용하다. 이러한 억제제는 또한 중간 또는 고위험 골수섬유증 (MF), 예컨대 원발성 MF, 진성 다혈구혈증-후 MF 및 본태성 혈소판혈증-후 MF를 갖는 환자의 치료에 유용하다.

[0377] 따라서, 본 발명의 한 측면은 원발성 골수섬유증을 치료하는 방법에 관한 것이다. 방법은 원발성 골수섬유증을 앓고 있는 환자에게 감소된 TGFβ 이용가능성을 유발하는 TGFβ 억제제를 포함하는 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, TGFβ1 활성화의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 모노클로날 항체 억제제가 골수섬유증을 갖는 환자에게 투여된다. 이러한 항체는 0.1 내지 100 mg/kg, 예컨대 1 내지 30 mg 범위의 투여량, 예를 들어, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg 등으로 투여될 수 있다. 항체를 포함하는 제약 조성물의 바람직한 투여 경로는 정맥내 또는 피하 투여이다. 조성물이 정맥내로 투여되는 경우에, 환자는 치료당 적합한 시간 지속기간, 예를 들어, 대략 60분에 걸쳐 치료제를 투여받았고, 이어서 이를 수주, 예를 들어, 3주, 4주, 6주 등마다 총 여러 주기, 예를 들어, 4 주기, 6 주기, 8 주기, 10 주기, 12 주기 등 동안 반복할 수 있다. 일부 실시양태에서, 환자는 28일 (4주)마다 6 주기 또는 12 주기 동안 정맥내 투여를 통한 1-10 mg/kg (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 mg/kg)의 투여 수준의 억제 항체를 포함하는 조성물로 치료된다. 일부 실시양태에서, 이러한 치료는 일련의 횟수의 투여 주기 후에 중단되지 않고 만성 (장기) 요법 (예를 들어, 유익한 것으로 간주되는 한, 무기한으로 계속됨)으로서 투여된다.

[0378] 일부 실시양태에서, TGFβ 억제제는 불활성 (예를 들어, 잠복) 프로TGFβ 복합체에 결합함으로써 복합체로부터의 활성 또는 성숙 TGFβ의 방출을 막고, 효과적으로 활성화 단계를 억제하는 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체 또는 항원-결합 부분은 LRRC33, GARP, LTBP1, LTBP3 또는 그의 임의의 조합과 연관된 프로TGFβ 복합체에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체 또는 항원-결합 부분

은 세포-테더링된 프로TGFβ 복합체에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 부분은 LRRC33 및/또는 GARP와 연관된 (그러나 LTBP1 또는 LTBP3과는 연관되지 않은) 프로TGFβ 복합체에 선택적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 부분은 LRRC33과 연관된 프로TGFβ 복합체에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 부분은 GARP와 연관된 프로TGFβ 복합체에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 부분은 LRRC33과 연관된 프로TGFβ 복합체뿐만 아니라 GARP와 연관된 프로TGFβ 복합체에 특이적으로 결합한다.

[0379] 상기 논의된 실시양태에 대안적으로 또는 추가적으로, TGFβ 억제제는 LRRC33 및/또는 GARP에 결합하고 추가의 이펙터 기능을 위한 도메인을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다. 일부 실시양태에서, 추가의 이펙터 기능을 위한 도메인은 표적 세포에서 ADCC를 매개하기 위한 Fc 또는 Fc-유사 도메인일 수 있다. 바람직하게는, ADCC-유발 항체는 ADCC-매개 표적 세포 사멸을 충분히 가능하게 하도록 내재화를 촉발하거나 용이하게 하지 않는다.

[0380] 상기 논의된 실시양태에 대안적으로 또는 추가적으로, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 관심 "페이로드"를 보유하는 추가의 모이어티를 포함할 수 있다 (예를 들어, 항체-약물 접합체, 또는 ADC). 적합한 페이로드의 예는 치료제/약물, 독소, 마커 및 검출/영상화 표지 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 페이로드는 화학 물질, 소분자, 폴리펩티드, 핵산, 방사성동위원소 등일 수 있다. 바람직하게는, ADC-매개 작용 메카니즘에 적합한 항체는 세포-표면 표적에의 결합 시에 항원-항체 복합체의 효과적인 내재화를 촉발하여 세포 내로 페이로드를 전달할 수 있다.

[0381] 골수섬유증이 다중 이환 조직 또는 기관에서 많은 측면의 병리상태를 나타내는 진행성 질환이기 때문에, 치료 접근법은 질환 진행에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 질환의 주요 부위 (골수)에서, 적합한 요법은 LRRC33을 발현하는 조혈 세포를 표적화할 수 있는 본원에 기재된 LRRC33 억제제를 포함하는 것으로 고려된다. 이는 LRRC33-제시된 프로TGFβ 복합체에 결합하고 환자에서 TGFβ의 활성화를 억제하는 항체를 포함하는 조성물의 투여에 의해 달성될 수 있다. 그것은 또한 LRRC33에 결합하고 환자에서 표적 세포의 사멸을 유발하는 항체를 포함하는 조성물의 투여에 의해 달성될 수 있다. 대안적으로, 이들 접근법은 TGFβ 활성화 억제제이고 또한 세포성 세포독성을 매개하기 위한 추가의 모이어티를 함유하는 항체를 사용하는 것과 조합될 수 있다. 예를 들어, 추가의 모이어티는 ADCC 또는 페이로드로서 항체에 접합된 독소 (예를 들어, 항체-약물 접합체, 또는 ADC)를 유발하기 위한 Fc 또는 Fc-유사 도메인일 수 있다.

[0382] 골수섬유증은 백혈병의 유형으로 간주될 수 있지만, 그것은 섬유증의 징후를 특징으로 한다. TGFβ가 ECM 항상성 (그의 조절이상은 조직 섬유증으로 이어질 수 있음)의 측면을 조절하는 것으로 알려져 있기 때문에, 일부 실시양태에서, ECM과 연관된 TGFβ 활성을 억제하는 것이 바람직하다. 따라서, LTBP (예컨대 LTBP1 및 LTBP3)에 의해 제시된 프로TGFβ에 결합하고 그를 억제하는 항체 또는 그의 단편이 본 발명에 의해 포괄된다. 일부 실시양태에서, 골수섬유증을 치료하기에 적합한 항체 또는 그의 단편은 그들이 프로TGFβ 복합체, 예컨대 LRRC33, GARP, LTBP1, LTBP3, 또는 그의 임의의 조합과 연관된 것들의 다중 콘텍스트에 결합할 수 있다는 점에서 "콘텍스트-허용성"이다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 TGFβ 활성화의 콘텍스트-비의존성 억제제이며, 항체가 하기 잠복 복합체 중 임의의 것에 결합하고 그를 억제할 수 있는 것을 특징으로 한다: LTBP1-프로TGFβ, LTBP3-프로TGFβ, GARP-프로TGFβ 및 LRRC33-프로TGFβ. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 TGFβ의 하나의 이소형만을 포함하고 다른 이소형은 포함하지 않는 이러한 잠복 복합체에 결합하고 그를 억제하는 이소형-특이적 항체이다. 이들은 예를 들어 LTBP1-프로TGFβ1, LTBP3-프로TGFβ1, GARP-프로TGFβ1 및 LRRC33-프로TGFβ1을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 TGFβ의 1종 이상의 이소형에 우선적으로 결합하고 그를 억제하는 이소형-선택적 항체이다. 콘텍스트-허용성 또는 콘텍스트-비의존성 방식으로 TGFβ1 활성화를 억제할 수 있는 항체는 골수섬유증의 치료에 사용하기에 유리한 것으로 고려된다.

[0383] 본원에 기재된 조성물 및 방법으로 치료될 수 있는 골수증식성 신생물의 적합한 환자 집단은 a) 필라델피아 (+)인 환자 집단; b) 필라델피아 (-)인 환자 집단; c) "전형적"인 것으로 카테고리화된 환자 집단 (PV, ET 및 PMF); d) 돌연변이 JAK2V617F(+)를 보유하는 환자 집단; e) JAK2V617F(-)를 보유하는 환자 집단; f) JAK2 엑손 12(+)를 갖는 환자 집단; g) MPL(+)을 갖는 환자 집단; 및 h) CALR(+)을 갖는 환자 집단을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0384] 일부 실시양태에서, 환자 집단은 중간체-2 또는 고위험 골수섬유증을 갖는 환자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 환자 집단은 이용가능한 요법에 불응성이거나 또는 그에 대한 후보가 아닌 골수섬유증을 갖는 대상체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 100-200 x 10^9개/L의 혈소판 수를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체

는 치료를 받기 전에 > 200 x 10^9개/L의 혈소판 수를 갖는다.

[0385] 일부 실시양태에서, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제 요법을 받는 (그리고 그를 받아서 이익을 얻을 수 있는) 대상체는 중간체-1 또는 보다 높은 원발성 골수섬유증 (PMF), 또는 진성 다혈구혈증/본태성 혈소판혈증-후 골수섬유증 (PV/ET-후 MF)으로 진단된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 치료 전에 골수 섬유증으로 문서화되었다. 일부 실시양태에서, 대상체는 치료 전에 유럽 컨센서스 등급화 점수에 의해 평가 시 MF-2 이상, 및 변형된 바우어마이스터 스케일에 의해 평가 시 등급 3 이상을 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 치료 전에 1의 ECOG 성능 상태를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 치료 전에 5 내지 120 범위의 백혈구 수 (10^9개/L)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 10-100% 범위의 JAK2V617F 대립유전자 부담을 갖는다.

[0386] 일부 실시양태에서, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제 요법을 받는 (그리고 그를 받아 이익을 얻을 수 있는) 대상체는 (치료 전) 수혈-의존성이며, 이는 대상체가 임상적으로 명백한 출혈과 연관된 8.5 g/dL 미만의 헤모글로빈 수준으로 지난달에 적어도 2 단위의 적혈구 수혈의 병력을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0387] 일부 실시양태에서, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제 요법을 받는 (그리고 그를 받아 이익을 얻을 수 있는) 대상체는 이전에 골수섬유증을 치료하기 위한 요법을 받았다. 일부 실시양태에서, 대상체는 AZD1480, 파노비노스타트, EPO, IFNα, 히드록시우레아, PEG화 인터페론, 탈리도미드, 프레드니손, 및 JAK2 억제제 (예를 들어, 레스타우르티닙, CEP-701)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 요법 중 1종 이상으로 치료되었다.

[0388] 일부 실시양태에서, 환자는 골수외 조혈을 갖는다. 일부 실시양태에서, 골수외 조혈은 간, 폐, 비장, 및/또는 림프절에 존재한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 질환 징후의 국재화된 부위 중 1개 이상에 국부로 투여된다.

[0389] 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제는 환자에게 골수섬유증을 치료하는 데 효과적인 양으로 투여된다. 치료 유효량은 골수 기질에서의 ECM의 과도한 침착, 신혈관신생, 골경화증, 비장비대, 간비대, 빈혈, 출혈, 골통 및 다른 골-관련 이환, 골수외 조혈, 혈소판증가증, 백혈구감소증, 악액질, 감염, 혈전증 및 사망을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 환자에서 골수섬유증의 1종 이상의 증상 및/또는 합병증을 완화시키기에 충분한 양이다.

[0390] 일부 실시양태에서, 양은 환자에서 (예컨대 거핵구 세포의) TGFβ1 발현 및/또는 분비를 감소시키는 데 효과적이다. 이러한 억제제는 따라서 치료된 환자에서 TGFβ1 mRNA 수준을 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 억제제는 골수에서, 예컨대 단핵구 세포에서 TGFβ1 mRNA 수준을 감소시킨다. PMF 환자는 전형적으로 ~2,500 pg/mL 초과, 예를 들어, 3,000, 3,500, 4,000, 4,500, 5,000, 6,000, 7,000, 8,000, 9,000, 및 10,000 pg/mL 초과 (ELISA에 의해 측정 시 ~600-2,000 pg/mL의 정상 범위와 대조)의 상승된 혈장 TGFβ1 수준을 나타낸다 (예를 들어, 문헌 [Mascaremhas et al. (Leukemia & Lymphoma, 2014, 55(2): 450-452)] 참조). 진가리엘로(Zingariello) (Blood, 2013, 121(17): 3345-3363)는 PMF 환자 및 대조군 개체의 혈장에서의 생물활성 및 총 TGFβ1 함량을 정량화하였다. 이 참고문헌에 따르면, PMF 환자에서의 중앙 생물활성 TGFβ1은 43 ng/mL (4-218 ng/mL 범위)이고 총 TGFβ1은 153 ng/mL (32-1000 ng/mL)이었으며, 대조군 대응물에서 값은 각각 18 (0.05-144) 및 52 (8-860)이었다. 따라서, 이들 보고에 기초하여, PMF 환자에서의 혈장 TGFβ1 함량은 대조군 또는 건강한 혈장 샘플과 비교하여 수배, 예를 들어, 2배, 3배, 4배, 5배 등으로 상승된다. 본원에 기재된, 0.1-100 mg/kg의 투여량, 예를 들어 1-30 mg/kg 모노클로날 항체에서, 예를 들어 4-12 투여 주기 (예를 들어, 2, 4, 6, 8, 10, 12 주기) 또는 예를 들어 4주마다의 만성 또는 장기 치료에 따라 억제제로 치료하는 것은 상응하는 기준선 (치료-전)에 비해 적어도 10%, 예를 들어, 적어도 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 및 50%만큼 혈장 TGFβ1 수준을 감소시킬 수 있다.

[0391] 치료 효과 중 일부는 치료의 시작 후, 예를 들어, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 또는 6주 후에 비교적 급속하게 관찰될 수 있다. 예를 들어, 억제제는 1-8주 내에 억제제로 치료된 환자의 골수 내의 줄기 세포 및/또는 전구체 세포의 수를 효과적으로 증가시킬 수 있다. 이들은 조혈 줄기 세포 및 혈액 전구체 세포를 포함한다. 골수 생검은 골수 세포의 빈도/수의 변화를 평가하기 위해 수행될 수 있다. 상응하게, 환자는 개선된 증상 예컨대 골통 및 피로를 나타낼 수 있다.

[0392] 골수섬유증의 형태학적 특징 중 하나는 골수 (예를 들어, 골수 기질)에서의 섬유증이며, 이는 부분적으로 이상 ECM을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 양은 예를 들어 중간엽 기질 세포에 의한 과도한 콜라겐 침착을 감소시키는 데 효과적이다. 일부 실시양태에서, 억제제는 치료를 받지 않은 대조군 대상체와 비교하여, 치료된

대상체에서 CD41-양성 세포, 예를 들어, 거핵구의 수를 감소시키는 데 효과적이다. 일부 실시양태에서, 무작위로 선택된 섹션에 의해 결정 시 PMF 골수에서의 거핵구의 기준선 빈도는 제곱 밀리미터 (mm^2)당 200-700개 세포 범위이고, PMF 비장에서는 제곱-밀리미터 (mm^2)당 40-300개 거핵구 범위일 수 있다. 대조적으로, 정상 공여자의 골수 및 비장에서의 거핵구 빈도는 각각 140 미만 및 10 미만이다. 억제제로의 치료는 골수 및/또는 비장에서의 거핵구의 수 (예를 들어, 빈도)를 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 억제제로의 치료는 하류 이펙터 신호전달, 예컨대 SMAD2/3의 인산화이 감소된 수준을 유발할 수 있다.

[0393] 골수섬유증을 갖는 환자는 비대 비장을 앓고 있을 수 있다. 따라서, 치료제의 임상 효과는 비장 크기의 변화를 모니터링함으로써 평가될 수 있다. 비장 크기는 알려져 있는 기술, 예컨대 촉진에 의한 비장 길이의 평가 및/또는 초음파에 의한 비장 부피의 평가에 의해 검사될 수 있다. 일부 실시양태에서, TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제로 치료될 대상체는 촉진에 의해 평가 시 (치료 전) 5 cm 이상, 예를 들어, 5 내지 30 cm 범위의 기준선 비장 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제로 치료될 대상체는 초음파에 의해 평가 시 (치료 전) 300 mL 이상, 예를 들어, 300-1500 mL 범위의 기준선 비장 부피를 갖는다. 본원에 기재된, 예를 들어 4-12 투여 주기 (예를 들어, 2, 4, 6, 8, 10, 12 주기) 후, 예를 들어 4주마다, 0.1-30 mg/kg 모노클로날 항체의 투여량의 억제제로의 치료는 대상체에서 비장 크기를 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 억제제의 유효량은 상응하는 기준선 값에 비해 적어도 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 50%, 및 60%만큼 억제제 치료를 받는 환자 집단에서의 비장 크기를 감소시키기에 충분하다. 예를 들어, 치료는 위약 대조군과 비교하여, MRI 또는 CT 스캔에 의해 측정 시 12-24주 내에 기준선으로부터 비장 부피의 ≥35% 감소를 달성하는 데 효과적이다. 일부 실시양태에서, 치료는 가장 잘 이용가능한 요법 대조군과 비교하여, MRI 또는 CT 스캔에 의해 측정 시 24-48주 내에 기준선으로부터 비장 부피의 ≥35% 감소를 달성하는 데 효과적이다. 가장 잘 이용가능한 요법은 히드록시우레아, 글루코코르티코이드, 뿐만 아니라 의약 없음, 아나그렐리드, 에포에틴 알파, 탈리도미드, 레날리도미드, 메르캅토퓨린, 티오구아닌, 다나졸, 페그인터페론 알파-2a, 인터페론-α, 멜팔란, 아세틸살리실산, 시타라빈, 및 콜키신을 포함할 수 있다.

[0394] 일부 실시양태에서, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제 예컨대 본원에 기재된 것들로 치료된 환자 집단은, 예를 들어 국제 골수섬유증 조사 및 치료 연구 그룹 (IWG-MRT) 기준에 의해 평가한 치료 반응, 치료 (예를 들어, 4, 6, 8, 또는 12 주기) 후 변형된 바우어마이스터 스케일 및 유럽 컨센서스 등급화 시스템에 의해 측정한 골수 섬유증의 변화 정도, 골수증식성 신생물 증상 평가 형태 (MPN-SAF)를 사용한 증상 반응이 통계적으로 개선된 것을 나타낸다.

[0395] 일부 실시양태에서, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제 예컨대 본원에 기재된 것들로의 치료는 예를 들어, 0 내지 10의 스케일 (여기서 0은 부재하다는 것이고 10은 상상할 수 있는 나쁜 것임)을 사용하여 골수섬유증의 쇠약 증상 (복부 불편감, 빠른 포만감, 왼쪽 갈비뼈 밑의 통증, 소양증, 야간 발한, 및 골통/근육통)을 포착하는 1일 다이어리인 변형된 골수섬유증 증상 평가 형태 (MFSAF) 툴 (예컨대 v2.0)에 의해 증상이 측정되는 MFSAF에 의해 평가 시 통계적으로 개선된 치료 반응을 달성한다. 일부 실시양태에서, 치료는 예를 들어 12-24주 내에 기준선으로부터 총 MFSAF 점수의 50%≥ 감소를 달성하는 데 효과적이다. 일부 실시양태에서, 요법을 받은 환자의 유의한 분율이 위약을 받은 환자와 비교하여 총 증상 점수에서 ≥50% 개선을 달성한다. 예를 들어, ≥50% 개선을 달성한 환자 풀의 분율은 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 80% 초과일 수 있다.

[0396] 일부 실시양태에서, 억제제의 치료 유효량은 빈혈 반응에 의해 평가 시 임상 개선을 달성하기에 충분한 양이다. 예를 들어, 개선된 빈혈 반응은 4-12 주기, 예를 들어, 6 주기의 치료 후에, 보다 긴 수혈-비의존성 지속기간, 예를 들어, 8주 이상을 포함할 수 있다.

[0397] 일부 실시양태에서, 억제제의 치료 유효량은 시간 지속기간, 예를 들어, 6주, 8주, 12주, 6개월 등 동안 안정한 질환을 유지하기에 충분한 양이다. 일부 실시양태에서, 질환의 진행은 전반적 골수 세포충실성의 변화, 레티쿨린 또는 콜라겐 섬유증의 정도, 및/또는 JAK2V617F 대립유전자 부담의 변화에 의해 평가될 수 있다.

[0398] 일부 실시양태에서, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제 예컨대 본원에 기재된 것들로 치료된 환자 집단은 치료를 받지 않은 대조군 집단과 비교하여 통계적으로 개선된 생존을 나타낸다. 예를 들어, 대조군에서, PMF 환자의 생존 중간값은 대략 6년 (고위험 환자에서는 대략 16개월)이고, 환자 중 20% 미만이 진단후 10년 이상 생존할 것으로 예상된다. 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제 예컨대 본원에 기재된 것들로의 치료는 적어도 6개월, 12개월, 18개월, 24개월, 30개월, 36개월, 또는 48개월만큼 생존 시간을 연장시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료는 위약을 받은 환자와 비교하여, 26주, 52주, 78주, 104주, 130주,

144주, 또는 156주의 개선된 전반적 생존을 달성하는 데 효과적이다.

[0399] 요법의 임상 이익, 예컨대 상기 예시된 것들은 새로운 발병 빈혈을 갖거나 갖지 않는 환자에서 관찰될 수 있다.

[0400] 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제의 유리한 특색 중 하나는 그들이 선택성이 결여된 통상적인 TGFβ 길항제와 비교하여, 이소형 선택성에 의해 가능해진 개선된 안전성 프로파일을 유지하는 것이다. 따라서, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제, 예컨대 본원에 기재된 것들이 통상적인 TGFβ 길항제로 치료된 동등한 환자 집단과 비교하여, 환자 집단에서의 유해 사건을 이러한 사건의 빈도 및/또는 중증도에 관해 감소시킬 수 있는 것으로 예측된다. 따라서, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제는 치료의 투여량 및/또는 지속기간에 관해 보다 큰 치료 범위를 제공할 수 있다.

[0401] 유해 사건은 관련 기술분야에서 인식된 적합한 방법, 예컨대 유해 사건에 대한 통상 용어 기준 (CTCAE) 버전 4에 의해 등급화될 수 있다. TGFβ 길항제, 예컨대 GC1008을 받은 인간 환자에서의 이전에 보고된 유해 사건은 백혈구증가증 (등급 3), 피로 (등급 3), 저산소증 (등급 3), 심장무수축 (등급 5), 백혈구감소증 (등급 1), 재발성, 일시적, 경도 홍반성, 결절성 피부 병변, 화농성 피부염, 및 대상 포진을 포함한다.

[0402] 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제 요법은 예를 들어 빈혈, 혈소판감소증, 호중구감소증, 고콜레스테롤혈증, 상승된 알라닌 트랜스아미나제 (ALT), 상승된 아스파르테이트 트랜스아미나제 (AST), 타박상, 어지럼증, 및 두통에 대해, 골수섬유증 환자에서 JAK 억제제 요법과 비교하여 덜 빈번하고/거나 덜 심각한 유해 사건 (부작용)을 유발할 수 있다.

[0403] TGFβ1 신호전달의 억제제는 조합 요법으로서 골수섬유증의 치료를 위해 1종 이상의 치료제와 함께 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 TGFβ1 활성화의 억제제는 JAK1 억제제, JAK2 억제제 또는 JAK1/JAK2 억제제를 받은, 골수섬유증을 앓고 있는 환자에게 투여된다. 일부 실시양태에서는 이러한 환자가 JAK1 억제제, JAK2 억제제 또는 JAK1/JAK2 억제제 억제제 요법에 반응성이지만, 다른 실시양태에서는 이러한 환자가 JAK1 억제제, JAK2 억제제 또는 JAK1/JAK2 억제제 요법에 불량하게 반응성이거나 반응성이지 않다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 TGFβ1의 이소형-특이적 억제제의 사용은 JAK1 억제제, JAK2 억제제 또는 JAK1/JAK2 억제제 요법에 불량하게 반응성이거나 또는 반응성이지 않은 자를 보다 반응성이게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 TGFβ1의 이소형-특이적 억제제의 사용은 여전히 환자에서 동등한 임상 효능을 생성하나 더 적거나 더 낮은 정도의 약물-관련 독성 또는 유해 사건 (예컨대 상기 기재된 것들)을 생성하는 감소된 투여량의 JAK1 억제제, JAK2 억제제 또는 JAK1/JAK2 억제제를 가능하게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, JAK1 억제제, JAK2 억제제 또는 JAK1/JAK2 억제제 억제제 요법과 함께 사용되는 본원에 기재된 TGFβ1 활성화의 억제제로의 치료는 환자에서 상승작용적 또는 상가적 치료 효과를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 TGFβ1 활성화의 억제제로의 치료는 JAK1 억제제, JAK2 억제제 또는 JAK1/JAK2 억제제 또는 골수섬유증을 치료하기 위해 제공되는 다른 요법의 이익을 부스팅할 수 있다. 일부 실시양태에서, 환자는 골수섬유증과 연관된 빈혈을 해결하기 위한 치료제를 추가적으로 받을 수 있다.

[0404] 암:

[0405] 다양한 암은 TGFβ1 활성을 수반하고, 본 개시내용의 항체 및/또는 조성물로 치료될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "암"은 주위 조직을 침습하고 새로운 신체 부위로 전이하는 경향이 있는 역형성 세포의 증식을 특징으로 하는 다양한 악성 신생물 중 임의의 것을 지칭하고, 또한 이러한 악성 신생물성 성장을 특징으로 하는 병리학적 상태를 지칭한다. 암은 국재화된 암 (예를 들어, 고형 종양) 또는 전신 암일 수 있다. 본 개시내용과 관련하여, 용어 "국재화된" ("국재화된 종양"에서와 같음)은 전신 질환과는 달리 해부학적으로 단리된 또는 단리가능한 이상, 예컨대 고형 악성종양을 지칭한다. 특정 암, 예컨대 특정 백혈병 (예를 들어, 골수섬유증) 및 다발성 골수종은 예를 들어, 질환에 대한 국재화된 성분 (예를 들어 골수) 및 전신 성분 (예를 들어 순환 혈액 세포) 둘 다를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 암은 전신 암, 예컨대 혈액 악성종양일 수 있다. 본 개시내용에 따라 치료될 수 있는 암은 모든 유형의 림프종/백혈병, 암종 및 육종, 예컨대 항문, 방광, 담관, 골, 뇌, 유방, 자궁경부, 결장/직장, 자궁내막, 식도, 눈, 담낭, 두경부, 간, 신장, 후두, 폐, 종격 (흉부), 구강, 난소, 췌장, 음경, 전립선, 피부, 소장, 위, 척수, 꼬리뼈, 고환, 갑상선 및 자궁에서 발견되는 이들 암 또는 종양을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 암에서, TGFβ (예를 들어, TGFβ1)는 성장 촉진 또는 성장 억제일 수 있다. 예로서, 췌장암에서, SMAD4 야생형 종양은 TGFβ에 반응하여 억제된 성장을 경험할 수 있지만, 질환이 진행됨에 따라, 구성적으로 활성화된 제II형 수용체가 전형적으로 존재한다. 추가적으로, SMAD4-널 췌장암이 존재한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체, 그의 항원 결합 부분 및/또는 조성물은 암의 1개 이상의 형태로 고유하게 기능하는 TGFβ 신호전달 경로의 성분을 임의로 표적화하도록 설계된다. 백혈병, 또는 백혈구

즉, 백혈구의 비정상적 증식을 특징으로 하는 혈액암 또는 골수암은 4가지 주요 분류로 분류될 수 있으며 이는 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 급성 골수 백혈병 또는 급성 골수성 백혈병 (AML) (염색체 10 및 11 [t(10, 11)], 염색체 8 및 21 [t(8;21)], 염색체 15 및 17 [t(15;17)] 사이의 전위, 및 염색체 16 [inv(16)]에서의 역위를 갖는 AML; 선행 골수이형성 증후군 (MDS) 또는 AML로 변형된 골수증식성 질환을 갖는 환자를 포함하는, 다계열 이형성증을 동반한 AML; AML 및 골수이형성 증후군 (MDS), 요법-관련, 이 카테고리는 선행 화학요법 및/또는 방사선을 가지며 후속적으로 AML 또는 MDS가 발생하는 환자를 포함함; d) 상기 카테고리에 속하지 않는 AML의 하위유형을 포함하는, 달리 카테고리화되지 않는 AML; e) 백혈병성 세포가 골수성 또는 림프성 세포로서 분류될 수 없는 경우, 또는 세포 유형 둘 다가 존재하는 경우에 발생하는, 모호한 계통의 급성 백혈병); 및 만성 골수 백혈병 (CML)을 포함한다.

[0406] TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제, 예컨대 본원에 기재된 것들은 다발성 골수종을 치료하는 데 사용될 수 있다. 다발성 골수종은 골수에서 발생하고 확장되어 파괴성 골 병변 (즉, 골용해성 병변)을 유발하는 B 림프구 (예를 들어, 형질 세포, 형질모구, 기억 B 세포)의 암이다. 전형적으로, 질환은 부분적으로 골용해성 병변, 골감소증, 골다공증, 고칼슘혈증, 뿐만 아니라 형질세포종, 혈소판감소증, 호중구감소증 및 신경병증을 특징으로 하는, 증진된 파골세포 골 흡수, 억제된 골모세포 분화 (예를 들어, 분화 저지) 및 손상된 골 형성을 나타낸다. 본원에 기재된 TGFβ1-선택적, 콘텍스트-허용성 억제제 요법은 환자에서 1종 이상의 이러한 임상 징후 또는 증상을 호전시키는 데 효과적일 수 있다. TGFβ1 억제제는 본원의 다른 곳에 열거된 것들을 포함한, 다발성 골수증을 치료하기 위한 추가의 요법 또는 요법들을 받는 환자에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 다발성 골수종은 미오스타틴 억제제 또는 IL-6 억제제와 조합되어 TGFβ1 억제제 (예컨대 이소형-특이적 콘텍스트-허용성 억제제)로 치료될 수 있다. 일부 실시양태에서, TGFβ1 억제제는 전통적인 다발성 골수종 요법, 예컨대 보르테조밉, 레날리도미드, 카르필조밉, 포말리도미드, 탈리도미드, 독소루비신, 코르티코스테로이드 (예를 들어, 덱사메타손 및 프레드니손), 화학요법 (예를 들어, 멜팔란), 방사선 요법, 줄기 세포 이식, 플리티덴신, 엘로투주맙, 익사조밉, 마시티닙 및/또는 파노비노스타트와 함께 사용될 수 있다.

[0407] 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 암종의 유형은 유두종/암종, 융모막암종, 내배엽동 종양, 기형종, 선종/선암종, 흑색종, 섬유종, 지방종, 평활근종, 횡문근종, 중피종, 혈관종, 골종, 연골종, 신경교종, 림프종/백혈병, 편평 세포 암종, 소세포 암종, 대세포 미분화 암종, 기저 세포 암종 및 부비동비강 미분화 암종을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0408] 육종의 유형은 연부 조직 육종 예컨대 폐포 연부 육종, 혈관육종, 피부섬유육종, 데스모이드 종양, 결합조직형성 원형 소세포 종양, 골격외 연골육종, 골격외 골육종, 섬유육종, 혈관주위세포종, 혈관육종, 카포시 육종, 평활근육종, 지방육종, 림프관육종, 림프육종, 악성 섬유성 조직구종, 신경섬유육종, 횡문근육종, 활막 육종 및 아스킨 종양, 유잉 육종 (원시 신경외배엽 종양), 악성 혈관내피종, 악성 슈반세포종, 골육종 및 연골육종을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0409] TGFβ1 활성화의 이소형-선택적, 콘텍스트-허용성/비의존성 억제제, 예컨대 본원에 기재된 것들은 신경 능성 기원의 세포를 수반하는 악성종양을 치료하는 데 적합할 수 있다. 신경 능선 계통의 암 (즉, 신경 능선-유래 종양)은 흑색종 (멜라닌세포의 암), 신경모세포종 (교감신경부신 전구체의 암), 신경절신경종 (말초 신경계 신경절의 암), 수질성 갑상선 암종 (갑상선 C 세포의 암), 크롬친화세포종 (부신 수질의 크로마핀 세포의 암), 및 MPNST (슈반 세포의 암)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체 및 방법은 결장암, 신암, 유방암, 악성 흑색종 및 교모세포종을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는 암 또는 암-관련 상태의 1개 이상의 유형을 치료하는 데 사용될 수 있다 (Schlingensiepen et al., 2008; Ouhtit et al., 2013).

[0410] 증가하는 증거 라인은 종양/암 진행에서의 대식세포의 역할을 시사한다. 본 발명은 이것이 부분적으로 질환 환경, 예컨대 TME에서의 TGFβ1 활성화에 의해 매개된다는 개념을 포괄한다. 골수-유래 단핵구 (예를 들어, CD11b+)는 종양-유래 시토카인/케모카인에 반응하여 종양 부위에 동원되며, 여기서 단핵구는 암유발 표현형 (예를 들어, M2-편향, TAM 또는 TAM-유사 세포)을 획득하기 위해 분화 및 분극을 겪는다. 본 개시내용에 제공된 실시예에 입증된 바와 같이, 인간 PBMC로부터 단리된 단핵구는 상이한 하위유형의 대식세포, 예를 들어, M1 (섬유화유발, 항암) 및 M2 (암유발)로 분극화되도록 유도될 수 있다. 많은 종양에서의 대다수의 TAM은 M2-편향이다. M2-유사 대식세포 중에서, M1이 아닌 M2c 및 M2d 하위유형은 세포 표면 상에 상승된 LRRC33을 발현하는 것으로 발견된다. 더욱이, 대식세포는 M-CSF 노출에 의해 추가로 편향 또는 활성화되어, TGFβ1 발현과 동시에 일어나는 LRRC33 발현을 현저하게 증가시킬 수 있다. 골수증식성 질환 (예를 들어, 골수섬유증)을 갖는 환자에서의 증가된 순환 M-CSF (즉, 혈청 M-CSF 농도)가 또한 관찰되었다. 일반적으로, 높은 대식세포 (TAM) 및/또는

MDSC 침윤을 갖는 종양은 불량한 예후와 연관된다. 유사하게, 상승된 수준의 M-CSF가 또한 불량한 예후를 나타낸다.

[0411] 상기 언급된 바와 같이, TGFβ1 활성화의 콘텍스트-허용성/비의존성 억제제는 흑색종의 치료에 사용될 수 있다. 이러한 억제제로 치료될 수 있는 흑색종의 유형은 악성 흑색점; 악성 흑자 흑색종; 표재 확산성 흑색종; 말단 흑자 흑색종; 점막 흑색종; 결절성 흑색종; 폴립양 흑색종 및 결합조직형성 흑색종을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 흑색종은 전이성 흑색종이다.

[0412] 보다 최근에, 면역 체크포인트 억제제는 진행성 흑색종 환자를 효과적으로 치료하는 데 사용되었다. 특히, 항-프로그램화된 사멸 (PD)-1 항체 (예를 들어, 니볼루맙 및 펨브롤리주맙)는 이제 특정 유형의 암 예컨대 진행성 흑색종에 대한 관리 표준이 되었으며, 이는 유의한 활성 및 지속적인 반응과 함께 관리가능한 독성 프로파일을 입증하였다. 그러나, PD-1 길항제의 효과적인 임상 적용은 선천성 저항성의 높은 비율 (~60-70%)에 의해 지장을 받으며 (문헌 [Hugo et al. (2016) Cell 165: 35-44] 참조), 이는 진행 중인 문제가 계속해서 환자 선택 및 반응 및 저항성의 예측자뿐만 아니라 조합 전략을 최적화하는 것에 대한 의문을 포함한다는 것을 예시한다 (Perrot et al. (2013) Ann Dermatol 25(2): 135-144). 더욱이, 연구는 처음에 항-PD-1 요법에 반응한 흑색종 환자 중 대략 25%가 결국 후천성 저항성을 발생시켰다는 것을 시사하였다 (Ribas et al. (2016) JAMA 315: 1600-9).

[0413] PD-1 및/또는 CTLA-4를 발현하는 종양-침윤 CD8+ T 세포의 수는 체크포인트 억제에 의한 성공의 주요 식별자인 것으로 보이고, PD-1 및 CTLA-4 차단 둘 다는 침윤 T 세포를 증가시킬 수 있다. 그러나, 더 높은 대식세포 침윤을 갖는 환자에서, CD8 세포의 항암 효과는 억제될 수 있다.

[0414] LRRC33-발현 세포, 예컨대 골수성 전구체 MDSC 및 TAM을 포함한 골수성 세포는 T 세포, 예컨대 CD4 및/또는 CD8 T 세포를 억제함으로써 (예를 들어, T 세포 고갈), 면역억제 환경 (예컨대 TME 및 골수섬유화 골수)을 생성하거나 억제할 수 있으며, 이는 적어도 부분적으로 특정 환자 집단에서 관찰되는 항-PD-1 저항성을 따라갈 수 있다. 사실상, 증거는 항-PD-1 단독요법에 대한 저항성이 CD8+ 세포독성 T 세포를 축적하고 Teff/Treg 비를 구출하는 데 실패하였음을 시사한다. 특히, 본 발명자들은 LRRC33 발현 수준에 대해, 특정 암 환자, 예컨대 흑색종 환자 집단 중에서 분기가 존재한다는 것을 인식하였다: 하나의 군은 높은 LRRC33 발현 ($LRRC33^{high}$)을 나타내고, 다른 군은 낮은 LRRC33 발현 ($LRRC33^{low}$)을 나타낸다. 따라서, 본 발명은 $LRRC33^{high}$ 환자 집단이 면역 체크포인트 억제제 요법에 불량하게 반응하거나 또는 그에 저항성인 자를 나타낼 수 있다는 개념을 포함한다. 따라서, LRRC33을 억제하는 작용제, 예컨대 본원에 기재된 것들은 체크포인트 억제제 요법 (예를 들어, 항-PD-1)에 저항성인 암, 예컨대 흑색종, 림프종, 및 골수증식성 장애의 치료에 특히 유익하다.

[0415] 일부 실시양태에서, 암/종양은 면역 체크포인트 억제제에 고유 저항성이거나 또는 비반응성이다. 하나의 예를 들자면, 특정 림프종은 면역 체크포인트 억제 예컨대 항-PD-1 요법에 불량하게 반응성인 것으로 보인다. 유사하게, 흑색종 환자 집단의 하위세트는 면역 체크포인트 억제제에 저항성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 특정한 이론에 얽매이는 것을 의도하지는 않지만, 본 개시내용의 발명자들은 이것이 적어도 부분적으로 체크포인트 억제제가 그의 효과를 발휘하는 데 실패한 면역억제 미세환경을 생성할 수 있는 TGFβ1 신호전달 경로의 상향조절로 인한 것일 수 있다는 것을 고려한다. TGFβ1 억제는 이러한 암이 체크포인트 억제제 요법에 더 반응성이게 할 수 있다. 면역 체크포인트 억제제 및 TGFβ1 억제제의 조합으로부터 이익을 얻을 수 있는 암 유형의 비제한적 예는 골수섬유증, 흑색종, 신세포 암종, 방광암, 결장암, 혈액 악성종양, 비소세포 암종, 비소세포 폐암 (NSCLC), 림프종 (전형적 호지킨 및 비-호지킨), 두경부암, 요로상피암, 높은 미소위성체 불안정성을 갖는 암, 미스매치 복구 결핍을 갖는 암, 위암, 신암, 및 간세포성암을 포함한다. 그러나, 예를 들어 생검에 의해 결정 시 TGFβ1이 과다발현되거나 또는 TGFβ2/3보다 우세한 이소형인 임의의 암 (예를 들어, 이러한 암을 갖는 환자)은 본 개시내용에 따라 TGFβ1의 이소형-선택적 억제제로 치료될 수 있다.

[0416] 일부 실시양태에서, 암/종양은 시간 경과에 따라 저항성이 될 수 있다. 이러한 현상은 후천성 저항성 또는 적응 저항성으로 지칭된다. 고유 저항성과 같이, 일부 실시양태에서, 후천성 저항성은 적어도 부분적으로 TGFβ1-의존성 경로에 의해 매개되며, 본원에 기재된 이소형-특이적 TGFβ1 억제제는 이들 경우에 항암 면역을 회복하는 데 효과적일 수 있다.

[0417] 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 억제제 및 LRRC33 억제제 (예컨대 본원에 기재된 것들)를 포함하는 조합 요법은 이러한 암을 치료하는 데 효과적일 수 있다. 또한, 종양에서의 높은 LRRC33-양성 세포 침윤, 또는 달리 비정상적 세포 증식을 갖는 부위/조직은 숙주 면역억제 및 면역 체크포인트 저항성에 대한 바이오마커로서의 역

할을 할 수 있다. 유사하게, 이펙터 T 세포는 암에 대항하는 신체의 능력을 제한하는 면역억제 함요로부터 배제될 수 있다. 더욱이, 하기 실시예 섹션에 입증된 바와 같이, GARP-제시된 TGFβ1을 발현하는 Treg은 이펙터 T 세포 증식을 억제한다. 종합하면, TGFβ1은 면역 억제 질환 미세환경 (예컨대 TME)의 생성 및 유지에서의 주요 유도인자이고, 다중 TGFβ1 제시 콘텍스트가 종양에 적절하다. 일부 실시양태에서, 조합 요법은 보다 유리한 Teff/Treg 비를 달성할 수 있다.

[0418] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법에 사용될 수 있으며, 상기 방법은 암이 치료되도록 대상체에게 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 암은 결장암이다.

[0419] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 고형 종양을 치료하는 방법에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 고형 종양은 전형적으로 치료 분자가 침투하기에 조밀하고 단단한 결합조직형성 종양일 수 있다. 이러한 종양의 ECM 성분을 표적화함으로써, 이러한 항체는 조밀한 종양 조직이 붕해되도록 "이완"시켜, 그의 항암 효과를 발휘하기 위한 치료적 접근을 용이하게 할 수 있다. 따라서, 추가의 치료제, 예컨대 임의의 공지된 항종양 약물이 조합하여 사용될 수 있다.

[0420] 추가적으로 또는 대안적으로, TGFβ1 활성화를 억제할 수 있는 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 항체 또는 그의 단편, 예컨대 본원에 개시된 것들은 세포-기반 면역요법, 예컨대 암에 대항하는 암 면역요법으로서의 키메라 항원 수용체 T-세포 ("CAR-T") 기술과 함께 사용될 수 있다.

[0421] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 고형 종양을 갖는 대상체에서 고형 종양 성장을 억제하거나 감소시키는 방법에 사용될 수 있으며, 상기 방법은 고형 종양 성장이 억제 또는 감소되도록 대상체에게 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 고형 종양은 결장 암종 종양이다. 일부 실시양태에서, 암을 치료하는 데 유용한 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 TGFβ1 활성화의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제이다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및 LRRC33-TGFβ1 복합체를 표적화한다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체 및 LTBP3-TGFβ1 복합체를 표적화한다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및 LRRC33-TGFβ1 복합체를 표적화한다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 GARP-TGFβ1 복합체 및 LRRC33-TGFβ1 복합체를 표적화한다.

[0422] 본 발명은 대상체에서의 고형 종양을 포함하는 암의 치료에서의 TGFβ1의 콘텍스트-허용성 (콘텍스트-비의존성), 이소형-특이적 억제제의 용도를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 콘텍스트 허용성 (콘텍스트-비의존성), 이소형-특이적 억제제는 TGFβ1의 활성화를 억제할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 이러한 활성화 억제제는 프로TGFβ1 복합체에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다. 결합은 복합체가 제시 분자, 예를 들어, LTBP1, LTBP3, GARP 또는 LRRC33 중 어느 하나와 연관되는 경우에 발생하여, 그에 의해 복합체로부터의 성숙 TGFβ1 성장 인자의 방출을 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 고형 종양은 CAF 및 콜라겐 섬유와 직접적으로 접촉하는 CD8+ T 세포가 풍부한 기질을 갖는 것을 특징으로 한다. 이러한 종양은 항종양 면역 세포 (예를 들어, 이펙터 T 세포)가 종양을 효과적으로 침윤하는 것, 암과 싸우는 신체의 능력을 제한하는 것을 막는 면역-억제 환경을 생성할 수 있다. 대신에, 이러한 세포는 종양 기질 내에 또는 그 근처에 축적될 수 있다. 이들 특색은 이러한 종양이 면역 체크포인트 억제제 요법에 불량하게 반응성이게 할 수 있다. 하기에 보다 상세하게 논의된 바와 같이, 본원에 개시된 TGFβ1 억제제는 예를 들어 면역 체크포인트 억제제와 함께 사용되어, 이펙터 세포가 암 세포에 도달하여 그를 사멸시키도록 억제를 비차단시킬 수 있다.

[0423] TGFβ1은 종양 성장, 숙주 면역 억제, 악성 세포 증식, 혈관분포도, 혈관신생, 이동, 침습, 전이, 및 화학요법 저항성을 포함하여, 종양 미세환경에서 다면적 역할을 하는 것으로 고려된다. 환경에서의 TGFβ1 제시의 각각의 "콘텍스트"는 따라서 질환 진행의 조절 (또는 조절이상)에 참여할 수 있다. 예를 들어, GARP 축은 암 세포에 대항하기 위해 숙주 면역 반응을 매개하는 이펙터 T 세포 반응을 조절하는 Treg 반응에서 특히 중요하다. LTBP1/3 축은 기질을 포함한 ECM을 조절할 수 있으며, 여기서 암-연관 섬유모세포 (CAF)는 암의 발병기전 및 진행에서 역할을 한다. LRRC33 축은 순환 단핵구의 종양 미세환경으로의 동원, 종양-연관 대식세포 (TAM)로의 후속적인 분화, 종양 조직으로의 침윤 및 질환의 악화에서 중대한 역할을 할 수 있다.

[0424] 일부 실시양태에서, TGFβ1-발현 세포는 종양을 침윤하여 면역억제 국부 환경을 생성한다. 이러한 침윤이 관찰

되는 정도는 보다 악화된 예후와 상관관계가 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 침윤은 또 다른 암 요법, 예컨대 면역 체크포인트 억제제에 대한 보다 불량한 치료 반응을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 종양 미세환경에서의 TGFβ1-발현 세포는 Treg 및/또는 골수 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 골수 세포는 대식세포, 단핵구 (조직 상주 또는 골수-유래), 및 MDSC를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0425] 일부 실시양태에서, TME에서의 LRRC33-발현 세포는 골수성-유래 억제 세포 (MDSC)이다. MDSC 침윤 (예를 들어, 고형 종양 침윤)은 숙주의 항종양 면역 세포가 배제되는 면역억제 함요를 생성함으로써 적어도 1개의 면역 회피 메카니즘을 따라갈 수 있다. 증거는 MDSC가 염증-연관 신호, 예컨대 종양-연관 염증 인자에 의해 가동화되며, 가동화 시에, MDSC는 질환-대항 세포, 예컨대 CD8+ T 세포 및 NK 세포를 손상시킴으로써 면역억제 효과에 영향을 미칠 수 있다는 것을 시사한다. 또한, MDSC는 TGFβ 및 IL-10을 분비함으로써 Treg의 분화를 유도할 수 있다. 따라서, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제, 예컨대 본원에 기재된 것들은 질환 (예컨대 암)에 맞서는 신체의 능력을 회복하거나 부스팅하기 위해 면역 회피 (예를 들어, 손상된 면역 감시)를 갖는 환자에게 투여될 수 있다. 본원에 보다 상세하게 기재된 바와 같이, 이는 또 다른 요법, 예컨대 암 요법에 대한 신체의 반응성 또는 감수성을 추가로 증진 (예를 들어, 회복 또는 강화)시킬 수 있다.

[0426] 일부 실시양태에서, 환자에서의 순환 MDSC의 상승된 빈도 (예를 들어, 수)는 체크포인트 차단 요법, 예컨대 PD-1 길항체 및 PD-L1 길항제에 대한 불량한 반응성을 예측한다. 예를 들어, 바이오마커 연구는 순환 치료-전 HLA-DR lo/CD14+/CD11b+ 골수-유래 억제제 세포 (MDSC)가 진행 및 악화된 OS (p = 0.0001 및 0.0009)와 연관되었음을 보여주었다. 또한, 염증발생 두경부 암종 (HNC)에서의 PD-1 체크포인트 차단에 대한 저항성은 GM-CSF 및 골수 유래 억제제 세포 (MDSC) 마커의 발현과 연관된다. 이러한 관찰은 MDSC를 고갈시키는 전략, 예컨대 화학요법이 항-PD-1과 조합되어 또는 그와 순차적으로 고려되어야 하는 것으로 제안하였다. LRRC33 또는 LRRC33-TGFβ 복합체는 면역억제 골수 세포 상의 선택적 발현으로 인해 암 면역요법에 대한 신규 표적을 나타낸다. 따라서, 특정한 이론에 얽매이는 것을 의도하지는 않지만, 이 복합체를 표적화하는 것은 환자 집단에서의 관리 표준 체크포인트 억제제 요법의 유효성을 증진시킬 수 있다.

[0427] 따라서, 본 발명은 고형 종양을 포함하는 암의 치료를 위한 본원에 기재된 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 또는 콘텍스트-비의존성 TGFβ1 억제제의 용도를 제공한다. 이러한 치료는 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 또는 콘텍스트-비의존성 TGFβ1 억제제를 적어도 1종의 국재화된 종양 (고형 종양)을 포함하는 암으로 진단된 대상체에게 암을 치료하는 데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다.

[0428] 증거는 암 진행 (예를 들어, 종양 증식/성장, 침습, 혈관신생 및 전이)이 적어도 부분적으로 종양-기질 상호작용에 의해 유도될 수 있다는 것을 시사한다. 특히, CAF는 다양한 시토카인 및 성장 인자의 분비 및 ECM 재형성에 의해 이 과정에 기여할 수 있다. 과정에 수반되는 인자는 기질-세포-유래 인자 1 (SCD-1), MMP2, MMP9, MMP3, MMP-13, TNF-α, TGFβ1, VEGF, IL-6, M-CSF를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 또한, CAF는 종양 부위에 CCL2/MCP-1 및 SDF-1/CXCL12와 같은 인자를 분비함으로써 TAM을 동원할 수 있고; 후속적으로, TAM이 우선적으로 부착되는 프로-TAM 함요 (예를 들어, 히알루로난-풍부 기질 영역)가 생성된다. TGFβ1이 정상 섬유모세포의 근섬유모세포-유사 CAF로의 활성화를 촉진하는 것으로 제안되므로, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 또는 콘텍스트-비의존성 TGFβ1 억제제 예컨대 본원에 기재된 것들의 투여는 CAF의 암-촉진 활성에 대응하는 데 효과적일 수 있다. 사실상, 본원에 제시된 데이터는 TGFβ1의 활성화를 차단하는 이소형-특이적 콘텍스트-비의존성 항체가 마커 유전자 예컨대 CCL2/MCP-1, α-SMA, FN1 및 Col1의 UUO-유발된 상향조절을 억제할 수 있으며, 이는 또한 많은 암에 연루된다는 것을 시사한다.

[0429] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 단독으로 또는 추가의 작용제, 예를 들어, 항-PD-1 항체 (예를 들어, 항-PD-1 길항제)와 조합하여, 암 또는 종양을 갖는 대상체에게 투여된다. 본 발명에 포함된 다른 조합 요법은 방사선 또는 화학요법제와 함께 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 투여하는 것이다. 예시적인 추가의 작용제는 PD-1 길항제, PDL1 길항제, PD-L1 또는 PDL2 융합 단백질, CTLA4 길항제, GITR 효능제, 항-ICOS 항체, 항-ICOSL 항체, 항-B7H3 항체, 항-B7H4 항체, 항-TIM3 항체, 항-LAG3 항체, 항-OX40 항체, 항-CD27 항체, 항-CD70 항체, 항-CD47 항체, 항-41BB 항체, 항-PD-1 항체, 항-CD20 항체, 종양용해 바이러스 및 PARP 억제제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0430] 일부 실시양태에서, 특정한 암 유형 또는 환자 집단에 적합한 조합 요법에 대한 치료 접근법의 결정 또는 선택은 하기를 수반할 수 있다: a) 관리 표준 요법이 이용가능한 암 유형에 관한 고려사항 (예를 들어, 면역요법-승인된 적응증); b) 치료-저항성 하위집단에 관한 고려사항; 및 c) "TGFβ1 경로-활성" 또는 달리 적어도 부분적

으로 TGFβ1-의존성 (예를 들어, TGFβ1 억제-감수성)인 암/종양에 관한 고려사항. 예를 들어, 많은 암 샘플은 TGFβ1이 예를 들어 TCGA RNAseq 분석에 의해 우세한 이소형임을 보여준다. 일부 실시양태에서, 각각의 종양 유형으로부터의 샘플 중 50% 초과 (예를 들어, 50%, 60%, 70%, 80% 및 90% 초과)가 TGFβ1 이소형 발현에 양성이다. 일부 실시양태에서, "TGFβ1 경로-활성" 또는 달리 적어도 부분적으로 TGFβ1-의존성 (예를 들어, TGFβ1 억제-감수성)인 암/종양은 적어도 1종의 Ras 돌연변이, 예컨대 K-ras, N-ras 및/또는 H-ras에서의 돌연변이를 함유한다. 일부 실시양태에서, 암/종양은 적어도 1종의 K-ras 돌연변이를 포함한다.

[0431] 일부 실시양태에서, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 억제제는 1종 이상의 체크포인트 억제제 요법이 승인된 암으로 진단된 환자에게 체크포인트 억제 요법과 함께 투여된다. 이들은 방광 요로상피 암종, 편평 세포 암종 (예컨대 두경부), 신장 투명 세포 암종, 신장 유두상 세포 암종, 간 간세포성 암종, 폐 선암종, 피부 흑색종, 및 위 선암종을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 바람직한 실시양태에서, 이러한 환자는 체크포인트 억제제 요법에 불량하게 반응성이거나 또는 비-반응성이다.

[0432] 근골격 상태에서의 TGFβ의 역할:

[0433] 골격의 골, 근육, 연골, 건, 인대, 관절, 및 조직 및 기관을 함께 지지하고 결합시키는 다른 결합 조직으로 구성된 근골격계에서, TGFβ는 증식 및 분화의 억제, 위축의 유도, 및 섬유증의 발생을 포함한 다양한 역할을 한다. TGFβ는 위성 세포 증식을 감소시키고 분화를 막는다 (MyoD 및 미오게닌의 억제를 통함) (Allen, R.E. and L.K. J Cell Physiol, 1987. 133(3): p. 567-72; Brennan, T.J., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(9): p. 3822-6; Massague, J., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(21): p. 8206-10; Olson, E.N., et al., J Cell Biol, 1986. 103(5): p. 1799-805). TGFβ의 이소형 (즉, TGFβ1, 2 또는 3)은 이들 초기 논문에 명시되지 않지만, TGFβ1인 것으로 추정된다. TGFβ는 또한 근육 섬유증에 기여하고; 재조합 TGFβ1의 직접적 주사는 골격근 섬유증을 발생시키고, 범-TGFβ 억제는 급성 및 만성적으로 손상된 근육에서 섬유증을 감소시킨다 (Li, Y., et al., Am J Pathol, 2004. 164(3): p. 1007-19; Mendias, C.L., et al., Muscle Nerve, 2012. 45(1): p. 55-9; Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611-21). TGFβ1은 골격근 내의 근섬유, 대식세포, 조절 T 세포, 섬유모세포 및 섬유세포에 의해 발현되고 (Li, Y., et al., Am J Pathol, 2004. 164(3): p. 1007-19; Lemos, D.R., et al., Nat Med, 2015. 21(7): p. 786-94; Villalta, S.A., et al., Sci Transl Med, 2014. 6(258): p. 258ra142; Wang, X., et al., J Immunol, 2016. 197(12): p. 4750-4761); 발현은 손상 시 및 질환에서 증가된다 (Li, Y., et al., Am J Pathol, 2004. 164(3): p. 1007-19; Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611-21; Bernasconi, P., et al., J Clin Invest, 1995. 96(2): p. 1137-44; Ishitobi, M., et al., Neuroreport, 2000. 11(18): p. 4033-5). TGFβ2 및 TGFβ3은 TGFβ1보다는 더 낮은 정도이지만, mdx 근육에서 (mRNA 수준에서) 또한 상향조절된다 (Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611-21; Zhou, L., et al., Neuromuscul Disord, 2006. 16(1): p. 32-8). 페시나(Pessina) 등은 최근에 이영양성 근육 내의 다중 기원을 갖는 세포가 TGFβ-의존성 경로를 통해 섬유발생 운명을 채택하는 것을 밝히기 위해 계통 추적 실험을 사용하였다 (Pessina, P., et al., Stem Cell Reports, 2015. 4(6): p. 1046-60).

[0434] 골은 신체에서 TGFβ의 가장 큰 저장소이다. 사실상, TGFβ 경로는 적어도 부분적으로 골모세포 분화 및/또는 파골세포 골 흡수를 조절함으로써 골 항상성 및 재형성에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 이 과정은 정상 상황, 및 조절이상의 경우 질환, 예컨대 골-관련 상태 및 암을 유발하거나 그를 악화시킬 수 있는 비정상적 상황 둘 다에 수반된다. 따라서, TGFβ1-선택적 억제제 예컨대 본원에 기재된 것들은 이러한 상태를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 억제제의 투여는 골 형성-흡수 균형을 회복하거나 정상화시키는 데 효과적이다. 일부 실시양태에서, TGFβ1 억제제는 조합 요법으로서 또 다른 요법, 예컨대 미오스타틴 억제제 및/또는 골-증진제와 함께 대상체에게 투여된다.

[0435] 골 상태 (예를 들어, 골격 질환)는 골다공증, 이형성증 및 골암을 포함한다. 골에서 기원하는 원발성 골암에 더하여, 많은 악성종양이 골로 전이되는 것으로 알려져 있고; 이들은 유방암, 폐암 (예를 들어, 편평 세포 암종), 갑상선암, 고환암, 신세포 암종, 전립선암, 및 다발성 골수종을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0436] 일부 실시양태에서, 이러한 상태는 근육 약화와 연관된다.

[0437] TGFβ1은 이환 조직의 만성 염증, 예컨대 인간 근육 이영양증을 동반한 섬유화 상태에서 역할을 할 수 있다. 뒤시엔느 근육 이영양증 (DMD)은 디스트로핀의 부재에 의해 유발된 중증, 진행성, 및 궁극적으로 치명적 질환이다 (Bushby, K., et al., Lancet Neurol, 2010. 9(1): p. 77-93). 디스트로핀의 결여는 수축-유발된 손상에 대한 감수성을 증가시켜, 지속적 근육 변성으로 이어진다 (Petrof, B.J., et al., Proc Natl Acad Sci U S A,

1993. 90(8): p. 3710-4; Dellorusso, C., et al., J Muscle Res Cell Motil, 2001. 22(5): p. 467-75; Pratt, S.J., et al., Cell Mol Life Sci, 2015. 72(1): p. 153-64). 복구의 반복된 라운드는 만성 염증, 섬유증, 위성 세포 풀의 소진, 이동성의 결과적인 상실 및 사망에 기여한다 (Bushby, K., et al., Lancet Neurol, 2010. 9(1): p. 77-93; McDonald, C.M., et al., Muscle Nerve, 2013. 48(3): p. 343-56). TGFβ1의 발현은 DMD를 갖는 환자에서 유의하게 증가되고, 이들 환자에서 관찰된 섬유증의 정도와 상관관계가 있다 (Bernasconi, P., et al., J Clin Invest, 1995. 96(2): p. 1137-44; Chen, Y.W., et al., Neurology, 2005. 65(6): p. 826-34). 과도한 ECM 침착은 근육의 수축 특성에 유해한 영향을 미치고, 근섬유가 그의 혈액 공급으로부터 고립됨에 따라 영양에 대한 접근이 제한될 수 있다 (Klingler, W., et al., Acta Myol, 2012. 31(3): p. 184-95). 최근에, 추가의 데이터는 근육 이영양증에 TGFβ1을 추가로 연루시켰다. LTBP4의 변이체가 마우스 및 인간에서 질환 중증도를 변형시키는 것으로 밝혀졌다. 마우스에서, LTBP4의 변이체는 디스트로핀 또는 ɣ-사르코글리칸이 결여된 마우스에서 보호적이다 (Coley, W.D., et al., Hum Mol Genet, 2016. 25(1): p. 130-45; Heydemann, A., et al., J Clin Invest, 2009. 119(12): p. 3703-12). 인간에서, 2개의 군은 독립적으로 LTBP4의 변이체가 수년에 걸쳐 보행의 상실을 지연시키면서, DMD에서 보호적인 것을 확인하였다 (Flanigan, K.M., et al., Ann Neurol, 2013. 73(4): p. 481-8; van den Bergen, J.C., et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2015. 86(10): p. 1060-5). 마우스 및 인간에서의 유전자 변이체의 성질이 상이하지만, 종 둘 다에서 보호적 변이체는 TGFβ 신호전달을 감소시킨다 (Heydemann, A., et al., J Clin Invest, 2009. 119(12): p. 3703-12); Ceco, E., et al., Sci Transl Med, 2014. 6(259): p. 259ra144). 골격근 생물학에서의 TGFβ1의 기능 중 다수는 정제된 활성 성장 인자가 동물 내로 주사되거나 또는 배양물 중 세포에 첨가되는 실험으로부터 추론되었다 (Massague, J., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(21): p. 8206-10; Li, Y., et al., Am J Pathol, 2004. 164(3): p. 1007-19; Mendias, C.L., et al., Muscle Nerve, 2012. 45(1): p. 55-9). TGFβ1의 구체적 기능에 대한 세포 콘텍스트의 중요성을 고려할 때 (예를 들어, 문헌 [Hinck et al., Cold Spring Harb. Perspect. Biol, 2016. 8(12)] 참조), 이들 실험에서 관찰된 효과 중 일부가 생체내 시토카인의 내인성 역할(들)을 반영하지 않는다는 것이 가능하다. 예를 들어, 재조합 TGFβ1, 미오스타틴 또는 GDF11을 사용한 인간 피부 섬유모세포의 치료는 이들 세포에서 유전자 발현의 거의 동일한 변화를 발생시키지만, 생체내에서 이들 단백질의 역할은 매우 상이하다 (Tanner, J.W., Khalil, A., Hill, J., Franti, M., MacDonnell, S.M., Growth Differentiation Factor 11 Potentiates Myofibroblast Activation, in Fibrosis: From Basic Mechanisms to Targeted therapies. 2016: Keystone, CO).

[0438] 다중 조사자가 생체내 성장 인자의 역할을 명확하게 하기 위해 TGFβ의 억제제를 사용하였다. 뮤-TGFβ 중화 항체 1D11을 사용한 mdx 마우스의 치료는 명백하게 감소된 섬유증 (조직학 및 히드록시프롤린 함량에 의함), 감소된 근육 손상 (감소된 혈청 크레아틴 키나제 및 보다 큰 근섬유 밀도), 및 개선된 근육 기능 (혈류량측정, 고립된 EDL 근육의 힘 생성, 및 증가된 앞다리 그립 강도)을 발생시킨다 (Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611-21; Andreetta, F., et al., J Neuroimmunol, 2006. 175(1-2): p. 77-86; Gumucio, J.P., et al., J Appl Physiol (1985), 2013. 115(4): p. 539-45). 또한, 우성 음성 TGFβ 제II형 수용체의 근섬유-특이적 발현은 심장독소 손상 후 및 δ-사르코글리칸-/- 마우스에서의 근육 손상에 대해 보호한다 (Accornero, F., et al., Hum Mol Genet, 2014. 23(25): p. 6903-15). 골격근에서 풍부하고 TGFβ 활성을 억제하는 프로테오글리칸 데코린은 mdx 마우스에서 및 열상 손상 후에 근육 섬유증을 감소시킨다 (Li, Y., et al., Mol Ther, 2007. 15(9): p. 1616-22; Gosselin, L.E., et al., Muscle Nerve, 2004. 30(5): p. 645-53). TGFβ 억제 활성을 갖는 다른 분자, 예컨대 수라민 (항신생물제) 및 로사르탄 (안지오텐신 수용체 차단제)은 근육 병리상태를 개선시키고 손상, 마르팡 증후군 및 근육 이영양증의 마우스 모델에서의 섬유증을 감소시키는 데 효과적이었다 (Spurney, C.F., et al., J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011. 16(1): p. 87-95; Taniguti, A.P., et al., Muscle Nerve, 2011. 43(1): p. 82-7; Bedair, H.S., et al., Am J Sports Med, 2008. 36(8): p. 1548-54; Cohn, R.D., et al., Nat Med, 2007. 13(2): p. 204-10). 상기 기재된 치료제 모두가 TGFβ1 또는 그의 신호전달을 억제하지만, 그들 중 어느 것도 TGFβ1 이소형에 대해 특이적이지 않다. 예를 들어, 1D11은 TGFβ1, 2 및 3 이소형에 결합하고 이를 억제한다 (Dasch, J.R., et al., J Immunol, 1989. 142(5): p. 1536-41). 수라민은 TGFβ1에 더하여 PDGF, FGF 및 EGF를 포함한 다중 성장 인자가 그의 수용체에 결합하는 능력을 억제한다 (Hosang, M., J Cell Biochem, 1985. 29(3): p. 265-73; Olivier, S., et al., Eur J Cancer, 1990. 26(8): p. 867-71; Scher, H.I. and W.D. Heston, Cancer Treat Res, 1992. 59: p. 131-51). 데코린은 또한 직접 결합 및 미오스타틴 억제제인 폴리스타틴의 상향조절 둘 다에 의해 미오스타틴 활성을 억제한다 (Miura, T., et al., Biochem Biophys Res Commun, 2006. 340(2): p. 675-80; Brandan, E., C. Cabello-Verrugio, and C. Vial, Matrix Biol, 2008. 27(8): p. 700-8; Zhu, J., et al., J Biol Chem, 2007.

282(35): p. 25852-63). 로사르탄은 레닌-안지오텐신-알도스테론 시스템에 대한 그의 효과를 통해, IGF-1/AKT/mTOR 경로를 포함한 추가의 신호전달 경로에 영향을 미친다 (Burks, T.N., et al., Sci Transl Med, 2011. 3(82): p. 82ra37; Sabharwal, R. and M.W. Chapleau, Exp Physiol, 2014. 99(4): p. 627-31; McIntyre, M., et al., Pharmacol Ther, 1997. 74(2): p. 181-94). 따라서, 이들 요법 모두는 독성뿐만 아니라, 그의 치료 효과에 기여할 수 있는 추가의 분자를 억제한다.

[0439] 근육 항상성, 복구 및 재생에서의 TGFβ의 상정된 역할을 고려할 때, TGFβ1 신호전달을 선택적으로 조정하는 작용제, 예컨대 본원에 기재된 모노클로날 항체는 지금까지 개발된 보다 광범위하게 작용하는 TGFβ 억제제와 연관된 독성 없이, 예컨대 만성/유전적 근육 이영양증 및 급성 근육 손상에서 손상된 근섬유를 치료하는 데 효과적일 수 있다.

[0440] 따라서, 본 발명은 생체내 TGFβ 효과의 모두는 아닌 하위세트를 우선적으로 조정하는 작용제를 사용하여 손상된 근섬유를 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 작용제는 TGFβ1 신호전달을 임의로 조정할 수 있다 ("이소형-특이적 조정").

[0441] 만성 근육 질환에서의 근섬유 복구:

[0442] 본 발명은 섬유증을 제한하고 근육 형태 및 기능의 정상화에 기여함으로써, DMD 환자에서 근육 질 및 기능을 개선시키는 방법을 포괄한다. TGFβ1이 또한 근발생을 억제하므로, TGFβ1 차단은 이영양성 근육에서 재생을 촉진하여, 추가의 치료 이익을 추가할 수 있다. TGFβ1 억제제는 디스트로핀 상향조절 요법, 예컨대 엑손디스(Exondys) 51 (에테플러센(Eteplirsen))과 조합하여 사용될 수 있다. 근육 이영양증에서의 TGFβ1 억제의 잠재적 치료 이익을 고려할 때, (1) TGFβ1의 역할(들)을 TGFβ2 및 TGFβ3의 것들로부터 구별하는 것, 및 (2) TGFβ1 억제가 어느 분자 콘텍스트(들)에서 가장 유익할 것인지 명확하게 하는 것이 중요하다. 상기 언급된 바와 같이, 범-TGFβ 억제제는 유의한 독성과 연관되어, 이들 화합물의 임상 용도를 제한하였다 (Anderton, M.J., et al., Toxicol Pathol, 2011. 39(6): p. 916-24; Stauber, A., et al., Clinical Toxicology, 2014. 4(3): p. 1-10). TGFβ 이소형(들) 중 어느 것이 이들 독성을 유발하는지 명확하지 않다. 기재된 독성 중 일부는 면역계에서의 TGFβ1 억제로 인한 것일 수 있다. 예를 들어, 1D11이 횡경막에서 섬유증의 수준을 유의하게 감소시켰지만, 치료는 또한 근육에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 수를 증가시켰으며, 이는 장기간 치료에 유해할 수 있는 범-TGFβ 억제 시의 증가된 염증 반응을 시사한다 (Andreetta, F., et al., J Neuroimmunol, 2006. 175(1-2): p. 77-86). 실제로, 근육으로부터의 T 세포의 고갈은 mdx 마우스의 근육 병리상태를 개선시키며, 이는 T-세포 매개 염증 반응이 이영양성 근육에 유해함을 시사한다 (Spencer, M.J., et al., Clin Immunol, 2001. 98(2): p. 235-43). 1D11 투여 시 T 세포 수의 증가는 조절 T (Treg) 세포에 대한 TGFβ1의 효과로 인한 것일 가능성이 있다. Treg는 GARP를 통해 그의 세포 표면 상에 TGFβ1을 제시하고, 이 복합체로부터의 TGFβ1의 방출은 Treg 억제 활성을 증진시키며, 따라서 T 세포 매개 염증을 제한한다 (Wang, R., et al., Mol Biol Cell, 2012. 23(6): p. 1129-39; Edwards, J.P., A.M. Thornton, and E.M. Shevach, J Immunol, 2014. 193(6): p. 2843-9; Nakamura, K., et al., J Immunol, 2004. 172(2): p. 834-42; Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, J Exp Med, 2001. 194(5): p. 629-44). 실제로, PC61 항체를 사용한 Treg의 고갈은 mdx 마우스의 횡경막에서 증가된 염증 및 근육 손상을 발생시켰으나, Treg 수 및 활성의 증대는 근육 손상을 감소시켰다 (Villalta, S.A., et al., Sci Transl Med, 2014. 6(258): p. 258ra142). 흥미롭게도, 면역억제 T 세포, Tr1 세포의 추가의 집단이 최근에 확인되었다. 이들 세포는 그의 억제 활성에 요구되는 대량의 TGFβ3을 생산한다 (Gagliani, N., et al., Nat Med, 2013. 19(6): p. 739-46; Okamura, T., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(33): p. 13974-9; Okamura, T., et al., Nat Commun, 2015. 6: p. 6329). 골격근에서의 Tr1 세포의 역할은 알려지지 않았으나, 1D11에 의한 TGFβ1 및 TGFβ3 둘 다의 억제가 Treg 및 Tr1 세포 둘 다를 억제함으로써 상가적 염증유발 효과를 가질 수 있다는 가능성이 존재한다.

[0443] TGFβ1 잠복기 및 활성화에 관해 상기 기재된 구조적 통찰은 TGFβ1의 활성화를 특이적으로 표적화하는 약물 발견에 대한 신규 접근법을 가능하게 한다 (Shi, M., et al., Nature, 2011. 474(7351): p. 343-9). 3개의 성숙 TGFβ 성장 인자 사이에 공유되는 고도의 서열 동일성은 잠복 복합체에 의해 공유되지 않으며, 이는 프로TGFβ1에 정교하게 특이적인 항체의 발견을 가능하게 한다. 항체 발견에 대한 적절한 접근법을 사용하여, 본 발명자들은 프로TGFβ1에 특이적으로 결합하는 항체 (Ab1, Ab2 및 Ab3)를 확인하였다 (예를 들어 도 4b 참조). 시험관내 공동-배양 시스템을 사용하여, 이들 항체가 TGFβ1의 인테그린-매개 방출을 억제하는 것으로 입증되었다. 이 시스템에서, 인간 피부 또는 마우스 골격근으로부터 유래된 섬유모세포는 잠복 TGFβ1의 공급원이고, αVβ6을 발현하는 세포주는 활성 TGFβ1의 방출을 가능하게 하며, 이는 이어서 SMAD2/3 반응성 루시페라제 리포터를 발현하는 제3 세포주를 사용하여 측정된다 (도 7g-7h). 이들 항체 중 1종인 Ab1은 생체내에서 시험되었고, 신

장 섬유증의 UUO (일측성 요관 폐쇄) 마우스 모델에서 효능을 보여주었다. 이 모델에서, 9 mg/kg/주 Ab1을 사용한 마우스 (n=10)의 치료는 TGFβ1-반응성 유전자의 상향조절을 막았고 (도 12a-12j), 손상 후 섬유증의 정도를 감소시켰다 (피크로시리우스 레드 염색에 의함) (도 12k). TGFβ1 특이적 요법은 범-TGFβ 억제제와 비교하여 개선된 효능 및 안전성 프로파일을 가질 수 있으며, 이는 DMD 집단에서와 같이 장기간 사용될 치료제에 대한 결정적인 측면이다. TGFβ1 억제 항체는 특이적 TGFβ1 억제가 DMD 또는 다른 근육 질환에 대한 치료제로서의 잠재력을 갖는지를 결정하고, 골격근 재생에서의 TGFβ1의 역할을 명확하게 하는 데 사용될 수 있다.

[0444] 만성 대 급성 근섬유 손상 및 최적 치료제의 선택

[0445] 급성 손상 (예컨대 달리 건강한 근육 또는 운동 뉴런에 대한 외상성 손상) 후의 정상이지만 재생하는 근육에서, 염증성 대식세포의 초기 침윤이 손상된 조직을 제거하고 위성 세포 활성화에 필요한 인자 (예를 들어, 시토카인)를 분비하는 데 요구되는 것으로 여겨진다. 후속적으로, 이들 세포는 M2 표현형으로 전환되어 상처 해소를 유도한다.

[0446] 대조적으로, 만성 상태, 예컨대 DMD를 포함한 질환에서, 염증유발 대식세포가 항상 우세하였고, M2로의 전환은 일어나지 않고 (또는 적어도 충분히 효율적이지 않게 일어남), 염증유발 대식세포는 계속해서 염증 및 근육 손상을 유도한다. DMD에서, NFkB 경로는 영속적으로 활성이며, 구성적 염증을 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 따라서, NFkB 억제제는 만성 염증을 감소시키기 위해 DMD 환자에게 투여될 수 있다.

[0447] 따라서, 만성 상태 예컨대 DMD에서, 치료 초점은 근육 재생과 달리 근육 복구에 있을 수 있다. 이는 DMD 근육 섬유가 결함이 있으나 파괴되지 않기 때문이며 - 이들은 막의 파열, 칼슘 과도의 조절이상, 및 대식세포로부터의 ROS 손상에 의해 손상된다. 이에 비해, 건강한 근육에 대한 손상의 경우에, 치료 초점은 재생에 있을 수 있다. 예를 들어, 심장독소 모델에서, 근섬유는 사멸되고 재생되어야 한다. 이는 외상성 손상, 예컨대 압궤 손상 후의 회복 과정을 모의한다.

[0448] 증거는 LRRC33이 M2-유사 표현형을 갖는 티오글리콜레이트-유발된 복막 대식세포에서 발현됨을 시사한다 (높은 수준의 아르기나제를 발현하고, iNOS를 발현하지 않고, 높은 수준의 CD206을 발현하는 것을 특징으로 함).

[0449] LRRC33이 주로 M2 세포 상에 발현되고 그의 TGFβ1 제시 ("콘텍스트")가 이들 세포의 상처 치유유발 효과에 중요한 상황에서, 복구 및/또는 근발생을 촉진하도록 LRRC33-매개 TGFβ1을 활성화하는 것이 유익할 수 있다. 다른 한편으로는, LRRC33이 또한 염증유발 M1 세포 상에 발현되는 상황에서, 염증이 특히 이영양성 환경, 예컨대 DMD에서 섬유증을 유도하는 것을 고려할 때, LRRC33-매개 TGFβ1을 억제하는 것이 유익할 수 있다. 따라서, 질환-연관 TGFβ1의 공급원/콘텍스트를 확인하는 것은 어느 수준의 선택성이 고려되어야 하는지 알려줄 TGFβ 신호전달의 올바른 조정제를 선택하는 데 중요한 단계일 수 있다 (예를 들어, 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 TGFβ1 조정제, 또는, 콘텍스트-특이적 TGFβ1 조정제; TGFβ1 억제제 또는 활성화제 등).

[0450] 만성 염증 외에도, DMD의 특징은 과도하고, 진행성인, 섬유증이다. 진행성 질환에서, 섬유증이 매우 심각하여 실제로 개별 근섬유를 그의 혈액 공급으로부터 고립시킬 수 있다. 이는 또한 근육의 수축 특성을 변경한다. 인간 환자에서, TGFβ1 상향조절의 정도와 섬유증 사이에 강한 상관관계가 존재하고, 섬유증의 정도와 음성 이동성 결과 사이에 강한 연결이 존재한다. 따라서, 일부 실시양태에서, LTBP-프로TGFβ1 억제제는 섬유증의 예방 및/또는 감소를 위해 이영양성 환자에게 투여되어 질환에서 ECM-연관 TGFβ1 효과를 선택적으로 표적화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 다양한 이소형- 및/또는 콘텍스트-선택적 작용제는 TGFβ1 신호전달의 억제를 달성하는 데 사용되어 (예를 들어, GARP 또는 LRRC33을 통해) 면역계에 대해 원치 않는 영향을 미치지 않으면서 섬유증을 예방하고 근발생을 촉진할 수 있다.

[0451] 치료, 투여

[0452] 본원에 개시된 방법을 실시하기 위해, 유효량의 상기 기재된 제약 조성물이 치료를 필요로 하는 대상체 (예를 들어, 인간)에게 적합한 경로, 예컨대 정맥내 투여를 통해, 예를 들어, 볼루스로서 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입에 의해, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활막내, 척수강내, 경구, 흡입 또는 국소 경로에 의해 투여될 수 있다. 제트 네뷸라이저 및 초음파 네뷸라이저를 포함하여, 액체 제제를 위한 상업적으로 입수가능한 네뷸라이저가 투여에 유용하다. 액체 제제는 직접적으로 연무화될 수 있고, 동결건조된 분말은 재구성 후에 연무화될 수 있다. 대안적으로, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 플루오로카본 제제 및 계량 용량 흡입기를 사용하여 에어로졸화되거나, 또는 동결건조되고 밀링된 분말로서 흡입될 수 있다.

[0453] 본원에 기재된 방법에 의해 치료될 대상체는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간일 수 있다. 포유동물은 가축,

스포츠 동물, 애완동물, 영장류, 말, 개, 고양이, 마우스 및 래트를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 치료를 필요로 하는 인간 대상체는 TGFβ-관련 적응증, 예컨대 상기 언급된 것들을 갖거나, 그에 대한 위험이 있거나, 또는 그를 가질 것으로 의심되는 인간 환자일 수 있다. TGFβ-관련 적응증을 갖는 대상체는 상용 의학적 검사, 예를 들어, 실험실 시험, 기관 기능 시험, CT 스캔 또는 초음파에 의해 확인될 수 있다. 이러한 적응증 중 임의의 것을 가질 것으로 의심되는 대상체는 적응증의 1종 이상의 증상을 나타낼 수 있다. 적응증에 대한 위험이 있는 대상체는 그 적응증에 대한 위험 인자 중 1개 이상을 갖는 대상체일 수 있다.

[0454] 본원에 사용된 용어 "유효량" 및 "유효 용량"은 그의 의도된 목적(들), 즉 허용되는 이익/위험 비로 조직 또는 대상체에서 목적하는 생물학적 또는 의학적 반응을 충족시키기에 충분한 화합물 또는 조성물의 임의의 양 또는 용량을 지칭한다. 예를 들어, 본 발명의 특정 실시양태에서, 의도된 목적은 TGFβ1 억제와 연관된 임상적으로 의미있는 결과를 달성하기 위해, 생체내에서 TGFβ1 활성화를 억제하는 것일 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 인식되는 바와 같이, 유효량은 치료되는 특정한 상태, 상태의 중증도, 연령, 신체 상태, 크기, 성별 및 체중을 포함한 개별 환자 파라미터, 치료 지속기간, 공동 요법 (존재하는 경우)의 성질, 특정한 투여 경로, 및 건강 진료의의 지식 및 경험 내의 기타 인자에 따라 달라진다. 이들 인자는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고, 상용 실험으로 다루어질 수 있다. 개별 성분 또는 그의 조합의 최대 용량, 즉 타당한 의학적 판단에 따른 가장 높은 안전한 용량이 사용되는 것이 일반적으로 바람직하다. 그러나, 환자가 의학적 이유, 심리적 이유 또는 실질적으로 임의의 다른 이유로 더 낮은 용량 또는 허용되는 용량을 요구할 수 있음이 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 것이다.

[0455] 실험적 고려사항, 예컨대 반감기가 일반적으로 투여량의 결정에 기여할 것이다. 예를 들어, 인간 면역계에 적합한 항체, 예컨대 인간화 항체 또는 완전 인간 항체가 항체의 반감기를 연장시키고 항체가 숙주의 면역계에 의해 공격받는 것을 막는 데 사용될 수 있다. 투여 빈도는 요법 과정에 걸쳐 결정 및 조정될 수 있고, 반드시는 아니지만 일반적으로 TGFβ-관련 적응증의 치료 및/또는 억제 및/또는 완화 및/또는 지연에 기초한다. 대안적으로, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체의 지속된 연속 방출 제제가 적절할 수 있다. 지속 방출을 달성하기 위한 다양한 제제 및 장치가 통상의 기술자에게 명백할 것이고, 본 개시내용의 범주 내에 있다.

[0456] 한 예에서, 본원에 기재된 바와 같은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체에 대한 투여량은 항체의 1회 이상의 투여(들)를 받은 개체에서 실험적으로 결정될 수 있다. 개체는 증분 투여량의 길항제를 받는다. 효능을 평가하기 위해, TGFβ-관련 적응증의 지표를 추적할 수 있다. 예를 들어, 근섬유 손상, 근섬유 복구, 근육에서의 염증 수준, 및/또는 근육에서의 섬유증 수준을 측정하는 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다.

[0457] 본 발명은 이소형-특이적 방식으로 TGFβ의 활성화 단계를 조정할 수 있는 작용제가 의약으로서 사용되는 경우에 개선된 안전성 프로파일을 제공할 수 있다는 인식을 포괄한다. 따라서, 본 발명은 TGFβ1에 특이적으로 결합하고 그의 활성화를 억제하며 TGFβ2 또는 TGFβ3에는 그렇지 않음으로써, TGFβ2 및/또는 TGFβ3 신호전달에 영향을 미침에 따른 원치 않는 부작용을 최소화하면서 생체내 TGFβ1 신호전달의 특이적 억제를 부여하는 항체 및 그의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0458] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 대상체에게 투여되는 경우에 독성이 아니다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 TGFβ1 및 TGFβ2 둘 다에 특이적으로 결합하는 항체와 비교하여 대상체에게 투여되는 경우에 감소된 독성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 TGFβ1 및 TGFβ3 둘 다에 특이적으로 결합하는 항체와 비교하여 대상체에게 투여되는 경우에 감소된 독성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3에 특이적으로 결합하는 항체와 비교하여 대상체에게 투여되는 경우에 감소된 독성을 나타낸다.

[0459] 일반적으로, 본원에 기재된 항체 중 임의의 것의 투여를 위해, 초기 후보 투여량은 약 2 mg/kg일 수 있다. 본 개시내용의 목적을 위해, 전형적인 1일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라, 약 0.1 μg/kg 내지 3 μg/kg 내지 30 μg/kg 내지 300 μg/kg 내지 3 mg/kg, 내지 30 mg/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 초과의 범위일 수 있다. 수일 또는 그 초과에 걸친 반복 투여를 위해, 상태에 따라, 치료는 목적하는 증상 억제가 발생할 때까지 또는 충분한 치료 수준이 달성되어 TGFβ-관련 적응증 또는 그의 증상이 완화될 때까지 지속된다. 예시적인 투여 요법은 항체를 초기 용량 약 2 mg/kg으로 투여한 후에 매주 유지 용량 약 1 mg/kg으로 투여하거나 격주로 유지 용량 약 1 mg/kg으로 투여하는 것을 포함한다. 그러나, 진료의가 달성하고자 하는 약동학적 붕괴 패턴에 따라 다른

투여 요법이 유용할 수 있다. 예를 들어, 1주 1-4회의 투여가 고려된다. 일부 실시양태에서, 약 3 μg/mg 내지 약 2 mg/kg (예컨대 약 3 μg/mg, 약 10 μg/mg, 약 30 μg/mg, 약 100 μg/mg, 약 300 μg/mg, 약 1 mg/kg, 및 약 2 mg/kg) 범위의 투여량이 사용될 수 있다. 약동학 실험은 본원에 개시된 항체 (예를 들어, Ab 2)의 혈청 농도가 전임상 동물 모델 (예를 들어, 마우스 모델)에 대한 투여 후 적어도 7일 동안 안정하게 유지되었음을 밝혀냈다. 어떠한 특정한 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, 이러한 투여-후 안정성은 항체가 투여되는 대상체 (예를 들어, 인간 대상체)에서 임상적으로 효과적인 혈청 농도를 유지하면서 항체가 덜 빈번하게 투여될 수 있으므로 유리할 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여 빈도는 1주마다, 2주마다, 4주마다, 5주마다, 6주마다, 7주마다, 8주마다, 9주마다 또는 10주마다 1회; 또는 1개월마다, 2개월마다 또는 3개월마다, 또는 그 초과마다 1회이다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다. 투여 요법 (사용된 항체 포함)은 시간 경과에 따라 달라질 수 있다.

[0460] 일부 실시양태에서, 정상 체중의 성인 환자의 경우, 약 0.3 내지 5.00 mg/kg 범위의 용량이 투여될 수 있다. 특정한 투여 요법, 예를 들어, 용량, 시기 및 반복은 특정한 개체 및 그 개체의 의료 병력, 뿐만 아니라 개별 작용제의 특성 (예컨대 작용제의 반감기, 및 다른 관련 고려사항)에 따라 달라질 것이다.

[0461] 본 개시내용의 목적을 위해, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체의 적절한 투여량은 사용되는 특정한 항체 (또는 그의 조성물), 적응증의 유형 및 중증도, 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 이전 요법, 환자의 임상 병력 및 길항체에 대한 반응, 및 담당 의사의 판단에 따라 달라질 것이다. 일부 실시양태에서, 임상의는 목적하는 결과를 달성하는 투여량에 도달할 때까지, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체를 투여할 것이다. GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체의 투여는 예를 들어, 수용자의 생리학적 상태, 투여 목적이 치료적인지 예방적인지 여부, 및 숙련된 진료의에게 공지된 다른 인자에 따라, 연속적 또는 간헐적일 수 있다. GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체의 투여는 미리 선택된 기간에 걸쳐 본질적으로 연속적일 수 있거나, 또는 예를 들어 TGFβ-관련 적응증이 발생하기 전에, 그 동안에, 또는 그 후에, 일련의 이격된 용량으로 이루어질 수 있다.

[0462] 본원에 사용된 용어 "치료하는"은 하나 이상의 활성제를 포함하는 조성물을 TGFβ-관련 적응증, 적응증의 증상, 또는 적응증에 대한 소인을 갖는 대상체에게 적응증, 적응증의 증상, 또는 적응증에 대한 소인을 치유하거나, 낫게 하거나, 완화시키거나, 경감시키거나, 변경하거나, 해소하거나, 호전시키거나, 개선시키거나, 이에 영향을 미칠 목적으로 적용 또는 투여하는 것을 지칭한다.

[0463] GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하여 TGFβ-관련 적응증을 완화시키는 것은 적응증의 발생 또는 진행을 지연시키거나, 또는 적응증의 중증도를 감소시키는 것을 포함한다. 적응증을 완화시키는 것은 반드시 치유적인 결과를 필요로 하지는 않는다. 본원에 사용된 TGFβ-관련 적응증과 연관된 적응증의 발생을 "지연시키는 것"은 적응증의 진행을 유예, 저해, 저속화, 지체, 안정화 및/또는 연기시키는 것을 의미한다. 이러한 지연은 치료되는 적응증 및/또는 개체의 병력에 따라 시간 길이가 다양할 수 있다. 적응증의 발생을 "지연" 또는 완화시키거나 또는 적응증의 발병을 지연시키는 방법은, 방법을 사용하지 않는 것과 비교하여 주어진 시간 프레임에서 적응증의 1종 이상의 증상이 발생할 확률을 감소시키고/거나 주어진 시간 프레임에서 증상의 정도를 감소시키는 방법이다. 이러한 비교는 전형적으로, 통계적으로 유의한 결과를 제공하기에 충분한 다수의 대상체를 사용하는 임상 연구에 기초한다.

[0464] DBA2/J 마우스는 LTBP4 대립유전자에서 40 bp 결실을 갖는다. 잠복 TGFb1이 회합된 ECM의 조절이상은 Ab1이 결합하는 에피토프를 노출시킬 수 있다. Ab1이 결합하는 에피토프가 노출되는 질환이 존재할 수 있고, 그러한 질환은 TGFb1 억제가 나타나는 경우 Ab1에 대한 치료 기회일 수 있다.

[0465] 조합 요법

[0466] 본 개시내용은 생체내 TGFβ 억제로부터 이익을 얻을 수 있는 대상체를 치료하기 위한 조합 요법으로서 사용되는 제약 조성물 및 관련 방법을 추가로 포괄한다. 이들 실시양태 중 임의의 것에서, 이러한 대상체는 적어도 1종의 본원에 기재된 TGFβ 억제제, 예를 들어, 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 제1 조성물을 동일하거나 중첩된 질환 또는 임상 상태를 치료하도록 의도된 적어도 1종의 추가의 치료제를 포함하는 제2 조성물과 함께 포함하는 조합 요법을 받을 수 있다. 제1 및 제2 조성물은 동일한 세포 표적, 또는 별개의 세포 표적 둘

다에 작용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 조성물은 동일하거나 중첩된 세트의 질환 또는 임상 상태의 증상 또는 측면을 치료하거나 완화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 조성물은 개별 세트의 질환 또는 임상 상태의 증상 또는 양상을 치료하거나 완화시킬 수 있다. 하나의 예를 들자면, 제1 조성물은 TGFβ 신호전달과 연관된 질환 또는 상태를 치료할 수 있는 한편, 제2 조성물은 동일한 질환 등과 연관된 염증 또는 섬유증을 치료할 수 있다. 이러한 조합 요법은 서로 함께 투여될 수 있다. 조합 요법과 관련된 어구 "와 함께"는, 조합 요법을 받는 대상체에서 제1 요법의 치료 효과가 제2 요법의 치료 효과와 시간적으로 및/또는 공간적으로 중첩된다는 것을 의미한다. 따라서, 조합 요법은 요법의 공동 투여를 위한 단일 제제로서, 또는 순차적 투여를 위한 개별 제제로서 제제화될 수 있다.

[0467] 바람직한 실시양태에서, 조합 요법은 질환의 치료에서 상승작용적 효과를 생성한다. 용어 "상승작용적"은 응집체에서 각각의 단독요법의 상가적 효과 (예를 들어, 더 큰 효능)보다 더 큰 효과를 지칭한다.

[0468] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 제약 조성물을 포함하는 조합 요법은 또 다른 요법 (예컨대 제2 작용제의 단독요법)에 의해 생성되는 것과 전체적으로 등가인 효능을 생성하지만 제2 작용제의 단독요법과 비교하여 제2 작용제와 연관된 보다 적은 원치 않는 유해 효과 또는 덜 심한 독성과 연관된다. 일부 실시양태에서, 이러한 조합 요법은 제2 작용제의 더 낮은 투여량을 가능하게 하지만, 전체적 효능을 유지한다. 이러한 조합 요법은 장기간 치료가 보장되고/거나 소아과 환자를 수반하는 환자 집단에 특히 적합할 수 있다.

[0469] 따라서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은, TGFβ1 단백질 활성화의 감소 및 TGFβ1 신호전달과 연관된 질환 또는 상태의 치료 또는 예방을 위한 조합 요법에 사용하기 위한 제약 조성물 및 방법을 제공한다. 따라서, 방법 또는 제약 조성물은 제2 요법을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 요법은 TGFβ1 신호전달과 연관된 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 데 유용할 수 있다. 제2 요법은 표적화된 질환과 연관된 적어도 1종의 증상(들)을 감소시키거나 치료할 수 있다. 제1 및 제2 요법은 유사한 또는 관련되지 않은 작용 메카니즘에 의해 그의 생물학적 효과를 발휘할 수 있거나; 또는 제1 및 제2 요법 중 하나 또는 둘 다는 다수의 작용 메카니즘에 의해 그의 생물학적 효과를 발휘할 수 있다.

[0470] 본원에 기재된 제약 조성물이 각각의 기재된 실시양태에 대해 제1 및 제2 요법을 동일한 제약상 허용되는 담체 내에 또는 상이한 제약상 허용되는 담체 내에 가질 수 있음이 이해되어야 한다. 제1 및 제2 요법이 기재된 실시양태 내에서 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있음이 추가로 이해되어야 한다.

[0471] 본 발명의 1종 이상의 항-TGFβ 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 추가의 치료제 중 1종 이상과 조합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 항-TGFβ 항체와 함께 사용될 수 있는 추가의 치료제의 예는 TGFβ 슈퍼패밀리의 구성원의 조정제, 예컨대 미오스타틴 억제제, 및 GDF11 억제제; VEGF 효능제; IGF1 효능제; FXR 효능제; CCR2 억제제; CCR5 억제제; 이중 CCR2/CCR5 억제제; 리실 옥시다제-유사-2 억제제; ASK1 억제제; 아세틸-CoA 카르복실라제 (ACC) 억제제; p38 키나제 억제제; 피르페니돈; 닌테다닙; M-CSF 억제제 (예를 들어, M-CSF 수용체 길항제 및 M-CSF 중화제); MAPK 억제제 (예를 들어, Erk 억제제), 면역 체크포인트 효능제 또는 길항제; IL-11 길항제; 및 IL-6 길항제 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. TGFβ 억제제와 함께 사용될 수 있는 추가의 치료제의 다른 예는 인돌아민 2,3-디옥시게나제 (IDO) 억제제, 티로신 키나제 억제제, Ser/Thr 키나제 억제제, 이중-특이적 키나제 억제제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 이러한 작용제는 PI3K 억제제, PKC 억제제 또는 JAK 억제제일 수 있다.

[0472] 일부 실시양태에서, 추가의 작용제는 체크포인트 억제제이다. 일부 실시양태에서, 추가의 작용제는 PD-1 길항제, PDL1 길항제, PD-L1 또는 PDL2 융합 단백질, CTLA4 길항제, GITR 효능제, 항-ICOS 항체, 항-ICOSL 항체, 항-B7H3 항체, 항-B7H4 항체, 항-TIM3 항체, 항-LAG3 항체, 항-OX40 항체, 항-CD27 항체, 항-CD70 항체, 항-CD47 항체, 항-41BB 항체, 항-PD-1 항체, 종양용해 바이러스 및 PARP 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0473] 일부 실시양태에서, 추가의 작용제는 T-세포 공동자극 분자, 예컨대 억제 공동자극 분자 및 활성화 공동자극 분자에 결합한다. 일부 실시양태에서, 추가의 작용제는 항-CD40 항체, 항-CD38 항체, 항-KIR 항체, 항-CD33 항체, 항-CD137 항체, 및 항-CD74 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0474] 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 방사선이다. 일부 실시양태에서, 추가의 작용제는 화학요법제이다. 일부 실시양태에서, 화학요법제는 탁솔이다. 일부 실시양태에서, 추가의 작용제는 항염증제이다. 일부 실시양태에서, 추가의 작용제는 단핵구/대식세포 동원 및/또는 조직 침윤의 과정을 억제한다. 일부 실시양태에서, 추가의 작용제는 간 성상 세포 활성화의 억제제이다. 일부 실시양태에서, 추가의 작용제는 케모카인 수용체 길항제, 예를 들어, CCR2 길항제 및 CCR5 길항제이다. 일부 실시양태에서, 이러한 케모카인 수용체 길항제는 이중 특이

적 길항제, 예컨대 CCR2/CCR5 길항제이다. 일부 실시양태에서, 조합 요법으로 투여될 추가의 작용제는 성장 인자 또는 그의 조절제의 TGFβ 슈퍼패밀리의 구성원이거나, 또는 이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 작용제는 GDF8/미오스타틴 및 GDF11의 조정제 (예를 들어, 억제제와 활성화제)로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 이러한 작용제는 GDF8/미오스타틴 신호전달의 억제제이다. 일부 실시양태에서, 이러한 작용제는 프로/잠복 미오스타틴 복합체에 특이적으로 결합하고 미오스타틴의 활성화를 차단하는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 프로/잠복 미오스타틴 복합체에 특이적으로 결합하고 미오스타틴의 활성화를 차단하는 모노클로날 항체는 유리 성숙 미오스타틴에 결합하지 않는다.

[0475] 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 CAR-T 요법을 포함한다.

[0476] 이러한 조합 요법은 유리하게는 보다 낮은 투여량의 투여되는 치료제를 이용함으로써, 다양한 단독요법과 연관된 가능한 독성 또는 합병증을 피할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 TGFβ1의 이소형-특이적 억제제의 사용은 요법 (예를 들어 관리 표준)에 불량하게 반응성이거나 반응성이지 않은 자를 보다 반응성이게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 TGFβ1의 이소형-특이적 억제제의 사용은 여전히 환자에서 동등한 임상 효능을 생성하나 더 적은 또는 더 낮은 정도의 약물-관련 독성 또는 유해 사건을 생성하는 요법 (예를 들어, 관리 표준)의 감소된 투여량을 가능하게 할 수 있다.

[0477] TGFβ1 활성의 억제

[0478] 본 개시내용의 방법은 하나 이상의 생물계에서의 TGFβ1 성장 인자 활성을 억제하는 방법을 포함한다. 이러한 방법은 하나 이상의 생물계를 본 개시내용의 항체 및/또는 조성물과 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 이들 방법은 생물계 (예를 들어 세포 함요 또는 대상체)에서 유리 성장 인자의 수준을 변형시키는 것을 포함한다. 이러한 방법에 따른 항체 및/또는 조성물은 본원에 기재된 재조합 단백질, 단백질 복합체 및/또는 항체 또는 그의 항원 부분을 포함하나 이에 제한되지는 않는 생체분자를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0479] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 성장 인자 활성을 감소시키거나 제거하는 데 사용될 수 있으며, 본원에서 "억제 방법"으로 지칭된다. 일부 이러한 방법은 TGFβ 복합체 (예를 들어, GARP, LTBP1, LTBP3 및/또는 LRRC33과 복합체화된 TGFβ1)에서의 성숙 성장 인자 체류 및/또는 성장 인자의 TGFβ 복합체 내로의 재회합의 촉진을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 억제 방법은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체의 사용을 포함할 수 있다. 일부 억제 방법에 따르면, 1종 이상의 억제 항체가 제공된다.

[0480] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체, 그의 항원 결합 부분 및 조성물은 TGFβ1 활성화를 억제하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체를 본원에 기재된 항체, 그의 항원 결합 부분 또는 제약 조성물에 노출시키는 것을 포함하는 TGFβ1 활성화를 억제하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 항체, 그의 항원 결합 부분 또는 제약 조성물은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체로부터의 성숙 TGFβ1의 방출을 억제한다. 일부 실시양태에서, 방법은 시험관내에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 방법은 생체내에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 방법은 생체외에서 수행된다.

[0481] 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체 또는 LRRC33-TGFβ1 복합체는 세포의 외부 표면에 존재한다.

[0482] 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체 또는 LRRC33-TGFβ1 복합체를 발현하는 세포는 T-세포, 섬유모세포, 근섬유모세포, 대식세포, 단핵구, 수지상 세포, 항원 제시 세포, 호중구, 골수성-유래 억제 세포 (MDSC), 림프구, 비만 세포 또는 소교세포이다. T-세포는 조절 T 세포 (예를 들어, 면역억제 T 세포)일 수 있다. 호중구는 활성화된 호중구일 수 있다. 대식세포는 활성화된 (예를 들어, 분극화된) 대식세포, 예컨대 섬유화유발 및/또는 종양-연관 대식세포 (TAM), 예를 들어, M2c 하위유형 및 M2d 하위유형 대식세포일 수 있다. 일부 실시양태에서, 대식세포는 대식세포에서 암유발 표현형을 추가로 유도할 수 있는 종양-유래 인자 (예를 들어, 시토카인, 성장 인자 등)에 노출된다. 일부 실시양태에서, 이러한 종양-유래 인자는 CSF-1/M-CSF이다.

[0483] 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체 또는 LRRC33-TGFβ1 복합체를 발현하는 세포는 암 세포, 예를 들어, 순환 암 세포 및 종양 세포이다.

[0484] 일부 실시양태에서, LTBP1-TGFβ1 복합체 또는 LTBP3-TGFβ1 복합체는 세포외 매트릭스 (즉, ECM의 성분)에 결합된다. 일부 실시양태에서, 세포외 매트릭스는 피브릴린 및/또는 피브로넥틴을 포함한다. 일부

실시양태에서, 세포외 매트릭스는 RGD 모티프를 포함하는 단백질을 포함한다.

[0485] LRRC33은 선택적 세포 유형, 특히 단핵구 및 대식세포를 포함한 골수계의 것들에서 발현된다. 단핵구는 골수에서의 전구세포로부터 기원하고 혈류에서 순환하고 말초 조직에 도달한다. 이어서, 순환 단핵구는 그들이 단핵구의 대식세포, 수지상 세포 등으로의 분화를 촉발하는 다양한 인자, 예컨대 시토카인 및 케모카인의 패널을 포함하는 국부 환경 (예를 들어, 조직-특이적, 질환-연관 등)에 노출되는 조직으로 이동할 수 있다. 이들은 예를 들어 폐에서의 폐포 대식세포, 골수에서의 파골세포, CNS에서의 소교세포, 결합 조직에서의 조직구, 간에서의 쿠퍼 세포, 및 갈색 지방 조직에서의 갈색 지방 조직 대식세포를 포함한다. 고형 종양에서, 침윤된 대식세포는 종양-연관 대식세포 (TAM), 종양-연관 호중구 (TAN), 및 골수성-유래 억제 세포 (MDSC) 등일 수 있다. 이러한 대식세포는 활성화된 섬유모세포, 예컨대 암종-연관 (또는 암-연관) 섬유모세포 (CAF) 및/또는 기질을 활성화시키고/거나 그와 연관될 수 있다. 따라서, LRRC33-함유 복합체로부터의 성숙 TGFβ1의 방출을 억제하는 본원에 기재된 TGFβ1 활성화의 억제제는 세포 표면 상에 LRRC33-프로TGFβ1을 발현하는 이들 세포 중 임의의 것을 표적화할 수 있다.

[0486] 일부 실시양태에서, LRRC33-TGFβ1 복합체는 섬유화유발 (M2-유사) 대식세포의 외부 표면에 존재한다. 일부 실시양태에서, 섬유화유발 (M2-유사) 대식세포는 섬유화 미세환경에 존재한다. 일부 실시양태에서, 섬유화유발 (M2-유사) 대식세포의 외부 표면에서 LRRC33-TGFβ1 복합체를 표적화하는 것은 단독으로 LTBP1-TGFβ1 및/또는 LTBP1-TGFβ1 복합체를 표적화하는 것과 비교하여 우수한 효과를 제공한다. 일부 실시양태에서, M2-유사 대식세포는 차등 표현형, 예컨대 M2c 및 M2d TAM-유사 대식세포를 갖는 다중 하위유형으로 추가로 분극화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 대식세포는 TGFβ1, CCL2 (MCP-1), CCL22, SDF-1/CXCL12, M-CSF (CSF-1), IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, CXCR4, VEGF, PDGF, 프로스타글란딘-조절제 예컨대 아라키돈산 및 시클로옥시게나제-2 (COX-2), 부갑상선 호르몬-관련 단백질 (PTHrP), RUNX2, HIF1α, 및 메탈로프로테이나제를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 종양 미세환경에 존재하는 다양한 인자 (예를 들어, 성장 인자, 케모카인, 시토카인 및 ECM-재형성 분자)에 의해 활성화될 수 있다. 이러한 인자 중 1종 이상에 대한 노출은 단핵구/대식세포를 종양유발 표현형으로 추가로 유도할 수 있다. 차례로, 이들 활성화된 종양-연관 세포는 또한 다른 세포의 종양유발 세포, 예를 들어, CAF, TAN, MDSC 등으로의 동원 및/또는 분화를 용이하게 할 수 있다. 기질 세포는 또한 대식세포 활성화에 반응하여 ECM 재형성, 및 결국 혈관화, 침습, 및 전이에 영향을 미칠 수 있다.

[0487] 일부 실시양태에서, GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체는 세포외 매트릭스에 결합된다. 일부 실시양태에서, 세포외 매트릭스는 피브릴린을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 매트릭스는 RGD 모티프를 포함하는 단백질을 포함한다.

[0488] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체, 그의 항원 결합 부분 또는 제약 조성물을 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 TGFβ1 단백질 활성화를 감소시키는 것을 포함하는, 대상체에서 TGFβ1 단백질 활성화를 감소시키는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 섬유증을 갖거나 또는 가질 위험이 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖거나 또는 가질 위험이 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 치매를 갖거나 또는 가질 위험이 있다.

[0489] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 본원에 기재된 바와 같이, 조절 T 세포 (Treg)의 억제 활성을 감소시킨다.

[0490] TGFβ-관련 적응증과 연관된 질환/장애를 완화시키는 데 사용하기 위한 키트

[0491] 본 개시내용은 또한 TGFβ-관련 적응증과 연관된 질환/장애를 완화시키는 데 사용하기 위한 키트를 제공한다. 이러한 키트는 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분, 예를 들어, 본원에 기재된 것들 중 임의의 것을 포함하는 1개 이상의 용기를 포함할 수 있다.

[0492] 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 방법 중 임의의 것에 따라 사용하는 것에 대한 지침서를 포함할 수 있다. 포함된 지침서는 본원에 기재된 것들과 같은 표적 질환을 치료하거나, 그의 발병을 지연시키거나, 또는 그를 완화시키기 위해 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 투여하는 것의 설명을 포함한다. 키트는 개체가 표적 질환을 갖는지 확인하는 것에 기초하여 치료에 적합한 개체를 선택하는 것의 설명을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 지침서는 표적 질환의 위험이 있는 개체에게 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 투여하는 것의 설명을 포함한다.

[0493] GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 사용에 관한 지침서는 일반적으로 의도된 치료를 위한 투여량, 투여 스케줄 및 투여 경로에 관한 정보를 포함한다. 용기는 단위 용량, 벌크 패키지 (예를 들어, 다중-용량 패키지), 또는 하위-단위 용량일 수 있다. 본 개시내용의 키트에서 공급되는 지침서는 전형적으로 라벨 또는 패키지 삽입물 (예를 들어, 키트에 포함된 종이 시트) 상의 서면 지침서이지만, 기계에서 판독가능한 지침서 (예를 들어, 자기 또는 광학 저장 디스크 상에 보유된 지침서)가 또한 허용된다. 라벨 또는 패키지 삽입물은 조성물이 TGFβ-관련 적응증과 연관된 질환 또는 장애를 치료하고/거나, 그의 발병을 지연시키고/거나, 그를 완화시키는 데 사용되는 것을 나타낸다. 지침서는 본원에 기재된 방법 중 임의의 것을 실시하기 위해 제공될 수 있다.

[0494] 본 개시내용의 키트는 적합한 포장으로 제공된다. 적합한 포장은 바이알, 병, 자(jar), 가요성 포장 (예를 들어, 밀봉된 마일라(Mylar) 또는 플라스틱 백) 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정한 장치, 예컨대 흡입기, 비강 투여 장치 (예를 들어, 아토마이저) 또는 주입 장치 예컨대 미니펌프와 조합하여 사용하기 위한 패키지 또한 고려된다. 키트는 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어 용기는 피하 주사 바늘에 의해 관통가능한 마개를 갖는 바이알 또는 정맥내 용액 백일 수 있음). 용기는 또한 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어 용기는 피하 주사 바늘에 의해 관통가능한 마개를 갖는 바이알 또는 정맥내 용액 백일 수 있음). 조성물 중의 적어도 1종의 활성제는 본원에 기재된 것들과 같은 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분이다.

[0495] 키트는 추가의 성분 예컨대 완충제 및 해석 정보를 임의로 제공할 수 있다. 통상적으로, 키트는 용기, 및 용기 상에 있거나 용기와 회합된 라벨 또는 패키지 삽입물(들)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 상기 기재된 키트의 내용물을 포함하는 제조 물품을 제공한다.

[0496] GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체를 검출하기 위한 검정

[0497] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법 및 조성물은 대상체로부터 수득된 샘플에서 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체를 검출하는 방법에 관한 것이다. 본원에 사용된 "대상체"는 개별 유기체, 예를 들어, 개별 포유동물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 포유동물이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 영장류이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 설치류이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 양, 염소, 소, 가금류, 고양이 또는 개이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 척추동물, 양서류, 파충류, 어류, 곤충, 파리 또는 선충류이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 연구용 동물이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 유전자 조작되며, 예를 들어, 유전자 조작된 비-인간 대상체이다. 대상체는 어느 한 성별일 수 있고 임의의 발달 단계에 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 환자 또는 건강한 지원자이다.

[0498] 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 샘플에서 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체를 검출하는 방법은 (a) 항원이 샘플 내에 존재하는 경우, 항원에 대한 항체의 결합에 적합한 조건 하에 GARP-TGFβ1 복합체, LTBP1-TGFβ1 복합체, LTBP3-TGFβ1 복합체 및/또는 LRRC33-TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하는 항체와 샘플을 접촉시킴으로써 결합 복합체를 형성하는 것; 및 (b) 항원에 결합된 항체의 수준을 결정하는 것 (예를 들어, 결합 복합체의 수준을 결정하는 것)을 수반한다.

[0499] 한 실시양태에서, 표면 상에 고정화된 비오티닐화된 잠복 TGFβ1 복합체를 이용하는 스크리닝 검정은 테더를 제공함으로써 인테그린에 의한 잠복 TGFβ의 활성화를 가능하게 한다. 다른 비-인테그린 활성화제가 또한 그 시스템에서 시험될 수 있다. 리포터 세포 또는 다른 TGFβ-의존성 세포성 반응을 통해 판독될 수 있다.

[0500] TGFβ 활성화를 측정하기 위한 세포-기반 검정

[0501] TGFβ의 활성화 (및 TGFβ 시험 억제제, 예컨대 항체에 의한 그의 억제)는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, TGFβ의 인테그린-매개 활성화는 세포-기반 검정, 예컨대 본원에 보다 상세하게 기재된 "CAGA12" 루시페라제 검정에 이용될 수 있다. 제시된 바와 같이, 이러한 검정 시스템은 하기 성분을 포함할 수 있다: i) TGFβ의 공급원 (재조합, 내인성 또는 형질감염됨); ii) 활성인자 예컨대 인테그린의 공급원 (재조합, 내인성 또는 형질감염됨); 및 iii) TGFβ 활성화에 반응하는 리포터 시스템, 예컨대 TGFβ에 반응하고 신호를 판독가능한 산출물로 번역할 수 있는 TGFβ 수용체를 발현하는 세포 (예를 들어, CAGA12 세포 또는 다른 리포터 세포주에서의 루시페라제 활성). 일부 실시양태에서, 리포터 세포주는 TGFβ-반응성 프로모터 (예를 들어, PAI-1 프로모터)의 제어 하의 리포터 유전자 (예를 들어, 루시페라제 유전자)를 포

함한다. 일부 실시양태에서, 감수성을 부여하는 특정 프로모터 요소는 리포터 시스템 내로 혼입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 프로모터 요소는 CAGA12 요소이다. 검정에 사용될 수 있는 리포터 세포주는 예를 들어 본원에 참조로 포함된 문헌 [Abe et al. (1994) Anal Biochem. 216(2): 276-84]에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 상기 언급된 검정 성분은 동일한 공급원 (예를 들어, 동일한 세포)으로부터 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 언급된 검정 성분 중 2종은 동일한 공급원으로부터 제공되고, 제3 검정 성분은 상이한 공급원으로부터 제공된다. 일부 실시양태에서, 모든 3종의 검정 성분은 상이한 공급원으로부터 제공된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 인테그린 및 잠복 TGFβ 복합체 (프로TGFβ 및 제시 분자)는 동일한 공급원 (예를 들어, 동일한 형질감염된 세포주)으로부터 검정을 위해 제공된다. 일부 실시양태에서, 인테그린 및 TGF는 별개의 공급원 (예를 들어, 2종의 상이한 세포주, 정제된 인테그린 및 형질감염된 세포의 조합)으로부터 검정을 위해 제공된다. 세포가 검정 성분 중 1종 이상의 공급원으로서 사용되는 경우에, 검정의 이러한 성분은 세포에 대해 내인성이거나, 세포에서 안정하게 발현되거나, 일시적으로 형질감염되거나, 또는 그의 임의의 조합일 수 있다. 항체 Ab1 및 Ab2를 사용한 GARP-프로TGFβ1 복합체 또는 LRRC33-프로TGFβ1 복합체의 억제를 입증하는 TGFβ 활성화를 측정하기 위한 세포-기반 검정의 비제한적 예시적인 실시양태로부터의 결과가 본원에 개시된다. 이 예시적인 검정에서, GARP-TGFβ1 복합체에 대한 Ab1의 IC50 (μg/mL)은 0.445였고, LRRC33-TGFβ1 복합체에 대한 Ab1의 IC50 (μg/mL)은 1.325였다.

[0502] 통상의 기술자는 다양한 적합한 구성에 이러한 검정을 용이하게 적합화시킬 수 있다. 예를 들어, TGFβ의 다양한 공급원이 고려될 수 있다. 일부 실시양태에서, TGFβ의 공급원은 TGFβ를 발현하고 침착시키는 세포 (예를 들어, 1차 세포, 전파 세포, 불멸화 세포 또는 세포주 등)이다. 일부 실시양태에서, TGFβ의 공급원은 적합한 수단을 사용하여 검정 시스템에 고정화된 정제된 및/또는 재조합 TGFβ이다. 일부 실시양태에서, 검정 시스템에 고정화된 TGFβ는 탈세포화의 존재 또는 부재 하에, 검정 플레이트 상의 세포외 매트릭스 (ECM) 조성물 내에 제시되며, 이는 섬유모세포-유래 TGFβ를 모방한다. 일부 실시양태에서, TGFβ는 검정에 사용되는 세포의 세포 표면 상에 제시된다. 추가적으로, 선택된 제시 분자는 적합한 잠복-TGFβ 복합체를 제공하기 위해 검정 시스템에 포함될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 어느 제시 분자(들)가 특정 세포 또는 세포 유형에 존재하거나 또는 발현될 수 있는지 용이하게 결정할 수 있다. 이러한 검정 시스템을 사용하여, 시험 작용제 (예컨대 항체)의 존재 또는 부재 하의 TGFβ 활성화의 상대적 변화는 시험관내 TGFβ 활성화에 대한 시험 작용제의 효과를 평가하기 위해 용이하게 측정될 수 있다. 예시적인 세포-기반 검정으로부터의 데이터가 하기 실시예 섹션에 제공된다.

[0503] 이러한 세포-기반 검정은 연구되는 TGFβ 이소형, 잠복 복합체 (예를 들어, 제시 분자)의 유형 등에 따라 다수의 방식으로 변형 또는 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, TGFβ를 활성화시킬 수 있는 인테그린을 발현하는 것으로 알려져 있는 세포는 검정에서 인테그린의 공급원으로서 사용될 수 있다. 이러한 세포는 SW480/β6 세포 (예를 들어, 클론 1E7)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 인테그린-발현 세포는 관심 제시 분자 (예컨대 GARP, LRRC33, LTBP (예를 들어, LTBP1 또는 LTBP3) 등)를 코딩하는 플라스미드 및 관심 TGFβ 이소형의 프로-형태 (예컨대 프로TGFβ1)를 코딩하는 플라스미드로 공동-형질감염될 수 있다. 형질감염 후에, 세포를 형질감염된 유전자의 발현을 가능하게 하기에 충분한 시간 (예를 들어, 약 24시간) 동안 인큐베이션하고, 세포를 세척하고, 시험 작용제 (예를 들어, 항체)의 연속 희석물과 함께 인큐베이션한다. 이어서, 리포터 세포주 (예를 들어, CAGA12 세포)를 검정 시스템에 첨가한 후, TGFβ 신호전달을 가능하게 하는 적절한 인큐베이션 시간을 거친다. 시험 작용제의 첨가 후 인큐베이션 기간 (예를 들어, 약 18-20시간) 후에, 신호/판독 (예를 들어, 루시페라제 활성)이 적합한 수단을 사용하여 검출된다 (예를 들어, 루시페라제-발현 리포터 세포주의 경우, 브라이트-글로 (Bright-Glo) 시약 (프로메가(Promega))이 사용될 수 있음). 일부 실시양태에서, 루시페라제 형광은 오토게인 (autogain) 설정 하에 바이오텍(BioTek) (시너지(Synergy) H1) 플레이트 판독기를 사용하여 검출될 수 있다.

[0504] 세포-기반 TGFβ 검정의 대표적인 결과가 본원의 도 7에 제공된다. 데이터는 본 발명의 예시적인 항체가 콘텍스트-비의존성 방식으로 TGFβ1의 활성화를 선택적으로 억제할 수 있다는 것을 입증한다.

[0505] 핵산

[0506] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체, 그의 항원 결합 부분 및/또는 조성물은 핵산 분자에 의해 코딩될 수 있다. 이러한 핵산 분자는 비제한적으로, DNA 분자, RNA 분자, 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, mRNA 분자, 벡터, 플라스미드 등을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 화합물 및/또는 조성물을 코딩하는 핵산 분자를 발현하기 위해 프로그램화되거나 생성된 세포를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 본 개시내용의 핵산은 코돈-최적화된 핵산을 포함한다. 코돈-최적화된 핵산을 생성하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 각각의 내용 전문이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 5,786,464 및 6,114,148에 기재된

것들을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0507] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이는 어떠한 방식으로든 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌, 특허 및 공개 특허 출원의 전체 내용, 뿐만 아니라 도면은 본원에 참조로 포함된다.

[0508] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되는 것이며 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0509] 실시예

[0510] 실시예 1: TGFβ1의 억제

[0511] TGFβ 슈퍼패밀리는 활성 성장 인자와 복합체화된 프로펩티드를 포함한다 (도 1). 복합체를 안정화시켜 보다 선택적이고 강력한 억제를 발생시키는 항체를 수득하기 위한 선택 전략이 개발되었다.

[0512] HEK293-기반 발현 시스템을 사용하여, NiNTA 친화도 및 겔 여과를 수행하여 멀티밀리그램 양의 정제된 단백질을 수득하고, 이를 LTBP에 복합체화된 TGFβ1 (LTBP-TGFβ1 복합체) 및 GARP에 복합체화된 TGFβ1 (GARP-TGFβ1 복합체)을 생성하는 데 사용하였다 (도 3). 제조된 단백질의 다양성은 종 교차-반응성 및 에피토프 맵핑의 시험을 가능하게 하였다.

[0513] 후보 항체는 시험관내 발광 검정을 사용하여 시험하였다. 스크린에서, 성장 인자 방출을 억제하는 항체는 정상 활성화를 위한 자극에 직면한 경우에 리포터 세포를 턴 "오프"하였다. Ab1 및 Ab2는 잠복 TGFβ1 복합체의 활성화의 억제제인 것으로 밝혀졌고, 마우스에 대해 교차-반응성이었다.

[0514] 인간 TGFβ1을 발현하는 세포에서의 Ab1의 초기 용량-반응 분석 곡선은 TGFβ1 활성 억제를 보여주었다. 보다 감수성인 CAGA12 리포터 세포주를 사용하여, Ab1은 인간 프로TGFβ1 활성의 유사한 억제를 보여주었다. 게다가, GARP 복합체의 억제는 건강한 공여자 혈액으로부터 단리된 T 세포 중 분열 T 이펙터 세포 (Teff)의 퍼센트에 의해 측정된 바와 같이 T 조절 세포 (Treg)의 억제 활성을 차단하는 것으로 밝혀졌다 (도 9a). 유사한 결과가 Ab3에 대해 관찰되었다. 인간 간 성상 세포 및 인간 피부 섬유모세포에서의 Ab3의 용량-반응 분석 곡선은 TGFβ1 활성 억제를 보여주었고 (도 7f), Ab3은 또한 억제 Treg 활성을 억제하는 것으로 나타났다 (도 9b).

[0515] GARP-프로TGFβ1 억제제의 친화도는 인간 GARP-프로TGFβ1 세포에 대한 옥테트 검정에 의해 측정된 한편, 활성은 인간 GARP-프로TGFβ1 억제를 시험하는 CAGA12 리포터 세포에 의해 측정되었다. 본원에 제공된 복합체에 대한 항체 Ab1 및 Ab2의 친화도를 측정하는 데 사용되는 프로토콜은 표 6에 요약된다. 결과는 표 7에 제시된다.

[0516] 표 6: 옥테트 결합 검정을 수행하기 위한 프로토콜

재료: - 96 웰 흑색 폴리프로필렌 플레이트 - 옥테트를 위한 스트렙타비딘-코팅된 팁 - 10x 동역학적 완충제 (PBS 중에 1:10 희석됨)
1. 필요한 양의 스트렙타비딘 팁을 1X 동역학적 완충제 중에 침지시키고; 기계에 두어 평형화한다
2. 샘플 플레이트를 로딩한다: - 각 웰에 대한 200 µl의 완충제 또는 항체 희석물 a. 칼럼 1 - 기준선 (완충제) b. 칼럼 2 - 비오티닐화된 단백질 (예를 들어, sGARP-프로TGFβ1 또는 LTBP1-프로TGFβ1); 5 µg/mL로 희석됨 c. 칼럼 3 - 기준선 2 (완충제) d. 칼럼 4 - Ab1에 대한 항체 회합 e. 칼럼 5 - Ab2에 대한 항체 회합 f. 칼럼 6 - 해리 Ab 1 (완충제) g. 칼럼 7 - 해리 Ab2 (완충제)
3. 96 웰 플레이트에서 희석물을 제조한다: a. A열에서 300 µl의 1x 완충제 중에 항체 둘 다를 50 µg/mL로 희석한다. b. 각 칼럼의 나머지에 200 µl의 완충제를 첨가한다 c. 100 µl를 칼럼 아래로 이동시켜 3배 희석물을 제조한다
4. 샘플 플레이트를 기계 내에서 팁 플레이트 옆에 둔다
5. 소프트웨어를 설정한다 a. 완충제, 로드, 샘플을 지시한다 (시험된 항체당 1개의 검정) b. 프로토콜의 단계 (기준선, 로드, 회합, 해리)를 설정된 양의 시간 동안 지시한다: • 기준선: 60초 • 로딩: 300초 • 기준선 2: 60초 • 회합: 300초 • 해리: 600초
6. 데이터를 분석한다 a. 참조 웰에서 기준선을 제한다 b. 기준선의 마지막 5초에 대해 정규화를 설정한다 c. 해리에 대해 정렬한다 d. 회합 및 해리에 대해 분석한다 (1:1 결합 모델, 피트 곡선) e. 최적 R^2 값을 결정하고; 최적 R^2 값을 갖는 농도를 포함시킨다 f. 글로벌 피트를 선택한다 g. 센서 유형에 의해 샘플의 색을 설정한다 h. 분석한다 i. 표를 저장하고 내보낸다

[0517]

[0518] 표 7: GARP-프로TGFβ1 억제제의 친화도 및 활성

클론	**GARP-프로TGFβ1에 대한 친화도 (nM ± SEM)**	**GARP-프로TGFβ1의 억제 (IC50) (nM; 95% CI)**	**최대 효과 (% 억제)**
Ab1	0.046 ± 0.043	3.4 (2.1-5.4)	75%
Ab2	0.561 ± 0.014	3.9 (1.5-10.3)	50%

[0519]

[0520] 클론은 결합 선택성 (표 8) 및 종 교차-반응성 (표 9)에 대해 추가로 스크리닝되었다. Ab1 및 Ab2는 TGFβ1, TGFβ2 또는 TGFβ3에 결합하지 않았으나, 프로TGFβ1 복합체에 결합하였고, 종 교차-반응성을 보여주었다.

[0521] 표 8: GARP-프로TGFβ1 억제제의 선택성

클론	**GARP-프로TGFβ1**	**LTBP1-프로TGFβ1**	**LTBP3-프로TGFβ1**
Ab1	+++	+++	+++
Ab2	+++	+++	+++

[0522]

[0523] 표 9: GARP-프로TGFβ1 억제제의 종 교차-반응성

클론	huGARP-프로TGFβ1	muGARP-프로TGFβ1	cyGARP-프로TGFβ1
Ab1	+++	++	+++
Ab2	+++	+++	+++

+++ KD < 1 nM,
++ KD 1 – 10 nM
+ KD 10 – 100 nM
- 결합 없음

[0524]

[0525] Ab3에 대한 결합 특이성을 옥테트 결합 검정에 의해 추가로 시험하였다. 도 4a에서 입증된 바와 같이, Ab3은 잠복 TGFβ1에 특이적으로 결합하고 잠복 TGFβ2 또는 잠복 TGFβ3에는 결합하지 않는 반면, 범-TGF베타 항체는 이소형 특이적이 아니다 (도 5). 이들 데이터는 Ab3이 TGFβ에 이소형 특이적 방식으로 결합한다는 것을 입증한다.

[0526] 실시예 2: Ab1, Ab2 및 Ab3은 다중 종으로부터의 프로TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합한다

[0527] Ab1, Ab2 및 Ab3이 다중 종으로부터의 프로TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합할 수 있는지를 결정하기 위해, 옥테트 결합 검정을 표 6에 기재된 바와 같이 수행하였다. 표 10 (하기)에 제시된 바와 같이, 3종의 항체 모두 (즉, Ab1, Ab2 및 Ab3)는 인간 및 뮤린 LTBP1-프로TGFβ1 복합체, 인간 LTBP3-프로TGFβ1 복합체 및 인간 GARP-프로TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하였다. 그러나, Ab2 및 Ab3만이 래트 LTBP1-프로TGFβ1 복합체에 특이적으로 결합하였다.

[0528] 표 10. 다중 종으로부터의 프로TGFβ1 복합체에 대한 Ab1, Ab2 및 Ab3의 친화도

	Ab1 (K_D)	Ab2 (K_D)	Ab3 (K_D)
인간 LTBP1-프로TGFβ1	16 ± 1.3	5.8 ± 0.6	1.1 ± 0.07
인간 LTBP3-프로TGFβ1	85 ± 5.0	122 ± 3.9	0.12 ± 0.04
마우스 LTBP1-프로TGFβ1	203 ± 13	61 ± 4.0	0.68 ± 0.06
래트 LTBP1-프로TGFβ1	결합이 검출되지 않음	38 ± 6.8	0.93 ± 0.03
인간 GARP-프로TGFβ1	293 ± 22	58 ± 6.2	4.9 ± 0.11

[0529]

[0530] 실시예 3: Ab2 및 Ab3은 LRRC33-프로TGFβ1에 결합한다

[0531] Ab1, Ab2 및 Ab3이 LRRC33과 복합체화된 프로TGFβ1에 결합하는지 결정하기 위해, 옥테트 결합 검정을 수행하였다. 도 12c에 제시된 바와 같이, Ab1, Ab2 및 Ab3은 LRRC33-프로TGFβ1 단백질 복합체에 결합할 수 있다. 그러나, Ab1은 LRRC33-프로TGFβ1 단백질 복합체에 결합함에 있어 느린 온-레이트를 보여준다. LRRC33-프로TGFβ1 단백질 복합체에 대한 Ab1, Ab2 및 Ab3의 결합은 ELISA를 사용하여 추가로 확인되었다.

[0532] 실시예 4: Ab1, Ab2 및 Ab3은 GARP-프로TGFβ1 및 LRRC33-프로TGFβ1 둘 다의 활성을 억제한다

[0533] Ab1, Ab2 및 Ab3이 GARP-프로TGF-β1 및/또는 LRRC33-프로TGF-β1의 활성을 억제하는지 결정하기 위해, 시험관내 세포-기반 검정을 수행하였다. 본 검정 시스템에서, β6 인테그린으로 안정하게 형질감염된 조작된 인간 결장암 세포주 (SW480/β6 세포)는 프로TGF-β1을 발현하기 위한 구축물 및 제시 분자 (즉, GARP 또는 LRRC33)를 발현하기 위한 구축물로 공동-형질감염되었다. 제시 분자를 발현하기 위해, 키메라 LRRC33-GARP (서열식별번호: 101) 또는 GARP를 코딩하는 구축물이 사용되었다. 형질감염된 세포는 성분 (각각의 제시 분자와 복합체화된 인테그린 및 프로TGFβ1)의 충분한 발현 및 침착이 가능하도록 인큐베이션하였다. 항체의 억제 활성을 측정하기 위해, 그의 하류 신호 전달 경로에 커플링된 TGFβ 수용체를 발현하는 리포터 세포 (CAGA12 세포)를 사용하여 Ab1 또는 Ab2 또는 Ab3의 존재 또는 부재 하의 TGFβ1의 활성화를 검정하였다. 도 7a 및 7b에 제시된 바와 같이, Ab1, Ab2 및 Ab3은 GARP-프로TGF-β1 및 LRRC33-프로TGF-β1 둘 다를 억제하였다.

[0534] 항체 Ab1 및 Ab2를 사용하여 GARP-프로TGFβ1 복합체 또는 LRRC33-프로TGFβ1 복합체의 억제를 검출하기 위해 추가의 세포-기반 검정을 수행하였다. Ab1 및 Ab2는 GARP-프로TGF-β1 및 LRRC33-프로TGF-β1 둘 다를 억제하였다. 본 검정에서, GARP-TGFβ1 복합체에 대한 Ab1의 IC50 (μg/mL)은 0.445였고, LRRC33-TGFβ1 복합체에

대한 Ab1의 IC50 (μg/mL)은 1.325였다.

[0535] 실시예 5: LTBP-TGFβ1-특이적 활성화를 검출하기 위한 검정

[0536] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법 및 조성물은 샘플에서 LTBP-TGFβ1 복합체, 예를 들어, LTBP1- 또는 LTBP3-TGFβ1 복합체를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0537] A. ECM에 침착된 잠복 TGFβ1의 활성화

[0538] 본 검정에서, 제시 분자는 인테그린-발현 세포에서 프로TGFβ1로 공동-형질감염된다. 일시적으로 형질감염된 세포를 억제제의 존재 하에 검정 플레이트에 시딩하였다. 잠복 LTBP-프로TGFβ1 복합체는 ECM에 포매된다. 이어서, TGFβ 리포터 세포를 시스템에 첨가하였으며; 유리 성장 인자 (인테그린에 의해 방출됨)가 신호전달하고 루시페라제 검정에 의해 검출되었다.

[0539] 하기 프로토콜은 인테그린 세포에 의한 세포외 매트릭스 (LTBP 제시됨) 활성화를 측정하기 위한 한 예이다. 물질은 MvLu1-CAGA12 세포 (클론 4A4); SW480/β6 세포 (클론 1E7) (αV 서브유닛은 높은 수준으로 내인성으로 발현됨; β6 서브유닛은 안정하게 과다발현됨); LN229 세포주 (높은 수준의 내인성 αVβ8 인테그린); 코스타 (Costar) 백색벽 TC 처리된 96 웰 검정 플레이트 #3903; 그라이너 바이오-원 높은 결합 백색 불투명 96 웰 검정 플레이트 #655094; 인간 피브로넥틴 (코닝(Corning) #354008); P200 다중채널 피펫; 각각 멸균 필터 팁이 있는 P20, P200, 및 P1000 피펫; 멸균 미세원심분리기 튜브 및 랙; 멸균 시약 저장소; 0.4% 트리판 블루; 2mL, 5mL, 10mL, 및 25mL 멸균 피펫; 조직 배양물 처리된 100mm 또는 150mm 플레이트; 70% 에탄올; 옵티-멤 감소된 혈청 배지 (라이프 테크(Life Tech) #31985-070); 리포펙타민 3000 (라이프 테크 #L3000015); 브라이트-글로 루시페라제 검정 시약 (프로메가 #E2620); 0.25% 트립신 + 0.53mM EDTA; 프로TGFb1 발현 플라스미드, 인간 (SR005); LTBP1S 발현 플라스미드, 인간 (SR044); LTBP3 발현 플라스미드, 인간 (SR117); LRRC32 (GARP) 발현 플라스미드, 인간 (SR116); 및 LRRC33 발현 플라스미드, 인간 (SR386)을 포함한다. 이용된 장비는 바이오텍 시너지 H1 플레이트 판독기; TC 후드; 벤치 탑 원심분리기; CO_2 인큐베이터 37℃ 5% CO_2; 37℃ 물/비드 조; 플랫폼 진탕기; 현미경; 및 혈구계/카운테스를 포함한다.

[0540] "CAGA12 4A4 세포"는 CAGA12 합성 프로모터로 안정하게 형질감염되어 루시페라제 유전자 발현을 유도하는 MvLu1 세포 (밍크 폐 상피 세포)의 유도체이다. "DMEM-0.1% BSA"는 검정 배지이고; 기초 배지는 DMEM (깁코(Gibco) Cat# 11995-065)이고, 배지는 또한 0.1% w/v로 희석된 BSA, 페니실린/스트렙티노마이신, 및 4mM 글루타민을 함유한다. "D10"은 DMEM 10% FBS, P/S, 4mM 글루타민, 1% NEAA, 1X 글루타맥스 (깁코 Cat# 35050061)를 지칭한다. "SW480/β6 배지"는 D10 + 1000ug/mL G-418을 지칭한다. "CAGA12 (4A4) 배지"는 D10 + 0.75ug/mL 퓨로마이신을 지칭한다.

[0541] 제0일에, 세포를 형질감염을 위해 시딩하였다. SW480/β6 (클론 1E7) 세포를 트립신으로 탈착시키고, 펠릿화하였다 (200 x g에서 5분 회전). 세포 펠릿을 D10 배지에 재-현탁시키고, ml당 생존 세포를 계수하였다. 세포를 5.0e6개 세포/12ml/100mm TC 디쉬에 시딩하였다. CAGA12 세포의 경우, 세포를 제3일에 검정에 사용되도록 T75 플라스크당 1.0백만개의 밀도로 계대배양하였다. 배양물을 37℃ 및 5% CO_2에서 인큐베이션하였다.

[0542] 제1일에, 인테그린-발현 세포를 형질감염시켰다. 리포펙타민 3000 시약으로의 형질감염을 위해 제조업체의 프로토콜을 따랐다. 간략하게, 하기를 옵티멤 I 중에 웰당 125ul로 희석하였다: 7.5ug DNA (제시 분자) + 7.5ug DNA (프로TGFβ1), 30ul P3000, 및 옵티멤 I로 125ul로 채움. 웰을 DNA를 함께 피펫팅함으로써 혼합한 다음, 옵티멤을 첨가하였다. P3000을 첨가하고, 모든 것을 피펫팅함으로써 잘 혼합하였다. DNA 믹스에 첨가될 리포펙타민3000의 마스터 믹스를 제조하였다: LTBP1 검정의 경우: 웰당 15ul 리포펙타민3000, 옵티멤 I로 125ul로 채움; LTBP3 검정의 경우: 웰당 45ul 리포펙타민3000, 옵티멤 I로 125ul로 채움. 희석된 리포펙타민3000을 DNA에 첨가하고, 피펫팅함으로써 잘 혼합하고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 용액을 피펫팅함으로써 수회 혼합한 다음, 디쉬당 250ul의 DNA:리포펙타민3000 (2 x 125ul)을 적가하였다. 각각의 디쉬를 완만하게 와류시켜 혼합하고, 디쉬를 조직 배양 인큐베이터에 ~24시간 동안 돌려놓았다.

[0543] 등가량의 각각의 플라스미드가 전형적으로 공동-형질감염에 최적이었다. 그러나, 공동-형질감염은 제시 분자 및 프로TGFβ1에 대한 플라스미드 DNA의 비를 변화시킴으로써 최적화될 수 있다.

[0544] 제1-2일에, 검정 플레이트를 인간 피브로넥틴으로 코팅하였다. 구체적으로, 동결건조된 피브로넥틴을 초순수 증류수 (멸균) 중에서 1mg/ml로 희석하였다. 1mg/ml 원액을 PBS (멸균) 중에서 19.2ug/ml로 희석하였다. 50ul/웰을 검정 플레이트에 첨가하고 (높은 결합), 조직 배양 인큐베이터 (37℃ 및 5% CO_2)에서 O/N 인큐베이션

하였다. 최종 농도는 3.0ug/cm^2이었다.

[0545] 제2일에, 형질감염된 세포를 검정 및 억제제 첨가를 위해 플레이팅하였다. 먼저, 이미 검정 플레이트 내에 있는 피브로넥틴 용액에 200ul/웰 PBS를 첨가함으로써 피브로넥틴 코팅을 세척하였다. 세척액을 다중채널 피펫으로 수동으로 제거하였다. 세척을 총 2회 세척으로 반복하였다. 플레이트를 세포 첨가 전에 뚜껑을 열고 실온에서 건조되도록 하였다. 이어서, 트립신으로 탈착시킴으로써 세포를 플레이팅하고 펠릿화하였다 (200 x g에서 5분 회전). 펠릿을 검정 배지에 재현탁시키고, ml당 생존 세포를 계수하였다. LTBP1 검정의 경우 세포를 0.10e6개 세포/ml로 희석하고 웰당 50ul (웰당 5,000개 세포)로 시딩하였다. LTBP3 검정의 경우, 세포를 0.05e6개 세포/ml로 희석하고, 웰당 50ul (웰당 2,500개 세포)로 시딩하였다. 기능적 항체 희석물을 제조하기 위해, 항체를 비히클 중에서 일정한 작업 농도로 사전-희석하였다. 스톡 항체를 비히클 중에서 연속 희석하였다 (PBS가 최적이며, 시트르산나트륨 완충제를 피한다). 각 포인트의 연속 희석물을 항체의 4X 최종 농도로 검정 배지 내에 희석시켰다. 웰당 25ul의 4X 항체를 첨가하고, 배양물을 37℃ 및 5% CO_2에서 ~24시간 동안 인큐베이션하였다.

[0546] 제3일에, TGFβ 리포터 세포를 첨가하였다. 검정을 위한 CAGA12 (클론 4A4) 세포를 트립신으로 탈착시키고, 펠릿화하였다 (200 x g에서 5분 회전). 펠릿을 검정 배지 중에 재현탁시키고, ml당 생존 세포를 계수하였다. 세포를 0.4e^6개 세포/ml로 희석하고, 웰당 50ul (웰당 20,000개 세포)로 시딩하였다. 세포를 인큐베이터에 돌려놓았다.

[0547] 제4일에, 검정을 판독하였다 (항체 및/또는 리포터 세포 첨가 16-20시간 후). 브라이트-글로 시약 및 시험 플레이트를 판독 전에 실온이 되도록 하였다. 바이오텍 시너지 H1 상에서의 판독 세팅을 TMLC_std 프로토콜을 사용하도록 설정하였다 - 이 방법은 오토-게인 세팅을 갖는다. 양성 대조군 웰을 오토스케일 (높음)에 대해 선택하였다. 웰당 100uL의 브라이트-글로 시약을 첨가하였다. 진탕시키면서 실온에서 2분 동안 인큐베이션하고; 플레이트를 광으로부터 보호하였다. 플레이트를 바이오텍 시너지 H1 상에서 판독하였다.

[0548] 본 검정으로부터 생성된 데이터는 세포 상청액에서의 LTBP1-TGFβ1 및/또는 LTBP3-TGFβ1 결합 활성을 반영한다.

[0549] B. 세포 표면 상에 제시된 잠복 TGFβ1의 활성화

[0550] 세포 표면 상에 제시된 잠복 TGFβ1의 활성화를 검출하기 위해, 제시 분자를 인테그린-발현 세포에서 프로TGFβ1과 공동-형질감염시켰다. 잠복 TGFβ1을 GARP 또는 LRRC33에 의해 세포 표면 상에 발현시켰다. 이어서, TGFβ 리포터 세포 및 억제제를 첨가하였으며; 유리 성장 인자 (인테그린에 의해 방출됨)는 신호전달하고, 루시페라제 검정에 의해 검출되었다. 본 검정, 또는 "직접-형질감염" 프로토콜은 인테그린 세포에 의해 세포-표면 제시된 TGFβ1 (GARP 또는 LRRC33 제시자)에 최적이다.

[0551] 사용된 물질은 MvLu1-CAGA12 세포 (클론 4A4); SW480/β6 세포 (클론 1E7) (αV 서브유닛은 높은 수준으로 내인성으로 발현됨; β6 서브유닛은 안정하게 과다발현됨); LN229 세포주 (높은 수준의 내인성 αVβ8 인테그린); 코스타 백색벽 TC 처리된 96 웰 검정 플레이트 #3903; 그라이너 바이오-원 높은 결합 백색 불투명 96 웰 검정 플레이트 #655094; 인간 피브로넥틴 (코닝 #354008); P200 다중채널 피펫; 각각 멸균 필터 팁이 있는 P20, P200, 및 P1000 피펫; 멸균 미세원심분리기 튜브 및 랙; 멸균 시약 저장소; 0.4% 트리판 블루; 2mL, 5mL, 10mL, 및 25mL 멸균 피펫; 조직 배양물 처리된 100mm 또는 150mm 플레이트; 70% 에탄올; 옵티-멤 감소된 혈청 배지 (라이프 테크 #31985-070); 리포펙타민 3000 (라이프 테크 #L3000015); 브라이트-글로 루시페라제 검정 시약 (프로메가 #E2620); 0.25% 트립신 + 0.53mM EDTA; 프로TGFb1 발현 플라스미드, 인간 (SR005); LTBP1S 발현 플라스미드, 인간 (SR044); LTBP3 발현 플라스미드, 인간 (SR117); LRRC32 (GARP) 발현 플라스미드, 인간 (SR116); 및 LRRC33 발현 플라스미드, 인간 (SR386)을 포함한다.

[0552] 사용된 장비는 바이오텍 시너지 H1 플레이트 판독기; TC 후드; 벤치 탑 원심분리기; CO_2 인큐베이터 37℃ 5% CO_2; 37℃ 물/비드 조; 플랫폼 진탕기; 현미경; 및 혈구계/카운테스를 포함한다.

[0553] 용어 "CAGA12 4A4 세포"는 CAGA12 합성 프로모터로 안정하게 형질감염되어 루시페라제 유전자 발현을 유도하는 MvLu1 세포 (밍크 폐 상피 세포)의 유도체를 지칭한다. "DMEM-0.1% BSA"는 검정 배지이고; 기초 배지는 DMEM (깁코 Cat# 11995-065)이고, 배지는 또한 0.1% w/v로 희석된 BSA, 페니실린/스트렙티노마이신, 및 4mM 글루타민을 함유한다. "D10"은 DMEM 10% FBS, P/S, 4mM 글루타민, 1% NEAA, 1X 글루타맥스 (깁코 Cat# 35050061)를 지

칭한다. "SW480/β6 배지"는 D10 + 1000ug/mL G-418을 지칭한다. "CAGA12 (4A4) 배지"는 D10 + 0.75ug/mL 퓨로마이신을 지칭한다.

[0554] 제0일에, 인테그린 발현 세포를 형질감염을 위해 시딩하였다. 세포를 트립신으로 탈착시키고, 펠릿화하였다 (200 x g에서 5분 회전). 세포 펠릿을 D10 배지에 재현탁시키고, ml당 생존 세포를 계수하였다. 세포를 0.1e^{6}개 세포/ml로 희석하고, 검정 플레이트에서 웰당 100ul (웰당 10,000개 세포)로 시딩하였다. CAGA12 세포의 경우, 제2일에 검정에 사용되도록 T75 플라스크당 1.5백만개의 밀도로 계대배양하였다. 배양물을 37℃ 및 5% CO_2에서 인큐베이션하였다.

[0555] 제1일에, 세포를 형질감염시켰다. 리포펙타민 3000 시약으로의 형질감염을 위해 제조업체의 프로토콜을 따랐다. 간략하게, 하기를 옵티멤 I 중에 웰당 5ul로 희석하였다: 0.1ug DNA (제시 분자) + 0.1ug DNA (프로TGFβ1), 0.4ul P3000, 및 옵티멤 I로 5ul로 채움. 웰을 DNA를 함께 피펫팅함으로써 혼합한 다음, 옵티멤을 첨가하였다. P3000을 첨가하고, 모든 것을 피펫팅함으로써 잘 혼합하였다. DNA 믹스에 첨가될 마스터를 리포펙타민3000으로 제조하였다: 웰당 0.2ul 리포펙타민3000, 옵티멤 I로 5ul로 채움. 희석된 리포펙타민3000을 DNA에 첨가하고, 피펫팅함으로써 잘 혼합하고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 용액을 피펫팅함으로써 수회 혼합한 다음, 웰당 10ul의 DNA:리포펙타민3000 (2 x 5ul)을 첨가하였다. 세포 플레이트를 조직 배양 인큐베이터에 ~24시간 동안 돌려놓았다.

[0556] 제2일에, 항체 및 TGFβ 리포터 세포를 첨가하였다. 기능적 항체 희석물을 제조하기 위해, 비히클 (PBS가 최적임) 중 스톡 항체를 연속 희석하였다. 이어서, 각 포인트를 항체의 2X 최종 농도로 검정 배지 내에 희석시켰다. 항체를 제조한 후, 세포 플레이트를 흡인함으로써 (진공 흡인기) 검정 배지로 2회 세척하고 이어서 웰당 100ul 검정 배지를 첨가하였다. 두번째 세척 후, 검정 배지를 웰당 50ul의 2X 항체로 대체하였다. 세포 플레이트를 인큐베이터에 ~15-20분 동안 돌려놓았다.

[0557] 검정을 위한 CAGA12 (클론 4A4) 세포를 제조하기 위해, 세포를 트립신으로 탈착시키고, 펠릿화하였다 (200 x g에서 5분 회전). 펠릿을 검정 배지 중에 재현탁시키고, ml당 생존 세포를 계수하였다. 세포를 0.3e^{6}개 세포/ml로 희석시키고, 웰당 50ul (웰당 15,000개 세포)로 시딩하였다. 세포를 인큐베이터에 돌려놓았다.

[0558] 제3일에, 검정을 항체 및/또는 리포터 세포 첨가 후 약 16-20시간에 판독하였다. 브라이트-글로 시약 및 시험 플레이트를 판독 전에 실온이 되도록 하였다. 바이오텍 시너지 H1 상에서의 판독 세팅을 TMLC_std 프로토콜을 사용하도록 설정하였다 - 이 방법은 오토-게인 세팅을 갖는다. 양성 대조군 웰을 오토스케일 (높음)에 대해 설정하였다. 웰당 100uL의 브라이트-글로 시약을 첨가하였다. 진탕시키면서 실온에서 2분 동안 인큐베이션하고; 플레이트를 광으로부터 보호하였다. 플레이트를 바이오텍 시너지 H1 상에서 판독하였다.

[0559] 본 검정으로부터 생성된 데이터는 세포 상청액에서의 TGFβ1 활성을 반영한다. 미가공 데이터 단위는 상대 광 단위 (RLU)이다. 높은 RLU 값을 갖는 샘플은 많은 양의 유리 TGFβ1을 함유하고, 낮은 RLU 값을 갖는 샘플은 낮은 수준의 TGFβ1을 함유한다.

[0560] 실시예 6: Ab1 및 Ab2는 인간 및 뮤린 섬유모세포에서 내인성 TGFβ1을 억제한다

[0561] Ab1 및 Ab2가 상이한 기원의 1차 배양된 섬유모세포에 의해 분비된 내인성 TGF-β1을 억제할 수 있는지 결정하기 위해, CAGA12 합성 프로모터에 융합된 루시페라제 리포터 유전자를 포함하는 핵산으로 안정하게 형질감염되고, Ab1 또는 Ab2로 치료된 섬유모세포와 함께 공동-배양된 밍크 폐 상피 세포에 의해 생성된 루시페라제 수준을 측정함으로써 분비된 TGF-β1의 활성이 결정되는 정량적 시험관내 검정을 수행하였다. 도 7g 및 7h에 제시된 바와 같이, Ab1 및 Ab2 둘 다는 정상 인간 피부 섬유모세포, 뮤린 C57BL.6J 폐 섬유모세포 및 DBA2/J 근육 섬유모세포에 의해 분비된 내인성 TGF-β1을 억제하였다. 각각의 항체에서 관찰된 최대 억제의 차이는 세포주-특이적이었다.

[0562] 실시예 7: 시험관내 TGFβ1의 인테그린-유발된 활성화에 대한 매트릭스 강성의 역할 및 TGFβ1-특이적, 콘텍스트-비의존성 항체의 효과

[0563] 상이한 정도의 강성을 갖는 기질이 TGFβ1 활성화를 조정할 수 있는지 검사하기 위해, 강성이 제어된 실리콘-기반 기질 (5 kPa 15 kPa, 및 100 kPa)을 사용하여 그 위에 플레이팅된 1차 섬유모세포에서의 TGFβ1의 인테그린-의존성 활성화를 측정하였다. 간략하게, SW480 세포를 프로TGFβ1 및 LTBP1로 공동-형질감염시켜 잠복 TGFβ1 복합체의 세포외 제시를 가능하게 하였다. αvβ6 인테그린을 과다발현하는 세포를 검정 시스템에 첨가하여 TGFβ1의 활성화를 촉발시켰다. TGFβ-반응성 리포터 유전자 활성화를 측정함으로써 TGFβ1 활성화를 결정하였

다. 이 세팅에서, αvβ6 인테그린은 달리 동일한 조건 하에, 보다 낮은 (5 또는 15 kPa) 강성을 갖는 실리콘 기질 상에 배양된 세포와 비교하여, 시험된 높은 강성 (100 kPa)의 실리콘 기질 상에 플레이팅된 세포에서 LTBP1-매개 TGFβ1 활성화의 대략 2배 증가를 유발하였다. 본 발명자들은 TGFβ1 활성화의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 억제제, 예컨대 본원에 기재된 것들이 시험된 모든 강성에서 항체 무함유 대조군과 비교하여, 이 효과를 억제하여 TGFβ1 활성화를 대략 절반 수준으로 감소시킬 수 있다는 것을 발견하였다.

[0564] 실시예 8: 시험관내 TGFβ1의 프로테아제-유발된 활성화에 대한 TGFβ1-특이적, 콘텍스트-비의존성 항체의 효과

[0565] 시험관내 TGFβ1의 인테그린-비의존성, 프로테아제-의존성 활성화를 시험하기 위해, 정제된 재조합 LTBP3-프로TGFβ1 복합체를 칼리크레인 (KLK)과 함께 인큐베이션하고, TGFβ1 활성화를 기재된 바와 같은 리포터 세포 시스템을 사용하여 측정하였다. TGFβ1은 KLK와의 인큐베이션 후에 잠복 복합체로부터 방출되었으나 비히클 단독과의 인큐베이션 후에는 그렇지 않았으며, 이는 ECM-연관 TGFβ1 활성이 프로테아제-의존성 방식으로 촉발될 수 있다는 것을 시사한다.

[0566] TGFβ1 활성화의 대체 방식 (예를 들어, 인테그린-비의존성)을 억제하는 이소형-특이적, 콘텍스트-비의존성 억제제 항체의 능력을 추가로 시험하기 위해, TGFβ1의 칼리크레인-활성화를 평가하기 위한 시험관내 검정을 확립하였다.

[0567] 간략하게, CAGA 리포터 세포를 검정의 시작 24시간 전에 시딩하였다. 프로TGFβ-C4S를 CAGA 세포 상에서 적정하였다. 혈장-KLK 프로테아제를 mL당 1 마이크로그램 또는 mL당 500 나노그램의 고정 농도로 첨가하였다. 검정 혼합물을 대략 18시간 동안 인큐베이션하였다. TGFβ 활성화를 루시퍼라제 검정에 의해 측정하였다. 데이터는 도 8에 제시된다. KLK의 존재 하에, 프로TGFβ1을 활성화시켰다 (양성 대조군). 이러한 TGFβ 활성화는 Ab3의 첨가에 의해 효과적으로 억제되었으며, 이는 TGFβ1의 인테그린-의존성 활성화에 더하여, 이소형-특이적, 콘텍스트-비의존성 억제 항체가 또한 시험관내 TGFβ1의 KLK-의존성 활성화를 차단할 수 있다는 것을 나타낸다. 유사하게, KLK-활성화된 TGFβ1의 억제가 또한 Ab1의 첨가에 의해 관찰되었다 (데이터는 제시되지 않음).

[0568] 실시예 9: 분극화 및 활성화된 대식세포에서의 LRRC33 발현.

[0569] TGFβ 신호전달이 대식세포의 최종 표현형으로의 성숙 및 분화에 수반된다는 것이 이전에 기재되었다. 단핵구-유래 대식세포는 LRRC33을 발현하는 것으로 제안되었다. 분극화된 대식세포에 대한 추가 연구는 분극화된 대식세포 모두가 LRRC33을 발현하지는 않는다는 것을 밝혀냈다. 본 발명자들은 소위 전형적 M1-유형 대식세포가 LRRC33의 낮은 발현을 나타내는 반면, M2 대식세포는 상승된 LRRC33 발현을 나타낸다는 것을 발견하였다. 예상외로, M2 대식세포의 하위유형 중에서, 본 발명자들은 M2c 및 M2d, TAM-유사 대식세포에서만 LRRC33 발현을 관찰하였다. 전자는 소위 "섬유화유발" 대식세포이고, 후자는 "TAM-유사" 또는 종양-연관 표현형을 모방하는 것이다. 이들 결과는 LRRC33 발현이 분극화된 대식세포의 선택적 하위세트로 제한된다는 것을 보여준다.

[0570] 증거는 종양 세포 및/또는 주위 종양 기질 세포가 TME에서의 다양한 세포의 표현형 (예를 들어, 활성화, 분화)에 영향을 미칠 수 있는 다수의 시토카인, 성장 인자 및 케모카인을 분비한다는 것을 시사한다. 예를 들어, 대식세포 콜로니-자극 인자 (M-CSF, CSF-1로도 지칭됨)는 알려져 있는 종양-유래 인자이며, 이는 TAM 활성화 및 표현형을 조절할 수 있다.

[0571] 형광-활성화된 세포 분류 (FACS) 분석을 수행하여 대식세포에서의 LRRC33 발현에 대한 M-CSF 노출의 효과를 검사하였다. 간략하게, 인간 PBMC를 건강한 공여자로부터 수집하였다. 1차 세포를 1주 동안, 10% 인간 혈청, 플러스 GM-CSF 또는 M-CSF를 함유하는 배지에서 배양하였다. 다양한 M2 대식세포 표현형을 유도하기 위해, 세포를 M2c 하위유형의 경우 IL-10 및 TGFβ, 및 M2d 하위유형의 경우 IL-6의 존재 하에 추가로 2-3일 동안 배양하였다. 도면에 나타난 바와 같은 세포 표면 마커에 대한 항체를 FACS 분석에 사용하였다. CD14+ 면역자기 선택은 단핵구를 나타낸다.

[0572] 놀랍게도, 결과는 대식세포 상의 세포 표면 LRRC33의 상향조절이 M-CSF (CSF-1로도 알려짐)에 대한 노출 시에 유의하게 증대되었음을 보여주었다. 도 10a는 M-CSF-처리된 대식세포가 일관적으로 M2-분극화된 대식세포의 것임을 보여준다. 더욱이, M-CSF 노출은 대식세포가 세포 표면 상에 LRRC33을 일관적으로 발현하도록 하였다 (도 10b 참조). 도 10c에 요약된 바와 같이, M-CSF-활성화된 대식세포 상의 강건한 LRRC33 발현이 관찰되었다. 이들 결과는 종양-유래 인자 예컨대 M-CSF가 종양 성장을 지지하기 위해 국부 대식세포 활성화를 유도할 수 있다는 것을 시사한다.

[0573] 실시예 10: 생체내 조절 T (Treg) 세포 활성에 대한 Ab3의 효과

[0574] GARP는 조절 T 세포 상에 발현되는 것으로 밝혀졌다. 생체내 조절 T 세포 활성에 대한 Ab3의 효과를 T 세포 전달 결장염 모델을 사용하여 평가하였다 (Powrie et al., 1993 International Immunology, 5(11): 1464-1474; Powrie et al., 1994 Immunity, 1: 553-562; Powrie et al., 1996 J. Exp. Med., 186: 2669-2674). CD45Rbhi T 세포의 중증 복합 면역 결핍 (SCID) 마우스로의 전달은 결장염을 유도하는 것으로 알려져 있고, CD45Rblo CD25+ 조절 T 세포 (Treg)의 공동-전달은 결장염 발생을 억제하고 마우스에 대한 보호 효과를 나타낸다. 도 11에서 입증된 바와 같이, 30 mg/kg Ab3을 받은 마우스는 CD45Rblo CD25+ Treg의 공동-전달에 의해 입증된 보호 효과를 제거하였다. 구체적으로, 30 mg/kg Ab3을 받은 마우스는 IgG 대조군과 비교하여 근위 결장 염증 점수 및 결장 중량 대 길이 비의 유의한 증가, 및 체중 증가의 유의한 감소를 입증하였다. 이들 데이터는 Ab3이 생체내 조절 T 세포 활성을 억제할 수 있다는 것을 입증한다.

[0575] 실시예 11: MC38 뮤린 결장 암종 동계 마우스 모델에서의 종양 진행에 대한, 단독의 또는 항-PD-1 항체와 조합된 Ab1 및 Ab2의 효과

[0576] 결정 암종 종양 진행을 감소시키기 위한, 단독의 또는 항-PD-1 항체와 조합된 Ab1 및 Ab2의 효과를 평가하기 위해, MC38 뮤린 결장 암종 C57BL/6 마우스 동계 모델을 사용하였다.

[0577] 종양 세포 배양

[0578] MC38 뮤린 결장 암종 세포를 10% 소 태아 혈청, 100 단위/mL 페니실린 G 나트륨, 100 μg/mL 스트렙토마이신 술페이트, 25 μg/mL 겐타미신 및 2 mM 글루타민을 함유하는 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM)에서 성장시켰다. 5% CO_2 및 95% 공기의 대기에서, 37℃에서 가습 인큐베이터 내의 조직 배양 플라스크에서 세포 배양을 유지하였다.

[0579] 생체내 이식 및 종양 성장

[0580] 이식에 사용되는 MC38 세포를 대수기 성장 동안 수거하고 포스페이트 완충 염수 (PBS) 중에 재현탁시켰다. 종양 이식 당일에, 각각의 시험 마우스에 5 x 10^5개 세포 (0.1 mL 세포 현탁액)를 우측 측복부에 피하로 주사하고, 종양 성장을 평균 크기가 80 내지 120 mm^3의 표적 범위에 접근하는 것으로 모니터링하였다. 연구 제1일로서 지정된, 11일 후에, 마우스를 계산된 종양 크기에 따라 각각 63 내지 196 mm^3 범위의 개별 종양 부피 및 95 내지 98 mm^3의 군 평균 종양 부피를 갖는 12마리의 동물로 이루어진 군으로 분류하였다. 종양을 캘리퍼를 사용하여 2차원으로 측정하고, 부피를 하기 식을 사용하여 계산하였다:

[0581] $$\text{종양 부피 } (mm^3) = \frac{w^2 \times l}{2}$$

[0582] 여기서 w = 종양의 폭이고 l = 종양의 길이 (mm)이다. 1 mg이 1 mm^3의 종양 부피와 등가라는 가정 하에 종양 중량을 추정할 수 있다.

[0583] 치료

[0584] 간략하게, 제1일에 피하 MC38 종양 (63-172 mm^3)을 보유하는 8주령 암컷 C57BL/6 마우스 (n = 12)에 Ab1, Ab2, 뮤린 IgG1 대조군 항체 (각각 30 mg/kg, 투여 부피 10 mL/kg으로)를 4주 동안 1주 2회 복강내로 (i.p.) 투여하였다. 종양이 대조군에서 150 mm^3에 도달하였을 때 (제6일), 마우스에 래트 항-마우스 PD-1 항체 (RMP1-14) 또는 래트 IgG2A 대조군 항체 (각각의 항체를 5 mg/kg, 투여 부피 10 mL/kg으로)를 2주 동안 1주 2회 i.p. 투여하였다.

[0585] 군 1은 종양 성장 대조군으로서의 역할을 하고, 뮤린 IgG1 이소형 대조군 항체를 래트 IgG2a 대조군 항체와 조합하여 받았다. 군 2는 Ab1을 래트 IgG2a 대조군 항체와 조합하여 받았다. 군 3은 Ab2를 래트 IgG2a 대조군 항체와 조합하여 받았다. 군 3은 뮤린 IgG1 대조군 항체를 항-PD-1 항체와 조합하여 받았다. 군 4는 Ab1을 항-PD-1 항체와 조합하여 받았다. 군 5는 Ab2를 항-PD-1 항체와 조합하여 받았다. 군 6 (n=16)은 치료되지 않았고 샘플링 대조군으로서의 역할을 하였다.

[0586] 종점 및 종양 성장 지연 (TGD) 분석

[0587] 종양을 캘리퍼를 사용하여 1주에 2회 측정하였고, 각각의 동물을 그의 종양이 1,000 mm^3의 종점 부피에 도달하였을 때든 또는 연구 종료 시 (제60일)에든 먼저 일어나는 시점에 안락사시켰다. 종양 부피 종점에 도달하여

연구를 마친 마우스는 종양 진행 (TP)으로 인해 안락사된 것으로 안락사 날짜와 함께 문서화되었다. 분석을 위한 종점까지의 시간 (TTE)은 2017년 9월 13일에 출원된 미국 가출원 번호 62/558,311에 기재된 방법에 따라 각각의 마우스에 대해 계산하였다.

[0588] MTV 및 퇴행 반응에 대한 기준

[0589] 최종일에 연구에 남아있는 동물의 종양 부피로부터 치료 효능이 결정될 수 있다. MTV (n)는 종양이 종점 부피에 도달하지 않은 남아있는 동물의 수 (n)에서의 연구 최종일의 중앙 종양 부피로서 정의된다.

[0590] 치료 효능은 또한 연구 동안 관찰된 퇴행 반응의 발생률 및 크기로부터 결정될 수 있다. 치료는 동물에서 종양의 부분 퇴행 (PR) 또는 완전 퇴행 (CR)을 유발할 수 있다. PR 반응에서, 종양 부피는 연구 과정 동안 3회 연속 측정에 대해 그의 제1일 부피의 50% 이하이고, 이들 3회 측정 중 1회 이상에 대해 13.5 mm^3 이상이었다. CR 반응에서, 종양 부피는 연구 과정 동안 3회 연속 측정에 대해 13.5 mm^3 미만이었다. 연구 종료 시 CR 반응을 갖는 동물은 추가적으로 종양-무함유 생존자 (TFS)로 분류되었다. 동물을 퇴행 반응에 대해 모니터링하였다.

[0591] 종양 성장 억제

[0592] 종양 성장 억제 (TGI) 분석은 치료군 및 대조군 마우스의 중앙 종양 부피 (MTV)의 차이를 평가한다. 본 연구의 경우, TGI를 결정하기 위한 종점은 대조군 마우스가 1500 mm^3의 평균 종양 부피에 도달한 날인 제29일이었다. TGI 분석 당일에, 동물의 수, n에 대한 중앙 종양 부피, MTV (n)를 각각의 군에 대해 결정하였다. 퍼센트 종양 성장 억제 (%TGI)는 지정된 대조군의 MTV와 약물-치료군의 MTV 사이의 차이로 정의되었으며, 대조군의 MTV의 백분율로서 표시되었다.

[0593] TGI 분석을 위한 데이터 세트는 TGI 분석일 전에 치료-관련 (TR) 또는 비-치료-관련 (NTR) 원인으로 인해 사망한 마우스를 제외하고, 군 내의 모든 마우스를 포함하였다.

[0594] 본 연구에서, Ab1 및 Ab2를 MC38 뮤린 결장 암종 C57BL/6 마우스 동계 모델에서 단독으로 및 항-PD-1과 조합하여 평가하였다. Ab2를 항-PD-1과 조합하여 투여받은 마우스는 유의한 제29일 TGI ($P < 0.05$, 만-휘트니(Mann-Whitney) U 검정)를 발생시켰으며, 이는 로그순위 생존 분석 ($P < 0.05$, 로그순위)을 사용하여 비히클-치료 대조군과 통계적으로 유의하게 상이한 생존 이익을 생성하였다 (도 16 참조). Ab1 또는 Ab2를 래트 IgG2a 대조군 항체와 조합하여 받은 마우스는 각각 1 CR 및 1 PR의 퇴행 반응을 가졌다. 항-PD-1과 조합된, Ab1 및 Ab2의 퇴행 반응은 각각 1 PR 및 1 CR, 및 4 CR이었다. 항-PD-1과 조합된 Ab2는 MC38 뮤린 결장 암종 C57BL/6 마우스 동계 모델에서 제29일에 유의한 단기간 효능을 생성하였고, 이 60일 TGD 연구에서 전체 생존 이익을 생성하였다.

[0595] 실시예 12: TGFβ1/3-모델에서의 PD-1 억제제와 조합된 생존에 대한 Ab3의 생체내 효과

[0596] EMT-6은 면역 체크포인트 억제제 치료 단독이 종양 성장 및 생존에 대한 제한된 효과를 나타낸 동소 마우스 종양 모델이다. 본 발명자들은 특정 동계 종양 모델에서, RNAseq에 의해 평가 시 TGFβ의 다중 이소형이 발현된다는 것을 인식하였다. TGFβ1 및 TGFβ3 둘 다는 EMT-6에서 공동-우세하며 (도 21 참조), 이들은 거의 동등한 양으로 발현된다. 따라서, 본 발명자들은 이 특정한 모델에서, TGFβ 이소형의 범-억제제가 이소형-선택적 억제제와 비교하여 보다 광범위한 생체내 효능을 제공할 수 있는 것으로 추론하였다.

[0597] 연구 설계

[0598] 이 가설을 시험하기 위해, 8-12주령 암컷 Balb/c 마우스에게 옆구리에 피하로 0% 매트리겔 중 $5x10^6$개 EMT6 유방암 세포를 함유하는 0.1mL를 주사하였다. 동물을 중량 및 종양 캘리퍼 측정을 위해 격주로 연구를 통해 모니터링하였다. 종양이 30-80mm^3의 부피에 도달할 시, 동물을 6개 군으로 무작위화하고, 투여를 하기와 같이 시작하였다: 군 1: HuNeg-rIgG1/HuNeg-mIgG1; 군 2: 항-PD1-rIgG1/HuNeg-mIgG1; 군 3: 항-PD1-rIgG1/ 범-TGFβ Ab-mIgG1; 군 4: 항-PD1-rIgG1/Ab3-mIgG1; 군 5: HuNeg-rIgG1/범-TGFβ Ab-mIgG1; 및, 군 6: HuNeg-rIgG1/Ab3-mIgG1. 항-PD1 클론은 RMP1-14 (바이오엑셀(BioXCell))이었고, 이를 1주 2회 5 mg/kg으로 투여하였다. HuNeg-rIgG1을 이소형 대조군으로서 사용하였고, 이를 유사하게 투여하였다. Ab3-mIgG1을 1주 1회 30 mg/kg으로 투여하고, HuNeg-mIgG1을 유사하게 투여하였다. 범-TGFβ Ab-mIgG1을 1주 2회 5 mg/kg으로 투여하였다. 모든 투여는 10 ml/kg으로 복강내로 이루어졌다. 종양이 2000mm^3을 초과할 때 동물을 희생시키고, 혈청

을 수집하고, 종양을 제거하고, 최종 분석을 위해 급속 동결시켰다. 상당한 체중 감소로 인해 희생된 동물은 없었으며, 군 2에서의 1마리의 동물이 사망한 것으로 발견되었다 (치료 관련된 것으로 결정되지 않음).

[0599] 결과

[0600] EMT6은 빠르게 진행되는 동계 종양 모델이다. 군 1 및 군 6 동물은 18일의 중앙 생존기간을 가졌으며, 이는 이 모델에서 치료 효과가 없을 시 전형적인 것이다. 항-PD1은 이 모델에 제한된 효과를 갖고, 이에 따라, 단독으로 투여된 경우에 중앙 생존기간을 19.5일로 증가시킨 것으로 알려져 있다 (군 2). 군 5는 또한 중앙 생존기간을 21일로 약간 증가시켰다. 군 4는 생존을 25일로 보통으로 증가시켰으며, 2마리의 동물이 제34일에 여전히 살아있었다. 군 3은 제34일까지 3건의 사망 사건만을 가졌으며, 이는 이 조합의 유의한 생존 효과를 나타낸다. Ab3-mIgG1 단독의 투여를 통한 TGFβ1 억제는 종양 부피 성장에 영향을 미치지 않았으나, 항-PD1과 함께는 5마리의 동물이 보다 느린 종양 성장을 보여주었고, 1마리의 동물은 완전 반응을 나타내었다. 범-TGFβ Ab 단독은 3마리의 동물에서 종양 성장을 늦추었으나, 항-PD1과 조합하여서는 4마리의 동물이 종양 성장을 유의하게 더 늦추고 5마리의 동물이 완전 반응을 나타내었다. 이들 발견은 공중 이용가능한 정보, 예를 들어, EMT6 종양이 거의 동등한 수준의 TGFβ1 및 TGFβ3 발현을 나타내는 것을 보여주는 전체 종양 RNAseq 데이터베이스 (크라운 바이오사이언스 뮤베이스(Crown Bioscience MuBase))와 일치한다.

[0601] 실시예 13: 일측성 요관 폐쇄된 (UUO) 마우스 모델에서의 신장 바이오마커 및 섬유증에 대한 Ab2 및 Ab3의 효과

[0602] 일측성 요관 폐쇄된 마우스 모델은 말기 신질환으로 이어질 수 있는 통상적인 병리학적 과정인 간질성 섬유증을 연구하는 데 광범위하게 사용되었다 (문헌 [Isaka et al. (2008) Contrib. Nephrol. 159: 109-21, 및 Chevalier (1999) Pediatr. Nephrol. 13: 612-9] 참조). UUO 마우스는 최소 사구체 병변을 동반한 신장 근섬유모세포 활성화, 세관 위축 및 간질성 섬유증을 특징으로 한다 (문헌 [Lian et al. (2011) Acta Pharmacol. Sin. 32: 1513-21] 참조). TGFβ1의 증가된 발현은 UUO 마우스에서 관찰된 표현형에서 역할을 하는 것으로 여겨진다. UUO 마우스 모델에서의 간질성 섬유증의 존재에 대한 Ab2의 효과를 평가하기 위해, 하기 실험을 수행하였다.

[0603] 간략하게, 7-8주령 수컷 CD-1 마우스 (찰스 리버 래보러토리즈(Charles River Laboratories)), 마우스 (n = 10)의 4개의 군에 Ab2 (3 mg/kg 또는 30 mg/kg; 투여 부피 10 mL/kg), 뮤린 IgG1 대조군 항체 (30 mg/kg; 투여 부피 10 mL/kg), 또는 비히클 대조군으로서 PBS를 복강내로 (i.p.) 외과적 개입 전에 투여하였다. 수술 1일 전 (d-1), 수술 1일 후 (d1), 및 수술 3일 후 (d3)에 치료를 투여하였다. 제0일 (d0)에, 마우스를 노즈콘 상에서 이소플루란 마취로 마취시키고, 개복술에 이어서 영구적 우측 일측성 UUO 수술을 수행하였다. 추가의 마우스 대조군 (n = 8)에 상기 기재된 바와 같이 PBS를 투여하였으나, 유일하게 모의 수술 (즉, 요관을 폐쇄하지 않는 개복술)을 받았다. 외과적 절차의 완료 직후에, 모든 마우스는 0.001 mg/kg 부프레노르핀의 1회의 피하 주사를 받았다. 마우스를 수술 5일 후에 희생시키고, 조직을 분석을 위해 수거하였다. 수거 후에, 신장 둘 다를 빙냉 0.9% NaCl에 두고, 탈캡슐화하고 칭량하였다. 신장 조직의 콜라겐 함량을 평가하기 위한 히드록시프롤린 수준을 평가하였다. 조직 섬유증 및 콜라겐 침착의 마커인 신장 히드록시프롤린 수준은 모의 수술을 받은 마우스와 비교하여 외과적 개입을 받은 마우스에서 유의하게 증가하였다.

[0604] 각각의 우측 신장의 중간 횡단 절편을 48시간 동안 10% 중성 완충 포르말린 중에 침지 고정시킨 다음, 조직학적 처리 및 분석을 위해 이를 70% 에탄올로 옮겼다. 고정된 신장 절편을 파라핀 포매시키고, 절편화하고 (3개의 5 μm 연속 절편을 동물 신장당 200-250 μm 떨어진 채로 획득하여 신장 손상의 더 큰 샘플링 및 표현이 가능해짐), 피크로시리우스 레드로 염색하고, 색 스펙트럼 세분화를 사용하는 정량적 조직학적 분석에 적용하여 피질 콜라겐 부피 분율 (CVF)을 결정하였다. 각각의 3개의 연속 절편에 대한 평균 CVF 점수를 결정함으로써 각각의 동물에 대해 하나의 복합 CVF 점수를 계산하였다. 독립표본 t-검정을 사용하여 통계적 분석을 수행하였다. 도 12k에 제시된 바와 같이, CVF에 의해 결정된 바와 같은 신장 피질 섬유증은 대조군 모의-치료된 마우스와 비교하여 UUO 폐쇄된 신장에서 증가하였다. 3 mg/kg 또는 30 mg/kg의 Ab2를 받은 마우스는 비히클 대조군 (PBS) 또는 IgG 대조군을 받은 마우스와 비교하여 UUO-유발된 CVF 증가에서 유의한 감쇠를 보여주었다.

[0605] 수거된 신장 조직에서의 플라스미노겐 활성화제 억제제-1 (PAI-1), 결합 조직 성장 인자 (CTGF), TGFβ1, 피브로넥틴-1, α-평활근 액틴 (α-SMA), 단핵구 화학주성 단백질 1 (MCP-1), 콜라겐 제I형 알파 1 (Col1a1) 및 콜라겐 제III형 알파 1 쇄 (Col3a1)의 상대적 mRNA 발현 수준을 결정하였다 (도 12a-12h). 하우스키핑 유전자 하이포크산틴 포스포리보실트랜스퍼라제 1 (HPRT1) mRNA 수준을 사용하여 mRNA 수준을 정규화하였다. 더욱이, 외과적 개입 전에 3 mg/kg 또는 30 mg/kg의 Ab2를 받은 마우스에서, PAI-1, CTGF, TGFβ1, 피브로넥틴 1, Col1a1 및 Col3a1의 mRNA 수준은 30 mg/kg IgG1 대조군을 받은 마우스와 비교하여 유의하게 감소하였다. 외과적 개입

전에 3 mg/kg의 Ab2를 받은 마우스에서, α-SMA의 mRNA 수준은 30 mg/kg IgG1 대조군을 받은 마우스와 비교하여 유의하게 감소하였다. 추가로, 외과적 개입 전에 30 mg/kg의 Ab2를 받은 마우스에서, MCP-1의 mRNA 수준은 30 mg/kg IgG1 대조군을 받은 마우스와 비교하여 유의하게 감소하였다.

[0606] 알려져 있는 섬유증 마커의 mRNA 발현 수준에 대한 Ab3의 효과를 또한 평가하였다. 도 12i 및 12j에 제시된 바와 같이, 외과적 개입 전에 3 mg/kg 또는 30 mg/kg의 Ab3을 받은 마우스에서, PAI-1 및 Col1a1의 mRNA 수준이 IgG1 대조군을 받은 마우스와 비교하여 유의하게 감소하였다.

[0607] 요약하면, 히드록시프롤린 수준을 제외하고, UUO 마우스 모델에서 Ab2 또는 Ab3로 치료된 마우스에서 유의한 효과가 관찰되었다. 도 12a-12h 및 12k에 제시된 바와 같이, Ab2 치료는 UUO-유발된 CVF 증가를 유의하게 감쇠시켰고, 알려져 있는 섬유증 마커, 예컨대 PAI-1, CTGF, TGFβ1, 피브로넥틴 1, Col1a1 및 Col3a1의 유전자 발현을 유의하게 감소시켰다. 유사하게, 도 12i-12j에 제시된 바와 같이, Ab3 치료는 알려져 있는 섬유증 마커, 예컨대 PAI-1 및 Col1a1의 유전자 발현을 유의하게 감소시켰다. 이들 데이터는 TGFβ1이 신질환에서 역할을 하는 TGFβ의 주요 형태이고, 놀랍게도, TGFβ2 및 TGFβ3은 발병기전에 수반되지 않을 가능성이 있음을 입증한다.

[0608] 실시예 14: 신섬유증의 뮤린 알포트 모델에 대한 TGFβ1-특이적, 콘텍스트-비의존성 항체의 효과

[0609] 뮤린 Col4a3 -/- 모델은 상염색체 열성 알포트 증후군의 확립된 유전적 모델이다. 알포트 마우스는 기능적 콜라겐 4 A3이 결여되고 (Col4A3-/-) 따라서 α3, α4 및 α5 쇄를 필요로 하는 제IV형 콜라겐을 형성할 수 없다. Col4a3-/- 마우스는 사구체경화증, 간질성 섬유증, 및 세관 위축을 포함한 인간 환자에서의 신섬유증과 일치하는 신장에서의 섬유증이 발생하고, 모든 Col4a3-/- 마우스는 마우스의 유전적 배경에 따라 10 내지 30주령에 말기 신질환 (ESRD)이 발생한다. Col4a3-/- 마우스에서의 신장 병리상태의 구조적 및 기능적 징후는 ESRD로의 진행과 조합되어 Col4a3-/- 마우스를 신장 섬유증을 이해하기에 이상적인 모델로 만들었다. 이전 보고는 이 과정에서의 TGFβ 신호전달 경로의 중요성을 가리키고, TGFβ의 알려져 있는 활성인자인 αvβ6 인테그린, 또는 TGFβ 리간드 트랩으로의 치료는 알포트 마우스에서 신섬유증 및 염증을 예방하는 것으로 보고되었다 (Hahm et al. (2007) The American Journal of Pathology, 170(1): 110-125).

[0610] TGFβ1 활성화의 이소형-특이적, 콘텍스트-비의존성 억제제인 Ab3을 알포트 마우스에서 신섬유증을 억제 또는 완화시키는 그의 능력에 대해 하기와 같이 시험하였다.

[0611] 129:B16 이형접합 X 이형접합 교배로부터의 F1 자손 (중앙 진행 모델)을 연구에 사용하였다. Ab3에 대한 항체 투여는 생후 6주에 1주 2회 5 mg/kg으로 (즉, 10 mg/kg/주) 6주의 시험 지속기간 동안 시작되었다. 범-TGFβ 중화 항체를 양성 대조군으로서 사용하였으며 (1주 2회 5 mg/kg으로 투여됨), IgG를 음성 대조군으로서 사용하였다. 모든 항체를 복강내 주사를 통해 투여하였다. 항체 치료 6주 후에 (생후 12주), 동물을 희생시키고, 신장을 분석을 위해 수집하였다.

[0612] TGFβ 수용체 활성화가 Smad2/3의 인산화를 포함한 세포내 사건의 하류 신호전달 캐스케이드로 이어진다는 것이 잘 문서화되어 있다. 따라서, Ab3 항체 치료의 효과는 제조업체의 지침에 따라 ELISA (셀 시그널링(Cell Signaling))에 의해 검정 시 Smad2/3의 상대 인산화 수준을 측정함으로써 신장 용해물 샘플에서 평가하였다. 도 15는 인산화된 vs. 전체 (인산화된 및 비인산화된) Smad2/3의 상대 비를 보여주는 그래프를 제공한다. Ab3으로 치료된 동물의 샘플로부터 제조된 전체 신장 용해물은 음성 대조군과 비교하여 Smad2/3의 상대 인산화의 유의한 감소를 보여주었다. 평균 비는 이형접합 대조군의 것과 동등하였다.

[0613] 상기 기재된 12주령 알포트 F1 마우스는 콜라겐 침착 (피크로시리우스 레드 정량화) 및 혈액 우레아 질소 (BUN)의 축적 둘 다에 의해 측정 시 (이들 각각은 섬유증을 나타냄), 연구의 완료 시점에 신장 섬유증의 초기 증거를 나타내었다. 하류 TGFβ 수용체 신호전달에서 관찰된 Ab3의 억제 활성과 일치하게, Ab3-치료된 조직은 섬유증의 감소된 징후를 보여주었다. 예를 들어, Ab3 치료를 받지 않은 대조군 알포트 동물에 대한 평균 BUN 수준은 50 mg/dL 초과인 반면 Ab3-치료된 동물에서의 평균 BUN 수준은 30 mg/dL 미만으로 감소되었으며, 이는 Ab3이 섬유증을 호전시킬 수 있다는 것을 시사한다.

[0614] 실시예 15: 탄소 테트라클로라이드-유발된 간 섬유증의 TGFβ1-특이적, 콘텍스트-비의존성 항체의 효과

[0615] TGFβ 활성은 기관 섬유증, 예컨대 간 섬유증의 병리상태에서 역할을 하는 것으로 연루되어 왔다. 가용성 TGFBRII 작용제는 간 섬유증의 사염화탄소 (CCl4) 모델에서 간 섬유증을 예방하는 것으로 이전에 보고되었다 (Yata et al., Hepatology, 2002). 유사하게, (아데노바이러스 전달을 통한) TGFβ1의 안티센스 억제는 담관 라이게이션으로 인해 간 섬유증을 호전시켰다 (Arias et al., BMC Gastroenterology, 2003). 또한, TGFβ의 모든 이소형을 중화시키는 범-TGFβ 항체인 1D11은 TAA-치료된 래트에서 간 섬유증 및 담관암종을 감소시키는

것으로 밝혀졌다 (Ling et al., PLoS ONE, 2013).

[0616] 여기서, 마우스에서의 사염화탄소 (CC14)-유발된 간 섬유증 모델을 사용하여 생체내에서 섬유증에 대한 TGFβ1 활성화의 콘텍스트-비의존성 억제제의 효과를 평가하였다. CC14를 i.p.를 통해 6주 동안 1주 2회 제공하여 수컷 BALB/c 마우스에서 간 섬유증을 유발하였다. CC14 처리의 처음 2주 후, 동물을 Ab3 (30 mg/kg)의 치료제 매주 투여로 치료하였다. 항체를 사용한 치료제 투여를 2주 후에 개시하고 4주 동안 계속하였다

[0617] 동물을 혈액 화학 데이터에 기초하여 무작위화하였다. 연구의 Ab3 투여 4주 동안, 혈액 샘플을 혈청 AST/ALT 및 총 빌리루빈 분석을 위해 채취하였다. 동물을 1주 2회 칭량하여 연구 동안 체중을 모니터링하였다. 6주 연구 후, 간 및 비장을 수집하고, 간:비장 중량 비를 결정하기 위해 칭량하였다. 간 병리상태를 피크로시리우스-레드 염색된 간 슬라이스 상에서 조직학에 의해 평가하였다. 간 섬유증의 정도를 마송 또는 피크로시리우스 레드 염색된 절편에 따라 및 전체 절편에 대해 10 또는 20 X 대물 렌즈 하에 관찰하여 하기 열거된 기준으로 점수화하였다:

[0618] 표 14. 섬유증 점수화 기준

점수	중심 정맥 비후	동모양혈관간	문맥	섬유증
	(CLV)	(PS)	(PT)	침범의 면적 (NS) 섬유의 층 (WS)
0	정상	없음	없음	없음
1	약간 비후됨	국소	경미한 양	≤6개 층 얇고 연결되어 있지 않음
2	중간 정도로 비후됨	중간 정도의 양	중간 정도의 양	>6개 층 두껍고 연결되어 있음
3	구별불가능	광범위한 양	간경변증	결절 형성 치밀한 섬유화 조직
4	-	-	-	절편의 >2/3

[0619]

[0620] 이어서, 중심 정맥 비후, 동모양혈관간, 문맥, 및 조직의 이환 면적 및 층을 고려하는 식 SSS=CLV+PS+PT+2x(NSxWS)를 사용하여 섬유화 점수를 계산하였다.

[0621] 도 14에 요약된 바와 같이, Ab3 치료의 4회 매주 용량은 CC14-유발된 간 섬유증을 유의하게 감소시켰다.

[0622] 유사하게, 다중 용량 (3, 10 및 30 mg/kg)의 Ab2 및 Ab3의 항섬유화 효과를 간의 단일 엽의 포르말린-고정, 파라핀-포매 절편에서의 피크로시리우스 레드 염색의 조직학적 정량화 (% 면적)에 의해 검사하였다. 정량화는 맹검 방식으로 병리학자가 수행하였다. 상기 제공된 관찰과 일치하게, 항체-치료된 동물로부터의 간 절편은 조직 콜라겐의 상대량에 상응하는 피크로시리우스 레드 염색에 의해 측정 시 유의하게 감소된 CC14-유발된 섬유증을 보여주었다. 결과는 Ab2 및 Ab3 각각이 시험된 최저 용량 (3 mg/kg)에서도 간 섬유증을 감소시키는 데 효과적이었음을 보여주었다. 보다 구체적으로, 3 mg/kg의 Ab2 치료를 받은 CC14-처리된 동물은 IgG 대조군 (3.356%)과 비교하여 콜라겐 부피 분율 (% 면적)을 2.03%를 감소시켰다 ($p<0.0005$). 유사하게, 3 mg/kg의 Ab3 치료를 받은 CC14-처리된 동물은 IgG 대조군 (3.356%)과 비교하여 콜라겐 부피 분율 (% 면적)을 1.92%로 감소시켰다 ($p<0.0005$). CC14 처리를 받지 않은 이중 음성 대조군 동물은 1.14%의 배경 콜라겐 부피 분율을 보여주었다.

[0623] 게다가, 예비 데이터는 인산화-대-전체 SMAD2/3의 비로서 ELISA에 의해 측정 시, Ab3 치료가 인산화된 SMAD2/3의 수준의 유의한 감소를 유발하였으며, 이는 TGFβ 하류 신호 전달 경로가 생체내 TGFβ1의 콘텍스트-비의존성 억제제의 투여에 의해 억제되었음을 나타낸다.

[0624] 실시예 16: 근육 이영양증에서의 TGFβ1의 역할

[0625] TGFβ는 근발생의 억제, 염증의 조절 및 근육 복구를 포함한 골격근 기능, 및 섬유증의 촉진에서 다중 역할을 한다. 근육 이영양증을 포함한 광범위한 질환에 대한 요법으로서의 TGFβ 억제에 상당한 관심이 있지만, 이들 요법은 분자 콘텍스트에 관계없이 TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3을 억제한다. 이들 억제제의 특이성/선택성의 결여는 불충분한 효능을 갖는 임상 용량으로 이어지는 원치 않는 부작용을 발생시킬 수 있다. 범-TGFβ 억제 분자

가 mdx 마우스에서 근육 기능을 개선시키고 섬유증을 감소시키는 것으로 보고되었지만, 그러한 효과가 TGFβ1, β2 또는 β3의 불활성화로 인한 것인지는 아직 다루어지지 않았다.

[0626] 이를 위해, TGFβ2 및 β3은 남겨두면서 잠복 TGFβ1의 인테그린-매개 활성화를 특이적으로 차단하는 항체가 생성되었다. 구체적으로 이영양성 근육에서의 근육 복구에서 TGFβ1의 역할을 확인하기 위해, D2.mdx 마우스는 프로TGFβ1 특이적 항체로 치료된다. 수축-유발된 손상으로부터의 보호, 뿐만 아니라 동일한 손상 방법으로부터의 회복에 대한 TGFβ1 억제의 기능적 효과가 평가된다. 조직학적 평가는 치료가 근육 손상, 섬유증 및 염증에 영향을 미치는지를 포함한다. 추가적으로, 근육에서의 범-TGFβ 억제에서 보고된 관찰된 부정적 영향 (예를 들어, 증가된 염증, 근육 기능의 장기간 결손)이 TGFβ1 또는 TGFβ2/3의 억제로 인한 것인지 결정하기 위해 가능한 독성이 평가될 수 있다. 특정한 분자 콘텍스트에서의 TGFβ1의 억제가 보다 효과적이고/거나 더 적은 부작용 (유해 효과)을 갖는지를 이해하기 위해, 세포외 매트릭스 (ECM)에 제시된 것으로부터 면역 세포 제시된 TGFβ1의 역할을 디콘볼루션하여, 잠재적으로 보다 안전하고/거나 보다 효과적인 항-섬유화 요법으로 나아가기 위해 이 모델에서의 LTBP-프로TGFβ1 억제제의 효능이 평가될 수 있다.

[0627] 이영양성 근육은 수축-유발된 손상에 대해 고도로 감수성이다. 손상 후에, mdx 마우스로부터의 근육은 WT와 비교하여 근섬유에 대한 물리적 손상(injury)/손상(damage)을 나타내는 힘 생성의 유의한 감소 및 에반스 블루 (Evan's Blue) 염료의 증가된 흡수를 보여준다 (Lovering, R.M., et al., Arch Phys Med Rehabil, 2007. 88(5): p. 617-25). 수축-유발된 손상의 정도를 감소시키거나, 또는 손상 후의 회복을 개선시키는 치료제는 근육 이영양증 환자에 대한 유의한 임상 이익을 가질 것이다 (Bushby, K., et al., Lancet Neurol, 2010. 9(1): p. 77-93). 시험 억제제, 예컨대 Ab1, Ab2 및 Ab3은 i) 수축-유발된 손상을 예방할 뿐만 아니라, ii) 손상으로부터의 회복을 촉진하는 그의 능력에 대해 평가될 수 있다. 본 발명자들의 실험에 대해 B10 배경 상의 전통적인 mdx 계통과 달리 D2.mdx 계통이 사용될 수 있다. mdx를 DBA2/J 배경 상에 교배시킴으로써 생성된 이들 마우스는 상기 기재된 LTBP4의 비-보호적 변이체를 가지며, 따라서 표준 mdx 계통보다 더 중증이고, 진행성이고, 인간 질환과 유사한 질환 병리상태를 나타낸다 (Coley, W.D., et al., Hum Mol Genet, 2016. 25(1): p. 130-45). D2.mdx 마우스가 사용되므로, DBA2/J 마우스는 야생형 대조군으로서의 역할을 할 수 있다. DMD가 주로 수컷에 영향을 미치므로, 연구는 수컷 마우스에 초점을 맞출 수 있다.

[0628] 수축-유발된 손상을 예방/제한하는 Ab1 및 Ab2의 능력을 검사하기 위해, 6주령 수컷 D2.mdx 마우스 (n=10)를 6주 동안 10 mg/kg/주의 IgG 대조군, Ab1 또는 Ab2로 치료한다. 범-TGFβ 억제제를 사용한 공개된 작업과의 비교를 가능하게 하기 위해, 제4 군은 10mg/kg/주 1D11이 투여된다. 모든 항체는 mIgG1 이소형이고 이 용량은 UUO 모델에서 효과적인 것으로 이전에 밝혀졌다 (도 12a-12k). IgG 대조군이 투여된 WT 군이 또한 포함된다. 희생 24시간 전에, 마우스에 PBS 중 1% 에반스 블루 염료 (EBD) (체중의 1% 부피)를 투여하여 형광 현미경검사에 의한 근섬유 손상의 평가를 가능하게 한다. 치료 종료 시에, 마우스에 생체내 편심성 수축 프로토콜을 적용한다. 비복근의 편심성 손상은 문헌 [Khairallah, R.J., et al., Sci Signal, 2012. 5(236): p. ra56]에 기재된 바와 같은 305B 근육 레버 시스템 (오로라 사이언티픽(Aurora Scientific))으로 수행될 수 있을 것이다. 간략하게, 사이에 1분 휴지를 갖는 20회의 편심성 수축을 수행하고, 편심기 전의 피크 이소메트릭 힘의 감소가 근육 손상의 지표로서 간주될 수 있다. 힘 상실의 정도 및 EBD 양성 섬유의 퍼센트가 결정될 수 있다. 이 프로토콜이 적용된 DBA2/J 마우스는 20회의 편심성 수축 후에 초기 힘의 30-40%를 잃는다. 그에 반해, D2.mdx 마우스는 이전에 기재된 바와 같이 (Pratt, S.J., et al., Cell Mol Life Sci, 2015. 72(1): p. 153-64; Khairallah, R.J., et al., Sci Signal, 2012. 5(236): p. ra56) 동일한 프로토콜 후에 초기 힘의 80%를 잃는다. 손상 후의 힘 상실을 감소시키는 Ab1 및 Ab2의 능력을 평가할 수 있다. 마우스를 실험 종료 시에 희생시키고, 손상된 및 손상되지 않은 비복근 둘 다를 조직학적 분석을 위해 수집할 수 있다. EBD 흡수를 근육 둘 다로부터 평가할 수 있다. 근섬유 단면적 및 섬유증의 정도를 측정할 수 있다. 단면적 결정을 위해, 근육의 중간-복부로부터의 절편을 형광단에 접합된 밀 배아 응집소로 염색하여 세포 막을 가시화할 수 있다. 형광 현미경검사를 사용하여 절편을 디지털화하고, 예측 소프트웨어를 사용하여 세포 경계를 추적하고, 비편향 자동화 측정을 통해 단면적을 결정할 수 있다. 섬유증의 분석을 위해, 절편을 피크로시리우스 레드 (PSR)로 염색하고 슬라이드당 PSR+의 면적을 계산할 수 있다.

[0629] 수축-유발된 손상으로부터의 회복을 가속시키는 Ab1, Ab2 또는 Ab3의 능력이 평가된다. 12주령 DBA2/J 및 D2.mdx 마우스는 상기 기재된 동일한 편심성 수축 프로토콜을 받을 수 있다. 손상 후에, 마우스는 치료군 (n=10)으로 분류되고 IgG 대조군 (WT 및 D2.mdx 마우스의 경우), 1D11, Ab1, Ab2 또는 Ab3 (오직 D2.mdx)을 투여받는다. 항체는 실험의 지속기간 동안 10mg/kg/주로 투여될 수 있다. 손상후 7 및 14일에, 최대 피크 이소메트릭 힘, 움찔수축-대-테타니 비, 및 힘-빈도 관계가 손상으로부터의 회복에 대한 치료의 효과를 평가하기 위

해 측정될 수 있다. Ab1, Ab2 및 Ab3이 제시 분자에 관계없이 TGFβ1의 방출을 억제하지만, 세포외 매트릭스로부터의 (즉, LTBP-제시된) TGFβ1의 선택적 방출은 TGFβ1 유도된 Treg 활성의 보존으로 인해 DMD에서 더 큰 이익을 가질 수 있었다. 이 문제를 다루기 위해, 특이적 LTBP-프로TGFβ1 억제 항체가 또한 수축-유발된 손상을 예방하는 능력 및 손상으로부터의 회복을 가속시키는 능력 둘 다에 대해 평가될 수 있다.

[0630] 실시예 17: 급성 손상 후 골격근에서의 TGFβ1의 역할.

[0631] 특히 근육 손상 후의 근섬유 재생에서의 TGFβ1의 역할이 조사될 수 있다. TGFβ1-특이적 항체는 심장독소 손상 모델에서 특히 근섬유 재생 동안 TGFβ1의 역할을 결정하는 데 사용될 수 있다. 재생은 조직학적으로 평가될 수 있고, 근육 강도 및 질의 기능적 평가가 수행될 수 있다. 근육 재생에 대한 TGFβ1 억제의 잠재적 이익을 고려할 때, 범-TGFβ 억제에서 관찰되는 독성이 없으면서 유익한 효과를 갖는 요법은 큰 이익을 가질 것이다. 이는 위성 세포 기능에 대한 TGFβ1-특이적 억제의 효과의 조사를 가능하게 하고, 위성 세포 이식 연구에 대한 통찰을 제공할 수 있다.

[0632] 상기 기재된 바와 같이, TGFβ는 근모세포 증식 및 분화의 억제, 뿐만 아니라 위축 및 섬유증의 촉진을 포함하여, 근육 생물학에 다중 영향을 미치는 것으로 보인다 (Allen, R.E. and L.K. Boxhorn, J Cell Physiol, 1987. 133(3): p. 567-72; Brennan, T.J., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(9): p. 3822-6; Massague, J., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(21): p. 8206-10; Olson, E.N., et al., J Cell Biol, 1986. 103(5): p. 1799-805; Li, Y., et al., Am J Pathol, 2004. 164(3): p. 1007-19; Mendias, C.L., et al., Muscle Nerve, 2012. 45(1): p. 55-9; Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611-21). 그러나, 이들 연구는 배양물 중 재조합 TGFβ1을 사용하거나 또는 성장 인자가 그의 분자 콘텍스트에서 제거되면서 비-생리학적 결과를 가질 수 있는 마우스 내로 주사하였다. 대안적으로, 조사자는 TGFβ1에 대해 선택적이지 않은 TGFβ 억제제를 사용하였다.

[0633] TGFβ1의 이소형-특이적, 콘텍스트-허용성 효과를 평가하기 위해, 다중 프로TGFβ1 항체 (예를 들어, Ab3)는 CTX-유발된 손상 후의 근육 재생에 영향을 미치는 그들의 능력에 대해 검사될 수 있다. 이들 항체는 TGFβ1 활성화의 "이소형-특이적" 및 "콘텍스트-허용성" 억제제이므로, 이들은 임의의 제시 분자로부터의 (TGFβ2 또는 TGFβ3과 달리) TGFβ1의 방출을 특이적으로 억제하고 성숙 성장 인자에 결합하지 않는다 (도 4b).

[0634] 근육 재생은 우측 비복근 내로의 CTX 주사를 통해 수컷 DBA2/J 마우스 (n=10)에서 유발될 수 있다. 손상 1일 전에, 마우스에 10mg/kg IgG 대조군, 1D11, Ab1 또는 Ab2를 투여할 수 있다. 항체는 연구 종료 시까지 계속해서 매주 투여된다. 손상후 7 및 14일에, 근육 힘 측정치를 305C 근육 레버 시스템 (오로라 사이언티픽 인크., 캐나다 오로라)으로 생체내에서 측정할 수 있다. 간략하게, 발바닥 굴근 근육군의 경우, 마취된 마우스에서 좌골 신경의 경피 전기 자극에 의해 수축이 도출되고, 이어서 증가하는 자극 빈도 (0.2 ms 펄스, 500 ms 트레인 지속기간): 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 Hz에서 일련의 자극이 수행된 후, 1 Hz에서 최종 자극이 수행되었다. 최대 피크 이소메트릭 힘, 움찔수축-대-테타니 비, 및 힘-빈도 관계가 결정될 것이다. 힘 측정 후에, 손상된 비복근 및 가자미근이 조직학을 위해 수집 및 준비된다. 근섬유 단면적 및 %PSR+ 면적이 상기 실시예 8에 기재된 바와 같이 결정될 수 있다.

[0635] Ab3을 사용한 치료는 감소된 섬유증 및 개선된 근육 기능을 발생시킬 수 있다. 그러나, 면역 활성화를 조절함에 있어서 TGFβ1의 역할을 고려할 때, 본 발명자들이 1D11 치료에서 보고된 바와 같이 항체로 인한 증가된 염증을 관찰할 수 있는 것이 가능하다 (Andreetta, F., et al., J Neuroimmunol, 2006. 175(1-2): p. 77-86). 증가된 염증이 TGFβ1 억제의 치료 효과를 제한할 수 있는 사건에서, 콘텍스트-특이적 항체는 후속적으로 독성을 제한할 수 있는 추가 정도의 특이성을 제공하기 위해 평가될 수 있다. 예를 들어, LTBP로부터의 TGFβ1의 방출을 억제하는 항체는 오직 상기 기재된 판독 및 방법을 사용하여 사용될 수 있다. 이들 항체는 Treg 또는 대식세포로부터의 방출에 영향을 미치지 않으면서, 오직 ECM으로부터의 TGFβ1의 방출을 제한할 수 있다.

[0636] 실시예 18: 근육 장애에서의 적합한 TGFβ1 억제제의 선택

[0637] 건강한, 재생하는, 및 이환된 근육에서의 프로TGFβ1 및 그의 제시 분자의 발현 분석은 최적 치료 접근법의 선택을 보조하기에 유용한 정보를 제공할 수 있다. 근육 재생 및 복구에서의 TGFβ1 억제의 잠재적 이익을 고려할 때, 상이한 상태 하의 (건강한, 급성 손상된, 및 만성 손상된) 골격근에서의 프로TGFβ1 제시 (예를 들어, ECM에서 또는 면역 세포 상에서)의 콘텍스트를 이해하는 것은 항체의 치료 유용성을 알리는 데 도움이 되고, 궁극적으로 임상 효능 및 안전성 둘 다를 달성하는 데 요구되는 특이성/선택성의 정도에 대한 통찰을 제공할 수 있다. TGFβ1 제시의 성질은 근육의 건강 상태에 따라 및 질환 과정에 걸쳐 달라질 수 있으며, 이는 임의의

TGFβ1 표적화된 요법에 대해 연관성을 가질 수 있다. 이들 분자의 발현 프로파일을 이해하는 것은 또한 잠재적 치료 분자에 대한 적절한 투여 시간의 선택을 보조할 것이다. 웨스턴 블롯, 면역조직화학 및 면역침전을 사용하여, 프로TGFβ1 및 그의 제시 분자의 발현은 정상의, 급성 손상된 (심장독소 손상), 및 만성적으로 재생하는 (D2.mdx 마우스) 근육에서 평가될 수 있다. 이들 분자의 발현은 상기 기재된 상이한 상태 하에 특히 주요 세포 유형 또는 세포 유형의 하위세트 (예를 들어, 위성 세포, 대식세포, 섬유-지방생성 전구세포 등)에서 조사될 수 있다.

[0638] TGFβ 이소형의 발현이 mdx 마우스로부터의 근육에서 검사되었지만, 이전의 작업은 성숙 성장 인자의 발현에 초점을 맞추었다 (Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611-21; Zhou, L., et al., Neuromuscul Disord, 2006. 16(1): p. 32-8). 본원에 기재된 TGFβ1 항체의 표적 특이성을 고려할 때, 발현 패턴이 성숙 및 프로TGFβ1에 대해서뿐만 아니라, 또한 관심 TGFβ1의 풀의 공급원 및/또는 콘텍스트에 관한 정보를 제공하여야 하는 제시 분자의 것들에 대해서도 검사되는 것이 필수적이다. 이상적으로, 단지 각각의 성분의 것이 아닌, 잠복 복합체의 발현 패턴을 이해하는 것이 바람직하다.

[0639] 항체는 관심 표적에 대한 웨스턴 블롯 및 IHC에 대해 스크리닝된다. 마우스 TGFβ1-LAP, LTBP1, LTBP3 및 LTBP4에 대한 항체는 상업적으로 입수가능하다. TGFβ1-LAP에 대한 항체 (클론 TW7-16B4)는 광범위하게 특징화되었고 유동 세포측정법 및 웨스턴 블롯 둘 다에서 효과적이다 (Oida, T. and H.L. Weiner, PLoS One, 2010. 5(11): p. e15523). LTBP1에 대한 항체 (프로테인테크(ProteinTech) # 22065-1-AP) 및 LTBP3에 대한 항체 (밀리포어(Millipore) #ABT316)는 LTBP1-프로TGFβ1 또는 LTBP3-프로TGFβ1로 형질감염된 SW480 세포를 사용하여 내부적으로 검증되었고, 그들의 표적에 대해 특이적인 것으로 밝혀졌다. IHC에 대한 이들 항체의 유용성이 결정될 수 있다. 건강한 및 D2.mdx 마우스로부터의 근육은 절편화되고, 항체는 동결된 및 FFPE 절편 상에서 시험된다. 항체는 관찰된 신호가 특이적이라는 것을 보장하기 위해 100x 과량의 정제된 표적 단백질 또는 복합체 (사내 제조됨)를 갖는 조건을 포함시킴으로써 검증될 수 있다.

[0640] 이전 작업은 주어진 잠복 복합체에 특이적으로 결합하나 억제 활성을 갖지는 않는 항체를 확인하였다. 이들 항체에 의한 항원 결합은 ELISA에 의해 확인되었고 (도 4c), 또한 IHC에서 그들의 유용성에 대해 평가될 수 있다 (이들 에피토프의 3차원 구조를 고려할 때 이들 항체는 웨스턴 블롯 시약으로서 효과적일 가능성이 없음). 벌크 조직으로부터의 잠복 TGFβ1 복합체의 존재는 또한 웨스턴 블롯 또는 면역침전에 의해 평가될 수 있다. 잠복 복합체는 환원 및 비-환원 조건 하에 동일한 샘플을 전개시킴으로써 웨스턴 블롯에 의해 확인될 수 있다. 환원 조건 하에, TGFβ1, LAP 및 제시 분자는 분리되고, 3개의 분자는 동일한 블롯 상에서 이중-색 웨스턴 블롯 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 비-환원 조건 하에, LAP:제시 분자 복합체는 TGFβ1이 방출되는 동안 회합된 채로 유지되고; 복합체는 비어있는 제시 분자보다 더 느리게 이동하고 TGFβ1-LAP와 함께 이동한다. 특정한 제시 분자에 대한 TGFβ1의 직접 결합을 입증하기 위해 다양한 항체가 또한 근육으로부터 잠복 복합체를 면역침전시키는 그들의 능력에 대해 평가된다.

[0641] 적절한 항체가 확인되면, 건강한, 재생하는, 및 이영양성 근육에서의 발현이 입수가능한 항체에 따라 웨스턴 및/또는 IHC에 의해 평가된다. 전경골근 (TA) 및 횡경막 근육은 4, 8 및 12주령의 DBA2/J 및 D2.mdx 마우스로부터 수집될 수 있다. 재생 근육의 경우, 심장독소가 12주령 DBA2/J 마우스의 TA 내로 주사되고, 근육이 손상후 3, 7 및 14일에 수집될 수 있다. 적어도 4마리의 마우스로부터의 조직이 각각의 조건/시점에 사용될 수 있다. 다양한 분자를 발현하는 세포 집단을 확인하기 위해 공동-염색 실험이 또한 수행될 수 있다 (예를 들어: 대식세포의 경우 CD11b, Treg의 경우 FoxP3, 근형성 세포의 경우 MyoD).

[0642] 실시예 19: Ab2 및 Ab3은 ALK5 키나제 억제제 LY2109761 및 범-TGFβ 항체와 비교하여 감소된 독성을 나타낸다

[0643] 소분자 TGF-β 제I형 수용체 (ALK5) 키나제 억제제 LY2109761 및 범-TGFβ 항체 (hIgG4)와 비교하여 Ab2 및 Ab3의 독성을 평가하기 위해, 독성 연구를 래트에서 수행하였다. 래트가 마우스와 비교하여 TGFβ 억제에 보다 감수성이라는 이전 보고에 기초하여 래트를 이 안전성 연구를 위한 종으로서 선택하였다. 래트에서 관찰된 유사한 독성이 또한 다른 포유동물 종, 예컨대 개, 비-인간 영장류, 뿐만 아니라 인간에서 관찰되었다.

[0644] A. 연구 I상

[0645] 간략하게, 암컷 F344/NHsd 래트에 Ab2를 3 mg/kg (1개 군, n=5), 30 mg/kg (1개 군, n=5), 또는 100 mg/kg (1개 군, n=5)으로; 범-TGFβ 항체를 3 mg/kg (1개 군, n=5), 30 mg/kg (1개 군, n=5), 또는 100 mg/kg (1개 군, n=5)으로; LY2109761을 200 mg/kg (1개 군, n=5) 또는 300 mg/kg (1개 군, n=5)으로; 또는 PBS (pH 7.4) 비히클 대조군 (1개 군, n=5)을 투여하였다. Ab2, 범-TGFβ 항체 또는 비히클 대조군을 받는 동물은 정맥내로 1회

투여하고 (제1일에), LY2109761을 받는 래트는 경구 위관영양에 의해 7일 동안 1일 1회 (7회 용량) 투여하였다. 동물 체중을 투여기의 제1, 3 및 7일에 결정하였다. 동물을 제8일에 희생시키고 부검을 수행하였다.

[0646] 도 17a에 제시된 생존 데이터에 제시된 바와 같이, Ab2는 다른 치료군과 비교하여 감소된 독성을 나타내었다. 300mg/kg의 ALK5 키나제 억제제 LY2109761이 투여된 모든 동물은 빈사 상태에서 희생되거나 또는 연구의 제3, 6 또는 7일에 사망한 것으로 발견되었다. 200 mg/kg의 LY2109761이 투여된 동물 중 2마리가 연구의 제7일에 사망한 것으로 발견되었다. 100 mg/kg의 범-TGFβ 항체가 투여된 1마리의 동물은 연구의 제6일에 사망한 것으로 발견되었다. 최대 100 mg/kg의 Ab2가 투여된 모든 동물은 종결 희생까지 생존하였다.

[0647] 유사하게, 도 19a에 제시된 생존 데이터에 제시된 바와 같이, Ab3으로 치료된 래트는 다른 치료군과 비교하여 감소된 독성을 나타내었다. 100 mg/kg의 범-TGFβ 항체가 투여된 1마리의 동물은 연구의 제6일에 사망한 것으로 발견되었다. 최대 100 mg/kg의 Ab3이 투여된 모든 동물은 종결 희생까지 생존하였다.

[0648] 추가로, 치료의 독성은 투여기 동안 동물의 체중을 모니터링함으로써 평가되었다. 도 18b-18e에 제시된 바와 같이, 200 mg/kg 또는 300 mg/kg의 LY2109761을 받은 동물은 연구 과정 동안 감소된 체중을 나타내었다.

[0649] 동물 기관 중량은 또한 사후에 평가되었다. 표 11에 제시된 바와 같이, ≥ 200 mg/kg의 LY2109761이 투여된 동물에서 증가된 심장 중량이 관찰되었다. 또한 ≥ 30 mg/kg의 범-TGFβ 항체가 투여된 동물에서 증가된 심장 중량이 관찰되었다. 최대 100 mg/kg의 Ab2 또는 Ab3이 투여된 동물에서 기관 중량에 대한 어떠한 효과도 관찰되지 않았다.

[0650] 표 11. 치료군에서의 기관 중량 변화

	치료군					
	비히클 대조군[a]	LY2109761		범-TGFβ 항체		
용량 수준 (mg/kg/일)	0	200	300	3	30	100
심장						
절대 중량 (g)	0.4084	112	NE	99	123	119
체중 비 (%)	0.3952	132	NE	96	122	122
뇌 중량 비 (%)	26.3420	113	NE	98	123	116

NE = 조기 사망으로 인해 평가되지 않음.
주: 각각의 치료군에 대한 절대 중량 및 (신체 및 뇌에 대한) 기관 중량의 비에 대한 값은 백분율 대조군 평균 값으로 표시됨.
[a] 비히클 대조군 = 포스페이트 완충 염수 (PBS), pH 7.4.

[0651]

[0652] 최대 100 mg/kg의 Ab2 또는 범-TGFβ 항체가 투여된 동물에서 어떠한 육안 발견도 관찰되지 않은 한편, 200 mg/kg 또는 300 mg/kg의 LY2109761을 받은 각각의 치료군의 4마리의 동물에서 비정상적 형상의 흉골이 관찰되었다. 연구의 제3일에 사망한 것으로 발견된, 300 mg/kg의 LY2109761이 투여된 1마리의 동물에서 흉강 및 과량의 유체로 인한 비대 흉선 (즉, 부종) 내에서 2.5 mL의 투명한 유체가 관찰되었다.

[0653] 표 12에 제시된 바와 같이, 현미경 수준에서, ≥ 200 mg/kg의 LY2109761이 투여된 동물은 심장 판막 소견 (즉, 판막증)을 나타내었다. 판막증은 출혈, 내피 증식증, 혼합 염증 세포 침윤 및/또는 기질 증식증으로 인한 심장 판막 비후를 특징으로 하였다 (도 18f, 상부 우측 패널 참조). 대부분의 동물은 다중 판막이 영향을 받았다. 추가적으로, 헤마톡실린 및 에오신-염색된 절편에서 심방의 호염기구성 염색을 증가시키는 최소 내지 경미한 혼합 염증 세포 침윤, 최소 출혈 및/또는 최소 내피 (심내막) 증식증을 포함한 심방 소견이 관찰되었다. 또한 대부분 심장의 기저에서 심근 소견이 관찰되었고 최소 내지 경미한 변성/괴사, 경미한 출혈 및/또는 경미한 혼합 염증 세포 침윤으로 이루어졌다. 300 mg/kg의 LY2109761이 투여된 1마리의 동물은 관상 동맥의 염증을 동반한 경미한 괴사를 가졌다. 추가로, 200 mg/kg의 LY2109761이 투여된 2마리의 동물은 대동맥 근부에서 최소 혼합 염증 세포 침윤 또는 출혈을 가졌다.

[0654] 표 12. LY2109761을 받은 동물에서의 현미경적 심장 소견

		LY2109761		
용량 수준 (mg/kg/일)		0	200	300
심장				
심장 판막				
판막증				
	최소	0	1	2
	경미	0	3	3
	중등도	0	1	0
심방				
침윤, 혼합 세포				
	최소	0	2	3
	경미	0	0	1
증식증, 내피				
	최소	0	1	3
출혈				
	최소	0	1	2
심근				
변성/괴사				
	최소	0	0	1
	경미	0	1	1
출혈				
	경미	0	1	0
침윤, 혼합 세포				
	경미	0	0	1
관상 동맥				
염증을 동반한 괴사				
	경미	0	0	1
대동맥 근부				
출혈				
	최소	0	1	0
침윤, 혼합 세포				
	최소	0	1	0

[0655]

[0656] 표 13 및 도 22에 제시된 바와 같이, ≥3 mg/kg의 범-TGFβ 항체가 투여된 동물은 상기 기재된 바와 같은, LY2109761이 투여된 동물에서 기재된 것들과 유사한 심장 판막 소견 (즉, 판막증)을 나타내었다 (또한 도 17f, 하부 좌측 패널 참조). ≥30 mg/kg의 범-TGFβ 항체가 투여된 동물은 LY2109761이 투여된 동물에서 기재된 것들과 유사한 심방 소견을 나타내었다. 100 mg/kg의 범-TGFβ 항체가 투여된 동물은 LY2109761이 투여된 동물에서 기재된 것들과 유사한 심근 소견을 나타내었고, 30 mg/kg의 범-TGFβ 항체가 투여된 동물은 심근에서 출혈을 가졌다. 100 mg/kg의 범-TGFβ 항체가 투여된 1마리의 동물은 관상 동맥에서 출혈을 동반한 중등도 벽내 괴사를 가졌으며, 이는 경미한 혈관주위 혼합 염증 세포 침윤과 연관되었다. 범-TGFβ 항체 및 LY2109761을 투여한 동물에서의 골 소견은 육안으로 보이는 비정상적 형상의 흉골, 및 흉골의 종말판 및 대퇴골 및 경골의 성장판에서의 비대성 구역의 현미경적 증가된 두께로 이루어졌으며; 이들 소견은 범-TGFβ 항체와 비교하여 LY2109761을 투여한 동물에서 보다 높은 발생률 및/또는 중증도를 갖는다.

[0657] 표 13: 범-TGFβ 항체를 받은 동물에서의 현미경적 심장 소견

	범-TGFβ 항체			
용량 수준 (mg/kg/일)	0	3	30	100
심장				
심장 판막				
판막증				
최소	0	2	0	0
경미	0	2	4	5
중등도	0	0	1	0
심방				
침윤, 혼합 세포				
최소	0	0	1	2
경미	0	0	1	1
증식증, 내피				
최소	0	0	3	1
출혈				
최소	0	0	1	0
심근				
변성/괴사				
경미	0	0	0	2
출혈				
최소	0	0	2	1
경미	0	0	1	1
침윤, 혼합 세포, 기저				
경미	0	0	0	1
관상 동맥				
출혈을 동반한 괴사				
중등도	0	0	0	1
침윤, 혼합 세포, 혈관주위				
경미	0	0	0	1

[0658]

[0659] 최소 또는 경미한 심장 판막 소견이 Ab2가 투여된 소수의 동물에서 발생하였지만, 이들 소견은 낮은 발생률 (동물 및 동물 내의 심장 판막의 수), 용량 반응의 결여, 및/또는 공동 골 소견의 결여로 인해 시험 물품 관련된 것으로 고려될 가능성이 적었다.

[0660] B. 연구 II상

[0661] 연구의 제2상에서, 암컷 래트를 군에 배정하고, Ab2를 3 mg/kg (1개 군, n=5), 30 mg/kg (1개 군, n=5), 또는 100 mg/kg (1개 군, n=5)으로; Ab3을 3 mg/kg (1개 군, n=5), 30 mg/kg (1개 군, n=5), 100 mg/kg (1개 군, n=5), 또는 60 mg/kg (1개 군, n=5)으로; LY2109761을 200 mg/kg (1개 군, n=5)으로; 또는 PBS (pH 7.4) (1개 군, n=5)를 상기 논의된 바와 같이 투여하였다. Ab2, Ab3 또는 비히클 대조군을 받는 동물에게 10 mL/kg의 부피로 4주 동안 매주 1회 정맥내로 투여하고, LY2109761을 받는 래트에게 5일 동안 매일 1회 경구 위관영양에 의해 투여하였다. 동물을 희생시키고 부검을 수행하였다.

[0662] 연구 제1상에서의 관찰과 유사하게, 시험 물품-관련 심장 소견은 200 mg/kg LY2109761이 투여된 동물에서 보다 짧은 지속기간 (즉, 7일 대신 5일) 동안 발생하였다. 현미경적 심장 소견은 200 mg/kg LY2109761 또는 ≥3 mg/kg 범-TGFβ 항체가 투여된 동물에 대한 증가된 심장 중량과 연관되었다.

[0663] 최소 또는 경미한 심장 판막 소견이 Ab2 또는 Ab3이 투여된 소수의 II상 동물에서 발생하였지만, 이들 소견은 낮은 발생률 (동물 및 동물 내의 심장 판막의 수), 용량 반응의 결여, 및/또는 공동 골 소견의 결여로 인해 시험 물품 관련된 것으로 고려될 가능성이 적었다.

[0664] 추가의 조직을 II상에서 평가하였다; 어떠한 현미경적 소견도 Ab2 또는 Ab3에 기인하지 않았다. 그러나, 현미경적 소견은 200 mg/kg LY2109761이 투여된 II상 동물의 골 (흉골, 대퇴골 및 경골), 간, 췌장 (동맥), 흉선, 갑상선, 암컷 생식 조직 (난소, 자궁, 자궁경부 및 질), 및 유선에서 발생하였다. 흉선 소견은 피질에서의 최소 내지 약간 감소된 림프구로 이루어졌으며, 이는 육안으로 관찰되는 작은 흉성 및 감소된 흉성 중량과 상관관계가 있다. 감소된 흉선 림프구는 1차 시험 물품 효과와 일치하거나 또는 2차적 스트레스 효과 (즉, 증가된 내인성 글루코코르티코이드)였다. 증가된 갑상선 중량과 상관관계가 있는 최소 갑상선 여포 세포 비대는 간 효소 유도와 일치하였으며, 이는 티록신의 대사를 증가시켰다. LY2109761이 투여된 동물에 대한 증가된 간 중량은

간 효소 유도를 시사하나, 이들은 현미경적 상관관계가 결여되었다. 암컷 생식 조적 및 유선에서의 현미경적 소견은 감소된 발정 사이클링과 일치하였고, 감소된 자궁 중량과 상관관계가 있었다. 일부 동물은 또한 폐포 및/또는 관 상피 세포 (즉, 남성화)의 소엽성 증식증/비대를 특징으로 하는 유선 소견을 가졌으며, 이는 감소된 에스트로겐과 일치하였다.

[0665] C. 연구 결론

[0666] 요약하면, 4주의 기간에 걸쳐 시험된 모든 용량 (3 mg/kg, 30 mg/kg 또는 100 mg/kg)의 Ab2 및 Ab3으로 치료된 동물은 하기 파라미터 중 임의의 것에서 배경을 초과하는 독성 효과를 나타내지 않았다: 심근 변성 또는 괴사, 심방 출혈, 심근 출혈, 판막 출혈, 판막 내피 증식증, 판막 기질 증식증, 심장 판막에서의 혼합 염증 세포 침윤, 무기질화, 관상 동맥에서의 출혈을 동반한 괴사, 대동맥 근부에서의 염증을 동반한 괴사, 심근세포에서의 괴사 또는 염증 세포 침윤, 및 판막증. 따라서, TGFβ1 활성화의 이소형-특이적 억제제로의 치료는 놀랍게도 범-TGFβ 억제제 치료 (예를 들어, ALK5 키나제 억제제 LY2109761 또는 범-TGFβ 항체)와 비교하여 유의하게 개선된 안전성 프로파일, 예를 들어, 감소된 사망률 및 감소된 심장독성을 발생시켰다.

[0667] 실시예 20: 생체내 Ab3의 이소형-선택성

[0668] 생체내 TGFβ1의 이소형-선택적 억제를 확인하기 위해 약역학 연구를 수행하였으며, 여기서 긴장성 포스포-SMAD2/3 수준에 대한 Ab3의 효과를 건강한 래트로부터 수집된 기관지폐포 세척 (BAL) 세포에서 평가하였다. 항상성 조건 하에, BAL 세포는 TGFβ2/3을 우세하게 발현하나 TGFβ1은 거의 발현하지 않으며, 후자는 병리학적 상태에서 우세하게 상승되는 것으로 문헌에 보고된다.

[0669] 건강한 스프라그 돌리 래트 (대략 6-8주령, 연구 시작 시 무게 200-250 g; 찰스 리버)를 체중에 의해 연구 군에 무작위화하였고 하기 기재된 바와 같이 투여하였다.

[0670] 동물은 제1, 8, 및 15일에 복강내 주사에 의해 시험 항체 (huNEG-mIgG1, 항-인테그린 β6 항체 또는 Ab3)를 받았다. 동물을 BAL 및 혈청 수집을 위해 제16일에 안락사시켰다. 대조군 동물의 1개 군에게 단일 경구 위관영양 (PO) 용량의 LY2109761 (소분자 ALK5 억제제)를 100 mg/kg으로 투여하고, BAL 수집을 위해 투여-후 2시간 (+/- 20분)에 안락사시켰다.

[0671] BAL 샘플을 수집하기 위해, 전체 폐를 5.0 mL의 빙냉 둘베코 포스페이트 완충 염수로 3회 세척하였다. 세척액을 풀링하고 즉시 습윤 얼음 상에 하기와 같이 처리될 때까지 두었다. 각각의 샘플로부터의 작은 부분 (100-150 μL)을 세포 카운트를 위해 얼음 상에 두었다. 남아있는 샘플을 1,300 g (2-8℃)에서 ≥ 10분 동안 원심분리하였다. 세포 펠릿을 즉시 얼음 상에 두었다. 250 μL의 새로 제조된, 빙냉 pSMAD 용해 완충제를 사용하여 펠릿을 용해시켰다. 용해된 샘플을 14,000 g에서 10분 동안 (2-8℃) 원심분리하였다. 생성된 상청액을 분취하고 즉시 액체 질소 중에서 또는 드라이 아이스 상에서 급속 동결시켰다.

[0672] 혈청 샘플을 2,500 g, 2-8℃에서 10분 동안 원심분리함으로써 처리하였다. 혈청 샘플을 -70 내지 -90℃에서 동결시켰다.

[0673] 포스포-SMAD2/3 검정을 제조업체의 지침에 따라 ELISA (셀 시그널링 테크놀로지스)에 의해 수행하였다. 결과를 인산화-대-전체 SMAD2/3 비에 의해 평가하였다. 도 20에 제시된 바와 같이, 긴장성 SMAD2/3 신호전달은 소분자 범-TGFβ 억제제, LY2109761, 또는 TGFβ1/3의 인테그린-매개 활성화를 차단하는 인테그린의 β6 쇄에 대한 모노클로날 항체로 치료된 동물에서 유의하게 억제되었다. 대조적으로, TGFβ1 이소형-특이적 항체 Ab3으로 치료된 동물은 BAL 세포에서 긴장성 인산화 수준을 유지하였으며, 이는 Ab3이 생체내 TGFβ2 또는 TGFβ3의 항상성 기능을 교란시키지 않으면서 TGFβ1 활성화를 선택적으로 억제할 수 있다는 개념을 지지한다.

[0674] 실시예 21: Ab3: 항섬유화 활성을 갖는 신규이고 고도로 특이적인 TGFβ1 억제 항체

[0675] 형질전환 성장 인자-β1 (TGFβ1)은 면역 반응 및 조직 항상성의 조절을 포함한 다양한 생물학적 기능을 갖는다. 조절이상 TGFβ1 활성화는 신장 섬유증을 포함한 다수의 질환과 연관되었으며, 여기서 만성 활성화가 주요 질환 유도인자이다. 그러나, TGFβ1 성장 인자와 그의 가까운 동족인 TGFβ2 및 TGFβ3 사이의 높은 상동성 때문에, 진정한 TGFβ1-특이적 억제제를 찾기가 힘든 상황이다. 다른 한편으로는, 범-TGFβ 억제는 장기 투여에 의한 독성 우려로 이어지는 용량-제한 심장 판막증을 유발할 수 있다. TGFβ는 N-말단 프로도메인 및 C-말단 성장 인자로 단백질분해적으로 절단되는 프로-단백질로서 발현된다. 프로도메인은 성장 인자와 비공유적으로 연관된 채로 남아 수용체 결합을 막는다. 이러한 잠복 TGFβ 복합체는 복합체가 인테그린에 의해 활성화되어 성장 인자를 유리시키고 수용체 결합을 가능하게 할 때까지 세포 상에 또는 세포외 매트릭스에 상주한다.

TGFβ1-특이적 항체를 확인하기 위해, 성장 인자보다 TGFβ2 및 TGFβ3과 훨씬 더 낮은 상동성을 공유하는 프로도메인이 표적화되었다. 잠복 TGFβ2 또는 TGFβ3에 대한 검출가능한 결합 없이 잠복 TGFβ1에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 Ab3이 확인되었다. Ab3은 αVβ6 또는 αVβ8 인테그린에 의해 잠복 TGFβ1 활성화를 차단하여 TGFβ1 성장 인자/수용체 상호작용을 표적화하는 생물제제에 의해서는 달성되지 않는 특이성을 제공하는 것으로 밝혀졌다. Ab3은 모든 4종의 알려져 있는 TGFβ-제시 분자와 복합체화된 잠복 TGFβ1에 결합하고 그를 억제하여, 다중 조직에서의 잠복 TGFβ1의 표적화를 가능하게 한다. Ab3은 피부 근섬유모세포 및 간 성상 세포를 포함한 다수의 1차 세포에서 내인성 TGFβ1의 활성화를 차단한다. 최종적으로, 이러한 신규 메카니즘을 통한 TGFβ1 억제의 생체내 효능을 신장 섬유증의 UUO 모델에서 시험하였으며, 이는 Ab3이 섬유증 마커를 범-TGFβ 항체-치료된 동물에서 달성되는 것과 유사한 수준으로 억제한다는 것을 보여준다. 종합하면, 이들 데이터는 잠복 TGFβ1 활성화의 억제가 전임상 섬유증 모델에서 효과적이고 범-TGFβ 억제와 비교하여 우수한 안전성 프로파일을 갖는다는 것을 입증한다.

[0676] 실시예 22: 항섬유화 활성을 갖는 항체인 Ab1에 의한 TGFβ1 활성화의 고도로 특이적인 억제

[0677] 형질전환 성장 인자-β1 (TGFβ1)은 면역 반응 및 조직 항상성의 조절을 포함한 중대하고 다양한 생물학적 기능을 갖는 시토카인이다. TGFβ는 N-말단 프로도메인 및 C-말단 성장 인자로 단백질분해적으로 절단되는 프로-단백질로서 발현된다. 분비된 성장 인자는 프로-단백질과 비공유적으로 연관된 채로 남아 수용체 결합 및 신호전달을 막는다. 잠복 TGFβ1은 잠복 TGFβ1을 세포외 매트릭스 또는 세포 표면에 연결시키는 디술피드 결합을 통해 제시 분자와 공유적으로 연관된다. 지금까지, 4종의 TGFβ-제시 분자 (LTBP1, LTBP3, GARP, 및 LRRC33)가 확인되었다. 이들 제시 분자는 그들이 잠복 TGFβ1에 대한 견인력을 발휘하기 위해 인테그린에 대한 앵커를 제공하여 활성 성장 인자를 방출시키므로, 잠복 복합체의 활성화에서 결정적인 역할을 한다. 조절이상 TGFβ1 활성화는 섬유화 질환을 포함한 다수의 병리상태와 연관되었으며, 여기서 만성 TGFβ1 활성화는 근섬유모세포 전환분화 및 세포외 매트릭스 단백질의 과다발현을 유도한다. 섬유증을 유도함에 있어서 TGFβ1의 역할은 그의 활성을 억제하기 위한 다중 치료제의 개발로 이어졌다. 그러나, 강력한 항-범-TGFβ 항체로의 억제는 용량-제한 심장 판막증을 유발하는 것으로 밝혀졌으며, 이는 이러한 치료 접근법의 독성에 대한 우려로 이어진다. TGFβ1을 특이적으로 표적화하는 것의 대체 전략은 TGFβ1 성장 인자와 그의 가까운 동족인 TGFβ2 및 TGFβ3 사이의 높은 상동성에 의해 복잡해진다. TGFβ2 및 TGFβ3의 프로도메인에 대해 훨씬 더 낮은 상동성을 갖는 TGFβ1 프로도메인이 표적화되었고, 잠복 TGFβ2 또는 TGFβ3에 대한 검출가능한 결합이 없이 잠복 TGFβ1에 특이적으로 결합하고 그의 활성화를 억제하는 완전 인간 모노클로날 항체인 Ab3이 확인되었다. 이러한 신규 메카니즘은 TGFβ1 성장 인자/수용체 상호작용에 결합하고 그를 차단하며, αVβ6 및 αVβ8 인테그린 둘 다에 의해 잠복 TGFβ1 활성화를 막는 생물제제에 의해 달성되지 않은 이소형 특이성을 가능하게 한다. Ab3은 모든 4종의 알려져 있는 TGFβ-제시 분자와 복합체화된 잠복 TGFβ1에 결합하고 그를 억제하여, 다중 조직에서 잠복 TGFβ1의 표적화를 가능하게 한다. Ab3은 피부 근섬유모세포 및 간 성상 세포를 포함한 다수의 시험관내 1차 세포에서 내인성 TGFβ1을 억제한다. 또한, 이러한 신규 메카니즘을 통한 TGFβ1 억제의 생체내 효능을 신장 섬유증의 일측성 요관 폐쇄 모델에서 시험하였다. Ab3은 섬유화유발 유전자의 유도를 범-TGFβ 항체-치료된 동물에서 달성된 것과 유사한 수준으로 억제하는 것으로 밝혀졌다. 종합하면, 이들 데이터는 잠복 TGFβ1 활성화의 억제가 전임상 섬유증 모델에서 효과적이고 범-TGFβ 억제와 비교하여 잠재적으로 우수한 안전성 프로파일을 갖는다는 것을 입증한다.

[0678] 실시예 23: TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3의 상대 발현의 생물정보학적 분석

[0679] 암성 종양에서 TGFβ 이소형의 발현을 평가하기 위해, 공중 이용가능한 데이터세트로부터의 유전자 발현 (RNAseq) 데이터를 검사하였다. 더 캔서 게놈 아틀라스(The Cancer Genome Atlas) (TCGA)에서 TGFβ 이소형의 발현을 검사하기 위해 공중 이용가능한 온라인 인터페이스 툴 (파이어브라우즈(Firebrowse))을 사용하여, 정상 및 암성 조직 둘 다에서 TGFβ 이소형을 코딩하는 RNA의 차등 발현을 먼저 검사하였다. 정상 조직 비교자가 존재하는 TCGA 데이터베이스에서의 모든 종양 RNAseq 데이터세트를 선택하고, TGFB1, TGFB2, 및 TGFB3 유전자의 발현을 검사하였다 (도 21a). 파이어브라우즈 인터페이스로부터의 데이터는 킬로염기 백만개당 판독 (RPKM)의 log2로서 표시된다.

[0680] 이들 데이터는 대부분의 종양 유형 (회색)에서, TGFB1이 일반적으로 TGFB2에 대한 0-2 및 TGFB3에 대한 2-4 대비 4-6 범위 내의 log2(RPKM) 값을 가지면서 TGFβ 이소형의 가장 풍부하게 발현된 전사체라는 것을 시사한다. 본 발명자들은 또한 여러 종양 유형에서, TGFB1 및 TGFB3 발현 둘 다의 평균 수준이 정상 비교자 샘플 (흑색)에 비해 상승된다는 것을 주목하였으며, 이는 이들 TGFβ 이소형의 증가된 발현이 암성 세포와 연관될 수 있다는 것을 시사한다. 암 미세환경에서 숙주 면역 시스템을 억제함에 있어서 TGFβ 신호전달의 잠재적 역할 때문에,

본 발명자들은 관심있게 TGFB1 전사체가 항-PD1 또는 항-PDL1 요법이 승인된 암 유형에서 상승되었음을 주목하였다 - 이들 지표는 도 21a에 회색으로 표지된다.

[0681] RPKM > 1이 일반적으로 생물학적으로 적절한 유전자 발현과 연관된 최소 값인 것으로 여겨지지만 (Hebenstreit et al., 2011; Wagner et al., 2013), 후속적인 분석의 경우 가양성을 회피하기 위해 > 10 또는 > 30의 RPKM (또는 관련 척도 FPKM (문헌 [Conesa et al., 2016] 참조))의 보다 엄격한 컷오프를 사용하였다. 비교를 위해, 이들 역치 3개 모두가 도 21a에 표시된다.

[0682] 도 21a에서의 큰 사분위간 범위는 개별 환자 중에서의 TGFβ 이소형 발현에서의 유의한 가변성을 나타낸다. 환자 집단 중 적어도 1개의 하위세트가 TGFB1 이소형을 차등 발현하는 종양을 갖는 암을 확인하기 위해, TCGA 데이터세트에서의 개별 종양 세트로부터의 RNAseq 데이터를 분석하여 킬로염기 백만개당 단편 (FPKM)의 수를 계산하였다. RPKM 및 FPKM은 대략 동등하지만, FPKM은 동일한 전사체의 반대 말단에서의 이중-카운팅 판독을 보정한다 (Conesa et al., 2016). 전사체의 FPKM 값이 >30인 경우에 종양 샘플을 TGFB1, TGFB2, 또는 TGFB3 발현에 대해 양성인 것으로 점수화하고, 각각의 TGFβ 이소형을 발현하는 각각의 암 유형의 환자의 분율 (%로서 표현됨)을 계산하였다 (도 21b).

[0683] 도 21b에 제시된 바와 같이, TGCA 데이터세트에서의 대다수의 종양 유형은 TGFB1 양성인 개별 샘플의 유의한 백분율을 나타내며, 급성 골수성 백혈병, 미만성 대 B-세포 림프종, 및 두경부 편평 세포 암종을 포함한 일부 암 유형은 모든 종양 샘플 중 80% 초과에서 TGFB1을 발현한다. 도 21a에서의 데이터와 일치하게, 더 적은 암 유형이 TGFB2 또는 TGFB3에 대해 양성이지만, 여러 암이 유방 침습성 암종, 중피종 및 육종을 포함한 TGFB3 양성인 종양 샘플의 동등하거나 더 큰 백분율을 나타낸다. 이들 데이터는 암 유형이 TGFβ 이소형 발현에 대해 계층화될 수 있고, 이러한 계층화가 TGFβ 이소형-특이적 억제제로의 치료 후보인 환자를 확인하는 데 유용할 수 있다는 것을 시사한다.

[0684] 이 가설을 추가로 조사하기 위해, 개별 종양 샘플의 하위세트로부터의 log2(FPKM) RNAseq 데이터를 열 지도에 플롯팅하고 (도 21c), FPKM > 30을 TGFB 이소형-양성으로 점수화될 최소 전사체 수준으로서 반영하도록 색상 역치를 설정하였다.

[0685] 각각의 샘플은 열 지도에서 단일 행으로 제시되고, 샘플은 TGFB1 발현의 수준에 의해 배열된다 (최고 발현 수준이 최상단). 도 21b에서의 분석과 일치하게, 각각의 암 유형에서의 샘플의 유의한 수가 TGFB1 발현에 대해 양성이다. 그러나, 이러한 표현은 또한 많은 종양이 특히 식도 암종, 방광 요로상피, 폐 선암종, 및 피부 흑색종 암 유형에서 오로지 TGFB1 전사체만을 발현한다는 사실을 강조한다. 흥미롭게도, 이러한 TGFB1 편향은 모든 암의 특색은 아니며, 유방 침습성 암종으로부터의 샘플은 TGFB1 양성인 것보다 훨씬 더 큰 수의 TGFB3-양성인 샘플을 나타낸다. 그럼에도 불구하고, 이러한 분석은 β1 이소형이 우세하고, 대부분의 경우에, 그 TGFβ 패밀리 구성원만이 다수의 암 환자로부터의 종양에 존재한다는 것을 나타낸다. TGFβ 신호전달이 암 미세환경에서의 면역억제에서 유의한 역할을 한다는 것을 시사하는 데이터와 종합하면, 이들 발견은 또한 이들 종양의 치료에서의 TGFβ1-특이적 억제의 유용성을 가리킨다.

[0686] 암 치료제로서의 TGFβ1-특이적 억제의 효능을 시험하기 위한 마우스 모델을 확인하기 위해, 마우스 동계 종양 모델에서 사용되는 다양한 세포주로부터의 RNAseq 데이터에서의 TGFβ 이소형 발현을 분석하였다. 이 분석에 대해, 데이터의 2개의 표현을 생성하였다. 먼저, 도 3에서의 데이터와 유사하게, 본 발명자들은 각각의 세포주로부터 유래된 종양에 대한 log2(FPKM) 값의 열 지도를 생성하였다 (도 21d, 좌측). 이 분석을 사용하여 TGFB2 및 TGFB3 음성인 높은 TGFB1을 발현하는 동계 모델을 확인하였기 때문에, 본 발명자들은 주로 가음성을 피하게 되는 것을 우려하였고, 본 발명자들은 본 발명자들의 "양성" 역치를 도 21b 및 21c에서의 표현의 것보다 훨씬 낮은 FPKM>1로 설정하였다.

[0687] 도 21d (좌측)에서의 데이터 표현에서 명백해진 바와 같이, 통상적으로 MC-38, 4T-1, 및 EMT6을 포함한 다수의 동계 종양이 유의한 수준의 TGFβ1 및 TGFβ3 둘 다를 발현한다. 대조적으로, A20 및 EL4 모델은 거의 독점적으로 TGFβ1을 발현하고, S91 및 P815 종양은 TGFB1 발현에 대한 강한 편향을 나타낸다.

[0688] TGFB1 vs TGFB2 및/또는 TGFB3의 차등 발현을 추가로 평가하기 위해, $\log2(FPKM_{TGFB1})$ - $\log2(FPKM_{TGFB2})$ 또는 $\log2(FPKM_{TGFB1})$ - $\log2(FPKM_{TGFB3})$의 더 작은 값으로 정의된 minΔTGFB1을 계산하였다. 각각의 모델에 대한 minΔTGFB1은 도 21d (우측)에서 열 지도로서 제시되고, A20, EL4, S91 및/또는 P815 세포주로부터의 동계 종양이 TGFβ1-특이적 억제제의 효능을 시험하기 위한 탁월한 모델을 대표할 수 있다는 도 21d (좌측)로부터의 결론을 강조한다.

[0689] 상기 개별 섹션에서 언급된 본 발명의 다양한 특색 및 실시양태는 적절하게 필요한 변경을 가하여 다른 섹션에 적용한다. 결과적으로, 한 섹션에 명시된 특색은 다른 섹션에 명시된 특색과 적절하게 조합될 수 있다.

[0690] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상용 실험을 사용하여, 본원에 기재된 발명의 구체적 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 하기 청구범위에 의해 포괄되는 것으로 의도된다.

[0691] [항목 1]

[0692] TGFβ1의 이소형-특이적 억제제 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는, 인간 대상체에서 TGFβ1 조절이상과 연관된 질환을 치료하는 방법에 사용하기 위한 조성물이며,

[0693] 여기서 억제제는 생체내에서 ECM-연관 TGFβ1 및 면역 세포-연관 TGFβ1 둘 다를 표적화하나 TGFβ2 또는 TGFβ3을 표적화하지는 않으며, 여기서 임의로 억제제는 TGFβ1의 활성화 단계를 억제하고;

[0694] 여기서 질환은 하기 속성:

[0695] a) 조절 T 세포 (Treg);

[0696] b) 이펙터 T 세포 (Teff) 증식 또는 기능;

[0697] c) 골수 세포 증식 또는 분화;

[0698] d) 단핵구 동원 또는 분화;

[0699] e) 대식세포 기능;

[0700] f) 상피-에서-중간엽 이행 (EMT) 및/또는 내피-에서-중간엽 이행 (EndMT);

[0701] g) PAI-1, ACTA2, CCL2, Col1a1, Col3a1, FN-1, CTGF, 및 TGFβ1로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커 유전자 중 1종 이상에서의 유전자 발현;

[0702] h) ECM 성분 또는 기능;

[0703] i) 섬유모세포 분화

[0704] 중 적어도 2가지의 조절이상 또는 장애를 특징으로 하며;

[0705] 여기서 방법은 치료 유효량의 조성물을 상기 질환으로 진단된 인간 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 것인

[0706] 조성물.

[0707] [항목 2]

[0708] 항목 1에 있어서, ECM-연관 TGFβ1이 LTBP1-제시된 TGFβ1 및/또는 LTBP3-제시된 TGFβ1이고; 면역 세포-연관 TGFβ1이 GARP-제시된 TGFβ1 및/또는 LRRC33-제시된 TGFβ1인 조성물.

[0709] [항목 3]

[0710] 항목 1 또는 항목 2에 있어서, 인간 대상체가 증식성 성분 및/또는 섬유화 성분을 수반하는 질환을 앓고 있는 것인 조성물.

[0711] [항목 4]

[0712] 항목 3에 있어서, 질환이 암이며, 여기서 임의로 암은 전이성 암인 조성물.

[0713] [항목 5]

[0714] 항목 4에 있어서, 암이 TGFβ1-양성인 고형 종양을 포함하며, 여기서 임의로 고형 종양은 결합조직형성 종양인 조성물.

[0715] [항목 6]

[0716] 항목 4에 있어서, 암이 골수증식성 장애이며, 여기서 임의로 골수증식성 장애는 본태성 혈소판혈증 (ET), 진성 다혈구혈증 (PV) 또는 원발성 골수섬유증 (PMF)인 조성물.

[0717] [항목 7]

[0718] 항목 4에 있어서, 암이 증가된 수의 Treg, TAM, TAN, MDSC, CAF, 또는 그의 임의의 조합과 연관된 것인 조성물.

[0719] [항목 8]

[0720] 항목 4에 있어서, 암이 방사선 요법, 화학요법 및 체크포인트 억제제 요법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암 요법에 불량하게 반응성이며, 여기서 체크포인트 억제제 요법은 PD-1 길항제, PD-L1 길항제 또는 CTLA-4 길항제를 임의로 포함하고; 여기서 추가로 임의로 불량한 반응은 고유 저항성 또는 후천성 저항성으로 인한 것인 조성물.

[0721] [항목 9]

[0722] 항목 8에 있어서, 대상체가

[0723] 골수섬유증, 흑색종, 신세포 암종, 방광암, 결장암, 혈액 악성종양, 비소세포 암종, 비소세포 폐암 (NSCLC), 림프종 (전형적 호지킨 및 비-호지킨), 두경부암, 요로상피암, 미소위성체 불안정성-높은 암, 미스매치 복구-결핍 암, 위암, 신암, 및 간세포성암

[0724] 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역 체크포인트 억제제-저항성 암을 갖는 것인 조성물.

[0725] [항목 10]

[0726] 항목 8에 있어서, 인간 대상체의 임상 샘플이 GARP 및/또는 LRRC33의 발현을 보여주고/거나; 임상 샘플에서의 TGFβ1 발현이 TGFβ2 또는 TGFβ3 발현보다 더 크며, 여기서 임의로 발현은 RNA 수준 및/또는 단백질 수준에 의해 결정되는 것인 조성물.

[0727] [항목 11]

[0728] 항목 4 내지 항목 10 중 어느 하나에 있어서, 치료 유효량이 하기 임상 효과:

[0729] a) 감소된 종양 성장;

[0730] b) 감소된 전이;

[0731] c) 감소된 종양 침습;

[0732] d) 감소된 혈관신생 및 혈관화/혈관분포도;

[0733] e) 종양 부위에 대한 감소된 단핵구 동원;

[0734] f) 종양의 감소된 TAM 침윤;

[0735] g) 감소된 대식세포 활성화;

[0736] h) 종양 부위에서의 M1 대 M2 (TAM-유사) 대식세포 집단의 증가된 비;

[0737] i) 종양 부위에서의 CAF의 감소된 수;

[0738] j) 감소된 면역-억제;

[0739] k) 암 요법에 대한 증진된 반응성;

[0740] l) 연장된 생존;

[0741] m) 연장된 불응기;

[0742] n) 완전 완화 또는 완전 반응의 증가된 속도;

[0743] o) 종양 부위에서의 Treg/Teff 세포의 감소된 비;

[0744] p) 종양 부위에서의 Teff 세포의 증가된 수;

[0745] q) 종양 부위에서의 Treg 세포의 감소된 수;

[0746] r) 대상체에서의 MDSC 및/또는 TAN의 감소된 수

[0747] 중 1가지 이상을 달성하는 데 효과적인 양이며;

[0748] 여기서 임상 효과(들)는 대상체에서 허용되는 수준의 독성으로 달성되는 것인

[0749] 조성물.

[0750] [항목 12]

[0751] 항목 4, 항목 6 및 항목 8 내지 항목 10 중 어느 하나에 있어서, 치료 유효량이 하기 임상 이익:

[0752] a) 골수에서의 감소된 섬유증;

[0753] b) 골수에서의 분화 혈액 세포의 증진된 조혈;

[0754] c) 골수에서의 비정상적 줄기 세포의 감소된 증식, 여기서 임의로 비정상적 줄기 세포는 CD133-양성임;

[0755] d) 골수 및/또는 비장에서의 감소된 거핵구;

[0756] e) 대상체에서의 골수외 조혈의 감소된 발생률 및/또는 정도, 여기서 임의로 골수외 조혈은 비장에서 발생함;

[0757] f) 골수 이식에 대한 감소된 필요;

[0758] g) 연장된 생존;

[0759] h) 발현 마커 중 1종 이상의 정상화된 수준, 여기서 발현 마커는 임의로 BMP1, BMP6, BMP7, 및 BMP-수용체 2, PLOD2, TGFβ1, bFGF, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), Col1, 메탈로프로테이나제, FN1, CXCL12, VEGF, CXCR4, IL-2, IL-3, IL-9, CXCL1, IL-5, IL-12, TNFα, Bmp2, Bmp5, Acvrl1, Tgfbli1, Igf1, Cdkn1a, Ltbp1, Gdf2, Lefty1 및 노달로 이루어진 군으로부터 선택됨; 및

[0760] i) 골수에서의 감소된 만성 염증

[0761] 중 적어도 2가지를 달성하는 데 효과적인 양인 조성물.

[0762] [항목 13]

[0763] 항목 3에 있어서, 인간 대상체가 기관 섬유증을 가지며, 여기서 임의로 기관 섬유증은 간 섬유증, 폐 섬유증, 신장 섬유증, 피부 섬유증 및/또는 심장 섬유증인 조성물.

[0764] [항목 14]

[0765] 항목 13에 있어서, 대상체가 기관 섬유증을 갖고, 기관 이식을 위한 후보는 아닌 것인 조성물.

[0766] [항목 15]

[0767] 항목 3, 항목 13 및 항목 14 중 어느 하나에 있어서, 대상체가 만성 염증을 동반한 섬유화 장애를 갖는 것인 조성물.

[0768] [항목 16]

[0769] 항목 15에 있어서, 섬유화 장애가 근육 이영양증이며, 여기서 임의로 근육 이영양증은 DMD인 조성물.

[0770] [항목 17]

[0771] 항목 1 내지 항목 16 중 어느 하나에 있어서, 이소형-선택적 억제제가 하기 TGFβ1 활성:

[0772] a) GARP-매개 TGFβ1 활성;

[0773] b) LRRC33-매개 TGFβ1 활성;

[0774] c) LTBP1-매개 TGFβ1 활성, 및

[0775] d) LTBP3-매개 TGFβ1 활성

[0776] 중 3가지 이상을 억제하며;

[0777] 여기서 임의로 억제제는 TGFβ1 활성 (a)-(d) 모두를 억제하는 것인

[0778] 조성물.

[0779] [항목 18]

[0780] 항목 1 내지 항목 17 중 어느 하나에 있어서, 억제제가 모노클로날 항체 또는 그의 단편인 조성물.

[0781] [항목 19]

[0782] 항목 18에 있어서, 모노클로날 항체 또는 그의 단편이 프로/잠복 TGFβ1을 포함하는 단백질 복합체에 결합하며, 여기서 임의로 단백질 복합체는 LTBP1, LTBP3, GARP 및 LRRC33으로 이루어진 군으로부터 선택되는 제시 분자를 추가로 포함하는 것인 조성물.

[0783] [항목 20]

[0784] 항목 18 또는 항목 19에 있어서, 항체 또는 그의 단편이 프로/잠복 TGFβ1 내의 에피토프에 특이적으로 결합하며, 여기서 임의로 에피토프는 프로/잠복 TGFβ1의 프로도메인 내에 있는 것인 조성물.

[0785] [항목 21]

[0786] 항목 18 내지 항목 20 중 어느 하나에 있어서, 항체 또는 그의 단편이 조합적 에피토프 및/또는 입체형태적 에피토프에 특이적으로 결합하는 것인 조성물.

[0787] [항목 22]

[0788] 항목 18 내지 항목 21 중 어느 하나에 있어서, 모노클로날 항체가 프로/잠복 TGFβ1을 포함하는 잠복 단백질 복합체로부터의 성숙 TGFβ1 성장 인자의 방출을 억제하는 것인 조성물.

[0789] [항목 23]

[0790] 항목 18 내지 항목 22 중 어느 하나에 있어서, 항체 또는 그의 단편이 완전 인간 또는 인간화 항체인 조성물.

[0791] [항목 24]

[0792] 항목 18 내지 항목 23 중 어느 하나에 있어서, 항체가 인간 IgG_4 항체이며, 여기서 임의로 인간 IgG_4 항체는 백본 치환을 포함하는 것인 조성물.

[0793] [항목 25]

[0794] 항목 18 내지 항목 24 중 어느 하나에 있어서, 항체가 임의로 3개 이하의 치환을 갖는 하기 CDR 서열:

[0795] CDR-H1: NYAMS (서열식별번호: 85);

[0796] CDR-H2: SISGSGGATYYADSVKG (서열식별번호: 86);

[0797] CDR-H3: ARVSSGHWDFDY (서열식별번호: 87);

[0798] CDR-L1: RASQSISSYLN (서열식별번호: 88);

[0799] CDR-L2: SSLQS (서열식별번호: 89); 및,

[0800] CDR-L3: QQSYSAPFT (서열식별번호: 90)

[0801] 를 갖는 것인 조성물.

[0802] [항목 26]

[0803] 서열식별번호: 95에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 중쇄 가변 영역 폴리펩티드 및 서열식별번호: 97에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 포함하는 항체를 포함하는 제약 조성물.

[0804] [항목 27]

[0805] 임의로 3개 이하의 치환을 갖는 하기 CDR 서열:

[0806] CDR-H1: NYAMS (서열식별번호: 85);

[0807] CDR-H2: SISGSGGATYYADSVKG (서열식별번호: 86);

[0808] CDR-H3: ARVSSGHWDFDY (서열식별번호: 87);

[0809] CDR-L1: RASQSISSYLN (서열식별번호: 88);

[0810] CDR-L2: SSLQS (서열식별번호: 89); 및,

[0811] CDR-L3: QQSYSAPFT (서열식별번호: 90)

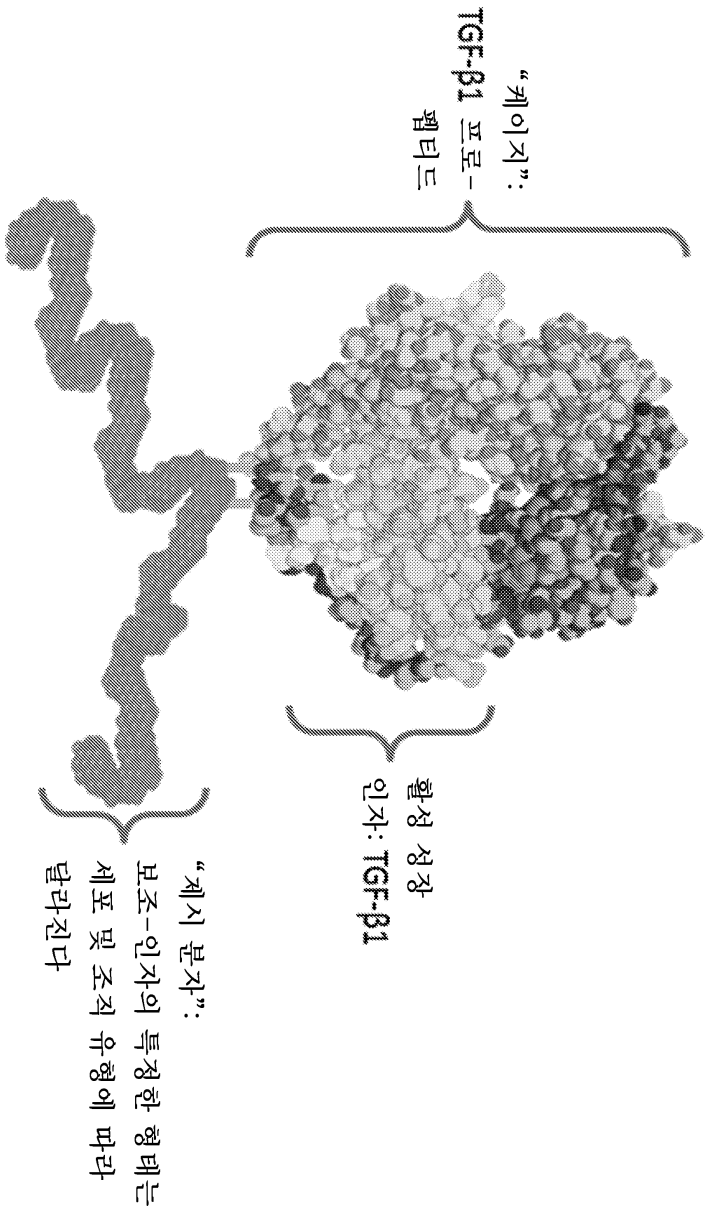
[0812] 를 갖는 항체를 포함하는 제약 조성물.

[0813] [항목 28]

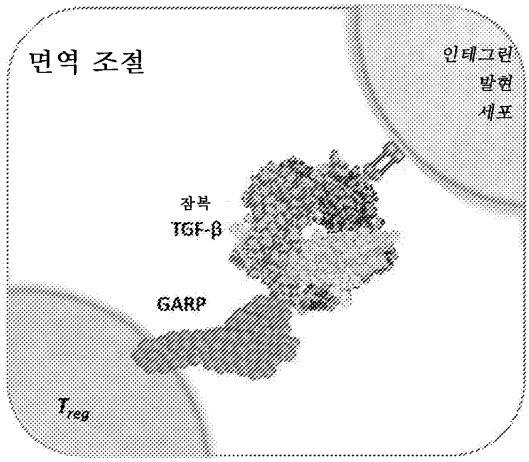
[0814] 항목 27에 있어서, 항체가 어떠한 치환도 갖지 않는 CDR 서열을 갖는 것인 제약 조성물.

도면

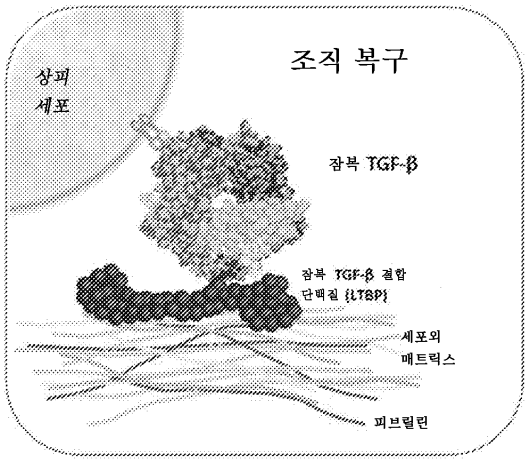
도면1



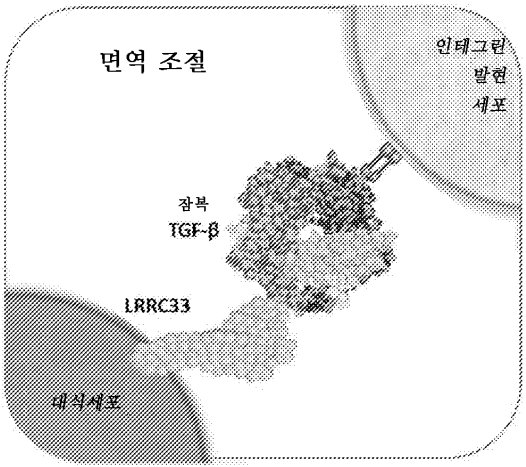
도면2a



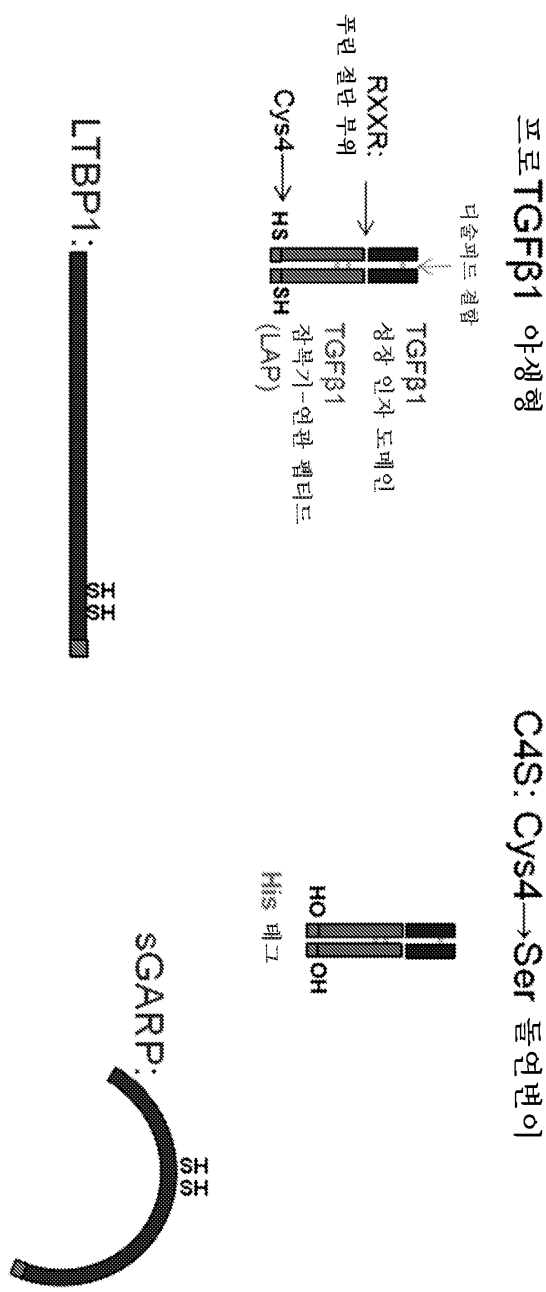
도면2b



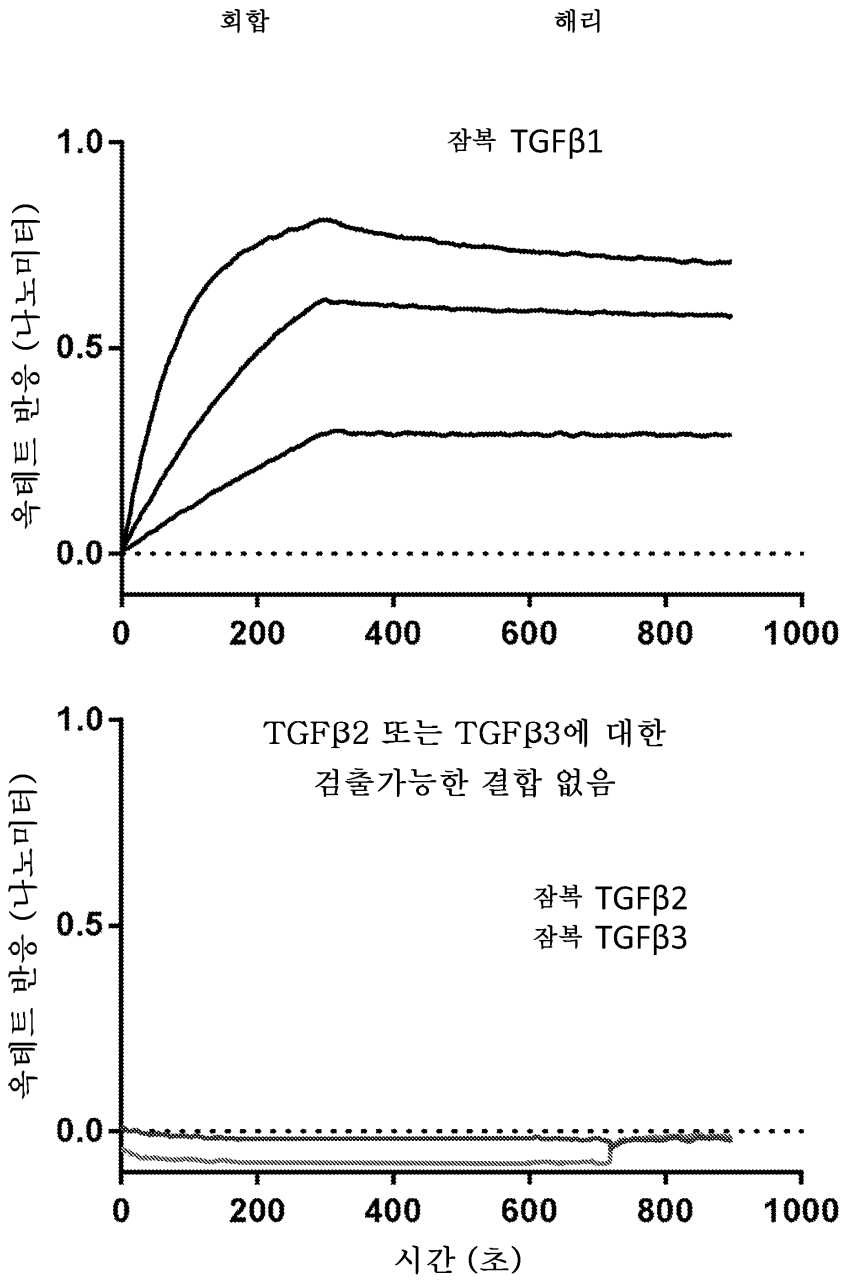
도면2c



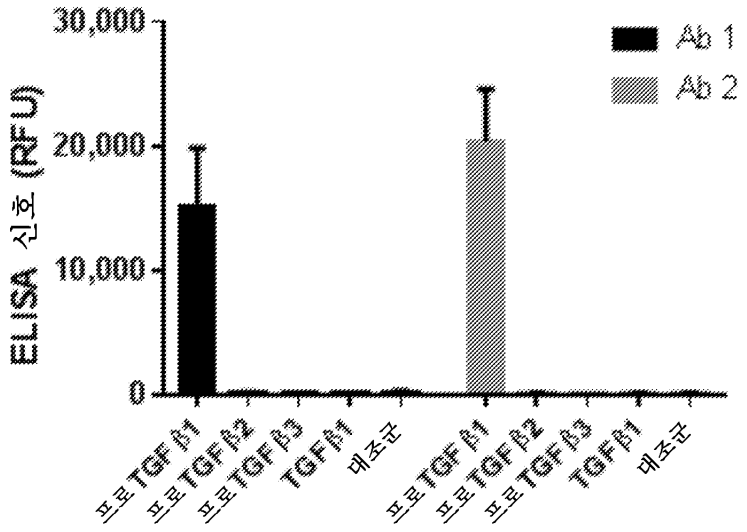
도면3


프로TGFβ1 야생형
RXXR:
푸린 절단 부위
Cys4
HS
SH
(LAP)
TGFβ1
성장 인자 도메인
TGFβ1
잠복기-연관 펩타이드
LTBP1:
sGARP:
C4S: Cys4→Ser 돌연변이
HO
OH
His 태그

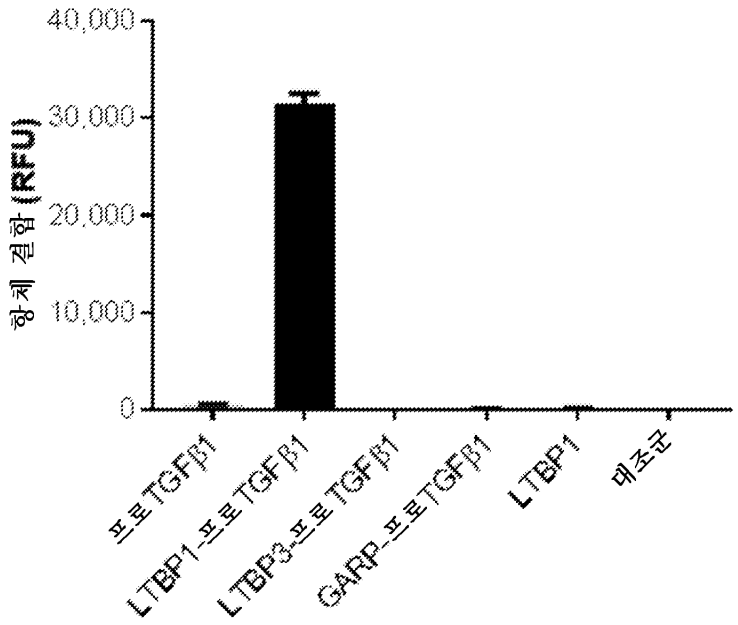
도면4a


회합
해리
잠복 TGFβ1
옥테트 반응 (나노미터)
1.0
0.5
0.0
0
200
400
600
800
1000
TGFβ2 또는 TGFβ3에 대한
검출가능한 결합 없음
잠복 TGFβ2
잠복 TGFβ3
옥테트 반응 (나노미터)
1.0
0.5
0.0
0
200
400
600
800
1000
시간 (초)

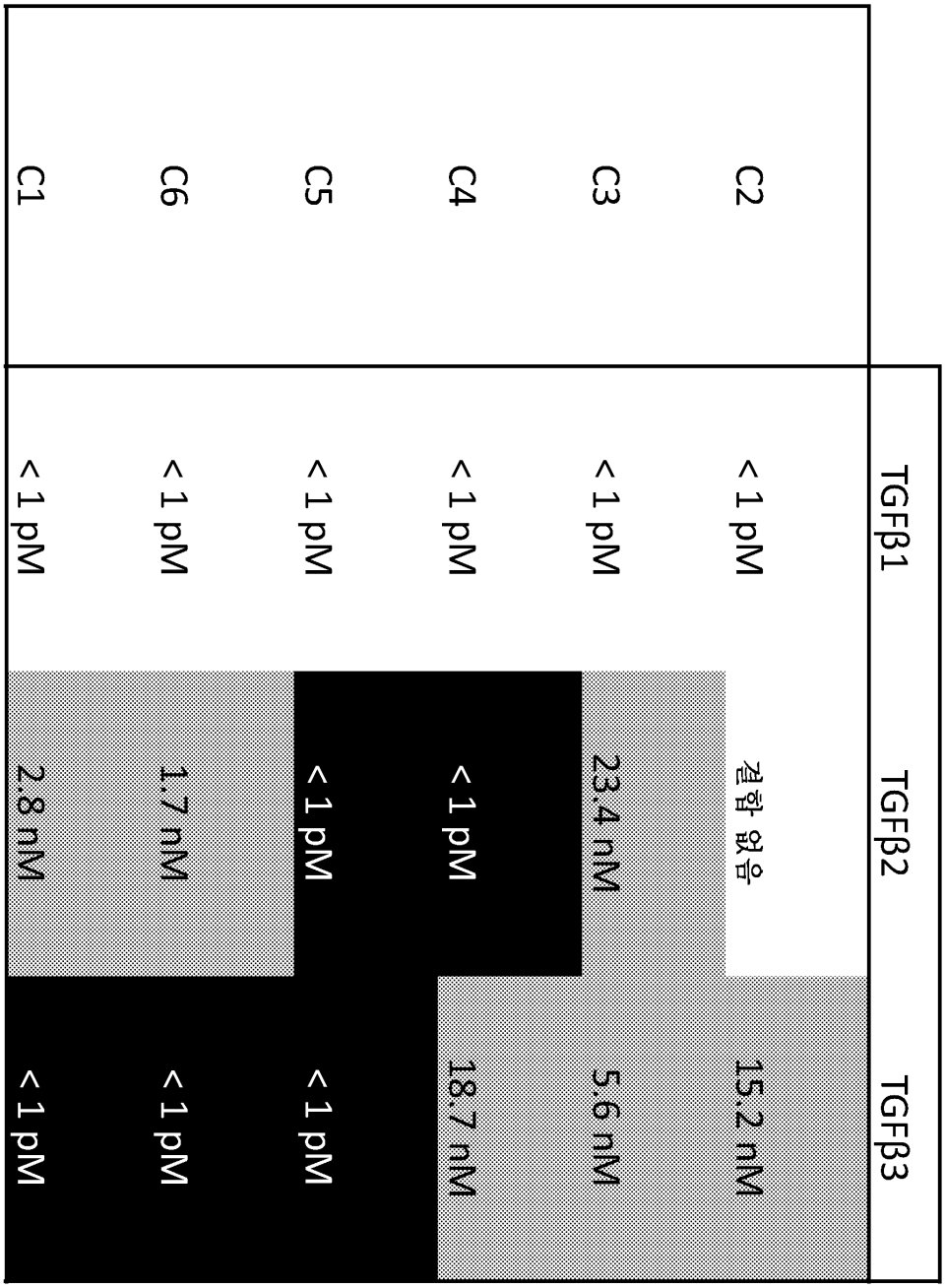
도면4b


30,000
20,000
10,000
0
ELISA 신호 (RFU)
Ab 1
Ab 2
프로TGFβ1
프로TGFβ2
프로TGFβ3
TGFβ1
대조군
프로TGFβ1
프로TGFβ2
프로TGFβ3
TGFβ1
대조군

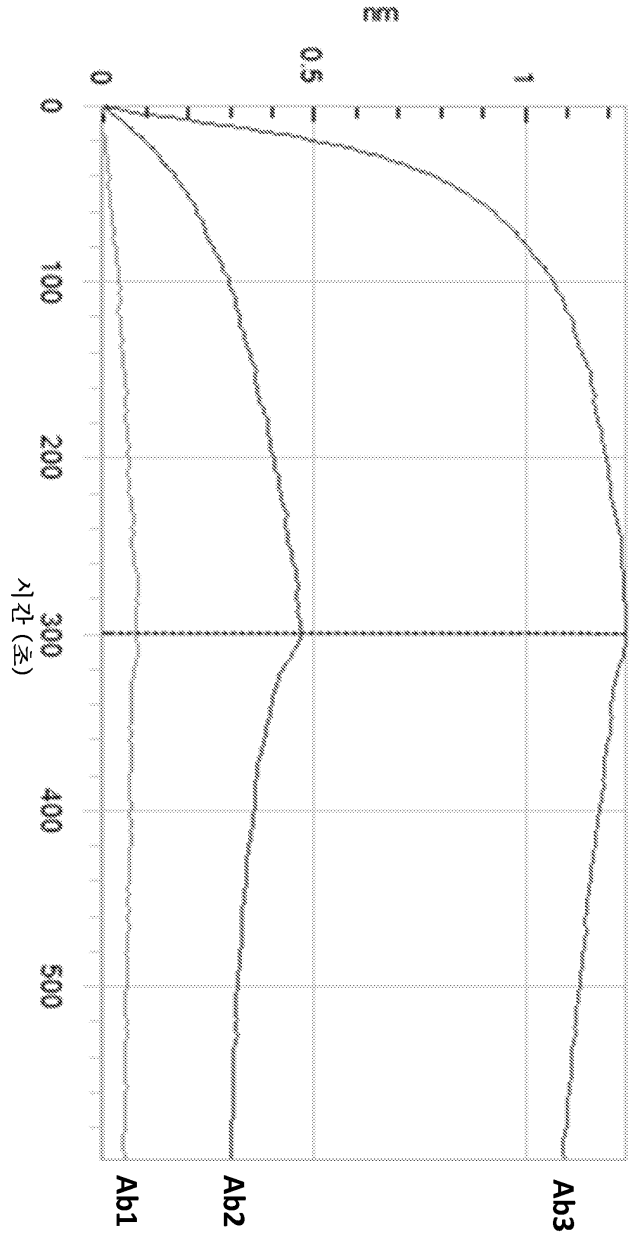
도면4c


40,000
30,000
20,000
10,000
0
항체 결합 (RFU)
프로TGFβ1
LTBP1-프로TGFβ1
LTBP3-프로TGFβ1
GARP-프로TGFβ1
LTBP1
대조군

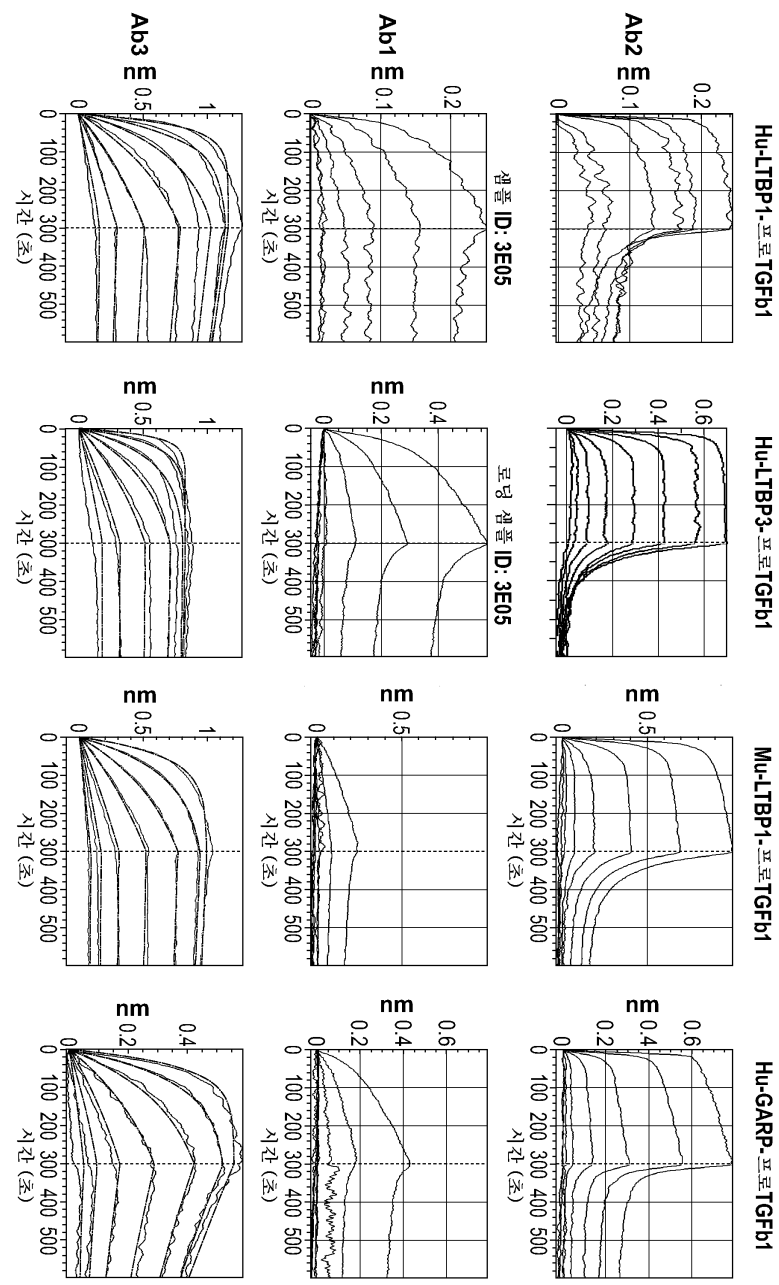
도면5


TGFβ1
TGFβ2
TGFβ3
C2
< 1 pM
결합 없음
15.2 nM
C3
< 1 pM
23.4 nM
5.6 nM
C4
< 1 pM
< 1 pM
18.7 nM
C5
< 1 pM
< 1 pM
< 1 pM
C6
< 1 pM
1.7 nM
< 1 pM
C1
< 1 pM
2.8 nM
< 1 pM

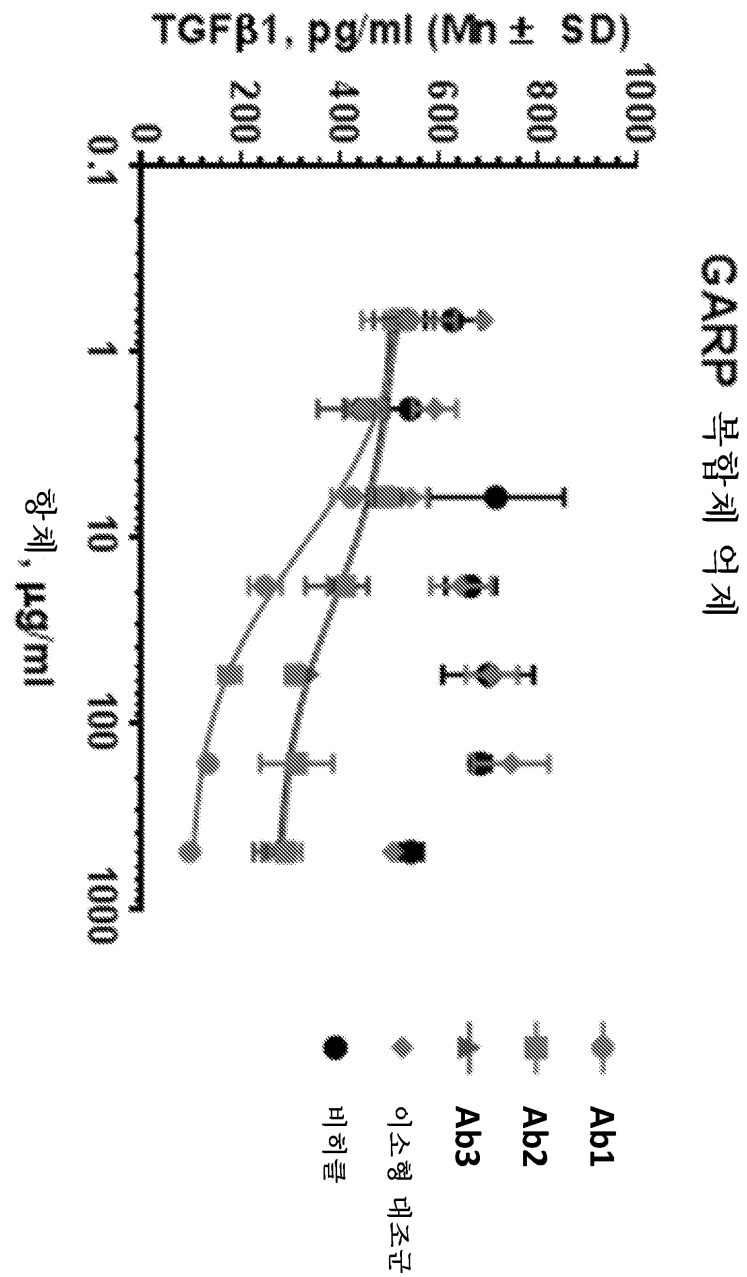
도면6a



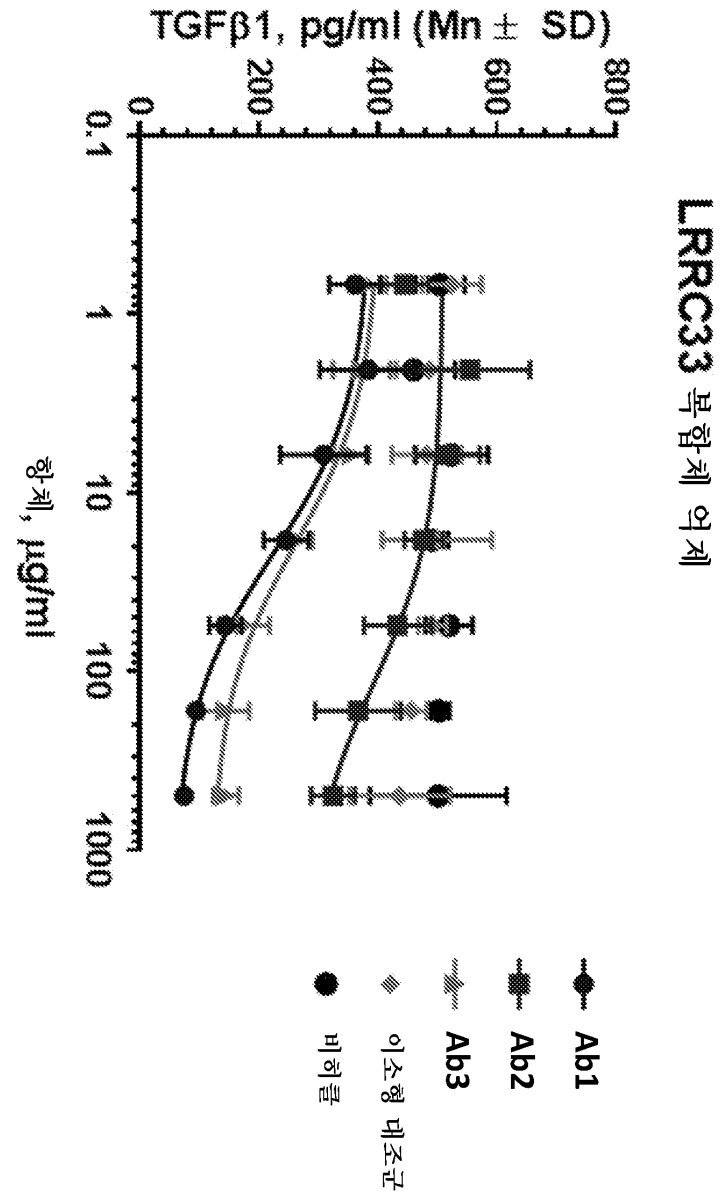
도면6b


적정 곡선 : Fc 포획 – mAb – Ag
Hu-LTBP1-프로TGFb1
Hu-LTBP3-프로TGFb1
Mu-LTBP1-프로TGFb1
Hu-GARP-프로TGFb1
Ab2
Ab1
Ab3
nm
시간 (초)
샘플 ID: 3E05
로딩 샘플 ID: 3E05

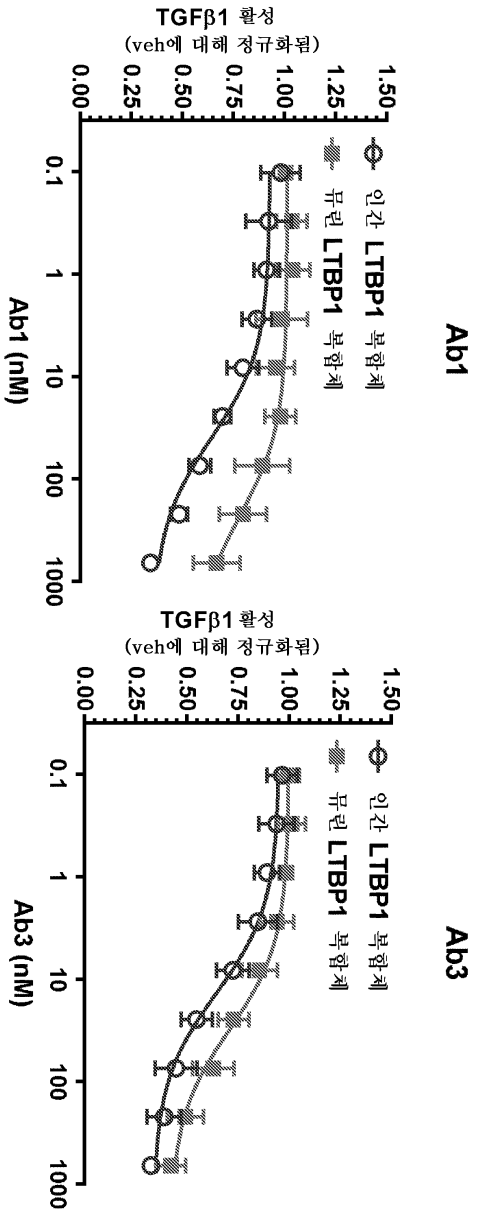
도면7a


TGFβ1, pg/ml (Mn ± SD)
0
200
400
600
800
1000
0.1
1
10
100
1000
항체, μg/ml
GARP 복합체 억제
Ab1
Ab2
Ab3
이소형 대조군
비히클

도면7b

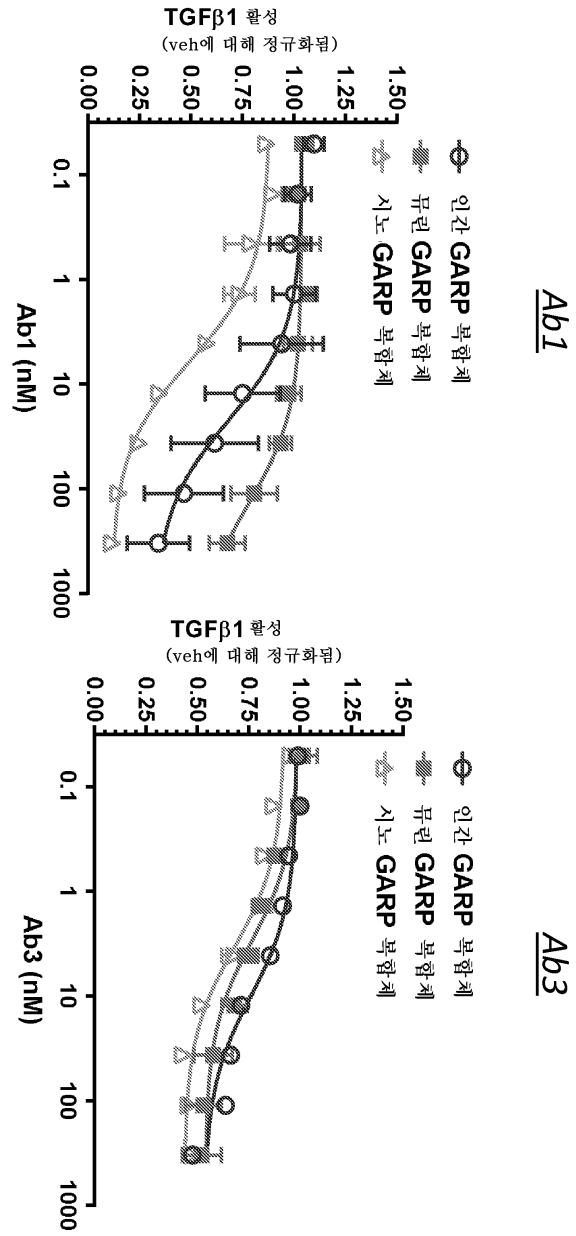

TGFβ1, pg/ml (Mn ± SD)
0
200
400
600
800
0.1
1
10
100
1000
항체, μg/ml
LRRC33 복합체 억제
Ab1
Ab2
Ab3
이소형 대조군
비히클

도면7c

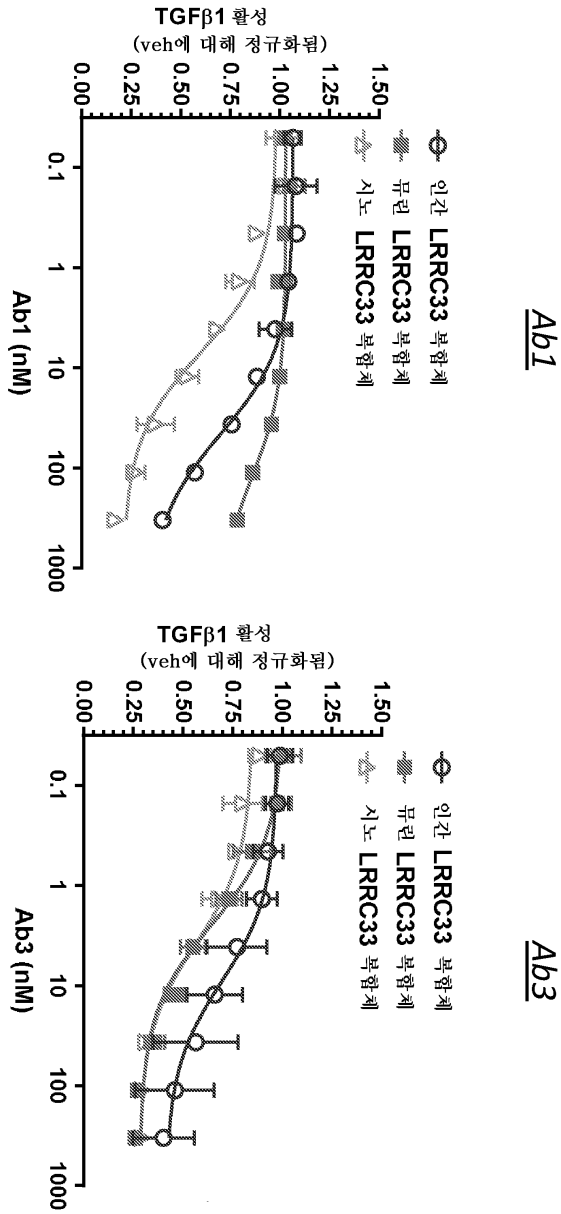


Ab2에 의한 GARP 및 LRRC33 복합체의 억제는 도 7a 및 7b에 있다.

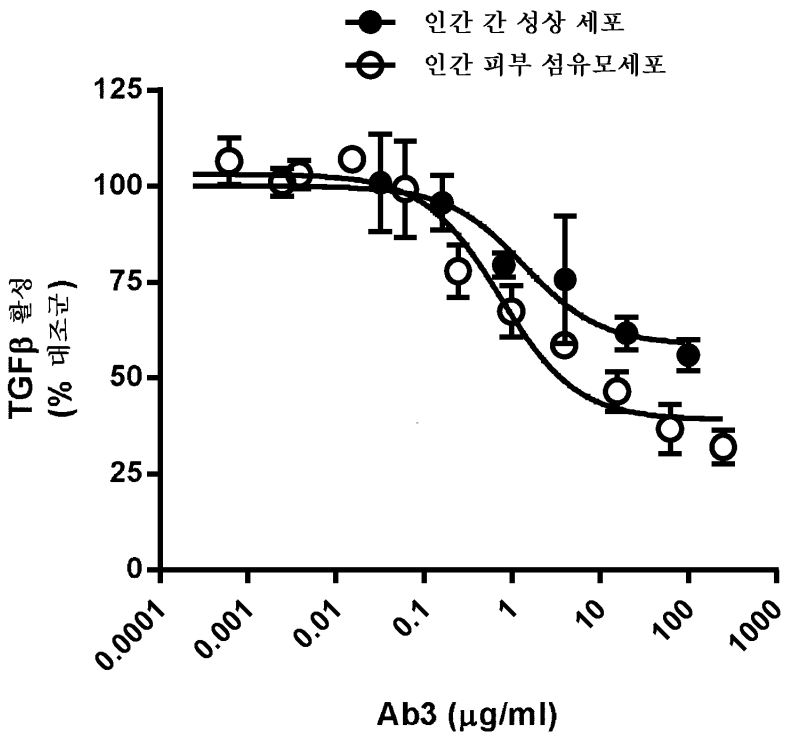
도면7d


GARP-프로TGFβ1 활성화의 억제 (SW480b6 검정)
Ab1
TGFβ1 활성
(veh에 대해 정규화됨)
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
1.50
0.1
1
10
100
1000
Ab1 (nM)
인간 GARP 복합체
뮤린 GARP 복합체
시노 GARP 복합체
Ab3
TGFβ1 활성
(veh에 대해 정규화됨)
Ab3 (nM)
인간 GARP 복합체
뮤린 GARP 복합체
시노 GARP 복합체

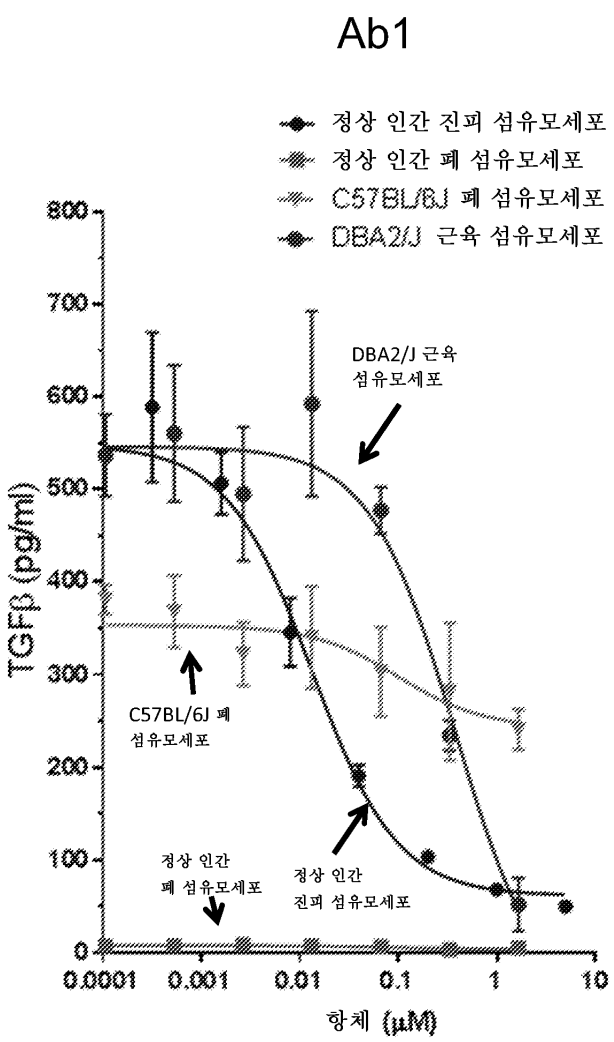
도면7e


LRRC33-프로TGFβ1 활성화의 억제 (SW480b6 검정)
Ab1
TGFβ1 활성
(veh에 대해 정규화됨)
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
1.50
0.1
1
10
100
1000
Ab1 (nM)
인간 LRRC33 복합체
뮤린 LRRC33 복합체
시노 LRRC33 복합체
Ab3
TGFβ1 활성
(veh에 대해 정규화됨)
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
1.50
0.1
1
10
100
1000
Ab3 (nM)
인간 LRRC33 복합체
뮤린 LRRC33 복합체
시노 LRRC33 복합체

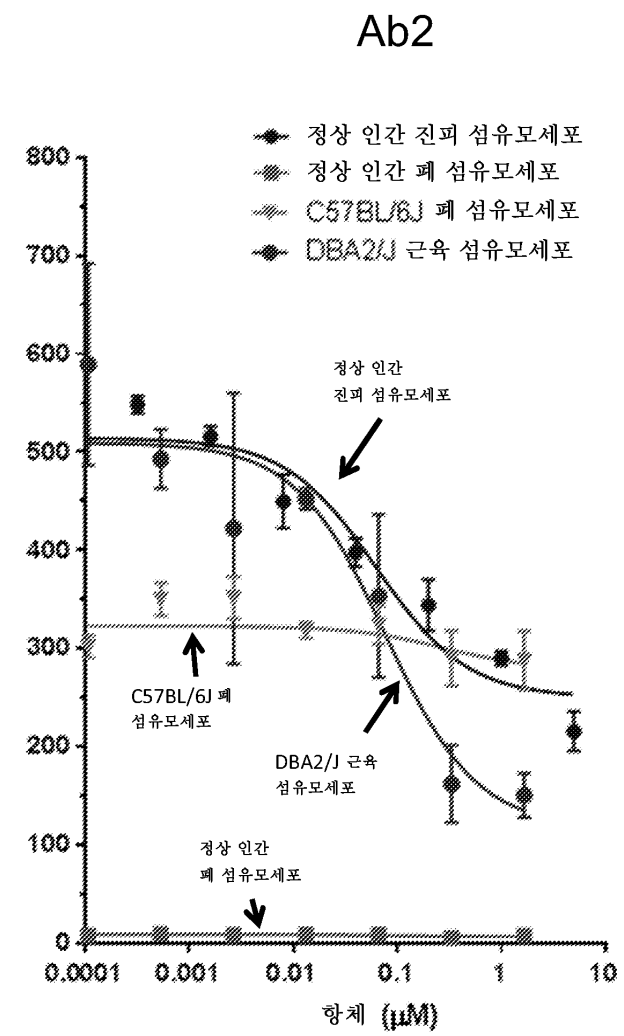
도면7f


인간 간 성상 세포
인간 피부 섬유모세포
TGFβ 활성
(% 대조군)
125
100
75
50
25
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Ab3 (μg/ml)

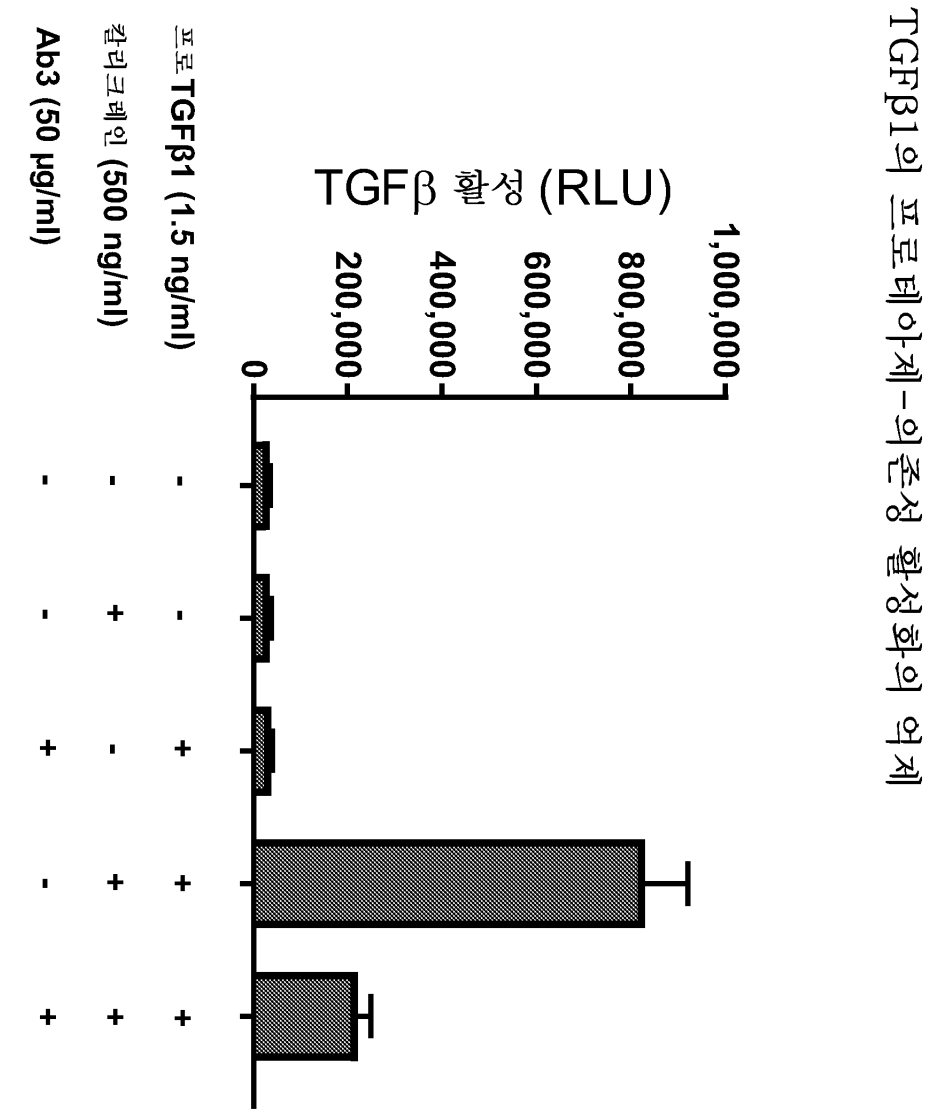
도면7g


Ab1
정상 인간 진피 섬유모세포
정상 인간 폐 섬유모세포
C57BL/6J 폐 섬유모세포
DBA2/J 근육 섬유모세포
TGFβ (pg/ml)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
항체 (μM)
DBA2/J 근육 섬유모세포
C57BL/6J 폐 섬유모세포
정상 인간 폐 섬유모세포
정상 인간 진피 섬유모세포

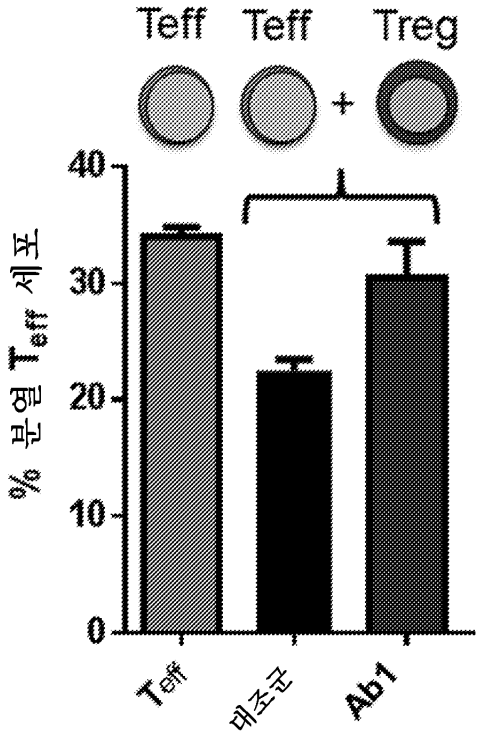
도면7h


Ab2
정상 인간 진피 섬유모세포
정상 인간 폐 섬유모세포
C57BL/6J 폐 섬유모세포
DBA2/J 근육 섬유모세포
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
항체 (μM)
정상 인간
진피 섬유모세포
C57BL/6J 폐
섬유모세포
DBA2/J 근육
섬유모세포
정상 인간
폐 섬유모세포

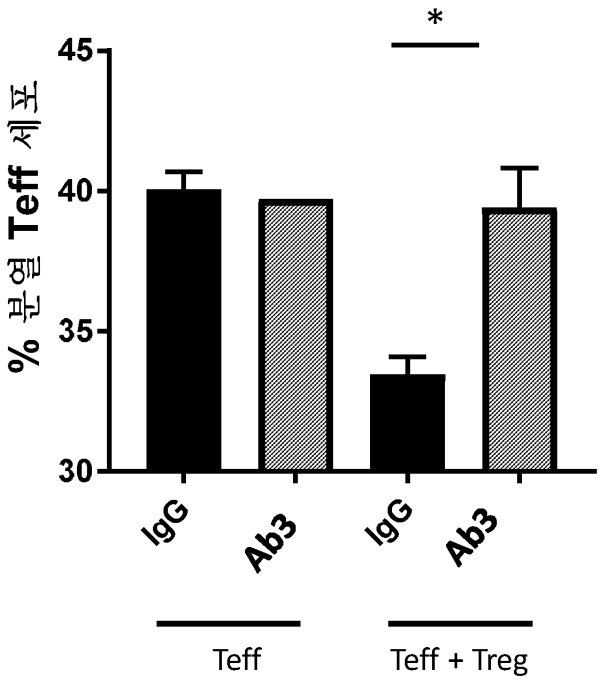
도면8


TGFβ1의 프로테아제-의존성 활성화의 억제
TGFβ 활성 (RLU)
0
200,000
400,000
600,000
800,000
1,000,000
프로TGFβ1 (1.5 ng/ml)
칼리크레인 (500 ng/ml)
Ab3 (50 μg/ml)
- - - + +
- + - + +
- - + + +

도면9a



도면9b

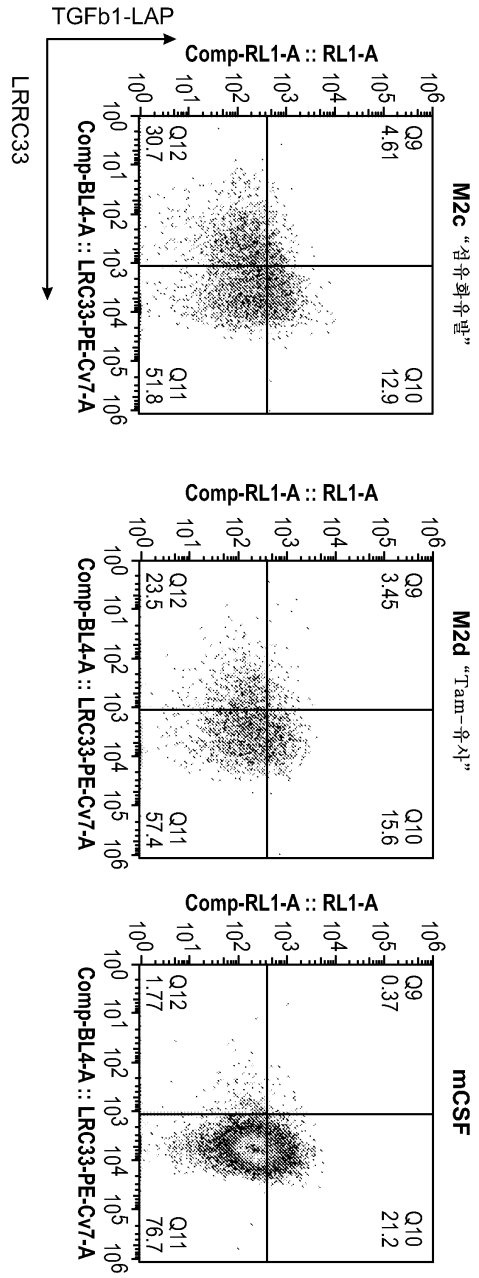


* P < 0.05 (양측 T 검정)

도면10a

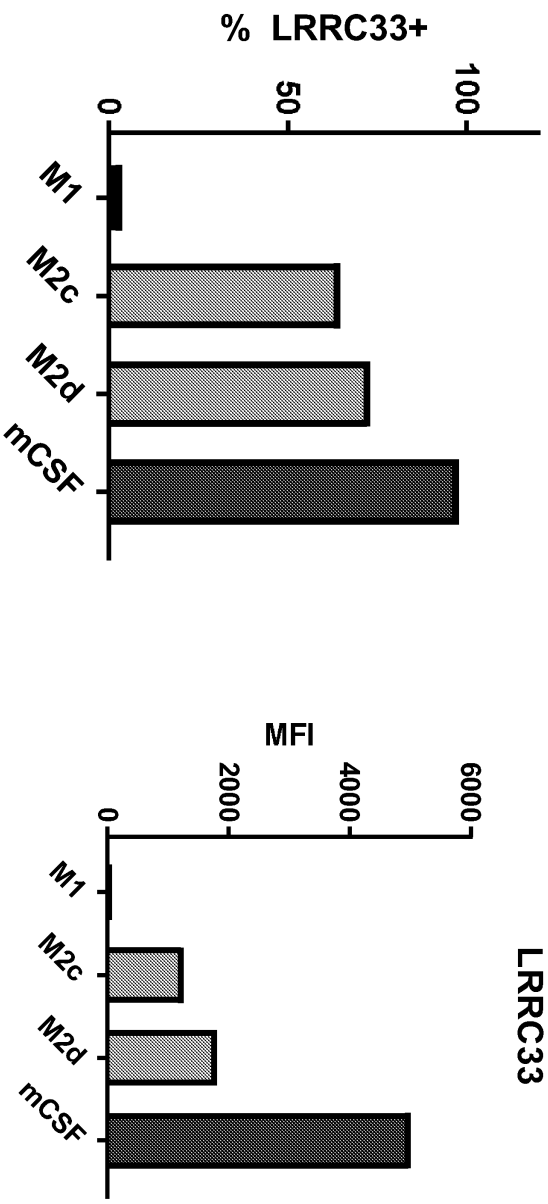
건강한 공여자로부터의 PBMC
CD14+ 면역자기 선택 = 단핵구
10% 인간 혈청 + GMCSF 또는 MCSF와의 ~1주 배양
다양한 M2 대식세포를 유도하기 위해: 하기와의 2-3일 추가 배양: M2c: IL10&TGFb, M2d: IL6
CD163 – 헤모글로빈 스캐빈저 수용체
CD206 – 만노스 수용체
mCSF 대식세포는 일관적으로 'M2'이다
M2c "섬유화유발"
M2d "Tam-유사"
mCSF
CD163
CD206
Comp-RL3-A :: CD163-APC-Cy7-A
Comp-BL1-A :: CD206-알렉사 플루오르 488-A
Q8 1.46
Q7 0.032
Q5 24.1
Q6 74.4
Q8 0.58
Q7 0
Q5 26.9
Q6 72.5
Q8 0.32
Q7 0.097
Q5 1.18
Q6 98.4

도면10b



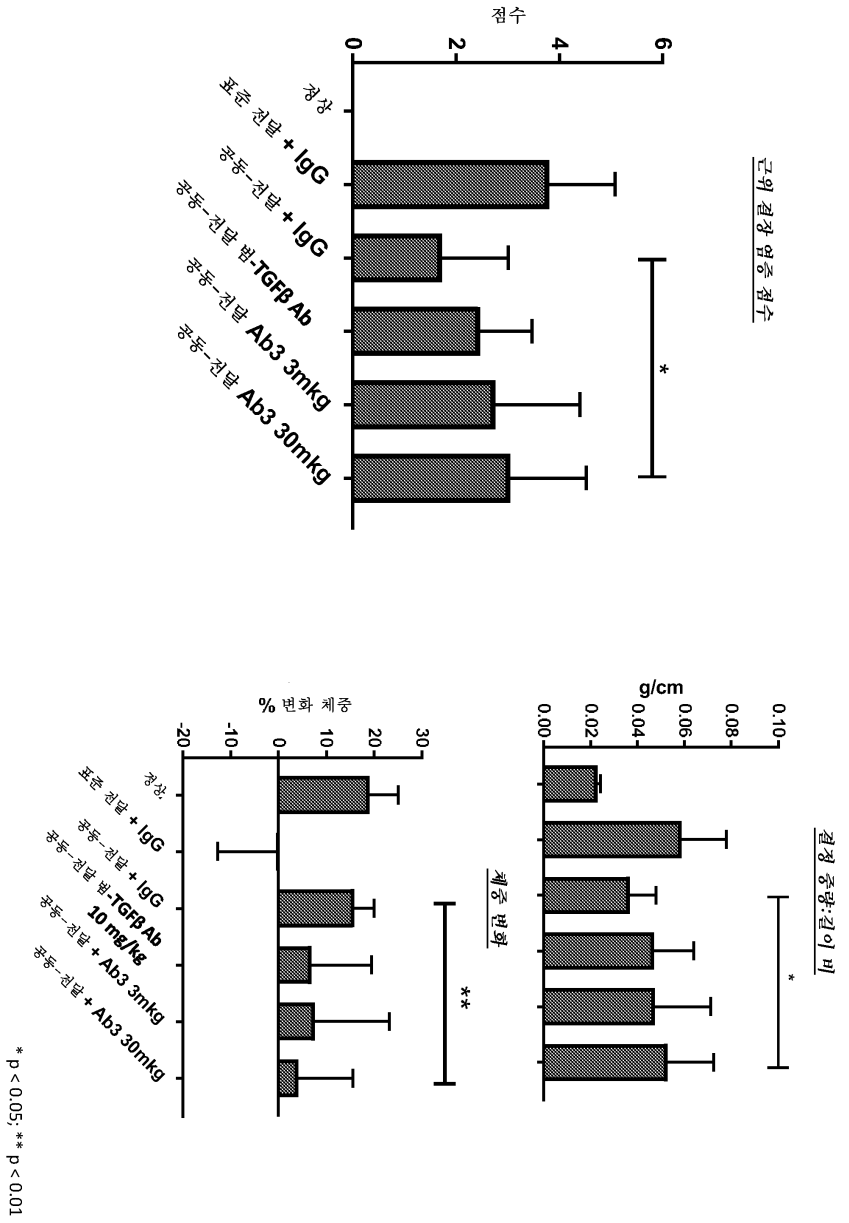
mCSF 대식세포는 일관적으로 LRRC33을 발현한다

도면10c

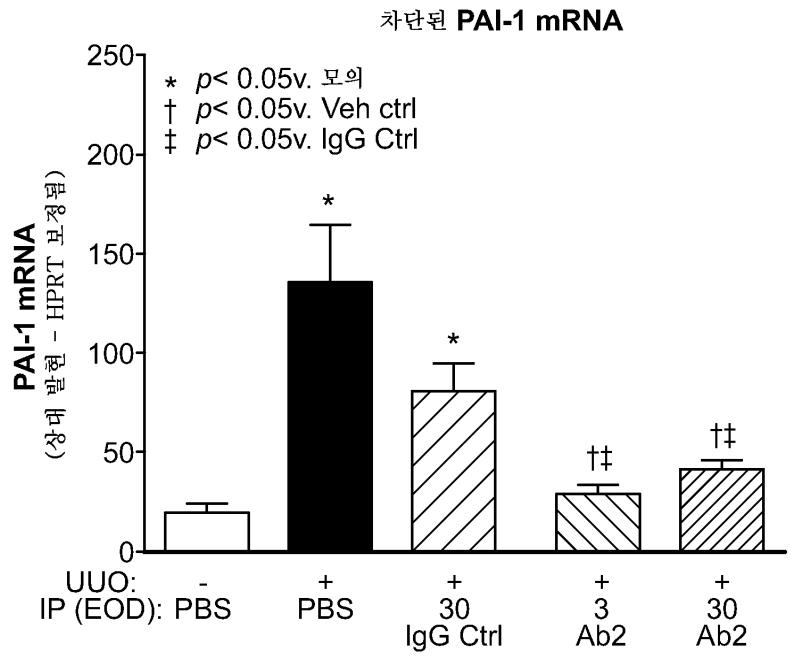


MCSF 대식세포 상에서의 강건한 LRRC33 발현

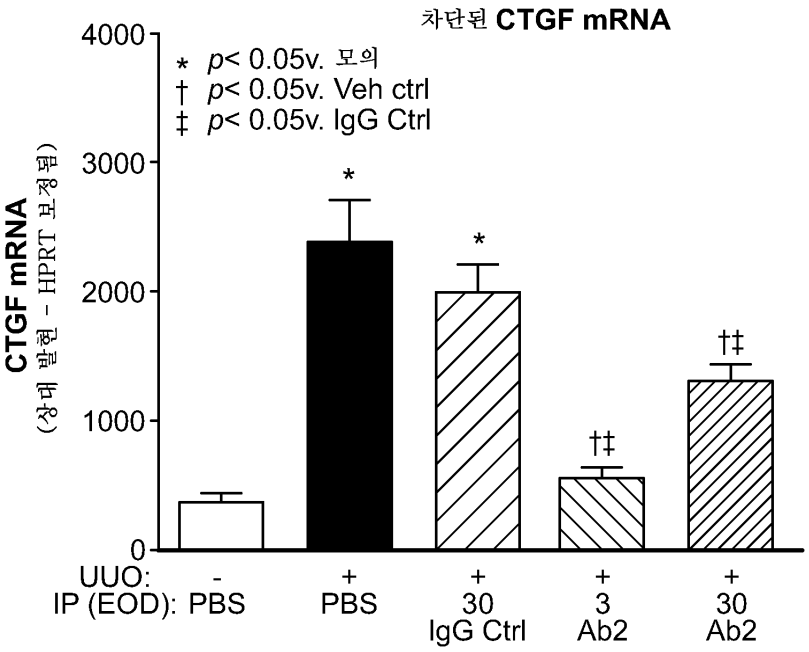
도면11


점수
0
2
4
6
정상
표준 전달 + IgG
공동-전달 + IgG
공동-전달 항-TGFβ Ab
공동-전달 Ab3 3mkg
공동-전달 Ab3 30mkg
근위 결장 염증 점수
*
% 변화 체중
-20
-10
0
10
20
30
정상
표준 전달 + IgG
공동-전달 + IgG
공동-전달 항-TGFβ Ab
10 mg/kg
공동-전달 + Ab3 3mkg
공동-전달 + Ab3 30mkg
체중 변화
**
g/cm
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
결정 중량:길이 비
*
* p < 0.05; ** p < 0.01

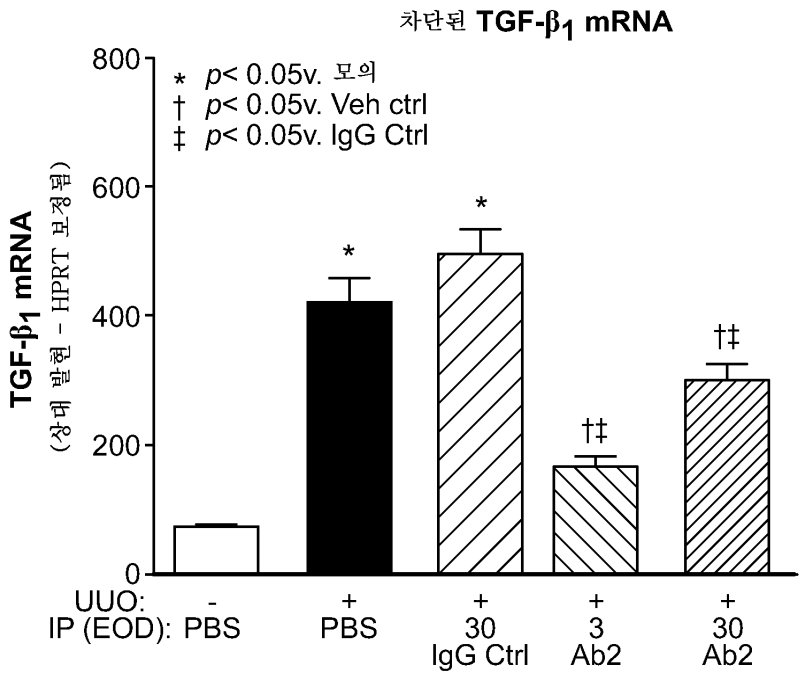
도면12a


차단된 PAI-1 mRNA
* p< 0.05v. 모의
† p< 0.05v. Veh ctrl
‡ p< 0.05v. IgG Ctrl
PAI-1 mRNA
(상대 발현 - HPRT 보정됨)
250
200
150
100
50
0
UUO: - + + + +
IP (EOD): PBS PBS 30 IgG Ctrl 3 Ab2 30 Ab2

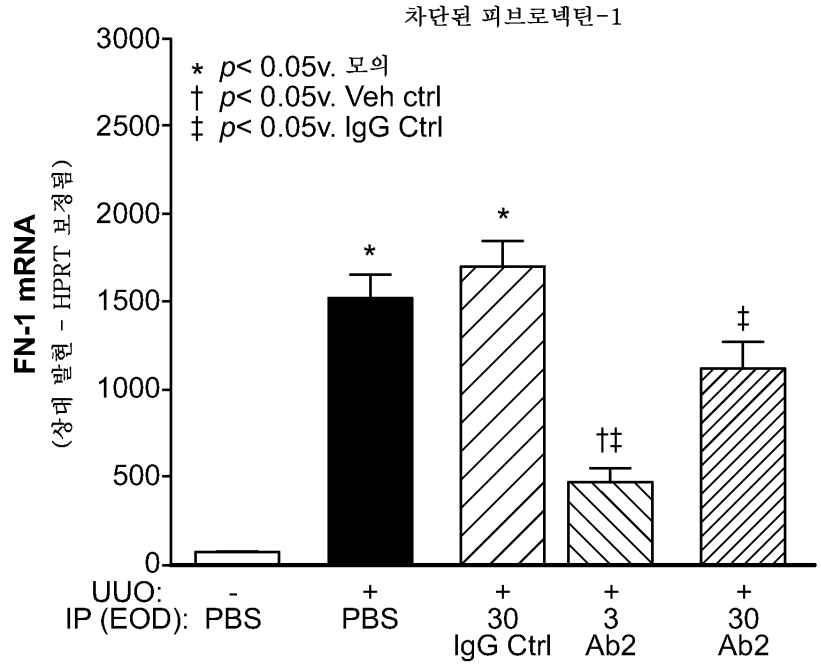
도면12b


차단된 CTGF mRNA
* p< 0.05v. 모의
† p< 0.05v. Veh ctrl
‡ p< 0.05v. IgG Ctrl
CTGF mRNA
(상대 발현 - HPRT 보정됨)
4000
3000
2000
1000
0
UUO: - + + + +
IP (EOD): PBS PBS 30 IgG Ctrl 3 Ab2 30 Ab2

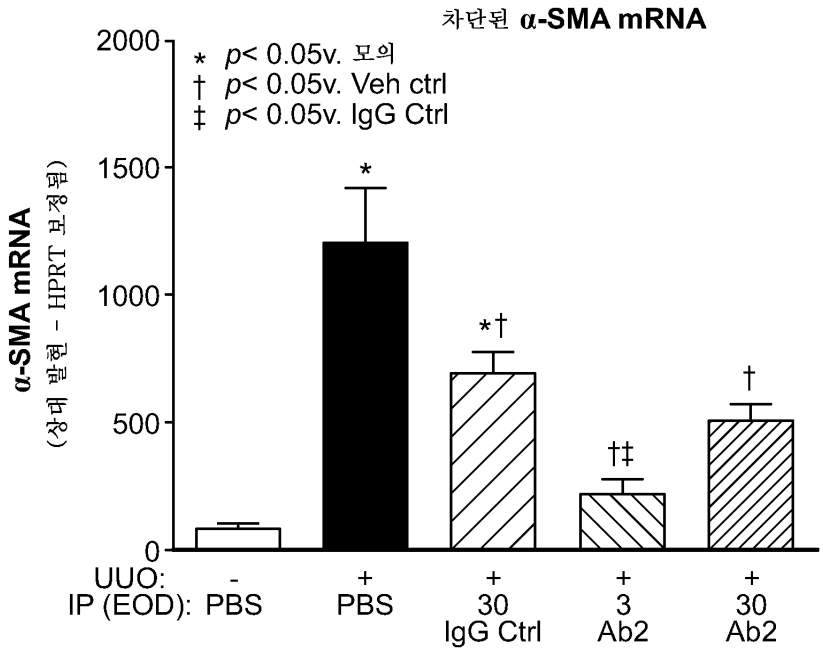
도면12c


차단된 TGF-β1 mRNA
* p< 0.05v. 모의
† p< 0.05v. Veh ctrl
‡ p< 0.05v. IgG Ctrl
TGF-β1 mRNA
(상대 발현 - HPRT 보정됨)
800
600
400
200
0
UUO: - + + + +
IP (EOD): PBS PBS 30 IgG Ctrl 3 Ab2 30 Ab2

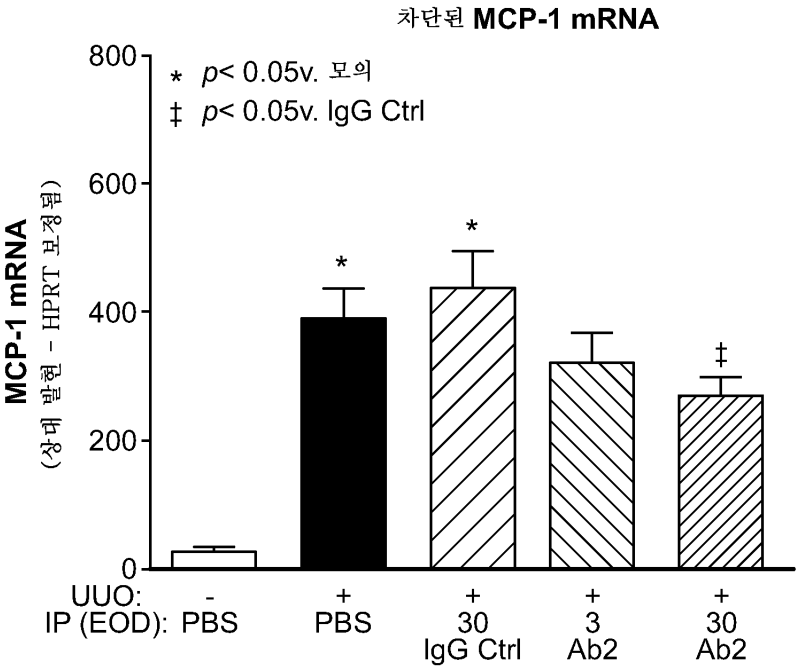
도면12d


차단된 피브로넥틴-1
* p< 0.05v. 모의
† p< 0.05v. Veh ctrl
‡ p< 0.05v. IgG Ctrl
FN-1 mRNA
(상대 발현 - HPRT 보정됨)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
UUO: - + + + +
IP (EOD): PBS PBS 30 IgG Ctrl 3 Ab2 30 Ab2

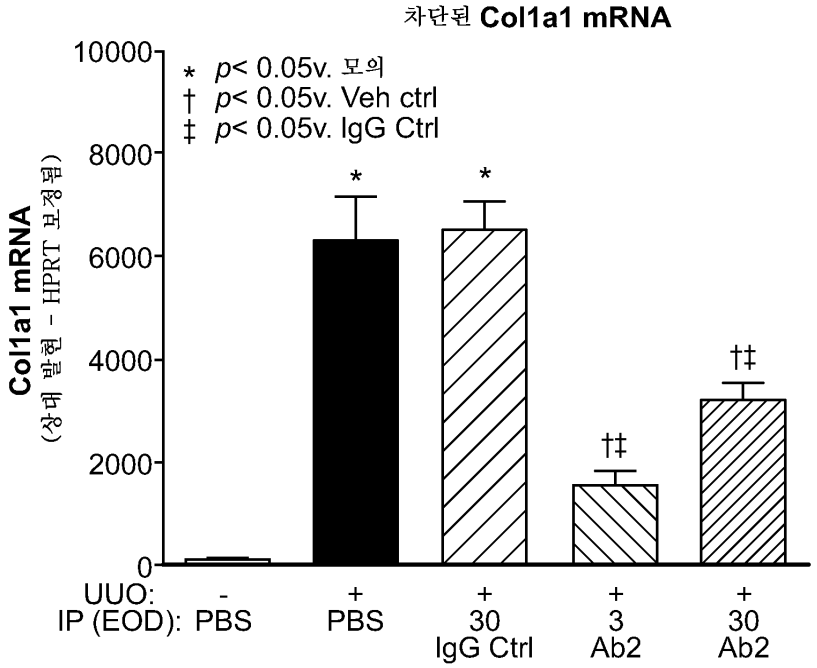
도면12e


차단된 α-SMA mRNA
* p< 0.05v. 모의
† p< 0.05v. Veh ctrl
‡ p< 0.05v. IgG Ctrl
α-SMA mRNA
(상대 발현 - HPRT 보정됨)
2000
1500
1000
500
0
*
*†
†‡
†
UUO: - + + + +
IP (EOD): PBS PBS 30 IgG Ctrl 3 Ab2 30 Ab2

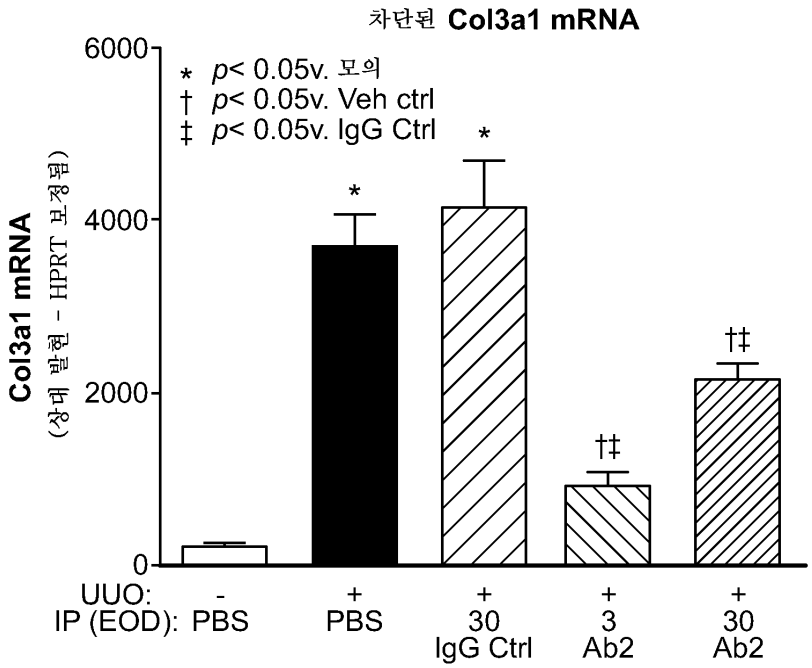
도면12f


차단된 MCP-1 mRNA
* p< 0.05v. 모의
‡ p< 0.05v. IgG Ctrl
MCP-1 mRNA
(상대 발현 - HPRT 보정됨)
800
600
400
200
0
*
*
‡
UUO: - + + + +
IP (EOD): PBS PBS 30 IgG Ctrl 3 Ab2 30 Ab2

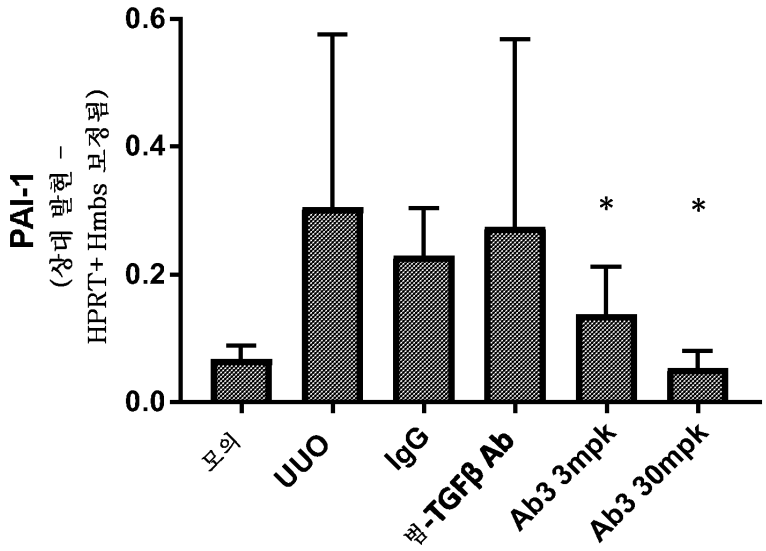
도면12g


차단된 Col1a1 mRNA
* p< 0.05v. 모의
† p< 0.05v. Veh ctrl
‡ p< 0.05v. IgG Ctrl
Col1a1 mRNA
(상대 발현 - HPRT 보정됨)
10000
8000
6000
4000
2000
0
UUO: - + + + +
IP (EOD): PBS PBS 30 IgG Ctrl 3 Ab2 30 Ab2

도면12h

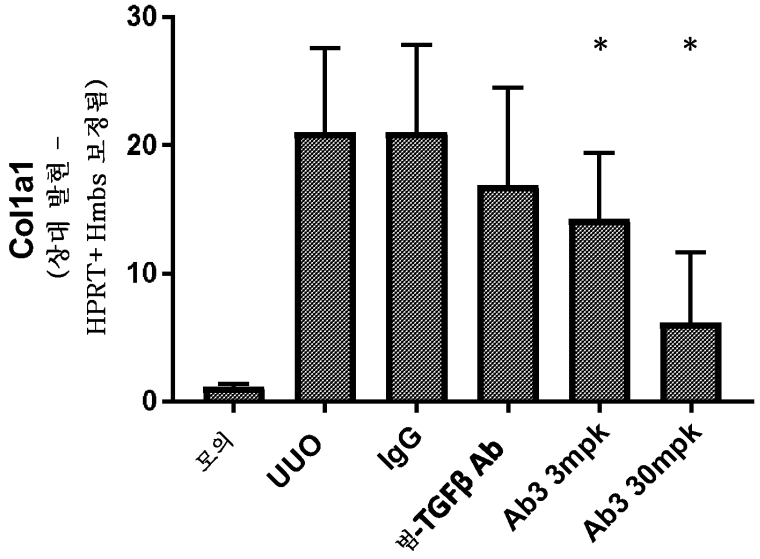

차단된 Col3a1 mRNA
* p< 0.05v. 모의
† p< 0.05v. Veh ctrl
‡ p< 0.05v. IgG Ctrl
Col3a1 mRNA
(상대 발현 - HPRT 보정됨)
6000
4000
2000
0
UUO: - + + + +
IP (EOD): PBS PBS 30 IgG Ctrl 3 Ab2 30 Ab2

도면12i



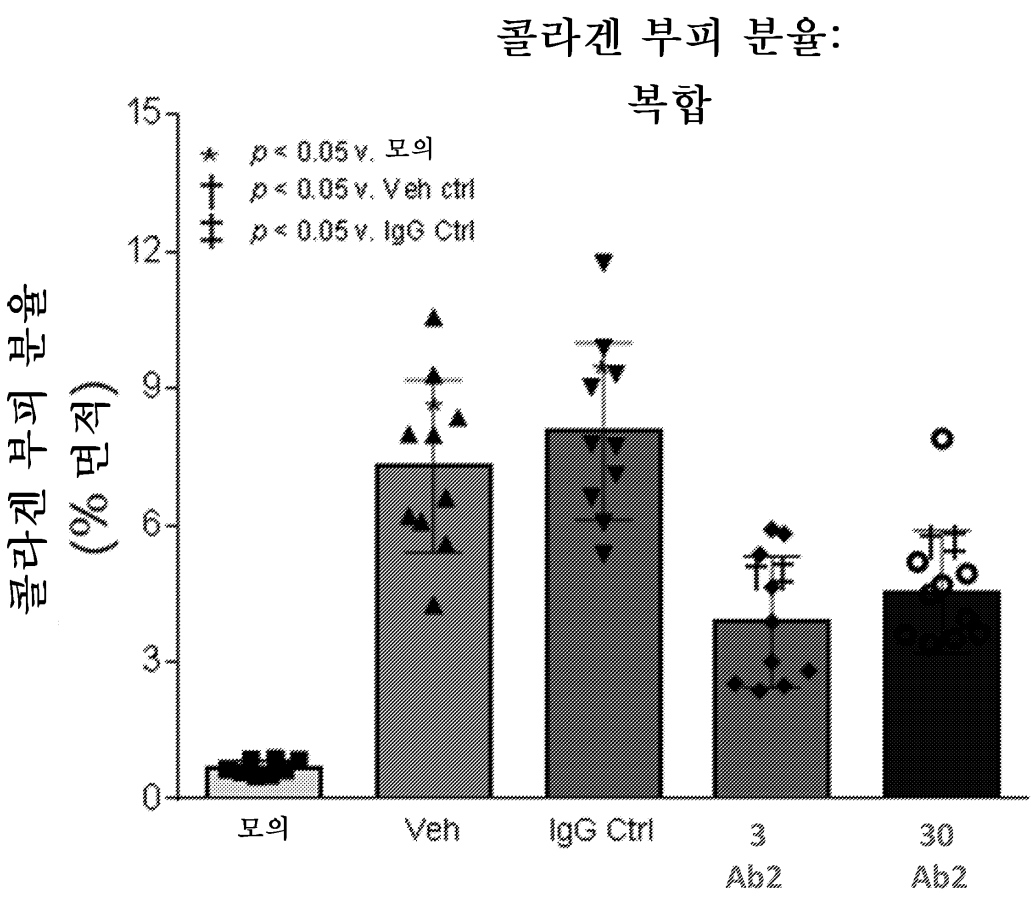
* P < 0.05; 양측 T-검정 vs. IgG

도면12j

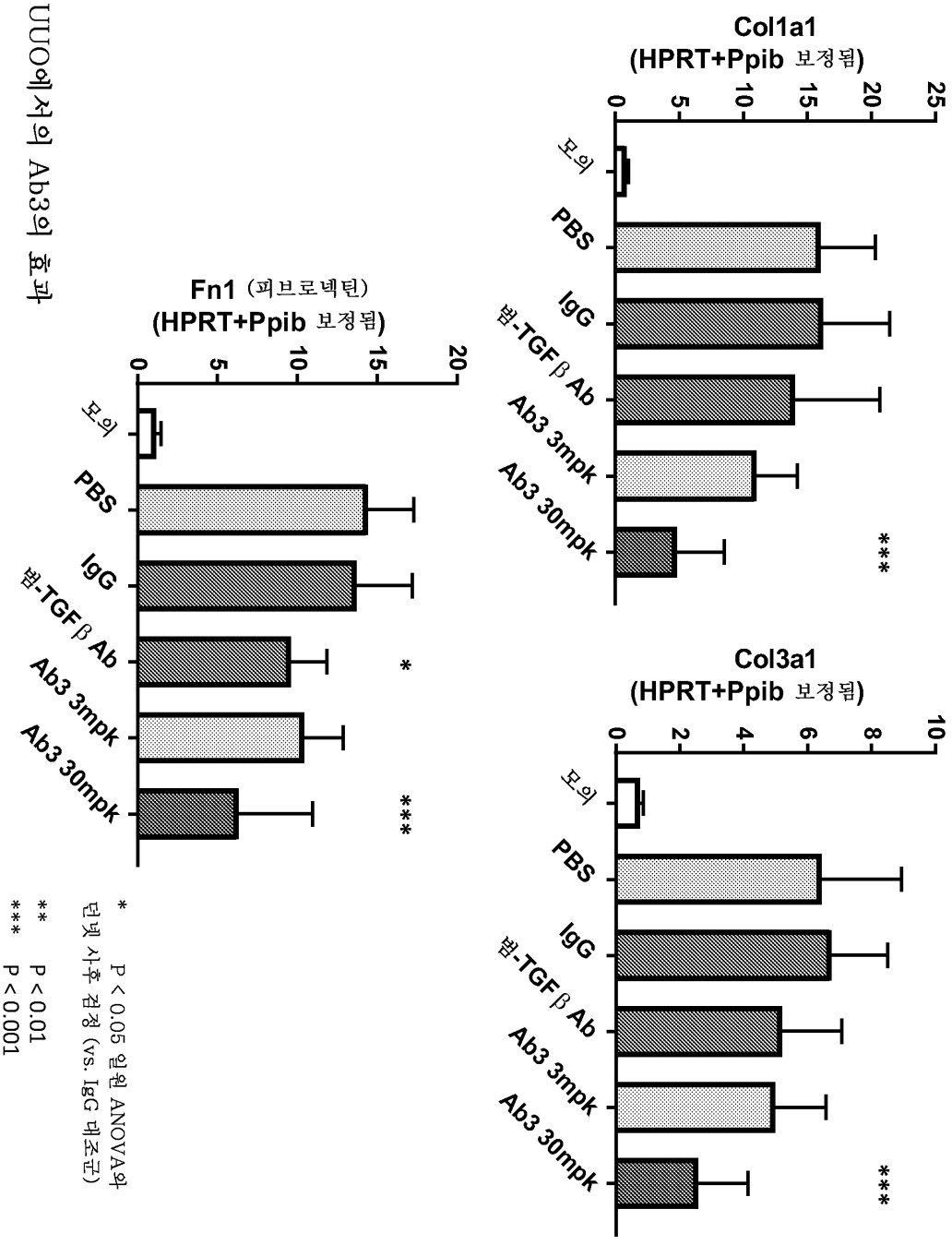


* P < 0.05; 양측 T-검정 vs. IgG

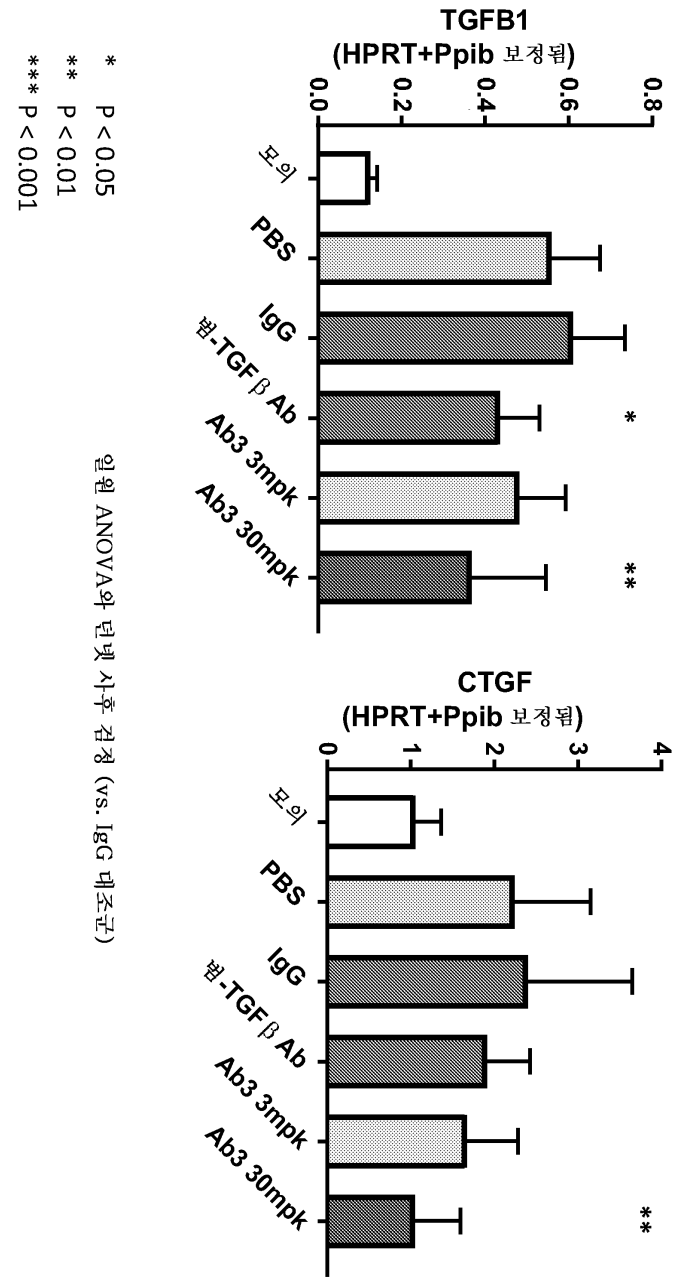
도면12k


콜라겐 부피 분율:
복합
콜라겐 부피 분율
(% 면적)
15
12
9
6
3
0
* p < 0.05 v. 모의
† p < 0.05 v. Veh ctrl
‡ p < 0.05 v. IgG Ctrl
모의
Veh
IgG Ctrl
3
Ab2
30
Ab2

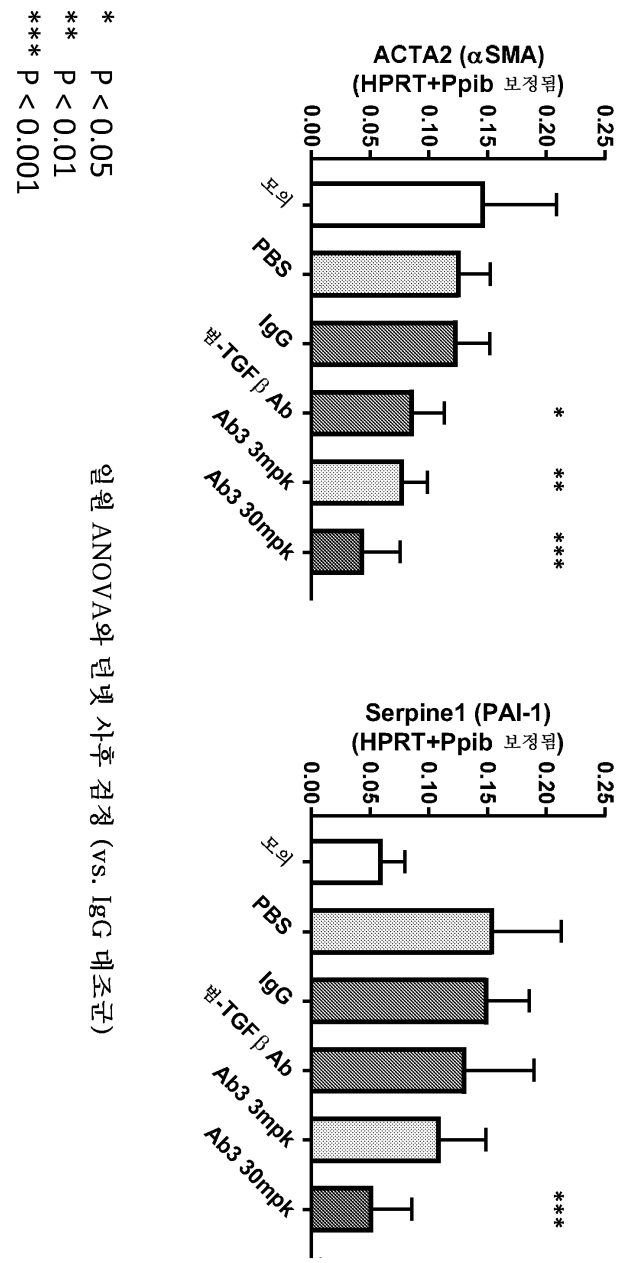
도면13a


UUO에서의 Ab3의 효과
Fn1 (피브로넥틴)
(HPRT+Ppib 보정됨)
0
5
10
15
20
모의
PBS
IgG
랫-TGFβ Ab
Ab3 3mpk
Ab3 30mpk
*
***
Col1a1
(HPRT+Ppib 보정됨)
0
5
10
15
20
25
모의
PBS
IgG
랫-TGFβ Ab
Ab3 3mpk
Ab3 30mpk
***
Col3a1
(HPRT+Ppib 보정됨)
0
2
4
6
8
10
모의
PBS
IgG
랫-TGFβ Ab
Ab3 3mpk
Ab3 30mpk
***
* P < 0.05 일원 ANOVA와 던넷 사후 검정 (vs. IgG 대조군)
** P < 0.01
*** P < 0.001

도면13b


TGFB1
(HPRT+Ppib 보정됨)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
모의
PBS
IgG
랫-TGFβ Ab
Ab3 3mpk
Ab3 30mpk
*
**
CTGF
(HPRT+Ppib 보정됨)
0
1
2
3
4
모의
PBS
IgG
랫-TGFβ Ab
Ab3 3mpk
Ab3 30mpk
**
일원 ANOVA와 던넷 사후 검정 (vs. IgG 대조군)
* P < 0.05
** P < 0.01
*** P < 0.001

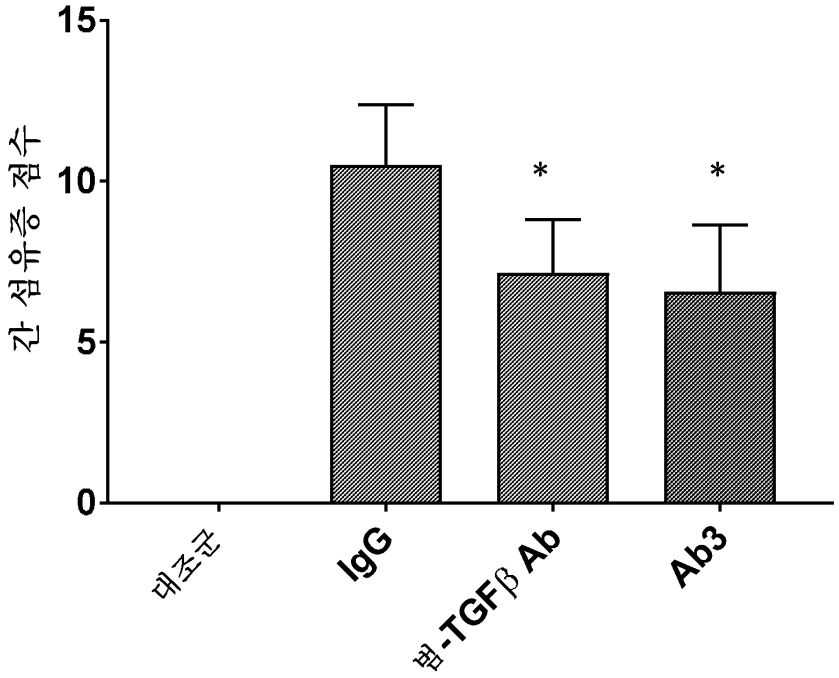
도면13c



일원 ANOVA와 던넷 사후 검정 (vs. IgG 대조군)

* P < 0.05
** P < 0.01
*** P < 0.001

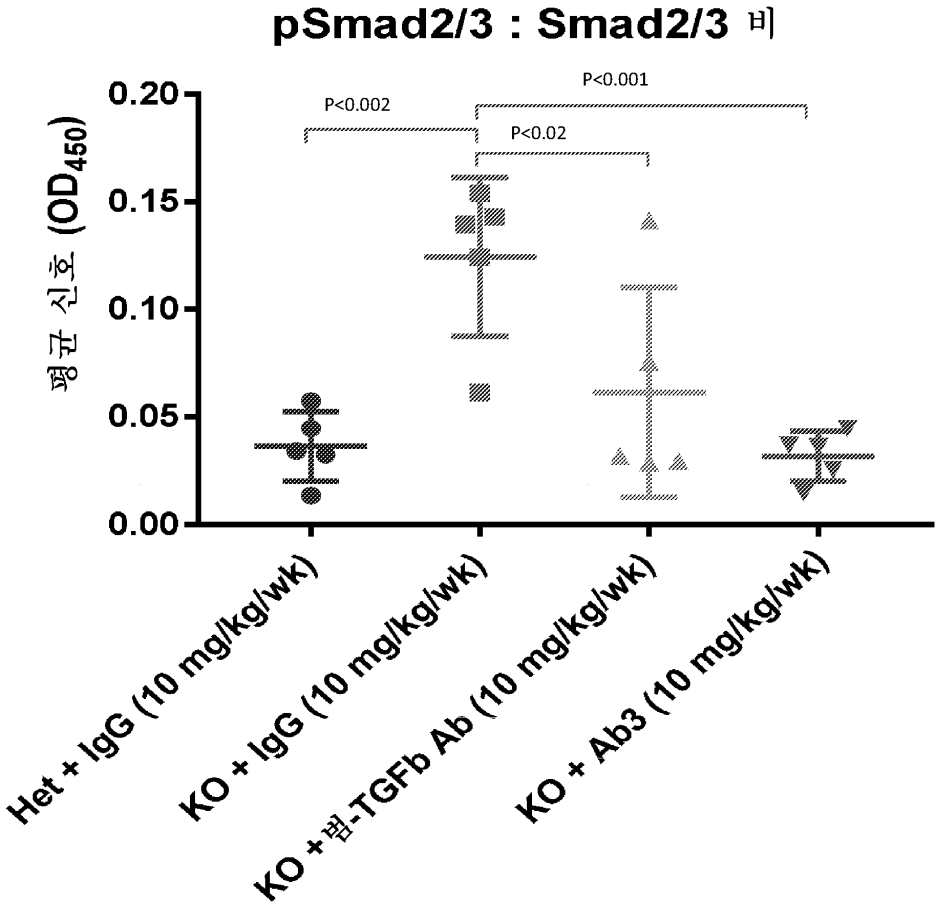
도면14



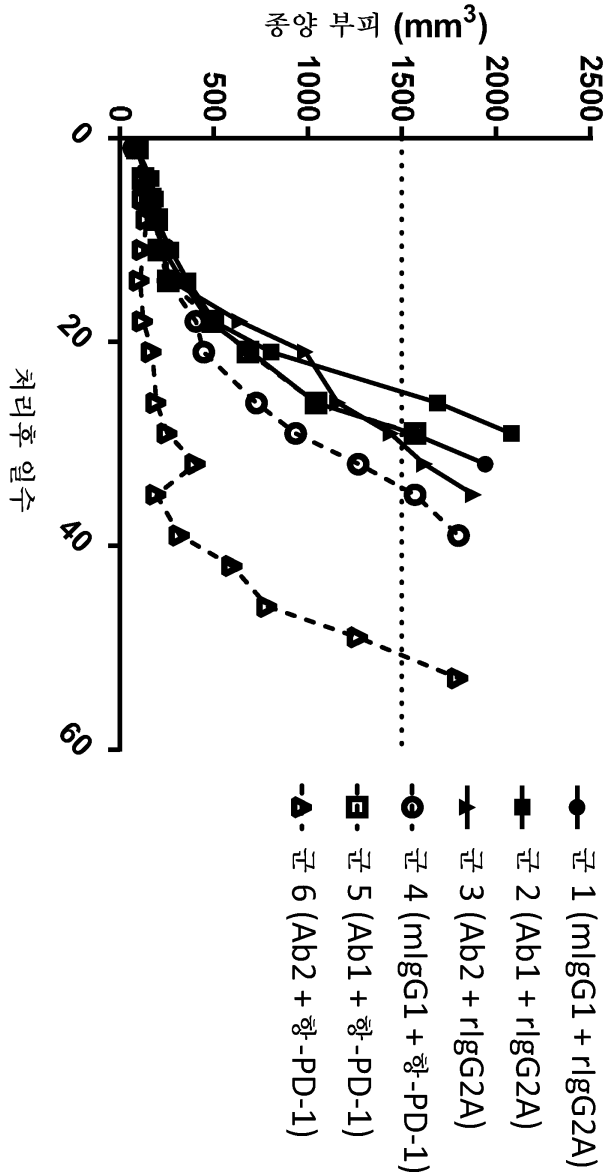
* P < 0.0001 (일원 ANOVA vs. IgG)

도면15

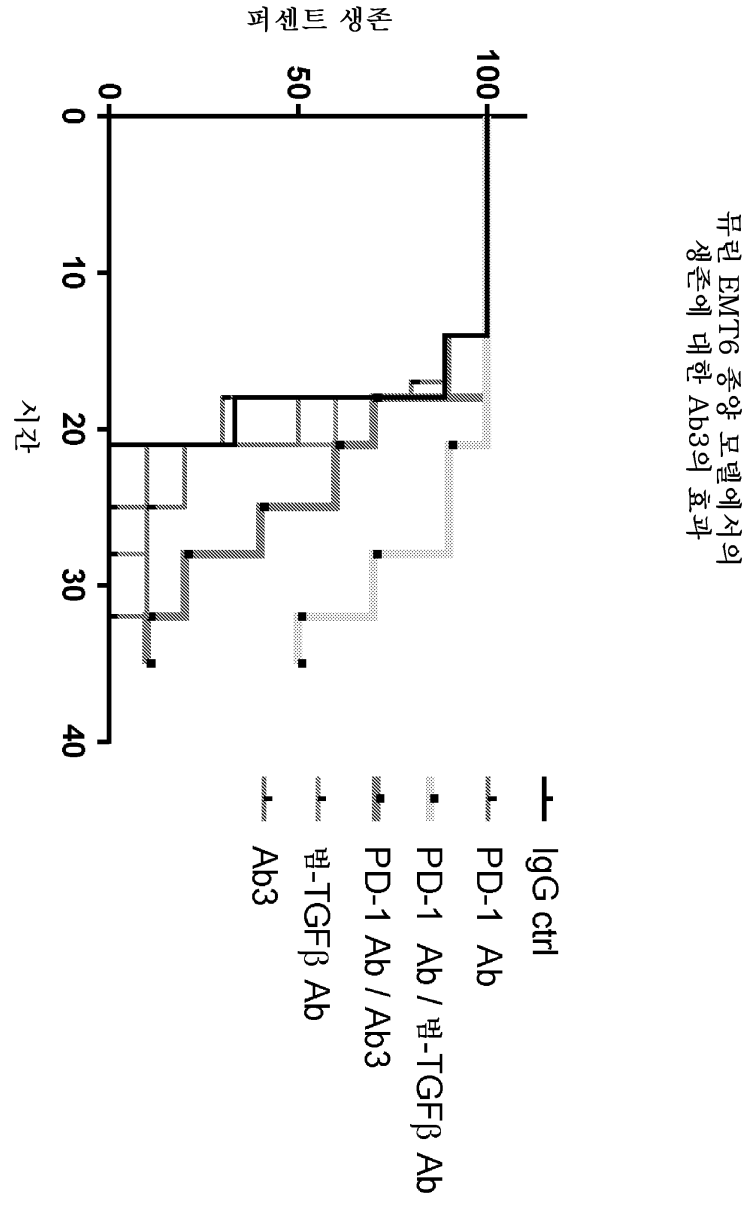
알포트 연구 표적 결속



도면16

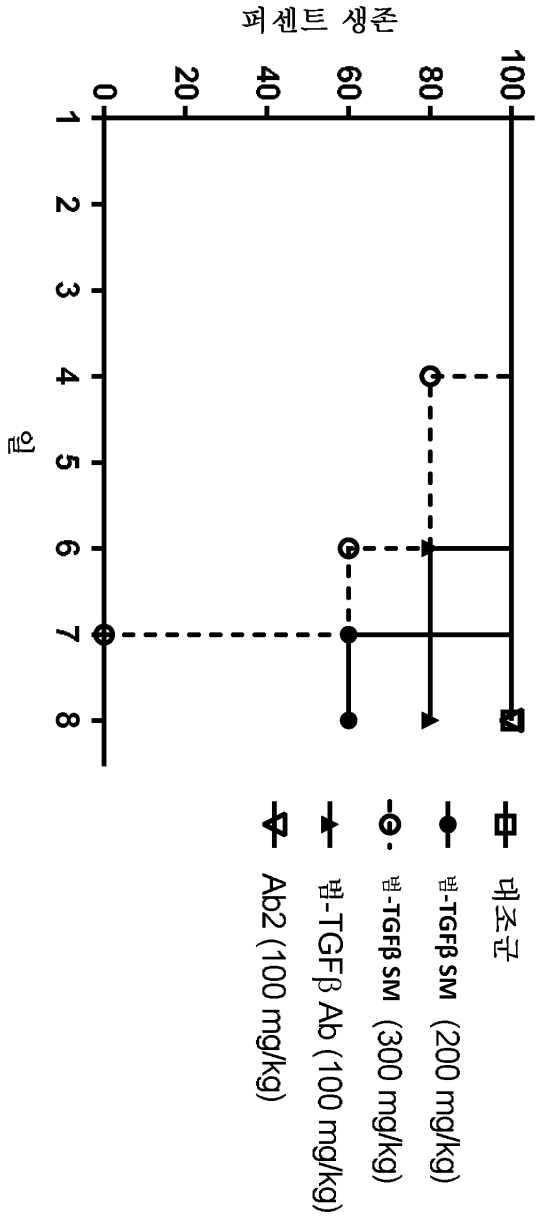

종양 부피 (mm3)
0
500
1000
1500
2000
2500
처리후 일수
0
20
40
60
군 1 (mIgG1 + rIgG2A)
군 2 (Ab1 + rIgG2A)
군 3 (Ab2 + rIgG2A)
군 4 (mIgG1 + 항-PD-1)
군 5 (Ab1 + 항-PD-1)
군 6 (Ab2 + 항-PD-1)

도면17

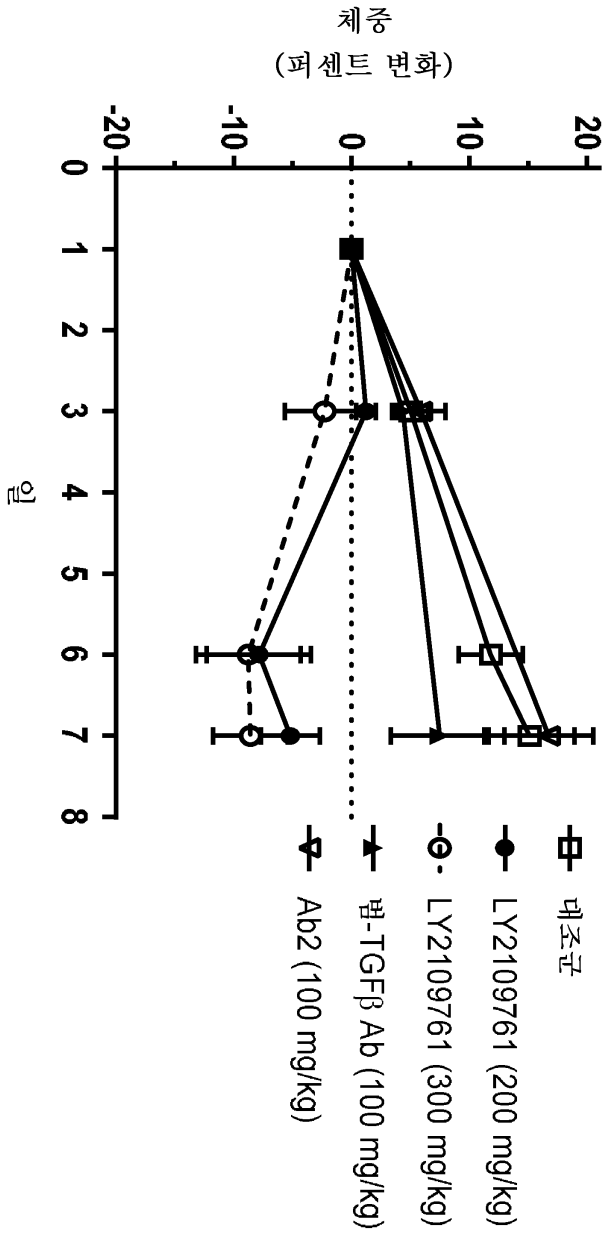


뮤린 EMT6 종양 모델에서의
생존에 대한 Ab3의 효과

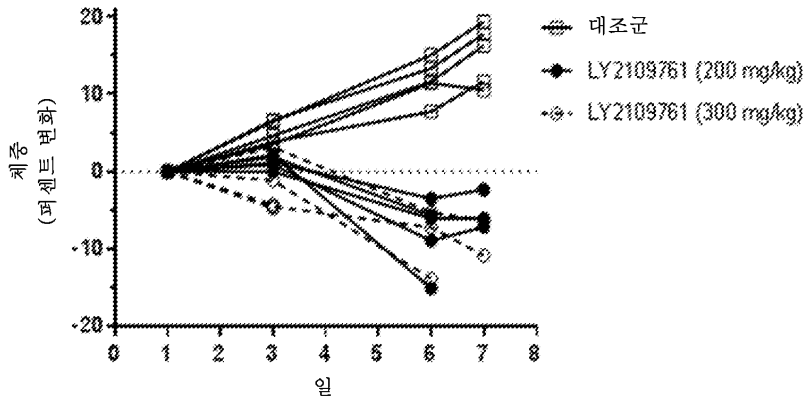
도면18a


퍼센트 생존
0
20
40
60
80
100
일
1
2
3
4
5
6
7
8
대조군
벱-TGFβ SM (200 mg/kg)
벱-TGFβ SM (300 mg/kg)
벱-TGFβ Ab (100 mg/kg)
Ab2 (100 mg/kg)

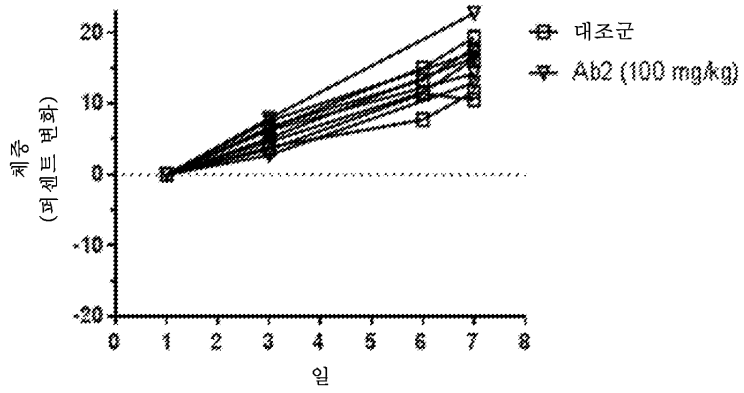
도면18b


체중
(퍼센트 변화)
-20
-10
0
10
20
0
1
2
3
4
5
6
7
8
일
대조군
LY2109761 (200 mg/kg)
LY2109761 (300 mg/kg)
범-TGFβ Ab (100 mg/kg)
Ab2 (100 mg/kg)

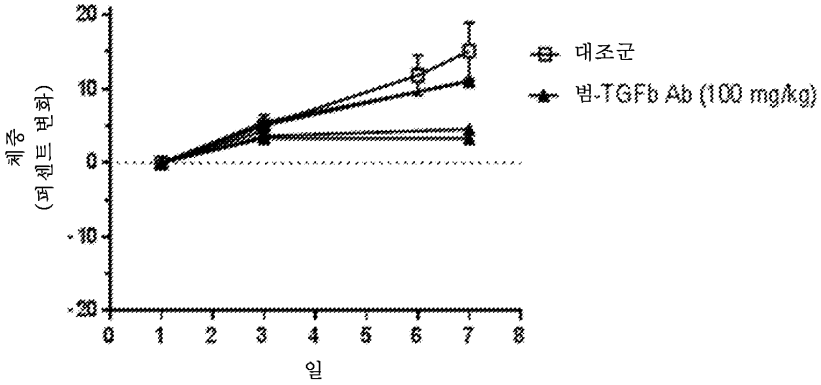
도면18c


체중
(퍼센트 변화)
20
10
0
-10
-20
0
1
2
3
4
5
6
7
8
일
대조군
LY2109761 (200 mg/kg)
LY2109761 (300 mg/kg)

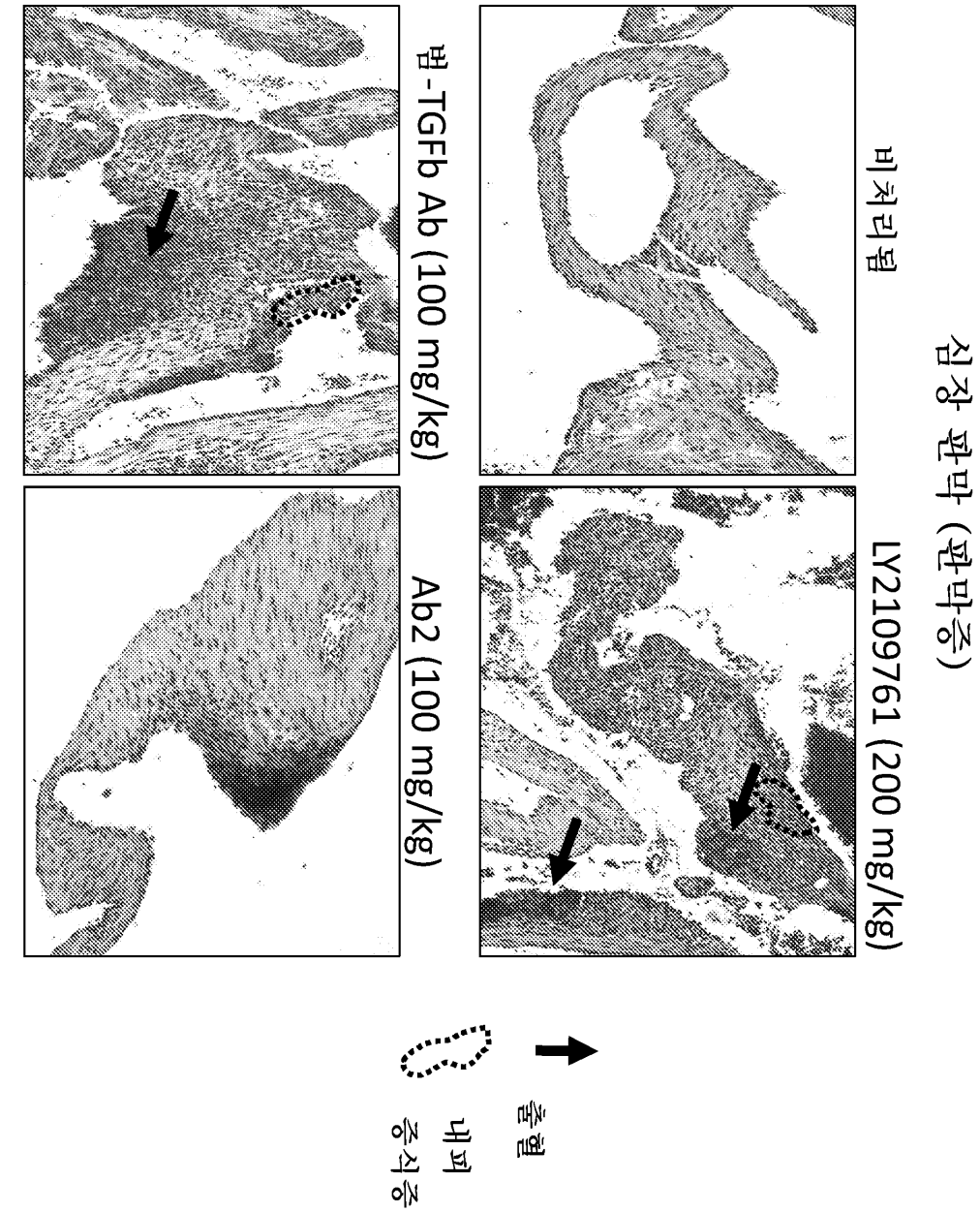
도면18d



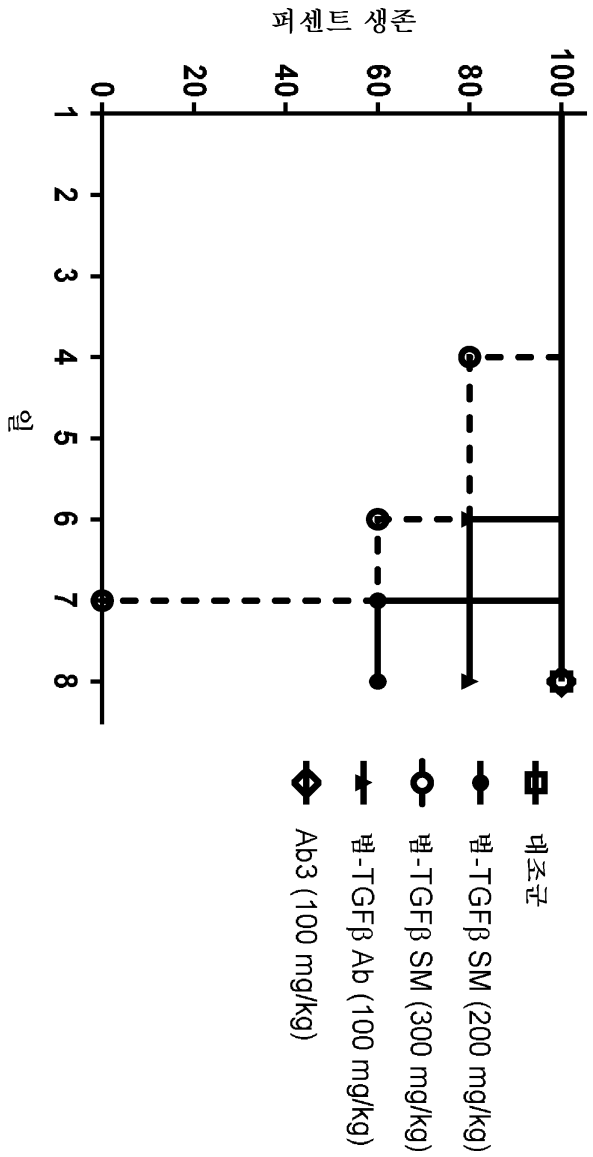
도면18e



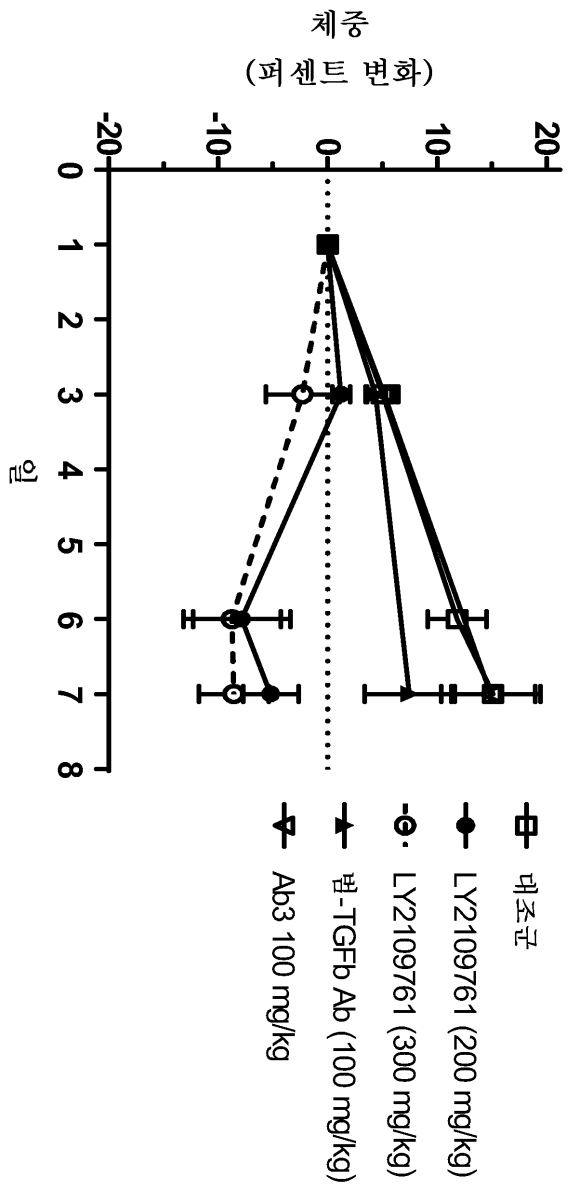
도면18f


심장 판막 (판막증)
비처리됨
LY2109761 (200 mg/kg)
범-TGFb Ab (100 mg/kg)
Ab2 (100 mg/kg)
출혈
내피 증식증

도면19a

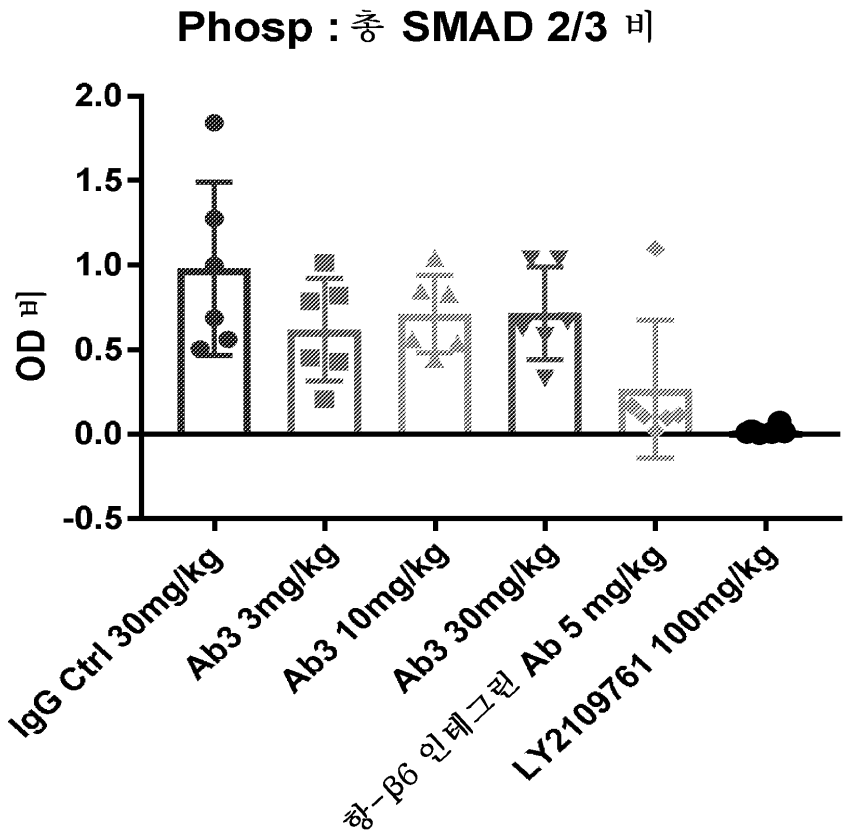

퍼센트 생존
0
20
40
60
80
100
일
1
2
3
4
5
6
7
8
대조군
벱-TGFβ SM (200 mg/kg)
벱-TGFβ SM (300 mg/kg)
벱-TGFβ Ab (100 mg/kg)
Ab3 (100 mg/kg)

도면19b

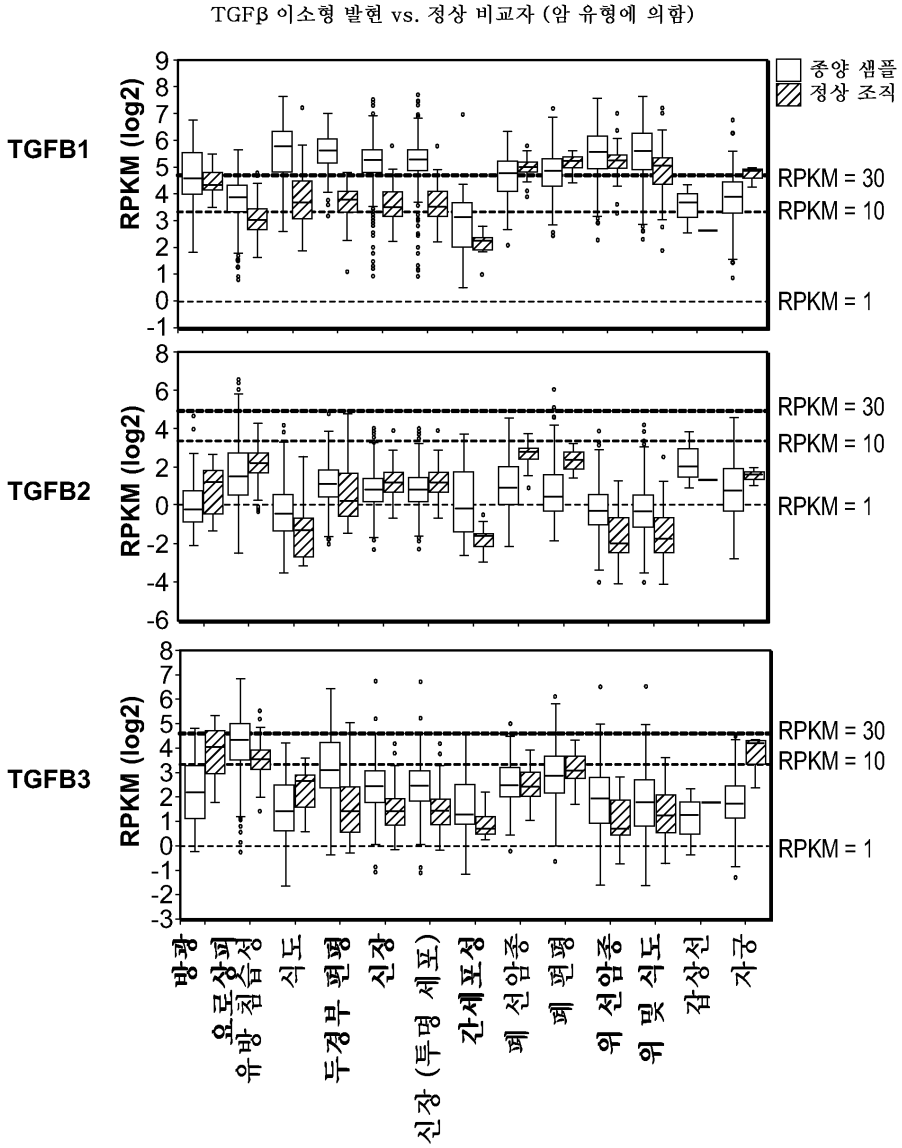

체중
(퍼센트 변화)
-20
-10
0
10
20
0
1
2
3
4
5
6
7
8
일
대조군
LY2109761 (200 mg/kg)
LY2109761 (300 mg/kg)
범-TGFb Ab (100 mg/kg)
Ab3 100 mg/kg

도면20

항상성 래트 BAL 세포에서의 긴장성 TGFβ 신호전달



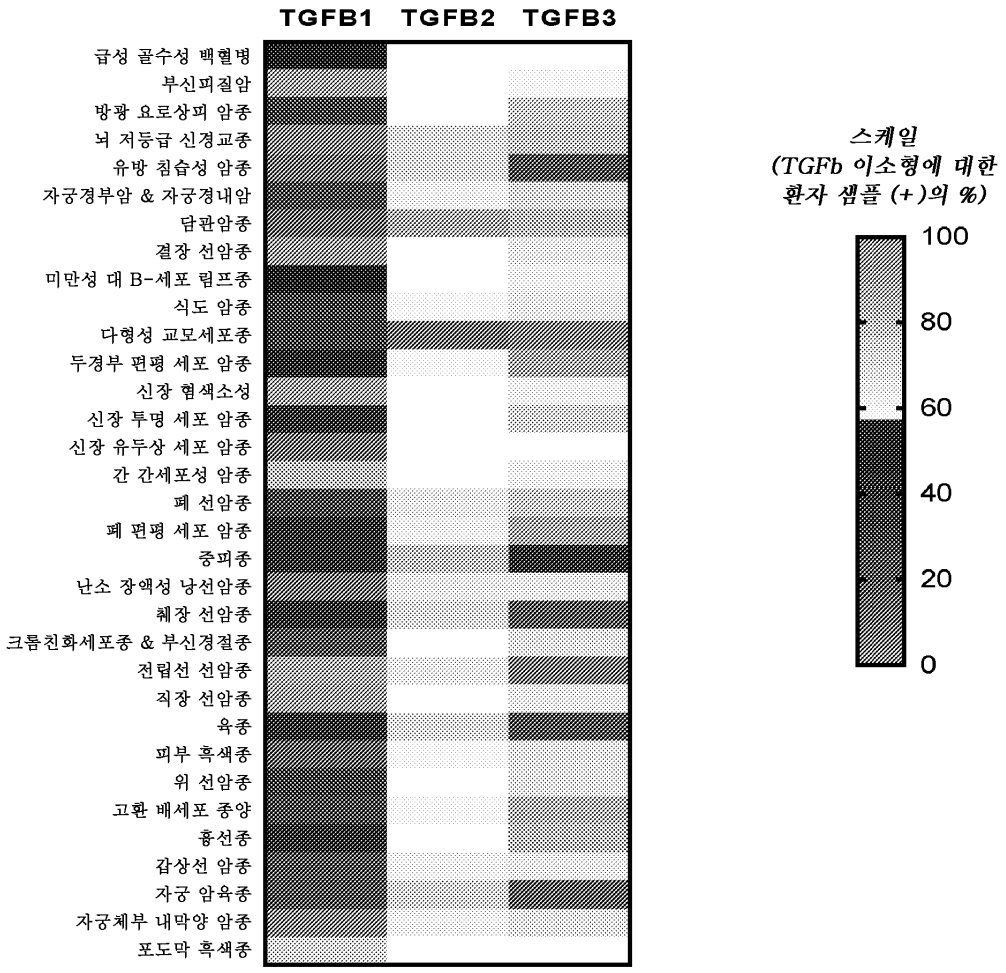
도면21a



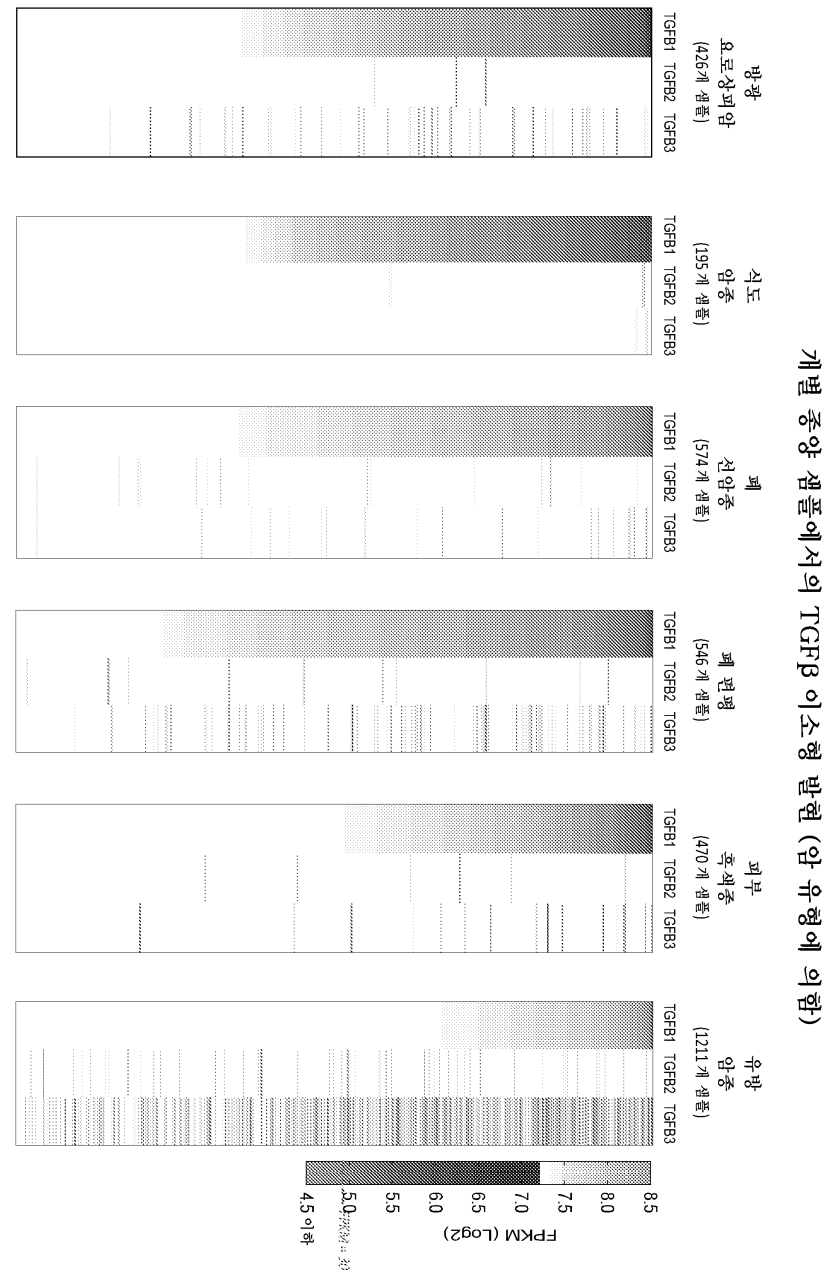
PD1/PDL1 요법에 대해 승인된 적응증은 볼드체로 열거됨

도면21b

TGFβ 이소형을 발현하는 종양의 백분율 (암 유형에 의함)



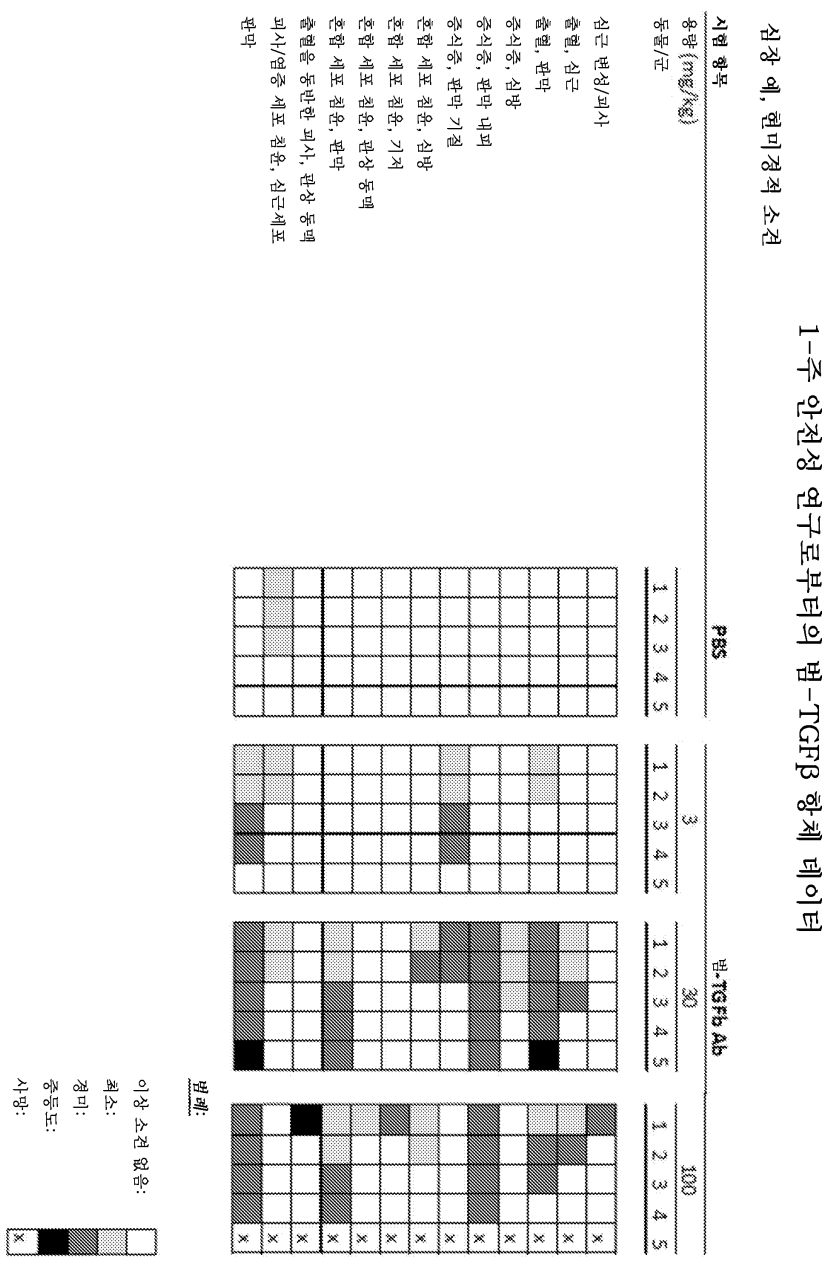
도면21c


개별 종양 샘플에서의 TGFβ 이소형 발현 (암 유형에 의함)
방광 요로상피암 (426개 샘플)
식도 암종 (195개 샘플)
폐 선암종 (574개 샘플)
폐 편평 (546개 샘플)
피부 흑색종 (470개 샘플)
유방 암종 (1211개 샘플)
TGFB1 TGFB2 TGFB3
FPKM (Log2)
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5 이하

도면21d

마우스 동계 암 세포주 모델에서의 TGFβ 이소형 발현
유전자 발현
FPKM > 1을 포함하도록 설정된 색 스케일
TGFB1 TGFB2 TGFB3
Log2(FPKM)
TGFB1 발현의 차이
minΔTGFB1 = TGFB1 - TGFB2 또는 TGFB1 - TGFB3 중 더 작은 값
minΔTGFB1
Log2(FPKM)
P388D1 (림프종)
P815 (비만세포종)
S91 (흑색종)
RM-1 (전립선)
L1210 (백혈병)
4T-1-orth (유방)
Pan02 (췌장)
KLN205 (폐)
EL4 (림프종)
4T-1 (유방)
Renca (신장)
MBT-2 (방광)
A20 (혈액/림프종)
EMT6 (유방)
MC-38 (결장직장)
H22 (간)
CT26.WT (결장직장)
LLC (폐)
B16-F10 (흑색종)
B16-BL6 (흑색종)
B16-F10 (흑색종)
MPC-11 (골수종)

도면22



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> SCHOLAR ROCK, INC.

<120> ISOFORM-SPECIFIC, CONTEXT-PERMISSIVE TGF-BETA-1 INHIBITORS AND USE THEREOF

<130> 127036-02020

<140> Not Yet Assigned

<141> 2018-01-05

<150> US 62/443,615

<151> 2017-01-06

<150> US 62/452,866

<151> 2017-01-31

<150> US 62/514,417

<151> 2017-06-02

<150> US 62/529,616

<151> 2017-07-07

<150> US 62/549,767

<151> 2017-08-24

<150> US 62/558,311

<151> 2017-09-13

<150> US 62/585,227

<151> 2017-11-13

<150

> US 62/587,964

<151> 2017-11-17

<150> US 62/588,626

<151> 2017-11-20

<160> 101

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab1 CDRH1

<400> 1

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab2 CDRH1

<400> 2

Ser Asp Trp Ile Gly

1 5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic: Ab1 CDRH2

<400> 3

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab2 CDRH2

<400> 4

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

1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Synthetic: Ab1 CDRH3

<400> 5

Asp Ile Arg Pro Tyr Gly Asp Tyr Ser Ala Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab2 CDRH3

<400> 6

Ala Ala Gly Ile Ala Ala Ala Gly His Val Thr Ala Phe Asp Ile

1 5 10 15

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab1 CDRL1

<400> 7

Thr Gly Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln

1 5 10

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab2 CDRL1

<400> 8

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab1 CDRL2

<400> 9

Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab2 CDRL2

<400> 10

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab1 CDRL3

<400> 11

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Asn His Gly Gly Val

1 5 10

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab2 CDRL3

<400> 12

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Val Thr

1 5

<210> 13

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab1 Heavy chain variable region amino acid sequence

<400> 13

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: Ab1 Light chain variable region amino acid sequence
<400> 14
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn
20 25 30

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

Ser Asn His Gly Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 15
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab1 Heavy chain amino acid sequence

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Ile Arg Pro Tyr Gly Asp Tyr Ser Ala Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
195 200 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
210 215 220

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu

325 330 335

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

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu

435 440 445

Gly

<210> 16

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab1 Light chain amino acid sequence

<400> 16

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn
20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Ser Ile Val
35 40 45

Ile Phe Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Ala Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser
85 90 95

Ser Asn His Gly Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
100 105 110

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
115 120 125

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
130 135 140

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
145 150 155 160

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
165 170 175

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
180 185 190

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
195 200 205

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 17

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab2 Heavy chain variable region amino acid sequence

<400> 17

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Asn Phe Ala Ser Asp

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Ala Ser Phe

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Ala Ala Gly Ile Ala Ala Ala Gly His Val Thr Ala Phe Asp

100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 18

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab2 Light chain variable region amino acid sequence

<400> 18

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

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

85 90 95
Tyr Tyr Ser Thr Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys

<210> 19
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: Ab2 Heavy chain amino acid sequence
<400> 19
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Met Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Asn Phe Ala Ser Asp

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

85 90 95
Ala Ser Ala Ala Gly Ile Ala Ala Ala Gly His Val Thr Ala Phe Asp
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
130 135 140
Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro

145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
195 200 205
Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser

210 215 220
Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val

405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445

Leu Gly

450

<210> 20

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab2 Light chain amino acid sequence

<400> 20

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 21

<211> 361

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TGF-beta-1

<400> 21

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

1 5 10 15

Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala

50 55 60

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr

65 70 75 80

Arg Val Leu Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys

85 90 95

Gln Ser Thr His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg
100 105 110
Glu Ala Val Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu
115 120 125
Leu Arg Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys
130 135 140
Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro
145 150 155 160

Ser Asp Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg
165 170 175
Gln Trp Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala
180 185 190
His Cys Ser Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn
195 200 205
Gly Phe Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met
210 215 220

Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln
225 230 235 240
His Leu Gln Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys
245 250 255
Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp
260 265 270
Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr
275 280 285

His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp
290 295 300
Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly
305 310 315 320
Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro
325 330 335

Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn
340 345 350

Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
355 360

<210> 22

<211> 395

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TGF-beta-2

<400> 22

Ser Leu Ser Thr Cys Ser Thr Leu Asp Met Asp Gln Phe Met Arg Lys
1 5 10 15

Arg Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Lys Leu Thr
20 25 30

Ser Pro Pro Glu Asp Tyr Pro Glu Pro Glu Glu Val Pro Pro Glu Val
35 40 45

Ile Ser Ile Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Leu Leu Gln Glu Lys Ala Ser
50 55 60

Arg Arg Ala Ala Ala Cys Glu Arg Glu Arg Ser Asp Glu Glu Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Lys Glu Val Tyr Lys Ile Asp Met Pro Pro Phe Phe Pro Ser Glu
85 90 95

Asn Ala Ile Pro Pro Thr Phe Tyr Arg Pro Tyr Phe Arg Ile Val Arg
100 105 110

Phe Asp Val Ser Ala Met Glu Lys Asn Ala Ser Asn Leu Val Lys Ala
115 120 125

Glu Phe Arg Val Phe Arg Leu Gln Asn Pro Lys Ala Arg Val Pro Glu
130 135 140

Gln Arg Ile Glu Leu Tyr Gln Ile Leu Lys Ser Lys Asp Leu Thr Ser
145 150 155 160

Pro Thr Gln Arg Tyr Ile Asp Ser Lys Val Val Lys Thr Arg Ala Glu

165 170 175

Gly Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Ala Val His Glu Trp Leu

180 185 190

His His Lys Asp Arg Asn Leu Gly Phe Lys Ile Ser Leu His Cys Pro

195 200 205

Cys Cys Thr Phe Val Pro Ser Asn Asn Tyr Ile Ile Pro Asn Lys Ser

210 215 220

Glu Glu Leu Glu Ala Arg Phe Ala Gly Ile Asp Gly Thr Ser Thr Tyr

225 230 235 240

Thr Ser Gly Asp Gln Lys Thr Ile Lys Ser Thr Arg Lys Lys Asn Ser

245 250 255

Gly Lys Thr Pro His Leu Leu Leu Met Leu Leu Pro Ser Tyr Arg Leu

260 265 270

Glu Ser Gln Gln Thr Asn Arg Arg Lys Lys Arg Ala Leu Asp Ala Ala

275 280 285

Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys Leu Arg Pro Leu Tyr

290 295 300

Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys

305 310 315 320

Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys Pro Tyr Leu Trp Ser

325 330 335

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

340 345 350

Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro

355 360 365

Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro Lys Ile Glu Gln Leu

370 375 380

Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser

385 390 395

<210> 23

<211> 392

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TGF-beta-3

<400> 23

Ser Leu Ser Leu Ser Thr Cys Thr Thr Leu Asp Phe Gly His Ile Lys
1 5 10 15

Lys Lys Arg Val Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg
20 25 30

Leu Thr Ser Pro Pro Glu Pro Thr Val Met Thr His Val Pro Tyr Gln
35 40 45

Val Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Glu Leu Leu Glu Glu Met His
50 55 60

Gly Glu Arg Glu Glu Gly Cys Thr Gln Glu Asn Thr Glu Ser Glu Tyr
65 70 75 80

Tyr Ala Lys Glu Ile His Lys Phe Asp Met Ile Gln Gly Leu Ala Glu
85 90 95

His Asn Glu Leu Ala Val Cys Pro Lys Gly Ile Thr Ser Lys Val Phe
100 105 110

Arg Phe Asn Val Ser Ser Val Glu Lys Asn Arg Thr Asn Leu Phe Arg
115 120 125

Ala Glu Phe Arg Val Leu Arg Val Pro Asn Pro Ser Ser Lys Arg Asn
130 135 140

Glu Gln Arg Ile Glu Leu Phe Gln Ile Leu Arg Pro Asp Glu His Ile
145 150 155 160

Ala Lys Gln Arg Tyr Ile Gly Gly Lys Asn Leu Pro Thr Arg Gly Thr
165 170 175

Ala Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Thr Val Arg Glu Trp Leu
180 185 190

Leu Arg Arg Glu Ser Asn Leu Gly Leu Glu Ile Ser Ile His Cys Pro
195 200 205

Cys His Thr Phe Gln Pro Asn Gly Asp Ile Leu Glu Asn Ile His Glu
210 215 220

Val Met Glu Ile Lys Phe Lys Gly Val Asp Asn Glu Asp Asp His Gly
225 230 235 240
Arg Gly Asp Leu Gly Arg Leu Lys Lys Gln Lys Asp His His Asn Pro
245 250 255
His Leu Ile Leu Met Met Ile Pro Pro His Arg Leu Asp Asn Pro Gly
260 265 270

Gln Gly Gly Gln Arg Lys Lys Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe
275 280 285
Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe
290 295 300
Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr
305 310 315 320
Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr
325 330 335

Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala
340 345 350
Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile
355 360 365
Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met
370 375 380
Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
385 390

<210> 24
<211> 361
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: proTGF-beta-1
<400> 24
Leu Ser Thr Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg
1 5 10 15
Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser
20 25 30

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

35 40 45

Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala

50 55 60

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr

65 70 75 80

Arg Val Leu Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys

85 90 95

Gln Ser Thr His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg

100 105 110

Glu Ala Val Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu

115 120 125

Leu Arg Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys

130 135 140

Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro

145 150 155 160

Ser Asp Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg

165 170 175

Gln Trp Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala

180 185 190

His Cys Ser Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn

195 200 205

Gly Phe Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met

210 215 220

Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln

225 230 235 240

His Leu Gln Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys

245 250 255

Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp

260 265 270

Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr

275 280 285

His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp

290 295 300

Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly

305 310 315 320

Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro

325 330 335

Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn

340 345 350

Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser

355 360

<210> 25

<211> 361

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: proTGF-beta-1 C4S

<400> 25

Leu Ser Thr Ser Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg

1 5 10 15

Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala

50 55 60

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr

65 70 75 80

Arg Val Leu Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys

85 90 95

Gln Ser Thr His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg

100 105 110

Glu Ala Val Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu

115 120 125

Leu Arg Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys
130 135 140
Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro
145 150 155 160
Ser Asp Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg
165 170 175
Gln Trp Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala
180 185 190

His Cys Ser Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn
195 200 205
Gly Phe Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met
210 215 220
Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln
225 230 235 240
His Leu Gln Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys
245 250 255

Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp
260 265 270
Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr
275 280 285
His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp
290 295 300
Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly
305 310 315 320

Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro
325 330 335
Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn
340 345 350
Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
355 360

<210> 26

<211> 360

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: proTGF-beta-1 D2G

<400> 26

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

1 5 10 15

Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala

50 55 60

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr

65 70 75 80

Arg Val Leu Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys

85 90 95

Gln Ser Thr His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg

100 105 110

Glu Ala Val Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu

115 120 125

Leu Arg Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys

130 135 140

Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro

145 150 155 160

Ser Asp Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg

165 170 175

Gln Trp Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala

180 185 190

His Cys Ser Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn

195 200 205

Gly Phe Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met

210 215 220

Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln

225 230 235 240

His Leu Gln Ser Ser Arg His Gly Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe

245 250 255

Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe

260 265 270

Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His

275 280 285

Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr

290 295 300

Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala

305 310 315 320

Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile

325 330 335

Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met

340 345 350

Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser

355 360

<210> 27

<211> 360

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: proTGF-beta-1 C4S D2G

<400> 27

Leu Ser Thr Ser Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg

1 5 10 15

Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser

20 25 30

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

```
        35                  40                  45
Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala
    50                  55                  60
Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr
65                  70                  75                  80

Arg Val Leu Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys
                85                  90                  95
Gln Ser Thr His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg
            100                 105                 110
Glu Ala Val Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu
        115                 120                 125
Leu Arg Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys
    130                 135                 140

Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro
145                 150                 155                 160
Ser Asp Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg
                165                 170                 175
Gln Trp Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala
            180                 185                 190
His Cys Ser Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn
        195                 200                 205

Gly Phe Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met
    210                 215                 220
Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln
225                 230                 235                 240
His Leu Gln Ser Ser Arg His Gly Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe
                245                 250                 255
Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe
            260                 265                 270

Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His
        275                 280                 285
```

Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr
290 295 300
Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala
305 310 315 320
Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile
325 330 335

Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met
340 345 350
Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
355 360

<210> 28
<211> 395
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: proTGF-beta-2
<400> 28
Ser Leu Ser Thr Cys Ser Thr Leu Asp Met Asp Gln Phe Met Arg Lys
1 5 10 15
Arg Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Lys Leu Thr

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

85 90 95
Asn Ala Ile Pro Pro Thr Phe Tyr Arg Pro Tyr Phe Arg Ile Val Arg
100 105 110
Phe Asp Val Ser Ala Met Glu Lys Asn Ala Ser Asn Leu Val Lys Ala
115 120 125

Glu Phe Arg Val Phe Arg Leu Gln Asn Pro Lys Ala Arg Val Pro Glu
130 135 140
Gln Arg Ile Glu Leu Tyr Gln Ile Leu Lys Ser Lys Asp Leu Thr Ser

145 150 155 160
Pro Thr Gln Arg Tyr Ile Asp Ser Lys Val Val Lys Thr Arg Ala Glu
165 170 175
Gly Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Ala Val His Glu Trp Leu
180 185 190
His His Lys Asp Arg Asn Leu Gly Phe Lys Ile Ser Leu His Cys Pro
195 200 205
Cys Cys Thr Phe Val Pro Ser Asn Asn Tyr Ile Ile Pro Asn Lys Ser

210 215 220
Glu Glu Leu Glu Ala Arg Phe Ala Gly Ile Asp Gly Thr Ser Thr Tyr
225 230 235 240
Thr Ser Gly Asp Gln Lys Thr Ile Lys Ser Thr Arg Lys Lys Asn Ser
245 250 255
Gly Lys Thr Pro His Leu Leu Leu Met Leu Leu Pro Ser Tyr Arg Leu
260 265 270
Glu Ser Gln Gln Thr Asn Arg Arg Lys Lys Arg Ala Leu Asp Ala Ala

275 280 285
Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys Leu Arg Pro Leu Tyr
290 295 300
Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys
305 310 315 320
Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys Pro Tyr Leu Trp Ser
325 330 335
Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu Tyr Asn Thr Ile Asn

340 345 350
Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro
355 360 365
Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro Lys Ile Glu Gln Leu

370 375 380

Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser

385 390 395

<210> 29

<211> 395

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: proTGF-beta-2 C5S

<400> 29

Ser Leu Ser Thr Ser Ser Thr Leu Asp Met Asp Gln Phe Met Arg Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Pro Pro Glu Asp Tyr Pro Glu Pro Glu Glu Val Pro Pro Glu Val

35 40 45

Ile Ser Ile Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Leu Leu Gln Glu Lys Ala Ser

50 55 60

Arg Arg Ala Ala Ala Cys Glu Arg Glu Arg Ser Asp Glu Glu Tyr Tyr

65 70 75 80

Ala Lys Glu Val Tyr Lys Ile Asp Met Pro Pro Phe Phe Pro Ser Glu

85 90 95

Asn Ala Ile Pro Pro Thr Phe Tyr Arg Pro Tyr Phe Arg Ile Val Arg

100 105 110

Phe Asp Val Ser Ala Met Glu Lys Asn Ala Ser Asn Leu Val Lys Ala

115 120 125

Glu Phe Arg Val Phe Arg Leu Gln Asn Pro Lys Ala Arg Val Pro Glu

130 135 140

Gln Arg Ile Glu Leu Tyr Gln Ile Leu Lys Ser Lys Asp Leu Thr Ser

145 150 155 160

Pro Thr Gln Arg Tyr Ile Asp Ser Lys Val Val Lys Thr Arg Ala Glu

165 170 175

Gly Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Ala Val His Glu Trp Leu

180 185 190

His His Lys Asp Arg Asn Leu Gly Phe Lys Ile Ser Leu His Cys Pro
195 200 205
Cys Cys Thr Phe Val Pro Ser Asn Asn Tyr Ile Ile Pro Asn Lys Ser
210 215 220
Glu Glu Leu Glu Ala Arg Phe Ala Gly Ile Asp Gly Thr Ser Thr Tyr
225 230 235 240
Thr Ser Gly Asp Gln Lys Thr Ile Lys Ser Thr Arg Lys Lys Asn Ser
245 250 255

Gly Lys Thr Pro His Leu Leu Leu Met Leu Leu Pro Ser Tyr Arg Leu
260 265 270
Glu Ser Gln Gln Thr Asn Arg Arg Lys Lys Arg Ala Leu Asp Ala Ala
275 280 285
Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys Leu Arg Pro Leu Tyr
290 295 300
Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys
305 310 315 320

Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys Pro Tyr Leu Trp Ser
325 330 335
Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu Tyr Asn Thr Ile Asn
340 345 350
Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro
355 360 365
Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro Lys Ile Glu Gln Leu
370 375 380

Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
385 390 395

<210> 30

<211> 394

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: proTGF-beta-2 C5S D2G

<400> 30

Ser Leu Ser Thr Ser Ser Thr Leu Asp Met Asp Gln Phe Met Arg Lys
1 5 10 15

Arg Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Lys Leu Thr
20 25 30

Ser Pro Pro Glu Asp Tyr Pro Glu Pro Glu Glu Val Pro Pro Glu Val

35 40 45

Ile Ser Ile Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Leu Leu Gln Glu Lys Ala Ser
50 55 60

Arg Arg Ala Ala Ala Cys Glu Arg Glu Arg Ser Asp Glu Glu Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Lys Glu Val Tyr Lys Ile Asp Met Pro Pro Phe Phe Pro Ser Glu
85 90 95

Asn Ala Ile Pro Pro Thr Phe Tyr Arg Pro Tyr Phe Arg Ile Val Arg

100 105 110

Phe Asp Val Ser Ala Met Glu Lys Asn Ala Ser Asn Leu Val Lys Ala
115 120 125

Glu Phe Arg Val Phe Arg Leu Gln Asn Pro Lys Ala Arg Val Pro Glu
130 135 140

Gln Arg Ile Glu Leu Tyr Gln Ile Leu Lys Ser Lys Asp Leu Thr Ser
145 150 155 160

Pro Thr Gln Arg Tyr Ile Asp Ser Lys Val Val Lys Thr Arg Ala Glu

165 170 175

Gly Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Ala Val His Glu Trp Leu
180 185 190

His His Lys Asp Arg Asn Leu Gly Phe Lys Ile Ser Leu His Cys Pro
195 200 205

Cys Cys Thr Phe Val Pro Ser Asn Asn Tyr Ile Ile Pro Asn Lys Ser
210 215 220

Glu Glu Leu Glu Ala Arg Phe Ala Gly Ile Asp Gly Thr Ser Thr Tyr

225 230 235 240

Thr Ser Gly Asp Gln Lys Thr Ile Lys Ser Thr Arg Lys Lys Asn Ser

245 250 255

Gly Lys Thr Pro His Leu Leu Leu Met Leu Leu Pro Ser Tyr Arg Leu

260 265 270

Glu Ser Gln Gln Thr Asn Arg Arg Lys Gly Ala Leu Asp Ala Ala Tyr

275 280 285

Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys Leu Arg Pro Leu Tyr Ile

290 295 300

Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly

305 310 315 320

Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys Pro Tyr Leu Trp Ser Ser

325 330 335

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

340 345 350

Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu

355 360 365

Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro Lys Ile Glu Gln Leu Ser

370 375 380

Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser

385 390

<210> 31

<211> 394

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: proTGF-beta-2 D2G

<400> 31

Ser Leu Ser Thr Cys Ser Thr Leu Asp Met Asp Gln Phe Met Arg Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Pro Pro Glu Asp Tyr Pro Glu Pro Glu Glu Val Pro Pro Glu Val

35 40 45

Ile Ser Ile Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Leu Leu Gln Glu Lys Ala Ser

50 55 60

Arg Arg Ala Ala Ala Cys Glu Arg Glu Arg Ser Asp Glu Glu Tyr Tyr

65 70 75 80

Ala Lys Glu Val Tyr Lys Ile Asp Met Pro Pro Phe Phe Pro Ser Glu

85 90 95

Asn Ala Ile Pro Pro Thr Phe Tyr Arg Pro Tyr Phe Arg Ile Val Arg

100 105 110

Phe Asp Val Ser Ala Met Glu Lys Asn Ala Ser Asn Leu Val Lys Ala

115 120 125

Glu Phe Arg Val Phe Arg Leu Gln Asn Pro Lys Ala Arg Val Pro Glu

130 135 140

Gln Arg Ile Glu Leu Tyr Gln Ile Leu Lys Ser Lys Asp Leu Thr Ser

145 150 155 160

Pro Thr Gln Arg Tyr Ile Asp Ser Lys Val Val Lys Thr Arg Ala Glu

165 170 175

Gly Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Ala Val His Glu Trp Leu

180 185 190

His His Lys Asp Arg Asn Leu Gly Phe Lys Ile Ser Leu His Cys Pro

195 200 205

Cys Cys Thr Phe Val Pro Ser Asn Asn Tyr Ile Ile Pro Asn Lys Ser

210 215 220

Glu Glu Leu Glu Ala Arg Phe Ala Gly Ile Asp Gly Thr Ser Thr Tyr

225 230 235 240

Thr Ser Gly Asp Gln Lys Thr Ile Lys Ser Thr Arg Lys Lys Asn Ser

245 250 255

Gly Lys Thr Pro His Leu Leu Leu Met Leu Leu Pro Ser Tyr Arg Leu

260 265 270

Glu Ser Gln Gln Thr Asn Arg Arg Lys Gly Ala Leu Asp Ala Ala Tyr

275 280 285

Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys Leu Arg Pro Leu Tyr Ile
290 295 300
Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly
305 310 315 320
Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys Pro Tyr Leu Trp Ser Ser
325 330 335

Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu Tyr Asn Thr Ile Asn Pro
340 345 350
Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu
355 360 365
Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro Lys Ile Glu Gln Leu Ser
370 375 380
Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
385 390

<210> 32

<211> 392

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: proTGF-beta-3

<400> 32

Ser Leu Ser Leu Ser Thr Cys Thr Thr Leu Asp Phe Gly His Ile Lys
1 5 10 15
Lys Lys Arg Val Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg
20 25 30
Leu Thr Ser Pro Pro Glu Pro Thr Val Met Thr His Val Pro Tyr Gln
35 40 45
Val Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Glu Leu Leu Glu Glu Met His

50 55 60
Gly Glu Arg Glu Glu Gly Cys Thr Gln Glu Asn Thr Glu Ser Glu Tyr
65 70 75 80
Tyr Ala Lys Glu Ile His Lys Phe Asp Met Ile Gln Gly Leu Ala Glu
85 90 95

His Asn Glu Leu Ala Val Cys Pro Lys Gly Ile Thr Ser Lys Val Phe
100 105 110
Arg Phe Asn Val Ser Ser Val Glu Lys Asn Arg Thr Asn Leu Phe Arg

115 120 125
Ala Glu Phe Arg Val Leu Arg Val Pro Asn Pro Ser Ser Lys Arg Asn
130 135 140
Glu Gln Arg Ile Glu Leu Phe Gln Ile Leu Arg Pro Asp Glu His Ile
145 150 155 160
Ala Lys Gln Arg Tyr Ile Gly Gly Lys Asn Leu Pro Thr Arg Gly Thr
165 170 175
Ala Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Thr Val Arg Glu Trp Leu

180 185 190
Leu Arg Arg Glu Ser Asn Leu Gly Leu Glu Ile Ser Ile His Cys Pro
195 200 205
Cys His Thr Phe Gln Pro Asn Gly Asp Ile Leu Glu Asn Ile His Glu
210 215 220
Val Met Glu Ile Lys Phe Lys Gly Val Asp Asn Glu Asp Asp His Gly
225 230 235 240
Arg Gly Asp Leu Gly Arg Leu Lys Lys Gln Lys Asp His His Asn Pro

245 250 255
His Leu Ile Leu Met Met Ile Pro Pro His Arg Leu Asp Asn Pro Gly
260 265 270
Gln Gly Gly Gln Arg Lys Lys Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe
275 280 285
Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe
290 295 300
Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr

305 310 315 320
Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr
325 330 335
Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala

340 345 350

Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile

355 360 365

Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met

370 375 380

Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser

385 390

<210> 33

<211> 392

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: proTGF-beta-3 C7S

<400> 33

Ser Leu Ser Leu Ser Thr Ser Thr Thr Leu Asp Phe Gly His Ile Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Thr Ser Pro Pro Glu Pro Thr Val Met Thr His Val Pro Tyr Gln

35 40 45

Val Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Glu Leu Leu Glu Glu Met His

50 55 60

Gly Glu Arg Glu Glu Gly Cys Thr Gln Glu Asn Thr Glu Ser Glu Tyr

65 70 75 80

Tyr Ala Lys Glu Ile His Lys Phe Asp Met Ile Gln Gly Leu Ala Glu

85 90 95

His Asn Glu Leu Ala Val Cys Pro Lys Gly Ile Thr Ser Lys Val Phe

100 105 110

Arg Phe Asn Val Ser Ser Val Glu Lys Asn Arg Thr Asn Leu Phe Arg

115 120 125

Ala Glu Phe Arg Val Leu Arg Val Pro Asn Pro Ser Ser Lys Arg Asn

130 135 140

Glu Gln Arg Ile Glu Leu Phe Gln Ile Leu Arg Pro Asp Glu His Ile

145 150 155 160

Ala Lys Gln Arg Tyr Ile Gly Gly Lys Asn Leu Pro Thr Arg Gly Thr
165 170 175
Ala Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Thr Val Arg Glu Trp Leu
180 185 190
Leu Arg Arg Glu Ser Asn Leu Gly Leu Glu Ile Ser Ile His Cys Pro
195 200 205
Cys His Thr Phe Gln Pro Asn Gly Asp Ile Leu Glu Asn Ile His Glu
210 215 220

Val Met Glu Ile Lys Phe Lys Gly Val Asp Asn Glu Asp Asp His Gly
225 230 235 240
Arg Gly Asp Leu Gly Arg Leu Lys Lys Gln Lys Asp His His Asn Pro
245 250 255
His Leu Ile Leu Met Met Ile Pro Pro His Arg Leu Asp Asn Pro Gly
260 265 270
Gln Gly Gly Gln Arg Lys Lys Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe
275 280 285

Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe
290 295 300
Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr
305 310 315 320
Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr
325 330 335
Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala
340 345 350

Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile
355 360 365
Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met
370 375 380
Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
385 390

<210> 34

<211> 391

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: proTGF-beta-3 C7S D2G

<400> 34

Ser Leu Ser Leu Ser Thr Ser Thr Thr Leu Asp Phe Gly His Ile Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Thr Ser Pro Pro Glu Pro Thr Val Met Thr His Val Pro Tyr Gln

35 40 45

Val Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Glu Leu Leu Glu Glu Met His

50 55 60

Gly Glu Arg Glu Glu Gly Cys Thr Gln Glu Asn Thr Glu Ser Glu Tyr

65 70 75 80

Tyr Ala Lys Glu Ile His Lys Phe Asp Met Ile Gln Gly Leu Ala Glu

85 90 95

His Asn Glu Leu Ala Val Cys Pro Lys Gly Ile Thr Ser Lys Val Phe

100 105 110

Arg Phe Asn Val Ser Ser Val Glu Lys Asn Arg Thr Asn Leu Phe Arg

115 120 125

Ala Glu Phe Arg Val Leu Arg Val Pro Asn Pro Ser Ser Lys Arg Asn

130 135 140

Glu Gln Arg Ile Glu Leu Phe Gln Ile Leu Arg Pro Asp Glu His Ile

145 150 155 160

Ala Lys Gln Arg Tyr Ile Gly Gly Lys Asn Leu Pro Thr Arg Gly Thr

165 170 175

Ala Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Thr Val Arg Glu Trp Leu

180 185 190

Leu Arg Arg Glu Ser Asn Leu Gly Leu Glu Ile Ser Ile His Cys Pro

195 200 205

Cys His Thr Phe Gln Pro Asn Gly Asp Ile Leu Glu Asn Ile His Glu

210 215 220

Val Met Glu Ile Lys Phe Lys Gly Val Asp Asn Glu Asp Asp His Gly

225 230 235 240

Arg Gly Asp Leu Gly Arg Leu Lys Lys Gln Lys Asp His His Asn Pro

245 250 255

His Leu Ile Leu Met Met Ile Pro Pro His Arg Leu Asp Asn Pro Gly

260 265 270

Gln Gly Gly Gln Arg Lys Gly Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg

275 280 285

Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg

290 295 300

Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala

305 310 315 320

Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr

325 330 335

His Ser Thr Val Leu Gly Leu Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser

340 345 350

Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu

355 360 365

Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val

370 375 380

Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser

385 390

<210> 35

<211> 391

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: proTGF-beta-3 D2G

<400> 35

Ser Leu Ser Leu Ser Thr Cys Thr Thr Leu Asp Phe Gly His Ile Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Thr Ser Pro Pro Glu Pro Thr Val Met Thr His Val Pro Tyr Gln

35 40 45

Val Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Glu Leu Leu Glu Glu Met His

50 55 60

Gly Glu Arg Glu Glu Gly Cys Thr Gln Glu Asn Thr Glu Ser Glu Tyr

65 70 75 80

Tyr Ala Lys Glu Ile His Lys Phe Asp Met Ile Gln Gly Leu Ala Glu

85 90 95

His Asn Glu Leu Ala Val Cys Pro Lys Gly Ile Thr Ser Lys Val Phe

100 105 110

Arg Phe Asn Val Ser Ser Val Glu Lys Asn Arg Thr Asn Leu Phe Arg

115 120 125

Ala Glu Phe Arg Val Leu Arg Val Pro Asn Pro Ser Ser Lys Arg Asn

130 135 140

Glu Gln Arg Ile Glu Leu Phe Gln Ile Leu Arg Pro Asp Glu His Ile

145 150 155 160

Ala Lys Gln Arg Tyr Ile Gly Gly Lys Asn Leu Pro Thr Arg Gly Thr

165 170 175

Ala Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Thr Val Arg Glu Trp Leu

180 185 190

Leu Arg Arg Glu Ser Asn Leu Gly Leu Glu Ile Ser Ile His Cys Pro

195 200 205

Cys His Thr Phe Gln Pro Asn Gly Asp Ile Leu Glu Asn Ile His Glu

210 215 220

Val Met Glu Ile Lys Phe Lys Gly Val Asp Asn Glu Asp Asp His Gly

225 230 235 240

Arg Gly Asp Leu Gly Arg Leu Lys Lys Gln Lys Asp His His Asn Pro

245 250 255

His Leu Ile Leu Met Met Ile Pro Pro His Arg Leu Asp Asn Pro Gly
260 265 270
Gln Gly Gly Gln Arg Lys Gly Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg
275 280 285
Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg
290 295 300

Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala
305 310 315 320
Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr
325 330 335
His Ser Thr Val Leu Gly Leu Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser
340 345 350
Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu
355 360 365

Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val
370 375 380
Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
385 390
<210> 36
<211> 361
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: proTGF-beta-1
<400> 36
Leu Ser Thr Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg
1 5 10 15
Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser
20 25 30

Pro Pro Ser Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val
35 40 45
Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala
50 55 60

Asp Pro Glu Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr
65 70 75 80
Arg Val Leu Met Val Asp Arg Asn Asn Ala Ile Tyr Glu Lys Thr Lys
85 90 95

Asp Ile Ser His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Asp Ile Arg
100 105 110
Glu Ala Val Pro Glu Pro Pro Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu
115 120 125
Gln Arg Leu Lys Ser Ser Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys
130 135 140
Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Gly Asn Arg Leu Leu Thr Pro
145 150 155 160

Thr Asp Thr Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg
165 170 175
Gln Trp Leu Asn Gln Gly Asp Gly Ile Gln Gly Phe Arg Phe Ser Ala
180 185 190
His Cys Ser Cys Asp Ser Lys Asp Asn Lys Leu His Val Glu Ile Asn
195 200 205
Gly Ile Ser Pro Lys Arg Arg Gly Asp Leu Gly Thr Ile His Asp Met
210 215 220

Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln
225 230 235 240
His Leu His Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys
245 250 255
Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp
260 265 270
Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr
275 280 285

His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp
290 295 300
Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly

305 310 315 320

Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro

325 330 335

Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn

340 345 350

Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser

355 360

<210> 37

<211> 361

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: proTGF-beta-1

<400> 37

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

1 5 10 15

Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala

50 55 60

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr

65 70 75 80

Arg Val Leu Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys

85 90 95

Gln Ser Thr His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg

100 105 110

Glu Ala Val Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu

115 120 125

Leu Arg Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys

130 135 140

Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro

145 150 155 160

Ser Asp Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg

165 170 175

Gln Trp Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala

180 185 190

His Cys Ser Cys Asp Ser Lys Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn

195 200 205

Gly Phe Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met

210 215 220

Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln

225 230 235 240

His Leu Gln Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys

245 250 255

Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp

260 265 270

Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr

275 280 285

His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp

290 295 300

Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly

305 310 315 320

Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro

325 330 335

Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn

340 345 350

Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser

355 360

<210> 38

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TGF-beta-1 LAP C4S

<400> 38

Leu Ser Thr Ser Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg
1 5 10 15

Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser
20 25 30

Pro Pro Ser Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val
35 40 45

Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala
50 55 60

Asp Pro Glu Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr
65 70 75 80

Arg Val Leu Met Val Asp Arg Asn Asn Ala Ile Tyr Glu Lys Thr Lys
85 90 95

Asp Ile Ser His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Asp Ile Arg
100 105 110

Glu Ala Val Pro Glu Pro Pro Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu
115 120 125

Gln Arg Leu Lys Ser Ser Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys
130 135 140

Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Gly Asn Arg Leu Leu Thr Pro
145 150 155 160

Thr Asp Thr Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg
165 170 175

Gln Trp Leu Asn Gln Gly Asp Gly Ile Gln Gly Phe Arg Phe Ser Ala
180 185 190

His Cys Ser Cys Asp Ser Lys Asp Asn Lys Leu His Val Glu Ile Asn
195 200 205

Gly Ile Ser Pro Lys Arg Arg Gly Asp Leu Gly Thr Ile His Asp Met
210 215 220

Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln

225 230 235 240

His Leu His Ser Ser Arg His Arg Arg
245

<210> 39

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TGF-beta-1 LAP C4S

<400> 39

Leu Ser Thr Ser Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg
1 5 10 15

Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser
20 25 30

Pro Pro Ser Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val
35 40 45

Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala
50 55 60

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr
65 70 75 80

Arg Val Leu Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys
85 90 95

Gln Ser Thr His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg
100 105 110

Glu Ala Val Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu
115 120 125

Leu Arg Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys
130 135 140

Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro
145 150 155 160

Ser Asp Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg
165 170 175

Gln Trp Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala
180 185 190
His Cys Ser Cys Asp Ser Lys Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn
195 200 205
Gly Phe Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met
210 215 220
Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln

225 230 235 240
His Leu Gln Ser Ser Arg His Arg Arg
245

<210> 40
<211> 360
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: proTGF-beta-1 C4S D2G
<400> 40
Leu Ser Thr Ser Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg
1 5 10 15
Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser
20 25 30

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

Asp Ile Ser His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Asp Ile Arg
100 105 110
Glu Ala Val Pro Glu Pro Pro Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu
115 120 125

Gln Arg Leu Lys Ser Ser Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys
130 135 140
Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Gly Asn Arg Leu Leu Thr Pro
145 150 155 160

Thr Asp Thr Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg
165 170 175
Gln Trp Leu Asn Gln Gly Asp Gly Ile Gln Gly Phe Arg Phe Ser Ala
180 185 190
His Cys Ser Cys Asp Ser Lys Asp Asn Lys Leu His Val Glu Ile Asn
195 200 205
Gly Ile Ser Pro Lys Arg Arg Gly Asp Leu Gly Thr Ile His Asp Met
210 215 220

Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln
225 230 235 240
His Leu His Ser Ser Arg His Gly Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe
245 250 255
Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe
260 265 270
Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His
275 280 285

Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr
290 295 300
Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala
305 310 315 320
Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile
325 330 335
Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met
340 345 350

Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
355 360

<210> 41

<211> 361

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: proTGF-beta-1 C4S

<400> 41

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

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

100 105 110
Glu Ala Val Pro Glu Pro Pro Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu
115 120 125
Gln Arg Leu Lys Ser Ser Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys
130 135 140
Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Gly Asn Arg Leu Leu Thr Pro
145 150 155 160
Thr Asp Thr Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg

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

210 215 220

Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln

225 230 235 240

His Leu His Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys

245 250 255

Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp

260 265 270

Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr

275 280 285

His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp

290 295 300

Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly

305 310 315 320

Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro

325 330 335

Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn

340 345 350

Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser

355 360

<210> 42

<211> 361

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: proTGF-beta-1 C4S

<400> 42

Leu Ser Thr Ser Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg

1 5 10 15

Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala
50 55 60

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr
65 70 75 80

Arg Val Leu Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys
85 90 95

Gln Ser Thr His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg
100 105 110

Glu Ala Val Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu
115 120 125

Leu Arg Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys
130 135 140

Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro
145 150 155 160

Ser Asp Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg
165 170 175

Gln Trp Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala
180 185 190

His Cys Ser Cys Asp Ser Lys Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn
195 200 205

Gly Phe Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met
210 215 220

Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln
225 230 235 240

His Leu Gln Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys
245 250 255

Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp
260 265 270

Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr
275 280 285

His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp

290 295 300

Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly
305 310 315 320
Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro
325 330 335
Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn
340 345 350
Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
355 360

<210> 43
<211> 360
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: proTGF-beta-1 C4S D2G
<400> 43
Leu Ser Thr Ser Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg
1 5 10 15
Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser
20 25 30
Pro Pro Ser Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val
35 40 45
Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala

50 55 60
Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr
65 70 75 80
Arg Val Leu Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys
85 90 95
Gln Ser Thr His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg
100 105 110
Glu Ala Val Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu

115 120 125

Leu Arg Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys
130 135 140
Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro
145 150 155 160
Ser Asp Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg
165 170 175
Gln Trp Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala

180 185 190
His Cys Ser Cys Asp Ser Lys Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn
195 200 205
Gly Phe Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met
210 215 220
Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln
225 230 235 240
His Leu Gln Ser Ser Arg His Gly Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe

245 250 255
Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe
260 265 270
Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His
275 280 285
Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr
290 295 300
Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala

305 310 315 320
Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile
325 330 335
Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met
340 345 350
Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
355 360
<210> 44
<211> 1260

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: LTBP3

<400> 44

Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Leu Ala Arg

1 5 10 15

Glu Arg Phe Lys Val Val Phe Ala Pro Val Ile Cys Lys Arg Thr Cys

20 25 30

Leu Lys Gly Gln Cys Arg Asp Ser Cys Gln Gln Gly Ser Asn Met Thr

35 40 45

Leu Ile Gly Glu Asn Gly His Ser Thr Asp Thr Leu Thr Gly Ser Gly

50 55 60

Phe Arg Val Val Val Cys Pro Leu Pro Cys Met Asn Gly Gly Gln Cys

65 70 75 80

Ser Ser Arg Asn Gln Cys Leu Cys Pro Pro Asp Phe Thr Gly Arg Phe

85 90 95

Cys Gln Val Pro Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Thr Gly Gly Ser Gly

100 105 110

Pro Gly Leu Ser Arg Ala Gly Ala Leu Ser Thr Gly Ala Leu Pro Pro

115 120 125

Leu Ala Pro Glu Gly Asp Ser Val Ala Ser Lys His Ala Ile Tyr Ala

130 135 140

Val Gln Val Ile Ala Asp Pro Pro Gly Pro Gly Glu Gly Pro Pro Ala

145 150 155 160

Gln His Ala Ala Phe Leu Val Pro Leu Gly Pro Gly Gln Ile Ser Ala

165 170 175

Glu Val Gln Ala Pro Pro Pro Val Val Asn Val Arg Val His His Pro

180 185 190

Pro Glu Ala Ser Val Gln Val His Arg Ile Glu Ser Ser Asn Ala Glu

195 200 205

Gly Ala Ala Pro Ser Gln His Leu Leu Pro His Pro Lys Pro Ser His

210 215 220

Pro Arg Pro Pro Thr Gln Lys Pro Leu Gly Arg Cys Phe Gln Asp Thr

225 230 235 240

Leu Pro Lys Gln Pro Cys Gly Ser Asn Pro Leu Pro Gly Leu Thr Lys

245 250 255

Gln Glu Asp Cys Cys Gly Ser Ile Gly Thr Ala Trp Gly Gln Ser Lys

260 265 270

Cys His Lys Cys Pro Gln Leu Gln Tyr Thr Gly Val Gln Lys Pro Gly

275 280 285

Pro Val Arg Gly Glu Val Gly Ala Asp Cys Pro Gln Gly Tyr Lys Arg

290 295 300

Leu Asn Ser Thr His Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Ala Met Pro Gly

305 310 315 320

Val Cys Arg His Gly Asp Cys Leu Asn Asn Pro Gly Ser Tyr Arg Cys

325 330 335

Val Cys Pro Pro Gly His Ser Leu Gly Pro Ser Arg Thr Gln Cys Ile

340 345 350

Ala Asp Lys Pro Glu Glu Lys Ser Leu Cys Phe Arg Leu Val Ser Pro

355 360 365

Glu His Gln Cys Gln His Pro Leu Thr Thr Arg Leu Thr Arg Gln Leu

370 375 380

Cys Cys Cys Ser Val Gly Lys Ala Trp Gly Ala Arg Cys Gln Arg Cys

385 390 395 400

Pro Ala Asp Gly Thr Ala Ala Phe Lys Glu Ile Cys Pro Ala Gly Lys

405 410 415

Gly Tyr His Ile Leu Thr Ser His Gln Thr Leu Thr Ile Gln Gly Glu

420 425 430

Ser Asp Phe Ser Leu Phe Leu His Pro Asp Gly Pro Pro Lys Pro Gln

435 440 445

Gln Leu Pro Glu Ser Pro Ser Gln Ala Pro Pro Pro Glu Asp Thr Glu

450 455 460

Glu Glu Arg Gly Val Thr Thr Asp Ser Pro Val Ser Glu Glu Arg Ser
465 470 475 480
Val Gln Gln Ser His Pro Thr Ala Thr Thr Ser Pro Ala Arg Pro Tyr
485 490 495
Pro Glu Leu Ile Ser Arg Pro Ser Pro Pro Thr Met Arg Trp Phe Leu
500 505 510
Pro Asp Leu Pro Pro Ser Arg Ser Ala Val Glu Ile Ala Pro Thr Gln

515 520 525
Val Thr Glu Thr Asp Glu Cys Arg Leu Asn Gln Asn Ile Cys Gly His
530 535 540
Gly Glu Cys Val Pro Gly Pro Pro Asp Tyr Ser Cys His Cys Asn Pro
545 550 555 560
Gly Tyr Arg Ser His Pro Gln His Arg Tyr Cys Val Asp Val Asn Glu
565 570 575
Cys Glu Ala Glu Pro Cys Gly Pro Gly Arg Gly Ile Cys Met Asn Thr

580 585 590
Gly Gly Ser Tyr Asn Cys His Cys Asn Arg Gly Tyr Arg Leu His Val
595 600 605
Gly Ala Gly Gly Arg Ser Cys Val Asp Leu Asn Glu Cys Ala Lys Pro
610 615 620
His Leu Cys Gly Asp Gly Gly Phe Cys Ile Asn Phe Pro Gly His Tyr
625 630 635 640
Lys Cys Asn Cys Tyr Pro Gly Tyr Arg Leu Lys Ala Ser Arg Pro Pro

645 650 655
Val Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Asp Pro Ser Ser Cys Pro Asp
660 665 670
Gly Lys Cys Glu Asn Lys Pro Gly Ser Phe Lys Cys Ile Ala Cys Gln
675 680 685
Pro Gly Tyr Arg Ser Gln Gly Gly Gly Ala Cys Arg Asp Val Asn Glu
690 695 700
Cys Ala Glu Gly Ser Pro Cys Ser Pro Gly Trp Cys Glu Asn Leu Pro

705 710 715 720

Gly Ser Phe Arg Cys Thr Cys Ala Gln Gly Tyr Ala Pro Ala Pro Asp

725 730 735

Gly Arg Ser Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Glu Ala Gly Asp Val Cys

740 745 750

Asp Asn Gly Ile Cys Thr Asn Thr Pro Gly Ser Phe Gln Cys Gln Cys

755 760 765

Leu Ser Gly Tyr His Leu Ser Arg Asp Arg Ser His Cys Glu Asp Ile

770 775 780

Asp Glu Cys Asp Phe Pro Ala Ala Cys Ile Gly Gly Asp Cys Ile Asn

785 790 795 800

Thr Asn Gly Ser Tyr Arg Cys Leu Cys Pro Gln Gly His Arg Leu Val

805 810 815

Gly Gly Arg Lys Cys Gln Asp Ile Asp Glu Cys Thr Gln Asp Pro Gly

820 825 830

Leu Cys Leu Pro His Gly Ala Cys Lys Asn Leu Gln Gly Ser Tyr Val

835 840 845

Cys Val Cys Asp Glu Gly Phe Thr Pro Thr Gln Asp Gln His Gly Cys

850 855 860

Glu Glu Val Glu Gln Pro His His Lys Lys Glu Cys Tyr Leu Asn Phe

865 870 875 880

Asp Asp Thr Val Phe Cys Asp Ser Val Leu Ala Thr Asn Val Thr Gln

885 890 895

Gln Glu Cys Cys Cys Ser Leu Gly Ala Gly Trp Gly Asp His Cys Glu

900 905 910

Ile Tyr Pro Cys Pro Val Tyr Ser Ser Ala Glu Phe His Ser Leu Cys

915 920 925

Pro Asp Gly Lys Gly Tyr Thr Gln Asp Asn Asn Ile Val Asn Tyr Gly

930 935 940

Ile Pro Ala His Arg Asp Ile Asp Glu Cys Met Leu Phe Gly Ala Glu

945 950 955 960

Ile Cys Lys Glu Gly Lys Cys Val Asn Thr Gln Pro Gly Tyr Glu Cys

965 970 975

Tyr Cys Lys Gln Gly Phe Tyr Tyr Asp Gly Asn Leu Leu Glu Cys Val

980 985 990

Asp Val Asp Glu Cys Leu Asp Glu Ser Asn Cys Arg Asn Gly Val Cys

995 1000 1005

Glu Asn Thr Arg Gly Gly Tyr Arg Cys Ala Cys Thr Pro Pro Ala

1010 1015 1020

Glu Tyr Ser Pro Ala Gln Arg Gln Cys Leu Ser Pro Glu Glu Met

1025 1030 1035

Asp Val Asp Glu Cys Gln Asp Pro Ala Ala Cys Arg Pro Gly Arg

1040 1045 1050

Cys Val Asn Leu Pro Gly Ser Tyr Arg Cys Glu Cys Arg Pro Pro

1055 1060 1065

Trp Val Pro Gly Pro Ser Gly Arg Asp Cys Gln Leu Pro Glu Ser

1070 1075 1080

Pro Ala Glu Arg Ala Pro Glu Arg Arg Asp Val Cys Trp Ser Gln

1085 1090 1095

Arg Gly Glu Asp Gly Met Cys Ala Gly Pro Gln Ala Gly Pro Ala

1100 1105 1110

Leu Thr Phe Asp Asp Cys Cys Cys Arg Gln Gly Arg Gly Trp Gly

1115 1120 1125

Ala Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro Arg Gly Ala Gly Ser Gln Cys

1130 1135 1140

Pro Thr Ser Gln Ser Glu Ser Asn Ser Phe Trp Asp Thr Ser Pro

1145 1150 1155

Leu Leu Leu Gly Lys Pro Arg Arg Asp Glu Asp Ser Ser Glu Glu

1160 1165 1170

Asp Ser Asp Glu Cys Arg Cys Val Ser Gly Arg Cys Val Pro Arg

1175 1180 1185

Pro Gly Gly Ala Val Cys Glu Cys Pro Gly Gly Phe Gln Leu Asp

1190 1195 1200

Ala Ser Arg Ala Arg Cys Val Asp Ile Asp Glu Cys Arg Glu Leu

1205 1210 1215

Asn Gln Arg Gly Leu Leu Cys Lys Ser Glu Arg Cys Val Asn Thr

1220 1225 1230

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

1235 1240 1245

Arg Pro His Gly Ala Cys Val Pro Gln Arg Arg Arg

1250 1255 1260

<210> 45

<211> 1228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic: LTBP3

<400> 45

Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ala Leu Ala Arg

1 5 10 15

Glu Arg Phe Lys Val Val Phe Ala Pro Val Ile Cys Lys Arg Thr Cys

20 25 30

Leu Lys Gly Gln Cys Arg Asp Ser Cys Gln Gln Gly Ser Asn Met Thr

35 40 45

Leu Ile Gly Glu Asn Gly His Ser Thr Asp Thr Leu Thr Gly Ser Ala

50 55 60

Phe Arg Val Val Val Cys Pro Leu Pro Cys Met Asn Gly Gly Gln Cys

65 70 75 80

Ser Ser Arg Asn Gln Cys Leu Cys Pro Pro Asp Phe Thr Gly Arg Phe

85 90 95

Cys Gln Val Pro Ala Ala Gly Thr Gly Ala Gly Thr Gly Ser Ser Gly

100 105 110

Pro Gly Leu Ala Arg Thr Gly Ala Met Ser Thr Gly Pro Leu Pro Pro

115 120 125

Leu Ala Pro Glu Gly Glu Ser Val Ala Ser Lys His Ala Ile Tyr Ala
130 135 140
Val Gln Val Ile Ala Asp Pro Pro Gly Pro Gly Glu Gly Pro Pro Ala
145 150 155 160
Gln His Ala Ala Phe Leu Val Pro Leu Gly Pro Gly Gln Ile Ser Ala
165 170 175
Glu Val Gln Ala Pro Pro Pro Val Val Asn Val Arg Val His His Pro
180 185 190

Pro Glu Ala Ser Val Gln Val His Arg Ile Glu Gly Pro Asn Ala Glu
195 200 205
Gly Pro Ala Ser Ser Gln His Leu Leu Pro His Pro Lys Pro Pro His
210 215 220
Pro Arg Pro Pro Thr Gln Lys Pro Leu Gly Arg Cys Phe Gln Asp Thr
225 230 235 240
Leu Pro Lys Gln Pro Cys Gly Ser Asn Pro Leu Pro Gly Leu Thr Lys
245 250 255

Gln Glu Asp Cys Cys Gly Ser Ile Gly Thr Ala Trp Gly Gln Ser Lys
260 265 270
Cys His Lys Cys Pro Gln Leu Gln Tyr Thr Gly Val Gln Lys Pro Val
275 280 285
Pro Val Arg Gly Glu Val Gly Ala Asp Cys Pro Gln Gly Tyr Lys Arg
290 295 300
Leu Asn Ser Thr His Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Ala Met Pro Gly
305 310 315 320

Asn Val Cys His Gly Asp Cys Leu Asn Asn Pro Gly Ser Tyr Arg Cys
325 330 335
Val Cys Pro Pro Gly His Ser Leu Gly Pro Leu Ala Ala Gln Cys Ile
340 345 350
Ala Asp Lys Pro Glu Glu Lys Ser Leu Cys Phe Arg Leu Val Ser Thr
355 360 365
Glu His Gln Cys Gln His Pro Leu Thr Thr Arg Leu Thr Arg Gln Leu

370 375 380

Cys Cys Cys Ser Val Gly Lys Ala Trp Gly Ala Arg Cys Gln Arg Cys
385 390 395 400
Pro Ala Asp Gly Thr Ala Ala Phe Lys Glu Ile Cys Pro Gly Lys Gly
405 410 415
Tyr His Ile Leu Thr Ser His Gln Thr Leu Thr Ile Gln Gly Glu Ser
420 425 430
Asp Phe Ser Leu Phe Leu His Pro Asp Gly Pro Pro Lys Pro Gln Gln
435 440 445

Leu Pro Glu Ser Pro Ser Arg Ala Pro Pro Leu Glu Asp Thr Glu Glu
450 455 460
Glu Arg Gly Val Thr Met Asp Pro Pro Val Ser Glu Glu Arg Ser Val
465 470 475 480
Gln Gln Ser His Pro Thr Thr Thr Thr Ser Pro Pro Arg Pro Tyr Pro
485 490 495
Glu Leu Ile Ser Arg Pro Ser Pro Pro Thr Phe His Arg Phe Leu Pro
500 505 510

Asp Leu Pro Pro Ser Arg Ser Ala Val Glu Ile Ala Pro Thr Gln Val
515 520 525
Thr Glu Thr Asp Glu Cys Arg Leu Asn Gln Asn Ile Cys Gly His Gly
530 535 540
Gln Cys Val Pro Gly Pro Ser Asp Tyr Ser Cys His Cys Asn Ala Gly
545 550 555 560
Tyr Arg Ser His Pro Gln His Arg Tyr Cys Val Asp Val Asn Glu Cys
565 570 575

Glu Ala Glu Pro Cys Gly Pro Gly Lys Gly Ile Cys Met Asn Thr Gly
580 585 590
Gly Ser Tyr Asn Cys His Cys Asn Arg Gly Tyr Arg Leu His Val Gly
595 600 605
Ala Gly Gly Arg Ser Cys Val Asp Leu Asn Glu Cys Ala Lys Pro His
610 615 620

Leu Cys Gly Asp Gly Gly Phe Cys Ile Asn Phe Pro Gly His Tyr Lys
625 630 635 640

Cys Asn Cys Tyr Pro Gly Tyr Arg Leu Lys Ala Ser Arg Pro Pro Ile
645 650 655
Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Asp Pro Ser Thr Cys Pro Asp Gly
660 665 670
Lys Cys Glu Asn Lys Pro Gly Ser Phe Lys Cys Ile Ala Cys Gln Pro
675 680 685
Gly Tyr Arg Ser Gln Gly Gly Gly Ala Cys Arg Asp Val Asn Glu Cys
690 695 700

Ser Glu Gly Thr Pro Cys Ser Pro Gly Trp Cys Glu Asn Leu Pro Gly
705 710 715 720
Ser Tyr Arg Cys Thr Cys Ala Gln Tyr Glu Pro Ala Gln Asp Gly Leu
725 730 735
Ser Cys Ile Asp Val Asp Glu Cys Glu Ala Gly Lys Val Cys Gln Asp
740 745 750
Gly Ile Cys Thr Asn Thr Pro Gly Ser Phe Gln Cys Gln Cys Leu Ser
755 760 765

Gly Tyr His Leu Ser Arg Asp Arg Ser Arg Cys Glu Asp Ile Asp Glu
770 775 780
Cys Asp Phe Pro Ala Ala Cys Ile Gly Gly Asp Cys Ile Asn Thr Asn
785 790 795 800
Gly Ser Tyr Arg Cys Leu Cys Pro Leu Gly His Arg Leu Val Gly Gly
805 810 815
Arg Lys Cys Lys Lys Asp Ile Asp Glu Cys Ser Gln Asp Pro Gly Leu
820 825 830

Cys Leu Pro His Ala Cys Glu Asn Leu Gln Gly Ser Tyr Val Cys Val
835 840 845
Cys Asp Glu Gly Phe Thr Leu Thr Gln Asp Gln His Gly Cys Glu Glu
850 855 860
Val Glu Gln Pro His His Lys Lys Glu Cys Tyr Leu Asn Phe Asp Asp

865 870 875 880

Thr Val Phe Cys Asp Ser Val Leu Ala Thr Asn Val Thr Gln Gln Glu

885 890 895

Cys Cys Cys Ser Leu Gly Ala Gly Trp Gly Asp His Cys Glu Ile Tyr

900 905 910

Pro Cys Pro Val Tyr Ser Ser Ala Glu Phe His Ser Leu Val Pro Asp

915 920 925

Gly Lys Arg Leu His Ser Gly Gln Gln His Cys Glu Leu Cys Ile Pro

930 935 940

Ala His Arg Asp Ile Asp Glu Cys Ile Leu Phe Gly Ala Glu Ile Cys

945 950 955 960

Lys Glu Gly Lys Cys Val Asn Thr Gln Pro Gly Tyr Glu Cys Tyr Cys

965 970 975

Lys Gln Gly Phe Tyr Tyr Asp Gly Asn Leu Leu Glu Cys Val Asp Val

980 985 990

Asp Glu Cys Leu Asp Glu Ser Asn Cys Arg Asn Gly Val Cys Glu Asn

995 1000 1005

Thr Arg Gly Gly Tyr Arg Cys Ala Cys Thr Pro Pro Ala Glu Tyr

1010 1015 1020

Ser Pro Ala Gln Ala Gln Cys Leu Ile Pro Glu Arg Trp Ser Thr

1025 1030 1035

Pro Gln Arg Asp Val Lys Cys Ala Gly Ala Ser Glu Glu Arg Thr

1040 1045 1050

Ala Cys Val Trp Gly Pro Trp Ala Gly Pro Ala Leu Thr Phe Asp

1055 1060 1065

Asp Cys Cys Cys Arg Gln Pro Arg Leu Gly Thr Gln Cys Arg Pro

1070 1075 1080

Cys Pro Pro Arg Gly Thr Gly Ser Gln Cys Pro Thr Ser Gln Ser

1085 1090 1095

Glu Ser Asn Ser Phe Trp Asp Thr Ser Pro Leu Leu Leu Gly Lys

1100 1105 1110

Ser Pro Arg Asp Glu Asp Ser Ser Glu Glu Asp Ser Asp Glu Cys
1115 1120 1125
Arg Cys Val Ser Gly Arg Cys Val Pro Arg Pro Gly Gly Ala Val
1130 1135 1140

Cys Glu Cys Pro Gly Gly Phe Gln Leu Asp Ala Ser Arg Ala Arg
1145 1150 1155
Cys Val Asp Ile Asp Glu Cys Arg Glu Leu Asn Gln Arg Gly Leu
1160 1165 1170
Leu Cys Lys Ser Glu Arg Cys Val Asn Thr Ser Gly Ser Phe Arg
1175 1180 1185
Cys Val Cys Lys Ala Gly Phe Thr Arg Ser Arg Pro His Gly Pro
1190 1195 1200

Ala Cys Leu Ser Ala Ala Ala Asp Asp Ala Ala Ile Ala His Thr
1205 1210 1215
Ser Val Ile Asp His Arg Gly Tyr Phe His
1220 1225

<210> 46
<211> 1373
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: LTBP1S
<400> 46
Asn His Thr Gly Arg Ile Lys Val Val Phe Thr Pro Ser Ile Cys Lys
1 5 10 15
Val Thr Cys Thr Lys Gly Ser Cys Gln Asn Ser Cys Glu Lys Gly Asn

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

Gly Lys Leu Cys Gln Ile Pro Val His Gly Ala Ser Val Pro Lys Leu

85 90 95

Tyr Gln His Ser Gln Gln Pro Gly Lys Ala Leu Gly Thr His Val Ile

100 105 110

His Ser Thr His Thr Leu Pro Leu Thr Val Thr Ser Gln Gln Gly Val

115 120 125

Lys Val Lys Phe Pro Pro Asn Ile Val Asn Ile His Val Lys His Pro

130 135 140

Pro Glu Ala Ser Val Gln Ile His Gln Val Ser Arg Ile Asp Gly Pro

145 150 155 160

Thr Gly Gln Lys Thr Lys Glu Ala Gln Pro Gly Gln Ser Gln Val Ser

165 170 175

Tyr Gln Gly Leu Pro Val Gln Lys Thr Gln Thr Ile His Ser Thr Tyr

180 185 190

Ser His Gln Gln Val Ile Pro His Val Tyr Pro Val Ala Ala Lys Thr

195 200 205

Gln Leu Gly Arg Cys Phe Gln Glu Thr Ile Gly Ser Gln Cys Gly Lys

210 215 220

Ala Leu Pro Gly Leu Ser Lys Gln Glu Asp Cys Cys Gly Thr Val Gly

225 230 235 240

Thr Ser Trp Gly Phe Asn Lys Cys Gln Lys Cys Pro Lys Lys Pro Ser

245 250 255

Tyr His Gly Tyr Asn Gln Met Met Glu Cys Leu Pro Gly Tyr Lys Arg

260 265 270

Val Asn Asn Thr Phe Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Gln Leu Gln Gly

275 280 285

Val Cys Pro Asn Gly Glu Cys Leu Asn Thr Met Gly Ser Tyr Arg Cys

290 295 300

Thr Cys Lys Ile Gly Phe Gly Pro Asp Pro Thr Phe Ser Ser Cys Val

305 310 315 320

Pro Asp Pro Pro Val Ile Ser Glu Glu Lys Gly Pro Cys Tyr Arg Leu

325 330 335

Val Ser Ser Gly Arg Gln Cys Met His Pro Leu Ser Val His Leu Thr

340 345 350

Lys Gln Leu Cys Cys Cys Ser Val Gly Lys Ala Trp Gly Pro His Cys

355 360 365

Glu Lys Cys Pro Leu Pro Gly Thr Ala Ala Phe Lys Glu Ile Cys Pro

370 375 380

Gly Gly Met Gly Tyr Thr Val Ser Gly Val His Arg Arg Arg Pro Ile

385 390 395 400

His His His Val Gly Lys Gly Pro Val Phe Val Lys Pro Lys Asn Thr

405 410 415

Gln Pro Val Ala Lys Ser Thr His Pro Pro Pro Leu Pro Ala Lys Glu

420 425 430

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

435 440 445

Ala Glu Pro Glu Val Ala Thr Ala Pro Pro Glu Lys Glu Ile Pro Ser

450 455 460

Leu Asp Gln Glu Lys Thr Lys Leu Glu Pro Gly Gln Pro Gln Leu Ser

465 470 475 480

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

485 490 495

Glu Lys Thr Ser Pro Pro Val Pro Val Glu Val Ala Pro Glu Ala Ser

500 505 510

Thr Ser Ser Ala Ser Gln Val Ile Ala Pro Thr Gln Val Thr Glu Ile

515 520 525

Asn Glu Cys Thr Val Asn Pro Asp Ile Cys Gly Ala Gly His Cys Ile

530 535 540

Asn Leu Pro Val Arg Tyr Thr Cys Ile Cys Tyr Glu Gly Tyr Lys Phe

545 550 555 560

Ser Glu Gln Gln Arg Lys Cys Val Asp Ile Asp Glu Cys Thr Gln Val

565 570 575

Gln His Leu Cys Ser Gln Gly Arg Cys Glu Asn Thr Glu Gly Ser Phe
580 585 590
Leu Cys Ile Cys Pro Ala Gly Phe Met Ala Ser Glu Glu Gly Thr Asn

595 600 605
Cys Ile Asp Val Asp Glu Cys Leu Arg Pro Asp Val Cys Gly Glu Gly
610 615 620
His Cys Val Asn Thr Val Gly Ala Phe Arg Cys Glu Tyr Cys Asp Ser
625 630 635 640
Gly Tyr Arg Met Thr Gln Arg Gly Arg Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys
645 650 655
Leu Asn Pro Ser Thr Cys Pro Asp Glu Gln Cys Val Asn Ser Pro Gly

660 665 670
Ser Tyr Gln Cys Val Pro Cys Thr Glu Gly Phe Arg Gly Trp Asn Gly
675 680 685
Gln Cys Leu Asp Val Asp Glu Cys Leu Glu Pro Asn Val Cys Thr Asn
690 695 700
Gly Asp Cys Ser Asn Leu Glu Gly Ser Tyr Met Cys Ser Cys His Lys
705 710 715 720
Gly Tyr Thr Arg Thr Pro Asp His Lys His Cys Lys Asp Ile Asp Glu

725 730 735
Cys Gln Gln Gly Asn Leu Cys Val Asn Gly Gln Cys Lys Asn Thr Glu
740 745 750
Gly Ser Phe Arg Cys Thr Cys Gly Gln Gly Tyr Gln Leu Ser Ala Ala
755 760 765
Lys Asp Gln Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln His His His Leu Cys
770 775 780
Ala His Gly Gln Cys Arg Asn Thr Glu Gly Ser Phe Gln Cys Val Cys

785 790 795 800
Asp Gln Gly Tyr Arg Ala Ser Gly Leu Gly Asp His Cys Glu Asp Ile
805 810 815
Asn Glu Cys Leu Glu Asp Lys Ser Val Cys Gln Arg Gly Asp Cys Ile

820 825 830

Asn Thr Ala Gly Ser Tyr Asp Cys Thr Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu

835 840 845

Asp Asp Asn Lys Thr Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Pro Gly

850 855 860

Leu Cys Gly Pro Gln Gly Glu Cys Leu Asn Thr Glu Gly Ser Phe His

865 870 875 880

Cys Val Cys Gln Gln Gly Phe Ser Ile Ser Ala Asp Gly Arg Thr Cys

885 890 895

Glu Asp Ile Asp Glu Cys Val Asn Asn Thr Val Cys Asp Ser His Gly

900 905 910

Phe Cys Asp Asn Thr Ala Gly Ser Phe Arg Cys Leu Cys Tyr Gln Gly

915 920 925

Phe Gln Ala Pro Gln Asp Gly Gln Gly Cys Val Asp Val Asn Glu Cys

930 935 940

Glu Leu Leu Ser Gly Val Cys Gly Glu Ala Phe Cys Glu Asn Val Glu

945 950 955 960

Gly Ser Phe Leu Cys Val Cys Ala Asp Glu Asn Gln Glu Tyr Ser Pro

965 970 975

Met Thr Gly Gln Cys Arg Ser Arg Thr Ser Thr Asp Leu Asp Val Glu

980 985 990

Gln Pro Lys Glu Glu Lys Lys Glu Cys Tyr Tyr Asn Leu Asn Asp Ala

995 1000 1005

Ser Leu Cys Asp Asn Val Leu Ala Pro Asn Val Thr Lys Gln Glu

1010 1015 1020

Cys Cys Cys Thr Ser Gly Ala Gly Trp Gly Asp Asn Cys Glu Ile

1025 1030 1035

Phe Pro Cys Pro Val Leu Gly Thr Ala Glu Phe Thr Glu Met Cys

1040 1045 1050

Pro Lys Gly Lys Gly Phe Val Pro Ala Gly Glu Ser Ser Ser Glu

1055 1060 1065

Ala Gly Gly Glu Asn Tyr Lys Asp Ala Asp Glu Cys Leu Leu Phe

1070 1075 1080

Gly Gln Glu Ile Cys Lys Asn Gly Phe Cys Leu Asn Thr Arg Pro

1085 1090 1095

Gly Tyr Glu Cys Tyr Cys Lys Gln Gly Thr Tyr Tyr Asp Pro Val

1100 1105 1110

Lys Leu Gln Cys Phe Asp Met Asp Glu Cys Gln Asp Pro Ser Ser

1115 1120 1125

Cys Ile Asp Gly Gln Cys Val Asn Thr Glu Gly Ser Tyr Asn Cys

1130 1135 1140

Phe Cys Thr His Pro Met Val Leu Asp Ala Ser Glu Lys Arg Cys

1145 1150 1155

Ile Arg Pro Ala Glu Ser Asn Glu Gln Ile Glu Glu Thr Asp Val

1160 1165 1170

Tyr Gln Asp Leu Cys Trp Glu His Leu Ser Asp Glu Tyr Val Cys

1175 1180 1185

Ser Arg Pro Leu Val Gly Lys Gln Thr Thr Tyr Thr Glu Cys Cys

1190 1195 1200

Cys Leu Tyr Gly Glu Ala Trp Gly Met Gln Cys Ala Leu Cys Pro

1205 1210 1215

Met Lys Asp Ser Asp Asp Tyr Ala Gln Leu Cys Asn Ile Pro Val

1220 1225 1230

Thr Gly Arg Arg Gln Pro Tyr Gly Arg Asp Ala Leu Val Asp Phe

1235 1240 1245

Ser Glu Gln Tyr Ala Pro Glu Ala Asp Pro Tyr Phe Ile Gln Asp

1250 1255 1260

Arg Phe Leu Asn Ser Phe Glu Glu Leu Gln Ala Glu Glu Cys Gly

1265 1270 1275

Ile Leu Asn Gly Cys Glu Asn Gly Arg Cys Val Arg Val Gln Glu

1280 1285 1290

Gly Tyr Thr Cys Asp Cys Phe Asp Gly Tyr His Leu Asp Thr Ala

1295 1300 1305

Lys Met Thr Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Asp Glu Leu Asn Asn

1310 1315 1320

Arg Met Ser Leu Cys Lys Asn Ala Lys Cys Ile Asn Thr Glu Gly

1325 1330 1335

Ser Tyr Lys Cys Leu Cys Leu Pro Gly Tyr Val Pro Ser Asp Lys

1340 1345 1350

Pro Asn Tyr Cys Thr Pro Leu Asn Thr Ala Leu Asn Leu Glu Lys

1355 1360 1365

Asp Ser Asp Leu Glu

1370

<210> 47

<211> 1374

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: LTBP1S

<400> 47

Asn His Thr Gly Arg Ile Lys Val Val Phe Thr Pro Ser Ile Cys Lys

1 5 10 15

Val Thr Cys Thr Lys Gly Asn Cys Gln Asn Ser Cys Gln Lys Gly Asn

20 25 30

Thr Thr Thr Leu Ile Ser Glu Asn Gly His Ala Ala Asp Thr Leu Thr

35 40 45

Ala Thr Asn Phe Arg Val Val Ile Cys His Leu Pro Cys Met Asn Gly

50 55 60

Gly Gln Cys Ser Ser Arg Asp Lys Cys Gln Cys Pro Pro Asn Phe Thr

65 70 75 80

Gly Lys Leu Cys Gln Ile Pro Val Leu Gly Ala Ser Met Pro Lys Leu

85 90 95

Tyr Gln His Ala Gln Gln Gln Gly Lys Ala Leu Gly Ser His Val Ile

100 105 110

His Ser Thr His Thr Leu Pro Leu Thr Met Thr Ser Gln Gln Gly Val

115 120 125

Lys Val Lys Phe Pro Pro Asn Ile Val Asn Ile His Val Lys His Pro

130 135 140

Pro Glu Ala Ser Val Gln Ile His Gln Val Ser Arg Ile Asp Ser Pro

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Gln Gly Leu Pro Val Gln Lys Thr Gln Thr Val His Ser Thr Tyr

180 185 190

Ser His Gln Gln Leu Ile Pro His Val Tyr Pro Val Ala Ala Lys Thr

195 200 205

Gln Leu Gly Arg Cys Phe Gln Glu Thr Ile Gly Ser Gln Cys Gly Lys

210 215 220

Ala Leu Pro Gly Leu Ser Lys Gln Glu Asp Cys Cys Gly Thr Val Gly

225 230 235 240

Thr Ser Trp Gly Phe Asn Lys Cys Gln Lys Cys Pro Lys Lys Gln Ser

245 250 255

Tyr His Gly Tyr Thr Gln Met Met Glu Cys Leu Gln Gly Tyr Lys Arg

260 265 270

Val Asn Asn Thr Phe Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Gln Leu Gln Gly

275 280 285

Val Cys Pro Asn Gly Glu Cys Leu Asn Thr Met Gly Ser Tyr Arg Cys

290 295 300

Ser Cys Lys Met Gly Phe Gly Pro Asp Pro Thr Phe Ser Ser Cys Val

305 310 315 320

Pro Asp Pro Pro Val Ile Ser Glu Glu Lys Gly Pro Cys Tyr Arg Leu

325 330 335

Val Ser Pro Gly Arg His Cys Met His Pro Leu Ser Val His Leu Thr

340 345 350

Lys Gln Ile Cys Cys Cys Ser Val Gly Lys Ala Trp Gly Pro His Cys

355 360 365

Glu Lys Cys Pro Leu Pro Gly Thr Ala Ala Phe Lys Glu Ile Cys Pro

370 375 380

Gly Gly Met Gly Tyr Thr Val Ser Gly Val His Arg Arg Arg Pro Ile

385 390 395 400

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

405 410 415

Gln Pro Val Ala Lys Ser Thr His Pro Pro Pro Leu Pro Ala Lys Glu

420 425 430

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

435 440 445

Ala Glu Pro Glu Val Val Thr Ala Pro Pro Glu Lys Glu Ile Pro Ser

450 455 460

Leu Asp Gln Glu Lys Thr Arg Leu Glu Pro Gly Gln Pro Gln Leu Ser

465 470 475 480

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

485 490 495

Glu Lys Thr Ser Pro Pro Val Pro Val Glu Val Ala Pro Glu Ala Ser

500 505 510

Thr Ser Ser Ala Ser Gln Val Ile Ala Pro Thr Gln Val Thr Glu Ile

515 520 525

Asn Glu Cys Thr Val Asn Pro Asp Ile Cys Gly Ala Gly His Cys Ile

530 535 540

Asn Leu Pro Val Arg Tyr Thr Cys Ile Cys Tyr Glu Gly Tyr Lys Phe

545 550 555 560

Ser Glu Gln Leu Arg Lys Cys Val Asp Ile Asp Glu Cys Ala Gln Val

565 570 575

Arg His Leu Cys Ser Gln Gly Arg Cys Glu Asn Thr Glu Gly Ser Phe

580 585 590

Leu Cys Val Cys Pro Ala Gly Phe Met Ala Ser Glu Glu Gly Thr Asn

595 600 605

Cys Ile Asp Val Asp Glu Cys Leu Arg Pro Asp Met Cys Arg Asp Gly

610 615 620

Arg Cys Ile Asn Thr Ala Gly Ala Phe Arg Cys Glu Tyr Cys Asp Ser

625 630 635 640

Gly Tyr Arg Met Ser Arg Arg Gly Tyr Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys

645 650 655

Leu Lys Pro Ser Thr Cys Pro Glu Glu Gln Cys Val Asn Thr Pro Gly

660 665 670

Ser Tyr Gln Cys Val Pro Cys Thr Glu Gly Phe Arg Gly Trp Asn Gly

675 680 685

Gln Cys Leu Asp Val Asp Glu Cys Leu Gln Pro Lys Val Cys Thr Asn

690 695 700

Gly Ser Cys Thr Asn Leu Glu Gly Ser Tyr Met Cys Ser Cys His Arg

705 710 715 720

Gly Tyr Ser Pro Thr Pro Asp His Arg His Cys Gln Asp Ile Asp Glu

725 730 735

Cys Gln Gln Gly Asn Leu Cys Met Asn Gly Gln Cys Arg Asn Thr Asp

740 745 750

Gly Ser Phe Arg Cys Thr Cys Gly Gln Gly Tyr Gln Leu Ser Ala Ala

755 760 765

Lys Asp Gln Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Glu His His His Leu Cys

770 775 780

Ser His Gly Gln Cys Arg Asn Thr Glu Gly Ser Phe Gln Cys Val Cys

785 790 795 800

Asn Gln Gly Tyr Arg Ala Ser Val Leu Gly Asp His Cys Glu Asp Ile

805 810 815

Asn Glu Cys Leu Glu Asp Ser Ser Val Cys Gln Gly Gly Asp Cys Ile

820 825 830

Asn Thr Ala Gly Ser Tyr Asp Cys Thr Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu

835 840 845

Asn Asp Asn Lys Gly Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Ala Gln Pro Gly

850 855 860

Leu Cys Gly Ser His Gly Glu Cys Leu Asn Thr Gln Gly Ser Phe His
865 870 875 880
Cys Val Cys Glu Gln Gly Phe Ser Ile Ser Ala Asp Gly Arg Thr Cys
885 890 895
Glu Asp Ile Asp Glu Cys Val Asn Asn Thr Val Cys Asp Ser His Gly
900 905 910
Phe Cys Asp Asn Thr Ala Gly Ser Phe Arg Cys Leu Cys Tyr Gln Gly

915 920 925
Phe Gln Ala Pro Gln Asp Gly Gln Gly Cys Val Asp Val Asn Glu Cys
930 935 940
Glu Leu Leu Ser Gly Val Cys Gly Glu Ala Phe Cys Glu Asn Val Glu
945 950 955 960
Gly Ser Phe Leu Cys Val Cys Ala Asp Glu Asn Gln Glu Tyr Ser Pro
965 970 975
Met Thr Gly Gln Cys Arg Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Gly Val Asp

980 985 990
Arg Gln Pro Arg Glu Glu Lys Lys Glu Cys Tyr Tyr Asn Leu Asn Asp
995 1000 1005
Ala Ser Leu Cys Asp Asn Val Leu Ala Pro Asn Val Thr Lys Gln
1010 1015 1020
Glu Cys Cys Cys Thr Ser Gly Ala Gly Trp Gly Asp Asn Cys Glu
1025 1030 1035
Ile Phe Pro Cys Pro Val Gln Gly Thr Ala Glu Phe Thr Glu Met

1040 1045 1050
Cys Pro Arg Gly Lys Gly Leu Val Pro Ala Gly Glu Ser Ser Tyr
1055 1060 1065
Asp Thr Gly Gly Glu Asn Tyr Lys Asp Ala Asp Glu Cys Leu Leu
1070 1075 1080
Phe Gly Glu Glu Ile Cys Lys Asn Gly Tyr Cys Leu Asn Thr Gln
1085 1090 1095
Pro Gly Tyr Glu Cys Tyr Cys Lys Gln Gly Thr Tyr Tyr Asp Pro

1100 1105 1110

Val Lys Leu Gln Cys Phe Asp Met Asp Glu Cys Gln Asp Pro Asn

1115 1120 1125

Ser Cys Ile Asp Gly Gln Cys Val Asn Thr Glu Gly Ser Tyr Asn

1130 1135 1140

Cys Phe Cys Thr His Pro Met Val Leu Asp Ala Ser Glu Lys Arg

1145 1150 1155

Cys Val Gln Pro Thr Glu Ser Asn Glu Gln Ile Glu Glu Thr Asp

1160 1165 1170

Val Tyr Gln Asp Leu Cys Trp Glu His Leu Ser Glu Glu Tyr Val

1175 1180 1185

Cys Ser Arg Pro Leu Val Gly Lys Gln Thr Thr Tyr Thr Glu Cys

1190 1195 1200

Cys Cys Leu Tyr Gly Glu Ala Trp Gly Met Gln Cys Ala Leu Cys

1205 1210 1215

Pro Met Lys Asp Ser Asp Asp Tyr Ala Gln Leu Cys Asn Ile Pro

1220 1225 1230

Val Thr Gly Arg Arg Arg Pro Tyr Gly Arg Asp Ala Leu Val Asp

1235 1240 1245

Phe Ser Glu Gln Tyr Gly Pro Glu Thr Asp Pro Tyr Phe Ile Gln

1250 1255 1260

Asp Arg Phe Leu Asn Ser Phe Glu Glu Leu Gln Ala Glu Glu Cys

1265 1270 1275

Gly Ile Leu Asn Gly Cys Glu Asn Gly Arg Cys Val Arg Val Gln

1280 1285 1290

Glu Gly Tyr Thr Cys Asp Cys Phe Asp Gly Tyr His Leu Asp Met

1295 1300 1305

Ala Lys Met Thr Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Ser Glu Leu Asn

1310 1315 1320

Asn Arg Met Ser Leu Cys Lys Asn Ala Lys Cys Ile Asn Thr Glu

1325 1330 1335

Gly Ser Tyr Lys Cys Leu Cys Leu Pro Gly Tyr Ile Pro Ser Asp

1340 1345 1350

Lys Pro Asn Tyr Cys Thr Pro Leu Asn Ser Ala Leu Asn Leu Asp

1355 1360 1365

Lys Glu Ser Asp Leu Glu

1370

<210> 48

<211> 646

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: GARP

<400> 48

Ile Ser Gln Arg Arg Glu Gln Val Pro Cys Arg Thr Val Asn Lys Glu

1 5 10 15

Ala Leu Cys His Gly Leu Gly Leu Leu Gln Val Pro Ser Val Leu Ser

20 25 30

Leu Asp Ile Gln Ala Leu Tyr Leu Ser Gly Asn Gln Leu Gln Ser Ile

35 40 45

Leu Val Ser Pro Leu Gly Phe Tyr Thr Ala Leu Arg His Leu Asp Leu

50 55 60

Ser Asp Asn Gln Ile Ser Phe Leu Gln Ala Gly Val Phe Gln Ala Leu

65 70 75 80

Pro Tyr Leu Glu His Leu Asn Leu Ala His Asn Arg Leu Ala Thr Gly

85 90 95

Met Ala Leu Asn Ser Gly Gly Leu Gly Arg Leu Pro Leu Leu Val Ser

100 105 110

Leu Asp Leu Ser Gly Asn Ser Leu His Gly Asn Leu Val Glu Arg Leu

115 120 125

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

130 135 140

Leu Thr Arg Leu Ala Arg His Thr Phe Trp Gly Met Pro Ala Val Glu

145 150 155 160

Gln Leu Asp Leu His Ser Asn Val Leu Met Asp Ile Glu Asp Gly Ala

165 170 175

Phe Glu Ala Leu Pro His Leu Thr His Leu Asn Leu Ser Arg Asn Ser

180 185 190

Leu Thr Cys Ile Ser Asp Phe Ser Leu Gln Gln Leu Gln Val Leu Asp

195 200 205

Leu Ser Cys Asn Ser Ile Glu Ala Phe Gln Thr Ala Pro Glu Pro Gln

210 215 220

Ala Gln Phe Gln Leu Ala Trp Leu Asp Leu Arg Glu Asn Lys Leu Leu

225 230 235 240

His Phe Pro Asp Leu Ala Val Phe Pro Arg Leu Ile Tyr Leu Asn Val

245 250 255

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

260 265 270

Asp Leu His Ala Pro Ser Glu Gly Trp Ser Ala Ser Pro Leu Ser Asn

275 280 285

Pro Ser Arg Asn Ala Ser Thr His Pro Leu Ser Gln Leu Leu Asn Leu

290 295 300

Asp Leu Ser Tyr Asn Glu Ile Glu Leu Val Pro Ala Ser Phe Leu Glu

305 310 315 320

His Leu Thr Ser Leu Arg Phe Leu Asn Leu Ser Arg Asn Cys Leu Arg

325 330 335

Ser Phe Glu Ala Arg Gln Val Asp Ser Leu Pro Cys Leu Val Leu Leu

340 345 350

Asp Leu Ser His Asn Val Leu Glu Ala Leu Glu Leu Gly Thr Lys Val

355 360 365

Leu Gly Ser Leu Gln Thr Leu Leu Leu Gln Asp Asn Ala Leu Gln Glu

370 375 380

Leu Pro Pro Tyr Thr Phe Ala Ser Leu Ala Ser Leu Gln Arg Leu Asn

385 390 395 400

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

405 410 415

Pro Pro Gly Cys Val Asp Phe Ser Gly Ile Pro Thr Leu His Val Leu

420 425 430

Asn Met Ala Gly Asn Ser Met Gly Met Leu Arg Ala Gly Ser Phe Leu

435 440 445

His Thr Pro Leu Thr Glu Leu Asp Leu Ser Thr Asn Pro Gly Leu Asp

450 455 460

Val Ala Thr Gly Ala Leu Val Gly Leu Glu Ala Ser Leu Glu Val Leu

465 470 475 480

Glu Leu Gln Gly Asn Gly Leu Thr Val Leu Arg Val Asp Leu Pro Cys

485 490 495

Phe Leu Arg Leu Lys Arg Leu Asn Leu Ala Glu Asn Gln Leu Ser His

500 505 510

Leu Pro Ala Trp Thr Arg Ala Val Ser Leu Glu Val Leu Asp Leu Arg

515 520 525

Asn Asn Ser Phe Ser Leu Leu Pro Gly Asn Ala Met Gly Gly Leu Glu

530 535 540

Thr Ser Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Gln Gly Asn Pro Leu Ser Cys Cys

545 550 555 560

Gly Asn Gly Trp Leu Ala Ala Gln Leu His Gln Gly Arg Val Asp Val

565 570 575

Asp Ala Thr Gln Asp Leu Ile Cys Arg Phe Gly Ser Gln Glu Glu Leu

580 585 590

Ser Leu Ser Leu Val Arg Pro Glu Asp Cys Glu Lys Gly Gly Leu Lys

595 600 605

Asn Val Asn Leu Ile Leu Leu Leu Ser Phe Thr Leu Val Ser Ala Ile

610 615 620

Val Leu Thr Thr Leu Ala Thr Ile Cys Phe Leu Arg Arg Gln Lys Leu

625 630 635 640

Ser Gln Gln Tyr Lys Ala

645

<210> 49

<211> 611

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: sGARP

<400> 49

Ile Ser Gln Arg Arg Glu Gln Val Pro Cys Arg Thr Val Asn Lys Glu

1 5 10 15

Ala Leu Cys His Gly Leu Gly Leu Leu Gln Val Pro Ser Val Leu Ser

20 25 30

Leu Asp Ile Gln Ala Leu Tyr Leu Ser Gly Asn Gln Leu Gln Ser Ile

35 40 45

Leu Val Ser Pro Leu Gly Phe Tyr Thr Ala Leu Arg His Leu Asp Leu

50 55 60

Ser Asp Asn Gln Ile Ser Phe Leu Gln Ala Gly Val Phe Gln Ala Leu

65 70 75 80

Pro Tyr Leu Glu His Leu Asn Leu Ala His Asn Arg Leu Ala Thr Gly

85 90 95

Met Ala Leu Asn Ser Gly Gly Leu Gly Arg Leu Pro Leu Leu Val Ser

100 105 110

Leu Asp Leu Ser Gly Asn Ser Leu His Gly Asn Leu Val Glu Arg Leu

115 120 125

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

130 135 140

Leu Thr Arg Leu Ala Arg His Thr Phe Trp Gly Met Pro Ala Val Glu

145 150 155 160

Gln Leu Asp Leu His Ser Asn Val Leu Met Asp Ile Glu Asp Gly Ala

165 170 175

Phe Glu Ala Leu Pro His Leu Thr His Leu Asn Leu Ser Arg Asn Ser

180 185 190

Leu Thr Cys Ile Ser Asp Phe Ser Leu Gln Gln Leu Gln Val Leu Asp

195 200 205

Leu Ser Cys Asn Ser Ile Glu Ala Phe Gln Thr Ala Pro Glu Pro Gln

210 215 220

Ala Gln Phe Gln Leu Ala Trp Leu Asp Leu Arg Glu Asn Lys Leu Leu

225 230 235 240

His Phe Pro Asp Leu Ala Val Phe Pro Arg Leu Ile Tyr Leu Asn Val

245 250 255

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

260 265 270

Asp Leu His Ala Pro Ser Glu Gly Trp Ser Ala Ser Pro Leu Ser Asn

275 280 285

Pro Ser Arg Asn Ala Ser Thr His Pro Leu Ser Gln Leu Leu Asn Leu

290 295 300

Asp Leu Ser Tyr Asn Glu Ile Glu Leu Val Pro Ala Ser Phe Leu Glu

305 310 315 320

His Leu Thr Ser Leu Arg Phe Leu Asn Leu Ser Arg Asn Cys Leu Arg

325 330 335

Ser Phe Glu Ala Arg Gln Val Asp Ser Leu Pro Cys Leu Val Leu Leu

340 345 350

Asp Leu Ser His Asn Val Leu Glu Ala Leu Glu Leu Gly Thr Lys Val

355 360 365

Leu Gly Ser Leu Gln Thr Leu Leu Leu Gln Asp Asn Ala Leu Gln Glu

370 375 380

Leu Pro Pro Tyr Thr Phe Ala Ser Leu Ala Ser Leu Gln Arg Leu Asn

385 390 395 400

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

405 410 415

Pro Pro Gly Cys Val Asp Phe Ser Gly Ile Pro Thr Leu His Val Leu

420 425 430

Asn Met Ala Gly Asn Ser Met Gly Met Leu Arg Ala Gly Ser Phe Leu

435 440 445

His Thr Pro Leu Thr Glu Leu Asp Leu Ser Thr Asn Pro Gly Leu Asp

450 455 460

Val Ala Thr Gly Ala Leu Val Gly Leu Glu Ala Ser Leu Glu Val Leu

465 470 475 480

Glu Leu Gln Gly Asn Gly Leu Thr Val Leu Arg Val Asp Leu Pro Cys

485 490 495

Phe Leu Arg Leu Lys Arg Leu Asn Leu Ala Glu Asn Gln Leu Ser His

500 505 510

Leu Pro Ala Trp Thr Arg Ala Val Ser Leu Glu Val Leu Asp Leu Arg

515 520 525

Asn Asn Ser Phe Ser Leu Leu Pro Gly Asn Ala Met Gly Gly Leu Glu

530 535 540

Thr Ser Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Gln Gly Asn Pro Leu Ser Cys Cys

545 550 555 560

Gly Asn Gly Trp Leu Ala Ala Gln Leu His Gln Gly Arg Val Asp Val

565 570 575

Asp Ala Thr Gln Asp Leu Ile Cys Arg Phe Gly Ser Gln Glu Glu Leu

580 585 590

Ser Leu Ser Leu Val Arg Pro Glu Asp Cys Glu Lys Gly Gly Leu Lys

595 600 605

Asn Val Asn

610

<210> 50

<211> 1375

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: LTBP1S

<400> 50

Asn His Thr Gly Arg Ile Lys Val Val Phe Thr Pro Ser Ile Cys Lys

1 5 10 15

Val Thr Cys Thr Lys Gly Ser Cys Gln Asn Ser Cys Glu Lys Gly Asn

20 25 30

Thr Thr Thr Leu Ile Ser Glu Asn Gly His Ala Ala Asp Thr Leu Thr

35 40 45

Ala Thr Asn Phe Arg Val Val Ile Cys His Leu Pro Cys Met Asn Gly

50 55 60

Gly Gln Cys Ser Ser Arg Asp Lys Cys Gln Cys Pro Pro Asn Phe Thr

65 70 75 80

Gly Lys Leu Cys Gln Ile Pro Val His Gly Ala Ser Val Pro Lys Leu

85 90 95

Tyr Gln His Ser Gln Gln Pro Gly Lys Ala Leu Gly Thr His Val Ile

100 105 110

His Ser Thr His Thr Leu Pro Leu Thr Val Thr Ser Gln Gln Gly Val

115 120 125

Lys Val Lys Phe Pro Pro Asn Ile Val Asn Ile His Val Lys His Pro

130 135 140

Pro Glu Ala Ser Val Gln Ile His Gln Val Ser Arg Ile Asp Gly Pro

145 150 155 160

Thr Gly Gln Lys Thr Lys Glu Ala Gln Pro Gly Gln Ser Gln Val Ser

165 170 175

Tyr Gln Gly Leu Pro Val Gln Lys Thr Gln Thr Ile His Ser Thr Tyr

180 185 190

Ser His Gln Gln Val Ile Pro His Val Tyr Pro Val Ala Ala Lys Thr

195 200 205

Gln Leu Gly Arg Cys Phe Gln Glu Thr Ile Gly Ser Gln Cys Gly Lys

210 215 220

Ala Leu Pro Gly Leu Ser Lys Gln Glu Asp Cys Cys Gly Thr Val Gly

225 230 235 240

Thr Ser Trp Gly Phe Asn Lys Cys Gln Lys Cys Pro Lys Lys Pro Ser

245 250 255

Tyr His Gly Tyr Asn Gln Met Met Glu Cys Leu Pro Gly Tyr Lys Arg

260 265 270

Val Asn Asn Thr Phe Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Gln Leu Gln Gly

275 280 285

Val Cys Pro Asn Gly Glu Cys Leu Asn Thr Met Gly Ser Tyr Arg Cys

290 295 300

Thr Cys Lys Ile Gly Phe Gly Pro Asp Pro Thr Phe Ser Ser Cys Val

305 310 315 320

Pro Asp Pro Pro Val Ile Ser Glu Glu Lys Gly Pro Cys Tyr Arg Leu

325 330 335

Val Ser Ser Gly Arg Gln Cys Met His Pro Leu Ser Val His Leu Thr

340 345 350

Lys Gln Leu Cys Cys Cys Ser Val Gly Lys Ala Trp Gly Pro His Cys

355 360 365

Glu Lys Cys Pro Leu Pro Gly Thr Ala Ala Phe Lys Glu Ile Cys Pro

370 375 380

Gly Gly Met Gly Tyr Thr Val Ser Gly Val His Arg Arg Arg Pro Ile

385 390 395 400

His His His Val Gly Lys Gly Pro Val Phe Val Lys Pro Lys Asn Thr

405 410 415

Gln Pro Val Ala Lys Ser Thr His Pro Pro Pro Leu Pro Ala Lys Glu

420 425 430

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

435 440 445

Ala Glu Pro Glu Val Ala Thr Ala Pro Pro Glu Lys Glu Ile Pro Ser

450 455 460

Leu Asp Gln Glu Lys Thr Lys Leu Glu Pro Gly Gln Pro Gln Leu Ser

465 470 475 480

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

485 490 495

Glu Lys Thr Ser Pro Pro Val Pro Val Glu Val Ala Pro Glu Ala Ser

500 505 510

Thr Ser Ser Ala Ser Gln Val Ile Ala Pro Thr Gln Val Thr Glu Ile
515 520 525
Asn Glu Cys Thr Val Asn Pro Asp Ile Cys Gly Ala Gly His Cys Ile

530 535 540
Asn Leu Pro Val Arg Tyr Thr Cys Ile Cys Tyr Glu Gly Tyr Arg Phe
545 550 555 560
Ser Glu Gln Gln Arg Lys Cys Val Asp Ile Asp Glu Cys Thr Gln Val
565 570 575
Gln His Leu Cys Ser Gln Gly Arg Cys Glu Asn Thr Glu Gly Ser Phe
580 585 590
Leu Cys Ile Cys Pro Ala Gly Phe Met Ala Ser Glu Glu Gly Thr Asn

595 600 605
Cys Ile Asp Val Asp Glu Cys Leu Arg Pro Asp Val Cys Gly Glu Gly
610 615 620
His Cys Val Asn Thr Val Gly Ala Phe Arg Cys Glu Tyr Cys Asp Ser
625 630 635 640
Gly Tyr Arg Met Thr Gln Arg Gly Arg Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys
645 650 655
Leu Asn Pro Ser Thr Cys Pro Asp Glu Gln Cys Val Asn Ser Pro Gly

660 665 670
Ser Tyr Gln Cys Val Pro Cys Thr Glu Gly Phe Arg Gly Trp Asn Gly
675 680 685
Gln Cys Leu Asp Val Asp Glu Cys Leu Glu Pro Asn Val Cys Ala Asn
690 695 700
Gly Asp Cys Ser Asn Leu Glu Gly Ser Tyr Met Cys Ser Cys His Lys
705 710 715 720
Gly Tyr Thr Arg Thr Pro Asp His Lys His Cys Arg Asp Ile Asp Glu

725 730 735
Cys Gln Gln Gly Asn Leu Cys Val Asn Gly Gln Cys Lys Asn Thr Glu
740 745 750
Gly Ser Phe Arg Cys Thr Cys Gly Gln Gly Tyr Gln Leu Ser Ala Ala

```
        755                 760                 765
Lys Asp Gln Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln His Arg His Leu Cys
    770                 775                 780
Ala His Gly Gln Cys Arg Asn Thr Glu Gly Ser Phe Gln Cys Val Cys

785                 790                 795                 800
Asp Gln Gly Tyr Arg Ala Ser Gly Leu Gly Asp His Cys Glu Asp Ile
                805                 810                 815
Asn Glu Cys Leu Glu Asp Lys Ser Val Cys Gln Arg Gly Asp Cys Ile
            820                 825                 830
Asn Thr Ala Gly Ser Tyr Asp Cys Thr Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu
        835                 840                 845
Asp Asp Asn Lys Thr Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Pro Gly

    850                 855                 860
Leu Cys Gly Pro Gln Gly Glu Cys Leu Asn Thr Glu Gly Ser Phe His
865                 870                 875                 880
Cys Val Cys Gln Gln Gly Phe Ser Ile Ser Ala Asp Gly Arg Thr Cys
                885                 890                 895
Glu Asp Ile Asp Glu Cys Val Asn Asn Thr Val Cys Asp Ser His Gly
            900                 905                 910
Phe Cys Asp Asn Thr Ala Gly Ser Phe Arg Cys Leu Cys Tyr Gln Gly

        915                 920                 925
Phe Gln Ala Pro Gln Asp Gly Gln Gly Cys Val Asp Val Asn Glu Cys
    930                 935                 940
Glu Leu Leu Ser Gly Val Cys Gly Glu Ala Phe Cys Glu Asn Val Glu
945                 950                 955                 960
Gly Ser Phe Leu Cys Val Cys Ala Asp Glu Asn Gln Glu Tyr Ser Pro
                965                 970                 975
Met Thr Gly Gln Cys Arg Ser Arg Thr Ser Thr Asp Leu Asp Val Asp

            980                 985                 990
Val Asp Gln Pro Lys Glu Glu Lys  Lys Glu Cys Tyr Tyr  Asn Leu Asn
        995                 1000                1005
```

```
Asp Ala  Ser Leu Cys Asp Asn  Val Leu Ala Pro Asn  Val Thr Lys
    1010                1015                1020
Gln Glu  Cys Cys Cys Thr Ser  Gly Val Gly Trp Gly  Asp Asn Cys
    1025                1030                1035
Glu Ile  Phe Pro Cys Pro Val  Leu Gly Thr Ala Glu  Phe Thr Glu

    1040                1045                1050
Met Cys  Pro Lys Gly Lys Gly  Phe Val Pro Ala Gly  Glu Ser Ser
    1055                1060                1065
Ser Glu  Ala Gly Gly Glu Asn  Tyr Lys Asp Ala Asp  Glu Cys Leu
    1070                1075                1080
Leu Phe  Gly Gln Glu Ile Cys  Lys Asn Gly Phe Cys  Leu Asn Thr
    1085                1090                1095
Arg Pro  Gly Tyr Glu Cys Tyr  Cys Lys Gln Gly Thr  Tyr Tyr Asp

    1100                1105                1110
Pro Val  Lys Leu Gln Cys Phe  Asp Met Asp Glu Cys  Gln Asp Pro
    1115                1120                1125
Ser Ser  Cys Ile Asp Gly Gln  Cys Val Asn Thr Glu  Gly Ser Tyr
    1130                1135                1140
Asn Cys  Phe Cys Thr His Pro  Met Val Leu Asp Ala  Ser Glu Lys
    1145                1150                1155
Arg Cys  Ile Arg Pro Ala Glu  Ser Asn Glu Gln Ile  Glu Glu Thr

    1160                1165                1170
Asp Val  Tyr Gln Asp Leu Cys  Trp Glu His Leu Ser  Asp Glu Tyr
    1175                1180                1185
Val Cys  Ser Arg Pro Leu Val  Gly Lys Gln Thr Thr  Tyr Thr Glu
    1190                1195                1200
Cys Cys  Cys Leu Tyr Gly Glu  Ala Trp Gly Met Gln  Cys Ala Leu
    1205                1210                1215
Cys Pro  Leu Lys Asp Ser Asp  Asp Tyr Ala Gln Leu  Cys Asn Ile

    1220                1225                1230
Pro Val  Thr Gly Arg Arg Gln  Pro Tyr Gly Arg Asp  Ala Leu Val
```

1235 1240 1245

Asp Phe Ser Glu Gln Tyr Thr Pro Glu Ala Asp Pro Tyr Phe Ile

1250 1255 1260

Gln Asp Arg Phe Leu Asn Ser Phe Glu Glu Leu Gln Ala Glu Glu

1265 1270 1275

Cys Gly Ile Leu Asn Gly Cys Glu Asn Gly Arg Cys Val Arg Val

1280 1285 1290

Gln Glu Gly Tyr Thr Cys Asp Cys Phe Asp Gly Tyr His Leu Asp

1295 1300 1305

Thr Ala Lys Met Thr Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Asp Glu Leu

1310 1315 1320

Asn Asn Arg Met Ser Leu Cys Lys Asn Ala Lys Cys Ile Asn Thr

1325 1330 1335

Asp Gly Ser Tyr Lys Cys Leu Cys Leu Pro Gly Tyr Val Pro Ser

1340 1345 1350

Asp Lys Pro Asn Tyr Cys Thr Pro Leu Asn Thr Ala Leu Asn Leu

1355 1360 1365

Glu Lys Asp Ser Asp Leu Glu

1370 1375

<210> 51

<211> 1260

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: LTBP3

<400> 51

Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Leu Ala Arg

1 5 10 15

Glu Arg Phe Lys Val Val Phe Ala Pro Val Ile Cys Lys Arg Thr Cys

20 25 30

Leu Lys Gly Gln Cys Arg Asp Ser Cys Gln Gln Gly Ser Asn Met Thr

35 40 45

Leu Ile Gly Glu Asn Gly His Ser Thr Asp Thr Leu Thr Gly Ser Gly

50 55 60

Phe Arg Val Val Val Cys Pro Leu Pro Cys Met Asn Gly Gly Gln Cys

65 70 75 80

Ser Ser Arg Asn Gln Cys Leu Cys Pro Pro Asp Phe Thr Gly Arg Phe

85 90 95

Cys Gln Val Pro Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Thr Gly Gly Ser Gly

100 105 110

Pro Gly Leu Ser Arg Thr Gly Ala Leu Ser Thr Gly Ala Leu Pro Pro

115 120 125

Leu Ala Pro Glu Gly Asp Ser Val Ala Ser Lys His Ala Ile Tyr Ala

130 135 140

Val Gln Val Ile Ala Asp Pro Pro Gly Pro Gly Glu Gly Pro Pro Ala

145 150 155 160

Gln His Ala Ala Phe Leu Val Pro Leu Gly Pro Gly Gln Ile Ser Ala

165 170 175

Glu Val Gln Ala Pro Pro Pro Val Val Asn Val Arg Val His His Pro

180 185 190

Pro Glu Ala Ser Val Gln Val His Arg Ile Glu Ser Ser Asn Ala Glu

195 200 205

Ser Ala Ala Pro Ser Gln His Leu Leu Pro His Pro Lys Pro Ser His

210 215 220

Pro Arg Pro Pro Thr Gln Lys Pro Leu Gly Arg Cys Phe Gln Asp Thr

225 230 235 240

Leu Pro Lys Gln Pro Cys Gly Ser Asn Pro Leu Pro Gly Leu Thr Lys

245 250 255

Gln Glu Asp Cys Cys Gly Ser Ile Gly Thr Ala Trp Gly Gln Ser Lys

260 265 270

Cys His Lys Cys Pro Gln Leu Gln Tyr Thr Gly Val Gln Lys Pro Gly

275 280 285

Pro Val Arg Gly Glu Val Gly Ala Asp Cys Pro Gln Gly Tyr Lys Arg

290 295 300

Leu Asn Ser Thr His Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Ala Met Pro Gly
305 310 315 320
Val Cys Arg His Gly Asp Cys Leu Asn Asn Pro Gly Ser Tyr Arg Cys
325 330 335
Val Cys Pro Pro Gly His Ser Leu Gly Pro Ser Arg Thr Gln Cys Ile

340 345 350
Ala Asp Lys Pro Glu Glu Lys Ser Leu Cys Phe Arg Leu Val Ser Pro
355 360 365
Glu His Gln Cys Gln His Pro Leu Thr Thr Arg Leu Thr Arg Gln Leu
370 375 380
Cys Cys Cys Ser Val Gly Lys Ala Trp Gly Ala Arg Cys Gln Arg Cys
385 390 395 400
Pro Thr Asp Gly Thr Ala Ala Phe Lys Glu Ile Cys Pro Ala Gly Lys

405 410 415
Gly Tyr His Ile Leu Thr Ser His Gln Thr Leu Thr Ile Gln Gly Glu
420 425 430
Ser Asp Phe Ser Leu Phe Leu His Pro Asp Gly Pro Pro Lys Pro Gln
435 440 445
Gln Leu Pro Glu Ser Pro Ser Gln Ala Pro Pro Pro Glu Asp Thr Glu
450 455 460
Glu Glu Arg Gly Val Thr Thr Asp Ser Pro Val Ser Glu Glu Arg Ser

465 470 475 480
Val Gln Gln Ser His Pro Thr Ala Thr Thr Thr Pro Ala Arg Pro Tyr
485 490 495
Pro Glu Leu Ile Ser Arg Pro Ser Pro Pro Thr Met Arg Trp Phe Leu
500 505 510
Pro Asp Leu Pro Pro Ser Arg Ser Ala Val Glu Ile Ala Pro Thr Gln
515 520 525
Val Thr Glu Thr Asp Glu Cys Arg Leu Asn Gln Asn Ile Cys Gly His

530 535 540
Gly Glu Cys Val Pro Gly Pro Pro Asp Tyr Ser Cys His Cys Asn Pro

545 550 555 560

Gly Tyr Arg Ser His Pro Gln His Arg Tyr Cys Val Asp Val Asn Glu

565 570 575

Cys Glu Ala Glu Pro Cys Gly Pro Gly Arg Gly Ile Cys Met Asn Thr

580 585 590

Gly Gly Ser Tyr Asn Cys His Cys Asn Arg Gly Tyr Arg Leu His Val

595 600 605

Gly Ala Gly Gly Arg Ser Cys Val Asp Leu Asn Glu Cys Ala Lys Pro

610 615 620

His Leu Cys Gly Asp Gly Gly Phe Cys Ile Asn Phe Pro Gly His Tyr

625 630 635 640

Lys Cys Asn Cys Tyr Pro Gly Tyr Arg Leu Lys Ala Ser Arg Pro Pro

645 650 655

Val Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Asp Pro Ser Ser Cys Pro Asp

660 665 670

Gly Lys Cys Glu Asn Lys Pro Gly Ser Phe Lys Cys Ile Ala Cys Gln

675 680 685

Pro Gly Tyr Arg Ser Gln Gly Gly Gly Ala Cys Arg Asp Val Asn Glu

690 695 700

Cys Ala Glu Gly Ser Pro Cys Ser Pro Gly Trp Cys Glu Asn Leu Pro

705 710 715 720

Gly Ser Phe Arg Cys Thr Cys Ala Gln Gly Tyr Ala Pro Ala Pro Asp

725 730 735

Gly Arg Ser Cys Leu Asp Val Asp Glu Cys Glu Ala Gly Asp Val Cys

740 745 750

Asp Asn Gly Ile Cys Ser Asn Thr Pro Gly Ser Phe Gln Cys Gln Cys

755 760 765

Leu Ser Gly Tyr His Leu Ser Arg Asp Arg Ser His Cys Glu Asp Ile

770 775 780

Asp Glu Cys Asp Phe Pro Ala Ala Cys Ile Gly Gly Asp Cys Ile Asn

785 790 795 800

Thr Asn Gly Ser Tyr Arg Cys Leu Cys Pro Gln Gly His Arg Leu Val
805 810 815
Gly Gly Arg Lys Cys Gln Asp Ile Asp Glu Cys Ser Gln Asp Pro Ser
820 825 830
Leu Cys Leu Pro His Gly Ala Cys Lys Asn Leu Gln Gly Ser Tyr Val
835 840 845
Cys Val Cys Asp Glu Gly Phe Thr Pro Thr Gln Asp Gln His Gly Cys

850 855 860
Glu Glu Val Glu Gln Pro His His Lys Lys Glu Cys Tyr Leu Asn Phe
865 870 875 880
Asp Asp Thr Val Phe Cys Asp Ser Val Leu Ala Thr Asn Val Thr Gln
885 890 895
Gln Glu Cys Cys Cys Ser Leu Gly Ala Gly Trp Gly Asp His Cys Glu
900 905 910
Ile Tyr Pro Cys Pro Val Tyr Ser Ser Ala Glu Phe His Ser Leu Cys

915 920 925
Pro Asp Gly Lys Gly Tyr Thr Gln Asp Asn Asn Ile Val Asn Tyr Gly
930 935 940
Ile Pro Ala His Arg Asp Ile Asp Glu Cys Met Leu Phe Gly Ser Glu
945 950 955 960
Ile Cys Lys Glu Gly Lys Cys Val Asn Thr Gln Pro Gly Tyr Glu Cys
965 970 975
Tyr Cys Lys Gln Gly Phe Tyr Tyr Asp Gly Asn Leu Leu Glu Cys Val

980 985 990
Asp Val Asp Glu Cys Leu Asp Glu Ser Asn Cys Arg Asn Gly Val Cys
995 1000 1005
Glu Asn Thr Arg Gly Gly Tyr Arg Cys Ala Cys Thr Pro Pro Ala
1010 1015 1020
Glu Tyr Ser Pro Ala Gln Arg Gln Cys Leu Ser Pro Glu Glu Met
1025 1030 1035
Asp Val Asp Glu Cys Gln Asp Pro Ala Ala Cys Arg Pro Gly Arg

1040 1045 1050

Cys Val Asn Leu Pro Gly Ser Tyr Arg Cys Glu Cys Arg Pro Pro

1055 1060 1065

Trp Val Pro Gly Pro Ser Gly Arg Asp Cys Gln Leu Pro Glu Ser

1070 1075 1080

Pro Ala Glu Arg Ala Pro Glu Arg Arg Asp Val Cys Trp Ser Gln

1085 1090 1095

Arg Gly Glu Asp Gly Met Cys Ala Gly Pro Leu Ala Gly Pro Ala

1100 1105 1110

Leu Thr Phe Asp Asp Cys Cys Cys Arg Gln Gly Arg Gly Trp Gly

1115 1120 1125

Ala Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro Arg Gly Ala Gly Ser His Cys

1130 1135 1140

Pro Thr Ser Gln Ser Glu Ser Asn Ser Phe Trp Asp Thr Ser Pro

1145 1150 1155

Leu Leu Leu Gly Lys Pro Pro Arg Asp Glu Asp Ser Ser Glu Glu

1160 1165 1170

Asp Ser Asp Glu Cys Arg Cys Val Ser Gly Arg Cys Val Pro Arg

1175 1180 1185

Pro Gly Gly Ala Val Cys Glu Cys Pro Gly Gly Phe Gln Leu Asp

1190 1195 1200

Ala Ser Arg Ala Arg Cys Val Asp Ile Asp Glu Cys Arg Glu Leu

1205 1210 1215

Asn Gln Arg Gly Leu Leu Cys Lys Ser Glu Arg Cys Val Asn Thr

1220 1225 1230

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

1235 1240 1245

Arg Pro His Gly Ala Cys Val Pro Gln Arg Arg Arg

1250 1255 1260

<210> 52

<211> 645

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: GARP

<400> 52

Ala Gln His Gln Asp Lys Val Pro Cys Lys Met Val Asp Lys Lys Val
1 5 10 15

Ser Cys Gln Val Leu Gly Leu Leu Gln Val Pro Ser Val Leu Pro Pro
20 25 30

Asp Thr Glu Thr Leu Asp Leu Ser Gly Asn Gln Leu Arg Ser Ile Leu
35 40 45

Ala Ser Pro Leu Gly Phe Tyr Thr Ala Leu Arg His Leu Asp Leu Ser
50 55 60

Thr Asn Glu Ile Ser Phe Leu Gln Pro Gly Ala Phe Gln Ala Leu Thr
65 70 75 80

His Leu Glu His Leu Ser Leu Ala His Asn Arg Leu Ala Met Ala Thr
85 90 95

Ala Leu Ser Ala Gly Gly Leu Gly Pro Leu Pro Arg Val Thr Ser Leu
100 105 110

Asp Leu Ser Gly Asn Ser Leu Tyr Ser Gly Leu Leu Glu Arg Leu Leu
115 120 125

Gly Glu Ala Pro Ser Leu His Thr Leu Ser Leu Ala Glu Asn Ser Leu
130 135 140

Thr Arg Leu Thr Arg His Thr Phe Arg Asp Met Pro Ala Leu Glu Gln
145 150 155 160

Leu Asp Leu His Ser Asn Val Leu Met Asp Ile Glu Asp Gly Ala Phe
165 170 175

Glu Gly Leu Pro Arg Leu Thr His Leu Asn Leu Ser Arg Asn Ser Leu
180 185 190

Thr Cys Ile Ser Asp Phe Ser Leu Gln Gln Leu Arg Val Leu Asp Leu
195 200 205

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

Glu Phe Gln Leu Thr Trp Leu Asp Leu Arg Glu Asn Lys Leu Leu His
225 230 235 240
Phe Pro Asp Leu Ala Ala Leu Pro Arg Leu Ile Tyr Leu Asn Leu Ser
245 250 255
Asn Asn Leu Ile Arg Leu Pro Thr Gly Pro Pro Gln Asp Ser Lys Gly
260 265 270

Ile His Ala Pro Ser Glu Gly Trp Ser Ala Leu Pro Leu Ser Ala Pro
275 280 285
Ser Gly Asn Ala Ser Gly Arg Pro Leu Ser Gln Leu Leu Asn Leu Asp
290 295 300
Leu Ser Tyr Asn Glu Ile Glu Leu Ile Pro Asp Ser Phe Leu Glu His
305 310 315 320
Leu Thr Ser Leu Cys Phe Leu Asn Leu Ser Arg Asn Cys Leu Arg Thr
325 330 335

Phe Glu Ala Arg Arg Leu Gly Ser Leu Pro Cys Leu Met Leu Leu Asp
340 345 350
Leu Ser His Asn Ala Leu Glu Thr Leu Glu Leu Gly Ala Arg Ala Leu
355 360 365
Gly Ser Leu Arg Thr Leu Leu Leu Gln Gly Asn Ala Leu Arg Asp Leu
370 375 380
Pro Pro Tyr Thr Phe Ala Asn Leu Ala Ser Leu Gln Arg Leu Asn Leu
385 390 395 400

Gln Gly Asn Arg Val Ser Pro Cys Gly Gly Pro Asp Glu Pro Gly Pro
405 410 415
Ser Gly Cys Val Ala Phe Ser Gly Ile Thr Ser Leu Arg Ser Leu Ser
420 425 430
Leu Val Asp Asn Glu Ile Glu Leu Leu Arg Ala Gly Ala Phe Leu His
435 440 445
Thr Pro Leu Thr Glu Leu Asp Leu Ser Ser Asn Pro Gly Leu Glu Val
450 455 460

Ala Thr Gly Ala Leu Gly Gly Leu Glu Ala Ser Leu Glu Val Leu Ala

465 470 475 480

Leu Gln Gly Asn Gly Leu Met Val Leu Gln Val Asp Leu Pro Cys Phe

485 490 495

Ile Cys Leu Lys Arg Leu Asn Leu Ala Glu Asn Arg Leu Ser His Leu

500 505 510

Pro Ala Trp Thr Gln Ala Val Ser Leu Glu Val Leu Asp Leu Arg Asn

515 520 525

Asn Ser Phe Ser Leu Leu Pro Gly Ser Ala Met Gly Gly Leu Glu Thr

530 535 540

Ser Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Gln Gly Asn Pro Leu Ser Cys Cys Gly

545 550 555 560

Asn Gly Trp Leu Ala Ala Gln Leu His Gln Gly Arg Val Asp Val Asp

565 570 575

Ala Thr Gln Asp Leu Ile Cys Arg Phe Ser Ser Gln Glu Glu Val Ser

580 585 590

Leu Ser His Val Arg Pro Glu Asp Cys Glu Lys Gly Gly Leu Lys Asn

595 600 605

Ile Asn Leu Ile Ile Ile Leu Thr Phe Ile Leu Val Ser Ala Ile Leu

610 615 620

Leu Thr Thr Leu Ala Ala Cys Cys Cys Val Arg Arg Gln Lys Phe Asn

625 630 635 640

Gln Gln Tyr Lys Ala

645

<210> 53

<211> 610

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic: sGARP

<400> 53

Ala Gln His Gln Asp Lys Val Pro Cys Lys Met Val Asp Lys Lys Val

1 5 10 15

Ser Cys Gln Val Leu Gly Leu Leu Gln Val Pro Ser Val Leu Pro Pro

20 25 30

Asp Thr Glu Thr Leu Asp Leu Ser Gly Asn Gln Leu Arg Ser Ile Leu

35 40 45

Ala Ser Pro Leu Gly Phe Tyr Thr Ala Leu Arg His Leu Asp Leu Ser

50 55 60

Thr Asn Glu Ile Ser Phe Leu Gln Pro Gly Ala Phe Gln Ala Leu Thr

65 70 75 80

His Leu Glu His Leu Ser Leu Ala His Asn Arg Leu Ala Met Ala Thr

85 90 95

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

100 105 110

Asp Leu Ser Gly Asn Ser Leu Tyr Ser Gly Leu Leu Glu Arg Leu Leu

115 120 125

Gly Glu Ala Pro Ser Leu His Thr Leu Ser Leu Ala Glu Asn Ser Leu

130 135 140

Thr Arg Leu Thr Arg His Thr Phe Arg Asp Met Pro Ala Leu Glu Gln

145 150 155 160

Leu Asp Leu His Ser Asn Val Leu Met Asp Ile Glu Asp Gly Ala Phe

165 170 175

Glu Gly Leu Pro Arg Leu Thr His Leu Asn Leu Ser Arg Asn Ser Leu

180 185 190

Thr Cys Ile Ser Asp Phe Ser Leu Gln Gln Leu Arg Val Leu Asp Leu

195 200 205

Ser Cys Asn Ser Ile Glu Ala Phe Gln Thr Ala Ser Gln Pro Gln Ala

210 215 220

Glu Phe Gln Leu Thr Trp Leu Asp Leu Arg Glu Asn Lys Leu Leu His

225 230 235 240

Phe Pro Asp Leu Ala Ala Leu Pro Arg Leu Ile Tyr Leu Asn Leu Ser

245 250 255

Asn Asn Leu Ile Arg Leu Pro Thr Gly Pro Pro Gln Asp Ser Lys Gly

260 265 270

Ile His Ala Pro Ser Glu Gly Trp Ser Ala Leu Pro Leu Ser Ala Pro
275 280 285
Ser Gly Asn Ala Ser Gly Arg Pro Leu Ser Gln Leu Leu Asn Leu Asp
290 295 300
Leu Ser Tyr Asn Glu Ile Glu Leu Ile Pro Asp Ser Phe Leu Glu His
305 310 315 320

Leu Thr Ser Leu Cys Phe Leu Asn Leu Ser Arg Asn Cys Leu Arg Thr
325 330 335
Phe Glu Ala Arg Arg Leu Gly Ser Leu Pro Cys Leu Met Leu Leu Asp
340 345 350
Leu Ser His Asn Ala Leu Glu Thr Leu Glu Leu Gly Ala Arg Ala Leu
355 360 365
Gly Ser Leu Arg Thr Leu Leu Leu Gln Gly Asn Ala Leu Arg Asp Leu
370 375 380

Pro Pro Tyr Thr Phe Ala Asn Leu Ala Ser Leu Gln Arg Leu Asn Leu
385 390 395 400
Gln Gly Asn Arg Val Ser Pro Cys Gly Gly Pro Asp Glu Pro Gly Pro
405 410 415
Ser Gly Cys Val Ala Phe Ser Gly Ile Thr Ser Leu Arg Ser Leu Ser
420 425 430
Leu Val Asp Asn Glu Ile Glu Leu Leu Arg Ala Gly Ala Phe Leu His
435 440 445

Thr Pro Leu Thr Glu Leu Asp Leu Ser Ser Asn Pro Gly Leu Glu Val
450 455 460
Ala Thr Gly Ala Leu Gly Gly Leu Glu Ala Ser Leu Glu Val Leu Ala
465 470 475 480
Leu Gln Gly Asn Gly Leu Met Val Leu Gln Val Asp Leu Pro Cys Phe
485 490 495
Ile Cys Leu Lys Arg Leu Asn Leu Ala Glu Asn Arg Leu Ser His Leu
500 505 510

Pro Ala Trp Thr Gln Ala Val Ser Leu Glu Val Leu Asp Leu Arg Asn

515 520 525

Asn Ser Phe Ser Leu Leu Pro Gly Ser Ala Met Gly Gly Leu Glu Thr

530 535 540

Ser Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Gln Gly Asn Pro Leu Ser Cys Cys Gly

545 550 555 560

Asn Gly Trp Leu Ala Ala Gln Leu His Gln Gly Arg Val Asp Val Asp

565 570 575

Ala Thr Gln Asp Leu Ile Cys Arg Phe Ser Ser Gln Glu Glu Val Ser

580 585 590

Leu Ser His Val Arg Pro Glu Asp Cys Glu Lys Gly Gly Leu Lys Asn

595 600 605

Ile Asn

610

<210> 54

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: peptide

<400> 54

Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 55

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Synthetic: Linker

<400> 55

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro

1 5 10

<210> 56

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 56

Ala Ser Thr Lys Gly Pro

1 5

<210> 57

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 57

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

1 5 10

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 58

Thr Val Ala Ala Pro

1 5

<210> 59

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 59

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

1 5 10 15

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 60

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

1 5 10 15

Val

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 61

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly

1 5

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 62

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly

1 5 10

<210> 63

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 63

Ser Ala Lys Thr Thr Pro

1 5

<210> 64

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 64

Arg Ala Asp Ala Ala Pro

1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 65

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser

1 5

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic: Linker

<400> 66

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser

1 5 10

<210> 67

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 67

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 68

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 68

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala

1 5 10 15

Arg Val

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 69

Ala Asp Ala Ala Pro

1 5

<210> 70

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 70

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro

1 5 10

<210> 71

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 71

Gln Pro Lys Ala Ala Pro

1 5

<210> 72

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 72

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro

1 5 10

<210> 73

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 73

Ala Lys Thr Thr Pro Pro

1 5

<210> 74

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 74

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Pro Leu Ala Pro

1 5 10

<210> 75

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 75

Ala Lys Thr Thr Ala Pro

1 5

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220><223> Synthetic: Linker

<400> 76

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro

1 5 10

<210> 77

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 77

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 78

Gly Glu Asn Lys Val Glu Tyr Ala Pro Ala Leu Met Ala Leu Ser

1 5 10 15

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 79

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

1 5 10 15

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 80

Gly His Glu Ala Ala Ala Val Met Gln Val Gln Tyr Pro Ala Ser

1 5 10 15

<210> 81

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 81

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Thr Val Ala Ala

1 5 10 15

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

20

<210> 82

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 82

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro

20 25

<210> 83

<211> 692

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<223> LRRC33 (also known as NRROS; Uniprot Accession No. Q86YC3)

<400> 83

Met Glu Leu Leu Pro Leu Trp Leu Cys Leu Gly Phe His Phe Leu Thr

1 5 10 15

Val Gly Trp Arg Asn Arg Ser Gly Thr Ala Thr Ala Ala Ser Gln Gly

20 25 30

Val Cys Lys Leu Val Gly Gly Ala Ala Asp Cys Arg Gly Gln Ser Leu
35 40 45

Ala Ser Val Pro Ser Ser Leu Pro Pro His Ala Arg Met Leu Thr Leu
50 55 60

Asp Ala Asn Pro Leu Lys Thr Leu Trp Asn His Ser Leu Gln Pro Tyr
65 70 75 80

Pro Leu Leu Glu Ser Leu Ser Leu His Ser Cys His Leu Glu Arg Ile
85 90 95

Ser Arg Gly Ala Phe Gln Glu Gln Gly His Leu Arg Ser Leu Val Leu
100 105 110

Gly Asp Asn Cys Leu Ser Glu Asn Tyr Glu Glu Thr Ala Ala Ala Leu
115 120 125

His Ala Leu Pro Gly Leu Arg Arg Leu Asp Leu Ser Gly Asn Ala Leu
130 135 140

Thr Glu Asp Met Ala Ala Leu Met Leu Gln Asn Leu Ser Ser Leu Arg
145 150 155 160

Ser Val Ser Leu Ala Gly Asn Thr Ile Met Arg Leu Asp Asp Ser Val
165 170 175

Phe Glu Gly Leu Glu Arg Leu Arg Glu Leu Asp Leu Gln Arg Asn Tyr
180 185 190

Ile Phe Glu Ile Glu Gly Gly Ala Phe Asp Gly Leu Ala Glu Leu Arg
195 200 205

His Leu Asn Leu Ala Phe Asn Asn Leu Pro Cys Ile Val Asp Phe Gly
210 215 220

Leu Thr Arg Leu Arg Val Leu Asn Val Ser Tyr Asn Val Leu Glu Trp
225 230 235 240

Phe Leu Ala Thr Gly Gly Glu Ala Ala Phe Glu Leu Glu Thr Leu Asp
245 250 255

Leu Ser His Asn Gln Leu Leu Phe Phe Pro Leu Leu Pro Gln Tyr Ser
260 265 270

Lys Leu Arg Thr Leu Leu Leu Arg Asp Asn Asn Met Gly Phe Tyr Arg

275 280 285

Asp Leu Tyr Asn Thr Ser Ser Pro Arg Glu Met Val Ala Gln Phe Leu
290 295 300
Leu Val Asp Gly Asn Val Thr Asn Ile Thr Thr Val Ser Leu Trp Glu
305 310 315 320
Glu Phe Ser Ser Ser Asp Leu Ala Asp Leu Arg Phe Leu Asp Met Ser
325 330 335
Gln Asn Gln Phe Gln Tyr Leu Pro Asp Gly Phe Leu Arg Lys Met Pro
340 345 350

Ser Leu Ser His Leu Asn Leu His Gln Asn Cys Leu Met Thr Leu His
355 360 365
Ile Arg Glu His Glu Pro Pro Gly Ala Leu Thr Glu Leu Asp Leu Ser
370 375 380
His Asn Gln Leu Ser Glu Leu His Leu Ala Pro Gly Leu Ala Ser Cys
385 390 395 400
Leu Gly Ser Leu Arg Leu Phe Asn Leu Ser Ser Asn Gln Leu Leu Gly
405 410 415

Val Pro Pro Gly Leu Phe Ala Asn Ala Arg Asn Ile Thr Thr Leu Asp
420 425 430
Met Ser His Asn Gln Ile Ser Leu Cys Pro Leu Pro Ala Ala Ser Asp
435 440 445
Arg Val Gly Pro Pro Ser Cys Val Asp Phe Arg Asn Met Ala Ser Leu
450 455 460
Arg Ser Leu Ser Leu Glu Gly Cys Gly Leu Gly Ala Leu Pro Asp Cys
465 470 475 480

Pro Phe Gln Gly Thr Ser Leu Thr Tyr Leu Asp Leu Ser Ser Asn Trp
485 490 495
Gly Val Leu Asn Gly Ser Leu Ala Pro Leu Gln Asp Val Ala Pro Met
500 505 510
Leu Gln Val Leu Ser Leu Arg Asn Met Gly Leu His Ser Ser Phe Met
515 520 525

Ala Leu Asp Phe Ser Gly Phe Gly Asn Leu Arg Asp Leu Asp Leu Ser
530 535 540

Gly Asn Cys Leu Thr Thr Phe Pro Arg Phe Gly Gly Ser Leu Ala Leu
545 550 555 560
Glu Thr Leu Asp Leu Arg Arg Asn Ser Leu Thr Ala Leu Pro Gln Lys
565 570 575
Ala Val Ser Glu Gln Leu Ser Arg Gly Leu Arg Thr Ile Tyr Leu Ser
580 585 590
Gln Asn Pro Tyr Asp Cys Cys Gly Val Asp Gly Trp Gly Ala Leu Gln
595 600 605

His Gly Gln Thr Val Ala Asp Trp Ala Met Val Thr Cys Asn Leu Ser
610 615 620
Ser Lys Ile Ile Arg Val Thr Glu Leu Pro Gly Gly Val Pro Arg Asp
625 630 635 640
Cys Lys Trp Glu Arg Leu Asp Leu Gly Leu Leu Tyr Leu Val Leu Ile
645 650 655
Leu Pro Ser Cys Leu Thr Leu Leu Val Ala Cys Thr Val Ile Val Leu
660 665 670

Thr Phe Lys Lys Pro Leu Leu Gln Val Ile Lys Ser Arg Cys His Trp
675 680 685
Ser Ser Val Tyr
690

<210> 84
<211> 660
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> misc_feature
<223> soluble LRRC33 (sLRRC33)
<400> 84
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Phe Ser Gly Val Leu Gly Trp Arg Asn Arg Ser Gly Thr Ala Thr Ala

20 25 30

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

Leu Glu Arg Ile Ser Arg Gly Ala Phe Gln Glu Gln Gly His Leu Arg
100 105 110
Ser Leu Val Leu Gly Asp Asn Cys Leu Ser Glu Asn Tyr Glu Glu Thr
115 120 125
Ala Ala Ala Leu His Ala Leu Pro Gly Leu Arg Arg Leu Asp Leu Ser
130 135 140
Gly Asn Ala Leu Thr Glu Asp Met Ala Ala Leu Met Leu Gln Asn Leu
145 150 155 160

Ser Ser Leu Arg Ser Val Ser Leu Ala Gly Asn Thr Ile Met Arg Leu
165 170 175
Asp Asp Ser Val Phe Glu Gly Leu Glu Arg Leu Arg Glu Leu Asp Leu
180 185 190
Gln Arg Asn Tyr Ile Phe Glu Ile Glu Gly Gly Ala Phe Asp Gly Leu
195 200 205
Ala Glu Leu Arg His Leu Asn Leu Ala Phe Asn Asn Leu Pro Cys Ile
210 215 220

Val Asp Phe Gly Leu Thr Arg Leu Arg Val Leu Asn Val Ser Tyr Asn
225 230 235 240
Val Leu Glu Trp Phe Leu Ala Thr Gly Gly Glu Ala Ala Phe Glu Leu
245 250 255
Glu Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Leu Phe Phe Pro Leu Leu
260 265 270

Pro Gln Tyr Ser Lys Leu Arg Thr Leu Leu Leu Arg Asp Asn Asn Met
275 280 285

Gly Phe Tyr Arg Asp Leu Tyr Asn Thr Ser Ser Pro Arg Glu Met Val
290 295 300
Ala Gln Phe Leu Leu Val Asp Gly Asn Val Thr Asn Ile Thr Thr Val
305 310 315 320
Ser Leu Trp Glu Glu Phe Ser Ser Ser Asp Leu Ala Asp Leu Arg Phe
325 330 335
Leu Asp Met Ser Gln Asn Gln Phe Gln Tyr Leu Pro Asp Gly Phe Leu
340 345 350

Arg Lys Met Pro Ser Leu Ser His Leu Asn Leu His Gln Asn Cys Leu
355 360 365
Met Thr Leu His Ile Arg Glu His Glu Pro Pro Gly Ala Leu Thr Glu
370 375 380
Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Ser Glu Leu His Leu Ala Pro Gly
385 390 395 400
Leu Ala Ser Cys Leu Gly Ser Leu Arg Leu Phe Asn Leu Ser Ser Asn
405 410 415

Gln Leu Leu Gly Val Pro Pro Gly Leu Phe Ala Asn Ala Arg Asn Ile
420 425 430
Thr Thr Leu Asp Met Ser His Asn Gln Ile Ser Leu Cys Pro Leu Pro
435 440 445
Ala Ala Ser Asp Arg Val Gly Pro Pro Ser Cys Val Asp Phe Arg Asn
450 455 460
Met Ala Ser Leu Arg Ser Leu Ser Leu Glu Gly Cys Gly Leu Gly Ala
465 470 475 480

Leu Pro Asp Cys Pro Phe Gln Gly Thr Ser Leu Thr Tyr Leu Asp Leu
485 490 495
Ser Ser Asn Trp Gly Val Leu Asn Gly Ser Leu Ala Pro Leu Gln Asp
500 505 510
Val Ala Pro Met Leu Gln Val Leu Ser Leu Arg Asn Met Gly Leu His

515 520 525

Ser Ser Phe Met Ala Leu Asp Phe Ser Gly Phe Gly Asn Leu Arg Asp

530 535 540

Leu Asp Leu Ser Gly Asn Cys Leu Thr Thr Phe Pro Arg Phe Gly Gly

545 550 555 560

Ser Leu Ala Leu Glu Thr Leu Asp Leu Arg Arg Asn Ser Leu Thr Ala

565 570 575

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

580 585 590

Ile Tyr Leu Ser Gln Asn Pro Tyr Asp Cys Cys Gly Val Asp Gly Trp

595 600 605

Gly Ala Leu Gln His Gly Gln Thr Val Ala Asp Trp Ala Met Val Thr

610 615 620

Cys Asn Leu Ser Ser Lys Ile Ile Arg Val Thr Glu Leu Pro Gly Gly

625 630 635 640

Val Pro Arg Asp Cys Lys Trp Glu Arg Leu Asp Leu Gly Leu His His

645 650 655

His His His His

660

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab3 CDRH1

<400> 85

Asn Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab3 CDRH2

<400> 86

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 87

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab3 CDRH3

<400> 87

Ala Arg Val Ser Ser Gly His Trp Asp Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab3 CDRL1

<400> 88

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 89

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab3 CDRL2

<400> 89

Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab3 CDRL3

<400> 90

Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Phe Thr

1 5

<210> 91

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab1 Heavy chain variable region nucleic acid sequence

<400> 91

gaggtgcaac tcgtggagtc aggcggtgga cttgttcagc ctgggcgaag tctgagactc 60

tcatgtgcag caagtggatt cactttctcc agttacggca tgcactgggt gagacaggcg 120

cctggaaagg gtttggaatg ggtcgctgtg atctcttacg acgggtcaaa caaatattac 180

gcggattcag tgaaagggcg gttcactatt tcacgggata actccaagaa caccctgtat 240

ctgcagatga atagcctgag ggcagaggac accgctgtgt actattgtgc ccgggacata 300

aggccttacg gcgattacag cgccgcattt gatatttggg gacaaggcac ccttgtgaca 360

gtatcttct 369

<210> 92

<211> 338

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab1 Light chain variable region nucleic acid sequence

<400> 92

aattttatgc ttacccaacc acatagtgtg agtgagtctc ccggcaagac tgtaacaatt 60

tcatgtaccg gcagcagtgg ctccatcgct agcaattatg tgcaatggta ccaacagcgc 120

cccgggagcg caccttcaat agtgatattc gaggataacc aacggcctag tggggctccc 180

gatagattta gtgggagtat agatagctcc tccaactctg cctctctcac cattagcggg 240

ctgaaaacag aggatgaagc cgactattac tgccaaagct atgattctag caaccacggc 300

ggagtgtttg gcggaggaac acagctgaca gtcctagg 338

<210> 93

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab2 Heavy chain variable region nucleic acid sequence

<400> 93

gaggtgcaac tggtgcaatc cggagccgag atgaaaaagc caggggagag cctgaagatc 60

tcttgtaagg gctctggcta taacttcgct agtgattgga tcggatgggt gaggcaaacc 120

cccggaaagg gcctcgagtg gatgggcgtg atctaccccg gcgactccga cacacgctat 180

agcgcctcat tccagggcca ggtcaccata agtgctgata aatcaataaa tacagcctac 240

ttgcaatggt caagtctgaa agcctcagat actgccatgt actattgtgc ctctgccgcc 300

ggcattgccg cggccggtca cgtcaccgcc ttcgacattt ggggtcaggg cactatggtc 360

actgtaagct cc 372

<210> 94

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab2 Light chain variable region nucleic acid sequence

<400> 94

gacatagtca tgacccagtc acctgactct ttggccgtgt ctctggggga gagagccaca 60

ataaattgca agtcatcaca gagcgtcctg tactcctcca ataataaaaa ttacctggcc 120

tggtaccagc aaaagcccgg gcaacccccc aaattgttga tttactgggc tagtacaagg 180

gaatctggag tgccagaccg gttttctggt tctggatctg gtactgactt caccctgaca 240

atcagctccc tgcaggccga agacgtggct gtgtactatt gtcagcagta ctatagtaca 300

ccagttactt tcggccaagg cactaaactc gaaatcaag 339

<210> 95

<211> 119

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Ab3 Heavy chain variable region amino acid sequence

<400> 95

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Val Ser Ser Gly His Trp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 96
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: Ab3 Heavy chain variable region nucleic acid sequence
<400> 96
gaggttcagc ttctggagag cggcggtggt cttgtacaac ctggaggatc actcaggttg 60
tcatgtgccg caagcgggtt tacattcagg aactatgcaa tgagctgggt cagacaggct 120
cccggcaagg gacttgagtg ggtatcttcc atcagcggat ctggaggagc aacatattat 180
gcagatagtg tcaaaggcag gttcacaata agccgcgaca attctaaaaa tactctttat 240

cttcaaatga atagccttag ggctgaggat acggcggtgt attattgtgc ccgcgtctca 300
agcgggcatt gggacttcga ttattggggg cagggtactc tggttactgt ttcctcc 357
<210> 97
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: Ab3 Light chain variable region amino acid sequence
<400> 97
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 98
<211> 322
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: Ab3 Light chain variable region nucleic acid sequence
<400> 98
gacatccaaa tgacacagag cccgtcttcc ctctcagctt cagtcggtga tcgagtgacg 60
attacgtgcc gcgccagcca aagcatctcc tcctatctta actggtatca gcagaaaccc 120
ggaaaggccc caaagttgct tatttacgac gcatcctccc ttcaatctgg tgtgcccagc 180
aggttctcag gcagcggttc aggaacggat tttactctta ccatttctag tcttcaacct 240

gaggattttg cgacgtatta ctgtcaacag agctacagtg cgccgttcac ctttgggcag 300
ggtactaagg ttgagataaa gc 322
<210> 99
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: Ab3 Heavy chain amino acid sequence
<400> 99
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr

20 25 30

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

Ala Arg Val Ser Ser Gly His Trp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

<210> 100
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: Ab3 Light chain amino acid sequence
<400> 100
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 101

<211> 689

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Human LRRC33-GARP chimera

<400> 101

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Phe Ser Gly Val Leu Gly Trp Arg Asn Arg Ser Gly Thr Ala Thr Ala

20 25 30

Ala Ser Gln Gly Val Cys Lys Leu Val Gly Gly Ala Ala Asp Cys Arg

35 40 45

Gly Gln Ser Leu Ala Ser Val Pro Ser Ser Leu Pro Pro His Ala Arg

50 55 60

Met Leu Thr Leu Asp Ala Asn Pro Leu Lys Thr Leu Trp Asn His Ser

65 70 75 80

Leu Gln Pro Tyr Pro Leu Leu Glu Ser Leu Ser Leu His Ser Cys His

85 90 95

Leu Glu Arg Ile Ser Arg Gly Ala Phe Gln Glu Gln Gly His Leu Arg

100 105 110

Ser Leu Val Leu Gly Asp Asn Cys Leu Ser Glu Asn Tyr Glu Glu Thr

115 120 125

Ala Ala Ala Leu His Ala Leu Pro Gly Leu Arg Arg Leu Asp Leu Ser

130 135 140

Gly Asn Ala Leu Thr Glu Asp Met Ala Ala Leu Met Leu Gln Asn Leu

145 150 155 160

Ser Ser Leu Arg Ser Val Ser Leu Ala Gly Asn Thr Ile Met Arg Leu

165 170 175

Asp Asp Ser Val Phe Glu Gly Leu Glu Arg Leu Arg Glu Leu Asp Leu

180 185 190

Gln Arg Asn Tyr Ile Phe Glu Ile Glu Gly Gly Ala Phe Asp Gly Leu

195 200 205

Ala Glu Leu Arg His Leu Asn Leu Ala Phe Asn Asn Leu Pro Cys Ile

210 215 220

Val Asp Phe Gly Leu Thr Arg Leu Arg Val Leu Asn Val Ser Tyr Asn

225 230 235 240

Val Leu Glu Trp Phe Leu Ala Thr Gly Gly Glu Ala Ala Phe Glu Leu

245 250 255

Glu Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Leu Phe Phe Pro Leu Leu
260 265 270
Pro Gln Tyr Ser Lys Leu Arg Thr Leu Leu Leu Arg Asp Asn Asn Met
275 280 285
Gly Phe Tyr Arg Asp Leu Tyr Asn Thr Ser Ser Pro Arg Glu Met Val

290 295 300
Ala Gln Phe Leu Leu Val Asp Gly Asn Val Thr Asn Ile Thr Thr Val
305 310 315 320
Ser Leu Trp Glu Glu Phe Ser Ser Ser Asp Leu Ala Asp Leu Arg Phe
325 330 335
Leu Asp Met Ser Gln Asn Gln Phe Gln Tyr Leu Pro Asp Gly Phe Leu
340 345 350
Arg Lys Met Pro Ser Leu Ser His Leu Asn Leu His Gln Asn Cys Leu

355 360 365
Met Thr Leu His Ile Arg Glu His Glu Pro Pro Gly Ala Leu Thr Glu
370 375 380
Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Ser Glu Leu His Leu Ala Pro Gly
385 390 395 400
Leu Ala Ser Cys Leu Gly Ser Leu Arg Leu Phe Asn Leu Ser Ser Asn
405 410 415
Gln Leu Leu Gly Val Pro Pro Gly Leu Phe Ala Asn Ala Arg Asn Ile

420 425 430
Thr Thr Leu Asp Met Ser His Asn Gln Ile Ser Leu Cys Pro Leu Pro
435 440 445
Ala Ala Ser Asp Arg Val Gly Pro Pro Ser Cys Val Asp Phe Arg Asn
450 455 460
Met Ala Ser Leu Arg Ser Leu Ser Leu Glu Gly Cys Gly Leu Gly Ala
465 470 475 480
Leu Pro Asp Cys Pro Phe Gln Gly Thr Ser Leu Thr Tyr Leu Asp Leu

485 490 495
Ser Ser Asn Trp Gly Val Leu Asn Gly Ser Leu Ala Pro Leu Gln Asp

500 505 510

Val Ala Pro Met Leu Gln Val Leu Ser Leu Arg Asn Met Gly Leu His

515 520 525

Ser Ser Phe Met Ala Leu Asp Phe Ser Gly Phe Gly Asn Leu Arg Asp

530 535 540

Leu Asp Leu Ser Gly Asn Cys Leu Thr Thr Phe Pro Arg Phe Gly Gly

545 550 555 560

Ser Leu Ala Leu Glu Thr Leu Asp Leu Arg Arg Asn Ser Leu Thr Ala

565 570 575

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

580 585 590

Ile Tyr Leu Ser Gln Asn Pro Tyr Asp Cys Cys Gly Val Asp Gly Trp

595 600 605

Gly Ala Leu Gln His Gly Gln Thr Val Ala Asp Trp Ala Met Val Thr

610 615 620

Cys Asn Leu Ser Ser Lys Ile Ile Arg Val Thr Glu Leu Pro Gly Gly

625 630 635 640

Val Pro Arg Asp Cys Lys Trp Glu Arg Leu Asp Leu Gly Leu Leu Ile

645 650 655

Ile Ile Leu Thr Phe Ile Leu Val Ser Ala Ile Leu Leu Thr Thr Leu

660 665 670

Ala Ala Cys Cys Cys Val Arg Arg Gln Lys Phe Asn Gln Gln Tyr Lys

675 680 685

Ala