

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 501348

(P2003 - 501348A)

(43)公表日 平成15年1月14日 (2003.1.14)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コード* ( 参考 )
C 0 7 K 16/22		C 0 7 K 16/22	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	N 4 B 0 6 4
A 6 1 P 11/06		A 6 1 P 11/06	4 C 0 8 5
	13/12		4 H 0 4 5
	17/02		

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 85数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 615659(P2000 - 615659)

(86)(22)出願日 平成12年5月2日(2000.5.2)

(85)翻訳文提出日 平成13年10月30日(2001.10.30)

(86)国際出願番号 PCT/GB00/01679

(87)国際公開番号 W000/066631

(87)国際公開日 平成12年11月9日(2000.11.9)

(31)優先権主張番号 60/131,983

(32)優先日 平成11年4月30日(1999.4.30)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ケンブリッジ アンティボディー テクノロジ- リミテッド  
イギリス国,ケンブリッジシャー エスジー  
8 6ジェイジェイ,ロイストン,メルボルン  
,ザ サイエンス パーク

(72)発明者 トンプソン, ジュリア エリザベス  
イギリス国,ケンブリッジシャー シービー  
2 4エルティ- ,ウィットルスフォード,ハイ  
ストリート 6,シービーズ コテイジ

(74)代理人 弁理士 石田 敬 ( 外 4 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T G F 1 に対する特異的抗体および抗体フラグメント

(57)【要約】

本発明は、S L 1 5 の ( 配列番号 4 )、および J T 1 8 2 の ( 配列番号 1 0 ) 抗体 V H 領域の C D R 3 配列に基づく、例えば抗体可変ドメインの形態の、特異的結合成員を提供するものである。この抗体は T G F 1 に対する強力な中和活性を持ち、過剰の T G F 1 活性に付随する病気、例えば線維症、免疫反応および腫瘍の進行の治療に有用である。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 特異的結合成員が、S L 1 5のV H C D R 3（配列番号13）またはJ T 1 8 2のV H C D R 3（配列番号15）として実質上開示されるアミノ酸配列を有するV H C D R 3を含む抗原結合ドメインを含む、T G F<sub>1</sub>に結合することのできる単離された前記特異的結合成員。

【請求項2】 C S 3 7 V H C D R 1（配列番号11）およびC S 3 7 V H C D R 2（配列番号12）の一方または両方として実質上開示されるアミノ酸配列を有する、V H C D R 1またはV H C D R 2をさらに含む、請求項1に記載の特異的結合成員。

【請求項3】 C S 3 7 V H C D R 1（配列番号11）およびC S 3 7 V H C D R 2（配列番号12）として実質上開示されるC D R 1配列を含む、請求項1または2に記載の特異的結合成員。

【請求項4】 当該C D R 1、C D R 2およびC D R 3配列がヒト抗体フレームワークに存在する、請求項3に記載の特異的結合成員。

【請求項5】 特異的結合成員が配列番号4に実質上開示されるS L 1 5 V Hドメインを含む、T G F<sub>1</sub>に結合することのできる単離された前記特異的結合成員。

【請求項6】 特異的結合成員が配列番号10に実質上開示されるJ T 1 8 2 V Hドメインを含む、T G F<sub>1</sub>に結合することのできる単離された前記特異的結合成員。

【請求項7】 特異的結合成員が配列番号8に実質上開示されるS L 1 5 S V Lドメインを含む、T G F<sub>1</sub>に結合することのできる単離された前記特異的結合成員。

【請求項8】 特異的結合成員が、  
( i ) 配列番号4に実質上開示されるS L 1 5 V Hドメインおよび配列番号10に実質上開示されるJ T 1 8 2 V Hドメインの群から選ばれるV Hドメイン；および、  
( ii ) 配列番号8に実質上開示されるS L 1 5 S V Lドメインおよび配列番号6に実質上開示されるS L 1 5 A V Lドメインの群から選ばれるV Lドメイン

、  
を含む、TGF<sub>1</sub>に結合することのできる単離された前記特異的結合成員。

【請求項9】 V Hドメインが配列番号4に実質上開示されるS L 1 5 V Hドメインである、請求項8に記載の単離された特異的結合成員。

【請求項10】 一本鎖F v ( s c F v ) の形態である、前記請求項のいずれか1項に記載の単離された特異的結合成員。

【請求項11】 I g Gの形態の、請求項1～9のいずれか1項に記載の単離された特異的結合成員。

【請求項12】 I g GがI g G 1またはI g G 4である、請求項11に記載の単離された特異的結合成員。

【請求項13】 薬学上許容し得る賦形剤、担体、緩衝剤または安定剤と合した、請求項1～12のいずれか1項に記載の特異的結合成員を含む医薬組成物。  
。

【請求項14】 ヒトまたは動物の治療方法における使用のための、請求項1～12のいずれか1項に記載の特異的結合成員または請求項13に記載の組成物。

【請求項15】 当該治療が、糸球体腎炎、ケロイドおよび過形成性瘢痕形成、増殖性硝子体網膜症、緑内障ドレナージ手術、角膜損傷および白内障を包含する、患者の細胞外マトリックス沈着に伴う状態を治療することである、請求項14に記載の使用のための、特異的結合成員または組成物。

【請求項16】 免疫または炎症反応を調節する方法における、請求項14に記載の使用のための、特異的結合成員または組成物。

【請求項17】 腫瘍の治療方法における、請求項14に記載の使用のための、特異的結合成員または組成物。

【請求項18】 当該腫瘍が血管新生または転移を伴う、請求項17に記載の使用のための、特異的結合成員または組成物。

【請求項19】 当該腫瘍が、乳房、前立腺、卵巣、胃、結腸直腸、皮膚、肺、子宮頸部および膀胱腫瘍、または白血病もしくは肉腫である、請求項17または18に記載の使用のための、特異的結合成員または組成物。

【請求項20】 喘息の治療方法における、請求項14に記載の使用のための、特異的結合成員または組成物。

【請求項21】 当該病気がTGF $\beta_1$ の発現に付随する、患者の病気を治療する方法であって、患者に、請求項1～12のいずれか1項に記載の特異的結合成員または請求項13に記載の組成物を投与することを含む方法。

【請求項22】 当該病気が、糸球体腎炎、ケロイドおよび過形成性瘢痕形成、増殖性硝子体網膜症、緑内障ドレナージ手術、角膜損傷および白内障；血管新生または転移を伴う腫瘍を包含する腫瘍、および/または乳房、前立腺、卵巣、胃、結腸直腸、皮膚、肺、子宮頸部および膀胱腫瘍、または白血病もしくは肉腫の群から選ばれる腫瘍；または喘息を包含する、患者における細胞外マトリックスの沈着を伴う、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 試料を請求項1～12のいずれか1項に記載の特異的結合成員と接触させ、当該試料中のTGF $\beta_1$ への該特異的結合成員の結合量を決定することを含む、試料中のTGF $\beta_1$ の量を決定する方法。

【請求項24】 請求項1～12のいずれか1項に記載の特異的結合成員をコードしている配列を含む、単離された核酸。

【請求項25】 請求項24に記載の核酸を、宿主細胞中で、当該核酸の発現をさせる条件の下で発現させ、その後当該特異的結合成員を回収することを含む、TGF $\beta_1$ に結合することのできる特異的結合成員を製造する方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

この出願は、1999年4月30日出願の米国仮出願60/131983号からの優先権を主張するものであり、当該仮出願の内容は引用によりその全体を本明細書の一部とする。

**【0002】****発明の分野**

本発明は、トランスフォーミング成長因子1 (TGF<sub>1</sub>) に結合する特異的結合成員、特に抗体およびそのフラグメントに関するものである。より詳細には、本発明は、抗体SL15 (かつてKyliieとして知られた抗体) のVH CDR3、特にSL15 VHドメインを含む特異的結合成員に関するものであり、これはSL15 AまたはSL15 S VLドメインと組み合わせることもできる。さらに、本発明は、特に線維症の疾患の治療、創傷治癒の調節および癌の治療のための医薬製剤への、かかる特異的結合成員の使用に関するものである。

**【0003】****発明の背景**

WO97/13844号として公開されたPCT/GB96/02450号は、ヒトTGF<sub>1</sub>に特異的なヒト抗体およびヒトTGF<sub>2</sub>に特異的なヒト抗体の単離を開示している。これは、31G9 VHドメインおよびこのドメインの変異体を有する抗体を記載している。より詳細には、この出願は、31G9 VHドメインをCS37 VLおよびこのドメインの変異体と共に含み、

(i) ELISAにおいてTGF<sub>1</sub>への結合に関してCS37と競合し、

(ii) TGF<sub>3</sub>に関してはTGF<sub>1</sub>と優先的に結合し、そして

(iii) TGF<sub>1</sub>を中和する、

抗体を包含する、抗体CS37を記載していた。

**【0004】****発明の説明**

本発明は、CS37に関連する抗体であってTGF<sub>1</sub>の結合および中和に関して予期し得ない有利な性質を有する抗体の同定を基礎とするものである。これ

らはTGF<sub>2</sub>またはTGF<sub>3</sub>には結合せず、またこれらを中和しない。

#### 【0005】

本発明に係る抗体は、活性なTGF<sub>1</sub>を強力に中和する。これらの抗体のためのエピトープはTGF<sub>1</sub>のC末端領域(残基83-112)に存在し、TGFのレセプターと相互作用することが確認されている領域である、フィンガー2としても知られるTGF<sub>1</sub>の残基92-98より成るループを含んでいる。この抗体は潜在性TGF<sub>1</sub>に関して活性TGF<sub>1</sub>と優先的に結合する。

#### 【0006】

TGF<sub>1</sub>を強力に中和するSL15Sの変異体もまた本明細書に開示する。これらは主としてVHまたはVLドメインのCDR3中のアミノ酸置換によって異なっている。しかしながら置換が施され得るその他の部位もまた存在し、例えば、軽鎖の残基25においてアラニンが置換され、IgG4抗体、SL15A IgG4、CAT-192が生成し得る。強力な中和活性の保持と共存し得る幾つかの置換が施されることもある。本発明に係る抗体は、線維症の疾患、例えば肺線維症の治療に、瘢痕形成反応、例えば創傷治癒および角膜瘢痕形成の調節に、そして下記に詳述するその他の状況、例えば腫瘍の治療に特に有用であろう。

#### 【0007】

特異的結合蛋白、例えば本明細書に定義する有利な抗体VHおよびVLドメインの相補性決定領域(CDR)、とりわけCDR3領域を基礎とする抗体は、前述の目的に役立ち、本発明の態様を表現するものである。

#### 【0008】

様々な側面のうち本発明の最も好ましい態様は、本明細書に定義するSL15 VHドメインのVH CDR3、SL15 VH CDR3を包含するVHドメイン、特にSL15 VHドメイン自身、およびかかるVHドメインと、VLドメイン、特にSL15AまたはSL15S VLドメイン、またはSL15 VL CDR3を含むその他のVLドメインとの対合に基づくものである。抗体の抗原結合ドメインSL15(いずれの形でもよく、例えばscFvまたはIgG4)は、SL15 VHと、二つの変異体SL15A VL(CS37)またはSL15S VL(A25Sを伴うCS37)のいずれかで構成される。いずれの変異

体においてもSL15はかつてKylieとして知られていた抗体である。SL15 S s c F vはCAT191として; SL15A I g G 4はCAT-192として;そしてSL15S I g G 4はCAT-193としても知られている。

【0009】

本発明の様々な側面において、そのさらなる態様は、JT182 VH CDR 3、JT182 VH CDR 3を包含するVHドメイン、特にJT182 VH ドメイン、および、かかるVHドメインと、VLドメイン、特にCS37 VL ドメインとの対合に基づくものである。JT182はSL15ほど有効ではないが、意外なことにCS37より優れた性質を有している。

【0010】

第一の態様において、本発明は、TGF $\beta_1$ と結合できる単離された特異的結合成員を提供し、ここで当該特異的結合成員は、第1表または第2表にSL15またはJT182のVH CDR 3として実質上開示したアミノ酸配列を有するVH CDR 3を含む抗原結合ドメインを含んでいる。

【0011】

【表1】

第1表：抗TGF $\beta$ 1クローン CDR3およびs c F vの相対力価

クローン	およその IC <sub>50</sub> (RRA)	VH CDR3	VL CDR3
CS37	10-15nM	TGEYSGYDTSGVEL (配列番号14)	LQDSNYPLT (配列番号18)
JT182	0.5-1nM	TGEYSGYDTPASPD (配列番号15)	CS37
SL15	0.1nM	TGEYSGYDTPQYS (配列番号13)	CS37 (+L25 AからSへ)

s c F vフラグメント間で相違する残基に下線を付した。

## 【0012】

さらに本発明は、CS37 VHのVH CDR1およびVH CDR2の一方または両方、好ましくは両方として実質的に開示される(第2表)アミノ酸配列を有するVH CDR1またはVH CDR2をさらに含む前記の単離された特異的結合成員を提供する。

## 【0013】

## 【表2】

第2表：CS37、SL15およびJT182のCDRのCDR配列

ドメイン	CDR1	CDR2	CDR3
CS37 VH	SYGMH (配列番号11)	VISYDGSIKYYADSVKG (配列番号12)	TGEYSGYDTSGVEL (配列番号14)
SL15 VH	SYGMH (配列番号11)	VISYDGSIKYYADSVKG (配列番号12)	TGEYSGYDTPQYS (配列番号13)
JT182 VH	SYGMH (配列番号11)	VISYDGSIKYYADSVKG (配列番号12)	TGEYSGYDTPASPD (配列番号15)
CS37 VL	RASQGIGDDL (配列番号16)	GTSTLQS (配列番号17)	LQDSNYPLT (配列番号18)
SL15 SVL	RSSQGIGDDL (配列番号19)	GTSTLQS (配列番号17)	LQDSNYPLT (配列番号18)

## 【0014】

好ましい態様において、結合ドメインはヒト抗体フレームワークに存在している。かかる態様の、一つの好ましい例は、JT182 VHドメインとして実質的に開示されているアミノ酸配列を有するVHドメインであって、その配列は配列番号10に開示されている。さらなる好ましい態様は、SL15 VHドメインとして実質的に開示されているアミノ酸配列を有するVHドメインであって、その配列は配列番号4に開示されている。

## 【0015】

第二の態様において、本発明は、TGF $\beta$ と結合できる単離された特異的結合成員を提供し、ここで当該特異的結合成員は、SL15 SVLドメインとして実質上開示されるアミノ酸配列を有するVLドメインを含む抗原結合ドメイン

を含み、その配列は配列番号8に開示されている。

【0016】

さらなる態様において、本発明は、第一の態様に関して上に開示されるVHドメイン、およびVLドメイン[ここで好ましくはVLドメインは、CS37 VL(SL15A)(その配列は配列番号6に開示されている)、またはSL15S VL(その配列は配列番号8に開示されている)として実質的に開示されているアミノ酸配列を有する]を含む、TGF<sub>β</sub>と結合できる特異的結合成員を提供する。

【0017】

特に好ましい態様において、本発明は、CS37 VLドメインと、JT182 VHおよびSL15 VHから選ばれるVHドメイン、最も好ましくはSL15 VHを含む、特異的結合成員を提供する。さらなる特に好ましい態様では、本発明は、SL15 VHおよびSL15A VL(CS37 VL)またはSL15S VLを含む特異的結合成員を提供する。

【0018】

本発明に係る好ましい態様は、1、2、3、4または5個のアミノ酸置換がCDR、例えばCDR3、および/またはFRに施されている、JT182 VHまたはSL15 VHドメインを含む特異的結合成員(ここでこの特異的結合成員は、TGF<sub>β</sub>と結合する能力を保持している)を提供する。さらなる好ましい態様は、SL15A(CS37)VLもしくはSL15S VL、または1、2、3、4または5個のアミノ酸置換がCDR、例えばCDR3、および/またはFRに施されている、SL15AもしくはSL15S VLドメインを含む特異的結合成員(ここでこの特異的結合成員は、TGF<sub>β</sub>と結合する能力を保持している)を提供する。このようなアミノ酸置換は一般に「保存性」であり、例えば、イソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンといった1個の疎水性残基を別のものに、または1個の極性残基を別のものに置換すること、例えばアルギニンをリジンに、グルタミン酸をアスパラギン酸に、またはグルタミンをアスパラギンに置換することである。或る種の位置では非保存性置換が許容できる。

。

## 【0019】

このような特異的結合成員はTGF<sub>1</sub>と結合することができる。好ましい態様は、TGF<sub>2</sub>および/またはTGF<sub>3</sub>との、好ましくはTGF<sub>2</sub>およびTGF<sub>3</sub>との有意な交差反応性を欠失している。

## 【0020】

好ましい態様は、放射性レセプター検定(Lucas C等(1991) Meth in Enzymology 198、303-16)においてCS37の少なくとも5倍、より好ましくは約10倍、15倍、20倍、50倍、75倍、100倍または150倍の力価をもってTGF<sub>1</sub>を強力に中和する。力価は、被検抗体とCS37とを、同等の分子形式で、例えば一価抗体(scFvまたはFab)として、または二価抗体(IgG1またはIgG4)として測定する。

## 【0021】

好ましい態様は、潜在性TGF<sub>1</sub>よりも活性TGF<sub>1</sub>に優先的に結合する。

## 【0022】

その配列が本明細書中に開示され、そしてTGF<sub>1</sub>のための特異的結合成員に使用できる、VHおよびVLドメインならびにCDRの変異体は、配列変更または突然変異およびスクリーニングの方法によって取得できる。かかる方法もまた本発明により提供される。

## 【0023】

抗体配列に加えて、特異的結合成員は、例えば折り畳まれたドメインといったようなペプチドまたはポリペプチドを形成している、または、当該分子に、抗原に結合する能力に加え、別の機能的性質を付与するための、他のアミノ酸を含んでいるかもしれない。本発明に係る特異的結合成員は、検出可能な標識を持っているかもしれず、または、毒素もしくは酵素とコンジュゲートしているかもしれない(例えばペプチド結合またはリンカーを介して)。

## 【0024】

さらなる態様では、本発明は、上記定義による特異的結合成員をコードしている配列を含む単離された核酸配列、および、当該結合成員の発現を引き起こす条件の下で当該核酸を発現させ、そして該結合成員を回収することを含む、本発明

に係る特異的結合成員を製造する方法を提供するものである。

【0025】

本発明に係る特異的結合成員は、人間または動物の身体の治療または診断方法、例えば、本発明に係る特異的結合成員の有効量を当該患者に投与することを含む、人間の患者における疾病または疾患の治療方法（これは予防的処置を包含し得る）に使用することができる。本発明に従って治療可能な状態は下に述べる。

【0026】

これらのおよびその他の本発明の態様のさらなる詳細を下に述べる。

【0027】

本明細書に記載する全ての文書は引用により本明細書の一部とする。本明細書に記載する配列は、別途個別的記載を行わない限り、核酸およびアミノ酸配列についてそれぞれ5'から3'への、およびNからC末端への常套的表記によって示され、且つそれを意味する。

【0028】

（発明の詳細な説明）

用語

特異的結合成員

これは、相互に結合特異性を有する一对の分子の成員を表す。特異的結合対の成員は、天然由来であってよく、または全体がもしくは部分的に合成により生成されていてもよい。この一对の分子の一方の成員は、他方の成員の特定の空間的および極性構成と特異的に結合し、それ故、該構成に対し相補的である、表面上の領域または空洞を有する。したがって、この対の成員は、相互に特異的に結合する性質を持っている。特異的結合対の種類例は、抗原 - 抗体、ビオチン - アビジン、ホルモン - ホルモンレセプター、レセプター - リガンド、酵素 - 基質である。この出願は、抗原 - 抗体型の反応に関するものである。

【0029】

抗体

これは、天然であるかまたは部分的もしくは全体的に合成により生成されたものであるかに拘わらず、免疫グロブリンを表す。さらにこの用語は、抗体結合ド

メインである、または抗体結合ドメインと実質上相同である、結合ドメインを有する任意のポリペプチドまたは蛋白を包含する。これらは天然原料から誘導でき、またはこれらは一部もしくは全体を合成により生成することができる。抗体の例は、免疫グロブリンイソタイプおよびそれらのイソタイプサブクラス；F a b、s c F v、F v、d A b、F dといったような抗原結合ドメインを含むフラグメント；およびジアボディ（diabody）である。

#### 【0030】

モノクローナルおよびその他の抗体を取得し、組換えDNA技術の技法を使用して、元の抗体の特異性を保持する別の抗体またはキメラ分子を産生することが可能である。このような技術は、或る抗体の免疫グロブリン可変領域または相補性決定領域（CDR）をコードしているDNAを、異なる免疫グロブリンの定常領域または定常領域プラスフレームワーク領域に導入することを含み得る。例えば、EP - A - 184187、GB2188638AまたはEP - A - 239400を参照されたい。抗体を産生するハイブリドーマまたはその他の細胞を遺伝子突然変異またはその他の変化に付すことができ、これは産生される抗体の結合特異性を変えることも変えないこともある。

#### 【0031】

抗体は幾つかの方法で修飾することができるため、「抗体」という語は、必要な特異性を伴う結合ドメインを有する任意の特異的結合成員または物質を包含するものと解するべきである。従って、この用語は、天然であるかまたは全体的もしくは部分的に合成品であるかに拘わらず、免疫グロブリン結合ドメインを含む任意のポリペプチドを包含する、抗体フラグメント、抗体の誘導體、機能的等価物および同族体を包含する。故に、別のポリペプチドに融合した、免疫グロブリン結合ドメインを含むキメラ分子、または等価物が包含される。キメラ抗体のクローニングおよび発現はEP - A - 0120694およびEP - A - 0125023に記載されている。

#### 【0032】

抗体全体のフラグメントが抗原を結合する機能を発揮し得るということが示されている。結合フラグメントの例は、(i) V L、V H、C LおよびC H 1ドメ

インで構成されるF a bフラグメント；(ii) V HおよびC H 1ドメインで構成されるF dフラグメント；(iii) 単一の抗体のV LおよびV Hドメインで構成されるF vフラグメント；(iv) V Hドメインで構成されるd A bフラグメント (Ward,E.S.等、Nature 341、544-546(1989))；(v) 単離されたC D R領域；(vi) 連結した2個のF a bフラグメントを含む二価フラグメントである、F ( a b ' ) 2フラグメント；(vii) 2個のドメインを結びつけて抗原結合部位を形成させるペプチドリンカーによってV HドメインおよびV Lドメインが連結している、一本鎖F v分子 ( s c F v ) (Bird等、Science、242、423-426、1988；Huston等、PNAS USA、85、5879-5883、1988)；(viii) 二重特異性一本鎖F v二量体 ( P C T / U S 9 2 / 0 9 9 6 5 ) および (ix) 遺伝子融合によって組み立てられた多価または多特異性フラグメントである、「ジアボディ」(W O 9 4 / 1 3 8 0 4；P.Holliger等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 6444-6448、1993)である。F v、s c F vまたはdiabody分子は、V HおよびV Lドメインを連結するジスルフィド橋を組み込むことによって安定化することができる (Y.Reiter等、Nature Biotech、14、1239-1245、1996)。C H 3ドメインに結合させたs c F vを含むミニボディ (minibody) もまた製造することができる (S.Hu等、Cancer Res.、56、3055-3061、1996)。

#### 【0033】

ジアボディはポリペプチドの多量体であって、各々のポリペプチドは、免疫グロブリン軽鎖の結合領域を含む第一ドメインと、免疫グロブリン重鎖の結合領域を含む第二ドメインとを含み、この二つのドメインは連結している (例えばペプチドリンカーによって) が、相互に結びついて抗原結合部位を形成することはできない。抗原結合部位は、この多量体内部の一つのポリペプチドの第一ドメインと、この多量体内部の別のポリペプチドの第二ドメインとの結合によって形成される (W O 9 4 / 1 3 8 0 4)。

#### 【0034】

二重特異性抗体を使用する場合、これらは、様々な方法 (Holliger,P.およびWinter G. Current Opinion Biotechnol. 4、446-449(1993)) で製造、例えば化学的に調製され、またはハイブリッドハイブリドーマから製造することができ、

または、上述の二重特異性抗体フラグメントのうち任意のものである、常套的二重特異性抗体であってよい。全抗体よりはs c F v二量体またはジアボディを使用することが好ましいであろう。ジアボディおよびs c F vは、抗イディオタイプ反応の影響を低減させるとされる可変ドメインのみを使用して、F c領域なしで組み立てることができる。

#### 【0035】

二重特異性全抗体とは対照的に、二重特異性ジアボディは、さらに、E.coli中で容易に組み立て、発現できるため、特に有用である。適当な結合特異性を有するジアボディ（およびその他の多くのポリペプチド、例えば抗体フラグメント）は、ライブラリー由来のファージディスプレイ（WO94/13804）を使用して容易に選択することができる。ジアボディの一方の腕を、例えば抗原Xに対する特異性と共に一定に保ちたい場合は、他方の腕が変化しているライブラリーを作成し、適当な特異性の抗体を選択することができる。二重特異性全抗体は、knobs-into-holes法によって作成することができる（J.B.B.Ridgeway等、Protein Eng., 9, 616-621, 1996）。

#### 【0036】

本出願に開示するVHおよびVLドメインにより作成されたTGF<sub>1</sub>のための一方の結合部位、およびTGF<sub>2</sub>のための他方の結合部位を有するジアボディを作成することができる。TGF<sub>2</sub>結合部位は、例えば抗体6B1のVHおよびVLドメインから作成することができる（WO97/13844）。

#### 【0037】

##### 抗原結合ドメイン

これは、抗原の一部または全体と特異的に結合し且つこれに対し相補的である領域を含む、抗体の一部分を表す。抗原が大きい場合、抗体は抗原の特定部分とのみ結合するが、この部分をエピトープと称する。抗原結合ドメインは1またはそれ以上の抗体可変ドメイン（例えば、VHドメインで構成される、いわゆるFd抗体フラグメント）によって提供し得る。好ましくは、抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域（VL）および抗体重鎖可変領域（VH）を含む。

#### 【0038】

### 特異的

これは、特異的結合対の一方の成員が、その特異的結合相手以外の分子と有意な結合を示さない状況を指すのに用いることができる。この用語は、例えば抗原結合ドメインが、幾つかの抗原が有する特定のエピトープに特異的である場合にも適用可能であり、その場合、抗原結合ドメインを有する特異的結合成員は、該エピトープを有する種々の抗原に結合することができるであろう。

#### 【0039】

### 含む

これは一般に、包含する、即ち、1以上の特徴または構成成分の存在を許容するという意味に使用する。

#### 【0040】

### 単離された

これは、本発明に係る特異的結合成員、または係る結合成員をコードしている核酸が本発明に合致する状態を指す。成員および核酸は、それらが本来結合している物質、例えば、天然環境において、または、インビトロもしくはインビボで実施される組換えDNA技術によって製造される場合はそれらが製造される環境（例えば細胞培養）において、見出される他のポリペプチドまたは核酸を含まない、または実質上含まないであろう。成員および核酸は、希釈剤またはアジュバントと共に調合することができ、それでいて実際的目的のために単離することができる。例えばこの成員は、通常、イムノアッセイに使用するための微量滴定板の被覆に使用する場合はゼラチンまたはその他の担体と混合し、または、診断もしくは治療に使用する場合は薬学上許容し得る担体または希釈剤と混合する。特異的結合成員は、天然状態で、または異種真核細胞（例えばCHOまたはNS0（E C A C C 8 5 1 1 0 5 0 3）細胞）の系によりグリコシル化されていてよく、またはグリコシル化されていなくともよい（例えば原核細胞における発現によって産生される場合）。

#### 【0041】

「実質的に開示されるような」とは、本発明に係るCDRまたはVHもしくはVLドメインが、本明細書に開示される配列の特定領域と同一である、または高

度に類似していることを意味する。「高度に類似している」とは、1～5、好ましくは1～4、例えば1～3または1もしくは2、または3もしくは4個の置換がCDRおよび/またはVHもしくはVLドメインに施されているかも知れないことを企図するものである。

#### 【0042】

本発明に係るCDRを有するための構造は、一般に、当該CDRが、再編成された免疫グロブリン遺伝子によりコードされている天然に存在するVHおよびVL抗体可変ドメインのCDRに対応する位置に存在する、抗体重鎖または軽鎖配列またはその実質的な部分の構造となるであろう。免疫グロブリン可変ドメインの構造および位置は、(Kabat, E.A.等、Sequences of Proteins of Immunological Interest 第4版、US Department of Health and Human Services 1987、およびその更新版、現在インターネット上で利用可能(<http://immuno.bme.nwu.edu>))を参照して決定できる。CDRは一般にKabatにより定義された通りである。さらに、CDRには、Kabat VH CDR 1に隣接するChothiaにより定義されたループの移植残基を移植することもできる。SL15Sに関しては、これは重鎖の残基26～30を含むであろう(GFTGS)。

#### 【0043】

好ましくは、第1表に実質上開示するアミノ酸配列は、ヒト重鎖可変ドメイン中のCDR3またはその実質的一部分として存在する。

#### 【0044】

本発明において使用する可変ドメインは、任意の生殖細胞系または再編成されたヒト可変ドメインから誘導されてよく、または、既知のヒト可変ドメインのコンセンサス配列に基づく合成可変ドメインであってよい。本発明に係るCDR由来配列は、組換えDNA技術を用いて、CDR3領域を欠失する可変ドメインのレパートリー中に導入することができる。

#### 【0045】

例えば、Marks等(Bio/Technology、1992、10:779-783)は、抗体可変ドメインのレパートリーを生成する方法を記載しており、この方法では、可変ドメイン領域の5'末端を目的とし、またはこれに隣接するコンセンサスプライマーを、ヒ

トVH遺伝子の第三フレームワーク領域に対するコンセンサプライマーと組み合わせて使用し、CDR3を欠失するVH可変ドメインのレパトリーを得る。Marks等はさらに、このレパトリーが特定の抗体のCDRと如何にして結合できるかを記載している。類似の技術を使用して、本発明に係るCDR3由来配列を、CDR3を欠失するVHまたはVLドメインのレパトリーとシャフルし、このシャフルした完全なVHまたはVLドメインを同起源のVLまたはVHドメインと合して、本発明に係る特異的結合成員を得ることができる。次いでこのレパトリーを適当な宿主系、例えばWO92/01047号のファージディスプレイ系中でディスプレイすると、その結果、好適な特異的結合成員が選択できる。レパトリーは、 $10^4$ 以上の個々の成員、例えば $10^6 \sim 10^8$ または $10^{10}$ の成員から構成し得る。

【0046】

類似のシャフルまたは組み合わせ技術はStemmerによっても開示されており(Nature、1994、370:389-391)、これは、 $\lambda$ -ラクターゼ遺伝子に関する技術を記載しているが、このアプローチは抗体の産生に使用できることを観察している。

【0047】

さらなる別法は、可変ドメイン全体に突然変異を導入するため、例えばSL15もしくはJT182のVH遺伝子またはSL15AもしくはSL15SのVL遺伝子の無作為突然変異誘発を使用して、本発明に係るCDR由来配列を有する新規なVHまたはVL領域を生成することである。このような技術はGram等(1992、Proc.Natl.Acad.Sci.,USA、89:3576-3580)により記載されており、誤りがちなPCRを使用している。

【0048】

使用できるもう一つの方法は、VHまたはVL遺伝子のCDR領域に突然変異誘発を実施することである。このような技術はBarbas等(1994、Proc.Natl.Acad.Sci.,USA、91:3809-3813)およびSchier等(1996、J.Mol.Biol. 263:551-567)により開示されている。

【0049】

上記の技術は全て当分野において自体既知であり、それ自体で本発明の一部を形成する訳ではない。当業者は、当分野における通常の方法を用いて本発明に係る特異的結合成員を得るために、このような技術を使用することができるであろう。

#### 【0050】

本発明のさらなる態様は、TGF $\beta_1$ に特異的な抗体抗原結合ドメイン、および、好ましくは、本発明に係る態様に従う特異的結合成員のために本明細書に開示される1以上のさらなる性質を取得するための方法を提供するものであって、この方法は、本明細書に開示されるVHドメイン(SL15またはJT182)のアミノ酸配列中の1以上のアミノ酸を付加、除去、置換または挿入することにより、当該VHドメインのアミノ酸配列変異体であるVHドメインを取得し、このように取得したVHドメインを1以上のVLドメインと合し、そしてこのVH/VLの組み合わせ物(群)を試験して、TGF $\beta_1$ に特異的な、そして所望により1以上の好ましい前記性質を有する、抗体抗原結合ドメインを同定することを含むものである。このVLドメインは、SL15A VLとして実質的に開示されているアミノ酸配列(CS37)を有するか、またはVLとして実質的に開示されているアミノ酸配列を有することができる。

#### 【0051】

本明細書に開示されているVLドメインの1以上の配列変異体を1以上のVHドメインと合する、類似の方法を使用することもできる。

#### 【0052】

本発明に係るさらなる態様は、TGF $\beta_1$ に対し特異的な特異的結合成員を製造する方法を提供し、この方法は、

a) 置換されるべきCDR3を含むか、またはCDR3コード化領域を欠失する、VHドメインをコードしている核酸の出発レパートリーを提供し；

b) 当該レパートリーを、ドナー核酸が当該レパートリーのCDR3領域中に挿入されるよう、SL15またはJT182 VH CDR3として本明細書に実質的に開示されているアミノ酸配列をコードしているドナー核酸と合して、VHドメインをコードしている核酸のレパートリー生成物を提供し；

- c) 当該レパートリー生成物の核酸を発現させ；そして、
  - d) TGF<sub>β</sub> に対し特異的な特異的結合成員を選択し；そして、
  - e) 当該特異的結合成員またはそれをコードしている核酸を回収する、
- ことを含む。

【0053】

また、本発明に係るV L CDR3を、置換されるべきCDR3を含むか、またはCDR3コード化領域を欠失する、V Lドメインをコードしている核酸のレパートリーと合する、類似方法を使用することもできる。

【0054】

同様に、1以上、または3個全てのCDRをV HまたはV Lドメインのレパートリー中に導入し、次いでこれを、特異的結合成員またはTGF<sub>β</sub> に特異的な特異的結合成員についてスクリーニングすることができる。

【0055】

免疫グロブリン可変ドメインの実質的な部分は、少なくとも3個のCDR領域を、それらに介在するフレームワーク領域と共に含むであろう。好ましくは、この部分はさらに、第一および第四フレームワーク領域の片方または両方の、少なくとも約50%を含むであろう[ここで、この50%とは、第一フレームワーク領域のC末端の50%および第四フレームワーク領域のN末端の50%である]。可変ドメインの実質的部分のN末端またはC末端にあるさらなる残基は、天然に存在する可変ドメイン領域には通常結合していないものであるかもしれない。例えば、組換えDNA技術によって作成される本発明に係る特異的結合成員の組み立ては、-または、クローニングまたはその他の操作工程を容易にするために導入されるリンカーによりコードされているC末端残基の導入を産むかもしれない。その他の操作工程は、本発明に係る可変ドメインを、免疫グロブリン重鎖、その他の可変ドメイン(例えば、ジアボディの生成において)またはより詳しく下記に論ずる蛋白標識を包含するさらなる蛋白配列に連結するためのリンカーの導入を包含する。

【0056】

本発明に係る好ましい態様において、一对のV HおよびV Lドメインを含む特

異的結合成員が好ましいものの、VHまたはVLドメイン配列のいずれかに基づく単一の結合ドメインは、本発明のさらなる態様を形成する。単一免疫グロブリンドメイン、特にVHドメインは、特異的に標的抗原を結合することができることが知られている。

【0057】

一本鎖の特異的結合ドメインのいずれかの場合、これらのドメインを用いて、TGF<sub>β</sub>に結合できる2ドメイン特異的結合成員を形成することのできる相補的ドメインをスクリーニングすることができる。

【0058】

これは、WO92/01047号に開示されるいわゆる序列的二元的組み合わせアプローチを用いるファージディスプレイスクリーニング法によって達成することができ、この方法では、HまたはL鎖クローンのいずれかを含む個々のコロニーを使用して、他方の鎖(LまたはH)をコードしているクローンの完全なライブラリーを感染させ、得られる二本鎖の特異的結合成員を、この参考文献に記載されるようなファージディスプレイ技術に従って選択する。この技術はMarks等、同書、にも開示されている。

【0059】

本発明に係る特異的結合成員は、さらに抗体定常領域またはその一部を含み得る。例えば、SL15A VLまたはSL15S VLといったようなVLドメインをそれらのC末端で、ヒトC<sub>1</sub>またはC<sub>2</sub>鎖、好ましくはC<sub>2</sub>鎖を含む抗体軽鎖定常ドメインに結合させることができる。同様に、SL15 VHに基づく特異的結合成員をそれらのC末端で、任意の抗体イソタイプ、例えばIgG、IgA、IgEおよびIgMならびに任意のイソタイプサブクラス、特にIgG1およびIgG4から誘導される免疫グロブリン重鎖の全てまたは一部に結合させることができる。IgG4が好ましい。

【0060】

本発明に係る抗体は、検出可能なまたは機能的な標識で標識することができる。検出可能な標識とは、<sup>131</sup>Iまたは<sup>99</sup>Tcといった放射性標識を包含し、これらは抗体画像化の分野で既知の常套的化学を用いて本発明に係る抗体に結合させ

ることができる。標識はまた、西洋ワサビペルオキシダーゼのような酵素標識を包含する。標識はさらに、同起源の特異的検出部分、例えば標識されたアビジンに結合させることによって検出できる、ビオチンのような化学的部分を包含する。

#### 【0061】

本発明に係る抗体は、人間または動物対象、好ましくは人間における診断または治療方法に使用するよう設計される。

#### 【0062】

ヒトTGF $\beta_1$ に対し特異的な抗体は、線維症の疾患および慢性関節リウマチまたは癌のようなTGF $\beta_1$ が過剰発現されるその他の疾患の治療に対して動物モデルにおいて有効であることが示された。TGF $\beta_1$ に対する抗体は、糸球体腎炎(W.A.Border等、Nature 346 371-374、1990)；神経癍痕形成(A.Logan等、Eur.J.Neurosci. 6 355-363、1994)；皮膚癍痕形成(M.Shah等、Lancet 339 213-214、1992；M.Shah等、J.Cell.Science 107 1137-1157、1994；M.Shah等、108 985-1002、1995)、および肺線維症(Giri等、Thorax 48、959-966、1993)の治療に有効であることが示された。さらに、イソ型TGF $\beta_1$ 、2および3と交差反応性の抗体は、肺線維症、照射誘発性線維症(Barcellos-Hoff、米国特許5616561(1997))、骨髄線維症、火傷、デュプイトラン拘縮、胃潰瘍および慢性関節リウマチ(Wahl等、J.Exp.Medicine 177 225-230、1993)のモデルにおいて有効であることが示された。

#### 【0063】

TGF $\beta_1$ に対する抗体の投与により改善し得る、細胞外マトリックス沈着を伴う幾つかの状態がさらに存在する。これらは、全身性硬化症、術後癒着、ケロイドおよび過形成性癍痕形成、増殖性硝子体網膜症、緑内障ドレナージ手術、角膜損傷、白内障、ペーロニー病、糖尿病性腎症、成人呼吸困難症候群、肝硬変、心筋梗塞後、血管形成術後再狭窄、ケロイド性癍痕、くも膜下出血後癍痕形成、多発性硬化症、椎弓切除術後線維症、腱およびその他の修復後の線維症、入れ墨除去、硬化性胆管炎、心膜炎、胸膜炎、気管切開術、貫通性CNS損傷、好酸球性筋痛症候群、血管再狭窄、静脈閉塞病、膝炎および乾癬性関節症を包含する。

幾つかの場合には、TGF<sub>2</sub>に対する抗体、例えば6B1 IgG4 (CAT-152) (WO97/13844号を参照されたい) と組み合わせた治療が、例えば皮膚癒痕形成の治療において有効に使用できる。角膜上皮創傷治癒の治療におけるSL15A IgG4の有効性を実施例6に立証する。

#### 【0064】

角膜創傷治癒の促進におけるCAT-192の成功は、上皮再形成の促進が有益であるその他の状態においてこれが有用であるという適応を提供する。これらは、皮膚の疾患、例えば静脈性潰瘍、虚血性潰瘍(褥創)、糖尿病性潰瘍、移植部位、移植ドナー部位、擦過傷および火傷、気管支上皮の疾患、例えば喘息、ARDS、腸管上皮の疾患、例えば細胞障害性治療に伴う粘膜炎、十二指腸潰瘍(反射性疾患)、胃潰瘍、小腸および大腸の病変(炎症性腸疾患)を包含する。

#### 【0065】

TGF はまた、内皮増殖を阻害し、よって抗TGF は、アテローム性プラークの安定化および血管吻合の高速治癒に使用することができる。TGF は平滑筋の増殖を刺激し、よって抗TGF 治療はさらに、動脈疾患および喘息に対して適当であり得る。

#### 【0066】

喘息は、空気の流れの間欠的な閉塞として現れ、時と共に進行性となり得る、気道の慢性炎症性疾患である。アレルギー性および非アレルギー性形態のいずれにおいても、Th-2サイトカイン放出に傾く局所T細胞反応の変化と、その結果起こるB細胞イソタイプのIgEへの変換、肥満細胞、好酸球および好塩基球の増加、ならびに広範囲の炎症仲介物質の活性化および放出の証拠がある。しかしながら、炎症は単独では慢性喘息の多くの特徴を説明することができず、気道壁の再構築もまた必要であることが明らかとなった(Holgate ST等、J.Allergy Clin.Immunol. 2000(印刷中))。この「リモデリング」反応は、持続性気管支過剰反応(BHR)(Lundgren R等、(1988) Eur.Respir.J. 1(10)、883-889)、および経時的な肺機能の進行性減衰(これは、より慢性且つ重篤な疾患に伴う喘息において起こる)(Lange P等、(1998) N.Engl.J.Med. 339(17)、1194-1200)を伴うコルチコステロイドの不完全な治療上の有効性を説明するものである。

## 【0067】

上皮下および粘膜下線維症が喘息に関連している。高分解能CTで評価すると、重篤な喘息の患者は、正常な対象または疾患が軽度である患者に比較して、より肥厚した気道を有する (Awadh N等、(1998) Thorax 53(4)、248-253)。これは、SBMコラーゲン層の肥厚および密度増加を含み、平滑筋および微小血管ネットワークの増加を含む (Carroll N等、(1993) Am.Rev.Respir.Dis. 147(2)、405-410)。人間の気道およびモルモットの慢性抗原曝露モデルで実施した測定に基づくと、SBM肥厚は気道壁全体の肥厚を反映している。SBM-コラーゲンの肥厚は、疾患の重篤度、慢性度およびBHRと相関していることが示された。

## 【0068】

SBMの肥厚は、網状板への介在性コラーゲンI、IIIおよびV型ならびにフィブロネクチンの沈着が原因であり、その数および活性が喘息時に増大し (Brewster CE等、(1990) Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 3(5)、507-511) アレルゲンの曝露によりさらに増強される (Gizycki MJ等、(1997) Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 16(6)、664-673)、筋線維芽細胞に由来している。気管支の生検および洗浄の研究は、上皮が前線維形成成長因子の供給源である可能性があるという事の動かしがたい事例を提供した。喘息では、TGF $\beta$  およびb-FGFの免疫染色は、マトリックスの上皮局在および広範囲の染色を共に示し、この事は、これらの成長因子とマトリックスプロテオグリカンとの間の、特異的グリコサミノグリカン(GAG)結合部位を介した重要な相互作用を示唆するものである (Redington AE等、(1998) J.Pathol. 186(4)、410-415)。TGF $\beta$  およびb-FGFは共に洗浄液中に濃度が増大して見出され、さらなる増大がアレルゲンの曝露後に見出された (Redington AE等、(1997) Am.J.Respir.Crit.Care Med. 156(2、Pt1)、642-647)。成長因子、サイトカインおよびケモカインの組織分析は、これらは主として複合体、高分子量形態で存在することを示した。潜在性関連ペプチドがTGF $\beta$ 結合分子として同定され、気管支の外植片モデルを使用して、喘息粘膜組織のアレルゲン曝露が、プラスミン活性に依存するTGF $\beta$ の活性化を引き起こし、一方b-FGFは、ヘパリンおよびヘパリナーゼにより、それぞれ肥満細胞および好酸球から可溶性型で放出されることが示された (McConnell W等、E

ur.Respir.J. 152s.1999、Ref Type:Abstract)。

【0069】

喘息はさらに、上皮の傷害および気道のリモデリングに関与している。喘息におけるリモデリングされた気道の特徴は、炎症性細胞生成物により惹起される広範な上皮の損傷である(Laitinen LA等、(1985) Am.Rev.Respir.Dis. 131(4)、599-606)。粘膜の損傷は、組織を損傷する分子がスムーズに気道壁中を通過することを可能にするのみならず、様々な前炎症性ケモカイン、オータコイド仲介物質および接着分子を発現させつつ(これらは慢性炎症に貢献する)上皮の「活性化」を惹起する(Holgate ST等、J.Allergy Clin.Immunol. 2000(印刷中))。傷ついたそして修復しつつある上皮細胞は、TGF $\beta$ 1イソ型を包含する線維増殖性および前線維形成性成長因子の産生増加を介する気道リモデリングの重要な調節物質でもある(Zhang S等、(1999) Lab.Invest. 79(4)、395-405)。表皮成長因子レセプター(EGFR)により仲介される上皮の修復の障害は、筋線維芽細胞培養に条件培地を添加する時、損傷した上皮細胞によるTGF $\beta$ 2の放出を大幅に増加させ、そしてコラーゲンIII遺伝子の発現を顕著に増強することが、近年判明した。TGF $\beta$ 1イソ型は上皮細胞増殖の強力なインヒビターであるため、喘息におけるTGF $\beta$ の過剰産生は、喘息の上皮に見出される増殖マーカーPCNAの発現が意外なほど低レベルであることを説明できる(Demoly P等、(1994) Am.J.Respir.Crit.Care Med. 150(1)、214-217)。このようにして、上皮下の筋線維芽細胞によるコラーゲン生合成に好都合な条件は、上皮の修復を遅延させることにより、疾病の慢性度にも貢献し得る。したがって、本発明に係る特異的結合剤の使用によるTGF $\beta$ レベルの低減は、慢性且つ重篤な喘息において気管支の筋線維芽細胞によるマトリックス蛋白生合成を妨げ、同時に非活性化上皮表現型および正常な障壁機能を回復するための気管支上皮修復を促進する必要性を標的とするものと期待できるであろう。

【0070】

TGF $\beta$ 1はまた、例えば悪性腫瘍および感染症に反応して免疫および炎症反応を調節する。TGF $\beta$ 1に対する抗体は、B型肝炎、C型肝炎または結核のような感染症に対する免疫反応を改善するために、または、例えば腫瘍もしくはA

I D S 感染症もしくは肉芽腫疾患により誘導される免疫抑制を減少させるために使用できる。T G F <sub>1</sub> に対する抗体は、臓器移植の急性および慢性拒絶および悪性腫瘍の治療に有用であり、シクロスポリン治療により誘発される癌細胞の拡散の防止に使用することができる。

【0071】

T G F <sub>1</sub> に対する抗体は免疫療法のアジュバントとして使用することができる。

【0072】

T G F <sub>1</sub> に対する抗体は、例えば腫瘍の治療において血管新生の阻害に使用することができる。腫瘍細胞の大部分は検出可能レベルの T G F <sub>1</sub> を発現する (Wojtowicz-Praga 1997、J.Immuther. 20(3):165-77)。さらに、高レベルの T G F <sub>1</sub> を産生する細胞は、高い転移 (Blanckaert等、1993、Cancer.Res. 53(17);4057-81) または侵襲 (Arteaga等、1993、Cell Growth and Differentiation 4(3):193-201) 可能性を持っている。多くの癌において T G F <sub>1</sub> の血漿レベルは疾病の経過と相関している。したがって、T G F <sub>1</sub> の供給源は、腫瘍細胞および周囲組織であり得る。

【0073】

T G F は正常な健康な上皮組織における悪性変化の強力な抑制物質であり、増殖を阻害することができる。しかしながら、多くの進行癌は、II型 T G F レセプター (Markowitz等、1995、Science 268(5215):1336-8) または S M A D シグナル伝達 (Hata等、1998、Mol.Med.Today 4(6):257-62) の異常の結果、T G F の生長阻害作用に対して耐性となる。

【0074】

腫瘍は 1 mm<sup>3</sup> を超える成長および転移のためには血液の供給を必要とする (Folkman 1995、Breast Cancer Res.Treat. 36(2):109-18)。この事が、充実性腫瘍の抗血管形成治療の急速な発展につながってきた。

【0075】

T G F <sub>1</sub> は、インビトロおよびインビボで V E G F 産生をアップレギュレーションすることにより間接的に血管新生を惹起することが示された。乳癌は多数

の浸潤するマクロファージを含んでいる。これらの腫瘍内部の細胞の役割および機能は依然として明らかでないが、幾つかの研究は、予後不良との結びつきを見出している。腫瘍細胞および腫瘍マクロファージはいずれもインビトロでVEGFを産生し、産生はTGF $\beta_1$ によりアップレギュレーションされる。血清VEGFレベルは乳癌患者において亢進し、これらのレベルは血清TGF $\beta_1$ レベルに直接相関している。したがって、乳癌細胞および癌関連マクロファージによるTGF $\beta_1$ 発現は、VEGFの生成によって血管新生反応を選択することができる (Donovan等、1997、Ann.Surg.Oncol. 4(8):621.7 ; Harme等、1998、Ann.Surg.Oncol. 5(3):217-8)。

#### 【0076】

Ueki等 (1992、Japanese Journal of Cancer Research 84(6):589-93) は、TGF $\beta_1$ がインビボで腫瘍の成長を増強することを立証した。このグループはCHO細胞をTGF $\beta_1$ 遺伝子で離断 (transect) し、TGF $\beta_1$ の過剰発現を引き出した。TGF $\beta_1$ を分泌するCHO細胞は、ヌードマウスに皮下注射すると、離断されていない細胞より迅速に増殖することが示された。顕著な血管新生がTGF $\beta_1$ -離断細胞から誘導された腫瘍で観察され、非離断細胞では、血管新生は減少した。加えて、抗TGF $\beta_1$ 中和抗体は、TGF $\beta_1$ -離断細胞から誘導された腫瘍における成長および血管新生の両者を阻害することができた。したがって、腫瘍細胞によるTGF $\beta_1$ の過剰産生は、腫瘍の成長および新生血管形成に寄与していた。

#### 【0077】

癌を持っている患者は不完全な免疫系を有することが知られている。近年、TGF $\beta_1$ は腫瘍関連免疫抑制において重要な役割を果たしていることが示唆された。この話題は最近の総説の焦点となっている (Wojtowicz-Praga、1997、同書)。確かにTGF $\beta_1$ は強力な免疫抑制物質であるように見受けられ、そしてこれは様々な腫瘍細胞系統から、そして腫瘍を持っている宿主の血漿中に一貫して検出されている。

#### 【0078】

モノクローナル抗体によるTGF $\beta_1$ の中和またはアンチセンスによる産生の

阻害は、動物モデルにおいて腫瘍の成長および転移能の減弱を産む。マウスにおける、 $TGF_{\beta 1}$ によって離断されたMCF-7乳癌細胞の成長は、2G7（反復i.p.用量）、抗 $TGF_{\beta 1,2,3}$ 抗体によって妨げられる（Arteaga等、同書）。正常なMCF-7細胞の成長は2G7によって妨げられるが、これは処置が腫瘍細胞の接種時に開始された場合に限る。さらに、抗 $TGF_{\beta}$ 抗体が、腫瘍により誘導される免疫抑制を再現する作用の、より信すべき証拠が提供された（Arteaga等、J.Clin.Invest. 92(6):2569-76）。MDA-231、ヒト乳癌細胞系統が、ヌードマウスにおいてi.p.接種後に脾臓ナチュラルキラー（NK）細胞活性の低下を惹起した。2G7（200  $\mu$ g、2日毎、i.p.）は、腹腔内腫瘍および肺転移を減弱させると共に、脾臓NK細胞活性を顕著に増大させた。さらに、MDA-231腫瘍細胞の培養由来の条件培地はヒト血液のNK細胞活性を阻害し、2G7はこれをも妨げた。MDA-231細胞の皮下異種移植片の成長は、2G7によって一時的に阻害されたに過ぎなかった。腫瘍成長、転移、およびNK細胞活性に及ぼす2G7の作用は、ベージュNK細胞欠損ヌードマウスでは存在しなかった（Arteaga等、J.Clin.Invest. 92(6):2569-76）。

#### 【0079】

さらなる研究では、IL-2（10000 U、腹腔内、2回/日）と組み合わせた2G7抗 $TGF_{\beta}$ 抗体（500  $\mu$ g、腹腔内、隔日）は、B16黒色腫の肺転移を低減することができたが、静脈内接種ほど有効ではなかった。2G7単独もまた肺転移の数を低下させたが、併用治療ほど有効ではなかった。血漿 $TGF_{\beta 1}$ レベルは抗体処置動物において有意に低下した（Wojtowicz-Praga等、1996、J.Immunother.Emphasis Tumour Immunol. 19(3):169-75）。先の二つの研究はいずれも、抗 $TGF_{\beta 1}$ およびIL-2の組み合わせを使用した場合の効果を示すことができないか、または些少の効果を惹起したに過ぎなかった（それぞれGridley等、1993、Cancer Biother. 8(2):159-70；Mao等、1994、Cancer Biother. 9(4):317-27）が、これらの研究で使用した抗 $TGF_{\beta 1}$ 抗体の用量は小さかった（それぞれ100 ngおよび1  $\mu$ g）。したがって、動物モデルのデータから、抗 $TGF_{\beta}$ 療法と免疫刺激との組み合わせは、癌に対するこの治療的アプローチの概念の証拠を提供するよう見受けられる。

## 【0080】

HoeferおよびAnderer (1995、Cancer Immunol. Immunother. 41(5):302-8) は、ヒト癌腫細胞系統SLU-1、および極めて転移性のサブラインSLU-M1が、ヌードマウスにおいて皮下接種後に転移を引き起こすことを立証した。転移の発生および一次腫瘍の成長は、抗TGF $\beta_1$ 抗体による処置によって低下した(3日目からの処置、腫瘍部位に100  $\mu$ gを、皮下に、3-4日毎)。この著者は、当該抗体がTGF $\beta_1$ により誘発される免疫抑制を逆転させ、腫瘍の成長および転移の阻害を導くと示唆した。

## 【0081】

過去の研究はさらに、抗TGF $\beta$ 抗体がインビボで腫瘍の転移を低減させ得ることを立証した(Arteaga等、1993、J. Clin. Invest. 92(6):2569-76; HoeferおよびAnderer、1995、同書; Wojtowicz-Praga等、1996、同書)。これらの研究からの最初の結論は、TGF $\beta_1$ により誘発される免疫抑制が、これらの腫瘍の異種移植片の転移をさせることを示唆した。しかしながら、最近の論文は、TGF $\beta_1$ が細胞の侵襲および転移能力を直接亢進し得ることを示唆している(Hojo等、1999、Nature 397:530-534)。シクロスポリンは、培養中のヒト肺腺癌細胞からのTGF $\beta_1$ の放出を用量依存的に誘発するが、シクロスポリンによるTGF $\beta$ 産生のメカニズムは分かっていない。シクロスポリン(またはTGF $\beta_1$ )による腺癌細胞の処理は、膜の波打ち運動、偽足の形成、足場非依存的(侵襲的)成長および運動性を引き起こす。抗TGF $\beta_1$ 抗体はインビトロでこれらの細胞形態および運動性の変化を阻害する。同様の観察が、腎細胞腺癌、乳腺上皮細胞およびミンクの肺上皮肺細胞についてなされた。免疫不全SCID-ベージュマウス(T細胞、B細胞、NK細胞における欠損)において、シクロスポリンは、マウス腎細胞腺癌、ルイス肺癌またはヒト膀胱癌細胞のインキュベーション(静脈内)後の転移の数を増加させた。抗TGF $\beta_{1,2,3}$ 中和抗体、1D11.16による処置(200  $\mu$ g/日、腫瘍細胞接種の1日前に最初の投与)は、シクロスポリン処置マウスにおいて肺転移の数を著しく低下させた(シクロスポリン非処置対照群以下のレベルまで)。したがって、TGF $\beta_1$ 産生に依存する作用により、シクロスポリンは、宿主免疫系に独立して動物モデルにおける侵襲および転移を増大

させると思われる (Hojo等、1999、同書)。

【0082】

インビトロおよびインビボモデルからの証拠は、TGF $\beta_1$ が3つの主要メカニズム；血管新生、免疫抑制、ならびに侵襲および転移行動を増大させる腫瘍細胞の表現型の変化、を利用して、腫瘍形成を増強し得るということを示唆している。したがって、TGF $\beta_1$ の阻害は、人間における悪性腫瘍を阻害し、1個の分子内部で複合的な抗癌治療を提供すると期待される。

【0083】

TGF $\beta_1$ が関与している癌は、乳房、前立腺、卵巣、胃、結腸直腸、皮膚、肺、子宮頸部および膀胱癌、ならびに様々な白血病および肉腫、例えばカポジ肉腫を包含する。したがって、本発明に係る抗体は、TGF $\beta_1$ が血管新生、転移または腫瘍の進行に関与している、前記の状態の癌を包含する癌の治療のために投与することができる。癌療法の文脈では、「治療」とは、腫瘍の成長の遅化または腫瘍転移の低減、ならびに患者の予測寿命を延長するための癌の部分的寛解を産む、任意の医学的介入を包含することが、むしろ理解されるであろう。

【0084】

癌の治療のための抗体療法は、当分野において確立した治療である。現在、臨床試験の第I相、第II相または第III相にあるその他多数の抗癌抗体に加えて、3つの抗癌抗体が、米国および/またはヨーロッパで臨床使用のために現在認可されている (結腸直腸癌治療のためのPanorex、B細胞リンパ腫のためのRituxanおよび乳癌のためのHerceptin)。これらの抗体はしばしば末期治療に使用され、前段落の基準により有効であると考えられると同時に、幾つかの症例では、腫瘍の完全な寛解をもたらす。

【0085】

したがって、本発明のさらなる態様は、提供された特異的結合成員の投与を含む治療方法、係る特異的結合成員を含む医薬組成物、および、投与のための医薬の製造、例えば該特異的結合成員を薬学上許容し得る賦形剤と共に調合することを含む、医薬または医薬組成物の製造方法におけるこのような特異的結合成員の使用、を提供するものである。

## 【0086】

本発明に従い、提供される組成物は個人に投与することができる。投与は好ましくは、患者にとって有益性を示すに十分な、「治療上有効な量」で行われる。かかる有益性は、少なくとも1個の症状の、少なくとも改善であってよい。実際の投与量、および投与の速度および時間的推移は、治療されるべきものの性質および重篤度に依存するであろう。治療の処方、例えば用量の決定等は、一般医およびその他の医師の責任範囲にある。抗体の適当な用量は当分野でよく知られており、Ledermann J.A.等、(1991)「Int J.Cancer」47:659-664 ; Bagshawe K.D.等、(1991)、「Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals」4:915-922を参照されたい。

## 【0087】

組成物は、単独で、または他の治療と組み合わせて、治療されるべき状態に応じて同時にまたは連続的に投与することができる。

## 【0088】

本発明に係る抗体は、治療を必要とする患者に、任意の適当な経路を介して、通常、血流中に、または治療すべき部位、例えば角膜、創傷、腫瘍等に直接注射することによって、投与できる。正確な用量は、抗体が診断用であるか治療用であるか、治療すべき領域（例えば創傷）の大きさおよび位置、抗体の正確な性質（例えば全抗体、フラグメントまたはジアボディ）、および抗体に結合させた検出標識またはその他の分子があればそのものの性質、を包含する、幾つかの因子に依存するであろう。典型的な抗体用量は、糸球体腎炎での線維症または癌の治療といった全身適用については0.5 mg ~ 100 g、そして皮膚瘢痕形成の治療といった局所適用については10 μg ~ 1 mgの範囲となるであろう。典型的には、当該抗体は、抗体全体、好ましくはIgG4イソタイプである。これは成人患者の一回治療のための用量であって、子供および幼児のためには比例させて調節することができる、また、他の抗体形式については分子量に比例して調節することができる。治療は医師の裁量で、毎日、週に2回、毎週または毎月の間隔で反復することができる。

## 【0089】

現在、全身および局所適用にはI g G 4 イソタイプの全抗体を使用するのが好ましいが、局所適用にはs c F v抗体が特に価値がある。

【0090】

本発明に係る特異的結合成員は、通常、医薬組成物の形で投与するが、これは、該特異的結合成員に加えて少なくとも1つの構成成分を含み得る。

【0091】

本発明に係る、そして本発明に従う用途のための、医薬組成物は、活性成分に加えて薬学上許容し得る賦形剤、担体、緩衝剤、安定剤または当業者によく知られるその他の材料を含んでいてよい。かかる材料は非毒性でなければならず、且つ活性成分の有効性を妨げるべきではない。担体またはその他の材料の正確な性質は、投与経路に依存し、これは経口、または注射、例えば静脈注射によるものであってよい。

【0092】

経口投与のための医薬組成物は、錠剤、カプセル剤、散剤または液体剤型とすることができる。錠剤はゼラチンまたはアジュバントのような固体担体を含むことができる。液体の医薬組成物は一般に、水、石油、動物性もしくは植物性油、鉱油または合成油といった液体担体を含む。生理食塩水、デキストロースまたはその他の糖類溶液またはグリコール類、例えばエチレングリコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールを包含し得る。点眼薬のような製剤は、目の線維症または瘢痕形成の予防または治療にとって価値がある。

【0093】

静脈注射または罹患部位への注射のためには、当該活性成分は、発熱物質を含まず、且つ適切なpH、等張性および安定性を有する、非経口的に許容し得る水溶液の剤型であろう。当業者は、例えば塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、乳酸化リンゲル注射液といったような等張媒質を用いて適当な溶液を調製することが十分可能である。保存料、安定化剤、緩衝剤、抗酸化剤および/またはその他の添加物を必要に応じて含有させることができる。

【0094】

当該抗体は、線維症を予防するため持続供給系から投与することができ、また

は、挿入に伴う線維症の発症を予防するため股関節置換具のような装具上に被覆することができる。

【0095】

組成物は単独で、または他の治療と組み合わせて、治療されるべき状態に応じて同時にまたは連続的に投与することができる。他の治療とは、適当な用量の疼痛緩和薬、例えば非ステロイド抗炎症薬（例えばアスピリン、パラセタモール、イブプロフェンまたはケトプロフェン）もしくはモルヒネのようなアヘン剤、または制吐剤の投与を包含することができる。

【0096】

本発明は、本発明において提供される特異的結合成員の、 $TGF_{\beta_1}$ への結合を引き起こす、またはそれを許容することを含む方法を提供する。言及したように、このような結合は、例えば特異的結合成員または特異的結合成員をコードしている核酸の投与後に、インビボで起こり得、またはこれはインビトロで起こり得る。

【0097】

$TGF_{\beta_1}$ への、特異的結合成員の結合量を決定することができる。定量は被検試料中の $TGF_{\beta_1}$ の量に関係しているかもしれず、これは診断上の興味を持たれ、例えば、 $TGF_{\beta_1}$ の測定値は、アテローム性動脈硬化症の指標としても提唱されている（低い濃度は進行したアテローム性動脈硬化症と相関している）。

【0098】

試料上での抗体の反応性は、任意の適当な手段によって決定することができる。ラジオイムノアッセイ（RIA）は一つの可能性である。放射標識された $TGF_{\beta_1}$ を非標識 $TGF_{\beta_1}$ （被検試料）と混合し、当該抗体と結合させる。結合した $TGF_{\beta_1}$ を非結合 $TGF_{\beta_1}$ から物理的に分離し、抗体に結合した放射性 $TGF_{\beta_1}$ の量を決定する。被検試料中に $TGF_{\beta_1}$ が多ければ多いほど、より少ない放射性 $TGF_{\beta_1}$ が抗体に結合する。リポーター分子に結合させた $TGF_{\beta_1}$ または $TGF_{\beta_1}$ の類似体を使用して、非放射性 $TGF_{\beta_1}$ を用いる競合的結合検定を使用することもできる。リポーター分子は、スペクトル的に孤立した吸収または

発光特性を有する、蛍光色素、燐またはレーザー色素とすることができる。好適な蛍光色素は、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリスリンおよびテキサスレッドを包含する。好適な色素生成染料はジアミノベンジジンを包含する。

#### 【0099】

その他のリポーターは、巨大分子のコロイド粒子または粒子材料、例えば着色した、磁性もしくは常時性のラテックスビーズ、および、視認でき、電氣的に検出でき、またはその他の手段で記録できる、検出シグナルを直接もしくは間接的に惹起できる、生物学的もしくは化学的に活性な物質を包含する。これらの分子は、発色させもしくは色調を変化させ、または例えば電氣的性質の変化を惹起する反応を触媒する酵素であってよい。それらは、エネルギー状態間の電子転移が特徴的なスペクトル吸収または発光を招くよう、分子的に励起させ得る。それらはバイオセンサーと組み合わせて使用する化学物質を包含し得る。ビオチン/アビジンまたはビオチン/ストレプトアビジンおよびアルカリホスファターゼ検出系が使用できる。

#### 【0100】

個々の抗体 - リポーターコンジュゲートにより生成されるシグナルを用いて、試料中の（正常および被検）関連する抗体結合の、定量可能な絶対的または相対的データを誘導することができる。

#### 【0101】

本発明はさらに、競合検定でTGF $\beta_1$ レベルを測定するための、上記特異的結合成員の用途、即ち、本発明により提供される特異的結合成員を競合検定に使用することによって試料中のTGF $\beta_1$ のレベルを測定する方法を提供する。これは、結合したTGF $\beta_1$ を非結合TGF $\beta_1$ から物理的に分離することを必要としない場合であってよい。結合時に物理的または視覚的变化が起こるよう、リポーター分子を特異的結合成員と結合させることが、一つの可能性である。リポーター分子は直接または間接的に、検出可能な、そして好ましくは測定可能なシグナルを生成することができる。リポーター分子の結合は、直接的または間接的、共有結合的、例えばペプチド結合を介して、または非共有結合的であってよい。ペプチド結合を介する結合は、抗体およびリポーター分子をコードしている遺伝

子融合の組換え発現の結果であるかもしれない。

【0102】

本発明はさらに、例えばバイオセンサー系において本発明に係る特異的結合成員を使用することにより、 $TGF_{\alpha}$ のレベルを直接測定することを提供する。

【0103】

結合を決定する様式は本発明の特徴ではなく、当業者は好みおよび一般知識に従って適当な様式を選択することができる。

【0104】

さらに本発明は、 $TGF_{\alpha}$ との結合について、いずれも $TGF_{\alpha}$ と結合する任意の特異的結合成員と競合し、そして、本明細書に実質上開示されているアミノ酸を有するCDRを含むVドメインまたは本明細書に実質上開示されているアミノ酸配列を有するVドメインを含む、特異的結合成員にまで拡大できる。結合成員間の競合は、別の標識されていない結合成員の存在下で検出できる、1個の結合成員に、特異的リポーター分子を結合させ、同じエピトープまたは部分重複するエピトープに結合する特異的結合成員の同定を可能にすることにより、インビトロで容易に検定することができる。競合は、例えば実施例1に記載の $TGF_{\alpha}$  ELISAを用いて決定することができる。

【0105】

$TGF_{\alpha}$ のための好ましい特異的結合成員は、 $TGF_{\alpha}$ との結合に関して、CAT191、CAT192および/またはCAT193と競合する。

【0106】

好ましい態様は、放射性レセプター検定において、CS37の少なくとも5倍、より好ましくは約10倍、15倍、20倍、50倍、75倍、100倍または150倍の力価で強力に $TGF_{\alpha}$ を中和する(Lucas C等(1991) Meth in Enzymology 198、303-16)。力価とは、同等の分子形式、例えば一価抗体(s c F vまたはF a b)または二価抗体(I g G 1またはI g G 4)としての被検抗体およびCS37による尺度である。

【0107】

或る態様において、本発明に係る特異的結合成員は、 $TGF_{\alpha}$ の残基92 -

98のアミノ酸配列を包含するペプチドに結合する(CS37と同じエピトープ)。

【0108】

これを試験する際には、いずれかの末端に1以上のアミノ酸が加わったこの配列を有するペプチドを使用することができる。このようなペプチドは、明記した配列で「本質上構成されている」と言うことができる。本発明に係る特異的結合成員は、TGF<sub>1</sub>に関するそれらの結合が、与えられた配列を有するまたはそれを含むペプチドによって阻害されるような成員であり得る。これを試験する際には、配列プラス1以上のアミノ酸を有するペプチドを使用することができる。

【0109】

特異的ペプチドに結合する特異的結合成員は、例えば該ペプチドを用いて調べることにより、ファージディスプレイライブラリーから単離することができる。

【0110】

さらに本発明は、本発明に係る特異的結合成員をコードしている単離された核酸を提供する。核酸とはDNAおよびRNAを包含する。好ましい態様において本発明は、前記定義のような、本発明に係るCDRまたはVHもしくはVLドメインをコードしている核酸を提供する。

【0111】

本発明はまた、上記のポリヌクレオチドを少なくとも1個含む、プラスミド、ベクター、転写もしくは発現カセットの形態の組み立て物を提供する。

【0112】

本発明はさらに、1以上の上記組み立て物を含む組換え宿主細胞を提供する。任意のCDR、VHもしくはVLドメインまたはそれ自身提供される特異的結合成員をコードしている核酸は、本発明の一つの態様を形成し、それをコードしている核酸からの発現を含む、コードされた生成物の産生方法もまた本発明の一つの態様を形成する。発現は、当該核酸を含む組換え宿主細胞を適当な条件下で培養することにより、簡便に達成できる。発現による産生の後、VHもしくはVLドメイン、または特異的結合成員を単離し、そして/または任意の適当な技術を用いて精製し、その後適宜使用することができる。

## 【0113】

本発明に係る、特異的結合成員、VHおよび/またはVLドメイン、およびコード化核酸分子およびベクターは、例えばそれらの天然環境から、実質上純粋または相同な形態で、または、核酸の場合には、必要な機能を持つポリペプチドをコードしている配列以外の核酸または遺伝子起源を持たずに、または実質上持たずに、単離されそして/または精製されて提供されることがある。本発明に係る核酸は、DNAまたはRNAを含み得、全体がもしくは部分的に合成であってもよい。本明細書に開示するヌクレオチド配列への言及は、特定の配列を有するDNA分子を包含し、そして文脈が別途必要としない限り、TがUに置き換えられたその特定配列を有するRNA分子を包含する。

## 【0114】

様々な異なる宿主細胞におけるポリペプチドのクローニングおよび発現のための系がよく知られている。好適な宿主細胞は、細菌、哺乳動物細胞、酵母およびバキュロウイルス系を包含する。異種ポリペプチドの発現のために当分野で取得可能な哺乳動物細胞系統は、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、幼体ハムスター腎細胞、NSOマウス黒色腫細胞およびその他多数を包含する。一般的な好ましい細菌宿主はE.coliである。

## 【0115】

E.coliのような原核細胞での抗体および抗体フラグメントの発現は、当分野で十分に確立されている。総説として、例えばPluckthun、「A. Bio/Technology」9:545-551(1991)を参照されたい。培養中の真核細胞での発現もまた、特異的結合成員の産生のための選択枝として当業者が利用できる。最近の総説として、例えば、Reff,M.E. (1993)「Curr.Opinion Biotech.」4:573-576; Trill J.J.等 (1995)「Curr.Opinion Biotech」6:553-560を参照されたい。

## 【0116】

プロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子およびその他の配列を適宜包含する、適当な調節配列を含む、適切なベクターを選択し、または組み立てることができる。ベクターは、適宜、プラスミド、ウイルス性、例えば「ファージ」またはファージミドとするこ

とができる。さらなる詳細については、例えば「Molecular Cloning: a Laboratory Manual」第2版、Sambrook等、1989、Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい。例えば核酸組み立て物の調製、突然変異誘発、配列決定、細胞へのDNAの導入および遺伝子発現、ならびに蛋白の分析において、核酸を操作するための、既知の多くの技術およびプロトコルが、「Short Protocols in Molecular Biology」、第2版、Ausubel等編、John Wiley & Sons、1992に詳細に記載されている。Sambrook等およびAusubel等の記述は引用により本明細書の一部とする。

#### 【0117】

したがって、本発明のさらなる態様は、本明細書に開示する核酸を含む宿主細胞を提供する。さらに別の態様は、かかる核酸を宿主細胞中に導入することを含む方法を提供する。この導入は、任意の利用可能な技術を用いることができる。真核細胞のためには、好適な技術は、燐酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン、電気穿孔、リポソーム仲介トランスフェクション、および、レトロウイルスまたはその他のウイルス、例えばワクシニア、または昆虫細胞のためにはバキュロウイルスを使用する、トランスダクションを包含し得る。細菌細胞のためには、好適な技術は、塩化カルシウム形質転換、電気穿孔およびバクテリオファージを用いるトランスフェクションを包含し得る。

#### 【0118】

この導入の後、例えば宿主細胞を当該遺伝子の発現のための条件下で培養することにより、核酸からの発現を惹起または許容する。

#### 【0119】

或る態様において、本発明に係る核酸は、宿主細胞のゲノム（例えば染色体）中に組み込まれる。組み込みは、標準技術に従い、組換えを促進する配列をゲノムに含ませることによって進めることができる。

#### 【0120】

本発明はまた、上記のような特異的結合成員またはポリペプチドを発現させるため、上記の組み立て物を発現系に使用することを含む方法を提供する。

#### 【0121】

以下の実施例は本発明の側面および態様を例示するものである。

【0122】

実施例1 SL15S scFv (CAT-191) およびJT182の同定

実施例2 抗体SL15A IgG4 (CAT-192) およびSL15S IgG4 (CAT-193) を発現する細胞系統の組み立て

実施例3 SL15S scFv (CAT-191) およびSL15A IgG4 (CAT-192) およびSL15S IgG4 (CAT-193) の中和特性の評価

実施例4 活性および潜在性TGF<sub>β</sub>への、抗体SL15S scFv (CAT-191) およびSL15A IgG4 (CAT-192) の結合

実施例5 抗体SL15S scFv およびCS37 scFvのエピトープマッピング

実施例1

SL15S scFv (CAT-191) およびJT182の同定

本発明者等は、WO97/13844号に開示されたCS37抗体のドメインに関連するが、予期し得ないほど良好な性質を有する、抗体CDRならびにVHおよびVLドメインを同定した。

【0123】

CS37 VH (31G9) ドメイン配列およびこれをコードしている核酸を、それぞれ配列番号2および配列番号1に示す。

【0124】

本発明に係るSL15 (KYLIEとしても知られる) VHドメイン配列およびこれをコードしている核酸を、それぞれ配列番号4および配列番号3に示す。

【0125】

それぞれのVH CDR3配列を第1表に、そしてVHおよびVLドメインのためのCDR1およびCDR2配列を含む第2表に示す。

【0126】

CS37 (31G9) およびSL15 (Kylie) VHドメインの比較は、フレームワーク残基中、残基1 (グルタミンCS37がグルタミン酸SL15に)、

6 (グルタミンCS37がグルタミン酸SL15に) および44 (グリシンCS37がグルタミン酸SL15に) に三つのさらなる相違を示す。

【0127】

SL15 VHドメインは異なるVLドメインと対合することができ、このような二つのSL15変異体が同定された。SL15Aとして知られる一方はCS37 VLを含む。SL15Sとして知られる他方は、SL15A (CS37) でアラニンである残基25がSL15Sでセリンであることを除けばCS37 VLに対応するVLを含んでいる。

【0128】

SL15A VL (CS37) ドメイン配列およびこれをコードしている核酸を、配列番号6および配列番号5にそれぞれ示す。

【0129】

SL15S VLドメイン配列およびこれをコードしている核酸を、配列番号8および配列番号7にそれぞれ示す。

【0130】

JT182 VHドメイン配列およびこれをコードしている核酸を、配列番号10および配列番号9にそれぞれ示す。

【0131】

SL15S scFv、CS37 scFvおよび関連抗体JT182を、ファージ上清として、TGF $\beta_1$ に結合する能力についてELISA検定でスクリーニングした。ELISAプレート(96ウェル; Falcon)は非被覆、または組換えTGF $\beta_1$  (0.2  $\mu$ g/mL) で被覆した。抗原で被覆したプレートに特異的に結合するファージを羊抗fd抗血清(Pharmacia)、引き続きアルカリホスファターゼコンジュゲート化抗羊(Sigma)および燐酸p-ニトロフェニル(pNPP)基質(Sigma)を用いて検出した。

【0132】

続いてscFvフラグメントを、実施例3に記載のプロトコル(下記参照)を用いて、A549細胞に対する $^{125}$ I-TGF $\beta_1$ の結合を中和する能力について放射性レセプター結合検定(RRA)で試験した。このRRAについては、個々

のクローンを可溶性 s c F v として発現させ、その後固定化金属親和クロマトグラフィー ( I M A C ) によってペリプラズム調製物から精製し、次いで Superdex 75 カラム ( Pharmacia ) 上でのゲル濾過 F P L C によりモノマー s c F v の分画を実施した。

#### 【 0 1 3 3 】

S L 1 5 s c F v ( S L 1 5 V H / S L 1 5 V L ) は、R R A において最も高い中和力価を持ち、それは C S 3 7 より少なくとも 1 0 0 倍良好な  $I C_{50}$  である 1 0 0 pM であった。T G F <sub>1</sub> イソ型に対する S L 1 5 s c F v の完全特異性が T F 1 検定で確認されたが、T G F <sub>2</sub> または T G F <sub>3</sub> との相互作用は全く検出されなかった。

#### 【 0 1 3 4 】

s c F v 抗体 S L 1 5 S ( S L 1 5 V H / S L 1 5 V L ; C A T - 1 9 1 ( K y l i e s c F v としても知られる) ) および S L 1 5 A ( S L 1 5 V H / C S 3 7 V L ) が全抗体に変換された。

#### 【 0 1 3 5 】

##### 実施例 2

抗体 S L 1 5 A I g G 4 ( C A T - 1 9 2 ) および S L 1 5 S I g G 4 ( C A T - 1 9 3 ) を発現する細胞系統の組み立て

ヒト I g G 4 , 抗体を発現する細胞系統の組み立てのため、S L 1 5 s c F v 重鎖および軽鎖可変ドメインを、ヒト I g G 4 およびヒト 定常ドメインをそれぞれ含む哺乳動物発現ベクター中にクローニングした。二つの型 S L 1 5 A I g G 4 ( C A T - 1 9 2 ) および S L 1 5 S I g G 4 ( C A T - 1 9 3 ) を調製した。この抗体は K y l i e I g G と称する。

#### 【 0 1 3 6 】

##### 重鎖発現ベクター

S L 1 5 S s c F v DNA 由来の V H をオリゴヌクレオチド P 8 0 ( 配列番号 2 5 ) および P 6 4 ( 配列番号 2 2 ) で P C R 増幅し、オリゴヌクレオチド P 1 0 ( 配列番号 2 0 ) および P 6 4 ( 配列番号 2 2 ) を使用して、P C R を部分重複させることにより、シグナル配列、スプライス部位および M 1 3 V H P C R

1由来のイントロンを含む159bp DNAフラグメント (Orlandi等、1989、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86、3833-3837) に結合させた。この558bp PCR生成物をHindIIIおよびApaIで切断し、HindIII - ApaI切断pGamma4 (Lonza Biologicsより入手) にクローニングした。ライゲーションしたDNAをE.coli TG1中に導入し、アンピシリン耐性コロニーをスクリーニングした。正しい挿入物を有するプラスミドを同定し、pKylieVH 4と命名した。

#### 【0137】

##### 軽鎖発現ベクター

CS37 scFv DNAまたはSL15S scFv由来のV をオリゴヌクレオチドP65 (配列番号23) およびP66 (配列番号24) でPCR増幅し、オリゴヌクレオチドP11 (配列番号21) およびP66 (配列番号24) を使用して、PCRを部分重複させることにより、シグナル配列、スプライス部位およびM13VKPCR1由来のイントロンを含む168bp DNAフラグメント (Orlandi等、1989、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86、3833-3837) に結合させた。この510bp PCR生成物をBstBIおよびBsiWIで切断し、BstBI - BsiWI切断pMR15.1にクローニングした。ライゲーションしたDNAをE.coli TG1中に導入し、アンピシリン耐性コロニーをスクリーニングした。正しい挿入物を有するプラスミドを同定し、pCS37 またはpKylieと命名した。

#### 【0138】

##### 縦列発現ベクター

重鎖および軽鎖両方のDNAおよびgs選択マーカを含む単一のプラスミドを、Kylie変異体の各々について組み立てた。重鎖ベクターpKylieVH 4をBamHIおよびNotIで消化し、H鎖DNAを含む4497bpフラグメントを精製した。軽鎖ベクターpCS37V またはpKylie はBamHIおよびNotIで同様に消化し、L鎖DNAを含む9611bpフラグメントを単離した。二つの精製されたフラグメントをライゲーションし、E.coli TG1細胞中に導入し、アンピシリン耐性コロニーをスクリーニングした。正しい挿入物を有するプラスミドを同定し、V領域を配列決定により確認した。この最後の発現ベクターは

pKylieg4 sと命名した。二つの型はSL15S VLまたはCS37 VLを含むよう調製した。

#### 【0139】

##### SL15S IgG4およびSL15A IgG4の発現

SL15S IgG4およびSL15A IgG4をマウス骨髄腫細胞系統NS0 (ECACC 85110503) で発現させた。50 µgのpKylieg4 sを、PvuIで消化することにより線状化し、エタノール沈殿し、100 µLの水に溶解した。10<sup>7</sup>のNS0細胞をPBSで洗浄し、PBS 0.9 mLに再懸濁し、ベクターDNAと混合し、氷中に5分間保持した。次いでこの細胞を、960 µFd、250Vの単一パルスで電気穿孔し、氷中で10分間インキュベートした。次に、トランスフェクトさせた細胞を、Bebbington等(1992)「Bio/Technology」10 169-175に記載のように2 mMグルタミンおよび10%透析牛胎児血清 (FCS) を含有するダルベッコの改良イーグル培地 (DMEM) 30 mLに添加し、50 µLアリコートをして6 × 96 ウェルプレートに分配した。24時間後、無グルタミンDMEM / 10% FCS (Bebbington等、1992) を各ウェルに加えた。

#### 【0140】

トランスフェクションの3～6週間後、コロニーを、ヒトIgGを分泌する能力についてELISAによりスクリーニングした。ELISAプレートのウェル (Immulon 4, Dynatech) を、ウェル当たり100 ngのヤギ抗ヒトIgG抗体 (Harlan) を含む50 mM重炭酸 / 炭酸ナトリウム (pH 9.6) で被覆した。トランスフェクトされたコロニーを含むウェル由来の上清を、0.05% (v/v) Tween 20を含有するPBS (PBST) の入ったウェルに1時間添加した。プレートをPBSTで3回洗浄し、捕捉されたヒトIgGを、PBST中の1:2000希釈西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) にコンジュゲートさせたヤギ抗ヒト抗体100 µL (Harlan) で検出した。室温で30分後、プレートをPBSTで3回洗浄し、OPD基質100 µLを加えた。5～10分後、12.5% (v/v) 硫酸50 µLの添加により反応を停止させ、A490 nmを測定した。

#### 【0141】

最も大量のIgGを分泌するトランスフェクト体を、還元FCS、無ガンマグ

ロブリンFC5中、またはFC5無しの無グルタミン培地で増殖拡大させた。細胞系統をその後限界希釈によってクローニングした。

#### 【0142】

##### IgGの精製

プロテインA親和クロマトグラフィーおよびこれに続くサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により、ヒトIgG抗体を精製した。IgGを分泌するトランスフェクトされたNS0細胞の成長由来の上清を、遠心分離および0.22 μm膜による濾過によって精製した。プロテインAセファロースFast Flowマトリックス(Pharmacia)のカラムを0.3M NaCl、50mM磷酸ナトリウム(pH 8.0)で平衡化し、上清を適用した。次いでこのカラムを50mM磷酸ナトリウム(pH 8.0)でよく洗浄した。ヒトIgGを0.1Mグリシン-HCl(pH 3.0)で溶出した。溶出した画分を1MトリスHCl(pH 9.0)で中和し、蛋白含有画分を、280nmの吸光度を測定することにより同定した。SECによる精製はSuperdex 200カラム上、PBS中で実施した。最後にこのIgGを、YM30 MWCOフィルター(Amicon)を使用し発熱性物質を含まないPBSに対してダイアフィルトレーションすることにより、濃縮した。

#### 【0143】

##### 実施例3

SL15S scFv(CAT-191)およびSL15A IgG4(CAT-192)およびSL15S IgG4(CAT-193)の中和特性の評価  
TG F<sub>1</sub>の中和力価を、放射性レセプター検定および細胞増殖検定(TF1)を用いて、SL15S scFv(Kylie scFv)およびその誘導体について測定した。

#### 【0144】

##### 材料

[<sup>125</sup>I] TG F<sub>1</sub>はAmershamにより供給された(比活性範囲800~2200 Ci/mmol)。組換えヒトTG F<sub>1</sub>、<sub>2</sub>、<sub>3</sub>、潜在性TG F<sub>1</sub>、GM-CSFおよびIL-5はR&D Systems(ミネアポリス、米国)から取得した。TG F<sub>1</sub>、<sub>2</sub>および<sub>3</sub>に対するGenzymeマウスmAbはGenzyme(ケンブリッジ、M

A、米国)から取得した。TF1細胞系統はRobin Thorpe (NIBSC、英国)により供給され、下に詳述するように培養した。A549ヒト肺上皮癌セルラインはATCCから取得し、10% FCSおよび2 mMグルタミンを含有するDMEM中で増殖させた。他の試薬は全てSigmaにより供給された。

#### 【0145】

方法

##### 放射性レセプター検定

A549細胞を24ウェルプレートに、ウェル当たり $2 \times 10^5$ 細胞で>90%密集を達成するため24時間接種した。検定の直前に単層を緩衝液(1:1のDMEM:Hams-F12)で2回洗浄し、検定緩衝液(1:1のDMEM:Hams-F12+0.1%BSA)0.5 mLを加えた。検定緩衝液で抗体の2または3倍連続希釈液を調製し、検定緩衝液に入れた等容量の40 pM [ $^{125}$ I] TGF $_{\alpha}$ に加えた。

#### 【0146】

室温で1時間後、この抗体/[ $^{125}$ I] TGF $_{\alpha}$ 混合物0.5 mLを細胞(既に検定緩衝液0.5 mLに入れてある)にn=2で加え、37°Cで1時間インキュベートした。 [ $^{125}$ I] TGF $_{\alpha}$ の最終濃度は10 pMであった。最大結合(細胞に対して、抗体無し)および最小結合(ウェルを緩衝液でインキュベートするが細胞は無し)としての対照を少なくともn=3で含んでいた。

#### 【0147】

最後にプレートを氷冷PBSで4回洗浄し、その後可溶化緩衝液(2.5 mM Tris pH7.5、10%グリセロール、1% Triton x100)0.8 mLを加えた。プレートを振盪プラットフォーム上で少なくとも20分間放置し、その後各ウェルの内容をガンマカウンターを用いて計数した。

#### 【0148】

データは最小結合を差し引いた後、最大結合の%として表した。

#### 【0149】

潜在性TGF $_{\alpha}$ を用いた研究では、各条件の組について%最大値を算出した(例えば、潜在性TGF $_{\alpha}$ 、酸活性化した潜在性TGF $_{\alpha}$ または活性TGF $_{\alpha}$ )

の存在下)。

【0150】

(Lucas C等 (1991) Meth in Enzymology 198、303-16)

TF1 検定

TF1細胞は、2 ng/mL GM-CSFを有する5% FCSおよび2 mMグルタミン(成長培地)を含有するRPMI 1640で常套的に増殖させた。実験の直前に、細胞を2回洗浄し、TGF<sub>1</sub>、<sub>2</sub>、または<sub>3</sub>(各々50 pM)を含むまたは含まない、4 ng/mL IL-5を添加した新鮮な培地に4 × 10<sup>5</sup>細胞/mLで再懸濁し、100 μLアリコートに96ウェルプレートに移した。この検定に使用したscFv調製物は、エンドトキシンを除去したFPLC精製画分であった。

【0151】

成長培地中に抗体(二倍希釈系列)を調製し、100 μLをn = 2で細胞に加えた。対照は、TGF<sub>1</sub>のみを加えた細胞(抗体無し、増殖の最大阻害)およびTGF<sub>1</sub>も抗体も加えていない細胞(最小阻害)であった。細胞は37℃で48時間インキュベートした。

【0152】

検定の終了時にCellTiter96 (Promega)を使用して細胞数を検定し、データを中和%、即ち、

(被検値 - 最大阻害)

中和% =  $\frac{\text{被検値} - \text{最大阻害}}{\text{最小阻害} - \text{最大阻害}} \times 100$

(最小阻害 - 最大阻害)

で表した。

【0153】

潜在性TGF<sub>1</sub>の研究においては、データは様々な試験条件の各々における活性TGF<sub>1</sub>の量としての対照の%(TGF<sub>1</sub>不在下での増殖)として表した。

【0154】

(Randall LA等 (1993) J. Immunol Meth 164、61-7)

抗体の産生

S c F v 抗体および I g G 4 抗体は上記のように製造および精製した。

【0155】

結果

バイオアッセイ ( T F 1 検定 ) における S L 1 5 S s c F v ( C A T - 1 9 1 ) および S L 1 5 A I g G 4 ( C A T - 1 9 2 ) の力価

S L 1 5 S s c F v ( C A T - 1 9 1 ) が T G F <sub>2</sub> または <sub>3</sub> ではなく T G F <sub>1</sub> を認識する能力を T F 1 検定で調べた。

【0156】

S L 1 5 S s c F v ( K y l i e s c F v と し て も 知 ら れ る ) は T G F <sub>1</sub> により誘導される増殖阻害を中和したが、T G F <sub>2</sub> または T G F <sub>3</sub> により誘導された増殖阻害は中和しなかった ( 図 1 ) 。 対照として、T G F <sub>1</sub>、T G F <sub>2</sub> および T G F <sub>3</sub> を中和するモノクローナル抗体 Genzyme M a b 1 . D . 1 1 . 1 6 を使用した ( Genzyme、Dasch, J. R. 等、J. Immunol.、142、1536-1541、1989 ) 。 M a b 1 . D . 1 1 . 1 6 は、肺線維症、照射により誘発される線維症 ( Barcellos-Hoff、米国特許 5 6 1 6 5 6 1、1997 ) および慢性関節リウマチ ( Wahl 等、J. Exp. Medicine、177、225-230、1993 ) のモデルにおいて有効であることが示されている。S L 1 5 S s c F v は T G F <sub>1</sub> に対して Genzyme M a b 1 . D . 1 1 . 1 6 対照に匹敵する力価を示す。

【0157】

潜在性 T G F <sub>1</sub> を使用する研究において、S L 1 5 A I g G 4 ( C A T - 1 9 2 ; K y l i e I g G 4 と も 呼 ば れ る ) の 活 性 も ま た T F 1 検 定 で 示 さ れ た ( 図 5 b ) 。

【0158】

放射性レセプター検定における、S L 1 5 S s c F v ( C A T - 1 9 1 )、S L 1 5 A I g G 4 ( C A T - 1 9 2 ) および S L 1 5 S I g G 4 ( C A T - 1 9 3 ) の力価

T G F <sub>1</sub> を認識し、A 5 4 9 細胞に対する T G F <sub>1</sub> の結合を中和する S L 1 5 S s c F v の能力を、放射性レセプター検定で測定した。

【0159】

s c F v の h i s - p r e p s の比較においては、S L 1 5 S (Kylie) を親抗体 C S 3 7 および J T 1 8 2 と比較し ( 図 2 )、1 0 0 ~ 1 5 0 倍および 1 0 倍活性であることが判明した。S L 1 5 は、S L 1 5 A I g G 4 ( C A T - 1 9 2 ) および S L 1 5 S I g G 4 ( C A T - 1 9 3 ) という二つの型で I g G として再配列させた。S L 1 5 S s c F v、S L 1 5 A I g G 4、S L 1 5 S I g G 4 および M a b 1 D . 1 1 . 1 6 ( G e n z y m e m A b ) の精製品もまた分析した ( 図 3 )。

#### 【0160】

S L 1 5 S s c F v は G e n z y m e M a b 1 . D . 1 1 . 1 6 に匹敵する力価を持ち、これは動物モデルにおいて有効である。要約すると、S L 1 5 S s c F v は、0 . 0 3 ~ 0 . 1 n M の範囲の  $I C_{50}$  値を有する、T G F  $_{1}$  のための高力価の中和抗体である。

#### 【0161】

##### 実施例 4

活性および潜在性 T G F  $_{1}$  への、抗体 S L 1 5 S s c F v ( C A T - 1 9 1 ) および S L 1 5 A I g G 4 ( C A T - 1 9 2 ) の結合

本実施例に記載の実験は、S L 1 5 S s c F v および S L 1 5 A I g G 4 が、活性 T G F  $_{1}$  には結合しこれを中和するが、潜在性 T G F  $_{1}$  には結合および中和を行わないことを証明した。

#### 【0162】

潜在性 T G F  $_{1}$  は、T G F  $_{1}$  が細胞から分泌される際の生物学的に不活性化型であって、潜在性会合ペプチド二量体 ( 2 個の 2 4 9 アミノ酸単量体より成る ) および成熟 T G F  $_{1}$  二量体 ( 2 個の 1 1 2 アミノ酸単量体より成る ) で構成されている。潜在性 T G F  $_{1}$  は細胞表面の T G F レセプターにより認識されない。

#### 【0163】

活性 T G F  $_{1}$  は、インビボではプロテアーゼの作用によって放出されると考えられており、これはインビトロにおける酸性化になぞらえることができる。

#### 【0164】

潜在性TGF $\beta_1$ は、増殖検定での検定によると、酸性化の前後でそれぞれ0.43nMおよび2pMのED50を有すると報告されている。活性TGF $\beta_1$ は増殖検定においておよそ2pMのED50を有すると報告されている。おそらく、酸性化前の潜在性TGF $\beta_1$ の効果は若干の活性TGF $\beta_1$ の存在によるものであろう。この残留活性は、結果の解釈の際に考慮されねばならない。

#### 【0165】

SL15S s c F vおよびSL15A I g G 4の力価を、様々な量の潜在性TGF $\beta_1$ 、酸活性化されたTGF $\beta_1$ および活性TGF $\beta_1$ の存在下で、放射性レセプター検定およびTF1増殖検定を用いて試験した。当該抗体が潜在性TGF $\beta_1$ を認識するならば、それらの力価は減じられねばならない。両検定の解釈は、潜在性調製物中に存在するかもしれない活性TGF $\beta_1$ が結合に関して [ $^{125}$ I] TGF $\beta_1$ と競合し、細胞への生物活性を有するという事実によって複雑となる。

#### 【0166】

潜在性TGF $\beta_1$ を、潜在性TGF $\beta_1$  1mLに0.5M HCl 2 $\mu$ Lを添加することによって室温で15分間酸活性化し、次いで0.05M NaOH / 0.01M Hepes 43 $\mu$ Lで中和した。

#### 【0167】

結果は、放射性レセプター検定において、潜在性TGF $\beta_1$  (0.1nM) にはSL15S s c F v (Kylie s c F v) またはSL15A I g G 4 (Kylie I g G) の力価に及ぼす有意な効果はなく、一方、潜在性TGF $\beta_1$ の酸活性化、または同等濃度の活性TGF $\beta_1$ は、該抗体が [ $^{125}$ I] TGF $\beta_1$  結合を中和する能力を低下させることを示している (図4)。

#### 【0168】

TF1増殖検定は、潜在性TGF $\beta_1$ 調製物中の活性TGF $\beta_1$ の活性に対して極めて鋭敏である。にもかかわらず、SL15S s c F vまたはSL15A I g G 4は、潜在性調製物中の小部分の活性TGF $\beta_1$ を中和することができ、且つこの潜在性TGF $\beta_1$ が酸活性化されている場合、これを効率的に中和できることが判明した (図5)。

## 【0169】

故に、s c F vまたはI g G形態のS L 1 5は、放射性レセプター検定およびT F 1中和検定の両方で測定したところによると、活性T G F<sub>1</sub>のみを結合および中和し潜在性T G F<sub>1</sub>を結合および中和しない。

## 【0170】

## 実施例5

抗体S L 1 5 S s c F vおよびC S 3 7 s c F vのエピトープマッピング

この実施例では、抗体C S 3 7およびS L 1 5 Sが結合するT G F<sub>1</sub>上のエピトープを決定した。

## 【0171】

T G F<sub>1</sub>およびT G F<sub>2</sub>は類似構造を有するが、T G F II型レセプターに対する結合親和性および幾つかの生物検定における力価が相違する(O.G.OttmanおよびL.M.Pelus J.Immunol. 140 2661-2665、1988 ; J.R.Merwin等、Am.J.Pathol. 138 37-51、1991 ; K.C.Flanders等、Development 113 183-191、1991 ; L.Suardet等、Cancer Res. 52 3705-3712、1992)。Qian等(J.Biol.Chem. 271 30656-30662、1996)は、親和性の相違を利用して、II型レセプターに対するT G F<sub>1</sub>の高親和性結合に関与している重要残基を同定した。これは、T G F<sub>1</sub>およびT G F<sub>2</sub>の間の、一連のキメラ分子を作製し、インビトロ(Qian等、上記)およびインビボ(J.K.Burmester等 Growth Factors 15 231-242、1998)で高親和性レセプター結合を保持しているものを同定することによってなされた。このようにして、T G F<sub>1</sub>の残基83 - 112により包含されるC末端領域が、有効なレセプター結合を保持するのに充分であるとして同定された。

## 【0172】

T G F<sub>1</sub>およびT G F<sub>2</sub>の配列の比較は、残基92 - 98より成るループを包含する幾つかの相違を同定したが、このループには、T G F<sub>1</sub>およびT G F<sub>2</sub>の間に4個のアミノ酸の相違を含んでいる。T G F<sub>2</sub>由来のこれらの残基をT G F<sub>1</sub>主鎖に導入するとレセプター結合は甚だしく低下し、この事により、これらがT G F<sub>1</sub>とII型レセプターとの相互作用における重要残基であることが確認された。

## 【0173】

キメラ分子を同様な方法で使用して、TGF<sub>1</sub>上のCS37およびSL15 SscFv (CAT-191)の結合部位をマッピングした。TGF<sub>1/2</sub> (83-112)は、TGF<sub>2</sub>の残基83-112のC末端領域に融合した、TGF<sub>1</sub>の残基1-82のN末端および中央領域に相当する。TGF<sub>2/1</sub> 83-112は、TGF<sub>1</sub>の残基83-112のC末端領域に融合した、TGF<sub>2</sub>の残基1-82のN末端および中央領域に相当する。最後にTGF<sub>1-2</sub> (40-112)は、TGF<sub>1</sub>の残基1-39のN末端領域、およびTGF<sub>2</sub>の残基40-112の中央およびC末端領域に相当する。以後、これらはそれぞれイソ型の相対的組成を反映させて、1-1-2、2-2-1および1-2-2と称する。

## 【0174】

これら3つの分子はTGF<sub>1</sub>およびTGF<sub>2</sub>と共に、固定化TGF<sub>1</sub>に対するSL15 SscFvおよびCS37 sscFvの結合阻害について以下のごとく解析した。

## 【0175】

SL15 SscFvまたはCS37 sscFvをディスプレイしているファージを、pCANTAB6においてM13K07重感染によりクローンから調製した。ファージをPEG沈殿させ、2%Marvelを含有するPBSに再懸濁した。0.5 µg/mLのTGF<sub>1</sub>で被覆した、プレブロックしたELISAプレートに、ファージ(50 µL中2.5 ~ 5 × 10<sup>10</sup>)を30分間添加した。

## 【0176】

阻害の分析のため、同濃度のファージを使用して、TGF<sub>1</sub>濃度の希釈系列を、上記のTGF<sub>1</sub>キメラ分子(J.Burmester、National Institutes of Healthからの寄贈)およびTGF<sub>1</sub>および2つのイソ型の各々について準備した。

## 【0177】

これらを4℃で一夜インキュベートした後、ELISAプレートに添加した。抗原で被覆したプレートに特異結合したファージを、羊抗fd抗血清(Pharmacia)、その後アルカリホスファターゼコンジュゲート化抗羊免疫グロブリン(Sig

ma) および燐酸 p - ニトロフェニル ( p N P P ) 基質 (Sigma) を用いて検出した。

#### 【0178】

Ky1ie1についての非阻害値 (即ち 0 nM) は 1.67 (3個の読み取りの平均) であり、CS37については1.216 (7個の読み取りの平均) であった。図6および7に示す結果は、CS37 scFvおよびSL15S scFvの両者により認識されるエピトープは、TGF<sub>1</sub>の残基83 - 112の間に存在するというを示している。さらに、TGF<sub>2</sub>配列の残基92 - 98と共にTGF<sub>1</sub>を含む突然変異体分子TGF<sub>1</sub>-<sub>2</sub> (92 - 98) もまた、TGF<sub>1</sub>に対するCS37およびSL15S scFvの結合を阻害するが、これは効果が低く、特にSL15S scFvについては低いものである。この事は、これらの抗体により認識されるエピトープの少なくとも一部は、92 - 98領域内部に存在するというを証明している (これは92、94、95および98位という4個の残基を有し、それはTGF<sub>1</sub>とTGF<sub>2</sub>の間で相違している)。

#### 【0179】

##### 実施例6

抗TGF<sub>1</sub>モノクローナル抗体SL15A IgG4 (CAT-192)の存在下での角膜上皮創傷治癒の加速

TGF<sub>1</sub>は創傷治癒 (目および皮膚の両方) の調節に関わっており、角膜上皮再形成の速度を阻害することが示されている。ここでは、角膜上皮創傷治癒の速度に及ぼすSL15A IgG4 (CAT-192)の局所適用の効果を、組織培養モデルを用いて評価した (DM Foreman等、Exp. Eye Res. 62、555-564、1996)。

#### 【0180】

牛の角膜に穿孔器による切除創傷 (直径5mm、深さ250 μm) を創った。角膜強膜環を、無血清の空気界面組織培養系で96時間まで維持した。切開時に、そしてその後1日に2回、(i) 10 ng/mL TGF<sub>1</sub>; (ii) 100 μg/mL 抗TGF<sub>1</sub> mAb; (iii) (i) および(ii) の組み合わせ; (iv) 100 μg/mL ヌル抗体 (2G6 IgG4); (v) 100 μg/mL 抗体希釈液; または(v)

i) 添加無し (各群について  $n = 9$ ) を含有する無血清 TGF $_{\beta 1}$  培地 100  $\mu$ L を上皮表面および縁に滴下した。画像分析系を用いて上皮再形成を評価し、上皮で覆われた元の創傷面積のパーセントとして表した。

#### 【0181】

培地のみ、ヌル抗体または抗体希釈液を投与された対照角膜は 72 時間までに完全な上皮再形成を示した。100  $\mu$ g/mL の抗 TGF $_{\beta 1}$  mAb による処置は上皮再形成速度を増大させ、その結果、角膜は 48 時間までに完全に上皮再形成した (図 8)。10 ng/mL の TGF $_{\beta 1}$  による角膜の処置は 24 時間までに遅延した上皮再形成を示し、この阻害効果は抗 TGF $_{\beta 1}$  mAb により破壊された (図 9)。言及した相違は全て有意である ( $p < 0.05$ )。2 ~ 48 時間の間のデータの点について線形回帰を実施し (図 8 を参照されたい)、上皮再形成の速度を決定した。CAT 192 はこの変数において有意な増大を惹起した (第 3 表)。組織学的分析は画像分析結果を支持し、且つ、抗 TGF $_{\beta 1}$  mAb の添加は角膜構造に有害な影響を及ぼさないことを確認した。

#### 【0182】

第 3 表 穿孔器による切除創傷後、空気界面組織培養中の牛の単離角膜の上皮再形成速度に及ぼす CAT 192 および TGF $_{\beta 1}$  の効果

処置	上皮再形成の速度 (% h $^{-1}$ )	n
培地 199 (100 $\mu$ L)	1.56 $\pm$ 0.07	8
媒質 (100 $\mu$ L)	1.57 $\pm$ 0.08	8
ヌル抗体 IgG4 (10 $\mu$ L)	1.48 $\pm$ 0.09	8
TGF $_{\beta 1}$ (1 ng)	1.01 $\pm$ 0.09	8
CAT 192 (10 $\mu$ L)	2.11 $\pm$ 0.09*	8

第 3 表の説明：牛角膜を、創傷後直ちに、そしてその後 12 時間の間隔で、無血清培地 199 (対照) または媒質 (抗体および TGF $_{\beta 1}$  について)、ヌル IgG4 アイソトープ合致抗体、TGF $_{\beta 1}$  もしくは CAT 192 を含有する培地のいずれか 100  $\mu$ L で処置した。2 ~ 48 時間の間のデータの点について線形回帰を実施し (図 8 を参照されたい)、上皮再形成の速度を決定した。CAT 19

2は牛角膜創傷の上皮再形成速度の著明な増大を惹起し、一方TGF $\beta_1$ はこの変数において有意な低下を惹起した。表示の数値は平均値およびs.e.平均である。異なる処置の効果を、Tukey試験による一元ANOVAを用いて比較した。\*ヌル抗体処置群と比較して $P < 0.01$ ； 媒質処置群と比較して $P < 0.01$ 。

#### 【0183】

これらの結果は、角膜上皮修復における内因性TGF $\beta_1$ の重要な役割を確認するものであり、そして、抗TGF $\beta_1$  mAb SL15A IgG4 (CAT-192)の局所投与がインビボでの創傷治癒の改善の促進に使用できるという指摘を提供するものである。

#### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO:1

Nucleic acid encoding CS37 VH (31G9)

```
          10          20          30          40          50
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC

          60          70          80          90         100
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCA

          110         120         130         140         150
TGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT

          160         170         180         190         200
ATATCATATGATGGAAGTATTAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG

          210         220         230         240         250
ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGA

          260         270         280         290         300
ACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGCGAACTGGT

          310         320         330         340         350
GAATATAGTGGCTACGATACGAGTGGTGTGGAGCTCTGGGGGCAAGGGAC

          360
CACGGTCACCGTCTCCTCA
```

SEQ ID NO:2

## Amino acid sequence of CS37 VH (31G9)

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

SEQ ID NO:3

## Nucleic acid encoding SL15 VH

10            20            30            40            50  
 GAGGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC

60            70            80            90            100  
 CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCA

110           120           130           140           150  
 TGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGAGCTGGAGTGGGTGGCAGTT

160           170           180           190           200  
 ATATCATATGATGGAAGTATTTAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG

210           220           230           240           250  
 ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGA

260           270           280           290           300  
 ACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGGAACTGGT

310           320           330           340           350

GAATATAGTGGCTACGATACGGACCCCCAGTACTCCTGGGGGCAAGGGAC

360

CACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:4

Amino acid sequence of SL15 VH

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

SEQ ID NO:5

Nucleic acid encoding SL15A VL (CS37)

10 20 30 40 50  
 GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA

60 70 80 90 100  
 CAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTGGAGATGATTTGG

110 120 130 140 150  
 GCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCTATCCTCCTGATCTATGGT

160 170 180 190 200  
 ACATCCACTTTACAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATC

210 220 230 240 250  
TGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTG  
260 270 280 290 300  
CAACTTATTACTGTCTACAAGATTCCAATTACCCGCTCACTTTCGGCGGA  
310 320  
GGGACACGACTGGAGATTA

SEQ ID NO:6

Amino acid sequence of SL15A VL (CS37)

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

SEQ ID NO:7

Nucleic acid encoding SL15S VL

10 20 30 40 50  
GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA  
60 70 80 90 100  
CAGAGTCACCATCACTTGCCGGTCAAGTCAGGGCATTGGAGATGATTTGG  
110 120 130 140 150  
GCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCTATCCTCCTGATCTATGGT

160            170            180            190            200  
 ACATCCACTTTTACAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATC  
  
 210            220            230            240            250  
 TGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTG  
  
 260            270            280            290            300  
 CAACTTATTACTGTCTACAAGATTCCAATTACCCGCTCACTTTTCGGCGGA  
  
 310            320  
 GGGACACGACTGGAGATTAAA

SEQ ID NO:8

Amino acid sequence of SL15S VL

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

SEQ ID NO:9

Nucleic acid sequence encoding JT182 VH

10            20            30            40            50  
 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC  
  
 60            70            80            90            100  
 CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCA

110            120            130            140            150  
 TGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGAGCTGGAGTGGGTGGCAGTT  
  
 160            170            180            190            200  
 ATATCATATGATGGAAGTATTAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG  
  
 210            220            230            240            250  
 ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGA  
  
 260            270            280            290            300  
 ACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGCGAACTGGT  
  
 310            320            330            340            350  
 GAATATAGTGGCTACGATACGCCCGCCTCGCCGGACTGGGGGCAAGGGAC  
  
 360  
 CACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:10

Amino acid sequence of JT182 VH

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

SEQ ID NO:11

SYGMH

SEQ ID NO:12  
VISYDGSIKYYADSVKG

SEQ ID NO:13  
TGEYSGYDTPQYS

SEQ ID NO:14  
TGEYSGYDTSGVEL

SEQ ID NO:15  
TGEYSGYDTPASPD

SEQ ID NO:16  
RASQGIGDDLG

SEQ ID NO:17  
GTSTLQS

SEQ ID NO:18  
LQDSNYPLT

SEQ ID NO:19  
RSSQGIGDDLG

SEQ ID NO:21  
CTAAGCTTACTGAGCACACAGGACCTCACC

SEQ ID NO:21  
AATTTTCGAACTACAGTTACTGAGCACACAGGACC

SEQ ID NO:22  
ATGGGCCCTTGGTGGAAAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTG

SEQ ID NO:23

TTGGATATCTCTCCACAGGTGTCCACTCCGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCA

SEQ ID NO:24

CTACCGTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCCTCCGCCGAA

SEQ ID NO:25

TTGGATATCTCTCCACAGGTGTCCACTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

図1は、TF1細胞を使用する増殖検定における、SL15S scFvによるTGF<sub>1</sub> (TGF<sub>2</sub>または<sub>3</sub>ではなく)の中和。TF1の増殖の、TGF<sub>1</sub>、<sub>2</sub>または<sub>3</sub>により誘導される阻害の、Genzyme mAb (Mab1D.11.16 - 正方形)またはSL15S scFv (菱形)による中和を示す。

## 【図2】

図2は、抗TGF<sub>1</sub> scFvによる、A549細胞への<sup>[125I]</sup>TGF<sub>1</sub>の結合の阻害。SL15S、JT183およびCS37のscFv調製物を2倍に滴定し、A549細胞への<sup>[125I]</sup>TGF<sub>1</sub>の結合を阻害するそれらの能力について試験した。SL15SおよびJT182はhis-prepsとして使用し、CS37はfp1c精製した。

## 【図3】

図3は、抗TGF<sub>1</sub>抗体による、A549細胞への<sup>[125I]</sup>TGF<sub>1</sub>の結合の阻害。SL15S scFv、SL15S IgG4およびSL15A IgG4を、A549細胞への<sup>[125I]</sup>TGF<sub>1</sub>の結合を阻害する能力についてGenzyme mAbと比較した。データは、3倍希釈系列を使用する3回の実験の平均である。

## 【図4】

図4は、潜在性TGF<sub>1</sub>の存在下でのscFvによる、A549細胞への<sup>[125I]</sup>TGF<sub>1</sub>の結合の阻害。SL15S scFvおよびSL15A IgG4

を、A549細胞への $[^{125}\text{I}]\text{TGF}_1$ の結合を阻害する能力について試験した。SL15Sが潜在性 $\text{TGF}_1$ を認識するかどうかを調べるため、0.1nMの潜在性 $\text{TGF}_1$ 、活性 $\text{TGF}_1$ または酸活性化した潜在性 $\text{TGF}_1$ の存在下で標準実験を実施した。データは条件の各組について%最大値として表す。

#### 【図5】

図5は、潜在性 $\text{TGF}_1$ の存在下での、scFvおよびIgGによるTF1細胞増殖の、 $\text{TGF}_1$ により誘導される阻害の中和。潜在性 $\text{TGF}_1$ 、活性 $\text{TGF}_1$ または酸活性化 $\text{TGF}_1$ により誘導される増殖阻害を中和する、SL15S scFvおよびSL15A IgG4の能力を、TF1検定で比較した。(a)では異なる濃度の $\text{TGF}_1$ フォーマットを比較し、(b)ではscFvおよびIgGを20pMの $\text{TGF}_1$ フォーマットに対して比較した。データは%対照( $\text{TGF}_1$ の不在下での増殖)として表した。潜在性 $\text{TGF}_1$ により誘導される阻害は、潜在性調製物中に存在する少量の活性 $\text{TGF}_1$ によるものである。

#### 【図6】

図6は、キメラ $\text{TGF}$ を使用する、ファージ上に展示されたCS37 scFvの、 $\text{TGF}_1$ への結合の阻害。ファージ上に展示されたCS37 scFvの、 $\text{TGF}_1$ への結合を、 $\text{TGF}_1$ イソ型( $\text{TGF}_1$ )； $\text{TGF}_2$ イソ型( $\text{TGF}_2$ )； $\text{TGF}_1/2$ (83-112)(1-1-2)； $\text{TGF}_2/1$  83-112(2-2-1)； $\text{TGF}_1-2$ (40-112)(1-2-2)；または $\text{TGF}_1-2$ (92-98)(92-98)の存在下でELISAによって検定した。

#### 【図7】

図7は、キメラ $\text{TGF}$ を使用する、ファージ上に展示されたSL15S(Kylie scFv)の、 $\text{TGF}_1$ への結合の阻害。ファージ上に展示されたSL15S(Kylie) scFvの、 $\text{TGF}_1$ への結合を、 $\text{TGF}_1$ イソ型( $\text{TGF}_1$ )； $\text{TGF}_2$ イソ型( $\text{TGF}_2$ )； $\text{TGF}_1/2$ (83-112)(1-1-2)； $\text{TGF}_2/1$  83-112(2-2-1)； $\text{TGF}_1-2$ (40-112)(1-2-2)；または $\text{TGF}_1-2$ (92-98)(92-98)

)の存在下でELISAによって検定した。

#### 【図8】

図8は、角膜上皮再形成に及ぼすCAT192の効果を、空気界面組織培養モデルにおいて、ウシ単離角膜より切除した穿孔創傷に従って研究した。ウシ角膜は、100  $\mu$ Lの無血清培地199（対照）または媒質を含有する培地（抗体およびTGF $_{\beta 1}$ のため）のいずれかで処理した。ヌルアイソタイプ合致抗体（10  $\mu$ g）、TGF $_{\beta 1}$ （1 ng）またはCAT192（10  $\mu$ g）を、創傷後直ちに、そしてその後12時間の間隔で投与した。CAT192は、傷つけたウシ角膜の上皮再形成速度の著しい増大を惹起し、一方TGF $_{\beta 1}$ は、この変数の著しい低下を惹起した。データは角膜創傷の上皮再形成のパーセントとして表す。各々の点は平均値を表し、垂直線は各点につき8個の角膜のs.e.平均を示す。異なる処置の効果を、Bonferroni試験を用いる反復測定ANOVAを用いて各時点で比較した。\*P < 0.01（ヌル抗体処置群との比較）；tP < 0.01（媒質処置群との比較）。

#### 【図9】

図9は、角膜上皮再形成に及ぼすCAT192の効果を、空気界面組織培養モデルにおいて、ウシ単離角膜より切除した穿孔創傷に従って研究した。CAT192（0.001 - 10  $\mu$ g）を、創傷後直ちに、そしてその後12時間の間隔で投与した。CAT192は、傷つけたウシ角膜の上皮再形成において、用量に相関する有意な増加を惹起した。CAT192のEC50は0.01および0.1  $\mu$ gの間であった。データは、媒質で処置した対照群の上皮再形成における変化パーセントとして表現する。点線は媒質対照群のs.e.平均値を示す。各々の点は平均値を表し、垂直線は各点につき6個の角膜のs.e.平均を示す。異なる用量のCAT192の効果を一元ANOVAおよびDunnett試験を用いて対照処置と比較した。\*P < 0.01。

【图1-1】

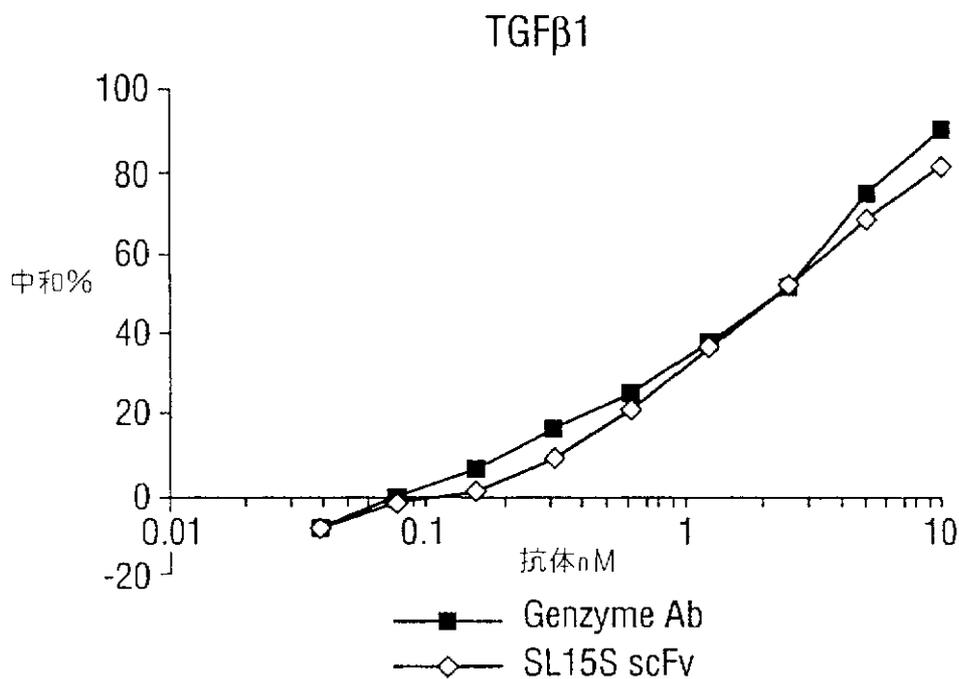
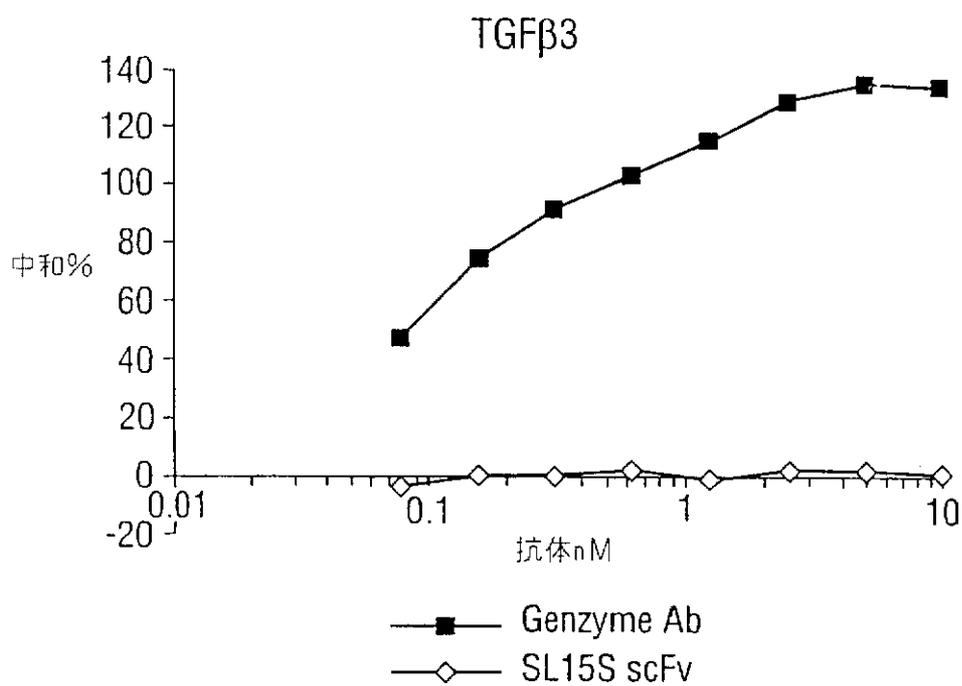


FIG. 1



【図1-2】

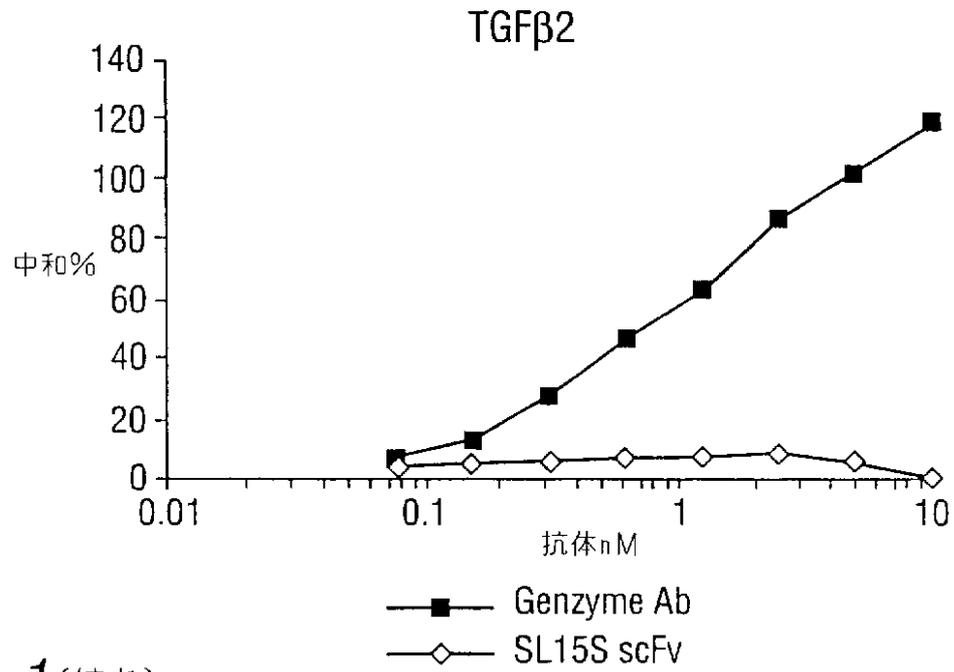
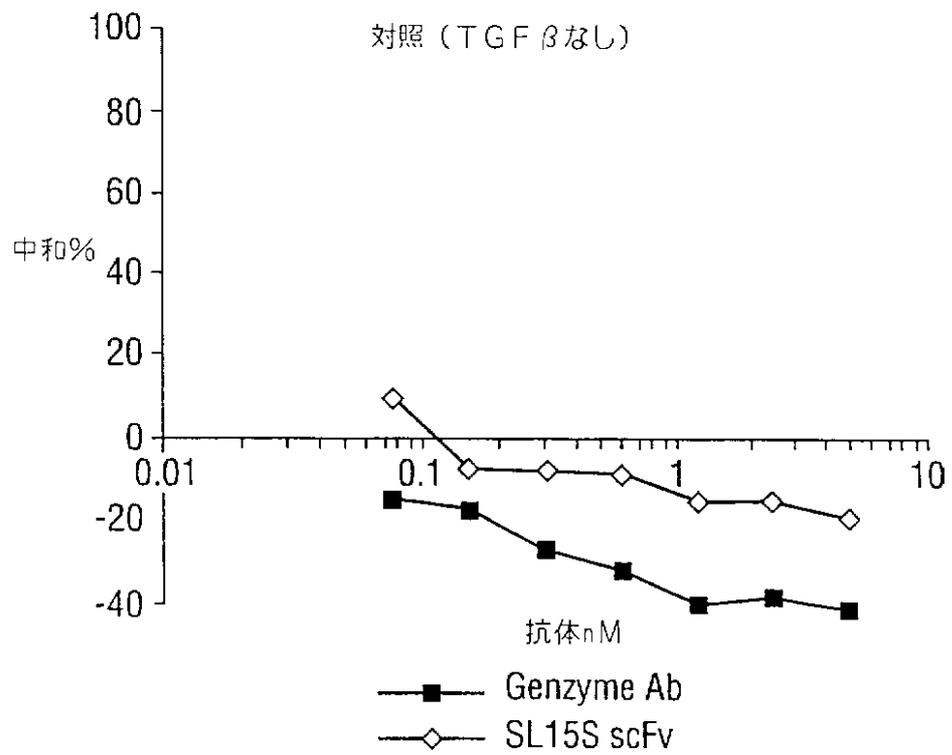
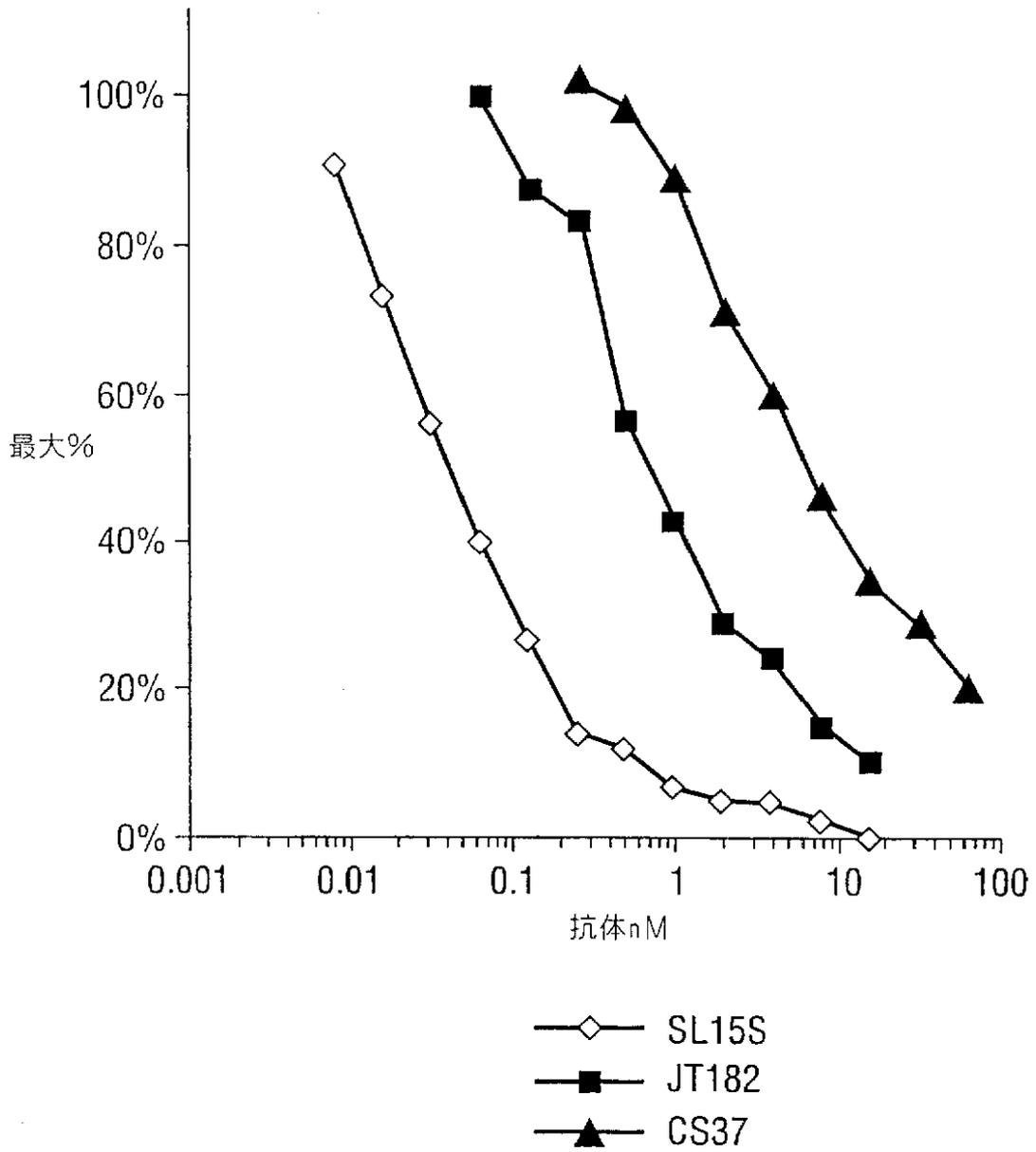


FIG. 1 (続き)



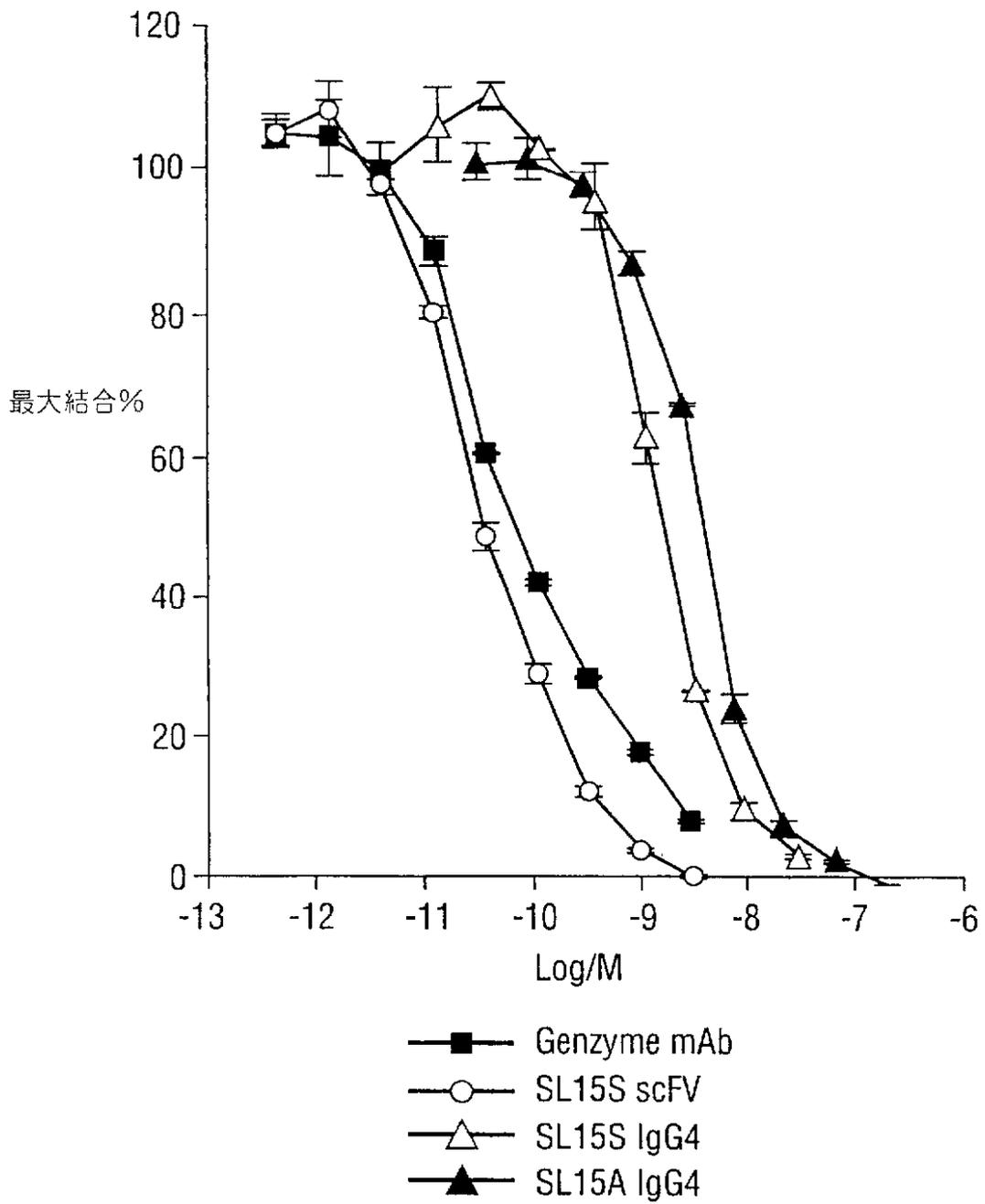
【图2】

FIG. 2



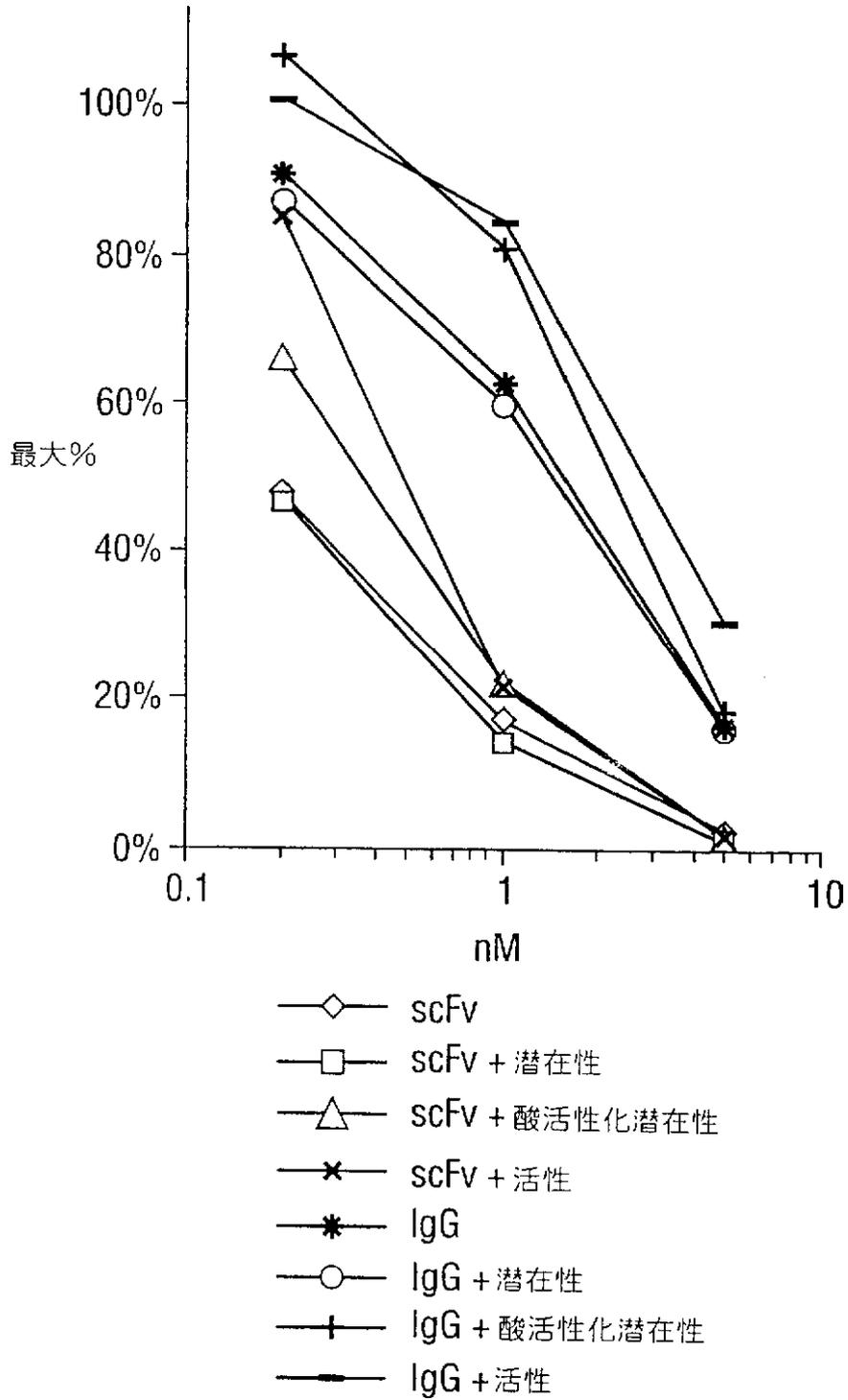
【図3】

FIG. 3



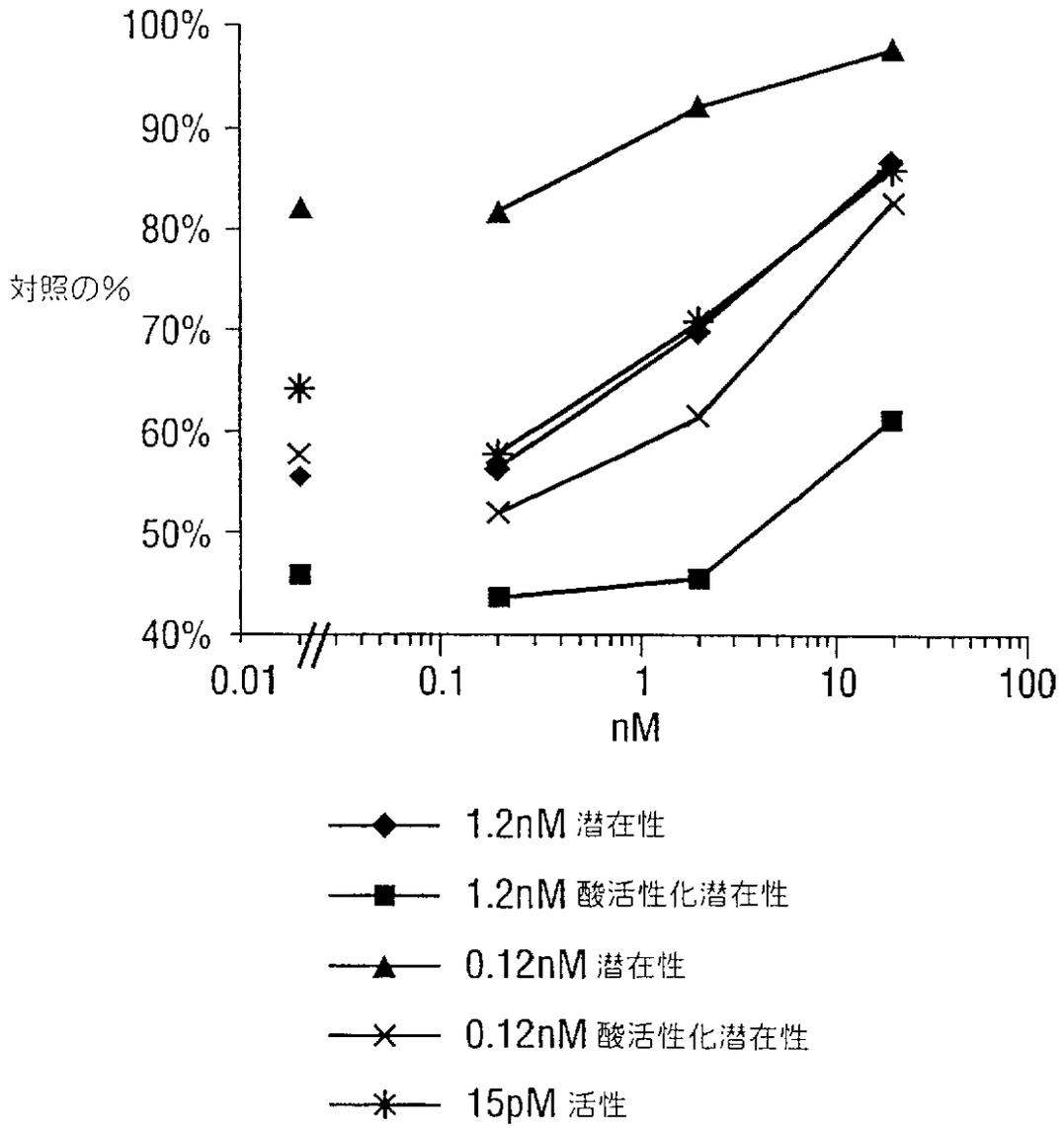
【图4】

FIG. 4

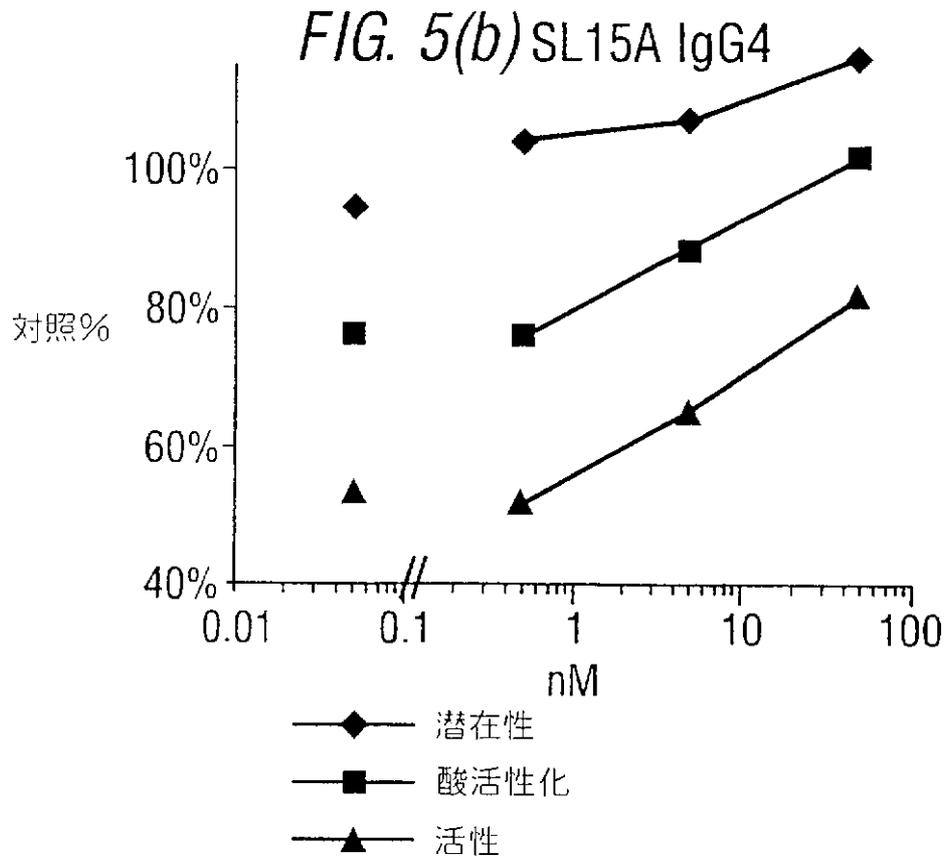


【図5(a)】

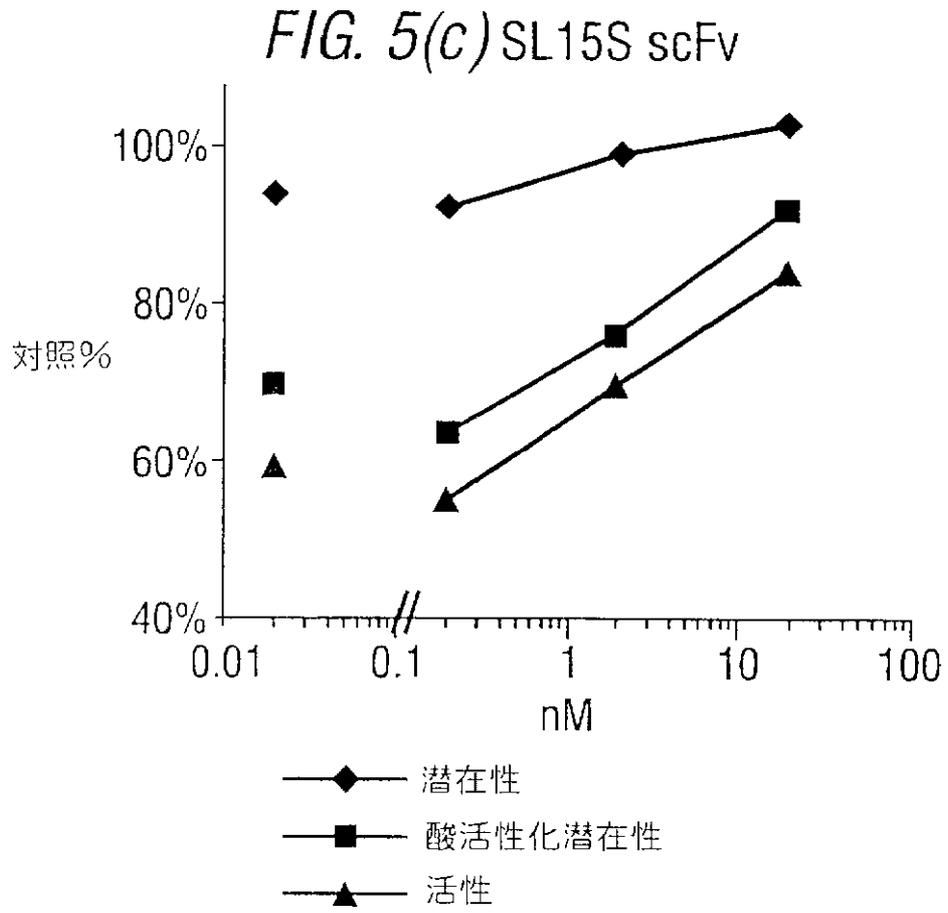
FIG. 5(a)  
SL15S scFv



【图5(b)】



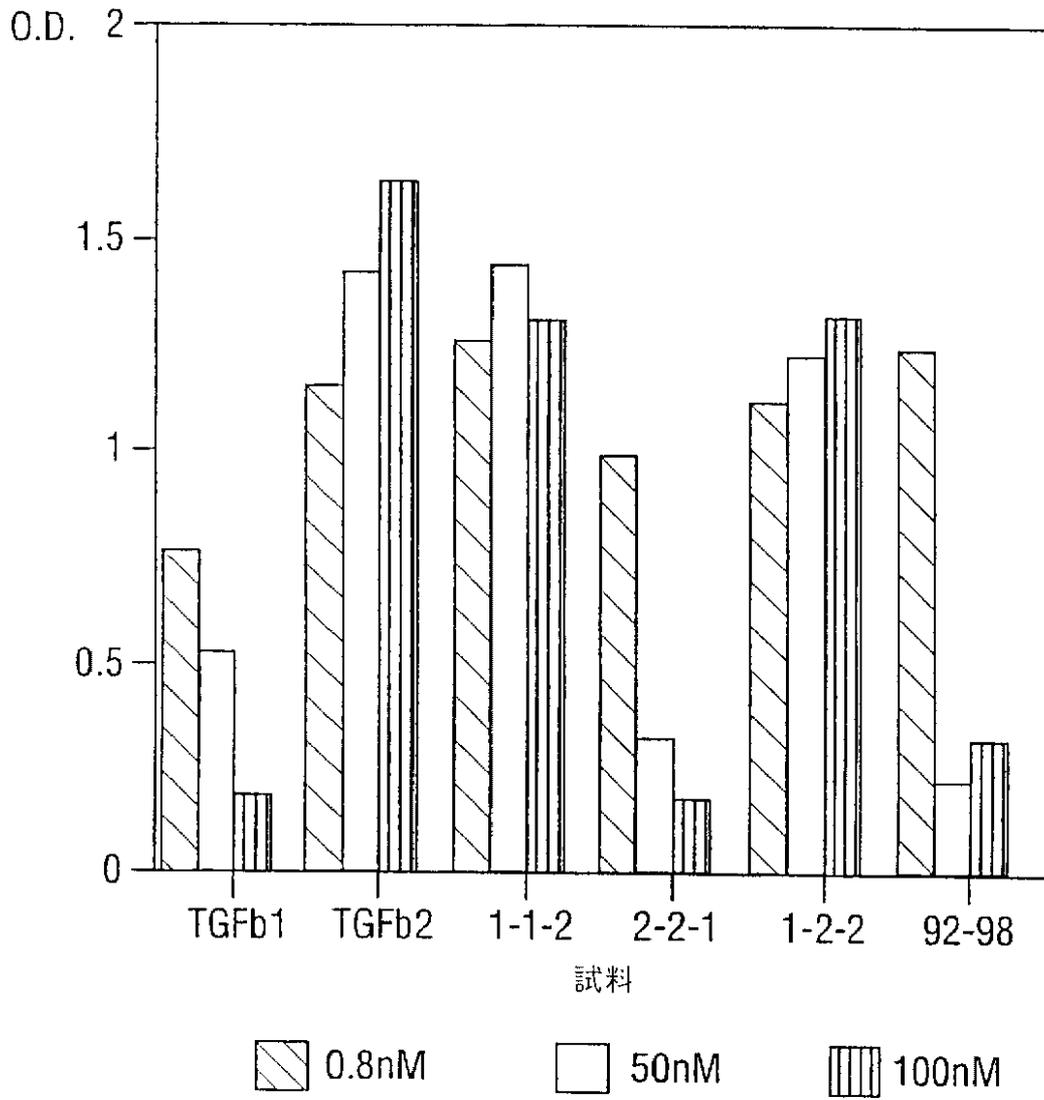
【图5(c)】



【図6】

### FIG. 6

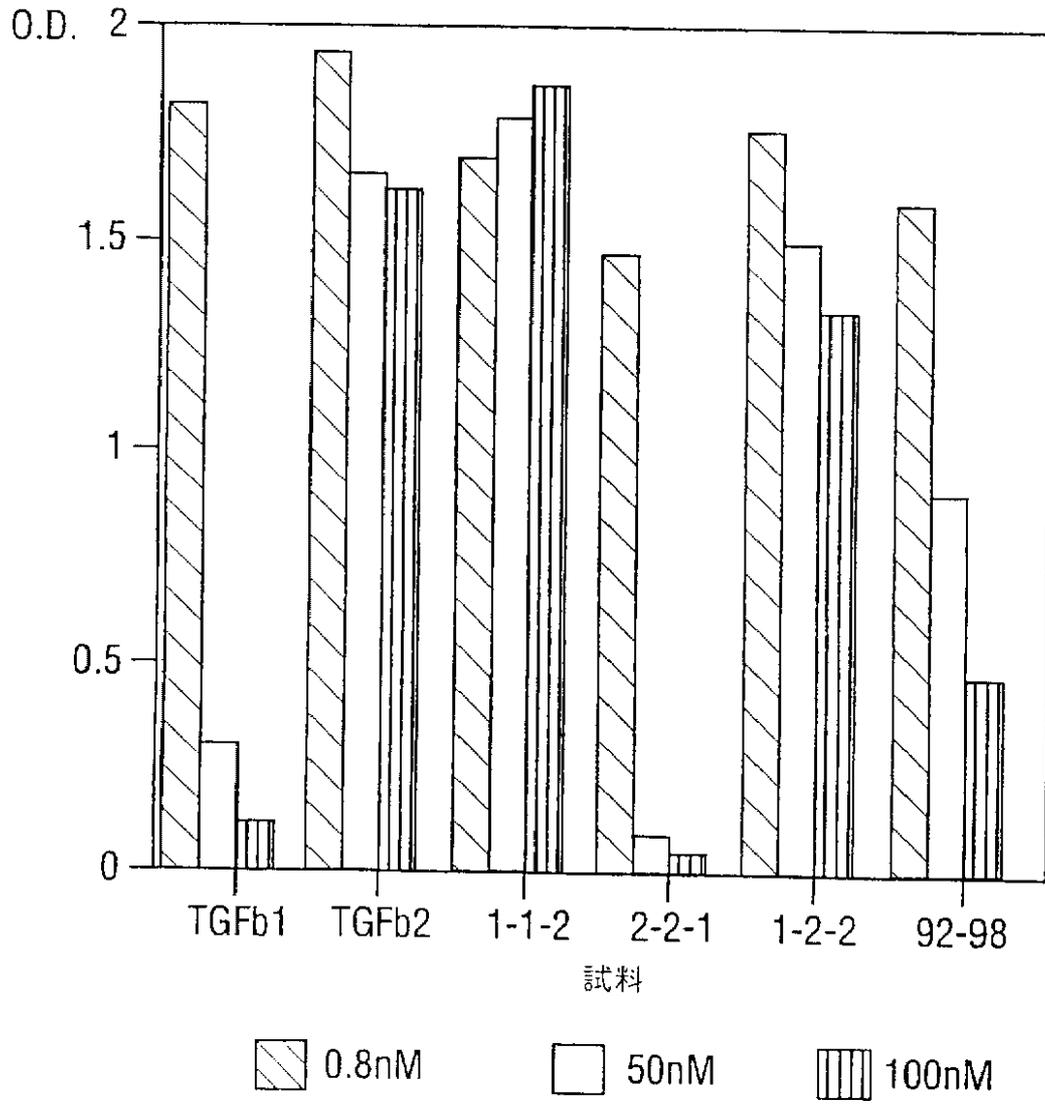
キメラTGFβを用いるCS37の結合の阻害



【図7】

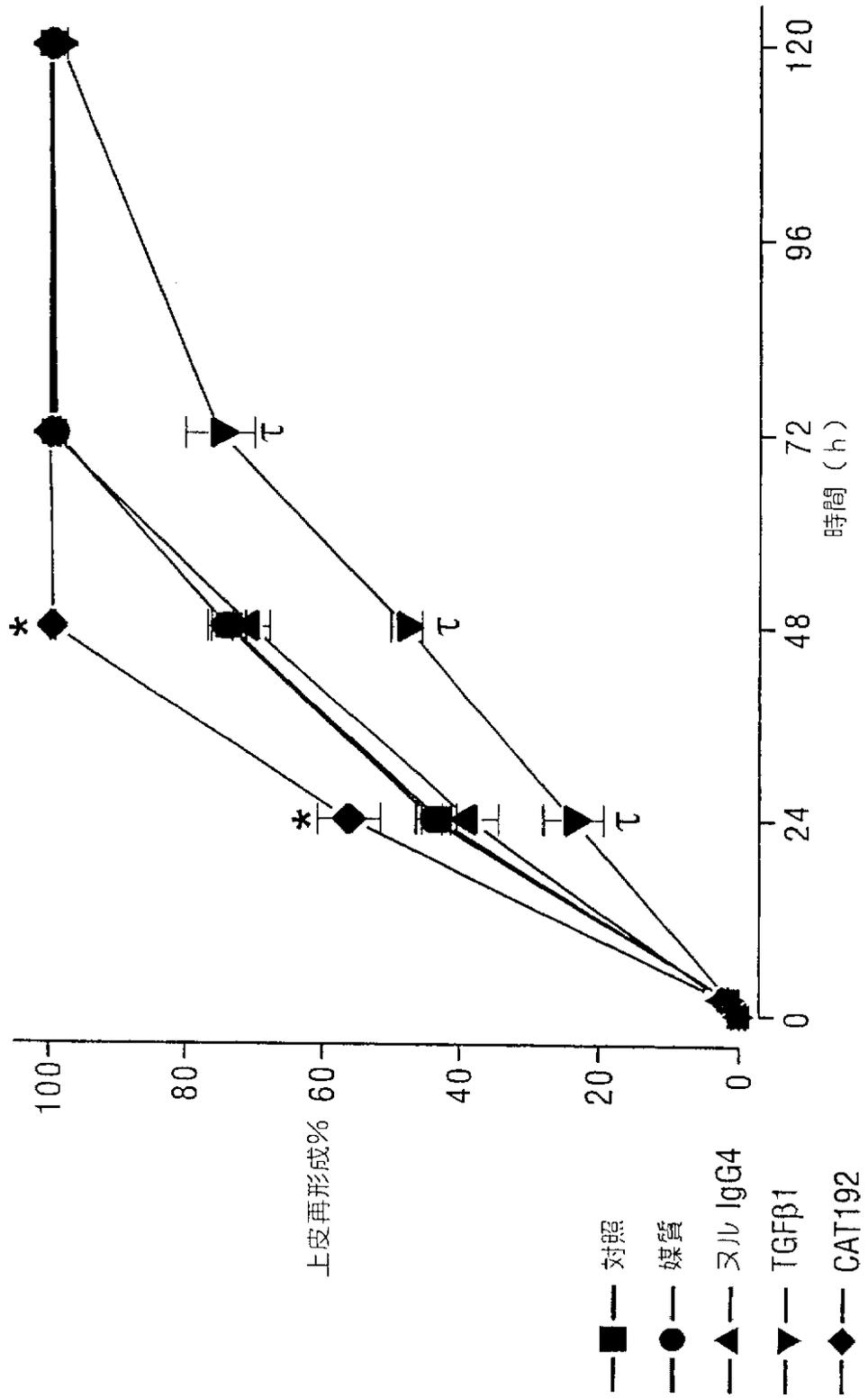
FIG. 7

キメラTGFβを用いるKylieの結合の阻害



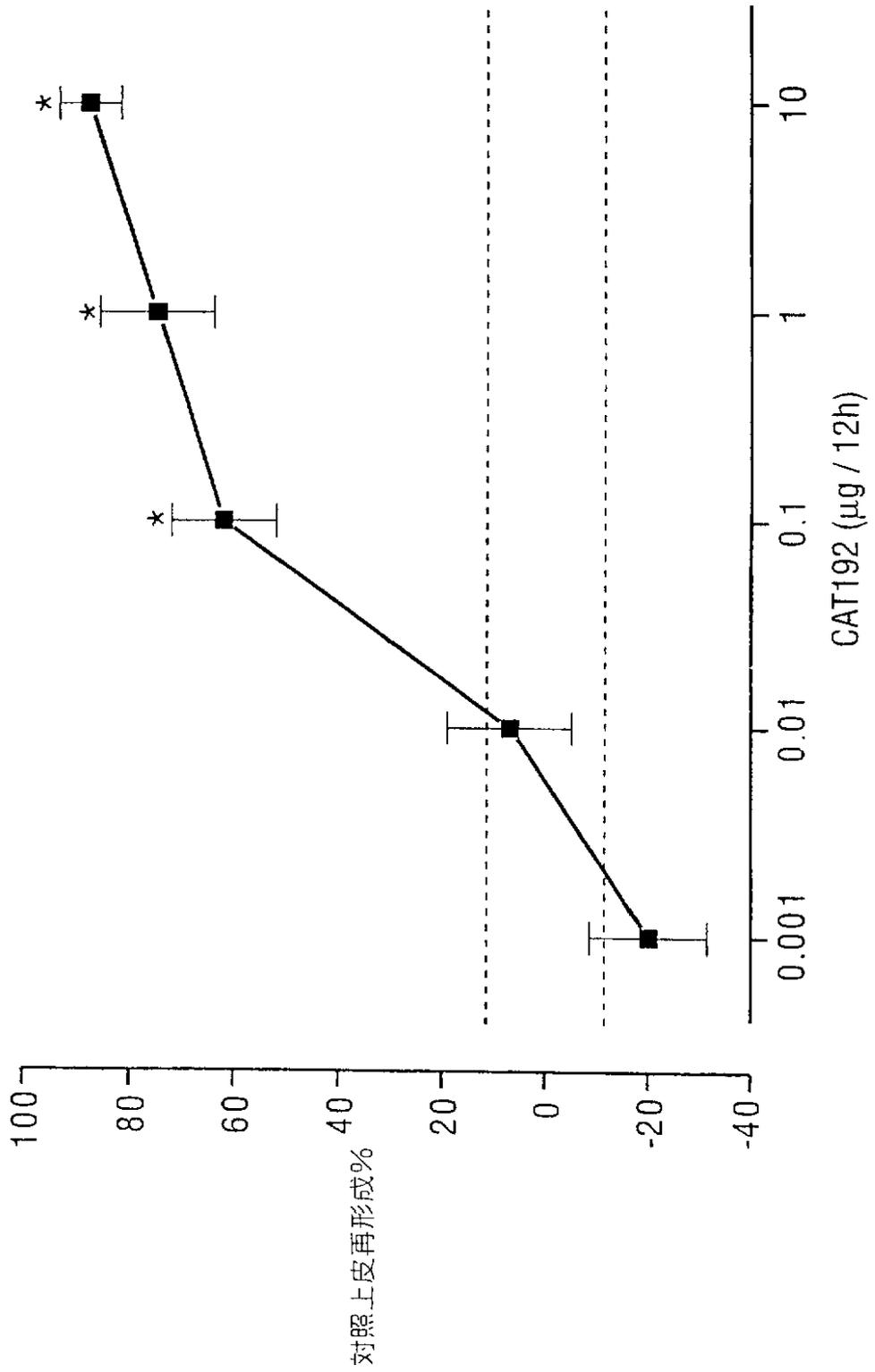
【図8】

FIG. 8



【图9】

FIG. 9



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年3月6日(2001.3.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 特異的結合成員が、SL15のVH CDR3(配列番号13)またはJT182のVH CDR3(配列番号15)として実質上開示されるアミノ酸配列を有するVH CDR3を含む抗原結合ドメインを含む、TGFR<sub>1</sub>に結合することのできる単離された前記特異的結合成員。

【請求項2】 CS37 VH CDR1(配列番号11)およびCS37 VH CDR2(配列番号12)の一方または両方として実質上開示されるアミノ酸配列を有する、VH CDR1またはVH CDR2をさらに含む、請求項1に記載の特異的結合成員。

【請求項3】 CS37 VH CDR1(配列番号11)およびCS37 VH CDR2(配列番号12)として実質上開示されるCDR1配列を含む、請求項1または2に記載の特異的結合成員。

【請求項4】 当該CDR1、CDR2およびCDR3配列がヒト抗体フレームワークに存在する、請求項3に記載の特異的結合成員。

【請求項5】 特異的結合成員が配列番号4に実質上開示されるSL15 VHドメインを含む、TGFR<sub>1</sub>に結合することのできる単離された前記特異的結合成員。

【請求項6】 特異的結合成員が配列番号10に実質上開示されるJT182 VHドメインを含む、TGFR<sub>1</sub>に結合することのできる単離された前記特異的結合成員。

【請求項7】 特異的結合成員が配列番号8に実質上開示されるSL15 SVLドメインを含む、TGFR<sub>1</sub>に結合することのできる単離された前記特異的

結合成員。

【請求項8】 特異的結合成員が、

(i) 配列番号4に実質上開示されるSL15 VHドメインおよび配列番号10に実質上開示されるJT182 VHドメインの群から選ばれるVHドメイン；および、

(ii) 配列番号8に実質上開示されるSL15S VLドメインおよび配列番号6に実質上開示されるSL15A VLドメインの群から選ばれるVLドメイン

、

を含む、TGFR<sub>1</sub>に結合することのできる単離された前記特異的結合成員。

【請求項9】 VHドメインが配列番号4に実質上開示されるSL15 VHドメインである、請求項8に記載の単離された特異的結合成員。

【請求項10】 一本鎖Fv(scFv)の形態である、前記請求項のいずれか1項に記載の単離された特異的結合成員。

【請求項11】 IgGの形態の、請求項1～9のいずれか1項に記載の単離された特異的結合成員。

【請求項12】 IgGがIgG1またはIgG4である、請求項11に記載の単離された特異的結合成員。

【請求項13】 薬学上許容し得る賦形剤、担体、緩衝剤または安定剤と合した、請求項1～12のいずれか1項に記載の特異的結合成員を含む医薬組成物。

【請求項14】 ヒトまたは動物の治療方法における使用のための、請求項1～12のいずれか1項に記載の特異的結合成員または請求項13に記載の組成物。

【請求項15】 当該治療が、糸球体腎炎、ケロイドおよび過形成性瘢痕形成、増殖性硝子体網膜症、緑内障ドレナージ手術、角膜損傷および白内障を包含する、患者の細胞外マトリックス沈着に伴う状態を治療することである、請求項14に記載の使用のための、特異的結合成員または組成物。

【請求項16】 免疫または炎症反応を調節する方法における、請求項14に記載の使用のための、特異的結合成員または組成物。

【請求項17】 腫瘍の治療方法における、請求項14に記載の使用のための、特異的結合成員または組成物。

【請求項18】 当該腫瘍が血管新生または転移を伴う、請求項17に記載の使用のための、特異的結合成員または組成物。

【請求項19】 当該腫瘍が、乳房、前立腺、卵巣、胃、結腸直腸、皮膚、肺、子宮頸部および膀胱腫瘍、または白血病もしくは肉腫である、請求項17または18に記載の使用のための、特異的結合成員または組成物。

【請求項20】 喘息の治療方法における、請求項14に記載の使用のための、特異的結合成員または組成物。

【請求項21】 当該病気がTGF $\beta_1$ の発現に付随する、患者の病気を治療する方法であって、患者に、請求項1～12のいずれか1項に記載の特異的結合成員または請求項13に記載の組成物を投与することを含む方法。

【請求項22】 当該病気が、糸球体腎炎、ケロイドおよび過形成性瘢痕形成、増殖性硝子体網膜症、緑内障ドレナージ手術、角膜損傷および白内障；血管新生または転移を伴う腫瘍を包含する腫瘍、および/または乳房、前立腺、卵巣、胃、結腸直腸、皮膚、肺、子宮頸部および膀胱腫瘍、または白血病もしくは肉腫の群から選ばれる腫瘍；または喘息を包含する、患者における細胞外マトリックスの沈着を伴う、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 試料を請求項1～12のいずれか1項に記載の特異的結合成員と接触させ、当該試料中のTGF $\beta_1$ への該特異的結合成員の結合量を決定することを含む、試料中のTGF $\beta_1$ の量を決定する方法。

【請求項24】 請求項1～12のいずれか1項に記載の特異的結合成員をコードしている配列を含む、単離された核酸。

【請求項25】 請求項24に記載の核酸を、宿主細胞中で、当該核酸の発現をさせる条件の下で発現させ、その後当該特異的結合成員を回収することを含む、TGF $\beta_1$ に結合することのできる特異的結合成員を製造する方法。

【請求項26】 TGF $\beta_1$ に特異的な抗体抗原結合ドメインを得る方法であって、

VHドメインのアミノ酸配列変異体である、配列番号4及び配列番号10 V

Hドメインから選択されるVHドメインのアミノ酸配列の1以上のアミノ酸を付加、除去、置換または挿入し、このようにして提供されたVHドメインと1以上のVLドメインとを合することにより、1以上のVH/VLの組み合わせ物を提供し、及び/または

VLドメインのアミノ酸配列変異体である、配列番号6及び配列番号8 VLドメインから選択されるVLドメインのアミノ酸配列の1以上のアミノ酸の付加、除去、置換または挿入し、このようにして提供されたVLドメインと1以上のVHドメインとを合することにより1以上のVH/VLの組み合わせ物を提供し、

そして、このVH/VLの組み合わせ物を試験してTGF $\beta_1$ に特異的な抗体抗原結合ドメインを同定することを含む前記方法。

【請求項27】 TGF $\beta_1$ に特異的な特異的結合成員を製造する方法であって、

置換されるべきCDR3を含むか、またはCDR3コード化領域を欠失する、VHドメインをコードしている核酸の出発レパートリーを提供し、

当該レパートリーを、ドナー核酸が当該レパートリーのCDR3領域中に挿入されるよう、SL15またはJT182 VH CDR3として本明細書に実質的に開示されているアミノ酸配列をコードしているドナー核酸と合して、VHドメインをコードしている核酸のレパートリー生成物を提供し、及び/または

置換されるべきCDR3を含むか、またはCDR3コード化領域を欠失する、VLドメインをコードしている核酸の出発レパートリーを提供し、

当該レパートリーを、ドナー核酸が当該レパートリーのCDR3領域中に挿入されるよう、SL15またはJT182 VL CDR3として本明細書に実質的に開示されているアミノ酸配列をコードしているドナー核酸と合して、VLドメインをコードしている核酸のレパートリー生成物を提供し、

そして

当該レパートリー生成物の核酸を発現させ、そして、

TGF $\beta_1$ に対し特異的な特異的結合成員を選択し、そして、

当該特異的結合成員またはそれをコードしている核酸を回収する、

ことを含む前記方法。

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		In national Application No PCT/GB 00/01679
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07K16/22 A61K39/395 G01N33/577 A61P35/00 A61P13/12 A61P27/02 A61P37/00 A61P11/06		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 13844 A (CAMBRIDGE ANTIBODY TECH ; TEMPEST PHILIP RONALD (GB); THOMSON JULIA) 17 April 1997 (1997-04-17) cited in the application page 29, line 14 - line 16; tables 3,5 Fig. 1a(i), 1a(ii), 14 claims 16,22,35-45	1-25
A	LUCAS C ET AL: "The autocrine production of transforming growth factor-beta 1 during lymphocyte activation. A study with a monoclonal antibody-based ELISA." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1990 SEP 1) 145 (5) 1415-22. , XP000917385 the whole document	1-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  7 August 2000		Date of mailing of the international search report  29/08/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 6818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo rd, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  von Ballmoos, P

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Patent Application No  
PCT/GB 00/01679

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9713844 A	17-04-1997	AT 190650 T	15-04-2000
		AU 702049 B	11-02-1999
		AU 7140596 A	30-04-1997
		CA 2233042 A	17-04-1997
		DE 69607191 D	20-04-2000
		EP 0853661 A	22-07-1998
		EP 0945464 A	29-09-1999
		ES 2146020 T	16-07-2000
		GB 2305921 A, B	23-04-1997
		JP 2000500643 T	25-01-2000

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト <sup>7</sup> (参考)
A 6 1 P 27/02		A 6 1 P 27/02	
27/06		27/06	
27/12		27/12	
29/00		29/00	
35/00		35/00	
35/02		35/02	
35/04		35/04	
37/02		37/02	
C 1 2 N 15/02	Z N A	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 15/00	Z N A C
(81)指定国	E P ( A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E ) , O A ( B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G ) , A P ( G H , G M , K E , L S , M W , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W ) , E A ( A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M ) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W		
(72)発明者	レナード, サイモン ニコラス イギリス国, サフォーク シービー9 7 エイチエヌ, ハイバーヒル, ハンチェット ブレッジ, ホレシャム クローズ 58		
(72)発明者	ウィルトン, アリソン ジェーン イギリス国, ケンブリッジ シービー3 0エイチエヌ, ハンティンドン ロード 46, フィッツウィリアム コテイジ		
(72)発明者	ブラッドドック, ペタ サリー ヘレナ イギリス国, ケンブリッジシャー ピーイ ー19 1ユーイー, ハンティンドン, セン ト ネオツ, ウッドランツ 6		
(72)発明者	ドゥ フウ, サラー レイラ イギリス国, ハートフォードシャー エス ジー5 1ティーエル, ヒッチン, アイク ルフォード ロード 76		

(72)発明者 マクカファーティ, ジョン ジェラルド  
イギリス国, ケンブリッジシャー シービー  
ー2 4エーピー, ブラブラハム, ソース  
トン ロード, チャーチ ファーム コテ  
ージ

(72)発明者 コンロイ, ルイーズ アン  
イギリス国, ケンブリッジシャー シービー  
ー1 3エイチエル, ケンブリッジ, プラ  
ムプトン ロード 35

(72)発明者 テンペスト, フィリップ ロナルド  
イギリス国, ケンブリッジシャー シービー  
ー1 5エルユー, ウエスト ウラッティ  
ング, ハイ ストリート 43

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 BA55 CA04  
DA02 EA04 GA14 HA15  
4B064 AG26 CA10 CA19 CC24 DA05  
DA14  
4C085 AA14 BB36 CC23 EE05  
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75  
EA22 EA28 EA50 EA51 FA74

专利名称(译)	针对TGFβ1的特异性抗体和抗体片段		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003501348A</a>	公开(公告)日	2003-01-14
申请号	JP2000615659	申请日	2000-05-02
[标]申请(专利权)人(译)	剑桥事前体科技有限公司德开球		
申请(专利权)人(译)	剑桥赌注车身技术Rimitido		
[标]发明人	トンプソングジュリアエリザベス レナードサイモンニコラス ウィルトンアリソングジェーン ブラッドドックベタサリーヘレナ ドゥフウサラレーイラ マクカファーティジョンジェラルド コンロイルーズアン テンベストフィリップロナルド		
发明人	トンプソン,ジュリア エリザベス レナード,サイモン ニコラス ウィルトン,アリソン ジェーン ブラッドドック,ベタ サリー ヘレナ ドゥ フウ,サラレーイラ マクカファーティ,ジョン ジェラルド コンロイ,ルーズ アン テンベスト,フィリップ ロナルド		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/02 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/12 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P37/00 A61P37/02 C07K16/22 C12N15/02 C12N15/13 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/02 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/12 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P37/00 A61P37/02 C07K16/22 C07K2317/21 C07K2317/565 C07K2317/622		
FI分类号	C07K16/22 A61K39/395.N A61P11/06 A61P13/12 A61P17/02 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/12 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P37/02 C12P21/08 G01N33/53.D C12N15/00.ZNA.C		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA55 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA14 4B024/HA15 4B064/AG26 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4C085/AA14 4C085/BB36 4C085/CC23 4C085/EE05 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA74		
优先权	60/131983 1999-04-30 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明基于SLV ( SEQ ID NO : 4 ) 和JT182 ( SEQ ID NO : 10 ) 抗体VH区的CDR3序列, 例如以抗体可变域的形式, 提供特异性结合成员。该抗体具有针对TGFβ1的有效中和活性, 可用于治疗与TGFβ1活性过高相关的疾病, 例如纤维化, 免疫反应和肿瘤进展。

クローン	およその IC <sub>50</sub> (RRA)	VH CDR3	VL CDR3
CS37	10-15nM	TGEYSGYDTSGVEL (配列番号14)	LQDSNYPLT (配列番号18)
JT182	0.5-1nM	TGEYSGYDTPASPD (配列番号15)	CS37
SL15	0.1nM	TGEYSGYDTPQYS (配列番号13)	CS37 (+L25 AからSへ)