

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-538564

(P2008-538564A)

(43) 公表日 平成20年10月30日(2008.10.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7K 16/22 (2006.01)</b>	CO7K 16/22 ZNA	4B064
<b>CO7K 16/24 (2006.01)</b>	CO7K 16/24	4C085
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 D	4H045
<b>C12P 21/08 (2006.01)</b>	C12P 21/08	
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A61K 39/395 N	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-507883 (P2008-507883)  
 (86) (22) 出願日 平成18年4月20日 (2006.4.20)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年10月22日 (2007.10.22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/014943  
 (87) 国際公開番号 WO2006/116002  
 (87) 国際公開日 平成18年11月2日 (2006.11.2)  
 (31) 優先権主張番号 60/674,082  
 (32) 優先日 平成17年4月22日 (2005.4.22)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 594197872  
 イーライ リリー アンド カンパニー  
 アメリカ合衆国 インディアナ州 462  
 85 インディアナポリス リリー コー  
 ポレイト センター (番地なし)  
 (74) 代理人 100068526  
 弁理士 田村 恭生  
 (74) 代理人 100100158  
 弁理士 鮫島 睦  
 (74) 代理人 100076521  
 弁理士 坪井 有四郎  
 (74) 代理人 100126778  
 弁理士 品川 永敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TGFベータ1に特異的な抗体

## (57) 【要約】

成熟TGF- $\beta$ 2および成熟TGF- $\beta$ 3以上に成熟TGF- $\beta$ 1に対して特異的な抗体を提供する。抗体は、重鎖のCDR3であるGYRX1X2X3Y(X1はWまたはA、X2はFまたはL、X3はA、EまたはY)によって特徴付けられる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

成熟 T G F ベータ 2 及び成熟 T G F ベータ 3 以上に成熟 T G F ベータ 1 に特異的に結合する単離された結合性組成物であって、G Y R X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> Y (配列番号 4) を含む結合部位を有する第 1 の部分を含み、X<sub>1</sub> が、W 又は A であり、X<sub>2</sub> が、F 又は L であり、X<sub>3</sub> が、A、E、又は Y である結合性組成物。

## 【請求項 2】

前記第 1 の部分が、

i . G Y X<sub>1</sub> F X<sub>2</sub> D Y N X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> (配列番号 2) であり、X<sub>1</sub> が、T 又は D であり、X<sub>2</sub> が、T、E 又は F であり、X<sub>3</sub> が、M、I、L 又は V であり、X<sub>4</sub> が、H、V 又は A である配列、又は、

i i . X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> Y P Y D G X<sub>3</sub> T G X<sub>4</sub> N X<sub>5</sub> K X<sub>6</sub> K S (配列番号 3) であり、X<sub>1</sub> が、Y、Q 又は S であり、X<sub>2</sub> が、I 又は V であり、X<sub>3</sub> が、D 又は E であり、X<sub>4</sub> が、Y、T、H 又は L であり、X<sub>5</sub> が、Q、K、P 又は S であり、X<sub>6</sub> が、F 又は Y である配列

のうち少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

X<sub>1</sub> Q W D X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> P A (配列番号 7) の結合部位を含む第 2 の部分をさらに含み、X<sub>1</sub> が、Q 又は S であり、X<sub>2</sub> が、L、D 又は P であり、X<sub>3</sub> が、N 又は R であり、X<sub>4</sub> が、P、F、Y 又は R である、請求項 2 に記載の組成物。

## 【請求項 4】

前記第 2 の部分が、

i . X<sub>1</sub> A X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> V X<sub>5</sub> Y M H (配列番号 5) であり、X<sub>1</sub> は、R、Y、E 又は Q であり、X<sub>2</sub> が、S 又は T であり、X<sub>3</sub> が、S、V 又は A であり、X<sub>4</sub> が、S 又は L であり、X<sub>5</sub> が、S、P、L 又は Y である配列、又は、

i i . A T S N X<sub>1</sub> A X<sub>2</sub> (配列番号 6) であり、X<sub>1</sub> が、L、N 又は P であり、X<sub>2</sub> が、S、K、Y、L、M、F、E、Q、R 又は H である配列

のうち少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 3 に記載の組成物。

## 【請求項 5】

a) 前記第 1 の部分が、

i) 成熟ヒト T G F ベータ 1 に対して免疫反応性である、

i i) 成熟霊長類 T G F ベータ 1 に対して免疫反応性である、

i i i) 精製された或いは組換え産生されたヒト T G F ベータ 1 タンパク質又はその断片に対して作られる、

i v) モノクローナル抗体、抗体の F a b、F v、s c F v、F ( a b ) 2 又は可変ドメインの一部である、

v) 少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、又は 4 つの保存的置換を有する、

v i) ヒト、又はヒト化抗体フレームワーク内に埋め込まれる、又は

v i i) 抗体の重鎖、F a b、F v、s c F v 又は F ( a b ) 2 の可変領域の一部を含む、請求項 1 に記載の組換え結合性組成物。

## 【請求項 6】

a) 以下を有する重鎖可変領域 ( H C V R ) :

I . G Y X<sub>1</sub> F X<sub>2</sub> D Y N X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> [ 配列番号 2 ] ( X<sub>1</sub> が、T か D であり、X<sub>2</sub> が、T、E 又は F であり、X<sub>3</sub> が、M、I、L 又は V であり、X<sub>4</sub> が、H、V、又は A である ) を含む配列から選択される C D R 1 ;

I I . X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> Y P Y D G X<sub>3</sub> T G X<sub>4</sub> N X<sub>5</sub> K X<sub>6</sub> K S [ 配列番号 3 ] ( X<sub>1</sub> が、Y、Q 又は S であり、X<sub>2</sub> が、I 又は V であり、X<sub>3</sub> が、D 又は E であり、X<sub>4</sub> が、Y、T、H 又は L であり、X<sub>5</sub> が、Q、K、P 又は S であり、X<sub>6</sub> は F か Y である ) を含む配列から選択される C D R 2 ; および

I I I . G Y R X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> Y [ 配列番号 4 ] ( X<sub>1</sub> が、W か A であり、X<sub>2</sub> が、F か

10

20

30

40

50

Lであり、 $X_3$ が、A又はEである)を含む配列から選択されるCDR3;並びに

b)以下を有する軽鎖可変領域(LCVR):

I.  $X_1AX_2X_3X_4VX_5YMH$  [配列番号5] ( $X_1$ が、R、Y、E又はQであり、 $X_2$ が、SかTであり、 $X_3$ が、S、V又はAであり、 $X_4$ が、S又はLであり、 $X_5$ が、S、P、L又はYである)を含む配列から選択されるCDR1;

II.  $ATSNX_1AX_2$  [配列番号6] ( $X_1$ が、L、N又はPであり、 $X_2$ が、S、K、Y、L、M、F、E、Q、R又はHである)を含む配列から選択されるCDR2;  
および

III.  $X_1QWDX_2X_3X_4PA$  [配列番号7] ( $X_1$ が、Q又はSであり、 $X_2$ が、L、D又はPであり、 $X_3$ が、NかRであり、 $X_4$ が、P、F、Y又はRである)を含む配列から選択されるCDR3

を含んでなるモノクローナル抗体である請求項5の結合性組成物。

【請求項7】

a)前記HCVRが、

I. 配列番号8を含むFR1フレームワーク、

II. 配列番号9を含むFR2フレームワーク、

III. 配列番号10を含むFR3フレームワーク、

IV. 配列番号11を含むFR4フレームワーク

を有し、

b)前記LCVRが、

I. 配列番号12を含むFR1フレームワーク、

II. 配列番号13~36から選択される配列を含むFR2フレームワーク、

III. 配列番号37を含むFR3フレームワーク、及び、

IV. 配列番号38を含むFR4フレームワーク

を有する請求項6のモノクローナル抗体。

【請求項8】

a)ヒト定常領域又はヒト化定常領域をさらに含み、

b)I. 配列番号40を含む重鎖配列、およびII. 配列番号41を含む軽鎖配列以下を含んでなるIgG4定常領域をさらに含み、

c)Fab断片であり、

d)Fv断片であり、

e)scFv断片であり、

f)F(ab)2断片であり、

g)ヒト定常領域に融合され、

h)検出可能に標識され、

i)凍結乾燥され、

j)単離核酸分子内でコードされ、

k)発現ベクターにおいて作動可能に連結された単離された核酸分子においてコードされ、

l)宿主細胞に組み込まれた発現ベクターにおいて作動可能に連結された単離された核酸分子においてコードされ、

m)キメラ抗体であり、

n)他の化学部分に接合され、

o)滅菌され、または

p)医薬組成物である、

請求項7に記載のモノクローナル抗体。

【請求項9】

a)配列番号42~86から選択される配列を有するLCVRと、b)配列番号87~125から選択される配列を有するHCVRとを含む請求項8のモノクローナル抗体。

【請求項10】

10

20

30

40

50

- a) ヒト化され、
- b) 1つ又は複数のヒト定常領域に融合され、
- c) F a b 断片であり、
- d) F v 断片であり、
- e) s c F v 断片であり、
- f) F ( a b ) 2 断片であり、
- g) I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、I g E、I g M 及び I g D から選択される定常領域を含み、
- h) 検出可能に標識され、
- i) 凍結乾燥され、
- j) キメラ抗体であり、
- k) 以下の状態

- 1. 腎臓病、
  - 2. 慢性腎疾患、
  - 3. 末期腎不全、
  - 4. 線維症、線維障害若しくは線維形成状態、又は、
  - 5. 腎線維症
- の治療のために霊長類に投与するための薬物の製造において使用され、

- l) 1つ又は複数の他の化学部分に接合され、
- m) 滅菌され、或いは、
- n) 医薬組成物を含む、

請求項 9 のモノクローナル抗体。

【請求項 1 1】

以下のもの

- 1. 配列番号 4 2 を含む L C V R 及び配列番号 8 7、8 8、8 9、9 0、9 1、9 2 を含む H C V R、
- 2. 配列番号 4 3 を含む L C V R 及び配列番号 9 0、9 5 を含む H C V R、
- 3. 配列番号 4 4 を含む L C V R 及び配列番号 9 3 又は 9 4 を含む H C V R
- 4. 配列番号 4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 2、5 3、5 4、又は 5 5 を含む L C V R 及び配列番号 9 6 を含む H C V R、
- 5. 配列番号 5 1 を含む L C V R 及び配列番号 9 7、9 8、9 9、1 0 0、1 0 1、1 0 2、1 0 3、1 0 4 を含む H C V R

を含む請求項 1 0 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 1 2】

以下の L C V R 及び H C V R :

- 1. 配列番号 5 6 を含む L C V R 及び配列番号 1 0 5、1 0 6、1 0 7、1 0 9、1 1 0 を含む H C V R、
  - 2. 配列番号 5 7 を含む L C V R 及び配列番号 1 0 7 を含む H C V R、
  - 3. 配列番号 5 8 を含む L C V R 及び配列番号 1 0 6 を含む H C V R、
  - 4. 配列番号 6 0 を含む L C V R 及び配列番号 1 0 8 を含む H C V R、
  - 5. 配列番号 6 1 を含む L C V R 及び配列番号 1 1 0、1 1 1 を含む H C V R、
  - 6. 配列番号 6 2、6 3、6 4、6 6、6 7、6 8、6 9 を含む L C V R 及び配列番号 1 1 2 を含む H C V R、
  - 7. 配列番号 6 9 を含む L C V R 及び配列番号 1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 1 5 を含む H C V R、又は、
  - 8. 配列番号 7 0、7 1、7 2 を含む L C V R、及び配列番号 1 1 6 からなる H C V R
- を含む請求項 8 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 1 3】

以下の L C V R 及び H C V R :

- 1. 配列番号 7 2、7 3 を含む L C V R 及び配列番号 1 1 7 を含む H C V R、

2. 配列番号74を含むLCVR及び配列番号118、119を含むHCVR、
  3. 配列番号73を含むLCVR及び配列番号119を含むHCVR、
  4. 配列番号75を含むLCVR及び配列番号96、117を含むHCVR、
  5. 配列番号76を含むLCVR及び配列番号117を含むHCVR、
  6. 配列番号77、78、79を含むLCVR、及び配列番号96を含むHCVR、
  7. 配列番号80を含むLCVR及び配列番号120、121、122を含むHCVR
- 、
8. 配列番号81を含むLCVR及び配列番号117、120、121、122、123を含むHCVR、
  9. 配列番号82、84を含むLCVR及び配列番号117を含むHCVR、
  10. 配列番号83を含むLCVR及び配列番号117、124を含むHCVR、
  11. 配列番号84を含むLCVR及び配列番号117を含むHCVR、
  12. 配列番号85を含むLCVR及び配列番号91を含むHCVR、
  13. 配列番号86を含むLCVR及び配列番号117、125を含むHCVR、又は
  14. 配列番号82を含むLCVR及び配列番号89を含むHCVR
- を含む請求項8に記載のモノクローナル抗体。

10

【請求項14】

請求項6に記載の結合性組成物を使用する方法であって、該結合性組成物を、抗原を含む生体試料に接触させ、これによりTGFベータ1結合性組成物-抗原複合体を生成することを含む方法。

20

【請求項15】

前記生体試料がヒト由来のものであり、前記結合性組成物がモノクローナル抗体である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

請求項6に記載の前記結合性組成物、および

- a) 前記結合性組成物の前記検出のための使用の教材、又は
- b) 前記結合性組成物の分離に使用できる区画

を含む、検出キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、TGFベータ1タンパク質に関連する組成物に関連する。本発明は、特に、精製された結合性の組成物と、細胞増殖性疾患、自己免疫疾患並びに炎症性疾患、心血管疾患、線維性疾患の診断、治療並びに予防、核酸の発現及びかかるタンパク質のアミノ酸配列に対する外因性化合物の効果の評価において役立つ試薬を提供する。

【背景技術】

【0002】

分泌ポリペプチド因子(TGF-ベータ1)のトランスフォーミング成長因子(TGF-ベータ)スーパーファミリーの最初のメンバーは、約20年前に発見された。以後、このファミリーは大きく拡大し、現在30種類以上の脊椎動物のメンバー、及び虫やハエなどの無脊椎動物における、10種類以上の構造的、機能的に関連するタンパク質が含まれる(たとえば、Attisano & Lee-Hoeflich (2001 Gen. Biol. 2, review 30101)、Moustakasら(2001 J. Cell Sci. 114:4359; Wrana, 2000 Cell 100:189)参照)。TGFベータファミリーのメンバーは、細胞のさまざまな機能を制御し、その活性は、発達及びホメオスタシスに関連するさまざまな働きを調節するうえで極めて重要である。保存されたTGF-ベータシグナリング経路が、脊椎動物、虫及びハエの中に存在することが、実験により明らかになった。

40

【0003】

このファミリーのメンバーであるTGFベータ1は、種々の細胞過程(たとえば細胞増

50

殖及び分化、移染、分化、アポトーシス、胚発生、細胞間マトリックス形成、骨成長、創傷治癒、造血、免疫及び炎症反応に関係している（たとえば、Robertson及びSporn（1990 Peptide Growth Factors and Their Receptors, pp. 419-72, Springer-Verlag, Heidelberg）、Germany、Massague, J.（1998 Annu. Rev. Biochem 67:753）参照）。

【0004】

さらに、症状発現前後のデータにより、TGF-ベータ1が間質性線維症の基質タンパク質堆積の主な一因であり、多くの付随する線維性疾患（全慢性腎疾患に共通して見られる腎性線維症を含む）の惹起及び進行に関連していることが明らかになっている。腎性線維症の拡大は、慢性腎不全（末期腎不全）の進行に明確な相関関係があり、死、あるいは継続的透析や腎移植術が必要となる場合がある。

10

【0005】

TGFベータは、腎臓の大多数の細胞に影響する複雑かつ多様なイベントを通じて、慢性腎不全と関連付けられる（Bottlinger、2002、J. Am. Soc. Nephrol. 13:2600）。これらのイベントは、ネフロンの機能損失をもたらす尿管間質性線維症及び糸球体硬化症をもたらし、これらが慢性腎不全につながる。3つのTGF-ベータアイソフォームのうち、TGF-ベータ1は慢性腎不全の進行を特異的に媒介する要素であると考えられる。これは、TGF-ベータ1が最も特異的に発現するアイソフォームであるというだけでなく、TGF-ベータ1の発現の増加が、TGF-ベータ2とTGF-ベータ3両方の効果を媒介していると考えられるためである（Yu、2003、Kid. Int. 64、844）。従って、慢性腎疾患のような疾患の有害作用を予防するためには、TGFベータ1の発現を調整する必要がある。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、新規なTGFベータ1結合性組成物の発見は、線維性疾患（たとえば慢性腎疾患）の診断、予防、治療に役立つ組成物を提供することで、当該技術における必要性を満たす。

【課題を解決するための手段】

30

【0007】

本発明の一部は、成熟TGF-ベータ2及び/又は成熟TGFベータ3ではなく成熟TGFベータ1に特異的及び/又は選択的に結合し、成熟TGFベータ1を中和する特性を有する結合性組成物の発見に基づく。

【0008】

これらの結合性組成物は、a) G Y R X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> Y [配列番号4]であって、X<sub>1</sub>が、WかAであり、X<sub>2</sub>は、FかLである。及び、X<sub>3</sub>もA、E又はYである配列と、b) G Y X<sub>1</sub> F X<sub>2</sub> D Y N X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> [配列番号2]であって、X<sub>1</sub>が、TかDであり、X<sub>2</sub>は、T、E、Fのいずれかであり、X<sub>3</sub>は、M、I、L、Vのいずれかであり、X<sub>4</sub>は、H、V、Aのいずれかである配列と、c) X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> Y P Y D G X<sub>3</sub> T G X<sub>4</sub> N X<sub>5</sub> K X<sub>6</sub> K S [配列番号3]であって、X<sub>1</sub>が、Y、Q、Sのいずれかであり、X<sub>2</sub>が、I又はVであり、X<sub>3</sub>が、D又はEであり、X<sub>4</sub>が、Y、T、H、Lのいずれかであり、X<sub>5</sub>が、Q、K、P、Sのいずれかであり、X<sub>6</sub>が、F又はYである配列のうち少なくとも1つを含む第1の部分、及び/又は、b) X<sub>1</sub> Q W D X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> P A [配列番号7]であって、X<sub>1</sub>が、Q又はSであり、X<sub>2</sub>が、L、D、Pのいずれかであり、X<sub>3</sub>が、N又はRであり、X<sub>4</sub>が、P、F、Y、Rのいずれかである配列と、X<sub>1</sub> A X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> V X<sub>5</sub> Y M H [配列番号5]であって、X<sub>1</sub>が、R、Y、E、Qのいずれかであり、X<sub>2</sub>が、S又はTであり、X<sub>3</sub>が、S、V、Aのいずれかであり、X<sub>4</sub>が、S又はLであり、X<sub>5</sub>が、S、P、L、Yのいずれかである配列と、A T S N X<sub>1</sub> A X<sub>2</sub> [配列番号6]であって、X<sub>1</sub>が、L、N、Pのいずれかであり、X<sub>2</sub>が、S、K、Y、L、M、F、E、Q、R、Hの

40

50

いずれかである配列のうち少なくとも1つを含む第2の部分を含む。前記結合性組成物は、a) 少なくとも2つの上記配列を含む上記第1の部分と、b) 3つの上記配列を含む上記第1の部分と、c) 少なくとも2つの上記配列を含む上記第2の部分と、d) 3つの上記配列を含む上記第2の部分と、e) 少なくとも2つの上記配列を含む上記第1の部分と、3つの上記配列を含む前記第2の部分と、f) 少なくとも2つの上記配列を含む上記第2の部分並びに3つの上記配列を含む上記第1の部分、g) 3つの上記配列を含む上記第1の部分並びに3つの上記配列を含む上記第2の部分とを含むことができ、前記結合性組成物の結合部位が、ヒトのTGFベータ-1のポリペプチドに対して特に免疫反応性であるか、ネズミのTGFベータ-1のポリペプチドに対して特に免疫反応性であるか、精製又は組換え産生されたヒトのTGFベータ-1タンパク質又はその断片に対して作られたものであるか、モノクローナル抗体、抗体のFab、Fv、scFv、F(ab)<sub>2</sub>、又は可変ドメイン内にあるか、少なくとも1、2、又は3個の保存的置換を有するか、或いは、ヒト又はヒト化抗体のフレームワーク内にあり、前記上記結合性組成物が、抗体分子、モノクローナル抗体分子、二重抗体分子、三重抗体分子、四重抗体分子、ミニ抗体分子、モノクローナル抗血清、検出可能標識を持つか、凍結乾燥されているか、無菌であるか、或いは、バッファ組成物中にあり、前記結合性組成物が、改良された特性を有するモノクローナル抗体である、結合性組成物である。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

#### I. 全般

本発明は、本願明細書で特定される組成物、方法、技術に限定されるものではなく、この組成物、方法、技術は、当然ながら変更可能であることを理解されたい。本願明細書において用いられる用語は、特定の態様を説明する目的にのみ使用され、本発明の範囲を限定することを目的とするものではないことも理解されたい。本発明の範囲は、本願の請求の範囲によってのみ限定される。

【0010】

請求の範囲を含む本願明細書において使用される単数形の単語は、特に明示がない限り、その複数形も包含するものである。つまり、たとえば「生体」という表現は、1又は複数の異なる生体を包含し、「細胞」という表現は1又は複数の同様の細胞を包含し、「方法」という表現は、当業者に周知である同様のステップ及び方法を包含するものである。

【0011】

特に明記しない限り、本願明細書において用いられるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者によって理解されるものと同じ意味を有する。本願明細書において記載されている方法及び物質は、同様又は同等のものによって置換することが可能であるが、以下に、適切な方法及び物質を説明する。本願明細書において言及するすべての出版物、特許出願、特許、その他の引用は、本願出願の出願日前に開示された技術を参照する目的にのみ使用されるものである。本願明細書のいかなる記述において、従来技術による開示に先立つものとして権利化できないことを承諾するとして解釈されるべきではない。本願明細書に記載のすべての出版物、特許出願、特許、その他の引用は、文脈によって明らかのように、教示目的のため、参照によりその全体が本願に援用されるものとする。これには、図、図面、画像、グラフ、ハイパーリンク、その他ブラウザ実施可能コードが含まれる。

【0012】

#### II. 定義

「結合性組成物」とは、少なくとも1つの他の分子の実体又は結合パートナーに対する選択性及び/又は特異性の結合能を有する分子の実体である。通常、結合は、共有又は非共有の天然の、かつ生理的に妥当な相互作用において存在し、多タンパク質複合体のメンバー（限定されるものではないが、担体化合物、二量体化パートナー又は多量体化パートナーを含む）を含有することができる。結合性組成物は、天然に生成する（たとえば、分離、及び/又は精製）ことも、一部又は全体を合成的に産生することもできる。通常、結

合性の組成物は、結合パートナー上の領域又は部位の特定の空間構成及び/又は極性組織に対して、特異的に及び/又は選択的に「適合する」、「結合する」、若しくは「相補性である」要素を少なくとも1つ有する。非限定的な例としては、表面範囲、形状(たとえばキャビティ、中裂、間隙又は突起)、分子配置、空間構成などである。つまり、たとえば結合性組成物が潜在的な結合パートナーに十分近づいた際に、結合性組成物及びパートナーは、互いに特異的に及び/又は選択的に結合する。結合パートナーと対をなす結合性組成物の非限定的な例としては、抗原抗体及びハプテン結合部位などがある。結合性の組成物が含有する抗体の非限定的な例としては、抗体、二重抗体、三重抗体、四重抗体、ミニ抗体、Fab断片(たとえば、二量体又は三量体のFab)、Fv断片、scFv断片、F(ab)<sub>2</sub>断片などがあげられる(本発明により包含される抗体結合組成物の非限定的な例については、Hudson & Souriau 2003 Nature Medicine 9:129-34を参照)。モノクローナル抗体結合組成物は、実質的に均一な抗体(すなわち、集合を含む個々の抗体が実質的に同一である(たとえば、単一の細胞型のクローンに由来するなど))の集合に由来するという点で、単クローン性である。しかし、これは、その由来を特定の起源に限定するものではない。このような抗体は、通常は抗体(たとえばCHO、NSO又はCOS細胞)を産生しない細胞において、容易に産生できる。さらに、このような抗体は、その他の種類の細胞(特に哺乳類や植物の細胞)を遺伝子操作し、抗体産生物を形成するポリペプチド軽鎖及び重鎖を発現させて構築させることにより、これらの細胞でも産生することができる。さらに、このような鎖は、化学合成可能であるが、これらの鎖は特定の抗原決定基群に対して特異性を持つことから、本願明細書で用いられる意味でのモノクローナル抗体を構成する。したがって、本願明細書において用いられるモノクローナル抗体という用語は、前記抗体の産生のために使用される単なるメカニズムではなく、むしろ抗体分子の特異性及び純度を指すために用いられる。

10

20

30

40

50

### 【0013】

結合部位とは、他の分子の実体との間に特異的及び/又は選択的な結合を構成する分子の実体における、特定の領域、範囲、又は構成である。結合部位の非限定的な例としては、抗体の相補性決定領域(CDR)を含む、隣接のアミノ酸配列があげられる。実施形態において、本発明の結合部位には、Table 1に示される式を有する配列が含まれる。別の非限定的な態様において、結合部位には、Table 1の配列の組み合わせが含まれる。別の非限定的な例としては、三次元構成によって、或いは、Fab断片の8重らせん状のバレルの末端にある重鎖軽鎖可変領域の6つのCDR環を含むアミノ酸配列の空間構成により形成される結合部位があげられる(Chothia及びLesk 1987 J. Mol. Biol. 196:901-17参照)。本発明で開示されるCDRは、たとえばCDR移植において行われるように、フレームワーク又は分子構造に組み込み/埋め込まれる。一態様において、本発明のCDRを担持する構造は通常、抗体の重鎖又は軽鎖配列、又はその実質部分の構造である。上記CDRは、再配列された免疫グロブリン遺伝子によってコードされた天然由来のVH抗体及びVL抗体の可変ドメインCDRに対応する位置に配置される。イムノグロブリンの可変ドメインの構造及び位置は、以下を参照して判定することができる(Kabatら、1987 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed. US Department of Health and Human Services、及び、現在インターネット(<http://immuno.b-mc.nwu.edu>)上でその最新版が利用可能である)。CDRは、通常、Kabatにより定義されたとおりであるが、Chothia(J. Mol. Biol. 196:901-17)及び/又はMacCallum(J. Mol. Biol. 262:732-45)による定義も知られている。当業者は、通常の方法によって、CDRが埋め込まれる可変部アミノ酸配列からそのCDRが含まれる残基を決定することができる。さらに、ChothiaならびにKabatにより定義されたループのCDRを移植した残基では、VH CDR1を移植することができる。

## 【0014】

一態様において、組換えDNA技術を用いて、本発明のCDR配列を、CDR部位を欠く可変ドメインのレパートリに導入することができる。たとえば、Marksら(1992 BioTechnology 10:779-83)は、抗体の可変ドメインのレパートリの生成方法を述べている。ここでは、CDR3を欠くVH可変ドメインのレパートリを生成するために、可変ドメイン域の5'末端、又はそれに隣接して導かれるコンセンサスプライマが、ヒトのVH遺伝子の第3のフレームワーク領域に対するコンセンサスプライマとあわせて使われる。Marksらはさらに、このレパートリを特定の抗体(たとえば、本願明細書において記載される抗体)のCDR3に結合する方法についても記述している。類似の技術を使用して、本発明のCDR3配列を、CDR3を欠くVH領域又はVL領域のレパートリと混合し、混合された完全なVH領域又はVL領域を同種のVL領域又はVH領域と結合させることで、本発明の、特定の結合性組成物のメンバーを形成することができる。あるいは、類似の方法により、CDR3配列を本発明の他のCDRと結合することもできる。次いで、適切な特定の結合性メンバーを選択できるように、上記レパートリをW092/01047のファージ提示システムのような適切な宿主系で表示することができる。

10

## 【0015】

結合性組成物：TGFベータ1複合体

本願明細書で用いられる「結合性組成物：TGFベータ1複合体」は、TGFベータ1タンパク質に結合性組成物を特異的及び/又は選択的に結合することにより形成される結合性組成物とTGFベータ1タンパク質の複合体を指すものである。好ましい一態様において、本願明細書を通じて言及するTGFベータ1は、成熟霊長類TGFベータ1タンパク質である。より好ましい一態様では、本願明細書全体を通じて言及するTGFベータ1は、成熟ヒトのTGFベータ1タンパク質(NCBIアクセス番号P01137(ヒトのトランスフォーミング成長因子ベータ1前駆体(TGFベータ1)及びその成熟部分のアミノ酸配列についての記述がある)参照)である。各例において、本願全体を通じて言及するTGFベータ1は、生物学的に能動的な状態の成熟TGFベータ1である[(TGFベータ1は、非活性の「潜在型」複合体として細胞から放出される。これは、2つのプロセグメントを有する非共有の複体内にあるTGFベータ1ホモ二量体を含み、このホモ二量体には、TGF潜在型ベータ1結合タンパク質のうちの1つがしばしば連結される(たとえば、Annesら、2003 J. Cell Science 116:217-24、Miyazonoら、1993 Growth Factors 8:11-22、Mungerら、1997 Kidney Int. 51:1376-82、Oklu & Hesketh 2000 Biochem. J. 352:601-10参照)。この潜在型TGFベータ1複合体は、偶発的活性化に対する重要な予防手段であり、また、潜在型のTGFベータ1の対象を、この複合体が単離細胞間マトリックスへと固定化して標的にすることが可能である(Taipaleら、1998 Adv. Cancer Res. 75:87-134)。上記細胞間マトリックスは、このように、TGF-ベータ1が新規な細胞合成を必要とすることなく、直ちに活性化できるようにするためのリゼルバとして機能する。潜在型複合体としてのTGFベータ1の分泌には、調節された活性化プロセスの存在が必要である。この活性化プロセスは、おそらく、優先的にTGFベータ1プロセグメントを分解し、安定性が高く、成熟活性型TGF-ベータ1二量体の二量体形を放出するプロテアーゼの活性により媒介される)]。

20

30

40

## 【0016】

結合性組成物の特異的結合とは、結合性組成物が、概して未変性の活性コンフォーメーションにおいてTGFベータ1の領域を認識する結合部位を有することを意味する。たとえば、TGFベータ1に対して作られ、TGFベータ1のエピトープを認識する抗体は、特異的結合により、結合性組成物TGFベータ1複合体を生成することができる。一般に、結合性組成物TGFベータ1タンパク質複合体の生成は、たとえば他のタンパク質や生物製剤と混合することにより、生体試料内のTGFベータ1の計測を可能にする。本発明

50

の結合性組成物のエピトープは、本願明細書において開示する技術又は従来技術（たとえば、G. Tribbick、2002 Journal of Immunological Methods 267:27-35、Woods及びHamuro、2001 Journal of Cellular Biochemistry Supplement 37:89-98参照）、及び/又は本願明細書において開示する競合性結合を用いることで測定できる。好ましい一態様において、本発明の結合性組成物のエピトープは、配列番号1のアミノ酸残基YYVGRK [配列番号136]を含む。別の態様では、本発明の結合性組成物のエピトープは、配列番号1のアミノ酸残基YYVGRK [配列番号136]及び配列番号1のYSKVを含む。さらに別の態様において、本発明の結合性組成物のエピトープは、配列番号1のYYVGRK [配列番号136]から、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つの（隣接又は非隣接の）残基を含み、及び/又は、配列番号1のYSKVから、少なくとも1つ、2つ、3つ、又は4つの（隣接又は非隣接の）残基を含む（この態様は、上記のすべての組み合わせを包含する。たとえば、これらに限らないが、YYVGRK [配列番号136]と配列番号1のKV、又はYVGRK [配列番号137]と配列番号1のY及びKV（コンピュータアルゴリズムと順列組み合わせの周知の数式を用いれば、すべての組み合わせを簡単に求めることができる））。更に好ましい一態様において、本発明のエピトープは、たとえば、本発明の結合性組成物が、同一抗原を対象とする結合性組成物（たとえばTGFベータ1）に競合することで後続の結合性複合体の生成を阻害する能力によって、機能的に定義される（このような競合性結合を本願明細書において開示する）。

10

20

#### 【0017】

本願明細書において使用される「特異的結合」の用語は、特異的な一对の結合における1つの構成要素が、その特異的な結合パートナー以外の分子と有意に結合しない状況を指す。上記用語はまた、たとえば抗原-結合ドメインは特定の多くの抗原によって担持されるエピトープに特異的である場合にも適用でき、その場合、その抗原-結合ドメインを有している特異的な結合メンバーはエピトープを担持している様々な抗原に結合することが可能である。つまり、成熟TGFベータ1に特異的な結合性組成物は、「その特異的な結合パートナー以外の分子には、有意な結合を示さない」。

#### 【0018】

結合性の組成物に関して「特異的に結合する」又は「特異的に免疫反応性である」という表現は、タンパク質及び他の生物学的要素の不均一な集合の存在下で結合性組成物の存在を決定する結合反応を指す。したがって、特定のイムノアッセイ状態の下で、特定の結合性組成物は、特異的なタンパク質に結合し、試料内に存在する他のタンパク質には有意に結合しない。このような状態下での結合性組成物に対する特異性結合には、特定のタンパク質に対する特異性によって選択された結合性組成物が必要となる場合がある。たとえば、結合性組成物（たとえば抗体）は、[配列番号1]で表される成熟アミノ酸配列単量体を有するTGFベータ1のヒト活性化二量体の形態に対して作られ、次いで、そのTGFベータ1タンパク質に対して特異的に免疫反応性であり、他のタンパク質に対しては免疫反応性でない抗体を得るために選択することができる。このような結合性組成物は、ヒトのTGFベータ1タンパク質に極めて相通的であるタンパク質（たとえば、別のヒトのTGFベータアイソフォーム（ヒトのTGFベータ2又はヒトのTGFベータ3など））を区別することができる。好ましい一態様において、成熟TGFベータ1に対する本発明の結合性組成物の特異性は、成熟TGFベータ2及び/又は成熟TGFベータ3に対する特異性の1.5倍、2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍、4.0倍、4.5倍、5.0倍、5.5倍、6.0倍、7.0倍、7.5倍、8.0倍、8.5倍、9.0倍、9.5倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、125倍、150倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、1500倍、2000倍、2500倍、3000倍、3500倍、4000倍、4500倍、5000倍、5500倍、6000倍、6500倍、7000倍、7500倍、8000倍、850

30

40

50

0倍、9000倍、9500倍、又は10,000倍に等しいかそれ以上である。別の好ましい一態様として、本発明の組成物の特異性は、ヒトのTGFベータ2に対して、上記リストのいずれかの特定の特異値を持ち、ヒトのTGFベータ3に対しては異なる特異値を持つ。たとえば、成熟TGFベータ1に対する特異性は、成熟TGFベータ2に対する特異値の100倍に等しいかそれ以上であり、成熟TGFベータ3に対する特異値の900倍に等しいかそれ以上になる。また、すべての値の組み合わせが包含される。

【0019】

本発明の結合性組成物は、好ましくはTGFベータ1を中和し、TGFベータ1に対する解離定数(K<sub>d</sub>)は、好ましくは、約100pM、95pM、90pM、85pM、80pM、75pM、70pM、65pM、60pM、55pM、50pM、45pM、40pM、35pM、30pM、25pM、20pM、15pM、14pM、13pM、12pM、11pM、10pM、又はこれ以下である。より好ましくは、約10pM、9.9pM、9.8pM、9.7pM、9.6pM、9.5pM、9.4pM、9.3pM、9.2pM、9.1pM、9.0pM、8.9pM、8.8pM、8.7pM、8.6pM、8.5pM、8.4pM、8.3pM、8.2pM、8.1pM、8.0pM、7.9pM、7.8pM、7.7pM、7.6pM、7.5pM、7.4pM、7.3pM、7.2pM、7.1pM、7.0pM、6.9pM、6.8pM、6.7pM、6.6pM、6.5pM、6.4pM、6.3pM、6.2pM、6.1pM、6.0pM、5.9pM、5.8pM、5.7pM、5.6pM、5.5pM、5.4pM、5.3pM、5.2pM、5.1pM、5.0pM又はそれ未満である。さらに好ましくは、約5.0pM、4.9pM、4.8pM、4.7pM、4.6pM、4.5pM、4.4pM、4.3pM、4.2pM、4.1pM、4.0pM、3.9pM、3.8pM、3.7pM、3.6pM、3.5pM、3.4pM、3.3pM、3.2pM、3.1pM、3.0pM、2.9pM、2.8pM、2.7pM、2.6pM、2.5pM、2.4pM、2.3pM、2.2pM、2.1pM、2.0pM、1.9pM、1.8pM、1.7pM、1.6pM、1.5pM、1.4pM、1.3pM、1.2pM、1.1pM、1.0pM又はそれ未満である。さらに好ましくは、9.9pM、9.8pM、9.7pM、9.6pM、9.5pM、9.4pM、9.3pM、9.2pM、9.1pM、9.0pM、8.9pM、8.8pM、8.7pM、8.6pM、8.5pM、8.4pM、8.3pM、8.2pM、8.1pM、8.0pM、7.9pM、7.8pM、7.7pM、7.6pM、7.5pM、7.4pM、7.3pM、7.2pM、7.1pM、7.0pM、6.9pM、6.8pM、6.7pM、6.6pM、6.5pM、6.4pM、6.3pM、6.2pM、6.1pM、6.0pM、5.9pM、5.8pM、5.7pM、5.6pM、5.5pM、5.4pM、5.3pM、5.2pM、5.1pM、5.0pM、5.0nM、4.9pM、4.8pM、4.7pM、4.6pM、4.5pM、4.4pM、4.3pM、4.2pM、4.1pM、4.0pM、3.9pM、3.8pM、3.7pM、3.6pM、3.5pM、3.4pM、3.3pM、3.2pM、3.1pM、3.0pM、2.9pM、2.8pM、2.7pM、2.6pM、2.5pM、2.4pM、2.3pM、2.2pM、2.1pM、2.0pM、1.9pM、1.8pM、1.7pM、1.6pM、1.5pM、1.4pM、1.3pM、1.2pM、1.1pM、1.0pM、0.9pM、0.8pM、0.7pM、0.6pM、0.5pM、0.4pM、0.3pM、0.2pM、0.1pM、又は0.01pMである。結合性組成物の解離定数(K<sub>d</sub>)は、任意の方法によって求めることができる。たとえば、Karlssoonら、1991 J. Immunol. Methods 145、299-340の方法を適応させたBIACore(登録商標)などである。その他の記述については、Jonssonら、1993 Ann. Biol. Clin. 51:19-26、Jonssonら、1991 Biotechniques 11:620-7、Johnssonら、1995 J. Mol. Recognit. 8:125-31、Johnssonら、1991 Anal. Biochem. 198:268-77を参照。

【0020】

10

20

30

40

50

本願明細書で用いられる用語「 $k_{on}$ 」は、 $M - 1 \text{ sec} - 1$ を単位として求められる、正反応又は複合体生成反応の結合又はオン反応速度定数、又は特定の反応速度を示す。本願明細書で用いられる用語「 $k_{off}$ 」は、 $1 / \text{秒}$ を単位として求められる、抗体抗原複合体からの抗体の解離に関する解離又はオフ反応速度定数、又は特定の反応速度を示す。本願明細書で用いられる用語「 $Kd$ 」は、特定の抗体 - 抗原相互作用の解離定数を示す。 $Kd$ は、次の式により求められる。

$$k_{off} / k_{on} = Kd$$

結合性組成物の親和性は、高い $k_{on}$ 値よりも低い $k_{off}$ 値と相関する場合があるが、態様では、理論の制約を受けることなく、改善した $k_{off}$ 値及び $k_{on}$ 値の両方を包含する。より好ましい一態様では、本発明の結合性組成物は高力価抗体又はその断片であり、通常、低い $k_{off}$ 値を呈する。さらに好ましい一態様では、本発明のFabの態様の $k_{on}$ 値は、相当するFab（たとえばPCT/US2004/018921、US60/485,820に記載されているmAb2471など）に比べ、少なくとも、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、又は2.4倍の改善した $k_{on}$ 値を呈する。他の態様では、本発明の組成は、相当する結合性組成物（たとえば、Fab又はmAb）に比べて、少なくとも、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、130、150、195、200、225、250、260、270、280、290、又は300倍に改善した $k_{off}$ 値を呈する。

#### 【0021】

好ましくは、抗体結合組成物はTGFベータ2及び/又はTGFベータ3と比較して、特異的に及び/又は選択的にTGFベータ1に結合する。より好ましくは、抗体結合組成物はヒトのTGFベータ2及び/又はヒトのTGFベータ3と比較して、特異的に及び/又は選択的にヒトのTGFベータ1に結合する。好ましくは、このような抗体は、TGFベータ2及び/又はTGFベータ3に対して20%未満の交差反応性を有し（解離定数の比率により測定）、より好ましくは、約15%未満の交差反応性を有し、さらに好ましくは、約10%未満の交差反応性を有する。さらにより好ましくは、9、8、7、6、5、4、3、2又は1%未満の交差反応性を有する。

#### 【0022】

さらに、抗体結合組成物は、好ましくはTGFベータ1の潜在型形態ではなく活性化形態を認識し、より好ましくはヒトTGFベータ1の潜在型形態ではなく活性化形態を認識する。

#### 【0023】

中和

結合性組成物に関する「中和する」又は「拮抗する」という用語は、結合性組成物の、他の分子の実体に対する特異的及び/又は選択的結合が、上記結合性組成物に結合した上記分子の実体の生物学的エフェクターの機能の抑止又は阻害をもたらすことを指す。TGFベータ1に関する「中和する」又は「拮抗する」という用語は、結合性組成物のTGFベータ1に対する結合又は相互作用が、TGFベータ1によって誘発された生物学的活性度の阻害をもたらす状況を指す。TGFベータ1の生物学的活性度の阻害は、1又は複数の*in vitro*若しくは*in vivo*におけるTGFベータ1の生物学的活性度の指標を測定することによって評価できる。非限定的な例として、受容体 - 結合の阻害、線維形成の阻害、化学向性の阻害、又はTGFベータ1の結合アッセイにおけるシグナル変換の阻害などがある（中和試験法の実施例は、欧州特許第0945464号明細書を参照）。非限定的な一態様において、TGFベータ1活性を中和又は拮抗する結合性組成物の能力は、本願明細書の実施例において説明されるとおり、上記アッセイによって評価される。

#### 【0024】

抗体の態様などのような結合性組成物の中和活性は、従来技術により認められた方法によって検査できる。非限定的な一態様において、Randallら（1993）*J. Immunol Methods* 164, 61 - 67のアッセイを適用/変更し、検査を

10

20

30

40

50

実施している。このアッセイはTGFベータ1及びTGFベータ2の、インターロイキン5 (IL-5) に誘発された赤白血病細胞系TF1の増殖を阻害する能力、また、TGFベータに特異的な結合性組成物によりTGFベータ阻害を逆転させる能力に基づくものである。上記アッセイでは、500fg/ml未満のTGFベータ1及び5-10pg/mlのTGFベータ2に、急速に繁殖できる感受性があったことが報告された。上記アッセイでは、他の抑制分子(たとえばインターフェロンベータ、インターフェロンガンマ及びTNFアルファ)に対しては、感受性が100-1000倍少ないことも報告された。上記アッセイでは、これらの分子の、容易に入手可能なすべての組み換え可能な分子種や、ヒト及びウシの血小板から産生した天然タンパク質を認識する目的、又は、血清サンプル内のTGFベータを検出する目的で、TGF-ベータ1又はTGF-ベータ2に対して特異的な中和抗体を含有させることによってTGF-ベータ1又はTGF-ベータ2に対して特異的に反応させることができると報告された。

10

#### 【0025】

本願明細書において報告される、又は公知の技術であるその他のアッセイも包含される。たとえば、ラットの抗Thy1.1モデルは、メサングウム細胞の表面にあるThy抗原を標的にした抗体の注入によってメサングウム融解を誘発し、それに続いて起こるメサングウム細胞の代償的増殖のフェーズが、尿タンパク質(蛋白尿)の濃度上昇をもたらすといったメサングウム増殖性糸球体腎炎の安定したモデルである(たとえば、Moritaら、1998 Am J Kidney Dis 31:559-73、Bagchusら、1986 Lab. Invest. 55:680-7、Yamamoto及びWilson、1987 Kidney Int. 32:514-25参照)。抗Thy1.1腎炎モデルは、多くの点で、ヒトのIgA腎炎又はヘーノホ-シェーンライン紫斑病に類似しており(O'Donoghueら、1991 J Clin Invest 88:1522-30)、試験組成物の投与量に関連する尿タンパクの減少量を測定することによって、腎臓病の潜在的治療法を検査するために用いられてきた(たとえば、Burgら、1997 Lab Invest 76:505-16、Johnsonら、1995 Kidney Int 47:62-9参照)。好ましい一態様において、本発明の結合性組成物は、このようなモデルにおいて、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%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、又はそれ以上の尿タンパク質を減少させる。また、同様のモデルにおいて、尿タンパク質の減少率が上記の2つの値の間の範囲にあり、その範囲が、上限及び下限の数値のいずれか又は両方を含むあるいは含まない(たとえば、12%を超え42%以下である)態様が、さらに包含される。

20

30

#### 【0026】

加えて、TGFベータが腎臓における生物学的作用を慢性的に阻害することで、糖尿病による腎不全を効果的に予防することを立証するSharmaのdb/db糖尿病マウスモデルアッセイ(2000 PNAS 97:8015-20参照)を採用することもできる。又は、糖尿病性腎障害の回復又は防止に関する結合性組成物の能力を検査するSharmaのSTZ糖尿病マウスモデルを採用することもできる。(1996 Diabetes 45:522-30)。さらに、Ueberhamら、2003 Hepatology 37(5):1067-78では、肝線維症の二重トランスジェニックマウスモデルのテトラサイクリンにより調節された遺伝子発現システムについての記載がある。ここでは、TGF-ベータ1の発現を、飲料水に塩酸ドキシサイクリンを追加又は除去することによってTGF-ベータの発現を調節することにより、TGF-ベータの発現を自由にオン/オフ切り替えできるようにする。このような動物の肝臓においてTGF-ベ-

40

50

タ1の発現が増加すると、線維性疾患の状態となる。これは、肝重が59%減少した後であっても、TGFベータ1の発現をオフにすることによって改善可能である。このモデルを使用することで、TGFベータ1の発現を切替える塩酸ドキシサイクリンの効果と、本発明の結合性組成物を比較することによって、本発明の結合性組成物がTGFベータ1の生物学的機能を阻害する効果を評価することができる。出願人は、HT-2細胞増殖アッセイ(本願明細書において開示される)を使用した特定の一態様において、IC<sub>50</sub>の値が、同一又は同様のアッセイ条件下で同様の結合性組成物(たとえば、PCT/US2004/018921、US 60/485,820に記載されているmAb2471)を使用して得られたIC<sub>50</sub>値と比較して、少なくとも、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、105倍、125倍、150倍、175倍、200倍、225倍、250倍、275倍、300倍、325倍、350倍、375倍、400倍、425倍、450倍又はそれ以上に改善している結合性組成物の態様を、好ましくは包含する。また、IC<sub>50</sub>の値の改善率(上記記載)が上記の2つの値の間の範囲にあり、その範囲が、上限及び下限の数値のいずれか又は両方を含むあるいは含まない(たとえば、IC<sub>50</sub>の値が、mAb2471と比較して80~100倍改善する)態様が、さらに包含される。

【0027】

抗体

本発明の抗体結合組成物には、たとえば、これらに限定されるものではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')断片、Fab発現ライブラリによって産生される断片、抗イデオタイプ(抗Id)抗体(たとえば、本発明の抗体に対する抗Id抗体を含む)及び上記のいずれかのエピトープ結合性断片が含まれる。

【0028】

本願明細書で用いられる用語「抗体」は、イムノグロブリン組成物と、イムノグロブリン組成物(たとえば特異的に及び/又は選択的に抗原に結合する結合部位を含有する結合性組成物分子)の免疫学的に活性な部分とを指す。本発明のイムノグロブリン組成物は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ(たとえばIgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY)、クラス(たとえばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2)又はサブクラスに属するものでもよい。好ましくは、抗体は、本発明のヒト抗原結合性の抗体断片、たとえば、これらに限定されるものではないが、Fab抗体、F(ab')抗体、F(ab')<sub>2</sub>抗体、Fc抗体、単鎖Fvs(scFv)単鎖抗体、ジスルフィド結合されたFvs(sdFv)及びVL領域又はVH領域からなる断片である。単鎖抗体を含む抗原結合性の抗体断片は、可変領域を、単独で、或いは、ヒンジ領域、CH1、CH2、CH3領域又はこれらの組み合わせの全体又は一部と共に含むことができる。また、本発明には、たとえば、これらに限定されるものではないが、ヒンジ領域を有する可変領域の任意の組み合わせ(たとえば、CH1、CH2、CH3領域又はそれらの組み合わせ)を含むことができる抗原結合性断片が包含される。本発明の抗体は、鳥類及び哺乳類を含む、任意の動物起源のものであってもよい。好ましくは、抗体は、ヒト、霊長類ネズミ科の動物(たとえばマウス、ラット)、ロバ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ又はニワトリのものである。

【0029】

本願明細書で使用される「ヒト抗体」という用語には、たとえば、これらに限定されるものではないが、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体(たとえば、これらに限定されるものではないが、ヒト免疫グロブリンライブラリ(たとえばヒトの生殖細胞系ライブラリ)から分離された抗体、又は、本願明細書で開示されるとおり、又は米国特許第5939598号明細書において教示されるとおり、1つ又は複数のヒト免疫グロブリンを導入した、内因性のイムノグロブリンを発現しない動物から分離された抗体が含まれる)が包含される。

【0030】

結合性組成物は、単一特異性、二重特異性、三重特異性、又はさらに多特異性であって

よい。多特異的な抗体は、標的タンパク質、ポリペプチド（又はその断片）の異なるエピトープに対し特異的であってよい。或いは、TGFベータ1と非相同のエピトープ（たとえば非相同のTGFベータアイソフォーム又は担体物質）の両方に対して特異的であってよい（たとえば、国際公開第2093/17715号パンフレット、国際公開第92/08802号パンフレット、国際公開第91/00360号パンフレット、国際公開第92/05793号パンフレット、Tuttrà(1991) J. Immunol. 147: 60-69、米国特許第4474893号明細書、4714681号明細書、4925648号明細書、5573920号明細書、5601819号明細書、又はKostelnyら(1992) J. Immunol. 148: 1547-1553参照）。

#### 【0031】

結合性組成物は、その結合性組成物が特異的に認識及び/又は特異的に結合するTGFベータ1タンパク質（又はその断片）のエピトープ又は部分によって表現若しくは特定することができる。エピトープ又はポリペプチド部分は、本願明細書において記載されるように特定することができる。たとえば、N末端及びC末端の位置によって、隣接するアミノ酸残基の大きさによって、或いは、本願明細書に添付の表及び/又は図若しくは本願明細書において記載されるように特定することができる。加えて、或るエピトープ、ポリペプチド、タンパク質、又はポリペプチド又はタンパク質の断片、に特異的に結合する抗体を本発明から具体的に除外してもよい。たとえば、出願人は、或るエピトープ、ポリペプチド、タンパク質、又はポリペプチド又はタンパク質の断片に特異的に結合する任意の抗体を除外する権利を保有する。したがって、本発明は、或るポリペプチド又はタンパク質（又はその断片）に特異的に結合する第1の（又は他の）抗体を包含できると同時に、たとえば別のエピトープに結合することにより、同一ポリペプチド又はタンパク質（又はその断片）に選択的に結合する第2の（又は他の）抗体を排除できる。好ましい一態様において、出願人は、TGFベータ2上及び/又はTGFベータ3上のTGFベータ1アイソフォームに特異的に及び/又は選択的に結合する少なくとも1つの結合部位を含むTGFベータ1を中和する結合性組成物を排除する。この結合性組成物には、少なくとも以下のものが含まれる。QQWNGNPPA [配列番号126]の4つの隣接するアミノ酸、QQWDSNPPA [配列番号127]の少なくとも6つの隣接するアミノ酸、YIYPYNGDTGYNQKFKS [配列番号128]の少なくとも5つの隣接するアミノ酸（少なくとも5つの隣接するアミノ酸のうちの一つはDである）、又は、GYTF TDYTMH [配列番号129]の少なくとも5つの隣接するアミノ酸。

#### 【0032】

本発明の抗体は、その交差反応性によって記述若しくは特定することができる。標的タンパク質又はポリペプチド（又はその断片）の他の任意の誘導体、オルソログ、パラログ又はホモログにも結合しない抗体が、包含される。

#### 【0033】

さらに、ストリンジェントなハイブリダイゼーション状態（本願明細書において記載される）の下で、安定してハイブリダイズするポリヌクレオチドによってエンコードされたポリペプチドをヒトのTGFベータ1ポリヌクレオチド配列に選択的に結合する抗体が、本発明に包含される。

#### 【0034】

結合性組成物は、タンパク質又はポリペプチド（又はその断片）又はエピトープに対する結合能によって特徴付け又は特定することもできる。他の態様では、抗体又は抗体結合断片などの結合性組成物の好適な結合能には、以下の数値よりも小さい（或いは、以下の2数値間の範囲にあり、その範囲が、上限及び下限の数値のいずれか又は両方を含むあるいは含まない）解離定数（Kd）を呈する結合能（本願明細書において記載されるアッセイにおける）が包含される。 $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ 、 $10^{-2} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 、 $10^{-3} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 、 $10^{-4} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、 $10^{-5} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、 $10^{-6} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 $10^{-7} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、 $10^{-8} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $10^{-9} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $10^{-10} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 $10^{-11} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $10^{-12} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ 、 $10^{-13} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-14} \text{ M}$ 、 $10^{-14} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-15} \text{ M}$ 、 $10^{-15} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-16} \text{ M}$ 、 $10^{-16} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-17} \text{ M}$ 、 $10^{-17} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-18} \text{ M}$ 、 $10^{-18} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-19} \text{ M}$ 、 $10^{-19} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-20} \text{ M}$ 、 $10^{-20} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-21} \text{ M}$ 、 $10^{-21} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-22} \text{ M}$ 、 $10^{-22} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-23} \text{ M}$ 、 $10^{-23} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-24} \text{ M}$ 、 $10^{-24} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-25} \text{ M}$ 、 $10^{-25} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-26} \text{ M}$ 、 $10^{-26} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-27} \text{ M}$ 、 $10^{-27} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-28} \text{ M}$ 、 $10^{-28} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-29} \text{ M}$ 、 $10^{-29} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-30} \text{ M}$ 、 $10^{-30} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-31} \text{ M}$ 、 $10^{-31} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-32} \text{ M}$ 、 $10^{-32} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-33} \text{ M}$ 、 $10^{-33} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-34} \text{ M}$ 、 $10^{-34} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-35} \text{ M}$ 、 $10^{-35} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-36} \text{ M}$ 、 $10^{-36} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-37} \text{ M}$ 、 $10^{-37} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-38} \text{ M}$ 、 $10^{-38} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-39} \text{ M}$ 、 $10^{-39} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-40} \text{ M}$ 、 $10^{-40} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-41} \text{ M}$ 、 $10^{-41} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-42} \text{ M}$ 、 $10^{-42} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-43} \text{ M}$ 、 $10^{-43} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-44} \text{ M}$ 、 $10^{-44} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-45} \text{ M}$ 、 $10^{-45} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-46} \text{ M}$ 、 $10^{-46} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-47} \text{ M}$ 、 $10^{-47} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-48} \text{ M}$ 、 $10^{-48} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-49} \text{ M}$ 、 $10^{-49} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-50} \text{ M}$ 、 $10^{-50} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-51} \text{ M}$ 、 $10^{-51} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-52} \text{ M}$ 、 $10^{-52} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-53} \text{ M}$ 、 $10^{-53} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-54} \text{ M}$ 、 $10^{-54} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-55} \text{ M}$ 、 $10^{-55} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-56} \text{ M}$ 、 $10^{-56} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-57} \text{ M}$ 、 $10^{-57} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-58} \text{ M}$ 、 $10^{-58} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-59} \text{ M}$ 、 $10^{-59} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-60} \text{ M}$ 、 $10^{-60} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-61} \text{ M}$ 、 $10^{-61} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-62} \text{ M}$ 、 $10^{-62} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-63} \text{ M}$ 、 $10^{-63} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-64} \text{ M}$ 、 $10^{-64} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-65} \text{ M}$ 、 $10^{-65} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-66} \text{ M}$ 、 $10^{-66} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-67} \text{ M}$ 、 $10^{-67} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-68} \text{ M}$ 、 $10^{-68} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-69} \text{ M}$ 、 $10^{-69} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-70} \text{ M}$ 、 $10^{-70} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-71} \text{ M}$ 、 $10^{-71} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-72} \text{ M}$ 、 $10^{-72} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-73} \text{ M}$ 、 $10^{-73} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-74} \text{ M}$ 、 $10^{-74} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-75} \text{ M}$ 、 $10^{-75} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-76} \text{ M}$ 、 $10^{-76} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-77} \text{ M}$ 、 $10^{-77} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-78} \text{ M}$ 、 $10^{-78} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-79} \text{ M}$ 、 $10^{-79} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-80} \text{ M}$ 、 $10^{-80} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-81} \text{ M}$ 、 $10^{-81} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-82} \text{ M}$ 、 $10^{-82} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-83} \text{ M}$ 、 $10^{-83} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-84} \text{ M}$ 、 $10^{-84} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-85} \text{ M}$ 、 $10^{-85} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-86} \text{ M}$ 、 $10^{-86} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-87} \text{ M}$ 、 $10^{-87} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-88} \text{ M}$ 、 $10^{-88} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-89} \text{ M}$ 、 $10^{-89} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-90} \text{ M}$ 、 $10^{-90} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-91} \text{ M}$ 、 $10^{-91} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-92} \text{ M}$ 、 $10^{-92} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-93} \text{ M}$ 、 $10^{-93} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-94} \text{ M}$ 、 $10^{-94} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-95} \text{ M}$ 、 $10^{-95} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-96} \text{ M}$ 、 $10^{-96} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-97} \text{ M}$ 、 $10^{-97} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-98} \text{ M}$ 、 $10^{-98} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-99} \text{ M}$ 、 $10^{-99} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-100} \text{ M}$ 、 $10^{-100} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-101} \text{ M}$ 、 $10^{-101} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-102} \text{ M}$ 、 $10^{-102} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-103} \text{ M}$ 、 $10^{-103} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-104} \text{ M}$ 、 $10^{-104} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-105} \text{ M}$ 、 $10^{-105} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-106} \text{ M}$ 、 $10^{-106} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-107} \text{ M}$ 、 $10^{-107} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-108} \text{ M}$ 、 $10^{-108} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-109} \text{ M}$ 、 $10^{-109} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-110} \text{ M}$ 、 $10^{-110} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-111} \text{ M}$ 、 $10^{-111} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-112} \text{ M}$ 、 $10^{-112} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-113} \text{ M}$ 、 $10^{-113} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-114} \text{ M}$ 、 $10^{-114} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-115} \text{ M}$ 、 $10^{-115} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-116} \text{ M}$ 、 $10^{-116} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-117} \text{ M}$ 、 $10^{-117} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-118} \text{ M}$ 、 $10^{-118} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-119} \text{ M}$ 、 $10^{-119} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-120} \text{ M}$ 、 $10^{-120} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-121} \text{ M}$ 、 $10^{-121} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-122} \text{ M}$ 、 $10^{-122} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-123} \text{ M}$ 、 $10^{-123} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-124} \text{ M}$ 、 $10^{-124} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-125} \text{ M}$ 、 $10^{-125} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-126} \text{ M}$ 、 $10^{-126} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-127} \text{ M}$ 、 $10^{-127} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-128} \text{ M}$ 、 $10^{-128} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-129} \text{ M}$ 、 $10^{-129} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-130} \text{ M}$ 、 $10^{-130} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-131} \text{ M}$ 、 $10^{-131} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-132} \text{ M}$ 、 $10^{-132} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-133} \text{ M}$ 、 $10^{-133} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-134} \text{ M}$ 、 $10^{-134} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-135} \text{ M}$ 、 $10^{-135} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-136} \text{ M}$ 、 $10^{-136} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-137} \text{ M}$ 、 $10^{-137} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-138} \text{ M}$ 、 $10^{-138} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-139} \text{ M}$ 、 $10^{-139} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-140} \text{ M}$ 、 $10^{-140} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-141} \text{ M}$ 、 $10^{-141} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-142} \text{ M}$ 、 $10^{-142} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-143} \text{ M}$ 、 $10^{-143} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-144} \text{ M}$ 、 $10^{-144} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-145} \text{ M}$ 、 $10^{-145} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-146} \text{ M}$ 、 $10^{-146} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-147} \text{ M}$ 、 $10^{-147} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-148} \text{ M}$ 、 $10^{-148} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-149} \text{ M}$ 、 $10^{-149} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-150} \text{ M}$ 、 $10^{-150} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-151} \text{ M}$ 、 $10^{-151} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-152} \text{ M}$ 、 $10^{-152} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-153} \text{ M}$ 、 $10^{-153} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-154} \text{ M}$ 、 $10^{-154} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-155} \text{ M}$ 、 $10^{-155} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-156} \text{ M}$ 、 $10^{-156} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-157} \text{ M}$ 、 $10^{-157} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-158} \text{ M}$ 、 $10^{-158} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-159} \text{ M}$ 、 $10^{-159} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-160} \text{ M}$ 、 $10^{-160} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-161} \text{ M}$ 、 $10^{-161} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-162} \text{ M}$ 、 $10^{-162} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-163} \text{ M}$ 、 $10^{-163} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-164} \text{ M}$ 、 $10^{-164} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-165} \text{ M}$ 、 $10^{-165} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-166} \text{ M}$ 、 $10^{-166} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-167} \text{ M}$ 、 $10^{-167} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-168} \text{ M}$ 、 $10^{-168} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-169} \text{ M}$ 、 $10^{-169} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-170} \text{ M}$ 、 $10^{-170} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-171} \text{ M}$ 、 $10^{-171} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-172} \text{ M}$ 、 $10^{-172} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-173} \text{ M}$ 、 $10^{-173} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-174} \text{ M}$ 、 $10^{-174} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-175} \text{ M}$ 、 $10^{-175} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-176} \text{ M}$ 、 $10^{-176} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-177} \text{ M}$ 、 $10^{-177} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-178} \text{ M}$ 、 $10^{-178} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-179} \text{ M}$ 、 $10^{-179} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-180} \text{ M}$ 、 $10^{-180} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-181} \text{ M}$ 、 $10^{-181} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-182} \text{ M}$ 、 $10^{-182} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-183} \text{ M}$ 、 $10^{-183} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-184} \text{ M}$ 、 $10^{-184} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-185} \text{ M}$ 、 $10^{-185} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-186} \text{ M}$ 、 $10^{-186} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-187} \text{ M}$ 、 $10^{-187} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-188} \text{ M}$ 、 $10^{-188} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-189} \text{ M}$ 、 $10^{-189} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-190} \text{ M}$ 、 $10^{-190} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-191} \text{ M}$ 、 $10^{-191} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-192} \text{ M}$ 、 $10^{-192} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-193} \text{ M}$ 、 $10^{-193} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-194} \text{ M}$ 、 $10^{-194} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-195} \text{ M}$ 、 $10^{-195} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-196} \text{ M}$ 、 $10^{-196} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-197} \text{ M}$ 、 $10^{-197} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-198} \text{ M}$ 、 $10^{-198} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-199} \text{ M}$ 、 $10^{-199} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-200} \text{ M}$ 、 $10^{-200} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-201} \text{ M}$ 、 $10^{-201} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-202} \text{ M}$ 、 $10^{-202} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-203} \text{ M}$ 、 $10^{-203} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-204} \text{ M}$ 、 $10^{-204} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-205} \text{ M}$ 、 $10^{-205} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-206} \text{ M}$ 、 $10^{-206} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-207} \text{ M}$ 、 $10^{-207} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-208} \text{ M}$ 、 $10^{-208} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-209} \text{ M}$ 、 $10^{-209} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-210} \text{ M}$ 、 $10^{-210} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-211} \text{ M}$ 、 $10^{-211} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-212} \text{ M}$ 、 $10^{-212} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-213} \text{ M}$ 、 $10^{-213} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-214} \text{ M}$ 、 $10^{-214} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-215} \text{ M}$ 、 $10^{-215} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-216} \text{ M}$ 、 $10^{-216} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-217} \text{ M}$ 、 $10^{-217} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-218} \text{ M}$ 、 $10^{-218} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-219} \text{ M}$ 、 $10^{-219} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-220} \text{ M}$ 、 $10^{-220} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-221} \text{ M}$ 、 $10^{-221} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-222} \text{ M}$ 、 $10^{-222} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-223} \text{ M}$ 、 $10^{-223} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-224} \text{ M}$ 、 $10^{-224} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-225} \text{ M}$ 、 $10^{-225} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-226} \text{ M}$ 、 $10^{-226} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-227} \text{ M}$ 、 $10^{-227} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-228} \text{ M}$ 、 $10^{-228} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-229} \text{ M}$ 、 $10^{-229} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-230} \text{ M}$ 、 $10^{-230} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-231} \text{ M}$ 、 $10^{-231} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-232} \text{ M}$ 、 $10^{-232} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-233} \text{ M}$ 、 $10^{-233} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-234} \text{ M}$ 、 $10^{-234} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-235} \text{ M}$ 、 $10^{-235} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-236} \text{ M}$ 、 $10^{-236} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-237} \text{ M}$ 、 $10^{-237} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-238} \text{ M}$ 、 $10^{-238} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-239} \text{ M}$ 、 $10^{-239} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-240} \text{ M}$ 、 $10^{-240} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-241} \text{ M}$ 、 $10^{-241} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-242} \text{ M}$ 、 $10^{-242} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-243} \text{ M}$ 、 $10^{-243} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-244} \text{ M}$ 、 $10^{-244} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-245} \text{ M}$ 、 $10^{-245} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-246} \text{ M}$ 、 $10^{-246} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-247} \text{ M}$ 、 $10^{-247} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-248} \text{ M}$ 、 $10^{-248} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-249} \text{ M}$ 、 $10^{-249} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-250} \text{ M}$ 、 $10^{-250} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-251} \text{ M}$ 、 $10^{-251} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-252} \text{ M}$ 、 $10^{-252} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-253} \text{ M}$ 、 $10^{-253} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-254} \text{ M}$ 、 $10^{-254} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-255} \text{ M}$ 、 $10^{-255} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-256} \text{ M}$ 、 $10^{-256} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-257} \text{ M}$ 、 $10^{-257} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-258} \text{ M}$ 、 $10^{-258} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-259} \text{ M}$ 、 $10^{-259} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-260} \text{ M}$ 、 $10^{-260} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-261} \text{ M}$ 、 $10^{-261} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-262} \text{ M}$ 、 $10^{-262} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-263} \text{ M}$ 、 $10^{-263} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-264} \text{ M}$ 、 $10^{-264} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-265} \text{ M}$ 、 $10^{-265} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-266} \text{ M}$ 、 $10^{-266} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-267} \text{ M}$ 、 $10^{-267} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-268} \text{ M}$ 、 $10^{-268} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-269} \text{ M}$ 、 $10^{-269} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-270} \text{ M}$ 、 $10^{-270} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-271} \text{ M}$ 、 $10^{-271} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-272} \text{ M}$ 、 $10^{-272} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-273} \text{ M}$ 、 $10^{-273} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-274} \text{ M}$ 、 $10^{-274} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-275} \text{ M}$ 、 $10^{-275} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-276} \text{ M}$ 、 $10^{-276} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-277} \text{ M}$ 、 $10^{-277} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-278} \text{ M}$ 、 $10^{-278} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-279} \text{ M}$ 、

$0.1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $4.9 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $4.8 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $4.7 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $4.6 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $4.5 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $4.4 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $4.3 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $4.2 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $4.1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $4.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $3.9 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $3.8 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $3.7 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $3.6 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $3.5 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $3.4 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $3.3 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $3.2 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $3.1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $3.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $2.9 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $2.8 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $2.7 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $2.6 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $2.5 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $2.4 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $2.3 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $2.2 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $2.1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $2.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $1.9 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $1.8 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $1.7 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $1.6 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $1.5 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $1.4 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $1.3 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $1.2 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $1.1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $1.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $0.9 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $0.8 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $0.7 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $0.6 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $0.5 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $0.4 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $0.3 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $0.2 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $0.1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 $10^{-12} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ 、 $10^{-13} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-14} \text{ M}$ 、 $10^{-14} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-15} \text{ M}$  又は  $10^{-15} \text{ M}$ 。

10

#### 【0035】

本発明にはまた、競合的結合を測定する公知の技術（たとえば、本願明細書において記載又は参照されるイムノアッセイ）によって測定される TGFβ1 のエピトープに対する結合性組成物の結合を、競合的に阻害する抗体が含まれる。他の好ましい態様では、上記抗体はエピトープへの結合を少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92% 又は 91%、少なくとも 90%、89%、88%、87%、86%、少なくとも 85%、少なくとも 80%、少なくとも 75%、少なくとも 70%、少なくとも 60%、又は少なくとも 50%（又は上記の 2 数値間の範囲にあり、その範囲が、上限及び下限の数値のいずれか又は両方を含むあるいは含まない）、競争的に阻害する。

20

#### 【0036】

本発明の抗体は、TGFβ1（又はその断片）のアンタゴニストとして作用しうる。たとえば、抗体又は本発明の結合性組成物は、たとえば同種の受容体/リガンドを有する TGFβ1 の相互作用を、部分的に又は完全に中断させることができる。好ましくは、本発明の抗体は、TGFβ1 の抗原エピトープ又はその一部分に結合する。

30

#### 【0037】

同様に、本発明には、リガンドに結合して、そのリガンドが受容体と結合するのを（たとえば立体障害により）妨げる抗体が包含される。同様に、受容体結合を阻害することなく受容体の活性化を阻害するリガンド結合性抗体も包含される。

#### 【0038】

本発明の抗体は、たとえば、これらに限定されるものではないが、たとえば *in vitro* 及び/又は *in vivo* での診断法及び治療法に利用する TGFβ1（又はその断片）を、精製、検出、又は標的にするために用いることができる。たとえば、抗体は、生体試料中の本発明の TGFβ1（又はその断片）の質的及び/又は量的な濃度を測定するイムノアッセイに使用できる（たとえば、Harlow 及び Lane、“Using Antibodies: A Laboratory Manual”（Cold Spring Harbor Laboratory Press、1999）参照）。

40

#### 【0039】

結合性組成物は、単独、或いは、他の組成物と組み合わせて用いることができる。さらに、抗体のような結合性組成物は、組換えにより、N末端又はC末端において異種ポリペプチドに融合させることができる。また、ポリペプチド又はその他の組成物に、化学的に接合（共有接合及び非共有接合）することができる。たとえば、本発明の抗体は、検出アッセイの標識として有効な分子及びエフェクター分子（たとえば異種ポリペプチド、薬物、放射性核種又は毒素）に対し、組換えによって融合又は接合することができる（たとえ

50

ば、国際公開第92/08495号パンフレット、国際公開第91/14438号パンフレット、国際公開第89/12624号パンフレット、米国特許第5314995号明細書、及び欧州特許第396387号明細書参照)。

#### 【0040】

結合性組成物には、共有結合が抗体が抗イディオタイプ応答の生成を妨げることが無いような方法で、たとえば、任意の種類分子をたとえば抗体に共有結合することにより改質された誘導体が含まれる。たとえば、抗体誘導体には、これらに限定されるものではないが、グリコシル化、アセチル化、PEG化、リン酸エステル化、アミド化、周知の保護/ブロックンググループによる誘導体化、タンパク分解性切断、細胞のリガンド又は他のタンパク質に対する結合、などによって改質された抗体が包含される。様々な化学修飾のうちいずれか、たとえば、これらに限定されるものではないが、特定の化学開裂、アセチル化、製剤、ツニカマイシンの代謝合成などを、周知の技術によって実施することができる。加えて、誘導体には、1つ又は複数の非古典的アミノ酸が含有されうる。結合性組成物は、任意の適切な公知技術によって生成されてもよい。たとえば、モノクローナル抗体は、たとえば以下のような公知技術によって生成できる。Harlow及びLane、"Antibodies: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)、Harlow及びLane、"Using Antibodies: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)、Breitling及びDuebel、1999、"Recombinant Antibodies" (John Wiley & Sons, New York)、H. Zola、"Monoclonal Antibodies" (Garland Press)、及びJames W. Goding、"Monoclonal Antibodies: Principles and Practice" (Academic Press)

10

20

#### 【0041】

本願明細書で用いられる用語「モノクローナル抗体」は限定されるものではないが、特定の技術(たとえば、ハイブリドーマ技術)によって産生される抗体である。ハイブリドーマ技術を使用した特定の抗体の作製及びスクリーニングは、慣習的技術及び従来技術において周知である。「モノクローナル抗体」とは、たとえば単一のクローン(たとえば、あらゆる真核生物、原核生物又はファージクローン)に由来する抗体を指し、それが産生される方法のことではない。

30

#### 【0042】

特異性のエピトープを認識する抗体断片は、周知の技術によって生成することができる。たとえば、本発明のFab及びF(ab')<sub>2</sub>断片は、パパイン(Fab断片を産生する場合)又はペプシン(F(ab')<sub>2</sub>断片を産生する場合)などの酵素を用いて、免疫グロブリン分子のタンパク分解性切断によって産生することができる。F(ab')<sub>2</sub>断片には、可変領域、軽鎖定常領域及び軽鎖のCH1領域が含まれる。たとえば、結合性組成物は、ファージ粒子をエンコードするポリヌクレオチド配列を担持しているファージ粒子の表面に機能性抗体ドメインを表示する当該技術において公知のさまざまなファージディスプレイ法を使用して生成することもできる。

40

#### 【0043】

特定の一態様では、ファージディスプレイ法を、レパートリ又はコンビナトリアル抗体ライブラリ(たとえば、ヒト又はネズミ)が発現する抗原結合ドメインを表示するために用いる。対象となる抗原に結合する抗原結合ドメインを表示するファージは、たとえば、標識抗原又は、固体表面又はビーズに結合又は捕獲された抗原を使用することにより、抗原によって選択又は同定することができる。ファージ選択の後、ファージから抗体コード領域を分離し、これを使用してヒト抗体を含む完全抗体、又は、その他任意の抗原結合性断片を生成し、及び、この抗体コード領域を、たとえば哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母菌及び細菌を含む、任意の望ましい宿主内に発現する。

50

## 【0044】

Fab、Fab'及びF(ab')<sub>2</sub>断片を組換えにより産生する技術は、周知の方法(たとえば、国際公開第92/122324号パンフレット、Mullinaxら、BioTechniques 1992 12(6):864-9、Sawaiら、1995 AJRI 34:26-34、及びBetterら、1988 Science 240:1041-3)を利用して採用することもできる。単鎖のFvs及び抗体の産生例は、たとえば、米国特許第4946778号明細書、5258498号明細書、Hustonら、1991 Methods in Enzymology 203:46-88、Shuら、1993 PNAS USA 90:7995-9、Skerraら、1988 Science 240:1038-40などがある。ヒト抗体のin vivoでの使用、及び、in vitroでの検出アッセイを含む一部の用途においては、周知の技術によって産生されたヒト化抗体又はヒト抗体を使用することが好ましい場合もある。

10

## 【0045】

本願明細書において言及されるヒト化抗体は、本願明細書において記述されるとおり、ヒト宿主系へのin vivo導入(たとえば、非経口投与後)において有害な免疫原性反応を引き起こす可能性が低く、フレームワーク領域内に埋め込まれる1つ又は複数の相補性決定領域(CDR)を持つ、所定の抗原に結合する結合性組成物である。しばしば、CDRドナー領域は、抗原結合を改善、及び/又は免疫原性を減少させるために、ヒトのフレームワーク領域内で適切に埋め込まれる。有用なフレームワーク領域は、周知の方法を使用して同定できる。たとえば、(1)CDR及びフレームワーク残基の相互作用をモデル化して、抗原結合において重要なフレームワーク残基を同定する、(2)配列比較により、特定の位置における異常なフレームワーク残基を同定する(米国特許第5585089号明細書、Riechmannら、Nature 332:323(1988))、(3)実験的に同定する。

20

## 【0046】

本発明の特定のモノクローナル抗体結合組成物の態様における重鎖及び軽鎖可変相補性決定領域(CDR)を、Table 1a、Table 1bに示す。CDR領域は、標準アミノ酸の1文字コード及び標準CDR番号を使用して表される(すなわち、CDRの値が大きいが、典型的なIgGの重鎖又は軽鎖構造の不変領域に近いことになる。たとえば、VH CDR3は、VH CDR1よりもCH1ドメインに近い)。

30

## 【0047】

特定のCDRの態様は、CDRの種類を記述するためにアミノ酸式を使用して一般的に表記する(ここにおいても、標準アミノ酸の1文字コードを使用し、代用可能なアミノ酸残基を「X」で表す。特定のCDR内における残基の配置は下付き数字によって表す。この下付き数字の値は、最小がCDR内で最もアミノ末端寄り、最大が最もカルボキシ末端寄りの残基を表す(たとえば、VH CDR2のX<sub>1</sub>はCDRの最もアミノ末端寄りの残基であり、X<sub>6</sub>は最もカルボキシ末端寄りの置換可能な残基である))。従来技術における当業者は、これらの一般的な式によって、本発明に包含される多様な重鎖ドメイン又は軽鎖ドメイン(V<sub>L</sub>又はV<sub>H</sub>)内のすべての所定位置におけるCDRの態様を確認できる。考えるアミノ酸配列の特定のインスタンス化は、アミノ酸コードを使用している特定のCDR式において、特定の残基Xそれぞれに置換可能なすべてのアミノ酸を生成することによってすべて確認可能である。本願明細書は、すべてのこのような態様を包含する。

40

## 【0048】

更に、考えるCDRの組み合わせにおける、考えるすべてのV<sub>L</sub>又はV<sub>H</sub>の態様も、本発明において包含される(たとえば、開示されている情報から、考えるVH CDR1は72個、考えるVH CDR2は384個、考えるVH CDR3は12個あることが直ちに算出可能である。ここから、本発明の結合性組成物の特定の可変重鎖抗体の態様においては合計72×384×12通りの考えるV<sub>H</sub>のCDRを組み合わせることができ。本願明細書は、すべてのこのような組み合わせを包含する。同様の論理が、すべて

50

の V L C D R 及び軽鎖可変ドメイン V<sub>L</sub> に包含されるすべての考える組み合わせにもあてはまる。たとえば、考える V L C D R 1 は 1 9 2 あり、考える V L C D R 2 は 1 2 個あり、考える V L C D R 3 は 4 8 個ある。ここから、本発明の結合性組成物の特定の可変軽鎖抗体の態様においては合計 1 9 2 × 1 2 × 4 8 通りの V<sub>L</sub> C D R を組み合わせることができる)。同様に、特定の結合性組成物の態様における、V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> の考えるすべての組み合わせも本発明に包含される。

Table 1 a 結合性組成物の C D R 重鎖の式

【表 1】

重鎖CDR		
CDR1	CDR2	CDR3
GYX <sub>1</sub> FX <sub>2</sub> DYNX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> * [配列番号2]	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> YPYDGX <sub>3</sub> TGX <sub>4</sub> NX <sub>5</sub> KX <sub>6</sub> KS ** [配列番号3]	GYRX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> Y *** [配列番号4]

10

\* V H C D R 1 について、X<sub>1</sub> は、T か D であり、X<sub>2</sub> は、T、E、F のいずれかであり、X<sub>3</sub> は、M、I、L、V のいずれかであり、X<sub>4</sub> は、H、V、A のいずれかである。

\*\* V H C D R 2 について、X<sub>1</sub> は、Y、Q、S のいずれかであり、X<sub>2</sub> は、I 又は V であり、X<sub>3</sub> は、D 又は E であり、X<sub>4</sub> は Y、T、H、L のいずれかであり、X<sub>5</sub> は、Q、K、P、S のいずれかであり、X<sub>6</sub> は、F 又は Y である。

\*\*\* V H C D R 3 について、X<sub>1</sub> は、W か A であり、X<sub>2</sub> は、F 又は L であり、X<sub>3</sub> も A、E 又は Y である。

20

Table 1 b 結合性組成物の C D R 軽鎖の式

【表 2】

軽鎖CDR		
CDR1	CDR2	CDR3
X <sub>1</sub> AX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> VX <sub>5</sub> YMH * [配列番号5]	ATSNX <sub>1</sub> AX <sub>2</sub> ** [配列番号6]	X <sub>1</sub> QWDX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> PA *** [配列番号7]

\* V L C D R 1 について、X<sub>1</sub> は、R、Y、E、Q のいずれかであり、X<sub>2</sub> は、S 又は T であり、X<sub>3</sub> は、S、V、A のいずれかであり、X<sub>4</sub> は、S 又は L であり、X<sub>5</sub> は、S、P、L、Y のいずれかである。

30

\*\* V L C D R 2 について、X<sub>1</sub> は、L、N、P のいずれかであり、X<sub>2</sub> は、S、K、Y、L、M、F、E、Q、R、H のいずれかである。

\*\*\* V L C D R 3 について、X<sub>1</sub> は、Q 又は S であり、X<sub>2</sub> は L、D、P のいずれかであり、X<sub>3</sub> は、N 又は R であり、X<sub>4</sub> は、P、F、Y、R のいずれかである。

## 【0049】

更に、本願明細書に包含される C D R (得られた結合性組成物が、成熟 T G F ベータ 2 又は成熟 T G F ベータ 3 ではなく、成熟 T G F ベータ 1 に、特異的及び / 又は選択的に結合することを可能にするために、かつ、成熟 T G F ベータ 1 を中和するために、ヒトの抗体フレームワーク領域内に埋め込む (適当な配向性において) 又は担持された) を使用する抗体結合組成物が、本発明に包含される。周知の技術を使用して、適当なフレームワーク内に特定の C D R を埋め込み、或いは、配置することができる。本発明で使用される可変ドメインは、任意の生殖細胞系又は再配列されたヒトの可変ドメインに由来するものでもよく、或いは、周知のヒトの可変ドメインのコンセンサス配列に基づく合成的な可変ドメインでもよい。

40

## 【0050】

好適な可変ドメインフレームワークは、抗 T G F ベータ 1 抗体結合組成物の態様の生物学的性質 (すなわち、成熟 T G F ベータ 2 及び / 又は T G F ベータ 3 ではなく成熟 T G F ベータ 1 に、特異的に及び / 又は選択的に結合し、成熟 T G F ベータ 1 を中和する機能) に

50

大きく影響を及ぼさないものである。より好ましくは、ヒト被験者に（たとえば、非経口的に）投与した際に、有意な免疫反応を誘発しないフレームワークである。好適なフレームワーク配列は、天然に存在するヒト抗体、又は複数のヒト抗体のコンセンサス配列であってよい。本発明の抗体の態様の重鎖可変領域のフレームワーク配列の非限定的な例には、VH segment DP-5 (Tomlinsonら、1992 J. Mol. Biol. 227:776-98) 及び、J segment JH4、JH1、又はJH5 (Ravetchら、1981 Cell 27:583-91) が含まれる。VkセグメントL1 (Coxら、1994 Eur. J. Immunol. 24:827-36) 及びJ segment Jk4 (Hieterら、1982 J. Biol. Chem 10:1516-22) は、軽鎖可変領域のフレームワーク配列の非限定的な例である。好ましい一態様において、HCVR FR1フレームワークはQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS [配列番号8] を含み、HCVR FR2フレームワークはWVRQAPGQGLEWMG [配列番号9] を含み、HCVR FR3フレームワークはRVTMTTDTSTSTAYMELRSLSRDDTAVYYCAR [配列番号10] を含み、HCVR FR4フレームワークはWGQGTLLVTVSS [配列番号11] を含む。他の好ましい一態様として、LCVR FR1フレームワークはDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC [配列番号12] を含み、LCVR FR2フレームワークは [配列番号13-36] から選択される配列を含み、LCVR FR3フレームワークはGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYC [配列番号37] を含み、LCVR FR4フレームワークはFGQGTKLEIK [配列番号38] を含む。より好ましい一態様において、このようなフレームワーク領域には、変更、欠失、付加、置換、又はそれらの組み合わせすべてが含まれうる。さらに、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個のアミノ酸が、任意の組み合わせで置換、欠失、又は付加されたフレームワークも好ましい。

#### 【0051】

一態様において、本発明の抗体結合組成物CDRを埋め込むのに用いられる好適な重鎖定常領域には、たとえば、IgG定常領域が含まれる。より好ましい一態様では、IgG定常領域は、以下に示すようにIgG1定常領域又はIgG4定常領域である。

IgG1 [配列番号39] :

STKGPVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTCPCPCAPELLGGPSVFLFPKPKDITLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLSPG又は、

IgG4 [配列番号40]

ASTKGPVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPCAPEFLGGPSVFLFPKPKDITLMISRTPPEVTCVVVDVSDQEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGL

#### 【0052】

本発明の好適な軽鎖定常領域配列は、以下に示されるカッパ鎖定常領域である。RTV

A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V  
D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K  
V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C [ 配列番号 4 1 ]

【 0 0 5 3 】

他の好ましい態様（抗体）において、結合性組成物は I g G 1 重鎖定常領域又は I g G 4 重鎖定常領域、及びカッパ軽鎖定常領域を含む。

【 0 0 5 4 】

本願明細書において開示されている情報から、従来技術における当業者は、No. 46 P - L 1 - 6 のような、以下を含む軽鎖と重鎖を有する本発明の 1 m A b 態様を作成できる。

10

軽鎖：D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C E A S S S V S Y M H W Y Q Q  
K P G K A P K P L I Y A T S N L A S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L  
Q P E D F A T Y Y C Q Q W D L N P P A F G Q G T K L E I K R T V A A P S V F I F  
P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N  
S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H  
Q G L S S P V T K S F N R G E C [ 配列番号 1 3 0 ] L C V R FR 1 フレームワーク  
= D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C [ 配列番号 1 2 ] V L C D R 1 =  
式 X<sub>1</sub> A X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> V X<sub>5</sub> Y M H [ 配列番号 5 ] ( X<sub>1</sub> は R、Y、E 又は Q であり、X<sub>2</sub>  
は S 又は T であり、X<sub>3</sub> は S、V、又は A であり、X<sub>4</sub> は S 又は L であり、X<sub>5</sub> は S、  
P、L 又は Y である ) の E A S S S V S Y M H [ 配列番号 1 3 8 ] L C V R FR 2 フレ  
ームワーク = W Y Q Q K P G K A P K P L I Y [ 配列番号 1 3 ] V L C D R 2 = 式 A T  
S N X<sub>1</sub> A X<sub>2</sub> [ 配列番号 6 ] ( X<sub>1</sub> は L、N 又は P であり、X<sub>2</sub> は、S、K、Y、L、  
M、F、E、Q、R 又は H である ) の A T S N L A S [ 配列番号 1 3 9 ] L C V R FR  
3 フレームワーク = G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y  
C [ 配列番号 3 7 ] V L C D R 3 = 式 X<sub>1</sub> Q W D X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> P A [ 配列番号 7 ] ( こ  
こで X<sub>1</sub> は、Q 又は S であり、X<sub>2</sub> は L、D、P のいずれかであり、X<sub>3</sub> は、N 又は R で  
あり、X<sub>4</sub> は、P、F、Y、R のいずれかである ) の Q Q W D L N P P A [ 配列番号 1 4  
0 ] L C V R FR 4 フレームワーク = F G Q G T K L E I K [ 配列番号 3 8 ] 軽鎖定常  
領域 = R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A  
K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A  
D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C [ 配列番号 4 1 ]

20

30

重鎖：Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T D Y N M H W V  
R Q A P G Q G L E W M G Y I Y P Y D G D T G Y N Q K F K S R V T M T T D T S T S  
T A Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C A R G Y R W F A Y W G Q G T L V T V S S A  
S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W  
N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y  
T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G P S V F  
L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G  
V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C  
K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N  
Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D  
G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L  
S L S L G [ 配列番号 1 3 1 ] H C V R FR 1 フレームワーク = Q V Q L V Q S G A E  
V K K P G A S V K V S C K A S [ 配列番号 8 ] V H C D R 1 = 式 G Y X<sub>1</sub> F X<sub>2</sub> D Y  
N X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> G Y T F T D Y N M H [ 配列番号 2 ] ( X<sub>1</sub> は T 又は D であり、X<sub>2</sub> は T、  
E、又は F であり、X<sub>3</sub> は M、I、L、又は V であり、X<sub>4</sub> は H、V、又は A である ) の  
G Y T F T D Y N M H [ 配列番号 1 4 1 ] H C V R FR 2 フレームワーク = W V R Q A  
P G Q G L E W M G G Y T F T D Y N M H [ 配列番号 9 ] V H C D R 2 = 式 X<sub>1</sub> X<sub>2</sub>  
Y P Y D G X<sub>3</sub> T G X<sub>4</sub> N X<sub>5</sub> K X<sub>6</sub> K S [ 配列番号 3 ] ( X<sub>1</sub> は、Y、Q、S のいずれ  
かであり、X<sub>2</sub> は、I 又は V であり、X<sub>3</sub> は、D 又は E であり、X<sub>4</sub> は Y、T、H、L の

40

50

いずれかであり、 $X_5$  は、Q、K、P、Sのいずれかであり、 $X_6$  は、F又はYである)のYIYPYDGD TGYNQKFKS GYTF T DYNMH [配列番号142] HCVR FR3フレームワーク = RVTMT TDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR YIYPYDGD TGYNQKFKS GYTF T DYNMH [配列番号10] VH CDR3 = 式GYRX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>Y [配列番号4] ( $X_1$  はWかAであり、 $X_2$  はFかLであり、 $X_3$  はA、E又はYである)のGYRWFAY [配列番号143] HCVR FR4フレームワーク = WGQGT LVT VSS [配列番号11] 重鎖定常領域 = ASTKGP S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G [配列番号40]である。

#### 【0055】

抗体をコードするポリヌクレオチド

本発明はさらに、結合性組成物(又はその断片)をエンコードするポリヌクレオチド配列又は本発明のポリペプチド配列を含む核酸分子を包含する。上記ポリヌクレオチドを得ることができ、及び、周知の方法(たとえば、(抗体又はその断片の)によってポリペプチド配列が明らかである場合、ポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドは、任意のコンピュータアルゴリズムで遺伝子コードの縮重を用いることで容易に判定できる)によって判定したポリヌクレオチドのヌクレオチド配列と、得られた配列情報を用いることにより、たとえば化学合成されたオリゴヌクレオチドを構築することができる(たとえば、Kutmeierら、(1994) *BioTechniques* 17:242に記載)。このステップは、簡潔に説明するならば、ポリペプチド配列をエンコードする配列部分を含む重複するオリゴヌクレオチドを合成し、これらのオリゴヌクレオチドをアニーリング及びライゲーションし、次いで、PCR法を使用して、ライゲーションしたオリゴヌクレオチドを増幅する。

#### 【0056】

あるいは、本発明のポリペプチド配列をエンコードするポリヌクレオチドは、任意の適切な発生種から生成された核酸からでも生成できる。特定の抗体をエンコードする核酸分子を含むクローンが利用できない場合においても、上記抗体の分子の配列が明らかになれば、イムノグロブリンをエンコードする核酸は、化学合成、又は適切なソースから得ることができる。たとえば、ソースは、対象の抗体を発現する任意の組織又は細胞(たとえば、対象となるポリヌクレオチド配列の3'及び5'端にハイブリダイズ可能な合成プライマを使用したPCR増幅により、本発明の抗体を発現するよう選択されたハイブリドーマ細胞)から分離された、抗体cDNAライブラリ又はポリA+RNAから生成されたcDNAライブラリであってよい。又は、同定したい特定の遺伝子配列(たとえば、上記抗体をエンコードするcDNAライブラリからのcDNAクローン)に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用したクローニングにより、上記抗体の核酸分子を生成できる。

#### 【0057】

増幅された核酸は、任意の技術周知の方法を使用して、複製可能なクローニングベクターにクローン化することが可能である。抗体のヌクレオチド及び対応するアミノ酸配列が決定されれば、任意の周知の方法(たとえば、組換えDNA技術、部位指定変異、PCRなど)を用いて、抗体のヌクレオチド配列を操作し、異なるアミノ酸配列を有する抗体を生成してアミノ酸の置換、欠失、挿入、及び/又は付加を実施することができる(たとえば、Sambrookら、及びAusubelら編、*current Current*

10

20

30

40

50

Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、NY参照)。

【0058】

特定の一態様において、重鎖及び/又は軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を周知の方法で検査することにより、相補性決定領域(CDR)の配列を同定可能である。たとえば、他の重鎖及び軽鎖可変領域の周知のアミノ酸配列と比較することにより、配列の超可変性領域を決定できる。慣習的な組換えDNA技術を使用して、本願明細書において記載されている1つ又は複数のCDRを、適切なフレームワーク領域内に挿入することができる。たとえば、免疫原性を減少させるためにヒトフレームワーク内に挿入することが可能である。フレームワーク領域は、天然由来であっても、又はコンセンサスフレームワーク領域(又は本願明細書において教示されるとおり)であってもよく、好ましくは、ヒトのフレームワーク領域である(ヒトのフレームワーク領域の一覧は、たとえばChothiaら、1998 J. Mol. Biol. 278: 457-79を参照)。一般的に、抗原結合部位の整合性に影響を与える可能性が高いヒトのフレームワーク内の残基を同定するには、ドナー及び選択されたヒトのアクセプター配列の両方を、抗体レパートリに由来するいくつかの配列テンプレートに整列配置すればよい。「Invariant residues」(Kabataら、1991)及び「key residues」(Chothiaら、1989)は同定されており、ドナー-抗原結合ループL1-L3、H1及びH2(順に)の標準クラスへの配列は、配列テンプレートに対して配列をスクリーニングすることによって決定される(Martin及びThornton、1996 Mol. Biol. 263: 800-15、<http://www.bioinf.org.uk/>)。さらに、VH/VLインタフェースにおける残基(Chothiaら、1985)及びコア部位に構造的に保存されることが公知である残基(Chothiaら、1998)が、対応するドナー及びアクセプター残基と比較される。これらの部位にある一致しないドナー及びアクセプターフレームワーク残基は、Protein Data Bankの周知の構造を有する他の抗体の情報に基づき解析される(Bermanら、2000 Nucleic Acids Res. 28(1): 235-42)。異質なV領域のヒト化において、テンプレートとして使用するヒトフレームワークの選択が、次ぎにどの残基をヒト化するかという判断を決定する。相同的なテンプレートは、周知の結晶構造を有する抗体から、生殖細胞系、非生殖細胞系、又は利用可能なデータベースに由来するコンセンサス配列から選択することができる。(これについての議論は、たとえばRoutledgeら(Routledgeら、1993 in Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man (Clark, M., ed) pp. 14-44, Academic Titles, Nottingham, UK、及びB. Lo、2004 Antibody Engineering: Methods and Protocols, Humana Press)を参照。抗体をヒト化する他の方法は、ドナーCDRを受け入れるフレームワークとして、最も近いヒトの生殖細胞系配列(Tomlinsonら、1992)を選択することである。この生殖細胞系アプローチは、最適な方法と同じ原理に基づいているが、データベースにおいて生殖細胞系配列だけを検索する(たとえば、VBASE参照。これは、公開されている1000を超える配列から収集(GenbankやEMBLデータライブラリの最近の発表もこれに含まれる)されたすべてのヒト生殖細胞系可変領域配列の包括的なディレクトリである。VBASEデータベースは、MRC Center for Protein Engineering(英国、ケンブリッジ)において、ヒト抗体遺伝子のシーケンシング及びマッピングの研究の延長として、或いは、解析用のユーザーフレンドリーなツールを提供することを目的として、数年かけて開発された)。ヒトの生殖細胞系配列は潜在的な免疫原性な体細胞超変異を示さないため、生殖細胞系フレームワークを用いる方法は極めて有用である。コンセンサスヒト生殖細胞系の方法を用いて、CDRをヒトフレームワークに移植又は埋め込むこともできる。フレームワークとして、ヒトの部分群

10

20

30

40

50

のうちの1つを使用する(たとえば、Prestara、1993 J. Immunol 151:2623-32、Coutora、1994 Hybridoma、13:215-9、Coutora、1995 Cancer Res. (Suppl.)、55、5973s-7s、Werthera、1996 J. Immunol.、157:4986-95、O'Connora、1998 Protein Engng 11:321-8参照)。

【0059】

好ましくは、フレームワーク配列とCDRの組み合わせにより生成されたポリヌクレオチドは、特異的及び/又は選択的にTGFベータ1(又はそのエピトープ)に結合する抗体(又はその断片)をエンコードする。好ましくは、本願明細書において述べられるように、その抗原に対する抗体の結合を改善するため、1又は複数のアミノ酸置換がフレームワーク領域内で作られる。

10

【0060】

加えて、このような方法を用いて、1又は複数の可変領域で、鎖内ジスルフィド結合に關与するシステイン残基のアミノ酸置換又は欠失させ、1又は複数の鎖内ジスルフィド結合が欠失している抗体分子を生成することができる。ポリヌクレオチドに対する他の改変も、本発明及び、分子生物学者などの当業者の技術の範囲内に包含される。

【0061】

あるいは、周知の技術を応用し、単鎖抗体を作製することができる(たとえば、米国特許第4946778号明細書、Birda、Science 242:423-42の(1988)、Hustona、PNAS 85:5879-5883(1988)、Warda、Nature 334:544-54(1989)を参照)。単鎖抗体はアンモ酸架橋を介してFv領域の重鎖及び軽鎖断片を連結することによって形成される。その結果、単鎖ポリペプチドとなる。大腸菌の機能的Fv断片の構築技術を用いることもできる(Skerrara、(1988)Science 242:1038-1041)。

20

【0062】

ポリペプチド断片

本発明には、結合性組成物の断片も包含される。「ポリペプチド断片又はセグメント」という表現には、本願明細書において記載される配列の一部又は配列番号のポリペプチド配列の一部であるアミノ酸配列が包含される。タンパク質及び/又はポリペプチド断片又はセグメントは、「独立して存在」していてもよく、又は、大きいポリペプチド又はタンパク質(その断片又はセグメントが、部分又は領域を形成するものであり、たとえば、配列番号(本願明細書では、融合タンパク質内に接続されている)の単一の連続した領域)の一部を含んでいてもよい。

30

【0063】

好ましくは、ポリペプチドセグメントの長さは、少なくとも約7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、110、120、130、140、又は150の隣接するアミノ酸の長さである。この文脈では、「約」とは、たとえば、本願明細書で具体的に記載されている範囲又は値を含むほか、さらに、上記に列挙された値が、断片の両端若しくは片方の端においてアミノ酸残基の数といくつか異なる値(たとえば、アミノ酸残基の数 $\pm 5$ 、 $\pm 4$ 、 $\pm 3$ 、 $\pm 2$ 、 $\pm 1$ )を包含する。このようなポリペプチド断片をエンコードするポリヌクレオチドが、本発明によって包含される。

40

【0064】

さらに、本発明は、複数の上記アミノ酸セグメント又は断片(たとえば、オーバーラップしていない特定の長さのセグメント)を含むタンパク質又はポリペプチドを包含する。通常、「複数」とは、少なくとも2、より一般的には、少なくとも3、好ましくは、少なくとも4、5、6、7、8、9又はそれ以上である。1つのセグメントの長さの下限値は

50

指定されており、任意の特定の複数のセグメントについても、さまざまな大きさにおける最大長が包含される。たとえば、複数の3つのセグメントには、全長が隣接アミノ酸7である1つのセグメントと、長さがそれぞれ12である2つのオーバーラップしていないセグメントを含まむことができる。

#### 【0065】

また好ましくは、構造的ドメイン又は機能的ドメインを特徴とするポリペプチド断片又はセグメント（及びそれに対応するポリヌクレオチド断片）である。たとえば、相補性決定領域（CDR、たとえばVL又はVH、CDR1、CDR2、又はCDR3）、可変領域（たとえば、重鎖又は軽鎖可変領域、VL又はVHの可変領域）、フレームワーク領域（FH1、2、3、又は4）、D又はJ領域、定常領域（たとえば、CL、CH1、CH2又はCH3）、ヒンジ領域、Fcガンマ受容体-結合領域、ヘリックス及びヘリックス形成領域、ベータシート及びベータシート形成領域、ターン及びターン形成領域、コイル及びコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、両親媒性領域、両親媒性領域、可撓性領域、ループ領域、ヘアピンドメイン、モチーフ、ヘリックス束、 $\alpha$ パレル、アップダウンパレル、ゼリーロール又はスイスロールモチーフ、膜貫通ドメイン、表面形成領域、基質結合性領域、膜貫通領域、リンカー、免疫原性領域、エピトープ領域、高抗原インデックス領域などである。さらに、これらの領域をエンコードするポリヌクレオチドも包含される。

10

#### 【0066】

他の好ましいポリペプチド断片は、生物活性な断片である。生物活性な断片は、結合性組成物ポリペプチド（又はその断片）（たとえばFab、Fv、scFv又はF(ab)<sub>2</sub>）の活性に類似であるが必ずしも同一でない活性を呈するものである。本発明は、これらのポリペプチド断片をエンコードするポリヌクレオチドを包含する。

20

#### 【0067】

好ましくは、ポリヌクレオチド断片は、機能活性を呈するポリペプチドをエンコードする。「機能活性」という用語は、1又は複数の周知の機能活性を達成することができるポリペプチドセグメントを包含する。このような機能活性には、たとえば、これらに限定されるものではないが、生物学的活性、抗原性〔本発明のポリペプチドに対する抗体結合組成物と結合する（又はポリペプチドと結合を競合する）能力〕、免疫原性（本発明のポリペプチドと結合する抗体を生成する能力）、本発明のポリペプチドを有する多量体を形成する能力、及び本願明細書において記載されているポリペプチドの受容体又はリガンドと結合する能力が包含される。

30

#### 【0068】

ポリペプチド（その断片、変異体、誘導体及び類縁体を含む）の機能活性は、さまざまな方法によって分析することができる。たとえば、本発明のポリペプチドの抗体と結合するため、本発明の全長ポリペプチドに結合又は競合する能力を分析する場合、公知技術のさまざまなイムノアッセイを用いることができる。たとえば、これらに限定されるものではないが、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素免疫測定法）、サンドイッチイムノアッセイ、免疫放射定量分析法、ゲル内拡散沈降素反応、免疫拡散法、*in situ*のイムノアッセイ（たとえば、コロイド金、酵素又はラジオアイソトープ標識を使用）、ウエスタンブロット法、沈降反応、アグルチネーション試験法（たとえばゲルアグルチネーション法、赤血球凝集反応、補体結合法、免疫蛍光検査、プロテインAアッセイ、及び免疫電気泳動法など）などの技術を使用する競合性及び非競合性のアッセイシステムがこれに含まれる。

40

#### 【0069】

別の一態様では、抗体の結合は、一次抗体の標識を検出することによって達成される。別の一態様では、二次抗体又は試薬による一次抗体への結合を検出することによって、一次抗体が検出される。さらに別の一態様では、二次抗体が標識化される。イムノアッセイにおいて結合を検出する方法としては、数多くの手段が当該技術において周知であり、本発明の範囲内である。

50

## 【0070】

別の態様では、リガンドを同定し、或いは、本発明のポリペプチド断片、変異体、又は誘導体の多重結合する能力を評価し、結合を分析することができる。たとえば、還元及び非還元ゲルクロマトグラフィー、タンパク質親和性-クロマトグラフィー、及び親和性プロッティング（一般的には *Phizicky*ら（1995）、*Microbial. Rev.* 59:94-123を参照）を用いて分析する。別の態様では、基質（細胞情報伝達）に対するポリペプチド結合の生理学的な関連要因は、一般的技術によって分析できる。加えて、本願明細書において記載（本願の「実施例」セクション参照）の分析法、或いは、従来技術において周知の分析法は、結合性組成物（その断片、変異体、誘導体、及び類縁体）のTGFβ1に関連する生物活性（*in vitro*又は*in vivo*）を調整するための性能を測定するために日常的に適用できる。

10

## 抗体産生方法

## 【0071】

抗体結合組成物は、任意の公知技術の方法を使っても産生できる。すなわち、化学合成、又は、好ましくは、組換え発現技術である。

## 【0072】

結合性組成物若しくはその断片、誘導体又は類縁体（たとえば本発明の抗体の重鎖又は軽鎖、若しくは本発明の単鎖抗体）の組換え発現には、抗体をエンコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターの作成が必要である。本発明の抗体分子若しくは抗体の重鎖又は軽鎖をエンコードするポリヌクレオチド配列又はその一部分（好ましくは、重鎖又は軽鎖可変ドメインを含む）を得れば、抗体分子を産生するベクターを周知の組換えDNA技術によって産生できる。

20

## 【0073】

結合性組成物のコード配列及び適切な転写並びに翻訳の制御シグナルを含む発現ベクターは、公知技術の方法を使って作成できる。これらの方法には、たとえば、これらに限定されるものではないが、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術、及び*in vivo*遺伝的組換えが包含される。つまり本発明は、本発明の抗体（又はその断片）若しくはその重鎖又は軽鎖若しくは重鎖又は軽鎖可変領域若しくはプロモーターと操作可能に連結されたCDRをエンコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを包含する。このようなベクターには、たとえば、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列（国際公開第86/05807号パンフレット、国際公開第89/01036号パンフレット、又は米国特許第5122464号明細書）が含まれ、上記抗体の可変ドメインをこのようなベクターにクローンすることにより、重鎖又は軽鎖全体若しくはその一部を発現させることができる。

30

## 【0074】

一般的に、従来技術によって発現ベクターを宿主細胞へ転送し、次いでトランスフェクション細胞を培養して抗体又はその一部を産生する。つまり、本発明には、たとえば、本発明の抗体をエンコードしているポリヌクレオチドを含む宿主細胞、又はその重鎖又は軽鎖若しくは非相同のプロモーターに操作可能に連結された単鎖抗体が含まれる。二重鎖抗体の発現のための好ましい態様において、本願明細書において詳述されるか又は従来技術において公知であるとおり、重鎖及び軽鎖の両方をエンコードしているベクターは、免疫グロブリン分子全体を発現するために、宿主細胞において共発現することができる。

40

## 【0075】

本発明の抗体分子は、さまざまな宿主発現ベクター系を使用して発現することができる。このような宿主発現系は、対象となる任意のコード配列も生成及び次いで精製することのできる媒介物を表す。しかしながら、宿主発現系細胞は、適切なヌクレオチドコード配列によってトランスフォーム又はトランスフェクトされた際に、その位置で本発明の抗体分子を発現することもできる。これらの細胞には、たとえば、限定されるものではないが、以下のものが含まれる。微生物（たとえば抗体コード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA又はコスミドDNA発現ベクターによってトランスフォー

50

ムされた細菌（たとえば大腸菌、枯草菌）、抗体コード配列を含む組換え酵母菌発現ベクターによってトランスフォームされた酵母菌（たとえばサッカロミセス、ピキア）、抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（たとえばかん状ウイルス）に感染した昆虫細胞系、組換えウイルス発現ベクター（たとえば、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）、タバコモザイクウイルス（TMV））に感染した、又は抗体コード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（たとえばTiプラスミド）によってトランスフォームされた植物細胞システム、又は、哺乳類細胞のゲノムを由来とするプロモーター（たとえばメタロチオネインプロモーター）又は哺乳類のウイルスを由来とするプロモーター（たとえば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含む組換え発現構造物を宿している哺乳類細胞系。

10

## 【0076】

組換え抗体分子の発現には、好ましくは、大腸菌のような細菌細胞、及び、より好ましくは、真核細胞が使われる。たとえば、ヒト-サイトメガロウイルスからの主要な中間初期遺伝子プロモーター要素のようなベクターと組み合わせたチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）のような哺乳動物細胞は、抗体の有効な発現系である（Foelckingerら（1986）Gene 45:101、Cockettら（1990）Bio/Technology 8:2）。

## 【0077】

細菌系では、発現された抗体分子の用途に合わせ、数多くの発現ベクターを適切に選択できる。たとえば、多量のタンパク質を産生する際（たとえば、抗体分子の医薬組成物を産生するなど）、高濃度の融合タンパク質産生物の発現（直ちに精製可能）を導くベクターが好ましい場合もある。このようなベクターには、たとえば、これらに限定されるものではないが、大腸菌発現ベクターpUR278（Rutherfordら、EMBO J. 2:1791（1983））（融合タンパク質を産生するよう、抗体コード配列が、ラックZコード領域と同一枠で個別にベクターに結紮される）、pINベクター（Inouye及びInouye、Nucleic Acids Res. 13:3101-3で109（1985）、Van Heeke及びSchuster、J. Biol. Chem. 24:5503-5509（1989））などが含まれる。pGEXベクターは、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）を有する融合タンパク質として異質なポリペプチドを表すために用いることもできる。

20

30

## 【0078】

一般に、そのような融合タンパク質は溶解性で、吸着、及び基質グルタチオンアガロースビーズとの結合、次いで遊離グルタチオンの存在下での溶離によって、溶解された細胞から容易に精製できる。pGEXベクターは、クローン化ターゲット遺伝子産物がGST部分から放出されるよう、たとえば、トロンプイン、又はXa因子プロテアーゼ切断部位を含有するように設計されている。異質な遺伝子を表すベクターとして使用される昆虫システムの1つが、オートグラフィア核多角体病ウイルス（AcNPV）系である。AcNPVウイルスは、ヨトウガ（Spodoptera frugiperda）の細胞において成長する。抗体コード配列は、ウイルスの非必須な部位（たとえばポリヘドリン遺伝子）に個々にクローン化でき、AcNPVプロモーター（たとえばポリヘドリンプロモーター）の制御下におくことができる。

40

## 【0079】

哺乳動物宿主細胞において、多くのウイルス由来の発現系を利用することができる。アデノウイルスが発現ベクターとして使われるケースにおいて、対象となる抗体コード配列は、アデノウイルス転写/翻訳調節複合体（たとえば後期プロモーター及びトリパーティトリダー配列）にライゲーションすることができる。このキメラ遺伝子は、続いて、in vitro又はin vivoでの組み換えを用いて、アデノウイルスゲノムに挿入できる。ウイルスのゲノム（たとえば領域E1又はE3）を必須でない部位へ挿入することにより、感染した宿主内で生存可能であり、抗体分子を発現することができる組換えウイルスが得られる。挿入された抗体コード配列の効率的な翻訳のためには、特定の開始シ

50

グナルが必要となる場合がある。これらのシグナルには、たとえば、A T G 開始コドン及び隣接する配列などが含まれる。さらに、挿入部分全体が適切に翻訳されるためには、開始コドンが、望ましいコード配列の読み取りフレームと一致する必要がある。これらの外因性翻訳制御シグナル及び開始コドンは、種々の起源（天然及び合成）に由来するものであってよい。

#### 【0080】

発現の効率は、適切な転写エンハンサー要素や転写ターミネーターなどを含めることにより改善できる（たとえば、Bittnerら、1987 *Methods in Enzymol.* 153: 51-4）。加えて、特定の所望の方法により、挿入配列の発現を調整する、或いは、遺伝子産物を改質修正及び加工する宿主細胞株を選択することができる。タンパク質産物のこのような改質（たとえばグリコシル化）及び処理（たとえば分解）は、タンパク質の機能にとって重要であり得る。

10

#### 【0081】

様々な宿主細胞は、タンパク質及び遺伝子産物の翻訳後のプロセッシング及び改質のための特性及び特定の機構を有する。発現する異質なタンパクの改質及び処理を確実に正しく実施するために、適当な細胞系又は宿主系を選択することができる。この目的のため、転写一次産物、グリコシル化、及びリン酸エステル化を適切に処理する細胞機構を有する真核の宿主細胞を用いることができる。このような哺乳類宿主細胞には、たとえば、これらに限定されるものではないが、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、及び、特に、たとえば乳がん細胞系（たとえばBT483、Hs578T、HTB2、BT20及びT47D）、及び通常の乳房腺細胞系（たとえばCRL7030及びHs578Bst）が含まれる。

20

#### 【0082】

本発明は、融合タンパク質を生成するために、ポリペプチド（又はその一部、好ましくは、上記ポリペプチドの隣接アミノ酸を少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は100個含む）に組み換えによって融合又は化学的に接合された（共有接合及び非共有接合の両方を含む）抗体を包含する。融合とは、必ずしも直接的である必要はなく、リンカー配列を介して発生することができる。

#### 【0083】

ポリペプチドに融合又は接合された抗体は、*in vitro* イムノアッセイにおいて、及び、公知技術の方法（たとえば、Harbor supra、国際公開第93121232号パンフレット、欧州特許第439095号明細書、Naramuraら、(1994) *Immunol. Lett.* 39: 91-9、米国特許第5474981号明細書、Gilliesら、1992 *PNAS* 89: 1428-32、Fellら、1991 *J. Immunol.* 146: 2446-52参照）を使用する精製法において用いることもできる。

30

#### 【0084】

本発明は更に、可変部以外の抗体領域に融合又は接合されたポリペプチド（又はその断片）を含む組成物を含む。たとえば、本発明のポリペプチド（又はその断片）は、抗体定常領域（D又はJ領域）又はFc領域若しくはその一部に融合又は接合できる。本発明のポリペプチド（又はその断片）に融合された抗体部は、定常領域、ヒンジ領域、CH1領域、CH2領域、及び/又はCH3領域、又はこれらの領域の任意の組み合わせ、又はその一部も含むことができる。ポリペプチド（又はその断片）は、多量体を生成するために、本願明細書において記載される抗体部に融合又は接合できる。たとえば、本発明のポリペプチド（又はその断片）に融合されるFc部は、Fc部同士の間ジスルフィド結合が起きることにより二量体を形成しうる。より高い多量体形が、IgA及びIgM部分にポリペプチドを融合することによって作製できる。抗体部に本発明のポリペプチド（又はその断片）を融合又は接合する方法は、公知である（たとえば、米国特許第5336603号明細書、5622929号明細書、5359046号明細書、5349053号明細書、5447851号明細書、5112946号明細書、欧州特許第307434明細書、

40

50

欧州特許第367166明細書、国際公開第96/04388号パンフレット、国際公開第9106570号パンフレット、Ashkenaziら、(1991)PNAS 88:10535-10539、Zhengら、(1995)J. Immunol. 154:5590-5600、及び、Vieiraら、(1992)PNAS 89:11337-11341参照)。

【0085】

本願明細書において述べられるように、ポリペプチド(ポリペプチド断片)は、本願明細書において記載されている、又は従来技術において公知である抗体部に融合又は接合して、*in vivo*の半減期を延長させることができる。更に、ポリペプチド(ポリペプチド断片)は、抗体部に融合又は接合することにより、精製を促進することができる。一実施例において、ヒトのCD4-ポリペプチドの最初の2つの領域、及び哺乳類の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖定常領域のさまざまな領域を含むキメラタンパク質が使用されている。(たとえば、欧州特許第394,827号明細書、Traunckerら、(1988)Nature 331:84-86参照)

10

【0086】

多くの場合、融合タンパク質のFc部分は治療及び診断において有益であり、すなわち、たとえば、薬物動態学的特性の改良(欧州特許公開第232,262号参照)をもたらすことが考えられる。あるいは、融合タンパク質が発現、欠失、精製した後でFc部分を欠失させることが好ましい。たとえば、融合タンパク質を免疫化のための抗原として使用する場合、Fc部分が治療及び診断の妨げとなることが考えられる。創薬において、たとえば、hIL-5の拮抗剤を同定するための高スループットのスクリーニング法を目的として、ヒトのタンパク(たとえばhIL-5)がFc部分に融合された(たとえば、Bennettら(1995)J. Molecular Recognition 8:52-58、Johanssonら、(1995)J. Biol. Chem. 270:9459-9471参照)。

20

【0087】

さらに、精製を促進するために、結合性組成物(又はその断片)を標識配列(たとえばペプチド)に融合させることができる。好ましい態様では、標識アミノ酸配列の1つは、ヘキサヒスチジンペプチド(たとえばpQEベクター(QIAGEN社製、カリフォルニア州チャットワース)に設けられたタグ)である。標識アミノ酸配列の多くは市販されている。ヘキサヒスチジンは、融合タンパク質(Gentzら(1989)PNAS 86:821-824)の簡便な精製を可能にする。精製に役立つ他のペプチドタグには、たとえば、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質に由来したエピトープに対応するHAタグ(Wilsonら、(1984)Cell 37:767)及び「フラグ」タグが含まれる。

30

【0088】

本発明はさらに、診断又は治療用の薬剤に接合された本発明の抗体又は断片を包含する。上記抗体は、所与の治療計画の有効性を判定するために、たとえば、臨床的な検査手順の一部として腫瘍の発現又は進行をモニタするなどの目的で診断において使用できる。検出は、検出可能な物質に抗体をカップリングさせることにより容易になる。検出可能な物質の例には、たとえば、さまざまな酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、さまざまな陽電子放出断層撮影を用いた陽電子放出金属、及び非放射性の定磁性金属イオンが含まれる。検出可能な実体は、確立した技術(本発明による診断使用のために抗体に接合することができる金属イオンについて、米国特許第4741900号明細書参照)を用いて、抗体(又はその断片)に直接、又は中間体(たとえば、当該技術で周知のリンカー)を介して間接的に、連関又は接合されることができる。好適な酵素の例には、たとえば、これらに限定されるものではないが、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ガラクトシダーゼ又はアセチルコリンエステラーゼが含まれる。好適な補欠分子団複合体の例には、たとえば、これらに限定されるものではないが、ストレプトアビジン/ビオチン、及びアビジン/ビオチンが含まれる。好適な蛍光

40

50

物質の例には、たとえば、これらに限定されるものではないが、ウンベリフェロン、フルオレsein、フルオレseinイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレsein、ダンシルクロリド又はフィコエリトリンが含まれる。発光物質の例には、たとえば、これらに限定されるものではないが、ルミノールが含まれる。生物発光物質の例には、たとえば、これらに限定されるものではないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン及びアエクオリンが含まれる。好適な放射性物質の例には、たとえば、 $I^{125}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{111}$ 又は $Tc^{99}$ が含まれる。

#### 【0089】

本発明の結合性組成物は固体の支持体に付着させることもでき、これは特に、標的抗原のイムノアッセイ又は精製に有用である。このような担体には、たとえば、これらに限定されるものではないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル又はポリプロピレンが含まれる。抗体に治療用部分を接合するための技術は、公知である。たとえば、Amonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeldら編、pp. 243 - 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)、Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」、Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)、Robinsonら編、pp. 623 - 53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)、Thorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications、Pincheraら編、pp. 475 - 506 (1985)、「Analysis, Results, and Future Prospective of THE Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy、Baldwinら編、pp. 303 - 16 (Academic Press 1985)、及びThorpeら、「The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates」Immunol. Rev. 62: 119 - 58 (1982)を参照。

#### 【0090】

##### B. イムノアッセイ

TGFベータ1のような特定のタンパク質は、さまざまなイムノアッセイ法、たとえば、これらに限定されるものではないが、ウエスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ、ELISA (酵素結合免疫測定法)、サンドイッチイムノアッセイ、免疫沈降法、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散法、アグルチネーション法、補体結合法、免疫放射定量測定法、蛍光免疫法及びプロテインAイムノアッセイなどの技術を使用する、競合性及び非競合性のアッセイシステムによって測定することができる。一般的な免疫学的手法やイムノアッセイ法についての議論は、Stites及びTerr編、(1991) Basic and Clinical Immunology (7th ed.)を参照。さらに、本発明のイムノアッセイは、数多くの構成において実施することができる。これらの構成については、Maggio編、(1980) Enzyme Immunoassay CRC Press、Boca Raton、Florida、Gosling J P 2000 Immunoassays: A Practical Approach (Practical Approach Series) Oxford Univ Press、Diamandis及びChristopoulos、1996 Immunoassay Academic Press、San Diego、CA、Tijan (1985)、「Practice and Theory of Enzyme I

10

20

30

40

50

mmunoassays, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Wild, D編、2001 The Immunoassay Handbook (2nd edition) Nature Pub Group, James T. Wu, 2000 Quantitative Immunoassay: A Practical Guide for Assay Establishment, Troubleshooting, and Clinical Application, Amer Assn for Clinical Chemistry, Brousseau及びBeaudet編、Manual of Immunological Methods CRC Press Boca Raton, Florida, 及びHarlow及びLane, Antibodies, A Laboratory Manual, supraで詳細にわたり論じられている。また、Chan編(1987) Immunoassay: A Practical Guide, Academic Press, Orlando, FL, Price及びNewman編(1991) Principles and Practice of Immunoassays, Stockton Press, NY, 及びNgo編(1988) Non-isotopic Immunoassays, Plenum Press, NY。

#### 【0091】

測定のためのイムノアッセイは、さまざまな技術周知の方法によって実施できる。簡単に言えば、タンパク質を測定するイムノアッセイは、競合性又は非競合性、いずれの結合アッセイであってもよい。競合的結合アッセイにおいて、分析される試料は、固体表面に結合された補足剤上の特定の結合部位に対して標識化された検体と競合する。好ましくは、上記補足剤は、本願明細書において記載されているTGFベータ1タンパク質に特異的に反応する抗体である。補足剤に結合された標識検体の濃度は、試料中に存在する遊離検体の量に反比例する。

#### 【0092】

競合的結合イムノアッセイにおいて、試料中に存在する標的タンパク質は、特定の結合性組成物(たとえば、標的タンパク質に対して特異的及び/又は選択的に反応する結合性組成物(抗体など))に対する標識タンパク質と競合する。結合性組成物は、結合標識タンパク質を非結合標識タンパク質から分離できるようにするために、固体表面に結合できる。あるいは、競合的結合アッセイは、非結合標識タンパク質から結合標識タンパク質を分離するために、液相内で実施することも、また、公知技術のさまざまな手法を用いて実施することもできる。分離後、結合標識タンパク質の量を測定する。試料内に存在するタンパク質の量は、標識化されたタンパク質結合の量に反比例する。

#### 【0093】

あるいは、分離のステップによって不要なホモジニアスイムノアッセイを実施することもできる。これらのイムノアッセイにおいて、タンパク質が、そのタンパク質に特異的な結合性組成物に結合することにより、上記タンパク質上の標識が変化する。標識タンパク質におけるこの変化は、標識によって放射されるシグナルの減少又は増加をもたらす。これにより、イムノアッセイ終了時に標識を測定することで、タンパク質の検出又は定量化が可能になる。

#### 【0094】

また、競合アッセイも特に有用である。ここでは、細胞が、標識化された結合パートナー又は上記タンパク質に対する周知の結合能を持つ抗体(たとえば<sup>125</sup>I-抗体)、及び結合性組成物に対する結合能が測定される試験サンプルによって接触及びインキュベーションされる。次いで、タンパク質結合の程度を評価するため、結合され、ラベルフリーの結合性組成物を分離する。結合される検査化合物の量は、周知のソースに結合している標識結合パートナーの量に反比例する。数多くある技術のいずれかを用いて、タンパク質結合の程度を評価するために、結合を遊離タンパク質から分離することができる。概して

この分離ステップには、細胞膜を、たとえばフィルタへ接着後に洗浄、プラスチックへ接着後に洗浄、或いは、遠心分離するなどの手順を含むことができる。TGFベータタンパク質が媒介する機能（たとえば、第二メッセンジャーの標識（たとえば細胞増殖）、リン酸イノシトールプールの変化、ルシフェラーゼタイプのアッセイを使用した転写など）に対する薬物の効果をスクリーニングするために、生菌を使用することもできる。一部の検出法では、分離ステップを排除できる（たとえば、接近感性検出システム）。

#### 【0095】

タンパク質の質的又は量的解析は、さまざまな非競合性イムノアッセイ法で測定できる。たとえば、2サイト固相サンドイッチイムノアッセイを用いることができる。このようなアッセイにおいては、タンパク質（たとえば抗体）用の結合性組成物が、担体に付着される。異なる部位でタンパク質に結合する2番目のタンパク質結合性組成物（こちらも抗体であってよい）が、標識化される。タンパク質上の両方の部位に結合が成立した後、結合されていない標識結合性組成物を取り除き、固相に結合された標識結合性組成物の量を測定する。結合した標識結合性組成物の量は、試料内のタンパク質の量に正比例する。

10

#### 【0096】

以上に記載したイムノアッセイのフォーマットでは、標識アッセイ要素を使用する。標識は、公知技術の方法により、アッセイの所望の要素に、直接的又は間接的にカップリングすることができる。様々な標識及び方法を用いることができる。従来は、放射性の標識が配合された<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C又は<sup>32</sup>Pが使われた。非放射性の標識にはタンパク質が含まれ、このタンパク質が、標識タンパク質に対する特異性結合ペアのメンバーとしての役割を果たすことのできる標識化された抗体、蛍光物質、化学発光材料、酵素、及び抗体に結合する。標識は、感性の要件、化合物に対する接合の容易さ、安定性の要件、及び利用可能な器具によって選択される。使用可能なさまざまな標識化、又はシグナル生成システムについての議論は、特許第4391904号明細書を参照。

20

#### 【0097】

特定のタンパク質に反応する抗体結合組成物は、種々のイムノアッセイ法で測定することもできる。イムノアッセイ技術によって抗体を測定する際に適用できる免疫学的手順又はイムノアッセイの手順についての議論は、Stites及びTerr編、Basic and Clinical Immunology (7th ed.) supra、Maggio編、Enzyme Immunoassay、supra、Harlow及びLane、Using Antibodies, A Laboratory Manual、supraを参照。

30

#### 【0098】

簡単に言えば、標的タンパク質に反応する抗血清を測定するイムノアッセイは、競合性又は非競合性、いずれの結合アッセイであってもよい。競合的結合アッセイにおいて、サンプル検体は、固体表面に結合された補足剤上の特定の結合部位への結合を、標識化された検体と競合する。好ましくは、捕捉剤は、精製組換えタンパク質である。他のタンパク源（たとえば、単離した、或いは、部分的に精製した自然由来のタンパク質）を用いることもできる。非競合性アッセイには、サンドイッチ法が含まれる。サンドイッチ法では、サンプル検体は2つの検体特異性結合性試薬の間に結合される。結合性組成物の1つは、捕捉剤として使われ、固体表面に結合する。第2の結合性組成物は、標識化され、結果として生じる複合体を視覚的手段又は計測手段によって測定又は検出するために用いられる。捕捉剤と標識結合性組成物は、様々な組み合わせで用いることができる。タンパク質の測定には、様々なイムノアッセイフォーマット、分離手法、及び標識を上記のものと同様に用いることができる。

40

#### 【0099】

たとえば、対象となる抗体の、特定の抗原を免疫沈降する性能は、ウエスタンブロット解析によって評価することができる。パラメータを変更して、抗体の抗原への結合を改善させたり、バックグラウンドを減少させたりすることが可能であることは、当業者には周知である（たとえば、セファロースビーズを用いて細胞可溶化物をあらかじめ除去する）

50

。免疫沈降プロトコールに関する詳細な議論は、たとえば、Ausubelら編、1994、*Current Protocols in Molecular Biology*、Vol. 1、John Wiley & Sons, Inc.、New Yorkにおいて参照できる。

【0100】

ELISAアッセイには、抗原を準備し、96穴マイクロタイタープレートのウェルに抗原を塗布し、ウェルに酵素基質（たとえば西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリ性ホスファターゼ）などの検出可能な化合物に接合した対象となる抗体を添加し、一定期間インキュベーションし、抗原の存在を検出するというステップが含まれる。ELISAにおいて、対象となる抗体を必ずしも検出可能な化合物に接合する必要はなく、その代わりに、上記抗体を認識する第二抗体を検出可能な化合物に接合し、ウェルに添加してもよい。更に、ウェルに抗原を塗布する代わりに、抗体をウェルに塗布することもできる。この場合、検出可能な化合物に接合された第二抗体は、コーティングされたウェルに対象となる抗原を添加した後に、添加することができる。当業者は、過度の実験を実施することなく、たとえば、シグナルを増加させるにはどのパラメータを調整すべきか、或いは、他のどの種類のELISAを利用すべきかなどを判断できる（たとえば、Ausubelら編、1994、*Current Protocols in Molecular Biology*、Vol. 1、John Wiley & Sons, Inc.、New York参照）。

10

【0101】

抗体の抗原に対する結合能、及び、抗体抗原相互作用のオンレート及びオフレートは、競合的結合アッセイを使用することで測定できる。非限定例の1つは、ラジオイムノアッセイである。ラジオイムノアッセイでは、増加する非標識抗原の存在化において、標識抗原（たとえば<sup>3</sup>H又は<sup>125</sup>Iを用いる）を対象となる抗体と共にインキュベーションし、標識抗体に結合された抗体の量を検出するというステップが含まれる。対象となる抗体の、特定の抗原に対する親和性、及び、結合のオフレートは、たとえば、スキッチャードプロット解析によって、データから測定することができる。第二抗体との競合は、たとえば、ラジオイムノアッセイを使用して測定することもできる。この場合、抗原は、標識化合物（たとえば<sup>3</sup>H又は<sup>125</sup>I）に接合された対象となる抗体と共に、増加する非標識第二抗体の存在下においてインキュベーションされる。

20

30

【0102】

物理的な変異体

本発明はまた、本願明細書に記載されるアミノ酸配列とアミノ酸配列の実質的な類似性及び/又は同一性を有するポリペプチド配列を包含する。アミノ酸の配列類似性又は配列同一性は、残基を同一となるように最適化することによって決定される。このことは、保存的置換を同一であるとみなすときに変化する。保存的置換は、一般的にグリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；リジン、アルギニン；及び、フェニルアラニン、チロシン基内の置換を含む。Needlehamら（1970年）*J. Mol. Biol.* 48: 443 - 453；Sankoffら（1983年）*Time Warps, String Edits, and Macromolecules: Sequence Comparison Chapter One, Theory and Practice*、Addison-Wesley、Reading、MA；及び、IntelliGenetics、Mountain View、CAからのソフトウェアパッケージ；及び、the University of Wisconsin Genetics Computer Group、Madison、WIも参照のこと。

40

【0103】

本発明は、限定されるものではないが、本願のある具体的な配列識別子によってコードされるポリペプチドに機能的に関連するポリペプチド配列を包含する。機能的に関連するポリペプチドは、結合性組成物（たとえば、TGFベータ1には選択的及び/又は特異的

50

に結合するが、TGFベータ2及び/又は3には結合しない能力)と機能特性を共有する任意のポリペプチドを含む。かかる機能的に関連するポリペプチドは、限定されるものではないが、本願明細書に記載される配列によってコードされるアミノ酸配列内のアミノ酸残基の追加又は置換、特にサイレント変化となることによって機能的に等価なポリペプチドを産生するものを含む。アミノ酸置換は、関係する残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性及び/又は両親媒性の性質における類似性に基づいて行なうことができる。

【0104】

たとえば、無極の(疎水)アミノ酸は、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、及びメチオニンを含有し、極性が中性アミノ酸は、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、及びグルタミンを含有し、正に荷電する(塩基の)アミノ酸は、アルギニン、リジン、及びヒスチジンを含有し、負に荷電する(酸性の)アミノ酸は、アスパラギン酸、及びグルタミン酸を含有する。

10

【0105】

さらにまた、非古典的なアミノ酸又は化学アミノ酸誘導体は、ポリペプチド配列に置換又は追加される場合がある。非古典的なアミノ酸は、限定されるものではないが、たとえば、一般のアミノ酸のD-異性体、2,4-ジアミノ酪酸、 $\beta$ -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、g-Abu、eAhx、6-アミノヘキサ酸、Aid、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、b-アラニン、フルオロアミノ酸、b-メチルアミノ酸のようなデザイナーアミノ酸、Ca-メチルアミノ酸、Na-メチルアミノ酸、及び一般のアミノ酸誘導体を含む。さらにまた、アミノ酸は、右旋性(D)又は左旋性(L)のいずれかであってよい。

20

【0106】

取り扱いが容易となるペプチド部分の追加は、周知の常套的な技術である。さらに、結合性組成物(その任意の断片及び特にエピトープを含む)は、イムノグロブリン(たとえば、そのIgA、IgE、IgG、IgMの部分(CH1、CH2、CH3)並びに全体のドメイン及びその部分の両方を含むそれらの任意の組み合わせ)の、不変ドメインの部分と組み合わせることができ、キメラポリペプチドが得られる。かかる融合タンパク質は、精製を促進することがあり、タンパク質のin vivoの半減期を増加させることに有用であることが多い。たとえば、このことは、ヒトCD4ポリペプチドの最初の2つのドメイン、及び哺乳類の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の定常領域のさまざまなドメインを含むキメラタンパク質について証明されている(欧州特許第394,827号明細書; Traunckerら、1988年、Nature 331:84-6)。ジスルフィドに結合された二量体の構造(IgGドメインに起因する)を有する融合タンパク質は、他の分子に結合して中和する際に、単遺伝子性の分泌されたタンパク質又は唯一のタンパク質断片よりも効率的であり得る(Fountoulakisら、1995年、J. Biochem. 15, 270:3958-64)。免疫系に対する上皮性関門全体の抗原が増大した送達は、FcR結合しているパートナー(たとえばIgG又はFc断片)に共役される抗原(たとえばインシュリン)について証明されている(たとえば国際公開第96/22024号パンフレット及び国際公開第99/104813号パンフレットを参照のこと)。

30

40

【0107】

加えて、融合タンパク質は、ヒトタンパク質(又はその一部)と共に、免疫グロブリン分子の定常領域のさまざまな部分を含み得る。多くの場合に、融合タンパク質におけるFc部分は、治療及び診断において有益であり、したがって、たとえば改良された薬物動態学的な特性を得ることができる。あるいは、融合タンパク質が発現、検出、及び精製された後に、Fc部分を欠失させることが所望される場合がある。たとえば、融合タンパク質が免疫化のための免疫原として使用される場合には、Fc部分は、治療及び/又は診断

50

を妨げることができる。たとえば薬物発見において、ヒトタンパクは、拮抗剤を確認する高いスループットスクリーニングアッセイのために、Fc部分と融合されている。

【0108】

さらにまた、新規な構造体は、他のタンパクから類似の機能的ドメインを組み合わせることによって作製できる。たとえば、タンパク結合又は他のセグメントは、異なる新たな融合ポリペプチド又は断片の間で「交換」できる。したがって、特異性の新しい組み合わせを呈する新しいキメラポリペプチドは、タンパク結合特異性及び他の機能的ドメインの機能的結合から生じる。加えて、融合構造は、遺伝子シャフリング、モチーフシャフリング、エクソンシャフリング、及び/又はコドンシャフリングの技術によって生成できる。

【0109】

「実質的に純粋である」というのは、自然環境から取り出され、他の汚染するタンパク質、核酸、及び他の生物学的製剤から分離及び/又は切り離された、核酸、タンパク質、又はポリペプチドを指す。純度又は「アイソレーション」は、標準的な方法によって検定することができ、通常は少なくとも約50%純粋であり、より通常には少なくとも約60%純粋であり、一般的には少なくとも約70%純粋であり、さらに一般的には少なくとも約80%純粋であり、しばしば少なくとも約85%純粋であり、よりしばしば少なくとも約90%純粋であり、より好ましくは少なくとも約98%純粋であり、最も好ましい態様において少なくとも約99%純粋である。同様の概念は、たとえば結合性組成物（たとえば本発明の抗体など）にあてはまる。たとえば、組換え細胞のタンパク質又はポリペプチドからポリペプチドを精製することが望ましい場合がある。

【0110】

タンパク質又はポリペプチドの「溶解性」は、スベドベリ単位において測定される遠心沈降によって反映される。スベドベリ単位は、特定の条件下での分子の沈降速度の測定である。沈降速度の決定は、古典的には分析用超遠心機において実施されたが、現在では一般的に標準的な超遠心機において実施される（Freifelder、1982年、Physical Biochemistry（第2版）W. H. Freeman & Co., San Francisco, CA; 及び、Cantor及びSchimmel（1980年）Biophysical Chemistryパート1~3、W. H. Freeman & Co., San Francisco, CAを参照のこと）。粗分析定量として、溶解性のポリペプチドを含むと推定されるサンプルは、約10分間にわたり約50Kのrpmで標準的な原寸の超遠心機で回転させ、溶解性の分子を上澄みの中に残す。溶解性の粒子又はポリペプチドは、一般的には約30S未満であり、より一般的には約15S未満であり、通常は約10S未満であり、より通常は約6S未満であり、特定の態様において、好ましくは約4S未満であり、より好ましくは約3S未満である。ポリペプチド又は断片の溶解性は、環境及びポリペプチドに依存する。多くのパラメータは、ポリペプチドの、温度、電解液環境、大きさ及び分子の特性、及び溶剤の性質を含む、ポリペプチド溶解性に影響を及ぼす。一般的に、ポリペプチドが使用される温度は、約4~約65の範囲にわたる。通常、使用における温度は、約18よりも高く、より通常は約22よりも高い。診断目的のため、温度は、通常はほぼ室温以上であるが、アッセイの構成成分の変性融点よりも低い。治療目的のために、温度は通常は体温であり、ヒトについては一般的に約37であるが、特定の状況下で、温度は、in situ又はin vitroで上下する場合がある。ポリペプチドの大きさ及び構造は、一般的には実質的に安定状態にある必要があり、通常は変性状態である必要はない。ポリペプチドは、たとえば溶解性を与えるために四次構造の他のポリペプチドと会合するか、又は天然の脂質二重層相互作用に近い方法で脂質又は洗浄剤と会合することができる。

【0111】

溶剤は、通常は生物活性の保存のために使用し、生物学的に適合性のある緩衝液であって、通常は生理学的な溶剤に近い。通常、溶剤のpHは、一般的にほぼ5~10、好ましくは約7.5、中性である。一部の場において、タンパク質の構造的又は生理学的な特性の有意な破壊を回避するために、一般的に穏やかな非変性の洗浄剤（たとえばCHS（

10

20

30

40

50

コレステリルヘミスクシナート)又はCHAPS(3-[3-胆汁アミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸)、又は十分に低い濃度の洗浄剤が添加される。好ましい態様において、本発明の結合性組成物(pH5.0~6.0及び150mMのNaCl)の溶解性は、10、15、20、25、30、35、又は40mg/mLよりも大きく、より好ましい態様において、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50mg/mLよりも大きく、さらにより好ましい態様において、51、52、53、54、55、56、57、58、59、又は60mg/mLよりも大きく、よりいっそう好ましい態様において、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、又は150mg/mLよりも大きい(又は、そのような任意の2つの値の間の範囲にあり、上限及び下限の数値のいずれか又は両方を含んでもよく、含まなくてもよい)。

#### 【0112】

##### 変異体

本発明は、たとえば本発明のポリペプチド配列(又はその断片)と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、99%同一であるアミノ酸配列を含むか、又は代替的にそのようなアミノ酸配列からなるポリペプチドを示す。特定の配列が結合性組成物の配列に対して同一性を示すかどうかを決定することは、当該技術分野において周知の方法を使用して達成できる。

#### 【0113】

一般的に、そのような配列の比較において、ある配列は参照配列として作用し、それに対してテスト配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用するとき、テスト配列及び参照配列がコンピュータに入力され、必要に応じて、得られた座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムパラメータが指定される。次に、配列比較アルゴリズムは、特定のプログラムのパラメータに基づいて、参照配列と関連してテスト配列についてのパーセンテージ配列同一性を算出する。

#### 【0114】

比較用の配列の最適整列は、たとえば、以下によって実施することができる。Smith及びWaterman(1981年)Adv. Appl. Math. 2:482の局在性ホモロジアルゴリズム;Needlman及びWunsch(1970年)J. Mol. Biol. 48:443のホモロジ整列化アルゴリズム;Pearson及びLipman(1988年)Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444の類似性検索の方法;これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実施(Genetic Computer Group, 575, Science Dr., Madison, WIのWisconsin Genetics Software PackageにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA);DNASTAR(Madison, Wisconsin)によって生産されるLASERGENE生命情報科学コンピューティングセット;Notredameらによって開発された複数の配列整列法(たとえば、Nucleic Acids Res. 2004年:32(Web Server issue):W37-40;Nucleic Acids Res. 2003年7月1日;31(13):3503-6;又はPharmacogenomics. 2002年1月;3(1):131-4における、3Dcoffee又はTcoffee);又は外観検査(一般的に上記のAusubelらを参照のこと)。最適な整列を測定することによってヌクレオチド又はアミノ酸配列を比較する他の方法は、周知である(たとえば、Peruski及びPeruski、The Internet and the New Biology:Tools for Genomic and Molecular Research(ASM Press, Inc. 1997年);Methods in Gene Biotechnology, 123-151頁におけるWuら(eds.)の「Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins」(CRC Press, Inc. 1997年);又はBishop(e

d.)の Guide to Human Genome Computing, 第2版 (Academic Press, Inc. 1998年)を参照のこと)。

【0115】

他のアミノ酸配列に対して、たとえば少なくとも約95%の「配列同一性」を呈するか又は有するポリペプチドは、たとえば、試験用アミノ酸配列の各100のアミノ酸鎖につき、最高5つのアミノ酸変異を含有することができる。換言すれば、第2のアミノ酸配列と少なくとも95%同一性である第1のアミノ酸配列は、たとえば、アミノ酸残基の挿入、欠失、又は置換によって、第2の配列とは異なるアミノ酸残基の総数の最高5%を含有することができる。ポリペプチド配列のアミノ残基の変質は、たとえば、アミノ又はカルボキシ末端位置において、或いは、これらの末端位置の間どこでも発生することが可能である。これらの末端位置は、配列における残基の間に個々に、或いは、配列内の1又は複数の隣接するアミノ残基セクション、部分又は断片のいずれかに点在する。実際問題として、たとえば、本願明細書中の表に示すように、任意の特定のポリペプチド配列が他の配列に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%の類似性を呈するか否かは、当該技術分野において周知の方法を使用して判定できる。

10

【0116】

本発明によって包含される変異体は、コード領域、非コード領域、又は両方における変質を含み得る。さらに、任意の組み合わせにおいて1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸が置換、欠失、又は追加される変異体もまた好ましい。非自然に生じる変異体は、突然変異誘発技術によって、又はタンパク質工学及び組換えDNA技術の周知の方法を使用する直接的な合成によって産生できる。かかる変異体は、結合性組成物ポリペプチド(又はその断片)の特性を改良するか又は変質するように生成できる。たとえば、1又は複数のアミノ酸は、生物学的機能を実質的に損失することなく、本発明の分泌されたポリペプチド(又はその断片)のN末端又はC末端から欠失させることができる。たとえば、Ronら(1993年、J. Biol. Chem. 268:2984-8)は、3、8、又は27のアミノ末端アミノ酸残基を欠失させた後でさえ、ヘパリン結合活性を有する変異体KGFタンパクを報告している。たとえば、分泌された形態の大部分に満たない残基が、N末端又はC末端から取り除かれるときに、抗原性及び/又は免疫原性が保持できる(たとえば、ポリペプチドの成熟形態を認識する抗体を誘導及び/又は結合する遺伝子欠失変異体の能力)。タンパク質のN末端又はC末端の残基が欠失したポリペプチドがかかる活性を保持するかどうかは、本願明細書に記載される日常的な方法又は当該技術分野において公知の日常的な方法で、容易に決定される。したがって、本発明はまた、たとえば生物活性(たとえば免疫原性又は抗原性など)を示すポリペプチド変異体を包含する。かかる変異体は、たとえば、当該技術において周知である一般的に規定させる活性に対してほとんど影響を及ぼさないように選択される欠失、挿入、逆位、反復及び置換を含む。たとえば、表現型的にサイレントなアミノ酸置換を作ることに関する教示は、たとえばBowieら((1990年)Science 247:1306-1310)から得られる。

20

30

【0117】

たとえば、保存的アミノ酸置換を使用することの他に、本発明の他の変異体は、限定されるものではないが、たとえば以下のいずれかを含む。(i)1以上の非保存的アミノ酸残基による置換(置換アミノ酸残基は遺伝子コードによってコードされるものであってもなくてもよい)(ii)置換基を有する1以上のアミノ酸残基による置換(iii)他の化合物(たとえばポリペプチド(たとえばポリエチレングリコール)の安定性及び/又は溶解性を増加させる化合物)による成熟ポリペプチドの融合(iv)付加アミノ酸(たとえばIgGFc融合領域ペプチド、若しくはリーダー配列又は分泌配列、若しくは精製を容易にする配列)によるポリペプチドの融合。そのような変異体はすべて本願明細書における出願人の教示が前提とする分子生物学の当業者の範囲内である(たとえば他とは異なるユニークなポリヌクレオチド及びポリペプチド配列を特定すること)。

40

50

## 【0118】

たとえば、他の荷電アミノ酸又は中性アミノ酸による荷電アミノ酸のアミノ酸置換を含むポリペプチド変異体は、改良された特性（たとえばより少ない凝集など）を有するポリペプチドを産生できる。医薬組成物の凝集は、凝集物の免疫原の活性に起因して、活性を減少させ、クリアランスを増加させる（Pinckardら（1967年）Clin. Exp. Immunol. 2: 331-340; Robbinsら（1987年）Diabetes 36: 838-845; Clellandら（1993年）Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10: 307-377）。好ましい態様において、適切なpH/緩衝液系において製剤化される本発明の結合性組成物（本願明細書に記載されているか、或いは、周知の技術である）は、約1~10、より好ましくは2~8、さらにより好ましくは3~7、及びさらにより好ましくは5~6の範囲の温度条件の下で、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、又は9ヶ月にわたるインキュベーション後でも有意な凝集を示さない。

10

## 【0119】

本発明のさらなる態様は、少なくとも1つのアミノ酸置換を含むが、50以下のアミノ酸置換、さらにより好ましくは40以下のアミノ酸置換、さらにもたより好ましくは30以下のアミノ酸置換、さらによりいっそう好ましくは20以下のアミノ酸置換、又は15以下のアミノ酸置換を含む本発明のアミノ酸配列を含む組成物を包含する。もちろん、好適である順番において、ペプチド又はポリペプチドは、本発明のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有することが極めて好ましく、アミノ酸配列は、少なくとも1個の、しかし10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1個以下のアミノ酸置換を含む。特定の態様において、本発明のポリペプチド配列又はその断片における、追加、置換、及び/又は欠失の数は、少なくとも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、10~50、又は50~150であり、保存的アミノ酸置換は非保存的な置換よりも好ましい。

20

## 【0120】

## 治療用途

本発明はまた、有用な治療的価値を備えた試薬を提供する。本発明の治療学的な結合性組成物は、たとえば、限定されるものではないが、本発明の抗体結合組成物（本願明細書に記載される断片、類縁体、及びその誘導体を含む）、及びそれらをコードする核酸分子（本願明細書に記載される断片、類縁体並びにその誘導体、及び抗イディオタイプの抗体を含む）を含む。そのような抗体は、異所性の発現及び/又はTGFベータ1（又はその断片）の活性に関連する疾患、障害、又は状態を、調整、治療、阻害、回復、又は防止するために使用することができる。それらは、たとえば、限定されるものではないが、本願明細書に記載される疾患、障害、症候群、又は状態のうちの任意の1又は複数を含む。異所性の発現及び/又はTGFベータ1の活性に関連する疾患、障害、又は状態の治療、回復及び/又は防止は、たとえば、限定されるものではないが、それらの疾患、障害又は状態に関連する症状を回復させることを含む。

30

## 【0121】

たとえば、TGFベータ1による異常性の発現又は異常性のシグナリングに関連する疾患又は障害は、TGFベータ1（たとえば本発明の結合性組成物）の拮抗剤の対象となる。本発明は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくは霊長類（たとえばヒト）に結合性組成物を投与することを含む、結合性組成物に基づいた治療法を包含することによって、本願明細書に記載して開示した疾患、障害、又は症状のうちの1又は複数、調整、治療、阻害、達成、又は回復させる。たとえば、理論によって固められてはいないが、ヒトTGFベータ1に特異的な抗体は、TGF受容体（TGF $\beta$ R）が完全に発現される疾患治療用の動物モデルに効果的であることが示されている。TGFベータ1に対する抗血清は、糸球体腎炎（Borderら、1990年、Nature 346: 371-4）及び肺線維症（Giriら、1993年、Thorax 48: 959-66）の治療に効果的であることが示されている。従って、改良された特性を有する本発明の新規な結合性組成物は

40

50

、症状、状態、又は疾患（たとえばTGFベータ1に関連する線維症及びその症状など）の回復にも効果的である。

【0122】

本発明の、組み換え型結合性組成物及び/又は単離された結合性組成物（たとえば抗体など）は、精製して治療の被験者に投与することができる。これらの試薬は、生理的に無害な安定剤及び賦形剤とともに、たとえば従来薬理学的に許容できる担体又は希釈液（たとえば免疫原のアジュバント）において、付加的な活性又は不活性の成分とともに使用するために組み合わせることができる。これらの組み合わせは、投与バイアルにおける凍結乾燥、或いは、安定化水性製剤における貯蔵によって細菌濾過して剤形の中に入れることができる。本発明はまた、抗体又はその結合性の断片の使用を企図し、補体結合でない形態を含む。

10

【0123】

本発明の範囲内に含まれる別の治療アプローチは、任意の従来投与技術（たとえば、限定されるものではないが、局所注入、吸入、又は全身投与）による、試薬、製剤、又は組成物の、被験者への直接投与を含む。本発明はまた、たとえば、治療のために、本発明の組成物の1以上の成分が入った容器と、例えば（典型的には医薬品又は生物学的産物の製造、使用、又は販売を規制する政府機関によって指定される形での）処分についての説明書を含んでなる製薬パック又はキットを提供する。投与の方法は、静脈内、腹腔内、又は筋肉内の投与、経皮的な拡散、及びその他を含む。薬理学的に許容できる担体としては、例えばMerck Index (Merck & Co., Rahway, N.J.)に記載されている水、生理的食塩水、緩衝液、及び他の化合物が挙げられる。

20

【0124】

本願明細書に包含される進行する他の異常な状態は、ノーザンブロット解析によってTGFベータ1メッセンジャーRNAを所有することが示される細胞型において知られている（たとえば、Berkow (ed.) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Merck & Co., Rahway, N.J.; Thornら、Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, N.Y.; 及びRich (ed.) Clinical Immunology; Principles and Practice, Mosby, St. Louis (cur. ed.) 及び下記を参照）。（たとえば、ニューロン、免疫性、又は造血系の）発達又は機能の異常は、本願明細書において提供される組成物を使用する予防又は治療の影響を受けやすい医学的な異常及び状態を顕著に生じる。

30

【0125】

本発明の範囲に含まれる別の治療アプローチは、任意の従来投与技術（たとえば、限定されるものではないが、局所注入、吸引、又は全身投与）による、試薬、製剤又は組成物の、被験者への直接投与を含む。包含される試薬、製剤、又は組成物は、本願明細書に記載されているか、或いは、当該技術分野において公知の任意の方法によって標的にできる。疾患、障害、状態、症候群、その他を調整する、試薬、製剤、又は組成物の実際の投与量は、生体の大きさ及び健康を含む多くの要因に依存する。しかしながら、当業者は、臨床的な投与量を決定する方法及び技術を記載する以下の教示を使用できる（たとえば、Spilker (1984年) Guide to Clinical Studies and Developing Protocols, Raven Press Books, Ltd., New York, pp. 7-13, 54-60; Spilker (1991年) Guide to Clinical Trials, Raven Press, Ltd., New York, pp. 93-101; Craig及びStitzel (eds. 1986年) Modern Pharmacology, 第2版、Little, Brown and Co., Boston, pp. 127-33; Speight (ed. 1987年) Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacolog

40

50

y and Therapeutics, 第3版、Williams及びWilkins, Baltimore, pp. 50 - 56; Tallarida (1988年) Principles in General Pharmacology, Springer-Verlag, New York pp. 18 - 20; 及び米国特許第4,657,760号明細書; 米国特許第5,206,344号明細書; 又は米国特許第5,225,212号明細書)。一般的に、終末濃度を含むおよそ0.5 fg/ml及び5000 ug/mlの間の(両方を含む)範囲において、任意の薬理的に許容できる担体で、成人に1日あたりに投与されるものである。さらにまた、動物実験は、ヒトの治療上有効量を決定するために、信頼性の高い指標を提供する。有効量の種間のスケールリングは、当該技術分野において周知の以下の原理に従って実施できる(たとえば、Mordenti及びChappell (1989年)のToxicokinetics and New Drug Developmentにおける「The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics」; Yacobiら(eds.) Pergamon Press, NYを参照のこと)。

10

#### 【0126】

有効量は、*in vitro*又は動物モデルの試験系に由来する用量反応曲線を用いて外挿することもできる。たとえば、抗体について、投与量は一般的に、レシピエントの体重の0.1 mg/kg ~ 100 mg/kgである。好ましくは、投与量は、レシピエントの体重の0.1 mg/kg ~ 20 mg/kgであり、より好ましくは、レシピエントの体重の1 mg/kg ~ 10 mg/kgである。一般的に、ヒト特異的抗体は、異種特異的抗体よりも長い半減期を有する(たとえば、ヒト抗体は、おそらく異質な組成物に対して宿主の免疫反応起因し、マウスなどの別の生物種由来の抗体よりもヒト宿主内で長く持続する)。したがって、抗体がヒト被験者に与えられる場合には、ヒト抗体のより投与量が少なく、投与回数が少なくなることが多い。さらにまた、本発明の抗体の投与の投与量及び頻度は、一時変異(たとえば脂質化)を使用して摂取及び組織透過性(たとえば、脳に)を増やすことによって減少させてもよい。

20

#### 【0127】

本発明はまた、たとえば、治療のために、本発明の組成物の1以上の成分が入った容器と、例えば(典型的には医薬品又は生物学的産物の製造、使用、又は販売を規制する政府機関によって指定される形での)処分についての説明書を含んでなる製薬パック又はキットを提供する。

30

#### 【0128】

有効な治療のために必要な試薬の量は、多くの異なる因子に依存し、因子は、投与の手段、標的部位、患者の生理学的な状態及び投与される他の薬物を含む。したがって、治療投与量は、安全性及び有効性を最適化するように滴定する必要がある。一般的に、*in vitro*で使用する投与量は、これらの試薬の*in situ*の投与において有用な量の有用な指標を提供することができる。特定の障害の治療上有効量の動物試験は、ヒトの投与量をさらに予測する指標を提供する。さまざまな考察は、たとえば、Gilmanら(eds.) (1990年)におけるGoodman及びGilmanのThe Pharmacological Bases of Therapeutics (第8版) Pergamon Press; 及び(1990年)Remington's Pharmaceutical Sciences (第17版) Mack Publishing Co., Easton, PAに記載されている。投与の方法は、経口的、静脈内、腹腔内、又は筋肉内の投与、経皮的な拡散、及びその他のために、上記及び下記に述べられている。薬理的に許容できる担体は、たとえばMerck Index (Merck & Co., Rahway, NJ)に記載されている水、生理的食塩水、緩衝液及び他の化合物を含む。投与量は、適切な担体について、通常、1 mM未満の濃度、一般的に約10 µM未満の濃度、通常は約100 nM未満、好ましくは約10 pM未満(ピコモル)、及び最も好ましくは約1 fM(フェムトモル)未満の量であると予想される。緩効性の製剤又は緩効性の装置は、継続投与のために利用されることが多い。

40

50

## 【0129】

結合性組成物は、治療されるべき宿主に直接的に投与でき、或いは化合物の大きさに応じて担体タンパク質（たとえばそれらを投与する前のオボアルブミン又は血清アルブミン）に接合することが望ましい場合がある。治療用製剤は、任意の従来 of 投与量製剤で投与できる。活性成分が単独で投与されることは可能であるが、医薬製剤として提示することが好ましい。一般的に、製剤は、1又は複数の許容できる担体と共に、本願明細書で定義されるように、少なくとも1つの活性成分を含む。各担体は、他の成分と適合性があり、かつ、患者に有害でないという意味において、薬理的及び生理的に許容可能であるべきである。製剤は、経口、直腸、経鼻、又は非経口（皮下、筋肉内、静脈内、及び皮内を含む）の投与に適した製剤を含む。製剤は、単位投与形態において都合よく提示でき、薬学の技術分野において周知の任意の方法によって調合できる。たとえば、Gilmanら(eds.) (1990年) Goodman及びGilmanの以下を参照されたい。The Pharmacological Bases of Therapeutics (第8版) Pergamon Press; 及び(1990年) Remington's Pharmaceutical Sciences (第17版) Mack Publishing Co., Easton, PA; Avisら(eds.) (1993年) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, NY; Liebermanら(eds.) (1990年) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, NY; 及び Liebermanら(eds.) (1990年) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, NY。本発明の治療は、他の治療薬（たとえばアンジオテンシン変換酵素阻害剤）と混合して、或いは、それと組み合わせて使用できる。

10

20

## 【0130】

本発明はまた、医薬組成物を提供する。そのような組成物は、たとえば、薬理的に許容できる担体において、本発明の組成の治療上有効量を含む。本願明細書において使用されているように、「薬理的に許容できる担体」という用語は、アメリカ合衆国の連邦規制機関又は米国州政府の規制/管理機関によって承認される担体、又は米国薬局方又は他の薬局方において列挙された担体を意味し、一般的に、動物（たとえば哺乳類）、より具体的には霊長類（たとえばヒト霊長類）における使用について、当業者によって認識される。

30

## 【0131】

本願明細書において使用される「担体」という用語は、本発明の組成物とともに投与される、希釈液、アジュバント、賦形剤又は媒介物に関する。薬剤担体は、一般的に無菌の液体（たとえば水又は油）（たとえば落花生油、ダイズ油、鉱油、胡麻油などの、石油、動物、野菜、又は合成的に由来する液体を含む）であり得る。一般的に、滅菌水は、医薬組成物が静脈内に投与される際の好ましい担体である。特に注射剤溶液のために、食塩溶液及び水性デキストロス及びグリセリン溶液もまた、液体担体として使用することができる。

40

## 【0132】

適切な医薬賦形剤は、たとえば、限定されるものではないが、デンプン、グルコース、乳糖、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどを含む。本発明の組成物は、必要に応じて、軽微な量の湿潤剤又は乳化剤、若しくはpH緩衝剤を含有できる。

## 【0133】

本発明の組成物は、溶液、懸濁液、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、パウダー、持効性製剤の形態とすることができ、或いは、（従来 of 結合剤、及び/又はたとえばトリグリセリドのような担体による）坐剤として処方することができる。適切な薬剤担体の付加的な例は、E. W. MartinによるRemington's Pharmaceutic

50

al Sciencesの最新版に記載されている。かかる製剤は、被験者に適切な投与を提供するために、適切な量の担体と共に、好ましくは精製された形で、治療上有効量の本発明の組成物を含む。伝統的に、製剤は投与の様式に適するようにする。

【0134】

好ましい態様において、組成物は、たとえばヒトへの静脈内投与のために適応された医薬組成物として、常套的な手順に従って処方される。一般的に、静脈内投与用の組成物は、無菌の等張水性緩衝液の溶液である。必要な場合には、組成物は、たとえば、可溶化剤及び局所麻酔薬（たとえば注射部位における快適さを促進するリドカイン）を含むこともある。一般的に、成分は、たとえば、密閉封入された容器（たとえば活性薬剤の量を示すアンプル又は小さい袋）の中の乾燥した凍結乾燥粉末又は水分を含有しない濃縮物として、単独で、或いは、単位投与形態で混合して供給される。組成物が注入液によって投与される場合には、無菌の製薬等級水又は生理食塩水が入っている注入ボトルを使用して調剤することができる。組成物が注射剤によって投与される場合には、成分を投与前に混合するために、注射用滅菌水又は生理食塩水のアンプルを提供することができる。

10

【0135】

本発明の組成物は、中性又は塩の形態として処方できる。薬理的に許容できる塩類は、たとえば、限定されるものではないが、アニオン性塩類（塩化水素酸、リン酸、酢酸、蔞酸、酒石酸、その他に由来するものなど）、及びカチオンの塩類（たとえば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するものなど）を含む。

20

【0136】

線維症、その障害又は症状

たとえば抗体などの結合性組成物は、線維症に関連する状態の治療に役立つ。細胞間マトリックス（ECM）の構成成分の蓄積又は多種多様な細胞、組織、及び器官のECM構成成分を有する正常な細胞形質成分の置換は、疾患をもたらす線維症となる場合がある。進行性線維症は致命的となる場合があり、多器官（たとえば腎臓）の末端器官不全に至る。症状発現前のデータ及び臨床的データの両方は、TGF-β1が、間質性線維症の基質タンパク質沈着の大きな一因であって、多くの付随する線維症及びその状態の惹起及び進行に関係していることを示す。疾患状態は、腎性線維症を含み、腎性線維症は、あらゆる種類の慢性腎疾患（CRD）に共通である。腎性線維症の範囲は、慢性腎不全（連続強化（CRF）、別名末期腎臓疾患（ESRD））の進行と明らかに相関する。慢性腎不全は、慢性的な透析又は腎移植術、及び死亡に至る場合がある。TGF-β1は、サイトカインであり、実験に基づいて、及びヒト研究及び動物研究との関連によって、そのような線維性のプロセスと最も一貫して関連性がある。

30

【0137】

TGF-β1のECMへの著しい効果は、合成の刺激及び細胞外基質成分の劣化の阻害における役割を含んでおり、数多くの検討課題になっている（たとえば、Contemporary Issues in Nephrology v. 23におけるRocco & Ziyadeh、1991年、「Hormones, autocooids and the kidney」Ed. Jay Stein, Churchill Livingstone, New York pp. 391-410; Robertsら、1988年、Rec. Prog. Hormone Res. 44: 157-97を参照のこと）。TGF-β1は、複数かつ協力的な方法で、ECMの蓄積を誘導することができる。たとえば、TGF-β1は、タイプIコラーゲン、タイプIVコラーゲン、フィブロネクチン、及びラミニンを含む主なECM構成成分のメッセンジャーRNA発現及びタンパク質生成を刺激する（Sharma & Ziyadeh、1997年、Semin Nephrol 17: 80-92）。同時に、TGF-β1は、基質を温浸するプロテアーゼ（たとえばプラスミノゲンアクチベータ、コラゲナーゼ、エラスターゼ、及びストロメライシンなど）の生成を阻害することによって、かつ、それらのプロテアーゼの阻害

40

50

剤（たとえばメタロプロテイナーゼ及びプラスミノゲン物質阻害剤1の組織阻害剤など）を活性化することによって、ECMの劣化を妨げる（Sharma & Ziyadeh、1995年、Kidney Int 51: S34-6）。TGF-ベータ1はまた、ECMのためのインテグリン及び細胞表面受容体を上方制御することによって特異性のECMタンパクと相互作用するように細胞の能力を高める（Heinoら、1989年、J Biol Chem 264: 380-8）。加えて、TGF-ベータ1は、ECM細胞（たとえば線維芽細胞及び食細胞）を引きつける強力な走化性特性を有する（Reibmanら、1991年、PNAS 88: 6805-9）。さらに、TGF-ベータ1は、それ自体の発現を誘導する特有の能力を有し、異所性の線維性プロセスを潜在的に増幅する（Kimら、1990年、Mol Cell Biol 10: 1492-7）。

10

## 【0138】

TGF-ベータ1は、以下の疾患、症候群及び/又は症状に関係する。

\* 腎疾患 - たとえば、慢性腎疾患（CRD）；慢性腎不全（連続強化）；末期腎臓疾患（ESRD）；糸球体腎炎（GN）であって、たとえば糸球体間質の増殖GN、メサンギウム細管系球GN、膜状GN、単状糸球体及び分節性糸球体GN、免疫性GN、及び半月状GNを含むもの；糸球体硬化症；腎硬化症、膜性腎症、免疫グロブリンA（IgA）腎症；腎性間質性線維症；単状分節性腎糸球体硬化症、サイクロスポリン移植患者の腎性線維症；慢性腎性移植拒絶；HIV関連腎症；腎性細胞肥大；慢性腎症を伴う尿細管間質性線維症であって、尿路内腔の閉塞又は鎮痛薬関連腎症に起因するもの、又は急性腎不全（たとえば腎虚血に起因する急性腎不全）の発症に続くものを含む（Spurgeonら、Am. J Physiol Renal Physiol 288: F568-F577, 2005年）；血栓性細小血管症腎性の血栓性細小血管症であって、たとえば腎糸球体内皮の細胞損傷、又は他の微小血管内皮の細胞損傷（たとえば子癩前症、エンドトキシン血症、及び放射線被曝に関連するもの）に関連するもの；腎性脈管炎；単状糸球体壊死性腎炎；糖尿病性腎障害（TGFベータ1は、腎の大多数の細胞に影響する複雑かつ多様なイベントに関連する）（Bottlinger、2002、J. Am. Soc. Nephrol. 13、2600年）。これらのイベントによって、最終的に、尿細管間質性線維症及び糸球体硬化症の両方を発症し、ネフロン機能損失、及び最終的に慢性腎不全につながる。3つのTGF-ベータアイソフォームのうち、TGF-ベータ1は、最も優性に発現したアイソフォームであるという理由のみならず、TGF-ベータ2及びTGF-ベータ3の両方がTGF-ベータ1発現の上方制御によってそれらの効果を媒介すると思われるという理由から、慢性腎疾患の進行を媒介する際に優性であることを示す（Yu、2003年、Kid. Int. 64: 844）。in vitro及びin vivoの両方の研究は、1型又は2型の真正糖尿病に伴う合併症を含む糖尿病性腎疾患（たとえば糸球体硬化症及び尿細管間質性線維症など）の病因において、TGF-ベータ1に関係があるとされる（Ziyadeh、1998年、Cur. Pract. Med. 1: 87-9）。TGFベータに対する抗血清は、以下の治療に効果的である。糸球体腎炎（Borderら、1990年、Nature 346: 371-4）；線維性腎疾患（TGF-ベータ1は、腎性の細胞性の肥大、すなわちサイクリンに依存するキナーゼ阻害剤（たとえばp27kip1及びp21cip1）を誘導することによって、細胞周期の通常の調節を妨げることによる糖尿病性腎障害の別の特性を媒介する）（Wolf及びZiyadeh、1999年、Kidney Int 56: 393-405）。これらの阻害剤もまた、高グルコース及び糖尿病の状態によって増加する（Wolfら、2001年、Am J Pathol 158: 1091-1100；Wolfら、1999年、Diabetologia 42: 1425-32；Wolfら、1997年、Am J Physiol 273: F348-56）。それらは、サイクリンに依存するキナーゼ（主にサイクリンに依存するキナーゼ2/サイクリンEキナーゼ）の活性を抑制する（Liu及びPresig、1999年、Am J Physiol 277: F186-94）ことによって、網膜芽細胞腫タンパク質のリン酸エステル化を阻害して、G1期後期に細胞を停止する。細胞は、DNA複製のないタンパク質合成の期間に入って肥大する。したがって、

20

30

40

50

TGF-β1は、糖尿病性腎障害、実験の糖尿病性腎障害、及び高血圧性腎硬化症の病態生理学的特徴につながる細胞レベルにおいて、変化を引き起こす。糸球体の構造及び濾過性は、主にメサンギウム及び腎糸球体膜の細胞間マトリックス組成物によって決定されるので、TGF-β1が腎臓に著しい影響を及ぼすことは驚くべきでない。TGF-β1は、糖尿病性腎疾患の病理的な変化を媒介する(Ziyadeh、1998年、Cur Prac Med 1:87-89)。増殖性糸球体腎炎(Bordera、1990年、Kidney Int. 37:689-695)及び糖尿病性腎障害(Mauerら(1984年)J. Clin. Invest. 74:1143-1155)における糸球体間質の基質の蓄積は、疾患の明確かつ優的な病理学的特徴である。TGF-β1の濃度は、ヒトの糖尿病性糸球体硬化症(後生的なニューロパチ)において上昇する(Yamamotoら、1993年、Proc. Natl. Acad. Sci. 90:1814-1818)。TGF-β1はまた、多くの動物モデルにおける腎性線維症の起源の重要な媒介物であることが見い出されている(Phanら、1990年、Kidney Int. 37:426; Okudaら、1990年、J. Clin. Invest. 86:453)。ラットにおける実験的に誘導される腎炎の抑止は、TGF-β1に対する抗血清を使用することによって(Bordera、1990年、Nature 346:371)、かつ、TGF-β1に結合し得る細胞外の基質タンパク質(デコリン)によって証明されている(Bordera、1992年、Nature 360:361-363;たとえば、Border及びNoble、1994年、N. Engl. J. Med. 331:1286-92; Borderら、1989年、Semin. Nephrol. 9:307-17; Hanら、2000年、Am J Physiol Renal Physiol 278:F628-34;及びZiyadehら、2000年、PNAS 97:8015-20も参照のこと)。したがって、本発明の結合性組成物は、上記の通りに、疾患、障害、症候群、及び/又は状態の治療、回復、変調、診断、及び/又は阻害において有用である。

10

20

30

40

#### 【0139】

\* 肝臓疾患 - たとえば、肝硬変、肝線維症。肝線維症は、肝細胞性のネクローシス又は損傷に対する一般によくある応答であり、それは多種多様な要因(たとえば肝臓のホメオスタシスを妨げる任意のプロセス(特に炎症、毒性の損傷、又は変質した肝血流))及び肝臓の感染症(ウイルス性、細菌性、真菌性、及び寄生性)によって誘発される場合がある。先天性代謝異常に起因する多数の貯蔵障害は、線維症に関連することが多く、以下を含む。脂質異常(ゴージェ病);糖原病(特にタイプIII、IV、VI、IX、及びX);1-抗トリプシン欠損症;鉄過剰負荷症候群(ヘモクロマトーシス)及び銅蓄積症(ウィルソン氏病)に見られるような外因性の物質の貯蔵;毒性の代謝産物の蓄積(チロシン血症、果糖血症、及びガラクトース血症におけるような);及びペルオキシソーム障害(ゼルウィガー症候群)。多数の化学物質及び薬物によって、線維症、特にアルコール、メトトレキサート、イソニアジド、オキシフェノールイサチン、メチルドパ、クロルプロマジン、トルブタミド、及びアミオダロンが生じる。肝臓の循環障害(たとえば慢性心不全、肝静脈血栓症、静脈閉塞の疾患、門静脈血栓症)及び胆汁の流れに対する慢性閉塞は、線維症に至る場合がある。最後に、先天性肝線維症は、常染色体劣性奇形である。

#### 【0140】

世界中の大多数の人々は、慢性ウイルス性肝炎、あるいはアルコール又は肥満症のいずれかに関連する脂肪肝炎を有する。しかし、他の線維症を誘発する傷害は、たとえば、寄生虫症(たとえば住血吸虫症)、肝細胞又は胆管上皮における自己免疫の発病、新生児の肝疾患、ウィルソンのヘモクロマトーシス及び種々の蓄積症を含む代謝異常、慢性炎症状態(たとえばサルコイドーシス)、薬物毒性(たとえばメトトレキサート又はビタミンA過剰症)、及び維管束障害(先天性又は後天性のいずれか)を含む。

#### 【0141】

肝星細胞(HSC)は、肝線維症におけるECMの重要な細胞性の源である(Li及びFriedman、1999年、J. Gastroenterol. Hepatol. 1

50

4 : 6 1 8 - 3 3 )。H S Cは、類洞周囲のディッセ腔にあり、それは肝細胞を類洞内皮から分離する。記載されているように、肝傷害は、通常は停止しているH S Cを活性化し、次にH S Cの増殖及び活性化につながる。活性化したH S Cは、収縮性の筋線維芽細胞(M F B)に対する次の表現形の分化転換を受け、これは、平滑筋アクチン、及び肝線維症に見られるE C M分子の過剰を表す。H S CのM F Bへの分化転換は、ストレス及び損傷に対する肝臓の線維性の反応の重要な調節因子として、完全にその役割におけるT G F - 1の発現に起因する(G r e s s n e rら、2 0 0 2年、F r o n t B i o s c i . 7 : d 7 9 3 - 8 0 7)。T G F - 1は、肝線維症のエフェクター細胞の線維形成で最も強力な周知の誘導物質である(S c h u p p a nら、2 0 0 3年、C e l l D e a t h D i f f e r . 1 0 S u p l 1 : S 5 9 - 6 7)。したがって、活性T G F - 1の組織及び血清中の濃度は、肝線維症において上昇し、トランスジェニックマウスにおけるT G F - 1の過剰発現及び外因性T G F - 1を適用することによって、器官線維症を誘発することが示されている(K a n z l e rら、1 9 9 9年、A m . J . P h y s i o l . 2 7 6 : G 1 0 5 9 - 6 8 ; S a n d e r s o nら、1 9 9 5年、P N A S 2 5 7 2 - 7 6)。さらに、実験に基づく線維症は、抗-T G F - 1処理によって(たとえば中和抗体又は溶解性のT G F受容体を用いて)阻害される場合がある(G e o r g eら、1 9 9 9年、P N A S 1 2 7 1 9 - 2 4 ; Q iら、1 9 9 9年、P N A S 2 3 4 5 - 4 9)。活性化したH S C / M F Bの観察されたT G F - 1発現、E C M発現を上方制御するT G F - 1の効力、及びH S C上のT G F受容体の発現は、広く認められるモデルに至り、そのモデルにおいて、T G F - 1による活性化したH S C / M F Bの持続的な自己刺激/パラクリン刺激は、器官線維症を促進する際の重要な線維形成の応答である。したがって、T G F - 1の低減は、肝線維形成を低減することが予測される(W u及びZ e r n、2 0 0 0年、J . G a s t r o e n t e r o l . 3 5 : 6 6 5 - 7 2)。

#### 【0142】

\* 肺疾患 - たとえば：肺線維症(G i r iら、T h o r a x 4 8、9 5 9 - 9 6 6、1 9 9 3)；特発性肺線維症；成人呼吸窮迫症候群；特発性器質化肺炎、閉塞性細気管支炎(B O)、閉塞性細気管支炎(移植に関連する)；薬物性肺疾患；放射線性肺疾患；喘息及び気腫における気道周辺の限局性線維症；過敏性肺臓炎；特発性器質化肺炎(C O P)；慢性閉塞性肺疾患(C O P D)；急性間質性肺炎(A I P)；石綿肺；自己免疫不全(たとえば全身性エリテマトーデス及び強皮症)、化学接触、又はアレルギーに関連する間質性肺線維症；喘息；新生児の慢性肺疾患(C L D)(T G F - 1の無調節発現は、喘息、肺線維症、及び新生児の慢性肺疾患(C L D)を含む多くの慢性肺疾患の異常気道増殖の病因において、重要な役割を果たす)(H o l g a t eら、2 0 0 1年、I n t A r c h A l l e r g y I m m u n o l 1 2 4 1 - 3 : 2 5 3 - 8 ; K h a l i lら、2 0 0 1年、T h o r a x 5 6 1 2 : 9 0 7 - 1 5 ; L e c a r tら、2 0 0 0年、B i o l N e o n a t e 7 7 4 : 2 1 7 - 2 3 ; P u l l e y nら、2 0 0 1年、H u m G e n e t 1 0 9 6 : 6 2 3 - 7 ; S a g a r aら、2 0 0 2年、J A l l e r g y C l i n I m m u n o l 1 1 0 2 : 2 4 9 - 5 4 ; S h e p p a r d、2 0 0 1年、C h e s t 1 2 0 1 S u p p l : 4 9 S - 5 3 S ; S t r i e t e r、2 0 0 1年、C h e s t 1 2 0 1 S u p p : 7 7 S - 8 5 S ; T o t iら、1 9 9 7年、P e d i a t r P u l m o n o l 2 4 1 : 2 2 - 8)。マウスの歯槽の表面に沿った活性T G F - 1の過剰発現によって、活発な線維性の応答が誘発され、抗体又はデコイによるT G F - 1の阻害によって、プレオマイシンによって誘発される線維症が阻止される(K e l l yら、2 0 0 3年、C u r . P h a r m . D e s . 9 : 3 9 4 9)。さらに、肺メッセンジャーRNA全体のマイクロアレイ解析は、周知のT G F - 1誘導性の遺伝子の大部分が、実験的に誘発された線維症において上方制御されることを示す(K a m i n s k iら、2 0 0 0年、P N A S 9 7 : 1 7 7 8 - 8 3)。

#### 【0143】

\* 心臓血管疾患 - アテローム性動脈硬化症；( T G F - 1 はアテローム性動脈硬化症に関連する(たとえば T . A . M c C a f f r e y : 2 0 0 0 年「T G F - 1 s a n d T G F - R e c e p t o r s i n A t h e r o s c l e r o s i s」C y t o k i n e a n d G r o w t h F a c t o r R e v i e w s 1 1 : 1 0 3 - 1 1 4 を参照のこと。))；肥大心成長( S c h u l t z ら、2 0 0 2 年、J C l i n I n v e s t . 1 0 9 ( 6 ) : 7 8 7 - 9 6 ; B r a n d 及 び S c h n e i d e r 、1 9 9 5 年、J . M o l . C e l l C a r d i o l . 2 7 : 5 1 8 )；全身性進行性硬化症(加齢による脈管構造内の T G F - 1 濃度の増加に匹敵して、フィブロネクチン濃度が著しい増加する( L i ら、1 9 9 9 年)。これらの変化によって、弾性のある血管から線維性の / 硬直した血管に変化することが確実である。)；機械的に誘発された微小血管の線維症；サルコイドーシス；心室の線維症；放射線障害性虚血性心疾患[ホジキン病及び乳癌のために放射線治療した患者について、虚血性心疾患に起因する死亡率が著しく高いことが報告されている。特定のサイトカイン及び成長因子(たとえば T G F - 1)は、放射線障害性の内皮増殖、線維芽細胞増殖、コラーゲン沈着、及び線維症を刺激することがあり、アテローム性動脈硬化症の進展病巣に至る。]；動脈損傷( W o l f ら、1 9 9 4 年、J . C l i n . I n v e s t . 9 3、1 1 7 2 - 8 )；慢性静脈機能不全( C V I )；経皮経管冠動脈形成術( P T C A )又はステント術後の再狭窄病変；ヘルマンスキー - パドラック症候群；多発性筋炎；強皮症；皮膚筋炎；エオジン好性筋膜炎；限局性強皮症、又はレイノー症候群の発生に関連する限局性強皮症；非梗塞性心筋の壁内冠状動脈脈管構造の血管周囲の線維症；損傷によって誘発された過形成症(たとえば再狭窄)；コラーゲン血管疾患を有するアテローム性動脈硬化症線維症( T G F - 1 は、バルーン血管形成術の後、平滑筋細胞の増殖及び動脈の細胞間マトリックスの堆積に起因する動脈壁の進行性肥厚の因子であり得る。再狭窄した動脈の直径は、肥厚によって 9 0 % 低減することがあり、直径の低減のほとんどは、平滑筋細胞体よりもむしろ細胞間マトリックスに起因するので、広範囲の細胞間マトリックス沈着を単に低減することによって、これらの血管を 5 0 % まで広げることが可能である。T G F - 1 遺伝子によって i n v i v o にトランスフェクトされる無傷のブタ動脈において、T G F - 1 遺伝子発現は、細胞間マトリックス合成及び過形成症の両方を伴った( N a b e l ら、1 9 9 3 年、P N A S 9 0 : 1 0 7 5 9 - 6 3 )。))；ヒスチオサイトーシス X (好酸性肉芽腫)。

10

20

30

40

50

## 【0144】

\* 軟組織線維症 - ( B o r d e r 及 び R u o s l a h t i 、1 9 9 2 年、J C l i n I n v 9 0 : 1 - 7 ; B o r d e r 及 び N o b l e 、1 9 9 4 年、N E n g l J M e d 3 3 1 : 1 2 8 6 - 9 1 )；勃起障害( M o r e l a n d , R . 、1 9 9 8 年、I n t J I m p o t R e s 1 0 : 1 1 3 - 2 0 )；リウマチ様関節炎( W a h l ら、1 9 9 3 年、J . E x p . M e d i c i n e 1 7 7 , 2 2 5 - 3 0 )。

## 【0145】

\* 損傷治癒 - 経皮の癒痕化；熱傷；肥厚性の癒痕化；ケロイド形成；結膜の癒痕化( C o r d e i r o M F 、2 0 0 3 年、C l i n S c i ( L o n d ) . 1 0 4 ( 2 ) : 1 8 1 - 7 ) ( 様々な濃度の T G F - 1 による胎児損傷の治療は、損傷の著しい癒痕化をもたらす、皮膚の癒痕化における T G F - 1 の直接的な関与を示した( S u l l i v a n ら、1 9 9 5 年、J P e d i a t r S u r g 3 0 : 1 9 8 - 2 0 3 )。ラットにおける治癒する損傷周囲に注入される T G F - 1 抗体を中和することは、損傷治癒率又は損傷の抗張力を妨げることなく、癒痕を阻害することが示された。同時に、脈管形成が低減し、損傷におけるマクロファージ及び単核細胞の数が低減し、癒痕組織における無秩序なコラーゲン繊維沈着の量が低減した( S h a h ら、1 9 9 2 年、L a n c e t 3 3 9 : 2 1 3 - 4 ; S h a h ら、1 9 9 4 年、J . C e l l S c i e n c e 1 0 7 : 1 1 3 7 - 5 7 ; S h a h ら、1 9 9 5 年、J C e l l S c i . 1 0 8 : 9 8 5 - 1 0 0 2 )。癒痕性の応答は、アンチセンス T G F - 1 によって局所的に治療されるマウス損傷において減少する( C h o i ら、1 9 9 6 年、I m m u n o l C e l l B i o l 7 4 : 1 4 4 - 5 0 )。合成 T G F - 1 拮抗剤の局所塗布によって、ウサギ皮膚切除

術と同様に、ブタの熱傷及び切除の損傷における瘢痕を低減した (Huangら、2002年、FASEB J 16:1269-70; Werner及びGrose、2003年、Physiol Rev 83(3):835-70)。

【0146】

\*炎症疾患 - 炎症性腸疾患 (IBD) (たとえばクローン病 (CD) 及び潰瘍性大腸炎 (UC) など) (腸管炎症は、炎症サイトカイン、特にIFN- $\gamma$  及びTGF- $\beta$ 1活性の間平衡性に依存している (Stroberら、1997年、Immunol Today 18:61-4; Neurathら、1996年、J. Exp. Med. 183, 2605-16; Ludvikssonら、1997年、J. Immunol. 159; Boirivantら、1998年、J. Exp. Med. 188, 1929-39; Powrieら、1996年、J. Exp. Med. 183, 2669-74)。腸における免疫学的に媒介された組織損傷は、炎症誘発性のサイトカインの産生を増大させ、種々の異なる細胞型の転写因子NF- $\kappa$ Bを活性化する。) ; リウマチ様関節炎 (RA) ; 滑液の過形成症 (TGF- $\beta$ 1は、ヒトのリウマチ様関節炎滑液において上昇する (Lotzら、1990年、J. Immunol. 144:4189-94)。過剰量のTGF- $\beta$ 1は、骨棘と呼ばれる痛みを伴う骨の成長 (van Beuningenら、1994年、Lab. Invest. 71:279-90)、滑液の過形成症、及びRAにおける炎症を形成する (Hamiltonら、1991年、PNAS 88:7180-4)。マウスの関節炎モデルにおける内因性TGF- $\beta$ 1の阻害によって、骨棘形成が防止でき、軟骨修復を損ない、これらの病理的なイベントにおけるその役割を示唆する (Scharstuhlら、2002年、Immunol. 169:507-14)。

【0147】

\*細胞増殖性疾患 - 数多くのデータによって、TGF- $\beta$ 1が形質転換能を有するのみならず、*in vitro*及び*in vivo*の両方で、悪性進行、浸潤、及び転移を誘発することを証明する (Derynckら、2001年、Nat. Genet 29:117-29; Cuiら、1996年、Cell 86:531-42)。高増殖性状態、疾患、障害、症候群、及び/又は症状の例は、たとえば、限定されるものではないが、結腸、腹部、骨、乳房、消化器系、肝、膵、腹膜、内分泌系 (たとえば副腎、上皮小体、脳下垂体、精巣、子房、胸腺、又は甲状腺)、眼、頭部、頸部、神経系 (中枢神経系又は末梢神経系)、リンパ系、骨盤、皮膚、脾臓、胸部、及び泌尿生殖器系の新生物を含む。同様に、他の高増殖性の状態は、たとえば、限定されるものではないが、グロブリン過剰血症、リンパ球増殖の状態、パラプロテイン血症、紫斑病、サルコイドーシス、過誤腫、セザリー症候群、Waldenströmマクログロブリン血症、ゴーシェ病症候群、組織球増殖症、及び他の高増殖性の状態を含む。

【0148】

TGF- $\beta$ 1の腫瘍サプレッサ活性にもかかわらず、腫瘍細胞は、成長因子がさらに生成することが多く (Derynckら、1987年、Cancer Res. 47:707-12; Dicksonら、1987年、PNAS 84:837-41)、腫瘍細胞浸潤への影響及び腫瘍微小環境の変化を通して、その発癌促進性の役割を文献によって証明されている。TGF- $\beta$ 1が、腫瘍サプレッサ、及び腫瘍の発達、浸潤及び転移の有意な刺激要因の両方として作用できることは、現在では明らかである。腫瘍形成の初期段階 (腫瘍がまだ良性であるときなど) において、TGF- $\beta$ 1は、腫瘍成長を抑制するように癌細胞に直接的に作用する。しかしながら、腫瘍が進行するにつれて、遺伝学的及び/又は生物化学的な変化によって、TGF- $\beta$ 1は、癌細胞自体及び腫瘍の非悪性の間質性細胞型の両方におけるその多形質発現活性によって、腫瘍発達を刺激する場合がある。ヒト腫瘍の大半が機能性TGF- $\beta$ 1シグナル伝達経路を維持するにつれて、TGF- $\beta$ 1による浸潤及び転移の刺激作用は、その腫瘍抑制的な役割よりも大きな臨床的結果になる可能性がある (Akhurst及びDerynck、2001年、Trends Cell Biol. 11:S44-51)。

【0149】

10

20

30

40

50

細胞増殖性疾患における過剰量のTGF- $\beta$ 1産生が予後不良を伴うという証拠がかなりある(Tsushimaら、1996年、Gastroenterology 110:375-82; Adlerら、1999年、J. Urol. 161:182-7)。腫瘍によって産生するTGF- $\beta$ 1が有害である可能性がある癌が数種類ある。MATLy Luラットの前立腺癌細胞(Steiner及びBarrack、1992年、Mol. Endocrinol 6:15-25)及びMCF-7ヒト乳がん細胞(Arteagaら、1993年、Cell Growth and Differ. 4:193-201)は、マウスTGF- $\beta$ 1を発現するベクターによるトランスフェクションの後、発癌性及び転移性になった。TGF- $\beta$ 1は、ヒトの前立腺癌及び進行性胃癌において、脈管形成、転移、及び予後不良を伴う(Wikstromら(1998) Prostate 37:19-29; Saito, H.ら(1999) Cancer 86:1455-62)。乳癌において、予後不良は、TGF- $\beta$ 1が増大し(Dicksonら、1987年、PNAS 84:837-41; Kasidら、1987年; Cancer Res. 47:5733-8; Dalyら、1990年、J. Cell Biochem. 43:199-211; Barrett-Leeら、1990年、Br. J. Cancer 61:612-7; Kingら、1989年、J. Steroid Biochem. 34:133-8; Welchら、1990年、PNAS 87:7678-82; Walkerら、1992年、Eur. J. Cancer 238:641-4)、タモキシフェン治療によるTGF- $\beta$ 1の誘発(Buttaら、1992年、Cancer Res. 52:4261-4)によって、乳癌のタモキシフェン治療の失敗となる(Thompsonら、1991年、Br. J. Cancer 63:609-14)。抗-TGF- $\beta$ 1抗体は、無胸腺症のマウスにおけるMDA-231ヒト乳癌細胞の成長を阻害する(Arteagaら、1993年、J. Clin. Invest. 92:2569-76)。これは、脾臓ナチュラルキラー細胞活性の増加と相関する治療である。潜在性のTGF- $\beta$ 1によってトランスフェクトされるCHO細胞もまた、ヌードマウスにおいて、低減したNK活性及び増加した腫瘍成長を示す(Wallickら、1990年、J. Exp. Med. 172:1777-84)。したがって、乳房腫瘍によって分泌されるTGF- $\beta$ 1は、内分泌免疫抑制を引き起こす可能性がある。TGF- $\beta$ 1の高い血漿濃度は、進行性乳癌患者の予後不良を示す(Anscherら、1993年、N. Engl. J. Med. 328:1592-8)。高用量化学療法及び自家骨髄移植の前にTGF- $\beta$ 1の循環が高い患者は、肝臓の静脈閉塞の疾患リスクが高く(50%までの死亡率を有する全患者の15~50%)、特発性間質性肺臓炎のリスクが高い(全患者の40~60%)。これらの所見の意味は、TGF- $\beta$ 1の高い血漿中の濃度によってリスクのある患者を確認できるということであり、TGF- $\beta$ 1を低減すれば乳癌患者におけるこれらの治療の罹患率及び死亡率を減少することができるということである。

#### 【0150】

多くの悪性細胞がTGF- $\beta$ 1を分泌するという事は、TGF- $\beta$ 1産生によって、宿主免疫監視機構から腫瘍細胞が逃れるメカニズムを得ることができることを示唆する。癌を有する宿主においてTGF- $\beta$ 1シグナル伝達が妨害された白血球の亜集団の確立は、癌の免疫療法のための可能性のある手段を提供する。T細胞においてTGF- $\beta$ 1シグナル伝達が妨害された移植遺伝子の動物モデルは、致命的なTGF- $\beta$ 1過剰発現リンパ腫腫瘍(EL4)を普通に根絶することができる(Gorelik及びFlavel、2001年、Nature Medicine 7(10):1118-22)。腫瘍細胞においてTGF- $\beta$ 1分泌の下方制御によって、宿主における免疫原性を回復できる一方で、TGF- $\beta$ 1に対するT細胞無感受性は、分化の促進と自己免疫をもたらし、その要素は、寛容化した宿主において自己抗原を発現する腫瘍と闘うのに必要となり得る。TGF- $\beta$ 1の免疫抑制効果もまた、CD4/CD8 T細胞計数に基づく予測よりも低い免疫反応を有するHIV患者の集団において関係している(Garbaraら、2002年、J. Immunology 168:2247-54)。TGF- $\beta$ 1中和抗体は、培養組織における効果を逆転させることができた。このことは、他のTGF- $\beta$ 1抗体阻害剤が

、H I V患者のこの亜集団に存在する免疫抑制を逆転させる効用を有する可能性があることを示す。

【 0 1 5 1 】

T G F - 1の2つの腫瘍抑止/腫瘍促進の役割は、ケラチノサイトにおいて発現するT G F - 1にわたるトランスジェニック系において明らかに解明される。トランスジェニックが良性の皮膚病巣の形成に対して耐性である際に、トランスジェニックにおける転移性への転換率は劇的に増加した(C u i ら、1996年、C e l l 86(4):531-42)。原発腫瘍の悪性細胞によるT G F - 1の産生は、腫瘍発達の進行段階と共に増加する。主要な上皮癌の多くにおける研究は、ヒト癌によるT G F - 1のさらなる産生が、腫瘍発達中に比較的遅いイベントとして発生することを示唆する。さらに、腫瘍関連のT G F - 1は、腫瘍細胞に選択有利性を提供して、腫瘍発達を促進する。細胞/細胞及び細胞/ストローマの相互作用に対するT G F - 1は、浸潤及び転移に大きな影響を与える。たとえば悪性の脳腫瘍又は乳房腫瘍の患者に見られるように、腫瘍関連のT G F - 1は、活性化リンパ球のクローン増殖の強力な阻害剤であるので、腫瘍細胞による免疫学的監視から逃れることができる(A r t e a g a ら、1993年、J . C l i n . I n v e s t . 92:2569-76)。T G F - 1は、アンジオスタチンの産生を阻害する。放射線療法及び化学療法などの癌治療法は、腫瘍における活性化T G F - 1の産生を誘発することによって、T G F - 1の増殖阻害性効果に対して耐性のある悪性細胞の成長を選択する。したがって、これらの抗癌治療法は、リスクを増加させ、悪性腫瘍の発育を促進する。T G F - 1によって媒介される細胞情報伝達を防止する要因は、かかる状況における極めて有効な治療戦略であるとされる。T G F - 1に対する腫瘍細胞の抵抗によって、放射線療法及び化学療法の細胞毒性効果の多くを無効にし、ストローマにおけるT G F - 1の治療依存の活性化によって、微環境が腫瘍発達を引き起こす場合があり、線維症に至る組織損傷に寄与するので、有害となる場合がある。前立腺癌細胞は、高度のT G F - 1を発現し、脈管形成を刺激することによって、かつ、腫瘍細胞に対する免疫反応を阻害することによって、前立腺癌の成長及び転移を高めるものと思われる。前立腺癌細胞は、しばしばT G F ベータ受容体を欠損しており、T G F - 1の抗増殖性及びプロアポトーシスの効果に対する耐性が得られる。したがって、T G F - 1の高い発現及びT G F ベータ受容体発現の欠損は、ヒト前立腺癌患者における特に悪い予後に関連している(W i k s t r o m ら、2000年、S c a n d J U r o l N e p h r o l . 34(2):85-94)。肝細胞癌(H C C )において、肝病巣及び結節におけるT G F - 1受容体発現の同時欠損のT G F - 1発現の誘発は、変質した肝細胞をT G F - 1誘発のアポトーシスから逃避させることによって、肝臓癌発生中に変質した肝細胞に成長効果を与える(L i m、2003年、M e c h A g e i n g D e v . 124(5):697-708)。頭頸部扁平上皮癌において、早期のT G F - 1過剰発現は、発癌促進性微小環境を提供する(L u ら、2004年、C a n c e r R e s 64(13):4405-10);結合性組成物は、直接的又は間接的な相互作用を介して、高増殖性疾患、状態、障害、又は症候群(たとえば新生物など)を調整、回復、治療、防止、及び/又は診断するために使用することができる。たとえば、高増殖性状態を調整する細胞増殖の阻害を防止することによって、或いは、免疫反応を増加させることによって(たとえば高増殖性状態に関係するタンパク質の抗原性を増加させることによって)、或いは、特異性の細胞型(たとえばT細胞)の増殖、分化、或いは、動員を引き起こすことによって、たとえば、T G F ベータ1は、Tリンパ球、リンフォカイン活性化キラー細胞、NK細胞、好中球、マクロファージ、及びB細胞の、増殖及び機能分化を阻害する(L e t t e r i o 及びR o b e r t s、1998年、「R e g u l a t i o n o f t h e i m m u n e r e s p o n s e b y T G F B e t a」Ann Rev Immunol 16:137-61)。本発明の組成物を使用することによる望ましい効果は、たとえば、既存の免疫反応を強化することによって、或いは、新しい免疫反応を開始することによって達成できる。あるいは、望ましい結果は、たとえば、既存の免疫反応を減少させるか又は遮断することによって、或いは、新しい免疫反応の開始を防止するこ

10

20

30

40

50

とによって影響される場合がある。異常増殖細胞への局所投与は、たとえば、限定されるものではないが、トランスフェクション、エレクトロポレーション、細胞のマイクロインジェクション、又は媒介物（たとえばリポソーム、リポフェクチン、又は裸（naked）ポリヌクレオチド）を含む、本願明細書に記載された当該技術分野において周知の任意の方法又は技術によって達成され得る。「細胞増殖の状態」は、任意のヒト又は動物の、疾患、症候群、障害、症状、又は状態を意味し、任意の細胞、組織、任意の部位、あるいは、器官、組織、又は身体部分の任意の組み合わせに影響を及ぼし、良性又は悪性の細胞、細胞のグループ、又は組織の単数又は複数の局在性の異常増殖を特徴とする。

#### 【0152】

\*ニューロン疾患 - 神経の瘢痕化 (Loganら、1994年、Eur. J. Neurosci. 6: 355 - 63) ; 脳血管異常; アルツハイマー病 (Masliahら、2001年、Neurochemistry International 39: 393 - 400) (中前頭回 (midfrontal gyrus) におけるTGF- $\beta$ 1メッセンジャーRNA濃度は、明らかに脳部位の脳血管性のアミロイド堆積の相対量と相関する。そのことは、ヒトの脳血管異常におけるTGF- $\beta$ 1の考えられる役割を示唆する。神経膠星状細胞においてTGF- $\beta$ 1を過剰発現しているトランスジェニックマウスは、血管周囲の星状細胞増加、微小血管の基底膜肥厚、及び実質性退化がない場合におけるチオフラビンS陽性アミロイドの蓄積を含む、アルツハイマー病 (AD) 状の脳血管異常を発症する。脳内のTGF- $\beta$ 1の慢性過剰産生は、アミロイド脈管障害を伴うAD患者における障害を連想させる構造的障害及び機能的障害となる (Buckwalterら、2002年、Ann N Y Acad Sci. 977: 87 - 95) ; 増殖性網膜症 (Chaturvediら、2002年、Diabetes Care 25: 2320 - 7) ; TGF- $\beta$ 1過剰産生に関連する繊維増殖性の状態に関連する他の眼疾患は、増殖性硝子体網膜症を伴う網膜再付着外科手術を含む ; 人工水晶体体内移植による白内障摘出 ; 及びポスト緑内障排液外科手術。

10

20

30

40

50

#### 【0153】

\*造血性の状態 / 状態 - 脈管形成の内因性刺激要因と阻害剤との間の自然に生じる平衡性は、抑制効果が一般的に主である (たとえばRastinejadら、Cell 56: 345 - 355 (1989年) を参照のこと)。通常の生理学的条件 (たとえば損傷治療、器官再生、胚発生、及び女性の生殖作用) の下で血管新生が発生するときに、脈管形成は、厳密に調節され、空間的かつ時間的に範囲を定められる。たとえば固形腫瘍形成などの病的な脈管形成において、これらの制御調節は失敗し、無秩序な脈管形成が、多くの腫瘍性疾患及び非腫瘍性疾患の進行を継続することによって発症する場合がある。多くの重病疾患は、異常な血管新生を特徴とする (たとえば、固形腫瘍の成長及び転移、関節炎、一部の眼疾患及び乾癬を含む) ; たとえば、Mosesら、1991年、Biotech. 9: 630 - 634 ; Folkmanら、1995年、N. Engl. J. Med. , 333: 1757 - 63 ; Auerbachら、1985年、J. Microvasc. Res. 29: 401 - 11 ; Folkman, 「Advances in Cancer Research」Eds. Klein及びWeinhouse, Academic Press, New York, pp. 175 - 203 (1985年) ; Patz, 1982年、Am. J. Ophthalmol. 94: 715 - 43 ; 及びFolkmanら、1983年、Science 221: 719 - 25による考察を参照のこと。血管は、栄養素及び酸素を腫瘍細胞に送達し、それらが血液系に血管内遊出 (intravasate) させて転移に至るため、腫瘍脈管形成は、腫瘍の成長及び浸潤にとって重大である。TGF- $\beta$ 1は、いくつかのアッセイにおける脈管形成の強力な誘導物質として作用し (Robertsら、1986年、PNAS 83: 4167 - 71 ; Madriら、1988年、J. Cell Biol. 106: 1375 - 84 ; Yang及びMoses、1990年、J. Cell Biol. 111: 731 - 74 ; Gajdusekら、1993年、J. Cell. Physiol. 157: 133 - 44 ; Choi及びBallermann、1995年、J. Biol. Chem. 270: 21144 - 5

0)、TGFシグナル伝達構成成分に欠陥があるマウスモデルによって、正常な血管発達におけるTGF-1の重要性を示される。さらに、TGF-1及びその受容体ALK-5及びALK-1は、脈管形成の血管成熟段階に含まれる(たとえばBull Acad Natl Med, 2000年; 184(3): 537-44を参照のこと)。多くの疾患状態において、脈管形成は疾患状態に寄与し、たとえば、固形腫瘍形成が脈管形成に依存することを示唆する有意なデータが蓄積されている(たとえばFolkman及びKlagsbrun, 1987年, Science 235: 442-7を参照のこと)。本発明の別の態様において、結合性組成物の投与は、血管新生又は造血性細胞増殖に関連する疾患、障害、症候群及び/又は状態の治療、回復、変調、診断及び/又は阻害を提供する。結合性組成物を使用して所望の方法で効果が得られる悪性状態及び転移性状態は、たとえば、本願明細書に記載されているように、或いは、当該技術分野において公知であるように、限定されるものではないが、悪性腫瘍、固形腫瘍及び癌を含む(かかる障害、症候群などの考察については、たとえばFishmanら、Medicine, Current Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia 2002年を参照のこと)。たとえば、本発明の組成物を使用して効果が得られる癌は、たとえば、限定されるものではないが、前立腺、肺、乳房、卵巣、胃、膵臓、喉頭、食道、精巣、肝臓、耳下腺、胆管、結腸、直腸、頸部、子宮、子宮内膜、腎臓、膀胱、及び甲状腺癌を含む固形腫瘍; 原発腫瘍及び転移; メラノーマ; 神経グリア芽細胞腫; カボジ肉腫; 平滑筋肉腫; 肺非小細胞癌; 結直腸癌; 新構成悪性腫瘍; 及び血液由来の腫瘍(たとえば白血病)を含む。

10

20

#### 【0154】

\* 感染症 - 敗血症; (マウスのレーシュマニア感染症の過程は、TGF-1によって大幅に変質される。遺伝的に耐性のあるマウスは、TGF-1の投与に応じて、レーシュマニア感染症にかかりやすくなった。TGF-1は疾患を悪化させたが、TGF-1抗体は疾患進行を停止させた(Barral-Nettoら、1992年、Science 257: 545-7) )。

#### 【0155】

\* 脱毛 - 脱毛症; 脱毛(中和抗-TGF-1抗体は、用量依存的方法でアンドロゲン誘発のケラチノサイトの成長阻害を逆転させた。このことは、脱毛している真皮乳頭細胞に由来するアンドロゲン誘発性TGF-1が、雄性発生の脱毛症における発毛抑制を媒介することによって、ヒトの禿頭症において役割を果たしえることを示唆する)(Inuiら、2002年、FASEB J, 16(14): 1967-9); したがって、本発明は、脈管形成関連の疾患及び/又は障害を回復、調整、治療、防止、及び/又は診断する方法を提供し、該方法は、その必要のある被験者に対して有益に効果的な量の結合性組成物を与えることを含む。

30

#### 【0156】

本発明の幅広い範囲は、以下の実施例を参照して最も良く理解され、実施例は本発明を特定の態様に制限することを目的としない。

#### 【実施例】

#### 【0157】

##### 一般的手法

本願明細書に記載されている標準分析法の多くは、たとえば、Sambrookら(2001) Molecular Cloning, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY; 及びその関連するウェブサイト:(www.MolecularCloning.com); Ausubelら, Biology Green Publishing Associates, Brooklyn, NY; 又はAusubelら(1987 and Supplements) Current Protocols in Molecular Biology Wiley/Greene, (NY); Bartlett & Stirling(2003) PCR Pro

40

50

tocols: Methods in Molecular Biology Vol. 226 Humana Press, (NJ)に記載又は参照されている。タンパク質精製方法としては、硫酸沈殿法、カラムクロマトグラフィー、電気泳動法、遠心沈殿法、結晶法、その他の方法が挙げられる(Ausubel, et al. (1987 and periodic supplements); Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification" Methods in Enzymology 第182巻及びこのシリーズの他の巻: Coligan, et al. (1995 and supplements) Current Protocols in Protein Science John Wiley and Sons, New York, NY; Matsudaira (ed.) (1993) A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, Academic Press, San Diego, CA; 及びmanufacture's literature on use of protein purification products, e.g., Pharmacia, Piscataway, NJ, 若しくはBio-Rad, Richmond, CA参照)。組換え技術の組み合わせによって、適切なセグメント(エピトープ標識)へ融合できる。たとえば、着脱可能なプロテアーゼ配列で、FLAG配列又は等価物を融合できる。Hochuli (1989) *Chemische Industrie* 12: 69 - 70; Hochuli (1990) "Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent" Setlow (編集) *Genetic Engineering, Principle and Methods* 12: 87 - 98, Plenum Press, NY; 並びにCrowe, et al. (1992) *QIAexpress: The High Level Expression and Protein Purification System* QUIAGEN, Inc., Chatsworth, CA参照。

【0158】

標準的な免疫学的技術は、たとえば、Hertzenbergら(編集)第5版 1996, *Weir's Handbook of Experimental Immunology* 第1から4巻, Blackwell Science; Biererら編集(2004) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene, NY; 及び *Methods in Enzymology* 第70, 73, 74, 84, 92, 93, 108, 116, 121, 132, 150, 162 及び163巻, Elsevier, USAに記載されている。

【0159】

実施例1

CDR及びヒトフレームワークを用いたFabの構造及びスクリーニング

単一の突然変異体の抗体可変部CDRライブラリの特徴づけ及び合成するために標準方法を用いる(Wuら, 1998, *PNAS* 95: 6037 - 42参照)。ライブラリを、抗体軽鎖を含むバクテリオファージM13発現ベクター及び本発明のCDR配列と共に本願明細書に記載されているヒト定常領域並びに可変部基質配列からなる重鎖遺伝子を構築する。場合によっては、標的CDRを、ヌクレオチドをアニーリングする前に、最初に除去する。オリゴヌクレオチド合成のために、コドンベースの突然変異誘発によって、本発明のCDR配列を得る。

【0160】

ライブラリを、最初にカプチュールリフトで選別し、最も親和性の高い変異体を識別する。カプチュールリフトによる手順(Watkins, 2002, *Methods Mol. Biol.* 178: 187 - 93)は公知の技術であり、国際公開/0164751号パンフレット及び米国特許出願公開第2002/0098189号明細書に記載されている。次いで、本願明細書に記載されているように、所望のクローンを、ELISA及び

細胞増殖能アッセイで固定された抗原に滴定して更に特徴づける。かかる選別の後、解離定数 ( $K_d$ )、結合速度 ( $K_{on}$ ) 及び解離速度 ( $K_{off}$ ) を、対象クローンに対して測定する。

#### 【0161】

合成CDRのライブラリを、本願明細書に記載の方法又は公知の方法で欠失テンプレートに挿入して、本発明の包埋ドナーCDRを含む潜在的な抗体結合組成物を決定する。標準的突然変異誘発技術 (Kunkel, 1985, PNAS 82: 488-92) を、突然変異誘発性のオリゴヌクレオチドのプールを用いて特定のCDRの置換に用いる。一般的に、フレームワーク中のCDRの配置を、CDRH1は例外として、Kabattによって定義されたシステムを用いて実施する。それはKabatt及びChothia定義の要旨である。突然変異誘発性のオリゴヌクレオチドを、対応するCDRが欠失しているウリジニル化したファージテンプレートにアニーリングする。

10

#### 【0162】

反応物を85°Cで5分間インキュベートし、次いで45分間以上かけて20°Cまで放冷して、アニーリングを実施する。アニーリングしたサンプルを氷上に置き、T4DNAポリメラーゼ及びT4DNAリガーゼを添加して、二本鎖DNAを生成し、反応物を4°Cで5分間、次いで37°Cで90分間インキュベートする。反応物は、抽出したフェノール、沈殿したエタノールであり、得られたDNAをDH10B細胞へと電気穿孔する。XLR細胞を反応物に添加して、ライブラリが培養される前にファージ増幅を可能にする。ファージストックを、プレートに8mlの増殖培地を添加して調製し、4°Cで最低4時間インキュベートする。ファージ含有培地を収集し、遠心沈殿法で浄化し、アジ化ナトリウム (0.02%) を防腐剤として添加する。

20

#### 【0163】

ライブラリの最初の選別を、Watkinsら, 1998, Anal Biochem 256: 169-77, 及びWatkins, 2002, Methods Mol Biol., 178: 187-93に記載されているように、ブランクリフトで実施する。固定された抗ヒト抗体に結合する個々のブランクから発現したFabを含むフィルタを、ビオチン化TGFβ-1 (バイオ-TGFβ-1)、ニュートラアビジン-アルカリホスファターゼ (NA-AP) で、合間に簡単に洗浄しながら順次インキュベートする。関連するクローンを順番に配列し、ELISAで更に特徴づける。通常ELISAには、0.4 µg/mlのTGFβ-1、TGFβ-2又はTGFβ-3を、終夜4°Cで塗布したCostar 3366のマイクロタイタープレートを使用した。プレートを、各ウェルに100 µLのブロッキング溶液 (洗浄バッファ中の10 mg/mlのBSA) を添加する前に、続けて2度洗浄する。Fabの希釈溶液を、被覆ウェル中で22°Cで1.5時間インキュベートする。洗浄後、抗ヒト-アルカリ性ホスファターゼ接合体を添加して、22°Cで1時間インキュベートする。発色基質を、十分な洗浄後に添加し、A560の吸光度で測定して、陽性クローンを同定する。

30

#### 【0164】

ELISAによるFabの分析

非限定的な一実施例では、ELISAに、0.4 µg/mlのTGFβ-1、TGFβ-2又はTGFβ-3 (TGFβ-1 (R&D Systems, Cat# 240-B/CF, 239 µg/ml), TGFβ-2 (RDI, Cat# RDI-1035, 50 µg/ml) 及びTGFβ-3 (RDI, Cat# RDI-1036/CF, 50 µg/ml) を、コーティング緩衝液中で0.4 µg/mlに希釈した) を、終夜4°Cで塗布したCostar 3366のマイクロタイタープレートを使用する。プレートを、各ウェルに100 µLのブロッキング溶液 (洗浄バッファ中の10 mg/mlのBSA) を添加する前に、続けて (2度) 洗浄する。本発明のFabの希釈溶液を、被覆ウェル中で (22°Cで1.5時間) インキュベートする。洗浄後、抗ヒト-アルカリホスファターゼ接合体を添加して、 (22°Cで1時間) インキュベートする。発色基質を、十分に洗浄後に添加し、吸光度をA560で測定する。

40

50

## 【0165】

別の実施例では、本発明の結合性組成物を、競合ELISAアッセイで検査する。一般的に、溶液相アッセイは、はじめに、結合組成物（たとえば抗体）に対する結合に関して抗原と競合し得る化合物を液相中で抗体と混合し、次いで、抗原に対する抗体の結合の程度を測定する。

## 【0166】

物質：

炭酸塩コーティング緩衝液は、50 mMのpH 9.6の炭酸ナトリウムからなる。抗原は、コーティング緩衝液中で0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈されたTGF- $\beta$ 1 (R&G Systems, Cat # 240-B/CF, 239  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、TGF- $\beta$ 2 (RDI, Cat # RDI-1035, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )及びTGF- $\beta$ 3 (RDI, Cat # RDI-1036/CF, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )である。洗浄バッファは、0.02 MのpH 7.4のトリス、0.15 MのNaCl、0.1%のTween 20及び洗浄バッファ中に溶解した10  $\text{mg}/\text{mL}$ のBSA (Sigma A-4503)のブロッキング溶液からなる。陽性対照として使用するタンパク質は、マウス-抗ヒトのTGF- $\beta$ 1、2又は3 (R&D Systems, cat # 1D11)、マウス-抗ヒトのTGF- $\beta$ 2 (R&D Systems, cat # BAF302)及びマウス-抗ヒトのTGF- $\beta$ 3 (R&D Systems, cat # BAF243)であり、ブロッキングバッファ中で1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈されている。使用する検出抗体複合体は、ブロッキング溶液中で使用濃度が1:2000の抗マウス - ペルオキシダーゼ接合体 (Southern Biotech, cat # 1050-05) である。呈色反応に用いた基質は、O-フェニレンジアミン (OPD) 錠剤 (Sigma cat # P-6912) であり、基質バッファ (0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、pH 5.0以下の0.05 Mのクエン酸を有する) 中に溶解される。各プレート展開前に、OPD基質希釈標準溶液 (すなわち1枚の196-ウェルプレートの容積) を、12.5 mLの基質バッファ中に1 x 5 mgのOPD錠剤を溶解し、次いで5  $\mu\text{L}$ の30%の $\text{H}_2\text{O}_2$ を添加することにより、新たに調製する。

## 【0167】

プロトコール：

単一の96ウェルプレートを、抗原 (0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のTGF- $\beta$ 1、2又は3であり、各ウェルごとに50  $\mu\text{L}$ ずつ分配されている) でコーティングし、次いで、貯蔵 (4で16-20時間) の前に接着テープで封止する。プレートを、各ウェルに100  $\mu\text{L}$ のブロッキング溶液 (洗浄バッファ中の10  $\text{mg}/\text{mL}$ のBSA) を添加する前に、(前記) 洗浄バッファで続けて (2度) 回洗浄する。インキュベーション (22でほぼ1時間) 後、プレートを洗浄バッファで (2度) 回洗浄する。次いで、100  $\mu\text{L}$ のサンプル (バッファで希釈される) 又は実験対照 (PBSで希釈される) のいずれかを各ウェルに添加して、(22で1.5時間) インキュベートする。インキュベーション後、プレートを、各ウェルごとに100  $\mu\text{L}$ の抗マウス - ペルオキシダーゼ接合体 (ブロッキング溶液中で1:2000に希釈される) 又はSA-HRP (ブロッキング溶液中で1:10、000に希釈される) のいずれかを添加する前に、洗浄バッファで (6度) 洗浄する。試験サンプルを、各ウェルに100  $\mu\text{L}$ のOPD基質を添加する前に、インキュベーション (22で1時間) する。発色現象 (ほぼ10分) の後、96穴プレートを、490 nmの吸光度で測定する。

## 【0168】

このような条件下での成果は、490 nmのTGF- $\beta$ 1で1.6ユニットより大きい吸光度を生じるが、TGF- $\beta$ 2及びTGF- $\beta$ 3では有意に低い値を示し、TGF- $\beta$ 1に対して特異的及び/又は選択的な結合を示すFabの態様である。

## 【0169】

細胞ベースのアッセイでのmAbsの分析

TGF- $\beta$ 生理活性を中和し、特定のTGF- $\beta$ アイソフォームを中和する本発明

の結合組成物の性能を試験するため、Tsangら(1995 Cytokine 7:389-97)のHT-2細胞増殖アッセイを適応させることができる。HT-2細胞増殖アッセイを利用して、Fab及びmAb組成物のインビトロ効力を判定する。簡潔には、HT-2細胞は、IL-4の存在下で増殖するが、TGF-ベータの存在下でアポトーシスを受ける。TGF-ベータ誘発性の細胞死を、TGF-ベータ1を中和するFab又はmAbの添加により防止する。

【0170】

ヒト細胞系HT-2は、IL-4に応答して増殖するが、IL-4により誘発された増殖は、TGF-ベータ1、TGF-ベータ2又はTGF-ベータ3により阻害される。従って、TGF-ベータ1に対して特異的及び/又は選択的な結合組成物は、それがIL-4により誘発されたHT-2細胞に対してTGF-ベータ1が有する通常の抑制効果を防止するならば、中和をしている。従って、十分なTGF-ベータ1の特異結合組成物をTGF-ベータ1を含むHT-2細胞の混合液に添加する場合、IL-4により誘発される細胞増殖は制約を受けることなく進行するはずである。従って、本発明の結合組成物の用量応答中和能力を、特定のTGFアイソフォーム及びIL-4増殖シグナルの存在下で、HT-2アッセイを使用して評価する。細胞増殖の程度を、市販の比色細胞増殖測定(たとえば、PromegaのCellTiter 96(登録商標)Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay)を用いて評価する。

【0171】

HT-2細胞を、それぞれ100U/ml及び100ug/mlの10%FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン、50uMのβ-メルカプトエタノール及び10ng/mlのヒトIL-2(R&D Systems)を添加したRPMI1640中で維持する。細胞を、Jouan CR422遠心分離機で1000回転数/分で遠心分離して、PBS中で再懸濁する。PBSで2度洗浄した後、それぞれ100U/ml及び100ug/mlの2%FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン、50uMのβ-メルカプトエタノールを添加した遊離フェノールレッドRPMI1640からなるアッセイ媒体中で細胞を最終的に再懸濁し $0.15 \times 10^6$ 細胞/mlとする。アッセイ媒体中の50ulの細胞を、96ウェルプレートの各ウェルに添加する。細胞バイオアッセイに被検mAbsを添加する前に、種々の濃度のmAbを、300pg/mlのTGF-ベータ1、TGF-ベータ2又はTGF-ベータ3(アッセイ媒体中)とプレインキュベートする。30分のインキュベーション後、50ulのTGF-ベータ/Fab混合液を細胞に添加し、次いで直ちに45ng/mlのマウスIL-4(終濃度15ng/ml)を含む50ulのアッセイ媒体を添加する。20~48時間のインキュベーション後、35ulのCellTiter 96水溶液(Promega Corp)を添加する。更に2~3時間のインキュベーション(加湿状態で37℃、5%の二酸化炭素雰囲気の下)の後、アッセイを、ELISAプレート読み取り装置上で、CellTiter 96(登録商標)比色アッセイを用いて490nmで分析することにより数量化する(生成したホルマジン生成物の量(490nmの吸光度により測定される)は、培養物中の生細胞の数と正比例している)。モデルデータを、下記のTable 2に示す。

Table 2 HT-2インビトロ細胞バイオアッセイ:

【表3】

抗-TGF-β1 mAb結合性組成物	mAb2471と比較したIC50の改善率
21D1	106.8+16.1
DM4	391.0+5.2
DM7	140.0+29.2
C27	401.0+132.3
23A3	234.2+37.9

10

20

30

40

50

HT-2細胞増殖アッセイを用いて、本発明のFab及びmAb結合組成物のインビトロ効力を判定する。HT-2細胞は、IL-4の存在下で増殖するが、TGF-ベータの存在下でアポトーシスを受ける。TGF-ベータ誘発性の細胞死を、TGF-ベータ中和組成物（たとえば本発明のFab又はmAb）の添加により防止する。マウスIgG1 Fab # 2471と比較して、本発明の結合組成物は、TGF-ベータ誘発性細胞死の防止における中和効力の少なくとも100倍以上の改善を示した。mAb組成物のIC50は、約0.1~1.0 ng/ml (mAb 2471のIC50は、約0.1 µg/mlである)の範囲である。

#### 【0172】

Fabの反応速度定数の測定

KinExA3000計測器(Sapidyne Inst. Inc.)を用いて、結合速度定数を測定する。簡潔に言えば、抗原をalzoctoneビーズと共有結合させ、ビーズに対する本発明の遊離Fab結合組成物の結合を計測器で検出する。Kdを測定するため、20 pMのFab (mAbに対して200 pM)を連続希釈された抗原(0-250 nM)と共に含む各試験管を、1%BSA、0.02%のアジド及び0.01%のTween20を含むPBS中で25℃にて1~6日間インキュベートする。インキュベーション後、各平衡サンプル中の遊離Fabを、取扱説明書に従いKinExA3000で測定する。Kd値を、KinExA3000ソフトウェアを用いて求める。

#### 【0173】

konを測定するため、2 nMのFabをそれぞれ、取扱説明書に従った注入法を用いて0~240 nMの抗原と混合し、結合しなかったFabを検出する。結果データを用い、KinExA3000ソフトウェアによりkonを算出する。koffは、式 $K_d = k_{off} / k_{on}$ を用いて算出する。

#### 【0174】

Mabに対する反応速度定数の測定

反応速度定数の測定の別の方法は公知である。たとえば、ヒトのTGF-ベータ1(R&D Systems, Cat# 240-B/CF)、TGF-ベータ2(RDI, Cat# RDI-1035)及びTGF-ベータ3(RDI, Cat# RDI-1036/CF)に対する結合組成物の親和性を、BIACore(登録商標)2000計測器を使用して測定する。BIACore(登録商標)は、表面プラズモン共鳴の光学特性を利用して、デキストランバイオセンサマトリクスの中で相互作用する分子のタンパク質濃度の変化を検出する。特に明記しない限り、すべての試薬及び物質はBIACore(登録商標)AB(Upsala, Sweden)から購入する。すべての測定は室温で行う。サンプルを、HBS-EPバッファ(150 mMの塩化ナトリウム、3 mMのEDTA、0.01% (w/v)の界面活性剤P-20及び10 mMのHEPES (pH 7.4))中に溶解する。組換えプロテインAを、CM4センサチップの全4つのフローセルに、アミン結合キットを用いて、400-450の応答単位(RU)レベルで固定する。

#### 【0175】

結合を、複数の分析サイクルを用いて測定する。各サイクルは、50 µL/分の流速で実施し、次の工程からなる：12 µLの抗体結合組成物0.5 µg/mlを注入、250 µLのTGF-ベータ1を注入(5 nMにて開始、0.13 nMまで各サイクルにつき二倍階段希釈、各濃度につき注入は2回)、次いで、短時間(5分)または長時間(120分)において解離させ、50 µLの10 mMグリシンヒドロクロリド(pH 1.5)を2度注入し再生成させる。各サイクルの会合速度と解離速度を、単純な会合モデルを用いているClampXP(Center for Biomolecular Interaction Analysis, Univ. of Utah)を用いて、バイオセンサデータを適合し、kon及びkoff速度定数を抽出して求める。平衡結合定数Kdを、関係式 $K_d = k_{off} / k_{on}$ を用いて算出する。本発明組成物のモデルデータを、以下のTable 3に示す。

10

20

30

40

【表 4】

	Fab結合データ (Kinexa)			Mab結合データ (Biacore)		
	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$ ( $\times 10^{-6}$ )	$k^{off} (sec^{-1})$ , calc, ( $\times 10^6$ )	$K_d (pM)$	$k^{on} (M^{-1} s^{-1})$ ( $\times 10^{-7}$ )	$k^{off} (sec^{-1})$ , ( $\times 10^5$ )	$K_d (pM)$ (calc)
2471	1.7	664	406	nd	nd	nd
21D1	4.0	3.4	0.9	$1.3 \pm 0.1$	$< 0.6 \pm 0.6$	$< 0.5 \pm 0.5$
DM4	4.2	5.1	1.2	$1.6 \pm 0.3$	$1.4 \pm 0.9$	$0.9 \pm 0.4$
DM7	4.5	2.3	0.5	$1.3 \pm 0.3$	$< 0.7 \pm 0.4$	$< 0.5 \pm 0.4$
C27	4.1	17	4.2	$1.3 \pm 0.1$	$0.8 \pm 0.5$	$0.6 \pm 0.4$
23A3	4.8	19	4.0	$1.9 \pm 0.4$	$1.0 \pm 0.8$	$0.8 \pm 0.6$

10

Table 3 本発明の Fab 及び mAbs の結合親和性及び反応速度測定

平衡結合パラメータ ( $K_d$ ) 及び動的結合パラメータ ( $k_{on}$ ) を、Kinexa ( $k_{off}$  は、 $K_d$  及び  $k_{on}$  から算出される) を用いて求める。mAbs の平衡状態及び及び動力学的結合特性を、ピアコアを用いて求める。平衡結合定数  $K_d$  を、求めた  $k_{on}$  及び  $k_{off}$  から算出する。マウス IgG1 Fab # 2471 と比較する。極めて緩慢な解離のため、21D1 及び DM7 の  $k_{off}$  は、検出可能な上限値であり、したがって更に緩慢である傾向があり、算出した  $K_d$  値もまた上限値となる。値は、繰り返し測定した値 ( $n = 3 \sim 4$ ) の平均である。

20

## 【0176】

Mab 特異性の測定

Biacore 法を用いて、本発明の mAb 組成物が他の実体、特に TGF- $\beta$ 1 又は TGF- $\beta$ 3 の潜在的な形に結合する能力を測定する。すべての測定を室温で実施する。サンプルを、HBS-EP バッファ (150 mM の塩化ナトリウム、3 mM の EDTA、0.01% (w/v) の界面活性剤 P-20 及び 10 mM の HEPES (pH 7.4)) 中に溶解する。組換えタンパク質 A を、CM4 センサチップの全 4 つのフローセルに、アミン結合キットを用いて、400 - 450 の応答単位 (RU) のレベルで固定する。

## 【0177】

結合を、複数の分析サイクルを用いて評価する。各サイクルを 100  $\mu$ L / 分の流速で実施し、次の工程からなる: 1  $\mu$ g / mL の抗体結合組成物 15  $\mu$ L を注入、250  $\mu$ L の 5 nM TGF- $\beta$ 1、5 nM 潜在性の TGF- $\beta$ 1 又は 5 nM の TGF- $\beta$ 3 のいずれかを注入、次いで、短時間 (5 分) おき、50  $\mu$ L の 10 mM のグリシンヒドロクロリド (pH 1.5) の 2 度の注入により再生させる。最初に Mab、次いでリガンドを捕捉したシグナル量を計測器制御ソフトウェアを用いて求める。シグナルが、捕捉されたタンパク質の質量と比例しているため、捕捉されたりリガンドの化学量論は容易に計算可能である (Table 4)。

30

## 【表 5】

Mab	リガンド結合の化学量論		
	TGF- $\beta$ 1	潜在型 TGF- $\beta$ 1	TGF- $\beta$ 3
21D1	1.29	0.05	0.16
DM4	1.55	0.03	ND
DM7	1.23	0.04	0.54
C27	1.74	0.08	ND
23A3	1.63	0.07	1.26

40

Table 4 TGF- $\beta$ 1、潜在性の TGF- $\beta$ 1 及び TGF- $\beta$ 3 の mAbs (5 nM リガンドで試験) との結合

## 【0178】

50

## TGF-β1の特異性

TGF-β3に対する結合組成物mAbsの親和性を、BIAcore方法を用いて求める。すべての測定を室温で実施する。サンプルを、HBS-EPバッファ(150mMの塩化ナトリウム、3mMのEDTA、0.01%(w/v)の界面活性剤P-20及び10mMのHEPES(pH7.4))中に溶解する。組換えプロテインAを、CM4センサーチップの4つのフローセルに、アミン結合キットを用いて、400-450の応答単位(RU)のレベルで固定する。結合を、複数の分析サイクルで評価する。各サイクルは、100μL/分の流速で実施され、次の工程からなる: 0.5μg/mLの15μLの抗体結合組成物を注入、250μLのTGF-β3(5nMにて開始、0.13nMまで各サイクルにつき二倍階段希釈、各濃度につき注入は2回)を注入し、次いで、解離のため短時間(5分)おき、50μLの10mMのグリシンヒドロクロリド(pH1.5)を2度注入し再生させる。

10

## 【0179】

TGF-β3注入の最後の10秒間で平均シグナルを測定して種々のTGF-β3の濃度で達した平衡シグナルに基づき、全てのTGF-β3濃度で得られたシグナルをSCRUBBER(Center for Biomolecular Interaction Analysis, Univ. of Utah)にて単純な結合均衡モデルに適合させて親和性を判定する。本発明の試験したヒトmabの $K_d$ 及び特異性(記載のTGF-β3結合の $K_d$ をTGF-β1結合の $K_d$ で割ることにより求めた)のモデルデータを、以下のTable 5に示す。

20

## 【表6】

Mab	$K_d$ (TGF-β3), nM	特異性 ( $K_{d, \beta3}/K_{d, \beta1}$ )
21D1	4.90	9800
DM4	0.53 ± 0.01	621
DM7	1.16 ± 0.18	2320
C27	2.20	3670
23A3	0.66 ± 0.04	1050

Table 5 TGF-β3の結合に対するmAbsを検査した結合組成物の親和性及び比特異性

30

示されている誤差は複数回の繰り返し測定(n=3)による標準偏差を表す。

## 【0180】

## 実施例2: 肝線維症胆管結紮In Vivoモデル

Ariasら(BMC Gastroenterology 3(29), 2003)による報告と類似の方法で、胆管結紮モデルを用いて、抗TGF-β1療法のIn Vivo有効性を測定する。簡潔には、オスのSDラット(250-300g)を、イソフルラン(2-3%)吸入で、作用するまで麻酔する。腹部を剃毛し、ベタジン及び70%のエチルアルコールで洗浄する。無菌条件の下、正中切開(~4cm)し、総胆管を分離し、ほぼ1cm離して6-0の外科用絹糸で2箇所を結紮し、次いで、結紮箇所の間を横切開する。腹壁を4-0の絹糸縫合で閉じて、皮膚をホチキスで留める。抗TGF-β1組成物の投与及びアイソタイプマウス制御mab(IgG)を、手術の日に開始し、次いで7日ごとに実施する。術後4から12日で、ラットを安楽死させ、血清肝酵素、全血球数算定及び肝組織像(トリクローム及びH&E染色)を実施し、治療の効果を判定する。

40

## 【0181】

## 実施例3: 肺線維症In Vivoモデル

肺線維症の抗TGFβ組成物のIn Vivo有効性を判定するために多くのモデルが利用できる。たとえば、プレオマイシンモデルを、Pittetら(JCI 107, 1537-1544, (2001))により報告された方法に適用し、抗TGFβ方法における改善を評価する。別のモデルは、呼吸器レオウィルス1/Lモデル(Bel

50

lumら, Am. J. Pathol, 150, 2243; 又は Londonら, Clin. Immunol. 103, 284; 及び Londonら, Exp. Mol. Pathol, 72, 24-36 参照) である。簡潔には、マウスを用いて、1日目に、レオウイルス  $1/L$ 、 $i.n. 1 \times 10^7 pfu$  (合計  $30 \mu l$ ) を、鼻孔から投与し、3日目、7日目、12日目に、本発明の抗 TGF $\beta$  結合組成物の濃度を变化させて投与するか、若しくは本願明細書に記載の方法又は公知の技術で、アイソタイプコントロール mAb を投与する。動物を、呼吸困難、体重損失及び死亡率の徴候の治療期間の間観察する。治療の開始から14日後、動物を安楽死させ、組織病理学検査 (H/E) 用に肺サンプルを調製し、(繊維増多の測定にヒドロキシプロリン含有量を分析して) 肺疾患の発現及び/又は進行を判定する。

10

## 【0182】

実施例4：抗 Thy 1.1 系球体腎炎 In Vivo モデル

ラット抗 Thy 1.1 モデルは、メサンギウム増殖性系球体腎炎 (Moritaら, 1998 Am J Kidney Dis 31: 559-73; Bagchusら, 1986 Lab. Invest. 55: 680-7 及び Yamamoto & Wilson 1987 Kidney Int. 32: 514-25 参照) の確立されたモデルであり、系球体間質細胞の表面にある Thy 抗原に対する抗体の注入は、メサンギウム融解を誘発し、次いで、系球体間質細胞を過剰代償増殖させ、尿タンパク質 (蛋白尿) を上昇させる。抗 Thy 1.1 腎炎モデルは、多くの面でヒト IgA 腎炎又はヘノッホ-シェーンライン紫斑病 (O'Donoghueら, 1991 J Clin Invest 88: 1522-30) と類似しており、試験組成の能力を判定して、蛋白尿 (Burgら, 1997 Lab Invest 76: 505-16; Johnsonら, 1995 Kidney Int 47: 62-9 参照) の用量関連減少を生じさせることにより、腎臓病の潜在的治療法の検査に用いる。

20

## 【0183】

そのようなモデルにおいて本発明の結合組成物を試験するために、それぞれ印をつけたオスSDラット (200-260グラム、ほぼ生後9週間目) を、標準食餌で餌と水を自由に摂取させて5日間前処理し、環境に順化させた。尿前タンパク定量は、処理の5日前に実施する。眼窩後で出血させる前にラットの尾にマーカーで着色すると共に耳にタグを付けて個体識別し、1日目に体重によって5群に無作為に分ける。

30

## 【0184】

試験は投与群が分からないようにして行い、検査終了時に非盲検とする。対照群には、1.25 mg の抗 Thy 1.1 mAb 又は PBS を、0日目に陰茎の静脈から投与する。結合組成物を、標準的な条件でまたは本願明細書に記載されている方法で、調製及び精製する。コントロールマウス IgG 1 mAb (11513) は、PBS pH 7.2 で再懸濁されたプロテインA精製物質であり、Harlan Bioproducts for Science, Indianapolis, IN 46229-0176 から購入する。

## 【0185】

マウス抗 Thy 1.1 は、マウスハイブリドーマの  $2 \times 10^6$  の培養組織中に産生させる。培養上清を混合し、18倍に濃縮した後精製する。約  $764 \text{ mL}$  の得られた濃縮上澄を、1.5 M のグリシン / 3.0 M の NaCl pH 8.9 と混合し、1.5 M のグリシン / 3.0 M の NaCl pH 8.9 で予め平衡化した未使用の  $137 \text{ mL}$  のプロテインA Sepharose カラムに入れる。次いで、プロテインA カラムを、1.5 M のグリシン / 3.0 M の NaCl pH 8.9 で洗浄する。カラムを、100 mM のクエン酸 pH 3.0 で溶離する。IgG と一致する溶離液の選択された留分をプールし、pH 7.4 に 1 M の NaOH で調整し、PBS (pH 7.4 塩化ナトリウム) 中の  $318 \text{ mL}$  のファルマシア Superdex 200 に適用する。IgG と大きさが一致するピークをプールし、等分して、 $-20^\circ\text{C}$  で保管する。

40

## 【0186】

50

抗Thy1.1 mAb投与の1時間後、動物に、アイソタイプ又は本発明の抗TGF- $\beta$ 1抗体組成物を皮下投与する。抗体を7日目に再び投与し、動物を以下の4種類の治療グループで検査する。

1) 擬似的処置; PBS注入

2) 抗thy1.1、アイソタイプコントロール抗体約12.5 mg/kg又は2.5 mg/dose

3) 抗thy1.1、DM4抗体約5 mg/kg又は1 mg/dose

4) 抗thy1.1、DM7抗体約12.5 mg/kg又は2.5 mg/dose

5) 抗thy1.1、C27抗体約12.5 mg/kg又は2.5 mg/dose

【0187】

ラットを、5日目と13日目に24時間代謝ケージに置く。14日目に、ラットをCO<sub>2</sub>で屠殺し、心臓穴から出血した血液を採取して分析する。左腎は、PBS中の4%のパラホルムアルデヒドで固定し、後の組織分析のために70%のエタノール中で保管する。ラットが瀕死となる場合は、屠殺し(CO<sub>2</sub>)、尿タンパク質及び血中尿素窒素濃度について処理をする。尿タンパク質及び血中尿素窒素(BUN)濃度を、HITACHI 911自動分析器にてBioradのコントロールを用い取扱説明書に従い分析する。

【0188】

下記Table 6のモデルデータは、本発明の結合組成物がIn Vivoで腎障害を軽減し、抗Thy1.1 mAb誘発性腎障害に関連する尿タンパクの増大を軽減させる有意の能力を有することを示す。

10

20

【表 7】

Thyl. I Ab	Ab group	試験番号	14日目の尿タンパク (mg/24 hrs)			対照IgG濃度 (%)	
			用量 (mg)	平均	標準 誤差	平均	標準誤差
			擬似的 処置	7	3		
2.5 mg/kg	21-D1	HS4606	0	73.4	9.5	100	14.3
i. v.			0.1	65.7	7.3	88.5	11.1
			0.5	35.2	6.2	42.5	9.3
			1	29.1	3.8	33.3	5.8
			擬似的 処置	9.9	2.3		
2.5 mg/kg	DM4	HS4607	0	67.2	6.5	100	11.3
i. v.			0.1	54.7	6.2	78.1	10.8
			0.5	49.7	6.2	69.4	10.7
			1	28.9	4.7	33.2	8.2

10

20

30

40

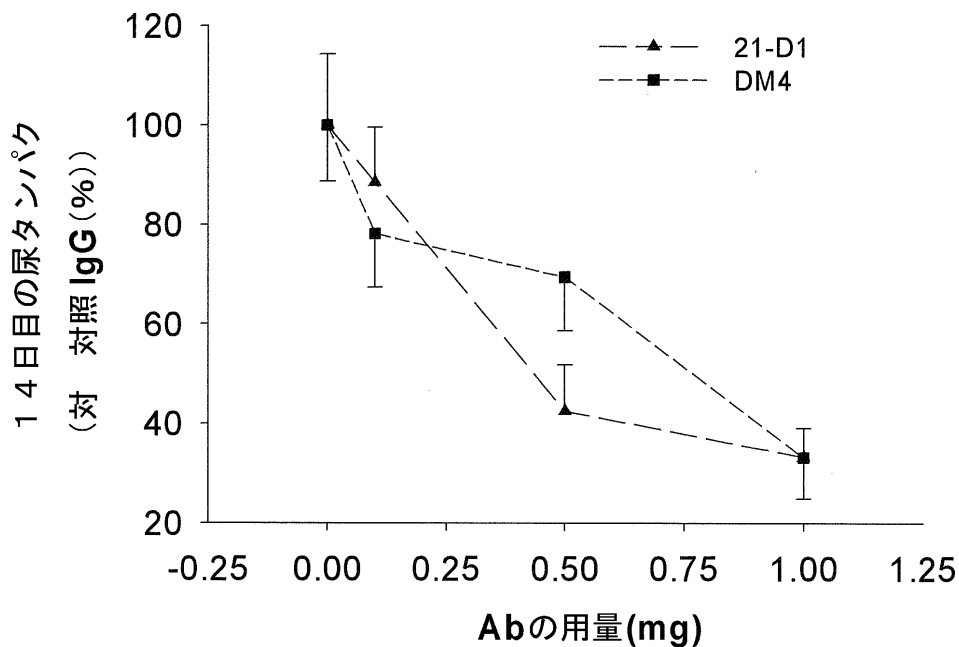


Table 6

ラットに、2.5 mg/kgのThy1.1 mAbを注入し、次いで、30分後に21-D1及びDM4研究の1 mgのHerceptinを注入する。抗TGF-β1及びコントロールmAbの2度目の投与を、7日目に行い、動物を14日目に安楽死させる。21-D1及びDM4 mAb結合組成物は、用量依存的方法で尿タンパク質濃度(蛋白尿)を減少させる。

【0189】

50

## 実施例 5

TGF- $\beta$ 1 結合組成物のエピトープマッピング

H/Dex 及び化学的標識の組み合わせを用いて、本発明の TGF- $\beta$ 1 結合組成物（たとえば抗体）のエピトープマッピングを行う。H/D 交換及び化学修飾は、アミノ酸残基の溶剤接触性次第であり、結合組成物の形成の後に溶剤接触性は変化する。TGF- $\beta$ 1 複合体を用いて、抗体結合に關与する残基を同定する。H/D 交換又は化学修飾の後に、前に結合した抗原のペプチドを切断断片にタンパク分解して、断片の間の分子量比較（LC/MS を用いる）を可能とし、結合複合体形成の後、どのアミノ酸残基が H/D 交換又は化学修飾からブロックされるか判定する。

## 【0190】

## タンパク質表面化学標識

4 mM の HCl 溶液中の 1 mg/mL の TGF- $\beta$ 1 の 15  $\mu$ g アリコートプラスチックパイアルに移し、そこへ 180  $\mu$ g のコントロール又は本発明の TGF- $\beta$ 1 抗体組成物を添加する（モル比：TGF- $\beta$ 1 / 抗体 = 1 / 2）。リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を各パイアルへ 150  $\mu$ L の最終容積まで添加し、溶液を、（結合複合体の形成を可能とするために）タンパク質表面標識の前に少なくとも 10 分間常温でインキュベートする。化学標識は、5 mg/mL の酢酸ヒドロキシルスクシンイミドエステル（AHSE）溶液の 7.5  $\mu$ L を各複合パイアルに添加し、次いで、混合液を常温度でインキュベート（モル比：AHSE / 抗体 = 200 / 1）する。種々の時間（例えば 10、20 及び 60 分）に、50  $\mu$ L の混合液溶液を、0.1 M のトリスバッファ（pH 8.0）中の 1 mg/mL の K50  $\mu$ L と混合してクエンチする。溶液を、（本願明細書に記載されているように）LC/MS で、直接分析する。各サンプルの残りの溶液を、3 ~ 5  $\mu$ L の 50 mg/mL の DTT 溶液で、37（10 ~ 15 分）にて処理して、成熟 TGF- $\beta$ 1 のジスルフィド結合を還元する。

## 【0191】

次いで、還元タンパク質溶液を、3  $\mu$ L の 0.1 mg/mL のキモトリプシン溶液で、37 で 2 ~ 3 時間処理し、1  $\mu$ L の 0.25 mg/mL の Glu-C 溶液で、更に 37 で 2 ~ 3 時間処理する。この反応物を、0.5  $\mu$ L の氷酢酸を添加してクエンチし、次いで、Waters 2795 HPLC 及び Micromass LTPC Premier Mass 分光計を用いて、LC/MS で分析する。HPLC は、常温で、2.1 x 50 mm、Zorbax (SB C18) を用い、タンパク質及びペプチドを、アセトニトリル法勾配で 0.15 % のギ酸に溶離し、14 分間の実施時間を完全なタンパク質の溶離に用い、75 分間の実施時間をタンパク分解性消化物の溶離に用いる。

## 【0192】

TGF- $\beta$ 1 表面若しくはエピトープの内部又は構造的に近くのリシン（K）残基について、K アミノ基のアセチル化は、試験組成物が TGF- $\beta$ 1 を結合した後、（部分的に、又は完全に）ブロックする。複合型（TGF- $\beta$ 1 + TGF- $\beta$ 1 と結合する抗体）および非複合型（TGF- $\beta$ 1 + TGF- $\beta$ 1 と結合しないコントロール抗体）サンプルからのペプチドの間でアセチル化の程度を比較することで、結合複合体の形成によりアセチル化からブロックされたアミノ酸残基を特定できる。そのような LC/MS 分析のもとで得られたアセチル化データの 1 つのモデルを、下記 Table 7 に示す。

## Table 7

エピトープマッピングに関して LC/MS により得られた、モルペプチドにつきアセチル化されたアミノ基のモル

10

20

30

40

【表 8】

アセチル化 時間	複合体	アセチル化 / モルペプチドのモル値											
		1-6	9-21	22-30	22-32	31-39	33-43	51-62	53-62	66-90	91-112	91-99	100-112
10分	TGF $\alpha$ 1+対照	0.97	0.10	0.07	0.94	0.74	0.22	0.64	0.60	0.00	1.09	1.28	0.03
	TGF $\beta$ 1+21D1	0.95	0.09	0.07	0.95	0.78	0.26	0.50	0.45	0.00	0.49	0.71	0.02
	TGF $\beta$ 1+DM4 *	0.91	0.10	0.04	0.88	0.56	0.05	0.31	0.29	0.00	0.35	0.59	0.02
	TGF $\beta$ 1+DM4 #	0.91	0.07	0.06	0.92	0.62	0.13	0.30	0.28	0.00	0.39	0.66	0.02
20分	TGF $\beta$ 1+対照	1.00	0.25	0.14	0.99	0.89	0.35	0.82	0.79	0.00	1.32	1.57	0.05
	TGF $\beta$ 1+21D1	1.00	0.27	0.15	1.00	0.95	0.42	0.76	0.71	0.00	1.01	0.96	0.04
	TGF $\beta$ 1+DM4 *	1.00	0.23	0.06	0.95	0.76	0.09	0.52	0.51	0.00	0.55	0.81	0.03
	TGF $\beta$ 1+DM4 #	1.00	0.21	0.12	0.97	0.85	0.22	0.59	0.58	0.00	0.63	0.88	0.04
60分	TGF $\beta$ 1+対照	0.97	0.67	0.30	1.03	1.03	0.56	0.87	0.82	0.00	1.68	1.85	0.10
	TGF $\beta$ 1+21D1	0.97	0.79	0.36	1.08	1.21	0.73	0.93	0.92	0.00	1.24	1.39	0.08
	TGF $\beta$ 1+DM4 *	0.91	0.80	0.16	0.99	0.95	0.26	0.85	0.80	0.00	0.91	1.13	0.08
	TGF $\beta$ 1+DM4 #	0.99	0.66	0.36	1.06	1.10	0.51	0.93	0.91	0.00	1.14	1.25	0.09

\* 及び # は、DM4 抗体の異なる 2 種のロットを別々に特徴づけられることを示す。

## 【0193】

そのようなモデルデータから、TGF- $\beta$ 1: 抗体複合体と対照との間の違いが、特に短時間（たとえば、10 分間）のアセチル化で示されるように、いくつかの TGF- $\beta$ 1 ペプチド断片について認められる。残基 31-39、33-43、53-62 及び 91-112 を含む断片は、そのような識別可能な違いを示している。断片 31-39 と 33-43 はいずれも K37 残基を含む。K26 及び K31 を含む断片 22-32 は、対照との有意な違いを示さないことから、断片 31-39 のアセチル化の違いが、抗原: 抗体複合体の形成の後のアセチル化から K37 をブロックすることに寄与している。

## 【0194】

断片 53-62 及び 91-112 は、試験した範囲において、並びに、試験した各抗体について持続的な違いを示している。断片 53-62 は、アセチル化（60 分）の上限範囲の減少の違いを示すが、AHSE / 抗体低比率の条件下、そのような違いは全範囲にわたり不変のままである。理論に束縛されないが、そのようなデータの 1 つの解釈は、K60 が抗原: 抗体結合に直接関与していないが、結合複合体に対するその近さは、AHSE が K60 残基へ接近するのをブロックするのに十分なほど接近し、従って、アセチル化をブロックしているというものである。あるいは、K60 は、試験した抗体で定義されるエピトープを含むことができる。

## 【0195】

断片 91-112 は、試験した範囲にわたってアセチル化の違いを示し、このことは、この断片の 3 個のリジン残基（K95、K97 又は K110）の少なくとも 1 個が、結合組成物: TGF- $\beta$ 1 複合体に関与することを示唆する。関与するリジン残基を特

定するために、キモトリプシン消化物を、G l u - Cを生じる2個の断片91 - 99及び100 - 112で更に処理する。後者(断片100 - 112)はK110を含むが、有意なアセチル化の違いを示さず、溶剤又は化学修飾に接触できないことを示唆する。

【0196】

K95及びK97を含む前者(断片91 - 99)を、A H S Eで処理した非複合型T G F - 1及びM S / M S分析を用いてさらに試験し、1カ所がアセチル化された種の溶離時間を判定し、K95又はK97アセチル化の程度を数量化する(そのような条件下でのモデルデータを下記Table 8に示す)。そのようなデータは、K97のアセチル化が複合体形成の有無にかかわらず不変であることを示すが、本発明の抗体組成物の存在はK95のアセチル化に有意に影響を及ぼし、K95が結合複合体形成に直接関与していることを示している。

Table 8

K95及びK97のアセチル化

【表9】

アセチル化 時間	TGFβ1及び抗体複合体	アセチル化(%)	
		K97	K95
10分	TGF-β1+対照	54	73
	TGF-β1+LA307-21D1	51	20
	TGF-β1+LA307-DM4*	44	16
	TGF-β1+LA307-DM4#	46	18
20分	TGF-β1+対照1	71	86
	TGF-β1+LA307-21D1	66	27
	TGF-β1+LA307-DM4*	59	22
	TGF-β1+LA307-DM4#	63	25
60分	TGF-β1+対照	87	95
	TGF-β1+LA307-21D1	86	53
	TGF-β1+LA307-DM4*	75	38
	TGF-β1+LA307-DM4#	82	42

\* 及び# は、D M 4抗体の異なる2種のロットが特徴づけられることを示す。

【0197】

H / D 交換

エピトープマッピングにおいて、重水素 / 水素 ( H / D ) 交換の技術は、タンパク質表面標識 / M S と類似するが、H / D 交換は残基に特異的でないことから、任意のアミノ酸残基の変化を検出できる。結合組成物：T G F - 1 複合体を、非複合型の成熟 T G F - 1 タンパク質と比較すると、複合型タンパク質の分子量は、非複合型 T G F - 1 より約 20 D a ( 又は 100 % D<sub>2</sub>O では 30 D a ) 軽く、複合型と非複合型 T G F - 1 との間の D<sub>2</sub>O の重量の差を算出することによって、成熟 T G F - 1 二量体中の約 30 アミノ酸残基が本発明の結合複合体の形成に関与し得ることを示すことができる。

【0198】

抗体溶液の 120 μ g アリコート ( 約 140 又は 280 μ L ) を、M i c r o c o n ( 30 k D ) 限外濾過タンパク質濃縮器 ( ミリポア ) を用いた連続濃縮及び希釈により P B S にバッファ交換する。P B S で 2 回連続濃縮及び希釈した後、抗体溶液を濃縮し、留去し、P B S で最終容積 70 μ L に調整する。次いで、4 m M の H C l 溶液中の 10 μ L の 1 m g / m L の T G F - 1 及び 2 μ L の 1 M の トリスバッファ ( p H 8 . 0 ) を、各抗体バイアルに添加して、T G F - 1 ( 抗体複合体 ) を形成する。T G F - 1 コントロール試料を、70 μ L の 1 x P B S 、 4 m M の H C l 溶液中の 20 μ L の T G F - 1 、 2 μ L の 1 M の トリスバッファ ( p H 8 . 0 ) を混合して調製する。次いで、9 μ L の T G F - 1 又は T G F - 1 抗体複合体を、マイクロプラスチックバイアルへ移し、次いで、21 μ L の 100 % の D<sub>2</sub>O を添加して、70 % の D<sub>2</sub>O 溶液を生成する。溶液を

、常温にて10分間温め、次いで、0 で1分間インキュベートする。

【0199】

インキュベーション後、H/D交換をクエンチし、15μLの1%のギ酸溶液(0 )及び4μLの2mg/mLのペプシン溶液(0 )を加えてタンパク質を消化し、次いで、0 で5分間インキュベートする。消化物を、手動で直ちにカラム上に注入し、LC/MS分析(管及びHPLCカラムは、氷水浴に浸漬させることを除いて、上記の通りである)する。

【0200】

ジスルフィド結合形成により、成熟TGF-β1は低pH(~2.5)及び低温(0 )でペプシン消化されない。その結果、ほとんどペプチド切断が生じず、大部分のTGF-β1は、長い消化時間と高酵素：タンパク質濃度にもかかわらず無傷である。特定可能なTGF-β1タンパク分解性断片は、典型的にはタンパク質のC末端および中間域(たとえば断片58-64又は61-64)で発生する。そのような断片を用いたD/H交換後の質量(質量)変化についてのモデルデータを、以下のTable 9に示す。断片61-64の質量がほぼ0である一方、断片58-64の質量は約1Daであり、このことは、重水素交換から保護された領域(本発明の結合組成物との複合体形成の後)がアミノ酸残基58-61を含んでなることを示唆している。

10

Table 9

TGF-β1の特定された消化ペプチドのD/H交換後の質量

【表10】

20

δ質量(100% D <sub>2</sub> O)*	TGF-β1のペプチド消化					
	61-64	59-64	58-64	58-61	91-104	90-104
DM4 (n=3)の平均	0.04	-0.87	-1.02	-0.30	-1.85	-1.87
DM4 (n=3)の標準偏差	0.01	0.11	0.21	0.05	0.30	0.30
21D1 (n=1)	0.01	-0.34	-0.99	-0.18	-1.90	-1.51

【表11】

TGF β-1 変異

30

	1	50
TGFβ1 (正常)	(1) ALDTNYCFSSTEKNCCVRLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPY	
TGFβ1 (突然変異)	(1) ALDTNYCFSSTEKNCCVRLYIDFRDLGWKVVHEPKGYHANFCLGPCPY	
	51	100
TGFβ1 (正常)	(51) IWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRPKPKVEQ	
TGFβ1 (突然変異)	(51) IWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLTILYYVGRTPKVEQ	
	101	113
TGFβ1 (正常)	(101) LSNMIVRSCKCS [配列番号1]	
TGFβ1 (突然変異)	(101) LSNMIVRSCKCS [配列番号144]	

【0201】

40

本発明の結合組成物のエピトープをさらに定義するために、伝統的な突然変異誘発技術を用いて、本発明の組成物と結合複合体を形成する際に必須のTGF β-1残基を特定する。TGF-β3/TGF-βRII複合体の結晶構造(2002 Nat Struct Biol. 3:203-8)をモデルとして用い、有意なTGF-β1のタンパク質突然変異誘発部位(R25K、K26R、V33I、P87T、V89L及びK95T(上記))を特定する。

【0202】

TGF β-1突然変異タンパク質を結合する能力を、TGF β-1アイソフォームに特異的な結合組成物、及びTGF β-1のその同族受容体(TGF-βRII)への結合を阻止する市販のmAbs(1D11及び240; R&D Syst

50

e m s ) を用いて試験する。試験は、レーザーで誘発された脱着 / 電離飛行時間型質量分析装置分析法で実施する。試験 m A b s ( たとえば、T G F B e t a 1 に特異的に結合する m A b 3 8 2 1 及び 2 4 7 1 ( P C T / U S 2 0 0 4 / 0 1 8 9 2 1 ; U S 6 0 / 4 8 5 , 8 2 0 号に開示 ) 及び対照 ( たとえば、3 種の T G F B e t a アイソフォーム全と結合する m A b 1 D 1 1 ) を、混合 ( T G F B e t a 1 タンパク質 ( 突然変異体又は野生型 ) と複合体を形成する機会を与える ) し、検出チップに固定し、レーザー処理し、次いで、製造元の条件下 ( C i p h e r g e n D i a g n o s t i c s ) 、標準化されたソフトウェアを使用して分析する。

【 0 2 0 3 】

モデル結果は、T G F B e t a 1 / T G F - ベータ R I I の結合面でアミノ酸残基のサブセットが、他の T G F - ベータアイソフォーム ( T G F B e t a 2 及び T G F B e t a 3 ) と明かに異なることを示している。試験した m A b # 2 4 7 1 ( T G F B e t a 1 に対して特異的な結合親和性を有する ) は、T G F B e t a 1 突然変異体と比較して 5 倍も野生型 T G F - ベータ 1 と結合し、一方、m A b s 3 8 2 1 及び 1 D 1 1 の T G F - ベータ 1 突然変異体との結合は、野生型 T G F B e t a 1 と比較して、2 . 5 倍低かった。

【 0 2 0 4 】

配列表

配列番号 1 は、霊長類成熟 T G F ベータ 1 アミノ酸配列である。

配列番号 2 は、霊長類 V H C D R 1 アミノ酸配列である。

配列番号 3 は、霊長類 V H C D R 2 アミノ酸配列である。

配列番号 4 は、霊長類 V H C D R 3 アミノ酸配列である。

配列番号 5 は、霊長類 V L C D R 1 アミノ酸配列である。

配列番号 6 は、霊長類 V L C D R 2 アミノ酸配列である。

配列番号 7 は、霊長類 V L C D R 3 アミノ酸配列である。

配列番号 8 は、霊長類 H C V R F R 1 フレームワークアミノ酸配列である。

配列番号 9 は、霊長類 H C V R F R 2 フレームワークアミノ酸配列である。

配列番号 1 0 は、霊長類 H C V R F R 3 フレームワークアミノ酸配列である。

配列番号 1 1 は、霊長類 H C V R F R 4 フレームワークアミノ酸配列である。

配列番号 1 2 は、霊長類 L C V R F R 1 フレームワークアミノ酸配列である。

配列番号 1 3 ~ 3 6 は、霊長類 L C V R F R 2 フレームワークアミノ酸配列である。

配列番号 3 7 は、霊長類 L C V R F R 3 フレームワークアミノ酸配列である。

配列番号 3 8 は、霊長類 L C V R F R 4 フレームワークアミノ酸配列である。

配列番号 3 9 は、霊長類 I g G 1 重鎖定常領域アミノ酸配列である。

配列番号 4 0 は、霊長類 I g G 4 重鎖定常領域アミノ酸配列である。

配列番号 4 1 は、霊長類 I g G 4 軽鎖定常領域アミノ酸配列である。

配列番号 4 2 ~ 8 6 は、霊長類軽鎖可変領域アミノ酸配列である。

配列番号 8 7 ~ 1 2 5 は、霊長類 H C V R 重鎖アミノ酸配列である。

【 配列表 】

2008538564000001.xml

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成 20 年 3 月 18 日 ( 2008 . 3 . 18 )

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】配列表

【 補正方法 】追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2008538564000001.app

10

20

30

40

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2006/014943

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/22 G01N33/68 G01N33/577		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K G01N		
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, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/010049 A2 (LILLY CO ELI [US]; BRADLEY HEIDI MARIE [US]; KIKLY KRISTINE KAY [US];) 3 February 2005 (2005-02-03) page 89 - page 97; tables 1-10 page 99; table 11 page 101; table 12 claim 1	1-16
X	WO 00/66631 A (CAMBRIDGE ANTIBODY TECH [GB]; THOMPSON JULIA ELIZABETH [GB]; LENNARD S) 9 November 2000 (2000-11-09) page 1, line 20 - page 2, line 23 figure 1	1-16
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  30 November 2006		Date of mailing of the international search report  13/12/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Cilensek, Zoran

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2006/014943
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"Monoclonal anti-TGF- $\beta$ 1 antibody" R&D SYSTEM ORDERING INFORMATION, no. mab2401, 29 January 2003 (2003-01-29), XP002313281 the whole document	1-16
X	LUCAS C ET AL: "THE AUTOCRINE PRODUCTION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA1 DURING LUMPHOCYTE ACTIVATION A STUDY WITH A MONOCLONAL ANTIBODY-BASED ELISA" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 145, 1 September 1990 (1990-09-01), pages 1415-1422, XP000917385 ISSN: 0022-1767 page 1416, column 1, paragraph 1 - column 2, paragraph 6 page 1417, column 2, lines 6-28; table 1 page 1418; table 2	1-16
X	SHEHATA MEDHAT ET AL: "TGF- $\beta$ 1 induces bone marrow reticulin fibrosis in hairy cell leukemia." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 113, no. 5, March 2004 (2004-03), pages 676-685, XP002406208 ISSN: 0021-9738 page 677, column 2, paragraph 3 - page 678, column 1, paragraph 3	14-16
X	FLANDERS K C ET AL: "ANTIBODIES TO PEPTIDE DETERMINANTS IN TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA AND THEIR APPLICATIONS" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, US, vol. 27, 1988, pages 739-746, XP002044723 ISSN: 0006-2960 page 741, column 2, paragraph 2; table 1	1-16
A	CHENG JINGFEI ET AL: "Transforming growth factor- $\beta$ 1 signal transduction and progressive renal disease." EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE (MAYWOOD), vol. 227, no. 11, December 2002 (2002-12), pages 943-956, XP002406209 ISSN: 1535-3702 the whole document	1-16

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/014943

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005010049	A2	03-02-2005 EP 1646655 A2	19-04-2006
WO 0066631	A	09-11-2000 AT 272073 T	15-08-2004
		AU 768554 B2	18-12-2003
		AU 4588600 A	17-11-2000
		BR 0010162 A	05-02-2002
		CA 2370304 A1	09-11-2000
		DE 60012500 D1	02-09-2004
		DE 60012500 T2	11-08-2005
		EP 1175445 A1	30-01-2002
		ES 2225132 T3	16-03-2005
		GB 2350612 A	06-12-2000
		JP 2003501348 T	14-01-2003
		MX PA01010739 A	20-08-2003
		NO 20015261 A	21-12-2001
		NZ 514759 A	31-10-2003

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 11/08 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/08	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 3
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 25/28	
	A 6 1 P 9/00	
	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72)発明者 ジュリアン・デイビーズ  
アメリカ合衆国 9 2 1 0 9 カリフォルニア州サンディエゴ、アガット・ストリート 9 3 8 番
- (72)発明者 クレイグ・デュエイン・ディッキンソン  
アメリカ合衆国 9 2 1 2 9 カリフォルニア州サンディエゴ、スシタ・ストリート 1 5 1 6 5 番
- (72)発明者 リファ・ファン  
アメリカ合衆国 4 6 0 3 2 インディアナ州カーメル、コーシャム・サークル 3 5 6 3 番
- (72)発明者 ブライアン・エドワード・ジョーンズ  
アメリカ合衆国 4 6 0 3 2 インディアナ州カーメル、ビーコン・パーク・ドライブ 1 4 7 7 2 番
- (72)発明者 デイビッド・マシュー・マーキス  
アメリカ合衆国 9 2 0 2 4 カリフォルニア州エンシニタス、メドークグリーン・コート 2 1 0 6 番
- (72)発明者 スコット・ウィリアム・ローリンソン  
アメリカ合衆国 4 6 0 7 7 インディアナ州ザイオンズビル、オーバーン・クリーク・クロッシング  
1 1 7 9 6 番
- (72)発明者 タン・イン  
アメリカ合衆国 9 2 1 2 9 カリフォルニア州サンディエゴ、パーク・ビレッジ・ロード 7 1 7 9 番
- (72)発明者 ビーター・エドワード・ベイランコート  
アメリカ合衆国 9 2 0 1 4 カリフォルニア州デル・マー、ロサナ・ロード 2 5 4 0 番
- (72)発明者 ジェフリー・ディーン・ワトキンス  
アメリカ合衆国 9 2 0 2 4 カリフォルニア州エンシニタス、フォーチュナ・ランチ・ロード 3 4 4  
2 番

Fターム(参考) 4B064 AG27 DA13

4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 BB11 BB33 BB36 BB41 BB43 CC02  
CC21 DD62 DD63 DD81 DD88 EE01 EE03

4H045 AA11 AA30 DA76 EA20 EA50

专利名称(译)	TGFβ1特异性抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008538564A</a>	公开(公告)日	2008-10-30
申请号	JP2008507883	申请日	2006-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	伊莱利利公司		
申请(专利权)人(译)	礼来公司		
[标]发明人	ジュリアンデイビーズ クレイグデュエインディッキンソン リファファン ブライアンエドワードジョーンズ デイビッドマシューマーキス スコットウィリアムローリンソン タンイン ピーターエドワードベイランコート ジェフリーディーンワトキンス		
发明人	ジュリアン・デイビーズ クレイグ・デュエイン・ディッキンソン リファ・ファン ブライアン・エドワード・ジョーンズ デイビッド・マシュー・マーキス スコット・ウィリアム・ローリンソン タン・イン ピーター・エドワード・ベイランコート ジェフリー・ディーン・ワトキンス		
IPC分类号	C07K16/22 C07K16/24 G01N33/53 C12P21/08 A61K39/395 A61P13/12 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/06 A61P11/08 A61P9/10 A61P17/00 A61P17/02 A61P1/00 A61P35/00 A61P25/28 A61P9/00 A61P43/00		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/06 A61P11/08 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/02 A61P25/28 C07K7/06 C07K7/08 C07K16/22 C07K2317/55 C07K2317/74 C07K2317/92		
FI分类号	C07K16/22.ZNA C07K16/24 G01N33/53.D C12P21/08 A61K39/395.N A61K39/395.Y A61K39/395.D A61P13/12 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/06 A61P11/08 A61P9/10.101 A61P9/10.103 A61P17/00 A61P17/02 A61P1/00 A61P35/00 A61P25/28 A61P9/00 A61P43/00.111		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/DA13 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/BB33 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/DD81 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	品川EiSatoshi		
优先权	60/674082 2005-04-22 US		
其他公开文献	JP5070200B2 JP2008538564A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

提供了TGF-β1结合组合物和与其相关的试剂。还提供了将此类组合物用于治疗目的的方法。

CDR1	CDR2	CDR3
<p>G<sub>1</sub>V<sub>2</sub>L<sub>3</sub>E<sub>4</sub>D<sub>5</sub>N<sub>6</sub>K<sub>7</sub>Y<sub>8</sub> *</p> <p>[配列番号2]</p>	<p>K<sub>1</sub>L<sub>2</sub>N<sub>3</sub>P<sub>4</sub>F<sub>5</sub>D<sub>6</sub>G<sub>7</sub>T<sub>8</sub>G<sub>9</sub>N<sub>10</sub>K<sub>11</sub>K<sub>12</sub>S<sub>13</sub> **</p> <p>[配列番号3]</p>	<p>G<sub>1</sub>V<sub>2</sub>K<sub>3</sub>L<sub>4</sub>I<sub>5</sub>F<sub>6</sub> ***</p> <p>[配列番号4]</p>