

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-504839

(P2022-504839A)

(43)公表日 令和4年1月13日(2022.1.13)

| (51)国際特許分類 | | F I | | テーマコード(参考) | |
|------------|-----------------|---------|-------|------------|--------------------|
| C 1 2 N | 15/13 (2006.01) | C 1 2 N | 15/13 | Z N A | 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 N | 15/63 (2006.01) | C 1 2 N | 15/63 | Z | 4 C 0 8 4 |
| C 0 7 K | 16/24 (2006.01) | C 0 7 K | 16/24 | | 4 C 0 8 5 |
| C 0 7 K | 16/46 (2006.01) | C 0 7 K | 16/46 | | 4 H 0 4 5 |
| C 1 2 N | 1/15 (2006.01) | C 1 2 N | 1/15 | | |
| | | 審査請求 | 未請求 | 予備審査請求 | 未請求 (全235頁) 最終頁に続く |

| | | | |
|-------------------|-----------------------------|---------|--|
| (21)出願番号 | 特願2021-520307(P2021-520307) | (71)出願人 | 521148290 |
| (86)(22)出願日 | 令和1年10月9日(2019.10.9) | | ティロス・セラピューティクス・インコーポレイテッド |
| (85)翻訳文提出日 | 令和3年6月4日(2021.6.4) | | アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126、メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション気付 |
| (86)国際出願番号 | PCT/US2019/055426 | (71)出願人 | 596129215 |
| (87)国際公開番号 | WO2020/076969 | | メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション |
| (87)国際公開日 | 令和2年4月16日(2020.4.16) | | Merck Sharp & Dohme Corp. |
| (31)優先権主張番号 | 62/757,519 | | アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907 |
| (32)優先日 | 平成30年11月8日(2018.11.8) | | ローウェイ、イ |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US) | | 最終頁に続く |
| (31)優先権主張番号 | 62/750,065 | | |
| (32)優先日 | 平成30年10月24日(2018.10.24) | | |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US) | | |
| (31)優先権主張番号 | 62/744,045 | | |
| | 最終頁に続く | | |

(54)【発明の名称】 抗LAP抗体変異体及びその使用

(57)【要約】

本明細書中で提供されているのは、細胞上のLAP-TGF β 1には特異的に結合するが細胞外マトリックスにおけるLAP-TGF β 1には結合しないなどの治療上有益な特性を有している抗LAP抗体(例えば、組換えヒト化抗LAP抗体、キメラ抗LAP抗体及びヒト抗LAP抗体)又はその抗原結合フラグメント、及び、該抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントを含む組成物である。さらにまた、これらの抗体又は抗原結合フラグメントの治療用途における使用、例えば、癌の治療における使用、及び、診断用途における使用も、提供されている。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

L A P に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合フラグメントであって：

(a) 配列番号 1 1 0、1 2 0 及び 1 1 2 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 1 1 3、1 1 4 及び 1 1 5 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む軽鎖可変領域；

(b) 配列番号 1 1 0、1 1 1 及び 1 1 2 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 1 1 3、1 1 4 及び 1 1 5 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む軽鎖可変領域；

(c) 配列番号 1 6、2 6 及び 1 8 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 1 9、2 0 及び 2 1 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む軽鎖可変領域；

(d) 配列番号 5 4、5 5 及び 5 6 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 5 7、5 8 及び 5 9 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む軽鎖可変領域；

(e) 配列番号 5 4、6 6 及び 5 6 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 5 7、5 8 及び 5 9 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む軽鎖可変領域；

(f) 配列番号 5 4、5 5 及び 6 8 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 5 7、5 8 及び 5 9 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む軽鎖可変領域；又は、

(g) 配列番号 5 4、6 6 及び 6 8 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 5 7、5 8 及び 5 9 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む軽鎖可変領域；

を含む、前記単離された抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

(a) それぞれ配列番号：2 1 8 及び 1 5 4、(b) それぞれ配列番号：1 3 3 及び 1 5 4、(c) それぞれ配列番号：4 2 及び 5 2、(d) それぞれ配列番号：1 0 1 及び 1 0 4、並びに、(e) それぞれ配列番号：9 8 及び 1 0 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 8 % 又は 9 9 % 同一である重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

配列番号：2 1 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、又は、1 - 5、5 - 1 0、1 0 - 1 5、1 5 - 2 0 又は 2 0 - 2 5 のアミノ酸置換を有する配列番号：2 1 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；及び、配列番号：1 5 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、又は、1 - 5、5 - 1 0、1 0 - 1 5、1 5 - 2 0 又は 2 0 - 2 5 のアミノ酸置換を有する配列番号：1 5 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

(a) それぞれ配列番号：2 1 8 及び 1 5 4、(b) 配列番号：1 3 3 及び 1 5 4、(c) それぞれ配列番号：4 2 及び 5 2、(d) それぞれ配列番号：1 0 1 及び 1 0 4、並びに、(e) それぞれ配列番号：9 8 及び 1 0 4 からなる群から選択される重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

10

20

30

40

50

【請求項 5】

(a) それぞれ配列番号： 2 1 9 及び 1 5 5、(b) それぞれ配列番号： 2 2 0 及び 1 5 5、(c) それぞれ配列番号： 1 3 4 及び 1 5 5、(d) それぞれ配列番号： 1 3 5 及び 1 5 5、(e) それぞれ配列番号： 4 3 及び 5 3、(f) それぞれ配列番号： 4 5 及び 5 3、(g) それぞれ配列番号： 1 0 2 及び 1 0 5、(h) それぞれ配列番号： 1 0 3 及び 1 0 5、(i) それぞれ配列番号： 9 9 及び 1 0 5、並びに、(j) それぞれ配列番号： 1 0 0 及び 1 0 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 8 % 又は 9 9 % 同一である重鎖及び軽鎖配列を含む、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

(a) それぞれ配列番号： 2 1 9 及び 1 5 5、(b) それぞれ配列番号： 2 2 0 及び 1 5 5、(c) それぞれ配列番号： 1 3 4 及び 1 5 5、(d) それぞれ配列番号： 1 3 5 及び 1 5 5、(e) それぞれ配列番号： 4 3 及び 5 3、(f) それぞれ配列番号： 4 5 及び 5 3、(g) それぞれ配列番号： 1 0 2 及び 1 0 5、(h) それぞれ配列番号： 1 0 3 及び 1 0 5、(i) それぞれ配列番号： 9 9 及び 1 0 5、並びに、(j) それぞれ配列番号： 1 0 0 及び 1 0 5 からなる群から選択される重鎖及び軽鎖配列を含む、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

前記抗体が、ヒト LAP、カニクイザル LAP、ラット LAP 及び / 又はマウス LAP に結合する、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

前記抗体が、TGF- β 1 活性化を阻害する、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項 9】

前記抗体が、60 nM 以下、50 nM 以下、40 nM 以下、30 nM 以下、20 nM 以下又は 10 nM 以下の K_D でヒト LAP に結合する、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項 10】

前記抗体が、アンカータンパク質の非存在下でヒト LAP に結合する、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項 11】

前記抗体が、免疫抑制細胞に結合する、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項 12】

前記抗体が、免疫抑制細胞上のアンカータンパク質と複合体を形成した LAP に結合するが、アンカータンパク質には結合しない、又は、LAP とアンカータンパク質の両方の残基から構成されるエピトープには結合しない、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項 13】

前記アンカータンパク質が、GARP 又は LRRC33 である、請求項 12 に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項 14】

前記免疫抑制細胞が、制御性 T 細胞、M2 マクロファージ、LAP を発現する癌細胞及び / 又は骨髄由来サブレッサー細胞である、請求項 11 ~ 13 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項 15】

前記抗体又は抗原結合フラグメントが、GARP 陽性免疫抑制細胞及び GARP 陰性免疫抑制細胞の両方に結合する、請求項 11 ~ 14 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項 16】

前記抗体又は抗原結合フラグメントが、GARP 陽性免疫抑制細胞及び GARP 陰性免疫抑制細胞の両方に結合する、請求項 11 ~ 14 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

10

20

30

40

50

前記抗体又は抗原結合フラグメントが、細胞外マトリックス上のLAPに結合しない、請求項1～15のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項17】

前記抗体又は抗原結合フラグメントが、LTBP1、LTBP3及び/又はLTBP4と複合体を形成したLAPに結合しない、請求項1～16のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項18】

前記抗体が、IgG定常領域又はその変異体を含む、請求項1～17のいずれかに記載の抗体。

【請求項19】

前記抗体が、キメラ抗体、ヒト抗体、又はヒト化抗体である、請求項1～18のいずれかに記載の抗体。

【請求項20】

請求項1～19のいずれかに記載の抗体と同じLAP上のエピトープに結合する、単離された抗体。

【請求項21】

前記抗体又は抗原結合フラグメントがLAPのエピトープに結合する、請求項1～20のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項22】

前記抗体又は抗原結合フラグメントが、Y74T突然変異を含むヒトLAPに結合しないか、又は、K27C及びY75C突然変異を含むヒトLAPに結合する、請求項1～21のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項23】

ヒトLAP-TGF1(配列番号:1)の残基31-40、274-280及び340-343のうち1以上の残基に結合するか、又は、ヒトLAP-TGF1(配列番号:1)の残基31-43、272-283及び340-344のうち1以上の残基に結合する、単離された抗体。

【請求項24】

ヒトLAPに結合し、且つ、配列番号110、120及び112のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号113、114及び115のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域を含む軽鎖可変領域を含んでおり、さらに、ヒトIgG1定常領域を含む、単離された抗体。

【請求項25】

ヒトLAPに結合し、且つ、配列番号110、120及び112のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号113、114及び115のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域を含む軽鎖可変領域を含んでおり、さらに、配列番号197のアミノ酸配列を含む突然変異ヒトIgG4定常領域を含む、単離された抗体。

【請求項26】

前記抗体が、それぞれ、配列番号218及び154のアミノ酸配列を含む重鎖及び軽鎖可変領域を含む、請求項24又は25に記載の抗体。

【請求項27】

第2の結合領域を有する分子に連結された、請求項1～26のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメントを含む、二重特異性分子。

【請求項28】

前記第2の結合領域が腫瘍関連抗原に結合する、請求項27に記載の二重特異性分子。

【請求項29】

前記第2の結合領域が、CD4、CD8、CD45、CD56、CD14、CD16、CD19、CD11b、CD25、CD20、CD22、CD30、CD38、CD114

10

20

30

40

50

、CD23、CD73、CD163、CD206、CD203、CD200R又はCD39に結合する、請求項27に記載の二重特異性分子。

【請求項30】

検出可能な部分、結合部分、標識部分又は生物学的に活性な部分に連結された請求項1～26のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメントを含む、イムノコンジュゲート。

【請求項31】

請求項1～26のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメントの重鎖及び/又は軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸。

【請求項32】

請求項31に記載の核酸を含む、発現ベクター。

10

【請求項33】

請求項32に記載の発現ベクターで形質転換された、細胞。

【請求項34】

医薬組成物であって、請求項1～30のいずれかに記載の抗体若しくは抗原結合フラグメント、二重特異性分子又はイムノコンジュゲート、及び、薬学的に許容される担体を含む、前記医薬組成物。

【請求項35】

1種類以上の追加の治療薬をさらに含む、請求項34に記載の医薬組成物。

【請求項36】

前記1種類以上の追加の治療薬が、抗癌剤、化学療法剤、免疫抑制剤、免疫刺激剤、抗炎症剤及び免疫チェックポイント阻害剤からなる群から選択される、請求項35に記載の医薬組成物。

20

【請求項37】

前記免疫チェックポイント遮断薬が、抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、抗LAG-3抗体、抗CTLA-4抗体、抗TIGIT抗体及び抗TIM3抗体からなる群から選択される、請求項36に記載の医薬組成物。

【請求項38】

キットであって、請求項1～30のいずれかに記載の抗体若しくは抗原結合フラグメント、二重特異性分子又はイムノコンジュゲート、及び、取扱い説明書を含む、前記キット。

【請求項39】

抗LAP抗体を調製する方法であって、請求項33に記載の細胞において前記抗体又は抗原結合フラグメントを発現させること、及び、その細胞から抗体又は抗原結合フラグメントを単離すること、を含む、前記方法。

30

【請求項40】

LAPを発現する細胞でのTGF- β 1活性化を選択的に阻害するが、細胞外マトリックスでのTGF- β 1活性化を阻害しない方法であって、対象者に、請求項1～26のいずれかに記載の抗体若しくは抗原結合フラグメント、請求項27～29のいずれかに記載の二重特異性分子、請求項30に記載のイムノコンジュゲート又は請求項34～37のいずれかに記載の医薬組成物を投与すること、を含む、前記方法。

【請求項41】

前記細胞が免疫抑制細胞である、請求項40に記載の方法。

40

【請求項42】

前記免疫抑制細胞が、抑制性T細胞、M2マクロファージ、LAP-TGF- β 1を発現する癌細胞及び単球性骨髄由来サブレッサー細胞からなる群から選択される、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

癌を治療する方法であって、該治療を必要とする対象者に、治療有効量の請求項1～30のいずれかに記載の抗体若しくは抗原結合フラグメント、二重特異性分子又はイムノコンジュゲートを投与することを含む、前記方法。

【請求項44】

50

前記癌が異常な T G F 活性を特徴とする、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記癌が、C D 4 + 制御性 T 細胞、C D 8 + 制御性 T 細胞、制御性 B 細胞、骨髄由来サブレッサー細胞、腫瘍関連マクロファージ、癌関連線維芽細胞及び / 又は自然リンパ球の浸潤に関連する、請求項 4 3 又は 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記癌が、乳癌、膀胱癌、子宮 / 子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、食道癌、胃腸癌、膵臓癌、結腸直腸癌、結腸癌、腎臓癌、頭頸部癌、肺癌、胃癌、胚細胞癌、骨癌、肝臓癌、甲状腺癌、皮膚癌、中枢神経系新生物、リンパ腫、白血病、骨髄腫、肉腫及び骨髄異形成症候群からなる群から選択される、請求項 4 3 ~ 4 5 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 4 7】

1 以上の追加の療法を投与することをさらに含む、請求項 4 3 ~ 4 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 8】

前記 1 以上の追加の療法が、放射線療法、化学療法、免疫チェックポイント阻害剤、免疫抑制療法、免疫刺激療法、細胞療法及び治療薬から選択される、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記免疫チェックポイント阻害剤が、抗 P D 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体、抗 L A G - 3 抗体、抗 C T L A - 4 抗体、抗 T I G I T 抗体又は抗 T I M 3 抗体である、請求項 4 8 に記載の方法。

20

【請求項 5 0】

サンプル中の L A P の存在を検出する方法であって、該サンプルを請求項 1 ~ 2 6 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメントと、該抗体と L A P との間で複合体を形成することを可能にする条件下で、接触させること、及び、複合体の形成を検出すること、を含む、前記方法。

【請求項 5 1】

制御性 T 細胞浸潤に関連する癌を診断する方法であって、該癌に罹患している患者からの生物学的サンプルを請求項 1 ~ 2 6 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメントと接触させることを含んでおり、ここで、該抗体による陽性染色は該癌が制御性 T 細胞浸潤に関連していることを示す、前記方法。

30

【請求項 5 2】

G A R P 陰性抑制細胞に関連する癌を診断する方法であって、該癌に罹患している患者からの生物学的サンプルを請求項 1 ~ 2 6 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメントと接触させることを含んでおり、ここで、該抗体による陽性染色及び抗 G A R P 抗体による陰性染色は該癌が G A R P 陰性抑制細胞に関連していることを示す、前記方法。

【請求項 5 3】

請求項 1 ~ 2 6 のいずれかに記載の抗体で治療するための癌に罹患している患者を選択する方法であって、該患者からの生物学的サンプルを該抗体又は抗原結合フラグメントと接触させることを含んでおり、ここで、該抗体による陽性染色は該癌が該抗体による治療に適していることを示す、前記方法。

40

【請求項 5 4】

癌に罹患している患者の請求項 1 ~ 2 6 のいずれかに記載されている抗体での治療に対する応答を確認する方法であって、該患者からの生物学的サンプルを該抗体又は抗原結合フラグメントと接触させることを含んでおり、ここで、該抗体による低減された染色は該癌が該抗体による治療に応答していることを示す、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

50

本出願は、2018年10月10日に出願された米国仮特許出願第62/744,045号、2018年10月24日に出願された米国仮特許出願第62/750,065号及び2018年11月8日に出願された米国仮特許出願第62/757,519号の利益を主張するものであり、これら出願の各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、抗LAP抗体又はその抗原結合フラグメントに関する。本発明の別の態様は、該抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントを含む組成物及びキットに関する。本発明の別の態様は、該抗体又は抗原結合フラグメントを投与することによる、疾患（例えば、癌）を治療する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

形質転換成長因子ベータ1 (TGF 1) は、TGF 1の潜伏関連ペプチドであるLAP (潜伏関連ペプチド) 内に成熟サイトカインが入れられているプロタンパク質複合体として合成される。LAP-TGF 1複合体は、現在知られている以下の5種類のアンカータンパク質のうちの一つにジスルフィド結合している：糖タンパク質A反復優性 (glycoprotein A repetitions predominant) (GARP)、ロイシンリッチリピート含有タンパク質33 (LRRC33)、潜在的形質転換成長因子ベータ結合タンパク質1 (LTBP1)、潜在的形質転換成長因子ベータ結合タンパク質3 (LTBP3)、及び、潜在的形質転換成長因子ベータ結合タンパク質4 (LTBP4)。これらのアンカータンパク質は、潜在的なTGF 1を体内の特定の部位及び特定の細胞に局在化させる。

【0004】

GARPは、ロイシンリッチリピートタンパク質32又はLRRC32とも称されるが、そのGARPは、LAP-TGF 1をリンパ球（特に、制御性T細胞）の表面に固定する膜貫通タンパク質である。GARPは、血小板、B細胞、NK細胞、線維芽細胞、間葉系間質細胞、間葉系幹細胞及び内皮細胞でも発現され、さらに、これらの細胞型におけるLAP-TGF 1の発現を制御する。LRRC33は、LAP-TGF 1を骨髄性細胞（特に、マクローファージ、樹状細胞、及び、骨髄由来サプレッサー細胞 (MDSCs)）の表面に固定することが報告されている膜貫通タンパク質である。LTBP1、LTBP3及びLTBP4は、LAP-TGF 1を細胞外マトリックス (ECM) 内に固定する分泌分子である。

【0005】

LAP結合剤は、特定の細胞集団を識別するためのツールとして当技術分野で使用されてきたが、疾患の状態におけるLAPの関連性についてはほとんど知られていない。

【0006】

溶液中での半減期が短い成熟TGF 1サイトカインが放出されると、それは、オートクリン様式又はパラクリンに近い様式のいずれかで局所的に作用するので、LAP-TGF 1複合体の位置は、生物学的に及び臨床的に極めて重要である。従って、アンカータンパク質は、潜在的なTGF 1が特定の場所で足場を作る主要なメカニズムであり、その場所で、その潜在的なTGF 1は局所組織に作用する強力な成熟サイトカインの放出を待つ。

【0007】

LAP-TGF 1は、異なる場所で発現した場合は異なる機能を有する。例えば、細胞外マトリックスでLTBPによって固定されたLAP-TGF 1は、組織の恒常性にとって最も重要である。この点に関して、Xuら (Bone Research 2018; 6: 2) は、「TGF- 複合体は、細胞レベルで生理学的効果を発揮する活性リガンドの放出を通じてECMの摂動に即座に応答する分子センサーに似ており、従って、正常な組織の恒常性が確保される」と、述べている。

【0008】

細胞外マトリックスへのLAP-TGF 1の取り込みの変化は、ヒトの疾患を引き起こ

10

20

30

40

50

すことが知られている。例えば、マウスとヒトの両方において、LTBP-3が欠失すると、骨と歯の両方の形成に同様の欠陥が生じる。LTBP-3の欠陥は、マルファン症候群で見られる大動脈拡張にも関連している(Rifkin et al, Matrix Biol 2018; 71-72: 90-99)。これらの影響は、局所的な細胞外マトリックスにおけるTGF-1の異常な直接的な作用によるものと考えられている(Xu et al, Bone Research 2018; 6: 2)。

【0009】

LAP-TGF-1を細胞外マトリックスに局在化させるアンカータンパク質とは対照的に、GARPによって固定されたLAP-TGF-1は、制御性T細胞の免疫抑制機能(Edwards et al, Eur J Immunol 2016; 46: 1480-9)及び抑制性B細胞亜集団の免疫抑制機能(Wallace et al, JCI Insight 2018; 3: e99863)にとって最も重要である。一部の腫瘍は、GARPを発現し、それによってTGF-1を局所的に発現させること、及び、腫瘍微小環境における免疫系を直接抑制し、腫瘍自体の成長を補助することも示されている(Metelli et al, Journal of Hematology & Oncology 2018; 11: 24)。

10

【0010】

骨髄性細胞に固定されたLAP-TGF-1は、MDSCの免疫抑制機能(Zhang H et al., Frontiers in Immunology 2017; 8: 1-15)及びM2マクロファージの免疫抑制機能(Zhang et al., Oncotarget 2017; 8: 99801-15)にとって最も重要である。最近の研究によると、骨髄性細胞は、アンカータンパク質LRRC33を使用して潜在的なTGF-1を細胞表面に固定することが示されている(Qin et al., Cell 2018; 174: 1-16)。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Bone Research 2018; 6: 2

【非特許文献2】Matrix Biol 2018; 71-72: 90-99

【非特許文献3】Eur J Immunol 2016; 46: 1480-9

30

【非特許文献4】JCI Insight 2018; 3: e99863

【非特許文献5】Journal of Hematology & Oncology 2018; 11: 24

【非特許文献6】Frontiers in Immunology 2017; 8: 1-15

【非特許文献7】Oncotarget 2017; 8: 99801-15

【非特許文献8】Cell 2018; 174: 1-16

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

癌治療における最近の発展は、例えば、消耗した免疫細胞集団の活性化、ワクチン接種及び免疫抑制細胞集団の除去による、患者の免疫系の利用に焦点を合わせてきた。癌などの疾患を標的とする(及び診断する)ための改善された戦略に対する継続的な必要性を考えると、これらの目的に有用な新しい薬剤及び方法が望まれている。

40

【課題を解決するための手段】

【0013】

本明細書中で提供されている本発明の一態様は、本明細書中に記載されている配列(例えば、表34などの表に見出されるアミノ酸配列)のいずれかを含む構築物(例えば、ポリヌクレオチド、発現ベクター及び宿主細胞)、タンパク質又はペプチドである。本明細書中で提供されているのは、以下で特定されている構造的特徴及び機能的特徴を含むLAP

50

に結合する抗体及びその抗原結合フラグメントである（例えば、表 3 4 中の配列番号 1 6 - 1 9 7、2 1 4、2 1 6 - 2 4 0、2 4 2 - 2 4 5、2 4 8、2 4 9 及び 2 5 5 のアミノ酸配列のいずれか 1 つ）。例えば、該抗体及び抗原結合フラグメントは、本明細書中の表に記載されているアミノ酸配列、例えば、配列番号 1 6 - 1 9 7、2 1 4 及び 2 1 6 - 2 5 5 を含む。さまざまな実施形態において、該 LAP は、LAP と TGF（例えば、TGF 1）を含む複合体及び / 又はエピトープを含む。さまざまな実施形態において、該エピトープは、本明細書中の実施例（例えば、実施例 1 9 - 2 3）に記載されている。

【0014】

本発明の一態様は、LAP - TGF 1（例えば、ヒト LAP - TGF 1）への結合の治療的に有利なパターン及び従来の抗 LAP 抗体と比較して機能特性を示す単離されたモノクローナル抗体（例えば、組換えヒト化抗体、キメラ抗体及びヒト抗体）を提供する。一実施形態では、該抗 LAP 抗体は、細胞（例えば、免疫細胞及び別の免疫抑制細胞）上の LAP - TGF 1 に選択的に結合するが、細胞外マトリックス中の LAP - TGF 1 には結合せず、従って、細胞外マトリックスにおける LAP - TGF 1 の自然な機能 / 活性化を温存しながら、臨床的に関連する広範囲の細胞型を標的とすることができる。TGF はオートクリン又はパラクリンに近い方法で作用するので、特定の細胞集団への選択的結合は、示された細胞集団のすぐ近くにおける成熟 TGF の産生の阻害をもたらす。従って、本明細書中に記載されている抗体は、TGF の活性化及び成熟サイトカインの放出を高度に選択的な細胞特異的な方法で阻害するという臨床的利益を提供する。一部の実施形態では、該抗 LAP 抗体は、活性なエフェクター機能を有するイソタイプであり、そして、所与の細胞集団への特定の抗 LAP 抗体の強化された結合によって、ADC または CDC によるその細胞集団の枯渇が増大する。従って、本明細書中に開示されている抗 LAP 抗体は、単独療法及び別の免疫調節剤又は治療剤（例えば、免疫チェックポイント阻害剤）との組み合わせの両方において、癌及び免疫抑制細胞に影響を与える別の疾患を包含するさまざまな疾患を治療するのに理想的である。

【0015】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、LAP に特異的に結合する抗体（例えば、組換えヒト化抗体、キメラ抗体、ドメイン抗体又はヒト抗体）又はその抗原結合フラグメントであり、それは、以下のものを含む：

- (a) 配列番号 1 6、2 6 及び 1 8 のアミノ酸配列をそれぞれ含む相補性決定領域（CDR）1、CDR 2 及び CDR 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 1 9、2 0 及び 2 1 のアミノ酸配列をそれぞれ含む CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 領域を含む軽鎖可変領域；
- (b) 配列番号 5 4、5 5 及び 5 6 のアミノ酸配列をそれぞれ含む CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 5 7、5 8 及び 5 9 のアミノ酸配列をそれぞれ含む CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 領域を含む軽鎖可変領域；
- (c) 配列番号 5 4、6 6 及び 5 6 のアミノ酸配列をそれぞれ含む CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 5 7、5 8 及び 5 9 のアミノ酸配列をそれぞれ含む CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 領域を含む軽鎖可変領域；
- (d) 配列番号 5 4、5 5 及び 6 8 のアミノ酸配列をそれぞれ含む CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 5 7、5 8 及び 5 9 のアミノ酸配列をそれぞれ含む CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 領域を含む軽鎖可変領域；
- (e) 配列番号 5 4、6 6 及び 6 8 のアミノ酸配列をそれぞれ含む CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 5 7、5 8 及び 5 9 のアミノ酸配列をそれぞれ含む CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 領域を含む軽鎖可変領域；
- (f) 配列番号 1 1 0、1 1 1 及び 1 1 2 のアミノ酸配列をそれぞれ含む CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 1 1 3、1 1 4 及び 1 1 5 のアミノ酸配列をそれぞれ含む CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 領域を含む軽鎖可変領域；又は、
- (g) 配列番号 1 1 0、1 2 0 及び 1 1 2 のアミノ酸配列をそれぞれ含む CDR 1、CDR

R 2 及び C D R 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 1 1 3、1 1 4 及び 1 1 5 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 領域を含む軽鎖可変領域。

【 0 0 1 6 】

さまざまな実施形態において、該抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体である。

【 0 0 1 7 】

さまざまな実施形態において、該投与段階（例えば、対象者を治療又は診断する方法における投与段階）は、抗体を用いて実施される。さまざまな実施形態において、該抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体である。さまざまな実施形態において、該 L A P は、ヒト L A P、カニクイザル（c y n o）L A P、ラット L A P 及び / 又はマウス L A P である。さまざまな実施形態において、該投与段階（例えば、対象者を治療又は診断する方法における投与段階）は、抗原結合フラグメントを用いて実施される。

【 0 0 1 8 】

さまざまな実施形態において、該抗体の定常領域は、ヒト I g G 1 定常領域である。例えば、該 I g G 1 定常領域は、本明細書中に開示されている表（例えば、表 3 4）に記載されているアミノ酸配列を含む。例えば、該 I g G 1 定常領域は、配列番号 1 9 6、2 4 4 又は 2 4 5 に記載されているアミノ酸配列を含む。さまざまな実施形態において、該抗体の定常領域は、ヒト I g G 4 定常領域である。例えば、該ヒト I g G 4 定常領域は、配列番号 1 9 7 に記載されているアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 9 】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、ヒト L A P に特異的に結合し、そして、以下のものからなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % 同一である重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む、単離された抗体又は抗原結合フラグメントである：（ a ）それぞれ配列番号 4 2 及び 5 2；（ b ）それぞれ配列番号 1 0 1 及び 1 0 4；（ c ）それぞれ配列番号 9 8 及び 1 0 4；（ d ）それぞれ配列番号 1 3 3 及び 1 5 4；及び、（ e ）それぞれ配列番号 2 1 8 及び 1 5 4。

【 0 0 2 0 】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、ヒト L A P に特異的に結合し、そして、配列番号 2 1 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域又は 1、2 若しくは 3 のアミノ酸置換を有する配列番号 2 1 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 1 5 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域又は 1、2 若しくは 3 のアミノ酸置換を有する配列番号 1 5 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、単離された抗体又は抗原結合フラグメントである。さまざまな実施形態において、少なくとも 1 の置換は、C D R 内に位置している。さまざまな実施形態において、少なくとも 1 の置換は、フレームワーク領域内に位置している。さまざまな実施形態において、少なくとも 1 の置換は、少なくとも 1 の C D R 内及び少なくとも 1 のフレームワーク領域内に位置している。さまざまな実施形態において、少なくとも 1 の置換のいずれか及び / 又は全ては、フレームワーク領域内に位置している及び / 又は見いだされる。さまざまな実施形態において、該抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体である。本明細書中で提供されている本発明の別の態様は、ヒト L A P に特異的に結合し、そして、配列番号 2 1 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域又は 1 - 5、5 - 1 0、1 0 - 1 5、1 5 - 2 0 若しくは 2 0 - 2 5 のアミノ酸置換を有する配列番号 2 1 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 1 5 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域又は 1 - 5、5 - 1 0、1 0 - 1 5、1 5 - 2 0 若しくは 2 0 - 2 5 のアミノ酸置換を有する配列番号 1 5 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、単離された抗体又は抗原結合フラグメントである。例えば、少なくとも 1 の置換は、少なくとも 1 の C D R 領域内に位置している。さまざまな実施形態において、少なくとも 1 の置換は、複数の C D R 内に位置している。さまざまな実施形態において、少なくとも 1 の置換は、少なくとも 1 のフレームワーク領域内に位置している。さまざまな実施形態において、少なくとも 1 の置換は、少なくとも 1 の C D R 内及び少なくとも 1 のフレーム

10

20

30

40

50

ワーク領域内に位置している。さまざまな実施形態において、少なくとも1の置換のいずれか及び/又は全ては、フレームワーク領域内に位置している及び/又は見いだされる。さまざまな実施形態において、該抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体である。

【0021】

本明細書中で提供されている本発明の別の態様は、ヒトLAPに特異的に結合する単離された抗体又は抗原結合フラグメントであり、ここで、該抗体又は抗原結合フラグメントは、配列番号218のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでおり、ここで、該抗体又は抗原結合フラグメントは、配列番号154のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。さまざまな実施形態において、該抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体、又はヒト抗体である。

【0022】

本明細書中で提供されている本発明の別の態様は、ヒトLAPに特異的に結合する単離された抗体又は抗原結合フラグメントであり、ここで、該抗体又は抗原結合フラグメントは、配列番号218のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含んでおり、ここで、該抗体又は抗原結合フラグメントは、配列番号154のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む。さまざまな実施形態において、該抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体である。

【0023】

本明細書中で提供されている本発明の別の態様は、ヒトLAPに特異的に結合する単離された抗体又は抗原結合フラグメントであり、ここで、該抗体又は抗原結合フラグメントは、配列番号219のアミノ酸配列を含む重鎖を含んでおり、ここで、該抗体又は抗原結合フラグメントは、配列番号155のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。さまざまな実施形態において、該抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体である。

【0024】

本明細書中で提供されている本発明の別の態様は、ヒトLAPに特異的に結合する単離された抗体又は抗原結合フラグメントであり、ここで、該抗体又は抗原結合フラグメントは、配列番号219のアミノ酸配列からなる重鎖を含んでおり、ここで、該抗体又は抗原結合フラグメントは、配列番号155のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む。さまざまな実施形態において、該抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体である。本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、ヒトLAPに特異的に結合し、そして、以下のものからなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、99%又は100%同一である重鎖及び軽鎖配列を含む、単離された抗体又は抗原結合フラグメントである：(a)それぞれ配列番号43及び53；(b)それぞれ配列番号45及び53；(c)それぞれ配列番号102及び105；(d)それぞれ配列番号103及び105；(e)それぞれ配列番号99及び105；(f)それぞれ配列番号100及び105；(g)それぞれ配列番号134及び155；(h)それぞれ配列番号135及び155；(i)それぞれ配列番号219及び155；及び、(j)それぞれ配列番号220及び155。例えば、少なくとも1の置換は、少なくとも1のCDR領域内に位置している。さまざまな実施形態において、少なくとも1の置換は、複数のCDR内に位置している。さまざまな実施形態において、少なくとも1の置換は、少なくとも1のフレームワーク領域内に位置している。さまざまな実施形態において、少なくとも1の置換は、少なくとも1のCDR内及び少なくとも1のフレームワーク領域内に位置している。さまざまな実施形態において、少なくとも1の置換のいずれか及び/又は全ては、フレームワーク領域内に位置している及び/又は見いだされる。さまざまな実施形態において、該抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体である。

【0025】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、ヒトLAPに結合し、そして、配列番号110、120及び112のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1、CDR2及びCDR3領域を含む重鎖可変領域並びに配列番号113、114及び115のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1、CDR2及びCDR3領域を含む軽鎖可変領域を含む、単離された抗体又は抗原結合フラグメントであり、ここで、該抗体は、さらにヒトI

10

20

30

40

50

g G 1 定常領域を含む。さまざまな実施形態において、該抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体である。

【 0 0 2 6 】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、ヒト L A P に結合し、そして、それぞれ配列番号 1 1 0、1 2 0 及び 1 1 2 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 領域を含む重鎖可変領域並びにそれぞれ配列番号 1 1 3、1 1 4 及び 1 1 5 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 領域を含む軽鎖可変領域を含む、単離された抗体又は抗原結合フラグメントであり、ここで、該抗体は、さらにヒト I g G 1 定常領域を含む。さまざまな実施形態において、該抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体である。

10

【 0 0 2 7 】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、ヒト L A P に結合し、そして、それぞれ配列番号 1 1 0、1 2 0 及び 1 1 2 のアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 領域を含む重鎖可変領域並びにそれぞれ配列番号 1 1 3、1 1 4 及び 1 1 5 のアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 領域を含む軽鎖可変領域を含む、単離された抗体又は抗原結合フラグメントであり、ここで、該抗体は、配列番号 1 9 7 のアミノ酸配列を含む突然変異ヒト I g G 4 定常領域をさらに含む。さまざまな実施形態において、該抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体である。

20

【 0 0 2 8 】

本発明の一態様は、配列番号 2 4 0 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖及び配列番号 2 4 1 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖を含む単離された抗体と関連している本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又はその抗原結合フラグメント（例えば、表 3 4 に記載されている 2 0 E 6 及びそのヒト化バージョン）を提供する。

【 0 0 2 9 】

本発明の一態様は、配列番号 2 4 6 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖及び配列番号 2 4 7 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖を含む単離された抗体と関連している本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又はその抗原結合フラグメント（例えば、表 3 4 に記載されている 2 0 E 6 及びそのヒト化バージョン）を提供する。

30

【 0 0 3 0 】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントと同じ L A P 上のエピトープに結合する単離された抗体又は抗原結合フラグメントである。別の態様において、本明細書中で提供されているのは、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントと同じ L A P 上のアミノ酸又はアミノ酸の基に結合する単離された抗体又は抗原結合フラグメントである。例えば、エピトープ（例えば、L A P、及び、L A P と T B R I を含む L A P 複合体）、抗体又は抗原結合フラグメントは、表 2 5、表 2 6、表 2 7、表 2 8、表 2 9 及び / 又は表 3 0 などの本明細書中に記載されている特徴を有する。一部の実施形態では、該抗 L A P 抗体は、例えば、結晶学及び / 又はクライオ E M などの少なくとも 1 の構造分析法によって評価されるように、ヒト L A P の特定のアミノ酸、例えば、ヒト L A P - T G F 1（配列番号 1）のアミノ酸 3 1 - 4 0、2 7 4 - 2 8 0 及び 3 4 0 - 3 4 3 に結合する。一部の実施形態では、該抗 L A P 抗原結合フラグメントは、例えば、結晶学及び / 又はクライオ E M などの少なくとも 1 の構造分析法によって評価されるように、ヒト L A P の特定のアミノ酸、例えば、ヒト L A P - T G F 1（配列番号 1）のアミノ酸 3 1 - 4 0、2 7 4 - 2 8 0 及び 3 4 0 - 3 4 3 に結合する。さまざまな実施形態において、該抗体又は該抗原結合フラグメントは、列挙されたアミノ酸内の 1 以上のアミノ酸、即ち、ヒト L A P - T G F 1（配列番号 1）のアミノ酸 3 1 - 4 0、2 7 4 - 2 8 0 及び 3 4 0 - 3 4 3 内の 1 以上のアミノ酸に結合する。一部の実施形態では、該単離された抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒト L A P - T G F 1（配列番号 1）の残基 3 1 -

40

50

40、274-280及び340-343の1以上の残基に結合するか、又は、ヒトLAP-TGF 1(配列番号1)の残基31-43、272-283及び340-344の1以上の残基に結合する。一部の実施形態では、該抗LAP抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば、HDX-MSなどの少なくとも1の構造分析法によって評価されるように、LAP-TGF 1の特定の1又は複数の領域、例えば、図34に示されている領域1、領域2、領域3及び/又は領域4に結合する。

【0031】

一部の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトLAPに結合する(例えば、約11nmのK_Dで、11nM以下のK_Dで、又は、10nM以下のK_Dで)。さまざまな実施形態において、該抗体又は抗原結合フラグメントは、60nM以下、50nM以下、40nM以下、30nM以下、20nM以下又は10nM以下のK_Dで、LAP(例えば、ヒト、カニクイザル、ラット又はマウス)に結合する。一部の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトLAPに結合する(例えば、60nM未満、50nM未満、40nM未満、30nM未満、20nM未満又は10nM未満のK_Dで)。一部の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、約40-60nM又は約50-60nMのK_Dで、ヒトLAPに結合する。さまざまな実施形態において、該K_Dは、Octet結合分析によって測定される。さまざまな実施形態において、該K_Dは、BIAcore(登録商標)表面プラズモン共鳴(交換可能に、「BiaCore」及び「BIAcore」と称される)結合分析によって測定される。さまざまな実施形態において、該抗体又は抗原結合フラグメントは、本明細書中(例えば、表31-32)に記載されている結合親和性を有する。一部の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、TGF 1活性化を阻害する。さまざまな実施形態において、該抗体又は抗原結合フラグメントは、TGF のインテグリン活性化及び/又はLAP-TGF 1複合体からのヒトLAPの放出を阻害する。一部の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトLAP及びマウスLAPの両方に結合する。一部の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、アンカータンパク質の非存在下でヒトLAPに結合する。一部の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、免疫抑制細胞上のアンカータンパク質(例えば、GARP、LRRC33)と複合体を形成したLAP-TGF 1に結合するか又は結合することが確認されるが、アンカータンパク質には結合せず、また、LAP-TGF とアンカータンパク質の両方の残基で構成されるエピトープにも結合しない。免疫抑制細胞には、例えば、抑制性T細胞(例えば、制御性T細胞、活性化T細胞)、癌関連線維芽細胞、M2マクロファージ、LAP-TGF 1を発現する癌細胞及び/又は単球性骨髄由来サブレッサー細胞が包含される。一部の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、遊離TGF 1には結合せず、また、TGF 1を含まないLAPにも結合しない。一部の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、細胞外マトリックスの中のLAPには結合しない。一部の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、LTBP1、LTBP3及び/又はLTBP4と複合体を形成したLAPには結合しないか又は結合しないことが確認される。一部の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、K27C及びY75C突然変異を含むヒトLAP-TGF 1及び/又はヒトLAP-TGF 1(配列番号1)の残基82-130の(例えば、内の)全て若しくは一部分に結合するか又は結合することが確認されるが、Y74T突然変異を含むヒトLAP-TGF 1には結合しない。

【0032】

一部の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、GARP陽性免疫抑制性細胞及びGARP陰性免疫抑制性細胞の両方に結合するか又は結合することが確認される。一部の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、血小板に結合するか又は血小板に結合することが確認されるが、血小板凝集も血小板脱顆粒も引き起こさない。

【0033】

一部の実施形態では、該抗体は、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、IgG4抗体、IgD抗体、IgA抗体、IgE抗体若しくはIgM抗体であるか、又は、それら

の変異体である。一部の実施形態では、該抗体は、キメラ抗体、ドメイン抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である。

【0034】

上記で記載した実施形態のいずれかにおいて、該抗体又はその抗原結合フラグメントは、本明細書中に記載されている可変軽鎖及び本明細書中に記載されている軽鎖定常ドメイン（例えば、ヒト軽鎖定常ドメイン）のいずれかを含むことができる。例えば、該軽鎖定常ドメインは、表34に記載されている。一実施形態において、該抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒトカッパ軽鎖定常ドメイン又はその変異体を含む。さまざまな実施形態において、該変異体は、最大で1 - 25の修飾アミノ酸置換（例えば、20の置換）を含む。別の実施形態において、該抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒトラムダ軽鎖定常ドメイン又はその変異体を含む。さまざまな実施形態において、該変異体は、最大で1 - 25の修飾アミノ酸置換（例えば、20の置換）を含む。一実施形態において、該抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号256のアミノ酸配列を含むヒトカッパ軽鎖定常ドメインを含む。

10

【0035】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、本明細書中に記載されている抗LAP抗体のLAPに対して特異性を有する第1の結合領域及び別の抗原（例えば、腫瘍関連抗原、CD4、CD8、CD45、CD56、CD14、CD16、CD19、CD11b、CD25、CD20、CD22、CD30、CD38、CD114、CD23、CD73、CD163、CD206、CD203、CD200R又はCD39）に結合する第2の結合領域又は治療薬を含む二重特異性抗体である。さまざまな実施形態において、該第2の結合領域又は治療薬は、受容体タンパク質に結合する。

20

【0036】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、検出可能部分、結合部分、標識部分及び/又は生物学的に活性な部分（例えば、二重特異性分子及び/又は二官能性分子）に連結された本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントを含むイムノコンジュゲートである。例えば、該生物学的に活性な部分は、受容体トラップ構築物を含む。

【0037】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントの重鎖及び/又は軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸（1以上の核酸）、並びに、それを含む発現ベクター及びその発現ベクターで形質転換された細胞である。別の態様において、本明細書中で提供されているのは、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントの重鎖及び/又は軽鎖をコードするヌクレオチド配列、並びに、それを含む発現ベクター及びその発現ベクターで形質転換された細胞である。

30

【0038】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントと薬学的に許容される担体を含む医薬組成物である。一部の実施形態では、該組成物は、抗癌剤、化学療法剤、免疫調節剤（例えば、免疫刺激剤又は免疫抑制剤）、抗炎症剤及び/又は免疫チェックポイント遮断薬（例えば、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗LAG-3抗体、抗CTLA-4抗体、抗TIGIT抗体、及び、抗TIM3抗体）などの1種類以上の付加的な治療薬を含む。例えば、該PD-1抗体は、ペンブロリズマブである。

40

【0039】

一実施形態において、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又はその抗原結合フラグメント（例えば、表34に記載されている20E6及びそのヒト化バージョン）は、配列番号240のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖及び配列番号241のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖を含む単離された抗体と関連している。配列番号240及び241は、ペンブロリズマブの重鎖配列及び軽鎖配列に対応する。

50

【 0 0 4 0 】

一実施形態において、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又はその抗原結合フラグメント（例えば、表 3 4 に記載されている 2 0 E 6 及びそのヒト化バージョン）は、配列番号 2 4 6 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖及び配列番号 2 4 7 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖を含む単離された抗体と関連している。配列番号 2 4 6 及び 2 4 7 は、ペンプロリズマブの重鎖配列及び軽鎖配列に対応する。

【 0 0 4 1 】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメント及び使用説明書を含むキットである。

【 0 0 4 2 】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、以下の段階を含む、L A P に特異的に結合する抗体を製造する方法である：（ a ） 2 8 G 1 1 によって認識されるヒト L A P 上のエピートープを含むポリペプチドで動物を免疫すること；（ b ）免疫された動物から 2 8 G 1 1 と同じエピートープに結合する抗体を選択すること；及び、（ c ）段階（ b ）から選択された抗体を単離すること。一部の実施形態では、該抗体は、T G F 1 を含むヒト L A P 複合体に結合する。一部の実施形態では、該抗体は、ヒト L A P の残基 8 2 - 1 3 0 の（例えば、内の）全て又は一部分に結合する。

【 0 0 4 3 】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、細胞（例えば、免疫抑制細胞、例えば、抑制性 T 細胞（例えば、制御性 T 細胞、活性化 T 細胞）、M 2 マクロファージ、L A P - T G F 1 を発現する癌細胞、癌関連線維芽細胞、間葉系間質細胞、間葉系幹細胞、及び / 又は、単球性骨髄由来サブレッサー細胞）における T G F 1 活性化を選択的に阻害するが、細胞外マトリックスにおける T G F 1 活性化は阻害しない方法であり、ここで、該方法は、該対象者に、本明細書中に記載されている任意の抗 L A P 抗体若しくは抗原結合フラグメント、二重特異性分子、イムノコンジュゲート及び / 又は医薬組成物を投与することを含む。

【 0 0 4 4 】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、癌を治療する方法であり、ここで、該方法は、癌の治療を必要とする対象者に、治療有効量の本明細書中に記載されている任意の抗 L A P 抗体若しくは抗原結合フラグメント、二重特異性分子、イムノコンジュゲート及び / 又は医薬組成物を投与することを含む。

【 0 0 4 5 】

一部の実施形態では、癌は、異常な T G F 1 活性によって特徴付けられる。一部の実施形態では、癌は、分化抗原群 4（C D 4）+ 制御性 T 細胞、分化抗原群 8（C D 8）+ 制御性 T 細胞、制御性 B 細胞、骨髄由来サブレッサー細胞、腫瘍関連マクロファージ、癌関連線維芽細胞及び / 又は自然リンパ球の浸潤に関連している。

【 0 0 4 6 】

一部の実施形態では、癌は、乳癌、膀胱癌、子宮 / 子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、食道癌、胃腸癌、膵臓癌、結腸直腸癌、結腸癌、腎臓癌、頭頸部癌、肺癌、胃癌、胚細胞癌、骨癌、肝癌、甲状腺癌、皮膚癌、中枢神経系の新生物、リンパ腫、白血病、骨髄腫、肉腫又は骨髄異形成症候群である。

【 0 0 4 7 】

上記の方法の一部の実施形態では、1 以上の追加の治療、例えば、放射線療法、化学療法、免疫チェックポイント阻害剤（例えば、抗 P D - 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体、抗 L A G 3 抗体、抗 C T L A - 4 抗体、抗 T I G I T 抗体、及び、抗 T I M 3 抗体）、免疫刺激療法、免疫抑制療法、細胞療法及び治療薬（例えば、抗癌剤、化学治療薬、免疫抑制剤、免疫調節剤及び抗炎症剤）などが投与される。

【 0 0 4 8 】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、L A P を検出する方法であり、ここで、該方法は、サンプル（例えば、生物学的サンプル）を本明細書中に記載さ

10

20

30

40

50

れている任意の抗LAP抗体若しくは抗原結合フラグメント、二重特異性分子、イムノコンジュゲート及び/又は医薬組成物と接触させること、及び、複合体を検出すること、を含む。

【0049】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、制御性T細胞浸潤に関連する癌を診断する方法であり、ここで、該方法は、癌に罹患している患者からの生物学的サンプルを本明細書中に記載されている任意の抗LAP抗体若しくは抗原結合フラグメント、二重特異性分子、イムノコンジュゲート及び/又は医薬組成物と接触させることを含んでおり、ここで、該抗体若しくは抗原結合フラグメント、二重特異性分子、イムノコンジュゲート及び/又は医薬組成物による陽性染色は、当該癌が制御性T細胞浸潤に関連していることを示している。

10

【0050】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、GAR P陰性抑制細胞に関連する癌を診断する方法であり、ここで、該方法は、癌に罹患している患者からの生物学的サンプルをGAR P陰性抑制細胞に結合する本明細書中に記載されている任意の抗LAP抗体若しくは抗原結合フラグメント、二重特異性分子、イムノコンジュゲート及び/又は医薬組成物と接触させることを含んでおり、ここで、該抗体若しくは抗原結合フラグメント、二重特異性分子、イムノコンジュゲート及び/又は医薬組成物による陽性染色並びに抗GAR P抗体による陰性染色は、当該癌がGAR P陰性抑制細胞に関連していることを示している。

20

【0051】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、本明細書中に記載されている抗LAP抗体若しくは抗原結合フラグメント、二重特異性分子、イムノコンジュゲート及び/又は医薬組成物で治療するための癌に罹患している患者を選択する方法であり、ここで、該方法は、その患者からの生物学的サンプルを該抗体若しくは抗原結合フラグメント、二重特異性分子、イムノコンジュゲート及び/又は医薬組成物と接触させることを含んでおり、ここで、該抗体又は抗原結合フラグメントによる陽性染色は、当該癌が該抗体による治療に適していることを示している。

【0052】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、癌に罹患している患者の本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントでの治療に対する応答を確認する方法であり、ここで、該方法は、その患者からの生物学的サンプルを該抗体又は抗原結合フラグメントと接触させることを含んでおり、ここで、該抗体若しくは抗原結合フラグメント、二重特異性分子、イムノコンジュゲート及び/又は医薬組成物による低減された染色は、当該癌が該抗体による治療に応答していることを示している。

30

【0053】

本発明の別の態様において、本明細書中で提供されているのは、28G11によって認識されるヒトLAP上の同じエピトープに特異的に結合する抗体を作製する方法であり、ここで、該方法は、ペプチド(ここで、該ペプチドは、28G11によって認識されるエピトープを含む)を含む免疫原で動物を免疫すること、免疫された動物から28G11と同じエピトープに結合する抗体を選択すること、及び、28G11と同じエピトープに結合する抗体を取得すること、を含む。さまざまな実施形態において、該ヒトLAPは、ヒトLAP及びTGF 1を含む複合体を包含する。

40

【0054】

本発明の別の態様は、免疫抑制細胞におけるTGF 1活性化を選択的に阻害するが、細胞外マトリックスにおけるTGF 1活性化を阻害しないための；癌を治療するための；癌(例えば、制御性T細胞浸潤又はGAR P陰性抑制細胞に関連する癌)を診断するための；癌に罹患している患者を選択するための；及び、癌に罹患している患者の本明細書中に記載されている抗LAP抗体での治療に対する応答を確認するための、本明細書中に記載されている抗LAP抗体若しくは抗原結合フラグメント、二重特異性分子、イムノコン

50

ジュゲート及び/又は医薬組成物のいずれかの使用である。さらにまた、免疫抑制細胞におけるTGF β 1活性化を選択的に阻害するが、細胞外マトリックスにおけるTGF β 1活性化を阻害しない薬物を調製するための、及び、癌を治療するための薬物を調製するための、本明細書中に記載されている抗LAP抗体若しくは抗原結合フラグメント、二重特異性分子、イムノコンジュゲート及び/又は医薬組成物のいずれかの使用も提供されている。

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1A】図1A - 図1Fは、トランスフェクトされていないHT1080細胞 (HT1080 - null) 並びにヒトLAP-TGF β 1を過剰発現しているHT1080細胞 (HT1080 - huB1)、ヒトLAP-TGF β 2を過剰発現しているHT1080細胞 (HT1080 - huB2)、ヒトLAP-TGF β 3を過剰発現しているHT1080細胞 (HT1080 - huB3) 及びマウスLAP-TGF β 1を過剰発現しているHT1080細胞 (HT1080 - muB1) に対する抗体28G11-hIgG1、抗体22F9-hIgG1、抗体20E6-hIgG1、抗体17G8-hIgG1、抗体24E3-hIgG1及び抗体2C9-(hyb)の結合を示しているグラフである。[TGF β 2 = トランスフォーミング増殖因子 - 2 ; TGF β 3 = トランスフォーミング増殖因子 - 3]。 10

【図1B】図1A - 図1Fは、トランスフェクトされていないHT1080細胞 (HT1080 - null) 並びにヒトLAP-TGF β 1を過剰発現しているHT1080細胞 (HT1080 - huB1)、ヒトLAP-TGF β 2を過剰発現しているHT1080細胞 (HT1080 - huB2)、ヒトLAP-TGF β 3を過剰発現しているHT1080細胞 (HT1080 - huB3) 及びマウスLAP-TGF β 1を過剰発現しているHT1080細胞 (HT1080 - muB1) に対する抗体28G11-hIgG1、抗体22F9-hIgG1、抗体20E6-hIgG1、抗体17G8-hIgG1、抗体24E3-hIgG1及び抗体2C9-(hyb)の結合を示しているグラフである。[TGF β 2 = トランスフォーミング増殖因子 - 2 ; TGF β 3 = トランスフォーミング増殖因子 - 3]。 20

【図1C】図1A - 図1Fは、トランスフェクトされていないHT1080細胞 (HT1080 - null) 並びにヒトLAP-TGF β 1を過剰発現しているHT1080細胞 (HT1080 - huB1)、ヒトLAP-TGF β 2を過剰発現しているHT1080細胞 (HT1080 - huB2)、ヒトLAP-TGF β 3を過剰発現しているHT1080細胞 (HT1080 - huB3) 及びマウスLAP-TGF β 1を過剰発現しているHT1080細胞 (HT1080 - muB1) に対する抗体28G11-hIgG1、抗体22F9-hIgG1、抗体20E6-hIgG1、抗体17G8-hIgG1、抗体24E3-hIgG1及び抗体2C9-(hyb)の結合を示しているグラフである。[TGF β 2 = トランスフォーミング増殖因子 - 2 ; TGF β 3 = トランスフォーミング増殖因子 - 3]。 30

【図1D】図1A - 図1Fは、トランスフェクトされていないHT1080細胞 (HT1080 - null) 並びにヒトLAP-TGF β 1を過剰発現しているHT1080細胞 (HT1080 - huB1)、ヒトLAP-TGF β 2を過剰発現しているHT1080細胞 (HT1080 - huB2)、ヒトLAP-TGF β 3を過剰発現しているHT1080細胞 (HT1080 - huB3) 及びマウスLAP-TGF β 1を過剰発現しているHT1080細胞 (HT1080 - muB1) に対する抗体28G11-hIgG1、抗体22F9-hIgG1、抗体20E6-hIgG1、抗体17G8-hIgG1、抗体24E3-hIgG1及び抗体2C9-(hyb)の結合を示しているグラフである。[TGF β 2 = トランスフォーミング増殖因子 - 2 ; TGF β 3 = トランスフォーミング増殖因子 - 3]。 40

【図1E】図1A - 図1Fは、トランスフェクトされていないHT1080細胞 (HT1080 - null) 並びにヒトLAP-TGF β 1を過剰発現しているHT1080細胞 50

(HT1080-huB1)、ヒトLAP-TGF₂を過剰発現しているHT1080細胞(HT1080-huB2)、ヒトLAP-TGF₃を過剰発現しているHT1080細胞(HT1080-huB3)及びマウスLAP-TGF₁を過剰発現しているHT1080細胞(HT1080-muB1)に対する抗体28G11-hIgG1、抗体22F9-hIgG1、抗体20E6-hIgG1、抗体17G8-hIgG1、抗体24E3-hIgG1及び抗体2C9-(hyb)の結合を示しているグラフである。[TGF₂=トランスフォーミング増殖因子-2;TGF₃=トランスフォーミング増殖因子-3]。

【図1F】図1A-図1Fは、トランスフェクトされていないHT1080細胞(HT1080-null)並びにヒトLAP-TGF₁を過剰発現しているHT1080細胞(HT1080-huB1)、ヒトLAP-TGF₂を過剰発現しているHT1080細胞(HT1080-huB2)、ヒトLAP-TGF₃を過剰発現しているHT1080細胞(HT1080-huB3)及びマウスLAP-TGF₁を過剰発現しているHT1080細胞(HT1080-muB1)に対する抗体28G11-hIgG1、抗体22F9-hIgG1、抗体20E6-hIgG1、抗体17G8-hIgG1、抗体24E3-hIgG1及び抗体2C9-(hyb)の結合を示しているグラフである。[TGF₂=トランスフォーミング増殖因子-2;TGF₃=トランスフォーミング増殖因子-3]。

【図2A】図2A-図2Fは、示されているLAP-TGF₁変異体への抗体28G11-hIgG1、抗体22F9-hIgG1、抗体20E6-hIgG1、抗体17G8-hIgG1、抗体24E3-hIgG1及び抗体2C9-(hyb)の結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒトLAP-TGF₁を過剰発現しているHT1080細胞に結合している示された抗体に対応する。灰色のバーは、抗LAP抗体が加えられなかった陰性対照サンプルに対応する。HT1080-huB1:LAP-TGF₁を過剰発現しているHT1080細胞、HT1080-K27C-Y75C:K27C及びY75C変異(インテグリンによるTGF₁活性化を妨げる変異;「閉じた立体配置」)を有するLAP-TGF₁を過剰発現しているHT1080細胞、HT1080-Y74T:Y74T変異(TGF₁の自然放出に有利な変異;「開いた立体配置」)を有するLAP-TGF₁を過剰発現しているHT1080細胞;HT1080-ch2.3:ヒトLAP-TGF₁のエクソン2.3(残基131-164)がニワトリLAP-TGF₁(UniProt受託番号H9CX01)に由来する対応する残基で置き換えられているキメラLAP-TGF₁を過剰発現しているHT1080細胞;HT1080-ch4:ヒトLAP-TGF₁のエクソン4(残基183-208)がニワトリLAP-TGF₁に由来するエクソン4で置き換えられているキメラLAP-TGF₁を過剰発現しているHT1080細胞。

【図2B】図2A-図2Fは、示されているLAP-TGF₁変異体への抗体28G11-hIgG1、抗体22F9-hIgG1、抗体20E6-hIgG1、抗体17G8-hIgG1、抗体24E3-hIgG1及び抗体2C9-(hyb)の結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒトLAP-TGF₁を過剰発現しているHT1080細胞に結合している示された抗体に対応する。灰色のバーは、抗LAP抗体が加えられなかった陰性対照サンプルに対応する。HT1080-huB1:LAP-TGF₁を過剰発現しているHT1080細胞、HT1080-K27C-Y75C:K27C及びY75C変異(インテグリンによるTGF₁活性化を妨げる変異;「閉じた立体配置」)を有するLAP-TGF₁を過剰発現しているHT1080細胞、HT1080-Y74T:Y74T変異(TGF₁の自然放出に有利な変異;「開いた立体配置」)を有するLAP-TGF₁を過剰発現しているHT1080細胞;HT1080-ch2.3:ヒトLAP-TGF₁のエクソン2.3(残基131-164)がニワトリLAP-TGF₁(UniProt受託番号H9CX01)に由来する対応する残基で置き換えられているキメラLAP-TGF₁を過剰発現しているHT1080細胞;HT1080-ch4:ヒトLAP-TGF₁のエクソン4(残基183-208)がニワトリL

A P - T G F 1 に由来するエクソン 4 で置き換えられているキメラ L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞。

【図 2 C】図 2 A - 図 2 F は、示されている L A P - T G F 変異体への抗体 2 8 G 1 1 __ h I g G 1、抗体 2 2 F 9 __ h I g G 1、抗体 2 0 E 6 __ h I g G 1、抗体 1 7 G 8 __ h I g G 1、抗体 2 4 E 3 __ h I g G 1 及び抗体 2 C 9 __ (h y b) の結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞に結合している示された抗体に対応する。灰色のバーは、抗 L A P 抗体が加えられなかった陰性対照サンプルに対応する。H T 1 0 8 0 - h u B 1 : L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞、H T 1 0 8 0 - K 2 7 C __ Y 7 5 C : K 2 7 C 及び Y 7 5 C 変異 (インテグリンによる T G F 1 活性化を妨げる変異 ; 「閉じた立体配置」) を有する L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞、H T 1 0 8 0 - Y 7 4 T : Y 7 4 T 変異 (T G F 1 の自然放出に有利な変異 ; 「開いた立体配置」) を有する L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞 ; H T 1 0 8 0 - c h 2 . 3 : ヒト L A P - T G F 1 のエクソン 2 . 3 (残基 1 3 1 - 1 6 4) がニワトリ L A P - T G F 1 (U n i P r o t 受託番号 H 9 C X 0 1) に由来する対応する残基で置き換えられているキメラ L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞 ; H T 1 0 8 0 - c h 4 : ヒト L A P - T G F 1 のエクソン 4 (残基 1 8 3 - 2 0 8) がニワトリ L A P - T G F 1 に由来するエクソン 4 で置き換えられているキメラ L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞。

10

【図 2 D】図 2 A - 図 2 F は、示されている L A P - T G F 変異体への抗体 2 8 G 1 1 __ h I g G 1、抗体 2 2 F 9 __ h I g G 1、抗体 2 0 E 6 __ h I g G 1、抗体 1 7 G 8 __ h I g G 1、抗体 2 4 E 3 __ h I g G 1 及び抗体 2 C 9 __ (h y b) の結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞に結合している示された抗体に対応する。灰色のバーは、抗 L A P 抗体が加えられなかった陰性対照サンプルに対応する。H T 1 0 8 0 - h u B 1 : L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞、H T 1 0 8 0 - K 2 7 C __ Y 7 5 C : K 2 7 C 及び Y 7 5 C 変異 (インテグリンによる T G F 1 活性化を妨げる変異 ; 「閉じた立体配置」) を有する L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞、H T 1 0 8 0 - Y 7 4 T : Y 7 4 T 変異 (T G F 1 の自然放出に有利な変異 ; 「開いた立体配置」) を有する L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞 ; H T 1 0 8 0 - c h 2 . 3 : ヒト L A P - T G F 1 のエクソン 2 . 3 (残基 1 3 1 - 1 6 4) がニワトリ L A P - T G F 1 (U n i P r o t 受託番号 H 9 C X 0 1) に由来する対応する残基で置き換えられているキメラ L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞 ; H T 1 0 8 0 - c h 4 : ヒト L A P - T G F 1 のエクソン 4 (残基 1 8 3 - 2 0 8) がニワトリ L A P - T G F 1 に由来するエクソン 4 で置き換えられているキメラ L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞。

20

30

【図 2 E】図 2 A - 図 2 F は、示されている L A P - T G F 変異体への抗体 2 8 G 1 1 __ h I g G 1、抗体 2 2 F 9 __ h I g G 1、抗体 2 0 E 6 __ h I g G 1、抗体 1 7 G 8 __ h I g G 1、抗体 2 4 E 3 __ h I g G 1 及び抗体 2 C 9 __ (h y b) の結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞に結合している示された抗体に対応する。灰色のバーは、抗 L A P 抗体が加えられなかった陰性対照サンプルに対応する。H T 1 0 8 0 - h u B 1 : L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞、H T 1 0 8 0 - K 2 7 C __ Y 7 5 C : K 2 7 C 及び Y 7 5 C 変異 (インテグリンによる T G F 1 活性化を妨げる変異 ; 「閉じた立体配置」) を有する L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞、H T 1 0 8 0 - Y 7 4 T : Y 7 4 T 変異 (T G F 1 の自然放出に有利な変異 ; 「開いた立体配置」) を有する L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞 ; H T 1 0 8 0 - c h 2 . 3 : ヒト L A P - T G F 1 のエクソン 2 . 3 (残基 1 3 1 - 1 6 4) がニワトリ L A P - T G F 1 (U n i P r o t 受託番号 H 9 C X 0 1) に由来する対応する残基で置き換えられているキメラ L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞 ; H T 1 0 8 0 - c h 4 : ヒト L A P - T G F 1 のエクソン 4 (残基 1 8 3 - 2 0 8) がニワトリ L A P - T G F 1 に由来するエクソン 4 で置き換えられているキメラ L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞。

40

50

0 - ch 4 : ヒト LAP - TGF 1 のエクソン 4 (残基 183 - 208) がニワトリ LAP - TGF 1 に由来するエクソン 4 で置き換えられているキメラ LAP - TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞。

【図 2 F】図 2 A - 図 2 F は、示されている LAP - TGF 変異体への抗体 28G11__hIgG1、抗体 22F9__hIgG1、抗体 20E6__hIgG1、抗体 17G8__hIgG1、抗体 24E3__hIgG1 及び抗体 2C9__(hyb) の結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト LAP - TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞に結合している示された抗体に対応する。灰色のバーは、抗 LAP 抗体が加えられなかった陰性対照サンプルに対応する。HT1080 - huB1 : LAP - TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞、HT1080 - K27C__Y75C : K27C 及び Y75C 変異 (インテグリンによる TGF 1 活性化を妨げる変異 ; 「閉じた立体配置」) を有する LAP - TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞、HT1080 - Y74T : Y74T 変異 (TGF 1 の自然放出に有利な変異 ; 「開いた立体配置」) を有する LAP - TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞 ; HT1080 - ch2.3 : ヒト LAP - TGF 1 のエクソン 2.3 (残基 131 - 164) がニワトリ LAP - TGF 1 (UniProt 受託番号 H9CX01) に由来する対応する残基で置き換えられているキメラ LAP - TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞 ; HT1080 - ch4 : ヒト LAP - TGF 1 のエクソン 4 (残基 183 - 208) がニワトリ LAP - TGF 1 に由来するエクソン 4 で置き換えられているキメラ LAP - TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞。

【図 3 A】図 3 A - 図 3 F は、示されている LAP - TGF 変異体への抗体 28G11__hIgG1、抗体 22F9__hIgG1、抗体 20E6__hIgG1、抗体 17G8__hIgG1、抗体 24E3__hIgG1 及び抗体 2C9__(hyb) の結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト LAP - TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞に結合している示された抗体に対応する。灰色のバーは、抗 LAP 抗体が加えられなかった陰性対照サンプルに対応する。HT1080 - huB1 : LAP - TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞、HT1080 - emptyLAP : 成熟 TGF 1 サイトカインを含んでいない LAP を過剰発現している HT1080 細胞、HT1080 - ch2.2 : ヒト LAP - TGF 1 のエクソン 2.2 (残基 108 - 130) がニワトリ LAP - TGF 1 に由来するエクソン 2.2 で置き換えられているキメラ LAP - TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞。

【図 3 B】図 3 A - 図 3 F は、示されている LAP - TGF 変異体への抗体 28G11__hIgG1、抗体 22F9__hIgG1、抗体 20E6__hIgG1、抗体 17G8__hIgG1、抗体 24E3__hIgG1 及び抗体 2C9__(hyb) の結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト LAP - TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞に結合している示された抗体に対応する。灰色のバーは、抗 LAP 抗体が加えられなかった陰性対照サンプルに対応する。HT1080 - huB1 : LAP - TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞、HT1080 - emptyLAP : 成熟 TGF 1 サイトカインを含んでいない LAP を過剰発現している HT1080 細胞、HT1080 - ch2.2 : ヒト LAP - TGF 1 のエクソン 2.2 (残基 108 - 130) がニワトリ LAP - TGF 1 に由来するエクソン 2.2 で置き換えられているキメラ LAP - TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞。

【図 3 C】図 3 A - 図 3 F は、示されている LAP - TGF 変異体への抗体 28G11__hIgG1、抗体 22F9__hIgG1、抗体 20E6__hIgG1、抗体 17G8__hIgG1、抗体 24E3__hIgG1 及び抗体 2C9__(hyb) の結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト LAP - TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞に結合している示された抗体に対応する。灰色のバーは、抗 LAP 抗体が加えられなかった陰性対照サンプルに対応する。HT1080 - huB1 : LAP - TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞、HT1080 - emptyLAP : 成熟 TGF 1 サイトカインを含んでいない LAP を過剰発現している HT1080 細胞、HT1080 -

10

20

30

40

50

ch2.2: ヒト LAP-TGF 1 のエクソン 2.2 (残基 108 - 130) がニワトリ LAP-TGF 1 に由来するエクソン 2.2 で置き換えられているキメラ LAP-TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞。

【図 3 D】図 3 A - 図 3 F は、示されている LAP-TGF 変異体への抗体 28G11__hIgG1、抗体 22F9__hIgG1、抗体 20E6__hIgG1、抗体 17G8__hIgG1、抗体 24E3__hIgG1 及び抗体 2C9__(hyb) の結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト LAP-TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞に結合している示された抗体に対応する。灰色のバーは、抗 LAP 抗体が加えられなかった陰性対照サンプルに対応する。HT1080-huB1: LAP-TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞、HT1080-emptyLAP: 成熟 TGF 1 サイトカインを含んでいない LAP を過剰発現している HT1080 細胞、HT1080-ch2.2: ヒト LAP-TGF 1 のエクソン 2.2 (残基 108 - 130) がニワトリ LAP-TGF 1 に由来するエクソン 2.2 で置き換えられているキメラ LAP-TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞。

【図 3 E】図 3 A - 図 3 F は、示されている LAP-TGF 変異体への抗体 28G11__hIgG1、抗体 22F9__hIgG1、抗体 20E6__hIgG1、抗体 17G8__hIgG1、抗体 24E3__hIgG1 及び抗体 2C9__(hyb) の結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト LAP-TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞に結合している示された抗体に対応する。灰色のバーは、抗 LAP 抗体が加えられなかった陰性対照サンプルに対応する。HT1080-huB1: LAP-TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞、HT1080-emptyLAP: 成熟 TGF 1 サイトカインを含んでいない LAP を過剰発現している HT1080 細胞、HT1080-ch2.2: ヒト LAP-TGF 1 のエクソン 2.2 (残基 108 - 130) がニワトリ LAP-TGF 1 に由来するエクソン 2.2 で置き換えられているキメラ LAP-TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞。

【図 3 F】図 3 A - 図 3 F は、示されている LAP-TGF 変異体への抗体 28G11__hIgG1、抗体 22F9__hIgG1、抗体 20E6__hIgG1、抗体 17G8__hIgG1、抗体 24E3__hIgG1 及び抗体 2C9__(hyb) の結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト LAP-TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞に結合している示された抗体に対応する。灰色のバーは、抗 LAP 抗体が加えられなかった陰性対照サンプルに対応する。HT1080-huB1: LAP-TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞、HT1080-emptyLAP: 成熟 TGF 1 サイトカインを含んでいない LAP を過剰発現している HT1080 細胞、HT1080-ch2.2: ヒト LAP-TGF 1 のエクソン 2.2 (残基 108 - 130) がニワトリ LAP-TGF 1 に由来するエクソン 2.2 で置き換えられているキメラ LAP-TGF 1 を過剰発現している HT1080 細胞。

【図 4】図 4 は、シグナルの阻害が成熟 TGF への結合を示す ELISA アッセイによって測定された、成熟 TGF (即ち、LAP を含んでいない TGF) への抗体 28G11__hIgG1、抗体 22F9__hIgG1、抗体 20E6__hIgG1、抗体 17G8__hIgG1、抗体 24E3__hIgG1 及び抗体 1D11 の結合を示しているグラフである。

【図 5 A】図 5 A 及び図 5 B は、ヒト LAP-TGF 1 (図 5 A) 及びマウス LAP-TGF 1 (図 5 B) を発現している P3U1 細胞における TGF 1 活性化に対する 28G11 の効果を示している一連のグラフである。

【図 5 B】図 5 A 及び図 5 B は、ヒト LAP-TGF 1 (図 5 A) 及びマウス LAP-TGF 1 (図 5 B) を発現している P3U1 細胞における TGF 1 活性化に対する 28G11 の効果を示している一連のグラフである。

【図 6 A】図 6 A - 図 6 F は、ヒト LAP-TGF 1 又はマウス LAP-TGF 1 を発現している P3U1 細胞における TGF 1 活性化に対する抗体 17G8 の効果 (図 6 A はヒト LAP-TGF 1 の場合、及び、図 6 B はマウス LAP-TGF 1 の場合)

10

20

30

40

50

場合)、抗体 20E6 の効果 (図 6 F はヒト LAP - TGF 1 の場合) を示しているグラフである。図 6 G - 図 6 L は、ヒト LAP - TGF 1 又はマウス LAP - TGF 1 を発現している P3U1 細胞における TGF 1 活性化に対する 28G11 __ IgG2a の効果 (図 6 G)、20E6 __ IgG2a の効果 (図 6 H)、22F9 __ IgG2a の効果 (図 6 I)、24E3 __ hIgG1 の効果 (図 6 J)、17G8 __ hIgG1 の効果 (図 6 K) 及び 20E6 __ H0 . 2aL1 __ hIgG1 の効果 (図 6 L) を示しているグラフである。

【図 6 F】図 6 A - 図 6 F は、ヒト LAP - TGF 1 又はマウス LAP - TGF 1 を発現している P3U1 細胞における TGF 1 活性化に対する抗体 17G8 の効果 (図 6 A はヒト LAP - TGF 1 の場合、及び、図 6 B はマウス LAP - TGF 1 の場合)、抗体 24E3 の効果 (図 6 C はヒト LAP - TGF 1 の場合、及び、図 6 D はマウス LAP - TGF 1 の場合)、抗体 22F9 の効果 (図 6 E はヒト LAP - TGF 1 の場合)、抗体 20E6 の効果 (図 6 F はヒト LAP - TGF 1 の場合) を示しているグラフである。図 6 G - 図 6 L は、ヒト LAP - TGF 1 又はマウス LAP - TGF 1 を発現している P3U1 細胞における TGF 1 活性化に対する 28G11 __ IgG2a の効果 (図 6 G)、20E6 __ IgG2a の効果 (図 6 H)、22F9 __ IgG2a の効果 (図 6 I)、24E3 __ hIgG1 の効果 (図 6 J)、17G8 __ hIgG1 の効果 (図 6 K) 及び 20E6 __ H0 . 2aL1 __ hIgG1 の効果 (図 6 L) を示しているグラフである。

10

【図 6 G】図 6 A - 図 6 F は、ヒト LAP - TGF 1 又はマウス LAP - TGF 1 を発現している P3U1 細胞における TGF 1 活性化に対する抗体 17G8 の効果 (図 6 A はヒト LAP - TGF 1 の場合、及び、図 6 B はマウス LAP - TGF 1 の場合)、抗体 24E3 の効果 (図 6 C はヒト LAP - TGF 1 の場合、及び、図 6 D はマウス LAP - TGF 1 の場合)、抗体 22F9 の効果 (図 6 E はヒト LAP - TGF 1 の場合)、抗体 20E6 の効果 (図 6 F はヒト LAP - TGF 1 の場合) を示しているグラフである。図 6 G - 図 6 L は、ヒト LAP - TGF 1 又はマウス LAP - TGF 1 を発現している P3U1 細胞における TGF 1 活性化に対する 28G11 __ IgG2a の効果 (図 6 G)、20E6 __ IgG2a の効果 (図 6 H)、22F9 __ IgG2a の効果 (図 6 I)、24E3 __ hIgG1 の効果 (図 6 J)、17G8 __ hIgG1 の効果 (図 6 K) 及び 20E6 __ H0 . 2aL1 __ hIgG1 の効果 (図 6 L) を示しているグラフである。

20

30

【図 6 H】図 6 A - 図 6 F は、ヒト LAP - TGF 1 又はマウス LAP - TGF 1 を発現している P3U1 細胞における TGF 1 活性化に対する抗体 17G8 の効果 (図 6 A はヒト LAP - TGF 1 の場合、及び、図 6 B はマウス LAP - TGF 1 の場合)、抗体 24E3 の効果 (図 6 C はヒト LAP - TGF 1 の場合、及び、図 6 D はマウス LAP - TGF 1 の場合)、抗体 22F9 の効果 (図 6 E はヒト LAP - TGF 1 の場合)、抗体 20E6 の効果 (図 6 F はヒト LAP - TGF 1 の場合) を示しているグラフである。図 6 G - 図 6 L は、ヒト LAP - TGF 1 又はマウス LAP - TGF 1 を発現している P3U1 細胞における TGF 1 活性化に対する 28G11 __ IgG2a の効果 (図 6 G)、20E6 __ IgG2a の効果 (図 6 H)、22F9 __ IgG2a の効果 (図 6 I)、24E3 __ hIgG1 の効果 (図 6 J)、17G8 __ hIgG1 の効果 (図 6 K) 及び 20E6 __ H0 . 2aL1 __ hIgG1 の効果 (図 6 L) を示しているグラフである。

40

【図 6 I】図 6 A - 図 6 F は、ヒト LAP - TGF 1 又はマウス LAP - TGF 1 を発現している P3U1 細胞における TGF 1 活性化に対する抗体 17G8 の効果 (図 6 A はヒト LAP - TGF 1 の場合、及び、図 6 B はマウス LAP - TGF 1 の場合)、抗体 24E3 の効果 (図 6 C はヒト LAP - TGF 1 の場合、及び、図 6 D はマウス LAP - TGF 1 の場合)、抗体 22F9 の効果 (図 6 E はヒト LAP - TGF 1 の場合)、抗体 20E6 の効果 (図 6 F はヒト LAP - TGF 1 の場合) を示しているグラフである。図 6 G - 図 6 L は、ヒト LAP - TGF 1 又はマウス LAP - TGF 1

50

を発現している P3U1 細胞における TGF- β 1 活性化に対する 28G11-IgG2a の効果 (図 6G)、20E6-IgG2a の効果 (図 6H)、22F9-IgG2a の効果 (図 6I)、24E3-hIgG1 の効果 (図 6J)、17G8-hIgG1 の効果 (図 6K) 及び 20E6-H0.2aL1-hIgG1 の効果 (図 6L) を示しているグラフである。

【図 6J】図 6A - 図 6F は、ヒト LAP-TGF- β 1 又はマウス LAP-TGF- β 1 を発現している P3U1 細胞における TGF- β 1 活性化に対する抗体 17G8 の効果 (図 6A はヒト LAP-TGF- β 1 の場合、及び、図 6B はマウス LAP-TGF- β 1 の場合)、抗体 24E3 の効果 (図 6C はヒト LAP-TGF- β 1 の場合、及び、図 6D はマウス LAP-TGF- β 1 の場合)、抗体 22F9 の効果 (図 6E はヒト LAP-TGF- β 1 の場合)、抗体 20E6 の効果 (図 6F はヒト LAP-TGF- β 1 の場合) を示しているグラフである。図 6G - 図 6L は、ヒト LAP-TGF- β 1 又はマウス LAP-TGF- β 1 を発現している P3U1 細胞における TGF- β 1 活性化に対する 28G11-IgG2a の効果 (図 6G)、20E6-IgG2a の効果 (図 6H)、22F9-IgG2a の効果 (図 6I)、24E3-hIgG1 の効果 (図 6J)、17G8-hIgG1 の効果 (図 6K) 及び 20E6-H0.2aL1-hIgG1 の効果 (図 6L) を示しているグラフである。

10

【図 6K】図 6A - 図 6F は、ヒト LAP-TGF- β 1 又はマウス LAP-TGF- β 1 を発現している P3U1 細胞における TGF- β 1 活性化に対する抗体 17G8 の効果 (図 6A はヒト LAP-TGF- β 1 の場合、及び、図 6B はマウス LAP-TGF- β 1 の場合)、抗体 24E3 の効果 (図 6C はヒト LAP-TGF- β 1 の場合、及び、図 6D はマウス LAP-TGF- β 1 の場合)、抗体 22F9 の効果 (図 6E はヒト LAP-TGF- β 1 の場合)、抗体 20E6 の効果 (図 6F はヒト LAP-TGF- β 1 の場合) を示しているグラフである。図 6G - 図 6L は、ヒト LAP-TGF- β 1 又はマウス LAP-TGF- β 1 を発現している P3U1 細胞における TGF- β 1 活性化に対する 28G11-IgG2a の効果 (図 6G)、20E6-IgG2a の効果 (図 6H)、22F9-IgG2a の効果 (図 6I)、24E3-hIgG1 の効果 (図 6J)、17G8-hIgG1 の効果 (図 6K) 及び 20E6-H0.2aL1-hIgG1 の効果 (図 6L) を示しているグラフである。

20

【図 6L】図 6A - 図 6F は、ヒト LAP-TGF- β 1 又はマウス LAP-TGF- β 1 を発現している P3U1 細胞における TGF- β 1 活性化に対する抗体 17G8 の効果 (図 6A はヒト LAP-TGF- β 1 の場合、及び、図 6B はマウス LAP-TGF- β 1 の場合)、抗体 24E3 の効果 (図 6C はヒト LAP-TGF- β 1 の場合、及び、図 6D はマウス LAP-TGF- β 1 の場合)、抗体 22F9 の効果 (図 6E はヒト LAP-TGF- β 1 の場合)、抗体 20E6 の効果 (図 6F はヒト LAP-TGF- β 1 の場合) を示しているグラフである。図 6G - 図 6L は、ヒト LAP-TGF- β 1 又はマウス LAP-TGF- β 1 を発現している P3U1 細胞における TGF- β 1 活性化に対する 28G11-IgG2a の効果 (図 6G)、20E6-IgG2a の効果 (図 6H)、22F9-IgG2a の効果 (図 6I)、24E3-hIgG1 の効果 (図 6J)、17G8-hIgG1 の効果 (図 6K) 及び 20E6-H0.2aL1-hIgG1 の効果 (図 6L) を示しているグラフである。

30

40

【図 7】図 7 は、P3U1 細胞によって沈着された細胞外マトリックス (ECM) への示されている抗 LAP 抗体の結合を示しているグラフである。3 種類の細胞型について試験した: LAP-TGF- β を有さない P3U1 細胞、ヒト LAP-TGF- β 1 を発現している P3U1 細胞、及び、マウス LAP-TGF- β 1 を発現している P3U1 細胞。抗体は、2 μ g/mL の濃度で使用した。

【図 8】図 8 は、ヒト血小板への示されている抗 LAP 抗体 (即ち、抗体 28G11、抗体 22F9、抗体 20E6、抗体 17G8、及び、抗体 24E3) の結合における用量反応関係を示しているグラフである。

【図 9A】図 9A - 図 9E は、ヒト血小板脱顆粒に対する抗 LAP 抗体 28G11-hy

50

b (図 9 A)、抗 L A P 抗体 2 0 E 6 __ I g G 2 a (図 9 B)、抗 L A P 抗体 2 2 F 9 __ I g G 2 a (図 9 C)、抗 L A P 抗体 1 7 G 8 __ h I g G 1 (図 9 D) 及び抗 L A P 抗体 2 4 E 3 __ h I g G 1 (図 9 E) の効果を示しているグラフである。

【 図 9 B 】 図 9 A - 図 9 E は、ヒト血小板脱顆粒に対する抗 L A P 抗体 2 8 G 1 1 __ h y b (図 9 A)、抗 L A P 抗体 2 0 E 6 __ I g G 2 a (図 9 B)、抗 L A P 抗体 2 2 F 9 __ I g G 2 a (図 9 C)、抗 L A P 抗体 1 7 G 8 __ h I g G 1 (図 9 D) 及び抗 L A P 抗体 2 4 E 3 __ h I g G 1 (図 9 E) の効果を示しているグラフである。

【 図 9 C 】 図 9 A - 図 9 E は、ヒト血小板脱顆粒に対する抗 L A P 抗体 2 8 G 1 1 __ h y b (図 9 A)、抗 L A P 抗体 2 0 E 6 __ I g G 2 a (図 9 B)、抗 L A P 抗体 2 2 F 9 __ I g G 2 a (図 9 C)、抗 L A P 抗体 1 7 G 8 __ h I g G 1 (図 9 D) 及び抗 L A P 抗体 2 4 E 3 __ h I g G 1 (図 9 E) の効果を示しているグラフである。

【 図 9 D 】 図 9 A - 図 9 E は、ヒト血小板脱顆粒に対する抗 L A P 抗体 2 8 G 1 1 __ h y b (図 9 A)、抗 L A P 抗体 2 0 E 6 __ I g G 2 a (図 9 B)、抗 L A P 抗体 2 2 F 9 __ I g G 2 a (図 9 C)、抗 L A P 抗体 1 7 G 8 __ h I g G 1 (図 9 D) 及び抗 L A P 抗体 2 4 E 3 __ h I g G 1 (図 9 E) の効果を示しているグラフである。

【 図 9 E 】 図 9 A - 図 9 E は、ヒト血小板脱顆粒に対する抗 L A P 抗体 2 8 G 1 1 __ h y b (図 9 A)、抗 L A P 抗体 2 0 E 6 __ I g G 2 a (図 9 B)、抗 L A P 抗体 2 2 F 9 __ I g G 2 a (図 9 C)、抗 L A P 抗体 1 7 G 8 __ h I g G 1 (図 9 D) 及び抗 L A P 抗体 2 4 E 3 __ h I g G 1 (図 9 E) の効果を示しているグラフである。

【 図 1 0 A 】 図 1 0 A 及び図 1 0 B は、T H P - 1 細胞への示されている抗 L A P 抗体の結合を示しているグラフである。T H P 細胞の結合は、図 1 0 A では、L A P + 細胞のパーセント (%) として表されており、及び、図 1 0 B では、蛍光強度の中央値 (M F I) として表されている。図 1 0 C は、T H P - 1 細胞への示されている抗 L A P 抗体の結合を示しているグラフである。T H P 細胞の結合は、L A P + 細胞の % として表されている。図 1 0 D は、T H P - 1 細胞への示されている抗 L A P 抗体の結合に関するドットプロットを示している。図 1 0 E 及び図 1 0 F は、U 9 3 7 細胞への示されている抗 L A P 抗体の結合を示しているグラフである。U 9 3 7 細胞の結合は、図 1 0 E では、L A P + 細胞の % として表されており、及び、図 1 0 F では、M F I として表されている。図 1 0 G は、U 9 3 7 細胞への示されている抗 L A P 抗体の結合に関するドットプロットを示している。

【 図 1 0 B 】 図 1 0 A 及び図 1 0 B は、T H P - 1 細胞への示されている抗 L A P 抗体の結合を示しているグラフである。T H P 細胞の結合は、図 1 0 A では、L A P + 細胞のパーセント (%) として表されており、及び、図 1 0 B では、蛍光強度の中央値 (M F I) として表されている。図 1 0 C は、T H P - 1 細胞への示されている抗 L A P 抗体の結合を示しているグラフである。T H P 細胞の結合は、L A P + 細胞の % として表されている。図 1 0 D は、T H P - 1 細胞への示されている抗 L A P 抗体の結合に関するドットプロットを示している。図 1 0 E 及び図 1 0 F は、U 9 3 7 細胞への示されている抗 L A P 抗体の結合を示しているグラフである。U 9 3 7 細胞の結合は、図 1 0 E では、L A P + 細胞の % として表されており、及び、図 1 0 F では、M F I として表されている。図 1 0 G は、U 9 3 7 細胞への示されている抗 L A P 抗体の結合に関するドットプロットを示している。

【 図 1 0 C 】 図 1 0 A 及び図 1 0 B は、T H P - 1 細胞への示されている抗 L A P 抗体の結合を示しているグラフである。T H P 細胞の結合は、図 1 0 A では、L A P + 細胞のパーセント (%) として表されており、及び、図 1 0 B では、蛍光強度の中央値 (M F I) として表されている。図 1 0 C は、T H P - 1 細胞への示されている抗 L A P 抗体の結合を示しているグラフである。T H P 細胞の結合は、L A P + 細胞の % として表されている。図 1 0 D は、T H P - 1 細胞への示されている抗 L A P 抗体の結合に関するドットプロットを示している。図 1 0 E 及び図 1 0 F は、U 9 3 7 細胞への示されている抗 L A P 抗体の結合を示しているグラフである。U 9 3 7 細胞の結合は、図 1 0 E では、L A P + 細胞の % として表されており、及び、図 1 0 F では、M F I として表されている。図 1 0 G

10

20

30

40

50

は、U937細胞への示されている抗LAP抗体の結合に関するドットプロットを示している。

【図10D】図10A及び図10Bは、THP-1細胞への示されている抗LAP抗体の結合を示しているグラフである。THP細胞の結合は、図10Aでは、LAP+細胞のパーセント(%)として表されており、及び、図10Bでは、蛍光強度の中央値(MFI)として表されている。図10Cは、THP-1細胞への示されている抗LAP抗体の結合を示しているグラフである。THP細胞の結合は、LAP+細胞の%として表されている。図10Dは、THP-1細胞への示されている抗LAP抗体の結合に関するドットプロットを示している。図10E及び図10Fは、U937細胞への示されている抗LAP抗体の結合を示しているグラフである。U937細胞の結合は、図10Eでは、LAP+細胞の%として表されており、及び、図10Fでは、MFIとして表されている。図10Gは、U937細胞への示されている抗LAP抗体の結合に関するドットプロットを示している。

10

【図10E】図10A及び図10Bは、THP-1細胞への示されている抗LAP抗体の結合を示しているグラフである。THP細胞の結合は、図10Aでは、LAP+細胞のパーセント(%)として表されており、及び、図10Bでは、蛍光強度の中央値(MFI)として表されている。図10Cは、THP-1細胞への示されている抗LAP抗体の結合を示しているグラフである。THP細胞の結合は、LAP+細胞の%として表されている。図10Dは、THP-1細胞への示されている抗LAP抗体の結合に関するドットプロットを示している。図10E及び図10Fは、U937細胞への示されている抗LAP抗体の結合を示しているグラフである。U937細胞の結合は、図10Eでは、LAP+細胞の%として表されており、及び、図10Fでは、MFIとして表されている。図10Gは、U937細胞への示されている抗LAP抗体の結合に関するドットプロットを示している。

20

【図10F】図10A及び図10Bは、THP-1細胞への示されている抗LAP抗体の結合を示しているグラフである。THP細胞の結合は、図10Aでは、LAP+細胞のパーセント(%)として表されており、及び、図10Bでは、蛍光強度の中央値(MFI)として表されている。図10Cは、THP-1細胞への示されている抗LAP抗体の結合を示しているグラフである。THP細胞の結合は、LAP+細胞の%として表されている。図10Dは、THP-1細胞への示されている抗LAP抗体の結合に関するドットプロットを示している。図10E及び図10Fは、U937細胞への示されている抗LAP抗体の結合を示しているグラフである。U937細胞の結合は、図10Eでは、LAP+細胞の%として表されており、及び、図10Fでは、MFIとして表されている。図10Gは、U937細胞への示されている抗LAP抗体の結合に関するドットプロットを示している。

30

【図10G】図10A及び図10Bは、THP-1細胞への示されている抗LAP抗体の結合を示しているグラフである。THP細胞の結合は、図10Aでは、LAP+細胞のパーセント(%)として表されており、及び、図10Bでは、蛍光強度の中央値(MFI)として表されている。図10Cは、THP-1細胞への示されている抗LAP抗体の結合を示しているグラフである。THP細胞の結合は、LAP+細胞の%として表されている。図10Dは、THP-1細胞への示されている抗LAP抗体の結合に関するドットプロットを示している。図10E及び図10Fは、U937細胞への示されている抗LAP抗体の結合を示しているグラフである。U937細胞の結合は、図10Eでは、LAP+細胞の%として表されており、及び、図10Fでは、MFIとして表されている。図10Gは、U937細胞への示されている抗LAP抗体の結合に関するドットプロットを示している。

40

【図11】図11は、陽性細胞のパーセントで表される、制御性T細胞、CD8細胞、M2マクロファージ及びCT26TILに由来するM-MDS Cへの抗LAP抗体28G11、抗LAP抗体22F9及び抗LAP抗体20E6の結合を示しているグラフである。

【図12】図12は、ヒトGARP及びLAP-TGF-1を過剰発現しているP3U1

50

細胞への結合に関して、マウス 28G11 親抗体と競合するヒト化 28G11 変異体の能力を示しているグラフである。H0 - H2 は、変異体ヒト化重鎖であり、L0 - L3 は、変異体ヒト化軽鎖である。

【図 13】図 13 は、ヒト GARP 及び LAP - TGF β 1 を過剰発現している P3U1 細胞への示されているヒト化 28G11 変異体の結合を示しているグラフである。

【図 14A】図 14A - 図 14D は、ELISA による示されているヒト化 28G11 変異体による TGF β 1 活性化の阻害を示しているグラフである。

【図 14B】図 14A - 図 14D は、ELISA による示されているヒト化 28G11 変異体による TGF β 1 活性化の阻害を示しているグラフである。

【図 14C】図 14A - 図 14D は、ELISA による示されているヒト化 28G11 変異体による TGF β 1 活性化の阻害を示しているグラフである。 10

【図 14D】図 14A - 図 14D は、ELISA による示されているヒト化 28G11 変異体による TGF β 1 活性化の阻害を示しているグラフである。

【図 15A】図 15A は、ヒト化 28G11__H2L3 変異体におけるヒト残基への復帰のさまざまな組合せがヒト LAP - TGF β 1 を過剰発現している HT1080 細胞への結合に対して及ぼす効果を示しているグラフである。試験されたさまざまな抗体は、HC 変異体__LC 変異体として記載されている。図 15B は、28G11__H2.1L3 変異体及び 28G11__H2aL3a 変異体がヒト LAP - TGF β 1 を過剰発現している HT1080 細胞への結合に対して及ぼす効果を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト LAP - TGF β 1 を過剰発現している HT1080 細胞に結合している抗体に対応 20
する。灰色のバーは、ヒト LAP - TGF β 1 を過剰発現しない対照 HT1080 細胞に結合している抗体に対応する。

【図 15B】図 15A は、ヒト化 28G11__H2L3 変異体におけるヒト残基への復帰のさまざまな組合せがヒト LAP - TGF β 1 を過剰発現している HT1080 細胞への結合に対して及ぼす効果を示しているグラフである。試験されたさまざまな抗体は、HC 変異体__LC 変異体として記載されている。図 15B は、28G11__H2.1L3 変異体及び 28G11__H2aL3a 変異体がヒト LAP - TGF β 1 を過剰発現している HT1080 細胞への結合に対して及ぼす効果を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト LAP - TGF β 1 を過剰発現している HT1080 細胞に結合している抗体に対応 30
する。灰色のバーは、ヒト LAP - TGF β 1 を過剰発現しない対照 HT1080 細胞に結合している抗体に対応する。

【図 16】図 16 は、ヒト LAP - TGF β 1 を過剰発現している HT1080 細胞への示されているヒト化 22F9 変異体の結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト LAP - TGF β 1 を過剰発現している HT1080 細胞に結合している抗体に対応する。灰色のバーは、ヒト LAP - TGF β 1 を過剰発現しない対照 HT1080 細胞に結合している抗体に対応する。

【図 17A】図 17A 及び図 17B は、示されている抗体 22F9 及び変異体に関するサイズ排除高性能液体クロマトグラフィー (SE-HPLC) からのクロマトグラムである。

【図 17B】図 17A 及び図 17B は、示されている抗体 22F9 及び変異体に関するサイズ排除高性能液体クロマトグラフィー (SE-HPLC) からのクロマトグラムである。 40

【図 18A】図 18A は、ヒト LAP - TGF β 1 を過剰発現している HT1080 細胞への結合に対する、22F9__H5L0 の重鎖内のマウス残基を対応するヒト残基に復帰させることの効果を示しているグラフである。図 18B は、ヒト LAP - TGF β 1 を過剰発現している HT1080 細胞への結合に対する、22F9__H5L0 内の潜在的な脱アミド化 / 異性化部位を除去するための置換の効果を示しているグラフである。22F9__H5.2L0 は、二重 N54Q / D102A 変異を有する 22F9__H5L0 に対応する。図 18C は、22F9__H0.1 変異体、22F9__H1.1 変異体、22F9__H2.1 変異体及び 22F9__H3.1 変異体のヒト LAP - TGF β 1 を過剰発現してい 50

る HT1080 細胞への結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現している HT1080 細胞に結合している抗体に対応する。灰色のバーは、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現しない対照 HT1080 細胞に結合している抗体に対応する。

【図 18B】図 18A は、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現している HT1080 細胞への結合に対する、22F9__H5L0 の重鎖内のマウス残基を対応するヒト残基に復帰させることの効果を示しているグラフである。図 18B は、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現している HT1080 細胞への結合に対する、22F9__H5L0 内の潜在的な脱アミド化/異性化部位を除去するための置換の効果を示しているグラフである。22F9__H5.2L0 は、二重 N54Q/D102A 変異を有する 22F9__H5L0 に対応する。図 18C は、22F9__H0.1 変異体、22F9__H1.1 変異体、22F9__H2.1 変異体及び 22F9__H3.1 変異体のヒト LAP-TGF1 を過剰発現している HT1080 細胞への結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現している HT1080 細胞に結合している抗体に対応する。灰色のバーは、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現しない対照 HT1080 細胞に結合している抗体に対応する。

【図 18C】図 18A は、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現している HT1080 細胞への結合に対する、22F9__H5L0 の重鎖内のマウス残基を対応するヒト残基に復帰させることの効果を示しているグラフである。図 18B は、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現している HT1080 細胞への結合に対する、22F9__H5L0 内の潜在的な脱アミド化/異性化部位を除去するための置換の効果を示しているグラフである。22F9__H5.2L0 は、二重 N54Q/D102A 変異を有する 22F9__H5L0 に対応する。図 18C は、22F9__H0.1 変異体、22F9__H1.1 変異体、22F9__H2.1 変異体及び 22F9__H3.1 変異体のヒト LAP-TGF1 を過剰発現している HT1080 細胞への結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現している HT1080 細胞に結合している抗体に対応する。灰色のバーは、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現しない対照 HT1080 細胞に結合している抗体に対応する。

【図 19A】図 19A 及び図 19B は、示されているヒト化 20E6 変異体のヒト LAP-TGF1 への結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現している HT1080 細胞に結合している抗体に対応する。灰色のバーは、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現しない対照 HT1080 細胞に結合している抗体に対応する。

【図 19B】図 19A 及び図 19B は、示されているヒト化 20E6 変異体のヒト LAP-TGF1 への結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現している HT1080 細胞に結合している抗体に対応する。灰色のバーは、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現しない対照 HT1080 細胞に結合している抗体に対応する。

【図 20A】図 20A は、ヒト LAP-TGF1 への結合に対する、20E6 の L1 軽鎖へのマウスの復帰置換 (back-substitution) の効果を示しているグラフである。図 20B は、結合時に免疫原性が低下している 20E6__H0 重鎖変異体のヒト LAP-TGF1 への結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現している HT1080 細胞に結合している抗体に対応する。灰色のバーは、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現しない対照 HT1080 細胞に結合している抗体に対応する。

【図 20B】図 20A は、ヒト LAP-TGF1 への結合に対する、20E6 の L1 軽鎖へのマウスの復帰置換 (back-substitution) の効果を示しているグラフである。図 20B は、結合時に免疫原性が低下している 20E6__H0 重鎖変異体のヒト LAP-TGF1 への結合を示しているグラフである。黒色のバーは、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現している HT1080 細胞に結合している抗体に対応する。灰色

10

20

30

40

50

のバーは、ヒト L A P - T G F 1 を過剰発現しない対照 H T 1 0 8 0 細胞に結合している抗体に対応する。

【図 2 1 A】図 2 1 A - 図 2 1 C は、ヒト L A P - T G F 1、L A P - T G F 2 又は L A P - T G F 3 のいずれかを含む F c 融合体への 2 0 E 6 __ H 0 . 2 a L 1 __ h I g G 1 抗体の結合を示しているバイオレイヤー干渉法曲線である。

【図 2 1 B】図 2 1 A - 図 2 1 C は、ヒト L A P - T G F 1、L A P - T G F 2 又は L A P - T G F 3 のいずれかを含む F c 融合体への 2 0 E 6 __ H 0 . 2 a L 1 __ h I g G 1 抗体の結合を示しているバイオレイヤー干渉法曲線である。

【図 2 1 C】図 2 1 A - 図 2 1 C は、ヒト L A P - T G F 1、L A P - T G F 2 又は L A P - T G F 3 のいずれかを含む F c 融合体への 2 0 E 6 __ H 0 . 2 a L 1 __ h I g G 1 抗体の結合を示しているバイオレイヤー干渉法曲線である。

【図 2 2 A】図 2 2 A - 図 2 2 D は、2 0 E 6 __ H 0 . 2 a L 1 __ h I g G 1 抗体の複数の重鎖及び軽鎖 C D R 変異体のヒト L A P - T G F 1 への結合を示しているグラフである。

【図 2 2 B】図 2 2 A - 図 2 2 D は、2 0 E 6 __ H 0 . 2 a L 1 __ h I g G 1 抗体の複数の重鎖及び軽鎖 C D R 変異体のヒト L A P - T G F 1 への結合を示しているグラフである。

【図 2 2 C】図 2 2 A - 図 2 2 D は、2 0 E 6 __ H 0 . 2 a L 1 __ h I g G 1 抗体の複数の重鎖及び軽鎖 C D R 変異体のヒト L A P - T G F 1 への結合を示しているグラフである。

【図 2 2 D】図 2 2 A - 図 2 2 D は、2 0 E 6 __ H 0 . 2 a L 1 __ h I g G 1 抗体の複数の重鎖及び軽鎖 C D R 変異体のヒト L A P - T G F 1 への結合を示しているグラフである。

【図 2 3 A】図 2 3 A 及び図 2 3 B は、G A R P 及び L A P - T G F 1 を過剰発現している P 3 U 1 細胞への 2 0 E 6 __ H 0 . 2 a L 1 __ h I g G 1 の F (a b ') 2 フラグメント及び F a b ' フラグメントの結合を示しているグラフである。

【図 2 3 B】図 2 3 A 及び図 2 3 B は、G A R P 及び L A P - T G F 1 を過剰発現している P 3 U 1 細胞への 2 0 E 6 __ H 0 . 2 a L 1 __ h I g G 1 の F (a b ') 2 フラグメント及び F a b ' フラグメントの結合を示しているグラフである。

【図 2 4】図 2 4 は、M H G 8 (G A R P 特異的マウス I g G 2 a) 抗体、1 6 F 4 (抗 L A P) 抗体及びヒト化 2 0 E 6 抗体の可溶性 L A P - T G F 1、s G A R P - L A P - T G F 1 及び E C R 3 E - L A P - T G F 1 複合体への結合を示している一連のバイオレイヤー干渉法曲線である。

【図 2 5】図 2 5 は、実施例 1 7 に記載されているような、マウス 2 8 G 1 1、1 6 F 4 及び M H G 8 の結合エピトープを比較するために使用される競合実験の概略図である。

【図 2 6 A】図 2 6 A は、ヒト化 2 0 E 6 - F a b / L A P - T G F 1 モデルを構築するために使用される c r y o - E M マップの例を示している。図 2 6 B は、分解能に対する F S C 曲線のプロットである。図 2 6 C は、ギニエプロットを使用した B 因子推定である。

【図 2 6 B】図 2 6 B は、分解能に対する F S C 曲線のプロットである。図 2 6 C は、ギニエプロットを使用した B 因子推定である。

【図 2 6 C】図 2 6 C は、ギニエプロットを使用した B 因子推定である。

【図 2 7 A】図 2 7 A は、3 . 1 分解能での、L A P - T G F 1 と複合体を形成したヒト化 2 0 E 6 抗体の c r y o - E M マップである。

【図 2 7 B】図 2 7 B は、2 . 9 分解能での P D B エントリー 5 j x e に関する電子密度を示している。

【図 2 8 A】図 2 8 A は、L A P とヒト化 2 0 E 6 F a b の V L 及び V H との間の相互作用を示している。図 2 8 B は、T G F 1 と F a b のヒト化 2 0 E 6 V L 及び V H 部分との間の相互作用を示している。図 2 8 C 及び図 2 8 D は、L A P - T G F 1 と 2 0 E 6 F a b の 2 0 E 6 V L 部分との間のさらなる相互作用を示している。構成及び相互作用は

10

20

30

40

50

、グレースケールで示されている。

【図28B】図28Aは、LAPとヒト化20E6FabのVL及びVHとの間の相互作用を示している。図28Bは、TGF1とFabのヒト化20E6VL及びVH部分との間の相互作用を示している。図28C及び図28Dは、LAP-TGF1と20E6Fabの20E6VL部分との間のさらなる相互作用を示している。構成及び相互作用は、グレースケールで示されている。

【図28C】図28Aは、LAPとヒト化20E6FabのVL及びVHとの間の相互作用を示している。図28Bは、TGF1とFabのヒト化20E6VL及びVH部分との間の相互作用を示している。図28C及び図28Dは、LAP-TGF1と20E6Fabの20E6VL部分との間のさらなる相互作用を示している。構成及び相互作用は、グレースケールで示されている。

10

【図28D】図28Aは、LAPとヒト化20E6FabのVL及びVHとの間の相互作用を示している。図28Bは、TGF1とFabのヒト化20E6VL及びVH部分との間の相互作用を示している。図28C及び図28Dは、LAP-TGF1と20E6Fabの20E6VL部分との間のさらなる相互作用を示している。構成及び相互作用は、グレースケールで示されている。

【図29A】図29Aは、LAPと28G11ヒト化FabのVL及びVHとの間の相互作用を示している。図29Bは、TGF1とFabのヒト化28G11VL及びVH部分との間の相互作用を示している。図29Cは、ヒト化28G11及びヒト化20E6におけるCDRの再配置を示している。図29Dは、ヒト化28G11内のQ56が、残基V342-K344にまたがるTGF1ループと相互作用する理想的な位置であることを示している。図29Eは、ヒト化28G11において、Tyr残基がGlyで置き換えられ、それによってV341の側鎖との相互作用が失われることを示している。構成及び相互作用は、グレースケールで示されている。

20

【図29B】図29Aは、LAPと28G11ヒト化FabのVL及びVHとの間の相互作用を示している。図29Bは、TGF1とFabのヒト化28G11VL及びVH部分との間の相互作用を示している。図29Cは、ヒト化28G11及びヒト化20E6におけるCDRの再配置を示している。図29Dは、ヒト化28G11内のQ56が、残基V342-K344にまたがるTGF1ループと相互作用する理想的な位置であることを示している。図29Eは、ヒト化28G11において、Tyr残基がGlyで置き換えられ、それによってV341の側鎖との相互作用が失われることを示している。構成及び相互作用は、グレースケールで示されている。

30

【図29C】図29Aは、LAPと28G11ヒト化FabのVL及びVHとの間の相互作用を示している。図29Bは、TGF1とFabのヒト化28G11VL及びVH部分との間の相互作用を示している。図29Cは、ヒト化28G11及びヒト化20E6におけるCDRの再配置を示している。図29Dは、ヒト化28G11内のQ56が、残基V342-K344にまたがるTGF1ループと相互作用する理想的な位置であることを示している。図29Eは、ヒト化28G11において、Tyr残基がGlyで置き換えられ、それによってV341の側鎖との相互作用が失われることを示している。構成及び相互作用は、グレースケールで示されている。

40

【図29D】図29Aは、LAPと28G11ヒト化FabのVL及びVHとの間の相互作用を示している。図29Bは、TGF1とFabのヒト化28G11VL及びVH部分との間の相互作用を示している。図29Cは、ヒト化28G11及びヒト化20E6におけるCDRの再配置を示している。図29Dは、ヒト化28G11内のQ56が、残基V342-K344にまたがるTGF1ループと相互作用する理想的な位置であることを示している。図29Eは、ヒト化28G11において、Tyr残基がGlyで置き換えられ、それによってV341の側鎖との相互作用が失われることを示している。構成及び相互作用は、グレースケールで示されている。

【図29E】図29Aは、LAPと28G11ヒト化FabのVL及びVHとの間の相互作用を示している。図29Bは、TGF1とFabのヒト化28G11VL及びVH部

50

分との間の相互作用を示している。図29Cは、ヒト化28G11及びヒト化20E6におけるCDRの再配置を示している。図29Dは、ヒト化28G11内のQ56が、残基V342-K344にまたがるTGF1ループと相互作用する理想的な位置であることを示している。図29Eは、ヒト化28G11において、Tyr残基がGlyで置き換えられ、それによってV341の側鎖との相互作用が失われることを示している。構成及び相互作用は、グレースケールで示されている。

【図30A】図30Aは、cryo-EM内で確認された2Mab:2TGF1複合体を示している(Mabは、22F9Fabを示している)。構成は以下のとおりである: LAP-TGF1二量体; 22F9-Fabs; 22F9-Fcs。図30Bは、2Dクラスの例を提供している。構成及び相互作用は、グレースケールで示されている。

10

【図30B】図30Aは、cryo-EM内で確認された2Mab:2TGF1複合体を示している(Mabは、22F9Fabを示している)。構成は以下のとおりである: LAP-TGF1二量体; 22F9-Fabs; 22F9-Fcs。図30Bは、2Dクラスの例を提供している。構成及び相互作用は、グレースケールで示されている。

【図31A】図31Aは、LAPと22F9FabのVL及びVH部分との間の相互作用を示している。図31Bは、TGFと22F9VL及びVHとの間の相互作用を示している。図31Cは、22F9-Fab+LAP-TGF1複合体及びヒト化20E6-Fab+LAP-TGF1(Fabs)のオーバーレイ、並びに、当該抗原に対するヒト化20E6-Fabs及び22F9-Fabsの異なる配向を示している。図31D及び図31Eは、LAP-TGF1と20E6Fabの部分との間のさらなる相互作用を示している。構成及び相互作用は、グレースケールで示されている。

20

【図31B】図31Aは、LAPと22F9FabのVL及びVH部分との間の相互作用を示している。図31Bは、TGFと22F9VL及びVHとの間の相互作用を示している。図31Cは、22F9-Fab+LAP-TGF1複合体及びヒト化20E6-Fab+LAP-TGF1(Fabs)のオーバーレイ、並びに、当該抗原に対するヒト化20E6-Fabs及び22F9-Fabsの異なる配向を示している。図31D及び図31Eは、LAP-TGF1と20E6Fabの部分との間のさらなる相互作用を示している。構成及び相互作用は、グレースケールで示されている。

【図31C】図31Aは、LAPと22F9FabのVL及びVH部分との間の相互作用を示している。図31Bは、TGFと22F9VL及びVHとの間の相互作用を示している。図31Cは、22F9-Fab+LAP-TGF1複合体及びヒト化20E6-Fab+LAP-TGF1(Fabs)のオーバーレイ、並びに、当該抗原に対するヒト化20E6-Fabs及び22F9-Fabsの異なる配向を示している。図31D及び図31Eは、LAP-TGF1と20E6Fabの部分との間のさらなる相互作用を示している。構成及び相互作用は、グレースケールで示されている。

30

【図31D】図31Aは、LAPと22F9FabのVL及びVH部分との間の相互作用を示している。図31Bは、TGFと22F9VL及びVHとの間の相互作用を示している。図31Cは、22F9-Fab+LAP-TGF1複合体及びヒト化20E6-Fab+LAP-TGF1(Fabs)のオーバーレイ、並びに、当該抗原に対するヒト化20E6-Fabs及び22F9-Fabsの異なる配向を示している。図31D及び図31Eは、LAP-TGF1と20E6Fabの部分との間のさらなる相互作用を示している。構成及び相互作用は、グレースケールで示されている。

40

【図31E】図31Aは、LAPと22F9FabのVL及びVH部分との間の相互作用を示している。図31Bは、TGFと22F9VL及びVHとの間の相互作用を示している。図31Cは、22F9-Fab+LAP-TGF1複合体及びヒト化20E6-Fab+LAP-TGF1(Fabs)のオーバーレイ、並びに、当該抗原に対するヒト化20E6-Fabs及び22F9-Fabsの異なる配向を示している。図31D及び図31Eは、LAP-TGF1と20E6Fabの部分との間のさらなる相互作用を示している。構成及び相互作用は、グレースケールで示されている。

【図32】図32は、ヒトLAP-TGF1タンパク質に結合しているヒト化20E6

50

抗体に対する重水素取り込み保護を示しているH/D差プロットである。

【図33】図33は、ヒトLAP-TGF β 1タンパク質に結合している抗体に対する重水素取り込み保護を示しているH/D差プロットである。

【図34】図34は、ヒトLAP-TGF β 1とマウスLAP-TGF β 1の間の配列アラインメントである。確認されたエピトープは、全て、ヒトとマウスのLAP-TGF β 1の間の相同な領域に存在している。図中のヒトLAP-TGF β 1配列は、配列番号：257に対応する。図中のマウスLAP-TGF β 1配列は、配列番号：7に対応する。

【図35A】図35A及び図35Bは、ヒトLAP-TGF β 1、GARP-LAP-TGF β 1、ヒト化20E6及び複合体に関するサイズ排除クロマトグラムである。各サンプルに関する溶出時間は、ゲル濾過標準と一致している。報告されている分子量は、光散乱検出器で求めた。 10

【図35B】図35A及び図35Bは、ヒトLAP-TGF β 1、GARP-LAP-TGF β 1、ヒト化20E6及び複合体に関するサイズ排除クロマトグラムである。各サンプルに関する溶出時間は、ゲル濾過標準と一致している。報告されている分子量は、光散乱検出器で求めた。

【図36A】図36A-図36Fは、同系のCT26結腸直腸癌腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、抗PD-1抗体と組み合わされた抗LAP抗体28G11及び16B4の効果を示している一連のグラフである。図中において示されているデータは、以下のとおりである：図36A（抗PD-1抗体単独）、図36B（28G11__IgG2a+抗PD-1抗体）、図36C（IgG2aイソタイプ対照）、図36D（抗PD-1抗体単独） 20、図36E（16B4__IgG2a単独）、及び、図36F（16B4__IgG2a+抗PD-1抗体）。抗PD-1抗体は、ラット抗PD-1（クローンRMP1-14）-IgG2a抗体であった。

【図36B】図36A-図36Fは、同系のCT26結腸直腸癌腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、抗PD-1抗体と組み合わされた抗LAP抗体28G11及び16B4の効果を示している一連のグラフである。図中において示されているデータは、以下のとおりである：図36A（抗PD-1抗体単独）、図36B（28G11__IgG2a+抗PD-1抗体）、図36C（IgG2aイソタイプ対照）、図36D（抗PD-1抗体単独） 30、図36E（16B4__IgG2a単独）、及び、図36F（16B4__IgG2a+抗PD-1抗体）。抗PD-1抗体は、ラット抗PD-1（クローンRMP1-14）-IgG2a抗体であった。

【図36C】図36A-図36Fは、同系のCT26結腸直腸癌腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、抗PD-1抗体と組み合わされた抗LAP抗体28G11及び16B4の効果を示している一連のグラフである。図中において示されているデータは、以下のとおりである：図36A（抗PD-1抗体単独）、図36B（28G11__IgG2a+抗PD-1抗体）、図36C（IgG2aイソタイプ対照）、図36D（抗PD-1抗体単独） 40、図36E（16B4__IgG2a単独）、及び、図36F（16B4__IgG2a+抗PD-1抗体）。抗PD-1抗体は、ラット抗PD-1（クローンRMP1-14）-IgG2a抗体であった。

【図36D】図36A-図36Fは、同系のCT26結腸直腸癌腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、抗PD-1抗体と組み合わされた抗LAP抗体28G11及び16B4の効果を示している一連のグラフである。図中において示されているデータは、以下のとおりである：図36A（抗PD-1抗体単独）、図36B（28G11__IgG2a+抗PD-1抗体）、図36C（IgG2aイソタイプ対照）、図36D（抗PD-1抗体単独） 40、図36E（16B4__IgG2a単独）、及び、図36F（16B4__IgG2a+抗PD-1抗体）。抗PD-1抗体は、ラット抗PD-1（クローンRMP1-14）-IgG2a抗体であった。

【図36E】図36A-図36Fは、同系のCT26結腸直腸癌腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、抗PD-1抗体と組み合わされた抗LAP抗体28G11及び16B4の効果を示している一連のグラフである。図中において示されているデータは、以下のとお 50

りである：図 3 6 A (抗 PD - 1 抗体単独)、図 3 6 B (2 8 G 1 1 __ I g G 2 a + 抗 PD - 1 抗体)、図 3 6 C (I g G 2 a イソタイプ対照)、図 3 6 D (抗 PD - 1 抗体単独)、図 3 6 E (1 6 B 4 __ I g G 2 a 単独)、及び、図 3 6 F (1 6 B 4 __ I g G 2 a + 抗 PD - 1 抗体)。抗 PD - 1 抗体は、ラット抗 PD - 1 (クローン R M P 1 - 1 4) - I g G 2 a 抗体であった。

【図 3 6 F】図 3 6 A - 図 3 6 F は、同系の C T 2 6 結腸直腸癌腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、抗 PD - 1 抗体と組み合わされた抗 L A P 抗体 2 8 G 1 1 及び 1 6 B 4 の効果を示している一連のグラフである。図中において示されているデータは、以下のとおりである：図 3 6 A (抗 PD - 1 抗体単独)、図 3 6 B (2 8 G 1 1 __ I g G 2 a + 抗 PD - 1 抗体)、図 3 6 C (I g G 2 a イソタイプ対照)、図 3 6 D (抗 PD - 1 抗体単独)、図 3 6 E (1 6 B 4 __ I g G 2 a 単独)、及び、図 3 6 F (1 6 B 4 __ I g G 2 a + 抗 PD - 1 抗体)。抗 PD - 1 抗体は、ラット抗 PD - 1 (クローン R M P 1 - 1 4) - I g G 2 a 抗体であった。

10

【図 3 7】図 3 7 は、同系の E M T 6 乳癌腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、抗 PD - 1 抗体と組み合わされた抗 L A P 抗体 2 8 G 1 1 の効果を示しているグラフである。抗 PD - 1 抗体は、ラット抗 PD - 1 (クローン R M P 1 - 1 4) - I g G 2 a 抗体であった。使用した統計的検定は、二元配置分散分析であった。

【図 3 8】図 3 8 は、同系の E M T 6 乳癌腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、抗 PD - 1 抗体と組み合わされた抗 L A P 抗体 2 2 F 9 の効果を示しているグラフである。抗 PD - 1 抗体は、ラット抗 PD - 1 (クローン R M P 1 - 1 4) - I g G 2 a 抗体であった。使用した統計的検定は、二元配置分散分析であった。

20

【図 3 9】図 3 9 は、同系の E M T 6 乳癌腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、抗 PD - 1 抗体と組み合わされた抗 L A P 抗体 2 0 E 6 の効果を示しているグラフである。抗 PD - 1 抗体は、ラット抗 PD - 1 (クローン R M P 1 - 1 4) - I g G 2 a 抗体であった。使用した統計的検定は、二元配置分散分析であった。

【図 4 0】図 4 0 は、4 T 1 乳癌腫瘍転移モデルにおける肺結節数に対する単独療法としての、抗 L A P 抗体 2 8 G 1 1 __ I g G 2 a 及び 1 6 B 4 __ I g G 2 a 並びに抗 T G F 抗体 1 D 1 1 __ I g G 1 の効果を示しているグラフである ($p < 0.05$ 、域外値を除去した後の対応のない T 検定)。

【図 4 1 A】図 4 1 A 及び図 4 1 B は、同系の C T 2 6 腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、1 2 G y (図 4 1 A) 放射線及び 2 0 G y (図 4 1 B) 放射線と組み合わされた抗 L A P 抗体 2 8 G 1 1 __ I g G 2 a の効果を示しているグラフである。使用した統計的検定は、二元配置分散分析であった。*** $P < .0001$ 、*** $P = .0004$ 。

30

【図 4 1 B】図 4 1 A 及び図 4 1 B は、同系の C T 2 6 腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、1 2 G y (図 4 1 A) 放射線及び 2 0 G y (図 4 1 B) 放射線と組み合わされた抗 L A P 抗体 2 8 G 1 1 __ I g G 2 a の効果を示しているグラフである。使用した統計的検定は、二元配置分散分析であった。*** $P < .0001$ 、*** $P = .0004$ 。

【図 4 2 A】図 4 2 A - 図 4 2 C は、1 2 G y 放射線若しくは 2 0 G y 放射線の存在下又は非存在下での、M - M D S C (図 4 2 A)、M 2 マクロファージ (図 4 2 B) 及び樹状細胞 (図 4 2 C) における C D 7 3 の発現に対する、抗 L A P 抗体 2 8 G 1 1 __ I g G 2 の効果を示しているグラフである。

40

【図 4 2 B】図 4 2 A - 図 4 2 C は、1 2 G y 放射線若しくは 2 0 G y 放射線の存在下又は非存在下での、M - M D S C (図 4 2 A)、M 2 マクロファージ (図 4 2 B) 及び樹状細胞 (図 4 2 C) における C D 7 3 の発現に対する、抗 L A P 抗体 2 8 G 1 1 __ I g G 2 の効果を示しているグラフである。

【図 4 2 C】図 4 2 A - 図 4 2 C は、1 2 G y 放射線若しくは 2 0 G y 放射線の存在下又は非存在下での、M - M D S C (図 4 2 A)、M 2 マクロファージ (図 4 2 B) 及び樹状細胞 (図 4 2 C) における C D 7 3 の発現に対する、抗 L A P 抗体 2 8 G 1 1 __ I g G 2 の効果を示しているグラフである。

【図 4 3 A】図 4 3 A - 図 4 3 H は、同系の E M T 6 マウス乳癌腫瘍モデルにおける腫瘍

50

体積に対する、抗LAP抗体28G11-mIgG2a及び20E6-mIgG2aの単独の効果並びに抗PD-1抗体と組み合わせられた抗LAP抗体28G11-mIgG2a及び20E6-mIgG2aの効果を示している一連のグラフである。図中において示されているデータは、以下のとおりである：図43Aは、28G11-mIgG2aの効力のグラフ要約であり、及び、図43Bは、20E6-mIgG2aの効力のグラフ要約である。さらにまた、以下のものに関する腫瘍体積データも示されている：対照抗体（図43C）、抗体20E6-mIgG2a（図43D）、抗体28G11-mIgG2a（図43E）、抗PD-1抗体（図43F）、抗体20E6-mIgG2aと抗PD-1抗体の組合せ（図43G）、及び、抗体28G11-mIgG2aと抗PD-1抗体（図43H）。

10

【図43B】図43A-図43Hは、同系のEMT6マウス乳癌腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、抗LAP抗体28G11-mIgG2a及び20E6-mIgG2aの単独の効果並びに抗PD-1抗体と組み合わせられた抗LAP抗体28G11-mIgG2a及び20E6-mIgG2aの効果を示している一連のグラフである。図中において示されているデータは、以下のとおりである：図43Aは、28G11-mIgG2aの効力のグラフ要約であり、及び、図43Bは、20E6-mIgG2aの効力のグラフ要約である。さらにまた、以下のものに関する腫瘍体積データも示されている：対照抗体（図43C）、抗体20E6-mIgG2a（図43D）、抗体28G11-mIgG2a（図43E）、抗PD-1抗体（図43F）、抗体20E6-mIgG2aと抗PD-1抗体の組合せ（図43G）、及び、抗体28G11-mIgG2aと抗PD-1抗体（図43H）。

20

【図43C】図43A-図43Hは、同系のEMT6マウス乳癌腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、抗LAP抗体28G11-mIgG2a及び20E6-mIgG2aの単独の効果並びに抗PD-1抗体と組み合わせられた抗LAP抗体28G11-mIgG2a及び20E6-mIgG2aの効果を示している一連のグラフである。図中において示されているデータは、以下のとおりである：図43Aは、28G11-mIgG2aの効力のグラフ要約であり、及び、図43Bは、20E6-mIgG2aの効力のグラフ要約である。さらにまた、以下のものに関する腫瘍体積データも示されている：対照抗体（図43C）、抗体20E6-mIgG2a（図43D）、抗体28G11-mIgG2a（図43E）、抗PD-1抗体（図43F）、抗体20E6-mIgG2aと抗PD-1抗体の組合せ（図43G）、及び、抗体28G11-mIgG2aと抗PD-1抗体（図43H）。

30

【図43D】図43A-図43Hは、同系のEMT6マウス乳癌腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、抗LAP抗体28G11-mIgG2a及び20E6-mIgG2aの単独の効果並びに抗PD-1抗体と組み合わせられた抗LAP抗体28G11-mIgG2a及び20E6-mIgG2aの効果を示している一連のグラフである。図中において示されているデータは、以下のとおりである：図43Aは、28G11-mIgG2aの効力のグラフ要約であり、及び、図43Bは、20E6-mIgG2aの効力のグラフ要約である。さらにまた、以下のものに関する腫瘍体積データも示されている：対照抗体（図43C）、抗体20E6-mIgG2a（図43D）、抗体28G11-mIgG2a（図43E）、抗PD-1抗体（図43F）、抗体20E6-mIgG2aと抗PD-1抗体の組合せ（図43G）、及び、抗体28G11-mIgG2aと抗PD-1抗体（図43H）。

40

【図43E】図43A-図43Hは、同系のEMT6マウス乳癌腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、抗LAP抗体28G11-mIgG2a及び20E6-mIgG2aの単独の効果並びに抗PD-1抗体と組み合わせられた抗LAP抗体28G11-mIgG2a及び20E6-mIgG2aの効果を示している一連のグラフである。図中において示されているデータは、以下のとおりである：図43Aは、28G11-mIgG2aの効力のグラフ要約であり、及び、図43Bは、20E6-mIgG2aの効力のグラフ要約である。さらにまた、以下のものに関する腫瘍体積データも示されている：対照抗体（図43C）、抗体20E6-mIgG2a（図43D）、抗体28G11-mIgG2a（図43E）、抗PD-1抗体（図43F）、抗体20E6-mIgG2aと抗PD-1抗体の組合せ（図43G）、及び、抗体28G11-mIgG2aと抗PD-1抗体（図43H）。

50

3 C)、抗体 20E6 - m I g G 2 a (図 4 3 D)、抗体 28G11 - m I g G 2 a (図 4 3 E)、抗 PD - 1 抗体 (図 4 3 F)、抗体 20E6 - m I g G 2 a と抗 PD - 1 抗体の組合せ (図 4 3 G)、及び、抗体 28G11 - m I g G 2 a と抗 PD - 1 抗体 (図 4 3 H)。

【図 4 3 F】図 4 3 A - 図 4 3 H は、同系の E M T 6 マウス乳癌腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、抗 LAP 抗体 28G11 - m I g G 2 a 及び 20E6 - m I g G 2 a の単独の効果並びに抗 PD - 1 抗体と組み合わせられた抗 LAP 抗体 28G11 - m I g G 2 a 及び 20E6 - m I g G 2 a の効果を示している一連のグラフである。図中において示されているデータは、以下のとおりである：図 4 3 A は、28G11 - m I g G 2 a の効力のグラフ要約であり、及び、図 4 3 B は、20E6 - m I g G 2 a の効力のグラフ要約である。さらにまた、以下のものに関する腫瘍体積データも示されている：対照抗体 (図 4 3 C)、抗体 20E6 - m I g G 2 a (図 4 3 D)、抗体 28G11 - m I g G 2 a (図 4 3 E)、抗 PD - 1 抗体 (図 4 3 F)、抗体 20E6 - m I g G 2 a と抗 PD - 1 抗体の組合せ (図 4 3 G)、及び、抗体 28G11 - m I g G 2 a と抗 PD - 1 抗体 (図 4 3 H)。

10

【図 4 3 G】図 4 3 A - 図 4 3 H は、同系の E M T 6 マウス乳癌腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、抗 LAP 抗体 28G11 - m I g G 2 a 及び 20E6 - m I g G 2 a の単独の効果並びに抗 PD - 1 抗体と組み合わせられた抗 LAP 抗体 28G11 - m I g G 2 a 及び 20E6 - m I g G 2 a の効果を示している一連のグラフである。図中において示されているデータは、以下のとおりである：図 4 3 A は、28G11 - m I g G 2 a の効力のグラフ要約であり、及び、図 4 3 B は、20E6 - m I g G 2 a の効力のグラフ要約である。さらにまた、以下のものに関する腫瘍体積データも示されている：対照抗体 (図 4 3 C)、抗体 20E6 - m I g G 2 a (図 4 3 D)、抗体 28G11 - m I g G 2 a (図 4 3 E)、抗 PD - 1 抗体 (図 4 3 F)、抗体 20E6 - m I g G 2 a と抗 PD - 1 抗体の組合せ (図 4 3 G)、及び、抗体 28G11 - m I g G 2 a と抗 PD - 1 抗体 (図 4 3 H)。

20

【図 4 3 H】図 4 3 A - 図 4 3 H は、同系の E M T 6 マウス乳癌腫瘍モデルにおける腫瘍体積に対する、抗 LAP 抗体 28G11 - m I g G 2 a 及び 20E6 - m I g G 2 a の単独の効果並びに抗 PD - 1 抗体と組み合わせられた抗 LAP 抗体 28G11 - m I g G 2 a 及び 20E6 - m I g G 2 a の効果を示している一連のグラフである。図中において示されているデータは、以下のとおりである：図 4 3 A は、28G11 - m I g G 2 a の効力のグラフ要約であり、及び、図 4 3 B は、20E6 - m I g G 2 a の効力のグラフ要約である。さらにまた、以下のものに関する腫瘍体積データも示されている：対照抗体 (図 4 3 C)、抗体 20E6 - m I g G 2 a (図 4 3 D)、抗体 28G11 - m I g G 2 a (図 4 3 E)、抗 PD - 1 抗体 (図 4 3 F)、抗体 20E6 - m I g G 2 a と抗 PD - 1 抗体の組合せ (図 4 3 G)、及び、抗体 28G11 - m I g G 2 a と抗 PD - 1 抗体 (図 4 3 H)。

30

【図 4 4 A】図 4 4 A - 図 4 4 D は、抗 LAP F (a b ') のヒト LAP - T G F イソ型 1、2 及び 3 への結合を示している一連の B i a c o r e グラフである。

【図 4 4 B】図 4 4 A - 図 4 4 D は、抗 LAP F (a b ') のヒト LAP - T G F イソ型 1、2 及び 3 への結合を示している一連の B i a c o r e グラフである。

40

【図 4 4 C】図 4 4 A - 図 4 4 D は、抗 LAP F (a b ') のヒト LAP - T G F イソ型 1、2 及び 3 への結合を示している一連の B i a c o r e グラフである。

【図 4 4 D】図 4 4 A - 図 4 4 D は、抗 LAP F (a b ') のヒト LAP - T G F イソ型 1、2 及び 3 への結合を示している一連の B i a c o r e グラフである。

【図 4 5 A】図 4 5 A - 図 4 5 D は、抗 LAP F (a b ') のヒト、カニクイザル、ラット及びマウスの LAP - T G F 1 への結合を示している一連の B i a c o r e グラフである。

【図 4 5 B】図 4 5 A - 図 4 5 D は、抗 LAP F (a b ') のヒト、カニクイザル、ラット及びマウスの LAP - T G F 1 への結合を示している一連の B i a c o r e グラフ

50

である。

【図 4 5 C】図 4 5 A - 図 4 5 D は、抗 L A P F (a b ') のヒト、カニクイザル、ラット及びマウスの L A P - T G F 1 への結合を示している一連の B i a c o r e グラフである。

【図 4 5 D】図 4 5 A - 図 4 5 D は、抗 L A P F (a b ') のヒト、カニクイザル、ラット及びマウスの L A P - T G F 1 への結合を示している一連の B i a c o r e グラフである。

【図 4 6】図 4 6 は、2 0 E 6 _ m I g G 2 a 抗体、イソタイプ対照抗体又は抗 V 6 (1 0 D 5) 抗体を使用した、L A P - T G F b 1 のインテグリン (a v b 6) 活性化の阻害を示しているグラフである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 6 】

定義

以下の詳細な説明が容易に理解されるように、特定の用語について最初に定義する。追加の定義は、全体をとおして提供されている。

【 0 0 5 7 】

分子の活性、レベル又は発現の関連における「異常」は、その活性、レベル又は発現が当該分子に関する正常な活性、レベル又は発現の範囲外にあることを意味する。活性、レベル又は発現の関連における「正常」は、性別及び年齢を調和させた健康な対象者の集団において見られるタンパク質の活性、レベル又は発現の範囲を示している。この健康な集団の最小サイズは、標準的な統計的方法を使用して決定することが可能であり、例えば、開業医は、一般的な集団における疾患の発生率及び結果に望まれる統計的确实性のレベルを考慮に入れることができる。好ましくは、バイオマーカーの活性、レベル又は発現の正常な範囲は、対象者の集団（例えば、少なくとも 5 人、10 人又は 20 人の対象者）から、さらに好ましくは、少なくとも 40 人又は 80 人の対象者の集団から、一層さらに好ましくは、100 人を超える対象者の集団から、決定される。

【 0 0 5 8 】

本明細書中で使用されている場合、「潜伏関連ペプチド」又は「L A P」は、ヒト T G F 1 前駆体ペプチドのアミノ末端ドメインを示しており、そして、配列番号 2 に記載されているアミノ酸配列を有する。「L A P - T G F 1」及び「L A P / T G F 1」は、本明細書中では、ヒト T G F 1 前駆体ペプチド（これは、T G F 1 サイトカインを包含する）を示すために交換可能的に使用され、そして、配列番号 1 のアミノ酸配列（シグナル配列が除去された U n i p r o t s p | P 0 1 1 3 7 | T G F B 1 _ H U M A N）を含む。

【 0 0 5 9 】

L A P は、さらにまた、ヒト T G F 2 前駆体ペプチド（L A P 領域：配列番号 4、L A P - T G F 2：配列番号 3）及びヒト T G F 3 前駆体ペプチド（L A P 領域：配列番号 6、L A P - T G F 2：配列番号 5）のアミノ末端ドメイン、並びに、他の種に由来するそれらの対応物（例えば、マウス T G F 1 前駆体ペプチド（マウス L A P 領域：配列番号 8；マウス L A P - T G F 1：配列番号 7）、マウス T G F 2 前駆体ペプチド（マウス L A P 領域：配列番号 10；マウス L A P - T G F 2：配列番号 9）及びマウス T G F 3 前駆体ペプチド（マウス L A P 領域：配列番号 12；マウス L A P - T G F 3：配列番号 11））、並びに、他の天然に存在するそれらの対立遺伝子、スプライス変異体及び処理された形態、を示すこともできる。L A P は、T G F との複合体として合成される。成熟 T G F が存在しない場合の L A P は、「e m p t y L A P」と称される。別途示されていない限り、本明細書中で使用されている「e m p t y L A P」は、ヒト T G F 1 の N 末端ドメインに由来する L A P を示している。L A P 上の残基に加えて、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体は、L A P - T G F 1 複合体内の成熟 T G F の残基に結合することができる。それにもかかわらず、全ての場合において、該抗体は、少なくとも当該複合体の L A P 部分の残基に結合する。

10

20

30

40

50

【0060】

本明細書中で使用されている場合、「遊離 TGF β 1」は、成熟 TGF β 1 サイトカイン、即ち、LAP と複合体を形成していない TGF β 1 を示している。

【0061】

本明細書中で使用されている場合、「アンカータンパク質」は、LAP - TGF β を細胞表面又は細胞外マトリックスに固定するタンパク質を示している。代表的なアンカータンパク質としては、GARP、LRRC33、LTBP1、LTBP3 及び LTBP4 などがある。GARP 及び LRRC33 は、LAP - TGF β を細胞の表面に固定するタンパク質であり、LTBP1、LTBP3 及び LTBP4 は、LAP - TGF β を細胞外マトリックスに固定するタンパク質である。

10

【0062】

本明細書中で使用されている用語「抗体」は、抗体全体及び任意の抗原結合フラグメント（即ち、「抗原結合部分」）又はそれらの一本鎖を包含する。「抗体」は、一実施形態において、ジスルフィド結合によって互いに連結された少なくとも2つの重（H）鎖及び2つの軽（L）鎖を含む糖タンパク質又はその抗原結合部分を示している。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書中では、V_H と略される）及び重鎖定常領域で構成されている。特定の天然に存在する抗体では、重鎖定常領域は、CH1、CH2 及び CH3 の3つのドメインで構成されている。特定の天然に存在する抗体では、各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書中では、V_L と略される）及び軽鎖定常領域で構成されている。軽鎖定常領域は、1つのドメイン CL で構成されている。V_H 領域及び V_L 領域は、相補性決定領域（CDR）と称される超可変性の領域にさらに細分化でき、フレームワーク領域（FR）と称されるより保存された領域が点在している。各 V_H 及び V_L は、3つの CDR と4つの FR で構成されており、それらは、アミノ末端からカルボキシ末端に向けて以下の順序で配置されている：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。該重鎖及び軽鎖の可変領域には、抗原と相互作用する結合ドメインが含まれている。抗体の定常領域は、免疫系のさまざまな細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的な補体系の第1の成分（C1q）を包含する宿主組織又は因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

20

【0063】

本明細書中で使用されている場合、「イソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス（例えば、IgG1 抗体、IgG2 抗体、IgG3 抗体、IgG4 抗体、IgM 抗体、IgA1 抗体、IgA2 抗体、IgD 抗体、及び、IgE 抗体）を示している。

30

【0064】

抗体は、典型的には、 $10^{-5} \sim 10^{-11}$ M 以下の解離定数（K_D）によって反映される高い親和性でそれらの同族抗原に特異的に結合する。約 10^{-4} M を超える K_D は、一般的に、非特異的結合を示すと見なされる。本明細書中で使用されている場合、抗原に「特異的に結合する」抗体は、その抗原及び実質的に同一の抗原に高い親和性で結合する（これは、 10^{-7} M 以下、好ましくは、 10^{-8} M 以下、一層さらに好ましくは、 5×10^{-9} M 以下、最も好ましくは、 10^{-8} M \sim 10^{-10} M 以下の K_D を有していることを意味する）が、無関係の抗原には高い親和性で結合しない抗体を示している。

40

【0065】

抗体の「抗原結合部分」という表現は、本明細書で使用されている場合、抗原（例えば、ヒト LAP 及び/又はマウス LAP）に特異的に結合する能力を保持している抗体の1以上のフラグメントを示している。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体のフラグメントによって実施され得ることが示されている。抗体の結合フラグメントの例としては、以下のものなどがある：(i) Fab フラグメント [V_L ドメイン、V_H ドメイン、CL ドメイン及び CH1 ドメインからなる一価フラグメント]；(ii) F(ab')₂ フラグメント [ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つの Fab フラグメントを含む二価フラグメント]；(iii) V_H ドメインと CH1 ドメインからなる Fd フラグメント；(iv) 抗体の単一群 (single arm) の V_L ドメインと V_H ドメインからな

50

るFvフラグメント；(v)V_HドメインからなるdAbフラグメント(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546)；及び、(vi)単離された相補性決定領域(CDR)又は(vii)場合により合成リンカーによって連結されていてもよい2つ以上の単離されたCDRの組み合わせ。さらに、Fvフラグメントの2つのドメインであるV_LとV_Hは別々の遺伝子によってコードされているが、それらは、組換え法を使用して、V_L領域とV_H領域が対になって一価分子を形成している単一のタンパク質鎖(一本鎖Fv(scfvとして知られる)；例えば、以下のものを参照されたい：「Bird et al., (1988) Science 242:423-426」及び「Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)としてそれらが作成されることを可能とする合成リンカーによって連結させることができる。そのような一本鎖抗体は、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されることも意図されている。これら抗体フラグメントは、当業者には知られている慣習的な技術を使用して得られ、そして、該フラグメントは、完全な抗体の場合と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。抗原結合部分は、組換えDNA技術によって製造することができるか、又は、完全な免疫グロブリンの酵素的若しくは化学的な切断によって生成させることができる。

10

【0066】

本発明の範囲内の抗体フラグメントは、さらにまた、例えばペプシンによる、IgGの酵素的切断によって生成され得るF(ab')₂フラグメントも含む。Fabフラグメントは、例えば、ジチオスレイトール又はメルカプトエチルアミンによるF(ab')₂の還元によって、生成させることができる。Fabフラグメントは、ジスルフィド架橋によってV_H-C_H1鎖に付加されたV_L-C_L鎖である。F(ab')₂フラグメントは、2つのFabフラグメントであり、その2つのFabフラグメントは、2つのジスルフィド架橋によって付加されている。F(ab')₂分子のFab部分には、その間にジスルフィド架橋が配置されているFc領域の一部が含まれている。

20

【0067】

用語「アクセプターヒトフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに由来する軽鎖可変ドメイン(V_L)フレームワーク又は重鎖可変ドメイン(V_H)フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークを示している。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに「由来する」アクセプターヒトフレームワークは、天然に存在するヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークと同じアミノ酸配列を有し得るか、あるいは、それは、野生型の天然に存在するヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークと比較してアミノ酸配列変化を有し得る。一部の実施形態では、アミノ酸変化の数は、10、9、8、7、6、5、4、3、又は、2、又は、1である。一部の実施形態では、V_Lアクセプターヒトフレームワークは、V_Lヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。「多重特異性抗体」は、2種類以上の異なる抗原又はエピトープを認識する抗体(例えば、二重特異性抗体、三重特異性抗体)である。

30

【0068】

本明細書中で使用されている用語「結合タンパク質」は、さらに、少なくとも1種類の標的抗原に特異的に結合する非天然(又は、組換え)タンパク質を示している。

40

【0069】

「二重特異性」又は「二価抗体」は、2つの異なる重鎖/軽鎖対及び2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合又はFab'フラグメントの連結を包含するさまざまな方法で製造することができる。例えば、「Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990)」、「Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992)」を参照されたい。二価抗体としては、例えば、ヘテロ二量体性抗体コンジュゲート(例えば、そ

50

れぞれが異なる特異性を有する一緒に連結された2つの抗体又は抗体フラグメント)、抗体/細胞表面結合分子コンジュゲート(例えば、受容体などの非抗体分子にコンジュゲートされた抗体)、及び、ハイブリッド抗体(例えば、2種類の異なる抗原に対する結合部位を有する抗体)などがある。

【0070】

用語「組換え抗体」は、組換え手段によって調製、発現、作成又は単離された抗体、例えば、(a)免疫グロブリン遺伝子(例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子)についてトランスジェニック若しくはトランスクロモソーマルである動物(例えば、マウス)又はそれから調製されたハイブリドーマから単離された抗体、(b)抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から(例えば、トランスフェクターマから)単離された抗体、(c)組換えコンビナトリアル抗体ライブラリー(例えば、ヒト抗体配列を含む)からファージディスプレイを用いて単離された抗体、及び、(d)他のDNA配列への免疫グロブリン遺伝子配列(例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子)のスプライシングを伴う任意の他の手段によって調製、発現、作製又は単離された抗体などを示している。そのような組換え抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域及び定常領域を有し得る。しかしながら、特定の実施形態において、そのような組換えヒト抗体は、インビトロ突然変異誘発に付されることができ、従って、組換え抗体のV_H及びV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列V_H及びV_L配列に由来し且つヒト生殖系列V_H及びV_L配列と関連があるが、インビボではヒト抗体生殖系列のレパートリー内に天然には存在しない場合がある配列である。

10

20

【0071】

「ヒト」抗体は、フレームワーク及びCDR領域の両方がヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を示している。さらに、抗体が定常領域を含む場合、その定常領域もヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する。さらに、野生型生殖系列免疫グロブリン配列と比較して生殖系列免疫グロブリン配列を変化させる正常な体細胞超変異を含むヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する抗体も包含される。

【0072】

「ヒト化」抗体は、非ヒト抗体のCDRドメインの外側のアミノ酸の一部、殆ど又は全てが、ヒト免疫グロブリンに由来する対応するアミノ酸で置き換えられている抗体を示している。抗体のヒト化形態の一実施形態では、CDRドメインの外側のアミノ酸の一部、殆ど又は全てはヒト免疫グロブリン由来のアミノ酸で置き換えられているが、1以上のCDR領域内の一部、殆ど又は全てのアミノ酸は変化していない。アミノ酸の追加、削除、挿入、置換又は修飾は、特定の抗原に結合する当該抗体の能力を妨げない限り、許容される。「ヒト化」抗体は、元来の抗体の抗原特異性と同様の抗原特異性を保持している。

30

【0073】

「キメラ抗体」は、可変領域が1以上の種に由来し及び定常領域が別の種に由来する抗体、例えば、可変領域がマウス抗体に由来し及び定常領域がヒト抗体に由来する抗体を示している。米国特許第4,816,567号及び「Morrisson et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855」を参照されたい。

40

【0074】

本明細書中で使用されている場合、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を示している、即ち、当該集団内の個々の抗体は、モノクローナル抗体の製造中に生じ得る可能な変異体を除いて、実質的に類似しており、そして、同じエピトープに結合する(例えば、抗体は、単一の結合特異性及び親和性を示す)。そのような変異体は、一般に少量で存在している。

【0075】

「モノクローナル」は、実質的に均質な抗体の集団から得られたものとしての抗体の特徴を示し、特定の方法による抗体の製造を必要としない。

【0076】

50

本明細書中で使用されている「モノクローナル抗体」という用語は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性及び親和性を示す抗体、又は、全ての抗体が特定のエピトープに対して単一の結合特異性及び親和性を示す抗体の組成物、を示している。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら [Kohler et al., (1975) Nature 256: 495] によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製し得るか、又は、組換えDNA法によって作製し得る（例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい）。「モノクローナル抗体」は、さらに、「Clackson et al., (1991) Nature 352: 624-628」及び「Marks et al., (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597」に記載されている技術を使用してファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

10

【0077】

そのような免疫グロブリンの抗原結合フラグメント（scFvを包含する）も、本明細書中で使用されている「モノクローナル抗体」という用語に包含される。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、単一の抗原部位に対して向けられている。さらに、抗原上の異なるエピトープに対して向けられた異なる抗体を典型的には含む従来の（ポリクローナル）抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、単一のエピトープに対して向けられている。モノクローナル抗体は、当技術分野で認められている任意の技術及び本明細書中に記載されている技術（例えば、ハイブリドーマ法、トランスジェニック動物、組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい））を用いて調製することができるか、又は、例えば、米国特許第7,388,088号及びPCT公開第WO00/31246号に記載されている技術を使用するファージ抗体ライブラリーを用いて調製することができる。モノクローナル抗体は、キメラ抗体、ヒト抗体及びヒト化抗体を包含し、そして、天然に存在し得るか又は組換え的に製造することができる。

20

【0078】

「ドメイン抗体」は、重鎖の可変領域又は軽鎖の可変領域のみを含む免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントである。場合によっては、2つ以上のV_H領域がペプチドリンカーと共有結合して、二価ドメイン抗体を作成する。二価ドメイン抗体の2つのV_H領域は、同じ抗原又は異なる抗原を標的とし得る。

【0079】

「二価抗体」は、2つの抗原結合部位を含む。場合によっては、その2つの結合部位は同じ抗原特異性を有している。しかしながら、二価抗体は二重特異性であることもできる（以下を参照）。

30

【0080】

本明細書中で使用されている場合、「一本鎖Fv」又は「scFv」抗体という用語は、抗体のV_Hドメイン及びV_Lドメインを含む抗体フラグメントを示し、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在する。一般に、Fvポリペプチドは、さらに、ポリペプチドリンカーを含む。sFvの概説については、「Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315」を参照されたい。

40

【0081】

本明細書中のモノクローナル抗体には、ラクダ化された単一ドメイン抗体も包含される。例えば、「Muyldermans et al. (2001) Trends Biochem. Sci. 26: 230」、「Reichmann et al. (1999) J. Immunol. Methods 231: 25」、WO94/04678、WO94/25591、米国特許第6,005,079号を参照されたい（これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。一実施形態において、本発明は、単一ドメイン抗体が形成されるように修飾された2つのV_Hドメインを含む単一ドメイ

50

ン抗体を提供する。

【0082】

本明細書中で使用されている場合、用語「ダイアボディ」は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントを示しており、ここで、これらのフラグメントは、同じポリペプチド鎖内に軽鎖可変ドメイン(V_L)に連結された重鎖可変ドメイン(V_H)を含む(V_H-V_L又はV_L-V_H)。同じ鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーを使用することにより、そのドメインは別の鎖の相補的ドメインと対形成を強要され、2つの抗原結合部位を作成する。ダイアボディは、例えば、EP 404,097、WO 93/11161及び「Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448」において、より十分に記載されている。工学的に操作された抗体変異体の概説については、一般に、「Holliger and Hudson (2005) Nat. Biotechnol. 23: 1126-1136」を参照された。

【0083】

本発明の抗体は、さらに、改変されたエフェクター機能を提供するために修飾された(又は、ブロックされた)Fc領域を有する抗体も包含する。例えば、米国特許第5,624,821、WO 2003/086310、WO 2005/120571、WO 2006/0057702、「Presta (2006) Adv. Drug Delivery Rev. 58: 640-656」を参照されたい。そのような修飾は、免疫系のさまざまな反応を増強又は抑制するために使用することが可能であり、診断及び治療において有益な効果をもたらす可能性がある。Fc領域の変更としては、置換、欠失及び挿入などのアミノ酸変化、グリコシル化又は脱グリコシル化並びに複数のFcの追加などがある。Fcの変更を用いて、治療用抗体における抗体の半減期を改変することができ、半減期が長くなると、投与頻度が減り、それにより、利便性が向上し、同時に材料の使用量が低減する。「Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116: 731 at 734-35」を参照されたい。

【0084】

用語「完全ヒト抗体」は、ヒト免疫グロブリンタンパク質配列のみを含む抗体を示している。完全ヒト抗体は、マウス、マウス細胞又はマウス細胞に由来するハイブリドーマにおいて産生された場合、マウスの炭水化物鎖を含むことができる。同様に、「マウス抗体」は、マウス免疫グロブリン配列のみを含む抗体を示している。

【0085】

本明細書中で使用されている場合、用語「超可変領域」(場合により、「可変領域」と称される)は、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を示している。該超可変領域は、「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメイン内の残基24-34(CDR_L1)、50-56(CDR_L2)及び89-97(CDR_L3)、並びに、重鎖可変ドメイン内の残基31-35(CDR_H1)、50-65(CDR_H2)及び95-102(CDR_H3); Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)及び/又は「超可変ループ」からの残基(即ち、軽鎖可変ドメイン内の残基26-32(L1)、50-52(L2)及び91-96(L3)並びに重鎖可変ドメイン内の26-32(H1)、53-55(H2)及び96-101(H3); Chothia and Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917)を含む。

【0086】

本明細書中で使用されている場合、「フレームワーク」又は「FR」残基という用語は、本明細書中でCDR残基として定義されている超可変領域残基以外の可変ドメイン残基を示している。上記の残基番号付けは、Kabat番号付けシステムに関連しており、添付

されている配列リストにおける配列番号付けに必ずしも詳細に対応しているわけではない。抗体中のアミノ酸残基は、Chothia、enhanced Chothia、IMGT、Kabata/Chothia composite、Honegger (AHO)、Contact又は別の慣習的な抗体番号付けスキームなどの、他の番号付けシステムを使用して定義することもできる。

【0087】

本明細書中で使用されている「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含んでいない抗体を示すことが意図されている。

【0088】

本明細書中で使用されている場合、「イソタイプ」は、抗体の重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス（例えば、IgG抗体（これは、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4を包含する）、IgM抗体、IgA抗体（これは、IgA1及びIgA2を包含する）、IgD抗体、及び、IgE抗体）を示している。 10

【0089】

「エフェクター機能」は、抗体Fc領域とFc受容体若しくはリガンドとの相互作用、又は、それから生じる生化学的イベントを示している。代表的な「エフェクター機能」としては、Clq結合、補体依存性細胞毒性(CDC)、Fc受容体結合、FcR媒介エフェクター機能（例えば、ADCC、及び、抗体依存性細胞媒介食作用(ADCP)）及び細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体；BCR）のダウンレギュレーションなどがある。そのようなエフェクター機能は、一般に、Fc領域が結合ドメイン（例えば、抗体可変ドメイン）と組み合わされることを必要とする。 20

【0090】

「Fc領域」、「Fcドメイン」又は「Fc」は、抗体の重鎖のC末端領域を意味する。従って、Fc領域は、第1の定常領域免疫グロブリンドメイン（例えば、CH1又はCL）を除く抗体の定常領域を含む。

【0091】

用語「エピトープ」又は「抗原決定基」は、免疫グロブリン又は抗体が特異的に結合する抗原（例えば、ヒトLAP-TGF1）の部位を示している。エピトープは、隣接アミノ酸（通常、線状エピトープ）又はタンパク質の三次折り畳みによって並置された非隣接アミノ酸（通常、立体配座エピトープ）の両方から形成させることができる。隣接アミノ酸から形成されたエピトープは、典型的には（必ずではないが）、変性溶媒への曝露時に保持されるが、三次折り畳みによって形成されたエピトープは、典型的には、変性溶媒で処理されたときに失われる。エピトープは、典型的には、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21又は22のアミノ酸を固有の空間的立体配座で含む。 30

【0092】

用語「エピトープマッピング」は、抗体-抗原認識に関与する抗原上の分子決定基を特定するプロセスを示している。所与の抗体がどのエピトープに結合するかを特定するための方法は当技術分野において既知であり、そして、そのような方法としては、例えば、以下のものがある：免疫プロットティングアッセイ及び免疫沈降アッセイ（ここで、該アッセイでは、重複又は隣接ペプチド（例えば、LAP-TGF1由来の重複又は隣接ペプチド）が所与の抗体（例えば、抗LAP抗体）との反応性について試験される）；X線結晶学；抗原変異解析、二次元核磁気共鳴；酵母ディスプレイ；及び、水素/重水素交換-質量分析(HDX-MS)（例えば、「Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)」を参照されたい）。「Champe et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:1388-1394」も参照されたい。 40

【0093】

2以上の抗体に関して「同一のエピトープに結合する」という用語は、当該抗体がアミノ 50

酸残基の単数又は複数の同一のセグメントに結合することを意味し、これは、所定の方法によって確認される。抗体が本明細書中に記載されている抗体と一緒に「LAP-TGF 1上の同一のエピトープ」に結合するかどうかを確認するための技術としては、例えば、エピトープの原子分解をもたらすエピトープマッピング法（例えば、抗原：抗体複合体の結晶のX線解析）及びHDX-MSなどがある。別の方法は、抗原フラグメント（例えば、タンパク質分解フラグメント）又は抗原の突然変異化変異体への抗体の結合をモニターし、ここで、抗原配列内のアミノ酸残基の修飾による結合の喪失は、多くの場合、エピトープ成分の指標と見なされる（例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発（Cunningham & Wells (1985) Science 244:1081）、突然変異体標的配列変異体の酵母ディスプレイ、又は、キメラの分析（例えば、実施例2及び実施例3に記載されている））。さらに、エピトープマッピングに関して計算的コンビナトリアル法も使用することができる。これらの方法は、コンビナトリアルファージディスプレイペプチドライブラリーから特異的な短いペプチドをアフィニティー単離する、対象の抗体が有する能力に依存している。同一のV_H及びV_Lを有する抗体、又は、同一のCDR1、CDR2及びCDR3配列を有する抗体は、同じエピトープに結合することが予期される。

10

【0094】

「標的への結合に関して別の抗体と競合する」抗体は、標的への当該別の抗体の結合を（部分的又は完全に）阻害する抗体を意味する。2つの抗体が標的への結合に関して互いに競合するかどうか（即ち、一方の抗体が標的への他方の抗体の結合を阻害するかどうか、及び、どの程度まで阻害するか）は、既知の結合競合実験（例えば、BIACORE（登録商標）表面プラズモン共鳴（SPR）分析）を用いて確認することができる。特定の実施形態において、抗体は、標的への別の抗体の結合と競合し、そして、その結合を少なくとも50%、60%、70%、80%、90%又は100%阻害する。阻害又は競合のレベルは、どの抗体が「ブロック抗体」（即ち、抗原と組み合わせられたときにその抗原との別の免疫反応をブロックする抗体）であるかに応じて異なり得る。競合アッセイは、例えば、「Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harb. Protoc. 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277」又は「Chapter 11 of "Using Antibodies" by Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999」に記載されているようにして、実施することができる。競合する抗体は、同一のエピトープ、重複するエピトープ又は隣接するエピトープ（例えば、立体障害によって明らかなように）に結合する。2つの抗体は、抗体が少なくとも50%まで両方の方法を相互にブロックする場合、即ち、当該競合実験において一方又は他方の抗体が最初に抗原と接触するかどうかに関係なく、「交差競合」する。

20

30

【0095】

2つの抗体が結合に関して競合するか又は交差競合するかを確認するための競合的結合アッセイとしては、例えばフローサイトメトリーによる、LAP-TGF 1を発現する細胞への結合に関する競合などがある。他の方法としては、以下のものなどがある：表面プラズモン共鳴（SPR）（例えば、BIACORE（登録商標））、固相直接又は間接放射免疫アッセイ（RIA）、固相直接又は間接酵素免疫アッセイ（EIA）、サンドイッチ競合アッセイ（「Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242 (1983)」を参照されたい）；固相直接ビオチン-アビジンEIA（「Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614 (1986)」を参照されたい）；固相直接標識化アッセイ、固相直接標識化サンドイッチアッセイ（「Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)」を参照されたい）；1-125ラベルを使用する固相直接ラベルRIA（「Morel et al., Mol. Immunol. 25(1):7

40

50

(1988)」を参照されたい) ; 固相直接ビオチン - アビジン E I A (C h e u n g e t a l . , V i r o l o g y 176 : 546 (1990)) ; 及び、直接ラベル化 R I A (M o l d e n h a u e r e t a l . , S c a n d . J . I m m u n o l . 32 : 77 (1990))。

【0096】

本明細書中で使用されている場合、「特異的結合」、「選択的結合」、「選択的に結合する」及び「特異的に結合する」という用語は、所定の抗原上のエピトープに結合している抗体を示している。典型的には、抗体は、(i) 例えば、分析物として所定の抗原を使用し且つリガンドとして抗体を使用する表面プラズモン共鳴 (S P R) 又は抗原陽性細胞への抗体の結合のスキヤッチャード解析によって確認した場合、約 10^{-7} M 未満の (例えば、約 10^{-8} M 未満の、約 10^{-9} M の未満の、又は、約 10^{-10} M 未満の、又は、それより低い) 平衡解離定数 (K_D) で、結合し、及び、(ii) 所定の抗原又は密接に関連する抗原以外の非特異的な抗原 (例えば、B S A、カゼイン) との結合に関する親和性よりも少なくとも 2 倍高い親和性で、所定の抗原に結合する。約 10^{-4} M を超える K_D は、一般に、非特異的結合を示すものと見なされる。

10

【0097】

本明細書中で使用されている用語「 k_{assoc} 」又は「 k_a 」は、特定の抗体 - 抗原相互作用の会合速度を示しており、本明細書中で使用されている用語「 k_{dis} 」又は「 k_d 」は、特定の抗体 - 抗原相互作用の解離速度を示すことが意図されている。本明細書中で使用されている用語「 K_D 」は、解離定数を示すことが意図されており、これは、 k_d 対 k_a の比 (即ち、 k_d / k_a) から得られ、そして、モル濃度 (M) として表される。抗体に関する K_D 値は、当技術分野で十分に確立されている方法を使用して確認することができる。抗体の K_D を確認するための好ましい方法は、表面プラズモン共鳴を使用することであり、好ましくは、B i a c o r e (登録商標) システム若しくはフローサイトメトリーなどのバイオセンサーシステム及びスキヤッチャード分析又はバイオレイヤー干渉法を使用することである。

20

【0098】

抗体を使用するインビトロアッセイ又はインビボアッセイに関連する用語「E C 5 0」は、最大応答の 5 0 % の応答、即ち、最大応答とベースラインの間の中間の応答を誘導する抗体の濃度を示している。

30

【0099】

本明細書中で使用されている用語「交差反応する」は、異なる種に由来する L A P - T G F 1 に結合する、本明細書中に記載されている抗体の能力を示している。例えば、ヒト L A P - T G F 1 に結合する本明細書中に記載されている抗体は、別の種の L A P - T G F 1 (例えば、マウス L A P - T G F 1、ラット L A P - T G F 1、又は、カニクイザル L A P - T G F 1) にも結合し得る。交差反応性は、結合アッセイ (例えば、S P R、E F I S A、バイオレイヤー干渉法) において精製された抗原との特異的反応性を検出することによって測定することができるか、又は、L A P - T G F 1 を生理的に発現する細胞 (例えば、L A P - T G F 1 を過剰発現している H T 1 0 8 0 細胞) に結合するか若しくは該細胞と機能的に相互作用するのを検出することによって測定することができる。)。交差反応性を確認する方法としては、例えば、バイオレイヤー干渉法又はフローサイトメトリー技術による、本明細書中に記載されているような標準的な結合アッセイをなどがある。

40

【0100】

本明細書中で使用されている場合、用語「連結された」は、2 つ以上の分子の会合を示している。結合は、共有結合又は非共有結合であることができる。結合は、さらに、遺伝的 (即ち、組換え的に融合された) であることもできる。そのような結合は、化学的コンジュゲーション及び組換えタンパク質産生などの当技術分野で認められているさまざまな技術を使用して実現することができる。

【0101】

50

本明細書中で使用されている用語「核酸分子」は、DNA分子及びRNA分子を包含することが意図されている。核酸分子は、一本鎖又は二本鎖であり得るが、好ましくは、二本鎖DNAである。

【0102】

抗体又は抗体フラグメント（例えば、V_H、V_L、CDR3）をコードする核酸に関して本明細書中で使用されている「単離された核酸分子」という用語は、そのヌクレオチド配列が他のゲノムヌクレオチド配列（例えば、LAP以外の抗原に結合する抗体をコードするゲノムヌクレオチド配列）を本質的に含んでいない核酸分子を示すことが意図されており、ここで、該他の配列は、ヒトゲノムDNA内の核酸に自然に隣接して配置されている可能性がある。

10

【0103】

本明細書中で使用されている用語「ベクター」は、それが連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を示すことが意図されている。ベクターの1つのタイプは「プラスミド」であり、これは、その中に付加的なDNAセグメントがライゲートされ得る環状二本鎖DNAループを意味する。別のタイプのベクターは、ウイルスベクターであり、ここでは、付加的なDNAセグメントはウイルスゲノム内にライゲートされ得る。特定のベクターは、それらが導入された宿主細胞において自律複製することができる（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞内に導入された際、その宿主細胞のゲノム内に組み込まれることができ、それによって、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、特定のベクターは、それらが作動可能に連結されている遺伝子の発現を誘導することができる。そのようなベクターは、本明細書中では、「組換え発現ベクター」（又は、単に、「発現ベクター」と称される。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形態にある。本明細書中では、プラスミドが最も一般的に使用されるベクターの形態であるので、「プラスミド」及び「ベクター」は交換可能に使用され得る。しかしながら、ウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス）などの他の形態の発現ベクターも包含され、これらは、同等の機能を果たす。

20

【0104】

さらにまた、本明細書中に記載されている配列の「保存的配列修飾」（即ち、ヌクレオチド配列によってコードされる抗体又はアミノ酸配列を含む抗体の抗原への結合を妨げないアミノ酸配列修飾）も提供される。そのような保存的配列修飾には、保存的ヌクレオチド及びアミノ酸置換、並びに、ヌクレオチド及びアミノ酸の付加及び欠失が包含される。例えば、修飾は、部位特異的突然変異誘発及びPCR介在突然変異誘発などの当技術分野で知られている標準的な技術によって、本明細書中の表（例えば、表34）の中の配列に導入することができる。保存的アミノ酸置換には、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられているものが包含される。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）などがある。従って、抗LAP抗体において予測される非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置き換えられる。抗原結合を排除しない、ヌクレオチド及びアミノ酸の保存的置換を確認する方法は、当技術分野でよく知られている（例えば、「Brummell et al., Biochem. 32:1180-1187 (1993)」、「Kobayashi et al. Protein Eng

30

40

50

12(10):879-884(1999)」及び「Burks et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:412-417(1997)」を参照されたい)。あるいは、別の実施形態において、突然変異は、飽和突然変異誘発などによって、抗LAP抗体コード配列の全体又は一部に沿ってランダムに導入することが可能であり、得られた修飾された抗LAP抗体は結合活性についてスクリーニングすることができる。

【0105】

核酸に関して、用語「実質的な相同性」は、2つの核酸又はその指定された配列が、最適に整列及び比較された場合に、適切なヌクレオチドの挿入又は欠失を伴って、ヌクレオチドの少なくとも約80%、通常は、ヌクレオチドの少なくとも約80%~85%、85%~90%又は90%~95%、さらに好ましくは、ヌクレオチドの少なくとも約98%~99.5%において同一であることを示している。あるいは、セグメントが選択的ハイブリダイゼーション条件下で当該鎖の補体にハイブリダイズする場合、実質的な相同性が存在する。

10

【0106】

ポリペプチドの場合、用語「実質的な相同性」は、2つのポリペプチド又はその指定された配列が、最適に整列及び比較された場合に、適切なアミノ酸の挿入又は欠失を伴って、アミノ酸の少なくとも約80%、通常は、アミノ酸の少なくとも約80%~85%、85%~90%、90%~95%、さらに好ましくは、アミノ酸の少なくとも約98%~99.5%において同一であることを示している。

20

【0107】

2つの配列の間のパーセント同一性は、2つの配列の最適なアライメントにおいて導入される必要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮に入れて、配列によって共有される同一の位置の数の関数である(即ち、%相同性=同一の位置の数/位置の総数×100)。配列の比較及び2つの配列の間のパーセント同一性の確認は、以下の非限定的な実施例において説明されているように、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。

【0108】

2つのヌクレオチド配列の間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ(<http://www.gcg.com>で入手可能)のGAPプログラムを使用し、NWS gapdna.CMPマトリックス、並びに、40、50、60、70又は80のギャップ加重(gap weight)及び1、2、3、4、5又は6の長さ加重(length weight)を用いて、確認することができる。2つのヌクレオチド配列又は2つのアミノ酸配列の間のパーセント同一性も、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれている「E. Meyers and W. Miller (CABIOS, 4:11-17(1989))」のアルゴリズムを使用し、PAM120加重残基表(weight residue table)、12のギャップ長ペナルティ及び4のギャップペナルティを用いて、確認することができる。さらに、2つのアミノ酸配列の間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ(<http://www.gcg.com>で入手可能)のGAPプログラムに組み込まれている「Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453(1970))」のアルゴリズムを使用し、Blossum62マトリックス又はPAM250マトリックス、並びに、16、14、12、10、8、6又は4のギャップ加重及び1、2、3、4、5又は6の長さ加重を用いて、確認することができる。

30

40

【0109】

本明細書中に記載されている核酸及びタンパク質の配列を「クエリー配列」として使用して、例えば関連する配列を特定するために、公開データベースに対する検索を実施することができる。そのような検索は、「Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10」のNBLAST及びXBLASTプログラム(バージョン2.0)を用いて実行することができる。NBLASTプログラ

50

ム、スコア = 100、ワード長 = 12 を用いて BLAST ヌクレオチド検索を実施して、本明細書中に記載されている核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得ることができる。XBLAST プログラム、スコア = 50、ワード長 = 3 を用いて BLAST タンパク質検索を実施して、本明細書中に記載されているタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較を目的とするギャップのあるアライメントを得るために、Gapped BLAST を「Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402」に記載されているようにして利用することができる。BLAST 及び Gapped BLAST プログラムを用いる場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLAST 及び NBLAST）のデフォルトパラメータを使用することができる。「www.ncbi.nlm.nih.gov.」を参照されたい。

【0110】

本明細書中に記載されている用語「組換え宿主細胞」（または、単に、「宿主細胞」）は、細胞中に天然には存在しない核酸を含む細胞を示すことが意図されており、そして、組換え発現ベクターが導入された細胞であり得る。そのような用語は、特定の対象細胞のみではなく、そのような細胞の子孫についても言及していることが意図されていることは理解されるべきである。突然変異又は環境的な影響のいずれかによって、後代に特定の改変が生じ得るため、そのような子孫は、実際には、親細胞と同一ではない可能性があるが、本明細書中において使用されている用語「宿主細胞」の範囲内に包含される。

【0111】

本明細書中で使用されている用語「阻害」は、活性の部分的及び完全なブロッキングを包含する、生物学的活性における統計的に有意な低減を示している。例えば、「阻害」は、生物学的活性における約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% の統計的に有意な低減を示すことができる。

【0112】

本明細書中で使用されている場合、「TGF- β 1 活性化」は、LAP と TGF- β 1 から構成されている潜在的複合体からの成熟サイトカイン TGF- β 1 の放出を意味する。TGF- β 1 の活性化を誘導することが知られている多くの機序が存在する（「Robertson IB, Rifkin DB. Unchaining the beast; insights from structural and evolutionary studies on TGF- β 1 secretion, sequestration, and activation. Cytokine Growth Factor Rev. 2013 Aug; 24(4):355-72」を参照されたい）。成熟サイトカインは、特定の ELISA 若しくは同様の検出方法を使用して、又は、TGF 受容体を発現するレポーター細胞システムを使用して検出することができる。

【0113】

例えば、本明細書中で使用されている場合、用語「TGF- β 1 活性化を阻害する」は、TGF- β 1 活性化における測定可能な任意の低減、例えば、対照（例えば、対照抗体）に対して、少なくとも約 10%、例えば、少なくとも約 20%、少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 99% 又は約 100% の TGF- β 1 活性化の阻害を包含する。該阻害は、TGF- β 1 活性化の単一の機序に対して特異的であり得るか、又は、TGF- β 1 活性化の全ての機序に対して一般化可能であり得る。本明細書中で使用されている場合、用語「TGF- β 1 活性化を阻害する」は、少なくとも 1 の活性化機序の阻害を包含する。

【0114】

本明細書中で使用されている「治療する (treat)」、「治療する (treating)」及び「治療 (treatment)」という用語は、本明細書中に記載されている治療的手段又は予防的手段を示している。「治療」の方法では、疾患若しくは障害又は再

発性の疾患若しくは障害の重症度を予防、治療、遅延、低減させるために、又は、疾患若しくは障害又は再発性の疾患若しくは障害の1以上の症状を改善させるために、又は、治療されなかった場合に予期される期間を超えて対象者の生存期間を延長させるために、腫瘍若しくは癌を有する対象者、又は、そのような疾患若しくは障害に罹患する素因がある対象者に、本明細書中に記載されている抗LAP抗体（例えば、抗ヒトLAP抗体）を投与することを使用する。

【0115】

「免疫療法」は、免疫応答を誘導すること、増強すること、抑制すること又は他の方法で改変することを含む方法による、疾患に罹患している対象者又は疾患に罹患するリスク若しくは疾患を再発するリスクがある対象者の治療を意味する。

10

【0116】

「免疫刺激療法 (immunostimulating therapy)」又は「免疫刺激療法 (immunostimulatory therapy)」は、例えば癌を治療するために、対象者において免疫応答の増大（誘導又は増強）をもたらす療法を示している。

【0117】

本明細書中で使用されている場合、「免疫細胞」は、白血球細胞（これは、リンパ球、単球、マクロファージ及び顆粒球などの単核細胞を包含する）として知られる血液細胞のサブセットを示している。

【0118】

本明細書中で使用されている場合、「免疫抑制細胞」は、免疫抑制腫瘍微小環境に寄与するか又はそれを促進する細胞を示している。腫瘍微小環境における免疫抑制細胞の集団の存在は、免疫応答に対する腫瘍の抵抗性を増大させ、それによって、腫瘍保護、腫瘍逸脱及び/又は腫瘍転移をもたらす。何らかの方法で対抗されない限り、これらの免疫抑制細胞は、免疫介在性抗癌治療の有効性を低減させる可能性がある。代表的な免疫抑制細胞としては、癌関連線維芽細胞、骨髄由来サプレッサー細胞、制御性T細胞 (Treg)、LAPを発現する腫瘍細胞及び免疫抑制マクロファージなどがある。これらの細胞型は、例えば、フローサイトメトリーを使用して、Treg（例えば、CD4、FoxP3、CD127、及び、CD25）、マクロファージ（例えば、CSF-IR、CD203、CD206、CD163、IL-10、及び、TGF β ）、癌関連線維芽細胞（例えば、平滑筋アクチン、線維芽細胞活性化タンパク質、テネイシン-C、ペリオスチン、NG2、ビメンチン、デスミン、PDGFR 及び、FSP-1、ASPN、及び、STC1）及び骨髄由来サプレッサー細胞（例えば、CD11b、CD33、CD14、又は、CD15、及び、低レベルのHLADR）のマーカーを識別することによって、当業者が確認することができる。免疫抑制細胞は、さらに、別の疾患状態において免疫系を抑制するのにも重要であり得ることは理解される。

20

30

【0119】

本明細書中で使用されている場合、「抑制性T細胞」は、免疫抑制性微小環境に寄与するか又はそれを促進するT細胞を示している。代表的な抑制性T細胞としては、CD4+制御性T細胞及びCD8+制御性T細胞などがある。そのような細胞は、例えば、フローサイトメトリーを使用して、FoxP3、LAP又はHeliosなどのマーカーを識別することによって、当業者が確認することができる。

40

【0120】

本明細書中で使用されている場合、「制御性T細胞」又は「Treg」は、エフェクターT細胞の誘導及び増殖を概して抑制又はダウンレギュレートする免疫抑制細胞を示している。Tregは、一般に、バイオマーカーCD4、FOX P3及びCD25を発現し、そして、ナイーブCD4細胞と同じ系統に由来すると考えられている。

【0121】

「Tエフェクター」（「Teff」）細胞は、細胞溶解活性を有するT細胞（例えば、CD4+T細胞及びCD8+T細胞）及びTヘルパー（Th）細胞を示しており、ここで、

50

、Tヘルパー（Th）細胞は、炎症性サイトカインを分泌し、他の免疫細胞を活性化及び誘導するが、制御性T細胞（Treg細胞）は包含しない。

【0122】

本明細書中で使用されている場合、「投与する」は、当業者には既知のさまざまな方法及び送達システムのいずれかを使用して、分子（例えば、LAPに結合する抗体又は抗原結合フラグメント）、又は、治療薬（例えば、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメント）を含む組成物を、対対象者に物理的に導入することを意味する。本明細書中に記載されている抗体の好ましい投与経路としては、例えば注射又は注入による、静脈内投与経路、腹腔内投与経路、筋肉内投与経路、皮下投与経路、脊髄投与経路又は他の非経口投与経路などがある。本明細書中で使用されている「非経口投与」という表現は、通常は注射による、経腸投与及び局所投与以外の投与方法を意味し、そして、限定するものではないが、静脈内、腹腔内、筋肉内、動脈内、髄腔内、リンパ管内、病変内、被膜内、眼窩内、心臓内、皮内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外及び胸骨内の注射及び注入、並びに、インビボ電気穿孔などがある。あるいは、本明細書中に記載されている抗体は、局所投与経路、表皮投与経路又は粘膜投与経路などの非非経口経路を介して、例えば、鼻腔内、経口、経膈、経直腸、舌下又は局所に投与することができる。投与は、さらにまた、例えば、1回、複数回、及び/又は、1以上の長期間にわたって、実施することができる。

10

【0123】

本明細書中で使用されている場合、「癌」は、体内の異常な細胞の制御されない増殖を特徴とする広範囲の群の疾患を示している。調節されていない細胞分裂は、隣接する組織に侵入し、リンパ系又は血流を介して体の離れた部分に転移し得る悪性の腫瘍又は細胞の形成をもたらし得る。

20

【0124】

本明細書中で使用されている場合、「自己免疫疾患」は、対象者の身体が対象者自身の身体成分に対して、悪影響を伴う機能不全性免疫応答を生じる、疾患状態又は症候群を示している。

【0125】

本明細書中で使用されている場合、「線維症」は、細胞外マトリックスの異常な沈着によって引き起こされるか又は細胞外マトリックスの異常な沈着を伴う（即ち、正常な器官及び組織における線維組織の形成ではない）障害又は疾患状態を示している。線維症は、影響を受けた組織における細胞外マトリックスの過剰な蓄積を特徴とし、それは、多くの場合、その正常な構造の破壊をもたらし、重大な臓器機能不全を引き起こす。さまざまな臓器の線維化状態にはさまざまな病因があるが、線維症は、典型的には、慢性感染症、虚血、アレルギー反応及び自己免疫反応、化学的傷害又は放射線障害などのさまざまな刺激によって誘発される慢性持続性炎症に起因する（B i e r n a c k a , 2 0 1 1 G r o w t h F a c t o r s . 2 0 1 1 O c t ; 2 9 (5) : 1 9 6 - 2 0 2 . d o i : 1 0 . 3 1 0 9 / 0 8 9 7 7 1 9 4 . 2 0 1 1 . 5 9 5 7 1 4 . E p u b 2 0 1 1 J u l 1 1)。線維症は、心臓、肝臓、腎臓、肺及び皮膚に影響を及ぼす可能性があり、さらに、多くの癌における主要な特徴でもある。

30

40

【0126】

本明細書中で使用されている場合、「細胞療法」は、生細胞（例えば、CAR T細胞、及び、NK細胞）の投与を含む治療方法を示している。

【0127】

本明細書中で使用されている「治療する（treat）」、「治療する（treating）」及び「治療（treatment）」という用語は、疾患に関連する症状、合併症、状態又は生化学的徴候の進行、発生、重症度又は再発を、元に戻すこと、軽減させること、改善すること、阻害すること又は遅延させること若しくは予防することを目的として、対象者に対して行う任意の種類 of 介入若しくは方法、又は、対象に活性薬剤（例えば、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメント）を投与すること、を意味する。治療は、疾患を

50

患っている対象者又は疾患を患っていない対象者（例えば、予防のため）に対するものであり得る。

【0128】

本明細書中で使用されている場合、「補助的な (adjunctive)」又は「組み合わせられた」投与（共投与 (co-administration)）は、同一の若しくは異なる投与形態での薬剤及び/若しくは化合物の同時投与、又は、化合物の別々の投与（例えば、順次的な投与）を包含する。例えば、少なくとも1の薬剤は、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントを含む。従って、第1の抗体又は抗原結合フラグメント（例えば、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメント）及び第2、第3又はそれ以上の抗体又は抗原結合フラグメントを、単一の製剤に含ませて同時に投与することができる。あるいは、第1及び第2（又は、それ以上）の抗体又は抗原結合フラグメントは、別々の投与のために製剤することができ、そして、同時に又は順次に投与される。

10

【0129】

「組合せ」療法は、本明細書中で使用されている場合、2種類以上の治療薬を協調的な方法で投与することを意味し、そして、限定するものではないが、同時投与を包含する。具体的には、組合せ療法は、共投与（例えば、共製剤の投与、又は、別個の治療組成物の同時投与）と連続的又は順次的な投与の両方を包含するが、但し、1治療薬の投与は別の治療薬の投与に何らかの方法で左右される。例えば、1治療薬は、異なる治療薬が投与された後にのみ投与することができ、そして、所定の期間作用することができる（例えば、「Kohrt et al. (2011) Blood 117:2423」を参照されたい）。例えば、抗LAP抗体を最初に投与し、その後（例えば、直後に）、二次抗体（例えば、抗PD-1抗体）又は抗原結合フラグメントを投与することができ、又は、その逆も可能である。一実施形態において、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、二番目の抗体又は抗原結合フラグメントの投与の前に投与される。別の実施形態において、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、二次抗体又は抗原結合フラグメントの数分後（例えば、約30分以内）又は少なくとも1時間後に投与される。そのような同時又は順次的な投与は、好ましくは、両方の抗体又は抗原結合フラグメントが治療された患者の体内に同時に存在することをもたらす。

20

【0130】

用語「有効用量 (effective dose)」又は「有効投与量 (effective dosage)」は、所望の効果を達成するのに又は少なくとも部分的に達成するのに十分な量として定義される。薬物（例えば、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメント）の「治療有効量 (therapeutically effective amount)」又は「治療有効投与量 (therapeutically effective dosage)」は、単独で又は別の治療薬と組み合わせて使用された場合に、疾患症状の重症度の低減、疾患症状がない期間の頻度及び持続期間の増大若しくは治療薬、又は、疾患の苦痛による機能障害若しくは身体障害の予防によって明白に示されるされる、疾患の退行を促進する薬物又は治療薬の任意の量である。薬物又は治療薬の治療有効量又は治療有効投与量は、「予防有効量」又は「予防有効投与量」を包含し、これは、疾患を発症するリスク又は疾患を再発するリスクのある対象者に単独で又は別の治療薬と組み合わせて投与された場合に、疾患の発症又は再発を阻止する薬物又は治療薬の任意の量である。疾患の退行を促進するか又は疾患の発症若しくは再発を阻止する治療薬の能力は、例えば、臨床試験中のヒト対象者において、ヒトにおける有効性を予測する動物モデル系において、又は、インビトロアッセイにおいて薬剤の活性をアッセイすることによって、当業者には知られているさまざまな方法を使用して評価することができる。

30

40

【0131】

本明細書中で提供されている方法のいずれかに従って、有効量の抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントを単独で投与するか、又は、有効量の抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントを別の化合物若しくは薬剤（例えば、抗PD-1抗体などの免疫チェックポイント遮断薬）と組み合わせて投与することで、少なくとも1の治療効果（これは、例えば、腫瘍

50

の増殖又はサイズの低減、経時的に現れる癌の徴候（例えば、転移性病変）の数の低減、完全寛解、部分寛解又は安定（stable disease）などを包含する）をもたらすことができる。例えば、当該治療方法は、その抗LAP抗体若しくは抗原結合フラグメントを投与しない場合に達成される臨床的有用率よりも優れた、又は、当該組み合わせた抗体のうちのいずれか1つを投与して達成される臨床的有用率よりも優れた、同等の臨床的有用率（CBR = 完全寛解（CR）+ 部分寛解（PR）+ 6ヶ月以上続く安定（SD））をもたらす。例えば、臨床的有用率の改善は、約20%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%又はそれ以上である。

【0132】

一例として、腫瘍の治療に関して、治療有効量又は治療有効投与量の該薬物又は治療薬（例えば、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメント）は、腫瘍細胞増殖を、治療されていないの対象者と比較して、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%又は少なくとも約90%、阻害する。一部の実施形態では、治療有効量又は治療有効投与量の該薬物又は治療薬は、細胞増殖又は腫瘍増殖を完全に阻害する、即ち、細胞増殖又は腫瘍増殖を100%阻害する。腫瘍増殖を阻害する化合物又は治療薬（これは、抗体を包含する）の能力は、本明細書中に記載されているアッセイを使用して評価することができる。あるいは、該化合物又は治療薬を含む組成物のこの特性は、細胞増殖を阻害する組成物の能力を調べることによって評価することができる；そのような阻害は、当業者には知られているアッセイによってインビトロで測定することができる。

10

20

【0133】

用語「患者」は、予防的処置又は治療的処置のいずれかを受けるヒト対象者及び別の哺乳動物対象者を包含する。

【0134】

本明細書中で使用されている場合、用語「対象者（subject）」は、任意のヒト又は非ヒト動物を包含する。例えば、本明細書中に記載されている方法及び組成物は、癌を有する対象者を治療するために使用することができる。用語「非ヒト動物」は、全ての脊椎動物、例えば、哺乳動物及び非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などを包含する。

【0135】

用語「サンプル」は、患者又は対象者から採取された組織、体液又は細胞（又は、前述のいずれかの一部）を示している。通常、組織又は細胞は患者から除去されるが、インビボでの診断も意図される。固形腫瘍の場合、外科的に切除された腫瘍から組織サンプルを採取し、慣習的な技術によって試験用に調製することができる。リンパ腫及び白血病の場合、リンパ球、白血病細胞又はリンパ組織を採取し（例えば、血液から白血病細胞採取）、適切に調製することができる。尿、涙、血清、血漿、脳脊髄液、糞便、痰、細胞抽出物などの別のサンプルも、特定の癌に対して有用であり得る。

30

【0136】

本明細書中で使用されている場合、「含む（comprising）」は、「含む（including）」、「含有する（containing）」又は「によって特徴付けられる（characterized by）」と同義であり、そして、包括的又は非制限的（open-ended）であって、列挙されていない追加の要素又は方法段階を除外しない。本明細書中で使用されている場合、「からなる（consisting of）」は、特許請求の範囲の要素において特定されていない要素、段階又は成分を除外する。本明細書中で使用されている場合、「本質的にからなる（consisting essentially of）」は、特許請求の範囲の基本的な新規特徴に実質的に影響を及ぼさない材料又は段階を除外しない。本明細書中の各例において、用語「含む」、「本質的にからなる」及び「からなる」は、いずれも、場合により残りの2つの用語のいずれかで置き換えることができ、斯くして、対象の範囲の代替的な態様について記載する。本明細書中において例示的に適切に記載される本発明は、本明細書中に具体的に開示されて

40

50

いない1つ又は複数の要素、1つ又は複数の制限がない状態で実施することができる。

【0137】

本明細書中で使用されている場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、その文脈が異なるように明らかに指示していない限り、複数の指示対象を包含する。「又は」又は「及び」の使用は、異なるように示されていない限り、「及び/又は」を意味する。さらに、用語「含む(including)」及び他の形態(例えば、「含む(include)」、「含む(includes)」及び「含まれている(included)」)の使用は、限定的ではない。

【0138】

量、時間長(temporal duration)などのような測定可能な値について言及するときに本明細書中で使用されている「約」という用語は、特定されている値から最大で±10%の変動を包含する。異なるように示されていない限り、本明細書中で使用されている成分の量、特性(例えば、分子量、反応条件など)を表す全ての数字は、用語「約」よって修飾されているものとして理解されるべきである。

10

【0139】

本明細書中で使用されている場合、「及び/又は」は、もう一方の有無にかかわらず、2つの特定の特定の特徴又は構成要素のそれぞれの特定の開示として解釈されるべきである。従って、「A及び/又はB」などの表現において使用される用語「及び/又は」は、「A及びB」、「A又はB」、「A」のみ及び「B」のみを包含する。同様に、「A、B及び/又はC」などの表現において使用される用語「及び/又は」は、以下のそれぞれを包含する：A、B及びC；A、B又はC；A又はC；A又はB；B又はC；A及びC；A及びB；B及びC；Aのみ；Bのみ；及び、Cのみ。

20

【0140】

本明細書中で使用されている場合、用語「ug」及び「uM」は、それぞれ「µg」及び「µM」と交換可能に使用される。

【0141】

本明細書中に記載されているさまざまな態様について、下記においてさらに詳細に記載する。

【0142】

I. 抗LAP抗体

30

一態様において、本明細書中で提供されているのは、単離された抗LAP抗体(即ち、LAPに結合する抗体)又はその抗原結合フラグメントである。

【0143】

一態様において、本明細書中で提供されているのは、単離された抗LAP抗体(例えば、組換えヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体)又はその抗原結合フラグメントであり、ここで、これらは、以下のものを含む：

40

(a) 配列番号16、26及び18のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号19、20及び21のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域を含む軽鎖可変領域；

(b) 配列番号16、27及び18のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号19、20及び21のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域を含む軽鎖可変領域；

(c) 配列番号16、28及び18のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号19、20及び21のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域を含む軽鎖可変領域；

(d) 配列番号16、29及び18のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号19、20及び21のア

50

(a p) 配列番号 2 2 5、2 3 3 及び 2 2 7 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 2 2 8、2 2 9 及び 2 3 0 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む軽鎖可変領域。

【 0 1 4 4 】

一部の実施形態では、抗 L A P 抗体（例えば、組換えヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体）又は抗原結合フラグメントは、配列番号 1 6、1 7 及び 1 8 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 1 9、2 0 及び 2 1 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む軽鎖可変領域、を含む、但し、重鎖可変領域の位置 5 6（これは、配列番号 1 7 の位置 7 に対応する）が、N 以外のアミノ酸（例えば、Q、S、H、L、D）である場合、又は、N 以外のアミノ酸残基（例えば、Q、S、H、L、D）で置換されている場合は、除外される。

10

【 0 1 4 5 】

一部の実施形態では、抗 L A P 抗体（例えば、組換えヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体）又は抗原結合フラグメントは、配列番号 5 4、5 5 及び 5 6 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 5 7、5 8 及び 5 9 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む軽鎖可変領域、を含む、但し、重鎖可変領域の位置 5 4（これは、配列番号 5 5 の位置 5 に対応する）が、N 以外のアミノ酸（例えば、Q、A、H、S）である場合、又は、N 以外のアミノ酸残基（例えば、Q、A、H、S）で置換されている場合は、除外される。

20

【 0 1 4 6 】

一部の実施形態では、抗 L A P 抗体（例えば、組換えヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体）又は抗原結合フラグメントは、配列番号 5 4、5 5 及び 5 6 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 5 7、5 8 及び 5 9 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む軽鎖可変領域、を含む、但し、重鎖可変領域の位置 1 0 2（これは、配列番号 5 6 の位置 4 に対応する）が、D 以外のアミノ酸（例えば、A、E、G）である場合、又は、D 以外のアミノ酸残基（例えば、A、E、G）で置換されている場合は、除外される。

30

【 0 1 4 7 】

一部の実施形態では、抗 L A P 抗体（例えば、組換えヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体）又は抗原結合フラグメントは、配列番号 5 4、5 5 及び 5 6 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 5 7、5 8 及び 5 9 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む軽鎖可変領域、を含む、但し、重鎖可変領域の位置 5 4（これは、配列番号 5 5 の位置 5 に対応する）が、N 以外のアミノ酸（例えば、Q、A、H、S）である場合、又は、N 以外のアミノ酸残基（例えば、Q、A、H、S）で置換されている場合、及び、重鎖可変領域の位置 1 0 2（これは、配列番号 5 6 の位置 4 に対応する）が、D 以外のアミノ酸（例えば、A、E、G）である場合、又は、D 以外のアミノ酸残基（例えば、A、E、G）で置換されている場合は、除外される。

40

【 0 1 4 8 】

一部の実施形態では、抗 L A P 抗体（例えば、組換えヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体）又は抗原結合フラグメントは、配列番号 1 1 0、1 1 1 及び 1 1 2 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号 1 1 3、1 1 4 及び 1 1 5 のアミノ酸配列をそれぞれ含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む軽鎖可変領域、を含む、但し、重鎖可変領域の位置 5 4（これは、配列番号 1 1 1 の位置 5 に対応する）が、N 以外アミノ酸（例えば、Q、G、A、S、H、L、D）である場合、又は、N 以外のアミノ酸残基（例えば、Q、G、A、

50

S、H、L、D)で置換されている場合は、除外される除外される。

【0149】

一部の実施形態では、抗LAP抗体(例えば、組換えヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体)又は抗原結合フラグメントは、配列番号162、163及び164のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号165、166及び167のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域を含む軽鎖可変領域、を含む、但し、重鎖可変領域の位置56(これは、配列番号163の位置7に対応する)が、N以外のアミノ酸(例えば、Q、G、A、S、H、L、D)である場合、又は、N以外のアミノ酸残基(例えば、Q、G、A、S、H、L、D)で置換されている場合は、除外される。

10

【0150】

一部の実施形態では、抗LAP抗体(例えば、組換えヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体)又は抗原結合フラグメントは、配列番号179、180及び181のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号182、183及び184のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域を含む軽鎖可変領域、を含む、但し、重鎖可変領域の位置55(これは、配列番号180の位置6に対応する)が、N以外のアミノ酸(例えば、Q、G、A、S、H、L、D)である場合、又は、N以外のアミノ酸残基(例えば、Q、G、A、S、H、L、D)で置換されている場合は、除外される。

20

【0151】

一部の実施形態では、抗LAP抗体(例えば、組換えヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体)は、配列番号225、226及び227のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号228、229及び230のアミノ酸配列をそれぞれ含むCDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域を含む軽鎖可変領域、を含む、但し、重鎖可変領域の位置55(これは、配列番号226の位置5に対応する)が、D以外のアミノ酸(例えば、G、A、E)である場合、又は、D以外のアミノ酸残基(例えば、G、A、E)で置換されている場合は、除外される。

【0152】

一部の実施形態では、抗LAP抗体は、上記下位区分(a)-(ap)のいずれかの重鎖CDR配列及び定常領域(例えば、ヒトIgG定常領域(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、又は、IgG4、又は、それらの変異体))を含む。一部の実施形態では、定常領域は、配列番号196に記載されているアミノ酸配列を含むヒトIgG1定常領域である。一部の実施形態では、定常領域は、配列番号197に記載されているアミノ酸配列を含む変異体ヒトIgG4定常領域である。一部の実施形態では、上記下位区分(a)-(ap)のいずれかの重鎖CDR配列を含む重鎖可変領域は、定常ドメインに連結されて、重鎖(例えば、全長重鎖)を形成し得る。同様に、上記下位区分(a)-(ap)のいずれかの軽鎖CDR配列を含む軽鎖可変領域は、定常領域に連結されて、軽鎖(例えば、全長軽鎖)を形成し得る。全長重鎖(但し、C末端リシン(K)は除く、又は、但し、存在しないか若しくは除去される可能性のあるC末端グリシン及びリシン(GK)を除く)と全長軽鎖が合して、全長抗体を形成する。

30

40

【0153】

別の態様において、本明細書中で提供されているのは、以下のものを含む単離された抗LAP抗体である：

- (a) 配列番号42及び52をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；
- (b) 配列番号40及び52をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；
- (c) 配列番号35及び46をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；
- (d) 配列番号35及び50をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；
- (e) 配列番号101及び104をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；
- (f) 配列番号98及び104をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；
- (g) 配列番号92及び104をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；

50

- (h) 配列番号 9 2 及び 1 0 6 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；
- (i) 配列番号 9 5 及び 1 0 4 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；
- (j) 配列番号 7 7 及び 1 0 4 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；
- (k) 配列番号 8 2 及び 1 0 4 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；
- (l) 配列番号 8 7 及び 1 0 4 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；
- (m) 配列番号 1 3 3 及び 1 5 4 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；
- (n) 配列番号 1 3 0 及び 1 5 4 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；
- (o) 配列番号 1 2 7 及び 1 5 4 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；
- (p) 配列番号 1 4 4 及び 1 5 4 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；
- (q) 配列番号 1 4 6 及び 1 5 4 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；
- (r) 配列番号 1 4 8 及び 1 5 4 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；
- (s) 配列番号 1 5 0 及び 1 5 4 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列；又は
- (t) 配列番号 2 1 8 及び 1 5 4 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列。

10

【 0 1 5 4 】

一部の実施形態では、抗 L A P 抗体は、潜在的な障害部位 (l i a b i l i t y s i t e) (例えば、脱アミド化部位及び / 又は異性化部位) が除去された可変領域配列を有している。

【 0 1 5 5 】

従って、一部の実施形態では、抗 L A P 抗体は、上記下位区分 (a) - (d) のいずれかの重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む、但し、重鎖可変領域の位置 5 6 が、N 以外のアミノ酸 (例えば、Q、S、H、L、D) である場合、又は、N 以外のアミノ酸残基 (例えば、Q、S、H、L、D) で置換されている場合は、除外される。

20

【 0 1 5 6 】

一部の実施形態では、抗 L A P 抗体は、上記下位区分 (e) - (l) のいずれかの重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む、但し、重鎖可変領域の位置 5 4 が、N 以外のアミノ酸 (例えば、Q、A、H、S) である場合、又は、N 以外のアミノ酸残基 (例えば、Q、A、H、S) で置換されている場合は、除外される。

【 0 1 5 7 】

一部の実施形態では、抗 L A P 抗体は、上記下位区分 (e) - (l) のいずれかの重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む、但し、重鎖可変領域の位置 1 0 2 が、D 以外のアミノ酸 (例えば、A、E、G) である場合、又は、D 以外のアミノ酸残基 (例えば、A、E、G) で置換されている場合は、除外される。

30

【 0 1 5 8 】

一部の実施形態では、抗 L A P 抗体は、上記下位区分 (e) - (l) のいずれかの重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む、但し、重鎖可変領域の位置 5 4 が、N 以外のアミノ酸 (例えば、Q、A、H、S) である場合、又は、N 以外のアミノ酸残基 (例えば、Q、A、H、S) で置換されている場合、及び、重鎖可変領域の位置 1 0 2 が、D 以外のアミノ酸 (例えば、A、E、G) である場合、又は、D 以外のアミノ酸残基 (例えば、A、E、G) で置換されている場合は、除外される。

【 0 1 5 9 】

一部の実施形態では、抗 L A P 抗体は、上記下位区分 (m) - (t) のいずれかの重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む、但し、重鎖可変領域の位置 5 4 が、N 以外のアミノ酸 (例えば、Q、G、A、S、H、L、D) である場合、又は、N 以外のアミノ酸残基 (例えば、Q、G、A、S、H、L、D) で置換されている場合は、除外される。

40

【 0 1 6 0 】

一部の実施形態では、抗 L A P 抗体は、上記下位区分 (a) - (t) のいずれかの重鎖及び / 又は軽鎖可変領域配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % 同一である重鎖及び / 又は軽鎖可変領域配列を含む。一部の実施形態では、上記下位区分 (a) - (t) のいずれかの重鎖及び / 又は軽鎖可変領域配列は、1、2、3、4、5、1 - 2、1 - 3、1 - 4 又は 1 - 5 のアミノ酸置換 (例えば、保存

50

的アミノ酸置換)を有している。一部の実施形態では、抗LAP抗体は、それぞれ配列番号22及び23と同一である；それぞれ配列番号60及び61と同一である；それぞれ配列番号116及び117と同一である；それぞれ配列番号168及び169と同一である；又は、それぞれ配列番号185及び186と同一である、重鎖及び軽鎖可変領域配列を有さない。これらの抗LAP抗体は、本明細書中に(例えば、実施例に)記載されているアッセイ及び動物モデルを使用して、臨床的に有利なさまざまな特性(例えば、LAP-TGF-1への結合、TGF-Iの活性化の阻害、さまざまな細胞(例えば、免疫細胞)集団への結合、インビボにおける腫瘍増殖の阻害)について試験することができる。

【0161】

一部の実施形態では、抗LAP抗体は、上記下位区分(a)-(t)のいずれかの重鎖可変領域配列及び定常領域(例えば、ヒトIgG定常領域(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、又は、IgG4、又は、それらの変異体))を含む。一部の実施形態では、定常領域は、配列番号196に記載されているアミノ酸配列を含むヒトIgG1定常領域である。一部の実施形態では、定常領域は、配列番号197に記載されているアミノ酸配列を含む変異体ヒトIgG4定常領域である。一部の実施形態では、上記下位区分(a)-(t)のいずれかの重鎖可変領域配列は、定常ドメインに連結されて、重鎖(例えば、全長重鎖)を形成し得る。同様に、上記下位区分(a)-(t)のいずれかの軽鎖可変領域配列は、定常領域に連結されて、軽鎖(例えば、全長軽鎖)を形成し得る。全長重鎖(但し、C末端リシン(K)は除く、又は、但し、存在しないか若しくは除去される可能性のあるC末端グリシン及びリシン(GK)を除く)と全長軽鎖が合して、全長抗体を形成する。

【0162】

従って、一部の実施形態では、本明細書中で提供されているのは、以下のものを含む抗LAP抗体である：(a)配列番号225、231及び227をそれぞれ含む重鎖CDR1-3配列並びに配列番号228、229及び230をそれぞれ含む軽鎖CDR1-3配列、(b)配列番号225、232及び227をそれぞれ含む重鎖CDR1-3配列並びに配列番号228、229及び230をそれぞれ含む軽鎖CDR1-3配列、又は、(c)配列番号225、233及び227をそれぞれ含む重鎖CDR1-3配列並びに配列番号228、229及び230をそれぞれ含む軽鎖CDR1-3配列。

【0163】

一部の実施形態では、本明細書中で提供されているのは、(a)配列番号234及び224をそれぞれ含む、(b)配列番号235及び224をそれぞれ含む、又は、(c)配列番号236及び224をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む、抗体である。

【0164】

一部の実施形態では、本明細書中で提供されているのは、(a)配列番号237及び222をそれぞれ含む、(b)配列番号238及び222をそれぞれ含む、又は、(c)配列番号239及び222をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列を含む、抗LAP抗体である。

【0165】

別の態様において、本明細書中で提供されているのは、以下のものを含む単離された抗LAP抗体である：

- (a) 配列番号43及び53をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (b) 配列番号45及び53をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (c) 配列番号41及び53をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (d) 配列番号36及び47をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (e) 配列番号37及び47をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (f) 配列番号36及び51をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (g) 配列番号37及び51をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (h) 配列番号102及び105をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (i) 配列番号103及び105をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (j) 配列番号99及び105をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；

10

20

30

40

50

- (k) 配列番号 100 及び 105 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (l) 配列番号 93 及び 105 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (m) 配列番号 94 及び 105 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (n) 配列番号 93 及び 107 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (o) 配列番号 94 及び 107 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (p) 配列番号 96 及び 105 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (q) 配列番号 97 及び 105 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (r) 配列番号 78 及び 105 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (s) 配列番号 79 及び 105 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (t) 配列番号 83 及び 105 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (u) 配列番号 84 及び 105 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (v) 配列番号 88 及び 105 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (w) 配列番号 89 及び 105 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (x) 配列番号 134 及び 155 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (y) 配列番号 135 及び 155 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (z) 配列番号 131 及び 155 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (aa) 配列番号 132 及び 155 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (ab) 配列番号 128 及び 155 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (ac) 配列番号 129 及び 155 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (ad) 配列番号 145 及び 155 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (ae) 配列番号 147 及び 155 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (af) 配列番号 149 及び 155 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (ag) 配列番号 151 及び 155 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；
- (ah) 配列番号 219 及び 155 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列；又は
- (ai) 配列番号 220 及び 155 をそれぞれ含む、重鎖及び軽鎖配列。

10

20

【0166】

一部の実施形態では、全長重鎖は、C末端リシン残基を欠いている（これは、存在しないか又は除去される可能性がある）。

【0167】

一部の実施形態では、抗LAP抗体は、潜在的な障害部位（liability site）（例えば、脱アミド化部位及び/又は異性化部位）が除去された重鎖及び軽鎖配列を有する。従って、一部の実施形態では、抗LAP抗体は、上記下位区分（a）-（g）のいずれかの重鎖及び軽鎖配列を含む、但し、重鎖の位置56が、N以外のアミノ酸（例えば、Q、S、H、L、D）である場合、又は、N以外のアミノ酸残基（例えば、Q、S、H、L、D）で置換されている場合は、除外される。

30

【0168】

一部の実施形態では、抗LAP抗体は、上記下位区分（h）-（w）のいずれかの重鎖及び軽鎖配列を含む、但し、重鎖の位置54が、N以外のアミノ酸（例えば、Q、A、H、S）である場合、又は、N、H若しくはS以外のアミノ酸残基（例えば、Q、A、H、S）で置換されている場合は、除外される。

40

【0169】

一部の実施形態では、抗LAP抗体は、上記下位区分（h）-（w）のいずれかの重鎖及び軽鎖配列を含む、但し、重鎖可変領域の位置102が、D以外のアミノ酸（例えば、A、E、G）である場合、又は、D以外のアミノ酸残基（例えば、A、E、G）で置換されている場合は、除外される。

【0170】

一部の実施形態では、抗LAP抗体は、上記下位区分（h）-（w）のいずれかの重鎖及び軽鎖配列を含む、但し、重鎖の位置54が、N以外のアミノ酸（例えば、Q、A、H、S）である場合、又は、N、H若しくはS以外のアミノ酸残基（例えば、Q、A、H、S）で置換されている場合、及び、重鎖可変領域の位置102が、D以外のアミノ酸（例え

50

ば、A、E、G)である場合、又は、D以外のアミノ酸残基(例えば、A、E、G)で置換されている場合は、除外される。

【0171】

一部の実施形態では、抗LAP抗体は、上記下位区分(x)-(ai)のいずれかの重鎖及び軽鎖配列を含む、但し、重鎖可変領域の位置54が、N以外のアミノ酸(例えば、Q、G、A、S、H、L、D)である場合、又は、N以外のアミノ酸残基(例えば、Q、G、A、S、H、L、D)で置換されている場合は、除外される。

【0172】

一部の実施形態では、抗LAP抗体は、上記下位区分(a)-(ai)のいずれかの重鎖及び/又は軽鎖配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%又は99.7%同一である重鎖及び/又は軽鎖配列を含む。一部の実施形態では、上記下位区分(a)-(ai)のいずれかの重鎖及び/又は軽鎖配列は、1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4又は1-5のアミノ酸置換(例えば、保存的アミノ酸置換)を有している。一部の実施形態では、抗LAP抗体は、それぞれ配列番号24及び25と同一である;それぞれ配列番号62及び63と同一である;又は、それぞれ配列番号118及び119と同一である、重鎖及び/又は軽鎖可変領域配列を有さない。これらの抗LAP抗体は、本明細書中に(例えば、実施例に)記載されているアッセイ及び動物モデルを使用して、臨床的に有利なさまざまな特性(例えば、LAP-TGF 1への結合、TGF Iの活性化の阻害、さまざまな細胞(例えば、免疫細胞)集団への結合、インビボにおける腫瘍増殖の阻害)について試験することができる。

【0173】

一部の実施形態では、それぞれ配列番号110、120及び113のVHCDR1-3配列並びにそれぞれ配列番号113、114及び115のVLC DR1-3配列を含む抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、CDR又は可変領域の中に1以上のアミノ酸置換を有している。例えば、一部の実施形態では、3以下のアミノ酸(即ち、1、2又は3のアミノ酸)が、6つの重鎖及び軽鎖CDR(集合的に)又は2つの重鎖及び軽鎖可変領域(集合的に)において、置換されている。

【0174】

一部の実施形態では、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、GYTF TSYWMH(配列番号110)と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のアミノ酸置換(例えば、保存的アミノ酸置換)を有するVHCDR1を含む。

【0175】

一部の実施形態では、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、RIDPQSGGIK(配列番号120)と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のアミノ酸置換(例えば、保存的アミノ酸置換)を有するVHCDR2を含む。一部の実施形態では、VHCDR2は、配列:RX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉を含んでおり、ここで、X₁-X₉は、任意のアミノ酸であり得る。一部の実施形態では、X₁-X₉のうちの1つの位置のみが、配列番号120のアミノ酸配列と比較して置換されている。

【0176】

一部の実施形態では、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、WDYGGYFDV(配列番号112)と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8又は9のアミノ酸置換(例えば、保存的アミノ酸置換)を含むVHCDR3を含む。一部の実施形態では、VHCDR3は、配列:WX₁YGGYFX₂X₃(配列番号242)を含んでおり、ここで、X₁-X₃は任意のアミノ酸であり得る。一部の実施形態では、X₁-X₃のうちの1つの位置のみが、配列番号112のアミノ酸配列と比較して置換されている。

【0177】

一部の実施形態では、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、RASQDITNYLN(配列番号113)と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又は11のアミノ酸置換(例えば、保存的アミノ酸置換)を含むVLC DR1を含む。一部の実施形態では、VLC DR1は、配列RX₁X₂X₃DI X₄X₅YX₆X₇を含むことがで

10

20

30

40

50

き、ここで、 $X_1 - X_7$ は、任意のアミノ酸である。一部の実施形態では、 $X_1 - X_7$ のうちの一つの位置のみが、配列番号113のアミノ酸配列と比較して置換されている。

【0178】

一部の実施形態では、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、YTSRLHS（配列番号114）と比較して、1、2、3、4、5、6又は7のアミノ酸置換（例えば、保存的アミノ酸置換）を含むVLCDR2を含む。一部の実施形態では、VLCDR2は、配列： $YX_1X_2RX_3X_4X_5$ を含んでおり、ここで、 $X_1 - X_5$ は、任意のアミノ酸である。一部の実施形態では、 $X_1 - X_5$ のうちの一つの位置のみが、配列番号114のアミノ酸配列と比較して置換されている。

【0179】

一部の実施形態では、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、QQGDTLPWT（配列番号115）と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8又は9のアミノ酸置換（例えば、保存的アミノ酸置換）を含むVLCDR3を含む。一部の実施形態では、VLCDR3は、配列： $QQGD X_1LPWT$ （配列番号243）を含むことができ、ここで、 X_1 は、任意のアミノ酸である。

【0180】

本明細書において提供されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントの機能的特徴について、以下でさらに詳細に記載する。

【0181】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、アンカータンパク質の非存在下で、LAP-TGF1（例えば、ヒトLAP-TGF1）に結合する。例えば、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、アンカータンパク質を含まないアッセイにおいて組換えヒトLAP-TGF1に結合する。

【0182】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、バイオレイヤー干渉法（例えば、実施例1に記載されている）によって評価された場合、又は、Octet若しくはBIACoreによって測定された場合、100nM以下の K_D で、例えば、90nM以下、80nM以下、70nM以下、60nM以下、50nM以下、例えば、40nM以下、30nM以下、20nM以下、10nM以下、5nM以下、3nM以下、1nM以下、0.9nM以下、0.8nM以下、0.7nM以下、0.6nM以下、0.5nM以下、0.4nM以下、0.3nM以下、0.2nM以下、0.1nM以下、10nM~0.1nM、5nM~0.1nM、3nM~0.1nM、1nM~0.1nM、0.8nM~0.1nM、0.5nM~0.1nM、10nM~0.5nM、10nM~0.8nM、10nM~1nM、1nM~0.5nM又は1nM~0.8nMの K_D で、LAP-TGF1（例えば、可溶性LAP-TGF1）に結合する。一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、本明細書中の実施例における K_D で、LAP-TGF1（例えば、ヒト、カニクイザル、ラット、及び）に結合する。さまざまな実施形態において、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトLAP-TGF1、ラットLAP-TGF1、カニクイザルLAP-TGF1及び/又はマウスLAP-TGF1に結合する。

【0183】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、免疫抑制細胞上のアンカータンパク質と複合体を形成したLAP-TGF1に結合するが、アンカータンパク質には結合しない。一部の実施形態では、アンカータンパク質は、GARP又はLRRC33である。

【0184】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、細胞外マトリックス上のTGF1活性化を阻害することなく、免疫抑制細胞上の

10

20

30

40

50

T G F 1 活性化を選択的に阻害する。

【 0 1 8 5 】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントは、L T B P 1、L T B P 3 及び / 又は L T B P 4 と複合体を形成した L A P には結合しない。

【 0 1 8 6 】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、T G F 2 若しくは T G F 3 を過剰発現する細胞を使用したフローサイトメトリー又は組換え L A P - T G F 2 若しくは L A P - T G F 3 を用いたバイオレイヤー干渉法によって評価された場合、L A P - T G F 2 (例えば、ヒト L A P - T G F 2) 及び L A P - T G F 3 (例えば、ヒト L A P - T G F 3) には結合しない。例えば、一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントは、対照抗体 (例えば、イソタイプ対照) で見られるシグナル又は抗 L A P 抗体の非存在下で見られるシグナル (例えば、実施例 2 に記載されている) を有意に超えないシグナル又は親和性で、L A P - T G F 2 又は L A P - T G F 3 に結合する。

【 0 1 8 7 】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、L A P - T G F 1 を過剰発現している P 3 U 1 細胞の培養物における遊離 T G F 1 の E L I S A 検出によって評価された場合、T G F 1 活性化を阻害する。一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントは、E L I S A によって評価された場合、例えば、L A P - T G F 1 を過剰発現している P 3 U 1 細胞の培養物における遊離 T G F 1 の E L I S A 検出 (例えば、実施例 4 に記載されている) によって評価された場合、T G F 1 活性化を、約 5 0 % 以上、例えば、約 6 0 % 以上、約 7 0 % 以上、8 0 % 以上、又は、約 9 0 % 以上阻害する (又は、阻害することが確認される)。

【 0 1 8 8 】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、活性化免疫細胞集団のフローサイトメトリーによって評価された場合、マウス L A P - T G F 1 及びヒト L A P - T G F 1 に結合する。

【 0 1 8 9 】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、E L I S A によって評価された場合、遊離 T G F 1 (即ち、L A P なしの T G F 1) には結合しない。一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、バイオレイヤー干渉法によって評価された場合、e m p t y L A P (即ち、T G F 1 と複合体を形成していない L A P) には結合しない。例えば、一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントは、対照抗体 (例えば、イソタイプ対照) で見られるシグナル又は抗 L A P 抗体の非存在下で見られるシグナル (例えば、実施例 2 に記載されている) を有意に超えないシグナル又は親和性で、遊離 T G F 1 又は e m p t y に結合する。

【 0 1 9 0 】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントは、K 2 7 C 及び Y 7 5 C 変異を含むヒト L A P - T G F 1 に結合する (配列番号 1 2) に結合する。別の実施形態において、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントは、Y 7 4 T 変異を含むヒト L A P - T G F 1 (配列番号 1 3) には結合しない (又は、結合しないことが確認される)。別の実施形態において、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントは、K 2 7 C 及び Y 7 5 C 変異を含むヒト L A P - T G F 1 に結合する (又は、結合することが確認される) が、Y 7 4 T 変異を含む L A P - T G F 1 には結合しない。

【 0 1 9 1 】

一部の実施形態では、該抗 L A P 抗体は、ヒト L A P - T G F 1 (配列番号 1) の残基

82-130の全部又は一部に結合する。

【0192】

一部の実施形態では、抗LAP抗体は、ヒトLAP-TGF 1（配列番号1）の残基82-130内に結合する。一部の実施形態では、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、アミノ酸31-40、274-280及び340-343を含む又はアミノ酸31-40、274-280及び340-343らからなるヒトLAP-TGF 1（配列番号1）上の1つ以上の領域に結合する。一部の実施形態では、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトLAP-TGF 1（配列番号1）のアミノ酸31-40、274-280及び340-343に結合する。一部の実施形態では、エピトープは、クライオEMによって決定される。

10

【0193】

一部の実施形態では、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、アミノ酸31-38、278-281及び342-344を含む又はアミノ酸31-38、278-281及び342-344からなるヒトLAP-TGF 1（配列番号1）上の1以上の領域に結合する。一部の実施形態では、抗LAP抗体は、ヒトLAP-TGF 1（配列番号1）のアミノ酸31-38、278-281及び342-344に結合する。一部の実施形態では、エピトープは、クライオEMによって決定される。一部の実施形態では、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、アミノ酸35-43、272-275、280-283及び340（配列番号1）を含む又はアミノ酸35-43、272-275、280-283及び340（配列番号1）からなるヒトLAP-TGF 1（配列番号1）上の1以上の領域に結合する。一部の実施形態では、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトLAP-TGF 1（配列番号1）のアミノ酸35-43、272-275、280-283及び340に結合する。一部の実施形態では、エピトープは、クライオEMによって決定される。

20

【0194】

上記で論じたように、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、免疫細胞（例えば、免疫抑制細胞）などの細胞上のLAP-TGF 1に結合する。免疫抑制細胞としては、フローサイトメトリーなどによって評価した場合、限定するものではないが、抑制性T細胞（例えば、制御性T細胞、活性化T細胞、抑制性CD8+T細胞）、M1マクロファージ、M2マクロファージ、樹状細胞、制御性B細胞、顆粒球性MDS C及び/又は単球性MDS Cなどがある。一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、腫瘍細胞、線維芽細胞（癌関連線維芽細胞を包含する）、間葉系間質細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞、非髓鞘形成シュワン細胞、筋線維芽細胞、内皮細胞、血小板、巨核球、周皮細胞及び/又は肝星細胞などの免疫細胞以外の細胞に結合する。一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、免疫細胞（例えば、免疫抑制細胞）及び非免疫細胞の両方のLAP-TGF 1に結合する。

30

【0195】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、GAR P陽性細胞（例えば、GAR P陽性免疫抑制細胞）上のLAP-TGF 1に結合する。一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、GAR P陰性細胞（例えば、GAR P陰性免疫抑制細胞）上のLAP-TGF 1に結合する（又は、結合することが確認される）。一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、フローサイトメトリーによって評価された場合、GAR P陽性細胞及びGAR P陰性細胞の両方のLAP-TGF 1に結合する。

40

【0196】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、CD73の内因性発現を低減させる。一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、治療（例えば、放射線）によって引き

50

起こされるCD73発現の増加を阻害する。CD73発現は、当技術分野で知られている標準的な方法（例えば、実施例16に記載されている）を使用して確認することができる。

【0197】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、フローサイトメトリー（例えば、実施例2に記載されている）によって測定された場合、1000 ng/mL以下、500 ng/mL以下、200 ng/mL以下、150 ng/mL以下、100 ng/mL以下、50 ng/mL以下、25 ng/mL以下、10 ng/mL以下、5 ng/mL以下、2 ng/mL以下、1 ng/mL～200 ng/mL、1 ng/mL～150 ng/mL、1 ng/mL～100 ng/mL、1 ng/mL～50 ng/mL、1 ng/mL～25 ng/mL、1 ng/mL～10 ng/mL又は1 ng/mL～5 ng/mLのEC50で、細胞上に発現されるLAP-TGF1（例えば、P3U1細胞上に発現される、例えば、ヒトLAP-TGF1又はマウスLAP-TGF1）に結合する。

10

【0198】

抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントのLAP-TGF1への結合は、フローサイトメトリーによる定量的免疫蛍光法を使用して定義することもでき、これにより、細胞1個あたりに結合した抗体分子の数を定量化することができる。従って、一部の実施形態では、GARPも発現する細胞に結合した抗LAP抗体の数は、その細胞に結合した抗GARP抗体の数と同じであり得るか、又は、その細胞に結合した抗GARP抗体の数の少なくとも80%、少なくとも50%、少なくとも20%、少なくとも10%、少なくとも5%、少なくとも1%又は少なくとも0.1%であり得る。一部の実施形態では、細胞1個あたりに発現されるLAP-TGF1分子の数は、LAP分子の大部分を検出する群の抗LAP抗体を使用する定量的免疫蛍光法を使用して定量化することができる；そのような抗体の例としては、2F8、2C9、16B4及び抗LAPモノクローナル抗体#27232（R&D Systems）などがある。一部の実施形態では、当該細胞に結合した抗LAP抗体の数は、その細胞上のLAP分子の数と同じであり得るか、又は、その細胞上で発現されるLAP分子の数の少なくとも80%、少なくとも50%、少なくとも20%、少なくとも10%、少なくとも5%、少なくとも1%又は少なくとも0.1%であり得る。

20

30

【0199】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、ELISAによって測定された場合（例えば、実施例4に記載されている）、対照（例えば、対照抗体）と比較して、TGF1活性化を、例えば、10%以上、例えば、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上、阻害する。

【0200】

好ましくは、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、可溶性LAP-TGF1に高親和性で結合し、例えば、バイオレイヤー干渉法（例えば、実施例1に記載されている）によって測定された場合、 10^{-7} M以下、 10^{-8} M以下、 10^{-9} M以下、 10^{-10} M以下、 10^{-11} M以下、 10^{-12} M以下、 10^{-12} M～ 10^{-7} M、 10^{-11} M～ 10^{-7} M、 10^{-10} M～ 10^{-7} M又は 10^{-9} M～ 10^{-7} Mの K_D で、可溶性LAP-TGF1に結合する。

40

【0201】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、細胞外マトリックス中のLAP-TGF1には結合しない。例えば、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、ELISAによって評価された場合、細胞外マトリックス中のLAP-TGF1に結合せず、ここで、抗体又は抗原結合フラグメントの結合のO.D.シグナルは、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントの非存在下で見られるシグナル又は対照抗体（例えば、イ

50

ソタイプ対照)で見られるシグナルを有意に上回らない(例えば、実施例5に記載されている)。

【0202】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、ECM中のLAP-TGF 1の供給源(実施例5に記載されている)をMMP-2、MMP-9、トロンボスポンジン又はV 6若しくはV 8インテグリンを発現する細胞と組み合わせたアッセイにおける遊離TGF 1のELISA検出によって評価される場合、ECM中のTGF 活性化を阻害しない。

【0203】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、血小板上のLAR-TGF 1に結合する。例えば、一部の実施形態では、血小板の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%又は少なくとも50%は、フローサイトメトリー(例えば、実施例6に記載されている)による抗LAP抗体の結合によって検出され得る(例えば、イソタイプ対照抗体で見られるものを超えるシグナルを示す)。一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、血小板に結合するが、血小板凝集又は血小板脱顆粒を引き起こさない。

10

【0204】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、免疫細胞、例えば、抑制性T細胞(例えば、制御性T細胞)、M2マクロファージ、単球MDS C、CD11b陽性細胞及び/又は樹状細胞に結合する。例えば、一部の実施形態では、これらの細胞型の少なくとも0.5%、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも5%、少なくとも7%、少なくとも10%、少なくとも20%又は少なくとも50%は、フローサイトメトリー(例えば、実施例7に記載されている)による抗LAP抗体の結合(例えば、イソタイプ対照抗体で見られるものを超えるシグナルを示す)によって検出され得る。一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、それらがイソタイプ対照を超える2標準偏差で結合する場合、これらの細胞型に結合すると見なされる。

20

【0205】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、GARP陰性白血球に結合する。例えば、一部の実施形態では、GARP陰性白血球の少なくとも0.5%、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも5%、少なくとも7%、少なくとも10%、少なくとも20%又は少なくとも50%は、フローサイトメトリー(例えば、実施例7に記載されている)による抗LAP抗体の結合(例えば、イソタイプ対照抗体で見られるものを超えるシグナルを示す)によって検出され得る。

30

【0206】

当技術分野で知られている及び本明細書中に記載されている方法を使用して確認された場合、上記で記載した機能的特性(例えば、生化学的活性、免疫化学的活性、細胞的活性、生理学的活性又は他の生物学的活性)のうちの1以上を示す抗体又は抗原結合フラグメントは、抗体の非存在下(例えば、又は、無関係な特異性の対照抗体が存在する場合)で見られるものと比較して特定の活性における統計的に有意な差に関連すると理解される。好ましくは、抗LAP抗体によって誘導された、測定されたパラメータにおける増大は、その測定されたパラメータの少なくとも10%、さらに好ましくは少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%又は100%(即ち、2倍)、3倍、5倍又は10倍だけ統計的に有意な増大をもたらす。逆に、抗LAP抗体によって誘導された、測定されたパラメータ(例えば、TGF 1活性化)における低減は、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%又は100%の統計的に有意な低減をもたらす。

40

【0207】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体のいずれかと同じヒトLAP-TGF 1上の

50

エピトープに結合する抗LAP抗体も、本明細書中で提供されている。これらの抗体は、ヒトLAP-TGF 1への結合に関して、本明細書中に記載されている抗LAP抗体のいずれかと交差競合する能力を有している。一部の実施形態では、抗LAP抗体は、ヒトLAP-TGF 1(配列番号1)の残基82-130内の1以上のアミノ酸に結合する。

【0208】

本明細書中に開示されている抗体は、抗体のような特性を有する抗体及び他のタンパク質骨格の全ての既知形態を包含する。例えば、抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、イムノコンジュゲート、キメラ抗体、又は、フィブロネクチン若しくはアンキリンリピートなどの抗体様特性を有するタンパク質骨格であり得る。

10

【0209】

一部の実施形態では、抗体は、第1及び第2の結合領域を含む二重特異性抗体であり、ここで、第1の結合領域は、本明細書中に記載されている抗LAP抗体の結合特異性(例えば、抗原結合領域)を含んでおり、及び、第2の結合領域は、LAPに結合しない結合特異性を含む。一部の実施形態では、第2の結合領域は、血小板上に発現されないタンパク質に結合する。

【0210】

抗体は、Fab、F(ab')₂、scFv、AFFIBODY、アビマー、ナノボディ、一本鎖抗体又はドメイン抗体であることもできる。抗体は、さらにまた、任意のイソタイプ(これは、以下のイソタイプを包含する: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD、及び、IgE)を有することもできる。全長抗体は、標準的な組換えDNA技術及び可変領域配列に作動可能に連結される所望の定常領域配列をコードする核酸を使用して、VH及びVL配列から調製することができる。

20

【0211】

特定の実施形態において、本明細書中に記載されている抗体は、エフェクター機能を有し得るか、又は、エフェクター機能が低下しているか若しくはエフェクター機能を有していない可能性がある。特定の実施形態において、抗LAP抗体は、エフェクターレス又は殆どエフェクターレスのFc、例えば、IgG2又はIgG4を含む。一般に、本明細書中に記載されている可変領域は、典型的には、抗体の1以上の機能特性(例えば、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合、及び/又は、抗原依存性細胞毒性)を改変するために、1以上の修飾を含むFcに連結され得る。さらに、本明細書中に記載されている抗体は、化学的に修飾され得る(例えば、1以上の化学部分を抗体に結合させることができる)か、又は、そのグリコシル化を改変するために、抗体の1以上の機能特性を改変するために、修飾され得る。これらの実施形態のそれぞれについては、以下でさらに詳細に説明される。Fc領域内の残基の番号付けは、KabataのEUIンデックスの番号付けである。

30

【0212】

一部の実施形態では、Fc領域は、変異体Fc領域、例えば、望ましい構造的特徴及び/又は生物学的活性を提供するために親Fc配列(例えば、後で改変されて変異体を生成する修飾されていないFcポリペプチド)に対して(例えば、アミノ酸置換、欠失及び/又は挿入によって)修飾されたFc配列である。例えば、(a)抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)が増加若しくは減少した、(b)補体媒介性細胞毒性(CDC)が増加若しくは減少した、(c)Clqに対する親和性が増加若しくは減少した、及び/又は、(d)親Fcと比較してFc受容体に対する親和性が増加若しくは減少した、Fc変異体を生成するために、Fc領域中に修飾を加えることができる。そのようなFc領域変異体は、一般に、Fc領域中に少なくとも1のアミノ酸修飾を含む。アミノ酸修飾を組み合わせることは、特に望ましいと考えられている。例えば、変異体Fc領域は、その中に、2、3、4、5などの置換、例えば、本明細書中で識別された特定のFc領域の位置の置換を含み得る。

40

【0213】

50

変異体 Fc 領域は、さらに、ジスルフィド結合形成に關与するアミノ酸が除去されるか又は別のアミノ酸で置き換えられる配列変更も含み得る。そのような除去によって、本明細書中に記載されている抗体を産生するために使用される宿主細胞の中に存在する他のシステイン含有タンパク質との反応を回避することができる。システイン残基が除去された場合でも、一本鎖 Fc ドメインは、非共有結合で一緒に保持された二量体 Fc ドメインを形成することができる。別の実施形態において、Fc 領域は、選択された宿主細胞との適合性を上昇させるように改変され得る。例えば、典型的な天然の Fc 領域の N 末端近くの P A 配列を除去することができ、これは、プロリンイミノペプチダーゼなどの E . c o l の消化酵素によって認識され得る。別の実施形態において、Fc ドメイン内の 1 以上のグリコシル化部位を除去することができる。通常グリコシル化される残基（例えば、アスパラギン）は、細胞溶解反応を引き起こす可能性がある。そのような残基は、削除され得るか、又は、グリコシル化されない残基（例えば、アラニン）で置換され得る。別の実施形態において、C 1 q 結合部位などの補体との相互作用に關与する部位は、Fc 領域から除去され得る。例えば、ヒト I g G 1 の E K K 配列を削除又は置換することができる。特定の実施形態において、Fc 受容体への結合に影響を与える部位、好ましくは、サルベージ受容体結合部位以外の部位は、除去することができる。別の実施形態において、Fc 領域は、A D C C 部位を除去するために修飾され得る。A D C C 部位は、当技術分野で知られている：例えば、I g G 1 中の A D C C 部位に關して、「M o l e c . I m m u n o l . 2 9 (5) : 6 3 3 - 9 (1 9 9 2)」を参照されたい。変異体 Fc ドメインの特定の例は、例えば、P C T 公開番号 W O 9 7 / 3 4 6 3 1 及び W O 9 6 / 3 2 4 7 8 に開示されている。

【0214】

一実施形態において、Fc のヒンジ領域は、そのヒンジ領域内のシステイン残基の数が変更されるように、例えば、増大又は低減されるように、改変される。このアプローチは、B o d m e r らによる米国特許第 5 , 6 7 7 , 4 2 5 号にさらに記載されている。さらに具体的には、抗体が、天然の Fc ヒンジドメインブドウ球菌タンパク質 A (S p A) 結合と比較して S p A 結合を損なうように、Fc ヒンジフラグメントの C H 2 - C H 3 ドメインインターフェース領域に 1 以上のアミノ酸変異を導入する。このアプローチは、W a r d らによる米国特許第 6 , 1 6 5 , 7 4 5 号にさらに詳細に記載されている。

【0215】

さらに別の実施形態において、Fc 領域は、抗体のエフェクター機能を変更するために、少なくとも 1 のアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置き換えることによって変更される。例えば、抗体が、エフェクターリガンドに対して変更された親和性を有するが親抗体の抗原結合能力は保持するように、アミノ酸残基 2 3 4、2 3 5、2 3 6、2 3 7、2 9 7、3 1 8、3 2 0 及び 3 2 2 から選択される 1 以上のアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。親和性が改変されるエフェクターリガンドは、例えば、Fc 受容体又は補体の C 1 成分であることができる。このアプローチは、いずれも W i n t e r らによる米国特許第 5 , 6 2 4 , 8 2 1 号及び第 5 , 6 4 8 , 2 6 0 号にさらに詳細に記載されている。別の例において、抗体が改変された C 1 q 結合を有するよう及び / 又は低減された若しくは無効にされた補体依存性細胞毒性 (C D C) を有するよう、アミノ酸残基 3 2 9、3 3 1 及び 3 2 2 から選択される 1 以上のアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。このアプローチは、I d u s o g i e らによる米国特許第 6 , 1 9 4 , 5 5 1 号にさらに詳細に記載されている。別の例では、アミノ酸位置 2 3 1 ~ 2 3 9 内の 1 以上のアミノ酸残基が変更され、それにより、補体を固定する抗体の能力が変更される。このアプローチは、B o d m e r らによる P C T 公開番号 W O 9 4 / 2 9 3 5 1 にさらに記載されている。

【0216】

さらに別の例では、Fc 領域は、抗体依存性細胞毒性 (A D C C) を増大させるために及び / 又は Fc 受容体に対する親和性を増大させるために、以下の位置の 1 以上のアミノ酸を修飾することによって、修飾することができる：2 3 4、2 3 5、2 3 6、2 3 8、

239、240、241、243、244、245、247、248、249、252、
 254、255、256、258、262、263、264、265、267、268、
 269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、
 290、292、293、294、295、296、298、299、301、303、
 305、307、309、312、313、315、320、322、324、325、
 326、327、329、330、331、332、333、334、335、337、
 338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、
 414、416、419、430、433、434、435、436、437、438又
 は439。例示的な置換としては、236A、239D、239E、268D、267E
 、268E、268F、324T、332D及び332Eなどがある。例示的な変異体と
 しては、239D/332E、236A/332E、236A/239D/332E、2
 68F/324T、267E/268F、267E/324T及び267E/268F/
 324Tなどがある。FcγR及び補体相互作用を増強するための他の修飾としては、限
 定するものではないが、置換298A、333A、334A、326A、247I、33
 9D、339Q、280H、290S、298D、298V、243L、292P、30
 0L、396L、305I及び396Lなどがある。これらの修飾及び他の修飾は、「S
 trohl, 2009, Current Opinion in Biotechn
 ology 20:685-691」において概説されている。

10

【0217】

Fc 受容体への結合を増大させるFc修飾としては、Fc領域のアミノ酸位置238、
 239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、
 268、269、270、272、279、280、283、285、298、289、
 290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、
 307、312、315、324、327、329、330、335、337、3338
 、340、360、373、376、379、382、388、389、398、414
 、416、419、430、434、435、437、438又は439のうちのいずれ
 か1以上におけるアミノ酸修飾などがあり、ここで、Fc領域内の残基の番号付けは、K
 abat (PCT特許公開番号WO00/42072)と同様のEUIンデックスの番号
 付けである。

20

【0218】

Fcsに対して行うことができる他のFc修飾は、Fc R及び/又は補体タンパク質へ
 の結合を低減又は除去し、それによって、ADCC、ADCP及びCDCなどのFc媒介
 エフェクター機能を低減又は除去するための修飾である。代表的な修飾としては、限定す
 るものではないが、位置234、235、236、237、267、269、325及び
 328における置換、挿入及び欠失などがあり、ここで、番号付けは、EUIンデックス
 に従う。代表的な置換としては、限定するものではないが、234G、235G、236
 R、237K、267R、269R、325L及び328Rなどがあり、ここで、番号付
 けは、EUIンデックスに従う。Fc変異体は、236R/328Rを含み得る。Fcγ
 R及び補体の相互作用を低減するための他の修飾としては、置換297A、234A、2
 35A、237A、318A、228P、236E、268Q、309L、330S、3
 31S、220S、226S、229S、238S、233P及び234V、並びに、突
 然変異的若しくは酵素的手段による又はタンパク質をグリコシル化しない細菌などの生物
 内で産生させることによる位置297でのグリコシル化の除去などがある。これらの修飾
 及び他の修飾は、「Strohl, 2009, Current Opinion i
 n Biotechnology 20:685-691」の中で概説されている。場合
 により、Fc領域は、当業者には知られている付加的な及び/又は代替的な位置に天然に
 は存在しないアミノ酸残基を含んでいてもよい(例えば、以下のものを参照されたい:米
 国特許第5,624,821号;第6,277,375号;第6,737,056号;第
 6,194,551号;第7,317,091号;第8,101,720号;PCT特許
 公開番号WO00/42072;WO01/58957;WO02/06919;WO0

30

40

50

4 / 0 1 6 7 5 0 ; W O 0 4 / 0 2 9 2 0 7 ; W O 0 4 / 0 3 5 7 5 2 ; W O 0 4 / 0 7
4 4 5 5 ; W O 0 4 / 0 9 9 2 4 9 ; W O 0 4 / 0 6 3 3 5 1 ; W O 0 5 / 0 7 0 9 6 3
; W O 0 5 / 0 4 0 2 1 7 ; W O 0 5 / 0 9 2 9 2 5、及び、W O 0 6 / 0 2 0 1 1 4)

【 0 2 1 9 】

抑制性受容体 F c y R 1 1 b に対する親和性を増強する F c 変異体も使用することができる。そのような変異体は、例えば B 細胞及び単球を包含する F c y R 1 1 b + 細胞に関連する免疫調節活性を有する F c 融合タンパク質を提供し得る。一実施形態において、F c 変異体は、1 以上の活性化受容体と比較して F c y R 1 1 b に対して選択的に増強された親和性を提供する。F c y R 1 1 b への結合を改変するための修飾としては、E U インデックスに従う 2 3 4、2 3 5、2 3 6、2 3 7、2 3 9、2 6 6、2 6 7、2 6 8、3 2 5、3 2 6、3 2 7、3 2 8 及び 3 3 2 からなる群から選択される位置での 1 以上の修飾などがある。F c y R 1 1 b 親和性を増強するための代表的な置換としては、限定するものではないが、2 3 4 D、2 3 4 E、2 3 4 F、2 3 4 W、2 3 5 D、2 3 5 F、2 3 5 R、2 3 5 Y、2 3 6 D、2 3 6 N、2 3 7 D、2 3 7 N、2 3 9 D、2 3 9 E、2 6 6 M、2 6 7 D、2 6 7 E、2 6 8 D、2 6 8 E、3 2 7 D、3 2 7 E、3 2 8 F、3 2 8 W、3 2 8 Y 及び 3 3 2 E などがある。代表的な置換としては、2 3 5 Y、2 3 6 D、2 3 9 D、2 6 6 M、2 6 7 E、2 6 8 D、2 6 8 E、3 2 8 F、3 2 8 W 及び 3 2 8 Y などがある。F c y R 1 1 b への結合を増強するための他の F c 変異体としては、2 3 5 Y / 2 6 7 E、2 3 6 D / 2 6 7 E、2 3 9 D / 2 6 8 D、2 3 9 D / 2 6 7 E、2 6 7 E / 2 6 8 D、2 6 7 E / 2 6 8 E 及び 2 6 7 E / 3 2 8 F などがある。

【 0 2 2 0 】

特定の実施形態において、抗体は、その生物学的半減期を増大させるように修飾される。さまざまなアプローチが可能である。例えば、これは、F c R n に対する F c 領域の結合親和性を増加させることによって行うことができる。例えば、米国特許第 6, 2 7 7, 3 7 5 号に記載されているように、以下の残基のうち 1 以上を変異させることができる：2 5 2、2 5 4、2 5 6、4 3 3、4 3 5、4 3 6。特定の代表的な置換としては、以下のうちの 1 以上などがある：T 2 5 2 L、T 2 5 4 S 及び / 又は T 2 5 6 F。あるいは、生物学的半減期を長くするために、P r e s t a らによる米国特許第 5, 8 6 9, 0 4 6 号及び第 6, 1 2 1, 0 2 2 号に記載されているように、抗体を C H 1 又は C L 領域内で改変して、I g G の F c 領域の C H 2 ドメインの 2 つのループから取得したサルベージ受容体結合エピトープを含ませることができる。F c R n への結合を増大させる及び / 又は薬物動態学的特性を改善する別の代表的な変異体としては、位置 2 5 9、3 0 8、4 2 8 及び 4 3 4 における置換などがあり、これらは、例えば、2 5 9 I、3 0 8 F、4 2 8 L、4 2 8 M、4 3 4 S、4 3 4 H、4 3 4 F、4 3 4 Y 及び 4 3 4 M を包含する。F c R n への F c 結合を増大させる別の変異体としては、2 5 0 E、2 5 0 Q、4 2 8 L、4 2 8 F、2 5 0 Q / 4 2 8 L (H i n t o n e t a l . , 2 0 0 4 , J . B i o l . C h e m . 2 7 9 (8) : 6 2 1 3 - 6 2 1 6 , H i n t o n e t a l . 2 0 0 6 J o u r n a l o f I m m u n o l o g y 1 7 6 : 3 4 6 - 3 5 6)、2 5 6 A、2 7 2 A、2 8 6 A、3 0 5 A、3 0 7 A、3 0 7 Q、3 1 1 A、3 1 2 A、3 7 6 A、3 7 8 Q、3 8 0 A、3 8 2 A、4 3 4 A (S h i e l d s e t a l , J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y , 2 0 0 1 , 2 7 6 (9) : 6 5 9 1 - 6 6 0 4)、2 5 2 F、2 5 2 T、2 5 2 Y、2 5 2 W、2 5 4 T、2 5 6 S、2 5 6 R、2 5 6 Q、2 5 6 E、2 5 6 D、2 5 6 T、3 0 9 P、3 1 1 S、4 3 3 R、4 3 3 S、4 3 3 I、4 3 3 P、4 3 3 Q、4 3 4 H、4 3 4 F、4 3 4 Y、2 5 2 Y / 2 5 4 T / 2 5 6 E、4 3 3 K / 4 3 4 F / 4 3 6 H、3 0 8 T / 3 0 9 P / 3 1 1 S (D a l l A c q u a e t a l . J o u r n a l o f I m m u n o l o g y , 2 0 0 2 , 1 6 9 : 5 1 7 1 - 5 1 8 0 , D a l l ' A c q u a e t a l . , 2 0 0 6 , J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y 2 8 1 : 2 3 5 1 4 - 2 3 5 2 4) などがある。F c R n 結合を調節するため

の他の修飾は、「Yeung et al., 2010, J Immunol, 182:7663-7671」に記載されている。特定の実施形態において、特定の生物学的特徴を有するハイブリッドIgGイソタイプを使用することができる。例えば、IgG1/IgG3ハイブリッド変異体は、CH2及び/又はCH3領域内のIgG1位置を2つのイソタイプが異なる位置のIgG3からのアミノ酸で置換することによって構築することができる。従って、1以上数の置換（例えば、274Q、276K、300F、339T、356E、358M、384S、392N、397M、4221、435R、及び、436F）を含むハイブリッド変異体IgG抗体を構築することができる。本明細書中に記載されている別の実施形態において、IgG1/IgG2ハイブリッド変異体は、CH2及び/又はCH3領域内のIgG2位置を2つのイソタイプが異なる位置のIgG1からのアミノ酸で置換することによって構築することができる。従って、1以上の置換（例えば、以下のアミノ酸置換のうち1以上：233E、234L、235L、-236G（これは、位置236におけるグリシンの挿入である）、及び、327A）を含むハイブリッド変異体IgG抗体を構築することができる。

10

【0221】

さらに、FcR1、FcRII、FcRIII及びFcRnに対するヒトIgG1の結合部位がマッピングされ、結合が改善された変異体が記載されている（「Shields, R. L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604」を参照されたい）。位置256、290、298、333、334及び339における特定の変異は、FcRIIIへの結合を改善することが示された。さらに、以下の変異の組み合わせがFcRIII結合を改善することが示された：T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224A、及び、S298A/E333A/K334A、これは増強されたFcRIIIa結合及びADCC活性を示すことが示された（Shields et al., 2001）。FcRIIIaへの結合が強く増強された別のIgG1変異体（これは、FcRIIIaに対する親和性の最大の増加、FcRIIb結合の低減及びカニクイザルにおける強力な細胞毒性活性を示したS239D/I332E及びS239D/I332E/A330L変異を有する変異体を包含する）が特定された（Lazar et al., 2006）。アレムツズマブ（CD52特異的）、トラスツズマブ（HER2/neu特異的）、リツキシマブ（CD20特異的）及びセツキシマブ（EGFR特異的）などの抗体への三重変異の導入は、インビトロで大幅に増強されたADCC活性に変化し、そして、S239D/I332E変異体は、サルのB細胞を枯渇させる能力の増強を示した（Lazar et al., 2006）。さらに、B細胞悪性腫瘍及び乳癌のモデルにおいてヒトFcRIIIaを発現するトランスジェニックマウスにおいてFcRIIIaへの増強された結合及び付随して増強されたADCC活性を示したL235V、F243L、R292P、Y300L及びP396L突然変異を含むIgG1突然変異体が特定された（Stavenhagen et al., 2007; Nordstrom et al., 2011）。使用できる他のFc突然変異体としては、以下のものなどがある：S298A/E333A/L334A、S239D/I332E、S239D/I332E/A330L、L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L、及び、M428L/N434S。

20

30

40

【0222】

IgG4定常ドメインを使用する場合、通常、IgG1のヒンジ配列を模倣してIgG4分子を安定化させる置換S228Pを含ませることが好ましい。

【0223】

さらに別の実施形態では、抗体のグリコシル化が改変されている。例えば、非グリコシル化抗体を作製することができる（即ち、その抗体はグリコシル化を欠いている）。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を高めるように改変することができる。そのような炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の1以上の部位を変更することによって達成することができる。例えば、1以上の可変領域フレームワークグリコシ

50

ル化部位の除去をもたらす、それによってその部位でのグリコシル化を排除する1以上のアミノ酸置換を行うことができる。そのような非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増大し得る。そのようなアプローチは、C o r aによる米国特許第5,714,350号及び第6,350,861号にさらに詳細に記載されている。N 2 9 7の定常領域のグリコシル化は、N 2 9 7残基を別の残基に変異させること(例えば、N 2 9 7 A)によって及び/又は隣接するアミノ酸(例えば、2 9 8)を変異させてN 2 9 7上のグリコシル化を低減させることによって、防止することができる。

【0224】

追加的又は代替的に、フコシル残基の量が低減した低フコシル化抗体又は二分G l c N a c構造が増大した抗体など、改変されたタイプのグリコシル化を有する抗体を作製することができる。そのような改変されたグリコシル化パターンは、抗体のA D C C能力を高めることが実証されている。そのような炭水化物修飾は、例えば、改変されたグリコシル化機構を有する宿主細胞において抗体を発現させることによって、達成することができる。改変されたグリコシル化機構を有する細胞は、当技術分野において記載されており、そして、本明細書中に記載されている組換え抗体を発現してそれにより改変されたグリコシル化を有する抗体を産生する宿主細胞として使用することができる。例えば、H a n a iらによるE P 1,176,195には、フコシルトランスフェラーゼをコードする機能的に破壊されたF U T 8遺伝子を有する細胞株が記載されており、そのような細胞系統において発現された抗体は低フコシル化を示す。P r e s t aによるP C T公開番号W O 0 3 / 0 3 5 8 3 5には、A s n (2 9 7)結合炭水化物にフコースを結合させる能力が低下して、さらに、その宿主細胞内で発現された抗体の低フコシル化ももたらす、変異体C H O細胞系統であるL e c 1 3細胞が記載されている(「S h i e l d s , R . L . e t a l . (2 0 0 2) J . B i o l . C h e m . 2 7 7 : 2 6 7 3 3 - 2 6 7 4 0」も参照されたい)。U m a n aらによるP C T公開番号W O 9 9 / 5 4 3 4 2には、操作された細胞系統において発現された抗体が抗体のA D C C活性の増大をもたらす二分G l c N a c構造の増加を示すように、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ(例えば、ベータ(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI I I (G n T I I I))を発現するように操作された細胞系統が記載されている(「U m a n a e t a l . (1 9 9 9) N a t . B i o t e c h . 1 7 : 1 7 6 - 1 8 0」も参照されたい)。

【0225】

本明細書中に記載されている抗体の別の修飾は、ペグ化である。抗体は、例えば、抗体の生物学的(例えば、血清)半減期を長くするために、ペグ化することができる。抗体をペグ化するために、抗体又はそのフラグメントを、典型的には、1以上のP E G基が抗体又は抗体フラグメントに結合する条件下で、ポリエチレングリコール(P E G)(例えば、P E Gの反応性エステル又はアルデヒド誘導体)と反応させる。好ましくは、該ペグ化は、反応性P E G分子(又は、類似の反応性水溶性ポリマー)とのアシル化反応又はアルキル化反応を介して実施される。本明細書中で使用されている場合、用語「ポリエチレングリコール」は、モノ(C 1 - C 1 0)アルコキシ-若しくはアリーロキシ-ポリエチレングリコール又はポリエチレングリコール-マレイミドなどの、他のタンパク質を誘導体化するために使用されてきた任意の形態のP E Gを包含することが意図されている。特定の実施形態において、ペグ化される抗体は、非グリコシル化抗体である。タンパク質をペグ化する方法は、当技術分野で知られており、そして、本明細書中に記載されている抗体に適用することができる。例えば、N i s h i m u r aらによる欧州特許番号E P 0 1 5 4 3 1 6号及びI s h i k a w aらによる欧州特許番号E P 0 4 0 1 3 8 4号を参照されたい。

【0226】

そのリガンドに対するF c領域の親和性及び結合特性は、当技術分野で知られているさまざまなインビトロアッセイ法(生化学又は免疫学に基づくアッセイ)によって確認することができ、ここで、そのようなインビトロアッセイ法としては、限定するものではないが

10

20

30

40

50

、以下のものなどがある：平衡法（例えば、酵素結合免疫吸着検定法（E L I S A）、又は、ラジオイムノアッセイ（R I A））、又は、動力学（例えば、B I A C O R E分析）、並びに、別の方法、例えば、間接結合アッセイ、競合阻害アッセイ、蛍光共鳴エネルギー転移（F R E T）、ゲル電気泳動、及び、クロマトグラフィー（例えば、ゲル濾過）。これらの方法及び他の方法は、検査される成分のうちの1種類以上への標識を利用することができ、及び/又は、さまざまな検出方法（これは、限定するものではないが、発色標識、蛍光標識、発光標識又は同位体性標識を包含する）を使用することができる。結合親和性及び動力学の詳細な説明は、抗体-免疫原相互作用に焦点を当てている、「Paul, W. E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)」の中に見いだすことができる。

10

【0227】

I I . 抗LAP抗体と同じエピトープに結合するか又は抗LAP抗体と交差競合する抗体

本明細書中に開示されている抗体と同じエピトープ又は類似のエピトープに結合する（従って、本明細書中に開示されている抗体と交差競合もする）抗LAP抗体は、免疫化プロトコルを使用して産生され得る。得られた抗体は、ヒトLAP-TGF 1への高親和性結合についてスクリーニングすることができる。次に、選択された抗体を、例えば、LAP-TGF 1の配列変異体が酵母細胞の表面に提示される酵母ディスプレイアッセイで、又は、水素-重水素交換実験によって、試験して、抗体が結合する正確なエピトープを決定することができる。

20

【0228】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体と同じエピトープに結合する抗体は、また、キメラ構築物（例えば、LAP-TGF 1のニワトリ-ヒトキメラ）を使用して生成することができる。ヒトとニワトリの配列を組み合わせ、正しく折りたたまれるLAP-TGF 1タンパク質を生成できるので（実施例に2に記載されている）、この方法を使用して、LAP-TGF 1上の目的の特定のエピトープに対する免疫原を生成することができる。この戦略では、配列の大部分はニワトリLAP-TGF 1から取得され、ヒトLAP-TGF 1の小さなセクションが所望のエピトープを含む領域に挿入される。この戦略を使用して標的化することができるLAP-TGF 1上の代表的なエピトープとしては、例えば、LAP-TGF 1の下腕、LAP-TGF 1の潜伏ループ、又は、ヒトLAP-TGF 1のアミノ酸82-130を含むエピトープなどがある。代表的なニワトリ-ヒトキメラ構築物は、実施例3に記載されている。このキメラタンパク質を使用して、ニワトリを免疫化してモノクローナル抗体を産生させることができる。ニワトリLAP-TGF 1は自己として認識されるため、免疫応答はヒトの配列に集中する。このアプローチを使用して生成された抗体は、当技術分野で知られている標準的な方法（例えば、本明細書に記載されている方法）を使用して、さまざまな機能/特性（例えば、LAP-TGF 1への結合、TGF 1活性化の阻害、ECMへの結合、免疫抑制細胞などの細胞への結合）について試験することができる。

30

【0229】

抗体が結合するエピトープは、当技術分野で認められている方法を使用して確認することができる。抗LAP抗体は、例えば、参照抗体と同じヒトLAP-TGF 1上の残基の1以上と接触する場合；参照抗体と同じヒトLAP-TGF 1の少なくとも1の領域内の残基の1以上と接触する場合；参照抗体と同じヒトLAP-TGF 1の少なくとも1の領域内の残基の大部分と接触する場合；参照抗体と同じヒトLAP-TGF 1の各領域内の残基の大部分と接触する場合；参照抗体と同じヒトLAP-TGF 1の全長に沿った残基の大部分と接触する場合；参照抗体と同じヒトLAP-TGF 1の異なる領域全てに接触する場合；参照抗体と同じヒトLAP-TGF 1の任意の1つの領域にある残基全てに接触する場合；又は、参照抗体と同じヒトLAP-TGF 1の全ての同じ領域にある全ての残基に接触する場合、参照抗LAP抗体と同じエピトープに結合すると考えられる。

40

50

【0230】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体を用いて「ヒトLAP-TGF 1上の同じエピトープ」に結合する抗体を特定するための技術としては、抗原：抗体複合体の結晶のX線分析などがあり、これは、エピトープの原子分解を提供する。他の方法は、抗原フラグメント又は抗原の突然変異変異体への抗体の結合をモニターし、ここで、抗原配列内のアミノ酸修飾による結合の喪失がエピトープ成分を示す。方法は、また、コンビナトリアルファージディスプレイペプチドライブラリー又は標的タンパク質のプロテアーゼ消化物から特定の短いペプチド（天然の三次元形態又は変性形態のいずれかにある）を親和性単離する、目的の抗体の能力に依存し得る。次に、そのペプチドを、ペプチドライブラリーをスクリーニングするのに使用される抗体に対応するエピトープの定義のリードと見なす。エピトープマッピングに関して、コンフォメーションの不連続なエピトープをマッピングすることが示されている計算アルゴリズムも開発された。

10

【0231】

エピトープ又はそのエピトープを含む領域は、さらにまた、ヒトLAP-TGF 1にまたがる一連の重複ペプチドへの結合についてスクリーニングすることによって確認することができる。あるいは、同じエピトープを有する抗体、従って本明細書中に記載されている抗LAP抗体と同様の特性を有する抗体の選抜をガイドするために、「Jesper set al. (1994) Biotechnology 12:899」の方法を使用することができる。ファージディスプレイを使用して、最初に、抗LAP抗体の重鎖を（例えば、ヒト）軽鎖のレパートリーと組み合わせてLAP結合抗体を選抜し、次に、その新しい軽鎖を（例えば、ヒト）重鎖のレパートリーと組み合わせて、本明細書中に記載されている抗LAP抗体と同じエピトープ又はエピトープ領域を有する（例えば、ヒト）LAP結合抗体を選抜する。あるいは、本明細書中に記載されている抗体の変異体は、抗体の重鎖及び軽鎖をコードするcDNA配列の突然変異誘発によって得ることができる。

20

【0232】

「Cunningham & Wells (1989) Science 244:1081」に記載されているアラニンスキャニング突然変異誘発、又は、LAP-TGF 1のアミノ酸残基の他の形態の点突然変異誘発を使用して、抗LAP抗体に対する機能的エピトープを特定することもできる。

【0233】

特定の抗体によって結合されるエピトープ又はエピトープ領域（「エピトープ領域」は、エピトープを含む領域又はエピトープと重複する領域である）は、また、LAP-TGF 1フラグメントを含むペプチドへの抗体の結合を評価することによって確認することができる。LAP-TGF 1配列を含む一連の重複するペプチドを合成し、そして、例えば、直接ELISAで、競合ELISA（ここで、ペプチドは、マイクロタイタープレートのウェルに結合したLAP-TGF 1への抗体の結合を防ぐ能力について評価される）で、又は、チップ上で、結合についてスクリーニングすることができる。そのようなペプチドスクリーニング法は、いくつかの不連続な機能的エピトープは検出することができない可能性がある。

30

【0234】

エピトープは、さらにまた、MSに基づくタンパク質フットプリンティング法（例えば、HDX-MS、及び、タンパク質の高速光化学酸化（FPOP））、構造的な方法（例えば、X線結晶構造決定、分子モデリング、及び、核磁気共鳴分光法）によって識別することができる。

40

【0235】

さらにまた、単粒子クライオ電子顕微鏡（SP-Cryo-EM）を使用して、抗体が結合するエピトープを特定することができる。SP-Cryo-EMは、高強度の電子ビームを使用して、極低温で本来の環境にある生体試料を画像化する高分子構造解析の技術である。近年、SP-cryo-EMは、創薬における応用に適した原子レベルに近い構造を決定するための結晶学及びNMRを補完する技術として登場した（Renaud et

50

al. Nat Rev Drug Discov 2018; 17: 471-92; Scapin et al. Cell Chem Biol 2018; 25: 1318-25; Ceska et al. Biochemical Society Transactions 2019: p. BST20180267)。高分解能の情報に加えて、SP-Cryo-EMは、より大きくより複雑な生体系へのアクセスを可能にするというさらなる利点を有し、同じサンプルから複数のコンフォメーション又は組成の溶液状態を特徴付ける可能性を有しており、高分子のより生物学的に関連する状態への洞察を提供する。画像化のために、少量のサンプル（例えば、3 µLアリコート）をグリッドに塗布し、液体エタン浴内で瞬間冷凍する。次に、凍結したグリッドを顕微鏡にロードし、グリッドのさまざまな領域の数百から数千の画像が収集する。これらの画像には、生体高分子（粒子）の二次元投影が含まれている：数学ツール及びGPUを利用したアルゴリズムを使用して、粒子が識別、抽出及び分類される；次の段階では、種々のクラスを使用して1以上の3D再構成を計算し、これらは、同じサンプル内に共存する場合、異なるコンフォメーション、オリゴマー化又は結合状態に対応する。その後、個々の再構成を高分解能に精練することができる。

10

【0236】

III. 核酸分子

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントをコードする核酸分子も、本明細書中で提供されている。核酸は、細胞全体中に、細胞溶解物中に、又は、部分的に精製された形態若しくは実施的に純粋な形態で、存在し得る。本明細書中に記載されている核酸は、例えば、DNA又はRNAであることができ、イントロン配列を含んでいてもよいが又は含んでいなくてもよい。特定の実施形態において、核酸は、cDNA分子である。本明細書中に記載されている核酸は、標準的な分子生物学技術を使用して得ることができる。ハイブリドーマ（例えば、以下においてさらに記載されるヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスから調製されたハイブリドーマ）によって発現される抗体について、ハイブリドーマによって作製された抗体の軽鎖及び重鎖をコードするcDNAは、標準的なPCR増幅又はcDNAクローニング技術によって得ることができる。免疫グロブリン遺伝子ライブラリーから（例えば、ファージディスプレイ技術を使用して）得られた抗体の場合、抗体をコードする核酸をライブラリーから見いだすことができる。

20

30

【0237】

一部の実施形態では、本明細書中で提供されているのは、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントのいずれかの、VH及び/若しくはVL配列又は重鎖及び/若しくは軽鎖配列をコードする核酸分子である。本明細書中に記載されているヌクレオチド配列（例えば、核酸分子）を含む宿主細胞は、本発明に包含される。VH及びVLセグメントをコードするDNAフラグメントが得られたら、これらのDNAフラグメントを標準的な組換えDNA技術によってさらに操作して、例えば、その可変領域遺伝子を、全長抗体鎖遺伝子、Fabフラグメント遺伝子又はscFv遺伝子に変換することができる。これらの操作では、VL又はVHをコードするDNAフラグメントを、別のタンパク質をコードする別のDNAフラグメント（例えば、抗体定常領域又は可動性リンカー）に作動可能に連結させる。用語「作動可能に連結された」は、この文脈で使用されている場合、2つのDNAフラグメントによってコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるように2つのDNAフラグメントが結合されることを意味することが意図されている。

40

【0238】

VH領域をコードする単離されたDNAは、VHをコードするDNAを重鎖定常領域（ヒンジ、CH1、CH2及び/又はCH3）をコードする別のDNA分子に作動可能に連結させることによって、全長重鎖遺伝子に変換することができる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野で知られており（例えば、「Kabata, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immu

50

n o l o g i c a l I n t e r e s t , F i f t h E d i t i o n , U . S .
D e p a r t m e n t o f H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s ,
N I H P u b l i c a t i o n N o . 9 1 - 3 2 4 2) を 参 照 さ れ たい)、そして、
これらの領域を含むDNAフラグメントは、標準的なPCR増幅によって得ることができる。

【0239】

VL領域をコードする単離されたDNAは、VLをコードするDNAを軽鎖定常領域、CLをコードする別のDNA分子に作動可能に連結させることにより、全長軽鎖遺伝子(及び、Fab軽鎖遺伝子)に変換することができる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は当技術分野で知られており(例えば、「Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242」を参照されたい)、そして、これらの領域を含むDNAフラグメントは、標準的なPCR増幅によって得ることができる。その軽鎖定常領域は、カッパ定常領域又はラムダ定常領域であることができる。

10

【0240】

また、本明細書中では、得られるアミノ酸配列を核酸分子の翻訳時に変更しない保存的置換を有する核酸分子も提供されている。

【0241】

20

IV. 製造方法

モノクローナル抗体は、当技術分野で知られている多種多様な技術(これは、ハイブリドーマ、組換え及びファージディスプレイ技術、又は、それらの組み合わせを使用することを包含する)を使用して調製することができる。

【0242】

本明細書中に記載されているモノクローナル抗体を作製するためのさまざまな方法が、当技術分野で利用可能である。例えば、モノクローナル抗体は、Kohlerら(Nature, 256:495 (1975))によって最初に記載されたハイブリドーマ法若しくはその後発展したハイブリドーマ法を使用して、又は、組換えDNA法(米国特許第4,816,567号)によって、作製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野で知られていて例えば以下のものにおいて教示されているハイブリドーマ技術を包含するハイブリドーマ技術を使用して製造することができる:「Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1988)」、「Hammerling, et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)」(これらの参考文献は、参照によりその全体が組み込まれる)。ハイブリドーマ技術を使用して特定の抗体を産生及びスクリーニングするための方法は日常的であり、当技術分野でよく知られている。別の例では、本明細書中に記載されている方法及び組成物において有用な抗体は、「McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)」に記載されている技術を使用して生成された抗体ファージライブラリーからの単離など、当技術分野で知られている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。「Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)」及び「Marks et al., J. Mol. Biol, 222:581-597 (1991)」には、ファージライブラリーを使用した、それぞれマウス抗体及びヒト抗体の単離について記載されている。その後の刊行物には、鎖シャッフリングによる高親和性(例えば、nM範囲)のヒト抗体の製造(Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992))、並びに、非常に大きなファージライブラリーを構築するための戦略として

30

40

50

の組み合わせ感染 (combinatorial infection) 及びインビボ組換え (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21 : 2265 - 2266 (1993)) が記載されている。従って、これらの技術は、モノクローナル抗体を単離するための慣習的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術に対する実行可能な代替技術である。

【0243】

ヒト抗体は、当技術分野で知られているさまざまな方法 (これは、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを使用する上記ファージディスプレイ法を包含する) によって、作製することができる。米国特許第 4, 444, 887 号及び第 4, 716, 111 号; 並びに、PCT 公開番号 WO 98 / 46645、WO 98 / 50433、WO 98 / 24893、WO 98 / 16654、WO 96 / 34096、WO 96 / 33735 及び WO 91 / 10741 を参照されたい (これらの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。ヒト抗体は、さらにまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現し、そして、免疫化すると、内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体の完全なレパートリーを産生することができるトランスジェニックマウスを使用して産生することができる。ヒト抗体を産生するためのこの技術の概要については、「Lonberg and Huszar, 1995, Int. Rev. Immunol. 13 : 65 - 93」を参照されたい。さらにまた、ファージディスプレイ技術 (McCafferty et al., Nature 348 : 552 - 553 (1990)) を使用して、免疫されていないドナーからの免疫グロブリン可変 (V) ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体フラグメントを産生することもできる。ヒト抗体は、さらにまた、インビトロで活性化された B 細胞によって生成され得る (米国特許第 5, 567, 610 号及び第 5, 229, 275 号を参照されたい; これらの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。選択されたエピトープを認識する完全なヒト抗体は、「ガイド付き選択」と称される技術を使用して生成することができる。このアプローチでは、選択された非ヒトモノクローナル抗体 (例えば、マウス抗体) を使用して、同じエピトープを認識する完全なヒト抗体の選択をガイドする (Jespers et al., 1994, Bio/technology 12 : 899 - 903)。

【0244】

キメラ抗体は、マウスモノクローナル抗体の配列に基づいて調製することができる。重鎖及び軽鎖免疫グロブリンをコードする DNA は、目的のマウスハイブリドーマから得ることができ、そして、標準的な分子生物学技術を使用して、非マウス (例えば、ヒト) 免疫グロブリン配列を含むように操作することができる。例えば、キメラ抗体を作製するために、当技術分野で知られている方法を使用して、マウス可変領域をヒト定常領域に連結させることができる (例えば、Cabillyらの米国特許第 4, 816, 567 号を参照されたい)。

【0245】

抗 LAP 抗体のヒト化形態 (例えば、マウス抗 LAP 抗体のヒト化形態) は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含むキメラ抗体である。ヒト化抗体は、典型的には、レシピエントの CDR 又は超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性及び性能を有するマウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類などの非ヒト種 (ドナー抗体) の CDR 又は超可変領域からの残基によって置き換えられるヒト免疫グロブリン (レシピエント抗体) である。場合により、ヒト免疫グロブリンの Fv フレームワーク領域 (FR) 残基が、対応する非ヒト残基で置き換えられる。ヒト化抗体は、レシピエント抗体又はドナー抗体の中では見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体の性能をさらに向上させるために行われる。一般に、ヒト化抗体は、実質的に、少なくとも 1 (典型的には、2) の可変ドメインの全てを含んでおり、ここで、超可変ループの全て又は実質的に全ては非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、及び、FR 領域の全て又は実質的に全てはヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体は、場合により、免疫グロブリン定常領域 (Fc) の少なくとも一部分、典型的には、ヒト免疫グロブリンの免疫グロブリン

定常領域 (Fc) の少なくとも一部分も含有する。さらなる詳細については、「Jones et al., Nature 321 : 522 - 525 (1986)」、「Riechmann et al., Nature 332 : 323 - 329 (1988)」及び「Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2 : 593 - 596 (1992)」を参照されたい。

【0246】

ヒト化抗体のフレームワーク及びCDR領域は、親配列に正確に対応する必要はなく、例えば、ドナー抗体CDR又はコンセンサフレームワークは、当該部位のCDR又はフレームワーク残基がドナー抗体又はコンセンサフレームワークのいずれにも正確に対応しないように、少なくとも1のアミノ酸残基の置換、挿入及び/又は欠失によって変異誘発することができる。本明細書中で使用されている場合、用語「コンセンサフレームワーク」は、コンセンサ免疫グロブリン配列のフレームワーク領域を示している。本明細書中で使用されている場合、用語「コンセンサ免疫グロブリン配列」は、関連する免疫グロブリン配列のファミリーにおいて最も頻繁に存在するアミノ酸(又は、ヌクレオチド)から形成される配列を示している(例えば、「Winnaker, From Gene to Clones (Veriagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987)」を参照されたい)。免疫グロブリンのファミリーでは、コンセンサ配列の各位置は、ファミリー内のその位置において最も頻繁に存在するアミノ酸によって占められている。2つのアミノ酸が同じ頻度で存在する場合、そのどちらもコンセンサ配列に含めることができる。本明細書中で使用されている場合、「パーニアゾン」は、Foote及びWinter(1992, J. Mol. Biol. 224 : 487 - 499;これは、参照により本明細書に組み込まれる)によって記載されているようにCDR構造を調節し、抗原への適合を微調整し得るフレームワーク残基のサブセットを示している。パーニアゾン残基は、CDRの下にある層を形成し、CDRの構造と抗体の親和性に影響を与えることができる。レシピエントとして使用することが可能なヒト免疫グロブリン(Ig)配列は、当技術分野でよく知られている。

【0247】

ヒトフレームワーク領域内のフレームワーク残基は、CDRドナー抗体からの対応する残基で置換して、抗原結合を改変する(好ましくは、改善する)ことができる。これらのフレームワーク置換は、当技術分野でよく知られている方法によって、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定するためのCDR及びフレームワーク残基の相互作用のモデリング並びに特定の位置における異常なフレームワーク残基を特定するための配列比較によって、識別することができる(例えば、「Queen et al., 米国特許第5,585,089号」及び「Riechmann et al., Nature 332 : 323 (1988)」を参照されたい;これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。三次元免疫グロブリンモデルは、一般に利用可能であり、そして、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の可能性のある三次元コンフォメーション構造を例示及び表示するコンピュータープログラムが利用可能である。これらのディスプレイの検査は、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、即ち、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を与える残基の分析、を可能にする。このようにして、所望の抗体特性(例えば、標的抗原に対する親和性の増大)が達成されるように、FR残基をコンセンサ及びインポート配列から選択し、組み合わせることができる。一般に、CDR残基は、抗原結合への影響に直接且つ最も実質的に関与している。抗体は、当技術分野で知られているさまざまな技術(これは、限定するものではないが、「Jones et al., Nature 321 : 522 (1986)」、「Verhoeyen et al., Science 239 : 1534 (1988)」、「Sims et al., J. Immunol. 151 : 2296 (1993)」、「Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196 : 901 (1987)」、「Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89 : 42

10

20

30

40

50

85 (1992)」、*Presta et al., J. Immunol.* 151 : 2623 (1993)」、*Padlan, Molecular Immunology* 28 (4/5) : 489 - 498 (1991)」、*Studnicka et al., Protein Engineering* 7 (6) : 805 - 814 (1994)」、*Roguska. et al., PNAS* 91 : 969 - 973 (1994)」、PCT公開番号WO91/09967、PCT/US98/16280、PCT/US96/18978、PCT/US91/09630、PCT/US91/05939、PCT/US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755、WO90/14443、WO90/14424、WO90/14430、EP229246、EP592,106、EP519,596、EP239,400、米国特許第5,565,332号、第5,723,323号、第5,976,862号、第5,824,514号、第5,817,483号、第5,814,476号、第5,763,192号、第5,723,323号、第5,766,886号、第5,714,352号、第6,204,023号、第6,180,370号、第5,693,762号、第5,530,101号、第5,585,089号、第5,225,539号、第4,816,567号(これらは、それぞれが、参照により本明細書に完全に組み込まれる)に記載されている技術を包含する)を用いてヒト化することができる。

【0248】

上記の方法を使用して生成された抗LAP抗体は、当技術分野で知られている方法及び実施例に記載されている方法(例えば、当技術分野で認識されているタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ及びセルベースアッセイ)を使用して、特定の結合特異性、結合親和性、標的化細胞集団などの所望の機能について試験することができる。本発明の一態様は、LAP、LAPを含む複合体及び/又はLAP-TGF β 1を含む複合体に結合する抗体又は抗原結合フラグメントをスクリーニングするために使用することができる分子を提供する。例えば、表4中の分子(即ち、配列番号1及び198-210のいずれかのアミノ酸配列を有する分子)を使用して、少なくとも1の結合タンパク質の結合をスクリーニング又は確認する。さまざまな実施形態において、表4(即ち、配列番号1及び198-210のいずれかのアミノ酸配列を有する分子)及び表6(即ち、配列番号211-213のいずれかのアミノ酸配列を有する分子)の中の少なくとも1の分子を使用して、少なくとも1の抗体又は抗原結合フラグメントの結合をスクリーニング又は確認する。

【0249】

代表的なアッセイとしては、限定するものではないが、免疫沈降、又は、インビトロ結合アッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)、FACS、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、バイオレイヤー干渉法(例えば、ForteBioアッセイ)及びスキャッチャード分析などがある。

【0250】

抗体工学

抗LAP抗体又はその抗原結合フラグメントが、例えば、抗体又はフラグメントの特性を改善するために、親モノクローナル抗体の可変ドメイン内のフレームワーク残基への修飾を含むように操作された抗体である実施形態も包含される。典型的には、そのようなフレームワークの修飾は、抗体又はフラグメントの免疫原性を低下させるために行われる。これは、通常、親(例えば、齧歯類)抗体又はフラグメントの可変ドメイン(即ち、フレームワーク残基)内の非CDR残基を、抗体が使用される種の免疫レパートリーからの類似の残基(例えば、ヒトの治療の場合は、ヒト残基)で置き換えることによって達成される。そのような抗体又はフラグメントは、「ヒト化」抗体又はフラグメントと称される。場合により、親和性を高めること、又は、操作された(例えば、ヒト化された)抗体の特異性を改変することは、望ましい。1つのアプローチは、1以上のフレームワーク残基を対応する生殖系列配列に「復帰突然変異」させることである。より具体的には、体細胞突然

変異を受けた抗体又はフラグメントは、抗体が由来する生殖系列配列とは異なるフレームワーク残基を含むことができる。そのような残基は、抗体又はフラグメントフレームワーク配列を、その抗体又はフラグメントが由来する生殖系列配列と比較することによって、確認することができる。別のアプローチは、例えば、フレームワーク残基を置き換える過程で失われた可能性のある結合親和性を回復させるために、操作された（例えば、ヒト化された）抗体の1以上の位置で元の親（例えば、齧歯類）残基に復帰することである（例えば、米国特許第5,693,762号、米国特許第5,585,089号及び米国特許第5,530,101号を参照されたい。）

特定の実施形態において、抗LAP抗体及びその抗原結合フラグメントは、それらの特性を改善するためにフレームワーク及び/又はCDR内に修飾を含むように操作される（例えば、ヒト化される）。そのような操作された変更は、分子モデリングに基づくことができる。親（非ヒト）抗体配列の可変領域に関する分子モデルを構築して、抗体の構造的特徴を理解し、抗原と相互作用することができる抗体上の潜在的な領域を特定するために使用することができる。従来のCDRは、免疫グロブリン配列のアラインメントと可変領域の識別に基づいている。Kabat et al., (1991) *Sequence of Proteins of Immunological Interest*, Kabat, et al.; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242; Kabat (1978) *Adv. Prot. Chem.* 32:1-75; Kabat, et al., (1977) *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616。Chothia及び共同研究者は、抗体の結晶構造におけるループのコンフォメーションを注意深く調べ、超可変ループを提案した。「Chothia, et al., (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917」又は「Chothia, et al., (1989) *Nature* 342:878-883」。「CDR」及び「超可変ループ」に分類される領域間には、変異が存在する。その後の研究（Raghunathan et al., (2012) *J. Mol. Recog.* 25, 3, 103-113）は、いくつかの抗体-抗原結晶複合体を分析し、抗体内の抗原結合領域が必ずしも「CDR」残基又は「超可変」ループに厳密には一致していないことを観察した。非ヒト抗体の可変領域に関する分子モデルを使用して、抗原に潜在的に結合することができる領域の選択をガイドすることができる。実際には、モデルに基づく潜在的な抗原結合領域は、従来の「CDR」又は「超可変」ループとは異なっている。MOE (Chemical Computing Group)などの市販の科学ソフトウェアを分子モデリングに使用することができる。ヒトフレームワークは、フレームワークとCDRの両方における非ヒト配列との最適な一致に基づいて選択することができる。VH内のFR4（フレームワーク4）の場合、ヒト生殖系列のVJ領域を対応する非ヒト領域と比較する。VL内のFR4（フレームワーク4）の場合、ヒト生殖系列配列のJ-カッパ及びJ-ラムダ領域を対応する非ヒト領域と比較する。適切なヒトフレームワークが識別されたら、CDRを選択されたヒトフレームワークに移植する。場合により、VF-VHインターフェースにおける特定の残基は、非ヒト（親）配列におけるように保持され得る。さらにまた、CDRコンフォメーションを潜在的に変更することが可能で、従って、抗原への結合を潜在的に改変することができる残基を特定するためにも、分子モデルを使用することができる。場合により、これらの残基は、非ヒト（親）配列におけるように保持される。さらにまた、グリコシル化、脱アミド化及び酸化などの望ましくない影響をもたらす可能性のある溶媒にさらされたアミノ酸を特定するためにも、分子モデルを使用することができる。開発可能性フィルターを設計段階の早期に導入して、これらの潜在的な問題を排除/最小化することができる。

【0251】

別のタイプのフレームワーク修飾は、T細胞エピトープを除去し、それによって抗体の潜在的な免疫原性を低減させるために、フレームワーク領域内において、又は、1以上のC

D R 領域内においてさえ、1以上の残基を変異させることを含む。このアプローチは「脱免疫化」とも称され、そして、米国特許第7,125,689号においてさらに詳細に記載されている。

【0252】

特定の実施形態において、脱アミド化又は異性化を回避することを目的として、最終的な抗体のより大きな化学的安定性を提供するために、露出した側鎖を含む特定のアミノ酸を別のアミノ酸残基に変更することが望ましい。アスパラギンの脱アミド化は、NG、DG、NG、NS、NA、NT、QG又はQS配列で生じて、ポリペプチド鎖にねじれを導入してその安定性を低減させるさせるイソアスパラギン酸残基の生成をもたらし得る(イソアスパラギン酸効果)。異性化は、DG、DS、DA又はDTシーケンスで生じる可能性
10

【0253】

同様の問題は、Asp-Gly配列でも生じる可能性がある。Reissner and Aswad (2003) Cell. Mol. Life Sci. 60:1281。イソアスパラギン酸の形成は、抗体のその標的抗原への結合を弱体化又は完全に無効にする可能性がある。「Presta (2005) J. Allergy Clin Immunol. 116:731 at 734」を参照されたい。
20

【0254】

さまざまな実施形態において、アスパラギンはグルタミン(Gln)に変更される。さらにまた、アスパラギン(Asn)又はグルタミン(Gln)残基に隣接するアミノ酸を変更して、アスパラギン又はグルタミンに隣接して小さなアミノ酸が存在する場合に高い割合で発生する脱アミド化の可能性を低減させることも望ましい場合がある。「Bischoff & Kolbe (1994) J. Chromatog. 662:261」を参照されたい。さらに、メチオニン硫黄が酸化すること(これは、抗原結合親和性を低下させる可能性があり、及び、さらに、最終的な抗体調製における分子の異質性の一因にもなり得る)の可能性を低減させるために、CDR内のメチオニン残基(典型的には、溶媒にさらされたMet)をLys、Leu、Ala若しくはPhe又は他のアミノ酸に
30

変更することができる。Id。さらに、潜在的な切断しやすいAsn-Proペプチド結合を防止又は最小化するために、CDR内にあるAsn-Proの組み合わせをGln-Pro、Ala-Pro又はAsn-Alaに変更することが望ましい場合がある。そのような置換を有する抗体を、次に、その置換がLAPに対する抗体の親和性若しくは特異性又は他の所望の生物学的活性を許容できないレベルまで低下させないことを確実にするために、スクリーニングした。代表的な安定化CDR変異体については、表1Aを参照されたい。

【表 1】

表 1 A. 代表的な安定化CDR変異体

| CDR 残基 | 安定化変異体配列 |
|------------------|--|
| Asn-Gly (N-G) | Gln-Gly, Ala-Gly, or Asn-Ala (Q-G), (A-G), or (N-A) |
| Asp-Gly (D-G) | Glu-Gly, Ala-Gly or Asp-Ala (E-G), (A-G), or (D-A) |
| Met (M) | Lys, Leu, Ala, or Phe (K), (L), (A), or (F) |
| Asn (N) | Gln or Ala (Q) or (A) |
| Asn-Pro (N-P) | Gln-Pro, Ala-Pro, or Asn-Ala (Q-P), (A-P), or (N-A) |

10

【0255】

Fc 領域の抗体工学

本明細書中に開示されている抗体（例えば、ヒト化抗体）及びその抗原結合フラグメント（例えば、抗体 20E6 及びそのヒト化バージョン、並びに、抗体及び 28G11 及びそのヒト化バージョン）は、さらにまた、典型的には、血清半減期、補体固定、Fc 受容体結合及び / 又はエフェクター機能（例えば、抗原依存性細胞毒性）などの抗体の 1 以上の特性を改変するために、Fc 領域内に修飾を含むように操作することもできる。さらに、本明細書中に開示されている抗体及びその抗原結合フラグメント（例えば、抗体 20E6 及びそのヒト化バージョン）は、化学的に修飾され得る（例えば、抗体に 1 以上の化学的部分を結合させることができる）、又は、そのグリコシル化を改変するように、再度、抗体又はフラグメントの 1 以上のプロパティを改変するように、修飾され得る。これらの実施形態のそれぞれは、以下でさらに詳細に記載されている。Fc 領域内の残基の番号付けは、Kabatt の EU インデックスの番号付けである。

20

【0256】

本明細書中に開示されている抗体及びその抗原結合フラグメント（例えば、抗体 20E6 及びそのヒト化バージョン）は、さらにまた、改変されたエフェクター機能を提供するために修飾された（又は、遮断された）Fc 領域を有する抗体及びフラグメントを包含する。例えば、米国特許第 5,624,821 号；及び、PCT 公開番号 WO 2003/086310、WO 2005/120571、WO 2006/0057702 を参照されたい。そのような修飾は、免疫系のさまざまな反応を増強又は抑制するために使用することができ、診断及び治療において有益な効果をもたらす可能性がある。Fc 領域の改変には、アミノ酸の変更（置換、欠失、及び、挿入）、グリコシル化又は脱グリコシル化及び複数の Fc 領域の追加が包含される。Fc が変更されると、治療用抗体における抗体の半減期も改変される可能性があり、投与頻度が低減し、従って、利便性が向上し、及び、材料の使用量が低減する。「Prestea (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731 at 734-35」を参照されたい。

30

40

【0257】

一実施形態において、本発明の抗体又は抗原結合フラグメント（例えば、抗体 20E6 及びそのヒト化バージョン）は、重鎖定常領域のヒンジ領域内の位置 228 (S228P; EU インデックス) に対応する位置にセリンからプロリンへの突然変異を含む IgG4 イソタイプ抗体又はフラグメントである。この変異は、ヒンジ領域内の重鎖間ジスルフィド架橋の不均一性を無効にすることが報告されている (Angalet al. 上掲; 位置 241 は Kabatt 番号付けシステムに基づいている)。

【0258】

本発明の一実施形態において、CH1 のヒンジ領域は、ヒンジ領域内のシステイン残基の

50

数が増加又は減少するように改変される。このアプローチは、米国特許第 5,677,425 号においてさらに記載されている。CH1 のヒンジ領域内のシステイン残基の数は、例えば、軽鎖と重鎖の組み立てを容易にするように、又は、抗体の安定性を増加若しくは低減させるように、変更される。

【0259】

別の実施形態において、本発明の抗体又は抗原結合フラグメント（例えば、抗体 20E6 及びそのヒト化バージョン、並びに、抗体 22F9 及びそのヒト化バージョン）の Fc ヒンジ領域は、抗体又はフラグメントの生物学的半減期を低減させるように変異される。

【0260】

さらに具体的には、抗体又はフラグメントが、天然の Fc ヒンジドメインブドウ球菌タンパク質 A (SpA) 結合と比較して SpA 結合を損なうように、Fc ヒンジフラグメントの CH2 - CH3 ドメインインターフェース領域に 1 以上のアミノ酸変異を導入する。このアプローチは、米国特許第 6,165,745 号において、さらに詳細に記載されている。

【0261】

別の実施形態において、本発明の抗体又は抗原結合フラグメント（例えば、抗体 20E6 及びそのヒト化バージョン、並びに、抗体 20E6 及びそのヒト化バージョン）は、その生物学的半減期を増大させるように改変される。さまざまなアプローチが可能である。例えば、以下の突然変異のうち 1 以上を導入することができる：米国特許第 6,277,375 号に記載されている、T252L、T254S、T256F。あるいは、生物学的半減期を増大させるために、米国特許第 5,869,046 号及び第 6,121,022 号に記載されているように、抗体を CH1 又は CL 領域内で改変して、IgG の Fc 領域の CH2 ドメインの 2 つのループから取得したサルベージ受容体結合エピートープを含ませることができる。

【0262】

さらに別の実施形態において、Fc 領域は、該抗体又は抗原結合フラグメントのエフェクター機能を変更するために、少なくとも 1 のアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置き換えることによって改変される。例えば、アミノ酸残基 234、235、236、237、297、318、320 及び 322 から選択される 1 つ以上のアミノ酸は、抗体がエフェクターリガンドに対して改変された親和性を有するように及び親抗体の抗原結合能力を保持するように、異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。エフェクターリガンドに対する親和性が改変されたエフェクターリガンドは、例えば、Fc 受容体又は補体の C1 成分であることができる。このアプローチは、米国特許第 5,624,821 号及び第 5,648,260 号においてさらに詳細に記載されている。

【0263】

別の例において、アミノ酸残基 329、331 及び 322 から選択される 1 以上のアミノ酸は、抗体が改変された C1q 結合及び/又は低減された若しくは無効にされた補体依存性細胞毒性 (CDC) を有するように、異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。このアプローチは、米国特許第 6,194,551 号においてさらに詳細に記載されている。

【0264】

別の例では、アミノ酸位置 231 及び 239 内の 1 以上のアミノ酸残基が変更され、それによって、補体を固定する抗体の能力が改変される。このアプローチは、PCT 公開番号 WO94/29351 においてさらに記載されている。

【0265】

さらに別の例では、Fc 領域は、以下の位置の 1 以上のアミノ酸を修飾することによって、抗体依存性細胞毒性 (ADCC) を媒介する及び/又は Fc 受容体に対する抗体若しくはフラグメントの親和性を低減させる本発明の抗体又は抗原結合フラグメント（例えば、抗体 20E6 及びそのヒト化バージョン、並びに、抗体 20E6 及びそのヒト化バージョン）の能力を低下させるように改変される：238、239、243、248、249

、 252、254、255、256、258、264、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438、又は、439。このアプローチは、PCT公開番号WO00/42072においてさらに記載されている。さらに、Fc R1、Fc RII、Fc RIII及びFc Rnに対するヒトIgG1上の結合部位がマッピングされ、結合が改善された変異体が記載されている(「Shields et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604」を参照されたい)。

10

【0266】

本発明の一実施形態において、Fc領域は、残基243及び264を修飾することによって、エフェクター機能を媒介する及び/又は抗炎症特性を増大させる本発明の抗体(例えば、抗体20E6及びそのヒト化バージョン)の能力を低下させるように修飾される。一実施形態において、抗体又はフラグメントのFc領域は、位置243及び264の残基をアラニンに変更することによって修飾される。一実施形態において、Fc領域は、残基243、264、267及び328を修飾することによって、エフェクター機能を媒介する及び/又は抗炎症特性を増大させる抗体又はフラグメントの能力を低下させるように修飾される。

20

【0267】

改変されたエフェクター機能

一部の実施形態では、抗LAP抗体のFc領域は、エフェクター機能を媒介する及び/又はFcガンマ受容体(Fc R)へのそれらの結合を増大/低減させる抗体又は抗原結合フラグメントの能力を増大又は低減させるように修飾される。

【0268】

抗原結合タンパク質の定常領域とさまざまなFc受容体(Fc R)(これは、Fc RI(CD64)、Fc RII(CD32)及びFc RIII(CD16)などを包含する)の間の相互作用は、抗原結合タンパク質のエフェクター機能(例えば、ADCC及びCDC)を媒介すると考えられている。Fc受容体は、抗体の架橋にとっても重要であり、これは、抗腫瘍免疫に重要であり得る。

30

【0269】

エフェクター機能は、さまざまな方法で、例えば、ナチュラルキラー細胞へのFc RIIの結合を介して、又は、ADCCエフェクター機能を測定するための単球/マクロファージへのFc RIを介して、測定することができる。例えば、本発明の抗原結合タンパク質は、ナチュラルキラー細胞アッセイにおいて、ADCCエフェクター機能について評価することができる。そのようなアッセイの例は、「Shields et al., 2001 J. Biol. Chem., Vol. 276, p 6591-6604」、「Chappel et al., 1993 J. Biol. Chem., Vol 268, p 25124-25131」、「Lazar et al., 2006 PNAS, 103; 4005-4010」の中に見いだすことができる。

40

【0270】

残基Asn297において特定の変異又は改変されたグリコシル化を含むヒトIgG1定常領域は、Fc受容体への結合を低減させることが示されている。他のケースでは、突然変異がADCC及びCDCを増強することも示されている(Lazar et al. PNAS 2006, 103; 4005-4010; Shields et al. J Biol Chem 2001, 276; 6591-6604; Nechan sky et al. Mol Immunol, 2007, 44; 1815-1817)。

【0271】

50

本発明の一実施形態において、そのような突然変異は、239、332及び330 (IgG1) から選択される1以上の位置又は他のIgGタイプの同等の位置に存在している。適切な変異の例は、S239D及びI332E及びA330Lである。一実施形態において、本明細書中に記載されている本発明の抗原結合タンパク質は、位置239及び332で変異しており(例えば、S239D及びI332E)、又は、さらなる実施形態では、239及び332及び330から選択される3以上の位置で変異している(例えばS239D及びI332E及びA330L)。(EUインデックス番号付け)。

【0272】

本発明の代替の実施形態において、抗原結合タンパク質が増強されたエフェクター機能を有するように、改変されたグリコシル化プロフィールを有する重鎖定常領域を含む抗体が提供される。例えば、抗体が増強されたADCC若しくは増強されたCDCを有する場合、又は、それが増強されたADCCエフェクター機能及びCDCエフェクター機能の両方を有する場合。グリコシル化プロフィールが改変された抗原結合タンパク質を生成するための適切な方法の例は、PCT公開番号WO2003011878及びWO2006014679並びに欧州特許番号EP1229125に記載されている。

10

【0273】

さらなる態様において、本発明は、「非フコシル化(non-fucosylated)」又は「アフコシル化(afucosylated)」抗体を提供する。非フコシル化抗体は、フコース残基のないFcの複合型N-グリカンのトリマンノシルコア構造を有している。Fc N-グリカンに由来するコアフコース残基を欠いているこれらの糖鎖工学抗体は、Fc RIIIIa結合能力の増強に起因してフコシル化同等物よりも強いADCCを示す可能性がある。

20

【0274】

本発明は、さらにまた、以下の段階を含む、本発明による抗体を産生する方法を提供する：(a)本明細書中に記載されている単離された核酸を含む発現ベクターを含む組換え宿主細胞(ここで、該組換え宿主細胞は、-1,6-フコシルトランスフェラーゼを含んでいない)を培養する段階；及び、(b)抗原結合タンパク質を回収する段階。組換え宿主細胞は、通常、-1,6-フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含んでいなくてよい(例えば、Pichia sp.などの酵母宿主細胞)、又は、-1,6-フコシルトランスフェラーゼを不活性化するように遺伝子操作されていてもよい。-1,6-フコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子を不活性化するように遺伝子操作された組換え宿主細胞が利用可能である。例えば、「BioWa, Inc.」(Princeton, N.J.)から入手可能なPOTELLIGENTTMテクノロジーシステムを参照されたい。このシステムでは、FUT8遺伝子の機能的コピーを欠いているCHOK1SV細胞が、機能的FUT8遺伝子を有する細胞内で産生された同一のモノクローナル抗体と比較して高められている増強された抗体依存性細胞毒性(ADCC)活性を有するモノクローナル抗体を産生する。POTELLIGENTTMテクノロジーシステムの態様は、米国特許番号US7214775及びUS6946292並びにPCT公開番号WO0061739及びWO0231240に記載されている。当業者は、他の適切なシステムも認識するであろう。

30

40

【0275】

エフェクター機能をさらに増強又は低減させるために、そのような修飾が単独で使用され得るのみではなく、互いに組み合わせて使用され得るということは、当業者には明らかである。

【0276】

グリコシル化が改変された抗体の産生

さらに別の実施形態において、本発明の抗体又は抗原結合フラグメント(例えば、抗体20E6及びそのヒト化バージョン)は、特定のグリコシル化パターンを含む。例えば、アフコシル化又はアグリコシル化された抗体又はフラグメントを作製することができる(即ち、該抗体は、それぞれ、フコース又はグリコシル化を欠いている)。抗体又はフラグメ

50

ントのグリコシル化パターンを改変して、例えば、L A P 抗原に対する抗体又はフラグメントの親和性又は結合力を増大させることができる。そのような修飾は、例えば、抗体又はフラグメント配列内の1以上のグリコシル化部位を変更することによって、達成することができる。例えば、1以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位の除去をもたらす、それによってその部位でのグリコシル化を排除する、1以上のアミノ酸置換を実施することができる。そのようなアグリコシル化は、抗原に対する抗体又はフラグメントの親和性又は結合力を増大させ得る。例えば、米国特許第5,714,350号及び第6,350,861号を参照されたい。

【0277】

本明細書中に開示されている抗体及び抗原結合フラグメント（例えば、抗体20E6及びそのヒト化バージョン、並びに、抗体28G11及びそのヒト化バージョン）は、下等真核生物宿主細胞において産生されるものをさらに含むことができ、特に、酵母及び糸状菌などの真菌宿主細胞は、哺乳動物様又はヒト様のグリコシル化パターンを有する糖タンパク質を産生するように遺伝子操作された（例えば、「Choi et al., (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 5022-5027」、「Hamilton et al., (2003) Science 301: 1244-1246」、「Hamilton et al., (2006) Science 313: 1441-1443」、「Nett et al., Yeast 28(3): 237-52 (2011)」、「Hamilton et al., Curr Opin Biotechnol. Oct; 18(5): 387-92 (2007)」を参照されたい）。現在使用されている哺乳動物細胞システムに対するこれらの遺伝子操作された宿主細胞の特定の有利点は、特定のN-グリカン構造が優勢である糖タンパク質の組成物を産生できるように、細胞内で産生される糖タンパク質のグリコシル化プロファイルを制御する能力である（例えば、米国特許第7,029,872号及び米国特許第7,449,308号を参照されたい）。これらの遺伝子操作された宿主細胞は、主に特定のN-グリカン構造を有する抗体を産生するために使用されてきた（例えば、「Li et al., (2006) Nat. Biotechnol. 24: 210-215」を参照されたい）。

【0278】

特定の実施形態において、本明細書中に開示されている抗体及びその抗原結合フラグメント（例えば、抗体20E6及びそのヒト化バージョン）は、フコシル化及び非フコシル化ハイブリッド及び複合N-グリカン（これは、二分岐種及び多アンテナ種（bisected and multiantennary species）を包含し、限定するものではないが、以下のものなどのN-グリカンを含む：GlcNAc(1-4)Man₃GlcNAc₂; Gal(1-4)GlcNAc(1-4)Man₃GlcNAc₂; NANA(1-4)Gal(1-4)GlcNAc(1-4)Man₃GlcNAc₂)を含む、下等真核生物宿主細胞において産生されるものをさらに含む。

【0279】

特定の実施形態において、本明細書中で提供されている抗体及びその抗原結合フラグメント（例えば、抗体20E6及びそのヒト化バージョン）は、GlcNAcMan₅GlcNAc₂; GalGlcNAcMan₅GlcNAc₂; 及び、NANAGalGlcNAcMan₅GlcNAc₂からなる群から選択される少なくとも1のハイブリッドN-グリカンを含む抗体又はフラグメントを含み得る。特定の態様において、該ハイブリッドN-グリカンは、当該組成物中の主要なN-グリカン種である。

【0280】

特定の実施形態において、本明細書中で提供されている抗体及びその抗原結合フラグメント（例えば、抗体20E6及びそのヒト化バージョン、並びに、抗体28G11及びそのヒト化バージョン）は、GlcNAcMan₃GlcNAc₂; GalGlcNAcMan₃GlcNAc₂; NANAGalGlcNAcMan₃GlcNAc₂; GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂; GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂; Gal₂

10

20

30

40

50

GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂; NANA Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂; 及び、NANA₂Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ からなる群から選択される少なくとも1の複合N-グリカンを含む。特定の態様において、該複合N-グリカンは、組成物中の主要なN-グリカン種である。さらなる態様において、該複合N-グリカンは、組成物中の複合N-グリカンの約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%又は100%を含む特定のN-グリカン種である。一実施形態において、本明細書中で提供されている抗体及びその抗原結合フラグメントは、複合N-グリカンを含んでおり、ここで、該複合N-グリカンの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%又は100%は、構造NANA₂Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂を含んでおり、ここで、そのような構造はアフコシル化されている。そのような構造は、例えば、操作されたピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 宿主細胞において産生させることができる。

10

【0281】

特定の実施形態において、N-グリカンはフコシル化されている。一般に、フコースは、N-グリカンの還元末端におけるGlcNAcとの1,3-結合、N-グリカンの還元末端におけるGlcNAcとの1,6-結合、N-グリカンの非還元末端におけるGalとの1,2-結合、N-グリカンの非還元末端におけるGlcNAcとの1,3-結合又はN-グリカンの非還元末端におけるGlcNAcとの1,4-結合の中に存在している。

20

【0282】

従って、上記糖タンパク質組成物の特定の態様において、該糖形態は、Man₅GlcNAc₂(Fuc)、GlcNAcMan₅GlcNAc₂(Fuc)、Man₃GlcNAc₂(Fuc)、GlcNAcMan₃GlcNAc₂(Fuc)、GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂(Fuc)、GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂(Fuc)、Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂(Fuc)、NANA Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂(Fuc) 及びNANA₂Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂(Fuc) からなる群から選択される糖形態を生成するために、1,3-結合又は1,6-結合フコースにあり; GlcNAc(Fuc)Man₅GlcNAc₂、GlcNAc(Fuc)Man₃GlcNAc₂、GlcNAc₂(Fuc₁₋₂)Man₃GlcNAc₂、GalGlcNAc₂(Fuc₁₋₂)Man₃GlcNAc₂、Gal₂GlcNAc₂(Fuc₁₋₂)Man₃GlcNAc₂、NANA Gal₂GlcNAc₂(Fuc₁₋₂)Man₃GlcNAc₂ 及びNANA₂Gal₂GlcNAc₂(Fuc₁₋₂)Man₃GlcNAc₂ からなる群から選択される糖形態を生成するために、1,3-結合又は1,4-結合フコースにあり; 又は、Gal(Fuc)GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Gal₂(Fuc₁₋₂)GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、NANA Gal₂(Fuc₁₋₂)GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 及びNANA₂Gal₂(Fuc₁₋₂)GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ からなる群から選択される糖形態を生成するために、1,2-結合フコースにある。

30

40

【0283】

さらなる態様において、抗体(例えば、ヒト化抗体)又はその抗原結合フラグメントは、高マンノースN-グリカン(これは、限定するものではないが、Man₈GlcNAc₂、Man₇GlcNAc₂、Man₆GlcNAc₂、Man₅GlcNAc₂、Man₄GlcNAc₂を包含する)又はMan₃GlcNAc₂N-グリカン構造で構成されるN-グリカンを含む。

【0284】

上記のさらなる態様において、複合N-グリカンは、さらに、フコシル化及び非フコシル化された二分岐種及び多アンテナ種(bisected and multiantennary species)をさらに含む。

50

【0285】

本明細書中で使用されている場合、「N-グリカン」及び「糖形態 (glycoform)」という用語は、交換可能に使用され、そして、N結合型オリゴ糖、例えば、アスパラギン-N-アセチルグルコアミン結合によってポリペプチドのアスパラギン残基に結合しているものを示している。N-結合型糖タンパク質には、タンパク質内のアスパラギン残基のアミド窒素に結合したN-アセチルグルコサミン残基が含まれている。糖タンパク質において見られる主な糖は、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 及びシアル酸 (例えば、N-アセチルノイラミン酸 (NANA)) である。糖基の処理は、小胞体の内腔で共翻訳的に起こり、N-結合型糖タンパク質に関するゴルジ装置で翻訳後継続する。N-グリカンは、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ («Man」はマンノースを示し；「Glc」はグルコースを示し；及び、「NAc」はN-アセチルを示し； GlcNAc はN-アセチルグルコサミンを示す)の共通する五糖コアを有している。通常、N-グリカン構造は、非還元端が左側に、還元端が右側に表示される。N-グリカンの還元末端は、タンパク質上のグリコシル化部位を構成するAsn残基に結合している末端である。N-グリカンは、「トリマンノースコア」、「五糖コア」又は「少量マンノースコア (paucimannose core)」とも称される $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ («Man3」)コア構造に付加された末梢糖 (例えば、 GlcNAc 、ガラクトース、フコース及びシアル酸)を含む分岐 (アンテナ)の数に関して異なっている。N-グリカンは、それらの分岐成分 (例えば、高マンノース、複合体又はハイブリッド)に従って分類される。20
「高マンノース」タイプのN-グリカンは、5以上のマンノース残基を有している。「複合体」タイプのN-グリカンは、典型的には、「トリマンノース」コアの1,3マンノースアームに結合した少なくとも1の GlcNAc 及び1,6マンノースアーム結合した少なくとも1の GlcNAc を有している。複合体N-グリカンは、さらに、シアル酸又は誘導體 (例えば、「NANA」又は「NeuAc」、ここで「Neu」はノイラミン酸を示し、及び、「Ac」はアセチルを示す)で場合により修飾されているガラクトース («Gal」)又はN-アセチルガラクトサミン («GalNAc」)残基も有することができる。複合体N-グリカンは、「二分する (bisecting)」 GlcNAc とコアフコース («Fuc」)を含む鎖内置換も有することができる。複合体N-グリカンは、30
「トリマンノースコア」上に複数のアンテナも有することができる (これは、多くの場合、「多アンテナグリカン」と称される)。「ハイブリッド」N-グリカンは、トリマンノースコアの1,3マンノースアームの末端に少なくとも1の GlcNAc を有し、及び、トリマンノースコアの1,6マンノースアームに0以上のマンノースを有している。さまざまなN-グリカンは、「糖形態 (glycoform)」とも称される。

【0286】

複合体N-グリカンに関して、用語「G-2」、「G-1」、「G0」、「G1」、「G2」、「A1」及び「A2」は、以下を意味する。「G-2」は、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ として特徴付けることができるN-グリカン構造を示す；用語「G-1」は、 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ として特徴付けることができるN-グリカン構造を示す；用語「G0」は、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ として特徴付けることができるN-グリカン構造を示す；用語「G1」は、 $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ として特徴付けることができるN-グリカン構造を示す；用語「G2」は、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ として特徴付けることができるN-グリカン構造を示す；用語「A1」は、 $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ として特徴付けることができるN-グリカン構造を示す；及び、用語「A2」は、 $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ として特徴付けることができるN-グリカン構造を示す。別途示されていない限り、用語「G-2」、「G-1」、「G0」、「G1」、「G2」、「A1」及び「A2」は、N-グリカンの還元末端で GlcNAc 残基に結合したフコースを欠いているN-グリカン種を示す。用語が「F」を含む場合、その「F」は、当該N-グリカン種がN-グリカンの還元末端で GlcNAc 残基上にフコース 50

残基を含むことを示す。例えば、G 0 F、G 1 F、G 2 F、A 1 F 及び A 2 F は、全て、N - グリカンが N - グリカンの還元末端で G l c N A c 残基に結合したフコース残基をさらに含むことを示している。酵母や糸状菌などの下等真核生物は、通常、フコースを生成する N - グリカンを生成しない。

【 0 2 8 7 】

多アンテナ N - グリカンに関して、用語「多アンテナ N - グリカン」は、N - グリカンの 1 , 6 アーム及び 1 , 3 アームの非還元末端を含むマンノース残基のそれぞれにおいて N - グリカン又は G l c N A c 残基の 1 , 6 アーム又は 1 , 3 アームの非還元末端を含むマンノース残基上に G l c N A c 残基をさらに含む N - グリカンを示している。従って、多アンテナ N - グリカンは、式 $G l c N A c (2 - 4) M a n _ 3 G l c N A c _ 2$ 、 $G a l (1 - 4) G l c N A c (2 - 4) M a n _ 3 G l c N A c _ 2$ 又は $N A N A (1 - 4) G a l (1 - 4) G l c N A c (2 - 4) M a n _ 3 G l c N A c _ 2$ によって特徴付けることができる。用語「1 - 4」は、1、2、3 又は 4 の残基を示している。二分岐 N - グリカンに関して、用語「二分岐 N - グリカン」は、G l c N A c 残基が N - グリカンの還元末端でマンノース残基に結合している N - グリカンを示している。二分岐 N - グリカンは、各マンノース残基がその非還元末端で G l c N A c 残基に結合している式 $G l c N A c _ 3 M a n _ 3 G l c N A c _ 2$ によって特徴付けることができる。対照的に、多アンテナ N - グリカンが $G l c N A c _ 3 M a n _ 3 G l c N A c _ 2$ として特徴付けられる場合、該式は、2 つの G l c N A c 残基が N - グリカンの 2 つのアームのうち 1 方の非還元末端でマンノース残基に結合し、1 つの G l c N A c 残基が N - グリカンのもう一方のアームの非還元末端でマンノース残基に結合していることを示す。

10

20

【 0 2 8 8 】

抗体の物理的特性

本明細書中に開示されている抗体及びその抗原結合フラグメント（例えば、抗体 2 0 E 6 及びそのヒト化バージョン）は、軽鎖又は重鎖免疫グロブリン可変領域のいずれかに 1 以上のグリコシル化部位をさらに含むことができる。そのようなグリコシル化部位は、改変された抗原結合に起因して、抗体若しくはフラグメントの免疫原性の増大又は抗体の p K の改変をもたらし得る（Marshall et al. (1972) Annu Rev Biochem 41: 673 - 702; Gala and Morrison (2004) J Immunol 172: 5489 - 94; Wallick et al (1988) J Exp Med 168: 1099 - 109; Spiro (2002) Glycobiology 12: 43R - 56R; Parekh et al (1985) Nature 316: 452 - 7; Mimura et al. (2000) Mol Immunol 37: 697 - 706)。グリコシル化は、N - X - S / T 配列を含むモチーフで起こることが知られている。

30

【 0 2 8 9 】

各抗体又は抗原結合フラグメント（例えば、2 0 E 6 又はそのヒト化バージョン）は、固有の等電点 (p I) を有しており、これは、一般に、6 ~ 9 . 5 の pH 範囲内にある。I g G 1 抗体に関する p I は、典型的には、7 ~ 9 . 5 の pH 範囲内にあり、及び、I g G 4 抗体に関する p I は、典型的には、6 ~ 8 の pH 範囲内にある。

40

【 0 2 9 0 】

各抗体又は抗原結合フラグメント（例えば、2 0 E 6 又はそのヒト化バージョン）は、特徴的な融解温度を有し、より高い融解温度は、インピボでの全体的な安定性がより高いことを示している（Krishnamurthy R and Manning MC (2002) Curr Pharm Biotechnol 3: 361 - 71)。一般に、T M I (最初の変性の温度) は、6 0 を超えるか、6 5 を超えるか、又は、7 0 を超える可能性がある。抗体又はフラグメントの融点は、示差走査熱量測定法 (Chen et al (2003) Pharm Res 20: 1952 - 60; Ghirlando et al (1999) Immunol Lett 68: 47 - 52) 又は円偏光二色性 (Murray et al. (2002) J. Chroma 50

50

t o g r S c i 4 0 : 3 4 3 - 9) を用いて測定することができる。さらなる実施形態において、急速に分解しない抗体及びその抗原結合フラグメント（例えば、抗体 2 0 E 6 及びそのヒト化バージョン）が選択される。抗体又はフラグメントの分解は、キャピラリー電気泳動（C E ）及びMALDI-MS（Alexander A J and Hughes DE（1995）Anal Chem 67:3626-32）を使用して測定することができる。

【0291】

さらなる実施形態において、凝集効果（これは、望ましくない免疫応答及び/又は改変された若しくは好ましくない薬物動態特性を誘発し得る）が最小である抗体（例えば、抗体 2 0 E 6 及びそのヒト化バージョン）及びその抗原結合フラグメントが選択される。一般に、抗体及びフラグメントでは、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下又は5%以下の凝集は許容される。凝集は、サイズ排除カラム（SEC）、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）及び光散乱などのいくつかの技術によって測定することができる。

10

【0292】

V. 多重特異性抗体

本明細書中で提供されている多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）は、本明細書中で記載されているLAP-TGF 1（例えば、ヒトLAP-TGF 1）上の特定のエピトープに対する少なくとも1の結合領域及び少なくとも1の別の結合領域（例えば、癌抗原）を含む。多重特異性抗体は、全長抗体又は抗体フラグメント（例えば、F(ab')₂抗体）として調製することができる。

20

【0293】

多重特異性抗体を作製する方法は、当技術分野でよく知られている（例えば、PCT公開番号WO05117973及びWO06091209を参照されたい）。例えば、全長多重特異性抗体の製造は、2つの対の免疫グロブリン重鎖-軽鎖の共発現に基づくことができ、ここで、該2つの鎖は異なる特異性を有する。組換え細胞培養物から多重特異性抗体フラグメントを直接作製及び単離するためのさまざまな技術も記載されている。例えば、多重特異性抗体は、ロイシンジッパーを使用して製造することができる。一本鎖Fv（sFv）二量体を使用して多重特異性抗体フラグメントを作成するための別の戦略も報告されている。

30

【0294】

適切な多重特異性分子プラットフォームの例としては、限定するものではないが、以下のものなどがある：Dual Targeting（DT）-Ig（GSK/Domantis）、Two-in-one Antibody（Genentech）、Cross-linked Mabs（Karmanos Cancer Center）、Fcab and mAb2（F-Star）、CovX-body（CovX/Pfizer）、Dual Variable Domain（DVD）-Ig（Abbott）、IgG-like Bispecific（ImClone/Eli Lilly）、Ts2Ab（MedImmune/AZ）and BsAb（Zymogenetics）、HERCULES（Biogen Idee）、TvAb（Roche）、ScFv/Fc Fusions、SCORPION（Emergent BioSolutions/Trubion、Zymogenetics/BMS）、Dual Affinity Retargeting Technology（Fc-DART）（MacroGenics）、Dual（ScFv）₂-Fab（National Research Center for Antibody Medicine - China）、F(ab)₂（Medarex/AMGEN）、Dual-Action or Bis-Fab（Genentech）、Dock-and-Lock（DNL）（ImmunoMedics）、Bivalent Bispecific（Biotecnol）、SEED（EMD Serono）、mAb2（F-star）、Fab-Fv（UCB-Celltech）、Bispe

40

50

cific T Cell Engager (BiTE) (Micromet、Tandem Diabody (Tandab) (Affimed)、Dual Affinity Retargeting Technology (DART) (MacroGenics)、Single-chain Diabody (Academic)、TCR-like Antibodies (AIT、ReceptorLogics)、COMBODY (Epigen Biotech)、dual targeting nanobodies (Ablynx)、及び、Fc-engineered IgG1 (Xencor)。

【0295】

特定の実施形態において、多重特異性抗体は、誘導体化された又は別の機能性分子（例えば、別のペプチド又はタンパク質（例えば、受容体に対する別の抗体又はリガンド））に連結したLAP-TGF β 1に結合して、LAP-TGF β 1及び非LAP標的分子に結合する多重特異性分子を生成する、一次抗体（又は、その結合部分）を含む。抗体は、誘導体化するか又は2以上の別の機能性分子に連結させて、3以上の異なる結合部位及び/又は標的分子に結合する多重特異性分子を生成させることができる。多重特異性分子を作成するために、本明細書中に開示されている抗体を、別の抗体、抗体フラグメント、ペプチド、受容体又は結合性模倣物（binding mimetic）などの1以上の別の結合性分子に機能的に（例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合性会合などによって）連結させることが可能であり、その結果、多重特異性分子が生じる。

【0296】

従って、LAP-TGF β 1（例えば、ヒトLAP-TGF β 1）上の特定のエピトープに対する少なくとも1の第1の結合特異性及び第2の標的に対する第2の結合特異性を含む多重特異性分子（例えば、二重特異性抗体及び二価抗体）が企図される。一部の実施形態では、第2の標的は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する第2の結合領域である。腫瘍関連抗原は、当技術分野でよく知られている。代表的な腫瘍関連抗原としては、限定するものではないが、AFP、ALK、BAGEタンパク質、 β -カテニン、brca-abl、BRCA1、BORIS、CA9、炭酸脱水酵素IX、カスパーゼ-8、CCR5、CD19、CD20、CD30、CDK4、CEA、サイクリン-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EpCAM、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGEタンパク質（例えば、GAGE-1、-2）、GD2、GD3、GloboH、グリピカン-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、LMP2、MAGEタンパク質（例えば、MAGE-1、-2、-3、-4、-6、及び、-12）、MART-1、メソテリン、ML-IAP、Muc1、Muc2、Muc3、Muc4、Muc5、Muc16（CA-125）、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ESO1、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA（FOLH1）、RAGEタンパク質、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、Steap-1、Steap-2、STn、サバイピン（survivin）、TAG-72、TGF β - β 、TMPRSS2、Tn、TRP-1、TRP-2、チロシナーゼ及びウロプラキン-3などを挙げるができる。

【0297】

一部の実施形態では、二重特異性抗体の第2の結合領域は、CD4、CD8、CD45、CD56、CD14、CD16、CD19、CD20、CD25、CD38、CD11b、CD22、CD30、CD39、CD114、CD23、CD73、CD163、CD206、CD203、CD200R、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、IDO、TIM-3、LAG-3、TIGIT、PVR、PVRL2、B7H3、B7H4、CSF-1R、VISTA、KIR、OX-40、GITR、4-1BB、CD40、CD40L、CD27/CD70、CD28、ICOS、CD3、CD56、NKG2DA、NKG2DB、NKG2DC、NKG2DD、NKG2DF、NKG2DH、C

10

20

30

40

50

D 9 4、N K P 4 6、N K P 3 0、C D 3 3、C D 7 3、C D 4 7、L I L R B 1、C D 9 1、c a l r e t i c u l i n、C D 1 2 2、G A R P、L R R C 3 3、L A P 2、L A P 3、T G F 1、T G F 2、T G F 3、F A P、カドヘリン 1 1 及びスタニオカルシン 1 に特異的に結合する。一部の実施形態では、第 2 の結合領域は、標的（例えば、T N F ファミリーメンバーアゴニスト、O X 4 0 リガンド、C D 1 3 7 リガンド、C D 1 3 7 アゴニスト、S T I N G アゴニスト、G I T R アゴニスト、I C O S アゴニスト、及び、C D 2 8 アゴニスト）に結合したとき、アゴニスト特性を示す。

【 0 2 9 8 】

一部の実施形態では、抗体は、第 1、第 2 及び第 3 の結合領域を含む三重特異性抗体であり、ここで、第 1 の結合領域は、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体の結合特異性（例えば、抗原結合領域）を含んでおり、並びに、第 2 の結合領域及び第 3 の結合領域は、2 つの異なる標的（又は、同じ標的上の異なるエピトープ）、例えば、上記で記載した標的に結合する。

10

【 0 2 9 9 】

一部の実施形態では、抗体は、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体及び受容体分子（即ち、T G F スーパーファミリーリガンド受容体（例えば、A c t R I I B 及びその変異体）又は V E G F R などの受容体トラップ構築物）を含む二価抗体である。

【 0 3 0 0 】

一実施形態において、多重特異性分子は、結合特異性として、少なくとも 1 の抗体又はその抗体フラグメント（これは、例えば、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v 又は一本鎖 F v をを包含する）を含む。抗体は、さらにまた、軽鎖若しくは重鎖二量体、又は、それらの任意の最小フラグメント（例えば、F v、又は、「L a d n e r ら、米国特許第 4 , 9 4 6 , 7 7 8 号」に記載されているような単鎖構築物）であることができる。

20

【 0 3 0 1 】

多重特異性分子は、当技術分野で知られている方法を使用して、構成要素の結合特異性（例えば、抗 F c R 及び抗 L A P 結合特異性）をコンジュゲートさせることによって調製することができる。例えば、多重特異性分子の各結合特異性は、別々に生成させ、次いで、互いにコンジュゲートさせることができる。結合特異性がタンパク質又はペプチドである場合、共有結合的にコンジュゲートさせるために、さまざまなカップリング剤又は架橋剤を使用することができる。架橋剤の例としては、プロテイン A、カルボジイミド、N - スクシンイミジル - S - アセチル - チオアセテート (S A T A)、5 , 5' - ジチオビス (2 - ニトロ安息香酸) (D T N B)、o - フェニレンジマレイミド (o P D M)、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (S P D P) 及びスルホスクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロハキサン - 1 - カルボキシレート (スルホ - S M C C) などがある。好ましいコンジュゲート剤 (c o n j u g a t i n g a g e n t) は、S A T A 及びスルホ - S M C C であり、両方とも、「P i e r c e C h e m i c a l C o . (R o c k f o r d , I L)」から入手可能である。

30

【 0 3 0 2 】

結合特異性が抗体である場合、それらは、2 つの重鎖の C 末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合を介してコンジュゲートさせることができる。特に好ましい実施形態では、コンジュゲーションの前に、奇数（好ましくは、1）のスルフヒドリル残基を含むようにヒンジ領域を修飾する。

40

【 0 3 0 3 】

あるいは、両方の結合特異性を同じベクター内にコード化し、そして、同じ宿主細胞内で発現及び構築させることができる。この方法は、多重特異性分子が m A b x m A b、m A b x F a b、F a b x F (a b')₂ 又はリガンド x F a b 融合タンパク質である場合に特に有用である。多重特異性分子は、1 つの一本鎖抗体及び結合決定基を含む一本鎖分子であることができるか、又は、2 つの結合決定基を含む一本鎖二重特異性分子であることができる。多重特異性分子は、少なくとも 2 つの一本鎖鎖分子を含むことができる。多重特異性分子を調製する方法は、例えば、米国特許第 5 , 2 6 0 , 2 0 3 号；米国特許第 5

50

、455,030号；米国特許第4,881,175号；米国特許第5,132,405号；米国特許第5,091,513号；米国特許第5,476,786号；米国特許第5,013,653号；米国特許第5,258,498号；及び、米国特許第5,482,858号に記載されている。

【0304】

多重特異性分子のそれらの特異的標的への結合は、例えば、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、FACS分析、バイオアッセイ（例えば、増殖阻害）又はウエスタンブロットアッセイによって、確認することができる。これらのアッセイのそれぞれは、一般に、目的の複合体に対して特異的な標識試薬（例えば、抗体）を使用することによって、特に目的のタンパク質-抗体複合体の存在を検出する。例えば、FcR-抗体複合体は、例えば、抗体-FcR複合体を認識し、そしてそれに特異的に結合する酵素結合抗体又は抗体フラグメントを使用して、検出することができる。あるいは、該複合体は、他のさまざまなイムノアッセイのいずれかを使用して検出することができる。例えば、抗体を放射性標識し、ラジオイムノアッセイ（RIA）で使用することができる。放射性同位元素は、
- カウンター若しくはシンチレーションカウンターを使用するなどの手段によって、又は、オートラジオグラフィーによって、検出することができる。

10

【0305】

VI. イムノコンジュゲート

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又はその抗原結合フラグメントを含むイムノコンジュゲートは、抗体を別の治療薬にコンジュゲートさせて、例えば、抗体-薬物コンジュゲート（ADC）を形成させることによって、形成させることができる。適切な薬剤としては、例えば、細胞毒性剤（例えば、化学療法剤）、毒素（例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素的に活性な毒素、又は、それらのフラグメント）及び/又は放射性同位体（即ち、放射性コンジュゲート）などがある。さらなる適切な薬剤としては、例えば、代謝拮抗剤、アルキル化剤、DNA副溝結合剤、DNAインターカレーター、DNA架橋剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、核外移行阻害剤（nuclear export inhibitor）、プロテアソーム阻害剤、トポイソメラーゼI又はII阻害剤、熱ショックタンパク質阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、抗生物質及び抗有糸分裂剤などがある。一部の実施形態では、免疫抑制細胞（例えば、制御性T細胞）に結合する本明細書中に記載されている抗LAP抗体又はその抗原結合フラグメント（例えば、細胞毒性剤にコンジュゲートしたもの）を有するADCを使用して、免疫抑制細胞を、例えば、腫瘍微小環境から、枯渇させることができる。

20

30

【0306】

使用することができる酵素的に活性な毒素及びそのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、エキソトキシンA鎖（緑膿菌由来）、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシンA鎖、
- サルシン、シナアブラギリ（*Aleurites fordii*）タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ（*Phytolacca americana*）タンパク質（PAPI、PAPII及びPAP-S）、ニガウリ（*momordica charantia*）阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ（*sapaonarria officinalis*）阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、ネオマイシン及びトリコテセン類などがある。細胞毒素又は細胞毒性剤のさらなる例としては、例えば、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン（colchicin）、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド類、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール及びピューロマイシン、並びに、それらの類似体又は相同体などがある。治療薬としては、限定するものではないが、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニ

40

50

ン、シタラピン、5 - フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオテパ(thioepa) クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)及びロムスチン(CCNU)、シクロトスファミド(cyclothosphamide)、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC及びシス - ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン類(例えば、ダウノルピシン(以前は、ダウノマイシン)及びドキシソルピシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(以前は、アクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシン及びアントラマイシン(AMC))及び抗有糸分裂剤(例えば、ビンクリスチン及びビンブラスチン)などがある。

【0307】

ADCにおいて、抗体及び治療薬は、好ましくは、ペプチジルリンカー、ジスルフィドリンカー又はヒドラゾンリンカーなどの切断可能なリンカーを介してコンジュゲートされる。さらに好ましくは、リンカーは、Val - Cit、Ala - Val、Val - Ala - Val、Lys - Lys、Pro - Val - Gly - Val - Val(配列番号214)、Ala - Asn - Val、Val - Leu - Lys、Ala - Ala - Asn、Cit - Cit、Val - Lys、Lys、Cit、Ser又はGluなどのペプチジルリンカーである。ADCは、米国特許第7,087,600号;米国特許第6,989,452号;及び、米国特許第7,129,261号;PCT公開番号WO02/096910;WO07/038658;WO07/051081;WO07/059404;WO08/083312;及び、WO08/103693;米国特許公開番号20060024317;米国特許公開番号20060004081;及び、米国特許公開番号20060247295(これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているようにして、調製することができる。

【0308】

放射性コンジュゲートされた抗LAP抗体を製造するために、さまざまな放射性核種を利用することができる。例としては、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y及び¹⁸⁶Reなどがある。

【0309】

イムノコンジュゲートは、さらにまた、所与の生物学的応答を改変するために使用することができ、そして、その薬物部分は、古典的な化学治療薬に限定されると解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質又はポリペプチド(例えば、リンホカイン、腫瘍壊死因子、IFN、成長因子)であることができる。

【0310】

イムノコンジュゲートは、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(例えば、アジプイミド酸ジメチルHCL)、活性エステル(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド(例えば、グルタルアルデヒド(glutarealdehyde))、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p - アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス - ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン2,6 - ジイソシアネート)及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5 - ジフルオロ - 2,4 - ジニトロベンゼン)などのさまざまな二官能性タンパク質カップリング剤を使用して作成することができる。炭素 - 14標識された1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドを抗体にコンジュゲートさせるための代表的なキレート剤である(例えば、PCT公開番号WO94/11026を参照されたい)。

【0311】

そのような治療部分を抗体に結合させるための技術はよく知られている。例えば、「Arnonet al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Th

10

20

30

40

50

erapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243 - 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)」、*「Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623 - 53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)」、**「Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475 - 506 (1985)」、**「"Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303 - 16 (Academic Press 1985)」*及び*「Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody - Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119 - 58 (1982)」*を参照されたい。

【0312】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、さらにまた、診断目的でも使用される。そのような抗体又は抗原結合フラグメントは、イムノコンジュゲートを形成させるために、適切な検出可能な薬剤にコンジュゲートさせることができる。診断目的の場合、適切な薬剤は、全身イメージング用の放射性同位元素並びにサンプル試験用の放射性同位元素、酵素、蛍光標識及び別の適切な抗体タグを包含する検出可能な標識である。

【0313】

検出可能な標識は、インビトロ診断の分野で現在使用されているさまざまなタイプのうちのいずれか、例えば、粒子状標識、同位体、発色団、蛍光マーカ、発光マーカ、金属標識（例えば、CYTOF、イメージングマスサイトメトリー用）、リン光マーカなど、並びに、所与の基質を検出可能なマーカに変換する酵素標識、及び、ポリメラーゼ連鎖反応などによる増幅後に明らかに示されるポリヌクレオチドタグなどであることができる。適切な酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼなどがある。例えば、標識は、酵素アルカリホスファターゼであることができ、これは、1,2ジオキセタン基質、例えば、アダマンチルメトキシホスホリルオキシフェニルジオキセタン(AMPPD)、二ナトリウム3-(4-(メトキシスピロ{1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ{3.3.1.1.1}デカン}-4-イル)フェニルホスフェート(CSPD)並びにCDP及びCDP-star(登録商標)又は当業者にはよく知られている別の発光基質、例えば、適切なランタニド系元素(例えば、テルビウム(III)及びユーロピウム(III))のキレートなどを変換した後、化学発光の存在又は形成を測定することによって検出される。検出手段は、選択したラベルによって決定される。ラベル又はその反応生成物の外観は、ラベルが粒子状で適切なレベルまで蓄積する場合は、裸眼を使用して、又は、分光光度計、ルミノメーター及び蛍光光度計などの機器(これらは、全て、標準実施法に従う)を使用して、得ることができる。

【0314】

好ましくは、コンジュゲーション法は、実質的に(又は、ほぼ)非免疫原性である結合、例えば、ペプチド結合(即ち、アミド結合)、スルフィド結合、(立体障害)結合、ジスルフィド結合、ヒドラゾン結合及びエーテル結合をもたらす。これらの結合は、ほぼ非免疫原性であり、そして、血清内で妥当な安定性を示す(例えば、*Senter, P.*

D., Curr. Opin. Chem. Biol. 13 (2009) 235-244」及びPCT公開番号WO2009/059278及びWO95/17886を参照されたい)。

【0315】

部分と抗体の生化学的性質に応じて、異なるコンジュゲーション戦略を採用することができる。部分が天然に存在するか又は50~500アミノ酸の組換え体である場合、タンパク質コンジュゲートの合成に関する化学について記載している教本の中に標準的な手順があり、これは、当業者が容易に従うことができる(例えば、「Hackenberger, C. P. R., and Schwarzer, D., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 47 (2008) 10030-10074」を参照されたい)。一実施形態において、マレインイミド部分と抗体又は部分内のシステイン残基との反応が使用される。これは、例えば抗体のFab又はFab'フラグメントが使用される場合、特に適しているカップリング化学である。あるいは、一実施形態において、抗体又は部分のC末端へのカップリングが行なわれる。タンパク質のC末端修飾、例えば、FabフラグメントのC末端修飾は、記載されているように実施することができる(Sunbul, M. and Yin, J., Org. Biomol. Chem. 7 (2009) 3361-3371)。

10

【0316】

一般に、部位特異的反応及び共有結合カップリングは、天然アミノ酸を、存在している別の官能基の反応性に直交性である反応性を有するアミノ酸に変換することに基づいている。例えば、稀な配列構成内の特定のシステインは、アルデヒド中で酵素的に変換され得る(「Frese, M. A., and Dierks, T., ChemBioChem. 10 (2009) 425-427」を参照されたい)。さらにまた、所与の配列構成において特定の酵素の天然アミノ酸との特定の酵素反応性を利用することにより、所望のアミノ酸修飾を得ることも可能である(例えば、「Taki, M. et al., Prot. Eng. Des. Sel. 17 (2004) 119-126」、「Gautier, A. et al. Chem. Biol. 15 (2008) 128-136」を参照されたい;及び、C-N結合のプロテアーゼが触媒する形成を「Bordusa, F., Highlights in Bioorganic Chemistry (2004) 389-403」によって使用する)。部位特異的反応及び共有結合カップリングは、末端アミノ酸の適切な修飾試薬との選択的反応によっても達成することができる。N末端システインとベンゾニトリルとの反応性(「Ren, H. et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 48 (2009) 9658-9662」を参照されたい)を使用して、部位特異的共有結合カップリングを達成することができる。天然の化学的ライゲーションは、さらにまた、C末端システイン残基に依存し得る(Taylor, E. Vogel; Imperiali, B, Nucleic Acids and Molecular Biology (2009), 22 (Protein Engineering), 65-96)。

20

30

【0317】

部分は、さらにまた、合成ペプチド又はペプチド模倣物であることもできる。ポリペプチドが化学的に合成される場合、直交性化学反応性を有するアミノ酸をそのような合成中に組み込むことができる(例えば、「de Graaf, A. J. et al., Bioconjug. Chem. 20 (2009) 1281-1295」を参照されたい)。多種多様な直交性官能基が危機に瀕しており(at stake)、そして、合成ペプチドに導入できるため、そのようなペプチドのリンカーへのコンジュゲーションは、標準的な化学である。

40

【0318】

一部の実施形態では、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントに結合した部分は、検出可能な部分、結合部分、標識部分及び生物学的に活性な部分からなる群から選択される。

50

V I I . アッセイ

本明細書中に開示されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、当技術分野で知られているさまざまなアッセイを使用して、所望の特性（例えば、本明細書中に記載される特性）について試験することができる。

【0319】

一実施形態において、抗体又は抗原結合フラグメントを、LAP-TGF β 1（例えば、ヒトLAP-TGF β 1）への特異的結合について試験する。さまざまな抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントの結合親和性、交差反応性及び結合反応速度を分析するための方法としては、当技術分野で知られている標準的なアッセイ、例えば、実施例に記載されているような、BiacoreTM2000 SPR機器（Biacore AB, Uppsala, Sweden）を使用するBiacoreTM表面プラズモン共鳴（SPR）分析又はバイオレイヤー干渉法（例えば、ForteBio assay）などがある。一部の実施形態では、結合アッセイで使用されるLAPは、TGF β 1と複合体を形成する。一部の実施形態では、結合アッセイで使用されるLAPは、TGF β 1と複合体を形成しない。一部の実施形態では、結合アッセイで使用されるLAPは、TGF β 1及びGARP若しくはGARPのフラグメント又はLRRC33若しくはLRRC33のフラグメントと、複合体を形成する。一部の実施形態では、結合アッセイで使用されるLAPは、TGF β 1及びLTBP（例えば、LTBP1、LTBP3又はLTBP4）又はLTBPのフラグメントと複合体を形成する。

【0320】

一実施形態において、該抗体又は抗原結合フラグメントを、LAP-TGF β 1でトランスフェクトされた細胞に結合する能力について試験する。一部の実施形態では、細胞は、さらに、GARP又はLRRC33でトランスフェクトされている。

【0321】

一実施形態において、該抗体又は抗原結合フラグメントを、LAPでコーティングされたビーズの表面に結合する能力についてスクリーニングする。

【0322】

一実施形態において、該抗体又は抗原結合フラグメントを、シンデカン-4などのヘパリン硫酸糖タンパク質を発現する細胞上のLAPに結合する能力についてスクリーニングする。例えば、ヘパリン硫酸糖タンパク質を発現する細胞を、LAPと一緒に、又は、LTBPと複合体を形成したLAP（例えば、LTBP1、LTBP3又はLTBP4）と一緒にインキュベートし、そして、抗体を、フローサイトメトリーによって結合についてスクリーニングする。

【0323】

一実施形態において、該抗体又は抗原結合フラグメントを、TGF β 1に結合する能力又はTGF β 1に影響を与える能力について試験する。一実施形態において、抗体を、TGF β 2に結合する能力又はTGF β 2に影響を与える能力についてスクリーニングする。一実施形態において、抗体を、TGF β 3に結合する能力又はTGF β 3に影響を与える能力について試験する。

【0324】

別の実施形態において、該抗体又は抗原結合フラグメントを、TGF β 活性化に対するそれらの効果（例えば、阻害、刺激、又は、効果なし）について試験する。一部の実施形態では、TGF β 1活性化は、インテグリン（これは、限定するものではないが、 α 6、 α 8、 α 3又は α 1を包含する）の結合によって媒介される。一部の実施形態では、TGF β 1活性化は、マトリックスメタロプロテアーゼ（これは、限定するものではないが、MMP2及びMMP9を包含する）によって媒介される。一部の実施形態では、TGF β 1活性化は、トロンボスポンジンによって媒介される。一部の実施形態では、TGF β 1活性化は、血清プロテアーゼによって媒介される。一部の実施形態では、TGF β 1の活性化は、熱によって、剪断力によって、pHのシフトによって、又は、電離放射線によって、媒介される。一部の実施形態では、TGF β 1活性化は、活性酸素種

10

20

30

40

50

(ROS)によって媒介される。活性化アッセイにおけるLAPの供給源は、トランスフェクトされた細胞系統の表面のLAP、LAPを内因的に又は特定の刺激に応答して発現する細胞集団の表面のLAP、細胞外マトリックスに結合したLAP、TGF-1と複合体を形成した若しくはTGF-1を含んでいない又はTGF-1及びアンカータンパク質(例えば、GARP、LRRC33、LTBP1、LTBP3又はLTBP4)と複合体を形成した溶液中のLAP(例えば、組換えLAP)であることができる。LAP-TGF-1は、「R&D Systems」から購入することができるか、又は、細胞上清から分離することができる。抗体がTGF-1活性化に及ぼす影響は、例えば、異なる条件下(例えば、抗体を使用する又は使用しない)で活性TGF-1のレベルを測定するELISA(例えば、実施例4に記載されている)を使用して、確認することができる。抗体がLAP-TGF-1活性化に及ぼす影響は、さらにまた、TGF受容体を発現し且つ成熟TGFに応答するレポーター細胞系統を使用して確認することもできる。

10

【0325】

別の実施形態において、該抗体又は抗原結合フラグメントを、細胞外マトリックス内のLAPに結合する能力について試験する。抗体が細胞外マトリックス内のLAPに結合するかどうかを確認するための適切な方法には、インビトロアッセイが包含され、該インビトロアッセイにおいては、細胞(例えば、LAP-TGFでトランスフェクトされたP3U1細胞)を培養して培養プレート上にECMを置き、その後除去し、そして、標識された抗体を培養プレート表面に残されたLAP及びECMに結合するそれらの能力について試験する(例えば、実施例5に記載されている)。同様のアッセイは、LAP-TGF及び細胞外マトリックス成分を分泌することが知られている線維芽細胞系統又は他の細胞を使用して実施することができる。一部の実施形態では、抗LAP抗体がECMに結合するか又は結合しないかは、ELISAによって確認することができ、ここで、ECMは、市販の抗体を使用して潜在的TGFを発現することが示された。

20

【0326】

別の実施形態において、該抗体又は抗原結合フラグメントを、特定の細胞型、例えば、免疫細胞(例えば、免疫抑制細胞、白血球)又は血小板に結合するそれらの能力について試験する。特定の白血球集団(例えば、Treg、マクロファージ、MDS、GARP陰性細胞)への抗体又は抗原結合フラグメントの結合は、例えば、実施例7に記載されているように、フローサイトメトリーを使用して確認することができる。

30

【0327】

抗体又は抗原結合フラグメントは、さらにまた、当技術分野で認められた方法(例えば、3H-チミジン取り込み、増殖マーカーを伴う免疫組織化学、動物癌モデル)を使用して、腫瘍細胞などの細胞の増殖又は生存(インビボ又はインビトロのいずれか)を阻害するそれらの能力についても試験することができる。

【0328】

抗体又は抗原結合フラグメントは、さらにまた、CT26結腸直腸腫瘍モデル、EMT6乳癌モデル及び4T1乳癌腫瘍転移モデルなどの当技術分野でよく知られている同系腫瘍モデルを使用して、インビボでのそれらの抗腫瘍活性についても試験することができる(例えば、単独療法又は併用療法として)。抗LAP抗体は、さらにまた、抗TGF抗体によって阻害されることが知られている腫瘍異種移植モデル(例えば、Detroit562腫瘍異種移植モデル)で試験することもできる。これらのモデルを抗LAP抗体で処理するための代表的な方法は、例えば、実施例12-16に記載されている。

40

【0329】

抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントが特定の特性(例えば、結合、活性化の阻害、活性化)を示すかどうかを確認するための代表的な基準を表1Bに示す。

50

【表 2】

表 1 B.

| 抗体の特性 | 陽性 |
|--|---|
| E L I S A によって評価された場合、細胞又はE C Mに結合する | 陰性対照の平均を上回る 2 S D |
| フローサイトメトリーによって評価された場合、細胞型に結合する | 陰性対照の平均（均一な細胞系統又は細胞集団のM F I）を上回る 2 S D |
| 結合アッセイ（例えば、バイオレイヤー干渉法）によって、T G F β に結合する | 陰性対照と比較して親和性の差は 1 0 0 倍以上 |
| T G F β 1 活性化の阻害 | 8 u g / m L の抗体濃度で試験した場合、陰性対照と比較してインビトロ培養中の成熟 T G F β 1 レベルが 5 0 % 以上低減 |
| T G F β 1 の活性化 | 8 u g / m L の抗体濃度で試験した場合、陰性対照と比較してインビトロ培養中の成熟 T G F β 1 レベルが 2 倍以上増加 |

10

20

【 0 3 3 0 】

V I I I . 組成物

本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントを含む組成物（例えば、医薬組成物）、同じものを含むイムノコンジュゲート又は同じものを含む二重特異性抗体及び担体（例えば、薬学的に許容される担体）も本明細書において提供されている。そのような組成物は、さまざまな治療用途に有用である。

【 0 3 3 1 】

一部の実施形態では、本明細書中に開示されている医薬組成物は、さまざまな疾患（例えば、癌、線維症、自己免疫疾患）の治療に使用される他の化合物、薬物及び/又は薬剤を含むことができる。そのような化合物、薬物及び/又は薬剤には、例えば、抗癌剤、化学療法剤、免疫抑制剤、免疫刺激剤、免疫チェックポイント阻害剤及び/又は抗炎症剤が含まれ得る。本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントと一緒に又は別々に製剤することができる代表的な化合物、薬物及び薬剤については、次のセクション（即ち、セクション I X ; 使用及び方法）に記載されている。

30

【 0 3 3 2 】

本明細書中で使用されている場合、「薬学的に許容される担体」には、生理学的に適合性のある全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などが含まれる。好ましくは、担体は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、非経口投与、脊髄投与又は表皮投与（例えば、注射又は注入による）に適している。投与経路に応じて、活性化合物、即ち、抗体、イムノコンジュゲート又は二重特異性分子を、化合物を不活性化する可能性のある酸及び他の自然条件の作用から化合物を保護するために材料物質でコーティングすることができる。

40

【 0 3 3 3 】

本明細書中に記載されている医薬化合物は、1 以上の薬学的に許容される塩を含み得る。「薬学的に許容される塩」は、親化合物の所望の生物学的活性を保持し、望ましくない毒物学的効果を与えない塩である（例えば、「B e r g e , S . M . , e t a l . (1 9 7 7) J . P h a r m . S c i . 6 6 : 1 - 1 9」を参照されたい）。そのような塩の例には、酸付加塩及び塩基付加塩が含まれる。酸付加塩としては、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などの無毒性無機酸から誘導

50

されたもの、並びに、脂肪族モノ及びジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族及び芳香族スルホン酸などの無毒性有機酸から誘導されたものなどがある。塩基付加塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどのアルカリ土類金属から誘導されたもの、並びに、N、N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどの無毒性有機アミンから誘導されたものなどがある。

【0334】

本明細書中に記載されている医薬組成物は、さらにまた、薬学的に許容される抗酸化剤も含むことができる。薬学的に許容される抗酸化剤の例としては、以下のものを挙げることができる：(1)水溶性抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸、システイン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；(2)油溶性抗酸化剤、例えば、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロールなど；(3)金属キレート剤、例えば、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸など。

10

【0335】

本明細書中に記載されている医薬組成物において使用することが可能な水性及び非水性の適切な担体の例としては、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)及びそれらの適切な混合物、植物油、例えば、オリーブ油、及び、注射可能な有機エステル、例えば、オレイン酸エチルなどがある。これらの組成物は、さらにまた、防腐剤、湿潤剤、乳化剤及び分散剤などの補助剤を含むことができる。微生物の存在の防止は、上記の滅菌手順並びにさまざまな抗細菌剤及び抗真菌剤(例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸など)を含ませることの両方によって、確実にされ得る。糖、塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物に含ませることも望ましい場合がある。さらに、注射可能な医薬形態の長期にわたる吸収は、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなどの吸収を遅延させる作用物質を含ませることによってもたらされ得る。

20

【0336】

薬学的に許容される担体には、無菌の注射可能な溶液又は分散液を必要に応じて調製するため無菌の水溶液又は分散液及び無菌の粉末が包含される。医薬活性物質のためのそのような媒体及び作用物質の使用は、当技術分野で知られている。従来の媒体又は作用物質が活性化化合物と適合しない場合を除いて、本明細書中に記載されている医薬組成物におけるそれらの使用が企図されている。医薬組成物は、防腐剤を含み得るか、又は、防腐剤を含まない場合がある。補足的な活性化化合物を組成物に組み込むことができる。

30

【0337】

治療用組成物は、典型的には、製造及び貯蔵の条件下で無菌且つ安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、又は、高薬物濃度に適した別の規則構造として、製剤することができる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコールなど)及びそれらの適切な混合物を含む溶媒又は分散媒体であることができる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散液の場合には必要とされる粒子サイズを維持することによって、及び、界面活性剤を使用することによって、維持することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、多価アルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、又は、塩化ナトリウムを組成物に含ませることが好ましい。注射可能な組成物の長期にわたる吸収は、吸収を遅らせる作用物質、例えば、モノステアリン酸塩及びゼラチンなどを組成物に含ませることによってもたらすことができる。

40

【0338】

無菌の注射可能な溶液は、必要に応じて、上記で列挙した成分の1種類又は組み合わせと一緒に、必要とされる量の活性化化合物を適切な溶媒に混和させ、続いて、滅菌精密濾過することによって、調製することができる。一般に、分散液は、基本的な分散媒及び本明細

50

書中に列挙されているものから選択される必要な他の成分を含む滅菌ビヒクルに活性化化合物を混和させることによって、調製する。無菌の注射可能な溶液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、有効成分と付加的な所望の成分の予め滅菌濾過された溶液からそれらの粉末を生成する真空乾燥及び凍結乾燥 (freeze - drying) (凍結乾燥 (lyophilization)) である。

【 0 3 3 9 】

担体材料と組み合わせて単一の投与形態を生成することができる有効成分の量は、治療される対象者及び特定の投与方法に応じてさまざまである。担体材料と組み合わせて単一の投与形態を生成することができる有効成分の量は、一般に、治療効果を生じる組成物の量である。一般に、100%のうち、この量は、薬学的に許容される担体と組み合わされた、約0.01%~約99%の範囲の有効成分、好ましくは、約0.1%~約70%の範囲の有効成分、最も好ましくは、約1%~約30%の範囲の有効成分である。

10

【 0 3 4 0 】

投与計画は、最適な所望の応答 (例えば、治療応答) を提供するように調節される。例えば、単一のボラスを投与することが可能であり、いくつかの分割された用量を経時的に投与することが可能であり、又は、治療状況の緊急性によって示されるように用量を比例して減少又は増加させることができる。投与の容易さ及び投薬量の均一性のために、非経口組成物を単位投与形態に製剤することは特に有利である。本明細書中で使用されている単位投与形態は、治療される対象者のための単位投与量として適した物理的に別個の単位を示している；各単位は、必要とされる医薬担体と協力して所望の治療効果を生み出すように計算された所定量の活性化化合物を含む。本明細書中に記載されている単位投与形態の仕様は、(a) 活性化化合物の固有の特性及び達成されるべき特定の治療効果、並びに、(b) 個人における感受性の治療のためのそのような活性化化合物を配合する技術に固有の制限によって決定され、そして、それらに直接依存する。

20

【 0 3 4 1 】

抗体又は抗原結合フラグメントを投与する場合、その投与量は、宿主の体重1kg当たり、約0.0001~100mg、より一般的には、0.01~5又は10mgの範囲である。代表的な治療レジームは、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、1ヶ月に1回、3ヶ月に1回又は3~6ヶ月に1回の投与を伴う。

【 0 3 4 2 】

抗体は、徐放性製剤として投与ことができ、その場合、より少ない頻度の投与が必要とされる。投与量と頻度は、患者体内における抗体の半減期に応じて異なる。一般に、ヒト抗体は最も長い半減期を示し、次に、ヒト化抗体、キメラ抗体及び非ヒト抗体が続く。投与量及び投与頻度は、治療が予防的であるか又は治療的であるかによって異なり得る。予防的用途では、比較的低い投与量が長期間にわたって比較的まれな間隔で投与される。一部の患者は、一生治療を受け続ける。治療用途では、疾患の進行が低減又は終了するまで、好ましくは、患者が疾患の症状の部分的又は完全な寛解を示すまで、比較的短い間隔での比較的高い投与量の場合により必要とされる。その後、患者には、予防レジームを投与することができる。

30

【 0 3 4 3 】

本明細書中に記載されている医薬組成物の中の有効成分の実際の投与量レベルは、患者に対して毒性を示すことなく、特定の患者、組成物及び投与方法に対して所望の治療応答を達成するのに有効な有効成分の量が得られるように、変えることができる。選択される投与量レベルは、使用する本明細書中に記載されている特定の組成物又はそのエステル、塩若しくはアミドの活性、投与経路、投与時間、使用する特定の化合物の排出速度、治療期間、使用する特定の組成物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物及び/若しくは材料、治療されている患者の年齢、性別、体重、状態、一般的な健康及び以前の病歴並びに医療分野でよく知られている同様の要因を包含するさまざまな薬物動態学的要因に依存する。

40

【 0 3 4 4 】

50

さまざまな実施形態における抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントの治療上有効な投与量は、疾患症状の重症度の低減、疾患無症状期間の頻度及び期間の増大又は疾患の苦痛に起因する機能障害若しくは能力障害の予防をもたらす。癌に関連して、治療上有効な用量は、好ましくは、生存者の増加及び/又は癌に関連する身体的症状のさらなる悪化の予防をもたらす。治療上有効な用量は、例えば疾患の初期又は予備的な兆候が存在する場合に望まれ得る、癌の発症を予防又は遅延させることができる。

【0345】

本明細書中に記載されている組成物は、当技術分野で知られているさまざまな方法のうちの1以上を使用して、1以上の投与経路を介して投与することができる。当業者には理解されるように、投与の経路及び/又は方法は、所望の結果に応じて変わる。本明細書中に記載されている抗体に関する好ましい投与経路としては、例えば注射又は注入による、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄又は他の非経口投与経路などがある。本明細書中で使用されている「非経口投与」という句は、通常は注射による、経腸及び局所投与以外の投与方法を意味し、そして、限定するものではないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外及び胸骨内の注射及び注入を包含する。

10

【0346】

あるいは、本明細書中に記載されている抗体又は抗原結合フラグメントは、局所、表皮又は粘膜の投与経路（例えば、鼻腔内、経口、経膈、経直腸、舌下又は局所）などの非非経口経路を介して投与することができる。

20

【0347】

活性化化合物は、制御放出製剤（これは、インプラント、経皮パッチ及びマイクロカプセル化送達システムを包含する）など、急速放出から化合物を保護する担体を用いて調製することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル及びポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。そのような製剤を調製するための多くの方法は、特許を取得しているか、又は、当業者に一般に知られている。例えば、「Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978」を参照されたい。

30

【0348】

治療用組成物は、当技術分野で知られている医療機器を用いて投与することができる。

【0349】

例えば、好ましい実施形態において、本明細書中に記載されている治療用組成物は、米国特許第5,399,163号；第5,383,851号；第5,312,335号；第5,064,413号；第4,941,880号；第4,790,824号；又は、第4,596,556号に開示されている機器などの無針皮下注射装置を用いて投与することができる。本明細書中に記載されている抗LAP抗体と一緒に使用するための周知のインプラント及びモジュールの例としては、以下のものを挙げるることができる：米国特許第4,487,603号、これは、制御された速度で薬剤を分配するための埋め込み型マイクロインフュージョンポンプを開示している；米国特許第4,486,194号、これは、皮膚を通して薬剤を投与するための治療装置を開示している；米国特許第4,447,233号、これは、正確な注入速度で薬物を送達するための薬物注入ポンプを開示している；米国特許第4,447,224号、これは、連続薬物送達のための可変流量埋め込み型注入装置を開示している；米国特許第4,439,196号、これは、マルチチャンパーコンパートメントを有する浸透圧薬物送達システムを開示している；及び、米国特許第4,475,196号、これは、浸透圧薬物送達システムを開示している。これらの特許は、参照により本明細書に組み込まれる。他の多くのそのようなインプラント、送達システム及びモジュールは、当業者には知られている。

40

【0350】

50

特定の実施形態において、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、インビボでの適切な分布を確実にするように製剤することができる。例えば、血液脳関門(BBB)は、親水性の高い多くの化合物を排除する。本明細書中に記載されている治療用化合物が(必要に応じて、例えば、脳腫瘍に関して)BBBを通過することを確実にするために、それらは、例えば、リポソームに製剤することができる。リポソームの製造方法については、例えば、米国特許第4,522,811号;第5,374,548号;及び、第5,399,331号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞又は器官に選択的に輸送される1以上の部分を含むことができ、従って、標的化された薬物送達を増強することができる(例えば、「V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685」を参照されたい)。代表的な標的化部分としては、以下のものなどがある:葉酸又はビオチン(例えば、Lowらの米国特許第5,416,016号を参照されたい);マンノシド類(Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038);抗体(P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180);界面活性剤タンパク質A受容体(Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134);p120(Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090);さらに、「K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123」、「J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273」も参照されたい。

【0351】

IX. 使用及び方法

本明細書中に記載されている抗体、抗体組成物及び方法は、インビトロ及びインビボでの多くの有用性を有する。

【0352】

例えば、本明細書中で提供されているのは、癌を治療する方法であり、ここで、該方法は、対象者が治療されるように、例えば、癌性腫瘍の増殖が阻害若しくは低減されるように及び/又は腫瘍が退縮するように及び/又は長期生存が達成されるように、癌の治療を必要とする対象者に本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントを投与することを含む。

【0353】

一実施形態において、本明細書中で提供されているのは、癌を治療する方法であり、ここで、該方法は、癌の治療を必要とする対象者に、有効量(例えば、治療有効量)の本明細書中に記載されている抗LAP抗体(又は、該抗体を含む二重特異性抗体若しくはイムノコンジュゲート)を投与することを含む。一部の実施形態では、対象者は、さらなる治療薬を投与される。一部の実施形態では、該さらなる治療薬は、以下のものからなる群から選択される:抗PD-1抗体又はその抗原結合フラグメント、抗LAG3抗体又はその抗原結合部分、抗VISTA抗体又はその抗原結合フラグメント、抗BTLA抗体又はその抗原結合フラグメント、抗TIM3抗体又はその抗原結合フラグメント、抗CTLA4抗体又はその抗原結合フラグメント、抗HVEH抗体又はその抗原結合フラグメント、抗CD27抗体又はその抗原結合フラグメント、抗CD137抗体又はその抗原結合フラグメント、抗OX40抗体又はその抗原結合フラグメント、抗CD28抗体又はその抗原結合フラグメント、抗PDL1抗体又はその抗原結合フラグメント、抗PDL2抗体又はその抗原結合フラグメント、抗GITR抗体又はその抗原結合フラグメント、抗ICOS抗体又はその抗原結合フラグメント、抗SIRP抗体又はその抗原結合フラグメント、抗ILT2抗体又はその抗原結合フラグメント、抗ILT3抗体又はその抗原結合フラグメント、抗ILT4抗体又はその抗原結合フラグメント、抗ILT5抗体又はその抗原結合フラグメント、及び、抗4-1BB抗体又はその抗原結合フラグメント。一部の実施形態で

は、抗PD1抗体又はその抗原結合フラグメントは、ペンブロリズマブ又はその抗原結合フラグメントである。ペンブロリズマブの重鎖及び軽鎖配列は、それぞれ配列番号240及び241に記載されている。一部の実施形態では、さらなる治療薬は、ニボルマブである。さまざまな実施形態において、ニボルマブの重鎖及び軽鎖配列は、配列番号246及び247をに記載されている。

【0354】

一部の実施形態では、癌は、異常なTGF活性によって特徴付けられる。一部の実施形態では、癌は、線維症に関連している。一部の実施形態では、癌は、CD4+制御性T細胞の浸潤に関連している。一部の実施形態では、癌は、CD8+制御性T細胞の浸潤に関連している。一部の実施形態では、癌は、制御性B細胞の浸潤に関連している。一部の実施形態では、癌は、骨髄由来のサブレッサー細胞の浸潤に関連している。一部の実施形態では、癌は、腫瘍関連マクロファージの浸潤に関連している。一部の実施形態では、癌は、自然リンパ球の浸潤に関連している。一部の実施形態では、癌は、癌関連線維芽細胞の浸潤に関連している。一部の実施形態では、癌は、上記細胞型における放射線関連の増加に関連している。

10

【0355】

一部の実施形態では、癌は、TGF1活性化の徴候の増大に関連している。一部の実施形態では、癌は、EMT又はEMTの徴候に関連している。一部の実施形態では、癌は、EMT又はEMTの徴候及び免疫浸潤を示す腫瘍に関連している。一部の実施形態では、癌は、免疫排除の腫瘍プロファイルに関連している。一部の実施形態では、癌は、LAP発現の増加に関連している。一部の実施形態では、癌は、GARP発現の増加に関連している。一部の実施形態では、癌は、LRC33発現の増加に関連している。

20

【0356】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体を使用して増殖を阻害することができる癌としては、限定するものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫及び白血病などがある。そのような癌のより具体的な例としては、限定するものではないが、以下のものなどがある：基底細胞癌、胆道癌；膀胱癌；骨肉腫；脳及びCNS癌；乳癌（例えば、エストロゲン受容体陽性乳癌、HER2陽性乳癌；トリプルネガティブ乳癌）；腹膜の癌；子宮頸癌；胆管癌；絨毛癌；結腸及び直腸癌；結合組織癌；消化器系の癌；子宮内膜癌；食道癌；眼の癌；頭頸部癌；胃癌（これは、胃腸癌を包含する）；膠芽腫；肝癌（例えば、肝細胞癌（hepatocellular carcinoma）；肝細胞癌（hepatoma））；上皮内腫瘍；腎臓癌又は腎癌；喉頭癌；白血病；肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌及び肺の扁平上皮癌）；ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫を包含するリンパ腫；黒色腫；骨髄腫；神経芽細胞腫；口腔癌（例えば、唇、舌、口及び咽頭）；卵巣癌；膵臓癌；前立腺癌；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸癌；呼吸器系の癌；唾液腺癌；肉腫；皮膚癌；扁平上皮癌；奇形腫；精巣癌；甲状腺癌；子宮癌又は子宮内膜癌；泌尿器系の癌；外陰癌；並びに、他の癌腫及び肉腫；B細胞リンパ腫（これは、以下のものを包含する：低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度/濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切れ込み細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及び、ワルデンストレームマクログロブリン血症）；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；ヘアリー細胞白血病；慢性骨髄芽球白血病；及び、移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、並びに、母斑症、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、原始起源の腫瘍及びメイグス症候群に関連する異常な血管増殖。

30

40

【0357】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントを使用して治療することができる追加の癌としては、転移性膵臓癌、膵臓の転移性腺癌、胃癌、線維性癌、神経膠腫、悪性神経膠腫、びまん性内因性橋神経膠腫、再発性小児脳腫瘍腎細胞癌、明細胞転移性腎細胞癌、転移性去勢抵抗性前立腺癌、ステージIV前立腺癌、転移性黒色腫、悪

50

性黒色腫、皮膚の再発性黒色腫、黒色腫脳転移、頭頸部の悪性黒色腫、扁平上皮細胞非小細胞肺癌、転移性乳癌、濾胞性リンパ腫、進行性B細胞NHL、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)を含むHL、多発性黒色腫、慢性骨髄性白血病、寛解期の成人急性骨髄性白血病、Inv(16)(p13.1q22)を伴う成人急性骨髄性白血病、CBFB-MYH11、t(16:16)(p13.1:q22)を伴う成人急性骨髄性白血病、CBFB-MYH11、t(8:21)(d22:q22)を伴う成人急性骨髄性白血病、RUNX1-RUNX1T1、t(9:11)(p22:q23)を伴う成人急性骨髄性白血病、MLLT3-MLL、t(11:17)(q22:q12)を伴う成人急性前骨髄球性白血病、PML-RARA、アルキル化剤関連急性骨髄性白血病、リヒター症候群、成人神経膠芽腫、成人神経膠肉腫、再発性神経膠芽腫、再発性小児横紋筋肉腫、再発性ユーイング肉腫/末梢原始神経外胚葉性腫瘍、再発性神経芽細胞腫、再発性骨肉腫、結腸直腸癌、MSI陽性結腸直腸癌、MSI陰性結腸直腸癌、鼻咽頭非角質化癌(nasopharyngeal nonkeratinizing carcinoma)、再発性鼻咽頭未分化癌(recurrent nasopharyngeal undifferentiated carcinoma)、子宮頸部腺癌、子宮頸部腺扁平上皮癌、子宮頸部扁平上皮癌、再発性子宮頸癌、肛門管扁平上皮癌、転移性肛門管癌、再発性肛門管癌、再発性頭頸部癌、頭頸部の扁平上皮細胞、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)、卵巣癌、結腸癌、進行性GI癌、胃腺癌、胃食道接合部腺癌、骨新生物、軟部組織肉腫、骨肉腫、胸腺癌、尿路上皮癌、メルケル細胞癌、再発性メルケル細胞癌、菌状息肉症、セザリ-症候群、神経内分泌癌、鼻咽腔癌、基底細胞皮膚癌、扁平上皮細胞皮膚癌、隆起性皮膚線維肉腫(dermatofibrosarcoma protuberans)、神経膠腫、中皮腫、骨髄異形成症候群(MDS)、骨髄線維症(MF)、骨髄増殖性腫瘍及び急性骨髄性白血病(AML)などがある。

10

20

【0358】

癌は、転移性であり得るか、又は、原発性癌であり得る。癌は、線維形成性又は非線維形成性であり得る。癌は、再発癌であり得る。

【0359】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、骨髄異形成症候群(MDS)を治療するために使用される。MDSは、造血障害及び異形成細胞の産生に起因する骨髄不全を特徴とする悪性疾患の多様なグループである。TGFは、MDSの主要なドライバーであり(Geyh et al., Haematologica 2018; 103: 1462-71)、そして、TGFの機能を阻害する薬剤が治療薬として提案されている(Mies et al., Curr Hematol Malign Rep 2016; 11: 416-24)。さらに、MDSは、MDSで調節不全であることが知られており(Chen et al., JCI 2013; 123: 4595-611)、そして、骨髄中のMDSレベルを低減させる薬剤は潜在的な治療法である。

30

【0360】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、TGF1が中心的な役割を果たす別の骨髄性悪性腫瘍である骨髄線維症を治療するために使用される(Mascarenhas et al., Leukemia & Lymphoma 2014; 55: 450-2)。

40

【0361】

一部の実施形態では、癌は、チェックポイント阻害剤に対して耐性がある。一部の実施形態では、癌は、本質的に難治性であるか又は耐性である(例えば、PD-1経路阻害剤、PD-1経路阻害剤又はCTLA-4経路阻害剤に対して耐性を示す)。一部の実施形態では、癌の耐性又は不応状態は、後天性である。一部の実施形態では、チェックポイント阻害剤に対する癌の耐性を克服するために、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントをチェックポイント阻害剤と組み合わせて使用することができる。一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメ

50

ントをチェックポイント阻害剤と一緒に、間葉表現型を誘導する薬剤（例えば、MAPK経路阻害剤）と組み合わせて又は順次使用して、間葉及び/又はEMTの徴候を有する腫瘍を治療することができる。

【0362】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、養子NK細胞移入において、エクスピボで免疫細胞の生存度を増強するために使用される。従って、一部の実施形態では、抗LAP抗体は、癌を治療するために養子移入されたNK細胞と組み合わせて使用される。

【0363】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、MHC喪失又はMHCダウンレギュレーションを伴う腫瘍を治療するために、単独療法として、又は、NKを活性化若しくは増強する治療と組み合わせて、使用される。一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体は、チェックポイント阻害剤耐性腫瘍を治療するために、NKを活性化又は増強する治療と組み合わせて使用される。

10

【0364】

さらにまた、本明細書中で提供されているのは、循環血小板の数の増加又は血小板対リンパ球比の増加に関連する癌を治療する方法であり、ここで、該方法は、その治療を必要とする対象者に、LAPに特異的に結合する抗体又は抗原結合フラグメントの有効量を投与することを含んでおり、ここで、該抗体は血小板に結合するが、血小板の凝集や脱顆粒は引き起こさない。

20

【0365】

癌を阻害する化合物の能力は、ヒト腫瘍における有効性を予測する動物モデルシステムで評価することができる。あるいは、組成物のこの特性は、当業者には知られているインビトロアッセイを使用して阻害する化合物の能力を調べることによって評価することができる。治療有効量の治療用化合物は、腫瘍サイズを減少させることができるか、さもなければ、対象者の症状を改善することができる。当業者は、対象者のサイズ、対象者の症状の重症度及び選択された特定の組成物又は投与経路などの要因に基づいてそのような量を決定することができるであろう。

【0366】

サンプル（例えば、腫瘍生検サンプル）中のLAP-TGF β 1の存在を検出する方法又はサンプル中のLAP-TGF β 1の量を測定する方法も包含され、ここで、該方法は、サンプル（例えば、腫瘍組織）及び対照サンプル（例えば、対応する健康な組織）を、抗体又はその一部とLAP-TGF β 1の間で複合体を形成することを可能にする条件下で、LAP-TGF β 1に特異的に結合する抗体（例えば、モノクローナル抗体）又は抗原結合フラグメントと接触させることを含む。次に、複合体の形成を検出するが、ここで、対照サンプルと比較した当該サンプルの間の複合体形成における相違は、そのサンプル中にLAP-TGF β 1が存在していることを示している。本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントを使用して、免疫親和性精製を介してLAP-TGF β 1を精製することもできる。

30

40

【0367】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体の診断用途も、企図される。

【0368】

一実施形態において、本明細書中で提供されているのは、制御性T細胞浸潤に関連する癌を診断する方法であり、ここで、該方法は、癌に罹患した患者からの生物学的サンプルを制御性T細胞に結合する本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントと接触させることを含んでおり、ここで、抗体による陽性染色は、癌が制御性T細胞浸潤に関連していることを示している。

【0369】

別の実施形態において、本明細書中で提供されているのは、GARP陰性抑制細胞に関連

50

する癌を診断する方法であり、ここで、該方法は、癌に罹患した患者からの生物学的サンプルを G A R P 陰性抑制細胞に結合する本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントと接触させることを含んでおり、ここで、抗体による陽性染色及び抗 G A R P 抗体による陰性染色は、癌が G A R P 陰性抑制細胞に関連していることを示す。

【 0 3 7 0 】

別の実施形態において、本明細書中で提供されているのは、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントによる治療に関して癌に罹患した患者を選択する方法であり、ここで、該方法は、患者からの生物学的サンプルを該抗体と接触させることを含んでおり、ここで、抗体による陽性染色は、癌が該抗体による治療に適していることを示す。

10

【 0 3 7 1 】

別の実施形態において、本明細書中で提供されているのは、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントによる治療に対する癌に罹患した患者の応答を確認する方法であり、ここで、該方法は、患者からの生物学的サンプルを該抗体と接触させることを含んでおり、ここで、抗体による低減された染色は、癌が該抗体による治療に反応していることを示す。

【 0 3 7 2 】

別の実施形態において、本明細書中で提供されているのは、患者の癌が転移したかどうかを確認する方法であり、ここで、該方法は、(a) 癌を有する患者を特定すること、(b) 本明細書中に記載されている標識された(例えば、放射性標識された)抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントを患者に投与し、その標識された抗 L A P 抗体の生体内分布を確認すること、及び、(c) 段階(b)を定期的に繰り返して、標識された抗 L A P 抗体の生体内分布が変化したかどうかを確認することを含んでおり、ここで、標識された抗 L A P 抗体の生体内分布の変化は、癌が転移したことを示している。

20

【 0 3 7 3 】

本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体で線維症を治療する方法も提供されている。一実施形態において、本明細書中で提供されているのは、線維症を治療する方法であり、ここで、該方法は、その治療を必要とする対象者に有効量の本明細書中に記載されている抗体又は抗原結合フラグメントを投与することを含む。一部の実施形態では、線維症は癌に関連している。一部の実施形態では、線維症は、骨髄由来サプレッサー細胞のレベルの増大に関連している(例えば、「*Fernandez et al., Eur Respir J* 2016; 48: 1171-83」)。

30

【 0 3 7 4 】

本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントのいずれかで治療することができる代表的な線維性疾患としては、限定するものではないが、心臓線維症、筋線維症、皮膚線維症、肝線維症、軟組織(例えば、縦隔又は後腹膜)線維症、腎線維症、骨髄線維症(bone marrow fibrosis)、腸線維症、関節(例えば、膝、肩又は他の関節)線維症、肺線維症、特発性肺線維症、嚢胞性線維症、心筋内線維症、縦隔線維症、骨髄線維症(myelofibrosis)、腹膜後線維症、進行性塊状線維症、パイプ軸線維症、腎性全身性線維症、クローン病、ケロイド、陳旧性心筋梗塞、強皮症/全身性硬化症、上皮線維症、関節線維症、一部の形態の癒着性関節包炎、増殖性線維症、ウイルス性肝炎誘発性線維症、薬物誘発性線維症、放射線誘発性線維症及び癌に関連する線維症などがある。

40

【 0 3 7 5 】

移植前、移植中又は移植後の患者において免疫抑制細胞の数を減らす方法も本明細書中で提供されており、ここで、該方法は、移植を受ける前、移植中及び/又は移植後の患者に有効量の本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントのいずれかを投与することを含む。一部の実施形態では、抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントは、移植片の生存を改善する。

【 0 3 7 6 】

50

TGF の阻害は、急性肝疾患のモデル（アセトアミノフェン損傷マウスモデル）において、老化を減少させ、肝臓の再生を促進することによって、再生障害を回復することが示されている（Bird et al., Sci Transl Med 2018; 10: eaan1230）。従って、本明細書中では、急性臓器損傷（例えば、急性肝損傷）における再生応答を増大させる方法も提供されており、ここで、該方法は、急性臓器損傷を有する対象者に有効量の本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントを投与することを含む。

【0377】

TGF の異常な活性化は、顎関節変形性関節症の発症を開始させることが示されている（Zheng et al., Bone Res 2018; 6: 26）。従って、本明細書中では、顎関節変形性関節症を患っている患者を治療する方法も提供されており、ここで、該方法は、その患者に有効量を本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントを投与して顎関節変形性関節症を治療することを含む。

10

【0378】

LAP-TGF 1は、HIV-1の感染に際してCD4+エフェクター細胞が生産的且つ潜在的に感染した中央メモリーT細胞に分化するのに介在することも示されている（Cheung et al., J Virol 2018; 92: e01510-17）。従って、本明細書中では、HIV-1感染症の患者（又は、HIV-1感染症を発症するリスクのある患者）を治療する方法も提供されており、ここで、該方法は、その患者に有効量の本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントを投与してHIV-1感染を治療する（例えば、CD4+エフェクター細胞が生産的且つ潜在的に感染した中央メモリーT細胞に分化するのを阻害する）ことを含む。

20

【0379】

TGF を発現しているマクロファージ及び抑制性制御性T細胞は、子宮内膜症を患っている患者の腹水中で変化することが示されており（Hanada et al., Reprod Biol Endocrinol 2018; 16: 9）、このことは、これらの細胞で発現されたLAP-TGFb1を標的とすることが該疾患の治療に有益であり得るということを示唆している。従って、本明細書中では、子宮内膜症を患っている患者を治療する方法も提供されており、ここで、該方法は、その患者に有効量の本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントを投与して子宮内膜症を治療することを含む。

30

【0380】

LAP-TGF 1を発現しているCD4+T細胞とCD14+単球及びマクロファージは、多剤耐性結核菌を保有する患者において増加することが示されており（Basile et al., Clin Exp Immunol 2016; 187: 160）、このことは、これらの細胞で発現されたLAP-TGF 1を標的とするが該感染症の治療に有益であり得るということを示唆している。従って、本明細書中では、多剤耐性結核菌を保有する患者を治療する方法も提供されており、ここで、該方法は、その患者に有効量の本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメント（例えば、LAP-TGF 1活性化を阻害する抗LAP抗体）を投与して該感染症を治療することを含む。

40

【0381】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、TGF スーパーファミリーメンバーが赤血球生成不全に関与している疾患であるサラセミアを治療するために使用される（Dussiot et al., Nat Med 2014; 20: 398-407）。

【0382】

特定の実施形態において、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、疾患又は障害（例えば、癌）を治療するために単剤療法として使用することができる。あるいは、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、以下でさらに詳細に記載されているように、別の薬剤

50

又は療法（例えば、抗癌剤、化学療法剤、免疫抑制剤、免疫刺激剤、免疫チェックポイント阻害剤、抗炎症剤又は細胞療法）と組み合わせて使用することができる。

【0383】

併用療法

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、以下に記載されているように、癌の治療に関して当技術分野で知られているさまざまな治療又は薬剤（又は、多重特異性抗体若しくは二価パートナーに関連して）と組み合わせて使用することができる。

【0384】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントとの併用療法において使用するのに適している抗癌剤としては、限定するものではないが、以下のものなどがある：手術、化学療法剤、増殖阻害剤、細胞毒性剤、放射線療法及び放射線療法で使用される薬剤、抗血管新生剤、アポトーシス剤、抗チューブリン剤、並びに、癌を治療するための別の薬剤、例えば、抗HER-2抗体（例えば、HERCEPTIN（登録商標））、抗CD20抗体、上皮増殖因子受容体（EGFR）アンタゴニスト（例えば、チロシンキナーゼ阻害剤）、HER1/EGFR阻害剤（例えば、エルロチニブ（TARCEVA（登録商標））、血小板由来増殖因子阻害剤（例えば、GLEEVEC（メシル酸イマチニブ））、COX-2阻害剤（例えば、セレコキシブ）、インターフェロン類、サイトカイン類、以下の標的PD1、PDL1、PDL2のうちの1種類以上に結合するアンタゴニスト（例えば、中和抗体）（例えば、ペンブロリズマブ；ニボルマブ；MK-3475；AMP-224；MPDL3280A；MED10680；MSB0010718C；及び/又は、MED14736）；CTLA4（例えば、トレメリムマブ（PFIZER）及びイピリムマブ）；LAG3（例えば、BMS-986016）；CD103；TIM-3及び/又は他のTIMファミリーメンバー；CEACAM-1及び/又は他のCEACAMファミリーメンバー、Erbb2、Erbb3、Erbb4、PDGFR-、BlyS、APRIL、BCMA又はVEGF受容体、TRAIL/Apo2、PARP阻害剤（例えば、AZD-2281、リンパルザ（オラカリブ）、ルブラカ（ルカパリブ）；（ゼジューラ）ニラパリブ）、DNA損傷修復阻害剤（例えば、ATMi、ATRi、DNAPKi）、及び、他の生物学的活性剤及び有機化学剤。それらの組み合わせも、本明細書中に記載されている方法について特に企図されている。

【0385】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントとの併用療法において使用するのに適している化学療法剤としては、限定するものではないが、以下のものなどがある：アルキル化剤、例えば、チオテパ及びCYTOXAN（登録商標）シクロホスファミド；テモゾロミド；アルキルスルホネート類、例えば、ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファン；アジリシン類、例えば、ベンゾドーパ、カルボクオン、メツレドーパ及びウレドパ；エチレンイミン類及びメチルアメラミン類、例えば、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド及びトリメチロールメラミン（trimethylololomelamine）；アセトゲニン類（特に、プラタシン及びプラタシノン）；カンプトテシン（合成類似体トポテカンを含む）；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン及びピゼレシン合成類似体を含む）；クリプトフィシン類（特に、クリプトフィシン1及びクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体、KW-2189及びCB-1-TM1を含む）；エレウテロビン（eleutherobin）；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；ナイトロジェンマスタード類、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピチン、フェネスチリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソ尿素類（nitrosureas）、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン及びラニムスチ

10

20

30

40

50

ン (r a n i m n u s t i n e) ; 抗生物質、例えば、エンジイン抗生物質 (例 例 ば、カ
 リケアマイシン、特に、カリケアマイシガンマル 1 1 及びカリケアマイシンオメガ 1 1
 (例 例 ば、「 A g n e w , C h e m . I n t l . E d . E n g l . , 3 3 :
 1 8 3 - 1 8 6 (1 9 9 4) 」を参照されたい) ; ダイネミシン、例えば、ダイネミシ
 ン A ; ビスホスホネート類、例えば、クロドロネート ; エスペラマイシン ; 並びに、ネオ
 カルジノスタチンクロモフォア及び関連するクロモプロテインエンジイン抗生物質クロモ
 フォア)、アクラシノマイシン類、アクチノマイシン、オートラマイシン、アザセリン、
 ブレオマイシン類、カクチノマイシン、カラビシン、カミノマイシン、カルジノフィリン
 、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ -
 5 - オキソ - L - ノルロイシン、A D R I A M Y C I N (登 録 商 標) ドキソルピシン (10
 モルホリノ - ドキソルピシン、シアノモルホリノ - ドキソルピシン、2 - ピロリノ - ドキ
 ソルピシン及びデオキシドキソルピシンを包含する)、エピルピシン、エソルピシン、イ
 ダルピシン、マルセロマイシン、ミトマイシン類、例えば、ミトマイシンノ C、ミコフェ
 ノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、プ
 ロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツ
 ベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン ; 代謝拮抗剤、例えば、メトトレ
 キセート及び 5 - フルオロウラシル (5 - F U) ; 葉酸類似体、例えば、デノプテリン、
 メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトレキセート ; プリン類似体、例えば、フル
 ダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン ; ピリミジン類似体、例
 えば、アンシタピン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデ
 オキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジン ; アンドロゲン類
 、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロスタノロン、エピチオスタノール、メピチオ
 スタン、テストトラクトン ; 抗アドレナル類 (a n t i - a d r e n a l s)、例えば、
 アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン ; 葉酸補充剤 (f o l i c a c i d r
 e p l e n i s h e r)、例えば、フロリン酸 ; アセグラトン ; アルドホスファミド配糖
 体 ; アミノレブリン酸 ; エニルラシル ; アムサクリン ; ベストラブシル ; ビサントレン ;
 エダトレキセート (e d a t r a x a t e) ; デフォファミン ; デメコルシン ; ジアジク
 オン ; エルフォルミチン ; 酢酸エリプチニウム ; エポチロン ; エトグルシド ; 硝酸ガリウ
 ム ; ヒドロキシ尿素 ; レンチナン ; ロニダイニン ; メイタンシノイド、例えば、メイタン
 シン及びアンサミトシン類 ; ミトグアゾン ; ミトキサントロン ; モピダンモール ; ニトラ
 エリン ; ペントスタチン ; フェナメット ; ピラルピシン ; ロソキサントロン ; ポドフィリ
 ン酸 ; 2 - エチルヒドラジド ; プロカルバジン ; P S K (登 録 商 標) 多糖複合体 (J H S
 N a t u r a l P r o d u c t s , E u g e n e , O r e g .) ; ラゾキシサン ; リ
 ゴキシサン ; シゾフラン ; スピロゲルマニウム ; テヌアゾン酸 ; トリアジクオン ; 2 , 2 '
 , 2 " - トリクロロトリエチルアミン ; トリコテセン類 (特に、T - 2 毒素、ベラクリン
 A、ロリジン A 及びアンギジン) ; ウレタン ; ビンデシン ; ダカルバジン ; マンノムスチ
 ン ; ミトブロニトール ; ミトラクトール ; ピポプロマン ; ガシトシン ; アラビノシド ("
 A r a - C ") ; シクロホスファミド ; チオテパ ; タキソイド類、例えば、T A X O L (登
 録商標) パクリタキセル (B r i s t o l - M y e r s S q u i b b O n c o l
 o g y , P r i n c e t o n , N . J .)、A B R A X A N E (登 録 商 標) クレモ
 フォアフリー、アルブミン工学によるパクリタキセルのナノ粒子製剤 (A m e r i c a n
 P h a r m a c e u t i c a l P a r t n e r s , S c h a u m b e r g , 1 1 1
 .)、及び、T A X O T E R E (登 録 商 標) ドキセタキセル (R h o n e - P o u l
 e n c R o r e r , A n t o n y , F r a n c e) ; クロランブシル ; G E M Z A
 R (登 録 商 標) ジェムシタピン ; 6 - チオグアニン ; メルカプトプリン ; メトトレキセ
 ート ; 白金類似体、例えば、シスプラチン、オキサリプラチン及びカルボプラチン、ピン
 プラスチン ; 白金 ; エトポシド (V P - 1 6) ; イホスファミド ; ミトキサントロン ; ビ
 ンクリスチン ; N A V E L B I N E、ピノレルピン ; ノバントロン ; テニポシド ; エダト
 レキセート ; ダウノマイシン ; アミノプテリン ; キセロダ ; イバンドロネート ; イリノテ
 カン (C a m p t o s a r , C P T - 1 1) (5 - F U 及びロイコボリンを加えたイリノ 30
 40
 50

テカンの治療レジメンを包含する)；トポイソメアーゼ阻害剤 R F S 2 0 0 0；ジフルオロメチルオルニチン (D M F O)；レチノイド類、例えば、レチノイン酸；カペシタビン；コンプレタスタチン；ロイコボリン (L V)；オキサリプラチン、これは、オキサリプラチン治療レジメン (F O L F O X) を包含する；ラパチニブ (T Y K E R B)；細胞増殖御低減させる、 P K C - 、 R a f、 H - R a s、 E G F R (例えば、エルロチニブ (T A R C E V A (登録商標))) 及び V E G F - A の阻害剤；及び、上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸又は誘導体。

【 0 3 8 6 】

さらにまた、本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントと組み合わせて使用するのに適しているのは、エピジェネティック制御因子を標的とする薬物、例えば、H D A C 阻害剤、プロモドメイン阻害剤及び E 3 リガーゼ (例えば、セレブロン) 阻害剤 (例えば、レナリドマイド、ポマリドマイド及びサリドマイド) である。

10

【 0 3 8 7 】

本明細書中に記載されている抗 L A P 抗体又は抗原結合フラグメントとの併用療法において使用するのに適している抗炎症剤としては、限定するものではないが、アスピリン及び他のサリチル酸塩、C o x - 2 阻害剤 (例えば、ロフェコキシブ及びセレコキシブ)、N S A I D (例えば、イブプロフェン、フェノプロフェン、ナプロキセン、スリンダック、ジクロフェナク、ピロキシカム、ケトプロフェン、ジフルニサル、ナブメトン、エトドラック、オキサプロジン及びインドメタシン)、抗 I L 6 R 抗体、抗 I L 8 抗体、抗 I L 1 5 抗体、抗 I L 1 5 R 抗体、抗 C D 4 抗体、抗 C D 1 1 a 抗体 (例えば、エファリズマブ)、抗 - 4 / - 1 インテグリン (V L A 4) 抗体 (例えば、ナタリズマブ)、炎症性疾患の治療のための C T L A 4 - I g、プレドニゾロン、プレドニゾン、疾患修飾性抗リウマチ薬 (D M A R D)、例えば、メトトレキセート、ヒドロキシクロロキン、スルファサラジン、ピリミジン合成阻害剤 (例えば、レフノミド)、I L - 1 受容体遮断薬 (例えば、アナキンラ)、T N F - 遮断薬 (例えば、エタネルセプト、インフリキシマブ及びアダリムマブ) などがある。

20

【 0 3 8 8 】

適切な免疫調節剤 (例えば、免疫刺激剤及び免疫抑制剤) としては、限定するものではないが、シクロスポリン、アザチオプリン、ミコフェノール酸、ミコフェノール酸モフェチル、コルチコステロイド、例えば、プレドニゾン、メトトレキセート、金塩、スルファサラジン、抗マラリア薬、ブレキナール、レフルノミド、ミゾリピン、1 5 - デオキシスベルグアリン、6 - メルカプトプリン、シクロホスファミド、ラパマイシン、タクロリムス (F K - 5 0 6)、O K T 3、抗胸腺細胞グロブリン、チモペンチン、サイモシン - 、I L - 2 受容体の p 7 5 に結合する抗体、M H C、C D 2、C D 3、C D 4、C D 7、C D 2 8、B 7、C D 4 0、C D 4 5、I F N - 、T N F - 、I L - 4、I L - 5、I L - 6 R、I L - 6、I G F、I G F R 1、I L - 7、I L - 8、I L - 1 0、C D 1 1 a 若しくは C D 5 8 に結合する抗体又はそれらのリガンドに結合する抗体、可溶性 I L - 1 5 R、I L - 1 0、B 7 分子 (B 7 - 1、B 7 - 2、それらの変異体、及び、それらのフラグメント)、I C O S、O X 4 0、陰性 T 細胞調節因子の阻害剤 (例えば、C T L A 4 に対する抗体) などがある。

30

40

【 0 3 8 9 】

さらなる免疫抑制剤としては、例えば、抗 T N F 剤、例えば、エタネルセプト、アダリムマブ及びインフリキシマブ、並びに、ステロイド類などがある。特定の天然ステロイド及び合成ステロイドの例としては、例えば、以下のものを挙げることができる：アルドステロン、ベクロメタゾン、ベタメタゾン、ブデソニド、クロプレドノール、コルチゾン、コルチバゾール、デオキシコルトン、デソニド、デソキシメタゾン、デキサメタゾン、ジフルオロコルトロン、フルクロロロン、フルメタゾン、フルニソリド、フルオシノロン、フルオシノニド、フルオコルチンブチル、フルオロコルチゾン、フルオロコルトロン、フルオロメトロン、フルランドレノロン、フルチカゾン、ハルシノニド、ヒドロコルチゾン、イコメタゾン、メプレドニゾン、メチルプレドニゾン、パラメタゾン、プレドニゾン

50

、プレドニゾン、チキソコルトール、及び、トリアムシノロン。

【0390】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントとの併用療法において使用するのに適している免疫刺激剤としては、限定するものではないが、例えば、抗原提示細胞（APC）を刺激することができる化合物、例えば、樹状細胞（DC）及びマクロファージなどがある。例えば、適切な免疫刺激剤は、APCを刺激することができ、その結果、APCの成熟プロセスが促進され、APCの増殖が増大し、並びに/又は、共刺激分子（例えば、CD80、CD86、ICAM-1、MHC分子及びCCR7）及び炎症誘発性サイトカイン（例えば、IL-1、IL-6、IL-12、IL-15及びIFN- γ ）の動員又は放出がアップレギュレートされる。適切な免疫刺激剤は、さらに、T細胞の増殖を増大させることもできる。そのような免疫刺激剤としては、限定するものではないが、以下のものなどがある：CD40リガンド；FLT3リガンド；サイトカイン類、例えば、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 及びIL-2；コロニー刺激因子、例えば、G-CSF（顆粒球コロニー刺激因子）及びGM-CSF（顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子）；抗CTLA-4抗体、抗PD1抗体、抗41BB抗体又は抗OX-40抗体；LPS（内毒素）；ssRNA；dsRNA；カルメット・ゲラン桿菌（*Bacille Calmette-Guérin*）（BCG）；レバミゾール塩酸塩；及び、静脈内免疫グロブリン。一実施形態において、免疫刺激剤は、トル様受容体（TLR）アゴニストであり得る。例えば、免疫刺激剤は、TLR3アゴニスト、例えば、以下のものであることができる：二本鎖イノシン：シトシンポリヌクレオチド（Poly I:C、例えば、AmpligenTMとして「Hemispherx BiPharma, PA, US」から、又は、Poly IC:LCとして「Oncovir」から入手可能）又はPoly A:U；TLR4アゴニスト、例えば、モノホスホリルリピドA（MPL）又はRC-529（例えば、「GSK, UK」から入手可能）；TLR5アゴニスト、例えば、フラジェリン；TLR7又はTLR8アゴニスト、例えば、イミダゾキノリンTLR7又はTLR8アゴニスト、例えば、イミキモド（例えば、AldaraTM）又はレシキモド及び関連するイミダゾキノリン剤（例えば、「3M Corporation」から入手可能）；又は、TLR9アゴニスト、例えば、メチル化されていないCpGモチーフを有するデオキシヌクレオチド（「CpG」、例えば、「Coley Pharmaceutical」から入手可能）。別の実施形態において、免疫刺激性分子は、STINGアゴニストである。そのような免疫刺激剤は、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントと、同時に、別々に又は順次に、投与することができる。

【0391】

適切な免疫チェックポイント遮断薬には、限定するものではないが、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、CTLA4、TIGIT、ICOS、OX40、PVR、PVRIG、VISTA及びTIM3に結合する薬剤（例えば、抗体）が包含される。PD-1、PD-L1及びPD-L2に結合する抗体の非限定的な例としては、以下のものを挙げることができる：ペンプロリズマブ；ニボルマブ；MK-3475；MPDL32；MED10680；MED14736；AMP-224；及び、MSB0010718C。

【0392】

一部の実施形態では、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）のメンバーである刺激性又は阻害性の分子を標的とする薬剤と一緒に投与する。例えば、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、免疫応答を増大させるためにIgSFファミリーのメンバーを標的とする薬剤と一緒に対象者に投与することができる。例えば、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、B7-1、B7-2、B7-H1（PD-L1）、B7-DC（PD-L2）、B7-H2（ICOS-L）、B7-H3、B7-H4、B7-H5（VISTA）及びB7-H6を包含する膜結合リガンドのB7ファミリーのメンバー又はB7ファミリーのメ

ンバーに特異的に結合する共刺激性又は共阻害性の受容体を標的とする薬剤と一緒に投与することができる。

【0393】

抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、さらにまた、TNF及びTNFRファミリーの分子(リガンド又は受容体)のメンバー、例えば、CD40及びCD40L、OX-40、OX-40L、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137、TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LT_R、LIGHT、DcR3、HVEM、VEG1/TL1A、TRAMP/DR3、EDA1、EDA2、TNFR1、Lymphotoxin /TNF、TNFR2、TNF、LT_R、Lymphotoxin 1 2、FAS、FASL、RELT、DR6、TROY及びNGFR(例えば、「Tansey(2009) Drug Discovery Today 00:1」を参照されたい)を標的とする薬剤と一緒に投与することもできる。

10

【0394】

T細胞応答は、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントと以下の薬剤のうちの1種類以上との組み合わせによって刺激することができる：

(1) T細胞活性化を阻害するタンパク質(例えば、上記で記載されているCTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2及びLAG-3、並びに、以下のタンパク質のいずれか：TIM-3、ガレクチン9、CEACAM-1、BTLA、CD69、Galactin-1、TIGIT、CD113、CD155、GPR56、VISTA、B7-H3、B7-H4、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM-1及びTIM-4)のアнтаゴニスト(阻害剤又は遮断剤)(例えば、免疫チェックポイント阻害剤)；及び/又は

20

(2) T細胞活性化を刺激するタンパク質(B7-1、B7-2、CD28、4-1BB(CD137)、4-1BBL、GITR、ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、CD70、CD27、CD40、DR3及びCD28H)のアゴニスト。

【0395】

上記タンパク質を調節し、そして、癌を治療するために本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントと組み合わせることができる代表的な薬剤としては、以下のものなどがある：Yervoy™(イピリムマブ)又はトレメリムマブ(CTLA-4に対する)、ガリキシマブ(B7.1に対する)、BMS-936558(PD-1に対する)、MK-3475(PD-1に対する)、AMP224(B7DCに対する)、BMS-936559(B7-H1に対する)、MPDL3280A(B7-H1に対する)、MEDI-570(ICOSに対する)、AMG557(B7H2に対する)、MGA271(B7H3に対する)、IMP321(LAG-3に対する)、BMS-663513(CD137に対する)、PF-05082566(CD137に対する)、CDX-1127(CD27に対する)、抗OX40(Providence Health Services)、huMAbOX40L(OX40Lに対する)、アタシセプト(TACIに対する)、CP-870893(CD40に対する)、ルカツムマブ(CD40に対する)、ダセツズマブ(CD40に対する)、ム口モナブ-CD3(CD3に対する)、イピリムマブ(CTLA-4に対する)。

30

40

【0396】

癌を治療するために抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントと組み合わせることができる他の分子には、NK細胞上の阻害性受容体のアンタゴニスト又はNK細胞上の活性化受容体のアゴニストが包含される。例えば、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、KIRのアンタゴニスト(例えば、リリルマブ)と組み合わせることができる。

【0397】

T細胞活性化は、さらにまた、可溶性サイトカインによっても調節され、そして、抗LAP

50

P抗体は、対象者（例えば、癌に罹患している対象者）に、T細胞活性化を阻害するサイトカインのアンタゴニスト又はT細胞活性化を刺激するサイトカインのアゴニストと一緒に投与することができる。

【0398】

特定の実施形態において、抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、増殖性疾患（例えば、癌）を治療するために、(i) T細胞活性化を阻害するIgSFファミリー若しくはB7ファミリー若しくはTNFファミリーのタンパク質のアンタゴニスト（又は、阻害剤、又は、遮断剤）又はT細胞活性化を阻害するサイトカイン（例えば、IL-6、IL-10、TGF- β 、VEGF；「免疫抑制性サイトカイン」）のアンタゴニスト、及び/又は、(ii) IgSFファミリー、B7ファミリー若しくはTNFファミリーの刺激性受容体のアゴニスト又は免疫応答を刺激するためにT細胞の活性化を刺激するサイトカインのアゴニストと組み合わせて使用することができる。

10

【0399】

併用療法のためのさらに他の薬剤には、マクロファージ又は単球を阻害する又は枯渇させる薬剤が包含され、ここで、そのような薬剤としては、限定するものではないが、CSF-1Rアンタゴニスト、例えば、CSF-1Rアンタゴニスト抗体、例えば、RG7155（PCT公開番号WO11/70024、WO11/107553、WO11/131407、WO13/87699、WO13/119716及びWO13/132044を参照されたい）又はFPA-008（PCT公開番号WO11/140249；WO13169264；及びWO14/036357を参照されたい）などがある。

20

【0400】

抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントと組み合わせることができるさらなる薬剤としては、腫瘍抗原提示を増強する薬剤、例えば、樹状細胞ワクチン、GM-CSF分泌細胞ワクチン、CpGオリゴヌクレオチド及びイミキモド、又は、腫瘍細胞の免疫原性を増強する療法（例えば、アントラサイクリン）などがある。

【0401】

抗LAP抗体と組み合わせることができる別の療法は、インドールアミンジオキシゲナーゼ（IDO）、トリプトファン-2,3-ジオキシゲナーゼ、ジオキシゲナーゼ、アルギナーゼ又は一酸化窒素シンターゼなどの代謝酵素を阻害する療法である。

【0402】

抗LAP抗体と一緒に使用することができる別のクラスの薬剤としては、アデノシンの形成を阻害するか又はアデノシンA2A受容体を阻害する薬剤、例えば、抗CD73抗体、抗CD39抗体及びアデノシンA2A/A2b阻害剤などがある。

30

【0403】

癌を治療するために抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントと組み合わせることができる他の療法としては、T細胞のアネルギー又は消耗を逆転/防止する療法及び腫瘍部位で先天性免疫活性化及び/又は炎症を引き起こす療法などがある。

【0404】

抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、免疫経路の複数の要素を標的とするコンビナトリアルアプローチ、例えば、以下のうちの1以上と組み合わせることができる：腫瘍抗原提示を増強する療法（例えば、樹状細胞ワクチン、GM-CSF分泌細胞ワクチン、CpGオリゴヌクレオチド、イミキモド）；例えば、CTLA-4及び/若しくはPD1/PD-L1/PD-L2経路を阻害することによって並びに/又は制御性T細胞若しくは他の免疫抑制細胞を枯渇させる若しくは遮断することによって、陰性免疫調節を阻害する療法；例えば、CD-137及び/若しくはGITR経路を刺激する及び/又はT細胞エフェクター機能を刺激するアゴニストを用いて、陽性免疫調節を刺激する療法；抗腫瘍T細胞の頻度を全身的に増大させる療法；CD25のアンタゴニスト（例えば、ダクリズマブ）を使用して又はエクスピボでの抗CD25ピーズ枯渇によって、制御性T細胞を枯渇させる又は阻害する療法；腫瘍内のサブレッサー骨髄細胞の機能に影響を与える療法；腫瘍細胞の免疫原性を高める療法（例えば、アントラサイクリン）；遺伝子改変細胞（例え

40

50

ば、キメラ抗原受容体によって改変された細胞を包含する養子T細胞又はNK細胞の移入を伴う細胞療法（CAR-T療法）；インドールアミンジオキシゲナーゼ（IDO）、ジオキシゲナーゼ、アルギナーゼ又は一酸化窒素シンターゼなどの代謝酵素を阻害する療法；T細胞のアネルギー又は消耗を逆転／防止する療法；腫瘍部位で先天性免疫活性化及び／又は炎症を引き起こす療法；免疫刺激性サイトカインの投与；又は、免疫抑制性（immunosuppressive）サイトカイン若しくは免疫抑制性（immunorepressive）サイトカインのブロック。

【0405】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、炎症誘発性サイトカイン（例えば、IL-12及びIL-2）と組み合わせることができる。これらのサイトカインは、半減期と腫瘍の標的化を強化するために修飾することができる。

10

【0406】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、免疫細胞エンゲージャー（engager）（例えば、NK細胞エンゲージャー又はT細胞エンゲージャー）と組み合わせることができる。

【0407】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、インドールアミンジオキシゲナーゼ（IDO）阻害剤、トリプトファン-2,3-ジオキシゲナーゼ（TDO）阻害剤及びデュアルIDO/TDO阻害剤と組み合わせることができる。

【0408】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、キヌリン阻害剤と組み合わせることができる。

20

【0409】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、CD47及び／又はSIRPαブロック療法と組み合わせることができる。

【0410】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、骨髄線維症及び骨髄増殖性腫瘍を治療するために、JAK阻害剤及びJAK経路阻害剤（例えば、STAT3阻害剤）と組み合わせることができる。

【0411】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、DNA損傷修復阻害剤と組み合わせることができる。

30

【0412】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、エリスロポエチン及び造血を刺激する薬物と組み合わせることができる。

【0413】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、血管新生阻害剤と組み合わせることができる。

【0414】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、抗ウイルス薬（例えば、ノイラミダーゼ阻害剤）と組み合わせることができる。

40

【0415】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントの特異性を有する第1の結合領域と免疫チェックポイント遮断薬（例えば、PD-1、PD-L1）に結合する第2の結合領域を有する二重特異性抗体は、腫瘍の成長を阻害するために、少なくとも1種類の追加の抗癌剤（例えば、放射線、化学療法剤、生物学的薬剤、ワクチン）と組み合わせて使用することができる。

【0416】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、1種類以上の免疫賦活抗体（例えば、抗PD-1アンタゴニスト抗体、抗PD-L1アンタゴニスト抗体

50

、アンタゴニスト抗CTLA-4抗体、拮抗的抗TIM3抗体及び/又は抗LAG3アンタゴニスト抗体)と組み合わせることができ、それによって、例えば、腫瘍増殖を阻害するために、免疫応答が対象者において刺激される。

【0417】

代表的な抗PD-1抗体としては、WO2012/145493に記載されているニボルマブ、ペンブロリズマブ(MK-3475、ランブロリズマブとしても知られている)；WO2012/145493に記載されているAMP-514、並びに、WO2009/014708、WO03/099196、WO2009/114335、WO2011/066389、WO2011/161699、WO2012/145493、米国特許第7,635,757号及び第8,217,149号並びに米国特許公開第2009/0317368号に記載されているPD-1抗体及び他のPD-1阻害剤、などがある。

10

【0418】

代表的な抗PD-L1抗体としては、MEDI4736(抗B7-H1としても知られる)、MPDL3280A(RG7446としても知られる)、MSB0010718C(WO2013/79174)、rHlgM12B7、並びに、WO2013/173223、WO2011/066389、WO2012/145493、米国特許公開第7,635,757号及び第8,217,149号並びに米国特許公開第2009/145493号に開示される抗PD-L1抗体のいずれか、などがある。

【0419】

代表的な抗CTLA-4抗体としては、Yervoy™(イピリムマブ)、トレメリマブ(以前のチシリムマブ、CP-675,206)、又は、以下の刊行物のいずれかに記載されている抗CTLA-4抗体などがある：WO98/42752；WO00/37504；米国特許第6,207,156号；「Hurwitz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(17):10067-10071」；「Camacho et al. (2004) J. Clin. Oncology 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206)」；及び、「Mokyr et al. (1998) Cancer Res. 58:5301-5304」。

20

【0420】

代表的な抗LAG3抗体としては、米国特許公開第2011/007023号並びにPCT公開番号WO08/132601及びWO09/44273に記載されているIMP731及びIMP-321、並びに、米国特許公開第US2011/0150892号並びに国際特許出願公開番号WO10/19570及びWO2014/008218に記載されている抗体などがある。

30

【0421】

抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、さらにまた、免疫腫瘍剤(immune-oncology agent)と、例えば、以下のものと、組み合わせることができる：CD137(4-1BB)アゴニスト(例えば、作動性CD137抗体、例えば、ウレルマブ又はPF-05082566(PCT公開番号WO12/32433を参照されたい)；GITRアゴニスト(例えば、作動性抗GITR抗体)、CD40アゴニスト(例えば、作動性CD40抗体)；CD40アンタゴニスト(例えば、拮抗性CD40抗体、例えば、ルカツムマブ(HCD122)、ダセツズマブ(SGN-40)、CP-870,893又はChilob7/4)；CD27アゴニスト(例えば、作動性CD27抗体、例えば、バルリルマブ(CDX-1127))、MGA271(B7H3に対する)(WO11/109400)；KIRアンタゴニスト(例えば、リリルマブ)；IDOアンタゴニスト(例えば、INCB-024360(WO2006/122150、WO07/75598、WO08/36653、WO08/36642)、インドキシモド、NLG-919(WO09/73620、WO09/1156652、WO11/56652、WO12/142237)又はF001287)；トル様受容体アゴニスト(例えば、TLR2/4アゴニスト(例えば、カルメット・ゲラン桿菌(Bacillus Ca

40

50

Imette - Guerin)); TLR7アゴニスト (例えば、ヒルトノール又はイミキモド); TLR7/8アゴニスト (例えば、レシキモド); 又は、TLR9アゴニスト (例えば、CpG7909); 及び、TGF-阻害剤 (例えば、GC1008、LY2157299、TEW7197、又は、IMC-TR1)。

【0422】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、さらにまた、免疫原、例えば、癌細胞、精製された腫瘍抗原 (これは、組換えタンパク質、ペプチド及び炭水化物分子を包含する)、細胞及び免疫を刺激するサイトカインをコードする遺伝子でトランスフェクトされた細胞 (He et al. (2004) J. Immunol. 173:4919-28) などと組み合わせることができる。使用することができる腫瘍ワクチンの非限定的な例としては、黒色腫瘍抗原のペプチド、例えば、gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1及び/若しくはチロシナーゼのペプチド、又は、サイトカインGM-CSFを発現するようにトランスフェクトされた腫瘍細胞などがある (以下で、さらに論じられる)。

10

【0423】

本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、さらにまた、抗腫瘍抗体、例えば、リツキサン (登録商標) (リツキシマブ)、ハーセプチン (登録商標) (トラスツズマブ)、ベクサル (登録商標) (トシツモマブ)、ゼバリン (登録商標) (イブリツモマブ)、カンパス (登録商標) (アレムツズマブ)、リンフォサイド (登録商標) (エブラツズマブ)、アバスチン (登録商標) (ベバシズマブ) 及びタルセバ (登録商標) (エルロチニブ) などと組み合わせることができる。

20

【0424】

いくつかの実験的治療プロトコルは、腫瘍に対する抗原特異的T細胞とするために、抗原特異的T細胞のエクスピボ活性化及び拡大、並びに、これらの細胞のレシピエントへの養子移入を含む (Greenberg & Riddell; 前掲)。追加の免疫刺激療法 (例えば、免疫チェックポイント遮断薬) の有無にかかわらず、本明細書中に記載されている抗LAP抗体の存在下でのエクスピボ活性化は、養子移入されたT細胞の頻度及び活性を増大させることが期待され得る。

【0425】

抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、さらにまた、標準治療又は別の治療 (例えば、放射線、外科手術又は化学療法) と一緒に投与することもできる。抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントは、ワクチン接種プロトコルと組み合わせることができる。腫瘍に対するワクチン接種のための多くの実験的戦略が考案されている (以下のものを参照されたい: Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D., 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K., 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; さらに、以下のものも参照されたい: Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition)。これらの戦略のうちの一つでは、ワクチンは、自己腫瘍細胞又は同種異系腫瘍細胞を使用して調製される。これらの細胞ワクチンは、腫瘍細胞がGM-CSFを発現するように形質導入された場合に最も効果的であることが示されている。GM-CSFは、腫瘍ワクチン接種のための抗原提示の強力な活性化因子であることが示されている (Dranoff et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:3539-43)。

30

40

50

【0426】

樹状細胞（DC）は、抗原特異的応答をプライムするために使用することができる強力な抗原提示細胞である。DCは、エクスピボで生成させることができ、そして、さまざまなタンパク質及びペプチド抗原並びに腫瘍細胞抽出物と一緒にロードすることができる（Nestle et al. (1998) Nature Medicine 4: 328 - 332）。DCは、さらに、これらの腫瘍抗原を発現させるために、遺伝的手段によって形質導入することもできる。DCは、さらにまた、免疫化の目的で腫瘍細胞に直接融合されている（Kugler et al. (2000) Nature Medicine 6: 332 - 336）。ワクチン接種の方法として、DC免疫化は、より強力な抗腫瘍応答を活性化するために、本明細書中に記載されている抗LAP抗体又は抗原結合フラグメントと効果的に組み合わせることができる。

10

【0427】

一部の実施形態では、本明細書中で論じられる治療用抗体の組み合わせは、薬学的に許容される担体中の単独の組成物として同時に投与することができるか、又は、薬学的に許容される担体中に各抗体を含む別個の組成物として同時に投与することができる。別の実施形態では、治療用抗体の組み合わせは、順次に投与することができる。

【0428】

X. キット

キットも提供され、ここで、該キットは、本明細書中に開示されている抗LAP抗体若しくは抗原結合フラグメント、多重特異性分子又はイムノコンジュゲートを含んでおり（場合により、単一のバイアル又は容器に含まれている）、及び、例えば、疾患（例えば、癌）の治療又は診断において使用するための取扱い説明書を含む。キットは、キットの内容物の使用目的を示すラベルを含み得る。用語「ラベル」は、任意の文書、マーケティング資料又は記録資料を包含し、これらは、キットに付いて若しくはキットと一緒に提供されているか、又は、添付されている。そのようなキットは、抗体、多重特異性分子又はイムノコンジュゲートを、単位投与形態の中に、例えば、単回投与バイアル又は単回投与プレロードシリンジなど中に、含むことができる。

20

【0429】

本開示は、以下の実施例によってさらに説明され、ここで、該実施例は、さらなる限定として解釈されるべきではない。本出願を通して引用された全ての図面並びに全ての参考文献、Genbank配列、特許及び公開された特許出願の内容は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

30

【実施例】

【0430】

実施例

以下の実施例で言及されている市販の試薬は、特に明記しない限り、製造業者の指示に従って使用された。特に断りのない限り、本発明は、上記及び以下の教科書に記載されているような組換えDNA技術の標準的な手順を使用する：Sambrook et al., supra; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989); Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Inc.: N.Y., 1990); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988); Gait, Oligonucleotide Synthesis (IRL Press: Oxford, 1984); Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan et al., Current Protocols in Immunology, 1991。

40

50

【0431】

以下の実施例は、「Oida et al. (PLoS One 2010; 5(11): e15523)」に記載されているように、TGF β 1ノックアウトマウスをマウスTGF β 1で免疫することによって生成された抗LAP抗体28G11、22F9、20E6(26E10とも称される)、17G8及び24E3の特徴づけに付いて記載する。抗LAP抗体28G11、22F9、20E6、17G8及び24E3のCDR配列、可変領域配列及び全長重鎖及び軽鎖配列は表34に示されている。これらの抗体は、mIgG2a定常領域を使用してマウス抗体フォーマットで、ヒトIgG定常領域を使用してキメラフォーマットで、及び/又は、ヒト化フォーマットで、調製した。

【0432】

mIgG2a定常領域を有する抗体を生成するために、各抗体の可変領域配列をマウスIgG2a定常領域に融合させた。オーバーラップエクステンションPCRを使用して、マウスVHドメインをマウスIgG2a定常ドメイン(UniProt受託番号P01863)のコドン最適化遺伝子に融合させた。オーバーラップエクステンションPCRを使用して、マウスVLドメインをマウスカッパ定常ドメイン(UniProt受託番号P01837)のコドン最適化遺伝子に融合させた。完全な重鎖及び軽鎖配列は、ExpichO細胞での発現のためにpcDNA3.4に個別にTOPO-TAクローン化した。

【0433】

キメラフォーマットで抗体を生成するために、マウス親クローンの可変領域配列をヒトIgG1定常領域配列に融合させた。マウスVHドメインは、オーバーラップエクステンションPCRを使用して、ヒトIgG1定常ドメイン(UniProt受託番号P01857)のコドン最適化遺伝子に融合させた。マウスVLドメインは、オーバーラップエクステンションPCRを使用して、ヒトカッパ定常ドメイン(UniProt受託番号P01834)のコドン最適化遺伝子に融合させた。完全な重鎖及び軽鎖配列は、ExpichO細胞での発現のためにpcDNA3.4に個別にTOPO-TAクローン化した。

【0434】

抗体のヒト化に関する詳細は、実施例8-11に記載されている。

【0435】

抗体の指定は、表2に記載されているフォーマットに従う。

【表3】

表2.

| 呼称 | 説明 |
|------------------------------------|---------------------------------------|
| 抗体クローン_(hyb) (例えば, 28G11_(hyb)) | 親マウス抗体 |
| 抗体_mIgG2a (例えば, 28G11_IgG2a) | マウスIgG2a定常領域に融合した親抗体のマウス可変領域 |
| 抗体_hIgG1 (例えば, 28G11_hIgG1) | 親抗体のマウス可変領域とヒトIgG1定常領域を有するキメラ抗体 |
| 抗体_H(X)L(Y) (例えば, 28G11_H2L3) | ヒト化抗体、ここで、Xは特定のヒト化重鎖を示し、Yは特定のヒト化軽鎖を示す |

【0436】

実施例1: 抗LAP抗体のヒト及びマウスLAP-TGF β 1への結合

この実施例は、バイオレイヤー干渉法を使用して、抗LAP抗体28G11_hIgG1

10

20

30

40

50

、22F9_hIgG1及び20E6_hIgG1がヒト及びマウスのLAP-TGF1に結合する能力について記載している。

【0437】

キメラ抗体を、EZ-Link SulfoNHS-LC-Biotin (ThermoFisher)を使用してビオチン化した。ストレプトアビジンで官能化されたチップを結合緩衝液(10mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、1%(w/v)ウシ血清アルブミン、0.05%(w/v)アジ化ナトリウム、pH7.4)で平衡化した。そのチップを結合緩衝液中のビオチン化キメラ抗LAPの10µg/mL溶液に15秒間浸して、チップに抗体をロードした。次に、その抗体をロードしたチップを結合緩衝液中で洗浄し、0-24nMのLAP-TGF1(ヒトLAP-TGF1に融合したヒトIgG1Fcドメインを含む融合タンパク質、又は、C末端ポリヒスチジン精製タグを有するマウスLAP-TGF1のいずれか)を含む溶液に入れた。抗原を抗体に5分間結合させ(会合相)、次に、チップを結合緩衝液に移動させた(解離相)。会合相及び解離相を1:1結合モデルに適合させて、結合速度定数を決定した。

10

【0438】

表3に示されているように、28G11_hIgG1、22F9_hIgG1及び20E6_hIgG1は、ナノモル以下の親和性で、ヒトLAP-TGF1及びマウスLAP-TGF1の両方に結合する。これらのデータは、該抗体がヒトLAP-TGF1及びマウスLAP-TGF1にアンカータンパク質の非存在下で結合することを示している。

20

【表4】

表3.

| マウス LAP-TGFβ1 | | | |
|---------------|-------------------------------|---------------------------|------------|
| 抗体 | $k_{on} (x10^6 M^{-1}s^{-1})$ | $k_{off} (x 10^4 s^{-1})$ | $K_D (nM)$ |
| 28G11_hIgG1 | 0.84 | 1.58 | 0.19 |
| 22F9_hIgG1 | 1.21 | 4.44 | 0.37 |
| 20E6_hIgG1 | 1.39 | 5.01 | 0.36 |
| ヒト LAP-TGFβ1 | | | |
| 28G11_hIgG1 | 0.54 | 3.60 | 0.67 |
| 22F9_hIgG1 | 1.01 | 7.68 | 0.76 |
| 20E6_hIgG1 | 1.04 | 6.06 | 0.58 |

30

【0439】

実施例2: LAP-TGF イソ型及びLAP-TGF 変異体への抗LAP抗体の結合

この実施例は、LAP-TGF イソ型及びLAP-TGF 変異体への抗LAP抗体の結合について記載する。この実験では、抗体28G11_hIgG1、22F9_hIgG1及び20E6_hIgG1に加えて、抗LAP抗体17G8_hIgG1、24E3_hIgG1及び2C9_(hyb)も試験した。簡単に説明すると、それぞれ4x10⁵個の(a)HT1080細胞、(b)ヒトLAP-TGF1を過剰発現するHT1080細胞、(c)ヒトLAP-TGF2を過剰発現するHT1080細胞、(d)ヒトLAP-TGF3を過剰発現するHT1080細胞、(e)マウスLAP-TGF1を過剰発現する細胞HT1080、(f)P3U1細胞、(g)LAP-TGF1及びGARPを過剰発現するP3U1細胞、及び、(h)LAP-TGF1及びLRRC33を過剰発現するP3U1細胞を、96ウェルプレート内で培養した。そのプレートを1,500rpmで5分間遠心分離し、液体を除去し、細胞を200µLのFACS緩衝液

40

50

に再懸濁させた。そのプレートを再度遠心分離し、希釈した一次抗体を各ウェルに加え、プレートを氷上で20分間インキュベートし、その後、遠心分離した。細胞を200 μ LのFACS緩衝液に再度懸濁させ、再度遠心分離し、50 μ Lの希釈二次抗体(Alexa647-抗ヒトIgG又はAPC-抗マウスIgG)に再度懸濁させた。そのプレートを暗所で、氷上で20分間インキュベートし、200 μ LのFACS緩衝液で2回洗浄し、各ウェルの細胞(200 μ LのFACS緩衝液中)をAttuneNX装置で読み取った。

【0440】

図1A - 図1Fに示されているように、試験した全ての抗体は、ヒトLAP-TGF1を過剰発現するHT1080細胞系統に結合するが、対照HT1080細胞又はヒトLAP-TGF2若しくはLAP-TGF3を過剰発現する細胞には結合しない。試験した全ての抗体は、P3U1-hTGF1細胞に結合し、その結合は、ヒトGARP又はLRRC33のいずれかを共発現させた場合に増強された。抗体28G11-hIgG1、22F9-hIgG1、20E6-hIgG1、17G8-hIgG1及び24E3-hIgG1は、マウスLAP-TGF1を過剰発現するHT1080細胞に結合するが、2C9-(hyb)は結合しない。これらの結果は、抗体28G11-hIgG1、22F9-hIgG1、20E6-hIgG1、17G8-hIgG1及び24E3-hIgG1がTGFのLAP-TGF1イソ型に特異的に結合することを示している。

10

【0441】

インテグリンによるTGF1の活性化を妨げる(「閉じた」コンフォメーション)又は放出を促進する(「開いた」コンフォメーション)TGF1の変異体、ニワトリTGF1からの残基を含むキメラTGF1配列及びLAPのみのTGF1変異体(即ち、成熟サイトカインを含まないヒトTGF1変異体)に結合する抗LAP抗体の能力について試験した。

20

【0442】

簡単に説明すると、それぞれ4 \times 10⁵個の(a)HT1080細胞、(b)ヒトLAP-TGF1を過剰発現するHT1080細胞、(c)K27C及びY75C突然変異を含むLAP-TGF1を過剰発現するHT1080細胞、(d)Y74T突然変異を含むLAP-TGF1を過剰発現するHT1080細胞、(e)ヒトLAP-TGF1のエキソン2.3(残基131-164)がニワトリLAP-TGF1(UniProt受託番号H9CX01)の対応する残基で置き換えられたキメラLAP-TGF1を過剰発現するHT1080細胞、(f)ヒトLAP-TGF1のエキソン4(残基183-208)がニワトリLAP-TGF1のエキソン4で置き換えられたキメラLAP-TGF1を過剰発現するHT1080細胞、(g)ヒトLAP-TGF1のエキソン2.2(残基108-130)がニワトリLAP-TGF1のエキソン2.2で置き換えられたキメラLAP-TGF1を過剰発現するHT1080細胞、及び、(h)LAPのみの変異体(即ち「emptyLAP」)を過剰発現するHT1080細胞を、96ウェルプレートで培養した。細胞は、イソ型特異的結合実験について上で記載したのと同じ方法でフローサイトメトリーのために処理した。

30

【0443】

図2A - 図2Fに示されているように、試験した抗LAP抗体はいずれも形質導入されていないHT1080細胞に結合しないが、試験した全ての抗体は野生型ヒトLAP-TGF1を過剰発現するHT1080細胞に結合する。抗体28G11-hIgG1、22F9-hIgG1、20E6-hIgG1、17G8-hIgG1及び24E3-hIgG1は、K27C/Y75C(「閉じた」)LAP-TGF1変異体に結合するが、Y74T(「開いた」)LAP-TGF1変異体には結合しない。対照的に、抗体2C9-(hyb)は、K27C/Y75C及びY74T両方のLAP-TGF1変異体に結合する。抗体28G11-hIgG1、22F9-hIgG1、20E6-hIgG1、17G8-hIgG1及び24E3-hIgG1は、ニワトリエクソン#2.3及び#4を含むキメラLAP-TGF1に結合するが、2C9-(hyb)は結合しない。さら

40

50

に、図3A - 図3Fに示されているように、試験した全ての抗体は野生型ヒトLAP - TGF β 1を過剰発現するHT1080細胞に結合するが、抗体28G11__hIgG1、22F9__hIgG1、20E6__hIgG1、17G8__hIgG1及び24E3__hIgG1は、LAPのみの変異体又はニワトリエクソン#2.2を含むキメラLAP - TGF β 1には結合しない。

【0444】

抗LAP抗体28G11__hIgG1、22F9__hIgG1、20E6__hIgG1、17G8__hIgG1及び24E3__hIgG1が遊離ヒトTGF β 1(即ち、LAPを欠く成熟TGF β 1)に結合するかどうかを確認するために、抗TGF β 1 ELISAを阻害する抗体の能力を評価した。簡単に説明すると、成熟TGF β 1(1000pg)を、示されている10 μ g/mLの抗LAP抗体、陰性対照としてのイソタイプ対照抗体又は陽性対照としての市販の抗TGF β 1抗体ID11と一緒に氷上で10分間インキュベートした。例えば、ID11抗体は、任意の数の販売者(例えば、「Bio x Cell Inc. (West Lebanon, NH)»)から市販されている。遊離TGF β 1を測定するために、製造業者の指示に従って、TGF β 1 ELISA(R&D Systems)で上清をアッセイした。図4に示されているように、抗TGF β 1抗体ID11は、成熟TGF β 1に結合してELISAを阻害したが、28G11__hIgG1、22F9__hIgG1、20E6__hIgG1、17G8__hIgG1及び24E3__hIgG1では阻害は見られなかった。これらのデータは、28G11__hIgG1、22F9__hIgG1、20E6__hIgG1、17G8__hIgG1及び24E3__hIgG1抗体が、LAPを欠く成熟TGF β 1に結合しないことを示している。図(Figure)と図(FIG.)が本出願においては交換可能に使用されていることに留意されたい。

【0445】

要約すると、これらの結果は、抗体28G11__hIgG1、22F9__hIgG1、20E6__hIgG1、17G8__hIgG1及び24E3__hIgG1が関連するエピトープを共有していることを示唆している。試験した全ての抗LAP抗体は、野生型ヒトLAP - TGF β 1(HT1080-h1)を過剰発現するHT1080細胞に結合するが、形質導入されていないHT1080細胞には結合しない。抗体28G11__hIgG1、22F9__hIgG1、20E6__hIgG1、17G8__hIgG1及び24E3__hIgG1は、LAPのみの構築物又はニワトリエクソン#2.2を含むキメラに結合しなかった。抗体2C9__(hyb)は、LAPのみの構築物の両方に結合するが、エクソン#2.2キメラには結合しない。データのこの複雑さは、抗体28G11__hIgG1、22F9__hIgG1、20E6__hIgG1、17G8__hIgG1及び24E3__hIgG1が成熟サイトカインを含むLAPにのみ結合することを示しており、これは、図4に示されている結果によって支持される。しかしながら、成熟サイトカインを含む、ニワトリエクソン#6及び#7を有するキメラには、28G11__hIgG1が結合し(データは示さず)、このことは、28G11__hIgG1、22F9__hIgG1、20E6__hIgG1、17G8__hIgG1及び24E3__hIgG1は成熟サイトカインに直接結合せず、むしろ、成熟サイトカインの有無によった誘発されたLAP領域内のコンフォメーション変化に敏感であることを、最初に示唆した。対照的に、2C9は、成熟サイトカインの存在下又は非存在下でのLAPだけでなく、「開いた」及び「閉じた」コンフォメーション変異体を包含するLAPの全ての変異体に結合する。

【0446】

フローサイトメトリーを使用して細胞表面キメラヒト/ニワトリLAP - TGF β 1分子の結合を評価することによって、28G11の結合エピトープをマッピングした。エピトープを特定するためのこれらの結合データの使用は、以下の仮定に基づいていた：

1. 抗LAP抗体は、ニワトリLAP - TGF β 1配列には結合しない；
2. ヒト/ニワトリのキメラは、細胞表面上で適切に発現及び表示される；
3. 抗LAP抗体がキメラに結合する場合、そのエクソンのどの残基もエピトープの一

部ではない；

4. 抗LAP抗体がキメラに結合しない場合、そのエクソン内の少なくとも1の残基がエピトープの一部であるか、又は、そのエクソン内のニワトリ配列の存在がLAP-TGFβの別の部分のコンフォメーション変化を引き起こし、それがエピトープを破壊する。

【0447】

キメラLAP-TGFβ1分子は、ヒトLAP-TGFβ1内の個々のエクソンを相同なニワトリLAP-TGFβ1配列で置き換えることによって作成した(表4)。ヒトとニワトリのLAP-TGFβ1は約50%の配列同一性を共有している。試験したLAP-TGFβ1配列のアミノ酸配列は、表34に示されている。

【表5】

10

表4. エピトープマッピングに使用したLAP-TGFβ1配列

| 配列番号 | 名称 | 説明 |
|------|----------------------|--|
| 1 | ヒトLAP-TGFβ1 (huB1) | 野生型ヒトLAP-TGFβ1配列 |
| 198 | ニワトリLAP-TGFβ1 (chB1) | 野生型ニワトリLAP-TGFβ1配列 |
| 199 | キメラ#1 | キメラLAP-TGFβ1、ここで、ヒトLAP-TGFβ1のエクソン1(残基1-89)は、ニワトリLAP-TGFβ1からのエクソン1で置き換えられている |
| 200 | キメラ#1.2 | キメラLAP-TGFβ1、ここで、ヒトLAP-TGFβ1のエクソン1.2(残基30-50)は、ニワトリLAP-TGFβ1からのエクソン1.2で置き換えられている |
| 201 | キメラ#1.3 | キメラLAP-TGFβ1、ここで、ヒトLAP-TGFβ1のエクソン1.3(残基51-81)は、ニワトリLAP-TGFβ1からのエクソン1.3で置き換えられている |
| 202 | キメラ#2 | キメラLAP-TGFβ1、ここで、ヒトLAP-TGFβ1のエクソン2(残基90-143)は、ニワトリLAP-TGFβ1からのエクソン2で置き換えられている |
| 203 | キメラ#2.1 | キメラLAP-TGFβ1、ここで、ヒトLAP-TGFβ1のエクソン2.1(残基82-107)は、ニワトリLAP-TGFβ1からのエクソン2.1で置き換えられている |
| 204 | キメラ#2.2 | キメラLAP-TGFβ1、ここで、ヒトLAP-TGFβ1のエクソン2.2(残基108-130)は、ニワトリLAP-TGFβ1からのエクソン2.2で置き換えられている |
| 205 | キメラ#2.3 | キメラLAP-TGFβ1、ここで、ヒトLAP-TGFβ1のエクソン2.3(残基131-164)は、ニワトリLAP-TGFβ1からの対応する残基で置き換えられている |

20

30

40

50

【 0 4 4 8 】

| | | | |
|-----|--------|---|----|
| 206 | キメラ #3 | キメラLAP-TGFβ1、ここで、ヒトLAP-TGFβ1のエクソン3 (残基144-182) は、ニワトリLAP-TGFβ1からの対応する残基で置き換えられている | |
| 207 | キメラ #4 | キメラLAP-TGFβ1、ここで、ヒトLAP-TGFβ1のエクソン4 (残基183-208) は、ニワトリLAP-TGFβ1からのエクソン4で置き換え得られている | 10 |
| 208 | キメラ #5 | キメラLAP-TGFβ1、ここで、ヒトLAP-TGFβ1のエクソン5 (残基209-257) は、ニワトリLAP-TGFβ1からの対応する残基で置き換えられている | |
| 209 | キメラ #6 | キメラLAP-TGFβ1、ここで、ヒトLAP-TGFβ1のエクソン6 (残基258-309) は、ニワトリLAP-TGFβ1からの対応する残基で置き換えられている | |
| 210 | キメラ #7 | キメラLAP-TGFβ1、ここで、ヒトLAP-TGFβ1のエクソン7 (残基310-361) は、ニワトリLAP-TGFβ1からの対応する残基で置き換えられている | 20 |

【 0 4 4 9 】

これらの構築物をレンチウイルスにサブクローニングし、HT1080細胞に形質導入した。遺伝子統合の成功は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) レポーター遺伝子の発現によって確認した。LAP-TGFβ1の発現は、成熟サイトカイン (残基250-361) ドメイン (Abeamcat#ab179695)、28G11_(hyb)及び2C9_(hyb)のペプチドに対して産生されたウサギモノクローナル抗体 (Rmab) を使用したフローサイトメトリーによって評価した。簡単に説明すると、それぞれ4×10⁵個の (a) HT1080細胞、(b) ヒトLAP-TGFβ1を過剰発現するHT1080細胞、(c) ニワトリLAP-TGFβ1を過剰発現するHT1080細胞、及び、(d) ヒト/ニワトリキメラ#1-#7を過剰発現するHT1080細胞を、96ウェルプレートで培養した。そのプレートを1,500rpmで5分間遠心分離し、液体を除去し、細胞を200μLのFACS緩衝液で再度懸濁させた。そのプレートを再度遠心分離し、希釈された一次抗体を各ウェルに加え、プレートを氷上で20分間インキュベートし、その後、遠心分離した。細胞を200μLのFACS緩衝液に再度懸濁させ、再度遠心分離し、50μLの希釈された二次抗体 (APC-抗Mouse IgG) に再度懸濁させた。プレートを、暗所で、氷上で20分間インキュベートし、200μLのFACS緩衝液で2回洗浄し、そして、各ウェルの細胞 (200μLのFACS緩衝液中) をAttuneNX装置で読み取った。細胞の>10%がGFP+/APC+であり、GFPとアロフィコシアニン (APC) シグナルの間に目に見える相関関係があった場合、抗体は結合していると見なした (表5)。

【表 6】

表 5. フローサイトメトリーによる% GFP+/APC+細胞

| HT1080 変異体 | Rmab | 28G11 (hyb) | 2C9 (hyb) |
|------------|-------|-------------|-----------|
| null | 0.7% | 0.0% | 0.0% |
| huB1 | 68.9% | 98.3% | 72.4% |
| chB1 | 0.5% | 0.3% | 1.1% |
| キメラ #1 | 7.5% | 0.2% | 7.6% |
| キメラ #1.2 | 78.3% | 84.1% | 81.8% |
| キメラ #1.3 | 65.2% | 83.0% | 82.6% |
| キメラ #2 | 1.5% | 0.2% | 4.1% |
| キメラ #2.1 | 79.1% | 3.5% | 5.6% |
| キメラ #2.2 | 47.2% | 0.5% | 0.2% |
| キメラ #2.3 | ND | 94.7% | 0.3% |
| キメラ #3 | 46.3% | 32.2% | 34.0% |
| キメラ #4 | 56.2% | 76.2% | 2.8% |
| キメラ #5 | 11.9% | 41.7% | 4.0% |
| キメラ #6 | 76.7% | 84.9% | 87.6% |
| キメラ #7 | 0.6% | 44.4% | 63.9% |

10

20

30

40

【0450】

3種類の抗体は、全て、ヒト LAP-TGF1 を過剰発現する陽性対照 HT1080 細胞系統に結合した。陰性対照株 (HT1080-null) では結合は観察されなかった。いずれの抗体もニワトリ LAP-TGF1 には結合しなかった、このことは、ヒトとニワトリの相同体間の配列の相違がこれらの抗体によって認識されるエピトープを破壊するのに充分であることを示している。キメラ #1 及び #2 は、どの抗体にも認識されなかった、このことは、これらの構築物が効率的に発現されなかったことを示唆している。この仮説を試験するために、ニワトリ配列のより小さな部分をヒト配列のエクソン #1 又は #2 に挿入した (キメラ #1.2、1.3、2.1、2.2 及び 2.3)。これらのより

50

小さな置換を有する構築物は、R m a b 抗体によって認識された、このことは、それらが H T 1 0 8 0 細胞で頑強に発現されたことを示している。キメラ# 7 には、R m a b 抗体は結合しなかったが、2 8 G 1 1 _ (h y b) と 2 C 9 _ (h y b) の両方で認識された、このことは、この構築物が細胞表面で発現されること、及び、R m a b に関するエピトープが該タンパク質のこの領域内にありそうであることを示している。

【 0 4 5 1 】

2 8 G 1 1 _ (h y b) 抗体は、キメラ# 1 . 2、1 . 3、2 . 3、3、4、5、6 及び 7 に結合した、このことは、これらの領域がこの抗体のエピトープに関与していないことを示している。対照的に、キメラ# 2 . 1 及び# 2 . 2 には、2 8 G 1 1 (h y b) が結合しなかった、このことは、この抗体が、配列

10

【表 7】

VLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAE (配列番号: 215).

【 0 4 5 2 】

内のヒト L A P - T G F 1 に結合することを示唆している。

【 0 4 5 3 】

2 C 9 _ (h y b) 結合は、キメラ# 2 . 1、2 . 2、2 . 3、4 及び 5 に存在するニワトリ残基によって破壊された。これは、この抗体が、配列中で離れているこれらの挿入物のそれぞれの部分を組み込んでいるが、抗原の三次元構造では隣接している、不連続エピトープに結合することを示唆している。

20

【 0 4 5 4 】

実施例 3 . L A P - T G F 1 上の目的の特定のエピトープに結合する抗体の生成

実施例 2 に記載されているように、ヒト及びニワトリの配列の組み合わせを有する構築物は、正しい構造に折りたたむことができる。従って、L A P - T G F 1 上の目的の特定のエピトープを標的とする免疫原として使用できる追加のキメラを生成することができる。これらの構築物は、実施例 2 に記載されている構築物の逆であろう。即ち、配列の大部分は、ニワトリ L A P - T G F 1 から取られ、ヒト L A P - T G F 1 の小さなセクションが、所望のエピトープを含む領域に挿入される。この戦略を使用して標的化することができる L A P - T G F 1 上の代表的なエピトープには、例えば、ヒト L A P - T G F 1 のアミノ酸 8 2 - 1 3 0、L A P - T G F 1 の下腕又は L A P - T G F 1 の潜伏ループを含むエピトープが包含される。このキメラタンパク質は、ニワトリを免疫してモノクローナル抗体を産生させるために使用することができる。ニワトリ L A P - T G F 1 は自己として認識されるので、免疫応答はヒトの配列に集中する。ニワトリを免疫するのに使用することができる代表的なニワトリ-ヒトキメラが、表 6 に示されている。これらのキメラの配列は、表 3 4 に記載されている。この方法で生成された抗 L A P 抗体は、本明細書中に記載されている方法を使用して、さまざまな機能(例えば、ヒト L A P - T G F 1 への結合、T G F 1 活性化の阻害、免疫細胞への結合)について試験することができる。

30

40

【表 8】

表 6. 免疫化のためのニワトリ-ヒトキメラ

| 配列番号 | 名称 | 説明 |
|------|---------------|--|
| 211 | chBlex2.1_2.2 | キメラLAP-TGFβ1、ここで、ニワトリLAP-TGFβ1のエクソン2.1及び2.2(残基83-128)は、ヒトLAP-TGFβ1からのエクソン2.1及び2.2で置き換えられている。このキメラを使用して、ヒトLAP-TGFβ1のアミノ酸残基82-130を標的化する抗体を生成することができる |
| 212 | chBlex1.3 | キメラLAP-TGFβ1、ここで、ニワトリLAP-TGFβ1のエクソン1.3(残基50-82)は、ヒトLAP-TGFβ1からのエクソン1.3で置き換えられている。このキメラを使用して、ヒトLAP-TGFβ1のアミノ酸残基50-81を標的化する抗体を生成することができる |
| 213 | chBlex1.2 | キメラLAP-TGFβ1、ここで、ニワトリLAP-TGFβ1のエクソン1.2(残基30-50)は、ヒトLAP-TGFβ1からのエクソン1.2で置き換えられている。このキメラを使用して、ヒトLAP-TGFβ1のアミノ酸残基30-50を標的化する抗体を生成することができる |

10

20

【0455】

実施例 4: TGFβ1 活性化に対する抗LAP抗体の効果

この実施例は、TGFβ1 活性化に対する抗LAP抗体 28G11_hIgG1、28G11_mIgG2a、17G8_hIgG1、24E3_hIgG1、22F9_hIgG1、22F9_mIgG2a、20E6_hIgG1 及び 20E6_mIgG2a 抗体の効果について記載している。

30

【0456】

簡単に説明すると、ヒトLAP-TGFβ1を発現するP3U1細胞又はマウスLAP-TGFβ1を発現するP3U1細胞を、丸底組織培養プレートの無血清Advanced DMEM内で一晚培養し、翌日、抗LAP抗体(20ug/mLの高さで開始する2倍段階希釈)で24時間処理した。活性TGFβ1は、市販のヒトTGFβ1 ELISAキット(R&D Systems)を製造元の指示に従って使用して、細胞培養の上清内で検出した。

40

【0457】

図5A及び図5Bは、28G11_hIgG1が、ヒトLAP-TGFβ1(IC50 = 1.4ug/mL)及びマウスLAP-TGFβ1(IC50 = 1ug/mL)を発現するP3U1細胞の両方でTGFβ1 活性化を阻害したことを示している。

【0458】

図5の28G11を使用した実験と同様に、試験された抗体は、ヒトLAP-TGFβ1を発現するP3U1細胞内でTGFβ1 活性化を阻害した。データは以下の図において示されている: IC50値は、抗体17G8(ヒトTGFβ1(IC50 = 1.5ug/mL))に関する図6A、及び、マウスTGFβ1(IC50 = 0.59ug/mL)に関する

50

る図 6 B)、抗体 24E3 (ヒト TGF β 1 (IC₅₀ = 2.6 μ g/mL) に関する図 6 C、及び、マウス TGF β 1 (IC₅₀ = 0.76 μ g/mL) に関する図 6 D)、抗体 22F9 (ヒト TGF β 1 (IC₅₀ = 1.8 μ g/mL) に関する図 6 E)、及び、抗体 20E6 (ヒト TGF β 1 (IC₅₀ = 1.08 μ g/mL) に関する図 6 F) に対して示されている。

【0459】

抗体がヒト LAP - TGF β 1 を発現する P3U1 細胞又はマウス LAP - TGF β 1 を発現する P3U1 細胞における活性化を阻害することをさらに確認するために、追加の実験を行った。データは以下の図において示されている；IC₅₀ 値は以下に示されているとおりである：抗体 28G11__mIgG2a (図 6 G：ヒト TGF β 1 の場合は IC₅₀ = 1.6 μ g/mL、及び、マウス TGF β 1 の場合は IC₅₀ = 0.8 μ g/mL)、抗体 20E6__mIgG2a (図 6 H：ヒト TGF β 1 の場合は IC₅₀ = 1.4 μ g/mL、及び、マウス TGF β 1 の場合は IC₅₀ = 1.0 μ g/mL)、抗体 22F9__mIgG2a (図 6 I：ヒト TGF β 1 の場合は IC₅₀ = 1.8 μ g/mL、及び、マウス TGF β 1 の場合は IC₅₀ = 1.0 μ g/mL)、抗体 24E3__hIgG1 (図 6 J：ヒト TGF β 1 の場合は IC₅₀ = 2.5 μ g/mL、及び、マウス TGF β 1 の場合は IC₅₀ = 1.1 μ g/mL)、抗体 17G8__hIgG1 (図 6 K：ヒト TGF β 1 の場合は IC₅₀ = 1.0 μ g/mL、及び、マウス TGF β 1 の場合は IC₅₀ = 1.4 μ g/mL)、抗体 20E6__H0.2aL1 (図 6 L：ヒト TGF β 1 の場合は IC₅₀ = 1.3 μ g/mL、及び、マウス TGF β 1 の場合は IC₅₀ = 1.7 μ g/mL)。

【0460】

上記の結果と一致して、P3U1 細胞に基づくアッセイを使用した別の実験では、28G11__hIgG1、22F9__hIgG1 及び 20E6__hIgG1 がヒト TGF β 1 の活性化を強力に阻害した (表 7)。

【表 9】

表 7. .

| ヒト TGF β 1 活性化の阻害 (IC ₅₀) | | |
|---|----------------|----------------|
| 28G11_hIgG1 | 22F9_hIgG1 | 20E6_hIgG1 |
| 2.3 μ g/mL | 3.9 μ g/mL | 4.7 μ g/mL |

【0461】

従って、この実施例に記載された複数の実験は、本明細書中に記載されている抗 LAP 抗体が TGF β 1 活性化に対して阻害効果を有することを示した。

【0462】

実施例 5：細胞外マトリックスへの抗 LAP 抗体の結合

この実施例は、ECM 中の LAP - TGF β 1 に結合する 28G11__hIgG1、22F9__hIgG1、20E6__hIgG1、2C9__mIgG2a、16B4__mIgG2a、17G8__hIgG1 及び 24E3__hIgG1 抗体の能力について記載している。

【0463】

簡単に説明すると、ECM に結合する抗体を評価するために、P3U1 細胞を丸底組織培養プレートで 48 時間インキュベートした。次に、細胞を除去し、プレートの表面に ECM を残した。3 つの異なるグループを比較した：(a) ヒト LAP - TGF β 1 を発現する P3U1 細胞、(b) マウス LAP - TGF β 1 を発現する P3U1 細胞、及び、(c) LAP - TGF β 1 を含まない P3U1 細胞 (null 細胞)。次に、抗体の LAP - TGF β 1 / ECM への結合を、ビオチン化抗 LAP 抗体を使用し、続いて、ストレプト

アビジン西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 及び 3', 5', 5' - テトラメチルベンジジン (TMB) 基質と一緒にインキュベートして確認した。

【0464】

図7に示されているように、28G11__hIgG1、22F9__hIgG1、20E6__hIgG1、17G8__hIgG1及び24E3__hIgG1抗体は、LAP-TGF1/ECMに結合しなかった。対照的に、抗LAP抗体16B4は、LAP-TGF1/ECMにおいてマウスLAP-TGF1への強い結合を示し、抗LAP抗体2C9は、LAP-TGF1/ECMにおいてヒトLAP-TGF1への強い結合を示した。この結果は、28G11__hIgG1、22F9__hIgG1、20E6__hIgG1、17G8__hIgG1及び24E3__hIgG1がマウスLAP-TGF1又はヒトLAP-TGF1を発現する細胞に強く結合する一方で、それらは、ECMではマウスLAP-TGF1又はヒトLAP-TGF1に結合しなかったことを示唆している。

【0465】

実施例6：血小板への抗LAP抗体の結合

この実施例は、血小板への抗LAP抗体の結合及び血小板脱顆粒に対するそれらの効果について記載している。

【0466】

簡単に説明すると、直接血小板結合アッセイをフローサイトメトリーによって実施した。希釈されたヒト全血を、示された濃度の直接コンジュゲートされた抗LAP抗体(28G11__(hyb)、20E6__mIgG2a、22F9__mIgG2a、17G8__hIgG1及び24E3__hIgG1)と一緒に15分間インキュベートした。次に、その反応物をCD61(BioLegend)に対する市販の直接コンジュゲートされた抗体と一緒にさらに15分間インキュベートし、フローサイトメトリーによって分析した。データは、CD61陽性血小板の抗LAP平均蛍光強度を表している。図8に示されているように、抗LAP抗体28G11、20E6、22F9、17G8及び24E3は、用量反応的に血小板への結合を示した。

【0467】

これらの抗LAP抗体は、血小板の脱顆粒についてさらに試験した。簡単に説明すると、希釈されたヒト全血を示された濃度の抗LAP抗体又は陽性対照としてのアデノシン二リン酸(ADP)と一緒に15分間インキュベートした。次に、その反応物を、CD61に対する直接コンジュゲートされた抗体と一緒にさらに15分間インキュベートして全血小板を検出し、そして、CD62P(BioLegend)を使用して脱顆粒血小板を検出した。そのサンプルをフローサイトメトリーで分析して、CD62P+血小板のパーセントを求めた。

【0468】

図9A-図9Eに示されているように、試験された抗体、即ち、28G11、20E6、22F9、17G8及び24E3は、いずれも、試験された最高用量でさえ、有意な血小板脱顆粒を誘発しなかった。

【0469】

実施例7：免疫細胞への抗LAP抗体の示差的結合

この実施例では、さまざまなタイプの免疫細胞への抗LAP抗体の結合について記載している。

【0470】

抗LAP抗体を、LRRC33を発現すると報告されている急性単球性白血病を患っている患者に由来する細胞系統であるTHP-1細胞に結合するそれらの能力について試験した。THP-1細胞をFACS緩衝液及びヒトFcブロックと一緒にインキュベートした後、Alexa647がコンジュゲートしたさまざまな濃度の28G11__(hyb)、22F9__mIgG2a、20E6__mIgG2a、17G8__hIgG1、24E3__hIgG1、2C9__mIgG2a又はmIgG2aイソタイプ対照と一緒にインキュベートした。細胞をフローサイトメトリーで分析し、陽性THP-1細胞のパーセント又は

抗LAP結合の蛍光強度の中央値(MFI)としてグラフ化した。図10A及び図10Bに示されているように、抗体22F9、17G8、24E3、20E6及び2C9は、THP-1細胞への強い結合を示す。抗LAP抗体28G11では、バックグラウンドを超える結合は見られなかった。別の実験では、20E6 mIgG2a及び7H4hybのTHP-1細胞への結合を、上記の方法を使用して比較した。図10Cに示されているように、そして、図10A及び図10Bと一致して、20E6はTHP-1細胞への強い結合を示したが、7H4は結合を示さなかった。別の実験では、THP-1細胞をFACS緩衝液及びヒトFcブロックと一緒にインキュベートし、その後、Alexa647がコンジュゲートした5ug/mLの28G11_hyb、22F9_mIgG2a、20E6_mIgG2a、2C9_mIgG2a又はIgG2aイソタイプ対照と一緒にインキュ

10

【0471】

抗LAP抗体を、組織球性リンパ腫を患っている患者に由来する骨髄性細胞系統であるU937細胞に結合するそれらの能力について試験した。U937細胞をFACS緩衝液及びヒトFcブロックとインキュベートし、その後、Alexa647がコンジュゲートしたさまざまな濃度の28G11_hyb、22F9_mIgG2a又は20E6_mIgG2aと一緒にインキュベートした。別の実験では、U937細胞をFACS緩衝液及びヒトFcブロックとインキュベートし、その後、Alexa647がコンジュゲートした

20

【0472】

これらのデータは、抗LAP抗体28G11、22F9及び20E6が、1種類のLAP+骨髄性細胞系統に対して同等の結合を示すが、別のLAP+骨髄性細胞系統に対しては劇的に異なる結合を示すことを実証している。以下の実験は、非形質転換細胞集団で同様の異なる結合が観察され得るかどうかを確認するために実施した。

30

【0473】

抗LAP抗体を、CT26腫瘍を有しているマウスから分離された免疫細胞に結合するそれらの能力について試験した。簡単に説明すると、 1×10^6 個のCT26細胞を6匹の雄Balb/Cマウスの脇腹領域に注射した。平均腫瘍体積が約80mm³に達したとき、マウスを10mg/kgのIgG2a又はIgG1イソタイプ対照抗体で処理した(これは、元々、マウスを治療用抗体で処理する実験の一部であり、これらの動物は対照として役目を果たすことが意図されていた)。マウスを3日後に再度処理し、最初の注射の7日後に収穫した。腫瘍組織をGentlMACS解離装置の中で分離し、Collagenase IV/DNase1で蒸解し、70µmセルストレーナーで濾し、カウントした。70µmのセルストレーナーを通過させることにより脾臓組織を解離させ、カウント

40

- 次のスキームを使用して、フローサイトメトリーによって細胞を分析した：生細胞のゲート 単一細胞のゲート CD45+細胞のゲート CD41-集団のゲート 適切な免疫細胞サブセットのゲートは以下のとおりである：
- ・ CD4T細胞 - CD45+、CD3+、CD4+
 - ・ 制御性T細胞 - CD45+、CD3+、CD4+、Foxp3+
 - ・ CD8T細胞 - CD45+、CD3+、CD8+
 - ・ CD11b - CD45+、CD11b+
 - ・ M2マクロファージ - CD45+、CD11b+、F4/80+、CD206+
 - ・ 樹状細胞 - CD45+、F4/80-、CD11c+
 - ・ M-MDSC - CD45+、CD11b+、F4/80-、Ly6G-、Ly6C高

50

- ・ G - M D S C - C D 4 5 +、C D 1 1 b +、F 4 / 8 0 -、L y 6 G +
- ・ M 1 マクロファージ - C D 4 5 +、C D 1 1 b +、F 4 / 8 0 +、M H C I I 高、C D 2 0 6 -
- ・ N K 細胞 - C D 4 5 +、C D 4 9 b +。

【 0 4 7 4 】

抗 L A P 抗体の結合は、A l e x a 6 4 7 で標識された 2 8 G 1 1 - I g G 2 a、2 2 F 9 - I g G 2 a 及び 2 0 E 6 - I g G 2 a を使用して分析した。データの要約が表 8 及び図 1 1 に示されている。3 種類の抗 L A P 抗体 2 8 G 1 1、2 2 F 9 及び 2 0 E 6 は、腫瘍組織内の臨床的に関連する免疫細胞サブセットに対して非常に異なる結合プロフィールを示す。最も注目すべきことに、2 2 F 9 及び 2 0 E 6 は、2 8 G 1 1 と比較して、高い割合の制御性 T 細胞、M 2 マクロファージ及び M - M D S C に結合する。これらのデータは、これら 3 種類の抗体は全てそれらの結合特性と機能特性において類似性を有している（実施例 1、2 及び 4 - 6 を参照されたい）が、該抗体は、免疫抑制腫瘍微小環境で重要であることが知られている細胞集団へのそれらの結合において大きな相違を示すことを示している。例えば、2 2 F 9 及び 2 0 E 6 は、両方とも、2 8 G 1 1 よりも高い割合の制御性 T 細胞、M 2 マクロファージ及び M - M D S C に結合する。これは、腫瘍におけるこれらの重要な免疫抑制細胞集団の調節に関して、2 8 G 1 1 に対する 2 2 F 9 及び 2 0 E 6 の優位性を支持する。さらに、2 2 F 9 と 2 0 E 6 の結合における相違は、浸潤する白血球集団の構成に応じて、所与の腫瘍における一方又は他方の抗体の潜在的な優先的使用を支持する。

10

20

【 表 1 0 】

表 8. 腫瘍中の免疫細胞への結合（6 個体のマウスの %陽性 ± SEM で表される）

| 免疫細胞型 | 28G11 | 22F9 | 20E6 |
|------------|------------|------------|------------|
| CD4 | 5.1 ± 1.0 | 44.2 ± 2.0 | 66.8 ± 2.4 |
| 制御性 T 細胞 | 24.8 ± 3.0 | 46.7 ± 2.2 | 75.8 ± 3.9 |
| CD8 | 0.5 ± 0.1 | 29.8 ± 7.4 | 3.4 ± 0.9 |
| CD11b | 16.8 ± 2.3 | 70.2 ± 3.2 | 50.7 ± 5.6 |
| M2 マクロファージ | 8.0 ± 1.4 | 92.5 ± 0.5 | 47.2 ± 4.5 |
| 樹状細胞 | 7.8 ± 1.3 | 50.4 ± 4.0 | 27.6 ± 4.5 |
| M-MDSC | 6.9 ± 0.8 | 64.0 ± 3.2 | 30.3 ± 4.9 |
| G-MDSC | 2.4 ± 0.6 | 21.9 ± 2.1 | 7.0 ± 1.9 |

30

【 0 4 7 5 】

同じマウスからの脾細胞を、腫瘍組織と並行してフローサイトメトリーによって分析した。表 9 に示されているように、抗体 2 8 G 1 1、2 2 F 9 及び 2 0 E 6 は、同じマウスの腫瘍よりも、担癌マウスの脾臓内で低い割合の免疫細胞に結合する（表 8）。これらのデータは、3 種類全ての抗体の腫瘍選択性を示している。抗体間にいくつかの相違が観察され、2 2 F 9 は脾臓で最も強い結合を示した。これは、腫瘍環境に対する最大の選択性が優先される設定における 2 0 E 6 の優位性を支持する。

40

50

【表 1 1】

表 9. 脾臓中の免疫細胞への結合 (6 個体のマウスの%陽性±SEM で表される)

| 免疫細胞型 | 28G11 | 22F9 | 20E6 |
|------------|------------|------------|------------|
| CD4 | 1.6 ± 0.05 | 2.9 ± 0.06 | 1.7 ± 0.06 |
| 制御性T細胞 | 4.0 ± 0.4 | 6.1 ± 0.5 | 3.6 ± 0.3 |
| CD8 | 0.9 ± 0.02 | 1.9 ± 0.1 | 0.9 ± 0.05 |
| CD11b | 4.0 ± 0.5 | 17.2 ± 1.1 | 4.2 ± 0.2 |
| M2 マクロファージ | 1.8 ± 0.6 | 11.3 ± 1.7 | 2.6 ± 0.5 |
| 樹状細胞 | 4.9 ± 0.5 | 21.5 ± 1.1 | 6.3 ± 0.5 |
| M-MDSC | 8.2 ± 0.6 | 21.7 ± 2.2 | 4.9 ± 0.3 |
| G-MDSC | 1.6 ± 0.4 | 8.0 ± 0.4 | 2.1 ± 0.2 |
| M1 マクロファージ | 1.0 ± 0.3 | 11.7 ± 1.3 | 1.7 ± 0.4 |
| NK 細胞 | 3.0 ± 0.2 | 13.4 ± 1.2 | 4.5 ± 0.2 |

10

20

【0 4 7 6】

抗体 2 8 G 1 1、2 2 F 9、2 0 E 6、1 7 G 8、2 4 E 3 及び 2 F 8 がヒトマクロファージサブセットに結合する能力も調べた。簡単に説明すると、CD 1 4 + 細胞を S t e m E x p r e s s から入手し、ここで、それらを磁気陰性選択によってドナーの全血から分離した。細胞を I m m u n o c u l t マクロファージ培地 (S t e m C e l l t e c h) + M - C S F (5 0 n g / m L) で 6 日間培養し、以下のものを加えて細胞を特定のマクロファージサブタイプに傾斜させた (M 1 マクロファージ : 5 0 n g / m L h - I F N - + 1 0 n g / m L L P S ; M 2 a マクロファージ : 1 0 n g / m L h - I L 4 ; M 2 b マクロファージ : 固定化 I g G + 1 0 0 n g / m L L P S ; M 2 c マクロファージ : 1 0 n g / m L I L 1 0 + 2 0 n g / m L T G F) 。細胞を CD 1 4 及び A l e x a 6 4 7 標識化抗 L A P 抗体 2 8 G 1 1 _ _ m I g G 2 a、2 2 F 9 _ _ m I g G 2 a、2 0 E 6 _ _ m I g G 2 a、1 7 G 8 _ _ h I g G 1、2 4 E 3 _ _ h I g G 1、2 F 8 _ _ (h y b)、m I g G 2 a イソタイプ対照又は h I g G 1 イソタイプ対照で染色した。分析前に、細胞を生々の単一細胞としてゲートした。

30

【0 4 7 7】

表 1 0 に示されているように、抗 L A P 抗体は、単離されたヒトマクロファージサブセットに対して、非常に異なる結合パターンを示した。特に、2 2 F 9 は、2 8 G 1 1 又は 2 0 E 6 よりもはるかに高い割合の全てのマクロファージ亜集団に結合した。2 0 E 6 は、2 8 G 1 1 よりも高い割合の M 1 マクロファージに結合した。

40

50

【表 1 2】

表 1 0. 健康なドナーからの免疫細胞への結合 (%陽性で表される)

| 免疫細胞型 | 28G11 | 22F9 | 20E6 | 17G8 | 24E3 | 2F8 | イソタイプ 対照 |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| マクロファージ | 55.8% | 85.0% | 51.8% | 24.8% | 50.8% | 40.0% | 1.04% |
| M1 マクロファージ [♂] | 15.2% | 86.4% | 46.1% | 52.2% | 50.1% | 0.91% | 2.34% |
| M2a マクロファージ [♂] | 55.6% | 85.0% | 51.5% | 20.6% | 34.3% | 29.1% | 3.53% |
| M2b マクロファージ [♂] | 24.5% | 90.8% | 20.4% | 50.7% | 66.7% | 26.9% | 2.14% |
| M2c マクロファージ [♂] | 29.1% | 99.1% | 28.2% | 72.8% | 84.5% | 5.1% | 1.26% |

10

【0 4 7 8】

別の実験では、活性化されたヒトCD4 + T細胞集団への抗LAP抗体の結合についても評価した。CD4 + 細胞は、磁気陰性選択を製造元 (Stem Cell Tech) の指示に従って使用して、PBMCから分離した。細胞は、Dynabeads (Thermo) と細胞の比率1 : 1を使用して活性化し、advanced RPMI + 10% FBS + 30 U / mL ヒトIL2で48時間培養した。細胞を生 / 死色素で染色し、続いて、CD4、CD25、及び、28G11 - IgG2a、22F9 - IgG2a、20E6 - IgG2a、17G8 - hIgG1、24E3 - hIgG1、2F8_{__}(hyb)、IgG1イソタイプ対照又はLAP発現用のIgG2aイソタイプ対照で染色した。細胞を固定し、製造元の推奨事項 (Ebiosciences) に従ってFoxp3染色用に透過処理し、Foxp3染色した。分析前に、細胞を生/死の単一細胞、CD4 + 及びCD25 + としてゲートした。22F9は、他の試験された抗LAP抗体よりも高い割合の活性化CD4 + 細胞に結合することが分かった。

20

【0 4 7 9】

特定の細胞集団への結合の増大は、直接的な臨床的利益と関連すると予期される。本明細書中に記載されている抗体は、TGFの活性化及び成熟サイトカインの放出を阻害する。TGFはオートクリン又はパラクリンに近い方法で作用するので、特定の細胞集団への選択的結合は、示された細胞集団のすぐ近くでの成熟TGFの産生の阻害をもたらす。従って、例えば、抗体28G11と比較した場合の抗LAP抗体20E6の制御性T細胞への結合の増大は、それらの同じ制御性T細胞の表面でのTGFレベルの選択的低減をもたらすと予期される。TGFが制御性T細胞生成の主要な推進力であることを考えると、これにより、腫瘍微小環境内における制御性T細胞の数が減少し、28G11よりも20E6の臨床効果が高まると予期される。第2の例では、抗体28G11と比較した場合の抗LAP抗体22F9のマクロファージサブセットへの結合の増大は、それらの同じマクロファージの表面でのTGFレベルの選択的低減をもたらすと予期される。TGFがエフェクターT細胞機能の細胞接触依存性マクロファージ阻害の主要な機序であることを考えると、これは、腫瘍微小環境中におけるマクロファージ媒介阻害の低減及びエフェクターT細胞機能の増大、並びに、28G11を超える20E6の臨床的有効性の増大をもたらすと予期される。

30

40

【0 4 8 0】

一部の実施形態では、抗LAP抗体は、活性なエフェクター機能を有するイソタイプであり、所与の細胞集団への特定の抗LAP抗体の増強された結合は、ADCC又はCDCによるその細胞集団の枯渇の増大をもたらす。従って、例えば、抗体28G11と比較した場合の抗LAP抗体20E6の制御性T細胞への結合の増大は、腫瘍微小環境中におけるそれらの制御性T細胞のADCC又はCDCが媒介する枯渇の増大及び28G11を超え

50

る 20E6 臨床的有効性の増大をもたらすと予期される。第 2 の例では、抗体 28G11 と比較した場合の抗 LAP 抗体 22F9 のマクロファージサブセットへの結合の増大は、腫瘍微小環境中におけるこれらのマクロファージサブセットの ADC 又は CDC が媒介する枯渇の増大及び 28G11 を超える 22F9 の臨床的有効性の増大をもたらすと予期される。

【0481】

この実施例で提示されたデータは、本明細書中に記載されている抗 LAP 抗体が免疫細胞亜集団に異なって結合するという発見が、マウスとヒトの両方のシステムにおいて、及び、一次細胞集団と形質転換細胞系統の両方において、実証され得ることを示している。

【0482】

実施例 8：ヒト化抗 LAP 抗体の生成

この実施例は、抗 LAP 抗体 28G11、22F9 及び 20E6 のヒト化について記載している。

【0483】

28G11、22F9 及び 26E10 (20E6 とも称される) 可変領域のモデルは、複数の構造テンプレートを使用して構造モデルを組み立てるプログラムである Modeler を使用して構築した。PDB コード 3dv6 が 28G11 重鎖に対するテンプレートとして選択され (28G11 VH ドメインと 86% の配列同一性)、及び、2zjs が 28G11 軽鎖に対するテンプレートとして選択された (28G11 VL ドメインと 97% の配列同一性)。PDB コード 1a6v が 22F9 重鎖に対するテンプレートとして選択され (22F9 V 領域と 89% の配列同一性)、及び、PDB コード 2xqy が 22F9 軽鎖に対するテンプレートとして選択された (22F9 V 領域と 94% の同一性)。PDB コード 1a6v が 26E10 (20E6) 重鎖に対するテンプレートとして選択され (26E10 (20E6) V 領域と 93% の配列同一性)、及び、PDB コード 1jv5 が 26E10 (20E6) 軽鎖に対するテンプレートとして選択された (26E10 V 領域と 96% の同一性)。可変ドメインの構造モデルは、Modeler を使用して組み立て、改良した。

【0484】

軽鎖及び重鎖に関する抗体アクセプターフレームワーク配列を選択するために、抗体配列データベース及びクエリツールを使用して、カノニカル、インターフェース及びバーニアゾーン残基内のマウス 28G11、22F9 及び 26E10 (20E6) 配列と最も類似性の高い適切なテンプレート；可能であれば同じ長さの CDR (CDR-H3 を除く)；及び、最小必要数の逆突然変異 (即ち、フレームワーク残基タイプのヒトアクセプターのものから成熟マウス抗体のものへの変化)、を特定した。FR4 フレームワーク領域内のヒトコンセンサス残基で満たされたヒト生殖細胞系列配列も考慮した。

【0485】

上記分析に基づいて、28G11 の CDR 配列をIGHV3-72*01 (H0) 及びIGKV1-27*01 (L0) 生殖細胞系列にグラフトした。22F9 のヒト化のために、22F9 の CDR 配列をIGHV1-46*01 (H0) 及びIGKV1-39*01 (L0) 生殖細胞系列にグラフトした。20E6 のヒト化のために、20E6 の CDR 配列をヒトIGHV1-2*05 (H0) 及びIGKV1-33*01 (L0) 生殖細胞系列にグラフトした。これらのヒト化抗体の重鎖及び / 又は軽鎖におけるマウス配列への逆置換は、相同性モデルの分析に基づいて導入した。潜在的な脱アミド化及び異性化部位を除去するために、置換も導入した (以下の実施例において論じられているように)。これらの候補のそれぞれは、以下の実施例に記載されているように、LAP-TGF1 を過剰発現する細胞への結合を包含するさまざまな機能について試験した。

【0486】

実施例 9：ヒト化 28G11 候補及び障害部位が除去された 28G11 変異体の特性評価

この実施例では、さまざまなヒト化 28G11 候補の特徴を調べて、親抗体の機能 (例えば、TGF1 への結合) を保持するヒト化抗体を特定した。さらにまた、脱アミド化 /

10

20

30

40

50

異性化部位が除去された 28G11 変異体も調べた。表 11 は、この実施例で使用されるさまざまなヒト化 28G11 構築物（重鎖及び軽鎖配列）をまとめたものである。これらの構築物の配列は、表 34 に記載されている。

【表 13】

表 11. 代表的な 28G11 抗体及び抗原結合フラグメント

| 配列番号 | 名称 | 説明 |
|------|--------------------|---|
| 32 | 28G11_H0 | コンセンサスフレームワーク 4 配列を有するヒト IGHV3-72*01 生殖細胞系列に挿入された親マウス抗体からの CDR1、CDR2 及び CDR3 配列を有するヒト化 28G11 重鎖配列 |
| 34 | 28G11_H1 | アミノ置換 S30T 及び V48L を含んでいるヒト化 28G11_H0 重鎖配列 |
| 36 | 28G11_H2 | アミノ置換 S30T、V48L、D73N、K75Q、N76S 及び V109L を含んでいるヒト化 28G11_H0 重鎖配列 |
| 39 | 28G11_H2.1 | アミノ置換 N56Q を含んでいるヒト化 28G11_H2 重鎖配列 |
| 41 | 28G11_H2a | アミノ置換 S30T 及び D73N を含んでいるヒト化 28G11_H0 重鎖配列 |
| 43 | 28G11_H2b | アミノ置換 S30T、N56Q 及び D73N を含んでいるヒト化 28G11_H0 重鎖配列 |
| 45 | 28G11_H2b_hIgG4mut | 変異体ヒト IgG4 定常領域を有する H2b 重鎖；該変異体ヒト IgG4 定常領域は、配列番号 197 の配列を有している |
| 217 | 28G11_L0 | huIGKJ2 フレームワーク 4 配列を有するヒト IGKV1-27*01 生殖細胞系列に挿入された親マウス抗体からの CDR1、CDR2 及び CDR3 配列を有するヒト化 28G11 軽鎖配列 |
| 47 | 28G11_L1 | アミノ置換 F71Y 及び Y87F を含んでいるヒト化 28G11_L0 軽鎖配列 |
| 49 | 28G11_L2 | アミノ置換 V43T、P44V、F71Y 及び Y87F を含んでいるヒト化 28G11_L0 軽鎖配列 |
| 51 | 28G11_L3 | アミノ置換 V19L、T22S、V43T、P44V、F71Y 及び Y87F F を含んでいるヒト化 28G11_L0 軽鎖配列 |

10

20

30

40

【0487】

| | | |
|----|-----------|--|
| 53 | 28G11_L3a | アミノ置換 V19L、T22S、P44V 及び F71Y を含んでいるヒト化 28G11_L0 軽鎖配列 |
|----|-----------|--|

50

【0488】

最初の実験では、フローサイトメトリーアッセイにおけるビオチン - 28G11との競合により、さまざまなヒト化28G11候補をヒトLAP - TGF β 1への結合の保持について試験した。

【0489】

ヒトGARP及びLAP - TGF β 1を過剰発現するP3U1細胞を、40,000細胞/ウェルの密度で丸底96ウェルプレートに配置した。その細胞を、FACS緩衝液（ハンス平衡塩類溶液中の25mM HEPES、2mM EDTA、2%ウシ胎児血清）で洗浄した。50 μ Lの1:200希釈TruStain Mouse FcX（BioLegend）を各ウェルに加え、続いて、50 μ Lの100ng/ μ Lのヒト化28G11構築物（H0L0、H0L1、H0L2、H0L3、H1L0、H1L1、H1L2、H1L3、H2L0、H2L1、H2L2、H2L3）を加えた。表34を参照されたい。抗体を10分間結合させた。50 μ Lの6.2ng/ μ Lのビオチン化マウスハイブリドーマ28G11__（hyb）を各ウェルに加えた。そのビオチン化抗体を10分間結合させ、次いで、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄した。細胞をアロフィトシアニン - ストレプトアビジン（BioLegend）で15分間標識し、FACS緩衝液で2回洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。

【0490】

図12に示されているように、H0、H1又はL0を含む全ての構築物は、ビオチン - 28G11のヒトLAP - TGF β 1への結合をブロックできなかった、このことは、これらのヒト化フレームワークでは、CDRループがLAP - TGF β 1の緊密な結合に正しい構造を採用できないことを示している。28G11__H2L1、28G11__H2L2及び28G11__H2L3は、親マウス抗体と競合した。これらの構築物は、特異的結合を確認するためにビオチン化した。

【0491】

次に、ヒトGARP及びLAP - TGF β 1を過剰発現するP3U1細胞へのヒト化28G11変異体の直接結合について試験した。簡単に説明すると、ヒトGARP及びLAP - TGF β 1を過剰発現するP3U1細胞を配置し、洗浄し、上記のようにFcX処理した。その細胞を10 μ g/mLのビオチン化28G11__H0L3、28G11__H2L0、28G11__H2L1、28G11__H2L2、又は28G11__H2L3と一緒に4で20分間インキュベートした。細胞を洗浄し、APC - ストレプトアビジンで染色し、再度洗浄し、上記で記載したようにフローサイトメトリーによって分析した。競合実験と一致して、28G11__H0L3及び28G11__H2L0は結合しなかったが、28G11__H2L1、28G11__H2L2及び28G11__H2L3は、ヒトLAP - TGF β 1への強力な結合を示した（図13）。

【0492】

上記研究で試験されたヒト化28G11変異体の中で最も強力な結合を示した28G11__H2L1、28G11__H2L2及び28G11__H2L3のTGF β 1活性化を阻害する能力について、ELISAに基づくアッセイで試験した。簡単に説明すると、ヒトTGF β 1を発現するP3U1細胞を、丸底組織培養プレート内の無血清advanced培地で一晚培養し、翌日、ヒト化28G11変異体（20 μ g/mLで開始する2倍段階希釈）で24時間処理した。活性TGF β 1は、市販のヒトTGF β 1 ELISAキット（R&D Systems）を製造元の指示に従って使用して、細胞培養の上清の中で検出した。図14A - 図14Dに示されているように、28G11__（hyb）、28G11__H2L1及び28G11__H2L3はTGF β 1の活性化を阻害したが、28G11__H2L2は阻害しなかった。

【0493】

上記研究に基づいて、最良の結合は、28G11__H2L3で観察された。以下に示されているように、H2重鎖とL3軽鎖の両方に、ヒトのフレームワークからマウス残基に逆変異した6つの位置が含まれている（逆変異した残基は、小文字で下線が引かれている。

【表 1 4】

28G11_H2: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTF_tDYYMS WVRQAPGKGLEW_lG
 FIRNKPNGYTTTEYSASVKGRFTISRDN_sSLYLQMN_sSLKTEDTAVYYCAR YTGGGYFDY
 WGQGTL_lTVSS 配列番号: 35)

28G11_L3: DIQMTQSPSSLSASVGDR_lTI_sC RASQDISNYLN WYQQKPGK_tvKLLIY
 YTSRLHS GVPSRFSGSGSGTD_yTLTISSLQPEDVATY_fC QQGDTLPWT FGQGTKLEIK
 (配列番号: 50)

10

【0 4 9 4】

2 8 G 1 1 __ H 2 L 3 は、個々の逆置換を追加して、逆変異位置の何れがヒトの残基に耐えられるかを決定するための土台として使用した。図 1 5 A 及び 1 5 B は、ヒト残基への復帰のさまざまな組み合わせがヒト L A P - T G F 1 を過剰発現する H T 1 0 8 0 細胞への結合に及ぼす影響を示している。例えば、H C __ N 7 3 D + L C __ Y 7 1 F の組み合わせは結合を排除し、H C __ T 3 0 S + L C __ V 4 4 P の組み合わせは結合を減少させた。L C __ L 1 9 V 構築物は、殆ど発現しなかった。図 1 5 A のデータから、L 4 8 V、Q 7 5 K、S 7 6 N 及び L 1 0 9 V の置換は重鎖で許容されることができ(配列 2 8 G 1 1 __ H 2 a になる)、並びに、T 4 3 V 及び F 8 7 Y は軽鎖で許容されることができ(配列 2 8 G 1 1 __ L 3 a になる)と結論付けられた。2 8 G 1 1 __ H 2 a L 3 a は、ヒト L A P - T G F 1 を過剰発現する H T 1 0 8 0 細胞への結合について試験した。表 1 2 及び表 3 4 を参照されたい。図 1 5 B に示されているように、この構築物は、親マウス 2 8 G 1 1 抗体の元の可変領域ドメインを含むマウス - ヒトキメラと同様に結合する。

20

【0 4 9 5】

2 8 G 1 1 __ H 2 L 3 配列は、脱アミド化反応を受けてアスパラギン残基の位置にアスパラギン酸又はイソアスパラギン酸を生成し得る C D R 2 領域に「N G」ジペプチドを含む。これを防ぐために、N 5 6 Q 置換が配列(2 8 G 1 1 __ H 2 . 1 L 3)に導入された。この抗体は、H T 1 0 8 0 - h u B 1 細胞に元の配列よりもわずかによく結合する(図 1 5 B)。

30

【0 4 9 6】

実施例 1 0 : ヒト化 2 2 F 9 候補及び障害部位が除去された 2 2 F 9 変異体の特性評価
 この実施例では、さまざまなヒト化 2 2 F 9 候補の特徴を調べて、親抗体の機能(例えば、T G F 1 への結合)を保持するヒト化抗体を特定した。さらにまた、脱アミド化/異性化部位が除去された 2 2 F 9 変異体も調べた。表 1 2 は、この実施例で使用されるさまざまな 2 2 F 9 変異体をまとめたものである。これらの構築物の配列は表 3 4 に記載されている。

40

50

【表 15】

表 12. 代表的な 22F9 抗体及び抗原結合フラグメント

| 配列番号 | 名称 | 説明 |
|------|-----------|--|
| 72 | 22F9_H0 | 親マウス抗体の CDR1、CDR2 及び CDR3 配列がコンセンサスフレームワーク 4 配列を有する IGHV1-46*01 生殖細胞系列に挿入されているヒト化 22F9 重鎖配列 |
| 74 | 22F9_H0.1 | アミノ置換 S7P、K12V、V20L、R38K、A40R、N54Q、R66K、V67A、M69L、T73K、T75S、V78A 及び D102A を含んでいるヒト化 22F9_H0 重鎖配列 |
| 76 | 22F9_H1 | アミノ置換 M48I、R71V 及び R94Y を含んでいるヒト化 22F9_H0 重鎖配列 |
| 78 | 22F9_H1.1 | アミノ置換 S7P、K12V、V20L、R38K、A40R、M48I、N54Q、R66K、V67A、R71V、T73K、T75S、R94Y 及び D102A を含んでいるヒト化 22F9_H0 重鎖配列 |
| 81 | 22F9_H2 | アミノ置換 M48I、M69L、R71V、V78A 及び R94Y を含んでいるヒト化 22F9_H0 重鎖配列 |
| 83 | 22F9_H2.1 | アミノ置換 S7P、K12V、V20L、R38K、A40R、M48I、N54Q、R66K、V67A、M69L、R71V、T73K、V78A、R94Y 及び D102A を含んでいるヒト化 22F9_H0 重鎖配列 |
| 86 | 22F9_H3 | アミノ置換 M48I、M69L、R71V、T73K、T75S、V78A 及び R94Y を含んでいるヒト化 22F9_H0 重鎖配列 |
| 88 | 22F9_H3.1 | アミノ置換 S7P、K12V、V20L、M48I、N54Q、M69L、R71V、T73K、T75S、V78A、R94Y 及び D102A を含んでいるヒト化 22F9_H0 重鎖配列 |
| 91 | 22F9_H4 | アミノ置換 R38K、A40R、M48I、R66K、V67A、M69L、R71V、T73K、T75S、V78A 及び R94Y を含んでいるヒト化 22F9_H0 重鎖配列 |

10

20

30

40

【0497】

50

| | | | |
|-----|-------------------|---|----|
| 93 | 22F9_H5 | アミノ置換 S7P、K12V、V20L、R38K、A40R、M48I、R66K、V67A、M69L、R71V、T73K、T75S、V78A 及び R94Y を含んでいるヒト化 22F9_H0 重鎖配列 | |
| 96 | 22F9_H5.2 | アミノ置換 S7P、K12V、V20L、R38K、A40R、M48I、N54Q、R66K、V67A、M69L、R71V、T73K、T75S、V78A、R94Y 及び D102A を含んでいるヒト化 22F9_H0 重鎖配列 | 10 |
| 99 | 22F9_H7 | アミノ置換 S7P、K12V、V20L、M48I、N54Q、R71V、T73K、R94Y 及び D102A を含んでいるヒト化 22F9_H0 重鎖配列 | |
| 100 | 22F9_H7_hIgG4mut | 変異体ヒト IgG4 定常領域を有する 22F9_H7 重鎖；該変異体ヒト IgG4 定常領域は、配列番号 197 の配列を有する | |
| 102 | 22F9_H7a | アミノ置換 Q1E、S7P、K12V、V20L、M48I、N54Q、R71V、T73K、R94Y 及び D102A を含んでいるヒト化 22F9_H0 重鎖配列 | |
| 103 | 22F9_H7a_hIgG4mut | 変異体ヒト IgG4 定常領域を有する 22F9_H7a 重鎖；該変異体ヒト IgG4 定常領域は、配列番号 197 の配列を有する | 20 |
| 105 | 22F9_L0 | 親マウス抗体の CDR1、CDR2 及び CDR3 配列が IGKJ4 フレームワーク 4 配列を有する IGKV1-39x01 生殖細胞系列に挿入されているヒト化 22F9 軽鎖配列 | |
| 107 | 22F9_L1 | アミノ置換 A43P 及び D70H を含んでいるヒト化 22F9_L0 軽鎖配列 | |
| 109 | 22F9_L2 | アミノ置換 A13V、V19A、A43P、D70H、L78V 及び V104L を含んでいるヒト化 22F9_L0 軽鎖配列 | 30 |

【 0 4 9 8 】

最初に、22F9__H0L0、H1L0、H2L0、H3L0、H4L0、H5L0、H0L1、H1L1、H2L1、H3L1、H4L1、H5L1、H0L2、H1L2、H2L2、H3L3、H4L2 及び H5L2 がヒト TGF-1 を過剰発現する HT1080 細胞に結合する能力について、フローサイトメトリーで試験した。ヒト LAP-TGF-1 を過剰発現する HT1080 細胞を、40,000 細胞/ウェルの密度で丸底 96 ウェルプレート内に配置した。その細胞を FACS 緩衝液（ハンクの平衡塩類溶液中の 25 mM HEPES、2 mM EDTA、2% ウシ胎児血清）で洗浄した。50 µL の 1:200 に希釈した TruStain Human FcX (BioLegend) を各ウェルに添加し、続いて、50 µL の 100 ng/mL のヒト化 22F9 構築物を添加した。その抗体を 20 分間結合させた。細胞を FACS 緩衝液で 2 回洗浄した。細胞を Alexa647-抗ヒト IgG (Jackson ImmunoResearch) で 15 分間標識し、FACS 緩衝液で 2 回洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。図 16 に示されているように、22F9__H2L0、H3L0、H4L0、H5L0、H2L1、H3L1、H4L1、H5L1 及び H4L2 は、対照 HT1080 細胞及び 22F9__H0L0 と比較してある程度の結合を示した。最も強い結合は、H5 重鎖配列を含む抗体で観察された。

【 0 4 9 9 】

10

20

30

40

50

候補のサブセットのヒト TGF- β 1 への結合も、バイオレイヤー干渉法 (Octet) によって試験した。ストレプトアビジンでコーティングされたチップを結合緩衝液 (10 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、1% ウシ血清アルブミン、0.05% アジ化ナトリウム) 中で 60 秒間平衡化した。次に、そのチップを結合緩衝液中の 10 μ g/mL ビオチン化抗体に浸漬した。15 秒間経過した後、そのチップを結合緩衝液中で 60 秒間洗浄し、次いで、0 - 24 nM Fc-ヒト LAP に浸漬した。分析対象物の会合を 5 分間測定した。チップを結合緩衝液のみに移し、分析対象物の解離を 5 分間測定した。結合及び解離データを、1:1 結合モデルに適合させた。表 13 に示されているように、試験した候補のうち、22F9_H5L0 は結合時に最も高いシグナル変化を示し、22F9_H4L0 は最も強い親和性を示した。

10

【表 16】

表 13. 22F9 抗体及び抗原結合フラグメントに関する結合データ

| 抗体 | k_{on} ($\times 10^5$ M $^{-1}$ s $^{-1}$) | k_{off} ($\times 10^{-3}$ s $^{-1}$) | K_D (nM) | ローディング (nm) | 結合 (nm) |
|------------|--|--|------------|-------------|---------|
| 22F9_hIgG1 | 4.50 | 1.68 | 3.74 | 1.13 | 0.27 |
| 22F9_H3L0 | 7.78 | 2.14 | 2.75 | 0.99 | 0.023 |
| 22F9_H4L0 | 8.10 | 1.32 | 1.63 | 0.90 | 0.057 |
| 22F9_H4L2 | 5.98 | 1.37 | 2.30 | 1.17 | 0.07 |
| 22F9_H5L0 | 5.10 | 1.7 | 3.35 | 1.22 | 0.13 |
| 22F9_H5L1 | 5.19 | 1.22 | 2.34 | 1.29 | 0.08 |
| 22F9_H5L2 | 6.29 | 2.46 | 3.91 | 1.25 | 0.06 |

20

【0500】

別の実験では、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を使用して候補の凝集を評価した。各タンパク質は、リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) で 1 mg/mL に希釈した。Sepax SEC-300 カラムを、「10 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、0.05% (v/v) アジ化ナトリウム、pH 7.4」で平衡化した。10 μ L の 1 mg/mL の抗体をカラムに注入した。溶出したタンパク質は、280 nm での吸光度によって検出した。IgG モノマーのピークは、その保持時間を一連のゲル濾過分子量標準 (Bio-Rad) と比較することによって特定した。結果は、表 14 に示されている。

30

40

50

【表 17】

表 14. 22F9 クロマトグラフィーデータ

| 抗体 | RT (分) | 面積 (mAU*s) | % 単量体 |
|-------------|--------|------------|-------|
| 22F9_mIgG2a | 7.956 | 341 | >99% |
| 22F9_hIgG1 | 8.035 | 259 | >99% |
| 22F9_H0L0 | 7.93 | 160 | 77% |
| 22F9_H4L0 | 8.083 | 168 | >99% |
| 22F9_H4L1 | 8.178 | 180 | >99% |
| 22F9_H4L2 | 8.161 | 214 | >99% |
| 22F9_H5L0 | 8.02 | 220 | >99% |
| 22F9_H5L1 | 8.106 | 219 | >99% |
| 22F9_H5L2 | 8.11 | 206 | >99% |

10

【0501】

20

試験された候補の殆どは、モノマーの高い割合 (>99%) を反映して、凝集を殆ど示さなかった。予想よりも低い Octet 結合シグナルを持つ候補も、より小さな SEC ピークを有していた。22F9_H4L0 に関する有意に小さい総面積は、集合体が大きすぎてカラムに入ることができないことを意味するが、一方、22F9_H5 構築物は全て正常に挙動した。図 17A は、22F9_hIgG1、22F9_H0L0 及び 22F9_H4L0 に関するサイズ排除高性能体クロマトグラフィー (SE-HPLC) の結果を示しており、図 17B は、22F9_H5L0、H5L1 及び H5L2 に関する結果を示している。

【0502】

30

その配列が以下に提供されている H5L0 候補は、どのマウス残基が必須であるかを確認するために、単一位置換によってマウス残基を対応するヒト残基に戻すことによってさらに特徴付けを行った。潜在的な脱アミド化部位 (N54S、N54H、N54A、N54Q) 及び異性化部位 (D102E、D102A、D102G) を除去するために、追加の置換を実施した。

【表 18】

22F9_H5: QVQLVQpGAEVvKPGASVKlSCKAS GYTF~~T~~SYWMH WVkQrPGQGLEWig
 MIHPN~~S~~SGSTNYNEKFKS kaTlTvDkSsSt~~a~~YMELSSLRSEDTAVYYCAy YDYDGF~~F~~FDV
 WGQGTlLVTVSS (配列番号: 92)

40

【0503】

図 18A に示されているように、マウスのフレームワーク残基をヒトに戻す全ての単一位置換は、LAP-TGF 1 への結合を実質的に低減させた。図 18B に示されているように、N54Q 及び D102A 置換は、これらの位置における全ての置換の殆どの結合活性を保持し、二重 N54Q/D102A 変異体 (22F9_H5.2) は、このアッセイで試験した全ての抗体の中で最も強い結合シグナルを示した。表 12 及び表 34 も参照されたい。

【0504】

単一の変異体はマウス残基の数の減少をもたらさなかったため、グループでアミノ酸置換

50

を行うために代替戦略が採用された。22F9__H0.1、22F9__H1.1、22F9__H2.1及び22F9__H3.1と標識付けされたこれらの構築物は、上記で記載したように、ヒトLAP-TGF β 1を過剰発現するHT1080細胞への結合についてアッセイした。図18Cに示されているように、22F9__H0.1変異体はヒトLAP-TGF β 1に結合しなかったが、22F9__H1.1、22F9__H2.1及び22F9__H3.1変異体はヒトLAP-TGF β 1に結合した。

【0505】

実施例11：ヒト化20E6候補及び障害部位が除去された20E6変異体の特性評価
この実施例では、さまざまなヒト化20E6候補の特徴を調べて、親抗体の機能（例えば、TGF β 1への結合）を保持するヒト化抗体を特定した。さらにまた、脱アミド化/異性化部位が除去された20E6変異体も調べた。表15は、この実施例で使用されるさまざまな20E6変異体をまとめたものである。これらの構築物の配列は表34に記載されている。特に、L1は、3つのマウス、即ち、P44V（これは、VH/VLインターフェースにあり、そして、潜在的にドメインの対形成と安定性に影響を与える可能性がある）、F71Y（CDRL2の構造に潜在的に影響を与える可能性があるカノニカル残基）及びY87F（これは、VH/VLインターフェースにあり、そして、潜在的にドメインの対形成と安定性に影響を与える可能性がある）逆置換を含む。

10

20

30

40

50

【表 19】

表 15. 代表的な 20E6 抗体及び抗原結合フラグメント

| 配列番号 | 名称 | 説明 |
|------|---------------------|---|
| 128 | 20E6_H0 | 親マウス抗体の CDR1、CDR2 (拡張定義) 及び CDR3 配列がコンセンサスフレームワーク 4 配列を有する IGHV1-2*02 生殖細胞系列に挿入されているヒト化 20E6 重鎖配列 |
| 131 | 20E6_H0.1 | 親マウス抗体の CDR1、CDR2 及び CDR3 配列がコンセンサスフレームワーク 4 配列を有する IGHV1-2*02 生殖細胞系列に挿入されているヒト化 20E6 重鎖配列 |
| 134 | 20E6_H0.2 | アミノ酸置換 N54Q を含んでいるヒト化 20E6_H0.1 重鎖配列 |
| 219 | 20E6_H0.2a | アミノ酸置換 Q1E 及び N54Q を含んでいるヒト化 20E6_H0.1 重鎖配列 |
| 136 | 20E6_H0.3 | アミノ酸置換 N54G を含んでいるヒト化 20E6_H0.1 重鎖配列 |
| 137 | 20E6_H0.4 | アミノ酸置換 N54A を含んでいるヒト化 20E6_H0.1 重鎖配列 |
| 138 | 20E6_H0.5 | アミノ酸置換 N54S を含んでいるヒト化 20E6_H0.1 重鎖配列 |
| 139 | 20E6_H0.6 | アミノ酸置換 N54H を含んでいるヒト化 20E6_H0.1 重鎖配列 |
| 140 | 20E6_H0.7 | アミノ酸置換 N54L を含んでいるヒト化 20E6_H0.1 重鎖配列 |
| 141 | 20E6_H0.8 | アミノ酸置換 N54D を含んでいるヒト化 20E6_H0.1 重鎖配列 |
| 135 | 20E6_H0.2_hIgG4 mut | 変異体ヒト IgG4 定常領域を有する 20E6_H0.2 重鎖; 該変異体ヒト IgG4 定常領域は、配列番号 197 の配列を有している |

10

20

30

40

【0506】

50

| | | | |
|-----|-------------------------|--|----|
| 220 | 20E6_H0.2a_hIgG4 mut | 変異体ヒト IgG4 定常領域を有する 20E6_H0.2a 重鎖；該変異体ヒト IgG4 定常領域は、配列番号 197 の配列を有している | |
| 145 | 20E6_H1 | アミノ酸置換 M48I、M69L、R71V を含んでいるヒト化 20E6_H0 重鎖配列 | |
| 147 | 20E6_H2 | アミノ酸置換 M48I、M69L、R71V、T73K、T75S を含んでいるヒト化 20E6_H0 重鎖配列 | 10 |
| 149 | 20E6_H3 | アミノ酸置換 R38K、A40R、M48I、R66K、V67A、M69L、R71V、T73K、T75S を含んでいるヒト化 20E6_H0 重鎖配列 | |
| 151 | 20E6_H4 | アミノ酸置換 S7P、K12V、V20L、R38K、A40R、M48I、R66K、V67A、M69L、R71V、T73K、T75S を含んでいるヒト化 20E6_H0 重鎖配列 | 20 |
| 153 | 20E6_L0 | 親マウス抗体の CDR1、CDR2 及び CDR3 配列が IGKJ2 フレームワーク 4 配列を有する IGKV1-39*01 生殖細胞系列に挿入されているヒト化 20E6 軽鎖配列 | |
| 155 | 20E6_L1 | アミノ酸置換 P44V、F71Y、Y87F を含んでいるヒト化 20E6_L0 軽鎖配列 | |
| 157 | 20E6_L0_P44V | 位置 44 に P から V への変異を有する 20E6_L0 | |
| 159 | 20E6_L0_F71Y | 位置 71 に F から Y への変異を有する 20E6_L0 | 30 |
| 161 | 20E6_L0_Y87F | 位置 87 に Y から F への変異を有する 20E6_L0 | |

【 0 5 0 7 】

最初に、ヒト TGF β 1 を過剰発現する HT 1080 細胞に結合するヒト化 20E6 候補の能力をフローサイトメトリーによって試験した。ヒト LAP-TGF β 1 を過剰発現する HT 1080 細胞を、40,000 細胞/ウェルの密度で丸底 96 ウェルプレートに配置した。細胞を FACS 緩衝液（ハンクス平衡塩類溶液中の 25 mM HEPES、2 mM EDTA、2% ウシ胎児血清）で洗浄した。体積（50 μ L）の 1:200 に希釈した TruStain Human FcX（BioLegend）を各ウェルに加え、続いて、50 μ L の 100 ng/ μ L のヒト化 20E6 抗体構築物を加えた。その抗体を 20 分間結合させた。細胞を FACS 緩衝液で 2 回洗浄した。細胞を Alexa647-抗ヒト IgG（Jackson ImmunoResearch）で 15 分間標識し、FACS 緩衝液で 2 回洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。図 19A 及び図 19B に示されているように、L1 軽鎖を含む候補は、対照の HT 1080 細胞と比較して HT 1080-hu β 1 細胞への強い結合を示した。

【 0 5 0 8 】

ヒト化 20E6 候補のヒト LAP-TGF β 1 への結合も、バイオレイヤー干渉法（Octet）によって試験した。表 16 に示されているように、20E6_H(0-4)L1 は、フローサイトメトリーの結果と一致して、同等の結合速度を示した。

10

20

30

40

50

【表 20】

表 16. 20E6 に関する Octet 結合データ

| 抗体 | k_{on} ($\times 10^5 M^{-1}s^{-1}$) | k_{off} ($\times 10^{-3} s^{-1}$) | K_D (nM) |
|------------|---|---------------------------------------|------------|
| 20E6_hIgG1 | 0.98 | 9.97 | 1.02 |
| 20E6_H0L1 | 1.59 | 8.14 | 0.51 |
| 20E6_H1L1 | 1.41 | 6.77 | 0.48 |
| 20E6_H2L1 | 1.57 | 7.47 | 0.48 |
| 20E6_H3L1 | 1.48 | 7.02 | 0.47 |
| 20E6_H4L1 | 1.56 | 7.29 | 0.47 |

10

【0509】

上記で論じたように、L1 軽鎖は、3つのマウスの逆置換、即ち、P44V、F71Y及びY87Fを含む。これらのマウス逆置換の3つ全てがLAP-TGF β 1への結合に必要かどうかを確認するために、各置換を個別にL0軽鎖に導入し、20E6_H0L1と比較した。図20Aに示されているように、LAP-TGF β 1を過剰発現しているHT1080細胞に結合するには、3つ全てのマウスの逆置換が必要である。

20

【0510】

20E6_H0配列を生成するために使用したCDRグラフト化は、重鎖CDR2の拡張定義を使用し、それによって、20E6_H0に追加のマウス残基が組み込まれた。免疫原性のリスクを減らすために、20E6_H0の変異体を、重鎖CDR2に関する従来の(Kabat)定義で作成した。この構築物20E6_H0.1は、ヒトLAP-TGF β 1及び20E6_H0に結合した、このことは、これらのマウス残基が不要であることを示している(図20B)。

【0511】

実施例12: 抗LAP抗体のヒトLAP-TGF β 1、2及び3への結合

30

この実施例は、ヒトLAP-TGF β 1、2及び3への結合に対する、配列番号219及び155のそれぞれの重鎖及び軽鎖配列を有するヒト化20E6(20E6_H0.2aL1_IgG1)抗体の特異性についての、バイオレイヤー干渉法を使用した試験について記載している。

【0512】

20E6_H0.2aL1_IgG1抗体を、EZ-Link SulfoNHS-LC-ビオチン(ThermoFisher)を使用してビオチン化した。ストレプトアビジンで官能化したチップを結合緩衝液(10mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、1%(w/v)ウシ血清アルブミン、0.05%(w/v)アジ化ナトリウム、pH7.4)の中で平衡化し、そして、チップに抗体をロードするために、結合緩衝液中のビオチン化抗LAPの10 μ g/mL溶液に30秒間に浸した。次に、抗体をロードしたチップを結合緩衝液中で洗浄し、そして、ヒトLAP-TGF β 1、ヒトLAP-TGF β 2又はヒトLAP-TGF β 3のいずれかに融合させたヒトIgG1 Fcドメインを有する0-24nMの融合タンパク質を含む溶液に入れた。抗原を抗体に5分間結合させ(結合相)、次に、チップを結合緩衝液に移動させた(解離相)。結合相と解離相を2:1の異種リガンド結合モデルに適合させて、結合速度定数を決定した。図21A及び表17に示されているように、20E6_H0.2aL1_IgG1は、ナノモル以下の親和性でヒトLAP-TGF β 1に結合したが、ヒトLAP-TGF β 2(図21B)又はLAP-TGF β 3(図21C)には結合しなかった。これらのデータは、20E6_H0.2aL1_IgG1抗体がヒトLAP-TGF β 1に特異的に結合すること、並びに、

40

50

LAP-TGF β 2 及び LAP-TGF β 3 には結合しないことを実証した。

【表 2 1】

表 1 7. ヒト LAP-TGF β 1、2 及び 3 への抗 LAP 抗体 20E6_H0.2aL1_IgG1 の結合

| サンプル ID | k_{on} ($\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$) | k_{off} ($\times 10^{-4} s^{-1}$) | K_D (nM) | $k_{on,2}$ ($\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$) | $k_{off,2}$ ($\times 10^{-4} s^{-1}$) | $K_{D,2}$ (nM) |
|---------|--|--|---------------|--|--|-------------------|
| Fc-huB1 | 3.24 | 369 | 11.4 | 1.18 | 4.09 | 0.35 |
| Fc-huB2 | - | - | - | - | - | - |
| Fc-huB3 | - | - | - | - | - | - |

10

【0 5 1 3】

実施例 1 3 : マウス、ラット、カニクイザル及びヒト LAP-TGF β 1 への抗 LAP 抗体の結合

この実施例は、20E6_H0.2aL1_hIgG1 抗体と 20E6_H0.2aL1_hIgG4mut 抗体（これらは、それぞれ、配列番号 220 及び 155 の重鎖及び軽鎖配列を含む）のいくつかの種からの LAP-TGF β 1 に結合するための種特異性についての、バイオレイヤー干渉法を使用した試験について記載している。

【0 5 1 4】

さまざまな種の LAP-TGF β 1 への 20E6_H0.2aL1_IgG1 抗体及び 20E6_H0.2aL1_hIgG4mut 抗体の結合を、抗体をロードしたチップをマウス、ラット、カニクイザル又はヒト LAP-TGF β 1 のいずれかに融合させたヒト IgG1 Fcドメインを有する 0-24 nM の融合タンパク質を含む溶液に入れた以外は、実施例 1 2 に記載されている方法を使用してバイオレイヤー干渉法によって調べた。それぞれ表 1 8 及び表 1 9 に示されているように、20E6_H0.2aL1_hIgG1 抗体及び 20E6_H0.2aL1_hIgG4mut 抗体は、試験した全ての種の LAP-TGF β 1 にナノモルの親和性で結合した。

20

【表 2 2】

表 1 8. さまざまな種の LAP-TGF β 1 への 20E6_H0.2aL1_IgG1 抗体の結合データ

| LAP-TGF β 1 | K_D (nM) | k_{on} ($\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$) | k_{off} ($\times 10^{-4} s^{-1}$) | $K_{D,2}$ (nM) | $k_{on,2}$ ($\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$) | $k_{off,2}$ ($\times 10^{-4} s^{-1}$) |
|-------------------|-------------------------------|---|---------------------------------------|-----------------|---|---|
| ヒト | 16.51 \pm 0.01 ^a | 2.15 \pm 0.18 | 355 \pm 14 | 0.97 \pm 0.10 | 0.68 \pm 0.02 | 6.57 \pm 0.67 |
| Cyno | 15.85 \pm 0.01 | 2.49 \pm 0.30 | 394 \pm 22 | 0.71 \pm 0.13 | 1.03 \pm 0.06 | 7.28 \pm 1.24 |
| ラット | 13.38 \pm 0.01 | 3.30 \pm 0.25 | 441 \pm 16 | 0.68 \pm 0.07 | 1.14 \pm 0.05 | 7.68 \pm 0.77 |
| マウス | 14.19 \pm 0.01 | 2.42 \pm 0.26 | 343 \pm 19 | 0.56 \pm 0.14 | 0.70 \pm 0.04 | 3.90 \pm 0.98 |

^a 全ての値は、3 回の測定からの平均 \pm 標準偏差として報告されている

30

【表 2 3】

表 1 9. さまざまな種の LAP-TGF β 1 の LAP-TGF β 1 への 20E6_H0.2aL1_hIgG4mut 抗体の結合データ

| | K_D (nM) | k_{on} ($\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$) | k_{off} ($\times 10^{-4} s^{-1}$) | $K_{D,2}$ (nM) | $k_{on,2}$ ($\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$) | $k_{off,2}$ ($\times 10^{-4} s^{-1}$) |
|------|------------------|---|---------------------------------------|-----------------|---|---|
| ヒト | 10.72 \pm 0.01 | 2.8 \pm 0.3 | 303 \pm 16 | 0.51 \pm 0.12 | 0.70 \pm 0.03 | 3.6 \pm 0.8 |
| Cyno | 26.14 \pm 0.05 | 2.0 \pm 0.4 | 524 \pm 36 | 1.53 \pm 0.18 | 0.94 \pm 0.06 | 14.3 \pm 1.4 |
| ラット | 11.14 \pm 0.01 | 3.6 \pm 0.4 | 406 \pm 20 | 0.51 \pm 0.06 | 1.70 \pm 0.08 | 8.7 \pm 0.9 |
| マウス | 16.88 \pm 0.02 | 2.8 \pm 0.4 | 478 \pm 27 | 1.31 \pm 0.11 | 0.84 \pm 0.04 | 11.0 \pm 0.8 |

^a 全ての値は、3 回の測定からの平均 \pm 標準偏差として報告されている

40

50

【0515】

実施例14：ヒト化20E6におけるCDRのアラニンスキャニング突然変異誘発

この実施例は、20E6__H0.2aL1__IgG1抗体の変異体へのヒトLAP-TGF 1の結合についての、バイオレイヤー干渉法を使用した試験について記載している。

【0516】

ヒトLAP-TGF 1結合に関する重要な残基を特定するために、抗体の重鎖及び軽鎖CDR内で合計49の単一アラニン置換を実施した。さらに、軽鎖の残基A25をグリシンで置換した。これらの変異体のプラスミドDNAを、DNAを含まないウェル（陰性対照）及び野生型抗体のDNAがトランスフェクトされたウェル（陽性対照）と一緒に、24ウェルプレート上の1mL培養内でExpichO細胞にトランスフェクトした。各ウェル内のIgG濃度は、プロテインAで官能化されたチップに結合することによって確認した。各培養物からの上清を含むウェルにチップを浸漬した。各ウェルのシグナル変化率を、ExpichO培地内で希釈した精製20E6__H0.2aL1__hIgG1抗体の標準曲線のシグナル変化率と比較することにより、IgG濃度を決定した。CHO上清を培地で0.6µg/mLに希釈した。ストレプトアビジンで官能化したチップを結合緩衝液（10mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、1%（w/v）ウシ血清アルブミン、0.05%（w/v）アジ化ナトリウム、pH7.4）内で平衡化し、次いで、チップに抗原をロードするために、結合緩衝液中のビオチン化ヒトLAP-TGF 1の5µg/mL溶液の中に60秒間浸漬した。次に、抗原をロードしたチップを結合緩衝液中で洗浄し、希釈されたCHO上清の中に入れた。抗原を抗体に5分間結合させ（結合相）、次に、チップを結合緩衝液に移動させた（解離相）。結合及び解離相を1:1結合モデルに適合させて、結合速度定数を決定した。

10

20

【0517】

図22A-図22D及び表20に示されているように、重鎖内の位置50、99、101、102、103、104、105及び軽鎖内の位置24、28、29、32、50、53、89、90、91、92、94、95、96及び97におけるアラニン置換は、結合親和性に中程度から重度の影響を及ぼした、このことは、これらの残基がヒトLAP-TGF 1への結合に関与していることを示している。

【0518】

実施例15：ヒトLAP-TGF 1への抗LAP抗体の一価結合対二価結合

この実施例は、ヒトLAP-TGF 1に対する20E6__H0.2aL1__hIgG1抗体の一価結合と二価結合を比較した。

30

【0519】

FragITキット（Genovis）を製造元の指示に従って使用して、20E6__H0.2aL1__hIgG1抗体のF(ab')₂フラグメントを生成した。次に、F(ab')₂を10mM 2-メルカプトエチルアミン-HCl（2-MEA）で処理して、Fab'フラグメントを生成した。ヒトLAP-TGF 1を過剰発現する細胞への結合について試験するために、それぞれ4×10⁵個の（a）R3U1細胞及び（b）ヒトGARF及びヒトLAP-TGF 1を過剰発現するR3U1細胞を、96ウェルプレートで培養した。そのプレートを1,500rpmで5分間遠心分離し、液体を除去し、細胞を200µLのFACS緩衝液に再度懸濁させた。プレートを再度遠心分離し、希釈された一次抗体を各ウェルに加え、プレートを氷上で20分間インキュベートし、その後、遠心分離した。細胞を200µLのFACS緩衝液に再度懸濁させ、再度遠心分離し、50µLの希釈された二次抗体（Alexa647-抗ヒトIgG）に再度懸濁させた。プレートを、暗所で、氷上で20分間インキュベートし、200µLのFACS緩衝液で2回洗浄し、各ウェルの細胞（200µLのFACS緩衝液中）をAttuneNX装置で読み取った。図23A及び図23Bに示されているように、3種類の構築物は全て、GARF及びLAP-TGF 1を過剰発現するP3U1細胞に結合した。

40

【0520】

実施例16：アンカータンパク質の存在下におけるヒトLAP-TGF 1への抗LA

50

P 抗体の結合

この実施例は、アンカータンパク質の存在下におけるヒト LAP - TGF β 1 への 20E6__H0.2aL1__hIgG1 抗体の結合に関する試験について記載している。

【0521】

LAP - TGF β を、LTBP を介して細胞外マトリックスに固定し、そして、GARP 又は LRRC33 を介して免疫抑制細胞の表面に固定する。可溶性形態のヒト LTBP1 及び GARP を調製して、抗 LAP 抗体結合に対するアンカータンパク質の影響を評価した。ECR3E フラグメント (「Annes et al. JCB 2004; 165 : 723」に記載されている) は、EGFR 様ドメインに隣接するヒト LTBP1 の 3 番目のシステインリッチドメインで構成されている。この構築物は、LAP - TGF β への共有結合に必要な全ての要素を含んでおり、可溶性複合体を形成する。可溶性 GARP - LAP - TGF β 複合体は、ヒト LAP - TGF β 1 を、ヒト GARP の細胞外ドメインと メブリン の膜貫通ドメイン及び細胞質ゾロドメインで構成されるキメラと、共発現させることによって調製した (「Fridrich et al. PLoS ONE. 2016; 11(4): e0153290」に記載されている)。

【0522】

ストレプトアビジンで官能化されたチップを結合緩衝液 (10 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、1% (w/v) ウシ血清アルブミン、0.05% (w/v) アジ化ナトリウム、pH 7.4) の中で平衡化し、そして、チップに抗体をロードするために、結合緩衝液の中のビオチン化抗体 (即ち、20E6__H0.2aL1__hIgG1、マウス 16F4、又は、MHG8、「Lienart et al. Science 2018; 362: 952 - 956」に記載されている GARP 特異的マウス IgG2a) の 5 μ g/mL 溶液に 30 秒間浸漬した。次に、抗体がロードされているチップを結合緩衝液で洗浄し、ヒト LAP - TGF β 1、可溶性 GARP - LAP - TGF β 1 複合体又は可溶性 ECR3E - LAP - TGF β 1 複合体のいずれかに融合させたヒト IgG1 Fc ドメインを含む 0 - 24 nM の融合タンパク質を含む溶液に入れた。抗原を抗体に 5 分間結合させ (結合相)、次に、チップを結合緩衝液に移動させた (解離相)。16F4 と MHG8 に関する結合と解離のデータは、1:1 の結合モデルによく適合した。20E6__H0.2aL1__hIgG1 抗体の結合相及び解離相を、2:1 の異種リガンド結合モデルに適合させて、結合速度定数を決定した。

【0523】

図 24 及び表 21 に示されているように、20E6__H0.2aL1__hIgG1 抗体は、遊離 LAP - TGF β 1 及び可溶性 GARP - LAP - TGF β 1 複合体にナノモルの親和性で結合したが、ECR3E - LAP - TGF β 1 複合体には結合しなかった。予想通り、抗 GARP 抗体 (MHG8) は GARP - LAP - TGF β 1 複合体に結合したが、遊離 LAP - TGF β 1 又は ECR3E - LAP - TGF β 1 複合体には結合しなかった。16F4 は、3 つの全ての構築物にしっかりと結合した。

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表 2 0 . 20E6_H0.2aL1_hlgG1 における CDR 置換のヒト LAP-TGFb1 結合効果

| 変異体 | K _{D,WT} /K _{D,Ala} | 変異体 | K _{D,WT} /K _{D,Ala} | 変異体 | K _{D,WT} /K _{D,Ala} | 変異体 | K _{D,WT} /K _{D,Ala} |
|---------|---------------------------------------|----------|---------------------------------------|----------|---------------------------------------|---------|---------------------------------------|
| WT #4 | 1.00 | WT #1 | 0.90 | WT #2 | 1.21 | WT #3 | 0.94 |
| VH_G26A | 1.40 | VH_S31A | 0.60 | VH_Y101A | 0.00 | VL_N34A | 0.07 |
| VH_Y27A | 1.29 | VH_Y32A | 1.00 | VH_G102A | 0.00 | VL_Y50A | 0.00 |
| VH_T28A | 0.97 | VH_W33A | 0.12 | VH_G103A | 0.00 | VL_T51A | 0.80 |
| VH_F29A | 1.16 | VH_M34A | 0.84 | VH_Y104A | 0.00 | VL_S52A | 0.12 |
| VH_T30A | 0.94 | VH_H35A | 2.07 | VH_F105A | 0.00 | VL_R53A | 0.02 |
| | | VH_R50A | 0.00 | VH_D106A | 0.24 | VL_L54A | 0.10 |
| | | VH_I51A | 0.73 | VH_V107A | 1.08 | VL_H55A | 0.33 |
| | | VH_D52A | 0.71 | VL_R24A | 0.01 | VL_Q89A | 0.01 |
| | | VH_P53A | 0.87 | VL_A25G | 0.09 | VL_Q90A | 0.00 |
| | | VH_Q54A | 0.67 | VL_S26S | 0.36 | VL_G91A | 0.00 |
| | | VH_S55A | 0.96 | VL_Q27A | 0.03 | VL_D92A | 0.00 |
| | | VH_G56A | 1.62 | VL_D28A | 0.00 | VL_T93A | 0.64 |
| | | VH_G57A | 0.37 | VL_I29A | 0.02 | VL_L94A | 0.00 |
| | | VH_I58A | 0.52 | VL_T30A | 1.00 | VL_P95A | 0.00 |
| | | VH_K59A | 0.69 | VL_N31A | 0.48 | VL_W96A | 0.00 |
| | | VH_W99A | 0.00 | VL_Y32A | 0.00 | VL_T97A | 0.01 |
| | | VH_D100A | 0.28 | VL_L33A | 0.08 | | |

10

20

30

40

50

【表 2 5】

表 2 1. 遊離 LAP-TGFβ1 複合体、可溶性 sGARP-LAP-TGFβ1 複合体及び ECR3E-LAP-TGFβ1 複合体に対する 20E6_H0.2aL1_hIgG1 抗体の結合アフィニティー

| サンプル | $K_{D,1}$ (nM) | $k_{on,1}$ ($\times 10^6 M^{-1} s^{-1}$) | $k_{off,1}$ ($\times 10^{-3} s^{-1}$) | $K_{D,2}$ (nM) | $k_{on,2}$ ($\times 10^6 M^{-1} s^{-1}$) | $k_{off,2}$ ($\times 10^{-3} s^{-1}$) |
|-----------|----------------|---|--|----------------|---|--|
| Fc-LAP | 16.16 ± 0.01 | 2.51 ± 0.25 | 40.58 ± 1.81 | 0.96 ± 0.09 | 0.96 ± 0.04 | 0.92 ± 0.07 |
| ECR3E-LAP | 結合無し | - | - | - | - | - |
| sGARP-LAP | 18.71 ± 0.05 | 2.77 ± 1.01 | 51.81 ± 6.84 | - | - | - |

10

【0 5 2 4】

実施例 1 7 : 可溶性ヒト GARP-LAP-TGFβ1 複合体への結合に関するヒト化 20E6 と他の抗 LAP 抗体の間の競合

マウス 28G11、16F4 及び MHG8 抗体は、ヒト GARP の細胞外ドメインとヒト LAP-TGFβ1 からなる可溶性複合体 (sGARP-LAP-TGFβ1) にしっかりと結合する。20E6_H0.2aL1_hIgG1 抗体もこの複合体にしっかりと結合することが観察された。図 2 5 に示されているように、競合実験を行って、これら 4 種の抗体の結合エピトープを比較した。

【0 5 2 5】

ストレプトアビジンで官能化されたチップを結合緩衝液 (10 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、1% (w/v) ウシ血清アルブミン、0.05% (w/v) アジ化ナトリウム、pH 7.4) の中で平衡化し、そして、チップに抗体をロードするために、結合緩衝液の中のビオチン化抗体 (即ち、20E6_H0.2aL1_hIgG1 抗体、マウス 16F4 抗体、マウス 28G11 抗体又は MHG8 抗体のいずれか) の 5 μg/mL 溶液に 30 秒間浸漬した。次に、抗体をロードしたチップを結合緩衝液の中で洗浄し、24 nM の sGARP-LAP-TGFβ1 複合体を含む溶液に入れた。抗原を抗体に 5 分間結合させ (結合相)、次に、チップを結合緩衝液のみ又は 24 nM の未修飾抗体を含むウェルに移した。2 番目の未修飾抗体の結合は、5 分間のインキュベーション後のシグナル変化によって評価した。

20

30

【0 5 2 6】

表 2 2 に示されているように、予想通り、4 種の全ての抗体が同じ抗体の結合をブロックした。20E6_H0.2aL1_hIgG1 (h12_hIgG1) 抗体は、28G11 抗体との結合について競合したが、16F4 抗体又は MHG8 抗体とは競合しなかった。

【表 2 6】

表 2 2. 可溶性ヒト sGARP-LAP-TGFβ1 複合体に対する抗 LAP 抗体の競合結合データ

| | MHG8 | 16F4 | h12_hIgG1 | 28G11 |
|-----------|------|------|-----------|-------|
| MHG8 | 0.00 | 0.30 | 0.25 | 0.28 |
| 16F4 | 0.46 | 0.00 | 0.43 | 0.43 |
| h12_hIgG1 | 0.07 | 0.08 | 0.00 | 0.00 |
| 28G11 | 0.29 | 0.20 | -0.01 | 0.00 |

40

【0 5 2 7】

実施例 1 8 : 最適化された 7H4 変異体抗体

この実施例は、抗体 7H4 の最適化 (例えば、重鎖内の潜在的な障害部位の除去) につい

50

て記載している。具体的には、CDR2内に位置している7H4の重鎖の位置55は、潜在的な異性化部位である。この潜在的な障害部位を除去するために、位置55のアスパラギン酸を、表23に記載されているように、アスパラギン酸以外のアミノ酸、例えば、グリシン、アラニン又はグルタミン酸に変異させる。配列は、表34に記載されている。

【0528】

これらの7H4変異体抗体は、本明細書中に記載されている方法を使用して、さまざまな機能（例えば、ヒトLAP-TGF1への結合、TGF1活性化の阻害、免疫細胞への結合）について試験することができる。

【表27】

表23. 7H4抗体配列及び抗原結合フラグメントの多種多様の変異体

| 配列番号 | 名称 | 説明 |
|------|--------------------|--------------------------------------|
| 221 | 7H4_HC (hyb) | マウス 7H4 重鎖配列 |
| 222 | 7H4_LC (hyb) | マウス 7H4 軽鎖配列 |
| 231 | 7H4_HCDR2 (D55G) | 潜在的な異性化部位(D55G)が除去されたマウス 7H4 重鎖 CDR2 |
| 232 | 7H4_HCDR2 (D55A) | 潜在的な異性化部位(D55A)が除去されたマウス 7H4 重鎖 CDR2 |
| 233 | 7H4_HCDR2 (D55E) | 潜在的な異性化部位(D55E)が除去されたマウス 7H4 重鎖 CDR2 |
| 234 | 7H4_VHmut#1 (D55G) | 潜在的な異性化部位(D55G)が除去されたマウス 7H4 重鎖 可変領域 |
| 235 | 7H4_VHmut#2 (D55A) | 潜在的な異性化部位(D55A)が除去されたマウス 7H4 重鎖 可変領域 |
| 236 | 7H4_VHmut#3 (D55E) | 潜在的な異性化部位(D55E)が除去されたマウス 7H4 重鎖 可変領域 |
| 224 | 7H4_VL | マウス 7H4 軽鎖可変領域配列 |
| 237 | 7H4_HCmut#1 (D55G) | 潜在的な異性化部位(D55G)が除去されたマウス 7H4 重鎖 |
| 238 | 7H4_HCmut#2 (D55A) | 潜在的な異性化部位(D55A)が除去されたマウス 7H4 重鎖 |
| 239 | 7H4_HCmut#3 (D55E) | 潜在的な異性化部位(D55E)が除去されたマウス 7H4 重鎖 |

【0529】

実施例19: LAP-TGF1と複合体を形成したヒト化20E6のCryo-EM構造

この実施例は、単粒子クライオ電子顕微鏡法(SP-Cryo-EM)による、ヒト化20E6が結合するLAP-TGF1上のエピトープ及びヒト化20E6のパラトープの識別について記載している。

【0530】

10

20

30

40

50

サンプル及びグリッドの調製。ヒト化 20E6 mAb (20E6__H0.2aL1__h IgG1) 及び Fab は、実施例 11 に記載されているように生成した。ヒトビオチン化 LAP-TGF1-Fc 及び GARP-LAP-TGF1 は、実施例 16 に記載されているように生成した。ヒト LAP-TGF1 は R&D から購入し、50%グリセロールを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) バッファー (10mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、pH7.4) に含まれて供給された。種々の濃度、比率及びインキュベーション時間でさまざまなタンパク質を使用して、いくつかの異なるサンプルを調製した。次の5つのサンプルを使用して、最終的な再構築物を生成した。

【0531】

(1) サンプル A : 20 マイクロリットル (μL 又は uL とも称される) の LAP-TGF1-Fc (PBS (10mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、pH7.4) 中の 10.3 μM (又は uM)) を、4.25 μM の LAP-TGF1-Fc と 4.3 μM の ヒト化 20E6-Mab からなる最終溶液 (二量体当たり 1 Mab の比) のために、4 uL の ヒト化 20E6 (PBS 中 26 μM) と混合させた; その混合物を氷上に 45 分間放置し、グリッドの調製に使用した。 10

【0532】

(2) サンプル B : サンプル A の 1 : 5 希釈物 : 4 μL の サンプル A + 16 μL の HEPES 緩衝生理食塩水 (HBS ; 20mM Hepes、150mM NaCl、pH7.0)。 20

【0533】

(3) サンプル C : 8 μL の LAP-TGF1-Fc (PBS 中 10.3 μM) を、2.34 μM の LAP-TGF1-Fc と 4.7 μM の ヒト化 20E6-Fab からなる最終溶液のために、8 μL の ヒト化 20E6 (PBS 中 8.6 μM) と混合させた; その混合物を氷上に 30 分間放置し、次に、HBS で 1 : 1 に希釈した。 20

【0534】

(4) サンプル D : 50%グリセロールを含む PBS 中の LAP-TGF1 を非グリセロール緩衝液 (即ち、PBS) に緩衝液交換し、そして、2 二量体 : 1 Mab 比で ヒト化 20E6-Mab と複合体を形成させ、次に、30 μM に濃縮した (HDX 試験用)。クライオEM試験では、サンプルを PBS で 10 倍に希釈した。 30

【0535】

(5) サンプル E : 1.2 μL の GARP-LAP-TGF1 (PBS 中 19.3 μM) を、4.4 μM の GARP-LAP-TGF1 と 2.2 μM の ヒト化 20E6-Fab からなる最終溶液 (GARP-LAP-TGF1 の 2 二量体当たり 1 Fab) のために、1.3 μL の ヒト化 20E6-Fab (PBS 中 8.6 μM) 及び 2.6 μL の HBS 緩衝液と混合させた。その混合物を氷上で 30 - 60 分間放置し、HBS 緩衝液で 1 : 10 に希釈した。 30

【0536】

Vitrobot Mark 4 (ThermoFisher) を使用し、標準的な手順を用いて、グリッド (金の表面に C-フラットカーボン、300メッシュ、1.3/1.2) を調製した: グリッドは、Pelco easyG1ow ユニット (Ted Pella, Inc.) をプラズマクリーニングに関する工場推奨値 (0.39mbar、低レベル 15mA、保持 10"、グロー 30") で使用して、グロー放電させた。Vitrobot は、以下のように設定した: チャンバー湿度 90 - 100%; チャンバー温度 4; プロット時間 3 秒; 待機時間 0 秒; プロット力 0.3 μL のサンプルをグリッドに適用し、プロットイングし、次いで、液体エタン浴に浸した; 次に、凍結したグリッドを液体窒素 (LN2) に移し、そして、後続の全ての段階 (クリッピング、顕微鏡カセットへの移動、及び、データ収集) の間、LN2 温度に維持した。 40

【0537】

データ収集及び構造決定。全てのデータセットは、Gatan K3 直接電子検出器を備えた ThermoFisher Titan Krios G3 で収集した。データ収集 50

は、Gatan Latitudeソフトウェアを使用して行った。5つのデータセット（調製した1サンプル当たり1）を収集した。表24は、データ収集に使用した顕微鏡とカメラのパラメーター及び各サンプルに対して収集されたムービーの総数をまとめたものである。全データ収集（5つのサンプルに対する）は、2週間に及んだ。

【表28】

表24. 20E6ヒト化抗体及びFabに関するCryo-EMの詳細

| サンプル | ムービーの数 | 電圧 | 倍率 | 検出器ピクセルサイズ (Å) | 線量 (e ⁻ /Å ²) | デフォーカス (µm) |
|--|--------|-----|--------|----------------|--------------------------------------|--------------|
| A) LAP-TGFβ1-FC + ヒト化 20E6-Mab、1 Mab/二量体 | 2690 | 300 | 81,000 | 1.07 | 62.5 | -0.8 to -1.8 |
| B) LAP-TGFβ1-FC + ヒト化 20E6-Mab、1 Mab/二量体 (1:5 希釈) | 1994 | 300 | 81,000 | 1.07 | 62.5 | -1.2 to -1.6 |
| C) LAP-TGFβ1-FC + ヒト化 20E6-Fab、2 Fab/二量体 | 2647 | 300 | 81,000 | 1.07 | 62.5 | -1.2 to -1.6 |
| D) LAP-TGFβ1 + ヒト化 20E6-Mab (1:10 希釈) | 4545 | 300 | 81,000 | 1.07 | 62.5 | -0.8 to -1.8 |
| E) GARP-LAP-TGFβ1 + ヒト化 20E6-Fab (1 Fab/1 二量体) 1:10 希釈 | 9366 | 300 | 81,000 | 1.07 | 62.5 | -0.8 to -1.8 |

10

20

【0538】

データ処理及びマップ再構築。全データ処理及びマップ再構築は、Cryosparc V2を使用して実施した (Structura Biotechnology Inc., Toronto, Canada; Punjani et al. Nature Methods 2017; 14: 290-6; Brubaker et al. IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell 2017; 39: 706-18)。処理パイプラインの初期段階（ムービーアラインメント、CTF推定、パーティクルピッキング及び2Dクラス決定）は、各データセットに対して個別に実行した。個々のデータセットからのクリーンアップされたパーティクルは、3つの段階で一緒にマージした。

30

【0539】

(1) 最初の3つのデータセット（サンプルA-C）のパーティクルをマージして一緒に処理したが、最良のマップは5のみであった。

40

【0540】

(2) サンプルDからのパーティクルを使用して、3.8 Angマップを生成することが可能であった。次に、サンプルDからのテンプレートを、サンプルA-Cに関する新しいパーティクルピッキングに使用した。次に、選択されたパーティクルを1ラウンドの2D分類に付し、サンプルDからの最良のパーティクルセットとマージして合計533, 297パーティクルとした。1ラウンドの2D分類後、最良のクラス（436, 918パーティクル）を使用して、均一な精緻化作業を実行した。得られたマップを1ラウンドの不均一精緻化（NU-精緻化）に付して、3.5の分解能のマップが得られた。

50

【0541】

(3) サンプルEからの約1.2Mパーティクルのセットを2からの最新の(最良の)セットとマージした。2ラウンドの2D分類の後、最良の2Dクラス(864, 958パーティクル)を使用して、(NU精緻化後)公称分解能が3.4のマップを計算した。

【0542】

次に、864, 958パーティクルに対する別の2ラウンドの2D分類を使用して、802, 256パーティクルと3.3のNU_精緻化された不均一なマップを含むセットを生成した。プロセス全体を通して、結果として得られたマップの目視検査(密度の向上、密度の連続性、好ましいオリエンテーションアーティファクトの欠如(又は、低減))を使用して、次の段階を決定した。最新のマップは、2つのFab/LAP-TGF 1二量体が存在し、その一方は他方よりも極めて良好に定義されているという事実を明確に示しており(図26A)、従って、パーティクル減算及び局所精緻化手順を適用した。結果として得られた最終マップの公称分解能は3.1であった。このマップは、最終モデルの構築と精緻化に使用した。図26B及び図26Cは、FSCプロット及び最終マップに対するギニエプロットを示している。

10

【0543】

モデルの構築及び精緻化。全てのモデルの構築及び精緻化は、COOT(Emsley et al. Acta Crystallogr D-Biological Crystallography 2010; 66: 486-501)及びPHENIX(Afonine et al. Acta Crystallogr D Struct Biol 2018; 74: 6: 531-44)を使用して実施した。LAP-TGF 1の座標は、PDBエントリー3RJRから取得し、Fabの座標はMOE2019.0101(Chemical Computing Group LLC)を使用して生成されたホモロジーモデルから取得した。LAP/TGF 1及びFabモデルは、最初、COOTを使用して剛体としてマップに配置し、そして、その密度を使用して一部のループを再構築し、正しい配列を付与した。モデル形状を最適化するために、PHENIX実空間精緻化モジュールを実施した。表25は、モデルの精緻化及び統計をまとめたものである。

20

30

40

50

【表 2 9】

表 2 5. ヒト化 20E6 Fab 及び LAP-TGFβ1 の cryo-EM に関するモデル精緻化及び統計

| | |
|-----------------------------------|---------|
| 課せられる対称性 | C1 |
| 使用したパーティクル | 802,256 |
| マップ分解能 (Å) | 3.1 |
| FSC 閾値 | 0.143 |
| マップ分解能範囲 (Å) | 3-19 |
| 精緻化 | |
| マップシャープニング B-因子 (Å ²) | 87.5 |
| モデル構成 | |
| 非水素原子 | 8,757 |
| タンパク質残基 | 1,110 |
| CC_マスク: | 0.655 |
| CC_体積: | 0.638 |
| CC_ピーク: | 0.525 |
| rmsd (結合) (Å): | 0.01 |
| rmsd (角度) (°): | 0.98 |
| 全原子クラッシュスコア | 5.41 |
| ラマチャンドラプロット: | |
| 外れ値: | 0.00 % |
| 許容される: | 7.16 % |
| 好意的: | 92.84 % |
| 回転異性体の外れ値: | 0.20 % |

10

20

【0544】

最終モデルは、LAP-TGFβ1 二量体に関する 2 つの鎖 (鎖 A 及び鎖 B、それぞれが、残基 1 - 61 + 70 - 208 + 216 - 241 + 250 - 361 を含む: 抗原の番号付けは、シグナルペプチドの非存在を推定している、即ち、完全配列中では、Leu1 = Leu30); ヒト化 20E6-Fab に関する 2 つの鎖 (重鎖 (VH)、残基 1 - 221、及び、軽鎖 (VL)、残基 2 - 214) を含んでいた。1 つの糖部分 (NAG) は、グリコシル化部位の 1 つ (Asn A53) でモデル化した; その他の全ての可能なグリコシル化位置 (A107、A147、B53、B107 及び B147) の場合、その密度は、糖の添加を保證するのに充分ではなかった)。

30

【0545】

構造解析。ヒト化 20E6-Fab と複合体を形成した LAP-TGFβ1 二量体の構造は、3.1 の分解能で決定した。クライオ EM マップの品質は、抗原と Fab の両方の側鎖の割り当てが明確であるようなものであった。抗原-抗体インターフェースでは、マップの品質は、同等の分解能で計算された X 線由来の電子密度マップの品質に匹敵する (図 27A: 3.1 の分解能でのクライオ EM マップ; 図 27B: 2.9 分解能での Protein Data Bank (PDB) エントリー 5jxe の電子密度)。

40

【0546】

クライオ EM マップの固有の特性 (Cardone G, et al, J Struct Biol. 2013; 184: 226-236) に起因して、LAP-TGFβ1: Fab インターフェースと分子の残部の間に明確な勾配が存在する。2 番目の対称的に結合した Fab には、より低いレベルの密度が存在し、これは、最終的なマップにドッキングできる (図 26A)。

【0547】

50

相互作用インターフェースを構成するヒト化 20E6-Fab パラトープ及び LAP-TGF β 1 エピトープ残基が、図 28A 及び図 28B に示されており、そして、表 26 で要約されている。該インターフェースは、ファンデルワールス力と静電相互作用で構成され、そして、タンパク質の界面、表面及び集合体 (PISA) によって計算された約 800² の埋もれた表面に相当する (Kris sine l et al, J Mol Biol 2007; 372: 774-97)。そのエピトープは、鎖 A からの残基 A31-P40 (LAP 残基) と鎖 B からの Y340-R343 及び R274-K280 (TGF β 1 残基) によって形成される。ヒト化 20E6-Fab との相互作用に LAP と TGF β 1 残基の両方が必要であるという事実は、当該抗体が LAP-TGF β 1 複合体の閉じた形態に対して特異的であり、empty LAP 又は成熟 TGF β 1 には結合しない理由を説明する。パラトープは、軽鎖 (VL) 残基: T30、Y32、Y49-Y50、R53、G91-L94、W96 と重鎖 (VH) 残基 W33、R50、I58-K59、W99 及び Y101-G103 によって形成される。クライオ EM 分析によって確認されたエピトープは、実施例 22 に記載されている水素重水素交換質量分析 (HDX-MS) 分析と一致している。パラトープは、実施例 14 に記載されているアラニン走査実験によって特定された残基と一致している。図 28C-D を参照されたい。

10

【表 30】

表 26. LAP-TGF β 1 及びヒト化 20E6-Fab* のエピトープ及びパラトープ

20

| VH | TGF β 1 | VL |
|---------------------|---------------|-----------------|
| | R274 | T30 |
| | G278 | T30 |
| | W279 | Y50、Y50 |
| | K280 | D92 |
| Y101 | V341 | |
| Y101、W33 | G342 | |
| VH | LAP | VL |
| | A31 | Y49、 R53 |
| Y104、 Y104 | S32 | Y49、Y50 |
| G102 | P33 | Y32 |
| | P34 | Y32 |
| G102、W99、 | S35 | G91、Y32 |
| | Q36 | D92 |
| | G37 | L94、 D92 |
| R50 、K59、W33 | E38 | L94、W96 |

30

* LAP-TGF β 1 残基と相互作用するヒト化 20E6-Fab の VH 又は VL からの残基が示されている。水素結合相互作用は太字で示されている (相互作用のカットオフは 4.5 Å に設定されている; 水素結合の相互作用のカットオフは 3.5 Å に設定されている)。

40

【0548】

実施例 20: LAP-TGF β 1 と複合体を形成したヒト化 28G11 の Cryo-EM 構造

ヒト LAP-TGF β 1 と複合体を形成したヒト化 28G11 Fab の構造を、抗体が結合する LAP-TGF β 1 上のエピトープとヒト化 28G11-Fab のパラトープを特定するためにクライオ EM によって決定した。

【0549】

サンプル及びグリッドの調製。ヒト化 28G11 mAb (28G11__H2bF3a__hIgG1、これは、それぞれ配列番号 43 及び 53 の重鎖及び軽鎖可変領域配列を有している) 及び GARP-LAP-TGF β 1 を、実施例 9 及び実施例 16 に記載されてい

50

るように生成し、PBS緩衝液(10 mMリン酸ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム、pH 7.4)に含まれて供給された。クライオEM実験に使用したサンプルは、2.0 μ LのGARP-LAP-TGF 1(38.7 μ M)、0.5 μ Lのヒト化28G11(77.3 μ M)及び17.5 μ LのHBS緩衝液(20 mM Hepes、150 mM NaCl、pH 7.0)を混合させることによって調製し、GARP-LAP-TGF 1の最終濃度3.87 μ M及びヒト化28G11の最終濃度1.95 μ Mとなった。グリッドを調製する前に、サンプルをHBSでさらに1:1に希釈した。GARPを含む複合体(LAP-TGF 1のみではなく)を使用して、ヒト化28G11:LAP-TGF 1のサンプルから収集されたデータで観察された優先オリエンテーション問題を破壊した。

【0550】

Vitrobot Mark 4(ThermoFisher)を使用し、標準的な手順を用いて、グリッド(金の表面にC-フラットカーボン、300メッシュ、1.3/1.2)を調製した。グリッドは、Pelco easyGlowユニット(Ted Pella, Inc.)をプラズマクリーニングに関する工場推奨値(0.39 mbar、低レベル15 mA、保持10"、グロー30")で使用して、グロー放電させた。Vitrobotは、以下のように設定した:チャンパー湿度 90-100%;チャンパー温度 4;プロット時間 3秒;待機時間 0秒;プロット力 0.3 μ Lのサンプルをグリッドに適用し、プロットングし、次いで、液体エタン浴に浸した;次に、凍結したグリッドを液体窒素(LN2)に移し、そして、後続の全ての段階(クリッピング、顕微鏡カセットへの移動、及び、データ収集)の間、LN2温度に維持した。

【0551】

データ収集及び構造決定。データセットは、ThermoFisher Falcon 3直接電子検出器を備えたThermoFisher 300 KeV Titan Krios G3で収集した。データ収集は、ThermoFisher EPUソフトウェアを使用して行った。4267のムービーを75,000倍の公称倍率で収集した;デフォーカス範囲は-1.4から-2.0 μ mの間に設定した。検出器のピクセルサイズは1.06であり、線量は37.74 e⁻/Å²であった。

【0552】

データ処理及びマップ再構築。全データ処理及びマップ再構築は、Cryosparc V2を使用して実施した。最初のパーティクルピッキングにより、2.9 Mパーティクルが特定された。2回の2D分類作業の後、約620 Kパーティクルを使用して、初期マップを計算した(公称分解能3.81 Ång)。パーティクルスタックは、さらに2回の2D分類を使用してさらにクリーンアップし、結果として得られたパーティクルのセット(505,582パーティクル)を使用して、NU精緻化後に、公称分解能3.48 Ångのマップを生成した。次に、局所的な(マスクされた)精緻化を使用して、エピトープ-パラトープインターフェースでの分解能を改善した。局所的な精緻化(パーティクル減算後の)の結果は、インターフェースの詳細が大幅に改善された3.38 Ångマップであった。このマップを使用して、モデルを構築した。

【0553】

モデルの構築及び精緻化。全てのモデルの構築及び精緻化は、COOTを使用して実施した。LAP-TGF 1とヒト化20E6 Fabの複合体をスターティングモデルとして使用した。LAP-TGF 1及びヒト化28G11-Fabは、最初、COOTを使用して剛体としてマップに配置し、そして、その密度を使用して一部のループを再構築し、正しい配列を付与した。モデル形状を最適化するために、PHENIX実空間精緻化モジュールを実施した。表27は、モデルの精緻化及び統計をまとめたものである。

10

20

30

40

50

【表 3 1】

表 2 7. ヒト化 28G11-Fab 及び LAP-TGFβ1 のモデル精緻化及び統計

| | |
|-----------------------------------|------------|
| 課せられる対称性 | C1 |
| 使用したパーティクル | 505,582 |
| マップ分解能 (Å) | 3.4 |
| FSC 閾値 | 0.143 |
| マップ分解能範囲 (Å) | 3.0 – 14.0 |
| 精緻化 | |
| マップシャープニング B-因子 (Å ²) | 105.6 |
| モデル構成 | |
| 非水素原子 | 8,960 |
| タンパク質残基 | 1,113 |
| CC_マスク: | 0.716 |
| CC_体積: | 0.702 |
| CC_ピーク: | 0.628 |
| rmsd (結合) (Å): | 0.007 |
| rmsd (角度) (°): | 0.81 |
| 全原子クラッシュスコア | 19.8 |
| ラマチャンドラプロット: | |
| 外れ値: | 0.00 % |
| 許容される: | 15.58 % |
| 好意的: | 84.42 % |
| 回転異性体の外れ値: | 0.20 % |

10

20

【0554】

最終モデルは、LAP-TGFβ1 二量体に関する 2 つの鎖 (鎖 A 及び鎖 B、それぞれが、残基 1 - 61 + 70 - 208 + 216 - 241 + 250 - 361 を含む: 抗原の番号付けは、シグナルペプチドの非存在を推定している、即ち、完全配列中では、Leu1 = Leu30)、及び、ヒト化 28G11-Fab に関する 1 つの分子 (重鎖 (VH)、残基 1 - 221、及び、軽鎖 (VL)、残基 2 - 214) を含んでいた。1 つの糖部分 N-アセチルグルコサミン (NAG) は、グリコシル化部位の 1 つ (Asn A53) でモデル化した; その他の全ての可能なグリコシル化位置 (Asn A107、Asn A147、Asn B53、Asn B107、及び、Asn B147) の場合、その密度は、糖の添加を保証するのに充分ではなかった)。

30

【0555】

構造解析。ヒト化 28G11-Fab と複合体を形成した LAP-TGFβ1 二量体の構造は、3.4 Å の分解能で決定した。クライオ EM マップの品質は、抗原と Fab の両方の側鎖の割り当てが明確であるようなものがあった。

40

【0556】

相互作用インターフェースを構成するヒト化 28G11-Fab パラトープ及び LAP-TGFβ1 エピトープ残基が、図 29A 及び図 29B に示されており、そして、表 28 で要約されている。図 29C-E も参照されたい。該インターフェースは、ファンデルワールス力と静電相互作用で構成され、そして、PISA によって計算された約 800 Å² の埋もれた表面に相当する。そのエピトープは、鎖 A からの残基 A31-E38 (LAP 残基) と鎖 B からの G342-K344 及び G278-W281 (TGFβ1 残基) によって形成される。h20E6-Fab との相互作用に LAP と TGFβ1 残基の両方が必要であるという事実は、当該抗体が LAP-TGFβ1 複合体の閉じた形に特異的であり、

50

empty L A P又は成熟 T G F 1に結合しない理由を説明する。パラトープは、軽鎖 (V L) 残基 : Y 3 2、Y 4 9 - Y 5 0、R 5 3及び G 9 1 - L 9 4と重鎖 (V H) 残基 W 3 3、F 5 0 - N 5 3、Q 5 6及び Y 1 0 1 - Y 1 0 6によって形成される。

【表 3 2】

表 2 8 . L A P - T G F β 1 及び 2 8 G 1 1 - F a b * のエピトープ及びパラトープ

| VH | TGF β 1 | VL |
|---|---------------|---------------------|
| | G278 | S30 |
| | W279 | Y50 |
| | K280 | D92 |
| | W281 | Y32 |
| Q56、W33 | G342 | |
| R52、Q56 | R343 | |
| Q56 | K344 | |
| VH | LAP | VL |
| | A31 | Y49、 R53 |
| Y106、 Y106 | S32 | Y49、Y50、R53 |
| G104 | P33 | Y32、Y50 |
| | P34 | Y32、 Y32 |
| Y101 、G104 | S35 | Y32、G91 |
| | Q36 | D92 |
| | G37 | D92 、T93、L94 |
| F50、 R52 、R52、 Y33 、 Y33 | E38 | L94 |

* L A P - T G F β 1 残基と相互作用する 2 8 G 1 1 - F a b の V H 又は V L からの残基が示されている。水素結合相互作用は太字で示されている (相互作用のカットオフは 4.5 Å に設定されている ; 水素結合の相互作用のカットオフは 3.5 Å に設定されている)。

【 0 5 5 7 】

実施例 2 1 : L A P - T G F 1 と複合体を形成したマウス 2 2 F 9 の C r y o - E M 構造

ヒト L A P - T G F 1 と複合体を形成したマウス 2 2 F 9 - F a b (本実施例では 2 2 F 9 と称される) の構造を S P - C r y o - E M によって決定し、抗体が結合する L A P - T G F 1 上のエピトープ及び 2 2 F 9 - F a b のパラトープを特定した。

【 0 5 5 8 】

サンプル及びグリッドの調製。この実験で使用したマウス 2 2 F 9 m A b は、2 2 F 9 _ N 5 4 Q _ D 1 0 2 A _ m I g G 2 a であり、これは、それぞれ配列番号 2 4 8 及び 2 4 9 の重鎖及び軽鎖可変領域配列を有している。ヒト L A P - T G F 1 は、R & D から購入し、5 0 % グリセロールを含む P B S 緩衝液 (1 0 m M リン酸ナトリウム、1 5 0 m M 塩化ナトリウム、p H 7 . 4) に含まれて供給された。サンプルは以下のように調製した : 5 0 % グリセロールを含む P B S の中の L A P - T G F 1 を非グリセロール緩衝液 (即ち、P B S) に緩衝液交換し、そして、1 二量体 : 1 M a b 比で 2 2 F 9 - M a b と複合体を形成させ、次に、P B S で 1 0 倍希釈した。

【 0 5 5 9 】

V i t r o b o t M a r k 4 (T h e r m o F i s h e r) を使用し、標準的な手順を用いて、グリッド (金の表面に C - フラットカーボン、3 0 0 メッシュ、1 . 3 / 1 . 2) を調製した。特に、グリッドは、P e l c o e a s y G 1 o w ユニット (T e d P e l l a , I n c .) をプラズマクリーニングに関する工場推奨値 (0 . 3 9 m b a r 、低レベル 1 5 m A 、保持 1 0 " 、グロー 3 0 ") で使用して、グロー放電させた。V i t 5 0

robotは、以下のように設定した：チャンパー湿度 90 - 100%；チャンパー温度 4；プロット時間 3秒；待機時間 0秒；プロット力 0。3 μ Lのサンプルをグリッドに適用し、プロットし、次いで、液体エタン浴に浸した。次に、凍結したグリッドを液体窒素 (LN2) に移し、そして、後続の全ての段階 (クリッピング、顕微鏡カセットへの移動、及び、データ収集) の間、LN2 温度に維持した。

【0560】

データ収集及び構造決定。データセットは、Gatan K3直接電子検出器を備えたThermoFisher 300 KeV Titan Krios G3で収集した。データ収集は、Gatan Latitudeソフトウェアを使用して行った。3741のムービーを81,000倍の公称倍率で収集し；デフォーカス範囲は-0.8から-1.8 μ mの間に設定した。検出器のピクセルサイズは1.07であり、線量は62.5 e⁻/²であった。 10

【0561】

データ処理及びマップ再構築。全データ処理及びマップ再構築は、Cryosparc V2を使用して実施した。初期処理により、2.9 Mパーティクルが特定された。パーティクルスタックをクリーンアップして外れ値を削除するために、いくつかの2D分類作業を実施した。最後に、522,208のパーティクルを均一な精緻化作業で使用して、3.68 Angマップが生成された。不均一な精緻化により、モデルの構築に使用した3.43 Angマップが生成された。2Dクラスは、2 Mab:2 TGF 1複合体の存在を明確に示し、SEC-MAL実験によって示唆された化学量論を確認した (図30A及び図30B)。 20

【0562】

モデルの構築及び精緻化。全てのモデルの構築及び精緻化は、COOT及びPHENIXを使用して実施した (Afonine et al. Acta Crystallogr D Struct Biol 2018; 74: 6: 531-44)。LAP/TGF 1とヒト化20E6の複合体をスターティングモデルとして使用した；LAP-TGF 1とヒト化20E6-Fabは、最初、COOTを使用して剛体としてマップに配置し、そして、その密度を使用して一部のループを再構築し、正しい配列を付与した。モデル形状を最適化するために、PHENIX実空間精緻化モジュールを実施した。表29は、モデルの精緻化及び統計をまとめたものである。 30

【表 3 3】

表 2 9. ヒト化 22F9-Fab 及び LAP-TGFβ1 のモデル精緻化及び統計

| | |
|-----------------------------------|---------|
| 課せられる対称性 | C2 |
| 使用したパーティクル | 522,208 |
| マップ分解能 (Å) | 3.4 |
| FSC 閾値 | 0.143 |
| マップ分解能範囲 (Å) | 3-14 |
| 精緻化 | |
| マップシャープニング B-因子 (Å ²) | 116.0 |
| モデル構成 | |
| 非水素原子 | 11926 |
| タンパク質残基 | 1530 |
| CC_マスク: | 0.689 |
| CC_体積: | 0.680 |
| CC_ピーク: | 0.615 |
| rmsd (結合) (Å): | 0.007 |
| rmsd (角度) (°): | 0.91 |
| 全原子クラッシュスコア | 25.1 |
| ラマチャンドラプロット: | |
| 外れ値: | 0.40 % |
| 許容される: | 18.1 % |
| 好意的: | 81.5 % |
| 回転異性体の外れ値: | 1.95 % |

10

20

【0563】

最終モデルは、LAP-TGFβ1 二量体の 2 つの鎖 (鎖 A 及び鎖 B、それぞれが、残基 1-61+70-208+216-241+250-361 を含む; 抗原の番号付けは、シグナルペプチドの非存在を推定している、即ち、完全配列中では、Leu1=Leu30); 22F9-Fab に関する 2 つの鎖 (重鎖 (VH)、残基 1-221、及び、軽鎖 (VL)、残基 2-214) を含んでいた。1 つの糖部分 (NAG) は、グリコシル化部位 (Asn A53 及び Asn B53) でモデル化した; その他の全ての可能なグリコシル化位置 (A107、A147、B107 及び B147) の場合、その密度は、糖の添加を保證するのに充分ではなかった)。

30

【0564】

構造解析。22F9-Fab と複合体を形成した LAP-TGFβ1 二量体の構造は、3.4 Å の分解能で決定した。クライオ EM マップの品質は、抗原と Fab の両方の側鎖の割り当てが明確であるようなものであった。

40

【0565】

相互作用インターフェースを構成する 22F9-Fab パラトープ及び LAP-TGFβ1 エピトープ残基が図 3 1 A 及び図 3 1 B に示されており、そして、表 3 0 で要約されている。

【0566】

該インターフェースは、ファンデルワールス力と静電相互作用で構成され、そして、PI SA によって計算された約 900 Å² の埋もれた表面に相当する。そのエピトープは、鎖 A からの残基 S35-P43 (LAP 残基) と鎖 B からの D272-K275、K280-H283 及び Y340 (TGFβ1 残基) によって形成される。

【0567】

50

22F9 パラトープは、軽鎖 (VL) 残基 : Y36、Y53、L58 - S60 及び R98 - Y100 と重鎖 (VH) 残基 S31 - W33、H52 及び Y98 - D106 によって形成される。図 31C - E を参照されたい。

【表 34】

表 30. LAP-TGFβ1 及び 22F9-Fab* のエピトープ及びパラトープ

| VH | TGFβ1 | VL |
|--|-------|-------------------------------------|
| | D272 | Y53 |
| D100、Y104、 D106 | R274 | Y53、 E59 |
| | K275 | Y53、L58、E59、S60 |
| Y32、Y98、Y99、 D100、Y101、 D106 | K280 | |
| Y101 | W281 | |
| Y101 | H283 | |
| Y101 | Y340 | |
| VH | LAP | VL |
| S31、Y32 | S35 | |
| W33、 W33 、Y32、 H52 Y99、 Y99 、 | Q36 | |
| W33、 W33 、 | G37 | |
| | E38 | |
| M50、Y101、Y99 | V39 | |
| Y99 | P41 | Y100、R96、E97、 L98 |
| | G42 | R96、 R96 、Y36、 Y36 |
| | P43 | T31、Y36、R96 |

* LAP-TGFβ1 残基と相互作用する 22F9-Fab の VH 又は VL からの残基が示されている。水素結合相互作用は太字で示されている (相互作用のカットオフは 4.5 Å に設定されている ; 水素結合の相互作用のカットオフは 3.5 Å に設定されている)。

【0568】

実施例 22 : 水素重水素交換質量分析によるヒト化 20E6 抗体の分析

ヒト化抗 LAP 抗体 20E6__H0.2__h IgG4 mut (この実施例では、「ヒト化 20E6」と称される) とヒト LAP - TGFβ1 の間の接触領域は、水素重水素交換質量分析 (HDX - MS) によって確認した。HDX - MS は、タンパク質のアミド骨格への水素による重水素の交換を測定する。交換速度に影響を与える 1 つの要因は、水素の溶媒への暴露である。抗体が結合しているときの抗原内の交換レベルを比較することで、抗体が結合しているタンパク質の領域を特定することができる。

【0569】

材料

・ ヒト LAP - TGFβ1 タンパク質は、R & D Systems から購入し、そして、N 末端 249 aa 潜伏関連ペプチド (LAP) と C 末端 112 aa 成熟 TGFβ1 タンパク質で構成されている。そのタンパク質を緩衝液交換し、「10 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.4」内で 40 μM に濃縮した。

【0570】

・ ヒト化抗 LAP - TGFβ1 抗体 (20E6__H0.2__h IgG4 mut) は、実施例 11 に記載されているように生成した。その抗体を、7.1 mg/mL から 5.8 mg/mL に希釈し、これは、40 μM に相当する。

【0571】

10

20

30

40

50

液体クロマトグラフィー - 質量分析

Waters Synapt G2 Si 四重極飛行時間型 (TOF) 質量分析計を使用した。重水素標識サンプルのペプチドの特定及び測定のために、質量分析計を、TOFのみのモードで1つのフルスキャンMSデータ (低エネルギー) と1つのMS (e) データ (高エネルギー) を取得するように、設定した。スキャン時間は0.4秒に設定した。ランプトラップの衝突エネルギーは、15~45ボルトであった。

【0572】

液体クロマトグラフィーシステムは、分析カラム勾配のためのWaters nanoAcquityバイナリポンプと、サンプルの消化及びローディングのための補助ポンプであった。サンプルの消化とローディングに関して、使用した緩衝液は、100µL/分の流速での100%水及び0.1%ギ酸であった。分析的勾配の場合、緩衝液は、緩衝液A (水中の0.1%ギ酸) 及び緩衝液B (アセトニトリル中の0.1%ギ酸) であった。

10

【0573】

勾配は、以下のとおりであった: 40µL/分で、9分間で5%Bから35%Bまで、その後、1分間で85%Bまでの勾配、1分間85%Bで洗浄、及び、1分間5%Bで再平衡化。次に、5%と95%Bの間の勾配を各ステップで1分間ずつ4回循環させ、続いて、5%Bで1分間最終平衡化することにより、カラムを洗浄した。トラッピングカラムは、「Waters Vanguard BEH C18 1.7µm Guard Column」であり、分析カラムは、「Waters BEH C18、1.7µm 1x50mmカラム」であった。

20

【0574】

重水素標識のためのサンプル処理は、Leaptec H/D-XPALシステムとカラム冷却用のWaters HDXチャンバーで構成されるWaters HDXユニットで実施した。標識化サンプルトレイは、10の温度に設定市、クエンチングトレイは、1.5に設定し、トラップ及び分析カラムチャンバーは、1.5に設定した。Nova Bioassay製の固定化プロテアーゼタイプXIII/ペプシンカラム (w/w、1:1) は、酵素カラムチャンバー内で20に維持した。

【0575】

重水素標識化

ヒトLAP-TGF1をヒト化20E6と混合させて、ヒトLAP-TGF1については20µM、ヒト化20E6については10µMの最終濃度とした。非結合対照は、ヒトLAP-TGF1を「10mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、pH7.4」内でインキュベートすることにより調製した。抗体が結合したサンプルと結合していない対照を室温で1時間インキュベートした後、標識化実験を開始した。

30

【0576】

サンプルを重水素標識するために、6µLのサンプルを54µLの「10mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、重水素酸化物中、pD7.4」と混合させた。標識化の時点は、0、10、60、600、6000及び14,400秒であった。各時点の後で、50µLの標識化混合物を50µLの冷クエンチ緩衝液 (リン酸緩衝液中の500mMトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP)、pH2.5) に加えた。一度混合した後、90µLをカラム冷却チャンバーに注入し、そこで、サンプルをプロテアーゼタイプXIII/ペプシンカラムに通し、得られたペプチドをトラッピングカラムにロードした。4分後、パルススイッチによって、プロテアーゼタイプXIII/ペプシンカラムがラインから外された。次に、トラップを分析カラムとインラインで切り替え、分析用勾配と質量分析計のデータ取得を開始した。各時点は、二反復で取得した。

40

【0577】

データ解析

標識化されていない結合サンプルと非結合サンプルの液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) データを4反復で取得し、ProteinLynx Global Server 3.0 (Waters Corporation) を使用した

50

データベース検索を実行して、タンパク質の消化が成功したことを確認し、及び、二重酵素消化からのペプチドのリストを生成した。使用したタンパク質データベースは、誤った識別を低減させるためにランダム化されたヒト LAP - TGF β 1 配列と組み合わせたヒト LAP - TGF β 1 であった

重水素標識化実験からの質量分析 (MS) データは、DynamX (バージョン 3.0.0、Waters Corporation) によって処理した。各ペプチドについて、ソフトウェアによって選択された質量、保持時間及び電荷状態を手動で検証した。

【0578】

結果

ヒト化 20E6 によって保護されたヒト LAP - TGF β 1 ペプチドは、H/D Difference Plot に示されている (図 32)。 10

【0579】

実施例 23: HDX - MS による マウス 28G11、22F9、20E6 及び 2F8 抗体のエピトープマッピング

マウス抗 LAP - TGF β 1 抗体 28G11、22F9、20E6 及び 2F8 とヒト LAP - TGF β 1 の間の接触領域は、以下に記載されているように、HDX - MS によって確認した。

【0580】

方法

使用した材料は以下のとおりである: 20

- ・ ヒト LAP - TGF β 1 タンパク質は、R&D Systems から購入し、そして、N 末端 249 aa 潜伏関連ペプチド (LAP) と C 末端 112 aa 成熟 TGF β 1 タンパク質で構成されている。そのタンパク質を緩衝液交換し、「10 mM リン酸ナトリウム及び 150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.4」の中で 40 μ M に濃縮した。

【0581】

- ・ マウス 28G11 __mIgG2a、マウス 22F9 __mIgG2a 及び マウス 20E6 __mIgG2a を 40 μ M に希釈した。28G11 (hyb)、22F9 (hyb) 及び 20E6 (hyb) の重鎖及び軽鎖可変領域配列 (表 34 に記載されている) を mIgG2a 定常に融合させた。マウス 2F8 (IgG1) は、BioLegend から購入し、0.5 mg/mL から 40 μ M に濃縮した。 30

【0582】

液体クロマトグラフィー - 質量分析を、重水素標識化のためのサンプル処理において標識化サンプルトレイを 10 ではなく 25 の温度に設定したことを除いて、実施例 22 に記載されている方法で実施した。重水素標識化も、実施例 22 に記載されているように実施したが、但し、ヒト LAP - TGF β 1 を抗体と混合させて、ヒト LAP - TGF β 1 については 20 μ M の最終濃度とし、及び、抗体については 20 μ M の最終濃度とした。データ分析は、実施例 22 に記載されているようにを実施した。

【0583】

結果

抗体によって保護されたヒト LAP - TGF β 1 ペプチドは、図 33 において示されている H/D Difference Plot に示されている。28G11、22F9 及び 20E6 の結合エピトープは、LAP - TGF β 1 タンパク質の 4 つの領域をカバーした: アミノ酸残基 14 - 25 (RKRIEAIRGQIL、領域 1; 配列番号 250)、30 - 39 (LASPPSQGEV、領域 2; 配列番号 251)、278 - 286 (GWKWIHEPK、領域 3; 配列番号 252)、及び、340 - 346 (YVGRKPK、領域 4; 配列番号 253)。領域 1 及び 2 は、LAP ドメイン内に存在し、領域 3 及び 4 は、成熟した TGF β 1 ドメイン内に存在する。 40

【0584】

重水素交換保護の程度における相違が、抗体間で検出された。例えば、20E6 と 28G11 及び 22F9 の比較においては、20E6 は、領域 1 で重水素交換保護を示さなかつ 50

たのに対し、28G11及び22F9は抗体結合時に検出可能な変化を示した(それぞれ、約1.3及び1.9Da)。重水素交換における僅かな違いも、領域2及び3で観察された。具体的には、領域2では、20E6の場合は6Daの差が検出されたが、28G11の場合は差は僅かに4Daであった。領域3では、20E6の場合4Daの差が検出されたが、28G11の場合は2Daの差しか検出されなかった。特に、HDXによって検出された領域1での相互作用は、cryo-EM構造では観察されなかった、このことは、領域1での重水素交換保護が直接抗体：抗原結合に起因するものではなく、これらの抗体とLAP-TGF1の間の僅かに異なる結合相互作用の結果としての局所溶液動力学の変化によるものであることを示唆している。総合すれば、HDXデータはクライオEM構造と一致している。

10

【0585】

抗体2F8が残基205-225(アミノ酸VDINGFTTGRRGDLATIHGMN;配列番号254)に結合することが観察された。

【0586】

マウスLAP-TGF1とヒトLAP-TGF1のアミノ酸配列は、89%同一である。特定されたエピトープは、全て相同領域内に存在している(図34)。

【0587】

実施例24: サイズ排除クロマトグラフィー及び多角度光散乱によるヒト化20E6抗体と複合体を形成したヒトLAP-TGF1又はGARP-LAP-TGF1の結合化学量論

20

20E6__H0.2__hIgG4mutと複合体を形成したヒトLAP-TGF1又はGARP-LAP-TGF1の結合化学量論を、サイズ排除クロマトグラフィー及び多角度光散乱(SEC-MALS)によって確認した。サイズの違いに起因して、ヒトLAP-TGF1のみ、20E6__H0.2__hIgG4mutのみ及び上記複合体は、SECクロマトグラムにおいて異なる時間に溶出する。

【0588】

MALS検出器は、検出された各ピークの分子量を決定するのに役立つ。個々のタンパク質とタンパク質複合体の分子量に基づいて、結合化学量論を求めることができる。

【0589】

材料

30

・ ヒトLAP/TGF1タンパク質は、R&D Systemsから購入し、そして、N末端249aa潜伏関連ペプチド(LAP)及びC末端112aa成熟TGF1タンパク質で構成されていた。そのタンパク質を緩衝液交換し、「10mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、pH7.4」の中で40µMに濃縮した。

【0590】

・ ヒトGARP-LAP-TGF1は、実施例16に記載されているように生成した。

【0591】

・ 抗ヒトLAP-TGF1抗体(20E6__H0.2__hIgG4mut)は、実施例11に記載されているように生成した。該抗体は、7.1mg/mLから5.8mg/mLに希釈し、これは、40µMに相当する。

40

【0592】

サイズ排除クロマトグラフィー - 多角度光散乱

サイズ排除クロマトグラフィーは、フォトダイオードアレイ検出器及びWyatt光散乱検出器に接続されたAgilent 1200HPLCを使用して実施した。Superdex 200 Increase 5/150 GLカラムは、無勾配下で、「10mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、pH7.4」緩衝液を使用して、0.2mL/分の流速で運転した。

【0593】

ヒトLAP-TGF1を抗体20E6__H0.2__hIgG4mutと混合させて、ヒトLAP-TGF1の場合は5µMの最終濃度、及び、20E6__H0.2__hIgG

50

4mutの場合は抗体2.5μMの最終濃度とした。30μLの5μMヒトLAP/TGF1のみ、5μM 20E6__H0.2__hIgG4mutのみ及びLAP-TGF1:20E6複合体を、ゲル濾過標準及びウシ血清アルブミン標準を含むSEC-MALSシステムを使用して分析した。以下のサンプルも分析した: 30μLの7.5μMヒトLAP-TGF1のみ、7.5μM抗体20E6__H0.2__hIgG4mutのみ及びGARP-LAP-TGF1:20E6__H0.2__hIgG4mut複合体。

【0594】

データ分析

全てのクロマトグラムは、ChemStation (バージョンA.01.08.108、Agilent Technologies)を使用して280nmのUV吸光度でプロットした。光散乱データは、ASTRA (バージョン6.1.2.84、Wyatt Technologies)を使用して分析した。全てのピークは、半分の高さで全幅にわたって積分した。

【0595】

結果

LAP-TGF1:20E6__H0.2__hIgG4mut複合体及びGARP-LAP-TGF1複合体に関するSEC-MALS分析は、それぞれ図35A及び図35Bに示されている。各タンパク質とタンパク質複合体の分子量に基づき、LAP-TGF1複合体に関する結合化学量論は2:2のモル比である、即ち、LAP-TGF1二量体の2つのコピーが20E6__H0.2__hIgG4mut抗体の2つのコピーに結合する; GARP-LAP-TGF1複合体に関する結合化学量論は2:1のモル比である。GARPの存在下では、LAP-TGF1二量体の1つの結合部位のみが抗体と相互作用することができる。

【0596】

実施例25: CT26同系モデルにおける抗LAP抗体の有効性

この実施例は、癌の同系モデルであるCT26結腸直腸癌腫瘍モデルにおける抗PD-1抗体と組み合わせた抗LAP抗体の有効性について記載している。この実験では、抗体のFc部分が親ハイブリドーマにおいて見られるイソタイプではなくIgG2aイソタイプである抗LAP抗体の変異体を使用した。

【0597】

簡単に説明すると、6-8週齢のBalb/cマウスに、 3×10^5 CT26結腸直腸癌細胞を皮下移植した。腫瘍を平均サイズが48mm²になるまで増殖させ、その時点で、担癌動物はそれぞれ10匹の動物のグループにランダム化した。

【0598】

1セットの動物に、ラット抗PD-1クローンRMP1-14-IgG2a(3mg/kg)又は抗PD-1と抗体28G11-IgG2aの組み合わせ(10mg/kg)のいずれかを、0、3、6、9及び12日目に腹腔内投与した。動物群には、イソタイプ対照抗体(ラット-IgG2a及び/又はマウスIgG2a、示されていない)も投与した。

【0599】

別のセットの動物には、ラット抗PD-1クローンRMP1-14-IgG2a(3mg/kg)、抗体16B4-IgG2a(10mg/kg)又は抗PD-1と抗体16B4-IgG2aの組み合わせ(10mg/kg)のいずれかを、0、3、6、9及び12日目に腹腔内投与した。動物群には、イソタイプ対照抗体(ラット-IgG2a及び/又はマウスIgG2a、示されていない)を投与した。

【0600】

生存率を毎日評価し、腫瘍体積は式 $V = W^2 \times L / 2$ を使用してキャリパーによって1週間に3回測定した。投与後53日間動物を追跡した。

【0601】

図36A及び図36Bに示されているように、この同系モデルを抗体28G11で処理することで、抗PD-1単独の場合に比べて完全奏効率が5倍に増加した。対照的に、図3

6 C - 図 3 6 F に示されているように、抗体 1 6 B 4 による動物の治療は、腫瘍増殖に影響を及ぼさなかった。実際、1 6 B 4 と抗 P D - 1 の組み合わせで動物を治療した場合、抗 P D - 1 抗体のみで見られる奏効率が低下した。これらのデータは、2 種類の抗 L A P 抗体 2 8 G 1 1 及び 1 6 B 4 がマウス腫瘍モデルにおいて異なる機能特性を有することを立証している。

【 0 6 0 2 】

実施例 2 6 : E M T 6 同系モデルにおける抗 L A P 抗体の有効性

この実施例は、癌の別の同系モデル（即ち、E M T 6 乳癌腫瘍モデル）における抗 P D - 1 抗体と組み合わせた抗 L A P 抗体の有効性について記載している。

【 0 6 0 3 】

簡単に説明すると、6 - 8 週齢の B a l b / c マウスに、 3×10^5 E M T 6 乳癌細胞を右後部側面に皮下移植した。腫瘍を平均サイズが 75 mm^2 になるまで増殖させ、その時点で、担癌動物はそれぞれ 1 0 匹の動物のグループにランダム化し、下記に準じて、0、3、6、9、1 2、1 5、1 8 及び 2 1 日目に腹腔内投与した：

【 表 3 5 】

表 3 1 . E M T 6 同系モデルに関する抗体及び投与情報

| グループ | 説明 | 投与量 |
|------|-------------------------|----------|
| 1 | ラット IgG2a | 5 mg/kg |
| | マウス IgG2a | 15 mg/kg |
| 2 | ラット抗 PD-1 RMP1-14-IgG2a | 5 mg/kg |
| | マウス IgG2a | 15 mg/kg |
| 3 | 28G11_IgG2a | 10 mg/kg |
| | ラット IgG2a | 5 mg/kg |
| 4 | ラット抗 PD-1 RMP1-14-IgG2a | 5 mg/kg |
| | 28G11_IgG2a | 10 mg/kg |
| 5 | 22F9_IgG2a | 10 mg/kg |
| | ラット IgG2a | 5 mg/kg |
| 6 | 22F9_IgG2a | 15 mg/kg |
| 7 | ラット抗 PD-1 RMP1-14-IgG2a | 5 mg/kg |
| | 22F9_IgG2a | 10 mg/kg |
| 8 | ラット抗 PD-1 RMP1-14-IgG2a | 5 mg/kg |
| | 22F9_IgG2a | 15 mg/kg |
| 9 | 20E6_IgG2a | 10 mg/kg |
| | ラット IgG2a | 5 mg/kg |
| 10 | ラット抗 PD-1 RMP1-14-IgG2a | 5 mg/kg |
| | 20E6_IgG2a | 10 mg/kg |

【 0 6 0 4 】

生存率を毎日評価し、腫瘍体積は式 $V = W^2 \times L / 2$ を使用してキャリパーによって 1 週

10

20

30

40

50

間に3回測定した。投与後28日間動物を追跡した。データは、平均腫瘍体積 + / - S E Mとしてグラフ化されている。

【0605】

図37に示されているように、単独の又は抗PD-1と組み合わせた抗体28G11で動物を治療することで、イソタイプ対照抗体又は抗PD-1単独と比較して、腫瘍増殖が統計的に有意に低減した。同様に、単独の又は抗PD-1と組み合わせた抗体22F9(図38)及び20E6(図39)で動物を治療することで、イソタイプ対照抗体又は抗PD-1単独と比較して、腫瘍増殖が統計的に有意に低減した。これらのデータは、EMT6マウスモデルにおいて、28G11、22F9及び20E6の全てが抗PD-1抗体と組み合わせて活性を示すことを実証している。

10

【0606】

実施例27：4T1乳癌腫瘍転移モデルにおける抗LAP抗体の有効性

この実施例は、腫瘍転移のモデル(即ち、4T1乳癌腫瘍転移モデル)における単独療法としての抗LAP抗体の有効性について記載している。

【0607】

簡単に説明すると、 1×10^5 4T1乳癌細胞を6-8週齢のBalb/cマウスの乳腺脂肪パッドに移植した。移植の1日後、動物をそれぞれ7匹の動物のグループにランダム化した。動物に、マウスIgG1イソタイプ対照抗体、マウス-IgG2a対照抗体、抗TGF- κ 1D11-IgG1、並びに、抗LAP抗体28G11及び16B4を投与した。全ての動物に、0、3、6、9及び12日目に10mg/kgを腹腔内投与した。投与後29日目に、動物を殺し、転移性肺腫瘍結節を数えた。データは、平均肺結節数 \pm S E Mとしてグラフ化されている。

20

【0608】

図40に示されているように、抗TGF- κ 1D11及び28G11で動物を治療することで、イソタイプ対照抗体で治療した動物と比較して、転移性肺結節が統計的に有意に低減した($p < 0.05$ 、外れ値を除去した後の対応のないT検定)が、16B4では低減しなかった。これらのデータは、2種類の抗LAP抗体28G11及び16B4が腫瘍転移のマウスモデルにおいて異なる機能的効果を有することを示している。28G11が抗TGF- κ 1D11と同等の有効性を有するという発見は、TGF- κ 経路への影響による28G11の効果と一致している。

30

【0609】

実施例28：放射線と組み合わせたCT26同系モデルにおける抗LAP抗体の有効性
この実施例は、同系CT26腫瘍モデルにおける放射線と組み合わせた抗LAP抗体の有効性について記載している。

【0610】

簡単に説明すると、 1×10^6 CT26結腸直腸癌細胞を、6-8週齢のBalb/cマウスに移植した。移植の8日後、平均腫瘍体積が300mm²のとき(0日目)、動物をそれぞれ16匹の動物からなる6つのグループにランダム化した。0日目に開始して、動物に、マウスIgG2aイソタイプ対照抗体(グループ1)、抗LAP抗体28G11-IgG2a(グループ2)、12Gy放射線療法及びマウスIgG2aイソタイプ対照抗体(グループ3)、20Gy放射線療法及びマウスIgG2aイソタイプ対照抗体(グループ4)、12Gy放射線療法及び抗LAP抗体28G11-IgG2a(グループ5)、又は、20Gy放射線療法及び抗LAP抗体28G11-IgG2a(グループ6)を投与した。全ての抗体は、10mg/kgで腹腔内投与した。グループ1及び2は、0、3及び6日目に合計3回の抗体投与を受け、これらの動物は、腫瘍量が多いため7日目に殺した。グループ3-6は、0、3、6、9及び12日目に合計5回の抗体投与を受けた。グループ3-6からの3匹のランダムな動物も、7日目に殺し、残りの動物は19日まで追跡した。動物が放射線療法を受けた全ての場合、放射線は0日目に1回だけ投与された。生存率を毎日評価し、腫瘍体積は式 $V = W^2 \times L / 2$ を使用してキャリパーによって1週間に3回測定した。データは、生存している動物の平均腫瘍体積 + / - S E Mとし

40

50

て表されている

図 4 1 A 及び図 4 1 B に示されているように、12 又は 20 Gy の放射線のみで動物を治療することで、腫瘍の増殖が遅延した。12 Gy の放射線量で 28 G 1 1 を同時投与した場合、放射線治療のみと比較して、腫瘍の増殖が統計的に有意に低減した (**** $P < .0001$ 、*** $P = .0004$ 、2 元配置分散分析)。20 Gy の放射線量で 28 G 1 1 を同時投与した場合も、放射線治療単独と比較して低減をもたらし、その効果も統計的に有意であった。

【0611】

実施例 29：CD73 発現に対する抗 LAP 抗体の効果

この実施例では、腫瘍微小環境における CD73 発現に対する抗 LAP 抗体の効果を調べた。CD73 は、アデノシンリン酸 (AMP) を処理して、腫瘍微小環境中における既知免疫抑制作用を有する分子であるアデノシンに変換する細胞表面酵素である。

【0612】

CT26 腫瘍を Balb/c マウス体内で 300 mm² になるまで増殖させ (0 日目と指定)、0、3 及び 6 日目に抗体 28 G 1 1 を 10 mg/kg で投与した。マウスを標的化放射線 (12 Gy 又は 20 Gy) で治療した。単球性骨髄由来サプレッサー細胞 (mMDS C)、M2 マクロファージ及び樹状細胞での CD73 の発現を、放射線照射後 7 日目にフローサイトメトリーで調べた。グループ分けは以下のとおりである：

グループ 1： イソタイプ対照、放射線なし (n = 5)

グループ 2： 28 G 1 1、放射線なし (n = 5)

グループ 3： イソタイプ対照、12 Gy 放射線 (N = 3)

グループ 4： イソタイプ対照、20 Gy 放射線 (N = 3)

グループ 5： 28 G 1 1、12 Gy 放射線 (N = 2)

グループ 6： 28 G 1 1、20 Gy 放射線 (N = 3)。

【0613】

図 4 2 A - 図 4 2 C に示されているように、両方の線量 (12 Gy 及び 20 Gy) での放射線は、mMDS C、M2 マクロファージ及び樹状細胞で CD73 発現を誘導した。CD73 発現におけるこの増加は、28 G 1 1 での治療によって弱められた。さらに、28 G 1 1 は、放射線で治療されていないマウスの mMDS C において、CD73 発現をベースラインレベル未満に低下させた (図 4 2 A)。これらの結果は、CD73 陽性 mMDS C、M2 マクロファージ及び樹状細胞の割合の減少に反映されるように、抗 LAP 抗体による治療が阻害細胞集団の数と免疫抑制能力の両方を低減させたことを示している。

【0614】

実施例 30：抗 LAP 抗体の生体内分布

この実施例では、腫瘍を有するマウスにおける抗 LAP 抗体の生体内分布を調べた。

【0615】

簡単に説明すると、3 匹の Balb/C マウスに 1×10^6 CT26 細胞を移植し、平均腫瘍体積が 150 mm³ に達するまで腫瘍を増殖させた。動物に、10 mg/kg の 28 G 1 1 __ h I g G 1 の単回注射を投与した。注射の 3 日後、動物を殺し、採血した。マウスに PBS を灌流させ、心臓、肝臓、腎臓、骨、結腸、肺及び脾臓の組織を採取した。組織を 10% 中性緩衝ホルマリンの中に入れ、4 で一晩保存し、80% エタノールに移した。動物体内の 28 G 1 1 の位置を特定するために、組織サンプルを切片化し、抗ヒト I g G 1 で染色した。殆どの組織で最小限の染色が観察され、最も強い染色は腫瘍組織で観察された。

【0616】

実施例 31：癌の動物モデルにおける 20 E 6 及び 28 G 1 1 の単独及び抗 PD - 1 との併用の有効性

この実施例は、EMT6 マウス乳癌腫瘍モデルにおける、単独の及び抗 PD - 1 と組み合わせた 20 E 6 及び 28 G 1 1 抗体の有効性の試験について記載している。使用した抗体は以下に記載されている：

10

20

30

40

50

- ・ マウス× [L A P - T G F b 1 __ H] m A b (2 8 G 1 1 __ V H __ N 5 6 Q) m I g G 2 a / カッパ (C X) : 2 8 G 1 1 __ m I g G 2 a
- ・ マウス× [L A P - T G F b 1 __ H] m A b (2 0 E 6 __ Q 1 E __ N 5 4 Q) I g G 2 a / カッパ (C X) : 2 0 E 6 __ m I g G 2 a
- ・ マウス× [H E X O N __ A d] m A b (T C 3 1 . 2 7 F 1 1 . C 2) I g G 2 a / カッパ (C C) : イソタイプ対照抗体。

【0617】

簡単に説明すると、6 - 8 週齢の B a l b / c マウスに 0.3×10^6 E M T 6 マウス乳癌細胞を皮下接種した。腫瘍が平均サイズ約 85 mm^3 に増殖したとき、動物をそれぞれ 10 匹の動物からなる 6 つの治療群に層別化し、その時点で治療を開始した。全ての抗体は、腹腔内投与した。抗体 20 E 6 及び 28 G 1 1 は、 10 mg / kg で 1 週間に 2 回投与し、抗 P D 1 は、 5 mg / kg で 5 日ごとに投与した。ピヒクル対照群は、 5 mg / kg で投与されたマウス I g G 1 イソタイプ対照及び 10 mg / kg で投与されたマウス I g G 2 a イソタイプ対照で構成された。腫瘍は、1 週間に 2 - 3 回測定し、腫瘍の体積は以下の式を使用して計算した： $V = (\text{腫瘍の幅})^2 \times (\text{腫瘍の長さ}) / 2$ 。抗体 20 E 6 及び抗体 28 G 1 1 のみでの対象者の治療は、イソタイプ対照抗体で治療された対象者と比較して、有意な腫瘍増殖阻害をもたらすことが観察された。さらに、抗体 20 E 6 又は抗体 28 G 1 1 のいずれかと抗 P D - 1 抗体との併用療法は、6 つの完全な反応をもたらし、動物には腫瘍が残っていなかった。図 4 3 A - 図 4 3 H を参照されたい。全ての治療は、忍容性が高く、体重減少を引き起こさないことが観察された。

【0618】

実施例 3 2 : ヒト L A P - T G F イソ型 1、2 及び 3 への抗 L A P F (a b ') の結合親和性測定におけるアピディティの干渉を回避するために、この実施例では、ヒト L A P - T G F に対する 20 E 6 F (a b ') 結合タンパク質の結合動態を分析した。この実施例は、表面プラズモン共鳴を使用して、ヒト L A P - T G F イソ型 1、2 及び 3 に結合するヒト化 20 E 6 F (a b ') 結合タンパク質のイソ型特異性について記載している。

【0619】

シリーズ S C M 4 センサーチップ (G E H e a l t h c a r e 、カタログ B R 1 0 0 5 3 4) を、キットプロトコル (G E H e a l t h c a r e 、カタログ B R 1 0 0 8 3 9) に従って、 $1 \times \text{HBS} - \text{EP} +$ (T e k n o v a 、カタログ H 8 0 2 2) を備えた B i a c o r e T 2 0 0 機器に、抗ヒト F c キャプチャー抗体で固定化した。ヒト L A P - T G F イソ型 1、2 及び 3 とヒト化 20 E 6 F (a b ') の間の速度論的結合相互作用を、 25°C で、 0.1 mg / mL B S A (J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h 、カタログ 0 0 1 - 0 0 0 - 1 6 2) を含む $1 \times \text{HBS} - \text{EP} +$ で実施させた。ヒト L A P - T G F - F c イソ型の約 50 - 65 R U を、抗ヒト F c 表面に捕捉し、その後、1 : 3 で段階希釈したヒト化 20 E 6 F (a b ') を 3000 n M から 1.37 n M まで注入し、及び、0 n M の F (a b ') も含ませた。結合データは、参照 (キャプチャー表面のみ) フローセル及び 0 n M F (a b ') 注入からのシグナルの減算によって、二重参照した。結合速度定数は、データを 1 : 1 結合モデル (G E H e a l t h c a r e B i a c o r e T 2 0 0 E v a l u a t i o n ソフトウェア 2 . 0) でフィッティングすることによって決定した。

【0620】

図と表 3 2 に示されているように、ヒト化 20 E 6 I g G 1 抗体は、抗ヒト F c キャプチャーセンサーチップに捕捉された場合、I g G 1 と L A P - T G F 1 分子によって供される二価エピトープの両方の二価特性に起因して、非 1 : 1 結合プロフィールを示した。図 4 4 A を参照されたい。さらにまた、一価ヒト化 20 E 6 F (a b ') はヒト L A P - T G F 1 にナノモルの親和性で結合したことが観察された (図 4 4 B) が、ヒト L A P - T G F 2 (図 4 4 C) 又は L A P - T G F 3 (図 4 4 D) では感知可能なシグナル増加は観察されなかった。これらのデータは、ヒト化 20 E 6 F (a b ') がヒト L A P - T G F 1 に特異的に結合したことを示している。

10

20

30

40

50

【表 3 6】

表 3 2. ヒト TGFβ イソ型に結合するヒト化 20E6 F(ab')の結合パラメータ

| イソ型 | k_{on} ($\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$) | k_{off} ($\times 10^{-2} s^{-1}$) | K_D (nM) |
|-----------|--|--|---------------|
| LAP-TGFβ1 | 1.96 | 8.00 | 40.8 |
| LAP-TGFβ2 | - | - | - |
| LAP-TGFβ3 | - | - | - |

10

【0 6 2 1】

実施例 3 3 : 抗 LAP F (a b ') のヒト、カニクイザル、ラット及びマウスの LAP - TGF 1 への結合

この実施例は、表面プラズモン共鳴を使用して、いくつかの種の LAP - TGF 1 に結合するヒト化 2 0 E 6 F (a b ') 結合タンパク質の種特異性について記載している。

【0 6 2 2】

シリーズ S C M 4 センサーチップ (G E H e a l t h c a r e 、 カ タ ロ グ B R 1 0 0 5 3 4) を、キットプロトコル (G E H e a l t h c a r e 、 カ タ ロ グ B R 1 0 0 8 3 9) に従って、1 x HBS - EP + (T e k n o v a 、 カ タ ロ グ H 8 0 2 2) を備えた B i a c o r e T 2 0 0 機器に、抗ヒトFcキャプチャー抗体で固定化した。ヒト、カニクイザル、ラット及びマウスの LAP - TGF 1 とヒト化 2 0 E 6 F (a b ') の間の速度論的結合相互作用を、25 で、0 . 1 m g / m L BSA (J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h 、 カ タ ロ グ 0 0 1 - 0 0 0 - 1 6 2) を含む 1 x HBS - EP + で実施させた。ヒト、カニクイザル、ラット及びマウスの LAP - TGF - Fc の約 6 0 - 9 5 R U を抗ヒトFc表面に捕捉し、その後、1 : 3 で段階希釈したヒト化 2 0 E 6 F (a b ') を 3 0 0 0 n M から 1 . 3 7 n M まで注入し、及び、0 n M の F (a b ') も含ませた。結合データは、参照 (キャプチャー表面のみ) フローセル及び 0 n M F (a b ') 注入からのシグナルの減算によって、二重参照した。結合速度定数は、データを 1 : 1 結合モデル (G E H e a l t h c a r e B i a c o r e T 2 0 0 E v a l u a t i o n ソフトウェア 2 . 0) でフィッティングすることによって決定した。

20

30

【0 6 2 3】

図及び表 3 3 に示されているように、ヒト化 2 0 E 6 F (a b ') は、ヒト LAP - TGF 1 (図 4 5 A)、カニクイザル LAP - TGF 1 (図 4 5 B)、ラット LAP - TGF 1 (図 4 5 C) 及びマウス LAP - TGF 1 (図 4 5 D) に、ナノモルの親和性で結合した。

【表 3 7】

表 3 3. さまざまな種からの LAP-TGFβ1 に結合するヒト化 20E6 F(ab')の結合パラメータ

| 種 | k_{on} ($\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$) | k_{off} ($\times 10^{-2} s^{-1}$) | K_D (nM) |
|--------|--|--|---------------|
| ヒト | 1.91 ± 0.53 | 9.39 ± 2.35 | 49.5 ± 1.4 |
| カニクイザル | 1.58 ± 0.03 | 9.50 ± 0.12 | 60.3 ± 0.9 |
| ラット | 1.79 ± 0.42 | 10.6 ± 2.57 | 59.4 ± 0.7 |
| マウス | 1.64 ± 0.04 | 7.90 ± 0.11 | 48.3 ± 0.9 |

全ての値は、3回の測定からの平均±標準偏差として報告されている

40

【0 6 2 4】

50

実施例 34 : LAP - TGF β 1 のインテグリン (α v β 6) 活性化の阻害

この実施例は、LAP 抗体 20E6__mIgG2a を使用して、LAP - TGF β 1 のインテグリン (α v β 6) 活性化の阻害を調べた。組換えヒト V β 6 インテグリン (R & D Systems ; カタログ番号 3817 - AV) を、96 ウェル平底組織培養プレート内に、無血清 RPMI 中の 2 μ g / mL で、37 $^{\circ}$ C で 2 時間コーティングした。ウェルを、20E6__mIgG2a、イソタイプ対照又は抗 V β 6 (10D5 ; Millipore Sigma から市販されている) の 3 倍段階希釈 (高 30 μ g / mL) で処理した。処理直後に、ヒト LAP - TGF β 1 を発現する P3U1 細胞 (5 \times 10 4 / ウェル) をプレートに加え、続いて、HEK - Blue TGF β (2 \times 10 4 / ウェル) 細胞を加えた。 (HEK - Blue TGF β 細胞は、SMAD 結合要素応答性 SEAP レポーターを含んでおり、生物活性 TGF β が受容体に結合した場合、SEAP の分泌をもたらす) 。次に、プレートを 37 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートし、翌日、125 μ L の上清を採取して 96 ウェル底プレートに入れ、500 G で 5 分間再度回転させて、細胞を除去した。上清 (25 μ L) 中の分泌されたアルカリホスファターゼ (SEAP) レベルは、Great EscAPE Chemiluminescence Kit 2.0 (Takara Bio ; カタログ番号 631736) を製品プロトコルに従って使用して検出した。データは、20E6__mIgG2a がイソタイプ対照抗体及び抗 V β 6 (10D5) 抗体と比較して、LAP - TGF β 1 のインテグリン α v β 6 活性化を効果的に阻害したことを示している (図 46) 。

10

20

30

40

50

【表 3 8】

表 3 4. 配列の要約表

| 配列番号 | 説明 | 配列 | |
|------|--------------------------|---|----|
| | | タンパク質配列 | |
| 1 | ヒト LAP-TGFβ1 | LSTCKTIDMELVKKRRIEAIHQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVE THNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLL RLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYSNRL LAPSDSPEWLSFDVT GVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGR GDLATIHGMRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFS STEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIW SLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPALEPLPIVYVGRK PKVEQLSNMIVRSCKCS | 10 |
| 2 | ヒト LAP-TGFβ1 の LAP 領域 | LSTCKTIDMELVKKRRIEAIHQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVE THNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLL RLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYSNRL LAPSDSPEWLSFDVT GVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGR GDLATIHGMRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRR | |
| 3 | ヒト LAP-TGFβ2 | LSTCSTLDMQFMKRRIEAIHQILSKLKLTSPPEDYPEPEEV PPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYAKEVYKI DMPPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFVDSAMEKNASNLVKAEF RVFRLQNPKARVPEQRIELYQILKSKDLTSPQRYIDSKVVKT RAEGEWLSFDVTDVAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCTFVPSN NYIIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTSQDQKTIKSTRKNSGKT PHLLMLLPSYRLESQQTNRKRKRALDAAYCFRNVQDNCCLRP LYIDFKRDLGWKWIHEPKGYANFCAGACPYLWSSDTQHSRVL SLYNTINPEASAPCCVSDLEPLTILYIYGKTPKIEQLSNMI VKSCCKS | 20 |
| 4 | ヒト LAP-TGFβ2 の LAP 領域 | LSTCSTLDMQFMKRRIEAIHQILSKLKLTSPPEDYPEPEEV PPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYAKEVYKI DMPPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFVDSAMEKNASNLVKAEF RVFRLQNPKARVPEQRIELYQILKSKDLTSPQRYIDSKVVKT RAEGEWLSFDVTDVAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCTFVPSN NYIIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTSQDQKTIKSTRK KNSGKTPHLLMLLPSYRLESQQTNRKRK | |
| 5 | ヒト LAP-TGFβ3 | LSTCTTLDGHIKKRVEAIHQILSKLRLTSPEPTVMTHVP YQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFD MIQGLAEHNE LAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFR VLRVNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRG TAEWLSFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDI LENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHPHLLIM MIPPHRLDNPQGQQRKRALDTNYCFRNLNENCCVRPLYIDF RQDLGWKWIHEPKGYANFCGPPYLRSA DTTHSTVLGLYNT LNPEASAPCCVQDLEPLTILYVGRTPKVEQLSNMVVKSCK CS | 30 |
| 6 | ヒト LAP-TGFβ3 の LAP 領域 | LSTCTTLDGHIKKRVEAIHQILSKLRLTSPEPTVMTHVP YQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFD MIQGLAEHNE LAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFR VLRVNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRG | 40 |

【 0 6 2 5 】

| | | | |
|----|---------------------------|--|----|
| | | TAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDI LENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHPHLILM MIPPHRLDNPQGQGGQRKRR | |
| 7 | マウス LAP-TGFβ1 | LSTCKTIDMELVKKRRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVD RNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPPLLSRAELRLQ RLKSSVEQHVELYQKYSNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVT GVVRQWLNQGDGIQGFSAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKR GDLGTIHDNMRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHRRALDTNYCFS STENCCVRQLYIDFRKDLGKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIW SLDTQYSKVLALYNQHNPGASAPCCVPQALEPLPIVYVGRK PKVEQLSNMIVRSCKCS | 10 |
| 8 | マウス LAP-TGFβ1 の LAP 領域 | LSTCKTIDMELVKKRRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVD RNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPPLLSRAELRLQ RLKSSVEQHVELYQKYSNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTG VVRQWLNQGDGIQGFSAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKR DLGTIHDNMRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHRR | |
| 9 | マウス LAP-TGFβ2 | LSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEDEV PPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAACERERSDEEYYAKEVYKI DMPSHLPSENAIPPTFYRPFYFRIVRFVSTMEKNASNLVKA RVFRLQNPKARVAEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVK RAEGEWLSFDVTDVQEWLHKKDRNLGFKISLHCPCTFVPSN NYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYASGDQKTIKSTRKKTSGKT PHLLMLLPSYRLESQSSRRKRALDAAYCFRNVQDNCCLRP LYIDFRKDLGKWIHEPKGYANFACAGACPYLWSSDTQHTKVL SLYNTINPEASAPCCVSQDLEPLTILYYIGNTPKIEQLSNMI VKSCCS | 20 |
| 10 | マウス LAP-TGFβ2 の LAP 領域 | LSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEDEV PPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAACERERSDEEYYAKEVYKI DMPSHLPSENAIPPTFYRPFYFRIVRFVSTMEKNASNLVKA RVFRLQNPKARVAEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVK RAEGEWLSFDVTDVQEWLHKKDRNLGFKISLHCPCTFVPSN NYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYASGDQKTIKSTRKKTSGKT PHLLMLLPSYRLESQSSRRKRR | |
| 11 | マウス LAP-TGFβ3 | LSTCTTLDGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPSVMTHVP YQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQETSESEYYAKEIHKFD MIQGLAEHNEAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNGTNLFRAEFR VLRVNPSSKRTEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRG TAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDI LENVHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHPHLILM MIPPHRLDSPGQGSQRKRALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDF RQDLGKWKVHEPKGYANFACGPCPYLRSADTTHSTVGLYNT LNPEASAPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVKSC CS | 30 |
| 12 | マウス LAP-TGFβ3 の LAP 領域 | LSTCTTLDGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPSVMTHVP YQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQETSESEYYAKEIHKFD MIQGLAEHNEAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNGTNLFRAEFR VLRVNPSSKRTEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRG TAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDI | 40 |

【 0 6 2 6 】

| | | | |
|------------------------|---|--|----|
| | | LENVHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHPHLIIM MIPPHRLDSPGQGSQRKKR | |
| 13 | ヒト LAP-TGFβ1 “開いたコンフォメーション” | LSTCKTIDMELVKKRIEAIHQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADTYAKEVTRVLMVE THNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLL RLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLNSRLLAPSDSPEWLSFDVT GVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRR GDLATIHGMRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRALDTNYCFSS TEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWS LDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYVYVGRKP KVEQLSNMIVRSCKCS | 10 |
| 14 | ヒト LAP-TGFβ1 “閉じたコンフォメーション” | LSTCKTIDMELVKKRIEAIHQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYCAKEVTRVLMVE THNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLL RLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLNSRLLAPSDSPEWLSFDVT GVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRR GDLATIHGMRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRALDTNYCFSS TEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWS LDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYVYVGRKP KVEQLSNMIVRSCKCS | |
| 15 | ヒト遊離 TGFβ1 (LAPを有さない成熟 TGFβ1) | ALDTNYCFSSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANF CLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPL PIVYVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS | |
| 257 | 図 34 のヒト LAP-TGFβ1 | LSTCKTIDMELVKKRIEAIHQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYAKEVTRVLMVE THNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLL RLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLNSRLLAPSDSPEWLSFDVT GVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINAGFTTGR RGDLATIHGMRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRALDTNYCF SSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYI WSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYVYVGR KPKVEQLSNMIVRSCKCS | 20 |
| 結合タンパク質、抗体及び抗原結合フラグメント | | | |
| 16 | 28G11(hyb)VHCDR1 | DYYS | |
| 17 | 28G11(hyb)VHCDR2 (ヒト化に使用される VHCDR2 の拡張定義) | FIRNKPNGYTTE | |
| 18 | 28G11(hyb)VHCDR3 | YTGGGYFDY | 30 |
| 19 | 28G11(hyb)VLCDR1 | RASQDISNYLN | |
| 20 | 28G11(hyb)VLCDR2 | YTSRLHS | |
| 21 | 28G11(hyb)VLCDR3 | QQGDTLPWT | |
| 22 | 28G11(hyb) VH | EVKLVEGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYMSWVRQPPGK ALEWLGFIIRNKPNGYTTEYSASVKGRFTISRDNSSQSIYLQMN VLAEDSATYCYARYTGGGYFDYWGQGTTLTVSS | |
| 23 | 28G11(hyb) VL | DIQMTQTSSLSASLGDRLLTISCRASQDISNYLNWYQKPDGT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQADIATY FCQQGDTLPWTFGGGKLEIK | |
| 24 | 28G11(hyb)重鎖 | EVKLVEGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYMSWVRQPPGK ALEWLGFIIRNKPNGYTTEYSASVKGRFTISRDNSSQSIYLQMN VLAEDSATYCYARYTGGGYFDYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVY | 40 |

【 0 6 2 7 】

| | | |
|----|-------------------|--|
| | | PLAPGCGDFTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVHT FPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDK KLEPSGPISITINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFIFFPNIKD VLMISLTPKVT CVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTH REDYNSTIRVVSTLPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERT ISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDIS VEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNKMTSKWEKTD SFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK |
| 25 | 28G11(hyb)軽鎖 | DIQMTQTSSLSASLGDRLTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQADIATY FCQQGDTLPWTFGGGTKLEIKRADAAPTVISFPPSSEQLTSGG ASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKST YSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC |
| 26 | 28G11 VHCDR2 N56Q | FIRNKPQGYTTE |
| 27 | 28G11 VHCDR2 N56S | FIRNKPSGYTTE |
| 28 | 28G11 VHCDR2 N56H | FIRNKPHGYTTE |
| 29 | 28G11 VHCDR2 N56L | FIRNKPLGYTTE |
| 30 | 28G11 VHCDR2 N56D | FIRNKPDGYTTE |
| 31 | 28G11_H0 VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSDYYMSWVRQAPGK GLEWVGFIRNKPNGYTTEYSASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARYTGGGYFDYWGQGTLLTVSS |
| 32 | 28G11_H0_IgG1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSDYYMSWVRQAPGK GLEWVGFIRNKPNGYTTEYSASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARYTGGGYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 33 | 28G11_H1 VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFTDYYMSWVRQAPGK GLEWLGFIRNKPNGYTTEYSASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARYTGGGYFDYWGQGTLLTVSS |
| 34 | 28G11_H1_IgG1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFTDYYMSWVRQAPGK GLEWLGFIRNKPNGYTTEYSASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARYTGGGYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 35 | 28G11_H2 VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFTDYYMSWVRQAPGK GLEWLGFIRNKPNGYTTEYSASVKGRFTISRDNSSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARYTGGGYFDYWGQGTLLTVSS |

10

20

30

40

【 0 6 2 8 】

| | | |
|----|------------------|---|
| 36 | 28G11_H2_IgG1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMSWVRQAPGK GLEWLG FIRNKPNGYTTEYSASVKGRFTISRDNSSSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARYTGGGYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 37 | 28G11_H2_IgG4mut | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMSWVRQAPGK GLEWLG FIRNKPNGYTTEYSASVKGRFTISRDNSSSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARYTGGGYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFCSSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 38 | 28G11_H2.1 VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMSWVRQAPGK GLEWLG FIRNKPYGTYTTEYSASVKGRFTISRDNSSSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARYTGGGYFDYWGQGTLLTVSS |
| 39 | 28G11_H2.1_IgG1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMSWVRQAPGK GLEWLG FIRNKPYGTYTTEYSASVKGRFTISRDNSSSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARYTGGGYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 40 | 28G11_H2a VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMSWVRQAPGK GLEWVGFIRNKPNGYTTEYSASVKGRFTISRDNSSKNSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARYTGGGYFDYWGQGTLLTVSS |
| 41 | 28G11_H2a_IgG1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMSWVRQAPGK GLEWVGFIRNKPNGYTTEYSASVKGRFTISRDNSSKNSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARYTGGGYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

10

20

30

40

【 0 6 2 9 】

50

| | | |
|----|--------------------------|---|
| 42 | 28G11_H2b VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGK GLEWVGFIRNKPQGYTTEYSASVKGRFTISRDN SKNSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARYTGGGYFDYWGQGLVTVSS |
| 43 | 28G11_H2b_IgG1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGK GLEWVGFIRNKPQGYTTEYSASVKGRFTISRDN SKNSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARYTGGGYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCTPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 44 | 28G11_H2b_hlgG4mut VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGK GLEWVGFIRNKPQGYTTEYSASVKGRFTISRDN SKNSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARYTGGGYFDYWGQGLVTVSS |
| 45 | 28G11_H2b_hlgG4mut | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGK GLEWVGFIRNKPQGYTTEYSASVKGRFTISRDN SKNSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARYTGGGYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVESKYGPCCPCPAPPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVME ALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 46 | 28G11_L1 VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKV PKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSDYTLTISSLPEDVATY FCQQGDTLPWTFGQGTKLEIK |
| 47 | 28G11_L1 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKV PKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSDYTLTISSLPEDVATY FCQQGDTLPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 48 | 28G11_L2 VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSDYTLTISSLPEDVATY FCQQGDTLPWTFGQGTKLEIK |
| 49 | 28G11_L2 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSDYTLTISSLPEDVATY FCQQGDTLPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 50 | 28G11_L3 VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRLTISCRASQDISNYLNWYQQKPGKT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSDYTLTISSLPEDVATY FCQQGDTLPWTFGQGTKLEIK |
| 51 | 28G11_L3 | DIQMTQSPSSLSASVGDRLTISCRASQDISNYLNWYQQKPGKT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSDYTLTISSLPEDVATY |

10

20

30

40

【 0 6 3 0 】

50

| | | |
|----|-------------------|--|
| | | FCQQGDTLPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST YSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 52 | 28G11_L3a VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRLTISCRASQDISNYLNWYQQKPGKV VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATY YCQQGDTLPWTFGQGTKLEIK |
| 53 | 28G11_L3a | DIQMTQSPSSLSASVGDRLTISCRASQDISNYLNWYQQKPGKV VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATY YCQQGDTLPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST YSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 54 | 22F9(hyb)VHCDR1 | GYTFTSYWMH |
| 55 | 22F9(hyb)VHCDR2 | MIHPNSGSTN |
| 56 | 22F9(hyb)VHCDR3 | YDYDGFDFV |
| 57 | 22F9(hyb)VLCDR1 | RASKSVSTSGYSYM |
| 58 | 22F9(hyb)VLCDR2 | LASNLES |
| 59 | 22F9(hyb)VLCDR3 | QHSRELPYT |
| 60 | 22F9(hyb) VH | QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWKQRPQG GLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSL TSEDSAVYYCAYDYDGFDFVWGTGTTVTVSS |
| 61 | 22F9(hyb) VL | DIVLTQSPASLDVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHYQQK SGQPPKLLIYLANLESVGPARGSGSGSGTHFTLNIHPVEEED AATYYCQHSRELPYTFGGGKLEIK |
| 62 | 22F9(hyb)重鎖 | QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWKQRPQG GLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSL TSEDSAVYYCAYDYDGFDFVWGTGTTVTVSSAKTTPPSVYPL APGSAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFP AVLQSDLYTLSSSVTPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKI VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVV VDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSEL PIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAIEKTI SKTKGRPKAPQVY TIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYK NTQPIMNTNGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNH HTEKSLSHSPGK |
| 63 | 22F9(hyb)輕鎖 | DIVLTQSPASLDVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHYQQK SGQPPKLLIYLANLESVGPARGSGSGSGTHFTLNIHPVEEED AATYYCQHSRELPYTFGGGKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQL TSGGASVVCFLNIFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDS KDSYMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN NEC |
| 64 | 22F9 VHCDR2 N54A | MIHPASGSTN |
| 65 | 22F9 VHCDR2 N54H | MIHPHSGSTN |
| 66 | 22F9 VHCDR2 N54Q | MIHPQSGSTN |
| 67 | 22F9 VHCDR2 N54S | MIHPSSGSTN |
| 68 | 22F9 VHCDR3 D102A | YDYAGDFDV |
| 69 | 22F9 VHCDR3 D102E | YDYEYDFDV |
| 70 | 22F9 VHCDR3 D102G | YDYGDFDV |

10

20

30

40

50

【 0 6 3 1 】

| | | |
|----|----------------|---|
| 71 | 22F9_H0 VH | QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWGMGIHPNSGSTNYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMEISSL RSEDTAVYYCARYDYDGFFDVWGQGTLLVTVSS |
| 72 | 22F9_H0_IgG1 | QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWGMGIHPNSGSTNYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMEISSL RSEDTAVYYCARYDYDGFFDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQP REPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 73 | 22F9_H0.1 VH | QVQLVQpGAEVvKPGASVKI SCKASGYTFTSYWMHWkQrPGQ GLEWGMGIHPqSGSTNYNEKFKSkaTlTRDkSsSTaYMEISSL RSEDTAVYYCARYDYaGFFDVWGQGTLLVTVSS |
| 74 | 22F9_H0.1_IgG1 | QVQLVQpGAEVvKPGASVKI SCKASGYTFTSYWMHWkQrPGQ GLEWGMGIHPqSGSTNYNEKFKSkaTlTRDkSsSTaYMEISSL RSEDTAVYYCARYDYaGFFDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQP REPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 75 | 22F9_H1 VH | QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWiGMIHPNSGSTNYNEKFKSRVTMTvDTSTSTVYMEISSL RSEDTAVYYCAyDYDGFFDVWGQGTLLVTVSS |
| 76 | 22F9_H1_IgG1 | QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWiGMIHPqSGSTNYNEKFKSRVTMTvDTSTSTVYMEISSL RSEDTAVYYCAyDYDGFFDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQP REPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 77 | 22F9_H1.1 VH | QVQLVQpGAEVvKPGASVKI SCKASGYTFTSYWMHWkQrPGQ GLEWIGMIHPqSGSTNYNEKFKSkaTMTVDkSsSTVYMEISSL RSEDTAVYYCAyDYaGFFDVWGQGTLLVTVSS |
| 78 | 22F9_H1.1_IgG1 | QVQLVQpGAEVvKPGASVKI SCKASGYTFTSYWMHWkQrPGQ GLEWIGMIHPqSGSTNYNEKFKSkaTMTVDkSsSTVYMEISSL RSEDTAVYYCAyDYaGFFDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP |

10

20

30

40

【 0 6 3 2 】

50

| | | |
|----|-------------------|---|
| | | EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 79 | 22F9_H1.1_IgG4mut | QVQLVQpGAEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWvKQrPGQGLEWIGMIHPqSGSTNYNEKFKSkaTMTVDkSsSTVYMELESSLRSEDTAVYYCAYDYaGFFDVGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 80 | 22F9_H2 VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKSRVTLTVDTSTSTaYMELESSLRSEDTAVYYCAYDYDGFFDVGQGTLLVTVSS |
| 81 | 22F9_H2_IgG1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKSRVTLTVDTSTSTaYMELESSLRSEDTAVYYCAYDYDGFFDVGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 82 | 22F9_H2.1 VH | QVQLVQpGAEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWvKQrPGQGLEWIGMIHPqSGSTNYNEKFKSkaTLTVDKSTSTAYMELESSLRSEDTAVYYCAYDYaGFFDVGQGTLLVTVSS |
| 83 | 22F9_H2.1_IgG1 | QVQLVQpGAEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWvKQrPGQGLEWIGMIHPqSGSTNYNEKFKSkaTLTVDKSTSTAYMELESSLRSEDTAVYYCAYDYaGFFDVGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 84 | 22F9_H2.1_IgG4mut | QVQLVQpGAEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWvKQrPGQGLEWIGMIHPqSGSTNYNEKFKSkaTLTVDKSTSTAYMELESSLRSEDTAVYYCAYDYaGFFDVGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV |

10

20

30

40

50

【 0 6 3 3 】

| | | |
|----|-------------------|---|
| | | SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 85 | 22F9_H3 VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKSRVTLTVdKsSsSTaYMELSSL RSED TAVYYCAyYDYDGFDFVWGQGTLLVTVSS |
| 86 | 22F9_H3_IgG1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKSRVTLTVdKsSsSTaYMELSSL RSED TAVYYCAyYDYDGFDFVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDK VEPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQ REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 87 | 22F9_H3.1 VH | QVQLVQpGAEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWIGMIHPqSGSTNYNEKFKSRVTLTVDKSSSTAYMELSSL RSED TAVYYCAYDYaGFFDFVWGQGTLLVTVSS |
| 88 | 22F9_H3.1_IgG1 | QVQLVQpGAEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWIGMIHPqSGSTNYNEKFKSRVTLTVDKSSSTAYMELSSL RSED TAVYYCAYDYaGFFDFVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDK VEPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQ REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 89 | 22F9_H3.1_IgG4mut | QVQLVQpGAEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWIGMIHPqSGSTNYNEKFKSRVTLTVDKSSSTAYMELSSL RSED TAVYYCAYDYaGFFDFVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDK VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 90 | 22F9_H4 VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWkQrPGQ GLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKSkaTlTVdKsSsSTaYMELSSL RSED TAVYYCAyYDYDGFDFVWGQGTLLVTVSS |
| 91 | 22F9_H4_IgG1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWkQrPGQ GLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKSkaTlTVdKsSsSTaYMELSSL RSED TAVYYCAyYDYDGFDFVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDK |

10

20

30

40

【 0 6 3 4 】

50

| | | |
|----|-------------------|--|
| | | VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 92 | 22F9_H5_VH | QVQLVQpGAEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWkQrPGQGLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKSkaTlTvDkSsSTaYME LSSLRSED TAVYYCAyDYDGFDFVWGQGLVTVSS |
| 93 | 22F9_H5_IgG1 | QVQLVQpGAEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWkQrPGQGLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKSkaTlTvDkSsSTaYME LSSLRSED TAVYYCAyDYDGFDFVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 94 | 22F9_H5_IgG4mut | QVQLVQpGAEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWkQrPGQGLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKSkaTlTvDkSsSTaYME LSSLRSED TAVYYCAyDYDGFDFVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 95 | 22F9_H5.2_VH | QVQLVQpGAEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWkQrPGQGLEWIGMIHPQSGSTNYNEKFKSkaTlTvDkSsSTaYME LSSLRSED TAVYYCAyDYAGFFDVWGQGLVTVSS |
| 96 | 22F9_H5.2_IgG1 | QVQLVQpGAEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWkQrPGQGLEWIGMIHPQSGSTNYNEKFKSkaTlTvDkSsSTaYME LSSLRSED TAVYYCAyDYAGFFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 97 | 22F9_H5.2_IgG4mut | QVQLVQpGAEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWkQrPGQGLEWIGMIHPQSGSTNYNEKFKSkaTlTvDkSsSTaYME LSSLRSED TAVYYCAyDYAGFFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT |

10

20

30

40

【 0 6 3 5 】

50

| | | |
|-----|------------------|--|
| | | CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREP QVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKLSLSLGLGK |
| 98 | 22F9_H7 VH | QVQLVQpGAIEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWIGMIHPqSGSTNYAQKFQGRVTMTvDkSTSTVYMESSL RSEDTAVYYCAyYDYaGFFDVGQGTLLVTVSS |
| 99 | 22F9_H7_IgG1 | QVQLVQpGAIEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWIGMIHPqSGSTNYAQKFQGRVTMTvDkSTSTVYMESSL RSEDTAVYYCAyYDYaGFFDVGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQ REPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| 100 | 22F9_H7_IgG4mut | QVQLVQpGAIEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWIGMIHPqSGSTNYAQKFQGRVTMTvDkSTSTVYMESSL RSEDTAVYYCAyYDYaGFFDVGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREP QVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKLSLSLGLGK |
| 101 | 22F9_H7a VH | EVQLVQpGAIEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWIGMIHPqSGSTNYAQKFQGRVTMTvDkSTSTVYMESSL RSEDTAVYYCAyYDYaGFFDVGQGTLLVTVSS |
| 102 | 22F9_H7a_IgG1 | EVQLVQpGAIEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWIGMIHPqSGSTNYAQKFQGRVTMTvDkSTSTVYMESSL RSEDTAVYYCAyYDYaGFFDVGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQ REPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| 103 | 22F9_H7a_IgG4mut | EVQLVQpGAIEVvKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWIGMIHPqSGSTNYAQKFQGRVTMTvDkSTSTVYMESSL RSEDTAVYYCAyYDYaGFFDVGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV |

10

20

30

40

【 0 6 3 6 】

| | | | |
|-----|-----------------|---|----|
| | | SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLK | |
| 104 | 22F9_L0 VL | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQK PGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFRSGSGSGTDFLLTISSIQPED FATYYCQHSRELPYTFGGGTKVEIK | |
| 105 | 22F9_L0 | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQK PGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFRSGSGSGTDFLLTISSIQPED FATYYCQHSRELPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC | 10 |
| 106 | 22F9_L1 VL | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQK PGKpPKLLIYLASNLESGVPSRFRSGSGSGThFLLTISSIQPED FATYYCQHSRELPYTFGGGTKVEIK | |
| 107 | 22F9_L1 | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQK PGKpPKLLIYLASNLESGVPSRFRSGSGSGThFLLTISSIQPED FATYYCQHSRELPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC | |
| 108 | 22F9_L2 VL | DIQLTQSPSSLSvSVGDRaTITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQK PGKpPKLLIYLASNLESGVPSRFRSGSGSGThFLLTISSvQPED FATYYCQHSRELPYTFGGGTKLEIK | 20 |
| 109 | 22F9_L2 | DIQLTQSPSSLSvSVGDRaTITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQK PGKpPKLLIYLASNLESGVPSRFRSGSGSGThFLLTISSvQPED FATYYCQHSRELPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC | |
| 110 | 20E6(hyb)VHCDR1 | GYTFTSYWMH | |
| 111 | 20E6(hyb)VHCDR2 | RIDPNSGGIK | |
| 112 | 20E6(hyb)VHCDR3 | WDYGGYFDV | |
| 113 | 20E6(hyb)VLCDR1 | RASQDITNYLN | |
| 114 | 20E6(hyb)VLCDR2 | YTSRLHS | |
| 115 | 20E6(hyb)VLCDR3 | QQGDTLPWT | 30 |
| 116 | 20E6(hyb) VH | QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGR GLEWIGRIDPNSGGIKYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSL TSEDSAVYYCARWDYGGYFDVWGTGTTVTVSS | |
| 117 | 20E6(hyb) VL | DIQMTQTSSLSASLGDRVITISCRASQDITNYLNWYQQKPDGA VKLLIYYTSRLHSGVPSRFRSGSGSGTDYSLTIISNLEQEDIATY FCQQGDTLPWTFGGGTKLEIK | |
| 118 | 20E6(hyb)重鎖 | QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGR GLEWIGRIDPNSGGIKYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSL TSEDSAVYYCARWDYGGYFDVWGTGTTVTVSSQSFPNVEPLV SCESPLSDKNLVAMGLARDFLPSTISFTWNYQNNEVIQGITR TFPTLRTGGKYLATSQVLLSPKSILEGSDEYLVCKIHYGGKNR DLHVPIPAVAEMNPNVNVFVPPRDFGSPAPRKSCLICEATNF TPKPIITVSWLKDGLVESGFTTDPVTIENKGSTPQTYKVISLTL | 40 |

【 0 6 3 7 】

| | | |
|-----|-------------------------|---|
| | | TISEIDWLNLNVYTCRVDHRGLTFLKNVSSTCAASPSTDILTF TI PPSFADIFLSKSNLTCCLVSNLATYETLNI SWASQSGEPL TKIKIMESHPNGTFSAGKVASVCVEDWNNRKEFVCTVTHRDL SPQKFI SKPNEVHKHPPAVYLLPPAREQLNLRRESATVTCLVK GFSPADISVQWLQRGQLLPQEKYVTSAPMPEPGAPGFYFTHSI LTVTEEEWNSGETYTCVVGHEALPHLV TERTVDKSTGKPTLYN VSLIMSDTGGTCY |
| 119 | 20E6(hyb)軽鎖 | DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDITNYLNWYQQKPDGA VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGDTLPWTFGGGKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGG ASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDS YSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC |
| 120 | 20E6(hyb)VHCDR2 N54Q | RIDPQSGGIK |
| 121 | 20E6(hyb)VHCDR2 N54G | RIDPGSGGIK |
| 122 | 20E6(hyb)VHCDR2 N54A | RIDPASGGIK |
| 123 | 20E6(hyb)VHCDR2 N54S | RIDPSSGGIK |
| 124 | 20E6(hyb)VHCDR2 N54H | RIDPHSGGIK |
| 125 | 20E6(hyb)VHCDR2 N54L | RIDPLSGGIK |
| 126 | 20E6(hyb)VHCDR2 N54D | RIDPDSGGIK |
| 127 | 20E6_H0_VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDPNSGGIKYNEKFKSRVTMTRDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSS |
| 128 | 20E6_H0_IgG1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDPNSGGIKYNEKFKSRVTMTRDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFP APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT EVTQVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 129 | 20E6_H0_IgG4mut | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDPNSGGIKYNEKFKSRVTMTRDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFP APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDK VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK |

10

20

30

40

【 0 6 3 8 】

50

| | | |
|-----|-------------------|--|
| 130 | 20E6_H0.1_VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDPNSGGIKYAQKFQGRATLTVDTSTSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSS |
| 131 | 20E6_H0.1_IgG1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDPNSGGIKYAQKFQGRATLTVDTSTSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMH EALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| 132 | 20E6_H0.1_IgG4mut | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDPNSGGIKYAQKFQGRATLTVDTSTSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKLSLSLSPGK |
| 133 | 20E6_H0.2_VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDPQSGGIKYAQKFQGRATLTVDTSTSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSS |
| 134 | 20E6_H0.2_IgG1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDPQSGGIKYAQKFQGRATLTVDTSTSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT EVTCCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMH EALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| 135 | 20E6_H0.2_IgG4mut | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDPQSGGIKYAQKFQGRATLTVDTSTSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKLSLSLSPGK |

10

20

30

40

【 0 6 3 9 】

50

| | | |
|-----|---------------------------|--|
| 136 | 20E6_H0.3_IgG1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDP _g SGGIKYAQKFQGRATLTVDSTSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSS |
| 137 | 20E6_H0.4_IgG1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDP _a SGGIKYAQKFQGRATLTVDSTSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSS |
| 138 | 20E6_H0.5_IgG1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDP _s SGGIKYAQKFQGRATLTVDSTSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSS |
| 139 | 20E6_H0.6_IgG1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDP _h SGGIKYAQKFQGRATLTVDSTSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSS |
| 140 | 20E6_H0.7_IgG1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDP _l SGGIKYAQKFQGRATLTVDSTSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSS |
| 141 | 20E6_H0.8_IgG1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDP _d SGGIKYAQKFQGRATLTVDSTSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSS |
| 142 | 20E6_H0.2_ hIgG4mut VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDPQSGGIKYAQKFQGRATLTVDSTSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSS |
| 143 | 20E6_H0.2_ hIgG4mut | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDPQSGGIKYAQKFQGRATLTVDSTSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTITCNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK |
| 144 | 20E6_H1 VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEW _i GRIDPNSSGGIKYNEKFKSRVT _l T _v DTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSS |
| 145 | 20E6_H1_IgG1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEW _i GRIDPNSSGGIKYNEKFKSRVT _l T _v DTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT EVT _l CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ _l NSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 146 | 20E6_H2 VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEW _i GRIDPNSSGGIKYNEKFKSRVT _l T _v DkS _s STAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSS |
| 147 | 20E6_H2_IgG1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEW _i GRIDPNSSGGIKYNEKFKSRVT _l T _v DkS _s STAYMELSRL |

10

20

30

40

50

【 0 6 4 0 】

| | | | |
|-----|--------------|---|----|
| | | RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHFFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK VEPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK | |
| 148 | 20E6_H3 VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF ^T SYMMHWv ^{Qr} PGQ GLEWIGRIDPNSGGIKYNEKFKSkaTlTvDkSsSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSS | 10 |
| 149 | 20E6_H3_IgG1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF ^T SYMMHWv ^{Qr} PGQ GLEWIGRIDPNSGGIKYNEKFKSkaTlTvDkSsSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHFFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK VEPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK | |
| 150 | 20E6_H4 VH | QVQLVQpGAEVvKPGASVKLSCKASGYTF ^T SYMMHWv ^{Qr} PGQ GLEWIGRIDPNSGGIKYNEKFKSkaTlTvDkSsSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSS | 20 |
| 151 | 20E6_H4_IgG1 | QVQLVQpGAEVvKPGASVKLSCKASGYTF ^T SYMMHWv ^{Qr} PGQ GLEWIGRIDPNSGGIKYNEKFKSkaTlTvDkSsSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHFFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK VEPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK | |
| 152 | 20E6_L0 VL | DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDITNYLNWYQOKPGKA PKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSDTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGD ^T LPWTFGQGTKLEIK | 30 |
| 153 | 20E6_L0 | DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDITNYLNWYQOKPGKA PKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSDTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGD ^T LPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | |
| 154 | 20E6_L1 VL | DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDITNYLNWYQOKPGKA vKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSDyTLTISSLQPEDFATY fCQQGD ^T LPWTFGQGTKLEIK | |
| 155 | 20E6_L1 | DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDITNYLNWYQOKPGKA vKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSDyTLTISSLQPEDFATY fCQQGD ^T LPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT | 40 |

【 0 6 4 1 】

| | | |
|-----|-----------------|---|
| | | ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDST YSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 156 | 20E6_L0_P44V VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDITNYLNWYQQKPGKA VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQGDTLPWTFGQGTKLEIK |
| 157 | 20E6_L0_P44V | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDITNYLNWYQQKPGKA VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQGDTLPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDST YSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 158 | 20E6_L0_F71Y VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDITNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATY YCQQGDTLPWTFGQGTKLEIK |
| 159 | 20E6_L0_F71Y | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDITNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATY YCQQGDTLPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDST YSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 160 | 20E6_L0_Y87F VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDITNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY FCQQGDTLPWTFGQGTKLEIK |
| 161 | 20E6_L0_Y87F | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDITNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY FCQQGDTLPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDST YSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 162 | 17G8(hyb)VHCDR1 | GFTFTDYMS |
| 163 | 17G8(hyb)VHCDR2 | FIRNKANGYTTE |
| 164 | 17G8(hyb)VHCDR3 | YKLGGYFDV |
| 165 | 17G8(hyb)VLCDR1 | RASQDISNYLN |
| 166 | 17G8(hyb)VLCDR2 | YTSRLHS |
| 167 | 17G8(hyb)VLCDR3 | QQGNTLPWT |
| 168 | 17G8(hyb)VH | EVKLVESSGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYMSWVRQPPGK ALEWLGFIIRNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNSSILYLQMN ALRAEDSATYYCARYKLGGYFDVWGTGTTVTVSS |
| 169 | 17G8(hyb) VL | DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGNTLPWTFGGGKLEIK |
| 170 | 17G8(hyb)重鎖 | EVKLVESSGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYMSWVRQPPGK ALEWLGFIIRNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNSSILYLQMN ALRAEDSATYYCARYKLGGYFDVWGTGTTVTVSSQSFPNVFP LVSCESPLSDKNLVAMGCLARDFLPSTISFTWNYQNNTEVIQ IRTFPTLRTGGKYLATSQVLLSPKSILEGSDEYLVCKIHYGK NRDLHVP I PAVAEMNPVNVFVPPRDGFSGPAPRKSCLICEAT NFTPKPITVSWLKDGLVESGFTDPVTIENKGSTPQTYKVIS TLTISEIDWLNLVYTCRVDHRGLTFLKNVSSCAASPSDIL TFTIPPSFADIFLSKSNLTCLVSNLATYETLNI SWASQSGEP LETKIKIMESHPNGTFSKGVASVCVEDWNNRKEFVCTVTHRD LPSPOKKFISKNEVHKHPPAVYLLPPAREQLNLRRESATVTCL VKGFSPADISVQWLQRGQLLPQEKYVTSAPMPEPGAPGFYFTH |

10

20

30

40

【 0 6 4 2 】

| | | |
|-----|-------------------------|--|
| | | SILTVTEEEWNSGETYTCVVGHEALPHLVTERTVVKSTGKPTL YNVSLIMSDTGGTCY |
| 171 | 17G8(hyb)軽鎖 | DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQOQNTLPWTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGG ASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSDST YSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC |
| 172 | 17G8(hyb)VHCDR2 N54Q | FIRNKAQGYTTE |
| 173 | 17G8(hyb)VHCDR2 N54G | FIRNKAGGYTTE |
| 174 | 17G8(hyb)VHCDR2 N54A | FIRNKAAGYTTE |
| 175 | 17G8(hyb)VHCDR2 N54S | FIRNKASGYTTE |
| 176 | 17G8(hyb)VHCDR2 N54H | FIRNKAHGYTTE |
| 177 | 17G8(hyb)VHCDR2 N54L | FIRNKALGYTTE |
| 178 | 17G8(hyb)VHCDR2 N54D | FIRNKADGYTTE |
| 179 | 24E3(hyb)VHCDR1 | GYTFTSYNMH |
| 180 | 24E3(hyb)VHCDR2 | AIYPGNGDTS |
| 181 | 24E3(hyb)VHCDR3 | WDWGGYFDV |
| 182 | 24E3(hyb)VLCDR1 | RASQDISNYLN |
| 183 | 24E3(hyb)VLCDR2 | YTSRLHS |
| 184 | 24E3(hyb)VLCDR3 | QOQDTPWTF |
| 185 | 24E3(hyb)VH | QAYLQOQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPRO GLEWIGAIYPGNGDTSYNPKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSL TSEDSAVYFCTRWDWGGYFDVWGTGTTVTVSS |
| 186 | 24E3(hyb) VL | DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQOQDTPWTFGGGTKLGIK |
| 187 | 24E3(hyb)重鎖 | QAYLQOQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPRO GLEWIGAIYPGNGDTSYNPKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSL TSEDSAVYFCTRWDWGGYFDVWGTGTTVTVSSQSFPNVFPLV SCESPLSDKNLVAMGCLARDFLPSTISFTWNYQNTEVIQIGIR TFPTLRTGGKYLATSQVLLSPKSILEGSDEYLVCKIHYGGKNR DLHVPIPAVAEMNPNVNVFVPPRDGFSGPAPRKSCLICEATNF TPKPI TVSWLKDGLVESGFTTDPVTIENKGSTPQTYKVI STL TISEIDWLNLVYTCRVDHRGLTFLKNVSSCAASPSTDILTF TIPPSFADIFLSKSNLTCVSNLATYETLNI SWASQSGEPL TKIKIMESH PNGTFSAKGVASVCVEDWNNRKEFVCTVTHRDL SPQKKFISKPNVHKHPPAVYLLPPAREQLNLRESATVTCLVK GFSPADISVQWLQRGQLLPQEKYVTSAPMPEPGAPGFYFTHSI LTVTEEEWNSGETYTCVVGHEALPHLVTERTVVKSTGKPTLYN VSLIMSDTGGTCY |
| 188 | 24E3(hyb)軽鎖 | DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQOQDTPWTFGGGTKLGIK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGG |

10

20

30

40

【 0 6 4 3 】

50

| | | |
|-----|--|--|
| | | ASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKSDST YSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSEFNRECE |
| 189 | 24E3(hyb)VHCDR2 N54Q | AIYPGQGDTs |
| 190 | 24E3(hyb)VHCDR2 N54G | AIYPGGGDTs |
| 191 | 24E3(hyb)VHCDR2 N54A | AIYPGAGDTs |
| 192 | 24E3(hyb)VHCDR2 N54S | AIYPGSGDTs |
| 193 | 24E3(hyb)VHCDR2 N54H | AIYPGHGDts |
| 194 | 24E3(hyb)VHCDR2 N54L | AIYPLGDts |
| 195 | 24E3(hyb)VHCDR2 N54D | AIYPGDGDts |
| 196 | ヒト IgG1 定常領域 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPK PKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 197 | ヒト IgG4 変異体定常 領域 ("IgG4mut"とも称され る) | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 198 | ニワトリ LAP-TGFβ1 | LSTCQRDLLEAAKKRIEAVRGQILSKLRLTAPPPASETPPRP LPDDVRALYNSTQELLKQARLRPPPDGPDEYWAKELRRIPME TTWDGPMHWPQSHSIFVFVNSRVRAEVGGRRALLHRAELRM LRQKAADSAGTEQRLELYQGYGNASWRYLHGRSVRATADDEW LSFDVTDVAVHQLSGSELLGVFKLSVHCPCMGPHADEMRIS IEGFQQRGDMQSIAKKHRRVPYVLAMALPAERANELHSARRR RDLDTDYCFGPGTDEKNCCVRPLYIDFRKDLQWKWIHEPKGYM ANFCMGPCPYIWSADTQYTKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQTL DPLPIIYYVGRNVRVEQLSNMVRACKCS |
| 199 | ヒト-ニワトリ LAP- TGFβ1 キメラ #1 | LSTCQRDLLEAAKKRIEAVRGQILSKLRLTAPPPASETPPRP LPDDVRALYNSTQELLKQARLRPPPDGPDEYWAKELRRIPME TTWDEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEVLLSRAELRL LRLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDV TGVVRQWLSRGGIEGFRLSAHCSDSRDNTLQVDINGFTTGR RGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCF SSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYI WSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYYVGR KPKVEQLSNMIVRSCKCS |

10

20

30

40

【 0 6 4 4 】

50

| | | |
|-----|----------------------------|--|
| 200 | ヒト-ニワトリ LAP-TGFβ1 キメラ #1.2 | LSTCKTIDMELVKKRIEAIRGQILSKLRLTAPPPASETPPRP LPDDVRALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVE THNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLL RLKLVQHVELYQKYSNNSWRYLNRLLAPSDSPEWLSFDVT GVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRR GDLATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFS STEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIW SLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYVGRK PKVEQLSNMIVRSCKCS |
| 201 | ヒト-ニワトリ LAP-TGFβ1 キメラ #1.3 | LSTCKTIDMELVKKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTQELLKQARLRPPDPGDEYWAKELRRVLMV ETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLL LRLKLVQHVELYQKYSNNSWRYLNRLLAPSDSPEWLSFDV TGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGR RGDLATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCF SSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYI WSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYVGR KPKVEQLSNMIVRSCKCS |
| 202 | ヒト-ニワトリ LAP-TGFβ1 キメラ #2 | LSTCKTIDMELVKKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVE THNGPMEHWQPQSHSIFVFNVSRAEVGGRALLHRAELRML RQKAAADSAGTEQRLELYQKYSNNSWRYLNRLLAPSDSPEWL SFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGF TTGRRGDLATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDT NYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGP CPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVY YVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS |
| 203 | ヒト-ニワトリ LAP-TGFβ1 キメラ #2.1 | LSTCKTIDMELVKKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRIPMET TWDGPMEHWPQSHSIFVFNSELREAVPEPVLLSRAELRLL RLKLVQHVELYQKYSNNSWRYLNRLLAPSDSPEWLSFDVT GVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRR GDLATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFS STEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIW SLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYVGRK PKVEQLSNMIVRSCKCS |
| 204 | ヒト-ニワトリ LAP-TGFβ1 キメラ #2.2 | LSTCKTIDMELVKKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVE THNEIYDKFKQSTHSIYMFNVSRAEVGGRALLHRAELRML RLRLKLVQHVELYQKYSNNSWRYLNRLLAPSDSPEWLSFDV TGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTT GRRGDLATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNY CFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCP YIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYV GRKPKVEQLSNMIVRSCKCS |
| 205 | ヒト-ニワトリ LAP-TGFβ1 キメラ #2.3 | LSTCKTIDMELVKKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVE THNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRML RQKAAADSAGTEQRLELYQGYGNASWRYLHGRSVRATADDEWL SFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGF TTGRRGDLATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDT |

10

20

30

40

【 0 6 4 5 】

| | | | |
|-----|-------------------------------------|--|----|
| | | NYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS | |
| 206 | ヒト-ニワトリ LAP-TGFβ1 キメラ #3 | LSTCKTIDMELVKKRRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVE THNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLL RLKLVKVEQHVELYQGYGNASWRYLHGRSVRATADDEWLSFDVT DAVHQWLSGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRG DLATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSS TEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPPYIWS LDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS | 10 |
| 207 | ヒト-ニワトリ LAP-TGFβ1 キメラ #4 | LSTCKTIDMELVKKRRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVE THNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLL RLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVT GVVQRWLSRGSELLGVFKLSVHCPCEMGPGHADEMRISIEGFT TGRRGDLATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTN YCFSSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPC PYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS | |
| 208 | ヒト-ニワトリ LAP-TGFβ1 キメラ #5 | LSTCKTIDMELVKKRRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVE THNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLL RLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVT GVVQRWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFEQQRG DMQSIAKKHRRVPYVFLAMALPAERANELHSARRRRDLDTDYCF SSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPPYI WSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYVGR KPKVEQLSNMIVRSCKCS | 20 |
| 209 | ヒト-ニワトリ LAP-TGFβ1 キメラ #6 | LSTCKTIDMELVKKRRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVE THNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLL RLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVT GVVQRWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRR GDLATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFG PGTDEKNCCVRPLYIDFRKDLQWKWIHEPKGYMANFCMGPCCPY IWSADTQYTKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYVGR RKPKVEQLSNMIVRSCKCS | 30 |
| 210 | ヒト-ニワトリ LAP-TGFβ1 キメラ #7 | LSTCKTIDMELVKKRRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVE THNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLL RLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVT GVVQRWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRR GDLATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSS TEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPPYIWS LDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYVGRN VRVEQLSNMIVRSCKCS | |
| 211 | ニワトリ-ヒト LAP-TGFβ1 キメラ chB1ex2.1 2.2 | LSTSQRDLDEAAKKRRIEAVRGQILSKLRLTAPPASETPPRP LPDDVRALYNSTQELLKQARLRPPDPDEYWAKELRRVLMV ETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRL | 40 |

【 0 6 4 6 】

| | | |
|-----|---|---|
| | | LRLKLVQHVLYQKYGNASWRYLHGRSVRATADDEWLSFDV TDAVHQWLSGSELLGVFKLSVHCPCEMGPGRHADEMRSIEGFE QQRGDMQSI AKKHRRVPYVLAMALPAERANELHSARRRRDLDT DYCFGPGTDEKNCCVRPLYIDFRKDLQWKWIHEPKGYMANFCM GPCPYIWSADTQYTKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQTLDP IYYVGRNVRVEQLSNMVRACKCS |
| 212 | ニワトリ-ヒト LAP- TGFβ1 キメラ chB1ex1.3 | LSTSQRDLLEAAKKRIEAVRGQILSKLRLTAPPPASETPPRP LPDDVRALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRIPMET TWDGPMHWPQSHSIFVFNVSRAEVGGRRALLHRAELRML RQKAAADSAGTEQRLELYQGYGNASWRYLHGRSVRATADDEWL SFDVTDVHQWLSGSELLGVFKLSVHCPCEMGPGRHADEMRSI EGFEQQRGDMQSI AKKHRRVPYVLAMALPAERANELHSARRRR DLDTDYCFGPGTDEKNCCVRPLYIDFRKDLQWKWIHEPKGYMA NFCMGPYPYIWSADTQYTKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQTL DPLPIYYVGRNVRVEQLSNMVRACKCS |
| 213 | ニワトリ-ヒト LAP- TGFβ1 キメラ chB1_ex1.2 | LSTSQRDLLEAAKKRIEAVRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTQELLKQRARLRPPDPGPDEYWAKELRRIPME TTWDGPMHWPQSHSIFVFNVSRAEVGGRRALLHRAELRML LRQKAAADSAGTEQRLELYQGYGNASWRYLHGRSVRATADDEW LSFDVTDVHQWLSGSELLGVFKLSVHCPCEMGPGRHADEMRSI IEGFEQQRGDMQSI AKKHRRVPYVLAMALPAERANELHSARRR RDLDTDYCFGPGTDEKNCCVRPLYIDFRKDLQWKWIHEPKGYM ANFCMGPYPYIWSADTQYTKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQTL DPLPIYYVGRNVRVEQLSNMVRACKCS |
| 214 | リンカー | PVGVV |
| 215 | LAP-TGFβ1 エピトープ | VLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLISRA E |
| 216 | 28G11_L0 VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQKPGKV PKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATY YCQQGDTLPWTFGQGTKEIK |
| 217 | 28G11_L0 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQKPGKV PKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATY YCQQGDTLPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST YSLSSITLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 218 | 20E6_H0.2a VH | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDPQSGGIKYAQKFQGRATLTVDTSSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLTVTVSS |
| 219 | 20E6_H0.2a_IgG1 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDPQSGGIKYAQKFQGRATLTVDTSSTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT EVTQVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 220 | 20E6_H0.2a_IgG4mut | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWMGRIDPQSGGIKYAQKFQGRATLTVDTSSTAYMELSRL |

10

20

30

40

【 0 6 4 7 】

| | | | |
|-----|--------------------|--|----|
| | | RSDDTAVYYCARWDYGGYFDVWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKLSLSLGLK | |
| 221 | 7H4_HC (hyb) | DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPG NKLEWMGYISYDGTNNYNPSLKNRISITRDTSKHQFFLKLNSV TTEDTATYYCARSFYNNYDFWVGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPL APGCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEVTVTWNSSGSLSSVHTFP ALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTVDDKLL EPSGPISTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFI FPPNIKDVL MISLTPKVTQVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHRE DYNSTIRVVSTLPIQHODWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTIS KIKGLVRAPQVYIILPPAEQLSRKDVSLTCLVGFNPGDISVE WTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKWEKTDSE SCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK | 10 |
| 222 | 7H4_LC (hyb) | DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKASQDIDKYIAWYQHKPGKG PRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSRDYSFNISNLEPEDIATY YCLQYDNLRTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGA SVVCFLNIFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQSKDSTY SMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC | 20 |
| 223 | 7H4_VH | DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPG NKLEWMGYISYDGTNNYNPSLKNRISITRDTSKHQFFLKLNSV TTEDTATYYCARSFYNNYDFWVGQGTTLTVSS | |
| 224 | 7H4_VL | DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKASQDIDKYIAWYQHKPGKG PRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSRDYSFNISNLEPEDIATY YCLQYDNLRTFGGGTKLEIK | |
| 225 | 7H4_HCDR1 | GYSITSGYYWN | |
| 226 | 7H4_HCDR2 | YISYDGTNNYNPSLKN | |
| 227 | 7H4_HCDR3 | SFYNNYDFD | |
| 228 | 7H4_LCDR1 | KASQDIDKYIA | |
| 229 | 7H4_LCDR2 | YTSTLQP | |
| 230 | 7H4_LCDR3 | LQYDNLRT | 30 |
| 231 | 7H4_HCDR2 (D55G) | YISYGGTNNYNPSLKN | |
| 232 | 7H4_HCDR2 (D55A) | YISYAGTNNYNPSLKN | |
| 233 | 7H4_HCDR2 (D55E) | YISYEGTNNYNPSLKN | |
| 234 | 7H4_VHmut#1 (D55G) | DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPG NKLEWMGYISYGGTNNYNPSLKNRISITRDTSKHQFFLKLNSV TTEDTATYYCARSFYNNYDFWVGQGTTLTVSS | |
| 235 | 7H4_VHmut#2 (D55A) | DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPG NKLEWMGYISYAGTNNYNPSLKNRISITRDTSKHQFFLKLNSV TTEDTATYYCARSFYNNYDFWVGQGTTLTVSS | |
| 236 | 7H4_VHmut#3 (D55E) | DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPG NKLEWMGYISYEGTNNYNPSLKNRISITRDTSKHQFFLKLNSV TTEDTATYYCARSFYNNYDFWVGQGTTLTVSS | 40 |

【 0 6 4 8 】

| | | |
|-----|--------------------|--|
| 237 | 7H4_HCmut#1 (D55G) | <p>DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPG NKLEWMGYISYGGTNNYNPSLKNRISITRDTSKHQFFLKLNSV TTEDTATYYCARSFYNNYDFWQGGTTLTVSSAKTTPPSVYPL APGCGD TTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVHTFP ALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDKKL EPSGPISTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFIFFPNIKDVL MISLTPKVT CVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHRE DYNSTIRVSTLPIQHODWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTIS KIKGLVRAPQVYI LPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVE WTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKWEKTDSE SCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK</p> |
| 238 | 7H4_HCmut#2 (D55A) | <p>DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPG NKLEWMGYISYAGTNNYNPSLKNRISITRDTSKHQFFLKLNSV TTEDTATYYCARSFYNNYDFWQGGTTLTVSSAKTTPPSVYPL APGCGD TTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVHTFP ALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDKKL EPSGPISTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFIFFPNIKDVL MISLTPKVT CVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHRE DYNSTIRVSTLPIQHODWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTIS KIKGLVRAPQVYI LPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVE WTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKWEKTDSE SCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK</p> |
| 239 | 7H4_HCmut#3 (D55E) | <p>DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPG NKLEWMGYISYEGTNNYNPSLKNRISITRDTSKHQFFLKLNSV TTEDTATYYCARSFYNNYDFWQGGTTLTVSSAKTTPPSVYPL APGCGD TTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVHTFP ALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDKKL EPSGPISTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFIFFPNIKDVL MISLTPKVT CVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHRE DYNSTIRVSTLPIQHODWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTIS KIKGLVRAPQVYI LPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVE WTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKWEKTDSE SCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK</p> |
| 240 | ペンブロリズマブ重鎖 | <p>QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQ GLEWMGGINPSNGGTNFKNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSL QFDDTAVYYCARDYRFDMGFYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKARKGQPR EPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKLSLSLGK</p> |
| 241 | ペンブロリズマブ軽鎖 | <p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQK PGQAPRLLIYLA SYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPED FAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFFPSDEQL KSGTASVVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC</p> |

10

20

30

40

【 0 6 4 9 】

50

| | | | |
|-----|--|---|----|
| 242 | 20E6 VHCDR3 コンセンサス | WX ₁ YGGYFX ₂ X ₃ (X ₁ -X ₃ は、任意のアミノ酸であることができる) | |
| 243 | 20E6 VLCDR3 コンセンサス | QQGDX ₁ LPWT (X ₁ は、任意のアミノ酸であることができる) | |
| 244 | ヒト_IgG1_ P01857_L234A_L235A | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEaaGGPSVFLFPPK PKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK | 10 |
| 245 | ヒト_IgG1_ P01857_L234A_L235A_ D265S | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEaaGGPSVFLFPPK PKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK | |
| 246 | ニボルマブ重鎖 | QVQLVESGGGVVQPGRSRLRDLCKASGITFSNSGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWYDGSKRYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSL RAEDTAVYYCATNDDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVFPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSLGK | 20 |
| 247 | ニボルマブ軽鎖 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY YCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | |
| 248 | 22F9_N54Q_D102A 重鎖 | QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWKQRPGQ GLEWIGMIHPQSGSTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSL TSEDSAVYYCAYDYAGFFDVWGTGTTVTVSSAKTTAPSVMYPL APVCGD'TGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFP AVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSI TCNVAHPASSTKVDKKI EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSL IVTCVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTL RVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDEMPEDIYVEWTNNGK TELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVH EGLHNHHTTKSFSRTPGK | 30 |
| 249 | 22F9_N54Q_D102A 軽鎖 | DIVLTQSPASLDVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQK SGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTHFTLNHPVEEED | 40 |

【 0 6 5 0 】

| | | |
|-----|-----------------------|---|
| | | AATYYCQHSRELPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRENEC |
| 250 | Region 1 of LAP-TGFβ1 | RKRIEAIRGQIL |
| 251 | Region 2 of LAP-TGFβ1 | LASPPSQGEV |
| 252 | Region 3 of LAP-TGFβ1 | GWKWIHEPK |
| 253 | Region 4 of LAP-TGFβ1 | YVGRKPK |
| 254 | 2F8 結合領域 | VDINGFTTGRRGDLATIHGMM |
| 255 | 7H4_HCmut #3 (D55G) | DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWMGYISYGGTNNYNP SLKNRISITRDTSKHQFFLKLNSVTTEDTATYYCARSFYNNYDFFWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGCGD TTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDKKEPSPGPISTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFI FPPNIKDVLMISLTPKVT CVVDVSEDDPDVQISWVFN NVEVHTAQTQTHRE DYNSTIRV VSTLPIQHQD WMSGKEFKCKV NNKDLPSPIERTIS KIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSR KDVSLTCLVVG FNP GDISVE WTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIY SKLNMKTSKWEK TDSFSCNVRHEGLKNYYL KKTI SRSPGK |
| 256 | カップ軽鎖定常ドメイン | VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |

10

20

【 0 6 5 1 】

この表及び前の表において、別途示されていない限り、下線が引かれている下線は、結合タンパク質（例えば、抗体又はその抗原結合フラグメント）中のCDRを示すと理解される。CDRは、本明細書中に記載されている方法及びシステム（例えば、Chothia、Rabat、及び、IMGT）のいずれかによって定義及び識別され得ることに留意されたい。

【 0 6 5 2 】

等価物：

当業者は、本明細書中に開示されている特定の実施形態の多くの同等物を、認識することができるか、又は、日常的な実験のみを使用して確認することができる。そのような等価物は、以下の特許請求の範囲に含まれることが意図されている。

【 図面 】

【 図 1 A 】

【 図 1 B 】

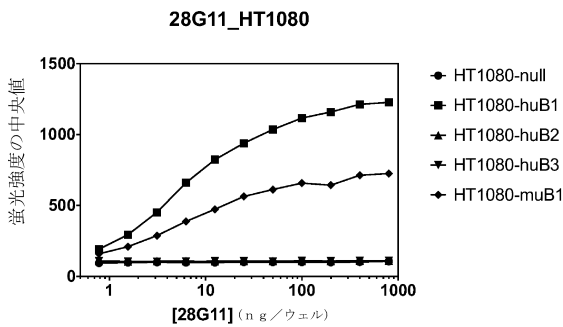


FIG. 1A

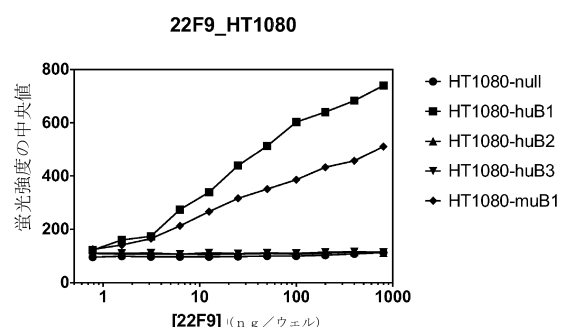
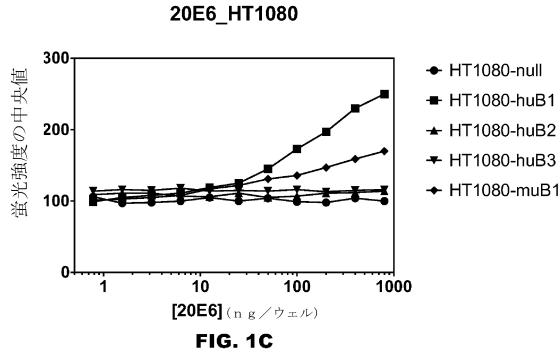


FIG. 1B

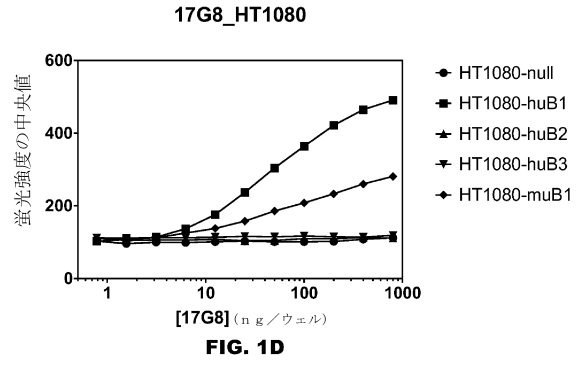
40

50

【 図 1 C 】

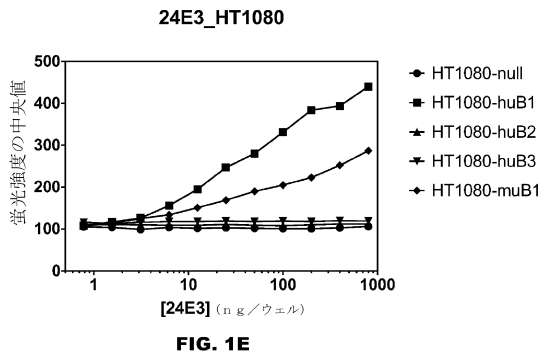


【 図 1 D 】

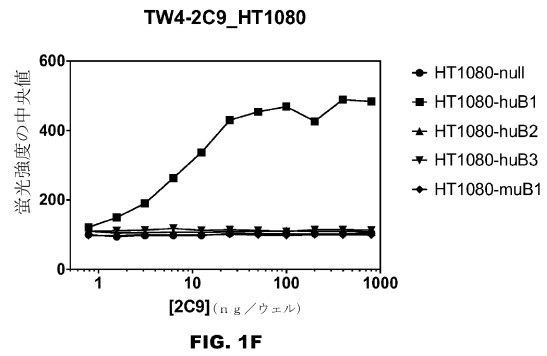


10

【 図 1 E 】

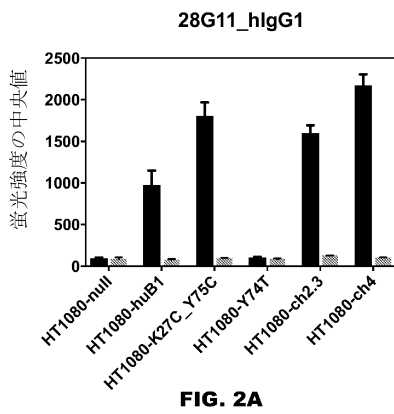


【 図 1 F 】

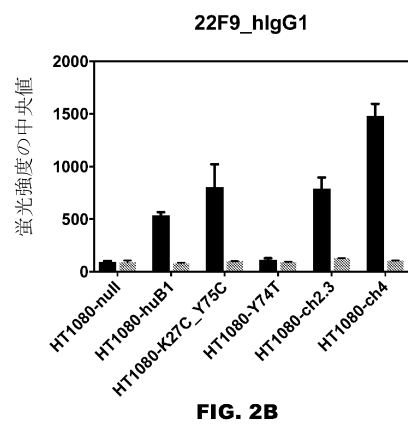


20

【 図 2 A 】



【 図 2 B 】

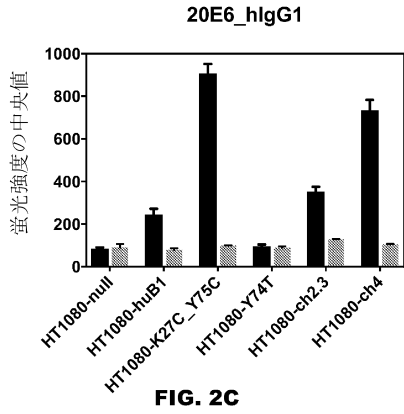


30

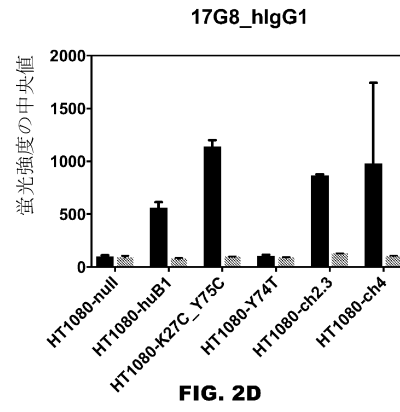
40

50

【 図 2 C 】

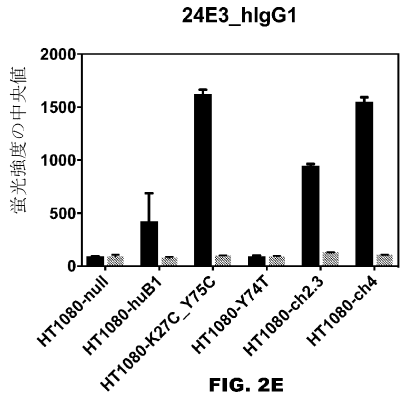


【 図 2 D 】

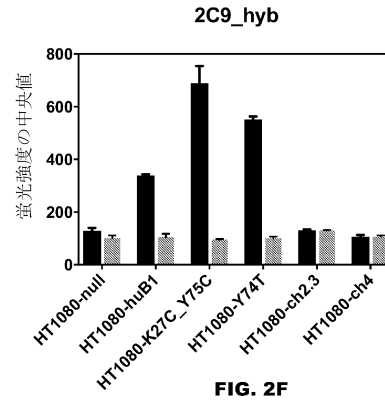


10

【 図 2 E 】



【 図 2 F 】



20

30

40

50

【 図 3 A 】

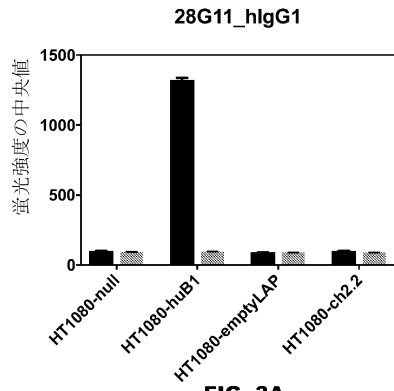


FIG. 3A

【 図 3 B 】

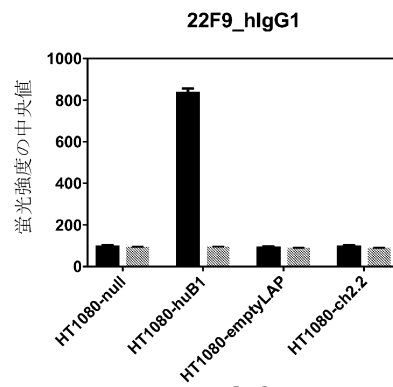


FIG. 3B

10

【 図 3 C 】

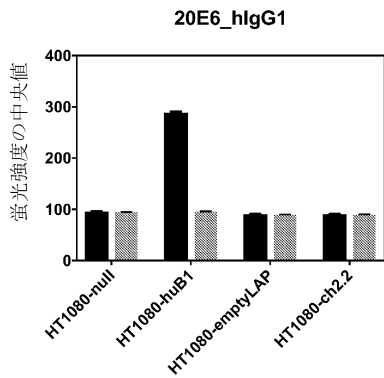


FIG. 3C

【 図 3 D 】

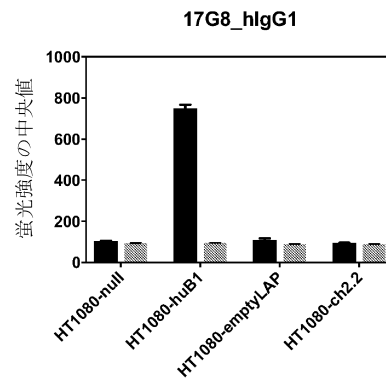


FIG. 3D

20

30

40

50

【 図 3 E 】

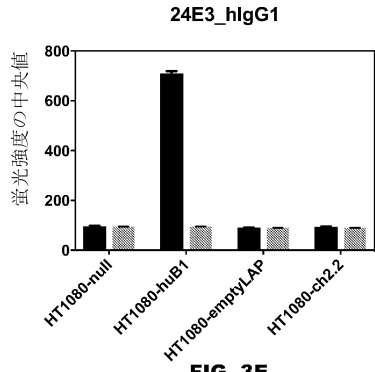


FIG. 3E

【 図 3 F 】

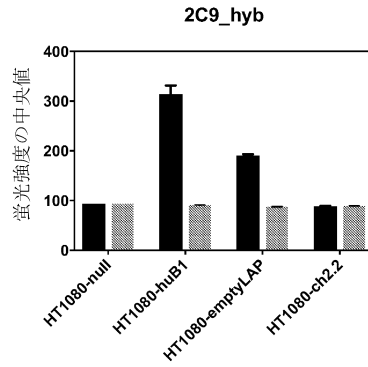


FIG. 3F

10

【 図 4 】

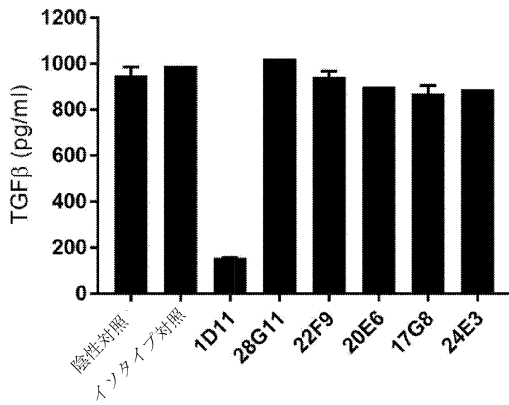
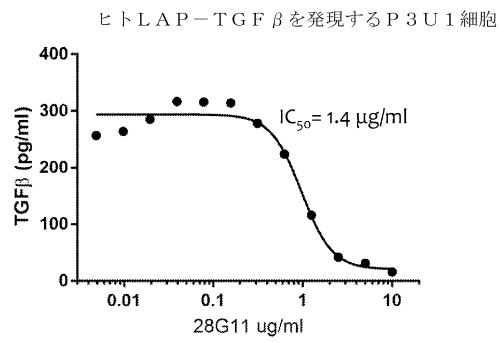


FIG. 4

【 図 5 A 】



20

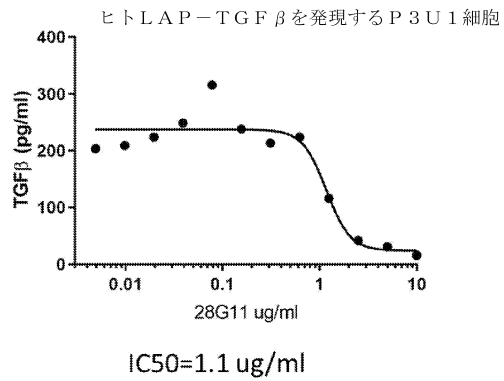


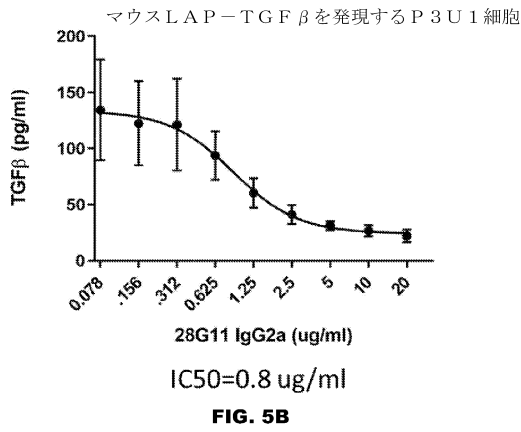
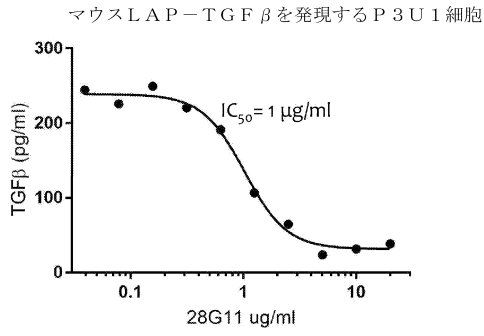
FIG. 5A

30

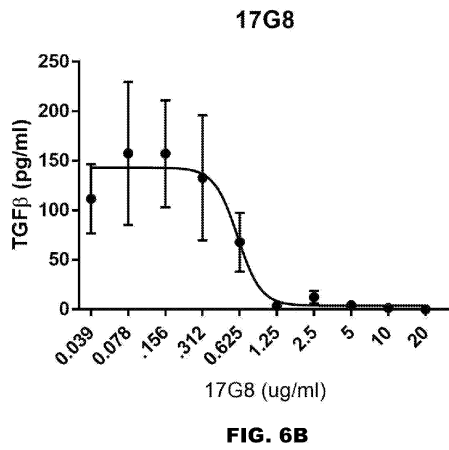
40

50

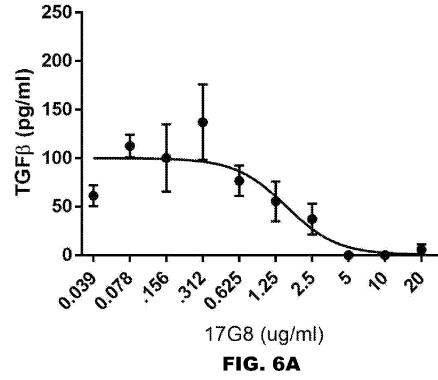
【 図 5 B 】



【 図 6 B 】



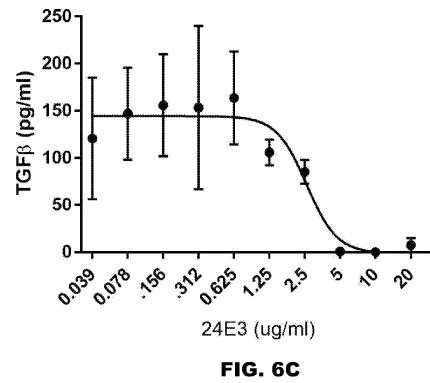
【 図 6 A 】



10

20

【 図 6 C 】

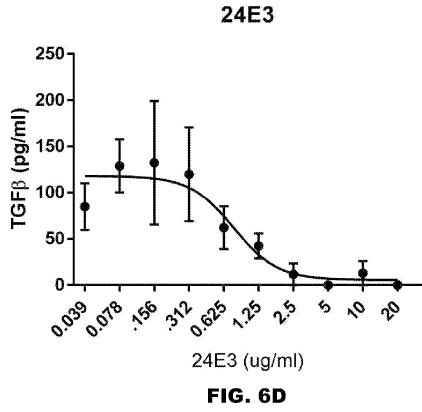


30

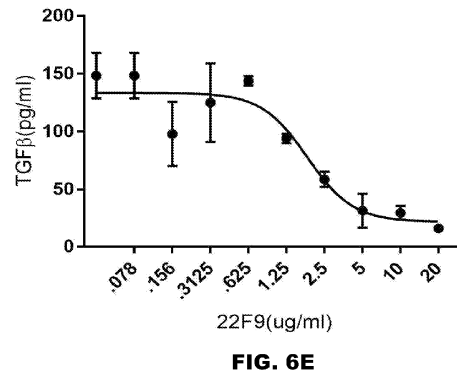
40

50

【 図 6 D 】

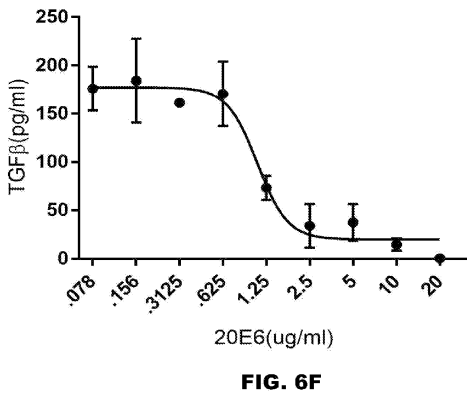


【 図 6 E 】

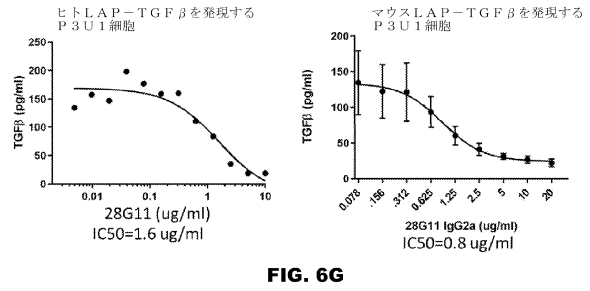


10

【 図 6 F 】

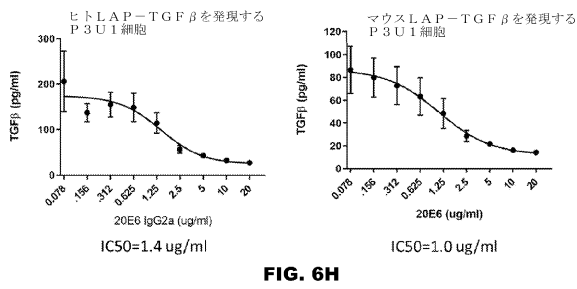


【 図 6 G 】

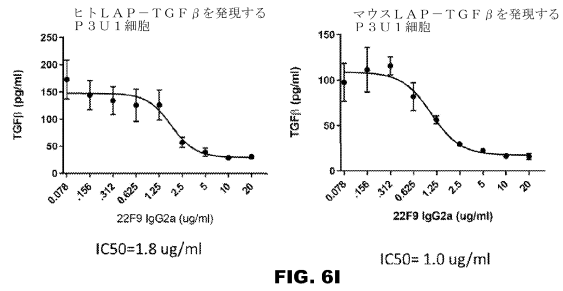


20

【 図 6 H 】



【 図 6 I 】



30

40

50

【 図 6 J 】

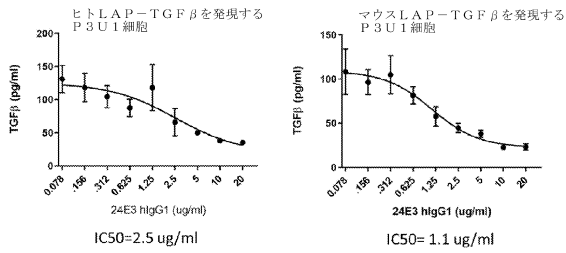


FIG. 6J

【 図 6 K 】

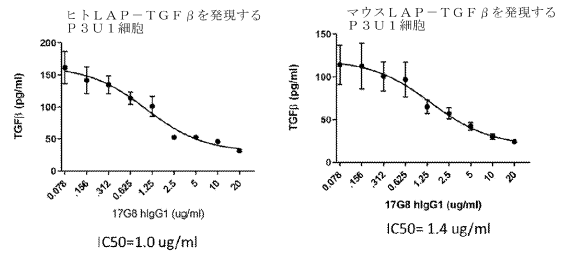


FIG. 6K

10

【 図 6 L 】

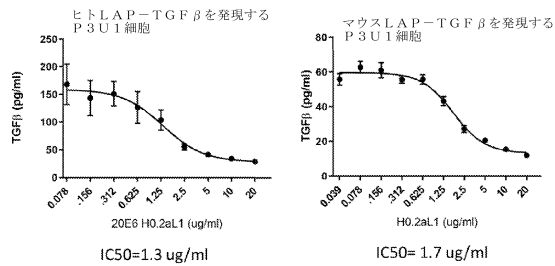


FIG. 6L

【 図 7 】

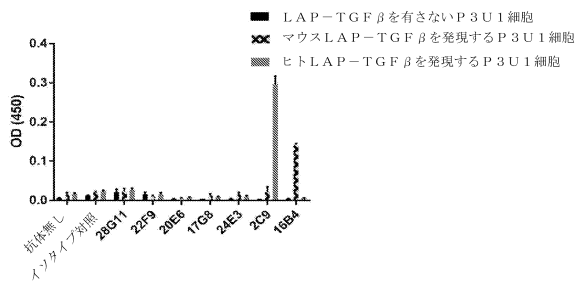


FIG. 7

20

【 図 8 】

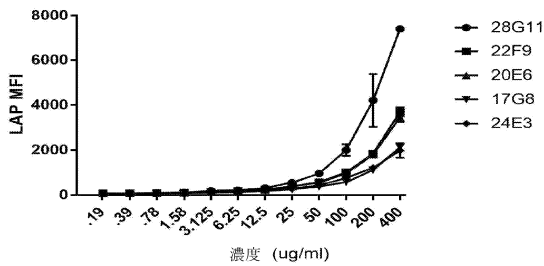


FIG. 8

【 図 9 A 】

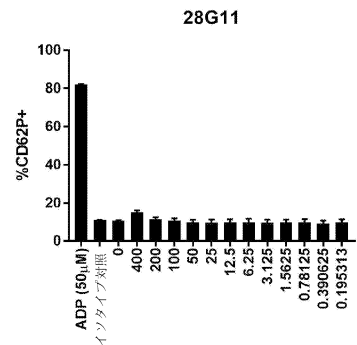


FIG. 9A

30

40

50

【 図 9 B 】

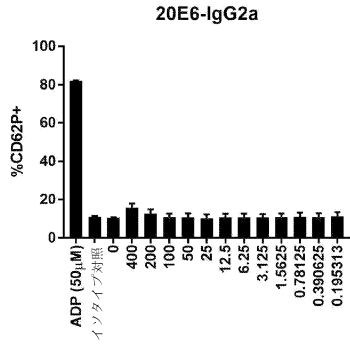


FIG. 9B

【 図 9 C 】

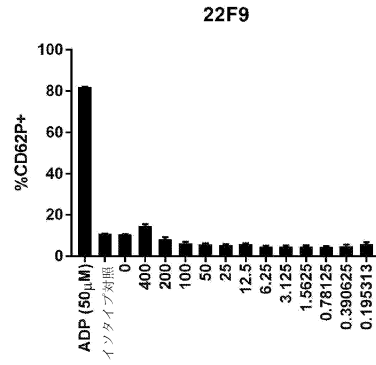


FIG. 9C

10

【 図 9 D 】

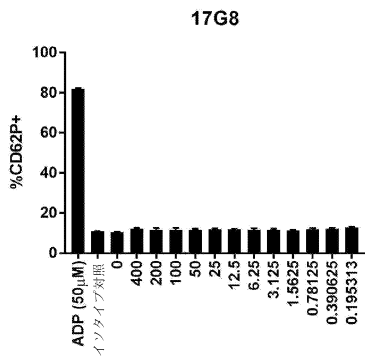


FIG. 9D

【 図 9 E 】

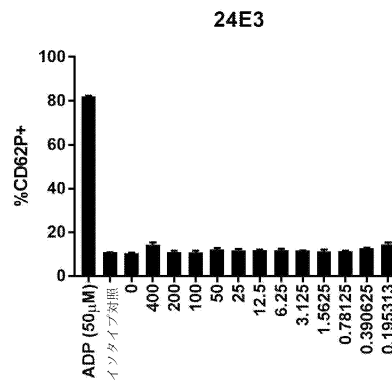


FIG. 9E

20

【 図 10 A 】

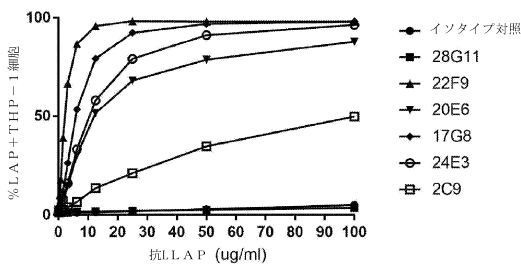


FIG. 10A

【 図 10 B 】

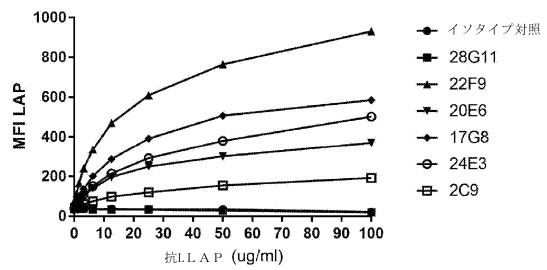


FIG. 10B

30

40

50

【 図 1 0 C 】

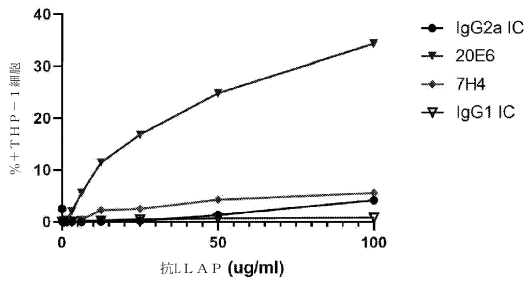


FIG. 10C

【 図 1 0 D 】

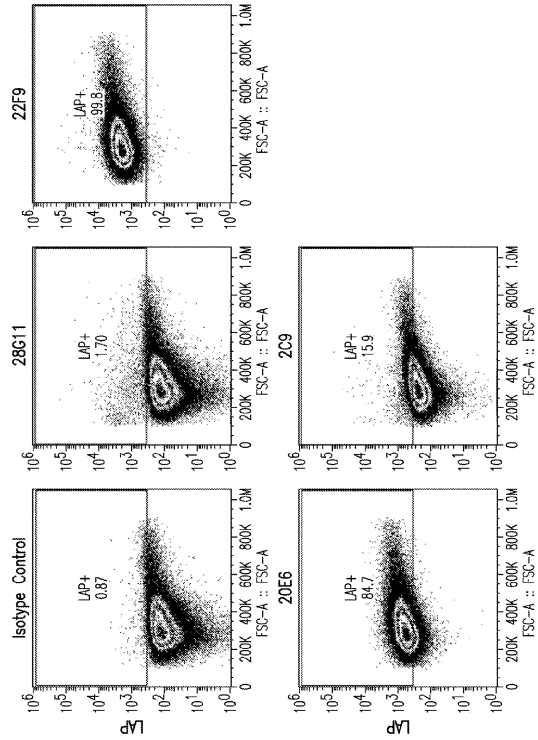


FIG.10D

10

20

【 図 1 0 E 】

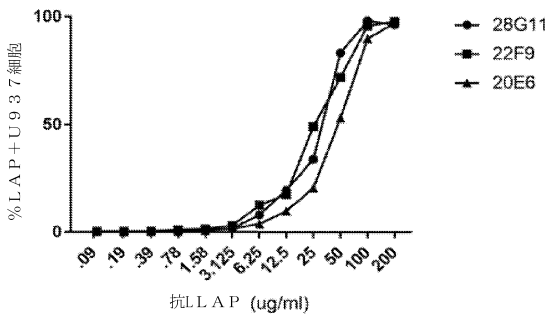


FIG. 10E

【 図 1 0 F 】

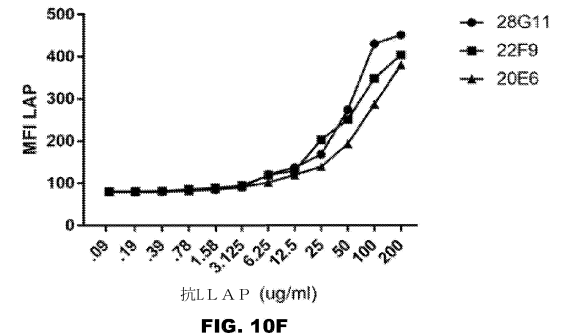


FIG. 10F

30

40

50

【 図 1 0 G 】

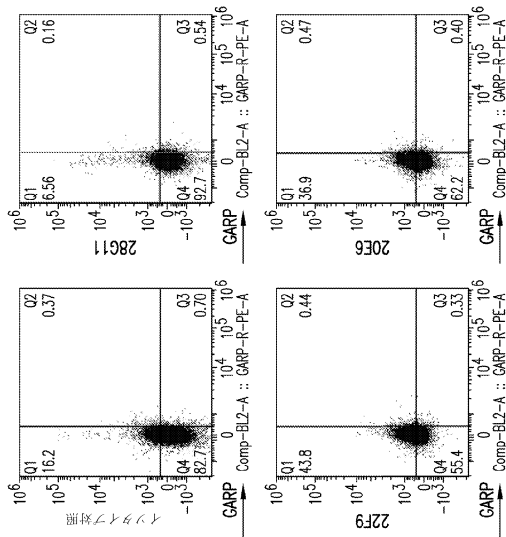


FIG. 10G

【 図 1 1 】

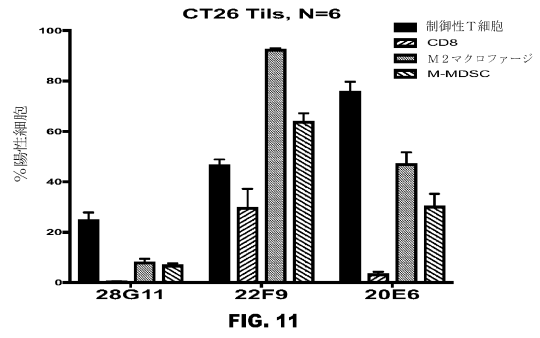


FIG. 11

10

20

【 図 1 2 】

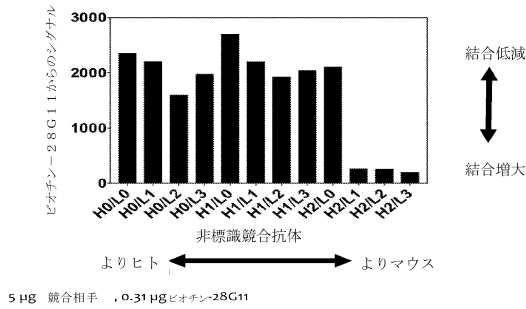


FIG. 12

【 図 1 3 】

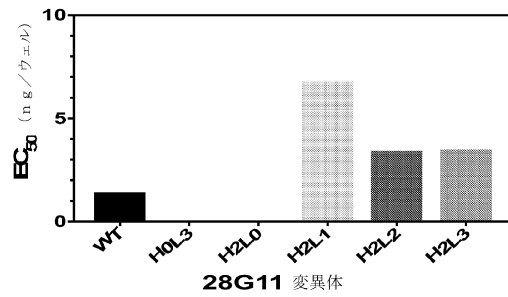


FIG. 13

30

40

50

【 図 1 4 A 】

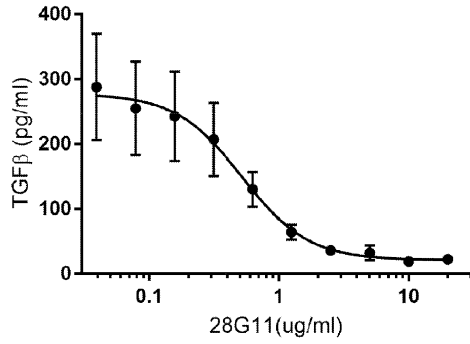


FIG. 14A

【 図 1 4 B 】

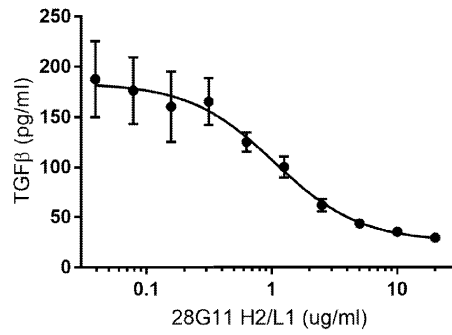


FIG. 14B

10

【 図 1 4 C 】

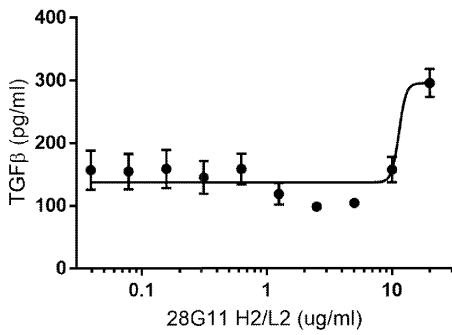


FIG. 14C

【 図 1 4 D 】

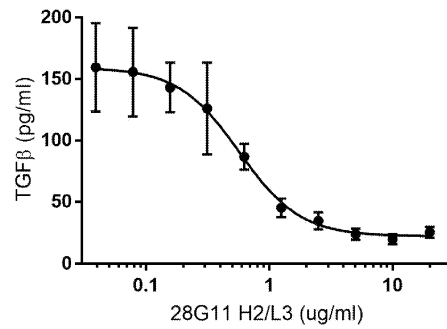


FIG. 14D

20

【 図 1 5 A 】

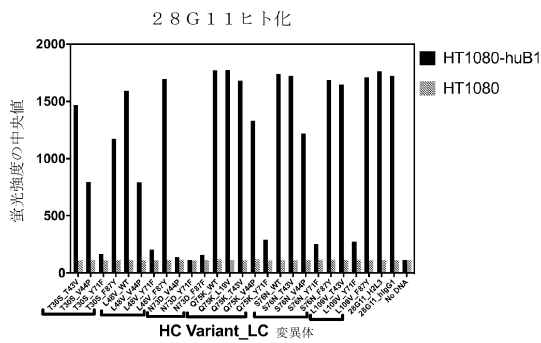


FIG. 15A

【 図 1 5 B 】

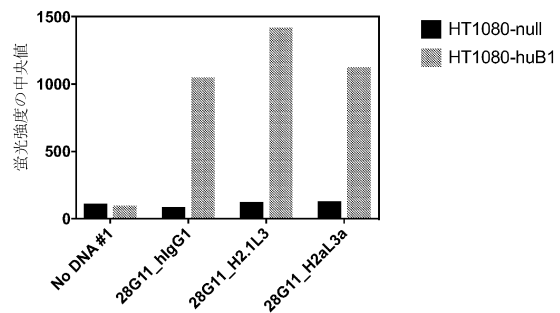


FIG. 15B

30

40

50

【 図 1 6 】

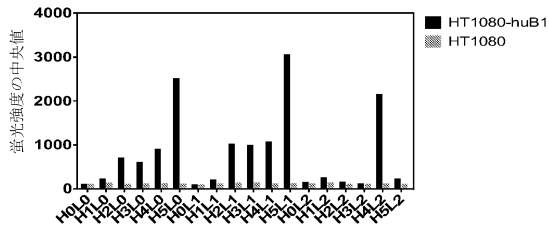


FIG. 16

【 図 1 7 A 】

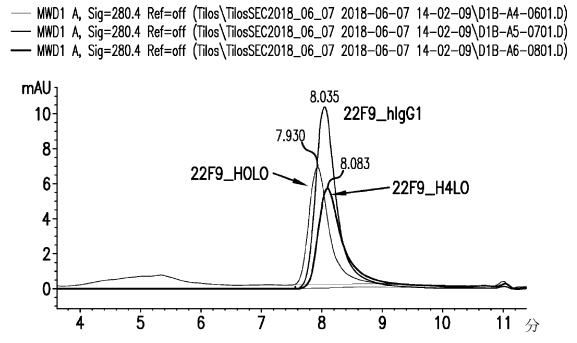


FIG.17A

10

【 図 1 7 B 】

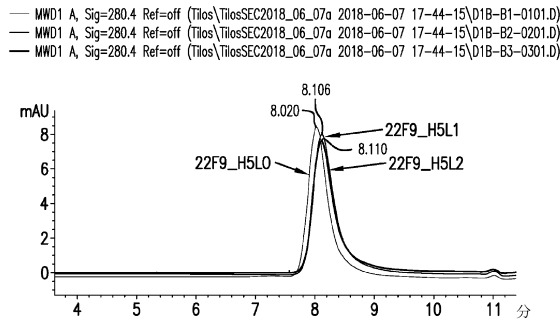


FIG.17B

【 図 1 8 A 】

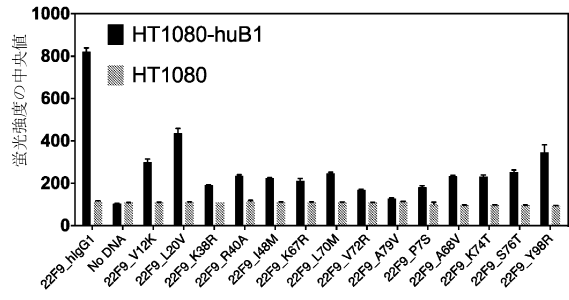


FIG. 18A

20

【 図 1 8 B 】

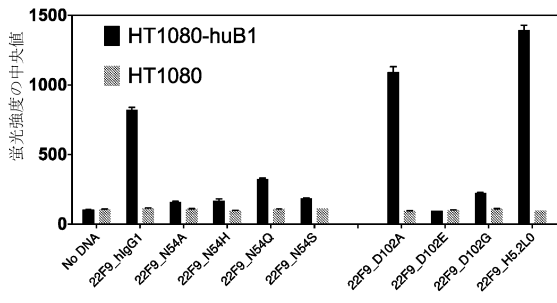


FIG. 18B

【 図 1 8 C 】

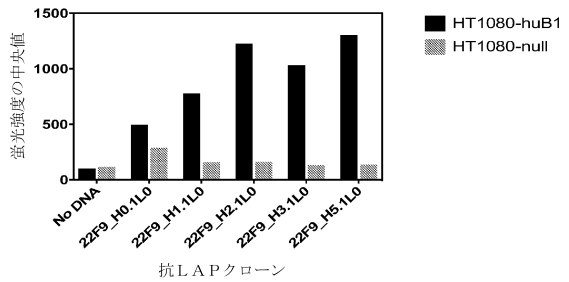


FIG. 18C

30

40

50

【 図 19 A 】

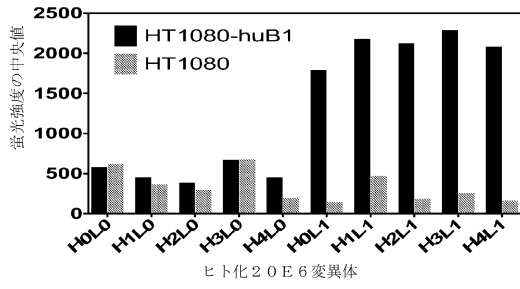


FIG. 19A

【 図 19 B 】

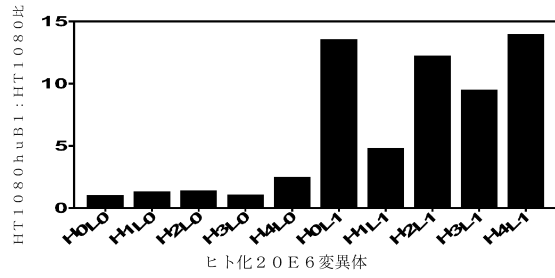


FIG. 19B

10

【 図 20 A 】

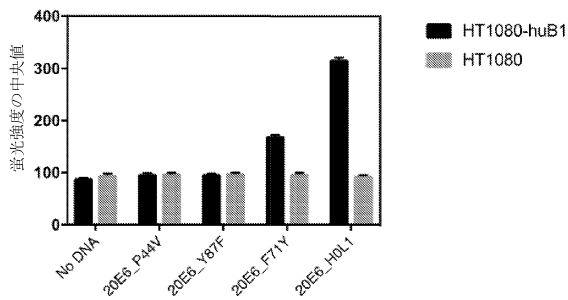


FIG. 20A

【 図 20 B 】

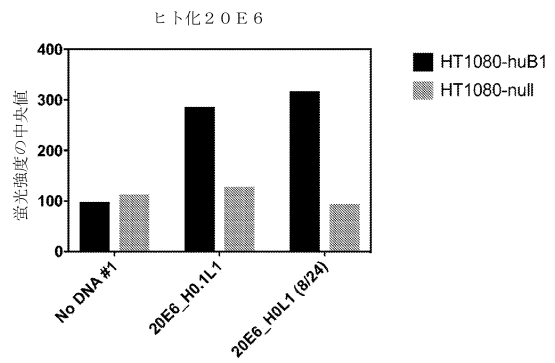


FIG. 20B

20

【 図 21 A 】

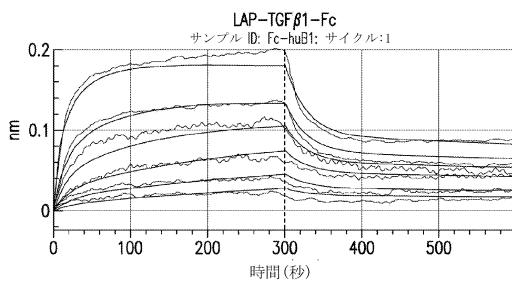


FIG. 21A

【 図 21 B 】

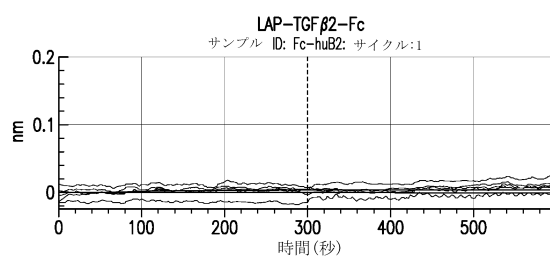


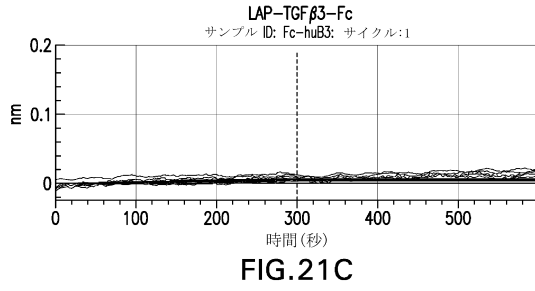
FIG. 21B

30

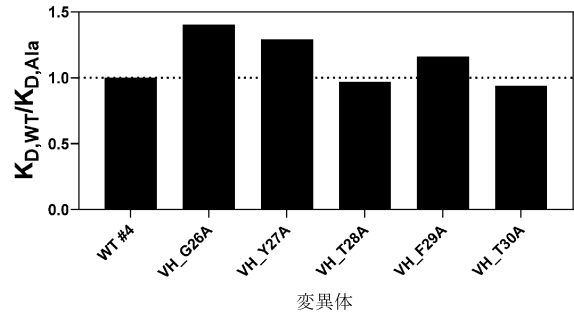
40

50

【 図 2 1 C 】

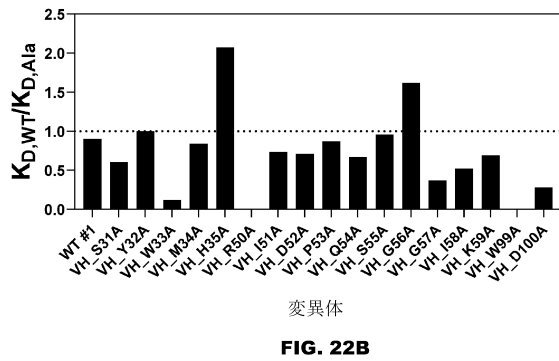


【 図 2 2 A 】

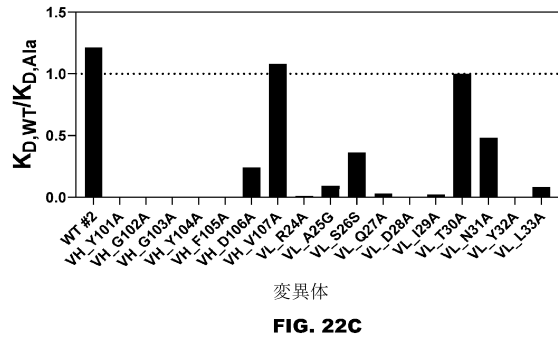


10

【 図 2 2 B 】

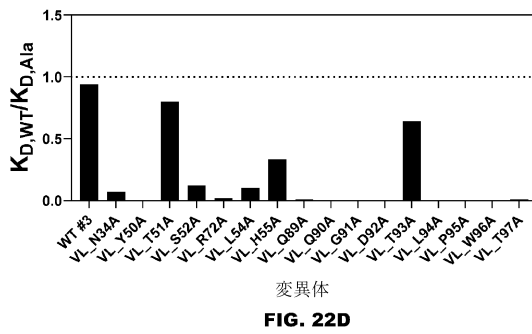


【 図 2 2 C 】

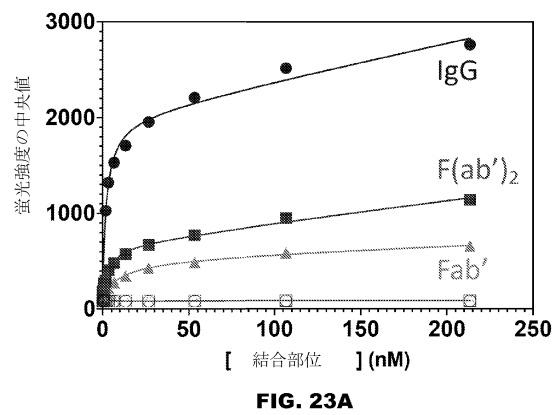


20

【 図 2 2 D 】



【 図 2 3 A 】



30

40

50

【 2 3 B 】

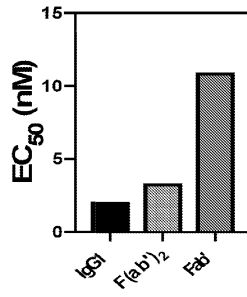


FIG. 23B

【 2 4 】

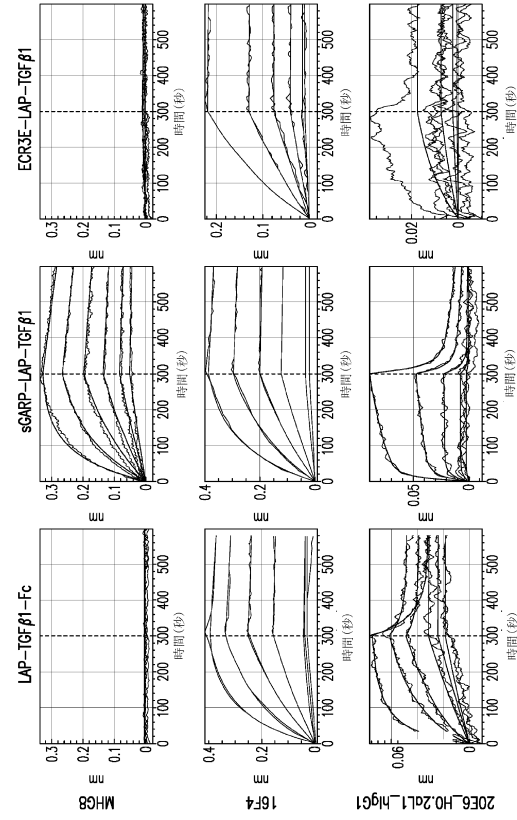


FIG. 24

10

20

【 2 5 】

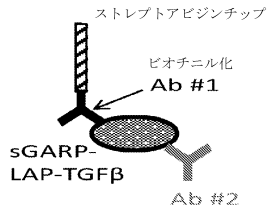


FIG. 25

【 2 6 A 】

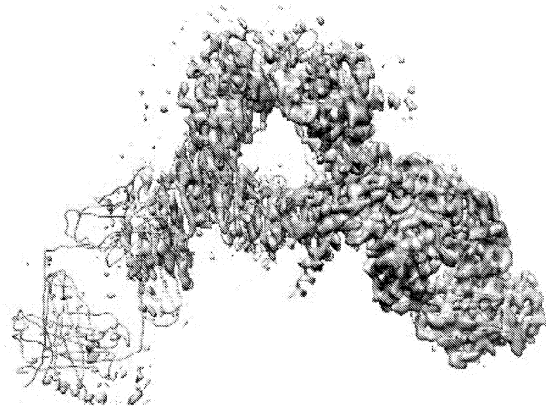


FIG. 26A

30

40

50

【 図 2 6 B 】

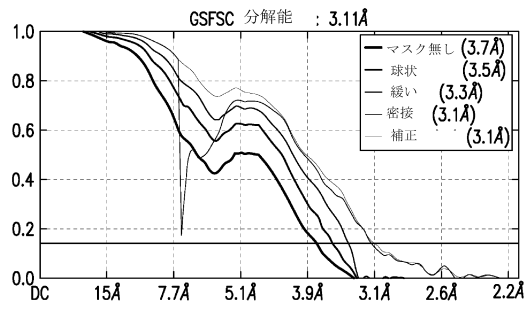


FIG.26B

【 図 2 6 C 】

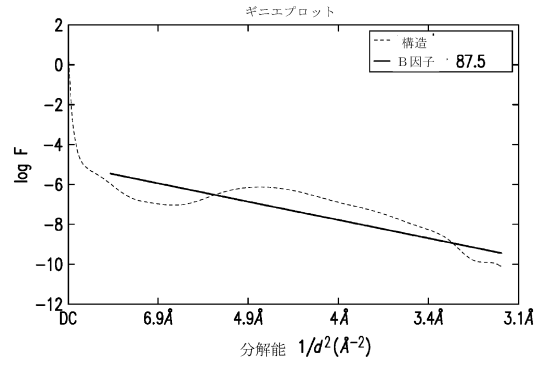


FIG.26C

10

【 図 2 7 A 】

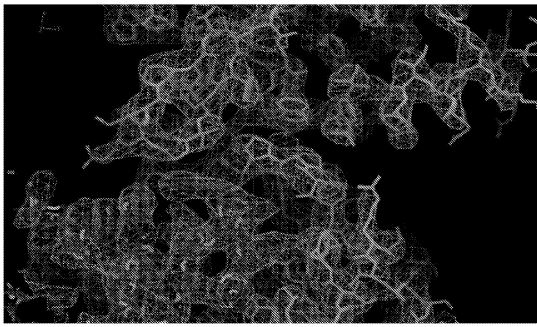


FIG. 27A

【 図 2 7 B 】

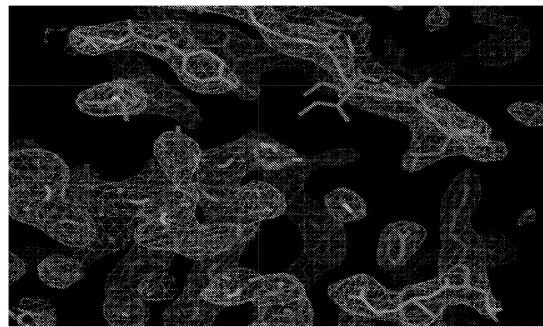


FIG. 27B

20

【 図 2 8 A 】

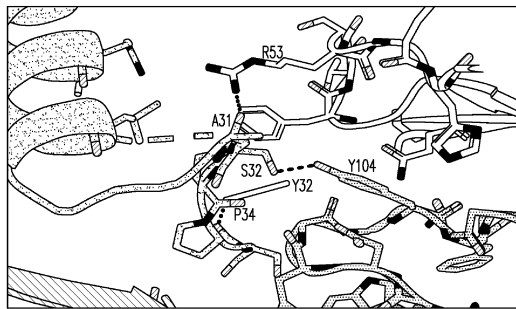


FIG.28A

【 図 2 8 B 】

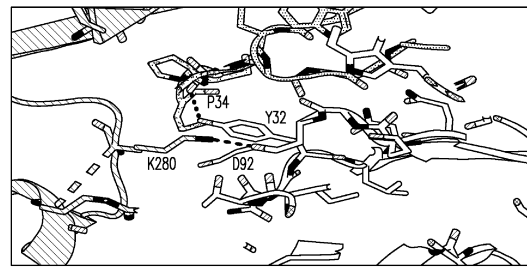


FIG.28B

30

40

50

【 28 C 】

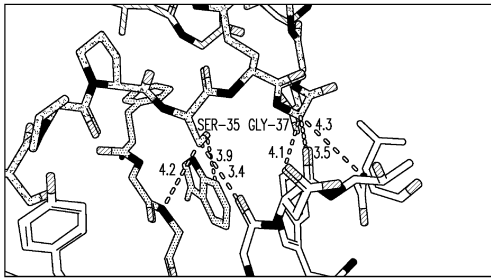


FIG.28C

【 28 D 】

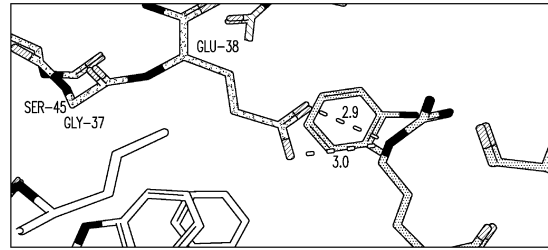


FIG.28D

10

【 29 A 】

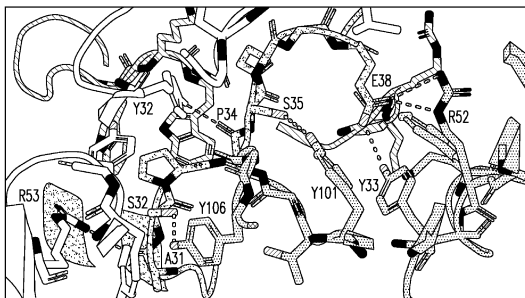


FIG.29A

【 29 B 】

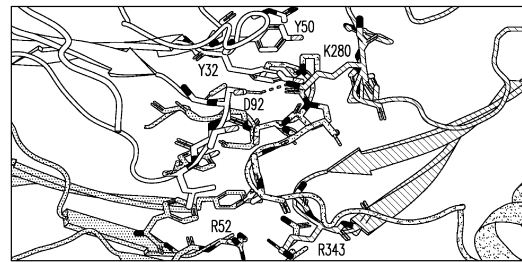


FIG.29B

20

【 29 C 】

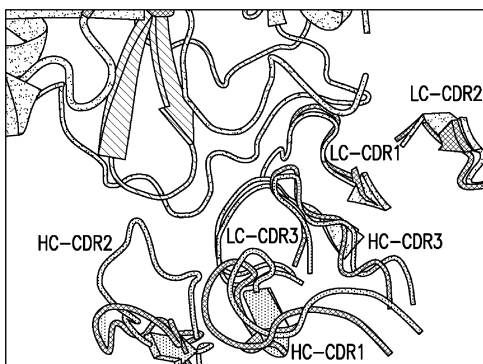


FIG.29C

【 29 D 】

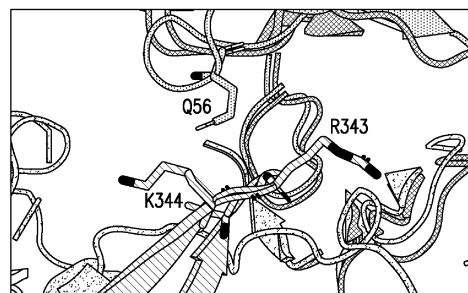


FIG.29D

30

40

50

【 29 E 】

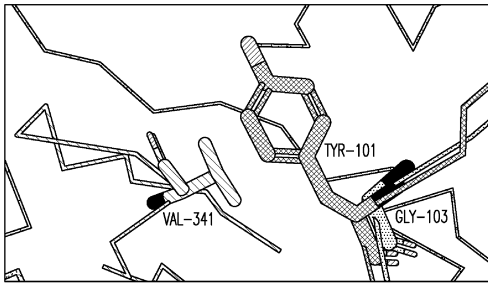


FIG.29E

【 30 A 】

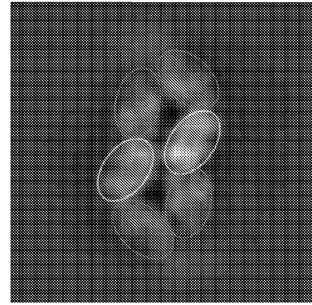


FIG. 30A

10

【 30 B 】

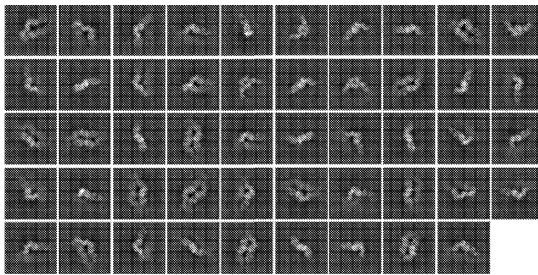


FIG. 30B

【 31 A 】

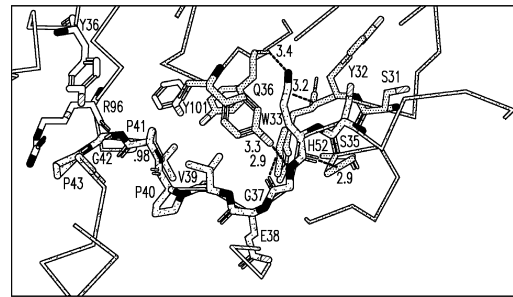


FIG.31A

20

【 31 B 】

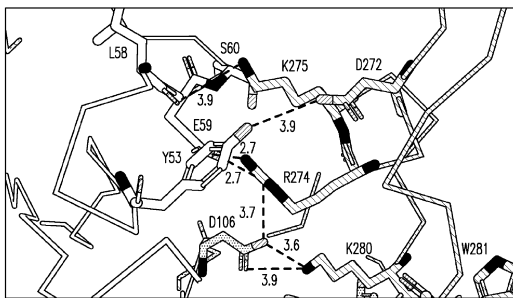


FIG.31B

【 31 C 】

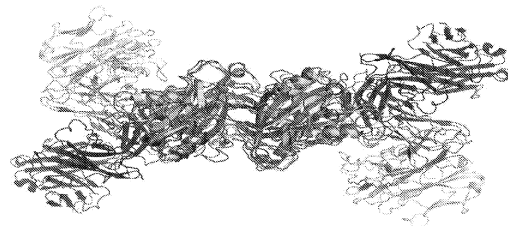


FIG.31C

30

40

50

【 図 3 1 D 】

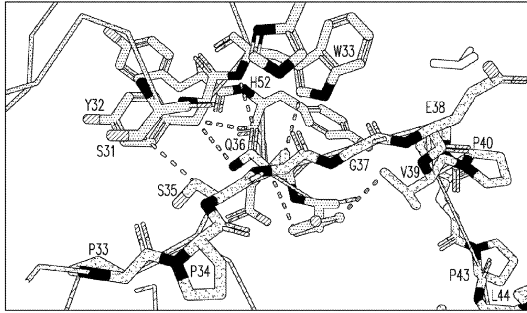


FIG.31D

【 図 3 1 E 】

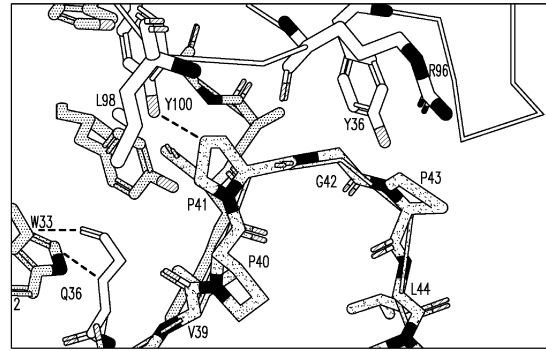


FIG.31E

10

【 図 3 2 】

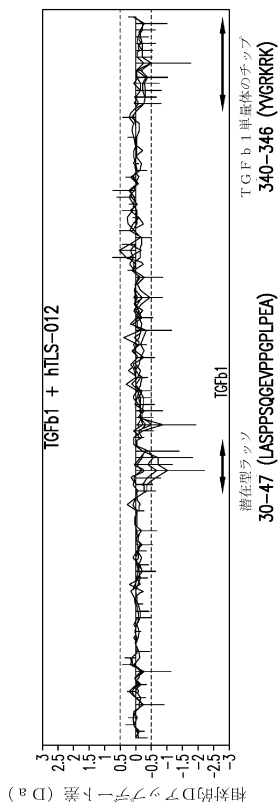


FIG.32

【 図 3 3 】

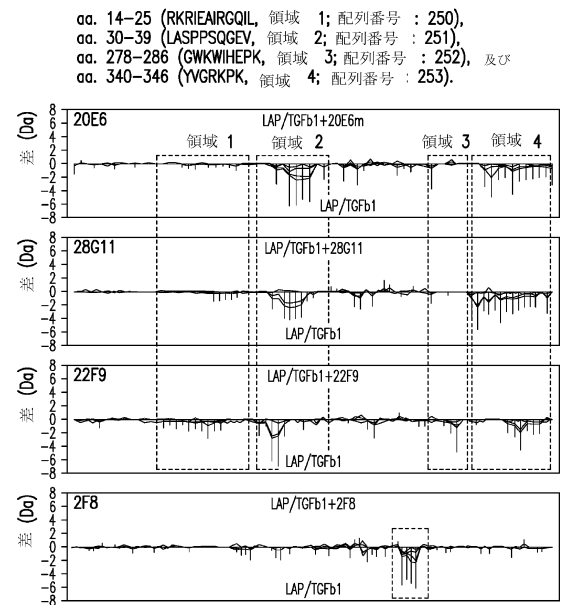


FIG.33

20

30

40

50

【 図 3 4 】

| | | | |
|-----|-----|---|-----|
| 1 | ヒト | LSTCKTIDMELVRRKRIEAIIRGQILSKLRLASPPSGEVRRPGLPEAVLALYNSTRDRVA | 60 |
| 1 | マウス | LSTCKTIDMELVRRKRIEAIIRGQILSKLRLASPPSGEVRRPGLPEAVLALYNSTRDRVA | 60 |
| 61 | ヒト | GESAPPEPEADYAKEVTRVLMWETHNEYOKFKKOSTHSIYMFNTSEIAREAVPEPL | 120 |
| 61 | マウス | GESAPPEPEADYAKEVTRVLMW+HN IYHK K #HSIYMFNTSHREAVPEPL L | 120 |
| 121 | ヒト | LSRAELRLRLKLVYQHEVELYQKYSNSMRYLSNRLIAPSDSEPMVSDFTGVVWRWLS | 180 |
| 121 | マウス | LSRAELRLRLK VEQHEVELYQKYSNSMRYL NRLI P+D+PEMVSFDTGVVWRW+L | 180 |
| 181 | ヒト | RGGEIEGFRLSAHCSQSDSRONTIQVDINAGFTTGRGDLATIHNRPFLLLMATPLERA | 240 |
| 181 | マウス | +G I+GFR SAHCSQSDSHN L V+IN G + RRGDL TIH MNRPFLLMATPLERA | 240 |
| 241 | ヒト | QHLQSSRRRRALDINTYCFSSSTEKNCVRRQLYIDFRKDLGKWKIHEPKGYNHFNCLGCPY | 300 |
| 240 | マウス | QHLSSRRRRALDINTYCFSSSTEKNCVRRQLYIDFRKDLGKWKIHEPKGYNHFNCLGCPY | 299 |
| 301 | ヒト | IWSLDTQYSKVALYNCHNPFASAPCCVQALEPLPTIYVYGRKPKYEQLSMIVRSCK | 360 |
| 300 | マウス | IWSLDTQYSKVALYNCHNPFASAPCCVQALEPLPTIYVYGRKPKYEQLSMIVRSCK | 359 |
| 361 | ヒト | CS 362 (配列番号: 257) | |
| 360 | マウス | CS 361 (配列番号: 7) | |

FIG. 34

【 図 3 5 A 】

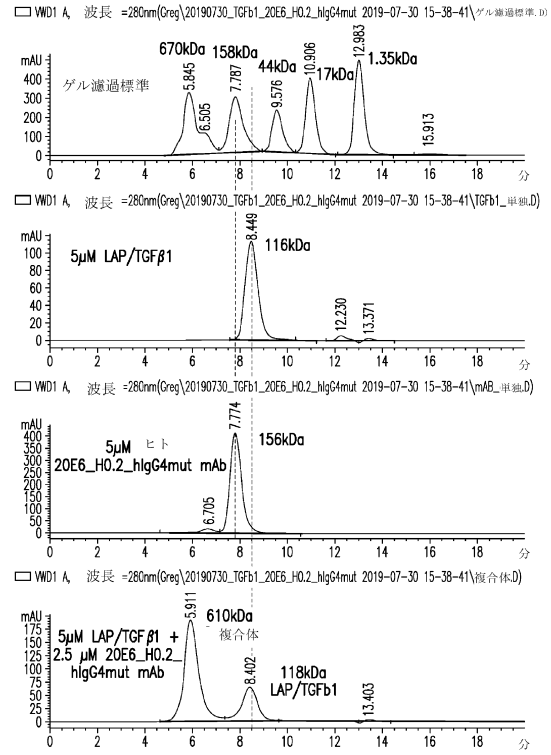


FIG. 35A

【 図 3 5 B 】

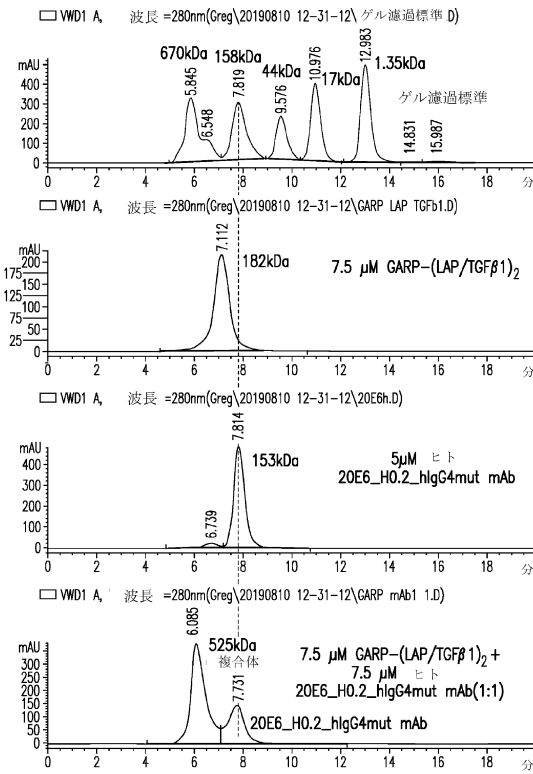


FIG. 35B

【 図 3 6 A 】

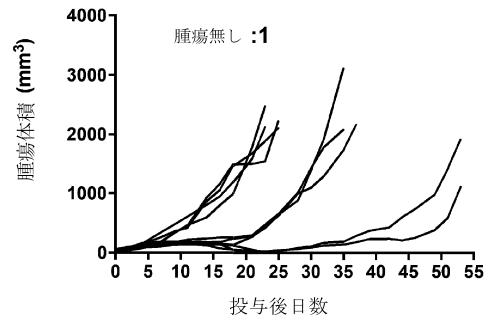


FIG. 36A

10

20

30

40

50

【 図 3 6 B 】

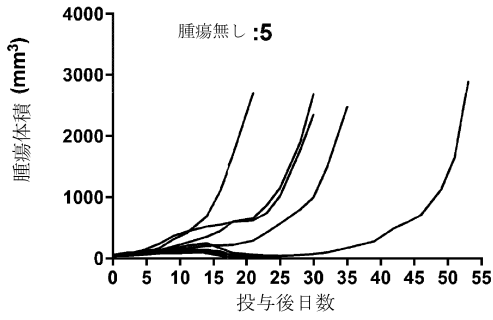
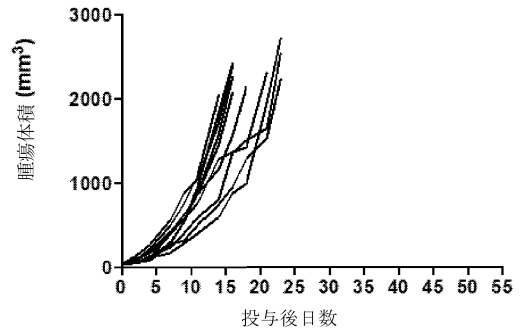


FIG. 36B

【 図 3 6 C 】

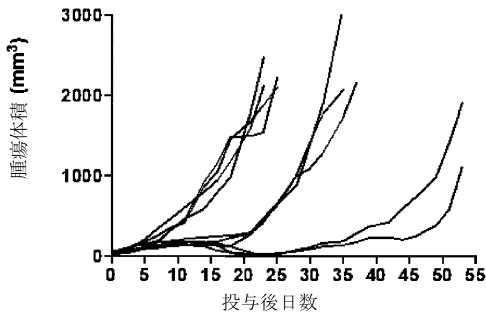


イソタイプ対照

FIG. 36C

10

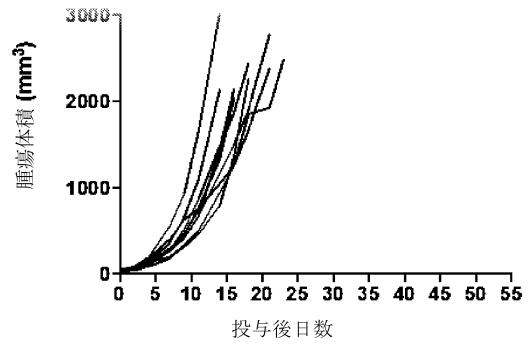
【 図 3 6 D 】



PD-1 単独

FIG. 36D

【 図 3 6 E 】



16B4 単独

FIG. 36E

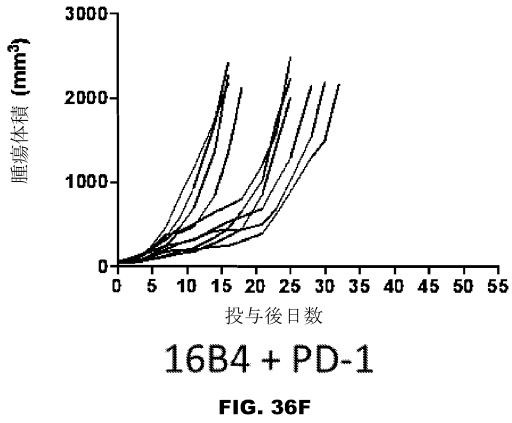
20

30

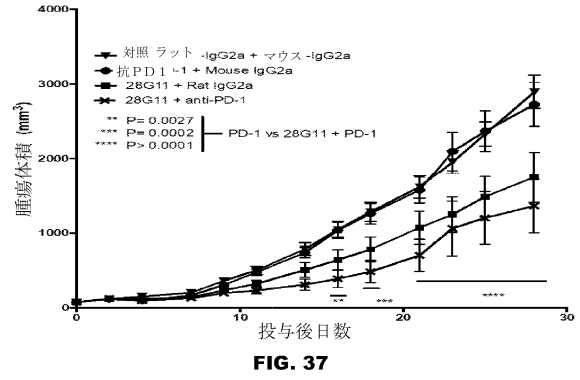
40

50

【 図 3 6 F 】

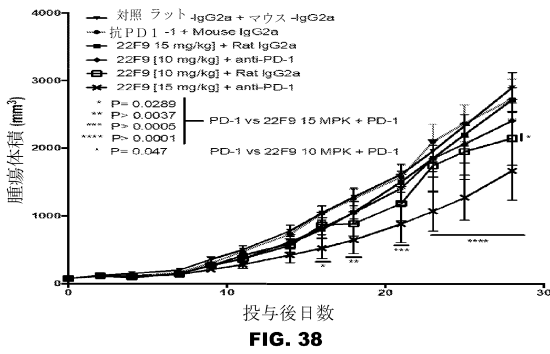


【 図 3 7 】

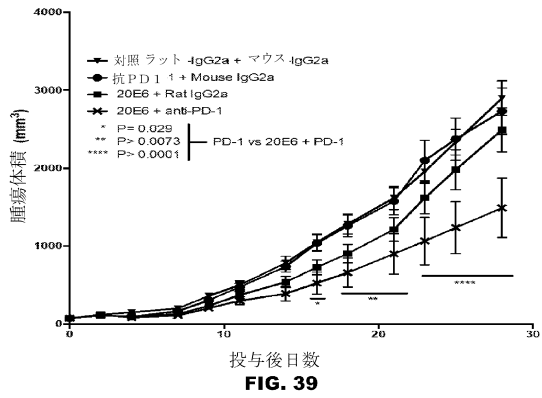


10

【 図 3 8 】

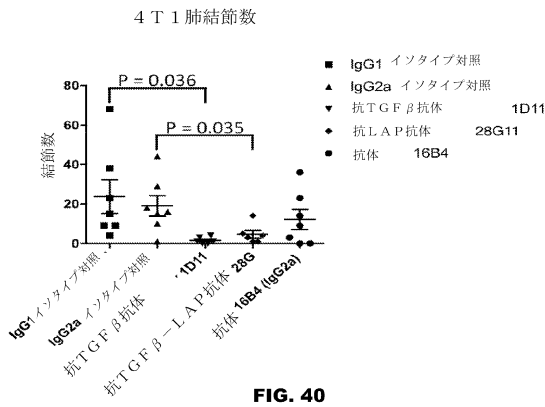


【 図 3 9 】

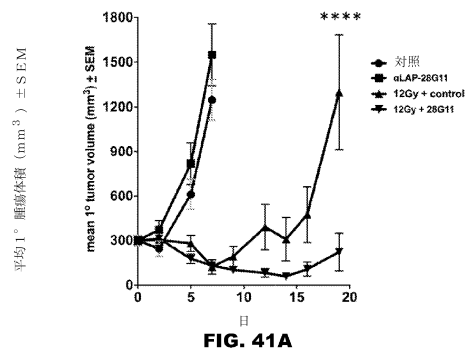


20

【 図 4 0 】



【 図 4 1 A 】



30

40

50

【 図 4 1 B 】

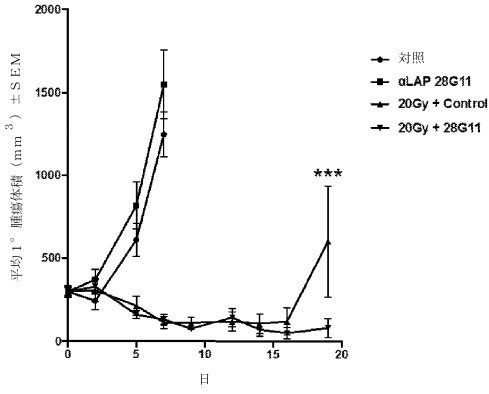


FIG. 41B

【 図 4 2 A 】

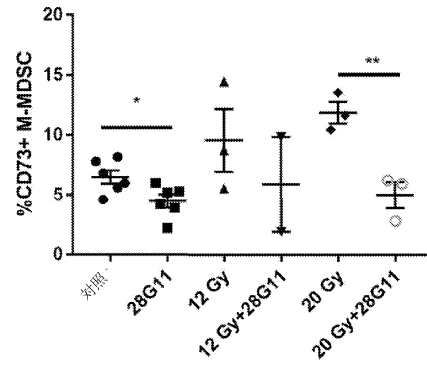


Fig. 42A

10

【 図 4 2 B 】

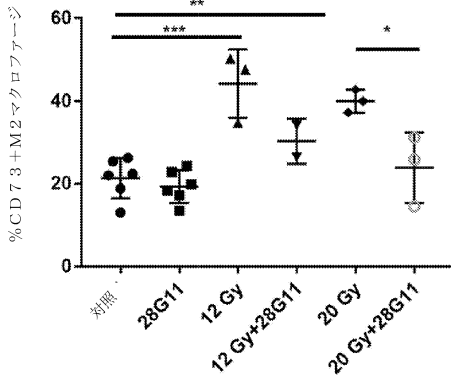


FIG. 42B

【 図 4 2 C 】

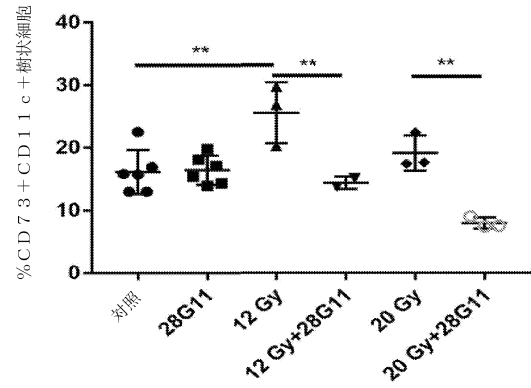


FIG. 42C

20

30

40

50

【 図 4 3 A 】

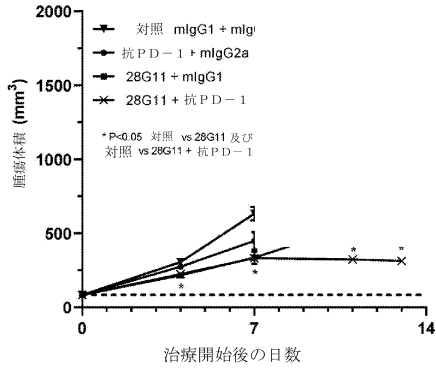


FIG. 43A

【 図 4 3 B 】

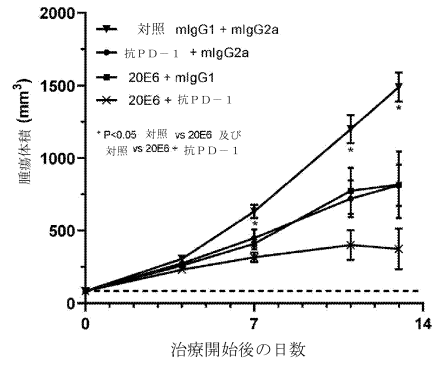


FIG. 43B

10

【 図 4 3 C 】

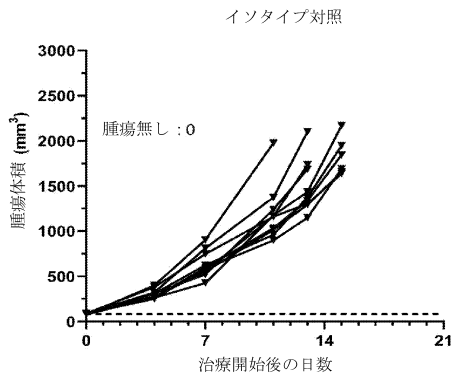


FIG. 43C

【 図 4 3 D 】

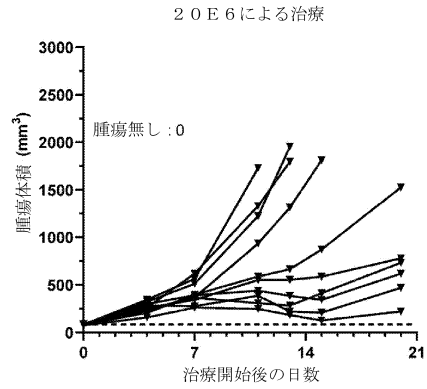


FIG. 43D

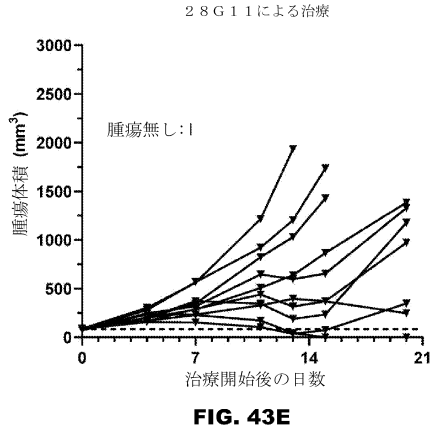
20

30

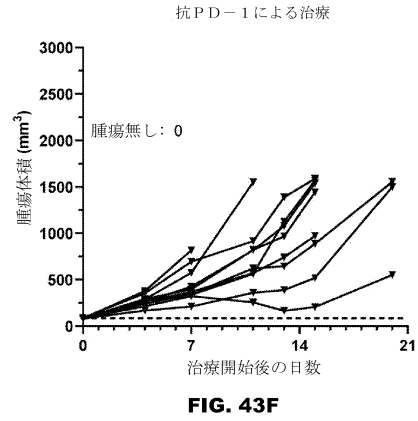
40

50

【 図 4 3 E 】

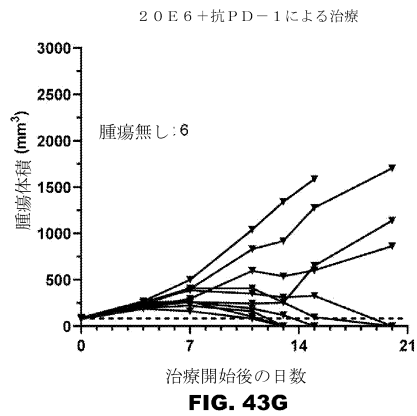


【 図 4 3 F 】

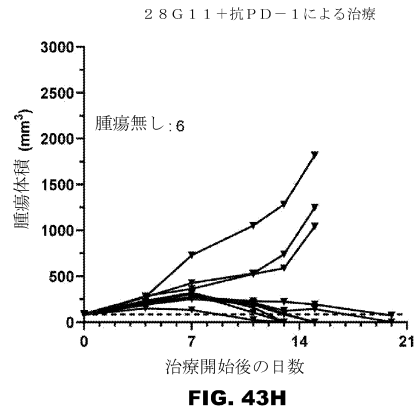


10

【 図 4 3 G 】



【 図 4 3 H 】



20

30

40

50

【 図 4 4 A 】

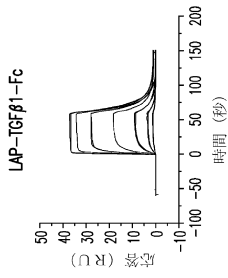


FIG.44B

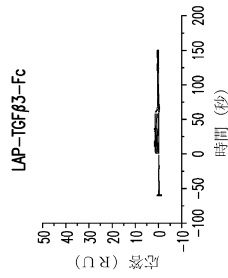


FIG.44D

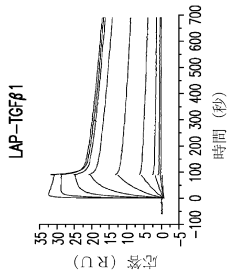


FIG.44A

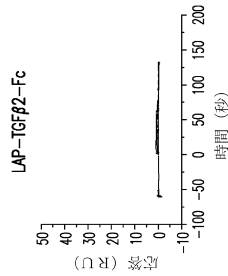


FIG.44C

【 図 4 4 B 】

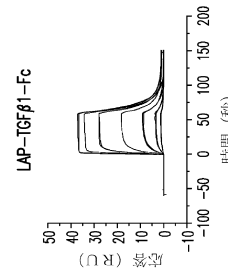


FIG.44B

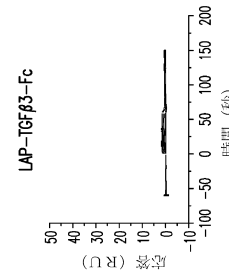


FIG.44D

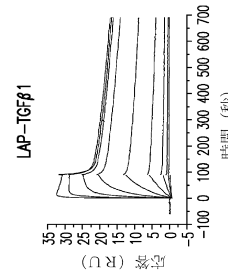


FIG.44A

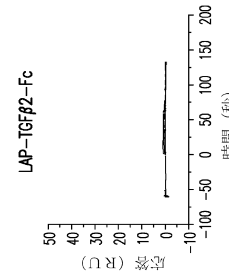


FIG.44C

10

20

【 図 4 4 C 】

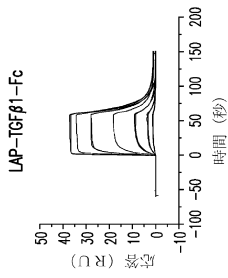


FIG.44B

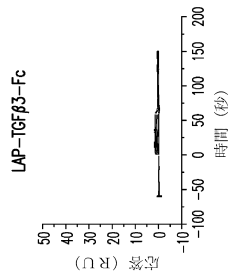


FIG.44D

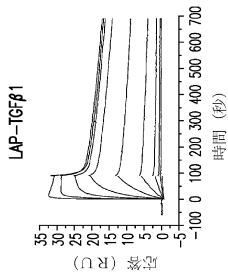


FIG.44A

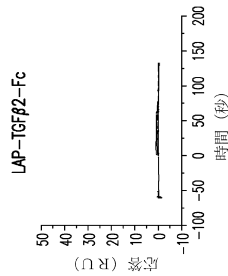


FIG.44C

【 図 4 4 D 】

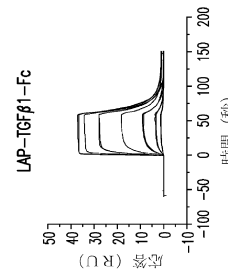


FIG.44B

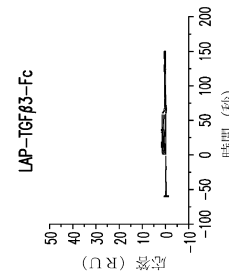


FIG.44D

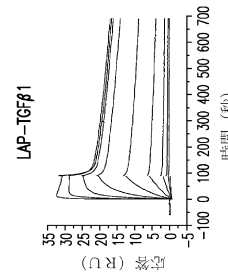


FIG.44A

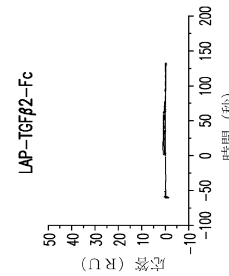


FIG.44C

30

40

50

【 図 4 5 A 】

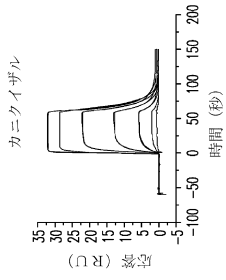


FIG. 45B

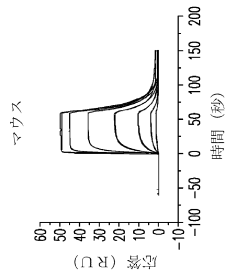


FIG. 45D

【 図 4 5 B 】

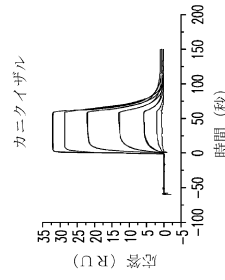


FIG. 45B

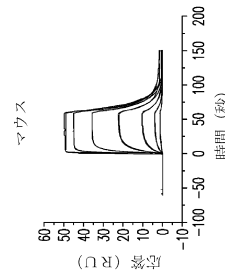


FIG. 45D

10

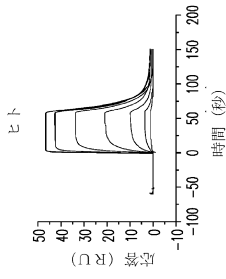


FIG. 45A

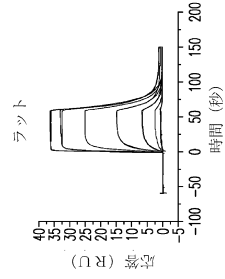


FIG. 45C

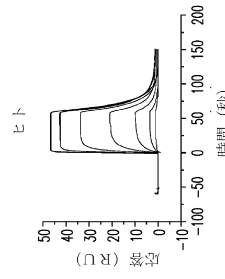


FIG. 45A

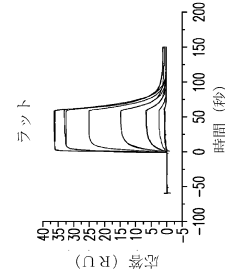


FIG. 45C

20

【 図 4 5 C 】

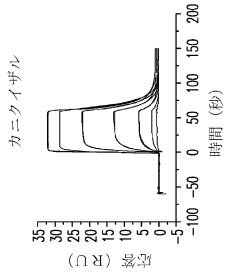


FIG. 45B

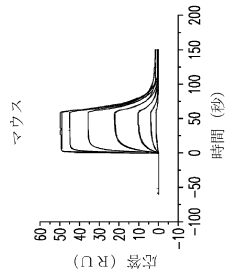


FIG. 45D

【 図 4 5 D 】

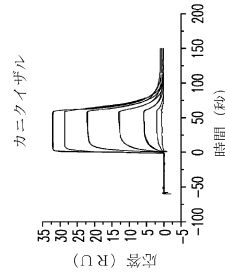


FIG. 45B

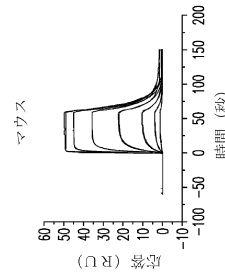


FIG. 45D

30

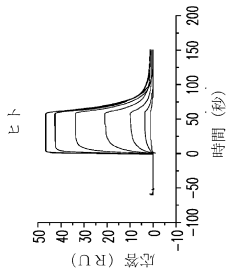


FIG. 45A

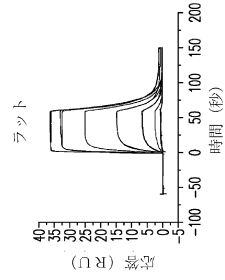


FIG. 45C

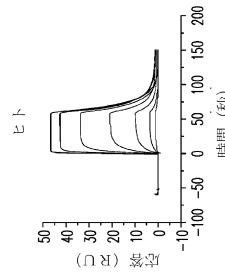


FIG. 45A

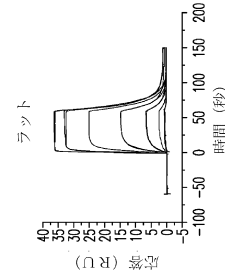


FIG. 45C

40

50

【 図 4 6 】

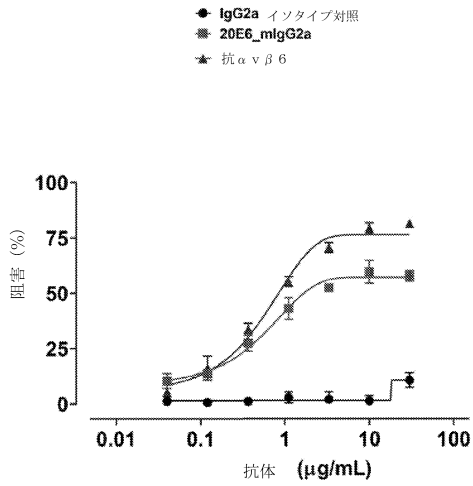


FIG. 46

10

【 配列表 】

202250483900001.app

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/055426

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

- 1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
- 2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
- 3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/055426

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
3, 4, 24-26(completely); 1, 2, 5-22, 27-54(partially)

30

40

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/055426

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61P35/00 C07K16/22 ADD. | | |
|--|---|---|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61P C07K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, 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 2016/115345 A1 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]) 21 July 2016 (2016-07-21) paragraphs [0015], [0017], [0020], [0023], [0028], [0029]; claim 4; example 1 paragraph [0161] paragraphs [0165], [0166] | 1-22, 24-54 |
| A | TAKATOKU OIDA ET AL: "TGF-[beta] Induces Surface LAP Expression on Murine CD4 T Cells Independent of Foxp3 Induction", PLOS ONE, vol. 5, no. 11, 24 November 2010 (2010-11-24), page e15523, XP055565045, DOI: 10.1371/journal.pone.0015523 | 1-22, 24-54 |
| -/-- | | |
| <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 application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art | *Z* document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search 3 February 2020 | Date of mailing of the international search report 23/06/2020 | |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Marinoni J-C | |

10

20

30

40

2

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/055426

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | GALINA GABRIELY ET AL: "Targeting latency-associated peptide promotes antitumor immunity", HHS PUBLIC ACCESS AUTHOR MANUSCRIPT, vol. 2, no. 11, 19 May 2017 (2017-05-19), pages 1-24, XP055475429, DOI: 10.1126/sciimmunol.aaj1738 ----- | 1-22, 24-54 |

10

20

30

40

2

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2019/055426

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2016115345 A1 | 21-07-2016 | AU 2016206682 A1 | 10-08-2017 |
| | | CA 2973978 A1 | 21-07-2016 |
| | | CN 107530423 A | 02-01-2018 |
| | | EP 3244926 A1 | 22-11-2017 |
| | | GB 2557389 A | 20-06-2018 |
| | | JP 2018508483 A | 29-03-2018 |
| | | SG 10201906471P A | 27-09-2019 |
| | | SG 11201705721W A | 30-08-2017 |
| | | US 2018009886 A1 | 11-01-2018 |
| | | US 2018030128 A1 | 01-02-2018 |
| | | US 2020040068 A1 | 06-02-2020 |
| | | WO 2016115345 A1 | 21-07-2016 |
| ----- | | | |

10

20

30

40

50

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

10

- 1. claims: 3, 4, 24-26(completely); 1, 2, 5-22, 27-54(partially)

Humanized anti-LAP antibodies characterized by having heavy chain CDR1, CDR2 and CDR3 of SEQ ID No. 110, 111 or 120, and 112 respectively and light chain CDR1, CDR2 and CDR3 of SEQ ID No. 113, 114 and 115 respectively

- 2. claims: 1, 2, 5-22, 27-54(all partially)

Humanized anti-LAP antibodies characterized by having heavy chain CDR1, CDR2 and CDR3 of SEQ ID No. 16, 26 and 18 respectively and light chain CDR1, CDR2 and CDR3 of SEQ ID No. 19, 20 and 21 respectively

20

- 3. claims: 1, 2, 5-22, 27-54(all partially)

Humanized anti-LAP antibodies characterized by having heavy chain CDR1, CDR2 and CDR3 of SEQ ID No. 54, 55 or 66, and 56 or 68 respectively and light chain CDR1, CDR2 and CDR3 of the amino acid sequences SEQ ID No. 57, 58 and 59 respectively

- 4. claims: 23(completely); 27-54(partially)

An isolated antibody which binds to one or more residues of residues 31-40, 274-280, and 340-343 of human LAP-TGFp1 (SEQ ID NO: 1), or binds to one or more residues of residues 31-43, 272-283, and 340-344 of human LAP-TGFp 1 (SEQ ID NO: 1).

30

40

50

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------|----------------|-------------|
| C 1 2 N 1/19 (2006.01) | C 1 2 N 1/19 | |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N 1/21 | |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/10 | |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | T |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | N |
| A 6 1 P 35/02 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/02 | |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 K 45/00 | |
| | A 6 1 P 43/00 | 1 2 1 |

(32)優先日 平成30年10月10日(2018.10.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW
 ースト・リンカーン・アベニュー・1 2 6
 1 2 6 East Lincoln Avenue , Rahway , New Jersey 0 7 0 6
 5 - 0 9 0 7 U . S . A .

(74)代理人 100114188
弁理士 小野 誠

(74)代理人 100119253
弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明

(74)代理人 100129713
弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213
弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823
弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100183519
弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483
弁理士 川寄 洋祐

(74)代理人 100203035
弁理士 五味淵 琢也

(74)代理人 100160749
弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255
弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100202267
弁理士 森山 正浩

(74)代理人 100182132
弁理士 河野 隆

- (74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和
- (74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文
- (72)発明者 パートン, ランドール
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126、メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション気付
- (72)発明者 イングリッシュ, ジェシー・エム
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126、メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション気付
- (72)発明者 フォックス, バーバラ・エス
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126、メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション気付
- (72)発明者 コプシアフティス, スタブロス
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126、メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション気付
- (72)発明者 ゴメス・ロレンテ, ヤコブ
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126、メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション気付
- (72)発明者 ムーア, レニー
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126、メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション気付
- (72)発明者 ラオ, パトリシア
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126、メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション気付
- (72)発明者 スカピン, ジョバンナ
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126、メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション気付
- (72)発明者 シモン, ケニス・ジェー
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126、メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション気付
- (72)発明者 ジョウ, ハイホン
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126、メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション気付
- F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA25 CA44
4C084 AA19 MA02 NA05 ZB262 ZB272 ZC752
4C085 AA14 AA15 CC23 EE01 EE03
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA20 EA28 EA51 FA72 FA74
GA26