

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-511911
(P2019-511911A)

(43) 公表日 令和1年5月9日(2019.5.9)

(51) Int. Cl.	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 O 6 3
C O 7 K 16/22 (2006.01)	C O 7 K 16/22	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 97 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-543390 (P2018-543390)
 (86) (22) 出願日 平成29年2月17日 (2017. 2. 17)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年10月9日 (2018. 10. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2017/050917
 (87) 国際公開番号 WO2017/141208
 (87) 国際公開日 平成29年8月24日 (2017. 8. 24)
 (31) 優先権主張番号 62/296, 282
 (32) 優先日 平成28年2月17日 (2016. 2. 17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
 35
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100095360
 弁理士 片山 英二
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100141195
 弁理士 西澤 恵美子
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

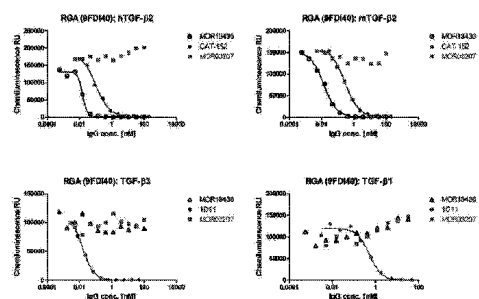
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TGFβ2抗体

(57) 【要約】

本発明は、抗トランスフォーミング増殖因子ベータ2 (TGF-β2) 抗体の分野に属する。特に、本発明は、ヒトTGF-β1またはTGF-β3アイソフォームより優先的にヒトTGF-β2アイソフォームに結合するヒトモノクローナル抗体を提供する。

Figure 3: Biologic activity and isoform-specificity by RGA activity (MOR13436)



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト TGF- β 1 アイソフォーム TGF- β 2 を中和し、ヒトアイソフォーム TGF- β 3 を中和しない、ヒトモノクローナル抗 TGF- β 2 抗体またはその機能的断片。

【請求項 2】

ヒト TGF- β 1 アイソフォーム TGF- β 2 を中和し、ヒトアイソフォーム TGF- β 3 および TGF- β 1 を中和しない、請求項 1 に記載の抗体またはその機能的断片。

【請求項 3】

中和が、Smad 依存性リポーター遺伝子アッセイによって測定される、請求項 1 または 2 に記載のヒトモノクローナル抗 TGF- β 2 抗体またはその機能的断片。

10

【請求項 4】

Smad 依存性リポーター遺伝子アッセイによって測定される場合、250 pM 未満の最大半減抑制濃度 (IC50) でヒト TGF- β 2 を中和し、100 nM を超える最大半減抑制濃度 (IC50) でヒト TGF- β 1 または TGF- β 3 を中和する、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体またはその機能的断片。

【請求項 5】

TGF- β 1 または TGF- β 3 に関するその解離定数の少なくとも 70 倍小さい解離定数で、ヒトアイソフォーム TGF- β 1 および TGF- β 3 より優先的にヒト TGF- β 1 アイソフォーム TGF- β 2 に結合する、ヒトモノクローナル抗 TGF- β 2 抗体またはその機能的断片であって、前記抗体がヒト TGF- β 2 を中和する、前記抗体またはその機能的断片。

20

【請求項 6】

1 pM 以下の K_D でヒト TGF- β 2 に結合する、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体またはその機能的断片。

【請求項 7】

配列番号 7、27、47、67、87 または 107 のうちの少なくとも 1 つに少なくとも 95% の配列同一性を有する VH ポリペプチド配列、および配列番号 17、37、57、77、97 または 117 のうちの少なくとも 1 つに少なくとも 95% の配列同一性を有する VL ポリペプチド配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体または機能的断片。

30

【請求項 8】

配列番号 1、21、41、61、81、101 または 4、24、44、64、84、104 または 124 ~ 129 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 CDR1；配列番号 2、22、42、62、82、102 または 5、25、45、65、85、105 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 CDR2；配列番号 3、23、43、63、83、103 または 6、26、46、66、86、106 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 CDR3；配列番号 11、31、51、71、91、111 または 14、34、54、74、94、114 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 CDR1；配列番号 12、32、52、72、92、112 または 15、35、55、75、95、115 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 CDR2；配列番号 13、33、53、73、93、113 または 16、36、56、76、96、116 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 CDR3 を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体または機能的断片。

40

【請求項 9】

(a) 配列番号 1 の重鎖可変領域 CDR1；配列番号 2 の重鎖可変領域 CDR2；配列番号 3 の重鎖可変領域 CDR3；配列番号 11 の軽鎖可変領域 CDR1；配列番号 12 の軽鎖可変領域 CDR2；および配列番号 13 の軽鎖可変領域 CDR3；

(b) 配列番号 21 の重鎖可変領域 CDR1；配列番号 22 の重鎖可変領域 CDR2；配列番号 23 の重鎖可変領域 CDR3；配列番号 31 の軽鎖可変領域 CDR1；配列番号 3

50

2の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号33の軽鎖可変領域CDR3；
 (c)配列番号41の重鎖可変領域CDR1；配列番号42の重鎖可変領域CDR2；配列番号43の重鎖可変領域CDR3；配列番号51の軽鎖可変領域CDR1；配列番号52の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号53の軽鎖可変領域CDR3；
 (d)配列番号61の重鎖可変領域CDR1；配列番号62の重鎖可変領域CDR2；配列番号63の重鎖可変領域CDR3；配列番号71の軽鎖可変領域CDR1；配列番号72の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号73の軽鎖可変領域CDR3；
 (e)配列番号81の重鎖可変領域CDR1；配列番号82の重鎖可変領域CDR2；配列番号83の重鎖可変領域CDR3；配列番号91の軽鎖可変領域CDR1；配列番号92の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号93の軽鎖可変領域CDR3；または
 (f)配列番号101の重鎖可変領域CDR1；配列番号102の重鎖可変領域CDR2；配列番号103の重鎖可変領域CDR3；配列番号111の軽鎖可変領域CDR1；配列番号112の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号113の軽鎖可変領域CDR3を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体または機能的断片。

10

【請求項10】

配列番号9、29、49、69、89、109からなる群から選択される少なくとも1つの配列に少なくとも95%の配列同一性を有する完全長重鎖アミノ酸配列、および配列番号19、39、59、79、99、119からなる群から選択される少なくとも1つの配列に少なくとも95%の配列同一性を有する完全長軽鎖アミノ酸配列を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の抗体または機能的断片。

20

【請求項11】

(a)配列番号7の可変重鎖配列および配列番号17の可変軽鎖配列；
 (b)配列番号27の可変重鎖配列および配列番号37の可変軽鎖配列；
 (c)配列番号47の可変重鎖配列および配列番号57の可変軽鎖配列；
 (d)配列番号67の可変重鎖配列および配列番号77の可変軽鎖配列；
 (e)配列番号87の可変重鎖配列および配列番号97の可変軽鎖配列；または
 (f)配列番号107の可変重鎖配列および配列番号117の可変軽鎖配列を含む、ヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体。

30

【請求項12】

(a)配列番号9の重鎖配列および配列番号19の軽鎖配列；
 (b)配列番号29の重鎖配列および配列番号39の軽鎖配列；
 (c)配列番号49の重鎖配列および配列番号59の軽鎖配列；
 (d)配列番号69の重鎖配列および配列番号79の軽鎖配列；
 (e)配列番号89の重鎖配列および配列番号99の軽鎖配列；または
 (f)配列番号109の重鎖配列および配列番号119の軽鎖配列を含む、ヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体。

【請求項13】

IgG1アイソタイプのものである、前記請求項のいずれか一項に記載の抗TGF- β 2抗体。

40

【請求項14】

Fc領域の突然変異により変更されたエフェクター機能を有する、前記請求項のいずれか一項に記載のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体。

【請求項15】

前記請求項のいずれか一項に記載の抗体または機能的断片をコードする、単離されたポリヌクレオチド配列。

【請求項16】

配列番号8、10、18、20、28、30、38、40、48、50、58、60、68、70、78、80、88、90、98、100、108、110、118または120の1つまたは複数を含む、請求項15に記載の単離されたポリヌクレオチド配列。

50

【請求項 17】

請求項 15 または 16 に記載の 1 つまたは複数の単離されたポリヌクレオチド配列を含む、クローニングまたは発現ベクター。

【請求項 18】

少なくとも 1 つの CDR 領域をコードする、配列番号 8、10、18、20、28、30、38、40、48、50、58、60、68、70、78、80、88、90、98、100、108、110、118 もしくは 120、またはその断片の 1 つまたは複数を含む、請求項 17 に記載のベクター。

【請求項 19】

請求項 17 または 18 に記載の 1 つまたは複数のベクターを含む宿主細胞。

10

【請求項 20】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗体または機能的断片の生成のための方法であって、請求項 24 の宿主細胞を培養し、前記抗体または機能的断片を単離することを含む方法。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗体またはその機能的断片を含む医薬組成物。

【請求項 22】

療法において、または医薬として使用するための、請求項 9 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗体またはその機能的断片を含む医薬組成物。

20

【請求項 23】

薬学的に許容される希釈剤または担体をさらに含む、請求項 21 または 22 に記載の医薬組成物。

【請求項 24】

1 つまたは複数のさらなる活性薬剤をさらに含む、請求項 21 ~ 23 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

デュピュイトラン病、マルファン関連の状態またはマルファン病、表皮水疱症、線維柱帯切除術、ロイス-ディーツ症候群、皮膚全身性硬化症および筋骨格疾患または障害からなる群から選択される疾患または病的状態の処置に使用するための、請求項 21 ~ 24 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 26】

デュピュイトラン病、マルファン関連の状態またはマルファン病、表皮水疱症、線維柱帯切除術、ロイス-ディーツ症候群、皮膚全身性硬化症および筋骨格疾患または障害からなる群から選択される疾患または病的状態を患っている患者を処置する方法であって、前記患者に請求項 21 ~ 24 のいずれか一項に記載の医薬組成物の有効用量を投与することを含む方法。

【請求項 27】

デュピュイトラン病、マルファン関連の状態またはマルファン病、表皮水疱症、線維柱帯切除術、ロイス-ディーツ症候群、皮膚全身性硬化症または筋骨格疾患または障害の処置のための医薬の製造における、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗体もしくは機能的断片、請求項 15 もしくは請求項 16 に記載のポリヌクレオチド配列または請求項 21 ~ 24 のいずれか一項に記載の医薬組成物の使用。

40

【請求項 28】

請求項 12 の少なくとも 1 つの抗体によって TGF- β 2 への結合を交差ブロックするかまたは交差ブロックされる、抗体またはその機能的断片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

50

本出願は、A S C I Iフォーマットで電子的に提出され、ここに参照により完全に組み込まれる配列表を含む。前記A S C I Iコピーは、2017年2月13日に作製され、P A T 0 5 7 2 0 6 - W O - P C T _ S L . T X Tと名付けられ、サイズは162,071バイトである。

【0002】

本発明は、抗トランスフォーミング増殖因子ベータ2 (TGF- β 2)抗体に関する。特に、本発明は、ヒトTGF- β 1またはTGF- β 3アイソフォームより優先的にヒトTGF- β 2アイソフォームに結合するヒトモノクローナル抗体を提供する。

【背景技術】

【0003】

トランスフォーミング増殖因子 (TGF- β)スーパーファミリーのメンバーは、様々な病的状態、例えば線維形成、癒痕化、がん (Growth Factors. 2011 Aug;29(4):140-52)、マルファン関連状態 (米国特許第8,597,646号)および表皮水疱症のような特定の状態に関連したサイトカインである。米国特許第5,571,714号は、悪性腫瘍および転移がんの処置における抗TGF- β 抗体の使用を開示する。抗TGF- β 抗体は多数の疾患の処置で使用されてきた、例えば：肺線維形成 (S.N. Giri et al. Thorax 48, 959-966, 1993)；神経性癒痕化 (A. Logan et al. Eur. J. Neurosci. 6, 355-363, 1994)；動脈損傷 (Y.G. Wolf, L.M. Rasmussen & E. Ruoslahti J. Clin. Invest. 93, 1172-1178, 1994)；糸球体腎炎 (W.A Border et al. Nature 346, 371-374, 1990)；慢性関節リウマチ (Wahl et al J. Exp. Medicine 177, 225-230, 1993)および皮膚の癒痕化 (M. Shah et al. Lancet 339, 213-214 1992; M. Shah et al. J. Cell Science 107, 1137-1157, 1994; M. Shah et al. 108, 985-1002, 1995)。したがって、TGF- β 活性を標的にすることは、アンチセンスオリゴヌクレオチド (Curr Pharm Biotechnol. 2011 Dec;12(12):2203-13.)、TGF- β 受容体キナーゼの小分子阻害剤 (例えば、TGF- β 受容体I型およびII型を標的にするLY2109761 (Mol Cancer Ther 2008 7; 829))、それらの天然のリガンドを捕捉する可溶性受容体外部ドメイン、およびモノクローナル抗体 (Growth Factors. 2011 Aug;29(4):140-52; 国際公開第9713844号で総論されている)を含む異なるアプローチを使用した研究の活動領域である。

【0004】

トランスフォーミング増殖因子ベータ2 (TGF- β 2)は、TGF- β タンパク質ファミリーの30を超えるメンバーのうちの1メンバーである。それは、TGF- β 1/3アイソフォームに緊密に関連している。全てのTGF- β 前駆体タンパク質は、N末端シグナルペプチド、大きなプロペプチドセグメントおよびC末端ポリペプチドからなる。後者は二量体化して、TGF- β 2と呼ばれる、活性のある成熟したTGF- β 2タンパク質を形成する。成熟したTGF- β 1、TGF- β 2およびTGF- β 3の間の相溶性は比較的高い(71~79%)が、プロペプチドセグメントは著しく保存されていない(43~54%の相溶性)。さらに、他のTGF- β ファミリータンパク質へのTGF- β 2の相溶性はわずか33%未満であるが、ヒト、カニクイザルおよびマウスを含む様々な種からのTGF- β 2の間で非常に高い相溶性が観察される(95~100%)。

【0005】

最も広く記載されたTGF- β シグナル伝達経路はTGF- β II型受容体、ALK5およびSmad2/3を介したものであるが、ALK-およびSmad非依存性経路を含む多くの他の経路が立証されている。大多数の市販されているTGF- β 抗体は、非ヒト種に由来するポリクローナル抗体、またはウエスタンブロット分析で使用するためのTGF- β 1特異的MAB240 (R&D Systems (商標)による)などのマウスモノクローナル抗体である (J Immunol Methods. 1999 May 27;225(1-2):87-93)。ヒトの臨床試験で使用するための抗体は、ツール抗体と異なる必要条件を満たさなければならない。重大な必要条件は、キメラ、ヒト化、または完全ヒト抗体の使用による潜在的免疫原性の低減である。以下を含む、これらの必要条件を満たす臨床開発途上のいくつかのTGF- β アイソフォーム抗体がある：

10

20

30

40

50

1. TGF- α アイソフォーム 1、2 および 3 を中和する完全ヒトモノクローナル抗体 GC1008 (フレソリムマブ)、
 2. TGF- α 1 を中和する抗体 LY2382770、
 3. TGF- α 1 を中和する抗体 CAT-192 (メテリムマブ)、および
 4. 抗体 CAT-152 (レルデリムマブ、6B1 としても知られる) は、TGF- β 2 に高い親和性を、および TGF- β 3 と交差反応性を有する (上の全ては、Growth Factors. 2011 Aug;29(4):140-52 で総論されている)。

【0006】

CAT-152: CAT-152 は、TGF- β 2 (Biacore (登録商標) システムの解離定数 0.89 nM) に親和性を有し、TGF- β 3 (Biacore (登録商標) システムの解離定数 10 nM) と 9% 交差反応性を有するが、TGF- β 1 への検出可能な結合を示さない、完全ヒト IgG4 抗体である (J Immunol Methods. 1999 Jul 30;227(1-2):17-29; Drugs R&D 2002; 3 (2):106-108; 国際公開第 9713844 号)。CAT-152 は、線維柱帯切除術としても知られる緑内障排液手術の補助的手段として開発された (Drugs R&D 2002; 3 (2):106-108)。しかし、CAT-152 は、フェーズ I I I 治験において初回の線維柱帯切除術の後にある特定の緑内障患者で線維形成の進行を予防することができなかった (Ophthalmology. 2007 Oct; 114(10):1822-30)。

【0007】

CAT-192: TGF- β 1 特異的組換えヒト抗体 CAT-192 は、初期の散在性皮膚全身性硬化症の処置を調査したフェーズ I / I I 治験において、効力の証拠を示すことができなかった (Arthritis Rheum. 2007 Jan;56(1):323-33)。さらに、その治験でプラセボを受けた患者より CAT-192 を受けた患者でより多くの有害事象が観察された。これらの所見は、活性 TGF- β 1 の低下したレベルが、多臓器炎症、表皮のランゲルハンス細胞の欠如および腫瘍の発達と関連することを示す、突然変異体マウスモデルで得られた結果によってさらに裏付けられる (Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 2;105(48))。

【0008】

3つの緊密に関連した TGF- β 1 / 2 / 3 アイソフォームの存在は、有害であるかまたは望ましくない事象と関連する可能性のある他の経路に対するいかなる干渉も回避するために、ヒトでそれらのタンパク質の特異的検出および中和を可能にする化合物の必要性を発生させる。より具体的には、これは、TGF- β 2 を効果的に中和し、TGF- β 1 または TGF- β 3 より優先的な TGF- β 2 の結合および中和を示す、アイソフォーム特異的抗 TGF- β 2 治療抗体への強力な医学的必要性を発生させる。理想的には、高い結合親和性は効力の増加およびより低い投与必要量と関連し、効力の強化、安全性およびより低い費用に寄与するので、TGF- β 2 抗体の特異性は高い結合親和性と組み合わせられる (MAbs. 2012 May-Jun;4(3):341-8)。モノクローナル抗体は、疾患機構における非常にタイトなタンパク質間相互作用を破壊するために、非常に低い (例えば、ピコモルの) 解離定数を必要とすることがしばしばある (MAbs. 2012 May-Jun;4(3):341-8)。これは、非常に低いピコモルの解離定数を示すアイソフォーム特異的 TGF- β 2 治療抗体への強力な医学的必要性を発生させるが、それも本発明によって解決される。

【発明の概要】

【0009】

本開示のある特定の実施形態は、以下の態様で記載される：

1. ヒト TGF- β アイソフォーム TGF- β 2 を中和し、ヒトアイソフォーム TGF- β 3 を中和しない、ヒトモノクローナル抗 TGF- β 2 抗体またはその機能的断片。
2. ヒト TGF- β アイソフォーム TGF- β 2 を中和し、ヒトアイソフォーム TGF- β 3 および TGF- β 1 を中和しない、態様 1 による抗体またはその機能的断片。
3. 中和は S m a d 依存性リポーター遺伝子アッセイによって測定される、態様 1 または 2 によるヒトモノクローナル抗 TGF- β 2 抗体またはその機能的断片。
4. S m a d 依存性リポーター遺伝子アッセイによって測定される場合、 250 pM 未満

10

20

30

40

50

の最大半減抑制濃度 (IC₅₀) でヒト TGF- β 2 を中和し、100 nM を超える最大半減抑制濃度 (IC₅₀) でヒト TGF- β 1 および / または TGF- β 3 を中和する、前記態様のいずれかによる抗体またはその機能的断片。

5. TGF- β 1 または TGF- β 3 に関するその解離定数の少なくとも 70 分の 1 の解離定数で、ヒトアイソフォーム TGF- β 1 および TGF- β 3 より優先的にヒト TGF- β アイソフォーム TGF- β 2 に結合し、ヒト TGF- β 2 を中和する、ヒトモノクローナル抗 TGF- β 2 抗体またはその機能的断片。

6. 1 pM 以下の K_D でヒト TGF- β 2 に結合する、前記態様のいずれかによる抗体またはその機能的断片。

7. 配列番号 1、21、41、61、81、101 または 4、24、44、64、84、104 または 124 ~ 129 からなる群から選択される配列に少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変 CDR1 領域; 配列番号 2、22、42、62、82、102 または 5、25、45、65、85、105 からなる群から選択される配列に少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変 CDR2 領域; 配列番号 3、23、43、63、83、103 または 6、26、46、66、86、106 からなる群から選択される配列に少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変 CDR3 領域; 配列番号 11、31、51、71、91、111 または 14、34、54、74、94、114 からなる群から選択される配列に少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変 CDR1 領域; 配列番号 12、32、52、72、92、112 または 15、35、55、75、95、115 からなる群から
20
選択される配列に少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変 CDR2 領域; および、配列番号 13、33、53、73、93、113 または 16、36、56、76、96、116 からなる群から選択される配列に少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変 CDR3 領域を含む、態様 1 ~ 6 のいずれかによる抗体または機能的断片。

8. 配列番号 7、27、47、67、87 または 107 のうちの少なくとも 1 つに少なくとも 95% の配列同一性を有する重鎖可変領域ポリペプチド配列を含む、態様 1 ~ 7 のいずれかによる抗体または機能的断片。

9. 配列番号 17、37、57、77、97 または 117 のうちの少なくとも 1 つに少なくとも 95% の配列同一性を有する軽鎖可変領域ポリペプチド配列を含む、態様 1 ~ 8 の
30
いずれかによる抗体または機能的断片。

10. 配列番号 7、27、47、67、87 または 107 のうちの少なくとも 1 つに少なくとも 95% の配列同一性を有する重鎖可変領域ポリペプチド配列、および配列番号 17、37、57、77、97 または 117 のうちの少なくとも 1 つに少なくとも 95% の配列同一性を有する軽鎖可変領域ポリペプチド配列を含む、態様 1 ~ 9 のいずれかによる抗体または機能的断片。

11. 配列番号 1、21、41、61、81、101 または 4、24、44、64、84、104 または 124 ~ 129 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 CDR1; 配列番号 2、22、42、62、82、102 または 5、25、45、65、85、105 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 CDR2; 配列番号 3、23、43、63、83、103 または 6、26、46、66、86、106 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 CDR3; 配列番号 11、31、51、71、91、111 または 14、34、54、74、94、114 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 CDR1; 配列番号 12、32、52、72、92、112 または 15、35、55、75、95、115 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 CDR2; 配列番号 13、33、53、73、93、113 または 16、36、56、76、96、116 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 CDR3 を含む、態様 1 ~ 10 のいずれかによる抗体またはその機能的断片。
40

12. (a) 配列番号 1 の重鎖可変領域 CDR1; 配列番号 2 の重鎖可変領域 CDR2; 50

配列番号 3 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号 1 1 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 1 2 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号 1 3 の軽鎖可変領域 C D R 3 ;
 (b) 配列番号 2 1 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 2 2 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号 2 3 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号 3 1 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 3 2 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号 3 3 の軽鎖可変領域 C D R 3 ;
 (c) 配列番号 4 1 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 4 2 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号 4 3 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号 5 1 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 5 2 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号 5 3 の軽鎖可変領域 C D R 3 ;
 (d) 配列番号 6 1 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 6 2 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号 6 3 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号 7 1 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 7 2 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号 7 3 の軽鎖可変領域 C D R 3 ;
 (e) 配列番号 8 1 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 8 2 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号 8 3 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号 9 1 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 9 2 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号 9 3 の軽鎖可変領域 C D R 3 ; または
 (f) 配列番号 1 0 1 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 1 0 2 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号 1 0 3 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号 1 1 1 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 1 1 2 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号 1 1 3 の軽鎖可変領域 C D R 3
 を含む、態様 1 ~ 1 1 のいずれか 1 つによるヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体または機能的断片。

10

1 3 . 配列番号 9 、 2 9 、 4 9 、 6 9 、 8 9 、 1 0 9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列に少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する完全長重鎖アミノ酸配列を含む、態様 1 ~ 1 2 のいずれかによる抗体または機能的断片。

20

1 4 . 配列番号 1 9 、 3 9 、 5 9 、 7 9 、 9 9 、 1 1 9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列に少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する完全長軽鎖アミノ酸配列を含む、態様 1 ~ 1 3 のいずれかによる抗体または機能的断片。

1 5 . 配列番号 9 、 2 9 、 4 9 、 6 9 、 8 9 、 1 0 9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列に少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する完全長重鎖アミノ酸配列、および配列番号 1 9 、 3 9 、 5 9 、 7 9 、 9 9 、 1 1 9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列に少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する完全長軽鎖アミノ酸配列を含む、態様 1 ~ 1 4 のいずれかによる抗体または機能的断片。

30

1 6 . (a) 配列番号 7 の可変重鎖配列および配列番号 1 7 の可変軽鎖配列 ;
 (b) 配列番号 2 7 の可変重鎖配列および配列番号 3 7 の可変軽鎖配列 ;
 (c) 配列番号 4 7 の可変重鎖配列および配列番号 5 7 の可変軽鎖配列 ;
 (d) 配列番号 6 7 の可変重鎖配列および配列番号 7 7 の可変軽鎖配列 ;
 (e) 配列番号 8 7 の可変重鎖配列および配列番号 9 7 の可変軽鎖配列 ; または
 (f) 配列番号 1 0 7 の可変重鎖配列および配列番号 1 1 7 の可変軽鎖配列
 を含む、ヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体。

1 7 . (a) 配列番号 9 の重鎖配列および配列番号 1 9 の軽鎖配列 ;
 (b) 配列番号 2 9 の重鎖配列および配列番号 3 9 の軽鎖配列 ;
 (c) 配列番号 4 9 の重鎖配列および配列番号 5 9 の軽鎖配列 ;
 (d) 配列番号 6 9 の重鎖配列および配列番号 7 9 の軽鎖配列 ;
 (e) 配列番号 8 9 の重鎖配列および配列番号 9 9 の軽鎖配列 ; または
 (f) 配列番号 1 0 9 の重鎖配列および配列番号 1 1 9 の軽鎖配列
 を含む、ヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体。

40

1 8 . I g G 1 アイソタイプである、前記態様のいずれかによる抗 T G F - 2 抗体。

1 9 . F c 領域の突然変異により変更されたエフェクター機能を有する、前記態様のいずれかによるヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体。

2 0 . 前記態様のいずれかによる抗体または機能的断片をコードする、単離されたポリヌクレオチド配列。

2 1 . 配列番号 8 、 1 0 、 1 8 、 2 0 、 2 8 、 3 0 、 3 8 、 4 0 、 4 8 、 5 0 、 5 8 、 6

50

- 0、68、70、78、80、88、90、98、100、108、110、118または120の1つまたは複数を含む、態様20による単離されたポリヌクレオチド配列。
- 22．態様20または21による1つまたは複数の単離されたポリヌクレオチド配列を含む、クローニングまたは発現ベクター。
- 23．少なくとも1つのCDR領域をコードする、配列番号8、10、18、20、28、30、38、40、48、50、58、60、68、70、78、80、88、90、98、100、108、110、118もしくは120、またはその断片の1つまたは複数を含む、態様22によるベクター。
- 24．態様22または23による1つまたは複数のベクターを含む宿主細胞。
- 25．態様1～19のいずれか1つの抗体またはその機能的断片の生成のための方法であって、態様24の宿主細胞を培養することおよび前記抗体または機能的断片を単離することを含む方法。 10
- 26．態様1～19のいずれか1つによる抗体またはその機能的断片を含む医薬組成物。
- 27．療法において使用するための態様12、15、16、17または26のいずれかの抗体またはその機能的断片を含む医薬組成物。
- 28．医薬として使用するための態様12、15、16、17または26のいずれかの抗体またはその機能的断片を含む医薬組成物。
- 29．薬学的に許容される希釈剤または担体をさらに含む、態様26～28による医薬組成物。
- 30．1つまたは複数のさらなる活性薬剤をさらに含む、態様26～29による医薬組成物。 20
- 31．デュピュイトラン病の処置で使用するための態様26～30の医薬組成物。
- 32．ロイス-ディーツ症候群の処置で使用するための態様26～30の医薬組成物。
- 33．マルファン関連状態またはマルファン病の処置で使用するための態様26～30の医薬組成物。
- 34．表皮水疱症の処置で使用するための態様26～30の医薬組成物。
- 35．線維柱帯切除術の処置で使用するための態様26～30の医薬組成物。
- 36．皮膚全身性硬化症の処置で使用するための態様26～30の医薬組成物。
- 37．筋骨格疾患または障害の処置で使用するための態様26～30の医薬組成物。
- 38．前記筋骨格疾患または障害が、筋萎縮症、例えばミオパシー、例えばミオトニー、先天性ミオパシー、例えばネマリンミオパシー、多重/ミニコアミオパシーおよび管状筋（中心核）ミオパシーによって引き起こされるもの、ミトコンドリアミオパシー、家族性周期性四肢麻痺、炎症性ミオパシー、代謝ミオパシー、例えば、グリコーゲンまたは脂質貯蔵病、皮膚筋炎、多発筋炎、封入体筋肉炎、骨化性筋炎、横紋筋融解およびミオグロビン尿症によって引き起こされるもの；筋ジストロフィー、例えば、デュシェンヌ、ベッカー、筋緊張性、筋膜肩甲上腕部、エメリー-ドライフス、眼球咽頭、肩甲上腕部、四肢肢帯、フクヤマ、先天性筋ジストロフィーまたは遺伝性末梢筋障害；骨粗しょう症；骨折；低い背丈；小人症；長期ベッド療養；随意不活動性；または不随意の不活動性である、態様37の医薬組成物。 30
- 39．デュピュイトラン病を患っている患者を処置する方法であって、前記患者に態様26～30のいずれか1つによる医薬組成物の有効用量を投与することを含む方法。 40
- 40．マルファン関連状態またはマルファン病を患っている患者を処置する方法であって、前記患者に態様26～30のいずれか1つによる医薬組成物の有効用量を投与することを含む方法。
- 41．表皮水疱症を患っている患者を処置する方法であって、前記患者に態様26～30のいずれか1つによる医薬組成物の有効用量を投与することを含む方法。
- 42．線維柱帯切除術を受ける患者を処置する方法であって、前記患者に態様26～30のいずれか1つによる医薬組成物の有効用量を投与することを含む方法。
- 43．皮膚全身性硬化症を患っている患者を処置する方法であって、前記患者に態様26～30のいずれか1つによる医薬組成物の有効用量を投与することを含む方法。 50

44. ロイス - ディーツ症候群を患っている患者を処置する方法であって、前記患者に態様 26 ~ 30 のいずれか 1 つによる医薬組成物の有効用量を投与することを含む方法。

45. 筋骨格疾患または障害を患っている患者を処置する方法であって、前記患者に態様 26 ~ 30 のいずれか 1 つによる医薬組成物の有効用量を投与することを含む方法。

46. 前記筋骨格疾患または障害が、筋萎縮症、例えばミオパシー、例えばミオトニー、先天性ミオパシー、例えばネマリンミオパシー、多重 / ミニコアミオパシーおよび管状筋 (中心核) ミオパシーによって引き起こされるもの、ミトコンドリアミオパシー、家族性周期性四肢麻痺、炎症性ミオパシー、代謝ミオパシー、例えば、グリコーゲンまたは脂質貯蔵病、皮膚筋炎、多発筋炎、封入体筋肉炎、骨化性筋炎、横紋筋融解およびミオグロビン尿症によって引き起こされるもの ; 筋ジストロフィー、例えば、デュシェンヌ、ベッカー、筋緊張性、筋膜肩甲上腕部、エメリー - ドライフス、眼球咽頭、肩甲上腕部、四肢肢帯、フクヤマ、先天性筋ジストロフィーまたは遺伝性末梢筋障害 ; 骨粗しょう症 ; 骨折 ; 低い背丈 ; 小人症 ; 長期ベッド療養 ; 随意不活動性 ; または不随意の不活動性である、態様 45 による方法。

47. デュピュイトラン病、マルファン関連状態もしくはマルファン病、表皮水疱症、線維柱帯切除術、ロイス - ディーツ症候群、皮膚全身性硬化症または筋骨格疾患もしくは障害の処置のための医薬の製造における、態様 1 ~ 19 のいずれか 1 つによる抗体もしくは機能的断片、態様 20 もしくは 21 によるポリヌクレオチド配列、または態様 26 ~ 30 のいずれか 1 つによる医薬組成物の使用。

48. 前記筋骨格疾患または障害が、筋萎縮症、例えばミオパシー、例えばミオトニー、先天性ミオパシー、例えばネマリンミオパシー、多重 / ミニコアミオパシーおよび管状筋 (中心核) ミオパシーによって引き起こされるもの、ミトコンドリアミオパシー、家族性周期性四肢麻痺、炎症性ミオパシー、代謝ミオパシー、例えば、グリコーゲンまたは脂質貯蔵病、皮膚筋炎、多発筋炎、封入体筋肉炎、骨化性筋炎、横紋筋融解およびミオグロビン尿症によって引き起こされるもの ; ジストロフィー、例えば、デュシェンヌ、ベッカー、筋緊張性、筋膜肩甲上腕部、エメリー - ドライフス、眼球咽頭、肩甲上腕部、四肢肢帯、フクヤマ、先天性筋ジストロフィーまたは遺伝性末梢筋障害 ; 骨粗しょう症 ; 骨折 ; 低い背丈 ; 小人症 ; 長期ベッド療養 ; 随意不活動性 ; または不随意の不活動性である、態様 47 の使用。

49. 態様 17 の少なくとも 1 つの抗体によって TGF - 2 への結合を交差ブロックするかまたは交差ブロックされる、抗体またはその機能的断片。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】溶液平衡滴定 (SET) 方法 (Sector Imager 6000 (MSD)) を使用して得られた、ヒト組換え TGF - 2 への TGF - 2 特異的 AB MOR 13436 結合の濃度 - 応答曲線を示す図である。K_D 親和性測定は、文献に記載されている通りに実施した (Friquet et al., J Immunol Meth 77, 305-319, 1985)。SET 方法の感度および精度を向上させるために、それは古典的 ELISA から ECL に基づくテクノロジーに変えられた (Haenel et al., Anal Biochem 339, 182-184, 2005)。

【図2】溶液平衡滴定 (SET) 方法 (Sector Imager 6000 (MSD)) を使用して得られた、ヒト組換え TGF - 2 およびマウス組換え TGF - 2 への TGF - 2 特異的 AB (A) MOR 14799、(B) MOR 14800、(C) MOR 14797 および (D) MOR 14809 の濃度 - 応答曲線を示す図である。K_D 親和性測定は、文献に記載されている通りに実施した (Friquet et al., J Immunol Meth 77, 305-319, 1985)。SET 方法の感度および精度を向上させるために、それは古典的 ELISA から ECL に基づくテクノロジーに変えられた (Haenel et al., Anal Biochem 339, 182-184, 2005)。

【図3】TGF - 2 特異的 AB MOR 13436 の生物学的「中和」活性を示す図である。HEK 293T / 17CAGA - 12 (HEK 293T - RGA)、リン酸化 Smad - 2 および Smad - 3 に特異的なルシフェラーゼリポーターアッセイにおける、組

10

20

30

40

50

換えヒトTGF- β 2、マウスTGF- β 2、ヒトTGF- β 3およびヒトTGF- β 1の効果に対する抗体の濃度-応答曲線を示す図である。組換えTGF- β は、CAGA-12リポーターに結合してルシフェラーゼ遺伝子発現を引き起こす、Smad-2およびSmad-3のリン酸化を誘導する。MOR13436は、組換えヒトおよびマウスTGF- β 2を中和するが、ヒトTGF- β 1およびTGF- β 3を中和しない。IgG抗体MOR03207は、陰性対照の役目をした。MOR03207は、ヒト生得的免疫系の一部である酵素を認識する。

【図4】TGF- β 2特異的AB MOR14799、MOR14800、MOR14797およびMOR14809の生物学的「中和」活性を示す図である。HEK293T/17CAGA-12(HEK293T-RGA)、リン酸化Smad-2およびSmad-3に特異的なルシフェラーゼリポーターアッセイにおける、様々な組換えヒトTGF- β ファミリータンパク質：アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB、GDF-11、ミオスタチン、TGF- β 2およびTGF- β 3の効果に対するABの濃度-応答曲線を示す。組換えTGF- β は、CAGA-12リポーターに結合してルシフェラーゼ遺伝子発現を引き起こす、Smad-2およびSmad-3のリン酸化を誘導した。全てのABは組換えヒトTGF- β 2を中和するが、いかなる他のTGF- β タンパク質ファミリーメンバーも中和しない。IgG抗体MOR03207(100nMおよび33.3nMで評価した)は、陰性対照の役目をした。MOR03207は、ヒト生得的免疫系の一部である酵素を認識する。

【図5】TGF- β 2特異的AB MOR13436の生物学的「中和」活性を示す図である。組換えヒトTGF- β 2()、マウスTGF- β 2()およびヒトTGF- β 3()によるヒト骨格筋細胞(skMC)分化のAB対抗阻害の濃度-応答曲線を示す。細胞を最高120時間分化させ、クレアチンキナーゼ(CK)活性、確立された骨格筋細胞分化マーカー、を測定した。全てのTGF- β はCK活性を阻害し、AbはTGF- β 2に対抗するが、TGF- β 3応答に対抗しない。

【図6】TGF- β 2特異的AB(A)MOR14799、(B)MOR14800、(C)MOR14797および(D)MOR14809の生物学的「中和」活性を示す図である。組換えヒトTGF- β 2()、マウスTGF- β 2()およびヒトTGF- β 3()によるヒト骨格筋細胞(skMC)分化のAB対抗阻害の濃度-応答曲線を示す。細胞を最高120時間分化させ、クレアチンキナーゼ(CK)活性、確立された骨格筋細胞分化マーカー、を測定した。全てのTGF- β はCK活性を阻害し、AbはTGF- β 2に対抗するが、TGF- β 3応答に対抗しない。

【図7】TGF- β 2特異的AB MOR14797または汎TGF- β 抗体1D11と7日間培養されたデュピイトラン患者試料中のコラーゲンIタンパク質の免疫染色を数量化した棒グラフを示す図である。患者組織をスライスし、Abの存在下で7日間培養し、その後コラーゲンIのために免疫染色した。

【図8】アイソタイプ対照(A/C)と比較してTGF- β 2特異的AB MOR14797(B/D)と7日間培養された2つの異なるデュピイトラン患者試料中のコラーゲンIタンパク質の免疫染色を示す図である。患者1からの結果はA/Bに示し、患者2からのものはC/Dに示す。患者組織をスライスし、Abの存在下で7日間培養し、その後コラーゲンIのために免疫染色した。

【図9】TGF- β 2特異的AB MOR13436で処置した片側性尿道閉塞モデル(UUO)からのマウス腎臓中のコラーゲンIタンパク質のmRNA発現を数量化した棒グラフを示す図である。偽-またはUUO手術動物をAbで14日間処置し、腎臓を取り出し、mRNAを単離してqPCRによって分析した。

【図10】TGF- β 2に結合するMOR14797のエピトープ：(A)TGF- β 2ダイマーに結合する2つのMOR14797 Fabの全体的構造を示す図である。MOR14797は面で、TGF- β 2はリボンで示される。(B)MOR14797まで5以内の距離のTGF- β 2ダイマーの残基は、棒で示される。

【図11】TGF- β 2に結合するMOR14797のパラトープ：MOR14797

10

20

30

40

50

V_H(A)(それぞれ配列番号67および67、登場順)およびV_L(B)(それぞれ配列番号77および77、登場順)の配列を掲載した図である。CDRループ(KabataおよびChothiaの定義)は、四角で囲まれる。TGF-2ダイマーまで5以内の距離のMOR14797の残基は、灰色で陰影をつけられる。

【発明を実施するための形態】

【0011】

一般定義

本発明がより容易に理解されるように、特定の用語を先ず定義する。さらなる定義は、詳細な説明全体で示される。

【0012】

以下を含む：用語「含む(comprising)」は「含む(including)」を意味し、例えば、Xを「含む(comprising)」組成物は、Xのみからなってもよいし、または例えばX+Yのように追加のものを含んでもよい。

【0013】

用語「ヒトTGF- α アイソフォーム」は、トランスフォーミング増殖因子(TGF- α)スーパーファミリーのメンバー、すなわち、ヒトTGF- α アイソフォームTGF- α 1、TGF- α 2およびTGF- α 3をそれぞれ記載するために使用される。用語「ヒトTGF- α アイソフォームTGF- α 2」、「TGF- α 2アイソフォーム」、「TGF- α 2」および「TGF- α 2」およびTGF- α ベータ2は、本開示全体で同義的に使用される。

【0014】

本明細書で言及される用語「抗体」は、完全な抗体およびその任意の抗原結合性断片(すなわち、「抗原結合性部分」)またはその単鎖を含む。天然に存在する「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互接続される少なくとも2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含む糖タンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書でV_Hと略す)および重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2およびCH3で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書でV_Lと略す)および軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、C_Lで構成される。V_HおよびV_L領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれるより保存されている領域が間に散在する、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分化することができる。各V_HおよびV_Lは、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序で配列される3つのCDRおよび4つのFRで構成される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合性ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体系の第1構成要素(C1q)を含む、宿主の組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。

【0015】

本明細書で用いるように、「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体が実質的に含まれない抗体を指す(例えば、抗原結合性部分に特異的に結合する単離された抗体には、TGF-2以外の抗原に特異的に結合する抗体が実質的に含まれない)。

【0016】

本明細書で用いるように、用語「K_D」は、K_d対K_aの比(すなわちK_d/K_a)から得られ、モル濃度(M)で表される解離定数を指すものとする。抗体の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測定することができる。抗体のK_Dを測定する方法は、表面プラズモン共鳴、例えばBiacore(登録商標)のバイオセンサーシステム、または溶液平衡滴定(SET)である(Friguet B et al. (1985) J. Immunol Methods; 77(2): 305-319、およびHanel C et al. (2005) Anal Biochem; 339(1): 182-184を参照)。用語「K_{assoc}」または「K_a」は、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度を指すものであり、用語「K_{dissoc}」または「K_d」は、本明細書で用いるように特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を指すものである。

10

20

30

40

50

【0017】

明細書全体で、10の倍率表記に対して様々な科学的表記が使用される。10の倍率表記に代わるものとして、科学的E表記（例えば、 1.1×10^{-15} ）が使用される。例えば、 0.000000001 モルは、 3.0×10^{-9} モルとして、または 3.0×10^{-9} モルとして表記できる。

【0018】

本明細書で用いるように、用語「ADCC」または「抗体依存性細胞傷害」活性は、ヒトB細胞消耗活性を指す。ADCC活性は、当技術分野で公知のヒトB細胞消耗アッセイによって測定することができる。

【0019】

本明細書で用いる用語「ヒト抗体」は、フレームワークおよびCDRの両領域がヒト起源の配列に由来する可変領域を有する抗体を含むものである。さらに、抗体が定常領域を含有する場合は、定常領域もそのようなヒト配列、例えばヒト生殖細胞系配列、またはヒト生殖細胞系配列の突然変異版、またはヒトフレームワーク配列分析から導かれるコンセンサスフレームワーク配列を含有する抗体に由来し、これは、例えば、Knappik, et al. (2000. J Mol Biol 296, 57-86)に記載されている。本発明のヒト抗体は、ヒト配列によってコードされないアミノ酸残基を含むことができる（例えば、*in vitro*でのランダムもしくは部位特異的突然変異誘発、または*in vivo*での体細胞突然変異によって導入される突然変異；またはヒト化抗体）。

【0020】

用語「ヒトモノクローナル抗体」は、フレームワークとCDR領域の両方がヒト配列に由来する可変領域を有する、単一の結合特異性を提示する抗体を指す。一実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞と融合されている、ヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、ヒト以外のトランスジェニック動物、例えばトランスジェニックマウスから得られるB細胞を含むハイブリドーマによって生成される。

【0021】

本明細書で用いるように、用語「組換えヒト抗体」は、組換え手段によって調製、発現、作製または単離された全てのヒト抗体、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックもしくはトランスクロモソーム型である動物（例えば、マウス）から単離された抗体、またはそれから調製されるハイブリドーマ、ヒト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、組換え型のコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、およびヒト免疫グロブリン遺伝子配列の全体または一部の他のDNA配列へのスプライシングを含む任意の他の手段によって調製、発現、作製または単離された抗体を含む。そのような組換えヒト抗体は、フレームワークおよびCDR領域がヒト生殖細胞系の免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。しかし、ある特定の実施形態では、そのような組換えヒト抗体は、*in vitro*突然変異誘発（または、ヒトIg配列にトランスジェニックである動物が使用される場合は*in vivo*体細胞突然変異誘発）にかけることができ、したがって、組換え抗体のV_HおよびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系のV_HおよびV_L配列に由来し、関係があるが、*in vivo*でヒト抗体生殖細胞系レパートリーの中に本来存在することができない配列である。

【0022】

本明細書で用いるように、「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によって提供される抗体クラス（例えば、IgM、IgE、IgG、例えばIgG1またはIgG2）を指す。

【0023】

本明細書で用いるように、用語「がん」は、組織病理タイプまたは侵襲性の段階にかかわらず、全てのタイプのがん性の増殖または腫瘍形成過程、転移組織または悪性形質転換細胞、組織もしくは器官を含むものである。がん性障害の例には、固形腫瘍、血液がん、軟組織腫瘍および転移性病変が限定されずに含まれる。固形腫瘍の例には、様々な器官

10

20

30

40

50

系の悪性腫瘍、例えば肉腫および癌腫（腺癌および扁平上皮細胞癌腫を含む）、例えば肝臓、肺、乳房、リンパ系、胃腸（例えば、結腸）、尿生殖器の管（例えば、腎臓、尿路上皮性細胞）、前立腺および咽頭を侵すものが含まれる。腺癌には、ほとんどの結腸がん、直腸がん、腎細胞腫、肝がん、肺の非小細胞癌、小腸のがんおよび食道のがんなどの悪性腫瘍が含まれる。扁平上皮細胞癌には、例えば、肺、食道、皮膚、頭頸部領域、口腔、肛門および頸部における悪性腫瘍が含まれる。一実施形態では、がんは、メラノーマ、例えば進行期のメラノーマである。前記のがんの転移性病変を、本発明の方法および組成物を使用して処置または予防することもできる。その増殖を本明細書に開示される抗体分子を使用して阻害することができる例示的ながんには、免疫療法に一般的に応答性であるがんが含まれる。処置が好ましいがんの非限定例には、メラノーマ（例えば、転移性悪性メラノーマ）、腎臓がん（例えば、明細胞癌）、前立腺がん（例えば、ホルモン抗療性の前立腺癌）、乳がん、結腸がんおよび肺がん（例えば、非小細胞肺がん）が含まれる。さらに、抗療性および再発性の悪性腫瘍を、本明細書に記載される抗体分子を使用して処置することができる。

10

【0024】

処置することができる他のがんの例には、骨がん、膵臓がん、皮膚がん、頭部または頸部のがん、皮膚または眼内の悪性メラノーマ、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門がん、胃食道、腹部のがん、脂肪肉腫、精巣がん、子宮がん、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸管癌、膣癌、外陰部癌、メルケル細胞がん、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、食道がん、小腸がん、内分泌系のがん、甲状腺がん、副甲状腺がん、副腎腺のがん、軟組織の肉腫、尿道がん、ペニスのがん、慢性または急性白血病、例えば急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病、小児期の固形腫瘍、リンパ球性リンパ腫、膀胱がん、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、腎臓または尿管のがん、腎盤の癌腫、中枢神経系（CNS）の新生物、原発性CNSリンパ腫、腫瘍血管新生、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮がん、扁平上皮細胞がん、T細胞リンパ腫、アスベストによって誘発されるものを含む環境誘発がん（例えば、中皮腫）、および前記がんの組合せが含まれる。ある特定の実施形態では、がんは、皮膚がん、例えばメルケル細胞癌またはメラノーマである。一実施形態では、がんはメルケル細胞癌である。他の実施形態では、がんはメラノーマである。他の実施形態では、がんは、乳がん、例えば三重陰性乳がん（TNBC）またはHER2陰性乳がんである。他の実施形態では、がんは、腎臓がん、例えば、腎細胞癌（例えば、明細胞腎細胞癌（CCRC））または非明細胞腎細胞癌（nccRC）である。他の実施形態では、がんは、甲状腺がん、例えば未分化甲状腺癌（ATC）である。他の実施形態では、がんは、神経内分泌腫瘍（NET）、例えば、非定型的肺カルチノイド腫瘍または膵臓、胃腸（GI）管もしくは肺におけるNETである。ある特定の実施形態では、がんは、肺がん、例えば非小細胞肺がん（NSCLC）（例えば、扁平上皮NSCLCまたは非扁平上皮NSCLC）である。

20

30

【0025】

本明細書で用いるように、用語「プログラム死1」または「PD-1」は、例えば活性化CD4+およびCD8+T細胞、TregおよびB細胞の上で発現されるCD28/CTLA-4ファミリーメンバーに関する。それは、エフェクターT細胞のシグナル伝達および機能を負に調節する。PD-1は腫瘍浸潤性T細胞の上で誘導され、機能的消耗または機能不全をもたらすことができる（Keir et al. (2008) Annu. Rev. Immunol. 26:677-704; Pardoll et al. (2012) Nat Rev Cancer 12(4):252-64）。PD-1は、その2つのリガンド、プログラム死-リガンド1（PD-L1）またはプログラム死-リガンド2（PD-L2）のいずれかへの結合の後に、共阻害性シグナルを送達する。PD-L1は、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、マクロファージ、樹状細胞（DC）、B細胞、上皮細胞、血管内皮細胞ならびに多くの種類の腫瘍を含む、いくつかの細胞形で発現される。マウスおよびヒト腫瘍でのPD-L1の高い発現は、様々ながんにおける不良な臨床転帰にリンクされた（Keir et al. (2008) Annu. Rev. Immunol. 26:677-704; Pardoll et

40

50

t al. (2012) Nat Rev Cancer 12(4):252-64)。PD-L2は、樹状細胞、マクロファージおよび一部の腫瘍で発現される。PD-1経路の遮断は、がん免疫療法のために前臨床的および臨床的に検証された。前臨床および臨床研究は、抗PD-1遮断がエフェクターT細胞の活性を回復することができ、強健な抗腫瘍応答をもたらすことを実証した。例えば、PD-1経路の遮断は、消耗した/機能不全のエフェクターT細胞機能(例えば、増殖、IFN-分泌または細胞溶解機能)を回復することができ、および/またはTreg細胞機能を阻害することができる(Keir et al. (2008) Annu. Rev. Immunol. 26:677-704; Pardoll et al. (2012) Nat Rev Cancer 12(4):252-64)。PD-1経路の遮断は、PD-1、PD-L1および/またはPD-L2の抗体、その抗原結合性断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質またはオリゴペプチドで実行することができる。PD-1、例えばヒトPD-1のアミノ酸配列は、当技術分野で公知である、例えば、Shinohara T et al. (1994) Genomics 23(3):704-6; Finger LR, et al. Gene (1997) 197(1-2):177-87

10

【0026】

本発明の様々な定義および態様は、以下のサブセクションでさらに詳細に提供/記載される。

【0027】

発明の詳細な説明

ヒトモノクローナル抗体による異なる機能と関連するいくつかの高度に相同的な標的の1つの特異的中和は、主要な課題のままである。この課題は、他の相同的標的との交差反応性を有害なまたは望ましくない事象と関連付けることができる場合、治療場面でより明白である。相同的アイソフォームTGF-1およびTGF-3の存在のために、ヒトモノクローナル抗体でTGF-2を標的にするときこれらの問題が生じることがある。これらのTGF-アイソフォームは、ノックアウトマウスからの実験データによると異なる機能と関連する。さらに、TGF-1の阻害は、有害事象の高いリスクと関連することが知られている。さらに、本明細書では、発明者は、動物モデルにおいてTGF-3およびTGF-2の同時阻害が弁膜症、心臓弁の重大な障害と関連するとの認識されていない問題を開示する。これは、TGF-2を特異的に中和するが、TGF-3を、またはTGF-3およびTGF-1を中和しないモノクローナル治療抗体を提供する、これまで未解決の必要性を発生させる。より具体的には、臨床場面で有効になるために、非常に低いピコモルの解離定数を示す中和抗TGF-2抗体の必要性がある。さらに、有害事象と関連する可能性のある他の経路に対する干渉を引き起こしそくないより低い用量でそれらを投与する必要があるため、高い結合親和性を有する中和抗TGF-2抗体は、強化された効力および安全性と関連する。さらに、モノクローナル抗TGF-2抗体のより低い用量の投与は、より低い費用とも関連する。これらの問題は、本発明によって解決される。

20

30

【0028】

TGF-ベータ1/2/3アイソフォームの中和は、Smad依存性リポーター遺伝子アッセイで測定される。用語「中和抗体」および「アンタゴニスト抗体」は同義的に使用され、Smad依存性リポーター遺伝子アッセイにおいてTGF-1、-2および/または-3誘導シグナル伝達活性を100nM以下のIC50で阻害する抗体を指すものである。本発明との関連で使用される、「ヒトTGF-アイソフォームTGF-2を中和し、ヒトアイソフォームTGF-3を中和しないヒトモノクローナル抗TGF-2抗体またはその機能的断片」、または「TGF-2を特異的に中和するが、TGF-3またはTGF-1(または、TGF-3およびTGF-1の両方)を中和しない」というフレーズは、Smad依存性リポーター遺伝子アッセイによって測定される場合、150pM未満の最大半減抑制濃度(IC50)でTGF-2を特異的に中和するが、ヒトTGF-1および/またはTGF-3を中和しないヒトモノクローナル抗体を指す(例えば、ヒトTGF-1および/またはTGF-3に関して100nMを超えるIC50を有する)。その結果として、本開示のヒトTGF-2中和抗体は、Smad

40

50

d 依存性リポーター遺伝子アッセイによって測定される場合、例えば 107 pM 未満の最大半減抑制濃度 (IC50) でヒト TGF- β 2 を中和し、100 nM を超える最大半減抑制濃度 (IC50) でヒト TGF- β 1 および / または TGF- β 3 を中和する。一実施形態では、本開示のヒト TGF- β 2 中和抗体は、例えば 107 pM 未満の最大半減抑制濃度 (IC50) でヒト TGF- β 2 を中和し、ヒト TGF- β 1 および / または TGF- β 3 を中和しないが、その理由は、前記抗体が Smad 依存性リポーター遺伝子アッセイにおいてこれらのタンパク質に対して事実上検出不能な結合しか示さないからである。

【0029】

本明細書で用いるように、用語「保存的配列改変」は、そのアミノ酸配列を含有する抗体の結合特性に有意に影響を及ぼさないか変化させないアミノ酸改変を指すものである。そのような保存的改変には、アミノ酸の置換、付加および欠失が含まれる。部位特異的突然変異誘発および PCR 媒介突然変異誘発などの当技術分野で公知の標準技術によって、改変を本発明の抗体に導入することができる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で規定されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖 (例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、無電荷極性側鎖 (例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、無極性側鎖 (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)、 β 分枝状側鎖 (例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族側鎖 (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) を有するアミノ酸が含まれる。したがって、本発明の抗体の CDR 領域中の 1 つまたは複数のアミノ酸残基を同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基で置き換えることができ、変更された抗体は、本明細書に記載される機能アッセイを使用して保持された機能について試験することができる。

【0030】

「交差反応する」抗体は、1 つを超える抗原に結合する抗体を指し、前記結合は、前記抗原の活性の操作 (中和、低減または活性化) をもたらしすることができるが、必ずしもそうしなければならないとは限らない。交差反応性は、Smad 依存性リポーター遺伝子アッセイを使用して、および、表面プラズモン共鳴バイオセンサーシステム、例えば Biacore (登録商標) システムまたは溶液平衡滴定を使用して測定することができる K_D を測定することによって、測定することができる。

【0031】

「ヒト TGF- β アイソフォーム TGF- β 2 に結合し、ヒトアイソフォーム TGF- β 3 もしくは TGF- β 1、または TGF- β 3 および TGF- β 1 に結合 (交差反応) しないヒトモノクローナル抗 TGF- β 2 抗体またはその機能的断片」は、約 1 pM 以下の K_D で TGF- β 2 に、および約 2×10^{-9} M、または約 5×10^{-9} M または約 10×10^{-9} M またはそれより高い K_D で TGF- β 1 または TGF- β 3 に結合する抗体を指すものでもある。ある特定の実施形態では、TGF- β 3 および TGF- β 1 抗原と交差反応しないそのような抗体は、実際には標準の結合アッセイにおいてこれらのタンパク質に対して事実上検出不能な結合を示す。

【0032】

様々な種の TGF- β 2 への抗体の結合能力を評価する標準のアッセイは、例えば ELISA、ウエスタンブロットおよびラジオイムノアッセイ (RIA) を含め、当技術分野で公知である。適するアッセイは、実施例のセクションにおいて詳細に記載される。抗体の結合親和性は、当技術分野で公知の標準アッセイによって、例えば表面プラズモン共鳴 (例えば、Biacore (登録商標) システム分析) または溶液平衡滴定によって調査することもできる。Biacore (登録商標) システムなどの表面プラズモン共鳴に基づく技術は、結合親和性の計算を可能にする結合動態を測定することができる。TGF- β

10

20

30

40

50

2の機能特性に及ぼす抗体の効果を評価するアッセイは、実施例のセクションにおいてさらに詳細に記載される。

【0033】

本発明は、ヒトモノクローナル抗TGF-2抗体またはその機能的断片を提供する。より詳細には、それは、ヒトTGF-アイソフォームTGF-2(配列番号122)(UniProt ID: P61812-TGFB2_HUMAN (<http://www.uniprot.org/>); HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)に承認された遺伝子記号= TGFB2; HGNC ID= HGNC: 11768)を中和し、ヒトアイソフォームTGF-3(配列番号123)(UniProt ID: P10600-TGFB3_HUMAN; 遺伝子記号HGNC= TGFB3; HGNC ID= HGNC: 11769)を中和しないヒトモノクローナル抗TGF-2抗体またはその機能的断片を提供する。特に、本発明は、ヒトTGF-アイソフォームTGF-2を中和し、ヒトアイソフォームTGF-3およびTGF-1(配列番号121)(UniProt ID: P01137-TGFB1_HUMAN; 遺伝子記号HGNC= TGFB1; HGNC ID= HGNC: 11766)を中和しない、ヒトモノクローナル抗TGF-2抗体またはその機能的断片を提供する。抗体またはその機能的断片によるTGF-1、TGF-2またはTGF-3の中和は、実施例のセクションに記載されるSmad依存性リポーター遺伝子アッセイによって測定される。好ましくは、本発明によって提供される抗体またはその機能的断片は、Smad依存性リポーター遺伝子アッセイによって測定される場合、ヒトTGF-2を150 pM未満、または107 pM未満、または100 pM未満、または95 pM未満、または80 pM未満、または30 pM未満、または20 pM未満、または10 pM未満、の最大半減抑制濃度(IC50)で中和し、ヒトTGF-1またはTGF-3(100 nMを超えるIC50を有する)を中和しない。本開示の別の実施形態では、抗体またはその機能的断片は、Smad依存性リポーター遺伝子アッセイによって測定される場合、ヒトTGF-2を、約1 pMから約150 pMの間、または約1 pMから約107 pMの間、または約1 pMから約95 pMの間、または約1 pMから約80 pMの間の最大半減抑制濃度(IC50)で中和し、ヒトTGF-1またはTGF-3(100 nMを超えるIC50を有する)を中和しない。

10

20

【0034】

本発明は、ヒトアイソフォームTGF-1および/またはTGF-3より優先的にヒトTGF-アイソフォームTGF-2に結合する、ヒトモノクローナル抗TGF-2抗体またはその機能的断片も提供する。特に、提供されるヒトモノクローナル抗TGF-2抗体またはその機能的断片は、ヒトTGF-アイソフォームTGF-2に、TGF-3に関するその解離定数の少なくとも約70分の1、約1000分の1、約2000分の1、約10000分の1、約20000分の1、約200000分の1、約300000分の1、約1000000分の1または約6000000分の1の解離定数で結合し、抗体またはその機能的断片はヒトTGF-2を中和するがTGF-3を中和しない。

30

【0035】

一実施形態では、ヒトTGF-2に関する提供される抗体の解離定数は、TGF-1またはTGF-3に関するその解離定数の約2000分の1から約1000000分の1である。別の実施形態では、ヒトモノクローナル抗TGF-2抗体またはその機能的断片は、ヒトTGF-アイソフォームTGF-2に、TGF-3に関するその解離定数の少なくとも2000分の1または少なくとも1000000分の1の解離定数で結合し、抗体はヒトTGF-2を中和するがTGF-3を中和しない。抗体の結合親和性は、本明細書に開示される標準アッセイによって、例えば表面プラズモン共鳴(例えば、Biacore(登録商標)システム分析)または溶液平衡滴定によって調査することもできる。ヒトアイソフォームTGF-1およびTGF-3より優先的にヒトTGF-2に結合する、ヒトモノクローナル抗TGF-2抗体またはその機能的断片は、

40

50

約 1 p M 以下、または約 1 0 0 f M 以下、または約 5 0 f M 以下の解離定数 (K_D) で T G F - 2 に結合する。別の実施形態では、開示される抗体または機能的断片は、1 p M 以下または約 1 p M から約 1 0 f M の解離定数 (K_D) でヒト T G F - アイソフォーム T G F - 2 に結合する。

【 0 0 3 6 】

別の実施形態では、ヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体またはその機能的断片は、ヒト T G F - アイソフォーム T G F - 3 に関するその解離定数の少なくとも 7 0 分の 1 の解離定数で、ヒト T G F - アイソフォーム T G F - 3 より優先的にヒト T G F - アイソフォーム T G F - 2 に結合し、抗体はヒト T G F - アイソフォーム T G F - 2 を中和するが、ヒト T G F - アイソフォーム T G F - 3 を中和せず、ヒト T G F - アイソフォーム T G F - 2 に 1 p M 以下の解離定数 (K_D) で結合する。

10

【 0 0 3 7 】

好ましい実施形態では、ヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体またはその機能的断片は、T G F - 1 および T G F - 3 に関するその解離定数の少なくとも 7 0 分の 1 の解離定数で、ヒト T G F - 1 および T G F - 3 より優先的にヒト T G F - 2 に結合し、抗体はヒト T G F - 2 を中和するが、T G F - 3 および T G F - 1 を中和せず、ヒト T G F - 2 に 1 p M 以下の解離定数 (K_D) で結合する。

【 0 0 3 8 】

抗 T G F - 2 抗体またはその抗原結合性断片は、本明細書に記載されるように、単鎖抗体、F a b 断片、F v 断片、F (a b ') 2 断片または s c F v 断片、および / または I g G アイソタイプであってもよい。

20

【 0 0 3 9 】

特異性および選択性に関して、先行技術抗体のいずれも本明細書に開示される抗体、特に、抗体 M O R 1 4 7 9 9、M O R 1 4 8 0 0、M O R 1 4 8 0 9、M O R 1 4 7 9 7、M O R 1 4 8 0 5 または M O R 1 4 7 8 7 に匹敵しない。本発明の抗体は、実施例に記載される通り、単離され、構造的に特徴付けられたヒト組換え抗体を含む。本発明の単離された抗体の V_H アミノ酸配列は、配列番号 7、27、47、67、87 および 107 にそれぞれ示す。本発明の単離された抗体の V_L アミノ酸配列は、配列番号 17、37、57、77、97 および 117 にそれぞれ示す。本発明の抗体の好ましい完全長重鎖アミノ酸配列の例は、配列番号 9、29、49、69、89 および 109 にそれぞれ示す。本発明の抗体の好ましい完全長軽鎖アミノ酸配列の例は、配列番号 19、39、59、79、99 および 119 にそれぞれ示す。本発明の他の抗体には、アミノ酸の欠失、挿入または置換によって突然変異されているが、上記の配列で表す完全長重鎖アミノ酸配列と少なくとも 80、90、95、97 または 99 パーセントの同一性をなお有する抗体が含まれる。さらに、可変重鎖ヌクレオチド配列を、配列番号 8、28、48、68、88 および 108 にそれぞれ示す。可変軽鎖ヌクレオチド配列は、配列番号 18、38、58、78、98 および 118 にそれぞれ示す。完全長軽鎖ヌクレオチド配列は、配列番号 20、40、60、80、100 および 120 にそれぞれ示す。完全長重鎖ヌクレオチド配列は、配列番号 10、30、50、70、90 および 110 に示す。本発明の他の抗体には、突然変異されているが、上記の配列と少なくとも 90 またはそれを超える (すなわち、91、92、93、94、95、97、99 またはそれを超える) パーセントの同一性をなお有する、アミノ酸または核酸が含まれる。一部の実施形態は、上記の配列で表す可変領域と比較した場合、可変領域で 1、2、3、4 または 5 個以下のアミノ酸がアミノ酸の欠失、挿入または置換によって突然変異されている突然変異アミノ酸配列を含む。これらの抗体の各々は同じ標的に結合するので、V_H、V_L、完全長軽鎖および完全長重鎖配列 (ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列) を「ミックスおよびマッチさせて」、本発明の他の抗 T G F - 2 抗体を作製することができる。そのような「ミックスおよびマッチさせた」抗体の T G F - 2 結合は、上記のおよび実施例の結合アッセイ (例えば、E L I S A) を使用して試験することができる。これらの鎖がミックスおよびマッチされるとき、特定の V_H / V_L 対合からの V_H 配列は、構造的に類似した V_H 配列で置き換えられると予想さ

30

40

50

れる。同様に、特定の完全長重鎖/完全長軽鎖対合からの完全長重鎖配列は、構造的に類似した完全長重鎖配列で置き換えられると予想される。同様に、特定の V_H/V_L 対合からの V_L 配列は、構造的に類似した V_L 配列で置き換えられると予想される。同様に、特定の完全長重鎖/完全長軽鎖対合からの完全長軽鎖配列は、構造的に類似した完全長軽鎖配列で置き換えられると予想される。したがって、一態様では、本発明は、配列番号7、27、47、67、87および107からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；ならびに配列番号17、37、57、77、97および117からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する、単離された組換え抗TGF- β 2抗体またはその抗原結合性領域を提供する。

【0040】

本明細書で用いるように、用語「相補性決定領域」および「CDR」は、抗原特異性および結合親和性に寄与する抗体可変領域中のアミノ酸の配列を指す。一般に、各重鎖可変領域には3つのCDR(HCDR1、HCDR2、HCDR3)が、および各軽鎖可変領域には3つのCDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)がある。所与のCDRのアミノ酸配列境界は、Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MDに記載されるもの(「Kabat」番号付けスキーム)を含む、いくつかの周知のスキームのいずれかを使用して決定することができる。CDR領域を決定する代替の方法は、Chothia (Chothia et al. 1989, Nature, 342:877-883)によって考案された方法を使用する。Chothiaの定義は、構造的ループ領域の位置に基づく。CDRを規定するための他のシステムが存在し、当業者に公知である(例えば、<http://www.bioinf.org.uk/abs/>を参照)。CDRは抗原の認識および結合を担い、したがって、抗原結合性領域を含有すると仮定されている。この開示との関連で、CDRはKabatおよびChothiaの番号付けシステムを使用して規定されている。Kabatシステムを使用して規定されるCDRは、「KabatのCDR」と指定される。Chothiaシステムを使用して規定されるCDRは、「ChothiaのCDR」と指定される。KabatおよびChothiaのシステムを使用して予測されるCDRは大部分重複するが、必ずしも同一であるとは限らない。したがって、抗体結合性領域は、KabatおよびChothiaのシステム(「Kabat/ChothiaのCDR」)によって予測されるCDRアミノ酸配列を併合することによって規定することもできる。抗原に実際に結合する一部のアミノ酸残基はCDRの外部にあり、その結果として、さらなる抗体結合性領域/アミノ酸またはパラトープ領域を規定するために、X線結晶学およびX線回折データを使用することもできることが知られている。

【0041】

用語「抗体結合性領域」、「抗体結合部位」および「パラトープ領域」は、この文書全体で同義的に使用され、抗体の軽鎖および重鎖両方の特異抗原と相互作用する可変領域の部分を指す。パラトープは、化学的相互作用(例えば、極性、非極性、水素結合/接触または塩橋)の確立によって抗原に結合する、抗体の可変領域に含まれるひと続きのアミノ酸または単独のアミノ酸からなる。CDR(例えば、Kabat/Chothiaシステムに基づいて予測される)は、抗体のKabat/Chothiaパラトープと総称される。この開示との関連で、パラトープは、抗体/抗原の結合/合併に關与する抗体のアミノ酸残基からなり、抗原まで5 Å以内の距離にあるアミノ酸が、抗体/抗原結合に關与すると考えられる。パラトープは、Kabat/Chothiaにより規定されるCDRアミノ酸、ならびに抗体/抗原の結合/合併に關与する、所与の抗体の可変軽鎖および/または重鎖領域のフレームワーク領域に含まれるアミノ酸を含むことができる。Kabat/Chothiaに基づくパラトープ予測の他に、X線結晶学/X線回折データを使用して所与の抗体の完全なパラトープを識別することができる。

【0042】

抗体との関連で使用されるとき、「その機能的断片」というフレーズは、抗原結合性領域(単鎖抗体、Fab断片、Fv断片、F(ab')₂断片および/またはscFv断片

10

20

30

40

50

)を含む、完全長抗体のタンパク質断片を指し、ここで、(i)前記断片は、抗原に特異的に結合する能力を保持するか、または、(ii)別の抗体(配列交換)または抗体様構造への前記機能的断片の移入/融合の後、抗原(例えば、TGF-2の一部)に特異的に結合する能力は保持される。抗体の「機能的断片」の例には、V_L、V_H、C_LおよびCH1ドメインからなる一価の断片であるFab断片;ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結される2つのFab断片を含む二価の断片であるF(ab)₂断片;V_HおよびCH1ドメインからなるFd断片;抗体の単一のアームのV_LおよびV_HドメインからなるFv断片;V_HドメインからなるdAb断片(Ward et al., 1989 Nature 341:544-546);ならびに単離された相補性決定領域(CDR)が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメイン、V_LおよびV_Hは別々の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え方法を使用して、V_LおよびV_H領域が対になって一価の分子を形成する単一のタンパク質鎖(単鎖Fv(scFv))として知られる;例えば、Bird et al., 1988 Science 242:423-426;およびHuston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883を参照)としてそれらが作製されることを可能にする合成リンカーによって連結することができる。そのような単鎖抗体も、抗体の「機能的断片」という用語の中に包含されるものである。これらの抗体断片は、当業者に公知である従来技術を使用して得られ、断片は元の抗体と同様に有用性についてスクリーニングされる。

10

【0043】

一態様では、本開示のヒトモノクローナル抗TGF-2抗体またはその機能的断片は、KabataまたはChothiaによって、またはKabataおよびChothiaによって規定される以下の相補性決定領域(CDR)を含む

20

(i)配列番号1~3、11~13、21~23、31~33、41~43、51~53、61~63、71~73、81~83、91~93、101~103もしくは111~113に列挙されるKabataのCDR、または

(ii)配列番号4~6、14~16、24~26、34~36、44~46、54~56、64~66、74~76、84~86、94~96、104~106もしくは114~116に列挙されるChothiaのCDR、または、

(iii)配列番号124~129に列挙されるKabata/ChothiaのCDR。

【0044】

本開示のヒトモノクローナル抗TGF-2抗体またはその機能的断片は、配列番号1、21、41、61、81、101または4、24、44、64、84、104または124~129からなる群から選択される配列に少なくとも80%、90%、95%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1;配列番号2、22、42、62、82、102または5、25、45、65、85、105からなる群から選択される配列に少なくとも70%、80%、90%、95%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2;配列番号3、23、43、63、83、103または6、26、46、66、86、106からなる群から選択される配列に少なくとも70%、80%、90%、95%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3;配列番号11、31、51、71、91、111または14、34、54、74、94、114からなる群から選択される配列に少なくとも70%、80%、90%、95%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1;配列番号12、32、52、72、92、112または15、35、55、75、95、115からなる群から選択される配列に少なくとも80%、90%、95%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2;配列番号13、33、53、73、93、113または16、36、56、76、96、116からなる群から選択される配列に少なくとも70%、80%、90%、95%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。

30

40

【0045】

本開示のヒトモノクローナル抗TGF-2抗体またはその機能的断片は、配列番号7

50

、 27、47、67、87または107の少なくとも1つに少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するVHポリペプチド配列を含む。

【0046】

本開示のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体またはその機能的断片は、配列番号17、37、57、77、97または117の少なくとも1つに少なくとも95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するVLポリペプチド配列を含む。

【0047】

本開示のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体またはその機能的断片は、配列番号7、27、47、67、87または107の少なくとも1つに少なくとも95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するVHポリペプチド配列、および配列番号17、37、57、77、97または117の少なくとも1つに少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するVLポリペプチド配列を含む。

【0048】

当業者は、2つのDNAまたはタンパク質配列の同一性を評価するために使用することができる方法を知っている。2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列のパーセント同一性を測定するために、配列を最適な比較目的のために整列させる（例えば、最適なアライメントのために第1および第2のアミノ酸または核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができ、非相同配列は比較目的のために無視することができる）。配列の比較および2つの配列間のパーセント同一性の測定は、数学アルゴリズムを使用して達成することができる。好ましい実施形態では、2つのアミノ酸配列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）中のGAPプログラムに組み込まれている、NeedlemanおよびWunsch（1970）*J. Mol. Biol.* 48:444-453）アルゴリズムを使用して、Blossum62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、ならびに16、14、12、10、8、6または4のギャップウェイトおよび1、2、3、4、5または6のレンジスウェイトを使用して測定される。さらに別の好ましい実施形態では、2つのヌクレオチド配列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）中のGAPプログラムを使用して、NWSgapdna.CMPマトリックスおよび40、50、60、70または80のギャップウェイトおよび1、2、3、4、5または6のレンジスウェイトを使用して測定される。パラメータの特に好ましいセット（特記しない限り使用されると予想されるもの）は、12のギャップペナルティ、4のギャップ伸長ペナルティおよび5のフレームシフトギャップペナルティによるBlossum62スコアリングマトリックスである。2つのアミノ酸またはヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれているE. MeyersおよびW. Miller（1989）*CABIOS*, 4: 11-17）のアルゴリズムを使用し、PAM120ウェイトレジデュ表、12のギャップ長ペナルティおよび4のギャップペナルティを使用して測定することができる。本明細書に記載される核酸およびタンパク質配列は、公開データベースで検索を実行するための「クエリー配列」として使用することができる。そのような検索は、Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10のNBLASTおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）を使用して実行することができる。本発明の核酸（配列番号1）分子に相同的なヌクレオチド配列を得るために、BLASTヌクレオチド検索をNBLASTプログラム、スコア=100、ワードレンジス=12で実行することができる。本発明のタンパク質分子に相同的なアミノ酸配列を得るために、BLASTタンパク質検索をXBLASTプログラム、スコア=50、ワードレンジス=3で実行することができる。比較目的のためにギャップがあるアライメントを得るために、Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402に記載されているようにGapped BLASTを利用することができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST

10

20

30

40

50

)のデフォルトパラメータを使用することができる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照。

【0049】

本開示のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体またはその機能的断片は、配列番号1、21、41、61、81、101または4、24、44、64、84、104または124~129からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号2、22、42、62、82、102または5、25、45、65、85、105からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号3、23、43、63、83、103または6、26、46、66、86、106からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号11、31、51、71、91、111または14、34、54、74、94、114からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号12、32、52、72、92、112または15、35、55、75、95、115からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；配列番号13、33、53、73、93、113または16、36、56、76、96、116からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。

10

【0050】

これらの抗体の各々はTGF- β 2に結合することができるので、V_H CDR1、2および3の配列、ならびにV_L CDR1、2および3の配列を「ミックスおよびマッチさせる」ことができる。そのような「ミックスおよびマッチさせた」抗体のTGF- β 2結合は、上記のおよび実施例の結合アッセイ（例えば、ELISA）を使用して試験することができる。V_H CDR配列をミックスおよびマッチさせるとき、特定のV_H配列からのCDR1、CDR2および/またはCDR3配列は、構造的に類似したCDR配列で置き換えると予想される。同様に、V_L CDR配列をミックスおよびマッチさせるとき、特定のV_L配列からのCDR1、CDR2および/またはCDR3配列は、構造的に類似したCDR配列で置き換えると予想される。1つまたは複数のV_Hおよび/またはV_L

20

CDR領域の配列を、本発明のモノクローナル抗体について本明細書に示すCDR配列からの構造的に類似した配列で置換することによって、新規のV_HおよびV_L配列を作製することができることは、当業技術者に容易に明白になる。

【0051】

本発明のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体またはその機能的断片は、(A)配列番号1の重鎖可変領域CDR1；配列番号2の重鎖可変領域CDR2；配列番号3の重鎖可変領域CDR3；配列番号11の軽鎖可変領域CDR1；配列番号12の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号13の軽鎖可変領域CDR3を含む。

30

【0052】

別の実施形態では、上記の(A)の抗体は、配列番号124の重鎖可変領域CDR1を含む。

【0053】

本発明のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体またはその機能的断片は、(B)配列番号4の重鎖可変領域CDR1；配列番号5の重鎖可変領域CDR2；配列番号6の重鎖可変領域CDR3；配列番号14の軽鎖可変領域CDR1；配列番号15の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号16の軽鎖可変領域CDR3を含む。

40

【0054】

別の実施形態では、上記の(B)の抗体は、配列番号124の重鎖可変領域CDR1を含む。

【0055】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体は、(C)：配列番号1、2および3のCDRを含む可変重鎖、ならびに配列番号11、12および13のCDRを含む可変軽鎖からなり、前記抗体の可変重鎖および可変軽鎖フレームワーク領域は、配列番号7の可変重鎖(V_H)配列のフレームワーク領域および配列番号17の可変軽

50

鎖（V L）配列のフレームワーク領域に少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性をそれぞれ有する。

【0056】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体は、（D）：配列番号4、5および6のCDRを含む可変重鎖、ならびに配列番号14、15および16のCDRを含む可変軽鎖からなり、前記抗体の可変重鎖および可変軽鎖フレームワーク領域は、配列番号7の可変重鎖（V H）配列のフレームワーク領域および配列番号17の可変軽鎖（V L）配列のフレームワーク領域に少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性をそれぞれ有する。

【0057】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体は、（E）：配列番号61、62および63のCDRを含む可変重鎖、ならびに配列番号71、72および73のCDRを含む可変軽鎖からなり、前記抗体の可変重鎖および可変軽鎖フレームワーク領域は、配列番号67の重鎖配列（V H）のフレームワーク領域および配列番号77の軽鎖配列（V L）のフレームワーク領域に少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性をそれぞれ有する。

【0058】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体またはその機能的断片は、（F）配列番号61の重鎖可変領域CDR1；配列番号62の重鎖可変領域CDR2；配列番号63の重鎖可変領域CDR3；配列番号71の軽鎖可変領域CDR1；配列番号72の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号73の軽鎖可変領域CDR3を含む。別の実施形態では、上記の抗体（F）は、配列番号127の重鎖可変領域CDR1を含む。

【0059】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体またはその機能的断片は、（F2）配列番号61の重鎖可変ドメインCDR1；配列番号62の重鎖可変ドメインCDR2；配列番号63の重鎖可変ドメインCDR3；配列番号71の軽鎖可変ドメインCDR1；配列番号72の軽鎖可変ドメインCDR2；および配列番号73の軽鎖可変ドメインCDR3を含み、前記抗体の重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインフレームワーク領域は、配列番号67の重鎖可変ドメイン（V H）および配列番号77の軽鎖可変ドメイン（V L）のフレームワーク領域に少なくとも95%の配列同一性をそれぞれ有する。別の実施形態では、上記の抗体（F2）は、配列番号127の重鎖可変ドメインCDR1を含む。

【0060】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体またはその機能的断片は、（G）：（i）配列番号61、62および63のCDR、ならびに（ii）1位のアミノ酸Qおよび99位のアミノ酸Rを含む重鎖可変ドメイン；ならびに（iii）配列番号71、72および73のCDR、ならびに（iv）49位のアミノ酸Fを含む軽鎖可変ドメインを含み、前記抗体の重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインフレームワーク領域は、配列番号67の重鎖可変ドメイン配列（V H）および配列番号77の軽鎖可変ドメイン配列（V L）のフレームワーク領域に少なくとも95%の配列同一性をそれぞれ有し、（ii）および（iv）に指摘されるアミノ酸の位置は、配列番号67および77の1位、99位および49位にそれぞれ対応する。

【0061】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体またはその機能的断片は、（H）配列番号64の重鎖可変領域CDR1；配列番号65の重鎖可変領域CDR2；配列番号66の重鎖可変領域CDR3；配列番号74の軽鎖可変領域CDR1；配列番号75の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号76の軽鎖可変領域CDR3を含む。別の実施形態では、上記の抗体（H）は、配列番号127の重鎖可変領域CDR1を含む。

10

20

30

40

50

【0062】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体またはその機能的断片は、(H1)配列番号64の重鎖可変ドメインCDR1；配列番号65の重鎖可変ドメインCDR2；配列番号66の重鎖可変ドメインCDR3；配列番号74の軽鎖可変ドメインCDR1；配列番号75の軽鎖可変ドメインCDR2；および配列番号76の軽鎖可変ドメインCDR3を含み、前記抗体の重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインフレームワーク領域は、配列番号67の重鎖可変ドメイン(VH)および配列番号77の軽鎖可変ドメイン(VL)のフレームワーク領域に少なくとも95%の配列同一性をそれぞれ有する。別の実施形態では、上記の抗体(H1)は、配列番号127の重鎖可変ドメインCDR1を含む。

10

【0063】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体またはその機能的断片は、(H2)：(i)配列番号64、65および66のCDR、ならびに(ii)1位のアミノ酸Qおよび99位のアミノ酸Rを含む重鎖可変ドメイン；ならびに(iii)配列番号74、75および76のCDR、ならびに(iv)49位のアミノ酸Fを含む軽鎖可変ドメインを含み、前記抗体の重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインフレームワーク領域は、配列番号67の重鎖可変ドメイン(VH)および配列番号77の軽鎖可変ドメイン(VL)のフレームワーク領域に少なくとも95%の配列同一性をそれぞれ有し、(ii)および(iv)に指摘されるアミノ酸の位置は、配列番号67および77の1位、99位および49位にそれぞれ対応する。

20

【0064】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体またはその機能的断片は、(I)：以下のアミノ酸：(i)1位のQ、31位のT、32位のS、34位のM、55位のW、56位のN、58位のD、99位のR、101位のF、102位および103位のY、104位のS、106位のYおよび108位のD、を含む重鎖可変ドメイン、ならびに以下のアミノ酸：(ii)32位のY、49位のF、53位のS、54位のL、55位のQ、56位のS、91位のT、92位のNおよび93位のT、を含む軽鎖可変ドメインを含み、前記抗体の重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインフレームワーク領域は、配列番号67の重鎖可変ドメイン(VH)および配列番号77の軽鎖可変ドメイン(VL)のフレームワーク領域に少なくとも95%の配列同一性をそれぞれ有し、(i)および(ii)で指摘するアミノ酸の位置は、配列番号67の位置1、31、32、34、55、56、58、99、101、102、103、104、106および108に、ならびに配列番号77の位置32、49、53、54、55、56、91、92および93にそれぞれ対応する。

30

【0065】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗TGF- β 2抗体またはその機能的断片は、(I1)：(i)TGF- β 2ダイマーに結合するとき、前記抗原まで5以内の距離にある位置1、31、32、34、55、56、58、99、101~104、106および108のアミノ酸を含む重鎖可変ドメイン、ならびに(ii)TGF- β 2ダイマーに結合するとき、抗原まで5以内の距離にある位置32、49、53~56および91~93のアミノ酸を含む軽鎖可変ドメインを含み、(i)および(ii)で指摘するアミノ酸の位置は、配列番号67の位置1、31、32、34、55、56、58、99、101~104、106および108に、ならびに配列番号77の位置32、49、53~56、91、92および93にそれぞれ対応する。

40

【0066】

別の実施形態では、上記の抗体(I2)またはその機能的断片は、重鎖可変ドメインの位置1、31、32、34、55、56、58、99、101~104、106および108に、配列番号67の重鎖可変ドメインタンパク質の同じ位置にあるそれらと同じアミノ酸を含み、軽鎖可変ドメインの位置32、49、53~56および91~93に、配列番号77の軽鎖可変ドメインタンパク質の同じ位置にあるそれらと同じアミノ酸を含む。

50

【 0 0 6 7 】

別の実施形態では、上記の抗体（I 3）またはその機能的断片は、重鎖可変ドメインの位置 1、31、32、34、55、56、58、99、101～104、106 および 108 に、配列番号 67 の重鎖可変ドメインタンパク質の同じ位置にあるアミノ酸と類似した側鎖を有するアミノ酸を含み、重鎖可変ドメインの位置 32、49、53～56 および 91～93 に、配列番号 77 の重鎖可変ドメインタンパク質の同じ位置にあるアミノ酸と類似した側鎖を有するアミノ酸を含む。

【 0 0 6 8 】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗 TGF- β 2 抗体またはその機能的断片は、（I 4）：以下のアミノ酸：TGF- β 2 ダイマーに結合するとき、抗原まで 5 以内の距離にある、1 位の Q、31 位の T、32 位の S、34 位の M、55 位の W、56 位の N、58 位の D、99 位の R、101 位の F、102 位および 103 位の Y、104 位の S、106 位の Y および 108 位の D、を含む重鎖可変ドメイン、ならびに以下のアミノ酸：TGF- β 2 ダイマーに結合するとき、抗原まで 5 以内の距離にある、32 位の Y、49 位の F、53 位の S、54 位の L、55 位の Q、56 位の S、91 位の T、92 位の N および 93 位の T、を含む軽鎖可変ドメインを含み、前記抗体の重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインフレームワーク領域は、配列番号 67 の重鎖可変ドメイン（VH）および配列番号 77 の軽鎖可変ドメイン（VL）のフレームワーク領域に少なくとも 95% の配列同一性をそれぞれ有する。

【 0 0 6 9 】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗 TGF- β 2 抗体またはその機能的断片は、（J）配列番号 21 の重鎖可変領域 CDR1；配列番号 22 の重鎖可変領域 CDR2；配列番号 23 の重鎖可変領域 CDR3；配列番号 31 の軽鎖可変領域 CDR1；配列番号 32 の軽鎖可変領域 CDR2；および配列番号 33 の軽鎖可変領域 CDR3 を含む。別の実施形態では、上記の抗体（J）は、配列番号 125 の重鎖可変領域 CDR1 を含む。

【 0 0 7 0 】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗 TGF- β 2 抗体は、（K）：配列番号 21、22 および 23 の CDR を含む可変重鎖、ならびに配列番号 31、32 および 33 の CDR を含む可変軽鎖からなり、前記抗体の可変重鎖および可変軽鎖フレームワーク領域は、配列番号 29 の重鎖配列（VH）のフレームワーク領域および配列番号 39 の軽鎖配列（VL）のフレームワーク領域に少なくとも 95%、96%、97%、98% または 99% の配列同一性をそれぞれ有する。

【 0 0 7 1 】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗 TGF- β 2 抗体またはその機能的断片は、（L）配列番号 21 の重鎖可変領域 CDR1；配列番号 22 の重鎖可変領域 CDR2；配列番号 23 の重鎖可変領域 CDR3；配列番号 31 の軽鎖可変領域 CDR1；配列番号 32 の軽鎖可変領域 CDR2；および配列番号 33 の軽鎖可変領域 CDR3；および配列番号 131 および 132 のフレームワークパラトープ領域を含む。別の実施形態では、上記の抗体（L）は、配列番号 125 の重鎖可変領域 CDR1 を含む。

【 0 0 7 2 】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗 TGF- β 2 抗体またはその機能的断片は、（M）配列番号 24 の重鎖可変領域 CDR1；配列番号 25 の重鎖可変領域 CDR2；配列番号 26 の重鎖可変領域 CDR3；配列番号 34 の軽鎖可変領域 CDR1；配列番号 35 の軽鎖可変領域 CDR2；および配列番号 36 の軽鎖可変領域 CDR3 を含む。別の実施形態では、上記の抗体（M）は、配列番号 125 の重鎖可変領域 CDR1 を含む。

【 0 0 7 3 】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗 TGF- β 2 抗体またはその機能的断片は、（N）配列番号 24 の重鎖可変領域 CDR1；配列番号 25 の重鎖可変領域 CDR

10

20

30

40

50

2 ; 配列番号 2 6 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号 3 4 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 3 5 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号 3 6 の軽鎖可変領域 C D R 3 ; および配列番号 1 3 1 および 1 3 2 のパラトープ領域を含む。別の実施形態では、上記の抗体 (N) は、配列番号 1 2 5 の重鎖可変領域 C D R 1 を含む。

【 0 0 7 4 】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体またはその機能的断片は、(O) 配列番号 4 1 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 4 2 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号 4 3 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号 5 1 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 5 2 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号 5 3 の軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。別の実施形態では、上記の抗体 (O) は、配列番号 1 2 6 の重鎖可変領域 C D R 1 を含む。

10

【 0 0 7 5 】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体は、(P) : 配列番号 4 1、4 2 および 4 3 の C D R を含む可変重鎖、ならびに配列番号 5 1、5 2 および 5 3 の C D R を含む可変軽鎖からなり、前記抗体の可変重鎖および可変軽鎖フレームワーク領域は、配列番号 4 7 の重鎖配列 (V H) のフレームワーク領域および配列番号 5 7 の軽鎖配列 (V L) のフレームワーク領域に少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % の配列同一性をそれぞれ有する。

【 0 0 7 6 】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体またはその機能的断片は、(Q) 配列番号 4 4 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 4 5 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号 4 6 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号 5 4 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 5 5 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号 5 6 の軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。別の実施形態では、上記の抗体 (Q) は、配列番号 1 2 6 の重鎖可変領域 C D R 1 を含む。

20

【 0 0 7 7 】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体またはその機能的断片は、(R) 配列番号 8 1 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 8 2 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号 8 3 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号 9 1 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 9 2 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号 9 3 の軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。別の実施形態では、上記の抗体 (R) は、配列番号 1 2 8 の重鎖可変領域 C D R 1 を含む。

30

【 0 0 7 8 】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体は、(S) : 配列番号 8 1、8 2 および 8 3 の C D R を含む可変重鎖、ならびに配列番号 9 1、9 2 および 9 3 の C D R を含む可変軽鎖からなり、前記抗体の可変重鎖および可変軽鎖フレームワーク領域は、配列番号 8 7 の重鎖配列 (V H) のフレームワーク領域および配列番号 9 7 の軽鎖配列 (V L) のフレームワーク領域に少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % の配列同一性をそれぞれ有する。

【 0 0 7 9 】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体またはその機能的断片は、(T) 配列番号 8 4 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 8 5 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号 8 6 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号 9 4 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 9 5 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号 9 6 の軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。別の実施形態では、上記の抗体 (T) は、配列番号 1 2 8 の重鎖可変領域 C D R 1 を含む。

40

【 0 0 8 0 】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体またはその機能的断片は、(U) 配列番号 1 0 1 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 1 0 2 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号 1 0 3 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号 1 1 1 の軽鎖可変領域 C D R

50

1 ; 配列番号 1 1 2 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号 1 1 3 の軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。別の実施形態では、上記の抗体 (U) は、配列番号 1 2 9 の重鎖可変領域 C D R 1 を含む。

【 0 0 8 1 】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体は、(V) : 配列番号 1 0 1、1 0 2 および 1 0 3 の C D R を含む可変重鎖、ならびに配列番号 1 1 1、1 1 2 および 1 1 3 の C D R を含む可変軽鎖からなり、前記抗体の可変重鎖および可変軽鎖フレームワーク領域は、配列番号 1 0 7 の重鎖配列 (V H) のフレームワーク領域および配列番号 1 1 7 の軽鎖配列 (V L) のフレームワーク領域に少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % の配列同一性をそれぞれ有する。

10

【 0 0 8 2 】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体またはその機能的断片は、(W) 配列番号 1 0 4 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 1 0 5 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号 1 0 6 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号 1 1 4 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 1 1 5 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号 1 1 6 の軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。別の実施形態では、上記の抗体 (W) は、配列番号 1 2 9 の重鎖可変領域 C D R 1 を含む。

【 0 0 8 3 】

別の好ましい実施形態では、上記のヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体 (A) ~ (W) またはその機能的断片は、T G F - 1 または T G F - 3 に関するその解離定数の少なくとも 2 0 0 0 分の 1 の解離定数で、ヒト T G F - 1 および T G F - 3 より優先的にヒト T G F - 2 に結合し、抗体はヒト T G F - 2 を中和するが、T G F - 3 を中和せず、ヒト T G F - 2 に 1 p M 以下の解離定数 (K_D) で結合する。別の実施形態では、本開示のヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体は、配列番号 9、2 9、4 9、6 9、8 9 および 1 0 9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列に少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を有する完全長重鎖アミノ酸配列を含む。

20

【 0 0 8 4 】

一実施形態では、本開示のヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体は、配列番号 1 9、3 9、5 9、7 9、9 9 および 1 1 9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列に少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を有する完全長軽鎖アミノ酸配列を含む。

30

【 0 0 8 5 】

一実施形態では、本開示のヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体は、配列番号 9、2 9、4 9、6 9、8 9 および 1 0 9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列に少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を有する完全長重鎖アミノ酸配列、および、配列番号 1 9、3 9、5 9、7 9、9 9 および 1 1 9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列に少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を有する完全長軽鎖アミノ酸配列を含む。

40

【 0 0 8 6 】

一態様では、本発明は、
(a) 配列番号 7 の可変重鎖配列および配列番号 1 7 の可変軽鎖配列 ; (b) 配列番号 2 7 の可変重鎖配列および配列番号 3 7 の可変軽鎖配列 ; (c) 配列番号 4 7 の可変重鎖配列および配列番号 5 7 の可変軽鎖配列 ; (d) 配列番号 6 7 の可変重鎖配列および配列番号 7 7 の可変軽鎖配列 ; (e) 配列番号 8 7 の可変重鎖配列および配列番号 9 7 の可変軽鎖配列 ; または (f) 配列番号 1 0 7 の可変重鎖配列および配列番号 1 1 7 の可変軽鎖配列を含む、ヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体またはその機能的断片をさらに提供する。

【 0 0 8 7 】

別の実施形態では、ヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体またはその機能的断片は、

50

TGF-1またはTGF-3に関するその解離定数の少なくとも2000分の1の解離定数で、ヒトTGF-1およびTGF-3より優先的にヒトTGF-2に結合し、抗体はヒトTGF-2を中和するが、TGF-3を中和せず、ヒトTGF-2に1 pM以下の解離定数(K_D)で結合し、抗体またはその機能的断片は：(a)配列番号7の変重鎖配列および配列番号17の変軽鎖配列；(b)配列番号27の変重鎖配列および配列番号37の変軽鎖配列；(c)配列番号47の変重鎖配列および配列番号57の変軽鎖配列；(d)配列番号67の変重鎖配列および配列番号77の変軽鎖配列；(e)配列番号87の変重鎖配列および配列番号97の変軽鎖配列；または(f)配列番号107の変重鎖配列および配列番号117の変軽鎖配列を含む。

【0088】

本発明は、

- (a)配列番号9の重鎖配列および配列番号19の軽鎖配列；
 - (b)配列番号29の重鎖配列および配列番号39の軽鎖配列；
 - (c)配列番号49の重鎖配列および配列番号59の軽鎖配列；
 - (d)配列番号69の重鎖配列および配列番号79の軽鎖配列；
 - (e)配列番号89の重鎖配列および配列番号99の軽鎖配列；または
 - (f)配列番号109の重鎖配列および配列番号119の軽鎖配列
- を含む、ヒトモノクローナル抗TGF-2抗体を提供する。

【0089】

MOR14799：本明細書でMOR14799と呼ばれる本開示のモノクローナル抗体は、配列番号9の重鎖配列および配列番号19の軽鎖配列を含む。MOR14799は、配列番号7の変重鎖配列および配列番号17の変軽鎖配列を含む。MOR14799は、配列番号1の重鎖可変領域CDR1；配列番号2の重鎖可変領域CDR2；配列番号3の重鎖可変領域CDR3；配列番号11の軽鎖可変領域CDR1；配列番号12の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号13の軽鎖可変領域CDR3を含む。別の実施形態では、MOR14799は、配列番号124の重鎖可変領域CDR1を含む。MOR14799の重鎖および重鎖可変領域は、配列番号10および8のポリヌクレオチド配列によってそれぞれコードされる。MOR14799の軽鎖および軽鎖可変領域は、配列番号20および18のポリヌクレオチド配列によってそれぞれコードされる。(i)hTGF-2に関する抗体MOR14799の K_D 値は $1.08E-15M$ であり、(ii)TGF-1への検出可能な結合がなく、および(iii)hTGF-3に関する K_D 値は $1.99E-11M$ である(表4を参照)。このことから、TGF-2に関するMOR14799の K_D 値は、TGF-3に関するものの18000分の1より低いことになる。さらにそのようなアッセイの検出限界近くの極めて低い K_D 値からもたらされる可能な測定誤差を考慮するために、100 fM以下の K_D 値について合意することによって、MOR14799の K_D 値測定のより控え目な解釈を適用するときでさえ、TGF-2に関するMOR14799の K_D 値は、TGF-3に関するもののなお200分の1である。これらのデータは、先行技術の抗体に対するMOR14799の意外な優位性を例示するが、その理由は、Thompson et al (J Immunol Methods. 1999 Jul 30;227(1-2):17-29)によって公開されたデータに基づくと、(i)hTGF-2に関する先行技術抗体CAT-152の K_D 値は $0.89nM$ であり、(ii)hTGF-3に関する K_D 値は $10nM$ であるからである。このことから、TGF-2に関するCAT-152の K_D 値は、TGF-3に関するもののちょうど11分の1になる。本明細書で提供される実験データに基づいて、TGF-2に関するCAT-152の K_D 値は $7.3E-11M$ であり、hTGF-3に関する K_D 値は $1.18E-09M$ であり、これは、TGF-3に関するもののわずか16分の1である、TGF-2に関するCAT-152の K_D 値をもたらず。

【0090】

本明細書で提供される実験データに基づいて、TGF-2に関する1D11の K_D 値は $1.17E-10M$ であり、hTGF-3に関する K_D 値は $2.0E-11M$ であり、これは、TGF-3に関するもののわずか17分の1である、TGF-2に関する1D1

10

20

30

40

50

1の K_D 値をもたらす。

【0091】

MOR14800：本明細書でMOR14800と呼ばれる本開示のモノクローナル抗体は、配列番号29の重鎖配列および配列番号39の軽鎖配列を含む。MOR14800は、配列番号27の変重鎖配列および配列番号37の変軽鎖配列を含む。MOR14800は、配列番号21の重鎖可変領域CDR1、配列番号22の重鎖可変領域CDR2；配列番号23の重鎖可変領域CDR3；配列番号31の軽鎖可変領域CDR1；配列番号32の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号33の軽鎖可変領域CDR3を含む。別の実施形態では、MOR14800は、配列番号125の重鎖可変領域CDR1を含む。MOR14800の重鎖および重鎖可変領域は、配列番号30および28のポリヌクレオチド配列によってそれぞれコードされる。MOR14800の軽鎖および軽鎖可変領域は、配列番号40および38のポリヌクレオチド配列によってそれぞれコードされる。(i)hTGF-2に関する抗体MOR14800の K_D 値は $4.34E-16M$ であり、(控え目な推定 $100fM$)、(ii)TGF-1への検出可能な結合がなく、および(iii)TGF-3への検出可能な結合がない(表4)。したがって、抗体MOR14800は、TGF-1ともTGF-3とも全く反応しない。これらのデータは、先行技術の抗体に対するMOR14800の意外な優位性を例示する。

10

【0092】

本開示の別の実施形態では、モノクローナル抗体MOR14800は、配列番号21の重鎖可変領域CDR1、配列番号22の重鎖可変領域CDR2；配列番号23の重鎖可変領域CDR3；配列番号31の軽鎖可変領域CDR1；配列番号32の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号33の軽鎖可変領域CDR3；ならびに配列番号131および132のフレームワークパラトープ領域を含む。別の実施形態では、上記の抗体MOR14800は、配列番号125の重鎖可変領域CDR1を含む。

20

【0093】

MOR14809：本明細書でMOR14809と呼ばれる本開示のモノクローナル抗体は、配列番号49の重鎖配列および配列番号59の軽鎖配列を含む。MOR14809は、配列番号47の変重鎖配列および配列番号57の変軽鎖配列を含む。MOR14809は、配列番号41の重鎖可変領域CDR1；配列番号42の重鎖可変領域CDR2；配列番号43の重鎖可変領域CDR3；配列番号51の軽鎖可変領域CDR1；配列番号52の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号53の軽鎖可変領域CDR3を含む。別の実施形態では、抗体MOR14809は、配列番号126の重鎖可変領域CDR1を含む。MOR14809の重鎖および重鎖可変領域は、配列番号50および48のポリヌクレオチド配列によってそれぞれコードされる。MOR14809の軽鎖および軽鎖可変領域は、配列番号60および58のポリヌクレオチド配列によってそれぞれコードされる。(i)hTGF-2に関する抗体MOR14809の K_D 値は $5.24E-14M$ であり(控え目な推定 $100fM$)、(ii)TGF-1への検出可能な結合がなく、および(iii)TGF-3への検出可能な結合がない(表4を参照)。したがって、抗体MOR14809は、TGF-1ともTGF-3とも全く反応しない。これらのデータは、先行技術の抗体に対するMOR14809の意外な優位性を例示する。

30

40

【0094】

MOR14797：本明細書でMOR14797と呼ばれる本開示のモノクローナル抗体は、配列番号69の重鎖配列および配列番号79の軽鎖配列を含む。MOR14797は、配列番号67の変重鎖配列および配列番号77の変軽鎖配列を含む。MOR14797は、配列番号61の重鎖可変領域CDR1；配列番号62の重鎖可変領域CDR2；配列番号63の重鎖可変領域CDR3；配列番号71の軽鎖可変領域CDR1；配列番号72の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号73の軽鎖可変領域CDR3を含む。別の実施形態では、抗体MOR14797は、配列番号127の重鎖可変領域CDR1を含む。MOR14797の重鎖および重鎖可変領域は、配列番号70および68のポリヌクレオチド配列によってそれぞれコードされる。MOR14797の軽鎖および軽鎖可変領域

50

域は、配列番号 80 および 78 のポリヌクレオチド配列によってそれぞれコードされる。
 (i) hTGF - 2 に関する抗体 MOR 14797 の K_D 値は $4.46E-15M$ であり、(ii) TGF - 1 への検出可能な結合がなく、および (iii) hTGF - 3 に関する K_D 値は $2.74E-08M$ である (表 4)。このことから、TGF - 2 に関する MOR 14797 の K_D 値は、TGF - 3 に関するものの 600 万分の 1 であることになる。さらにそのようなアッセイの検出限界近くの極めて低い K_D 値からもたらされる可能な測定誤差を考慮するために、 $100fM$ 以下の K_D 値について合意することによって、MOR 14799 の K_D 値測定のより控え目な解釈を適用するときでさえ、TGF - 2 に関する MOR 14797 の K_D 値は、TGF - 3 に関するもののなお 27000 分の 1 と予想される。これらのデータは、先行技術の抗体に対する MOR 14797 の意外な優位性を例示する。

10

【0095】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗 TGF - 2 抗体またはその機能的断片は、(i) 配列番号 61、62 および 63 の CDR ならびに (ii) 1 位のアミノ酸 Q および 99 位のアミノ酸 R を含む重鎖可変ドメイン；ならびに (iii) 配列番号 71、72 および 73 の CDR ならびに (iv) 49 位のアミノ酸 F を含む軽鎖可変ドメインを含み、前記抗体の重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインフレームワーク領域は、配列番号 67 の重鎖可変ドメイン配列 (VH) および配列番号 77 の軽鎖可変ドメイン配列 (VL) のフレームワーク領域に少なくとも 98% の配列同一性をそれぞれ有し、(ii) および (iv) に指摘されるアミノ酸の位置は、配列番号 67 および 77 の 1 位、99 位 および 49 位にそれぞれ対応する。

20

【0096】

一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗 TGF - 2 抗体またはその機能的断片は、(i) 配列番号 64、65 および 66 の CDR ならびに (ii) 1 位のアミノ酸 Q および 99 位のアミノ酸 R を含む重鎖可変ドメイン；ならびに (iii) 配列番号 74、75 および 76 の CDR ならびに (iv) 49 位のアミノ酸 F を含む軽鎖可変ドメインを含み、前記抗体の重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインフレームワーク領域は、配列番号 67 の重鎖可変ドメイン (VH) および配列番号 77 の軽鎖可変ドメイン (VL) のフレームワーク領域に少なくとも 98% の配列同一性をそれぞれ有し、(ii) および (iv) に指摘されるアミノ酸の位置は、配列番号 67 および 77 の 1 位、99 位 および 49 位にそれぞれ対応する。

30

【0097】

MOR 14805：本明細書で MOR 14805 と呼ばれる本開示のモノクローナル抗体は、配列番号 89 の重鎖配列および配列番号 99 の軽鎖配列を含む。MOR 14805 は、配列番号 87 の可変重鎖配列および配列番号 97 の可変軽鎖配列を含む。MOR 14805 は、配列番号 81 の重鎖可変領域 CDR 1；配列番号 82 の重鎖可変領域 CDR 2；配列番号 83 の重鎖可変領域 CDR 3；配列番号 91 の軽鎖可変領域 CDR 1；配列番号 92 の軽鎖可変領域 CDR 2；および配列番号 93 の軽鎖可変領域 CDR 3 を含む。別の実施形態では、抗体 MOR 14805 は、配列番号 128 の重鎖可変領域 CDR 1 を含む。MOR 14805 の重鎖および重鎖可変領域は、配列番号 90 および 88 のポリヌクレオチド配列によってそれぞれコードされる。MOR 14805 の軽鎖および軽鎖可変領域は、配列番号 100 および 98 のポリヌクレオチド配列によってそれぞれコードされる。(i) hTGF - 2 に関する抗体 MOR 14805 の K_D 値は $9.70E-13M$ であり、(ii) TGF - 1 への検出可能な結合がなく、および (iii) hTGF - 3 に関する K_D 値は $7.05E-11M$ である (表 4 を参照)。このことから、TGF - 2 に関する MOR 14805 の K_D 値は、TGF - 3 に関するものの 73 分の 1 であることになる。これらのデータは、先行技術の抗体に対する MOR 14805 の意外な優位性を例示する。

40

【0098】

MOR 14787：本明細書で MOR 14787 と呼ばれる本開示のモノクローナル抗

50

体は、配列番号109の重鎖配列および配列番号119の軽鎖配列を含む。MOR14787は、配列番号107の可変重鎖配列および配列番号117の可変軽鎖配列を含む。MOR14787は、配列番号101の重鎖可変領域CDR1；配列番号102の重鎖可変領域CDR2；配列番号103の重鎖可変領域CDR3；配列番号111の軽鎖可変領域CDR1；配列番号112の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号113の軽鎖可変領域CDR3を含む。別の実施形態では、抗体MOR14787は、配列番号129の重鎖可変領域CDR1を含む。MOR14787の重鎖および重鎖可変領域は、配列番号110および108のポリヌクレオチド配列によってそれぞれコードされる。MOR14787の軽鎖および軽鎖可変領域は、配列番号120および118のポリヌクレオチド配列によってそれぞれコードされる。(i) hTGF-2に関する抗体MOR14787のK_D値は7.38E-16Mであり、(ii) TGF-1への検出可能な結合がなく、および(iii) TGF-3への検出可能な結合がない(表4を参照)。したがって、抗体MOR14787は、TGF-1ともTGF-3とも全く反応しない。これらのデータは、先行技術の抗体に対するMOR14787の意外な優位性を例示する。

10

20

30

40

50

【0099】

高い結合親和性/選択性で抗TGF-2抗体を中和することは、有害事象と関連する可能性のある他の経路に対する干渉をより引き起こしそうにない。本発明の抗体は、TGF-αアイソフォーム1および3に結合および/または中和しない。さらに、本発明の抗体は、同じかまたは関連した代謝経路において活性である他のタンパク質に結合しない。特に、本発明の抗体は、ヒトタンパク質GDF-11、GDF-8、アクチビンA、アクチビンBおよびアクチビンA/B(「反標的」)に結合しない。したがって、一実施形態では、本発明は本明細書に開示される抗体MOR14799、MOR14800、MOR14809、MOR14797、MOR14805またはMOR14787に関し、前記抗体は、100nMのIgG抗体まで反標的GDF-11、GDF-8、アクチビンA、アクチビンBおよびアクチビンA/Bを中和しない。

【0100】

ある特定の実施形態では、本発明の抗体は、CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む重鎖可変領域ならびにCDR1、CDR2、CDR3配列を含む軽鎖可変領域を有し、これらの配列の1つまたは複数は、本明細書に記載される抗体またはその保存的改変に基づく指定されたアミノ酸配列を有し、抗体は本発明の抗TGF-2抗体の所望の機能特性を保持する。したがって、本発明は、(a)配列番号1~3、11~13、21~23、31~33、41~43、51~53、61~63、71~73、81~83、91~93、101~103、111~113および124~129もしくはその保存的改変からなる群から選択される、またはb)配列番号4~6、14~16、24~26、34~36、44~46、54~56、64~66、74~76、84~86、94~96、104~106、114~116および124~129もしくはその保存的改変からなる群から選択される、CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む重鎖可変領域ならびにCDR1、CDR2、CDR3を含む軽鎖可変領域、からなる単離された組換え抗TGF-2抗体またはその機能的断片を提供する。好ましくは、そのような抗体は、以下の機能特性の少なくとも1つを示す：(i)ヒトTGF-2を150pM未満、または107pM未満、または100pM未満、または80pM未満、または30pM未満、または20pM未満、または10pM未満の最大半減抑制濃度(IC50)で中和し、およびSmad依存性リポーター遺伝子アッセイによって測定される場合、100nMを超える最大半減抑制濃度(IC50)でヒトTGF-1またはTGF-3を中和する、または(ii)ヒトTGF-2を、約1pMから約150pMの間、または約1pMから約107pMの間、または約1pMから約80pMの間の最大半減抑制濃度(IC50)で中和し、およびSmad依存性リポーター遺伝子アッセイによって測定される場合、100nMを超える最大半減抑制濃度(IC50)でヒトTGF-1またはTGF-3を中和する。そのような抗体は、例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体であってもよい。

【 0 1 0 1 】

他の実施形態では、哺乳動物細胞での発現のために最適化される本発明の抗体は、完全長重鎖配列および完全長軽鎖配列を有し、これらの配列の1つまたは複数は、本明細書に記載される抗体またはその保存的改変に基づく指定されたアミノ酸配列を有し、抗体は本発明の抗 T G F - 2 抗体の所望の機能特性を保持する。したがって、本発明は、配列番号 9、29、49、69、89 および 109 の完全長重鎖配列、ならびに配列番号 19、39、59、79、99 または 119 の完全長軽鎖配列からなる、哺乳動物細胞での発現のために最適化される単離されたモノクローナル抗 T G F - 2 抗体を提供し、ここで、前記配列に保存的改変が導入されている。様々な実施形態では、抗体は、上記の機能特性の一方または両方を提示することができる。そのような抗体は、例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体であってもよい。

10

【 0 1 0 2 】

本発明のヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体またはその機能的断片は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、I g E、I g M または I g D アイソタイプであってよく、特に、例えば I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 アイソタイプのヒト重鎖定常領域から選択される。本明細書で用いるように、「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によって提供される抗体クラス（例えば、I g M、I g E、I g G、例えば I g G 1 または I g G 2）を指す。

【 0 1 0 3 】

本発明のヒトモノクローナル抗 T G F - 2 抗体または機能的断片は、F c 領域の突然変異により変更されたエフェクター機能を有することができる。さらなる実施形態では、本発明の抗体は I g G 1 アイソタイプであり、F c 領域の突然変異により変更されたエフェクター機能を有する。一実施形態では、前記変更されたエフェクター機能は、低減された抗体依存性細胞傷害（A D C C）および補体依存性細胞傷害（C D C）活性である。一実施形態では、前記変更されたエフェクター機能は、抑制された A D C C および C D C 活性である。F c R 結合を抑制し、エフェクター機能を減弱するために、234 位および 235 位のロイシンがアラニンに突然変異されたサイレント I g G 1 L A L A フォーマットに、抗体を変換することもできる。抗体定常領域を変更する方法は、当技術分野で公知である。変更された機能、例えばエフェクターリガンド、例えば細胞上の F c R、または補体の C 1 構成成分への親和性の変更を有する抗体は、抗体の定常部分の少なくとも 1 つのアミノ酸残基を異なる残基で置き換えることによって生成することができる（例えば、欧州特許第 3 8 8 1 5 1 号；米国特許第 5, 6 2 4, 8 2 1 号を参照）。マウスまたは他の種の免疫グロブリンに適用される場合、これらの機能を低下または消失させるだろう、類似の種類の変更が記載されるかもしれない。

20

30

【 0 1 0 4 】

本発明の抗 T G F - 2 抗体と同じエピトープに結合する抗体

別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される本発明の様々な特異的抗 T G F - 2 抗体と同じエピトープに結合する抗体を提供する。したがって、本発明は、配列番号 67 の重鎖可変ドメインおよび配列番号 77 の軽鎖可変ドメインを含む抗体によって認識されるエピトープに結合する、抗体またはその機能的断片を提供する。したがって、本発明は、抗体 M O R 1 4 7 9 7 によって認識されるエピトープに結合する抗体またはその機能的断片を提供する。結晶化および構造決定の後、本発明の好ましい抗体の結合性領域がより明らかに規定された。したがって、本発明は、ヒト T G F - 2 タンパク質の鎖 A のアミノ酸 L E U 3 0 4、A S N 3 1 6、P R O 3 5 1、T Y R 3 5 2、L E U 3 5 3、T R P 3 5 4、S E R 3 5 5、S E R 3 5 6、G L N 3 5 9、A R G 3 6 2、V A L 3 6 3、L E U 3 6 6、T H R 3 6 9 および I L E 3 7 0 ならびにヒト T G F - 2 タンパク質の鎖 B の L Y S 3 2 7、G L Y 3 3 1、T R P 3 3 2、L Y S 3 3 3、T R P 3 3 4、T Y R 3 9 2、I L E 3 9 4、L Y S 3 9 9、G L U 4 0 1 および L E U 4 0 3 を含むヒト T G F - 2 タンパク質のエピトープに結合する抗体を提供する。

40

【 0 1 0 5 】

50

したがって、本発明は、配列番号27の重鎖可変ドメインおよび配列番号37の軽鎖可変ドメインを含む抗体によって認識されるエピトープに結合する、抗体またはその機能的断片を提供する。したがって、本発明は、抗体MOR14800によって認識されるエピトープに結合する抗体またはその機能的断片を提供する。したがって、本発明は、ヒトTGF-2タンパク質の鎖Aのアミノ酸GLY29、TRP30、LYS31、TRP32、TYR90、TYR91、ILE92、GLU99、LEU101およびMET104、ならびにヒトTGF-2タンパク質の鎖BのALA1、LEU2、ASP3、ALA5、TYR6、ASN10、ASN14、PRO49、TYR50、LEU51、TRP52、SER53、SER54、ASP55、GLN57、ARG60、VAL61、LEU64、GLN81、LYS110を含むヒトTGF-2タンパク質のエピトープに結合する抗体を提供する。

10

【0106】

工学操作および改変された抗体

本発明の抗体は、改変された抗体を工学的に操作するための出発材料として、本明細書に示すV_Hおよび/またはV_L配列の1つまたは複数を含む抗体を使用してさらに調製することができ、この改変された抗体は、出発抗体から変更された特性を有することができる。一方または両方の可変領域（すなわちV_Hおよび/またはV_L）の中の、例えば、1つまたは複数のCDR領域の中および/または1つまたは複数のフレームワーク領域の中の1つまたは複数の残基を改変することによって、抗体を工学的に操作することができる。さらに、または代わりに、例えば抗体のエフェクター機能を変更するために、定常領域の中の残基を改変することによって、抗体を工学的に操作することができる。実行することができる可変領域工学操作の1つのタイプは、抗体結合性領域/パラトープまたはCDR移植である。パラトープ配列は抗体抗原相互作用の役割を担うので、異なる特性を有する異なる抗体からのフレームワーク配列の上に接がれた特異的な天然に存在する抗体からのCDR/パラトープ配列を含む発現ベクターを構築することによって、特異的な天然に存在する抗体の特性を模倣した組換え抗体を発現させることが可能である（例えば、Riechmann, L. et al., 1998 Nature 332:323-327; Jones, P. et al., 1986 Nature 321:522-525; Queen, C. et al., 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; Winterへの米国特許第5,225,539号、および米国特許第5,530,101号;第5,585,089号;Queenらへの第5,693,762号および第6,180,370号を参照）。

20

30

【0107】

したがって、本発明の別の実施形態は、(a)配列番号1~3、11~13、21~23、31~33、41~43、51~53、61~63、71~73、81~83、91~93、101~103、111~113および124~129、またはb)配列番号4~6、14~16、24~26、34~36、44~46、54~56、64~66、74~76、84~86、94~96、104~106、114~116および124~129に列挙される配列の群から選択される相補性決定領域配列の混合を含む、単離されたモノクローナル抗TGF-2抗体またはその機能的断片に関する。したがって、そのような抗体は、開示される抗体のV_HおよびV_LCDR配列を含有するが、これらの抗体と異なるフレームワーク配列を含有することができる。そのようなフレームワーク配列は、生殖系列抗体遺伝子配列を含む公開DNAデータベースまたは公開された参照から得ることができる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子の生殖系列DNA配列は、「VBase」ヒト生殖系列配列データベース（インターネットのwww.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbaseで利用可能）、ならびにKabat, E. A.ら[上記];Tomlinson, I. M., et al., 1992 J. Mol. Biol. 227:776-798;およびCox, J. P. L. et al., 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836で見出すことができる。

40

【0108】

本発明の抗体で使用するためのフレームワーク配列の例は、本発明の選択される抗体によって使用されるフレームワーク配列に構造的に類似したもの、例えば、本発明のモノク

50

ローナル抗体によって使用されるコンセンサス配列および/またはフレームワーク配列である。 V_H CDR 1、2および3配列、ならびに V_L CDR 1、2および3配列は、そのフレームワーク配列が由来する生殖系列免疫グロブリン遺伝子に見出されるもの同一の配列を有するフレームワーク領域に移植することができるか、または、生殖系列配列と比較して1つまたは複数の突然変異を含有するフレームワーク領域にCDR配列を移植することができる。例えば、ある特定の場合には、抗体の抗原結合能力を維持または強化するために、フレームワーク領域の中の残基を突然変異させることが有益であることが見出されている（例えば、米国特許第5,530,101号；米国特許第5,585,089号；米国特許第5,693,762号および米国特許第6,180,370号を参照）。別のタイプの可変領域改変は、 V_H および/または V_L CDR 1、CDR 2および/またはCDR 3領域の中のアミノ酸残基を突然変異させ、それによって「親和性成熟」として知られる目的の抗体の1つまたは複数の結合特性（例えば、親和性）を改善することである。突然変異を導入するために、部位特異的突然変異誘発またはPCR媒介突然変異誘発を実行することができ、抗体結合性または目的の他の機能特性に及ぼす影響は、本明細書に記載され、実施例に提供される *in vitro* または *in vivo* アッセイで評価することができる。保存的改変（本明細書で議論される）を導入することができる。突然変異は、アミノ酸の置換、付加または欠失であってよい。さらに、一般的にCDR領域の中の1つ、2つ、3つ、4つまたは5つ以下の残基が変更される。

10

【0109】

代わりのフレームワークまたは足場への抗原結合性ドメインの移植

20

結果として生じるポリペプチドがTGF- β 2に特異的に結合する少なくとも1つの結合性領域を含む限り、多種多様の抗体/免疫グロブリンフレームワークまたは足場を用いることができる。そのようなフレームワークまたは足場には、ヒト免疫グロブリンの5つの主要なイディオタイプまたはその断片（本明細書の他の場所で開示されるものなど）が含まれ、ヒト化態様を好ましくは有する、他の動物種の免疫グロブリンが含まれる。この点に関しては、ラクダ科の動物で同定されたものなどの単一重鎖抗体が特に興味がある。当業者によって、新規のフレームワーク、足場および断片が継続して発見され、開発されている。

【0110】

ラクダ科の動物の抗体

30

ラマ種（ラマ・パッコス（*Lama paccos*）、ラマ・グラマ（*Lama glama*）およびラマ・ビキューナ（*Lama vicugna*））などの新世界の種を含むラクダおよびヒトコブラクダ科のメンバー（カメルス・バクトリアヌス（*Camelus bactrianus*）およびカメルス・ドロマデリウス（*Camelus dromaderius*））から得た抗体タンパク質が、サイズ、構造的複雑性およびヒト対象への抗原性に関して特徴付けられている。天然に見出されるこの科の哺乳動物からのある特定のIgG抗体は軽鎖を欠き、したがって、2つの重鎖および2つの軽鎖を有する、他の動物からの抗体の一般的な4つの鎖の四次構造と構造的に異なる（国際公開第94/04678を参照）。 V_{HH} と同定された小さい単一の可変ドメインであるラクダ科の動物の抗体の領域を遺伝子操作によって得、標的に高い親和性を有する小さいタンパク質を生成し、「ラクダ科の動物のナノボディ」として知られる低分子量抗体誘導タンパク質をもたらすことができる（米国特許第5,759,808号；Stijlemans, B. et al., 2004 *J Biol Chem* 279: 1256-1261；Dumoulin, M. et al., 2003 *Nature* 424: 783-788；Pleschberger, M. et al. 2003 *Bioconjugate Chem* 14: 440-448；Cortez-Retamozo, V. et al. 2002 *Int J Cancer* 89: 456-62；およびLauwereys, M. et al. 1998 *EMBO J* 17: 3512-3520を参照）。ラクダ科の動物の抗体および抗体断片の工学操作ライブラリーは、例えば、Ablynx、Ghent、Belgiumから市販されている。非ヒト起源の他の抗体と同様に、ラクダ科の動物の抗体のアミノ酸配列を組換えで変更してヒト配列により緊密に類似する配列を得ることができ、すなわち、ナノボディを「ヒト化」することができる。したがって、ヒトに対するラクダ科の動物の抗体の天然の低い抗原性は、さらに低減させることができる。ラクダ科の動物のナノボディは、ヒトIgG分子のそ

40

50

れの概ね 1 / 10 の分子量を有し、このタンパク質はわずか数ナノメートルの物理的直径を有する。小さいサイズの 1 つの結果は、より大きな抗体タンパク質に機能的に不可視である抗原性部位に結合するラクダ科の動物のナノボディの能力であり、すなわち、ラクダ科の動物のナノボディは、さもなければ古典的な免疫学的技術を用いると潜在性である抗原を検出する試薬として、および可能性がある治療剤として有益である。したがって、小さいサイズのさらに別の結果は、ラクダ科の動物のナノボディが、標的タンパク質の溝または狭い裂け目の中の特異的部位に結合する結果として阻害することができ、したがって、古典的な抗体のそれより古典的な低分子量薬物の機能により緊密に類似する能力で役目を果たすことができるということである。低分子量およびコンパクトなサイズは、極めて耐熱性で、極端な pH およびタンパク分解に安定であり、抗原性に劣るラクダ科の動物のナノボディをさらにもたす。別の結果は、ラクダ科の動物のナノボディが循環系から組織に容易に移動し、さらに脳血液関門を通過して、神経組織に影響する障害を処置することができるということである。ナノボディは脳血液関門を越える薬物輸送をさらに促進することができる（米国特許出願公開第 2004 / 0161738 号を参照）。ヒトへの低い抗原性と組み合わせたこれらの特徴は、大きな治療的潜在能力を示す。さらに、これらの分子は大腸菌 (*E. coli*) などの原核細胞で完全に発現させることができ、バクテリオファージとの融合タンパク質として発現され、機能的である。したがって、本発明の特徴は、例えば国際公開第 94 / 04678 号に記載されるように、本発明のヒト抗体の重鎖または軽鎖の CDR 配列をナノボディまたは単ドメイン抗体フレームワーク配列に移植することによって得られる、ラクダ科の動物の抗体である。

10

20

【0111】

非抗体足場

公知の非免疫グロブリンフレームワークまたは足場には、アドネクチン（フィブロネクチン）（Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA）、アンキリン（Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland）、ドメイン抗体（Domantis, Ltd (Cambridge, MA) および Ablynx nv (Zwijnaarde, Belgium)）、リポカリン（アンチカリン）（Pieris Proteolab AG, Freising, Germany）、小モジュール式の免疫医薬（Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA）、マキシボディ（Avidia, Inc. (Mountain View, CA)）、プロテイン A（Affibody AG, Sweden）およびアフィリン（ガンマ-クリスタリンまたはユビキチン）（SciL Proteins GmbH, Halle, Germany）、タンパク質エピトープ模倣体（Polyphor Ltd, Allschwil, Switzerland）が限定されずに含まれる。

30

【0112】

(i) フィブロネクチン足場

フィブロネクチン足場は、好ましくはフィブロネクチンタイプ I I I ドメイン（例えば、フィブロネクチンタイプ I I I の第 10 モジュール（10Fn3 ドメイン））に基づく。フィブロネクチンタイプ I I I ドメインは、それ自身互いに対してバックされてタンパク質のコアを形成し、鎖を互いと接続して、溶媒に曝露されるループ（CDR に類似している）をさらに含有している、2 つのシートの間で分配される 7 つまたは 8 つの鎖を有する。ベータシートサンドイッチの各エッジに少なくとも 3 つのそのようなループがあり、そこでは、エッジはベータ鎖の方向に直角であるタンパク質の境界である（米国特許第 6,818,418 号）。これらのフィブロネクチンをベースとした足場は免疫グロブリンでないが、全体の折重なりは、ラクダおよびラマの IgG での全体の抗原認識単位を含む最も小さな機能的抗体断片、重鎖の変領域のそれに緊密に関係する。この構造のため、非免疫グロブリン抗体は、性質および親和性が抗体のそれらに類似する抗原結合特性を模倣する。これらの足場は、*in vivo* での抗体の親和性成熟の過程に類似する、*in vitro* でのループランダム化およびシャフリング戦略で使用することができ

40

50

る。これらのフィブロネクチンをベースとした分子は足場として使用することができ、ここでは、標準のクローニング技術を使用して分子のループ領域を本発明のCDRで置き換えることができる。

【0113】

フレームワークまたはFcの工学操作

本発明の工学操作抗体には、例えば抗体の特性を改善するために、 V_H および/または V_L の中のフレームワーク残基に改変が加えられたものが含まれる。一般的に、そのようなフレームワーク改変は、抗体の免疫原性を減少させるために加えられる。例えば、1つのアプローチは、1つまたは複数のフレームワーク残基を対応する生殖細胞系配列に「復帰突然変異」させることである。より具体的には、体細胞突然変異を経た抗体は、その抗体が由来する生殖細胞系配列と異なるフレームワーク残基を含有することができる。抗体のフレームワーク配列を抗体が由来する生殖細胞系配列と比較することによって、そのような残基を同定することができる。それらの生殖細胞系構成にフレームワーク領域配列を戻すために、体細胞突然変異を、例えば部位特異的突然変異誘発またはPCR媒介突然変異誘発によって生殖細胞系配列に「復帰突然変異」させることができる。そのような「復帰突然変異」した抗体も、本発明に包含されるものである。フレームワーク改変の別のタイプは、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するために、フレームワーク領域の中で、または1つもしくは複数のCDR領域の中でさえも1つまたは複数の残基を突然変異させることを含む。このアプローチは「脱免疫化」とも呼ばれ、米国特許出願公開第2003/0153043号にさらに詳細に記載されている。

フレームワークまたはCDR領域に加えられる改変に加えて、またはその代替で、抗体の1つまたは複数の機能的特性、例えば血清中半減期、補体結合、Fc受容体結合および/または抗原依存性細胞傷害活性を一般的に変化させるために、本発明の抗体は、Fc領域中の改変を含むように工学操作することができる。さらに、同じく抗体の1つまたは複数の機能的特性を変化させるために、本発明の抗体は、化学的に改変する（例えば、1つまたは複数の化学部分を抗体に付着することができる）か、またはそのグリコシル化を変化させるように改変することができる。一実施形態では、CH1のヒンジ領域は、ヒンジ領域のシステイン残基の数が変化するように、例えば増加また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る。CH1のヒンジ領域のシステイン残基の数は、例えば軽鎖および重鎖のアセンブリーを促進するか、または抗体の安定性を増減するために変更される。別の実施形態では、抗体は、その生物学的半減期を増加させるために改変される。様々なアプローチが可能である。例えば、米国特許第6,277,375号に記載されているように、以下の突然変異の1つまたは複数を導入することができる：T252L、T254S、T256F。あるいは、生物学的半減期を増加させるために、米国特許第5,869,046号および米国特許第6,121,022号に記載の通り、IgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループからとられるサルベージ受容体結合性エピトープを含有するように、抗体をCH1またはCL領域の中で変化させることができる。さらに他の実施形態では、抗体のエフェクター機能を変化させるために、少なくとも1つ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、Fc領域を変化させる。例えば、抗体がエフェクターリガンドに対して変化した親和性を有するが、親抗体の抗原結合能力を保持するように、1つまたは複数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。それに対する親和性が変化させられるエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体または補体のC1成分であってもよい。このアプローチは、両方ともWinterらによる、米国特許第5,624,821号および米国特許第5,648,260号にさらに詳細に記載される。特に、残基234および235を突然変異させることができる。特に、これらの突然変異は、アラニンへのものであってよい。したがって、一実施形態では、本発明の抗体は、Fc領域中のアミノ酸234および235の一方または両方の突然変異を有する。別の実施形態では、アミノ酸234および235の一方または両方をアラニンに置換することができる。アラニンへのアミノ酸234および235の両方の置換は、低下したADCC活性をもたらす。さ

10

20

30

40

50

らに別の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸を改変することによって抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を媒介する抗体の能力を増加させるために、および/またはFc 受容体への抗体の親和性を増加させるために、Fc 領域を改変する。このアプローチは、国際公開第00/42072号においてさらに記載される。さらに、Fc R1、Fc RI I、Fc RI I IおよびFc Rnに関するヒトIgG1の上の結合部位がマッピングされ、向上した結合を有する変異体が記載された (Shields, R.L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604を参照)。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る。例えば、無グリコシル化抗体を作製することができる (すなわち、抗体はグリコシル化を欠く)。例えば抗原への抗体の親和性を増加させるために、グリコシル化を変化させることができる。そのような炭水化物改変は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の1つまたは複数の部位を変化させることによって達成することができる。例えば、1つまたは複数の可変領域フレームワークグリコシル化部位の消去をもたらし、それによってその部位のグリコシル化を消去する、1つまたは複数のアミノ酸置換を加えることができる。そのような無グリコシル化は、抗原への抗体の親和性を増加させることができる。そのようなアプローチは、Coraによる米国特許第5,714,350号および第6,350,861号にさらに詳細に記載される。さらに、または代わりに、変化したタイプのグリコシル化を有する抗体、例えば低減された量のフコシル残基を有する低フコシル化抗体、または増加した二分GlcNAc構造を有する抗体を作製することができる。そのような変化したグリコシル化パターンは、抗体のADCC能力を増加させることが実証されている。そのような炭水化物改変は、例えば変化したグリコシル化機構を有する宿主細胞で抗体を発現させることによって達成することができる。変化したグリコシル化機構を有する細胞は当技術分野で記載されており、本発明の組換え抗体を発現させ、それによって変化したグリコシル化を有する抗体を生成するための宿主細胞として使用することができる。例えば、Hangらによる欧州特許第1,176,195号は、そのような細胞系で発現される抗体が低フコシル化を示すように、機能的に破壊された、フコシル転移酵素をコードするFUT8遺伝子を有する細胞系を記載する。したがって、一実施形態では、本発明の抗体は低フコシル化パターンを示す細胞系、例えばフコシル基転移酵素をコードするFUT8遺伝子の欠損発現を有する哺乳動物細胞系での組換え発現によって生成される。国際公開第03/035835号は、フコースをAsn(297)連結炭水化物に付着させる能力が低下し、その宿主細胞で発現される抗体の低フコシル化をももたらす変異体CHO細胞系、Lec13細胞を記載する (Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740も参照する)。国際公開第99/54342号は、工学操作された細胞系で発現される抗体が、抗体のADCC活性の増加をもたらす二分GlcNAc構造の増加を示すように、糖タンパク質改変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ン転移酵素III (GnTIII)) を発現するように工学操作された細胞系を記載する (Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180も参照する)。あるいは、本発明の抗体は、哺乳動物様グリコシル化パターンのために操作され、グリコシル化パターンとしてフコースを欠く抗体を生成することが可能である、酵母または糸状菌で生成することができる (例えば、欧州特許第1297172号明細書を参照)。

【0114】

本発明の抗体をコードする核酸分子

用語「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、一本鎖または二本鎖の形のデオキシリボ核酸 (DNA) またはリボ核酸 (RNA) およびそのポリマーを指す。特に限定されない限り、この用語は、参照核酸に類似した結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドに類似の方法で代謝される、天然ヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸を包含する。具体的には、変性コドン置換は、1つまたは複数の選択される (または全ての) コドンの第3位が混合基および/またはデオキシイノシン残基で置換される配列を生成することによって達成することができる (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); およびRossolini et al., Mol. C

10

20

30

40

50

ell. Probes 8:91-98 (1994))。本発明の別の態様は、本発明の抗体をコードする核酸分子に関する。完全長軽鎖ヌクレオチド配列の例は、配列番号 20、40、60、80、100 または 120 に示す。完全長重鎖ヌクレオチド配列の例は、配列番号 10、30、50、70、90 または 110 に示す。核酸は、完全細胞、細胞溶解物に存在することができるか、または部分的に精製されたか実質的に純粋な形の核酸であってもよい。アルカリ / SDS 処理、CsCl バンディング、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動および当技術分野で周知である他を含む標準の技術によって、他の細胞構成成分または他の汚染物質、例えば他の細胞性核酸またはタンパク質から精製されるとき、核酸は「単離される」または「実質的に純粋にされる」。F. Ausubel, et al., ed. 1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York を参照。本発明の核酸は、例えば DNA または RNA であってもよく、イントロン配列を含有しても含有しなくてもよい。一実施形態では、核酸は cDNA 分子である。核酸は、ファージディスプレイベクターまたは組換えプラスミドベクターなどのベクターに存在してもよい。本発明の核酸は、標準の分子生物学技術を用いて得ることができる。ハイブリドーマ (例えば、さらに下で記載されるヒト免疫グロブリン遺伝子を運ぶトランスジェニックマウスから調製されるハイブリドーマ) によって発現される抗体については、ハイブリドーマによって作製される抗体の軽鎖および重鎖をコードする cDNA は、標準の PCR 増幅または 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) 得られる抗体については、抗体をコードする核酸は、ライブラリーのメンバーである様々なファージクローンから回収することができる。1 つまたは複数の欠失、付加または置換を含む変異核酸配列も、本発明の範囲内に含まれる。一実施形態では、本発明は、配列番号 8、10、18、20、28、30、38、40、48、50、58、60、68、70、78、80、88、90、98、100、108、110、118 または 120 の 1 つまたは複数を含む。遺伝子コードの同義性のために、アミノ酸は、1 つより多いコドンによってコードすることができる。したがって、翻訳されるアミノ酸配列が同じままで、ヌクレオチド配列を修正することが可能である。

【0115】

V_H および V_L セグメントをコードする DNA 断片が得られると、例えば可変領域遺伝子を完全長抗体鎖遺伝子、Fab 断片遺伝子または scFv 遺伝子に変換するために、標準の組換え DNA 技術によってこれらの DNA 断片をさらに操作することができる。これらの操作では、V_L または V_H をコードする DNA 断片を、別の DNA 分子、または別のタンパク質、例えば抗体定常領域もしくはフレキシブルリンカーをコードする断片に作動可能に連結される。この文脈で使用するように、用語「作動可能に連結される」は、例えば、2 つの DNA 断片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、またはタンパク質が所望のプロモーターの制御下で発現されるように、2 つの DNA 断片が機能的に連結されることを意味するものである。V_H 領域をコードする単離された DNA は、重鎖定常領域 (CH1、CH2 および CH3) をコードする別の DNA 分子に V_H をコードする DNA を作動可能に連結することによって、完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公知であり (例えば、Kabat, E. A., et al. [上記] を参照)、これらの領域を包含する DNA 断片は標準の PCR 増幅によって得ることができる。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM または IgD 定常領域であってもよい。一部の実施形態では、重鎖定常領域は、IgG1 アイソタイプの中から選択される。Fab 断片重鎖遺伝子については、V_H をコードする DNA を、重鎖 CH1 定常領域だけをコードする別の DNA 分子に作動可能に連結することができる。V_L 領域をコードする単離された DNA は、軽鎖定常領域 CL をコードする別の DNA 分子に V_L をコードする DNA を作動可能に連結することによって、完全長軽鎖遺伝子 (ならびに 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公知であり (例えば、Kabat, E. A., et al. [上記] を参照)、これらの領域を包含する DNA 断片は標準の PCR 増幅

によって得ることができる。軽鎖定常領域は、カッパまたはラムダ定常領域であってよい。s c F v 遺伝子を作製するために、V_L および V_H 領域がフレキシブルリンカーによって連結された、連続した単鎖タンパク質として V_H および V_L 配列を発現させることができるように、V_H および V_L をコードする DNA 断片は、フレキシブルリンカーをコードする、例えばアミノ酸配列 (G l y 4 - S e r)₃ をコードする別の断片に作動可能に連結される (例えば、Bird et al., 1988 Science 242:423-426 ; Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 ; McCafferty et al., 1990 Nature 348:552-554 を参照)。

【 0 1 1 6 】

本発明のモノクローナル抗体の生成

モノクローナル抗体 (m A b) は、従来のモノクローナル抗体方法論、例えば Kohler a n d Milstein (1975 Nature 256: 495) の標準体細胞ハイブリダイゼーション技術を含む、様々な技術によって生成することができる。モノクローナル抗体を生成するための多くの技術、例えば B リンパ球のウイルス性または腫瘍形成性の形質転換を用いることができる。ハイブリドーマを調製するための動物系は、マウス系である。マウスにおけるハイブリドーマ生成は、確立された手順である。融合のための免疫化脾細胞の単離のための免疫化プロトコールおよび技術は、当技術分野で公知である。融合パートナー (例えば、マウス骨髄腫細胞) および融合手順も公知である。

【 0 1 1 7 】

ヒトモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマの生成

本発明のヒトモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマを生成するために、免疫化されたマウスから脾細胞および / またはリンパ節細胞を単離して、マウス骨髄腫細胞系などの適当な不死化細胞系に融合することができる。結果として生じるハイブリドーマは、抗原特異的抗体の生成についてスクリーニングすることができる。例えば、免疫化されたマウスからの脾臓リンパ球の単一細胞懸濁液を、50% P E G で P 3 X 6 3 - A g 8 . 6 5 3 非分泌性マウス骨髄腫細胞 (A T C C 、 C R L 1 5 8 0) の数の 1 / 6 に融合することができる。平底マイクロタイタープレートに細胞を概ね 2 × 1 4 5 で平板培養し、続いて、20% 胎児クローン血清、18% 「 6 5 3 」 馴化培地、5% オリゲン (I G E N) 、4 m M の L - グルタミン、1 m M のピルビン酸ナトリウム、5 m M の H E P E S 、 0 : 0 5 5 m M の 2 - メルカプトエタノール、50 単位 / m l のペニシリン、50 m g / m l のストレプトマイシン、50 m g / m l のゲンタマイシン、および 1 × H A T (S i g m a ; H A T は、融合の 2 4 時間後に加えられる) を含有する選択培地に 2 週間インキュベートする。概ね 2 週後、H A T が H T で置き換えられた培地で細胞を培養することができる。次に、ヒトモノクローナル I g M および I g G 抗体について個々のウェルを E L I S A でスクリーニングすることができる。広範なハイブリドーマ増殖が起こると、通常 1 0 ~ 1 4 日後に培地を観察することができる。抗体分泌ハイブリドーマを再び平板培養し、再びスクリーニングし、ヒト I g G に関してなお陽性であるならば、限界希釈によってモノクローナル抗体を少なくとも 2 回サブクロニングすることができる。次に特徴付けのために組織培養培地で少量の抗体を生成するために、安定したサブクローンを i n v i t r o で培養することができる。ヒトモノクローナル抗体を精製するために、モノクローナル抗体精製のための 2 リットルのスピナーフラスコにおいて選択されたハイブリドーマを増殖させることができる。上清を濾過、濃縮してから、プロテイン A - セファロース (P h a r m a c i a) で親和性クロマトグラフィーを行うことができる。純度を確認するために、溶出した I g G をゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーによって検査することができる。緩衝溶液を P B S に交換して、1 . 4 3 の吸光係数を使用して O D₂₈₀ によって濃度を測定することができる。モノクローナル抗体を小分けして、- 8 0 で保存することができる。

【 0 1 1 8 】

モノクローナル抗体を生成するトランスフェクターマの生成

本発明の抗体は、例えば当技術分野で周知である (例えば、Morrison, S. (1985) Scie

10

20

30

40

50

nce 229:1202) 組換えDNA技術および遺伝子トランスフェクション方法の組合せを使用して、宿主細胞トランスフェクターで生成することもできる。例えば、抗体またはその抗体断片を発現させるには、標準の分子生物学技術(例えば、目的の抗体を発現するハイブリドーマを使用するPCR増幅またはcDNAクローニング)によって、部分的または完全長の軽鎖および重鎖をコードするDNAを得ることができ、遺伝子が転写および翻訳制御配列に作動可能に連結されるように、このDNAを発現ベクターに挿入することができる。この関係で、用語「作動可能に連結する」は、ベクターの中の転写および翻訳制御配列が抗体遺伝子の転写および翻訳を調節するそれらの意図された機能を果たすように、抗体遺伝子がベクターの中にライゲーションされることを意味するものである。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用する発現宿主細胞に適合するように選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子を別々のベクターに挿入することができるか、より一般的には、両方の遺伝子は同じ発現ベクターに挿入される。抗体遺伝子は、標準の方法によって発現ベクターに挿入される(例えば、抗体遺伝子断片の上の相補的制限部位およびベクターのライゲーション、または制限部位が存在しない場合は平滑末端ライゲーション)。本明細書に記載される抗体の軽鎖および重鎖可変領域は、V_Hセグメントがベクター中のCHセグメントに作動可能に連結され、V_Lセグメントがベクター中のCLセグメントに作動可能に連結されるように、所望のアイソタイプの重鎖定常領域および軽鎖定常領域を既にコードしている発現ベクターにそれらを挿入することによって、任意の抗体アイソタイプの完全長抗体遺伝子を作製するために使用することができる。さらに、または代わりに、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードすることができる。シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連結されるように、抗体鎖遺伝子をベクターにクローニングすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドであってもよく、または異種シグナルペプチド(すなわち、免疫グロブリン以外のタンパク質からのシグナルペプチド)であってもよい。抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞で抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を運ぶ。用語「調節配列」は、抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御するプロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント(例えば、ポリアデニル化シグナル)を含むものである。そのような調節配列は、例えば、Goeddel(*Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA 1990)に記載されている。調節配列の選択を含む発現ベクターの設計は、形質転換する宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベル等の因子によって決めることができることは、当業者に理解される。哺乳動物宿主細胞での発現のための調節配列には、哺乳動物細胞での高レベルのタンパク質発現を誘導するウイルスエレメント、例えばサイトメガロウイルス(CMV)、シミアンウイルス40(SV40)、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス主後期プロモーター(AdMLP))およびポリオーマに由来するプロモーターおよび/またはエンハンサーが含まれる。あるいは、ユビキチンプロモーターまたはP-グロビンプロモーターなどの、非ウイルス調節配列を使用することができる。さらに、調節エレメントは、SV40初期プロモーターからの配列および1型ヒトT細胞白血病ウイルスの長い末端反復配列を含有するSRaプロモーター系などの、異なる供給源からの配列で構成された(Takebe, Y. et al., 1988 *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472)。抗体鎖遺伝子および調節配列に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞でのベクターの複製を調節する配列(例えば、複製開始点)および選択マーカー遺伝子などの、追加の配列を運ぶことができる。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする(例えば、米国特許第4,399,216号、第4,634,665号および第5,179,017号を参照)。例えば、一般的に、選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞に、G418、ハイグロマイシンまたはメトトレキセートなどの薬物への耐性を付与する。選択マーカー遺伝子には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子(dhfr-宿主細胞でメトトレキセート選択/増幅で使用するため)およびネオ遺伝子(G418選択のため)が含まれる。したがって、別の実施形態では、本発明は、少なくとも1つのCDR領域をコードする、配列番号8、10、18、20、28、

10

20

30

40

50

30、38、40、48、50、58、60、68、70、78、80、88、90、98、100、108、110、118もしくは120、またはその断片の1つまたは複数を含む、上記のクローニングまたは発現ベクターに関する。軽鎖および重鎖の発現のために、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクターが、標準の技術によって宿主細胞にトランスフェクトされる。用語「トランスフェクション」の様々な形態は、原核生物または真核生物の宿主細胞への外因性DNAの導入のために一般的に使用される各種の技術、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなどを包含するものである。原核生物または真核生物の宿主細胞で本発明の抗体を発現させることは、理論的に可能である。真核生物の細胞、特に哺乳動物の宿主細胞での抗体の発現が議論されるが、その理由は、そのような真核生物の細胞、特に哺乳動物細胞は、適切に折り畳まれて免疫学的に活性な抗体を組み立て、分泌する可能性が原核細胞より高いからである。原核生物による抗体遺伝子の発現は、活性抗体の高収率生成のために有効でないことが報告されている(Boss, M. A. and Wood, C. R., 1985 Immunology Today 6:12-13)。本発明の組換え抗体を発現させるための哺乳動物宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣(CHO細胞)(DHFR選択マーカー、例えばR.J. Kaufman and P.A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621に記載されているものと一緒に使用された、Urlaub and Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載されているdhfr-CHO細胞を含む)、NSO骨髄腫細胞、COS細胞およびSP2細胞が含まれる。一実施形態では、宿主細胞は、CHO K1PD細胞である。特に、NSO骨髄腫細胞での使用のために、別の発現システムは、国際公開第87/04462号、国際公開第89/01036号および欧州特許第338,841号に示されるGS遺伝子発現システムである。一実施形態では、本発明の組換え抗体を発現させるための哺乳動物宿主細胞には、FUT8遺伝子発現が欠損した哺乳動物細胞系、例えば米国特許第6,946,292号に記載のものが含まれる。したがって、一態様では、本発明は、上記のまたは本明細書に開示されるベクターの1つまたは複数を含む宿主細胞を提供する。

10

20

30

40

50

【0119】

抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞に導入されるとき、宿主細胞での抗体の発現を可能にするかまたは宿主細胞を増殖させる培地への抗体の分泌を可能にするのに十分な時間、宿主細胞を培養することによって抗体が生成される。抗体は、標準のタンパク質精製方法を用いて培地から回収することができる。したがって、本発明は、本発明のTGF-2抗体またはその機能的断片の生成のための方法であって、上記の宿主細胞を培養すること、および抗体またはその機能的断片を単離することを含む方法を提供する。

【0120】

医薬組成物

別の態様では、本発明は、本開示のTGF-2抗体またはその機能的断片を含有する組成物、例えば医薬組成物を提供する。一実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体と一緒に製剤化される。本発明の医薬組成物は、併用療法で投与すること、すなわち他の薬剤と組み合わせることもできる。例えば、TGF-2抗体またはその機能的断片は、少なくとも1つの筋肉質量/力増強剤、例えばIGF-1もしくはIGF-1の変異体、抗ミオスタチン抗体、抗アクチビン抗体、ミオスタチンプロペプチド、ActRIIBに結合するがそれを活性化しないミオスタチンデコイタンパク質、ActRIIBデコイ受容体、2アゴニスト、グレリンアゴニスト、SARM、GHアゴニスト/模倣体またはフォリスタチンと組み合わせることができる。本発明のTGF-2抗体またはその機能的断片による処置は、コルチコステロイド、免疫抑制剤、抗サイトカイン剤、抗がん薬；増殖因子、例えばエリスロポイエチン、G-CSF、GM-CSFまたは他；糖尿病の処置のために使用される薬物(インスリンおよび経口血糖降下剤を含む)、抗結核薬および抗生物質と組み合わせることができる。組合せは、小分子および生体分子の薬剤を含むことができる。

【0121】

本発明の医薬組成物は単独の活性薬剤として、または、ActRIIB抗体、ActRIIA抗体またはActRIIAおよびActRIIB汎特異的抗体と併用して投与することができる。例えば、本発明の薬物は、国際公開第2010125003号に開示されるActRIIB抗体と併用することができる。用語「薬学的に許容される」は、連邦もしくは州政府の規制機関に承認されたこと、または、動物、より詳細にはヒトでの使用のために米国薬局方もしくは他の公認の薬局方に掲載されていることを意味する。用語「担体」は、治療薬と一緒に投与される、希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルを指す。そのような医薬担体は、無菌の液体、例えば水および油、例えば、石油、動物、植物または合成起源のもの、例えば落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油などであってもよい。適する医薬用の賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、ショ糖、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、チョコレート、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノールなどが含まれる。組成物は、所望により、少量の湿潤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含有することもできる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳濁液、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐放性製剤などの形態をとることができる。組成物は、伝統的な結合剤および担体、例えばトリグリセリドで、坐薬として製剤化することができる。経口製剤は、標準の担体、例えば、医薬グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等を含むことができる。適する医薬担体の例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。好ましい実施形態では、組成物は、ルーチンの手順に従ってヒトへの静脈内投与に適合させた医薬組成物として製剤化される。必要な場合、組成物は、可溶化剤および局所麻酔薬、例えばリドカインを、注射部位の疼痛を軽減するために含むこともできる。組成物を注入により投与する場合は、無菌の医薬グレードの水または食塩水を含有する注入ボトルにより注入することができる。組成物を注射により投与する場合は、成分を投与前に混合できるように、無菌の注射用水または食塩水のアンブルが提供されてもよい。薬学的に許容される担体には、生理的に適合する任意の全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張性および吸収遅延剤などが含まれる。担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または表皮の投与（例えば、注射または注入による）に適するものと予想される。投与経路に従い、活性化合物、すなわち抗体、イムノコンジュゲートまたは二重特異的分子は、化合物を酸の作用および化合物を不活性化するかもしれない他の天然の条件から保護する材料でコーティングしてもよい。本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される抗酸化剤を含むこともできる。薬学的に許容される抗酸化剤の例には、以下のものが含まれる：水溶性抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、塩酸システイン、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；油溶性抗酸化剤、例えばパルミチン酸アスコルビル、ブチルヒドロキシアニソール（BHA）、ブチルヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、没食子酸プロピル、アルファトコフェロールなど；および金属キレート化剤、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。

【0122】

本発明の医薬組成物で用いることができる、適する水性および非水性担体の例には、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）および適するそれらの混合物、植物油、例えばオリーブ油、ならびに注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルが含まれる。例えばレシチンなどのコーティング材の使用によって、分散液の場合は所望の粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって、適切な流動性を維持することができる。

【0123】

これらの組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤などのアジュバントを含有することもできる。微生物の存在の防止は、上記の滅菌手順と様々な抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、ソルビン酸フェノールなどの含有の両方によって確実なものにすることができる。組成物中に糖、塩化ナトリウムなどの等張剤を含め

10

20

30

40

50

ることも望ましいであろう。さらに、吸収を遅らせる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの含有によって、注射用の医薬剤形の長期吸収をもたらすことができる。薬学的に許容される担体には、無菌の水性溶液または分散液、および無菌の注射用溶液または分散液の即座の調製のための無菌の粉末が含まれる。薬学的に活性な物質に関するそのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野で公知である。いずれかの従来の媒体または薬剤が活性化合物と相容れない場合以外は、本発明の医薬組成物でのその使用が企図される。補助活性化合物を、組成物に組み込むこともできる。治療組成物は、製造および保存の条件下で一般的に無菌および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、または高い薬物濃度に適する他の注文構造に製剤化することができる。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および液体ポリエチレングリコールなど）、および適するその混合物を含有する溶媒または分散媒体であってもよい。例えばレシチンなどのコーティング材の使用によって、分散液の場合は所望の粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって、適切な流動性を維持することができる。多くの場合には、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、または塩化ナトリウムを組成物中に含めることができる。吸収を遅らせる薬剤、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物中に含ませることによって、注射可能な組成物の長期吸収をもたらすことができる。無菌の注射可能な溶液は、必要に応じて上に列挙された薬剤の1つまたは組合せと一緒に、適当な溶媒に必要な量で活性化合物を組み込み、続いて精密濾過滅菌を行うことによって調製することができる。一般に、分散液は、基礎的分散媒体および上に列挙されるものからの必要とされる他の薬剤を含有する無菌のビヒクルに活性化合物を組み込むことによって調製される。無菌の注射可能な溶液の調製のための無菌粉末の場合は、調製法は、活性薬剤と前もって濾過滅菌したその溶液からの任意の追加の所望の薬剤の粉末を与える、真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）である。したがって、本発明は、本開示のTGF-2抗体またはその機能的断片を含み、薬学的に許容される希釈剤または担体をさらに含む、医薬組成物を提供した。

【0124】

単一の剤形を生成するために担体材料と組み合わせることができる活性薬剤の量は、処置する対象および特定の投与様式によって異なる。単一の剤形を生成するために担体材料と組み合わせることができる活性薬剤の量は、治療効果を生成する組成物の量に一般的になる。一般的に、薬学的に許容される担体と組み合わせた場合、100パーセントのうち、この量は、約0.0001パーセントから約15パーセントの活性薬剤、約0.01パーセントから約10パーセント、または約0.1パーセントから約5パーセントの範囲の活性薬剤である。投薬レジメンは、最適な所望の応答（例えば、治療応答）を提供するように調整される。例えば、単一のボラスを投与することができるか、いくつかの分割用量を経時的に投与することができるか、または治療状況の緊急性によって指示される場合、用量をそれ相応に低減もしくは増加することができる。投与の容易さおよび投薬量の均一性のために、投薬単位剤形で非経口組成物を製剤化することが特に有利である。本明細書で用いられる投薬単位剤形は、処置対象のための単回投薬量として適している物理的に別個の単位を指し、各単位は、必要な薬用担体と共同して所望の治療効果を生むように計算された活性化合物の所定量を含有する。本発明の投薬単位剤形の明細は、活性化合物の特異な特徴および達成すべき特定の治療効果、およびそのような活性化合物を個体の感受性の処置のために配合する技術に固有の限界によって決定づけられ、それに直接的に依存する。本開示のTGF-2抗体もしくはその機能的断片または前記TGF-2抗体もしくはその機能的断片を含む組成物の治療的有効量は、宿主の体重あたり約0.001から150mg/kg、または0.01から30mg/kg、より普通には0.1から10mg/kgの範囲内にある。当業者は適する有効用量を特定することを知っており、それは投与の経路（例えば、静脈内または皮下）によって異なる。例示的な処置療法は、1日につき1回、毎週1回、2週おきに1回、3週おきに1回、4週おきに1回または1カ月に1回の投与を必要とする。そのような投与は、静脈内または皮下で実行することができ

る。本開示の TGF-2 抗体またはその機能的断片のための投薬レジメンは、静脈内投与による 0.01 mg/kg 体重または 0.1 mg/kg 体重または 0.5 mg/kg 体重または 1 mg/kg 体重または 3 mg/kg 体重または 10 mg/kg 体重を含む。あるいは、組成物は持続放出製剤であってよく、その場合には、より低い頻度の投与が必要とされる。投薬量および頻度は、患者での抗体の半減期次第で異なる。投与の投薬量および頻度は、処置が予防的であるかまたは治療的であるかによって異なってもよい。予防的適用では、長期間にわたって比較的低い頻度の間隔で比較的低い投薬量が投与される。一部の患者は、残りの存命期間中、処置を受け続ける。治療的適用では、疾患の進行が低減もしくは終了するまで、または疾患の症状の部分的もしくは完全な改善を患者が示すまで、比較的短い間隔の比較的高い投薬量が時には必要とされる。その後、患者に予防的療法を投与することができる。本発明の医薬組成物中の活性薬剤の実際の投薬量レベルは、患者に毒性でなく、特定の患者、組成物および投与様式のために所望の治療応答を達成するのに有効である活性薬剤の量を得るように変更することができる。選択される投薬量レベルは、用いられる本発明の特定の組成物、またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与経路、投与時間、用いられる特定の化合物の排泄速度、処置の持続時間、用いられる特定の組成物と併用される他の薬物、化合物および/または材料、処置患者の年齢、性別、体重、状態、健康状態および以前の病歴ならびに医療技術で周知の類似の因子を含む、様々な薬物動態学的因子による。例示的な処置療法は、毎週 1 回、2 週おきに 1 回、3 週おきに 1 回、4 週おきに 1 回、1 カ月に 1 回、3 カ月に 1 回または 3 ~ 6 カ月に 1 回の投与を必要とする。あるいは、抗体は、1 年に約 1 回、または 1 回だけ投与することができる。そのような投与は、静脈内または皮下で実行することができる。本発明の抗 TGF-2 抗体のための投薬レジメンは、静脈内投与による 0.1 mg/kg 体重または 1 mg/kg 体重または 3 mg/kg 体重を含むことができ、抗体は以下の例示される投与スケジュールの 1 つを使用して与えられる：4 週おきに 6 回の投薬、その後 3 カ月おき；3 週おき；3 mg/kg 体重を 1 回、続いて 1 mg/kg 体重を 3 週おき。本発明の組成物に含まれる本開示の TGF-2 抗体またはその機能的断片の治療的有効用量の投与は、疾患症状の重症度の低下、疾患無症状期間の頻度および持続時間の増加、または、デュピュイトラン病患者における微細な動作能力を恒久的に阻害する、疾患苦痛による障害もしくは能力障害の予防、すなわち手のひらと指の間の強い線維組織の低減をもたらすことができる。患者は、ポリペプチド有効成分の有効量、すなわち問題の疾患または障害を検出、処置、寛解または予防するのに十分な量を受ける。治療効果は、身体症状の低減を含むこともできる。任意の特定の対象のための治療的タンパク質の最適な有効量および濃度は、患者の年齢、サイズ、健康状態および/または性別、状態の性質および程度、特定の治療的タンパク質の活性、体によるそのクリアランスの速度、さらに治療的タンパク質と組み合わせる任意の可能なさらなる治療薬を含む様々な因子による。所与の状況のために送達される有効量は、ルーチンの実験によって決定することができ、臨床医の判断の範囲内である。投薬は、単回投与スケジュールまたは多回投与スケジュールによるものであってよい。

【0125】

本発明の組成物は、当技術分野で公知の様々な方法の 1 つまたは複数を用いて 1 つまたは複数の投与経路を介して投与することができる。当業者が理解するように、投与の経路および/または様式は、所望の結果によって異なる。本発明の治療的タンパク質のための投与経路には、例えば注射または注入による、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄または他の非経口投与経路が含まれる。本明細書で用いるように「非経口投与」という語句は、通常注射による、腸内および局所投与以外の投与様式を意味し、限定されずに、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、包内、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、クモ膜下、脊椎内、硬膜外および胸骨内の注射および注入が含まれる。一実施形態では、組成物を含む抗体は、静脈内投与される。別の実施形態では、抗体は、皮下に投与される。あるいは、本発明の組成物に含まれる本開示の TGF-2 抗体またはその機能的断片は、非非経口経路、例えば、局所、表皮または粘膜投与経路

10

20

30

40

50

、例えば、鼻腔内、経口、経膈、直腸、舌下または局所によって投与することができる。

【0126】

活性化合物は、インプラント、経皮パッチおよびマイクロカプセル送達系を含む制御放出製剤などの、急速な放出から化合物を保護する担体で調製することができる。生分解性、生体適合性のポリマー、例えば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およびポリ乳酸を使用することができる。そのような製剤の調製のための多くの方法は、特許を受けているか、または当業者に周知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照する。治療組成物は、当技術分野で公知の医療器具で投与することができる。例えば、一実施形態では、本発明の治療組成物は、無針皮下注射器具、例えば米国特許第5,399,163号;5,383,851号;5,312,335号;5,064,413号;4,941,880号;4,790,824号;または4,596,556号に示される器具で投与することができる。本発明において有益な周知のインプラントおよびモジュールの例には、以下のものが含まれる:制御された速度で医薬品を小出しするための植込み型マイクロ注入ポンプを開示する米国特許第4,487,603号;皮膚を介して医薬品を投与するための治療器具を示す米国特許第4,486,194号;正確な注入速度で医薬品を送達するための医薬品注入ポンプを示す米国特許第4,447,233号;連続的薬物送達のための可変流量植込み型注入機器を示す米国特許第4,447,224号;マルチチャンバーコンパートメントを有する浸透圧薬物送達系を示す米国特許第4,439,196号;および、浸透圧薬物送達系を示す米国特許第4,475,196号。他の多くのそのようなインプラント、送達系およびモジュールが当業者に公知であり、例には、MicroCHIPSTM (Bedford, MA)によって作製されたものが含まれる。

10

20

【0127】

ある特定の実施形態では、本開示のTGF- β 2抗体またはその機能的断片を含む組成物は、*in vivo*で適切な分布を確実なものにするために製剤化することができる。例えば、脳血液関門(BBB)は多くの高親水性化合物を排除する。本発明の治療化合物がBBBを通過することを(所望により)確実なものにするために;それらは、例えば、リポソームに製剤化することができる。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;および第5,399,331号を参照する。リポソームは、特異的細胞または器官に選択的に輸送され、したがって、標的化薬物送達を強化する1つまたは複数の部分を含むことができる(例えば、V.V. Ranade, 1989 J. Clin Pharmacol. 29:685を参照)。例示的な標的化部分には、葉酸またはピオチン(例えば、米国特許第5,416,016号を参照);マンノシド(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);界面活性剤プロテインA受容体(Briscoe et al., 1995 Am. J. Physiol.1233:134);p120(Schreier et al., 1994 J. Biol. Chem. 269:9090);が含まれるが、K. Keinanen;M.L. Laukkanen, 1994 FEBS Lett. 346:123;J.J. Killian;I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4:273も参照する。

30

40

【0128】

患者群

提案された処置から恩恵を受けることができる患者には、集中治療または長期入院(1週を超える)を必要とする急性または重大な病気から回復している患者;サルコペニアを有する虚弱な高齢患者;重度の外傷、例えば自動車事故、重度のやけど、戦闘負傷および他の外傷性損傷から回復している若年成人;上記のような、悪液質を引き起こすことが知られている慢性疾患を有する患者;ならびに、上記のような筋肉疾患を有する患者が含まれる。筋肉の損耗は、重度または長期にわたるほとんどの病気に一般的な合併症であるので、筋肉消耗からの復帰が、この損耗の根源に関係なく筋肉損耗を経験する患者の機能の回復および復活を速くすることが予期される。さらに、病的状態、例えば、デュピュイト

50

ラン病（手のひらと指の間で強い線維組織を形成し、微細な動作能力を恒久的に阻害する、細胞外マトリックス（ECM）タンパク質の過剰な生成によって特徴付けられる、手の良性線維増殖性疾患）線維形成、癩痕化、がん、特定の状態、例えば、マルファン関連の状態、表皮水疱症、特に栄養障害型表皮水疱症または接合部表皮水疱症、線維柱帯切除術および皮膚の全身性硬化症を有する患者は、提案された処置の恩恵を受けることができる。

【0129】

さらに、緑内障、加齢性黄斑変性症、糖尿病性網膜症およびフックスジストロフィーの患者は、提案された処置の恩恵を受けることができる。さらに、過剰増殖性障害、例えば、レダーホース病、ペイロニ病、指関節背結節症、五十肩、手の背の線維腫症、手根管圧迫症候群、結節性筋膜炎、攻撃的な線維腫症、振戦、白蟻病、ムービングフィンガー（手腕振動症候群（HAVS）としても知られる）、足底線維腫症およびギャロッドパッドの患者は、提案された処置の恩恵を受けることができる。線維症は、一般的に炎症または傷害の結果として体の多くの組織で起こることができ、例には以下が含まれる：肺、肝臓、心臓、膝、肩、他の関節。したがって、変性および線維性疾患、例えば、強皮症、肥大性癩痕化およびケロイド、特発性肺線維症、心臓線維症（線維性心筋炎も）、心房性線維症、心内膜心筋線維症、肝臓線維症（例えば、NASH）、肺線維症、腎臓線維症（例えば、アルポート症候群）、嚢胞性線維症、全身性硬化症、原発性骨髄線維症、関節線維症、アテローム硬化症および縦隔線維症を有する患者は、提案された処置の恩恵を受けることができる。

10

20

【0130】

本発明の使用および方法

本発明の抗体は、治療的有用性を有する。例えば、これらの分子は、対象に投与することができ、疾患の処置、予防で、および疾患症状の開始を遅延させるために使用することができる。本発明は、療法において使用するための、または医薬としての、本発明のポリペプチド、核酸または医薬組成物を提供する。本発明は、病的障害の処置で使用するための、本発明のポリペプチド、核酸または医薬組成物をさらに提供する。本発明は、病的障害の処置のための医薬の製造における、本発明のポリペプチド、核酸または医薬組成物の使用をさらに提供する。本発明は、病的障害を患っている患者を処置する方法であって、前記患者に本発明のポリペプチド、核酸または医薬組成物の治療的有効量を投与することを含む方法をさらに提供する。本明細書で用いるように、用語「対象」は、哺乳動物、例えば霊長類、好ましくはより高等な霊長類、例えばヒト（例えば、本明細書に記載される障害を有するまたはその危険がある患者）であってよい。一実施形態では、対象は、ヒト対象、例えば、異常なTGF-2機能によって特徴付けられる障害または状態を有するヒト患者である。本発明は、病的障害を患っている患者を処置する方法であって、本開示のTGF-2抗体またはその機能的断片の治療的有効量を投与することを含む方法を提供する。したがって、本発明は、病的障害を患っている患者を処置する方法であって、抗体MOR14799、MOR14800、MOR14809、MOR14797、MOR14805またはMOR14787の治療的有効量を投与することを含む方法を提供する。本発明は、療法において使用するための、本開示のTGF-2抗体またはその機能的断片も提供する。したがって、本発明は、療法において使用するための、抗体MOR14799、MOR14800、MOR14809、MOR14797、MOR14805またはMOR14787を提供する。本明細書で用いるように、「病的障害」には、限定されずに、筋骨格疾患または障害、筋萎縮症、筋ジストロフィー、デュピュイトラン病、サルコペニア、外傷性損傷、悪液質を引き起こすことが知られている慢性疾患（例えば、がん）、病的状態、例えば線維症、マルファン関連の状態、表皮水疱症、特に栄養障害型表皮水疱症または接合部表皮水疱症、線維柱帯切除術、ロイス-ディーツ症候群、皮膚全身性硬化症、過剰増殖性障害、例えば、レダーホース病、ペイロニ病、指関節背結節症、五十肩、手の背の線維腫症、手根管圧迫症候群、結節性筋膜炎、攻撃的な線維腫症、振戦、白蟻病、ムービングフィンガー、足底線維腫症およびギャロッドパッドは提案された治療

30

40

50

の恩恵を受けることができる、変性および線維性疾患、例えば、強皮症、肥大性癍痕化およびケロイド、特発性肺線維症、心臓線維症（線維性心筋炎も）、肝臓線維症（例えば、NASH）、肺線維症、腎臓線維症（例えば、アルポート）、嚢胞性線維症、全身性硬化症、原発性骨髄線維症、アテローム硬化症、緑内障、加齢性黄斑変性症、糖尿病性網膜症およびフックスジストロフィーが含まれる。表皮水疱症は表皮水疱症の任意の形態を指すが、特に栄養障害型表皮水疱症および接合部表皮水疱症を指す。

【0131】

糖質コルチコイド、例えばコルチゾール、デキサメタゾン、ベタメタゾン、プレドニゾン、メチルプレドニゾンまたはプレドニゾンによる処置の結果を含む、筋萎縮症の多くの原因がある。筋萎縮症は、神経外傷による除神経の結果、または変性、代謝性もしくは炎症性神経障害（例えば、ギランバレー症候群、末梢神経障害または環境毒素もしくはは薬物への曝露）の結果であってもよい。さらに、筋萎縮症は、ミオパシー、例えばミオトニー；ネマリンミオパシー、多重ノミニコアミオパシーおよび筋細管性（中心核）ミオパシーを含む先天性ミオパシー；ミトコンドリアのミオパシー；家族性周期性四肢麻痺；炎症性ミオパシー；例えばグリコーゲンまたは脂質貯蔵病によって引き起こされる代謝ミオパシー；皮膚筋炎；多発筋炎；封入体筋肉炎；骨化性筋炎；横紋筋融解およびミオグロビン尿症の結果であってもよい。ミオパシーは、筋ジストロフィー症候群、例えば、デュシェンヌ、ベッカー、筋緊張性、筋膜肩甲上腕部、エメリー-ドライフス、眼球咽頭、肩甲上腕部、四肢肢帯、フクヤマ、先天性筋ジストロフィーまたは遺伝性末梢筋障害を引き起こすことができる。さらに、筋萎縮症は、成人の運動ニューロン疾患、例えば、筋萎縮性側索硬化症；乳児脊髄筋萎縮、若年性の脊髄筋萎縮、多病巣性伝導体ブロックによる自己免疫性運動神経障害、脳卒中または脊髄損傷による麻痺、外傷による骨格の固定化、長期ベッド療養、随意的不活動性、不随意的不活動性、代謝ストレスまたは栄養不足、がん、AIDS、絶食、甲状腺または副腎または下垂体障害、糖尿病、良性先天性緊張低下、筋中心軸病、肝疾患（線維症、肝硬変などの例）、敗血症、腎不全、うっ血性心不全、加齢、宇宙旅行または無重力環境で費やした時間、の結果であってもよい。本開示の別の実施形態では、本発明の医薬組成物は、上記の病的障害の処置のために使用することができる。したがって、本発明の医薬組成物は、デュピュイトラン病の処置のために使用することができるか、筋ジストロフィーの処置のために使用することができるか、サルコペニアの処置のために使用することができるか、線維性状態の処置のために使用することができるか、マルファン関連の状態の処置のために使用することができるか、表皮水疱症、特に栄養障害型表皮水疱症または接合部表皮水疱症、ロイス-ディーツ症候群の処置のために使用することができるか、線維柱帯切除術の処置のために使用することができるか、皮膚全身性硬化症の処置のために使用することができる。一実施形態では、本発明は、デュピュイトラン病の処置、または筋ジストロフィーの処置、またはサルコペニアの処置、または線維性状態の処置、またはマルファン関連の状態の処置、または表皮水疱症、特に栄養障害型表皮水疱症もしくは接合部表皮水疱症の処置、または線維柱帯切除術の処置、または皮膚全身性硬化症の処置、またはロイス-ディーツ症候群の処置で使用するための、抗体MOR14799、MOR14800、MOR14809、MOR14797、MOR14805またはMOR14787を提供する。特定の実施形態では、MOR14799、MOR14800、MOR14809、MOR14797、MOR14805およびMOR14787からなる群から選択される抗体を含む本発明の医薬組成物は、デュピュイトラン病の処置またはロイス-ディーツ症候群の処置のために使用することができる。本開示の別の特定の実施形態では、MOR14799、MOR14800、MOR14809、MOR14797、MOR14805およびMOR14787からなる群から選択される抗体を含む本発明の医薬組成物は、筋ジストロフィーの処置のために使用することができる。さらなる状態には、悪液質、慢性関節リウマチと関連した悪液質およびがんに関連した悪液質が含まれる。別の実施形態では、本開示は筋肉障害を処置する方法であって、上記のように本発明の抗体またはその機能的断片の治療的有効量を投与することを含む方法に関する。したがって、本開示は筋肉障害を処置する方法であって、MOR14799、

10

20

30

40

50

MOR14800、MOR14809、MOR14797、MOR14805およびMOR14787からなる群から選択される抗体の治療的有効量を投与することを含む方法に関する。筋肉質量を増加させるための開示されるポリペプチドまたはそれらを含む組成物による処置の必要性は、上述の状態の1つから、特に筋萎縮症などの筋骨格疾患または障害の結果として生じることができ、ここで、筋肉障害は、肥満関連のサルコペニア、サルコペニアおよび糖尿病関連の筋萎縮症からなる群から選択される筋萎縮症である。

【0132】

さらに、本発明は、デュピイトラン病、マルファン関連の状態またはマルファン病、表皮水疱症、線維柱帯切除術、ロイス-ディーツ症候群、皮膚全身性硬化症または筋骨格疾患または障害の処置のための医薬の製造のための、本発明の抗体またはその機能的断片、特にMOR14799、MOR14800、MOR14809、MOR14797、MOR14805およびMOR14787からなる群から選択される抗体の使用に関する。

10

【0133】

TGF- は、例えば、骨形成タンパク質(BMP)、増殖および分化因子、アクチビンおよびインヒピンを含む、構造的に関係したサイトカインの大きなファミリーに属する。

【0134】

正常状態の下で、TGF- はホメオスタシスを維持し、例えば、増殖抑制およびアポトーシスの応答の誘導を介して、上皮、内皮、ニューロンおよび造血細胞系統の増殖を制限する。正規のおよび非正規のシグナル伝達経路が、TGF- に対する細胞性応答に参与する。TGF- /Smadの正規経路の活性化は、TGF- の増殖抑制効果を媒介することができる。非正規のTGF- 経路は、さらなる細胞内経路、例えば、分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ(MAPK)、ホスファチジルイノシトール3キナーゼ/プロテインキナーゼB、Rho様GTPアーゼを活性化することができ(Tian et al. Cell Signal. 2011; 23(6):951-62; Blobe et al. N Engl J Med. 2000; 342(18):1350-8)、したがって、上皮-間充織転移(EMT)および/または細胞運動性をモジュレートする。

20

【0135】

TGF- シグナル伝達経路の変化は、ヒト疾患、例えば、がん、心血管疾患、線維症、生殖障害および創傷治癒と関連する。理論に束縛されることを望むことなく、がんにおけるTGF- の役割は、疾患状況(例えば、腫瘍段階および遺伝子の変化)および/または細胞環境に依存すると考えられている。例えば、がんの後期では、TGF- は、がん関連の過程を、例えば、腫瘍増殖を促進する(例えば、EMTを誘導する)か、抗腫瘍免疫応答をブロックするか、腫瘍関連の線維症を増加させるか、血管新生を強化することによってモジュレートすることができる(Wakefield and Hill Nat Rev Cancer. 2013; 13(5):328-41)。

30

【0136】

前臨床証拠は、TGF- が免疫調節において重要な役割を演ずることを示す(Wojtowicz-Praga Invest New Drugs. 2003; 21(1):21-32; Yang et al. Trends Immunol. 2010; 31(6):220-7)。TGF- は、いくつかの機構、例えば、Th2免疫表現型の方へのヘルパーT平衡のシフト; 抗腫瘍Th1タイプ応答およびM1タイプマクロファージの阻害; 細胞傷害性CD8+Tリンパ球(CTL)、NKリンパ球および樹状細胞機能の抑制、CD4+CD25+T調節細胞の生成; または、免疫抑制サイトカイン(例えば、IL10またはVEGF)、炎症誘発性サイトカイン(例えば、IL6、TNF またはIL1)の分泌によって媒介される腫瘍誘発活性を有するM2タイプマクロファージの促進、および遺伝毒性活性を有する反応性酸素種(ROS)の生成を介して、宿主免疫応答を下方制御することができる(Yang et al. Trends Immunol. 2010; 31(6):220-7; Truty and Urrutia Pancreatol. 2007; 7(5-6):423-35; Achyut et al Gastroenterology. 2011; 141(4):1167-78)。

40

【0137】

50

理論に束縛されることを望むことなく、PD-1免疫療法への抵抗性は、例えば、TGF- β シグナル伝達およびTGF- β 依存性の過程、例えば創傷治癒または血管新生に連結された遺伝子を含む、転写サインの存在に関連していると考えられている (Hugo et al. *Cell*. 2016; 165(1):35-44)。TGF- β 遮断は、PD-1/PD-L1軸を阻害する療法の治療ウィンドウを拡張する。TGF- β 阻害剤は、例えば、腫瘍微小環境、例えば脈管形成、線維形成またはエフェクターT細胞の動員に影響する因子をモジュレートすることによって、PD-1免疫療法の臨床有益性に影響することができる (Yang et al. *Trends Immunol*. 2010; 31(6):220-7; Wakefield and Hill *Nat Rev Cancer*. 2013; 13(5):328-41; Truty and Urrutia *Pancreatol*. 2007; 7(5-6):423-35)。

【0138】

理論に束縛されることを望むことなく、抗腫瘍免疫サイクルのいくつかのエLEMENTがPD-1およびTGF- β 受容体の両方を発現し、PD-1およびTGF- β 受容体はおそらく非冗長細胞性シグナルを増殖させるとも考えられている。例えば、自所性前立腺がんのマウスモデルでは、TGFBR1の優性ネガティブ形の使用、またはT細胞でのTGF- β 生成の抑止は、腫瘍増殖を遅延させる (Donkor et al. *Immunity*. 2011; 35(1):123-34; Diener et al. *Lab Invest*. 2009; 89(2):142-51)。マウス前立腺トランスジェニック腺癌 (TRAMP) マウスにおける研究は、養子移転T細胞でのTGF- β シグナル伝達のプロッキングは、それらの持続性および抗腫瘍活性を増加させることを示した (Chou et al. *J Immunol*. 2012; 189(8):3936-46)。一部、腫瘍浸潤性リンパ球におけるPD-1の上方制御のために、移転されたT細胞の抗腫瘍活性は経時的に減少する可能性があり、本明細書に記載されるようにPD-1およびTGF- β 阻害の組合せを支持する。それらのPD-1の高い発現レベルおよびTGF- β 刺激に対するそれらの応答性を考慮すると、PD-1またはTGF- β に対する中和抗体の使用は、調節T細胞 (Treg) に影響することもでき (Riella et al. *Am J Transplant*. 2012; 12(10):2575-87)、例えばTregの分化および機能のモジュレーションを強化することによってがんを処置するための、PD-1およびTGF- β 阻害の組合せを支持する。

【0139】

理論に束縛されることを望むことなく、腫瘍増殖および転移性進行を促進するために免疫監視を逃避するために、がんはTGF- β を使用することができると考えられている。例えば、ある特定の進行したがんでは、高レベルのTGF- β は腫瘍攻撃性および不良な予後と関連し、TGF- β 経路は、がん細胞運動性、浸潤、EMTまたは幹細胞表現型のうちの1つまたは複数促進することができる。がん細胞および白血球集団によって媒介される (例えば、様々な細胞によって発現または分泌される分子、例えばIL-10またはTGF- β を介して) 免疫調節は、ある特定の患者において単独療法としてのチェックポイント阻害剤への応答を制限することができる。ある特定の実施形態では、チェックポイント阻害剤 (例えば、抗PD-1) 単独療法に反応しないか十分に反応しないがん、例えば、膵臓がんまたは結腸直腸がん (例えば、マイクロサテライト安定結腸直腸がん (MSI-CRC)) を処置するために、チェックポイント阻害剤 (例えば、PD-1の阻害剤) によるTGF- β の組合せ阻害が使用される。他の実施形態では、高レベルのエフェクターT細胞浸潤を示すがん、例えば、肺がん (例えば、非小細胞肺がん)、乳がん (例えば、三重陰性乳がん)、肝がん (例えば、肝細胞癌)、前立腺がんまたは腎臓がん (例えば、明細胞腎細胞癌) を処置するために、チェックポイント阻害剤 (例えば、PD-1の阻害剤) によるTGF- β の組合せ阻害が使用される。一実施形態では、本開示は、対象でがんを処置する方法であって、対象にTGF- β -2抗体とPD-1の阻害剤 (例えば、抗PD-1抗体) の組合せを投与することを含む方法に関する。一実施形態では、本組合せは、本明細書に開示されるTGF- β -2抗体またはその機能的断片およびPD-1阻害剤 (例えば、抗PD-1抗体) を含む。一実施形態では、本明細書に開示されるTGF- β -2抗体またはその機能的断片は、0.1 mg/kg から 15 mg/kg の間 (例えば、0.3 mg/kg から 12 mg/kg の間、または 1 mg/kg から 6 mg/kg の間、例えば、約 0.1 mg/kg、0.3 mg/kg、1 mg/kg、3 mg/kg、6 m

10

20

30

40

50

g / k g、12 m g / k g または 15 m g / k g) の用量で、例えば静脈内に、例えば3週おきに1回投与され、配列番号159のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号169のアミノ酸配列を含むVLを含む、ヒトプログラム死-1(PD-1)タンパク質に結合することが可能な抗体は、50 m g から500 m g の間の用量(例えば、100 m g から400 m g の間、例えば、約100 m g、200 m g、300 m g または400 m g の用量)で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回または4週おきに1回投与される。一部の実施形態では、配列番号159のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号169のアミノ酸配列を含むVLを含む、ヒトプログラム死-1(PD-1)タンパク質に結合することが可能な抗体は、100 m g から300 m g の間の用量(例えば、約100 m g、200 m g または300 m g の用量)で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与される。

10

【0140】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるTGF- β 2抗体またはその機能的断片は、約0.1 m g / k g または0.3 m g / k g の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与され、配列番号159のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号169のアミノ酸配列を含むVLを含む、ヒトプログラム死-1(PD-1)タンパク質に結合することが可能な抗体は、約100 m g の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与される。一部の実施形態では、本明細書に開示されるTGF- β 2抗体またはその機能的断片は、約0.3 m g / k g の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与され、配列番号159のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号169のアミノ酸配列を含むVLを含む、ヒトプログラム死-1(PD-1)タンパク質に結合することが可能な抗体は、約100 m g または300 m g の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与される。一部の実施形態では、本明細書に開示されるTGF- β 2抗体またはその機能的断片は、約1 m g / k g、3 m g / k g、6 m g / k g、12 m g / k g または15 m g / k g の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与され、配列番号159のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号169のアミノ酸配列を含むVLを含む、ヒトプログラム死-1(PD-1)タンパク質に結合することが可能な抗体は、約300 m g の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与される。

20

【0141】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるTGF- β 2抗体またはその機能的断片は、0.1 m g から0.2 m g の間の用量(例えば、約0.1 m g / k g)で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与され、配列番号159のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号169のアミノ酸配列を含むVLを含む、ヒトプログラム死-1(PD-1)タンパク質に結合することが可能な抗体は、50 m g から200 m g の間(例えば、約100 m g)の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与される。

30

【0142】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるTGF- β 2抗体またはその機能的断片は、0.2 m g から0.5 m g の間(例えば、約0.3 m g / k g)の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与され、配列番号159のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号169のアミノ酸配列を含むVLを含む、ヒトプログラム死-1(PD-1)タンパク質に結合することが可能な抗体は、50 m g から200 m g の間(例えば、約100 m g)の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与される。

40

【0143】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるTGF- β 2抗体またはその機能的断片は、0.2 m g から0.5 m g の間(例えば、約0.3 m g / k g)の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与され、配列番号159のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号169のアミノ酸配列を含むVLを含む、ヒトプログラム死-1(P

50

D - 1) タンパク質に結合することが可能な抗体は、200 mg から 400 mg の間 (例えば、約 300 mg) の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与される。

【0144】

一部の実施形態では、本明細書に開示される TGF - β 2 抗体またはその機能的断片は、0.5 mg から 2 mg の間 (例えば、約 1 mg / kg) の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与され、配列番号 159 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 169 のアミノ酸配列を含む V L を含む、ヒトプログラム死 - 1 (PD - 1) タンパク質に結合することが可能な抗体は、200 mg から 400 mg の間 (例えば、約 300 mg) の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与される。

10

【0145】

一部の実施形態では、本明細書に開示される TGF - β 2 抗体またはその機能的断片は、2 mg から 5 mg の間 (例えば、約 3 mg / kg) の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与され、配列番号 159 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 169 のアミノ酸配列を含む V L を含む、ヒトプログラム死 - 1 (PD - 1) タンパク質に結合することが可能な抗体は、200 mg から 400 mg の間 (例えば、約 300 mg) の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与される。

【0146】

一部の実施形態では、本明細書に開示される TGF - β 2 抗体またはその機能的断片は、5 mg から 10 mg の間 (例えば、約 6 mg / kg) の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与され、配列番号 159 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 169 のアミノ酸配列を含む V L を含む、ヒトプログラム死 - 1 (PD - 1) タンパク質に結合することが可能な抗体は、200 mg から 400 mg の間 (例えば、約 300 mg) の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与される。

20

【0147】

一部の実施形態では、本明細書に開示される TGF - β 2 抗体またはその機能的断片は、10 mg から 15 mg の間 (例えば、約 12 mg / kg) の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与され、配列番号 159 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 169 のアミノ酸配列を含む V L を含む、ヒトプログラム死 - 1 (PD - 1) タンパク質に結合することが可能な抗体は、200 mg から 400 mg の間 (例えば、約 300 mg) の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与される。

30

【0148】

一部の実施形態では、本明細書に開示される TGF - β 2 抗体またはその機能的断片は、10 mg から 20 mg の間 (例えば、約 15 mg / kg) の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与され、配列番号 159 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 169 のアミノ酸配列を含む V L を含む、ヒトプログラム死 - 1 (PD - 1) タンパク質に結合することが可能な抗体は、200 mg から 400 mg の間 (例えば、約 300 mg) の用量で、例えば静脈内注入により、例えば3週おきに1回投与される。

【0149】

一部の実施形態では、本明細書に開示される TGF - β 2 抗体またはその機能的断片は、PD - 1 の阻害剤 (例えば、配列番号 159 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 169 のアミノ酸配列を含む V L を含む、ヒトプログラム死 - 1 (PD - 1) タンパク質に結合することが可能な抗体) が投与される前に投与される。他の実施形態では、本明細書に開示される TGF - β 2 抗体またはその機能的断片は、PD - 1 の阻害剤 (例えば、配列番号 159 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 169 のアミノ酸配列を含む V L を含む、ヒトプログラム死 - 1 (PD - 1) タンパク質に結合することが可能な抗体) が投与される後に投与される。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される TGF - β 2 抗体またはその機能的断片、および PD - 1 の阻害剤 (例えば、配列番号 159 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 169 のアミノ酸配列を含む V L を含む、ヒトプログラム死 - 1 (PD - 1) タンパク質に結合することが可能な抗体) は、2つの投

40

50

与の間に少なくとも30分（例えば、少なくとも1、1.5または2時間）の中断を入れて別々に投与される。

【0150】

一実施形態では、膵臓がん、結腸直腸がん（例えば、マイクロサテライト安定結腸直腸がん（MSS-CRC））、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）、乳がん（例えば、三重陰性乳がん）、肝がん（例えば、肝細胞癌）、前立腺がんまたは腎臓がん（例えば、明細胞腎細胞癌）を処置するために、本明細書に開示されるTGF- β 2抗体またはその機能的断片は、配列番号159のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号169のアミノ酸配列を含むVLを含む、ヒトプログラム死-1（PD-1）タンパク質に結合することが可能な抗体と併用投与される。

10

【0151】

一実施形態では、配列番号159のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号169のアミノ酸配列を含むVLを含む、ヒトプログラム死-1（PD-1）タンパク質に結合することが可能な抗体と併用投与されるTGF- β 2抗体またはその機能的断片は、抗体MOR14799、MOR14800、MOR14809、MOR14797、MOR14805またはMOR14787である。一実施形態では、配列番号159のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号169のアミノ酸配列を含むVLを含む、ヒトプログラム死-1（PD-1）タンパク質に結合することが可能な抗体と併用投与されるTGF- β 2抗体またはその機能的断片は、抗体MOR14797である。

20

【0152】

がんは、例えば、本明細書に記載されるがん、例えば、肺がん（扁平上皮）、肺がん（腺癌）、頭頸部がん、子宮頸がん（扁平上皮）、胃がん、甲状腺がん、皮膚がん、メラノーマ、鼻咽頭がん（例えば、分化したまたは未分化の転移性または局所再発性の上咽頭癌）、腎臓がん、神経内分泌腫瘍（NET）、卵巣がん、卵管がん、結腸直腸がんまたは乳がんであってよい。ある特定の実施形態では、がんは、皮膚がん、例えばメルケル細胞癌またはメラノーマである。一実施形態では、がんはメルケル細胞癌である。他の実施形態では、がんはメラノーマである。他の実施形態では、がんは、乳がん、例えば三重陰性乳がん（TNBC）またはHER2陰性乳がんである。他の実施形態では、がんは、腎臓がん、例えば、腎細胞癌（例えば、明細胞腎細胞癌（CCRC）または非明細胞腎細胞癌（nccRC））である。他の実施形態では、がんは、甲状腺がん、例えば未分化甲状腺癌（ATC）である。他の実施形態では、がんは、神経内分泌腫瘍（NET）、例えば、非定型的肺カルチノイド腫瘍、または膵臓、胃腸（GI）管もしくは肺におけるNETである。ある特定の実施形態では、がんは、肺がん、例えば非小細胞肺がん（NSCLC）（例えば、扁平上皮NSCLCまたは非扁平上皮NSCLC）である。ある特定の実施形態では、がんは卵巣がんである。ある特定の実施形態では、がんは卵管がんである。ある特定の実施形態では、がんは結腸直腸がん（CRC）（例えば、高マイクロサテライト不安定性結腸直腸がん（高MSI-CRC）またはマイクロサテライト安定結腸直腸がん（MSS-CRC））である。

30

【0153】

別の態様では、対象を処置する、例えば、対象で過剰増殖性状態または障害（例えば、がん）、例えば固形腫瘍、血液がん、軟組織腫瘍または転移性病変を低減または改善する方法が提供される。本方法は、対象に本明細書に開示されるTGF- β 2抗体/PD-1阻害剤組合せの1つまたは複数投与することを含む。

40

【0154】

本開示のある特定の実施形態は、以下の態様に記載される：

50. それを必要とする対象に、

- (a) 配列番号7の変重鎖配列および配列番号17の変軽鎖配列；
- (b) 配列番号27の変重鎖配列および配列番号37の変軽鎖配列；
- (c) 配列番号47の変重鎖配列および配列番号57の変軽鎖配列；
- (d) 配列番号67の変重鎖配列および配列番号77の変軽鎖配列；

50

(e) 配列番号 87 の可変重鎖配列および配列番号 97 の可変軽鎖配列；または
 (f) 配列番号 107 の可変重鎖配列および配列番号 117 の可変軽鎖配列を含む、ヒトモノクローナル抗 TGF- β 2 抗体、
 ならびに、がんを処置するのに有効な量のヒトプログラム死 - 1 (PD - 1) タンパク質に結合することが可能な抗体分子を投与することを含み、抗体分子は、配列番号 153 の VHC DR1 アミノ酸配列、配列番号 154 の VHC DR2 アミノ酸配列および配列番号 155 の VHC DR3 アミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (VH)；および、配列番号 163 の VLC DR1 アミノ酸配列、配列番号 164 の VLC DR2 アミノ酸配列および配列番号 165 の VLC DR3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (VL) を含む、がんを処置する方法。

10

【0155】

51. ヒトプログラム死 - 1 (PD - 1) タンパク質に結合することが可能な抗体は、配列番号 159 のアミノ酸配列を含む VH および配列番号 169 のアミノ酸配列を含む VL を含む、態様 50 の方法。

【0156】

52. ヒトプログラム死 - 1 (PD - 1) タンパク質に結合することが可能な抗体は、配列番号 161 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 171 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、態様 50 または 51 の方法。

【0157】

53. ヒトプログラム死 - 1 (PD - 1) タンパク質に結合することが可能な抗体は、配列番号 159 のアミノ酸配列を含む VH および配列番号 149 のアミノ酸配列を含む VL を含む、態様 50 の方法。

20

【0158】

54. ヒトプログラム死 - 1 (PD - 1) タンパク質に結合することが可能な抗体は、配列番号 161 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 151 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、態様 50 または 53 の方法。

【0159】

例示的な PD - 1 阻害剤

一実施形態では、PD - 1 阻害剤は、抗 PD - 1 抗体分子である。一実施形態では、PD - 1 阻害剤は、参照により完全に組み込まれている、2015年7月30日に公開された「Antibody Molecules to PD - 1 and Uses Thereof」という表題の米国特許出願公開第 2015 / 0210769 号に記載される抗 PD - 1 抗体分子である。

30

【0160】

一実施形態では、抗 PD - 1 抗体分子は、配列表に示されるアミノ酸配列を含む、または配列表に示されるヌクレオチド配列によってコードされる、重鎖および軽鎖可変領域からの (例えば、配列表に開示される BAP049 - クローン - E または BAP049 - クローン - B の重鎖および軽鎖可変領域配列からの) 少なくとも 1、2、3、4、5 または 6 つの相補性決定領域 (CDR) (または、一括して CDR の全て) を含む。一部の実施形態では、CDR は Kabat の定義による (例えば、配列表に示される通りである)。一部の実施形態では、CDR は Chothia の定義による (例えば、配列表に示される通りである)。一部の実施形態では、CDR は、Kabat と Chothia の両方の合わせた CDR 定義による (例えば、配列表に示される通りである)。一実施形態では、VH CDR1 の Kabat および Chothia の CDR の組合せは、アミノ酸配列 GYTF TTYWMH (配列番号 203) を含む。一実施形態では、CDR の 1 つまたは複数 (または、一括して CDR の全て) は、配列表に示されるアミノ酸配列と比較して、1、2、3、4、5、6 またはそれより多くの変化、例えばアミノ酸置換 (例えば、保存的アミノ酸置換) もしくは欠失を有するか、または配列表に示されるヌクレオチド配列によってコードされる。

40

【0161】

50

一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、配列番号153のVHCDR1アミノ酸配列、配列番号154のVHCDR2アミノ酸配列および配列番号155のVHCDR3アミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)；ならびに、配列番号163のVLCDR1アミノ酸配列、配列番号164のVLCDR2アミノ酸配列および配列番号165のVLCDR3アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含み、各々は、配列表に開示されている。

【0162】

一実施形態では、抗体分子は、配列番号173のヌクレオチド配列によってコードされるVHCDR1、配列番号174のヌクレオチド配列によってコードされるVHCDR2、および配列番号175のヌクレオチド配列によってコードされるVHCDR3を含むVH；ならびに、配列番号179のヌクレオチド配列によってコードされるVLCDR1、配列番号180のヌクレオチド配列によってコードされるVLCDR2、および配列番号181のヌクレオチド配列によってコードされるVLCDR3を含むVLを含み、各々は、配列表に開示されている。

10

【0163】

一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、配列番号139のアミノ酸配列または配列番号139に少なくとも85%、90%、95%もしくは99%もしくはそれより高く同一であるアミノ酸配列を含むVHを含む。一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、配列番号169のアミノ酸配列または配列番号169に少なくとも85%、90%、95%もしくは99%もしくはそれより高く同一であるアミノ酸配列を含むVLを含む。一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、配列番号149のアミノ酸配列または配列番号149に少なくとも85%、90%、95%もしくは99%もしくはそれより高く同一であるアミノ酸配列を含むVLを含む。一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、配列番号139のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号169のアミノ酸配列を含むVLを含む。一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、配列番号139のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号149のアミノ酸配列を含むVLを含む。

20

【0164】

一実施形態では、抗体分子は、配列番号140のヌクレオチド配列または配列番号140に少なくとも85%、90%、95%もしくは99%もしくはそれより高く同一であるヌクレオチド配列によってコードされるVHを含む。一実施形態では、抗体分子は、配列番号170もしくは150のヌクレオチド配列または配列番号170もしくは150に少なくとも85%、90%、95%もしくは99%もしくはそれより高く同一であるヌクレオチド配列によってコードされるVLを含む。一実施形態では、抗体分子は、配列番号140のヌクレオチド配列によってコードされるVHおよび配列番号170または150のヌクレオチド配列によってコードされるVLを含む。

30

【0165】

一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、配列番号141のアミノ酸配列または配列番号141に少なくとも85%、90%、95%もしくは99%もしくはそれより高く同一であるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、配列番号171のアミノ酸配列または配列番号171に少なくとも85%、90%、95%もしくは99%もしくはそれより高く同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、配列番号151のアミノ酸配列または配列番号151に少なくとも85%、90%、95%もしくは99%もしくはそれより高く同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、配列番号141のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号171のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、配列番号141のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号151のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

40

【0166】

一実施形態では、抗体分子は、配列番号162のヌクレオチド配列または配列番号162に少なくとも85%、90%、95%もしくは99%もしくはそれより高く同一であるヌクレオチド配列によってコードされる重鎖を含む。一実施形態では、抗体分子は、配列

50

番号172もしくは152のヌクレオチド配列または配列番号172もしくは152に少なくとも85%、90%、95%もしくは99%もしくはそれより高く同一であるヌクレオチド配列によってコードされる軽鎖を含む。一実施形態では、抗体分子は、配列番号142のヌクレオチド配列によってコードされる重鎖および配列番号172または152のヌクレオチド配列によってコードされる軽鎖を含む。

【0167】

一般的に、特記されない限り、抗PD-1抗体分子は、例えば本明細書に含まれる配列表に記載される、1つまたは複数のKabata CDRおよび/またはChothia CDRの任意の組合せを含むことができる。全ての定義の下で、各VHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端にかけて以下の順序で配列される3つのCDRおよび4つのフレームワーク(FR)を一般的に含む: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

10

【0168】

他の例示的なPD-1阻害剤

一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、ニボルマブ(Bristol-Myers Squibb)、別名MDX-1106、MDX-1106-04、ONO-4538、BMS-936558またはOPDIVO(登録商標)である。ニボルマブ(クローン5C4)および他の抗PD-1抗体は、参照により完全に組み込まれる、米国特許第8,008,449号および国際出願2006/121168に開示される。一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、配列表に開示されるニボルマブのCDR配列の1つもしくは複数(または、一括してCDR配列の全て)、重鎖もしくは軽鎖可変領域配列、または重鎖もしくは軽鎖配列を含む。

20

【0169】

一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、ペムプロリズマブ(Merck & Co)、別名ラムプロリズマブ、MK-3475、MK03475、SCH-900475またはKEYTRUDA(登録商標)である。ペムプロリズマブおよび他の抗PD-1抗体は、参照により完全に組み込まれる、Hamid, O. et al. (2013) New England Journal of Medicine 369 (2): 134-44、米国特許第8,354,509号および国際出願2009/114335に開示される。一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、配列表に開示されるペムプロリズマブのCDR配列の1つもしくは複数(または、一括してCDR配列の全て)、重鎖もしくは軽鎖可変領域配列、または重鎖もしくは軽鎖配列を含む。

30

【0170】

一実施形態では、抗PD-1抗体分子はピジリズマブ(CureTech)であり、CT-011としても知られる。ピジリズマブおよび他の抗PD-1抗体は、参照により完全に組み込まれる、Rosenblatt, J. et al. (2011) J Immunotherapy 34(5): 409-18、米国特許第7,695,715号、米国特許第7,332,582号および米国特許第8,686,119号に開示される。一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、配列表に開示されるピジリズマブのCDR配列の1つもしくは複数(または、一括してCDR配列の全て)、重鎖もしくは軽鎖可変領域配列、または重鎖もしくは軽鎖配列を含む。

40

【0171】

一実施形態では、抗PD-1抗体分子はMEDI0680(Medimmune)であり、AMP-514としても知られる。MEDI0680および他の抗PD-1抗体は、参照により完全に組み込まれる、米国特許第9,205,148号および国際出願2012/145493に開示される。一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、MEDI0680のCDR配列の1つもしくは複数(または、一括してCDR配列の全て)、重鎖もしくは軽鎖可変領域配列、または重鎖もしくは軽鎖配列を含む。

【0172】

一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、REGN2810(Regeneron)である。一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、REGN2810のCDR配列の1つもしくは複数(または、一括してCDR配列の全て)、重鎖もしくは軽鎖可変領域配列、ま

50

たは重鎖もしくは軽鎖配列を含む。

【0173】

一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、PF-06801591 (Pfizer) である。一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、PF-06801591のCDR配列の1つもしくは複数(または、一括してCDR配列の全て)、重鎖もしくは軽鎖可変領域配列、または重鎖もしくは軽鎖配列を含む。

【0174】

一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、BGB-A317またはBGB-108 (Beigene) である。一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、BGB-A317またはBGB-108のCDR配列の1つもしくは複数(または、一括してCDR配列の全て)、重鎖もしくは軽鎖可変領域配列、または重鎖もしくは軽鎖配列を含む。

10

【0175】

一実施形態では、抗PD-1抗体分子はINCSHR1210 (Incyte) であり、別名、INCSHR01210またはSHR-1210である。一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、INCSHR1210のCDR配列の1つもしくは複数(または、一括してCDR配列の全て)、重鎖もしくは軽鎖可変領域配列、または重鎖もしくは軽鎖配列を含む。

【0176】

一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、TSR-042 (Tesarro) であり、ANB011としても知られる。一実施形態では、抗PD-1抗体分子は、TSR-042のCDR配列の1つもしくは複数(または、一括してCDR配列の全て)、重鎖もしくは軽鎖可変領域配列、または重鎖もしくは軽鎖配列を含む。

20

【0177】

さらなる公知の抗PD-1抗体には、例えば、参照により完全に組み込まれる、国際出願2015/112800、国際出願2016/092419、国際出願2015/085847、国際出願2014/179664、国際出願2014/194302、国際出願2014/209804、国際出願2015/200119、米国特許第8,735,553号、米国特許第7,488,802号、米国特許第8,927,697号、米国特許第8,993,731号および米国特許第9,102,727号に記載されるものが含まれる。一実施形態では、抗PD-1抗体は、本明細書に記載される抗PD-1抗体の1つと同じ、PD-1上のエピトープとの結合で競合し、および/またはそれに結合する抗体である。一実施形態では、PD-1阻害剤は、例えば、参照により完全に組み込まれる米国特許第8,907,053号に記載されるように、PD-1シグナル伝達経路を阻害するペプチドである。一実施形態では、PD-1阻害剤は、イムノアドヘシンである(例えば、定常領域(例えば、免疫グロブリン配列のFc領域)に融合したPD-L1またはPD-L2の細胞外またはPD-1結合性部分を含むイムノアドヘシン)。一実施形態では、PD-1阻害剤は、AMP-224 (B7-DCIg (Amplimmune))、例えば、参照により完全に組み込まれる国際出願2010/027827および国際出願2011/066342に開示されるもの)である。

30

【0178】

上述により、本発明はさらに他の態様で以下を規定する：
本発明の抗体が別の活性薬剤と併用投与される場合、共投与される組合せ化合物の投薬量は、用いられる共薬物のタイプ、用いられる特定薬物、処置される状態などによって当然ながら異なる。本発明のヒト抗体を含む組成物および使用説明書からなるキットも、本発明の範囲内である。キットは、少なくとも1つのさらなる試薬、または本発明の1つまたは複数のさらなる抗体をさらに含有することができる。キットは、キットの内容物の使用目的を示す表示を一般的に含む。用語表示は、キットの上にもまたはそれと一緒に提供される、さもなければキットに付随する任意の書面、または記録資料を含む。キットは、患者が抗TGF-2抗体処置に应答する群に属するかどうかについて診断するためのツールをさらに含むことができる。そのようなキットは、凍結乾燥形の本発明の抗体、希釈剤お

40

50

よび使用説明書を含むことができる。本発明を完全に記載したが、本発明は以下の実施例および請求項によってさらに説明され、それらは例示的であり、さらに制限するものではない。

【 0 1 7 9 】

配列/配列表

MOR14799		
配列番号 1 (Kabat)	HCDR1	RYYVA
配列番号 2 (Kabat)	HCDR2	WIDPGQSNTRYSPSFQG
配列番号 3 (Kabat)	HCDR3	MLAWGWFDY
配列番号 4 (Chothia)	HCDR1	GYSFTRY
配列番号 5 (Chothia)	HCDR2	DPGQSN
配列番号 6 (Chothia)	HCDR3	MLAWGWFDY
配列番号 7	VH	QVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTRYVAVVRQMPGKGLEWMGWIDPGQSNTRYSPSFQGQVTI SADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARMMLAWGWFDYWGGQGLVTVSS
配列番号 8	DNA VH	cagggtgcagctggtgcagtcaggcgccgaagtgaagaagcccggcgagtcactgaagat tagctgtaaaggctcaggctatagcttcactaggtactactggtgagacaga tgcccgcaagggcctggagtgatgggctggatcgaccccgccagcttaacactaga tatagccctagcttcaggggccaggtgacaattagcgccgataagtctattagcaccgc ctacctgcagtggtctagcctgaaggctagtgacaccgctatgtactactgctagaa tgctggcctggggctggttcgactactggggccagggcacccctggtgacagtgcttagc
配列番号 9	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTRYVAVVRQMPGKGLEWMGWIDPGQSNTRYSPSFQGQVTI SADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARMMLAWGWFDYWGGQGLVTVSS ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFFAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTV DKSRRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
配列番号 10	DNA 重鎖	cagggtgcagctggtgcagtcaggcgccgaagtgaagaagcccggcgagtcactgaagat tagctgtaaaggctcaggctatagcttcactaggtactactggtgagacaga tgcccgcaagggcctggagtgatgggctggatcgaccccgccagcttaacactaga tatagccctagcttcaggggccaggtgacaattagcgccgataagtctattagcaccgc ctacctgcagtggtctagcctgaaggctagtgacaccgctatgtactactgctagaa tgctggcctggggctggttcgactactggggccagggcacccctggtgacagtgcttagc gctagcaccgaagggcccaagtggtttcccctggccccagcagcaagtcacttccgg cggaactgctgccctgggttgcctggtgaaggactacttccccgagcccgtagcagtgct cctggaactctgggctctgacttccggcgtgcacacctcccccgctgctgcagagc agcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgacagtgccctccagctctctgggaacca gacctatctgcaacgtgaaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtgaggcccaagagctgcgacaagaccacacctgccccctgcccagctccagaactgctg ggagggccttccgtgttccgttcccccccaagccaaggacaacctgatgatcagcag gacccccgaggtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccaaggagaccagaggtgaagt tcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggag cagtacaacagcacctacaggggtggtgctcctgctgacctgctgcaccaggactggct gaacggcaagaatacaagtgcaagtgctccaacaaggccctgccagcccaatcgaaa

10

20

30

【 0 1 8 0 】

40

		agacaatcagcaaggccaaggccagccacgggagccccaggtgtacaccctgcccccc agccgggaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgggtaagggttcta ccccagcgatatcgccgtggagtgaggagagcaacggccagcccagagaacaactacaaga ccacccccccagtgctggacagcgacggcagcttcttcctgtacagcaagctgacctg gacaagtccaggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgagccct gcacaaccactaccccagaagtccttgagcctgagccccggcaag
配列番号 11 (Kabat)	LCDR1	SGDNLGGYYAH
配列番号 12 (Kabat)	LCDR2	DKSDRPS
配列番号 13 (Kabat)	LCDR3	ASYDSSLMMV
配列番号 14 (Chothia)	LCDR1	DNLGGYY
配列番号 15 (Chothia)	LCDR2	DKS
配列番号 16 (Chothia)	LCDR3	YDSSLMM
配列番号 17	VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNLGGYYAHWYQQKPGQAPVLVIYDKSDRPSGIPE RFSGSNSGNTATLTI SRAQAGDEADYYCAS YDSSLMMVFGGTTKLTVL
配列番号 18	DNA VL	agctacgagctgactcagccctgtcagtgctcagtgccctggccagaccgctagaat cacctgtagcggcgataacctggcggtactacgctcactggatcagcagaagccc gccagggccccgtgctgggtgatctacgataagtcagatagacctagcggaaatccccgag cggtttagcggctctaatagcggcaacaccgctaaccctgactatctctagggctcaggc cggcgacgagggcactactactgcgctagttacgactctagcctgatgatgggtgtc gcgagggcactaagctgacctgctgggcccagcctaaggctgccccagcgtgacctg
配列番号 19	軽鎖	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNLGGYYAHWYQQKPGQAPVLVIYDKSDRPSGIPE RFSGSNSGNTATLTI SRAQAGDEADYYCAS YDSSLMMVFGGTTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
配列番号 20	DNA 軽鎖	agctacgagctgactcagccctgtcagtgctcagtgccctggccagaccgctagaat cacctgtagcggcgataacctggcggtactacgctcactggatcagcagaagccc gccagggccccgtgctgggtgatctacgataagtcagatagacctagcggaaatccccgag cggtttagcggctctaatagcggcaacaccgctaaccctgactatctctagggctcaggc cggcgacgagggcactactactgcgctagttacgactctagcctgatgatgggtgtc gcgagggcactaagctgacctgctgggcccagcctaaggctgccccagcgtgacctg ttccccccagcagcgaggagctgcaggccaaacaaggccaccctgggtgtgctgatcag cgacttctaccagggcgcgtgacctggcctggaaggccgacagcagccccgtgaagg ccggcgtggagaccaccacccccagcaagcagagcaacaacaagtagcggccagcagc tacctgagcctgacccccgagcagtggaagagccacaggtcctacagctgccaggtgac ccacgagggcagcaccgtggaaaagaccgtggcccccaaccgagtgagc
MOR14800		
配列番号 21 (Kabat)	HCDR1	RYYVA
配列番号 22 (Kabat)	HCDR2	WIDPGQSNTRYSPSFQG
配列番号 23 (Kabat)	HCDR3	MLAWGWFYD
配列番号 24 (Chothia)	HCDR1	GYSFTRY
配列番号 25 (Chothia)	HCDR2	DPGQSN
配列番号 26 (Chothia)	HCDR3	MLAWGWFYD
配列番号 27	VH	QVQLVQSGAEVKKPESLKI SCKGSGYSFTRYVAWVRQMPGKGLEWMGWIDPGQSNTR YSPSFQGGVITISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARM LAWGWFYDWGQGLTIVTSS
配列番号 28	DNA VH	caggtgcagctgggtcagtcaggcgcgaagtgagaagccccggcagtcactgaagat tagctgtaaaggctcaggctatagcttcactaggtactactggtcctgggtgagacaga tgccccgcaaggcctggagtgatgggctggatcgacccccggcagcttaactactaga tatagccctagcttccagggccaggtgacaattagcggcgataagctctattagcaccgc ctacctgcagtggtctagcctgaaggctagtgacaccgctatgtactactgcgctagaa tgctggcctggggctgggttcgactactggggccagggcaccctgggtgacagtgctagc

10

20

30

40

配列番号 29	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTRYVAVVRQMPGKGLEWMGWIDPGQSNTR YSPSFQGGVITISADKSI STAYLQWSS LKASDTAMYYCARM LAWGWFYDYGQGT LVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYLSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 30	DNA 重鎖	cagggtgcagctgggtgcagtcaggcgccgaagtgaagaagcccgccgagtcactgaagat tagctgtaaaggctcaggctatagcttcactaggtaactacgtggcctgggtgagacaga tgcccggaagggcctggagtgatgggctggatcgaccccgccagtcactaactaga tatagccctagcttcaggccaggtgacaatagcgccgataagtctattagcaccgc ctacctgcagtggtctagcctgaaggctagtgacaccgctatgtaactactgcgctagaa tgctggcctggggctggttcgactactggggccagggcacccctggtgacagtgctctagc gtagacccaagggcccaagtgtgtttcccctggccccagcagcaagtctacttccgg cggaactgctgccctgggtgctgggtgaaggactactccccgagcccgtagcagtggt cctggaactctggggctctgacttccggcgtgcaacacctccccgcccgtgctgcagagc agcggcctgtacagcctgagcagcgtgggtgacagtgccctccagctctctgggaacca gacctatctgcaacgtgaaccacaagccagcaaacccaaggtggacaagagagtggtg ggaggccttccgtgttctctgttccccccaagcccaaggacaacctgatgatcagcag gacccccgaggtgacctgctgggtgggacgtgtcccaagaggaccagaggtgaagt tcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcacaaagcgaagaccagccagagagggag cagtacaacagcacctacagggtgggtgctcctgctgacctgctgcaaccaggaactggt gaacggcaagaatacaagtgcacagctctccacaagggcctgcccagcccccaatcgaaa agacaatcagcaagccaagggccagccacgggagccccaggtgtacacctgcccccc agccgggagggagatgaccaagaaccaggtgtcctgacctgctgggtgaagggcttcta ccccagcagatctgcccgtggagtgaggagcaacggccagcccagagaacaactacaaga ccacccccagtgctggacagcgacggcagcttcttctctgacagcaagctgacctg gacaagtccaggtggcagcagggcaacgtgttcagctgacgctgatgacagggccct gcacaaccactacaccagaagtcctgagcctgagccccggcaag
配列番号 31 (Kabat)	LCDR1	SGDNLGGYYAH
配列番号 32 (Kabat)	LCDR2	DTSDRPS
配列番号 33 (Kabat)	LCDR3	ASYDSSLMMV
配列番号 34 (Chothia)	LCDR1	DNLGGYY
配列番号 35 (Chothia)	LCDR2	DTS
配列番号 36 (Chothia)	LCDR3	YDSSLMM
配列番号 37	VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNLGGYYAHWYQKPGQAPV LVI YDTS DRPSGI PE RFSGSNSGNTATLTISR AQAQGEADY YCAS YDSSLMMVFGGGT KLT V L
配列番号 38	DNA VL	agctacgagctgactcagccctgtcagtgctcagtgccctggggccagaccgctagaat cacctgtagcggcgataacctggggcggtactactcgtcactgggtatcagcagaagccc gccaggccccgtgctgggtgatctacgacactagcgatagacctagcggaatccccgag cggtttagcggctctaatagcggcaacaccgctaccctgactatctctagggctcaggc cggcgacgagggccgactactactgcgctagttacgactctagcctgatgatgggtgttcg gaggagcactaagctgacctgctggggccagcctaaggctgccccagcgtgacctg
配列番号 39	軽鎖	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNLGGYYAHWYQKPGQAPV LVI YDTS DRPSGI PE RFSGSNSGNTATLTISR AQAQGEADY YCAS YDSSLMMVFGGGT KLT V L G Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D S S P V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S
配列番号 40	DNA 軽鎖	agctacgagctgactcagccctgtcagtgctcagtgccctggggccagaccgctagaat cacctgtagcggcgataacctggggcggtactactcgtcactgggtatcagcagaagccc gccaggccccgtgctgggtgatctacgacactagcgatagacctagcggaatccccgag cggtttagcggctctaatagcggcaacaccgctaccctgactatctctagggctcaggc cggcgacgagggccgactactactgcgctagttacgactctagcctgatgatgggtgttcg gaggagcactaagctgacctgctggggccagcctaaggctgccccagcgtgacctg ttccccccagcagcagggagctgcaggccaacaaggccaacctgggtgtgctgatcag cgacttctaccagggcgcgtgacctggcctggaaggccgacagcagccccgtgaagg ccggcgtggagaccaccacccccagcaagcagagcaacaacaagtagcggccagcagc tacctgagcctgacccccgagcagtggaagagccacaggtcctacagctgccaggtgac ccacgagggcagcaccgtggaaaagacctggcccccaaccagagtgacg

10

20

30

40

MOR14809		
配列番号 41 (Kabat)	HCDR1	RYWIA
配列番号 42 (Kabat)	HCDR2	IIDPGTSDTRYSPSFQG
配列番号 43 (Kabat)	HCDR3	IDKSLILHSAFDY
配列番号 44 (Chothia)	HCDR1	GYSFTRY
配列番号 45 (Chothia)	HCDR2	DPGTSD
配列番号 46 (Chothia)	HCDR3	IDKSLILHSAFDY
配列番号 47	VH	QVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTRYWIAWVRQMPGKGLEWMGIIDPGTSDTRYSPSFQGVVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARIDKSLILHSAFDYWGQGLVTVSS
配列番号 48	DNA VH	caggtgcagctggtgcagtcaggcgccgaagtgaagaagcccggcgagtcactgaagat tagctgtaaaggctcaggctatagcttcactagatactggatcgcctgggtgagacaga tgcggcgcaagggcctggagtgatgggaattatcgaccccgccactagcgacactaga tatagccctagctttcagggccaggtgacaattagcgccgataagtctattagcaccgc ctacctgcagtggtctagcctgaaggctagtgacaccgctatgtactactgcgctagaa tcgataagtcactgatcctgcactcagccttcgactactggggccagggcacctggtg acagtgctctagc
配列番号 49	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTRYWIAWVRQMPGKGLEWMGIIDPGTSDTRYSPSFQGVVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARIDKSLILHSAFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPS SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK
配列番号 50	DNA 重鎖	caggtgcagctggtgcagtcaggcgccgaagtgaagaagcccggcgagtcactgaagat tagctgtaaaggctcaggctatagcttcactagatactggatcgcctgggtgagacaga tgcggcgcaagggcctggagtgatgggaattatcgaccccgccactagcgacactaga tatagccctagctttcagggccaggtgacaattagcgccgataagtctattagcaccgc ctacctgcagtggtctagcctgaaggctagtgacaccgctatgtactactgcgctagaa tcgataagtcactgatcctgcactcagccttcgactactggggccagggcacctggtg acagtgctctagcgctagcaccaggcccaagtgtgtttcccctggccccagcagcaa gtctacttccggcggaactgctgcctgggtgcctgggtgaaggactacttccccgagc ccgtgacagtgctcctggaaactctggggctctgacttccggcggtgcacaccttccccgc gtgctgcagagcagcgccctgtacagcctgagcagcgtggtgacagtgccctccagctc tctgggaaccagacctatctgcaacgtgaaccacaagcccagcaacaccaaggtgg acaagagagtgaggcccaagagctgcgacaagaccacacctgccccctgcccagct ccagaactgctgggagggccttccgtgttccgtgtccccccaagcccaaggacacct gatgatcagcaggacccccaggtgacctgcgtgggtggagcgtgtcccacgaggacc cagaggtgaagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcaaacgccaagaccaag ccagagaggagcagtaaacagcacctacaggggtggtgctccgtgctgacctgctgca ccaggactggctgaaaggcaagaatacaagtgcaagctctccaacaaggccctgcccag ccccaatcgaaaagacaatcagcaaggcccaaggccagccagggagccccaggtgtac accctgccccagccgggaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggt gaaggcttctaccccagcgatctgcctggagtgaggagcaacggccagccccgaga acaactacaagaccacccccagtgctggacagcgagcagcttcttctctgtacagc aagctgacctggcaagtcaggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgat gcacgagccctgcacaaccactacaccagaagtccctgagcctgagccccggcaag
配列番号 51 (Kabat)	LCDR1	SGDNLGGYYAY
配列番号 52 (Kabat)	LCDR2	ETNNRPS
配列番号 53 (Kabat)	LCDR3	ASTTQDYLVFV
配列番号 54 (Chothia)	LCDR1	DNLGGYY
配列番号 55 (Chothia)	LCDR2	ETN
配列番号 56 (Chothia)	LCDR3	TTQDYLVF

10

20

30

40

配列番号 57	VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNLGGYYAYWYQQKPGQAPV LVIYETNNRPSGIPE RFSGSNSGNTATLTISR A QAGDEADY YCASTTQDYL V FV FGGG T K L T V L	
配列番号 58	DNA VL	agctacgagctgactcagccccctgtcagtgctcagtgccctgggcccagaccgctagaat cacctgtagcggcgataacctggggcgctactacgcctactggatcagcagaagcccg gccaggccccctgtgctggtgatctacgagactacaatagacctagcggaaatccccgag cggtttagcggctctaataagcggcaacaccgctaccctgactatctctagggctcaggc cggcgacgaggccgactactactgcgctagtagtactactcaggactacctggtgttcgtgt tcggcggaggcactaaactgaccgtgctg	
配列番号 59	軽鎖	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNLGGYYAYWYQQKPGQAPV LVIYETNNRPSGIPE RFSGSNSGNTATLTISR A QAGDEADY YCASTTQDYL V FV FGGG T K L T V L G Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D S S P V K A G V E T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S	
配列番号 60	DNA 軽鎖	agctacgagctgactcagccccctgtcagtgctcagtgccctgggcccagaccgctagaat cacctgtagcggcgataacctggggcgctactacgcctactggatcagcagaagcccg gccaggccccctgtgctggtgatctacgagactacaatagacctagcggaaatccccgag cggtttagcggctctaataagcggcaacaccgctaccctgactatctctagggctcaggc cggcgacgaggccgactactactgcgctagtagtactactcaggactacctggtgttcgtgt tcggcggaggcactaaactgaccgtgctgggcccagcctaagctgccccagcgtgacc ctgttccccccagcagcaggagctgcaggccaacaaggccaccctggtgtgctgat cagcacttctaccaggcgcctgaccgtggcctggaaggccgacagcagccccgtga aggccggcgtggagaccaccaccgcaagcagagcaacaacaagtaagccgcccagc agctacctgagcctgacccccgagcagtggaagagccacaggtcctacagctgccaggt gaccacgagggcagcaccgtggaaaagaccgtggccccaaccgagtgacg	10
MOR14797			
配列番号 61 (Kabat)	HCDR1	TSGMGVG	
配列番号 62 (Kabat)	HCDR2	HIYWNDDKSYSTSLKT	20
配列番号 63 (Kabat)	HCDR3	DFYYSYGFDS	
配列番号 64 (Chothia)	HCDR1	GFSLSTSGM	
配列番号 65 (Chothia)	HCDR2	YWNDD	
配列番号 66 (Chothia)	HCDR3	DFYYSYGFDS	
配列番号 67	VH	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGI RQPPGKALEWLAHIYWNDDK SYSTSLKTRLTI SKDT SKNQVVL TMTNMDPVD TATYYCARDFYYSYGFDSWGQGLTVTV SS	
配列番号 68	DNA VH	caggtgacactgagagagtcaggccctgcctgggtaaacctactcagaccctgacct gacctgaccttttagcggctttagcctgagcactagcggaaatgggctgggctggatta gacagccccctggcaaggccctggagtggtgctcacatctactggaacgacgataag tcctactctactagcctgaaaactaggctgactatctctaaaggacacctctaagaatca ggtggtgctgactatgactaataatggacccctggacaccgctacctactctgctga gagacttctactatagcggctacttcgatagctggggccaggccaccctggtagcagtg tctagc	30
配列番号 69	重鎖	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGI RQPPGKALEWLAHIYWNDDK SYSTSLKTRLTI SKDT SKNQVVL TMTNMDPVD TATYYCARDFYYSYGFDSWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTRP EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK	
配列番号 70	DNA 重鎖	caggtgacactgagagagtcaggccctgcctgggtaaacctactcagaccctgacct gacctgaccttttagcggctttagcctgagcactagcggaaatgggctgggctggatta gacagccccctggcaaggccctggagtggtgctcacatctactggaacgacgataag tcctactctactagcctgaaaactaggctgactatctctaaaggacacctctaagaatca ggtggtgctgactatgactaataatggacccctggacaccgctacctactctgctga gagacttctactatagcggctacttcgatagctggggccaggccaccctggtagcagtg tctagcgtagcaccaggcccaagtggtgttccccctggccccagcagcaagctctac ttccggcgaactgctgccctgggttgcctggtgaaggactacttccccgcccctgga cagtgctcctggaactcggggctgacttccggcgtgcacaccttccccgcccgtgctg cagagcagcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgacagtgccctccagctctctggg aaccagacctatctgcaactgaaaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaaga gagtgagcccagagctgcgacaagaccacacctgccccctgcccagctccagaa	40

		ctgctgggagggccttccgtgttctgttccccccaagccaaggacacacctgatgat cagcaggacccccgaggtgacctgctggtggtggagcgtgtcccacgaggaccagagg tgaagtccaactggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcccaga gaggagcagtacaacagcacctacaggggtggtgctccgtgctgacctgctgaccagga ctggctgaacggcaaaagaatacaagtgcaaagtctccaacaaggccctgccagccca tcgaaaagacaatcagcaaggccaaggccagccacgggagccccaggtgtacacctg ccccagccgggaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagg cttctaccccagcgatatcgccgtggagtgaggagcaacggccagcccagagaacaact acaagaccacccccagtgctggacagcgacggcagcttcttctgtacagcaagctg accgtggacaagtccaggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcagga ggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgagcctgagccccggcaag
配列番号 71 (Kabat)	LCDR1	RASQDISNYLN
配列番号 72 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 73 (Kabat)	LCDR3	QQTNTMNT
配列番号 74 (Chothia)	LCDR1	SQDISNY
配列番号 75 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 76 (Chothia)	LCDR3	TNTMN
配列番号 77	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKAPKLLIFGASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTNTMNTFGQGTKVEIK
配列番号 78	DNA VL	gatattcagatgactcagtcacctagtagcctgagcgtagtggtggcgatagagtgc tatcacctgtagagcctctcaggataatctctaactacctgaactggtatcagcagaagc ccggcaaggcccctaagctgctgatcttcggcgctctagcctgcagtcaggcgtgcc tctaggttagcggctcaggctcagcaccgacttcacctgactattagtagcctgca gcccaggacttcgctacctactactgtcagcagactaacactatgaacaccttcggcc agggcactaagggtggagattaag
配列番号 79	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKAPKLLIFGASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTNTMNTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI PSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLST LTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 80	DNA 軽鎖	gatattcagatgactcagtcacctagtagcctgagcgtagtggtggcgatagagtgc tatcacctgtagagcctctcaggataatctctaactacctgaactggtatcagcagaagc ccggcaaggcccctaagctgctgatcttcggcgctctagcctgcagtcaggcgtgcc tctaggttagcggctcaggctcagcaccgacttcacctgactattagtagcctgca gcccaggacttcgctacctactactgtcagcagactaacactatgaacaccttcggcc agggcactaagggtggagattaagcgtacgggtggcgcctcccagcgtgtcatctcccc cccagcgcagcagcgtgaagagcggcaccgccaagcgtggtgtgcctgctgaacaactt ctacccccgggaggccaagggtgcagtggaagggtggacaacgcccctgcagagcggcaaca gccagagagcgtcaccgagcaggacagcaaggactccacctacagcctgagcagcacc ctgacctgagcaaggccgactacgagaagcataagggtgtagcctgcaggtgaccca ccaggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacagggggcaggtgc
MOR14805		
配列番号 81 (Kabat)	HCDR1	RYYVA
配列番号 82 (Kabat)	HCDR2	WIDPGTSNTRYSPFQG
配列番号 83 (Kabat)	HCDR3	MLAWGWFYD
配列番号 84 (Chothia)	HCDR1	GYSFTRY
配列番号 85 (Chothia)	HCDR2	DPGTSN
配列番号 86 (Chothia)	HCDR3	MLAWGWFYD
配列番号 87	VH	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTRYVAWVRQMPGKGLEWMGWIDPGTSNTR YSPFQGVITISADKSI STAYLQWSS LKASDTAMYYCARM LAGWGFYDYGQGLTIVTSS

10

20

30

40

配列番号 88	DNA VH	caggtgcagctggtgcagtcaggcgccgaagtgaagaagccggcgagtcactgaagat tagctgtaaaggctcaggctatagcttcactaggtactactggtgagacaga tgcccgcaagggcctggagtgatgggctggatcgaccccgccacctctaactactaga tatagccctagctttcagggccaggtgacaattagcgccgataagtctattagcaccg ctagctgcagtggtctagcctgaaggctagtgacaccgctatgtactactgcgctagaa tgctggcctggggctggttcgactactggggccagggcacctgggtgacagtggtctagc	
配列番号 89	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTRYVAVVRQMPGKGLEWMGWIDPGTSNTR YSPSFQGVVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARM LAWGWFYDYGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDSGSFFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
配列番号 90	DNA 重鎖	caggtgcagctggtgcagtcaggcgccgaagtgaagaagccggcgagtcactgaagat tagctgtaaaggctcaggctatagcttcactaggtactactggtgagacaga tgcccgcaagggcctggagtgatgggctggatcgaccccgccacctctaactactaga tatagccctagctttcagggccaggtgacaattagcgccgataagtctattagcaccg ctagctgcagtggtctagcctgaaggctagtgacaccgctatgtactactgcgctagaa tgctggcctggggctggttcgactactggggccagggcacctgggtgacagtggtctagc gtagaccaagggccaagtgtgtttcccctggccccagcagcaagtcacttccgg cggaactgctgccctgggttgcctgggtgaaggactacttcccagccccgtgacagtg tctggaactctgggctctgacttccggcgtgcaacacttcccgcgctgctgcagagc agcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgacagtgccctccagctctctgggaacca gacctatctgcaacgtgaaccaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtg gagcccaagagctgcgacaagaccacactgccccctgcccagctccagaactgctg ggagggccttccgtgttctgttccccccaagccaaggaacacctgatgatcagcag gacccccgaggtgacctgctggtggtggaactgctcccaagagccaagaggtgaa gttcaactggtacgtggaaggcgtggaggtgcaaacgccaagaccaagcccagagaggag cagtacaacagcacctacaggggtggtgtccgtgctgacctgctgcaaccaggactggct gaacggcaagaatacaagtgcaaggtctccaacaaggcctgcccagcccaatcgaaa agacaatcagcaagggcaagggccagccagggagccccaggtgtacacctgcccccc agccgggaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaaagggcttcta ccccagcgatatcgccgtggagtgaggagcaacggccagcccagagaacactacaaga ccacccccagtgctggacagcgacggcagcttcttctgtacagcaagctgacctg gacaagtcagggtggcagcagggcaacgtgttcagctgacagcgtgatgacagggccct gcacaaccactacaccagaagtcctgagcctgagccccggcaag	20
配列番号 91 (Kabat)	LCDR1	SGDNLGGYYAH	
配列番号 92 (Kabat)	LCDR2	DKSDRPS	
配列番号 93 (Kabat)	LCDR3	ASYDSSLMMV	30
配列番号 94 (Chothia)	LCDR1	DNLGGYY	
配列番号 95 (Chothia)	LCDR2	DKS	
配列番号 96 (Chothia)	LCDR3	YDSSLMM	
配列番号 97	VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNLGGYYAHWYQQKPGQAPV LVIYDKSDRPSGIPE RFSGSNSGNTATLTISR AQAQGEADY YCAS YDSSLMMVFGGGTKLTVL	
配列番号 98	DNA VL	agctacgagctgactcagccccctgtcagtgctcagtgccctggggccagaccgctagaat cacctgtagcggcgataacctggggcggtactacgctcactggtatcagcagaagccc gcccagggccccgtgctggtgatctacgataagtcagatagacctagcggaaatccccgag cggtttagcggctctaatagcggcaacaccgctaccctgactatctctagggctcaggc cggcgacgagggccgactactactgcgctagttacgactctagcctgatgatggtgttcg gcgaggcactaagctgacctgctg	40
配列番号 99	軽鎖	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNLGGYYAHWYQQKPGQAPV LVIYDKSDRPSGIPE RFSGSNSGNTATLTISR AQAQGEADY YCAS YDSSLMMVFGGGTKLTVLQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKS HRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS	

配列番号 100	DNA 軽鎖	agctacgagctgactcagccctgtcagtgctcagtgccctgggcccagaccgctagaat cacctgtagcggcgataacctgggcggtactacgctcactggatcagcagaagcccg gccaggccccgctgctggatctacgataagtcagatagacctagcgggaatccccgag cggtttagcggctctaatagcggcaacaccgctacctgactatctctagggctcaggc cggcgacgaggccgactactactgctgctagttacgactctagcctgatgatgggtgtc gctggaggcactaagctgaccgtgctgggcccagcctaaggctgccccagcgtgaccctg tcccccccagcagcaggagctgcaggccaacaaggccacctgggtgctgatcag cgacttctaccagggcggctgaccgtggcctggaaggccgacagcagccccgtgaagg ccggcgtggagaccaccacccccagcaagcagagcaacaagaagtcgcccagcagc tacctgagcctgacccccgagcagtggaagagccacaggtcctacagctgccaggtgac ccacgagggcagcaccgtggaaaagaccgtggccccaaccgagtgccagc
MOR14787		
配列番号 101 (Kabat)	HCDR1	SYAIS
配列番号 102 (Kabat)	HCDR2	VIVPKWGHQPYAQKFQG
配列番号 103 (Kabat)	HCDR3	EGDFVVLVLTEHYMGGFDV
配列番号 104 (Chothia)	HCDR1	GGTFSSY
配列番号 105 (Chothia)	HCDR2	VPKWGH
配列番号 106 (Chothia)	HCDR3	EGDFVVLVLTEHYMGGFDV
配列番号 107	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGVI VPKWGHQP YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGDFVVLVLTEHYMGGFDVW GQGLTLTVSS
配列番号 108	DNA VH	cagggtcagctggtgagtcaggcgcgaagtgaagaaaccggctctagcgtgaaagt gagctgtaaagctagtgccggcacccttctctagctacgctattagctgggtgagacagg ccccaggcccaggcctggagtgatgggctgatcgtgcctaagtggggccaccctcag tacgctcagaaatttcagggcagagtgactatcacggccgacgagtgctactagcaccgc ctatatggaactgtctagcctgagatcagaggacaccgcccgtgtaactactgctgtagag aaggcacttcgtggtgctggtgctgaccgagcactatatgggcccgttcgacgtgtgg ggccaggccaccctggtagcagtgcttagc
配列番号 109	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGVI VPKWGHQP YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGDFVVLVLTEHYMGGFDVW GQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTH CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPFPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGK
配列番号 110	DNA 重鎖	cagggtcagctggtgagtcaggcgcgaagtgaagaaaccggctctagcgtgaaagt gagctgtaaagctagtgccggcacccttctctagctacgctattagctgggtgagacagg ccccaggcccaggcctggagtgatgggctgatcgtgcctaagtggggccaccctcag tacgctcagaaatttcagggcagagtgactatcacggccgacgagtgctactagcaccgc ctatatggaactgtctagcctgagatcagaggacaccgcccgtgtaactactgctgtagag aaggcacttcgtggtgctggtgctgaccgagcactatatgggcccgttcgacgtgtgg ggccaggccaccctggtagcagtgcttagcgttagcaccaggcccaaggtgtgttcc cctggccccagcagcaagtctacttccggcggaaactgctgcccctgggtgctggtgga aggactacttccccgagcccgtgacagtgctcctggaactctgggctctgacttccggc gtgcacaccttccccgctgctgacagcagcggcctgtacagcctgagcagcgtggtg gacagtgccctccagctctctgggaaccagacctatatctgcaacgtgaaaccacaagc ccagcaacaccaaggtggacaagagagtgagcccaagagctgagcaagaccacaacc tgccccctgcccagctccagaactgctgggaggcccttccgtgttctggttcccccc caagcccaaggacaccctgatgatcagcaggacccccaggtgacctgctggtggtgg acgtgtcccacgaggaccagaggtgaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtg cacaacgccaagaccaagcccagagaggagcagtaacaacagcactacaggtggtgct cgtgctgaccgtgctgaccaggactggctgaacggcaagaatacaagtgcaagctct ccaaacaggccctgcccagcccccaatcgaaaagacaatcagcaaggcccaagggccagcca cgggagccccagggtgtacacctgccccccagccgggaggagatgaccaagaaccaggt gtccctgacctgtctggtgaaggcttctaccccagcgatatcgccgtggagtgaggaga gcaacggccagcccagaaactacaagaccccccccagtgctggaacagcagcagcggc agcttcttctgtacagcaagctgaccgtggcaagtcaggtggcagcagggcaacgt gttcagctgagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccctacaccagaaagtcctgga gcctgagccccggcaag

10

20

30

40

配列番号 111 (Kabat)	LCDR1	RASQSIDEYLN	
配列番号 112 (Kabat)	LCDR2	AGSNLQS	
配列番号 113 (Kabat)	LCDR3	LQGYSPRT	
配列番号 114 (Chothia)	LCDR1	SQSIDEY	
配列番号 115 (Chothia)	LCDR2	AGS	
配列番号 116 (Chothia)	LCDR3	GYSYPR	
配列番号 117	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDEYLNWYQQKPKGAPKLLIYAGSNLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCLQGYSPRTFGQGTKEVIK	10
配列番号 118	DNA VL	gatattcagatgactcagtcacctagtagcctgagcgcctagtggtggcgatagagtgc tatacctgttagagcctctcagtcctatcgacgagtagcctgaactggatcagcagaagc ccggcaaggcccctaagctgctgatctacgccgctctaactgcagtcaggcgtgcc tctaggttttagcggctcaggctcaggcaccgacttcaccctgactatctctagcctgca gcccgaggacttcgctacctactactgtctgcagggtatagctaccctagaacctcg gccagggcactaaggtggagattaag	
配列番号 119	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDEYLNWYQQKPKGAPKLLIYAGSNLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCLQGYSPRTFGQGTKEVIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
配列番号 120	DNA 軽鎖	gatattcagatgactcagtcacctagtagcctgagcgcctagtggtggcgatagagtgc tatacctgttagagcctctcagtcctatcgacgagtagcctgaactggatcagcagaagc ccggcaaggcccctaagctgctgatctacgccgctctaactgcagtcaggcgtgcc tctaggttttagcggctcaggctcaggcaccgacttcaccctgactatctctagcctgca gcccgaggacttcgctacctactactgtctgcagggtatagctaccctagaacctcg gccagggcactaaggtggagattaagcgtacggtggcgcctcccagcgtgtcatctc cccccaagcagcagcagctgaagagcggcaccgccagcgtggtgtgctgctgaacaa cttctacccccgggaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcctgcagagcggca acagccaggagagcgtcaccgagcaggacagcaaggactccacctacagcctgagcagc accctgacctgagcaaggccgactacgagaagcataaggtgtacgcctgcgaggtgac ccaccaggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacagggcgagtg	20
配列番号 121	タンパク質 TGFβ 1 UniProt ID: P01137	MPPSGLRLLLLLLPLLWLLVLTGRPAAGLSTCKTIDMELVKKRIEAI RGQILSKLRL ASPPSQGEVPPGPLEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHN EIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVKVEQHVELYQKYSNN SWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDI NGFTTGRGDLATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRALDNTNYCFSTEKNCCV RQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAP CCVPQALEPLPIVYVYGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	30
配列番号 122	タンパク質 TGFβ2 UniProt ID: P61812	MHYCVLSAFLILHLVTVALSLSSTCSTLDMDQFMRKRIEAI RGQILSKLKLTPPEDYPE PEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAACERERSDEEY YAKEVYKIDMPPFFPSENAI PPTFYRPFYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVRLQNP KARKVPEQRIELYQILKSKDL TSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDVAVHEWLHKKDRNLGFKI SLHPCCTFPVPSNN YIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKN SGKTPHLLMLLPSYRLESQQ TNRKRKRALDAAYCFRNVDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYANFACAGACPYLW SSDTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVS QDLEPLTILYIYIGKTPKIEQLSNMIVKSKC S	
配列番号 123	タンパク質 TGFβ 3 UniProt ID: P10600	MKMHLQRALVVLALLNFATVLSLSSTCTTLDLFGHIKKRVEAI RGQILSKLRLTSPPEP TVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEY YAKEIHKFDMIQGLAEHN ELAVCPKGITSKVFVFNVSVEKNRNTLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQILRPD EHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNG DILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHPHLLMI PPHRLDNP GQGG QRKKRALDNTNYCFRNLEENCCVRLYIDFRQDLGWKQVHEPKGYANFCSGPCPYLRS DTHSTVGLYNTLNPEASASPCCVQDLEPLTILYIYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	40
配列番号 124 (Kabat 配列番号 1/ Chothia 配列番号 4)	HCDR1	GYSFTRYVA	

配列番号 125 (Kabat 配列番号 21 / Chothia 配列番号 24)	HCDR1	GYSFTRYYYVA	
配列番号 126 (Kabat 配列番号 41 / Chothia 配列番号 44)	HCDR1	GYSFTRYWIA	
配列番号 127 (Kabat 配列番号 61 / Chothia 配列番号 64)	HCDR1	GFSLSSTSGMGVG	10
配列番号 128 (Kabat 配列番号 81 / Chothia 配列番号 84)	HCDR1	GYSFTRYYYVA	
配列番号 129 (Kabat 配列番号 101 / Chothia 配列番号 104)	HCDR1	GGTFSSYAIS	
配列番号 131 パラトープ 配列 MOR14800	VL	NSGN	20
配列番号 132 パラトープ 配列 MOR14800	VL	GSGT	
BAP049- グロニ - B HC			
配列番号 133 (Kabat)	HCDR1	TYWMH	
配列番号 134 (Kabat)	HCDR2	NIYPGTGGSNFDEKFKN	
配列番号 135 (Kabat)	HCDR3	WTTGTGAY	30
配列番号 136 (Chothia)	HCDR1	GYTFTTY	
配列番号 137 (Chothia)	HCDR2	YPGTGG	
配列番号 138 (Chothia)	HCDR3	WTTGTGAY	
配列番号 139	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYFTTTYWMHWVRQATGQGLEWMGNIYPGTGGSN FDEKFKNRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWTGTGAYWGQGTTVTVSS	
配列番号 140	DNA VH	Gaggtgcagctggtgcagtcaggcgccgaagtgaagaagcccggcgagtcactgagaat tagctgtaaagggttcaggctacaccttcaactactgagtgactgggtccgcccagg ctaccggtcaaggcctcgagtgatgggtaatatctacccggcaccggcggtcctaac ttcgacgagaagtttaagaatagagtgactatcaccgcccataagtctactagcaccgc ctatatggaactgtctagcctgagatcagaggacaccgcccgtctactactgcactaggt ggactaccggcacaggcgccactgggggtcaaggcactaccgtgaccgtgtctagc	40
配列番号 141	HC	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYFTTTYWMHWVRQATGQGLEWMGNIYPGTGGSN FDEKFKNRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWTGTGAYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFFLYRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGL	

配列番号 142	DNA HC	gaggtgcagctggtgcagtcaggcgcgaagtgaagaagccggcgagtcactgagaat tagctgtaaagggttcaggctacacctcactacctactggatgcactgggtccgccagg ctaccgggcaaggcctcgagtggaaggtaataatctaccgccgataagctactagcaccg ttcgacgagaagtttaagaatagagtgactatcaccgccgataagctactagcaccg ctatatggaactgtctagcctgagatcagaggacaccgccgtctactactgactagg ggactaccggcacaggcgcctactggggtaaggcactaccgtgaccgtgtctagcgt agcactaaggcccgtccgtgttccccctggcaccttgtagccggagcactagcgaatc caccgctgcctcggtgcctgggtcaaggattacttccccggagcccgtgaccgtgtcct ggaaacagcggagccctgacctccggagtgacaccttccccgctgtgtgcagagctcc gggctgtactcgctgtcggtgggtcacgggtgccttcatctagcctgggtaccaagac ctacacttgcaacgtggaccacaagccttccaacactaagggtggacaagcgctcgaat cgaagtacggcccaccgtgcccgcctgtcccgcgcggaggttccctggcggtccctcg gtctttctgttcccaccgaagcccaaggacactttgatgatctcccgcacccctgaagt gacatgcgtggtcggtgacgtgtcacaggaagatccggaggtgcagttcaattggtacg tggatggcgtcgaggtgcacaacgccaacccaagccgagggaggagcagttcaactcc acttaccgctcgtgtccgtgctgacgggtgctgcatcaggactgggtgaacgggaagga gtacaagtgcaaagtgtccaacaaggacttccctagctcaatcgaaaagaccatctcga aagccaaggagacagcccgggaaccccaagtgtataccctgccaccgagccaggaagaa atgactaagaaccaagtctcattgacttgccttgtgaagggtcttctaccctccgat cgccgtggaatggagttccaacggccagccggaaaacaaactacaagaccacccctccgg tgctggactcagacggatccttcttctctactcggcggtgaccgtggataagagcaga tggcaggagggaatgtgttcagctgttctgtgatgcatgaagccctgcacaaccacta cactcagaagtccctgtccctctccctggga
BAP049- クロニ - B LC		
配列番号 143 (Kabat)	LCDR1	KSSQSLLDsgnQKNFLT
配列番号 144 (Kabat)	LCDR2	WASTRES
配列番号 145 (Kabat)	LCDR3	QNDYSYPYT
配列番号 146 (Chothia)	LCDR1	SQSLLDsgnQKNF
配列番号 147 (Chothia)	LCDR2	WAS
配列番号 148 (Chothia)	LCDR3	DYSYPY
配列番号 149	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCkSSQSLLDsgnQKNFLTWYQKPKGKAPKLLIYWAST RESGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDiATYYCQNDYSYPYTFGQGTKVEIK
配列番号 150	DNA VL	Gagatcgctcctgactcagtcacccgctaccctgagcctgagccctggcgagcgggctac actgagctgtaaacttagtcagtcactgctggatagcggtaatcagaagaacttctga cctggatcagcagaagcccggtaagcccctaagctgctgatctactggcctctact agagaatcaggcgtgcctctaggtttagcggtagcggtagtggcaccgacttcaact cactatctctagcctgcagcccaggatctcgtacctaactactgtcagaacgactata gtaacccctacaccttcggtaaggcactaaggtcgagattaag
配列番号 151	LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCkSSQSLLDsgnQKNFLTWYQKPKGKAPKLLIYWAST RESGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDiATYYCQNDYSYPYTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFFPPSDEQLKSGTASVVCLLNfYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEkHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 152	DNA LC	Gagatcgctcctgactcagtcacccgctaccctgagcctgagccctggcgagcgggctac actgagctgtaaacttagtcagtcactgctggatagcggtaatcagaagaacttctga cctggatcagcagaagcccggtaagcccctaagctgctgatctactggcctctact agagaatcaggcgtgcctctaggtttagcggtagcggtagtggcaccgacttcaact cactatctctagcctgcagcccaggatctcgtacctaactactgtcagaacgactata gtaacccctacaccttcggtaaggcactaaggtcgagattaagcgtacgggtggcgt ccagcgtgttcatcttccccccagcgacgagcagctgaagagcggcaccgccagcgt ggtgtgcctgctgaacaacttctacccccgggaggccaaggtgcagtggaaggtggaca acgcctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggacagcaaggactcc acctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaggccgactacgagaagcataaggt gtacgcctgcgaggtgaccaccaggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaaca ggggcgagtgc
BAP049- クロニ - E HC		
配列番号	HCDR1	TYWMH

10

20

30

40

153 (Kabat)		
配列番号 154 (Kabat)	HCDR2	NIYPGTGGSNFDEKFKN
配列番号 155 (Kabat)	HCDR3	WTTGTGAY
配列番号 156 (Chothia)	HCDR1	GYTFTTY
配列番号 157 (Chothia)	HCDR2	YPGTGG
配列番号 158 (Chothia)	HCDR3	WTTGTGAY
配列番号 159	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLRI SCKGSGYTFTTYWMHWVRQATGQGLEWMGNIYPGTGGSN FDEKFKNRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWTTGTGAYWGQGTITVTVSS
配列番号 160	DNA VH	Gaggtgcagctgggtgcagtcagggcgccaagtgaagaagccggcgagtcactgagaat tagctgtaaaaggttcaggtacacctcactacctaactggatgcactgggtccgccagg ctaccggtcaaggcctcgagtgatgggtaatatctaccggcaccggcggtctaac ttcgacgagaagtttaagaatagagtgactatcaccggcgataagtctactagcaccgc ctatatggaactgtctagcctgagatcagaggacaccggcgtctactactgcaactaggt ggactaccggcacaggcgctactgggtcaaggcactaccgtgaccgtgtctagc
配列番号 161	HC	EVQLVQSGAEVKKPGESLRI SCKGSGYTFTTYWMHWVRQATGQGLEWMGNIYPGTGGSN FDEKFKNRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWTTGTGAYWGQGTITVTVSSA STKGFPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLG
配列番号 162	DNA HC	gaggtgcagctgggtgcagtcagggcgccaagtgaagaagccggcgagtcactgagaat tagctgtaaaaggttcaggtacacctcactacctaactggatgcactgggtccgccagg ctaccggtcaaggcctcgagtgatgggtaatatctaccggcaccggcggtctaac ttcgacgagaagtttaagaatagagtgactatcaccggcgataagtctactagcaccgc ctatatggaactgtctagcctgagatcagaggacaccggcgtctactactgcaactaggt ggactaccggcacaggcgctactgggtcaaggcactaccgtgaccgtgtctagcgt agcactaagggcccgctccgtgttcccctggcaccttgtagccggagcactagcgaatc caccgctgcctcggtgcctgggtcaaggattacttcccggagcccgtagccgtgtcct ggaaacagcggagccctgacctccggagtgacacaccttcccctgtgtgctgcagagctcc ggctgtactcgtgtcgctgggtgcaggtgccttcatctagcctgggtaccaagac ctacacttgcaacgtggaccacaagccttccaacactaaggtggacaagcgcgtcgaat cgaagtacggcccaccgtgcccgcctgtcccgcggcagggttccctcggcggtccctcg gtcttctgttcccaccgaagcccaaggacacttggatgatattcccgcacccctgaagt gacatgctgtgctggtgagcgtgtcacaggaagatccggaggtgcagttcaattggtacg tggatggcgtcgaggtgcacaacgcaaaacaaagccgagggagagcagttcaactcc acttaccgctcgtgtccgtgctgacgggtgctgcatcaggactggctgaacgggaagga gtacaagtgcaaagtgtccaacaaggacttccctagctcaatcgaaaagaccatctcga aagccaaggacagcccgggaaccccaagtgtataccctgccaccgagccaggaagaa atgactaagaaccaagtctcattgacttgccttgtgaagggttctaccatcggat cgccgtggaatgggagtcacaacggccagccgaaacaactacaagaccaccctccgg tgctggactcagacggatccttctcctctactcggcgtgacccgtggaataagagcaga tgccaggaggaaatgtgttcagctgttctgtgatgcatgaagccctgcacaaccacta cactcagaagtcctgtccctctccctggga
BAP049- クロニ - E LC		
配列番号 163 (Kabat)	LCDR1	KSSQSLLDsgnQKNFLT
配列番号 164 (Kabat)	LCDR2	WASTRES
配列番号 165 (Kabat)	LCDR3	QNDYSYPYT
配列番号 166 (Chothia)	LCDR1	SQSLLDsgnQKNF
配列番号 167 (Chothia)	LCDR2	WAS
配列番号 168 (Chothia)	LCDR3	DYSYPY

10

20

30

40

配列番号 190 (Chothia)	HCDR3	TGGACTACCGGCACAGGCGCCTAC
BAP049- クロニ - E LC		
配列番号 191 (Kabat)	LCDR1	AAATCTAGTCAGTCACTGCTGGATAGCGGTAATCAGAAGAACTTCCTGACC
配列番号 192 (Kabat)	LCDR2	TGGGCCTCTACTAGAGAATCA
配列番号 193 (Kabat)	LCDR3	CAGAACGACTATAGCTACCCCTACACC
配列番号 194 (Chothia)	LCDR1	AGTCAGTCACTGCTGGATAGCGGTAATCAGAAGAACTTC
配列番号 195 (Chothia)	LCDR2	TGGGCCTCT
配列番号 196 (Chothia)	LCDR3	GACTATAGCTACCCCTAC
ニボルマブ		
配列番号 197	HC	QVQLVESGGGVVQPGRSRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRY YADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHSTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGKTITCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 198	LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPRKAVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ペムプロリズマブ		
配列番号 199	HC	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSSGGTN FNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARDYRFDMGFDYWGQGTITVTV SSASTKGPVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHSTFPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTITCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 200	LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLE SGVPARFSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPRKAVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTY SLSSLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ビジリズマブ		
配列番号 201	HC	QVQLVQSGSELKPKGASVKISCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLQWMGWINTDSGEST YAEFFKGRFVFLDTSVNTAYLQITSLTAEDTGMVFCVRVGYDALDYWGQGLTVTVSSA STKGPVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHSTFPAVLQSS GLYSLSVVTVPSSSLGQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKSCDKTHTCPPCPAPELGG GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 202	LC	EIVLTQSPSSLSASVGRVITITCSARSSVSYMHWFQQKPGKAPKLIYRTSNLASGVPS RFGSGSGTYSCLTINSLQPEDFATYYCQQRSSFLPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPRKAVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 203		GYTFTTYWMH

10

20

30

40

【 0 1 9 3 】

本発明を実行するための様式

H u C A L P L A T I N U M (登録商標) パニング

ファージミドリブラリーは、H u C A L (登録商標) 概念 (Knappik et al., J Mol Biol 296, 57-86. 2000) に基づき、ファージ表面で F a b を提示するために C y s D i

50

s p l a y (商 標) 技 術 を 用 い る (国 際 公 開 第 0 1 / 0 5 9 5 0 号) 。

【 0 1 9 4 】

T G F - 2 対 する ビーズベースのパニング

ビーズベースのパニングの前に、抗原をカルボキシビーズ (D y n a b e a d s (登 録 商 標) M - 2 7 0 カルボン酸、 I n v i t r o g e n) に 固 定 化 し な け れ ば な ら な かつ た 。 ファージプールにつき、 1×10^7 個の抗原コートビーズを、等量の P B S / 0 . 1 % T w e e n 2 0 / 5 % ミルク粉末でブロックした。並行して、各パニングのために、 H u C A L P L A T I N U M (登 録 商 標) ファージ - 抗体を、等量の P B S / 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 / 5 % ミルク粉末 / 5 % B S A でブロックした。ビーズ結合性ファージの除去のために、各々 $0.5 \sim 1.0 \times 10^7$ 個の B S A コートビーズを使用して、ブロックされたファージ粒子の前吸着を 2 回実行した。次に、ブロックされた抗原コートビーズを前吸着およびブロックされたファージ粒子に加え、ローテータの上で R T (室温) において 1 ~ 2 時間インキュベートした。抗原コートビーズに結合したファージ粒子を、磁気分離器で採集した。 P B S / 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 および P B S を使用したいくつかの洗浄ステップによって、非特異的に結合したファージを洗い落とし、特異的に結合したファージは、 D D T を使用して抗原コートビーズから溶出させた。 D T T 溶出液は次に大腸菌 (E . c o l i) T G 1 に移し、ファージ感染のために 3 7 ° C の水浴で 4 5 分間インキュベートした。細菌ペレットを 2 x Y T 培地に再懸濁させ、 L B / C a m 寒天プレートの上で平板培養し、 o / n でインキュベートした。コロニーをプレートから削り取り、ファージ奪還、選択されたクローンのポリクローナル増幅およびファージ生成のために使用した。精製されたファージで、次の回のパニングを開始した。第 2 および第 3 回のビーズベースのパニングは、よりストリンジেন্টな洗浄条件が適用されたこと以外は、1 回目のプロトコルに従って実行した。

10

20

【 0 1 9 5 】

T G F - 2 対 する 溶液パニング

溶液パニングの必要条件は、抗原のビオチン化およびビオチン化抗原の保持された活性の確認であった。溶液パニングの間、 F a b 提示ファージおよびビオチン化抗原は、ファージによる抗原のアクセス性を促進した溶液にインキュベートした。

【 0 1 9 6 】

ストレプトアビジン結合磁気ビーズによる溶液パニングプロトコル

ファージプールにつき、 4 m g のストレプトアビジンビーズ (D y n a b e a d s (登 録 商 標) M - 2 8 0 ストレプトアビジン、 I n v i t r o g e n) を、 1 x C h e m i b l o c k e r 中 で ブ ロ ッ ク し た 。 並 行 し て 、 各 パ ニ ン グ の た め に 、 H u C A L P L A T I N U M (登 録 商 標) ファージ - 抗体を、 C h e m i b l o c k e r / 0 . 1 % T w e e n 2 0 で ブ ロ ッ ク し た 。 そ の 後 、 ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン ま た は ビ ー ズ 結 合 性 ファ ー ジ の 除 去 の た め に 、 各 々 ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン ビ ー ズ を 使 用 し て 、 ブ ロ ッ ク さ れ た ファ ー ジ 粒 子 の 前 吸 着 を 2 回 実 行 し た 。 次 に 、 1 0 0 n M の ビ オ チ ン 化 抗 原 T G F - 2 を 前 吸 着 お よ び ブ ロ ッ ク さ れ た ファ ー ジ 粒 子 に 加 え 、 ロ ー テ ー タ の 上 で 室 温 に お い て 1 ~ 2 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た 。 ファ ー ジ - 抗 原 複 合 体 は 2 m g の ブ ロ ッ ク さ れ た ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン ビ ー ズ を 使 用 し て 捕 捉 し 、 ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン ビ ー ズ に 結 合 し た ファ ー ジ 粒 子 は 磁 気 分 離 器 で 採 取 し た 。 P B S / 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 および P B S を使用したいくつかの洗浄ステップによって、非特異的に結合したファージを洗い落とした。特異的に結合したファージは、 D D T を使用してストレプトアビジンビーズから溶出させた。 D T T 溶出液は次に大腸菌 (E . c o l i) T G 1 に移し、 T G 1 および D T T 溶出液の混合液をファージ感染のためにインキュベートした。細菌ペレットを 2 x Y T 培地に再懸濁させ、 L B / C a m 寒天プレートの上で平板培養し、 o / n でインキュベートした。コロニーをプレートから削り取り、ファージ奪還、選択されたクローンのポリクローナル増幅およびファージ生成のために使用した。精製されたファージで、次の回のパニングを開始した。第 2 および第 3 回の溶液パニングは、低減された抗原の量およびよりストリンジেন্টな洗浄条件以外は、1 回目のプロトコルに従って実行した。

30

40

50

【0197】

R a p M A T (登録商標) パニング

増加した親和性を有する特異的抗体を得るために、R a p M A T (登録商標) パニングを実行した (Prassler et al., Immunotherapy 1, 571-583. 2009)。この目的のために、2回のピーズベースのまたは溶液パニングを上記の抗原 T G F - 2 で実行した。

a) L C D R 3 R a p M A T (登録商標) のために：第2回のパニングの後、ファージ由来の p M O R P H 3 0 (登録商標) ベクター-DNAの F a b コード断片を酵素的に消化し、T R I M (商標) L C D R 3 成熟カセットを酵素的ライゲーション (Virnekas et al., 1994) によって挿入し、L C D R 3 を多様化した。

b) H C D R 2 R a p M A T (登録商標) のために：第2回のパニングの後、ファージ由来の p M O R P H (登録商標) 3 0 ベクター-DNAの F a b コード断片を酵素的に消化し、T R I M (商標) H C D R 2 成熟カセット (Virnekas et al., Nucleic Acids Res 22, 5600-5607. 1994) を酵素的ライゲーションによって挿入し、H C D R 2 を多様化した。

【0198】

ライゲーション混合物は、大腸菌 (E. coli) T O P 1 0 F ' 細胞でエレクトロポレーションさせ、 $> 5 \times 10^6$ 個の独立したコロニーを与えた。生成されたライブラリーを増幅し、第3回および第4回の溶液パニングのために 5 n M および 0.5 n M の抗原濃度をそれぞれ使用して、増加したストリンジエンシーによるさらなる2回のパニングに付した。

【0199】

選択された F a b 断片のサブクローニングおよびスクリーニングスケールの発現

可溶性 F a b の迅速な発現を促進するために、選択された H u C A L P L A T I N U M (登録商標) ファージの F a b コード挿入断片を、p M O R P H (登録商標) 3 0 ディスプレイベクターから p M O R P H (登録商標) x 1 1 発現ベクター p M O R P H (登録商標) x 1 1 _ F a b _ F H にサブクローニングした。大腸菌 (E. coli) T G 1 - F ' の形質転換の後、H u C A L (登録商標) - F a b 断片を含有するペリプラズム抽出物の単クローン発現および調製を、以前に記載される通りに実行した (Rauchenberger et al., J Biol Chem 278, 38194-38205. 2003)。

【0200】

マスタープレートの生成

2 x Y T - C G (34 μ g / ml クロラムフェニコール (C a m) ; 0.1% グルコース) 培地を予充填した無菌の 384 ウェルマイクロタイタープレートのウェルに、クロラムフェニコール耐性単クローンを選んで入れ、37 °C で o / n で増殖させた。翌朝、グリセロールを含有する無菌の 2 x Y T 培地を、マスタープレートの各ウェルに加え、プレートをアルミ箔で密封し、-80 °C で保存した。以下の2つの章は、それぞれ 384 および 96 ウェルフォーマットにおける F a b 発現大腸菌 (E. coli) からの溶菌液の調製を記載する。これらの発現プレートは、スクリーニングアプローチのために後に使用される。

【0201】

E L I S A および F M A T スクリーニングのための F a b 含有細菌溶菌液の調製

各 o / n 培養の 5 μ l を、ウェルにつき 40 μ l の 2 x Y T - C G 培地 (34 μ g / ml クロラムフェニコール (C a m) ; 0.1% グルコース) を予充填した無菌の 384 ウェルマイクロタイタープレートに移した。培養がわずかに濁るまで、プレートを 37 °C でインキュベートし、C a m および I P T G を含有する 2 x Y T 培地を各ウェルに加えた。一晩のインキュベーションの後、B E L 緩衝液 (2.5 mg / ml リゾチーム、4 mM E D T A、10 U / μ l ベンゾナーゼ) を加え、プレートを 1 時間インキュベートした。

【0202】

p S M A D 3 S u r e F i r e (登録商標) アッセイのための F a b 含有細菌溶菌液の調製

10

20

30

40

50

各 o/n 培養の $5 \mu\text{l}$ を、ウェルにつき $100 \mu\text{l}$ の $2 \times \text{YT} - \text{CG}$ 培地 ($34 \mu\text{g} / \text{ml}$ の $\text{Cam} ; 0.1\%$ グルコース) を予充填した無菌の 96 ウェルマイクロタイタープレートに移した。培養がわずかに濁るまで、プレートを 22°C でインキュベートし、 CAM および IPTG を含有する $2 \times \text{YT}$ 培地を各ウェルに加えた。翌朝、遠心分離によって細菌を遠沈させ、上清を破棄し、 BEL 緩衝液 ($2.5 \text{mg} / \text{ml}$ リゾチーム、完全 (w/o $\text{EDTA} ; \text{Roche}$)、 $20 \text{U} / \text{ml}$ ベンゾナーゼ) を各ウェルに加えた。プレートを 2 ハンド (hand) 間インキュベートし、 BEL - 溶菌液 (BEL 緩衝液を使用して生成した溶菌液) を遠心分離して細菌細胞デブリを遠沈させた。 Fab 含有上清は、スクリーニング目的 (例えば、 $\text{pSMA} \text{D}3 \text{ SureFire}$ (登録商標) アッセイ) のために使用した。

10

【0203】

Fab 含有生細菌溶菌液のスクリーニング

ELISA スクリーニング

ELISA スクリーニングを使用して、標的抗原 $\text{hTGF} - 2$ タンパク質への結合に関するパニングアウトプットから単一の Fab クローンが同定される。上記の Fab 含有粗大腸菌 ($E. coli$) 溶菌液を使用して、 Fab を試験する。

【0204】

直接コート抗原での ELISA スクリーニング

このアプローチは、 SET の前に一部の RapMAT (登録商標) パニングのスクリーニングのために使用された。 Maxisorp (商標) 384 ウェルプレートを、 PBS にそれぞれ $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ または $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度のマウス $\text{TGF} - 2$ でコーティングした。 PBS 中の 5% スキムミルクによるプレートのブロッキングの後、 Fab 含有大腸菌 ($E. coli$) 溶菌液を加えた。 Attophos 蛍光基質 (Roche 、 $\#11681982001$) を使用して、アルカリ性ホスファターゼ ($\text{Jackson Immuno Research}$ 、 $\#109-055-097$) ($1:5000$ に希釈) にコンジュゲートした $\text{F}(\text{ab})_2$ 特異的ヤギ抗 $\text{hTGF} - 2$ によって、 Fab の結合性を検出した。 535nm の蛍光発光を、 430nm での励起で記録した。

20

【0205】

ビオチン化抗原の ELISA スクリーニング (Fab 捕捉 ELISA)

$\text{hTGF} - 2$ およびマウス $\text{TGF} - 2$ に対する抗 $\text{TGF} - 2 \text{ Fab}$ 抗体の特異性ならびにラット $\text{TGF} - 3$ 、 $\text{hTGF} - 1$ への交差反応性を ELISA のセッティングで評価した。

30

【0206】

これのために、特記されない限り、 Maxisorp (商標) 384 ウェルプレートを、 PBS に $1:1000$ で希釈した Fd 断片特異的ヒツジ抗 $\text{hTGF} - 2$ (結合部位 、 $\# \text{PC}075$) でコーティングした。 PBS 中の 5% スキムミルクパウダーによるブロッキングの後、 Fab 含有大腸菌 ($E. coli$) 溶菌液を加えた。その後、捕捉された HuCAL (登録商標) Fab 断片をビオチン化抗原に結合させた。ビオチン化抗原の以下の濃度をスクリーニングのために使用した：

- ・標準のパニングの Fab 捕捉 ELISA ベースのスクリーニングのための $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ のビオチン化 $\text{hTGF} - 2$ / ビオチン化トランスフェリン (無関係なビオチン化タンパク質でのカウンタースクリーニングのため)；

40

- ・ SET の前の一部の RapMAT (登録商標) パニングの Fab 捕捉 ELISA ベースのスクリーニングのための $0.01 \mu\text{g} / \text{ml}$ のビオチン化 $\text{hTGF} - 2$ ；

抗 $\text{TGF} - 2 \text{ Fab}$ 抗体結合ビオチン化抗原は、アルカリ性ホスファターゼ (ホスファターゼ (Invitrogen (Zymed)、 $\#43-4322$)) にコンジュゲートしたストレプトアビジンとのインキュベーションと、続く Attophos 蛍光基質 (Roche 、 $\#11681982001$) の添加によって検出した。 535nm の蛍光発光を、 430nm での励起で記録した。

【0207】

50

F M A Tスクリーニング

F M A T (蛍光定量的微量アッセイテクノロジー) スクリーニングを使用して、ビーズに固定化された標的抗原への結合に関するパニングアウトプットから単一の F a b クローンを同定する (上記のように、カルボキシビーズの上に抗原または B S A が固定化された) 。 F a b 含有粗大腸菌 (E. coli) 溶菌液 (上記のように調製された) を使用して、 F a b を試験する。

【 0 2 0 8 】

F a b 含有溶菌液およびビーズを、 P B S / 0 . 1 % T w e e n 2 0 / 3 % B S A でブロックした。ブロックされた溶菌液、ブロックされたビーズおよび C y (商標) 5 コンジュゲート A f f i n i P u r e F (a b ') ₂ 断片ヤギ抗ヒト I g G (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h 、 # 1 0 9 - 1 7 6 - 0 9 7) を、 F M A T プレートに移した。プレートは、暗所において室温で約 3 時間の間インキュベートした。 8 2 0 0 細胞検出システム (A p p l i e d B i o s y s t e m s) を製造業者の説明書に従って使用して、 F M A T 読取りをとった。

10

【 0 2 0 9 】

S E Tスクリーニング

親和性のランク付けは、原則として上記の通りに実行した。 (H a e n e l e t a l . , A n a l B i o c h e m 3 3 9 , 1 8 2 - 1 8 4 2 0 0 5) に記載される原理に基づく溶液平衡滴定による成熟結合剤のランク付けのために、一定量の希釈された B E L 抽出物 (B E L 緩衝液 : 2 . 5 m g / m l リゾチーム、 4 m M E D T A 、 1 0 U / μ l ベンゾナーゼを使用して生成された溶菌液) を、抗原の異なる濃度で一晩平衡させた。

20

【 0 2 1 0 】

次に、以前に抗原でコーティングした M S D プレートに混合物を移し、インキュベーションおよび洗浄の後に、適する M S D - スルホ - タグ標識検出抗体を加えた。その後、 S e c t o r I m a g e r 6 0 0 0 (M e s o S c a l e D i s c o v e r y 、 G a i t h e r s b u r g 、 M D 、 U S A) を使用した E C L 検出を介して、未結合の F a b の濃度を数量化した。親和性を推定し、こうして成熟によって最も向上したクローンを同定するために、対応するフィットモデル (下を参照) を適用して、 X L f i t (I D B S) ソフトウェアを使用して結果を処理した。

30

【 0 2 1 1 】

H u C A L (登録商標) F a b 断片の発現および精製

大腸菌 (E. coli) における H i s タグ付き H u C A L (登録商標) F a b 断片の微発現および微精製

0 . 1 % グルコース、 3 4 μ g / m l クロラムフェニコールおよび 0 . 1 m M I P T G (イソプロピル - D - チオガラクト - ピラノシド) を加えた 2 5 m l の 2 x Y T 培地を使用して、大腸菌 (E. coli) T G 1 F ' 細胞における p M O R P H (登録商標) x 1 1 _ F a b _ F H によってコードされる F a b 断片の発現を、 5 0 m l ファルコンにおいて実行した。培養は、 3 0 ° C で 1 8 時間振盪させた。細胞を収集し、リゾチームおよびバグバスタータンパク質抽出試薬 (N o v a g e n 、 G e r m a n y) の組合せを使用して破壊した。 H i s ₆ タグ付き F a b 断片 (配列番号 2 0 4 として開示される「 H i s ₆ 」) を、 I M A C (Q i a g e n 、 G e r m a n y) によって単離した。 D - T u b e 9 6 (商標) 透析器 (M W C O 6 ~ 8 k D a 、 N o v a g e n 、 G e r m a n y) を使用して、 1 x ダルベッコの P B S (p H 7 . 2) への緩衝液交換を実行した。紫外分光光度法によって、タンパク質濃度を測定した。代表として選択された試料の純度を、変性、還元性 1 5 % S D S - P A G E で分析した。

40

【 0 2 1 2 】

大腸菌 (E. coli) における H i s タグ付き H u C A L (登録商標) F a b 断片の発現および精製

0 . 1 % グルコースおよび 3 4 μ g / m l クロラムフェニコールを加えた 5 0 0 m l の 2 x Y T 培地を使用して、大腸菌 (E. coli) T G 1 F ' 細胞における p M O R P H (

50

登録商標) × 11 __ F a b __ F H によってコードされる F a b 断片の発現を、振盪フラスコ培養において実行した。OD₆₀₀ が 0.5 の値に到達するまで、培養を 30 で振盪した。0.75 mM の最終濃度で IPTG (イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド) を加え、さらに 30 で 20 時間の培養によって F a b 発現を誘導した。細胞を収集し、リゾチームを使用して破壊した。His₆ タグ付き F a b 断片 (配列番号 204 として開示される「His₆」) を、IMAC (Bio - Rad、Germany) によって単離し、イミダゾールを使用して溶出した。PD10 カラム (GE Health care、Germany) を使用して、1 × ダルベッコの PBS (pH 7.2) への緩衝液交換を実行した。試料を滅菌濾過した (0.2 μm)。紫外分光光度法によって、タンパク質濃度を測定した。試料の純度は、変性、還元性 15% SDS - PAGE で分析した。校正標準によるサイズ排除クロマトグラフィー (HP - SEC) によって、F a b 調製物の均一性を自然状態で測定した。

10

【0213】

機能的バイオアッセイ

リポーター遺伝子アッセイ (RGA)

HEK293T / 17 細胞系の培養

10% FBS (ウシ胎児血清)、2 mM L - グルタミン、ペニシリン (50 IE / ml) およびストレプトマイシン (50 μg / ml) を含有する DMEM (ダルベッコの改変イーグル培地) で、HEK293T / 17 細胞を維持した。細胞を 37 および 5% CO₂ のインキュベーター内で増殖させ、3 ~ 4 日おきに継代培養した。Accutase (商標) を使用して細胞を切り離し、新鮮培地を含有する新しいフラスコに次に移した。CAGA - 12 luc で安定してトランスフェクトさせた HEK293T / 17 細胞を、親の HEK293T / 17 細胞のために上に記載の通りに培養したが、細胞増殖培地には、FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシンに加えて 4 mM の L - グルタミンおよび 3 μg / ml のプラストサイジンを加えた。

20

【0214】

TGF - タンパク質誘導ルシフェラーゼリポーター遺伝子アッセイ

TGF - 2 誘導シグナル伝達および他の TGF - 1、TGF - 3、ミオスタチン、アクチビンおよび GDF - 11 に対する特異性を阻害する抗 TGF - 2 抗体の能力を測定するために、安定したリポーター細胞系 HEK293T / 17 CAGA - 12 luc を使用したリポーター遺伝子アッセイを実行した。CAGA - 12 ルシフェラーゼリポーター構築物は、最小限のプロモーターの下流のルシフェラーゼ遺伝子ならびにリン酸化 Smad - 2 および Smad - 3 に特異的である複数の CAGA ボックスを有する。精製された組換え TGF - 2 (さらに、TGF - 3、TGF - 1、ミオスタチン、GDF - 11 およびアクチビン) の追加は、Smad - 2 および Smad - 3 のリン酸化を、したがって CAGA - 12 リポーターへの結合性を誘導し、ルシフェラーゼ遺伝子発現につながる。HEK293T / 17 CAGA - 12 luc 細胞の 90% の集密度で、accutase を使用して細胞を切り離し、細胞数 2.5 × 10⁵ / ml の濃度までアッセイ培地 (2% FBS および 2 mM L グルタミンを加えた DMEM) で希釈した。その後、ウェルにつき 100 μl の細胞を白色平底 96 ウェルプレート (BD Falcon、# 353296) に播種し、37 および 5% CO₂ で一晩インキュベートした。翌日、所望の濃度の TGF - 2 抗体 (Fab または IgG) および TGF - タンパク質を PBS 中で混合した。混合物中の抗原の最終濃度は、このアッセイにおけるそれらのそれぞれの約 EC₅₀ 濃度に対応し、以下の通りである: TGF - 1 / 2 / 3 タンパク質 - 12 pM (活性ダイマー)、アクチビン A、GDF - 8、GDF - 11 - 1 nM (活性ダイマー) およびアクチビン、アクチビン AB - 100 pM (活性ダイマー)。抗原および抗体は、室温で 30 分の間インキュベートした。アッセイ培地を細胞から除去し、播種した細胞に混合物を加えた。一晩のインキュベーションの後、アッセイ培地を除去し、70 μl の PBS を (CaCl₂ および MgCl₂ と一緒に) 各ウェルに加えた。室温に適応させた後、50 μl の新たに調製した Brite Lite Plus 試薬 (Perk

30

40

50

inElmer、#6016761)を各ウェルに加えた。5分間のインキュベーション時間の後、発光を照度計(GeniosPro、Tecan)で読み取った。それぞれの抗体の完全滴定の後、プリズムソフトウェア(GraphPad Software)を使用して最大半減抑制濃度(IC50値)を計算した。

【0215】

受容体/リガンド相互作用Elisa

阻害性FabがヒトTGF-RII/FcのTGF-2結合部位をブロックすることにより作用するかどうかについて評価するために、TGF-受容体-TGF-相互作用ELISAを実行した。

【0216】

TGF-2-TGF-RII相互作用アッセイ

これのために、Maxisorp(商標)384ウェルプレートを、2 μ g/ml(約22nM)のTGF-RII(R&D Systems、#LF1309051)により、4 μ g/mlで一晩コーティングした。1.25 μ g/ml(約100nM)のビオチン化ヒトTGF-2を、異なるFab/IgG濃度と30分間インキュベートし、次にChemiblockerでブロックしたコーティングされたウェルに加えた。結合したビオチン化ヒトTGF-2は、アルカリ性ホスファターゼ(Invitrogen(Zymed)、#43-4322)にコンジュゲートしたストレプトアビジンとのインキュベーションと、続くAttoPhos蛍光基質(Roche、#11681982001)の添加によって検出した。535nmの蛍光発光を、430nmでの励起で記録した。

【0217】

pSMAD3 SureFire(登録商標)アッセイ

この機能性スクリーニングのために、特製のFab含有細菌溶菌液(BEL緩衝液)を使用して、ホスホSMAD3(Ser423/425)キット(PerkinElmer #TGRSM3S10K)およびAlphaScreen(登録商標)IgG(ProteinA)検出キット(#6760617C)のためのAlphaScreen(登録商標)SureFire(登録商標)によりHEK293T細胞におけるTGF-誘導Smad3リン酸化を測定した。BEL溶菌液(BEL緩衝液を使用することにより生成した溶菌液)のTGF-2/3の中和能力を測定するために、各ウェルにつきリポーター細胞系HEK293T(CAGA-12ルシフェラーゼ)からの8,000個の細胞を、アッセイ培地(2%FBSおよび2mM L-グルタミンを追加したDMEM)中のコーゲンコートproxiplate(商標)に播種し、37 $^{\circ}$ Cおよび5%CO₂で一晩培養した。その翌日、0.3ng/mlのTGF-2または3をそれぞれ加えた、25 μ lのBEL溶菌液および75 μ lの無血清アッセイ培地を含有するマスタープレートを調製した。ペーパータオルの上でプレートを払い落とし、タブをつけること(tabbing)によって、アッセイ培地を細胞から除去した。次に、マスタープレートから15 μ lをHEK293T細胞に移し、37 $^{\circ}$ Cおよび5%CO₂で1時間刺激した。培地を除去し、4 μ lの1 \times 溶解緩衝液を各ウェルに加えた。分析まで、プレートを-80 $^{\circ}$ Cで保存した。分析のために、5 μ lの「アクセプタービーズミックス」を2時間加え、その後2 μ lの「ドナービーズミックス」を追加し、さらに2時間の間インキュベートした。AlphaScreenセッティングを使用して、AlphaScreenプレートリーダーでプレートを読み取った。

【0218】

骨格筋細胞分化アッセイ(クレアチンキナーゼ(CK)アッセイ)

20%FCS(PAA)を加えた骨格筋基礎培地(skBM;Lonza)からなる増殖培地(GM)を使用して、96ウェルプレートでヒト骨格筋細胞(HsKMC;Lonza)を培養した(7500個の細胞/ウェル)。skBMからなる無血清分化培地(DM)に変更することによって、播種の24~48時間後に分化が開始された。分化の開始時に0.3ng/mlのTGF-2およびそれぞれのIgG1を7つの異なる濃度(最高3 μ g/ml)で加え、細胞を最高120時間管状筋細胞に分化させることによって、

10

20

30

40

50

HuSKMCs分化に及ぼす効果を評価した。細胞をPBSで3回洗浄し、次にリポーター溶解緩衝液(Promega)で溶解し、測定まで-80で保存した。CK活性は、CK(IFCC)試薬(Thermo Electron)を使用して測定した。CK試薬は、製造業者の指示に従って調製した。室温(RT)への調整のために、測定の少なくとも90分前にアッセイプレートを-80のフリーザーから取り出した。75µlのCK試薬を各ウェルに加えた後に(プレート設計を参照)、アッセイプレートをELISAリーダーに直ちに移し、1分間の読取り間隔で吸光度を340nmで20分間読み取った。CK活性を計算するために、ウサギの筋肉からのCK(#10127566001; Roche Diagnostics)を使用して、リポーター溶解緩衝液で標準曲線(0.02~40µg/ml)を新たに作成した。

10

【0219】

タンパク含有量は、ピシンコニン酸(BCA)試薬(#BCA-1;シグマ)を使用して測定した。BCA試薬は、製造業者の指示に従って調製した。200µlのBCA試薬を各ウェルに加えた後に、アッセイプレートを37で30分間インキュベートし、次に吸光度を562nmで読み取った。タンパク含有量を計算するために、タンパク質標準曲線(リポーター溶解緩衝液に0.25~1mg/ml)を作成した。CK活性は、以下の通りに計算した(Florini et al. 1989も参照する)。記録した21時点の各々での吸光度の値を平均して、プロットした。これらのプロットの線形部分から、線形回帰(SigmaPlotソフトウェアを使用する)によって最大勾配を測定し、CK標準曲線の助けを借りてCK活性(mUnit)に変換した。値は対応するタンパク含有量で次に正規化し、CK活性はmUnit/mgタンパク質または対照の百分率(CK活性)で表した。可能ならば、EC₅₀値(最大半減効果を引き起こす濃度)およびE_{max}(最大効果)を与えるS字曲線のあてはめ(XLfitソフトウェアを使用する)によって、濃度-応答データを評価した。

20

【0220】

親和性測定

表面プラズモン共鳴(Biacore)を使用した親和性測定

直接抗原固定化のために、標準のEDC-NHSアミンカップリング化学を使用した。CM5チップ(Biacore, Sweden)を、10mM酢酸緩衝液pH4.5中の適当な共鳴単位(RU)のヒト-またはマウス-TGF-2/Fc(抗原の活性による)でコーティングした。参照フローセルのために、HSAのそれぞれの量を使用した。5µlの10mMグリシン/HCl緩衝液pH1.5で、再生を実行した。あるいは、抗原を直接的に固定化せずに、抗ヒトFc抗体で改変した(Fc捕捉キット、GE Healthcare/Biacore)CM5チップの上に捕捉した。参照フローセルの上では、捕捉抗体は固定化されたが、抗原は捕捉されなかった。再生は、5µLの3M MgCl₂の2回の注射を使用して達成された。動態測定は、Fab試料の段階希釈列を使用して、ダルベッコのPBSにおいて20µl/分の流量で実行した。Fab濃度は、15.6から500nMの範囲内だった。各濃度の注射時間は、1分であった。解離時間は、少なくとも2分(または、測定された親和性によってそれより長く)に設定した。二重参照のために、ランニングバッファのブランク注射を使用した。BIA評価ソフトウェア3.2(Biacore, Sweden)を使用して、全てのセンサーグラムを全般的にあてはめた。

30

40

【0221】

溶液平衡滴定(SET)方法(Sector Imager 6000(MSD))を使用した選択された抗ヒトTGF-2 FabおよびIgGの親和性測定

KD測定のために、抗体タンパク質のモノマー分画を使用した(少なくとも90%のモノマー含有量、Fabのためには分析的SEC; Superdex 75(Amersham Pharmacia)によって、またはIgGのためにはTosoh G3000SWXL(Tosoh Bioscience)によってそれぞれ分析した)。溶液での親和性測定は、基本的には文献に記載されている通りに実施した(Friquet et al., J Immunol)

50

unol Meth 77, 305-319. 1985)。S E T方法の感度および精度を向上させるために、それは古典的E L I S AからE C Lに基づくテクノロジーに変えられた(Haenel et al., Anal Biochem 339, 182-184. 2005)。1 mg / mlのヤギ抗ヒト(F a b) 2断片特異的抗体(D i a n o v a)を、製造業者の指示に従ってM S D - S u l f o - T A G (商標) N H S - エステル(M e s o S c a l e D i s c o v e r y, G a i t h e r s b u r g, M D, U S A)で標識した。ポリプロピレンマイクロタイタープレートおよびアッセイ緩衝液として0.5% B S Aおよび0.02% T w e e n - 2 0を含有するP B S p H 7.4で実験を実行した。予想されるK Dより少なくとも10倍高い濃度から出発して、非標識の抗原を2 n系列で希釈した。B m a x値を測定するために、抗原なしのウェルを使用し、バックグラウンドを測定するために、アッセイ緩衝剤だけを含むウェルを使用した。適当な量の結合剤(予想されるK Dに類似のまたはそれ未満の抗体濃度、60 μ lの最終量)の添加の後、混合物を室温で一晩インキュベートした。M S Dプレートを、抗原(1ウェルにつき30 μ l)でコーティングした。0.02% T w e e n - 2 0を含むP B Sでプレートを洗浄した後に、平衡させた試料をそれらのプレートに移し(1ウェルにつき30 μ l)、20分の間インキュベートした。洗浄の後、1ウェルにつき30 μ lのM S D - S i l f o - T a g標識検出抗体(抗ヒト(F a b) 2、最終希釈は一般的に1:2,000)をM S Dプレートに加え、エッペンドルフ振盪機(700 rpm)の上において室温で30分間インキュベートした。M S Dプレートを洗浄して、界面活性剤と一緒に30 μ l / ウェルのM S D R e a d B u f f e r Tを加えた後、S e c t o r I m a g e r 6000(M e s o S c a l e D i s c o v e r y, G a i t h e r s b u r g, M D, U S A)を使用して電気化学発光シグナルを検出した。

【0222】

カスタマイズしたフィッティングモデルを適用して、X L f i t (I D B S) ソフトウェアでデータを評価した。F a b分子のK D測定のために、以下のフィットモデルを使用した((Abraham et al., J Mol Recognit. 9, 456-461.1996)によって改変された、(Haenel et al., Anal Biochem 339, 182-184.2005)による)：

【0223】

【数1】

$$y = B_{\max} - \left(\frac{B_{\max}}{2[Fab]_t} \left([Fab]_t + x + K_D - \sqrt{([Fab]_t + x + K_D)^2 - 4x[Fab]_t} \right) \right) \quad 30$$

[F a b] t : 適用された全体の F a b 濃度
 x : 適用された全体の可溶性抗原濃度 (結合部位)
 B m a x : 抗原なしの F a b の最大シグナル
 K D : 親和性

【0224】

F a b の親和性測定

抗 T G F - 2 F a b の K D 測定は、基本的に以下の通りに実行した：全ての希釈溶液のために、ヒト T G F - 2 を 4 m M の H C l で 1 0 0 μ g / m l まで前希釈した。コーティングのために、抗原を P B S で 0.05 μ g / m l (T G F - 2) までさらに希釈し、標準の M S D プレートの上で 4 において o / n でコーティングした。その後、P B S 中の 3 % B S A により、M S D プレートを室温で 1 時間ブロックした。

【0225】

T G F - 1 / 3 および反標的への結合

T G F - 1、T G F - 3 および反標的 (ミオスタチン、G D F - 1 1、アクチビン A、アクチビン B およびアクチビン A B) への結合の S E T をベースとした分析のために、特異抗原、それぞれヒト T G F - 1 または T G F - 3 を記載の通りコーティングした。試験するタンパク質を滴定のために使用し、2 n 系列で希釈した。出発濃度は、それぞれ、T G F - 1 の場合 2 μ M、T G F - 3 の場合 0.05 μ g / m l、または全ての反標的の場合 1 0 0 n M であった。

【0226】

エピトープビニング

PBSに希釈した $2.5 \mu\text{g/ml}$ のTGF- β 2特異的Fabにより、Maxisorp(商標)384ウェルプレートに4日間一晩コーティングした。ビオチン化TGF- β 2タンパク質を $0.1 \mu\text{g/ml}$ (約8nM)の定常TGF- β 2濃度の溶液中のFabと室温で1時間インキュベートし、Fabの滴定はTGF- β 2タンパク質と比較して12.5モル過剰のFab($5 \mu\text{g/ml}$ (100nM))から開始された。Fab-TGF- β 2複合体を、BSAで30分間ブロックされたFabをコートしたウェルに次に加えた。結合したビオチン化TGF- β 2は、アルカリ性ホスファターゼ(Invitrogen(ZyMed)、#43-4322)にコンジュゲートしたストレプトアビジンとのインキュベーションと、続くAttoPhos蛍光基質(Roche、#11681982001)の添加によって検出した。 535nm の蛍光発光を、 430nm での励起で記録した。

10

【0227】

IgGへの変換

完全長IgGを発現させるために、重鎖(VH)および軽鎖(VL)の可変ドメイン断片を、Fab発現ベクターからヒトIgG1f__LALAのためのpMorph(登録商標)4__hIg1f__LALA__カップまたはpMorph(登録商標)4__hIg1f__LALA__ラムダベクターにサブクローニングした。

20

【0228】

HuCAL(登録商標)免疫グロブリンの生成

pMORPH(登録商標)4ベクター系を使用したヒトIgGの一過性の試験的発現および精製。IgGの重鎖および軽鎖の両方をコードするpMORPH(登録商標)4発現ベクターDNAにより、真核生物のHKB11細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションから3日または7日目に細胞培養上清を収集し、標準のプロテインA親和性クマトグラフィー(MabSelect SURE、GE Healthcare)に付した。特記されない限り、1xダルベッコのPBS(pH7.2、Invitrogen)への緩衝液交換を実行し、試料を濾過滅菌($0.2 \mu\text{m}$ の孔径)した。IgGの純度は、Labchipシステム(Caliper Life Sciences、USAまたはAgilent、USA)を使用した変性、還元性および非還元性条件の下で、またはSDS-PAGEで分析した。タンパク質濃度を紫外分光光度法によって測定し、自然状態のIgG調製物を分析するためにHP-SECを実行した。

30

【0229】

パニング、抗体の同定および特徴付け

抗体変異体タンパク質の供与源として市販されているファージディスプレイライブラリー、MorphoSys HuCAL PLATINUM(登録商標)ライブラリーを使用して、高い結合親和性を有するクローンの選択によって、抗原TGF- β 2タンパク質の生物学的活性を中和する治療的抗体を生成した。HuCAL PLATINUM(登録商標)ファージミドリブラリーは、HuCAL(登録商標)概念(Knappik et al., J Mol Biol 296, 57-86, 2000)に基づき、ファージ表面でFabを提示するためにCys Display(登録商標)テクノロジーを用いる(国際公開第01/05950号)。

40

【0230】

5つのパニング戦略、3つはビーズベースのものおよび2つは溶液パニング、を実行した。第2回の標準パニングのアウトプットを使用して、RapMAT(登録商標)パニングを実行した。高度に多様なHuCAL(登録商標)抗体を選択する確率を高くするために、ライブラリープールを主に別個に保った。高親和性抗体を生成する確率を高くするために、標準パニングの2回目のアウトプットを使用してRapMAT(登録商標)を実行した。H-CDR2およびL-CDR3を、別々に多様化した。標準パニングのアウトプットを、ヒトTGF- β 2への結合についてスクリーニングした。スクリーニング方法は、パニング戦略に基づいて選択した：ビーズパニングはFMATアプローチを使用してス

50

クリーニングし、溶液パニングはF a b捕捉E L I S Aアプローチを使用してスクリーニングした。T G F - 1に対するカウンタースクリーニングは、F M A Tを使用して実行した。r h T G F - 2に対するパニングのために、p S m a d 3 S u r e F i r e (登録商標)をベースとしたスクリーニングを実行した。S E Tアプローチを使用して、主に最もアフィンなヒットについてR a p M A T (登録商標)パニングアウトプットをスクリーニングした。標準対R a p M A T (登録商標)パニングの一部として、r h T G F - 2に対するパニングのために、p S m a d 3 S u r e F i r e (登録商標)をベースとしたスクリーニングを実行した。これらの方法を使用して、h T G F - 2の阻害を分析した。h T G F - 2およびT G F - 3陰性クローンを選択する、ストリンジェントなE L I S Aスクリーニングを適用した。さらに、高アフィン(T G F - 1へのK_D < 25 nM) T G F - 1結合体を排除するために、S E TスクリーニングはT G F - 1に対するカウンタースクリーニングを含んだ。標準パニングの一次スクリーニングにおいて同定された一次ヒットのうち、p S m a d 3 S u r e F i r e (登録商標)をベースとしたスクリーニングで同定された27個のモノクローナルT G F - 2阻害抗体が固定された。その後、10/27個の特異な強固になったクローンを試験的スケールで発現させ、精製した。これらの精製されたF a bタンパク質も、その後R G Aで分析した。R a p M A T (登録商標)パニングの一次スクリーニングで同定された一次ヒットは、F a b - F Hフォーマットで微量発現させ、微量精製し、その後、R G Aでh T G F - 2、m T G F - 2、T G F - 3およびT G F - 1の阻害について分析した。p S m a d 3 S u r e F i r e (登録商標)スクリーニングアプローチにおいて同定されたm T G F - 2阻害性ヒットと合わせて、38個の特異な固定された抗体は、次にF a b - F Hフォーマットにより試験的スケールで発現させ、R G Aで分析もした。E L I S Aおよび配列決定における異なるT G F - アイソフォームへの結合の分析を含んだ固定ステップのために、最も有力な二次ヒットを選択した。全てのパニングおよびスクリーニング戦略から、合計で190個の特異なF a bを固定することができた。190個の特異な固定された抗体の配列分析は、以下を示した：

- 90個のH C D R 3ファミリー；
- 89個のカッパおよび101個のラムダ抗体。

【0231】

190個の固定されたF a bを大腸菌(E. coli)で発現させ、精製した。169/190個の発現させたF a bは品質管理に合格し、ヒトT G F - 2、マウスT G F - 2、ヒトT G F - 3およびヒトT G F - 1の阻害についてR G Aにおいて特徴付けられた。この特徴付けの結果に基づいて、最も見込みがある116個の抗体を、R a p C L O N E (登録商標)を介したh I g G 1 f _ L A L Aフォーマットへの変換のために選択した。

【0232】

選択 - 発展性評価(s - D A S)を含むI g G特徴付け

116個のI g Gを真核生物のH K B 1 1細胞で発現させ、精製した。90/116個の発現させたI g Gは品質管理に合格し、ヒトT G F - 2、マウスT G F - 2、ヒトT G F - 3およびヒトT G F - 1の阻害についてR G Aにおいて特徴付けられた。高い割合の抗体が、凝集傾向のために高いか中等度の発展性リスクを有することが見出された。延長されたs - D A S分析の中で、疎水性分析も実行した。結果は、高い割合の、非常に疎水性の抗体を明らかにした。高い疎水性は、抗体の凝集傾向と相関することが見出された。低い発展性リスクを有すると明記された抗体と比較して高いか中等度の発展性リスクを有すると明記された抗体の間で、より高い割合の高/中等度の疎水性を有する抗体が見出された。

【0233】

候補の特徴付け(生殖系列化およびP T M除去の前)

s - D A Sに合格した56個の抗体は、R G Aにおいて親和性および効力を示した。R G AおよびC Kアッセイおよび延長されたs - D A Sデータ(s - D A S + 疎水性評価)に

おける活性に基づく。i n v i v o特徴付けおよびPTM除去/生殖系列化のために、6つの抗TGF- β 2抗体を選択した。これらの6つの選択された抗体(MOR12773、MOR13436、MOR13438、MOR12413、MOR13416、MOR13426)を、下に要約される様々なアッセイで特徴付けた。

【0234】

親和性測定

抗体抗原相互作用の K_D 値は、上記の原理および条件に従ってSETを使用して測定した。TGF- β 2特異的Ab MOR13436、および選択されたTGF- β 2抗体に関する K_D 値は、表1に要約する。このプロジェクトの K_D 成功基準は、ヒトTGF- β 2については200 pM未満に設定した。全ての選択されたTGF- β 2特異的抗体候補は、この基準を満たした。TGF- β 2特異的は、好ましくは5倍の緩い基準でマウスTGF- β 2に結合すると予想される。6つの選択されたTGF- β 2特異的抗体のうちの4つは、この基準を満たした。

10

【0235】

【表1】

表1 SET測定による K_D 判定(生殖系列化/PTM除去の前)

番号	hTGF- β 2 KD [pM]	mTGF- β 2 KD [pM]	hTGF- β 3 KD [pM]
MOR12773	23	2700	シグナルなし
MOR13436	4	18	n.a.
MOR13438	2	110	n.a.
MOR12413	8	2000	n.a.
MOR13416	2	130	n.a.
MOR13426	8	4	n.a.

20

n.a. 2 μ Mまで親和性なし

【0236】

反標的への交差反応性

TGF- β 1および5つの反標的(ミオスタチン、GDF-11、アクチビンA、アクチビンBおよびアクチビンAB)への最終抗体の結合(PTM除去および生殖系列化の前)を、上記の原理および条件に従ってSETを使用して分析した。全ての選択されたTGF- β 2特異的Abは、成功基準を満たした。

30

【0237】

RGAにおける活性

最終抗体の活性(PTM除去および生殖系列化の前)を、上記の条件を使用したRGAにおいてhTGF- β 2、mTGF- β 2、TGF- β 3およびTGF- β 1の阻害について分析した。MOR13436に関するRGA活性データの一例を、図3に示す。このプロジェクトのRGA成功基準のIC₅₀は、ヒトTGF- β 2については200 pM未満に設定した。全ての選択されたTGF- β 2特異的抗体候補は、この基準を満たした。

40

【0238】

CKアッセイにおける活性

最終抗体の活性(PTM除去および生殖系列化の前)を、上記の条件を使用したCKアッセイで分析した。CKアッセイデータはRGAデータとよく相関したが、CKアッセイで一般的により低い効力であった。このプロジェクトのCKアッセイ成功基準のIC₅₀は、ヒトTGF- β 2およびTGF- β 3抗体のそれぞれについて1000 pM未満に設定した。MOR13436の濃度-応答曲線の例を、図5に提供する。

【0239】

50

受容体 - リガンド相互作用アッセイ

TGF- β 2 - TGF- β RII結合を阻害する最終抗体の能力（PTM除去および生殖系列化の前）を、上記の条件を使用した受容体 - リガンド相互作用アッセイで分析した。

【0240】

最終候補の生殖系列化 / 工学操作

【0241】

【表2】

表 2: TGF- β 2 特異的抗体の配列を必要な PTM 除去および生殖系列化について検討した。

10

番号	VH	VL	除去する PTM						実行する生殖系列化							
			HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3	VH-FR1	VH-FR2	VH-FR3	VH-FR4	VL-FR1	VL-FR2	VL-FR3	VL-FR4
MOR12773	VH2	κ 1	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
MOR13436	VH5	λ 3	-	NS	-	-	NS	-	-	-	-	-	6	-	3	-
MOR13438	VH5	λ 3	-	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	3	-
MOR12413	VH1A	κ 1	-	-	DG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

20

【0242】

PTM除去および生殖系列化の後に、合計で23個の誘導体をpM4__hIgG1f__LALA__カップタまたはpM4__hIgG1f__LALA__ラムダにおいて生成した。表は、PTM除去および生殖系列化の後の抗体誘導体の概要を提供する。

【0243】

【表3】

表 3: PTM 除去/生殖系列化の後の抗体誘導体

親の抗体	誘導体抗体	PTM 除去/生殖系列化の詳細
MOR12773	14797	VH2 生殖系列化:Chothia による aa 位置
MOR13436	14799	N54Q (HCDR2) + VL3_3j への λ 3 生殖系列化 + N51K (LCDR2)
	14800	N54Q (HCDR2) + VL3_3j への λ 3 生殖系列化 + N51T (LCDR2)
	14805	N54T (HCDR2) + VL3_3j への λ 3 生殖系列化 + N51K (LCDR2)
MOR13438	14809	N54T (HCDR2) + VL3_3j への λ 3 生殖系列化
MOR12413	14787	D95E (HCDR3)

30

40

【0244】

RGAにおける活性

最終抗体の活性（PTM除去および生殖系列化の後）を、上記の条件を使用したRGAにおいてhTGF- β 2、mTGF- β 2、TGF- β 3およびTGF- β 1の阻害について分析した。データは、表4に要約する。

【0245】

CKアッセイにおける活性

最終抗体の活性（PTM除去および生殖系列化の後）を、上記の条件を使用したCKアッセイで分析した。CKアッセイデータは、表4に要約する。

50

【 0 2 4 6 】

【表 4】

表 4:TGF- β 2 特異的 Ab の結合性および生物活性

Ab	RGA (CAGA-12 luc/Smad-2/3 RGA; IC 50 [pM])				BiaCORE (表面プラズモン共鳴;KD[M])			CK (IC 50 [pM])	
	ヒト TGF- β 2	マウス TGF- β 2	ヒト TGF- β 3	ヒト TGF- β 1	ヒト TGF- β 2	マウス TGF- β 2	ヒト TGF- β 3	ヒト TGF- β 2	マウス TGF- β 2
MOR 14797	8.4	329	n.e.	n.e	4.46E-15	6.33E-13	2.74E-08	105	1504
MOR 14799	78	138	n.e.	n.e	1.08E-15	2.77E-15	1.99E-11	1050	909
MOR 14800	29	123	n.e.	n.e	4.34E-16	1.09E-15	> 1 E-06	491	1200
MOR 14805	106	248	n.e.	n.e.	9.70E-13	1.31E-16	7.05E-11	315	629
MOR 14809	94	598	n.e.	n.e.	5.24E-14	2.36E-15	> 1 E-06	220	800
MOR 14787	2.8	n.e.	n.e.	n.e.	7.38E-16	1.89E-12	> 1 E-06	366	3000
CAT -152	26	298	1234	n.e.	7.3E-11		1.175E-09		
1D11	4370	n.e.	32	108	1.17E-10		2.0E-11		

CK: 骨格筋細胞分化アッセイ(クレアチンキナーゼ);n.e. 100nM まで効果なし

【 0 2 4 7 】

反標的への交差反応性 (R G A)

TGF- β 3 および 5 つの反標的 (ミオスタチン、GDF-11、アクチビン A、アクチビン B およびアクチビン A B) への最終抗体の交差反応性 (P T M 除去および生殖系列化の後) を、上記の条件を使用した R G A で分析し、図 4 に示す。

【 0 2 4 8 】

要約すると、TGF- β 3 および 5 つの反標的の濃度依存性阻害は、試験した抗体のいずれについても検出できなかった。最終抗体は、TGF- β 1 の阻害についても試験した。抗体のいずれも、100 nM I g G まで TGF- β 1 の濃度依存性阻害を示さなかった。

【 0 2 4 9 】

統計分析

結果は、平均 + / - S E M で表す。統計分析は、一元配置分散分析法に従って、ダネットの多重比較検定を使用して実行した。確率値が < 0 . 0 5 であったとき、処置 (抗 TGF- β 2 抗体 MOR 1 4 7 9 7、MOR 1 4 7 9 9、MOR 1 4 8 0 0、MOR 1 4 8 0 5、MOR 1 4 8 0 9 および MOR 1 4 7 8 7 を対照抗体との差について試験した) および差は有意であると考えた : * : P < 0 . 0 5、* * : P < 0 . 0 1、NS : I g G 対照に対して有意性なし。統計分析は、Graph Pad Prismバージョン 5 . 0 (G

10

20

30

40

50

raphPad Software, Inc) によって実行した。0日目の体重を引き算することによって体重を計算し、筋肉重は0日目の体重(初期体重)によって正規化した。

【0250】

デュピイトラン病を患っている患者からの組織における抗TGF- β 2抗体の*ex vivo*試験

免疫組織化学およびmRNAによって線維症マーカーを測定する、その抗線維症活性を測定するためのデュピイトランの拘縮疾患の最近記載された三次元*ex vivo*培養システム(Karkampouna et al. 2014, Molecular Therapy - Nucleic Acids, (2014) 3, e142)で、TGF- β 2特異的Ab MOR14797を試験し、汎TGF- β 1D11と比較した。結果は、図7および8に示す。*ex vivo*モデルは、Karkampouna et al. 2014に記載されている通りに実行した。患者組織をスライスし、3 μ g/mlの抗体の存在下で7日間、ニトロセルラー膜上で培養した。7日目に、組織スライスをmRNA単離のために収集したか、または免疫組織化学分析のために使用されるならば、低温包埋のために固定し、処理した。

【0251】

免疫組織化学のために、5 μ mの切片を切り出し、コラーゲン1および α -平滑筋アクチンに対する抗体で染色した。核色素DAPIを使用して、核を評価した。標識された検体の共焦点顕微鏡で切片につき3つの画像を取得し、画像化分析によって数量化した。RNA分析のために、全RNAを単離し、定量的PCR(qPCR)を実行した。結果は、ハウスキーピング遺伝子の発現に正規化したmRNA発現で表す。3人の異なる患者からの培養で、3 μ g/mlのMOR14797は、免疫組織化学によって測定したとき線維症マーカーコラーゲン1および α -平滑筋アクチン(SMA; 図7を参照)を効果的に低減した。MOR14797は、汎TGF- β 1D11より効果的だった。2人のさらなる患者からの培養で、線維症マーカーコラーゲン1および α -平滑筋アクチンの用量依存的(0.03~3 μ g/ml)低減が示された。TGF- β 2特異的Ab MOR14797のコラーゲン1免疫染色阻害の例を、図8に示す。MOR14797は、mRNAレベルの様々な線維症マーカーの発現も低減した。

【0252】

片側性尿管閉塞(UUO)マウス腎臓線維症モデルにおける*in vivo*試験
mRNAによって線維症マーカーを測定する、その抗線維症活性を測定するための、片側性尿管閉塞(UUO)マウス腎臓線維症モデルにおけるTGF- β 2特異的Ab MOR13436。結果を、図9に示す。*ex vivo*モデルは、Kitamoto et al. 2009(J Pharmacol Sci, 111, 285-292)に記載されている通りに実行した。簡潔には、左尿管の完全なライゲーションによってUUOを実行し、5mg/kgのTGF- β 2特異的Ab MOR13436で14日間処置した。mRNA単離のために、腎臓を回収した。RNA分析のために、全RNAを単離し、定量的PCR(qPCR)を実行した。結果は、ハウスキーピング遺伝子の発現に正規化したmRNA発現で表す。

【0253】

ヒトTGF- β 2/MOR14797 Fab複合体のX線結晶構造
MOR14797のFab断片(配列番号69(部分配列)および79、表5)に結合したヒトTGF- β 2(残基303~414、配列番号122)の結晶構造を測定した。下で詳述されるように、複合体の個々の構成成分は、別個の発現系を使用して生成され、精製された複合体を生成するために組み合わせた。MOR14797 Fabに結合したTGF- β 2に関する回折データを生成するために、X線結晶学を次に用い、抗原結合部位を解明した。

【0254】

【表 5】

表 5:結晶構造決定のために使用されたタンパク質

構築物	1文字コードによるアミノ酸配列	配列番号
MOR14797 Fab 重鎖	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVIRQPPGKALEWLAHIYWNDDK SYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARDFYYSYGYFDSWGQGTLLVTV SSASTKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTC	69 (部分 配列); 配列番号 69の残基 1~229)
MOR14797 Fab 軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKLLIFGASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQTNTMNTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	79

10

【0255】

タンパク質生成

IgGのパイン切断からのFab生成：MOR14797 Fabは、固定化されたパイン（Thermo Scientific Pierce）による完全長MOR14797 IgGの切断によって生成された。20mMリン酸ナトリウム（pH7.0）、10mM EDTA中の20mg/mlのMOR14797 IgGを、80：1の重量比で固定化されたパインと混合し、混合物は、37℃で一晩、回転プラットフォームの上でインキュベートした。次に、重力流動カラムを使用して、FabおよびFc断片を固定化されたパインから分離した。次に、あらゆるFc断片を除去するために、収集したフロースルーをHiTrap MabSelect SUREカラム（GE Healthcare Life Sciences）に加えた。Fab含有フロースルーを次に濃縮し、20mM HEPES（pH7.5）、150mM NaClで平衡させたHiLoad 16/600 Superdex 200カラム（GE Healthcare Life Sciences）に加えた。ピーク分画はSDS-PAGEによる分析にかけ、組み合わせた分画はTGF-2と複合体を形成するために次に使用した。

20

30

【0256】

TGF-2-MOR14797 Fab複合体のin vitro再構成：1：10（v/v）の1Mクエン酸三ナトリウム（pH3.5）を加えることによって、1mg/mlの濃度のFabを酸性化した。次に、精製されたTGF-2を、1：1.5のモル比（濃度はOD A280によって測定した）でMOR14797 Fabと混合した。複合体を1：5（v/v）の1Mトリス-HCl（pH8.5）で中和し、次に濃縮し、その後20mM HEPES（pH7.5）、150mM NaClで平衡させたHiLoad 16/600 Superdex 200カラム（GE Healthcare Life Sciences）に加えた。ピーク分画はSDS-PAGEによる分析にかけ、選択された分画を結晶化試験のために組み合わせた。

40

【0257】

結晶化および構造決定

TGF-2-MOR14797複合体を20mg/mlに濃縮し、その後、結晶化スクリーニングを実施する前に20,000×gで10分間遠心分離した。シッピングドロップ蒸気拡散セットアップを使用して、結晶を20℃で成長させた。TGF-2-MOR14797複合体の0.1μlを、0.1MのHEPES（pH7.5）および70%（v/v）のMPDを含有するレザパー溶液の0.1μlと混合し、液滴を、45μlのレザパー溶液に対して平衡させた。液体室素の中で結晶を直接的に瞬間冷却し、光線1

50

7-IDでの回折データの収集のために、Advanced Photon Source (Argonne National Laboratory, USA) に送った。データセットは、autoPROC (バージョン1.1.6、Global Phasing Ltd.) を使用して、格子サイズ $a = 77.2$ 、 $b = 122.1$ 、 $c = 130.1$ 、 $\beta = 90^\circ$ 、 $\gamma = 90^\circ$ および $\alpha = 90^\circ$ の空間群 $P2_12_12_1$ において 2.4 の解像度まで処理した。複合体の構造は Phaser (バージョン2.5.5、McCoy et al., J. Appl. Cryst. 40, 658-674, 2007) を使用して分子交換によって解決し、最終モデルは COOT (バージョン0.8.7、Emsley et al., Acta Cryst. D66, 486-501, 2010) において構築され、Phenix (バージョン1.11.1、Afonine et al., Acta Cryst. D66, 213-221, 2010) を使用して精密化された。R_work および R_{free} 値は、それぞれ 17.5% および 23.0% である。結合の長さおよび角度の RMSD 値は、0.008 および 1.054° であった。

10

【0258】

エピトープは、MOR14797 Fab の任意の原子から 5 Å 以内の原子を含有する TGFβ-2 の残基と規定され、PyMOL (バージョン1.8、Schrodinger, LLC.) を使用して同定され、表6に掲載される。非対称単位 (結晶中の最小の特異な単位) 中に 2 コピーの TGFβ-2 / MOR14797 Fab 複合体があり、両方のコピーに共通する抗体接触残基だけがエピトープ残基として掲載される。

【0259】

TGFβ-2 に結合する MOR14797 のエピトープおよびパラトープ
TGFβ-2 に結合する MOR14797 のエピトープおよびパラトープを同定するために、TGFβ-2 - MOR14797 Fab 複合体の結晶構造を使用した。表6に詳述されるように、MOR14797 Fab と相互作用する TGFβ-2 の表面は、いくつかの非連続配列によって形成される。これらの残基は、MOR14797 Fab によって認識される三次元立体配置エピトープを形成する (図1)。表6に詳述されるように、TGFβ-2 と相互作用する MOR14797 の表面は、いくつかの非連続配列によって形成される。これらの残基は、TGFβ-2 に結合する MOR14797 の三次元パラトープを形成する (図1)。

20

【0260】

【表6-1】

30

表6: ヒト TGFβ-2 と MOR14797 Fab の間の相互作用。TGFβ-2 残基は UniProt エントリー番号 P61812 (配列番号 122) に基づいて番号付けされ、TGFβ-2 ダイマーの2つの鎖は A および B と表示される。Fab 残基はそれらの線状アミノ酸配列 (配列番号 69 (部分配列) および 79) に基づいて番号付けされ、対応する鎖は (重鎖は「H」、軽鎖は「L」) と表示される。潜在的な水媒介相互作用を考慮して、示される TGFβ-2 残基は MOR14797 Fab の原子から 5 Å 以内に少なくとも 1 つの原子を有する。

TGFβ-2			MOR14797		
アミノ酸	番号	鎖	アミノ酸	番号	鎖
LEU	304	A	GLN	1	H
ASN	316	A	SER	56	L
LYS	327	B	TYR	32	L
GLY	331	B	TYR	32	L

40

【0261】

【表 6 - 2】

TRP	332	B	TYR	32	L
			PHE	101	H
			TYR	102	H
LYS	333	B	TYR	32	L
			THR	91	L
			ASN	92	L
			THR	93	L
TRP	334	B	TRP	55	H
			TYR	102	H
			TYR	103	H
PRO	351	A	SER	56	L
TYR	352	A	GLN	55	L
			PHE	101	H
			SER	104	H
			TYR	106	H
			ASP	108	H
LEU	353	A	GLN	1	H
			MET	34	H
			ARG	99	H
			PHE	101	H
			ASP	108	H
TRP	354	A	GLN	1	H
SER	355	A	GLN	1	H
SER	356	A	GLN	1	H
GLN	359	A	SER	32	H
			TYR	102	H
ARG	362	A	THR	31	H
			SER	32	H
			MET	34	H
			PHE	101	H
VAL	363	A	PHE	101	H
			TYR	102	H
LEU	366	A	PHE	49	L
			PHE	101	H
			TYR	102	H
THR	369	A	PHE	49	L
			SER	53	L
			LEU	54	L
			GLN	55	L
ILE	370	A	PHE	49	L
			SER	53	L

10

20

30

40

【表 6 - 3】

TYR	392	B	TRP	55	H
			ASN	56	H
			TYR	103	H
ILE	394	B	ASN	56	H
			ASP	58	H
			TYR	103	H
LYS	399	B	ASN	56	H
GLU	401	B	SER	32	H
			TRP	55	H
			ASN	56	H
LEU	403	B	SER	32	H
			TYR	102	H

10

【 0 2 6 3 】

T G F - 2 に結合する M O R 1 4 8 0 0 のエピトープ

【 0 2 6 4 】

【表 7】

表 7: ヒト TGFβ-2 と MOR14800 Fab の間の相互作用。TGFβ-2 残基は UniProt エントリー番号 P61812(配列番号 122)に基づいて番号付けされ、TGFβ-2 ダイマーの 2 つの鎖は A および B と表示される。潜在的水媒介相互作用を考慮して、示される TGFβ-2 残基は MOR14797 Fab の原子から 5Å 以内に少なくとも 1 つの原子を有する。

タンパク質	鎖	アミノ酸	配列位置
TGF_B2	鎖 B	1(ALA).	1
TGF_B2	鎖 B	2(LEU).	2
TGF_B2	鎖 B	3(ASP).	3
TGF_B2	鎖 B	5(ALA).	5
TGF_B2	鎖 B	6(TYR).	6
TGF_B2	鎖 B	10(ASN).	10
TGF_B2	鎖 B	14(ASN).	14
TGF_B2	鎖 A	29(GLY).	29
TGF_B2	鎖 A	30(TRP).	30
TGF_B2	鎖 A	31(LYS).	31
TGF_B2	鎖 A	32(TRP).	32
TGF_B2	鎖 B	49(PRO).	49
TGF_B2	鎖 B	50(TYR).	50
TGF_B2	鎖 B	51(LEU).	51
TGF_B2	鎖 B	52(TRP).	52
TGF_B2	鎖 B	53(SER).	53
TGF_B2	鎖 B	54(SER).	54
TGF_B2	鎖 B	55(ASP).	55
TGF_B2	鎖 B	57(GLN).	57
TGF_B2	鎖 B	60(ARG).	60
TGF_B2	鎖 B	61(VAL).	61
TGF_B2	鎖 B	64(LEU).	64
TGF_B2	鎖 B	81(GLN).	81
TGF_B2	鎖 A	90(TYR).	90
TGF_B2	鎖 A	91(TYR).	91
TGF_B2	鎖 A	92(ILE).	92
TGF_B2	鎖 A	99(GLU).	99
TGF_B2	鎖 A	101(LEU).	101
TGF_B2	鎖 A	104(MET).	104
TGF_B2	鎖 B	110(LYS).	110

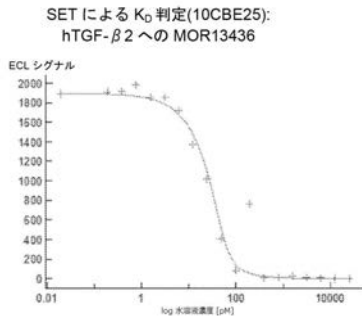
10

20

30

【 図 1 】

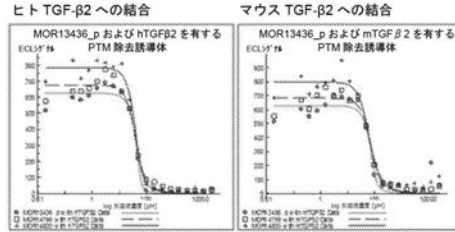
図 1: SET 測定による K_D 判定(MOR13436)



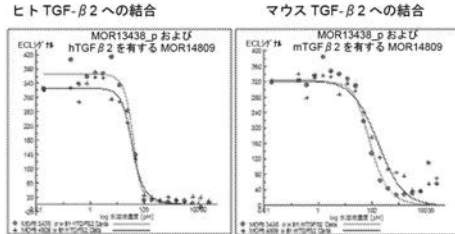
【 図 2 】

図 2: SET 測定による K_D 判定(生殖系列化/PTM 除去)

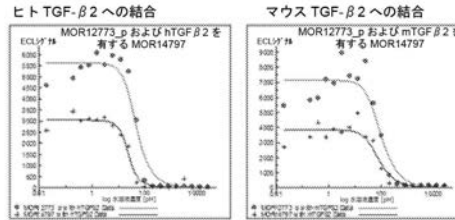
SET(13CBE18)親の Ab MOR13436 と比較した MOR14799 および MOR14800



SET(13CBE18)親の Ab MOR13438 と比較した MOR14809

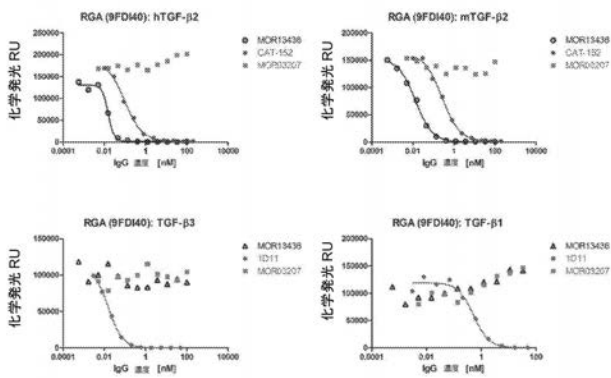


SET(13CBE17)親の Ab MOR12773 と比較した MOR14797



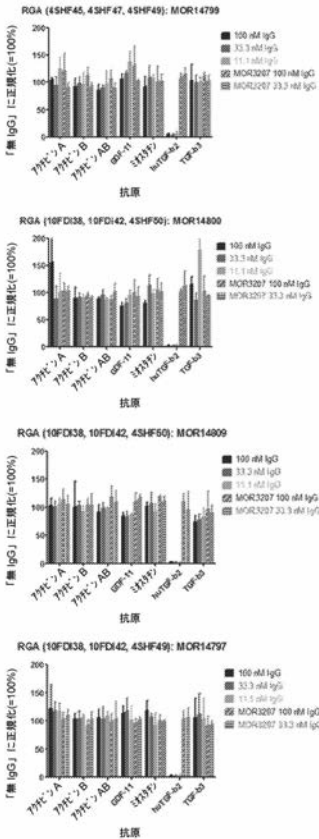
【 図 3 】

図 3: RGA 活性による生物活性およびアイソフォーム特異性(MOR13436)



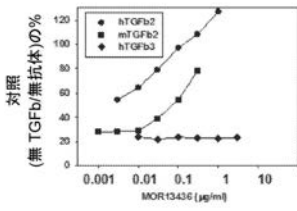
【 図 4 】

図 4: RGA 活性による生物活性および特異性(生殖系列化/PTM 除去)



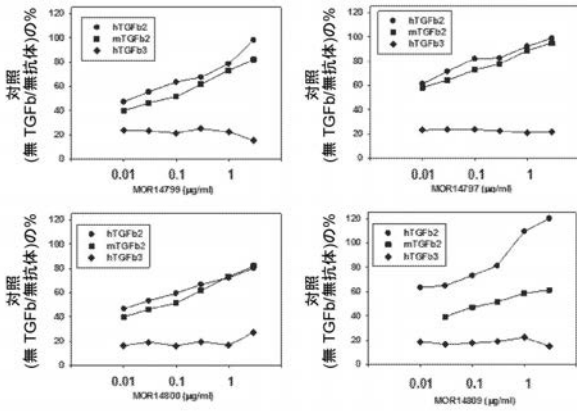
【 図 5 】

図 5: skMC 分化に対抗することによる生物活性および選択性



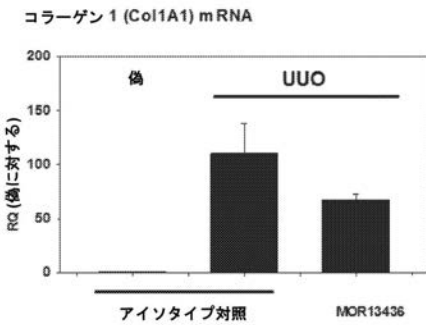
【 図 6 】

図 6: skMC 分化に対抗することによる生物活性および選択性



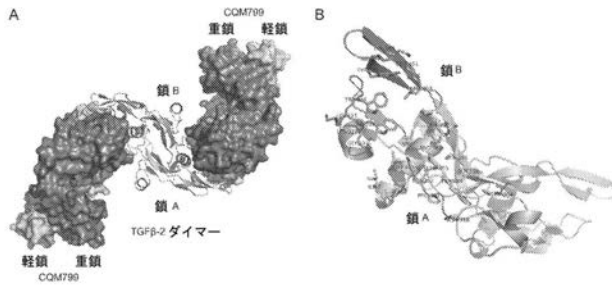
【 図 9 】

図 9: 片側性尿管閉そく(UUO)における生物活性



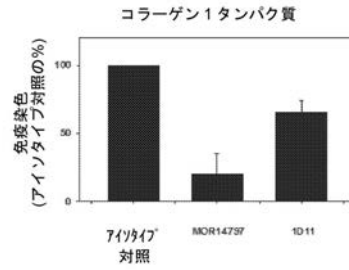
【 図 10 】

図 10: TGFβ-2 に結合する MOR14797 のエピトープ



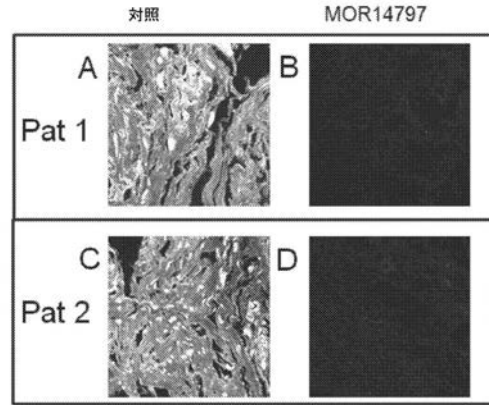
【 図 7 】

図 7: デュビユイトラン患者培養物におけるコラーゲン 1 タンパク質への生物活性



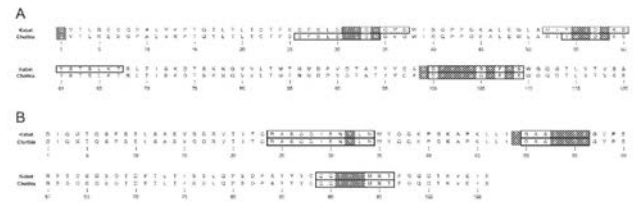
【 図 8 】

図 8: デュビユイトラン患者培養物におけるコラーゲン 1 タンパク質への生物活性



【 図 11 】

図 11: TGFβ-2 に結合する MOR14797 のパルトープ



【配列表】

2019511911000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2017/050917

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/22 A61K39/395 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) C07K A61K		
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, Sequence Search, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1993, PASQUALE LOUIS R ET AL: "Immunolocalization of TGF-beta-1, TGF-beta-2, and TGF-beta-3 in the anterior segment of the human eye", XP002768926, Database accession no. PREV199395091674 abstract -/--	1-28
<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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
28 April 2017		12/05/2017
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 Fleitmann, J

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2017/050917

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>-& PASQUALE LOUIS R ET AL: "Immunolocalization of TGF-beta-1, TGF-beta-2, and TGF-beta-3 in the anterior segment of the human eye", INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY AND VISUAL SCIENCE, vol. 34, no. 1, 1993, pages 23-30, XP002769673, ISSN: 0146-0404 page 24, left-hand column, paragraph 3 - page 25, left-hand column, paragraph 1 -----</p> <p>DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; September 2001 (2001-09), HILL C ET AL: "Transforming growth factor-beta2 antibody attenuates fibrosis in the experimental diabetic rat kidney.", XP002768927, Database accession no. NLM11524245 abstract -& HILL C ET AL: "Transforming growth factor-beta2 antibody attenuates fibrosis in the experimental diabetic rat kidney.", THE JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY SEP 2001, vol. 170, no. 3, September 2001 (2001-09), pages 647-651, XP002769674, ISSN: 0022-0795 abstract -----</p>	28
X	<p>EP 0 646 012 B1 (UNIV MANCHESTER [GB]) 8 January 2003 (2003-01-08) paragraph [0024] - paragraph [0025] -----</p>	1-8,10, 13-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2017/050917

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0646012	B1	08-01-2003	
		AT 230605 T	15-01-2003
		AU 673161 B2	31-10-1996
		BR 9306226 A	03-12-1996
		CA 2131383 A1	14-10-1993
		CZ 9402366 A3	12-04-1995
		DE 69332624 D1	13-02-2003
		DE 69332624 T2	02-10-2003
		DK 0646012 T3	03-03-2003
		EP 0646012 A1	05-04-1995
		ES 2189790 T3	16-07-2003
		JP 3919212 B2	23-05-2007
		JP H07505378 A	15-06-1995
		JP 2005290009 A	20-10-2005
		NO 943466 A	16-09-1994
		NZ 249937 A	25-09-1996
		PT 646012 E	31-03-2003
		RU 94042387 A	10-11-1996
		SK 116894 A3	08-02-1995
		US 6331298 B1	18-12-2001
		WO 9319769 A1	14-10-1993

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
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	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	M
C 1 2 Q 1/6897 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6897	Z

(81) 指定国 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, 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, TT, TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- (72) 発明者 イベブンジョ, チクウエンデュ
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー 2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ インコーポレイテッド
- (72) 発明者 ヤコビ, カルステン
スイス国 バーゼル 4 0 0 2, ポストファッハ, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメド. リサーチ, ノバルティス ファーマ アーゲー
- (72) 発明者 メイヤー, アンジェリカ
スイス国 バーゼル 4 0 0 2, ポストファッハ, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメド. リサーチ, ノバルティス ファーマ アーゲー
- (72) 発明者 シャード, イーブリン
ドイツ国 8 2 1 5 2 プラネック, レナ-クリスト-シュトラッセ 4 8, モーフォシス アーゲー
- (72) 発明者 トレンデレンバーク, アン-ウルリケ
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー 2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ インコーポレイテッド
- (72) 発明者 ヴラディミロヴナ ミティナ, オルガ
ドイツ国 8 2 1 5 2 プラネック, レナ-クリスト-シュトラッセ 4 8, モーフォシス アーゲー

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ79 QQ96 QR02 QR32 QR57 QR58 QR74
QR80 QS05 QS28 QS33 QX02
4B064 AG26 AG27 CA02 CA05 CA06 CA08 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA57X AA72X AA83X AA90X AA90Y AA93Y AB01 AC14 BA02
CA25 CA44
4C085 AA14 CC23 DD62 EE01 EE03 GG01 GG08
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA22 DA75 DA76 DA86

EA20 FA72 FA74