



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110945027 B

(45) 授权公告日 2023. 08. 01

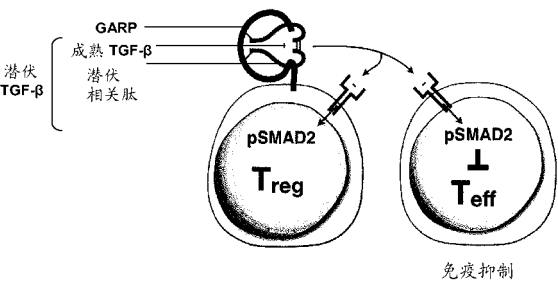
(21) 申请号 201880046262.8	S.利纳特 S.卢卡斯 P.库利
(22) 申请日 2018.05.11	(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 110945027 A	专利代理师 任晓华 黄登高
(43) 申请公布日 2020.03.31	(51) Int.Cl.
(30) 优先权数据 1707561.5 2017.05.11 GB	C07K 16/28 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.01.10	A61K 39/395 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/EP2018/062251 2018.05.11	A61K 39/00 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 W02018/206790 EN 2018.11.15	(56) 对比文件
(73) 专利权人 阿根思有限公司 地址 比利时根特 专利权人 天主教鲁汶大学	EP 2832747 A1,2015.02.04
(72) 发明人 S.范德沃宁 F.博吉翁斯 T.德雷尔 L.马里恩 G.德伯克	WO 2015015003 A1,2015.02.05
	J. Cuende等.Monoclonal antibodies against GARP/TGF- β 1 complexes inhibit the immunosuppressive activity of human regulatory T cells in vivo.《Science Translational Medicine》.2015,第7卷(第284期),
	审查员 刘芳
	权利要求书1页 说明书54页 序列表28页 附图22页

(54) 发明名称

GARP-TGF- β 抗体

(57) 摘要

本发明涉及结合GARP和TGF- β 1的复合物、尤其是人GARP和人TGF- β 1的复合物的抗体及其抗原结合片段。这些抗体和抗原结合片段表现出有利特性的组合,包括高亲和力抗原结合和抑制活性TGF- β 从调节性T细胞释放的能力。本发明的抗体和抗原结合片段对脱酰胺、异构化和氧化是相对抗性的,使得它们表现出改善的稳定性。



1. 抗体,其结合人GARP和TGF- β 1的复合物,其中所述抗体包含重链可变结构域(VH),其中:

VHCDR3为氨基酸序列YEWETVVVGDLMEYEEY (SEQ ID NO:13),

VHCDR2为氨基酸序列RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:12),且VHCDR1为氨基酸序列SYYID (SEQ ID NO:4);和

轻链可变结构域(VL),其中:

VLCDR3为氨基酸序列QQYASVPVT (SEQ ID NO:11),

VLCDR2为氨基酸序列GASRLKT (SEQ ID NO:10),且

VLCDR1为氨基酸序列QASQSISSYLA (SEQ ID NO:9)。

2. 权利要求1的抗体,其中所述重链可变结构域(VH)为SEQ ID NO:14的氨基酸序列,且所述轻链可变结构域(VL)为SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

3. 权利要求1或2的抗体,其包含人IgG的CH1结构域、铰链区、CH2结构域和/或CH3结构域。

4. 权利要求3的抗体,其中所述人IgG是IgG1。

5. 权利要求3的抗体,其中所述人IgG是IgG4。

6. 权利要求5的抗体,其中所述人IgG4具有取代S228P。

7. 权利要求1、5或6中任一项的抗体,其包含重链和轻链,所述重链为SEQ ID NO:16的氨基酸序列,所述轻链为SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

GARP-TGF- β 抗体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2017年5月11日提交的英国申请号1707561.5(其全部内容通过引用并入本文)的优先权的权益。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已经以ASCII形式电子提交且在此以其整体通过引用并入的序列表。

发明领域

[0005] 本发明涉及结合GARP和TGF- β 1的复合物、尤其是人GARP和人TGF- β 1的复合物的抗体及其抗原结合片段。这些抗体和抗原结合片段表现出有利特性的组合,包括高亲和力抗原结合和抑制活性TGF- β 从调节性T细胞释放的能力。与结合GARP和TGF- β 1的复合物的现有技术抗体相比,本发明的抗体和抗原结合片段得到改善。具体而言,与现有技术中描述的GARP-TGF- β 1抗体相比,本发明的抗体和抗原结合片段对脱酰胺、异构化和氧化是相对抗性的,使得它们表现出改善的稳定性。

[0006] 发明背景

[0007] 调节性T细胞(另外称为“Tregs”或Foxp3⁺ T调节性细胞)是免疫系统的重要组分。具体而言,Treg通过抑制免疫应答的各个方面在免疫内稳态中发挥关键作用。由于它们在协调免疫应答中的作用,失调的Treg活性可以导致各种疾病和病况的发展。具体而言,不足的Treg功能可以导致自身免疫病理,而过度的Treg活性已与癌症患者中的抗肿瘤应答的抑制相关。

[0008] 蛋白GARP(糖蛋白A主导重复序列)已被鉴定为Treg、尤其是活化的Treg的表面上的高度表达的标志物。GARP是一种80kDa跨膜蛋白,具有包含20个富含亮氨酸的重复的细胞外区域。其也被称为LRRC32。GARP充当TGF- β 、尤其是TGF- β 的潜伏形式的受体,并且是在Treg细胞上表达潜伏TGF- β 所需的(EM Shevach. Expert Opin Ther Targets (2016) 21 (2), 191-200)。

[0009] TGF- β 是已知在多种过程(包括细胞增殖和分化、组织形态发生、炎症和凋亡)中发挥作用的细胞因子。其也已被鉴定为牵涉于癌症发展中的重要生长因子,并且相当不寻常地,已被鉴定为具有肿瘤促进和肿瘤抑制特性的细胞因子。

[0010] TGF- β 的产生和活化是多步骤过程,其在不同水平上被调节。TGF- β 合成为前-TGF- β 二聚体前体,每条多肽链由潜伏相关肽(LAP)和成熟的TGF- β 区域组成。前-TGF- β 经历被弗林蛋白酶切割以形成“潜伏TGF- β ”,一种无活性形式,其中LAP保持与每条多肽链的成熟TGF- β 区域非共价缔合(参见图1)。膜定位的GARP用于将潜伏的TGF- β 转运和锚定至Treg的细胞表面,并且是从这种膜结合的GARP潜伏的TGF- β 复合物释放TGF- β 的活性形式。已经提出各种机制来解释活性TGF- β 如何从Treg的表面的GARP-潜伏的TGF- β 复合物释放。然而,现在认为整联蛋白、尤其是 α v β 6和 α v β 8在驱动成熟TGF- β 二聚体的释放所需的剪切力中发挥重要作用。

[0011] 一旦释放,活性TGF- β 二聚体可以充当下游信号传导途径的自分泌或旁分泌介质。

在免疫系统的背景中,从Treg细胞释放TGF- β 被认为影响各种T效应细胞以及Treg自身的活性(参见图1)。由于Treg在抑制免疫中发挥重要作用,所以认为从Tregs释放并以自分泌方式起作用的TGF- β 可以参与介导Treg抑制。具体而言,认为Treg来源的TGF- β 1在Treg介导的肿瘤免疫的抑制中发挥重要作用。

[0012] 鉴于Treg来源的TGF- β 在抑制肿瘤微环境中的免疫应答中的作用,已经有兴趣靶向该途径作为癌症免疫疗法的替代方法。例如,能够抑制该途径的治疗剂可以充当改善癌症疫苗或经设计以利用人体免疫系统治疗癌症的能力的其他癌症免疫疗法的效力的有用工具。

[0013] Cuende等人(Sci Transl Med. 2015 Apr 22;7(284):284ra56)描述了一种单克隆抗体(MHG-8和LHG10)的产生和表征,所述单克隆抗体结合Treg上的GARP-TGF- β 复合物并抑制TGF- β 产生。这两种抗体也在国际专利申请W02015/015003和W02016/125017中进行描述和表征。显示这些抗体在异种移植物抗宿主疾病小鼠模型中能够抑制人Treg的免疫抑制活性。该工作用于验证GARP-TGF- β 复合物作为目标治疗靶标,用于调节Treg功能和因此治疗其中Treg活性的水平发挥重要作用的疾病(诸如癌症和自身免疫性疾病)的目的。然而,仍然需要能够抑制TGF- β 释放且由此修饰Treg活性的改进的GARP-TGF- β 抗体。如本文所述,本发明解决了该问题。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明通过提供结合人GARP-TGF- β 1复合物的新抗体及其抗原结合片段来改进现有技术。本发明的抗体和抗原结合片段衍生自国际专利申请W02015/015003和W02016/125017中描述的GARP-TGF- β 1抗体“LHG-10”。LHG-10的重链和轻链可变结构域序列分别显示于SEQ ID NO:1和2中,且链改组变体LHG-10.6的轻链可变结构域(也描述于W02015/015003和W02016/125017中)显示于SEQ ID NO:3中。尤其就某些CDR序列而言,特别是就重链可变结构域的CDR2和CDR3序列而言,本发明的抗体与LHG-10和LHG-10.6相比不同。LHG-10和LHG-10.6 GARP-TGF- β 抗体具有重链CDR2序列:RIDPEDGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:5);和重链CDR3序列:NEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO:6),而本发明的抗体包含重链CDR2序列:RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:12);和重链CDR3序列:YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO:13)。

[0016] 本文报道的重链CDR2和CDR3序列的差异导致凭借其改善的稳定性而与现有技术抗体相比得到改善的抗体。更具体地,本发明的抗体对脱酰胺、异构化和氧化是相对抗性的,使得它们表现出增强的稳定性。令人惊讶地,在重链CDR2和CDR3区域中导致稳定性改善的这些特定取代并未显著降低抗体对GARP-TGF- β 1复合物的结合亲和力。改善的稳定性与高亲和力靶标结合组合,使得本发明的抗体尤其适用于临床开发作为治疗剂,例如作为癌症治疗剂。

[0017] 在第一个方面,本发明提供了抗体或其抗原结合片段,其结合人GARP-TGF- β 1的复合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域(VH),其中:

[0018] VH CDR3包含氨基酸序列YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO:13),

[0019] VH CDR2包含氨基酸序列RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:12),且

[0020] VH CDR1包含氨基酸序列SYYID (SEQ ID NO:4)。

[0021] 在某些实施方案中,本发明提供了抗体或其抗原结合片段,其结合人GARP-TGF- β 1

的复合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域(VH),其中:

[0022] VH CDR3由氨基酸序列YEWETVVVGDLMEY EY (SEQ ID NO:13)组成,

[0023] VH CDR2由氨基酸序列RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:12)组成,且

[0024] VH CDR1由氨基酸序列SYYID (SEQ ID NO:4)组成。

[0025] 所述抗体或抗原结合片段可以额外包含轻链可变结构域(VL),其中:

[0026] VL CDR3包含氨基酸序列QQYASVPVT (SEQ ID NO:11),

[0027] VL CDR2包含氨基酸序列GASRLKT (SEQ ID NO:10),且

[0028] VL CDR1包含氨基酸序列QASQSISSYLA (SEQ ID NO:9)。

[0029] 在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以额外包含轻链可变结构域(VL),其中:

[0030] VL CDR3由氨基酸序列QQYASVPVT (SEQ ID NO:11)组成,

[0031] VL CDR2由氨基酸序列GASRLKT (SEQ ID NO:10)组成,且

[0032] VL CDR1由氨基酸序列QASQSISSYLA (SEQ ID NO:9)组成。

[0033] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0034] 重链可变结构域(VH),其中:

[0035] VH CDR3包含氨基酸序列YEWETVVVGDLMEY EY (SEQ ID NO:13),

[0036] VH CDR2包含氨基酸序列RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:12),且

[0037] VH CDR1包含氨基酸序列SYYID (SEQ ID NO:4);和

[0038] 轻链可变结构域(VL),其中:

[0039] VL CDR3包含氨基酸序列QQYASVPVT (SEQ ID NO:11),

[0040] VL CDR2包含氨基酸序列GASRLKT (SEQ ID NO:10),且

[0041] VL CDR1包含氨基酸序列QASQSISSYLA (SEQ ID NO:9)。

[0042] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0043] 重链可变结构域(VH),其中:

[0044] VH CDR3由氨基酸序列YEWETVVVGDLMEY EY (SEQ ID NO:13)组成,

[0045] VH CDR2由氨基酸序列RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:12)组成,且

[0046] VH CDR1由氨基酸序列SYYID (SEQ ID NO:4)组成;和

[0047] 轻链可变结构域(VL),其中:

[0048] VL CDR3由氨基酸序列QQYASVPVT (SEQ ID NO:11)组成,

[0049] VL CDR2由氨基酸序列GASRLKT (SEQ ID NO:10)组成,且

[0050] VL CDR1由氨基酸序列QASQSISSYLA (SEQ ID NO:9)组成。

[0051] 在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包括至少一个重链可变结构域(VH)和/或至少一个轻链可变结构域(VL),其为骆驼科动物来源的VH或VL结构域的人源化、种系化或亲和力变体。

[0052] 在某些实施方案中,本文提供了抗体或其抗原结合片段,其结合人GARP和人TGF- β 1的复合物,其中所述抗体或抗原结合片段包含选自以下的重链可变结构域:

[0053] (i) 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列或由其组成的VH;或

[0054] (ii) 包含与SEQ ID NO:14具有至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成的VH。

[0055] 可替代地或另外,所述抗体或抗原结合片段可以包含选自以下的轻链可变结构域(VL):

[0056] (i) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由其组成的VL;或

[0057] (ii) 包含与SEQ ID NO:15具有至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成的VL。

[0058] 对于其中抗体或抗原结合片段的结构域通过与参考序列的特定百分比序列同一性来限定的实施方案,VH结构域和/或VL结构域可以保留与参考序列中存在的那些CDR序列相同的CDR序列,使得变异仅存在于框架区内。

[0059] 在具体实施方案中,本文提供了抗体或其抗原结合片段,其中重链可变结构域(VH)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列或由其组成,且轻链可变结构域(VL)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由其组成。

[0060] 在某些实施方案中,本发明的抗体包括人抗体、特别是人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域。在某些实施方案中,所述抗体包括人IgG4的CH3区,且在CH3结构域中包括取代S228P。

[0061] 结合GARP-TGF- β 1复合物的抗体可以包含至少一条全长免疫球蛋白重链和/或至少一条全长 λ 或 κ 轻链。在某些实施方案中,所述抗体含有包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的轻链。在某些实施方案中,本文提供了单克隆抗体,其包含与显示为SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的重链。在某些实施方案中,本文提供了单克隆抗体,其包含与显示为SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的轻链。在某些实施方案中,本文提供了单克隆抗体,其包含与显示为SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的重链,和与显示为SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的轻链。

[0062] 对于其中抗体的重链和/或轻链通过与参考序列的特定百分比序列同一性来限定的实施方案,重链和/或轻链可以保留与参考序列中存在的那些CDR序列相同的CDR序列,使得变异仅存在于CDR区之外。

[0063] 除非在本申请中另有说明,否则两个氨基酸序列之间的%序列同一性可以通过比较以最佳方式比对的这两个序列来确定并且其中待比较的氨基酸序列相对于参考序列可以包含添加或缺失以用于这两个序列之间的最佳比对。同一性百分比通过如下计算:确定在这两个序列之间具有相同氨基酸残基的相同位置的数目,用该相同位置的数目除以比较窗口中位置的总数并且将获得的结果乘以100以获得这两个序列之间的同一性百分比。例如,有可能使用BLAST程序,"BLAST 2 sequences" (Tatusova等人, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250),所使用的参数是由默认给出的那些(特别是对于参数"开放空位罚分":5,以及"延伸空位罚分":2;所选择的矩阵是例如由所述程序提出的矩阵"BLSUM 62"),待比较的两个序列之间的同一性百分比通过所述程序直接计算。

[0064] 本文提供的GARP-TGF- β 1抗体或其抗原结合片段可以各自表现出以下特性/特征中的一种或多种:

- [0065] - 所述抗体或抗原结合片段可以与食蟹猴来源的GARP-TGF- β 复合物交叉反应；
- [0066] - 所述抗体或抗原结合片段可以以高亲和力结合人GARP-TGF- β 1；
- [0067] - 所述抗体或抗原结合片段可以包括VH结构域和VL结构域,当作为Fab片段测试时,其表现出对人GARP和TGF- β 1的复合物的小于 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 的解离速率(K_{off})；
- [0068] - 所述抗体或抗原结合片段可以包括VH结构域和VL结构域,当作为Fab片段测试时,其表现出对人GARP和TGF- β 1的复合物的范围 $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 至 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 内的解离速率(K_{off})；
- [0069] - 所述抗体或抗原结合片段可以包括VH结构域和VL结构域,当作为mAb测试时,其表现出小于 $1.7 \times 10^{-9} \text{ M}$ 的 K_{D} ；
- [0070] - 所述抗体或抗原结合片段可以阻断或抑制活性TGF- β 1从调节性T细胞的释放。
- [0071] 在进一步方面,本发明还提供了编码上文所列的抗体和抗原结合片段的多核苷酸分子,以及包含所述多核苷酸的表达载体、含有所述载体的宿主细胞和重组表达/产生本文所述的抗体的方法。
- [0072] 在一个又进一步方面,本发明提供了药物组合物,其包含本文所述的GARP-TGF- β 1抗体或其抗原结合片段中的任一种和药学上可接受的载体或赋形剂。
- [0073] 本发明的一个又进一步方面涉及使用上文所列的GARP-TGF- β 1抗体或其抗原结合片段进行医学治疗、特别是预防和/或治疗TGF- β 相关的病症的方法。在某些实施方案中,本发明涉及使用GARP-TGF- β 1抗体或其抗原结合片段的治疗方法,其中待治疗的疾病或病况选自炎症性疾病、慢性感染、癌症、纤维化、心血管疾病、脑血管疾病和神经退行性疾病。在某些实施方案中,GARP-TGF- β 1抗体或其抗原结合片段与作为组合疗法的一部分的另一种疗法组合施用。例如,GARP-TGF- β 1抗体或其抗原结合片段可以与免疫治疗剂、任选地免疫刺激抗体或肿瘤疫苗组合施用。
- [0074] 当结合以下描述和附图考虑时,将更好地了解和理解本发明的这些和其他实施方案。然而,应当理解,以下描述,尽管表明本发明的各个实施方案和其许多具体细节,但通过举例说明的方式而非限制的方式给出。可以在本发明的范围内在不脱离其精神的情况下进行许多置换、修改、添加和/或重排,并且本发明包括所有这些置换、修改、添加和/或重排。
- [0075] 附图简述
- [0076] 图1是显示潜伏TGF- β 与调节性T细胞的表面上的GARP的结合的示意图。TGF- β 作为前体“前-TGF- β ”产生,并且经历切割以产生“潜伏-TGF- β ”,其中成熟的TGF- β 二聚体保持与每种多肽的潜伏相关肽(LAP)区域非共价缔合的形式。正是该潜伏形式结合Treg细胞的表面上的GARP。整联蛋白 $\alpha_v\beta_6$ 和 $\alpha_v\beta_8$ 被认为负责介导从细胞表面释放成熟或“活性TGF- β ”。该活性形式可以旁分泌方式起作用以在各种靶细胞中带来作用,或者可以通过结合Treg细胞上的TGF- β 受体而充当自分泌介质。
- [0077] 图2显示对于在PBS或PBSTween (PBSTw)中在-20℃、5℃和37℃下储存的样品,经56天时段抗体39B6 IgG1^{N297Q}和39B6 IgG4^{S228P}的如通过Biacore™或表面等离子体共振(SPR)所测量的靶标结合活性。在每个时间点将参考样品(-20℃)设置为100%结合活性。
- [0078] 图3显示经设计以监测TGF- β 受体活化下游的SMAD2磷酸化的测定法中测试39B6-A抗体变体的结果。在TGF- β 结合其受体后,SMAD2磷酸化充当TGF- β 信号传导途径的活化的标志。如果SMAD2磷酸化降低,则TGF- β 活性被抑制。图3A:Western印迹,其显示在不同浓度的

GARP-TGF- β 抗体39B6-A、39B6-AVE、39B6-AEE、39B6-AYE、39B6-ANR和39B6-ANK存在的情况下SMAD2磷酸化的降低。图3B: (A) 中的数据图形表示,其显示在不同抗体浓度下SMAD2磷酸化的百分比抑制。

[0079] 图4显示经设计以经由缀合至SMAD启动子的荧光素酶报告基因测量TGF- β 活性的测定法中测试39B6-A抗体变体的结果。图显示在不同浓度的GARP-TGF- β 抗体LHG-10、39B6-A、39B6-AVE、39B6-AEE、39B6-AYE、39B6-ANR和39B6-ANK存在的情况下发光信号的百分比抑制。

[0080] 图5显示用在5℃和37℃下储存的抗体39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR经56天时段百分比聚集物形成。通过大小排阻色谱法(SE-HPLC)监测聚集物形成。

[0081] 图6显示用在37℃下储存的抗体39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR经56天时段百分比片段形成。通过大小排阻色谱法(SE-HPLC)监测片段形成。

[0082] 图7显示用在5℃和37℃下储存的抗体39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR经56天时段百分比单体面积。通过大小排阻色谱法(SE-HPLC)监测单体面积。

[0083] 图8显示在参考温度(-20℃)、5℃和37℃下储存56天的抗体样品的SDS-PAGE分析的结果。图8A:39B6-AVE。图8B:39B6-AYE。图8C:39B6-ANK。图8D:39B6-ANR。标记出现在每个凝胶的中心。在标记的左侧,3个样品是在非还原条件下测试的(i)参考;(ii)5℃;(iii)37℃样品,且在标记的右侧,3个样品是在还原条件下测试的(i)参考;(ii)5℃;(iii)37℃样品。

[0084] 图9显示对于在-20℃、5℃和37℃下储存的样品,经56天时段抗体39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR的如通过Biacore™或SPR所测量的靶标结合活性。在每个时间点将参考样品(-20℃)设置为100%结合活性。

[0085] 图10显示对于在-20℃(参考)、5℃和37℃下储存的样品,经56天时段抗体39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR的样品的蛋白浓度(mg/ml)。

[0086] 图11显示10个冷冻-解冻循环后抗体样品的SDS-PAGE分析的结果。标记出现在凝胶的中心。在标记的左侧,4个样品是在非还原条件下分析的样品:(i)39B6-AVE的参考;(ii)39B6-AVE的冷冻-解冻样品;(iii)39B6-AYE的参考;和(iv)39B6-AYE的冷冻-解冻样品。在标记的右侧,4个样品是在还原条件下分析的样品:(i)39B6-AVE的参考;(ii)39B6-AVE的冷冻-解冻样品;(iii)39B6-AYE的参考;和(iv)39B6-AYE的冷冻-解冻样品。

[0087] 图12显示对于抗体39B6-AVE和39B6-AYE在10个冷冻-解冻循环后如通过Biacore™或SPR所测量的靶标结合活性。在每个时间点将参考样品(-20℃)设置为100%结合活性。

[0088] 图13显示在10个冷冻-解冻循环后抗体39B6-AVE和39B6-AYE的样品的蛋白浓度(mg/ml)。

[0089] 图14显示对于抗体39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR在范围为54.6℃至71.4℃的温度下热稳定性测试后如通过Biacore™或SPR所测量的靶标结合活性。将参考样品设定为100%结合活性。

[0090] 图15显示旋转96小时后抗体样品的SDS-PAGE分析的结果。标记出现在凝胶的中心。在标记的左侧,4个样品是在非还原条件下分析的样品:(i)39B6-AVE的参考;(ii)39B6-AVE的旋转样品;(iii)39B6-AYE的参考;和(iv)39B6-AYE的旋转样品。在标记的右侧,4个样品是在还原条件下分析的样品:(i)39B6-AVE的参考;(ii)39B6-AVE的旋转样

品; (iii) 39B6-AYE的参考; 和(iv) 39B6-AYE的旋转样品。

[0091] 图16显示对于mAb 39B6-AYE和39B6-AYE在旋转稳定性测试后如通过Biacore™或SPR所测量的靶标结合活性。将参考样品设定为100%结合活性。

[0092] 图17显示在旋转稳定性测试后mAb 39B6-AYE和39B6-AYE的样品的蛋白浓度(mg/ml)。

[0093] 图18显示经56天时段抗体39B6-ANE、39B6-ANR和39B6-ANK中的位置N95的脱酰胺和异构化的相对量。不包括抗体39B6-AYE和39B6-AYE, 因为从这些抗体的CDR3去除残基“N95”。还显示对于在37℃下储存的样品, 经56 d时间过程mAb 39B6-ANE、39B6-AYE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR的相对结合活性。

[0094] 图19显示在39B6-AYE (ARGX-115) 与GARP-TGF-β复合物的结合中需要成熟的TGF-β。ELISA板用GARP或抗GARP Ab ARGX-115包被。对于用GARP包被的ELISA板, 可以通过添加相关重组蛋白来允许形成具有全长潜伏TGF-β (包括LAP和成熟TGF-β区域) 的复合物或具有重组LAP的复合物。对于用ARGX-115包被的ELISA板, 添加GARP, 且然后添加全长潜伏TGF-β或LAP。ARGX-115仅在全长TGF-β存在的情况下结合GARP。ARGX-115与GARP-LAP复合物的结合没有发生。相反, 抗LAP抗体能够结合GARP-LAP复合物。这表明ARGX-115与GARP-TGF-β复合物的结合需要成熟TGF-β。

[0095] 图20显示抗体通过具有TGF-β的各种突变形式的GARP-TGF-β复合物中和TGF-β活化的能力。通过LAP中的R58和成熟TGF-β中的K338的突变消除ARGX-115的中和活性。

[0096] 详述

[0097] A. 定义

[0098] “GARP” - GARP (糖蛋白A主导重复序列) 是蛋白的富含亮氨酸重复家族的成员。其也被称为含有富含亮氨酸重复的32 (LRRC32)。GARP是一种80kDa跨膜蛋白, 具有主要由20个富含亮氨酸的重复构成的细胞外区域。人GARP蛋白转录物变体2的完整氨基酸序列 (GenBank登录号NP_001122394.1) 为:

[0099] MRPQILLLLALLTLGLAAQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPDPTETLDLSGNQLRSIL
ASPLGFYALTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALTHLEHLSLAHNRLAMATASAGGLGPLPRVTSLD
LSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSNVLMIEDGAFE
GLPRLTHLNLSRNSLTCSDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFP
DLAALPRLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLSQLLNLDLSY
NEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLMLLDLSHNALETLELGARALGSLRT
[0100] LLLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEPGPSGCVAFGITSLRSLSLVDN
EIELLRAGAFHTPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLAQGNGLMVLQVDLPCFICKR
LNLAENRLSHLPAAWTQAVSLEVLDLRNNSFSLLPGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGW
LAAQLHQGRVDVDATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEKGGLKNINLIILTFILVSAILTTLAA
CCCVRRQKFNQQYKA (SEQ ID NO: 33)

[0101] “TGF-β” - TGF-β是属于生长因子的超家族的细胞因子。存在由三种不同基因编码的TGF-β的三种不同同种型 (TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3), 但TGF-β同种型的总体结构是高度相似的, 其中同源性的约70-80%。如本文所用的术语TGF-β通常用于涵盖TGF-β细胞因子的所有三种不同的同种型, 除非上下文另外指出。

[0102] 所有三种TGF- β 同种型都被编码为大蛋白前体;TGF- β 1 (GenBank登录号:NM_000660) 含有390个氨基酸,且TGF- β 2 (GenBank登录号:NM_001135599和NM_003238),和TGF- β 3 (GenBank登录号:XM_005268028) 各自包含412个氨基酸。它们各自具有从细胞分泌所需的20-30个氨基酸的N-末端信号肽,前区(命名为潜伏相关肽或LAP),和112-114个氨基酸的C-末端区域(其在通过蛋白水解切割从前区释放后变为成熟TGF- β 分子)。在蛋白水解切割之后,LAP和成熟TGF- β 保持非共价缔合并形成“潜伏TGF- β ”分子。以这种潜伏形式,通过LAP防止成熟TGF- β 结合TGF- β 受体。为了施加信号,必须从LAP释放成熟TGF- β 。不与LAP缔合的成熟TGF- β 被称为活性TGF- β ,因为其可以结合TGF- β 受体并转导信号。

[0103] 全长TGF- β 1具有以下氨基酸序列:

MPPSGLRLLPLLLPLLWLLVLTGPRPAAGLSTCKTIDMELVKKRIEAIKQILSKRLASPPSQG
EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTH

[0104] SIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRVLSNRLLAPSDSP
EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATHGMNR
PFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYH

[0105] ANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSN
MIVRSCKCS (SEQ ID NO: 34)

[0106] LAP具有以下氨基酸序列:

LSTCKTIDMELVKKRIEAIKQILSKRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAE
PEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLR

[0107] LKLKVEQHVELYQKYSNNSWRVLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSA
HCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRR (SEQ ID
NO: 35)

[0108] 成熟TGF- β 1具有以下氨基酸序列:

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVL

[0109] ALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS (SEQ ID NO: 36)

[0110] “GARP-TGF- β 复合物”- 如本文所用,GARP-TGF- β 复合物意指当潜伏TGF- β 结合GARP、特别是位于Treg细胞的表面上的GARP时形成的天然复合物。尽管未全文指定,但本文所用的“GARP-TGF- β 复合物”或简称为“GARP-TGF- β ”意指GARP与潜伏TGF- β 之间的复合物。GARP与TGF- β 、更具体地潜伏TGF- β 的结合已在分子水平上表征,例如,如Wang等人Mol Biol Cell. 2012 Mar;23(6):1129-39中所报道。GARP与潜伏TGF- β 的Cys4形成二硫键,并且还通过非共价相互作用与潜伏TGF- β 缔合。GARP的细胞外结构域中存在15个Cys残基,并且GARP使用Cys-192和Cys-331与与潜伏TGF- β 的两个Cys4残基形成二硫键。因此,一个GARP蛋白与一个TGF- β 二聚体缔合。

[0111] “抗体”或“免疫球蛋白”- 如本文所用,术语“免疫球蛋白”包括具有两条重链和两条轻链的组合的多肽,无论它是否具有任何相关的特异性免疫反应性。“抗体”是指这样的组装体,其对目标抗原(例如GARP和TGF- β 的复合物)具有显著的已知的特异性免疫反应活性。术语“GARP-TGF- β 抗体”在本文中用于指对GARP和TGF- β 的复合物(尤其是人GARP-TGF- β 1复合物,和在一些情况下其物种同源物)表现出免疫特异性的抗体。抗体和免疫球蛋白包含轻链和重链,且在它们之间有或没有链间共价键。脊椎动物系统中的基本免疫球蛋白结构是相对充分理解的。

[0112] 通用术语“免疫球蛋白”包括可以在生物化学上区分的五种不同类别的抗体(IgG、IgM、IgA、IgD或IgE)。所有五种类别的抗体都在本发明的范围内。以下论述将大体上涉及免疫球蛋白分子的IgG类别。对于IgG,免疫球蛋白通常包含两条相同的具有近似23,000道尔顿的分子量的轻链多肽和两条相同的具有53,000-70,000的分子量的重链。四条链由二硫键连接成“Y”构型,其中轻链从“Y”的口部开始并且继续通过可变区与重链括在一起。

[0113] 抗体的轻链被分类为kappa (κ)或lambda (λ)。每个重链类别可以与 κ 或 λ 轻链结合。通常,当免疫球蛋白由杂交瘤、B细胞或遗传工程改造的宿主细胞产生时,轻链和重链彼此共价键合,并且两条重链的“尾”部分通过共价二硫键或非共价键彼此键合。在重链中,氨基酸序列从Y构型的分叉末端处的N-末端延伸到每条链底部处的C-末端。本领域技术人员将理解的是,重链被分类为gamma, mu, alpha, delta或epsilon (γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ),其中在它们间存在一些亚类(例如 $\gamma 1$ - $\gamma 4$)。正是这条链的性质决定抗体的“类别”分别是IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1等被充分表征并且已知赋予功能特化。鉴于本公开内容,这些类别和同种型中的每一种的修饰形式容易由本领域技术人员辨别并且因此,在本发明的范围内。

[0114] 如上文所示,抗体的可变区允许抗体选择性识别并且特异性结合抗原上的表位。也就是说,抗体的VL结构域和VH结构域组合形成限定三维抗原结合位点的可变区。这种四级抗体结构形成存在于Y的每个臂的末端处的抗原结合位点。更具体地,抗原结合位点由VH链和VL链中的每一个上的三个互补决定区(CDR)限定。

[0115] “结合位点” - 如本文所用,术语“结合位点”包含多肽的区域,其负责选择性结合目标靶抗原。结合结构域包含至少一个结合位点。示例性结合结构域包括抗体可变结构域。本发明的抗体分子可以包含单个结合位点或多个(例如两个、三个或四个)结合位点。

[0116] “可变区”或“可变结构域” - 术语“可变区”和“可变结构域”在本文可互换使用并且意图具有等同的含义。术语“可变”是指以下事实,可变结构域VH和VL的某些部分在抗体间在序列上广泛不同并且用于每种特定抗体对其靶抗原的结合和特异性。然而,可变性在抗体的整个可变结构域中不是均匀分布的。其集中在VL结构域和VH结构域中的每一个中被称为“高变环”的三个片段中,其形成抗原结合位点的一部分。V λ 轻链结构域的第一高变环、第二高变环和第三高变环在本文被称为L1(λ)、L2(λ)以及L3(λ)并且可以被定义为包含VL结构域中的残基24-33(L1(λ),由9个、10个或11个氨基酸残基组成)、残基49-53(L2(λ),由3个残基组成)以及残基90-96(L3(λ),由5个残基组成)(Morea等人, Methods 20:267-279 (2000))。V κ 轻链结构域的第一高变环、第二高变环和第三高变环在本文被称为L1(κ)、L2(κ)以及L3(κ)并且可以被定义为包含VL结构域中的残基25-33(L1(κ),由6个、7个、8个、11个、12个或13个残基组成)、残基49-53(L2(κ),由3个残基组成)以及残基90-97(L3(κ),由6个残基组成)(Morea等人, Methods 20:267-279 (2000))。VH结构域的第一高变环、第二高变环和第三高变环在本文被称为H1、H2以及H3并且可以被定义为包含VH结构域中的残基25-33(H1,由7个、8个或9个残基组成)、残基52-56(H2,由3个或4个残基组成)以及残基91-105(H3,长度高度可变)(Morea等人, Methods 20:267-279 (2000))。

[0117] 除非另外指明,否则术语L1、L2和L3分别是指VL结构域的第一高变环、第二高变环和第三高变环,并且涵盖从V κ 同种型和V λ 同种型两者获得的高变环。术语H1、H2和H3分别是指VH结构域的第一高变环、第二高变环和第三高变环,并且涵盖从已知重链同种型中的任

一种(包括 γ 、 ϵ 、 δ 、 α 或 μ)获得的高变环。

[0118] 高变环L1、L2、L3、H1、H2和H3可以各自包含如下文所定义的“互补决定区”或“CDR”的一部分。术语“高变环”和“互补决定区”不是严格同义的,因为高变环(HV)基于结构定义,而互补决定区(CDR)基于序列可变性定义(Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1983)并且HV和CDR的限制在一些VH结构域和VL结构域中可能是不同的。

[0119] VL结构域和VH结构域的CDR通常可以被定义为包含以下氨基酸:轻链可变结构域中的残基24-34(LCDR1)、残基50-56(LCDR2)和残基89-97(LCDR3);以及重链可变结构域中的残基31-35或31-35b(HCDR1)、残基50-65(HCDR2)和残基95-102(HCDR3)(Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。因此,HV可以被包含在相应CDR内并且除非另外指明,否则在本文提及VH结构域和VL结构域的“高变环”应当被解释为还涵盖相应的CDR,且反之亦然。

[0120] 可变结构域的更高度保守的部分被称为框架区(FR),如下文所定义。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR(分别是FR1、FR2、FR3和FR4),其主要采用 β -折叠构型,由三个高变环连接。每条链中的高变环由FR紧密靠近地保持在一起,并且连同来自另一条链的高变环一起,促成抗体的抗原结合位点的形成。抗体的结构分析揭示由互补决定区形成的结合位点的序列和形状之间的关系(Chothia等人, J. Mol. Biol. 227: 799-817 (1992)); Tramontano等人, J. Mol. Biol, 215:175-182 (1990))。尽管它们具有高度的序列可变性,但这六个环中的五个仅采用一个小的主链构象库,被称为“规范结构”。这些构象首先由环的长度决定,且其次由环和框架区中某些位置处关键残基的存在决定,这些关键残基通过它们的堆积、氢键键合或呈现不寻常的主链构象的能力来决定构象。

[0121] “CDR” - 如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”意指在重链多肽和轻链多肽两者的可变区内发现的非连续抗原结合位点。这些特定区域已经由Kabat等人, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977)和Kabat等人, Sequences of protein of immunological interest. (1991),和Chothia等人, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)和MacCallum等人, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)描述,其中定义包括在彼此比较时氨基酸残基的重叠或子集。为了比较,阐述包括如由上文所引用的参考文献中的每一篇所定义的CDR的氨基酸残基。优选地,术语“CDR”是如由Kabat基于序列比较所定义的CDR。

[0122] 表1:CDR定义

	CDR 定义		
	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V_H CDR1	31-35	26-32	30-35
V_H CDR2	50-65	53-55	47-58
V_H CDR3	95-102	96-101	93-101
V_L CDR1	24-34	26-32	30-36
V_L CDR2	50-56	50-52	46-55
V_L CDR3	89-97	91-96	89-96

[0124] ¹残基编号遵循Kabat等(同上)的命名法

[0125] ²残基编号遵循Chothia等(同上)的命名法

[0126] ³残基编号遵循MacCallum等(同上)的命名法。

[0127] “框架区” - 如本文所用的术语“框架区”或“FR区”包括作为可变区的一部分、但不是CDR (例如使用CDR的Kabat定义)的一部分的氨基酸残基。因此,可变区框架长度为约100-120个氨基酸,但仅包括CDR之外的那些氨基酸。对于重链可变结构域的具体实例和如由Kabat等人所定义的CDR,框架区1对应于涵盖氨基酸1-30的可变区的结构域;框架区2对应于涵盖氨基酸36-49的可变区的结构域;框架区3对应于涵盖氨基酸66-94的可变区的结构域;并且框架区4对应于从氨基酸103至可变区的末端的可变区的结构域。轻链的框架区类似地由轻链可变区CDR中的每一个隔开。类似地,使用Chothia等人或McCallum等人的CDR的定义,框架区边界由如上文所述的对应的CDR末端隔开。在优选的实施方案中,CDR如由Kabat所定义。

[0128] 在天然存在的抗体中,存在于每个单体抗体上的六个CDR是短的非连续的氨基酸序列,其在抗体在水性环境中呈现其三维构型时特异性定位以形成抗原结合位点。重链可变结构域和轻链可变结构域的其余部分在氨基酸序列上显示更低的分子间可变性并且被称为框架区。框架区主要采用 β -折叠构象并且CDR形成环,所述环连接 β -折叠结构并且在一些情况下,形成 β -折叠结构的一部分。因此,这些框架区起作用以形成支架,所述支架通过链间非共价相互作用提供六个CDR在正确取向的定位。由定位的CDR形成的抗原结合位点限定与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。该互补表面促进抗体与免疫反应性抗原表位的非共价结合。CDR的位置可以由本领域普通技术人员容易地鉴定。

[0129] “恒定区” - 如本文所用,术语“恒定区”是指抗体分子在可变结构域或可变区之外的部分。免疫球蛋白轻链具有单结构域“恒定区”,通常被称为“CL或CL1结构域”。该结构域位于VL结构域的C末端。免疫球蛋白重链的恒定区不同,这取决于免疫球蛋白的类别(γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ)。重链 γ 、 α 和 δ 具有由三个免疫球蛋白结构域(被称为CH1、CH2和CH3)与分开CH1和CH2结构域的柔性铰链区组成的恒定区。重链 μ 和 ϵ 具有由四个结构域(CH1-CH4)组成的恒定区。重链的恒定结构域位于VH结构域的C末端。

[0130] 免疫球蛋白重链和轻链中的氨基酸的编号从Y构型的分叉末端的N末端至每条链的底部的C末端行进。使用不同的编号方案来定义免疫球蛋白重链和轻链的恒定结构域。根据EU编号方案,IgG分子的重链恒定结构域如下标识:CH1 -氨基酸残基118-215;CH2 -氨基酸残基231-340;CH3 -氨基酸残基341-446。根据Kabat编号方案,IgG分子的重链恒定结构域如下标识:CH1 -氨基酸残基114-223;CH2 -氨基酸残基244-360;CH3 -氨基酸残基361-477。“铰链区”包括重链分子中使CH1结构域与CH2结构域连接的部分。该铰链区包含近似25个残基并且是柔性的,因此允许两个N-末端抗原结合区独立地移动。铰链区可以被细分成三个不同的结构域:上铰链、中铰链和下铰链结构域(Roux K.H.等人 J. Immunol. 161: 4083-90 1998)。包含“完全人”铰链区的本发明的抗体可以含有下表2中所示的铰链区序列之一。

[0131] 表2:人铰链序列

[0132]	IgG	上铰链	中铰链	下铰链
	IgG1	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:37)	CPPCP (SEQ ID NO:38)	APELLGGP (SEQ ID NO:39)
	IgG3	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:40)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (SEQ ID NO:41)	APELLGGP (SEQ ID NO:42)
	IgG4	ESKYGPP (SEQ ID NO:43)	CPSCP (SEQ ID NO:44)	APEFLGGP (SEQ ID NO:45)
	IgG2	ERK (SEQ ID NO:46)	CCVECPPPCP (SEQ ID NO:47)	APPVAGP (SEQ ID NO:48)

[0133] “片段” - 如在本发明的抗体的背景下所用的术语“片段”是指抗体或抗体链的一部分 (“part”或“portion”), 其包含比完整或完全抗体或抗体链更少的氨基酸残基。术语“抗原结合片段”是指免疫球蛋白或抗体的多肽片段, 其结合抗原或与完整抗体 (即与衍生出所述多肽片段的完整抗体) 竞争结合抗原 (即特异性结合GARP-TGF- β 复合物)。如本文所用, 术语抗体分子的“片段”包括抗体的抗原结合片段, 例如抗体轻链可变结构域 (VL)、抗体重链可变结构域 (VH)、单链抗体 (scFv)、F(ab')₂片段、Fab片段、Fd片段、Fv片段、单臂 (单价) 抗体、双抗体、三抗体、四抗体或通过此类抗原结合片段的组合、组装或缀合形成的任何抗原结合分子。如本文所用的术语“抗原结合片段”进一步旨在涵盖选自单抗体、结构域抗体和纳米抗体的抗体片段。片段可以例如经由对完整或完全抗体或抗体链的化学或酶促处理或通过重组手段获得。

[0134] “保守氨基酸取代” - “保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基所替代的氨基酸取代。具有相似侧链的氨基酸残基的家族已经在本领域中被定义, 包括碱性侧链 (例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链 (例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链 (例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链 (例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -分支侧链 (例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸) 以及芳族侧链 (例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此, 免疫球蛋白多肽中的非必需氨基酸残基可以被来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代。在另一个实施方案中, 氨基酸链可以被在侧链家族成员的顺序和/或组成方面不同的结构相似的链替代。

[0135] “嵌合” - “嵌合”蛋白包含与第二氨基酸序列连接的第一氨基酸序列, 所述第一氨基酸序列与所述第二氨基酸序列在自然界中不天然连接。所述氨基酸序列可以天然存在于在融合多肽中被汇集在一起的单独的蛋白中, 或它们可以天然存在于同一蛋白中, 但以新的排列方式置于融合多肽中。嵌合蛋白可以例如通过化学合成, 或通过产生和翻译其中肽区以期望的关系编码的多核苷酸来产生。本发明的示例性嵌合抗体包括融合蛋白, 所述融合蛋白包含与人抗体 (例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4) 的恒定结构域融合的骆驼科动物来源的VH结构域和VL结构域或其人源化变体。

[0136] “效价” - 如本文所用, 术语“效价”是指多肽中潜在的靶标结合位点的数量。每个靶标结合位点特异性结合一个靶分子或靶分子上的特定位点。当多肽包含超过一个靶标结合位点时, 每个靶标结合位点可以特异性结合相同的或不同的分子 (例如可以结合不同的配体或不同的抗原, 或相同抗原上的不同表位)。

[0137] “特异性” - 术语“特异性”是指与给定靶标、例如GARP-TGF- β 的复合物结合 (例如免疫反应) 的能力。多肽可以是单特异性的并且含有特异性结合靶标的一个或多个结合位

点或多肽可以是多特异性的并且含有特异性结合相同或不同靶标的两个或更多个结合位点。

[0138] “合成的” - 如本文所用,关于多肽的术语“合成”包括包含非天然存在的氨基酸序列的多肽。例如,非天然存在的多肽,其是天然存在的多肽的修饰形式(例如包含突变,诸如添加、取代或缺失)或包含第一氨基酸序列(其可以是或可以不是天然存在的),所述第一氨基酸序列与在自然界中不与其天然连接的第二氨基酸序列(其可以是或可以不是天然存在的)连接成线性氨基酸序列。

[0139] “工程改造” - 如本文所用,术语“工程改造”包括通过合成手段(例如通过重组技术、体外肽合成、通过肽的酶促或化学偶联或这些技术的一些组合)操作核酸或多肽分子。优选地,本发明的抗体是工程改造的,包括例如人源化和/或嵌合抗体、以及已经被工程改造以改进一种或多种特性,诸如抗原结合、稳定性/半衰期或效应子功能的抗体。

[0140] “人源化取代” - 如本文所用,术语“人源化取代”是指氨基酸取代,其中存在于抗体(例如骆驼科动物来源的GARP-TGF- β 1抗体)的VH或VL结构域中的特定位置处的氨基酸残基被存在于参考人VH或VL结构域中的等同位置处的氨基酸残基替代。参考人VH或VL结构域可以由人种系编码的VH或VL结构域。可以在本文定义的抗体的框架区和/或CDR中进行人源化取代。

[0141] “人源化变体” - 如本文所用,术语“人源化变体”是指变体抗体,所述变体抗体与参考抗体相比含有一个或多个“人源化取代”,其中所述参考抗体的一部分(例如VH结构域和/或VL结构域或其含有至少一个CDR的部分)具有源自非人物种的氨基酸,并且所述“人源化取代”发生在源自非人物种的氨基酸序列内。

[0142] “种系化变体” - 术语“种系化变体”在本文中,特指“人源化变体”,其中“人源化取代”导致存在于抗体(例如骆驼科动物来源的GARP-TGF- β 1抗体)的VH或VL结构域中的特定位置处的一个或多个氨基酸残基被存在于由人种系编码的参考人VH或VL结构域中的等同位置处的氨基酸残基替代。对于任何给定的“种系化变体”而言典型的是,取代至种系化变体中的替代氨基酸残基仅仅或主要取自单个人种系编码的VH或VL结构域。术语“人源化变体”和“种系化变体”在本文经常可互换使用。将一个或多个“人源化取代”引入骆驼科动物来源(例如美洲驼来源)的VH或VL结构域中导致骆驼科动物(美洲驼)来源的VH或VL结构域的“人源化变体”的产生。如果取代至其中的氨基酸残基主要或仅仅源自单个人种系编码的VH或VL结构域序列,则结果可以是骆驼科动物(美洲驼)来源的VH或VL结构域的“人种系化变体”。

[0143] “亲和变体” - 如本文所用,术语“亲和变体”是指变体抗体,所述变体抗体与参考抗体相比表现出氨基酸序列的一个或多个变化,其中所述亲和变体与参考抗体相比表现出改变的对靶抗原的亲和力。例如,与参考GARP-TGF- β 1抗体相比,亲和变体将表现出改变的对GARP-TGF- β 1的亲和力。优选地,与参考抗体相比,亲和变体将表现出改进的对靶抗原的亲和力。与参考抗体相比,亲和变体通常表现出CDR中的氨基酸序列的一个或多个变化。此类取代可以导致存在于CDR中的给定位置处的原始氨基酸被不同的氨基酸残基替代,所述不同的氨基酸残基可以是天然存在的氨基酸残基或非天然存在的氨基酸残基。所述氨基酸取代可以是保守的或非保守的。

[0144] B. GARP-TGF- β 1抗体

[0145] 本发明涉及抗体及其抗原结合片段,其特异性结合GARP和TGF- β 1的复合物,尤其是人GARP和人TGF- β 1的复合物。可以就如本文所述的结构和功能特征来定义本发明的抗体和抗原结合片段。

[0146] 重要的是,与先前描述的GARP-TGF- β 1抗体相比,本发明的GARP-TGF- β 1抗体得到改进,因为它们展现改进的稳定性。具体而言,与具有W02015/015003和W02016/125017中描述的GARP-TGF- β 1参考抗体LHG-10和LHG-10.6的重链和轻链CDR序列的抗体相比,本文所述的GARP-TGF- β 1抗体的稳定性得到改进。与参考LHG10和LHG10.6抗体相比,可以在抗体对GARP-TGF- β 1复合物的结合亲和力不显著降低的情况下实现这种稳定性的改进。

[0147] 本发明的抗体尤其关于重链CDR2和CDR3序列的序列不同于先前描述的LHG-10和LHG-10.6 GARP-TGF- β 1参考抗体。更具体地,LHG-10和LHG-10.6 GARP-TGF- β 1抗体具有重链CDR2序列:RIDPEDGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:5)和重链CDR3序列:NEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO:6),而本发明的抗体包含重链CDR2序列:RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:12)和重链CDR3序列:YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO:13)。如本文所述和例举,发现分别在重链CDR2和CDR3序列中的G55A和N95Y氨基酸取代通过减少脱酰胺、异构化和氧化来改进抗体稳定性,同时实现对GARP-TGF- β 1复合物的结合亲和力近似等同于参考抗体的结合亲和力。

[0148] 在第一个方面,本发明提供了抗体或其抗原结合片段,其结合GARP和TGF- β 1的复合物,并且包含重链可变结构域(VH),其中:

[0149] VH CDR3包含氨基酸序列YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO:13)或由其组成,

[0150] VH CDR2包含氨基酸序列RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:12)或由其组成,且

[0151] VH CDR1包含氨基酸序列SYYID (SEQ ID NO:4)或由其组成。

[0152] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段还包含轻链可变结构域(VL),其中:

[0153] VL CDR3包含氨基酸序列QQYASVPVT (SEQ ID NO:11)或由其组成,

[0154] VL CDR2包含氨基酸序列GASRLKT (SEQ ID NO:10)或由其组成,且

[0155] VL CDR1包含氨基酸序列QASQSISSYLA (SEQ ID NO:9)或由其组成。

[0156] 在某些实施方案中,本文提供了抗体或其抗原结合片段,其特异性结合GARP-TGF- β 1复合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含至少一个重链可变结构域(VH)和至少一个轻链可变结构域(VL),其中:

[0157] VH CDR3包含氨基酸序列YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO:13)或由其组成,

[0158] VH CDR2包含氨基酸序列RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:12)或由其组成,

[0159] VH CDR1包含氨基酸序列SYYID (SEQ ID NO:4)或由其组成,

[0160] VL CDR3包含氨基酸序列QQYASVPVT (SEQ ID NO:11)或由其组成,

[0161] VL CDR2包含氨基酸序列GASRLKT (SEQ ID NO:10)或由其组成,且

[0162] VL CDR1包含氨基酸序列QASQSISSYLA (SEQ ID NO:9)或由其组成。

[0163] 在某些实施方案中,本文提供了抗体或其抗原结合片段,其特异性结合GARP-TGF- β 1复合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含至少一个重链可变结构域(VH)和至少一个轻链可变结构域(VL),其中:

[0164] VH CDR3由氨基酸序列YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO:13)组成,

[0165] VH CDR2由氨基酸序列RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:12)组成,

[0166] VH CDR1由氨基酸序列SYIID (SEQ ID NO:4)组成,

[0167] VL CDR3由氨基酸序列QQYASVPVT (SEQ ID NO:11)组成,

[0168] VL CDR2由氨基酸序列GASRLKT (SEQ ID NO:10)组成,且

[0169] VL CDR1由氨基酸序列QASQSISSYLA (SEQ ID NO:9)组成。

[0170] 在某些实施方案中,所述抗体和抗原结合片段是重组的。在某些实施方案中,所述抗体和抗原结合片段是单克隆的。

[0171] 术语“抗体”在本文以最广泛的意义使用,并且涵盖但不限于单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和多特异性抗体(例如双特异性抗体),只要它们对GARP-TGF- β 1复合物表现出适当的免疫特异性即可。如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上均质的抗体的群体获得的抗体,即构成所述群体的单个抗体是相同的,除了可能以少量存在的可能的天然存在的突变之外。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原位点。此外,与通常包括针对抗原上的不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂相比,每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇或表位。

[0172] 本发明还涵盖抗体的“抗原结合片段”,并且此类片段在本文别处定义。抗体片段通常包含全长抗体的一部分,通常是其抗原结合或可变结构域。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂、双特异性Fab'和Fv片段、线性抗体、单链抗体分子、单链可变片段(scFv)以及由抗体片段形成的多特异性抗体(参见Holliger和Hudson, *Nature Biotechnol.* 23: 1126-36 (2005))。

[0173] 本发明的抗体和抗原结合片段可以表现出高度人同源性。可以在重链可变结构域(VH)的长度上和/或在轻链可变结构域(VL)的长度上评价与人序列的同源性的水平。在本发明的背景下,如果重链可变(VH)结构域和轻链可变(VL)结构域一起表现出与最接近的匹配的人种系VH和VL序列的至少90%、至少92%、至少94%或至少96%氨基酸序列同一性,则包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)的抗体可以被认为具有高度人同源性。在一个实施方案中,具有高度人同源性的抗体的VH结构域可以表现出在框架区FR1、FR2、FR3和FR4上与一个或多个人VH结构域的至少90%、至少92%、至少94%或至少96%的氨基酸序列同一性或序列同源性。在一个实施方案中,与最接近的匹配的人VH序列相比,具有高度人同源性的抗体的VH结构域可以在框架区FR1、FR2、FR3和FR4上含有一个或多个(例如1至10个)氨基酸序列错配。

[0174] 在另一个实施方案中,具有高度人同源性的抗体的VL结构域可以表现出在框架区FR1、FR2、FR3和FR4上与一个或多个人VL结构域的至少90%、至少92%、至少94%或至少96%的序列同一性或序列同源性。在一个实施方案中,与最接近的匹配的人VL序列相比,具有高度人同源性的抗体的VL结构域可以在框架区FR1、FR2、FR3和FR4上含有一个或多个(例如1至10个)氨基酸序列错配。

[0175] 具有高度人同源性的本发明的抗体和抗原结合片段可以包括包含表现出与人种系序列具有足够高的%序列同一性的天然非人抗体的VH和VL结构域的抗体。在某些实施方案中,本发明的抗体和抗原结合片段是非人抗体的人源化或种系化变体,例如被工程改造以便作为原始抗体的人源化或种系化变体的,包含骆驼科动物常规抗体的VH和VL结构域的抗体。

[0176] 所述抗体或其抗原结合片段可以包含重链可变结构域(VH)和任选轻链可变结构

域(VL),所述重链可变结构域(VH)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列或由其组成,且所述轻链可变结构域(VL)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由其组成。

[0177] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可以含有包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变结构域(VH)。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可以含有包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的轻链可变结构域(VL)。

[0178] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可以包含由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的重链可变结构域(VH)。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可以包含由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的轻链可变结构域(VL)。

[0179] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可以含有包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变结构域(VH)和包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的轻链可变结构域(VL)。

[0180] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可以包含由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的重链可变结构域(VH)和由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的轻链可变结构域(VL)。

[0181] 在某些实施方案中,本文提供了单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变结构域和轻链可变结构域,所述重链可变结构域包含与显示为SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VH序列,和/或所述轻链可变结构域包含与显示为SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VL。

[0182] 对于其中抗体或抗原结合片段的结构域通过与参考序列的特定百分比序列同一性来限定的实施方案,VH结构域和/或VL结构域可以保留与参考序列中存在的那些CDR序列相同的CDR序列,使得变异仅存在于框架区内。在某些实施方案中,包含被定义为分别与SEQ ID NO:14和15具有特定百分比同一性的重链可变结构域和/或轻链可变结构域的抗体或抗原结合片段将具有以下CDR序列:

[0183] 包含氨基酸序列YEWETVVVGDLMEY EY (SEQ ID NO:13)或由其组成的VH CDR3,

[0184] 包含氨基酸序列RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:12)或由其组成的VH CDR2,

[0185] 包含氨基酸序列SYYID (SEQ ID NO:4)或由其组成的VH CDR1,

[0186] 包含氨基酸序列QQYASVPVT (SEQ ID NO:11)或由其组成的VL CDR3,

[0187] 包含氨基酸序列GASRLKT (SEQ ID NO:10)或由其组成的VL CDR2,和

[0188] 包含氨基酸序列QASQSISSYLA (SEQ ID NO:9)或由其组成的VL CDR1。

[0189] 在非限制性实施方案中,本发明的抗体可以包含CH1结构域和/或CL结构域(分别来自重链和轻链),其氨基酸序列是完全或基本上人的。在本发明的抗体或抗原结合片段是预期用于人治疗用途的抗体的情况下,抗体的整个恒定区或至少其部分通常具有完全或基本上人氨基酸序列。因此,CH1结构域、铰链区、CH2结构域、CH3结构域以及CL结构域(和CH4结构域,如果存在的话)中的一个或多个或任何组合,就其氨基酸序列可以是完全或基本上人的。

[0190] 有利地,CH1结构域、铰链区、CH2结构域、CH3结构域和CL结构域(以及CH4结构域,如果存在的话)全部都可以具有完全或基本上人氨基酸序列。在人源化抗体或嵌合抗体或抗体片段的恒定区的背景下,术语“基本上人”是指与人恒定区具有至少90%、或至少92%、或

至少95%、或至少97%、或至少99%的氨基酸序列同一性。在这种背景下的术语“人氨基酸序列”是指由人免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列,所述人免疫球蛋白基因包括种系基因、重排基因以及体细胞突变基因。本发明还考虑包含已经通过一个或多个氨基酸添加、缺失或取代而相对于人序列发生改变的人序列恒定结构域的多肽,除了其中明确需要“完全人”铰链区的存在的那些实施方案之外。

[0191] 在本发明的GARP-TGF- β 1抗体中“完全人”铰链区的存在对于使免疫原性最小化以及优化抗体的稳定性都可能是有益的。

[0192] 如本文别处所论述,考虑可以在重链和/或轻链的恒定区内,特别是在Fc区内进行一个或多个氨基酸取代、插入或缺失。氨基酸取代可以导致被取代的氨基酸被不同的天然存在的氨基酸或非天然或修饰的氨基酸替代。还允许其他结构修饰,诸如例如糖基化模式的变化(例如通过添加或缺失N-或O-连接的糖基化位点)。

[0193] 可以在Fc区内修饰GARP-TGF- β 1抗体,以增加对新生儿受体FcRn的结合亲和力。增加的结合亲和力可以在酸性pH下(例如从约近似pH 5.5至近似pH 6.0)可测量。增加的结合亲和力也可以在中性pH下(例如从近似pH 6.9至近似pH 7.4)可测量。“增加的结合亲和力”意指相对于未修饰的Fc区域增加的对FcRn的结合亲和力。通常,未修饰的Fc区将具有人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的野生型氨基酸序列。在此类实施方案中,相对于野生型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4对FcRn的结合亲和力,将测量具有修饰的Fc区的抗体分子的增加的FcRn结合亲和力。

[0194] 在某些实施方案中,Fc区内的一个或多个氨基酸残基可以被不同的氨基酸取代,从而增加与FcRn的结合。已经报道几种Fc取代,其增加FcRn结合且由此改进抗体药代动力学。此类取代报道于例如Zalevsky等人(2010) *Nat. Biotechnol.* 28(2):157-9;Hinton等人(2006) *J Immunol.* 176:346-356;Yeung等人(2009) *J Immunol.* 182:7663-7671;Presta LG. (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:460-470;和Vaccaro等人(2005) *Nat. Biotechnol.* 23(10):1283-88,其内容以其整体并入本文。

[0195] 在某些实施方案中,GARP-TGF- β 1抗体包含修饰的人IgG Fc结构域,其包含氨基酸取代H433K和N434F或由其组成,其中根据EU编号进行Fc结构域编号。在一个进一步实施方案中,本文所述的GARP-TGF- β 1抗体包含修饰的人IgG Fc结构域,其包含氨基酸取代M252Y、S254T、T256E、H433K和N434F或由其组成,其中根据EU编号进行Fc结构域编号。

[0196] 在某些实施方案中,GARP-TGF- β 1抗体包含修饰的人IgG Fc结构域,其由相对于相应的野生型IgG序列最多达2个、最多达3个、最多达4个、最多达5个、最多达6个、最多达7个、最多达8个、最多达9个、最多达10个、最多达12个、最多达15个、最多达20个取代组成。

[0197] 根据抗体的预期用途,可能期望在其与Fc受体的结合特性方面修饰本发明的抗体,例如以调节效应子功能。例如,可以将半胱氨酸残基引入Fc区中,由此允许在该区域中形成链间二硫键。因此产生的同二聚体抗体可以具有改进的内化能力和/或增加的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)。参见Caron等人, *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992) 和Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992)。本发明还考虑免疫缀合物,所述免疫缀合物包含与细胞毒性剂缀合的如本文所述的抗体,所述细胞毒性剂诸如化疗剂、毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)、或放射性同位素(即放射性缀合物)。Fc区也可以被工程改造以延长半衰期,如Chan和Carter, *Nature*

Reviews: Immunology, Vol.10, pp301-316, 2010(其通过引用并入本文)所述。

[0198] 在又一个实施方案中,通过修饰一个或多个氨基酸来修饰Fc区以增加抗体介导抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)和/或增加抗体对Fc γ 受体的亲和力的能力。

[0199] 在具体实施方案中,Fc区可以被工程改造,使得没有效应子功能。没有Fc效应子功能的GARP-TGF- β 1抗体可以特别用作受体阻断剂。在某些实施方案中,本发明的抗体可以具有源自具有降低的效应子功能的天然存在的IgG同种型(例如IgG4)的Fc区。可以进一步修饰源自IgG4的Fc区以增加治疗效用,例如通过引入使体内IgG4分子之间的臂交换最小化的修饰。可以修饰衍生自IgG4的Fc区以包括S228P取代。

[0200] 在又一个实施方案中,抗体的糖基化被修饰。例如,可以制备无糖基化的抗体(即所述抗体缺乏糖基化)。可以改变糖基化以例如增加抗体对靶抗原的亲和力。此类碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可以进行一个或多个氨基酸取代,其导致一个或多个可变区框架糖基化位点的消除,以由此消除该位点处的糖基化。这种去糖基化可以增加抗体对抗原的亲和力。

[0201] 还设想的是,具有改变的糖基化类型的变体GARP-TGF- β 1抗体,诸如具有减少量的岩藻糖基残基的低岩藻糖基化的抗体或完全或部分脱岩藻糖基化的抗体(如Natsume等人, Drug Design Development and Therapy, Vol.3, pp7-16, 2009所述)或具有增加的二等分GlcNAc结构的抗体。此类改变的糖基化模式已经被证实增加抗体的ADCC活性,通常使得ADCC相对于包含“天然”人Fc结构域的等同抗体增强10倍。此类碳水化合物修饰可以通过例如使抗体在具有改变的糖基化酶促机制的宿主细胞中表达来实现(如Yamane-Ohnuki和Sato, mAbs 1:3, 230-236, 2009所述)。具有增强的ADCC功能的非岩藻糖基化的抗体的实例是使用BioWa Inc.的Potelligent[®]技术产生的那些。

[0202] 预期用于人治疗用途的抗体通常将是IgG、IgM、IgA、IgD或IgE类型,经常是IgG类型,在这种情况下,它们可以属于四个亚类IgG1、IgG2a和b、IgG3或IgG4中的任一个。在这些亚类中的每一个内,允许在Fc部分内进行一个或多个氨基酸取代、插入或缺失,或进行其他结构修饰,例如以增强或降低Fc依赖性功能。

[0203] 在某些实施方案中,特异性结合GARP-TGF- β 1的抗体包含至少一条全长免疫球蛋白重链和/或至少一条全长 λ 或 κ 轻链,其中所述重链包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或由其组成,且所述轻链包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列或由其组成。

[0204] 在某些实施方案中,特异性结合GARP-TGF- β 1的抗体包含至少一条全长免疫球蛋白重链和/或至少一条全长 λ 或 κ 轻链,其中所述重链包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,且所述轻链包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0205] 在某些实施方案中,特异性结合GARP-TGF- β 1的抗体包含至少一条全长免疫球蛋白重链和/或至少一条全长 λ 或 κ 轻链,其中所述重链由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成,且所述轻链由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成。

[0206] 在某些实施方案中,本文提供了单克隆抗体,其包含与显示为SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的重链,和/或与显示为SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的轻链。

[0207] 在某些实施方案中,本文提供了单克隆抗体,其包含与显示为SEQ ID NO:16的氨

氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的重链。在某些实施方案中,本文提供了单克隆抗体,其包含与显示为SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的轻链。在某些实施方案中,本文提供了单克隆抗体,其包含与显示为SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的重链,和与显示为SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的轻链。

[0208] 对于其中抗体的链通过与参考序列的特定百分比序列同一性来限定的实施方案,重链和/或轻链可以保留与参考序列中存在的那些CDR序列相同的CDR序列,使得变异仅存在于CDR区之外。具体而言,包含被定义为分别与SEQ ID NO:16和17具有特定百分比同一性的重链和/或轻链的抗体或抗原结合片段可以具有以下CDR序列:

[0209] 包含氨基酸序列YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO:13)或由其组成的VH CDR3,

[0210] 包含氨基酸序列RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:12)或由其组成的VH CDR2,

[0211] 包含氨基酸序列SYYID (SEQ ID NO:4)或由其组成的VH CDR1,

[0212] 包含氨基酸序列QQYASVPVT (SEQ ID NO:11)或由其组成的VL CDR3,和

[0213] 包含SEQ ID NO:10 [GASRLKT]或由其组成的VL CDR2序列,和

[0214] 包含氨基酸序列QASQSISSYLA (SEQ ID NO:9)或由其组成的VL CDR1。

[0215] 与GARP-TGF- β 1的结合

[0216] 本发明的抗体和抗原结合片段结合GARP和TGF- β 1的复合物,尤其是人GARP和人TGF- β 1的复合物。如本文别处所解释,GARP是在调节性T细胞的表面上表达的跨膜蛋白,并且充当潜伏形式的TGF- β 的受体。图1包括在调节性T细胞的细胞表面在GARP和潜伏TGF- β 之间形成的复合物的示意图。

[0217] 本发明的抗体和抗原结合片段结合的GARP-TGF- β 1复合物是在GARP和TGF- β 1之间的细胞表面形成的天然GARP-TGF- β 1复合物。

[0218] 本发明的抗体和抗原结合片段的特征在于它们结合GARP-TGF- β 1的复合物,但是在TGF- β 1或潜伏TGF- β 不存在的情况下不结合GARP。所述抗体和抗原结合片段仅在TGF- β 1存在的情况下结合GARP。具体而言,所述抗体和抗原结合片段仅在潜伏TGF- β 1存在的情况下结合GARP。所述抗体和抗原结合片段可以阻断或抑制活性TGF- β 从Treg细胞的释放。

[0219] 由于本发明的抗体及其抗原结合片段的靶抗原是包含两个分开的蛋白的复合物,所以所述抗体和抗原结合片段结合的表位是构象表位,与线性表位相反。所述构象表位包含来自GARP的至少一个残基和来自潜伏TGF- β 1的至少一个残基。在优选实施方案中,所述构象表位包含来自GARP的至少一个残基,来自潜伏TGF- β 1的潜伏相关肽(LAP)的至少一个残基和来自成熟TGF- β 1的至少一个残基。

[0220] 本发明的抗体和抗原结合片段可以结合由人GARP和人TGF- β 1形成的复合物的表位,其中所述表位包含来自GARP的选自Y137、S138、G139、T162和R163的至少一个残基(参考SEQ ID NO:33)和来自TGF- β 1的至少一个残基。在优选实施方案中,所述表位至少包含GARP的残基Y137、S138、G139、T162和R163(参考SEQ ID NO:33)。

[0221] 所述表位可以包含来自TGF- β 1多肽(SEQ ID NO:34)的至少一个残基,任选地,其中至少一个残基是K338。所述表位可以包含来自TGF- β 1的潜伏相关肽(LAP)的至少一个残基和来自成熟TGF- β 1的至少一个残基。所述表位可以包含LAP的R58和成熟TGF- β 1的K338

(参考SEQ ID NO:34)。

[0222] 本发明的抗体和抗原结合片段结合GARP和TGF- β 1的复合物。本发明的抗体和抗原结合片段还可以结合人GARP和人TGF- β 2的复合物和/或人GARP和人TGF- β 3的复合物。

[0223] 在某些实施方案中,本发明的抗体和抗原结合片段以高亲和力结合GARP和TGF- β 1的复合物。如本文所用,术语“亲和力”或“结合亲和力”应当基于本领域在抗体结合的背景下的通常含义来理解,并且反映抗原和抗体或其抗原结合片段上的结合位点之间结合的程度和/或稳定性。

[0224] 抗体或其抗原结合片段对其对应抗原的结合亲和力可以通过实验使用本领域已知的技术来确定。例如,SPR仪器诸如Biacore™基于将靶蛋白或靶抗原固定在生物传感器芯片上、同时使抗体或抗体片段在特定流动条件下通过固定的靶标上来测量亲和力。这些实验产生 K_{on} 和 K_{off} 测量值,它们可以被转换为 K_D 值,其中 K_D 是抗原与抗体或其片段解离的平衡常数。 K_D 值越小,则抗体与其靶抗原之间的结合相互作用越强。

[0225] 如上所示,抗体的亲和力可以通过Biacore™或SPR,例如使用本文别处所述的方案来确定。如通过Biacore™或SPR所测量的抗体或抗原结合片段对GARP-TGF- β 1复合物的亲和力可以使用重组表达的GARP-TGF- β 1复合物来测定,如例如实施例2中所述。

[0226] 当作为Fab测试时,本发明的GARP-TGF- β 1抗体或其抗原结合片段对于GARP-TGF- β 1复合物表现出小于 $7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、小于 $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、小于 $1.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 的解离速率(k_{off})。本发明的GARP-TGF- β 抗体或其抗原结合片段对于GARP-TGF- β 1的复合物可以表现出的 $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 至 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 范围内、优选 $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 至 $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 的范围内、更优选 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 至 $1.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 的范围内的解离速率(k_{off})。

[0227] 本发明的GARP-TGF- β 1抗体可以表现出小于 $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、小于 $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ 的 K_D 值。在优选实施方案中,本发明的GARP-TGF- β 1抗体表现出小于 $1.7 \times 10^{-9} \text{ M}$ 的 K_D 值。

[0228] 在某些实施方案中,本文所述的结合GARP和TGF- β 1的复合物的抗体或抗原结合片段可以与GARP和TGF- β 的一种或多种物种同源物(例如非人灵长类动物来源的GARP和TGF- β 同源物)交叉反应。

[0229] 在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段不与鼠来源的GARP和TGF- β 1的复合物交叉反应。可替代地或另外地,所述抗体或抗原结合片段可以结合非人灵长类动物来源的GARP-TGF- β 复合物,尤其是食蟹猴来源的GARP-TGF- β 复合物。与其他物种同源物的交叉反应性在开发和测试治疗性抗体中可以是特别有利的。例如,治疗性抗体的临床前毒理学测试经常在灵长类动物物种(包括但不限于食蟹猴)中实施。与这些物种同源物的交叉反应性因此对于开发作为临床候选物的抗体可以是特别有利的。

[0230] 改进的稳定性

[0231] 与先前描述的GARP-TGF- β 1抗体相比,本发明的GARP-TGF- β 1抗体得到改进,因为它们展现改进的稳定性。具体而言,与具有W02015/015003和W02016/125017中描述的GARP-TGF- β 1参考抗体LHG10.6的重链和轻链CDR序列的抗体相比,GARP-TGF- β 1抗体的稳定性得到改进。

[0232] GARP-TGF- β 抗体LHG10.6具有以下重链可变结构域和轻链可变结构域CDR序列的组合:

[0233] 由NEWETVVVGDLMEYIEY (SEQ ID NO:6)组成的重链CDR3,

[0234] 由RIDPEDGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:5)组成的重链CDR2,

[0235] 由SYYID (SEQ ID NO:4)组成的重链CDR1,

[0236] 由QQYASVPVT (SEQ ID NO:11)组成的轻链CDR3,

[0237] 由GASRLKT (SEQ ID NO:10)组成的轻链CDR2,和

[0238] 由QASQSISSYLA (SEQ ID NO:9)组成的轻链CDR1。

[0239] 如本文别处所报道,已经发现具有LHG10.6的重链和轻链CDR序列的GARP-TGF- β 1抗体缺乏稳定性。具体而言,发现LHG10.6的种系化单克隆抗体变体(在本文别处称为mAb 39B6 IgG4和39B6 IgG1)当在37°C下在PBS和PBS/Tween两者中储存时表现出朝向更低的靶标结合活性的趋势(参见例如,图2)。该不稳定性至少部分归因于HCDR3的位置N95(即重链CDR3的第一个残基)处的异构化和脱酰胺。

[0240] 本发明的GARP-TGF- β 1抗体和抗原结合片段关于其CDR序列、尤其是其重链CDR序列不同,使得改进其稳定性。具体而言,修饰重链CDR2(HCDR2或VH CDR2)序列以包括G55A取代,使得本发明的抗体的HCDR2序列包含由RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:12)代表的HCDR2。此外,修饰重链CDR3(HCDR3或VH CDR3)序列以包括N95Y取代,使得本发明的抗体的HCDR3序列包含由YEWETVVVGDLMEYEEY (SEQ ID NO:13)代表的HCDR3。本发明的抗体不经历脱酰胺或异构化。另外,已令人惊讶地发现本发明的GARP-TGF- β 1抗体对于氧化相对抗性。这种对脱酰胺、异构化和氧化的抗性与本发明的抗体的改进的稳定性、特别是如在37°C的温度下测量的改进的稳定性相关。

[0241] 此外,本发明的抗体和抗原结合片段是令人惊讶地有利的,因为与参考抗体LHG10.6相比对重链CDR2和CDR3序列的修饰没有显著降低靶标结合活性。如本文所列举,与参考抗体LHG10.6或其种系化变体(39B6)相比,本发明的GARP-TGF- β 1抗体在37°C下相对稳定,并且没有表现出对GARP-TGF- β 1复合物的结合亲和力的显著降低。如别处所述,在优选实施方案中,本发明的GARP-TGF- β 1抗体表现出小于 1.7×10^{-9} M的 K_D 值。

[0242] 如本文所报道,并非所有在HCDR3的位置N95处的除去Asn(N)残基的取代都能够改进抗体稳定性,同时还保留对GARP-TGF- β 1复合物的结合亲和力。发现具有N95V取代的种系化单克隆抗体变体(在本文中被称作39B6-AVE)对脱酰胺和异构化是抗性的,但是在37°C下储存28天后经历显著的氧化。还发现该N95V抗体变体的结合活性经在37°C下储存56天时段显著降低。本发明人还发现,在重链中的相邻位置96(即HCDR3的第二个残基)处的大体积取代不能改进稳定性并保留高亲和力抗原结合活性。如本文所列举,本发明人测试在HCDR3结构域中包括取代E96K和E96R的两种种系化单克隆抗体变体。E96K变体(在本文中被称作39B6-ANK)没有经历氧化,但在37°C下经28天经历脱酰胺和异构化,并且经56天时段经历结合活性的显著降低。E96R变体(在本文中被称作39B6-ANR)在37°C下经28天时段经历显著的氧化和脱酰胺,并且经56天时段经历结合活性的降低。

[0243] 在本发明的优选实施方案中,特异性结合GARP-TGF- β 1复合物且表现出改进的稳定性的抗体包含至少一个重链可变结构域(VH)和至少一个轻链可变结构域(VL),其中

[0244] VH CDR3包含氨基酸序列YEWETVVVGDLMEYEEY (SEQ ID NO:13)或由其组成,

[0245] VH CDR2包含氨基酸序列RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:12)或由其组成,

[0246] VH CDR1包含氨基酸序列SYYID (SEQ ID NO:4)或由其组成,

[0247] VL CDR3包含氨基酸序列QQYASVPVT (SEQ ID NO:11)或由其组成,

- [0248] VL CDR2包含氨基酸序列GASRLKT (SEQ ID NO:10)或由其组成,且
- [0249] VL CDR1包含氨基酸序列QASQSISSYLA (SEQ ID NO:9)或由其组成。
- [0250] 在本发明的某些优选实施方案中,特异性结合GARP-TGF- β 1复合物且表现出改进的稳定性的抗体包含至少一个重链可变结构域(VH)和至少一个轻链可变结构域(VL),其中
- [0251] VH CDR3包含氨基酸序列YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO:13),
- [0252] VH CDR2包含氨基酸序列RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:12),
- [0253] VH CDR1包含氨基酸序列SYYID (SEQ ID NO:4),
- [0254] VL CDR3包含氨基酸序列QQYASVPVT (SEQ ID NO:11),
- [0255] VL CDR2包含氨基酸序列GASRLKT (SEQ ID NO:10),且
- [0256] VL CDR1包含氨基酸序列QASQSISSYLA (SEQ ID NO:9)。
- [0257] 在本发明的某些优选实施方案中,特异性结合GARP-TGF- β 1复合物且表现出改进的稳定性的抗体包含至少一个重链可变结构域(VH)和至少一个轻链可变结构域(VL),其中
- [0258] VH CDR3由氨基酸序列YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO:13)组成,
- [0259] VH CDR2由氨基酸序列RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:12)组成,
- [0260] VH CDR1由氨基酸序列SYYID (SEQ ID NO:4)组成,
- [0261] VL CDR3由氨基酸序列QQYASVPVT (SEQ ID NO:11)组成,
- [0262] VL CDR2由氨基酸序列GASRLKT (SEQ ID NO:10)组成,且
- [0263] VL CDR1由氨基酸序列QASQSISSYLA (SEQ ID NO:9)组成。
- [0264] 这些抗体优选表现出小于 1.7×10^{-9} M的 K_D 值。
- [0265] 在本发明的特别优选的实施方案中,特异性结合GARP-TGF- β 1复合物且表现出改进的稳定性的抗体含有包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域(VH),和任选包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域(VL)。
- [0266] 在本发明的特别优选的实施方案中,特异性结合GARP-TGF- β 1复合物且表现出改进的稳定性的抗体含有包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变结构域(VH)和包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的轻链可变结构域(VL)。
- [0267] 在本发明的特别优选的实施方案中,特异性结合GARP-TGF- β 1复合物且表现出改进的稳定性的抗体含有由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的重链可变结构域(VH)和由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的轻链可变结构域(VL)。
- [0268] 在本发明的进一步优选的实施方案中,特异性结合GARP-TGF- β 1复合物且表现出改进的稳定性的抗体含有包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或由其组成的重链,和任选包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列或由其组成的轻链。
- [0269] 在本发明的进一步优选的实施方案中,特异性结合GARP-TGF- β 1复合物且表现出改进的稳定性的抗体含有包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的轻链。
- [0270] 在本发明的进一步优选的实施方案中,特异性结合GARP-TGF- β 1复合物且表现出改进的稳定性的抗体含有由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的轻链。
- [0271] 编码GARP-TGF- β 抗体的多核苷酸
- [0272] 本发明还提供了包含编码本发明的GARP-TGF- β 1抗体或抗原结合片段的一个或多

个核苷酸序列的多核苷酸分子;含有与调控序列可操作连接的本发明的所述核苷酸序列的表达载体,所述调控序列允许所述抗体或其片段在宿主细胞或无细胞表达系统中表达;以及含有所述表达载体的宿主细胞或无细胞表达系统。

[0273] 在某些实施方案中,根据本发明的GARP-TGF- β 1抗体或抗原结合片段的重链可变结构域和/或轻链可变结构域由第一和第二多核苷酸序列编码,其中所述第一和第二多核苷酸序列分别包含SEQ ID NO:18和19的氨基酸序列。在某些实施方案中,编码本发明的GARP-TGF- β 1抗体的多核苷酸可以包含编码GARP-TGF- β 1抗体的功能性VH或VL结构域的变体序列。编码VH结构域的变体序列当与SEQ ID NO:18最佳比对时可以表现出至少80%、85%、90%、95%、97%或99%序列同一性,且编码VL结构域的变体序列当与SEQ ID NO:19最佳比对时可以表现出至少80%、85%、90%、95%、97%或99%序列同一性。

[0274] 在某些实施方案中,根据本发明的GARP-TGF- β 1抗体或抗原结合片段的重链和/或轻链由第一和第二多核苷酸序列编码,其中所述第一和第二多核苷酸序列分别包含SEQ ID NO:20和21的氨基酸序列。在某些实施方案中,编码本发明的GARP-TGF- β 1抗体的多核苷酸可以包含编码GARP-TGF- β 1抗体的重链或轻链的变体序列。编码重链的变体序列当与SEQ ID NO:20最佳比对时可以表现出至少80%、85%、90%、95%、97%或99%序列同一性,且编码轻链的变体序列当与SEQ ID NO:21最佳比对时可以表现出至少80%、85%、90%、95%、97%或99%序列同一性。

[0275] 在这种背景下,在两个多核苷酸序列之间的%序列同一性可以通过比较以最佳方式比对的这两个序列来确定并且其中待比较的多核苷酸序列相对于参考序列可以包含添加或缺失以用于这两个序列之间的最佳比对。同一性百分比通过如下计算:确定在这两个序列之间具有相同核苷酸残基的相同位置的数目,用该相同位置的数目除以比较窗中位置的总数并且将所获得的结果乘以100以获得这两个序列之间的同一性百分比。例如,有可能使用BLAST程序“BLAST 2sequences”(Tatusova等人,“Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”, FEMS Microbiol Lett. 174: 247-250),其可在ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2获得,使用的参数是由默认给出的那些(特别是对于参数“开放空位罚分”:5以及“延伸空位罚分”:2;所选择的矩阵是例如由所述程序提出的矩阵“BLOSUM 62”),通过所述程序直接计算待比较的两个序列之间的同一性百分比。

[0276] 编码本发明的抗体的多核苷酸分子包括例如重组DNA分子。如本文可互换使用的术语“核酸”、“多核苷酸”或“多核苷酸分子”是指单链或双链的任何DNA分子或RNA分子以及在单链的情况下,其互补序列的分子。在论述核酸分子时,特定核酸分子的序列或结构在本文可以根据按5'至3'方向提供序列的正常惯例来描述。在本发明的一些实施方案中,核酸或多核苷酸是“分离的”。该术语在应用于核酸分子时是指与如下序列分离的核酸分子:在作为所述核酸分子来源的生物体的天然存在的基因组中与其直接连续的序列。例如,“分离的核酸”可以包含插入载体(诸如质粒或病毒载体)中或整合至原核或真核细胞或非人宿主生物体的基因组DNA中的DNA分子。当应用于RNA时,术语“分离的多核苷酸”主要是指由如上文所定义的分离的DNA分子编码的RNA分子。或者,所述术语可以是指RNA分子,所述RNA分子已经从在其天然状态下(即在细胞或组织中)与其缔合的其他核酸中纯化/分离。分离的多核苷酸(DNA或RNA)可以进一步代表通过生物学或合成手段直接产生并且与在其产生期间

存在的其他组分分离的分子。

[0277] 为了重组产生根据本发明的抗体,可以制备编码它的重组多核苷酸(使用标准分子生物学技术)并且将其插入可复制的载体中以用于在选择的宿主细胞或无细胞表达系统中表达。合适的宿主细胞可以是原核细胞、酵母细胞、或高等真核细胞,特别是哺乳动物细胞。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是由SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7, ATCC CRL 1651);人胚肾细胞系(293细胞或被亚克隆用于在悬浮培养中生长的293细胞, Graham等人, J. Gen. Virol. 36:59 (1977));幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR (CHO, Urlaub等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980));小鼠塞尔托利细胞(sertoli cell) (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980));小鼠骨髓瘤细胞SP2/0-AG14 (ATCC CRL 1581; ATCC CRL 8287)或NS0(HPA培养物保藏号85110503);猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等人, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982));MRC 5细胞;FS4细胞;和人肝细胞瘤细胞系(Hep G2)以及DSM的PERC-6细胞系。适用于这些宿主细胞中的每一种的表达载体也是本领域中通常已知的。

[0278] 应当指出的是,术语“宿主细胞”通常是指培养细胞系。从“宿主细胞”的定义明确地排除已经引入编码根据本发明的抗体或抗原结合片段的表达载体的整个人类。

[0279] 抗体产生

[0280] 在一个进一步方面,本发明还提供了产生本发明的抗体的方法,其包括在允许表达所述抗体的条件下培养含有编码所述抗体的一个或多个多核苷酸(例如表达载体)的宿主细胞(或无细胞表达系统)以及回收所表达的抗体。这种重组表达方法可以用于大规模生产抗体,包括根据本发明的GARP-TGF- β 1抗体,包括预期用于人治疗用途的单克隆抗体。用于大规模生产适用于体内治疗用途的重组抗体的合适的载体、细胞系以及生产方法是本领域中通常可得的并且将是技术人员众所周知的。

[0281] 药物组合物

[0282] 本发明的范围包括药物组合物,其含有与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂一起配制的本发明的GARP-TGF- β 1抗体、或其抗原结合片段中的一种或组合。此类组合物可以包括GARP-TGF- β 1抗体中的一种或组合(例如两种或更多种不同的GARP-TGF- β 1抗体)。用于配制用于人治疗用途的单克隆抗体的技术是本领域中众所周知的并且综述于例如Wang等人, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol.96, pp1-26, 2007(其内容以其整体并入本文)。

[0283] 在某些实施方案中,所述药物组合物被配制用于经由任何合适的施用途径施用于受试者,包括但不限于静脉内、肌内、真皮内、腹膜内、皮下、硬膜外、经鼻、口服、经直肠、局部、吸入、颊面(例如舌下)、以及透皮施用。

[0284] 可用于这些组合物中的药学上可接受的赋形剂包括,但不限于,离子交换剂,氧化铝,硬脂酸铝,卵磷脂,血清蛋白,诸如人血清白蛋白,缓冲物质,诸如磷酸盐,甘氨酸,山梨酸,山梨酸钾,饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物,水,盐或电解质,诸如硫酸鱼精蛋白,磷酸氢二钠,磷酸氢钾,氯化钠,锌盐,胶体二氧化硅,三硅酸镁,聚乙烯吡咯烷酮,基于纤维

素的物质(例如羧甲基纤维素钠),聚乙二醇,聚丙烯酸酯,蜡类,聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物,聚乙二醇和羊毛脂。

[0285] GARP-TGF- β 1抗体的治疗效用

[0286] 本发明的抗体和抗原结合片段可以用于治疗方法中,其中向有此需要的受试者施用治疗有效量的GARP-TGF- β 1抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,本发明的抗体和抗原结合片段可以用于治疗方法中,其中向有此需要的人受试者施用治疗有效量的GARP-TGF- β 1抗体或其抗原结合片段。本文提供了结合人GARP和TGF- β 1的复合物的抗体或其抗原结合片段,其用作药物。

[0287] 本发明的抗体和抗原结合片段结合调节性T细胞上的GARP-TGF- β 复合物,并且可以阻断或抑制活性TGF- β 产生或释放。因此,在本发明的一个进一步方面,本文提供了用于治疗患有或怀疑患有TGF- β 相关病症的受试者的方法。此类方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的本发明的GARP-TGF- β 1抗体。

[0288] 示例性TGF- β 相关病症包括,但不限于,炎症性疾病、慢性感染、癌症、纤维化、心血管疾病、脑血管疾病(例如缺血性中风)和神经退行性疾病。在某些实施方案中,TGF- β 相关病症是慢性感染。在某些实施方案中,TGF- β 相关病症是癌症。

[0289] 为了用于向受试者施用,可以将本发明的抗体和抗原结合片段配制为药物组合物。所述组合物可以经口、胃肠外、通过吸入喷雾、局部、直肠、经鼻、经颊、经阴道或经由植入的储库施用。如本文所用的术语“施用”包括但不限于皮下、静脉内、腹膜内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内、肿瘤内和颅内注射或输注技术。

[0290] 组合物的无菌可注射形式可以是水性或油性悬浮液。这些悬浮液可以根据本领域已知的技术使用合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂来配制。无菌可注射制剂也可以是在无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液。可以采用的可接受的媒介物和溶剂是水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。另外,无菌的不挥发油通常用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以采用任何温和的不挥发油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。脂肪酸,诸如油酸及其甘油酯衍生物,可用于制备注射剂,如同天然药学上可接受的油,诸如橄榄油或蓖麻油,特别是其聚氧乙烯化形式。这些油溶液或悬浮液还可以含有长链醇稀释剂或分散剂,诸如羧甲基纤维素或类似的分散剂,其通常用于配制药学上可接受的剂型,包括乳剂和悬浮液。通常用于制造药学上可接受的固体、液体或其他剂型中的其他通常使用的表面活性剂,诸如Tweens、Spans和其他乳化剂或生物利用度增强剂也可以用于配制的目的。

[0291] 可以根据用于这些产品类型的方法,例如使用制造商的说明书,确定施用药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的时间表和剂量。例如,本发明的药物组合物中存在的抗体可以以10 mg/mL的浓度供应在100 mg (10mL)或500 mg (50mL)一次性小瓶中。将该产品配制用于在9.0 mg/mL氯化钠、7.35 mg/mL柠檬酸钠二水合物、0.7 g/mL聚山梨酯80和无菌注射用水中静脉内(IV)施用。将pH调节至6.5。

[0292] 对于临床用途,可以将所述抗体或抗原结合片段以一个或多个剂量施用于受试者。对于胃肠外施用途,所述抗体或抗原结合片段的单剂量可以是例如约0.01至约100 mg/kg体重。在一个实施方案中,所述抗体或抗原结合片段的单剂量可以是例如约0.1至约50 mg/kg体重。在一个实施方案中,所述抗体或抗原结合片段的单剂量可以是例如约1至约20 mg/kg体重。对于重复给药,可以通过相同或不同的施用途来施用单独剂量。同样对于

重复给药,单独剂量可以是相同或不同的。例如,第一或负载剂量可以大于随后的剂量。同样对于重复给药,可以基于受试者的临床状况或临床应答,以固定的时间表或可调整的或可变的时间表来施用单独剂量。同样对于重复给药,通常可以每天一次、每隔天一次、每3、4、5、6或7天一次、每周一次、每两周一次、每三或四周一次或每隔月一次施用单独剂量。本发明还考虑其他时间表。

[0293] 应理解,这些剂量和时间表是示例性的,并且可以通过考虑因素诸如待施用的特定抗体或抗原结合片段、待治疗的疾病或病症、待治疗受试者的体型、年龄和状况、施用途径、向受试者施用的其他疗法以及特定抗体的亲和力和耐受性来确定最佳时间表和方案。此类因素和给药考虑可以在一项或多项临床试验中确定。

[0294] 本发明还提供了用于加强有此需要的受试者中的免疫系统的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本发明的抗体或抗原结合片段。本发明还提供了用于抑制有此需要的受试者中的人Treg的免疫抑制功能的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本发明的抗体或抗原结合片段。

[0295] 本发明还提供了用于使用本发明的GARP-TGF- β 1抗体和抗原结合片段治疗癌症的方法。此类方法可以涉及减少有此需要的受试者中的肿瘤环境中的免疫抑制。

[0296] 对于其中GARP-TGF- β 1抗体或其抗原结合片段用于治疗癌症的方法中的实施方案,可以将所述抗体或其抗原结合片段与一种或多种针对癌症的额外治疗、例如一种或多种免疫治疗剂组合施用。

[0297] 对于其中GARP-TGF- β 1抗体与免疫治疗剂组合施用的实施方案,所述免疫治疗剂可以是肿瘤疫苗。或者,所述免疫治疗剂可以是免疫刺激抗体。不希望被理论束缚,本发明的抗体将可能通过预防或减轻任何免疫抑制来改善免疫治疗剂的效力。在某些实施方案中,与免疫治疗剂的组合可以表现出协同作用。

[0298] 可以根据本文所述的方法治疗各种癌症,包括但不限于肾上腺皮质癌、肛门癌、膀胱癌、脑瘤、胶质瘤、乳腺癌、类癌瘤、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、食道癌、肝外胆管癌、尤因氏瘤、颅外生殖细胞瘤、眼癌、胆囊癌、胃癌、生殖细胞肿瘤、妊娠滋养细胞肿瘤、头颈癌、下咽癌、胰岛细胞癌、肾癌、喉癌、白血病、嘴唇和口腔癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、默克尔细胞癌、转移性鳞状头颈癌、骨髓瘤、赘生物、鼻咽癌、神经母细胞瘤、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、鼻窦和鼻癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、垂体癌、浆细胞瘤、前列腺癌、横纹肌肉瘤、直肠癌、肾细胞癌、唾液腺癌、皮肤癌、卡波西氏肉瘤、T-细胞淋巴瘤、软组织肉瘤、胃癌、睾丸癌、胸腺瘤、甲状腺癌、尿道癌、子宫癌、阴道癌、外阴癌或威尔姆斯氏瘤。

[0299] 本领域中已知的用作肿瘤疫苗的合适的肿瘤抗原包括例如:(a)癌-睾丸抗原,诸如NY-ESO-1,SSX2,SCP1以及RAGE,BAGE,GAGE和MAGE家族多肽,例如,GAGE-1,GAGE-2,MAGE-1,MAGE-2,MAGE-3,MAGE-4,MAGE-5,MAGE-6和MAGE-12(其例如可用于治疗黑色素瘤、肺、头颈、NSCLC、乳腺、胃肠道和膀胱肿瘤),(b)突变的抗原,例如p53(与各种实体瘤(例如结肠直肠癌、肺癌、头颈癌)相关),p21/Ras(与例如黑色素瘤、胰腺癌和结肠直肠癌相关),CD 4(与例如黑色素瘤相关),MUM 1(与例如黑色素瘤相关),胱天蛋白酶-8(与例如头颈癌相关),CIA 0205(与例如膀胱癌相关),HLA-A2-R1701, β 连环蛋白(与黑色素瘤相关),TCR(与T-细胞非霍奇金淋巴瘤相关),BCR-ab1(与例如慢性髓细胞性白血病相关),磷酸丙糖异构酶,

IA 0205, CDC-27和LDLR- FUT, (c) 过表达的抗原, 例如半乳凝素4 (与例如结肠直肠癌相关), 半乳凝素9 (与例如霍奇金氏病相关), 蛋白酶3 (与例如慢性髓细胞性白血病相关), WT 1 (与例如各种白血病相关), 碳酸酐酶 (与例如肾癌相关), 醛缩酶A (与例如肺癌相关), PRAME (与例如黑色素瘤相关), HER-2/neu (与例如乳腺癌、结肠癌、肺癌和卵巢癌相关), 甲胎蛋白 (与例如肝细胞瘤相关), SA (与例如结肠直肠癌相关), 胃泌素 (与例如胰腺癌和胃癌相关), 端粒酶催化蛋白, MUC-1 (与例如乳腺癌和卵巢癌相关), G-250 (与例如肾细胞癌相关), 和癌胚抗原 (与例如乳腺癌、肺癌和胃肠道癌 (诸如结肠直肠癌) 相关), (d) 共有抗原, 例如黑色素瘤-黑色素细胞分化抗原, 诸如MART-1/Melan A, gp100, MC1R, 刺激黑色素细胞的激素受体, 酪氨酸酶, 酪氨酸酶相关蛋白-1/TRP1和酪氨酸酶相关蛋白-2/TRP2 (与例如黑色素瘤相关), (e) 前列腺相关抗原, 诸如PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-P1, PSM-P2, 与例如前列腺癌相关, (f) 免疫球蛋白独特型 (与例如骨髓瘤和B细胞淋巴瘤相关), 以及 (g) 其他肿瘤抗原, 诸如含多肽和糖的抗原, 包括 (i) 糖蛋白, 诸如唾液酸Tn和唾液酸Le^x (与例如乳腺癌和结肠直肠癌相关) 以及各种粘蛋白; 糖蛋白可以与载体蛋白偶联 (例如, MUC-1可以与LH偶联); (ii) 脂多肽 (例如, 与脂质部分连接的MUC-1); (iii) 多糖 (例如Globo H合成六糖), 其可以与载体蛋白 (例如, 与KLH) 偶联, (iv) 神经节苷脂, 诸如GM2、GM12、GD2、GD3 (与例如脑癌、肺癌、黑色素瘤相关), 其也可以与载体蛋白 (例如KLH) 偶联。其他肿瘤抗原包括p15, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH- IGK, MYL-RAR, Epstein Barr病毒抗原、EBNA、人乳头瘤病毒 (HPV) 抗原, 包括E6和E7, 乙型和丙型肝炎病毒抗原, 人T-细胞淋巴病毒抗原, TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, mn-23H I, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, p 16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, β -HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV 18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (Mac-2结合蛋白/亲环蛋白C相关蛋白), TAAL6, TAG72, TLP, TPS等。合适的免疫刺激抗体包括, 但不限于: 抗CTLA-4、抗PD1、抗PDL1和抗KIR抗体。

[0300] 在某些实施方案中, 本文所述的治疗癌症的方法包括在施用另一种抗癌剂或癌症治疗、诸如化学疗法治疗之前、同时和/或之后, 向受试者施用本发明的抗体或抗原结合片段。

[0301] 本发明还包括通过施用本发明的抗体或抗原结合片段以改进疫苗接种策略的效力来预防感染性疾病的方法。例如, 本发明的方法可以包括通过组合施用本文所述的抗体或抗原结合片段连同这些疾病特有的疫苗来预防感染性疾病, 诸如HIV、疟疾或埃博拉。

[0302] 试剂盒

[0303] 在一个进一步方面, 本发明提供了试剂盒, 其包含至少一种本发明的GARP-TGF- β 1抗体或抗原结合片段。

[0304] 术语“试剂盒”意指包含至少一种用于特异性结合GARP-TGF- β 1复合物的试剂 (例如本发明的抗体或抗原结合片段) 的任何制品 (例如包装或容器)。所述试剂盒可以作为用于实施本发明的方法的单元进行促销、分发或销售。此外, 可以在保护其免受外部环境影响的容器 (例如密封容器) 内提供任何或所有试剂盒试剂。所述试剂盒还可以含有包装插页, 其描述所述试剂盒及其使用方法。

实施例

[0305] 将参考以下非限制性实施例进一步理解本发明。

[0306] 实施例1:将抗体LHG-10.6种系化

[0307] 抗体“LHG-10”的产生和表征描述于国际专利申请W02015/015003和W02016/125017 (其内容以其整体并入本文)中。通过用过表达人GARP-TGF-β1复合物的HEK293E细胞免疫美洲驼来产生抗体LHG-10,并通过选择和筛选GARP-TGF-β1 Fab进行鉴定。轻链改组方法(如例如国际专利申请W02014/033252中所述)用于改善单克隆抗体LHG-10的亲和力,并且变体“LHG-10.6”(本文也称为17H5)为被鉴定为具有改善的结合特征。LHG-10和Vκ改组变体LHG-10.6的VH和VL序列显示于表3中。

[0308] 表3

[0309]

		SEQ ID NO.
LHG-10和LHG10.6的VH结构域	EVQLVQPGAE LRNSGASVKVCKASGYRFT SYYID WVRQAPGQGLEWMG RIDPEDGGTKYAQKFGG RVTFTADTSTSTAYVELSSLRSED TAV YYCAR NEWETVVVGDLMEY EY WGQGTQVT VSS	1
LHG-10的VL结构域	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITC QASQSISSYLA WYQQKPGQAPKLLIY GASRLQT GVPSRFSGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYIC QQYDSL PVT FGQGTKVELK	2
LHG10.6的VL结构域	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITC QASQSISSYLA WYQQKPGQAPNIIY GASRLKT GVPSRFSGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYIC QQYASVPVT FGQGTKVELK	3

[0310] 发现17H5抗体与VH结构域中最接近的人种系序列(X92343|IGHV1-46*01)具有88.5%同一性,并且与VL结构域中最接近的人种系序列(X59315|IGKV1-39*01)具有86.2%同一性。根据3-步方法对该抗体进行种系化:

[0311] 1- 通过使用重叠的寡核苷酸组装基因文库以经由PCR合成产生编码可变轻链(VL)和可变重链(VH)的基因。

[0312] 2- 将该基因文库克隆至含有编码人恒定重链(CH1)和恒定轻κ(Cκ)链的基因的载体(pCB13)中(文库构建)。

[0313] 3- 使用噬菌体展示和亲和力选择来选择功能性Fab。

[0314] 1. 文库构建

[0315] 将17H5的VH与最接近的人种系序列进行比较,并鉴定偏离人种系的框架残基。使这些框架残基突变为在人V-区中存在的残基,同时还在文库中保留原始残基。允许突变为其对应物的12个VH残基显示于下表中。除了这些种系化突变以外,还允许CDR2内的异构化位点(D54;D55)和CDR3中的氧化位点(M100f)突变。这些位点也显示于下表中。

[0316] 表4:17H5 VH结构域中的被靶向残基

[0317]

位置	骆驼科动物aa	突变的aa	概率	克隆
1	E	Q	0.5	2
7	P	S	0.5	2
11	L	V	0.5	2
12	R	K	0.5	2
13	N	K	0.5	2
14	S	P	0.5	2
28	R	T	0.5	2
54 (HCDR2)	D	E	0.5	2

55 (HCDR2)	G	A	0.5	2
69	F	M	0.5	2
71	A	R	0.5	2
78	A	V	0.5	2
80	V	M	0.5	2
100f (HCDR3)	M	L/T	0.33	3
108	Q	L	0.5	2

[0318] 对于17H5的Vk,最接近的人种系序列和框架序列之间的比较导致鉴定11个待靶向的残基。这些位点显示于下表中。

[0319] 表5:17H5 VL结构域中的被靶向残基

[0320]

位置	骆驼科动物aa	突变的aa	概率	克隆
11	L	V	0.5	2
42	Q	K	0.5	2
45	N	K	0.5	2
46	I	L	0.5	2
70	S	D	0.5	2
77	G	S	0.5	2
79	E	Q	0.5	2
80	A	P	0.5	2
83	A	F	0.5	2
84	G	A	0.5	2
106	L	I	0.5	2

[0321] 17H5种系化文库的理论大小显示于表6中。

[0322] 表6

[0323]

	17H5
VH文库的大小	5×10^4
VL文库的大小	2×10^3
最终文库的大小	1×10^8

[0324] 2. 基因文库的构建

[0325] 通过基因组组装来创建种系化文库。通过基于PCR的组装来产生基于该设计的VH和VL(两个集合)的合成基因(Stemmer等人, Gene (1995) 164: 49 - 530)。通过PCR组装在某些位置上具有特定突变的重叠寡核苷酸。将所述核苷酸简并以编码人和美洲驼氨基酸。这样做是为了防止在美洲驼残基对于稳定性、折叠或高亲和力结合至关重要的情况下完全丧失结合。

[0326] 首先将17H5Vk和VH文库的合成基因克隆于pCB13-CK1 (分别具有人Ck和CH1结构域的噬菌粒载体)中。在构建这些VkCk和VHCH1子文库之后,通过将重链插入物连接至轻链文库中来制成最终的文库。实施菌落PCR以确定插入百分比,并将克隆送去测序以确保文库中存在所有期望的突变。不同文库的特征描述于下表中。

[0327] 表7:17H5种系化文库的特征

[0328]		17H5
	VH文库的大小	1E5
	VL文库的大小	1E3
	最终文库的大小	1E8
	%插入物	85%

[0329] 发现种系化文库具有良好质量,并且可用于选择。

[0330] 3. 选择具有高度人同一性的Fab

[0331] 使用噬菌体展示来选择对人GARP-TGF- β 1复合物具有高亲和力的Fab,如先前在W02015/015003 (其内容以其整体并入本文)中所述。简而言之,将微量滴定板在4℃下用GARP-TGF- β 1复合物包被过夜,并且第二天,将表达Fab的噬菌体在用不同浓度的复合物包被的孔中孵育2小时。将板洗涤,并用胰蛋白酶洗脱特定的噬菌体,并将其用于感染TG1细胞。选择条件的详情列于表8中。

[0332] 表8:17H5的种系化文库的选择轮次的详情

[0333]	轮次	噬菌体输入量(μ l)	huGARP-TGF- β 1 [ng/孔]	洗涤时间	洗涤抗原
	1	10	1000-100-10	-	-
	2	1	1000-100-10	-	-
	3	1	1000-100-10	2小时	20 x huGT
	4	1	1000-100-10	24小时	20 x huGT
	5	1	1000-100-10	72小时	20 x huGT
	6	1	1000-100-10	1周	100 x huGT

[0334] 在第一轮选择后,仅在10 μ g/ml的不相关蛋白的涂层上观察到富集。在第2轮中,富集10倍更高,而输入噬菌体的量则10倍更少。从第3轮开始,通过增加洗涤的持续时间并通过在溶液中添加过量靶标来增加严格性。在溶液中添加大量过量靶标以防止解离的噬菌体重新结合。甚至在第6轮之后,以1周解离速率洗涤和100倍过量的可溶性靶标,仍观察到富集。

[0335] 4. 筛选具有高度人同一性的Fab

[0336] 从选择轮2、3、4、5和6(每轮48个克隆)挑取母板。制备周质提取物,并通过SPR(使用Biacore)测定解离速率。将所有克隆进行DNA测序,并推导其氨基酸序列。与人种系Ig V-区具有高于92%的同一性的克隆概述于表9中。在SPR上(使用Biacore)测量作为周质提取物的这些克隆的解离速率,并与Fab 17H5的解离速率进行比较。

[0337] 表9:具有超过92%总体人同一性的克隆的结合亲和力

[0338]

Fab	解离速率 (10^{-4} s^{-1})	%同一性 VH	%同一性 VK	%总体 同一性	异构化位点 D54;G55 (HCDR2)	氧化风险 M100f (HCDR3)
17H5	2,01	88,5	86,2	87,4	wt (D54;G55)	wt (M100f)
*39A12	6,06	95,4	96,2	95,8	E54;G55	T100f
*39A5	1,9	94,2	96,2	95,2	wt	wt
39H6	4,4	93,1	96,2	94,7	wt	wt
40H3	2,47	94,2	95,0	94,6	wt	wt
39A10	1,77	94,2	95,0	94,6	wt	wt
*39B6	1,05	95,4	93,7	94,6	wt	wt
39E6	8,61	96,5	92,5	94,5	wt	wt
40G4	2,07	93,1	95,0	94,1	wt	wt
38C3	2,32	95,4	92,5	94,0	wt	wt
39G3	6,62	95,4	92,5	94,0	E54;G55	T100f
39G9	9,47	95,4	92,5	94,0	E54;G55	T100f
38F3	2,03	91,9	95,0	93,5	D54;A55	wt
*38F2	4,08	94,2	92,5	93,4	D54;A55	T100f
*39B10	2,36	95,4	91,2	93,3	E54;G55	wt
39C6	7,89	95,4	91,2	93,3	E54;G55	T100f
39G6	7,79	94,2	91,2	92,7	wt	L100f
38C5	1,69	90,8	93,7	92,3	E54;G55	wt
38B2	2,86	93,1	91,2	92,2	wt	T100f

[0339] * 5种重新格式化为完整IgG1的Fab。

[0340] 将显示>93%的总体人同一性且与亲本17H5 Fab相当的解离速率的5种克隆重新克隆为完整的人IgG1抗体。这些抗体的CDR、VH和VL序列显示于表10、11和12中。

[0341]

表 10 GARP-TGF-β1 Ab 的 VH CDR 序列

	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
39B6	SYVID	4	RIDPEDGGTKYAQKFQG	5	NEWETVVVVGDLMEYEV	6
39A12	SYVID	4	RIDPEEGGTKYAQKFQG	7	NEWETVVVVGDLTYEVY	32
39A5	SYVID	4	RIDPEDGGTKYAQKFQG	5	NEWETVVVVGDLMEYEV	6
38F2	SYVID	4	RIDPEDAGTKYAQKFQG	8	NEWETVVVVGDLTYEVY	32
39B10	SYVID	4	RIDPEEGGTKYAQKFQG	5	NEWETVVVVGDLMEYEV	6

表 11 GARP-TGF-β1 Ab 的 VL CDR 序列

	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
39B6	QASQSISSYLA	9	GASRLKT	10	QQYASVPVT	11
39A12	QASQSISSYLA	9	GASRLKT	10	QQYASVPVT	11
39A5	QASQSISSYLA	9	GASRLKT	10	QQYASVPVT	11
38F2	QASQSISSYLA	9	GASRLKT	10	QQYASVPVT	11
39B10	QASQSISSYLA	9	GASRLKT	10	QQYASVPVT	11

[0342]

表 12 GARP-TGF- β 1 Ab 的可变结构域序列

克隆	VH	SEQ ID NO.	VL	SEQ ID NO.
39B6	QVQLVQPGAEVRKPGASVKVSCKASGYRFT SYVIDWVRQAPGQGLEWMGRIDPEDGGTKYAQ KFQGRVTMTADTSTSTVYVELSSLRSEDYAVYVC AR NEWETVVVGDLMYEYEWGQGLTVTVSS	22	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCQASQSISSYL AWYQQKPGQAPKILYVIGASRLKTGVPSRFSG SGSGTFTLTISSELPEDAATYYC QQYASVPVT FGQGTKVEIK	23
39A12	EVQLVQPGAEVKKPGASVKVSCKASGYRFT SYVIDWVRQAPGQGLEWMGRIDPEEGTKYAQ KFQGRVTFTADTSTSTVYVELSSLRSEDYAVYVC AR NEWETVVVGDLTVEYEWGQGLTVTVSS	24	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCQASQSISSYL AWYQQKPGQAPKILYVIGASRLKTGVPSRFSG SGSGTFTLTISSELPEDAATYYC QQYASVPVT FGQGTKVEIK	25
39A5	QVQLVQPGAEVRKPGASVKVSCKASGYRFT SYVIDWVRQAPGQGLEWMGRIDPEDGGTKYAQ KFQGRVTFTADTSTSTVYVELSSLRSEDYAVYVC AR NEWETVVVGDLMYEYEWGQGLTVTVSS	26	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCQASQSISSYL AWYQQKPGQAPKILYVIGASRLKTGVPSRFS GSGSGTFTLTISSELPEDAATYYCQQYASVP VT FGQGTKVEIK	27
38F2	QVQLVQPGAEVKKPGASVKVSCKASGYRFT SYVIDWVRQAPGQGLEWMGRIDPEDAGTKYAQ KFQGRVTFTADTSTSTVYVELSSLRSEDYAVYVCAR NEWETVVVGDLTVEYEWGQGLTVTVSS	28	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCQASQSISSYL AWYQQKPGKAPNLLYVIGASRLKTEVPSRFSG SGSGTFTLTISSELPEDAATYYC QQYASVPVT FGQGTKVEIK	29
39B10	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYRFTSYVI D WVRQAPGQGLEWMGRIDPEEGTKYAQKFQGR RVMTADTSTSTAYMELSSLRSEDYAVYVCAR NEWETVVVGDLMYEYEWGQGLTVTVSS	30	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCQASQSISSYL AWYQQKPGQAPNLLYVIGASRLKTGVPSRFSG SGSGTFTLTISSELPEDAATYYC QQYASVPVT FGQGTKVEIK	31

[0343] 5. 具有高度人框架残基同一性的mAb的体外表征

[0344] 通过在HEK 293E细胞中瞬时转染来产生重新格式化为人IgG1的五个种系化克隆。通过SPR测试所有抗体与人GARP-TGF- β 1复合物的结合,并显示类似于非种系化亲本克隆的结合亲和力(KD比17H5低2-5倍)。将CDR3中的残基M100f改变为苏氨酸使 K_D 降低 \approx 5倍。种系化17H5 Ab的结合特性和特征列于表13中。

[0345] 表13:种系化17H5抗体的结合特性和特征

mAb	KD (M)	差异倍数	异构化位点 D54;G55	氧化风险 M100f	%同一性 VH	%同一性 VK	%总体 同一性
17H5	1,00E-10	1,0	wt (DG)	wt (M)	88,5	86,2	87,3
39B6	1,67E-10	1,7	wt (DG)	wt (M)	95,4	93,7	94,5
39B10	2,62E-10	2,6	EG	wt (M)	95,4	91,2	93,3
39A5	2,98E-10	3,0	wt (DG)	wt (M)	94,2	96,2	95,2
38F2	4,80E-10	4,8	DA	T	94,2	92,5	93,3
39A12_T	5,05E-10	5,1	EG	T	95,4	96,2	95,8

[0347] 6. 种系化mAb 39B6的稳定性

[0348] 基于其结合特性,选择克隆39B6作为先导种系化克隆。产生两种效应子功能缺陷形式(hIgG1^{N297Q}和hIgG4^{S228P})的该抗体,并实施稳定性测试。在稳定性测试前,通过BiacoreT200使用用GARP-TGF- β 1复合物以750RU包被(表14)或用所述抗体以1000RU包被(表15)的CM5芯片,测试效应子缺陷的39B6抗体对GARP-TGF- β 1的亲合力。

[0349] 表14

mAb	格式	K _D (M)	差异倍数
LHG10.6	IgG1-N297Q	8,19E-10	1
39B6	IgG1-N297Q	8,63E-11	0.1
39B6	IgG4-S228P	3,13E-10	0.4

[0351] 表15

mAb	格式	K _D (M)	差异倍数
LHG10.6	IgG1-N297Q	5,34E-10	1
39B6	IgG1-N297Q	1,23E-09	2.3
39B6	IgG4-S228P	1,02E-09	1.9

[0353] 使用以下设置测试39B6抗体的耐热性。

[0354] ● mAb样品制备:将1 ml的mAb (39B6-IgG1和39B6-IgG4),新鲜制备的储备溶液(5 mg/ml)放入2 ml玻璃螺帽玻璃小瓶中,并保存在5℃和37℃。立即检查小瓶中颗粒的不存在。

[0355] ● PBS阴性对照:在2 ml玻璃小瓶中制备1 ml过滤的Dulbecco氏PBS的等分试样作为PBST阴性对照。立即检查小瓶中颗粒的不存在。

[0356] ● PBSTw阴性对照:在2 ml玻璃小瓶中制备1 ml过滤的含有0.02% Tween80 (Sigma)的Dulbecco氏PBS的等分试样作为PBSTw阴性对照。立即检查小瓶中颗粒的不存在。

[0357] ● 高聚集对照:在2 ml玻璃小瓶中制备1 ml内部抗体的等分试样,其具有大量可见的聚集。

[0358] ● 参考样品:对于每种抗体,在500 μ l无菌、PCR管中制备60 μ l mAb等分试样,标记并储存在-20℃。

[0359] 经56天时间过程,监测在不同温度 and 不同条件(PBS相比于PBSTw)下存储的抗体的稳定性。如通过SPR (Biacore™)所测量的储存对靶标结合活性的影响显示于图2中。如从呈现的结果可见,当储存在37℃时,39B6抗体(以两种效应子缺陷形式)在PBS和PBS/Tween两者中表现出朝向较低靶标结合活性的趋势。相反,在5℃储存的样品经该时间过程并未展现

靶标结合活性的明显损失。

[0360] 实施例2:开发具有改善的稳定性的GARP-TGF- β 1抗体

[0361] 2.1 39B6变体的产生

[0362] 对于抗体39B6,发现上述靶标结合活性的降低与发生在VH CDR3的位置95-96处的脱酰胺相关。因此,实施进一步工作以改善39B6的稳定性。

[0363] 首先,对该克隆进行CDR2区域中的VH链的修饰以引入G55A取代(39B6-A)。将39B6-A的VH和VL区域重新克隆至人IgG4^{S228P}骨架中,即效应子功能缺陷的人抗体形式。

[0364] 为了尝试改善抗体39B6-A IgG4^{S228P}的稳定性,产生五种变体,其在VH结构域的CDR3的位置 95或96处具有突变。下面显示这些变体。所有变体均以效应子功能缺陷形式IgG4^{S228P}产生。

[0365] 表16:39B6-A变体

[0366]

变体	位置95	位置96
39B6-AVE	V	E*
39B6-AYE	Y	E*
39B6-ANK	N*	K
39B6-ANR	N*	R
39B6-AEE	E	E*

[0367] *39B6-A中已经存在的残基。

[0368] 将抗体过滤并浓缩至5mg/ml,并储存在具有0.02% Tween80 (Sigma)的Dulbecco氏PBS中。需要Tween80来稳定抗体制剂。

[0369] 通过BiacoreT200使用用GARP-TGF- β 1复合物以150RU包被(表17)或用所述抗体以200RU包被(表18)的CM5芯片,测试所有抗体(包括39B6-A)对GARP-TGF- β 1的亲合力。

[0370] 表17

[0371]

mAb	K _D (M)	差异倍数
39B6-A	9,91E-10	1,0
39B6-AVE	8,94E-10	0,9
39B6-AYE	7,63E-10	0,8
39B6-AEE	5,79E-09	5,8
39B6-ANK	8,80E-10	0,9
39B6-ANR	8,84E-10	0,9
LHG10.6	5,17E-10	0,5

[0372] 表18

[0373]

mAb	K _D (M)	差异倍数
39B6-A	1,33E-09	1,0
39B6-AVE	1,29E-09	1,0
39B6-AYE	1,62E-09	1,2
39B6-AEE	1,02E-07	76,7
39B6-ANK	2,02E-09	1,5

39B6-ANR	1,94E-09	1,5
----------	----------	-----

[0374] 通过测定在mAb存在的情况下CD3/CD28刺激的人Treg的SMAD2磷酸化的水平,用所有变体分析阻断人Treg释放活性TGF- β 的能力。如图3中所示,与原始的39B6-A相比,抗体39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR在SMAD2磷酸化测定中具有类似的功效。变体39B6-AEE和39B6-AVE显示明显的功效损失。

[0375] 使用GAGA-1uc测定法获得类似的结果,其中293T-hGARP细胞用报告质粒瞬时转染,在所述报告质粒中,萤火虫荧光素酶在 SMAD响应启动子(GAGA-1uc)的控制之下。与原始的39B6-A相比,抗体39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR在荧光素酶测定中具有类似的功效。变体39B6-AEE和39B6-AVE显示明显的功效损失(参见图4)。

[0376] 2.2稳定性研究

[0377] 除了39B6-AEE以外,使用如下所述的不同方法测试所述变体的稳定性。

[0378] 对于不同的稳定性研究的每一种,使用以下技术中的一种或多种测试抗体:

[0379] - 视觉检查

[0380] - 大小排阻-HPLC

[0381] - SDS PAGE(还原和非还原)

[0382] - SPR上的靶标结合亲和力

[0383] - 蛋白浓度。

[0384] 下面描述这些技术的方案。

[0385] 视觉检查的方案

[0386] 对样品不知情,并通过由三个分析人员目视检查小瓶,针对可见颗粒的存在进行评分。在检查之前,使样品达到室温持续30分钟。以下评分系统用于评估:

[0387] A:样品是澄清的,无可见颗粒

[0388] B:非常少的颗粒

[0389] C:适度存在颗粒

[0390] D:观察到大量颗粒

[0391] f:纤维。

[0392] 大小排阻色谱法(SE-HPLC)的方案

[0393] 系统、柱和样品制备

[0394] 在整个研究中使用的柱是Xbridge Protein BEH SEC 200A (3.5 μ m, 7.8*30 mm, Waters),其通常储存于20% EtOH中。将Xbridge Protein BEH 200A前-保护柱偶联至分析柱(3.5 μ m, 7.8*3 mm; Waters)。在每次利用之前,将柱用至少5CV的Dulbecco氏PBS平衡,并且在从系统取出之前,将其用5CV的LC-级水清洗。利用前,将所有溶剂过滤并脱气。

[0395] 使用的色谱系统为Agilent 1260 Infinity,其配备有四元泵、自动注入器、在线脱气机和DAD检测器。该柱未保持在恒温室中,并且在室温下分析样品。将检测器同时设置为波长280和214 nm(参考波长为360 nm,其中截止值为100 nm)。在214 nm通道上进行聚集监测。用Chemstation软件(Agilent)进行数据采集。

[0396] 通过无菌条件下直接从5 mg/ml浓度转移25 μ l所有原始样品来进行样品分析。将它们以2000 rcf离心1 min,并将20 μ l小心地转移至螺旋盖、琥珀色、玻璃小瓶中。每种条件下的注入体积为5 μ l (25 μ g),流速为0.7 ml PBS/min,持续25 min。每次注射伴随用

LC-级水的针洗涤,并且在每个样品结束时进行密封洗涤。

[0397] 每个时间点序列均用2x PBS注入(空白;5 μ l注入体积)起始,随后为2 μ l BEH 200标准蛋白混合物注入(Waters)和已知聚集mAb样品。每分析十二个样品,进行一次空白注入。每个分析序列的终止均如同起始,但顺序相反(已知聚集对照mAb、BEH标准蛋白混合物和2x空白)。

[0398] 用于测定%聚集和%单体面积的方法

[0399] 使用以下方案:

[0400] - 用方法ARGX 115对所有色谱图进行积分(基本技术参数:切线撇去标准模式,斜率灵敏度2.0,最低峰高1.7,最小峰面积1.0,峰宽:0.02)

[0401] - 验证所有峰以与先前获得的分析一致的方式积分

[0402] - 以PDF和Excel文件输出积分结果

[0403] - 计算%总体聚集作为在单体峰之前洗脱的所有峰的面积的总和除以注入的总面积且乘以100

[0404] - 还通过将单体面积除以总面积且乘以100来计算%单体面积。该%单体面积反映样品中是否存在不溶性聚集物

[0405] - 保持详细记录以监测分析柱的性能、效率和分辨率(即峰对称性、单体面积、总面积、保留时间的重现性等)。

[0406] SDS-PAGE的方案

[0407] 样品制备

[0408] 样品分析通过进行:在无菌条件下转移25 μ l的100 μ l PBS/0.02% Tween80(在整个研究中缩写为PBSTw)中5 mg/ml的所有原始样品,以产生1 mg/ml的中间浓度,用于SDS PAGE(还原和非还原),SPR上的结合亲和力和蛋白浓度评价。使用4-20% tris甘氨酸、mini-protean、无染料、预制凝胶用于样品的SDS PAGE分析(Biorad)。制备一批具有或不具有还原剂DTT的4x-浓缩的上样染料,并等分至-20 $^{\circ}$ C。通常,从1 mg/ml中间稀释液取5 μ l,且然后将5 μ l 4x浓缩的上样染料(+/- DDT)与10 μ l mQ一起添加。每种条件的最终量为5 μ g。将样品在95 $^{\circ}$ C下煮沸10 min,且然后加样(20 μ l)至预制凝胶。在tris-甘氨酸缓冲液系统中,在200 V的恒定电压下进行电泳35 min。随后进行蓝色染色(Gentaur) 1 h。将所有凝胶用mQ水脱色至少1 h。

[0409] %全长Ab的测定

[0410] 在Odyssey v3.0 Li-Cor系统上,通过在以下设置下扫描蛋白凝胶至单通道检测(700 nm)来测定不同条带的强度:聚焦偏移0.5 mm和“高”质量。用线性手动参数5将每次分析的亮度和对比度设置为50%。

[0411] 方法如下:

[0412] - 扫描凝胶并验证凝胶上的所有条带都被紧密的矩形包围

[0413] - 在设置中选择“输出”,以便以Excel格式获得所有条带的原始强度

[0414] - 计算泳道中存在每个条带的%原始强度,作为该条带的原始强度除以泳道的总原始强度且乘以100

[0415] - 对于非还原条件,%全长Ab被定义为对应于~100 kD条带的条带的%原始强度

[0416] - 对于还原条件,%全长Ab被定义为对应于~25-35 kD和~55 kD条带的条带的%原

始强度的总和。

[0417] Biacore 3000中的靶标结合活性测量的方案

[0418] 样品制备

[0419] 从上述1 mg/ml的所有样品的中间浓度,进行额外1/250稀释用于SPR分析,以得到4 µg/ml的最终浓度。对于所有条件,该1/250稀释在两步中进行:a) 5 µl (1 mg/ml) + 120 µl HBS-EP (SPR缓冲液),和b) 额外的10x稀释液(15 µl + 135 µl HBS-EP)。对于每种抗体和每个时间点,从-80℃冷冻样品开始,准备单独的标准曲线。将其与稳定性样品一起进行分析,以确定标准品的一般拟合后的每条曲线的斜率。通过将参考样品设置为100%,这些斜率用于计算稳定性样品的百分比活性。

[0420] 在Biacore上测定%活性

[0421] 为了在Biacore中测定靶标结合活性,将CM5芯片用~4000 RU人GARP-TGF-β复合物包被。将流速设置为30 µl/min,其使用"kinject"注入模式和具有5 min间隔的两次再生注入(1 mM NaCl, 2.5 mM甘氨酸pH 1.5)。

[0422] 方法如下实施:

[0423] - 在BIAEVAL程序中打开曲线,且选择值 '2-1' (1:空白,2 hGARP-TGF-β1)

[0424] - 一次选择一条曲线用于图形重叠

[0425] - 删除曲线的再生部分

[0426] - 选择临注入前的基线,并转换Y-轴用于"选择中值处的零"

[0427] - 从注入后120秒开始且在155秒结束,选择 '一般拟合'

[0428] - 在Excel中绘制标准品并确定每种抗体的曲线的斜率

[0429] - 通过将参考(储存在-20℃的样品)设置为100%,将这些值转换为百分比活性。

[0430] 蛋白浓缩的方案

[0431] 为了测定每种条件的蛋白含量,通过测量每个样品(2 µl)的280 nm处的吸光度,使用NanoDrop系统。将系统用PBS设空白,并通过一式三份测量每个样品的280 nm处的吸光度(以1 mg/ml的中间稀释)来进行蛋白测定。将在280 nm处获得的所有值除以系数1.51。在每种不同条件之后进行PBS空白测量。所有数据均被报告为每种条件的三个测量值的平均值。

[0432] 2.2.1 温度稳定性研究

[0433] 为了监测所述抗体在不同温度储存条件下的稳定性,遵循以下设置:

[0434] ● mAb样品制备:将1 ml的mAb (39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR),新鲜制备的储备溶液(5 mg/ml)放入2 ml玻璃螺帽玻璃小瓶中,并保存在5℃和37℃。立即检查小瓶中颗粒的不存在。

[0435] ● PBSTw阴性对照:在2 ml玻璃小瓶中制备1 ml过滤的含有0.02% Tween80 (Sigma)的Dulbecco氏PBS的等分试样作为PBSTw阴性对照。立即检查小瓶中颗粒的不存在。

[0436] ● 高聚集对照:在2 ml玻璃小瓶中制备1 ml内部抗体的等分试样,其具有大量可见的聚集。

[0437] ● 参考样品:对于每种抗体,在500 µl无菌、PCR管中制备60 µl mAb等分试样,标记并储存在-20℃。

[0438] 在不同的时间点,从储存条件取mAb样品,并测试:

- [0439] - 视觉检查
- [0440] - SE-HPLC
- [0441] - SDS PAGE(还原和非还原)
- [0442] - SPR上的靶标结合亲和力
- [0443] - 蛋白浓度。
- [0444] 视觉检查
- [0445] 视觉检查的结果显示于下表19中。所有mAb均在PBSTw中,其应当给予稳定化作用。
- [0446] 表19:在5℃和37℃的存储条件下经56-d时段的39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR的mAb样品的视觉检查的结果

	0d	1d	7d	14d	28d	56d
样品	储存条件: 5℃					
39B6-AVE	A-B-B	A-B-B	Af-B-B	Af-B-B	Af-B-A	B-Bf-Af
39B6-AYE	A-A-A	A-A-A	A-A-B	Af-A-B	Af-Af-B	Af-Bf-A
39B6-ANK	A-A-A	A-A-B	Af-B-B	Af-A-B	B-A-C	B-A-B
39B6-ANR	B-A-A	B-B-B	B-Bf-Bf	C-Bf-Bf	C-Bf-Cf	C-Bf-C
高聚集对照	C-C-C	C-C-C	C-D-D	D-D-D	D-D-D	D-D-D
PBSTw	Af-A-A	Af-A-A	A-B-B	Af-A-B	Af-A-A	Af-A-A
	储存条件: 37℃					
39B6-AVE	A-A-A	A-B-B	Af-Bf-B	Af-Bf-B	Af-Bf-B	Af-Bf-Af
39B6-AYE	A-A-A	A-B-B	Af-A-B	Af-B-B	B-B-B	B-Af-Bf
39B6-ANK	A-A-A	A-A-B	A-B-B	B-A-B	C-B-B	D-Bf-Bf
39B6-ANR	B-A-A	B-A-B	Af-Af-Bf	Af-Af-Bf	B-Af-Bf	C-Af-Bf
高聚集对照	C-C-C	C-C-C	C-D-C	D-D-C	D-D-D	D-D-D
PBSTw	Af-B-B	Af-Bf-B	Af-Af-Bf	Af-Bf-B	Af-Bf-Bf	Af-A-Af

- [0447] [0448] 对于5℃条件,在56天后mAb的平均评分如下:
- [0449] 39B6-AYE: ‘样品是澄清的,无可见颗粒’
- [0450] 39B6-AVE和39B6-ANK: ‘非常少的颗粒’
- [0451] 39B6-ANR: ‘适度存在颗粒’。
- [0452] PBSTw缓冲液在5℃被评分为 ‘样品是澄清的,无颗粒可见’,因此这表明观察到的颗粒是蛋白相关的。
- [0453] 对于37℃储存条件,在56天后mAb的平均评分如下:
- [0454] 39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR: ‘非常少的颗粒’
- [0455] 39B6-AVE: ‘样品是澄清的,无可见颗粒’。
- [0456] PBSTw缓冲液在37℃被评分为 ‘样品是澄清的,无可见颗粒’,因此这表明观察到的颗粒是蛋白相关的。
- [0457] 通过SE-HPLC分析
- [0458] 通过SE-HPLC测量蛋白聚集和片段化。
- [0459] 如通过SE-HPLC所测量的mAb 39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR的蛋白聚集结果概述于下表20中且显示于图5中。
- [0460] 表20:对于mAb 39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR通过SE-HPLC监测的%聚集物形成

[0461]

39B6-AVE - SE-HPLC 分析后的百分比聚集(%)			
t (天)	参考	5℃	37℃
0	1,0	1,0	1,0
7	1,0	1,1	1,2
14	1,0	1,0	2,2
28	0,9	0,9	3,0
56	1,1	1,1	4,4
39B6-AYE - SE-HPLC 分析后的百分比聚集(%)			
t (天)	参考	5℃	37℃
0	1,2	1,0	1,0
7	1,0	1,0	1,0
14	1,0	1,0	1,1
28	0,9	0,9	1,4
56	1,1	1,0	0,5
39B6-ANK - SE-HPLC 分析后的百分比聚集(%)			
t (天)	参考	5℃	37℃
0	1,0	1,0	1,0
28	0,9	0,9	1,1
56	0,9	0,9	0,7
39B6-ANR - SE-HPLC 分析后的百分比聚集(%)			
t (天)	参考	5℃	37℃
0	1,0	1,1	1,1
28	1,0	1,0	1,3
56	1,0	1,4	1,5

[0462] 当在5℃下储存时,经56 d时间段,对于mAb 39B6-AYE、39B6-AVE和39B6-ANK没有观察到%聚集物水平的变化。观察到的%聚集物水平低-在0.9%和1.1%之间。对于mAb 39B6-ANR观察到聚集物水平从1.1%至1.4%的轻微增加。

[0463] 在37℃下,对于mAb 39B6-AYE和39B6-ANK没有观察到%聚集物水平的变化。对于39B6-ANR,观察到从0d的1.1%轻微增加至56d的1.5%。对于39B6-AVE,观察到%聚集物从0d的1.0%增加至56d的4.4%。

[0464] 如通过SE-HPLC所测量的mAb 39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR的片段峰的存在显示于表21和图6中。由于在56天后仅在37℃下观察到片段峰,仅呈现这些结果。

[0465] 表21:在56天时对于mAb 39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR通过大小排阻色谱监测的%片段形成

[0466]

39B6-AVE - SE-HPLC 分析后的百分比片段化(%)			
t (天)	参考	5℃	37℃
56	0	0	0,3
39B6-AYE - SE-HPLC 分析后的百分比片段化(%)			
t (天)	参考	5℃	37℃
56	0	0	5,7
39B6-ANK - SE-HPLC 分析后的百分比片段化(%)			
t (天)	参考	5℃	37℃
56	0	0	0,2
39B6-ANR - SE-HPLC 分析后的百分比片段化(%)			
t (天)	参考	5℃	37℃
56	0	0	0,3

[0467] 对于mAb 39B6-AVE、39B6-ANK和39B6-ANR,在56天后片段峰的百分比在0.2%和

0.3%之间,而对于mAb 39B6-AYE,片段峰的百分比为5.7%。

[0468] 所有mAb的%单体峰的结果概述于表22中。

[0469] 表22:对于mAb 39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR通过大小排阻色谱监测的单体面积(%)

[0470]

39B6-AVE - SE-HPLC 分析后的百分比单体面积(%)			
t (天)	参考	5℃	37℃
0	99,0	99,0	99,0
7	99,0	98,9	98,8
14	99,0	99,0	97,8
28	99,1	99,1	97,0
56	98,9	98,9	95,3
39B6-AYE - SE-HPLC 分析后的百分比单体面积(%)			
t (天)	参考	5℃	37℃
0	98,8	99,0	99,0
7	99,0	99,0	99,0
14	99,0	99,0	98,9
28	99,1	99,1	98,6
56	98,9	99,0	93,8
39B6-ANK - SE-HPLC 分析后的百分比单体面积(%)			
t (天)	参考	5℃	37℃
0	99,0	99,0	99,0
28	99,1	99,0	98,9
56	99,1	99,1	99,1
39B6-ANR - SE-HPLC 分析后的百分比单体面积(%)			
t (天)	参考	5℃	37℃
0	99,0	98,9	98,9
28	99,0	99,0	98,7
56	99,0	98,6	98,2

[0471] SDS-PAGE

[0472] 用于分析所有抗体的SDS-PAGE结果显示于表23和图8中。

[0473] 表23:对于mAb 39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR通过SDS-PAGE分析和Odyssey扫描估算的全长Ab/重链的总百分比

[0474]

%全长 39B6-AVE						
非还原条件				还原条件		
t (天)	参考	5℃	37℃	参考	5℃	37℃
0	77,2	74,4		96,7	96,6	
7	76,0	78,0	79,8	97,9	98,0	97,8
14	80,3	81,9	79,8	98,4	97,5	97,1
28	82,8	81,9	74,5	96,2	96,1	85,6
56	79,2	80,7	70,7	95,1	94,8	78,6
%全长 39B6-AYE						
非还原条件				还原条件		
t (天)	参考	5℃	37℃	参考	5℃	37℃
0	74,2	74,6		96,4	97,2	
7	76,5	79,6	77,8	98,4	97,8	98,0
14	77,1	77,9	76,9	97,1	96,5	90,8
28	75,6	77,3	73,6	97,0	98,3	90,3
56	73,4	73,4	59,8	96,4	94,7	88,0
%全长 39B6-ANK						
非还原条件				还原条件		
t (天)	参考	5℃	37℃	参考	5℃	37℃
0	74,7	71,3		96,7	96,6	
28	70,8	70,7	74,2	97,0	96,9	89,5
56	79,3	78,5	73,6	96,8	96,7	88,1
%全长 39B6-ANR						
非还原条件				还原条件		
t (天)	参考	5℃	37℃	参考	5℃	37℃
0	76,2	76,5		97,1	96,9	
28	78,1	78,7	73,5	96,9	96,1	84,9
56	74,1	75,7	70,6	95,5	95,6	79,0

[0475] 对于还原和非还原条件两者,对于5℃温度条件,对于任何mAb,均未观察到朝向降解的趋势。

[0476] 在37℃,除了mAb 39B6-AYE以外,对于非还原条件,所有mAb都显示类似的降解速率。与其他mAb相比,该mAb显示最长达28天的类似的降解速率,但证实在第28天和第56天之间更快的降解速率。对于还原条件,所有mAb均显示类似的降解速率。

[0477] Biacore上的靶标结合亲和力

[0478] 通过测量每个时间点的斜率来测试样品在Biacore中的靶标结合活性。将参考样品设置为活性的100%。所有mAb的结果概述于表24和图9中。

[0479] 表24:对于mAb 39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR的Biacore上的百分比活性

[0480]

39B6-AVE – Biacore 上的活性(%)			
t (天)	参考	5℃	37℃
0	100,0%	99,5%	99,5%
7	100,0%	111,7%	113,9%
14	100,0%	93,8%	90,2%
28	100,0%	99,0%	68,0%
56	100,0%	96,9%	31,3%
39B6-AYE – Biacore 上的活性(%)			
t (天)	参考	5℃	37℃
0	100,0%	93,5%	93,5%
7	100,0%	103,1%	101,5%
14	100,0%	97,5%	97,5%
28	100,0%	96,7%	96,1%
56	100,0%	103,5%	104,2%
39B6-ANK – Biacore 上的活性(%)			
t (天)	参考	5℃	37℃
0	100,0%	130,1%	130,1%
28	100,0%	101,1%	77,8%
56	100,0%	100,6%	62,4%
39B6-ANR – Biacore 上的活性(%)			
t (天)	参考	5℃	37℃
0	100,0%	100,9%	100,9%
28	100,0%	129,1%	85,4%
56	100,0%	85,4%	46,3%

[0481] 对于在37℃下储存的mAb样品,仅抗体39B6-AYE经整个56天时段保留靶标结合活性。当在37℃下储存时,所有其他抗体经56天时段都展现靶标结合活性的显著降低。

[0482] 蛋白浓度

[0483] 在NanoDrop上对于每种条件测量所有样品的蛋白浓度。在表25和图10中,显示所有mAb的测量蛋白浓度。

[0484] 表25:mAb 39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR的蛋白浓度 (mg/ml)

[0485]

39B6-AVE – 蛋白浓度(mg/ml)			
t (天)	参考	5℃	37℃
0	1,1	1,0	1,0
7	1,0	1,0	1,1
14	1,0	1,0	1,1
28	1,0	1,0	1,0
56	1,0	1,0	1,1
39B6-AYE – 蛋白浓度(mg/ml)			
t (天)	参考	5℃	37℃
0	1,0	1,0	1,0
7	1,0	1,0	1,0
14	1,0	1,0	1,0
28	1,0	1,0	1,0
56	1,0	1,0	1,0
39B6-ANK – 蛋白浓度(mg/ml)			
t (天)	参考	5℃	37℃
0	1,1	1,1	1,1
28	1,0	1,0	1,1
56	1,1	1,1	1,1
39B6-ANR – 蛋白浓度(mg/ml)			
t (天)	参考	5℃	37℃
0	1,0	1,0	1,0
28	1,0	1,0	1,0
56	1,0	1,0	1,0

[0486] 温度稳定性研究的概述和结论

[0487] 温度稳定性研究揭示测试的四种mAb之间的一些显著差异:在SE HPLC上,在37℃下56天后,对于mAb 39B6-AVE观察到4.4%的聚集,并且对于mAb 39B6-AYE观察到5.7%的片段化。然而,mAb 39B6-AYE的这种片段化不影响Biacore在37℃的靶标结合活性;在56天后,这仍与参考样品一样好。同时,在56天后在37℃清楚地看到mAb 39B6-AVE、39B6-ANK和39B6-ANR的较低靶标结合活性。

[0488] 2.2.2 冷冻-解冻稳定性研究

[0489] 为了监测所述抗体在冷冻-解冻条件下的稳定性,设置如下。将1 ml mAb的等分试样(5 mg/ml)在-20℃下冷冻至少6小时,并在室温下解冻1小时。将该循环重复9次(总共10个冷冻-解冻循环)。通过视觉检查、SE-HPLC、SDS-PAGE、Biacore上的靶标结合活性和蛋白浓度分析样品。对于所有分析平行使用在-20℃下储存的参考样品。由于mAb 39B6-ANR和39B6-ANK具有可能的脱酰胺位点,将它们仅通过视觉检查进行分析。

[0490] 视觉检查

[0491] 冷冻-解冻稳定性研究中的视觉检查的结果显示于表26中。所有mAb均在PBSTw中,其应当给予稳定化作用。

[0492] 表26:对于mAb 39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR的视觉检查冷冻-解冻稳定性

[0493]

	10x FT
样品	
39B6-AVE	B-B-B

39B6-AYE	B-Af-B
39B6-ANK	A-Bf-Bf
39B6-ANR	A-A-B
高聚集对照	C-D-D
PBSTw	B-Af-Bf

[0494] mAb的平均评分如下：

[0495] 39B6-AVE、39B6-AYE和39B-ANK：‘非常少的颗粒’；和

[0496] 39B6-ANR：‘样品是澄清的，无可见颗粒’。

[0497] PBSTw缓冲液被两个人评分为‘非常少的颗粒’，且因此，在39B6-AVE、39B6-AYE和39B-ANK样品中看到的颗粒可能不是蛋白相关的。可以得出结论，在10个冷冻-解冻循环后，所有mAb都保持不变。

[0498] 通过SE-HPLC分析

[0499] 通过SE-HPLC测量蛋白聚集和片段化。

[0500] mAb 39B6-AVE和39B6-AYE的冷冻-解冻稳定性研究的蛋白聚集结果概述于表27中。

[0501] 表27：mAb 39B6-AVE和39B6-AYE的冷冻-解冻稳定性中，通过大小排阻色谱监测的%聚集物形成

	39B6-AVE		39B6-AYE	
样品	参考	10x FT	参考	10x FT
	1,0	1,0	1,0	0,9

[0503] 与参考样品相比，在10个冷冻-解冻循环后，对于任一mAb没有观察到百分比聚集物水平的变化。

[0504] 还检查所有不同注入的单体峰的面积。mAb 39B6-AVE和39B6-AYE的%单体面积结果概述于表28中。

[0505] 表28：mAb 39B6-AVE和39B6-AYE的冷冻-解冻稳定性中，通过大小排阻色谱监测的%单体面积。

	39B6-AVE		39B6-AYE	
样品	参考	10x FT	参考	10x FT
	99,0	99,0	99,0	99,1

[0507] 与参考样品相比，在10个冷冻-解冻循环后，对于两种mAb都没有观察到%单体面积的变化。

[0508] 通过SDS-PAGE分析

[0509] 在非还原和还原条件下，通过SDS-PAGE分析冷冻-解冻样品的完整性。mAb 39B6-AVE和39B6-AYE的结果显示于表29和图11中。

[0510] 表29：对于mAb 39B6-AVE和39B6-AYE在冷冻-解冻稳定性研究中，通过SDS-PAGE分析和Odyssey扫描估算的全长Ab/重链的总百分比

[0511]

%全长 39B6-AVE				
非还原条件			还原条件	
样品	参考	10x FT	参考	10x FT
	78,1	79,3	95,9	96,1
%全长 39B6-AYE				
非还原条件			还原条件	
样品	参考	10x FT	参考	10x FT
	78,8	78,7	96,3	97,0

[0512] 在10个冷冻-解冻循环后,对于两种mAb均未观察到变化。

[0513] 通过Biacore分析靶标结合

[0514] 通过测量10个冷冻-解冻循环后的斜率来测试样品在Biacore中的靶标结合活性。将参考样品设置为活性的100%。mAb 39B6-AVE和39B6-AYE两者的结果显示于图12中。

[0515] 结果证实,在10个冷冻-解冻循环后,未观察到靶标结合活性的变化。

[0516] 蛋白浓度的分析

[0517] 在NanoDrop上测量冷冻-解冻样品的蛋白浓度。在表30中,显示在10个冷冻-解冻循环后mAb 39B6-AVE和39B6-AYE的测量的蛋白浓度。同样,图13显示两种mAb的这些结果。

[0518] 表30:mAb 39B6-AVE和39B6-AYE的冷冻-解冻稳定性中的蛋白浓度(mg/ml)

[0519]

39B6-AVE			39B6-AYE	
样品	参考	10x FT	参考	10x FT
	1,0	1,1	1,0	1,0

[0520] 结论

[0521] 冷冻-解冻稳定性研究未揭示测试的mAb 39B6-AVE和39B6-AYE的任何显著差异。

[0522] 2.2.3 热稳定性研究

[0523] 为了分析解链曲线,将mAb根据以下方案进行加热。在PCR装置中完成热循环后,在Biacore上测试样品的亲和力。

[0524] 使用的方案如下:

[0525] 1) 在研究开始时,将1 ml每种mAb的等分试样储存于-20℃的玻璃小瓶中

[0526] 2) 在储存一周后,将它们解冻一次

[0527] 3) 将mAb如通常稀释在1 mg/ml,且然后进一步稀释至100 µg/ml (10倍稀释度: 200 µl + 1800 µl PBSTw)

[0528] 4) 将稀释的mAb在PCR板中等分(50 µl/孔)

[0529] 5) 保持足够的样品,并且还在5℃下取样作为待平行分析的参考


[0530] 6) 在PCR装置中暴露于下面给出的温度1 h

[0531] 7) 在PCR装置中在25℃下2 h

[0532] 8) 在PCR装置中在4℃下

[0533] 9) 制备4 µg/ml的样品和参考用于分析(25倍稀释液:168 µl Biacore缓冲液+ 7 µl样品)。

[0534] 在梯度PCR装置中运行以下程序:

盖温度		80 °C	 (°C/s)
		54,6 – 71,4	
步骤 1	°C	60 min	
步骤 2	25 °C	120 min	
步骤 3	4 °C	暂停	

[0536] Biacore分析的方案：

[0537] - 使用用~4000 RU人GARP-TGF-β复合物包被的相同CM5芯片

[0538] - 在BIAEvaluation程序中打开曲线,且选择值‘2-1’ (1:空白,2 hGARP-TGF-β)

[0539] - 一次选择一条曲线用于图形重叠

[0540] - 删除曲线的再生部分

[0541] - 选择临注入前的基线,并转换Y-轴用于“选择中值处的零”

[0542] - 从注入后120秒开始且在155秒结束,选择‘一般拟合’

[0543] - 对于IC50的计算:将5°C参考的斜率调整水平为100%。可以计算其他温度(X-轴)的百分比(Y-轴)。

[0544] 测量四种mAb的耐热性,并且结果概述于图14中。将解链温度计算为50%的抗体仍然有功能的温度。将保持在5°C的参考样品设置为活性的100%。解链温度显示于表31中。

[0545] 表31:热稳定性研究中的解链温度

mAb	解链温度
39B6-AVE	67,0°C
39B6-AYE	66,5°C
39B6-ANK	69,1°C
39B6-ANR	68,6°C

[0547] mAb 39B6-ANK和39B6-ANR分别展现最高解链温度:69.13°C和68.55°C。mAb 39B6-AVE和39B6-AYE也分别给出良好的解链温度,66.99°C和66.53°C。所有mAb的所有解链温度都可以被认为是高的。

[0548] 热稳定性研究的结论

[0549] 四种mAb展示了良好的耐热性。解链温度与先前稳定性研究中的原始39B6-A mAb (66.8°C) 相当。

[0550] 2.2.4 旋转稳定性研究

[0551] 对于旋转稳定性研究,设置如下。在研究开始时,将1 ml每种mAb的等分试样储存于-20°C的玻璃小瓶中。在储存一周之后,将等分试样解冻一次,并在室温下以15 rpm倒置(head over head)旋转。

[0552] 将样品在指定的时间点针对颗粒的存在进行评分：

[0553] - 小时:0、3、6、24、30、48、54、72和96。

[0554] 还在96小时后通过SE-HPLC、SDS-PAGE、Biacore上的靶标结合活性和蛋白浓度分析样品。对于所有分析平行使用在-20℃下储存的参考样品。由于mAb 39B6-ANR和39B6-ANK仍具有可能的脱酰胺位点,将它们仅通过视觉检查进行评价。

[0555] 视觉检查

[0556] 旋转稳定性研究中的视觉检查的结果显示于表32中。所有mAb均在PBSTw中,其应当给予稳定化作用。

[0557] 表32:对于mAb 39B6-AVE、39B6-AYE、39B6-ANK和39B6-ANR的视觉检查旋转稳定性研究

[0558]

	0h	3h	6h	24h	30h	48h	54h	72h	96h
样品									
39B6-AVE	Af-B-Bf	Af-B-Bf	Af-B-Bf	Af-Cf-Cf	Af-Bf-Cf	Af-B-Bf	B-B-Bf	B-B-Bf	B-B-Bf
39B6-AYE	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	B-Bf-Bf	B-Bf-Bf
39B6-ANK	Af-Bf-C	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	B-Bf-Cf	B-Bf-Cf	B-Bf-Cf
39B6-ANR	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf
高聚集对照	C-B-C	C-Df-D	C-Df-D	C-Df-Df	C-Df-Df	C-Df-Df	C-Df-Df	D-Df-Df	D-Df-Df
PBSTw	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A

[0559] 发现所有mAb具有‘非常少的颗粒’的平均评分,因此它们在旋转96小时后仍然相对不受影响。在测试的任一实验条件下,PBSTw缓冲液均不含任何颗粒。这表明在抗体样品中观察到的‘非常少的颗粒’是蛋白相关的。

[0560] 通过SE-HPLC分析

[0561] 通过SE-HPLC测量蛋白聚集和片段化。mAb 39B6-AVE和39B6-AYE的旋转稳定性研究的蛋白聚集结果显示于表33中。

[0562] 表33:mAb 39B6-AVE和39B6-AYE的旋转稳定性研究中,通过大小排阻色谱监测的%聚集物形成。

[0563]

	39B6-AVE		39B6-AYE	
样品	参考	96h	参考	96h
	1,1	1,0	1,0	1,0

[0564] 与参考样品相比,在旋转应激后,对于mAb没有观察到%聚集物水平的变化。

[0565] 还检查所有不同注入的单体峰的面积。mAb 39B6-AVE和39B6-AYE的%单体面积结果显示于表34中。

[0566] 表34:mAb 39B6-AVE和39B6-AYE的旋转稳定性研究中,通过大小排阻色谱监测的%单体面积。

[0567]

	39B6-AVE		39B6-AYE	
样品	参考	96h	参考	96h
	98,9	99,0	99,0	99,0

[0568] 与参考样品相比,在旋转96小时后,对于任一mAb都没有观察到%单体面积的变化。

[0569] 对于两种抗体,与参考样品相比,在旋转96小时后没有观察到SE-HPLC谱的变化。

[0570] 通过SDS-PAGE分析

[0571] 在非还原和还原条件下,通过SDS-PAGE分析旋转样品的完整性。mAb 39B6-AVE和

39B6-AYE的结果概述于表35中。

[0572] 表35:对于mAb 39B6-AVE和39B6-AYE在旋转稳定性研究中,通过SDS-PAGE分析和Odyssey扫描估算的全长Ab/重链的总百分比

[0573]

	%全长 39B6-AVE			
	非还原条件		还原条件	
	参考	96 小时	参考	96 小时
样品	81,3	76,6	91,0	90,7
	%全长 39B6-AYE			
	非还原条件		还原条件	
样品	参考	96 小时	参考	96 小时
	76,2	79,0	91,5	92,6

[0574] 旋转96小时后,两种mAb的SDS-PAGE凝胶可见于图15中。旋转96小时后,对于任一抗体都没有观察到变化。

[0575] 在Biacore中分析靶标结合

[0576] 通过测量旋转96小时后的斜率来测试样品在Biacore中的靶标结合活性。将参考样品设置为活性的100%。mAb 39B6-AVE和39B6-AYE两者的结果显示于图16中。

[0577] 蛋白浓度的分析

[0578] 在NanoDrop上测量旋转样品的蛋白浓度。在表36中,显示在旋转96小时后mAb 39B6-AVE和39B6-AYE的测量的蛋白浓度。同样,图17显示两种mAb的这些结果。

[0579] 表36 mAb 39B6-AVE和39B6-AYE的旋转稳定性中的蛋白浓度 (mg/ml)

[0580]	39B6-AVE		39B6-AYE	
	参考	96h	参考	96h
	1,0	1,1	1,0	1,1

[0581] 旋转96小时后,对于两种mAb均未观察到蛋白损失。

[0582] 旋转稳定性研究的结论

[0583] 旋转稳定性研究未揭示测试的mAb 39B6-AVE和39B6-AYE之间的任何差异。

[0584] 2.2.5通过肽作图的一级序列分析

[0585] 使用胰蛋白酶肽作图RP-HPLC-UV-MS方法分析来自温度、冷冻-解冻和旋转稳定性研究的样品,以鉴定蛋白(肽)水平上的修饰(脱酰胺、异构化和氧化)。

[0586] 通过位置N95的突变,在mAb 39B6-AVE和39B6-AYE中工程改造位置95-96处(氨基酸NE)的重链CDR3中的脱酰胺。该脱酰胺位点仍存在于mAb 39B6-ANK和39B6-ANR中,并且在温度稳定性研究以及冷冻-解冻和旋转稳定性研究中,在5℃和37℃下28天后均检测到显著的脱酰胺/异构化。结论是,通过在N95的下游引入大体积的带正电荷的残基无法防止脱酰胺。

[0587] 在重链的CDR3的位置100f处,存在对高结合亲和力至关重要的甲硫氨酸。温度、冷冻-解冻和旋转稳定性研究已证实,mAb 39B6-AYE和39B6-ANK中未发生M100f的氧化,而对于mAb 39B6-AVE和39B6-ANR仍观察到氧化。这证实位置95和96处的氨基酸影响对下游甲硫氨酸的氧化的敏感性。表37显示通过胰蛋白酶消化产生的覆盖重链CDR3的肽的氧化和脱酰胺的水平概述。

[0588] 表37 重链CDR3内的肽的氧化和脱酰胺的程度

[0589]

	氧化(%)				脱酰胺(%)			
	5℃ 第 28 天	37℃ 第 28 天	旋转 (96h)	冷冻-解冻 (10x)	5℃ 第 28 天	37℃ 第 28 天	旋转 (96h)	冷冻-解冻 (10x)
39B6-AVE	1.08	10.51	1.58	3.47	0	0	0	0
39B6-AYE	低于定量限值(LOQ)				0	0	0	0
39B6-ANK	低于定量限值(LOQ)				4.72	11.15	3.5	4.75
39B6-ANR	9.20	20.98	19.37	12.47	12.85	34.38	12.79	12.77

[0590] * 低于定量限值 (LOQ)=氧化形式的强度接近于背景。

[0591] N95的脱酰胺和异构化的相对量以及在37℃下储存的变体的相对结合活性描绘于图18中。原始39B6-A也展现图中(标记为39B6-ANE)。由于N95已在mAb 39B6-AVE和39B6-AYE中突变,所以脱酰胺和异构化水平为零,且因此不包括在内。N95的脱酰胺和对于mAb 39B6-ANK和39B6-ANR观察到的较低靶标结合活性之间的相关性表明N95脱酰胺负面影响mAb与其靶标的结合。

[0592] 结论

[0593] GARP-TGF-β1抗体变体39B6-AYE是特别好的GARP-TGF-β1抗体以用于临床开发,因为:

[0594] - 保留与其靶标GARPTGF-β1复合物的高亲和力结合;

[0595] - 在SMAD2磷酸化测定中展现良好的功效;

[0596] - 不经历CDR3中的脱酰胺或异构化

[0597] - 不经历CDR3中的氧化

[0598] - 展现高度人同源性(95%)

[0599] - 展现与39B6-A相比改善的稳定性,如通过不同的稳定性测定法所测量。

[0600] 39B6-AYE的CDR和可变结构域序列显示于下表38和39中。全长重链和轻链序列显示于表40中。编码VH和VL结构域以及全长重链和轻链的多核苷酸序列显示于表41中。

[0601] 表38:39B6-AYE的VH和VL CDR序列

[0602]

39B6-AYE			SEQ ID NO:
VH	CDR1	SYIID	4
	CDR2	RIDPEDAGTKYAQKFQG	12
	CDR3	YEWETVVVGDLMEYEEY	13
VL	CDR1	QASQSISSYLA	9
	CDR2	GASRLKT	10
	CDR3	QQYASVPVT	11

[0603] 表39:39B6-AYE的VH和VL结构域序列

[0604]

39B6-AYE		SEQ ID NO:
VH	QVQLVQPGAQEVKPGASVKVSKASGYRFTSYIIDW VRQAPGQGLEWMGRIDPEDAGTKYAQKFQGRVTM TADTSTSTVYVELSSLRSEDAVYYCARYEWETVVV GDLMEYEEYWGQGLTLTVSS	14
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSYLAWYQ QKPGQAPKILYIGASRLKTGVPSRFSGSGSGTSFTLT SSLEPEDAATYYCQQYASVPVTFGQGTKVEIK	15

[0605] 表40:39B6-AYE的重链和轻链序列

[0606]

39B6-AYE		SEQ ID NO:
重链	QVQLVQPGAEVRKPGASVKVSCKASGYRFTSYIIDW VRQAPGQGLEWMGRIDPEDAGTKYAQKFQGRVTM TADTSTSTVYVELSSLRSEDTAVYYCARYEWETVVV GDLMEYEEYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLG	16
轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSYLAWYQ QKPGQAPKILIYGASRLKTGVPSRFSGSGSGTSFTLT SSLEPEDAATYYCQYASVPVTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC	17

[0607] 表41:编码39B6-AYE的多核苷酸序列

		SEQ ID NO:
VH	CAAGTCCAACCTTGTCCAACCGGGGGCGGAAGTGC GGAAGCCGGGGGCGAGCGTGAAAGTCTCGTGCAA GGCATCGGGATACCGATTACATCATATTACATCG ACTGGGTCAAGCAAGCGCCGGGGCAAGGGCTGGA ATGGATGGGGCGGATCGACCCGGAGGATGCCGGG ACGAAATATGCGCAAAAATTCCAAGGGCGCGTCA CGATGACGGCCGACACATCGACGAGCACGGTATA CGTGGAGCTGAGCTCGCTGAGGAGCGAGGACACC GCGGTATACTACTGCGCGCGATACGAATGGGAGA CCGTCGTCGTCGGGGACCTGATGTACGAATACGA ATACTGGGGGCAAGGGACGCTTGTACGGTCTCG AGC	18
VL	GACATCCAGATGACTCAGAGCCCTTCCAGCCTGAG CGCCTCTGTGGGAGATAGAGTCACCATCACATGCC AGGCTAGTCAGTCAATTTCTAGTTACCTGGCATGG TATCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCACCTAAAATCCT GATCTACGGAGCCAGTAGGCTGAAGACAGGGGTG CCATCTCGGTTCTCCGGCAGCGGATCTGGGACATC CTTTACTCTGACCATCTCATCCCTGGAGCCAGAAG ACGCCGCTACATACTATTGTCAGCAGTATGCTTCC GTGCCCGTCACATTCCGTCAGGGGCACTAAGGTCC AGATCAAG	19
重链	CAAGTCCAACCTTGTCCAACCGGGGGCGGAAGTGC GGAAGCCGGGGGCGAGCGTGAAAGTCTCGTGCAA GGCATCGGGATACCGATTACATCATATTACATCG ACTGGGTCAAGCAAGCGCCGGGGCAAGGGCTGGA ATGGATGGGGCGGATCGACCCGGAGGATGCCGGG ACGAAATATGCGCAAAAATTCCAAGGGCGCGTCA CGATGACGGCCGACACATCGACGAGCACGGTATA CGTGGAGCTGAGCTCGCTGAGGAGCGAGGACACC GCGGTATACTACTGCGCGCGATACGAATGGGAGA CCGTCGTCGTCGGGGACCTGATGTACGAATACGA ATACTGGGGGCAAGGGACGCTTGTACGGTCTCG AGCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCT GGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCTACCG CCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAAGACTACTTCCCC GAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTCTGGCGCCC TGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTG CAATCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGT GACAGTGCCCTCCTCCAGCCTGGGCACCAAGACC TACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACAC CAAGGTGGACAAGCGGGTGAATCTAAATACGGC CCTCCCTGCCCCCCTGCCCTGCCCTGAATTTCT GGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCCAAAGC CCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGA AGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAA GATCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTATGTTGACG GCGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCAG AGAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTG TCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAA	20

[0608]

[0609]

	GGGCCTGCCCTCCAGCATCGAAAAGACCATCTCCA AGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTA CACCCCTGCCCCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAAGGCTT CTACCCCTCCGACATTGCCGTGGAATGGGAGTCCA ACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCC CCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGT ACTCTCGGCTGACAGTGGATAAGTCCCGGTGGCA GGAAGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCAC GAGGCCCTGCACAACCACTATACCCAGAAGTCCCT GTCCCTGAGCCTGGGC	
轻链	GACATCCAGATGACTCAGAGCCCTTCCAGCCTGAG CGCCTCTGTGGGAGATAGAGTCACCATCACATGCC AGGCTAGTCAGTCAATTTCTAGTTACCTGGCATGG TATCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCACCTAAAATCCT GATCTACGGAGCCAGTAGGCTGAAGACAGGGGTG CCATCTCGGTTCTCCGGCAGCGGATCTGGGACATC CTTTACTCTGACCATCTCATCCCTGGAGCCAGAAG ACGCCGCTACATACTATTGTCAGCAGTATGCTTCC GTGCCCGTCACATTCGGTCAGGGCACTAAGGTCG AGATCAAGCGTACGGTCGCGGCGCCTTCTGTGTTT ATTTTCCCCCATCTGATGAACAGCTGAAATCTGG CACTGCTTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAACCTTCT ACCCTAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGGAAGTGGGA CAATGCTCTGCAGAGTGGGAATTCCCAGGAATCTG TCACTGAGCAGGACTCTAAGGATAGCACATACTCC CTGTCCTCTACTCTGACACTGAGCAAGGCTGATTA CGAGAAACACAAAGTGACGCCTGTGAAGTCACA CATCAGGGGCTGTCTAGTCCTGTGACCAAATCCTT CAATAGGGGAGAGTG	21

[0610] 实施例3:39B6-AYE (ARGX-115)的批次测试

[0611] 经三个月时段测试ARGX-115的中试原料药批次的稳定性。将中试原料药批次的测试样品储存在-70℃的预期储存条件,+5℃的加速储存条件和+25℃的应激储存条件。中试原料药呈现于如下制剂中:10 mM组氨酸/组氨酸盐酸盐,200 mM蔗糖,40 mM精氨酸,0.03% (w/v) 聚山梨酸酯80 (pH 6.0)且蛋白浓度为 20.0 ± 2.0 mg/ml。

[0612] 证实ARGX-115中试原料药批次当在-70℃的预期储存条件下储存时稳定三个月。还确定SPR结合活性作为稳定性的量度。结合活性被表示为保持在-70℃的参考样品的结合活性的百分比。

[0613] 结果显示于下表42中。

[0614]

方法	样品	结果
ARGX115 Biacore	T3M +5℃	101%
	T3M -70℃	106%
	T3M +25℃	107%

[0615] 这些结果证实ARGX-115经延长的存储期是稳定的。

[0616] 实施例4:ARGX-115与GARP-TGF-β复合物的结合的表征

[0617] 4.1成熟的TGF-β对于ARGX-115结合至关重要

[0618] 本质上,GARP-TGF-β复合物(GARP与潜伏TGF-β复合)在内质网中形成,其中GARP和潜伏TGFβ之间具有共价半胱氨酸相互作用(二硫桥)。然后将该复合物展示在细胞表面上。在体外,GARP-TGF-β复合物可以由重组人GARP和重组人潜伏TGF-β (C33S)-3xstrep-标签形成。潜伏TGF-β的C33S突变型形式不像天然复合物中存在那样与GARP(或任何潜伏TGF-β

结合蛋白 (LTBP)) 形成共价相互作用。

[0619] 为了证实ARGX-115与重组GARP和重组潜伏TGF β (C33S) 的体外形成的复合物的结合, 将重组GARP包被至ELISA板 (在4℃下用1 μ g/mL人GARP包被过夜), 用封闭剂 (酪蛋白-PBS) 封闭, 并通过包被的GARP捕获潜伏TGF- β (5 μ g/mL 1h RT)。使ARGX-115和同种型对照抗体 (1 μ g/mL, 在室温下, 1h) 结合复合物, 并用HRP缀合的抗人IgG进行检测。如图19中所示, ARGX-115与GARP-潜伏TGF- β (C33S) 复合物结合, 而同种型对照则没有。还发现该测定法换另一种方式仍然工作。将ELISA板用ARGX-115或同种型对照抗体 (1 μ g/mL, 在4℃下过夜) 包被, 并用封闭剂 (酪蛋白-PBS) 封闭。通过包被的ARGX-115抗体捕获重组GARP (5 μ g/mL), 洗涤板, 并捕获重组潜伏TGF- β (C33S) -3xstrep-标签 (5 μ g/mL), 并用链霉抗生物素蛋白-HRP检测。HRP活性仅在ARGX-115存在的情况下检测到, 而在用同种型对照包被的板的孔中未检测到。

[0620] 为了测试ARGX-115与GARP和TGF- β 的潜伏相关肽 (LAP) 的复合物的结合, 形成重组GARP和重组LAP之间的复合物。将ELISA板用重组GARP (1 μ g/mL, 4℃过夜) 包被, 用封闭剂 (酪蛋白-PBS) 封闭, 并在包被的重组GARP上捕获LAP (5 μ g/mL)。用抗LAP-HRP检测到LAP结合。抗LAP-HRP的结合证实GARP-LAP复合物确实在体外形成。然而, ARGX-115没有显示与GARP-LAP复合物的任何结合。此外, 当ELISA板用ARGX-115 (1 μ g/mL, 4℃过夜) 包被时, 添加重组GARP (5 μ g/mL), 随后添加LAP (5 μ g/mL), 未测量到抗LAP-HRP的结合。这些结果证实, 成熟TGF- β 是ARGX-115与GARP-TGF- β 复合物的结合所需的。

[0621] 4.2 与GARP复合的hTGF- β 中的突变对ARGX-115的中和活性的影响

[0622] 用3种质粒的混合物 (质粒混合物) 瞬时转染稳定表达整联蛋白 α v β 6的293T细胞 (293Tc1.ITGB6): (i) CAGA-luc报告质粒; (ii) 人GARP (pEF-BOS-puro-hGARP); 和 (iii) WT人TGF- β 或突变型TGF- β (pDisplay)。整联蛋白 α v β 6是两种TGF- β -活化整联蛋白之一。从半汇合的75cm²烧瓶分离并收获293Tc1.ITGB6细胞, 计数并稀释至1E+06个细胞/mL, 并且每个eppendorf管分配1mL。将250 μ l质粒混合物添加至每个管用于转染。转染后立即将转染的细胞以每孔50 μ l (4E+04个细胞) 分配于96-孔光学板中, 所述孔含有不同的测试mAb (ARGX-115、LHG10.6、1D11和MHG-8, 100 μ l/mL)。1D11是针对TGF- β 同种型-1、-2和-3的活性形式的mAb。MHG-8和LHG10.6描述于W02015/015003和W02016/125017中。在37℃下孵育24h之后, 测量荧光素酶活性。用突变型TGF- β 的转染获得的值表示为对于WT-TGF- β 获得的值的百分比。结果显示于图20中。如从图中可见, 测量的ARGX-115针对包括R58A取代的TGF- β 突变体和包括K338E取代的TGF- β 突变体的中和活性显著降低。这表明, GARP-TGF- β 复合物中的这两个残基对于ARGX-115的中和活性特别重要。

序列表

<110> argenx BVBA
 <120> GARP-TGF- β 抗体
 <130> N415743W0
 <140> PCT/EP2018/062251
 <141> 2018-05-11
 <150> GB1707561.5
 <151> 2017-05-11
 <160> 48
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 大羊驼(Llama glama)
 <400> 1

[0001]

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Arg	Asn	Ser	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Arg	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Ile	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Gly	Thr	Lys	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Phe	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75						80
Val	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Asn	Glu	Trp	Glu	Thr	Val	Val	Val	Gly	Asp	Leu	Met	Tyr	Glu
			100					105					110		
Tyr	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115					120					125			

<210> 2
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 大羊驼(Llama glama)

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Ala
65 70 75 80

[0002] Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Leu Pro Val
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
100 105

<210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 大羊驼(Llama glama)

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Asn Ile Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ser Val Pro Val
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
100 105

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 大羊驼(Llama glama)

<400> 4

Ser Tyr Tyr Ile Asp
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 大羊驼(Llama glama)

[0003]

<400> 5

Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> 大羊驼(Llama glama)

<400> 6

Asn Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Met Tyr Glu Tyr Glu
1 5 10 15

Tyr

<210> 7
<211> 17
<212> PRT

<213> 大羊驼 (Llama glama)

<400> 7

Arg	Ile	Asp	Pro	Glu	Glu	Gly	Gly	Thr	Lys	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> 大羊驼 (Llama glama)

<400> 8

Arg	Ile	Asp	Pro	Glu	Asp	Ala	Gly	Thr	Lys	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

[0004]

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> 大羊驼 (Llama glama)

<400> 9

Gln	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala
1			5						10	

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 大羊驼 (Llama glama)

<400> 10

Gly	Ala	Ser	Arg	Leu	Lys	Thr
1			5			

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 大羊驼 (Llama glama)

<400> 11

Gln Gln Tyr Ala Ser Val Pro Val Thr

1 5

<210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 抗体片段

<400> 12

Arg Ile Asp Pro Glu Asp Ala Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工的

[0005] <220>
 <223> 抗体片段

<400> 13

Tyr Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Met Tyr Glu Tyr Glu
 1 5 10 15

Tyr

<210> 14
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 抗体片段

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Ala Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Val Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Met Tyr Glu
100 105 110

Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

[0006]

<213> 人工的

<220>

<223> 抗体片段

<400> 15

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Ile Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ser Val Pro Val
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 16
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 抗体片段

<400> 16

Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

[0007] Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Ala Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Val Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Met Tyr Glu
100 105 110

Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
130 135 140

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr
195 200 205

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
210 215 220

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

[0008]

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
325 330 335

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Gly
450

<210> 17

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 抗体片段

<400> 17

[0009] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Ile Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ser Val Pro Val
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

[0010] <210> 18
<211> 378
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 抗体片段

<400> 18
caagtccaac ttgtccaacc gggggcggaa gtgcggaagc cgggggcgag cgtgaaagtc 60
tcgtgcaagg catcgggata ccgattcaca tcatattaca tcgactgggt caggcaagcg 120
ccggggcaag ggctggaatg gatggggcgg atcgaccgag aggatgccgg gacgaaatat 180
gcgcaaaaat tccaaggcg cgtcacgatg acggccgaca catcgacgag cacggtatac 240
gtggagctga gctcgctgag gagcgaggac accgcggtat actactgcgc gcgatacgaa 300
tgggagaccg tcgtcgctcg ggacctgatg tacgaatacg aatactgggg gcaagggacg 360
cttgtcacgg tctcgagc 378

<210> 19
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 抗体片段

	<400> 19	
	gacatccaga tgactcagag cccttcagc ctgagcgcct ctgtgggaga tagagtcacc	60
	atcacatgcc aggctagtca gtcaatttct agttacctgg catggtatca gcagaagcct	120
	ggccaggcac ctaaaatcct gatctacgga gccagtaggc tgaagacagg ggtgccatct	180
	cggttctccg gcagcggatc tgggacatcc ttactctga ccatctcatc cctggagcca	240
	gaagacgccg ctacatacta ttgtcagcag tatgcttccg tgcccgtcac attcggtcag	300
	ggcactaagg tcgagatcaa g	321
	<210> 20	
	<211> 420	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 抗体片段	
	<400> 20	
	caagtccaac ttgtccaacc gggggcggaa gtgcggaagc cgggggcgag cgtgaaagtc	60
	tcgtgcaagg catcgggata ccgattcaca tcatattaca tcgactgggt caggcaagcg	120
[0011]	ccggggcaag ggctggaatg gatggggcgg atcgaccgag aggatgccgg gacgaaatat	180
	gcgcaaaaat tccaaggcg cgtcacgatg acggccgaca catcgacgag cacggtatac	240
	gtggagctga gctcgctgag gagcgaggac accgcggtat actactgcgc gcgatacgaa	300
	tgggagaccg tcgtcgctgg ggacctgatg tacgaatacg aatactgggg gcaagggacg	360
	cttgtcacgg tctcgagcgc tagcaccaag ggcccctccg tgttccccct ggccccttgc	420
	<210> 21	
	<211> 936	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 抗体片段	
	<400> 21	
	tcccggtcca cctccgagtc taccgccgct ctgggctgcc tggtgaaaga ctacttcccc	60
	gagcctgtga ccgtgagctg gaactctggc gccctgacct ccggcgtgca caccttccct	120
	gccgtgctgc aatcctccgg cctgtactcc ctgtcctccg tggtagacagt gccctcctcc	180
	agcctgggca ccaagacctc cacctgtaac gtggaccaca agccctccaa caccaagggtg	240
	gacaagcggg tggaatctaa atacggccct ccctgcccc cctgccctgc ccctgaattt	300

```

ctgggcggac cttccgtgtt tctgttcccc ccaaagccca aggacaccct gatgatctcc 360
cggacccccg aagtgacctg cgtggtggtg gacgtgtccc aggaagatcc agaggatgcag 420
ttcaactggt atgttgacgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa 480
cagttcaact ccacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 540
aacggcaaag agtacaagtg caagggtgcc aacaagggcc tgccctccag catcgaaaag 600
accatctcca aggccaaggg ccagccccgc gagccccagg tgtacaccct gccccctagc 660
caggaagaga tgaccaagaa ccagggtgcc ctgacctgtc tggtgaaagg cttctacccc 720
tccgacattg ccgtggaatg ggagtccaac ggccagcccc agaacaacta caagaccacc 780
ccccctgtgc tggactccga cggtctcttc ttctgtact ctcggtgac agtggataag 840
tcccggtggc aggaaggcaa cgtgttctcc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac 900
cactataccc agaagtcctt gtcctgagc ctgggc 936

```

<210> 22
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工的

[0012]

<220>
 <223> 抗体片段

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Val Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asn Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Met Tyr Glu
100 105 110

Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 23
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 抗体片段

<400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

[0013] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Ile Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ser Val Pro Val
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 24
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 抗体片段

<400> 24

Glu Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Glu Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Val Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Thr Tyr Glu
100 105 110

[0014]

Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 抗体片段

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Ile Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ser Val Pro Val
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 26
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 抗体片段

<400> 26

Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Leu Arg Asn Pro Gly Ala
1 5 10 15

[0015] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Met Tyr Glu
100 105 110

Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 27
<211> 107

<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 抗体片段

<400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

[0016]

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ser Val Pro Val
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 28
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 抗体片段

<400> 28

Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Ala Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Val Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Thr Tyr Glu
100 105 110

Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 29

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 抗体片段

[0017]

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Lys Thr Glu Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ile Ser Gly Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ser Val Pro Val Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 30
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 抗体片段

<400> 30

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Glu Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

[0018] Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asn Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Met Tyr Glu
 100 105 110

Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 31
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 抗体片段

<400> 31

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Asn Ile Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ser Val Pro Val
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

[0019] <213> 人工的

<220>

<223> 抗体片段

<400> 32

Asn Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Thr Tyr Glu Tyr Glu
1 5 10 15

Tyr

<210> 33

<211> 662

<212> PRT

<213> 智人

<400> 33

Met Arg Pro Gln Ile Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Thr Leu Gly Leu
1 5 10 15

Ala Ala Gln His Gln Asp Lys Val Pro Cys Lys Met Val Asp Lys Lys
20 25 30

Val Ser Cys Gln Val Leu Gly Leu Leu Gln Val Pro Ser Val Leu Pro
35 40 45

Pro Asp Thr Glu Thr Leu Asp Leu Ser Gly Asn Gln Leu Arg Ser Ile
50 55 60

Leu Ala Ser Pro Leu Gly Phe Tyr Thr Ala Leu Arg His Leu Asp Leu
65 70 75 80

Ser Thr Asn Glu Ile Ser Phe Leu Gln Pro Gly Ala Phe Gln Ala Leu
85 90 95

Thr His Leu Glu His Leu Ser Leu Ala His Asn Arg Leu Ala Met Ala
100 105 110

Thr Ala Leu Ser Ala Gly Gly Leu Gly Pro Leu Pro Arg Val Thr Ser
115 120 125

Leu Asp Leu Ser Gly Asn Ser Leu Tyr Ser Gly Leu Leu Glu Arg Leu
130 135 140

[0020]

Leu Gly Glu Ala Pro Ser Leu His Thr Leu Ser Leu Ala Glu Asn Ser
145 150 155 160

Leu Thr Arg Leu Thr Arg His Thr Phe Arg Asp Met Pro Ala Leu Glu
165 170 175

Gln Leu Asp Leu His Ser Asn Val Leu Met Asp Ile Glu Asp Gly Ala
180 185 190

Phe Glu Gly Leu Pro Arg Leu Thr His Leu Asn Leu Ser Arg Asn Ser
195 200 205

Leu Thr Cys Ile Ser Asp Phe Ser Leu Gln Gln Leu Arg Val Leu Asp
210 215 220

Leu Ser Cys Asn Ser Ile Glu Ala Phe Gln Thr Ala Ser Gln Pro Gln
225 230 235 240

Ala Glu Phe Gln Leu Thr Trp Leu Asp Leu Arg Glu Asn Lys Leu Leu
245 250 255

	His	Phe	Pro	Asp	Leu	Ala	Ala	Leu	Pro	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Asn	Leu	
				260					265					270			
	Ser	Asn	Asn	Leu	Ile	Arg	Leu	Pro	Thr	Gly	Pro	Pro	Gln	Asp	Ser	Lys	
		275						280					285				
	Gly	Ile	His	Ala	Pro	Ser	Glu	Gly	Trp	Ser	Ala	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala	
		290					295					300					
	Pro	Ser	Gly	Asn	Ala	Ser	Gly	Arg	Pro	Leu	Ser	Gln	Leu	Leu	Asn	Leu	
	305					310					315					320	
	Asp	Leu	Ser	Tyr	Asn	Glu	Ile	Glu	Leu	Ile	Pro	Asp	Ser	Phe	Leu	Glu	
				325						330					335		
	His	Leu	Thr	Ser	Leu	Cys	Phe	Leu	Asn	Leu	Ser	Arg	Asn	Cys	Leu	Arg	
			340						345					350			
	Thr	Phe	Glu	Ala	Arg	Arg	Leu	Gly	Ser	Leu	Pro	Cys	Leu	Met	Leu	Leu	
		355						360					365				
[0021]	Asp	Leu	Ser	His	Asn	Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Glu	Leu	Gly	Ala	Arg	Ala	
	370						375					380					
	Leu	Gly	Ser	Leu	Arg	Thr	Leu	Leu	Leu	Gln	Gly	Asn	Ala	Leu	Arg	Asp	
	385					390					395					400	
	Leu	Pro	Pro	Tyr	Thr	Phe	Ala	Asn	Leu	Ala	Ser	Leu	Gln	Arg	Leu	Asn	
				405						410					415		
	Leu	Gln	Gly	Asn	Arg	Val	Ser	Pro	Cys	Gly	Gly	Pro	Asp	Glu	Pro	Gly	
			420						425					430			
	Pro	Ser	Gly	Cys	Val	Ala	Phe	Ser	Gly	Ile	Thr	Ser	Leu	Arg	Ser	Leu	
		435						440					445				
	Ser	Leu	Val	Asp	Asn	Glu	Ile	Glu	Leu	Leu	Arg	Ala	Gly	Ala	Phe	Leu	
		450					455					460					
	His	Thr	Pro	Leu	Thr	Glu	Leu	Asp	Leu	Ser	Ser	Asn	Pro	Gly	Leu	Glu	
	465					470					475					480	
	Val	Ala	Thr	Gly	Ala	Leu	Gly	Gly	Leu	Glu	Ala	Ser	Leu	Glu	Val	Leu	

	485	490	495
	Ala Leu Gln Gly Asn Gly Leu Met Val Leu Gln Val Asp Leu Pro Cys 500 505 510		
	Phe Ile Cys Leu Lys Arg Leu Asn Leu Ala Glu Asn Arg Leu Ser His 515 520 525		
	Leu Pro Ala Trp Thr Gln Ala Val Ser Leu Glu Val Leu Asp Leu Arg 530 535 540		
	Asn Asn Ser Phe Ser Leu Leu Pro Gly Ser Ala Met Gly Gly Leu Glu 545 550 555 560		
	Thr Ser Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Gln Gly Asn Pro Leu Ser Cys Cys 565 570 575		
	Gly Asn Gly Trp Leu Ala Ala Gln Leu His Gln Gly Arg Val Asp Val 580 585 590		
[0022]	Asp Ala Thr Gln Asp Leu Ile Cys Arg Phe Ser Ser Gln Glu Glu Val 595 600 605		
	Ser Leu Ser His Val Arg Pro Glu Asp Cys Glu Lys Gly Gly Leu Lys 610 615 620		
	Asn Ile Asn Leu Ile Ile Ile Leu Thr Phe Ile Leu Val Ser Ala Ile 625 630 635 640		
	Leu Leu Thr Thr Leu Ala Ala Cys Cys Cys Val Arg Arg Gln Lys Phe 645 650 655		
	Asn Gln Gln Tyr Lys Ala 660		
	<210> 34 <211> 390 <212> PRT <213> 智人		
	<400> 34		
	Met Pro Pro Ser Gly Leu Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu 1 5 10 15		

Trp Leu Leu Val Leu Thr Pro Gly Arg Pro Ala Ala Gly Leu Ser Thr
20 25 30

Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg Ile Glu Ala
35 40 45

Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser Pro Pro Ser
50 55 60

Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val Leu Ala Leu
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala Glu Pro Glu
85 90 95

Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr Arg Val Leu
100 105 110

Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys Gln Ser Thr
115 120 125

[0023]

His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg Glu Ala Val
130 135 140

Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu Leu Arg Leu
145 150 155 160

Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys Tyr Ser Asn
165 170 175

Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro Ser Asp Ser
180 185 190

Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg Gln Trp Leu
195 200 205

Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala His Cys Ser
210 215 220

Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn Gly Phe Thr
225 230 235 240

	Thr	Gly	Arg	Arg	Gly	Asp	Leu	Ala	Thr	Ile	His	Gly	Met	Asn	Arg	Pro	
					245					250					255		
	Phe	Leu	Leu	Leu	Met	Ala	Thr	Pro	Leu	Glu	Arg	Ala	Gln	His	Leu	Gln	
				260					265					270			
	Ser	Ser	Arg	His	Arg	Arg	Ala	Leu	Asp	Thr	Asn	Tyr	Cys	Phe	Ser	Ser	
			275					280					285				
	Thr	Glu	Lys	Asn	Cys	Cys	Val	Arg	Gln	Leu	Tyr	Ile	Asp	Phe	Arg	Lys	
		290					295					300					
	Asp	Leu	Gly	Trp	Lys	Trp	Ile	His	Glu	Pro	Lys	Gly	Tyr	His	Ala	Asn	
	305					310					315					320	
	Phe	Cys	Leu	Gly	Pro	Cys	Pro	Tyr	Ile	Trp	Ser	Leu	Asp	Thr	Gln	Tyr	
					325					330					335		
	Ser	Lys	Val	Leu	Ala	Leu	Tyr	Asn	Gln	His	Asn	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	
				340					345					350			
[0024]	Ala	Pro	Cys	Cys	Val	Pro	Gln	Ala	Leu	Glu	Pro	Leu	Pro	Ile	Val	Tyr	
			355					360					365				
	Tyr	Val	Gly	Arg	Lys	Pro	Lys	Val	Glu	Gln	Leu	Ser	Asn	Met	Ile	Val	
		370					375					380					
	Arg	Ser	Cys	Lys	Cys	Ser											
	385					390											
	<210>	35															
	<211>	249															
	<212>	PRT															
	<213>	智人															
	<400>	35															
	Leu	Ser	Thr	Cys	Lys	Thr	Ile	Asp	Met	Glu	Leu	Val	Lys	Arg	Lys	Arg	
	1				5					10					15		
	Ile	Glu	Ala	Ile	Arg	Gly	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Arg	Leu	Ala	Ser	
				20					25					30			
	Pro	Pro	Ser	Gln	Gly	Glu	Val	Pro	Pro	Gly	Pro	Leu	Pro	Glu	Ala	Val	
			35					40					45				

Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala
50 55 60

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr
65 70 75 80

Arg Val Leu Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys
85 90 95

Gln Ser Thr His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg
100 105 110

Glu Ala Val Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu
115 120 125

Leu Arg Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys
130 135 140

Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro
145 150 155 160

[0025]

Ser Asp Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg
165 170 175

Gln Trp Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala
180 185 190

His Cys Ser Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn
195 200 205

Gly Phe Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met
210 215 220

Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln
225 230 235 240

His Leu Gln Ser Ser Arg His Arg Arg
245

<210> 36
<211> 112
<212> PRT

<213> 智人

<400> 36

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro
85 90 95

[0026] Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
100 105 110

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 37

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
1 5 10

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 38

Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 39

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1 5

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 40

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr
1 5 10

<210> 41

<211> 50

<212> PRT

<213> 智人

<400> 41

Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys
1 5 10 15

[0027]

Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
35 40 45

Cys Pro
50

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 42

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 43

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
1 5

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 44

Cys Pro Ser Cys Pro
1 5

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 45

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
1 5

[0028]

<210> 46

<211> 3

<212> PRT

<213> 智人

<400> 46

Glu Arg Lys
1

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 47

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 48

[0029]

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
1 5

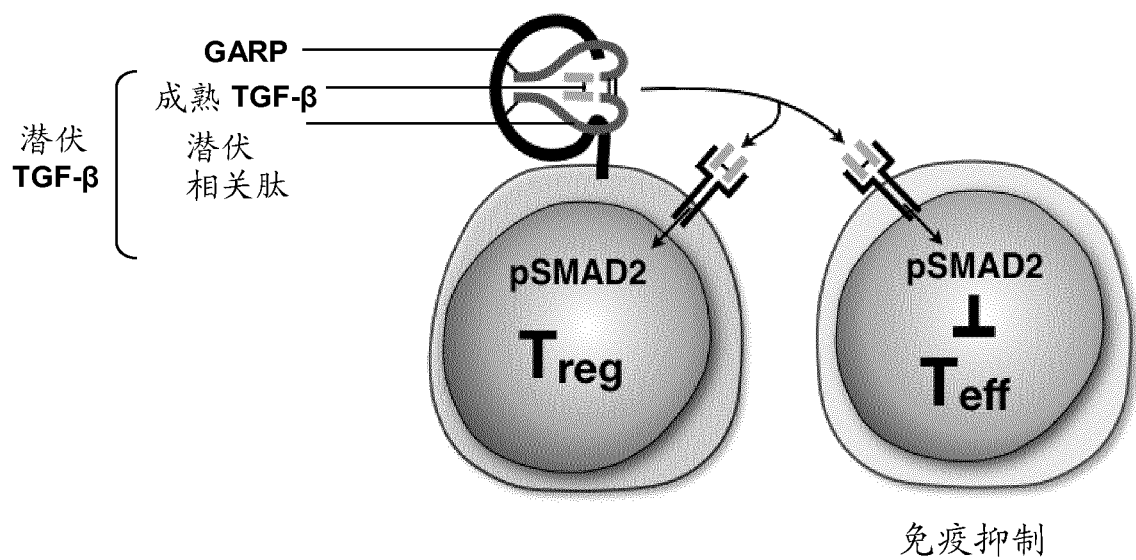


图 1

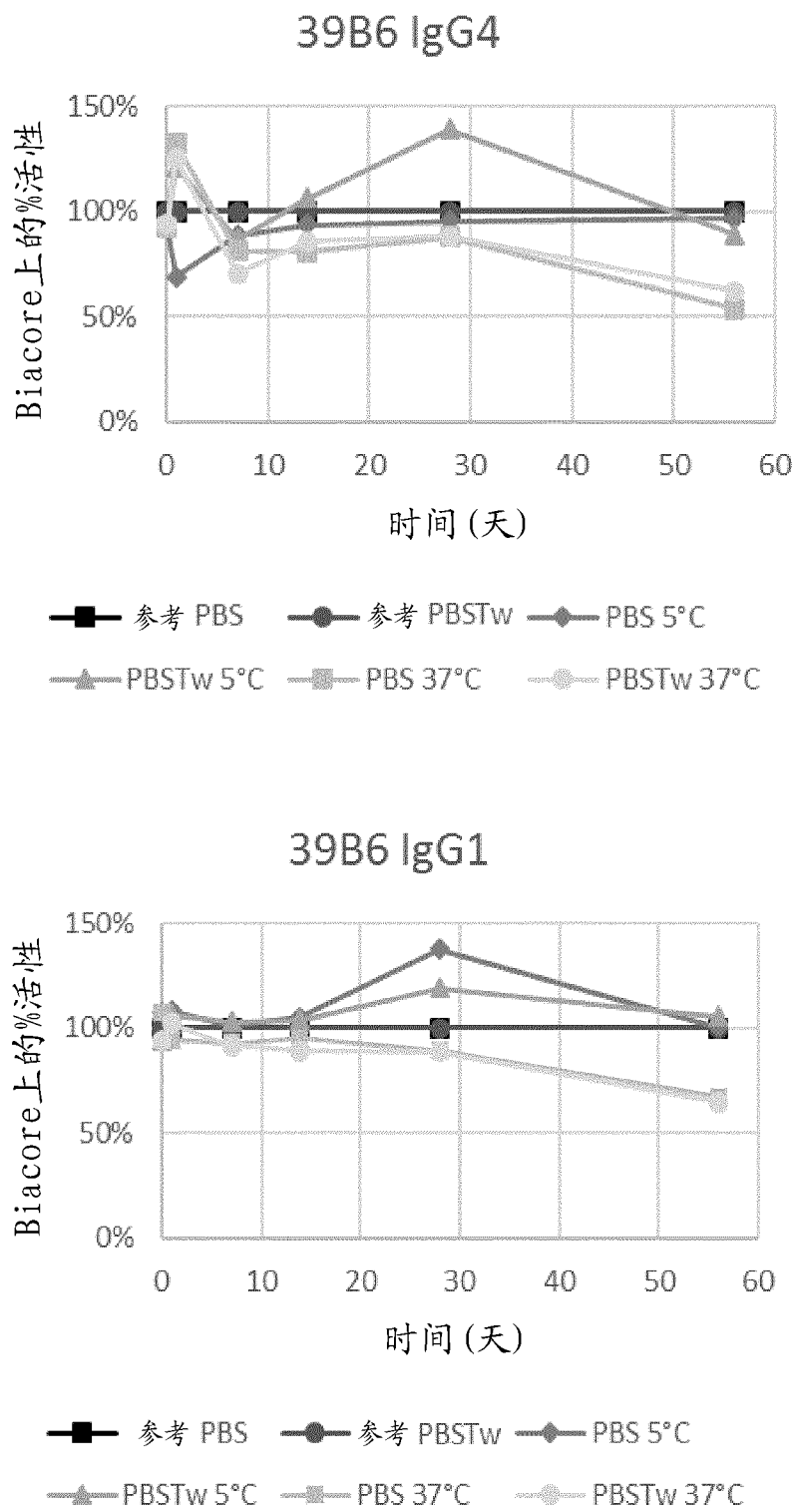


图 2

B

P-SMAD2测定的结果

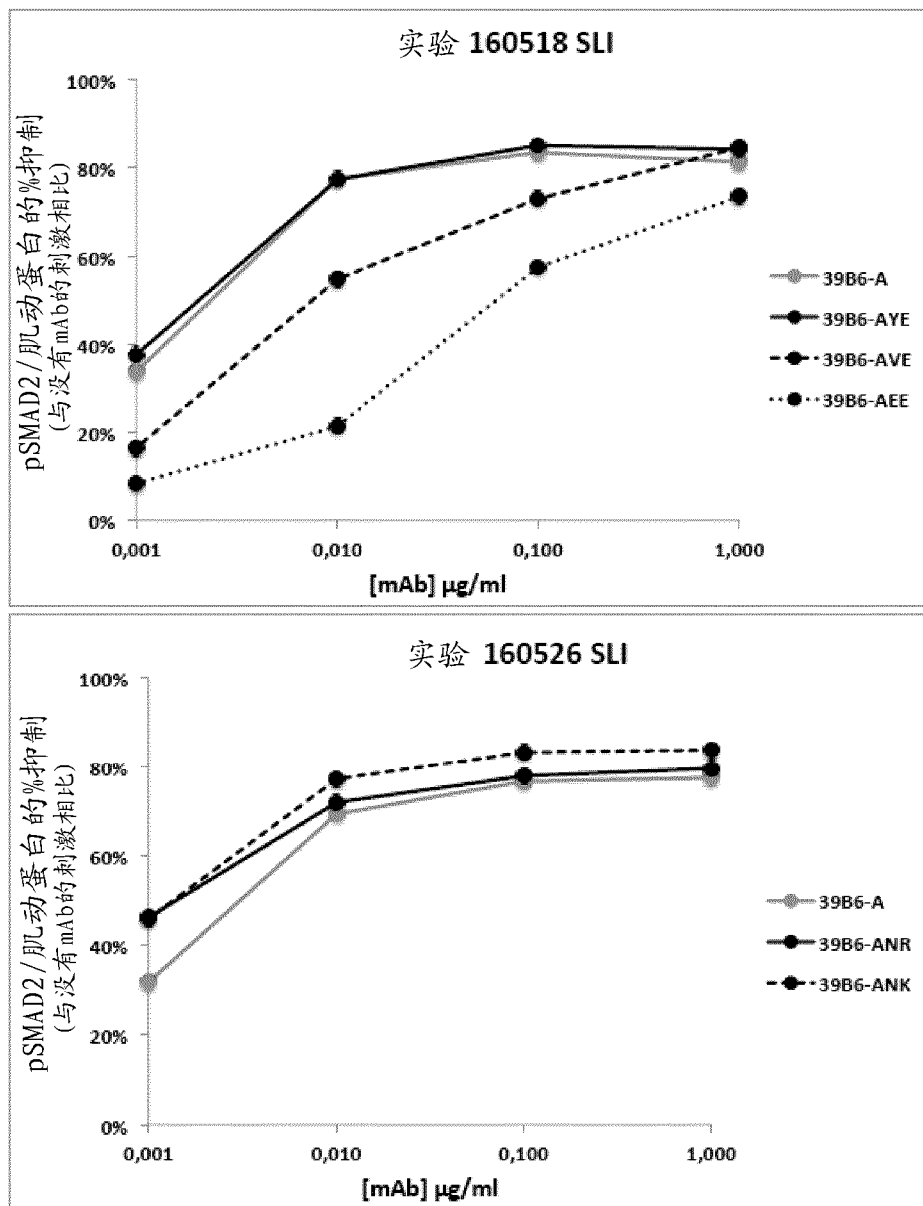


图 3续

GAGA-1uc测定的结果

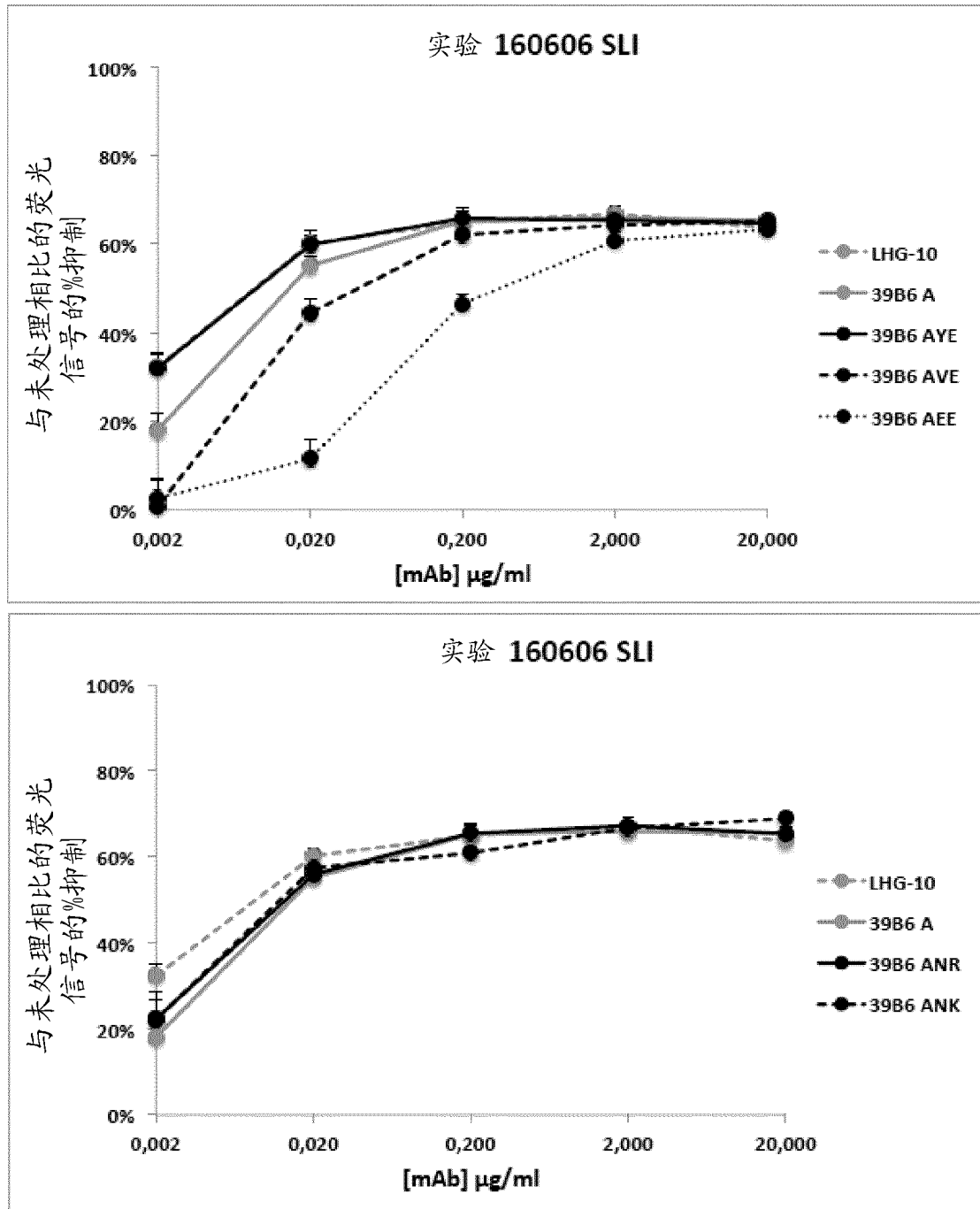
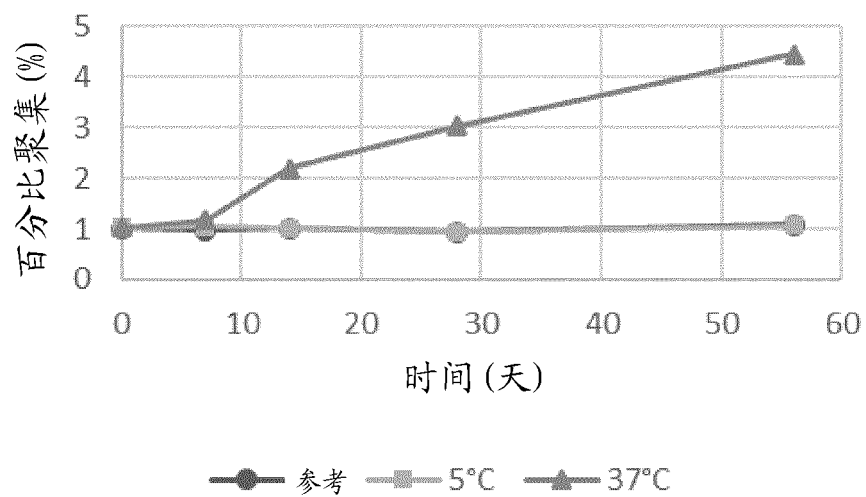


图 4

39B6-AVE %聚集



39B6-AYE %聚集

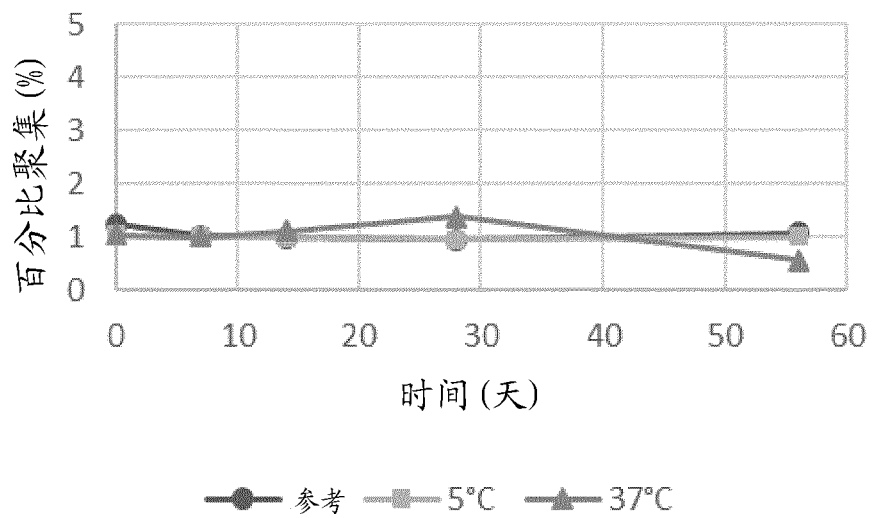
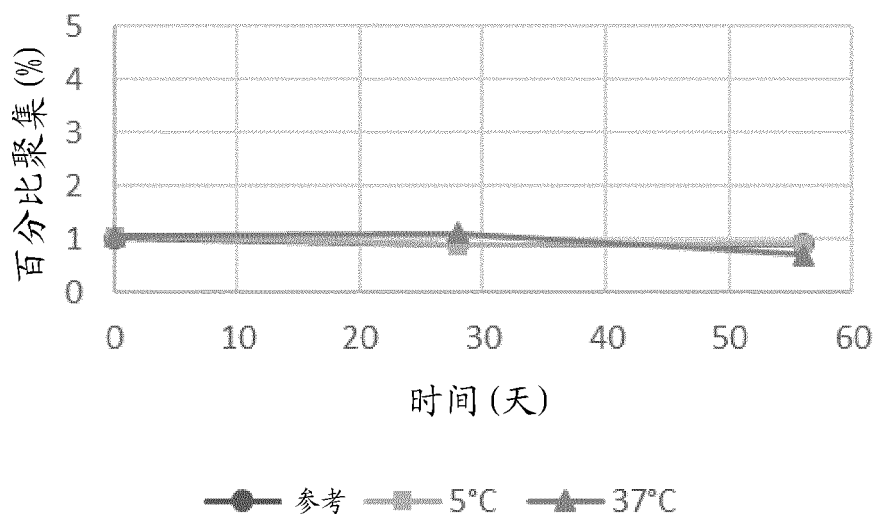


图 5

39B6-ANK %聚集



39B6-ANR %聚集

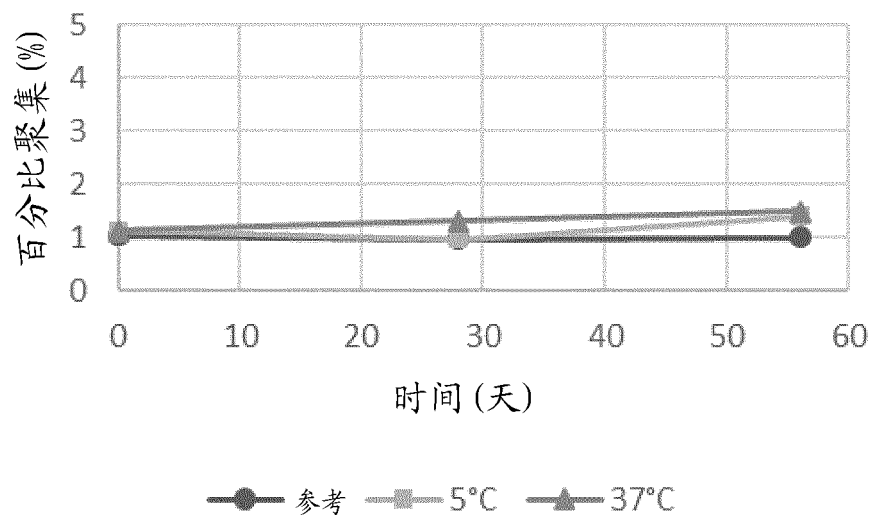


图 5续

在第56天在37℃下的%片段化

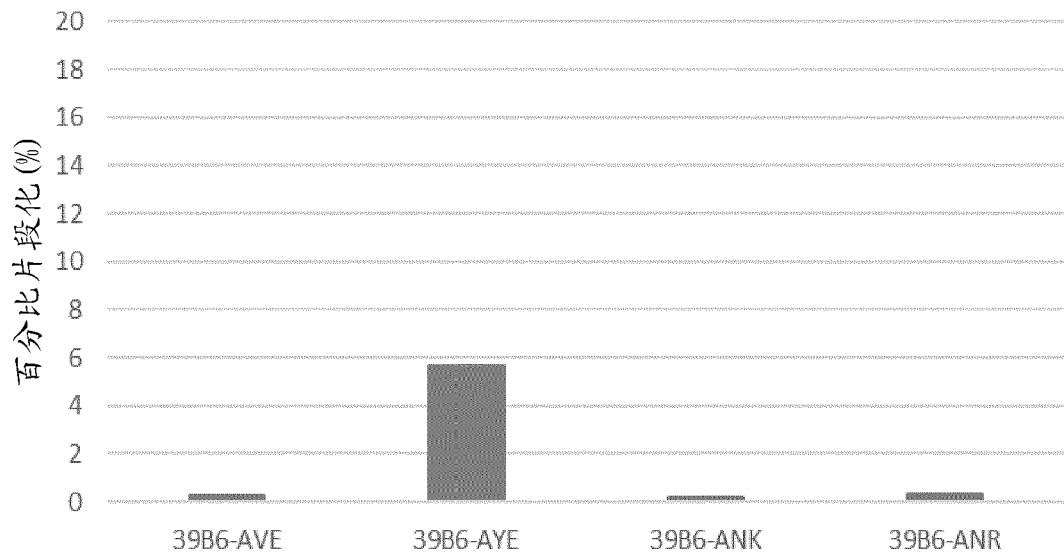


图 6

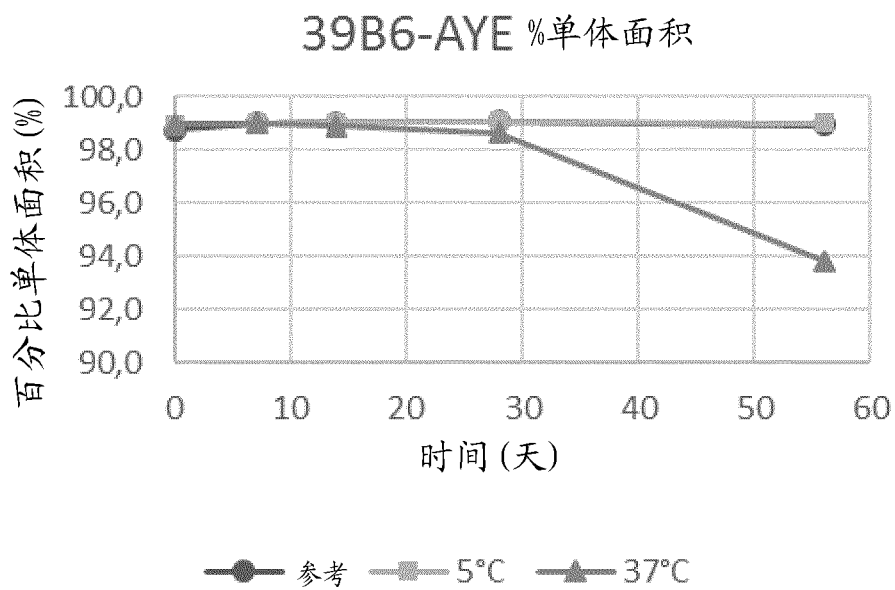
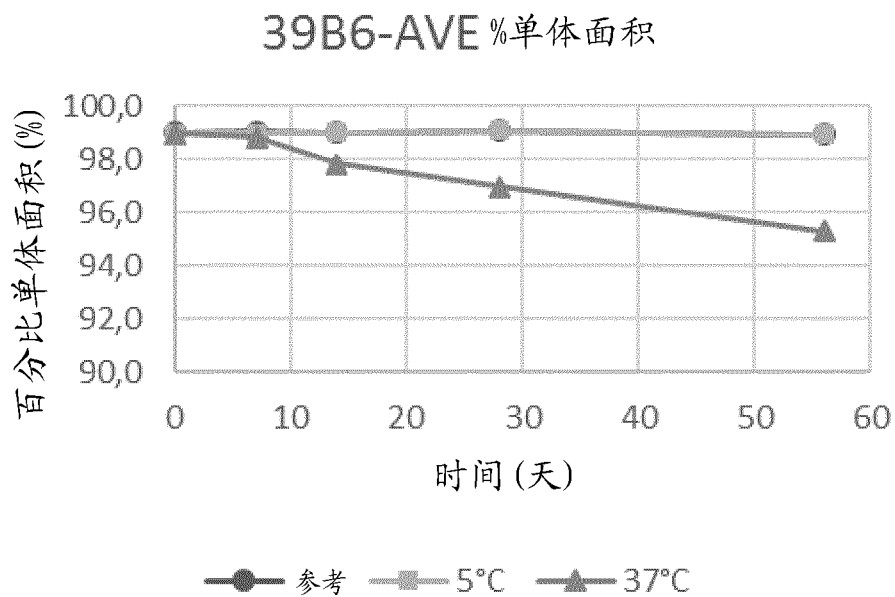


图 7

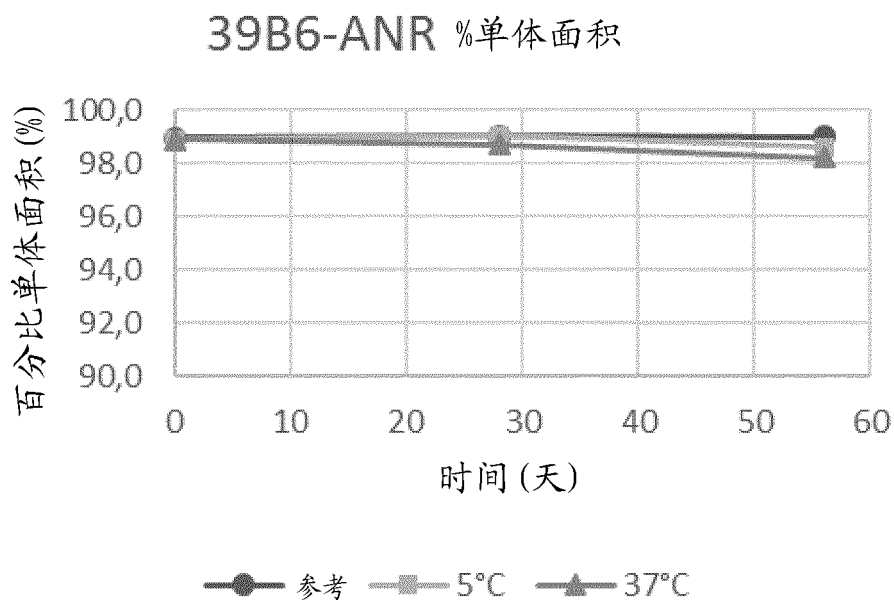
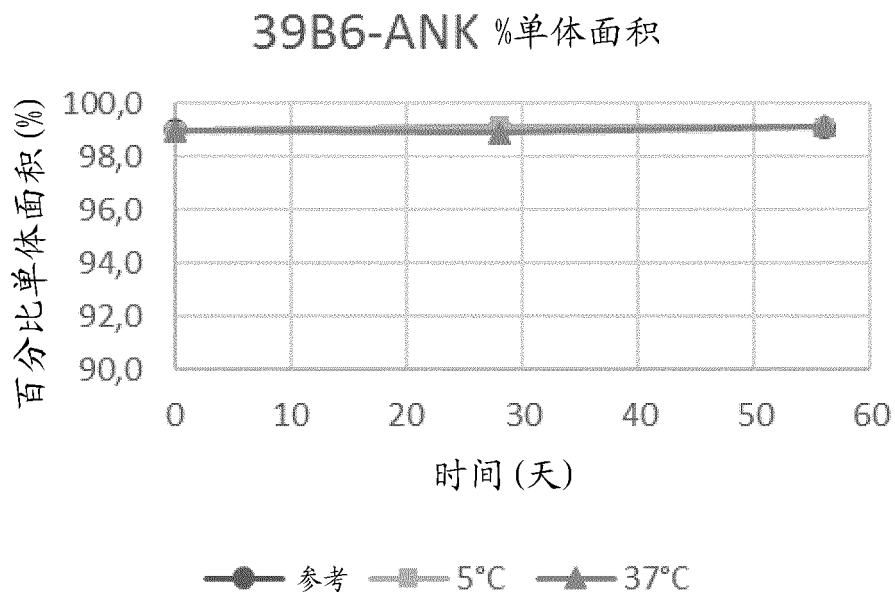


图 7续

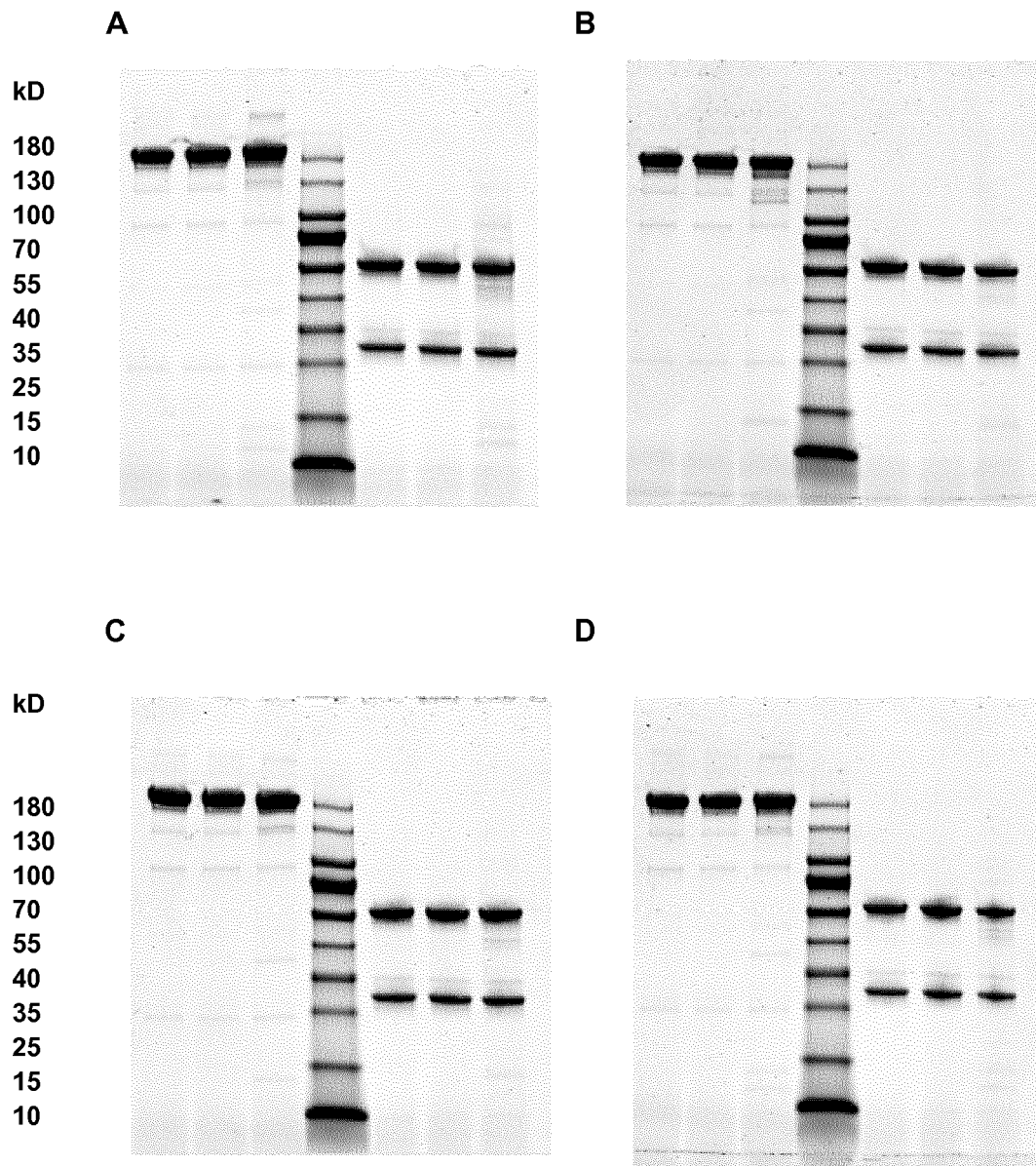


图 8

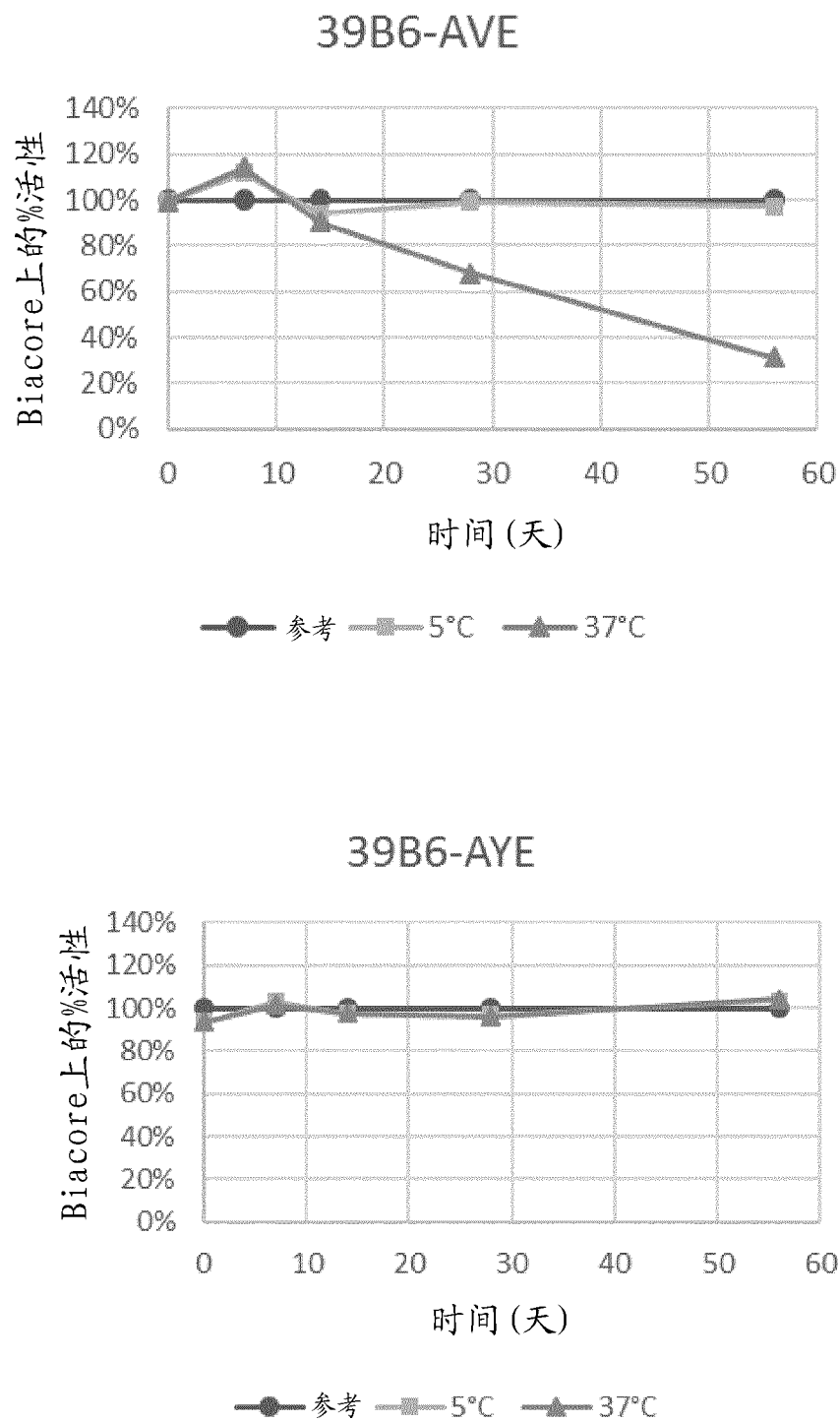


图 9

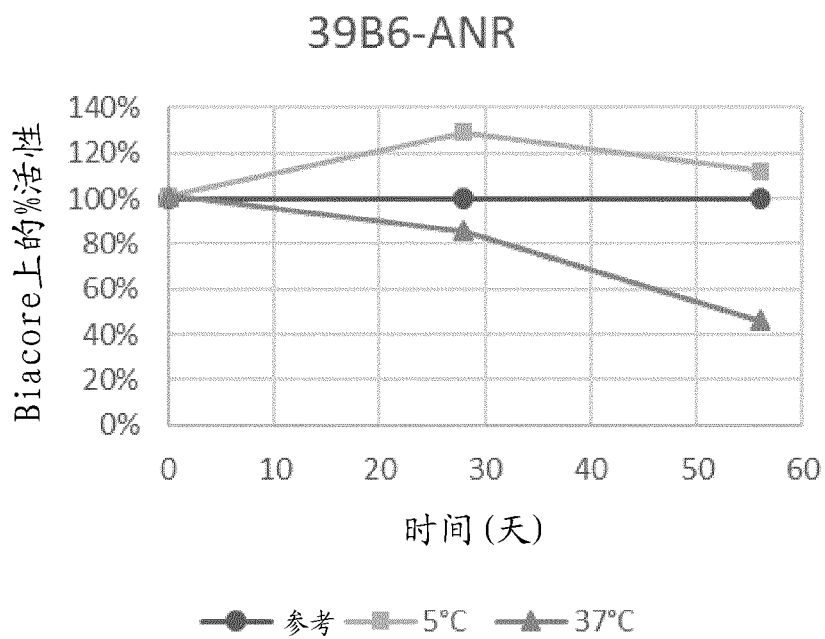
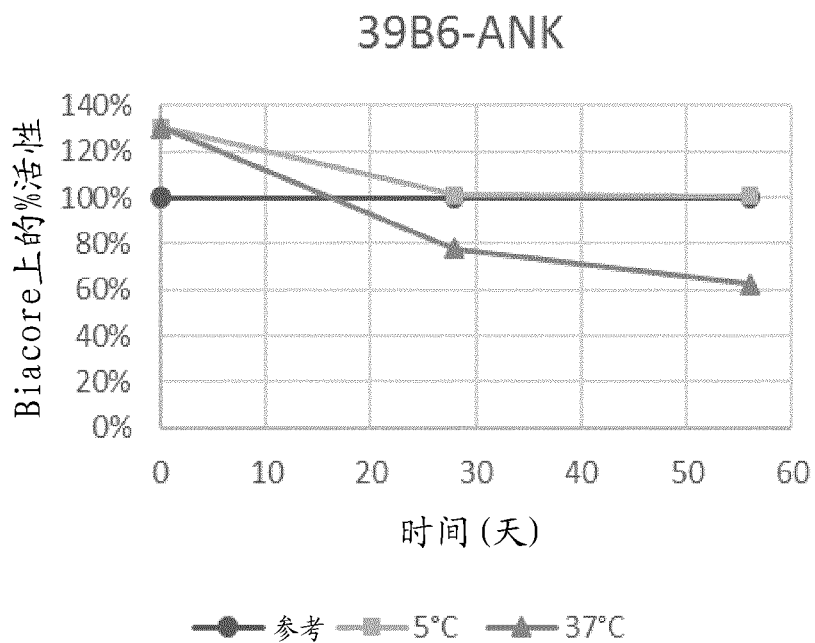


图 9续

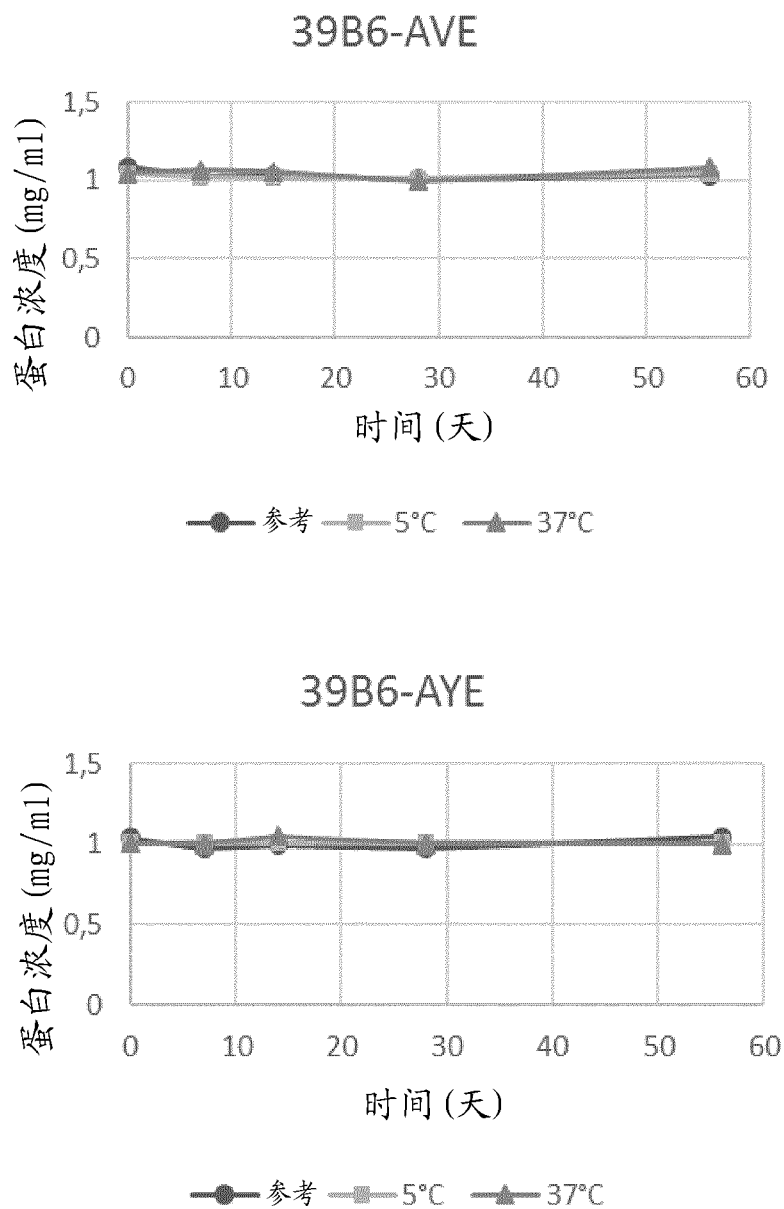
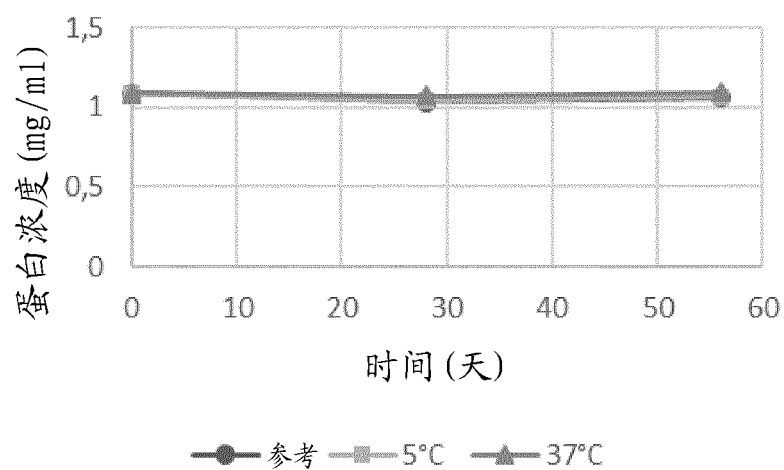


图 10

39B6-ANK



39B6-ANR

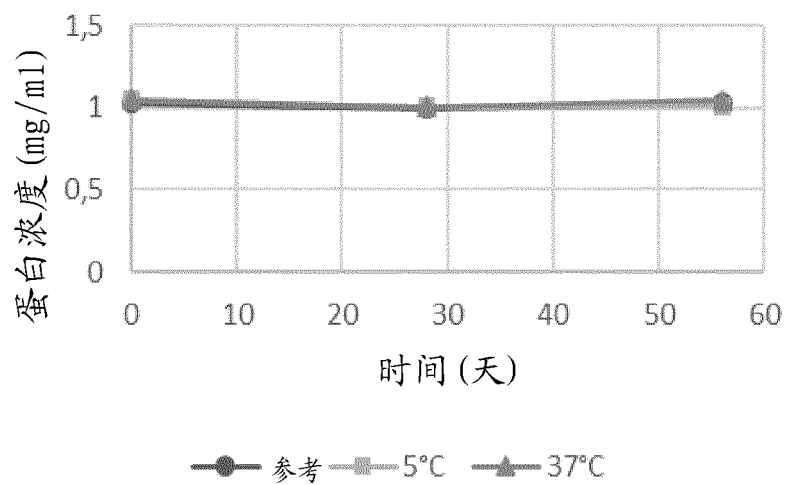
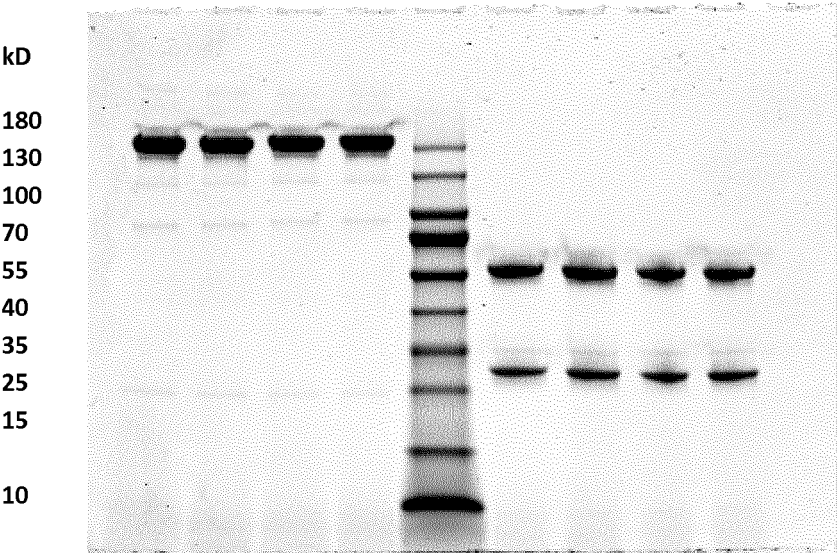


图 10续



	10个冷冻-解冻循环			
	非还原条件		还原条件	
	参考	10x FT	参考	10x FT
39B6-AVE	1	2	5	6
39B6-AYE	3	4	7	8

图 11

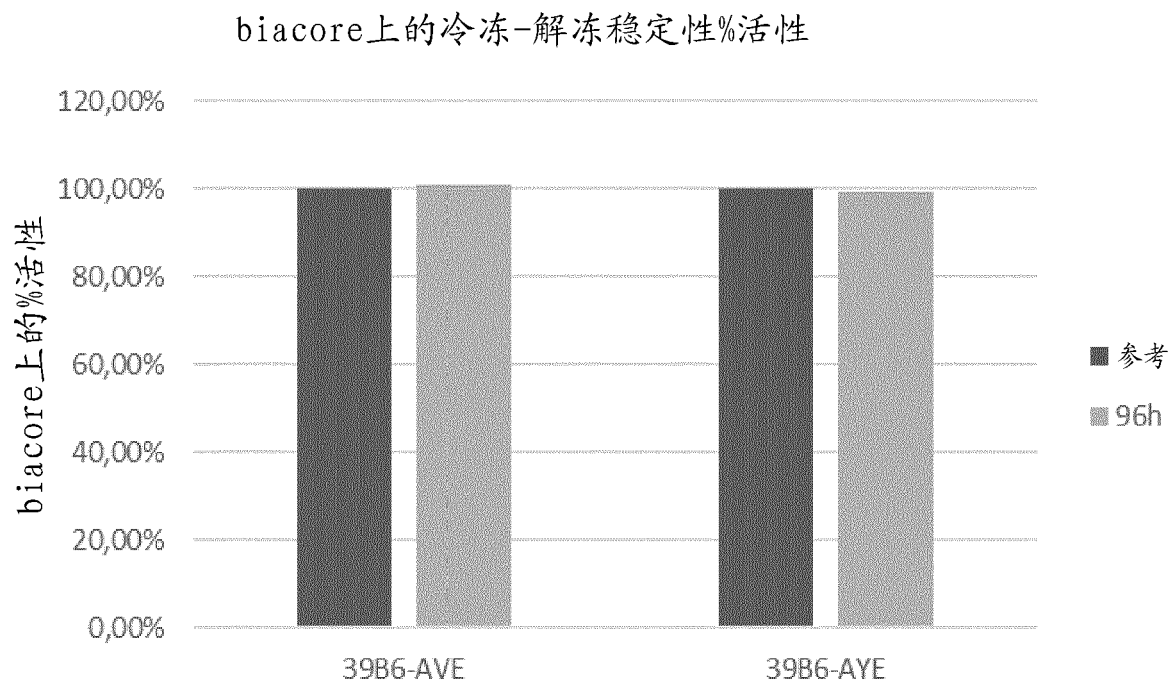


图 12

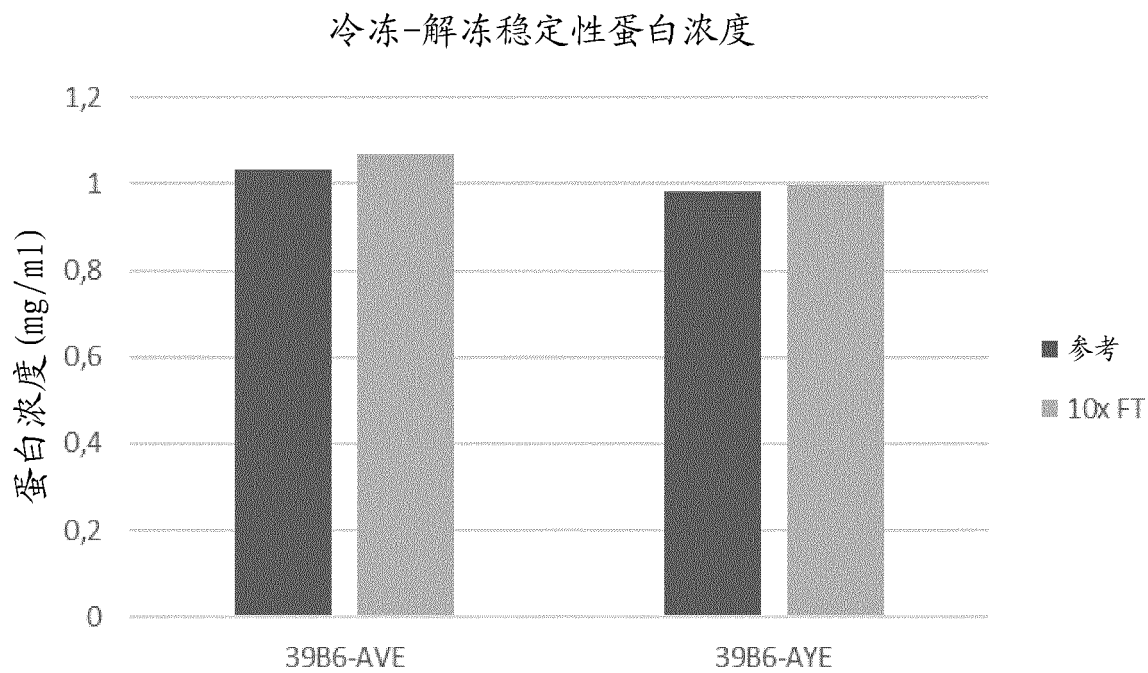


图 13

热稳定性研究39B6变体

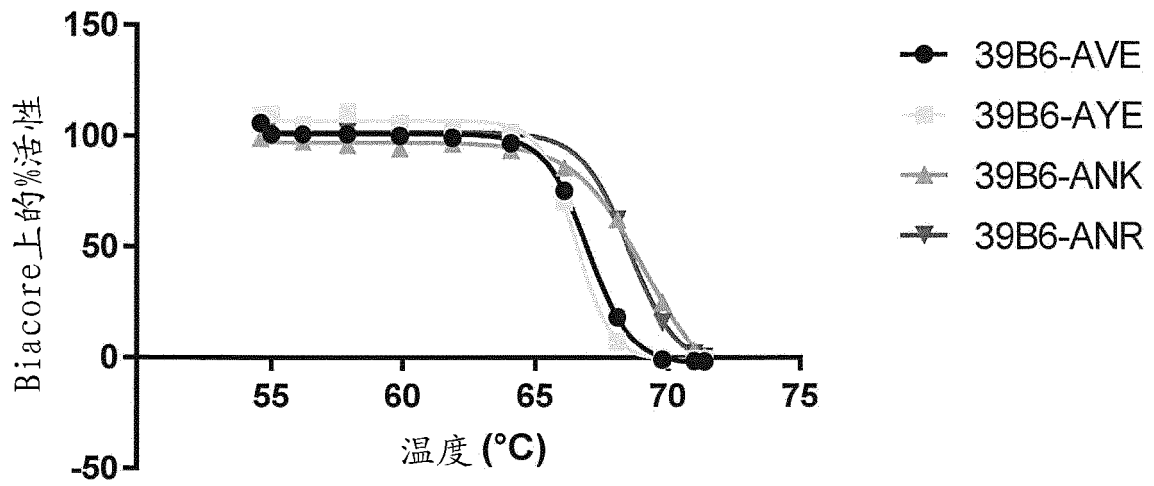
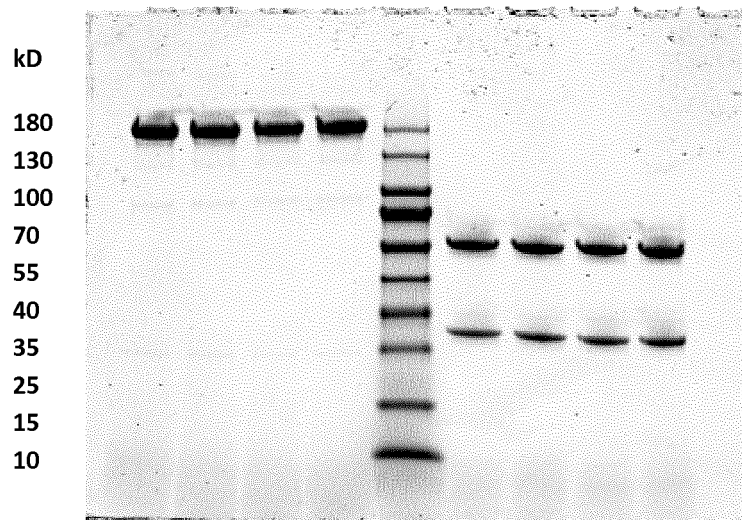


图 14



	旋转96小时			
	非还原条件		还原条件	
	参考	96h	参考	96h
39B6-AVE	1	2	5	6
39B6-AYE	3	4	7	8

图 15

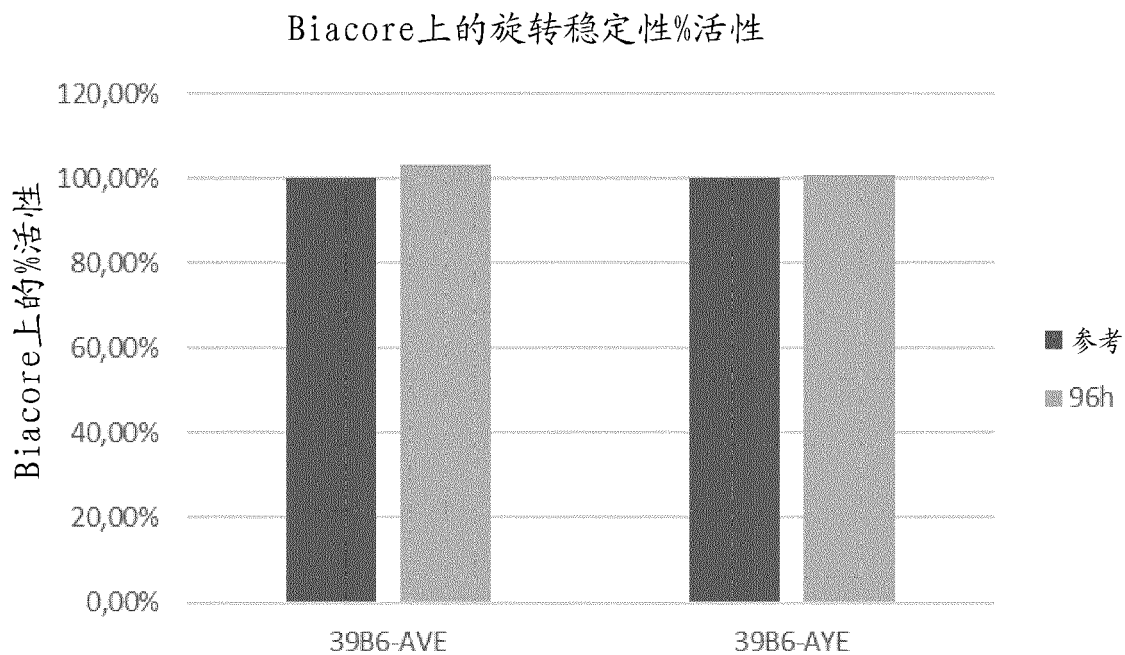


图 16

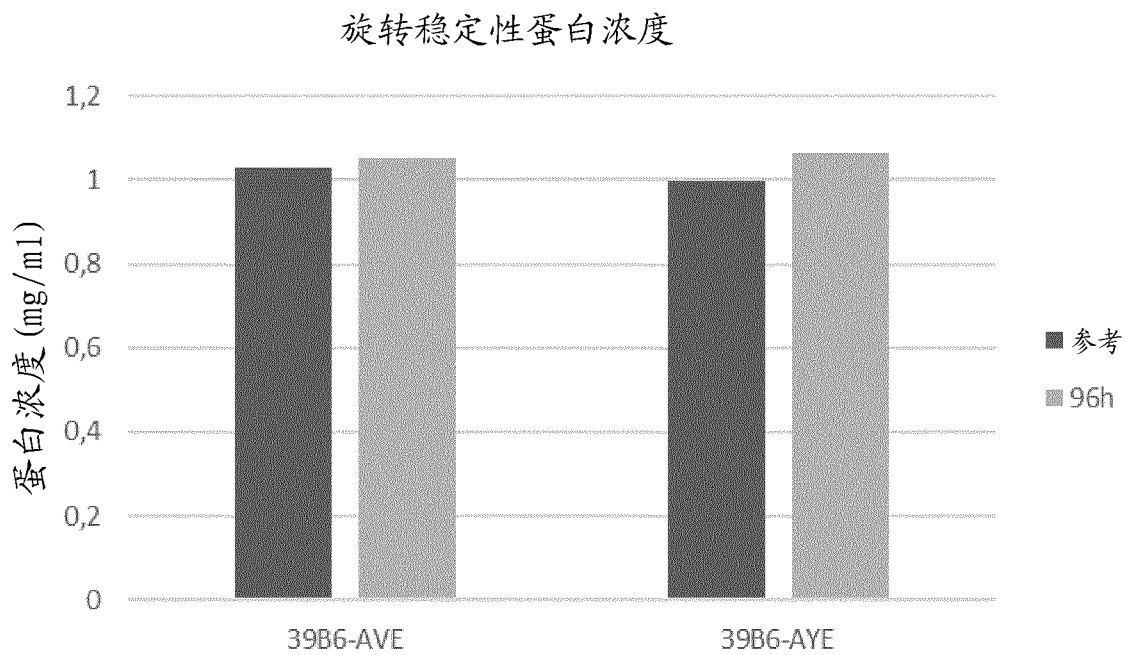
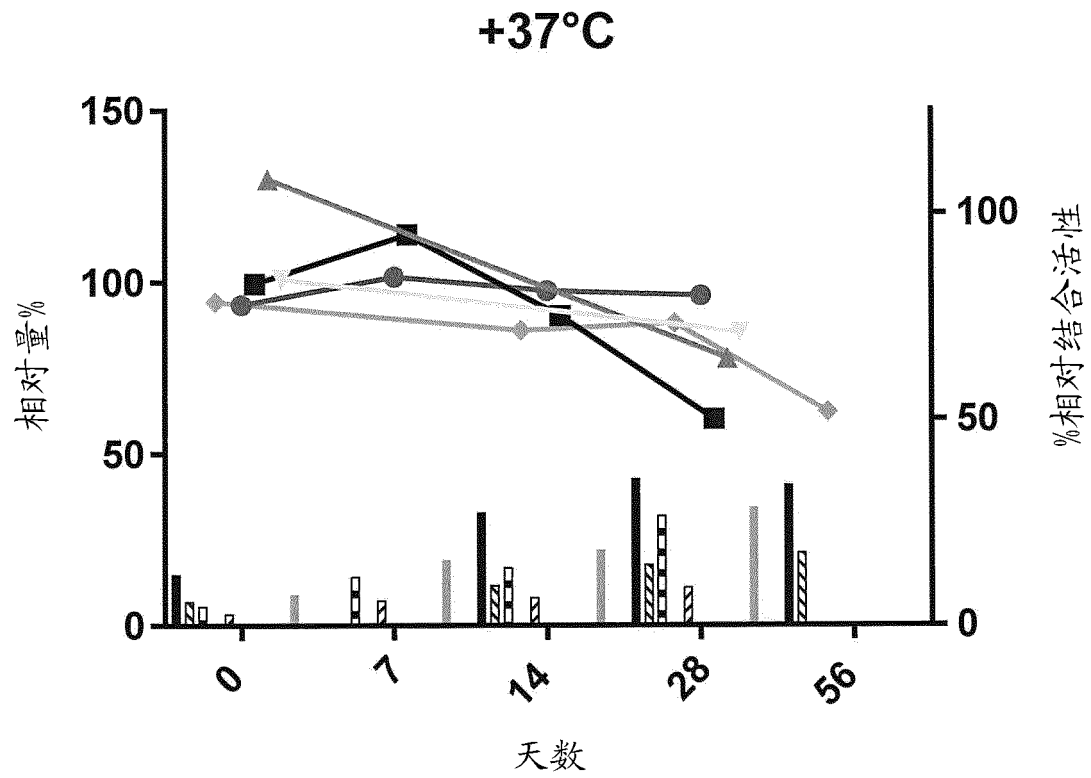


图 17



结合活性 (SPR)

- 39B6-AVE
- 39B6-AYE
- ▲ 39B6-ANK
- ◆ 39B6-ANE
- ◆ 39B6-ANR

- N DeamD 39B6-ANE
- N DeamD 39B6-ANR
- ▨ N IsoD 39B6-ANE
- N DeamD 39B6-ANK
- ▨ N IsoD 39B6-ANK
- N IsoD 39B6-ANR

图 18

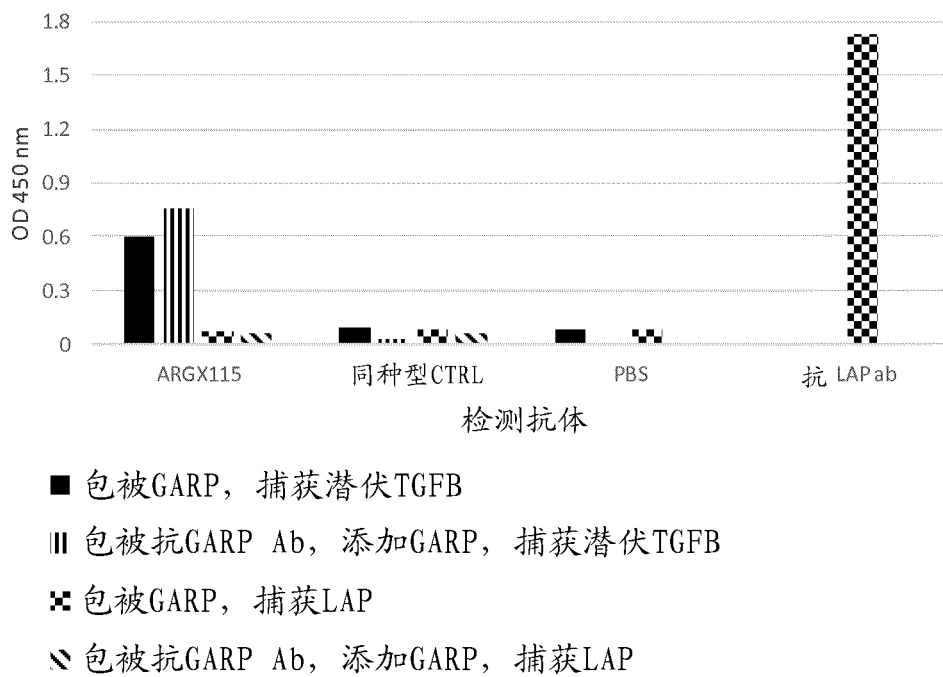


图 19

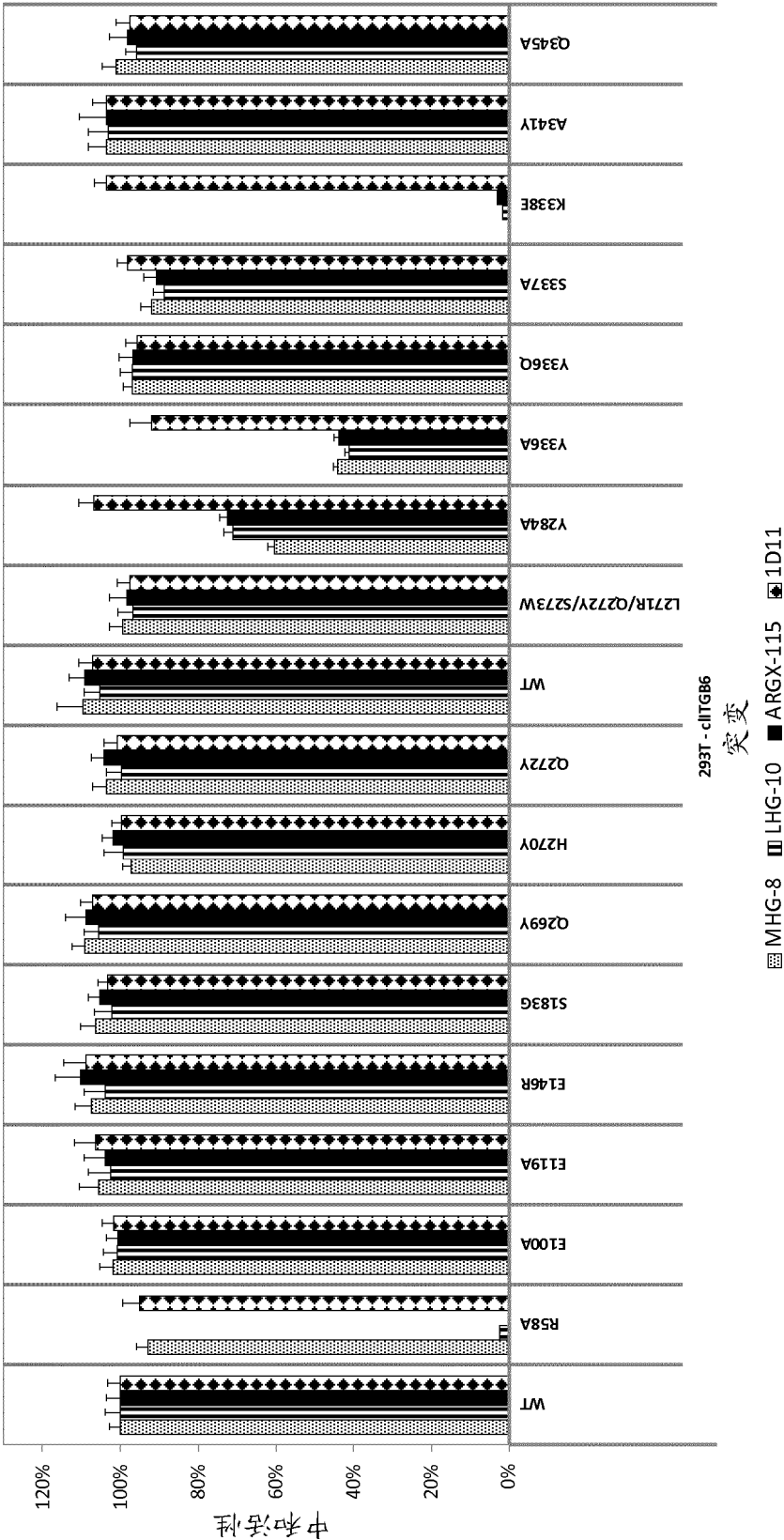


图 20