202330579

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：TW 202330579 A

(43)公開日：中華民國 112 (2023) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：111138471　(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 10 月 11 日

(51)Int. Cl.：*C07K14/495 (2006.01)*　*A61K38/18 (2006.01)*

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2021/10/11　美國　63/254,249

(71)申請人：高等教育聯邦系統　匹茲堡大學 (美國) UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION　(US)
美國

(72)發明人：欣克　安德魯　P HINCK, ANDREW P. (US)；德波　克里斯汀 DEPEAUX, KRISTIN (US)；戴爾葛夫　格雷戈　M DELGOFFE, GREG M. (US)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：29 項　圖式數：6　共 57 頁

(54)名稱

經工程改造 TGF-β 單體及使用方法

(57)摘要

本發明描述經工程改造以防止二聚且阻斷 TGF-β 傳訊之重組 TGF-β2 單體。經工程改造單體缺乏結合且募集 TGF-β I 型受體（TβRI）之能力，但保持結合高親和力 TGF-β II 型受體（TβRII）的能力。該等 TGF-β2 單體亦包括增加其對 TβRII 之親和力、降低其聚集及/或改進其摺疊的額外修飾。亦描述編碼該等重組 TGF-β2 單體之核酸分子及載體。經分離細胞，諸如 T 細胞可經編碼 TGF-β2 單體之核酸或載體經再程式化以分泌該單體。亦描述該等重組 TGF-β2 單體及/或產生該等重組 TGF-β2 單體之細胞抑制 TGF-β 傳訊的用途，諸如用於治療與異常 TGF-β 傳訊相關之病症。

Recombinant TGF-β2 monomers engineered to prevent dimerization and block TGF-β signaling are described. The engineered monomers lack the ability to bind and recruit TGF-β type I receptor (TβRI), but retain the capacity to bind the high affinity TGF-β type II receptor (TβRII). The TGF-β2 monomers also include additional modifications that increase their affinity for TβRII, reduce their aggregation and/or improve their folding. Nucleic acid molecules and vectors encoding the recombinant TGF-β2 monomers are also described. Isolated cells, such as T cells, can be re-programmed with a TGF-β2 monomer-encoding nucleic acid or vector to secrete the monomer. Use of the recombinant TGF-β2 monomers and/or cells producing the recombinant TGF-β2 monomers, to inhibit TGF-β signaling, such as to treat disorders associated with aberrant TGF-β signaling, are also described.

指定代表圖：

mmTGF-β2-7M (SEQ ID NO: 3) 相對於 mmTGF-β2-7M2R (SEQ ID NO: 4)

5. 用精胺酸取代鏈間二硫鍵位置
6. 在二聚體界面處引入鹼性殘基

```
                                                                  57 59
                                                                  |  |
SEQ ID NO: 3 ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCV   59
SEQ ID NO: 4 ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPrCr   59
             ************************************************************5*6

SEQ ID NO: 3 SQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS    92
SEQ ID NO: 4 SQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS    92
             *********************************
```

圖1B

20233144
20250979
專利案號：111138471

【發明摘要】

【中文發明名稱】 經工程改造TGF-β單體及使用方法

【英文發明名稱】 ENGINEERED TGF-BETA MONOMERS AND METHODS OF USE

【中文】

本發明描述經工程改造以防止二聚且阻斷TGF-β傳訊之重組TGF-β2單體。經工程改造單體缺乏結合且募集TGF-β I型受體（TβRI）之能力，但保持結合高親和力TGF-β II型受體（TβRII）的能力。該等TGF-β2單體亦包括增加其對TβRII之親和力、降低其聚集及/或改進其摺疊的額外修飾。亦描述編碼該等重組TGF-β2單體之核酸分子及載體。經分離細胞，諸如T細胞可經編碼TGF-β2單體之核酸或載體經再程式化以分泌該單體。亦描述該等重組TGF-β2單體及/或產生該等重組TGF-β2單體之細胞抑制TGF-β傳訊的用途，諸如用於治療與異常TGF-β傳訊相關之病症。

【英文】

Recombinant TGF-β2 monomers engineered to prevent dimerization and block TGF-β signaling are described. The engineered monomers lack the ability to bind and recruit TGF-β type I receptor (TβRI), but retain the capacity to bind the high affinity TGF-β type II receptor (TβRII). The TGF-β2 monomers also include additional modifications that increase their affinity for TβRII, reduce their aggregation and/or improve their folding. Nucleic acid molecules and vectors encoding the recombinant TGF-β2 monomers are also described. Isolated cells, such as T cells, can be re-programmed with a TGF-β2 monomer-encoding nucleic acid or vector to

secrete the monomer. Use of the recombinant TGF-β2 monomers and/or cells producing the recombinant TGF-β2 monomers, to inhibit TGF-β signaling, such as to treat disorders associated with aberrant TGF-β signaling, are also described.

【指定代表圖】　　圖1B

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 經工程改造TGF-β單體及使用方法

【英文發明名稱】 ENGINEERED TGF-BETA MONOMERS AND METHODS OF USE

【技術領域】

相關申請案之交互參照

【0001】 本申請案主張2021年10月11日申請之美國臨時申請案第63/254,249號之權益，該申請案以全文引用之方式併入本文中。

【0002】 本發明係關於具有改進特性之轉形生長因子（TGF）-β單體，及其用於抑制TGF-β傳訊及治療與異常TGF-β傳訊相關之病症的用途。

對政府支援的承認

【0003】 本發明係在政府支援下在由美國國家衛生研究院（National Institutes of Health）授予的資助號CA247129下進行。政府對本發明有一定的權利。

【先前技術】

【0004】 TGF-β為癌症免疫療法之重要目標，因為TGF-β所介導之免疫抑制引起細胞毒性缺乏的環境，其中T調節（T_{reg}）細胞經由免疫抑制性細胞介素之分泌及效應T細胞之直接抑制來抑制抗腫瘤免疫性。腫瘤微環境（TME）中之TGF-β的過度表現已與較高腫瘤負荷及不良臨床結果相關。此外，檢查點療法無反應患者由於TGF-β所介導之免疫排斥而具有T細胞耗乏表型。作為PD-1及PD-

L1療法之補佐物，TGF-β抑制劑已進一步展示在活體內優於檢查點單一療法且此類方法正在臨床試驗中進行。TGF-β同功異構物亦強力地刺激基質蛋白質（諸如膠原蛋白及纖維接合素）之積聚，且可驅動纖維化病症，諸如特發性肺纖維化（IPF）、腎纖維化、心臟纖維化及冠狀動脈再狹窄。IPF的特徵在於發生在老年人中的肺功能之進行性喪失，診斷之後的平均存活率為5年。儘管觸發各種形式之纖維化的機制不同，但其都有共同的誘導因素，亦即TGF-β蛋白質含量增加。在IPF及腎纖維化中，TGF-β蛋白質含量增加會刺激纖維母細胞之活化且分化成肌纖維母細胞，從而引起細胞外基質（ECM）發生異常沈積，導致瘢痕形成（scarring）及器官功能降低。

【0005】 在癌症及纖維化之情況下，使用中和抗體抑制TGF-β具有有限功效，可能因為大部分TGF-β作為潛伏蛋白質儲存在ECM中，使得其無法被抑制。TGF-β受體激酶抑制劑對其目標，亦即TGF-β I型及II型受體之激酶域具有更大的可及性，但不具有特異性，且不僅抑制其他TGF-β家族I型受體，而且抑制非TGF-β受體激酶。激酶抑制劑在臨床試驗中尚未進展到超過II期，且當前尚沒有經FDA批准的TGF-β抑制劑。因此，需要用於治療與異常TGF-β傳訊相關之病症的改進療法。

【發明內容】

【0006】 本文描述經工程改造以防止二聚且阻斷TGF-β傳訊之TGF-β2單體。經工程改造單體缺乏結合且募集TGF-β I型受體（TβRI）之能力，但保持結合高親和力TGF-β II型受體（TβRII）的能力。所揭示之TGF-β2單體亦包括增加其對TβRII之親和力、降低其聚集及/或改進其摺疊的額外修飾。所揭示之TGF-β2單體及其組成物可例如用於治療與異常TGF-β傳訊相關之病症，例如纖維化病症及癌症。

【0007】 本文提供重組TGF-β2單體，其包括對應於野生型人類TGF-β2之胺基酸殘基52-71的α3（踵）螺旋之缺失（闡述為SEQ ID NO: 1），及對應於SEQ ID NO: 1之殘基77之胺基酸殘基處的半胱胺酸至精胺酸或絲胺酸取代；此等修飾防止單體發生二聚。TGF-β2單體進一步包括對應於SEQ ID NO: 1之殘基51之胺基酸殘基處的白胺酸至精胺酸取代，及對應於SEQ ID NO: 1之殘基74之胺基酸殘基處的丙胺酸至離胺酸取代；此等修飾增加單體之淨電荷。TGF-β2單體亦包括對應於SEQ ID NO: 1之殘基25之胺基酸殘基處的離胺酸至精胺酸取代，及對應於SEQ ID NO: 1之殘基94之胺基酸殘基處的離胺酸至精胺酸取代，其增加單體對TβRII之親和力。在一些具體實例中，TGF-β2單體進一步包括增加單體對TβRII之親和力、降低聚集及/或改進摺疊的一或多種額外修飾。

【0008】 本文亦提供經工程改造之TGF-β2單體，其經修飾以包括與Dan及Cerubus相關之蛋白質（PRDC）的半胱胺酸結區域，其增強單體之摺疊。

【0009】 亦提供包括TGF-β2單體及異源蛋白質之融合蛋白質。在一些具體實例中，異源蛋白質包括蛋白質標籤、Fc域、白蛋白、白蛋白結合多肽、抗體、抗體之抗原結合片段或靶向部分。

【0010】 亦提供編碼本文所揭示之重組TGF-β2單體或融合蛋白質的核酸分子及載體。進一步提供經分離細胞，諸如經分離T細胞，其包括重組TGF-β2單體或編碼融合蛋白質之核酸分子或載體。

【0011】 進一步提供包括本文所揭示之重組TGF-β2單體、融合蛋白質、核酸分子、載體或經分離細胞之組成物及醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。

【0012】 亦提供藉由使該細胞與重組TGF-β2單體、融合蛋白質、核酸分子、載體或本文所揭示之組成物接觸來抑制細胞中之TGF-β傳訊的方法。

【0013】 另外提供抑制患有與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症之個體

的TGF-β傳訊之方法。在一些具體實例中，該方法包括向該個體投予有效量之重組TGF-β2單體、融合蛋白質、核酸分子、載體、經分離細胞（諸如，T細胞）或本文所揭示之組成物。另外提供治療個體之與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症的方法。在一些具體實例中，該方法包括向該個體投予治療有效量之重組TGF-β2單體、融合蛋白質、核酸分子、載體、經分離細胞（諸如，T細胞）或本文所揭示之組成物。在所揭示之方法的一些實施例中，與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症為纖維化病症、癌症、眼部病症或結締組織之遺傳病症。

【0014】 本發明之前述及其他目標及特徵將自以下參見附圖描述之實施方式變得更顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0015】 **[圖1A-1E]**：經工程改造TGF-β2單體mmTGF-β2-7M（SEQ ID NO: 3）與TGF-β2（SEQ ID NO: 1）（圖1A）、mmTGF-β2-7M2R（SEQ ID NO: 4）（圖1B）、mmTGF-β2-2M-Del7_16（SEQ ID NO: 5）（圖1C）、mmTGF-β2-7M-PRDC（SEQ ID NO: 7）（圖1D及mmTGF-β2-7M2R-Del7-16（SEQ ID NO: 6）（圖1E）之序列比較。序列差異由兩個經比對序列下之數字來表示，其中數字之身分表示差異之性質。序列一致性由星號表示。圖1A中之序列下方展示TGF-β3-$(T\beta RII)_2$-$(T\beta RI)_2$複合體（PDB 2PJY）（左）及mmTGF-β2-7M-TβRII複合體（PDB 5TX4）（右）之結構，其中突出顯示一些主要結構特徵。

【0016】 **[圖2A-2F]**：mmTGF-β2-7M2R（圖2A-2C）與親體蛋白質mmTGF-β2-7M（圖2D-2F）相比之醯胺^{1}H-^{15}N一鍵位移相關核磁共振（NMR）光譜。光譜在37°C下在pH 4.6（圖2A及2D）或pH 7.2之10 mM磷酸鹽緩衝液中記錄，緩衝液中不存在CHAPS（圖2B及2E）或添加CHAPS至10 mM之最終濃度（圖2C及2F）。

【0017】 **[圖3A-3C]**：mmTGF-β2-2M-Del7-16之醯胺^{1}H-^{15}N一鍵位移相關

NMR光譜。光譜在37℃下在pH 6.0（圖3B）或pH 4.5之10 mM磷酸鹽緩衝液中記錄，緩衝液中不存在CHAPS（圖3A）或添加CHAPS至10 mM之最終濃度（圖3C）。

【0018】 **[圖4A-4D]**：mmTGF-β2-7M-PRDC之醯胺^{1}H-^{15}N一鍵位移相關NMR光譜（圖4A-4C）及如藉由原生凝膠電泳所偵測的與TβRII之結合（圖4D）。光譜在37℃下在pH 4.8（圖4A）或pH 6.0（圖4B至圖4C）之10 mM磷酸鹽緩衝液中記錄。圖4B及圖4C僅在標繪訊號之等高含量方面不同（與圖區4C相比，圖4B以更接近雜訊之等高含量標繪）。圖7D中所示之原生凝膠藉由操作單獨的2 μg TβRII（最左泳道）或添加指定莫耳比之經工程改造之TGF-β單體（+A及+B分別表示1:1或2:1莫耳比之TβRII:經工程改造之TGF-β單體）進行。

【0019】 **[圖5]**：如藉由等溫滴定量熱法（ITC）來偵測，經工程改造之TGF-β單體（mmTGF-β2-7M，左側；mmTGF-β2-7M2R，中間及mmTGF-β2-2M-Del7-16，右側）與TGF-β II型受體（TβRII）之結合。上圖區描繪出三次重複滴定之原始熱分析圖，而下圖區描繪出整體擬合至1:1結合等溫線（平滑線）的三次重複滴定之積分熱（integrated heat）（數據點）。擬合參數提供於位於底部之表格中。

【0020】 **[圖6A-6D]**：評估經工程改造之TGF-β單體相對於彼此之抑制效力的基於HEK-293細胞之CAGA-Luc TGF-β報導分析。用TGF-β CAGA-Luc報導體穩定轉染之HEK-293細胞用指定濃度之指定之經工程改造之TGF-β單體處理30分鐘且隨後藉由添加10 pM TGF-β3刺激。14小時後收集細胞且分析螢光素酶活性。（圖6A）mmTGF-β2-7M（SEQ ID NO: 3），IC_{50}為58.23 nM。（圖6B）mmTGF-β2-7M2R （SEQ ID NO: 4），IC_{50}為53.29 nM。（圖6C）mmTGF-β2-2M-Del7-16（SEQ ID NO: 5），IC_{50}為111.0 nM。（圖6D）mmTGF-β2-7M-PRDC （SEQ ID NO: 7），IC_{50}為282.5 nM。所示數據點及誤差槓對應於一式三份量測之平均值及標準差。平滑曲線對應於擬合至標準劑量反應抑制等溫線。展示擬合IC50值。

【0021】 序列表被提交為ST.26序列表XML檔案，名為8123-107062-02，其

在2022年10月6日產生，具有7561位元組之大小，其以引用之方式併入本文中。在隨附序列表中：

SEQ ID NO: 1為野生型人類TGF-β2之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 2為命名為mmTGF-β2之經工程改造之人類TGF-β2單體的胺基酸序列。

SEQ ID NO: 3為命名為mmTGF-β2-7M之經工程改造之人類TGF-β2單體的胺基酸序列。

SEQ ID NO: 4為命名為mmTGF-β2-7M2R之經工程改造之人類TGF-β2單體的胺基酸序列。

SEQ ID NO: 5為命名為mmTGF-β2-2M-Del7-16之經工程改造之人類TGF-β2單體的胺基酸序列。

SEQ ID NO: 6為命名為mmTGF-β2-7M2R-Del7-16之經工程改造之人類TGF-β2單體的胺基酸序列。

SEQ ID NO: 7為命名為mmTGF-β2-7M-PRDC之經工程改造之人類TGF-β2單體的胺基酸序列。

【實施方式】

【0022】

I. 縮寫

CKGF	胱胺酸結生長因子摺疊
ECM	胞外基質
ER	內質網
GFD	生長因子域

IPF	特發性肺部纖維化
ITC	等溫滴定量熱法
NGF	神經生長因子
NMR	核磁共振
PDGF	血小板衍生生長因子
PRDC	Dan及Cerubus相關蛋白質
TGF-β	轉形生長因子β
TβRI	轉形生長因子-β I型受體
TβRII	轉形生長因子-β II型受體
TME	腫瘤微環境
VEGF	血管內皮生長因子

【0023】

II. 術語

除非另外指出，否則根據習知用法使用技術術語。分子生物學中常見術語之定義可見於Benjamin Lewin, Genes X, Jones & Bartlett出版社出版, 2009；及Meyers等人(編), The Encyclopedia of Cell Biology and Molecular Medicine, Wiley-VCH以16卷出版, 2008；及其他類似參考文獻。

【0024】 如本文所使用，除非上下文明確另外表示，否則單數形式「一（a）」、「一（an）」及「該（the）」係指單數以及複數兩者。舉例而言，術語「抗原（an antigen）」包括單個或複數個抗原且可視為等效於片語「至少一個抗原（at least one antigen）」。如本文所用，術語「包含（comprise）」意謂「包括（include）」。應進一步理解，除非另外規定，否則對核酸或多肽給出之任何及所有鹼基尺寸或胺基酸尺寸及所有分子量或分子量值均為近似值，且出於描述性目的提供。儘管

可使用類似於或等效於本文所描述之方法及材料的多種方法及材料，但本文描述特定適合之方法及材料。在有衝突之情況下，將以本說明書（包括對術語之解釋）為準。另外，材料、方法及實例僅為說明性的且並不意欲為限制性的。

【0025】 為了便於評述各種具體實例，提供術語之以下解釋：

【0026】 **異常（TGF-β傳訊）**：異常或調節異常TGF-β傳訊。在本發明之上下文中，「異常TGF-β傳訊」係指TGF-β傳訊路徑之過度（病理性）活化。

【0027】 **投予：**藉由任何有效途徑向個體提供或給予藥劑，諸如治療劑（例如，TGF-β單體）。例示性投予途徑包括但不限於注射或輸注（諸如瘤內、皮下、肌肉內、皮內、腹膜內、鞘內、靜脈內、前列腺內、腦室內、紋狀體內、顱內及至脊髓中）、經口、管內、舌下、經直腸、經皮、鼻內、經陰道及吸入途徑。

【0028】 **接觸：**以直接物理締合形式安置；包括呈固體及液體形式。當在活體內方法之上下文中使用時，「接觸」亦包括投予。

【0029】 **纖維化：**在修復或反應性過程中在器官或組織中形成過量纖維性結締組織。纖維化可通常由於發炎或損傷而出現於身體之許多不同組織（諸如心臟、肺及肝）中。**纖維化病症**包括（但不限於）肺纖維化、囊腫性纖維化、特發性肺纖維化、間質性肺病、肝硬化、腎臟纖維化（諸如由糖尿病引起之損傷）、心房纖維化、心肌內膜纖維化、動脈粥樣硬化、再狹窄及硬皮病。纖維化亦可作為手術併發症、化學治療藥物、輻射、損傷或灼傷之結果出現。

【0030】 **融合蛋白質**：包含兩種不同（異源性）蛋白質之至少一部分的蛋白質。在本文中之一些具體實例中，融合蛋白質包括融合至蛋白質標籤、Fc域（諸如人類Fc域）或白蛋白之TGF-β2單體。

【0031】 **醣基化：**碳水化合物部分共價連接於天冬醯胺（N-醣基化）或絲胺酸或蘇胺酸殘基（O-醣基化）之過程。醣基化之含量及類型可在用於重組表現之不同宿主生物體中變化。新穎醣基化位點可藉由在蛋白質之溶劑暴露區域中

引入醣基化序列來經序列工程改造。舉例而言，N-醣基化序列NX[S/T]可在本文所揭示之某些具體實例之序列內的一或多個位置引入。改變醣基化之類型及程度在調節溶解度、功能及半衰期，以及實現位點特異性化學共軛方面具有實用應用。

【0032】 **異源（heterologous）：**源自不同基因來源或物種。

【0033】 **分離（isolated）：**「分離」之生物組分，諸如核酸、蛋白質（包括抗體）、細胞器或重組病毒已實質上與其中組分存在之環境（諸如細胞）中之其他生物組分，亦即其他染色體及染色體外DNA及RNA、蛋白質及細胞器分離或自其純化。已「分離」之核酸及蛋白質包括藉由標準純化方法純化之核酸及蛋白質。該術語亦涵蓋藉由宿主細胞中重組表現製備之核酸及蛋白質以及化學合成之核酸或蛋白質。分離不需要絕對純度，且可包括至少50%分離，諸如至少75%、80%、90%、95%、98%、99%或甚至99.9%分離之蛋白質、肽、核酸分子或病毒。

【0034】 **修飾（modification）：**核酸或蛋白質序列之序列變化。舉例而言，胺基酸序列修飾包括例如取代、插入及缺失或其組合。插入包括單個或多個胺基酸殘基之胺基及/或羧基端融合以及序列內插入。缺失由自蛋白質序列移除一或多個胺基酸殘基界定特徵。在本文之一些具體實例中，修飾（諸如，取代、插入或缺失）引起功能改變，諸如蛋白質之特定活性降低或增強（例如，降低聚集、改進摺疊或增加對目標蛋白質之親和力）。取代型修飾為其中至少一個殘基已移除且不同殘基插入其位置的修飾。胺基酸取代典型地為單個殘基，但可一次性發生於多個不同位置。取代、缺失、插入或其任何組合可組合以獲得最終突變序列。此等修飾可藉由修飾編碼蛋白質之DNA中之核苷酸，進而產生編碼修飾之DNA來製備。已知用於在具有已知序列之DNA中之預定位點處進行插入、缺失及取代突變的技術。「**經修飾之**」蛋白質或核酸係具有如上文所概述之一或多個修飾的蛋白質或核酸。

【0035】 **單體（monomer）：**單一分子單元（諸如蛋白質），其能夠結合至其他分子單元以形成二聚體或聚合物。在本發明之上下文中，「TGF-β2單體」為單一TGF-β2多肽鏈，其野生型形式可結合其他TGF-β2單體以形成二聚體。在本文中之一些具體實例中，重組TGF-β2單體已經工程改造以防止二聚。在本文中之其他具體實例中，已經工程改造以防止其直接二聚之重組TGF-β2單體可與自身能夠二聚之異源蛋白質（例如，IgG之Fc域）融合。

【0036】 **贅瘤形成（neoplasia）、惡性病（malignancy）、癌症（cancer）或腫瘤（tumor）：**贅瘤為過度細胞分裂產生之組織或細胞的異常生長。贅生性生長可以產生腫瘤。個體中腫瘤之量為可作為腫瘤之數目、體積或重量量測的「腫瘤負荷（tumor burden）」。不轉移之腫瘤稱為「良性（benign）」的。侵襲周圍組織及/或可轉移之腫瘤稱為「惡性（malignant）」的。

【0037】 血液腫瘤之實例包括白血病，包括急性白血病（如11q23陽性急性白血病、急性淋巴球性白血病、急性骨髓細胞性白血病、急性骨髓性白血病及骨髓母細胞性、前髓細胞性、骨髓單核球性、單核球性及紅白血病）、慢性白血病（如慢性骨髓細胞性（粒細胞性）白血病、慢性骨髓性白血病及慢性淋巴球性白血病）、真性紅血球增多症、淋巴瘤、霍奇金氏病（Hodgkin's disease）、非霍奇金氏淋巴瘤（頑固性及高級形式）、多發性骨髓瘤、瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症（Waldenstrom's macroglobulinemia）、重鏈病、骨髓發育不良症候群、毛細胞白血病及骨髓發育不良。

【0038】 實體腫瘤，諸如肉瘤及癌瘤之實例包括纖維肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、軟骨肉瘤、骨原性肉瘤及其他肉瘤、滑膜瘤、間皮瘤、尤文氏腫瘤（Ewing's tumor）、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤、結腸癌、淋巴惡性病、胰臟癌、乳癌（包括基底乳癌、乳管癌及小葉乳癌）、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝細胞癌、鱗狀細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、甲狀腺髓質癌、乳頭狀甲狀腺癌、嗜鉻細胞

瘤皮脂腺癌、乳頭狀癌、乳頭狀腺癌、髓質癌、支氣管癌、腎細胞癌、肝癌、膽管癌、絨膜癌、威耳姆士腫瘤（Wilms'tumor）、子宮頸癌、睪丸腫瘤、精原細胞瘤、膀胱癌及CNS腫瘤（諸如神經膠質瘤、星形細胞瘤、神經管胚細胞瘤、顱咽管瘤、室管膜瘤、松果體瘤、血管母細胞瘤、聽神經瘤、少突神經膠質瘤、腦膜瘤、黑色素瘤、神經母細胞瘤及視網膜母細胞瘤）。

【0039】 **聚乙二醇化：**聚乙二醇（PEG）聚合物鏈與分子及大分子結構（諸如藥物、治療性蛋白質或囊泡）之共價及非共價連接或融合之過程，其接著稱為**聚乙二醇化**（或聚乙二醇化）。聚乙二醇化通常藉由PEG之反應性衍生物與目標分子一起培育來達成。PEG與藥物或治療性蛋白質之共價連接可掩蔽來自宿主免疫系統之藥劑（降低之免疫原性及抗原性），且增加藥劑之流體動力學尺寸（溶液尺寸），其藉由降低腎清除率而延長其循環系統時間。聚乙二醇化亦可向疏水性藥物及蛋白質提供水溶性。

【0040】 **肽（peptide）或多肽（polypeptide）：**其中單體為經由醯胺鍵接合在一起之胺基酸殘基的聚合物。當胺基酸為α-胺基酸時，可使用L-光學異構體或D-光學異構體。如本文所用之術語「肽」、「多肽」或「蛋白質」意欲涵蓋任何胺基酸序列且包括經修飾之序列。術語「肽」及「多肽」特定言之意欲涵蓋天然存在之蛋白質，以及以重組方式或以合成方式產生之蛋白質。

【0041】 保守胺基酸取代為當進行時最少干擾原始蛋白質之特性的取代，亦即，蛋白質之結構且尤其功能被保留且不由此類取代顯著改變。保守取代之實例展示如下。

初始殘基	保守性取代
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln、His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn；Gln
Ile	Leu、Val
Leu	Ile；Val
Lys	Arg；Gln；Glu
Met	Leu；Ile
Phe	Met；Leu；Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp；Phe
Val	Ile；Leu

【0042】 保守取代一般維持（a）取代區域中之多肽主鏈的結構，例如呈薄片或螺旋構形；（b）分子在目標位點處之電荷或疏水性；或（c）側鏈之主體。

【0043】 一般預期產生蛋白質特性之最大變化的取代將為非保守的，例如如下之變化：（a）親水性殘基，例如絲胺酸或蘇胺酸經（或被）疏水性殘基，例如白胺酸、異白胺酸、苯丙胺酸、纈胺酸或丙胺酸取代；（b）半胱胺酸或脯胺酸

經（或被）任何其他殘基取代；（c）具有正電性側鏈之殘基，例如離胺酸、精胺酸或組胺酸經（或被）負電殘基，例如麩醯胺酸或天冬胺酸取代；或（d）具有大體積側鏈之殘基，例如苯丙胺酸經（或被）不具有側鏈之殘基，例如甘胺酸取代。

【0044】 **醫藥學上可接受之載劑：**適用於本發明之醫藥學上可接受之載劑（媒劑）為習知的。*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, The University of the Sciences in Philadelphia, Editor, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, 第21版（2005描述適合於醫藥遞送一或多種治療化合物、分子或藥劑（例如，重組TGF-β2單體）之組成物及調配物。

【0045】 一般而言，載劑之性質將視所採用之特定投予模式而定。舉例而言，非經腸調配物通常包含包括醫藥學上及生理學上可接受之流體的可注射流體，諸如水、生理鹽水、平衡鹽溶液、葡萄糖水溶液、甘油或其類似物作為媒劑。對於固體組成物（例如散劑、丸劑、錠劑或膠囊形式），習知無毒固體載劑可包括例如醫藥級甘露醇、乳糖、澱粉或硬脂酸鎂。除生物學中性載劑以外，待投予之醫藥組成物亦可含有少量無毒輔助物質，諸如濕潤劑或乳化劑、防腐劑及pH緩衝劑及其類似者，例如乙酸鈉或脫水山梨醇單月桂酸酯。

【0046】 **預防、治療或改善疾病：**「預防」疾病係指抑制疾病之完全發展。「治療（treating）」係指改善疾病或病理性病狀在其開始發展之後的病徵或症狀，諸如減少腫瘤負荷（諸如減小腫瘤體積或尺寸）或減小轉移之尺寸數目的治療性干預。「改善（ameliorating）」係指疾病病徵或症狀之數目或嚴重程度降低。

【0047】 **重組：**重組（recombinant）：重組核酸、蛋白質或病毒為具有並非天然存在之序列或具有藉由人工組合兩個在其他情況下分離之序列片段製成之序列的核酸、蛋白質或病毒。此人工組合通常藉由化學合成或藉由人工操縱核酸之分離片段，例如藉由基因工程改造技術實現。術語重組包括已藉由添加、取

代或刪除天然核酸分子或蛋白質之一部分而改變的核酸、蛋白質及病毒。

【0048】 **序列一致性/相似性：**兩種或更多種核酸序列或兩種或更多種胺基酸序列之間的一致性係依據序列之間的一致性或相似性來表現。序列一致性可依據一致性百分比進行量測；百分比愈高，序列愈一致。序列相似性可依據相似性百分比（其考慮保守胺基酸取代）進行量測；百分比愈高，序列愈相似。當使用標準方法比對時，核酸或胺基酸序列之同源物或異種同源物擁有相對較高程度之序列一致性/相似性。當直系同源蛋白質或cDNA衍生自與更遠相關之物種（諸如人類與秀麗隱桿線蟲（C. elegans）序列）相比更緊密相關之物種（諸如人類與小鼠序列）時，此同源性更顯著。

【0049】 用於比較之序列比對方法在此項技術中已熟知。各種程式及比對演算法描述於以下中：Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, *Gene*, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, *CABIOS* 5:151-3, 1989; Corpet等人., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90, 1988; Huang等人. *Computer Appls. in the Biosciences* 8, 155-65, 1992；及Pearson等人., *Meth. Mol. Bio.* 24:307-31, 1994. Altschul等人., *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990呈現序列比對方法及同源性計算之詳細考慮。

【0050】 NCBI鹼基局部比對檢索工具（Basic Local Alignment Search Tool；BLAST）（Altschul等人, J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990）可獲自數種來源，包括國家生物技術資訊中心（National Center for Biotechnology Information，NCBI）及在網際網路上，其與序列分析程式blastp、blastn、blastx、tblastn及tblastx結合使用。額外資訊可發現於NCBI網站處。

【0051】 **個體（subject）：**活多細胞生物體，包括脊椎動物生物體，其為包括人類與非人類哺乳動物之類別。

【0052】 **標籤：**可連接至蛋白質或核酸，諸如用於標記、偵測或純化目的之分子。在一些具體實例中，標籤為蛋白質標籤。在一些具體實例中，蛋白質標籤為親和標籤（例如Avitag、六組胺酸、幾丁質結合蛋白質、麥芽糖結合蛋白質或麩胱甘肽-S-轉移酶）、抗原決定位標籤（例如，V5、c-myc、HA或FLAG）或螢光標籤（例如，GFP或另一熟知螢光蛋白質）。

【0053】 **治療有效量（therapeutically effective amount）：**足以在所治療之個體中達成所要功效的化合物或組成物，例如重組TGF-β2單體之數量。舉例而言，此可為抑制或阻斷細胞中之TGF-β傳訊所必需之量。在其他情況下，此可為抑制或遏制腫瘤生長所必需之量。在一個具體實例中，治療有效量為消除腫瘤、減小腫瘤尺寸或預防腫瘤轉移所必需之量，例如與治療之前的尺寸/體積/數目相比，諸如使腫瘤尺寸及/或體積減小至少10%、至少20%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或甚至100%，及/或將轉移瘤之數目及/或尺寸/體積減少至少10%、至少20%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或甚至100%。在一個具體實例中，治療有效量為增加個體存活時間所必需之量，諸如使個體之存活時間增加，至少3個月、至少4個月、至少5個月、至少6個月、至少9個月、至少1年、至少1.5年、至少2年、至少3年、至少4年或至少5年，例如與不用重組TGF-β2單體處理之患有相同癌症之個體的存活時間相比。在其他情況下，治療有效量為抑制或降低纖維化所需之作用，諸如與治療之前相比降低至少10%、至少20%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或甚至100%。當向個體投予時，一般將使用將達成已展示達成所要試管內功效之目標組織濃度（例如在腫瘤中）的劑量。

【0054】 **轉形生長因子-β（TGF-β）：**調節增殖、細胞分化及多種其他細胞功能的分泌多功能蛋白。許多細胞合成TGF-β且幾乎所有細胞均表現TGF-β之受體。術語「TGF-β」係指分別由基因TGFB1、TGFB2、TGFB3編碼的三種不同蛋

白質同功異構物TGF-β1、TGF-β2及TGF-β3。

【0055】 **TGF-β傳訊路徑（TGF-β signaling pathway）：**涉及多種細胞過程，諸如細胞增殖、分化及細胞凋亡之傳訊路徑。TGF-β路徑之成員包括但不限於TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、TGF-β受體I型及TGF-β受體II型。

【0056】 **TGF-β受體（TGF-β receptor）：**術語「TGF-β受體」包括TGF-β受體I型（由TGFBR1編碼之TβRI）及TGF-β受體II型（由TGFBR2編碼之TβRII）。TGF-β受體為絲胺酸/蘇胺酸蛋白激酶。I型及II型TGF-β受體在結合於TGF-β時形成異二聚複合體，將TGF-β訊號自細胞表面轉導至細胞質。

【0057】

III. 重組TGF-β2單體

本文揭示經工程改造以防止二聚且阻斷TGF-β傳訊之TGF-β2單體。經工程改造單體缺乏結合且募集TGF-β I型受體（TβRI）之能力，但保持結合高親和力TGF-β II型受體（TβRII）的能力。所揭示之TGF-β2單體亦包括增加其對TβRII之親和力、降低其聚集及/或改進其摺疊的額外修飾。所揭示之TGF-β2單體及其組成物可例如用於抑制細胞或個體之TGF-β傳訊，或用於治療與異常TGF-β傳訊相關之病症，例如纖維化病症、癌症、眼部疾病或結締組織之遺傳病症。

【0058】 本文提供重組TGF-β2單體，其包括對應於野生型人類TGF-β2之胺基酸殘基52-71的α3螺旋之缺失（闡述為SEQ ID NO: 1），及對應於SEQ ID NO: 1之殘基77之胺基酸殘基處的半胱胺酸至精胺酸（或絲胺酸）取代；此等修飾防止單體發生二聚。TGF-β2單體進一步包括對應於SEQ ID NO: 1之殘基51之胺基酸殘基處的白胺酸至精胺酸取代，及對應於SEQ ID NO: 1之殘基74之胺基酸殘基處的丙胺酸至離胺酸取代；此等修飾增加單體之淨電荷。TGF-β2單體亦包括對應於SEQ ID NO: 1之殘基25之胺基酸殘基處的離胺酸至精胺酸取代，及對應

於SEQ ID NO: 1之殘基94之胺基酸殘基處的離胺酸至精胺酸取代，其增加對TβRII之親和力。TGF-β2單體視情況進一步包括增加單體對TβRII之親和力、降低聚集及/或改進摺疊的一或多種額外修飾。

【0059】 在一些具體實例中，TGF-β2單體進一步包括對應於SEQ ID NO: 1之殘基26之胺基酸殘基處的精胺酸至離胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基79之胺基酸殘基處的纈胺酸至精胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基89之胺基酸殘基處的白胺酸至纈胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基92之胺基酸殘基處的異白胺酸至纈胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基95之胺基酸殘基處的蘇胺酸至離胺酸取代；及對應於SEQ ID NO: 1之殘基98之胺基酸殘基處的異白胺酸至纈胺酸取代。在一些實例中，TGF-β2單體具有對應於SEQ ID NO: 1之殘基77之胺基酸殘基處的半胱胺酸至精胺酸取代。在特定實例中，TGF-β2單體之胺基酸序列與SEQ ID NO: 4具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性（同時保持以上所列之胺基酸取代）。在特定非限制性實例中，TGF-β2單體之胺基酸序列包含本文闡述為SEQ ID NO: 4之mmTGF-β2-7M2R之胺基酸序列或由該胺基酸序列組成。

【0060】 在其他具體實例中，TGF-β2單體進一步包括對應於SEQ ID NO: 1之殘基7之胺基酸殘基處的半胱胺酸至纈胺酸取代；及對應於SEQ ID NO: 1之殘基16之胺基酸殘基處的半胱胺酸至丙胺酸取代。在一些實例中，TGF-β2單體具有對應於SEQ ID NO: 1之殘基77之胺基酸殘基處的半胱胺酸至絲胺酸取代。在特定實例中，TGF-β2單體之胺基酸序列與SEQ ID NO: 5具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性（同時保持以上所列之胺基酸取代）。在特定非限制性實例中，TGF-β2單體之胺基酸序列包含本文闡述為SEQ ID NO: 5之mmTGF-β2-2M-Del7-16之胺基酸序列或由該胺基酸序列組成。

【0061】 在其他具體實例中，TGF-β2單體進一步包括對應於SEQ ID NO: 1之殘基7之胺基酸殘基處的半胱胺酸至纈胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基16之胺基酸殘基處的半胱胺酸至丙胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基26之胺基酸殘基處的精胺酸至離胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基79之胺基酸殘基處的纈胺酸至精胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基89之胺基酸殘基處的白胺酸至纈胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基92之胺基酸殘基處的異白胺酸至纈胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基95之胺基酸殘基處的蘇胺酸至離胺酸取代；及對應於SEQ ID NO: 1之殘基98之胺基酸殘基處的異白胺酸至纈胺酸取代。在一些實例中，TGF-β2單體具有對應於SEQ ID NO: 1之殘基77之胺基酸殘基處的半胱胺酸至精胺酸取代。在特定實例中，TGF-β2單體之胺基酸序列與SEQ ID NO: 6具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性（同時保持以上所列之胺基酸取代）。在特定非限制性實例中，TGF-β2單體之胺基酸序列包含本文闡述為SEQ ID NO: 6之mmTGF-β2-7M2R-Del7-16（「變異體1」或「var1」）之胺基酸序列或由該胺基酸序列組成。

【0062】 本文亦提供重組TGF-β2單體，其經修飾以包括與Dan及Cerubus相關之蛋白質（PRDC）的半胱胺酸結區域，以增強單體之摺疊。在一些具體實例中，TGF-β2單體之胺基酸序列與SEQ ID NO: 7具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性。在特定實例中，TGF-β2單體之胺基酸序列包含本文闡述為SEQ ID NO: 7之mmTGF-β2-7M-PRDC之胺基酸序列或由該胺基酸序列組成。

【0063】 在本文中之一些具體實例中，重組TGF-β2單體經聚乙二醇化、醣基化、高醣基化，或包括延長循環時間之另一修飾。

【0064】 在一些具體實例中，重組TGF-β2單體進一步包括放射治療劑、用於化學療法之細胞毒性劑、藥物、顯像劑、螢光染料或螢光蛋白質標籤。

【0065】 本文亦提供包括TGF-β2單體及異源蛋白質之融合蛋白質。在一些具體實例中，異源蛋白質為蛋白質標籤。在一些實例中，蛋白質標籤為親和標籤（例如Avitag、六組胺酸、幾丁質結合蛋白質、麥芽糖結合蛋白質或麩胱甘肽-S-轉移酶）、抗原決定位標籤（例如，V5、c-myc、HA或FLAG）或螢光標籤（例如，GFP或另一熟知螢光蛋白質）。

【0066】 在其他具體實例中，異源蛋白質包括Fc域，諸如小鼠或人類Fc域。在特定具體實例中，異源蛋白質促進融合蛋白質之同二聚體（例如，來自人類IgG1、IgG2、IgG3之Fc域）、異二聚體（例如，經工程改造之Fc域、E/K捲曲螺旋）或多聚體（例如，五元抗體、奈米粒子）狀態的分子間締合。因此，在一些實例中，融合蛋白質為單鏈多肽。在其他實例中，融合蛋白質形成二聚或多聚體多肽。在特定實例中，融合蛋白質為異二聚體。

【0067】 在其他具體實例中，異源蛋白質為白蛋白、白蛋白結合蛋白質或藥劑或增加活體內TGF-β單體之循環時間的另一蛋白質。

【0068】 本文進一步提供編碼本文中所揭示之重組TGF-β2單體或融合蛋白質之經分離核酸分子。在一些具體實例中，核酸分子可操作地連接至啟動子，諸如T細胞特異性啟動子。

【0069】 亦提供包括所揭示之核酸分子的載體。在一些實例中，載體為病毒載體，諸如慢病毒載體。進一步提供包括本文所揭示之核酸分子或載體的經分離細胞。在一些實例中，細胞為T細胞。細胞對個體可為自體的，或其可為異源（同種異體）。

【0070】 本文進一步提供包括本文所揭示之重組TGF-β2單體、融合蛋白質、核酸分子、載體或經分離細胞之組成物及醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。

【0071】 本文亦提供抑制細胞中之TGF-β傳訊的方法。在一些具體實例

中，該方法包括使細胞與有效量之本文所揭示之重組TGF-β2單體、融合蛋白質、核酸分子、載體、經分離細胞或組成物接觸。在一些實例中，該方法為試管內方法。在其他實例中，該方法係離體。在其他實例中，該方法係活體內方法。

【0072】 另外提供抑制患有與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症之個體的TGF-β傳訊之方法。在一些具體實例中，該方法包括向該個體投予有效量之重組TGF-β2單體、融合蛋白質、核酸分子、載體、經分離細胞或本文所揭示之組成物。在一些實例中，與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症為纖維化病症，諸如（但不限於）肺纖維化、囊腫性纖維化、特發性肺纖維化、間質性肺病、肝硬化、腎臟纖維化（諸如由糖尿病引起之損傷）、心房纖維化、心肌內膜纖維化、動脈粥樣硬化、再狹窄、硬皮病或由手術併發症、化學治療藥物、輻射、損傷或灼傷引起之纖維化。在其他實例中，與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症為乳癌、腦癌、胰臟癌、前列腺癌、皮膚癌、膀胱癌、肝癌、卵巢癌、腎癌、子宮內膜癌、大腸直腸癌、胃癌、皮膚癌（諸如惡性黑色素瘤）或甲狀腺癌。在其他實例中，與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症為眼部疾病。在另外其他實例中，與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症為結締組織之遺傳病症。

【0073】 另外提供治療個體之與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症的方法。在一些具體實例中，該方法包括向該個體投予治療有效量之重組TGF-β2單體、融合蛋白質、核酸分子、載體、經分離細胞或本文所揭示之組成物。在一些實例中，與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症為纖維化病症，諸如（但不限於）肺纖維化、囊腫性纖維化、特發性肺纖維化、間質性肺病、肝硬化、腎臟纖維化（諸如由糖尿病引起之損傷）、心房纖維化、心肌內膜纖維化、動脈粥樣硬化、再狹窄、硬皮病或由手術併發症、化學治療藥物、輻射、損傷或灼傷引起之纖維化。在其他實例中，與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症為乳癌、腦癌、胰臟癌、前列腺癌、皮膚癌、膀胱癌、肝癌、卵巢癌、腎癌、子宮內膜癌、大腸直腸癌、

胃癌、皮膚癌（諸如惡性黑色素瘤）或甲狀腺癌。在其他實例中，與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症為眼部疾病。在另外其他實例中，與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症為結締組織之遺傳病症。

【0074】

IV. 經工程改造TGF-β單體之投予

本文提供組成物，諸如醫藥組成物，其包括重組人類TGF-β2單體、融合蛋白質或編碼TGF-β2單體或融合蛋白質之核酸分子或載體。亦提供包括經分離細胞，諸如T細胞之組成物，其包含編碼重組人類TGF-β2單體（或其融合蛋白質）之載體。在一些具體實例中，組成物包括醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。

【0075】 適用於本發明之醫藥學上可接受之載劑及賦形劑為習知的。參見例如*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, The University of the Sciences in Philadelphia, Editor, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, 第21版(2005)。舉例而言，非經腸調配物通常包括醫藥學上及生理學上可接受之流體媒劑的可注射流體，諸如水、生理鹽水、其他平衡鹽溶液、右旋糖水溶液、甘油或其類似物。對於固體組成物（例如散劑、丸劑、錠劑或膠囊形式），習知無毒固體載劑可包括例如醫藥級之甘露醇、乳糖、澱粉或硬脂酸鎂。除生物學中性載劑以外，待投予之醫藥組成物亦可含有少量無毒輔助物質，諸如濕潤劑或乳化劑、防腐劑、pH緩衝劑或其類似物，例如乙酸鈉或脫水山梨醇單月桂酸酯。可包括之賦形劑為例如其他蛋白質，諸如人類血清白蛋白或血漿製劑。

【0076】 關於投予細胞，可使用多種水性載劑，例如緩衝鹽水及其類似物，以引入細胞。此等溶液為無菌的且大體上不含非所需物質。此等組成物可藉由習知、眾所周知的滅菌技術來滅菌。組成物可含有接近生理條件所需的醫藥學上可

接受之輔助物質，諸如pH調節劑及緩衝劑、毒性調節劑及其類似物，例如乙酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、乳酸鈉及其類似物。此等調配物中之濃度可廣泛變化，且將主要基於流體體積、黏度、體重及其類似者根據所選擇之特定投予模式及個體需求進行選擇。

【0077】 組成物之劑型將藉由所選擇之投予模式來確定。舉例而言，除可注射流體以外，可採用局部、吸入、口服及栓劑調配物。局部製劑可包括滴眼劑、軟膏、噴霧劑、貼片及其類似物。吸入製劑可為液體（例如，溶液或懸浮液）且包括噴霧、噴霧劑及其類似物。口服調配物可為液體（例如糖漿、溶液或懸浮液）或固體（例如粉劑、丸劑、錠劑或膠囊）。栓劑製劑亦可為固體、凝膠或懸浮液形式。對於固體組成物而言，習知無毒固體載劑可包括醫藥級甘露醇、乳糖、澱粉或硬脂酸鎂。製備此類劑型之實際方法為熟習此項技術者已知或將顯而易見的。

【0078】 包括重組人類TGF-β2單體或融合蛋白質（或編碼TGF-β2單體或融合蛋白質之核酸分子/載體）之組成物，諸如醫藥組成物可以適合於分別投予精確劑量之單位劑型調配。所投予之TGF-β2單體、融合蛋白質、核酸分子或載體之量將視所治療之個體、病痛之嚴重程度及投予方式而定，且最好留給開處方的臨床醫生來判斷。在此等界限內，待投予之調配物將含有能有效地在所治療之個體中達成所需作用之量的一定量的活性組分。

【0079】 TGF-β2單體或其組成物可在其組織上以各種方式（諸如，局部、經口、靜脈內、肌內、腹膜內、鼻內、皮內、鞘內、皮下、經由吸入或經由栓劑）向人類或其他動物投予。考慮案例之細節（例如，個體、疾病、所涉及之疾病狀態及治療是否為預防性的），主治臨床醫師將選擇特定投予模式及給藥方案。治療可涉及經數天至數月或甚至數年之時段的每天或多日劑量之化合物。

【0080】

V. 例示性條項

條項1. 一種重組轉形生長因子（TGF）-β2單體，其包含：

對應於SEQ ID NO: 1之殘基77之胺基酸殘基處的半胱胺酸至絲胺酸取代或半胱胺酸至精胺酸取代；

對應於SEQ ID NO: 1之胺基酸殘基52-71的α3螺旋之缺失；

對應於SEQ ID NO: 1之殘基25之胺基酸殘基處的離胺酸至精胺酸取代；

對應於SEQ ID NO: 1之殘基51之胺基酸殘基處的白胺酸至精胺酸取代；

對應於SEQ ID NO: 1之殘基74之胺基酸殘基處的丙胺酸至離胺酸取代；

對應於SEQ ID NO: 1之殘基94之胺基酸殘基處的離胺酸至精胺酸取代；及

（i） 對應於SEQ ID NO: 1之殘基26之胺基酸殘基處的精胺酸至離胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基79之胺基酸殘基處的纈胺酸至精胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基89之胺基酸殘基處的白胺酸至纈胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基92之胺基酸殘基處的異白胺酸至纈胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基95之胺基酸殘基處的蘇胺酸至離胺酸取代；及對應於SEQ ID NO: 1之殘基98之胺基酸殘基處的異白胺酸至纈胺酸取代；

（ii） 對應於SEQ ID NO: 1之殘基7之胺基酸殘基處的半胱胺酸至纈胺酸取代；及對應於SEQ ID NO: 1之殘基16之胺基酸殘基處的半胱胺酸至丙胺酸取代；或

（iii） 對應於SEQ ID NO: 1之殘基7之胺基酸殘基處的半胱胺酸至纈胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基16之胺基酸殘基處的半胱胺酸至丙胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基26之胺基酸殘基處的精胺酸至離胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基79之胺基酸殘基處的纈胺酸至精胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基89之胺基酸殘基處的白胺酸至纈胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基

92之胺基酸殘基處的異白胺酸至纈胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基95之胺基酸殘基處的蘇胺酸至離胺酸取代；及對應於SEQ ID NO: 1之殘基98之胺基酸殘基處的異白胺酸至纈胺酸取代。

條項2. 如條項1之重組TGF-β2單體，其包含對應於SEQ ID NO: 1之殘基77之胺基酸殘基處的半胱胺酸至精胺酸取代。

條項3. 如條項2之重組TGF-β2單體，其中該TGF-β2單體之胺基酸序列包含SEQ ID NO: 4或由其組成。

條項4. 如條項2之重組TGF-β2單體，其中該TGF-β2單體之胺基酸序列包含SEQ ID NO: 6或由其組成。

條項5. 如條項1之重組TGF-β2單體，其包含對應於SEQ ID NO: 1之殘基77之胺基酸殘基處的半胱胺酸至絲胺酸取代。

條項6. 如條項5之重組TGF-β2單體，其中該TGF-β2單體之胺基酸序列包含SEQ ID NO: 5或由其組成。

條項7. 一種重組轉形生長因子（TGF）-β2單體，其中該TGF-β2單體之胺基酸序列包含SEQ ID NO: 7或由其組成。

條項8. 如條項1至7中任一項之重組TGF-β2單體，其經聚乙二醇化。

條項9. 如條項1至7中任一項之重組TGF-β2單體，其經醣基化或高醣基化。

條項10. 如條項1至9中任一項之重組TGF-β2單體，其進一步包含放射治療劑、用於化學療法之細胞毒性劑、藥物、顯像劑、螢光染料或螢光蛋白質標籤。

條項11. 一種融合蛋白質，其包含如條項1至10中任一項之重組TGF-β2單體及異源蛋白質。

條項12. 如條項11之融合蛋白質，其中該異源蛋白質包含蛋白質標籤、Fc域、白蛋白、白蛋白結合多肽、抗體、抗體之抗原結合片段或靶向部分。

條項13. 如條項11或條項12之融合蛋白質，其中該融合蛋白質為單鏈多肽。

條項14. 如條項11或條項12之融合蛋白質，其中該融合蛋白質形成二聚多肽。

條項15. 如條項11或條項12之融合蛋白質，其中該融合蛋白質為異二聚體。

條項16. 如條項11或條項12之融合蛋白質，其中該融合蛋白質為多聚體。

條項17. 一種經分離核酸分子，其編碼如條項1至10中任一項之重組TGF-β2單體，或如條項11至16中任一項之融合蛋白質。

條項18. 如條項17之核酸分子，其可操作地連接至啟動子。

條項19. 一種載體，其包含如條項17或條項18之核酸分子。

條項20. 一種經分離細胞，其包含如條項17或條項18之核酸分子或如條項19之載體。

條項21. 如條項20之經分離細胞，其中該細胞為T淋巴細胞。

條項22. 一種組成物，其包含：

如條項1至10中任一項之重組TGF-β2單體，如條項11-16中任一項之融合蛋白質，如條項17或條項18之核酸分子，如條項19之載體，或如條項20或條項21之經分離細胞；及

醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。

條項23. 一種抑制細胞中之TGF-β傳訊的方法，其包含使該細胞與有效量之如條項1-10中任一項之重組TGF-β2單體，如條項11-16中任一項之融合蛋白質，如條項17或條項18之核酸分子，如條項19之載體，如條項20或條項21之經分離細胞或如條項22之組成物接觸。

條項24. 一種抑制患有與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症之個體的

TGF-β傳訊之方法，其包含向該個體投予有效量之如條項1-10中任一項之重組TGF-β2單體，如條項11-16中任一項之融合蛋白質，如條項17或條項18之核酸分子，如條項19之載體，如條項20或條項21之經分離細胞或如條項22之組成物。

條項25. 一種治療個體之與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症的方法，其包含向該個體投予治療有效量之如條項1-10中任一項之重組TGF-β2單體，如條項11-16中任一項之融合蛋白質，如條項17或條項18之核酸分子，如條項19之載體，如條項20或條項21之經分離細胞或如條項22之組成物。

條項26. 如條項24或條項25之方法，其中與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症為纖維化病症。

條項27. 如條項24或條項25之方法，其中與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症為乳癌、腦癌、胰臟癌、前列腺癌、皮膚癌、膀胱癌、肝癌、卵巢癌、腎癌、子宮內膜癌、大腸直腸癌、胃癌、皮膚癌或甲狀腺癌。

條項28. 如條項24或條項25之方法，其中與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症為眼部疾病。

條項29. 如條項24或條項25之方法，其中與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症為結締組織之遺傳病症。

【0081】

實施例

實施例1：用於活體內投予之經修飾TGF-β2單體

此實施例描述用於評價修飾以增強TGF-β2單體之活體內遞送的研究。

【0082】 經工程改造以防止二聚，藉此防止結合至及募集TGF-β I型受體（TβRI）的TGF-β單體描述於WO 2018/094173中，其以全文引用之方式併入本文中。TGF-β2單體mmTGF-β2-7M包括C77S取代及α3螺旋之缺失以防止二聚，且進

一步包括七個胺基酸取代，該等取代實現高親和力TβRII結合及兩個經取代鹼性殘基，以增加其電荷，且因此增加其溶解度（圖1A）。為了改進此單體之特性，產生四種mmTGF-β2-7M變異體（SEQ ID NOs: 4-7），其描述於表1及圖1B-圖1E中。單胺基酸取代及缺失之位置係相對於SEQ ID NO: 1所闡述之人類TGF-β2。

【0083】

表1.TGF-β單體變異體

變異體名稱	SEQ ID NO	變異體描述	單體長度	單胺基酸取代	缺失
mmTGF-β2	2	人類 TGF-β2 單體	112 a.a.	C77S	無
mmTGF-β2-7M	3	人類 TGF-β2 單體，其中 α3 經環置換	92 a.a.	K25R、R26K、L51R、A74K、C77S、L89V、I92V、K94R T95K、I98V	殘基 52-71
mmTGF-β2-7M2R	4	人類 TGF-β2 微型單體，其中對 TβRII 之親和力增加且聚集降低	92 a.a.	K25R、R26K、L51R、A74K、C77R、V79R、L89V、I92V、K94R、T95K、I98V	殘基 52-71
mmTGF-β2-2M-Del7-16	5	人類 TGF-β2 微型單體，其中對 TβRII 之親和力增加且摺疊改進	92 a.a.	C7V、C16A、K25R、L51R、A74K、C77S、K94R	殘基 52-71
mmTGF-β2-7M2R-Del7-16（亦稱為「var1」）	6	人類 TGF-β2 微型單體，其中對 TβRII 之親和力增加，聚集降低且摺疊改進	92 a.a.	C7V、C16A、K25R、R26K、L51R、A74K、C77R、V79R、L89V、I92V、K94R、T95K、I98V	殘基 52-71
mmTGF-β2-7M-PRDC	7	包括指 1-2 及指 3-4 之人類 TGF-β2 微型單體，移植有 PRDC 之胱胺酸結區域	115 a.a.	K25R、R26K、L89V、I92V、K94R、T95K、I98V	參見圖 1D

如在下文更詳細地描述，代替如在mmTGF-β2-7M中之絲胺酸，用精胺酸取代C77連同用精胺酸取代V79，使得能夠形成單體且降低mmTGF-β2-7M2R之聚

集（圖1B）。錯誤摺疊之降低係藉由C7V及C16A取代（mmTGF-β2-2M-Del7-16；圖1C）消除C7-C16二硫鍵或藉由用PRDC（mmTGF-β2-7M-PRDC；圖1D）置換胱胺酸結區域而實現。單體mmTGF-β2-7M2R-Del7-16（圖1E）包括降低聚集及改進摺疊之修飾。

【0084】

SEQ ID NO: 1 - WT人類TGF-β2

ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGAC
PYLWSSDTQHSKVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSN
MIVKSCKCS

SEQ ID NO: 2 - mmTGF-β**2**

ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGAC
PYRASKSPSCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS

SEQ ID NO: 3 - mmTGF-β**2-7M**

ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGAC
PYRASKSPSCVSQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS

SEQ ID NO: 4 - mmTGF-β**2-7M2R**

ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGAC
PYRASKSPRCRSQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS

SEQ ID NO: 5 - mmTGF-β**2-2M-Del7-16**

ALDAAYVFRNVQDNCALRPLYIDFRRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGAC
PYRASKSPSCVSQDLEPLTILYYIGRTPKIEQLSNMIVKSCKCS

SEQ ID NO: 6 - mmTGF-β**2-7M2R-Del7-16**

ALDAAYVFRNVQDNCALRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGA
CPYRASKSPRCRSQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS

SEQ ID NO: 7 - mmTGF-β**2-7M-PRDC**

KEVLASSQEALVVTERKYLKSDWCKLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGY NANFCYGQCNSFYIPRHVKKEEDSFQSSAFCVSQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQ LSNMIVKSCRCMSV

在一些具體實例中，以上序列中之任一者包括N端甲硫胺酸（M）殘基。

【0085】

聚集傾向之消除或降低

首先研究消除或減少mmTGF-β2-7M聚集之傾向的修飾。儘管先前展示經工程改造之mmTGF-β2-7M單體比野生型TGF-β2不易聚集得多，但mmTGF-β2-7M仍然保持一定聚集傾向（Kim等人，*J Biol Chem* 292(17):7173-7188, 2017）。此自以下顯而易見：如在不存在非變性清潔劑3-[(3-膽醯胺基丙基)二甲基銨基]-1-丙磺酸鹽（CHAPS）下（圖2D、2E）或在其存在下（圖2F）記錄時，藉由二維^{1}H-^{15}N NMR位移相關（HSQC，異核單一量子相關）光譜所偵測到的，出現醯胺主鏈^{1}H-^{15}N訊號。在不存在CHAPS之情況下，主鏈醯胺訊號之強度變化很大，其中一些幾乎不可偵測，尤其在已知蛋白質之溶解度相對於pH 4.6下降低的pH 7.2下。訊號強度之此類型變化係由高階聚集體之短暫形成引起。此類聚集體之形成延長蛋白質之旋轉相關時間（τc），因此加寬NMR訊號且使訊號強度降低。已觀測到，在pH 4.6或7.2下添加增加濃度之CHAPS引起許多訊號之強度的提高，且因此引起此等訊號在所觀測到之光譜中之均勻性的增加（圖2F）。訊號強度之改善取決於CHAPS之濃度，在濃度高達約10 mM時，出現大幅改善。

【0086】 假設CHAPS在減少mmTGF-β2-7M之聚集中發揮的作用係由於經由一些保留在分子區域中之疏水性殘基短暫形成聚集體，最佳地描述為指之基底，其在野生型TGF-β2同二聚體中係二聚體界面之一部分（圖1A）。儘管測試

發現對聚集體形成影響極小之若干替代，但將mmTGF-β2-7M中之兩個殘基取代為精胺酸，S57R及V59R（圖1B），其對應於相對於SEQ ID NO: 1之野生型人類TGF-β2之C77S及V79R取代，顯著降低了聚集傾向。攜帶經精胺酸置換的兩個殘基之mmTGF-β2-7M之此變異體命名為mmTGF-β2-7M2R（SEQ ID NO: 4）。聚集傾向降低之證據為不管pH如何或是否添加非變性CHAPS，此變異體觀測到之均勻得多的NMR訊號強度（圖2A-2C）。

【0087】

改進摺疊的修飾

TGF-β蛋白質由歸類為具有胱胺酸結生長因子摺疊（CKGF）之單體形成（Hinck等人，Cold Spring Harb Prospect Biol 8(12):a022103, 2016）。此摺疊存在於TGF-β家族之所有蛋白質中，但亦發現於人類中之許多其他傳訊蛋白質及傳訊蛋白質拮抗因子中。其包括傳訊蛋白質血小板衍生生長因子（platelet-derived growth factor，PDGF）、血管內皮生長因子（vascular-endothelial growth factor，VEGF）及神經生長因子（nerve growth factor，NGF）及拮抗因子，諸如諾金（noggin）、硬骨素及Dan及Cerubus相關蛋白質（PRDC）。TGF-β家族之蛋白質在CKGF蛋白質中為獨特的，因為其均具有N端前域。儘管仍在研究前域之作用，但已知其對該家族之許多蛋白質具有調節作用（Hinck等人，Cold Spring Harb Prospect Biol 8(12):a022103, 2016）。此調節係來自前域與生長因子域（growth factor domain，GFD）之結合，有時具有足夠（奈莫耳至亞奈莫耳）親和力以完全阻斷GFD結合I型及II型受體之能力。一些前域，諸如TGF-β1、TGF-β2及TGF-β3之前域僅以極高的親和力結合GFD，且因此其維持於非活性（潛伏）形式直至其被活化，但亦為GFD之適當摺疊所需。TGF-β之GFD，如其他CKGF蛋白質之GFD，由為藉由三個二硫鍵穩定化的結構模體的胱胺酸結界定特徵（Schwarz,

Biol Chem 398(12): 1295-1308, 2017）。三個二硫鍵在空間上彼此非常接近，且因此其形成為複雜的，且除正確者之外亦存在許多可能的替代拓樸配置。

【0088】 此與mmTGF-β2-7M相關，因為其保留胱胺酸結（以及一種額外二硫鍵，稱為8-17二硫鍵（對應於相對於SEQ ID NO: 1之殘基7及16處的半胱胺酸，因此在本文中稱為「7-16」）。一種產生mmTGF-β2-7M蛋白質之方式為以不溶性包涵體形式將其表現且使蛋白質再摺疊以形成二硫鍵之天然配對（Huang and Hinck, *Methods Mol Biol* 1344:63-92, 2016）。但是總體摺疊產率受到由於其八個半胱胺酸殘基之錯誤摺疊及不當配對而形成的聚集體的限制。mmTGF-β2-7M蛋白質亦可藉由以分泌蛋白質形式在真核宿主中表現蛋白質而產生，但不同於無前域之野生型TGF-β同二聚體。然而，嘗試使用此方法表現mmTGF-β2-7M使得形成顯著錯誤摺疊二硫鍵連接的聚集體。

【0089】 因此，研究旨在改進mmTGF-β2-7M之摺疊的修飾。為了改進摺疊，一次一個二硫鍵消除mmTGF-β2-7M之四個二硫鍵中之每一者。為此，形成各二硫鍵之兩個半胱胺酸經纈胺酸-丙胺酸對取代，且隨後經修飾之蛋白質經表現、再摺疊且根據前述程序純化（Kim等人., *J Biol Chem* 292(17):7173-7188, 2017）。為了增強獲得天然摺疊蛋白質之可能性，在經工程改造之TGF-β2單體之背景下產生取代，但僅兩個必需殘基K25及K94變成TGF-β1之取代，而非如在mmTGF-β2-7M中之七個取代。仍預期此等變異體以高親和力結合TβRII，但以改進之效率摺疊，此係因為已知TGF-β2以比TGF-β1高得多的效率摺疊（Huang and Hinck, *Methods Mol Biol* 1344:63-92, 2016）。結果顯示，在此背景下，形成經纈胺酸及丙胺酸取代之7至16個二硫鍵的半胱胺酸變異體，設計為mmTGF-β2-2M-Del7-16（SEQ ID NO: 5；圖1C）天然摺疊（圖3A-3C），但具有所消除之其他三個二硫鍵的變異體（15-78、44-109及48-111）為非原生的。在不存在CHAPS下存在尤其顯著的NMR訊號強度變化，暗示聚集，但在添加CHAPS時，此等差異減

少（圖3A-3C）。可在不破壞蛋白質摺疊下消除7-16二硫鍵之事實表明此可引起摺疊之顯著改進，無論蛋白質係在細菌中產生且試管內再摺疊，抑或蛋白質在真核細胞中作為分泌蛋白質產生。

【0090】 所研究之第三類型之修飾亦旨在改進mmTGF-β2-7M之摺疊。所選擇之策略為利用以下事實：存在天然產生為單體且不具有或依賴於前域來摺疊的一些CKGF蛋白質，諸如骨成形性蛋白質（bone morphogenetic protein，BMP）拮抗因子PRDC。為了利用PRDC摺疊之潛在改進，但保持高親和力TβRII結合，產生嵌合mmTGF-β2-7M:PRDC構築體，其中將為負責結合TβRII之區域的mmTGF-β2-7M之指1至2及3至4區移植至PRDC之胱胺酸結區上。命名為mmTGF-β2-7M-PRDC（SEQ ID NO: 7；圖1D）之此構築體在大腸桿菌中表現，以類似於用於mmTGF-β27M之方式再摺疊（Kim等人，J Biol Chem 292(17):7173-7188, 2017），且使用高解析度陽離子交換層析純化至均質。經由NMR分析，此蛋白質展示為原生摺疊，如遠超出對應於^{1}H維度中之7.9至8.5 ppm的無規線圈區域之醯胺信號分散所證明（圖4A-4C）。此表示設計為成功的，其中PRDC之胱胺酸結區與mmTGF-β2-7M之指區充分整合。

【0091】

mmTGF-β2-7M變異體之結合特性

為了在細胞中及活體內發揮功能，任何設計之mmTGF-β2-7M變異體之前提條件為其以高親和力結合TβRII。為了評價本文所描述之mmTGF-β2-7M變異體（mmTGF-β2-7M2R（SEQ ID NO: 4）、mmTGF-β2-2M-Del7-16（SEQ ID NO: 5）及mmTGF-β2-7M-PRDC（SEQ ID NO: 7））結合TβRII之能力，使用等溫滴定量熱法（ITC）及原生凝膠。ITC結合實驗藉由以下方式進行：將遞增量之TβRII注入至mmTGF-β2-7M2R（SEQ ID NO: 4）或mmTGF-β2-2M-Del7-16（SEQ ID NO:

5）中，其中mmTGF-β2-7M（SEQ ID NO: 3）用作參考對照組。此等滴定產生可易於偵測之等溫線，具有較大負焓及接近1:1的結合化學計算量（圖5）。綜合熱量與1:1結合模型的擬合得出mmTGF-β2-7M2R及mmTGF-β2-2M-Del7-16之結合TβRII的解離常數（K_D）分別為75.1 nM及80.1 nM（圖5）。此等K_D在針對mmTGF-β2-7M所測定（60.5 nM）之實驗誤差內，表示為減少聚集或改良摺疊而引入之取代對蛋白質結合TβRII之能力無不利影響。

【0092】 或者使用原生凝膠評估mmTGF-β2-7M-PRDC（SEQ ID NO: 7）之結合。此等不提供KD之定量量測，但其表示高親和力結合，因為偵測複合體需要兩種蛋白質在與電泳之時間標度相當的時間標度上保持結合，電泳之該時間標度為約一小時。原生凝膠展示mmTGF-β2-7M、mmTGF-β2-7M2R及mmTGF-β2-7M-PRDC均形成遷移凝膠長度之大約四分之一的條帶，而TβRII移過凝膠之接近全長（圖4D）。此與先前單獨的mmTGF-β2-7M、mmTGF-β2-7M2R及mmTGF-β2-7M-PRDC不進入凝膠的發現一起表明，所有三種此等蛋白質以高親和力結合TβRII。此與mmTGF-β2-7M及mmTGF-β2-7M2R變異體之ITC結果一致，且表示此對於mmTGF-β2-7M-PRDC亦成立。

【0093】

mmTGF-β2-7M變異體之抑制特性

為了在活體內發揮功能，任何設計之mmTGF-β2-7M變異體應抑制細胞中之TGF-β傳訊。為了對所揭示之mmTGF-β2-7M變異體，mmTGF-β2-7M2R（SEQ ID NO: 4）、mmTGF-β2-2M-Del7-16（SEQ ID NO: 5）及mmTGF-β2-7M-PRDC（SEQ ID NO: 7）評估此點，使用HEK-293 TGF-β螢光素酶報導體細胞系，其中細胞用融合至螢光素酶報導基因之TGF-β CAGA強化子元件穩定轉染。為了利用此分析評估抑制潛能，將細胞塗鋪於96孔盤中且添加不同濃度之mmTGF-β2-7M2R、

mmTGF-β2-2M-Del7-16及mmTGF-β2-7M-PRDC，其中mmTGF-β2-7M用作對照組。在30分鐘之後，藉由添加TGF-β3至10 pM之最終濃度來刺激TGF-β傳訊，且在12小時之後，溶解細胞且評估螢光素酶活性。所獲得之結果展示，mmTGF-β2-7M2R、mmTGF-β2-2M-Del7-16及mmTGF-β2-7M-PRDC各自強力抑制由TGF-β3誘導之信號傳導，其中擬合IC_{50}值分別為53 nM、111 nM及283 nM（圖6B-6D）。mmTGF-β2-7M2R及mmTGF-β2-2M-Del7-16之值均在針對mmTGF-β2-7M所量測值之兩倍以內（圖6A），表明此等蛋白質均幾乎與mmTGF-β2-7M（IC_{50} 58 nM）一樣有效。雖然仍有效力，但mmTGF-β2-7M-PRDC之IC_{50}為283 nM，其相對於mmTGF-β2-7M降低約5倍。此表示，儘管mmTGF-β2-7M-PRDC為功能性TGF-β抑制劑，但其效力可能由於兩個指區之位向的一些較小變化而稍微受損。

【0094】

概述

本文所揭示之mmTGF-β2-7M變異體具有降低其聚集傾向且增加其摺疊傾向之取代。經培養細胞中mmTGF-β2-7M變異體各自展示為保持以高親和力結合TβRII及強力抑制TGF-β3傳訊的能力。因此，所揭示之mmTGF-β2-7M變異體具有改良其活體內投予之能力的屬性，且因此為治療介入以減弱TGF-β所介導之疾病進展提供新途徑。

【0095】 鑒於所揭示發明之原理可應用於許多可能的具體實例，應認識到，所說明具體實例僅為本發明之較佳實施例且不應視為限制本發明之範圍。確切而言，本發明之範疇由以下申請專利範圍界定。吾人因此主張吾人之本發明全部屬於在此等技術方案申請專利範圍之範疇及精神的範圍內。

【符號說明】

無

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"
nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3"
fileName="FCP068075.SEQ.xml" softwareName="WIPO Sequence"
softwareVersion="2.2.0" productionDate="2023-03-25">
 <ApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>111138471</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2022-10-11</FilingDate>
 </ApplicationIdentification>
 <ApplicantFileReference>8123-107062-02</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>63/254,249</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2021-10-11</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="en">高等教育聯邦系統－匹茲堡大學</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF
HIGHER EDUCATION</ApplicantNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="zh">經工程改造TGF-β單體及使用方法
</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>7</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q1">
```

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSKVL
SLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>92</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..92</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q2">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCVSQD
LEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
```

```
    <INSDSeq_length>92</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..92</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q3">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCVSQD
LEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="4">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>92</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..92</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q4">
```

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPRCRSQD
LEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="5">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>92</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..92</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q5">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ALDAAYVFRNVQDNCALRPLYIDFRRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCVSQD
LEPLTILYYIGRTPKIEQLSNMIVKSCKCS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="6">
   <INSDSeq>
```

```
    <INSDSeq_length>92</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..92</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q6">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ALDAAYVFRNVQDNCALRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPRCRSQD
LEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="7">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>115</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..115</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q7">
```

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>KEVLASSQEALVVTERKYLKSDWCKLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCYGQCNSFYI
PRHVKKEEDSFQSSAFCVSQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCRCMSV</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種重組轉形生長因子（TGF）-β2單體，其包含：

對應於SEQ ID NO: 1之殘基77之胺基酸殘基處的半胱胺酸至絲胺酸取代或半胱胺酸至精胺酸取代；

對應於SEQ ID NO: 1之胺基酸殘基52-71的α3螺旋之缺失；

對應於SEQ ID NO: 1之殘基25之胺基酸殘基處的離胺酸至精胺酸取代；

對應於SEQ ID NO: 1之殘基51之胺基酸殘基處的白胺酸至精胺酸取代；

對應於SEQ ID NO: 1之殘基74之胺基酸殘基處的丙胺酸至離胺酸取代；

對應於SEQ ID NO: 1之殘基94之胺基酸殘基處的離胺酸至精胺酸取代；及

（i） 對應於SEQ ID NO: 1之殘基26之胺基酸殘基處的精胺酸至離胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基79之胺基酸殘基處的纈胺酸至精胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基89之胺基酸殘基處的白胺酸至纈胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基92之胺基酸殘基處的異白胺酸至纈胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基95之胺基酸殘基處的蘇胺酸至離胺酸取代；及對應於SEQ ID NO: 1之殘基98之胺基酸殘基處的異白胺酸至纈胺酸取代；

（ii） 對應於SEQ ID NO: 1之殘基7之胺基酸殘基處的半胱胺酸至纈胺酸取代；及對應於SEQ ID NO: 1之殘基16之胺基酸殘基處的半胱胺酸至丙胺酸取代；或

（iii） 對應於SEQ ID NO: 1之殘基7之胺基酸殘基處的半胱胺酸至纈胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基16之胺基酸殘基處的半胱胺酸至丙胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基26之胺基酸殘基處的精胺酸至離胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基79之胺基酸殘基處的纈胺酸至精胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基89之胺基酸殘基處的白胺酸至纈胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基92之胺基酸殘基處的異白胺酸至纈胺酸取代；對應於SEQ ID NO: 1之殘基95之

胺基酸殘基處的蘇胺酸至離胺酸取代；及對應於SEQ ID NO: 1之殘基98之胺基酸殘基處的異白胺酸至纈胺酸取代。

【請求項2】如請求項1之重組TGF-β2單體，其包含對應於SEQ ID NO: 1之殘基77之胺基酸殘基處的半胱胺酸至精胺酸取代。

【請求項3】如請求項2之重組TGF-β2單體，其中該TGF-β2單體之胺基酸序列包含SEQ ID NO: 4或由其組成。

【請求項4】如請求項2之重組TGF-β2單體，其中該TGF-β2單體之胺基酸序列包含SEQ ID NO: 6或由其組成。

【請求項5】如請求項1之重組TGF-β2單體，其包含對應於SEQ ID NO: 1之殘基77之胺基酸殘基處的半胱胺酸至絲胺酸取代。

【請求項6】如請求項5之重組TGF-β2單體，其中該TGF-β2單體之胺基酸序列包含SEQ ID NO: 5或由其組成。

【請求項7】一種重組轉形生長因子（TGF）-β2單體，其中該TGF-β2單體之胺基酸序列包含SEQ ID NO: 7或由其組成。

【請求項8】如請求項1之重組TGF-β2單體，其經聚乙二醇化。

【請求項9】如請求項1之重組TGF-β2單體，其經醣基化或高醣基化。

【請求項10】如請求項1之重組TGF-β2單體，其進一步包含放射治療劑、用於化學療法之細胞毒性劑、藥物、顯像劑、螢光染料或螢光蛋白質標籤。

【請求項11】一種融合蛋白質，其包含如請求項1之重組TGF-β2單體及異源蛋白質。

【請求項12】如請求項11之融合蛋白質，其中該異源蛋白質包含蛋白質標籤、Fc域、白蛋白、白蛋白結合多肽、抗體、抗體之抗原結合片段或靶向部分。

【請求項13】如請求項11之融合蛋白質，其中該融合蛋白質為單鏈多肽。

【請求項14】如請求項11之融合蛋白質，其中該融合蛋白質形成二聚多肽。

【請求項15】如請求項11之融合蛋白質，其中該融合蛋白質為異二聚體。

【請求項16】如請求項11之融合蛋白質，其中該融合蛋白質為多聚體。

【請求項17】一種經分離核酸分子，其編碼如請求項1之重組TGF-β2單體。

【請求項18】如請求項17之核酸分子，其可操作地連接至啟動子。

【請求項19】一種載體，其包含如請求項18之核酸分子。

【請求項20】一種經分離細胞，其包含如請求項19之載體。

【請求項21】如請求項20之經分離細胞，其中該細胞為T淋巴細胞。

【請求項22】一種組成物，其包含：

如請求項1之重組TGF-β2單體；及

醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。

【請求項23】一種抑制細胞中之TGF-β傳訊的方法，其包含使該細胞與有效量之如請求項1之重組TGF-β2單體接觸。

【請求項24】一種抑制患有與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症之個體的TGF-β傳訊之方法，其包含向該個體投予有效量之如請求項1之重組TGF-β2單體。

【請求項25】一種治療個體之與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症的方法，其包含向該個體投予治療有效量之如請求項1之重組TGF-β2單體。

【請求項26】如請求項25之方法，其中該與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症為纖維化病症。

【請求項27】如請求項25之方法，其中該與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症為乳癌、腦癌、胰臟癌、前列腺癌、皮膚癌、膀胱癌、肝癌、卵巢癌、腎癌、子宮內膜癌、大腸直腸癌、胃癌、皮膚癌或甲狀腺癌。

【請求項28】如請求項25之方法，其中該與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症為眼部疾病。

【請求項29】如請求項25之方法，其中該與異常TGF-β傳訊相關之疾病或病症為結締組織之遺傳病症。

[發明圖式]

TGF-β2 (SEQ ID NO: 6) 與源於 TGF-β2-7V (SEQ ID NO: 2)
SEQ ID NO: 6
SEQ ID NO: 2
SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 3
TGF-β3-1 (SEQ ID NO: 4)
TGF-β3
TGF-β2
TGF-β2-7V
圖 A

mmTGF-β2-7M (SEQ ID NO: 3) 與表 mmTGF-β2-7M2R (SEQ ID NO: 4)

5：代表該放大倍率下的觀察位置

6：左二表示胎兒主動脈入路的管道

圖 3

圖 3C

SEQ ID NO: 3 ALDAATCERVQDVCCLRPLYEDFRRDLGTKTLEEPKGYVAFCAGACPYRASKSPSCV 59
SEQ ID NO: 5 ALDAAYVFRVQDVCALRPLYEDFRRDLGTKTLEEPKGYVAFCAGACPYRASKSPSCV 59
********7***********8**********************************

SEQ ID NO: 3 SQDLEPLFTVVVGRKPKVTEQFSVMFVKSCKCS 92
SEQ ID NO: 5 SQDLEPLFTVVVGRRPKVTEQFSVMFVKSCKCS 92
**********8*********8**********************

圖 3C 之說明：

7：定序決定 SEQ ID NO: 3) 之胺基 [CE-32-2M-2a7-18 (SEQ ID NO: 5) 之胺基 [CE-32-7M (SEQ ID NO: 3) 之胺基酸之比較

8：星號 [CE-32 序列之保守胺基酸

mmTGF-β2-7M (SEQ ID NO: 3) 相對於 mmTGF-β2-7M-PRDC (SEQ ID NO: 7)

9. 如天於三PRDC之肽接酸結至接枝二產生之修飾

```
                                                    環 1-2
                                                ═══════════
SEQ ID NO: 3   ----------ALDAAICTRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPY  50
SEQ ID NO: 7   KEVLASSQEALVVTERKYLKSDWCKLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCYGQCNS  59
               999999999**99999999999*9*9**************************9*9*99
                                                    環 3-4
                                                ═══════════
SEQ ID NO: 3   R-------------ASKSPSCVSQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS--    92
SEQ ID NO: 7   FYIPRHVKKEEDSFQSSAFCVSQDLEPLEIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCRCMSV    115
               99999999999999999999*****************************9*999
```

圖1D

SEQUENCE LISTING

<1> PATENT APPLICANT: Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.

<120> TITLE OF INVENTION: Method for Producing Purified Antibody

<130> FILE REFERENCE: WO 2012/133782

<150> PRIOR APPLICATION NUMBER: JP 2011-078000

<151> PRIOR FILING DATE: 2011-03-31

<160> NUMBER OF SEQ ID NOS: 6

<170> SOFTWARE: PatentIn version 3.5

SEQ ID NO: 1 ALDAAYCTRYVQDYCCRPLYIDFTRKDLGWKWIHEPKGYHANFCAGACPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPSCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMIVKSCKCS 59

SEQ ID NO: 2 ALDAAYCTRYVQDYCCRPLYIDFTRKDLGWKWIHEPKGYHANFCAGACPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPSCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMIVRSCKCS 59

SEQ ID NO: 3 ALDAAYCTRYVQDYCCRPLYIDFTRKDLGWKWIHEPKGYHANFCAGACPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPSCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMIVKSCKCS 59

SEQ ID NO: 4 ALDAAYCTRYVQDYCCRPLYIDFTRKDLGWKWIHEPKGYHANFCAGACPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPSCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMIVRSCKCS 59

SEQ ID NO: 5 ********7*** 59

SEQ ID NO: 6 ** 56

圖2A
pH 4.5
圖2B
(ppm) N$_{15}$
圖2C
pH 7.2 (10 mM CHAPS)
圖2D
圖2E
圖2F
pH 7.2
圖2G
圖2H
(ppm) H^{1}
(ppm) N$_{15}$
(ppm) H^{1}
(ppm) N$_{15}$
(ppm) H^{1}
(ppm) N$_{15}$
(ppm) H^{1}
(ppm) N$_{15}$
SEQ ID NO: 2
SEQ ID NO: 1

圖3A
圖3B
圖3C
(udd) N_{st}
(udd) H1
pH 4.5
pH 6.5
pH 7.5 (10 mM CHAPS)

圖4A

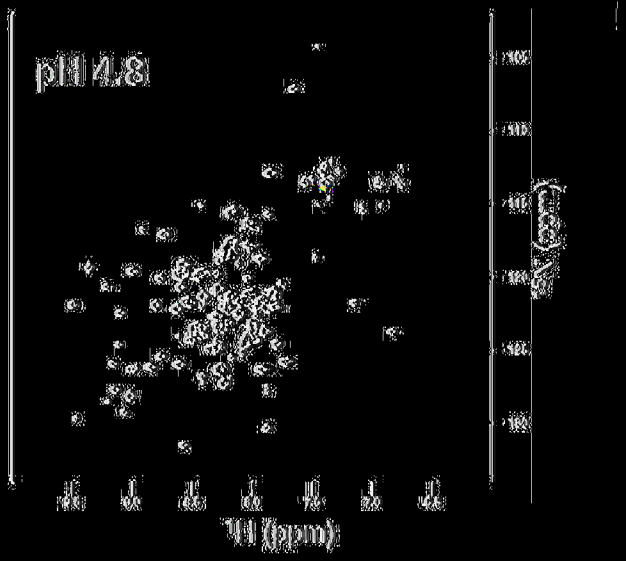


圖4B

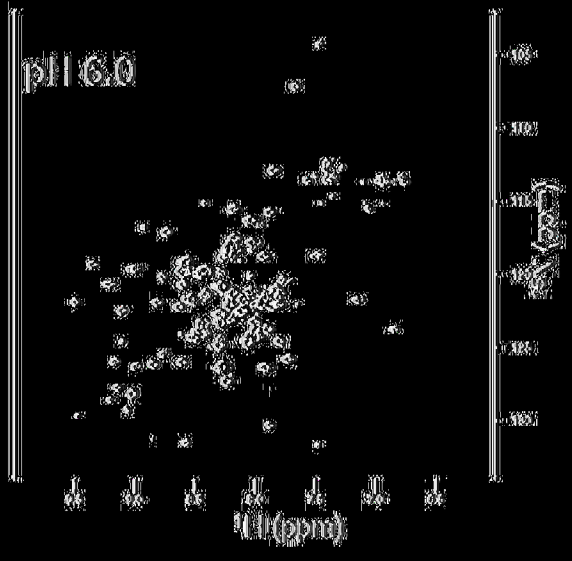


圖4C

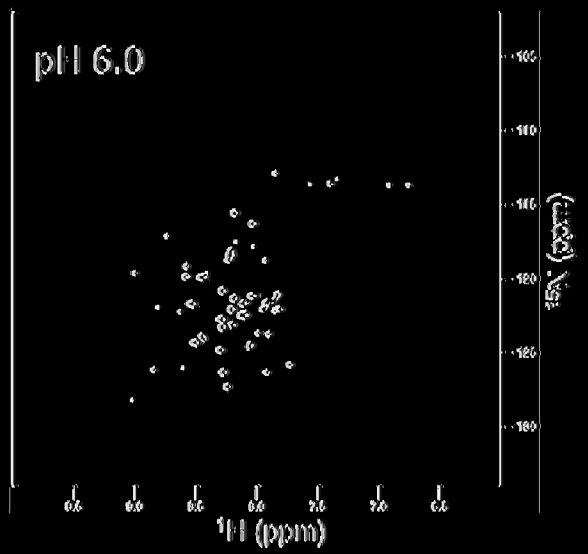
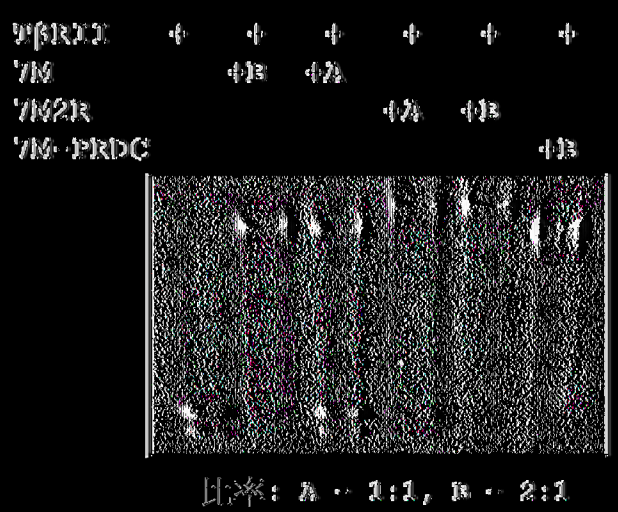


圖4D



mmTG-82-7M
mmTG-82-7AVZR
mmTG-82-7AV-De17-16
無
有
DP (kcal/s)
計入熱比
(kcal/mol)
殘基
Mw
kDa
Mn
kDa
Mw/Mn
Tm1
°C
Tm2
°C
ΔHm1
J/g
ΔHm2
J/g
Tg
°C
mmTG-82-7M
mmTG-82-7AVZR
mmTG-82-7AV-De17-16

圖3
光計次
圖6
光計次
圖9A
光計次
圖9C
光計次