



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115869398 B

(45) 授权公告日 2025. 04. 22

(21) 申请号 202211442176.3

(22) 申请日 2016.09.23

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 115869398 A

(43) 申请公布日 2023.03.31

(30) 优先权数据  
2015-187488 2015.09.24 JP

(62) 分案原申请数据  
201680056149.9 2016.09.23

(73) 专利权人 第一三共株式会社  
地址 日本东京都

(72) 发明人 佐藤一纪 平原一树 渡边一郎  
天野正人

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

专利代理师 罗文锋 林毅斌

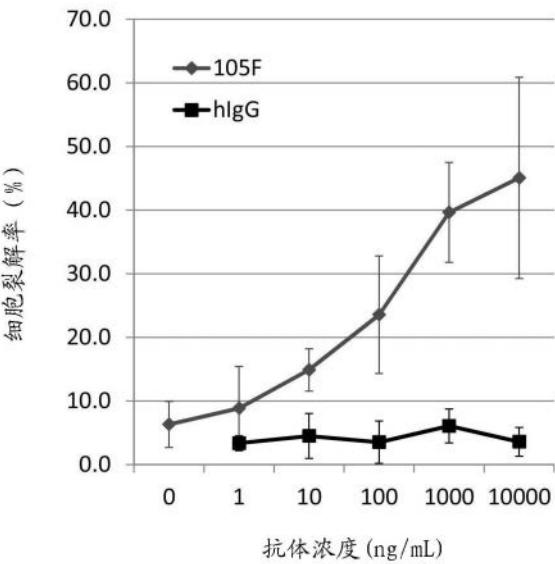
(51) Int.Cl.  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 45/06 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 35/02 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 104619722 A, 2015.05.13  
CN 1333274 A, 2002.01.30  
审查员 罗志英

权利要求书2页 说明书55页  
序列表(电子公布) 附图33页

(54) 发明名称  
抗GARP抗体

(57) 摘要  
本发明涉及抗GARP抗体。本发明涉及与GARP结合且可用作用于肿瘤的治疗剂的抗体,以及使用上述抗体用于治疗肿瘤的方法。本发明的目的在于提供抑制肿瘤中的Treg功能并且从而用作具有治疗效应的药物产品的抗体,使用上述抗体用于治疗肿瘤的方法等等。获得与GARP结合且显示出对Treg功能的抑制活性和显示出ADCC活性的抗GARP抗体,并且获得包含上述抗体等用于肿瘤治疗中的药物组合物。



1. 一种免疫缀合物,其包含抗体和另一种药物,其中所述抗体与糖蛋白A重复主导序列特异性结合并且与所述药物缀合,并且其中所述抗体具有:

(1) 由在SEQ ID NO:25中所示的氨基酸位置45至54处的氨基酸序列组成的CDRH1、由在SEQ ID NO:25中所示的氨基酸位置69至78处的氨基酸序列组成的CDRH2、和由在SEQ ID NO:25中所示的氨基酸位置118至125处的氨基酸序列组成的CDRH3,以及由在SEQ ID NO:27中所示的氨基酸位置44至54处的氨基酸序列组成的CDRL1、由在SEQ ID NO:27中所示的氨基酸位置70至76处的氨基酸序列组成的CDRL2、和由在SEQ ID NO:27中所示的氨基酸位置109至117处的氨基酸序列组成的CDRL3,或

(2) 由在SEQ ID NO:29中所示的氨基酸位置45至54处的氨基酸序列组成的CDRH1、由在SEQ ID NO:29中所示的氨基酸位置69至77处的氨基酸序列组成的CDRH2、和由在SEQ ID NO:29中所示的氨基酸位置117至128处的氨基酸序列组成的CDRH3,以及由在SEQ ID NO:31中所示的氨基酸位置44至54处的氨基酸序列组成的CDRL1、由在SEQ ID NO:31中所示的氨基酸位置70至76处的氨基酸序列组成的CDRL2、和由在SEQ ID NO:31中所示的氨基酸位置109至117处的氨基酸序列组成的CDRL3。

2. 根据权利要求1的免疫缀合物,其中所述抗体对调节性T细胞的免疫抑制功能具有抑制活性。

3. 根据权利要求1的免疫缀合物,其中所述抗体具有抗体依赖性细胞毒性活性。

4. 根据权利要求1的免疫缀合物,其中所述抗体具有体内抗肿瘤活性。

5. 根据权利要求1的免疫缀合物,其中所述糖蛋白A重复主导序列是由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成的分子。

6. 根据权利要求4的免疫缀合物,其中所述肿瘤是癌症。

7. 根据权利要求6的免疫缀合物,其中所述癌症是肺癌、肾癌、泌尿道上皮癌、结肠癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、食道癌或血液癌症。

8. 根据权利要求1的免疫缀合物,其中所述抗体具有:

(1) 由在SEQ ID NO:25中所示的氨基酸位置20至136处的氨基酸序列组成的重链可变区,以及由在SEQ ID NO:27中所示的氨基酸位置21至129处的氨基酸序列组成的轻链可变区,或

(2) 由在SEQ ID NO:29中所示的氨基酸位置20至139处的氨基酸序列组成的重链可变区,以及由在SEQ ID NO:31中所示的氨基酸位置21至129处的氨基酸序列组成的轻链可变区。

9. 根据权利要求1的免疫缀合物,其中所述抗体的恒定区是人衍生的恒定区。

10. 根据权利要求1的免疫缀合物,其中所述抗体具有:

(1) 由在SEQ ID NO:25中所示的氨基酸位置20至466处的氨基酸序列组成的重链,以及由在SEQ ID NO:27中所示的氨基酸位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,或

(2) 由在SEQ ID NO:29中所示的氨基酸位置20至469处的氨基酸序列组成的重链,以及由在SEQ ID NO:31中所示的氨基酸位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链。

11. 根据权利要求1的免疫缀合物,其中所述抗体是人源化的。

12. 根据权利要求11的免疫缀合物,其中所述抗体具有:

(1) 由在SEQ ID NO:33中所示的氨基酸位置20至136处的氨基酸序列组成的重链可变区,以及由在SEQ ID NO:37中所示的氨基酸位置21至129处的氨基酸序列组成的轻链可变区,

(2) 由在SEQ ID NO:35中所示的氨基酸位置20至136处的氨基酸序列组成的重链可变区,以及由在SEQ ID NO:39中所示的氨基酸位置21至129处的氨基酸序列组成的轻链可变区,或

(3) 由在SEQ ID NO:41中所示的氨基酸位置20至139处的氨基酸序列组成的重链可变区,以及由在SEQ ID NO:43中所示的氨基酸位置21至129处的氨基酸序列组成的轻链可变区。

13. 根据权利要求11的免疫缀合物,其中所述抗体具有:

(1) 具有在SEQ ID NO:33中所示的氨基酸位置20至466处的氨基酸序列的重链,以及具有在SEQ ID NO:37中所示的氨基酸位置21至234处的氨基酸序列的轻链,

(2) 具有在SEQ ID NO:35中所示的氨基酸位置20至466处的氨基酸序列的重链,以及具有在SEQ ID NO:39中所示的氨基酸位置21至234处的氨基酸序列的轻链,或

(3) 具有在SEQ ID NO:41中所示的氨基酸位置20至469处的氨基酸序列的重链,以及具有在SEQ ID NO:43中所示的氨基酸位置21至234处的氨基酸序列的轻链。

14. 根据权利要求1至4和7至13中任一项的免疫缀合物,其中所述抗体包含选自以下的一种、两种或更多种修饰:N-联糖基化、O-联糖基化、N-末端加工、C-末端加工、脱酰胺、天冬氨酸的异构化、甲硫氨酸的氧化、甲硫氨酸残基对N-末端的添加、脯氨酸残基的酰胺化、以及包含在羧基末端处的一个或两个氨基酸的缺失的重链。

15. 根据权利要求14的免疫缀合物,其中一个或两个氨基酸在其重链的羧基末端处缺失。

16. 根据权利要求15的免疫缀合物,其中一个氨基酸在其两条重链的每个羧基末端处缺失。

17. 根据权利要求14的免疫缀合物,其中在其重链的羧基末端处的脯氨酸残基进一步酰胺化。

18. 根据权利要求1至4和7至13中任一项的免疫缀合物,其中调节糖链修饰,以便增强抗体依赖性细胞毒性。

19. 根据权利要求1至4和7至13中任一项的免疫缀合物,其中所述药物是放射性物质或具有药理作用的化合物。

20. 根据权利要求19的免疫缀合物,其中所述放射性物质是<sup>111</sup>In、<sup>99m</sup>Tc、<sup>90</sup>Y或<sup>131</sup>I。

21. 一种包含根据权利要求1至20中任一项的免疫缀合物中的至少一种的药物组合物。

22. 根据权利要求21的药物组合物在制备用于肿瘤治疗的药物中的用途。

23. 根据权利要求22的用途,其中所述肿瘤是癌症。

24. 根据权利要求23的用途,其中所述癌症是肺癌、肾癌、泌尿道上皮癌、结肠癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、食道癌或血液癌症。

## 抗GARP抗体

[0001] 本申请是国际申请日为2016年9月23日的国际申请PCT/JP2016/078067进入中国、申请号为201680056149.9的题为“抗GARP抗体”的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及与GARP结合且可作用于肿瘤的治疗剂的抗体,以及使用上述抗体用于治疗肿瘤的方法。

### 背景技术

[0003] 调节性T细胞(Treg)是诱导免疫耐受性的主要致因细胞,所述免疫耐受性在癌症患者的肿瘤区域中观察到。即,在癌症患者中,使本质上作用于杀死肿瘤的免疫细胞群通过肿瘤中的活化Treg而成为免疫抑制状态,并且这导致肿瘤的恶性进展[非专利文献1]。

[0004] 糖蛋白A重复主导序列(Glycoprotein-A Repetitions Predominant,GARP)是具有单次跨膜结构的蛋白质[非专利文献2],并且这种蛋白质在活化的Treg的细胞表面上表达,并且与潜伏的TGF- $\beta$ (其为用于诱导免疫耐受性的重要分子的TGF- $\beta$ 的前体)形成复合物[非专利文献3]。

[0005] 由于Treg与Treg对其诱导免疫抑制的靶细胞之间的细胞间相互作用,TGF- $\beta$ 通过在Treg的细胞表面上的GARP由潜伏TGF- $\beta$ 成熟且从Treg分泌,并且TGF- $\beta$ 的免疫抑制信号直接传送到靶细胞[非专利文献4、5]。已证实细胞表面上表达的膜结合的GARP是TGF- $\beta$ 的这种成熟所必需的[非专利文献5]。另一方面,还已证实当它直接加入细胞培养物中时,缺乏跨膜区的可溶性GARP压制CD4阳性T细胞的增殖[非专利文献6]。因此,不能排除不需要细胞膜上的TGF- $\beta$ 成熟的GARP的免疫抑制机制。

[0006] GARP不仅在它们变得活化时由外周血的Treg表达,而且在临床环境中在癌症患者的肿瘤部位处由肿瘤浸润T细胞[非专利文献7]、由腹水中存在的Treg [非专利文献8]、以及由在癌症患者的外周血中循环的Treg [非专利文献9]表达。

[0007] 在调查GARP表达的抑制对Treg功能的作用的报道中,靶向GARP的siRNA抑制了Treg对辅助性T细胞的增殖应答的免疫抑制功能,但这样的抑制效应是部分的[非专利文献10]。

[0008] 在另一个报道中,已就其抑制TGF- $\beta$ 成熟的能力获得的抗GARP抗体(MHG-8和LHG-10)抑制了A1细胞对辅助T细胞的增殖应答的抑制功能[专利文献1和非专利文献12],所述A1细胞是由黑色素沉着症患者建立的Treg细胞系[非专利文献11]。然而,还不了解上述抗体在肿瘤微环境中是否有效地显示出对Treg的这种抑制作用,并且迄今为止,还没有报道具有这种作用的抗GARP抗体。识别GARP和TGF- $\beta$ 两者的抗体也是已知的[专利文献2]。

[0009] 已证实,患有疟疾和HIV感染的患者中Treg的过度存在和活化显示出与疾病状态的相关性[非专利文献13和14],并且Treg的去除导致疾病的鼠模型中疾病状态的缓解[非专利文献15和16]。

[0010] 引用列表

- [0011] 专利文献
- [0012] 专利文献1:W02015/015003
- [0013] 专利文献2:W02016/125017
- [0014] 非专利文献
- [0015] 非专利文献:1:Int J Cancer. 2010 Aug 15;127(4):759-67.
- [0016] 非专利文献:2:PLoS One. 2008;3(7):e2705.
- [0017] 非专利文献:3:Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106(32):13445-50.
- [0018] 非专利文献:4:Eur J Immunol. 2009;39(12):3315-22.
- [0019] 非专利文献:5:Mol Biol Cell. 2012;23(6):1129-39.
- [0020] 非专利文献:6:Blood. 2013;122(7):1182-91.
- [0021] 非专利文献:7:Eur J Immunol. 2012 Jul;42(7):1876-85.
- [0022] 非专利文献:8:Clin Immunol. 2013 Oct;149(1):97-110.
- [0023] 非专利文献:9:Cancer Res. 2013;73:2435.
- [0024] 非专利文献:10:Proc Natl Acad Sci USA. 2009 Aug 11;106(32):13445-50.
- [0025] 非专利文献:11:Eur J Immunol. 2009;39(12):869-82.
- [0026] 非专利文献:12:Sci Transl Med. 2015 Apr 22;7(284)
- [0027] 非专利文献:13:PLoS One. 2008 Apr 30;3(4):e2027.
- [0028] 非专利文献:14:Clin Exp Immunol. 2014 Jun;176(3):401-9.
- [0029] 非专利文献:15:J Immunol. 2012 Jun 1;188(11):5467-77.
- [0030] 非专利文献:16:PLoS Pathog. 2013;9(12):e1003798.

## 发明内容

### [0031] 技术问题

[0032] 本发明的目的在于提供抑制肿瘤中的Treg功能并且由此用作具有治疗效应的药物产品的抗体,使用上述抗体用于治疗肿瘤的方法等等。

### [0033] 解决问题的方案

[0034] 本发明人已进行了涉及实现上述目的的深入研究。因此,发明人已发现与GARP特异性结合且显示出经由抗体依赖性细胞毒性抑制Treg功能的活性的抗体,由此完成了本发明。具体地,本发明包括下述发明方面。

[0035] (1)具有下述性质的抗体:

[0036] (a)与糖蛋白A重复主导序列(GARP)特异性结合;

[0037] (b)对调节性T细胞的免疫抑制功能具有抑制活性;

[0038] (c)具有抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性;和

[0039] (d)具有体内抗肿瘤活性。

[0040] (2)根据上述(1)的抗体,其中GARP是由SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列组成的分子。

[0041] (3)根据上述(1)或(2)的抗体,其结合:

[0042] (a)SEQ ID NO:1中所示的氨基酸位置366至377、407至445和456至470处的氨基酸序列部分,

[0043] (b) SEQ ID NO:1中所示的氨基酸位置54-112和366-392处的氨基酸序列部分,

[0044] (c) SEQ ID NO:1中所示的氨基酸位置352至392处的氨基酸序列部分,或

[0045] (d) SEQ ID NO:1中所示的氨基酸位置18至112处的氨基酸序列部分。

[0046] (4) 根据上述 (1) 至 (3) 中任一的抗体,其具有针对具有下列的抗体对于与GARP的结合的竞争性抑制活性:

[0047] (a) 由SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列组成的轻链,

[0048] (b) 由SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列组成的轻链,

[0049] (c) 由SEQ ID NO:25中所示的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列组成的轻链,或

[0050] (d) 由SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:31中所示的氨基酸序列组成的轻链。

[0051] (5) 上述 (1) 至 (4) 中任一的抗体,其中所述肿瘤是癌症。

[0052] (6) 根据上述 (5) 的抗体,其中所述癌症是肺癌、肾癌、泌尿道上皮癌、结肠癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、食道癌或血液癌症。

[0053] (7) 根据上述 (1) 至 (6) 中任一的抗体,其具有:

[0054] (a) 由在SEQ ID NO:2中所示的氨基酸位置26至35处的氨基酸序列组成的CDRH1、由在SEQ ID NO:2中所示的氨基酸位置50至66处的氨基酸序列组成的CDRH2、和由在SEQ ID NO:2中所示的氨基酸位置99至107处的氨基酸序列组成的CDRH3,以及由在SEQ ID NO:3中所示的氨基酸位置23至36处的氨基酸序列组成的CDRL1、由在SEQ ID NO:3中所示的氨基酸位置52至58处的氨基酸序列组成的CDRL2、和由在SEQ ID NO:3中所示的氨基酸位置91至101处的氨基酸序列组成的CDRL3,

[0055] (b) 由在SEQ ID NO:4中所示的氨基酸位置26至35处的氨基酸序列组成的CDRH1、由在SEQ ID NO:4中所示的氨基酸位置50至66处的氨基酸序列组成的CDRH2、和由在SEQ ID NO:4中所示的氨基酸位置99至112处的氨基酸序列组成的CDRH3,以及由在SEQ ID NO:5中所示的氨基酸位置23至36处的氨基酸序列组成的CDRL1、由在SEQ ID NO:5中所示的氨基酸位置52至58处的氨基酸序列组成的CDRL2、和由在SEQ ID NO:5中所示的氨基酸位置91至100处的氨基酸序列组成的CDRL3,

[0056] (c) 由在SEQ ID NO:25中所示的氨基酸位置45至54处的氨基酸序列组成的CDRH1、由在SEQ ID NO:25中所示的氨基酸位置69至78处的氨基酸序列组成的CDRH2、和由在SEQ ID NO:25中所示的氨基酸位置118至125处的氨基酸序列组成的CDRH3,以及由在SEQ ID NO:27中所示的氨基酸位置44至54处的氨基酸序列组成的CDRL1、由在SEQ ID NO:27中所示的氨基酸位置70至76处的氨基酸序列组成的CDRL2、和由在SEQ ID NO:27中所示的氨基酸位置109至117处的氨基酸序列组成的CDRL3,或

[0057] (d) 由在SEQ ID NO:29中所示的氨基酸位置45至54处的氨基酸序列组成的CDRH1、由在SEQ ID NO:29中所示的氨基酸位置69至77处的氨基酸序列组成的CDRH2、和由在SEQ ID NO:29中所示的氨基酸位置117至128处的氨基酸序列组成的CDRH3,以及由在SEQ ID

N0:31中所示的氨基酸位置44至54处的氨基酸序列组成的CDRL1、由在SEQ ID N0:31中所示的氨基酸位置70至76处的氨基酸序列组成的CDRL2、和由在SEQ ID N0:31中所示的氨基酸位置109至117处的氨基酸序列组成的CDRL3。

[0058] (8) 根据上述(1)至(7)中任一抗体,其具有:

[0059] (a) 由在SEQ ID N0:2中所示的氨基酸位置1至118处的氨基酸序列组成的重链可变区,以及由在SEQ ID N0:3中所示的氨基酸位置1至112处的氨基酸序列组成的轻链可变区,

[0060] (b) 由在SEQ ID N0:4中所示的氨基酸位置1至123处的氨基酸序列组成的重链可变区,以及由在SEQ ID N0:5中所示的氨基酸位置1至111处的氨基酸序列组成的轻链可变区,

[0061] (c) 由在SEQ ID N0:25中所示的氨基酸位置20至136处的氨基酸序列组成的重链可变区,以及由在SEQ ID N0:27中所示的氨基酸位置21至129处的氨基酸序列组成的轻链可变区,或

[0062] (d) 由在SEQ ID N0:29中所示的氨基酸位置20至139处的氨基酸序列组成的重链可变区,以及由在SEQ ID N0:31中所示的氨基酸位置21至129处的氨基酸序列组成的轻链可变区。

[0063] (9) 根据上述(1)至(8)中任一抗体,其中所述恒定区是人衍生的恒定区。

[0064] (10) 根据上述(1)至(9)中任一抗体,其具有:

[0065] (a) 由SEQ ID N0:2中所示的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID N0:3中所示的氨基酸序列组成的轻链,

[0066] (b) 由SEQ ID N0:4中所示的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID N0:5中所示的氨基酸序列组成的轻链,

[0067] (c) 由在SEQ ID N0:25中所示的氨基酸位置20至466处的氨基酸序列组成的重链,以及由在SEQ ID N0:27中所示的氨基酸位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,或

[0068] (d) 由在SEQ ID N0:29中所示的氨基酸位置20至469处的氨基酸序列组成的重链,以及由在SEQ ID N0:31中所示的氨基酸位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链。

[0069] (11) 根据上述(1)至(10)中任一抗体,其是人源化的。

[0070] (12) 根据上述(11)的抗体,其具有:

[0071] 由选自以下的氨基酸序列组成的重链可变区:

[0072] (a) 在SEQ ID N0:33中所示的氨基酸位置20至136处的氨基酸序列,

[0073] (b) 在SEQ ID N0:35中所示的氨基酸位置20至136处的氨基酸序列,

[0074] (c) 在SEQ ID N0:41中所示的氨基酸位置20至139处的氨基酸序列,

[0075] (d) 与(a)至(c)的序列中除每个CDR序列外的构架区序列具有至少95%或更多同源性的氨基酸序列,和

[0076] (e) 包含(a)至(c)的序列中除每个CDR序列外的构架区序列中的一个或几个氨基酸的缺失、取代或添加的氨基酸序列,和

[0077] 由选自以下的氨基酸序列组成的轻链可变区:

[0078] (f) 在SEQ ID N0:37中所示的氨基酸位置21至129处的氨基酸序列,

[0079] (g) 在SEQ ID N0:39中所示的氨基酸位置21至129处的氨基酸序列,

[0080] (h) 在SEQ ID NO:43中所示的氨基酸位置21至129处的氨基酸序列,

[0081] (i) 与(f)至(h)的序列中除每个CDR序列外的构架区序列具有至少95%或更多同源性的氨基酸序列,和

[0082] (j) 包含(f)至(h)的序列中除每个CDR序列外的构架区序列中的一个或几个氨基酸的缺失、取代或添加的氨基酸序列。

[0083] (13) 根据上述(11)或(12)的抗体,其具有:

[0084] (a) 由在SEQ ID NO:33中所示的氨基酸位置20至136处的氨基酸序列组成的重链可变区,以及由在SEQ ID NO:37中所示的氨基酸位置21至129处的氨基酸序列组成的轻链可变区,

[0085] (b) 由在SEQ ID NO:35中所示的氨基酸位置20至136处的氨基酸序列组成的重链可变区,以及由在SEQ ID NO:39中所示的氨基酸位置21至129处的氨基酸序列组成的轻链可变区,或

[0086] (c) 由在SEQ ID NO:41中所示的氨基酸位置20至139处的氨基酸序列组成的重链可变区,以及由在SEQ ID NO:43中所示的氨基酸位置21至129处的氨基酸序列组成的轻链可变区。

[0087] (14) 根据上述(11)至(13)中任一的抗体,其具有:

[0088] (a) 选自以下的重链:具有在SEQ ID NO:33中所示的氨基酸位置20至466处的氨基酸序列的重链,具有在SEQ ID NO:35中所示的氨基酸位置20至466处的氨基酸序列的重链,以及具有在SEQ ID NO:41中所示的氨基酸位置20至469处的氨基酸序列的重链,和

[0089] (b) 选自以下的轻链:具有在SEQ ID NO:37中所示的氨基酸位置21至234处的氨基酸序列的轻链,具有在SEQ ID NO:39中所示的氨基酸位置21至234处的氨基酸序列的轻链,以及具有在SEQ ID NO:43中所示的氨基酸位置21至234处的氨基酸序列的轻链。

[0090] (15) 根据上述(11)至(14)中任一的抗体,其具有:

[0091] (a) 具有在SEQ ID NO:33中所示的氨基酸位置20至466处的氨基酸序列的重链,以及在SEQ ID NO:37中所示的氨基酸位置21至234处的氨基酸序列的轻链,

[0092] (b) 具有在SEQ ID NO:35中所示的氨基酸位置20至466处的氨基酸序列的重链,以及在SEQ ID NO:39中所示的氨基酸位置21至234处的氨基酸序列的轻链,或

[0093] (c) 具有在SEQ ID NO:41中所示的氨基酸位置20至469处的氨基酸序列的重链,以及在SEQ ID NO:43中所示的氨基酸位置21至234处的氨基酸序列的轻链。

[0094] (16) 编码根据上述(1)至(15)中任一的抗体的多核苷酸。

[0095] (17) 根据上述(16)的多核苷酸,其具有:

[0096] (a) 由在SEQ ID NO:6中所示的核苷酸位置76至105处的核苷酸序列组成的CDRH1的多核苷酸,由在SEQ ID NO:6中所示的核苷酸位置148至198处的核苷酸序列组成的CDRH2的多核苷酸,和由在SEQ ID NO:6中所示的核苷酸位置295至321处的核苷酸序列组成的CDRH3的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:7中所示的核苷酸位置67至108处的核苷酸序列组成的CDRL1的多核苷酸,由在SEQ ID NO:7中所示的核苷酸位置154至174处的核苷酸序列组成的CDRL2的多核苷酸,和由在SEQ ID NO:7中所示的核苷酸位置271至303处的核苷酸序列组成的CDRL3的多核苷酸,

[0097] (b) 编码由在SEQ ID NO:8中所示的核苷酸位置76至105处的核苷酸序列组成的



CDRH1的多核苷酸,由在SEQ ID NO:8中所示的核苷酸位置148至198处的核苷酸序列组成的CDRH2的多核苷酸,和由在SEQ ID NO:8中所示的核苷酸位置295至336处的核苷酸序列组成的CDRH3的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:9中所示的核苷酸位置67至108处的核苷酸序列组成的CDRL1的多核苷酸,由在SEQ ID NO:9中所示的核苷酸位置154至174处的核苷酸序列组成的CDRL2的多核苷酸,和由在SEQ ID NO:9中所示的核苷酸位置271至300处的核苷酸序列组成的CDRL3的多核苷酸,

[0098] (c) 由在SEQ ID NO:24中所示的核苷酸位置133至162处的核苷酸序列组成的CDRH1的多核苷酸,由在SEQ ID NO:24中所示的核苷酸位置205至234处的核苷酸序列组成的CDRH2的多核苷酸,和由在SEQ ID NO:24中所示的核苷酸位置352至375处的核苷酸序列组成的CDRH3的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:26中所示的核苷酸位置130至162处的核苷酸序列组成的CDRL1的多核苷酸,由在SEQ ID NO:26中所示的核苷酸位置208至228处的核苷酸序列组成的CDRL2的多核苷酸,和由在SEQ ID NO:26中所示的核苷酸位置325至351处的核苷酸序列组成的CDRL3的多核苷酸,或

[0099] (d) 由在SEQ ID NO:28中所示的核苷酸位置133至162处的核苷酸序列组成的CDRH1的多核苷酸,由在SEQ ID NO:28中所示的核苷酸位置205至231处的核苷酸序列组成的CDRH2的多核苷酸,和由在SEQ ID NO:28中所示的核苷酸位置349至384处的核苷酸序列组成的CDRH3的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:30中所示的核苷酸位置130至162处的核苷酸序列组成的CDRL1的多核苷酸,由在SEQ ID NO:30中所示的核苷酸位置208至228处的核苷酸序列组成的CDRL2的多核苷酸,和由在SEQ ID NO:30中所示的核苷酸位置325至351处的核苷酸序列组成的CDRL3的多核苷酸。

[0100] (18) 根据上述(16)或(17)的多核苷酸,其具有:

[0101] (a) 由在SEQ ID NO:6中所示的核苷酸位置1至354处的核苷酸序列组成的重链可变区的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:7中所示的核苷酸位置1至336处的核苷酸序列组成的轻链可变区的多核苷酸,

[0102] (b) 由在SEQ ID NO:8中所示的核苷酸位置1至369处的核苷酸序列组成的重链可变区的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:9中所示的核苷酸位置1至333处的核苷酸序列组成的轻链可变区的多核苷酸,

[0103] (c) 由在SEQ ID NO:24中所示的核苷酸位置58至408处的核苷酸序列组成的重链可变区的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:26中所示的核苷酸位置61至387处的核苷酸序列组成的轻链可变区的多核苷酸,或

[0104] (d) 由在SEQ ID NO:28中所示的核苷酸位置58至417处的核苷酸序列组成的重链可变区的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:30中所示的核苷酸位置61至387处的核苷酸序列组成的轻链可变区的多核苷酸。

[0105] (19) 根据上述(16)至(18)中任一的多核苷酸,其具有:

[0106] (a) 由SEQ ID NO:6中所示的核苷酸序列组成的重链的多核苷酸,以及由SEQ ID NO:7中所示的核苷酸序列组成的轻链的多核苷酸,

[0107] (b) 由SEQ ID NO:8中所示的核苷酸序列组成的重链的多核苷酸,以及由SEQ ID NO:9中所示的核苷酸序列组成的轻链的多核苷酸,

[0108] (c) 由在SEQ ID NO:24中所示的核苷酸位置58至1398处的核苷酸序列组成的重链

的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:26中所示的核苷酸位置61至702处的核苷酸序列组成的轻链的多核苷酸,或

[0109] (d)由在SEQ ID NO:28中所示的核苷酸位置58至1407处的核苷酸序列组成的重链的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:30中所示的核苷酸位置61至702处的核苷酸序列组成的轻链的多核苷酸。

[0110] (20)根据上述(16)或(17)的多核苷酸,其具有:

[0111] (a)选自以下的重链可变区的多核苷酸:由在SEQ ID NO:32中所示的核苷酸位置58至408处的核苷酸序列组成的重链可变区的多核苷酸,由在SEQ ID NO:34中所示的核苷酸位置58至408处的核苷酸序列组成的重链可变区的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:40中所示的核苷酸位置58至417处的核苷酸序列组成的重链可变区的多核苷酸,和

[0112] (b)选自以下的轻链可变区的多核苷酸:由在SEQ ID NO:36中所示的核苷酸位置61至387处的核苷酸序列组成的轻链可变区的多核苷酸,由在SEQ ID NO:38中所示的核苷酸位置61至387处的核苷酸序列组成的轻链可变区的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:42中所示的核苷酸位置61至387处的核苷酸序列组成的轻链可变区的多核苷酸。

[0113] (21)根据上述(16)、(17)或(20)的多核苷酸,其具有:

[0114] (a)由在SEQ ID NO:32中所示的核苷酸位置58至408处的核苷酸序列组成的重链可变区的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:36中所示的核苷酸位置61至387处的核苷酸序列组成的轻链可变区的多核苷酸,

[0115] (b)由在SEQ ID NO:34中所示的核苷酸位置58至408处的核苷酸序列组成的重链可变区的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:38中所示的核苷酸位置61至387处的核苷酸序列组成的轻链可变区的多核苷酸,或

[0116] (c)由在SEQ ID NO:40中所示的核苷酸位置58至417处的核苷酸序列组成的重链可变区的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:42中所示的核苷酸位置61至387处的核苷酸序列组成的轻链可变区的多核苷酸。

[0117] (22)根据上述(16)、(17)、(20)或(21)的多核苷酸,其具有:

[0118] (a)选自以下的重链的多核苷酸:由在SEQ ID NO:32中所示的核苷酸位置58至1398处的核苷酸序列组成的重链的多核苷酸,由在SEQ ID NO:34中所示的核苷酸位置58至1398处的核苷酸序列组成的重链的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:40中所示的核苷酸位置58至1407处的核苷酸序列组成的重链的多核苷酸,和

[0119] (b)选自以下的轻链的多核苷酸:由在SEQ ID NO:36中所示的核苷酸位置61至702处的核苷酸序列组成的轻链的多核苷酸,由在SEQ ID NO:38中所示的核苷酸位置61至702处的核苷酸序列组成的轻链的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:42中所示的核苷酸位置61至702处的核苷酸序列组成的轻链的多核苷酸。

[0120] (23)根据上述(16)、(17)和(20)至(22)中任一的多核苷酸,其具有:

[0121] (a)由在SEQ ID NO:32中所示的核苷酸位置58至1398处的核苷酸序列组成的重链的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:36中所示的核苷酸位置61至702处的核苷酸序列组成的轻链的多核苷酸,

[0122] (b)由在SEQ ID NO:34中所示的核苷酸位置58至1398处的核苷酸序列组成的重链的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:38中所示的核苷酸位置61至702处的核苷酸序列组成的

轻链的多核苷酸,或

[0123] (c)由在SEQ ID NO:40中所示的核苷酸位置58至1407处的核苷酸序列组成的重链的多核苷酸,以及由在SEQ ID NO:42中所示的核苷酸位置61至702处的核苷酸序列组成的轻链的多核苷酸。

[0124] (24)包含根据上述(16)至(23)中任一的多核苷酸的表达载体。

[0125] (25)用根据上述(24)的表达载体转化的宿主细胞。

[0126] (26)用于生产目的抗体或其片段的方法,其包括培养根据上述(25)的宿主细胞的步骤,以及从通过前述步骤获得的培养物中收集目的抗体的步骤。

[0127] (27)通过根据上述(26)的生产方法获得的抗体。

[0128] (28)根据上述(1)至(15)和(27)中任一抗体,其包含选自以下的两种或更多种修饰:N-联糖基化、O-联糖基化、N-末端加工、C-末端加工、脱酰胺、天冬氨酸的异构化、甲硫氨酸的氧化、甲硫氨酸残基对N-末端的添加、脯氨酸残基的酰胺化、以及包含在羧基末端处的一个或两个氨基酸的缺失的重链。

[0129] (29)根据上述(28)的抗体,其中一个或两个氨基酸在其重链的羧基末端处缺失。

[0130] (30)根据上述(29)的抗体,其中一个氨基酸在其两条重链的每个羧基末端处缺失。

[0131] (31)根据上述(28)至(30)中任一抗体,其中在其重链的羧基末端处的脯氨酸残基进一步酰胺化。

[0132] (32)根据上述(1)至(15)和(27)至(31)中任一抗体,其中调节糖链修饰,以便增强抗体依赖性细胞毒性。

[0133] (33)包含根据上述(1)至(15)和(27)至(32)中的抗体中的至少一种的药物组合物。

[0134] (34)根据上述(33)的药物组合物,其用于肿瘤治疗中。

[0135] (35)根据上述(34)的药物组合物,其中所述肿瘤是癌症。

[0136] (36)根据上述(35)的药物组合物,其中所述癌症是肺癌、肾癌、泌尿道上皮癌、结肠癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、食道癌或血液癌症。

[0137] (37)用于治疗肿瘤的方法,其包括将根据上述(1)至(15)和(27)至(32)中的抗体中的至少一种施用于个体。

[0138] (38)根据上述(37)的治疗方法,其中所述肿瘤是癌症。

[0139] (39)根据上述(38)的治疗方法,其中所述癌症是肺癌、肾癌、泌尿道上皮癌、结肠癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、食道癌或血液癌症。

[0140] 发明的有益效果

[0141] 根据本发明,可以获得包含抗体的用于癌症的治疗剂,所述抗体与GARP结合并且具有由ADCC介导的Treg抑制引起的抗肿瘤活性。另外,患有疟疾和HIV感染的患者中Treg的过度存在和活化显示出与该疾病状态的相关性,并且Treg的去除诱导疾病的鼠模型中疾病状态的缓解。相应地,可以预期Treg功能的有效抑制也将对难治性感染病例如由疟疾和HIV引起的那些具有治疗作用。

**附图说明**

- [0142] [图1]显示了GARP的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。
- [0143] [图2]图2显示了105F抗体重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。
- [0144] [图3]图3显示了105F抗体轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)。
- [0145] [图4]图4显示了110F抗体重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)。
- [0146] [图5]图5显示了110F抗体轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:5)。
- [0147] [图6]图6显示105F抗体重链的核苷酸序列(SEQ ID NO:6)。
- [0148] [图7]图7显示了105F抗体轻链的核苷酸序列(SEQ ID NO:7)。
- [0149] [图8]图8显示了110F抗体重链的核苷酸序列(SEQ ID NO:8)。
- [0150] [图9]图9显示了110F抗体轻链的核苷酸序列(SEQ ID NO:9)。
- [0151] [图10]图10显示了抗体与GARP的结合。根据ELISA方法,105F抗体和110F抗体显示出其与GARP的结合。
- [0152] [图11]图11显示了抗体与GARP的特异性结合。105F抗体不与其中引入空载体的HEK293T细胞结合,并且显示出其与GARP已在其中瞬时表达的HEK293T细胞的结合。
- [0153] [图12]图12显示了抗体与GARP的特异性结合。105F抗体显示出与内源性表达GARP的L428细胞的结合活性。
- [0154] [图13]图13显示了抗体与GARP的特异性结合。105F抗体显示出与活化的Treg的结合活性。
- [0155] [图14]图14显示了抗体的ADCC活性。当靶向内源性表达GARP的L428细胞时,发现以105F抗体浓度依赖性方式的ADCC活性中的增加。
- [0156] [图15]图15显示了抗体对Treg功能的抑制活性。105F抗体(50  $\mu\text{g/mL}$ )抑制Treg针对辅助性T细胞的增殖抑制功能。
- [0157] [图16]图16显示了抗体对Treg功能的抑制活性。105F抗体(10  $\mu\text{g/mL}$ )抑制Treg针对辅助性T细胞的增殖抑制功能。另一方面,MHG-8和LHG-10抗体并未显示出对Treg针对辅助性T细胞的增殖抑制功能的作用。
- [0158] [图17]图17显示了c151D抗体重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:25)。
- [0159] [图18]图18显示了c151D抗体轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:27)。
- [0160] [图19]图19显示了c198D抗体重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:29)。
- [0161] [图20]图20显示了c198D抗体轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:31)。
- [0162] [图21]图21显示了h151D-H1重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:33)。
- [0163] [图22]图22显示了h151D-L1轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:37)。
- [0164] [图23]图23显示了h151D-H4重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:35)。
- [0165] [图24]图24显示了h151D-L4轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:39)。
- [0166] [图25]图25显示了h198D-H3重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:41)。
- [0167] [图26]图26显示了h198D-L4轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:43)。
- [0168] [图27]图27显示了c151D抗体重链的核苷酸序列(SEQ ID NO:24)。
- [0169] [图28]图28显示了c151D抗体轻链的核苷酸序列(SEQ ID NO:26)。
- [0170] [图29]图29显示了c198D抗体重链的核苷酸序列(SEQ ID NO:28)。
- [0171] [图30]图30显示了c198D抗体轻链的核苷酸序列(SEQ ID NO:30)。

- [0172] [图31]图31显示了h151D-H1抗体重链的核苷酸序列(SEQ ID NO:32)。
- [0173] [图32]图32显示了h151D-L1抗体重链的核苷酸序列(SEQ ID NO:36)。
- [0174] [图33]图33显示了h151D-H4重链的核苷酸序列(SEQ ID NO:34)。
- [0175] [图34]图34显示了h151D-L4轻链的核苷酸序列(SEQ ID NO:38)。
- [0176] [图35]图35显示了h198D-H3重链的核苷酸序列(SEQ ID NO:40)。
- [0177] [图36]图36显示了h198D-L4轻链的核苷酸序列(SEQ ID NO:42)。
- [0178] [图37]图37显示了每种抗体与表达GARP的细胞的结合活性。h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4显示出对GARP的特异性结合活性。
- [0179] [图38]图38显示了每种抗体与GARP-TGF  $\beta$ 1共表达细胞的结合活性。个别抗体105F、h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4结合与TGF  $\beta$ 1共表达的GARP和GARP突变体两者,并且根据已知抗体MHG8和LHG10的情况,这些抗体显示出与GARP中不同区域的结合活性。
- [0180] [图39]图39显示了每种抗体与L428细胞的结合活性。个别抗体h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4显示出与内源性表达的GARP的结合活性。
- [0181] [图40]图40显示了每种抗体与Treg的结合活性。个别抗体h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4显示出对FoxP3-阳性Treg的结合活性。
- [0182] [图41]图41显示了每种抗体的ADCC活性。个别抗体h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4显示出ADCC活性。
- [0183] [图42]图42显示了每种抗体对Treg功能的抑制活性。个别抗体h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4显示出对Treg功能的抑制活性。
- [0184] [图43]图43显示了Treg对CTL的靶细胞裂解活性的压制活性。
- [0185] [图44]图44显示了每种抗体的抗肿瘤活性中的增加。个别抗体105F、h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4抑制Treg对CTL的细胞裂解活性的压制功能。
- [0186] [图45]图45显示了每种抗体的体内抗肿瘤活性。个别抗体105F、h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4在体内模型中显示出抗肿瘤活性。

### 具体实施方式

- [0187] 在本说明书中,术语“癌症”用于具有与术语“肿瘤”的那种相同的含义。
- [0188] 在本说明书中,术语“基因”不仅用于包括DNA,还用于包括其mRNA和cDNA以及其cRNA。
- [0189] 在本说明书中,术语“多核苷酸”用于具有与核酸的那种相同的含义,并且它包括DNA、RNA、探针、寡核苷酸和引物。
- [0190] 在本说明书中,术语“多肽”这样使用,使得它与术语“蛋白质”并无区别。
- [0191] 在本说明书中,术语“细胞”包括个别动物中的细胞和培养的细胞。
- [0192] 在本说明书中,术语“GARP”用于具有与GARP蛋白的那种相同的含义。
- [0193] 在本说明书中,术语“细胞毒性”用于意指以任何给定的方式对细胞引起的病理变化。这不仅意指直接创伤,还意指对细胞引起的所有类型的结构或功能损害,例如DNA裂解、碱基二聚体的形成、染色体裂解、对细胞有丝分裂器的损害、以及各种类型酶的活性中的降低。

[0194] 在本说明书中,术语“细胞毒性活性”用于意指引起上述细胞毒性的活性。

[0195] 在本说明书中,术语“抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性”,并且该活性意指经由通过抗体介导的NK细胞损害靶细胞例如肿瘤细胞的效应或活性。

[0196] 在本说明书中,术语“表位”用于意指特异性抗GARP抗体与之结合的GARP的部分肽或部分三维结构。其为上述GARP的部分肽的这种表位可以通过本领域技术人员众所周知的方法例如免疫测定,例如通过下述方法来确定。首先,产生抗原的各种部分结构。关于产生这种部分结构,可以应用已知的寡肽合成技术。例如,通过本领域技术人员众所周知的遗传重组技术产生一系列肽,其中抗原已从其C-末端或N-末端以适当的长度相继截短,并且其后,研究抗体对这种多肽的反应性,且大致确定识别位点。其后,合成进一步更短的肽,然后研究其与上述肽的反应性,以便确定表位。此外,其为与特异性抗体结合的抗原的部分三维结构的表位,可以通过经由X射线结构分析指定与上述抗体相邻的抗原的氨基酸残基来确定。

[0197] 在本说明书中,短语“与相同表位结合的抗体”用于意指与共同表位结合的不同抗体。如果第二抗体结合第一抗体与之结合的部分肽或部分三维结构,则可以确定第一抗体和第二抗体结合相同的表位。另外,通过证实第二抗体与第一抗体竞争第一抗体与抗原的结合(即,第二抗体干扰第一抗体与抗原的结合),可以确定第一抗体和第二抗体结合相同的表位,即使表位的特定序列或结构仍未确定。此外,当第一抗体和第二抗体与相同的表位结合,并且第一抗体具有特殊效应例如抗肿瘤活性时,第二抗体可预期具有与第一抗体的那种相同的活性。相应地,如果第二抗GARP抗体结合第一抗GARP抗体与之结合的部分肽,则可以确定第一抗体和第二抗体与GARP的相同表位结合。另外,通过证实第二抗GARP抗体与第一抗GARP抗体竞争第一抗GARP抗体与GARP的结合,可以确定第一抗体和第二抗体是与GARP的相同表位结合的抗体。

[0198] 在本说明书中,术语“CDR”用于意指互补决定区。已知抗体分子的重链和轻链各自具有三个CDR。这样的CDR也被称为高变结构域,并且位于抗体的重链和轻链的可变区中。这些区域具有特别高度可变的一级结构,并且在重链和轻链各自的多肽链的一级结构上分成三个位点。在本说明书中,就抗体的CDR而言,重链的CDR从重链的氨基酸序列的氨基末端侧分别被称为CDRH1、CDRH2和CDRH3,而轻链的CDR从轻链的氨基酸序列的氨基末端侧分别被称为CDRL1、CDRL2和CDRL3。这些位点在三维结构上彼此接近定位,并且决定抗体对所述抗体与之结合的抗原的特异性。

[0199] 在本发明中,短语“在严格条件下杂交”用于意指杂交在商业上可获得的杂交溶液ExpressHyb Hybridization Solution(由Clontech制造)中在68°C下进行,或者杂交在这样的条件下进行,其中杂交在68°C下在0.7-1.0 M NaCl的存在下使用DNA固定化滤器进行,并且生成物随后在68°C下用0.1至2倍浓度的SSC溶液(其中1×SSC由150mM NaCl和15mM柠檬酸钠组成)洗涤用于鉴定,或者与其等价的条件。

[0200] 1. GARP

[0201] 用于本发明中的GARP可以从人或非人哺乳动物(例如大鼠、小鼠等)的GARP表达细胞中直接纯化并且然后可以使用,或者前述细胞的细胞膜级分可以被制备并且可以用作该GARP。可替代地,也可以通过在体外合成GARP,或通过经由遗传操作允许宿主细胞产生GARP

来获得GARP。根据这样的遗传操作,具体地,GARP蛋白可以通过下述获得:将GARP cDNA掺入能够表达GARP cDNA的表达载体内,然后在包含酶、底物以及转录和翻译所必需的能量材料的溶液中合成GARP,或者转化其它原核生物或真核生物的宿主细胞,以便允许其表达GARP。

[0202] 人GARP的氨基酸序列显示于序列表中的SEQ ID NO:1中。另外,SEQ ID NO:1的序列显示于图1中。

[0203] 此外,由在GARP的上述氨基酸序列中包含一个或几个氨基酸的取代、缺失和/或添加的氨基酸序列组成,且具有与GARP蛋白的那种等价的生物活性的蛋白质,也包括在GARP中。

[0204] 信号序列已从其中去除的成熟的人GARP对应于由SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的位置20至662处的氨基酸残基组成的氨基酸序列。

[0205] 此外,在GARP中还包括这样的蛋白质,其由包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列、或信号序列已从其中去除的SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的一个或几个氨基酸的取代、缺失和/或添加的氨基酸序列组成,并且具有与GARP的那种等价的生物活性。此外,在GARP中还包括这样的蛋白质,其由下列氨基酸序列组成并且具有与GARP的那种等价的生物活性,所述氨基酸序列通过从人GARP基因座转录的剪接变体编码,或在上述氨基酸序列中包含一个或几个氨基酸的取代、缺失和/或添加。

[0206] 2. 抗GARP抗体的产生

[0207] 本发明的抗GARP抗体的实例可以是抗GARP人抗体。抗GARP人抗体意指仅具有衍生自人染色体的抗体的基因序列的人抗体。

[0208] 抗GARP人抗体可以通过使用具有包含人抗体的重链和轻链基因的人染色体片段的人抗体生产小鼠的方法来获得(参见Tomizuka,K.等人Nature Genetics(1997)16,,第133-143页;Kuroiwa,Y.等人Nucl. Acids Res.(1998)26,第3447-3448页;Yoshida,H.等人Animal Cell Technology:Basic and Applied Aspects第10卷,第69-73页(Kitagawa,Y., Matsuda,T.和Iijima,S.编辑),Kluwer Academic Publishers,1999;Tomizuka,K.等人Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2000)97,第722-727页等)。

[0209] 这种人抗体生产小鼠可以通过使用基因修饰的动物来特异性地产生,所述基因修饰的动物的内源性免疫球蛋白重链和轻链的基因座已被破坏,并且代替地,人免疫球蛋白重链和轻链的基因座然后已使用酵母人工染色体(YAC)载体等等引入,然后从这种遗传修饰的动物产生敲除动物和转基因动物,然后将这些动物彼此交配。

[0210] 另外,抗GARP人抗体也可以通过下述获得:根据遗传重组技术,用编码这种人抗体的重链和轻链各自的cDNA、或优选包含该cDNA的载体来转化真核细胞,然后培养产生遗传修饰的人单克隆抗体的转化细胞,使得可以从培养上清液中获得抗体。作为宿主细胞,例如可以使用真核细胞,且优选哺乳动物细胞,例如CHO细胞、淋巴细胞或骨髓瘤。

[0211] 可替代地,抗体也可以通过获得已从人抗体文库中选择的噬菌体展示衍生的人抗体的方法获得(参见Wormstone,I. M.等人Investigative Ophthalmology & Visual Science.(2002)43(7),第2301-2308页;Carmen,S.等人Briefings in Functional Genomics and Proteomics(2002),1(2),第189-203页;Siriwardena,D.等人Ophthalmology(2002)109(3),第427-431页等)。例如,可以应用噬菌体展示方法,其包括允许人抗体的可变区在噬菌体的表面上作为单链抗体(scFv)表达,然后选择与抗原结合的噬

菌体 (Nature Biotechnology (2005) ,23, (9) ,第1105-1116页)。

[0212] 通过分析已由于其与抗原的结合能力而选择的噬菌体基因,可以确定编码与抗原结合的人抗体的可变区的DNA序列。一旦确定与抗原结合的scFv的DNA序列,则允许抗体恒定区的DNA序列与其结合,以产生具有上述序列的IgG表达载体,然后将产生的表达载体引入合适的宿主细胞内,并且允许在其中表达,由此获得人抗体 (W092/01047、W092/20791、W093/06213、W093/11236、W093/19172、W095/01438、W095/15388、Annu. Rev. Immunol (1994) 12,第433-455页,Nature Biotechnology (2005) 23 (9) ,第1105-1116页)。

[0213] 此外,本发明的针对GARP的抗体可以通过下述来获得:用GARP或选自GARP的氨基酸序列的任何给定多肽免疫动物,然后收集且纯化其活体中产生的抗体。用作抗原的GARP的生物种并不限于人,并且因此也可以用衍生自除人外的动物例如小鼠或大鼠的GARP免疫动物。在这种情况下,通过检查获得的与异源GARP结合的抗体与人GARP的交叉反应性,可以选择可应用于人疾病的抗体。

[0214] 此外,根据已知的方法 (例如,Kohler和Milstein,Nature (1975) 256,第495-497页,Kennet,R.编辑,Monoclonal Antibodies,第365-367页,Plenum Press,N. Y. (1980)),将产生针对GARP的抗体的抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合,以建立杂交瘤,以便获得单克隆抗体。

[0215] 应注意,用作抗原的GARP可以通过允许宿主细胞根据遗传操作产生GARP基因而获得。

[0216] 具体地,产生能够表达GARP基因的载体,然后将载体引入宿主细胞内,使得基因在其中表达,并且其后可以纯化所表达的GARP。下文将具体描述获得针对GARP的抗体的方法。

[0217] (1) 抗原的制备

[0218] 用于产生抗GARP抗体的抗原的实例可以包括GARP、由其至少6个连续的部分氨基酸序列组成的多肽、以及通过向这种GARP或其多肽添加任何给定的氨基酸序列或载体而制备的衍生物。

[0219] GARP可以直接从人的肿瘤组织或肿瘤细胞中纯化并且然后可以使用。可替代地,GARP也可通过在体外合成它或通过遗传操作允许宿主细胞产生它来获得。

[0220] 根据这样的遗传操作,具体地,抗原可以通过下述获得:将GARP cDNA引入能够表达GARP cDNA的表达载体内,然后在包含酶、底物以及转录和翻译所必需的能量材料的溶液中合成GARP,或转化其它原核生物或真核生物的宿主细胞,以便允许其表达GARP。

[0221] 也可以通过允许将编码作为膜蛋白的GARP的胞外区的DNA与编码抗体的恒定区的DNA连接而形成的融合蛋白在合适的宿主和/或载体系统中表达来获得作为分泌蛋白的抗原。

[0222] GARP cDNA可以通过所谓的PCR法来获得,所述PCR法包括例如使用表达GARP的cDNA的cDNA文库作为模板,并且也使用用于特异性扩增GARP cDNA的引物来执行聚合酶链反应 (以下称为“PCR”) (参见Saiki,R. K.,等人Science (1988) 239,第487-489页)。

[0223] 多肽的体外合成的实例可以是由Roche Diagnostics制造的快速翻译系统 (Rapid Translation System) (RTS),但不限于其。

[0224] 用作宿主细胞的原核细胞的实例可以包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。为了用目的基因转化宿主细胞,用包含衍生自与宿主相容



物种的复制子即复制起点和调节序列的质粒载体转化宿主细胞。作为载体,具有能够对待转化细胞赋予表型选择性的序列的载体是优选的。

[0225] 用作宿主细胞的真核细胞的实例可以包括脊椎动物、昆虫和酵母的细胞。可以经常使用的脊椎动物细胞的实例包括其为猴细胞的COS细胞(Gluzman, Y., Cell (1981) 23, 第175-182页, ATCC CRL-1650)、小鼠成纤维细胞NIH3T3(ATCC编号CRL-1658)、以及中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞, ATCC CCL-61)的二氢叶酸还原酶缺陷型细胞系(Urlaub, G. 和Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1980) 77, 第4126-4220页), 但不限于其。

[0226] 如此获得的转化体可以根据普通方法进行培养, 并且目的多肽可以在该培养的细胞的内部或外部产生。

[0227] 作为培养中使用的培养基, 适当时, 取决于所采用的宿主细胞的类型, 可以选择各种类型的常用培养基。如果宿主细胞是大肠杆菌, 则必要时, 例如, 可以将抗生素如氨苄青霉素或IPMG加入LB培养基中, 然后可以使用所得到的培养基。

[0228] 作为上述培养的结果, 可以通过利用蛋白质的物理性质或化学性质的各种已知的分离方法, 来分离和/或纯化在转化体的细胞内部或外部产生的重组蛋白质。

[0229] 该方法的具体实例可以包括使用普通蛋白质沉淀剂的处理、超滤、各种类型的液相层析如分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析或亲和层析、透析方法及其组合。

[0230] 另外, 通过将由6个残基组成的组氨酸标签附着到待表达的重组蛋白质, 可以使用镍亲和柱有效地纯化蛋白质。以其它方法, 通过将IgG的Fc区与待表达的重组蛋白连接, 可以使用蛋白A柱有效地纯化蛋白质。

[0231] 通过将上述方法彼此组合, 可以以高收率和高纯度大规模生产目的多肽。

[0232] (2) 抗GARP单克隆抗体的产生

[0233] 与GARP特异性结合的抗体的实例可以是与GARP特异性结合的单克隆抗体。获得这种单克隆抗体的方法如下。

[0234] 对于产生单克隆抗体, 下述工作步骤一般是必要的。

[0235] 具体地, 必要的工作步骤包括:

[0236] (a) 用作抗原的生物聚合物的纯化,

[0237] (b) 通过注射用抗原免疫动物, 从动物收集血液, 检查抗体滴度以确定从动物切除脾脏的时期, 然后制备抗体产生细胞的步骤,

[0238] (c) 骨髓瘤细胞(以下称为“骨髓瘤”)的制备,

[0239] (d) 抗体产生细胞和骨髓瘤之间的细胞融合,

[0240] (e) 选择产生目的抗体的杂交瘤组,

[0241] (f) 分割成单细胞克隆(克隆),

[0242] (g) 任选地, 用于大量生产单克隆抗体的杂交瘤的培养、或杂交瘤移植到其内的动物的养育, 和

[0243] (h) 因此产生的单克隆抗体的生理活性和结合特异性的分析, 或作为标记试剂的抗体性质的检查。

[0244] 下文将连同上述步骤一起详细描述用于产生单克隆抗体的方法。但是, 产生上述抗体的方法不限于其, 并且例如也可以使用除脾细胞和骨髓瘤外的抗体产生细胞。

[0245] (a) 抗原的纯化

[0246] 作为抗原,可以使用通过上述方法制备的GARP或其一部分。

[0247] 可替代地,由表达GARP的重组体细胞制备的膜级分、或这种表达GARP的重组体细胞本身、或进一步地根据本领域技术人员众所周知的方法化学合成的本发明的蛋白质的部分肽也可以用作抗原。

[0248] (b) 抗体产生细胞的制备

[0249] 将步骤(a)中获得的抗原与辅助试剂例如弗氏完全佐剂或不完全佐剂、或钾明矾混合,以制备免疫原,并且其后用免疫原免疫实验动物。作为这样的实验动物,毫无疑问可以使用用于产生杂交瘤的已知方法中使用的动物。在本文中可以使用的这种动物的具体实例包括小鼠、大鼠、山羊、绵羊、牛和马。从待与切除的抗体产生细胞等融合的骨髓瘤细胞的可用性的观点来看,优选使用小鼠或大鼠作为待免疫的动物。

[0250] 实际使用的小鼠和大鼠的品系并无特别限制。在小鼠的情况下,在本文中可以使用品系的实例包括A、AKR、BALB/c、BDP、BA、CE、C3H、57BL、C57BL、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF、R III、SJL、SWR、WB和129。另一方面,在大鼠的情况下,在本文中可以使用品系的实例包括Wistar、Low、Lewis、Sprague、Dawley、ACI、BN和Fischer。

[0251] 这些小鼠和大鼠可得自实验动物养育者和分销商,例如CLEA Japan, Inc. 和 CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.

[0252] 其中,考虑到与下述的骨髓瘤细胞的融合相容性,在小鼠的情况下BALB/c品系和在大鼠的情况下Wistar和Low品系特别优选作为待免疫的动物。

[0253] 此外,考虑到人和小鼠的抗原的同源性,还优选使用其用于去除自身抗体的生物学机制已减少的小鼠,即自身免疫疾病小鼠。

[0254] 这些小鼠或大鼠在免疫时的年龄优选为5至12周龄,且更优选6至8周龄。

[0255] 为了用GARP或其重组体免疫动物,可以应用已知的方法,例如在Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology, 第I. II. III.卷, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. 和 Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) 中详细描述的方法等。

[0256] 在这些免疫方法中,优选应用于本发明的方法具体为例如下述方法。

[0257] 也就是说,首先将其中用作抗原的膜蛋白级分或抗原已得到表达的细胞皮内或腹膜内施用于动物。

[0258] 为了增强免疫效率,其组合使用是优选的。如果在施用方案的第一半中进行皮内施用,并且在其后一半或仅在最终施用情况进行腹膜内施用,则可以特别增强免疫效率。

[0259] 抗原的施用时间表取决于待免疫动物的类型、个体差异等而不同。一般而言,3至6个抗原剂量以及2至6周的给药间隔是优选的,并且3或4个抗原剂量和2至4周的给药间隔是更优选的。

[0260] 抗原的应用剂量取决于待免疫动物的类型、个体差异等而不同。它一般为0.05至5 mg,且优选大约0.1至0.5 mg。

[0261] 在上述抗原施用后1至6周,优选2至4周,且更优选2至3周,进行加强。

[0262] 当进行加强时,抗原的应用剂量取决于动物的类型、其大小等而不同。例如,在小

鼠的情况下,抗原的应用剂量一般为0.05至5 mg,优选0.1至0.5mg,且更优选大约0.1至0.2 mg。

[0263] 在完成上述加强后1至10天,优选2至5天,且更优选2或3天,从免疫动物中无菌去除包含抗体产生细胞的脾细胞或淋巴细胞。此时测定抗体滴度。其中抗体滴度已充分增加的动物用作抗体产生细胞的供应来源,使得可以增强后续操作的效率。

[0264] 本文使用的测量抗体滴度的方法的实例可以包括RIA方法和ELISA方法,但不限于这些。

[0265] 关于本发明中的抗体滴度的测量,例如,可以根据下述程序进行ELISA方法。

[0266] 首先,将纯化或部分纯化的抗原吸附在固相例如用于ELISA的96孔板的表面上,并且在其上不吸附该抗原的另一个固体表面用与抗原无关的蛋白质如牛血清白蛋白(以下称为“BSA”)覆盖。洗涤表面,然后允许与用作初次抗体的连续稀释的样品(例如小鼠血清)接触,使得样品中的抗体允许与上述抗原结合。

[0267] 其后,加入针对小鼠抗体的酶标记的抗体作为二次抗体,使得它允许与小鼠抗体结合,随后为洗涤。这之后,对其加入酶的底物,然后测量基于底物分解等由于显色的吸光度中的变化,以计算抗体滴度。

[0268] 根据已知方法(例如,Kohler等人Nature (1975) 256,第495页;Kohler等人Eur. J. Immunol. (1977) 6,第511页;Milstein等人Nature (1977) ,266,第550页;Walsh,Nature, (1977) 266,第495页),可从免疫动物的脾细胞或淋巴细胞分离抗体产生细胞。例如,在脾细胞的情况下,可以采用通常的方法,其包括将脾切碎,然后通过不锈钢网过滤细胞,然后将滤液悬浮于伊格尔氏最低必需培养基(MEM)中,以分离抗体产生细胞。

[0269] (c)骨髓瘤细胞(以下称为“骨髓瘤”)的制备

[0270] 用于细胞融合的骨髓瘤细胞并无特别限制,并且适当时,可以从已知的细胞系中选择细胞且然后可以使用。考虑到从融合细胞中选择杂交瘤中的便利性问题,优选使用其选择程序已建立的HGPRT(次黄嘌呤-鸟氨酸磷酸核糖基转移酶)缺陷型细胞系。

[0271] 也就是说,这种HGPRT缺陷型细胞系的实例包括小鼠衍生的X63-Ag8 (X63)、NS1-ANS/1 (NS1)、P3X63-Ag8. U1 (P3U1)、X63-Ag8.653 (X63.653)、SP2/0-Ag14 (SP2/0)、MPC11-45.6TG1.7 (45.6TG)、F0、S149/5XX0和BU. 1;大鼠衍生的210. RSY3. Ag. 1. 2.3 (Y3);以及人衍生的U266AR (SK0-007)、GM1500·GTG-A12 (GM1500)、UC729-6、LICR-LOW-HMy2 (HMy2)和8226AR/NIP4-1 (NP41)。这些HGPRT缺陷型细胞系可得自例如美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

[0272] 这些细胞系在合适的培养基中进行传代培养,所述培养基例如8-氮鸟嘌呤培养基[通过将8-氮鸟嘌呤加入包含谷氨酰胺、2-巯基乙醇、庆大霉素和胎牛血清(以下称为“FCS”)的RPMI-1640培养基中制备的培养基]、Iscove氏改良达尔贝科氏培养基(以下称为“IMDM”)、或达尔贝科氏改良伊格尔培养基(以下称为“DMEM”)。细胞融合前3或4天,细胞在正常培养基[例如,包含10% FCS的ASF104培养基(由Ajinomoto Co.,Inc.制造)]中进行传代培养,以确保细胞融合当天不少于 $2 \times 10^7$ 个细胞。

[0273] (d)细胞融合

[0274] 适当时,根据已知方法(Weir,D. M.,Handbook of Experimental Immunology,第I. II. III.卷,Blackwell Scientific Publications,Oxford(1987),Kabat,E. A.和

Mayer, M. M., *Experimental Immunochimistry*, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) 等), 在其中细胞的存活率并未极度降低的条件下, 可以将抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合。

[0275] 可以在本文中使用的这种方法的实例包括化学方法, 其包括在高浓度聚合物溶液如聚乙二醇中, 将抗体产生细胞与骨髓瘤细胞混合, 以及利用电刺激的物理方法。在这些方法中, 上述化学方法的具体实例如下。

[0276] 即, 当聚乙二醇用作高浓度聚合物溶液时, 在分子量为1500至6000, 优选2000至4000的聚乙二醇溶液中、在30°C至40°C, 优选35°C至38°C的温度下, 将抗体产生细胞与骨髓瘤细胞混合1至10分钟, 优选5至8分钟。

[0277] (e) 杂交瘤组的选择

[0278] 选择通过上述细胞融合获得的杂交瘤的方法并无特别限制。一般而言, 应用HAT (次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷) 选择方法 (Kohler等人Nature (1975) 256, 第495页; Milstein等人Nature (1977) 266, 第550页)。

[0279] 当使用不能在氨基蝶呤中存活的HGPRT缺陷型细胞系的骨髓瘤细胞获得杂交瘤时, 该方法是有效的。

[0280] 具体地, 将未融合的细胞和杂交瘤在HAT培养基中培养, 使得只有对氨基蝶呤抗性的杂交瘤被允许选择性地保留且生长。

[0281] (f) 分割成单细胞克隆 (克隆)

[0282] 作为杂交瘤克隆方法, 例如可以应用已知方法, 例如甲基纤维素法、软琼脂糖法或极限稀释法 (参见例如Barbara, B. M. 和Stanley, M. S.: *Selected Methods in Cellular Immunology*, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980))。在这些方法中, 三维培养法例如甲基纤维素法是特别优选的。例如, 将通过细胞融合形成的杂交瘤组悬浮于甲基纤维素培养基如ClonaCell-HY Selection Medium D (由StemCell Technologies制造, #03804) 中, 然后进行培养。其后, 收获所形成的杂交瘤集落, 使得可以获得单克隆杂交瘤。收获的杂交瘤集落各自进行培养, 并且选择在其中观察到稳定的抗体滴度的所获得的杂交瘤培养上清作为GARP单克隆抗体产生杂交瘤株。

[0283] 因此建立的杂交瘤株的实例可以包括GARP杂交瘤151D和198D。在本说明书中, 将由GARP杂交瘤151D和198D产生的抗体称为“151D抗体”或“198D抗体”, 或者它被简称为“151D”或“198D”。

[0284] 151D抗体的重链可变区具有序列表中的SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列。另外, 151D抗体的轻链可变区具有序列表中的SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列。应指出, 序列表中的SEQ ID NO:15中所示的重链可变区的氨基酸序列由序列表中的SEQ ID NO:14中所示的核苷酸序列编码。还应指出, 序列表中的SEQ ID NO:17中所示的轻链可变区的氨基酸序列由序列表中的SEQ ID NO:16中所示的核苷酸序列编码。

[0285] 198D抗体的重链可变区具有序列表中的SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列。另外, 198D抗体的轻链可变区具有序列表中的SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列。应指出, 序列表中的SEQ ID NO:19中所示的重链可变区的氨基酸序列由序列表中的SEQ ID NO:18中所示的核苷酸序列编码。还应指出, 序列表中的SEQ ID NO:21中所示的轻链可变区的氨基酸序列由序列表中的SEQ ID NO:20中所示的核苷酸序列编码。

[0286] (g) 通过培养杂交瘤制备单克隆抗体

[0287] 培养因此选择的杂交瘤,使得可以有效地获得单克隆抗体。在执行培养之前,需要筛选产生目的单克隆抗体的杂交瘤。

[0288] 对于这种筛选,可以采用已知方法。

[0289] 抗体滴度可以在本发明中例如通过上述节段(b)中描述的ELISA法进行测量。

[0290] 通过上述方法获得的杂交瘤可以保存在液氮中或以冷冻状态的形式保存在-80°C或更低的温度下的冷库中。

[0291] 在完成克隆后,培养杂交瘤,同时用普通培养基替换HT培养基。

[0292] 大量培养通过旋转培养或旋动培养,使用大型培养瓶来进行。根据本领域技术人员众所周知的方法例如凝胶过滤纯化由该大量培养获得的上清液,使得获得与本发明的蛋白质特异性结合的单克隆抗体。

[0293] 此外,将杂交瘤注射到相同品系的小鼠(例如,上述BALB/c)或Nu/Nu小鼠的腹腔内,并且允许杂交瘤在其中生长,以便获得包含大量本发明的单克隆抗体的腹水。

[0294] 当杂交瘤施用到这种小鼠的腹腔内时,如果矿物油如2,6,10,14-四甲基十五烷(降植烷)已预先施用于小鼠(杂交瘤施用前3至7天),则可以获得更大量的腹水。

[0295] 例如,假设免疫抑制剂先前已施用到与杂交瘤相同品系的小鼠的腹腔内,使得T细胞失活。注射后20天,将 $10^6$ 至 $10^7$ 个杂交瘤和/或克隆细胞悬浮于不含血清的培养基(0.5 ml)中,然后将该悬浮液施用到腹腔内。当正常的腹部已肿胀且腹水已聚集时,从小鼠中收集腹水。根据该方法,可以获得其浓度为培养溶液中的约100倍或更多的单克隆抗体。

[0296] 通过上述方法获得的单克隆抗体可以例如通过Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology, 第I、II、III卷, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978)中所述的方法来纯化。

[0297] 因此获得的单克隆抗体对GARP具有高抗原特异性。

[0298] (h) 单克隆抗体的测定

[0299] 所获得的单克隆抗体的同种型和亚型可以如下确定。

[0300] 首先,测定方法的例子可以包括奥脱洛尼(ouchterlony)法、ELISA法和RIA法。

[0301] 奥脱洛尼方法简单,但当单克隆抗体的浓度低时,需要浓缩程序。

[0302] 另一方面,当使用ELISA法或RIA法时,使培养上清液直接与抗原吸附的固相反应,并且将与各种免疫球蛋白同种型或亚类对应的抗体用作二次抗体,使得可以鉴定单克隆抗体的同种型和亚型。

[0303] 作为更简单的方法,也可以利用商购可得的鉴定试剂盒(例如,Mouse Typer Kit; 由BioRad制造)等。

[0304] 此外,蛋白质的定量可以通过Folin Lowry法和根据在280 nm处的吸光度计算值 $[1.4(OD\ 280) = 1\ \text{mg/ml 免疫球蛋白}]$ 的方法来进行。

[0305] 此外,同样在其中再次进行上述(2)中的(a)至(h)的步骤、并且分开地独立获得单克隆抗体的情况下,也可以获得具有与105F抗体、110F抗体、151D衍生的抗体(人源化151D抗体)和198D衍生的抗体(人源化198D抗体)的那些等价的性质的抗体。这种抗体的实例可以是与上述抗体各自与之结合的相同表位结合的抗体。105F抗体识别在GARP的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)中的氨基酸位置366至377、407至445和456至470处的氨基酸序列部分,并且

与其结合,110F抗体识别在GARP的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)中的氨基酸位置54至112和366至392处的氨基酸序列部分,并且与其结合;151D衍生的抗体(人源化151D抗体)识别在GARP的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)的氨基酸位置352至392处的氨基酸序列,并且与其结合;并且198D衍生的抗体(人源化198D抗体)识别在GARP的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)的氨基酸位置18至112处的氨基酸序列,并且与其结合。相应地,上述表位的具体实例可以包括在GARP的氨基酸序列中的上述区域。

[0306] 如果新近制备的单克隆抗体结合上述105F抗体等与之结合的部分肽或部分三维结构,则可以确定该单克隆抗体结合上述105F抗体等与之结合的部分表位。此外,通过证实单克隆抗体与上述抗体例如105F抗体在抗体与GARP的结合中竞争(即,单克隆抗体干扰上述抗体例如105F抗体与GARP的结合),可以确定单克隆抗体结合上述105F抗体等与之结合的部分表位,即使表位的特定序列或结构仍未确定。当证实单克隆抗体结合105F抗体等与之结合的部分表位时,则强烈预期单克隆抗体应该具有与上述抗体例如105F抗体等价的性质。

[0307] (3) 其它抗体

[0308] 本发明的抗体还包括遗传重组抗体,其已进行人工修饰用于降低对人的异源抗原性的目的,例如嵌合抗体、人源化抗体和上述人抗体,以及上述针对GARP的单克隆抗体。这些抗体可以通过已知方法产生。

[0309] 所获得的抗体可以纯化至均质状态。为了分离和纯化抗体,可以使用用于普通蛋白质的分离和纯化方法。例如,适当地选择柱层析、过滤、超滤、盐析、透析、制备型聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦等,并且彼此组合,使得抗体可以得到分离和纯化(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak等人编辑, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. 编辑Harlow和David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)),但分离和纯化方法的实例不限于这些。

[0310] 层析的实例可以包括亲和层析、离子交换层析、疏水层析、凝胶过滤层析、反相层析和吸附层析。

[0311] 这些层析技术可以使用液相层析如HPLC或FPLC进行。

[0312] 亲和层析中使用的柱的实例可以包括蛋白A柱和蛋白G柱。涉及使用蛋白A的柱的实例可以包括Hyper D、POROS和Sepharose F.F. (Pharmacia)。

[0313] 另外,使用抗原固定载体,通过利用抗体对抗原的结合活性,可以纯化抗体。

[0314] 根据下述的实施例等中描述的方法,依据它们对抗原的结合活性评估所得到的抗体,使得可以选择优选抗体。

[0315] 抗体的稳定性可以用作用于抗体性质比较的指示剂。差示扫描量热器(DSC)是能够迅速且准确地测量热变性中点( $T_m$ )的装置,所述热变性中点是蛋白质的相对结构稳定性的良好指示剂。通过使用DSC测量 $T_m$ 值并且做出关于所得到的值的比较,可以比较热稳定性中的差异。已知抗体的保存稳定性与抗体的热稳定性具有一定的相关性(Lori Burton, 等人 Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, 第265-273页),并且因此,优选的抗体可以使用热稳定性作为指示剂来选择。用于选择抗体的其它指示剂的实例可以包括在合适的宿主细胞中的高收率和水溶液中的低凝集。例如,因为具有最高收率的抗体

并不总是显示出最高的热稳定性,所以需要基于上述指示剂通过综合测定它来选择最适合施用于人的抗体。

[0316] 本发明的抗GARP人抗体的实例可以通过上述噬菌体展示方法获得的抗GARP人抗体,并且本文抗GARP人抗体的优选实例可以包括105F抗体和110F抗体,其各自具有下述结构。

[0317] 105F抗体的重链具有序列表中的SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。在序列表中的SEQ ID NO:2中所示的重链氨基酸序列中,由在位置1至118处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是可变区,而由在位置119至448处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是恒定区。在序列表的SEQ ID NO:2中,该可变区具有由在氨基酸位置26至35处的氨基酸序列组成的CDRH1、由在氨基酸位置50至66处的氨基酸序列组成的CDRH2、以及由在氨基酸位置99至107处的氨基酸序列组成的CDRH3。另外,SEQ ID NO:2的序列显示于图2中。

[0318] 105F抗体的轻链具有序列表中的SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列。在序列表中的SEQ ID NO:3中所示的轻链氨基酸序列中,由在位置1至112处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是可变区,而由在位置113至217处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是恒定区。在序列表的SEQ ID NO:3中,该可变区具有由在氨基酸位置23至36处的氨基酸序列组成的CDRL1、由在氨基酸位置52至58处的氨基酸序列组成的CDRL2、以及由在氨基酸位置91至101处的氨基酸序列组成的CDRL3。另外,SEQ ID NO:3的序列显示于图3中。

[0319] 110F抗体的重链具有序列表中的SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列。在序列表中的SEQ ID NO:4中所示的重链氨基酸序列中,由在位置1至123处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是可变区,而由在位置124至453处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是恒定区。在序列表的SEQ ID NO:4中,该可变区具有由在氨基酸位置26至35处的氨基酸序列组成的CDRH1、由在氨基酸位置50至66处的氨基酸序列组成的CDRH2、以及由在氨基酸位置99至112处的氨基酸序列组成的CDRH3。另外,SEQ ID NO:4的序列显示于图4中。

[0320] 110F抗体的轻链具有序列表中的SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列。在序列表中的SEQ ID NO:5中所示的轻链氨基酸序列中,由在位置1至111处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是可变区,而由在位置112至216处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是恒定区。在序列表的SEQ ID NO:5中,该可变区具有由在氨基酸位置23至36处的氨基酸序列组成的CDRL1、由在氨基酸位置52至58处的氨基酸序列组成的CDRL2、以及由在氨基酸位置91至100处的氨基酸序列组成的CDRL3。另外,SEQ ID NO:5的序列显示于图5中。

[0321] 序列表中的SEQ ID NO:2中所示的105F抗体重链的氨基酸序列由序列表中的SEQ ID NO:6中所示的核苷酸序列编码。由在序列表中的SEQ ID NO:6中所示的核苷酸序列的核苷酸位置1至354处的核苷酸组成的核苷酸序列编码105F抗体的重链可变区,并且由在核苷酸位置355至1344处的核苷酸组成的核苷酸序列编码105F抗体的重链恒定区。如SEQ ID NO:6中所示,编码可变区的核苷酸序列具有由编码CDRH1的在核苷酸位置76至105处的核苷酸序列组成的多核苷酸、由编码CDRH2的在核苷酸位置148至198处的核苷酸序列组成的多核苷酸、以及由编码CDRH3的在核苷酸位置295至321处的核苷酸序列组成的多核苷酸。另外,SEQ ID NO:6的序列显示于图6中。

[0322] 序列表中的SEQ ID NO:3中所示的105F抗体轻链的氨基酸序列由序列表中的SEQ ID NO:7中所示的核苷酸序列编码。由在序列表中的SEQ ID NO:7中所示的核苷酸序列的核

苷酸位置1至336处的核苷酸组成的核苷酸序列编码105F抗体的轻链可变区,并且由在核苷酸位置337至651处的核苷酸组成的核苷酸序列编码105F抗体的轻链恒定区。如SEQ ID NO:7中所示,编码可变区的核苷酸序列具有由编码CDRL1的在核苷酸位置67至108处的核苷酸序列组成的多核苷酸、由编码CDRL2的在核苷酸位置154至174处的核苷酸序列组成的多核苷酸、以及由编码CDRL3的在核苷酸位置271至303处的核苷酸序列组成的多核苷酸。另外,SEQ ID NO:7的序列显示于图7中。

[0323] 序列表中的SEQ ID NO:4中所示的110F抗体重链的氨基酸序列由序列表中的SEQ ID NO:8中所示的核苷酸序列编码。由在序列表中的SEQ ID NO:8中所示的核苷酸序列的核苷酸位置1至369处的核苷酸组成的核苷酸序列编码110F抗体的重链可变区,并且由在核苷酸位置370至1359处的核苷酸组成的核苷酸序列编码110F抗体的重链恒定区。如SEQ ID NO:8中所示,编码可变区的核苷酸序列具有由编码CDRH1的在核苷酸位置76至105处的核苷酸序列组成的多核苷酸、由编码CDRH2的在核苷酸位置148至198处的核苷酸序列组成的多核苷酸、以及由编码CDRH3的在核苷酸位置295至336处的核苷酸序列组成的多核苷酸。另外,SEQ ID NO:8的序列显示于图8中。

[0324] 序列表中的SEQ ID NO:5中所示的110F抗体轻链的氨基酸序列由序列表中的SEQ ID NO:9中所示的核苷酸序列编码。由在序列表中的SEQ ID NO:9中所示的核苷酸序列的核苷酸位置1至333处的核苷酸组成的核苷酸序列编码110F抗体的轻链可变区,并且由在核苷酸位置334至648处的核苷酸组成的核苷酸序列编码110F抗体的轻链恒定区。如SEQ ID NO:9中所示,编码可变区的核苷酸序列具有由编码CDRL1的在核苷酸位置67至108处的核苷酸序列组成的多核苷酸、由编码CDRL2的在核苷酸位置154至174处的核苷酸序列组成的多核苷酸、以及由编码CDRL3的在核苷酸位置271至300处的核苷酸序列组成的多核苷酸。另外,SEQ ID NO:9的序列显示于图9中。

[0325] 关于本发明的抗体,除上述抗GARP人抗体之外,即使在其中根据除上述获得抗体的方法外的方法,分开地独立地获得抗体的情况下,可以获得具有与105F抗体或110F抗体的那种等价的细胞毒性的抗体。这种抗体的实例可以是与105F抗体或110F抗体与之结合的相同表位结合的抗体。

[0326] 如果新近产生的人抗体结合105F抗体或110F抗体与之结合的部分肽或部分三维结构,则可以确定所产生的抗体结合105F抗体或110F抗体与之结合的相同表位。另外,通过证实所涉及的抗体与105F抗体或110F抗体竞争其与GARP的结合(即,所涉及的抗体干扰105F抗体或110F抗体与GARP的结合),可以确定所涉及的抗体结合105F抗体或110F抗体与之结合的相同表位,即使表位的特定序列或结构仍未确定。如果证实所涉及的抗体结合105F抗体或110F抗体与之结合的相同表位,则强烈预期所涉及的抗体应该具有与105F抗体或110F抗体的那种等价的细胞毒性。

[0327] 此外,本发明的抗体包括人工修饰的遗传重组抗体。这些抗体可以使用已知方法来产生。所涉及的抗体优选为这样的抗体,其至少具有与上述105F抗体或110F抗体的重链和轻链相同的6个CDR,并且还具ADCC活性和对Treg的免疫抑制功能的抑制活性。所涉及的抗体并不限于特定抗体,只要它具有上述性质。抗体更优选为具有上述105F抗体或110F抗体的重链可变区和轻链可变区的抗体。

[0328] 此外,通过彼此组合显示与105F抗体或110F抗体的重链氨基酸序列和轻链氨基酸



序列高度同源的序列,能够选择具有与上述抗体等价的活性的抗体。这种同源性是一般80%或更多,优选90%或更多,更优选95%或更多,且最优选99%或更多(然而,各个CDR与上述抗体各自的那种相同)的同源性。此外,通过将包含一个或几个氨基酸残基的取代、缺失或添加的氨基酸序列掺入上述重链或轻链(排除每个CDR位点)的氨基酸序列,也能够选择具有与上述抗体各自等价的活性的抗体。

[0329] 再进一步地,根据本发明的抗GARP抗体的实例可以包括下述嵌合抗体和人源化抗体。

[0330] 嵌合抗体的实例可以包括其中可变区和恒定区彼此是异源的抗体,例如通过将小鼠或大鼠衍生的抗体的可变区与人衍生的恒定区缀合而形成的嵌合抗体(参见Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 6851-6855, (1984))。

[0331] 衍生自大鼠抗人GARP抗体151D的嵌合抗体是由包含重链可变区的重链和包含轻链可变区的轻链组成的抗体,所述重链可变区由由在SEQ ID NO:15中所示的位置1至117处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成,所述轻链可变区由由在SEQ ID NO:17中所示的位置1至109的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成,并且该嵌合抗体可以具有衍生自任何给定人的恒定区。

[0332] 此外,衍生自大鼠抗人GARP抗体198D的嵌合抗体是由包含重链可变区的重链和包含轻链可变区的轻链组成的抗体,所述重链可变区由由在SEQ ID NO:19中所示的位置1至120处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成,所述轻链可变区由由在SEQ ID NO:21中所示的位置1至109的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成,并且该嵌合抗体可以具有衍生自任何给定人的恒定区。

[0333] 这样的嵌合抗体的实例可以包括:由重链和轻链组成的抗体,所述重链具有由序列表中的SEQ ID NO:25中所示的位置20至466处的氨基酸残基组成的氨基酸序列,所述轻链具有由其中的SEQ ID NO:27中所示的位置21至234处的氨基酸残基组成的氨基酸序列;以及由重链和轻链组成的抗体,所述重链具有由序列表中的SEQ ID NO:29中所示的位置20至469处的氨基酸残基组成的氨基酸序列,所述轻链具有由其中的SEQ ID NO:31中所示的位置21至234处的氨基酸残基组成的氨基酸序列。

[0334] 应指出,在序列表中的SEQ ID NO:25中所示的重链序列中,由在位置1至19处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是信号序列,由在位置20至136处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是可变区,并且由在位置137至466处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是恒定区。

[0335] 还应指出,在序列表中的SEQ ID NO:27中所示的轻链序列中,由在位置1至20处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是信号序列,由在位置21至129处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是可变区,并且由在位置130至234处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是恒定区。

[0336] 应进一步指出,在序列表中的SEQ ID NO:29中所示的重链序列中,由在位置1至19处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是信号序列,由在位置20至139处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是可变区,并且由在位置140至469处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是恒定区。

[0337] 应进一步指出,在序列表中的SEQ ID NO:31中所示的轻链序列中,由在位置1至20处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是信号序列,由在位置21至129处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是可变区,并且由在位置130至234处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是恒定

区。

[0338] 序列表中的SEQ ID NO:25中所示的c151D抗体重链的氨基酸序列由序列表中的SEQ ID NO:24中所示的核苷酸序列编码。由在序列表中的SEQ ID NO:24中所示的核苷酸序列的核苷酸位置1至57处的核苷酸组成的核苷酸序列编码c151D抗体的重链信号序列,由其中在核苷酸位置58至408处的核苷酸组成的核苷酸序列编码c151D抗体的重链可变区,并且由其中在核苷酸位置409至1398处的核苷酸组成的核苷酸序列编码c151D抗体的重链恒定区。

[0339] 此外,序列表中的SEQ ID NO:27中所示的c151D抗体轻链的氨基酸序列由序列表中的SEQ ID NO:26中所示的核苷酸序列编码。由在序列表中的SEQ ID NO:26中所示的核苷酸序列的核苷酸位置1至60处的核苷酸组成的核苷酸序列编码c151D抗体的轻链信号序列,由其中在核苷酸位置61至387处的核苷酸组成的核苷酸序列编码c151D抗体的轻链可变区,并且由其中在核苷酸位置388至702处的核苷酸组成的核苷酸序列编码c151D抗体的轻链恒定区。

[0340] 此外,序列表中的SEQ ID NO:29中所示的c198D抗体重链的氨基酸序列由序列表中的SEQ ID NO:28中所示的核苷酸序列编码。由在序列表中的SEQ ID NO:28中所示的核苷酸序列的核苷酸位置1至57处的核苷酸组成的核苷酸序列编码c198D抗体的重链信号序列,由其中在核苷酸位置58至417处的核苷酸组成的核苷酸序列编码c198D抗体的重链可变区,并且由其中在核苷酸位置418至1407处的核苷酸组成的核苷酸序列编码c198D抗体的重链恒定区。

[0341] 进一步地,序列表中的SEQ ID NO:31中所示的c198D抗体轻链的氨基酸序列由序列表中的SEQ ID NO:30中所示的核苷酸序列编码。由在序列表中的SEQ ID NO:30中所示的核苷酸序列的核苷酸位置1至60处的核苷酸组成的核苷酸序列编码c198D抗体的轻链信号序列,由其中在核苷酸位置61至387处的核苷酸组成的核苷酸序列编码c198D抗体的轻链可变区,并且由其中在核苷酸位置388至702处的核苷酸组成的核苷酸序列编码c198D抗体的轻链恒定区。

[0342] 人源化抗体的实例包括通过仅将互补决定区(CDR)掺入人衍生的抗体而形成的人源化抗体(参见Nature (1986) 321,第522-525页),以及通过根据CDR移植方法(国际公开号W090/07861),将一些构架中的氨基酸残基以及CDR序列移植到人抗体内而形成的人源化抗体。

[0343] 然而,衍生自151D抗体的人源化抗体并不限于特定的人源化抗体,只要它保留151D抗体的全部6个CDR序列并且具有抗肿瘤活性。

[0344] 应指出,151D抗体的重链可变区具有由由在序列表中的SEQ ID NO:15的位置26至35处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成的CDRH1(GFTFSNYMA)、由由在其中的SEQ ID NO:15中的位置50至59处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成的CDRH2(SIGTVGGNTY)、以及由由在其中的SEQ ID NO:15中的位置99至106处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成的CDRH3(EDYGGFPH)。

[0345] 另外,151D抗体的轻链可变区具有由由在序列表中的SEQ ID NO:17的位置24至34处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成的CDRL1(KASQNVGTNVD)、由由在其中的SEQ ID NO:17中的位置50至56处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成的CDRL2(GASNRYT)、以及由由在

其中的SEQ ID NO:17中的位置89至97处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成的CDRL3 (LQYKYNPYT)。

[0346] 此外,198D抗体的重链可变区具有由由在序列表中的SEQ ID NO:19的位置26至35处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成的CDRH1 (GFSLTSFHVS)、由由在其中的SEQ ID NO:19中的位置50至58处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成的CDRH2 (TISSGGGTY)、以及由由在其中的SEQ ID NO:19中的位置98至109处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成的CDRH3 (ISGWGHYYVMDV)。

[0347] 此外,198D抗体的轻链可变区具有由由在序列表中的SEQ ID NO:21的位置24至34处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成的CDRL1 (QASEDIYSGLA)、由由在其中的SEQ ID NO:21中的位置50至56处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成的CDRL2 (GAGSLQD)、以及由由在其中的SEQ ID NO:21中的位置89至97处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成的CDRL3 (QQGLKFPLT)。

[0348] 大鼠抗体151D的人源化抗体的具体实例可以是以下的任何给定组合:包含由以下任何一个组成的重链可变区的重链:(1)由序列表中的SEQ ID NO:33 (h151D-H1)或35 (h151D-H4)中所示的位置20至136处的氨基酸残基组成的氨基酸序列,(2)与上述(1)的序列中除每个CDR序列外的构架区序列具有至少95%或更多的同源性的氨基酸序列,和(3)在上述(1)的序列中除每个CDR序列外的构架区序列中包含一个或几个氨基酸的缺失、取代或添加的氨基酸序列;以及包含由以下任何一个组成的轻链可变区的轻链:(4)由SEQ ID NO:37 (h151D-L1)或39 (h151D-L1)中所示的位置21至129处的氨基酸残基组成的氨基酸序列,(5)与上述(4)的序列中除每个CDR序列外的构架区序列具有至少95%或更多的同源性的氨基酸序列,和(6)在上述(4)的序列中除每个CDR序列外的构架区序列中包含一个或几个氨基酸的缺失、取代或添加的氨基酸序列。

[0349] 另一方面,大鼠抗体198D的人源化抗体的具体实例可以是以下的任何给定组合:包含由以下任何一个组成的重链可变区的重链:(1)由序列表中的SEQ ID NO:41 (h198D-H3)中所示的位置20至139处的氨基酸残基组成的氨基酸序列,(2)与上述(1)的序列中除每个CDR序列外的构架区序列具有至少95%或更多的同源性的氨基酸序列,和(3)在上述(1)的序列中除每个CDR序列外的构架区序列中包含一个或几个氨基酸的缺失、取代或添加的氨基酸序列;以及包含由以下任何一个组成的轻链可变区的轻链:(4)由序列表中的SEQ ID NO:43 (h198D-L4)中所示的位置21至129处的氨基酸残基组成的氨基酸序列,(5)与上述(4)的序列中除每个CDR序列外的构架区序列具有至少95%或更多的同源性的氨基酸序列,和(6)在上述(4)的序列中除每个CDR序列外的构架区序列中包含一个或几个氨基酸的缺失、取代或添加的氨基酸序列。

[0350] 人源化151D抗体的重链和轻链的优选组合的实例可以包括:由具有重链可变区的重链和具有轻链可变区的轻链组成的抗体,所述重链可变区由由在SEQ ID NO:33中所示的位置20至136处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成,所述轻链可变区由由在SEQ ID NO:37中所示的位置21至129处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成;以及由具有重链可变区的重链和具有轻链可变区的轻链组成的抗体,所述重链可变区由由在SEQ ID NO:35中所示的位置20至136处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成,所述轻链可变区由由在SEQ ID NO:39中所示的位置21至129处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成。

[0351] 更优选的其组合的实例可以包括:由具有SEQ ID NO:33中所示的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:37中所示的氨基酸序列的轻链组成的抗体(h151D-H1L1);和由具有SEQ ID NO:35中所示的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列的轻链组成的抗体(h151D-H4L4)。

[0352] 人源化198D抗体的重链和轻链的优选组合的实例可以是由具有重链可变区的重链和具有轻链可变区的轻链组成的抗体,所述重链可变区由在SEQ ID NO:41中所示的位置20至139处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成,所述轻链可变区由在SEQ ID NO:43中所示的位置21至129处的氨基酸残基组成的氨基酸序列组成。

[0353] 其更优选的组合的实例可以是由具有SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:43中所示的氨基酸序列的轻链组成的抗体(h198D-H3L4)。

[0354] 通过将显示与上述重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列的高度同源性的序列组合在一起,能够选择具有与上述抗体各自等价的细胞毒性的抗体。这种同源性是一般80%或更多,优选90%或更多,更优选95%或更多,且最优选99%或更多的同源性。此外,通过彼此组合包含关于重链或轻链的氨基酸序列的一个或几个氨基酸残基的取代、缺失或添加的氨基酸序列,也能够选择具有与上述抗体各自等价的细胞毒性的抗体。

[0355] 应指出,在本说明书中使用的术语“几个”意指1至10、1至9、1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3,或1或2。

[0356] 本说明书中的氨基酸取代优选为保守氨基酸取代。保守氨基酸取代是在与某些氨基酸侧链相关的氨基酸基团中发生的取代。优选的氨基酸基团如下:酸性基团 = 天冬氨酸和谷氨酸;碱性基团 = 赖氨酸、精氨酸和组氨酸;非极性基团 = 丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸;和不带电的极性基团 = 甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。其它优选的氨基酸基团如下:脂肪族羟基 = 丝氨酸和苏氨酸;含酰胺基团 = 天冬酰胺和谷氨酰胺;脂肪族基团 = 丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;和芳香族基团 = 苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。这样的氨基酸取代优选在具有原始氨基酸序列的物质的性质不损害的范围进行。

[0357] 两种类型的氨基酸序列之间的同源性可以使用Blast算法版本2.2.2(Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller和David J. Lipman(1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs," Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)的缺省参数来确定。Blast算法也可以通过经由互联网访问[www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)来使用。应指出,本发明的抗体的核苷酸序列与另一种抗体的核苷酸序列之间的同源性也可以使用Blast算法来确定。

[0358] 在序列表中的SEQ ID NO:33或35中所示的人源化151D抗体重链的氨基酸序列中,由在位置1至19处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是信号序列,由在位置20至136处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是可变区,并且由在位置137至466处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是恒定区。

[0359] 此外,在序列表中的SEQ ID NO:37或39中所示的人源化151D抗体轻链的氨基酸序列中,由在位置1至20处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是信号序列,由在位置21至129处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是可变区,并且由在位置130至234处的氨基酸残基组成的

氨基酸序列是恒定区。

[0360] 此外,在序列表中的SEQ ID NO:41中所示的人源化198D抗体重链的氨基酸序列中,由在位置1至19处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是信号序列,由在位置20至139处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是可变区,并且由在位置140至469处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是恒定区。

[0361] 此外,在序列表中的SEQ ID NO:43中所示的人源化198D抗体轻链的氨基酸序列中,由在位置1至20处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是信号序列,由在位置21至129处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是可变区,并且由在位置130至234处的氨基酸残基组成的氨基酸序列是恒定区。

[0362] 序列表中的SEQ ID NO:33或35中所示的人源化151D抗体的重链的氨基酸序列分别由序列表中的SEQ ID NO:32或34中所示的核苷酸序列编码。另外,分别地,SEQ ID NO:33的序列显示于图21中,SEQ ID NO:35的序列显示于图23中,SEQ ID NO:32的序列显示于图31中,并且SEQ ID NO:34的序列显示于图33中。

[0363] 由在每个核苷酸序列中的核苷酸位置1至57处的核苷酸组成的核苷酸序列编码人源化151D抗体的重链信号序列,由在其中的核苷酸位置58至408处的核苷酸组成的核苷酸序列编码人源化151D抗体的重链可变区,并且由在其中的核苷酸位置409至1398处的核苷酸组成的核苷酸序列编码人源化151D抗体的重链恒定区。

[0364] 序列表中的SEQ ID NO:41中所示的人源化198D抗体重链的氨基酸序列由序列表中的SEQ ID NO:40中所示的核苷酸序列编码。另外,SEQ ID NO:41的序列显示于图25中,并且SEQ ID NO:40的序列显示于图35中。

[0365] 由在上述核苷酸序列中的核苷酸位置1至57处的核苷酸组成的核苷酸序列编码人源化198D抗体的重链信号序列,由在其中的核苷酸位置58至417处的核苷酸组成的核苷酸序列编码人源化198D抗体的重链可变区,并且由在其中的核苷酸位置418至1407处的核苷酸组成的核苷酸序列编码人源化198D抗体的重链恒定区。

[0366] 序列表中的SEQ ID NO:37或39中所示的人源化151D抗体的轻链的氨基酸序列分别由序列表中的SEQ ID NO:36或38中所示的核苷酸序列编码。另外,分别地,SEQ ID NO:37的序列显示于图22中,SEQ ID NO:39的序列显示于图24中,SEQ ID NO:36的序列显示于图32中,并且SEQ ID NO:38的序列显示于图34中。

[0367] 由在每个核苷酸序列中的核苷酸位置1至60处的核苷酸组成的核苷酸序列编码人源化151D抗体的轻链信号序列,由在其中的核苷酸位置61至387处的核苷酸组成的核苷酸序列编码人源化151D抗体的轻链可变区,并且由在其中的核苷酸位置388至702处的核苷酸组成的核苷酸序列编码人源化151D抗体的轻链恒定区。

[0368] 序列表中的SEQ ID NO:43中所示的人源化198D抗体轻链的氨基酸序列由序列表中的SEQ ID NO:42中所示的核苷酸序列编码。另外,SEQ ID NO:43的序列显示于图26中,并且SEQ ID NO:42的序列显示于图36中。

[0369] 由在上述核苷酸序列中的核苷酸位置1至60处的核苷酸组成的核苷酸序列编码人源化198D抗体的轻链信号序列,由在其中的核苷酸位置61至387处的核苷酸组成的核苷酸序列编码人源化198D抗体的轻链可变区,并且由在其中的核苷酸位置388至702处的核苷酸组成的核苷酸序列编码人源化198D抗体的轻链恒定区。

[0370] 这些核苷酸序列与其它抗体的核苷酸序列之间的同源性也可以使用Blast算法来确定。

[0371] 本发明抗体的进一步实例可以是结合人源化151D抗体或人源化198D抗体也与之结合的相同表位的人抗体。抗GARP人抗体意指仅具有人染色体衍生的抗体的基因序列的人抗体。抗GARP人抗体可以通过上述方法获得。

[0372] 如果新近产生的人抗体结合人源化151D抗体或人源化198D抗体与之结合的部分肽或部分三维结构,则可以确定人抗体结合人源化151D抗体或人源化198D抗体与之结合的相同表位。另外,通过证实人抗体与人源化151D抗体或人源化198D抗体竞争其与GARP的结合(即,人抗体干扰人源化151D抗体或人源化198D抗体与GARP的结合),可以确定人抗体结合人源化151D抗体或人源化198D抗体与之结合的表位,即使表位的特定序列或结构仍未确定。如果证实所涉及的人抗体结合人源化151D抗体或人源化198D抗体与之结合的相同表位,则强烈预期人抗体应该具有与人源化151D抗体或人源化198D抗体的那种等价的细胞毒性。

[0373] 按照对抗原的结合活性,通过后文在实施例等中描述的方法评估通过上述方法获得的嵌合抗体、人源化抗体或人抗体,并且因此可以选择优选的抗体。

[0374] 本发明还包括抗体的修饰。术语“修饰”在本文中用于意指化学或生物学修饰的本发明的抗体。这种化学修饰的实例包括化学部分与氨基酸骨架的结合、以及N-联或O-联碳水化合物链的化学修饰。这种生物学修饰的实例包括已经历翻译后修饰(例如N-联或O-联糖链修饰、N-末端或C-末端加工、脱酰胺、天冬氨酸的异构化和甲硫氨酸的氧化)的抗体,以及由于已允许使用原核生物宿主细胞表达而对其N-末端添加甲硫氨酸残基的抗体。另外,这种修饰还包括使得能够检测或分离本发明的抗体或抗原的标记抗体,诸如,例如酶标记抗体、荧光标记抗体和亲和标记抗体。本发明的抗体的这种修饰可用于改善本发明的原始抗体在血液中的稳定性和保留性、抗原性的降低、这种抗体或抗原的检测或分离等。

[0375] 此外,通过调节与本发明的抗体结合的糖链修饰(糖基化、去岩藻糖基化等),可以增强抗体依赖性细胞毒性。作为调节抗体的糖链修饰的技术,在W099/54342、W02000/61739、W02002/31140等中描述的那些是已知的,但技术并不限于这些。本发明的抗体还包括其中上述糖链修饰已得到调节的抗体。

[0376] 在抗体基因已被分离后,使用宿主和表达载体的合适组合,基因被引入合适的宿主内以产生抗体。抗体基因的具体实例可以是编码本说明书中描述的抗体的重链序列的基因与编码其中描述的抗体的轻链序列的基因的组合。在宿主细胞转化后,可以将重链序列基因和轻链序列基因插入到单个表达载体内,或者可以将这些基因替代地各自插入到不同的表达载体内。

[0377] 当真核细胞用作宿主时,可以使用动物细胞、植物细胞或真核微生物。动物细胞的实例包括哺乳动物细胞,例如其为猴细胞的COS细胞(Gluzman, Y., Cell (1981) 23, 第175-182页, ATCC CRL-1650)、小鼠成纤维细胞NIH3T3(ATCC编号CRL-1658)、以及中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞, ATCC CCL-61)的二氢叶酸还原酶缺陷型细胞系(Urlaub, G.和Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1980) 77, 第4126-4220页)。

[0378] 当原核细胞用作宿主时,例如可以使用大肠杆菌或枯草芽孢杆菌。

[0379] 将目的抗体基因引入这些细胞内用于转化,然后将经转化的细胞在体外培养以获

得抗体。在上述培养中,存在其中取决于抗体的序列收率不同的情况,并且因此,能够使用收率作为指示剂,从具有等价结合活性的抗体中选择作为药剂容易产生的抗体。相应地,本发明的抗体还包括通过用于产生抗体的上述方法获得的抗体,其特征在于它包括培养经转化的宿主细胞的步骤和从上述步骤中获得的培养物中收集目的抗体的步骤。

[0380] 已知在培养的哺乳动物细胞中产生的抗体重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失(Journal of Chromatography A, 705:129-134 (1995)),并且此外,已知在重链羧基末端处的两个氨基酸残基甘氨酸和赖氨酸被缺失,并且位于羧基末端处的脯氨酸残基被新近酰胺化(Analytical Biochemistry, 360:75-83 (2007))。然而,这些重链序列的这种缺失和修饰对抗体的抗原结合活性和效应子功能(补体活化、抗体依赖性细胞毒性等)没有影响。相应地,本发明还包括已经历上述修饰的抗体,并且该抗体的具体实例包括在重链羧基末端处包含1或2个氨基酸的缺失的缺失突变体,以及通过使上述缺失突变体酰胺化而形成的缺失突变体(例如其中在羧基末端位点处的脯氨酸残基被酰胺化的重链)。然而,涉及在根据本发明的抗体重链的羧基末端处缺失的缺失突变体并不限于上述缺失突变体,只要它们保持抗原结合活性和效应子功能。构成根据本发明的抗体的两条重链可以是选自全长抗体和上述缺失突变体的重链的任何一种,或选自上述组的任何两种的组合。个别缺失突变体的比率可以受产生根据本发明的抗体的培养的哺乳动物细胞的类型和培养条件的影响。根据本发明的抗体的主要成分可以是其中一个氨基酸残基在两条重链的每个羧基末端处缺失的抗体。

[0381] 本发明的抗体的同种型的实例可以包括IgG (IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。其中,IgG1和IgG2是优选的。

[0382] 抗体的一般功能的实例可以包括抗原结合活性、中和抗原活性的活性、增强抗原活性的活性、ADCC活性、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)活性和补体依赖性细胞毒性(CDC)活性。根据本发明的抗体的功能是与GARP的结合活性,优选ADCC活性,且更优选由ADCC介导的Treg功能抑制引起的细胞毒性(抗肿瘤活性)。此外,本发明的抗体可以具有ADCP活性和/或CDC活性,以及ADCC活性。特别地,关于包含现有抗肿瘤抗体的药剂,已报道了药剂直接作用于肿瘤细胞以阻断生长信号,它们直接作用于肿瘤细胞以诱导细胞死亡信号,它们压制血管生成,它们引起经由NK细胞的ADCC活性,并且它们诱导经由补体的CDC活性,以压制肿瘤细胞的生长(J Clin Oncol 28:4390-4399. (2010), Clin Cancer Res;16(1);11-20. (2010))。然而,就根据本申请的本发明的抗GARP抗体的ADCP活性而言,至少本发明人不知道ADCP活性已作为包含现有抗GARP抗肿瘤抗体的药剂的活性被报道。

[0383] 本发明的抗体可以是已被多聚化以增强对抗原的亲合力的抗体。待多聚化的抗体可以是单一类型的抗体,或识别单个抗原的多个表位的多种抗体。使抗体多聚化的方法的实例可以包括IgG CH3结构域与两个scFv(单链抗体)的结合、抗体与链霉抗生物素蛋白的结合、以及螺旋-转角-螺旋基序的引入。

[0384] 本发明的抗体也可以是多克隆抗体,其为具有不同氨基酸序列的多种类型的抗GARP抗体的混合物。多克隆抗体的实例可以是具有不同CDR的多种类型的抗体的混合物。作为这样的多克隆抗体,可以使用通过培养产生不同抗体的细胞的混合物然后纯化所获得的培养物而获得的抗体(参见W02004/061104)。

[0385] 作为抗体的修饰,可以使用与各种类型的分子例如聚乙二醇(PEG)结合的抗体。

[0386] 本发明的抗体可以进一步是由这种抗体和另一种药物形成的缀合物(免疫缀合物)。这种抗体可以是例如与放射性物质或具有药理作用的化合物结合的抗体(Nature Biotechnology (2005) 23,第1137-1146页)。这种抗体的实例可以包括铟( $^{111}\text{In}$ ) 卡罗单抗喷地肽(Indium ( $^{111}\text{In}$ ) Capromab pendetide)、锝( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) 硫诺莫单抗(Technetium ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) Nofetumomab merpentan)、铟( $^{111}\text{In}$ ) 替伊莫单抗(Indium ( $^{111}\text{In}$ ) Ibiritumomab)、钇( $^{90}\text{Y}$ ) 替伊莫单抗(Yttrium ( $^{90}\text{Y}$ ) Ibiritumomab)和碘( $^{131}\text{I}$ ) 托西莫单抗(Iodine ( $^{131}\text{I}$ ) Tositumomab)。

[0387] 3. 含有抗GARP抗体的药剂

[0388] 由于通过上文节段“2. 抗GARP抗体的产生”中描述的方法得到的抗体显示出对Treg的细胞毒性,它可以用作药剂,且特别用作用于癌症和感染病(特别是疟疾和HIV感染)的治疗剂。

[0389] 体外由抗体引起的细胞毒性可以基于压制细胞的增殖应答的活性来测量。

[0390] 例如,培养过表达GARP的癌细胞系,并且将具有不同浓度的抗体加入培养系统中。其后,可以测量抗体对灶(focus)形成、集落形成和球体生长的抑制活性。

[0391] 抗体对实验动物的癌症的体内治疗效应可以例如通过下述进行测量:将抗体施用于过表达GARP的肿瘤细胞系已移植到其内的裸鼠,然后测量癌细胞中的变化。

[0392] 癌症类型的实例可以包括肺癌、肾癌、泌尿道上皮癌、结肠癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、食道癌和血液癌症。然而,癌症类型并不限于上述实例,只要作为治疗靶的癌细胞表达GARP。

[0393] 作为在对于本发明的药物组合物可接受的药剂中使用的物质,依据应用剂量或应用浓度,对药物组合物待施用于其的对象无毒的物质是优选的。

[0394] 本发明的药物组合物可以包含用于改变或保持pH、渗透压、粘度、透明度、颜色、等渗性、无菌性、稳定性、溶解性、持续释放速率、吸收性和渗透性的药物物质。药物物质的实例可以包括下述物质,但不限于其:氨基酸如甘氨酸、丙氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;抗菌剂;抗氧化剂如抗坏血酸、硫酸钠或亚硫酸氢钠;缓冲液如磷酸盐、柠檬酸盐或硼酸盐缓冲液、碳酸氢钠或Tris-HCl溶液;填料如甘露醇或甘氨酸;螯合剂如乙二胺四乙酸(EDTA);络合剂如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 $\beta$ -环糊精或羟丙基- $\beta$ -环糊精;填充剂如葡萄糖、甘露糖或糊精;其它碳水化合物如单糖或二糖;着色剂;调味剂;稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;低分子量多肽;成盐抗衡离子;防腐剂如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定(chlorhexidine)、山梨酸或过氧化氢;溶剂如丙三醇、丙二醇或聚乙二醇;糖醇如甘露糖醇或山梨糖醇;聚山梨醇酯如悬浮剂、脱水山梨糖醇酯、聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80;表面活性剂如Triton、氨丁三醇、卵磷脂或胆固醇;稳定增强剂如蔗糖或山梨糖醇;悬浮剂;弹性增强剂如氯化钠、氯化钾、甘露糖醇或山梨糖醇;运输剂;赋形剂;和/或药物佐剂。这种药物物质优选以为抗GARP抗体的重量的0.001至100倍,特别是0.1至10倍高的量加入抗GARP抗体中。制剂中药物组合物的优选组成可以根据靶疾病、应用的施用途等适当地由本领域技术人员确定。

[0395] 药物组合物中的赋形剂或载体可以是液体或固体。合适的赋形剂或载体可以是注射用水、生理盐水、人工脑脊液或通常用于肠胃外施用的其它物质。中性生理盐水或包含血清白蛋白的生理盐水也可以用作载体。药物组合物可以包含具有pH 7.0-8.5的Tris缓冲



液、具有pH 4.0-5.5的乙酸盐缓冲液或具有pH 3.0-6.2的柠檬酸盐缓冲液。另外,这些缓冲液还可以包含山梨糖醇或其它化合物。

[0396] 本发明的药物组合物的实例可以包括包含抗GARP抗体的药物组合物、以及包含抗GARP抗体和至少一种癌症治疗剂的药物组合物。本发明的药物组合物制备为以冷冻干燥产物或液体形式的具有所选择的组成和必要纯度的药物。包含抗GARP抗体的这种药物组合物、以及包含抗GARP抗体和至少一种癌症治疗剂的药物组合物也可以模制成包含合适赋形剂如蔗糖的冷冻干燥产品。

[0397] 在上述药物组合物中连同抗GARP抗体一起包含的癌症治疗剂可以连同抗GARP抗体一起同时、分别或连续地施用于个体。以其它方式,癌症治疗剂和抗GARP抗体可以各自以不同的施用间隔施用于对象。这种癌症治疗剂的实例可以包括abraxane、卡铂、顺铂、吉西他滨、伊立替康(CPT-11)、紫杉醇、培美曲塞、索拉非尼、长春碱、国际公开号W02003/038043中描述的藥物、LH-RH类似物(亮丙瑞林、戈舍瑞林等)、雌莫司汀磷酸盐、雌激素拮抗剂(他莫昔芬、雷洛昔芬等)和芳香酶抑制剂(阿那曲唑、来曲唑、依西美坦等)。然而,癌症治疗剂的实例并不限于上述药物,只要该药剂具有抗肿瘤活性。

[0398] 作为用于施用的靶的对象并无特别限制。它优选是哺乳动物,且更优选是人。

[0399] 本发明的药物组合物可以制备用于肠胃外施用,或用于涉及经口施用的胃肠道吸收。制剂的组成和浓度可以根据施用方法来确定。关于包含在本发明的药物组合物中的抗GARP抗体对于GARP的亲合力,即抗GARP抗体对GARP的解离常数(K<sub>d</sub>值),随着亲合力增加(即K<sub>d</sub>值低),即使其对人应用的剂量减少,药物组合物也可以显示出药物效应。基于这些结果,还可以确定本发明的药物组合物对人的应用剂量。当将人类型的抗GARP抗体施用于人时,抗体可以以大约0.001至100 mg/kg的剂量施用一次或以1至180天的间隔施用几次。本发明的药物组合物形式的实例可以包括包含滴注的注射剂、栓剂、经鼻剂、舌下剂和经皮吸收剂。

[0400] 在下文中,本发明将在下述实施例中具体描述。然而,这些实施例并不预期限制本发明的范围。

## 实施例

[0401] 在下述实施例中,除非另有说明,否则关于遗传操作的个别操作根据“Molecular Cloning”(Sambrook,J.,Fritsch,E. F.和Maniatis,T.,由Cold Spring Harbor Laboratory Press于1989年出版)中描述的方法或本领域技术人员使用的实验手册中描述的其它方法进行,或者当使用商购可得的试剂或试剂盒时,实施例根据商购可得的产品中包含的说明书进行。

[0402] 在下文中,本发明将在下述实施例中具体描述。然而,这些实施例并不预期限制本发明的范围。

[0403] 实施例1:获得抗体

[0404] 1)-1通过在噬菌体展示中淘选分离抗GARP Fab

[0405] n-CoDeR Fab噬菌体文库(BioInvent)用于分离与GARP结合的Fab。使用EZ-Link NHS-Chromogenic-Biotin试剂(Thermo Scientific)生物素化GARP(R&D Systems)。对于液相淘选,将生物素化的GARP在Dynabeads Streptavidin M-280(Life Technologies)上

固相化,然后加入噬菌体。通过使用磁体 (DynaMag-2,Life Technologies)的洗涤操作去除未结合的噬菌体。其后,通过用胰蛋白酶 (Sigma-Aldrich)处理其收集GARP结合的噬菌体,然后使用大肠杆菌进行扩增。总共进行三次淘选操作,并且使用限制性酶,从多克隆噬菌粒中切割编码Fab的DNA片段,然后装载到用于大肠杆菌的表达载体上。其后,用表达载体转化大肠杆菌TOP10F' (Life Technologies),然后允许Fab在IPTG (Sigma-Aldrich)的存在下表达。使所获得的Fab经受通过ELISA的筛选。

[0406] 1)-2通过ELISA筛选GARP结合Fab

[0407] 将已用PBS (含有0.138 M氯化钠和0.0027 M氯化钾的0.01 M磷酸盐缓冲盐水 (pH 7.4);Sigma-Aldrich)稀释至2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的50 $\mu\text{L}$  GARP加入384孔Maxi-sorp板 (黑色,Nunc)的各孔中,然后使它在4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育过夜用于包被板。可替代地,将已用PBS稀释至1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的50  $\mu\text{L}$  NeutrAvidin (Life Technologies)加入这种384孔Maxi-sorp板中,用于包被板 (通过在4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育过夜)。其后,用ELISA缓冲液 (补充有0.05% Tween-20 (Bio-RAD)的PBS (Sigma-Aldrich))洗涤板三次,然后向其中加入生物素化的GARP (1 pmol/50  $\mu\text{L}$  PBS/孔),随后为伴随混合在室温下温育1小时。用ELISA缓冲液洗涤板三次,然后用Blocker Casein (Thermo Scientific)封闭,并且用ELISA缓冲液进一步洗涤三次。其后,加入含有由大肠杆菌产生的Fab的培养上清液,然后将该板在室温下伴随混合温育1小时。用ELISA缓冲液洗涤板三次,并且加入50  $\mu\text{L}$  2500倍稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) -标记的抗人F(ab')<sub>2</sub>抗体 (R&D Systems)。将板进一步伴随混合在室温下温育1小时。用ELISA缓冲液洗涤反应混合物三次,然后将SuperSignal Pico ELISA化学发光底物 (Thermo Scientific)加入孔中。十分钟后,使用板阅读器 (Envision 2104 Multilabel Reader,Perkin Elmer)测量化学发光,并且分离结合GARP的Fab。

[0408] 1)-3 ELISA阳性克隆的核苷酸序列的确定

[0409] 通过染料终止法 (BigDye (注册商标) Terminator v3.1,Life Technologies)分析ELISA阳性克隆 (105F和110F)的重链和轻链可变区。测序中使用的主要引物的序列如下。

[0410] 引物A:5'-GAA ACA GCT ATG AAA TAC CTA TTG C-3' (SEQ ID NO:10)

[0411] 引物B:5'-GCC TGA GCA GTG GAA GTC C-3' (SEQ ID NO:11)

[0412] 引物C:5'-TAG GTA TTT CAT TAT GAC TGT CTC-3' (SEQ ID NO:12)

[0413] 引物D:5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG-3' (SEQ ID NO:13)。

[0414] 作为上述分析的结果,确定了105F抗体和110F抗体基因的可变区的核苷酸序列。

[0415] 105F抗体的重链可变区的核苷酸序列是由在序列表中的SEQ ID NO:6中所示的核苷酸序列的核苷酸位置1至354处的核苷酸组成的序列,并且105F抗体的轻链可变区的核苷酸序列是由在序列表中的SEQ ID NO:7中所示的核苷酸序列的核苷酸位置1至336处的核苷酸组成的序列。

[0416] 110F抗体的重链可变区的核苷酸序列是由在序列表中的SEQ ID NO:8中所示的核苷酸序列的核苷酸位置1至369处的核苷酸组成的序列,并且110F抗体的轻链可变区的核苷酸序列是由在序列表中的SEQ ID NO:9中所示的核苷酸序列的核苷酸位置1至333处的核苷酸组成的序列。

[0417] 1)-4:全长IgG的制备以及IgG的表达和纯化

[0418] 通过下述方法制备包括105F和110F的ELISA阳性克隆的全长IgG。

[0419] 确定编码Fab的核苷酸序列,并且其后指定与上述1)-3中指定的每种抗体的重链和轻链可变区对应的核苷酸序列。

[0420] 根据普通方法,将上述重链的可变区的核苷酸序列连接至编码人IgG<sub>1</sub>重链的恒定区的核苷酸序列(CH1 + Fc区:在序列表中的SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列中的氨基酸位置119至448处的氨基酸序列),并且还将上述轻链的可变区的核苷酸序列连接至编码人IgG<sub>1</sub>轻链的恒定区的核苷酸序列(CL:在序列表中的SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列中的氨基酸位置113至217处的氨基酸序列)。其后,将所得到的连接物插入用于动物细胞的表达载体例如pcDNA3.3(Invitrogen)内,以构建用于动物细胞的IgG表达载体。

[0421] 再次分析构建的IgG表达载体的核苷酸序列,使得证实105F抗体的全长重链的核苷酸序列是序列表中的SEQ ID NO:6中所示的核苷酸序列,并且105F抗体的全长轻链的核苷酸序列是序列表中的SEQ ID NO:7中所示的核苷酸序列。

[0422] 还证实了110F抗体的全长重链的核苷酸序列是序列表中的SEQ ID NO:8中所示的核苷酸序列,并且110F抗体的全长轻链的核苷酸序列是序列表中的SEQ ID NO:9中所示的核苷酸序列。

[0423] 此外,基于上述核苷酸序列,确定由该核苷酸序列编码的105F抗体的全长重链和全长轻链的氨基酸序列,以及由该核苷酸序列编码的110F抗体的全长重链和全长轻链的氨基酸序列。

[0424] 105F抗体的重链的氨基酸序列是序列表中的SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列,并且其轻链的氨基酸序列是序列表中的SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列。

[0425] 110F抗体的重链的氨基酸序列是序列表中的SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列,并且其轻链的氨基酸序列是序列表中的SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列。

[0426] 通过将用于动物细胞的上述IgG表达载体插入FreeStyle 293F细胞(Life Technologies)中,来瞬时表达105F抗体或110F抗体的IgG,然后在必要时,使用蛋白A亲和柱(HiTrap Mab Select SuRe,GE Healthcare)纯化所得到的IgG。其后,使用Vivaspin 20 (7k MWC0,GE Healthcare)将IgG在其中溶解的缓冲液替换为PBS,然后使所得物经受下述步骤“1)-5”。

[0427] 1)-5根据ELISA证实纯化的IgG与GARP的结合

[0428] 将用PBS稀释至1 μg/mL的100 μL人GARP(R&D Systems,目录号:6055-LR)加入96孔Maxi-sorp板(黑色,Nunc)的各孔中,然后使板在4°C下温育过夜用于包被板。

[0429] 将板用ELISA缓冲液洗涤三次,然后用Blocker Casein在室温下封闭1小时。将板用ELISA缓冲液洗涤三次,并且将100 μL 50 nM 105F抗体、50 nM 110F抗体、50 nM人IgG(Jackson Immuno Research)、50 nM小鼠抗GARP抗体(Plato-1,ENZO Life Science)或50 nM小鼠IgG(Jackson Immuno Research)加入孔中,并且使板伴随混合在室温下温育1小时。

[0430] 将板用ELISA缓冲液洗涤三次。这之后,将已用PBS稀释5000倍的100 μL HRP标记的抗人Fc抗体(R&D Systems)加入用105F抗体、110F抗体或人IgG处理的孔中。另一方面,将已用PBS稀释5000倍的100 μL HRP标记的抗小鼠Fc抗体(R&D Systems)加入用小鼠抗GARP抗体和小鼠IgG处理的孔中。使板伴随混合在室温下温育1小时。

[0431] 将板用ELISA缓冲液洗涤五次,然后将0.1 mL SuperSignal Pico ELISA化学发光底物加入孔中。十分钟后,使用板阅读器(Envision 2104 Multilabel Reader,Perkin

Elmer) 测量化学发光。

[0432] 结果证明105F抗体和110F抗体与商购可得的抗GARP抗体一样与GARP结合(图10)。

[0433] 实施例2:与表达抗原基因的细胞结合

[0434] 关于GARP表达载体,购买人GARP的cDNA克隆(Origene),然后根据常见方法将其克隆到pcDNA3.1(+)载体(Invitrogen)内。其后,证实其核苷酸序列。

[0435] 使用Lipofectamine 2000(Invitrogen),将GARP表达载体和用作对照的pcDNA3.1载体各自转染到HEK-293T细胞(ATCC:CRL-11268)内。将所得到的细胞在补充有10%胎牛血清(FBS,Hyclone)的DMEM培养基(Invitrogen)中在37℃下在5% CO<sub>2</sub>中培养过夜。其后,通过TrypLE Express(Invitrogen)处理从板中收获细胞,并且将细胞用MACS缓冲液(含有0.5% BSA和2 mM EDTA的PBS;Miltenyi Biotec)洗涤两次,然后悬浮在与上文描述相同的溶液中。将105F抗体和对照人IgG(ENZO Life Science)各自加入细胞悬浮液中,并且将细胞在4℃下温育15分钟。将细胞用MACS缓冲液洗涤两次。加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗-IgG抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories)且悬浮,并且将细胞在4℃下进一步温育15分钟。将细胞用MACS缓冲液洗涤两次,然后将细胞用1% PFA(由多聚甲醛32%溶液(ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES)制备)固定,并且通过使用流式细胞仪(FACS Canto II; Becton Dickinson)测量。数据使用Flowjo(TreeStar)进行分析。通过门控出用Horizon FVS450(Becton Dickinson)染色的细胞,从分析中去除死细胞。其后,生成活细胞的FITC荧光强度的直方图。

[0436] 就用对照载体单独转染的HEK-293T细胞而言,关于105F抗体的荧光强度的直方图与关于对照IgG的那种相似。另一方面,就表达GARP的HEK-293T细胞而言,与关于对照IgG的直方图相比,证实了关于105F抗体的直方图向强荧光强度侧移动(图11)。根据上述结果,发现105F抗体与由HEK-293T细胞表达的GARP特异性结合。

[0437] 实施例3:与内源性GARP表达细胞结合

[0438] 3)-1使用L428细胞的流式细胞术分析

[0439] 使用Alexa Fluor 647单克隆抗体标记试剂盒(Invitrogen)制备荧光标记形式的105F抗体。将L428细胞(得自DSMZ)用MACS缓冲液洗涤两次,并且悬浮于相同溶液中。将标记的105F抗体加入细胞悬浮液中,并且将细胞在4℃下温育30分钟。将细胞用MACS缓冲液洗涤两次,然后将细胞用1% PFA固定,并且通过使用流式细胞仪(FACS Canto II, Becton Dickinson)测量。数据使用FlowJo(TreeStar)进行分析。通过门控出用Horizon FVS450染色的细胞来去除死细胞。其后,生成活细胞的FITC荧光强度的直方图。与关于单独的L428细胞的荧光强度的直方图相比,105F抗体已加入其中的L428细胞的直方图向强荧光强度侧移动。因此,证实105F抗体与由细胞内源性表达的GARP结合(图12)。

[0440] 3)-2使用人Treg的流式细胞术分析

[0441] 使用Ficoll-Paque PLUS(GE Healthcare)分离来自健康对象的外周血单核细胞(PBMC),然后将分离的细胞以 $2 \times 10^6$ 个细胞/mL接种到在低粘附性24孔板(Costar)中的补充有10% FBS的RPMI1640培养基(Invitrogen)(以下称为“RP-F10培养基”)中。向孔中加入抗CD3抗体(BD Pharmingen)和抗CD28抗体(BD Pharmingen),并且将细胞培养20小时。其后,将细胞悬浮于FACS缓冲液(补充有10 mM HEPES(Invitrogen)、2 mM EDTA(Invitrogen)和2% FBS的HBSS(Invitrogen))中,并且将上述3)-1中制备的标记的105F抗体和Alexa

Fluor 647标记的抗GARP抗体(G14D9,eBioscience)加入悬浮液中。使细胞在冰上温育30分钟。将细胞用FACS缓冲液洗涤,并且加入固定/渗透化工作溶液(eBioscience)。使细胞在冰上进一步温育30分钟,并且用渗透化缓冲液(eBioscience)洗涤细胞。这之后,将2%大鼠血清(eBioscience)加入细胞中。使细胞在室温下温育15分钟,并且加入PE标记的抗Foxp3抗体(eBioscience),随后为在室温下30分钟的进一步温育。将细胞在4℃下用组织固定液洗涤且固定15分钟或更久,所述组织固定液通过用D-PBS(Invitrogen)将4%多聚甲醛磷酸盐缓冲溶液(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)两倍稀释进行制备。将细胞用FACS缓冲液洗涤后,通过使用流式细胞仪(FACS Canto II;Becton Dickinson)测量细胞,并且使用FlowJo(Tree Star)分析。结果,105F抗体与商购可得的抗GARP抗体一样结合FoxP3-阳性Treg(图13)。

[0442] 实施例4:抗GARP抗体的性质

[0443] 4)-1 ADCC活性

[0444] 4)-1-1效应细胞的制备

[0445] 按照上述3)-2分离来自健康志愿者的PBMC。使用NK细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec),从PBMC中纯化NK细胞。将所获得的NK细胞在补充有100 IU/mL rhIL-2(Novartis)的RP-F10培养基(Invitrogen)中温育过夜。其后,通过台盼蓝拒染测试计数活细胞数目,然后将细胞以 $2 \times 10^5$ 个细胞/mL的细胞密度重悬浮于RP-F10培养基中。将所获得的细胞用作效应细胞。

[0446] 4)-1-2靶细胞的制备

[0447] 在补充有10% FBS的RPMI1640培养基(Invitrogen)中,将30 $\mu$ L(1110 kBq)铬-51( $^{51}\text{Cr}$ )与 $0.6 \times 10^6$ 个实施例3)-1中所述的L428细胞混合,并且将细胞在37℃下在5%  $\text{CO}_2$ 中温育2小时,使得细胞是放射性标记的。标记的细胞用补充有10% FBS的RPMI1640培养基(Invitrogen)洗涤三次,然后将细胞以 $4 \times 10^4$ 个细胞/mL重悬浮于相同培养基中。将所获得的细胞用作靶细胞。

[0448] 4)-1-3  $^{51}\text{Cr}$ 释放测定

[0449] 将已用RP-F10培养基稀释使得最终浓度为1、10、100或1000 ng/mL的105F抗体以50  $\mu$ L/孔的量分配到96孔U形底部微板(Costar)内,并且将靶细胞加入孔中(50  $\mu$ L/孔)。使板在4℃下温育30分钟。随后,将效应细胞加入孔中(100  $\mu$ L/孔),并且使板在37℃下在5%  $\text{CO}_2$ 中温育4小时。其后,收集50  $\mu$ L/孔的上清液并应用于LumaPlate(PerkinElmer),并且通过使用 $\gamma$ 计数器测量所释放的 $\gamma$ 射线剂量。根据下式计算由ADCC活性引起的细胞裂解率。

[0450] 细胞裂解率(%) =  $(A - B) / (C - B) \times 100$

[0451] A:样品孔的计数

[0452] B:自发释放(不含抗体和效应细胞的孔)的计数的平均值( $n = 3$ )。在加入抗体和加入效应细胞后,分别加入50  $\mu$ L和100  $\mu$ L的 RP-F10培养基。除上述外,进行与对于样品孔的那些相同的操作。

[0453] C:最大释放(其中靶细胞被表面活性剂溶解的孔)的计数的平均值( $n = 3$ )。在加入抗体后,加入50  $\mu$ L RP-F10培养基。在加入效应细胞后,加入100  $\mu$ L补充有2%(v/v) Triton-X100(Sigma)的RP-F10培养基。除上述外,进行与对于样品孔的那些相同的操作。

[0454] 结果显示于图14中。105F抗体显示出以抗体浓度依赖性方式对L428细胞的细胞裂

解活性。另一方面,对照人IgG不显示出这种细胞裂解活性。因此,105F抗体对表达内源性GARP的L428细胞具有ADCC活性。应指出,基于专利文献1描述的序列信息产生的人IgG1抗GARP抗体(MHG8和LHG10)并未显示出ADCC活性。

[0455] 4)-2对Treg功能的抑制活性

[0456] 4)-2-1 Treg、Teff(效应T细胞:CD4阳性CD25阴性辅助性T细胞)和辅助细胞的制备

[0457] 使用CD4 T细胞ISOLATION Kit(Miltenyi Biotec),从以与上述4)-1-1相同的方式制备的PBMC中分离CD4阳性T细胞,并且将FITC标记的抗CD4抗体(Miltenyi Biotec)和APC标记的抗CD25抗体(Miltenyi Biotec)加入CD4阳性T细胞中。使细胞在4℃下温育30分钟。在细胞洗涤后,将细胞悬浮于MACS缓冲液中,并且使用FACS Aria IIu(Becton Dickinson)分离CD4阳性CD25阴性细胞(Teff)和CD4阳性CD25强阳性细胞(Treg)。

[0458] 另一方面,使用CD3 Microbeads(Miltenyi Biotec)从PBMC中去除CD3阳性细胞,并且使用X射线辐射器(Hitachi Medical Corporation)以1 C/kg的剂量(吸收剂量:38.76 Gy/kg(3876 Rad/kg))照射细胞,以制备辅助细胞。

[0459] 4)-2-2共培养方法和关于对Treg功能的抑制活性的测定

[0460] 作为培养基,使用补充有青霉素和链霉素(Invitrogen)、 $1 \times$  MEM NEAA(Invitrogen)、 $1 \times$  丙酮酸钠(Invitrogen)、5 mM Hepes和5%人雄性AB血清(Sigma)的RPMI1640培养基(Invitrogen)。将Teff(2000个细胞/孔)和辅助细胞(20000个细胞/孔)混合,并且加入96孔U形底部微板的每个孔内,并且进一步加入Treg并且以500个细胞/孔接种到孔中。另外,还制备了不含Treg的对照孔。将抗CD3抗体、抗CD28抗体和105F抗体以50或10  $\mu\text{g/mL}$ 的最终浓度加入孔中,并使板在37℃下在5%  $\text{CO}_2$ 下温育5天。其后,制备以18.5 kBq/mL的 $[^3\text{H}]$ -胸苷(PerkinElmer),并以20  $\mu\text{L}$ /孔加入每个孔中。使细胞进一步温育18小时。通过使用细胞收集器(Mach II, Tomtech)在Filtermat A(PerkinElmer)中收获细胞,并且使用闪烁计数器(MicroBeta, PerkinElmer)测量掺入细胞内的 $[^3\text{H}]$ -胸苷的放射性。测量的数据表示为校正数目/分钟(CCPM)。

[0461] 基于专利文献1中描述的序列信息产生的人IgG1抗GARP抗体(MHG8和LHG10)也经受本文实验系统。

[0462] 4)-2-3抑制活性的计算

[0463] 计算了在个别共培养条件下的三个孔的平均值。将与单独的Teff那种相比时共培养Teff与Treg中减小的增殖值定义为“由Treg引起的Teff增殖的压制率”(= $1 - [\text{共培养物的CCPM}/\text{单独Teff的CCPM}]$ )。

[0464] 每种抗体对Treg功能的抑制活性通过从在不存在抗体的情况下的那种中扣除在抗体的存在下通过Treg的Teff增殖的压制率来确定(= $[\text{不加入抗体时的压制率}] - [\text{加入每种抗体时的压制率}]$ )。应指出,在每个实验中每一次都计算样品的这种抑制活性。

[0465] 105F抗体在50  $\mu\text{g/mL}$ 对Treg功能的抑制活性结果(抑制率:72.6%)显示于图15中,并且105F抗体以及MHG-8和LHG-10抗体(各10  $\mu\text{g/mL}$ )的结果显示于图16中。MHG-8和LHG-10抗体对Treg功能没有抑制活性(抑制率:分别为0.8%和0.0%),而105F抗体显著抑制Treg功能(抑制率:65.8%)。当通过使用在非专利文献10图5A中的值( $\text{CD4} + \text{CD25}^- (\text{Teff}) : \text{Treg} = 4:1$ )粗略地计算时,由针对GARP的siRNA转导至Treg中引起的抑制率为约15%。

[0466] 实施例5:大鼠抗体的生产

[0467] 5)-1 GARP表达载体的制备

[0468] 实施例2中描述的表达载体用作GARP表达载体,并且EndoFree Plasmid Giga Kit (QIAGEN)用于大量生产。

[0469] 5)-2大鼠的免疫

[0470] 对于免疫,使用WKY/Izm雌性大鼠(Japan SLC, Inc.)。首先,用透明质酸酶(SIGMA-ALDRICH)预处理每只大鼠的下肢,并且将GARP表达载体肌肉注射到相同部位内。随后,采用ECM830 (BTX),使用双针电极对相同部位执行体内电穿孔。每两周一次,重复相同的体内电穿孔,并且从大鼠收集淋巴结或脾脏,并用于杂交瘤的生产中。

[0471] 5)-3杂交瘤的生产

[0472] 使用LF301 Cell Fusion Unit (BEX),根据电细胞融合,将淋巴结或脾细胞与小鼠骨髓瘤SP2/0-ag14细胞(ATCC,编号CRL-1581)融合,然后将细胞用ClonaCell- HY Selection Medium D (StemCell Technologies)稀释且温育。挑选在培养物中出现的杂交瘤集落且选择作为单克隆杂交瘤。培养每一个杂交瘤集落,并且来自每一杂交瘤的培养上清液用于筛选产生抗GARP抗体的杂交瘤。

[0473] 5)-4根据细胞-ELISA方法的抗体筛选

[0474] 5)-4-1用于细胞-ELISA中的抗原基因表达细胞的制备

[0475] 在补充有10% FBS的DMEM培养基(Invitrogen)中以 $7.5 \times 10^5$ 个细胞/mL制备293 $\alpha$ 细胞(衍生自表达整联蛋白 $\alpha$ v和整联蛋白 $\beta$ 3的HEK-293细胞(ATCC:CRL-1573)的稳定表达细胞系)。根据使用Lipofectamine 2000 (Life Technologies)的转导程序,将GARP表达载体或用作阴性对照的pcDNA3.1 (+)载体转染到细胞中,并且将细胞以各50  $\mu$ l的量分配到96-Half区域孔板(Corning)中。其后,将细胞在补充有10% FBS的DMEM培养基中在37°C下在% CO<sub>2</sub>中培养24至27小时。所获得的转染细胞以粘附状态用于细胞-ELISA。

[0476] 5)-4-2细胞-ELISA

[0477] 去除用实施例5)-4-1中制备的用表达载体转染的293 $\alpha$ 细胞的培养上清液,并且将来自杂交瘤的培养上清液加入用GARP表达载体或pcDNA3.1 (+)载体转染的293 $\alpha$ 细胞中。细胞在4°C下温育1小时。将孔中的细胞用补充有5% FBS的PBS (+)洗涤一次,并且其后,将已用补充有5% FBS的PBS (+)稀释500倍的兔(SIGMA)中产生的抗大鼠IgG-过氧化物酶抗体加入孔中。使细胞在4°C下温育1小时。将孔中的细胞用补充有5% FBS的PBS (+)洗涤三次,并且将OPD着色溶液(其已通过将邻苯二胺二盐酸盐(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶解于OPD溶液(0.05 M柠檬酸三钠、0.1 M磷酸氢二钠12-水;pH 4.5)中,使得物质分别变为0.4 mg/ml和0.6% (v/v)进行制备)以50  $\mu$ l/孔的量加入孔中。在板伴随混合温育一段时间时,进行显色反应。其后,向板中加入1M HCl (50  $\mu$ l/孔)以终止显色反应,并且使用板阅读器(ENVISION;PerkinElmer)测量在490 nm处的吸光度。为了选择产生与在细胞膜的表面上表达的人GARP特异性结合的抗体的杂交瘤,选择产生培养上清液的杂交瘤作为产生抗人GARP抗体的阳性细胞,所述培养上清液在用GARP表达载体转染的293 $\alpha$ 细胞中显示出比用对照pcDNA3.1 (+)载体转染的细胞中的那种更高的吸光度。

[0478] 5)-5根据流式细胞术方法的抗体筛选

[0479] 5)-5-1用于在流式细胞术分析中使用的抗原基因表达细胞的制备

[0480] 将HEK-293T细胞(从ATCC获得)以 $5 \times 10^4$ 个细胞/ $\text{cm}^2$ 接种于 $225\text{-cm}^2$ 烧瓶(Sumitomo Bakelite Co.,Ltd.)中,然后将细胞在补充有10% FBS的DMEM培养基中在5%  $\text{CO}_2$ 中在 $37^\circ\text{C}$ 下培养过夜。在第二天时,使用Lipofectamine 2000,将HEK-293T细胞用GARP表达载体或用作阴性对照的pcDNA3.1(+)载体转染,并且使细胞在5%  $\text{CO}_2$ 中在 $37^\circ\text{C}$ 下进一步温育过夜。在第二天时,将经转染的HEK-293T细胞用TrypLE Express(Life Technologies)处理,用补充有10% FBS的DMEM培养基洗涤,并且重悬浮于补充有5% FBS的PBS中。所获得的细胞悬浮液用于流式细胞术分析中。

[0481] 5)-5-2流式细胞术分析

[0482] 通过流式细胞术分析进一步证实了从杂交瘤产生的抗体对人GARP的结合特异性,所述杂交瘤在实施例5)-4-2中已通过细胞-ELISA确定为阳性。

[0483] 将实施例5)-5-1中制备的瞬时表达HEK-293T细胞的悬浮液离心,然后去除上清液。其后,将来自每一杂交瘤的培养上清液加入细胞中并悬浮。使细胞在 $4^\circ\text{C}$ 下温育1小时。将细胞用补充有5% FBS的PBS洗涤2次,并且将已用补充有5% FBS的PBS稀释500倍的FITC缀合的抗大鼠IgG(SIGMA)加入细胞中并悬浮。使细胞在 $4^\circ\text{C}$ 下温育1小时。将细胞用补充有5% FBS的PBS洗涤两次,然后重悬浮于补充有5% FBS和 $2 \mu\text{g/ml}$  7-氨基放线菌素D(Molecular Probes)的PBS中。使用流式细胞仪(FC500:由Beckman Coulter制造)测量细胞。数据使用Flowjo(TreeStar)进行分析。通过门控出7-氨基放线菌素D-阳性细胞从分析中去除死细胞后,产生活细胞的FITC荧光强度的直方图。基于与用对照pcDNA3.1载体转染的细胞中相比,其中关于抗体的直方图在用GARP表达载体转染的HEK-293T细胞中移动到强荧光强度侧的结果,选择产生人GARP结合抗体的杂交瘤(113个克隆)。

[0484] 5)-6单克隆抗体的制备

[0485] 5)-6-1杂交瘤151D和198D的培养

[0486] 从上述5)-5-2中获得的大鼠抗人GARP抗体产生杂交瘤中,选择已提示与人GARP强结合的杂交瘤151D和198D。

[0487] 从杂交瘤培养物上清液纯化大鼠抗GARP单克隆抗体。

[0488] 首先,用ClonaCell-HY Selection Medium E充分地增加大鼠抗GARP单克隆抗体产生杂交瘤的体积,然后将培养基更换为20%的Ultra Low IgG FBS(Life Technologies)已加入其中的Hybridoma SFM(Life Technologies)。其后,将杂交瘤( $8$ 至 $9 \times 10^7$ 细胞)接种于 $1272\text{-cm}^2$ 培养瓶(Corning)中,然后培养7天。通过离心收获本培养上清液,并且通过经过 $0.8\text{-}\mu\text{m}$ 过滤器且经过 $0.45\text{-}\mu\text{m}$ 过滤器(Corning)将它灭菌。

[0489] 5)-6-2单克隆抗体的纯化

[0490] 根据蛋白G亲和层析从实施例5)-6-1中制备的杂交瘤的培养上清液中纯化抗体。将抗体吸附到蛋白G柱(GE Healthcare Bioscience)上,然后用PBS洗涤柱,然后用 $0.1 \text{ M}$ 甘氨酸/HCl水溶液( $\text{pH } 2.7$ )洗脱抗体。向洗脱剂中加入 $1 \text{ M}$  Tris-HCl( $\text{pH } 9.0$ ),使得 $\text{pH}$ 调节到 $\text{pH } 7.0$ 至 $7.5$ 。其后,将溶液透析(Thermo Scientific,Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette),使得缓冲液替换为PBS。使用Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20(分子量截断:UF30K,Sartorius),将抗体浓缩,使得抗体的浓度调节至 $0.7 \text{ mg/mL}$ 或更多。最后,通过Minisart-Plus过滤器(Sartorius)过滤抗体以获得纯化的样品。

[0491] 实施例6:大鼠抗体的克隆和人嵌合抗体的产生



[0492] 6) -1大鼠抗体151D的cDNA的克隆和测序

[0493] 6) -1-1从产生151D的杂交瘤制备总RNA

[0494] 为了扩增包含151D可变区的cDNA,使用TRIzol试剂(Ambion)从产生151D的杂交瘤制备总RNA。

[0495] 6) -1-2根据5'-RACE PCR扩增包含151D重链可变区的cDNA及其测序

[0496] 使用大约1  $\mu$ g实施例6) -1-1中制备的总RNA和SMARTer RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)扩增包含重链可变区的cDNA。

[0497] 作为用于根据PCR扩增151D重链基因的可变区的cDNA的引物,使用UPM(通用引物A混合物:包括在SMARTer RACE cDNA Amplification Kit中)和由已知大鼠重链的恒定区序列设计的引物。

[0498] 将包含通过5'-RACE PCR扩增的重链可变区的cDNA克隆到质粒内,并且其后,使重链可变区的cDNA的核苷酸序列经受序列分析。

[0499] 所测定的编码151D重链可变区的cDNA的核苷酸序列显示于SEQ ID NO:14中,并且其氨基酸序列显示于SEQ ID NO:15中。

[0500] 6) -1-3根据5'-RACE PCR扩增包含151D轻链可变区的cDNA及其测序

[0501] 扩增和测序通过与实施例6) -1-2中应用的那种相同的方法进行。然而,作为用于根据PCR扩增151D轻链基因的可变区的cDNA的引物,使用UPM(通用引物A混合物:包含在SMARTer RACE cDNA Amplification Kit中)和由已知大鼠轻链的恒定区序列设计的引物。

[0502] 所测定的编码151D轻链可变区的cDNA的核苷酸序列显示于SEQ ID NO:16中,并且其氨基酸序列显示于SEQ ID NO:17中。

[0503] 6) -2大鼠抗体198D的cDNA的克隆和测序

[0504] 通过与实施例6) -1中应用的那种相同的方法测定序列。

[0505] 所测定的编码198D重链可变区的cDNA的核苷酸序列显示于SEQ ID NO:18中,并且其氨基酸序列显示于SEQ ID NO:19中。所测定的编码198D轻链可变区的cDNA的核苷酸序列显示于SEQ ID NO:20中,并且其氨基酸序列显示于SEQ ID NO:21中。

[0506] 6) -3人嵌合抗体表达载体的产生

[0507] 6) -3-1人嵌合轻链表达载体pCMA-LK的构建

[0508] 使用In-Fusion Advantage PCR克隆试剂盒(CLONTECH),将已通过用限制性酶XbaI和PmeI消化质粒pcDNA3.3-TOPO/LacZ(Invitrogen)而获得的大约5.4-kb片段与包含SEQ ID NO:22中所示的人轻链信号序列的DNA片段和编码人 $\kappa$ 链恒定区的DNA序列结合,以产生pcDNA3.3/LK。

[0509] 从pcDNA3.3/LK中去除新霉素表达单位以构建pCMA-LK。

[0510] 6) -3-2人嵌合IgG1型重链表达载体pCMA-G1的构建

[0511] 使用In-Fusion Advantage PCR克隆试剂盒(CLONTECH),将已通过用XbaI和PmeI消化pCMA-LK以从其中去除轻链信号序列和人 $\kappa$ 链恒定区而获得的DNA片段与包含SEQ ID NO:23中所示的人重链信号序列的DNA片段和编码人IgG1恒定区中的氨基酸的DNA序列结合,以构建pCMA-G1。

[0512] 6) -3-3人嵌合151D重链表达载体的构建

[0513] 使用实施例6) -1中获得的编码大鼠抗体151D重链可变区的cDNA作为模板,用设计

用于In-fusion克隆的引物进行PCR,以便扩增包含编码重链可变区的cDNA的DNA片段。使用In-Fusion HD PCR克隆试剂盒(Clontech),将扩增的DNA片段插入已用限制性酶BspI切割的pCMA-G1的位点内,以便构建人嵌合151D重链表达载体。

[0514] 人嵌合151D重链的核苷酸序列和该重链的氨基酸序列分别显示于SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25中。

[0515] 6)-3-4人嵌合151D轻链表达载体的构建

[0516] 使用实施例6)-1中获得的编码151D轻链可变区的可变区的cDNA作为模板,用设计用于In-fusion克隆的引物进行PCR,以便扩增包含编码轻链可变区的cDNA的DNA片段。使用In-Fusion HD PCR克隆试剂盒(Clontech),将扩增的DNA片段插入已用限制性酶BspI切割的pCMA-LK的位点内,以便构建人嵌合151D轻链表达载体。

[0517] 人嵌合151D轻链的核苷酸序列和该轻链的氨基酸序列分别显示于SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27中。

[0518] 6)-3-5人嵌合198D重链表达载体的构建

[0519] 使用实施例6)-2中获得的编码大鼠抗体198D重链可变区的cDNA作为模板,通过与实施例6)-3-3中应用的那种相同的方法构建人嵌合198D重链表达载体。

[0520] 人嵌合198D重链的核苷酸序列和该重链的氨基酸序列分别显示于SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29中。

[0521] 6)-3-6人嵌合198D轻链表达载体的构建

[0522] 使用实施例6)-2中获得的编码198D轻链可变区的cDNA作为模板,通过与实施例6)-3-4中应用的那种相同的方法构建人嵌合198D轻链表达载体。

[0523] 人嵌合198D轻链的核苷酸序列和该轻链的氨基酸序列分别显示于SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31中。

[0524] 6)-4人嵌合抗体的制备

[0525] 6)-4-1人嵌合抗体的产生

[0526] 按照手册,将FreeStyle 293F细胞(Invitrogen)培养并传代。将处于对数生长期的 $1 \times 10^8$ 个FreeStyle 293F细胞(Invitrogen)接种在250-mL Fernbach锥形瓶(CORNING)上,然后以 $2.0 \times 10^6$ 个细胞/mL用FreeStyle 293表达培养基(Invitrogen)稀释。

[0527] 同时,将20  $\mu$ g重链表达载体、30  $\mu$ g轻链表达载体和150  $\mu$ g聚乙烯亚胺(Polyscience #24765)加入5 mL Opti-Pro SFM培养基(Invitrogen)中,并将所获得的混合物轻轻搅拌。在温育5分钟后,将混合物加入FreeStyle 293F细胞中。

[0528] 使细胞在培养箱(37°C,8% CO<sub>2</sub>)中伴随以125 rpm的振荡温育4小时,并且其后,将50 mL EX-CELL VPRO培养基(SAFC Biosciences)、0.36 mL GlutaMAX I(GIBCO)和2.5 mL Yeastolate Ultrafiltrate(GIBCO)加入培养物中。使细胞在培养箱(37°C,8% CO<sub>2</sub>)中伴随以125 rpm的振荡进一步温育7天。收获培养上清液并用250-mL Filter System(CORNING,#431096)过滤。

[0529] 通过人嵌合151D重链表达载体与人嵌合151D轻链表达载体的组合获得的人嵌合151D抗体被命名为“c151D”,而通过人嵌合198D重链表达载体与人嵌合198D轻链表达载体的组合获得的人嵌合198D抗体被命名为“c198D”。

[0530] 6) -4-2嵌合抗体的纯化

[0531] 通过rProtein A亲和层析的一步法纯化实施例6) -4-1中获得的培养上清液。将培养上清液应用于已填充有用PBS平衡的MabSelectSuRe的柱(由GE Healthcare Bioscience制造),然后用其量为柱体积的2倍或更多倍的PBS洗涤柱。随后,使用2 M精氨酸盐酸盐溶液(pH 4.0)进行洗脱,使得收集含有抗体的级分。使该级分经受Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20(分子量截断:UF30K,Sartorius),使得缓冲液替换为PBS,并且将抗体浓缩,从而将抗体浓度调节至1 mg/mL或更多。最后,通过Minisart-Plus过滤器(Sartorius)过滤抗体以获得纯化的样品。

[0532] 6) -5人嵌合抗体与人GARP的结合活性的评估

[0533] 根据捕获方法通过使用Biacore T200(GE Healthcare Bioscience),评估实施例6) -4中产生的c151D或c198D与人GARP之间的解离常数,所述捕获方法包括用固定的蛋白A捕获作为配体的抗体,然后使用抗原(重组人GARP:R&D Systems)作为分析物分析解离常数。HBS-EP +(由GE Healthcare Bioscience制造)用作运行缓冲液,并且蛋白A传感器芯片(由GE Healthcare Bioscience制造)用作传感器芯片。

[0534] 将人嵌合抗体(1  $\mu$ g/mL)以10  $\mu$ L/分钟的速率加入芯片上20秒,然后以30  $\mu$ L/分钟的流速添加抗原的稀释系列溶液(8至128 nM) 120秒。随后,监测解离480秒。作为再生溶液,以20  $\mu$ L/分钟的流速加入甘氨酸1.5(由GE Healthcare Bioscience制造) 30秒。

[0535] 在数据分析中使用1:1拟合模型,并且计算结合速率常数 $k_a$ 、解离速率常数 $k_d$ 和解离常数(KD; $KD = k_d/k_a$ )。

[0536] 结果显示于表1中。

[0537] 表1 c151D或c198D与人GARP之间的解离常数

[0538] [表1]

[0539]

	名称	KD (nM)
1	c151D	0.47
2	c198D	0.17

[0540] 实施例7人源化抗体的生产

[0541] 7) -1 c151D抗体可变区的分子建模

[0542] c151D抗体的可变区的分子建模根据一般已知称为同源建模(Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991))的方法进行。

[0543] 蛋白质数据库(Nuc. Acid Res. 28, 235-242 (2000))中登记的人免疫球蛋白的可变区的一级序列(由X-射线晶体结构推断的三维结构是可用的)与c151D抗体的可变区相比较。

[0544] 可变区的三维结构通过将c151D抗体的重链和轻链的坐标以及与界面具有高度序列同源性的模型彼此组合而产生,以便获得“构架模型”。

[0545] 这之后,将每个CDR的代表性构象掺入构架模型内。

[0546] 最后,为了消除在能量方面不利的原子接触,进行能量最小化计算。上述程序使用Discovery Studio(Dassault Systemes)进行。

[0547] 7) -2人源化151D抗体的氨基酸序列的设计

[0548] 根据一般称为CDR移植(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989))

的方法构建人源化151D抗体。基于构架区中的氨基酸同源性来选择受体抗体。

[0549] 将c151D抗体构架区的序列与由KABAT等人(Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))测定的人亚组共有序列的构架区进行比较。结果,人 $\gamma$ 链亚组3以及人 $\kappa$ 链亚组1和4的共有序列具有高度序列同源性,并且在此基础上,它们被选择作为受体。

[0550] 关于人 $\gamma$ 链亚组3的共有序列以及人 $\kappa$ 链亚组1和人 $\kappa$ 链亚组4的共有序列,构架区中的氨基酸残基与c151D抗体的氨基酸残基进行比对,使得鉴定了其中使用不同氨基酸的位置。使用上述7)-1中构建的c151D抗体的三维模型分析这些残基的位置,并且基于由Queen等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86,10029-10033(1989))给出的标准,选择待移植到受体上的供体残基。

[0551] 将因此选择的几个供体残基引入受体抗体内,以便如下述实施例中所述的方式构建人源化h151D的序列。

[0552] 7)-3人源化151D重链h151D-H的设计

[0553] 7)-3-1 h151D-H1型重链

[0554] 通过在序列表中的SEQ ID NO:25中所示的c151D重链中用甘氨酸残基取代在氨基酸位置35处的精氨酸残基,用亮氨酸残基取代在氨基酸位置37处的赖氨酸残基,用精氨酸残基取代在氨基酸位置38处的赖氨酸残基,用丙氨酸残基取代在氨基酸位置42处的丝氨酸残基,用甘氨酸残基取代在氨基酸位置61处的苏氨酸残基,用赖氨酸残基取代在氨基酸位置62处的谷氨酰胺残基,用丝氨酸残基取代在氨基酸位置68处的丙氨酸残基,用丙氨酸残基取代在氨基酸位置80处的精氨酸残基,用丝氨酸残基取代在氨基酸位置94处的丙氨酸残基,用天冬酰胺残基取代在氨基酸位置96处的丝氨酸残基,用天冬酰胺残基取代在氨基酸位置103处的天冬氨酸残基,用丙氨酸残基取代在氨基酸位置107处的丝氨酸残基,用缬氨酸残基取代在氨基酸位置112处的苏氨酸残基,用苏氨酸残基取代在氨基酸位置130处的缬氨酸残基,并且用亮氨酸残基取代在氨基酸位置131处的甲硫氨酸残基设计的人源化151D重链被命名为“h151D-H1型重链”。

[0555] 在编码h151D-H1型重链的核苷酸序列(SEQ ID NO:32)中,信号序列已从其中去除的成熟重链由由在核苷酸位置58至1398处的核苷酸组成的核苷酸序列编码,可变区由由在核苷酸位置58至408处的核苷酸组成的核苷酸序列编码,并且恒定区由由在核苷酸位置409至1398处的核苷酸组成的核苷酸序列编码。上述可变区具有在序列表中的SEQ ID NO:32中,由编码CDRH1的在核苷酸位置133至162处的核苷酸组成的核苷酸序列、由编码CDRH2的在核苷酸位置205至234处的核苷酸组成的核苷酸序列、以及由编码CDRH3的在核苷酸位置352至375处的核苷酸组成的核苷酸序列。

[0556] 另外,在h151D-H1型重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:33)中,信号序列已从其中去除的成熟重链是由在氨基酸位置20至466处的氨基酸组成的氨基酸序列,可变区是由在氨基酸位置20至136处的氨基酸组成的氨基酸序列,并且恒定区是由在氨基酸位置137至466处的氨基酸组成的氨基酸序列。上述可变区具有由在序列表中的SEQ ID NO:33中的氨基酸位置45至54处的氨基酸序列组成的CDRH1、由在其中的氨基酸位置69至78处的氨基酸序列组成的CDRH2、以及由在其中的氨基酸位置118至125处的氨基酸序列组成的CDRH3。

[0557] 此外,SEQ ID NO:32和33中所示的序列也分别显示于图31和21中。

[0558] 7) -3-2 h151D\_H4型重链

[0559] 通过在序列表中的SEQ ID NO:25中所示的c151D重链中用甘氨酸残基取代在氨基酸位置35处的精氨酸残基,用亮氨酸残基取代在氨基酸位置37处的赖氨酸残基,用精氨酸残基取代在氨基酸位置38处的赖氨酸残基,用丙氨酸残基取代在氨基酸位置42处的丝氨酸残基,用甘氨酸残基取代在氨基酸位置61处的苏氨酸残基,用赖氨酸残基取代在氨基酸位置62处的谷氨酰胺残基,用丝氨酸残基取代在氨基酸位置94处的丙氨酸残基,用天冬酰胺残基取代在氨基酸位置103处的天冬氨酸残基,用丙氨酸残基取代在氨基酸位置107处的丝氨酸残基,用缬氨酸残基取代在氨基酸位置112处的苏氨酸残基,用苏氨酸残基取代在氨基酸位置130处的缬氨酸残基,并且用亮氨酸残基取代在氨基酸位置131处的甲硫氨酸残基设计的人源化151D重链被命名为“h151D\_H4型重链”。

[0560] 在编码h151D-H4型重链的核苷酸序列(SEQ ID NO:34)中,信号序列已从其中去除的成熟重链由在核苷酸位置58至1398处的核苷酸组成的核苷酸序列编码,可变区由在核苷酸位置58至408处的核苷酸组成的核苷酸序列编码,并且恒定区由在核苷酸位置409至1398处的核苷酸组成的核苷酸序列编码。上述可变区具有在序列表中的SEQ ID NO:34中,由编码CDRH1的在核苷酸位置133至162处的核苷酸组成的核苷酸序列、由编码CDRH2的在核苷酸位置205至234处的核苷酸组成的核苷酸序列、以及由编码CDRH3的在核苷酸位置352至375处的核苷酸组成的核苷酸序列。

[0561] 另外,在h151D-H4型重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:35)中,信号序列已从其中去除的成熟重链是由在氨基酸位置20至466处的氨基酸组成的氨基酸序列,可变区是由在氨基酸位置20至136处的氨基酸组成的氨基酸序列,并且恒定区是由在氨基酸位置137至466处的氨基酸组成的氨基酸序列。上述可变区具有由在序列表中的SEQ ID NO:35中的氨基酸位置45至54处的氨基酸序列组成的CDRH1、由在其中的氨基酸位置69至78处的氨基酸序列组成的CDRH2、以及由在其中的氨基酸位置118至125处的氨基酸序列组成的CDRH3。

[0562] 此外,SEQ ID NO:34和35中所示的序列也分别显示于图33和23中。

[0563] 7) -4人源化151D轻链h151D\_L的设计

[0564] 7) -4-1 h151D-L1型轻链

[0565] 通过在序列表中的SEQ ID NO:27中所示的c151D轻链中用天冬氨酸残基取代在氨基酸位置29处的苏氨酸残基,用亮氨酸残基取代在氨基酸位置31处的甲硫氨酸残基,用丙氨酸残基取代在氨基酸位置32处的苯丙氨酸残基,用缬氨酸残基取代在氨基酸位置33处的异亮氨酸残基,用亮氨酸残基取代在氨基酸位置35处的缬氨酸残基,用谷氨酸残基取代在氨基酸位置37处的天冬氨酸残基,用丙氨酸残基取代在氨基酸位置39处的缬氨酸残基,用异亮氨酸残基取代在氨基酸位置41处的甲硫氨酸残基,用脯氨酸残基取代在氨基酸位置60处的苏氨酸残基,用丝氨酸残基取代在氨基酸位置83处的苏氨酸残基,用丝氨酸残基取代在氨基酸位置97处的天冬酰胺残基,用亮氨酸残基取代在氨基酸位置98处的甲硫氨酸残基,用缬氨酸残基取代在氨基酸位置103处的亮氨酸残基,用谷氨酰胺残基取代在氨基酸位置120处的苏氨酸残基,用缬氨酸残基取代在氨基酸位置124处的亮氨酸残基,用异亮氨酸残基取代在氨基酸位置126处的亮氨酸残基,用赖氨酸残基取代在氨基酸位置127处的天冬酰胺残基,并且用苏氨酸残基取代在氨基酸位置129处的丙氨酸残基设计的人源化151D轻

链被命名为“h151D\_L1型轻链”。

[0566] 在编码h151D-L1型轻链的核苷酸序列(SEQ ID NO:36)中,信号序列已从其中去除的成熟轻链由由在核苷酸位置61至702处的核苷酸组成的核苷酸序列编码,可变区由由在核苷酸位置61至387处的核苷酸组成的核苷酸序列编码,并且恒定区由由在核苷酸位置388至702处的核苷酸组成的核苷酸序列编码。上述可变区具有在序列表中的SEQ ID NO:36中,由编码CDRH1的在核苷酸位置130至162处的核苷酸组成的核苷酸序列、由编码CDRH2的在核苷酸位置208至228处的核苷酸组成的核苷酸序列、以及由编码CDRH3的在核苷酸位置325至351处的核苷酸组成的核苷酸序列。

[0567] 另外,在h151D\_L1型轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:37)中,信号序列已从其中去除的成熟轻链是由在氨基酸位置21至234处的氨基酸组成的氨基酸序列,可变区是由在氨基酸位置21至129处的氨基酸组成的氨基酸序列,并且恒定区是由在氨基酸位置130至234处的氨基酸组成的氨基酸序列。上述可变区具有由在序列表中的SEQ ID NO:37中的氨基酸位置44至54处的氨基酸序列组成的CDRL1、由在其中的氨基酸位置70至76处的氨基酸序列组成的CDRL2、以及由在其中的氨基酸位置109至117处的氨基酸序列组成的CDRL3。

[0568] 此外,SEQ ID NO:36和37中所示的序列也分别显示于图32和22中。

[0569] 7) -4-2 h151D-L4型轻链:

[0570] 通过在序列表中的SEQ ID NO:27中所示的c151D轻链中用丝氨酸残基取代在氨基酸位置29处的苏氨酸残基,用亮氨酸残基取代在氨基酸位置31处的甲硫氨酸残基,用丝氨酸残基取代在氨基酸位置32处的苯丙氨酸残基,用丙氨酸残基取代在氨基酸位置33处的异亮氨酸残基,用异亮氨酸残基取代在氨基酸位置41处的甲硫氨酸残基,用脯氨酸残基取代在氨基酸位置60处的苏氨酸残基,用赖氨酸残基取代在氨基酸位置62处的谷氨酰胺残基,用丝氨酸残基取代在氨基酸位置83处的苏氨酸残基,用丝氨酸残基取代在氨基酸位置97处的天冬酰胺残基,用亮氨酸残基取代在氨基酸位置98处的甲硫氨酸残基,用脯氨酸残基取代在氨基酸位置100处的丙氨酸残基,用苯丙氨酸残基取代在氨基酸位置103处的亮氨酸残基,用苏氨酸残基取代在氨基酸位置105处的缬氨酸残基,用谷氨酰胺残基取代在氨基酸位置120处的苏氨酸残基,用缬氨酸残基取代在氨基酸位置124处的亮氨酸残基,用异亮氨酸残基取代在氨基酸位置126处的亮氨酸残基,用赖氨酸残基取代在氨基酸位置127处的天冬酰胺残基,并且用苏氨酸残基取代在氨基酸位置129处的丙氨酸残基设计的人源化151D轻链被命名为“h151D-L4型轻链”。

[0571] 在编码h151D-L4型轻链的核苷酸序列(SEQ ID NO:38)中,信号序列已从其中去除的成熟轻链由由在核苷酸位置61至702处的核苷酸组成的核苷酸序列编码,可变区由由在核苷酸位置61至387处的核苷酸组成的核苷酸序列编码,并且恒定区由由在核苷酸位置388至702处的核苷酸组成的核苷酸序列编码。上述可变区具有在序列表中的SEQ ID NO:38中,由编码CDRL1的在核苷酸位置130至162处的核苷酸组成的核苷酸序列、由编码CDRL2的在核苷酸位置208至228处的核苷酸组成的核苷酸序列、以及由编码CDRL3的在核苷酸位置325至351处的核苷酸组成的核苷酸序列。

[0572] 另外,在h151D\_L4型轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:39)中,信号序列已从其中去除的成熟轻链是由在氨基酸位置21至234处的氨基酸组成的氨基酸序列,可变区是由在氨基酸位置21至129处的氨基酸组成的氨基酸序列,并且恒定区是由在氨基酸位置130至234

处的氨基酸组成的氨基酸序列。上述可变区具有由在序列表中的SEQ ID NO:39中的氨基酸位置44至54处的氨基酸序列组成的CDRL1、由在其中的氨基酸位置70至76处的氨基酸序列组成的CDRL2、以及由在其中的氨基酸位置109至117处的氨基酸序列组成的CDRL3。

[0573] 此外,SEQ ID NO:38和39中所示的序列也分别显示于图34和24中。

[0574] 7) -5 c198D变异区的分子建模

[0575] c198D抗体的可变区的分子建模根据一般称为同源建模(Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991))的方法进行。蛋白质数据库(Nuc. Acid Res. 28, 235-242 (2000))中登记的人免疫球蛋白的可变区的一级序列(由X-射线晶体结构推断的三维结构是可用的)与c198D抗体的可变区相比较。

[0576] 可变区的三维结构通过将c198D抗体的重链和轻链的坐标以及与其界面具有高度序列同源性的模型彼此组合而产生,以便获得“构架模型”。

[0577] 这之后,将每个CDR的代表性构象掺入构架模型内。

[0578] 最后,为了消除在能量方面不利的原子接触,进行能量最小化计算。上述程序使用Discovery Studio(Dassault Systemes)进行。

[0579] 7) -6人源化198D的氨基酸序列设计

[0580] 根据一般称为CDR移植(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989))的方法构建人源化198D抗体。基于构架区中的氨基酸同源性来选择受体抗体。

[0581] 将c198D抗体构架区的序列与由KABAT等人(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版Public Health Service National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))测定的人亚组共有序列的构架区进行比较。结果,人 $\gamma$ 链亚组2和人 $\kappa$ 链亚组1的共有序列具有高度序列同源性,并且在此基础上,它们被选择作为受体。另外,将人 $\gamma$ 链亚组3的共有序列中的几个残基引入重链的受体内。

[0582] 关于包含人 $\gamma$ 链亚组3的共有序列的一部分的人 $\gamma$ 链亚组2的共有序列和人 $\kappa$ 链亚组1的共有序列,构架区中的氨基酸残基与c198D抗体的氨基酸残基进行比对,使得鉴定了其中使用不同氨基酸的位置。使用上述7) -5中构建的c198D抗体的三维模型分析这些残基的位置,并且基于由Queen等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989))给出的标准,选择待移植到受体上的供体残基。

[0583] 将因此选择的几个供体残基引入受体抗体内,以便如下述实施例中所述的方式构建人源化h198D的序列。

[0584] 7) -7人源化198D重链h198D-H的设计

[0585] 7) -7-1 h198D-H3型重链

[0586] 通过在序列表中的SEQ ID NO:29中所示的c198D重链中用谷氨酸残基取代在氨基酸位置20处的谷氨酰胺残基,用缬氨酸残基取代在氨基酸位置24处的精氨酸残基,用甘氨酸残基取代在氨基酸位置28处的脯氨酸残基,用赖氨酸残基取代在氨基酸位置32处的谷氨酰胺残基,用甘氨酸残基取代在氨基酸位置61处的谷氨酸残基,用脯氨酸残基取代在氨基酸位置80处的丝氨酸残基,用丝氨酸残基取代在氨基酸位置81处的丙氨酸残基,用缬氨酸残基取代在氨基酸位置86处的亮氨酸残基,用苏氨酸残基取代在氨基酸位置87处的丝氨酸残基,用天冬酰胺残基取代在氨基酸位置95处的丝氨酸残基,用丝氨酸残基取代在氨基酸位置98处的苯丙氨酸残基,用亮氨酸残基取代在氨基酸位置101处的甲硫氨酸残基,用丝氨

酸残基取代在氨基酸位置103处的苏氨酸残基,用缬氨酸残基取代在氨基酸位置104处的亮氨酸残基,用苏氨酸残基取代在氨基酸位置105处的谷氨酰胺残基,用丙氨酸残基取代在氨基酸位置106处的苏氨酸残基,用丙氨酸残基取代在氨基酸位置107处的谷氨酸残基,用缬氨酸残基取代在氨基酸位置111处的甲硫氨酸残基,用酪氨酸残基取代在氨基酸位置113处的苯丙氨酸残基,用苏氨酸残基取代在氨基酸位置133处的丙氨酸残基,并且用亮氨酸残基取代在氨基酸位置134处的丝氨酸残基设计的人源化198D重链被命名为“h198D\_H3型重链”。

[0587] 在编码h198D-H3型重链的核苷酸序列(SEQ ID NO:40)中,信号序列已从其中去除的成熟重链由由在核苷酸位置58至1407处的核苷酸组成的核苷酸序列编码,可变区由由在核苷酸位置58至417处的核苷酸组成的核苷酸序列编码,并且恒定区由由在核苷酸位置418至1407处的核苷酸组成的核苷酸序列编码。上述可变区具有在序列表中的SEQ ID NO:40中,由编码CDRH1的在核苷酸位置130至162处的核苷酸组成的核苷酸序列、由编码CDRH2的在核苷酸位置205至231处的核苷酸组成的核苷酸序列、以及由编码CDRH3的在核苷酸位置349至 384处的核苷酸组成的核苷酸序列。

[0588] 另外,在h198D-H3型重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:41)中,信号序列已从其中去除的成熟重链是由在氨基酸位置20至469处的氨基酸组成的氨基酸序列,可变区是由在氨基酸位置20至139处的氨基酸组成的氨基酸序列,并且恒定区是由在氨基酸位置140至469处的氨基酸组成的氨基酸序列。

[0589] 此外,SEQ ID NO:40和41中所示的序列也分别显示于图35和25中。

[0590] 7)-8人源化198D轻链h198D-L的设计

[0591] 7)-8-1 h198D-L4型轻链

[0592] 通过在序列表中的SEQ ID NO:31中所示的c198D轻链中用丝氨酸残基取代在氨基酸位置29处的丙氨酸残基,用丙氨酸残基取代在氨基酸位置33处的甘氨酸残基,用缬氨酸残基取代在氨基酸位置35处的亮氨酸残基,用天冬氨酸残基取代在氨基酸位置37处的谷氨酸残基,用精氨酸残基取代在氨基酸位置38处的苏氨酸残基,用苏氨酸残基取代在氨基酸位置42处的谷氨酰胺残基,用赖氨酸残基取代在氨基酸位置65处的谷氨酰胺残基,用丝氨酸残基取代在氨基酸位置85处的甘氨酸残基,用苏氨酸残基取代在氨基酸位置92处的丝氨酸残基,用苏氨酸残基取代在氨基酸位置94处的赖氨酸残基,用亮氨酸残基取代在氨基酸位置98处的甲硫氨酸残基,用脯氨酸残基取代在氨基酸位置100处的苏氨酸残基,用苯丙氨酸残基取代在氨基酸位置103处的谷氨酸残基,用丙氨酸残基取代在氨基酸位置104处的甘氨酸残基,用苏氨酸残基取代在氨基酸位置105处的缬氨酸残基,用谷氨酰胺残基取代在氨基酸位置120处的丝氨酸残基,用缬氨酸残基取代在氨基酸位置124处的亮氨酸残基,并且用苏氨酸残基取代在氨基酸位置129处的丙氨酸残基设计的人源化198D轻链被命名为“h198D-L4型轻链”。

[0593] 在编码h198D-L4型轻链的核苷酸序列(SEQ ID NO:42)中,信号序列已从其中去除的成熟轻链由由在核苷酸位置61至702处的核苷酸组成的核苷酸序列编码,可变区由由在核苷酸位置61至387处的核苷酸组成的核苷酸序列编码,并且恒定区由由在核苷酸位置388至702处的核苷酸组成的核苷酸序列编码。上述可变区具有在序列表中的SEQ ID NO:42中,由编码CDRL1的在核苷酸位置130至162处的核苷酸组成的核苷酸序列、由编码CDRL2的在核



苷酸位置208至228处的核苷酸组成的核苷酸序列、以及由编码CDRL3的在核苷酸位置325至351处的核苷酸组成的核苷酸序列。

[0594] 另外,在h198D\_L4型轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:43)中,信号序列已从其中去除的成熟轻链是由在氨基酸位置21至234处的氨基酸组成的氨基酸序列,可变区是由在氨基酸位置21至129处的氨基酸组成的氨基酸序列,并且恒定区是由在氨基酸位置130至234处的氨基酸组成的氨基酸序列。

[0595] 此外,SEQ ID NO:42和43中所示的序列也分别显示于图36和26中。

[0596] 7) -9用于人源化抗体的表达载体的构建

[0597] 7) -9-1用于人源化的抗人GARP抗体h151D-H1L1的表达载体的构建

[0598] 合成(GENEART,人工基因合成服务)包含编码h151D-H1型重链的序列的DNA片段,所述h151D-H1型重链由在序列表中的SEQ ID NO:32中所示的h151D-H1型重链的核苷酸序列的核苷酸位置58至1398处的核苷酸组成。使用合成的DNA片段,根据由BioWa和Lonza的Potelligent (R) CHOK1SV Technology的方案,构建h151D-H1型重链的表达载体。所构建的表达载体被命名为“GSV-h151D-H1”。

[0599] 随后,合成(GENEART,人工基因合成服务)包含编码h151D-L1型轻链的序列的DNA片段,所述h151D-L1型轻链由在序列表中的SEQ ID NO:36中所示的h151D-L1型轻链的核苷酸序列的核苷酸位置61至702处的核苷酸组成。

[0600] 使用合成的DNA片段,根据由BioWa和Lonza的Potelligent (R) CHOK1SV Technology的方案,构建h151D-L1型轻链的表达载体。所构建的表达载体被命名为“GSV-h151D-L1”。

[0601] 随后,根据由BioWa和Lonza的Potelligent (R) CHOK1SV Technology的方案,由因此构建的表达载体“GSV-h151D-H1”和“GSV-h151D-L1”构建MACA-1511a表达载体。所获得的表达载体被命名为“DGV-h151D-H1L1-GS”。

[0602] 7) -9-2用于人源化的抗人GARP抗体h151D-H4L4的表达载体的构建

[0603] 与实施例7) -9-1的情况一样,合成(GENEART,人工基因合成服务)包含编码h151D-H4型重链的序列的DNA片段和包含编码h151D-L4型轻链的序列的DNA片段,所述h151D-H4型重链由在序列表中的SEQ ID NO:34中所示的h151D-H4型重链的核苷酸序列的核苷酸位置58至1398处的核苷酸组成,所述h151D-L4型轻链由在序列表中的SEQ ID NO:38中所示的h151D-L4型轻链的核苷酸序列的核苷酸位置61至702处的核苷酸组成。

[0604] 使用合成的DNA片段,根据由BioWa和Lonza的Potelligent (R) CHOK1SV Technology的方案,构建MACA-1514a表达载体。所获得的表达载体被命名为“DGV-h151D-H4L4-GS”。

[0605] 7) -9-3用于人源化的抗人GARP抗体h198D-H3L4的表达载体的构建

[0606] 与实施例7) -9-1的情况一样,合成(GENEART,人工基因合成服务)包含编码h198D-H3型重链的序列的DNA片段和包含编码h198D-L4型轻链的序列的DNA片段,所述h151D-H4型重链由在序列表中的SEQ ID NO:40中所示的h198D-H3型重链的核苷酸序列的核苷酸位置58至1407处的核苷酸组成,所述h198D-L4型轻链由在序列表中的SEQ ID NO:42中所示的h198D-L4型轻链的核苷酸序列的核苷酸位置61至702处的核苷酸组成。

[0607] 使用合成的DNA片段,根据由BioWa和Lonza的Potelligent (R) CHOK1SV

Technology的方案,构建MACA-1983a表达载体。所获得的表达载体被命名为“DGV-h198D-H3L4-GS”。

[0608] 7)-10人源化的抗人GARP抗体的制备

[0609] 7)-10-1产生人源化的抗人GARP抗体的细胞的生产

[0610] 7)-10-1-1产生人源化的抗人GARP抗体h151D-H1L1的细胞的生产

[0611] 用人源化的抗人GARP抗体h151D-H1L1表达载体DGV-h151D-H1L1-GS转染Potelligent CHOK1SV细胞(BioWa和Lonza),所述DGV-h151D-H1L1-GS已根据由BioWa和Lonza的Potelligent(R)CHOK1SV Technology的方案,在实施例7)-9-1中构建,以便构建产生人源化的抗人GARP抗体h151D-H1L1的细胞系。所获得的生产细胞系被命名为“MAC1-1”。

[0612] 7)-10-1-2产生人源化的抗人GARP抗体h151D-H4L4的细胞的生产

[0613] 与实施例7)-10-1-1的情况一样,用人源化的抗人GARP抗体h151D-H4L4表达载体DGV-h151D-H4L4-GS转染Potelligent CHOK1SV细胞(BioWa和Lonza),所述DGV-h151D-H4L4-GS已在实施例7)-9-2中构建,以便构建产生人源化的抗人GARP抗体h151D-H4L4的细胞系。所获得的生产细胞系被命名为“MAC2-1”。

[0614] 7)-10-1-3产生人源化的抗人GARP抗体h198D-H3L4的细胞的生产

[0615] 与实施例7)-10-1-1的情况一样,用人源化的抗人GARP抗体h198D-H3L4表达载体DGV-h198D-H3L4-GS转染Potelligent CHOK1SV细胞(BioWa和Lonza),所述DGV-h198D-H3L4-GS已在实施例7)-9-3中构建,以便构建产生人源化的抗人GARP抗体h198D-H3L4的细胞系。所获得的细胞系被命名为“MAC3-1”。

[0616] 7)-10-2产生人源化的抗人GARP抗体的细胞的培养

[0617] 7)-10-2-1产生人源化的抗人GARP抗体h151D-H1L1的细胞的培养

[0618] 使用培养仪器Wave反应器(GE Healthcare Japan)培养实施例7)-10-1-1中产生的人源化的抗人GARP抗体h151D-H1L1产生细胞系“MAC1-1”。将产生细胞系“MAC1-1”在Dsp04B(JX Energy)培养基中解冻,然后在Dsp04B(JX Energy)培养基中在培养箱(37°C,5% CO<sub>2</sub>)中以120 rpm进行培养。将所获得的培养溶液用C36(JX Energy)培养基稀释,然后在培养箱(37°C,5% CO<sub>2</sub>)中以120 rpm进行扩增培养。

[0619] 将所获得的培养溶液用C36培养基以 $30 \times 10^4$ 个细胞/mL进行稀释,然后转移到WAVE CELLBAG(GE Healthcare Bioscience)中,然后在37°C下在5% CO<sub>2</sub>中、在0.3 L/分钟的空气供应速率下、在18-24 rpm的转速下、以6-8°的角度执行培养13天。

[0620] 从培养开始后的第3天开始,以初期培养体积6%/天的量,向培养物中加入FM4Ae2培养基(自制的)。将所获得的培养溶液通过深度过滤器Millistak MC0HC054H1(Merck Millipore)大致过滤,然后通过Flexboy Bags所附的0.22-μm过滤器(Sartorius)过滤。该滤液被命名为“MACA-1511a培养上清液”。

[0621] 7)-10-2-2产生人源化的抗人GARP抗体h151D-H4L4的细胞的培养

[0622] 以与实施例7)-10-2-1中应用的那种相同的方式,将实施例7)-10-1-2中产生的人源化的抗人GARP抗体h151D-H4L4产生细胞系“MAC2-1”培养且扩增,并且其后,使细胞经受使用培养仪器Wave反应器(GE Healthcare Japan)的补料分批培养。将所获得的培养物用C36培养基以 $30 \times 10^4$ 个细胞/mL进行稀释,然后转移到WAVE CELLBAG(GE Healthcare Bioscience)中,随后为执行培养13天。将所获得的培养溶液过滤,并且所获得的滤液被命

名为“MACA-1514a培养上清液”。

[0623] 7)-10-2-3产生人源化的抗人GARP抗体h198D-H3L4的细胞的培养

[0624] 以与实施例7)-10-2-1中应用的那种相同的方式,将实施例7)-10-1-3中产生的人源化的抗人GARP抗体h198D-H3L4产生细胞系“MAC3-1”培养且扩增,并且其后,使细胞经受使用培养仪器Wave反应器(GE Healthcare Japan)的补料分批培养。将所获得的培养物用C36培养基以 $30 \times 10^4$ 个细胞/mL进行稀释,然后转移到WAVE CELLBAG(GE Healthcare Bioscience)中,随后为执行培养13天。将所获得的培养溶液过滤,并且所获得的滤液被命名为“MACA-1983a培养上清液”。

[0625] 7)-10-3人源化的抗人GARP抗体的纯化

[0626] 7)-10-3-1人源化的抗人GARP抗体h151D-H1L1的纯化

[0627] 实施例7)-10-2-1中获得的“MACA-1511a培养上清液”通过三步法进行纯化,所述三步法即rProtein A亲和层析、阴离子交换层析和阳离子交换层析。

[0628] 首先,将培养上清液应用于已用PBS平衡的rProtein A亲和层析树脂。在整个培养溶液已进入柱后,用PBS、含精氨酸的缓冲液和PBS洗涤柱。随后,用乙酸盐缓冲液洗脱柱中的剩余物质,然后收集在280 nm处的吸收峰。收集的溶液用Tris缓冲液中和,然后通过玻璃纤维过滤器AP20(Merck Millipore)大致过滤。溶液通过其为0.22- $\mu$ m过滤器的Stericup-GV(Merck Millipore)过滤,并且将所得滤液定义为rProtein A纯化库。

[0629] 随后,将rProtein A纯化库应用于已用PBS平衡的阴离子交换层析树脂。在作为整体的应用溶液已进入柱后,供应PBS。收集流通级分和在供应PBS时在280 nm处的吸收峰。收集溶液的pH用乙酸调节,然后溶液通过玻璃纤维过滤器AP20(Merck Millipore)大致过滤。溶液通过其为0.22- $\mu$ m过滤器的Stericup-GV(Merck Millipore)过滤,并且将所得滤液定义为AEX纯化库。

[0630] 随后,将AEX纯化库应用于已用乙酸盐缓冲液平衡的阳离子交换层析树脂。在作为整体的应用溶液已进入柱后,用乙酸盐缓冲液洗涤柱。其后,使用含有高浓度NaCl的乙酸缓冲液进行洗脱,并且收集在280 nm处的吸收峰。将收集的溶液通过玻璃纤维过滤器AP20(Merck Millipore)大致过滤,然后通过其为0.22- $\mu$ m过滤器的Stericup-GV(Merck Millipore)过滤。将所得滤液定义为CEX纯化库。

[0631] 用Pellicon 3 Cassette 30 kDa(Merck Millipore)将CEX纯化库浓缩至25 mg/mL的抗体浓度,然后将缓冲液替换为组氨酸缓冲液(25mM组氨酸,5%山梨糖醇,pH 6.0)。最后,溶液通过玻璃纤维过滤器AP20(Merck Millipore)大致过滤,然后通过其为0.22- $\mu$ m过滤器的Stericup-GV(Merck Millipore)过滤,以便获得纯化的样品。该纯化的样品被命名为“h151D-H1L1”。

[0632] 7)-10-3-2人源化的抗人GARP抗体h151D-H4L4的纯化

[0633] 以与实施例7)-10-3-1中应用的那种相同的方式,实施例7)-10-2-2中获得的“MACA-1514a培养上清液”通过三步法进行纯化,所述三步法即rProtein A亲和层析、阴离子交换层析和阳离子交换层析。纯化的样品被命名为“h151D-H4L4”。

[0634] 7)-10-3-3人源化的抗人GARP抗体h198D-H3L4的纯化

[0635] 以与实施例7)-10-3-1中应用的那种相同的方式,实施例7)-10-2-3中获得的“MACA-1983a培养上清液”通过三步法进行纯化,所述三步法即rProtein A亲和层析、阴离

子交换层析和阳离子交换层析。纯化的样品被命名为“h198D-H3L4”。

[0636] 7) -11人源化的抗人GARP抗体对人GARP的结合活性的评估

[0637] 根据捕获方法通过使用Biacore T200 (GE Healthcare Bioscience), 评估实施例7) -10中产生的人源化的抗人GARP抗体h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4各自与GARP之间的解离常数, 所述捕获方法包括通过固定的蛋白A捕获作为配体的抗体, 然后使用抗原作为分析物分析解离常数。HBS-EP + (由GE Healthcare Bioscience制造) 用作运行缓冲液, 并且蛋白A传感器芯片 (由GE Healthcare Bioscience制造) 用作传感器芯片。

[0638] 将人嵌合抗体 (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 以10  $\mu\text{L/分钟}$ 的速率加入芯片上20秒, 并且以30  $\mu\text{L/分钟}$ 的流速添加抗原的稀释系列溶液 (8至128 nM) 120秒。随后, 监测解离480秒。作为再生溶液, 以20  $\mu\text{L/分钟}$ 的流速加入甘氨酸1.5 (由GE Healthcare Bioscience制造) 30秒。

[0639] 在数据分析中使用1:1拟合模型, 并且计算结合速率常数 $k_a$ 、解离速率常数 $k_d$ 和解离常数(KD;  $KD = k_d/k_a$ )。

[0640] 结果显示于表2中。

[0641] 表2 人源化的抗人GARP抗体的解离常数

[0642] [表2]

[0643]

	名称	KD (nM)
1	h151D-H1L1	1.8
2	h151D-H4L4	1.2
3	h198D-H3L4	0.088

[0644] 实施例8: 与表达抗原基因的细胞结合

[0645] 8) -1与GARP的结合

[0646] 根据实施例2中描述的方法, 制备人GARP表达载体或对照载体已转染到其内的HEK-293T细胞悬浮液。将h151D-H1L1、h151D-H4L4、h198D-H3L4和对照人IgG (人IgG: Eureka Therapeutics) 加入细胞悬浮液中, 并且使细胞在4°C下温育15分钟。

[0647] 将细胞用FACS缓冲液 (补充有3% FBS的PBS (Invitrogen)) 洗涤两次, 并且其后, 加入R-藻红蛋白 (PE) 标记的抗IgG抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 和Horizon FVS450 (Becton Dickinson) 且悬浮。使细胞在4°C下进一步温育15分钟。如实施例2中所述进行流式细胞术分析, 并生成PE荧光强度的直方图 (图37)。

[0648] 用对照载体转染的HEK-293T细胞中的h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4的荧光强度的直方图与对照IgG的直方图相似 (在该图中, 细胞被称为“模拟载体转染的HEK-293T”)。

[0649] 另一方面, 与关于对照人IgG的直方图相比, 证实了关于h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4的荧光强度的直方图在表达GARP的HEK-293T细胞 (其在该图中被称为“hGARP转染的HEK-293T”) 中向强荧光强度侧移动。

[0650] 根据上述结果, 发现h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4与GARP特异性结合。

[0651] 8) -2与GARP-TGF  $\beta$ 1的结合

[0652] 8) -2-1人GARP突变体表达载体的构建

[0653] 使用人GARP表达载体 (Origene) 作为模板, 并且也使用引物F (cacggcaacctgctggagcggctgctgggggagg) (SEQ ID NO: 44)、引物R (caggctgttcccagacaggtccag) (SEQ ID NO:

45)和KOD-Plus-Mutagenesis Kit (Toyobo),将人GARP氨基酸序列(SEQ ID NO:1)的氨基酸位置137-139处的YSG转换为HGN,以便构建人GARP突变体表达载体。然后,证实该载体的核苷酸序列。

[0654] 8)-2-2 GARP-TGF  $\beta$ 1的共表达

[0655] 使用Lipofectamine 2000 (Invitrogen),用人TGF  $\beta$ 1表达载体(Sino Biological)以及人GARP表达载体或人GARP突变体表达载体转染HEK-293T细胞。

[0656] 将细胞在补充有10% FBS的DMEM培养基(Invitrogen)中在5% CO<sub>2</sub>中在37°C下培养过夜,然后通过用TrypLE Express (Invitrogen)处理它们从板收获细胞。收获的细胞用FACS缓冲液洗涤两次并重悬浮于相同溶液中。

[0657] 将本发明中的抗体105F、h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4,已知抗体(基于专利文献1中描述的序列信息产生的人IgG1抗GARP抗体MHG8和LHG10)和对照人IgG(Eureka Therapeutics)加入细胞悬浮液中,并且使细胞在4°C下温育15分钟。

[0658] 用FACS缓冲液洗涤细胞两次,加入PE标记的抗-IgG抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories)和Horizon FVS450(Becton Dickinson)并悬浮。使细胞在4°C下进一步温育15分钟。如实施例2中所述进行流式细胞术分析,并且生成PE荧光强度的直方图(图38)。

[0659] 与关于对照IgG的直方图(图38)相比,证实了关于所有抗体的直方图在用TGF  $\beta$ 1和GARP共转染的HEK-293T细胞中都向强荧光强度侧移动。

[0660] 另一方面,在用TGF  $\beta$ 1和GARP突变体共转染的HEK-293T细胞中,关于MHG8和LHG10的直方图不移动并且类似于关于对照IgG的直方图,而关于抗体105F、h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4的直方图在该细胞中向强荧光强度侧移动。因此,如[非专利文献12]中所述,证明抗体MHG8和LHG10不结合GARP突变体。

[0661] 根据上述结果证明,抗体105F、h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4与在共表达TGF  $\beta$ 1的细胞上的GARP和GARP突变体两者均结合,并且发现这些抗体结合的区域不同于MHG8和LHG10抗体与之结合的那些。

[0662] 实施例9:与内源性GARP表达细胞的结合

[0663] 9)-1使用L428细胞的流式细胞术分析

[0664] 将L428细胞用FACS缓冲液洗涤两次并悬浮于相同溶液中。其后,向悬浮液中加入h151D-H1L1、h151D-H4L4、h198D-H3L4和对照人IgG(人IgG:Eureka Therapeutics),并使细胞在4°C下温育15分钟。用FACS缓冲液洗涤细胞两次,加入PE标记的抗-IgG抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories)并悬浮。使细胞在4°C下温育15分钟。如实施例3中所述进行流式细胞术分析,并且生成PE荧光强度的直方图。

[0665] 结果,与关于对照IgG的直方图相比,关于抗体h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4的直方图在L428细胞中向强荧光强度侧移动。因此,证实了h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4结合内源性表达的GARP(图39)。

[0666] 9)-2使用人Treg的流式细胞术分析

[0667] 根据方案将冷冻的人PBMC(细胞技术)解冻,并且使用补充有10% FBS的RPMI1640培养基(Invitrogen),将PBMC以 $2 \times 10^6$ 个细胞/mL接种在24孔板(umitomo Bakelite Co.,Ltd.)中。

[0668] 将Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Life technologies) 加入板中,并且将细胞培养48小时。其后,将细胞悬浮于FACS缓冲液中,并且加入抗体h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4以及对照人IgG (人IgG:Eureka Therapeutics)。还将APC标记的抗-CD4抗体 (Becton Dickinson) 加入悬浮液中。使细胞在4°C下温育10分钟。

[0669] 用FACS缓冲液洗涤细胞,并且其后,加入FITC标记的抗IgG抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 和Horizon FVS450 (Becton Dickinson) 并悬浮。使细胞在4°C下进一步温育15分钟。

[0670] 再次用FACS缓冲液洗涤细胞,并使用FoxP3 Staining Buffer Set (Miltenyi Biotec) 重悬浮于溶液中。这之后,将PE标记的抗Foxp3抗体 (Miltenyi Biotec) 加入细胞中,并使细胞在4°C下温育30分钟。

[0671] 在细胞洗涤后,使用流式细胞仪 (FACS Canto II; Becton Dickinson) 测量细胞。通过门控出用Horizon FVS450染色的细胞,从分析中去除死细胞后,使用FlowJo (Tree Star) 分析CD4阳性细胞。

[0672] 结果证明,抗体h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4结合FoxP3-阳性Treg (图40)。

[0673] 实施例10:抗GARP抗体的性质

[0674] 10) -1 ADCC活性

[0675] 根据实施例4中所述的方法,就其ADCC活性分析抗体h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4,已知抗体 (基于专利文献1中描述的序列信息产生的人IgG1抗GARP抗体MHG8和LHG10) 和对照人IgG (Sigma)。

[0676] 抗体h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4显示出以抗体浓度依赖性方式对L428细胞的细胞裂解活性 (图41A)。

[0677] 相比之下,如实施例4中所述,以与对照人IgG并未显示相同的方式,MHG8和LHG10并未显示细胞裂解活性 (图41B)。

[0678] 根据上述结果,证明抗体h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4具有ADCC活性。

[0679] 10) -2对Treg功能的抑制活性

[0680] 根据实施例4中描述的方法,就其对Treg功能的抑制活性分析抗体h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4。在1  $\mu$ g/mL的最终浓度,h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4对Treg功能的抑制活性显示于图42中 (h151D-H1L1的抑制率:81.5%;h151D-H4L4的抑制率:80.4%;以及h198D-H3L4的抑制率:70.8%)。

[0681] 证明抗体h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4对Treg功能具有抑制活性。

[0682] 10) -3抗肿瘤活性 (体外)

[0683] 10) -3-1细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 的制备

[0684] 根据来自Mie University的方案,将具有NY-ESO-1特异性T细胞受体 (MU28 CD8B35克隆#7:得自Mie University) 的CTL细胞以 $3 \times 10^5$ 个细胞在25  $\text{cm}^2$ 烧瓶 (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) 中,在抗CD3抗体 (OKT3: Imgenex)、IL-2 (Novartis) 和饲养细胞的存在下,在补充有10%人雄性AB血清 (Sigma) 的RPMI1640培养基 (Invitrogen) 中温育7天。

[0685] 关于饲养细胞,将冷冻的人PBMC (Cellular Technology) 解冻,并且使用CD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec) 从PBMC中去除CD8阳性细胞,以获得CD8耗尽的PBMC (7.5

$\times 10^6$ 个细胞/25 cm<sup>2</sup>烧瓶),并且细胞是受X射线照射的。另外,103-LCL细胞(得自Riken BioResource Center)( $1.5 \times 10^6$ 个细胞/25 cm<sup>2</sup>培养瓶)也通过使用X射线辐射器(Hitachi Medical Corporation)受X射线照射。这些细胞用作饲养细胞。

[0686] 在培养开始时( $1.5 \times 10^5$ 个细胞/25 cm<sup>2</sup>培养瓶),加入通过实施例4)-2-1中描述的方法获得的Treg,以便评估Treg对CTL细胞活性的抑制作用。另外,在培养开始时,加入(10  $\mu$ g/ml)通过上述方法获得的Treg( $7.5 \times 10^4$ 个细胞/25 cm<sup>2</sup>培养瓶)以及抗体105F、h151D-H1L1、h151D-H4L4、h198D-H3L4和人IgG1(Enzo),以便评估每种抗体的抗肿瘤活性。

[0687] 在培养完成后,使用CD8<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit(Miltenyi Biotech)纯化并且分离CD8阳性细胞,以制备CTL细胞。其后,将制备的CTL细胞用于活性的评估中。

[0688] 10)-3-2靶细胞的制备

[0689] 使用补充有10% FBS的RPMI1640培养基(Invitrogen)培养人黑素瘤细胞系,即表达NY-ESO-1的SK-MEL-52细胞(得自Mie University:Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Jul;77(7):4260-4)。细胞用<sup>51</sup>Cr的标记如实施例4)-1-2所述进行,并且将细胞调节到 $2 \times 10^4$ 个细胞/mL。将所获得的细胞定义为靶细胞。

[0690] 10)-3-3 <sup>51</sup>Cr释放测定

[0691] 将靶细胞分配在96孔U形底部微板(Costar)(50  $\mu$ L/孔)中。

[0692] 随后,将CTL细胞加入板(100  $\mu$ L/孔)中,使得CTL细胞的数目是靶细胞的数目的16、8、4或2倍(CTL细胞:靶细胞= 16:1、8:1、4:1或2:1),并使细胞在% CO<sub>2</sub>中在37°C下温育4小时。这之后,根据如实施例4)-1-3中所述的方法加工细胞。应指出,每次实验中每一次计算样品的抑制活性。另外,证实CTL细胞对不表达NY-ESO-1的细胞并未显示出细胞裂解活性。

[0693] 测量结果显示于图43和44中。

[0694] CTL细胞对SK-MEL-52的细胞裂解活性被Treg抑制(图43)。

[0695] 另一方面,在抗体105F、h151D-H1L1、h151D-H4L4或h198D-H3L4已加入其中的CTL细胞中,CTL细胞针对SK-MEL-52细胞的细胞裂解率随着CTL细胞数目增加而升高,并且在任何靶-效应物比率下,细胞裂解率也明显高于对照IgG已加入其中的对照CTL细胞的那种(图44)。

[0696] 因此,证明了抗体105F、h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4抑制了Treg对CTL细胞的抑制活性,并且增强了抗肿瘤活性。

[0697] 10)-4抗肿瘤活性(体内)

[0698] 已知具有ADCC活性的嵌合抗体的抗肿瘤效应可以在NOD/Shi-scid,IL-2R<sup>null</sup>(NOG)小鼠中进行评估,在所述小鼠中已移植L428细胞且施用人PBMC(J Immunol. 2009 Oct 1;183(7):4782-91)。

[0699] 已以 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL悬浮于RPMI1640培养基(Invitrogen)和Matrigel(Becton Dickinson)的混合溶液(1:1)中的L428细胞(DSMZ)以0.1 mL的体积移植到NOG小鼠(雌性,In vivo science)的腋窝区域的皮下组织内。移植L428细胞的日期定义为第0天。在第6天时,基于肿瘤体积值将小鼠分组(每组中n = 6),并且如下设定施用组。

[0700] PBS对照1:在第6、10、14、18、22和26天时施用,并且另外,人PBMC(批号:20140707)在第6、14和22天时施用

[0701] 105F抗体:在第6、10、14、18、22和26天时以5 mg/kg的剂量施用,并且另外,人PBMC(批号:20140707)在第6、14和22天时施用

[0702] PBS对照2:在第6、10、14、18、22天时施用,并且另外,人PBMC(批号:20150924)在第6、14和22天时施用

[0703] h151D-H1L1抗体:在第6、10、14、18和22天时以1 mg/kg的剂量施用,并且另外,人PBMC(批号:20150924)在第6、14和22天时施用

[0704] h151D-H4L4抗体:在第0、6、10、14、18和22天时以1 mg/kg的剂量施用,并且另外,人PBMC(批号:20150924)在第6、14和22天时施用

[0705] h198D-H3L4抗体:在第0、6、10、14、18和22天时以1 mg/kg的剂量施用,并且另外,人PBMC(批号:20150924)在第6、14和22天时施用。

[0706] 每种抗体用PBS (Invitrogen) 稀释并且通过尾静脉(10 mL/kg)施用于小鼠。

[0707] 关于人PBMC,按照方案将冷冻的人PBMC (Cellular Technology) 解冻,并且以 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL制备。将制备的细胞(0.2 mL)通过尾静脉施用于小鼠。

[0708] 使用电子数字卡钳 (Mitutoyo),随着时间过去测量肿瘤的长直径(mm)和短直径(mm),然后根据以下表达式计算肿瘤的体积。

[0709] 肿瘤体积(mm<sup>3</sup>) =  $1/2 \times [\text{肿瘤的长直径}] \times [\text{肿瘤的短直径}] \times [\text{肿瘤的短直径}]$

[0710] 各个组中的肿瘤体积的平均值±标准误(SE)中的变化显示于图45中。

[0711] 与对其仅施用PBMC的对照组相比,抗体105F、h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4显示出对L428细胞的抗肿瘤活性。因此,观察到就对照组而言的显著差异(105F:t检验;以及h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4:Dunnett多重比较检验)。图中还显示了在各个组的最后测量日(105F:第31天;以及h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4:第25天)时的显著性差异检验结果(P值)。

[0712] 因此,抗体105F、h151D-H1L1、h151D-H4L4和h198D-H3L4在体内模型中显示出抗肿瘤活性。

[0713] 实施例11:抗GARP抗体的表位分析

[0714] 通过氢-氘交换质谱法分析抗人GARP抗体(105F、110F、h151D-H1L1和h198D-H3L4)的表位。

[0715] 将7 mg/mL抗人GARP抗体与3 mg/mL人GARP (R&D Systems)或以等体积的空白缓冲液混合。向所获得的溶液中加入9当量的轻水或重水。在加入水30秒、480秒或6000秒后,或在一晚过去之后,将等量的100 mM磷酸、4 M Gdn-HCl和150 mM TCEP (pH 2.5)加入样品中,使所获得的混合物经受氘取代。将这样的氘取代的样品在冷却下注入HPLC内,然后将它供应给具有0.1% TFA溶液的固定的胃蛋白酶柱。

[0716] 通过消化胃蛋白酶柱中的人GARP而获得的肽片段保留在C18捕获柱中,然后通过0.1%甲酸和0.025% TFA已加入其中的水和乙腈的线性梯度洗脱,然后在C18分析柱中分离。使分离的肽片段经受使用飞行时间质谱仪的质谱法。

[0717] 根据每种肽的质量计算氘取代率。其中由于抗人GARP抗体的添加而观察到氘取代率中的显著降低的肽片段被鉴定为表位片段。

[0718] 在105F的情况下,在SEQ ID NO:1中所示的人GARP的位置366-377、407-445和456-



470的氨基酸残基中发现氘取代率的压制,并且因此,它们被鉴定为表位。

[0719] 在110F的情况下,在SEQ ID NO:1中所示的人GARP的位置54-112和366-392的氨基酸残基中发现氘取代率的压制,并且因此,它们被鉴定为表位。

[0720] 在h151D-H1L1的情况下,在SEQ ID NO:1中所示的人GARP的位置352-392的氨基酸残基中发现氘取代率的压制,并且因此,它们被鉴定为表位。

[0721] 在h198D-H3L4的情况下,在SEQ ID NO:1中所示的人GARP的位置18-112的氨基酸残基中发现氘取代率的压制,并且因此,它们被鉴定为表位。

[0722] 工业实用性

[0723] 本发明的抗GARP抗体具有由ADCC活性介导的通过对Treg功能的抑制活性引起的抗肿瘤活性,并且因此,包含该抗GARP抗体的药物组合物可以用作抗癌剂。

[0724] 此外,在患有疟疾和HIV感染的患者中Treg的过量存在及其活化显示出与疾病状态的相关性,并且Treg的去除在用于疾病的鼠模型中诱导每一疾病的缓解。相应地,可以预期,Treg功能的有效抑制也将对难治性感染例如疟疾和HIV具有治疗作用。

[0725] 序列表自由文本

[0726] SEQ ID NO:1 - GARP的氨基酸序列

[0727] SEQ ID NO:2 - 105F抗体重链的氨基酸序列

[0728] SEQ ID NO:3 - 105F抗体轻链的氨基酸序列

[0729] SEQ ID NO:4 - 110F抗体重链的氨基酸序列

[0730] SEQ ID NO:5 - 110F抗体轻链的氨基酸序列

[0731] SEQ ID NO:6 - 105F抗体重链的核苷酸序列

[0732] SEQ ID NO:7 - 105F抗体轻链的核苷酸序列

[0733] SEQ ID NO:8 - 110F抗体重链的核苷酸序列

[0734] SEQ ID NO:9 - 110F抗体轻链的核苷酸序列

[0735] SEQ ID NO:10 - 引物A

[0736] SEQ ID NO:11 - 引物B

[0737] SEQ ID NO:12 - 引物C

[0738] SEQ ID NO:13 - 引物D

[0739] SEQ ID NO:14 - 编码151D重链可变区的cDNA的核苷酸序列

[0740] SEQ ID NO:15 - 151D重链可变区的氨基酸序列

[0741] SEQ ID NO:16 - 编码151D轻链可变区的cDNA的核苷酸序列

[0742] SEQ ID NO:17 - 151D轻链可变区的氨基酸序列

[0743] SEQ ID NO:18 - 编码198D重链可变区的cDNA的核苷酸序列

[0744] SEQ ID NO:19 - 198D重链可变区的氨基酸序列

[0745] SEQ ID NO:20 - 编码198D轻链可变区的cDNA的核苷酸序列

[0746] SEQ ID NO:21 - 198D轻链可变区的氨基酸序列

[0747] SEQ ID NO:22 - 包含人轻链信号序列和编码人 $\kappa$ 链恒定区中的氨基酸的序列的DNA片段的核苷酸序列

[0748] SEQ ID NO:23 - 包含人重链信号序列和编码人IgG1恒定区中的氨基酸的序列的DNA片段的核苷酸序列

- [0749] SEQ ID NO:24 - 人嵌合抗体c151D重链的核苷酸序列
- [0750] SEQ ID NO:25 - 人嵌合抗体c151D重链的氨基酸序列
- [0751] SEQ ID NO:26 - 人嵌合抗体c151D轻链的核苷酸序列
- [0752] SEQ ID NO:27 - 人嵌合抗体c151D轻链的氨基酸序列
- [0753] SEQ ID NO:28 - 人嵌合抗体c198D重链的核苷酸序列
- [0754] SEQ ID NO:29 - 人嵌合抗体c198D重链的氨基酸序列
- [0755] SEQ ID NO:30 - 人嵌合抗体c198D轻链的核苷酸序列
- [0756] SEQ ID NO:31 - 人嵌合抗体c198D轻链的氨基酸序列
- [0757] SEQ ID NO:32 - 人源化抗体h151D-H1的核苷酸序列
- [0758] SEQ ID NO:33 - 人源化抗体h151D-H1的氨基酸序列
- [0759] SEQ ID NO:34 - 人源化抗体h151D-H4的核苷酸序列
- [0760] SEQ ID NO:35 - 人源化抗体h151D-H4的氨基酸序列
- [0761] SEQ ID NO:36 - 人源化抗体h151D-L1的核苷酸序列
- [0762] SEQ ID NO:37 - 人源化抗体h151D-L1的氨基酸序列
- [0763] SEQ ID NO:38 - 人源化抗体h151D-L4的核苷酸序列
- [0764] SEQ ID NO:39 - 人源化抗体h151D-L4的氨基酸序列
- [0765] SEQ ID NO:40 - 人源化抗体h198D-H3的核苷酸序列
- [0766] SEQ ID NO:41 - 人源化抗体h198D-H3的氨基酸序列
- [0767] SEQ ID NO:42 - 人源化抗体h198D-L4的核苷酸序列
- [0768] SEQ ID NO:43 - 人源化抗体h198D-L4的氨基酸序列
- [0769] SEQ ID NO:44 - 引物F
- [0770] SEQ ID NO:45 - 引物R。

## 糖蛋白A重复主导序列 (GARP) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1)

MRPQILLLLALLTLGLAAQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTETLDLSGNQLR  
SILASPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALHLEHLSLAHNRLAMATALSAGGLGPLP  
RVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSNVL  
DIEDGAFEGLPRLTHLNLNRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWL  
DLRENKLLHFDPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNAS  
GRPLSQLLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLMLLDLSH  
NALETLELGARALGSLRTLQLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEPGPS  
GCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFLLHTPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVL  
ALQGNGLMVLQVDLPFCICLKRLNLAENRLSHLPWATQAVSLEVLDLRNNSFSLPGSAMGG  
LETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDTQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEK  
GGLKNINLIIILTFILVSAILLTTLAACCCVRRQKFNQYKA

图 1

## 105F抗体重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDIYMSWIRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRTHYAD  
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARQRQLAEFDYWGQGLTVTVSSASTKGP  
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP  
KDTLMISRTP E VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALH  
NHYTQKSLSLSPGK

图 2

## 105F抗体轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 3)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYVVHWYQQLPGTAPKLLIYADTNRPSGVPD  
RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYQC SYDSSLRGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP  
PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLT  
PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

图 3

## 110F抗体重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 4)

EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAGISWNSAITVYAD  
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDAGGRYSGSYFFDYWGQGT LVT VSSA  
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY  
SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL  
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS  
VLT V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T  
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV M  
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 4

## 110F抗体轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 5)

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPD  
RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDRSLNWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP  
SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN NKYAASSYLSLTP  
EQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

图 5



## 105F抗体重链的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 6)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC  
CTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAG  
GCAAGGGGCTGGAGTGGGTATCGGGTGTAGTTGGAATGGCAGTAGGACGCACTATGCAGAC  
TCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT  
GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCCAGACAGAGGCAGCTGGCTG  
AATTTGACTACTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA  
AGCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTG  
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCA  
GCGGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG  
GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC  
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCC  
CACCCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCTAAAACCC  
AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA  
CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA  
CAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTG  
CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC  
CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACCC  
TGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC  
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAA  
GACCACCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGG  
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC  
AACCCTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

图 6

## 105F抗体轻链的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 7)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTC  
CTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATTGGGGCGGGTTATGTTGTACATTGGTATCAGCAGCTCC  
CAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGCTGACACCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGAC  
CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGA  
GGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCATGACAGCAGCCTGAGAGGTTGGGTGTTTCGGCG  
GAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGTGAGCCTAAGGCTGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCT  
CCTTCCAGCGAGGAGCTTCAAGCTAACAAGGCCACCCTGGTGTGTCTTATCTCTGACTTCTA  
CCCTGGCGCTGTGACCGTGGCCTGGAAGGCTGACAGCTCCCCTGTGAAGGCCGGAGTGGAGA  
CCACCACACCTAGCAAGCAGTCTAACAACAAGTACGCTGCCAGCTCCTACCTGAGCCTTACC  
CCTGAGCAGTGGAAGTCTCACAGAAGCTACTCCTGTCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGT  
GGAGAAGACCGTGGCTCCTACCGAGTGTTCC

图 7

## 110F抗体重链的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 8)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC  
CTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG  
GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGCCGAATTAGTTGGAACAGTGCCATCACAGTCTATGCGGAC  
TCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT  
GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCAAAAGATGCCGGGGGCCGGT  
ATAGTGGGAGCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTGAGCTCAGCC  
TCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCAC  
AGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAAC  
CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTAC  
TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA  
CGTGAATCACAAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA  
AAACTCACACATGCCCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCCTCAGTCTTCCTC  
TCCCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT  
GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG  
TGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC  
GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA  
CAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAAC  
CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCCTGACC  
TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCC  
CGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA  
GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG  
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

图 8

## 110F抗体轻链的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 9)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTC  
CTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTACTGTTATCAGCAGCTCC  
CAGGAACGGCCCCCAAATCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGAC  
CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGA  
GGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGAAGCCTGAATTGGGTGTTCGGCGGAG  
GAACCAAGCTGACGGTCCTAGGTACGCTAAGGCTGCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCT  
TCCAGCGAGGAGCTTCAAGCTAACAAGGCCACCCTGGTGTGTCTTATCTCTGACTTCTACCC  
TGGCGCTGTGACCGTGGCCTGGAAGGCTGACAGCTCCCCTGTGAAGGCCGGAGTGGAGACCA  
CCACACCTAGCAAGCAGTCTAACAACAAGTACGCTGCCAGCTCCTACCTGAGCCTTACCCCT  
GAGCAGTGGAAGTCTCACAGAAGCTACTCCTGTCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGA  
GAAGACCGTGGCTCCTACCGAGTGTTCC

图 9



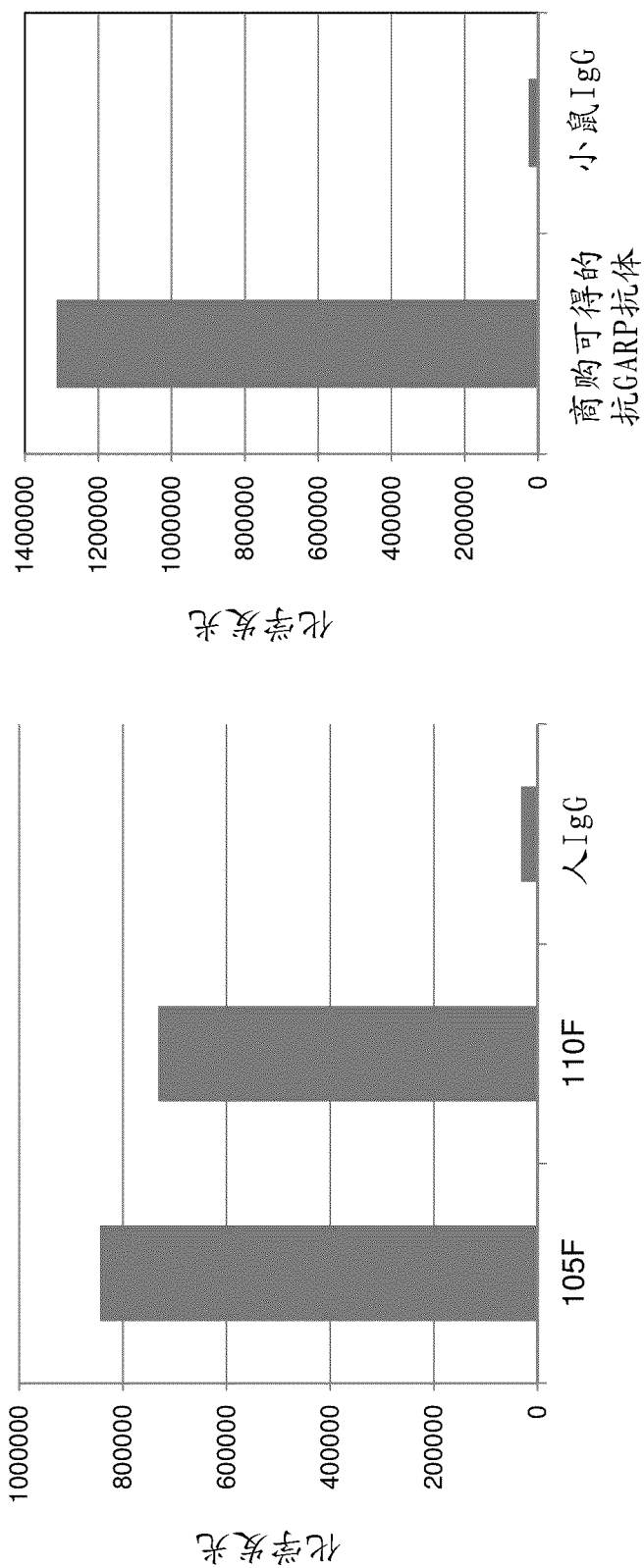


图 10

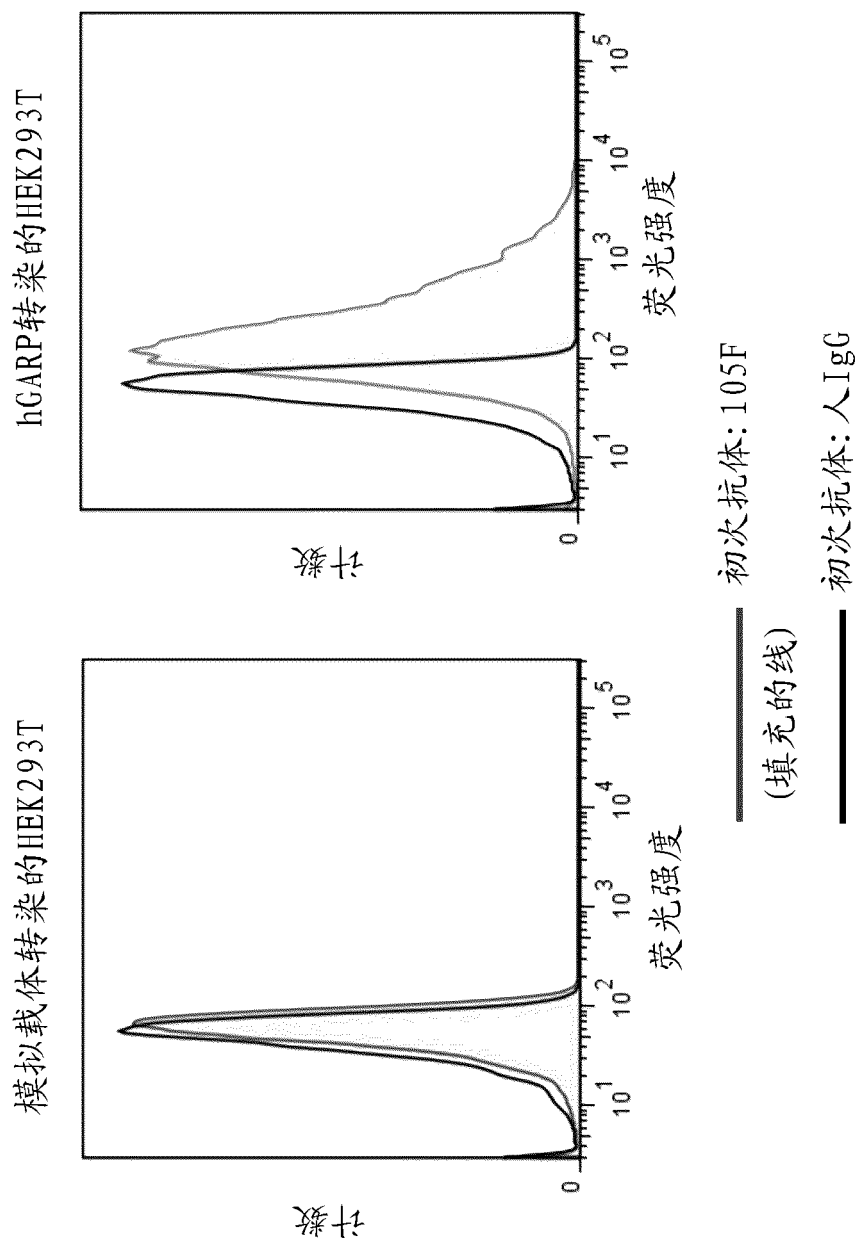


图 11



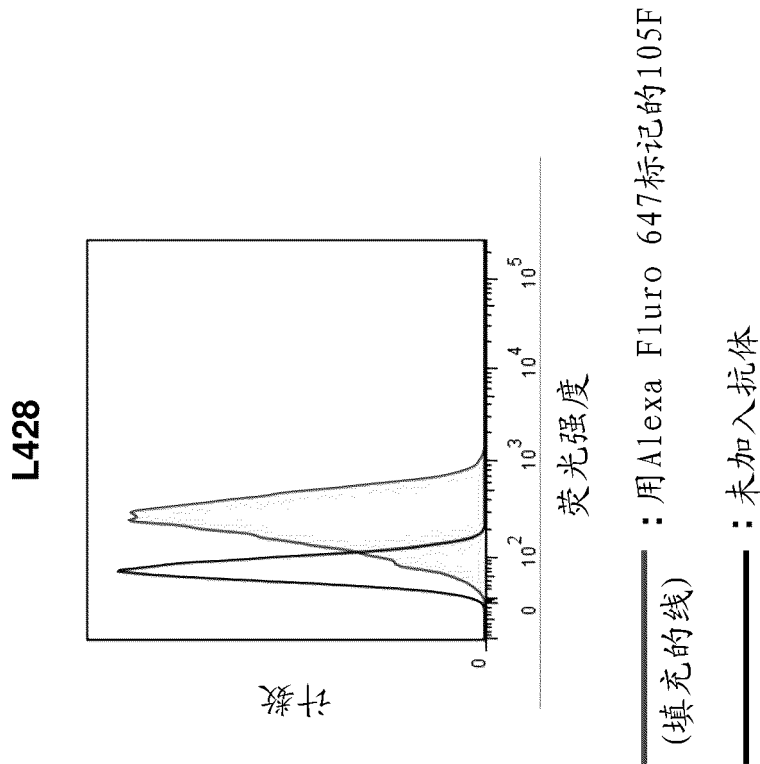


图 12

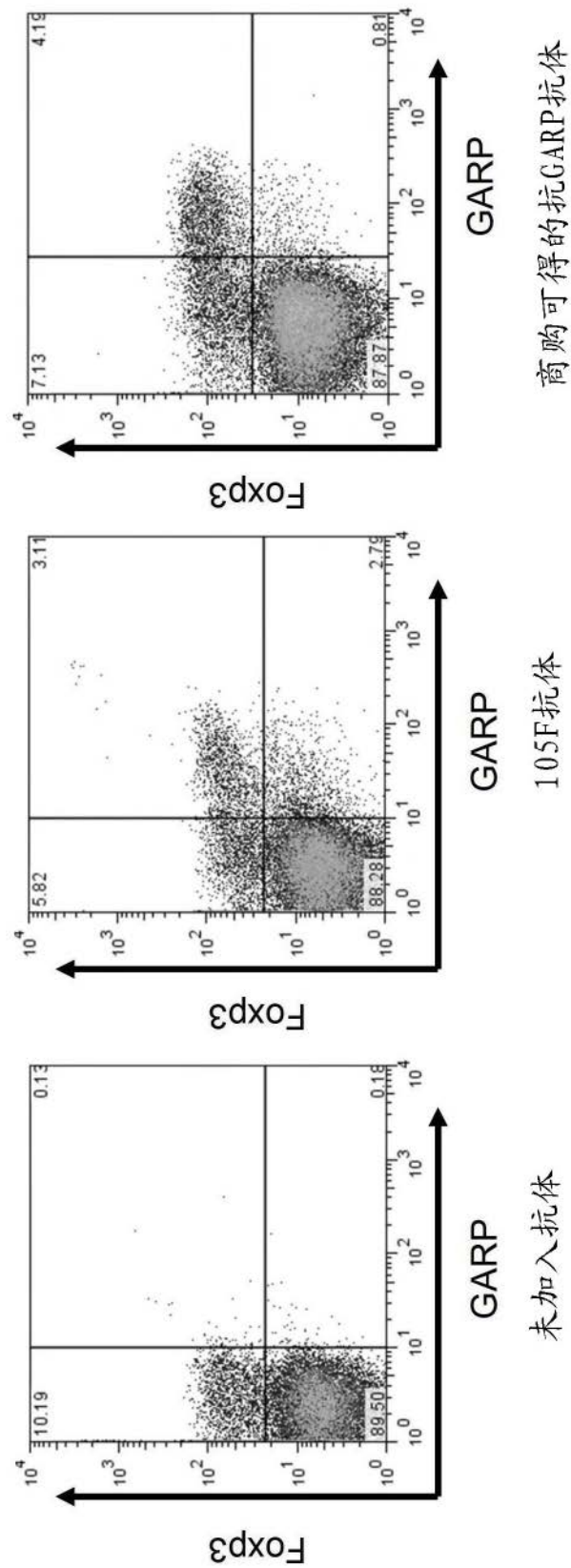


图 13

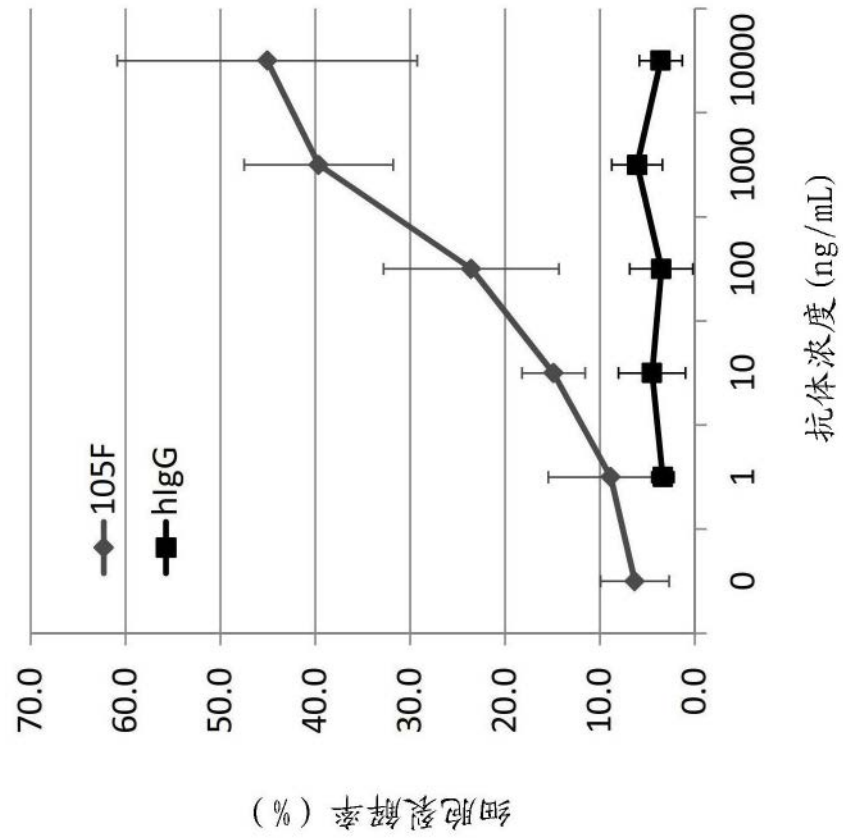


图 14

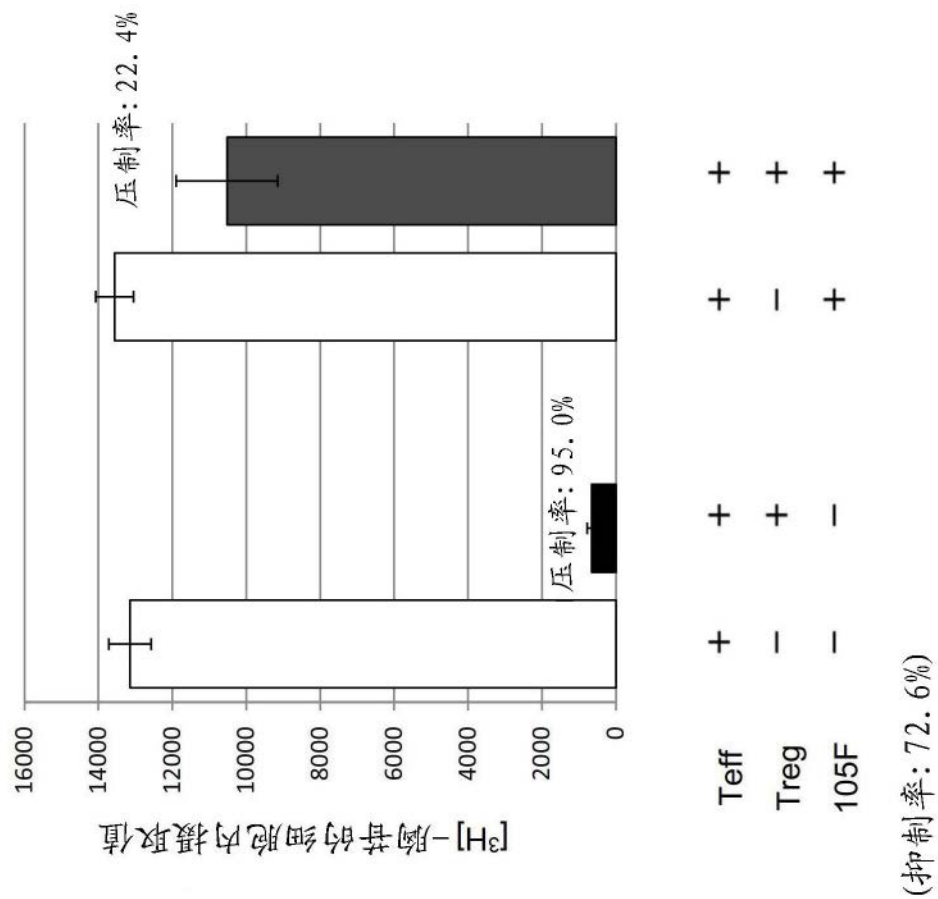


图 15

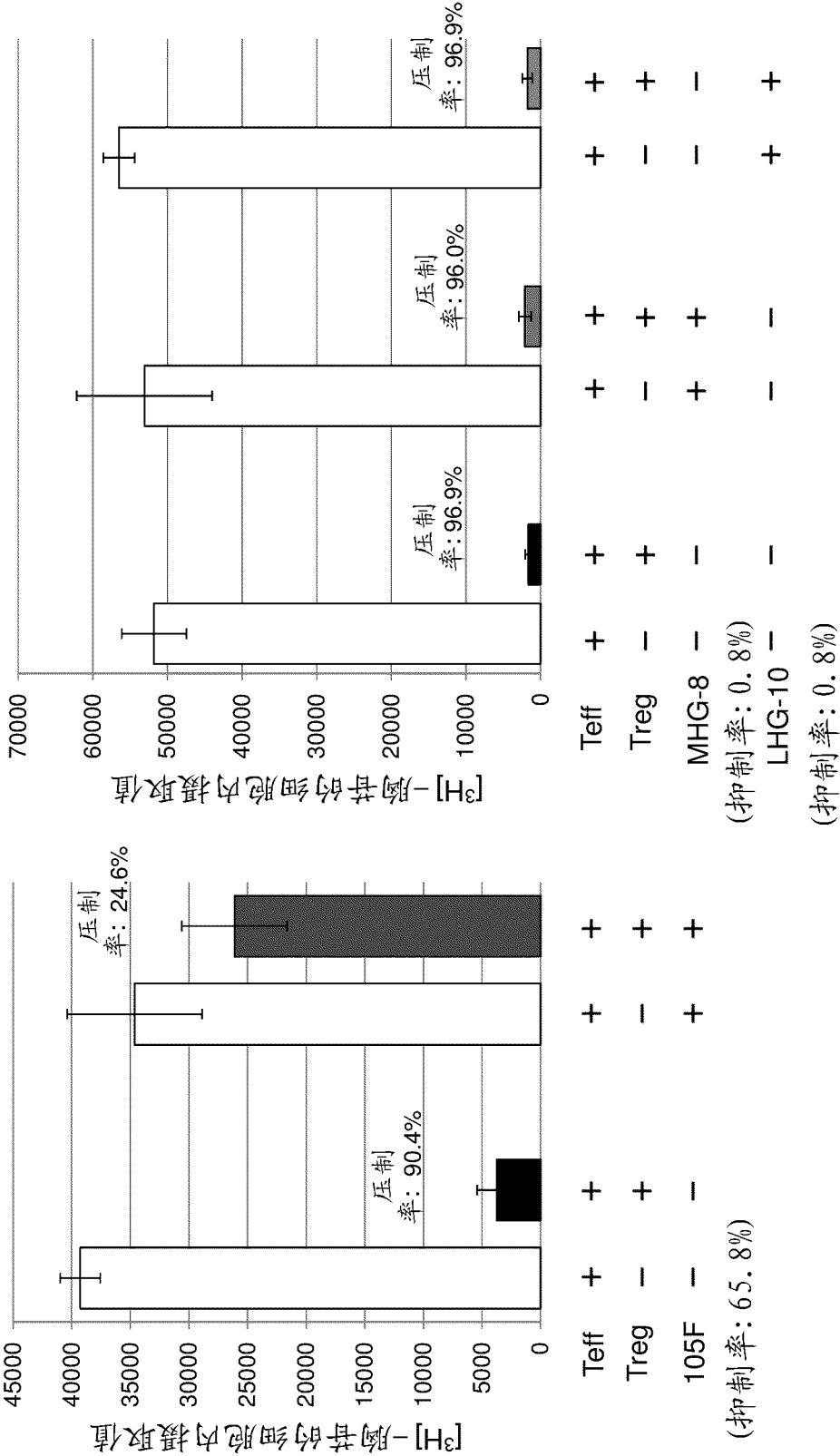


图 16

## c151D抗体重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 25)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGRSKKLSCSASGFTFSNYMAWVRQAPTQ  
GLEWVASIGTVGGNTYYRDSVKGRFTISRDDAKSTLYLQMDSLRSEDATYYCAREDYGGFP  
HWGQGVMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV  
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQITICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP  
APPELLGGPSVFLFPPKPDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPREPQVYTLPPSRE  
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLLSPGK

图 17

## c151D抗体轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 27)

## SEQ ID NO: 27: 人嵌合抗体c151D轻链的氨基酸序列

MVLQQTQVFISLLWISGAYGNIVMTQSPTSMFISVGDRVTMNCKASQNVGTNVDWYQQKTGQ  
SPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQAEDLAVYDCLQYKYNPYTFGTGTKL  
ELNRAVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
DSKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图 18

## c198D抗体重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 29)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLRESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSFHVSWVRQPPEK  
GLEWIATISSGGGTYYNSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMSTLQTEDTAMYFCARISGWGHYY  
VMDVWGQGASVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC  
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV  
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 19

## c198D抗体轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 31)

MVLQTQVFISLLWISGAYGDIQMTQSPASLSGSLGETVTIQCASEDIYSGLAWYQQKPGK  
SPQLLIYGAGSLQDGVPSRFSGGSGTHYSLKISSMQTEDEGVYFCQQGLKFPLTFGSGTKL  
EIKRAVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
DSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图 20

## h151D-H1重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 33)

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPGK  
GLEWVSSIGTVGGNTYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDYGGFP  
HWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV  
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC  
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
RWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 21

## h151D-L1轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 37)

MVLQTQVFISLLWISGAYGNIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQNVGTNVDWYQQKPGQ  
SPKLLIYGASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYDCLQYKYNPYTFGQGTKV  
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
DSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图 22



## h151D-H4重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 35)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPGK  
GLEWVASIGTVGGNTYYRDSVKGRFTISRDDSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDYGGFP  
HWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV  
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC  
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 23

## h151D-L4轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 39)

MVLQTQVFISLLWISGAYGNIVMTQSPSSLSASVGDRVTINCKASQNVGTNVDWYQQKPGK  
SPKLLIYGASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYDCLQYKYNPYTFGQGTKV  
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC

图 24

## h198D-H3重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 41)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVKPSQTLSTCTVSGFSLTSFHVSWVRQPPGK  
GLEWIATISSGGGTYYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARISGWGHYY  
VMDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC  
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV  
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 25



## h198D-L4轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 43)

MVLQTQVFISLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASEDIYSGLAWYQQKPGK  
SPKLLIYGAGSLQDGVPSRFSGSGSGTHYTLTISSLQPEDFATYFCQQGLKFPLTFGQGTKV  
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图 26

## c151D抗体重链的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 24)

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGT  
GCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCAAGAACTCTCCTGTT  
CAGCCTCAGGATTCACCTTCAGTAACTATTACATGGCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAACGCAG  
GGTCTGGAGTGGGTTCGCATCCATTGGTACTGTTGGTGGTAACACTTACTATCGAGACTCCGT  
GAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGATGATGCAAAAAGCACCTTATACCTGCAAATGGACA  
GTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCACTTATTACTGTGCAAGAGAGGATTACGGAGGGTTTCCC  
CACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTTCACAGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTT  
CCCCCTGGCACCTCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCA  
AGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG  
CACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT  
GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA  
CCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCCTGC  
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACAC  
CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC  
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCC  
CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTACGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA  
CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCG  
AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGAACCAAGGTGTACACCCTGCCCCCA  
TCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC  
CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCC  
CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC  
AGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA  
CACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

图 27

## c151D抗体轻链的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 26)

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCAA  
TATTGTGATGACTCAGTCTCCACATCCATGTTTCATATCAGTCGGAGACAGGGTCACCATGA  
ACTGTAAGGCCAGTCAGAATGTGGGAATAATGTAGACTGGTACCAGCAGAAAACAGGGCAG  
TCTCCTAAACTGCTTATCTATGGGGCGTCCAACCGCTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCAC  
AGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAACATGCAGGCTGAAGACCTGG  
CTGTTTATGACTGTCTACAGTATAAGTACAATCCATACACGTTTGGAACTGGGACCAAGCTG  
GAACTGAACCGGGCTGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCCTCCGACGAGCAGCT  
GAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGG  
TGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAATACTCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAG  
GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGA  
GAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGA  
GCTTCAACAGGGGGGAGTGT

图 28

## c198D抗体重链的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 28)

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCCAGGT  
GCAGCTGAGGGAGTCAGGACCTGGTCTGGTGCAGCCCTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCA  
CTGTCTCTGGGTTCCTACTAACCAGCTTTCATGTAAGCTGGGTTCGCCAGCCTCCAGAGAAG  
GGTCTGGAGTGGATTGCAACAATTTCAAGTGGTGGAGGTACATATTATAATTACAGCTCTCAA  
ATCCCGACTGAGCATCAGCAGGGACACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAGATGAGCACTC  
TGCAAACCTGAAGACACAGCCATGTACTTCTGTGCCCCGATTTCGGGCTGGGGCCATTACTAT  
GTTATGGATGTCTGGGGTCAAGGAGCTTCAGTCACTGTCTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC  
AAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCT  
GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACC  
AGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCTCTGCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT  
GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC  
CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGC  
CCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCTAAACC  
CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC  
ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG  
ACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCT  
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG  
CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACC  
CTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG  
CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACCTACA  
AGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTG  
GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA  
CAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAA

图 29



## c198D抗体轻链的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 30)

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGA  
CATCCAGATGACACAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTGGATCTCTGGGAGAACTGTCACCATCC  
AATGTCAAGCAAGTGAGGACATTTACAGTGGTTTAGCGTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAA  
TCTCCTCAGCTCCTGATCTATGGTGCAGGTAGCTTACAAGACGGCGTCCCATCACGATTCAG  
TGGCGGTGGATCTGGCACACATTATTCTCTCAAGATCAGCAGCATGCAAACTGAAGATGAAG  
GGGTTTATTTCTGTCAACAGGGTTTAAAGTTTCCGCTCACGTTTCGGTTCTGGGACCAAGCTG  
GAGATCAAACGGGCTGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCCTCCGACGAGCAGCT  
GAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGG  
TGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAG  
GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGA  
GAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGA  
GCTTCAACAGGGGGGAGTGT

图 30

## h151D-H1重链的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 32)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTGAAGT  
GCAGCTGGTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTG  
CCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAATACTACATGGCCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAG  
GGACTGGAATGGGTGTCTCTATCGGCACCGTGGGCGGCAACACCTACTACGCCGATTCTGT  
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACGACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACT  
CCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGAGGACTACGGCGGCTTCCCT  
CATGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTCTGCTTCCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTT  
TCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGA  
AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGAACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTG  
CACACCTTTCAGCTGTGCTGCAGTCTTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTCTGTACTGT  
GCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACA  
CCAAGGTGGACAAGCGGGTGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGT  
CCTGCCCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCCAAAGCCTAAGGACAC  
CCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACC  
CTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCT  
AGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCATCAGGA  
CTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCG  
AAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCT  
AGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCC  
CTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAACAAGACCACCC  
CCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCC  
CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA  
CACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA

图 31

## h151D-L1轻链的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 36)

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGCAA  
CATCGTGATGACCCAGTCCCCGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCACCATCA  
ACTGCAAGGCCTCCCAGAACGTGGGCACCAACGTGGACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAG  
TCCCCTAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCAACCGGTACACCGGCGTGCCCGATAGATTCTC  
CGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACAATCAGCTCTCTGCAGGCCGAGGACGTGG  
CCGTGTACGACTGCCTGCAGTACAAGTACAACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACAAAGGTG  
GAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTCCCACCTCCGACGAGCAGCT  
GAAGTCCGGCACAGCTTCCGTCTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCCCGCGAGGCCAAGG  
TGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAG  
GACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGA  
GAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGT  
CTTTCAACCGGGGCGAGTGC

图 32



## h151D-H4重链的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 34)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTGAAGT  
GCAGCTGGTGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTG  
CCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAACTACTACATGGCCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAG  
GGACTGGAATGGGTGGCCTCTATCGGCACCGTGGGCGGCAACACCTACTACCGGGATTCTGT  
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACGACTCCAAGTCCACCCTGTACCTGCAGATGAACT  
CCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGAGGACTACGGCGGCTTCCCT  
CATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTCTGCTTCCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTT  
TCCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGA  
AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG  
CACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTCTGTGACTGT  
GCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACA  
CCAAGGTGGACAAGCGGGTGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGT  
CCTGCCCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTCCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACAC  
CCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACC  
CTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCT  
AGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCATCAGGA  
CTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCG  
AAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCT  
AGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCC  
CTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCC  
CCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCC  
CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA  
CACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA

图 33

## h151D-L4轻链的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 38)

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGCAA  
CATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCTGCTTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCA  
ACTGCAAGGCCTCCCAGAACGTGGGCACCAACGTGGACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAG  
TCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCAACAGATACACGGCGTGCCCGACAGATTCTC  
CGGCTCTGGCTCTGGCACC GACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCGAGGACTTCG  
CCACCTACGACTGCCTGCAGTACAAGTACAACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACAAGGTG  
GAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCT  
GAAGTCCGGCACAGCTTCTGTCTGTGCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGCGAGGCCAAGG  
TGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAG  
GACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGA  
GAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGT  
CTTTCAACCGGGGCGAGTGC

图 34



## h198D-H3重链的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 40)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTGAAGT  
GCAGCTGGTGGGAATCCGGCGGAGGCCTCGTGAAGCCTTCCCAGACCCTGTCTCTGACCTGCA  
CCGTGTCCGGCTTCTCCCTGACCTCCTTCCACGTGTCATGGGTGCGACAGCCTCCAGGCAAG  
GGCCTGGAATGGATCGCCACCATCTCCTCTGGCGGCGGAACCTACTACAACCCAGCCTGAA  
GTCCAGAGTGACCATCTCCCGGGACACCTCCAAGAACCAGGTGTCCCTGAAGCTGTCCTCCG  
TGACCGCCGCTGATAACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAATCTCCGGCTGGGGCCACTACTAC  
GTGATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACAGTGTCTCTGCTTCCACCAAGGGCCC  
CTCCGTGTTTCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCT  
GCCTCGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACCTCTGGCGCTCTGACC  
AGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCAGCGT  
CGTGACTGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC  
CCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGAACCCAAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGT  
CCCCCTTGTCCTGCCCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCCAAAGCC  
CAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCC  
ACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG  
ACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT  
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTG  
CCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACA  
CTGCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACAAAAAATCAGGTGTCACTGACCTGTCTCGTGAAGGG  
CTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACA  
AGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACAGTG  
GACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCA  
CAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAA

图 35

## h198D-L4轻链的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 42)

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGCGA  
CATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCCGCTTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCA  
CCTGTCAGGCCTCCGAGGACATCTACTCCGGCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAG  
TCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCTGGATCTCTGCAGGACGGCGTGCCCTCTAGATTCTC  
CGGCTCTGGATCCGGCACCCACTACACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCG  
CTACCTACTTCTGTCAGCAAGGCCTGAAGTTCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTG  
GAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCT  
GAAGTCCGGCACAGCTTCTGTCTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCCCGCGAGGCCAAGG  
TGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAG  
GACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCTACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGA  
GAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGT  
CTTTCAACCGGGGCGAGTGC

图 36

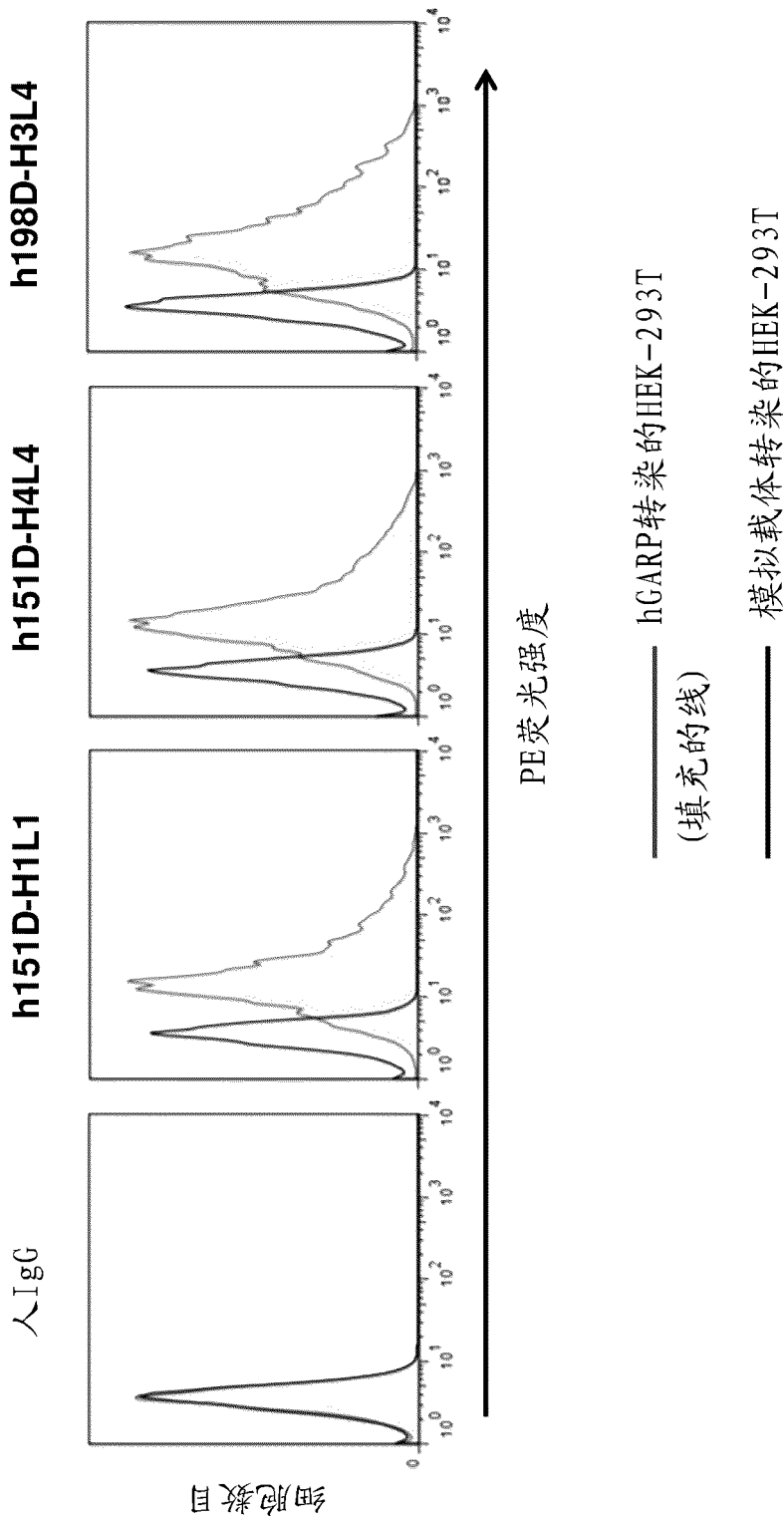


图 37

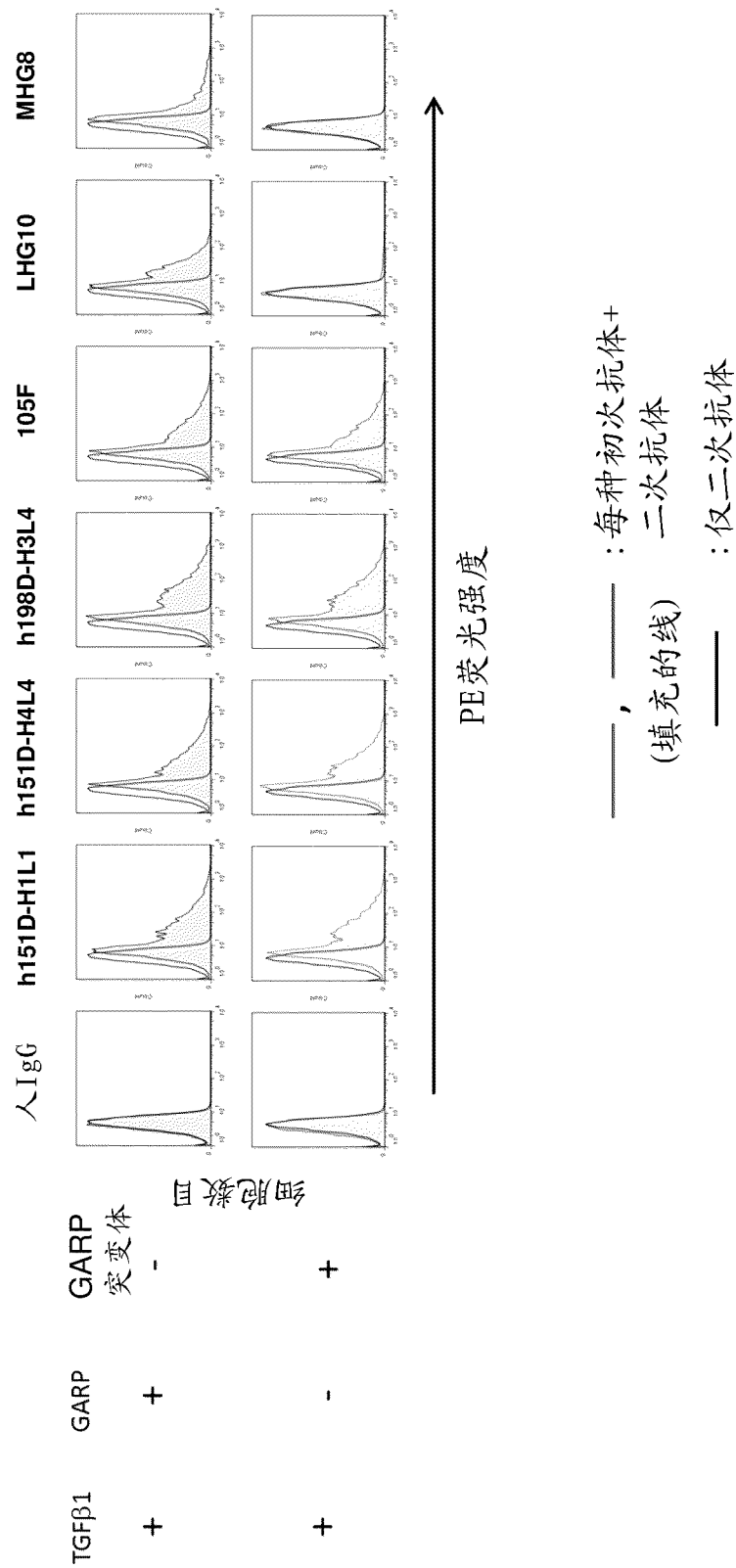


图 38

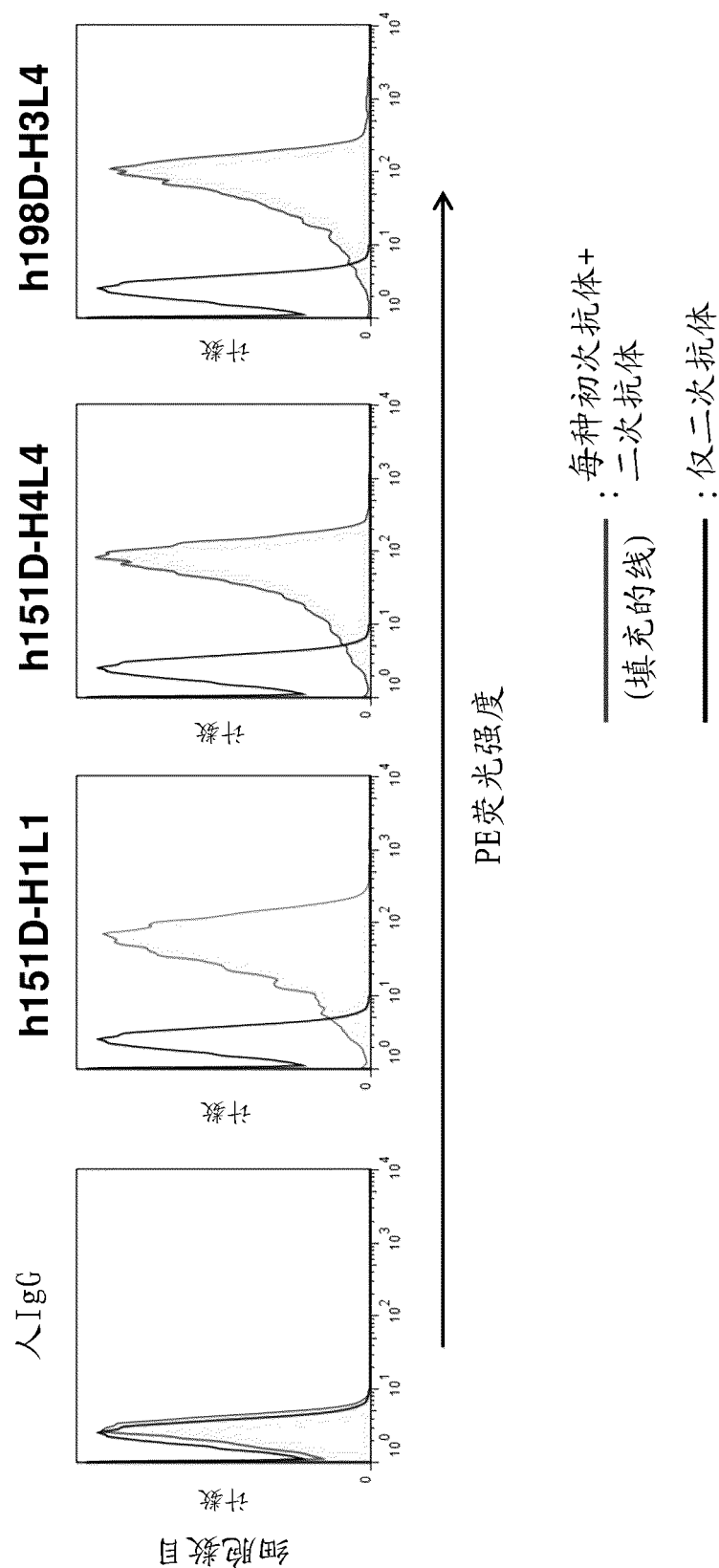


图 39

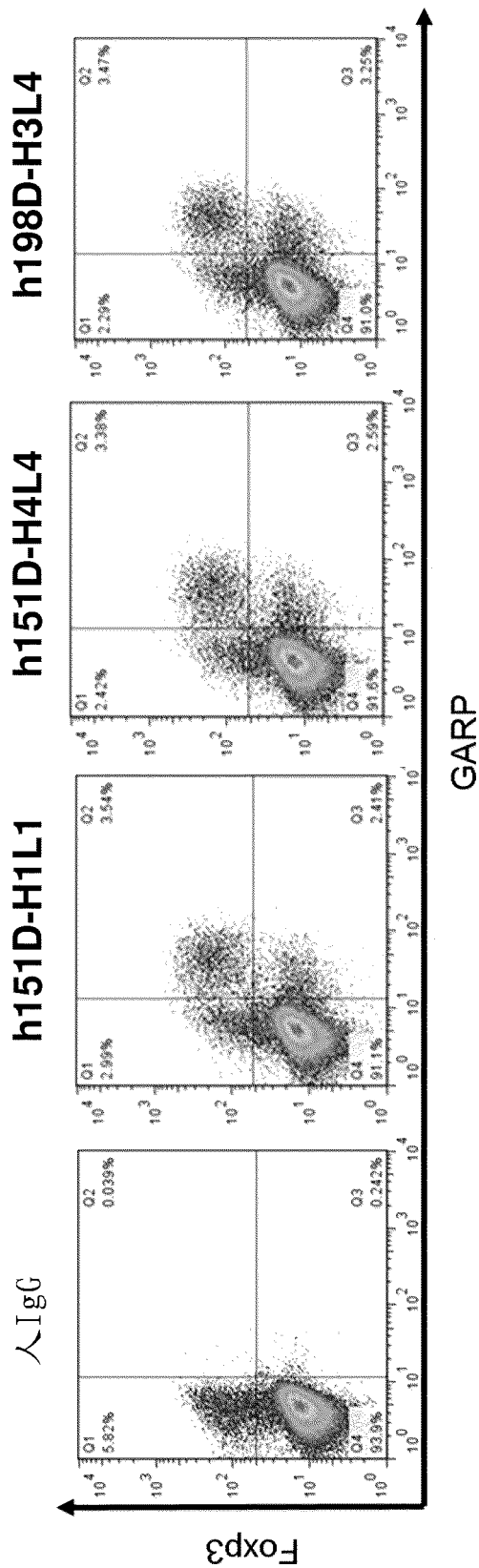


图 40

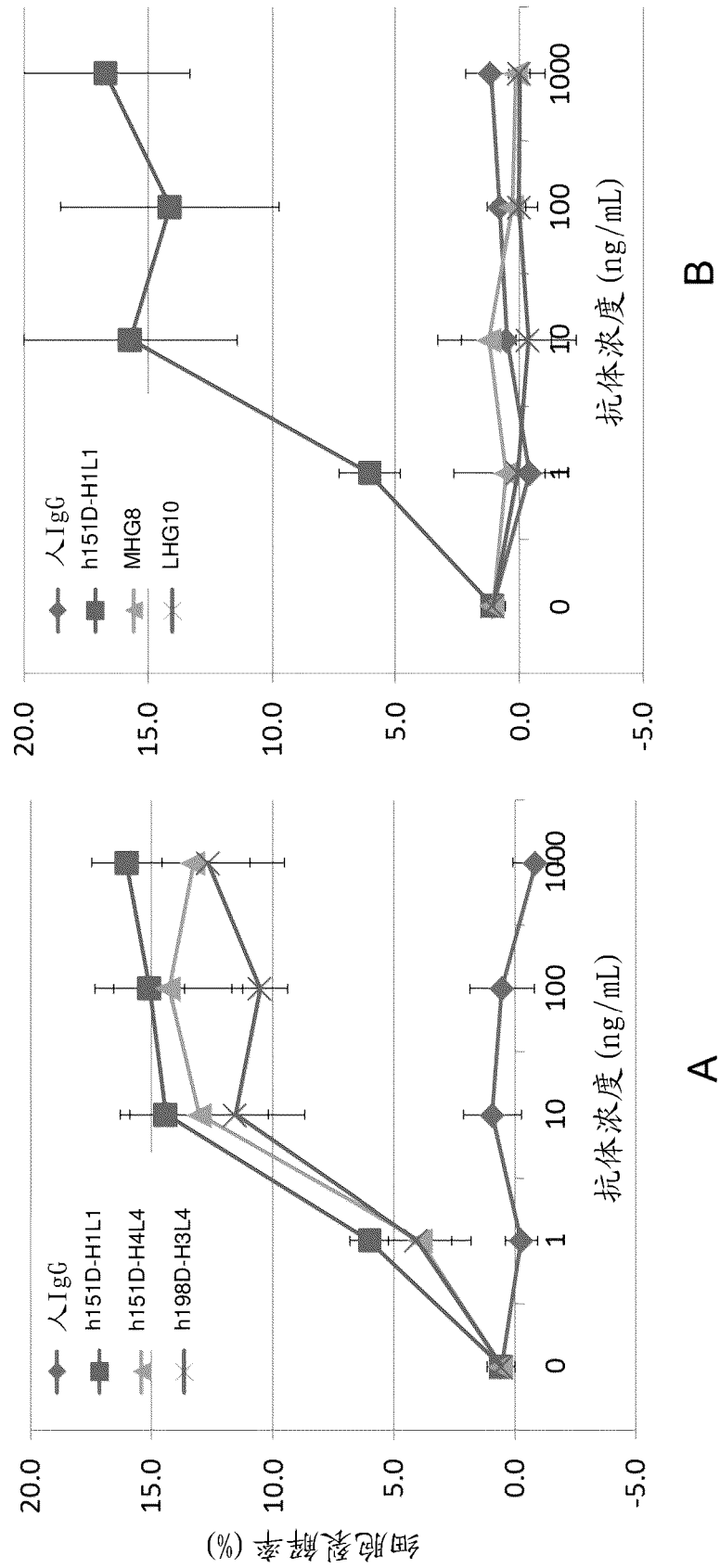


图 41

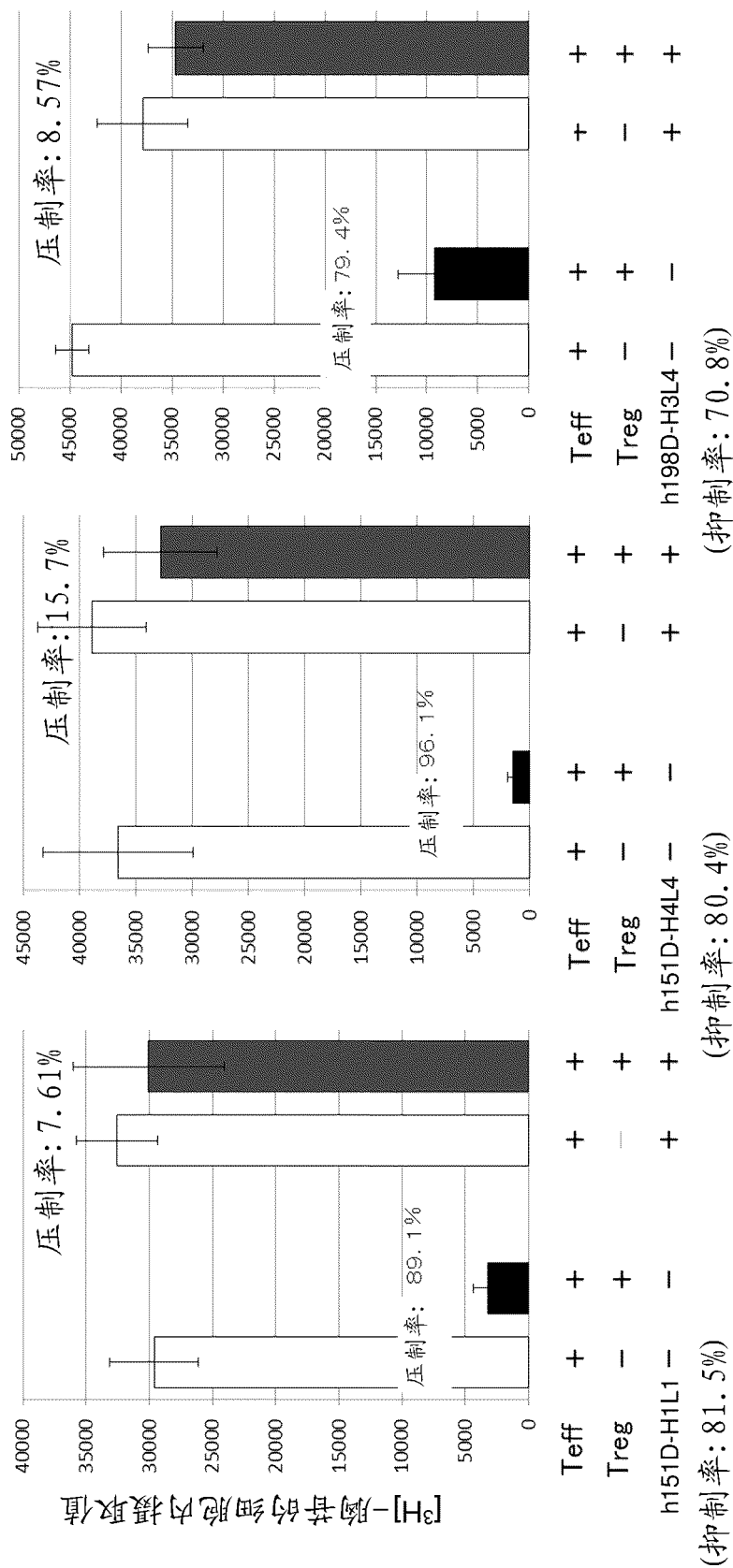


图 42



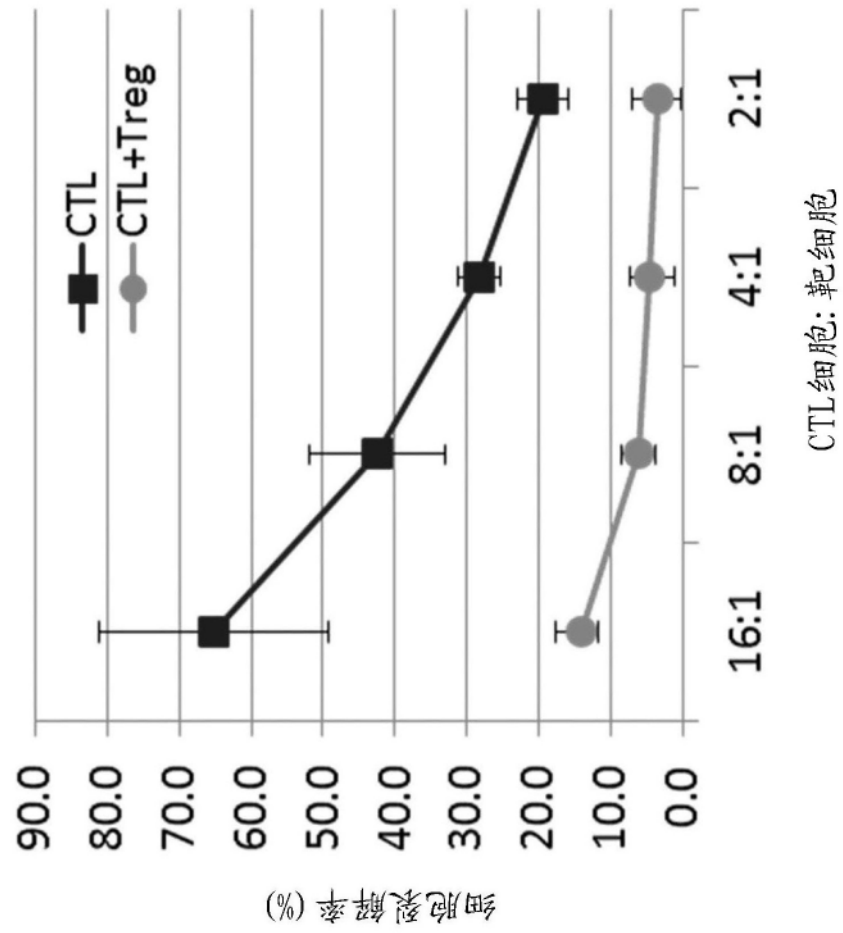


图 43

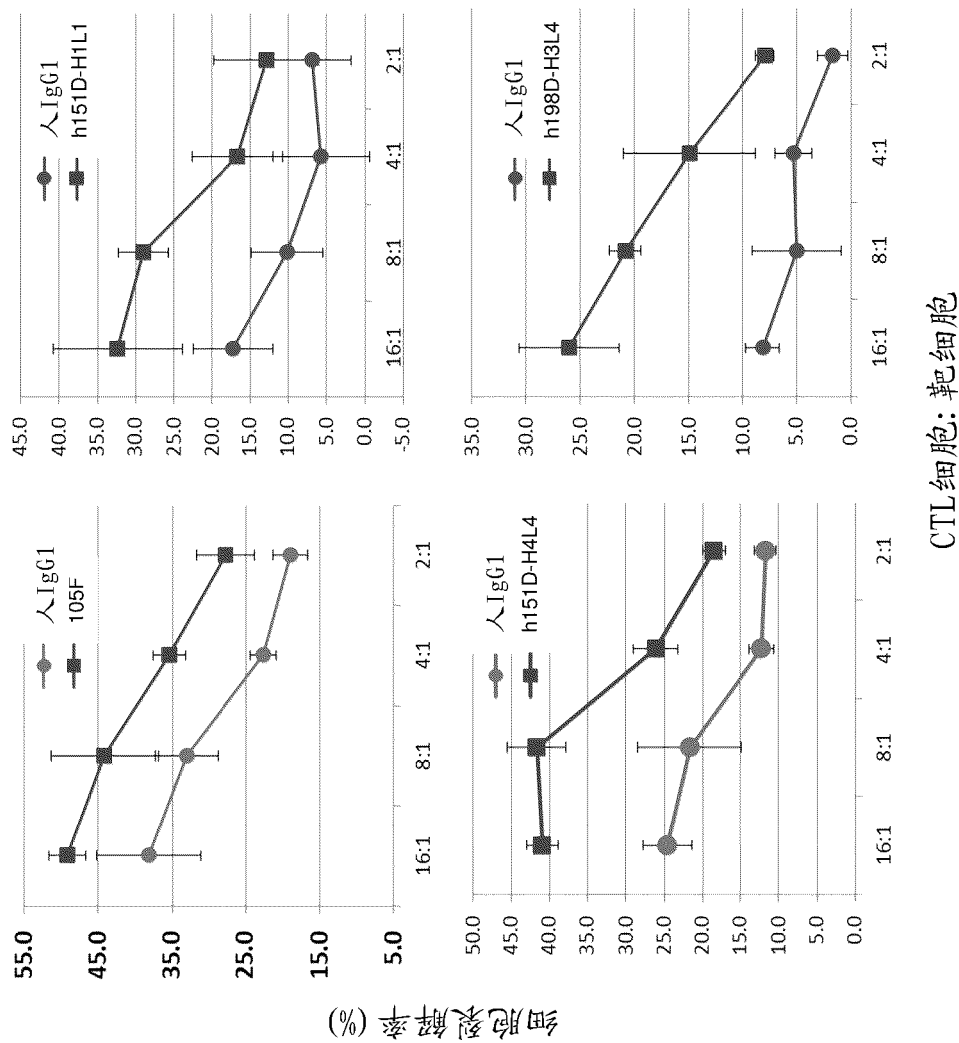


图 44

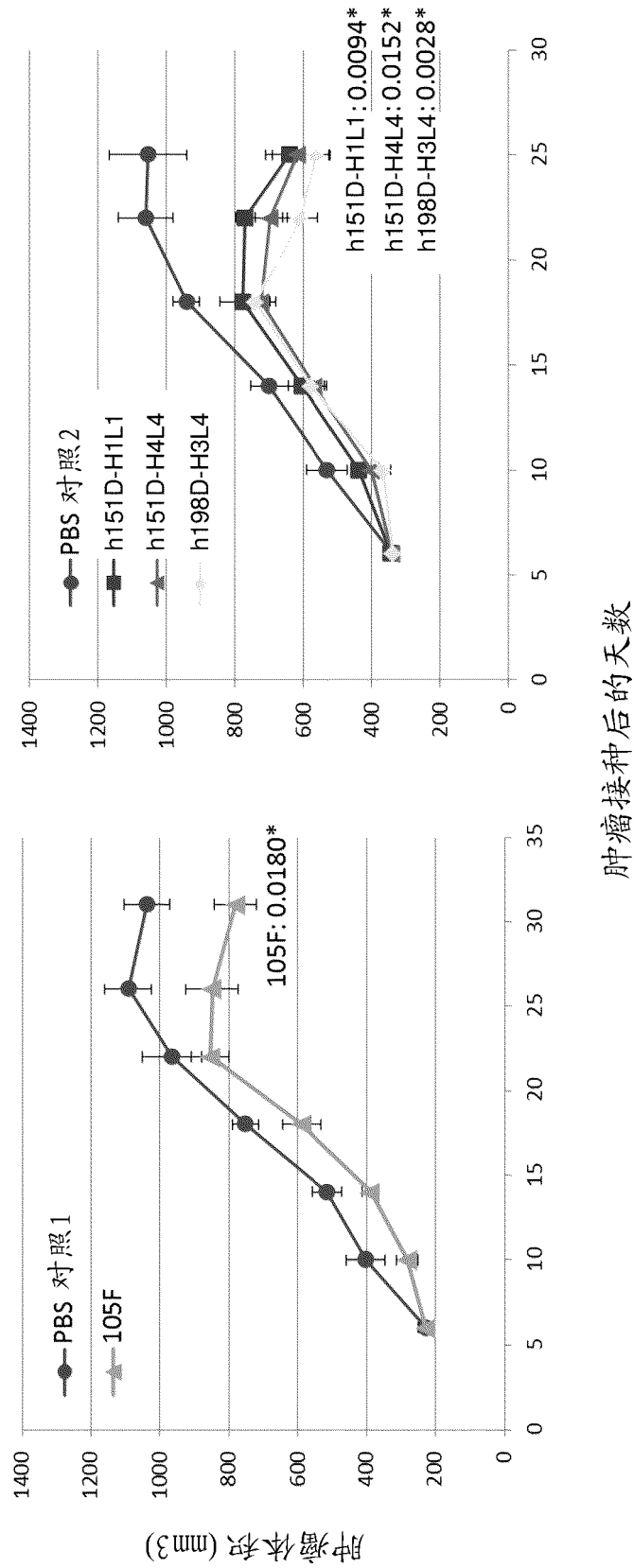


图 45