



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109071646 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201780023887.8

A·达塔 K·朗

(22)申请日 2017.03.10

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

(30)优先权数据

代理人 陈文平 徐志明

62/307,353 2016.03.11 US

62/443,615 2017.01.06 US

62/452,866 2017.01.31 US

(51)Int.Cl.

C07K 16/22(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.10.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/021972 2017.03.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/156500 EN 2017.09.14

(71)申请人 供石公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 T·舒尔普夫 G·J·卡文

权利要求书5页 说明书82页 附图33页

(54)发明名称

TGF β 1-结合免疫球蛋白及其用途

(57)摘要

本文公开了特异性地结合GARP-TGF β 1、LTBP1-TGF β 1、LTBP3-TGF β 1和/或LRRC33-TGF β 1复合物的免疫球蛋白,如抗体及其抗原结合部分。本申请还提供这些免疫球蛋白用于例如抑制TGF β 1活性和治疗患有TGF β 1-相关障碍如癌症和纤维化的受试者的使用方法。

1. 一种特异性地结合TGFβ1的表位的分离的抗体或其抗原结合部分,其中当所述TGFβ1存在于两种或更多种以下蛋白质复合物中时,所述表位可用于被所述抗体结合:

GARP-TGFβ1复合物,

LTBP1-TGFβ1复合物,

LTBP3-TGFβ1复合物,和

LRRC33-TGFβ1复合物;且

其中所述抗体不结合游离的成熟TGFβ1。

2. 如权利要求1所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述TGFβ1是潜伏TGFβ1。

3. 如权利要求1所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述TGFβ1是原TGFβ1。

4. 如权利要求1-3任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体不结合TGFβ2。

5. 如权利要求1-4任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分不结合TGFβ3。

6. 如权利要求1-5任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分不阻止TGFβ1结合整联蛋白的能力。

7. 如权利要求1-6任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的互补决定区3(CDR3),和该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR3。

8. 如权利要求1-7任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的互补决定区2(CDR2),和该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR2。

9. 如权利要求1-8任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含具有SEQ ID NO:1氨基酸序列的互补决定区1(CDR1),和该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1。

10. 如权利要求1-9任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含含有与SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的重链可变域和含有与SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的轻链可变域。

11. 如权利要求1-10任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含含有SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列的重链可变域和含有SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的轻链可变域。

12. 如权利要求1-6任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR3,和该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR3。

13. 如权利要求1-6和12任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR2,和该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2。

14. 如权利要求1-6、12和13任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含具有SEQ ID NO:2的氨基

酸序列的CDR1,和该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1。

15.如权利要求1-6和12-14任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含含有与SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的重链可变域和含有与SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的轻链可变域。

16.如权利要求1-6和12-15任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含含有SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的重链可变域和含有SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的轻链可变域。

17.如权利要求1-16任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分抑制TGFβ1激活。

18.如权利要求1-17任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分抑制成熟TGFβ1从GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的释放。

19.如权利要求1-18任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分具有选自以下的与TGFβ1的表位的解离常数(K_D):至少约 10^{-8} M、至少约 10^{-9} M、至少约 10^{-10} M、至少约 10^{-11} M、至少约 10^{-12} M和至少约 10^{-13} M。

20.如权利要求1-19任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含人IgG1恒定域或人IgG4恒定域的重链免疫球蛋白恒定域。

21.如权利要求1-20任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含人IgG4恒定域的重链免疫球蛋白恒定域。

22.如权利要求21所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含具有Ser至Pro的骨架置换的人IgG4恒定域的重链免疫球蛋白恒定域,该置换产生IgG1-样铰链并允许形成链间二链键。

23.如权利要求1-22任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分进一步包含含有人Igλ恒定域或人Igκ恒定域的轻链免疫球蛋白恒定域。

24.如权利要求1-23任一项所述的抗体,其中所述抗体是具有四条多肽链的IgG,该四条多肽链是两条重链和两条轻链。

25.如权利要求1-24任一项所述的抗体,其中所述抗体是人源化抗体、双链抗体或嵌合抗体。

26.如权利要求1-25任一项所述的抗体,其中所述抗体是人源化抗体。

27.如权利要求1-26任一项所述的抗体,其中所述抗体是人抗体。

28.如权利要求1-27任一项所述的抗体,其中所述抗体包含具有人种系氨基酸序列的框架。

29.如权利要求1-28任一项所述的抗原结合部分,其中所述抗原结合部分是Fab片段、F(ab')₂片段、scFab片段或scFv片段。

30.一种抗-TGFβ1抗体或其抗原结合部分,其与如权利要求1-29任一项所述的抗体或其抗原结合部分竞争结合。

31.一种抗-TGFβ1抗体或其抗原结合部分,其与如权利要求1-29任一项所述的抗体或

其抗原结合部分结合相同的表位。

32. 一种药物组合物, 其包含如权利要求1-31任一项所述的抗体或其抗原结合部分和药学上可接受的载体。

33. 一种用于抑制TGFβ1激活的方法, 该方法包括将GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物或LRRC33-TGFβ1复合物暴露于如权利要求1-31任一项所述的抗体或其抗原结合部分或者如权利要求32所述的药物组合物。

34. 如权利要求33所述的方法, 其中所述抗体或其抗原结合部分抑制成熟TGFβ1从所述GARP-TGFβ1复合物、所述LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或所述LRRC33-TGFβ1复合物的释放。

35. 如权利要求33或34所述的方法, 其中所述方法在体外进行。

36. 如权利要求33或34所述的方法, 其中所述方法在体内进行。

37. 如权利要求33-34任一项所述的方法, 其中所述GARP-TGFβ1复合物或所述LRRC33-TGFβ1复合物存在于细胞的外表面处。

38. 如权利要求37所述的方法, 其中所述细胞是T-细胞、成纤维细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、抗原呈递细胞或小胶质细胞。

39. 如权利要求33-36任一项所述的方法, 其中所述LTBP1-TGFβ1复合物或所述LTBP3-TGFβ1复合物被结合于细胞外基质。

40. 如权利要求39所述的方法, 其中所述细胞外基质包含原纤维蛋白。

41. 如权利要求39或40所述的方法, 其中所述细胞外基质包含含有RGD基序的蛋白质。

42. 一种用于减少受试者中的TGFβ1激活的方法, 该方法包括向所述受试者施用有效量的如权利要求1-31任一项所述的抗体或其抗原结合部分或者如权利要求32所述的药物组合物, 从而减少所述受试者中的TGFβ1激活。

43. 如权利要求42所述的方法, 其中所述受试者患有选自纤维化、肌营养不良、癌症、痴呆和骨髓纤维化的病症或者处于患该病症的风险中。

44. 如权利要求43所述的方法, 其中所述受试者患有肝纤维化、肾纤维化或肺纤维化(例如, 特发性肺纤维化)或者处于患该病症的风险中。

45. 如权利要求44所述的方法, 其中所述受试者还接受包括肌生长抑制素抑制剂、VEGF激动剂、IGF1激动剂、FXR激动剂、CCR2抑制剂、CCR5抑制剂、双重CCR2/CCR5抑制剂、赖氨酰氧化酶样-2抑制剂、ASK1抑制剂、乙酰-CoA羧化酶(ACC)抑制剂、p38激酶抑制剂、吡啡尼酮、尼达尼布、GDF11抑制剂或其任何组合的疗法。

46. 如权利要求42-45任一项所述的方法, 其中所述抗体或其抗原结合部分降低调节性T细胞的抑制性活性。

47. 如权利要求33-46任一项所述的方法, 其中所述抗体或其抗原结合部分在所述受试者中不诱导器官毒性。

48. 如权利要求47所述的方法, 其中所述器官毒性包括心血管毒性、胃肠毒性、免疫毒性、骨毒性、软骨毒性、生殖系统毒性或肾毒性。

49. 一种用于治疗需要的受试者的癌症的方法, 该方法包括向所述受试者施用有效量的如权利要求1-31任一项所述的抗体或其抗原结合部分或者如权利要求32所述的药物组合物, 从而治疗所述受试者的癌症。

50. 如权利要求49所述的方法, 其中所述抗体或其抗原结合部分与另外的药剂或另外的疗法结合施用。

51. 如权利要求49所述的方法, 其中所述另外的药剂是检查点抑制剂。

52. 如权利要求49所述的方法, 其中所述另外的药剂选自PD-1拮抗剂、PDL1拮抗剂、PD-L1或PDL2融合蛋白、CTLA4拮抗剂、GITR激动剂、抗-ICOS抗体、抗-ICOSL抗体、抗-B7H3抗体、抗-B7H4抗体、抗-TIM3抗体、抗-LAG3抗体、抗-OX40抗体、抗-CD27抗体、抗-CD70抗体、抗-CD47抗体、抗-41BB抗体、抗-PD-1抗体、溶瘤病毒和PARP抑制剂。

53. 如权利要求49所述的方法, 其中所述另外的疗法是放疗、化疗剂或其组合。

54. 一种核酸, 其编码如权利要求1-31任一项所述的抗体或其抗原结合部分。

55. 一种试剂盒, 其包含如权利要求1-31任一项所述的抗体或其抗原结合部分或者如权利要求32所述的药物组合物及其使用说明书。

56. 一种用于治疗肌纤维损伤的方法, 该方法包括以下步骤:

向具有肌纤维损伤的受试者施用相对于TGF β 2/3选择性地抑制TGF β 1的药剂, 该药剂的量使得有效地

- i) 促进肌纤维修复;
- ii) 保护免于收缩诱导的损伤;
- iii) 减少肌肉的炎症; 和/或
- iv) 减少肌肉的纤维化。

57. 如权利要求56所述的方法, 其中所述量在所述受试者中不引起不可接受水平的不良反应。

58. 如权利要求56或57所述的方法, 其中所述肌纤维损伤

- i) 与肌营养不良相关; 或
- ii) 与急性肌损伤相关。

59. 如权利要求56-58任一项所述的方法, 其中所述药剂阻断TGF β 1的激活, 但不阻断TGF β 2或TGF β 3的激活。

60. 如权利要求56-59任一项所述的方法, 其中所述药剂是单克隆抗体。

61. 如权利要求60所述的方法, 其中所述单克隆抗体结合GARP-proTGF β 1潜伏复合物、LRRC33-proTGF β 1潜伏复合物、LTBP1-proTGF β 1潜伏复合物、LTBP2-proTGF β 1潜伏复合物、LTBP3-proTGF β 1潜伏复合物和/或LTBP4-proTGF β 1潜伏复合物。

62. 如权利要求56-61任一项所述的方法, 其中所述受试者还接受肌生长抑制素抑制剂。

63. 如权利要求56-62任一项所述的方法, 还包括以下步骤:

鉴定疾病相关TGF β 1的来源或情境。

64. 一种用于产生调节TGF β 信号传导的药物组合物的方法, 该方法包括以下步骤:

提供调节TGF β 的至少一种亚型的信号传导的一种或多种药剂;

测量所述一种或多种药剂对所有TGF β 亚型的活性;

选择对于TGF β 的单一亚型特异性的药剂;

配制成包含亚型特异性的TGF β 调节剂和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

65. 如权利要求64所述的方法, 其中所述亚型特异性的TGF β 调节剂是TGF β 1-特异性调

节剂。

66. 如权利要求65所述的方法,其中所述TGFβ1-特异性调节剂是TGFβ1的抑制剂。

67. 如权利要求64所述的方法,其中所述亚型特异性的TGFβ调节剂是抗体或其片段。

68. 如权利要求67所述的方法,其中所述抗体或其片段特异性地结合TGFβ1的原/潜伏复合物。

69. 如权利要求68所述的方法,其中所述抗体或其片段不结合游离的成熟TGFβ1,该成熟TGFβ1不是在所述原/潜伏复合物中。

70. 如权利要求68所述的方法,其中所述原/潜伏复合物包含GARP、LRRC33、LTBP1、LTBP2、LTBP3或LTBP4。

71. 一种通过权利要求64的方法产生的药物组合物。

72. 一种用于治疗与TGFβ信号传导相关的疾病的方法,该方法包括以下步骤:

以有效治疗该疾病的量向需要的受试者施用权利要求71的药物组合物,其中所述量使得在施用于患有所述疾病的患者群体时获得统计学显著的临床疗效和安全性。

73. 一种用于降低受试者中的不良反应的用途的TGFβ抑制剂,其中所述TGFβ抑制剂是亚型选择性的。

74. 如权利要求73所述的用途,其中所述TGFβ抑制剂是特异性地抑制TGFβ1的抗体。

TGF β 1-结合免疫球蛋白及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2016年3月11日提交的U.S.临时申请No.62/307,353、2017年1月6日提交的U.S.临时申请No.62/443,615和2017年1月31日提交的U.S.临时申请No.62/452,866的优先权,其各自的全部内容明确地通过引用全文并入本文中。

背景技术

[0003] 生长因子的转化生长因子 β (TGF β) 超家族是参与调节多样的生物过程(包括,但不限于:细胞生长的抑制、组织内稳态、细胞外基质 (ECM) 重塑、内皮-间充质转化 (EMT)、细胞迁移和侵入及免疫调节/抑制,以及间充质-上皮转化)的多种信号传导级联。与ECM重塑相关,TGF β 信号传导可以增加成纤维细胞群体和ECM沉积(例如,胶原蛋白)。在免疫系统中,TGF β 配体调节调节性T细胞的功能及免疫前体细胞生长和动态平衡的维持。在正常上皮细胞中,TGF β 是强效生长抑制剂和细胞分化的促进剂。但是,随着肿瘤发生和进展,它们通常丧失对TGF β 的负向生长反应。在这种情况下,TGF β 可以由于其刺激血管生成、改变基质环境及诱导局部和系统性的免疫抑制的能力而变成肿瘤发展的促进剂。出于这些和其它原因,TGF β 已经成为多种临床适应症的治疗靶标。尽管直到目前为止已经由多个小组进行了大量的工作,TGF β 治疗剂的临床开发一直是挑战性的。

[0004] 来自临床前研究(包括大鼠和狗)的观察已经揭示了与TGF β 的体内抑制相关的某些毒性。此外,虽然到目前为止已经开发了几种TGF β 抑制剂,但大多数靶向TGF β 的临床项目已经由于副作用而中断。

[0005] 例如,Anderton等(*Toxicology Pathology*,39:916-24,2011)报告,I型TGF β (ALK5) 受体的小分子抑制剂在临床前动物模型中诱导心脏瓣膜病变,其特征出血、炎症、瓣膜间质细胞的变性和增殖。毒性在所有测试的剂量下在所有心脏瓣膜中观察到。Frazier等(*Toxicology Pathology*,35:284-295,2007)报告,I型TGF β (ALK5) 受体的小分子抑制剂GW788388在大鼠中诱导生长板发育不良 (physeal dysplasia)。

[0006] Stauber等(*J.Clin.Practice* 4:3,2014)报告,长期(≥ 3 个月)施用TGF β 受体I激酶的抑制剂LY2157299(其正在研究用于某些癌症的治疗)在大鼠和狗中引起涉及心血管、胃肠、免疫、骨/软骨、生殖和肾系统的多器官毒性。

[0007] Fresolimumab (GC1008),一种能够中和TGF β 的所有亚型的“泛”TGF β 抗体,已经报告在食蟹猴的研究中,多次施用后诱导牙龈、膀胱和鼻甲上皮的上皮增生(Lonning等,*Current Pharmaceutical Biotechnology* 12:2176-89,2011)。类似地,在临床试验中报告了在多个剂量的药物施用后的多种皮疹/病变、牙龈出血和疲劳。fresolimumab的最值得注意的不良反应包括在人类癌症患者中皮肤角质棘皮瘤和/或鳞状细胞癌的诱导(参见,例如,Lacouture等,2015,*Cancer Immunol Immunother*,64:437-46;Stevenson等,2013,*OncoImmunology*,2:8,e26218;和Lonning等,2011)。来自临床试验的另外的证据表明,在一些情况中,这一抗体可以加速肿瘤进展(Stevenson等,2013,*OncoImmunology*,2:8,e26218)。

[0008] 因此,用于调节TGF β 信号传导的新方法和组合物是需要的,其可以用于有效地和安全地治疗涉及TGF β 的疾病和障碍,包括,例如,癌症、纤维化和炎症。

发明内容

[0009] 本公开涉及TGF β 效应的亚集的选择性调节。本发明至少部分地基于迄今为止已知的TGF β 拮抗剂缺乏亚型特异性可能是与TGF β 抑制相关的毒性来源的基础的认识。事实上,本公开的发明人已经发现,迄今为止描述的大多数TGF β 抑制剂拮抗多种或所有的TGF β 亚型。此外,本领域中描述的一般趋势是拮抗多种TGF β 亚型的抑制剂(如抗-TGF β 抗体)是有利的,因为多种TGF β 亚型的中和对于获得“最大疗效”是必要的或有利的(参见,例如, Bedinger等(2016) MABS 8(2):389-404)。

[0010] 与这种一般教导相反,本公开的发明人反而试图开发能够实现TGF β 1的亚型特异性的抑制(与也影响TGF β 2和/或TGF β 3的抑制相反的)的药剂,目的在于消除或明显地降低已知TGF β 拮抗剂在体内观察到的毒性(例如,不良事件、副作用)。这一新型途径至少部分地基于TGF β 抑制剂的临床应用不仅可能依赖于其功效,而且依赖于其安全性的认识。合理的是,以前所未有的特异性水平细调靶标的能力可以在临床环境中同时实现功效和安全性/耐受性。

[0011] 因此,本发明包括以亚型特异性的方式抑制TGF β 信号传导的药物剂可以相对于影响多种TGF β 亚型的药剂提供改进的安全性特征的认识。与之相反,本领域中多种已知的TGF β 拮抗剂在体内显示为有效的剂量下产生不可接受水平的毒性。在这样的情况中,较低剂量可以用于避免毒性,但其在降低的剂量下可能不再产生足够的体内效力。不希望局限于特定理论,设想的是这样的毒性至少部分地源于该药剂缺乏亚型特异性/选择性。

[0012] 因此,在一个方面,本发明提供用于降低受试者中与TGF β 抑制相关的毒性(例如,不良事件、不希望的副作用)的方法。根据本发明,TGF β 1-特异性抑制剂(如本文中所述的那些)与诱发针对较宽靶标(例如,超过一种TGF β 亚型)的活性的药剂相比具有优异的安全性-功效特征。这样的TGF β 1-特异性抑制剂因此可以以治疗有效的剂量施用于需要的受试者而不引起不良反应。这种途径因此扩展了其中可以在患者中同时实现疗效和安全性/耐受性两者的剂量范围。因此,本发明提供通过向受试者施用有效量的对于TGF β 1亚型特异性的或高度选择性的TGF β 抑制剂而治疗与TGF β 1信号传导相关的疾病的方法。在一些实施方式中,这样的TGF β 1亚型选择性的或TGF β 1亚型-特异性的抑制剂可以是小分子药剂或生物制剂(例如,抗体)。用于在受试者中降低与TGF β 抑制相关的毒性(例如,不良事件或副作用)的任何这种抑制剂的使用被本发明涵盖。根据本发明,有效量在能够实现以下两者的剂量范围内:i) 功效(例如,治疗有益的效果);和ii) 安全性(例如,在可接受的不良反应或副作用水平内)。在一些实施方式中,不良反应可以包括心血管毒性、胃肠毒性、免疫毒性、骨/软骨毒性、生殖毒性和肾毒性。在一些实施方式中,心血管毒性包括,但不限于:心脏瓣膜病变,例如,出血、炎症、瓣膜间质细胞的变性和增殖。在一些实施方式中,不良反应可以包括渗血。在一些实施方式中,不良反应可以包括皮肤病变或肿瘤。在一些实施方式中,不良反应可以包括肿瘤进展。

[0013] 因此,在一些实施方式中,本发明提供亚型-特异性的TGF β 1抑制剂抗体或其抗原结合片段,特征在于它们选择性地抑制体内TGF β 1激活的步骤,但不抑制TGF β 2和/或TGF β 3

激活的步骤。这样的抗体或其片段可以以有效实现临床疗效而不引起不可接受或不可耐受水平的不良反应的量施用于受益于TGF β 1抑制的受试者。因此,本发明教导,特别地选择TGF β 1亚型-特异性的抑制剂以满足用于治疗人类受试者中与TGF β 信号传导相关的疾病或病症的功效和安全性标准两者。

[0014] 在相关的方面,本发明提供具有改善的安全性特征(例如,降低的体内毒性)的亚型-特异性的TGF β 调节剂的生产方法。这样的方法需要针对亚型特异性测试和选择候选药剂。在一些实施方式中,候选药剂对于针对TGF β 1信号传导而不针对TGF β 2和/或TGF β 3信号传导的特异性活性进行选择。在一些实施方式中,这样的药剂是TGF β 1亚型-特异性的抑制剂。在一些实施方式中,这样的药剂是特异性地结合和阻断TGF β 1而非TGF β 2和/或TGF β 3的激活的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,这样的抗体或其抗原结合片段不结合未与原/潜伏复合物结合的游离的成熟TGF β 1生长因子。

[0015] 在另一方面,本发明提供通过以情境依赖性(context-dependent)的方式调节TGF β 激活而实现TGF β 信号传导的进一步细调的组合物和相关方法。

[0016] TGF β 参与赋予多种细胞/组织效应,且每种这样的效应部分地通过其与所谓的“呈递分子”的相互作用介导。因为各种呈递分子的表达是细胞类型-或组织-特异性的,预想TGF β 根据其特定呈递分子的相互作用(即,“情境”)而赋予细胞效应。因此,特别地,本公开提供了选择性地结合特定情境(即,包含TGF β 和呈递分子的复合物)中存在的TGF β 的单克隆抗体。在一些实施方式中,这样的单克隆抗体特异性地结合至少一种、至少两种或至少三种以下复合物:i) TGF β 1-GARP; ii) TGF β 1-LRRC33; iii) TGF β 1-LTBP1; 和iv) TGF β 1-LTBP3。在一些实施方式中,这样的单克隆抗体特异性地结合以下复合物之一:i) TGF β 1-GARP; ii) TGF β 1-LRRC33; iii) TGF β 1-LTBP1; 和iv) TGF β 1-LTBP3。在一些实施方式中,这样的单克隆抗体特异性地结合以下复合物中的两种:i) TGF β 1-GARP; ii) TGF β 1-LRRC33; iii) TGF β 1-LTBP1; 和iv) TGF β 1-LTBP3。在一些实施方式中,这样的单克隆抗体特异性地结合以下复合物中的三种:i) TGF β 1-GARP; ii) TGF β 1-LRRC33; iii) TGF β 1-LTBP1; 和iv) TGF β 1-LTBP3。在一些实施方式中,这样的单克隆抗体特异性地结合所有以下复合物:i) TGF β 1-GARP; ii) TGF β 1-LRRC33; iii) TGF β 1-LTBP1; 和iv) TGF β 1-LTBP3。在一些实施方式中,这样的单克隆抗体不结合成熟TGF β 1,其为游离的TGF β 1(例如,未与呈递分子复合)。

[0017] 本公开包括结合TGF β 1的小潜伏复合物(例如,“C4S”)的单克隆抗体。

[0018] 本公开进一步提供选择性地靶标和调节特定情境中的TGF β 的单克隆抗体。在一些实施方式中,这样的单克隆抗体抑制或激活特定情境中的TGF β 。

[0019] 因此,本发明提供用于调节(激活或抑制)TGF β 活性的亚集的组合物和方法。因此,本发明包括可以选择性地调节TGF β -介导的信号传导途径的亚组而不影响其它TGF β -介导的信号传导途径的单克隆抗体。在一些实施方式中,TGF β -介导的信号传导途径的亚组包括以下的至少一种、至少两种或至少三种:i) GARP-介导的TGF β 效应, ii) LRRC33-介导的TGF β 效应, iii) LTBP1-介导的TGF β 效应和iv) LTBP3-介导的TGF β 效应。在一些实施方式中,这样的单克隆抗体特异性地调节以下TGF β -介导的信号传导途径之一而不调节其它三种途径:i) GARP-介导的TGF β 效应, ii) LRRC33-介导的TGF β 效应, iii) LTBP1-介导的TGF β 效应和iv) LTBP3-介导的TGF β 效应。在一些实施方式中,这样的单克隆抗体特异性地调节以下TGF β -介导的信号传导途径中的两种而不调节其它两种途径:i) GARP-介导的TGF β 效应, ii) LRRC33-

介导的TGFβ效应,iii)LTBP1-介导的TGFβ效应和iv)LTBP3-介导的TGFβ效应。在一些实施方式中,这样的单克隆抗体特异性地调节以下TGFβ-介导的信号传导途径中的三种而不调节其它一种途径:i)GARP-介导的TGFβ效应,ii)LRRC33-介导的TGFβ效应,iii)LTBP1-介导的TGFβ效应和iv)LTBP3-介导的TGFβ效应。在一些实施方式中,这样的单克隆抗体特异性地调节所有以下TGFβ-介导的信号传导途径:i)GARP-介导的TGFβ效应,ii)LRRC33-介导的TGFβ效应,iii)LTBP1-介导的TGFβ效应和iv)LTBP3-介导的TGFβ效应。在一些实施方式中,这样的单克隆抗体特异性地调节GARP-介导的TGFβ效应。在一些实施方式中,这样的单克隆抗体特异性地调节LRRC33-介导的TGFβ效应。在一些实施方式中,这样的单克隆抗体特异性地调节LTBP1-介导的TGFβ效应。在一些实施方式中,这样的单克隆抗体特异性地调节LTBP3-介导的TGFβ效应。因此,本发明提供用于以情境依赖性的方式选择性地靶向TGFβ活性的方法。

[0020] 本发明的方面包括用于治疗人类受试者的疾病或障碍的药物组合物和方法。在一些实施方式中,这种疾病或障碍包括与免疫调节/功能障碍相关的病症、与T细胞调节/功能障碍相关的病症、与纤维化特征(纤维化)相关的病症和/或与肿瘤相关的病症。

[0021] 因为本文所述的特异性地靶向TGFβ的原/潜伏复合物的抗体或其片段调节激活步骤(即,游离的成熟TGFβ生长因子从非活性的潜伏预形成复合物的释放)(与靶向早已释放的、游离的、成熟生长因子相反),这些调节性药剂的作用模式取决于组织中TGFβ生长因子的来源。因此设想的是,涉及到疾病背景的TGFβ来源的鉴别可以帮助选择可有效地调节在适当情境中的TGFβ的药剂。例如,为治疗涉及GARP-介导的TGFβ1效应的疾病表型,希望的是选择特异性地靶向GARP-proTGFβ1复合物的抗体或其片段。为治疗涉及LRRC33-介导的TGFβ1效应的疾病表型,希望的是选择特异性地靶向LRRC33-proTGFβ1复合物的抗体或其片段。为治疗涉及LTBP1-介导的TGFβ1效应的疾病表型,希望的是选择特异性地靶向LTBP1-proTGFβ1复合物的抗体或其片段。为治疗涉及LTBP2-介导的TGFβ1效应的疾病表型,希望的是选择特异性地靶向LTBP2-proTGFβ1复合物的抗体或其片段。为治疗涉及LTBP3-介导的TGFβ1效应的疾病表型,希望的是选择特异性地靶向LTBP3-proTGFβ1复合物的抗体或其片段。为治疗涉及LTBP4-介导的TGFβ1效应的疾病表型,希望的是选择特异性地靶向LTBP4-proTGFβ1复合物的抗体或其片段。为治疗涉及通过多种(例如,两种或更多种)情境介导的TGFβ1效应的疾病表型,希望的是选择可以靶向相应的多种TGFβ1呈递的情境的抗体或其片段。

[0022] 某些疾病与TGFβ信号传导的多种生物学作用相关,其不限于TGFβ功能的单一情境。在这样的情况中,可能有益的是调节跨多种情境的TGFβ效应。因此,在一些实施方式中,本发明提供用于以亚型-特异性的方式而不是情境-特异性的方式靶向和调节TGFβ1的方法。这样的药剂可以称为“亚型特异性的,情境许可的”TGFβ1调节剂。在一些实施方式中,情境许可的TGFβ1调节剂靶向多种情境(例如,多种类型的原/潜伏TGFβ1复合物)。在一些实施方式中,情境许可的TGFβ1调节剂靶向所有类型的原/潜伏TGFβ1复合物(例如,GARP-相关的、LRRC33-相关的、LTBP-相关的,等)以致涵盖所有情境。

[0023] 尽管情境许可的TGFβ1调节剂能够靶向超过一种类型的原/潜伏TGFβ1复合物(即,与不同的呈递分子的复合物),但在一些实施方式中,这样的调节剂可以相对于其它情境有利于一种或多种情境。因此,在一些实施方式中,抑制TGFβ1激活的情境许可的抗体可以相对于一种呈递分子优先地抑制通过另一呈递分子介导的TGFβ1激活,即使这种抗体能够结

合两种类型的原/潜伏复合物。在一些实施方式中,这种抗体是结合和抑制LTBP-相关的TGF β 1、GARP-相关的TGF β 1和LRRC33-相关的TGF β 1的激活,但具有对于LTBP-相关的TGF β 1的优先抑制性活性的单克隆抗体。在一些实施方式中,这种抗体是结合和抑制LTBP1-相关的TGF β 1、LTBP3-相关的TGF β 1、GARP-相关的TGF β 1和LRRC33-相关的TGF β 1的激活,但具有对于LTBP1-和LTBP-3-相关的TGF β 1的优先抑制性活性的单克隆抗体。在一些实施方式中,这种抗体是结合和抑制LTBP1-相关的TGF β 1、LTBP3-相关的TGF β 1、GARP-相关的TGF β 1和LRRC33-相关的TGF β 1的激活,但具有对于GARP-相关的TGF β 1和LRRC33-相关的TGF β 1的优先抑制性活性的单克隆抗体。在一些实施方式中,这种抗体是结合和抑制GARP-相关的TGF β 1和LRRC33-相关的TGF β 1的激活,但具有对于GARP-相关的TGF β 1的优先抑制性活性的单克隆抗体。在一些实施方式中,这种抗体是结合和抑制GARP-相关的TGF β 1和LRRC33-相关的TGF β 1的激活,但具有对于LRRC33-相关的TGF β 1的优先抑制性活性的单克隆抗体。

[0024] 因此,根据本发明,可以产生不同的选择性水平以靶向TGF β 效应的亚组。TGF β 的亚型-特异性的调节剂(其靶向单一TGF β 亚型)提供比泛-TGF β 调节剂(其靶向多种或所有TGF β 亚型)更高的选择性。TGF β 的亚型特异性的、情境许可的调节剂(其靶向单一TGF β 亚型的多种情境)提供比亚型-特异性的调节剂更高的选择性。TGF β 的亚型特异性的、情境特异性的(其靶向单一TGF β 亚型的单一情境)提供比亚型特异性的、情境许可的调节剂甚至更高的选择性。

[0025] 因此,在一些实施方式中,本发明包括用于治疗与TGF β 信号传导相关的疾病的方法,其包括首先鉴定和确认疾病-相关的TGF β 的来源和/或情境,然后选择特异性地靶向组织中的特定TGF β 子池(sub-pool)的药剂。以这种方式,设想的是这种方法可以保持TGF β 的正常功能而同时优先调节疾病-相关的TGF β 功能。在一些实施方式中,为鉴定疾病-相关的TGF β 的来源/情境,可以评价患病组织中存在的TGF β 呈递分子的表达。仅举例来说,在疾病组织内,可能存在LTBP-相关的TGF β 1潜伏复合物和GARP-相关的TGF β 1复合物两者,且仅这两者中的后者可以作为疾病表型表达。在该场景中,希望的是抑制GARP-介导的TGF β 1信号传导而同时维持LTBP-介导的TGF β 1信号传导完整。疾病-相关的TGF β 1的来源/情境的确定可以利用特异性地结合包括特定呈递分子(例如,GARP、LRRC33、LTBPs等)的TGF β 1潜伏复合物的抗体进行。为治疗与T细胞调节/功能障碍相关的病症,本发明的一些实施方式包括施用包含有效量的调节受试者中的GARP-介导的TGF β 效应的单克隆抗体的组合物。

[0026] 为治疗与免疫调节/功能障碍相关的病症,本发明的一些实施方式包括施用包含有效量的调节受试者中的GARP-介导的TGF β 效应和/或LRRC33-介导的TGF β 效应的单克隆抗体的组合物。

[0027] 为治疗与纤维化相关的病症,本发明的一些实施方式包括施用包含有效量的调节受试者中的LTBP1-介导的TGF β 效应和/或LTBP3-介导的TGF β 效应的单克隆抗体的组合物。

[0028] 为治疗与某些类型的癌症相关的病症,本发明的一些实施方式包括施用包含有效量的调节受试者中的GARP-介导的TGF β 效应、LTBP1-介导的TGF β 效应和/或LTBP3-介导的TGF β 效应的单克隆抗体的组合物。

[0029] 本公开的方面涉及特异性地结合GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物的免疫球蛋白,如抗体或其抗原结合部分。本文所述的抗体或其抗原结合部分特异性地结合在TGF β 1存在于GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1

复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1中时可由该抗体或其抗原结合部分结合的TGFβ1的表位。

[0030] 在一个方面,本文提供了特异性地结合TGFβ1的表位的分离的抗体或其抗原结合部分,其中当TGFβ1存在于以下两种或更多种蛋白质复合物中时:GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和LRRC33-TGFβ1复合物,该表位可由该抗体结合;且其中该抗体不结合游离的成熟TGFβ1。

[0031] 在一些实施方式中,TGFβ1是潜伏TGFβ1。在一些实施方式中,TGFβ1是原TGFβ1(proTGFβ1)。

[0032] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分不结合TGFβ2。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分不结合TGFβ3。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分不阻止TGFβ1结合整联蛋白的能力。

[0033] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的互补决定区3(CDR3),且该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的互补决定区2(CDR2),且该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR2。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的互补决定区1(CDR1),且该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1。

[0034] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含含有与SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的重链可变域和含有与SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的轻链可变域。

[0035] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含含有SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列的重链可变域和含有SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的轻链可变域。

[0036] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR3,和该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR2,和该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR1,和该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1。

[0037] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含含有与SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的重链可变域和含有与SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的轻链可变域。

[0038] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含含有SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的重链可变域和含有SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的轻链可变域。

[0039] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分抑制TGFβ1激活。

[0040] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分抑制成熟TGF β 1从GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物或LRRC33-TGF β 1复合物的释放。

[0041] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分具有选自以下的与TGF β 1的表位的解离常数(K_D):至少约10⁻⁸M、至少约10⁻⁹M、至少约10⁻¹⁰M、至少约10⁻¹¹M、至少约10⁻¹²M和至少约10⁻¹³M。

[0042] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含人IgM恒定域、人IgG恒定域、人IgG1恒定域、人IgG2恒定域、人IgG2A恒定域、人IgG2B恒定域、人IgG2恒定域、人IgG3恒定域、人IgG3恒定域、人IgG4恒定域、人IgA恒定域、人IgA1恒定域、人IgA2恒定域、人IgD恒定域或人IgE恒定域的重链免疫球蛋白恒定域。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含人IgG1恒定域或人IgG4恒定域的重链免疫球蛋白恒定域。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含人IgG4恒定域的重链免疫球蛋白恒定域。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含具有Ser至Pro的骨架置换的人IgG4恒定域的重链免疫球蛋白恒定域,该置换产生IgG1-样铰链并允许形成链间二链键。

[0043] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分进一步包含含有人Ig λ 恒定域或人Ig κ 恒定域的轻链免疫球蛋白恒定域。

[0044] 在一些实施方式中,抗体是具有四条多肽链的IgG,该四条多肽链是两条重链和两条轻链。

[0045] 在一些实施方式中,其中抗体是人源化抗体、双链抗体或嵌合抗体。在一些实施方式中,抗体是人源化抗体。在一些实施方式中,抗体是人抗体。在一些实施方式中,抗体包含具有人种系氨基酸序列的框架。

[0046] 在一些实施方式中,抗原结合部分是Fab片段、F(ab')₂片段、scFab片段或scFv片段。

[0047] 在一个方面,本文提供了抗-TGF β 1抗体或其抗原结合部分,其与如本文所述的抗体或其抗原结合部分竞争结合。

[0048] 在另一方面,本文提供了抗-TGF β 1抗体或其抗原结合部分,其与如本文所述的抗体或其抗原结合部分结合相同的表位。

[0049] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分与药物或可检测的部分缀合。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分通过接头与药物或可检测的部分缀合。在一些实施方式中,接头是可切割的接头。在一些实施方式中,可检测的部分选自荧光剂、发光剂、酶学剂和放射活性剂。

[0050] 在一个方面,本文提供了包含如本文所述的抗体或其抗原结合部分和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0051] 在另一方面,本文提供了用于抑制TGF β 1激活的方法,该方法包括将GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物或LRRC33-TGF β 1复合物暴露于本文所述的抗体、其抗原结合部分或药物组合物。

[0052] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分抑制成熟TGF β 1从GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物或LRRC33-TGF β 1复合物的释放。

[0053] 在一些实施方式中,该方法在体外进行。在一些实施方式中,该方法在体内进行。

[0054] 在一些实施方式中,GARP-TGF β 1复合物或LRRC33-TGF β 1复合物存在于细胞的外表

面处。

[0055] 在一些实施方式中,细胞是T-细胞、成纤维细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、抗原呈递细胞或小胶质细胞。

[0056] 在一些实施方式中,LTBP1-TGF β 1复合物或LTBP3-TGF β 1复合物被结合于细胞外基质。在一些实施方式中,细胞外基质包含原纤维蛋白。在一些实施方式中,细胞外基质包含含有RGD基序的蛋白质。

[0057] 在另一方面,本文提供了用于减少受试者中的TGF β 1激活的方法,该方法包括向受试者施用有效量的如本文所述的抗体、其抗原结合部分或药物组合物,从而减少受试者中的TGF β 1激活。

[0058] 在一些实施方式中,受试者患有纤维化或具有患纤维化的风险。在一些实施方式中,受试者患有肌营养不良。在一些实施方式中,受试者患有杜氏肌营养不良(DMD)。在一些实施方式中,受试者患有肝纤维化、肾纤维化或肺纤维化(例如,特发性肺纤维化)或者处于患该病症的风险中。在一些实施方式中,受试者患有癌症或者处于患癌症的风险中。在一些实施方式中,受试者患有痴呆或者处于患痴呆的风险中。在一些实施方式中,受试者患有骨髓纤维化或者处于发生骨髓纤维化的风险中。

[0059] 在一些实施方式中,受试者还接受另外的疗法。在一些实施方式中,另外的疗法选自肌生长抑制素抑制剂、VEGF激动剂、IGF1激动剂、FXR激动剂、CCR2抑制剂、CCR5抑制剂、双重CCR2/CCR5抑制剂、赖氨酰氧化酶样-2抑制剂、ASK1抑制剂、乙酰-CoA羧化酶(ACC)抑制剂、p38激酶抑制剂、吡啡尼酮、尼达尼布、GDF11抑制剂或其任何组合。

[0060] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分降低调节性T细胞的抑制性活性。

[0061] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分在受试者中不诱导器官毒性。在一些实施方式中,器官毒性包括心血管毒性、胃肠毒性、免疫毒性、骨毒性、软骨毒性、生殖系统毒性或肾毒性。

[0062] 在一个方面,本文提供了用于治疗需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的如本文所述的抗体、其抗原结合部分或药物组合物,从而治疗受试者的癌症。

[0063] 在另一方面,本文提供了用于减少需要的受试者的肿瘤生长的方法,该方法包括向受试者施用有效量的如本文所述的抗体、其抗原结合部分或药物组合物,从而减少受试者的肿瘤生长。

[0064] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分与另外的药剂或另外的疗法结合施用。在一些实施方式中,另外的药剂是检查点抑制剂。在一些实施方式中,另外的药剂选自PD-1拮抗剂、PDL1拮抗剂、PD-L1或PDL2融合蛋白、CTLA4拮抗剂、GITR激动剂、抗-ICOS抗体、抗-ICOSL抗体、抗-B7H3抗体、抗-B7H4抗体、抗-TIM3抗体、抗-LAG3抗体、抗-OX40抗体、抗-CD27抗体、抗-CD70抗体、抗-CD47抗体、抗-41BB抗体、抗-PD-1抗体、溶瘤病毒和PARP抑制剂。在一些实施方式中,另外的疗法是放疗、化疗剂或其组合。在一些实施方式中,另外的疗法是放疗。在一些实施方式中,另外的药剂是化疗剂。在一些实施方式中,化疗剂是泰素(Taxol)。在一些实施方式中,另外的药剂是抗炎药物。在一些实施方式中,另外的药剂抑制单核细胞/巨噬细胞募集和/或组织浸润的过程。在一些实施方式中,另外的药剂是肝星状细胞激活的抑制剂。在一些实施方式中,另外的药剂是趋化因子受体拮抗剂,例如,CCR2拮

抗剂和CCR5拮抗剂。在一些实施方式中,这样的趋化因子受体拮抗剂是双重特异性的拮抗剂,如CCR2/CCR5拮抗剂。在一些实施方式中,作为联合疗法施用的另外的药剂是或包括生长因子的TGF β 超家族的成员或其调节剂。在一些实施方式中,这样的药剂选自GDF8/肌生长抑制素和GDF11的调节剂(例如,抑制剂和激活剂)。在一些实施方式中,这样的药剂是GDF8/肌生长抑制素信号传导的抑制剂。在一些实施方式中,这样的药剂是特异性地结合原/潜伏肌生长抑制素复合物并阻断肌生长抑制素的激活的单克隆抗体。在一些实施方式中,特异性地结合原/潜伏肌生长抑制素复合物并阻断肌生长抑制素的激活的单克隆抗体不结合游离的成熟肌生长抑制素。

[0065] 在又另一方面,本文提供了治疗需要的受试者的肾障碍的方法,该方法包括向受试者施用有效量的如本文所述的抗体、其抗原结合部分或药物组合物,从而治疗受试者的肾障碍。

[0066] 在一个方面,本文提供了编码如本文所述的抗体或其抗原结合部分的核酸。还提供了包含该核酸的载体。

[0067] 在另一方面,本文提供了包含编码如本文所述的抗体或其抗原结合部分的核酸的细胞。还提供了包含如本文所述的包含编码抗体或其抗原结合部分的核酸的载体的细胞。

[0068] 在又另一方面,本文提供了包含如本文所述的抗体、其抗原结合部分或药物组合物及其使用说明书的试剂盒。

[0069] 在另一方面,本文提供了用于治疗肌纤维损伤的方法,该方法包括以下步骤:向具有肌纤维损伤的受试者施用相对于TGF β 2/3选择性地抑制TGF β 1的药剂,该药剂的量有效地 i) 促进肌纤维修复; ii) 保护免于收缩诱导的损伤; iii) 减少肌肉的炎症;和/或 iv) 减少肌肉的纤维化。在一些实施方式中,该量在受试者中不引起不可接受水平的不良反应。

[0070] 在一些实施方式中,肌纤维损伤 i) 与肌营养不良相关;或 ii) 与急性肌损伤相关。在一些实施方式中,药剂阻断TGF β 1的激活,但不阻断TGF β 2或TGF β 3的激活。在一些实施方式中,药剂是单克隆抗体。在一些实施方式中,单克隆抗体结合GARP-proTGF β 1潜伏复合物、LRRC33-proTGF β 1潜伏复合物、LTBP1-proTGF β 1潜伏复合物、LTBP2-proTGF β 1潜伏复合物、LTBP3-proTGF β 1潜伏复合物和/或LTBP4-proTGF β 1潜伏复合物。在一些实施方式中,受试者还接受肌生长抑制素抑制剂。

[0071] 在一些实施方式中,该方法还包括以下步骤:鉴定疾病相关TGF β 1的来源或情境。

[0072] 在又另一方面,本文提供了用于产生调节TGF β 信号传导的药物组合物的方法,该方法包括以下步骤:提供调节TGF β 的至少一种亚型的信号传导的一种或多种药剂;测量一种或多种药剂对所有TGF β 亚型的活性;选择对于TGF β 的单一亚型特异性的药剂;配制成包含亚型特异性的TGF β 调节剂和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。还提供了通过这一方法产生的药物组合物。

[0073] 在一些实施方式中,亚型-特异性的TGF β 调节剂是TGF β 1-特异性调节剂。在一些实施方式中,TGF β 1-特异性调节剂是TGF β 1的抑制剂。在一些实施方式中,亚型-特异性的TGF β 调节剂是抗体或其片段。在一些实施方式中,抗体或其片段特异性地结合TGF β 1的原/潜伏复合物。在一些实施方式中,抗体或其片段不结合游离的成熟TGF β 1(其不是在原/潜伏复合物中)。在一些实施方式中,原/潜伏复合物包含GARP、LRRC33、LTBP1、LTBP2、LTBP3或LTBP4。

[0074] 在另一方面,本文提供了用于治疗与TGF β 信号传导相关的疾病的方法,该方法包

括以下步骤:以有效治疗该疾病的量向需要的受试者施用本文提供的药物组合物,其中所述量在施用于患有疾病的患者群体时获得统计学显著的临床疗效和安全性。

[0075] 在又另一方面,本文提供了用于降低受试者中的不良反应的用途的TGF β 抑制剂,其中该TGF β 抑制剂是亚型选择性的。在一些实施方式中,TGF β 抑制剂是特异性地抑制TGF β 1的抗体。

附图说明

[0076] 图1是描绘在组织微环境中结合在潜伏复合物中的TGF β 的示意图。

[0077] 图2A和2B是描绘微环境中的小生境调节(niche modulation)的示意图。图2A显示在纤维化疾病小生境和伤口愈合小生境中呈递TGF β 的潜伏-转化生长因子 β -结合蛋白(LTBPs)。图2B说明糖蛋白A重复序列为主蛋白(glycoprotein-A repetitions predominant protein)(GARP)在炎性小生境中调节TGF β 激活。

[0078] 图3说明用于产生GARP-TGF β 1复合物和LTBP-TGF β 1复合物的蛋白质表达平台。基于HEK293的表达系统使用NiNTA亲和纯化和凝胶过滤以获得多毫克量的纯化蛋白质。显示了野生型proTGF β 1、LTBP1、sGARP和proTGF β 1C4S的示意图。

[0079] 图4A和4B显示sGARP-proTGF β 1复合物的纯化。图4A是样品的色谱图和图4B显示产物的印迹和图解复合物的示意图。

[0080] 图5A和5B显示sGARP-TGF β 1LAP复合物的纯化。图5A是样品的色谱图和图5B显示产物的印迹和图解复合物的示意图。

[0081] 图6A和6B显示与proTGF β 1复合的LTBP1的纯化。图6A是样品的色谱图和图6B显示产物的印迹和图解复合物的示意图。NR代表非还原的和R代表还原的。

[0082] 图7是显示Ab1和Ab2阻断TGF β 1活性的激活的曲线图。

[0083] 图8显示人细胞中Ab1的初始剂量-反应分析。

[0084] 图9显示说明人细胞中通过Ab1的TGF β 1抑制的CAGA12报告细胞分析。

[0085] 图10是显示在从健康供体血液分离的T细胞中GARP复合物的抑制阻断调节性T细胞(Treg)的抑制性活性的曲线图。

[0086] 图11A-11C显示整联蛋白-介导的TGF β 1从成纤维细胞释放的抑制。图11A和11B是描绘在正常人皮肤成纤维细胞(圆形)、正常人肺成纤维细胞(方块)、鼠C57BL/6J肺成纤维细胞(倒三角)或鼠DBA2/J肌肉成纤维细胞(圆形)中使用提高浓度的Ab1(图11A)或Ab2(图11B)的内源TGF β 1抑制的曲线图。图11C提供共培养分析系统的示意图。

[0087] 图12A和12B描绘Ab1(图12A)或Ab2(图12B)与LRRC33-proTGF β 1复合物的结合。

[0088] 图13A和13B是描绘在SW480/ β 6细胞转染子中GARP-TGF β 1复合物(图13A)或LRRC33-TGF β 1复合物(图13B)使用提高浓度的Ab1("Ab1")、Ab2("Ab2")、同种型对照IgG1抗体("同种型对照")或溶媒对照("溶媒")的抑制的曲线图。

[0089] 图14是描绘来自经历永久性右单侧UUO手术并在手术干预前腹膜内(i.p.)施用PBS(对照)、30mg/kg的鼠IgG1对照抗体、3mg/kg的Ab2或30mg/kg的Ab2的小鼠(第二至第五个条形)或者施用PBS且经历开腹手术的小鼠(假手术对照;第一个条形)的肾组织中羟脯氨酸水平的条形图。

[0090] 图15A-15H是描绘来自经历永久性右单侧UUO手术并在手术干预前一天和然后在

手术后1和3天腹膜内(i.p.)施用PBS(对照)、30mg/kg的鼠IgG1对照抗体、3mg/kg的Ab2或30mg/kg的Ab2的小鼠(各曲线图的第二个至第五个条形)或者施用PBS且经历开腹手术的小鼠(假手术对照;各曲线图的第一个条形)的肾组织中纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1;图15A)、结缔组织生长因子(CTGF;图15B)、TGF β 1(图15C)、纤连蛋白-1(图15D)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA;图15E)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1;图15F)、I型胶原蛋白 α 1(Coll1a1;图15G)或III型胶原蛋白 α 1链(Coll3a1;图15H)的相对mRNA水平的条形图。这一数据是多个实验的代表。

[0091] 图16描绘用天狼猩红染色并使用色谱分割(color spectrum segmentation)进行定量组织学分析的从小鼠收获的右肾的三个系列切片的复合皮质胶原容积分数(CVF)。来自经历永久性右单侧UUO手术并在手术干预前腹膜内(i.p.)施用PBS(对照)、30mg/kg的鼠IgG1对照抗体("IgG Ctrl")、3mg/kg的Ab2("3Ab2")或30mg/kg的Ab2("30Ab2")的小鼠(各曲线图的第二个至第五个条形)或者施用PBS且经历开腹手术的小鼠(假手术对照;各曲线图的第一个条形)的CVF。

[0092] 图17描绘施用与大鼠IgG2a对照抗体组合的IgG1同种型对照抗体(组1;对照)、与大鼠IgG2a对照抗体组合的Ab1(组2)、与大鼠IgG2a对照抗体组合的Ab2(组3)、与抗-PD-1抗体组合的鼠IgG1对照抗体(组4)、与抗-PD-1抗体组合的Ab1(组5)、与抗-PD-1抗体组合的Ab2(组6)的MC38鼠结肠癌同系模型C57/BL/6小鼠的中位肿瘤体积。

[0093] 图18A-18C显示示例性单克隆抗体的结合特异性。图18A描绘Ab1和Ab2特异性地结合proTGF β 1(如通过ELISA测量的),但不结合proTGF β 2、proTGF β 3或成熟TGF β 1。图18B描绘为用作抗原以测定抗体结合特异性而表达和纯化的纯化LTBP-proTGF β 1的实例。图18C描绘特异性地结合LTBP1-proTGF β 1复合物(如通过ELISA测量的)的抗体的实例。

[0094] 图19描绘用溶媒对照(PBS;"对照")、200mg/kg的LY2109761、300mg/kg的LY2109761、100mg/kg的泛-TGF β 抗体("泛-TGF β Ab")或100mg/kg的Ab2处理的大鼠的存活曲线。

[0095] 图20描绘用溶媒对照(PBS;"对照")、200mg/kg的LY2109761、300mg/kg的LY2109761、100mg/kg的泛-TGF β 抗体("泛-TGF β Ab")或100mg/kg的Ab2处理的大鼠的体重(平均值/标准差)。

[0096] 图21A-21C描绘用溶媒对照(PBS;"对照")、200mg/kg的LY2109761或300mg/kg的LY2109761(图21A);溶媒对照(PBS;"对照")或100mg/kg的泛-TGF β 抗体("泛-TGF β Ab");或者溶媒对照(PBS;"对照")或100mg/kg的Ab2处理的个体大鼠的体重。

[0097] 图22A和22B是描绘在用质粒瞬时转染以表达proTGF β 1和呈递分子(即,GARP或LRRC33)的SW480/β6细胞中使用提高浓度的Ab1(图22A)或Ab2(图22B)的GARP-proTGF β 1复合物或LRRC33-proTGF β 1复合物的抑制的曲线图。Ab1对于GARP-TGF β 1复合物的IC₅₀(μg/mL)是0.445,且Ab1对于LRRC33-TGF β 1复合物的IC₅₀(μg/mL)是1.325。

[0098] 图23描绘来自用200mg/kg的LY2109761(右上图)、100mg/kg的泛-TGF β 抗体("泛-TGF β Ab",左下图)、100mg/kg的Ab2(右下图)处理的大鼠或未处理的对照(左上图)的心脏瓣膜的苏木精和曙红染色的切片。注:右下图(Ab2)是由于不均匀的厚度而染色较深的斜切片。

具体实施方式

[0099] 在哺乳动物中,转化生长因子- β (TGF β) 超家族由至少33个基因产物组成。这些包括骨形态发生蛋白 (BMPs)、激活素类、生长和分化因子 (GDFs) 和TGF β 家族的三种亚型:TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3。TGF β s被认为在多样的过程中发挥关键作用,如细胞增殖的抑制、细胞外基质 (ECM) 重塑和免疫动态平衡。TGF β 1对于T细胞动态平衡的重要性通过以下观察证明:TGF β 1 $^{-/-}$ 小鼠仅存活3-4周,由于大规模的免疫激活而死于多器官衰竭 (Kulkarni, A.B. 等, Proc Natl Acad Sci USA, 1993.90 (2) :p.770-4; Shull, M.M. 等, Nature, 1992.359 (6397) :p.693-9)。TGF β 2和TGF β 3的作用还不太清楚。尽管三种TGF β 亚型具有不同的时间和空间表达模式,但它们通过相同的受体 (TGF β RI和TGF β RII) 发送信号,虽然在一些情况中,例如对于TGF β 2信号传导,III型受体如 β 聚糖也是需要的 (Feng, X.H. 和R. Derynck, Annu Rev Cell Dev Biol, 2005.21:p.659-93; Massague, J., Annu Rev Biochem, 1998.67:p.753-91)。配体诱导的TGF β RI/II寡聚化触发SMAD转录因子的磷酸化,从而导致目标基因如Col1a1、Col3a1、ACTA2和SERPINE1的转录 (Massague, J., J. Seoane和D. Wotton, Genes Dev, 2005.19 (23) :p.2783-810)。非SMAD依赖的TGF β 信号传导途径也已经描述于,例如,Marfan小鼠的癌症或主动脉病变中 (Derynck, R. 和Y.E. Zhang, Nature, 2003.425 (6958) :p.577-84; Holm, T.M. 等, Science, 2011.332 (6027) :p.358-61)。

[0100] TGF β 途径在人体中的生物学重要性已经通过遗传疾病验证。由于TGF β 1基因中的常染色体显性突变而导致TGF β 1信号传导的组成型激活, Camurati-Engelman病导致骨发育不良 (Janssens, K. 等, J Med Genet, 2006.43 (1) :p.1-11)。具有Loeys/Dietz综合征的患者在TGF β 信号传导途径的成分中携带常染色体显性突变,其引起主动脉瘤、器官过距和悬雍垂裂 (Van Laer, L., H. Dietz和B. Loeys, Adv Exp Med Biol, 2014.802:p.95-105)。由于TGF β 途径功能失调涉及到多种疾病,已经开发并在患者中测试了靶向TGF β 途径的几种药物,但具有有限的成功。

[0101] 本公开的发明人推断,尽管TGF β 的所有三种亚型能够通过相同的受体进行信号传导并在表达该受体的细胞中转导下游效应子,但各TGF β 亚型可以在体内产生不同的生物学效应。此外,本发明人设想,至少在一些情况中,生长因子-受体相互作用通过其触发的模式可以进一步在体内提供信号传导特异性。鉴于这一认识,值得注意的是迄今为止在文献中描述的TGF β 抑制剂缺乏特异性,如以下简略总结的。

[0102] Fresolimumab,一种结合并抑制TGF β 的所有三种亚型的人源化单克隆抗体已经在具有局灶性节段性肾小球硬化症、恶性黑素瘤、肾细胞癌和系统性硬化的患者中临床测试 (Rice, L.M. 等, J Clin Invest, 2015.125 (7) :p.2795-807; Trachtman, H. 等, Kidney Int, 2011.79 (11) :p.1236-43; Morris, J.C. 等, PLoS One, 2014.9 (3) :p.e90353)。其它公司已经开发了对于TGF β 亚型具有不同特异性水平的针对TGF β 生长因子的单克隆抗体。这样的药剂很可能通过针对TGF β 1之外的其它TGF β 家族成员的残余活性而在体内诱发毒性。就本公开的发明人所知,由于亚型之间的高序列同一性水平,对于单一亚型的完全特异性未通过靶向成熟的生长因子而获得。

[0103] 靶向TGF β 途径的其它方法包括ACE-1332,来自Acceleron的一种可溶性TGF β RII-Fc配体陷阱 (Yung, L.M. 等, A Am J Respir Crit Care Med, 2016.194 (9) :p.1140-1151),

或者ALK5激酶的小分子抑制剂,如Lilly's galunisertib。而ACE-1332以同样高的亲和力结合TGF β 1和TGF β 3(Yung,L.M.等,Am J Respir Crit Care Med,2016.194(9):p.1140-1151)。ALK5抑制剂阻断通过TGF β 1发送信号的所有生长因子的活性。重大的毒性已经在使用ALK5抑制剂的临床前研究中发现(Anderton,M.J.等,Toxicol Pathol,2011.39(6):p.916-24;Stauber,A.等,Clinical Toxicology,2014.4(3):p.1-10),且需要复杂的临床给药方案来维持疗效而同时减少不良事件(Herbertz,S.等,Drug Des Devel Ther,2015.9:p.4479-99)。事实上,对于已知的TGF β 抑制剂观察到的TGF β 信号传导特异性及其对毒性的可能作用的问题没有在大多数(如果不是全部)试图阻断TGF β 的候选药物中提出。例如,多大的毒性是由于TGF β 1相对于TGF β 2和/或TGF β 3的抑制的问题还未得到解决。类似地,TGF β 激活的模式未在设计或开发拮抗TGF β 信号传导的路径中加以考虑。

[0104] 最近的关于TGF β 1激活机制的结构性认识使得本发明人能够采取新型的、更特异性的TGF β 抑制方式(Shi,M.等,Nature,2011.474(7351):p.343-9)。与其它细胞因子不同,TGF β 超家族成员不作为活性生长因子分泌,而是作为由N-末端前结构域和C-末端生长因子结构域组成的二聚体前体蛋白分泌。proTGF β 1通过弗林蛋白酶的切割将同型二聚的生长因子结构域与其前结构域(也称为潜伏相关肽(LAP))分离。但是,生长因子和LAP保持非共价结合,从而形成潜伏复合物,其不能与其受体结合和诱导信号传导(图1)。在翻译过程中,潜伏TGF β 1(也称为小潜伏复合物(SLC))变成通过二硫桥与“呈递分子”连接,从而形成大潜伏复合物(LLC)。这些分子允许proTGF β 1存在于特定细胞或组织情境(contexts)中。靠近潜伏TGF β 1的N-末端的两个半胱氨酸连接于呈递分子上适当定位的半胱氨酸。呈递分子的身份取决于环境和产生潜伏TGF β 1的细胞类型。例如,成纤维细胞分泌系着于TGF β -结合蛋白(LTBPs)的潜伏TGF β 1,其然后与细胞外基质(ECM)中的蛋白质(即,纤连蛋白、原纤维蛋白-1)结合以将潜伏TGF β 连接于ECM(Robertson等Matrix Biol 47:44-53(2015)) (图2A)。在激活的调节性T细胞的表面上,潜伏TGF β 1共价连接于跨膜蛋白GARP(图2B),且最近与GARP,LRRC33密切相关的蛋白质鉴定为在单核细胞、巨噬细胞和小胶质细胞的表面上TGF β 1的呈递分子(Wang,R.等,Mol Biol Cell,2012.23(6):p.1129-39和T.A.Springer,Int.BMP Conference 2016)。

[0105] 在哺乳动物中,存在四种已知的LTBPs,LTBP1-4,其各自具有多个剪接变体(Robertson,I.B.等,Matrix Biol,2015.47:p.44-53)。LTBP2是唯一不与潜伏TGF β 结合的LTBP(Saharinen,J.和J.Keski-Oja,Mol Biol Cell,2000.11(8):p.2691-704)。尽管LTBP1或LTBP3与潜伏TGF β 1的相关性已经良好验证,但LTBP4在TGF β 呈递中的作用仍不太清楚。与LTBP4和潜伏TGF β 1的复合物看起来效率低得多地形成,可能由于LTBP4的TGF β -结合结构域中不存在几个带负电的残基(Saharinen,J.和J.Keski-Oja,Mol Biol Cell,2000.11(8):p.2691-704;Chen,Y.等,J Mol Biol,2005.345(1):p.175-86)。LTBP4S^{-/-}小鼠和Urban-Rifkin-Davis综合征患者(其具有LTBP4中的无效突变)两者遭受破坏的弹性纤维组装的问题(Urban,Z.等,Am J Hum Genet,2009.85(5):p.593-605;Dabovic,B.等,J Cell Physiol,2015.230(1):p.226-36)。另外,尽管LTBP4S^{-/-}小鼠具有肺分隔和弹性组织生成(elastogenesis)缺陷,具有不能与潜伏TGF β 1形成复合物的LTBP4的转基因小鼠没有明显的表型(Dabovic,B.等,J Cell Physiol,2015.230(1):p.226-36)。是否LTBP4通过作为呈递分子发挥作用而直接参与潜伏TGF β 1的调节是不清楚的;LTBP4相反可能是ECM中弹性原

纤维的正确形成所需的,且其损失通过ECM中的缺陷间接影响潜伏TGF β 1激活。

[0106] 多项研究已经阐明了TGF β 1激活的机制。三种整联蛋白(α V β 6、 α V β 8和 α V β 1)已经证明是潜伏TGF β 1的关键激活剂(Reed,N.I.等,Sci Transl Med,2015.7(288):p.288ra79; Travis,M.A.和D.Sheppard,Annu Rev Immunol,2014.32:p.51-82;Munger,J.S.等,Cell,1999.96(3):p.319-28)。 α V整联蛋白以高亲和力结合TGF β 1和TGF β 1LAPs中存在的RGD序列(Dong,X.等,Nat Struct Mol Biol,2014.21(12):p.1091-6)。具有TGF β 1RGD位点中的突变(其阻止整联蛋白结合但不阻止其分泌)的转基因小鼠表型复制TGF β 1-/-小鼠(Yang,Z.等,J Cell Biol,2007.176(6):p.787-93)。缺乏 β 6和 β 8整联蛋白两者的小鼠重演TGF β 1和TGF β 3敲除小鼠的所有关键表型,包括多器官炎症和腭裂,证实了这两种整联蛋白在发育和体内平衡中对于TGF β 1激活的必要作用(Aluwihare,P.等,J Cell Sci,2009.122(Pt 2):p.227-32)。整联蛋白依赖的潜伏TGF β 1激活的关键是共价系着于呈递分子;通过诱变破坏GARP和TGF β 1LAP之间的二硫键不影响复合物形成,而是完全消除通过 α V β 6的TGF β 1激活(Wang,R.等,Mol Biol Cell,2012.23(6):p.1129-39)。潜伏TGF β 1的当前结构阐明了整联蛋白如何使得能够从潜伏复合物释放活性TGF β 1:潜伏TGF β 1与其呈递分子的共价连接通过LTBPs将潜伏TGF β 1锚定于ECM或者通过GARP或LRRC33将潜伏TGF β 1锚定于细胞骨架。整联蛋白与RGD序列结合导致LAP结构的力依赖性的改变,从而允许活性TGF β 1被释放和结合附近受体(Shi,M.等,Nature,2011.474(7351):p.343-9)。整联蛋白依赖的TGF β 1激活在疾病中的重要性也已经良好验证。 α V β 1的小分子抑制剂保护免于博来霉素诱导的肺纤维化和四氯化碳诱导的肝纤维化(Reed,N.I.等,Sci Transl Med,2015.7(288):p.288ra79),且用抗体阻断 α V β 6或整联蛋白 β 6表达的丧失抑制博来霉素诱导的肺纤维化和放射诱导的纤维化(Munger,J.S.等,Cell,1999.96(3):p.319-28);Horan,G.S.等,Am J Respir Crit Care Med,2008.177(1):p.56-65)。除整联蛋白外,也涉及TGF β 1激活的其它机制,包括血小板反应蛋白-1和通过蛋白酶如基质金属蛋白酶(MMPs)、组织蛋白酶D或激肽释放酶的激活。但是,这些研究中大部分在体外使用纯化的蛋白质进行;具有较少的来自体内研究的关于这些分子的作用的证据。血小板反应蛋白-1的敲除在一些组织中重演TGF β 1-/-表型的一些方面,但在博来霉素诱导的肺纤维化(其已知是TGF β -依赖的)中不是保护性的(Ezzie,M.E.等,Am J Respir Cell Mol Biol,2011.44(4):p.556-61)。另外,候选蛋白酶的敲除不导致TGF β 1表型(Worthington,J.J.,J.E.Klementowicz和M.A.Travis,Trends Biochem Sci,2011.36(1):p.47-54)。这可以通过冗余或通过特定疾病中而不是在发育和体内平衡中关键的这些机制来解释。

[0107] TGF β 已经参与多种生物学过程,包括纤维化、免疫调节和癌症进展。TGF β 1是蛋白质的TGF β 超家族中第一个鉴定的成员。如同TGF β 超家族的其它成员,TGF β 1及亚型TGF β 2和TGF β 3最初作为非活性前体的前体蛋白形式(称为原TGF β)表达。TGF β 蛋白(例如,TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3)通过前体蛋白转化酶(例如,弗林蛋白酶)蛋白水解切割以产生潜伏形式(称为潜伏TGF β)。在一些实施方式中,TGF β 蛋白(例如,TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3)的前体蛋白形式或潜伏形式可以称为“原/潜伏TGF β 蛋白”。TGF β 1可以呈递给与多种分子复合的其它分子,包括,例如,GARP(以形成GARP-TGF β 1复合物)、LRRC33(以形成LRRC33-TGF β 1复合物)、LTBP1(以形成LTBP1-TGF β 1复合物)和/或LTBP3(以形成LTBP3-TGF β 1复合物)。这些复合物中存在的TGF β 1可以为潜伏形式(潜伏TGF β 1)或前体形式(原TGF β 1)。

[0108] 本发明涉及特异性地结合以下的免疫球蛋白(例如,抗体或其抗原结合部分):(1)与GARP蛋白复合的TGF β 蛋白(例如,原/潜伏TGF β 1、原/潜伏TGF β 2和原/潜伏TGF β 3),(2)与LTBP蛋白(例如,LTBP1或LTBP3)复合的TGF β 蛋白和/或(3)与LRRC33蛋白复合的TGF β 蛋白。在一些实施方式中,本文公开的抗体或其抗原结合部分结合在TGF β 1存在于GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物中时可用于被抗体或其抗原结合部分结合的TGF β 1的表位。不希望局限于任何特定理论,本文公开的抗体及其抗原结合部分结合与GARP蛋白、LTBP蛋白和/或LRRC33蛋白复合的TGF β 蛋白(例如,TGF β 1)的能力允许以非情境依赖性的方式靶向TGF β 蛋白,且可以特别适合于治疗应用。

[0109] 定义

[0110] 为了本公开可以更容易地理解,首先定义某些术语。这些定义应当根据本公开的其余部分并如本领域普通技术人员理解的阅读。除非另外定义,本文使用的所有技术和科学术语具有如本领域普通技术人员通常理解的相同含义。另外的定义在整个详细说明中给出。

[0111] 如本文所用的术语“特异性结合”或“特异性地结合”意思是抗体或其抗原结合部分与抗原的相互作用依赖于特定结构(例如,抗原决定子或表位)的存在。例如,抗体或其抗原结合部分结合特定蛋白质而不是一般地结合多种蛋白质。在一些实施方式中,如果抗体对于靶标(例如,TGF β 1)具有至少约 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 10^{-13} M或更小的 K_D ,抗体或其抗原结合部分特异性地结合靶标。在一些实施方式中,如本文所用的术语“与TGF β 1的表位特异性结合”、“特异性地结合TGF β 1的表位”、“与TGF β 1特异性地结合”或“特异性地结合TGF β 1”是指结合TGF β 1且具有 1.0×10^{-7} M或更小的解离常数(K_D)的抗体或其抗原结合部分,如通过表面等离子体共振测定的。在一个实施方式中,抗体或其抗原结合部分可以特异性地结合TGF β 1的人和/或非人(例如,小鼠)同源物。

[0112] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分对于GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物的结合亲和力使用Octet分析测定。在一些实施方式中,Octet分析是测定指示抗体和抗原之间的结合的一种或多种动力学参数的分析。在一些实施方式中,Octet[®]系统(ForteBio, Menlo Park, CA)用于测定抗体或其抗原结合部分与GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物的结合亲和力。例如,抗体的结合亲和力可以使用利用了生物层干涉测定法的ForteBio Octet QK[®]浸试即读无标记分析系统测定。在一些实施方式中,抗原固定于生物传感器(例如,链霉亲和素包被的生物传感器)且抗体和复合物(例如,生物素化GARP-TGF β 1复合物和生物素化LTBP-TGF β 1复合物)以高浓度(50 μ g/mL)存在于溶液中以测量结合相互作用。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分与GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物的结合亲和力使用表6中概述的方案测定。

[0113] 如本文所用的术语“GARP-TGF β 1复合物”是指包含转化生长因子- β 1(TGF β 1)蛋白的前体蛋白形式或潜伏形式和糖蛋白-A重复序列为主蛋白(GARP)的蛋白质复合物。在一些实施方式中,TGF β 1蛋白的前体蛋白形式或潜伏形式可以称为“原/潜伏TGF β 1蛋白”。在一些实施方式中,GARP-TGF β 1复合物包含通过一个或多个二硫键与原/潜伏TGF β 1共价连接的GARP。在其它实施方式中,GARP-TGF β 1复合物包含与原/潜伏TGF β 1非共价连接的GARP。在一

些实施方式中,GARP-TGFβ1复合物是天然发生的复合物,例如细胞中的GARP-TGFβ1复合物。示例性的GARP-TGFβ1复合物显示于图3中。

[0114] 如本文所用的术语“LTBP1-TGFβ1复合物”是指包含转化生长因子-β1 (TGFβ1) 蛋白的前体蛋白形式或潜伏形式和潜伏TGF-β结合蛋白1 (LTBP1) 的蛋白质复合物。在一些实施方式中,LTBP1-TGFβ1复合物包含通过一个或多个二硫键与原/潜伏TGFβ1共价连接的LTBP1。在其它实施方式中,LTBP1-TGFβ1复合物包含与原/潜伏TGFβ1非共价连接的LTBP1。在一些实施方式中,LTBP1-TGFβ1复合物是天然发生的复合物,例如细胞中的LTBP1-TGFβ1复合物。示例性的LTBP1-TGFβ1复合物显示于图3中。

[0115] 如本文所用的术语“LTBP3-TGFβ1复合物”是指包含转化生长因子-β1 (TGFβ1) 蛋白的前体蛋白形式或潜伏形式和潜伏TGF-β结合蛋白1 (LTBP3) 的蛋白质复合物。在一些实施方式中,LTBP3-TGFβ1复合物包含通过一个或多个二硫键与原/潜伏TGFβ1共价连接的LTBP3。在其它实施方式中,LTBP3-TGFβ1复合物包含与原/潜伏TGFβ1非共价连接的LTBP1。在一些实施方式中,LTBP3-TGFβ1复合物是天然发生的复合物,例如细胞中的LTBP3-TGFβ1复合物。示例性的LTBP3-TGFβ1复合物显示于图3中。

[0116] 如本文所用的术语“LRRC33-TGFβ1复合物”是指转化生长因子-β1 (TGFβ1) 蛋白的前体蛋白形式或潜伏形式与含富亮氨酸重复蛋白33 (LRRC33; 也称为活性氧物质的负调节剂或NRR0S) 之间的复合物。在一些实施方式中,LRRC33-TGFβ1复合物包含通过一个或多个二硫键与原/潜伏TGFβ1共价连接的LRRC33。在其它实施方式中,LRRC33-TGFβ1复合物包含与原/潜伏TGFβ1非共价连接的LRRC33。在一些实施方式中,LRRC33-TGFβ1复合物是天然发生的复合物,例如细胞中的LRRC33-TGFβ1复合物。

[0117] 术语“抗体”是指特异性地结合靶抗原的免疫球蛋白分子且包括,例如,嵌合、人源化、全人和双特异性抗体。完整抗体一般包含至少两个全长重链和两个全长轻链,但在一些情况中可以包括较少的链,如骆驼中天然发生的抗体,其可以仅包含重链。抗体可以单纯地来源于单一来源,或可以是“嵌合的”,即抗体的不同部分可以源自两个不同抗体。抗体或其抗原结合部分可以在杂交瘤中产生,通过重组DNA技术产生或通过完整抗体的酶促或化学切割产生。如本文所用的术语抗体分别包括单克隆抗体、双特异性抗体、微抗体、域抗体、合成抗体(本文中有时称为“抗体模拟物”)、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、抗体融合体(本文中有时称为“抗体缀合物”)。在一些实施方式中,该术语也包括肽抗体(peptibodies)。

[0118] 天然发生的抗体结构单元通常包括四聚体。每个这种四聚体通常由两个相同的多肽链对组成,各个对具有一个全长“轻链”(在某些实施方式中,约25kDa) 和一个全长“重链”(在某些实施方式中,约50-70kDa)。各链的氨基-末端部分通常包括约100-110个或更多个氨基酸的可变区,其通常负责抗原识别。各链的羧基-末端部分通常限定可以负责效应子功能的恒定区。人抗体轻链通常分类为κ和λ轻链。重链通常分类为μ、δ、γ、α或ε,且定义抗体的同种型。抗体可以是任何类型(例如,IgM、IgD、IgG、IgA、IgY和IgE) 和类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM1、IgM2、IgA1和IgA2)。在全长轻链和重链内,通常可变区和恒定区通过约12个或更多个氨基酸的“J”区接合,而重链也包括10个或更多个氨基酸的“D”区(参见,例如,Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (通过引用全文并入))。各轻链/重链对的可变区通常形成抗原结合位点。

[0119] 可变区通常表现出通过三个超变区(也称为互补决定区或CDRs) 连接的相对保守

的框架区 (FR) 的相同总体结构。来自各个对的两条链的CDR通常通过框架区对齐,其可以实现对特定表位的结合。从N-末端至C-末端,轻链和重链可变区两者通常包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。氨基酸到各结构域的分配通常根据Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)) 或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等 (1989) Nature 342:878-883 的定义。轻链的CDR也可以称为CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,且重链的CDR也可以称为CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。在一些实施方式中,抗体可以包含从重链羧基末端的少数氨基酸删除。在一些实施方式中,抗体包含具有在重链羧基末端的1-5个氨基酸删除的重链。在某些实施方式中,CDR的确定划界及构成抗体的结合位点的残基的确定通过解析抗体的结构和/或解析抗体-配体复合物的结构来完成。在某些实施方式中,其可以通过本领域技术人员已知的多种技术中的任一种进行,如X-射线晶体学。在一些实施方式中,各种分析方法可以用于确定或近似估计CDR区。这样的方法的实例包括,但不限于Kabat定义、Chothia定义、AbM定义和接触定义。

[0120] 结合蛋白的“功能性抗原结合位点”是可以结合靶标、抗原或配体的位点。抗原结合位点的抗原结合亲和力不必然与该抗原结合位点所来源的亲本结合蛋白一样强,但结合抗原的能力必须是使用已知用于评估结合蛋白与抗原的结合的多种方法中任一种可测量的。此外,本文的多特异性结合蛋白的各抗原结合位点的抗原结合亲和力不需要是数量上相同的。

[0121] 术语“可变区”或“可变域”是指抗体的轻链和/或重链的一部分,通常包括大约重链中的氨基末端120-130个氨基酸和轻链中约100-110个氨基末端氨基酸。在某些实施方式中,不同抗体的可变区在氨基酸序列中显著不同,甚至在相同物种的抗体之间。抗体的可变区通常决定特定抗体对于其靶标的特异性。

[0122] 免疫球蛋白恒定域是指重链或轻链恒定域。人IgG重链和轻链恒定域氨基酸序列是本领域中已知的。

[0123] 在竞争相同表位的抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合部分)的情况中使用的术语“竞争”意思是抗原结合蛋白之间的竞争,如通过其中所测试的抗原结合蛋白阻止或抑制(例如,减少)参比抗原结合蛋白与共同抗原(例如,TGFβ1或其片段)的特异性结合的分析测定的。多种类型的竞争结合分析可以用于确定是否一种抗原结合蛋白与另一种抗原结合蛋白竞争,例如:固相直接或间接放射免疫分析(RIA)、固相直接或间接酶免疫分析(EIA)、夹心竞争分析;固相直接生物素-亲和素EIA;固相直接标记分析和固相直接标记夹心分析。通常,当竞争抗原结合蛋白过量存在时,它抑制(例如,减少)参照抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合至少40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或者75%或更多。在一些情况中,结合被抑制至少80-85%、85-90%、90-95%、95-97%或者97%或更多。

[0124] 术语“抗原”是指提供能够被选择性结合剂如抗原结合蛋白(包括,例如,抗体)结合的表位(例如,分子或分子的部分,或者分子或分子部分的复合物)的分子结构。因此,选择性结合剂可以特异性地结合通过复合物中的两个或更多个组分形成的抗原。在一些实施方式中,抗原能够用于动物中以产生能够结合该抗原的抗体。抗原可以具有能够与不同抗原结合蛋白(例如,抗体)相互作用的一个或多个表位。

[0125] 如本文所用的术语“CDR”是指抗体可变序列内的互补决定区。重链和轻链的可变区中各自具有三个CDR,其对于各可变区命名为CDR1、CDR2和CDR3。如本文中所用的术语“CDR组”是指在可以结合抗原的单一可变区中存在的三个CDR的组。这些CDR的精确边界根据不同的系统差异地定义。通过Kabat (Kabat等(1987;1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md.)) 描述的系统不仅提供可应用于抗体的任何可变区的明确的残基编号系统,而且提供定义这三个CDR的精确残基边界。这些CDR可以称为Kabat CDR。Chothia及同事 (Chothia&Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; 和Chothia等(1989) *Nature* 342:877-883) 发现Kabat CDR内的某些子部分采取几乎相同的肽骨架构象,尽管在氨基酸序列水平具有重大多样性。这些子部分命名为L1、L2和L3或者H1、H2和H3,其中“L”和“H”分别指定轻链和重链区。这些区可以称为Chothia CDR,其具有与Kabat CDR重叠的边界。限定与Kabat CDR重叠的CDR的其它边界通过Padlan (1995) *FASEB J.* 9:133-139和MacCallum (1996) *J. Mol. Biol.* 262 (5) :732-45 描述。再其它的CDR边界定义可能不严格遵循本文的系统之一,但仍然与Kabat CDR重叠,虽然它们可以根据特定残基或残基组或甚至整个CDR不显著影响抗原结合的预测或实验发现而缩短或延长。本文中使用的可以利用根据任何这些系统定义的CDR,虽然某些实施方式使用Kabat或Chothia定义的CDR。

[0126] 如本文所用的术语“晶体”和“结晶的”是指以晶体形式存在的结合蛋白(例如,抗体)或其抗原结合部分。晶体是物质的固态的一种形式,其不同于其它形式如无定形固态或液晶态。晶体由规则的、重复的三维原子、离子、分子(例如,蛋白质如抗体)或分子组合体(例如,抗原/抗体复合物)的阵列构成。这些三维阵列按照该领域中充分了解的特定数学关系排列。在晶体中重复的基本单元或构建块称为不对称单元。符合给定的良好定义的晶体学对称性的排列中不对称单元的重复提供晶体的“晶胞”。在所有三个维度上按照规则平移的晶胞重复提供晶体。参见Giege, R. 和Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2nd ed., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)。

[0127] 术语“表位”包括可以特异性地结合结合剂、免疫球蛋白或T-细胞受体的任何分子决定子(例如,多肽决定子)。在某些实施方式中,表位决定子包括化学活性的表面分子组群,如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,且在某些实施方式中,可以具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。表位是被结合蛋白结合的抗原区域。表位因此由已知结合特定结合伴侣上的互补性位点的抗原区域(或其片段)的氨基酸残基组成。抗原性片段可以包含超过一个表位。在某些实施方式中,当抗体识别蛋白质和/或大分子的复杂混合物中的其靶抗原时,其被称为特异性地结合抗原。例如,如果抗体交叉竞争(一个抗体阻止另一抗体的结合或调节效应),则抗体被称为“结合相同表位”。另外,表位的结构定义(重叠、相似、相同)是信息性的,但功能定义通常更相关,因为它们涵盖结构(结合)和功能(调节、竞争)参数。

[0128] 术语“治疗”和“处理”包括治疗性处理、预防性处理和其中降低受试者发生障碍的风险或其它风险因子的应用。治疗不需要障碍的完全治愈且包含其中减少症状或基础风险因子的实施方式。

[0129] 标准技术可以用于重组DNA、寡核苷酸合成及组织培养和转化(例如,电穿孔、脂质转染)。酶促反应和纯化技术可以按照制造商的说明书或如本领域中通常完成的或如本文

所述的进行。前述技术和过程可以一般地按照本领域中公知的和如整个本说明书中引用和讨论的各种一般的和更特殊的参考文献中描述的常规方法进行。参见,例如,Sambrook等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), 其为任何目的通过引用并入本文中。除非提供具体的定义, 结合本文中所述的分析化学、合成有机化学及医疗和药物化学的实验室程序和技术使用的术语是本领域技术人员公知的和通常使用的。标准技术可以用于化学合成、化学分析、药物制备、制剂和递送, 以及患者的治疗。

[0130] 如本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”是指保留特异性地结合抗原(例如, TGF β 1)的能力的一个或多个抗体片段。抗原结合部分包括, 但不限于特异性地结合抗原以形成复合物的任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或遗传工程化的多肽或糖蛋白。在一些实施方式中, 抗体的抗原结合部分可以使用任何合适的标准技术如蛋白水解消化或涉及编码抗体可变域和任选地恒定域的DNA的操作和表达的重组遗传工程技术而源自, 例如, 完全抗体分子。抗原结合部分的非限制性实例包括: (i) Fab片段, 由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段; (ii) F(ab')₂片段, 包含通过铰链区的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段; (iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段; (iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段; (v) 单链Fv(scFv)分子(参见, 例如, Bird等(1988) *SCIENCE* 242:423-426; 和Huston等(1988) *PROC. NAT'L ACAD. SCI. USA* 85:5879-5883); (vi) dAb片段(参见, 例如, Ward等, (1989) *Nature* 341:544-546); 和(vii) 由模拟抗体的高变区的氨基酸残基组成的最小识别单元(例如, 分离的互补决定区(CDR))。也包括单链抗体的其它形式如双链抗体。术语抗体的抗原结合部分包括“单链Fab片段”, 另外称为“scFab”, 其包含抗体重链可变域(VH)、抗体恒定域1(CH1)、抗体轻链可变域(VL)、抗体轻链恒定域(CL)和接头, 其中所述抗体结构域和所述接头具有沿N-末端至C-末端方向的以下顺序之一: a) VH-CH1-接头-VL-CL, b) VL-CL-接头-VH-CH1、c) VH-CL-接头-VL-CH1或d) VL-CH1-接头-VH-CL; 和其中所述接头是至少30个氨基酸, 优选32-50个氨基酸的多肽。

[0131] 如本文所用的“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体。在一些实施方式中, 分离的抗体基本上不含其它细胞物质和/或化学品。

[0132] “亲和力成熟的”抗体是在其一个或多个CDR中具有一个或多个改变的抗体, 这导致该抗体对抗原的亲和力与不具有那些改变的亲本抗体相比的提高。示例性的亲和力成熟的抗体对于靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。亲和力成熟的抗体通过本领域中已知的过程产生。Marks等(1992) *Bio/Technology* 10:779-783描述了通过VH和VL域混编(shuffling)的亲和力成熟。CDR和/或框架残基的随机诱变通过Barbas等(1994) *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813; Schier等(1995) *Gene* 169:147-155; Yelton等, (1995) *J. Immunol.* 155:1994-2004; Jackson等(1995) *J. Immunol.* 154(7):3310-9; 和Hawkins等(1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896描述; 且在选择性诱变位置、接触或高变位置处利用活性增强氨基酸残基的选择性突变描述于U.S. 专利No. 6,914,128中。

[0133] 术语“CDR-嫁接的抗体”是指包含来自一个物种的重链和轻链可变区序列且其中VH和/或VL的一个或多个CDR区的序列被另一物种的CDR序列替代的抗体, 如具有鼠重链和轻链可变区的抗体, 其中一个或多个鼠CDR(例如, CDR3)已经用人CDR序列替代。

[0134] 术语“嵌合抗体”是指包含来自一个物种的重链和轻链可变区序列及来自另一物

种的恒定区序列的抗体,如具有与人恒定区连接的鼠重链和轻链可变区的抗体。

[0135] 如本文所用的术语“人抗体”意图包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本公开的人抗体可以包括非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变),例如在CDRs和特别地CDR3中。但是,如本文所用的术语“人抗体”不意图包括其中源自另一哺乳动物物种如小鼠的种系的CDR序列已经被嫁接到人框架序列上的抗体。

[0136] 术语“人源化抗体”是指包含来自非人物种(例如,小鼠)的重链和轻链可变区序列,但其中VH和/或VL序列的至少一部分已经改变为更“人样的”(即,更类似于人种系可变序列)的抗体。一种类型的人源化抗体是CDR-嫁接抗体,其中人CDR序列被引入非人VH和VL序列中以替代相应的非人CDR序列。而且,“人源化抗体”是抗体或其变体、衍生物、类似物或片段,其免疫特异性地结合目标抗原且其包含具有基本上人抗体的氨基酸序列的FR区和具有基本上非人抗体的氨基酸序列的CDR区。如本文所用的在CDR的情况中的术语“基本上”是指具有与非人抗体CDR的氨基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列的CDR。人源化抗体基本上包含至少一个和通常两个可变域的全部(Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv),其中全部或基本上全部CDR区对应于非人免疫球蛋白(即,供体抗体)的那些CDR区和全部或基本上全部FR区是人免疫球蛋白共有序列的那些FR区。在一个实施方式中,人源化抗体也包含至少一部分免疫球蛋白Fc区,通常人免疫球蛋白的Fc区。在一些实施方式中,人源化抗体包含轻链以及至少重链的可变域。抗体也可以包括重链的CH1、铰链、CH2、CH3和CH4区。在一些实施方式中,人源化抗体仅包含人源化轻链。在一些实施方式中,人源化抗体仅包含人源化重链。在特定实施方式中,人源化抗体仅包含轻链的人源化可变域和/或人源化重链。

[0137] 如本文所用的术语“框架”或“框架序列”是指可变区减去CDR的其余序列。因为CDR序列的精确定义可以通过不同的系统确定,框架序列的含义相应地进行不同的解释。六个CDR(轻链的CDR-L1、-L2和-L3及重链的CDR-H1、-H2和-H3)也将轻链和重链上的框架区划分成各链上的四个子区(FR1、FR2、FR3和FR4),其中CDR1位于FR1和FR2之间,CDR2位于FR2和FR3之间,及CDR3位于FR3和FR4之间。在未指明特定的子区为FR1、FR2、FR3或FR4的情况下,如其它所述的框架区代表单一的天然存在免疫球蛋白链的可变区内的综合FRs。如本文中所用的,FR代表四个子区之一,且FRs代表构成框架区的四个子区中的两个或更多个。

[0138] 如本文所用的术语“种系抗体基因”或“基因片段”是指通过未经历导致遗传重排和突变以表达特定免疫球蛋白的成熟过程的非淋巴样细胞编码的免疫球蛋白序列(参见,例如,Shapiro等(2002) Crit. Rev. Immunol. 22 (3):183-200; Marchalonis等(2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484:13-30)。通过本公开的各种实施方式提供的优势之一源自种系抗体基因比成熟抗体基因更可能保持物种中的个体特征性的必要氨基酸序列结构,且因此在治疗性地用于该物种中时较少被识别为来自外部来源的认识。

[0139] 如本文所用的术语“中和”是指当结合蛋白特异性地结合抗原时抵消该抗原的生物学活性。在一个实施方式中,中和结合蛋白结合抗原/靶标,例如,细胞因子、激酶、生长因子、细胞表面蛋白、可溶性蛋白、磷酸酶或受体配体,并降低其生物学活性至少约20%、40%、60%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多。

[0140] 如本文所用的术语“结合蛋白”包括特异性地结合抗原(例如,TGFB1)的任何多肽,

包括但不限于,抗体或其抗原结合部分、DVD-IgTM、TVD-Ig、RAb-Ig、双特异性抗体和双重特异性抗体。

[0141] 术语“单克隆抗体”或“mAb”在用于包含该单克隆抗体的组合物的情况中时可以指从基本上同质抗体的群体获得的抗体制备物,即,构成该群体的单个抗体除了可能少量存在的可能天然发生的突变外是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原。此外,与通常包括针对不同决定子(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物相反,各mAb针对抗原上的单一决定子。修饰语“单克隆”不解释为需要通过任何特定方法产生抗体。

[0142] 如本文中使用的术语“重组人抗体”意图包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体(在以下II C节中进一步描述的)、从重组的组合人抗体文库分离的抗体(Hoogenboom, H. R. (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy, H. 和 Highsmith, W. E. (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo, J. V. 和 Larrick, J. W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom, H. 和 Chames, P. (2000) Immunol. Today 21:371-378, 通过引入并入本文)、从人免疫球蛋白基因转基因的动物(例如,小鼠)分离的抗体(参见, Taylor, L. D. 等 (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann, S-A. 和 Green, L. L. (2002) Cur. Opin. in Biotechnol. 13:593-597; Little, M. 等 (2000) Immunol. Today 21:364-370) 或通过涉及人免疫球蛋白基因序列与其它DNA序列的剪接的任何其它方式制备、表达、产生或分离的抗体。这样的重组人抗体具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区。但是,在某些实施方式中,这样的重组人抗体经历体外诱变(或当使用对于人Ig序列转基因的动物时,体内体细胞诱变)且因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是可能不是在体内天然存在于人抗体种系库内的序列,尽管源自人种系VH和VL序列或与其相关。

[0143] 如本文所用的,“双重可变结构域免疫球蛋白”或“DVD-IgTM”等等包括包含配对的重链DVD多肽和轻链DVD多肽的结合蛋白,其中各配对的重链和轻链提供两个抗原结合位点。各结合位点包括每抗原结合位点总共6个参与抗原结合的CDR。DVD-IgTM通常具有两个至少部分地通过CH3结构域的二聚化彼此结合的臂,DVD的各个臂是双特异性的,从而提供具有四个结合位点的免疫球蛋白。DVD-IgTM在US专利公开No. 2010/0260668和2009/0304693中提供,其各自通过引入并入本文中,包括序列表。

[0144] 如本文所用的,“三重可变结构域免疫球蛋白”或“TVD-Ig”等等是包含配对的重链TVD结合蛋白多肽和轻链TVD结合蛋白多肽的结合蛋白,其中各配对的重链和轻链提供三个抗原结合位点。各结合位点包括每抗原结合位点总共6个参与抗原结合的CDR。TVD结合蛋白可以具有两个至少部分地通过CH3结构域的二聚化彼此结合的臂,TVD结合蛋白的各个臂是三特异性的,从而提供具有六个结合位点的结合蛋白。

[0145] 如本文所用的,“受体-抗体免疫球蛋白”或“RAb-Ig”等等是包含重链RAb多肽和轻链RAb多肽的结合蛋白,它们一起形成总共三个抗原结合位点。一个抗原结合位点通过存在于重链RAb多肽和轻链RAb多肽各自中的重链和轻链抗体可变域的配对形成以形成具有提供第一抗原结合位点的总共6个CDR的单一结合位点。重链RAb多肽和轻链RAb多肽各自包括独立地结合配体的受体序列,从而提供第二和第三“抗原”结合位点。RAb-Ig通常具有两个至少部分地通过CH3结构域的二聚化彼此结合的臂,RAb-Ig的各个臂是三特异性的,从而提供具有六个结合位点的免疫球蛋白。RAb-Igs描述于US专利申请公开No. 2002/0127231中,

其整个内容(包括序列表)通过引用并入本文中。

[0146] 如本文所用的且如与“双特异性半-Ig结合蛋白”或“双特异性(半-Ig)结合蛋白”区分的术语“双特异性抗体”是指通过四价体瘤技术(参见Milstein,C.和Cuello,A.C.(1983) *Nature* 305 (5934):p.537-540),通过两种不同单克隆抗体的化学偶联(参见Staerz,U.D.等(1985) *Nature* 314 (6012):628-631),或通过将不抑制CH3-CH3二聚化的突变引入Fc区中的柞臼(knob-into-hole)或类似方法(参见Holliger,P.等(1993) *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 90 (14):6444-6448)产生的全长抗体,从而导致多种不同免疫球蛋白种类,其中仅一种是功能性双特异性抗体。按照分子功能,双特异性抗体在其两个结合臂之一(一个HC/LC对)上结合一个抗原(或表位),并在其第二臂(不同的HC/LC对)上结合不同的抗原(或表位)。按照该定义,双特异性抗体具有两个不同的抗原结合臂(在特异性和CDR序列两方面),且对于其结合的各抗原是单价的。

[0147] 如本文所用的且如与双特异性半-Ig结合蛋白或双特异性结合蛋白区分的术语“双重特异性抗体”是指可以在其两个结合臂(一对HC/LC)的每一个中结合两个不同抗原(或表位)的全长抗体(参见PCT公开No.WO 02/02773)。因此,双重特异性结合蛋白具有两个相同的抗原结合臂(具有相同的特异性和相同的CDR序列),且对于其结合的各抗原是二价的。

[0148] 术语“泛-TGFβ抗体”是指能够结合超过一种TGFβ亚型的任何抗体,例如,TGFβ1、TGFβ2和TGFβ3的至少两种。在一些实施方式中,泛-TGFβ抗体结合全部三种亚型,即TGFβ1、TGFβ2和TGFβ3。在一些实施方式中,泛-TGFβ抗体结合和中和全部三种亚型,即TGFβ1、TGFβ2和TGFβ3。

[0149] 如本文所用的术语“ K_{on} ”意图指结合蛋白(例如,抗体)与抗原结合以形成,例如,抗体/抗原复合物的结合速率常数,如本领域中已知的。“ K_{on} ”也通过如本文中可互换使用的术语“结合速率常数”或“ k_a ”为人所知。指示抗体与其靶抗原的结合速率或者抗体和抗原之间的复合物形成的速率的这一值也通过下式显示:抗体(“Ab”)+抗原(“Ag”)→Ab-Ag。

[0150] 如本文中所用的术语“ K_{off} ”意图指如本领域中已知的结合蛋白(例如,抗原)从例如抗体/抗原复合物解离的解离速率常数。“ K_{off} ”也通过如本文中可互换使用的术语“解离速率常数”或“ k_d ”为人所知。这一值指示抗体与其靶抗原的解离速率或者Ab-Ag复合物随时间分离成游离抗体和抗原的分离,如通过下式显示的:Ab+Ag←Ab-Ag。

[0151] 本文中可互换使用的术语“平衡解离常数”或“ K_D ”是指在平衡时滴定测量中获得的或通过将解离速率常数(k_{off})除以结合速率常数(k_{on})获得的值。结合速率常数、解离速率常数和平衡解离常数用于表示结合蛋白(例如,抗体)与抗原的结合亲和力。用于测定结合速率常数和解离速率常数的方法是本领域中公知的。使用基于荧光的技术提供了高灵敏度和在平衡下检验生理缓冲液中的样品的能力。可以使用其它试验方法和仪器如BIAcore®(生物分子相互作用分析)分析(例如,从BIAcore International AB,GE Healthcare公司,Uppsala,Sweden可得的仪器)。另外,也可以使用可从Sapidyne Instruments(Boise,Idaho)获得的KinExA®(Kinetic Exclusion Assay)分析。

[0152] 术语“接头”用于表示包含通过肽键接合的两个或更多个氨基酸残基的多肽并用于连接一个或多个抗原结合部分。这样的接头多肽是本领域中公知的(参见,例如,Holliger,P.等(1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:6444-6448;Poljak,R.J.等(1994)

Structure 2:1121-1123)。示例性的接头包括,但不限于ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:55), ASTKGP (SEQ ID NO:56);TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO:57);TVAAP (SEQ ID NO:58); AKTTPKLEEGERSEAR (SEQ ID NO:59);AKTTPKLEEGERSEARV (SEQ ID NO:60);AKTTPKLGG (SEQ ID NO:61);SAKTTPKLGG (SEQ ID NO:62);SAKTTP (SEQ ID NO:63);RADAAP (SEQ ID NO:64); RADAAPTVS (SEQ ID NO:65);RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO:66);RADAAAA (G4S)₄ (SEQ ID NO:67);SAKTTPKLEEGERSEARV (SEQ ID NO:68);ADAAP (SEQ ID NO:69);ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO:70);QPKAAP (SEQ ID NO:71);QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO:72);AKTTPP (SEQ ID NO:73); AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO:74);AKTTAP (SEQ ID NO:75);AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO:76); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:77);GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO:78);GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO:79);GHEAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO:80);TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO:81);和ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:82)。

[0153] 如本文中使用的术语“癌症”是指多细胞真核生物中通常特征在于未调控的细胞增殖的生理状况。

[0154] “标记”和“可检测的标记”或“可检测的部分”意思是连接于特定结合伴侣如抗体或分析物的部分,例如,以使得特定结合对的成员如抗体和分析物之间的反应可检测,且如此标记的特定结合伴侣,例如,抗体或分析物,称为“可检测地标记的”。因此,如本文中使用的术语“标记的结合蛋白”是指具有所并入的提供结合蛋白的识别的蛋白质。在一个实施方式中,标记是可以提供可通过视觉或仪器手段检测的信号的可检测标志物,例如,掺入放射标记的氨基酸或将可通过标记的亲合素检测的生物素部分连接到多肽(例如,包含荧光标志物的链霉亲和素或可通过光学或比色方法检测的酶活性)。用于多肽的标记的实例包括,但不限于以下:放射性同位素或放射性核素(例如,³H、¹⁴C、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁷⁷Lu、¹⁶⁶Ho和¹⁵³Sm);色原、荧光标记(例如,FITC、若丹明和镧系磷光体);酶标记(例如,辣根过氧化物酶、荧光素酶和碱性磷酸酶);化学发光标志物;生物素基团;被第二受体识别的预定多肽表位(例如,亮氨酸拉链对序列、第二抗体的结合位点、金属结合结构域和表位标签);及磁性剂,如钆螯合剂。通常用于免疫分析的标记的代表性实例包括产生光的部分(例如,吖啶化合物)和产生荧光的部分(例如,荧光素)。其它标记在本文中描述。就此而言,该部分本身可能不是可检测地标记的,但可以在与再另一部分反应时变成可检测的。使用“可检测地标记的”意图包括可检测标记的后一类型。

[0155] 如本文中使用的术语“表面等离子体共振”是指允许通过例如使用BIAcore®系统(BIAcore International AB,GE Healthcare公司,Uppsala,Sweden and Piscataway, NJ)检测生物传感器基质内蛋白质浓度的改变而分析实时特异性相互作用的光学现象。对于进一步的描述,参见Jönsson,U.等(1993)Ann.Biol.Clin.51:19-26;Jönsson,U.等(1991)Biotechniques 11:620-627;Johnsson,B.等(1995)J.Mol.Recognit.8:125-131;和Johnsson,B.等(1991)Anal.Biochem.198:268-277。

[0156] “质粒”或“载体”包括设计用于递送到宿主细胞或在不同宿主细胞之间的转移的核酸构建体。“表达质粒”或“表达载体”可以是具有在细胞中并入和表达异源核酸片段的能力的质粒。表达质粒可以包含另外的元件,例如,表达载体可以具有两个复制系统,因此允许其保持在两个生物体中。当表达控制序列控制和调节该多肽序列的转录和翻译时,并入到质粒中的核酸可以可操作地连接到表达控制序列。

[0157] “核酸”或“核酸序列”可以是整合核糖核酸、脱氧核糖核酸或其类似物的单元的任何分子,优选聚合物分子。核酸可以是单链的或双链的。单链核酸可以是变性的双链DNA的一个核酸链。或者,它可以是非源自任何双链DNA的单链核酸。在一个方面,核酸可以是DNA。在另一方面,核酸可以是RNA。合适的核酸分子是DNA,包括基因组DNA或cDNA。其它合适的核酸分子是RNA,包括mRNA。

[0158] 除了的操作实施例中或者在另有指明的情况中,本文中所用的表示组分或反应条件的量的所有数字应当理解为在所有情况下用术语“约”来修饰。术语“约”在结合百分比使用时可以意指 $\pm 1\%$ 。

[0159] 尽管本公开的几个实施方式已经在本文中描述和阐明,本领域普通技术人员容易预想用于执行本文所述的功能和/或获得结果和/或一种或多种优势的多种其它手段和/或结构,且这样的变化和/或改进各自视为在本公开的范围。更一般地,本领域技术人员容易理解本文所述的所有参数、尺寸、材料和构型意思是示例性的且实际的参数、尺寸、材料和/或构型取决于本公开的教导所使用的一种或多种特定应用。本领域技术人员会认识到或能够仅使用常规实验确定本文所述公开的特定实施方式的许多等同。因此,应理解前述实施方式仅通过举例的方式给出,且在所附权利要求及其等同的范围内,本公开可以以具体描述和要求的以外的方式实施。本公开涉及本文所述的各单个特征、系统、物品、材料和/或方法。另外,如果这样的特征、系统、物品、材料和/或方法不互相矛盾,两个或更多个这样的特征、系统、物品、材料和/或方法的任何组合包括在本公开的范围。

[0160] 在说明书和权利要求中如本文所用的不定冠词“一”和“一个”应当理解为意思是“至少一个”,除非明确地指示相反。

[0161] 在说明书和权利要求中如本文所用的短语“和/或”应当理解为意思是如此连结的元素的“任一或两者”,即,在一些情况中连带地给出的和在其它情况中分别地给出的元素。除了通过“和/或”从句特别指定的元素外,可以任选地存在其它元素,无论与那些指定的元素相关或不相关,除非明确地指示相反。因此,作为非限制性的实例,所称的“A和/或B”在结合开放式词语如“包含”使用时,在一个实施方式中,可以指A而没有B(任选地包括B以外的元素);在另一实施方式中,可以指B而没有A(任选地包括A以外的元素);在再另一实施方式中,可以指A和B两者(任选地包括其它元素);等等。

[0162] 如本文中在说明书或权利要求中使用的,涉及一个或多个元素的列表的短语“至少一个”应当理解为意思是选自该元素的列表中的任何一个或多个元素的至少一个元素,但不是必然包括该元素的列表中具体所列的各个和每个元素的至少一个且不排除元素列表中的任何元素组合。这一定义也允许可以任选地存在术语“至少一个”所指的元素列表内具体指定的元素以外的元素,无论与那些具体指定的元素相关或不相关。因此,作为非限制性的实例,“A和B中至少一个”(或等同地,“A或B的至少一个”,或等同地,“A和/或B中至少一个”),在一个实施方式中,可以指至少一种(任选地包括超过一个)A,而不存在B(且任选地包括B以外的元素);在另一实施方式中,可以指至少一个(任选地包括超过一个)B,而不存在A(且任选地包括A以外的元素);在再另一实施方式中,可以指至少一个(任选地包括超过一个)A,和至少一个(任选地包括超过一个)B(且任选地包括其它元素);等等。

[0163] 权利要求中使用顺序术语如“第一”、“第二”、“第三”等修饰权利要求元素本身并不意味着一个权利要求元素相对于另一个权利要求元素的任何优先级、优先序或顺序或者其

中方法的行为执行的时间顺序,而仅是用作区分具有特定名称的一个权利要求元素与具有相同名称(如果不是使用该顺序术语的话)的另一个权利要求元素的标记以区分权利要求元素。

[0164] 本文提供的范围理解为该范围内所有值的速记。例如,1-50的范围理解为包括由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50组成的组的任何数字、数字组合或亚范围,例如,10-20、1-10、30-40等。

[0165] 特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体及其抗原结合部分

[0166] 本发明至少部分地基于结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物中存在的TGFβ1的抗体及其抗原结合部分的发现。因此,本发明的一些方面涉及特异性地结合TGFβ1的表位的抗体或其抗原结合部分,其中当TGFβ1存在于GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物中时,该表位可用于被抗体或其抗原结合部分结合。在一些实施方式中,表位由于在与GARP、LTBP1、LTBP3和/或LRRC33复合时TGFβ1的构象变化而可用。在一些实施方式中,TGFβ1中抗体或其抗原结合部分结合的表位在TGFβ1未与GARP、LTBP1、LTBP3和/或LRRC33复合时是不可用的。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分不特异性地结合TGFβ2。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分不特异性地结合TGFβ3。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分不阻止TGFβ1与整联蛋白结合。例如,在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分不掩蔽TGFβ1的整联蛋白结合位点。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分抑制TGFβ1的激活。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分抑制成熟TGFβ1从GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的释放。

[0167] 本文提供的抗体或其抗原结合部分特异性地结合TGFβ1的表位,其中当TGFβ1存在于GARP-TGFβ1、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP2-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物中时,表位可用于被抗体或其抗原结合部分结合。在一些实施方式中,TGFβ1包含天然存在的哺乳动物氨基酸序列。在一些实施方式中,TGFβ1包含天然存在的人氨基酸序列。在一些实施方式中,TGFβ1包含人、猴、大鼠或小鼠氨基酸序列。在一些实施方式中,本文所述的抗体或其抗原结合部分不特异性地结合TGFβ2。在一些实施方式中,本文所述的抗体或其抗原结合部分不特异性地结合TGFβ3。在一些实施方式中,本文所述的抗体或其抗原结合部分不特异性地结合TGFβ2或TGFβ3。在一些实施方式中,本文所述的抗体或其抗原结合部分特异性地结合包含SEQ ID NO:21中所示氨基酸序列的TGFβ1。TGFβ2的氨基酸序列和TGFβ3氨基酸序列分别在SEQ ID NO:22和23中所示。在一些实施方式中,本文所述的抗体或其抗原结合部分特异性地结合包含非天然存在的氨基酸序列的TGFβ1(本文中另外称为非天然存在的TGFβ1)。例如,非天然存在的TGFβ1可以相对于天然存在的TGFβ1氨基酸序列包含一个或多个重组产生的突变。在一些实施方式中,TGFβ1、TGFβ2或TGFβ3氨基酸序列包含如表1中显示的SEQ ID NO:24-35中所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,TGFβ1、TGFβ2或TGFβ3氨基酸序列包含如表2中显示的SEQ ID NO:36-43中所示的氨基酸序列。

[0168] TGFβ1

[0169]

LSTCKTIDMELVKRKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAK
 EVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLS
 NRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLL
 MATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYS
 KVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS (SEQ ID NO: 21)

[0170] TGFβ2

[0171]

SLSTCSTLMDQFMRKRIEAI RGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDE
 EYYAKEVYKIDMPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVRLQNP KARVPEQRIELYQILK
 SKDLTSPTQRYIDS KVVKT RAEGEWLSFDVTDVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCTFVPSNNYIIPNKSEELARF
 AGIDGTSTYTS GDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLMLPSYRLESQQTNRRKKRALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFK
 RDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLS
 NMIVKSKCS (SEQ ID NO: 22)

[0172] TGFβ3

[0173]

SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAI RGQILSKLRLTSPPPEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTE
 SEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIELFQIL
 RPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFK
 GVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHPHLILMMIPPHRLDNPGQGGQRKKRALDTNYCFRNL EENCCVRPLYIDFRQDL
 GWKWVHEPKGYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMV
 VKSKCS (SEQ ID NO: 23)

[0174] 表1. 示例性的TGFβ1、TGFβ2和TGFβ3氨基酸序列

[0175]

蛋白质	序列	SEQ ID NO
proTGFβ1	LSTCKTIDMELVKRKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTR DRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSE LREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPE	24

[0176]

	WLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGD LATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYI DFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAA APCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	
proTGFβ1 C4S	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIARGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLEAVLALYNSTR DRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSE LREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSPE WLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGD LATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYI DFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAA APCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	25
proTGFβ1 D2G	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIARGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLEAVLALYNSTR DRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSE LREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSPE WLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGD LATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYID FRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAA PCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	26
proTGFβ1 C4S D2G	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIARGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLEAVLALYNSTR DRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSE LREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSPE WLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGD LATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYID FRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAA PCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	27
proTGFβ2	SLSTCSTLDMQFMRKRIEAIARGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRD LLQEKASRRAAACERERSDEEYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRF DVSAMEKNASNLVKAEFRVFRQLQNPKEVPEQRIELYQILSKDLTSPTQRYIDS KVVKTRAEGEWLSFDVTDVHVEWLHHKDRNLGFKISLHCPCTFVPSNNYIIP NKSEELARFAGIDGTSTYTSQDQTIKSTRKKNSGKTPHLLMLLPYSYRLESQQ TNRKKRALDAAYCFRNVQDNCLRPYIDFKRDLGWKWIHEPKGYANFCA GACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASAPCCVSQDLEPLTILYIGKTPKIEQL SNMIVKSKCS	28
proTGFβ2 C5S	SLSTSSTLDMQFMRKRIEAIARGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRD LLQEKASRRAAACERERSDEEYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRF DVSAMEKNASNLVKAEFRVFRQLQNPKEVPEQRIELYQILSKDLTSPTQRYIDS KVVKTRAEGEWLSFDVTDVHVEWLHHKDRNLGFKISLHCPCTFVPSNNYIIP NKSEELARFAGIDGTSTYTSQDQTIKSTRKKNSGKTPHLLMLLPYSYRLESQQ TNRKKRALDAAYCFRNVQDNCLRPYIDFKRDLGWKWIHEPKGYANFCA GACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASAPCCVSQDLEPLTILYIGKTPKIEQL SNMIVKSKCS	29
proTGFβ2 C5S D2G	SLSTSSTLDMQFMRKRIEAIARGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRD LLQEKASRRAAACERERSDEEYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRF DVSAMEKNASNLVKAEFRVFRQLQNPKEVPEQRIELYQILSKDLTSPTQRYIDS KVVKTRAEGEWLSFDVTDVHVEWLHHKDRNLGFKISLHCPCTFVPSNNYIIP NKSEELARFAGIDGTSTYTSQDQTIKSTRKKNSGKTPHLLMLLPYSYRLESQQ TNRKGALDAAYCFRNVQDNCLRPYIDFKRDLGWKWIHEPKGYANFCA GACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASAPCCVSQDLEPLTILYIGKTPKIEQLS	30

[0177]

	NMIVKSCCKCS	
proTGFβ2 D2G	SLSTCSTLMDQFMRKRIEAIKQILSKLRLTSPPEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRD LLQEKASRRAAACERERSDEEYAYKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYFRIVRF DVSAMEKNASNLVKAEFRVFRQLQNPKEVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDS KVVKTRAEGEWLSFDVTDVAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCTFVPSNNYIIP NKSEELARFAGIDGTSTYTSQDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLMLLPYSYRLESQQ TNRKRGALDAAYCFRNVDNCCRLPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAG ACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLS NMIVKSCCKCS	31
proTGFβ3	SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLALYNST RELLEEMHGEREEGCTQENTESEYAYKEIHKFDMIQGLAEHNEAVCPKGITSK VFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYI GGKNLPTRGTAEWLSFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNQDILE NIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNP GQGGQRKKRALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKWWHEPKGYAN FCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPK VEQLSNMVMVKSCCKCS	32
proTGFβ3 C7S	SLSLSTSTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLALYNST RELLEEMHGEREEGCTQENTESEYAYKEIHKFDMIQGLAEHNEAVCPKGITSK VFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYI GGKNLPTRGTAEWLSFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNQDILE NIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNP GQGGQRKKRALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKWWHEPKGYAN FCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPK VEQLSNMVMVKSCCKCS	33
proTGFβ3 C7S D2G	SLSLSTSTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLALYNST RELLEEMHGEREEGCTQENTESEYAYKEIHKFDMIQGLAEHNEAVCPKGITSK VFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYI GGKNLPTRGTAEWLSFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNQDILE NIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNP GQGGQRKKGALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKWWHEPKGYANF CSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKV EQLSNMVMVKSCCKCS	34
proTGFβ3 D2G	SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLALYNST RELLEEMHGEREEGCTQENTESEYAYKEIHKFDMIQGLAEHNEAVCPKGITSK VFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYI GGKNLPTRGTAEWLSFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNQDILE NIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNP GQGGQRKKGALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKWWHEPKGYANF CSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKV EQLSNMVMVKSCCKCS	35

[0178] 表2. 示例性的非人氨基酸序列

[0179]

蛋白质	物种	序列	SEQ ID NO
proTGFβ1	小鼠	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVT	36

[0180]

		RVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPPL LSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRLLT PTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGFRFSAHCSCDS KDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHD MNRPFLLLMATPLER AQHLHSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDL GWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYN QHNP GASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMI VRSCCKCS	
proTGFβ1	食蟹 猴	LSTCKTIDMELVKRKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVT RVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVL LSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLA PSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDS KDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLE RAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKD LGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALY NQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNM IVRSCCKCS	37
TGFβ1 LAP C4S	小鼠	LSTSKTIDMELVKRKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVT RVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPPL LSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRLLT PTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGFRFSAHCSCDS KDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHD MNRPFLLLMATPLER AQHLHSSRHRR	38
TGFβ1 LAP C4S	食蟹 猴	LSTSKTIDMELVKRKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVT RVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVL LSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLA PSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDS KDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLE RAQHLQSSRHRR	39
proTGFβ1 C4S D2G	小鼠	LSTSKTIDMELVKRKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVT RVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPPL LSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRLLT PTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGFRFSAHCSCDS KDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHD MNRPFLLLMATPLER AQHLHSSRHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLG WKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQ HNPGASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVR SCKCS	40
proTGFβ1 C4S	小鼠	LSTSKTIDMELVKRKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVT RVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPPL LSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRLLT PTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGFRFSAHCSCDS KDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHD MNRPFLLLMATPLER AQHLHSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDL GWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYN	41

[0181]

		QHNP GASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	
proTGFβ1 C4S	食蟹 猴	LSTSKTIDMELVKRKRIEAI RQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVT RVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVL LSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYL SNRLLA PSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDS KDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLE RAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKD LGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALY NQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	42
proTGFβ1 C4S D2G	食蟹 猴	LSTSKTIDMELVKRKRIEAI RQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVT RVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVL LSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYL SNRLLA PSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDS KDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLE RAQHLQSSRHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDL GWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYN QHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	43
LTBP3	食蟹 猴	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCR DSCQQGSNMTLIGENGHSTDITL TSGSFRVVVCP LPCMNG GQCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAGGAGGGTGGSGPGLS RAGALSTGALPPLAPEGDSVASKHAIYAVQVIADPPGPGE GPPAQHA AFLVPLGPGQISAEVQAPPPVNV RVHHPPEAS VQVHRIESSNAEGAAPSQHLLPHPKPSHPRPPTQKPLGRC FQDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKCHK CPQLQYTG VQKPGPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDI NECAMPGVCRHGDCLNPNPGSYRCVCPGHSLGPSRTQCI ADKPEEKSLCFRLVSPEHQCHPLTTRLTRQLCCCSVGK AWGARCQRCPADGTA AFKEICPAGKGYHILTSHQTLTIQ GESDFSLFLHPDGPPKPQQLPESPSQAPPEDTEEERGVT DSPVSEERSVQQSHPTATTSPARPYPELISRPSPTMRWFL PDLPPSRSAVEIAPTQVTETDECRLNQNICGHGECVPGPP DYSCHCNPGYRSHPHRYCVDVNECEAEPCGPGRGICM NTGGSYNCHCNRGYRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCG DGGFCINFPGHYKCNCYPGYRLKASRPVCEIDIDECDPS SCPDGKCENKPGSFKCIACQPGYRSQGGGACRDVNECAE GSPCSPGWCENLPGSFRCTCAQGYAPAPDGRSCVDVDEC EAGDVCDNGICTNTPGSFQCQCLSGYHLSRDRSHCEDIDE CDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPQGHRLVGGRKCQDID ECTQDPGLCLPHGACKNLQGSYVCVDEGFTPTQDQHG CEEVEQPHHKKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCCS LGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIV NYGIPAHRDIDECMLFGAEICKEGKCVNTQPGYECYCKQ GFYYDGNLLECVDVDECLDESNCRNVCENTRGGYRCA CTPPAEYSPAQRQCLSPEEMDVDECQDPAACRPGRVCNL PGSYRCECRPPWVPGPSGRDCQLPESPAERAPERRDVCW	44

[0182]

		SQRGEDGMCAGPQAGPALTFDDCCCRQGRGWGAQCRP CPPRGAGSQCPTSQSESNSFWDTSPLLL GKPRDEDSSEE DSDECRCVSGRCVPRPGGAVCECPGGFQLDASRARCVDI DECRELNQRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCKAGFARSRPH GACVPQRRR	
LTBP3	小鼠	GPAGERGTGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCRD SCQQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSAFRVVVCPLPCMNGG QCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAAGTGAGTGSSGPGLAR TGAMSTGPLPLAPEGESVASKHAIYAVQVIADPPGPGEG PPAQHAAFLVPLGPGQISAEVQAPPVVNVVRVHHPPEASV QVHRIEGPNAEGPASSQHLLPHPKPPHPRPPTQKPLGRCF QDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKCHKC PQLQYTGVQKPVPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDIN ECAMPGNVCHGDCLNNPGSYRCVCPPGHSLGPLAAQCIA DKPEEKSLCFRLVSTEHQCQHPLTTRLTRQLCCCSVGKA WGARCQRCPADGTAAFKEICPGKGYHILTSHTLTIQGES DFSLFLHPDGPCKPQQLPESPSRAPPLEDEEERGVTMDPP VSEERSVQQSHPTTTTSPPRPYPELISRPSPTFHRFLPDL PSRSAVEIAPTQVTETDECRLNQNICGHGQCVPGPSDYSC HCNAGYRSHPQHRYCVDVNECEAEPCGPGKICMNTGG SYNCHCNRGYRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCGDGGF CINFPGHYKCNCYPGYRLKASRPICEDIDECRDPSTCPDG KCENKPGSFKCIACQPGYRSQGGGACRDVNECSEGTPCS PGWCENLPGSYRCTCAQYEP AQDGLSCIDVDECEAGKVC QDGICTNTPGSFQCQCLSGYHLSRDRSRCEDIDECDFPAA CIGGDCINTNGSYRCLCPLGHRLVGGRKCKKDIDECSDP GLCLPHACENLQGSYVCVCDEGFTLTQDQHGCEEVEQPH HKKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTTQEECCSLGAGWGD HCEIYPCPVYSSAEFHS LVPDGKRLHSGQQHCELCPAHR DIDECILFGAEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNL LECVDVDECLDESNCRNGVCENTRGGYRCACTPPAEYSP AQAQCLIPERWSTPQRDVKCAGASEERTACVWGPWAGP ALTFDDCCCRQPR LGTQCRPCPPRGTSQCPTSQSESNSF WDTSPLLL GKSPRDEDSSEEDSDECRCVSGRCVPRPGGA VCECPGGFQLDASRARCVDIDECRELNQRGLLCKSERCV NTSGSFRCVCKAGFTRSRPHGPACLSAAADDAIAHTSVI DHRGYFH	45
LTBP1S	食蟹猴	NHTGRIKVVF TPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTTLISEN GHAADTLTATNFRVVLCHLPCMNGGQCSSRDKCQCPPN FTGKLCQIPVHGASVPKLYQHSQQPGKALGTHVIHSTHTL PLTVTSQQGVKVKFPPNIVNIHV KHPPEASVQIHQVSRID GPTGQKTKEAQPGOSQVSYQGLPVQKTQTIHSTYSHQQV IPHVYPVAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSKQEDCC GTVGTSWGFNKCQKCPKKPSYHGYNQMMECLPGYKRV NNTFCQDINECQLQGVC PNGECLNTMGSYRCTCKIGFGP DPTFSSCVDP PPVISEEKGPCYRLVSSGRQCMHPLSVHLT KQLCCCSVGKAWGPHCEKCPLPGTAAFKEICPGMGYT VSGVHRRRPIHHHV GKGPFVFKPKNTQPVAKSTHPPPLP AKEEPVEAL TFSREHGPGVAEPEVATAPPEKEIPSLDQEK TKLEPGQPQLSPGISTIHLPQFPV VIEKTSPPVPVEVAPEA	46

[0183]

		STSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAGHCINLPVRYTC ICYEGYKFSEQQRKCVDIDECTQVQHLCSQGRCENTEGSF LCICPAGFMASEEGTNCIDVDECLRPDVCGEHCVNTVG AFRCEYCDSGYRMTQRGRCEDIDECLNPSTCPDEQCVNS PGSYQCVPCTEGFRGWNGQCLDVDECLPNVCTNGDCS NLEGSYMC SCHKGYTRTPDHKHCKDIDECQQGNLCVNG QCKNTEGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECQHHLCS AHGQCRNTEGSFQCVCDQGYRASGLGDHCEINEDLED KSVCQRGDCINTAGSYDCTCPDGFQLDDNKTCQDINECE HPGLCGPQGECLNTEGSFHCVCQQGFSISADGRTCEDIDE CVNNTVCDSHGFCDNTAGSFRCLCYQGFQAPQDGQGC DVNECELLSGVCGEAFCEENVEGSFLCVCADENQEYSPMT GQCRSRTSTDLDVEQPKEEKKECYYNLNDASLCDNVLAP NVTKECCCTSGAGWGDNCEIFPCPVLTAEFTMCPRG KGFVPAGESSEAGGENYKDADECLLFGQEICKNGFCLN TRPGYECYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPSSCIDGQC VNTEGSYNCFCTHPMVLDASEKRCIRPAESNEQIEETDVY QDLCWEHLSDEYVCSRPLVGKQTTYTECCCLYGEAWGM QCALCPMKDSDDYAQLCNIPVTGRRQPYGRDALVDFSE QYAPEADPYFIQDRFLNSFEELQAECCGILNGCENGRCVR VQEGYTCDCFDGYHLDTAKMTCVDVNECDELNNRMSL CKNAKCINTEGSYKCLCLPGYVPSDKPNYCTPLNTALNL EKDSLE	
LTBP1S	小鼠	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGNCQNSCQKGNTTTLISEN GHAADTLTATNFRVVICHLPCMNGGQCSSRDKCQCPPNF TGKLCQIPVLGASMPKLYQHAQQQGKALGSHVIHSTHTL PLTMTSQQGVKVKFPPNIVNIHVKHPPEASVQIHQVSRID SPGGQKVKEAQPQGSQVSYQGLPVQKTQTVHSTYSHQQ LIPHVYPVAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSKQEDCC GTVGTSWGFNKCQKCPKKQSYHGYTQMMECLQGYKRV NNTFCQDINECQLQGVCNNGECLNTMGSYRCSCCKMGFG PDPTFSSCVPDPVISEEKGPCYRLVSPGRHCMHPLSVHL TKQICCCSVGKAWGPHCEKCPLPGTAAFKEICPGGMGYT VSGVHRRRPIHQHIGKEAVYVKPKNTQPVAKSTHPPPLPA KEEPVEALTSSWEHGPRGAEPVV TAPPEKEIPSLDQEK RLEPGQPQLSPGVSTIHLHPQFPVVVEKTSPVPVEVAPEA STSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAGHCINLPVRYTC ICYEGYKFSEQRLRKCV DIDECAQVRHLCSQGRCENTEGSF LCVCPAGFMASEEGTNCIDVDECLRPDMCRDGRICNTAG AFRCEYCDSGYRMSRRGYCEDIDECLKPSTCPPEEQCVNT PGSYQCVPCTEGFRGWNGQCLDVDECLQPKVCTNGSCT NLEGSYMC SCHRGYSPTPDHRHCQDIDECQQGNLCMNG QCRNTDGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECHEHHHLCS HGQCRNTEGSFQVCNQGYSRVLGDHCEINEDLEDSS VCQGGDCINTAGSYDCTCPDGFQLNDNKGCQDINECAQP GLCGSHGECLNTQGSFHCVCQGFQFSISADGRTCEDIDECV NNTVCDSHGFCDNTAGSFRCLCYQGFQAPQDGQGCVDV NECELLSGVCGEAFCEENVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQ CRSRVTEDSGVDRQPREKKKECYYNLNDASLCDNVLAP NVTKECCCTSGAGWGDNCEIFPCPVQGTAEFTMCPRG	47

[0184]

		KGLVPAGESSYDTGGENYKDADECLLFGEIICKNGYCLN TQPGYECYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPNSCIDGQ CVNTEGSYNCFCTHPMVLDASEKRCVQPTESNEQIEETD VYQDLCWEHLSEEYVCSRPLVGKQTTYTECCCLYGEAW GMQCALCPMKDSDDYAQLCNIPVTGRRRPYGRDALVDF SEQYGPETDPYFIQDRFLNSFEELQAEECGILNGCENGRC VRVQEGYTCDCFDGYHLDMAKMTCDVDNECSELNNRM SLCKNAKCINTEGSYKCLCLPGYIPSDKPNYCTPLNSALN LDKESDLE	
GARP	小鼠	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQALYL SGNQLQSILVSPLGFYTALRHLDLSDNQISFLQAGVFQAL PYLEHLNLAHNRLATGMALNSGGLGRPLLVSLDLSGNS LHGNLVERLLGETPRLRTLSLAENSLTRLARHTFWGMPA VEQLDLHSNVLMIEDGAFAEALPHLTHLNLSRNSLTCISD FSLQQQLQVLDLSCNSIEAFQTAPEPQAQFQLAWLDLREN KLLHFPDLAVFPRLIYLNVSNNLIQLPAGLPRGSEDLHAPS EGWSASPLSNPSRNASTHPLSPLLNDLSYNEIELVPASFL EHLTSLRFLNLSRNCLRSFEARQVDSLPCLVLLDLSHNVL EAELELGTKVLGSLQTLTLLQDNALQELPPYTFASLASLQRL NLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFSGIPTLHVLNMAGNS MGMLRAGSFLHTPLTELDSLSTNPGLDVATGALVGLEASL EVLELQGNGLTVLRVDLPCFLRLKRLNLAENQLSHLPAW TRAVSLEVLDLRNNSFSLLPGNAMGGLETSLRRLYLQGN PLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICRFGSQEELS SLVRPEDCEKGGKKNVNLILLLSFTLVSAIVLTTLATICFL RRQKLSQQYKA	48
sGARP	小鼠	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQALYL SGNQLQSILVSPLGFYTALRHLDLSDNQISFLQAGVFQAL PYLEHLNLAHNRLATGMALNSGGLGRPLLVSLDLSGNS LHGNLVERLLGETPRLRTLSLAENSLTRLARHTFWGMPA VEQLDLHSNVLMIEDGAFAEALPHLTHLNLSRNSLTCISD FSLQQQLQVLDLSCNSIEAFQTAPEPQAQFQLAWLDLREN KLLHFPDLAVFPRLIYLNVSNNLIQLPAGLPRGSEDLHAPS EGWSASPLSNPSRNASTHPLSPLLNDLSYNEIELVPASFL EHLTSLRFLNLSRNCLRSFEARQVDSLPCLVLLDLSHNVL EAELELGTKVLGSLQTLTLLQDNALQELPPYTFASLASLQRL NLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFSGIPTLHVLNMAGNS MGMLRAGSFLHTPLTELDSLSTNPGLDVATGALVGLEASL EVLELQGNGLTVLRVDLPCFLRLKRLNLAENQLSHLPAW TRAVSLEVLDLRNNSFSLLPGNAMGGLETSLRRLYLQGN PLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICRFGSQEELS SLVRPEDCEKGGKKNVN	49

[0185] 在一些实施方式中,如本文所述的抗体或其抗原结合部分能够结合LTBP1-TGFβ1复合物。在一些实施方式中,抗原性蛋白质复合物(例如,LTBP-TGFβ1复合物)可以包含一个或多个LTBP蛋白(例如,LTBP1、LTBP2、LTBP3和LTBP4)。在一些实施方式中,LTBP1蛋白是天然发生的蛋白质。在一些实施方式中,LTBP1蛋白是非天然发生的蛋白质。在一些实施方式中,LTBP1蛋白是重组蛋白。这种重组LTBP1蛋白可以包括LTBP1、其可选剪接变体和/或其片段。重组LTBP1蛋白也可以修饰以包含一个或多个可检测的标记。在一些实施方式中,LTBP1蛋白包含前导序列(例如,原始或非原始前导序列)。在一些实施方式中,LTBP1蛋白不包含

前导序列(即,前导序列已经被加工或切割)。这样的可检测标记可以包括,但不限于生物素标记、聚组氨酸标签、myc标签、HA标签和/或荧光标签。在一些实施方式中,LTBP1蛋白是哺乳动物LTBP1蛋白。在一些实施方式中,LTBP1蛋白是人、猴、小鼠或大鼠LTBP1蛋白。在一些实施方式中,LTBP1蛋白包含表2的SEQ ID NO:46和47中所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,LTBP1蛋白包含表3的SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列。

[0186] 在一些实施方式中,如本文所述的抗体或其抗原结合部分能够结合LTBP3-TGFβ1复合物。在一些实施方式中,LTBP3蛋白是天然存在的蛋白质。在一些实施方式中,LTBP3蛋白是非天然存在的蛋白质。在一些实施方式中,LTBP3蛋白是重组蛋白。这种重组LTBP3蛋白可以包括LTBP3、其可选剪接变体和/或其片段。在一些实施方式中,LTBP3蛋白包含前导序列(例如,原始或非原始前导序列)。在一些实施方式中,LTBP3蛋白不包含前导序列(即,前导序列已经被加工或切割)。重组LTBP3蛋白也可以经修饰以包含一个或多个可检测的标记。这样的可检测标记可以包括,但不限于生物素标记、聚组氨酸标签、myc标签、HA标签和/或荧光标签。在一些实施方式中,LTBP3蛋白是哺乳动物LTBP3蛋白。在一些实施方式中,LTBP3蛋白是人、猴、小鼠或大鼠LTBP3蛋白。在一些实施方式中,LTBP3蛋白包含表2的SEQ ID NO:44和45中所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,LTBP1蛋白包含表3的SEQ ID NO:51中所示的氨基酸序列。

[0187] 在一些实施方式中,如本文所述的抗体或其抗原结合部分能够结合GARP-TGFβ1复合物。在一些实施方式中,GARP蛋白是天然存在的蛋白质。在一些实施方式中,GARP蛋白是非天然存在的蛋白。在一些实施方式中,GARP蛋白是重组蛋白。这种GARP可以是重组的,本文中称为重组GARP。一些重组GARP与野生型GARP相比可以包含一个或多个修饰、截短和/或突变。重组GARP可以经修饰以成为可溶性的。在一些实施方式中,GARP蛋白包含前导序列(例如,原始或非原始前导序列)。在一些实施方式中,GARP蛋白不包含前导序列(即,前导序列已经被加工或切割)。在其它实施方式中,重组GARP经修饰以包含一个或多个可检测的标记。在进一步的实施方式中,这样的可检测标记可以包括,但不限于生物素标记、聚组氨酸标签、myc标签、HA标签和/或荧光标签。在一些实施方式中,GARP蛋白是哺乳动物GARP蛋白。在一些实施方式中,GARP蛋白是人、猴、小鼠或大鼠GARP蛋白。在一些实施方式中,GARP蛋白包含表2的SEQ ID NO:48-49中所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,GARP蛋白包含表4的SEQ ID NO:52和53中所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本文所述的抗体或其抗原结合部分不以情境依赖性的方式结合TGFβ1,例如与TGFβ1的结合仅在TGFβ1分子与特定呈递分子如GARP复合时发生。相反,抗体及其抗原结合部分以情境依赖性的方式结合TGFβ1。换句话说,抗体或其抗原结合部分结合在与任何以下呈递分子结合时的TGFβ1:GARP、LTBP1、LTBP3和/或LRCC33。

[0188] 在一些实施方式中,如本文所述的抗体或其抗原结合部分能够结合LRRC33-TGFβ1复合物。在一些实施方式中,LRRC33蛋白是天然存在的蛋白质。在一些实施方式中,LRRC33蛋白是非天然存在的蛋白质。在一些实施方式中,LRRC33蛋白是重组蛋白。这种LRRC33可以是重组的,本文中称为重组LRRC33。一些重组LRRC33蛋白与野生型LRRC33相比可以包含一个或多个修饰、截短和/或突变。重组LRRC33蛋白可以经修饰以成为可溶性的。例如,在一些实施方式中,LRRC33的胞外域可以与C-末端His-标签一起表达以表达可溶性LRRC33蛋白(sLRRC33;参见,例如,SEQ ID NO:84)。在一些实施方式中,LRRC33蛋白包含前导序列(例

如,原始或非原始前导序列)。在一些实施方式中,LRRC33蛋白不包含前导序列(即,前导序列已经被加工或切割)。在其它实施方式中,重组LRRC33蛋白经修饰以包含一个或多个可检测的标记。在进一步的实施方式中,这样的可检测标记可以包括,但不限于生物素标记、聚组氨酸标签、flag标签、myc标签、HA标签和/或荧光标签。在一些实施方式中,LRRC33蛋白是哺乳动物LRRC33蛋白。在一些实施方式中,LRRC33蛋白是人、猴、小鼠或大鼠LRRC33蛋白。在一些实施方式中,LRRC33蛋白包含表4的SEQ ID NO:83、84和85中所示的氨基酸序列。

[0189] 表3. 示例性LTBP氨基酸序列。

[0190]

蛋白质	序列	SEQ ID NO
LTBP1S	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTTLISENGHAADTLTATNFRVVIC H LPCMNGGQCSSRD KCQCPPNFTGKLCQIPVHGASVPKLYQHSQQPGKALGTH VIHSTHTLPLTVTSQQGVKVKFPPNIVNIHV KHPPEASVQIHQVSRIDGPTGQKTK EAQPGQSQVSYQGLPVQKTQTIHSTYSHQQVIPHVYPVAAKTQLGRCFQETIGSQ CGKALPGLSKQEDCCGTVGTSWGFNKCQKCPKKPSYHGYNQMMECLPGYKRV NNTFCQDINECQLQGVC PNGECLNTMG SYRCTCKIGFGPDPTFSSCVPDPPVISE EKGPCYRLVSSGRQCMHPLSVHLTKQLCCCSVGKAWGPHCEKCPLPGTAAFEIC PGGMGYTVSGVHRRRPIHHHV GKGPFVVKPKNTQPVAKSTHPPPLPAKEEPVEA LTSREHGPVGAEPVATAPPEKEIPSLDQEKTKLEPGQPQLSPGISTIHLPQFPV VIEKTSPVPVEVAPEASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAGHCINLPVRYT CICYEGYRFSEQQRKCVDIDECTQVQHLC SQGRCENTEGSFLCICPAGFMASEEGT NCIDVDECLRPDVC GEGHCVNTVGAFRCEYCD SGYRMTQRGRCEDIDECLNPST CPDEQCVNSPGSYQCV PCTEGFRGWNGQCLDVDECLEPNVCANGDCSNLEGSY MCSCHKGYTRTPDHKHCRDIDECQQGNLCVNGQCKNTEGSFRCTCGQGYQLSA AKDQCEDIDECQHRHLCAHGQCRNTEGSFQCVCDQGYRASGLGDHCE DINECLE DKSVCQRGDCINTAGSYDCTCPDGFQLDDNKTCDINECEHPGLCGPQGECLNT EGSFHCVCQQGFSISADGRTCEDIDECVNNTVCD SHGFCDN TAGSFRCLCYQGF QAPQDGQGCVDVNECELLSGVCGEAF CENVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCR SRTSTDLDVDVDQPK EEKKECYYNLNDASLCDNV LAPNVTKQECCCTSGVGWGD NCEIFPCPVLGTAEFTEMCPKGKGFVPAGESSSEAGGENYKDADECLLFGQEICKN GFCLNTRPGYECYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPSSCIDGQCVNTEGSYNCF CTHPMVLDASEKRCIRPAESNEQIEETDVYQDLCWEHLSDEYVCSRPLVGKQTTY TECCCLYGEAWGMQCALCPLKDSDDYAQLCNIPVTGRRQPYGRDALVDFSEQYT PEADPYFIQDRFLNSFEELQAE ECGILNGCENGRCVRVQEGYTCDFDGYHLDTA KMTCVDVNECDELNNRMSLCKNAKCINTDGSYKCLCLPGYVPSDKPNYCTPLNT ALNLEKDSLE	50
LTBP3	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCRDSCQQGSNMTLIGENG HSTDTLTGSGFRVVV CPLPCMNGGQCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAGGAGGG TGGSGPGLSRTGALSTGALPPLAPEGDSVASKHAIYAVQVIADPPGPGEPPAQH AAFLVPLPGPGQISAEVQAPPPVNVVRVHHPPEASVQVHRIESSNAESAAPSQHLL	51

[0191]

PHPKPSHPRPPTQKPLGRCFQDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQS KCHKCPQLQYTG VQKPGPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINECAMPGVCRH GDCLNNPGSYRCVCPPGHSLGPSRTQCIADKPEEKSLCFRLVSPEHQCQHPLTTRL TRQLCCCSVGKAWGARCQRCPTDGTAAFKEICPAGKGYHILTSHTLTIQGESDF SLFLHPDGP KPKPQQLPESPSQAPPPEDTEEERGVTTDSPVSEERSVQQSHPTATTT PARPYELISRPSPTMRWFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTETDECRLNQNICGHGEC VPGPPDYSCHCNPGYRSHQHRVCVDVNECEAEPCGPGRGICMNTGGSYNCHC NRGYRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCGDGGFCINFPGHYKNCNCPGYRLKASR PPVCEDIDECRDPSSCPDGKCENKPGSFKCIACQPGYRSQGGGACRDVNECAEGS PCSPGWCENLPGSFRCTCAQGYAPAPDGRSCLDVDECEAGDVCDNGICSNTPGS FQCQCLSGYHLSRDRSHCEDIDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPQGHRLVGG RKCQDIDEC SQDPSLCLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFTPTQDQHGCEEVEQPHH KKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCCSLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEFSL CPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDECMLFGSEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGF YYDGNLLECVDVDECLDESNCRNGVCENTRGGYRCACPPAEYSPAQRQCLSPEE MDVDECQDPAACRPGRCVNLPGSYRCECRPPWVPGPSGRDCQLPESPAERAPE RRDVCWSQRGEDGMCAGPLAGPALTFDDCCCRQGRGWGAQCRPCPPRGAGS HCPTSQSESNSFWDTSPLLL GKPPRDEDSSEEDSDECRCVSGRCVPRPGGAVCEC PGGFQLDASRARCVDIDECRELNQRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCKAGFARSRPH GACVPQRRR	
---	--

[0192] 表4. 示例性GARP和LRRC33氨基酸序列。

[0193]

蛋白质	序列	SEQ ID NO
GARP	AQHQQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTETLDLSGNQLRSILASPLG FYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALHLEHLSLAHNRLAMATALSAGGLGPLP RVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDL HSNVLMIEDGAFEGLPRLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQT ASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYNLSNNLIRLPTGPPQDSKGI HAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLSQLLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNL SRNCLRTFEARRLGSLPCLMLLDLSHNALETLELGARALGSLRTLLLQGNALRDL PPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEPGPSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIE LLRAGAFHLHTPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLAQGNGLMVLQVDL PCFICKRLNLAENRLSHLPAWTQAVSLEVLDLRNNSFSLLPGSAMGGLETSLR RLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPE DCEKGGLKNINLIILTFILVSAILTTLAACCCVRRQKFNQQYKA	52
sGARP	AQHQQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTETLDLSGNQLRSILASPLG FYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALHLEHLSLAHNRLAMATALSAGGLGPLP RVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDL HSNVLMIEDGAFEGLPRLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQT ASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYNLSNNLIRLPTGPPQDSKGI HAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLSQLLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNL SRNCLRTFEARRLGSLPCLMLLDLSHNALETLELGARALGSLRTLLLQGNALRDL PPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEPGPSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIE LLRAGAFHLHTPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLAQGNGLMVLQVDL PCFICKRLNLAENRLSHLPAWTQAVSLEVLDLRNNSFSLLPGSAMGGLETSLR RLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPE	53

[0194]

	DCEKGGLKNIN	
LRR33 (也称为 NRROS; Uniprot 登录 No. Q86YC3)	MELLPLWLCLGFHFLTVGWRNRSGTATAASQGVCKLVGGAADCRGQSLASV PSSLPPHARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSCHLERISRGAFAQEQG HLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRDLDSGNALTEDMAALMLQNLSS LRVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERLRELDLQRNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLA FNNLPCIVDFGLTRLRLVNLVSYNVLEWFLATGGEEAFELETDLDSHNQLLFFPLL PQYSKLRTLLLRDNNMGFYRDLYNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTVSLWEE FSSDLADLRFLDMSQNFQYLPDGFRLKMPSLSHLNHLHQNCLMTLHIREHEP PGALTELDLSHNQLSELHLAPGLASCLGSLRFLNLSSNQLLGVPPGLFANARNIT TLDMSHNQISLCPLPAASDRVGPSCVDFRNMASLRSLSEGCGLGALPDCPF QGTSITYLDLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMGLHSSFMALDFSG FGNLRDLDSGNCLTTFFPRFGGSLALETDLRRNSLTALPQKAVSEQLSRGLRTIY LSQNPYDCCGVDGWGALQHGTQVADWAMVTCNLSSKIIRVTELPGGVPRDC KWERLDLGLLYLVILPSCLTLLVACTVIVLTFKKPLLQVIKSRCHWSSVY * 原始信号肽以粗体显示。	83
可溶性 LRR33 (sLRR33)	MDMRVPAQLLGLLLWFSGVLGWRNRSGTATAASQGVCKLVGGAADCRG QSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSCHLERISRGA FAQEQGHLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRDLDSGNALTEDMAALML QNLSSLRVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERLRELDLQRNYIFEIEGGAFDGLAELR HLNLAFFNNLPCIVDFGLTRLRLVNLVSYNVLEWFLATGGEEAFELETDLDSHNQL LFFPLLQYSKLRTLLLRDNNMGFYRDLYNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTV SLWEEFSSDLADLRFLDMSQNFQYLPDGFRLKMPSLSHLNHLHQNCLMTLHI REHEPPGALTELDLSHNQLSELHLAPGLASCLGSLRFLNLSSNQLLGVPPGLFAN ARNITTLDMSHNQISLCPLPAASDRVGPSCVDFRNMASLRSLSEGCGLGALP DCPFQGTSITYLDLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMGLHSSFMAL DFSGFGNLRDLDSGNCLTTFFPRFGGSLALETDLRRNSLTALPQKAVSEQLSRG LRTIYLSQNPYDCCGVDGWGALQHGTQVADWAMVTCNLSSKIIRVTELPGGV PRDCKWERLDLGLHHHHHH * 修饰的人 κ 轻链信号肽以粗体显示。 ** 组氨酸标签加下划线。	84
人 LRR33-GARP 嵌合体	MDMRVPAQLLGLLLWFSGVLGWRNRSGTATAASQGVCKLVGGAADCRG <u>QSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSCHLERISRGA</u> <u>FQEQGHLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRDLDSGNALTEDMAALML</u> <u>QNLSSLRVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERLRELDLQRNYIFEIEGGAFDGLAELR</u> <u>HLNLAFFNNLPCIVDFGLTRLRLVNLVSYNVLEWFLATGGEEAFELETDLDSHNQL</u> <u>LFFPLLQYSKLRTLLLRDNNMGFYRDLYNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTV</u> <u>SLWEEFSSDLADLRFLDMSQNFQYLPDGFRLKMPSLSHLNHLHQNCLMTLHI</u> <u>REHEPPGALTELDLSHNQLSELHLAPGLASCLGSLRFLNLSSNQLLGVPPGLFAN</u> <u>ARNITTLDMSHNQISLCPLPAASDRVGPSCVDFRNMASLRSLSEGCGLGALP</u> <u>DCPFQGTSITYLDLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMGLHSSFMAL</u> <u>DFSGFGNLRDLDSGNCLTTFFPRFGGSLALETDLRRNSLTALPQKAVSEQLSRG</u> <u>LRTIYLSQNPYDCCGVDGWGALQHGTQVADWAMVTCNLSSKIIRVTELPGGV</u> <u>PRDCKWERLDLGLIIILTFILVSAILLTTLAACCCVRRQKFNQQYKA</u> * 修饰的人 κ 轻链信号肽以粗体显示。 ** LRR33 胞外域加下划线。 # GARP 跨膜结构域是斜体的。 ## GARP 细胞内尾加双下划线。	85

[0195] 在一些实施方式中,特异性地结合TGFβ1的表位的本发明的抗体或其抗原结合部分及编码该抗体的本公开的核酸分子包括表5中所示的一个或多个CDR氨基酸序列,该表位在TGFβ1存在于GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物中时可用于被该抗体结合。

[0196] 表5.使用Kabat编号方案确定的重链的互补决定区(CDRHs)和轻链的互补决定区(CDRLs)对于抗体Ab1和Ab2显示。

[0197]

抗体	Ab1	Ab2
CDRH1 (SEQ ID NO: 1-2)	SYGMH (SEQ ID NO: 1)	SDWIG (SEQ ID NO: 2)
CDRH2 (SEQ ID NO: 3-4)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 3)	VIYPGDS DTRYSA SFQG (SEQ ID NO: 4)
CDRH3 (SEQ ID NO: 5-6)	DIRPYGDYSAAFDI (SEQ ID NO: 5)	AAGIAAAGHVTA FDI (SEQ ID NO: 6)
CDRL1 (SEQ ID NO: 7-8)	TGSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO: 7)	KSSQSVLYSSNNKNYLA (SEQ ID NO: 8)
CDRL2 (SEQ ID NO: 9-10)	EDNQRPS (SEQ ID NO: 9)	WASTRES (SEQ ID NO: 10)
CDRL3 (SEQ ID NO: 11-12)	QSYDSSNHGGV (SEQ ID NO: 11)	QQYYSTPVT (SEQ ID NO: 12)

[0198] 在一些实施方式中,特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的本发明的抗体包括包含如表5中所示的任何一种抗体所提供的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2或CDRL3或者其组合的任何抗体或其抗原结合部分。在一些实施方式中,特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体包括表5中所示的任何一种抗体的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3。本发明还提供编码包含如表5中显示的任何一种抗体提供的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2或CDRL3的分子的任何核酸序列。抗体重链和轻链CDR3结构域可以在抗体对抗原的结合特异性/亲和力中发挥特别重要的作用。因此,本公开的特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体或者编码这些抗体或其抗原结合部分的核酸分子可以包括至少如表5中所示的抗体的重链和/或轻链CDR3。

[0199] 本发明的方面涉及特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物且包含六个互补决定区(CDR):CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3的单克隆抗体或其抗原结合部分。

[0200] 在一些实施方式中,CDRH1包含如SEQ ID NO:1和2任一所示的序列。在一些实施方式中,CDRH2包含如SEQ ID NO:3和4任一所示的序列。在一些实施方式中,CDRH3包含SEQ ID NO:5和6中任一所示的序列。CDRL1包含SEQ ID NO:7和8中任一所示的序列。在一些实施方式中,CDRL2包含SEQ ID NO:9和10中任一所示的序列。在一些实施方式中,CDRL3包含SEQ ID NO:11和12中任一所示的序列。

[0201] 在一些实施方式(例如,对于表5中所示的抗体Ab1)中,特异性地结合GARP-TGFβ1

复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体或其抗原结合部分包含：包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的CDRH3、包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列的CDRL3。

[0202] 在一些实施方式中，抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区，该重链可变区包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的互补决定区3 (CDR3) 和该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方式中，抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区，该重链可变区包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的互补决定区2 (CDR2) 和该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR2。在一些实施方式中，抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区，该重链可变区包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的互补决定区1 (CDR1) 和该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1。

[0203] 在一些实施方式中，抗体或其抗原结合部分包含含有与SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的重链可变域和含有与SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的轻链可变域。在一些实施方式中，抗体或其抗原结合部分包含含有SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列的重链可变域和含有SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的轻链可变域。

[0204] 在一些实施方式中，特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体或其抗原结合部分包含通过与SEQ ID NO:91中所示的核酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核酸序列编码的重链可变域氨基酸序列，和通过与SEQ ID NO:92中所示的核酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核酸序列编码的轻链可变域氨基酸序列。在一些实施方式中，抗体或其抗原结合部分包含通过SEQ ID NO:91中所示的核酸序列编码的重链可变域氨基酸序列和通过SEQ ID NO:92中所示的核酸序列编码的轻链可变域氨基酸序列。

[0205] 在一些实施方式（例如，对于表5中所示的抗体Ab2）中，特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体或其抗原结合部分包含：包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列的CDRH3、包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的CDRL2和包含SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列的CDRL3。

[0206] 在一些实施方式中，抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区，该重链可变区包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR3和该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方式中，抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区，该重链可变区包含具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR2和该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2。在一些实施方式中，抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区，该重链可变区包含具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR1，和该

轻链可变区包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1。

[0207] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含含有与SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的重链可变域和含有与SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的轻链可变域。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含含有SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的重链可变域和含有SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的轻链可变域。

[0208] 在一些实施方式中,特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体或其抗原结合部分包含通过与SEQ ID NO:93中所示的核酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核酸序列编码的重链可变域氨基酸序列,和通过与SEQ ID NO:94中所示的核酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核酸序列编码的轻链可变域氨基酸序列。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含通过SEQ ID NO:93中所示的核酸序列编码的重链可变域氨基酸序列和通过SEQ ID NO:94中所示的核酸序列编码的轻链可变域氨基酸序列。

[0209] 在一些实例中,特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的本公开的任何抗体包括具有与CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和/或CDRL3基本上相似的一个或多个CDR(例如,CDRH或CDRL)序列的任何抗体(包括其抗原结合部分)。例如,抗体可以包括与SEQ ID NO:1-12任一的对应CDR区相比含有最多5、4、3、2或1个氨基酸残基变异的如表5中所示的一个或多个CDR序列(SEQ ID NO:1-12)。表5中所列的抗体(例如,Ab1和Ab2)的重链可变区和轻链可变区的完整氨基酸序列以及编码抗体的重链可变区和轻链可变区的核酸序列在下面提供。

[0210] Ab1-重链可变区氨基酸序列

[0211]

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIRPYGDYSAAFDIWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:13)

[0212] Ab1-重链可变区核酸序列

[0213]

GAGGTGCAACTCGTGGAGTCAGGCGGTGGACTTGTTTCAGCCTGGGCGAAGTCTGAGACTCTCATGTGCAGCAAGTGG
ATTCAC TTTCTCCAGTTACGGCATGCACTGGGTGAGACAGGCGCCTGGAAAGGGTTTGAATGGGTCGCTGTGATCT
CTTACGACGGGTCAAACAAATATTACGCGGATTCAGTGAAAGGGCGGTTCACTATTTACGGGATAACTCCAAGAAC
ACCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGAGGGCAGAGGACACCGCTGTGTACTATTGTGCCCCGGGACATAAGGCCTTA
CGGCGATTACAGCGCCGATTTGATATTTGGGGACAAGGCACCCTTGTGACAGTATCTTCT (SEQ ID NO:91)

[0214] Ab1-轻链可变区氨基酸序列

[0215]

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPSIVIFEDNQRP SGAPDRFSGSIDSSNSASLT
ISGLKTEDEADYYCQSYDSSNHGGVFGGGTQLTVL (SEQ ID NO:14)

[0216] Ab1-轻链可变区核酸序列

[0217]

AATTTTATGCTTACCCAACCACATAGTGTGAGTGAGTCTCCCGGCAAGACTGTAACAATTTTCATGTACCGGCAGCAG
TGGCTCCATCGCTAGCAATTATGTGCAATGGTACCAACAGCGCCCCGGGAGCGCACCTTCAATAGTGATATTCGAGG
ATAACCAACGGCCTAGTGGGGCTCCCGATAGATTTAGTGGGAGTATAGATAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCTCTCACC
ATTAGCGGGCTGAAAACAGAGGATGAAGCCGACTATTACTGCCAAAGCTATGATTCTAGCAACCACGGCGGAGTGTT
TGGCGGAGGAACACAGCTGACAGTCCTAGG (SEQ ID NO:92)

[0218] Ab1-重链氨基酸序列

[0219]

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIRPYGDYSAAFDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:
15)

[0220] Ab1-轻链氨基酸序列

[0221]

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPSIVIFEDNQRPSGAPDRFSGSIDSSSNSASLT
ISGLKTEDEADYYCQSYDSSNHGGVFVGGGTQLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW
KADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO:
16)

[0222] Ab2-重链可变区氨基酸序列

[0223]

EVQLVQSGAEMKKPGESLKISCKGSGYNFASDWIGWVRQTPGKGLEWMGVIYPGDS DTRYSA SFQGQVTISADKSIN
TAYLQWSSLKASDTAMYYCASAAGIAAAGHVTAFDIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:17)

[0224] Ab2-重链可变区核酸序列

[0225]

GAGGTGCAACTGGTGCAATCCGAGCCGAGATGAAAAAGCCAGGGGAGAGCCTGAAGATCTCTTGTAAGGGCTCTGG
CTATAACTTCGCTAGTGATTGGATCGGATGGGTGAGGCAAACCCCGGAAAGGGCCTCGAGTGGATGGGCGTGATCT
ACCCCGGCGACTCCGACACACGCTATAGCGCCTCATTCCAGGGCCAGGTCACCATAAGTGCTGATAAATCAATAAAT
ACAGCCTACTTGCAATGGTCAAGTCTGAAAGCCTCAGATACTGCCATGTACTATTGTGCCCTCTGCCGCCGGCATTGC
CGCGGCCGGTCACGTCACCGCCTTCGACATTTGGGGTCAGGGCACTATGGTCACTGTAAGCTCC (SEQ ID NO:
93)

[0226] Ab2-轻链可变区氨基酸序列

[0227]

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPVTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:18)

[0228] Ab2-轻链可变区核酸序列

[0229]

GACATAGTCATGACCCAGTCACCTGACTCTTTGGCCGTGTCTCTGGGGGAGAGAGCCACAATAAATTGCAAGTCATC

ACAGAGCGTCTGTACTCCTCCAATAATAAAAAATTACCTGGCCTGGTACCAGCAAAAGCCCGGGCAACCCCCCAAAT
TGTTGATTTACTGGGCTAGTACAAGGAATCTGGAGTGCCAGACCGGTTTTCTGGTTCTGGATCTGGTACTGACTTC
ACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCCGAAGACGTGGCTGTGTACTATTGTCAGCAGTACTATAGTACACCAGTTAC
TTTCGGCCAAGGCACTAAACTCGAAATCAAG (SEQ ID NO:94)

[0230] Ab2-重链氨基酸序列

[0231]

EVQLVQSGAEMKKPGESLKISCKGSGYNFASDWIGWVRQTPGKGLEWMGVIYPGDS TRY SASFQGQVTISADKSIN
TAYLQWSSLKASDTAMYYCASAAGIAAAGHVTAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV D HKPSNTKVDKRVESKYGP PCP
PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEV
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:
19)

[0232] Ab2-轻链氨基酸序列

[0233]

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPVTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:
20)

[0234] 在一些实施方式中,特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和LRRC33-TGFβ1复合物的本公开的抗体包括包含SEQ ID NO:13或17的重链可变域或者SEQ ID NO:14或18的轻链可变域的任何抗体。在一些实施方式中,特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和LRRC33-TGFβ1复合物的本公开的抗体包括包含SEQ ID NO:13和14及17和18的重链可变和轻链可变对的任何抗体。

[0235] 本公开的方面提供具有与本文所述的那些抗体任一同源的重链可变和/或轻链可变氨基酸序列的特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和LRRC33-TGFβ1复合物的抗体。在一些实施方式中,特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和LRRC33-TGFβ1复合物的抗体包含与SEQ ID NO:13或17的重链可变氨基酸序列或者SEQ ID NO:14或18的轻链可变序列至少75% (例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%) 相同的重链可变序列或轻链可变序列。在一些实施方式中,同源重链可变氨基酸序列和/或轻链可变氨基酸序列不在本文提供的任何CDR序列内变化。例如,在一些实施方式中,序列变异的程度 (例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%) 可以在排除本文中提供的任何CDR序列的重链可变氨基酸序列和/或轻链可变氨基酸序列内存在。

[0236] 在一些实施方式中,本公开的特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体包括任何抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:15或19的重链或者SEQ ID NO:16或20的轻链。在一些实施方式中,本

公开的特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体包括包含SEQ ID NO:15和16或者SEQ ID NO:19和20的重链和轻链对的任何抗体。

[0237] 本公开的方面提供特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体,其具有与本文所述的那些中的任一种同源的重链和/或轻链氨基酸序列。在一些实施方式中,特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体包含与SEQ ID NO:15或19的重链序列或者SEQ ID NO:16或20的轻链氨基酸序列至少75% (例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%) 相同的重链序列或轻链序列。在一些实施方式中,同源重链和/或轻链氨基酸序列不在本文提供的任何CDR序列内变化。例如,在一些实施方式中,序列变异的程度(例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%) 可以在排除本文中提供的任何CDR序列的重链和/或轻链氨基酸序列内存在。

[0238] 在一些实施方式中,本公开的特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体包括任何抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:15或19的重链或者SEQ ID NO:16或20的轻链。在一些实施方式中,本公开的特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体包括包含SEQ ID NO:15和16或者SEQ ID NO:19和20的重链和轻链对的任何抗体。

[0239] 本公开的方面提供特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体,其具有与本文所述的那些中的任一种同源的重链和/或轻链氨基酸序列。在一些实施方式中,特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体包含与SEQ ID NO:15或19的重链序列或者SEQ ID NO:16或20的轻链氨基酸序列至少75% (例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%) 相同的重链序列或轻链序列。在一些实施方式中,同源重链和/或轻链氨基酸序列不在本文提供的任何CDR序列内变化。例如,在一些实施方式中,序列变异的程度(例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%) 可以在排除本文中提供的任何CDR序列的重链和/或轻链氨基酸序列内存在。

[0240] 在一些实施方式中,两个氨基酸序列的“百分同一性”使用Karlin和Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-68,1990的算法(如在Karlin和Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-77,1993中改进的)确定。这种算法整合在Altschul等 J.Mol.Biol.215:403-10,1990的NBLAST和XBLAST程序(版本2.0)中。BLAST蛋白质检索可以用XBLAST程序,评分=50,字长=3进行以获得与目标蛋白质分子同源的氨基酸序列。在两个序列之间存在空位的情况中,带空位BLAST可以如Altschul等,Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402,1997中所述使用。当采用BLAST和带空位BLAST程序时,可以使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0241] 在本文所述任何抗体或抗原结合片段中,一个或多个保守突变可以在其中残基不太可能参与抗体-抗原相互作用的位置处引入CDR或框架序列中。在一些实施方式中,这样的保守突变可以在其中如基于晶体结构确定的,残基不太可能参与与GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和LRRC33-TGFβ1复合物的相互作用的位置处引入CDR或框架序列中。在一些实施方式中,很可能界面(例如,参与抗体-抗原相互作用的残基)可以从已知的共有结构相似性的另一抗原的结构信息推导。

[0242] 如本文中使用的,“保守氨基酸置换”是指不改变在其中进行氨基酸置换的蛋白质的相对电荷和大小特征的氨基酸置换。变体可以按照本领域技术人员已知用于改变多肽序列的方法制备,如在汇编这样的方法的参考文献中发现的,例如,Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook等,eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, 或Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel等,eds., John Wiley & Sons, Inc., New York。氨基酸的保守置换包括在以下组中的氨基酸之间进行的置换: (a) M、I、L、V; (b) F、Y、W; (c) K、R、H; (d) A、G; (e) S、T; (f) Q、N; 和 (g) E、D。

[0243] 在一些实施方式中,本文提供的抗体包含赋予抗体所需的特性的突变。例如,为避免由于Fab-臂交换(其已知对于原始IgG4mAb发生)导致的潜在并发症,本文中提供的抗体可以包含稳定性“Adair”突变(Angal等,“A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human(IgG4) antibody”, Mol Immunol 30, 105-108; 1993), 其中丝氨酸228(EU编号; 残基241Kabat编号)转换为脯氨酸,导致IgG1-样(CPPCP(SEQ ID NO:58))铰链序列。因此,任何抗体可以包括稳定性“Adair”突变或氨基酸序列CPPCP(SEQ ID NO:54)。

[0244] 特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的本公开的抗体可以任选地包含抗体恒定区或其部分。例如,V_L结构域可以在其C-末端连接于轻链恒定域如C_κ或C_λ。类似地,V_H结构域或其部分可以连接于全部或部分的重链,如IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,及任何同种型亚类。抗体可以包括合适的恒定区(参见,例如,Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md. (1991))。因此,本公开范围内的抗体或其抗原结合部分可以包括与任何合适的恒定区组合的V_H和V_L结构域。

[0245] 在一些实施方式中,特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体可以包括或不包括SEQ ID NO:13-20的抗体的框架区。在一些实施方式中,特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体是鼠抗体且包括鼠框架区序列。

[0246] 在一些实施方式中,本公开的特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体可以以相对高的亲和力结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物,例如,具有小于10⁻⁶M、10⁻⁷M、10⁻⁸M、10⁻⁹M、10⁻¹⁰M、10⁻¹¹M或更小的K_D。例如,特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体可以以5pM和500nM,例如,50pM-100nM,例如,500pM-50nM之间的亲和力结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物。本公开还包

括与本文所述的任何抗体竞争结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物且具有50nM或更低(例如,20nM或更低、10nM或更低、500pM或更低、50pM或更低或者5pM或更低)的亲力的抗体或抗原结合片段。特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体的亲和力和结合动力学可以使用任何合适的方法测试,包括但不限于生物传感器技术(例如,OCTET或BIAcore)。

[0247] 抑制TGFβ的抗体

[0248] 在一个方面,本发明提供功能性抗体。如本文中使用的“功能性抗体”通过其结合抗原的能力赋予一种或多种生物学活性。功能性抗体可以包括抑制抗体(或抑制性抗体)和激活抗体。因此,本公开包括可以调节(例如,抑制或激活)通过TGFβ信号传导介导的生物过程的TGFβ抗体。

[0249] 如本文所用的术语“抑制抗体”是指抑制成熟生长因子释放或降低生长因子活性的抗体。抑制抗体包括靶向在与这样的抗体结合时降低生长因子释放或活性的任何表位的抗体。这样的表位可以位于TGFβ蛋白(例如,TGFβ1)的前结构域、生长因子或在被抗体结合时导致降低的生长因子活性的其它表位上。本发明的抑制抗体包括,但不限于TGFβ1-抑制抗体。

[0250] 本公开的实施方式包括在溶液、细胞培养物和/或受试者中使用抑制抗体以改变生长因子信号传导的方法。

[0251] 多肽

[0252] 本公开的一些方面涉及具有选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:19的序列的多肽。在一些实施方式中,多肽是可变重链结构域或重链结构域。在一些实施方式中,多肽与SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:19中所示的任一氨基酸序列至少75%(例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)相同。

[0253] 本公开的一些方面涉及具有选自SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:20的序列的多肽。在一些实施方式中,多肽是可变轻链结构域或轻链结构域。在一些实施方式中,多肽与SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:20中所示的任一氨基酸序列至少75%(例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)相同。

[0254] 与特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体竞争的抗体

[0255] 本公开的方面涉及与本文提供的抗体竞争或交叉竞争的抗体。本文中对于抗体使用的术语“竞争”意思是第一抗体以与第二抗体的结合充分相似的方式结合表位(例如,GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的表位),以使得第一抗体与其表位结合的结果在第二抗体的存在下与不存在第二抗体的情况下第一抗体的结合相比可检测地降低。其中第二抗体与其表位的结合也在第一抗体的存在下可检测地降低的替代方式可能是这种情况,但不必然是这种情况。也就是说,第一抗体可以抑制第二抗体与其表位的结合,而没有第二抗体抑制第一抗体与其相应表位的结合。但是,在其中各抗体可检测地抑制另一抗体与其表位或配体的结合(无论是以相同、较大或

较小的程度)的情况下,抗体被称为彼此“交叉竞争”结合其相应的表位。竞争和交叉竞争抗体两者在本公开的范围。无论这类竞争或交叉竞争发生的机制(例如,立体位阻、构象变化或者与共同表位或其部分的结合),本领域技术人员将理解,这样的竞争和/或交叉竞争抗体被包括在本文提供的方法和/或组合物中且可以用于本文提供的方法和/或组合物。

[0256] 本公开的方面涉及与本文提供的任何特定抗体或其抗原结合部分竞争或交叉竞争的抗体。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分与本文提供的任何抗体结合在相同的表位处或附近。在一些实施方式中,如果抗体或其抗原结合部分结合在表位的15个或更少的氨基酸残基内,则其结合在表位附近。在一些实施方式中,本文中提供的任何抗体或其抗原结合部分结合在本文提供的任何抗体所结合的表位的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸残基内。

[0257] 在另一实施方式中,本文提供了抗体或其抗原结合部分,其以低于 10^{-6} M的抗体和蛋白质之间的平衡解离常数 K_d 竞争或交叉-竞争结合本文中提供的任何抗原(例如,GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物)。在其它实施方式中,抗体以 10^{-11} M至 10^{-6} M范围的 K_d 竞争或交叉-竞争结合本文中提供的任何抗原。在一些实施方式中,本文提供了与本文所述的抗体或其抗原结合部分竞争结合的抗-TGF β 1抗体或其抗原结合部分。在一些实施方式中,本文提供了与本文所述的抗体或其抗原结合部分结合相同表位的抗-TGF β 1抗体或其抗原结合部分。

[0258] 本文提供的任何抗体可以使用任何合适的方法表征。例如,一种方法是鉴别抗原与其结合的表位或“表位作图”。存在着许多用于定位和表征蛋白质上表位的位置的合适方法,包括解析抗体-抗原复合物的晶体结构、竞争分析、基因片段表达分析和基于合成肽的分析,如在例如,Harlow和Lane,Using Antibodies,a Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1999的第11章中所述的。在另外的实例中,表位作图可以用于确定抗体与其结合的序列。表位可以是线性表位,即包含在单一氨基酸延伸链中,或由氨基酸的三维相互作用形成的构象表位,其可能不是必然包含在单一延伸链(初级结构线性序列)中。在一些实施方式中,表位是仅可在TGF β 1在GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物中时用于本文所述的抗体或其抗原结合部分结合的TGF β 1表位。可以分离或合成(例如,重组地合成)变化长度(例如,至少4-6氨基酸长)的肽且用于与抗体的结合分析。在另一实例中,抗体与其结合的表位可以通过使用源自靶抗原序列的重叠肽并测定抗体的结合在系统筛选中确定。根据基因片段表达分析,编码靶抗原的开放阅读框随机地或通过特定遗传构建片段化且测定表达的抗原片段与待测试的抗体的反应性。例如,基因片段可以通过PCR产生和然后在放射性氨基酸的存在下在体外转录和翻译成蛋白质。抗体与放射标记的抗原片段的结合然后通过免疫沉淀和凝胶电泳测定。某些表位也可以通过使用在噬菌体颗粒的表面上展示的随机肽序列的大文库(噬菌体文库)来鉴定。或者,重叠肽片段的限定文库可以在简单结合分析中测试与测试抗体的结合。在另外的实例中,可以进行抗原结合结构域的诱变、结构域交换实验和丙氨酸扫描诱变以鉴定表位结合所需要的、足够的和/或必要的残基。例如,结构域交换实验可以使用其中GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物的各种片段已经用来自密切相关的但抗原性上不同的蛋白质(如TGF β 蛋白家族的另一成员,例如,GDF11)的序列替代(交换)的目标抗原的突变体进行。通过评估

抗体与GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的突变体的结合,可以评价特定抗原片段对抗体结合的重要性。

[0259] 或者,竞争分析可以使用已知结合相同抗原的其它抗体进行以确定抗体是否与其它抗体结合相同的表位。竞争分析是本领域技术人员公知的。

[0260] 此外,任何本文提供的抗体与GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物中的一个或多个残基的相互作用可以通过常规技术测定。例如,可以确定晶体结构,且相应地可以测定GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物中的残基与抗体中的一个或多个残基之间的距离。基于这种距离,可以确定是否GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物中的特定残基与抗体中的一个或多个残基相互作用。此外,合适的方法如竞争分析和靶诱变分析可以应用于确定候选抗体的优先结合。

[0261] 结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体的产生

[0262] 多种方法可以用于获得本公开的抗体或其抗原结合片段。例如,抗体可以使用重组DNA方法产生。单克隆抗体也可以通过根据已知方法生成杂交瘤(参见,例如,Kohler和Milstein (1975) *Nature*, 256:495-499) 来产生。以这种方式形成的杂交瘤然后使用标准方法,如酶联免疫吸附分析(ELISA)和表面等离子体共振(例如,OCTET或BIACORE)分析,进行筛选以鉴定产生特异性地结合指定抗原的抗体的一种或多种杂交瘤。任何形式的指定抗原可以用作免疫原,例如,重组抗原、天然存在的形式、其任何变体或片段,以及其抗原性肽(例如,本文中描述为线性表位或在骨架内作为构象表位的任何表位)。制备抗体的一种示例性的方法包括筛选表达抗体或其片段(例如,scFv)的蛋白质表达文库,例如,噬菌体或核糖体展示文库。噬菌体展示描述于,例如,Ladner等,U.S.专利No.5,223,409;Smith (1985) *Science* 228:1315-1317;Clackson等(1991) *Nature*, 352:624-628;Marks等(1991) *J.Mol.Biol.*, 222:581-597;WO 92/18619;WO 91/17271;WO 92/20791;WO 92/15679;WO 93/01288;WO 92/01047;WO 92/09690和WO 90/02809中。

[0263] 除了使用展示文库外,指定的抗原(例如,GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物)可以用于免疫非人动物,例如,啮齿动物,例如,小鼠、仓鼠或大鼠。在一个实施方式中,非人动物是小鼠。

[0264] 在另一实施方式中,单克隆抗体从非人动物获得,和然后使用合适的重组DNA技术修饰(例如,嵌合)。用于制备嵌合抗体的多种途径已经描述。参见例如,Morrison等, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81:6851, 1985;Takeda等, *Nature* 314:452, 1985,Cabilly等, U.S.专利No.4,816,567;Boss等,U.S.专利No.4,816,397;Tanaguchi等,欧洲专利公开EP171496;欧洲专利公开0173494,英国专利GB 2177096B。

[0265] 对于另外的抗体产生技术,参见Antibodies:A Laboratory Manual,eds.Harlow等,Cold Spring Harbor Laboratory,1988。本公开不必然限制于抗体的任何特定的来源、产生方法或其它特殊的特征。

[0266] 本公开的一些方面涉及用多核苷酸或载体转化的宿主细胞。宿主细胞可以是原核或真核细胞。存在于宿主细胞中的多核苷酸或载体可以整合到宿主细胞的基因组中或其可以保持在染色体外。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞,如细菌、昆虫、真菌、植物、动物

或人细胞。在一些实施方式中,真菌细胞是,例如,酵母属的那些,特别是酿酒酵母种的那些。术语“原核的”包括可以用DNA或RNA分子转化或转染用于表达抗体或相应的免疫球蛋白链的所有细菌。原核宿主可以包括格兰氏阴性以及格兰氏阳性细菌如,例如,大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌、粘质沙雷氏菌和枯草芽胞杆菌。术语“真核的”包括酵母、高等植物、昆虫和脊椎动物细胞,例如,哺乳动物细胞,如NS0和CHO细胞。取决于重组体产生过程中使用的宿主,多核苷酸编码的抗体或免疫球蛋白链可以是糖基化的或可以是非糖基化的。抗体或相应的免疫球蛋白链也可以包括起始甲硫氨酸氨基酸残基。

[0267] 在一些实施方式中,一旦载体并入合适的宿主中,宿主可以保持在适合核苷酸序列的高水平表达的条件下,且根据需要,可以随后进行免疫球蛋白轻链、重链、轻链/重链二聚体或完整抗体、抗原结合片段或其它免疫球蛋白形式的收集和纯化;参见,Beychok, *Cells of Immunoglobulin Synthesis*, Academic Press, N.Y., (1979)。因此,多核苷酸或载体引入细胞中,其随后产生该抗体或抗原结合片段。此外,包含前述宿主细胞的转基因动物,优选哺乳动物,可以用于抗体或抗体片段的大规模生产。

[0268] 转化的宿主细胞可以在发酵器中生长并使用任何合适的技术培养以实现最佳细胞生长。一旦表达,全抗体、其二聚体、单个轻链和重链、其它免疫球蛋白形式或抗原结合片段可以按照本领域的标准过程纯化,包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱色谱、凝胶电泳等等;参见,Scopes, *"Protein Purification"*, Springer Verlag, N.Y. (1982)。抗体或抗原结合片段然后可以从生长培养基、细胞溶解产物或细胞膜部分分离。例如,细菌表达的抗体或抗原结合片段的分离和纯化可以通过任何常规的方式,如,例如,制备性色谱分离和免疫分离,如涉及使用针对例如抗体的恒定区的单克隆或多克隆抗体的那些。

[0269] 本公开的方面涉及杂交瘤,其提供无限延长的单克隆抗体来源。作为直接从杂交瘤的培养物获得免疫球蛋白的替代方式,永生化的杂交瘤细胞可以用作用于后续表达和/或遗传操作的重排的重链和轻链基因座的来源。重排的抗体基因可以从适宜的mRNA反转录以产生cDNA。在一些实施方式中,重链恒定区可以与不同同种型的重链恒定区交换或一起消除。可变区可以连接以编码单链Fv区。多个Fv区可以连接以赋予对超过一个靶标的结合能力或者可以采用嵌合的重链和轻链组合。任何适宜的方法可以用于抗体可变区的克隆和重组抗体的产生。

[0270] 在一些实施方式中,获得编码重链和/或轻链的可变区的适宜核酸并插入可转染到标准重组宿主细胞中的表达载体中。可以使用多种这样的宿主细胞。在一些实施方式中,哺乳动物宿主细胞对于高效的加工和产生可能是有利的。可用于这一目的的典型哺乳动物细胞系包括CHO细胞、293细胞或NS0细胞。抗体或抗原结合片段的产生可以通过在适合于宿主细胞的生长和编码序列的表达的培养条件下培养修饰的重组宿主来进行。抗体或抗原结合片段可以通过将其从培养物分离来回收。表达系统可以设计为包括信号肽以使得所得抗体分泌到培养基中;但是,细胞内产生也是可能的。

[0271] 本公开还包括编码本文所述抗体的至少免疫球蛋白链的可变区的多核苷酸。在一些实施方式中,该多核苷酸编码的可变区包含通过上述任一杂交瘤产生的抗体可变区的VH和/或VL的至少一个互补决定区(CDR)。

[0272] 编码抗体或抗原结合片段的多核苷酸可以是,例如,DNA、cDNA、RNA或者合成产生的DNA或RNA或者重组产生的嵌合核酸分子(包含单独或组合的那些多核苷酸中的任一个)。

在一些实施方式中,多核苷酸是载体的部分。这样的载体可以包含允许在合适的宿主细胞中和在合适的条件下载体的选择的进一步的基因,如标记基因。

[0273] 在一些实施方式中,多核苷酸可操作地连接表达控制序列而允许在原核或真核细胞中表达。多核苷酸的表达包括多核苷酸转录成可翻译的mRNA。确保在真核细胞(优选哺乳动物细胞)中的表达的调控元件是本领域技术人员公知的。它们可以包括促进转录起始的调控序列及任选地促进转录终止和转录物的稳定的聚-A信号。另外的调控元件可以包括转录以及翻译增强子和/或天然相关的或异源的启动子区域。允许在原核宿主细胞中表达的可能的调控元件包括,例如,大肠杆菌中的PL、Lac、Trp或Tac启动子,且允许在真核宿主细胞中表达的调控元件的实例是酵母中的AOX1或GAL1启动子或者在哺乳动物和其它动物细胞中的CMV-启动子、SV40-启动子、RSV-启动子(劳氏肉瘤病毒)、CMV-增强子、SV40-增强子或球蛋白内含子。

[0274] 除了负责转录启动的元件外,这样的调控元件也可以包括该多核苷酸下游的转录终止信号,如SV40-聚-A位点或tk-聚-A位点。此外,取决于所采用的表达系统,能够将多肽指引到细胞区室或将其分泌到培养基中的前导序列可以添加到多核苷酸的编码序列上并已经在之前描述。前导序列与翻译、起始和终止序列,及优选地能够指导翻译的蛋白质的或其部分分泌到例如细胞外基质中的前导序列以适当的相组装。任选地,可以使用编码包括赋予所需特性(例如,表达的重组产物的稳定或简化的纯化)的C-或N-末端鉴别肽的融合蛋白的异源多核苷酸序列。

[0275] 在一些实施方式中,编码轻链和/或重链的至少可变域的多核苷酸可以编码两个免疫球蛋白链或仅一个免疫球蛋白链的可变域。同样地,多核苷酸可以在相同启动子的控制下或可以单独地控制用于表达。此外,一些方面涉及载体,特别地常规地用于遗传工程中的质粒、粘粒、病毒和噬菌体,其包含编码抗体或抗原结合片段的免疫球蛋白链的可变域的多核苷酸;任选地与编码抗体的另一免疫球蛋白链的可变域的多核苷酸组合。

[0276] 在一些实施方式中,表达控制序列作为真核启动子系统提供在能够转化或转染真核宿主细胞的载体中,但也可以使用用于原核宿主的控制序列。源自病毒如逆转录病毒、牛痘病毒、腺相关病毒、疱疹病毒或牛乳头瘤病毒的表达载体可以用于递送多核苷酸或载体到靶向的细胞群体中(例如,以对细胞进行工程化而表达抗体或抗原结合片段)。多种适宜的方法可用于构建重组病毒载体。在一些实施方式中,多核苷酸和载体可以重构到脂质体中以用于递送到靶细胞。包含多核苷酸(例如,免疫球蛋白链的重链和/或轻链可变域的编码序列和表达控制序列)的载体可以通过合适的方法转移到宿主细胞中,该方法根据细胞宿主的类型而变化。

[0277] 修饰

[0278] 本公开的抗体或其抗原结合部分可以用可检测的标记或可检测的部分进行修饰,包括但不限于,酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质、放射性物质、正电子发射金属、非放射性顺磁性金属离子和用于检测和分离GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的亲和标记。可检测物质或部分可以使用合适的技术直接地与本公开的多肽偶联或缀合或者通过中间体(如,例如,接头(例如,可切割接头))间接地偶联或缀合。合适的酶的非限制性实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的非限制性实例包括链酶

亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适的荧光物质的非限制性实例包括生物素、伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光物质的实例包括鲁米诺;生物发光物质的非限制性实例包括荧光素酶、萤光素和水母发光蛋白;且合适的放射性物质的实例包括放射性金属离子,例如, α -发射体或其它放射性同位素如,例如,碘(^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{115}mIn , ^{113}mIn , ^{112}In , ^{111}In)和锝(^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、铊(^{201}Tl)、镓(^{68}Ga , ^{67}Ga)、钯(^{103}Pd)、钼(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{86}R 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 和锡(^{113}Sn , ^{117}Sn)。可检测物质可以使用合适的技术直接地与本公开的特定性地结合GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物的抗体偶联或缀合或者通过中间体(如,例如,接头)间接地偶联或缀合。与可检测物质缀合的本文提供的任何抗体可以用于任何合适的诊断分析,如本文中所述的那些。

[0279] 另外,本公开的抗体或其抗原结合部分也可以用药物修饰。该药物可以使用合适的技术直接地与本公开的多肽偶联或缀合或者或者通过中间体(如,例如,接头(例如,可切割接头))间接地偶联或缀合。

[0280] 靶向剂

[0281] 在一些实施方式中,本公开的方法包括使用一种或多种靶向剂以将如本文公开的抗体或其抗原结合部分靶向于受试者中的特定位点用于调节成熟TGF β 从GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物的释放的目的。例如,LTBP1-TGF β 1和LTBP3-TGF β 1复合物通常定位于细胞外基质。因此,在一些实施方式中,本文公开的抗体可以与细胞外基质靶向剂缀合用于将抗体定位于其中LTBP1-TGF β 1和LTBP3-TGF β 1复合物所处的位点的目的。在这样的实施方式中,抗体的选择性靶向导致LTBP1-TGF β 1和/或LTBP3-TGF β 1复合物的选择性调节。在一些实施方式中,抗体的选择性靶向导致LTBP1-TGF β 1和/或LTBP3-TGF β 1复合物的选择性抑制(例如,用于治疗纤维化的目的)。在一些实施方式中,细胞外基质靶向剂包括肝素结合剂、基质金属蛋白酶结合剂、赖氨酰氧化酶结合结构域、原纤维蛋白-结合剂、透明质酸结合剂等等。

[0282] 类似地,GARP-TGF β 1复合物通常定位于细胞的表面,例如激活的FOXP3⁺调节性T细胞(Tregs)。因此,在一些实施方式中,本文公开的抗体可以与免疫细胞(例如,Treg细胞)结合剂缀合用于将抗体定位于其中GARP-TGF β 1复合物所处的位点的目的。在这样的实施方式中,抗体的选择性靶向导致GARP-TGF β 1复合物的选择性调节。在一些实施方式中,抗体的选择性靶向导致GARP-TGF β 1复合物的选择性抑制(例如,成熟TGF β 1的释放的选择性抑制用于免疫调节的目的,例如,在癌症的治疗中)。在这样的实施方式中,Treg细胞靶向剂可以包括,例如,CCL22和CXCL12蛋白或其片段。

[0283] 在一些实施方式中,可以使用具有选择性地结合GARP-TGF β 1复合物和LTBP-TGF β 1复合物的第一部分和选择性地结合靶位点的组分,例如,ECM的组分(例如,原纤维蛋白)或Treg细胞的组分(例如,CTLA-4),的第二部分的双特异性抗体。

[0284] 药物组合物

[0285] 本发明进一步提供用作适合施用于人或非人受试者的药物的药物组合物。特异性地结合GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复

合物的一种或多种抗体可以与药学上可接受的载体(赋形剂)(包括例如,缓冲剂)配制或混合以形成药物组合物。这样的制剂可以用于治疗涉及TGF β 信号传导的疾病或障碍。在一些实施方式中,与TGF β 信号传导相关的这类疾病或障碍涉及一种或多种情境,即,TGF β 与一种或多种特定类型的呈递分子相关联。在一些实施方式中,这种情境以细胞类型特异性的和/或组织特异性的方式存在。在一些实施方式中,例如,TGF β 信号传导的这种情境依赖性的作用部分地通过GARP、LRRC33、LTBP1和/或LTBP3介导。

[0286] 在一些实施方式中,本发明的抗体特异性地结合两种或更多种情境的TGF β ,使得该抗体结合在与选自以下的两种或更多种呈递分子的复合物中的TGF β :GARP、LRRC33、LTBP1和LTBP3。因此,这样的药物组合物可以施用于患者而用于缓解TGF β -相关的适应症(例如,纤维化、免疫障碍和/或癌症)。“可接受的”意思是载体与组合物的活性成分相容(和优选地,能够稳定活性成分)且对于所治疗的受试者不是有害的。药学上可接受的赋形剂(载体)(包括缓冲剂)的实例是本领域技术人员清楚的且之前已经描述。参见,例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed.(2000)Lippincott Williams and Wilkins,Ed.K.E.Hoover。在一个实例中,本文所述的药物组合物包含超过一种特异性地结合GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物的抗体,其中抗体识别GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物的不同表位/残基。

[0287] 本发明的方法中使用的药物组合物可以包含冻干制剂或水溶液形式的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington:The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed.(2000)Lippincott Williams and Wilkins,Ed.K.E.Hoover)。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所使用的剂量和浓度下对于接受者是无毒的,并且可以包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵(hexamethonium chloride);苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(低于约10个残基)的多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物类,包括葡萄糖、甘露糖或葡聚糖;螯合剂,如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐反离子,如钠;金属络合物(例如,锌-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,如TweenTM、PluronicTM或聚乙二醇(PEG)。药学上可接受的赋形剂在本文中进一步描述。

[0288] 在一些实例中,本文所述的药物组合物包含含有特异性地结合GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物的抗体的脂质体,其可以通过任何合适的方法制备,如在Epstein等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:3688(1985);Hwang et al.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4030(1980);及U.S.专利No.4,485,045和4,544,545中描述的。具有增加的循环时间的脂质体公开于U.S.专利No.5,013,556中。特别有用的脂质体可以通过反相蒸发方法用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG-衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物产生。脂质体通过具有限定孔隙大小的过滤器挤出以产生具有所需直径的脂质体。

[0289] 特异性地结合GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或

LRRC33-TGFβ1复合物的抗体也可以包裹在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如,分别在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)中或在粗乳液中的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。示例性的技术之前已经描述,参见例如,Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)。

[0290] 在其它实例中,本文所述的药物组合物可以配制成持续释放形式。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半渗透基质,该基质为成形颗粒的形式,例如,膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(U.S. 专利No. 3,773,919)、L-谷氨酸和7-乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙酸乙烯乙烯基酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球)、乙酸异丁酸蔗糖酯和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0291] 用于体内施用的药物组合物必须为无菌的。这容易地例如通过经过无菌的过滤膜的过滤来完成。治疗性抗体组合物一般置于具有无菌进入端口的容器中,例如,具有可通过皮下注射针刺穿的塞子的静注溶液袋或小瓶。

[0292] 本文所述的药物组合物可以为单位剂型如片剂、丸剂、胶囊、粉末剂、颗粒剂、溶液或悬浮液、或栓剂,其用于口服、肠胃外或直肠施用,或通过吸入或吹入的施用。

[0293] 为制备固体组合物如片剂,主要活性成分可以与药用载体混合,例如,常规压片成分如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨糖醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或树脂,及其它药用稀释剂,例如,水,以形成包含本公开的化合物或其非毒性的药学上可接受的盐的均质混合物的固体预制组合物。当提到这些预制组合物为均质的时,其意思是活性成分在整个组合物中均匀地分散,使得组合物可以容易地细分成同等有效的单位剂型如片剂、丸剂和胶囊。这一固体预制组合物然后细分成包含0.1mg至约500mg的本公开活性成分的上述类型的单位剂型。新型组合物的片剂或丸剂可以包衣或另外地复配以提供给予延长作用的优势的剂型。例如,片剂或丸剂可以包含内剂量和外剂量组分,后者为前者上的包覆层的形式。这两个组分可以通过肠溶层分隔,该肠溶层用于对抗胃中的崩解并允许内组分完整地进入到十二指肠中或延迟释放。多种材料可以用于这类肠溶层或包衣,这样的材料包括多种聚合酸和聚合酸与诸如虫胶、鲸蜡醇和醋酸纤维素的这些材料的混合物。

[0294] 合适的表面活性试剂包括,特别地,非离子试剂如聚氧乙烯山梨聚糖(例如, Tween™ 20、40、60、80或85)和其它山梨聚糖(例如, Span™ 20、40、60、80或85)。具有表面活性试剂的组合物方便地包含0.05-5%的表面活性试剂,且可以为0.1-2.5%。应理解,如果需要,可以添加其它成分,例如甘露糖醇或其它药学上可接受的溶媒。

[0295] 合适的乳液可以使用商购可得的脂肪乳液如Intralipid™、Liposyn™、Infonutrol™、Lipofundin™和Lipiphysan™制备。活性成分可以溶解在预混合的乳液组合物中或者可选地它可以溶解在油(例如,大豆油、红花油、棉籽油、芝麻油、玉米油或杏仁油)中,且乳液在与磷脂(例如,卵磷脂、大豆磷脂或大豆卵磷脂)和水混合时形成。应理解,可以添加其它成分,例如甘油或葡萄糖,以调节乳液的张力。合适的乳液通常含有最多20%的油,例如,5和20%之间。

[0296] 乳液组合物可以通过混合特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合

物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体与Intralipid™或其组分(大豆油、卵磷脂、甘油和水)制备的那些。

[0297] 用于吸入或吹入的药物组合物包括药学上可接受的水性或有机溶剂或其混合物中的溶液和悬浮液,及粉末。液体或固体组合物可以包含如以上给出的合适的药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中,组合物通过口腔或鼻呼吸途径施用用于实现局部或系统效应。

[0298] 在优选无菌的药学上可接受的溶剂中的组合物可以通过使用气体来雾化。雾化的溶液可以从雾化装置直接呼吸或者雾化装置可以连接于面罩、帐幕或间歇性正压呼吸机。溶液、悬浮液或粉末组合物可以从以适宜的方式递送制剂的装置(优选经口或经鼻腔)施用。

[0299] 特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体及其抗原结合部分的用途

[0300] 在一些实施方式中,本公开的抗体、其抗原结合部分和组合物可以用于治疗广泛的疾病、障碍和/或病症。在一些情况中,这样的疾病、障碍和/或病症可以是TGFβ-相关的适应症。如本文所用的术语“TGFβ-相关的适应症”是指与TGFβ家族成员蛋白的表达、活性和/或代谢相关的任何疾病、障碍和/或病症或者可能受益于一种或多种TGFβ家族成员蛋白的活性和/或水平的调节的任何疾病、障碍和/或病症。TGFβ-相关的适应症可以包括,但不限于纤维化、癌症(包括但不限于结肠癌、肾癌、乳腺癌、恶性黑色素瘤和成胶质细胞瘤)、化疗后快速造血作用的促进、骨愈合、伤口愈合、痴呆、骨髓纤维化、肾病、单侧输尿管闭塞(UUO)、牙损失和/或退化、内皮增殖综合征、哮喘和过敏、胃肠障碍、老年性贫血、主动脉血管瘤、孤儿适应症(orphan indications)(如马方氏综合征和进行性骨干发育不良(Camurati-Engelmann disease))、肥胖症、糖尿病、关节炎、多发性硬化、肌营养不良、肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病、骨质疏松症、骨关节炎、骨量减少症、代谢综合征、营养障碍、器官萎缩、慢性阻塞性肺病(COPD)和厌食症。另外的适应症可以包括US公开No. 2013/0122007、US专利No. 8,415,459或国际公开No. W02011/151432中公开的那些的任一种,其各自的内容通过引用全文并入本文中。

[0301] 纤维化

[0302] 在一些实施方式中,本公开的抗体和/或组合物可能可用于改变纤维化。在一些实施方式中,这样的抗体和/或组合物是TGFβ(例如,TGFβ1)的拮抗剂。TGFβ1公认为纤维化反应的中心协调器(orchestrator)。靶向TGFβ1的抗体在多种临床前模型中降低纤维化。这样的抗体和/或基于抗体的化合物包括LY2382770(Eli Lilly, Indianapolis, IN)。还包括在U.S. 专利号US 6,492,497,US 7,151,169,US 7,723,486和U.S. 申请公开No. 2011/0008364中描述的那些,其各自的内容通过引用全文并入本文中。

[0303] 本公开的抗体和/或组合物可以治疗性地使用的纤维化适应症包括,但不限于肺适应症(例如,特发性肺纤维化(IPF)、慢性阻塞性肺病(COPD)、过敏性哮喘、急性肺损伤、嗜酸性细胞性食管炎、肺动脉高血压和化学气体损伤)、肾适应症(例如,糖尿病性肾小球硬化症、局灶性节段性肾小球硬化症(FSGS)、慢性肾病、与肾移植和慢性排斥相关的纤维化、IgA肾病和溶血性尿毒综合征)、肝纤维化(例如,非酒精性脂肪肝(NASH)、慢性病毒性肝炎、寄生虫血症、先天性代谢缺陷、毒素-介导的纤维化如酒精性纤维化、非酒精性脂肪肝-肝细胞

癌 (NASH-HCC)、原发性胆汁性肝硬化和硬化性胆管炎)、心血管纤维化 (例如, 心肌病、肥厚性心肌病、动脉粥样硬化和再狭窄)、系统性硬化、皮肤纤维化 (例如, 系统性硬化中的皮肤纤维化、弥漫性皮肤系统性硬化、硬皮病、病理性皮肤疤痕、瘢痕疙瘩、手术后疤痕、疤痕修复手术、辐射诱导的疤痕和慢性创面) 和癌症或继发纤维化 (例如, 骨髓纤维化、头颈癌、M7 急性原巨核细胞性白血病和粘膜炎)。可以使用本公开的化合物和/或组合物治疗的与纤维化有关的其它疾病、障碍或病症包括, 但不限于马方氏综合征、皮肤僵硬综合征、硬皮病、类风湿性关节炎、骨髓纤维化、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、系统性红斑狼疮、肌营养不良 (如 DMD)、掌腱膜挛缩症 (Dupuytren's contracture)、进行性骨干发育不良、神经瘢痕、痴呆、增生性玻璃体视网膜病变、角膜损伤、青光眼引流手术后的并发症和多发性硬化。许多这样的纤维化适应症也与受影响的组织的炎症相关, 表明牵涉免疫组分。

[0304] 本文所述的抗体可以用于治疗纤维化。在一些实施方式中, TGF β 1 亚型特异性的药剂以有效治疗纤维化的量施用于受试者。这种抗体的有效量是在受试者中有效地实现治疗功效和临床安全性两者的量。在一些实施方式中, 这种抗体是可以阻断通过含 LTBP 的 ECM-相关的 TGF β 1 介导的 TGF β 1 激活的情境特异性的抗体。在一些实施方式中, LTBP 是 LTBP1 和/或 LTBP3。在一些实施方式中, 抗体是可以阻断定位于 ECM 中的 LTBP-介导的 TGF β 1 和定位于免疫细胞中的 GARP-介导的 TGF β 1 的激活的情境许可的抗体。在一些实施方式中, 抗体是可以阻断定位于 ECM 中的 LTBP-介导的 TGF β 1 和定位于单核细胞/巨噬细胞中的 LRRC33-介导的 TGF β 1 的激活的情境许可的抗体。在一些实施方式中, LTBP 是 LTBP1 和/或 LTBP3。在一些实施方式中, 靶向和抑制在纤维化微环境中通过促纤维化的 M2-样巨噬细胞上的 LRRC33 呈递的 TGF β 1 可能是有益的。

[0305] 可用于测定本公开的抗体和/或组合物对于改变纤维化的功效的分析包括, 但不限于用于计数成纤维细胞的组织学分析和本领域中已知的基础免疫组织化学分析。

[0306] 癌症

[0307] 各种癌症可以用本公开的抗体和/或组合物治疗。如本文所用的术语“癌症”是指特征在于倾向于侵入周围组织和转移到新的身体部位的未分化细胞 (anaplastic cell) 增殖的各种恶性肿瘤中的任一种且也指特征在于这种恶性肿瘤生长的病理状况。癌症可以是肿瘤或血液恶性肿瘤, 且包括但不限于所有类型的淋巴瘤/白血病、内皮瘤和肉瘤, 如在肛门、膀胱、胆管、骨骼、脑、乳腺、子宫颈、结肠/直肠、子宫内膜、食管、眼、胆囊、头和颈、肝、肾、喉、肺、纵隔膜 (胸部)、口腔、卵巢、胰腺、阴茎、前列腺、皮肤、小肠、胃、脊髓、尾椎骨、睾丸、甲状腺和子宫中发现的那些癌症或肿瘤。

[0308] 在癌症中, TGF β (例如, TGF β 1) 可以是生长促进性的或生长抑制性的。作为实例, 在胰腺癌中, SMAD4 野生型肿瘤可以发生响应于 TGF β 的抑制的生长, 但由于疾病进展, 通常存在组成型激活的 II 型受体。另外, 存在 SMAD4-无效 (SMAD4-null) 胰腺癌。在一些实施方式中, 本公开的抗体、其抗原结合部分和/或组合物设计为选择性地靶向在一种或多种癌症形式中独特地发挥功能的 TGF β 信号传导途径的组分。特征在于白血细胞 (即, 白细胞) 的异常增殖的白血病或者血液或骨髓的癌症可以分成四种主要的分类, 包括急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、急性髓性白血病或急性髓细胞性白血病 (AML) (伴随染色体 10 和 11 之间的转位 [t (10, 11)]、染色体 8 和 21 之间的转位 [t (8; 21)]、染色体 15 和 17 之间的转位 [t (15; 17)] 及染色体 16 中的倒位 [inv (16)] 的 AML; 伴随多系增生异常

(multilineage dysplasia)的AML,其包括具有先前的骨髓增生异常综合征(MDS)或骨髓增生性疾病(其转化成AML)的患者;AML和骨髓增生异常综合征(MDS),治疗相关的,其类别包括具有先前的化疗和/或放疗且随后发生AML或MDS的患者;d)未另外分类的AML,其包括不落入以上类别中的AML亚型;和e)未定谱系的急性白血病,其在白血病细胞不能分类为髓系或淋巴样细胞时或者在存在两种类型的细胞的情况下发生);及慢性髓性白血病(CML)。

[0309] 内皮瘤的类型包括,但不限于乳头瘤/内皮瘤、绒毛膜癌、内胚窦瘤、畸胎瘤、腺瘤/腺癌、黑素瘤、纤维瘤、脂肪瘤、平滑肌瘤、横纹肌瘤、间皮瘤、血管瘤、骨肉瘤、软骨瘤、神经胶质瘤、淋巴瘤/白血病、鳞状细胞瘤、小细胞癌、大细胞未分化癌、基底细胞癌和鼻窦未分化癌。

[0310] 肉瘤的类型包括,但不限于软组织肉瘤如腺泡状软组织肉瘤、血管肉瘤、皮肤纤维肉瘤、硬纤维瘤、促纤维增生性小圆细胞肿瘤、骨外软骨肉瘤、骨外骨肉瘤、纤维肉瘤、血管外皮细胞瘤、血管肉瘤、卡波济氏肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、神经纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、滑膜肉瘤和Askin's瘤、尤因氏肉瘤(原始神经外胚层肿瘤)、恶性血管内皮瘤、恶性神经鞘瘤、骨肉瘤和软骨肉瘤。

[0311] 在一些实施方式中,本公开的抗体和方法可以用于治疗一种或多种类型的癌症或癌症相关病症,其可以包括,但不限于结肠癌、肾癌、乳腺癌、恶性黑素瘤和成胶质细胞瘤(Schlingensiepen等,2008;Ouhthit等,2013)。

[0312] 在一些实施方式中,如本文所述的特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体或其抗原结合部分可以用于治疗需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用抗体或其抗原结合部分,使得治疗癌症。在某些实施方式中,癌症是结肠癌。

[0313] 在一些实施方式中,如本文所述的特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体或其抗原结合部分可以用于治疗实体肿瘤的方法中。在一些实施方式中,实体肿瘤可以是促结缔组织增生性肿瘤,其通常是致密的且对于治疗性分子难以渗透。通过靶向这些肿瘤的ECM组分,这样的抗体可以“松弛”致密的肿瘤组织以使其分解,从而促进治疗访问以发挥其抗癌作用。因此,另外的治疗剂如任何已知的抗-肿瘤药物可以组合使用。

[0314] 在一些实施方式中,如本文所述的特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体或其抗原结合部分可以用于抑制或降低患有实体肿瘤的受试者中的实体肿瘤生长的方法中,所述方法包括向受试者施用抗体或其抗原结合部分,使得实体肿瘤生长被抑制或降低。在某些实施方式中,实体肿瘤是结肠癌肿瘤。在一些实施方式中,可用于治疗癌症的抗体或其抗原结合部分是亚型特异性的、情境许可的TGFβ1激活抑制剂。在一些实施方式中,这样的抗体靶向GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和LRRC33-TGFβ1复合物。在一些实施方式中,这样的抗体靶向GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物和LTBP3-TGFβ1复合物。在一些实施方式中,这样的抗体靶向LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和LRRC33-TGFβ1复合物。在一些实施方式中,这样的抗体靶向GARP-TGFβ1复合物和LRRC33-TGFβ1复合物。

[0315] 在某些实施方式中,如本文所述的特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体或其抗原结合部分单独地或

与另外的药剂,例如,抗-PD-1抗体(例如,抗-PD-1拮抗剂),结合施用于患有癌症或肿瘤的受试者。包括在本发明中的其它组合疗法是施用本文所述的抗体或其抗原结合部分及放疗或化疗剂。示例性的另外药剂包括,但不限于PD-1拮抗剂、PDL1拮抗剂、PD-L1或PDL2融合蛋白、CTLA4拮抗剂、GITR激动剂、抗-ICOS抗体、抗-ICOSL抗体、抗-B7H3抗体、抗-B7H4抗体、抗-TIM3抗体、抗-LAG3抗体、抗-OX40抗体、抗-CD27抗体、抗-CD70抗体、抗-CD47抗体、抗-41BB抗体、抗-PD-1抗体、溶瘤病毒和PARP抑制剂。

[0316] TGFβ在骨骼肌病症中的作用

[0317] 在骨骼肌中,TGFβ发挥多种作用,包括增殖和分化的抑制、肌萎缩的诱导和纤维化的发展。TGFβ减少星状细胞增殖和防止分化(通过MyoD和肌细胞生成素的抑制)(Allen, R.E.和L.K.J Cell Physiol,1987.133(3):p.567-72;Brennan,T.J.等,Proc Natl Acad Sci U S A,1991.88(9):p.3822-6;Massague,J.等,Proc Natl Acad Sci U S A,1986.83(21):p.8206-10;Olson,E.N.等,J Cell Biol,1986.103(5):p.1799-805)。TGFβ的亚型(即,TGFβ1、2或3)在这些早期的文章中未指明,而假定是TGFβ1。TGFβ也造成肌纤维化;重组TGFβ1的直接注射导致骨骼肌纤维化,且泛-TGFβ抑制在急性和慢性损伤的肌肉中降低纤维化(Li,Y.等,Am J Pathol,2004.164(3):p.1007-19;Mendias,C.L.等,Muscle Nerve,2012.45(1):p.55-9;Nelson,C.A.等,Am J Pathol,2011.178(6):p.2611-21)。TGFβ1通过骨骼肌内的肌纤维、巨噬细胞、调节性T细胞、成纤维细胞和纤维细胞表达(Li,Y.等,Am J Pathol,2004.164(3):p.1007-19;Lemos,D.R.等,Nat Med,2015.21(7):p.786-94;Villalta,S.A.等,Sci Transl Med,2014.6(258):p.258ra142;Wang,X.等,J Immunol,2016.197(12):p.4750-4761);且表达在损伤时和在疾病中增加(Li,Y.等,Am J Pathol,2004.164(3):p.1007-19;Nelson,C.A.等,Am J Pathol,2011.178(6):p.2611-21;Bernasconi,P.等,J Clin Invest,1995.96(2):p.1137-44;Ishitobi,M.等,Neuroreport,2000.11(18):p.4033-5)。TGFβ2和TGFβ3也在mdx肌肉中上调(在mRNA水平),虽然以比TGFβ1低的水平(Nelson,C.A.等,Am J Pathol,2011.178(6):p.2611-21;Zhou,L.等,Neuromuscul Disord,2006.16(1):p.32-8)。Pessina等最近使用谱系追踪实验来证明营养不良的肌肉内多种起源的细胞经由TGFβ-依赖性的途径而接受纤维发生命运(Pessina,P.等,Stem Cell Reports,2015.4(6):p.1046-60)。

[0318] TGFβ1牵涉到人肌肉营养不良。杜氏肌营养不良(DMD)是通过肌营养不良蛋白的缺乏引起的严重的、进行性的和最终致死性的疾病(Bushby,K.等,Lancet Neurol,2010.9(1):p.77-93)。肌营养不良蛋白的缺乏导致对收缩诱导的损伤的易感性,从而导致持续的肌肉退化(Petrof,B.J.等,Proc Natl Acad Sci U S A,1993.90(8):p.3710-4;Dellorusso,C.等,J Muscle Res Cell Motil,2001.22(5):p.467-75;Pratt,S.J.等,Cell Mol Life Sci,2015.72(1):p.153-64)。重复轮的修复造成慢性炎症、纤维化、星状细胞池的耗尽、运动性的最终丧失和死亡(Bushby,K.等,Lancet Neurol,2010.9(1):p.77-93;McDonald,C.M.等,Muscle Nerve,2013.48(3):p.343-56)。TGFβ1的表达在患有DMD的患者中显著增加并与在这些患者中观察到的纤维化程度相关联(Bernasconi,P.等,J Clin Invest,1995.96(2):p.1137-44;Chen,Y.W.等,Neurology,2005.65(6):p.826-34)。过度的ECM沉积对肌肉的收缩性能具有有害的影响且可以限制对营养的获取,因为肌纤维与其血液供应隔离(Klingler,W.等,Acta Myol,2012.31(3):p.184-95)。最近,另外的数据进一步

将TGF β 1牵涉到肌肉营养不良中。已经发现LTBP4的变体在小鼠和人中改变疾病严重性。在小鼠中,LTBP4的变体在缺乏肌营养不良蛋白或 γ -肌聚糖的小鼠中是保护性的(Coley, W.D.等, Hum Mol Genet, 2016.25(1):p.130-45; Heydemann, A.等, J Clin Invest, 2009.119(12):p.3703-12)。在人体中,两个小组独立地鉴定了LTBP4的变体为在DMD中是保护性的,从而延迟行走的丧失几年(Flanigan, K.M.等, Ann Neurol, 2013.73(4):p.481-8; van den Bergen, J.C.等, J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2015.86(10):p.1060-5)。虽然在小鼠和人体中的遗传变体的性质不同,但在这两个物种中保护性的变体导致降低的TGF β 信号传导(Heydemann, A.等, J Clin Invest, 2009.119(12):p.3703-12; Ceco, E.等, Sci Transl Med, 2014.6(259):p.259ra144)。TGF β 1在骨骼肌生物学中的许多功能已经从其中纯化的活性生长因子注射到动物中或添加到培养的细胞中的实验推论(Massague, J.等, Proc Natl Acad Sci U S A, 1986.83(21):p.8206-10; Li, Y.等, Am J Pathol, 2004.164(3):p.1007-19; Mendias, C.L.等, Muscle Nerve, 2012.45(1):p.55-9)。考虑到细胞情境对于TGF β 1的特定功能的重要性(参见,例如, Hinck等, Cold Spring Harb. Perspect. Biol, 2016.8(12)),有可能在这些实验中观察到的一些效应不反映细胞因子在体内的内源作用。例如,人皮肤成纤维细胞用重组TGF β 1、肌生长抑制素或GDF11处理在这些细胞中导致基因表达的相同变化,虽然在体内这些蛋白质的作用是非常不同的(Tanner, J.W., Khalil, A., Hill, J., Franti, M., MacDonnell, S.M., Growth Differentiation Factor 11 Potentiates Myofibroblast Activation, in fibrosis: From Basic Mechanisms to Targeted therapies. 2016:Keystone, CO)。

[0319] 多名研究者已经使用TGF β 的抑制剂以阐明生长因子的体内作用。mdx小鼠用泛-TGF β 中和抗体1D11处理明显地导致降低的纤维化(通过组织学和羟脯氨酸含量)、降低的肌肉损伤(降低的血清肌酐激酶和更高的肌纤维密度)和提高的肌肉功能(通过体积描记法、分离的EDL肌肉的力生成和增大的前肢握力)(Nelson, C.A.等, Am J Pathol, 2011.178(6):p.2611-21; Andreetta, F.等, J Neuroimmunol, 2006.175(1-2):p.77-86; Gumucio, J.P.等, J Appl Physiol (1985), 2013.115(4):p.539-45)。另外,显性负效TGF β II型受体的肌纤维特异性的表达提供针对在心脏毒素损伤后和在 δ -肌聚糖-/-小鼠中的肌肉损害的保护(Accornero, F.等, Hum Mol Genet, 2014.23(25):p.6903-15)。在骨骼肌中丰富的且抑制TGF β 活性的蛋白聚糖饰胶蛋白(proteoglycan decorin)在mdx小鼠中且在撕裂损伤后降低肌肉纤维化(Li, Y.等, Mol Ther, 2007.15(9):p.1616-22; Gosselin, L.E.等, Muscle Nerve, 2004.30(5):p.645-53)。具有TGF β 抑制性活性的其它分子如苏拉明(抗-肿瘤剂)和洛沙坦(血管紧张肽受体阻滞剂)有效地改善肌肉病理并在小鼠损伤模型、马方氏综合征和肌营养不良中减少纤维化(Spurney, C.F.等, J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011.16(1):p.87-95; Taniguti, A.P.等, Muscle Nerve, 2011.43(1):p.82-7; Bedair, H.S.等, Am J Sports Med, 2008.36(8):p.1548-54; Cohn, R.D.等, Nat Med, 2007.13(2):p.204-10)。尽管上述所有治疗剂确实抑制TGF β 1或其信号传导,它们中没有一种是针对TGF β 1亚型特异性的。例如,1D11结合并抑制TGF β 1、2和3亚型(Dasch, J.R.等, J Immunol, 1989.142(5):p.1536-41)。除TGF β 1外,苏拉明抑制多种生长因子结合其受体(包括PDGF、FGF和EGF)的能力(Hosang, M., J Cell Biochem, 1985.29(3):p.265-73; Olivier, S.等, Eur J Cancer, 1990.26(8):p.867-71; Scher, H.I.和W.D.Heston, Cancer Treat Res, 1992.59:p.131-

51)。饰胶蛋白也通过直接结合和通过卵泡抑素(一种肌生长抑制素抑制剂)的上调两者抑制肌生长抑制素活性(Miura,T.等,Biochem Biophys Res Commun,2006.340(2):p.675-80;Brandan,E.,C.Cabello-Verrugio和C.Vial,Matrix Biol,2008.27(8):p.700-8;Zhu,J.等,J Biol Chem,2007.282(35):p.25852-63)。洛沙坦通过其对肾素-血管紧张素-醛固酮系统的作用影响另外的信号传导途径,包括IGF-1/AKT/mTOR途径(Burks,T.N.等,Sci Transl Med,2011.3(82):p.82ra37;Sabharwal,R.和M.W.Chapleau,Exp Physiol,2014.99(4):p.627-31;McIntyre,M.等,Pharmacol Ther,1997.74(2):p.181-94)。因此,所有这些疗法抑制另外的分子(这可以造成其治疗效果以及毒性)。

[0320] 考虑到TGF β 在肌肉动态平衡、修复和再生中的推测的作用,选择性地调节TGF β 1信号传导的药剂,如本文所述的单克隆抗体,可以有效地治疗损伤的肌肉纤维,如在慢性/遗传性肌肉营养不良及急性肌肉损伤中,而没有与迄今开发的更广泛作用的TGF β 抑制剂相关的毒性。

[0321] 因此,本发明提供使用优先在体内调节TGF β 效应的亚组而不是全部的药剂来治疗损伤的肌肉纤维的方法。这样的药剂可以选择性地调节TGF β 1信号传导(“亚型-特异性的调节”)。在一些实施方式中,这样的药剂可以在特定情境中进一步选择性地调节TGF β 1(“情境-特异性的调节”)。

[0322] 慢性肌肉疾病中的肌肉纤维修复

[0323] 本发明包括在DMD患者中通过限制纤维化且造成肌肉形态和功能的正常化而改善肌肉质量和功能的方法。由于TGF β 1也抑制肌发生,TGF β 1阻断可以促进营养不良肌肉的再生,从而增加另外的治疗益处。TGF β 1抑制剂可以与肌营养不良蛋白上调疗法如Exondys 51(Eteplirsen)结合使用。考虑到肌营养不良中TGF β 1抑制的潜在治疗益处,关键的是(1)区分TGF β 1的作用与TGF β 2和TGF β 3的作用,和(2)澄清其中TGF β 1抑制最有益的分子情境。如上所述,泛-TGF β 抑制剂与严重的毒性相关,限制了这些化合物的临床使用(Anderton,M.J.等,Toxicol Pathol,2011.39(6):p.916-24;Stauber,A.等,Clinical Toxicology,2014.4(3):p.1-10)。不清楚的是哪些TGF β 亚型引起这些毒性。一些所描述的毒性可能是由于免疫系统中的TGF β 1抑制。例如,尽管1D11显著降低隔膜中的纤维化水平,但治疗也增加肌肉中CD4⁺和CD8⁺T细胞的数目,表明在泛-TGF β 抑制时增加的炎症反应,这对于长期治疗可能是有害的(Andreetta,F.等,J Neuroimmunol,2006.175(1-2):p.77-86)。事实上,T细胞从肌肉耗尽改善了mdx小鼠的肌肉病理,表明T-细胞介导的炎症反应对于营养不良的肌肉是有害的(Spencer,M.J.等,Clin Immunol,2001.98(2):p.235-43)。1D11施用T细胞数量的增加很可能是由于TGF β 1对调节性T(Treg)细胞的作用。Tregs在其细胞表面上通过GARP呈递TGF β 1,且TGF β 1从这一复合物的释放增强Treg抑制性活性,因此限制T细胞介导的炎症(Wang,R.等,Mol Biol Cell,2012.23(6):p.1129-39;Edwards,J.P.,

[0324] A.M.Thornton和E.M.Shevach,J Immunol,2014.193(6):p.2843-9;Nakamura,K.等,J Immunol,2004.172(2):p.834-42;Nakamura,K.,A.Kitani和W.Strober,J Exp Med,2001.194(5):p.629-44)。事实上,使用PC61抗体耗尽Tregs导致mdx小鼠的隔膜中增加的炎症和肌肉损害,而Treg数量和活性的增加减少肌肉损害(Villalta,S.A.等,Sci Transl Med,2014.6(258):p.258ra142)。有趣的是,最近鉴定了另外的免疫抑制性T细胞群体,Tr1细胞。这些细胞产生大量的TGF β 3,这是其抑制性活性所需的(Gagliani,N.等,Nat Med,

2013.19 (6) :p.739-46;Okamura,T.等,Proc Natl Acad Sci U S A,2009.106 (33) : p.13974-9;Okamura,T.等,Nat Commun,2015.6:p.6329)。尽管Tr1细胞在骨骼肌中的作用是未知的,存在着TGFβ1和TGFβ3两者被1D11抑制可能通过抑制Tregs和Tr1细胞两者而具有附加的促炎性效应的可能性。

[0325] 上述关于TGFβ1潜伏和激活的结构认识允许特异性靶向TGFβ1的激活的药物开发的新途径(Shi,M.等,Nature,2011.474 (7351) :p.343-9)。在三种成熟TGFβ生长因子之间共有的高序列同一性水平不是潜伏复合物所共有的,从而允许发现特别地对于proTGFβ1特异性的抗体。使用抗体发现的专有途径,本发明人鉴别了特异性地结合proTGFβ1的抗体(Ab1和Ab2)(图18A)。使用体外共培养系统,这些抗体表现出抑制整联蛋白-介导的TGFβ1释放。在这一系统中,源自人皮肤或小鼠骨骼肌的成纤维细胞是潜伏TGFβ1的来源,表达αVβ6的细胞系允许释放活性TGFβ1,其然后使用表达SMAD2/3响应性荧光素酶报告体的第三细胞系测量(图11A-C)。这些抗体之一,Ab1,已经在体内测试并在肾纤维化的UUO(单侧输尿管闭塞)小鼠模型中显示功效。在这一模型中,小鼠(n=10)用9mg/kg/周的Ab1治疗防止TGFβ1-应答基因的上调(图15)并降低损伤后的纤维化程度(通过天狼猩红染色)(图16)。TGFβ1特异性的疗法与泛-TGFβ抑制剂相比可以具有改善的功效和安全性特征,这是在DMD群体中长期使用的治疗剂的关键方面。TGFβ1抑制性抗体可以用于确定是否特异性TGFβ1抑制具有作为DMD或其它肌肉疾病的治疗剂的潜能,并阐明TGFβ1在骨骼肌再生中的作用。

[0326] 慢性vs.急性肌纤维损伤和最佳治疗剂的选择

[0327] 在正常的但在急性损伤(如对另外健康的肌肉或运动神经元的创伤性损伤)后再生的肌肉中,据信炎性巨噬细胞的初始浸润是清除受损的组织 and 分泌星状细胞激活必要的因子(例如,细胞因子)所需的。随后,这些细胞转换到M2表型以驱动伤口消退。

[0328] 与之相反,在慢性病症如包括DMD的疾病中,在所有时间占优势和转换为M2的促炎性巨噬细胞不发生(或至少不足够有效地发生),且促炎性巨噬细胞持续驱动炎症和肌肉损害。在DMD中,NFκB途径是持久活性的,导致组成性炎症。在一些实施方式中,因此,NFκB抑制剂可以施用于DMD患者以减少慢性炎症。

[0329] 因此,在慢性病症如DMD中,治疗焦点可以是在肌肉修复上,与肌肉再生相反。这是因为DMD肌肉纤维是有缺陷的但不是破坏的-它们通过膜的撕裂、钙瞬变的失调和巨噬细胞的ROS损害而受到损害。相比之下,在对健康肌肉的损伤的情况中,治疗焦点可能是在再生。例如,在心脏毒素模型中,肌肉纤维被杀死且必须再生。这模拟在创伤损伤如挤压伤后的恢复过程。

[0330] 证据表明,LRRC33在巯基乙酸盐诱导的腹腔巨噬细胞中表达,其具有M2-样的表型(特征在于它们表达高水平的精氨酸酶而非iNOS,及高水平的CD206)。

[0331] 在其中LRRC33主要在M2细胞上表达和其中其TGFβ1的呈递(“情境”)对于这些细胞的促伤口愈合效应重要的情况中,可能有利的是激活LRRC33-介导的TGFβ1以促进修复和/或肌生成。另一方面,在其中LRRC33也在促炎性M1细胞上表达的情况中,则可能有利的是抑制LRRC33-介导的TGFβ1,假定炎症驱动纤维化,特别是在营养不良的背景中,如DMD。因此,鉴定疾病相关的TGFβ1的来源/情境可以是选择TGFβ信号传导的适当调节剂的重要步骤,这将给出应当考虑什么样的选择性水平的信息(例如,亚型特异性的、情境许可的TGFβ1调节剂,或者情境特异性的TGFβ1调节剂;TGFβ1抑制剂或激活剂,等)。

[0332] 与慢性炎症不同,DMD的标志是过度的和进行性的纤维化。在晚期疾病中,纤维化是如此严重以使得可能实际上将单个肌肉纤维与它们的血液供应隔离。它也改变肌肉的收缩性能。在人类患者中,在TGF β 1上调的程度和纤维化之间存在着强相关性,且在纤维化的程度和消极的运动结果之间存在着强关联。因此,在一些实施方式中,LTBP-proTGF β 1抑制剂可以施用于营养不良的患者用于预防和/或降低纤维化以在疾病中选择性地靶向ECM-相关的TGF β 1效应。在一些实施方式中,本文所述的各种亚型-和/或情境-选择性的药剂可以用于实现TGF β 1信号传导的抑制以防止纤维化和促进肌生成,而没有对免疫系统的不希望的作用(例如,通过GARP或LRRC33)。

[0333] 治疗

[0334] 为实施本文公开的方法,有效量的上述药物组合物可以通过合适的途径如静脉内施用(例如,作为浓注或通过在一时间内的连续输液)、肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、吸入或局部途径施用于需要治疗的受试者(例如,人)。用于液体制剂的可商购喷雾器,包括喷射喷雾器和超声喷雾器,可用于施用。液体制剂可以直接雾化且冻干粉末可以在重构后雾化。或者,特异性地结合GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物的抗体或其抗原结合部分可以使用氟碳化合物制剂及计量吸入器雾化,或者作为冻干和研磨粉末吸入。

[0335] 通过本文所述方法治疗的受试者可以是哺乳动物,更优选人。哺乳动物包括,但不限于农畜、运动动物、宠物、灵长动物、马、狗、猫、小鼠和大鼠。需要治疗的人类受试者可以是患有TGF β -相关的适应症(如以上提到的那些)或处于TGF β -相关的适应症的风险中或疑似患有TGF β -相关的适应症的人类患者。患有TGF β -相关的适应症的受试者可以通过常规医学检验鉴别,例如,实验室检查、器官功能测试、CT扫描或超声。疑似具有任何这类适应症的受试者可以显示该适应症的一种或多种症状。处于该适应症的风险中的受试者可以是具有该适应症的一种或多种风险因子的受试者。

[0336] 如本文中使用的术语“有效量”和“有效剂量”是指足以以可接受的效益/风险比实现其预期目的(即,在组织或受试者中所希望的生物学或医学反应)的化合物或组合物的任何量或剂量。例如,在本发明的某些实施方式中,预期的目的可以是抑制TGF β -1的体内激活,以实现与TGF β -1抑制相关的临床有意义的结果。如本领域技术人员公认的,有效量根据治疗的特定病症、病症的严重性、个体患者参数(包括年龄、身体状况、体形、性别和体重)、治疗持续时间、同时治疗(如果有的话)的性质、具体施用途径及健康护理者的知识和技能内的类似因素而变化。这些因素是本领域普通技术人员公知的且可以仅利用常规试验解决。一般优选的是使用单个组分或者其组合的最大剂量,也就是说,根据合理的医学判断的最高安全剂量。但是,本领域技术人员应理解,患者出于医学原因、生理原因或出于实际上任何其它理由可以坚持较低剂量或可耐受剂量。

[0337] 经验考虑因素,如半衰期,一般有助于剂量的确定。例如,与人免疫系统相容的抗体,如人源化抗体或全人抗体,可以用于延长抗体的半衰期和防止抗体被宿主的免疫系统攻击。施用频率可以在治疗过程中确定和调整,且一般地但不是必然地基于TGF β -相关的适应症的治疗和/或抑制和/或缓解和/或延迟。或者,特异性地结合GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物的抗体的持续连续释放制剂可能是适宜的。用于实现持续释放的各种制剂和装置对于本领域技术人员是清楚的

且在本公开的范围內。

[0338] 在一个实例中,如本文所述的特异性地结合GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物的抗体的剂量可以在已经给予一次或多次抗体施用的个体中经验地确定。个体给予递增剂量的拮抗剂。为评价功效,可以追踪TGF β -相关的适应症的指标。例如,用于测量肌肉中的肌纤维损伤、肌纤维修复、炎症水平和/或肌肉中的纤维化水平的方法是本领域普通技术人员公知的。

[0339] 本发明包括能够以亚型-特异性的方式调节TGF β s的激活步骤的药剂可以在用作药物时提供改善的安全性特征的认识。因此,本发明包括特异性地结合和抑制TGF β 1(而非TGF β 2或TGF β 3)的激活的抗体及其结合片段,从而在体内赋予TGF β 1信号传导的特异性抑制而同时最小化由影响TGF β 2和/或TGF β 3信号传导导致的不希望的副作用。

[0340] 在一些实施方式中,如本文所述的抗体或其抗原结合部分在施用于受试者时不是毒性的。在一些实施方式中,如本文所述的抗体或其抗原结合部分在施用于受试者时与特异性地结合TGF β 1和TGF β 2两者的抗体相比表现出降低的毒性。在一些实施方式中,如本文所述的抗体或其抗原结合部分在施用于受试者时与特异性地结合TGF β 1和TGF β 3两者的抗体相比表现出降低的毒性。在一些实施方式中,如本文所述的抗体或其抗原结合部分在施用于受试者时与特异性地结合TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3的抗体相比表现出降低的毒性。

[0341] 一般地,对于本文所述的任何抗体的施用,初始候选剂量可以是约2mg/kg。为本公开的目的,典型的日剂量可以大约为0.1 μ g/kg至3 μ g/kg至30 μ g/kg至300 μ g/kg至3mg/kg,至30mg/kg至100mg/kg或更高的范围中的任何一种,其取决于以上提及的因素。对于在几天或更长时间内的重复施用,根据病症,治疗持续直到发生所需的症状抑制或直到实现足够的治疗水平以缓解TGF β -相关的适应症或者其症状。示例性的给药方案包括施用约2mg/kg的初始剂量,接着约1mg/kg的抗体的每周维持剂量,或接着每隔一周的约1mg/kg的维持剂量。但是,其它剂量方案可能是有用的,取决于实施者希望获得的药代动力学衰减模式。例如,设想一周1-4次的给药。在一些实施方式中,可以使用约3 μ g/mg-约2mg/kg范围(如约3 μ g/mg、约10 μ g/mg、约30 μ g/mg、约100 μ g/mg、约300 μ g/mg、约1mg/kg和约2mg/kg)的给药。药代动力学实验已经显示,本文公开的抗体(例如,Ab2)的血清浓度在施用于临床前动物模型(例如,小鼠模型)后保持稳定至少7天。不希望局限于任何特定理论,这种施用后稳定性可能是有利的,因为抗体可以较低频率地施用而同时在抗体施用的受试者(例如,人受试者)中维持临床有效的血清浓度。在一些实施方式中,给药频率是每周一次、每2周一次、每4周一次、每5周一次、每6周一次、每7周一次、每8周一次、每9周一次或每10周一次;或者每月一次、每2月一次、或每3月一次或更长时间一次。这一治疗的进展容易地通过常规技术和分析监测。给药方案(包括使用的抗体)可以随时间变化。

[0342] 在一些实施方式中,对于正常体重的成年人,可以施用约0.3-5.00mg/kg范围的剂量。特定剂量方案,例如,剂量、时机和重复,取决于特定个体和该个体的医疗史,以及单个药剂的性质(如药剂的半衰期及其它相关考虑因素)。

[0343] 为本公开的目的,特异性地结合GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物的抗体的适宜剂量取决于所使用的特定抗体(或其组合物)、适应症的类型和严重性、是否抗体为预防性或治疗性目的而施用、在先的治疗、患者的临床病史和对拮抗剂的反应及主治医生的判断。在一些实施方式中,临床医生施用特

异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体,直到剂量达到实现所需结果的剂量。特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体的施用可以是连续的或间歇的,例如,取决于接受者的生理状况、施用目的是治疗性还是预防性的及有经验的实施者已知的其它因素。特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体的施用可以在预先选择的时间段内基本上是连续的或可以为一系列的间隔剂量,例如,在TGFβ-相关的适应症发生之前、期间或之后。

[0344] 如本文所用的术语“治疗”是指为治愈、愈合、缓解、减轻、改变、治疗、改善、改进或影响适应症、适应症的症状或适应症的倾向的目的向具有TGFβ-相关的适应症、该适应症的症状或该适应症的倾向的受试者应用或施用包括一种或多种活性剂的组合物。

[0345] 用特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体缓解TGFβ-相关的适应症包括延迟适应症的发生或进展或者降低适应症的严重性。减轻适应症不必然需要治愈性的结果。如本文中使用的,“延迟”与TGFβ-相关的适应症相关的适应症的发展意味着推迟、阻碍、减缓、迟滞、稳定和/或延缓适应症的进展。这种延迟可以具有变化的时间长度,这取决于适应症的病史和/或治疗的个体。“延迟”或减轻适应症的发展或者延迟适应症的发作的方法是当与未使用该方法相比时,降低在给定时间段内发生疾病的一种或多种症状的可能性和/或减轻在给定时间段内症状的程度的方法。这样的比较通常基于使用足以给出统计学显著的结果的多个受试者的临床研究。

[0346] DBA2/J小鼠在LTBP4等位基因中具有40bp删除。潜伏TGFβ1与其相关的ECM的失调可以暴露Ab1与其结合的表位。可能存在其中Ab1与其结合的表位被暴露的疾病,且在指示TGFβ1抑制的情况下,那些疾病可能是Ab1的治疗机会。

[0347] 联合疗法

[0348] 本公开进一步包括用作用于治疗可能受益于体内TGFβ抑制的受试者的联合疗法的药物组合物和相关方法。在任何这些实施方式中,这样的受试者可以接受包括与第二组合物结合的包含至少一种本文所述的TGFβ抑制剂(例如,抗体或其抗原结合部分)的第一组合物的联合疗法,该第二组合物包含至少一种意图治疗相同或重叠的疾病或临床病症的另外的治疗剂。第一和第二组合物可以同时作用于相同的细胞靶标或独立的细胞靶标。在一些实施方式中,第一和第二组合物可以治疗或改善疾病或临床病症的相同或重叠的症状集或方面。在一些实施方式中,第一和第二组合物可以治疗或改善疾病或临床病症的单独的症状集或方面。仅举个例子,第一组合物可以治疗与TGFβ信号传导相关的疾病或病症,而第二组合物可以治疗与相同疾病相关的炎症或纤维化,等等。这样的联合疗法可以彼此结合施用。在联合疗法的情况中的短语“与...结合”意思是在接受联合疗法的受试者中第一疗法的疗效在时间和/或空间上与第二疗法的疗效重叠。因此,联合疗法可以配制为用于同时施用的单一制剂,或配制为用于疗法的顺序施用的单独制剂。

[0349] 在优选的实施方式中,联合疗法在疾病的治疗中产生协同效应。术语“协同”是指总体上高于各单一疗法的加性效应的效应(例如,更高疗效)。

[0350] 在一些实施方式中,包含本文所述的药物组合物的联合疗法产生与通过另一疗法

(如第二药剂的单一疗法)产生的功效总体等同的功效,但与第二药剂的单一疗法相比,其与第二药剂相关的更少的不希望副作用或较不严重的毒性关联。在一些实施方式中,这样的联合疗法允许较低的第二药剂剂量但维持总体功效。这样的联合疗法可以特别适合于其中批准长期治疗的患者和/或涉及儿科患者的群体。

[0351] 因此,本发明提供用于减少TGF β 1蛋白激活和用于治疗或预防如本文所述的与TGF β 1信号传导相关的疾病的联合疗法中的药物组合物和方法。因此,方法或药物组合物进一步包括第二疗法。在一些实施方式中,第二疗法可能可用于治疗或预防与TGF β 1信号传导相关的疾病或病症。第二疗法可以减轻或治疗与靶向的疾病相关的至少一种症状。第一和第二疗法可以通过相似或不相关的作用机制发挥其生物学作用;或者第一和第二疗法中任一或两者可以通过多重作用机制发挥其生物学作用。

[0352] 应理解,本文所述的药物组合物可以在相同的药物上可接受的载体中或在不同的药物上可接受的载体中具有第一和第二疗法用于各所述的实施方式。应进一步理解,第一和第二疗法可以在所述的实施方式中同时或顺序地施用。

[0353] 本发明的一种或多种抗-TGF β 抗体或其抗原结合部分可以与一种或多种另外的治疗剂组合使用。可以与本发明的抗-TGF β 抗体一起使用的另外的治疗剂的实例包括,但不限于肌生长抑制素抑制剂、VEGF激动剂、IGF1激动剂、FXR激动剂、CCR2抑制剂、CCR5抑制剂、双重CCR2/CCR5抑制剂、赖氨酰氧化酶样-2抑制剂、ASK1抑制剂、乙酰-CoA羧化酶 (ACC) 抑制剂、p38激酶抑制剂、吡啡尼酮、尼达尼布、GDF11抑制剂等等。

[0354] 在一些实施方式中,另外的药剂是检查点抑制剂。在一些实施方式中,另外的药剂选自PD-1拮抗剂、PDL1拮抗剂、PD-L1或PDL2融合蛋白、CTLA4拮抗剂、GITR激动剂、抗-ICOS抗体、抗-ICOSL抗体、抗-B7H3抗体、抗-B7H4抗体、抗-TIM3抗体、抗-LAG3抗体、抗-OX40抗体、抗-CD27抗体、抗-CD70抗体、抗-CD47抗体、抗-41BB抗体、抗-PD-1抗体、溶瘤病毒和PARP抑制剂。在一些实施方式中,另外的疗法是放疗。在一些实施方式中,另外的药剂是化疗剂。在一些实施方式中,化疗剂是泰素。在一些实施方式中,另外的药剂是抗炎剂。在一些实施方式中,另外的药剂抑制单核细胞/巨噬细胞募集和/或组织浸润的过程。在一些实施方式中,另外的药剂是肝星状细胞激活的抑制剂。在一些实施方式中,另外的药剂是趋化因子受体拮抗剂,例如,CCR2拮抗剂和CCR5拮抗剂。在一些实施方式中,这种趋化因子受体拮抗剂是双重特异性拮抗剂,如CCR2/CCR5拮抗剂。在一些实施方式中,作为联合疗法施用的另外的药剂是或包括生长因子TGF β 超家族的成员或其调节剂。在一些实施方式中,这种药剂选自GDF8/肌生长抑制素和GDF11的调节剂(例如,抑制剂和激活剂)。在一些实施方式中,这种药剂是GDF8/肌生长抑制素信号传导的抑制剂。在一些实施方式中,这种药剂是特异性地结合原/潜伏肌生长抑制素复合物并阻断肌生长抑制素的激活的单克隆抗体。在一些实施方式中,特异性地结合原/潜伏肌生长抑制素复合物并阻断肌生长抑制素的激活的单克隆抗体不结合游离的成熟肌生长抑制素。

[0355] 这样的联合疗法可以有利地采用所施用治疗剂的较低剂量,因此避免可能的毒性或与各种单一疗法相关的并发症。

[0356] 调节TGF β 活性

[0357] 本公开的方法包括在一种或多种生物系统中调节生长因子活性的方法。这样的方法可以包括使一种或多种生物系统与本公开的抗体和/或组合物接触。在一些情况中,这些

方法包括改变生物系统中(例如,细胞小生境或受试者中)游离生长因子的水平。根据这样的方法的抗体和/或组合物可以包括,但不限于生物分子,包括但不限于本文所述的重组蛋白、蛋白质复合物和/或抗体或其抗原部分。

[0358] 在一些实施方式中,本公开的方法可以用于降低或消除生长因子活性,在本文中称为“抑制方法”。一些这样的方法可以包括保留成熟生长因子在TGF β 1复合物中(例如,与GARP、LTBP1、LTBP3和/或LRRC33复合的TGF β 1)和/或促进生长因子重新结合到TGF β 1复合物中。在一些情况中,抑制方法可以包括使用特异性地结合GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物的抗体。根据一些抑制方法,提供一种或多种抑制抗体。

[0359] 在一些实施方式中,本公开的抗体、其抗原结合部分和组合物可以用于抑制TGF β 1激活。在一些实施方式中,本文提供了抑制TGF β 1激活的方法,包括将GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物暴露于本文所述的抗体、其抗原结合部分或药物组合物。在一些实施方式中,抗体、其抗原结合部分或药物组合物抑制成熟TGF β 1从GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物的释放。在一些实施方式中,该方法在体外进行。在一些实施方式中,该方法在体内进行。在一些实施方式中,该方法离体进行。

[0360] 在一些实施方式中,GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物或LRRC33-TGF β 1复合物存在于细胞的外表面处。在一些实施方式中,细胞是T-细胞、成纤维细胞、巨噬细胞、单核细胞或小胶质细胞。

[0361] 在一些实施方式中,LRRC33-TGF β 1复合物存在于促纤维化(M2-样)巨噬细胞的外表面处。在一些实施方式中,促纤维化(M2-样)巨噬细胞存在于纤维化微环境中。在一些实施方式中,促纤维化(M2-样)巨噬细胞的外表面处LRRC33-TGF β 1复合物的靶向与单独地靶向LTBP1-TGF β 1和/或LTBP1-TGF β 1复合物相比提供更优异的效果。

[0362] 在一些实施方式中,GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物结合于细胞外基质。在一些实施方式中,细胞外基质包含原纤维蛋白。在一些实施方式中,细胞外基质包含含有RGD基序的蛋白质。

[0363] 在一些实施方式中,本文提供了用于在受试者中降低TGF β 1蛋白激活的方法,包括向受试者施用本文所述的抗体、其抗原结合部分或药物组合物,从而在受试者中降低TGF β 1蛋白激活。在一些实施方式中,受试者具有纤维化或处于患纤维化的风险中。在一些实施方式中,受试者患有癌症或处于患癌症的风险中。在一些实施方式中,受试者患有痴呆或处于患痴呆的风险中。

[0364] 在一些实施方式中,如本文所述的抗体或其抗原结合部分降低调节性T细胞(Tregs)的抑制性活性。

[0365] 用于缓解与TGF β -相关的适应症相关的疾病/障碍的试剂盒

[0366] 本公开还提供用于缓解与TGF β -相关适应症相关的疾病/障碍的试剂盒。这样的试剂盒可以包含一个或多个含有特异性地结合GARP-TGF β 1复合物、LTBP1-TGF β 1复合物、LTBP3-TGF β 1复合物和/或LRRC33-TGF β 1复合物的抗体或其抗原结合部分(例如,本文所述那些抗体中的任一种)的容器。

[0367] 在一些实施方式中,试剂盒可以包括用于根据本文所述任何方法使用的说明书。

包括的说明书可以包含施用特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体或其抗原结合部分以治疗目标疾病(如本文所述的那些)、延迟目标疾病的发作或缓解目标疾病的说明。试剂盒可以进一步包括基于确定个体是否患有目标疾病而选择适合于治疗的个体的说明。在再其它的实施方式中,说明书包括向具有目标疾病的风险的个体施用抗体或其抗原结合部分的说明。

[0368] 与特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体或其抗原结合部分的使用有关的说明书一般包括关于用于预定治疗的剂量、给药时间表和施用途径的信息。容器可以是单位剂量、大包装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。在本公开的试剂盒中提供的说明书通常是标签或包装插页(例如,试剂盒中包括的纸页)上的书面说明书,但机器可读的说明书(例如,承载在磁盘或光存储盘上的说明书)也是可接受的。

[0369] 标签或包装插页指示组合物用于治疗与TGFβ-相关适应症相关的疾病或障碍、延迟其发作和/或缓解与肌病相关的疾病或障碍。可以提供用于实施本文所述的任何方法的说明书。

[0370] 本公开的试剂盒在合适的包装中。合适的包装包括,但不限于小瓶、瓶子、罐子、柔性包装(例如,密封的Mylar或塑料袋)等等。还设想与特定装置如吸入器、经鼻施用装置(例如,雾化器)或输注装置如微型泵结合使用的包装。试剂盒可以具有无菌入口(例如容器可以是静脉内溶液袋或具有通过皮下注射针可刺穿的瓶塞的小瓶)。容器也可以具有无菌入口(例如容器可以是静脉内溶液袋或具有通过皮下注射针可刺穿的瓶塞的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是如本文中所述的那些的特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体或其抗原结合部分。

[0371] 试剂盒可以任选地提供另外的组分如缓冲剂和解说信息。正常情况下,试剂盒包含容器及在容器上或与容器结合的标签或包装插页。在一些实施方式中,本公开提供了包含本文所述的试剂盒的内容物的制品。

[0372] 用于检测GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的分析

[0373] 在一些实施方式中,本文提供的方法和组合物涉及用于检测从受试者获得的样品中的GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的方法。如本文中使用的“受试者”是指单个生物体,例如,单个哺乳动物。在一些实施方式中,受试者是人。在一些实施方式中,受试者是非人哺乳动物。在一些实施方式中,受试者是非人灵长动物。在一些实施方式中,受试者是啮齿动物。在一些实施方式中,受试者是绵羊、山羊、牛、家禽、猫或狗。在一些实施方式中,受试者是脊椎动物、两栖动物、爬行动物、鱼、昆虫、苍蝇或线虫。在一些实施方式中,受试者是研究动物。在一些实施方式中,受试者是遗传工程化的,例如,遗传工程化的非人受试者。受试者可以是任一性别且可以处于任何发育阶段。在一些实施方式中,受试者是患者或健康志愿者。

[0374] 在一些实施方式中,用于检测从受试者获得的样品中的GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的方法包括(a)在适合于抗体与抗原的结合(如果抗原存在于样品中)的条件下使样品与特异性地结合GARP-TGFβ1复合物、LTBP1-TGFβ1复合物、LTBP3-TGFβ1复合物和/或LRRC33-TGFβ1复合物的抗体接触,

从而形成结合复合物;和(b)测定与抗原结合的抗体的水平(例如,测定结合复合物的水平)。

[0375] 在一个实施方式中,筛选分析利用固定到表面上的生物素化的潜伏TGF β 1复合物,这允许通过提供栓系由整联蛋白激活潜伏TGF β 。其它的非整联蛋白激活剂也可以在该系统中测试。读出可以是报告细胞或其它TGF β -依赖性细胞反应。

[0376] 用于测量TGF β 激活的基于细胞的分析

[0377] TGF β 的激活(及其通过TGF β 测试抑制剂如抗体的抑制)可以通过本领域中已知的任何合适的方法测量。例如,整联蛋白-介导的TGF β 激活可以用于本文中更详细地描述的基于细胞的分析中,如“CAGA12”荧光素酶分析。这种分析的示例性实施方式描绘于图11C中用于说明性目的。如图所示,这种分析系统可以包括以下组分:i) TGF β 的来源(重组的、内源的或转染的);ii) 整联蛋白的来源(重组的、内源的或转染的);和iii) 对TGF β 激活有反应的报告系统,如表达能够对TGF β 有反应且将信号翻译成可阅读的输出(例如,CAGA12细胞或其它报告细胞中的荧光素酶活性)的TGF β 受体的细胞。在一些实施方式中,报告细胞系包含在TGF β -反应性启动子(例如,PAI-1启动子)控制下的报告基因(例如,荧光素酶基因)。在一些实施方式中,赋予敏感性的某些启动子元件可以并入报告系统中。在一些实施方式中,这种启动子元件是CAGA12元件。可以用于分析中的报告细胞系已经描述于,例如,Abe等(1994) Anal Biochem. 216 (2):276-84中,其通过引入并入本文。在一些实施方式中,各前述分析组分从相同来源(例如,相同细胞)提供。在一些实施方式中,前述分析组分中的两种从相同来源提供,且第三分析组分从不同来源提供。在一些实施方式中,所有三种分析组分从不同来源提供。例如,在一些实施方式中,来自相同来源(例如,相同转染细胞系)的整联蛋白和潜伏TGF β 复合物(proTGF β 和呈递分子)提供用于分析。在一些实施方式中,来自单独来源(例如,两种不同细胞系,纯化的整联蛋白和转染细胞的组合)的整联蛋白和TGF提供用于分析。当细胞用作一种或多种分析组分的来源时,这样的分析组分对于细胞可以是内源的、在细胞中稳定地表达、瞬时转染或其任何组合。来自用于测量TGF β 激活的基于细胞的分析的非限制性示例实施方式的结果分别显示于图22A和图22B,其证明使用本文所述的抗体Ab1和Ab2的GARP-proTGF β 1复合物或LRRC33-proTGF β 1复合物的抑制。在这一示例性分析中,Ab1对于GARP-TGF β 1复合物的IC₅₀(μ g/mL)是0.445,且Ab1对于LRRC33-TGF β 1复合物的IC₅₀(μ g/mL)是1.325。

[0378] 技术人员可以容易地使这些分析适应于各种合适的配置。例如,可以考虑多种TGF β 来源。在一些实施方式中,TGF β 的来源是表达和沉积TGF β 的细胞(例如,原代细胞、繁殖的细胞、永生化细胞或细胞系等)。在一些实施方式中,TGF β 的来源经纯化和/或重组TGF β 使用合适的方式固定在分析系统中。在一些实施方式中,固定在分析系统中的TGF β 在具有或没有去细胞化的情况下存在于分析平板上的细胞外基质(ECM)组合物内,这模拟成纤维细胞-起源的TGF β 。在一些实施方式中,TGF β 存在于分析中使用的细胞的细胞表面上。另外,选择的呈递分子可以包括在分析系统中以提供合适的潜伏-TGF β 复合物。本领域普通技术人员可以容易地确定哪些呈递分子可以在某些细胞或细胞类型中存在或表达。使用这样的分析系统,在测试剂(如抗体)存在或不存在的条件下TGF β 激活的相对变化可以容易地测量以评估测试剂在体外对TGF β 激活的作用。来自示例性的基于细胞的分析的数据提供在以下实施例章节中。

[0379] 这样的基于细胞的分析可以根据研究的TGF β 亚型、潜伏复合物(例如,呈递分子)的类型等等以多种方式改进或调整。在一些实施方式中,已知表达能够激活TGF β 的整联蛋白的细胞可以在分析中用作整联蛋白的来源。这些细胞包括SW480/ β 6细胞(例如,克隆1E7)。在一些实施方式中,整联蛋白表达细胞可以用编码目标呈递分子(如GARP、LRRC33、LTBP(例如,LTBP1或LTBP3)等)的质粒和编码目标TGF β 亚型的原-形式(如proTGF β 1)的质粒共转染。在转染后,细胞孵育足够的时间(例如,约24小时)以允许表达转染的基因,洗涤细胞,并与系列稀释的测试剂(例如,抗体)一起孵育。然后,报告细胞系(例如,CAGA12细胞)添加到分析系统,接着适当的孵育时间以允许TGF β 信号传导。在添加测试剂后的孵育期(例如,约18-20小时)之后,信号/读数结果(例如,荧光素酶活性)使用合适的方式检测(例如,对于荧光素酶表达报告细胞系,可以使用Bright-Glo试剂(Promega))。在一些实施方式中,荧光素酶荧光可以使用BioTek (Synergy H1) 平板阅读仪以自动增益设置来检测。

[0380] 核酸

[0381] 在一些实施方式中,本公开的抗体、其抗原结合部分和/或组合物可以通过核酸分子编码。这样的核酸分子包括,但不限于DNA分子、RNA分子、多核苷酸、寡核苷酸、mRNA分子、载体、质粒等。在一些实施方式中,本公开可以包含经编程或生成以表达编码本公开的化合物和/或组合物的核酸分子的细胞。在一些情况中,本公开的核酸包括密码子优化的核酸。产生密码子优化的核酸的方法是本领域中已知的且可以包括,但不限于US专利No. 5,786,464和6,114,148中描述的那些,其各自的内容通过引用全文并入本文中。

[0382] 本发明进一步通过以下实施例举例说明,该实施例不意图以任何方式进行限制。整个本申请中引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的全部内容以及附图由此通过引用合并于此。

[0383] 实施例

[0384] 实施例1:TGF β 1的抑制

[0385] TGF β 超家族包括与活性生长因子复合的前体肽(图1)。开发了获得稳定复合物的抗体的选择策略,从而导致更高选择性的和高效的抑制。

[0386] 使用基于HEK293的表达系统,进行NiNTA亲和和凝胶过滤以获得数毫克量的纯化的蛋白质,其用于产生与LTBP复合的TGF β 1 (LTBP-TGF β 1复合物) 和与GARP复合的TGF β 1 (GARP-TGF β 1复合物) (图3)。所制备的蛋白质的多样性使得能够测试物种交叉反应性和表位作图。显示了sGARP-proTGF β 复合物(图4A和4B)、sGARP-TGF β LAP复合物(图5)和LTBP1-proTGF β 1复合物(图6)的纯化。

[0387] 候选抗体使用体外荧光分析进行测试(图8)。在筛选中,抑制生长因子释放的抗体在面对正常激活的刺激时将报告细胞“关闭”。Ab1和Ab2显示为是潜伏TGF β 1复合物的激活的抑制剂(图7)且对于小鼠是交叉反应性的。

[0388] Ab1在表达人TGF β 1的细胞中的初始剂量-反应分析曲线显示TGF β 1活性抑制(图8)。使用更灵敏的CAGA12报告细胞系,Ab1显示相似的人proTGF β 1活性的抑制(图9)。此外,GARP复合物的抑制显示阻断调节性T细胞(Tregs)的抑制性活性,如通过从健康供体血液分离的T细胞中分裂T效应细胞(Teff)的百分比测量的(图10)。

[0389] GARP-proTGF β 1抑制剂的亲和力通过Octet分析在人GARP-proTGF β 1细胞上测量,同时活性通过测试人GARP-proTGF β 1抑制的CAGA12报告细胞测量。用于测量抗体Ab1和Ab2

对本文提供的复合物的亲和力的实验方案总结于表6中。结果显示于表7中。

[0390] 表6:用于进行Octet结合分析的实验方案。

[0391]

材料:

- 96 孔黑色聚丙烯平板
- 用于 Octet 的链酶亲和素-涂覆的尖端
- 10x 动力学缓冲液(在 PBS 中 1:10 稀释)

1. 在 1X 动力学缓冲液中浸泡需要量的链酶亲和素尖端;放入仪器中以平衡

[0392]

2. 加载样品板:

- 200 μ l 的缓冲液或抗体稀释液到各孔

- a. 列 1 - 基线(缓冲液)
- b. 列 2 - 生物素化蛋白质(例如, sGARP-proTGF β 1 或 LTBP1-proTGF β 1); 稀释到 5 μ g/mL
- c. 列 3 - 基线 2(缓冲液)
- d. 列 4 - 对于 Ab1 的抗体结合
- e. 列 5 - 对于 Ab2 的抗体结合
- f. 列 6 - 解离 Ab1(缓冲液)
- g. 列 7 - 解离 Ab2(缓冲液)

3. 在 96 孔板中制备稀释液:

- a. A 行中在 300 μ l 的 1x 缓冲液中稀释两种抗体到 50 μ g/mL
- b. 添加 200 μ l 的缓冲液到每列的其余部分
- c. 沿列向下转移 100 μ l 以进行 3-倍稀释

4. 将样品板靠近尖端板置于仪器中

5. 设置软件

- a. 指明缓冲液、加载、样品(每种测试的抗体一个分析)
- b. 指明实验方案的步骤(基线、加载、结合、解离)的设定时间量:
 - 基线: 60 秒
 - 加载: 300 秒
 - 基线 2: 60 秒
 - 结合: 300 秒
 - 解离: 600 秒

[0393]

6. 分析数据

- a. 减去来自参比孔的基线
- b. 设定对于基线的最后五秒的标准化
- c. 与解离一致(Align to dissociation)
- d. 针对结合和解离进行分析(1:1 结合模型, 拟合曲线)
- e. 确定最佳 R^2 值; 包括具有最佳 R^2 值的浓度
- f. 选择全局拟合
- g. 按照传感器类型设定样品颜色
- h. 分析
- i. 保存表格并输出

[0394] 表7: GARP-proTGFβ1抑制剂的亲和力和活性

[0395]

克隆	对 GARP-proTGFβ1 的亲和力(nM ± SEM)	GARP-proTGFβ1 的抑制(IC50) (nM; 95% CI)	最大效应(% 抑制)
Ab1	0.046 ± 0.043	3.4 (2.1-5.4)	75%
Ab2	0.561 ± 0.014	3.9 (1.5-10.3)	50%

[0396] 克隆进一步筛选结合选择性(表8)和物种交叉反应性(表9)。Ab1和Ab2不结合TGFβ1、TGFβ2或TGFβ3,但确实结合proTGFβ1复合物并显示物种交叉反应性。

[0397] 表8: GARP-proTGFβ1抑制剂的选择性

[0398]

克隆	GARP-proTGFβ1	LTBP1-proTGFβ1	LTBP3-proTGFβ1
Ab1	+++	+++	+++
Ab2	+++	+++	+++

[0399] 表9: GARP-proTGFβ1抑制剂的物种交叉反应性

[0400]

克隆	huGARP-proTGFβ1	muGARP-proTGFβ1	cyGARP-proTGFβ1
Ab1	+++	++	+++
Ab2	+++	+++	+++

[0401] +++KD<1nM,

[0402] ++KD 1-10nM

[0403] +KD 10-100nM

[0404] -无结合

[0405] 实施例2: Ab1和Ab2特异性地结合来自多个物种的proTGFβ1复合物

[0406] 为确定Ab1和Ab2是否能够特异性地结合来自多个物种的proTGFβ1复合物,如表6中所述进行Octet结合分析。如表10(以下)中所示,两种抗体(即,Ab1和Ab2)特异性地结合人和鼠LTBP1-proTGFβ1复合物、人LTBP3-proTGFβ1复合物和人GARP-proTGFβ1复合物。但是,仅Ab2特异性地结合大鼠LTBP1-proTGFβ1复合物。

[0407] 表10. Ab1和Ab2对于来自多个物种的proTGFβ1复合物的亲和力

[0408]

	Ab1 (K _D)	Ab2 (K _D)
人LTBP1-proTGFβ1	16±1.3	5.8±0.6
人LTBP3-proTGFβ1	85±5.0	122±3.9
小鼠LTBP1-proTGFβ1	203±13	61±4.0
大鼠LTBP1-proTGFβ1	未检测到结合	38±6.8
人GARP-proTGFβ1	293±22	58±6.2

[0409] 实施例3: Ab1和Ab2抑制人和鼠成纤维细胞中的内源TGFβ1

[0410] 为确定Ab1和Ab2是否能够抑制由不同起源的原代培养成纤维细胞分泌的内源TGF-β1,进行定量体外分析,其中分泌的TGF-β1的活性通过测量由用包含与CAGA12合成启动子融合的荧光素酶报告基因的核酸稳定转染,并与用Ab1或Ab2处理的成纤维细胞共培养的水貂肺上皮细胞产生的荧光素酶水平来测定。如图11A和11B中所示的,Ab1和Ab2两者抑制正常人皮肤成纤维细胞、鼠C57BL.6J肺成纤维细胞和DBA2/J肌肉成纤维细胞分泌的内源TGF-β1。对于各抗体观察到的最大抑制的差异是细胞系特异性的。

[0411] 实施例4: Ab2结合LRRC33-proTGFβ1

[0412] 为确定是否Ab1和Ab2结合与LRRC33复合的proTGFβ1,进行Octet结合分析。如图12A和12B中所示,Ab1和Ab2两者能够结合LRRC33-proTGFβ1蛋白复合物。但是,Ab1显示结合LRRC33-proTGFβ1蛋白复合物的慢结合速率。Ab1和Ab2与LRRC33-proTGFβ1蛋白复合物的结合使用ELISA进一步确认。

[0413] 实施例5: Ab1和Ab2抑制GARP-proTGFβ1和LRRC33-proTGFβ1两者的活性

[0414] 为确定是否Ab1和Ab2抑制GARP-proTGF-β1和/或LRRC33-proTGF-β1的活性,进行基于细胞的体外分析。在这一分析系统中,用β6整联蛋白稳定转染的工程化的人结肠癌细胞系(SW480/β6细胞)用表达proTGF-β1的构建体和表达呈递分子(即,GARP或LRRC33)的构建体共转染。为表达呈递分子,使用编码嵌合LRRC33-GARP(SEQ ID NO:85)或GARP的构建体。转染的细胞进行孵育以允许组分(整联蛋白和与相应呈递分子复合的proTGFβ1)的充分表达和沉积。在Ab1或Ab2存在或不存在的情况下TGFβ1的激活使用表达与其下游信号转导途径耦联的TGFβ受体的报告细胞(CAGA12细胞)测定以测量抗体的抑制性活性。如图13A和13B中所示,Ab1和Ab2抑制GARP-proTGF-β1和LRRC33-proTGF-β1两者。

[0415] 进行另外的基于细胞的分析以使用抗体Ab1和Ab2检测GARP-proTGFβ1复合物或LRRC33-proTGFβ1复合物的抑制。如图22A和图22B中所示,Ab1和Ab2抑制GARP-proTGF-β1和LRRC33-proTGF-β1两者。在这一分析中,Ab1对于GARP-TGFβ1复合物的IC₅₀(μg/mL)是0.445,和Ab1对于LRRC33-TGFβ1复合物的IC₅₀(μg/mL)是1.325。

[0416] 实施例6:Ab2对肾生物标志物和单侧输尿管堵塞(UUO)小鼠模型中的纤维化的影响

[0417] 单侧输尿管堵塞小鼠模型广泛地用于研究间质纤维化,这是可能导致终末期肾病的常见病理过程(参见Isaka等(2008) *Contrib.Nephrol.*159:109-21和Chevalier(1999) *Pediatr.Nephrol.*13:612-9)。UUO小鼠特征在于肾肌成纤维细胞激活、肾小管萎缩和具有最小肾小球病变的间质纤维化(参见Lian等(2011) *Acta Pharmacol.Sin.*32:1513-21)。增加的TGF β 1表达被认为在UUO小鼠中观察到的表型中发挥作用。为评估在UUO小鼠模型中Ab2对间质纤维化的表现的作用,进行以下实验。

[0418] 简言之,7-8周龄的雄性CD-1小鼠(Charles River Laboratories),4个小鼠组($n=10$),在手术介入之前腹腔内(i.p.)施用Ab2(3mg/kg或30mg/kg;给药体积10mL/kg)、鼠IgG1对照抗体(30mg/kg;给药体积10mL/kg)或PBS作为溶媒对照。治疗在手术前一天(d-1)、手术后一天(d1)和手术后3天(d3)施用。在第0天(d0),小鼠在头锥上用异氟烷麻醉处死,并进行剖腹手术和接着永久右单侧UUO手术。另外的小鼠对照组($n=8$)如上所述施用PBS,但仅仅进行假手术(即,没有输尿管阻塞的剖腹手术)。紧接在外科手术完成后,所有小鼠接受0.001mg/kg丁丙诺啡的一次皮下注射。小鼠在手术后五天处死并收获组织用于分析。在收获后,两个肾置于冰冷的0.9%NaCl中,去包囊和称重。评价羟脯氨酸水平以评价肾组织的胶原蛋白含量。如图14中所示,肾羟脯氨酸水平(组织纤维化和胶原沉积的标志物)在接受手术介入的小鼠中与接受假手术的小鼠相比显著提高。

[0419] 各右肾的中间横向切片在10%中性缓冲福尔马林中浸入固定48小时,其然后转移到70%乙醇用于组织学处理和分析。固定的肾切片石蜡包埋,切片(每个动物肾需要200-250 μ m间隔的三个5 μ m系列切片以使得能够较大的采样和肾损伤的表现)、用天狼猩红染色,并使用颜色光谱切割进行定量组织学分析以确定皮质胶原容积分数(CVF)。对于各动物通过确定三个系列切片中每一个的平均CVF评分计算一种复合CVF评分。使用非配对t-检验进行统计学分析。如图16中所示,如通过CVF确定的肾皮质纤维化在UUO阻塞的肾中与对照假手术处理的小鼠相比增加。如与接受溶媒对照(PBS)或IgG对照的小鼠相比的,接受3mg/kg或30mg/kg的Ab2的小鼠显示出UUO-诱导的CVF增加的显著减弱。

[0420] 测定纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)、结缔组织生长因子(CTGF)、TGF β 1、纤连蛋白-1、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、I型胶原蛋白 α 1(Col1a1)和III型胶原蛋白 α 1链(Col3a1)在收获的肾组织中的相对mRNA表达水平(图15A-15H)。mRNA水平使用管家基因次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1(HPRT1)mRNA水平标准化。此外,在手术介入前接受3mg/kg或30mg/kg的Ab2的小鼠中,PAI-1、CTGF、TGF β 1、纤连蛋白1、Col1a1和Col3a1的mRNA水平与接受30mg/kg IgG1对照的小鼠相比显著降低。在手术介入前接受3mg/kg的Ab2的小鼠中, α -SMA的mRNA水平与接受30mg/kg IgG1对照的小鼠相比显著降低。进一步地,在手术介入前接受30mg/kg的Ab2的小鼠中,MCP-1的mRNA水平与接受30mg/kg IgG1对照的小鼠相比显著降低。

[0421] 总之,在UUO小鼠模型中用Ab2治疗的小鼠中观察到了显著的效果,羟脯氨酸水平除外。如图15A-15H和16中所示,Ab2治疗显著减弱UUO-诱导的CVF增加,且显著降低已知纤维化标志物如PAI-1、CTGF、TGF β 1、纤连蛋白1、Col1a1和Col3a1的基因表达。这些数据证明TGF β 1是在肾疾病中发挥作用的主要TGF β 形式,且令人惊异地,TGF β 2和TGF β 3很可能不参与

疾病发生。

[0422] 实施例7: Ab1和Ab2单独或与抗-PD-1抗体组合对MC38鼠结肠癌同系小鼠模型中的肿瘤进展的作用

[0423] 为评估Ab1和Ab2单独地或与抗-PD-1抗体组合降低结肠癌肿瘤进展的作用, 使用MC38鼠结肠癌C57BL/6小鼠同系模型。

[0424] 肿瘤细胞培养物

[0425] MC38鼠结肠癌在包含10%胎牛血清、100单位/mL青霉素G钠、100μg/mL硫酸链霉素、25μg/mL庆大霉素和2mM谷氨酰胺的Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 中生长。细胞培养物保持在37°C的湿润培养器及5%CO₂和95%空气的气氛中的组织培养瓶中。

[0426] 体内植入和肿瘤生长

[0427] 用于植入的MC38细胞在对数生长期期间收获并重悬于磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中。在肿瘤植入的那一天, 各测试小鼠在右侧腹皮下注射 5×10^5 细胞 (0.1mL细胞悬液), 且肿瘤生长作为接近80-120mm³的目标范围的平均大小来监测。十一天后 (指定为研究的第1天), 小鼠按照计算的肿瘤大小分选到各自由十二只动物组成的组中, 个体肿瘤体积范围为63-196mm³和组平均肿瘤体积为95-98mm³。肿瘤使用卡尺在两个维度上测量, 且体积使用下式计算:

[0428]
$$\text{肿瘤体积(mm}^3\text{)} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

[0429] 其中w=肿瘤的宽度和l=肿瘤的长度, 以mm计。肿瘤重量可以利用1mg等于1mm³的肿瘤体积的假设估计。

[0430] 治疗

[0431] 简言之, 在第1天携带皮下MC38肿瘤 (63-172mm³) 的八周龄雌性C57BL/6小鼠 (n=12) 一周两次腹膜内 (i.p.) 施用Ab1、Ab2、鼠IgG1对照抗体 (在10mL/kg的给药体积中各30mg/kg), 共四周。当在对照组中肿瘤达到150mm³ (第6天) 时, 小鼠一周两次i.p. 施用大鼠抗-小鼠PD-1抗体 (RMP1-14) 或大鼠IgG2A对照抗体 (在10mL/kg的给药体积中5mg/kg的各抗体), 共两周。

[0432] 组1用作肿瘤生长对照, 并接受与大鼠IgG2a对照抗体组合的鼠IgG1同种型对照抗体。组2接受与大鼠IgG2a对照抗体组合的Ab1。组3接受与大鼠IgG2a对照抗体组合的Ab2。组3接受与抗-PD-1抗体组合的鼠IgG1对照抗体。组4接受与抗-PD-1抗体组合的Ab1。组5接受与抗-PD-1抗体组合的Ab2。组6 (n=16) 未治疗且用作采样对照组。

[0433] 终点和肿瘤生长延迟 (TGD) 分析

[0434] 肿瘤每周使用卡尺测量两次, 且各动物在其肿瘤达到1,000mm³的终点体积时或在研究结束 (第60天) 时处死, 以较早发生者为准。因为肿瘤体积终点而退出研究的小鼠记录为由于肿瘤进展 (TP) 而处死及处死日期。用于分析的达到终点时间 (TTE) 使用以下等式对于各小鼠计算:

[0435]
$$\text{TTE} = \frac{\log_{10}(\text{终点体积}) - b}{M}$$

[0436] 其中TTE以天表示, 终点体积以mm³表示, b是截距, 和m是通过取对数变换的肿瘤生长

数据集的线性回归获得的直线的斜率。该数据集由分析中使用的超过终点体积的第一观察和紧接在达到这一终点体积之前的三个连续观察组成。计算的TTE通常小于TP日期(动物因为肿瘤大小处死的日期)。具有未达到终点体积的肿瘤的小鼠分配等于研究的最后一天(第60天)的TTE值。在其中对数变换计算的TTE领先于在达到终点之前的一天或者超过达到肿瘤体积终点的一天的情况中,进行线性插值法以近似计算TTE。分类为死于非治疗相关(NTR)原因的小鼠从TTE计算(及所有进一步的分析)排除。分类为TR(治疗相关)死亡或NTRm(由于转移导致的非治疗相关的死亡)的动物分配等于死亡日的TTE值。

[0437] 治疗结果从肿瘤生长延迟(TGD)评估,其定义为治疗组与对照组相比的达到终点中位时间(TTE)的增加(以天表示):

[0438] $TGD = T - C$,

[0439] 或者定义为对照组的中位TTE的百分比:

[0440] $\%TGD = \frac{T - C}{C} \times 100$

[0441] C

[0442] 其中:

[0443] T=治疗组的中位TTE,和

[0444] C=指定对照组的中位TTE。

[0445] MTV和消退反应的标准

[0446] 治疗功效可以从在最后一天保留在研究中的动物的肿瘤体积确定。MTV(n)定义为肿瘤未达到终点体积的多只保留动物(n)在研究的最后一天的中位肿瘤体积。

[0447] 治疗功效也可以从在研究期间观察到的消退反应的发生率和幅度确定。治疗可以在动物中引起肿瘤的部分消退(PR)或完全消退(CR)。在PR反应中,肿瘤体积对于在研究过程中的三个连续测量是其第1天体积的50%或更小,且对于这三个测量中的一个或多个等于或大于 13.5mm^3 。在CR反应中,肿瘤体积对于在研究过程中的三个连续测量小于 13.5mm^3 。在研究结束时具有CR反应的动物另外分类为无肿瘤存活者(TFS)。对动物监测消退反应。

[0448] 肿瘤生长抑制

[0449] 肿瘤生长抑制(TGI)分析评估治疗小鼠和对照小鼠的中位肿瘤体积(MTVs)的差异。对于这一研究,用于确定TGI的终点是第29天,其是对照小鼠达到 1500mm^3 的平均肿瘤体积的日期。在TGI分析日对于各组确定MTV(n),多只动物n的中位肿瘤体积。百分肿瘤生长抑制(%TGI)定义为指定对照组的MTV和药物治疗组的MTV之间的差异,表示为对照组的MTV的百分比:

[0450] $\%TGI = \left(\frac{MTV_{\text{对照}} - MTV_{\text{药物治疗}}}{MTV_{\text{对照}}} \right) \times 100 = \left[1 - \left(MTV_{\text{药物治疗}} / MTV_{\text{对照}} \right) \right] \times 100$

[0451] 用于TGI分析的数据集包括组中的所有小鼠,除了在TGI分析日之前由于治疗相关(TR)或非治疗相关(NTR)的原因死亡的那些动物。

[0452] 在本研究中,Ab1和Ab2在MC38鼠结肠癌C57BL/6小鼠同系模型中单独地或与抗-PD-1组合评估。施用与抗-PD-1组合的Ab2的小鼠导致显著的第29天TGI ($P < 0.05$, Mann-Whitney U检验),从而产生使用秩和存活分析与溶媒处理对照显著不同 ($P < 0.05$, 秩和)的存活率利益(参见图17)。接受与大鼠IgG2a对照抗体组合的Ab1或Ab2的小鼠分别具有1CR和1PR的消退反应。与抗-PD-1结合,Ab1和Ab2的消退反应分别是1PR和1CR,及4CRs。在MC38鼠

结肠癌C57BL/6小鼠同系模型中,与抗-PD-1组合的Ab2在第29天产生显著的短期效力且在这一60-天TGD研究中产生总体存活率利益。

[0453] 实施例8:TGF β 1在肌营养不良中的作用

[0454] TGF β 在骨骼肌功能中发挥多种作用,包括肌发生的抑制、炎症的调控和肌肉修复及纤维化的促进。尽管TGF β 抑制作为广泛的疾病包括肌肉营养不良的疗法具有重要的意义,但这些疗法抑制TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3而无论分子情境。这些抑制剂的特异性/选择性的缺乏可能产生不希望的副作用,从而导致功效不足的临床剂量。尽管泛-TGF β 抑制性分子报告为在mdx小鼠中改善肌肉功能和降低纤维化,是否这些效应是由于TGF β 1、 β 2或 β 3的灭活仍然未解决。

[0455] 为此,已经产生特异性地阻断整联蛋白-介导的潜伏TGF β 1激活而同时回避TGF β 2和 β 3的抗体。D2.mdx小鼠用proTGF β 1特异性的抗体治疗,以确定TGF β 1特别地在营养不良肌肉的肌肉修复中的作用。评价了TGF β 1抑制对于针对收缩诱导的损伤的保护以及对于从相同损伤方法的恢复的功能效应。组织学评估包括是否治疗影响肌肉损伤、纤维化和炎症。另外,可以评价可能的毒性以确定是否观察到的对于肌肉中的泛-TGF β 抑制报告的负效应(例如,增加的炎症、肌肉功能的长期缺陷)是由于TGF β 1或TGF β 2/3的抑制。为理解是否在特定分子情境中TGF β 1的抑制更有效和/或具有较少的负效应(不良反应),LTBP-proTGF β 1抑制剂在这一模型中的功效可以评价以从细胞外基质(ECM)中呈递的TGF β 1解卷积免疫细胞呈递的TGF β 1的作用,潜在地导致更安全和/或更有效的抗-纤维化疗法。

[0456] 营养不良的肌肉高度易感收缩诱导的损伤。在损伤后,来自mdx小鼠的肌肉显示与WT相比的力生成的显著降低和伊文氏蓝染料吸收的增加,指示对肌纤维的物理损伤/损害(Lovering,R.M.等,Arch Phys Med Rehabil,2007.88(5):p.617-25)。降低收缩诱导的损伤的程度或改善损伤后的恢复的治疗剂对于肌营养不良患者具有显著临床益处(Bushby,K.等,Lancet Neurol,2010.9(1):p.77-93)。Ab1和Ab2将评估其以下能力:i)预防收缩诱导的损伤,以及ii)促进从损伤的恢复。D2.mdx品系可以用于我们的实验,与B10背景的传统mdx品系相反。通过将mdx杂交到DBA2/J背景上产生的这些小鼠具有如上所述的LTBP4的非保护性变体,且因此与标准mdx品系相比表现出更严重的、进行性的和与人类疾病相似的疾病病理(Coley,W.D.等,Hum Mol Genet,2016.25(1):p.130-45)。因为正在使用D2.mdx小鼠,DBA2/J小鼠可以用作野生型对照。因为DMD主要影响雄性,该研究可能聚焦于雄性小鼠。

[0457] 为检验Ab1和Ab2防止/限制收缩诱导的损伤的能力,6周龄雄性D2.mdx小鼠(n=10)用10mg/kg/周的IgG对照、Ab1或Ab2治疗6周。为允许与使用泛-TGF β 抑制剂的已发布工作进行比较,第四组给药10mg/kg/周的1D11。所有抗体是mIgG1同种型且这一剂量之前已经证明在UUO模型中是有效的(图15&16)。也包括给药IgG对照的WT组。在处死前24小时,小鼠施用PBS中的1%伊文氏蓝(EBD)(体重的1体积%)以允许通过荧光显微术评价肌纤维损伤。在治疗结束时,小鼠进行体内离心收缩方案。腓肠肌的离心损伤可以如所述的(Khairallah,R.J.等,Sci Signal,2012.5(236):p.ra56)用305B肌肉杠杆系统(Aurora Scientific)进行。简言之,进行其间具有1分钟停顿的20次离心收缩,且离心相之前峰值等长力的降低可以视为肌肉损伤的指标。可以测定力损失的程度和EBD阳性纤维的百分比。经历这一实验方案的DBA2/J小鼠在20次离心收缩后损失初始力的30-40%。相反,D2.mdx小鼠在相同实验方案后损失初始力的80%,如之前所述的(Pratt,S.J.等,Cell Mol Life Sci,

2015.72(1):p.153-64;Khairallah,R.J.等,Sci Signal,2012.5(236):p.ra56)。可以评价Ab1和Ab2在损伤后减少力损失的能力。小鼠在实验结束时处死,且损伤和未损伤的腓肠肌两者可以收集用于组织学分析。EBD摄取可以从两种肌肉评价。可以测量肌纤维横截面积和纤维化的程度。对于横截面积测定,来自肌肉中腹的切片可以用与荧光团偶联的麦胚凝集素染色以可视化细胞膜。切片可以使用荧光显微术数字化,细胞边界使用预测软件追踪和横截面积通过无偏的自动化测量测定。为了纤维化的分析,切片可以用天狼猩红(PSR)染色且计算每载玻片的PSR+的面积。

[0458] 评价Ab1和Ab2加速从收缩诱导的损伤恢复的能力。12周龄DBA2/J和D2.mdx小鼠可以进行如上所述的相同离心收缩实验方案。在损伤后,小鼠分成多个治疗组(n=10)并施用IgG对照(对于WT和D2.mdx小鼠)、1D11、Ab1或Ab2(仅D2.mdx)。抗体可以在实验期间以10mg/kg/周给药。在损伤后7和14天,可以测量峰值等距力、抽搐-僵直比率和力-频率关系以评估治疗对从损伤的恢复的作用。尽管Ab1和Ab2抑制TGFβ1的释放而无论呈递分子如何,但TGFβ1从细胞外基质的选择性释放(即,LTBP-呈递的)可以由于TGFβ1驱动的Treg活性的保留而在DMD中具有更大益处。为解决这一问题,特异性的LTBP-proTGFβ1抑制性抗体也可以评价防止收缩诱导的损伤和加速从损伤的恢复的能力。

[0459] 实施例9:TGFβ1在急性损伤后骨骼肌再生中的作用

[0460] 可以研究TGFβ1特别地在肌损伤后的肌纤维再生中的作用。TGFβ1-特异性的抗体可以用于心脏毒素损伤模型中以确定TGFβ1特别地在肌纤维再生期间的作用。可以组织学地评价再生且可以进行肌肉强度和质量的的功能性评价。考虑到TGFβ1抑制对于肌肉再生的潜在益处,具有有益效果而没有对于泛-TGFβ抑制观察到的毒性的疗法是非常有益的。这允许研究TGFβ1-特异性的抑制对星状细胞功能的作用且可以提供对于星状细胞移植研究的深入了解。

[0461] 如上所述,TGFβ看起来对于肌肉生理学具有多种效应,包括成肌细胞增殖和分化的抑制以及肌萎缩和纤维化的促进(Allen,R.E.和L.K.Boxhorn,J Cell Physiol,1987.133(3):p.567-72;Brennan,T.J.等,Proc Natl Acad Sci U S A,1991.88(9):p.3822-6;Massague,J.等,Proc Natl Acad Sci U S A,1986.83(21):p.8206-10;Olson,E.N.等,J Cell Biol,1986.103(5):p.1799-805;Li,Y.等,Am J Pathol,2004.164(3):p.1007-19;Mendias,C.L.等,Muscle Nerve,2012.45(1):p.55-9;Nelson,C.A.等,Am J Pathol,2011.178(6):p.2611-21)。但是,这些研究使用培养中或注射到小鼠中的重组TGFβ1,其可以具有非生理的结果,因为生长因子从其分子情境中移除。或者,研究者使用对于TGFβ1非选择性的TGFβ抑制剂。

[0462] 为评估TGFβ1的亚型-特异性的效应,可以检验多种proTGFβ1抗体(例如,Ab1和Ab2)影响CTX-诱导的损伤后的肌肉再生的能力。这些抗体是TGFβ1激活的“亚型-特异性的”和“情境-允许的”抑制剂,使得它们特异性地抑制TGFβ1(与TGFβ2或TGFβ3相反)从任何呈递分子的释放且不结合成熟生长因子(图18A)。

[0463] 肌肉再生可以通过CTX注射到右腓肠肌中在雄性DBA2/J小鼠(n=10)中诱导。在损伤前一天,小鼠可以施用10mg/kg IgG对照、1D11、Ab1或Ab2。抗体每周连续给药直到研究结束。在损伤后7和14天,肌肉力测量可以在体内用305C肌肉杠杆系统(Aurora Scientific Inc.,Aurora,CAN)测量。简言之,对于跖屈肌群,收缩在麻醉的小鼠中通过坐骨神经的经皮

电刺激引发,且一系列的刺激然后以提高的刺激频率(0.2ms脉冲,500ms训练持续时间)进行:1、10、20、40、60、80、100、150Hz,接着1Hz的最终刺激。测定最大峰值等距力、抽搐-僵直比率和力-频率关系。在力测量后,收集损伤的腓肠肌和比目鱼肌并制备用于组织学分析。肌纤维横截面积和%PSR+面积可以如以上实施例8中所述测定。

[0464] Ab1和Ab2的治疗可以导致降低的纤维化和改善的肌肉功能。但是,考虑到TGF β 1在调节免疫激活中的作用,有可能我们可以观察对于抗体的增加的炎症,如对于1D11治疗报告的(Andreetta,F.等,J Neuroimmunol,2006.175(1-2):p.77-86)。在此情况中,增加的炎症可能限制TGF β 1抑制的治疗效果,随后情境特异性的抗体可以评估以提供进一步的特异性水平,这可以限制毒性。例如,利用如上所述的读数和方法,可以使用抑制仅TGF β 1从LTBPs释放的抗体。这些抗体可以限制仅TGF β 1从ECM的释放而不影响从Tregs或巨噬细胞的释放。

[0465] 实施例10:合适的TGF β 1抑制性试剂的选择

[0466] proTGF β 1及其呈递分子在健康的、再生的和患病的肌肉中的表达分析可以提供有用的信息以帮助选择最佳治疗途径。考虑到TGF β 1抑制在肌肉再生和修复中的潜在益处,理解在不同条件(健康的、急性损伤的和慢性损伤的)下骨骼肌中的proTGF β 1呈递的情境(例如,在ECM中或在免疫细胞上)可以帮助提供抗体的治疗效用的信息,并最终提供对于实现临床疗效和安全性两者所需的特异性/选择性水平的深入了解。TGF β 1呈递的性质可以根据肌肉的健康状态且在疾病过程中变化,其可能牵涉到任何TGF β 1靶向的疗法。理解这些分子的表达谱也有助于选择对于潜在治疗分子的适宜给药时间。使用蛋白质印迹、免疫组织化学和免疫沉淀,proTGF β 1及其呈递分子的表达可以在正常的、急性损伤的(心脏毒素损伤)和慢性再生的(D2.mdx小鼠)肌肉中评价。这些分子的表达可以特别地在如上所述的不同条件下在关键细胞类型或细胞类型的亚集(例如,星状细胞、巨噬细胞、纤维发生-脂肪生成祖细胞,等)中研究。

[0467] 尽管TGF β 亚型的表达已经在来自mdx小鼠的肌肉中检验,之前的工作聚焦于成熟生长因子的表达(Nelson,C.A.等,Am J Pathol,2011.178(6):p.2611-21;Zhou,L.等,Neuromuscul Disord,2006.16(1):p.32-8)。考虑到本文所述的TGF β 1抗体的靶标特异性,必要的是不仅对于成熟和proTGF β 1检查表达谱,而且也检查呈递分子的表达谱,这应当提供关于目标TGF β 1池的来源和/或情境的信息。理想地,希望的是得到潜伏复合物而不仅仅是各组分的表达谱的理解。

[0468] 针对目标靶标的蛋白质印迹和IHC对抗体进行筛选。针对小鼠TGF β 1-LAP、LTBP1、LTBP3和LTBP4的抗体可商购。针对TGF β 1-LAP的抗体(克隆TW7-16B4)已经广泛地表征且在流式细胞术和蛋白质印迹两者中是有效的(Oida,T.和H.L.Weiner,PLoS One,2010.5(11):p.e15523)。针对LTBP1(ProteinTech#22065-1-AP)和LTBP3(Millipore#ABT316)的抗体使用用LTBP1-proTGF β 1或LTBP3-proTGF β 1转染的SW480细胞内部验证并显示对于其靶标是特异性的。这些抗体用于IHC的效用可以确定。来自健康和D2.mdx小鼠的肌肉被切片且抗体在冷冻和FFPE切片上测试。抗体可以通过包括具有100x过量的纯化靶标蛋白或复合物(自制的,参见例如图18B)的条件验证以确保观察到的信号是特异性的。

[0469] 先前的工作鉴定了特异性地结合给定潜伏复合物但没有抑制性活性的抗体。这些抗体的抗原结合已经通过ELISA确认(图18B&18C)且也可以评估其在IHC中的效用(考虑到

这些表位的三维结构,这些抗体不太可能与蛋白质印迹试剂一样有效)。来自大块组织的潜伏TGF β 1复合物的存在也可以通过蛋白质印迹或免疫沉淀评价。潜伏复合物可以通过在还原和非还原条件下运行相同的样品而使用蛋白质印迹鉴定。在还原条件下,TGF β 1、LAP和呈递分子分离,且三种分子可以在相同的印迹上但使用双色蛋白质印迹方法鉴定。在非还原条件下,在TGF β 1被释放时LAP:呈递分子复合物保持结合;该复合物比空呈递分子更慢地迁移且与TGF β 1-LAP一起迁移(图18B)。各种抗体也评估其免疫沉淀来自肌肉的潜伏复合物的能力以证明TGF β 1与特定呈递分子的直接结合。

[0470] 一旦已经鉴定适宜的抗体,根据可用的抗体,通过蛋白质印迹和/或IHC评价健康的、再生的和营养不良的肌肉中的表达。胫骨前肌(TA)和膈肌可以从DBA2/J和D2.mdx小鼠在4、8和12周龄时收集。对于再生肌肉,心脏毒素可以注射到12周龄DBA2/J小鼠的TA中,且肌肉在损伤后3、7和14天收集。来自至少4只小鼠的组织可以用于各种情况/时间点。也进行共染色实验以鉴定表达各种分子(例如:对于巨噬细胞的CD11b、对于Tregs的FoxP3、对于成肌细胞的MyoD)的细胞群体。

[0471] 实施例11:Ab2与ALK5激酶抑制剂LY2109761和泛-TGF β 抗体相比表现出降低的毒性

[0472] 为评估Ab2的毒性,如与小分子TGF- β 1型受体(ALK5)激酶抑制剂LY2109761和与泛-TGF β 抗体(hIgG4)相比的,在大鼠中进行毒性研究。简言之,雌性F344/NHsd大鼠施用3mg/kg(1组,n=5)、30mg/kg(1组,n=5)或100mg/kg(1组,n=5)的Ab2;3mg/kg(1组,n=5)、30mg/kg(1组,n=5)或100mg/kg(1组,n=5)的泛-TGF β 抗体;200mg/kg(1组,n=5)或300mg/kg(1组,n=5)的LY2109761;或者PBS(pH7.4)溶媒对照(1组,n=5)。接受Ab2、泛-TGF β 抗体或溶媒对照的动物静脉内给药一次(在第1天),且接受LY2109761的大鼠在7天过程中每日一次通过口服灌胃给药(7个剂量)。动物体重在给药期的第1、3和7天测定。动物在第8天处死并进行尸检。

[0473] 如图19中显示的存活数据所示的,Ab2与其它治疗组相比表现出降低的毒性。施用300mg/kg的ALK5激酶抑制剂LY2109761的所有动物在濒死状态下处死或在研究的第3、6或7天发现死亡。施用200mg/kg的LY2109761的两只动物发现在研究的第7天死亡。施用100mg/kg的泛-TGF β 抗体的一只动物发现在研究的第6天死亡。施用最多100mg/kg的Ab2的所有动物存活直到最终处死。

[0474] 此外,治疗的毒性通过在给药期中监测动物的体重来评价。如图20和21A-21C中所示,接受200mg/kg或300mg/kg的LY2109761的动物在研究过程中表现出降低的体重。

[0475] 动物器官重量也在死亡后评价。如表11中所示,增加的心脏重量在施用 $\geq$ 200mg/kg的LY2109761的动物中观察到。增加的心脏重量也在施用 $\geq$ 30mg/kg的泛-TGF β 抗体的动物中观察到。在施用最多100mg/kg的Ab2的动物中没有观察到对器官重量的影响。

[0476] 表11. 治疗组中的器官重量变化

[0477]

治疗组		
溶媒对照 a	LY2109761	泛-TGF β 抗体

[0478]

剂量水平(mg/kg/天)	0	200	300	3	30	100
心脏						
绝对重量(g)	0.4084	112	NE	99	123	119
体重比率(%)	0.3952	132	NE	96	122	122
脑重量比率(%)	26.3420	113	NE	98	123	116

[0479] NE=由于过早死亡未评估。

[0480] 注:对于各治疗组表示为百分对照平均值的绝对重量值和器官重量比率(相对于体重和脑重)。

[0481] ^a溶媒对照=磷酸盐缓冲盐水(PBS), pH 7.4。

[0482] 尽管在施用最多100mg/kg的Ab2或泛-TGFβ抗体的动物中没有观察到宏观发现,但在接受200mg/kg或300mg/kg的LY2109761的各治疗组的四只动物中观察到形状异常的胸骨。在施用300mg/kg的LY2109761的一只动物中观察到胸腔中2.5mL的澄清流体和由于过量流体导致的扩大的胸腺(即,水肿),其在研究的第30天发现死亡。

[0483] 如表12中所示,在微观水平,施用≥200mg/kg的LY2109761的动物表现出瓣膜发现(即,瓣膜病)。瓣膜病特征在于由于出血、内皮增生、混合炎性细胞浸润和/或基质增生导致的心脏瓣膜增厚(参见图23,右上图)。大多数动物具有多个受影响的瓣膜。另外,观察到心房发现,包括最少至轻微的混合炎性细胞浸润、最少的出血和/或最少的内皮(心内膜)增生,导致在苏木精和曙红染色的切片中心房的嗜碱性染色的增加。心肌发现也主要在心脏的底部中观察到且由最少至轻微的退化/坏死、轻微出血和/或轻微的混合炎性细胞浸润组成。施用300mg/kg的LY2109761的一只动物具有轻微的坏死伴随冠状动脉的炎症。此外,施用200mg/kg的LY2109761的两只动物具有主动脉根的最少的混合炎性细胞浸润或出血。

[0484] 表12. 接受LY2109761的动物中的微观心脏发现

[0485]

LY2109761			
剂量水平(mg/kg/天)	0	200	300
心脏			
<u>心脏瓣膜</u>			

[0486]

<u>心脏瓣膜病</u>				
	最少	0	1	2
	轻微	0	3	3
	中度	0	1	0
<u>心房</u>				
浸润，混合细胞				
	最少	0	2	3
	轻微	0	0	1
增生，内皮				
	最少	0	1	3
出血				
	最少	0	1	2
<u>心肌</u>				
变性/坏死				
	最少	0	0	1
	轻微	0	1	1
出血				
	轻微	0	1	0
浸润，混合细胞				
	轻微	0	0	1
<u>冠状动脉</u>				
伴随炎症的坏死				
	轻微	0	0	1
<u>主动脉根</u>				
出血				
	最少	0	1	0
浸润，混合细胞				
	最少	0	1	0

[0487] 如13中所示，施用 $\geq 3\text{mg/kg}$ 的泛-TGF β 抗体的动物表现出与施用LY2109761的动物中描述的类似的心脏瓣膜发现(即，瓣膜病)，如上所述(也参见图23，左下图)。施用 $\geq 30\text{mg/kg}$ 的泛-TGF β 抗体的动物表现出与施用LY2109761的动物中描述的类似的心房发现。施用 100mg/kg 的泛-TGF β 抗体的动物表现出与施用LY2109761的动物中描述的类似的心肌发现，且施用 30mg/kg 的泛-TGF β 抗体的动物具有心肌的出血。施用 100mg/kg 的泛-TGF β 抗体的一只动物具有中度的壁内坏死伴随冠状动脉中的出血，这与轻微的血管周混合炎性细胞浸润相关。

[0488] 表13. 接受泛-TGF β 抗体的动物中的微观心脏发现

[0489]

		泛-TGFβ 抗体			
剂量水平(mg/kg/天)		0	3	30	100
心脏					
心脏瓣膜					
心脏瓣膜病					
最少	0	2	0	0	
轻微	0	2	4	5	
中度	0	0	1	0	
心房					
浸润，混合细胞					
最少	0	0	1	2	
轻微	0	0	1	1	
增生，内皮					
最少	0	0	3	1	
出血					
最少	0	0	1	0	
心肌					
变性/坏死					
轻微	0	0	0	2	
出血					
最小	0	0	2	1	
轻微	0	0	1	1	
浸润，混合细胞，基底					
轻微	0	0	0	1	
冠状动脉					
伴随出血的坏死					
中度	0	0	0	1	
浸润，混合细胞，血管周					
轻微	0	0	0	1	

[0490] 相反，施用100mg/kg的Ab2的治疗组中的单一动物在左房室瓣的单一心脏瓣叶中具有最少的混合炎性细胞浸润物(参见图23,右下图)，这与由于单次发病导致的背景发现和缺乏同时瓣膜发现一致。因此，Ab2的治疗与ALK5激酶抑制剂LY2109761的治疗或泛-TGFβ抗体的治疗相比出人意料地导致降低的死亡率和降低的心脏毒性。

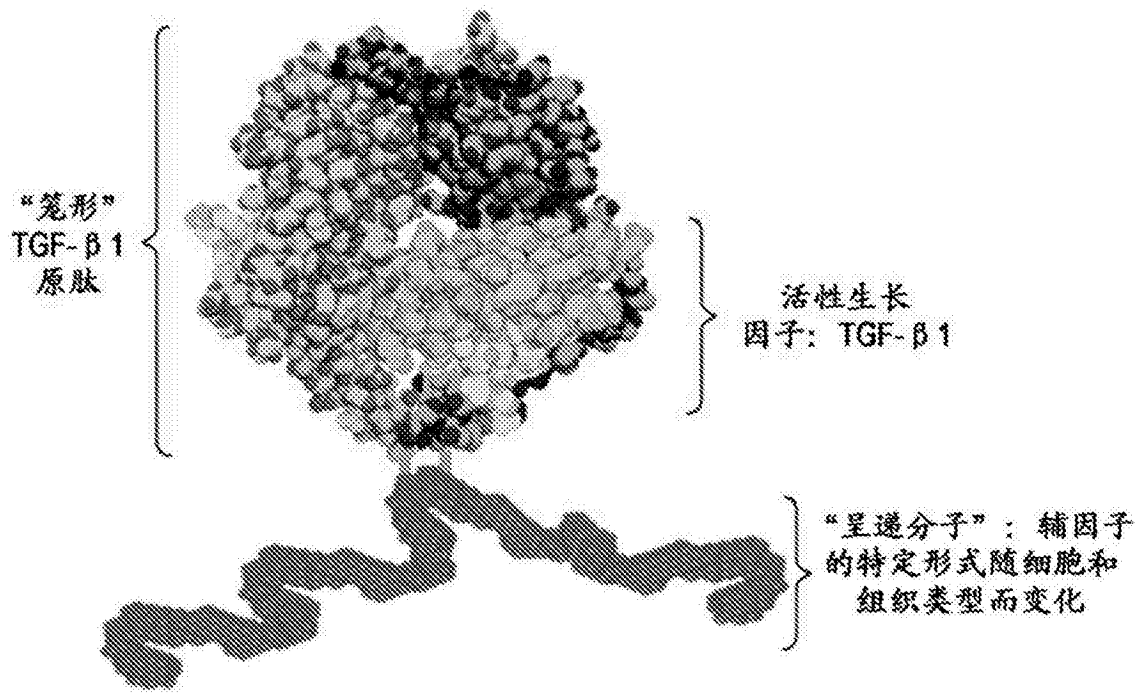


图1

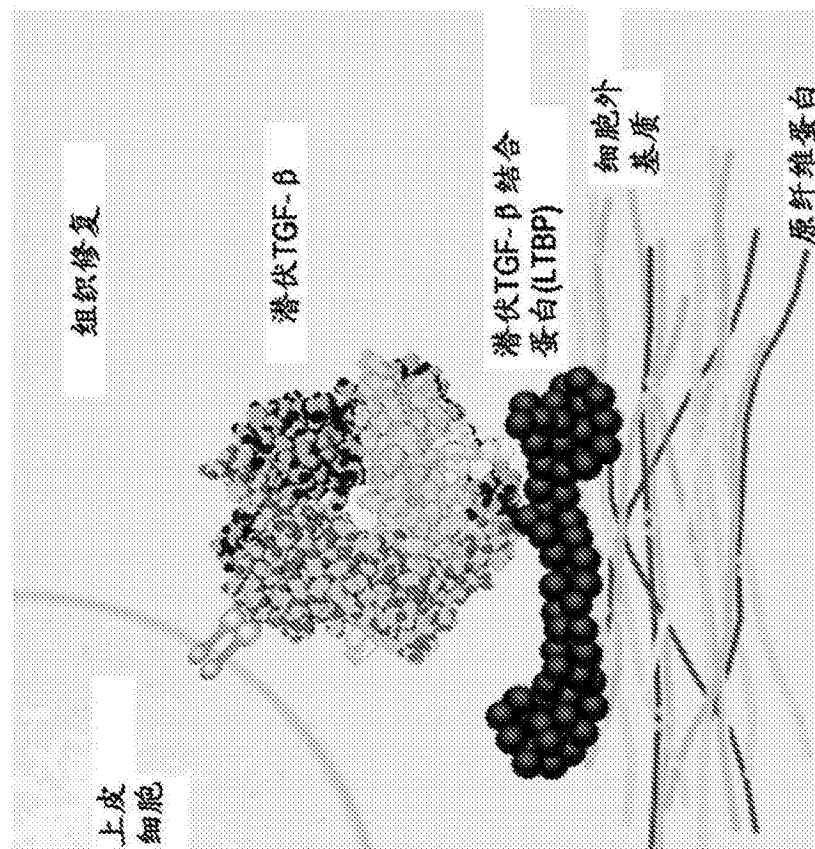


图2A

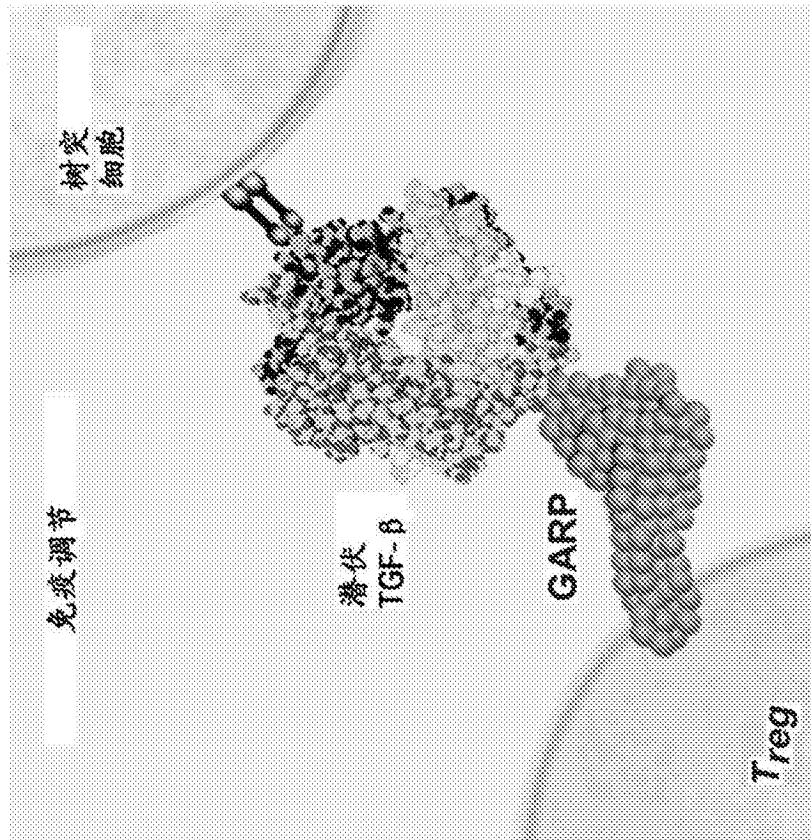


图2B

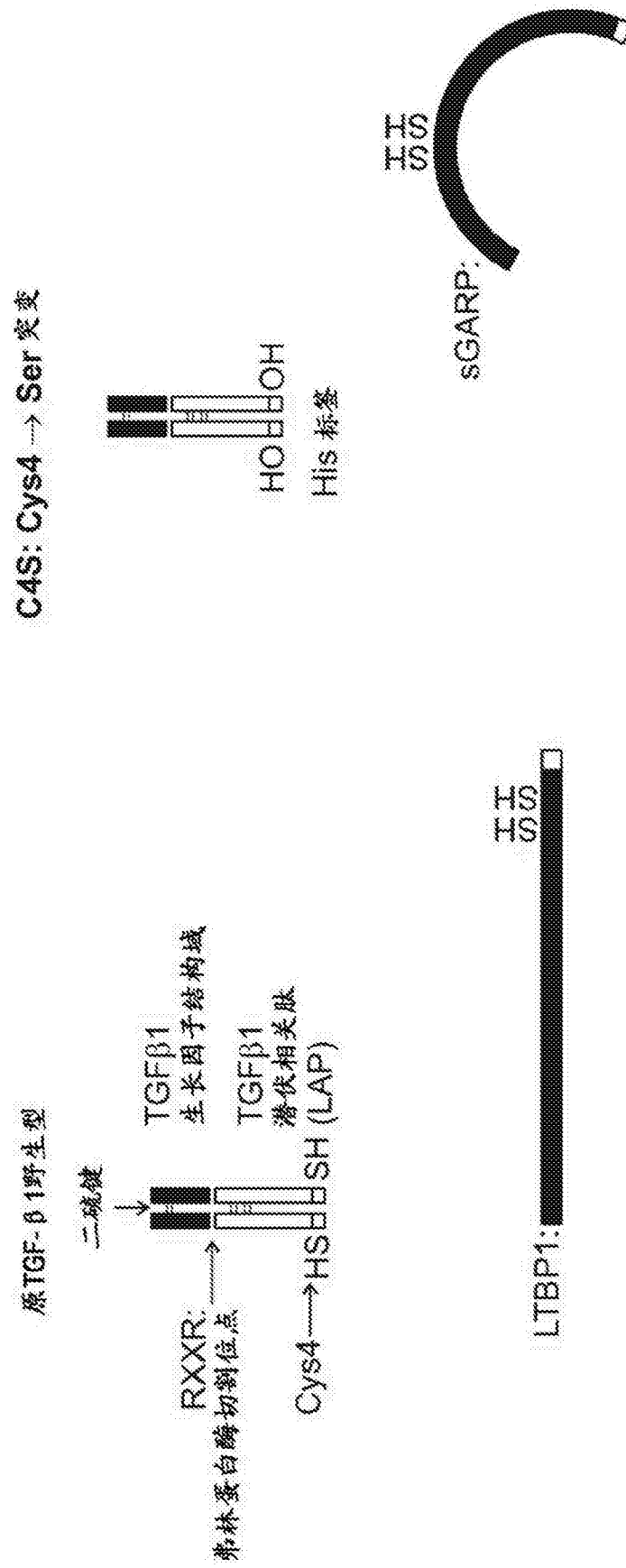


图3

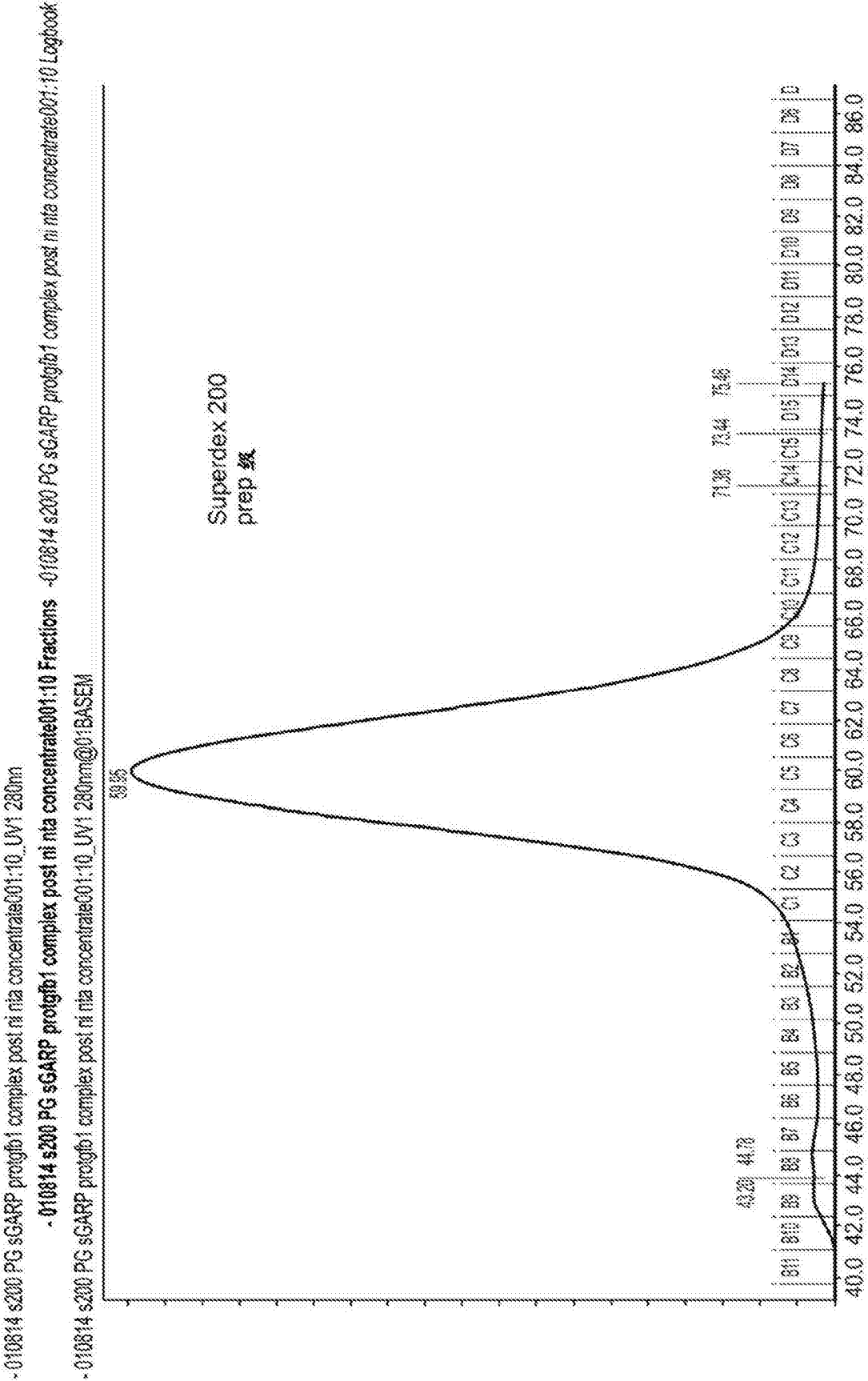


图4A

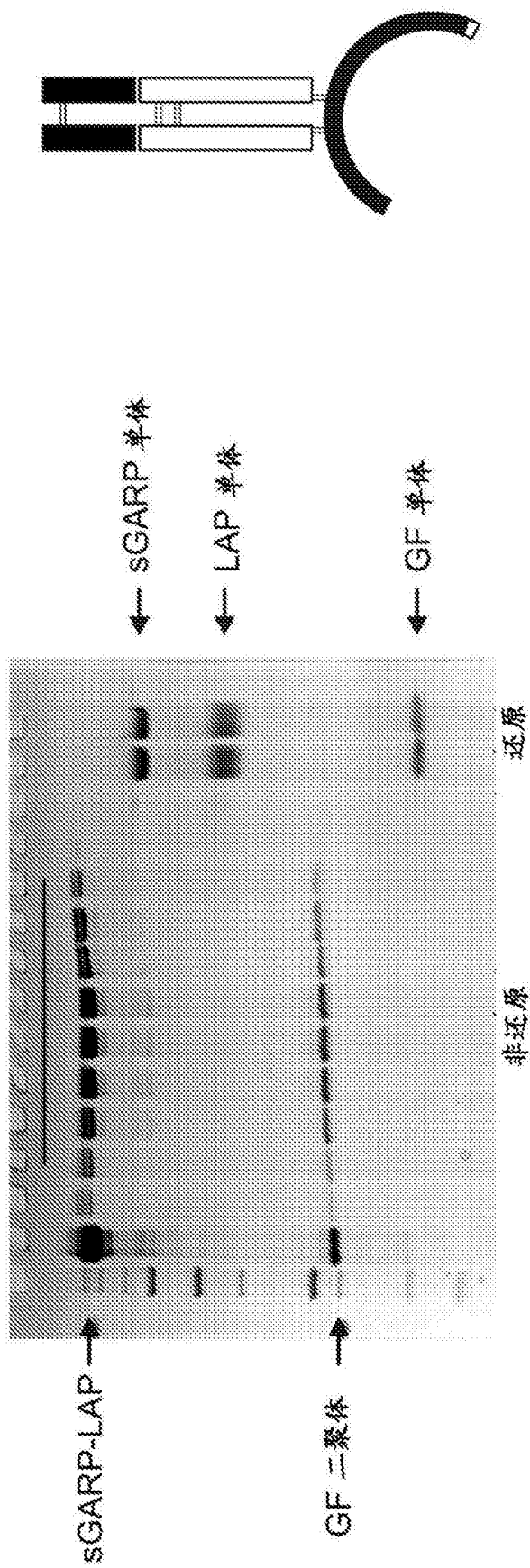


图4B

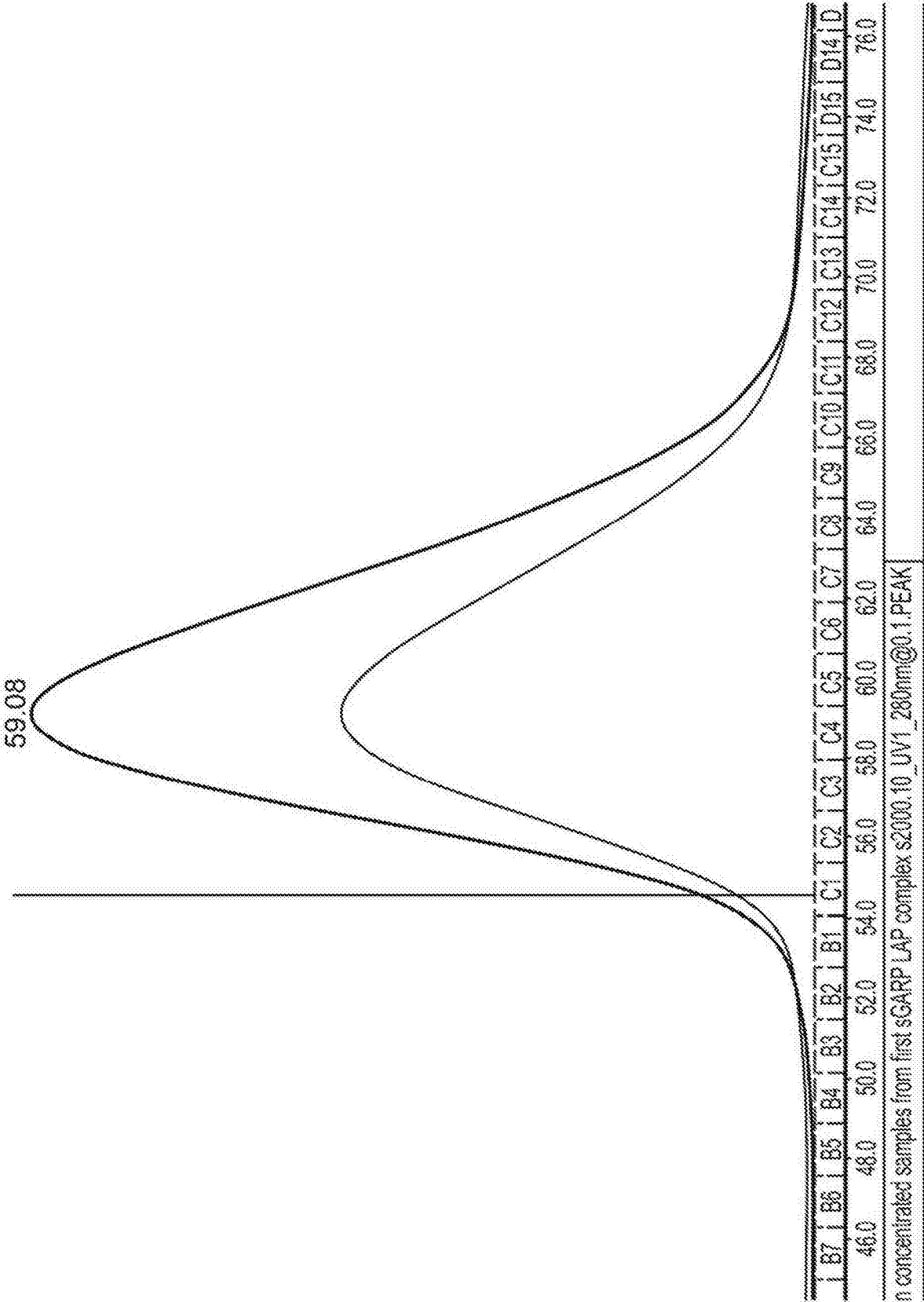


图5A

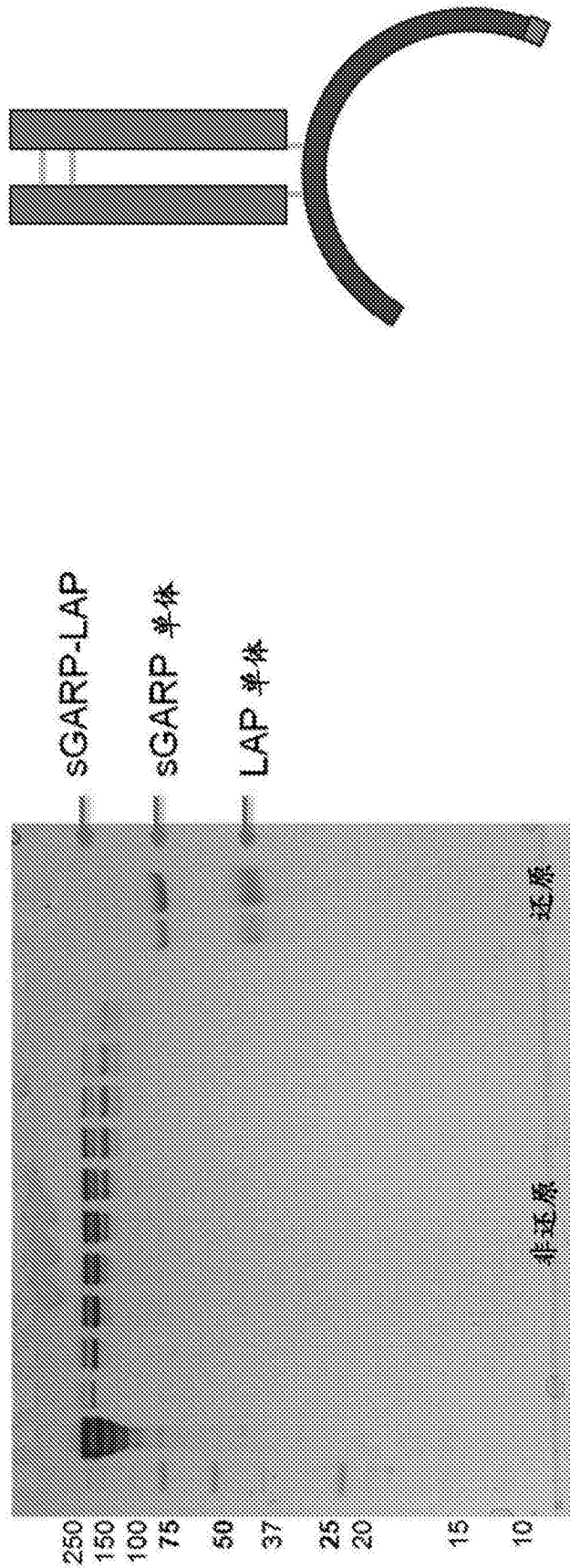


图5B

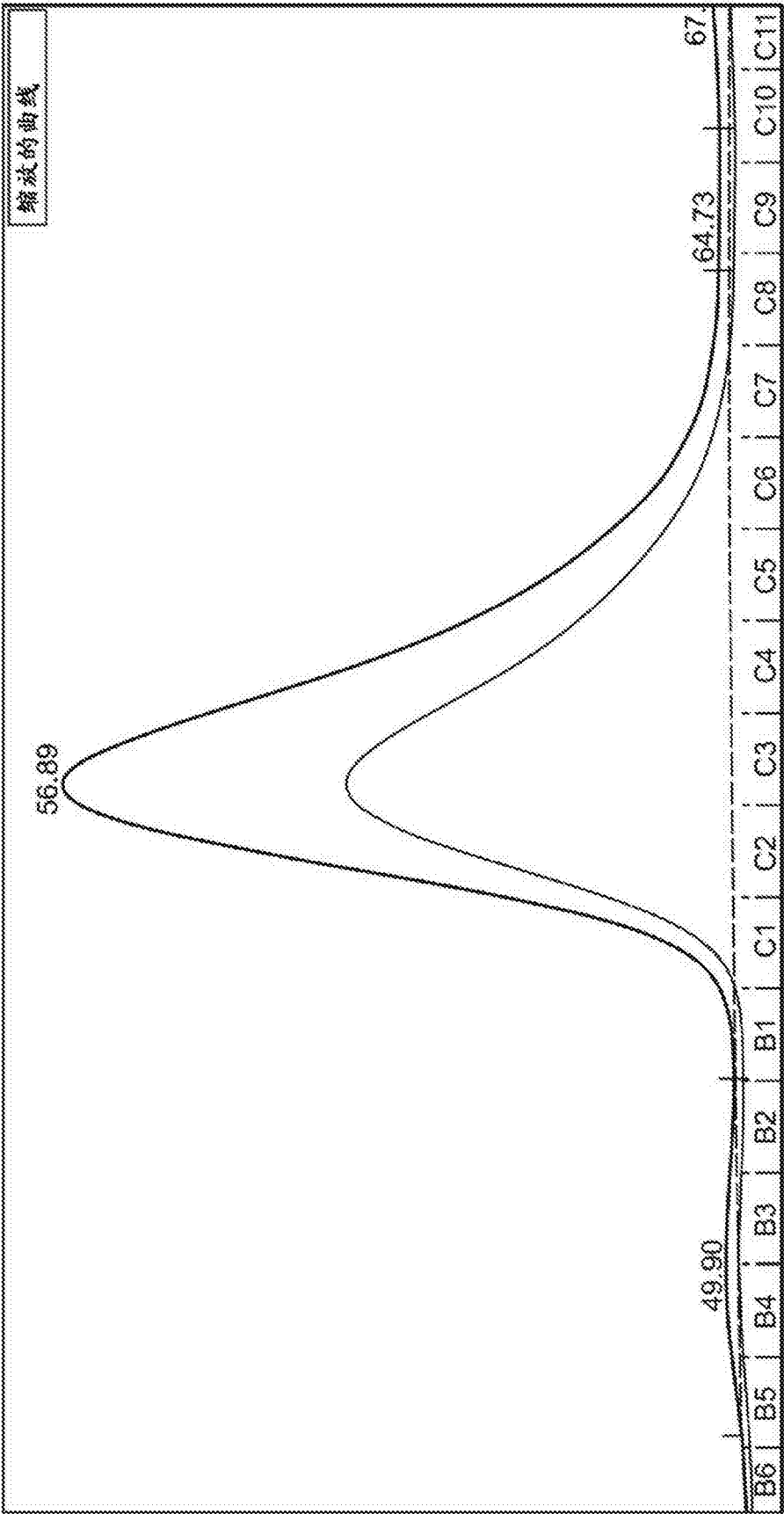


图6A

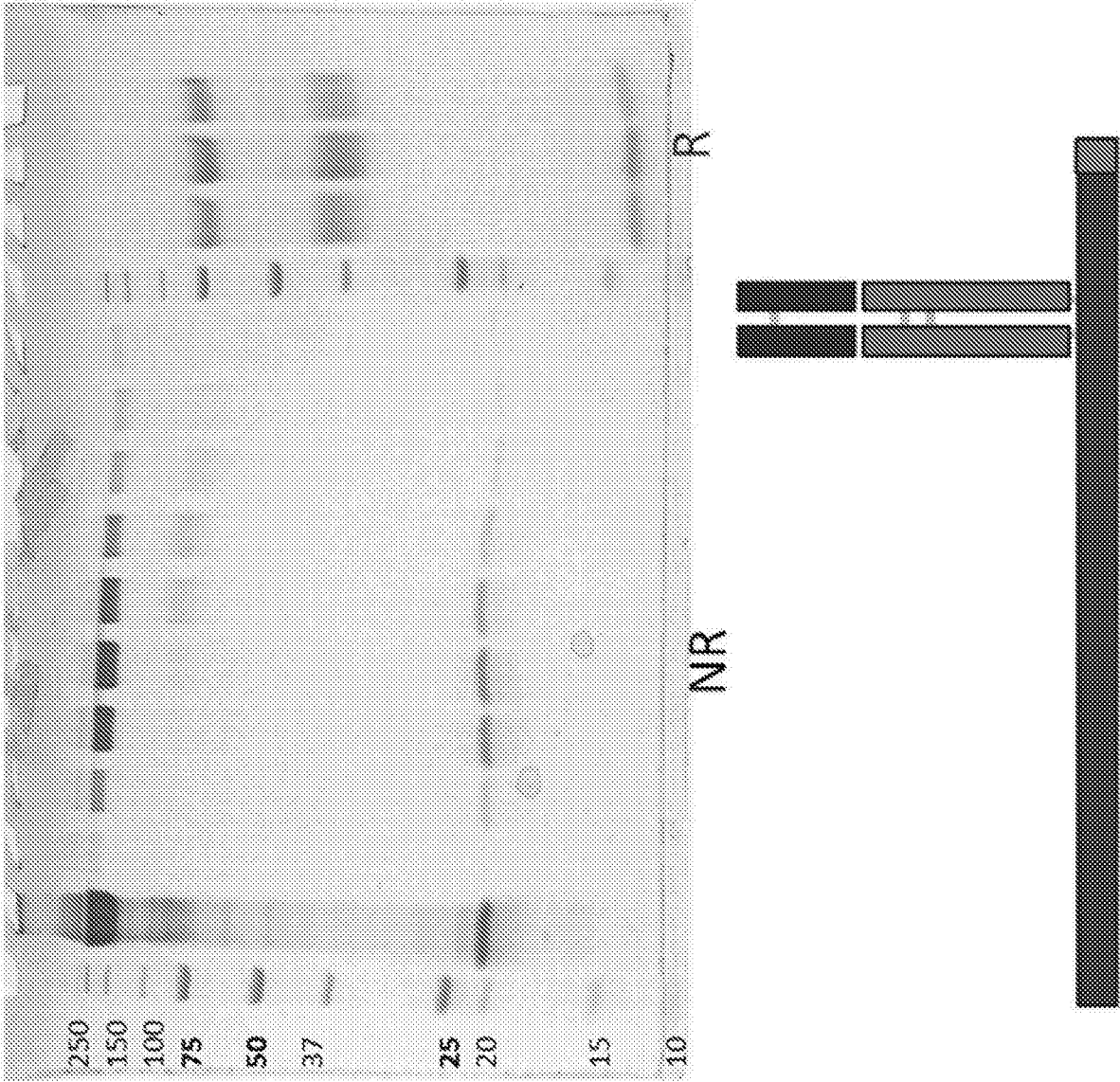


图6B

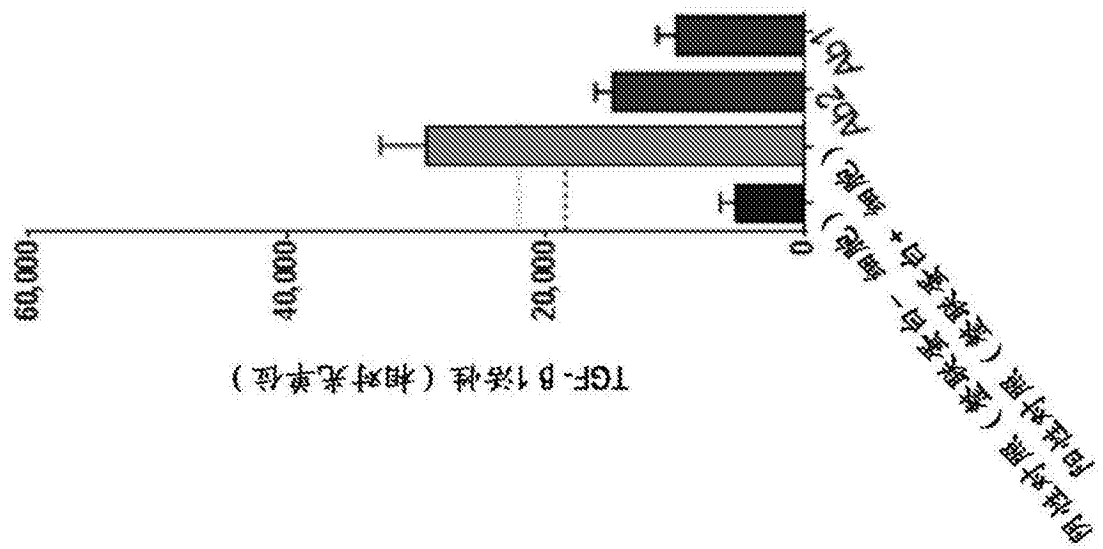


图7

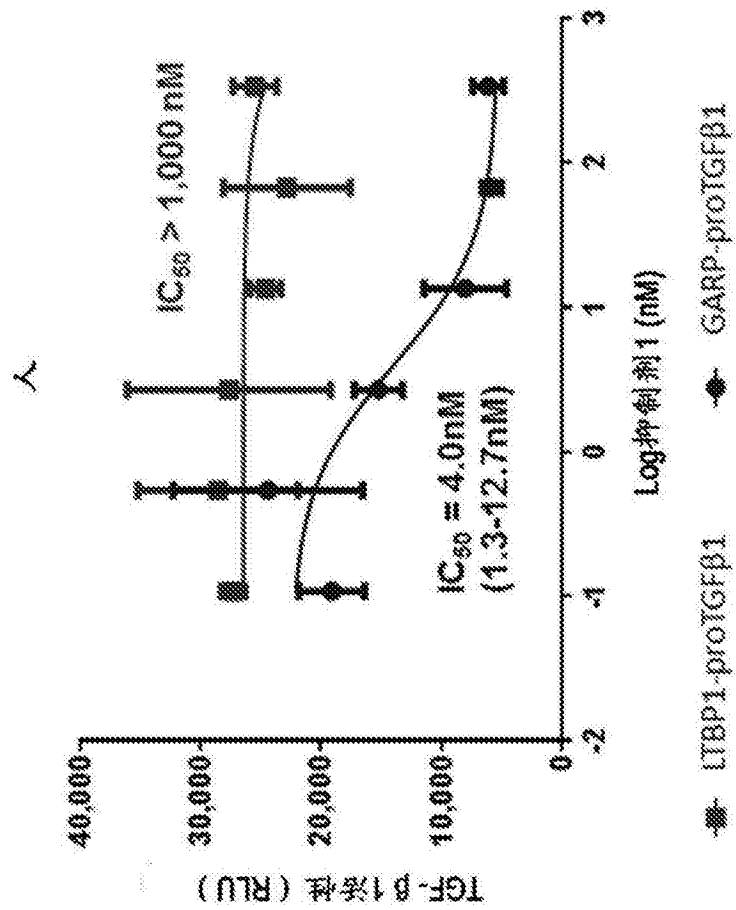


图8

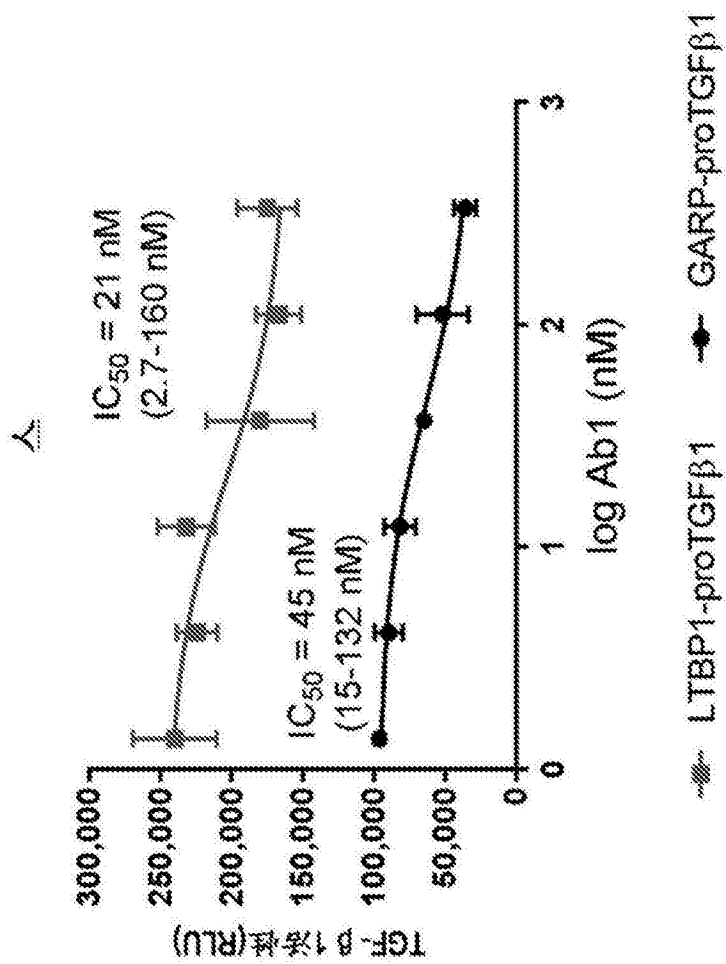


图9

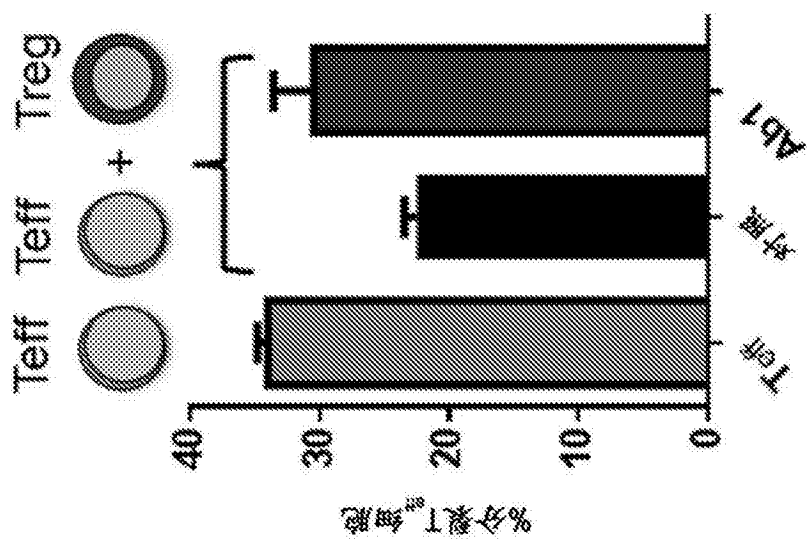


图10

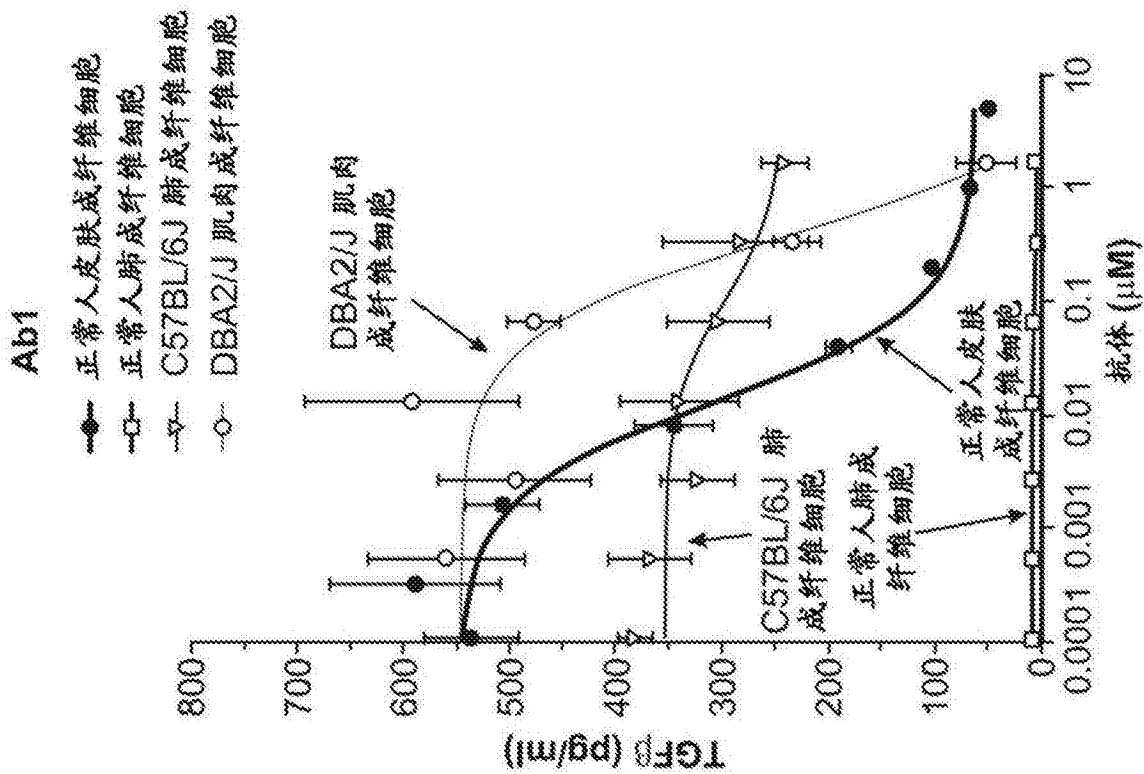


图11A

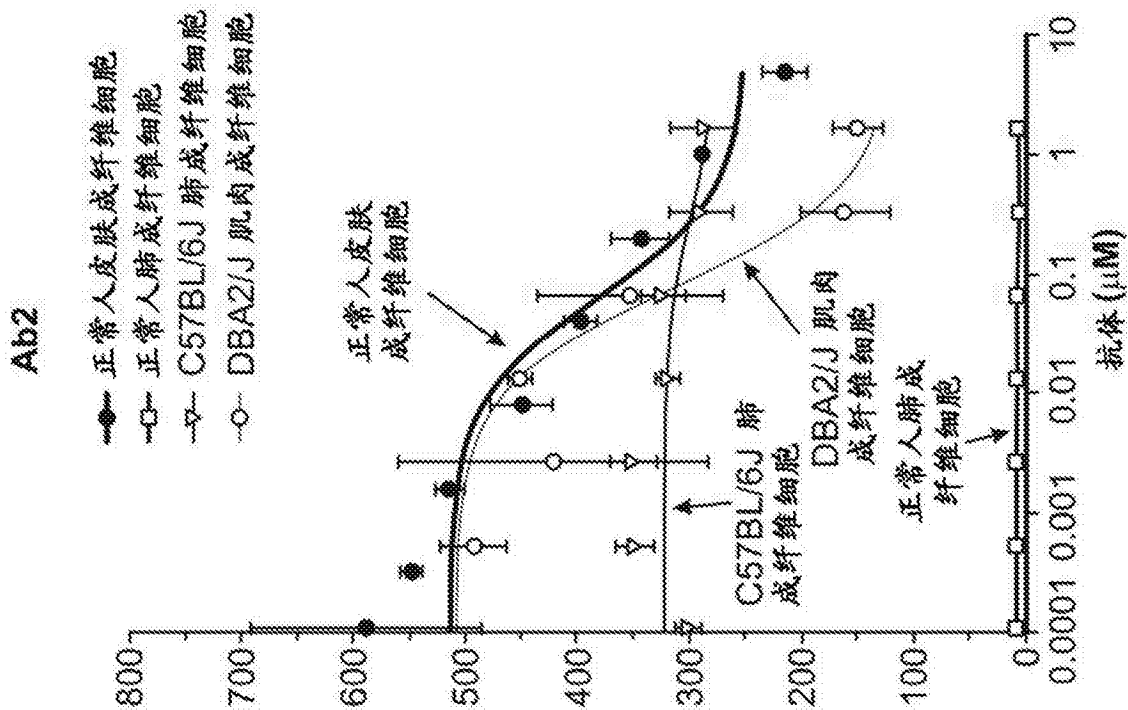


图11B

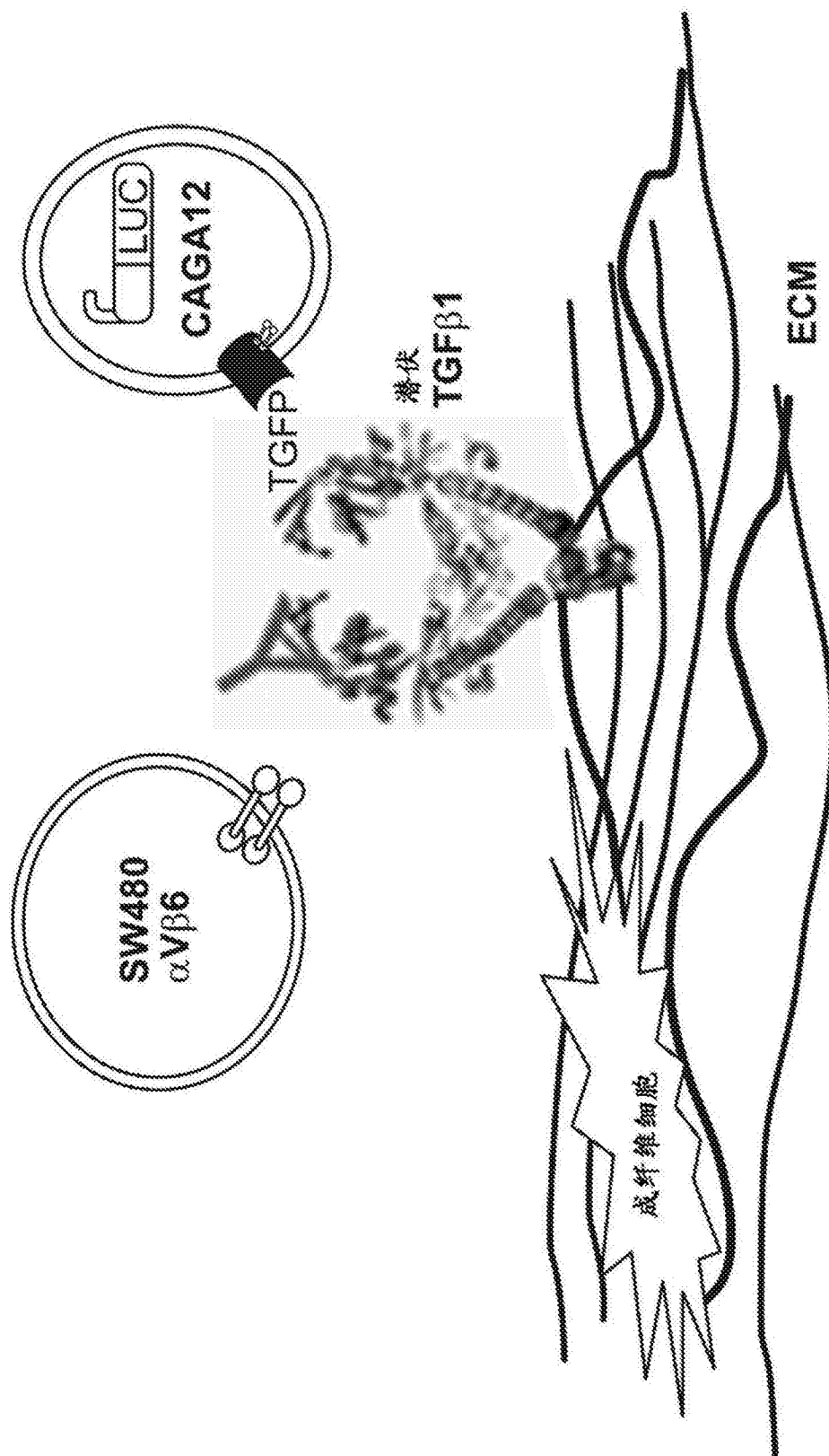


图11C

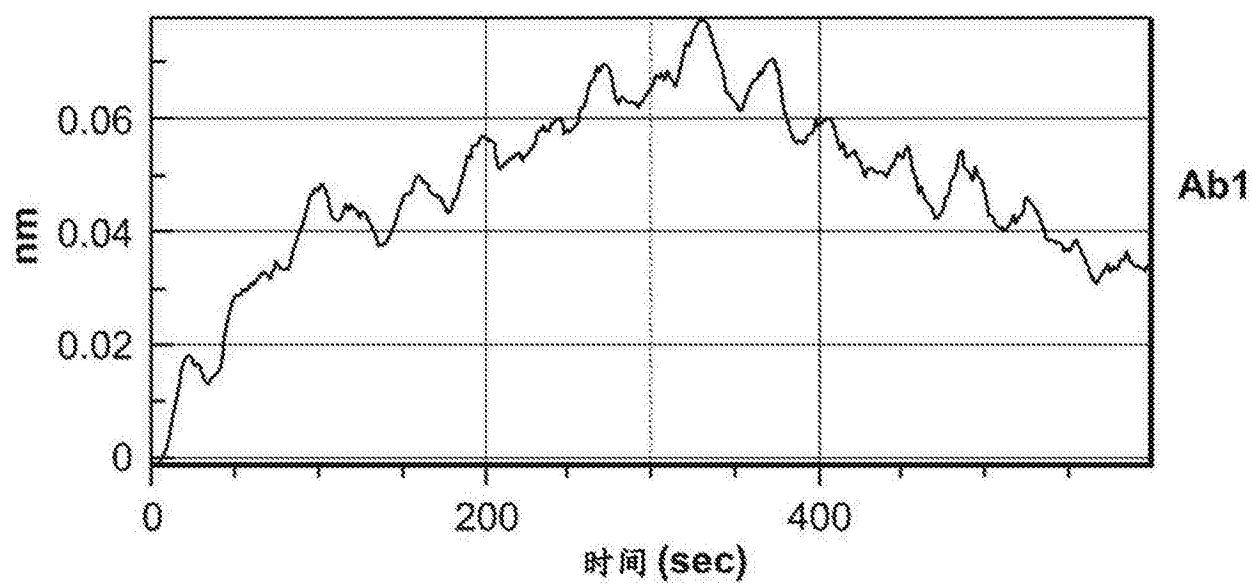


图12A

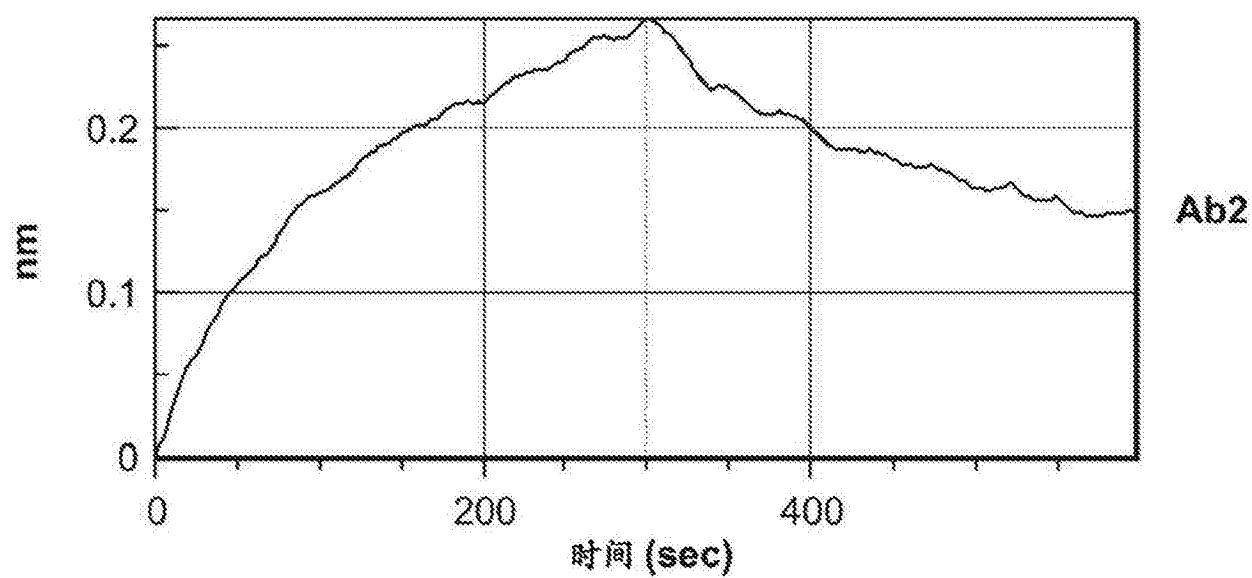


图12B

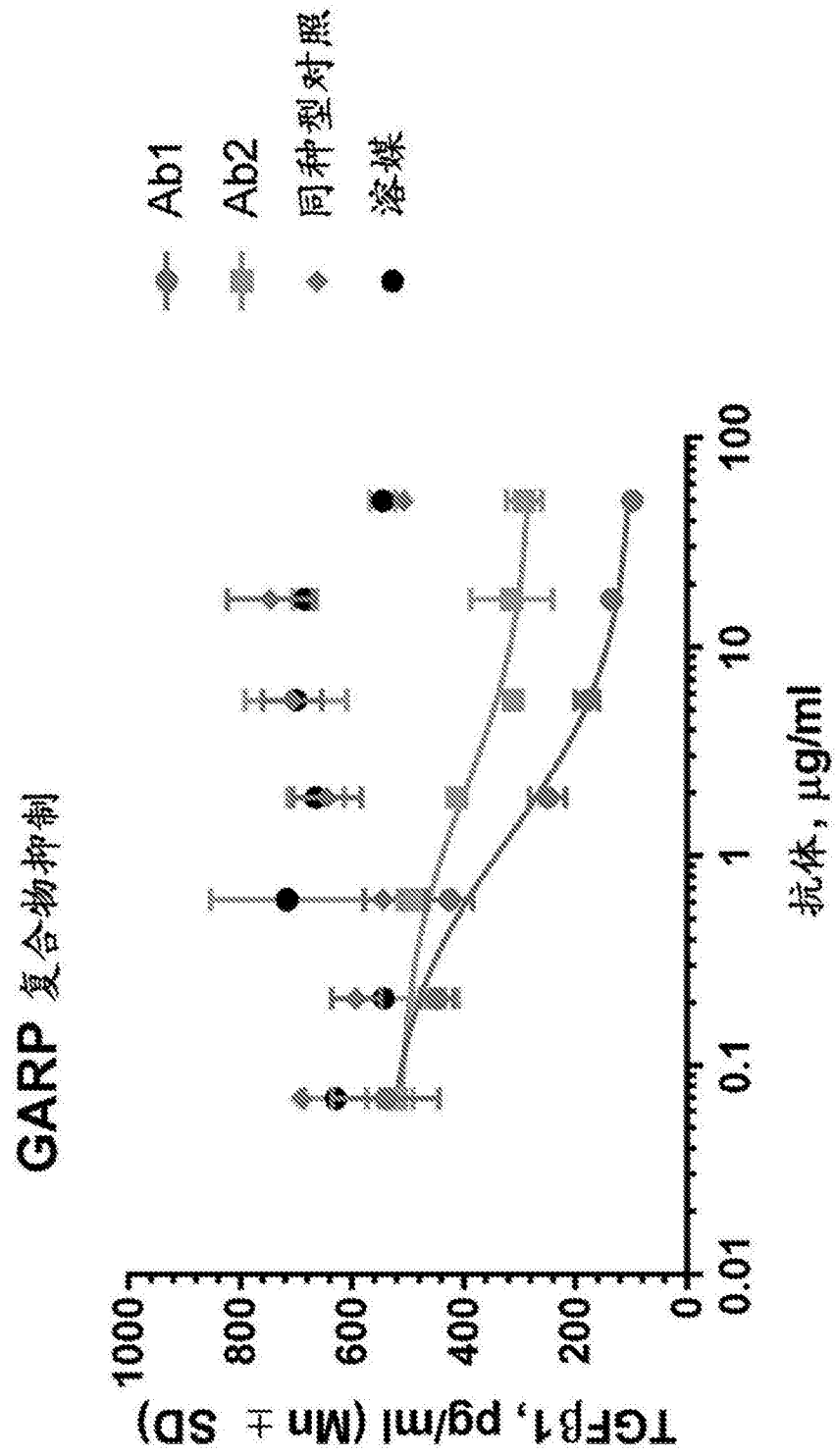


图13A

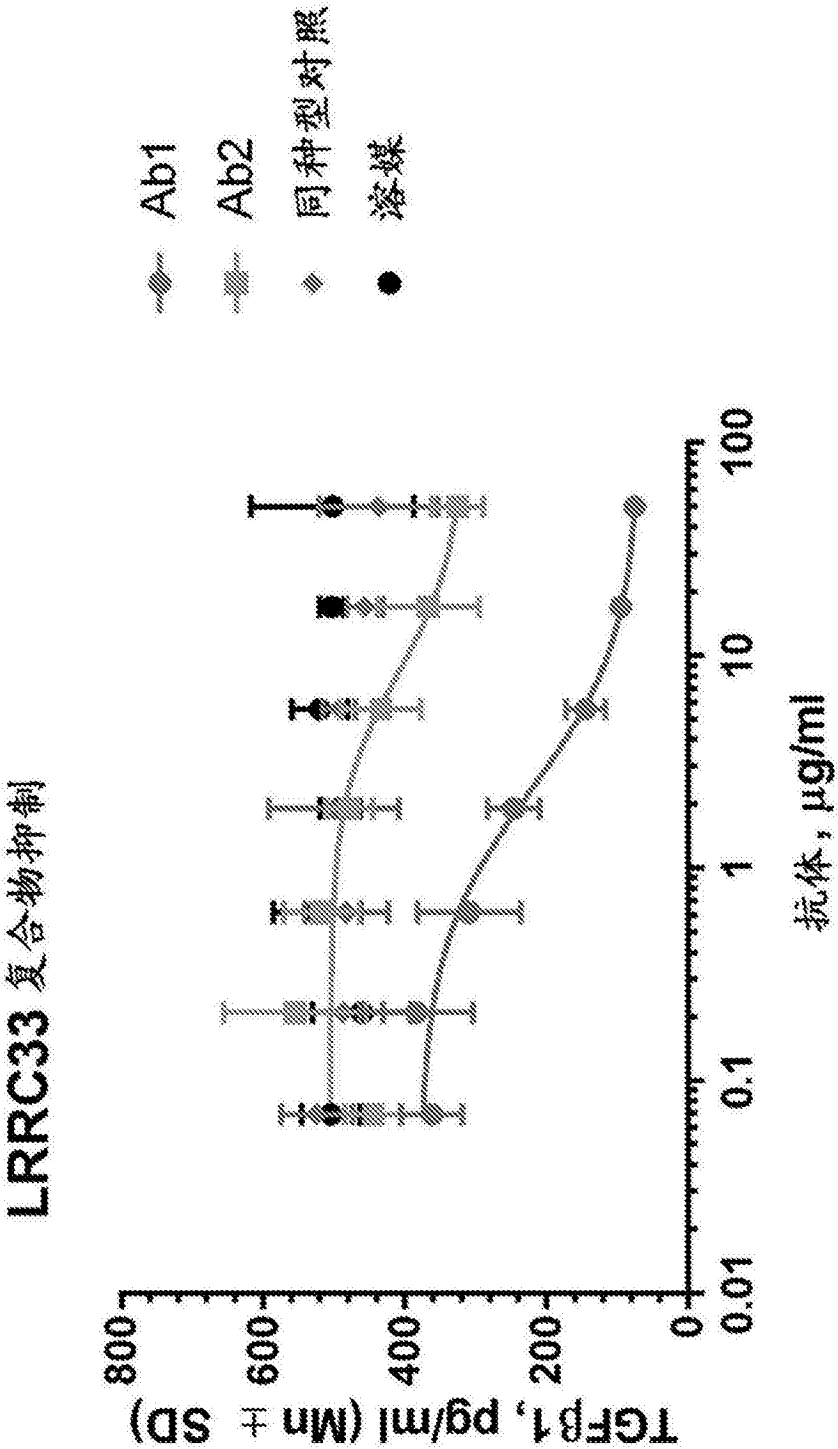


图13B

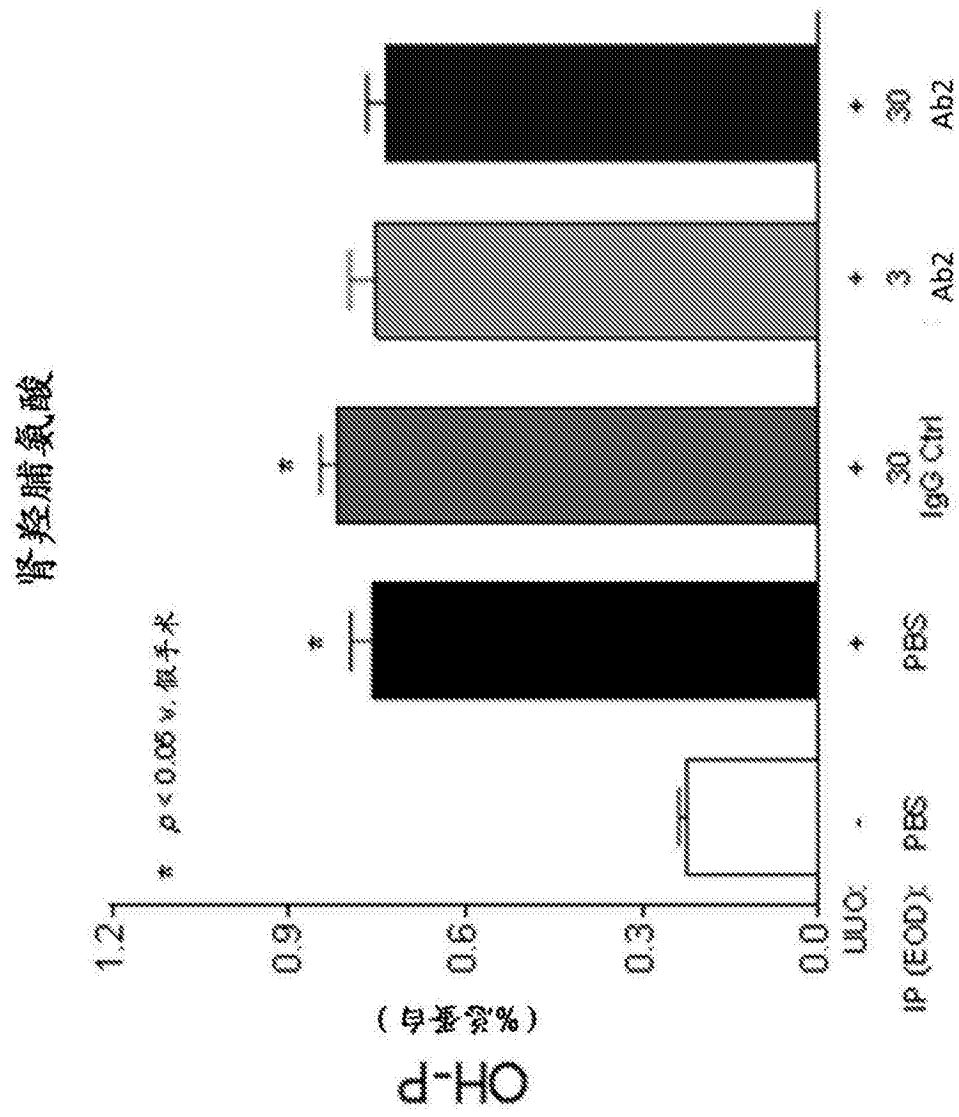


图14

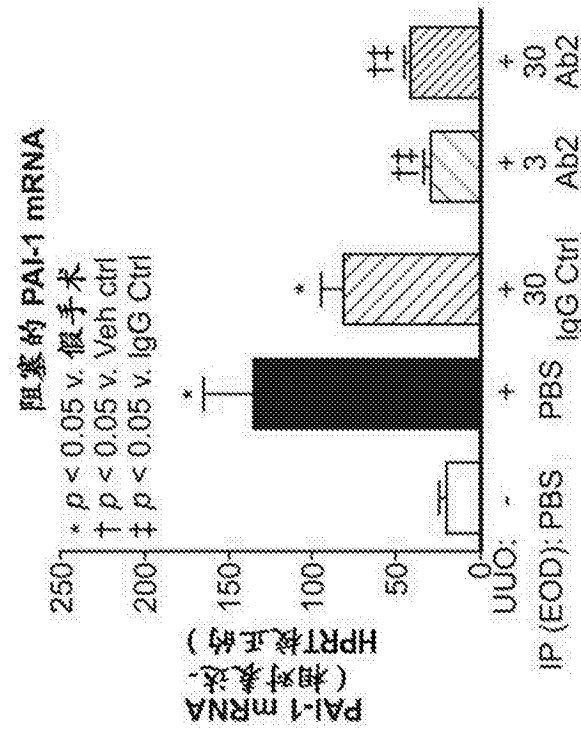


图15A

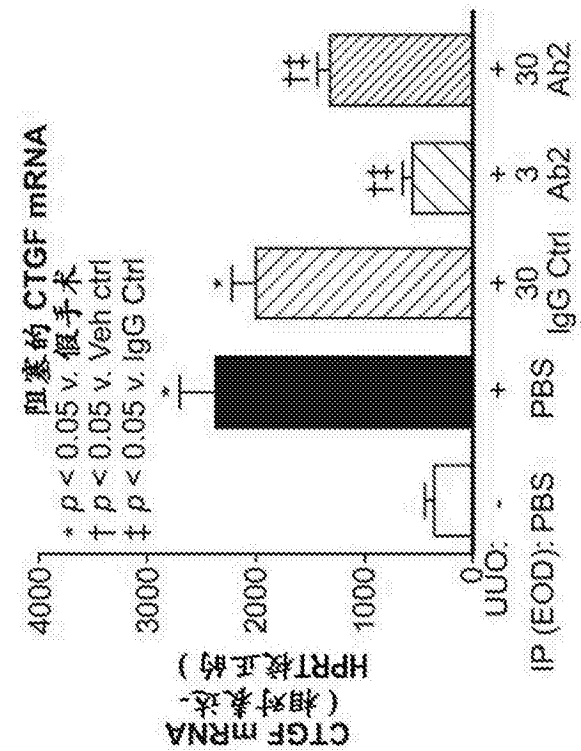


图15B

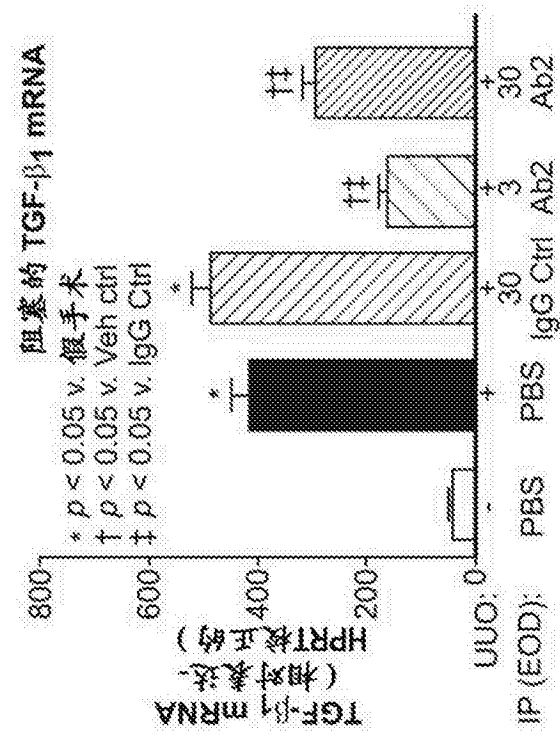


图15C

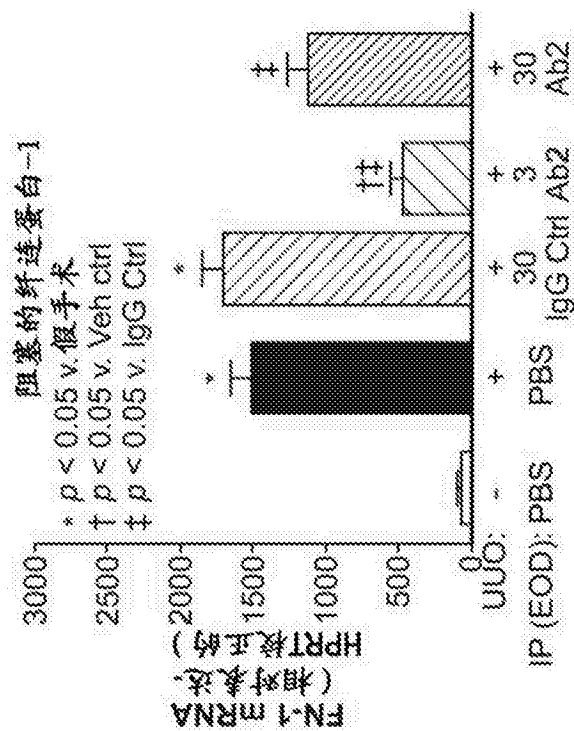


图15D

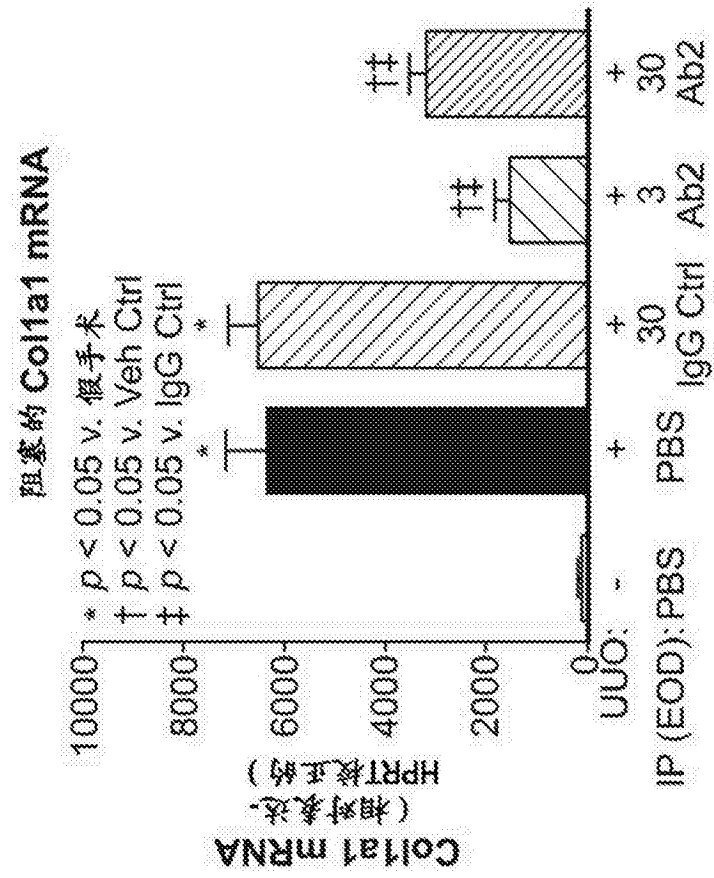


图15G

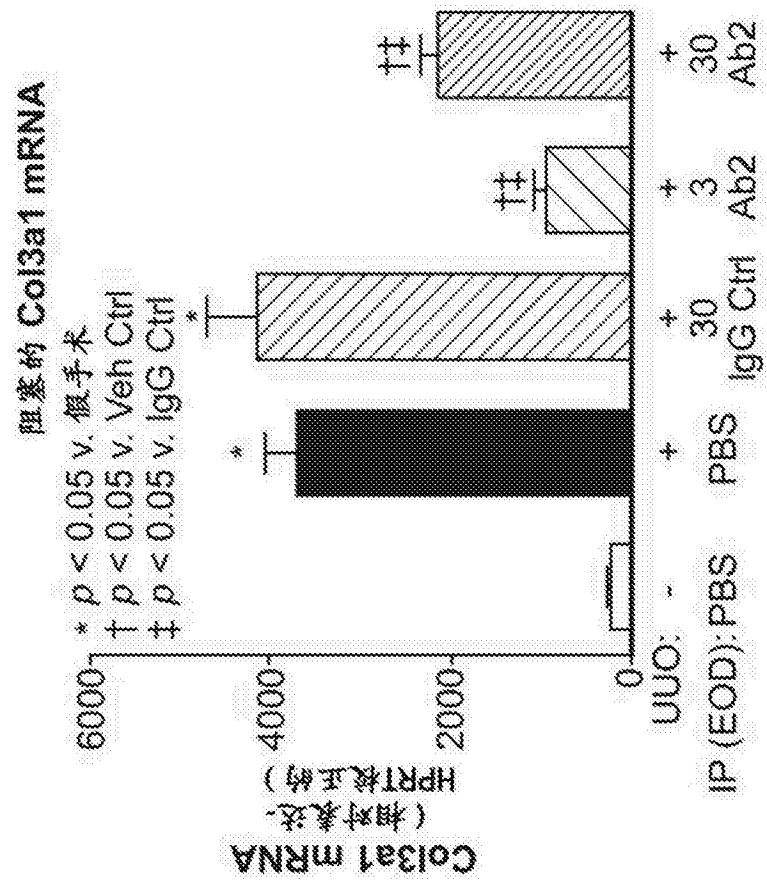


图15H

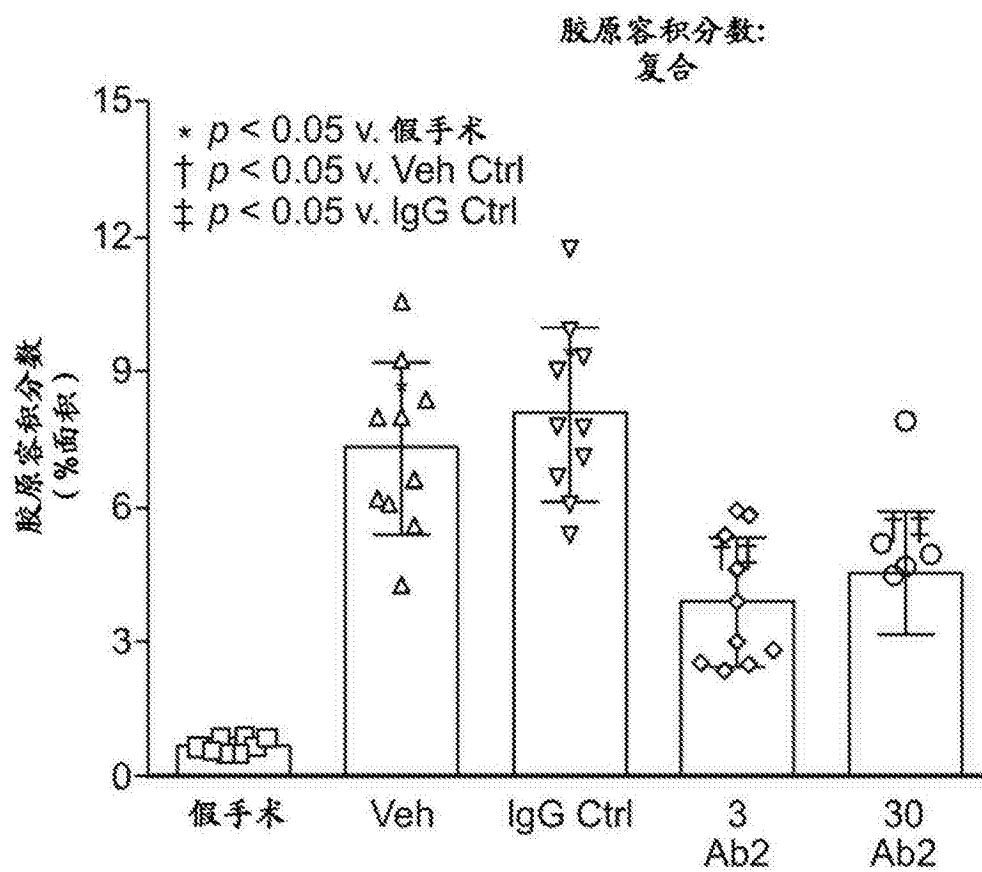


图16

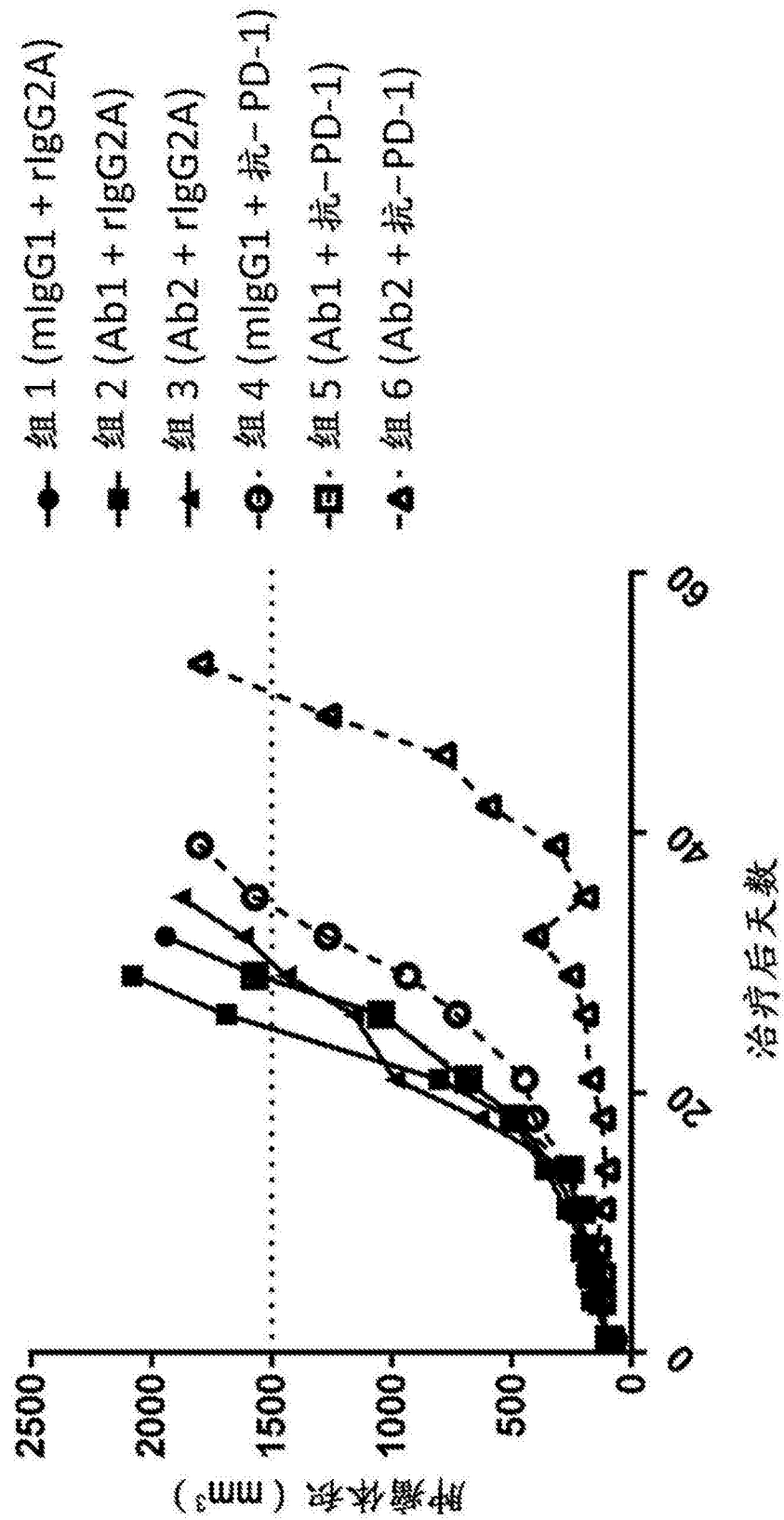


图17

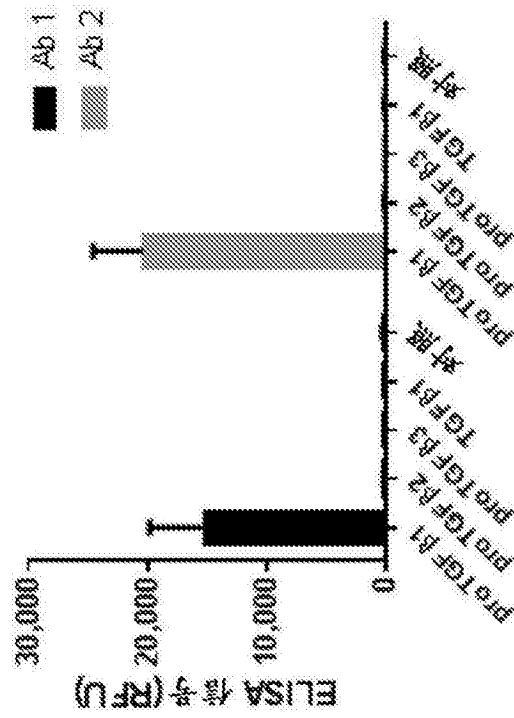


图18A

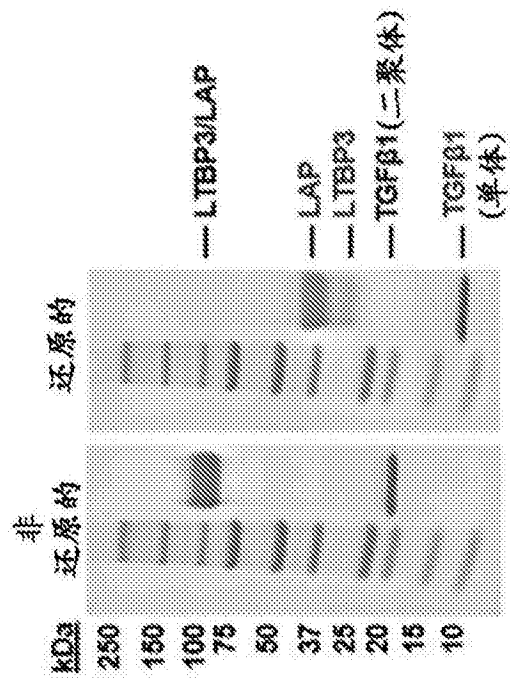


图18B

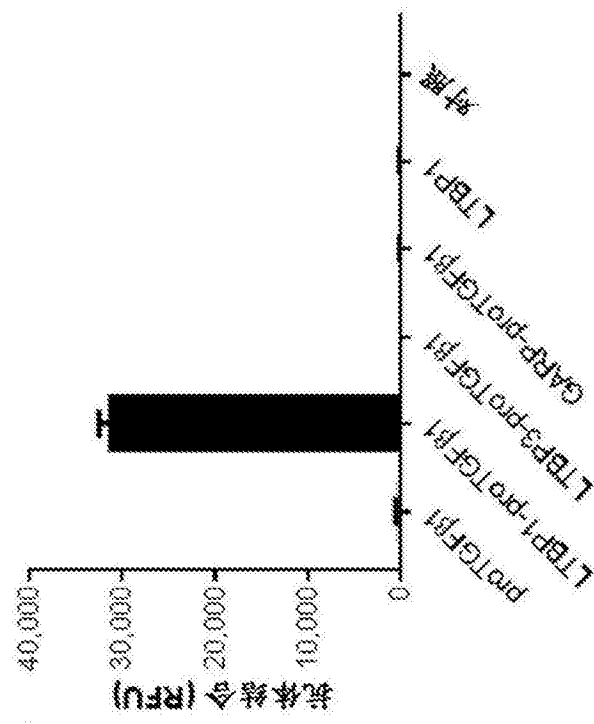


图18C

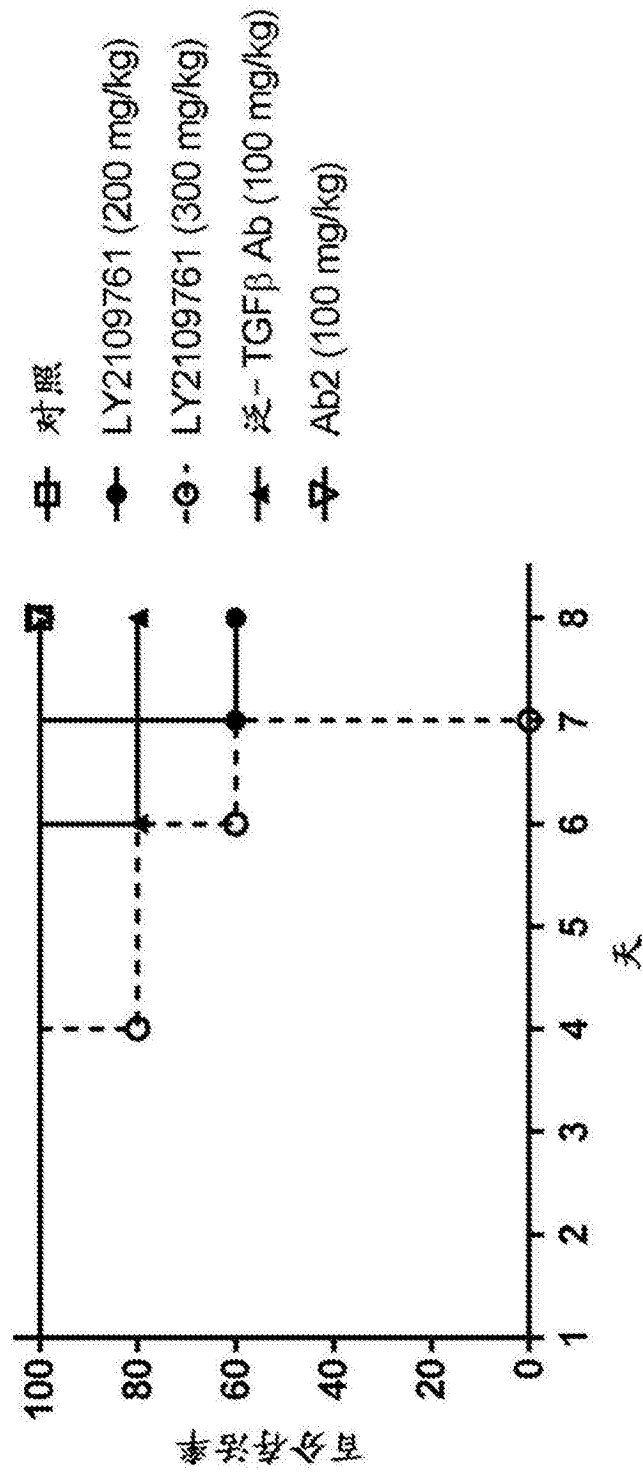


图19

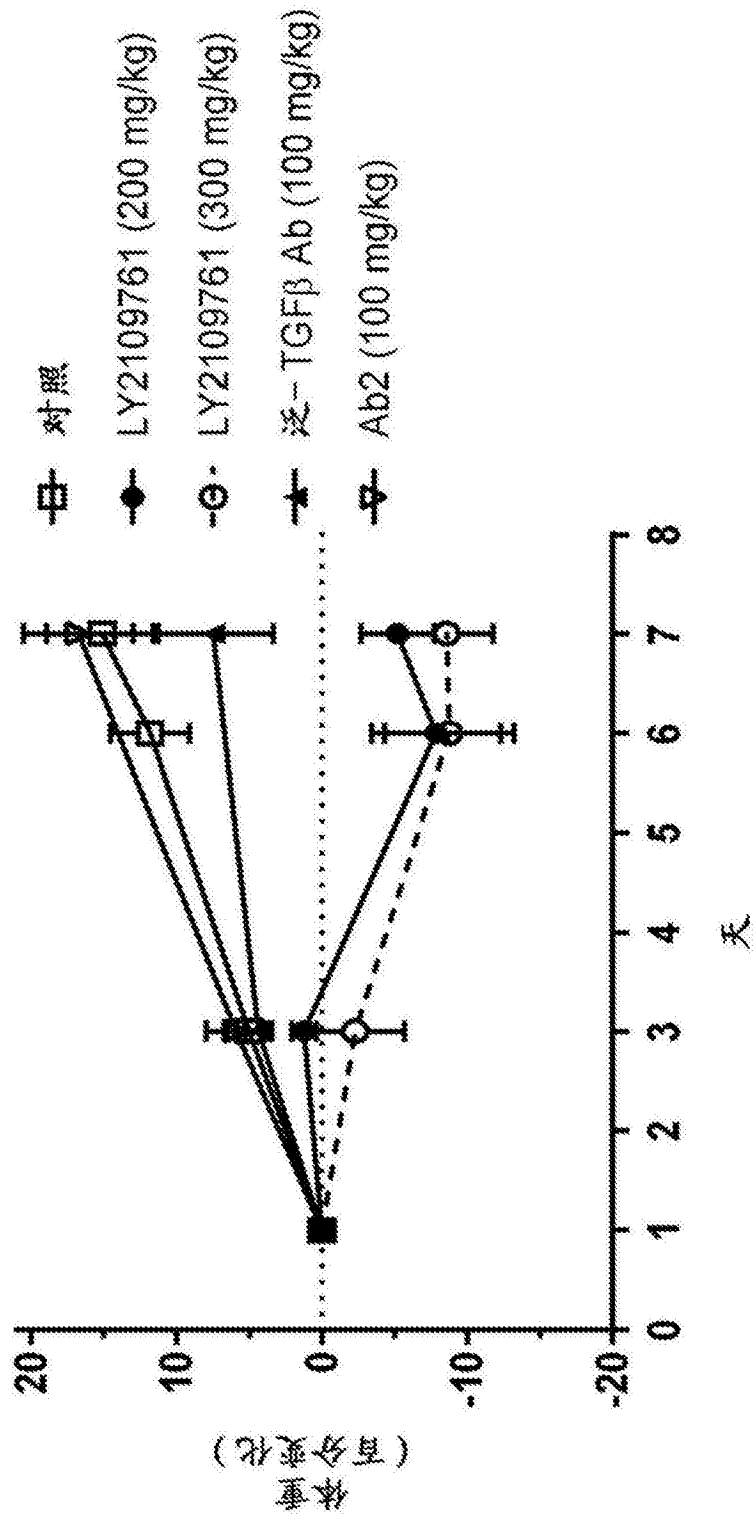


图20

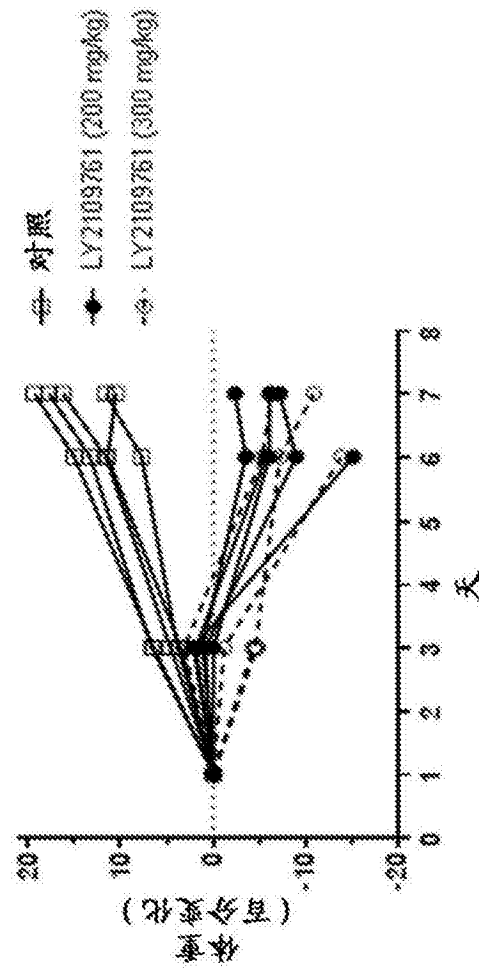


图21A

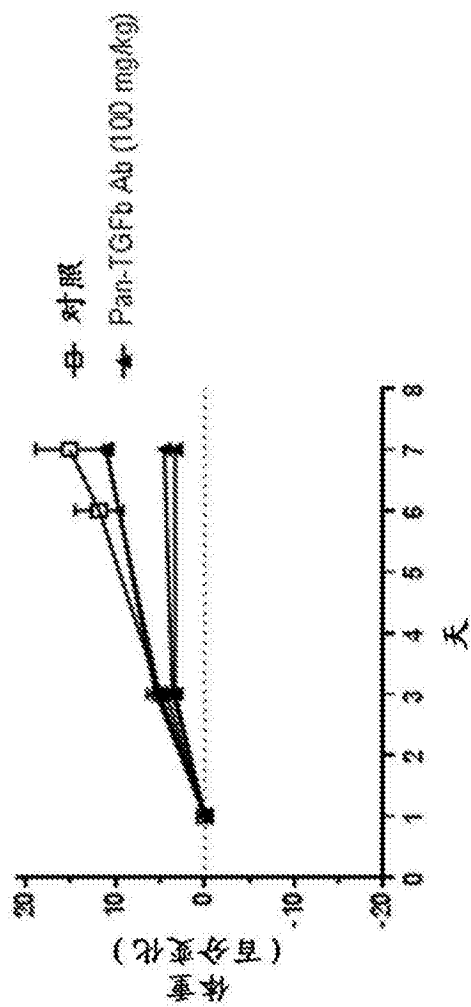


图21B

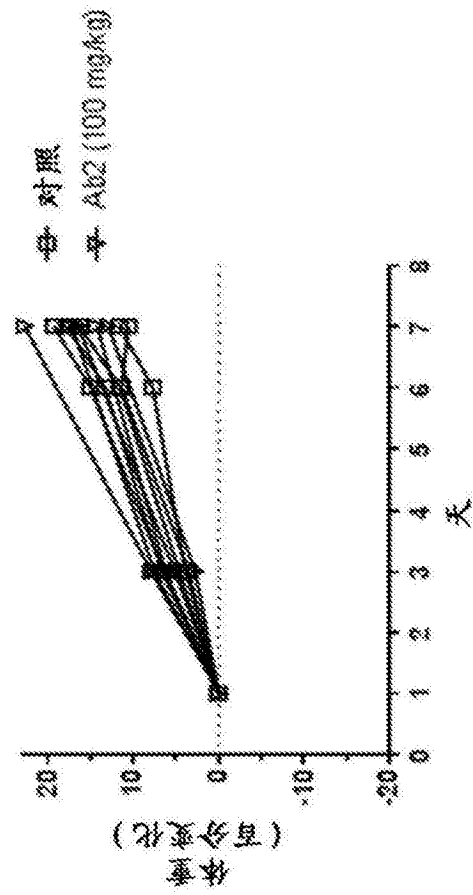


图21C

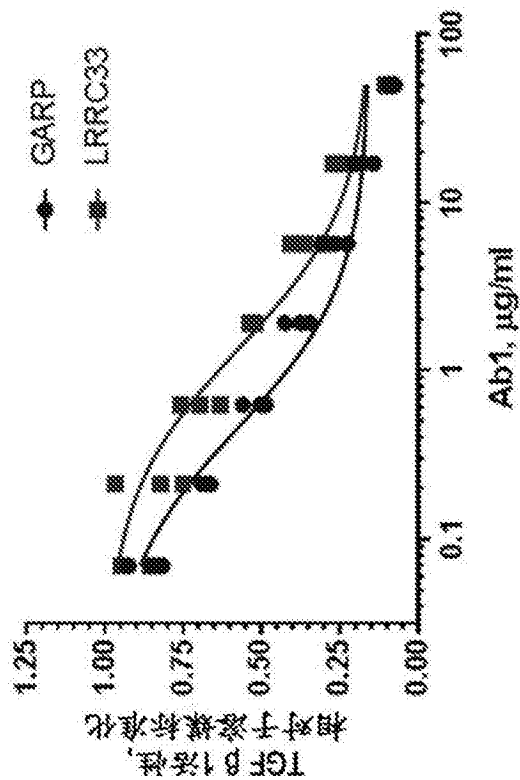


图22A

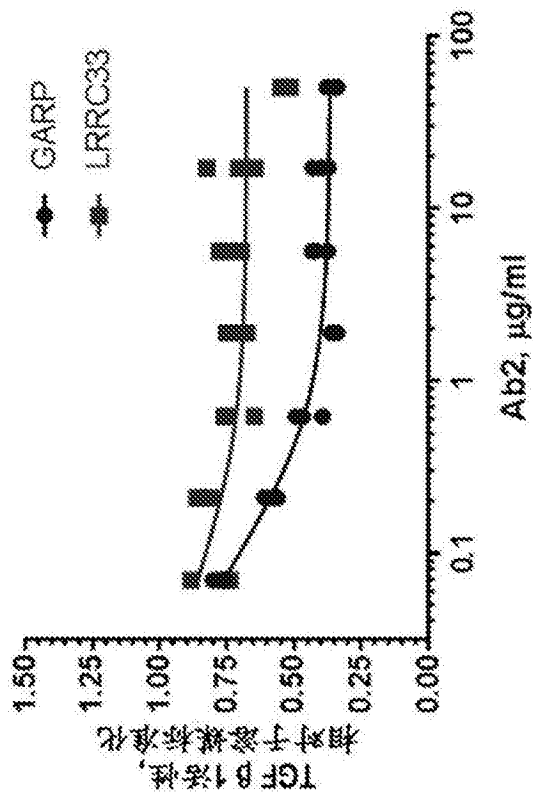


图22B

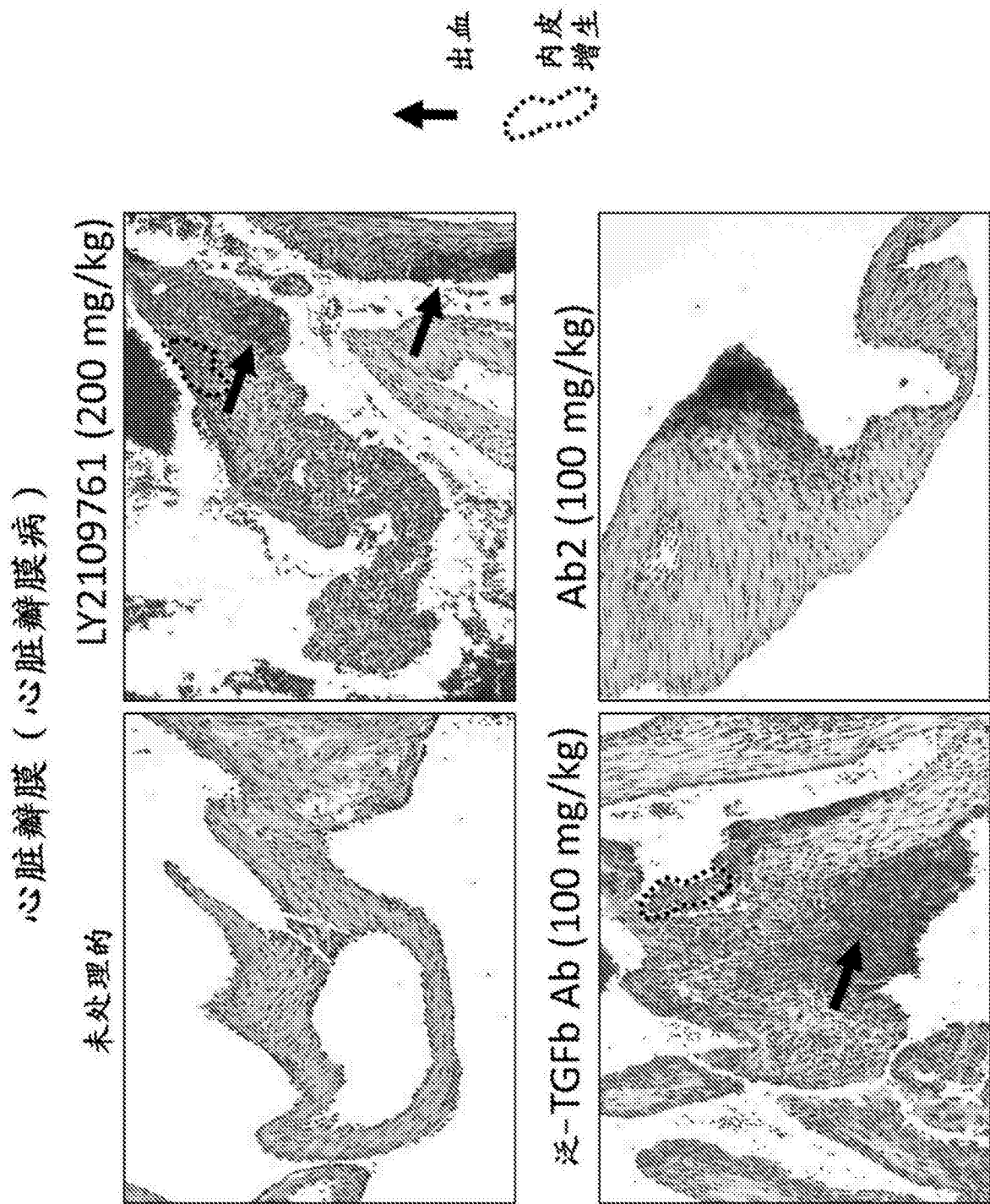


图23