



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202506185 A

(43)公開日：中華民國 114 (2025) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：113140547

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 01 月 18 日

(51)Int. Cl.：

*A61K39/395 (2006.01)**C07K16/22 (2006.01)**A61P37/00 (2006.01)**A61P13/12 (2006.01)**A61P11/00 (2006.01)*

(30)優先權：2017/01/20

美國

62/448,800

2017/01/20

歐洲專利局

17305061.8

(71)申請人：法商賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)

法國

(72)發明人：夏皮羅 蓋瑞 SHAPIRO, GARY (US)；布勞爾 凱文 BROWER, KEVIN (US)；芬恩 派翠克 FINN, PATRICK (US)；格雷戈里 理查 GREGORY, RICHARD C. (US)；柯都里 拉歐 KODURI, RAO (IN)；劉 鋒 LIU, FENG (US)；瑪爾科娃 納塔利婭 MALKOVA, NATALIA (US)；米高 帕明德 MANKOO, PARMINDER (US)；波拉德 傑克 POLLARD, JACK R. (US)；邱 華偉 QIU, HUAWEI (US)；泰哈柏 約阿希姆 THEILHABER, JOACHIM (US)；溫特 克里斯多福 WINTER, CHRISTOPHER (US)；俞 翠琿 YU, MARCELLA (US)

(74)代理人：何愛文；王仁君

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：12 共 110 頁

(54)名稱

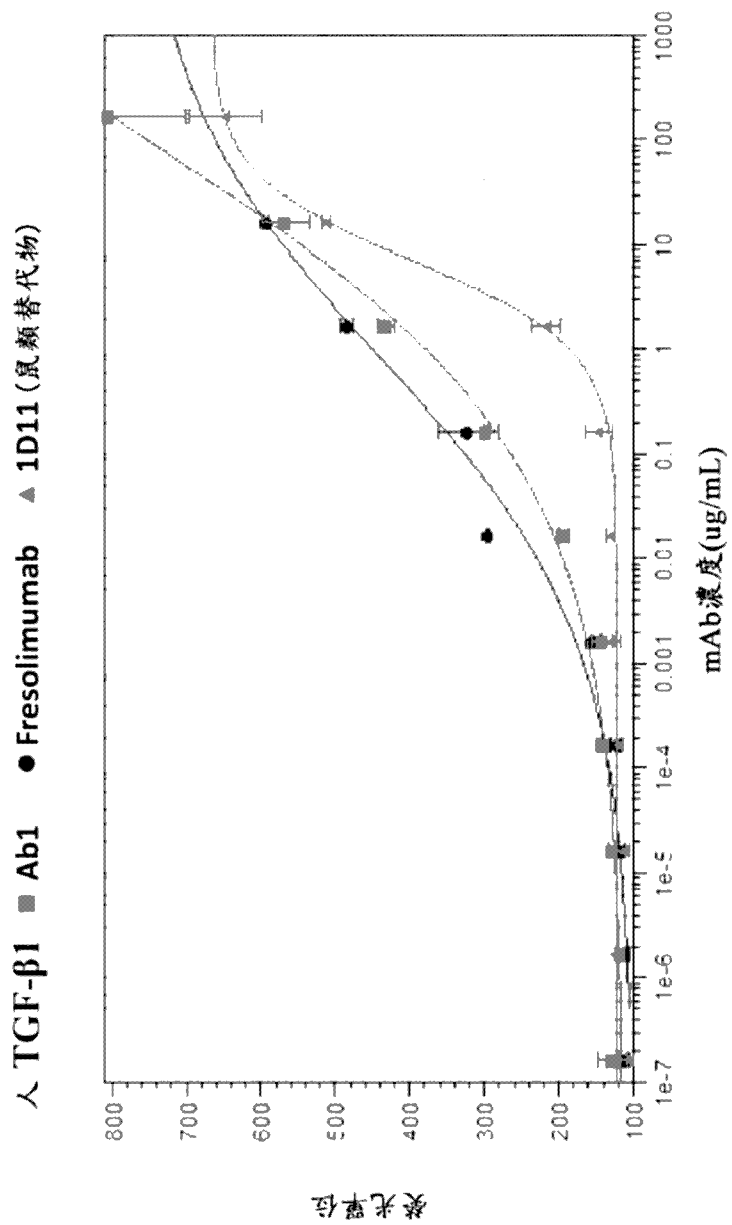
抗 TGF- β 抗體及其用途

(57)摘要

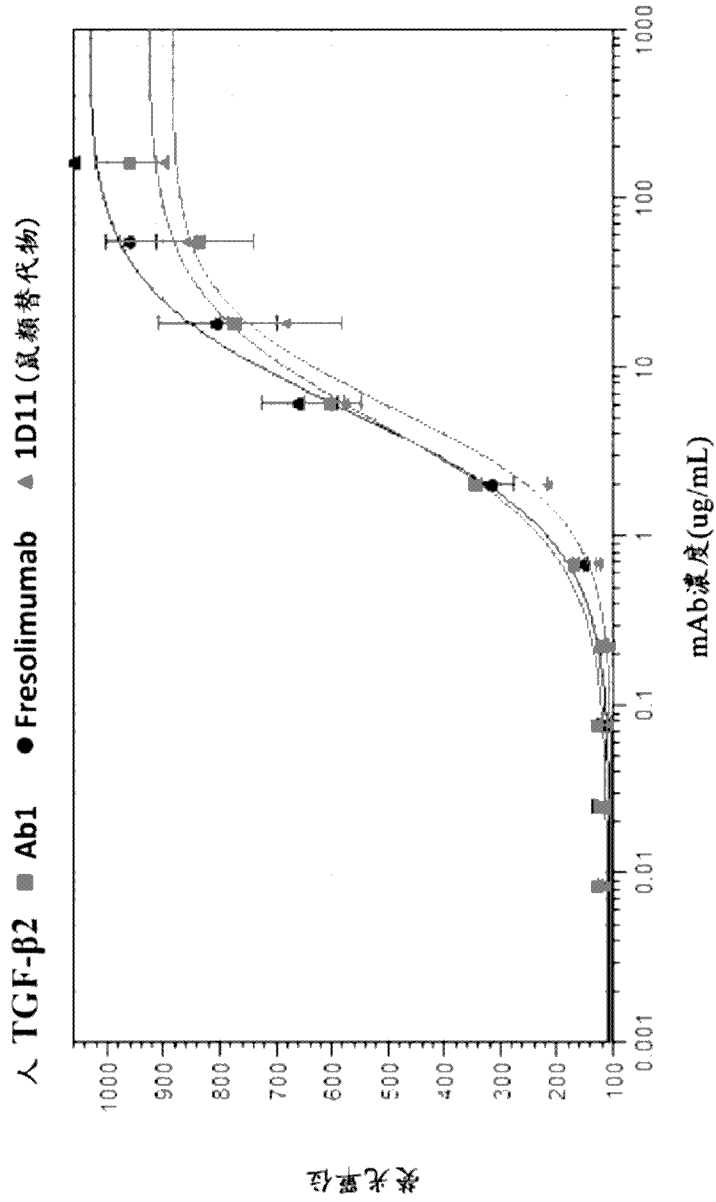
本發明提供了用於治療由 TGF- β 介導的病症，包括自身免疫性疾病、纖維化病症和癌症的改善的泛-TGF- β 抗體(pan-TGF- β antibody)。還提供了該抗體與其他免疫調節劑例如抗 PD-1 抗體聯合的方法和用途。

The invention provides an improved pan-TGF- β antibody for treatment of conditions that are mediated by TGF- β , including autoimmune diseases, fibrotic conditions, and cancers. Also provided are methods and uses of the antibody in conjunction with other immunomodulatory agents such as an anti-PD-1 antibody.

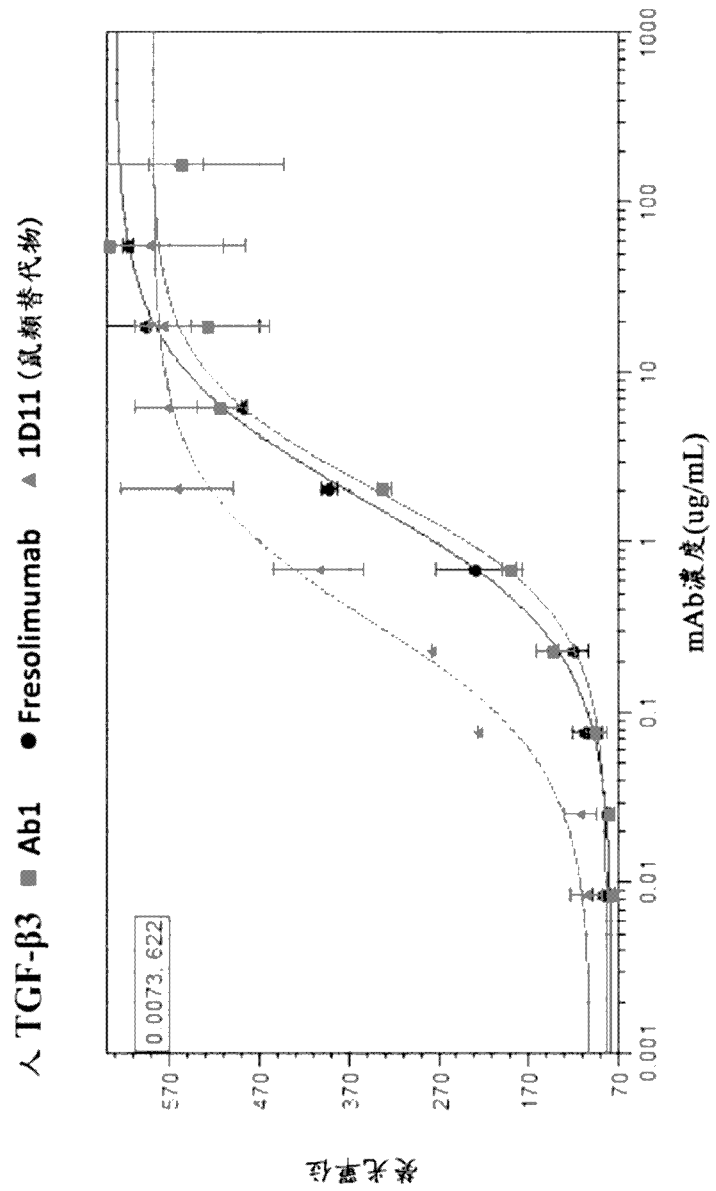
指定代表圖：



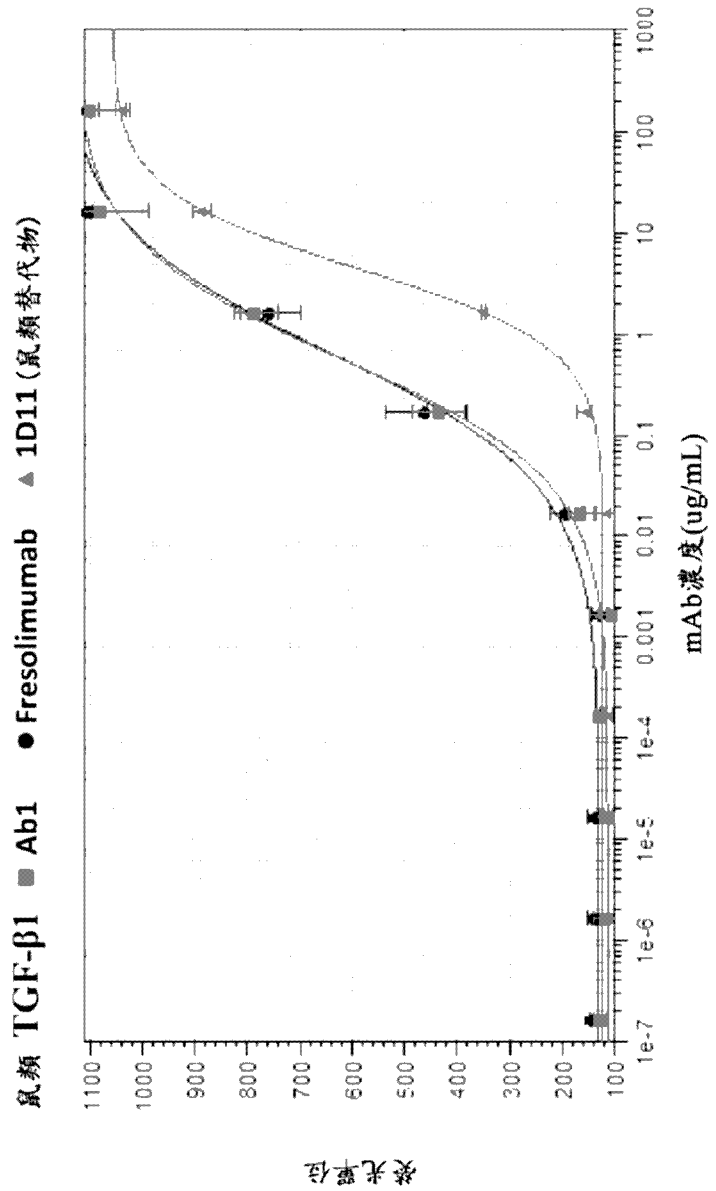
【圖1A】



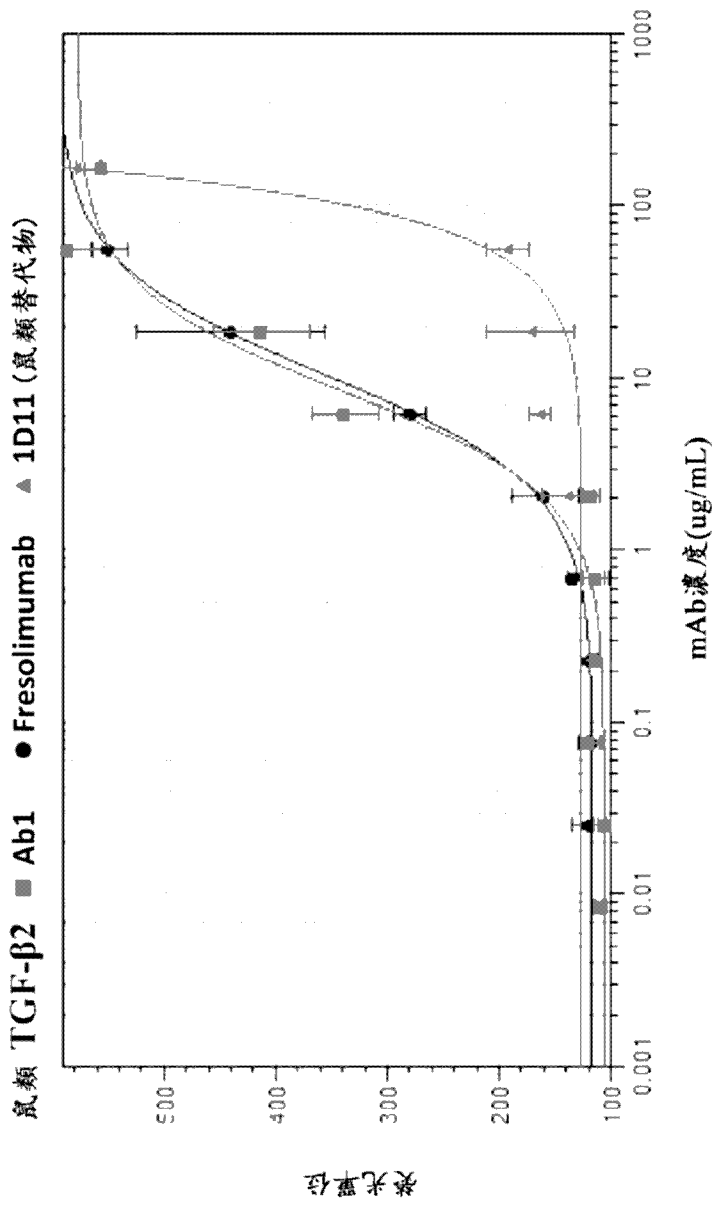
【圖1B】



【圖1C】



【圖1D】



【圖1E】

【發明摘要】

【中文發明名稱】抗TGF- β 抗體及其用途

【英文發明名稱】ANTI-TGF-BETA ANTIBODIES AND THEIR USE

【中文】

本發明提供了用於治療由TGF- β 介導的病症，包括自身免疫性疾病、纖維化病症和癌症的改善的泛-TGF- β 抗體(pan-TGF- β antibody)。還提供了該抗體與其他免疫調節劑例如抗PD-1抗體聯合的方法和用途。

【英文】

The invention provides an improved pan-TGF- β antibody for treatment of conditions that are mediated by TGF- β , including autoimmune diseases, fibrotic conditions, and cancers. Also provided are methods and uses of the antibody in conjunction with other immunomodulatory agents such as an anti-PD-1 antibody.

【指定代表圖】圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】抗TGF- β 抗體及其用途

【英文發明名稱】ANTI-TGF-BETA ANTIBODIES AND THEIR USE

【技術領域】

【0001】 本發明提供了用於治療由TGF- β 介導的病徵，包括自身免疫性疾病、纖維化病徵和癌症的改善的泛-TGF- β 抗體(pan-TGF- β antibody)。還提供了該抗體與其他免疫調節劑例如抗PD-1抗體聯合的方法和用途。

【先前技術】

【0002】 轉化生長因子 β (TGF- β)是一種控制許多關鍵細胞功能的細胞因子，包括增殖、分化、存活、遷移和上皮間充質轉化。它調節多種生物過程，如細胞外基質形成、傷口癒合、胚胎發育、骨骼發育、造血、免疫和炎症反應以及惡性轉化。TGF- β 的失調導致病理狀況，例如出生缺陷、癌症、慢性炎症以及自身免疫和纖維化疾病。

【0003】 TGF- β 具有三種已知的同種型—TGF- β 1、2和3。所有三種同種型最初都被翻譯成前肽(pro-peptide)。切割後，成熟的C-端保持與N-端相結合(稱為潛伏期結合肽(latency associated peptide)或LAP)，形成從細胞分泌的小潛伏複合物(SLC)。SLC不能結合TGF- β 受體II(TGF β RII)阻止了受體接合。通過解離N-和C-端的活化通過幾種機制之一發生，包括蛋白水解切割、酸性pH或整聯蛋白結構改變(Connolly等，Int J Biol Sci (2012) 8(7):964-78)。

【0004】 TGF- β 1、2和3在其功能上是多效性的並且在不同細胞和組織類型中以不同的模式表現。它們具有相似的體外活性，但是特定細胞類型中的單個敲除表明儘管它們具有共享的結合相同受體的能力，但它們在體內具有不同的作用(Akhurst等，Nat Rev Drug Discov (2012) 11(10):790-811)。在TGF- β 與TGF β RII結合後，受體的組成型激酶活性磷酸化並激活TGF β RI，其使SMAD2/3磷酸化，從而允許與SMAD4結合，定位至細胞核，以及TGF- β 響應性基因的轉錄。見上文。除了這種典型的信號傳導級聯，非典型途徑通過其他因子傳遞信號，包括p38 MAPK、PI3K、AKT、JUN、JNK和NF- κ B。TGF- β 信號傳導也受到其他途徑調控，包括WNT、Hedgehog、Notch、IFN、TNF和RAS。因此TGF- β 信號傳導的最終結果是所有這些整合了細胞的狀態和環境的信號傳導途徑的串擾(crosstalk)。見上文。

【0005】 鑒於TGF- β 的不同功能，需要對人類患者安全的泛-TGF- β 特異性治療性抗體(Bedinger等，mAbs. (2016) 8(2):389–404)。但是，TGF- β 在物種間高度保守。結果，在動物例如小鼠中生產抗人TGF- β 的抗體是一項具有挑戰性的任務。

【0006】 對於目前沒有得到有效治療的患者而言也存在醫療需求。例如，用抗PD1抗體nivolumab單一療法治療的III期Checkmate-067研究中超過50%的晚期黑色素瘤患者對治療沒有完全或部分的反應(Larkin等，N Engl J Med (2015) 373:23–34；Redman等，BMC Med (2016) 14:20-30)。

【發明內容】

【0007】 本發明提供了特異性結合人TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3(即泛-TGF- β 特異性)的改進的單株抗體。這些抗體在製造期間不易形成半抗體(即，具有一條重鏈和一條輕鏈的二聚體複合物)。它們還具有優越的藥代動力學概貌(pharmacokinetic profile)，例如增加的半衰期，並因此可以賦予患者改善的臨床益處。本發明人還發現TGF- β 抑制，例如由本發明的抗體和抗原結合片段實現者，緩和了腫瘤中的免疫抑制性微環境並增強了免疫療法的功效，所述免疫療法例如靶向程序性細胞死亡蛋白1 (PD-1)、PD-1配體1 (PD-L1)和2 (PD-L2)的療法。

【0008】 一方面，本發明提供了與人TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3特異性結合的單離單株抗體，其包含SEQ ID NO: 1中的重鏈互補決定區(CDR)1-3和SEQ ID NO: 2中的輕鏈CDR1-3，其中所述抗體包含在228位(EU編號)具有突變的人IgG₄恒定區。在一些實施方案中，突變是絲胺酸成為脯胺酸的突變(S228P)。在一些實施方案中，抗體包含對應於SEQ ID NO:1的殘基1-120的可變域(V_H)胺基酸序列和對應於SEQ ID NO: 2的殘基1-108的輕鏈可變域(V_L)胺基酸序列。在進一步的實施方案中，抗體包含SEQ ID NO:1中所示的重鏈胺基酸序列(具有或不具有C-端賴胺酸)和SEQ ID NO: 2中所示的輕鏈胺基酸序列。本發明的特徵還在於上述抗體的F(ab')₂抗原結合片段。

【0009】 在優選的實施方案中，與夫蘇木單抗(fresolimumab)治療相比，本發明的抗體或片段具有增加的半衰期、增加的暴露或兩者兼有。例如，增加為10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%或更多。藥物如本發明的抗體或片段的暴露(exposure)是藥物在體內的濃度相對於時間的函數。

藥物在體內的濃度通常由血液、血漿或血清中的藥物水平來表示。如下面的實施例7所示，藥物的半衰期和暴露可以通過眾所周知的方法測量。

【0010】 本發明還提供了包含本發明的抗體的組成物，其中所述組成物包含小於1%的半抗體。半抗體形成可以通過對單株抗體製備物的純度分析測定，其使用例如在非還原條件下的SDS-毛細管電泳或非還原性SDS-PAGE分析，繼之以密度測定法或RP-HPLC(Angal等，Mol Immunol (1993) 30(1):105-8；Bloom等，Protein Science (1997) 6:407-415；Schuurman等，(2001) 38(1):1-8；和Solanos等，Anal Chem (2006) 78:6583-94)。在一些實施方案中，這種組成物是還包含藥學上可接受的賦形劑的醫藥組成物。

【0011】 另一方面，本發明提供了在有需要的患者(人)中抑制TGF- β 信號轉導的方法，其包括向患者施用治療量的本發明的抗體或片段。在一些實施方案中，患者患有免疫介導的疾病(例如硬皮病)，纖維化病症(例如腎纖維化病症，諸如局部節段性腎小球硬化症(FSGS)，或肺纖維化病症諸如特發性肺纖維化)，或者出生或骨缺損(例如，成骨不全症)。在一些實施方案中，患者患有癌症。在一些實施方案中，該方法中使用的抗體或片段抑制CD4⁺ T細胞向可誘導型調節性T細胞(iTreg)的分化。所述抗體或片段可以緩和免疫抑制性腫瘤微環境。抗體或片段的這種作用有助於激活免疫系統並增強免疫療法的功效。本文所述的治療方法的功效可以通過例如患者中(例如患者的腫瘤組織中)的以下一項或多項來指示：(1)MIP2和/或KC/GRO水平的增加，(2)CD8⁺ T細胞如INF- γ 陽性CD8⁺ T細胞對腫瘤組織的活化或浸潤，以及(3)自然殺手(NK)細胞的聚集(clustering)的增加。

【0012】 本發明進一步提供了治療患者(人)中的癌症的方法，其包括向患者施用(1)治療有效量的本發明的抗體或片段，和(2)治療有效量的免疫檢查點蛋白抑制劑。這兩種藥劑可以同時施用(例如，以單一組成物或以分開的組成物)，或以任一順序依次施用。例如，這兩種藥劑可以在同一天施用。在一些實施方案中，治療劑(1)在治療劑(2)之前(例如，一天或更多天之前)施用於患者。

【0013】 在一些實施方案中，免疫檢查點蛋白是PD-1、PD-L1或PD-L2。在進一步的實施方案中，免疫檢查點蛋白的抑制劑是抗PD-1抗體。在進一步的實施方案中，抗PD-1抗體包含(1)SEQ ID NO:5中的重鏈CDR1-3和SEQ ID NO:6中的輕鏈CDR1-3，(2)對應於SEQ ID NO:5的殘基1-117的V_H胺基酸序列和對應於SEQ ID NO:6的殘基1-107的V_L胺基酸序列，或(3)SEQ ID NO:5中所示的重鏈胺基酸序列(具有或不具有C-端賴胺酸)和SEQ ID NO:6中所示的輕鏈胺基酸序列。在一個具體的實施方案中，所述方法包括向癌症患者施用包含SEQ ID NO:1中所示的重鏈胺基酸序列(具有或不具有C-膜端賴胺酸)和SEQ ID NO:2中所示的輕鏈胺基酸序列的抗TGF- β 抗體，以及包含SEQ ID NO:5中所示的重鏈胺基酸序列(具有或不具有C-膜端賴胺酸)和SEQ ID NO:6中所示的輕鏈胺基酸序列的抗PD-1抗體序列。在一些實施方案中，患者對抗PD-1抗體單一療法是難治的。患者可能有晚期或轉移性黑色素瘤，或皮膚鱗狀細胞癌。

【0014】 在一些方案中，每2週或每3週向患者施用抗TGF- β 抗體和抗PD-1抗體。在一些方案中，兩種藥劑分別以0.01-40 (例如0.02-20、0.05-15或0.05-20) mg/kg體重的劑量施用。

【0015】 本發明還提供了在有需要的患者中增加免疫應答的方法，包括對患者施用免疫檢查點抑制劑和本發明的抗體或片段。在一些實施方案中，免疫

檢查點抑制劑是抗PD-1抗體，例如包含如下者：(1)SEQ ID NO:5中的HCDR1-3和SEQ ID NO:6中的LCDR1-3；(2)分別對應於SEQ ID NO:5中的殘基1-117和SEQ ID NO:6中的殘基1-107的VH和VL；或(3)具有SEQ ID NO:5的胺基酸序列的重鏈(具有或不具有C-端賴胺酸)和具有SEQ ID NO:6的胺基酸序列的輕鏈。

【0016】 本發明的方法可用於治療多種癌症，包括但不限於黑色素瘤(例如轉移性或晚期)、肺癌(例如，非小細胞肺癌)、皮膚鱗狀細胞癌、結腸直腸癌、乳腺癌、卵巢癌、輸卵管癌、子宮癌、頭頸癌(例如，頭頸部鱗狀細胞癌)、肝癌(liver cancer)(例如肝癌(hepatocarcinoma))、尿路上皮癌和腎癌(例如腎細胞癌)。在一些實施方案中，患者具有間充質腫瘤或實體瘤的間充質亞型。這樣的實體腫瘤的實例包括結腸(例如，結腸直腸癌)、卵巢、頭和頸(例如，頭頸部鱗狀細胞癌)、肝(例如肝細胞癌)和泌尿系統中的那些。

【0017】 在一些實施方案中，包括間充質腫瘤在內的癌症可通過ACTA2(平滑肌 α 2肌動蛋白)、VIM(波形蛋白)、MGP(基質Gla蛋白)、ZWINT(ZW10相互作用著絲點蛋白(ZW10 Interacting Kinetochore Protein))和ZEB2(鋅指E框結合同源框2)中一種或多種的過表現來表徵。這樣的生物標誌物的表現水平可以例如在mRNA水平或蛋白質水平在來自患者的生物樣品如腫瘤活組織檢查或循環腫瘤細胞中測定。

【0018】 本發明還提供用於治療本文所述病症的上述抗體、片段或組成物，以及上述抗體、片段或組成物在製備用於治療本文所述的病症的藥物中的用途。

【0019】 本發明還包括編碼本發明的抗體的重鏈或輕鏈或兩者的核酸表現載體；包含抗體的重鏈和輕鏈編碼序列的宿主細胞；以及使用宿主細胞製備

抗體的方法，所述方法包括在合適的培養基中培養宿主細胞以允許表現抗體基因和隨後收穫抗體的步驟。

【圖式簡單說明】

【0020】 圖1A-E是顯示Ab1、夫蘇木單抗和1D11對用1 ng/ml的人TGF- β 1(A)、人TGF- β 2(B)、人TGF β 1(C)、鼠TGF- β 1(D)或鼠TGF- β 2(E)處理的貂肺(Mv 1 Lu)細胞的增殖的作用的圖。抗體濃度以 μ g/ml計。

【0021】 圖2是顯示50 μ g/ml Ab1對人可誘導型調節性T細胞(iTreg)分化的作用的條形圖。提供給T細胞的刺激是抗CD3和抗CD28抗體加IL-2。

【0022】 圖3是顯示用2 ng/ml人TGF- β 1處理的人CD4⁺ T細胞培養物中Ab1對人可誘導型調節性T細胞(iTreg)分化的作用的條形圖。提供給T細胞的刺激是抗CD3和抗CD28抗體加IL-2。

【0023】 圖4是條形圖，其顯示在T細胞刺激和抗PD-1治療之後，Ab1(30 μ g/ml)和人TGF- β 1(18 ng/ml)對Jurkat T細胞上NFATc-驅動的螢光素酶表現的作用。

【0024】 圖5是顯示使用C57BL/6 MC38結腸小鼠模型在所示治療組中的中值腫瘤體積與中值絕對偏差(MAD)的圖。載體：PBS。「抗PD-1」：x-抗-mPD-1 Mab(參見下面的詳述)。「Ab1的同種型對照」：抗HEL hIgG4。

【0025】 圖6是顯示使用C57BL/6 MC38結腸小鼠模型的所示治療的第27天時距離基線的腫瘤體積變化的散點圖。對照：PBS。「抗PD-1 RPM114 mIgG1」：x-抗-mPD-1 Mab。

【0026】圖7A-F是顯示使用C57BL/6 MC38結腸小鼠模型的各個所示治療組隨時間的腫瘤體積的圖。圖表中的每條線代表一隻動物。「mpk」：mg/kg。「Ab1同種型Ctrl」：抗HEL hIgG4。 α PD1：x-抗-mPD-1 Mab。

【0027】圖8是顯示Ab1對LoVo腫瘤裂解物中活性TGF- β 1濃度的影響的圖。

【0028】圖9A是顯示在給予單劑量5 mg / kg的任一抗體的五組大鼠中Ab1和夫蘇木單抗隨時間的血清濃度的圖。組(Gr.)1-3被給予三種不同批次(B1、B2和B3)的夫蘇木單抗。組4和5被給予兩種不同批次(B1和B2)的Ab1。

【0029】圖9B是顯示在給予單劑量1 mg / kg的任一抗體的猴子中Ab1和夫蘇木單抗隨時間的血清濃度的圖。

【0030】圖9C是顯示在給予五個每劑量1mg / kg的每週劑量的Ab1或給予每劑量1 mg / kg的每兩週劑量的夫蘇木單抗達指定的研究持續時間的猴子中Ab1和夫蘇木單抗隨時間的血清濃度的圖。

【0031】圖9D是顯示在給予單劑量10mg / kg的任一抗體的猴子中Ab1和夫蘇木單抗隨時間的血清濃度的圖。

【0032】圖9E是顯示在給予五個每劑量10 mg / kg的每週劑量的Ab1或給予每劑量10 mg / kg的每兩週劑量的夫蘇木單抗達指定的研究持續時間的猴子中Ab1和夫蘇木單抗隨時間的血清濃度的圖。

【0033】圖10A是顯示用Ab1($^+/-$ 抗-PD1)處理後MC38腫瘤中MIP-2水平變化的圖。

【0034】圖10B是顯示用Ab1($^+/-$ 抗-PD1)處理後MC38腫瘤中TGF- β 1水平變化的圖。

【0035】 圖10C是顯示用Ab1(+/-抗-PD1)處理後MC38腫瘤中KC/GRO水平變化的圖。

【0036】 圖11A是量化CD8^{pos}細胞的CellTrace Violet染色和IFN- γ 染色的圖。

【0037】 圖11B是顯示Ab1恢復了TGF β 處理的CD8⁺ T細胞中的增殖和IFN- γ 產生二者的圖。

【0038】 圖12A是顯示在整個針對結腸癌、白血病、肺癌、淋巴瘤、乳腺癌、黑色素瘤、間皮瘤和腎癌的同基因小鼠腫瘤模型的概要之間CD8⁺ T細胞的相對豐度(經log2-轉化)的圖。

【0039】 圖12B是顯示在整個針對結腸癌、白血病、肺癌、淋巴瘤、乳腺癌、黑色素瘤、間皮瘤和腎癌的同基因小鼠腫瘤模型的概要之間TGF β 途徑活化的圖。

【實施方式】

【0040】 本發明的特徵在於改進的泛-TGF- β 特異性單株抗體，其不易形成半抗體，同時還具有優異的藥代動力學概貌，例如比現有已知抗體更高的體內暴露。本發明的抗體被統稱為「Ab1和相關抗體」並且共享共同的結構特徵，即它們具有SEQ ID NO:1中的重鏈CDR(HCDR)1-3和SEQ ID NO:2中的輕鏈CDR(LCDR)1-3，並且具有其中鉸鏈區中的殘基228(EU編號)已經從絲胺酸突變為脯胺酸的人IgG₄恒定區。P228在下面顯示的SEQ ID NO:1的序列中以方框和黑體字表示。

【0041】 當未糖基化時，抗體Ab1具有144KD的估算分子量。其重和輕(鏈)胺基酸序列分別是SEQ ID NO:1和2。這兩個序列如下所示。可變域為斜體。CDR以方框顯示。重鏈恒定區中的糖基化位點以黑體字表示(N297)。

*QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFS **SNVIS**WVRQA PGQGLEWMG**G** VIPIVDIANY*
***AQRFKG**RVTI TADESTTTY MELSSLRSED TAVYYCAS**TL GLVLDAMDY**W GQGTLVTVSS*
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCP**P**CP APEFLGGPSV
FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPQSQEEMTK
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO:1)

*ETVLTQSPGT LSLSPGERAT LSC**RASQSLG SSYLA**WYQQK PGQAPRLLIY **GASSRAP**GIP*
*DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYC**Q QYADSPIT**FG QGTRLEIKRT VAAPSVFIFP*
PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTL
TLISKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO:2)

【0042】 在一些實施方案中，本發明的抗體，如抗TGFβ抗體，在重鏈中不具有C-端賴胺酸。C-端賴胺酸可以在製備期間或通過重組技術(即，重鏈的編碼序列不包括C-端賴胺酸的密碼子)被去除。因此，在本發明內考慮的還有包含的SEQ ID NO：1的重鏈胺基酸序列不含C-端賴胺酸的抗體。

【0043】 Ab1和相關抗體特異性結合人TGF-β1、-β2和-β3。「特異性」意指通過例如表面等離子體共振(參見例如下文實施例1)或生物層干涉(Bio-Layer Interferometry)測定，結合具有低於10⁻⁷ M的K_D，例如低於10⁻⁸ M (例如，1-5 nM)。Ab1和相關抗體還可以具有當在貂肺上皮細胞測定法中測定時(參見例如下文實施例2)的強TGF-β中和效力，或在A549細胞IL-11誘導測定法中測定的約0.05-1 μg/ml的EC 50(參見例如PCT公開WO 2006/086469中的實施例6，其公開內容通過引用整體併入本文)。

【0044】 Ab1和相關抗體的這些抗原結合和中和特性與先前的抗TGF- β 抗體夫蘇木單抗(WO 2006/086469中描述的種系化的IgG₄ PET1073G12抗體)相當。夫蘇木單抗的重鏈和輕鏈序列，包括前導序列，分別顯示於SEQ ID NO:3和4中。如SEQ ID NO:3中可見，夫蘇木單抗沒有在位置228(EU編號，其對應於SEQ ID NO:3中的實際位置247)的脯胺酸。Ab1和相關抗體與夫蘇木單抗相比具有數種改進的特徵。

【0045】 在製造過程中，夫蘇木單抗可在非還原性變性條件下形成高達6-18%的半抗體(即具有一重鏈和一輕鏈的二聚體，而不是具有與兩條輕鏈複合的兩條重鏈的四聚體)。相反，Ab1產生實質性更少的半抗體(<1%)。因此，Ab1和相關抗體在製造過程中產生更純的藥物產品。

【0046】 此外，與夫蘇木單抗相比，Ab1和相關抗體可具有改進的藥代動力學(PK)概貌。它們可能具有線性PK表現，其比夫蘇木單抗半衰期長得多且消除速率更低，導致體內暴露比夫蘇木單抗大約高1.7倍。例如，在大鼠中，已顯示Ab1具有與夫蘇木單抗的4.3天相比7.1天的平均半衰期，和與夫蘇木單抗的0.51 ml/hr/kg相比0.30 ml/hr/kg的消除速率(CL)(實施例7，下文)。在食蟹猴中，已顯示Ab1具有與夫蘇木單抗的4.5天相比13天的平均半衰期，和與夫蘇木單抗的0.66 ml/hr/kg相比0.40 ml/hr/kg的消除速率(CL)。同上文。這些改進的PK特性表明，Ab1和相關抗體可以以比夫蘇木單抗更低的劑量和/或更低的頻率給予患者，以實現相同或更好的臨床效果，同時引起更少的不良副作用和更少的抗藥物抗體反應，因此在必要時允許更長的治療持續時間。

【0047】此外，在非人靈長類動物中夫蘇木單抗的毒理學研究期間，觀察到了藥物暴露與不良事件如貧血之間的相關性。然而，在用Ab1在相當或甚至更高的暴露下進行的類似研究中，沒有觀察到這種事件。

【0048】不受理論束縛，我們假定Ab1和相關抗體的重鏈中的殘基228突變導致增加的穩定性以及改進的PK和毒理學概貌。

【0049】可以根據需要進一步修飾Ab1和相關抗體的恒定結構域，例如在Kabat殘基L248處(例如通過引入突變L248E)，以減少分子的任何不需要的效應功能。

【0050】如本文所用，術語「抗體」(Ab)或「免疫球蛋白」(Ig)是指包含通過二硫鍵相互連接的兩條重(H)鏈(約50-70kDa)和兩條輕(L)鏈(約25 kDa)的四聚體蛋白。每條重鏈包含重鏈可變域(V_H)和重鏈恒定區(C_H)組成。每條輕鏈由輕鏈可變域(V_L)和輕鏈恒定區(C_L)組成。V_H和V_L結構域可以進一步細分成高變區，稱為「互補決定區」(CDR)，其間為更保守的區域，稱為「框架區」(FR)。每個V_H或V_L由三個CDR和四個FR組成，按照以下順序從胺基末端排列到羧基末端：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。可以根據IMGT®定義(Lefranc等，Dev Comp Immunol 27(1):55-77 (2003)；或Kabat的定義，Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 and 1991))；Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)；或Chothia等，Nature 342:878-883 (1989)將胺基酸分配到每個區域。

【0051】術語「人類抗體」是指其中可變域和恒定區序列源自人序列的抗體。該術語涵蓋具有源自人基因的序列，但是那些序列已經被修飾的抗體，例

如，被修飾以降低免疫原性，增加親和力和增加穩定性。該術語涵蓋在非人細胞中重組產生的抗體，其可以賦予對於人細胞而言非典型的糖基化。

【0052】術語「嵌合抗體」是指包含來自兩種不同動物物種的序列的抗體。例如，嵌合抗體可以含有鼠抗體(即，由鼠抗體基因編碼的抗體，例如使用雜交瘤技術從經免疫的小鼠獲得的抗體)的 V_H 和 V_L ，其與來自另一物種(例如，人、兔子或大鼠)的抗體的恒定區連接。

【0053】術語抗體的「抗原結合片段」是指保留特異性結合抗原的能力的抗體片段。在一些實施方案中，本發明的抗原結合片段是 $F(ab')_2$ 片段，其是包含通過鉸鏈區處的二硫鍵連接的兩個Fab片段的二價片段(Fab是由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_{H1} 結構域組成的單價抗體片段)。在一些實施方案中，本發明的抗原結合片段還可以包含 C_{H2} 或 C_{H3} 結構域。

【0054】本文所述的抗體和抗原結合片段可以是單離的。術語「單離蛋白質」、「單離多肽」或「單離抗體」是指這樣的蛋白質、多肽或抗體，其由於其起源或衍生來源而(1)不與在其天然狀態下伴隨它的天然結合相關組分相關，(2)基本上不含來自相同物種的其他蛋白質，(3)由來自不同物種的細胞表現，或(4)在自然界中不存在。因此，化學合成或在與其天然來源的細胞不同的細胞系統中合成的多肽會是與其天然相關組分「分離的」。使用本領域公知的蛋白質純化技術，通過分離也可使蛋白質基本上不含天然相關組分。

I. Ab1和相關抗體的用途

【0055】TGF- β 受體在免疫細胞上廣泛表現，導致TGF- β 在先天性和適應性免疫系統中具有廣泛的作用。TGF- β 與許多疾病狀況有關，例如出生缺陷、癌症、慢性炎症、自身免疫和纖維化疾病。治療量的Ab1或相關抗體可用於治療這

些病症。「治療有效」量指的是減輕所治療病症的一種或多種症狀的Ab1、相關抗體或本文提到的另一種治療劑的量。這個量可能會根據治療的病症或患者而有所不同，並且可以由醫療專業人員使用完善的原則來確定。

【0056】 在一些實施方案中，Ab1或相關抗體可以以40、20或15 mg/kg或更少(例如14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1 mg/kg)施用。在一些其他實施方案中，劑量可以是0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4或0.5 mg/kg。給藥頻率可以是例如每天，每兩天，三天，四天或五天，每週，每兩週或每三週，每月或每兩個月。抗體可以靜脈內(例如，0.5-8小時的靜脈內輸注)、皮下、局部或適合於病症和藥物製劑的任何其他途徑施用。

【0057】 Ab1和相關抗體源自人類抗體基因，因此在人體中具有低免疫原性。Ab1的毒理學研究在下面的實施例8中詳述。在大鼠中觀察到某些心臟和肺部副作用。因此，在用Ab1或相關抗體治療患者時，可監測患者的不良事件。

【0058】 在一些實施方案中，本發明的抗體的功效可以由患者中下列的一項或多項指示(例如，在受影響的組織中，例如患者的腫瘤組織中)：(1)TGF- β 水平或活性的減少，(2)MIP2和/或KC/GRO水平的增加，(3)CD8⁺ T細胞如INF- γ 陽性CD8⁺ T細胞對腫瘤組織的活化或浸潤，以及(4)自然殺手(NK)細胞聚集的增加。

A. 非腫瘤疾病狀況

【0059】 可以通過Ab1和相關抗體治療的病症可以包括但不限於骨缺損(例如成骨不全症)、腎小球腎炎、神經或皮膚癢痕形成、肺或肺纖維化(lung or pulmonary fibrosis)(例如、特發性肺纖維化)、輻射誘發的纖維化、肝纖維化、骨髓纖維化、硬皮病、免疫介導的疾病(包括類風濕性關節炎、多發性硬化症、系

統性紅斑狼瘡、乾燥綜合征(Sjogren's syndrome)、伯格氏病(Berger's disease)和移植排斥)和Dupuytren氏攣縮。

【0060】它們也可用於治療、預防和降低發生腎功能不全的風險，包括但不限於局部節段性腎小球硬化症(FSGS)、糖尿病(I型和II型)性腎病、放射性腎病、梗阻性腎病、彌漫性系統性硬化症、遺傳性腎病(例如，多囊腎病、髓質海綿腎、馬蹄腎)、腎小球腎炎、腎硬化、腎鈣質沉著症、系統性或腎小球性高血壓、腎小管間質性腎病、腎小管酸中毒、腎結核和腎梗塞。特別地，它們與腎素-血管緊張素-醛固酮體系的拮抗劑組合時是有用的，所述腎素-血管緊張素-醛固酮體系包括但不限於：腎素抑制劑、血管緊張素轉化酶(ACE)抑制劑、Ang II受體拮抗劑(也稱為「Ang II受體阻斷劑」)和醛固酮拮抗劑。參見例如WO 2004/098637，其公開內容通過引用整體併入本文。

【0061】Ab1和相關抗體可用於治療與ECM沉積有關的疾病和病症，例如系統性硬化、術後粘連、癥痕瘤和增生性癥痕形成、增生性玻璃體視網膜病變、青光眼引流手術、角膜損傷、白內障、佩羅尼氏病、成人呼吸窘迫綜合征、肝硬化、心肌梗塞後的癥痕形成、血管成形術後的再狹窄、蛛網膜下腔出血後的癥痕形成、椎板切除術後的纖維化、肌腱和其他修復後的纖維化、膽汁性肝硬化(包括硬化性膽管炎)、心包炎、胸膜炎、氣管切開術、穿透性CNS損傷、嗜酸性肌炎綜合征、血管再狹窄、靜脈閉塞性疾病、胰腺炎和銀屑病性關節病。

【0062】Ab1和相關抗體進一步用於其中促進上皮再形成是有益的病症。這些病症包括但不限於皮膚疾病如靜脈性潰瘍、缺血性潰瘍(壓瘡)、糖尿病性潰瘍、移植部位、移植供體部位、擦傷和燒傷，支氣管上皮的疾病如哮喘、ARDS，

腸上皮的疾病如與細胞毒性治療相關的粘膜炎、食管潰瘍(反射疾病)、胃食管返流疾病、胃潰瘍、小腸和大腸損傷(炎性腸病)。

【0063】 Ab1和相關抗體的進一步用途是在其中期望內皮細胞增殖的情況下，例如穩定動脈粥樣硬化斑塊，促進血管吻合的癒合，或在其中期望抑制平滑肌細胞增殖的情況下，如動脈疾病、再狹窄和哮喘。

【0064】 Ab1和相關抗體也可用於增強對巨噬細胞介導的感染的免疫應答，所述感染如由利什曼原蟲屬物種(*Leishmania spp.*)、克氏錐蟲(*Trypanosoma cruzi*)、結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*)和麻風分枝桿菌(*Mycobacterium leprae*)以及原生動物剛地弓形蟲(*Toxoplasma gondii*)、真菌荚膜組織胞漿菌(*Histoplasma capsulatum*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、近平滑假絲酵母菌(*Candida parapsilosis*)和新型隱球菌(*Cryptococcus neoformans*)引起的感染。它們也可用於減少例如由腫瘤、AIDS或肉芽腫性疾病引起的免疫抑制。

【0065】 Ab1和相關抗體也可用於預防和/或治療眼科病症，例如小梁切除術後的青光眼和癥痕形成。

B. 腫瘤疾病狀況

【0066】 TGF- β 調節幾種生物過程，包括細胞增殖、上皮-間充質轉化(EMT)、基質重塑、血管生成和免疫功能。這些過程中的每一個都促成腫瘤進展。TGF- β 在跨越適應症的癌症患者中廣泛的不利作用也因其在腫瘤微環境內以及全身性的升高而提示。參見，例如，Kadam等，Mol. Biomark. Diagn. (2013) 4(3)。研究表明，在惡性狀態下，TGF- β 可誘導EMT，並且由此產生的間充質表型導致細胞遷移和侵襲增加。

【0067】 Ab1和相關抗體可用於治療過度增殖性疾病，例如癌症，包括但不限於皮膚癌(例如，黑色素瘤，包括不可切除或轉移性黑色素瘤、皮膚鱗狀細胞癌和角化棘皮瘤)、肺癌(例如，非小細胞肺癌)、食道癌、胃癌、結腸直腸癌、胰腺癌、肝癌(例如，肝細胞癌)、原發性腹膜癌、膀胱癌、腎癌(renal cancer)或腎癌(kidney cancer)(例如，腎細胞癌)、尿路上皮癌、乳腺癌、卵巢癌、輸卵管癌、宮頸癌、子宮癌、前列腺癌、睪丸癌、頭頸癌(例如，頭頸鱗狀細胞癌)、腦癌、成膠質細胞瘤、神經膠質瘤、間皮瘤和淋巴瘤。

【0068】 在一些實施方案中，Ab1和相關抗體可用於治療基於抗PD-1、抗PD-L1或抗PD-L2治療劑的先前治療失敗或預期會失敗的患者中的癌症，即對抗PD-1、抗PD-L1或抗PD-L2治療為非響應者或預期為非響應者的患者。在一些實施方案中，Ab1和相關抗體可用於治療已經從先前的抗PD-1、抗PD-L1或抗PD-L2療法復發的患者中的癌症。如本文所用，術語「預期」是指醫學領域的技術人員在沒有施用治療的情況下，基於他/她的一般醫學知識和患者的具體情況，可以預見到患者會是響應者還是非響應者，以及該療法是否會失效或將不會有效。

【0069】 在一些實施方案中，癌症是實體瘤的間充質亞型，包括但不限於間充質結腸直腸癌、間充質卵巢癌、間充質肺癌、間充質頭癌和間充質頸癌。上皮間充質轉化(EMT)通過下調上皮細胞基因和增強間充質基因表現來促進細胞遷移和侵入性質。EMT是腫瘤進展和侵入的標誌。多達四分之一的結腸直腸癌和卵巢癌是間充質的。因此，通過抑制TGF- β 及其對EMT的誘導，Ab1或相關抗體可用於治療間充質實體瘤。實體瘤的間充質亞型可通過許多遺傳標誌物和病理學檢測來鑒定。標誌物包括可通過qRT-PCR或免疫組織化學檢測的

ACTA2、VIM、MGP、ZEB2和ZWINT。此類標誌物可用於選擇用於本發明的抗TGF- β 單一療法或聯合療法的患者。

【0070】 在一些實施方案中，Ab1和相關抗體可用於治療晚期實體瘤患者。

【0071】 Ab1和相關抗體也可用於治療造血功能紊亂(hematopoietic disorder)或惡性腫瘤，如多發性骨髓瘤、骨髓增生異常綜合征(MDS)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤和白血病，以及各種肉瘤如卡波西肉瘤(Kaposi's Sarcoma)。

【0072】 Ab1和相關抗體也可用於抑制環孢菌素介導的惡性腫瘤或癌症進展(例如，轉移)。

【0073】 當然可以理解的是，在癌症治療的情況下，「治療」包括為了延長患者的預期壽命而致使癌症生長減緩，癌症進展或復發延遲，或癌症轉移減少，以及癌症部分緩解的任何醫學干預。

C. 腫瘤學中的聯合療法

【0074】 已經觀察到，癌症中細胞毒性T細胞浸潤的水平與有利的臨床結果相關(Fridman等，Nat Rev Cancer (2012) 12(4):298–306；和Galon等，Immunity (2013) 39(1):11–26)。另外，輔助細胞毒性T細胞(CD4⁺ T_{H1})和它們產生的細胞因子(例如，INF- γ)的T輔助細胞通常也與積極的患者結果相關。相反，Treg細胞的存在已被證明與不良患者預後相關(Fridman，見上文)。

【0075】 TGF- β 抑制抗腫瘤免疫應答的幾乎所有方面。細胞因子促進iTreg分化並降低細胞毒性(CD8⁺)細胞增殖和浸潤。如上所述，通過Ab1或相關抗體抑制TGF- β 將緩和免疫抑制性腫瘤微環境，從而為癌症患者帶來積極結果。

【0076】此外，發明人已經發現通過減輕免疫抑制性腫瘤微環境，Ab1和相關抗體可以允許檢查點調節劑(例如抗PD-1抗體)更好地誘導免疫應答。因此，更多的患者可以從免疫治療如抗PD-1、抗PD-L1或抗PD-L2治療中受益。

【0077】在使用或不用靶向免疫檢查點分子的治療劑的情況下，Ab1和相關抗體也可以與其他癌症療法聯合使用，例如化療(例如，基於鉑或紫杉烷類的療法)、放射療法和靶向癌症抗原或致癌驅動者的療法。

【0078】可以通過涉及Ab1或相關抗體以及免疫檢查點抑制劑例如抗PD-1抗體的組合來治療的癌症包括上文小節中列出的癌症。

【0079】在一些實施方案中，癌症對於先前的抗PD-1、抗PD-L1或抗PD-L2療法是難治的，例如晚期或轉移性黑色素瘤、非小細胞肺癌、腎細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌和霍奇金淋巴瘤。難治性患者是疾病進展得到確認的患者，例如，在開始治療的12週內通過放射性方法確認沒有任何響應的證據。

【0080】在一些實施方案中，Ab1或相關抗體可以與另一種癌症療法如抗-PD-1療法聯合使用以治療間充質癌症，例如結腸直腸癌、非小細胞肺癌、卵巢癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌、腎細胞癌、肝細胞癌和皮膚鱗狀細胞癌。另見上文的討論。

【0081】抗PD-1抗體的例子是nivolumab、pembrolizumab、pidilizumab、MEDI0608(曾為AMP-514；參見例如WO2012/145493和美國專利9,205,148)、PDR001(參見例如WO2015/112900)、PF-06801591(參見例如WO 2016/092419)和BGB-A317(參見例如WO 2015/035606)。在一些實施方案中，抗PD-1抗體包括在WO 2015/112800中公開的那些(如在PCT公開的表1中稱為H1M7789N、H1M7799N、H1M7800N、H2M7780N、H2M7788N、H2M7790N、H2M7791N、

H2M7794N、H2M7795N、H2M7796N、H2M7798N、H4H9019P、H4xH9034P2、
H4xH9035P2、H4xH9037P2、H4xH9045P2、H4xH9048P2、H4H9057P2、
H4H9068P2、H4xH9119P2、H4xH9120P2、H4xH9128P2、H4xH9135P2、
H4xH9145P2、H4xH8992P、H4xH8999P and H4xH9008P的那些，和在PCT公開
的表3中稱為H4H7798N、H4H7795N2、H4H9008P and H4H9048P2的那些)。
WO2015/112800的公開內容通過引用整體併入本文。

【0082】 例如，WO 2015/112800中公開的抗體和相關抗體，包括具有該
PCT公開中公開的CDR、V_H和V_L序列或重鏈和輕鏈序列的抗體和抗原結合片
段，以及與該PCT公開中公開的抗體結合相同PD-1表位的抗體和抗原結合片
段，可以與本發明的Ab1或相關抗體聯合用於治療癌症。在相關實施方案中，有
用的抗PD-1抗體可包含分別如下文中作為SEQ ID NO:5和6所示的重鏈和輕鏈胺
基酸序列；SEQ ID NO:5和6中的V_H和V_L序列(斜體顯示)，或SEQ ID NO:5和6中
的一個或多個(例如全部六個)CDR(顯示在框中)。

*EVQLLES*GGV LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NFGMTWVRQA PGKGLEWVSG ISGGGRDTYF
ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLKGED TAVYYCVKWG NIYFDYWGQG TLVTVSSAST
KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV
SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV
SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF
SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK (SEQ ID NO:5)

DIQMTQSPSS LSASVGDSIT ITCRASLSIN TFLNWYQQKP GKAPNLLIYA ASSLHGGVPS RFSGSGSGTD
FTLTIRTLPQ EDFATYYCQQ SSNTPFTFGP GTVVDFRRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA
SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK
VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK (SEQ ID NO:6)

【0083】 在一些實施方案中，本發明的抗體如抗PD-1抗體在重鏈中不具有C-端賴胺酸。C-端賴胺酸可以在製造期間或通過重組技術(即，重鏈的編碼序列不包括C-端賴胺酸的密碼子)去除。如此在本發明內考慮的還有包含沒有C-端賴胺酸的SEQ ID NO: 5的重鏈胺基酸序列的抗體。

【0084】 在一些實施方案中，本發明的抗TGF- β 抗體或片段也可以與針對免疫調節性抗原如PD-L1和CTLA-4的抗體聯合使用。示例性的抗PD-L1抗體是atezolizumab、avelumab、durvalumab、LY3300054和BMS-936559。示例性的抗CTLA-4抗體是ipilimumab或tremelimumab。

D. 治療功效的生物標誌物

【0085】 Ab1和相關抗體的功效可以通過生物標誌物或靶標佔有率(target occupancy)來確定。例如，在腫瘤組織中，可通過使用Meso Scale Discovery(MSD)測定法評估活檢組織中活性TGF- β 的水平來測定靶標佔有率。在血液中，靶標接合可以通過評估外周血單核細胞如淋巴細胞(T細胞、B細胞、NK細胞)和單核細胞上循環TGF- β 降低的效果來測定。例如，可以使用CD45⁺RO⁺CCR7⁺CD28⁺ Ki67⁺作為流式細胞術中的標誌物來評估循環CD8⁺ T細胞增殖的增加。循環NK細胞的活化可以使用CD3⁻CD56^{high/dim} CD16⁺或CD137⁺作為流式細胞術中的標誌物來評估。此外，Ki-67、PD-1和ICOS可以用作與T細胞活化相關的PD標誌物。

【0086】 通過使用例如NeoGenomics平臺等多重免疫組織化學(IHC)測定法評估浸潤性免疫細胞和免疫標誌物的變化，由此可以測定通過Ab1或相關抗體治療後的免疫調節。具體而言，NeoGenomic的MultiOmyx TIL Panel染色一組免疫標誌物，允許定量測定各種免疫細胞的密度和定位。免疫標誌物可表明iTreg的分化；CD8⁺ T細胞的浸潤和增殖；並通過CD8⁺ T細胞產生IFN γ 。已顯示Ab1

抑制CD4⁺ T細胞分化成iTreg(參見例如下文實施例3)，並增加CD8⁺ T細胞增殖及其IFN γ 的產生(如混合淋巴細胞反應測定法中所示；數據未顯示)。因此，可以通過對iTreg的抑制、對CD8⁺ T細胞增殖和向腫瘤或其他患病組織的浸潤的誘導、增加的IFN γ 產生和/或增加的CD8⁺ T細胞與Treg細胞的比率來指示Ab1或相關抗體的治療功效。還可以通過基於甲基化-PCR的CD8⁺ T細胞、Treg細胞、NK細胞和其他免疫細胞的定量免疫細胞計數在外周血中測定Ab1或相關抗體治療後的免疫調節。治療功效在臨床上可表現為疾病進展如腫瘤進展的延遲或逆轉。

II. 製備抗體的方法

【0087】 Ab1和相關抗體，以及靶向其他共同靶標如PD-1、PD-L1或PD-L2的抗體可以通過本領域充分確立的方法製備。可將編碼抗體重鏈和輕鏈的DNA序列插入到表現載體中，使得基因可操作地連接到必需的表現控制序列，例如轉錄和翻譯控制序列。表現載體包括質粒、逆轉錄病毒、腺病毒、腺伴隨病毒(AAV)、植物病毒如花椰菜花葉病毒、煙草花葉病毒、粘粒、YAC、EBV衍生的附加體等。抗體輕鏈編碼序列和抗體重鏈編碼序列可以插入分開的載體中，並且可以可操作地連接至相同或不同的表現控制序列(例如啟動子)。在一個實施方案中，兩種編碼序列被插入到相同的表現載體中，並且可以可操作地連接到相同的表現控制序列(例如，共同的啟動子)，連接到分開的相同表現控制序列(例如啟動子)或連接到不同的表現控制序列(例如啟動子)。可以通過標準方法(例如連接抗體基因片段和載體上的互補限制性位點，或者如果不存在限制性位點則進行平端連接)將抗體編碼序列插入表現載體中。

【0088】 除抗體鏈基因外，重組表現載體可攜帶控制宿主細胞中抗體鏈基因表現的調節序列。用於哺乳動物宿主細胞表現的調節序列的實例包括指導哺

乳動物細胞中高水平蛋白質表現的病毒元件，例如來源於如下的啟動子和/或增強子：逆轉錄病毒LTR、巨細胞病毒(CMV)(如CMV啟動子/增強子)、猿猴病毒40(SV40)(例如SV40啟動子/增強子)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期啟動子(AdMLP))、多瘤病毒和強哺乳動物啟動子如天然免疫球蛋白和肌動蛋白啟動子。

【0089】除了抗體鏈基因和調節序列之外，本發明的重組表現載體可以攜帶額外的序列，例如調節載體在宿主細胞中複製的序列(例如複製起點)和選擇標記基因。例如，選擇標記基因賦予載體已經導入其中的宿主細胞對藥物如G418、潮黴素或甲胺蝶呤的抗性。選擇標記基因可以包括二氫葉酸還原酶(DHFR)基因(用於具有甲胺蝶呤選擇/擴增的dhfr-宿主細胞)、neo基因(用於G418選擇)和谷氨酰胺合成酶基因。

【0090】將編碼本發明抗體的表現載體導入宿主細胞中進行表現。宿主細胞在適合表現抗體的條件下培養，然後將抗體收穫並分離。宿主細胞包括哺乳動物、植物、細菌或酵母宿主細胞。可用作表現宿主的哺乳動物細胞系在本領域中是公知的，並且包括許多可從美國典型培養物保藏中心(ATCC)獲得的永生細胞系。這些中包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、NS0細胞、SP2細胞、HEK-293T細胞、293 Freestyle細胞(Invitrogen)、NIH-3T3細胞、HeLa細胞、幼倉鼠腎(BHK)細胞、非洲綠猴腎細胞(COS)、人肝細胞癌細胞(例如Hep G2)、A549細胞和許多其他細胞系。可以基於它們的表現水平選擇細胞系。可以使用的其他細胞系是昆蟲細胞系，例如Sf9或Sf21細胞。

【0091】此外，使用許多已知技術可以增強抗體的表現。例如，谷氨酰胺合成酶基因表現系統(GS系統)是在某些條件下增強表現的常用方法。

【0092】 用於宿主細胞的組織培養基可包含或不含動物衍生組分(ADC)，例如牛血清白蛋白。在一些實施方案中，無ADC的培養基對人的安全是優選的。組織培養可以使用補料分批方法、連續灌注方法或任何其他適合宿主細胞和所需產率的方法進行。

III. 醫藥組成物

【0093】 本發明的抗體可以針對合適的儲存穩定性配製。例如，可以使用藥學上可接受的賦形劑將抗體凍乾或保存或重構以供使用。對於聯合療法，可以將兩種或更多種治療劑例如抗體共同配製，例如混合並以單一組成物提供。

【0094】 本文使用術語「賦形劑」來描述除本發明化合物之外的任何成分。賦形劑的選擇在很大程度上取決於諸如特定施用模式、賦形劑對溶解性和穩定性的影響以及劑型的性質等因素。「藥學上可接受的賦形劑」包括生理學相容的任何和所有溶劑、分散介質、包衣、抗菌劑和抗真菌劑、等滲劑和吸收延遲劑等。藥學上可接受的賦形劑的一些實例是水、鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水、右旋糖、甘油、乙醇等，以及它們的組合。在一些情況下，會在組成物中包含等滲劑，例如糖、多元醇如甘露醇、山梨糖醇或氯化鈉。藥學上可接受的物質的另外的實例是潤濕劑或少量輔助物質，例如潤濕劑或乳化劑、防腐劑或緩衝劑，其增加抗體的保質期或功效。

【0095】 本發明的醫藥組成物可以作為單一單位劑量或作為多個單一單位劑量製備、包裝或散裝銷售(sold in bulk)。如本文所用，「單位劑量」是包含預定量的活性成分的醫藥組成物的離散量。活性成分的量通常等於將施用於受試者的活性成分的劑量或該劑量的方便的一部分，例如該劑量的一半或三分之一。

【0096】 本發明的醫藥組成物通常適用於腸胃外施用。如本文所用，醫藥組成物的「腸胃外施用」包括任何特徵如下的施用途徑，其特徵在於物理破壞受試者組織並通過組織中的所述破裂施用醫藥組成物，因此通常導致直接施用到血液中、肌肉中或進入內部器官。因此，腸胃外施用包括但不限於通過注射組成物、通過手術切口施用組成物、通過組織穿透性非手術傷口施用組成物等來施用醫藥組成物。特別地，考慮的腸胃外給藥包括但不限於皮下、腹膜內、肌內、胸骨內、靜脈內、動脈內、鞘內、心室內、尿道內、顱內、腫瘤內和滑膜內注射或輸注；以及腎透析輸注技術。也考慮區域灌注。優選的實施方案可包括靜脈內和皮下途徑。

【0097】 適用於胃腸外施用的醫藥組成物的製劑通常包含與藥學上可接受的載體(例如無菌水或無菌等滲鹽水)組合的活性成分。這樣的製劑可以適合於推注施用(bolus administration)或連續施用的形式製備、包裝或出售。注射製劑可以以單位劑量形式製備、包裝或銷售，例如在安瓿或含有防腐劑的多劑量容器中。用於腸胃外施用的製劑包括但不限於混懸液、溶液、油性或水性載體中的乳劑、糊劑等。這樣的製劑可以進一步包含一種或多種另外的成分，包括但不限於懸浮劑、穩定劑或分散劑。在用於腸胃外施用的製劑的一個實施方案中，活性成分以乾燥(即粉末或顆粒)形式提供，用於在腸胃外施用重構組成物之前用合適的載體(例如無菌無熱原水)重構。胃腸外製劑還包括可含有賦形劑例如鹽、碳水化合物和緩沖劑(例如，具有pH 3-9)的水溶液，但是對於一些應用，它們可以更合適地配製成無菌非水溶液或作為乾燥形式與適宜的載體如無菌無熱原水一起使用。示例性腸胃外施用形式包括在無菌水溶液中的溶液或混懸液，例如丙二醇水溶液或右旋糖水溶液。如果需要，可以適當緩衝這種劑型。可用的其

它可以腸胃外施用的製劑包括含有微晶形式的活性成分或脂質製備物的那些製劑。用於腸胃外施用的製劑可以配製成立即和/或調節釋放(modified release)。調節釋放製劑包括延遲釋放、持續釋放、脈衝釋放、控制釋放、靶向釋放和程序釋放。

實施例

【0098】 為了更好地理解本發明，闡述了以下實施例。這些實施例僅用於說明，而不應被理解為以任何方式限制本發明的範圍。

實施例1：Ab1的TGF-β-結合性質

【0099】 使用葡聚糖包被的(dextran-coated)羧甲基化(CM5)系列S芯片，通過在Biacore T200生物傳感器儀器(GE Healthcare)上的表面等離子體共振測定了Ab1對所有人和鼠類TGF-β同種型的親和力。將Ab1以一系列濃度(1.11、3.33、10和30nM)注射到固定的重組TGF-β上以實時測量結合相互作用。將TGF-β同源二聚體以低密度固定以降低親合力效應。一式三份進行注射，並重複三次結合測定。使用Biacore T200 Biaevaluation v2.0軟件處理來自動力學實驗的數據。使用1:1結合模型將由此得到的傳感圖歸零、比對、進行雙重參照並修剪(cropped)以供曲線擬合分析，從而確定結合速率常數(k_a)，解離速率常數(k_d)和平衡解離常數(K_D)。

【0100】 重組蛋白是內部生產的(人TGF-β1、2和3)或從R&D Systems獲得的(鼠TGF-β1和2)。下表1顯示恒河猴、小鼠或大鼠與人之間三種活性TGF-β同種型的胺基酸序列同源性(同源性作為保守胺基酸相對於總胺基酸的百分比報道)。

表1 TGF-β活性同種型與人的同源性

	百分比同源性		
	TGF-β1	TGF-β2	TGF-β3
恒河猴	100% (112/112)	100% (112/112)	100% (112/112)
小鼠	99.1% (111/112)*	97% (109/112)*	100% (112/112)
大鼠	99.1% (111/112)*	97% (109/112)*	99.1% (111/112)

*大鼠和小鼠TGFβ1彼此100%同源，並且大鼠和小鼠TGFβ2彼此100%同源

【0101】 由於人TGF-β3和鼠(murine) TGF-β3在胺基酸序列上是相同的，因此未計算這兩種蛋白質的單獨親和力測量結果。同樣，鼠和大鼠TGF-β1和2在胺基酸序列上是相同的，並且未計算單獨的親和力測量結果。

【0102】 通過上述方法測定的Ab1的k_a、k_d和K_D值列於下表2中。測定了Ab1對於人TGF-β1、2和3的K_D值分別為1.48、3.00和1.65 nM。測定了Ab1對鼠/大鼠TGF-β1和2的K_D值分別為2.80和1.88 nM。這些結合性質與夫蘇木單抗的相似。

表2 Ab1與TGF-β的平衡常數和親和力

	人		鼠和大鼠		人和鼠
	TGF-β1	TGF-β2	TGF-β1	TGF-β2	TGF-β3
k _a (x10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	3.11 ± 0.3	2.86 ± 0.3	2.98 ± 0.07	3.48 ± 0.24	2.23 ± 0.6
k _d (x10 ⁻⁴ s ⁻¹)	3.43 ± 2.9	8.23 ± 5.0	8.35 ± 0.38	6.45 ± 1.44	3.72 ± 2.3
K _D (nM)	1.48 ± 1.1	3.00 ± 2.0	2.80 ± 0.08	1.88 ± 0.56	1.65 ± 1.1

【0103】 上述數據表明，Ab1是強力且具有選擇性的泛-TGF- β 抑制劑。使用表面等離子體共振的測量表明，Ab1對於所有人和鼠類TGF- β 同種型具有1至5 nM的親和力。通過使用正常大鼠、食蟹猴和人組織的GLP免疫組織化學(IHC)組織交叉反應性研究確認了高水平的特異性。

實施例2: Ab1的TGF- β 中和效力

【0104】 在基於細胞的測定中測量了Ab1在中和TGF- β 活性方面的體外效力。該測定法測量TGF- β 抑制未轉化的貂肺上皮細胞(Mv 1 Lu細胞)增殖的能力。參見，例如，WO 2006/086469和Mazzieri等編輯，“Methods in Molecular Biology”，第142卷，“Transforming Growth Factor- β Protocols”。評價了Ab1、夫蘇木單抗和1D11(一種鼠類抗TGF- β 抗體，其重鏈和輕鏈序列在本文中公開為SEQ ID NO: 9和10)中和人TGF- β 1、2、3和鼠TGF- β 1和2的能力。重組TGF- β 蛋白在內部產生(人TGF- β 1、2和3)或從R & D Systems獲得(鼠TGF- β 1和2)。

【0105】 所有人和鼠TGF- β 同種型在0.02 pg/ml至10 ng/ml範圍內以劑量依賴性的方式抑制了貂肺細胞的增殖。為了量化Ab1、夫蘇木單抗和1D11的效力，將1 ng/ml指定的TGF- β 和連續稀釋的抗體與貂肺細胞一起培養。培養三天後，通過在與DNA結合時發熒光的CyQUANT染料定量細胞增殖(圖1A-E)。數據顯示Ab1、夫蘇木單抗及其鼠類替代物1D11以相似的程度抑制了所有人和鼠類TGF- β 同種型。

實施例3: Ab1對誘導型T調節性細胞分化的抑制

【0106】 調節性T細胞(Treg)是免疫抑制性的，並且已經與癌症患者的負面結果相關。在下述研究中，我們研究了Ab1是否能夠抑制TGF- β 誘導的人CD4⁺ T

細胞向可誘導型調節性T細胞(iTreg)的分化。原代人CD4⁺ T細胞從健康的正常供體分離。人TGF-β1購自R & D Systems。

【0107】 為了研究Ab1對由培養的細胞內源性產生的TGF-β的拮抗劑活性，用50 μg/ml的同種型對照(人IgG4，κ抗雞卵溶菌酶(HEL)抗體， Crown Bioscience)、Ab1或夫蘇木單抗，在存在或不存在刺激(抗CD3、抗CD28和IL-2)的條件下，處理總體CD4⁺ T細胞而不添加外源性TGF-β達6天，然後進行流式細胞術分析。從親本群體(淋巴細胞/活的/單個細胞/CD4⁺CD127⁺)一式三份計算CD25⁺FOXP3⁺群體的平均百分比和標準偏差。用抗CD3、抗CD28和IL-2刺激總體人CD4⁺ T細胞將培養物中FOXP3⁺CD25⁺(iTreg)的百分比從0%增加到15%。用50 μg/ml Ab1或50 μg/ml 夫蘇木單抗治療以相似的程度降低了iTreg的百分比(分別為8%和7%；圖2)。相反，用同種型人IgG4(hIgG4)對照的處理對iTreg分化的影響最小(20% iTreg)(圖2)。從第二位健康的正常志願者單離CD4⁺ T細胞產生了相似的結果。

【0108】 為了研究Ab1對外源性TGF-β的拮抗劑活性，將與2 ng/ml人TGF-β1一起培養的總體CD4⁺ T細胞用同種型對照、Ab1或夫蘇木單抗在不同抗體濃度下，在存在或不存在刺激(抗CD3、抗CD28和IL-2)的條件下處理6天，然後進行流式細胞術分析。除非另有說明，否則從親本群體(淋巴細胞/活的/單細胞/CD4⁺CD127⁺)一式三份計CD25⁺FOXP3⁺群體的平均百分比和標準偏差。添加外源性TGF-β1(2 ng/ml)刺激總體人CD4⁺ T細胞將培養物中iTreg的百分比從15%增加至55%。用濃度漸增的Ab1的處理使iTreg的百分比以伴隨的方式從55%降低至200μg/ml下的15%和6.25μg/ml下的43%。用夫蘇木單抗治療使iTreg的百分比降低至與Ab1類似的程度(在200μg/ml時從55%至16%，而在6.25μg/ml時從55%至

32%)。用不同濃度的同種型對照抗體處理對於iTreg的百分比沒有影響，在200 $\mu\text{g/ml}$ 和6.25 $\mu\text{g/ml}$ 為60%。參見圖3。從第二位健康的正常志願者單離CD4⁺ T細胞產生了相似的結果。

【0109】 這項研究表明，Ab1抑制TGF- β 誘導的iTreg分化，並因此可通過緩和免疫抑制性腫瘤微環境而帶來臨床益處。

實施例4：Ab1和抗PD-1抗體組合在體外的效果

【0110】 在這項研究中，我們研究了抗PD-1治療後TGF- β 是否會阻止體外T細胞的最大刺激，並且如果是這樣，那麼Ab1是否可以抵消這種阻止。使用在來自NFATc(活化T細胞的核因子，細胞質1)調節序列的轉錄控制下的表現構建體的螢光素酶表現來測量T細胞活化的水平。

【0111】 我們使用了購自Promega的細胞測定系統進行這項研究。該系統包含兩種細胞類型：1)表現由NFAT應答元件驅動的人PD-1和螢光素酶報道基因的Jurkat T細胞，和2)表現人PD-L1和經設計以抗原非依賴性方式激活同源的T細胞受體的工程化細胞表面蛋白的CHO-K1細胞。在共培養時，Jurkat T細胞與CHO-K1細胞相互作用，引起T細胞受體刺激和NFATc易位至細胞核中，在那裡其驅動螢光素酶表現。然而，PD-1/PD-L1的參與將酪胺酸蛋白磷酸酶非受體11(SHP2)募集至T細胞受體複合物，抑制NFATc核易位和隨後的螢光素酶表現。PD-1信號傳導的阻斷緩解了SHP2依賴性抑制，並因此允許最大的螢光素酶表現。因此該系統提供了用於確定TGF- β 對T細胞信號傳導的作用以及Ab1對T細胞的抗PD-1治療的影響的功能性方法。

【0112】 由於與TGF-β依賴性作用相關的緩慢動力學，在T細胞受體刺激之前用TGF-β預處理Jurkat T細胞。人TGF-β1購自R & D Systems。用於Ab1的同種型對照抗體(抗HEL hIgG₄)購自Crown Bioscience(目錄號C0004-5)。小鼠抗hPD-1 IgG及其同種型對照抗體購自BioLegend(目錄號329912)。針對每種樣品分析了十四個重複。

【0113】 結果顯示將抗hPD-1抗體添加至與CHO-K1細胞共培養24小時的Jurkat T細胞誘導了螢光素酶活性(865794相對發光單位[RLU])的程度大於添加同種型對照(234963 RLU，倍數變化= 3.685，p值<0.0001)或者僅僅不存在抗體(206043 RLU，倍數變化= 4.202，p值<0.0001)。用18 ng/ml TGF-β1預處理Jurkat T細胞12天在存在抗hPD-1抗體的CHO-K1細胞共培養物中，與未用TGF-β1處理的Jurkat T細胞相比(865794 RLU，倍數變化= -1.355，p值<0.0001)，誘導了更少的螢光素酶活性(638866 RLU)(圖4)。

【0114】 為了評估Ab1的拮抗效力，將Jurkat T細胞在存在Ab1、同種型對照Ab或無Ab的情況下用18 ng/ml TGF-β1預處理12天，然後與CHO- K1細胞在抗PD-1存在下共培養24小時。與同種型對照Ab(639440 RLU，倍數變化= 1.445，p值<0.0001)和無Ab對照(638866 RLU，倍數變化 = 1.447，p值<0.0001)相比，Ab1(924186 RLU)的存在緩和了螢光素酶活性的TGF-β-依賴性抑制。將使用Ab1(975654 RLU)或同種型對照(955717 RLU)的對照組加入未用TGF-β1預處理的Jurkat T細胞中，並在抗-PD-1 Ab存在下與CHO-K1細胞共培養物共培養，與無Ab對照相比具有統計學上升高的螢光素酶活性，但是具有最小的倍數變化(865794 RLU，倍數變化= 1.127和1.104，p值分別為0.0023和0.001284)(圖4)。RLU值也列在下面的表3中。

表3 T細胞活化測定中的相對發光單位

	抗PD-1 Ab		抗PD-1 Ab同種型對照	媒劑 (PBS)
	無 TGF-β1 預處理	TGF-β1 預處理		
無Ab1	865794	638866	234963	206043
Ab1	975654	924186	-	-
抗HEL hIgG ₄	955717	639440	-	-

【0115】 為了排除對Jurkat T細胞的TGF-β1預處理可能導致了降低的增殖或存活力，並因此在與CHO-K1細胞共培養24小時期間導致了降低的螢光素酶活性的可能性，我們將Jurkat T細胞與18 ng/ml TGF-β1或PBS在Ab1、抗HEL hIgG₄或無抗體(媒劑)的存在下培養7天。每2至3天用等體積的各個組接種新的培養瓶，此時TGF-β1和抗體二者都被刷新(總共發生兩次再接再種事件)。最終培養物的評估表明，所有處理組的存活力未變(範圍從94%至96%)。此外，每個治療組的最終培養物中的Jurkat T細胞總數非常相似(範圍從2500至2900萬)。

【0116】 上述研究表明，抗PD-1治療後T細胞受體下游的信號傳導的增加被TGF-β抑制，導致次最佳(sub-optimal) T細胞刺激。我們的數據表明，抑制TGF-β緩和了免疫抑制腫瘤微環境，並允許檢查點調節劑如抗PD-1劑更好地誘導免疫應答，從而增加受益於免疫腫瘤治療的患者比例。

實施例5：Ab1和抗PD1抗體組合在體內的效果

【0117】 接下來我們研究了在C57BL/6小鼠癌症模型中抗TGF-β和抗PD-1聯合治療的效果。

耐受性/初步安全性

材料和方法

【0118】 在C57BL/6雌性小鼠中評估了Ab1和抗小鼠PD-1(mPD-1)單株抗體(mAb)作為單一藥劑和組合的耐受性。Ab1(10、20和50 mg/kg)或同種型對照Ab(購自Crown Bioscience的抗HEL hIgG₄；以10和20mg/kg使用)每三天IV施用(Q3D)，作為單一藥劑或與每週兩次5 mg/kg IV的抗PD1 Mab組合。本研究使用的抗PD1 Ab被命名為“antimPD1_hyb_RMP114_mIgG1LCfullrat”(或x抗mPD-1 Mab)。它是通過用小鼠IgG₁ Fc區替代大鼠IgG_{2a}克隆RMP1-14(BioXcell，目錄號BE0146)的大鼠Fc區產生的嵌合大鼠抗mPD-1抗體。這種嵌合抗體的重鏈和輕鏈胺基酸序列示於SEQ ID NO:7和8中。通過測量動物體重和臨床觀察結果來評估耐受性。在三週治療結束時，在最後一次治療4小時後，進行終末採樣，並將組織(心臟、腎臟、肝臟、肺臟和脾臟)固定在甲醛中並送去進行組織病理學分析。

【0119】 如果劑量在單個小鼠中在連續三天期間產生了15%體重減輕，在一天其間產生了20%體重減輕，或10%或更多的藥物相關死亡，則該劑量被認為是過度毒性的，除非在對照媒劑處理組觀察到了腫瘤誘導的惡病質導致的體重下降。動物體重包括了腫瘤重量。

毒性/安全性結果

【0120】 在C57BL/6小鼠中的耐受性研究顯示，所有測試的劑量水平的單一藥劑以及Ab1與x-抗mPD-1 Mab的組合都是良好耐受的。在所有測試劑量的任何治療組中都沒有觀察到體重的重大變化。研究期間未觀察到嚴重或主要的臨床觀察結果。組織病理學分析鑒定了所有處理組(包括同種型對照抗體處理的組)的脾臟(白髓)中淋巴細胞的數量增加，無論組合並且沒有任何劑量關係。沒有觀

察到其他顯著的顯微發現。在研究的最後一天最後一次施用後，來自聯用組(同種型對照Ab(10 mg/kg)和抗PD-1 Mab(5 mg/kg))的兩隻小鼠被發現死亡。組織病理學分析沒有發現任何與藥物有關的死亡原因。

功效研究

【0121】評估了在攜帶皮下MC38同基因結腸腫瘤的C57BL/6小鼠中組合抗TGF- β 和抗PD-1治療的效果。給予小鼠25 mg/kg的Ab1、5mg/kg的x-抗mPD-1 Mab或兩者，Q3D，持續三週。這項研究證明，Ab1和抗mPD-1 Mab聯用比僅單一藥劑具有顯著更高的抗腫瘤活性。下面詳細描述這項研究的材料和方法以及數據。

材料和方法

動物

【0122】雌性C57BL/6小鼠獲自Charles River Labs(Wilmington, MA, USA)。在研究登記前讓動物適應環境至少3天。在研究開始時，小鼠為11週齡，體重在17.0至20.9 g之間。它們可以自由獲得食物(Harlan 2916齧齒動物飲食，美國馬薩諸塞州)和無菌水，並且在12小時光照/黑暗週期中飼養。

腫瘤細胞

【0123】MC38是結腸腺癌細胞系。細胞從國立癌症研究所(National Cancer Institute)(Bethesda, MD, USA)獲得並且在37°C下5% CO₂中在完全培養基(CM)中培養，所述培養基包括Roswell Park Memorial Institute培養基(RPMI)-1640與L-穀胺醯胺(Gibco，目錄號11875)，補充有10%熱滅活胎牛血清(HI FBS)(Gibco，

目錄號10438026)。將細胞收穫並重懸於Dulbecco磷酸鹽緩衝鹽水(DPBS)(Gibco，目錄號14190)中，並將每小鼠 1×10^6 個細胞/200 μ l皮下(SC)植入雌性C57BL/6小鼠的右側。

化合物

【0124】 Ab1在水溶液中施用至動物。其通過PES進行0.22 μ m過濾，並以無菌等分試樣儲存在2-10°C。將抗體以10 ml/kg腹膜內(IP)，25mg/kg給予動物。

【0125】 使用抗HEL hIgG₄(Crown Bioscience)作為Ab1的同種型對照。這種抗體以10 ml/kg通過IP，25 mg/kg給予對照動物。

【0126】 x-抗mPD-1 Mab(同上)在DPBS(Gibco，目錄號14190-094)中提供，並以10ml/kg，5mg/kg通過IP給予動物。

研究設計

【0127】 在第0天，為60隻動物植入MC38腫瘤細胞。植入後第8天，將平均腫瘤大小為50-75 mm³的小鼠合併並隨機分配至對照組和治療組(每組10隻小鼠)。在第9天開始用上述劑量的媒劑(PBS，pH7.2)、抗HEL hIgG₄、Ab1和抗mPD-1 Mab處理，並在第12、15、18、21和27天重複。將用媒劑和抗HEL hIgG₄處理的動物用作對照。每天檢查小鼠並記錄不良臨床反應。一週將各個小鼠稱重三至四次直至實驗結束。

【0128】 當觀察到發病率或體重減輕 $\geq 20\%$ 時，使小鼠安樂死。用卡尺每週兩次測量腫瘤直至最終處死。當腫瘤大小達到約2000 mm³或存在動物健康問題(腫瘤潰瘍面積的20%)時，動物將被安樂死並記錄死亡日期。根據二維腫瘤測量估計實體腫瘤體積並根據以下等式進行計算：

$$\text{腫瘤體積(mm}^3\text{)} = [\text{長度(mm)} \times \text{寬度}^2 \text{(mm}^2\text{)}] / 2$$

【0129】 然後給定日的組的百分比中值消退(regression)通過取得針對該組中每隻動物在該日計算的個體百分比消退的中值來獲得。計算的日期是在計算 $\Delta T/\Delta C$ (即，治療組和對照組之間的腫瘤體積從基線變化的中值的比例)的那天確定的，除非中值百分比消退不代表該組的活性。在那種情況下，當中值百分比消退最大時的第一天確定為這一天。如果腫瘤體積在治療開始時降至腫瘤體積的50%，則將消退定義為部分的(PR)。當腫瘤體積低於14 mm³或無法記錄時，認為已經實現了完全消退(CR)。

功效

【0130】 主要功效終點是由 $\Delta T/\Delta C$ 、中值百分比消退、部分消退和完全消退指示的與基線相比的腫瘤體積變化。通過在指定觀察日從腫瘤體積中減去第一次治療當天(分期日(staging day))的腫瘤體積，每天為每隻動物計算每個治療組(T)和對照組(C)的腫瘤體積變化。計算處理組的中值 ΔT ，並計算對照組的中值 ΔC 。計算比率 $\Delta T/\Delta C$ 並以百分比表示：

$$\Delta T/\Delta C = (\text{中值}\Delta T/\text{中值}\Delta C) \times 100$$

【0131】 $\Delta T/\Delta C$ 比率 $\leq 40\%$ 被認為有治療活性。 $\Delta T/\Delta C$ 比率為0%被認為是腫瘤停滯。 $\Delta T/\Delta C$ 比率 $< 0\%$ 被認為是腫瘤消退。

【0132】 將腫瘤消退百分比定義為與在研究開始時(t_0)的腫瘤體積相比，在指定觀察日處理組中腫瘤體積減少的百分比。在特定時間點(t)並且對於每隻動物，使用以下公式計算百分比消退：

$$\% \text{ 消退(在} t \text{時)} = [(\text{體積}_{t0} - \text{體積}_t) / \text{體積}_{t0}] \times 100$$

【0133】 然後通過取得為組中每隻動物計算的個體%消退值的中值來計算在給定日組的中值百分比消退。計算的日期由計算 $\Delta T/\Delta C$ 的日期決定，除非中值百分比消退不代表該組的活性。在那種情況下，通過中值百分比消退最大時的第一天確定這一天。

統計學分析

【0134】 對與基線相比的腫瘤體積變化進行具有因子治療和天數(重複)的雙向ANOVA類型。在顯著治療*天數相互作用或治療效果的情況下，隨後進行帶有Bonferroni-Holm校正多重性的對比分析以在第8天至第27天的每一天比較所有的治療組與對照組。針對每隻動物並且在每天計算腫瘤體積相對於基線的變化，其通過從指定的觀察日的腫瘤體積中減去第一次治療當天(第8天)的腫瘤體積計算。

【0135】 因為在組之間觀察到差異的異質性，所以對於ANOVA類型模型(SAS Institute Inc. (2008) SAS/STAT 9.2 用戶指南，Cary NC)選擇了具有組=選項的複合對稱(CS)協方差結構。在圖5和圖6中，對於每個測量日呈現每組的中值和中值絕對偏差(MAD)。在下面的表4-6中，為每個測量日報告每組的中值和歸一化MAD($nMAD = 1.4826 * MAD$)。所有統計分析均使用SAS版本v9.2軟件進行。小於5%的概率($p < 0.05$)被認為是顯著的。

功效結果

【0136】 用Ab1、抗PD-1 Mab或兩者的組合處理帶有腫瘤的C57BL/6小鼠也被良好耐受性且無毒性，如動物的一般健康和活動以及沒有體重的顯著變化所表明的。作為單一藥劑，25 mg/kg Q3D的Ab1和5 mg/kg Q3D的抗PD-1 Mab分別導致最低點僅3.4%(第9天)和2.1%(第9天)的體重減輕值。Ab1(25mg/kg Q3D)和抗PD-1 Mab(5mg/kg Q3D)的組合也是良好耐受的，顯示最低點的體重損失值為1.3%(第9天)(表4)。

【0137】 作為單一藥劑，與用Ab1同種型對照(抗HEL hIgG₄)處理的動物相比，Ab1(25 mg/kg Q3D)和抗PD-1 Mab(5 mg/kg Q3D)顯示對腫瘤生長沒有擾動。治療第27天的 $\Delta T/\Delta C$ 比率分別為93%和109%(表4)。抗PD-1 Mab和抗HEL hIgG₄的組合顯示最小的抗腫瘤活性，在治療的第27天 $\Delta T/\Delta C$ 為31%(與對照組沒有統計學差異)，並且在10隻小鼠中隻有2隻觀察到完全消退。然而，抗PD-1 Mab和Ab1的組合在第15天至第27天表現出優異的抗腫瘤活性，在治療的第27天具有-1 $\Delta T/\Delta C$ (統計學上不同於對照組)，並且在10隻小鼠中的6隻中觀察到完全消退(表4)。

表4 Abl和X抗mPD-1 Mab在C57BL/6 MC38癌症模型中的活性

藥劑	ΔW^* (最低點日)	$\Delta T/\Delta C\%$ (第27天)	中值消退的 % (第27天)	p值** (第27天)	消退 (第27天)	
					PR	CR
媒劑	-1.8 (D9)	100	-	-	0/10	0/10
抗HEL hIgG ₄ (25 mg/kg)	-	104	-	0.7914	1/10	1/10
Ab1 (25 mg/kg)	-3.4 (D9)	93	-	0.9953	0/10	0/10
x- 抗 mPD-1 (5 mg/kg)	-2.1 (D9)	109	-	0.5435	2/10	1/10
Ab1 (25 mg/kg) +	-1.3 (D9)	-1	24.5	<0.0001	6/10	6/10

藥劑	ΔW* (最低點日)	ΔT/ΔC% (第 27天)	中值消退的 % (第27天)	p值** (第27天)	消退 (第27天)	
x- 抗 mPD-1 (5 mg/kg)						
抗HEL hIgG ₄ (25 mg/kg) + x- 抗 mPD-1 (5 mg/kg)	-3.0 (D9)	31	-	0.4020	2/10	2/10

* ΔW表示最低點處每組的平均體重變化%。

** 在對距離基線的腫瘤體積變化進行重複測量的雙向ANOVA-Type之後，使用 Bonferroni-Holm調整多重性，使用比較各治療組與對照的對比分析獲得p值。小於5%的概率(p <0.05)被認為是顯著的。

【0138】 表5和6以及圖5-7提供了另外的數據，其顯示了單獨或組合的抗體對小鼠模型中腫瘤體積的活性。

表5 處理組與對照組的比較

腫瘤體積相對於基線的變化mm ³ ：中值(nMAD)、n和p值*						
治療組	全域	第12天	第15天	第19天	第23天	第27天
媒劑	-	26.0 (20.02) n=10	71.5 (53.37) n=10	220.5 (117.87) n=10	528.0 (157.16) n=10	1610.0 (413.65) n=9
抗HEL hIgG ₄ (25mg/kg)	- 0.9629	17.0 (17.79) n=10 0.5197	65.5 (51.89) n=10 1.0000	182.5 (113.42) n=10 0.8858	491.5 (358.05) n=10 1.0000	1675.0 (621.21) n=9 0.7914
Ab1 (25 mg/kg)	- 0.9629	17.0 (15.57) n=10 0.4754	79.0 (43.74) n=10 1.0000	218.0 (83.03) n=10 0.8858	567.0 (344.70) n=10 1.0000	1496.5 (472.21) n=8 0.9953
X- 抗 mPD1 Mab (5 mg/kg)	- 0.2439	-2.0 (21.50) n=10 0.0224	38.5 (68.20) n=10 0.1235	147.5 (149.74) n=10 0.2259	458.0 (280.21) n=10 0.2228	1748.0 (851.01) n=9 0.5435
Ab1 (25 mg/kg) + x- 抗 mPD-1 Mab (5 mg/kg)	- 0.0007	-3.5 (10.38) n=10 0.0743	20.0 (20.02) n=10 0.0121	-0.5 (69.68) n=10 <.0001	-17.0 (51.15) n=10 <.0001	-9.0 (86.73) n=10 <.0001
抗HEL hIgG ₄ (25mg/kg) + x-抗m-PD-1	- 0.2531	19.0 (37.81) n=10	61.5 (65.98) n=10	145.0 (160.12) n=10	266.0 (398.82) n=10 0.1979	503.0 (841.38) n=8

(5 mg/kg)		0.5197	0.2848	0.2259		0.4020
-----------	--	--------	--------	--------	--	--------

*在對距離基線的腫瘤體積變化的雙向Anova-Type之後，使用Bonferroni-Holm調整多重性，使用每天相對於對照的對比分析獲得p值。

表6 Ab1和X-抗mPD-1 Mab作為單一藥劑與組合的對比

腫瘤體積相對於基線的變化mm ³ ：中值 (nMAD)、n和p值*						
治療組	全域	第12天	第15天	第19天	第23天	第27天
Ab1 (25 mg/kg) + x-抗mPD-1 Mab (5 mg/kg)	-	-3.5 (10.38) n=10	20.0 (20.02) n=10	-0.5 (69.68) n=10	-17.0 (51.15) n=10	-9.0 (86.73) n=10
X-抗mPD-1 (5 mg/kg)	- 0.0405	-2.0 (21.50) n=10 1.0000	38.5 (68.20) n=10 0.7631	147.5 (149.74) n=1 0.0276	458.0 (280.21) n=10 0.0004	1748.0 (851.01) n=9 0.0024
Ab1 (25 mg/kg)	- 0.0017	17.0 (15.57) n=10 1.0000	79.0 (43.74) n=10 0.0694	218.0 (83.03) n=10 0.0007	567.0 (344.70) n=10 <.0001	1496.5 (472.21) n=8 <.0001
抗HEL hIgG ₄ (25mg/kg) + x-抗mPD-1 Mab (5 mg/kg)	-	19.0 (37.81) n=10	61.5 (65.98) n=10	145.0 (160.12) n=10	266.0 (398.82) n=10	503.0 (841.38) n=8
X-抗mPD-1 Mab (5 mg/kg)	- 0.8680	-2.0 (21.50) n=10 0.2024	38.5 (68.20) n=10 0.7631	147.5 (149.74) n=10 0.9476	458.0 (280.21) n=10 0.8576	1748.0 (851.01) n=9 0.8491
抗 HEL hIgG ₄ (25mg/kg)	- 0.5691	17.0 (17.79) n=10 1.0000	65.5 (51.89) n=10 0.5743	182.5 (113.42) n=10 0.4761	491.5 (358.05) n=10 0.2357	1675.0 (621.21) n=9 0.8491

* 在對距離基線的腫瘤體積變化進行雙向 Anova -Type 之後，使用 Bonferroni-Holm調整多重性，使用比較每天Ab1、抗HEL hIgG₄和x-抗mPD-1的組合相對於組合中涉及的劑量的每種單一藥劑的對比分析獲得p值。

【0139】 表格和附圖中的數據顯示，25 mg/kg Q3D的Ab1和5 mg/kg Q3D的x-抗mPD-1 Mab的組合比那些劑量下的任一抗體具有更高的抗腫瘤效果。當將組合與作為單一藥劑的Ab1比較時，在第19、23和27天的p值分別為0.0007、<0.0001和<0.0001，這種差異是統計學顯著的。當將組合與作為單一藥劑的x-抗mPD-1

Mab比較時，在第19、23和27天的p值分別為0.0276、0.0004和0.0024，這種差異也是統計學顯著的(表6)。對於25 mg/kg Q3D的抗HEL hIgG₄和5mg/kg Q3D的x-抗mPD-1 Mab的聯用組，在測量任何一天在從基線的腫瘤體積變化上的治療效果與單獨使用任一種藥劑的效果沒有顯著差異。

【0140】總之，從第15天至第27天，25 mg/kg Q3D的Ab1和5 mg/kg Q3D的抗mPD-1 Mab的組合具有比單獨使用的任一種藥劑顯著更大的抗腫瘤效果。

【0141】在另一項研究中，我們評估了劑量為1、10或25 mg/kg的Ab1與劑量為5 mg/kg的小鼠PD-1抗體對C57BL/6J小鼠中皮下MC38小鼠結腸癌模型的抗腫瘤活性。將指數生長的MC38結腸腺癌細胞(NCI, Frederick, MD)在補充有10% FBS的RPMI-1640中在濕潤的5% CO₂培養箱中培養，然後皮下植入(1×10^6 個細胞)到雌性C57/BL6J小鼠側腹(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)。一旦腫瘤達到50-75 mm³的平均大小，則將小鼠合併並隨機分配至對照組和治療組(每組10隻小鼠)。然後用PBS、IgG4同種型對照抗體(25 mg/kg)或Ab1(1、10和25mg/kg)腹膜內處理帶有腫瘤的小鼠，每週三次，直到每隻動物接受總共6至7個劑量。用數字卡尺每週測量腫瘤2次並計算腫瘤體積(mm³ = L x W x H)並用GraphPad Prism繪圖。如果腫瘤生長至> 2000mm³，或腫瘤展現出潰瘍> 20%的腫瘤面積，則在研究結束時將小鼠用CO₂安樂死。

【0142】作為單一藥劑，劑量為25 mg/kg Q3D的Ab1和劑量為5 mg/kg的小鼠α-PD-1抗體分別在攜帶MC38腫瘤的小鼠中表現出2/8和4/8完全消退的部分活性。1、10或25 mg/kg Q3D的Ab1與5 mg/kg Q3D的小鼠α-PD-1抗體的組合具有治療活性。在植入後第24天，當比較相對於基線的腫瘤體積變化時，所有測試劑量的Ab1和5 mg/kg Q3D的小鼠α-PD-1抗體的組合的效果大於每種單一藥劑的效

果，其中對於1、10和25 mg/kg的Ab1 分別為5/8、6/8和7/8完全消退。表6A提供了對結果的總結。

表6A Ab1⁺ 抗mPD-1 mAb組合的抗腫瘤效果

組	處理	小鼠總數	完全應答/消退數 (完全應答/消退率)
1	PBS	8	0 (0%)
2	25 mg/kg Ab1的同種型對照 抗體 ⁺ 5 mg/kg 抗mPD-1 Mab的同 種型對照抗體	8	0 (0%)
3	25 mg/kg Ab1 + 5 mg/kg 抗mPD-1 Mab的同 種型對照抗體	8	2 (25%)
4	25 mg/kg Ab1的同種型對照 抗體 + 5 mg/kg x-抗mPD-1 Mab	8	4 (50%)
5	1 mg/kg Ab1 + 5 mg/kg x-抗mPD-1 Mab	8	5 (62.5%)
6	10 mg/kg Ab1 + 5 mg/kg x-抗mPD-1 Mab	8	6 (75%)
7	25 mg/kg Ab1 + 5 mg/kg x-抗mPD-1 Mab	8	7 (87.5%)

【0143】 總之，這些臨床前數據表明，PD-1抑制與TGF- β 抑制的組合能夠比僅是單獨的檢查點抑制劑更大程度地抑制腫瘤生長。

實施例6：腫瘤內TGF- β 1水平

【0144】 在LoVo結腸直腸癌皮下異種移植物移植的BALB/c小鼠模型中研究了腫瘤內TGF- β 1水平。在腫瘤體積小於100 mm³時開始，為小鼠每3天靜脈內注射10、25或50 mg/kg的Ab1或同種型對照Mab，共8次IV施用。

【0145】 將在-80°C下儲存在具有2.8 mm陶瓷球(MoBio 13114-50)的2ml塑料管中的腫瘤樣品在室溫下解凍。向組織添加1毫升(ml)冷的Meso Scale Diagnostic(MSD)Tris Lysis緩衝液(R60TX-2)(補充有1x Halt™蛋白酶和磷酸酶抑制劑混合物(Thermo 78440))，然後使用Precellys® 24 Dual勻漿器(Bertin Instruments)在2個循環中以6500 rpm在4°C進行勻漿，每個循環20s。通過在4°C下在Eppendorf 5417C離心機中以20,000 xg離心10分鐘來澄清裂解物。如上所述，將上清液轉移至乾淨的冷凍Eppendorf管中並通過再離心20分鐘進一步使之澄清。之後，將上清液轉移至塑料96-孔儲存塊中，在液氮中快速冷凍，並在-80°C下儲存。

【0146】 第二天將樣品在室溫下解凍並置於冰上。根據製造商的說明使用Bicinchoninic Acid(BCA)Protein Assay試劑盒(Thermo 23225)測量裂解物中的蛋白質濃度。通過使用具有蛋白酶和磷酸酶抑制劑的MSD Tris Lysis緩衝液(參見上文)將裂解物標準化至約8 mg/ml的蛋白質濃度，並等分在塑料微型管中。

【0147】 使用電化學發光測定法使用人TGF- β 1試劑盒(MSD，K151IUC-2)根據製造商的說明測量了標準化腫瘤裂解物中的TGF- β 1濃度。使用在MSD Lysis

Buffer中連續稀釋的重組小鼠TGF- β 1(R&D Systems, 目錄號7666-MB-005)作為校準物。將樣品一式兩份加載在平板上。使用MESO SECTOR S 600讀板器(MSD)測量了電化學發光信號，並且基於標準曲線使用MSD Discovery Workbench軟件v4.0定量了樣品中的TGF- β 1濃度。

【0148】 通過軟件計算了樣品一式兩份重複的平均濃度。由軟件確定為「低於擬合曲線範圍(Below Fit Curve Range)」或「低於檢測範圍(Below Detection Range)」的濃度值用零值代替。為了計算每mg總蛋白質的TGF- β 1濃度，用測定中測得的濃度(pg/ml)除以樣品中的蛋白質濃度(mg/ml)。

【0149】 結果顯示，注射了同種型對照的小鼠的腫瘤內TGF- β 1水平具有21.4 pg/mg總蛋白的中值，在注射了Ab1的小鼠中的相應水平不可檢測(圖8)。

【0150】 為了證明上述發現在人類中的相關性，我們使用上述方法如上所述測試了10份人結腸直腸腫瘤樣品和10份人黑色素瘤腫瘤樣品的腫瘤內TGF- β 1水平。對於人CRC樣品，TGF- β 1水平在約7至25 pg/mg範圍內。對於人黑色素瘤樣品，TGF- β 1水平在約1 pg/mg至高達43 pg/mg的範圍。這些數據進一步支持了抗TGF- β 1治療劑如Ab1在單獨或與其他免疫檢查點抑制劑如抗PD-1抗體聯合的情況下在治療腫瘤方面的用途。

實施例7：Ab1的藥代動力學研究

【0151】 本實施例描述了表徵Ab1的藥代動力學(PK)概貌並將其與夫蘇木單抗藥代動力學(PK)概貌相比較的研究。在一項研究中，為5組空腸Sprague-Dawley大鼠靜脈內給予5 mg/kg單劑量的Ab1或夫蘇木單抗。每組有五隻雌性和五隻雄性。在給藥後0.25、6、24、48、72、144、192和240小時收集來自

於比較。這些數據顯示，在單次和重複給藥後，Ab1在猴子中也具有線性PK表現，並且顯示出比每劑量1 mg/kg和10 mg/kg兩種劑量的夫蘇木單抗更高的暴露。在10 mg/kg的單次給藥下，Ab1具有13天的半衰期，而夫蘇木單抗具有4.5天的半衰期；Ab1具有約0.40 ml/hr/kg的CL，而夫蘇木單抗具有0.66 ml/hr/kg的CL。與大鼠研究一樣，猴子研究也顯示Ab1比夫蘇木單抗具有約1.7倍的更高的暴露。

【0154】 上述研究表明，Ab1與夫蘇木單抗相比在體內具有統計學顯著更長的半衰期，更長的清除時間和更高的生物暴露。

【0155】 此外，在攜帶Ab12腫瘤的Balb/C小鼠中的研究顯示，Ab1具有類似的PK概貌，無論其是靜脈內還是腹膜內施用。

【0156】 在雙室模型(two-compartment model)上使用異速定標(allometric scaling)，我們根據猴子數據預測了70 kg男性中的以下PK參數(表8)：

表8 PK參數的異速建模

PK參數	猴子中的Ab1	人中的Ab1
T _{1/2} (天數)	13.1	20.9
CL (ml/hr/kg)	0.392	5.7
V1 (中央室) (L)	0.104	2.43
Q (ml/hr)	3.18	46
V2 (周邊室) (L)	0.0693	1.62

【0157】 在人類中Ab1的預測PK參數也比夫蘇木單抗的預測PK參數更有利。例如，在人體中夫蘇木單抗 的CL為12.3 ml/hr/kg，比Ab1的清除速率快。

實施例8：Ab1的毒理學研究

【0158】 Ab1的毒理學研究在大鼠和食蟹猴中進行。在重複劑量的GLP(良好的實驗室操作)中每週評估安全藥理學終點達5週。在猴子中高達10 mg/kg/劑量(濃度為2 mg/ml)的劑量和在大鼠中高達30 mg/kg/劑量(濃度為6 mg/ml)的劑量下，在注射部位沒有觀察到Ab1相關的組織病理學發現。在這項研究中，在神經系統檢查、體溫、呼吸率、血壓和ECG參數方面測試的任何劑量水平都沒有注意到Ab1相關的影響。

【0159】 發現大鼠的NOAEL(沒有觀察到的不良反應的水平)為每週重複給藥5週3 mg/kg/劑量，且發現大鼠的STD10(導致10%的動物死亡或不可逆的嚴重毒性的嚴重毒性劑量)為3至10 mg/kg/劑量。毒性包括以多個增厚的結節為特徵的心臟瓣膜增殖；和異常肺部狀況，如混合細胞肺泡滲出液、混合細胞血管周圍浸潤、肌肉動脈肥大、出血和/或肺重增加。

【0160】 發現每週重複給藥5週的猴子的NOAEL和HNSTD (即，最高非嚴重毒性劑量，在其之上發生致死性、危及生命的毒性或不可逆的毒性)為10 mg/kg/劑量(參考夫蘇木單抗，當其每兩週施用達7或13次劑量或Q3D施用達4週時，其猴子中的NOAEL顯示為1 mg/kg)。另見下表9中的數據。

表9 大鼠和猴子的毒理學研究總結

毒理學參數	大鼠	猴子
LD (致死劑量)	50 mg/kg/劑量 ¹	> 10 mg/kg/劑量
HNLD (最高非致死劑量)	30 mg/kg/劑量	10 mg/kg/劑量
STD10	3-10 mg/kg/劑量	NA
HNSTD	NA	10 mg/kg/劑量
NOAEL	< 3 mg/kg/劑量	10 mg/kg/劑量

主要目標器官(組織病理學)	心臟、肺、骨骼、牙齒	沒有鑒定
¹ ：基於探索性研究 NA：不可用		

【0161】 基於上述毒理學數據，預期Ab1可以以約0.05 mg / kg至0.5 mg / kg 每週或者更低頻率例如每兩週的劑量水平安全地施用於人類患者。

實施例9：抗TGF-β單一療法的體內功效

【0162】 在此項研究中，我們研究了1D11(一種與人和小鼠TGF-β1、2和3交叉反應的小鼠IgG₁抗牛TGF-β抗體)對轉移性同基因(syngeneic)腫瘤模型的影響。在該模型中，通過IV將B16-F10小鼠黑色素瘤細胞引入C57BL/6小鼠的足墊中，並在小鼠的引流淋巴結中形成轉移。雖然用對照抗體13C4處理沒有效果，但在腫瘤接種後一天開始每週三次用50mg / kg 1D11處理完全消除了轉移。

【0163】 為了研究免疫應答的作用，將B16-F10植入β2-微球蛋白基因中有缺陷並因此缺乏CD8⁺細胞毒性T細胞應答的小鼠的足墊中並如前處理。與有免疫活性的小鼠(immune competent mice)中所見到的結果相反，1D11對這些小鼠中引流淋巴結中轉移的數量沒有影響。這些結果表明TGF-β抑制作用的機制依賴於適應性細胞免疫。

實施例10：癌症中的TGF-β簽名標記(Signatures)

【0164】 先前的研究已經表明，對抗PD-1療法沒有應答的黑色素瘤患者具有轉錄簽名標記IPRES (Hugo等，Cell (2016) 165:35-44)。為了研究對抗PD-1單一療法的先天性抗性的機制，我們研究了無應答者相對於應答者的轉錄簽名標

記。我們發現，使用基因組富集分析(Gene Set Enrichment Analyses)將這些概貌(profile)與具有超過1M個概貌的數據庫比較，揭示了抗PD-1應答與腫瘤中TGF- β 信號傳導的活化之間的強相關性。這些數據表明，在黑色素瘤中在基線時，TGF- β 與抗PD-1單一療法的先天性抗性相關。

【0165】此外，我們不僅發現抗PD-1應答與TGF- β 信號傳導活化之間存在相關性，而且還發現相關性很強($R = 0.59$ ，t檢驗的p值 $<9E-4$)。因此，我們得到了我們的關口指征(gateway indication) 1：黑色素瘤(例如，轉移性黑色素瘤)中TGF- β 介導的免疫抑制可能導致先天性抗性。此外，我們發現TGF- β 誘導的基因表現變化可通過1D11處理淬滅，證實了TGF- β 活化簽名標記的特異性。這些結果為聯合使用抗TGF- β 和抗PD-1治療劑治療對抗PD-1單一療法無應答的癌症患者提供了支持。

【0166】對黑色素瘤之外的其他腫瘤類型之中這種相關性的分析揭示了間充質腫瘤(例如，CRC、HCC、頭頸部鱗狀細胞癌和卵巢癌)也富含TGF- β 活化和預測的抗PD-1抗性二者。這一發現與TGF- β 信號傳導在EMT中的作用一致。因此，我們到達了我們的關口指征2：間充質腫瘤，尤其是那些帶有免疫浸潤的腫瘤，可能受益於抗TGF- β 和抗PD-1聯合治療。使用機器學習方法從30多個EMT標誌物基因中鑒定出可用於選擇間充質腫瘤的較少數量的基因，例如ACTA2、VIM、MGP、ZEB2和ZWINT。例如，ACTA2和VIM被發現可跨越腫瘤類型轉運。因此，TGF- β 活化轉錄簽名標記和簽名標記內的基因可作為在基線時為抗TGF- β 和抗PD-1抗體聯合療法進行癌症患者選擇的有用生物標誌物。

【0167】為了研究腫瘤微環境中的生物標誌物，使用MultiOmyx (一種針對CRC和黑色素瘤的多重IHC測定法)評估了患者腫瘤的免疫情況。在來自每個腫

瘤樣品的單個FFPE切片上用12種生物標誌物(在一起描述了22種免疫細胞類型)進行複合(multiplexing)。該研究包括了一系列炎症以評估分析物評價每種腫瘤類型以及與可能的治療效果相關聯的情況有多好。開發了統計方法來評價在細胞群體水平上的差異，包括重複一致性、方差分析的火山圖和相關性矩陣。

MultiOmyx測定法顯示出卓越的技術可重複性和精確性、有利的動態範圍、在選擇免疫細胞和感興趣區域中的炎症狀態差異，並且包括細胞群體之間的正相關性和負相關性二者。

實施例11：在使用或不用抗PD1的條件下用Ab1處理後MC38腫瘤中的TGF- β 1、MIP2和KC / GRO的變化

【0168】 為了證明TGF- β 的中和，評估了Ab1(使用或不適用抗PD-1)影響腫瘤中細胞因子表現的能力。當腫瘤為61-110 mm³時，用單劑量的PBS或增加劑量的Ab1 (10、25或50 mg / kg，腹膜內)處理攜帶MC38腫瘤的小鼠。在指定的時間點收穫腫瘤並快速冷凍。製備腫瘤裂解物並且通過MSD(MesoScale Discovery)根據製造商的方案評估TGF- β 1、MIP2(CXCL2)和KC / GRO(CXCL1)的水平。

【0169】 已知TGF- β 在自分泌環路中起作用(Chen等，J. Biol. Chem. (1997) 272:12862-12867；Lopez-Casillas等，Cell (1993) 73:1435-1444)。預測TGF- β 中和通過直接中和和破壞TGF- β 的自分泌誘導導致腫瘤中發現的TGF- β 水平降低。

MIP2和KC / GRO是粒細胞包括嗜中性粒細胞的趨化性趨化因子。與單獨使用PBS或抗PD-1治療的動物相比，與抗PD-1 (5 mg / kg)一起用Ab1以所有給藥水平(10、25或50 mg / kg)處理的動物顯示了腫瘤中具有減少的活性TGF- β 1 (圖10A)。1小時內觀察到TGF- β 1水平降低並持續至少168小時。

【0170】還在這些相同的樣品中評估了MIP2的水平。在Ab1處理後，與單獨使用PBS或抗PD-1處理的動物相比，顯示MIP2的水平增加至少3-5倍，並且顯示MIP-2的升高持續至少168小時(圖10B)。類似地，顯示KC / GRO的水平增加，但是是在96和168小時的更晚的時間點(圖10C)。因此，與MIP2和KC / GRO水平的增加相比，Ab1和抗mPD-1 mAb組合更早地引起活性TGF- β 1水平的降低。這些結果表明Ab1可以降低腫瘤微環境中TGF- β 的水平 and 抑制TGF- β 。此外，觀察到的MIP2和KC / GRO水平的增加表明，它們是被TGF- β 的中和所影響的細胞因子，並因此可充當用Ab1治療的患者中的潛在生物標誌物。

實施例12：用Ab1處理恢復NK細胞聚集

【0171】已知TGF- β 通過抑制不同免疫細胞類型的活性來影響免疫系統。已經報道了TGF- β 抑制自然殺手(NK)細胞活性和NK細胞介導的ADCC (Trotta等，Journal of immunology (2008) 181:3784-3792。最近報道了NK細胞形成密集的簇作為通過IL-2定位在這些密集包裝的簇內來增強NK細胞的活性和活化的機制(Kim等，Scientific Reports (2017) 7:40623)。顯示在IL2存在下體外培養的純化人NK細胞形成了這些密集包裝的簇。

【0172】在本研究中，我們評估了在Ab1缺失或存在的情況下TGF- β 對NK細胞「聚集」的作用。通過用NK細胞RosetteSep試劑的負選擇(negative selection)根據製造商的方案(Stem Cell Technologies)從健康供體的血液中新鮮分離NK細胞。將NK細胞以 1.2×10^5 個細胞/孔在圓底測定板(Costar)中補充了Myelocult (Stem Cell Technologies)的IL-2 (100 IU / mL)中培養。如所示，在存在100 μ g / mL的無

關IgG4或Ab1的情況下，加入TGF- β 1至終濃度為0.1、1或10 ng / mL。將細胞培養72小時，並通過在尼康顯微鏡上捕獲圖像來顯現NK細胞聚集。

【0173】 顯示漸增劑量的TGF- β 1的添加抑制了NK細胞聚集。當將Ab1而不是IgG4對照抗體加入到NK細胞培養物中時，顯示了NK細胞簇的形成。該結果表明，TGF- β 中和影響NK細胞活化，導致NK細胞的活性和增殖增加以支持免疫系統的抗腫瘤應答。

實施例13：Ab1處理對增殖性CD8⁺T細胞中TGF- β 介導的對IFN- γ 產生的抑制的逆轉

【0174】 除了先天性免疫系統之外，已經報道了TGF- β 抑制CD8⁺T細胞的活性(Flavell等，Nature Reviews Immunology (2010) 10:554-567)。為了探索TGF- β 和Ab1對CD8⁺T細胞活性的作用，建立了MLR(混合淋巴細胞反應)測定系統，其中將純化的人CD3⁺細胞與BLCL細胞混合。首先在TGF- β 存在下評估了CD8⁺細胞增殖和IFN- γ 產生。具體而言，在Ficoll梯度分離後，使用EasySep T細胞富集試劑盒(StemCell Technologies)從由正常健康供體分級的PBMC分離CD3⁺細胞。然後根據製造商的方案(ThermoFisher)用CellTrace Violet標記CD3⁺細胞。通過將標記的CD3⁺細胞(2×10^5 個細胞)與經輻照的BLCL細胞(Astarte Bio)(2×10^4 個細胞；2分鐘)在補充有10%FBS的RPMI中混合來進行MLR測定。如所示，將TGF- β 1、IgG4對照抗體和/或Ab1加入到培養物中，並將培養物在37°C、5% CO₂下培養4天。接下來在存在PMA細胞刺激混合物(eBioscience)和蛋白質轉運蛋白抑制劑混合物(eBioscience)的情況下刺激細胞4小時。通過在冰上用Zombie NIR存活力染料(BioLegend)染色來區分活細胞並用FAC緩衝液洗滌。將細胞用True-Nuclear緩

衝液(BioLegend)固定、洗滌、沉澱(pelleted)並重懸於FAC緩衝液中。通過用BV650抗huCD4、PERCP / Cy5.5抗huCD8、FITC抗huCD3和PE抗huIFN γ (BioLegend)染色來製備細胞用於流式細胞術。在BD Canto上運行流式細胞術，並在FlowJo軟件中分析結果並對活細胞、單個細胞(singlet)和CD3⁺細胞進行門控。通過對CD8⁺細胞的門控來定量IFN γ ⁺CD8⁺ T細胞的百分比，所述CD8⁺細胞基於減少的CellTrace Violet染色已經增殖並且對於IFN- γ 染色為陽性。運行FMO作為所有抗體染色的對照。

【0175】 顯示在MLR測定中包含TGF- β 使得IFN- γ 陽性的CD8⁺ T細胞的百分比降低約4倍(圖11A)。在不存在TGF- β 的情況下，包含Ab1或對照Ab對這些IFN γ ⁺增殖性CD8⁺細胞的發育沒有影響(圖11B)。然而，包含Ab1而不是對照抗體能夠以劑量依賴性方式恢復IFN γ ⁺CD8⁺細胞的增殖。這些結果表明，通過阻斷TGF- β 對表現IFN- γ 的效應CD8⁺細胞的增殖的免疫抑制作用，TGF- β 中和能夠影響適應性免疫系統。已經提示這些IFN γ ⁺CD8⁺ T細胞在抗腫瘤免疫中發揮重要作用(Ikeda等，Cytokine Growth Factor Rev (2002) 13:95-109)。

實施例14：響應於抗TGF- β 療法的同基因小鼠模型

【0176】 在此項研究中，我們調查了哪些同基因小鼠模型可用於預測對使用抗TGF- β 抗體Ab1和抗PD-1的治療的應答。為了對小鼠模型進行分層，我們評估了CD8⁺ T細胞向小鼠腫瘤中的浸潤和TGF- β 途徑活化。基於來自從RNASeq獲得的數據的CD8⁺ T細胞簽名標記來分析CD8⁺ T細胞浸潤。使用全轉錄組RNAseq對具有從幾種適應症(如圖12A和12B中x軸下所示)產生的腫瘤細胞的17種不同小鼠同基因模型進行了轉錄側寫。同基因模型的這種「概要(compendium)」建立

在常見的背景品系C57/BL6上，每種模型使用了5至7個生物學重複。在Illumina2000測序後，使用STAR比對器(aligner)和Cufflinks轉錄本豐度估計值(transcript abundance estimators)，通過對原始序列讀數的標準處理產生了表示為每百萬轉錄物(TPM)的基因表現譜。最終將得到的多樣本數據矩陣分位歸一化(quantile normalized)。

【0177】 圖12A顯示了在概要中CD8⁺ T細胞的相對豐度(log2-轉化的)。使用獨特的標誌物基因CD8B估計了相對CD8⁺ T細胞豐度，其已經顯示為CD8T細胞存在的高度特異性指示物(Becht等，Curr Opin Immunol (2016) 39:7-13；和Becht等，Genome Biol (2016) 17:218)。每個方塊圖總結了生物學重複中的數值的範圍。與EMT6模型相比，MC38模型顯示CD8⁺ T細胞浸潤多約2倍(分別為左框和右框)。A20和EL4淋巴瘤模型分別顯示出CD8⁺ T細胞浸潤的總體最高和最低水平，而EL4中的CD8⁺ T細胞可忽略不計。

【0178】 MC38、MC38.ova、CT26和L1210鼠類細胞系表現出最高水平的CD8基因簽名標記。另外，EMT-6乳腺癌細胞系顯示出具有接近基線的T細胞浸潤，這與近來有關EMT6腫瘤具有免疫排除表型(immune-excluded phenotype)的報道一致(S. Mariathasan et al. 2017, ESMO Immuno-Oncology Congress, Geneva, Geneva Switzerland)。

【0179】 圖12B顯示整個概要中的TGF- β 途徑活化。通過TGF- β 體外刺激MCF7細胞衍生出並通過與幾種其他TGF- β 簽名標記比較驗證了TGF β 途徑活化的170個基因的轉錄簽名標記，將其用於為概要中的每個概貌指定途徑活化評分。使用「受調控的基因集富集分析」(rGSEA，Theilhaber等，2014)計算得分，

並將其表示為針對基因背景的簽名標記基因的log2富集。雖然MC38模型顯示了平均活化，但EMT6模型顯示出非常高的TGF-β途徑活化(分別為左框和右框)。

實施例15：Ab1和抗PD1抗體組合對小鼠乳腺癌模型的影響

【0180】 在本項研究中，我們研究了Ab1在有或沒有抗PD-1的情況下的治療效果。將指數生長的EMT-6乳腺細胞(CRL-2755，ATCC)在補充有10%FBS的RPMI-1640中在潮濕的5% CO₂培養箱中培養，然後皮下植入(0.5X10⁶個細胞/小鼠)到雌性BALB/c小鼠(上海靈昌生物技術有限公司，中國上海)的側腹。一旦腫瘤達到68-116 mm³的平均大小，將小鼠合併並隨機分配至對照和治療組(每組10隻小鼠)。然後對每隻動物用PBS、Ab1(10和25mg / kg)每週三次腹膜內處理攜帶腫瘤的小鼠，總共6次劑量。用數字卡尺每週測量腫瘤2次並計算腫瘤體積(mm³= L x W x H)，並使用GraphPad Prism繪圖。如果腫瘤生長至> 3000mm³或腫瘤展現出潰瘍> 20%的腫瘤面積，則在研究結束時將小鼠用CO₂安樂死。

【0181】 作為單一藥劑，劑量為10或25 mg / kg Q3D的Ab1和劑量為5 mg / kg的小鼠α-PD-1抗體在攜帶EMT-6腫瘤的小鼠中分別顯示出具有1/10、2/10和2/10完全消退的部分活性。劑量為10或25 mg / kg Q3D的Ab1與5 mg / kg Q3D的小鼠α-PD-1抗體的組合具有治療活性。在植入後第31天，當比較與基線相比的腫瘤體積變化時，所有測試劑量的Ab1與5 mg / kg Q3D的小鼠α-PD-1抗體的組合的效果大於每種單一藥劑的效果，其中對於10和25 mg / kg的Ab1分別為7/10和4/10完全消退。表10是對結果的總結。

表10 Ab1/抗mPD-1組合對EMT-6小鼠模型的作用

組	處理	小鼠總數	完全應答數 (完全應答率)
1.	PBS	10	0 (0%)
2.	5 mg/kg x-抗mPD-1 Mab	10	2 (20%)
3.	10 mg/kg Ab1	10	1 (10%)
4.	25 mg/kg Ab1	10	2 (20%)
5.	10 mg/kg Ab1 + 5 mg/kg x-抗mPD-1 Mab	10	7 (70%)
6.	25 mg/kg Ab1 + 5 mg/kg x-抗mPD-1 Mab	10	4 (40%)

【0182】 除非在此另外定義，否則與本發明結合使用的科學和技術術語將具有本領域普通技術人員通常理解的含義。以下描述示例性方法和材料，儘管與本文所述相似或等同的方法和材料也可以用於本發明的實踐或測試中。本文提及的所有出版物和其他參考文獻的全部內容通過引用併入。如有衝突，以本包括定義在內的本說明書為準。雖然本文引用了許多文獻，但是這種引用不構成承認這些文獻中的任何文獻構成本領域公知常識的一部分。此外，除非上下文另有要求，否則單數形式的詞語應包括複數形式，複數形式的詞語應包括單數形式。通常，與細胞和組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學、分析化學、合成有機化學、藥物和藥物化學以及蛋白質和核酸化學和雜交有關的命名法和技術是那些熟知並且在本領域中通常使用者。根據製造商的說明書

進行酶促反應和純化技術，如本領域通常完成的或如本文所述。在整個說明書和實施例中，詞語「具有(have)」和「包含(comprise)」或諸如「具有(has)」，「具有(having)」，「包含(comprises)」或「包含(comprising)」這樣的變化將被理解為暗示包含所述整數或組整數，但不排除任何其他整數或整數組。

序列表

SEQ ID NO:1 (Ab1重鏈)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFS SNVISWVRQA PGQGLEWMGG VIPIVDIANY
AQRFKGRVTI TADESTSTTY MELSSLRSED TAVYYCASTL GLVLDAMDYW GQGLTLTVSS
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV
FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

SEQ ID NO:2 (Ab1輕鏈)

ETVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSLG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRAPGIP
DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYADSPITFG QGTRLEIKRT VAAPSVFIFP
PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPBREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTLT
TLISKADYEKH KUYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEK

SEQ ID NO:3 (夫蘇木單抗重鏈，包括前導序列 – 殘基1-19)

MGWSCILFL VATATGVHSQ VQLVQSGAEV KKPSSSVKVS CKASGYTFSS NVISWVRQAP
GQGLEWMGGV IPIVDIANYA QRFKGRVTIT ADESTSTTYM ELSSLRSEDT AVYYCASTLG
LVLAMDYWG QGTLTVVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD YFPEPVTVSW
NSGALTSGVH TFPVLQSSG LYSLSVTV PSSSLGTKTY TCNVDHKPSN TKVDKRVESK
YGPSPSCPA PEFLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSQEDP EVQFNWYVDG
VEVHNAKTKP REEQFNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPSS IEKTISKAKG
QPREPQVYTL PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDS
GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLGK

SEQ ID NO:4 (夫蘇木單抗輕鏈，包括前導序列 – 殘基1-19)

MGWSCILFL VATATGVHSE TVLTQSPGTL SLSPGERATL SCRASQSLGS SYLAWYQQKP
GQAPRLLIYG ASSRAPGIPD RFSGSGSGTD FTLTISRLEP EDFAVYYCQQ YADSPITFGQ
GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PBREAKVQWKV DNALQSGNSQ
ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK

SEQ ID NO:5 (抗-PD-1 Mab重鏈)

EVQLLESQGV LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NFGMTWVRQA PGKGLEWVSG ISGGGRDITYF
ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLKGED TAVYYCVKVG NIYFDYWGQG TLTVVSSAST
KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY

SLSSVVTVPSS SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV
SVLTVLHQDW LNGKEYCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV
SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF
SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK

SEQ ID NO:6 (抗-PD-1 Mab輕鏈)

DIQMTQSPSS LSASVGDSIT ITCRASLSIN TFLNWyQQKP GKAPNLLIYA ASSLHGGVPS
RFGSGSGTD FTLTIRTLQP EDFATYYCQQ SSNTPFTFGP GTVVDFRRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNfY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEc

SEQ ID NO:7 (x-抗-mPD-1 Mab重鏈)

EVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCSVTGYSIT SSYRWNWIRK FPGNRLEWMG YINSAGISNY
NPSLKRRISI TRDTSKNQFF LQVNSVTTED AATYYCARSD NMGTTPFTYW GQGTLVTVSS
AKTTPPSVYP LAPGSAAQTn SMVTLGCLVK GYFPEPVTVT WNSGSLSSGV HTFPAVLQSD
LYTLSSSVTV PSSTWPSETV TCNVaHPASS TKVDKKIVPR DCGCKPCICT VPEVSSVFIF
PPKPKDVLTI TLTPKVTCVV VDISKDDPEV QFSWFVDDVE VHtAQTPRE EQFNSTFRSV
SELPIMHQDW LNGKEFKCRV NSAAFPaPIE KTISKTKGRP KAPQVYTIPP PKEQMAKDKV
SLTCMITDFP PEDITVEWQW NGQPaENYKn TQPIMDTDGS YFVYSKLNvQ KSNWEAGNTF
TCSVLHEGLH NHHTEKSLSH SPG

SEQ ID NO:8 (x-抗-mPD-1 Mab輕鏈)

DIVMTQGTLP NPVPSGESVS ITCRSSKSLl YSDGKTYLNW YLQRPGQSPQ LLIYWMSTRA
SGVSDRfSGS GSGTDFTLKI SGVEAEDVGI YYCQQGLEFP TFGGGTKLEL KRADAAPTVS
IFPPSTEQLA TGGASVVCLM NFYPRDISV KWKIDGTERR DGVLDsvTDQ DSKDSTYSMS
STLSLTkADY ESHNLYTCEV VHKtSSSPVv KSFNRNEc

SEQ ID NO:9 (1D11重鏈)

HVQLQQSGPE LVRPGASVKL SCKASGYIFI TYWMNWVKQR PGQGLEWIGQ IFPASGSTNY
NEMFEGKATL TVDTSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARGD GNYALDAMDY WGQGTsvTVS
SAKtTPPSVY PLAPGSAAQT NSMvTLGCLV KGYFPEPVTv TWNSGSLSSG VHTFPAVLQS
DLYTLSSSVT VPSSTWPSQT VTCNVaHPAS STKVDKKIVP RDCGCKPCIC TVPEVSSVFI
FPKPKDVLTI ITLTPKVTCV VVDISKDDPE VQFSWFVDDV EVHtAQTKPR EEQFNSTFRS
VSELPIMHQD WLNGKEFKCR VNSAAFPaPI EKTISKTKGR PKAPQVYTIP PPKEQMAKDK
VSLTCMITDF FPEDITVEWQ WNGQPaENYK NTQPIMDTDG SYFVYSKLNv QKSNWEAGNT
FTCSVLHEGL HHHTEKSLS HSPGK

SEQ ID NO:10 (1D11輕鏈)

NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD SYGNSFMHWY QQKSGQPPKL LIYLASNLES
GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPL TFGAGTKLEL KRADAAPTVS
IFPPSSEQLT SGGASVVCFL NNFYPKDINV KWKIDGSERQ NGVLNSWTDQ DSKDSTYSMS
STLTLTKDEY ERHNSYTCEA THKTSTSPIV KSFNRNEC

序列表

<110> 法商賽諾菲公司(SANOFI)

<120> 抗 TGF- β 抗體及其用途

<130> 022548.00011

<150> EP 17305061.8

<151> 2017-01-20

<150> 62/448,800

<151> 2017-01-20

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之敘述：合成多肽

<400> 1

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

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

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

Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

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

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

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

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

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

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 2
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成多肽

<400> 2
Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 3
<211> 466
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成多肽

<400> 3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Asn Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala
65 70 75 80

Gln Arg Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
210 215 220

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
225 230 235 240

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
275 280 285

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Gly Lys
465

<210> 4
<211> 234
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成多肽

<400> 4
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala
100 105 110

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 5
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成多肽

<400> 5
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Phe Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Lys Trp Gly Asn Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 6
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成多肽

<400> 6
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Ser Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Leu Ser Ile Asn Thr Phe
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Val Val Asp Phe Arg Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 7
<211> 443
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成多肽

<400> 7
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ser
20 25 30

Tyr Arg Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Arg Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Asn Ser Ala Gly Ile Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Arg Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Asp Asn Met Gly Thr Thr Pro Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
130 135 140

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

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

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
195 200 205

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
210 215 220

Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
290 295 300

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
305 310 315 320

Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys
340 345 350

Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp
355 360 365

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser
385 390 395 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
435 440

<210> 8
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成多肽

<400> 8
Asp Ile Val Met Thr Gln Gly Thr Leu Pro Asn Pro Val Pro Ser Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Thr Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Ser
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

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

Leu Glu Phe Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105 110

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Thr Glu Gln
115 120 125

Leu Ala Thr Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Leu Met Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Asp Ile Ser Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Thr Glu Arg Arg
145 150 155 160

Asp Gly Val Leu Asp Ser Val Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Ser Leu Thr Lys Ala Asp Tyr Glu Ser
180 185 190

His Asn Leu Tyr Thr Cys Glu Val Val His Lys Thr Ser Ser Ser Pro
195 200 205

Val Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 9
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成多肽

<400> 9
His Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Met Phe
50 55 60

Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser

115					120					125					
Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val
	130					135					140				
Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
145					150					155					160
Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
				165					170					175	
Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro
			180					185					190		
Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Gln	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro
		195					200					205			
Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly
	210					215					220				
Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile
225					230					235					240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys
				245					250					255	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
			260					265					270		
Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Lys
		275					280					285			
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu
	290					295					300				
Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg
305					310					315					320
Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
				325					330					335	

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
340 345 350

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
355 360 365

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly
385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
405 410 415

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
420 425 430

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 10
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成多肽

<400> 10
Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp

65					70						75					80
Pro	Val	Glu	Ala	Asp	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	
				85					90					95		
Glu	Asp	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	
			100					105					110			
Ala	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	
		115					120					125				
Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	
	130					135					140					
Pro	Lys	Asp	Ile	Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln	
145					150					155					160	
Asn	Gly	Val	Leu	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	
				165					170					175		
Tyr	Ser	Met	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Arg	
			180					185					190			
His	Asn	Ser	Tyr	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	His	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	
		195					200					205				
Ile	Val	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Asn	Glu	Cys							
	210					215										

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種特異性結合人類TGF- β 1、TGF- β 2、和TGF- β 3的抗TGF- β 抗體用於製造治療病患中免疫介導疾病、纖維化疾病、出生或骨缺損的藥物之用途，其中該抗體包含SEQ ID NO：1中的重鏈互補決定區(CDR)1-3和SEQ ID NO：2中的輕鏈CDR1-3，其中該抗體包含在第228位具有脯胺酸(EU編號)的人類IgG4恒定區。

【請求項2】 如請求項1之用途，其中該抗體包含對應於SEQ ID NO：1的殘基1-120的重鏈可變結構域(VH)胺基酸序列和對應於SEQ ID NO：2的殘基1-108的輕鏈可變結構域(VL)胺基酸序列。

【請求項3】 如請求項1或2之用途，其中該抗體包含SEQ ID NO:1的重鏈胺基酸序列和SEQ ID NO:2的輕鏈胺基酸序列。

【請求項4】 如請求項1或2之用途，其中其中IgG4恆定區包含SEQ ID NO：1的殘基121至447。

【請求項5】 如請求項1至4任一項之用途，其中該免疫介導疾病為硬皮病。

【請求項6】 如請求項1至4任一項之用途，其中該纖維化疾病為腎臟纖維化病症或肺纖維化病症。

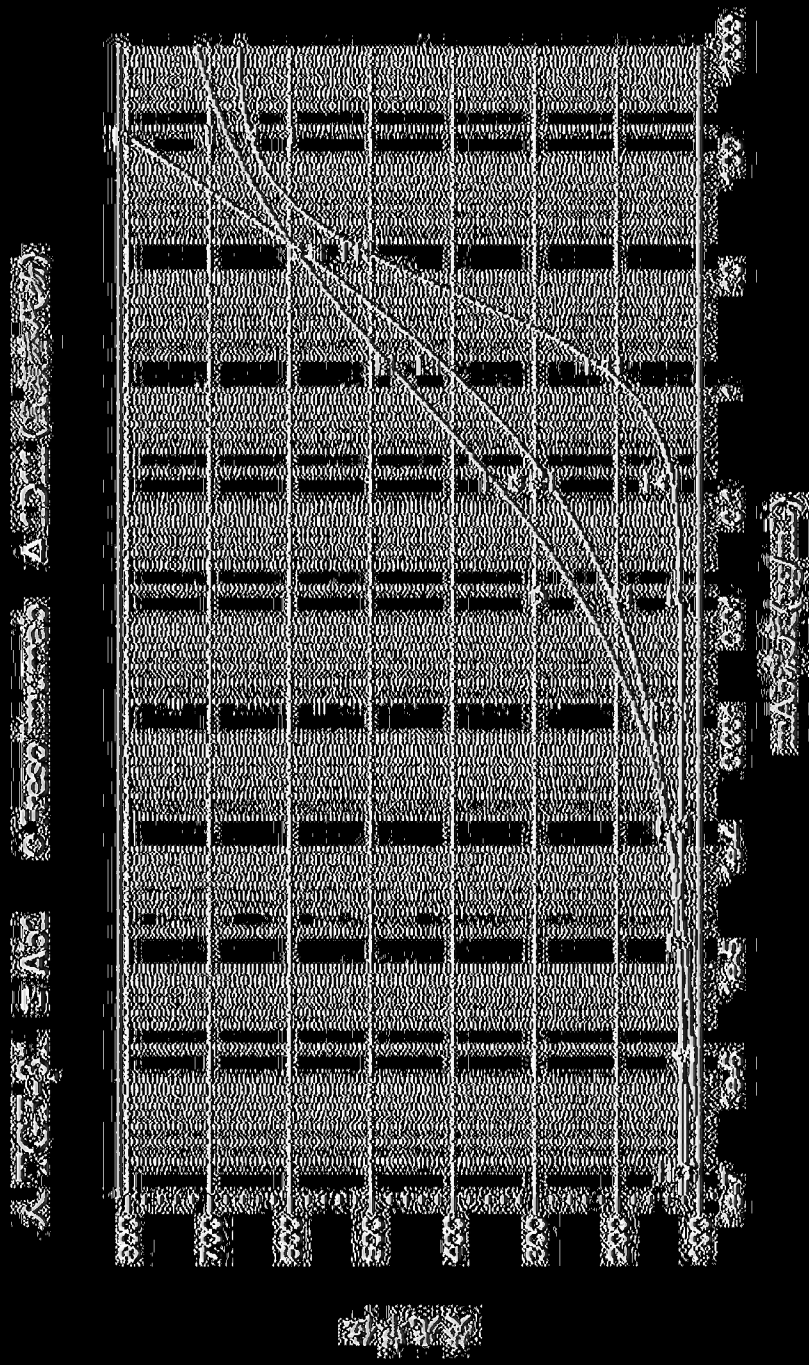
【請求項7】 如請求項6之用途，其中該腎纖維化病症為局部節段性腎小球硬化症(FSGS)。

【請求項8】 如請求項6之用途，其中該肺纖維化病症為特發性肺纖維化。

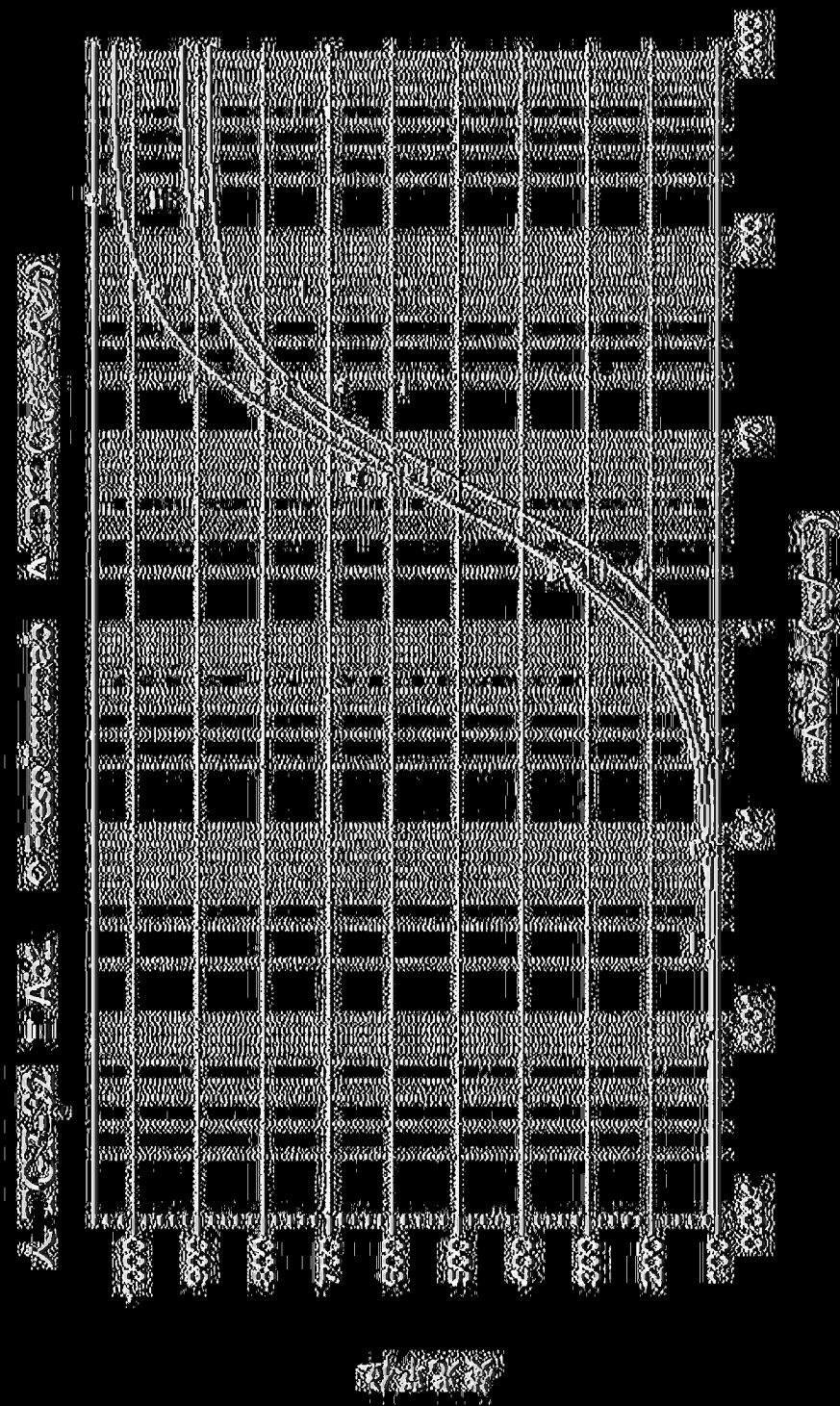
【請求項9】 如請求項1至4任一項之用途，其中該纖維化病症為輻射輻射誘發的纖維化、肝纖維化或骨髓纖維化病症。

【請求項10】 如請求項1至4任一項之用途，其中該出生或骨缺損為成骨不全症。

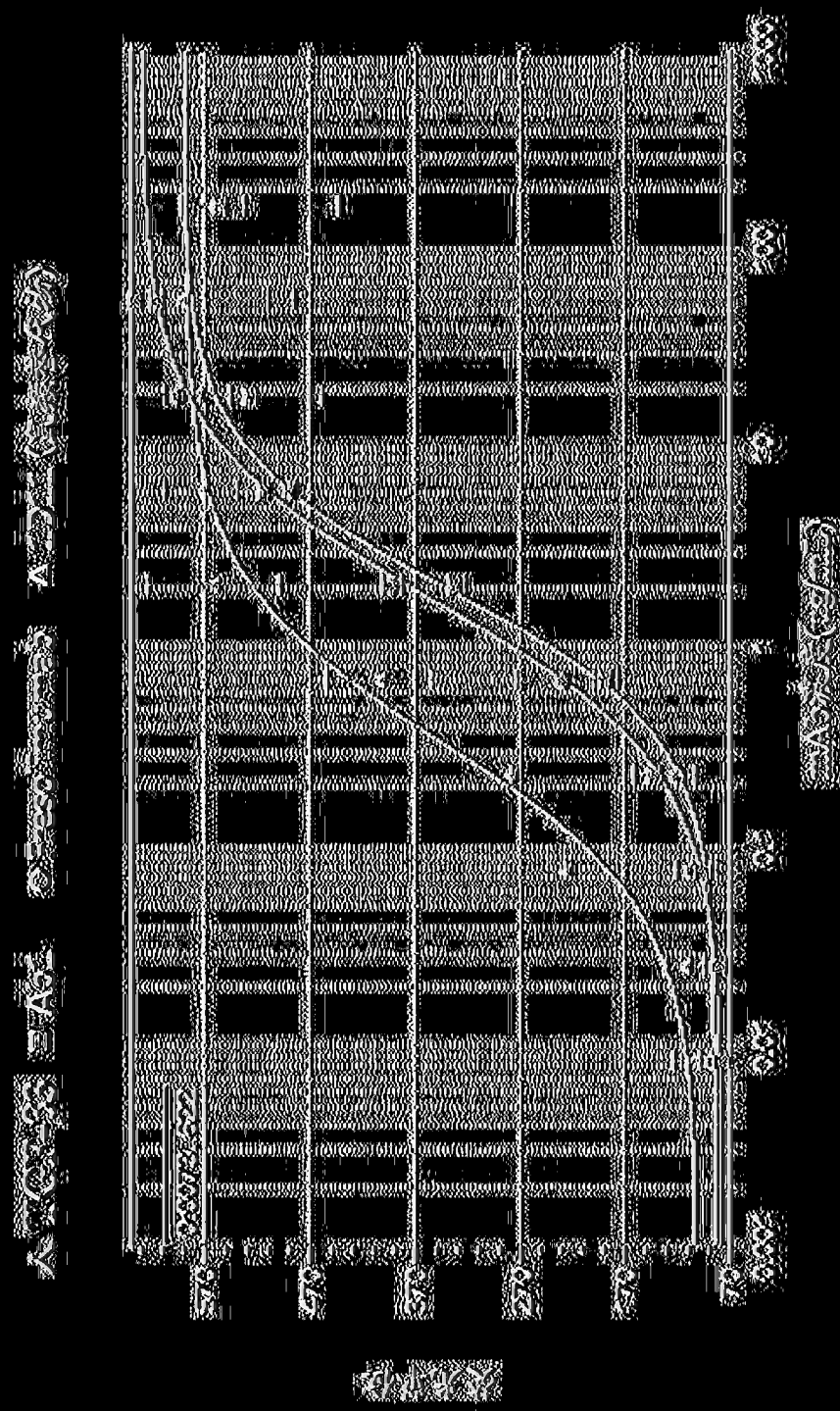
|(發明圖式)|



|(圖1A)|



(圖113)



(圖1C)

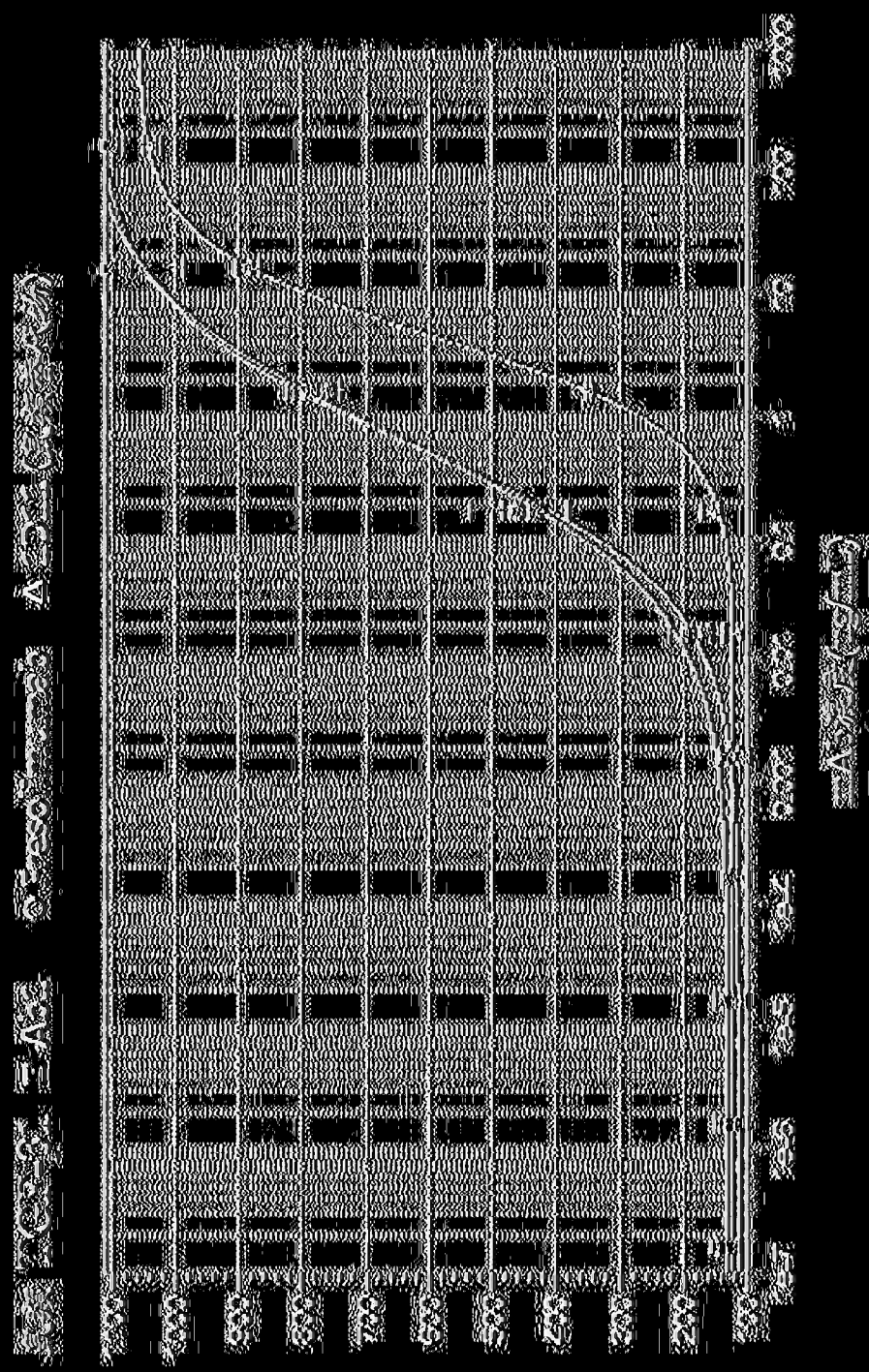
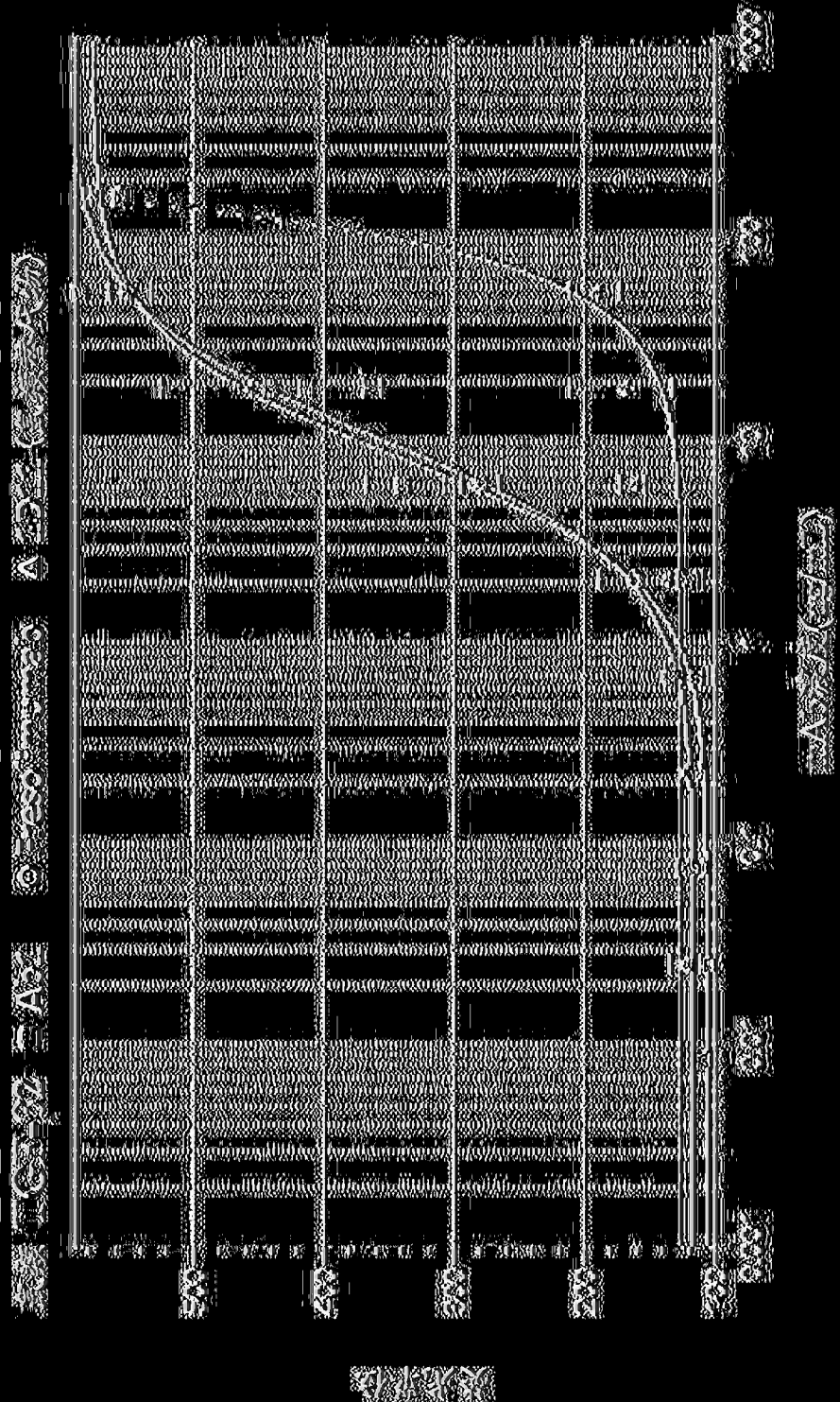
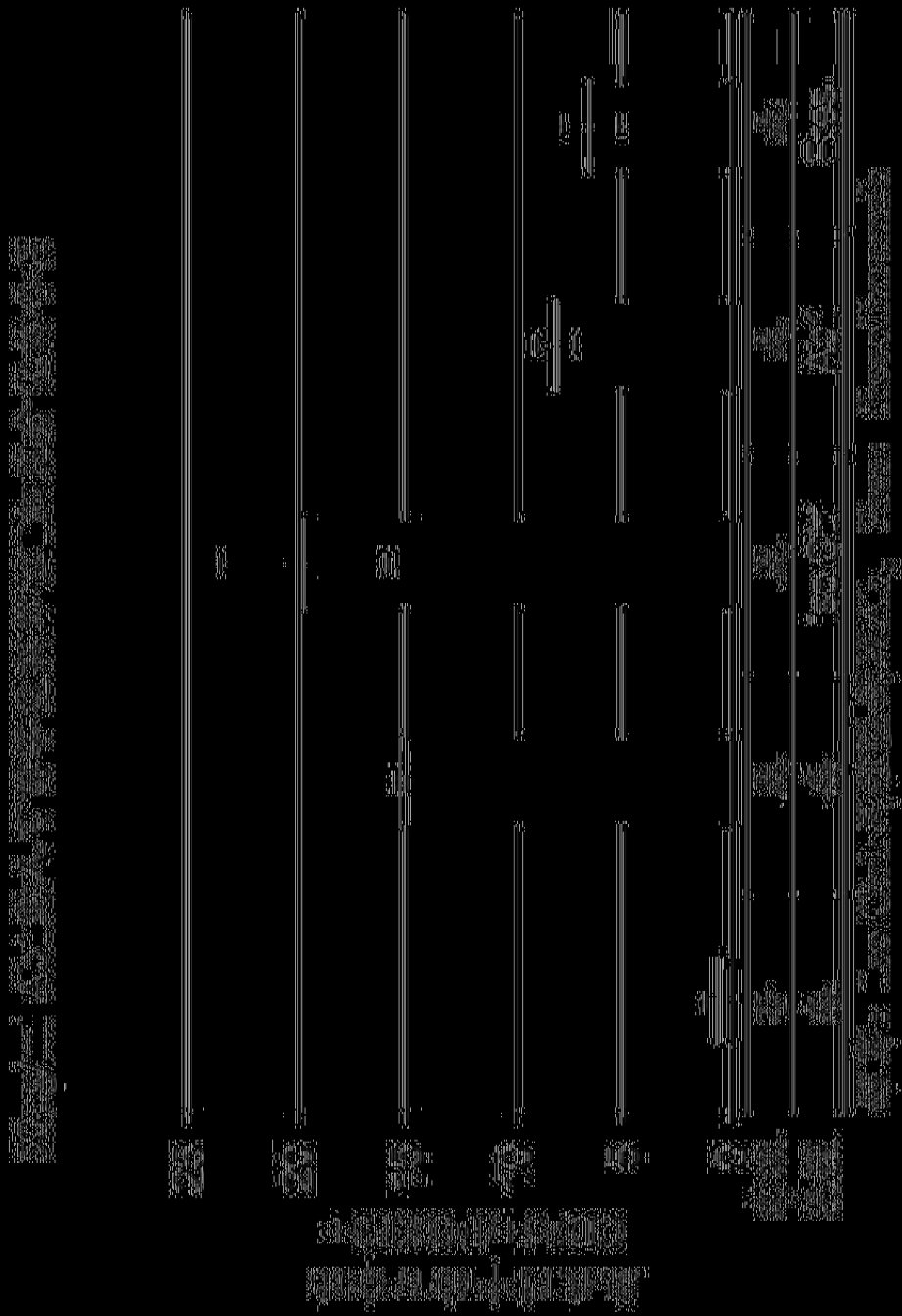


圖 1D

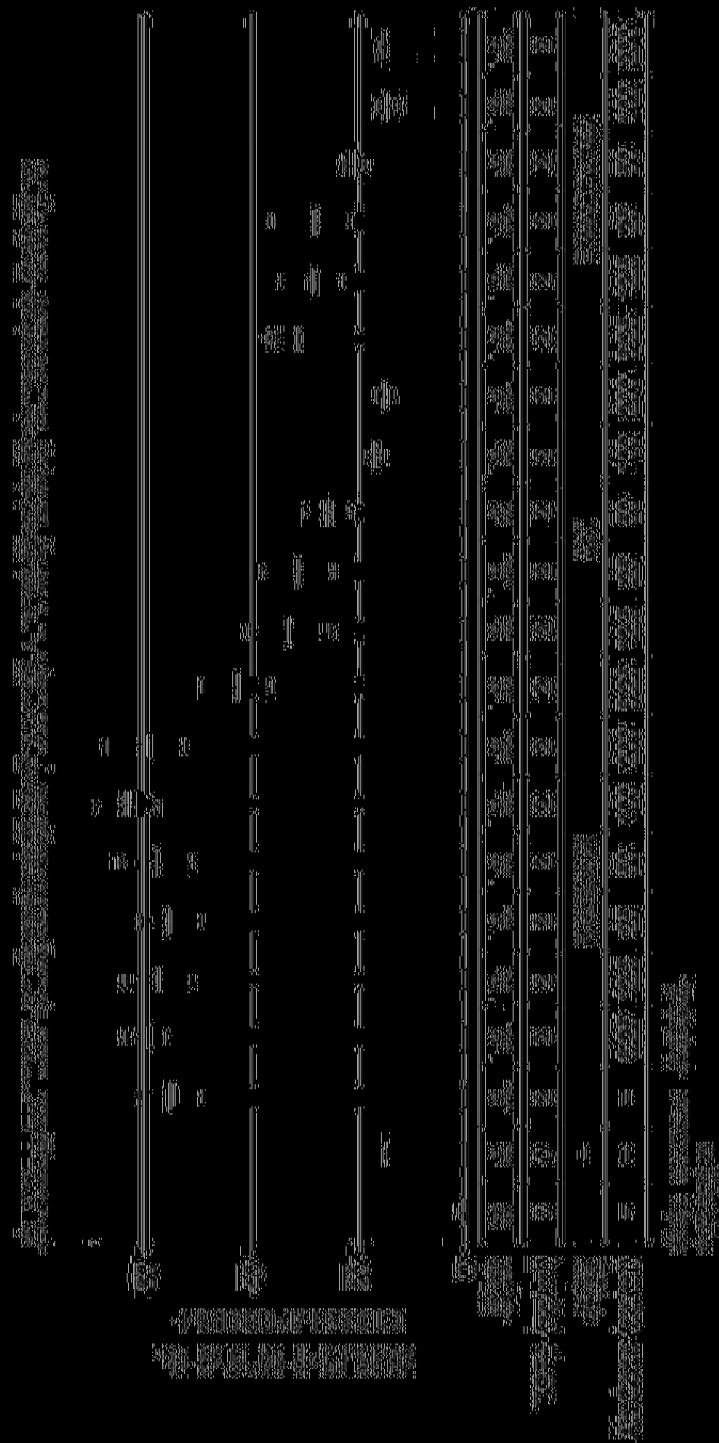
(圖 1D)

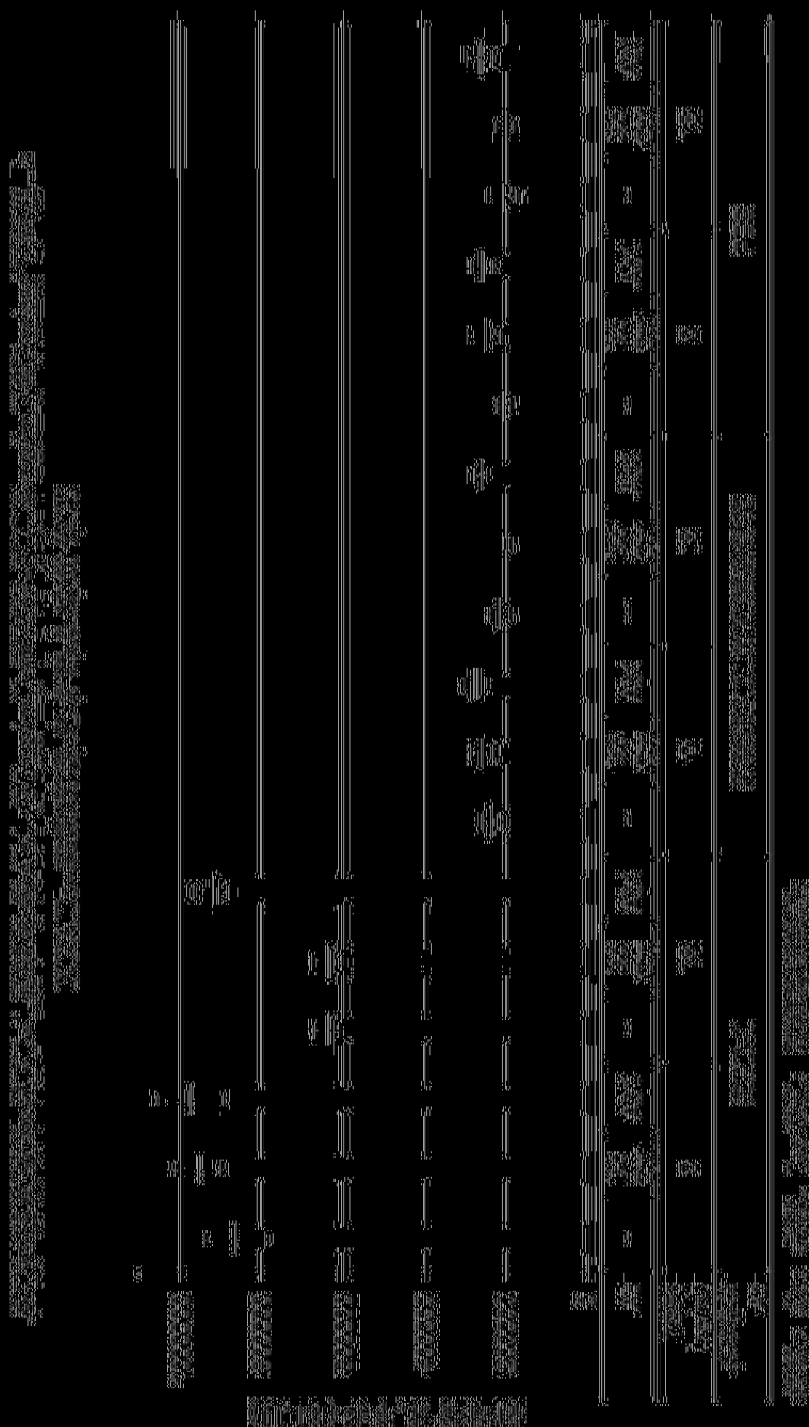


(圖113)

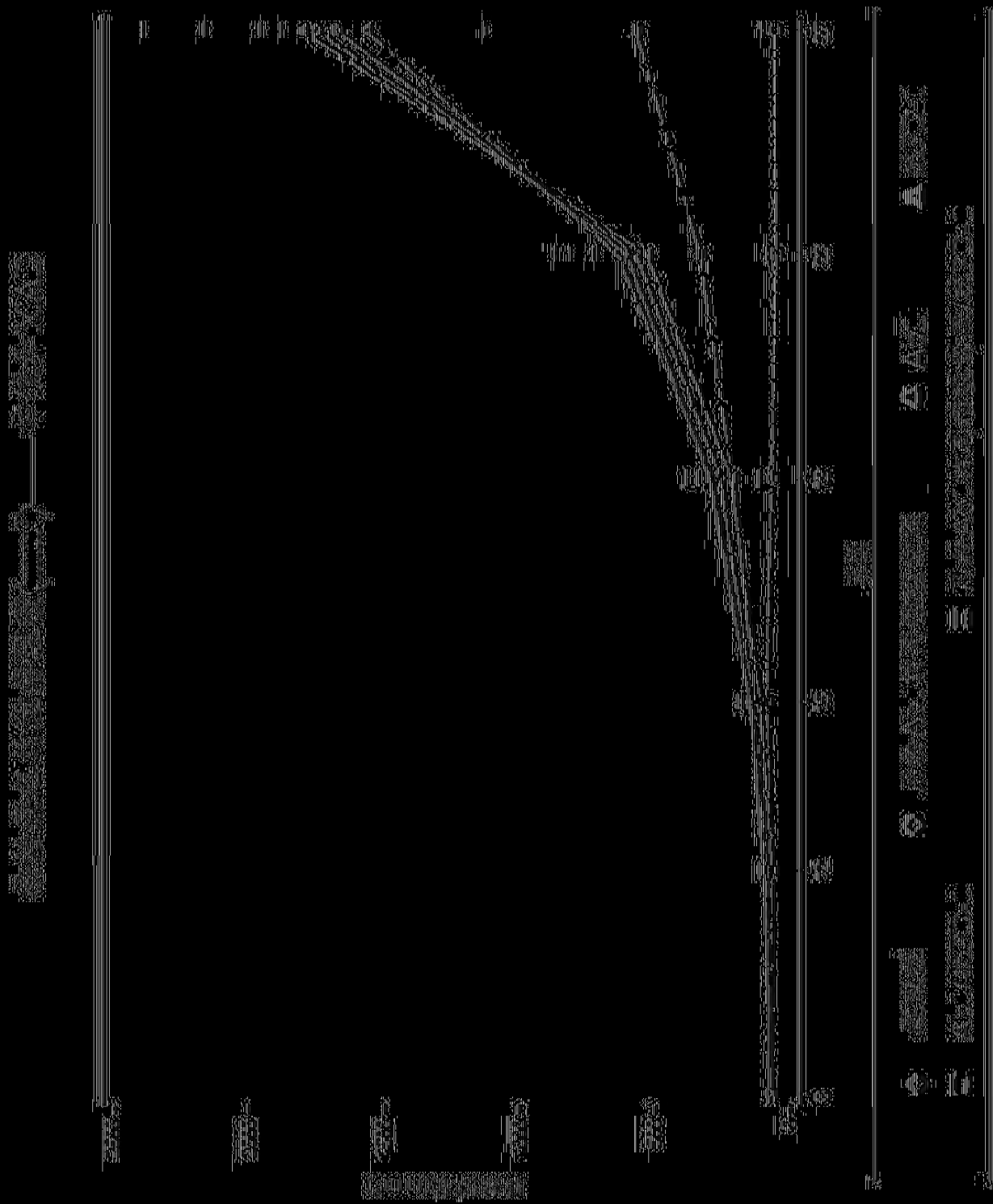


(圖2)

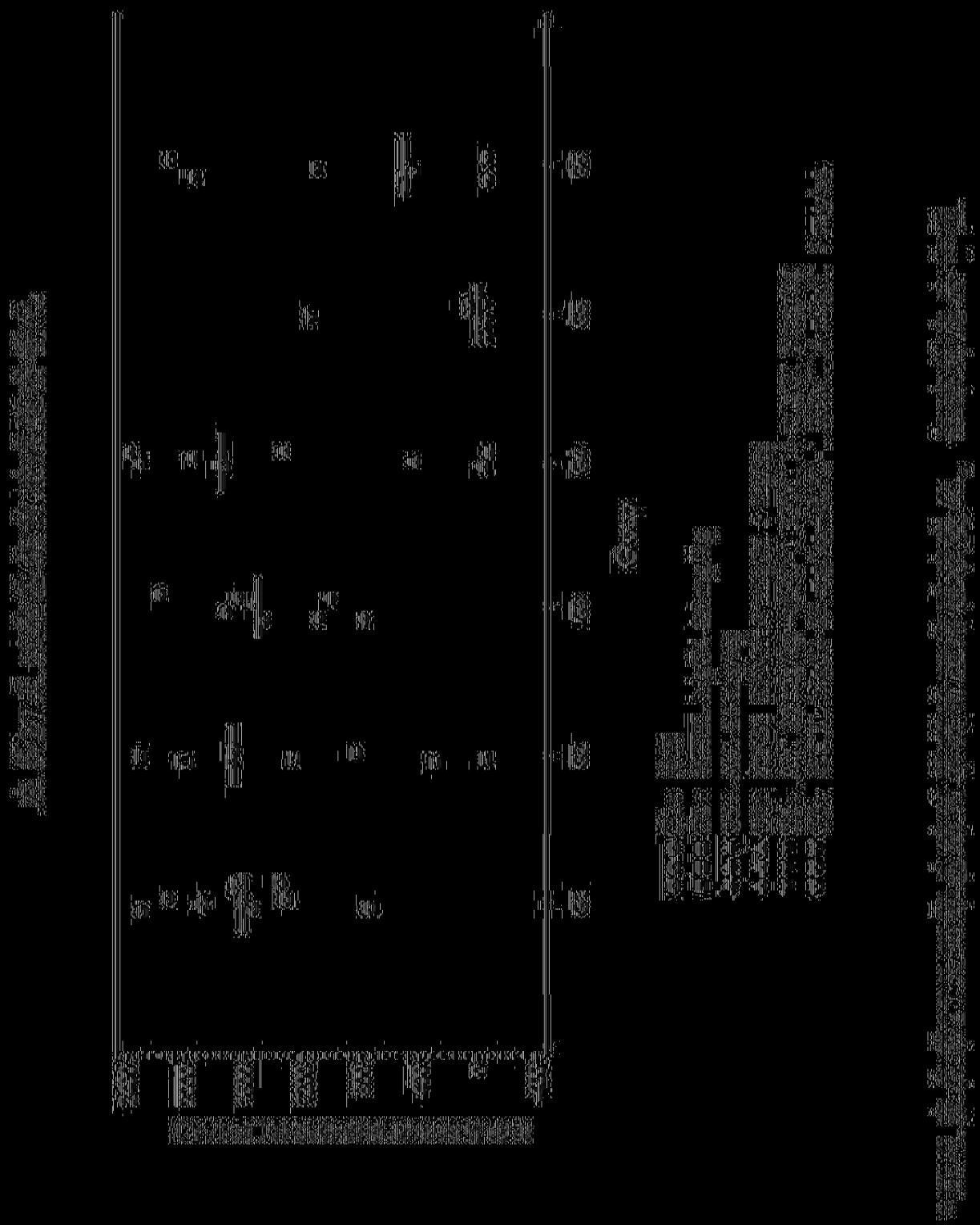

$$|(\llbracket \mathbf{R} \rrbracket 3)|$$



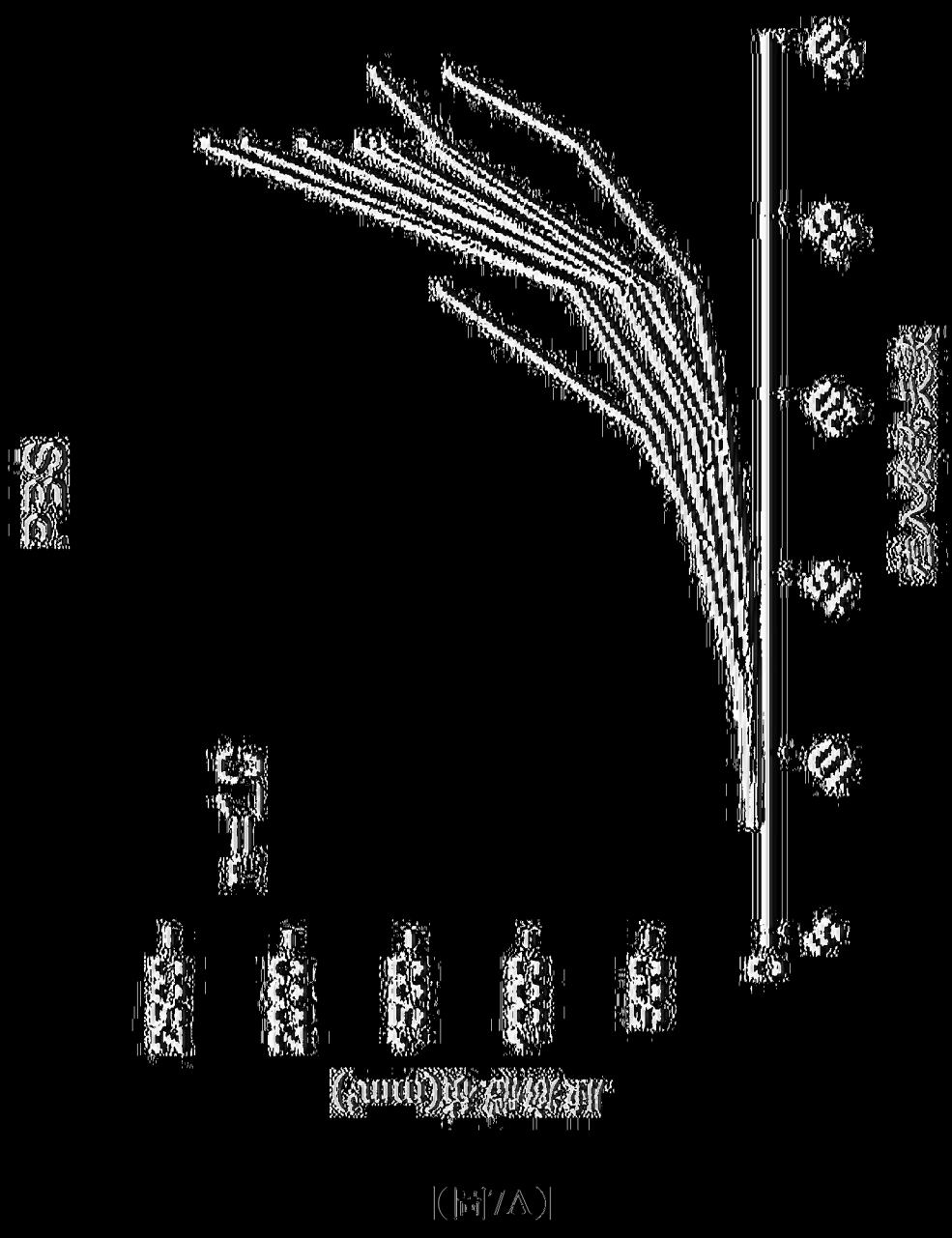
(圖4)

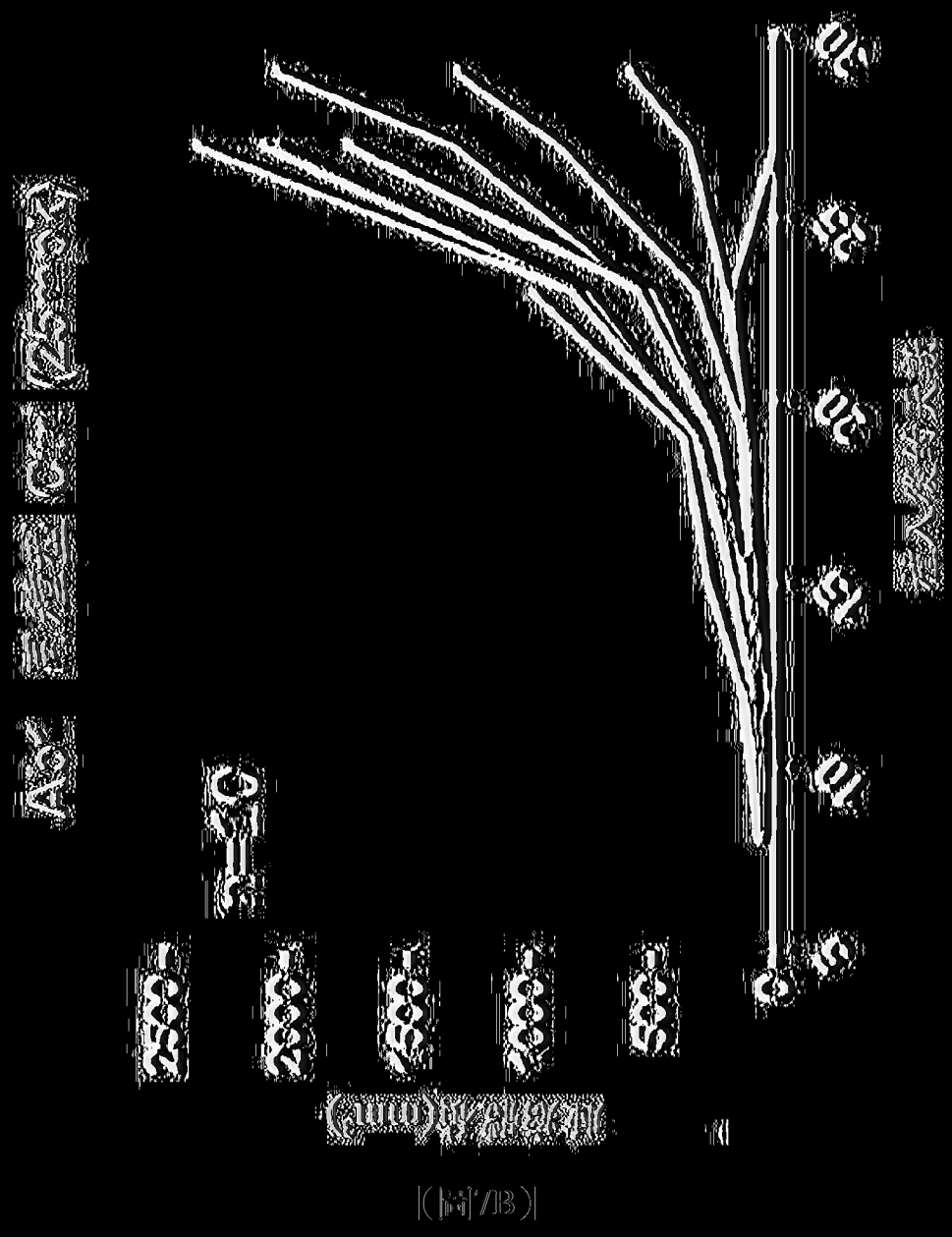


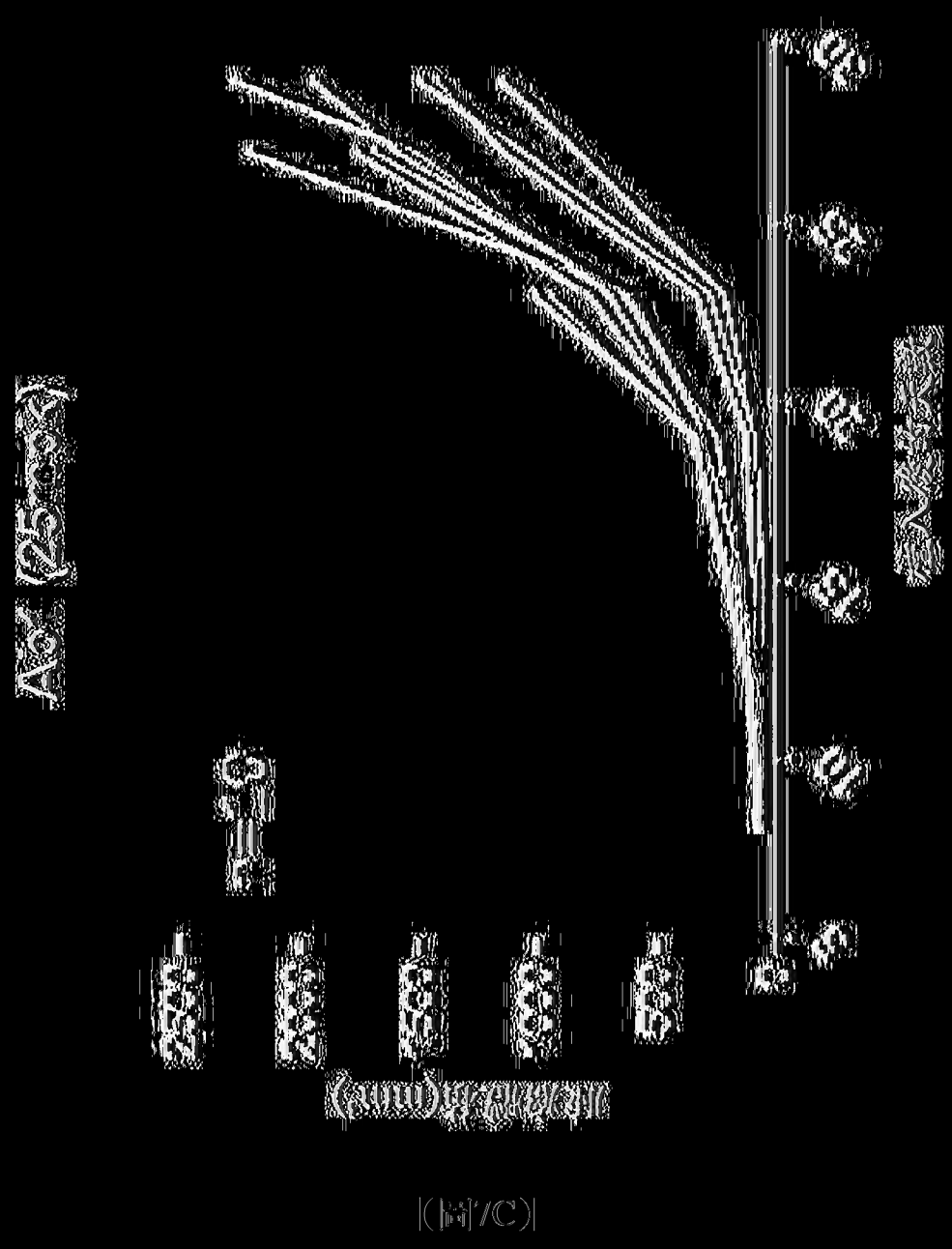
(同5)

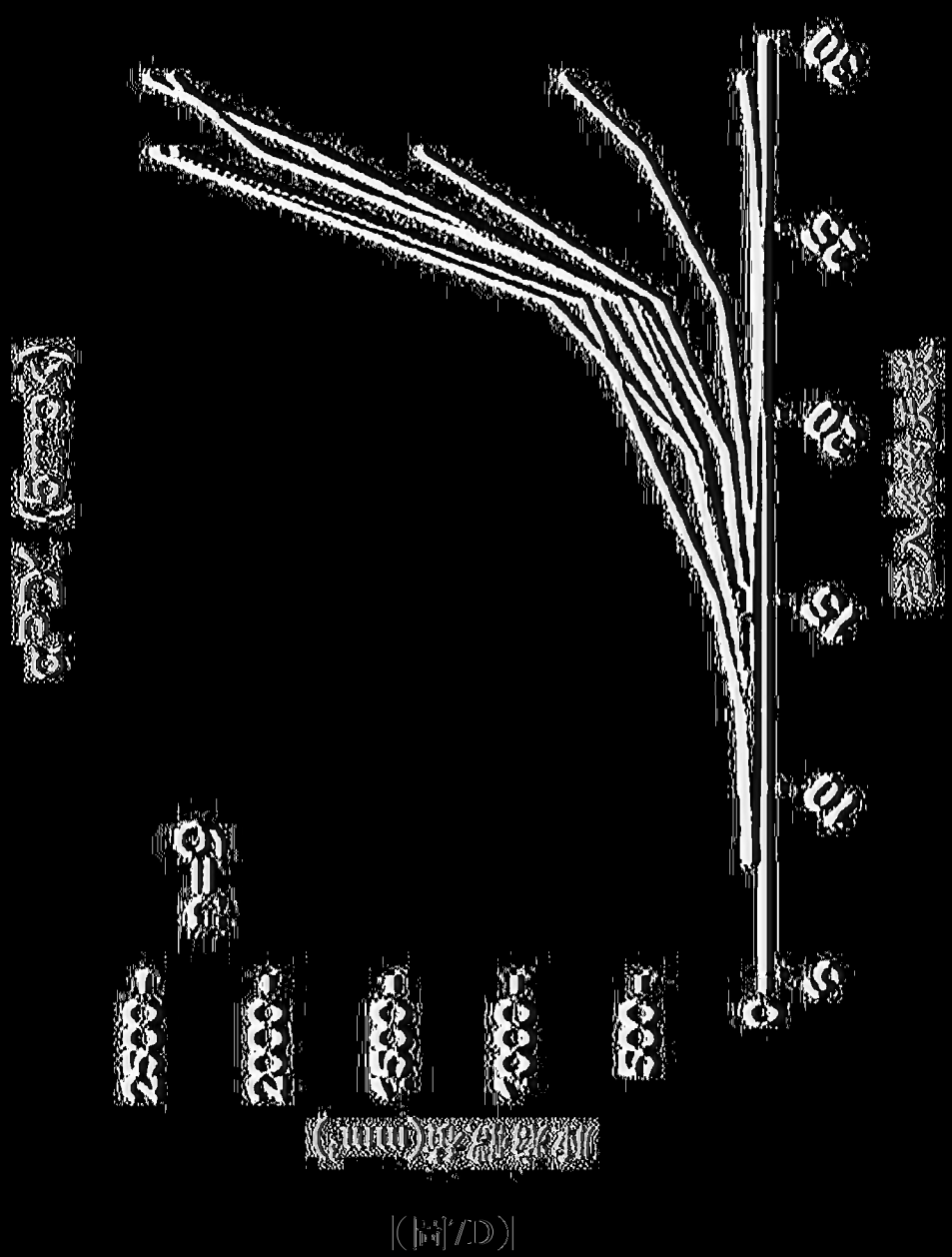


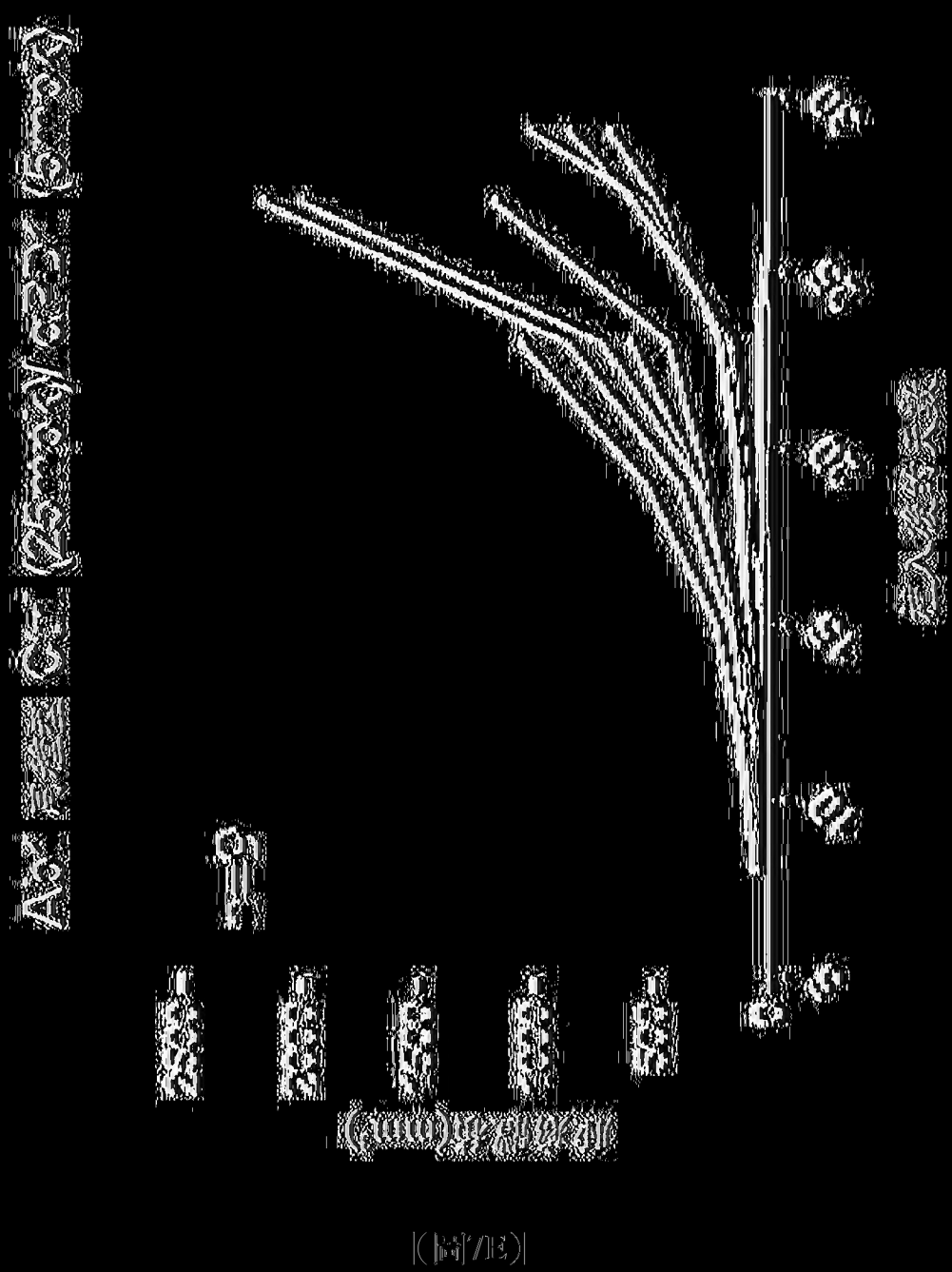
[(圖6)]



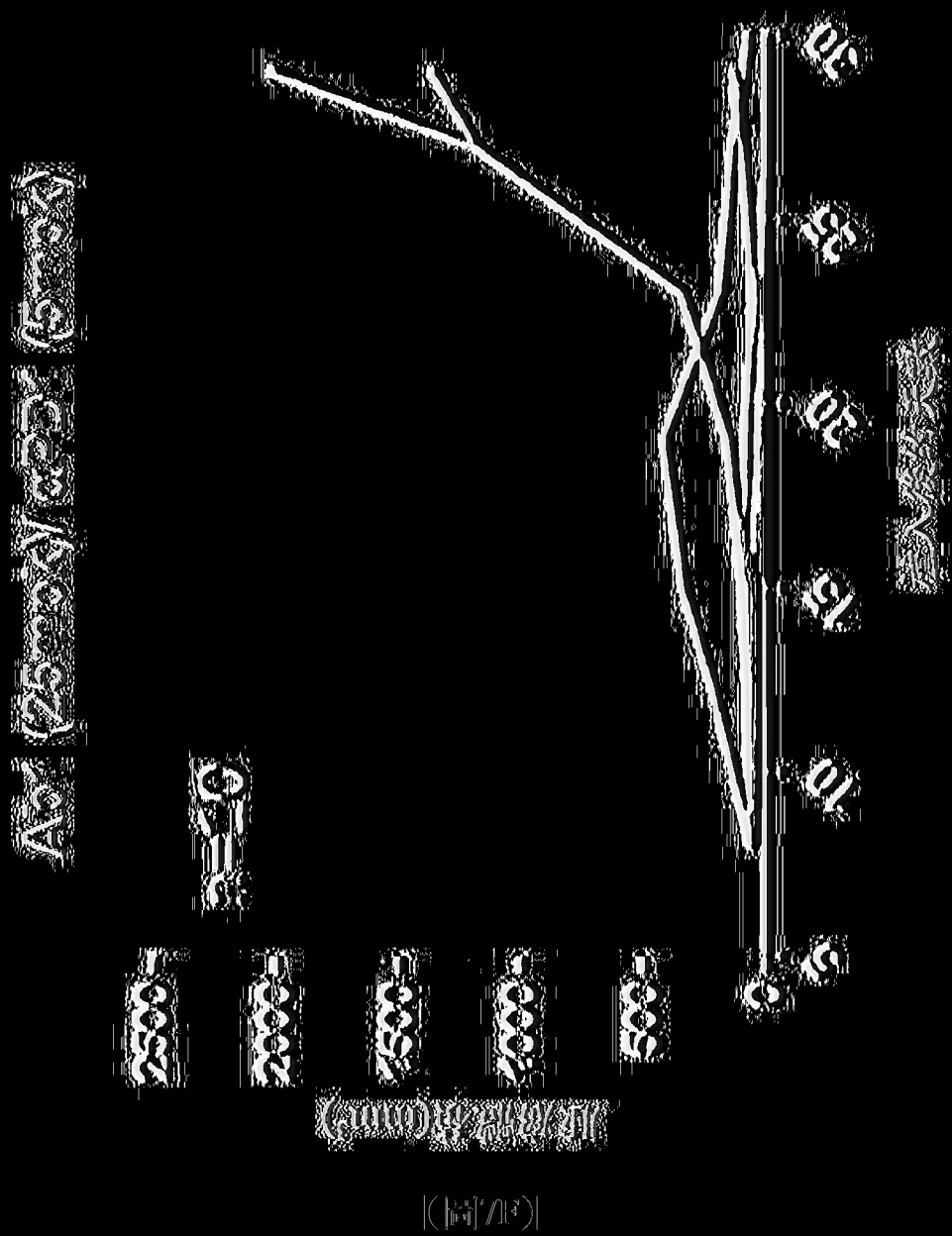


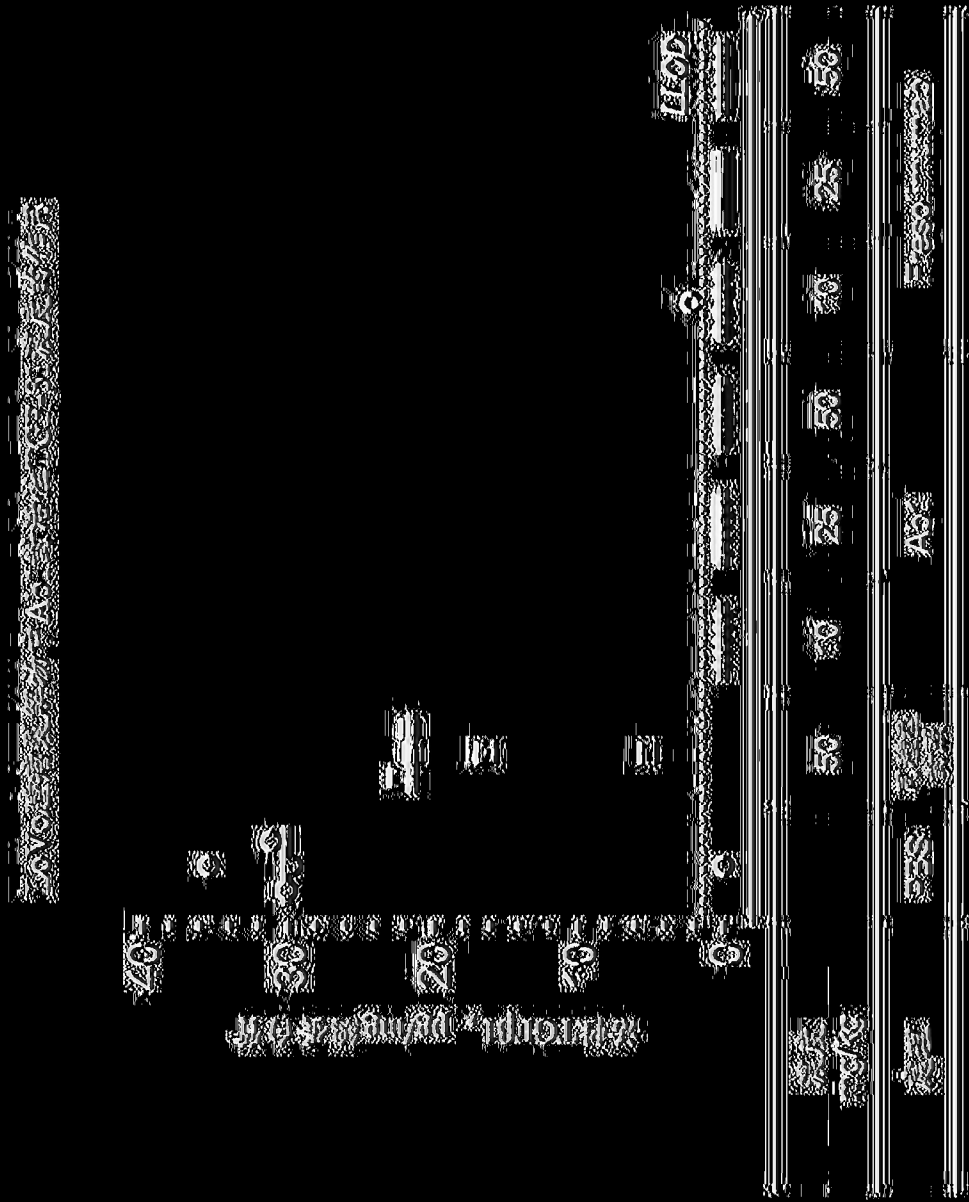




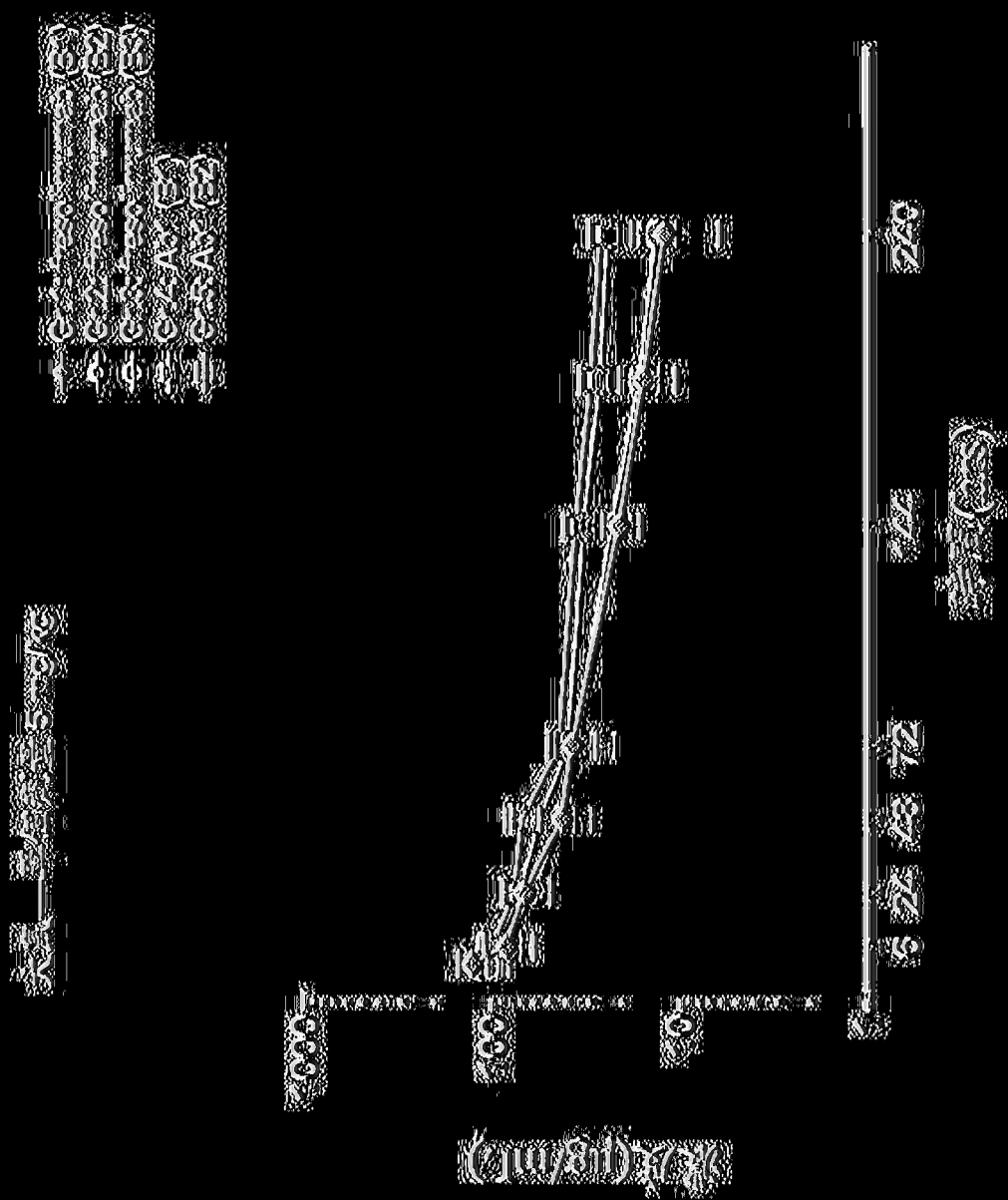


|(100)/11|

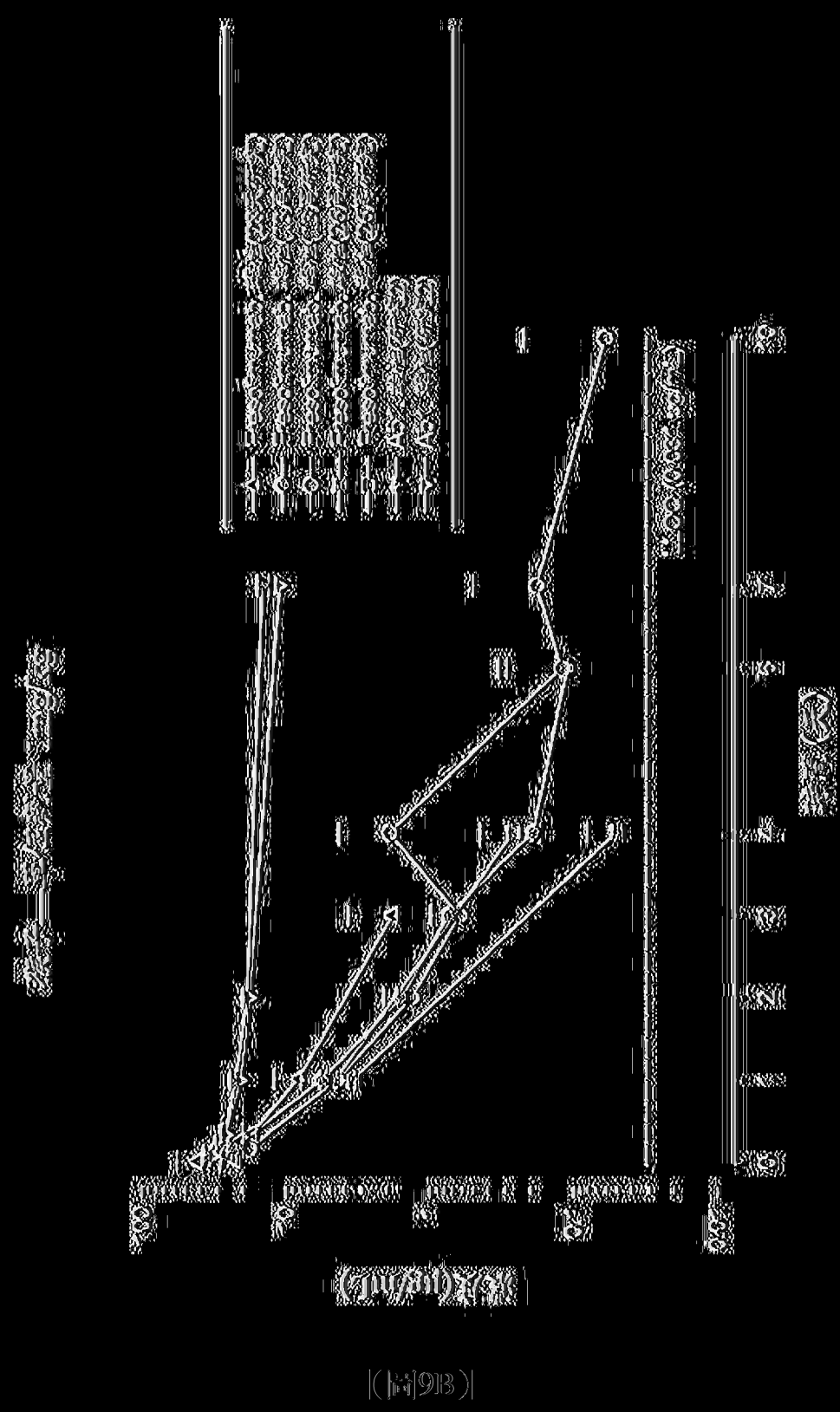


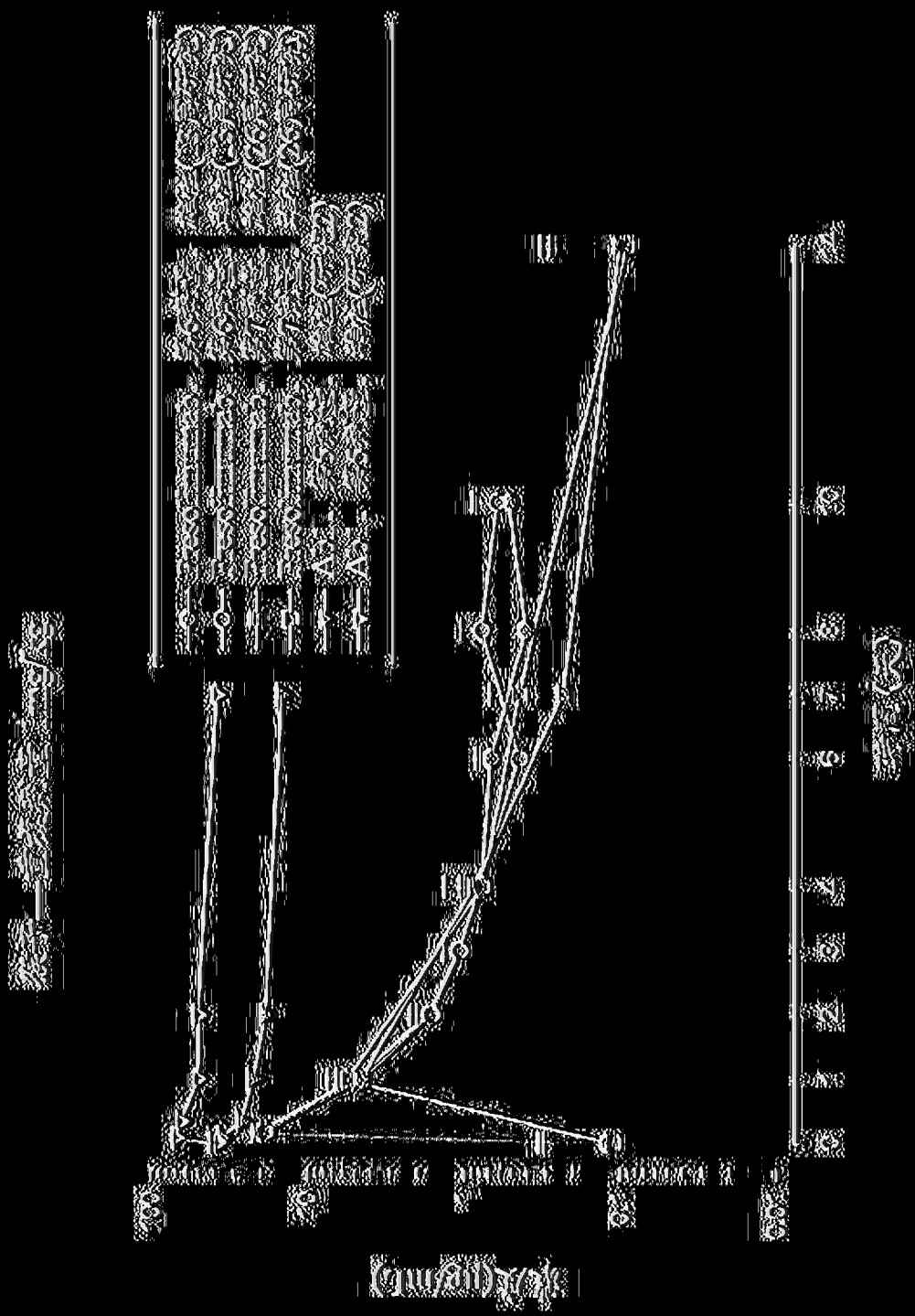


(圖8)



[(F9A)]





(圖) 2C

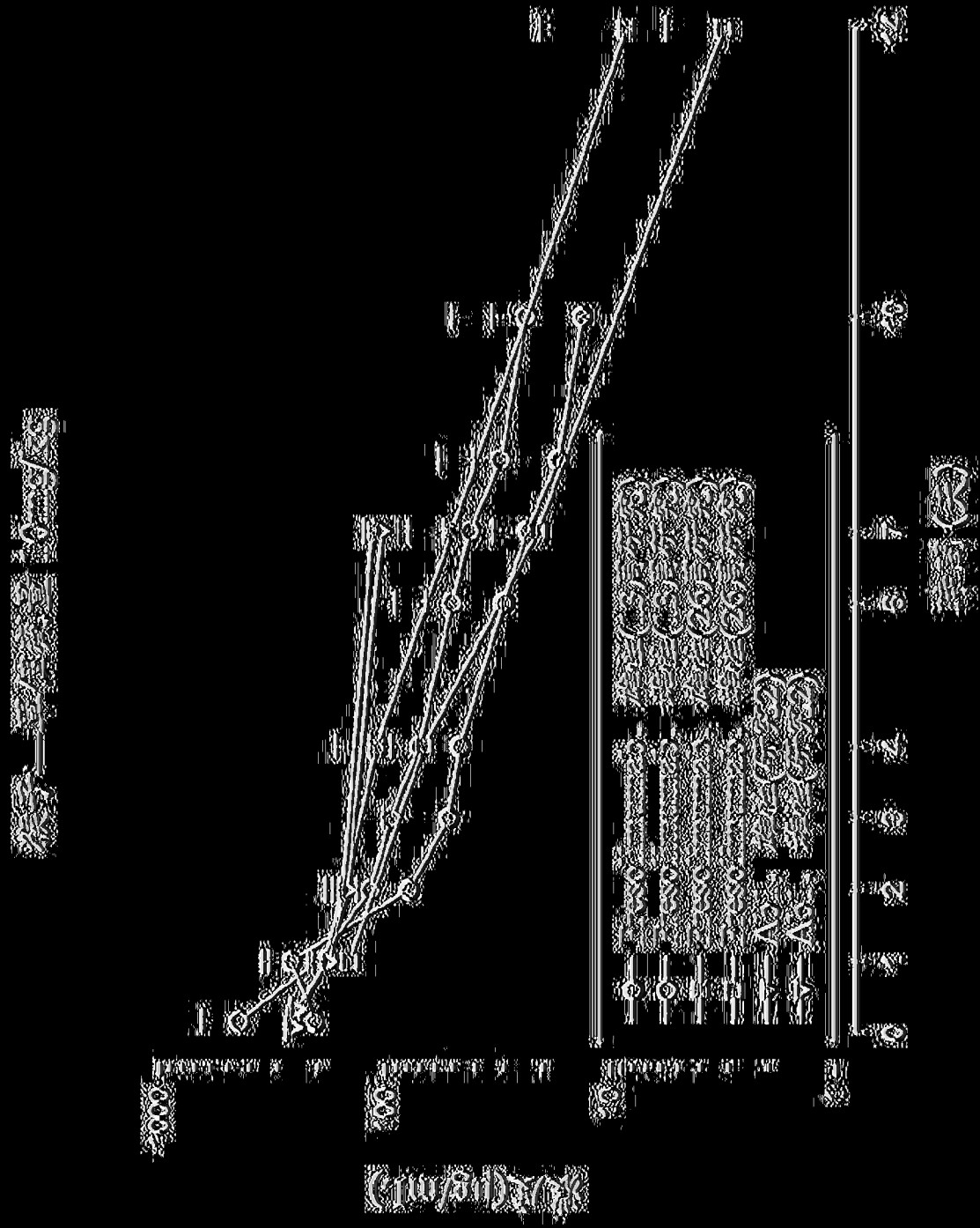
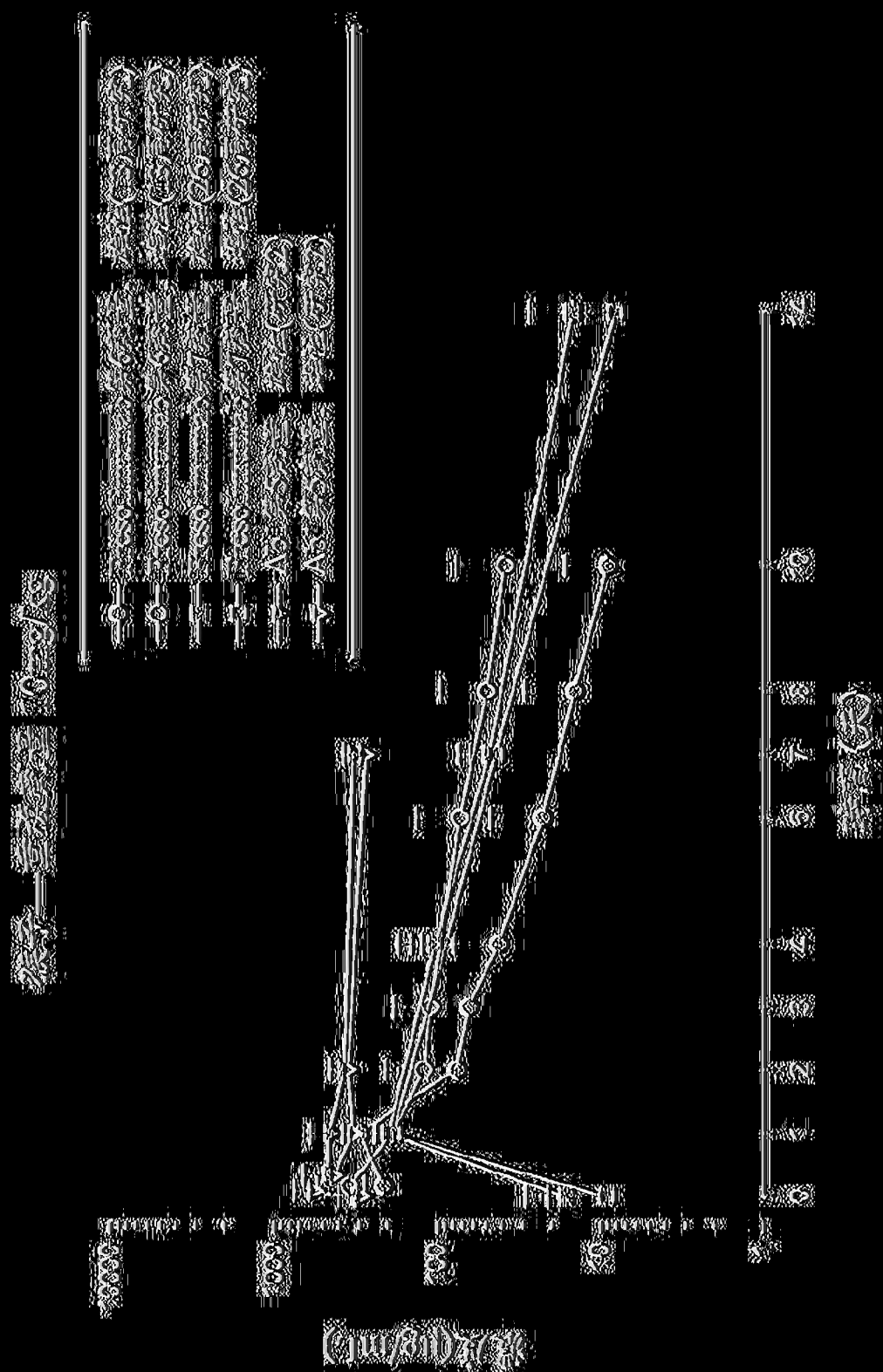
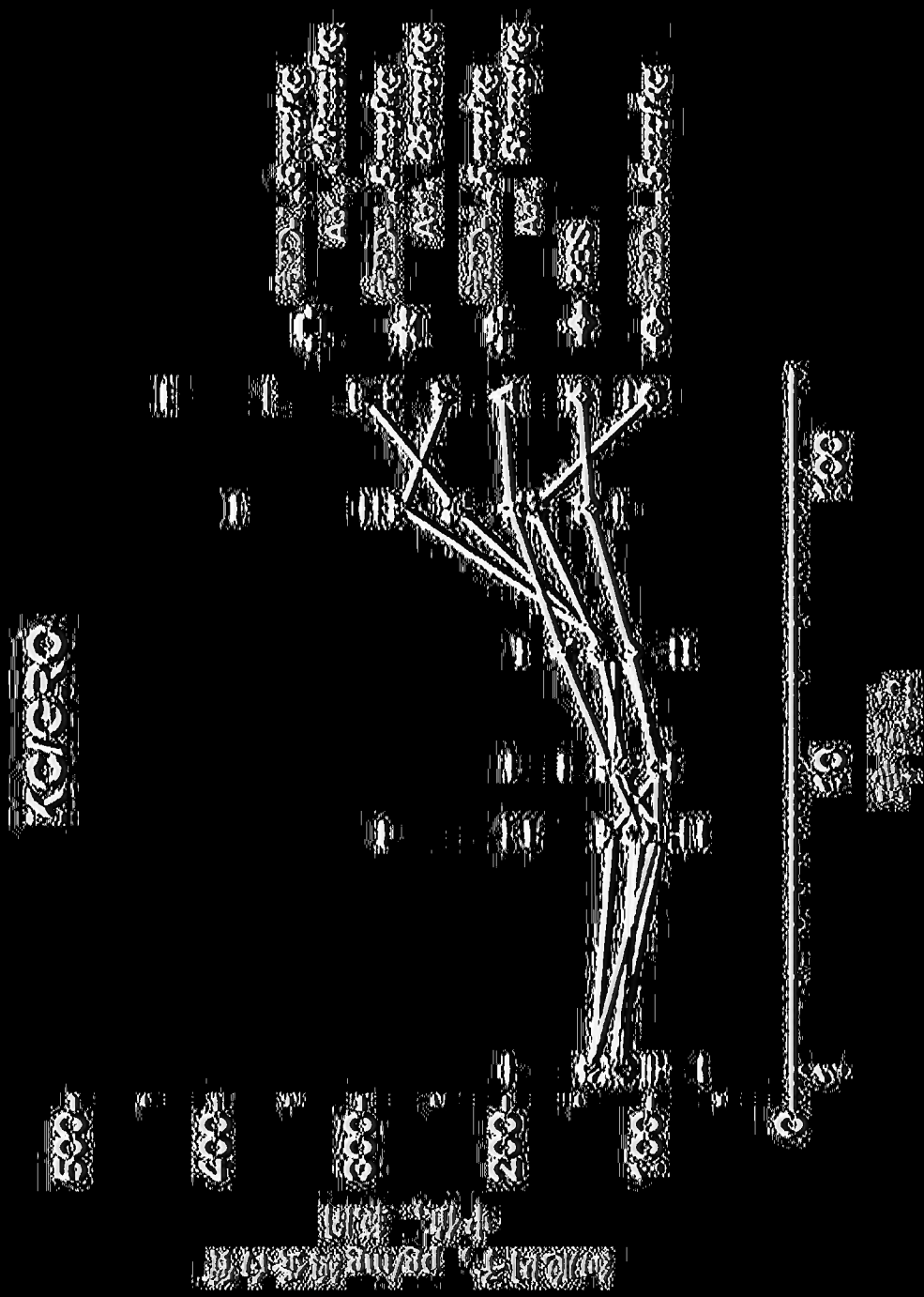


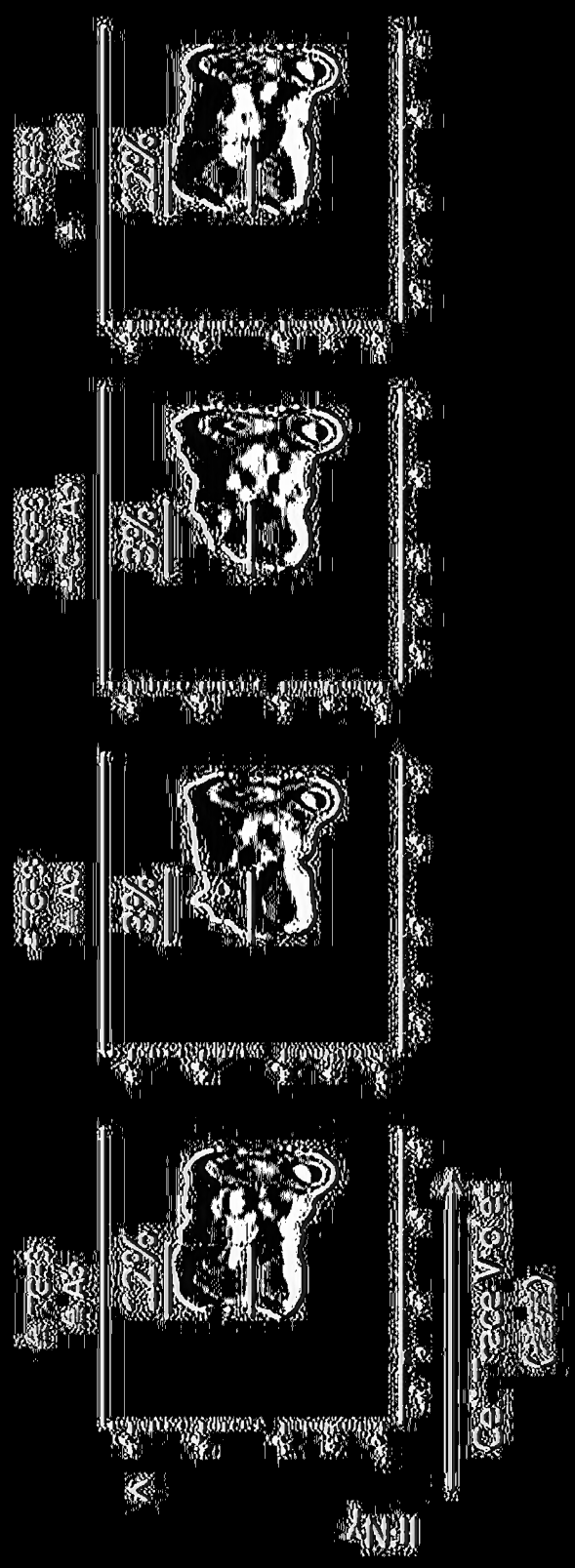
Figure 9D



[E-911]



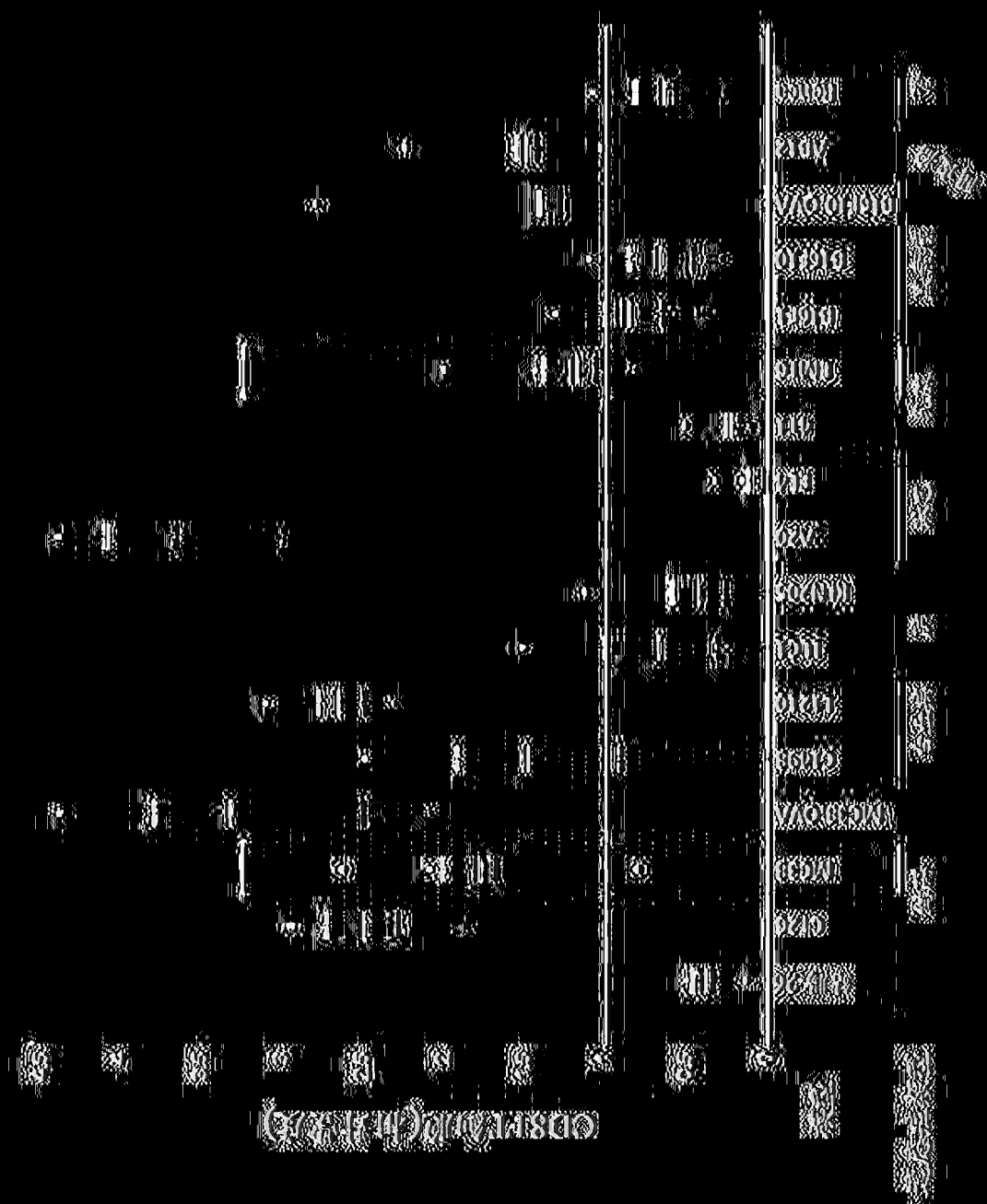
[(H)10C]



[(圖]11A)]



[(圖11B)]



[(圖12A)]

