

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 7 月 18 日 (18.07.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/149237 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/22 (2006.01) **A61K 38/18** (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/071321

(22) 国际申请日: 2024 年 1 月 9 日 (09.01.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202310027965.9 2023 年 1 月 9 日 (09.01.2023) CN
202310037692.6 2023 年 1 月 9 日 (09.01.2023) CN

(71) 申请人: 北京拓界生物医药科技有限公司(BEIJING TUO JIE BIOPHARMACEUTICAL CO. LTD.) [CN/CN]; 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。

(72) 发明人: 曹保华(CAO, Baohua); 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。何湘(HE, Xiang); 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。徐金敬(XU, Jinjing); 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。杜延平(DU, Yanping); 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。王宇(WANG, Yu); 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。刘潇(LIU, Xiao); 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。张晓谦(ZHANG, Xiaoqian); 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。李元元(LI, Yuanyuan); 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。申晨曦(SHEN, Chenxi); 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。

王雷(WANG, Lei); 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司(GE CHENG & CO., LTD); 中国北京市东城区东长安街1号东方广场东三办公楼10层, Beijing 100738 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: TGFβ1 BINDING MOLECULE, GARP-TGFβ1 BINDING MOLECULE AND MEDICAL USE THEREOF

(54) 发明名称: TGFβ1结合分子、GARP-TGFβ1结合分子及其医药用途

(57) Abstract: The present disclosure relates to a TGFβ1 binding molecule, a GARP-TGFβ1 binding molecule and a medical use thereof. In particular, the present disclosure relates to a TGFβ1 binding molecule, a GARP-TGFβ1 binding molecule, a pharmaceutical composition comprising same, a preparation method therefor and a medical use thereof. The present disclosure further relates to a method for treating and/or preventing diseases (e.g., tumors or cancer) by using the TGFβ1 binding molecule, the GARP-TGFβ1 binding molecule, and the pharmaceutical composition comprising same.

(57) 摘要: 涉及 TGFβ1 结合分子、GARP-TGFβ1 结合分子及其医药用途。具体涉及 TGFβ1 结合分子、GARP-TGFβ1 结合分子、包含其的药物组合物、其制备方法及其医药用途。还涉及使用所述的 TGFβ1 结合分子、GARP-TGFβ1 结合分子和包含其的药物组合物治疗和/或预防疾病(例如肿瘤或癌症)的方法。

WO 2024/149237 A1

TGFβ1 结合分子、GARP-TGFβ1 结合分子及其医药用途

本公开要求2023年01月09日提交的中国专利申请202310027965.9、以及2023年01月09日提交的中国专利申请202310037692.6的优先权，前述专利申请的全部内容通过引用并入本公开。

技术领域

本公开涉及生物医药领域，具体涉及TGFβ1结合分子、包含TGFβ1结合分子的药物组合物，及医药用途、制备方法，预防或治疗与TGFβ1信号通路相关的疾病的方法。

背景技术

TGFβ(Transforming growth factor β)是一类多效的生长因子，包括TGFβ1、TGFβ2和TGFβ3。它们调节许多重要的生理过程，如细胞生长、分化、增殖、凋亡和基质产生。研究发现，TGFβ在肿瘤发生的早期能够抑制肿瘤的生长，但是在肿瘤进展的晚期却促进肿瘤生长(Liu S, Ren J, Ten Dijke P. Signal Transduct Target Ther. 2021 Jan 8;6(1):8.)。TGFβ促进晚期肿瘤生长的一个重要机理是抑制肿瘤微环境的免疫细胞。其中，TGFβ1，而非TGFβ2和TGFβ3，是促进晚期肿瘤生长的关键因子(Constance J Martin, et al. Sci Transl Med. 2020 Mar 25;12(536):eaay8456.)。肿瘤细胞、调控T细胞(Treg)和抑制性的吞噬细胞等产生的TGFβ1能够直接促进Treg细胞的活性并抑制效应T细胞和抗原呈递细胞，从而达到抑制免疫的效果。

目前，肿瘤免疫检查点抑制剂抗PD-1(Programmed Cell Death-1)抗体在肿瘤的免疫治疗过程中取得了巨大的成功，但是患者的总应答率只有20%左右。抗TGFβ1抗体与抗PD-1抗体联用在EMT-6、MBT-2、Cloudman S91、CT26和MC38等肿瘤模型上能够显著克服肿瘤的免疫逃避，增强抗PD-1抗体的药效。然而，靶向成熟TGFβ1的pan-TGFβ抗体在实验中呈现出剂量依赖的体内毒性。靶向原/潜伏TGFβ1复合物从源头上抑制TGFβ1的产生，这比靶向成熟的TGFβ1在动物模型上具有更好的药效，并具有显著减少的毒性。

TGFβ1的产生受到多步过程的严密调控。TGFβ1前体蛋白中，其C末端的成熟TGF-β1结构域与N末端的称作潜伏相关肽(Latency Associated Peptide, LAP)的结构域保持共价或非共价结合。因为LAP阻止成熟TGF-β1与其受体结合，所以通常是无活性的。这样的TGFβ1前体蛋白还可以进一步与GARP、LRRC33、LTBP1、LTBP3等形成大的潜伏复合物。在肿瘤微环境中，GARP-TGFβ1主要由Treg和肿瘤细胞产生，LRRC33-TGFβ1主要由免疫抑制的吞噬细胞产生，而LTBP1-TGFβ1、LTBP3-TGFβ1主要存在于肿瘤基质中。目前，全球范围内尚未有针对TGFβ1前体蛋白或TGFβ1复合物的抗体上市。本领域仍需要能够与TGFβ1前体蛋白或TGFβ1

复合物高亲和力结合并能阻断其激活，用于对肿瘤、纤维化等TGFβ相关疾病的治疗。

发明内容

5 本公开提供 TGFβ1 结合分子，GARP-TGFβ1 结合分子，包含前述结合分子的药物组合物，及医药用途、制备方法，预防或治疗与 TGFβ 信号通路相关的疾病的方法，特别是预防或治疗癌症或肿瘤的方法。

TGFβ1 结合分子

10 第一方面，本公开提供 TGFβ1 结合分子，包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。

在一些实施方案中，所述 VH 包含 SEQ ID NO:11 所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和/或，所述 VL 包含 SEQ ID NO:12、21-35 中任一项所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

上述的 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的。

15 在一些具体的实施方案中，所述 CDR 是根据 Kabat 定义方案定义的。

在一些实施方案中，所述 CDR 还可以由其他编号系统定义，例如，根据 IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义。示例性的，以下提供根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的 SEQ ID NO:11 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，以及 SEQ ID NO: 35 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

20 表 1. SEQ ID NO:11 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3

	HCDR1	HCDR2	HCDR3
IMGT	GFTFSSYA (SEQ ID NO:113)	ISGSGGST (SEQ ID NO:117)	ARVDSSGGYWYFDL (SEQ ID NO:121)
Chothia	GFTFSSY (SEQ ID NO:114)	SGSGGS (SEQ ID NO:118)	VDSSGGYWYFDL (SEQ ID NO:15)
AbM	GFTFSSYAMS (SEQ ID NO:115)	AISGSGGSTY (SEQ ID NO:119)	VDSSGGYWYFDL (SEQ ID NO:15)
Contact	SSYAMS (SEQ ID NO:116)	WVSAISGSGGSTY (SEQ ID NO:120)	ARVDSSGGYWYFD (SEQ ID NO:122)
Kabat	SYAMS (SEQ ID NO:13)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:14)	VDSSGGYWYFDL (SEQ ID NO:15)

表 2. SEQ ID NO: 35 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3

	LCDR1	LCDR2	LCDR3
IMGT	QSIDY (SEQ ID NO:123)	TA	QQSYSTPLT (SEQ ID NO:18)
Chothia	RASQSIDYLN (SEQ ID NO:59)	TASYLDS (SEQ ID NO:40)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO:18)
AbM	RASQSIDYLN (SEQ ID NO:59)	TASYLDS (SEQ ID NO:40)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO:18)
Contact	SDYLNWY	LLIYTASYLD	QQSYSTPL

	(SEQ ID NO:124)	(SEQ ID NO:125)	(SEQ ID NO:126)
Kabat	RASQSIDYLN (SEQ ID NO:59)	TASYLDS (SEQ ID NO:40)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO:18)

在一些实施方案中，所述 TGFβ1 结合分子，包含如下所示 VH 和 VL：

所述 VH 包含 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和/或，
所述 VL 包含 SEQ ID NO:38、64、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

5 其中，SEQ ID NO:38 所示氨基酸序列为 RASQX₁ISX₂YLN，X₁ 选自 S、A、F、G、I、P、Y、V 或 K，X₂ 选自 S、D、E、P 或 H；

SEQ ID NO:64 所示氨基酸序列为 X₃ASX₄LX₅S，X₃ 选自 A、T、S 或 M，X₄ 选自 S、Y、A、E 或 G，X₅ 选自 Q、T、D 或 E。

10 在一些实施方案中，SEQ ID NO:38 所示氨基酸序列为 RASQX₁ISX₂YLN，X₁ 选自 F、Y 或 A，X₂ 选自 D 或 P；SEQ ID NO:64 所示氨基酸序列为 X₃ASX₄LX₅S，X₃ 选自 A、T 或 S，X₄ 选自 S、Y 或 E，X₅ 选自 Q、D 或 E。

在一些实施方案中，所述 TGFβ1 结合分子，其中：

所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示，

所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示，

15 所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示，

所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:16、36、39、41-42、44、46、49、52、54、56-59 任一项所示，

所述 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:17、37、40、43、45、47-48、50-51、53、55 任一项所示，和/或，

20 所述 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示。

在一些实施方案中，所述 TGFβ1 结合分子，其中，

a) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:59、40、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

25 b) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:36-37、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

c) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:39-40、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

d) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:41、40、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

30 e) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:42-43、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

f) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:44-45、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

g) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述

VL 包含 SEQ ID NO:46-47、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

h) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:46、48、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

j) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述
5 VL 包含 SEQ ID NO:49-50、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

k) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:46、51、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

l) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:52-53、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

10 m) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:54-55、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

n) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:56、53、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

o) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述
15 VL 包含 SEQ ID NO:57、45、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

p) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:58、50、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或，

q) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:16-18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

20 在一些实施方案中，所述 TGFβ1 结合分子，包含 VH 和 VL，其中：

所示 VH 中包含的任一 HCDR 与前述任一种 HCDR 相比，具有 0、1、2、3、4 或 5 个氨基酸突变；和/或，所示 VL 中包含的任一 LCDR 与前述任一种 HCDR 相比，具有 0、1、2、3、4 或 5 个氨基酸突变。

在一些具体的实施方案中，HCDR 或 LCDR 中的氨基酸突变为保守性取代。

25 在一些实施方案中，本公开提供的 TGFβ1 结合分子，其包含前述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3 中的任意一个或任意几个(例如，2、3、4、5 或 6)的组合。

在一些实施方案中，所述 TGFβ1 结合分子为抗 TGFβ1 抗体或其抗原结合片段。

30 在一些实施方案中，所述抗 TGFβ1 抗体或其抗原结合片段为鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人源抗体或前述任意一种的抗原结合片段。

在一些具体的实施方案中，抗 TGFβ1 抗体或其抗原结合片段为人源化抗体或其抗原结合片段，或者为人源抗体或其抗原结合片段。在一些具体的实施方案中，抗 TGFβ1 抗体或其抗原结合片段为人源抗体或其抗原结合片段。

35 在一些具体的实施方案中，抗 TGFβ1 抗体或其抗原结合片段是经亲和力成熟改造的。经亲和力成熟改造的抗 TGFβ1 抗体或其抗原结合片段包含位于 VH 和/或 VL 的一个或多个突变。示例性地，位于 VH 的突变包含如下任意一个或任意组

合的位置处的突变：99、100、53、56、58、31、33、95、100。示例性地，位于 VL 的突变包含如下任意一个或任意组合的位置处的突变：24、28、31、32、50、53、55、92、93、94。上述突变的位置根据 Kabat 编号规则编号。

在一些实施方案中，所述 TGFβ1 结合分子包含 VH 和 VL，其中，

5 所述 VH 包含如 SEQ ID NO:11 所示氨基酸序列，或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列；和/或，

所述 VL 包含如 SEQ ID NO:12、21-35 中任一项所示氨基酸序列，或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列。

10 在一些实施方案中，所述 TGFβ1 结合分子，包含 VH 和 VL，其中：所示 VH 中与前述任一种 VH 相比，具有 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸突变；和/或，所示 VL 与前述任一种 VL 相比，具有 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸突变。

在一些实施方案中，本公开提供的 TGFβ1 结合分子，其包含前述 VH、VL 中的任意一个或任意 2 个的组合。

15 在一些实施方案中，本公开提供的 TGFβ1 结合分子，其进一步包含免疫球蛋白 Fc 区。在一些实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 区来源于 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或前述任一种的变体。在一些实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 区来源于人 IgG4 或其变体。在一些实施方案中，人 IgG4 变体中包含降低或消除 Fc 效应功能的突变。示例性地，人 IgG4 变体中包含突变 S228P。上述突变的位点根据 EU 编号规则编号。

20 在一些实施方案中，所述 TGFβ1 结合分子，其进一步包含轻链恒定区和/或重链恒定区。

在一些实施方案中，轻链恒定区来源于 κ 轻链、λ 轻链或前述任一种的变体。在一些实施方案中，轻链恒定区来源于人 κ 轻链、人 λ 轻链或前述任一种的变体。

25 在一些具体的实施方案中，轻链恒定区来源于人 κ 轻链或其变体。

在一些具体的实施方案中，轻链恒定区来源于鼠 κ 轻链或其变体。

在一些具体的实施方案中，轻链恒定区包含如 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列，或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列。

30 在一些实施方案中，重链恒定区来源于 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或前述任一种的变体。在一些实施方案中，重链恒定区来源于人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3、人 IgG4 或前述任一种的变体。

在一些具体的实施方案中，重链恒定区来源于人 IgG4 或其变体。

35 在一些具体的实施方案中，人 IgG4 变体中包含降低或消除 Fc 效应功能的突变。示例性地，人 IgG4 变体中包含突变 S228P。上述突变的位点根据 EU 编号规则编号。

在一些具体的实施方案中，重链恒定区来源于鼠 IgG2 或其变体。

在一些具体的实施方案中,鼠 IgG2 变体中包含降低或消除 ADCC 效应的突变。示例性地,鼠 IgG2 变体中包含至少一种如下所示突变:L234A/L235E/G237A/D327Q/A330S/P331S。上述突变的位点根据 EU 编号规则编号。

- 5 在一些实施方案中,免疫球蛋白 Fc 区是效应器功能降低或消除的 Fc 区,例如,具有降低或去除 ADCC 效应的突变。示例性地,降低或消除 ADCC 效应的突变包含如下至少一种:

L234A/L235E/G237A/D327Q/A330S/P331S(IgG2a); N297A 或 N297Q(IgG1);
L234A/L235A(IgG1) ; V234A/G237A(IgG2) ; L235A/G237A/E318A(IgG4) ;
10 H268Q/V309L/A330S/A331S(IgG2) ; C220S/C226S/C229S/P238S(IgG1) ;
C226S/C229S/E233P/L234V/L235A(IgG1) ; L234F/L235E/P331S(IgG1) ; 或
S267E/L328F(IgG1)。上述突变的位置根据 EU 编号规则编号。

在一些具体的实施方案中,重链恒定区包含如 SEQ ID NO:20 所示氨基酸序列,或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列。

- 15 在一些实施方案中,所述 TGFβ1 结合分子,其包含重链和轻链,其中:

所述重链包含如 SEQ ID NO:66 所示的氨基酸序列,或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列;和/或,

所述轻链包含如 SEQ ID NO:65、67-81 中任一项所示的氨基酸序列,或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列。

- 20 在一些实施方案中,所述 TGFβ1 结合分子,其包含重链和轻链,其中:

所述重链包含如 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列,或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列;和/或,

所述轻链包含如 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列,或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列。

- 25 在一些实施方案中,所述 TGFβ1 结合分子,包含重链和轻链,其中:所示重链与前述任一种重链相比,具有 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸突变;和/或,所示轻链与前述任一种轻链相比,具有 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸突变。

在一些具体的实施方案中,重链和/或轻链上的氨基酸突变未保守性取代。

- 30 在一些实施方案中,本公开的 TGFβ1 结合分子,其包含前述重链、轻链中的任意一个或任意 2 个的组合。

在本公开的上下文中,“至少 80%”涵盖 80%及以上,例如至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少
35 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%,以及任意两者之间的数值范围。

在一些实施方案中，前述 TGFβ1 结合分子与 TGFβ1 前体蛋白或 TGFβ1 复合物特异性结合。

在一些实施方案中，TGFβ1 复合物中的 TGFβ1 以 TGFβ1 前体蛋白存在。

在一些实施方案中，TGFβ1 复合物包含如下任一种：

- 5 (2) LTBP1-TGFβ1 复合物，
- (3) LTBP3-TGFβ1 复合物，
- (4) LRRC33-TGFβ1 复合物，
- (5) GARP-TGFβ1 复合物。

如本公开所使用，“TGFβ1”或“TGFβ1 蛋白”以广泛的含义理解，包含转化生长因子-β1(TGFβ1)蛋白的原蛋白形式(又称，原 TGFβ1(pro-TGFβ1))或潜伏形式(潜伏 TGFβ1(latent TGFβ1))，或经释放后的成熟 TGFβ1。

在一些实施方案中，本公开中所使用的“TGFβ1”或“TGFβ1 蛋白”是指“TGFβ1 前体蛋白”。

在一些实施方案中，TGFβ1 前体蛋白包含：(i)成熟 TGFβ1 结构域，(ii)潜能相关肽(LAP)。

示例性地，TGFβ1 前体蛋白是原 TGFβ1 或潜伏 TGFβ1。原 TGFβ1 中成熟 TGFβ1 结构域与潜能相关肽(latency-associated peptides, LAPs)共价结合，潜伏 TGFβ1 中成熟 TGFβ1 结构域与潜能相关肽(latency-associated peptides, LAPs)非共价结合。

在本公开中，“原 TGFβ1”或“潜伏 TGFβ1”可以互换地使用。

在翻译过程中，潜伏 TGFβ1(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)，包括，例如，与 GARP 形成 GARP-TGFβ1 复合物。在 GARP-TGFβ1 复合物中存在的 TGFβ1 可以为潜伏形式(潜伏 TGFβ1)或前体形式(原 TGFβ1)。

在一些实施方案中，所述 TGFβ1 前体蛋白或 TGFβ1 复合物还包含前述任意蛋白或蛋白复合物的蛋白片段、功能变体等。

示例性地，“片段”、“蛋白片段”包括但不限于：生长因子结构域(growth factor domains)、N-末端前结构域(N-terminal prodomain)、潜伏相关肽(latency-associated peptides, LAPs)、LAP 样结构域(LAP-like domains)、直夹克区域(straight jacket regions)、紧固件区域(fastener regions)、弗林蛋白酶切位点(furin cleavage site regions)、手臂区域(arm regions)、手指区域(fingers regions)、潜伏环(latency loops)、α₁螺旋区域(alpha 1 helical regions)、α₂螺旋区域(alpha 2 helical regions)、RGD 序列区(RGD sequence regions)、触发环区(trigger loop regions)、胞外结构域、跨膜结构域、胞内结构域等。

示例性地，“变体”、“功能变体”是指包含一个或几个氨基酸的取代、缺失和/或添加的氨基酸，且具有相当的生物活性的蛋白或蛋白复合物。

示例性地，TGFβ1 前体蛋白的变体包含相对于 SEQ ID NO: 6 所示氨基酸序

列按自然计数第 4 位氨基酸突变。在一些实施方案中，TGFβ1 前体蛋白的变体包含突变 C4S，所述突变的位点是相对于 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列按自然计数的位点。

5 在一些实施方案中，所述 TGFβ1 复合物是由 TGFβ1 前体蛋白与其他种类的蛋白或其蛋白片段、功能变体形成的复合物，例如，与 LTBP1S、LTBP4、fibrillin-1、fibrillin-2、fibrillin-3、fibrillin-4 等形成的复合物。

在一些实施方案中，TGFβ1 前体蛋白包含如 SEQ ID NO:1、3、6-7、9-10 任一项所示的氨基酸序列，或与之具有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列。

10 示例性地，TGFβ1 复合物是 GARP-TGFβ1 复合物，其包含 GARP 和 TGFβ1 前体蛋白；其中：

GARP 包含如 SEQ ID NO:2、4、5、8、100、103 任一项所示的氨基酸序列，或与之具有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列；

和/或，TGFβ1 蛋白包含如 SEQ ID NO:1、3、6-7、9-10 任一项所示的氨基酸序列，或与之具有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列。

15 在一些实施方案中，TGFβ1 结合分子是抗 TGFβ1 抗体或其抗原结合片段，其与 TGFβ1 前体蛋白或 TGFβ1 复合物的抗原表位特异性结合。在一些实施方式中，抗 TGFβ1 抗体或其抗原结合片段不阻止 TGFβ1 与整联蛋白结合。例如，在一些实施方式中，抗 TGFβ1 抗体或其抗原结合片段不掩蔽 TGFβ1 的整联蛋白结合位点。

20 在一些实施方案中，TGFβ1 结合分子以 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M 或更低的 K_D 结合 TGFβ1 前体蛋白或 TGFβ1 复合物(例如，LTBP1-TGFβ1 复合物、LTBP3-TGFβ1 复合物、LRRC33-TGFβ1 复合物、GARP-TGFβ1 复合物等)。在一些实施方案中，TGFβ1 复合物中包含所述 TGFβ1 前体蛋白。

25 在一些实施方式中，TGFβ1 结合分子与 TGFβ2 蛋白或 TGFβ2 复合物不结合或极微弱结合。示例性地，抗 TGFβ1 抗体或其抗原结合片段不与如下至少一种特异性结合或极弱地结合：成熟 TGFβ2、TGFβ2 前体蛋白、GARP-TGFβ2 复合物、LTBP-TGFβ2 复合物等。

30 在一些实施方式中，TGFβ1 结合分子与 TGFβ3 蛋白或 TGFβ3 复合物不结合或极微弱结合。示例性地，抗 TGFβ1 抗体或其抗原结合片段不与如下至少一种特异性结合或极弱地结合：成熟 TGFβ3、TGFβ3 前体蛋白、GARP-TGFβ3 复合物、LTBP-TGFβ3 复合物等。

在本公开中，“TGFβ2 蛋白”应作广义理解，其范围覆盖成熟 TGFβ2，以及 pro-TGFβ2、latent TGFβ2 等非活性的前体蛋白形式。“pro-TGFβ2”与“latent TGFβ2”可以互换地使用。

35 在本公开中，“TGFβ3 蛋白”应作广义理解，其范围覆盖成熟 TGFβ3，以及 pro-TGFβ3、latent TGFβ3 等非活性的前体蛋白形式。“pro-TGFβ3”与“latent TGFβ3”可以互换地使用。

在一些实施方案中,本公开的 TGFβ1 结合分子抑制 TGFβ1 活性。例如, TGFβ1 结合分子与 TGFβ1 前体蛋白(原/潜伏 TGFβ1)或 TGFβ1 复合物(例如, GARP-TGFβ1 复合物, LTBP1-TGFβ1 复合物, LTBP3-TGFβ1 复合物, LRRC33-TGFβ1 复合物)结合,进而选择性抑制 TGFβ1 的活性(例如,抑制 TGFβ1 的激活,和/或抑制成熟 TGFβ1 的释放;和/或,抑制 TGFβ1 信号转导)。并且,选择性不抑制 TGFβ2 和/或 TGFβ3 的活性,例如,选择性抑制 TGFβ1 的激活,但不抑制 TGFβ2 和/或 TGFβ3 的激活。其中, TGFβ1 复合物中的 TGFβ1 以 TGFβ1 前体蛋白形式存在。

在一些实施方案中,本公开的 TGFβ1 结合分子具有改善的安全性(例如,降低的体内毒性和/或不良反应)。

在一些实施方案中,本公开的 TGFβ1 结合分子还具有至少一种如下所示特性:抑制调节性 T(T_{reg})细胞的免疫抑制活性,抑制肿瘤生长,抑制纤维化。

在一些实施方案中, TGFβ1 结合分子是抗 TGFβ1 抗体或其抗原结合片段,进一步为 Fab、Fv、sFv、Fab'、F(ab')₂、线性抗体、单链抗体、scFv、sdAb、sdFv、纳米抗体、肽抗体(peptibody)、结构域抗体和多特异性抗体(双特异性抗体、双链抗体(diabody)、三链抗体(triabody)和四链抗体(tetrabody)、串联二-scFv、串联三-scFv),例如具体为 scFv、Fv、Fab 或 Fab' 片段。

在一些实施方案中,提供抗 TGFβ1 抗体或其抗原结合片段,其与前述 TGFβ1 结合分子结合或竞争结合相同的 TGFβ1 前体蛋白或 TGFβ1 复合物(例如人或鼠 GARP-TGFβ1 复合物、LTBP-TGFβ1 复合物、LRRC33-TGFβ1 复合物)表位。在一些实施方案中, TGFβ1 复合物中的 TGFβ1 以 TGFβ1 前体蛋白形式存在。

在一些实施方案中,提供抗 TGFβ1 抗体或其抗原结合片段,其阻断前述 TGFβ1 结合分子与 TGFβ1 前体蛋白或 TGFβ1 复合物(例如人或鼠 GARP-TGFβ1 复合物、LTBP-TGFβ1 复合物、LRRC33-TGFβ1 复合物)的结合。在一些实施方案中, TGFβ1 复合物中的 TGFβ1 以 TGFβ1 前体蛋白形式存在。

在一些实施方案中,提供抗 TGFβ1 抗体或其抗原结合片段,其与 TGFβ1 蛋白或 TGFβ1 复合物(例如人或鼠 GARP-TGFβ1 复合物、LTBP-TGFβ1 复合物、LRRC33-TGFβ1 复合物)的结合被前述 TGFβ1 结合分子阻断。在一些实施方案中, TGFβ1 复合物中的 TGFβ1 以 TGFβ1 前体蛋白形式存在。

GARP-TGFβ1 结合分子

第二方面,本公开提供 GARP-TGFβ1 结合分子,其包含至少一个与 TGFβ1 复合物结合的免疫球蛋白单一可变结构域。

在一些实施方案中,所述 TGFβ1 复合物是 GARP-TGFβ1 复合物。在一些实施方案中,所述 GARP-TGFβ1 复合物中 TGFβ1 为 TGFβ1 前体蛋白。示例性地, TGFβ1 前体蛋白选自原 TGFβ1 或潜伏 TGFβ1。在本公开中,“原 TGFβ1”与“潜伏 TGFβ1”

可以互换地使用。

在一些实施方案中，本公开提供 GARP-TGFβ1 结合分子，其包含至少一个与 GARP-TGFβ1 复合物结合的免疫球蛋白单一可变结构域。

在一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含三个互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3，其中：

a) 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 84 所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

b) 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 90 所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

c) 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 91 所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3；或，

d) 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 92 所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

上述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的。在一些具体的实施方案中，所述 CDR 是根据 Kabat 编号系统定义的。示例性地，以下提供 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

表 3. SEQ ID NO:84 所示序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3

	CDR1	CDR2	CDR3
IMGT	GFTYCEYD (SEQ ID NO:96)	IASDGRT (SEQ ID NO:107)	KTEAVKYSGNWCVAAPGFAY (SEQ ID NO:111)
Chothia	GFTYCEY (SEQ ID NO:97)	ASDGR (SEQ ID NO:108)	EAVKYSGNWCVAAPGFAY (SEQ ID NO:87)
AbM	GFTYCEYDMS (SEQ ID NO:98)	RIASDGRTS (SEQ ID NO:109)	EAVKYSGNWCVAAPGFAY (SEQ ID NO:87)
Contact	CEYDMS (SEQ ID NO:99)	FVSRIASDGRTS (SEQ ID NO:110)	KTEAVKYSGNWCVAAPGFA (SEQ ID NO:112)
Kabat	EYDMS (SEQ ID NO:85)	RIASDGRTSYVDSVKG (SEQ ID NO:86)	EAVKYSGNWCVAAPGFAY (SEQ ID NO:87)

在一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含三个互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3，其中：

CDR1 包含如 SEQ ID NO:85 所示的氨基酸序列；

CDR2 包含如 SEQ ID NO:86 所示的氨基酸序列；和/或，

CDR2 包含如 SEQ ID NO:87 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO:85-87 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

在一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含的 CDR1 与 SEQ ID NO:85 所示氨基酸序列相比，具有 0、1、2、3、4 或 5 个氨基酸突变；和/或，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含的 CDR2 与 SEQ ID NO:86 所示氨基酸序

列相比, 具有 0、1、2、3、4 或 5 个氨基酸突变; 和/或,

所述免疫球蛋白单一可变结构域包含的 CDR3 与 SEQ ID NO:87 所示氨基酸序列相比, 具有 0、1、2、3、4 或 5 个氨基酸突变。

在一些具体的实施方案中, CDR1、CDR2 或 CDR3 中的氨基酸突变为保守性取代。

在一些实施方案中, GARP-TGF β 1 结合分子包含前述任意 1 个或多个(例如, 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、50 等等)的免疫球蛋白单一可变结构域。在一些实施方案中, GARP-TGF β 1 结合分子包含 2 个或以上的免疫球蛋白单一可变结构域, 且其中任意两个免疫球蛋白单一可变结构域可以是相同的或不同的。

在一些实施方案中, GARP-TGF β 1 结合分子可以包含前述任一的完整的免疫球蛋白单一可变结构域; 也可以包含前述任一的免疫球蛋白单一可变结构域的功能部分或其变体, 例如 CDR3、CDR3-FR4、CDR2-FR3-CDR3、CDR2-FR3-CDR3-FR4、FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4、CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3。

在一些实施方案中, 所述免疫球蛋白单一可变结构域的功能部分的变体可以是保留了 CDR3、CDR3-FR4、CDR2-FR3-CDR3、CDR2-FR3-CDR3-FR4、FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4、CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4、或 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3 的血清白蛋白结合功能且与之具有至少 80%、至少 90% 序列同源性的多肽, 例如可以是保留了 CDR3 的 TGF β 1 复合物结合功能并与之具有一定序列同源性的多肽, 例如与上述任一 CDR3 具有至少 80%、至少 90% 序列同源性的多肽。

在一些实施方案中, 所述免疫球蛋白单一可变结构域为 VHH。示例性地, 免疫球蛋白单一可变结构域为骆驼源 VHH、全人 VHH 或人源化 VHH。

在一些具体的实施方案中, 免疫球蛋白单一可变结构域为人源化 VHH。

在一些实施方案中, 人源化 VHH 的人种系模板选自 IGHV3-23 和 IGJH4 的至少一种。在一些具体的方案中, 人源化 VHH 包含来源于 IGHV3-23 的 FR1、FR2、FR3, 人源化 VHH 包含来源于 IGJH4 的 FR4。

在一些实施方案中, 人源化 VHH 包含至少一个如下所示的回复突变: 23T、29Y、30C、37Y、44E、45R、47F、71Q、74A、75R、78G、81E、93K 和 94T。在一些具体的实施方案中, 人源化 VHH 的框架区包含至少一个上述的回复突变。

上述的回复突变的位点依据 Kabat 编号规则编号。

在一些实施方案中, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO: 84、90-92 中任一项所示的氨基酸序列或与之具有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 84、90-92 中任一项所示的序列相比, 具有 1 个或多个(例如 2、3、4、

5、6、7、8、9 或 10 个等)的氨基酸突变。

在一些具体的实施方案中，免疫球蛋白单一可变结构域的氨基酸突变为保守性取代。

在一些实施方案中，GARP-TGFβ1 结合分子进一步包含免疫球蛋白 Fc 区。示例性地，免疫球蛋白 Fc 区来源于 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。在一些实施方案中，免疫球蛋白 Fc 区来源于 IgG2 或 IgG4。在一些具体的实施方案中，免疫球蛋白 Fc 区来源于人 IgG4。

在一些实施方案中，免疫球蛋白 Fc 区包含降低或消除 Fc 效应功能的突变。示例性地，免疫球蛋白 Fc 区包含突变：S228P。上述突变的位置根据 EU 编号规则编号。

在一些具体实施方案中，免疫球蛋白 Fc 区包含如 SEQ ID NO:88 所示的氨基酸序列或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，免疫球蛋白 Fc 区来源于小鼠 IgG2。

在一些实施方案中，免疫球蛋白 Fc 区是效应器功能降低或消除的 Fc 区，例如，具有降低或去除 ADCC 效应的突变。示例性地，降低或消除 ADCC 效应的突变包含如下至少一种：L234A/L235E/G237A/D327Q/A330S/P331S(IgG2a)；N297A 或 N297Q(IgG1)；L234A/L235A(IgG1)；V234A/G237A(IgG2)；L235A/G237A/E318A(IgG4)；H268Q/V309L/A330S/A331S(IgG2)；C220S/C226S/C229S/P238S(IgG1)；C226S/C229S/E233P/L234V/L235A(IgG1)；L234F/L235E/P331S(IgG1)；或 S267E/L328F(IgG1)。上述突变的位置根据 EU 编号规则编号。

在一些实施方案中，所述 GARP-TGFβ1 结合分子是与 GARP-TGFβ1 复合物结合的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，GARP-TGFβ1 结合分子包含如 SEQ ID NO: 89、93-95、106 任一项所示的氨基酸序列，或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，GARP-TGFβ1 结合分子包含与 SEQ ID NO: 89、93-95、106 任一项所示的氨基酸序列相比，具有一个多个（例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个等）氨基酸突变，且具有与 GARP-TGFβ1 复合物特异性结合的功能活性。

在一些具体的实施方案中，GARP-TGFβ1 结合分子中的氨基酸突变为保守性取代。

在本公开的上下文中，“至少 80%”涵盖 80%及以上，例如至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%，以及任意两者之间的数值范围。

在一些实施方案中, 前述 GARP-TGFβ1 结合分子与 GARP-TGFβ1 复合物特异性结合, 从而抑制成熟 TGFβ1 从 GARP-TGFβ1 复合物中的释放、和/或抑制 TGFβ1 活性、和/或抑制 TGFβ1 信号转导。

在一些实施方案中, GARP-TGFβ1 结合分子不结合游离的成熟 TGFβ1。

5 在一些实施方案中, GARP-TGFβ1 结合分子不结合或极弱结合 TGFβ2 蛋白或 TGFβ2 复合物。例如, TGFβ1 结合分子不结合或极弱结合成熟 TGFβ2、TGFβ2 前体蛋白、GARP-TGFβ2 复合物、LTBP-TGFβ2 复合物等。

在一些实施方案中, GARP-TGFβ1 结合分子不结合或极弱结合 TGFβ3 蛋白或 TGFβ3 复合物。例如, GARP-TGFβ1 结合分子不结合或极弱结合成熟 TGFβ3、
10 TGFβ3 前体蛋白、GARP-TGFβ3 复合物、LTBP-TGFβ3 复合物等。

在本公开中, “TGFβ2 蛋白” 应作广义理解, 其范围覆盖成熟 TGFβ2, 以及 pro-TGFβ2、latent TGFβ2 等非活性的前体蛋白形式。“TGFβ3 蛋白” 应作广义理解, 其范围覆盖成熟 TGFβ3, 以及 pro-TGFβ3、latent TGFβ3 等非活性的前体蛋白形式。

在一些实施方案中, 前述 GARP-TGFβ1 结合分子能够选择性抑制 TGFβ1 活性,
15 但不抑制 TGFβ2 和/或 TGFβ3 的活性。例如, GARP-TGFβ1 结合分子选择性抑制 TGFβ1 的激活, 但不抑制 TGFβ2 和/或 TGFβ3 的激活。因而, 本公开的 GARP-TGFβ1 结合分子具有改善的安全性(例如, 降低的体内毒性和/或不良反应)。

在本公开的一些实施方案中, 成熟 TGFβ1、成熟 TGFβ2、和/或成熟 TGFβ3 在细胞中呈现游离状态。

20 在一些实施方案中, GARP-TGFβ1 结合分子与 GARP-TGFβ1 复合物特异性结合。其中, GARP-TGFβ1 复合物包含:

- a) 糖蛋白 A 重复主导序列(GARP);
- b) 成熟 TGFβ1 结构域; 以及,
- c) 潜能相关肽(LAP)。

25 在一些实施方案中, 所述 GARP 包含如 SEQ ID NO:100 或 103 所示的氨基酸序列或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列, 所述成熟 TGFβ1 结构域包含如 SEQ ID NO:101 或 104 所示的氨基酸序列或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列, 和/或, 所述 LAP 包含如 SEQ ID NO:102 或 105 所示的氨基酸序列或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

30 在一些实施方案中, GARP-TGFβ1 结合分子以 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或更低的 K_D 结合 GARP-TGFβ1 复合物或其片段。

在一些实施方案中, GARP-TGFβ1 结合分子, 其具有如下所示特性: 抑制 TGFβ1 活性, 抑制调节性 T 细胞的免疫抑制活性, 和/或抑制肿瘤生长。

在一些实施方案中, GARP-TGFβ1 结合分子为抗 GARP-TGFβ1 抗体或其抗原
35 结合片段; 在一些具体实施方案中, 为嵌合抗体、骆驼抗体、人源化抗体、全人抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，GARP-TGFβ1 结合分子为抗 GARP-TGFβ1 抗体或其抗原结合片段；在一些具体实施方案中，抗 GARP-TGFβ1 抗体或其抗原结合片段包括但不限于：Fab、Fv、sFv、Fab'、F(ab')₂、线性抗体、单链抗体、scFv、sdAb、sdFv、纳米抗体、肽抗体 peptibody、结构域抗体和多特异性抗体(双特异性抗体、diabody、5 triabody 和 tetrabody、串联二-scFv、串联三-scFv)，例如为 scFv、Fv、Fab 或 Fab' 片段。

在一些实施方案中，提供抗 GARP-TGFβ1 抗体或其抗原结合片段，其与前述 GARP-TGFβ1 结合分子结合或竞争结合相同的 GARP-TGFβ1 复合物 (例如人或鼠 GARP-TGFβ1 复合物)表位。

10 在一些实施方案中，提供抗 GARP-TGFβ1 抗体或其抗原结合片段，其阻断前述 GARP-TGFβ1 结合分子与 GARP-TGFβ1 (例如人或鼠 GARP-TGFβ1 复合物)的结合。

在一些实施方案中，提供抗 GARP-TGFβ1 抗体或其抗原结合片段，其与 GARP-TGFβ1 复合物 (例如人或鼠 GARP-TGFβ1 复合物)的结合被前述 15 GARP-TGFβ1 结合分子阻断。

在一些实施方案中，所述 GARP-TGFβ1 复合物包含(i)GARP，和(ii) TGFβ1 前体蛋白。示例性地，所述 GARP-TGFβ1 复合物中：

GARP 包含如 SEQ ID NO:2、4、5、8、100、103 任一项所示的氨基酸序列，或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列；

20 和/或，TGFβ1 蛋白包含如 SEQ ID NO:1、3、6-7、9-10 任一项所示的氨基酸序列，或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列。

蛋白结合分子

在一些实施方案中，本公开提供 TGFβ1 结合分子。

25 在一些实施方案中，所述 TGFβ1 结合分子特异性结合 TGFβ1 前体蛋白或 TGFβ1 复合物。在一些实施方案中，所述 TGFβ1 复合物包含 TGFβ1 前体蛋白。

如本公开所使用，“TGFβ1”或“TGFβ1 蛋白”以广泛的含义理解，包含转化生长因子-β1(TGFβ1)蛋白的原蛋白形式(又称，原 TGFβ1)或潜伏形式(潜伏 TGFβ1)，或经释放后的成熟 TGFβ1。在一些实施方案中，TGFβ1 或 TGFβ1 蛋白是指 TGFβ1 30 前体蛋白。

在一些实施方案中，TGFβ1 前体蛋白包含：(i)成熟 TGFβ1 结构域，(ii)潜能相关肽(LAP)。

示例性地，TGFβ1 前体蛋白是原 TGFβ1 或潜伏 TGFβ1。原 TGFβ1 中成熟 TGFβ1 结构域与潜能相关肽(latency-associated peptides, LAPs)共价结合，潜伏 TGFβ1 中 35 成熟 TGFβ1 结构域与潜能相关肽(latency-associated peptides, LAPs)非共价结合。

在本公开中，“原 TGFβ1”或“潜伏 TGFβ1”可以互换地使用。

示例性地，成熟 TGFβ1 结构域包含如 SEQ ID NO:101 或 104 所示的氨基酸序列或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列。

示例性地，LAP 包含如 SEQ ID NO:102 或 105 所示的氨基酸序列，或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列。

5 示例性地，TGFβ1 前体蛋白包含如 SEQ ID NO:1、3、6-7、9-10 任一项所述的氨基酸序列，或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述 TGFβ1 前体蛋白或 TGFβ1 复合物还包含前述任意蛋白或蛋白复合物的蛋白片段、功能变体等。

10 在一些实施方案中，所述 TGFβ1 前体蛋白或 TGFβ1 复合物来源于任意的脊椎动物，包括哺乳动物如灵长类(例如人)和其他物种(例如，小鼠、大鼠、豚鼠、兔子、狗、猪、羊等)等。

示例性地，“片段”、“蛋白片段”包括但不限于：生长因子结构域(growth factor domains)、N-末端前结构域(N-terminal prodomain)、潜伏相关肽(latency-associated peptides, LAPs)、LAP 样结构域(LAP-like domains)、直夹克区域(straight jacket regions)、紧固件区域(fastener regions)、弗林蛋白酶切位点(furin cleavage site regions)、手臂区域(arm regions)、手指区域(fingers regions)、潜伏环(latency loops)、α₁ 螺旋区域(alpha 1 helical regions)、α₂ 螺旋区域(alpha 2 helical regions)、RGD 序列区(RGD sequence regions)、触发环区(trigger loop regions)、胞外结构域、跨膜结构域、胞内结构域等。

20 示例性地，“变体”、“功能变体”是指包含一个或几个氨基酸的取代、缺失和/或添加的氨基酸，且具有相当的生物活性的蛋白或蛋白复合物。

示例性地，TGFβ1 前体蛋白的变体包含相对于 SEQ ID NO: 6 所示氨基酸序列按自然计数第 4 位氨基酸突变。在一些实施方案中，TGFβ1 前体蛋白的变体包含突变 C4S，所述突变的位点是相对于 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列按自然计数的位点。

25 在一些实施方案中，所述 TGFβ1 前体蛋白或 TGFβ1 复合物可以包含或不包含前导序列。示例性地，前导序列为信号肽序列。在一些实施方案中，所述 TGFβ1 前体蛋白或 TGFβ1 复合物可以包含或不包含标签序列。示例性地，标签序列为 His-tag、AVI-tag、myc-tag、荧光标签等。

30 在一些实施方案中，所述 TGFβ1 复合物包含 TGFβ1 蛋白，以及选自如下所示的任意的第二蛋白：糖蛋白 A 重复主导序列(GARP)、潜伏 TGF-β 结合蛋白(Latent TGF-β-binding proteins, LTBP; 例如 LTBP1、LTBP1S、LTBP2、LTBP3、LTBP4)、原纤蛋白(例如，fibrillin-1、fibrillin-2、fibrillin-3、fibrillin-4)、LRRC33(Leucine-Rich Repeat-Containing Protein 33)、或前述任意一种的变体或蛋白片段等。

35 示例性地，“蛋白片段”或“片段”包括但不限于胞外结构域、跨膜结构域或胞内结构域等。

在一些实施方案中,所述 TGFβ1 复合物包括但不限于:GARP-TGFβ1 复合物、LTBP-TGFβ1 复合物(例如,LTBP1-TGFβ1 复合物、LTBP3-TGFβ1 复合物)、或 LRRC33-TGFβ1 复合物。在一些实施方案中,所述 TGFβ1 复合物中 TGFβ1 以 TGFβ1 前体蛋白形式存在。

5 示例性地, GARP-TGFβ1 复合物包括:

- a) 糖蛋白 A 重复主导序列(GARP);
- b) 成熟 TGFβ1 结构域; 以及,
- c) 潜能相关肽(LAP)。

10 在一些实施方案中,所述 GARP 包含如 SEQ ID NO:100 或 103 所示的氨基酸序列或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列,所述 TGFβ1 包含如 SEQ ID NO:101 或 104 所示的氨基酸序列或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列,和/或,所述 LAP 包含如 SEQ ID NO:102 或 105 所示的氨基酸序列或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中, GARP-TGFβ1 复合物由 GARP 与 TGFβ1 前体蛋白形成。

15 在一些具体的实施方案中, GARP-TGFβ1 复合物由 GARP 的胞外区与 TGFβ1 前体蛋白形成。

本公开中“GARP”可以是天然来源的野生型 GARP,也可以是 GARP 的功能变体(例如,与野生型 GARP 相比,包含一个或多个修饰、截短和/或突变)。在一些实施方案中, GARP 可以是全长或其部分结构域(例如,胞外结构域、跨膜结构域或胞内结构域)。例如,天然来源指来自任何脊椎动物来源,包括哺乳动物如灵长类(例如人)和其他物种(例如,小鼠、大鼠、豚鼠、兔子、狗、猪、羊等等)。

20 在一些实施方案中, GARP 可以包含或不包含前导序列。示例性地,前导序列为信号肽序列。在一些实施方案中, GARP 可以包含一个或多个标签序列,例如 His-tag、AVI-tag、myc-tag、荧光标签等。在一些实施方案中, GARP 可以不包含
25 标签序列。

示例性地,GARP 的胞外区包含如 SEQ ID NO:100 或 103 所示的氨基酸序列,或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列。

示例性地, GARP 包含如 SEQ ID NO:2、4、5、8、100、103 任一项所示的氨基酸序列,或与之具有至少 80%序列同一性的氨基酸序列。

30 在一些实施方案中,与 TGFβ1 前体蛋白或 TGFβ1 复合物结合的蛋白结合分子选自抗体或其抗原结合片段。示例性地,抗体或其抗原结合片段包括但不限于如下任意一种:线性抗体、单链抗体(scFv)、单域抗体(sdAb)、纳米抗体、肽抗体 peptibody、结构域抗体和多特异性抗体(双特异性抗体、diabody、triabody 和 tetrabody、串联二-scFv、串联三-scFv)、Fab、Fv、sFv、Fab'、F(ab')₂。

35 在一些实施方案中,提供特异性地结合 TGFβ1 前体蛋白或 TGFβ1 复合物的表位的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,当 TGFβ1 为前体蛋白形式或存

在于与 GARP、LTBP1、LTBP3 和/或 LRRC33 复合物中时，该表位可用于被抗体或其抗原结合片段结合。在一些实施方式中，表位由于在与 GARP、LTBP 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片段结合的表位在 TGFβ1 未与 GARP、LTBP 和/或 LRRC33 复合时，
5 或 TGFβ1 是成熟 TGFβ1 时是不可用的。在一些实施方式中，抗体或其抗原结合片段不阻止 TGFβ1 与整联蛋白结合。例如，在一些实施方式中，抗体或其抗原结合片段不掩蔽 TGFβ1 的整联蛋白结合位点。

在一些实施方式中，蛋白结合分子与 TGFβ2 蛋白或 TGFβ2 复合物不结合或极弱结合。示例性地，蛋白结合分子不与如下至少一种特异性结合：成熟 TGFβ2、
10 TGFβ2 前体蛋白、GARP-TGFβ2 复合物、LTBP-TGFβ2 复合物等。

在一些实施方式中，蛋白结合分子与 TGFβ3 蛋白或 TGFβ3 复合物不结合或极弱结合。示例性地，蛋白结合分子不与如下至少一种特异性结合：成熟 TGFβ3、TGFβ3 前体蛋白、GARP-TGFβ3 复合物、LTBP-TGFβ3 复合物等。

在本公开中，“TGFβ2 蛋白”应作广义理解，其范围覆盖成熟 TGFβ2，以及
15 pro-TGFβ2、latent TGFβ2 等非活性的前体蛋白形式。“pro-TGFβ2”与“latent TGFβ2”可以互换地使用。

在本公开中，“TGFβ3 蛋白”应作广义理解，其范围覆盖成熟 TGFβ3，以及
pro-TGFβ3、latent TGFβ3 等非活性的前体蛋白形式。“pro-TGFβ3”与“latent TGFβ3”可以互换地使用。

20 在一些实施方案中，成熟 TGFβ1、成熟 TGFβ2、和/或成熟 TGFβ3 在细胞中呈现游离状态。

在一些实施方案中，蛋白结合分子特异性结合 TGFβ1 前体蛋白或 TGFβ1 复合物(例如，GARP-TGFβ1 复合物，LTBP1-TGFβ1 复合物，LTBP3-TGFβ1 复合物，LRRC33-TGFβ1 复合物等)，可以选择性抑制 TGFβ1 的活性。例如，抑制 TGFβ1
25 的激活，和/或抑制成熟 TGFβ1 的释放，和/或抑制 TGFβ1 信号转导。

多核苷酸

本公开提供编码前述任一种蛋白结合分子的多核苷酸。在一些实施方案中，本公开提供编码前述任一种 TGFβ1 结合分子、GARP-TGFβ1 结合分子的多核苷酸。

30 在一些实施方案中，本公开提供编码本公开第一方面所述 TGFβ1 结合分子的多核苷酸。在一些实施方案中，本公开提供编码本公开第二方面所述 GARP-TGFβ1 结合分子的多核苷酸。

在一些实施方案中，本公开的多核苷酸可为 RNA、DNA 或 cDNA。

在一些实施方案中，本公开的多核苷酸是分离的多核苷酸。

35 在一些实施方案中，本公开的多核苷酸是也可呈载体形式，可存在于载体中和/或可为载体的一部分，该载体可以是真核载体、原核载体、病毒载体，例如质

粒、粘端质粒、YAC 或病毒载体等。载体可尤其为表达载体，即可提供结合分子(例如，TGFβ1 结合分子)在体外和/或体内(即在适合宿主细胞、宿主有机体和/或表达系统中)表达的载体。该表达载体通常包含至少一种本公开的多核苷酸，其可操作地连接至一个或多个适合的表达调控元件(例如启动子、增强子、终止子等)。针对在特定宿主中的表达对所述元件及其序列进行选择为本领域技术人员的常识。对本公开的蛋白结合分子、TGFβ1 结合分子、GARP-TGFβ1 结合分子表达有用或必需的调控元件及其他元件例如为启动子、增强子、终止子、整合子、选择标记物、前导序列、报告基因。

本公开的多核苷酸可基于本公开的多肽的氨基酸序列的信息通过已知的方式(例如通过自动 DNA 合成和/或重组 DNA 技术)制备或获得，和/或可从适合的天然来源加以分离。

在一些实施方案中，本公开中的多核苷酸及载体可用于制备 TGFβ1 结合分子。在一些实施方案中，本公开中的多核苷酸及载体用于在体外或体内表达 TGFβ1 结合分子，TGFβ1 结合分子结合 TGFβ1 前体蛋白或 TGFβ1 复合物，用于检测、诊断、治疗、调节等不同目的。

在一些实施方案中，本公开中的多核苷酸及载体可用于制备 GARP-TGFβ1 结合分子。在一些实施方案中，本公开中的多核苷酸及载体用于在体外或体内表达 GARP-TGFβ1 结合分子，GARP-TGFβ1 结合分子结合 GARP-TGFβ1 复合物，用于检测、诊断、治疗、调节等不同目的。

宿主细胞

本公开提供表达一种或多种本公开的蛋白结合分子的宿主细胞。在一些实施方案中，本公开提供的宿主细胞其包含前述任一种的多核苷酸或载体；或者，宿主细胞表达前述任一种的 TGFβ1 结合分子或 GARP-TGFβ1 结合分子。

在一些实施方案中，宿主细胞表达本公开第一方面所述的 TGFβ1 结合分子。在一些实施方案中，宿主细胞表达本公开第二方面所述的 GARP-TGFβ1 结合分子。

在一些实施方案中，宿主细胞为细菌细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。

示例性地，细菌细胞例如包括革兰氏阴性细菌菌株(例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株、变形杆菌属(*Proteus*)菌株及假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株)及革兰氏阳性细菌菌株(例如芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株、链霉菌属(*Streptomyces*)菌株、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)菌株及乳球菌属(*Lactococcus*)菌株)的细胞。

示例性地，真菌细胞例如包括木霉属(*Trichoderma*)、脉孢菌属(*Neurospora*)及曲菌属(*Aspergillus*)的物种的细胞；或者包括酵母属(*Saccharomyces*)(例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)(例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*))、毕赤酵母属(*Pichia*)(例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia*

pastoris)及嗜甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*))及汉森酵母属(*Hansenula*)的物种的细胞。

示例性地,哺乳动物细胞例如猴肾 CV1 系(COS-7)、人胚胎肾系(293 或 293T 细胞)、幼仓鼠肾细胞(BHK)、小鼠塞托利(sertoli)细胞(TM4 细胞)、猴肾细胞(CV1)、
5 非洲绿猴肾细胞(VERO-76)、犬肾细胞(MDCK)、buffalo 大鼠肝细胞(BRL3A)、人肺细胞(W138)、人肝细胞(HepG2)、人胶质瘤细胞(LN229 细胞)、人宫颈癌细胞(HeLa 细胞)、人乳腺癌细胞(MCF-7)、人前列腺癌细胞(PC3),小鼠乳腺癌细胞(EMT-6 细胞)、小鼠乳房肿瘤细胞(MMT060562)、小鼠结肠癌细胞(CT26 细胞),TRI 细胞(如例如记载于 Mather 等, Annals N.Y.Acad Sci383, 44-68(1982))、MRC5 细胞和 FS4
10 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、骨髓瘤细胞系如 YO、NS0、P3X63 和 Sp2/0。

本公开也可使用两栖类细胞、昆虫细胞、植物细胞及本领域中用于表达异源蛋白的任何其他细胞。

本公开的细胞不能发育成完整的植物或动物个体。

15 生产或制备方法

本公开提供制备本公开的蛋白结合分子的方法。

在一些实施方案中,本公开提供制备前述第一方面所述的 TGFβ1 结合分子的方法,其包括如下步骤:

a. 形成 TGFβ1 前体蛋白或包含所述 TGFβ1 前体蛋白的 TGFβ1 复合物,作为
20 抗原蛋白;

b. 构建人源抗体噬菌体库;

c. 利用所述噬菌体文库筛选与所述抗原蛋白特异性结合的 TGFβ1 结合分子。

在一些实施方案中,TGFβ1 结合分子的制备方法还包括如下步骤:

d. 对所述 TGFβ1 结合分子进行亲和力成熟改造。

25 上述的制备方法也是与 TGFβ1 前体蛋白或包含所述 TGFβ1 前体蛋白的 TGFβ1 复合物特异性结合的 TGFβ1 结合分子的筛选方法。

在一些实施方案中,本公开提供制备前述第二方面所述 GARP-TGFβ1 结合分子的方法,其包括如下步骤:

30 a. 形成包含人 GARP 和人 TGFβ1 前体蛋白的复合物,作为抗原蛋白;

b. 利用所述抗原蛋白免疫动物,构建噬菌体文库;

c. 利用所述噬菌体文库筛选 GARP-TGFβ1 结合分子,所述 GARP-TGFβ1 结合分子包含与 GARP-TGFβ1 复合物结合的免疫球蛋白单一可变结构域。

在一些实施方案中,GARP-TGFβ1 结合分子的制备方法还包括如下步骤:

35 d. 对所述 GARP-TGFβ1 结合分子进行人源化改造。

在一些具体的实施方案中,步骤 b 进一步为:

利用所述抗原蛋白免疫骆驼，采集免疫后的骆驼外周血，提取核酸，利用所述核酸构建噬菌体文库。

上述的制备方法也是与 GARP-TGFβ1 复合物特异性结合的 GARP-TGFβ1 结合分子的筛选方法。

5

在另外一些实施方案中，本公开提供制备前述任一种 TGFβ1 结合分子或 GARP-TGFβ1 结合分子的方法，包括：

- 在允许表达本公开的 TGFβ1 结合分子或 GARP-TGFβ1 结合分子条件下培养本公开的宿主细胞；及
- 10 - 从培养物回收由所述宿主细胞表达的目的蛋白；及
- 任选的，包括进一步纯化和/或修饰本公开的目的蛋白。

本公开的 TGFβ1 结合分子或 GARP-TGFβ1 结合分子可在如上所述细胞中以细胞内方式(例如在细胞质中、在周质中或在包涵体中)产生，接着从宿主细胞分离且任选进一步纯化；或其可以细胞外方式(例如在培养宿主细胞的培养基中)产生，接着自培养基分离且任选进一步纯化。

用于重组产生蛋白或多肽的方法及试剂，例如特定适合表达载体、转化或转染方法、选择标记物、诱导蛋白表达的方法、培养条件等在本领域中是已知的。类似地，适用于制造本公开的结合分子或抗体等目的蛋白的分离及纯化技术为本领域技术人员所公知。生产和纯化抗体的方法在现有技术中熟知和能找到，如冷泉港的抗体实验技术指南(5-8 章和 15 章)。本公开工程化的抗体也可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的 cDNA 序列，可以克隆并重组至表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染细胞。哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在 Fc 区的高度保守 N 端。通过表达与人源抗原特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化、收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛，离子交换。得到的产物需立即冷冻，如-70°C，或者冻干。

然而，本公开的 TGFβ1 结合分子或 GARP-TGFβ1 结合分子也可以通过本领域已知的其它产生蛋白质的方法获得，例如化学合成，包括固相或液相合成。

30

药物组合物

本公开提供药物组合物，其含有选自以下的任一项或其组合：如上所述的蛋白结合分子或其编码多核苷酸。在一些实施方案中，药物组合物中包含预防或治疗有效量的如前述任一种所述的 TGFβ1 结合分子或 GARP-TGFβ1 结合分子，或编码所述 TGFβ1 结合分子或 GARP-TGFβ1 结合分子的多核苷酸、载体。

在一些实施方案中，药物组合物中进一步包含一种或多种药学上可接受的辅

料、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。

在一些实施方案中，药物组合物可以配制成医学领域已知的任何剂型，剂型选择取决于预期的给药方式和治疗用途。

5 在一些实施方案中，药物组合物进一步包含免疫检查点抑制剂。例如，免疫检查点抑制剂包括但不限于 PD-1、PD-L1、PD-L2 中的一种或多种抑制剂。在一些实施方案中，药物组合物中进一步包含抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段。

本公开中的 TGFβ1 结合分子或 GARP-TGFβ1 结合分子能够抑制 TGFβ1 活性、抑制调节性 T 细胞的免疫抑制活性。TGFβ1 结合分子或 GARP-TGFβ1 结合分子与抗 PD-1 抗体联用可以解除肿瘤免疫抑制微环境，本公开实施例发现，TGFβ1 结合分子或 GARP-TGFβ1 结合分子与抗 PD-1 抗体联用后在肿瘤治疗中发挥显著改善的治疗效果。

在一些实施方案中，所述药物组合物单位剂量中可含有 0.01 至 99 重量%的 TGFβ1 结合分子。另一些具体实施方案中，药物组合物单位剂量中含 TGFβ1 结合分子的量为 0.1-2000mg；一些具体实施方案中为 1-1000mg。

15 在一些实施方案中，所述药物组合物单位剂量中可含有 0.01 至 99 重量%的 GARP-TGFβ1 结合分子。另一些具体实施方案中，药物组合物单位剂量中含 GARP-TGFβ1 结合分子的量为 0.1-2000mg；一些具体实施方案中为 1-1000mg。

联合用药

20 本公开提供任一种蛋白结合分子或其编码多核苷酸，联合免疫检查点抑制剂在用于治疗与 TGFβ 信号通路相关的疾病中的用途。示例性地，免疫检查点抑制剂包括但不限于 PD-1、PD-L1、PD-L2 中的一种或多种抑制剂。

在一些实施方案中，提供 TGFβ1 结合分子联合免疫检查点抑制剂在用于治疗与 TGFβ 信号通路相关的疾病中的用途。

25 在一些实施方案中，提供 TGFβ1 结合分子联合抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段在用于治疗与 TGFβ 信号通路相关的疾病中的用途。

在一些实施方案中，提供 GARP-TGFβ1 结合分子联合免疫检查点抑制剂在用于治疗与 TGFβ 信号通路相关的疾病中的用途。

30 在一些实施方案中，提供 GARP-TGFβ1 结合分子联合抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段在用于治疗与 TGFβ 信号通路相关的疾病中的用途。

术语“TGFβ 信号通路相关的疾病”是指与 TGFβ 家族蛋白的表达、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 家族蛋白的活性和/或水平的调节的任何疾病、障碍和/或病症。TGFβ 信号通路相关的疾病可以包括，但不限于肿瘤或癌症。

35 在一些实施方案中，与 TGFβ 信号通路相关的疾病为癌症。本公开提供 TGFβ1 结合分子或 GARP-TGFβ1 结合分子联合抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段在用于治

疗癌症中的用途。

TGFβ1 结合分子或 GARP-TGFβ1 结合分子显著改善肿瘤的免疫抑制微环境，其与抗 PD-1 抗体联用后在肿瘤治疗中发挥显著改善的治疗效果。

5 在一些实施方案中，癌症选自肺癌、肠癌、肾癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、结肠癌、宫颈癌、前列腺癌、头颈癌。

试剂盒(或药盒)

本公开提供试剂盒或药盒，包含一个或多个容器，其各自独立地包含选自以下的任一项或其组合：本公开的蛋白结合分子(例如，所述的 TGFβ1 结合分子或
10 GARP-TGFβ1 结合分子)，或其编码多核苷酸、载体。

预防、治疗疾病的方法和制药用途

本公开提供蛋白结合分子，或其编码多核苷酸、载体、药物组合物的医药用途，和预防、治疗、缓解疾病或症状的方法。

15 在一些实施方案中，本公开提供 TGFβ1 结合分子、编码多核苷酸、载体或药物组合物在如下至少一种中的用途：

(1) 用于抑制 TGFβ1 活性；例如，抑制 TGFβ1 激活，抑制成熟 TGFβ1 从 TGFβ1 复合物中的释放，和/或抑制 TGFβ1 信号转导；

(2) 制备用于抑制 TGFβ1 活性的药物；

20 (3) 用于抑制调节性 T 细胞的免疫抑制活性；

(4) 制备用于抑制调节性 T 细胞的免疫抑制活性的药物；

(5) 用于预防或治疗与 TGFβ 信号通路相关的疾病或病症。

在一些实施方案中，本公开提供预防或治疗与 TGFβ 信号通路相关的疾病或病症的方法，包括向受试者施用预防或治疗有效量的 TGFβ1 结合分子、编码多核苷酸、载体或药物组合物。
25

在一些实施方案中，本公开提供在体外抑制 TGFβ1 活性的方法，其包括：在体外施用 TGFβ1 抗体或其抗原结合片段、编码多核苷酸、载体或药物组合物。在一些具体的实施方案中，施用抑制有效量的 TGFβ1 结合分子、编码多核苷酸、载体或药物组合物。

30 在一些实施方案中，本公开提供在体内抑制 TGFβ1 活性的方法，其包括：向受试者施用 TGFβ1 结合分子、编码多核苷酸、载体或药物组合物。在一些具体的实施方案中，向受试者施用抑制有效量的 TGFβ1 结合分子、编码多核苷酸、载体或药物组合物。

在一些具体的实施方案中，所述受试者患有与 TGFβ 信号通路相关的疾病或病症。
35

术语“TGFβ 信号通路相关的疾病”是指与 TGFβ 家族蛋白的表达、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 TGF β 家族蛋白的活性和/或水平的调节的任何疾病、障碍和/或病症。TGF β 信号通路相关的疾病可以包括，但不限于纤维化相关的疾病或病症、肿瘤或癌症。

在一些实施方案中，所述与 TGF β 信号通路相关的疾病为癌症。

5 在一些实施方案中，所述与 TGF β 信号通路相关的疾病或病症为纤维化。

在一些实施方案中，提供预防或治疗癌症的方法，联合施用预防或治疗有效量的如下 1)和 2)所示的组分：

1) 抗 TGF β 1 抗体或其抗原结合片段，或编码多核苷酸、载体，或药物组合物；

2) 免疫检查点抑制剂。

10 示例性地，所述 PD-1 信号通路抑制剂包括但不限于 PD-1、PD-L1、PD-L2 中的一种或多种抑制剂。在一些实施方案中，所述免疫检查点抑制剂为抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，所述癌症选自肺癌、肠癌、肾癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、结肠癌、宫颈癌、前列腺癌、头颈癌。

15 在一些实施方案中，本公开的 TGF β 1 结合分子或药物组合物可以通过本领域已知的任何合适的方法来施用，施用可以为全身性或局部的。

在一些实施方案中，可调整给药方案以获得最佳目的反应(例如治疗或预防反应)。例如，可以单次给药，可以在一段时间内多次给药，或者可以随治疗情况的紧急程度按比例减少或增加剂量。

20

在一些实施方案中，本公开提供 GARP-TGF β 1 结合分子、编码多核苷酸、载体或药物组合物在如下至少一种中的用途：

(1) 用于抑制 TGF β 1 活性；例如，抑制 TGF β 1 激活，抑制成熟 TGF β 1 从 TGF β 1 复合物中的释放，和/或抑制 TGF β 1 信号转导；

25 (2) 制备用于抑制 TGF β 1 活性的药物；

(3) 用于抑制调节性 T 细胞的免疫抑制活性；

(4) 制备用于抑制调节性 T 细胞的免疫抑制活性的药物；

(5) 用于预防或治疗与 TGF β 信号通路相关的疾病或病症。

30 在一些实施方案中，本公开提供预防或治疗与 TGF β 信号通路相关的疾病或病症的方法，包括向受试者施用预防或治疗有效量的 GARP-TGF β 1 结合分子、编码多核苷酸、载体或药物组合物。

在一些实施方案中，本公开提供预防或治疗与 TGF β 信号通路相关的疾病的方法，包括向受试者施用预防或治疗有效量的 GARP-TGF β 1 结合分子、编码多核苷酸、载体或药物组合物；以及，预防或治疗有效量的免疫检查点抑制剂。

35 示例性地，免疫检查点抑制剂包括但不限于 PD-1、PD-L1、PD-L2 中的一种或多种抑制剂。在一些实施方案中，免疫检查点抑制剂为抗 PD-1 抗体或其抗原结

合片段。

在一些实施方案中，本公开提供在体外抑制 TGFβ1 活性的方法，其包括：在体外施用 GARP-TGFβ1 结合分子、编码多核苷酸、载体或药物组合物。在一些具体的实施方案中，施用抑制有效量的 GARP-TGFβ1 结合分子、编码多核苷酸、载体或药物组合物。

在一些实施方案中，本公开提供在体外抑制 TGFβ1 激活或抑制成熟 TGFβ1 从 GARP-TGFβ1 复合物中释放的方法，其包括：在体外施用 GARP-TGFβ1 结合分子、编码多核苷酸、载体或药物组合物。在一些具体的实施方案中，施用抑制有效量的 GARP-TGFβ1 结合分子、编码多核苷酸、载体或药物组合物。

在一些实施方案中，本公开提供在体内抑制 TGFβ1 活性的方法，其包括：向受试者施用 GARP-TGFβ1 结合分子、编码多核苷酸、载体或药物组合物。在一些具体的实施方案中，向受试者施用抑制有效量的 GARP-TGFβ1 结合分子、编码多核苷酸、载体或药物组合物。

在一些实施方案中，本公开提供在体内抑制 TGFβ1 激活或抑制成熟 TGFβ1 从 GARP-TGFβ1 复合物中释放的方法，其包括：向受试者施用 GARP-TGFβ1 结合分子、编码多核苷酸、载体或药物组合物。在一些具体的实施方案中，向受试者施用抑制有效量的 GARP-TGFβ1 结合分子、编码多核苷酸、载体或药物组合物。

在一些具体的实施方案中，所述受试者患有与 TGFβ 信号通路相关的疾病或病症。

在一些实施方案中，与 TGFβ 信号通路相关的疾病为癌症。

在一些实施方案中，所述癌症选自肺癌、肠癌、肾癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、结肠癌、宫颈癌、前列腺癌、头颈癌。

在一些实施方案中，本公开的 GARP-TGFβ1 结合分子或药物组合物可以通过本领域已知的任何合适的方法来施用，施用可以为全身性或局部的。

在一些实施方案中，可调整给药方案以获得最佳目的反应(例如治疗或预防反应)。例如，可以单次给药，可以在一段时间内多次给药，或者可以随治疗情况的紧急程度按比例减少或增加剂量。

定义

为了更容易理解本公开，以下具体定义了某些技术和科学。除非在本公开中另有明确定义，本公开使用的所有其它技术和科学都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

除非上下文另外清楚要求，否则在整个说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为具有包含意义，而不是排他性或穷举性意义；也即，“包括但不限于”的意义。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。

“约”、“大约”是指数值在由本领域一般技术人员所测定的具体值的可接受误差范围内，所述数值部分取决于怎样测量或测定(即测量体系的限度)。例如，“约”可意味着在 1 内或超过 1 的标准差。或者，“约”或“基本上包含”可意味着至多 20% 的范围，例如 1%至 15%之间、在 1%至 10%之间、在 1%至 5%之间、在 0.5%至 5%之间、在 0.5%至 1%之间变化，本公开中，数字或数值范围之前有术语“约”的每种情况也包括给定数的实施方案。除非另外说明，否则当具体值在本申请和权利要求中出现时，“约”或“基本上包含”的含义应该假定为在该具体值的可接受误差范围内。

本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558(1968) 中所述。

术语“转化生长因子 β (transforming growth factor- β)”家族是由一类结构、功能相关的多肽生长因子亚家族组成，参与许多不同的生物学途径。除 TGF- β 外，还包括激活素、抑制素、生长和分化因子(GDFs)、骨形态发生蛋白(BMP)等。TGF β 具有 3 种形式的异构体：TGF β 1、TGF β 2 和 TGF β 3，在哺乳动物的几乎所有细胞类型中被广泛表达。

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。原 TGF 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。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)。这些分子允许原 TGF 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))。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，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)。

在本公开的范畴内，TGF β 1 蛋白应做最广泛的理解。该术语涵盖 TGF β 1 在自然界中的天然形式、天然存在的变体，也包括人工表达的形式、功能变体等。当上下文没有专门说明时，TGF β 1 涵盖成熟 TGF β 1、TGF β 1 前体蛋白及其蛋白表位的范畴。TGF β 1 前体蛋白涵盖原 TGF β 1、潜伏 TGF β 1 及其片段。TGF β 1 序列可获取于 GenBank、UniProt 等。例如，人原 TGF β 1(Uniprot: P01137)、鼠原 TGF β 1(Uniprot: P04202)。

在本公开的上下文中，“原 TGFβ1”与“潜伏 TGFβ1”可以互换地使用。

如本文所用，术语“TGFβ1 复合物”是指 TGFβ1 与包括但不限于 GARP、LRRC33、LTBP3 或 LTBP1 的蛋白分子通过二硫桥连接形成的复合物，也称为 LTBP1-TGFβ1 复合物、LTBP3-TGFβ1 复合物、LRRC33-TGFβ1 复合物或 GARP-TGFβ1 复合物。在所述 TGFβ1 复合物中，TGFβ1 以 TGFβ1 前体蛋白(例如，原/潜伏 TGFβ1)的形式存在。

术语“功能变体”包括但不限于野生型蛋白的同系物、片段、截短体、突变体、修饰物等，蛋白的功能变体与野生型蛋白相比，具有提高的、降低的或维持的蛋白活性。

术语“结合分子”涵盖任何能够特异性结合抗原或抗原表位的分子，例如本公开所定义的抗体、其抗原结合片段或其缀合物、融合蛋白。

“抗体”以最广义使用，涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体；单特异性抗体，多特异性抗体(例如双特异性抗体)，全长抗体和抗体片段(或抗原结合片段，或抗原结合部分)，只要它们展现出期望的抗原结合活性。抗体可以指免疫球蛋白，是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、δ 链、γ 链、α 链和 ε 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大，为可变区(V 区)；靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区(C 区)。可变区包括 3 个高变区(CDR)和 4 个序列相对保守的骨架区(FR)。3 个高变区决定抗体的特异性，又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1，LCDR2，和 LCDR3；重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3。

对于 CDR 的确定或定义，能够通过分辨抗体的结构和/或分辨抗体-配体复合物的结构来完成 CDR 的确定性描绘和包含抗体的结合位点的残基的鉴定。这可通过本领域技术人员已知的各种技术中的任一种，例如 X 射线晶体学来实现。多种分析方法可用于鉴定 CDR，包括但不限于 Kabat 编号系统、Chothia 编号系统、AbM 编号系统、IMGT 编号系统、接触定义、构象定义。

Kabat 编号系统是用于编号抗体中残基的标准并且通常用于鉴定 CDR 区域(参见例如 Johnson&Wu, 2000, Nucleic Acids Res., 28: 214-8)。Chothia 编号系统与 Kabat 编号系统类似，但 Chothia 编号系统考虑了某些结构环区域的位置。(参见例

如 Chothia 等, 1986, J.Mol.Biol., 196: 901-17; Chothia 等人, 1989, Nature, 342: 877-83)。AbM 编号系统使用建模抗体结构的由 Oxford Molecular Group 生产的计算机程序集成套件(参见例如 Martin 等, 1989, ProcNatl Acad Sci(USA), 86: 9268-9272; “AbMTM, A Computer Program for ModelingVariable Regions of Antibodies,”Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd)。AbM 编号系统使用知识数据库和从头开始方法的组合, 从基本序列建模抗体的三级结构(参见 Samudrala 等, 1999, 在 PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl., 3: 194-198 中的“Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined HierarchicalApproach”描述的那些)。接触定义基于可用复杂晶体结构的分析(参见例如 MacCallum 等, 1996, J.Mol.Biol., 5: 732-45)。构象定义中, CDR 的位置可鉴定为对抗原结合做出焓贡献的残基(参见例如 Makabe 等, 2008, Journal ofBiological Chemistry, 283: 1156-1166)。另外其它的 CDR 边界定义可能不严格遵循上述方法之一, 但仍然与 Kabat CDR 的至少一部分重叠, 尽管根据特定残基或残基组不显著影响抗原结合的预测或实验结果, 它们可缩短或延长。如本公开使用的, CDR 可指通过本领域已知的任何方法(包括方法的组合)定义的 CDR。各种编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的, 示例性的, 如下表 4 中所示。

表 4. CDR 编号系统之间的关系

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

多肽或蛋白的“结构域”是指折叠蛋白结构, 其能够独立于蛋白的其余部分维持其三级结构。一般而言, 结构域负责蛋白的单个功能性质, 且在许多情况下可添加、移除或转移至其它蛋白而不损失蛋白的其余部分和/或结构域的功能。

“免疫球蛋白可变结构域”是指基本上由本领域及下文中分别称为“框架区 1”或“FR1”、“框架区 2”或“FR2”、“框架区 3”或“FR3”、及“框架区 4”或“FR4”的四个“框架区”组成的免疫球蛋白结构域, 其中所述框架区由本领域及下文中分别称为“互补决定区 1”或“CDR1”、“互补决定区 2”或“CDR2”、及“互补决定区 3”或“CDR3”的三个“互补决定区”或“CDR”间隔开。因此, 免疫球蛋白可变结构域的一般结构或序列可如下表示为: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。免疫球蛋白可变结构域因具有抗原结合位点而赋予其对抗原的特异性。

“抗体框架(FR)”, 是指可变结构域的一部分, 其用作该可变结构域的抗原结合环(CDR)的支架。

“免疫球蛋白单一可变结构域”通常用于指可以在不与其他可变结构域相互作用的情况下(例如在没有如常规四链单克隆抗体的 VH 和 VL 结构域之间所需要的 VH/VL 相互作用的情况下),形成功能性抗原结合位点的免疫球蛋白可变结构域(其可以是重链或轻链结构域,包括 VH、VHH 或 VL 结构域)。“免疫球蛋白单一可变结构域”的实例包括纳米抗体(包括 VHH、人源化 VHH 和/或骆驼化 VH,例如骆驼化人 VH)、IgNAR、结构域、作为 VH 结构域或衍生自 VH 结构域的(单结构域)抗体(诸如 dAbsTM)和作为 VL 结构域或衍生自 VL 结构域的(单结构域)抗体(诸如 dAbsTM)。基于和/或衍生自重链可变结构域(诸如 VH 或 VHH 结构域)的免疫球蛋白单一可变结构域通常是优选的。免疫球蛋白单一可变结构域的一个具体实例为如下文定义的“VHH 结构域”(或简称为“VHH”)。

“VHH 结构域”,亦称为重链单域抗体、VHH、V_HH 结构域、VHH 抗体片段、VHH 抗体、纳米抗体,是称为“重链抗体”(即“缺乏轻链的抗体”)的抗原结合免疫球蛋白的可变结构域(Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.:“Naturally occurring antibodies devoid of light chains”; Nature363, 446-448(1993))。使用术语“VHH 结构域”以将所述可变结构域与存在于常规四肽链结构抗体中的重链可变结构域(其在本公开中称为“VH 结构域”)以及轻链可变结构域(其在本公开中称为“VL 结构域”)进行区分。VHH 结构域特异性结合表位而无需其他抗原结合结构域(此与常规四肽链结构抗体中的 VH 或 VL 结构域相反,在该情况下表位由 VL 结构域与 VH 结构域一起识别)。VHH 结构域为由单一免疫球蛋白结构域形成的小型稳定及高效的抗原识别单元。术语“重链单域抗体”、“VHH 结构域”、“VHH”、“V_HH 结构域”、“VHH 抗体片段”、“VHH 抗体”、“Nanobody”以及“Nanobody 结构域”可互换使用。“VHH 结构域”包括但不限于经骆驼科动物产生的天然抗体,也可以是骆驼科动物产生的抗体后再经人源化的,也可以是经噬菌体展示技术筛选获得的全人源抗体。VHH 结构域中的氨基酸残基的总数将通常在 110 至 120 范围内,常常介于 112 与 115 之间。然而应注意较小及较长序列也可适于本公开所述的目的。获得结合特定抗原或表位的 VHH 的方法,先前已公开于以下文献中:R.van der Linden et al., Journal of Immunological Methods, 240(2000)185-195; Li et al., J Biol Chem., 287(2012)13713-13721; Deffar et al., African Journal of Biotechnology Vol.8(12), pp.2645-2652, 17June, 2009 和 WO94/04678。

如本领域中对于 VH 结构域及 VHH 结构域所公知的,各 CDR 中的氨基酸残基的总数可能不同,且可能不对应于由 Kabat 编号指示的氨基酸残基的总数(即根据 Kabat 编号的一个或多个位置可能在实际序列中未被占据,或实际序列可能含有多于 Kabat 编号所允许数目的氨基酸残基)。这意味着一般而言,根据 Kabat 的编号可能对应或可能不对应于实际序列中氨基酸残基的实际编号。其它的编号系统或编码规则包括 Chothia、IMGT、AbM。

“人源化抗体(humanized antibody)”，也称为 CDR 移植抗体(CDR-grafted antibody)，是指将非人 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量非人蛋白成分，从而诱导的强烈的免疫应答反应。为避免在免疫原性下降的同时引起活性的下降，可对所述的全人抗体可变区可进行最少反向突变，以保持活性。“人源化”的例子包括可将源自骆驼科的 VHH 结构域通过以人常规四肽链结构抗体 VH 结构域中相应位置处存在的一个或多个氨基酸残基置换原始 VHH 序列的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基而“人源化”(本公开中亦称为“序列优化”，除人源化外，“序列优化”也可涵盖通过提供 VHH 改良性质的一个或多个突变对序列进行的其它修饰，例如移除潜在的翻译后修饰位点)。人源化 VHH 结构域可含有一个或多个完全人框架区序列。此外，为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变，以保持活性。

“全人抗体”或“全人源抗体”包括具有人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本公开的全人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(如通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变所引入的突变)。“全人抗体”不包括“人源化抗体”。

当“竞争”用于竞争相同表位的抗原结合蛋白(例如中和抗原结合蛋白或中和抗体)的情况中时，意指在抗原结合蛋白之间竞争，其通过以下测定法来测定：待检测的抗原结合蛋白(例如抗体或其免疫学功能片段)防止或抑制(例如降低)参考抗原结合蛋白(例如配体或参考抗体)与共同抗原的特异性结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗原结合蛋白是否与另一种竞争，这些测定例如：固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见例如 Stahli 等，1983，Methods in Enzymology 9: 242-253)；固相直接生物素-亲和素 EIA(参见例如 Kirkland 等，1986，J.Immunol.137: 3614-3619)、固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见例如 Harlow 和 Lane，1988，Antibodies, A Laboratory Manual(抗体，实验室手册)，Cold Spring Harbor Press)；用 I-125 标记物的固相直接标记 RIA(参见例如 Morel 等，1988，Molec.Immunol.25: 7-15)；固相直接生物素-亲和素 EIA(参见例如 Cheung，等，1990，Virology 176: 546-552)；和直接标记的 RIA(Moldenhauer 等，1990，Scand.J.Immunol.32: 77-82)。通常所述测定法涉及使用能与带有未标记的检测抗原结合蛋白及标记的参考抗原结合蛋白结合的纯化抗原(所述抗原在固态表面或细胞表面上)。在待测抗原结合蛋白存在下，测量结合于固态表面或细胞的标记的量，来测量竞争性抑制。通常，待测抗原结合蛋白是过量存在的。由竞争性测定(竞争抗原结合蛋白)鉴定的抗原结合蛋白包括：与参考抗原结合蛋白相同的表位发生结合的抗原结合蛋白；以及，与充分接近参考抗原结合蛋白结合的表位所邻近的表位发生结合的抗原结合蛋白，所述两个表位在空间上互相妨碍结合的发生。通常当竞争的抗原结合蛋白过量存在时，其将

抑制(例如降低)至少 40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75% 或 75%或更多参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合。在某些情况下, 结合被抑制至少 80-85%、85-90%、90-95%、95-97%或 97%或更多。

可使用本领域技术人员已知的常规技术, 就与相同表位的结合竞争性筛选抗体。例如, 可进行竞争和交叉竞争研究, 以获得彼此竞争或交叉竞争与抗原结合的抗体。基于它们的交叉竞争来获得结合相同表位的抗体的高通量方法描述于国际专利公开 WO03/48731 中。因此, 可使用本领域技术人员已知的常规技术, 获得与本公开的抗体分子竞争结合抗原蛋白上的相同表位的抗体。

术语“糖蛋白 A 重复主导序列(Glycoprotein-A Repetitions Predominant, GARP)”是具有单次跨膜结构的蛋白质, “GARP”还被称为富含亮氨酸重复序列 32(LeucinRichRepeatContaining32, LRRC32), 并且属于富含亮氨酸重复序列家族。GARP可以在活化的 Treg 的细胞表面上表达, 并且与 TGF- β 前体(例如 latent TGF- β)形成复合物。GARP 序列可获取于 GenBank、UniProt 等。例如, 人 GARP(LRRC32, Uniprot: Q14392), 鼠 GARP(LRRC32, Uniprot: G3XA59)。

在本公开的范畴内, GARP 应做最广泛的理解。该术语涵盖 GARP 在自然界中的天然形式、天然存在的变体, 也包括人工表达的形式、功能变体等。当上下文没有专门说明时, 涉及抗原-抗体相互作用的情形下, GARP 涵盖完整蛋白、胞外结构域及其表位的范畴。

术语“GARP-TGF β 1 复合物”“GARP/TGF β 1 蛋白”“GARP/TGF β 1”是指包含转化生长因子- β 1(TGF β 1)蛋白的前体蛋白和糖蛋白-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 蛋白的原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 TGF β 1 前体蛋白(原/潜伏 TGF β 1 蛋白)共价连接的 GARP。在其它实施方式中, GARP-TGF β 1 复合物包含与 TGF β 1 前体蛋白(原/潜伏 TGF β 1 蛋白)非共价连接的 GARP。在一些实施方式中, GARP-TGF β 1 复合物是天然发生的复合物, 例如细胞中的 GARP-TGF β 1 复合物。

术语“LTBP”是指潜在转化生长因子 β 结合蛋白(latent transforming growth factor β binding proteins), LTBP 是细胞外基质 (ECM)的重要组成部分, 其主要功能与调节原纤蛋白、转化生长因子 β (TGF- β)相关。在哺乳动物中, 存在四种已知的 LTBP, LTBP1-4, 其各自具有多个剪接变体(Robertson, J. B. 等, Matrix Biol, 2015, 47:p. 44-53)。

术语“GARP-TGF β 1 复合物”“GARP/TGF β 1 蛋白”“GARP/TGF β 1”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 蛋白的原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 TGF β 1 前体蛋白(原/潜伏 TGF β 1 蛋白)共价连

接的 GARP。在其它实施方式中, GARP-TGFβ1 复合物包含与 TGFβ1 前体蛋白(原/潜伏 TGFβ1 蛋白)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。

术语“LTBP1-TGFβ1 复合物”是指包含转化生长因子 β1(TGFβ1)蛋白的前体蛋白和潜伏 TGFβ 结合蛋白(例如, LTBP1、LTBP3)的蛋白质复合物。在一些实施方式中, LTBP-TGFβ1 复合物包含通过一个或多个二硫键与 TGFβ1 前体蛋白共价连接的 LTBP1。在其它实施方式中, LTBP1-TGFβ1 复合物包含与 TGFβ1 前体蛋白非共价连接的 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。

术语“抗原”指用于免疫接种免疫活性的脊椎动物的分子, 以产生识别抗原的抗体, 或筛选表达文库(例如尤其是噬菌体、酵母或核糖体展示文库)。在本公开中, 抗原被更广义地定义, 包括由抗体特异性识别的靶分子, 以及包括用于产生抗体的免疫接种过程或用于选择抗体的文库筛选中使用的分子的一部分或模拟物。例如, 对于本公开的与人 GARP-TGFβ1 复合物结合的抗体, 以及人 GARP-TGFβ1 复合物的截短变体和其它变体均被称为抗原。

术语“表位”是指抗原上与免疫球蛋白或抗体结合的位点。表位可以由相邻的氨基酸、或通过蛋白质的三级折叠而并列的不相邻的氨基酸形成。由相邻的氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂后保持, 而通过三级折叠形成的表位通常在变性溶剂处理后丧失。表位通常以独特的空间构象包括至少 3-15 个氨基酸。确定什么表位由给定的抗体结合的方法在本领域中是熟知的, 包括免疫印迹和免疫沉淀检测分析等。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术和本公开所述的技术, 例如 X 射线晶体分析法和二维核磁共振等。

“特异性结合”、“选择性结合”是指抗体与预定的抗原上的表位结合。例如, 当使用人 GARP-TGFβ1 复合物或其表位作为分析物并使用抗体作为配体, 在仪器中通过表面等离子体共振(SPR)技术测定时, 抗体以大约低于 10^{-7} M 或甚至更小的平衡解离常数(K_D)与预定的抗原或其表位结合, 并且其与预定抗原或其表位结合的亲和力是其与预定抗原(或其表位)或紧密相关的抗原之外的非特异性抗原(如 BSA 等)结合的亲和力的至少两倍。“识别抗原的抗体”在本公开中可以与“特异性结合的抗体”互换使用。

“结合亲和力”或“亲和力”在本公开中用作两个分子(例如抗体或其部分与抗原)之间的非共价相互作用的强度量度。两个分子之间的结合亲和力可通过确定解离常数(KD)来量化。可通过使用例如表面等离子共振(SPR)方法(Biacore)测量复合物形成和解离的动力学来确定 KD。对应于单价复合物的结合和解离的速率常数分别被称为结合速率常数 k_a (或 k_{on})和解离速率常数 k_d (或 k_{off})。 K_D 通过方程 $K_D = k_d/k_a$ 与 k_a 和 k_d 有关。解离常数的值可通过众所周知的方法直接确定, 并且可通过方法例如 Caceci 等人(1984, Byte 9: 340-362)中所述的那些甚至对于复杂混合物进行

计算。例如，可使用双重过滤硝化纤维素滤器结合测定如 Wong&Lohman(1993, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 5428-5432)中公开的那种来确定 K_D 。评估抗体针对靶抗原的结合能力的其它标准测定是本领域已知的，包括例如 ELISA、蛋白质印迹、RIA 和流式细胞术分析、以及本公开其它地方例举的其它测定。抗体的结合动力学和结合亲和力也可通过本领域已知的标准测定，例如表面等离子共振(SPR)，例如通过使用 BiacoreTM 系统或 KinExA 来评价。可通过比较各个抗体/抗原复合物的 K_D 值来比较与不同分子相互作用相关的结合亲和力，例如，不同抗体对于给定抗原的结合亲和力的比较。类似地，相互作用的特异性可通过确定和比较目的相互作用(例如抗体和抗原之间的特异性相互作用)的 K_D 值与非目的相互作用(例如已知不结合抗原的对照抗体)的 K_D 值进行评价。

术语“保守性取代”、“保守性置换”指置换为具有与原始氨基酸残基相似的特性的另一个氨基酸残基。例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有碱性侧链，并且天冬氨酸和谷氨酸具有相似的特性，在于它们具有酸性侧链。此外，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸和色氨酸具有相似的特性，在于它们具有不带电荷极性侧链，并且丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和甲硫氨酸具有相似的特性，在于它们具有非极性侧链。另外，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有芳族侧链。因此，本领域技术人员将显而易见，甚至当置换如上文所述的显示相似特性的组中的氨基酸残基时，它将不显示特性的特定变化。

术语“同源性”、“同一性”或“序列同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同核苷酸或氨基酸单体占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被相同核苷酸占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数 $\times 100\%$ 的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源，那么两个序列为 60%同源。一般而言，当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。

术语“核酸分子”与“多核苷酸”可互换使用，其是指 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的，优选是双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时，核酸是“有效连接的”。例如，如果启动子或增强子影响编码序列的转录，那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

术语“宿主细胞”包括各个细胞或细胞培养物，其可为或已是用于掺入多核苷酸插入片段的载体的受体。宿主细胞包括单个宿主细胞的子代，并且由于天然、偶然或有意的突变，子代可不一定与原始亲本细胞完全相同(在形态学或基因组 DNA 互补体中)。宿主细胞包括用本公开的多核苷酸在体内转染和/或转化的细胞。“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括其后代。还

应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。

术语“抑制”或“阻断”可互换使用，并涵盖部分和完全抑制/阻断这两者。例如，“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
5 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 TGF β 蛋白(例如，TGF β 1)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 TGF β 1-抑制抗体。

“有效量”包含足以改善或预防医学病症的症状或病症的量。有效量还意指足以
10 允许或促进诊断的量。用于受试者的有效量可依据以下因素而变化：如待治疗的病症、受试者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。本公开的受试者可以是动物或人类受试者。

术语“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述活性成分或其生理学上/可药
15 用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

术语“药学可接受的辅料”或“药学可接受的赋形剂”包括当与活性成分组合时，
20 允许该成分保留生物学活性并且不与受试者的免疫系统反应的任何材料。例子包括但不限于任何标准药物载体，例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳剂如油/水乳剂、和各种类型的润湿剂。在一些实施例中，用于气雾剂或肠胃外施用的稀释剂是磷酸盐缓冲盐水(PBS)或生理(0.9%)盐水。包含此类载体的组合物通过众所周知的常规方法配制(参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, A.Gennaro, 编辑, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; 以及 R Remington, The Science and
25 Practice of Pharmacy 第 20 版 Mack Publishing, 2000)。

“癌症”、“癌性”、“增殖性病症”和“肿瘤”在本公开中提到时并不互相排斥。

术语“给予”、“施用”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、
器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受
30 试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触，例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“给予”、“施用”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

术语“治疗”意指给予受试者治疗剂，诸如包含本公开的任一种融合蛋白或胰岛
35 素类似物为治疗剂，所述受试者已经患有、疑似患有、倾向于患有一种或多种糖尿病或高血糖相关疾病或其症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。

通常，在受治疗受试者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，是通过以预防或延迟症状或并发症的发作，减轻症状或并发症，或者消除疾病、病况或病症到任何临床能测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化，例如受试者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在受试者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本公开的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解某个受试者中目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验(H 检验)、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的受试者中应当减轻目标疾病症状。待治疗的患者是哺乳动物，并且优选地为人类。

术语“预防”是指降低一种或多种病况、症状、并发症或病症的风险或发病率，或者消除或减缓一种或多种病况、症状、并发症或病症的进展。

术语“受试者”、“患者”意指哺乳动物，尤其灵长类动物，尤其是人。

附图说明

图 1 示出了检测抗 TGFβ1 抗体(H27、SL2-2、SL2-9、SL2-12、SL2-19 及 SL2-22)对人或小鼠 TGFβ1 复合物(人 proTGFβ1、GARP-TGFβ1 复合物、LRRC33-TGFβ1 复合物，鼠 GARP-TGFβ1 复合物)的活性抑制结果图。图 1 中：A 为抗体对人 proTGFβ1 激活的抑制效果图，B 为抗体对人 GARP-TGFβ1 复合物激活的抑制效果图，C 为抗体对人 LRRC33-TGFβ1 复合物激活的抑制效果图，D 为抗体对鼠 GARP-TGFβ1 复合物激活的抑制效果图。

图 2 示出了检测抗 TGFβ1 抗体(SL2-22、Ab6)与表达人或小鼠的原 TGFβ1、TGFβ2、TGFβ3、及 TGFβ 复合物(GARP-TGFβ1 复合物、GARP-TGFβ2 复合物、GARP-TGFβ3 复合物)的 HEK293E 细胞结合实验的结果图。

图 3A-3C 示出了抗 TGFβ1 抗体与抗 PD-1 抗体联合(RMP1-14-mIgG2a-FcS+SL2-22-mIgG2a-FcS)在小鼠 EMT-6 模型中抑制肿瘤生长的结果图。图 3A 为小鼠肿瘤体积曲线图，图 3B 为小鼠生存率曲线图，图 3C 为小鼠体重曲线图。

图 4A-4C 示出了抗 TGFβ1 抗体与抗 PD-1 抗体联合(RMP1-14-mIgG2a-FcS+SL2-22-mIgG2a-FcS)在小鼠 CT26 模型中抑制肿瘤生长结果图。图 4A 为小鼠肿瘤体积曲线图，图 4B 为小鼠生存率曲线图，图 4C 为小鼠体重曲线图。

图 5A-5E 示出了抗 TGFβ1 抗体(SL2-22-mIgG2a-FcS) 在小鼠特发性纤维化模型中抑制纤维化结果图。图 5A 为肺纤维化模型小鼠体重变化曲线，图 5B 为肺纤维化模型小鼠存活率曲线，图 5C 为肺纤维化模型实验终点小鼠肺重及肺组织羟脯

氨酸含量, 图 5D 为肺纤维化模型实验终点小鼠肺切片, 图 5E 为 Masson 染色胶原面积比。

图 6 示出了通过 LN229 实验检测抗 GARP-TGF β 1 单域抗体对 GARP-TGF β 1 复合物激活的抑制。LN229 细胞转染人或鼠原 TGF β 1 和人或鼠 GARP 表达质粒, 通过 HepG2 CAGA12-luc 荧光素酶报道细胞, 检测 Abbv-151、C19、C19-3、C19-7、C19-8 对人和鼠 GARP-TGF β 1 复合物激活的抑制。图 6A 为抗体对人 GARP-TGF β 1 复合物激活的抑制效果图, 图 6B 为抗体对鼠 GARP-TGF β 1 复合物激活的抑制效果图。

图 7 示出了 C19-8 与表达人或小鼠的 GARP-TGF β 1 复合物的 HEK293E 细胞结合实验的结果图。HEK293E 细胞转染表 3 中质粒, 加入 C19-8 和 Abbv-151, 分别染色, 检测, 获得结果。

图 8A-8C 示出了 C19-8 与抗 PD-1 抗体联合(RMP1-14-mIgG2a-FcS+C19-8-mIgG2a-FcS)在小鼠 EMT-6 模型中抑制肿瘤生长结果图。图 8A 为小鼠肿瘤体积曲线图, 图 8B 为小鼠生存率曲线图, 图 8C 为小鼠体重曲线图。

图 9A-9C 示出了 C19-8 与抗 PD-1 抗体联合(RMP1-14-mIgG2a-FcS+C19-8-mIgG2a-FcS)在小鼠 CT26 模型中抑制肿瘤生长结果图。图 9A 为小鼠肿瘤体积曲线图, 图 9B 为小鼠生存率曲线图, 图 9C 为小鼠体重曲线图。

具体实施方式

实施例

以下结合实施例用于进一步描述本公开, 但这些实施例并非限制本公开的范围。

本公开实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见 Sambrook 等, 分子克隆, 实验室手册, 冷泉港实验室; 当代分子生物学方法, Ausubel 等著, Greene 出版协会, Wiley Interscience, NY。未注明具体来源的试剂, 为市场购买的常规试剂。

实施例 1. 抗原及检测用蛋白的制备

以人原 TGF β 1(Uniprot: P01137)、人 GARP(LRRC32, Uniprot: Q14392)、鼠原 TGF β 1(Uniprot: P04202)和鼠 GARP(LRRC32, Uniprot: G3XA59)为模板, 设计筛选和检测用相关蛋白的氨基酸序列。

>人原 TGF β 1 全长氨基酸序列:

MPPSGLRLLLLLLPLLWLLVLTTPGRPAAGLSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQIL
SKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEV
TRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLK
VEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEG
FRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQH

LQSSRHRR***ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCL***
GPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP***GASAA******PCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVE***
QLSNMIVRSCKCS

(SEQ ID NO: 1)

- 5 (注释: *斜体部分*为信号肽(Signal peptide); 下划线部分为潜能相关肽
 (Latency-associated peptide; LAP); ***斜体加粗部分***为 TGFβ1 结构域
 >成熟的人 TGFβ1(mature transforming growth factor beta-1):

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPY
IWSLDTQYSKVLALYNQHNP***GASAA******PCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNM***
 10 ***IVRSCKCS***

(SEQ ID NO: 101)

>人 LAP:

LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYN
STRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFN
 15 TSELREAVPEPVLLSRAELRLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPS
DSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRR
GDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRR

(SEQ ID NO: 102)

>人 GARP 全长氨基酸序列:

MRPQILLLLALLTLGLAAQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDT
ETLDLSGNQLRSILASPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALTHLEHLSLAH
NRLAMATALSAGGLGPLPRVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENS
LTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSNVLMIEDGAFEGLPRLTHLNLSRNSLTCISDF
SLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRIYL
 25 NLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLSOLLNLDLSYN
EIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLMLLDLSHNALETLELG
ARALGSLRTLQLQGNALRDLPPTYFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEPGPSG
CVAFSGITSRLSLVDNEIELLRAGAFHTPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLE
ASLEVLALQGNGLMVLQVDLPFCICKRLNLAENRLSHLPAWTQAVSLEVLDL
 30 RNNSFSLPGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDAT
QDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEKGGKLNINLIIILTFILVSAILLTTLAACCCVR
RQKFNOQYKA

(SEQ ID NO: 2)

- (注释: *斜体部分*为信号肽; 下划线部分为胞外区(Extracellular domain); ***斜体***
 35 ***加粗部分***为跨膜区(Transmembrane domain); ***斜体下划线部分***为胞内区(Cytoplasmic
 domain))

>人 GARP 胞外区:

HQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTETLDLSGNQLRSILASPL
GFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALTHLEHLSLAHNRLAMATALSAGGLGPL

PRVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQL
DLHSNVLMIEDGAFEGLPRLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAF
QTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSK
GIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLSQLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFL
5 NLSRNCLRTFEARRLGSLPCLMLLDLSHNALETLELGARALGSLRTLQGNAL
RDLPPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEPGPSGCVAFSGITSRLSLSLVDN
EIELLRAGAFLHTPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLAQGNGLMVLO
VDLPCFICKRLNLAENRLSHLPAWTQAVSLEVLDLRNNSFSLLPGSAMGGLET
SLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDV DATQDLICRFSSQEEVSLSHVR
10 PEDCEKGGLKNIN

(SEQ ID NO: 100)

>小鼠原 TGFβ1 全长氨基酸序列:

MPPSGLRLLPLLLPLPWLLVLTTPGRPAAGLSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQIL
SKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVT
15 RVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPPLSRAELRLQRLKSSVE
QHVELYQKYSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGF
RFAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHD MNRPFLLLMATPLERAQHL
HSSRHRR**ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLG**
PCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASASPCCVPALEPLPIVYYVGRKPKVEQL
20 **SNMIVRSCKCS**

(SEQ ID NO: 3)

(注释: 斜体部分为信号肽; 下划线部分为潜能相关肽(LAP); 斜体加粗部分为
TGFβ1 结构域)

>成熟的小鼠 TGFβ1:

25 **ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYI**
WSLDTQYSKVLALYNQHNP GASASPCCVPALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMI
VRSCCKCS

(SEQ ID NO: 104)

>小鼠 LAP:

30 LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYN
STRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFEN
TSIREAVPEPPLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRLLTPTD
TPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGFRFAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKRR
GDLGTIHD MNRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHRR

35 (SEQ ID NO: 105)

>小鼠GARP全长氨基酸序列:

MSHQILLLLAMLTGLAISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQ
ALYLSGNQLQSILVSPLGFYTALRHLDLSDNQISFLQAGVFQALPYLEHLNLAHN
RLATGMALNSGGLGRLPLLVSLDLSGNSLHGNLVERLLGETPRLRTLSLAENSLT
40 RLARHTFWGMPAVEQLDLHSNVLMIEDGAFEALPHLTHLNLSRNSLTCISDFSL

QQLQVLDLSCNSIEAFQTAPEPQAQFQLAWLDLRENKLLHFPDLAVFPRLIYLVN
SNNLIQLPAGLPRGSEDLHAPSEGWSASPLSNPSRNASTHPLSQLLNLDLSYNEIE
LVPASFLEHLTSLRFLNLSRNCLRSFEARQVDSLPCVLVLDLSHNVLEALELGTK
VLGSLQTLLLQDNALQELPPYTFASLASLQRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCV
 5 DFSGIPTLHVLNMAGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVATGALVGLEA
SLEVLELQGNGLTVLRVDLPCFLRLKRLNLAENQLSHLPAWTRAVSLEVLDLRN
NSFSLLPGNAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQD
LICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKGGLKNVN**LILLSFTLVSAIVLTTLATICFLRRO**
KLSQOYKA

10 (SEQ ID NO: 4)

(注释: 斜体部分为信号肽; 下划线部分为胞外区; 斜体加粗部分为跨膜区;
斜体下划线部分为胞内区)

>小鼠 GARP 胞外区:

ISORREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQALYLSGNQLQSILVSP
 15 LGFYTALRHLDLSDNQISFLQAGVFQALPYLEHLNLAHNRLATGMALNSGGGLG
RLPLLVSLLDLSGNSLHGNNLVERLLGETPRLRTLSLAENSLTRLARHTFWGMPAVE
QLDLHSNVLMIEDGAFAELPHLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLQVLDLSCNSIE
AFQTAPEPQAQFQLAWLDLRENKLLHFPDLAVFPRLIYLVNVSNNLIQLPAGLPRG
SEDLHAPSEGWSASPLSNPSRNASTHPLSQLLNLDLSYNEIELVPASFLEHLTSLR
 20 FLNLSRNCLRSFEARQVDSLPCVLVLDLSHNVLEALELGTKVLGSLQTLLLQDN
ALQELPPYTFASLASLQRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFSGIPTLHVLNM
AGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVATGALVGLEASLEVLELQGNGLT
VLRVDLPCFLRLKRLNLAENQLSHLPAWTRAVSLEVLDLRNNSFSLLPGNAMGG
LETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICRFGSQEELSLSL
 25 VRPEDCEKGGLKNVN

(SEQ ID NO: 103)

筛选和检测用人 GARP/TGFβ1 复合物如下制备: 将人 GARP-avi-his 与人天然
 TGFβ1 (分别如 SEQ ID NO: 5 和 6 所示)在 ExpiCHO 细胞(ThermoFisher, A29127)
 中共表达、纯化获得蛋白复合物; 人 TGFβ1 C4S 蛋白如 SEQ ID NO: 7 所示; 小鼠
 30 GARP/TGFβ1 复合物如下制备: 将小鼠 GARP-avi-his 与小鼠天然 TGFβ1(分别如
 SEQ ID NO: 8 和 9 所示)在 ExpiCHO 细胞(ThermoFisher, A29127)中共表达、纯化
 获得蛋白复合物; 小鼠 TGFβ1 C4S 蛋白如 SEQ ID NO: 10 所示:

>人 GARP-avi-his 氨基酸序列:

HQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPDPTETLDLSGNQLRSILASPL
 35 GFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALHLEHLNLAHNRLAMATASAGGLGPLP
RVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLD
LHSNVLMIEDGAFEGLPRLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQT
ASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLVNLSNNLIRLPTGPPQDSKGI
HAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLSQLLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNL

SRNCLRTFEARRLGSLPCLMLLDLSHNALETLELGARALGSLRTLLLQGNALRD
LPPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEPGPSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIE
LLRAGAFHTPLTELDLSSNPGLVATGALGGLEASLEVLAQGNGLMVLQVDL
PCFICLKRLNLAENRLSHLPAWTQAVSLEVLDLRNNSFSLLPGSAMGGLETSLRR
5 LYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDC
EKGGLKNINGGGGSGGGGSGGLNDIFEAQKIEWHEGGGGSGGGGSHHHHHHHH

(SEQ ID NO: 5)

(注释: 下划线部分为人 GARP 胞外区; 斜体部分为(G₄S)₂ 接头; 虚线部分为
Avi tag; 曲线部分为 His 标签)

10 >人 TGFβ1-天然氨基酸序列:

LSTCKTIDMELVKRKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYN
STRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFN
TSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPS
DSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRR
15 GDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQL
YIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GAS
AAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

(SEQ ID NO: 6)

>人 TGFβ1 C4S 氨基酸序列:

20 HHHHHHHHGGGGSGGGGSGGLNDIFEAQKIEWHEGGGGSGGGGSLSTSKI
DMELVKRKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGES
AEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEP
VLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDV
TGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGM
25 NRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLG
WKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQ
ALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

(SEQ ID NO: 7)

(注释: 曲线部分为 His 标签; 斜体部分为(G₄S)₂ 接头; 虚线部分为 Avi 标签; 下
30 划线部为人 TGFβ1 全长蛋白, 其中第四位的氨基酸 C 突变为 S)

>小鼠 GARP-avi-his 氨基酸序列:

ISQRRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQALYLSGNQLQSILVSP
LGFYTALRHLDLSDNQISFLQAGVFQALPYLEHLNLAHNRLATGMALNSGGGLG
RLPLLVS LDLSGNSLHG N LVERLLGETPRLRTL SLAENSLTRLARHTFWGMPAVE
35 QLDLHSNVLM DIEDGA FEALPHLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLQVLDLSCNSIE
AFQTAPEPQAQFQLAWLDLRENKLLHFPDLAVFPRLIYLNVSNNLIQLPAGLPRG
SEDLHAPSEGWSASPLSNPSRNASTHPLSQLLNLDLSYNEIELVPASFLEHLTSLR
FLNLSRNCLRSFEARQVDSLPCVLVLDLSHNVLEALELGTKVLGSLQOTLLQDN
ALQELPPYTFASLASLQRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFSGIPTLHVLNM
40 AGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVATGALVGLEASLEVLELQGNGLT

VLRVDLPCFLRLKRLNLAENQLSHLPAWTRAVSLEVLDLRNNSFSLLPGNAMGG
LETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICRFGSQEELSLSL
VRPEDCEKGGGLKNVNGGGGSGGGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGGGSGGGGSHH
HHHHHH

5

(SEQ ID NO: 8)

(注释: 下划线部分为小鼠 GARP 胞外区; 斜体部分为(G₄S)₂ 接头; 虚线部分为 Avi tag; 下曲线部分为 His 标签)

>小鼠 TGFβ1-天然氨基酸序列:

LSTCKTIDMELVKRKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYN
10 STRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFFN
TSDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRLLTPTD
TPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGFRFSAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKRR
GDLGTIHD MNRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQL
YIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GAS
15 ASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

(SEQ ID NO: 9)

>小鼠 TGFβ1 C4S 氨基酸序列:

HHHHHHHHGGGGSGGGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGGGSGGGGSLSTSKI
DMELVKRKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGES
20 ADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFFNTSDIREAVPEP
PLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRLLTPTDTP EWLSFDVT
GVVRQWLNQGDGIQGFRFSAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHD MN
RPFLLLMATPLERAQHLHSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGW
KWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASASPCCVPQAL
25 EPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

(SEQ ID NO: 10)

(注释: 曲线部分为 His 标签; 斜体部分为(G₄S)₂ 接头; 虚线部分为 Avi 标签;
下划线部分为小鼠 TGFβ1 全长蛋白, 其中第四位的氨基酸 C 突变为 S)

以上序列均可以经本领域的常规方法表达、纯化、分离获得。

30

实施例 2. 特异性结合人 TGFβ1 复合物的抗 TGFβ1 单克隆抗体的筛选

通过人源抗体噬菌体库的筛选来获得与人 TGFβ1 复合物具有高亲和力的抗体。
人源抗体噬菌体库一共四个(1: 半合成 Fab 库 1(种系 3-23); 2: 半合成 Fab
库 2(种系 1-69); 3: 全人源 Naïve Fab 库; 4: 全人源 scFV 库), 均为上海恒瑞医
35 药有限公司赠送。使用 10 μg 生物素化的人 GARP-TGFβ1 复合物(包含 SEQ ID NO:
5 和 6)蛋白结合 1 mg Dynabeads M-280 链霉亲和素(Cat No. 11206D, Invitrogen),
室温反应半小时, 1 × PBS 洗 3 遍, 之后加入 2%的脱脂牛奶室温封闭 1 小时, 同
时使用 2%的脱脂牛奶和 1 mg Dynabeads M-280 链霉亲和素对人源抗体噬菌体展

示文库进行封闭和消耗(depletion)，将处理后的噬菌体文库加入到结合了抗原的珠中，室温作用 1 小时。使用 1 × PBST(含 0.05% Tween-20)，pH 7.4 溶液洗 10 遍，以去除不结合的噬菌体，1 × PBS 再洗 2 遍后用 0.5 mL 的胰蛋白酶(1 mg/mL)将与人 GARP/TGFβ1 特异性结合的噬菌体洗脱，并感染处于对数生长期的大肠杆菌 TG1，2YT(含 2%葡萄糖)抗性平板生长过夜，从平板刮菌生产并纯化噬菌体用于下一轮筛选。

相同筛选过程重复 2 轮，为获得与小鼠 TGFβ1 复合物有交叉结合的抗体，第二轮使用生物素化的小鼠 TGFβ1_C4S(SEQ ID NO: 10)作为筛选抗原。第三轮使用生物素化的人 GARP-TGFβ1 复合物(包含 SEQ ID NO: 5 和 6)作为筛选抗原。三轮筛选过后阳性的克隆被富集。

从筛选富集的克隆中挑取 6 × 92 个单克隆包装成单克隆噬菌体，用于噬菌体 ELISA 测试。ELISA 板(Cat No. 9018, Corning)分别包被 2 μg/mL 的人 GARP-TGFβ1 复合物(SEQ ID NO: 5 和 6)和小鼠 TGFβ1_C4S(SEQ ID NO: 10)蛋白，4°C 放置过夜，1 × PBST 洗 3 遍，用 2% BSA 37°C 封闭 1 个小时，PBST 洗 3 遍后，加入封闭液稀释的噬菌体上清，室温反应 1 小时，PBST 洗 6 遍，加入抗 M13 HRP(Cat No. 11973-MM05T-H, 义翘神州)，室温反应 1 小时，PBST 洗 3 遍，加入 100 μL TMB 显色底物，并用 100 μL 1 M 硫酸终止反应，用 SpectraMax M5 酶标仪读取 450 nm 处吸收值。将 ELISA 结合测试中 OD450 读值大于 3 倍阴性对照的克隆进行测序，分析得到 43 个特异性抗体序列。通过 SPR 实验显示抗体 H5、H14、H16、H17、H19、H20、H21、H23、H24、H27、H28、H30、H32、H34 和 H39 能够结合 TGFβ1 复合物。但是细胞功能实验显示，只有 H27 有较好的抑制功能，并且和人和小鼠 GARP-TGFβ1 复合物以及人和小鼠 TGFβ1_C4S(也即，TGFβ1 前体蛋白)都有很好的结合。

以下示出其中的 H27 序列。

>H27 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISG
SGGSTYYADSVKGRFRTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARVDSSGGYWYF
DLWGRGTLVTSS

(SEQ ID NO: 11)

>H27 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKLEIK

(SEQ ID NO: 12)

以上序列 SEQ ID NO: 11 和 12 中，顺序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为 FR 序列，下划线分别为 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。本公开提供的人源抗体的编号规则均为 Kabat，表 5 是 CDR 序列。

表 5. H27 抗体的 CDR 序列

重链		轻链	
HCDR1	SYAMS SEQ ID NO: 13	LCDR1	RASQSISSYLN SEQ ID NO: 16
HCDR2	AISGSGGSTYYADSVKG SEQ ID NO: 14	LCDR2	AASSLQS SEQ ID NO: 17
HCDR3	VDSSGGYWYFDL SEQ ID NO: 15	LCDR3	QQSYSTPLT SEQ ID NO: 18

实施例 3. 完整单克隆抗体的构建与表达纯化

将实施例 2 中通过人源抗体噬菌体文库筛选得到的 H27 的序列构建完整重组
5 抗体：将抗体的轻链可变区 VL 克隆进含有人源 kappa 轻链恒定区(SEQ ID NO: 19)的 pTT5 表达载体，将抗体的重链可变区 VH 克隆进含有人 IgG4-S228P(CH1-CH2-CH3)重链恒定区(SEQ ID NO: 20)的 pTT5 表达载体。

>人 kappa 轻链恒定区：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
10 SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

(SEQ ID NO: 19)

>人 IgG4-S228P(CH1-CH2-CH3)重链恒定区：

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
15 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCP
PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
20 SLSLGK

(SEQ ID NO: 20)

H27 完整抗体序列如下：

>H27 轻链：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS
25 SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 65)

>H27 重链：

30 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSA
ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARVDSSGG
YWYFDLWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNT

KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
5 HEALHNHYTQKSLSLGLGK

(SEQ ID NO: 66)

将克隆所得轻链和重链质粒配对共转染 HEK293E 细胞(上海恒瑞医药有限公司赠送)或者 ExpiCHO(Cat No. A29127, ThermoFisher)细胞, 转染后 5 天(37 度, HEK29E3 细胞)或者 10-12 天(32 度, expiCHO 细胞)收获细胞培养上清, 4000 转离
10 心 20 分钟, 上清使用 0.45 μM 滤器过滤。接着用 MabSelectSure LX 柱(GE Healthcare)进行第一步亲和纯化。将培养液上清流过 PBS 平衡的 MabSelectSure LX 柱, 经 PBS 洗涤后, 用 pH 3.0 的 0.1 M Glycine 酸性洗脱液洗脱目的蛋白后用 1 M MES(pH 6.0)中和, 最后用 HiTrap SP HP 离子柱精细纯化。经检测, 获得目的抗体。

15 **实施例 4. TGFβ1 单克隆抗体的亲和力测定**

用 Biacore T200(GE Healthcare)测定抗体与人/小鼠 GARP/TGFβ1 以及人/小鼠 TGFβ1_C4S 的亲和力。

使用 Protein A 生物传感芯片(Cat No. # 29127556, GE)亲和捕获一定量的待测抗体, 然后于芯片表面流经一系列梯度稀释的人或小鼠 GARP-TGFβ1 复合物
20 TGFβ1_C4S 抗原, 流速 50 μL/min, 解离时间 5 分钟, 每个循环结束后使用 pH 1.5 甘氨酸-盐酸(Cat. # BR-1003-54, GE)对芯片进行再生, 反应缓冲液为用蒸馏水稀释至 1 x 的 HBS-EP+缓冲溶液(Cat No. # BR-1006-69, GE)pH 7.4)。

利用 Biacore T200 实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线, 得到的数据用 BIAevaluation version 4.1, GE 软件以 Langmuir 1:1 结合模型进行拟合, 得出亲
25 和力数值, 结果见表 6。

表 6. H27 的亲和力数据

抗原	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
人 GARP-TGFβ1 复合物	8.64e+04	5.94e-04	6.88e-09
小鼠 GARP-TGFβ1 复合物	1.37e+05	7.08e-04	5.16e-09
人 TGFβ1_C4S	2.63e+05	7.43e-04	2.83e-09
小鼠 TGFβ1_C4S	3.68e+05	8.06e-04	2.19e-09

实施例 5. TGFβ1 单克隆抗体 H27 的亲和力成熟

将 H27 抗体分子进行三维结构模拟。参考人种系基因突变热点和三维结构模
30 拟结果, 选定框架区和 CDR 区部分关键氨基酸残基, 建立 4 个随机突变噬菌体文库(表 7)。利用噬菌体文库展示技术, 筛选得到亲和力有所提高的功能性抗体。对不同文库获得新氨基酸残基进行组合与验证, 获得亲和力与功能均有提高的功能性抗体。

表 7. H27 亲和力成熟文库设计

文库	库容	重链突变残基	轻链突变残基
1	1x10 ⁷	G99 G100 Y100A	Y32 Y92
2	1x10 ⁷	/	S28 S31 A50 S53 Q55
3	1x10 ⁷	S53 S56 Y58	S93 T94
4	1x10 ⁷	S31 A33 V95 W100B	R24

注：“/”为不含突变残基

对 4 个随机突变噬菌体文库进行筛选，利用生物素化的人 GARP-TGFβ1(包含 SEQ ID NO: 5 和 6)作为筛选抗原，经过 3-4 轮筛选，对所获克隆进行序列分析并
5 结合噬菌体 ELISA 结果，挑选 62 个抗体序列进行克隆构建，将抗体的轻链可变区 VL 克隆进含有人源 kappa 轻链恒定区(SEQ ID NO: 19)的 pTT5 表达载体，将抗体重链可变区 VH 克隆进含有人 hIgG4-S228P(CH1-CH2-CH3)重链恒定区(SEQ ID NO: 20)的 pTT5 表达载体。

将克隆所得轻链重链质粒配对共转染 HEK293E 细胞，5 天后收集细胞培养上
10 清，4000 转离心去除细胞，用 MabSelect Sure 进行纯化后参照实施例 4 的方法进行亲和力测定。

通过 SPR 蛋白相互作用确定亲和力比 H27 提高 5 倍以上的抗体均来自第二个随机突变库，该库抗体重链为 H27 重链。其轻链可变区序列如表 8 所示(下划线部分为 CDR 区，采用 Kabat 编码规则)。另外，其轻链全长序列和 CDR 组合分别如
15 表 9 和 10 所示。

表 8. TGFβ1 单克隆抗体 H27 的亲和力成熟后的轻链可变区序列

编号	VL
SL2-1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAISDYLNWYQQKPGKA PKLLIYTASYLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO: 21)
SL2-2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQFISDYLNWYQQKPGKA PKLLIYTASYLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO: 22)
SL2-3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISEYLNWYQQKPGKA PKLLIYTASYLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO: 23)
SL2-4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQIISDYLNWYQQKPGKA PKLLIYSASYLES GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO: 24)
SL2-5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQPISDYLNWYQQKPGKA PKLLIYTASYLES GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO: 25)
SL2-6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQYISDYLNWYQQKPGKA PKLLIYMASALD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO: 26)
SL2-8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQYISDYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASYLES GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO: 27)

SL2-9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQFISPYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASELESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO: 28)
SL2-12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQYISDYLWYQQKPGKA PKLLIYSASYLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO: 29)
SL2-13	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQVISDYLWYQQKPGKA PKLLIYAASYLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO: 30)
SL2-15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQKISDYLWYQQKPGKA PKLLIYAASGLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO: 31)
SL2-17	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISHYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASYLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO: 32)
SL2-18	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISEYLNWYQQKPGKA PKLLIYTASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO: 33)
SL2-19	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQAISPYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASELESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 34)
SL2-22	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQISDYLWYQQKPGKA PKLLIYTASYLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 35)

表 9. TGFβ1 单克隆抗体 H27 的亲合力成熟后的轻链序列

编号	轻链 LC
SL2-1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQAISDYLWYQQKPGKA PKLLIYTASYLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:67)
SL2-2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQFISDYLWYQQKPGKA PKLLIYTASYLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:68)
SL2-3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISDYLWYQQKPGKA PKLLIYTASYLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:69)
SL2-4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQIISDYLWYQQKPGKA PKLLIYSASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC

	QQSYSTPLTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:70)
SL2-5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQPISDYLNWYQQKPGKA PKLLIYTASYLES ^{GVPSR} FGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:71)
SL2-6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQYISDYLNWYQQKPGKA PKLLIYMASALDS ^{GVPSR} FGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:72)
SL2-8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQYISDYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASYLES ^{GVPSR} FGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:73)
SL2-9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQFISPYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASELES ^{GVPSR} FGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:74)
SL2-12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQYISDYLNWYQQKPGKA PKLLIYSASYLDS ^{GVPSR} FGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:75)
SL2-13	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQVISDYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASYLDS ^{GVPSR} FGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:76)
SL2-15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQKISDYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASGLESGVPSR ^{FGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC} QQSYSTPLTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:77)
SL2-17	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISHYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASYLDS ^{GVPSR} FGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS

	LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:78)
SL2-18	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISEYLNWYQQKPGKA PKLLIYTASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:79)
SL2-19	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAISPYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASELESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:80)
SL2-22	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISDYLNWYQQKPGKA PKLLIYTASYLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:81)

表 10. TGFβ1 单克隆抗体 H27 的亲和力成熟后的轻链 CDR 序列

编号	序列	
SL2-1	LCDR1	RASQAISDYLN (SEQ ID NO: 36)
	LCDR2	TASYLTS (SEQ ID NO: 37)
	LCDR3	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 18)
SL2-2	LCDR1	RASQFISDYLN (SEQ ID NO: 39)
	LCDR2	TASYLDS (SEQ ID NO: 40)
	LCDR3	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 18)
SL2-3	LCDR1	RASQGISEYLN (SEQ ID NO: 41)
	LCDR2	TASYLDS (SEQ ID NO: 40)
	LCDR3	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 18)
SL2-4	LCDR1	RASQIISDYLN (SEQ ID NO: 42)
	LCDR2	SASYLES (SEQ ID NO: 43)
	LCDR3	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 18)
SL2-5	LCDR1	RASQPISDYLN (SEQ ID NO: 44)
	LCDR2	TASYLES (SEQ ID NO: 45)
	LCDR3	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 18)
SL2-6	LCDR1	RASQYISDYLN (SEQ ID NO: 46)
	LCDR2	MASALDS (SEQ ID NO: 47)
	LCDR3	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 18)
SL2-8	LCDR1	RASQYISDYLN (SEQ ID NO: 46)
	LCDR2	AASYLES (SEQ ID NO: 48)
	LCDR3	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 18)
SL2-9	LCDR1	RASQFISPYLN (SEQ ID NO: 49)
	LCDR2	AASELES (SEQ ID NO: 50)
	LCDR3	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 18)
SL2-12	LCDR1	RASQYISDYLN (SEQ ID NO: 46)

	LCDR2	SASYLDS(SEQ ID NO: 51)
	LCDR3	QQSYSTPLT(SEQ ID NO: 18)
SL2-13	LCDR1	RASQVISDYLN(SEQ ID NO: 52)
	LCDR2	AASYLDS(SEQ ID NO: 53)
	LCDR3	QQSYSTPLT(SEQ ID NO: 18)
SL2-15	LCDR1	RASQKISDYLN(SEQ ID NO: 54)
	LCDR2	AASGLES(SEQ ID NO: 55)
	LCDR3	QQSYSTPLT(SEQ ID NO: 18)
SL2-17	LCDR1	RASQGISHYLN(SEQ ID NO: 56)
	LCDR2	AASYLDS(SEQ ID NO: 53)
	LCDR3	QQSYSTPLT(SEQ ID NO: 18)
SL2-18	LCDR1	RASQSISEYLN(SEQ ID NO: 57)
	LCDR2	TASYLES(SEQ ID NO: 45)
	LCDR3	QQSYSTPLT(SEQ ID NO: 18)
SL2-19	LCDR1	RASQAISPYLN(SEQ ID NO: 58)
	LCDR2	AASELES(SEQ ID NO: 50)
	LCDR3	QQSYSTPLT(SEQ ID NO: 18)
SL2-22	LCDR1	RASQSISDYLN(SEQ ID NO: 59)
	LCDR2	TASYLDS(SEQ ID NO: 40)
	LCDR3	QQSYSTPLT(SEQ ID NO: 18)

H27、SL2-1、SL2-2、SL2-3、SL2-4、SL2-5、SL2-6、SL2-8、SL2-9、SL2-12、SL2-13、SL2-15、SL2-17、SL2-18、SL2-19、SL2-22 具有如下通式结构：

LCDR1 为 RASQX₁ISX₂YLN (SEQ ID NO:38)，X₁ 选自 S、A、F、G、I、P、Y、V 或 K，X₂ 选自 S、D、E、P 或 H；

LCDR2 为 X₃ASX₄LX₅S (SEQ ID NO:64)，X₃ 选自 A、T、S 或 M，X₄ 选自 S、Y、A、E 或 G，X₅ 选自 Q、T、D 或 E。

SL2-2、SL2-9、SL2-12、SL2-19、SL2-22 具有如下通式结构：

LCDR1 为 RASQX₁ISX₂YLN(SEQ ID NO:38)，其中 X₁ 选自 F、Y 或 A，X₂ 选自 D 或 P；

LCDR2 为 X₃ASX₄LX₅S(SEQ ID NO:64)，其中 X₃ 选自 A、T 或 S，X₄ 选自 S、Y 或 E，X₅ 选自 Q、D 或 E。

实施例 6. TGFβ1 亲和力成熟单克隆抗体的亲和力测定

本实施例的阴性对照为 HBS-EP，阳性对照为 Ab6(Scholar rock, WO2020014460A1)和 Abbv-151(Abbvie, US10793627B2)。Ab6 与 GARP-TGFβ1 复合物、LRRC33-TGFβ1 复合物、LTBP3-TGFβ1 复合物和 LTBP1-TGFβ1 复合物都结合，结合表位完全在 TGFβ1 上(Martin 等，2020)；而 Abbv-151 的结合表位包括 GARP-TGFβ1 复合物中的 GARP 和 TGFβ1，不与单独的 GARP 或 TGFβ1 结合(Streel 等，2020)。Ab6 和 Abbv-151 的序列如下：

>Ab6 抗体重链序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSFSMDWVRQAPGKGLEWVSYI
SPSADTIYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGVLDYG
DMLMPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNV
5 KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
HEALHNHYTQKSLSLGLG

10 (SEQ ID NO: 60)

>Ab6 抗体轻链序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDA
SNLETGVPSRFSGSGSGTDFFTISSSLQPEDATYYCQQADNHPWTFGGGKVE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
15 QESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

(SEQ ID NO: 61)

>Abbv-151 抗体重链序列:

QVQLVQPGAIEVRKPGASVKVSCKASGYRFTSYIDWVRQAPGQGLEWMG
20 RIDPEDAGTKYAQKFQGRVTMTADTSTSTVYVELSSLRSEDATVYYCARYEWET
VVVGDLMEYEWYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNV
DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
25 WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG

(SEQ ID NO: 62)

>Abbv-151 抗体轻链:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSYLAWYQQKPGQAPKILYIGAS
30 RLKTGVPSRFSGSGSGTSFTLTISSELEPEDAATYYCQQYASVPVTFGGGKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 63)

35 用 Biacore T200 (GE Healthcare)按照实施例 4 的方法测定几个亲和力成熟单克
隆抗体与人和小鼠 GARP-TGFβ1 复合物的亲和力。亲和力测定结果参见表 11 和
12。

表 11. H27 亲和力成熟抗体的亲和力数据

抗体	抗原	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
----	----	--------------	-------------	-----------

H27	人 GARP-TGFβ1 复合物	3.61E+05	9.57E-04	2.65E-09
SL2-2		3.87E+05	5.24E-05	1.35E-10
SL2-22		3.79E+05	6.08E-05	1.61E-10
SL2-12		3.20E+05	8.51E-05	2.66E-10
SL2-19		1.92E+05	6.95E-05	3.62E-10
SL2-9		1.80E+05	8.54E-05	4.75E-10

表 12. SL2-22 的亲合力数据

抗体	抗原	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
Abbv151	人 GARP-TGFβ1 复合物	1.54E+05	1.51E-04	9.80E-10
Ab6		4.17E+05	1.38E-04	3.32E-10
SL2-22		3.75E+05	9.50E-05	2.54E-10
Abbv151	鼠 GARP-TGFβ1 复合物	/	/	/
Ab6		4.69E+05	1.06E-04	2.26E-10
SL2-22		3.89E+05	8.86E-05	2.28E-10

实施例 7. TGFβ1 单克隆抗体体外抑制 GARP-TGFβ1 复合物的功能

将 2×10^6 个 LN229 细胞(Procell, CL-0578)传至 T75 培养瓶(Nunc)中, 24 h 后
5 利用 293fectin™ (Invitrogen)转染试剂单转染人或小鼠的原 TGFβ1、或共转染人或小鼠的原 TGFβ1 和 GARP 或 LRRC33 质粒。24 h 后, 将细胞按每孔 1×10^4 个传至白色不透明 96 孔细胞培养板(PerkinElmer)中。24 h 后, 吸出培养基, 加入重悬于 DMEM + 0.5% BSA 中的 HepG2 CAGA12-luc 荧光素酶报道细胞, 同时加入倍比稀释的 H27、H27 亲和力成熟抗体以及对照抗体 Ab6。混合培养 20 h 后, 加入
10 ONE-Glo™ 荧光素酶试剂, 孵育 5 min 后, 在多功能酶标仪(SpectraMax M5)上读取化学发光值。溶媒处理组的荧光素酶活性值标准化到 1, 相对活性=抗体处理组荧光素酶÷溶媒对照组。使用 Prism 9 通过非线性拟合、三参数对数抑制剂对反应模型作图。

结果如图 1A 和图 1B 显示, 亲和力成熟后的 SL2-2、SL2-9、SL2-12、SL2-19
15 及 SL2-22 抑制原 TGFβ1 及 TGFβ1 各个复合物的活性均高于母本 H27。SL2-2、SL2-9、SL2-12、SL2-19 及 SL2-22 在抑制人原 TGFβ1、GARP-TGFβ1 复合物和鼠 GARP-TGFβ1 复合物活性上与阳性对照 Ab6 相当, 在抑制人 LRRC33-TGFβ1 复合物活性上优于 Ab6。

20 实施例 8. TGFβ1 单克隆抗体 SL2-22 与表达不同 TGFβ 复合物的细胞结合实验

将 HEK293E 细胞配制成 1×10^6 个/mL, 取 5 mL 放入 50 mL 培养管中, 用 293fectin™ 试剂转染表 13 中质粒。48 h 后, 将细胞用 1 x PBS 洗 2 次, 按每孔 1×10^5 个放入 96 孔圆底细胞培养板(Nunc)中。加入 100 μL 1 x PBS 配制的 10 nM 抗体或对照抗体, 室温染色 1 h, 1 x PBS 洗 3 次后, 加入 FITC 标记的抗人 Fc 抗体
25 100 μL, 室温染色 30 min。染色结束, 1 x PBS 洗 3 次。加入 7-AAD 孵育 5 min,

1 x PBS 洗 3 次后，流式细胞仪检测。通过 Flowjo 分析活细胞中 FITC 阳性的细胞数，计算 FITC 阳性的细胞数占活细胞总数的百分比，并作图。

表 13. 质粒结构

质粒名称	结构
对照质粒 (Control plasmids)	pcDNA3.1
TGFβ1	hTGFβ1 表达质粒表达人 TGFβ1 序列(Genbank Accession NO. NC_000019.10)
TGFβ2	hTGFβ2 表达质粒表达人 TGFβ2 序列(Genbank Accession NO. NC_000001.11)
TGFβ3	hTGFβ3 表达质粒表达人 TGFβ3 序列(Genbank Accession NO. NC_000014.9)
TGFβ1-GARP 复合物	hTGFβ1 表达质粒表达人 TGFβ1 序列(Genbank Accession NO. NC_000019.10) GARP 表达质粒表达人 GARP 序列(Genbank Accession NO. NC_000011.10)
TGFβ2-GARP 复合物	hTGFβ2 表达质粒表达人 TGFβ2 序列(Genbank Accession NO. NC_000001.11) GARP 表达质粒表达人 GARP 序列(Genbank Accession NO. NC_000011.10)
TGFβ3-GARP 复合物	hTGFβ3 表达质粒表达人 TGFβ3 序列(Genbank Accession NO. NC_000014.9) GARP 表达质粒表达人 GARP 序列(Genbank Accession NO. NC_000011.10)
mTGFβ1	mTGFβ1 表达质粒表达小鼠 TGFβ1 序列 (Genbank Accession NO. NC_000073.7)
mTGFβ1-mGARP 复合物	mTGFβ1 表达质粒表达小鼠 TGFβ1 序列 (Genbank Accession NO. NC_000073.7) mGARP 表达质粒表达小鼠 GARP 序列(Genbank Accession NO. NC_000073.7)

结果如图 2 所示，SL2-22 和 Ab6 均与人和鼠 TGFβ1(图 2 中分别对应 TGFβ1 和 mTGFβ1)、GARP-TGFβ1 复合物(图 2 中分别对应 TGFβ1+ GARP, mTGFβ1+mGARP)结合，并且不结合 TGFβ2、GARP-TGFβ2 复合物(图 2 中对应为 TGFβ2+GARP)，不同的是 Ab6 与人 TGFβ3、GARP-TGFβ3 复合物(图 2 中对应 TGFβ3+GARP)也有一定结合，而 SL2-22 只特异结合 TGFβ1 复合物。

实施例 9. TGFβ1 抗体的表位竞争研究

本实施例的阴性对照为 HBS-EP，阳性对照为 Ab6 和 Abbv-151。

用 Biacore T200(GE Healthcare)研究抗人 TGFβ1 抗体 SL2-22 与阳性对照抗体与人 GARP-TGFβ1 复合物的表位竞争。

使用氨基偶联试剂盒(Cat No. BR-1000-50, GE)和 His 捕获试剂盒(Cat No. 28-9950-56, GE)根据试剂盒说明书对 CM5 传感芯片(Cat. 29-1049-88, GE)进行抗

His 标签抗体的偶联,使表面响应值达到约 10000RU,之后用乙醇胺封闭后待用。

表位竞争研究步骤(样本使用双模式)如下(抗体两两循环配对):

- 1) 抗原捕获: 人 GARP-TGFβ1 复合物
- 2) 第一个抗体: 浓度 100 μg/ml, 流速 50 μL/min, 60 秒, HBS-EP 缓冲液做对照
- 3) 第二个抗体: 浓度 100 μg/ml, 流速 50 μL/min, 60 秒, HBS-EP 缓冲液做对照
- 4) 对传感图进行分析, SL2-22 与 Ab6 对人 GARP-TGFβ1 复合物的结合表位有

部分竞争,SL2-22 与 Abbv151 对人 GARP-TGFβ1 复合物的结合表位完全不竞争(表 14)。

表 14. SL2-22 与阳性抗体 Ab6、Abbv151 表位竞争的测定

	SL2-22	Ab6	Abbv151
SL2-22		部分竞争	×
Ab6	部分竞争		×
Abbv151	×	×	

(注: “×”表示完全不竞争)

实施例 10. TGFβ1 单克隆抗体 SL2-22 在小鼠 EMT-6 模型中抑制肿瘤生长

为检测 SL2-22 体内肿瘤抑制活性,将 BALB/c 小鼠(雌性,6 周龄,购买于北京维通利华实验动物技术有限公司)适应性饲养 1 周,实验当天编号称重。收集处于对数生长期的鼠乳腺癌细胞 EMT-6(Procell, CL-0573),用 PBS 重悬,以 5×10⁶个/mL 浓度,0.1 mL/只体积接种于 BALB/c 小鼠的右侧肋部皮下。接种后第 3 d,当平均肿瘤体积达到约 60 mm³时,挑选个体肿瘤体积适中的小鼠,按照表 15 所示进行随机分组。mIgG2a-FcS 为去除 ADCC 效应的带有 L234A/L235E/G237A/D327Q/A330S/P331S 的 mIgG2a Fc,作为同种型对照;RMP1-14-mIgG2a-FcS 为抗 PD1 抗体 RMP1-14 的可变区(WO2018223182A1 中除去信号肽的序列 285(重链可变区)和 286(轻链可变区);WO2018223182A1 通过引用全文并入本公开)与去除 ADCC 效应的带有 L234A/L235E/G237A/D327Q/A330S/P331S 的 mIgG2a 重链恒定区/鼠 kappa 轻链恒定区融合在一起的抗体;SL2-22-mIgG2a-FcS 为 SL2-22 的可变区与去除 ADCC 效应的带有 L234A/L235E/G237A/D327Q/A330S/P331S 的 mIgG2a 重链恒定区/鼠 kappa 轻链恒定区融合在一起的抗体,序列如下:

>SL2-22-mIgG2a-FcS 抗体重链:

EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P G K G L E W V S A
I S G S G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R V D S S G G
Y W Y F D L W G R G T L V T V S S A K T T A P S V Y P L A P V C G D T T G S S V T L G C L V K G Y F P E P

VTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTK
VDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAEGAPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDV
SEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEF
KCKVNNKQLPSSIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFM
5 PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCS
VVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

(SEQ ID NO: 82)

>SL2-22-mIgG2a-FcS 抗体轻链:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDYLNWYQQKPGKAPKLLIYTAS
10 YLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGGTKLEIKR
ADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS
WTDQDSKDDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

(SEQ ID NO: 83)

分组当天开始给药，按照相同摩尔剂量，给药频率为一周两次，共给药 7 次，
15 给药方式为腹腔注射。每周测量 2 次小鼠体重以及肿瘤体积，肿瘤体积计算公式
为 $TV=L_{长} \times L_{短}^2/2$ 。各组肿瘤体积用平均值±标准差表示，使用 Two-way ANOVA
进行统计分析，并计算肿瘤抑制率(%TGI)，计算公式为 $\%TGI=[1-(T-T_0)/(C-C_0)]$
×100%。

结果如图 3A、3B、表 15 所示，SL2-22-mIgG2a-FcS 与抗 PD-1 抗体
20 RMP1-14-mIgG2a-FcS 联用相比于 RMP1-14-mIgG2a-FcS 单用组显著抑制小鼠
EMT-6 肿瘤生长($p = 0.0127$, Two-way ANOVA)，并延长动物生存期($p = 0.0323$,
Log-rank (Mantel-Cox) test)。在治疗过程中，小鼠耐受良好，没有出现明显的体重
下降(图 3C)。

表 15. SL2-22 在 EMT-6 模型上的给药方案、抑瘤效果和中位生存期

分组	动物数量 (只)	给药剂量 (mg/kg)	%TGI (第 28 天)	中位生存期 (天)
mIgG2a-FcS	12	3.5	—	22.5
RMP1-14-mIgG2a-FcS	12	10	15.98	24
RMP1-14-mIgG2a-FcS + SL2-22-mIgG2a-FcS	12	10 + 10	56.60	40

25 注：mIgG2a-FcS、RMP1-14-mIgG2a-FcS 和 SL2-22-mIgG2a-FcS 给药摩尔浓度
相同，约为 68 μmol/kg。

实施例 11. TGFβ1 抗体 SL2-22 在小鼠 CT26 模型中抑制肿瘤生长

为检测 SL2-22 体内肿瘤抑制活性，将 BALB/c 小鼠(雌性，6 周龄，购买于北
30 京维通利华实验动物技术有限公司)适应性饲养 1 周，实验当天编号称重。收集处
于对数生长期的 小鼠结肠癌细胞 CT26(国家生物医学实验细胞资源库，
1101MOU-PUMC000275)，用 PBS 重悬，以 3×10^6 个/mL 浓度，0.1 mL/只体积接

种于 BALB/c 小鼠的右侧肋部皮下。接种后第 8-9 d, 当平均肿瘤体积达到约 60 mm³ 时, 挑选个体肿瘤体积适中的小鼠, 按照表 16 所示进行随机分组。分组当天开始给药, 按照相同摩尔剂量, 给药频率为一周两次, 共给药 6 次, 给药方式为腹腔注射。每周测量 2 次小鼠体重以及肿瘤体积, 肿瘤体积计算公式为 $TV=L_{长} \times L_{短}^2/2$ 。

5 各组肿瘤体积用平均值±标准差表示, 并计算肿瘤抑制率(%TGI), 计算公式为 $\%TGI=[1-(T-T_0)/(C-C_0)] \times 100\%$ 。

结果如图 4A、4B、表 16 所示, SL2-22-mIgG2a-FcS 与抗 PD-1 抗体 RMP1-14-mIgG2a-FcS 联用能够抑制小鼠 CT26 肿瘤生长, 并延长动物生存期。在治疗过程中, 小鼠耐受良好, 没有出现明显的体重下降(图 4C)。

10 表 16. SL2-22 在 CT26 模型上的给药方案、抑瘤效果和中位生存期

分组	动物数量(只)	给药剂量(mg/kg)	%TGI(第 28 天)	中位生存期(天)
mIgG2a-FcS	10	3.5	—	22
RMP1-14-mIgG2a-FcS	10	10	33.96	30
RMP1-14-mIgG2a-FcS + SL2-22-mIgG2a-FcS	10	10 + 10	48.55	37

注: mIgG2a-FcS、RMP1-14-mIgG2a-FcS 和 SL2-22-mIgG2a-FcS 给药摩尔浓度相同, 约为 68 μmol/kg

15 实施例 12. TGFβ1 单克隆抗体 SL2-22 在小鼠特发性纤维化模型中抑制纤维化进程

为检测 TGFβ1 抗体 SL2-22 体内抑制纤维化进程, 使用 C57BL/6J 小鼠, 雄性, 8 周龄, 购买于北京维通利华实验动物技术有限公司, 适应性饲养 1 周, 实验当天编号称重。造模当天编号称重, 按照体重分布随机分组, 每组 15 只, 具体分组见下表 17。实验第 1 天按照体重, 腹腔注射给予抗体药物或溶媒对照, 2 小时后使用平头针经气管滴注博莱霉素, 以 2U/kg 的剂量, 每只动物缓慢滴注约 50 μL。然后按照上述组别, 每周给药 2 次, 共给药 3 周。实验第 22 天分别采集支气管肺泡灌洗液和肺组织, 分析免疫细胞浸润程度、肺组织羟脯氨酸水平, 以及 Masson 染色分析。

表 17. 实验分组及给药情况

分组	造模类型	给药类型	动物数量(只)	给药剂量(mg/kg)
假手术组	PBS	PBS	10	/
造模组	博莱霉素	PBS	15	/
给药组	博莱霉素	SL2-22-mIgG2a-FcS	15	15 mg/kg

25 SL2-22-mIgG2a-Fc 给药组显著改善动物整体体重和存活率(图 5A 和 5B), 降低肺组织羟脯氨酸水平, 相比造模组降低 40.44%(图 5C); 同时显著降低博莱霉素造模后的肺内胶原沉积和纤维化水平, 相比造模组降低 46.51%(图 5D 和 5E)。

实施例 13.抗人和小鼠 GARP-TGFβ1 的单域抗体(VHH)的筛选和制备

1. 骆驼免疫和文库构建

5 用人 GARP/TGFβ1 蛋白(由 SEQ ID NO: 5 和 6 所示的蛋白共表达、纯化获得的蛋白复合物)作为抗原免疫一头双峰驼。将弗氏完全佐剂与抗原以 1: 1 体积混合后, 每两周对骆驼进行皮下多点免疫。第一次免疫剂量为 200 μg 蛋白, 随后四次免疫剂量为 100 μg 蛋白/次, 共五次免疫, 然后用人 GARP/TGFβ1 蛋白测定效价。效价合格时, 采集骆驼外周血, 分离淋巴细胞, Trizol 裂解细胞, 抽提 RNA, 逆转录得到 cDNA, 构建噬菌体文库。

10 2. 单域抗体(VHH)的筛选

用 20 μg 的生物素化的人 GARP/TGFβ1 蛋白结合 100 μL Dynabeads™ M-280 链霉亲和素, 37 °C 放置 1h 后用 2%脱脂奶室温封闭 1 h, 加入前述噬菌体文库, 在室温下作用 1h。用 PBST(含有 0.05% Tween-20 的 PBS)洗 9 遍, 去除不结合的噬菌体。用 1mg/mL 的胰蛋白酶将与人 GARP/TGFβ1 蛋白特异性结合的噬菌体洗脱, 15 并感染处于对数期生长的大肠杆菌 TG1, 产生并纯化获得第一轮阳性噬菌体。基于第一轮筛到的阳性噬菌体, 在第二轮筛选中获得与小鼠 GARP-TGFβ1 复合物蛋白也具有高亲和力的单域抗体(VHH)。

从筛选富集的阳性克隆中挑取 96 个单克隆菌落包装成噬菌体单链抗体, 用于噬菌体 ELISA 测试。ELISA 板上分别包被 2 μg/mL 的人 GARP-TGFβ1 复合物蛋白, 20 加入封闭液稀释的噬菌体上清, 用抗 M13 HRP 标记的抗体检测。对 ELISA 结合测试结果中 OD450 值/背景值>5 的克隆测序, 获得序列。以下示出其中的 C19-VHH 序列。

>C19-VHH

25 QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTASGFTYCEYDMSWYRQAPGKEREFVSRIAS
DGRTSYVDSVKGRFTISQDNARNTGYLEMNSLKPEDTAMYYCKTEAVKYSGNWC
VAAPGFAYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 84)

SEQ ID NO:84 中, 顺序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, 序列中斜体为 FR 序列, 下划线分别为 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。本公开提供的抗 GARP-TGFβ1 单域抗体的编号规则均为 Kabat。

30 表 18. C19 VHH 的 CDR 序列

CDR1	EYDMS (SEQ ID NO: 85)
CDR2	RIASDGRTSYVDSVKG (SEQ ID NO: 86)
CDR3	EAVKYSGNWCVAAPGFAY (SEQ ID NO: 87)

3. 完整抗体的制备

将 C19-VHH 序列与如下人 IgG4-Fc(CH2-CH3, 含有 S228P)片段融合, 获得 C19。

>hIgG4-Fc(S228P)

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
5 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLGLGK

(SEQ ID NO: 88)

>C19

QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTASGFTYCEYDMSWYRQAPGKEREFVSR
10 IASDGRTSYVDSVKGRFTISQDNARNTGYLEMNSLKPEDTAMYYCKTEAVKYS
GNWCVAAPGFAYWGQGTQVTVSSESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT
15 VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(SEQ ID NO: 89)

将 C19 序列克隆进哺乳动物表达载体 pTT5，转染 HEK293E 或
ExpiCHO(ThermoFisher, A29127)细胞,转染后 5 天(HEK293E 细胞, 37 °C)或 10-12
天(ExpiCHO 细胞, 32 °C)于 4000 rpm 离心 20 min 收获细胞培养上清,并用 0.45 μM
20 滤器过滤。接着用 MabSelectSure LX 柱(GE Healthcare)进行第一步亲和纯化。将培
养液上清流过 PBS 平衡的 MabSelectSure LX 柱,经 PBS 洗涤后,用 pH 3.0 的 0.1
M Glycine 酸性洗脱液洗脱目的蛋白后用 1 M Tris-HCl(pH 8.0)中和,最后用 HiTrap
Q HP 离子柱精细纯化。经检测,获得目的抗体。

通过 SPR 和细胞功能实验发现 C19 有较好的抑制功能,并且和人和小鼠
25 GARP-TGFβ1 复合物都有很好的结合。

实施例 14. 抗 GARP-TGFβ1 单域抗体的人源化改造

通过对选定的特异性 TGFβ1 单域抗体 C19 进行三维结构同源建模,结合与
V-base 人种系序列数据库和 IMGT 人类抗体重链可变区种系基因数据库进行比对的
30 的结果,挑选与 C19 序列同源性高的重链可变区种系基因 IGHV3-23 作为 FR1、
FR2、FR3 的模板,用 IGJH4 作为 FR4 的模板,将骆驼来源单域抗体的 CDR 移植
到相应的人源模板中,形成次序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可变
区序列。为保留人源化后单域抗体原有活性,在框架区进行一系列回复突变。人
源化的 VHH 框架区包含选自以下的至少一种氨基酸突变: 23T、29Y、30C、37Y、
35 44E、45R、47F、71Q、74A、75R、78G、81E、93K 和 94T。上述氨基酸位置根
据 Kabat 编码。

获得的人源化序列如下, CDR 区用下划线表示, 编码规则为 Kabat 编码:

> C19-hu3

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTYCEYDMSWYRQAPGKEREFVSRI
ASDGRTSYVDSVKGRFTISQDNARNTGYLQMNSLRAEDTAVYYCKTEAVKYSG
NWCVAAPGFAYWGQGLTVTVSS

(SEQ ID NO: 90)

5 > C19-hu7

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTYCEYDMSWYRQAPGKEREFVSRI
ASDGRTSYVDSVKGRFTISQDNARNTGYLEMNSLRAEDTAVYYCKTEAVKYSG
NWCVAAPGFAYWGQGLTVTVSS

(SEQ ID NO: 91)

10 > C19-hu8

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTYCEYDMSWYRQAPGKEREFVSRI
ASDGRTSYVDSVKGRFTISQDNSKNTGYLEMNSLRAEDTAVYYCKTEAVKYSG
NWCVAAPGFAYWGQGLTVTVSS

(SEQ ID NO: 92)

15 使用实施例 2 中的方法构建人源化单域抗体 VHH 与 hIgG4 的 Fc 区融合的全
抗体序列。获得的人源化完整抗体序列如下：

>C19-3

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTYCEYDMSWYRQAPGKEREFVSRI
ASDGRTSYVDSVKGRFTISQDNARNTGYLQMNSLRAEDTAVYYCKTEAVKYSG
20 NWCVAAPGFAYWGQGLTVTVSSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVD
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

25 (SEQ ID NO: 93)

>C19-7

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTYCEYDMSWYRQAPGKEREFVSRI
ASDGRTSYVDSVKGRFTISQDNARNTGYLEMNSLRAEDTAVYYCKTEAVKYSG
NWCVAAPGFAYWGQGLTVTVSSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL
30 MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVD
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

(SEQ ID NO: 94)

35 >C19-8

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTYCEYDMSWYRQAPGKEREFVSRI
ASDGRTSYVDSVKGRFTISQDNSKNTGYLEMNSLRAEDTAVYYCKTEAVKYSG
NWCVAAPGFAYWGQGLTVTVSSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL
40 MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM

TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVD
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(SEQ ID NO: 95)

5 **实施例 15. 抗 GARP-TGFβ1 单域抗体与 GARP-TGFβ1 复合物的亲和力测定**
 本实施例的阴性对照为 HBS-EP(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% P20, pH7.4)。阳性对照为 Abbv-151(Abbvie, US10793627B2)。其序列如下:

 >Abbv-151 抗体重链:

10 QVQLVQPGA EVRKPGASVKV SCKASGYRFTSY YIDWVRQAPGQGLEWMG
 RIDPEDAGTKYA QKFQGRVTMTADTSTSTVYVELSSLRSEDTAVYYCARYEWET
 VVVGDLMEY EYWGQGT LTVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNV
 DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
15 CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

(SEQ ID NO: 62)

20 >Abbv-151 抗体轻链:

 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSYLA WYQQKPGQAPKILYYGAS
 RLKTGVPSRFSGSGSGTSFTLTIS SLEPEDAATYYCQQYASVPVTFGQGTKVEIKR
 TVAAPS FIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 63)

25 通过 Biacore T200(GE Healthcare)仪器测定 C19 及其人源化抗体、阳性对照抗
 体 Abbv-151 与人 GARP-TGFβ1 复合物(由 SEQ ID NO: 5 和 6 所示序列的蛋白复合
 形成)或小鼠 GARP-TGFβ1 复合物(由 SEQ ID NO: 8 和 9 所示序列的蛋白复合
 形成)的亲和力。使用芯片 Series S sensor chip Protein A(GE Healthcare, 29127556)
30 将待检测抗体捕获至芯片表面, 然后于芯片表面流过不同浓度的人或小鼠
 GARP-TGFβ1 复合物, 实时检测反应信号从而获得结合解离曲线, 通过拟合获得
 结合力常数。实验使用溶液为 HBS-EP 溶液。每个实验循环结束时, 用 pH 1.5
 Glycine(GE Healthcare, BR-1003-54)溶液将芯片再生。抗体的亲和力结果如表 19
 所示。结果显示, 本公开筛选获得的抗体 C19、C19-3、C19-7 和 C19-8 与人
35 GARP-TGFβ1 复合物的亲和力与阳性对照 Abbv-151 相当, 不同的是它们与小鼠
 GARP-TGFβ1 复合物也有一定结合。

表 19. C19 和 C19 人源化抗体与人或小鼠 GARP/TGFβ1 的亲和力测定

抗体名称	抗原	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$
------	----	-------------	------------	----------

C19	人 GARP-TGFβ1 复合物	7.38E+04	1.57E-04	2.12E-09
C19-3	人 GARP-TGFβ1 复合物	3.08E+04	1.45E-04	4.69E-09
C19-7	人 GARP-TGFβ1 复合物	4.12E+04	1.01E-04	2.46E-09
C19-8	人 GARP-TGFβ1 复合物	4.48E+04	1.52E-04	3.39E-09
Abbv151	人 GARP-TGFβ1 复合物	6.45E+05	2.83E-03	4.39E-09
C19	小鼠 GARP-TGFβ1 复合物	5.00E+04	5.07E-04	1.01E-08
C19-3	小鼠 GARP-TGFβ1 复合物	1.40E+04	6.25E-04	4.46E-08
C19-7	小鼠 GARP-TGFβ1 复合物	2.48E+04	6.10E-04	2.46E-08
C19-8	小鼠 GARP-TGFβ1 复合物	2.38E+04	6.67E-04	2.80E-08
Abbv151	小鼠 GARP-TGFβ1 复合物	/	/	/

(注：“/”表示没有结合)

实施例 16. 抗 GARP/TGFβ1 单域抗体体外抑制 GARP/TGFβ1 功能

将 2 x 10⁶ 个 LN229 细胞(Procell, CL-0578)传至 T75 培养瓶(Nunc)中, 24 h 后
5 利用 293fectin™ (Invitrogen)转染试剂单转染人或小鼠的原 TGFβ1、或共转染人和
小鼠的原 TGFβ1 和 GARP 质粒。24 h 后, 将细胞按每孔 1×10⁴ 个传至白色不透明
96 孔细胞培养板(PerkinElmer)中。24 h 后, 吸出培养基, 加入重悬于 DMEM + 0.5%
BSA 中的 HepG2 CAGA12-luc 荧光素酶报道细胞, 同时加入倍比稀释的 C19、C19
人源化抗体以及对照抗体 Abbv-151。混合培养 20 h 后, 加入 ONE-Glo™ 萤光素酶
10 试剂, 孵育 5 min 后, 在多功能酶标仪(SpectraMax M5)上读取化学发光值。溶媒
处理组的荧光素酶活性值标准化到 1, 相对活性=抗体处理组荧光素酶÷溶媒对照组。
使用 Prism 9 通过非线性拟合、三参数对数抑制剂对反应模型作图。

结果如图 6A 和图 6B 显示, C19、C19-3、C19-7 和 C19-8 在抑制人 GARP-TGFβ1
复合物活性上与阳性对照 Abbv-151 相当, 不同的是它们也抑制小鼠 GARP-TGFβ1
15 复合物。

实施例 17. 抗 GARP-TGFβ1 单域抗体 C19-8 与表达 GARP-TGFβ1 的细胞结合实验

将 HEK293E 细胞配制成 1×10⁶ 个/mL, 取 5 mL 放入 50 mL 培养管中, 用
20 293fectin™ 试剂转染表 20 中质粒。48 h 后, 将细胞用 1×PBS 洗 2 次, 按每孔 1×10⁵
个放入 96 孔圆底细胞培养板(Nunc)中。加入 100 μL 1×PBS 配制的 10 nM 抗体或
对照抗体, 室温染色 1 h, 1×PBS 洗 3 次后, 加入 FITC 标记的抗人 Fc 抗体 100 μL,
室温染色 30 min。染色结束, 1×PBS 洗 3 次。加入 7-AAD 孵育 5 min, 1×PBS 洗
3 次后, 流式细胞仪检测。通过 Flowjo 分析活细胞中 FITC 阳性的细胞数, 计算
25 FITC 阳性的细胞数占活细胞总数的百分比, 并作图。

表 20. 质粒结构

质粒名称	结构
------	----

对照质粒 (Control plasmids)	pcDNA3.1
TGFβ1	hTGFβ1 表达质粒表达人 TGFβ1 序列(Genbank Accession NO. NC_000019.10)
TGFβ2	hTGFβ2 表达质粒表达人 TGFβ2 序列(Genbank Accession NO. NC_000001.11)
TGFβ3	hTGFβ3 表达质粒表达人 TGFβ3 序列(Genbank Accession NO. NC_000014.9)
TGFβ1-GARP 复合物	hTGFβ1 表达质粒表达人 TGFβ1 序列(Genbank Accession NO. NC_000019.10) GARP 表达质粒表达人 GARP 序列(Genbank Accession NO. NC_000011.10)
TGFβ2-GARP 复合物	hTGFβ2 表达质粒表达人 TGFβ2 序列(Genbank Accession NO. NC_000001.11) GARP 表达质粒表达人 GARP 序列(Genbank Accession NO. NC_000011.10)
TGFβ3-GARP 复合物	hTGFβ3 表达质粒表达人 TGFβ3 序列(Genbank Accession NO. NC_000014.9) GARP 表达质粒表达人 GARP 序列(Genbank Accession NO. NC_000011.10)
mTGFβ1	mTGFβ1 表达质粒表达小鼠 TGFβ1 序列(Genbank Accession NO. NC_000073.7)
mTGFβ1-mGARP 复合物	mTGFβ1 表达质粒表达小鼠 TGFβ1 序列(Genbank Accession NO. NC_000073.7) mGARP 表达质粒表达小鼠 GARP 序列(Genbank Accession NO. NC_000073.7)

结果如图 7 所示，C19-8 和 Abbv-151 均与人 GARP-TGFβ1 复合物(对应图 7 中 TGFβ1+GARP)结合，不同的是 C19-8 与小鼠 GARP-TGFβ1 复合物(对应图 7 中 mTGFβ1+mGARP)也有一定结合。另外，C19-8 和 Abbv-151 均不与 TGFβ2 复合物(TGFβ2+GARP)和 TGFβ3 复合物(TGFβ3+GARP)结合。

5

实施例 18. 抗 GARP/TGFβ1 单域抗体 C19-8 与 Ab6 和 Abbv-151 的表位竞争研究

本实施例的阴性对照为 HBS-EP，阳性对照为 Ab6(Scholar rock, WO2020014460A1，全文引入本公开)和 Abbv-151。Ab6 与 GARP-TGFβ1 复合物、
10 LRRC33-TGFβ1 复合物、LTBP1-TGFβ1 复合物、LTBP3-TGFβ1 复合物都结合，结合表位完全在 TGFβ1 上(Martin 等，2020)；而 Abbv-151 的结合表位包括 GARP-TGFβ1 复合物中的 GARP 和 TGFβ1，不与单独的 GARP 或 TGFβ1 结合(Streel 等，2020)。Ab6 的序列如下：

>Ab6 抗体重链：

15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSFSMDWVRQAPGKGLEWVSYI
SPSADTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGVLDYG

DMLMPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT
KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
5 KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLGLGK

(SEQ ID NO: 60)

>Ab6 抗体轻链:

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDA
SNLETGVPSRFGSGSGTDFFTISSLQPEDATYYCQQADNHPPWTFGGGKVE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

(SEQ ID NO: 61)

15 通过 Biacore T200(GE Healthcare)仪器测定 C19-8 及阳性抗体 Abbv-151、Ab6
与人 GARP/TGFβ1 的表位竞争。使用芯片 Series S sensor chip CM5(GE Healthacare,
Br100530)偶联抗组氨酸标签抗体, 所用试剂盒为 His 捕获试剂盒(GE Healthcare,
28-9950-56)。将抗原蛋白人 GARP-TGFβ1 复合物捕获至芯片表面, 然后于芯片表
面依次流过相同浓度(500 nM)的抗体, 按表 21 组合进行, 1st 抗体为第一个流过的
20 抗体, 2nd 抗体为第二个流过的抗体。

表 21. 抗体组合

1 st 抗体	2 nd 抗体
C19-8	C19-8
Ab6	C19-8
Abbv-151	C19-8
HBS-EP	C19-8
C19-8	Ab6
Ab6	Ab6
Abbv-151	Ab6
HBS-EP	Ab6
C19-8	Abbv-151
Ab6	Abbv-151
Abbv-151	Abbv-151
HBS-EP	Abbv-151

利用 Biacore 仪器实时检测反应信号从而获得表位竞争曲线。实验使用溶液为

HBS-EP 溶液。每个实验循环结束时，用 pH 1.5 Glycine(GE Healthcare, BR-1003-54) 溶液将芯片再生。抗体的表位竞争测定结果如表 22 所示。

结果显示，C19-8 与 Ab6 完全竞争，与 Abbv-151 完全不竞争。综合前述的体外抑制和细胞结合实验表明，C19-8 是一个与 Abbv-151 一样只抑制 GARP-TGFβ1 复合物，但结合表位不同的抗体。

表 22. C19-8 与阳性抗体 Abbv-151、Ab6 表位竞争的测定

	C19-8	Ab6	Abbv151
C19-8		√	×
Ab6	√		×
Abbv151	×	×	

(注：“√”表示完全竞争； “×”表示完全不竞争)

实施例 19. 抗 GARP-TGFβ1 单域抗体 C19-8 在 小鼠 EMT-6 模型中抑瘤生长

为检测 C19-8 体内肿瘤抑制活性，将 BALB/c 小鼠(雌性，6 周龄，购买于北京维通利华实验动物技术有限公司)适应性饲养 1 周，实验当天编号称重。收集处于对数生长期的小鼠乳腺癌细胞 EMT-6(Procell, CL-0573)，用 PBS 重悬，以 5×10⁶ 个/mL 浓度，0.1 mL/只体积接种于 BALB/c 小鼠的右侧肋部皮下。接种后第 3 d，当平均肿瘤体积达到约 60 mm³ 时，挑选个体肿瘤体积适中的小鼠，按照表 23 所示进行随机分组。

其中，阳性药 M7824 为 PD-L1/TGFβ-trap(Merck KGaA, WO2018029367A1(通过引用全文并入本公开)中的序列 3(重链)和序列 1(轻链))；mIgG2a-FcS 为去除 ADCC 效应的带有 L234A/L235E/G237A/D327Q/A330S/P331S 的 mIgG2a Fc，这里作为同种型对照；RMP1-14-mIgG2a-FcS 为 anti-PD1 抗体 RMP1-14 的可变区 (WO2018223182A1(通过引用全文并入本公开)中除去信号肽的序列 285(重链可变区) 和 286(轻 链 可 变 区)) 与 去 除 ADCC 效 应 的 带 有 L234A/L235E/G237A/D327Q/A330S/P331S 的 mIgG2a 重链恒定区/鼠 kappa 轻链恒定区融合在一起的抗体；C19-8-mIgG2a-FcS 为 C19-8 的可变区与去除 ADCC 效应的带有 L234A/L235E/G237A/D327Q/A330S/P331S 的 mIgG2a 重链 Fc 融合在一起的抗体，序列如下：

>C19-8-mIgG2a-FcS:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTYCEYDMSWYRQAPGKEREFVSRI
ASDGRTSYVDSVKGRFTISQDNSKNTGYLEMNSLRAEDTAVYYCKTEAVKYSG
NWCVAAPGFAYWGQGTLVTVSSPTIKPCPPCKCPAPNAEGAPSVFIFPPKIKDVL
MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSA
LPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKQLPSSIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMT
KKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLR
VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

(SEQ ID NO: 106)

5 分组当天开始给药，按照相同摩尔剂量，给药频率为一周两次，共给药 7 次，给药方式为腹腔注射。每周测量 2 次小鼠体重以及肿瘤体积，肿瘤体积计算公式为 $TV=L_{长} \times L_{短}^2/2$ 。各组肿瘤体积用平均值±标准差表示，使用 Two-way ANOVA 进行统计分析，并计算肿瘤抑制率(%TGI)，计算公式为 $\%TGI=[1-(T-T_0)/(C-C_0)] \times 100\%$ 。

10 结果如图 8A、8B 示，C19-8-mIgG2a-FcS 与抗 PD-1 抗体 RMP1-14-mIgG2a-FcS 联用相比于 RMP1-14-mIgG2a-FcS 单用组显著抑制小鼠 EMT-6 肿瘤生长($p = 0.0017$, Two-way ANOVA)，并延长动物生存期($p = 0.0157$, Log-rank (Mantel-Cox test))。在治疗过程中，小鼠耐受良好，没有出现明显的体重下降(图 8C)。

表 23. C19-8 在 EMT-6 模型上的给药方案、抑瘤效果和中位生存期

分组	动物数量 (只)	给药剂量 (mg/kg)	%TGI (第 28 天)	中位生存期 (天)
mIgG2a-FcS	10	3.5	—	21
RMP1-14-mIgG2a-FcS	10	10	2.88	18
RMP1-14-mIgG2a-FcS + C19-8-mIgG2a-FcS	10	10 + 5.5	60.60	47
M7824	10	12	23.56	29

注：mIgG2a-FcS、RMP1-14-mIgG2a-FcS、C19-8-mIgG2a-FcS 和 M7824 给药摩尔浓度相同，约为 68 μmol/kg。

15 实施例 9. 抗 GARP-TGFβ1 单域抗体 C19-8 在小鼠 CT26 模型中抑瘤生长

为检测 C19-8 体内肿瘤抑制活性，将 BALB/c 小鼠(雌性，6 周龄，北京维通利华实验动物技术有限公司)适应性饲养 1 周，实验当天编号称重。收集处于对数生长期的 小鼠 结肠癌细胞 CT26(国家生物医学实验细胞资源库，1101MOU-PUMC000275)，用 PBS 重悬，以 3×10^6 个/mL 浓度，0.1 mL/只体积接种于 BALB/c 小鼠的右侧肋部皮下。接种后第 8-9 d，当平均肿瘤体积达到约 60 mm³ 时，挑选个体肿瘤体积适中的小鼠，按照表 24 所示进行随机分组。分组当天开始给药，按照相同摩尔剂量，给药频率为一周两次，共给药 6 次，给药方式为腹腔注射。每周测量 2 次小鼠体重以及肿瘤体积，肿瘤体积计算公式为 $TV=L_{长} \times L_{短}^2/2$ 。各组肿瘤体积用平均值±标准差表示，并计算肿瘤抑制率(%TGI)，计算公式为 $\%TGI=[1-(T-T_0)/(C-C_0)] \times 100\%$ 。

20 25

结果如图 9A、9B 所示，C19-8-mIgG2a-FcS 与抗 PD-1 抗体 RMP1-14-mIgG2a-FcS 联用能够抑制小鼠 CT26 肿瘤生长，并延长动物生存期。在治疗过程中，小鼠耐受良好，没有出现明显的体重下降(图 9C)。

表 24. C19-8 在 CT26 模型上的给药方案、抑瘤效果和中位生存期

分组	动物数量 (只)	给药剂量 (mg/kg)	%TGI (第 28 天)	中位生存期 (天)
mIgG2a-FcS	14	3.5	—	24
RMP1-14-mIgG2a-FcS	14	10	31.29	31.5
RMP1-14-mIgG2a-FcS + C19-8-mIgG2a-FcS	14	10 + 5.5	49.26	37.5

注：mIgG2a-FcS、RMP1-14-mIgG2a-FcS 和 C19-8-mIgG2a-FcS 给药摩尔浓度相同，约为 68 μmol/kg

虽然以上描述了本公开的具体实施方案，但是本领域的技术人员应当理解，
5 这些仅是举例说明，在不背离本公开的原理和实质的前提下，可以对这些实施方案做出多种变更或修改。因此，本公开的保护范围由所附权利要求书限定。

权利要求书

1. TGFβ1 结合分子，其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中：

5 所述 VH 包含 SEQ ID NO:11 所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，
和所述 VL 包含 SEQ ID NO:12、21-35 中任一项所示氨基酸序列中的 LCDR1、
LCDR2 和 LCDR3；所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact
编号系统定义的；

10 优选地，所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和
HCDR3，和，所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO:38、64 和 18 所示的 LCDR1、
LCDR2 和 LCDR3；

优选地，所述 TGFβ1 结合分子包含：

如 SEQ ID NO:13 所示的 HCDR1，

如 SEQ ID NO:14 所示的 HCDR2，

如 SEQ ID NO:15 所示的 HCDR3，

15 如 SEQ ID NO:16、36、39、41-42、44、46、49、52、54 和 56-59 中任一项所
示的 LCDR1，

如 SEQ ID NO:17、37、40、43、45、47-48、50-51、53 和 55 中任一项所示的
LCDR2，和

如 SEQ ID NO:18 所示的 LCDR3。

20

2. 根据权利要求 1 所述的 TGFβ1 结合分子，其中：

a) 所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，
所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO:59、40 和 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

25 b) 所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，
所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO:36-37 和 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

c) 所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，
所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO:39-40 和 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

d) 所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，
所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO:41、40 和 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

30 e) 所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，
所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO:42-43 和 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

f) 所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，
所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO:44-45 和 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

35 g) 所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，
所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO:46-47 和 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

h) 所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，

所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO:46、48 和 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

j) 所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，

所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO:49-50 和 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

k) 所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，

5 所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO:46、51 和 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

l) 所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，

所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO:52-53 和 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

m) 所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，

所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO:54-55 和 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

10 n) 所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，

所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO:56、53 和 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

o) 所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，

所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO:57、45 和 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

p) 所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，

15 所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO:58、50 和 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

或，

q) 所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO:13-15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，

所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO:16-18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

20 3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的 TGF β 1 结合分子，其中：所述 VH 包含如 SEQ ID NO:11 所示氨基酸序列，或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；和，

所述 VL 包含如 SEQ ID NO:12 和 21-35 中任一项所示氨基酸序列，或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

25

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的 TGF β 1 结合分子，其进一步包含免疫球蛋白 Fc 区；优选地，所述免疫球蛋白 Fc 区来源于 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或前述任一种的变体；更优选地，所述免疫球蛋白 Fc 区来源于人 IgG4 或其变体，所述变体包含突变 228P。

30

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的 TGF β 1 结合分子，其包含重链和轻链，其中：

所述重链包含如 SEQ ID NO:66 所示，或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；和所述轻链包含如 SEQ ID NO:65、67-81 中任一项所示，或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；或，

35

所述重链包含如 SEQ ID NO:82 所示，或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基

酸序列；和所述轻链包含如 SEQ ID NO:83 所示，或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的 TGFβ1 结合分子，其是抗 TGFβ1 抗体或其抗原结合片段；

优选地，所述抗 TGFβ1 抗体为鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人抗体，优选为人源化抗体，更优选为经亲和力成熟改造的人源化抗体；

优选地，所述抗原结合片段选自 scFv、dsFv、(dsFv)₂、dsFv-dsFv'、Fv 片段、Fab、Fab' 或 F(ab')₂。

10

7. 根据权利要求 1-6 任一项所述的 TGFβ1 结合分子，其具有至少一种如下所示的特性：

(1) 结合 TGFβ1 前体蛋白和/或结合 TGFβ1 复合物，

(2) 不结合 TGFβ2 或 TGFβ2 复合物，

15 (3) 不结合 TGFβ3 或 TGFβ3 复合物，

(4) 抑制 TGFβ1 活性，

(5) 抑制调节性 T(T_{reg}) 细胞的免疫抑制活性，

(6) 抑制肿瘤生长，

(7) 抑制纤维化；

20 优选地，所述抑制 TGFβ1 活性包括：抑制 TGFβ1 激活，抑制成熟 TGFβ1 从 TGFβ1 复合物中释放，和/或抑制 TGFβ1 信号转导；

优选地，所述 TGFβ1 复合物中的 TGFβ1 以 TGFβ1 前体蛋白存在，所述 TGFβ1 前体蛋白优选包含成熟 TGFβ1 结构域和潜能相关肽(LAP)；

25 优选地，所述 TGFβ1 复合物选自 LTBP1-TGFβ1 复合物、LTBP3-TGFβ1 复合物、LRRC33-TGFβ1 复合物和/或 GARP-TGFβ1 复合物。

8. GARP-TGFβ1 结合分子，其包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO:84 和 90-92 中任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的；

30 优选地，所述 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO:85、86 和 87 所示的氨基酸序列。

9. 根据权利要求 8 所述的 GARP-TGFβ1 结合分子，其中，所述免疫球蛋白单一可变结构域是为人源化、亲和力成熟、去除 T 细胞表位、降低抗体脱酰胺和/或降低抗体异构化改造的；

优选地，人源化改造过程使用的人种系模板选自 IGHV3-23 和/或 IGJH4。

10. 根据权利要求 8-9 中任一项所述的 GARP-TGF β 1 结合分子, 其中, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO: 84 和 90-92 中任一项所示, 或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列; 优选地, 所述免疫球蛋白单一可变结构域是 VHH。

11. 根据权利要求 8-10 中任一项所述的 GARP-TGF β 1 结合分子, 其进一步包含免疫球蛋白 Fc 区; 优选地, 所述 Fc 区来源于 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或前述任一种的变体; 更优选来源于人 IgG4 或其变体, 所述变体包含突变 228P。

12. 根据权利要求 11 所述的 GARP-TGF β 1 结合分子, 其包含如 SEQ ID NO:89、93-95 和 106 中任一项所示的氨基酸序列, 或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

13. 根据权利要求 8-12 中任一项所述的 GARP-TGF β 1 结合分子, 其是与 GARP-TGF β 1 复合物结合的抗体或其抗原结合片段;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段选自线性抗体、单链抗体、纳米抗体、肽抗体、结构域抗体、多特异性抗体或其抗原结合片段;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段为骆驼抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或其抗原结合片段。

14. GARP-TGF β 1 结合分子, 其包含与 GARP-TGF β 1 复合物结合的免疫球蛋白单一可变结构域, 所述 GARP-TGF β 1 复合物包含:

TGF β 1 前体蛋白和糖蛋白 A 重复主导序列(GARP); 所述 TGF β 1 前体蛋白包含: 成熟 TGF β 1 结构域以及潜能相关肽(LAP);

优选地, 所述 GARP 包含如 SEQ ID NO:100 或 103 所示的氨基酸序列或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列, 所述成熟 TGF β 1 结构域包含如 SEQ ID NO:101 或 104 所示的氨基酸序列或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列, 和/或, 所述 LAP 包含如 SEQ ID NO:102 或 105 所示的氨基酸序列或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

15. 根据权利要求 8-14 任一项所述的 GARP-TGF β 1 结合分子, 其具有至少一种如下所示特性:

- (1) 结合 GARP-TGF β 1 复合物;
- (2) 不结合 TGF β 2 蛋白或 TGF β 2 复合物;
- (3) 不结合 TGF β 3 蛋白或 TGF β 3 复合物;
- (4) 不结合游离的成熟 TGF β 1;

- (5) 抑制 TGFβ1 活性;
- (6) 抑制调节性 T(T_{reg})细胞的免疫抑制活性;
- (7) 抑制肿瘤生长;

优选地, 所述抑制 TGFβ1 活性包括: 抑制 TGFβ1 激活, 抑制成熟 TGFβ1 从
5 GARP-TGFβ1 复合物中释放, 和/或抑制 TGFβ1 信号转导;

优选地, 所述 GARP-TGFβ1 复合物包含(i)GARP, 和(ii) TGFβ1 前体蛋白, 所述 TGFβ1 前体蛋白优选包含成熟 TGFβ1 结构域和潜能相关肽 (LAP)。

16. 多核苷酸, 其编码权利要求 1-7 任一项所述的 TGFβ1 结合分子, 或权利
10 要求 8-15 任一项所述的 GARP-TGFβ1 结合分子。

17. 载体, 其含有权利要求 16 所述的多核苷酸。

18. 宿主细胞, 其包含权利要求 16 所述的多核苷酸, 或权利要求 17 所述的载
15 体;

优选地, 所述宿主细胞为细菌、酵母或哺乳动物细胞; 更优选地, 所述宿主细胞为大肠杆菌、毕赤酵母、中国仓鼠卵巢细胞或人胚肾 293 细胞。

19. 药物组合物, 其含有权利要求 1-7 任一项所述的 TGFβ1 结合分子, 权利
20 要求 8-15 任一项所述的 GARP-TGFβ1 结合分子, 权利要求 16 所述的多核苷酸, 或权利要求 17 所述的载体;

优选地, 所述药物组合物进一步包含一种或多种可药用的赋形剂、稀释剂或辅料;

优选地, 所述药物组合物进一步包含免疫检查点抑制剂;

25 优选地, 所述药物组合物进一步包含抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段。

20. 一种制备权利要求 1-7 任一项所述的 TGFβ1 结合分子的方法, 其中, 所述方法包括:

在宿主细胞中表达权利要求 1-7 任一项所述的 TGFβ1 结合分子, 以及,
30 从所述宿主细胞中分离所述 TGFβ1 结合分子;

可选地, 所述方法进一步包含纯化所述 TGFβ1 结合分子的步骤。

21. 一种制备权利要求 8-15 任一项所述的 GARP-TGFβ1 结合分子的方法, 其中, 所述方法包括:

在宿主细胞中表达权利要求 8-15 任一项所述的 GARP-TGFβ1 结合分子, 以及,
35 从所述宿主细胞中分离所述 GARP-TGFβ1 结合分子;

可选地, 所述方法进一步包含纯化所述 GARP-TGFβ1 结合分子的步骤。

22. 权利要求 1-7 任一项所述的 TGFβ1 结合分子、权利要求 8-15 任一项所述的 GARP-TGFβ1 结合分子、权利要求 16 所述的多核苷酸、权利要求 17 所述的载体，或权利要求 19 所述的药物组合物在制备与 TGFβ 信号通路相关的疾病或症状的药物中的用途；

优选地，所述与 TGFβ 信号通路相关的疾病选自癌症或纤维化；

优选地，所述癌症选自肺癌、肠癌、肾癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、结肠癌、宫颈癌、前列腺癌和头颈癌。

23. 一种预防或治疗与 TGFβ 信号通路相关的疾病或病症的方法，其包括向受试者施用预防或治疗有效量的权利要求 1-7 任一项所述的 TGFβ1 结合分子，权利要求 8-15 任一项所述的 GARP-TGFβ1 结合分子，权利要求 16 所述的多核苷酸，权利要求 17 所述的载体，或权利要求 19 所述的药物组合物；

或者，

所述方法包括向受试者施用预防或治疗有效量的权利要求 1-7 任一项所述的 TGFβ1 结合分子，或权利要求 8-15 任一项所述的 GARP-TGFβ1 结合分子；以及，预防或治疗有效量的免疫检查点抑制剂；

优选地，所述免疫检查点抑制剂为抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段；

优选地，所述与 TGFβ 信号通路相关的疾病或病症选自癌症或纤维化；优选地，所述癌症选自肺癌、肠癌、肾癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、结肠癌、宫颈癌、前列腺癌和头颈癌。

24. 一种在体外或受试者体内抑制 TGFβ1 活性的方法，其包括：

在体外或体内施用权利要求 1-7 任一项所述的 TGFβ1 结合分子，权利要求 8-15 任一项所述的 GARP-TGFβ1 结合分子，权利要求 16 所述的多核苷酸，权利要求 17 所述的载体，或权利要求 19 所述的药物组合物。

25. TGFβ1 结合分子或 GARP-TGFβ1 结合分子联合免疫检查点抑制剂在制备治疗癌症的药物中的用途；其中，所述 TGFβ1 结合分子如权利要求 1-7 任一项所定义，所述 GARP-TGFβ1 结合分子如权利要求 8-15 任一项所定义

优选地，所述免疫检查点抑制剂为抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段；

优选地，所述癌症选自肺癌、肠癌、肾癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、结肠癌、宫颈癌、前列腺癌和头颈癌。

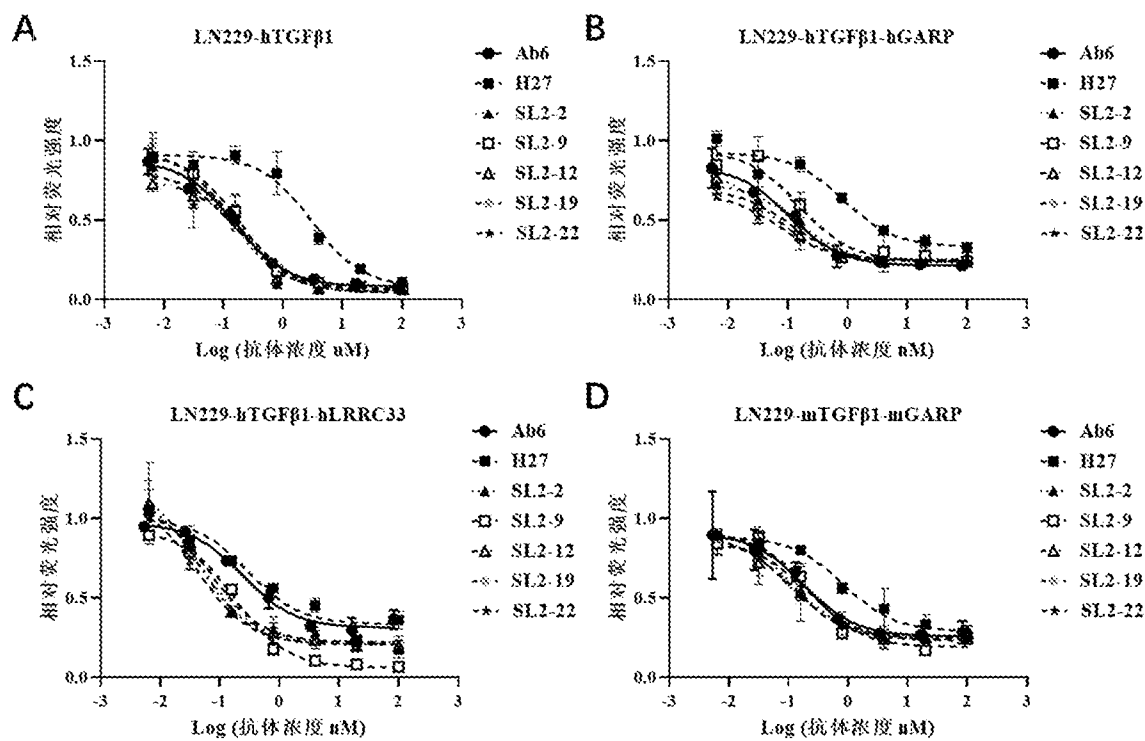


图 1

5

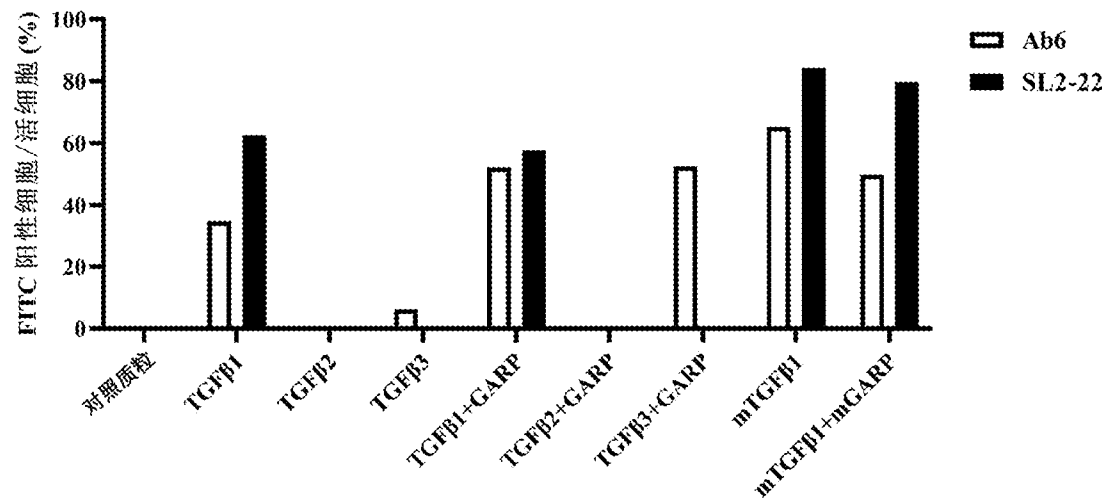


图 2

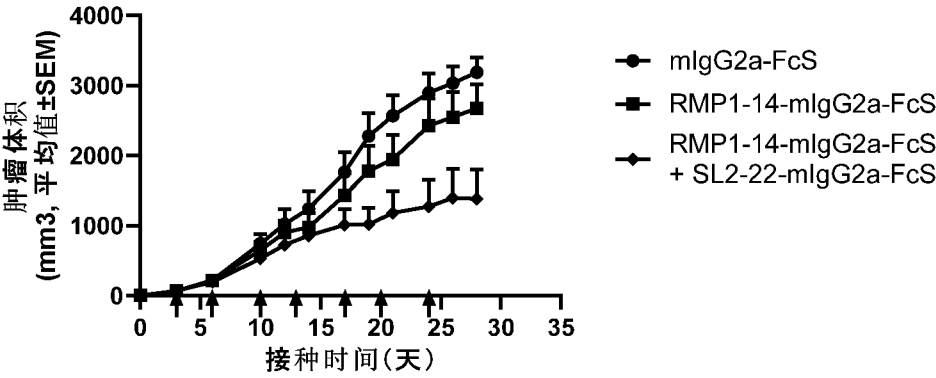


图 3A

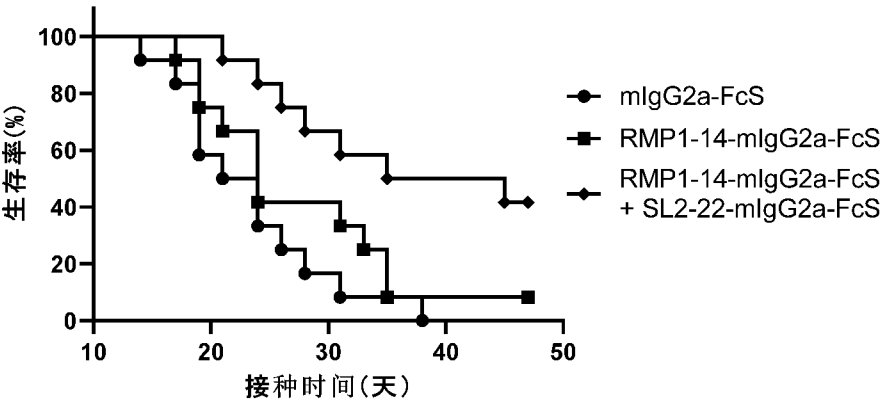


图 3B

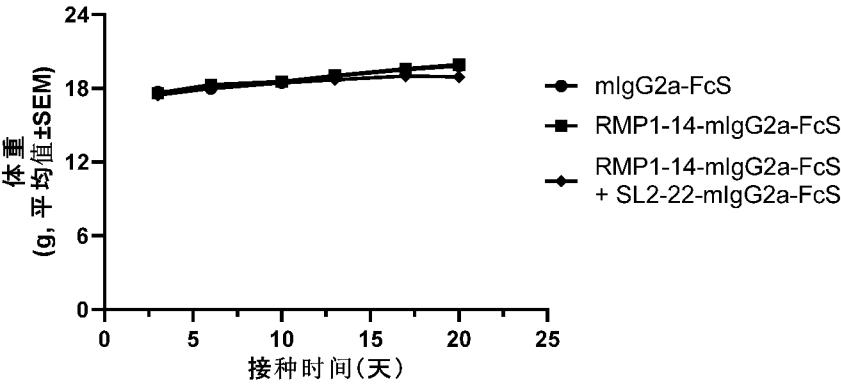


图 3C

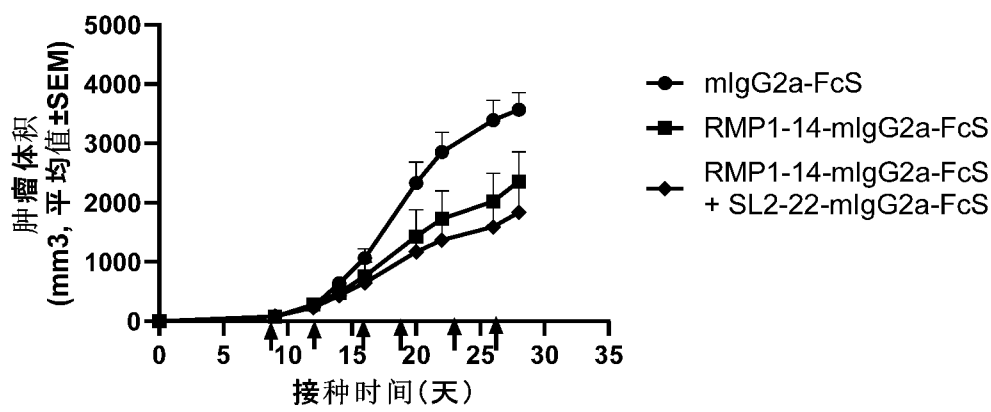


图 4A

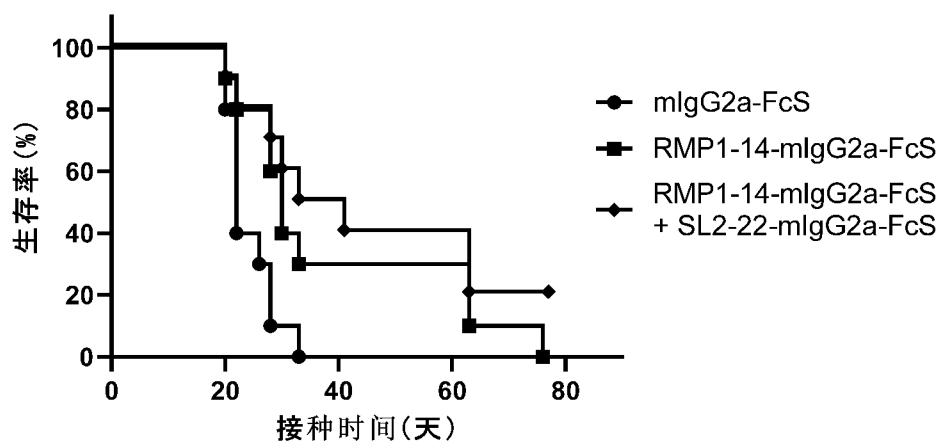


图 4B

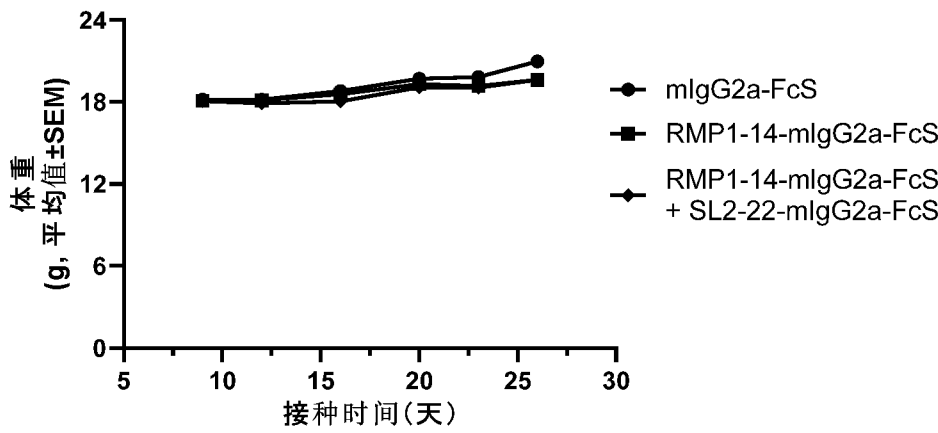


图 4C

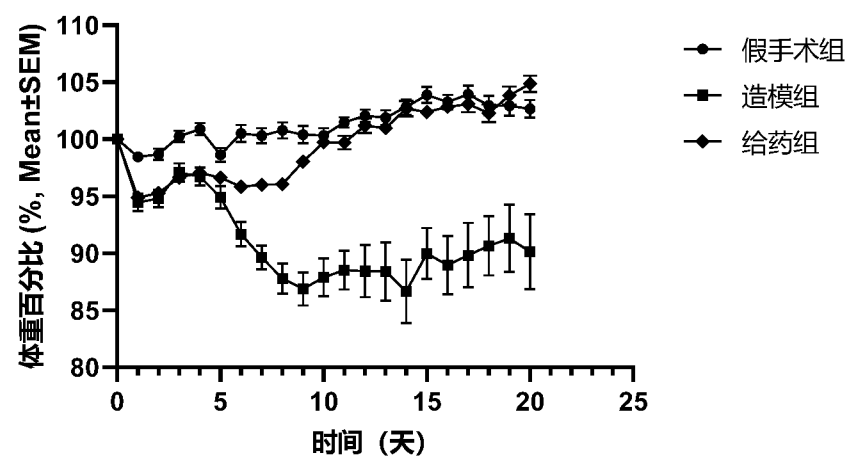


图 5A

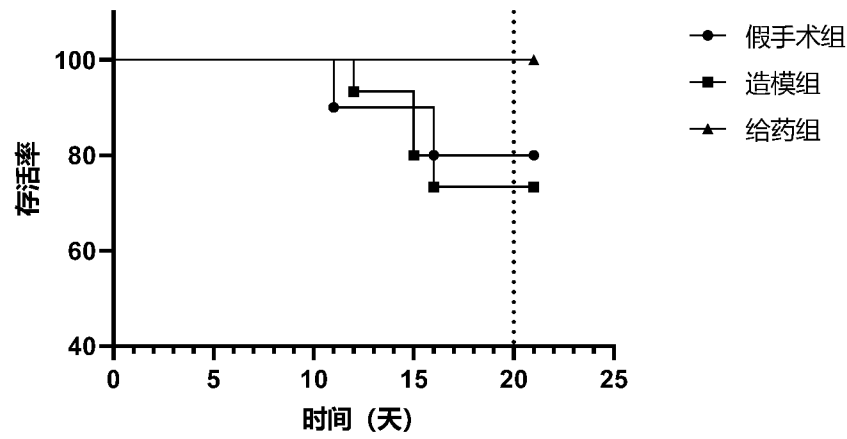


图 5B

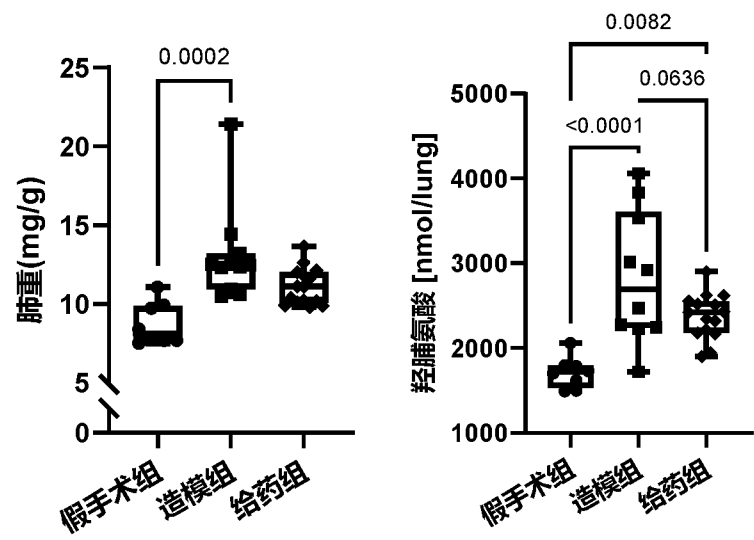
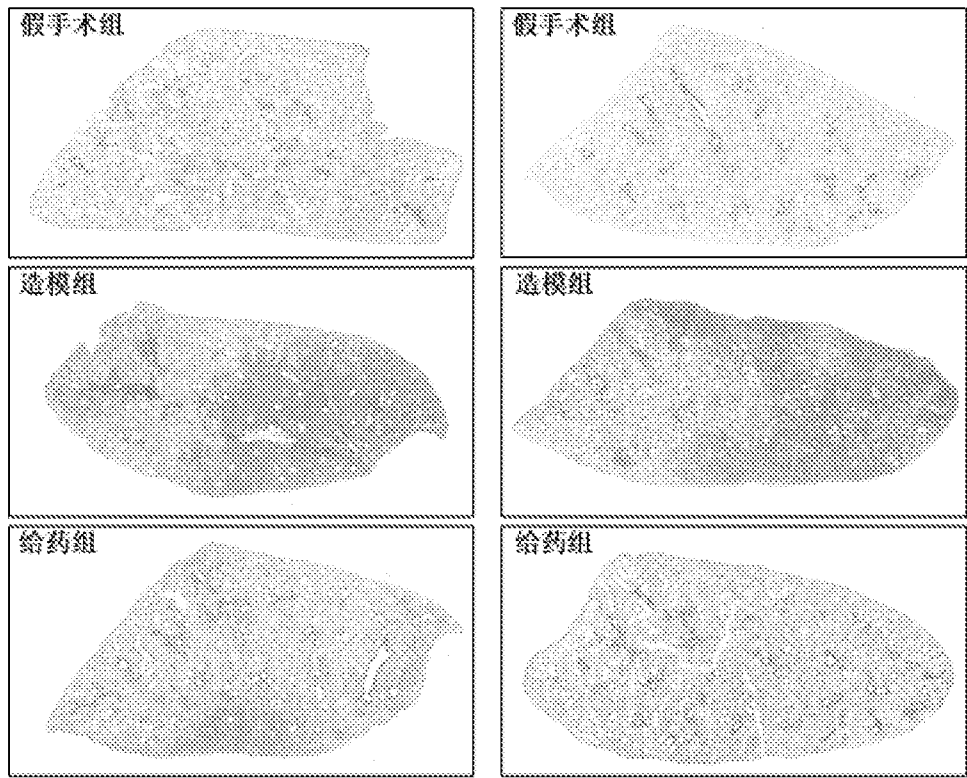


图 5C



Masson染色(2x)

图 5D

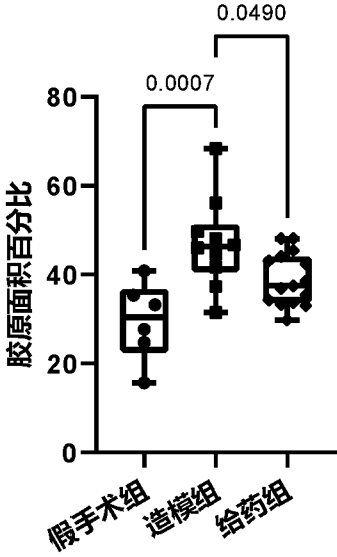


图 5E

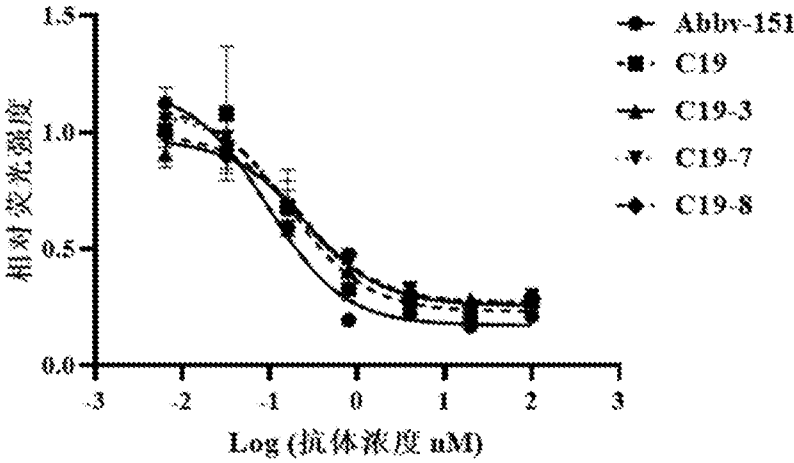


图 6A

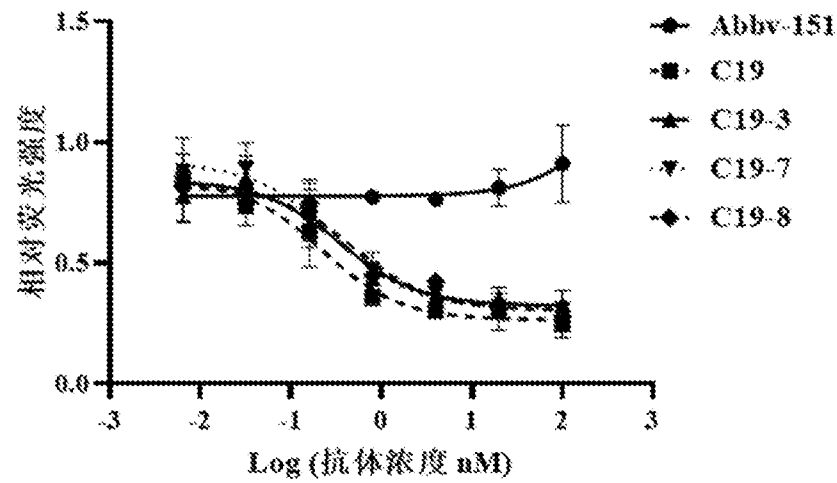


图 6B

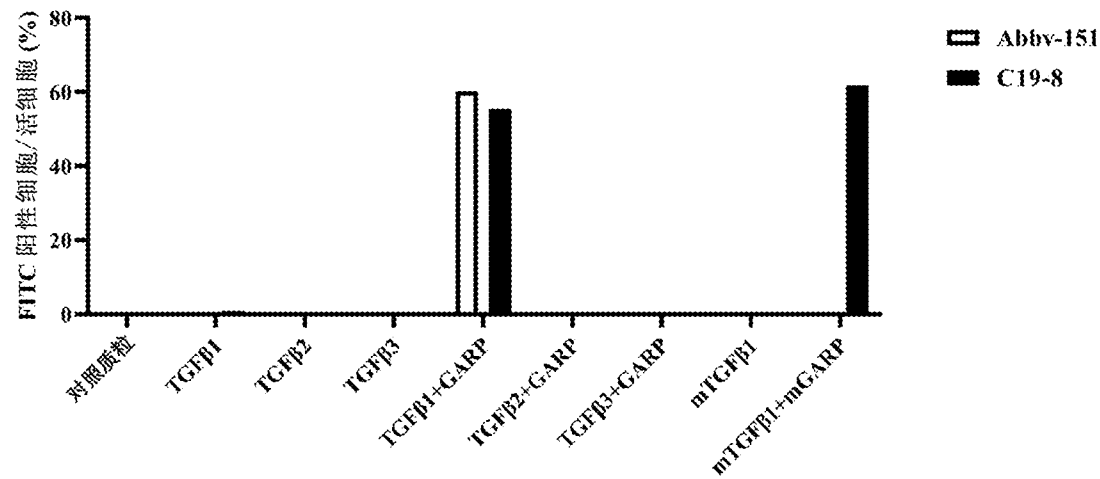


图 7

5

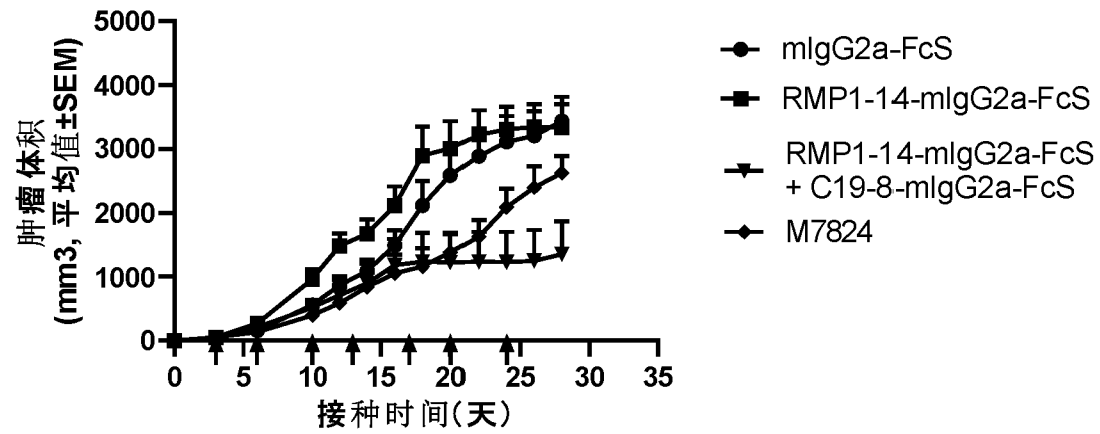


图 8A

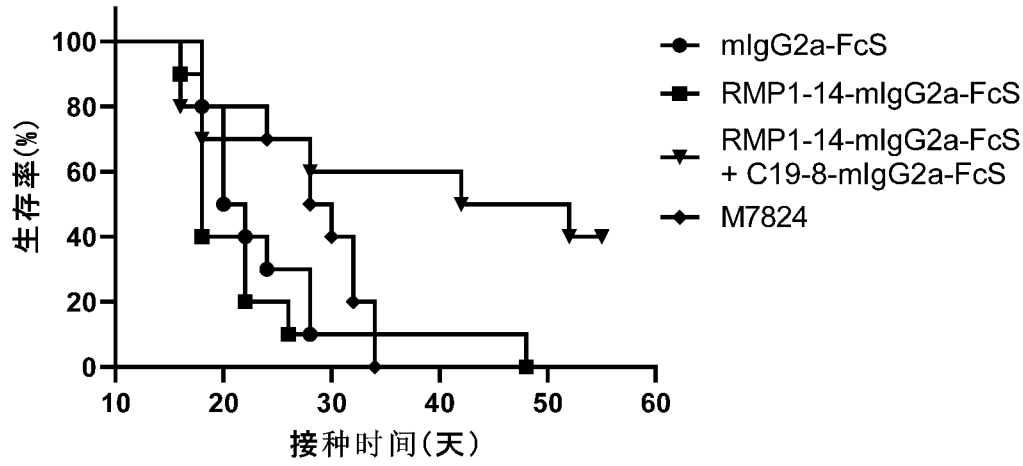


图 8B

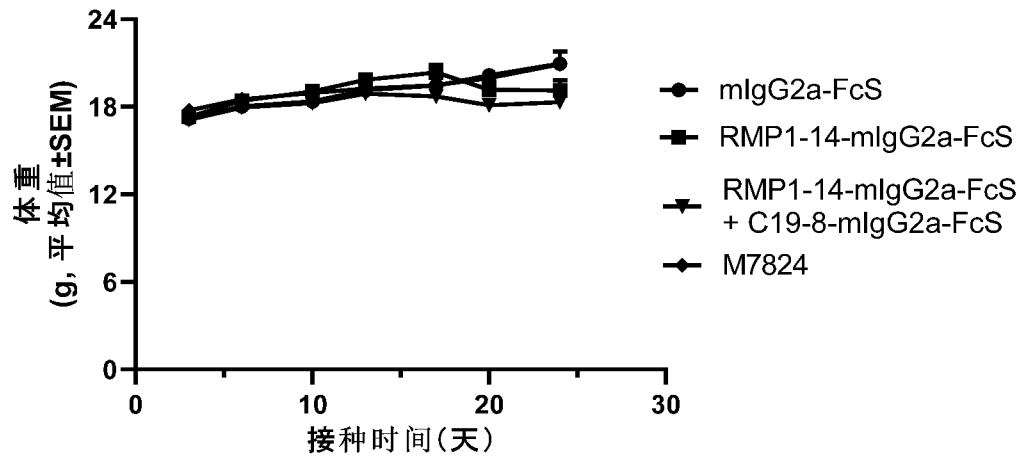


图 8C

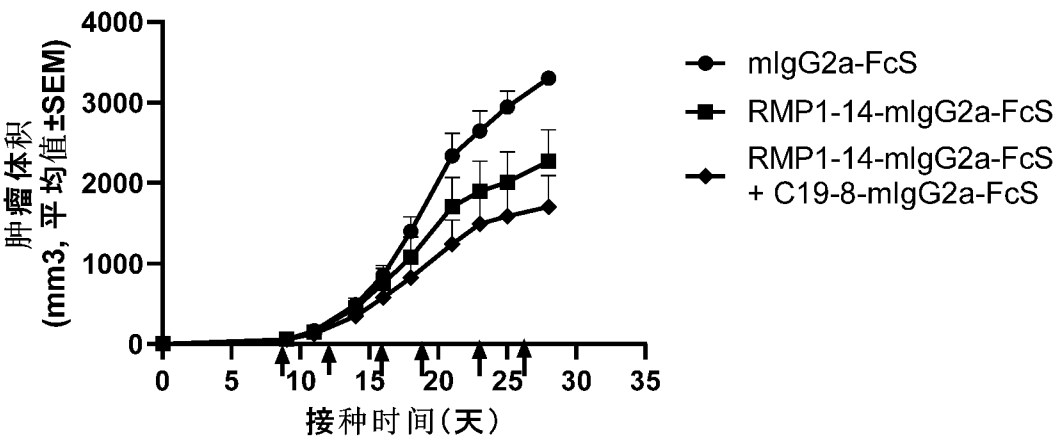


图 9A

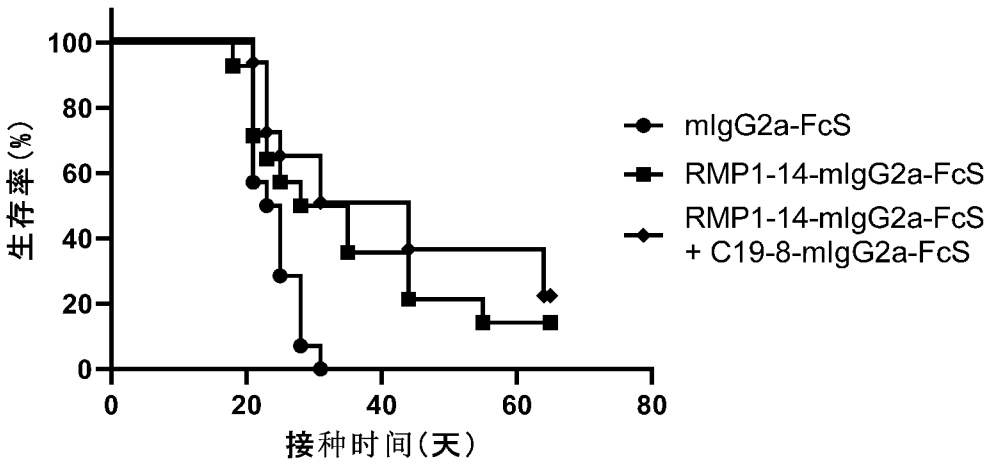


图 9B

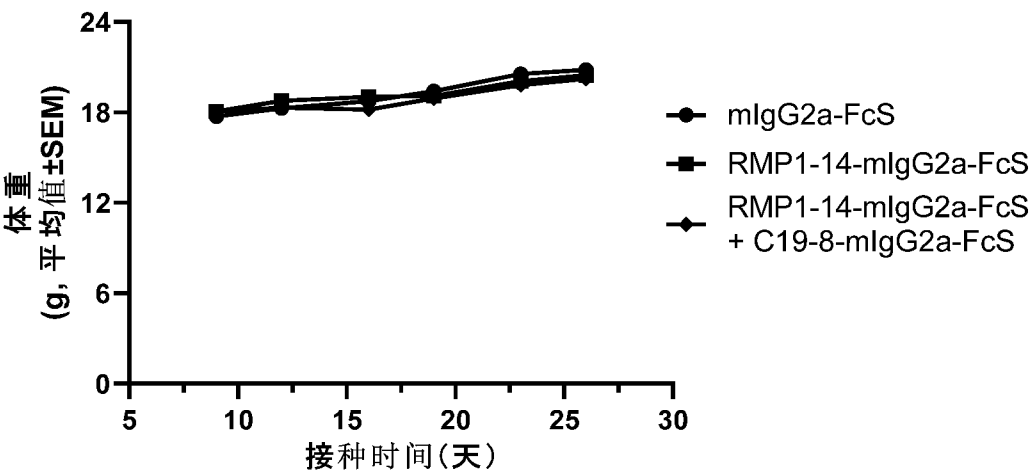


图 9C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/071321

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/22(2006.01)i; C12N 9/00(2006.01)i; A61K 38/18(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K; C12N; A61K;

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, EPTXT, WOTXT, USTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, Bing, 万方, WANFANG, 百度, Baidu, 中文序列检索系统, Chinese Sequence Search System, NCBI, STN: 转化生长因子 β 1, TGF β 1, TGF- β 1, transforming growth factor β 1, 抗体, antibody, SEQ ID NOs: 11-87**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 109071646 A (SCHOLAR ROCK INC.) 21 December 2018 (2018-12-21) claims 1-9	1-7, 16-19 (in part), 20, 22-25 (in part)
A	CN 101163502 A (GENZYME CORP. et al.) 16 April 2008 (2008-04-16) entire document	1-7, 16-19 (in part), 20, 22-25 (in part)
A	CN 110049773 A (SCHOLAR ROCK INC.) 23 July 2019 (2019-07-23) entire document	1-7, 16-19 (in part), 20, 22-25 (in part)
A	US 2008292638 A1 (JONES, B.E. et al.) 27 November 2008 (2008-11-27) entire document	1-7, 16-19 (in part), 20, 22-25 (in part)
A	US 2021340238 A1 (SCHOLAR ROCK, INC.) 04 November 2021 (2021-11-04) entire document	1-7, 16-19 (in part), 20, 22-25 (in part)
A	WO 2018043734 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 08 March 2018 (2018-03-08) entire document	1-7, 16-19 (in part), 20, 22-25 (in part)



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 April 2024

Date of mailing of the international search report

22 April 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/071321

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2022206753 A1 (SHANDONG SIMCERE BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD. et al.) 06 October 2022 (2022-10-06) entire document	1-7, 16-19 (in part), 20, 22-25 (in part)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/071321

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/071321

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **23, 24 (in part)**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 23 and 24 (in part) relate to a method for treating diseases, which falls within subject matter defined in PCT Rule 39(iv). The present search report is provided on the basis of claims 23 and 24 (in part) being amended to pharmaceutical use claims.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Invention 1: Claims 1-7, 16-19 (in part), 20 and 22-25 (in part) relate to a TGFβ1 binding molecule having heavy chain and light chain CDR1-3 of an H27 antibody or a variant thereof, and a corresponding coding polynucleotide, vector, host cell, preparation method, pharmaceutical composition and pharmaceutical use thereof, and a method for in-vitro inhibition of the activity of TGFβ1.

Invention 2: Claims 8-13, 15-19 (in part) and 21-25 (in part) relate to a GARP-TGFβ1 binding molecule having CDR1-3 of a C19 antibody, and a corresponding coding polynucleotide, vector, host cell, preparation method, pharmaceutical composition and pharmaceutical use thereof, and a method for in-vitro inhibition of the activity of TGFβ1.

Invention 3: Claims 14, 15-19 (in part) and 21-25 (in part) relate to a GARP-TGFβ1 binding molecule and a corresponding coding polynucleotide, vector, host cell, preparation method, pharmaceutical composition and pharmaceutical use thereof, and a method for in-vitro inhibition of the activity of TGFβ1.

The same technical feature among inventions 1-3 is a TGFβ1 binding molecule, but the TGFβ1 binding molecule belong to the prior art. Therefore, inventions 1-3 do not have a special technical feature, and do not comply with PCT Rule 13(2).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/071321

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **1-7, 16-19 (in part), 20, 22-25 (in part).**

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/071321

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109071646	A	21 December 2018	JP	2022028680	A	16 February 2022
				AU	2017230103	A1	06 September 2018
				JP	2022031403	A	18 February 2022
				IL	307835	A	01 December 2023
				EP	4169942	A1	26 April 2023
				KR	20230088508	A	19 June 2023
				WO	2017156500	A1	14 September 2017
				WO	2017156500	A8	25 January 2018
				WO	2017156500	A9	22 February 2018
				JP	2019509737	A	11 April 2019
				PL	3365368	T3	21 August 2023
				CA	3055555	A1	14 September 2017
				FI	3365368	T3	13 June 2023
				US	2019071493	A1	07 March 2019
				US	11643459	B2	09 May 2023
				HUE	062976	T2	28 December 2023
				KR	20180122397	A	12 November 2018
				US	2023348583	A1	02 November 2023
				ES	2951648	T3	24 October 2023
				BR	112018068340	A2	15 January 2019
				EP	3365368	A1	29 August 2018
				EP	3365368	B1	17 May 2023
				PT	3365368	T	17 August 2023
				SG	11201807176	XA	27 September 2018
				EA	201891909	A1	28 February 2019
				DK	3365368	T3	26 June 2023
				IL	261442	A	31 October 2018
				MX	2018010948	A	20 June 2019
				JP	2023108057	A	03 August 2023
CN	101163502	A	16 April 2008	US	2017066821	A1	09 March 2017
				US	10174108	B2	08 January 2019
				US	2019177406	A1	13 June 2019
				US	10781252	B2	22 September 2020
				PL	1850873	T3	28 June 2019
				DK	1850873	T3	18 March 2019
				AU	2006213875	A1	17 August 2006
				AU	2006213875	B2	19 August 2010
				CA	2930677	A1	17 August 2006
				MX	2007009545	A	11 March 2008
				SI	1850873	T1	31 May 2019
				JP	2016128512	A	14 July 2016
				JP	6341945	B2	13 June 2018
				US	2021061897	A1	04 March 2021
				US	2023078449	A1	16 March 2023
				JP	2015003917	A	08 January 2015
				JP	6005703	B2	12 October 2016
				PT	3520815	T	02 February 2022
				PL	3520815	T3	11 April 2022
				IL	255078	A0	31 December 2017
				IL	255078	B	31 January 2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/071321

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		TR 201901929 T4	21 March 2019
		US 2011008364 A1	13 January 2011
		US 8383780 B2	26 February 2013
		HK 1201860 A1	11 September 2015
		BRPI 0607639 A2	22 September 2009
		BRPI 0607639 B1	05 April 2022
		US 2007264255 A1	15 November 2007
		JP 2017217003 A	14 December 2017
		JP 6463807 B2	06 February 2019
		WO 2006086469 A2	17 August 2006
		WO 2006086469 A3	19 April 2007
		PT 1850873 T	19 February 2019
		JP 2008529503 A	07 August 2008
		JP 5174466 B2	03 April 2013
		IL 184995 A0	03 December 2007
		IL 184995 A	30 April 2013
		US 2007134246 A1	14 June 2007
		LT 1850873 T	10 April 2019
		HUE 042689 T2	29 July 2019
		CY 1121424 T1	29 May 2020
		US 2014127230 A1	08 May 2014
		US 9090685 B2	28 July 2015
		IL 225752 A0	27 June 2013
		IL 225752 A	31 October 2017
		HK 1201859 A1	11 September 2015
		CA 2597098 A1	17 August 2006
		CA 2597098 C	02 August 2016
		US 2015284456 A1	08 October 2015
		US 9481726 B2	01 November 2016
		ES 2711213 T3	30 April 2019
		US 2013243788 A1	19 September 2013
		US 8591901 B2	26 November 2013
		EP 1850873 A2	07 November 2007
		EP 1850873 A4	13 June 2012
		EP 1850873 B1	28 November 2018
		EP 3520815 A1	07 August 2019
		EP 3520815 B1	17 November 2021
		JP 2013031444 A	14 February 2013
		JP 5726140 B2	27 May 2015
		US 2006251658 A1	09 November 2006
		US 7723486 B2	25 May 2010
		ES 2905923 T3	12 April 2022
CN	110049773	A	23 July 2019
		CA 3030862 A1	18 January 2018
		JP 2019524094 A	05 September 2019
		JP 7128801 B2	31 August 2022
		MA 45690 A	22 May 2019
		SG 11201900200 XA	27 February 2019
		US 2019292254 A1	26 September 2019
		US 2021277100 A1	09 September 2021
		JP 2022153406 A	12 October 2022

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/071321

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
				BR	112019000621	A2	24 April 2019
				KR	20190034560	A	02 April 2019
				KR	102577551	B1	11 September 2023
				IL	264161	A	28 February 2019
				EP	3484499	A1	22 May 2019
				EP	3484499	A4	13 May 2020
				WO	2018013939	A1	18 January 2018
				AU	2017294772	A1	31 January 2019
				MX	2019000514	A	12 July 2019
US	2008292638	A1	27 November 2008	US	2010136021	A1	03 June 2010
				US	7927593	B2	19 April 2011
				ES	2379194	T3	23 April 2012
				WO	2007076391	A1	05 July 2007
				WO	2007076391	A9	28 August 2008
				ATE	545657	T1	15 March 2012
				AU	2006330542	A1	05 July 2007
				AU	2006330542	B2	24 May 2012
				CA	2632799	A1	05 July 2007
				JP	2009521496	A	04 June 2009
				US	2009155285	A1	18 June 2009
				US	7494651	B2	24 February 2009
				BRPI	0620240	A2	08 November 2011
				EP	1966243	A1	10 September 2008
				EP	1966243	B1	15 February 2012
US	2021340238	A1	04 November 2021	EP	3820896	A1	19 May 2021
				TW	202019957	A	01 June 2020
				WO	2020014473	A1	16 January 2020
				WO	2020014473	A8	13 February 2020
WO	2018043734	A1	08 March 2018	TW	201811827	A	01 April 2018
WO	2022206753	A1	06 October 2022	CN	117043187	A	10 November 2023

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:
- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:
 - b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交 (细则13之三.1(a)) ,
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

- ☒ 权利要求：23,24（部分）
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求23、24（部分）涉及疾病的治疗方法，属于PCT细则第39条（iv）规定的主题，本检索报告基于权利要求23、24（部分）修改为制药用途权利要求而作出。
- ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
- ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

发明1：权利要求1-7、16-19（部分）、20、22-25（部分），涉及具有H27抗体或其变体的重链和轻链CDR1-3的TGF β 1结合分子及其相应的编码多核苷酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物、制药用途和体外抑制TGF β 1的活性的方法；

发明2：权利要求8-13、15-19（部分）、21-25（部分），涉及具有C19抗体的CDR1-3的GARP-TGF β 1结合分子及其相应的编码多核苷酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物、制药用途和体外抑制TGF β 1的活性的方法；

发明3：权利要求14、15-19（部分）、21-25（部分），涉及GARP-TGF β 1结合分子及其相应的编码多核苷酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物、制药用途和体外抑制TGF β 1的活性的方法。

发明1-3之间相同的技术特征为均涉及TGF β 1结合分子，但TGF β 1结合分子属于现有技术。因此，发明1-3之间不具备特定技术特征，不符合PCT细则第13条（2）的要求。

- ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
- ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
- ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
- ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：1-7，16-19（部分），20，22-25（部分）。

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

A. 主题的分类

C07K 16/22(2006.01)i; C12N 9/00(2006.01)i; A61K 38/18(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C07K; C12N; A61K;

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, EPTXT, WOTXT, USTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, Bing, 万方, 百度, 中文序列检索系统, NCBI, STN: 转化生长因子β1, TGFβ1, TGF-β1, transforming growth factor β1, 抗体, antibody, SEQ ID NOs: 11-87

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 109071646 A (供石公司) 2018年12月21日 (2018 - 12 - 21) 权利要求1-9	1-7, 16-19 (部分), 20, 22-25 (部分)
A	CN 101163502 A (根茨美公司等) 2008年4月16日 (2008 - 04 - 16) 全文	1-7, 16-19 (部分), 20, 22-25 (部分)
A	CN 110049773 A (供石公司) 2019年7月23日 (2019 - 07 - 23) 全文	1-7, 16-19 (部分), 20, 22-25 (部分)
A	US 2008292638 A1 (JONES, B.E.等) 2008年11月27日 (2008 - 11 - 27) 全文	1-7, 16-19 (部分), 20, 22-25 (部分)
A	US 2021340238 A1 (SCHOLAR ROCK, INC.) 2021年11月4日 (2021 - 11 - 04) 全文	1-7, 16-19 (部分), 20, 22-25 (部分)

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

★ 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“p” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年4月17日

国际检索报告邮寄日期

2024年4月22日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

张蕾

电话号码 (+86) 010-53962037

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2018043734 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 2018年3月8日 (2018 - 03 - 08) 全文	1-7, 16-19 (部分), 20, 22-25 (部分)
A	WO 2022206753 A1 (SHANDONG SIMCERE BIOPHARMACEUTICAL CO.,LTD.等) 2022年10月6日 (2022 - 10 - 06) 全文	1-7, 16-19 (部分), 20, 22-25 (部分)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/071321

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109071646	A	2018年12月21日	JP	2022028680	A	2022年2月16日
				AU	2017230103	A1	2018年9月6日
				JP	2022031403	A	2022年2月18日
				IL	307835	A	2023年12月1日
				EP	4169942	A1	2023年4月26日
				KR	20230088508	A	2023年6月19日
				WO	2017156500	A1	2017年9月14日
				WO	2017156500	A8	2018年1月25日
				WO	2017156500	A9	2018年2月22日
				JP	2019509737	A	2019年4月11日
				PL	3365368	T3	2023年8月21日
				CA	3055555	A1	2017年9月14日
				FI	3365368	T3	2023年6月13日
				US	2019071493	A1	2019年3月7日
				US	11643459	B2	2023年5月9日
				HUE	062976	T2	2023年12月28日
				KR	20180122397	A	2018年11月12日
				US	2023348583	A1	2023年11月2日
				ES	2951648	T3	2023年10月24日
				BR	112018068340	A2	2019年1月15日
				EP	3365368	A1	2018年8月29日
				EP	3365368	B1	2023年5月17日
				PT	3365368	T	2023年8月17日
				SG	11201807176	XA	2018年9月27日
				EA	201891909	A1	2019年2月28日
				DK	3365368	T3	2023年6月26日
				IL	261442	A	2018年10月31日
				MX	2018010948	A	2019年6月20日
				JP	2023108057	A	2023年8月3日
CN	101163502	A	2008年4月16日	US	2017066821	A1	2017年3月9日
				US	10174108	B2	2019年1月8日
				US	2019177406	A1	2019年6月13日
				US	10781252	B2	2020年9月22日
				PL	1850873	T3	2019年6月28日
				DK	1850873	T3	2019年3月18日
				AU	2006213875	A1	2006年8月17日
				AU	2006213875	B2	2010年8月19日
				CA	2930677	A1	2006年8月17日
				MX	2007009545	A	2008年3月11日
				SI	1850873	T1	2019年5月31日
				JP	2016128512	A	2016年7月14日
				JP	6341945	B2	2018年6月13日
				US	2021061897	A1	2021年3月4日
				US	2023078449	A1	2023年3月16日
				JP	2015003917	A	2015年1月8日
				JP	6005703	B2	2016年10月12日
				PT	3520815	T	2022年2月2日
				PL	3520815	T3	2022年4月11日
				IL	255078	A0	2017年12月31日
				IL	255078	B	2021年1月31日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/071321

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		TR 201901929 T4	2019年3月21日
		US 2011008364 A1	2011年1月13日
		US 8383780 B2	2013年2月26日
		HK 1201860 A1	2015年9月11日
		BR- 0607639 A2	2009年9月22日
		PI	
		BR- 0607639 B1	2022年4月5日
		PI	
		US 2007264255 A1	2007年11月15日
		JP 2017217003 A	2017年12月14日
		JP 6463807 B2	2019年2月6日
		WO 2006086469 A2	2006年8月17日
		WO 2006086469 A3	2007年4月19日
		PT 1850873 T	2019年2月19日
		JP 2008529503 A	2008年8月7日
		JP 5174466 B2	2013年4月3日
		IL 184995 A0	2007年12月3日
		IL 184995 A	2013年4月30日
		US 2007134246 A1	2007年6月14日
		LT 1850873 T	2019年4月10日
		HUE 042689 T2	2019年7月29日
		CY 1121424 T1	2020年5月29日
		US 2014127230 A1	2014年5月8日
		US 9090685 B2	2015年7月28日
		IL 225752 A0	2013年6月27日
		IL 225752 A	2017年10月31日
		HK 1201859 A1	2015年9月11日
		CA 2597098 A1	2006年8月17日
		CA 2597098 C	2016年8月2日
		US 2015284456 A1	2015年10月8日
		US 9481726 B2	2016年11月1日
		ES 2711213 T3	2019年4月30日
		US 2013243788 A1	2013年9月19日
		US 8591901 B2	2013年11月26日
		EP 1850873 A2	2007年11月7日
		EP 1850873 A4	2012年6月13日
		EP 1850873 B1	2018年11月28日
		EP 3520815 A1	2019年8月7日
		EP 3520815 B1	2021年11月17日
		JP 2013031444 A	2013年2月14日
		JP 5726140 B2	2015年5月27日
		US 2006251658 A1	2006年11月9日
		US 7723486 B2	2010年5月25日
		ES 2905923 T3	2022年4月12日
CN	110049773 A	2019年7月23日	
		CA 3030862 A1	2018年1月18日
		JP 2019524094 A	2019年9月5日
		JP 7128801 B2	2022年8月31日
		MA 45690 A	2019年5月22日
		SG 11201900200 XA	2019年2月27日
		US 2019292254 A1	2019年9月26日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/071321

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				US	2021277100	A1	2021年9月9日
				JP	2022153406	A	2022年10月12日
				BR	112019000621	A2	2019年4月24日
				KR	20190034560	A	2019年4月2日
				KR	102577551	B1	2023年9月11日
				IL	264161	A	2019年2月28日
				EP	3484499	A1	2019年5月22日
				EP	3484499	A4	2020年5月13日
				WO	2018013939	A1	2018年1月18日
				AU	2017294772	A1	2019年1月31日
				MX	2019000514	A	2019年7月12日
US	2008292638	A1	2008年11月27日	US	2010136021	A1	2010年6月3日
				US	7927593	B2	2011年4月19日
				ES	2379194	T3	2012年4月23日
				WO	2007076391	A1	2007年7月5日
				WO	2007076391	A9	2008年8月28日
				ATE	545657	T1	2012年3月15日
				AU	2006330542	A1	2007年7月5日
				AU	2006330542	B2	2012年5月24日
				CA	2632799	A1	2007年7月5日
				JP	2009521496	A	2009年6月4日
				US	2009155285	A1	2009年6月18日
				US	7494651	B2	2009年2月24日
				BR- PI	0620240	A2	2011年11月8日
				EP	1966243	A1	2008年9月10日
				EP	1966243	B1	2012年2月15日
US	2021340238	A1	2021年11月4日	EP	3820896	A1	2021年5月19日
				TW	202019957	A	2020年6月1日
				WO	2020014473	A1	2020年1月16日
				WO	2020014473	A8	2020年2月13日
WO	2018043734	A1	2018年3月8日	TW	201811827	A	2018年4月1日
WO	2022206753	A1	2022年10月6日	CN	117043187	A	2023年11月10日