



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116710125 A

(43) 申请公布日 2023.09.05

(21) 申请号 202280010421.5

杨璐 刘培培 曹晓丹 邓俗俊  
王学萍

(22) 申请日 2022.01.17

(66) 本国优先权数据

202110065290.8 2021.01.18 CN

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

专利代理师 史文静 黄革生

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.07.17

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2022/072265 2022.01.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/152285 ZH 2022.07.21

(71) 申请人 上海济煜医药科技有限公司

地址 201203 上海市浦东新区自由贸易试  
验区哈雷路1118号

申请人 江西济民可信集团有限公司

(72) 发明人 张健建 潘忠宗 杨欣秀 刘小五

(54) 发明名称

GARP蛋白抗体及其应用

(57) 摘要

本申请涉及一种GARP蛋白抗体,以及包含或表达所述GARP蛋白抗体的细胞。所述GARP蛋白抗体以约 $1.0E-12$ 或更低的 $K_D$ 值与人GARP/人TGF- $\beta$ 1复合物结合。本申请还提供一种包含所述GARP蛋白抗体和免疫检查点抑制剂的药物组合及其用途。

## (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  
2022年7月21日 (21.07.2022)



(10) 国际公布号  
**WO 2022/152285 A1**

- (51) 国际专利分类号:  
*C07K 16/28* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/072265
- (22) 国际申请日: 2022年1月17日 (17.01.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
202110065290.8 2021年1月18日 (18.01.2021) CN
- (71) 申请人: 上海济煜医药科技有限公司 (SHANGHAI JEMINCARE PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。江西济民可信集团有限公司 (JIANGXI JEMINCARE GROUP CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江西省南昌市艾溪湖北路688号中兴软件园14栋, Jiangxi 330096 (CN)。
- (72) 发明人: 张 Jianjian (ZHANG, Jianjian); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。潘忠宗 (PAN, Zhongzong); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。杨欣秀 (YANG, Xinxiu); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。刘小五 (LIU, Xiaowu); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。杨璐 (YANG, Lu); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。刘培培 (LIU, Peipei); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。曹晓丹 (CAO, Xiaodan); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。邓俗俊 (DENG, Sujun); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。王学萍 (WANG, Xueping); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。
- (74) 代理人: 上海巛石知识产权代理事务所 (普通合伙) (SHANGHAI DIANSHI PARTNERS, P.C.); 中国上海市浦东新区盛夏路608号2号103室/张琤, Shanghai 201210 (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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)。

根据细则4.17的声明:

— 发明人资格 (细则4.17(iv))

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: GARP PROTEIN ANTIBODY AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: GARP蛋白抗体及其应用

(57) Abstract: Provided is an GARP protein antibody, and a cell comprising or expressing the GARP protein antibody. The GARP protein antibody binds to human GARP/human TGF- $\beta$ 1 complex with a  $K_D$  value of about  $1.0E-12$  or less. Also provided are a pharmaceutical combination comprising the GARP protein antibody and an immune checkpoint inhibitor and use thereof.

(57) 摘要: 提供一种GARP蛋白抗体, 以及包含或表达所述GARP蛋白抗体的细胞。所述GARP蛋白抗体以约 $1.0E-12$ 或更低的 $K_D$ 值与人GARP/人TGF- $\beta$ 1复合物结合。还提供一种包含所述GARP蛋白抗体和免疫检查点抑制剂的药物组合及其用途。



WO 2022/152285 A1

## GARP 蛋白抗体及其应用

### 技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种 GARP 蛋白抗体及其应用。

### 背景技术

调节性 T 细胞 (Treg) 与自身免疫性疾病和肿瘤发生关系密切，其异常活性可导致自身免疫性疾病或者肿瘤发生。Treg 细胞是近年来免疫学领域研究的热点，其具有免疫应答低下和免疫抑制两大特征，通过“主动”的方式抑制免疫系统从而发挥免疫负调作用。根据来源及作用机制，Treg 可分为天然产生的 CD4+CD25+Treg(自然调节性 T 细胞，nTreg)和诱导产生的适应性调节 T 细胞(aTreg 或 iTreg)。

GARP (human glycoprotein A repetitions predominant) 蛋白是 80 kDa 的 I 型膜糖蛋白，属于富含亮氨酸的重复蛋白家族。GARP 蛋白表达在巨核细胞，血小板和活化的调节性 T 细胞 (Treg 细胞) 上。TGF- $\beta$  与无活性结合蛋白 LAP 形成笼状结构，处于非活性状态，这种笼状结构可以被 GARP，整合素，蛋白酶或其他基质激活，形成活性的 TGF- $\beta$ ，通过自分泌或旁分泌与受体结合激活细胞信号。TGF- $\beta$  信号被认为是导致肿瘤对检查点阻断疗法产生耐药的主要原因。例如，TGF- $\beta$  增加肿瘤微环境中的免疫抑制细胞和免疫抑制因子。

TGF- $\beta$  作为一种免疫抑制细胞因子，通过不同的机制对免疫应答产生广泛的抑制作用。TGF- $\beta$  降低 Th1、Th2 细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的分化和功能，所有这些都提供重要的抗肿瘤效应。TGF- $\beta$  还通过调节调节性 T (Treg) 细胞的数量和功能，增强免疫耐受和肿瘤逃避。此外，TGF- $\beta$  通过抑制或刺激细胞增殖来调节免疫细胞的命运，从而影响胸腺和外周 T 细胞的发育。

目前，临床上的大部分抗体是中和所有 TGF- $\beta$  亚型，存在较大的安全性问题。通过针对 GARP-TGF- $\beta$ 1 复合物的疗法可以抑制 Treg 释放活性 TGF- $\beta$ 1，提高 PD-1/PD-L1 的抗肿瘤活性。目前，亟需副作用小、安全性高的、对肿瘤微环境的不良影响比广泛阻断所有 TGF- $\beta$  亚型小的抗 GARP-TGF- $\beta$ 1 复合物的新型抗体。

### 发明内容

本申请提供了一种分离的抗原结合蛋白，其具有下列性质中的一种或多种：1) 在 Octet 测定中，以约 1.0E-12 或更低的 KD 值与人 GARP/人 TGF- $\beta$ 1 复合物结合；2) 不与只表达人

GARP 的细胞或只表达人 TGF- $\beta$ 1 的细胞结合；3) 抑制 Treg 细胞中的 SMAD2 磷酸化；4) 抑制表达人 GARP /人 TGF- $\beta$ 1 的 HEK293T 细胞释放 TGF- $\beta$ 1；5) 阻止 Treg 细胞对人外周血单个核细胞 (PBMC) 释放白细胞介素-2 (IL-2) 和干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 的抑制；以及 6) 在人 PBMC 移植小鼠的 GvHD 模型中，阻断 Treg 细胞对所述人 PBMC 引起的 GvHD 的抑制作用。一方面，本申请提供了一种分离的抗原结合蛋白，其包含 HCDR3，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 HCDR2，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 HCDR1，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含重链可变区 VH，所述 VH 包含所述 HCDR1、所述 HCDR2 和所述 HCDR3，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；以及所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 H-FR1，所述 H-FR1 的 C 末端与所述 HCDR1 的 N 末端直接或间接地相连，且所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白的 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 22 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 H-FR2，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 与所述 HCDR2 之间，且所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白的 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 23 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 H-FR3，所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 与所述 HCDR3 之间，且所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白的 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 24 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 H-FR4，所述 H-FR4 的 N 末端与所述 HCDR3 的 C 末端直接或间接地相连，且所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白的 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 25 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 H-FR1, H-FR2, H-FR3 和 H-FR4, 所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列；所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列；所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列；以及所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 H-FR1, H-FR2, H-FR3 和 H-FR4, 所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 22 中任一项所示的氨基酸序列；所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 23 中任一项所示的氨基酸序列；所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 24 中任一项所示的氨基酸序列；以及所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 25 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白的 H-FR1、H-FR2、H-FR3 和 H-FR4 包含选自下述任意一组的氨基酸序列：

a) H-FR1: SEQ ID NO: 5, H-FR2: SEQ ID NO: 6, H-FR3: SEQ ID NO: 7 和 H-FR4: SEQ ID NO: 8;

b) H-FR1: SEQ ID NO: 22, H-FR2: SEQ ID NO: 23, H-FR3: SEQ ID NO: 24 和 H-FR4: SEQ ID NO: 25。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含重链可变区 VH, 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白的 VH 包含 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 21 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 LCDR3, 所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 LCDR2, 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 LCDR2, 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 LCDR1, 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 LCDR1, 所述 LCDR1 包含 SEQ ID

NO: 10 和 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含轻链可变区 VL，所述 VL 包含所述 LCDR1、所述 LCDR2 和所述 LCDR3，所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列；以及所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含轻链可变区 VL，所述 VL 包含所述 LCDR1、所述 LCDR2 和所述 LCDR3，所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 28 中任一项所示的氨基酸序列；以及所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 27 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白中所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 包含选自下述任意一组的氨基酸序列：

a) LCDR1: SEQ ID NO: 10, LCDR2: SEQ ID NO: 11 和 LCDR3: SEQ ID NO: 12;

b) LCDR1: SEQ ID NO: 27, LCDR2: SEQ ID NO: 28 和 LCDR3: SEQ ID NO: 12。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 L-FR1，所述 L-FR1 的 C 末端与所述 LCDR1 的 N 末端直接或间接地相连，且所述 L-FR1 包含 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白的 L-FR1 包含 SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 29 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 L-FR2，所述 L-FR2 位于所述 LCDR1 与所述 LCDR2 之间，且所述 L-FR2 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 L-FR3，所述 L-FR3 位于所述 LCDR2 与所述 LCDR3 之间，且所述 L-FR3 包含 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白的 L-FR3 包含 SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 30 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 L-FR4，所述 L-FR4 的 N 末端与所述 LCDR3 的 C 末端直接或间接地相连，且所述 L-FR4 包含 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白的 L-FR4 包含 SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 31 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 L-FR1，L-FR2，L-FR3 和 L-FR4，

所述 L-FR1 包含 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列；所述 L-FR2 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列；所述 L-FR3 包含 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列；以及所述 L-FR4 包含 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 L-FR1, L-FR2, L-FR3 和 L-FR4, 所述 L-FR1 包含 SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 29 中任一项所示的氨基酸序列；所述 L-FR2 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列；所述 L-FR3 包含 SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 30 中任一项所示的氨基酸序列；以及所述 L-FR4 包含 SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 31 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白的 L-FR1、L-FR2、L-FR3 和 L-FR4 包含选自下述任意一组的氨基酸序列：

a) L-FR1: SEQ ID NO: 13, L-FR2: SEQ ID NO: 14, L-FR3: SEQ ID NO: 15 和 L-FR4: SEQ ID NO: 16;

b) L-FR1: SEQ ID NO: 29, L-FR2: SEQ ID NO: 14, L-FR3: SEQ ID NO: 30 和 L-FR4: SEQ ID NO: 31。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含轻链可变区 VL, 所述 VL 包含 SEQ ID NO: 51 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白的 VL 包含 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 26 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含重链恒定区，且所述重链恒定区包括源自 IgG 的恒定区或源自 IgY 的恒定区。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白的重链恒定区包括源自人 IgG4 的恒定区。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白的重链恒定区包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含轻链恒定区，且所述抗体轻链恒定区包括源自 Igκ 的恒定区或源自 Igλ 的恒定区。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白的轻链恒定区包括源自人 Igκ 的恒定区。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白的轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含重链 HC, 所述 HC 包含 SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 32 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述的分离的抗原结合蛋白包含轻链 LC,所述 LC 包含 SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 33 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述的分离的抗原结合蛋白包含 HC 和 LC,所述 HC 包含 SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 32 中任一项所示的氨基酸序列,且所述 LC 包含 SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 33 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述抗原结合蛋白的 HC 和 LC 包含选自下述任意一组的氨基酸序列:

a) HC: SEQ ID NO: 19 和 LC: SEQ ID NO: 20;

b) HC: SEQ ID NO: 32 和 LC: SEQ ID NO: 33。

在某些实施方式中,所述的分离的抗原结合蛋白包括抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方式中,所述抗原结合片段包括 Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, Fv 片段, F(ab')<sub>2</sub>, scFv, di-scFv, VHH 和/或 dAb。

在某些实施方式中,所述抗体选自下组:单克隆抗体、单链抗体、鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。

另一方面,本申请提供了一种多肽,其包含所述的分离的抗原结合蛋白。

另一方面,本申请提供了一种免疫缀合物,其包含所述的分离的抗原结合蛋白或所述的多肽。

在某些实施方式中,所述的免疫缀合物还包括药学上可接受的治疗剂。

在某些实施方式中,所述治疗剂选自下组:细胞毒性剂和细胞抑制剂。

另一方面,本申请提供了一种分离的核酸分子,其编码所述的分离的抗原结合蛋白,或者所述的多肽。

另一方面,本申请提供了一种载体,其包含所述的分离的核酸分子。

另一方面,本申请提供了一种细胞,其包含所述的分离的抗原结合蛋白,所述的多肽,所述的免疫缀合物,所述的分离的核酸分子和/或所述的载体。

另一方面,本申请提供了一种制备所述的分离的抗原结合蛋白或所述的多肽的方法,所述方法包括在使得所述的分离的抗原结合蛋白或所述的多肽表达的条件下,培养所述的细胞。

另一方面,本申请提供了一种药物组合物,其包含所述的分离的抗原结合蛋白,所述的多肽,所述的免疫缀合物,所述的分离的核酸分子,所述的载体,所述的细胞,和/或药学上可接受的佐剂和/或赋形剂。

另一方面,本申请提供了一种药物组合,其包含所述的分离的抗原结合蛋白和免疫检查

点抑制剂。

在某些实施方式中，所述免疫检查点抑制剂包括抑制 PD-1/PD-L1 相互作用的物质。

在某些实施方式中，所述免疫检查点抑制剂选自下组：PD-1/PD-L1 阻断剂、PD-1 拮抗剂、PD-L1 拮抗剂、PD-1 抑制剂和 PD-L1 抑制剂。

在某些实施方式中，所述免疫检查点抑制剂包括抗 PD-L1 抗体。

在某些实施方式中，所述抗 PD-L1 抗体包含 HCDR3，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗 PD-L1 抗体包含 HCDR2，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗 PD-L1 抗体包含 HCDR1，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗 PD-L1 抗体包含重链可变区 VH，所述 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列；以及所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗 PD-L1 抗体包含重链可变区 VH，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗 PD-L1 抗体包含 LCDR3，所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗 PD-L1 抗体包含 LCDR2，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗 PD-L1 抗体包含 LCDR1，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗 PD-L1 抗体包含轻链可变区 VL，所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列；以及所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗 PD-L1 抗体包含轻链可变区 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗 PD-L1 抗体包括阿替利珠单抗。

在某些实施方式中，所述的药物组合可以是药物组合物。

另一方面，本申请提供了一种试剂盒，其包括所述的药物组合。

另一方面，本申请提供了所述的分离的抗原结合蛋白、所述的多肽、所述的免疫缀合物、所述的分离的核酸分子、所述的载体，所述的细胞和/或所述的药物组合物，其用于预防、缓解和/或治疗肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括与 GARP 的蛋白表达相关的肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。

另一方面，本申请提供了所述的药物组合和/或所述的试剂盒，其用于预防、缓解和/或治疗肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括与 GARP 的表达相关的肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。

另一方面，本申请提供了所述的分离的抗原结合蛋白、所述的多肽、所述的免疫缀合物、所述的分离的核酸分子、所述的载体，所述的细胞和/或所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防、缓解和/或治疗肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括与 GARP 的表达相关的肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括黑色素瘤。

另一方面，本申请提供了所述的药物组合和/或所述的试剂盒在制备药物中的用途，所述药物用于预防、缓解和/或治疗肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括与 GARP 的表达相关的肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。

另一方面，本申请提供了一种预防和/或治疗疾病或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用有效量的所述的分离的抗原结合蛋白、所述的分离的核酸分子、所述的载体，所述的细胞、所述的药物组合物，其中所述疾病或病症包括肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括与 GARP 的表达相关的肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。

另一方面，本申请提供了一种预防和/或治疗疾病或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用有效量的所述的药物组合，其中所述疾病或病症包括肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括与 GARP 的表达相关的肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。

本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本申请的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本申请的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的，本申请的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行改动而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地，本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的，而非为限制性的。

## 附图说明

本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述示例性实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明如下：

图 1A-1D 显示的是本申请所述抗原结合蛋白的抗原结合活性。

图 2 显示的是本申请示例性的鼠源抗体 8H2D7B3 的阻断实验结果。

图 3A-3B 显示的是本申请示例性的鼠源抗体 8H2D7B3 对 Treg 细胞中 SMAD2 磷酸化的影响。

图 4 显示的是本申请示例性的 JYB1907hz18 抗体对 Treg 细胞中 SMAD2 磷酸化的影响。

图 5 显示的是本申请示例性的 JYB1907hz18 抗体对 HEK293T 细胞释放 TGF- $\beta$ 1 的影响。

图 6A-6B 显示的是本申请示例性的 JYB1907hz18 抗体对 PBMC 释放 IL-2 和 IFN- $\gamma$  的影响。

图 7A 显示的是本申请示例性的 JYB1907hz18 抗体在人源化 FcRn 小鼠模型中药代动力学 (PK) 研究曲线。

图 7B 显示的是本申请所述 MHG8 抗体在人源化 FcRn 小鼠模型中药代动力学 (PK) 研究曲线。

图 8A-8B 显示的是本申请示例性的 JYB1907hz18 抗体在小鼠 GvHD 模型中的研究结果。

图 9 显示的是本申请示例性的 JYB1907hz18 抗体在小鼠黑色素瘤模型中的药效检测结果。

图 10 显示的是本申请示例性的 JYB1907hz18 抗体在小鼠乳腺癌模型中的药效检测结果。

图 11 显示的是本申请示例性的 JYB1907hz18 抗体在小鼠肺鳞癌模型中的药效检测结果。

## 具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

## 术语定义

在本申请中，术语“分离的”通常指从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变，或从天然环境下分离出该物质，或二者情况均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”不排除混有人工或合成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

在本申请中，术语“抗原结合蛋白”通常是指一种能够特异性识别和/或中和特定抗原的多肽分子。在本申请中，术语“抗原结合蛋白”可包括“抗体”或“抗原结合片段”。例如，所述抗体可包含通过二硫键相互连接的至少两条重（H）链和两条轻（L）链组成的免疫球蛋白，并且可包括任何包含其抗原结合部分的分子。术语“抗体”可包括单克隆抗体、抗体片段或抗体衍生物，包括但不限于鼠源抗体、人抗体（全人源抗体）、人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体（例如，scFv），以及与抗原结合的抗体片段（例如，Fab、Fab'和（Fab）<sub>2</sub> 片段）。术语“抗体”还可包括抗体的所有重组体形式，例如在原核细胞中表达的抗体、未糖基化的抗体以及本文所述的任何与抗原结合的抗体片段及其衍生物。每条重链可由重链可变区（VH）和重链恒定区构成。每条轻链可由轻链可变区（VL）和轻链恒定区构成。VH 和 VL 区可进一步被区分为称为互补决定区（CDR）的高变区，它们散布在称为构架区（FR）的更保守的区域中。每个 VH 和 VL 可由三个 CDR 和四个 FR 区构成，它们从氨基端至羧基端可按以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原（例如，人 GARP）相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导该免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，所述宿主组织或因子包括免疫系统的多种细胞（例如，效应细胞）和经典补体系统的第一成分（Clq）。所述 CDRs 的确切边界已根据不同系统不同地限定。由 Kabat（Kabat 等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*（National Institutes of Health, Bethesda, Md.（1987）和（1991））描述的系统，不仅提供了可应用于抗原结合片段的任何可变区的明确残基编号系统，还提供了限定 CDRs 的精确残基边界。这些 CDRs 可以被称为 Kabat CDRs。Chothia 和同事（Chothia 和 Lesk，

J.Mol.Biol.196: 901-917(1987)以及 Chothia 等人, Nature 342: 877-883(1989))发现尽管在氨基酸序列水平上具有大的多样性,但是 Kabat CDRs 内的某些亚部分采取几乎相同的肽主链构象。这些亚部分命名为 L1、L2 和 L3 或 H1、H2 和 H3,其中“L”和“H”分别指轻链和重链区域。这些区域可以被称为 Chothia CDRs,所述 Chothia CDRs 具有与 Kabat CDRs 重叠的边界。与 Kabat CDRs 重叠的限定 CDRs 的其他边界已由 Padlan(FASEB J.9: 133-139(1995))和 MacCallum(J Mol Biol 262(5): 732-45(1996))描述。另外,其他的 CDR 边界定义可能不严格地遵循上述系统之一,但仍将与 Kabat CDRs 重叠,尽管按照特定残基或残基组或甚至整个 CDRs 并不显著影响抗原结合的预测或实验发现,它们可以缩短或加长。在本申请中,使用的是 Chothia 编号系统。

在本申请中,术语“抗原结合片段”通常是指抗体中发挥特异性结合抗原功能的一个或多个片段。抗体的抗原结合功能可通过抗体的全长片段来实现。抗体的抗原结合功能也可通过以下来实现:包括 Fv、ScFv、dsFv、Fab、Fab'或 F(ab')<sub>2</sub> 的片段的重链,或者,包括 Fv、scFv、dsFv、Fab、Fab'或 F(ab')<sub>2</sub> 的片段的轻链。(1) Fab 片段,即由 VL、VH、CL 和 CH 结构域组成的一价片段;(2) F(ab')<sub>2</sub> 片段,包含通过铰链区处的二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段;(3) 由 VH 和 CH 结构域组成的 Fd 片段;(4) 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段;(5) 由 VH 结构域组成的 dAb 片段(Ward 等,(1989) Nature 341: 544-546);(6) 分离的互补决定区(CDR)和(7)可任选地通过接头连接的两个或以上分离的 CDR 的组合。例如,还可包括由 VL 和 VH 配对形成的一价单链分子 Fv(scFv)(参见 Bird 等(1988) Science 242: 423-426; 以及 Huston 等(1988) Proc.Natl.Acad.Sci. 85: 5879-5883)。例如,还可包括缺失抗体轻链而只有重链可变区的一类抗体 VHH(例如,可参见康晓圳等,生物工程学报,2018,34(12): 1974-1984)。所述“抗原结合部分”还可包括免疫球蛋白融合蛋白,所述融合蛋白包含选自以下的结合结构域:(1) 与免疫球蛋白铰链区多肽融合的结合结构域多肽;(2) 与铰链区融合的免疫球蛋白重链 CH2 恒定区;和(3) 与 CH2 恒定区融合的免疫球蛋白重链 CH3 恒定区。

在本申请中,术语“单克隆抗体”通常是指一群基本同源的抗体,即包含该群的各个抗体除了可能的以微量存在的天然发生的突变之外是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,直接针对单个抗原性位点。例如,所述单克隆抗体可以通过杂交瘤技术制备或者通过使用重组 DNA 方法在细菌、真核动物或植物细胞中产生单克隆抗体也可以得自噬菌体抗体文库,使用例如 Clackson et al., Nature, 352:624-628(1991) 和 Marks et al., Mol.Biol., 222:581-597(1991) 所述的技术进行。

在本申请中，术语“嵌合抗体”通常是指这样的抗体，其中每个重链或轻链氨基酸序列的一部分与来自特定物种的抗体中相应氨基酸序列同源，或者属于特定的类别，而该链的其余区段则与另一物种中的相应序列同源。例如，轻链和重链的可变区均来自一个动物物种（如小鼠、大鼠等）的抗体的可变区，而恒定部分则与来自另一物种（如人）的抗体序列同源。例如，为获得嵌合抗体，可利用非人源的 B 细胞或杂交瘤细胞产生可变区，而与其组合的恒定区则来自人。所述可变区具有易于制备的优点，并且其特异性不受与其组合的恒定区的来源的影响。同时，由于嵌合抗体的恒定区可来源于人类，因此嵌合在注射时抗体引发免疫应答的可能性会低于使用恒定区为非人来源的抗体。

在本申请中，术语“人源化抗体”通常是指一种嵌合抗体，其含有较少的来自非人免疫球蛋白的序列，从而降低异种抗体引入到人类中时的免疫原性，同时保持抗体的完全抗原结合亲和力和特异性。例如，可以使用 CDR 移植（Jones et al., Nature 321:522 (1986)）及其变体；包括“重塑”（reshaping），（Verhoeyen, et al., 1988 Science 239:1534-1536; Riechmann, et al., 1988 Nature 332:323-337; Tempest, et al., Bio/Technol 1991 9:266-271），“高度加成”（hyperchimerization），（Queen, et al., 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86:10029-10033; Co, et al., 1991 Proc Natl Acad Sci USA 88:2869-2873; Co, et al., 1992 J Immunol 148:1149-1154）和“贴面”（veneering），（Mark, et al., “Derivation of therapeutically active humanized and veneered anti-CD18 antibodies.” In: Metcalf B W, Dalton B J, eds. Cellular adhesion: molecular definition to therapeutic potential. New York: Plenum Press, 1994: 291-312）、表面重建（美国专利 US5639641）等技术手段，对非人源的结合域进行人源化。如果其他区域，例如铰链区和恒定区结构域也源自非人来源，则这些区域也可以被人源化。

在本申请中，术语“鼠源抗体”通常是指可变区框架和 CDR 区得自小鼠种系免疫球蛋白序列的抗体。此外，如果抗体包含恒定区，其也得自小鼠种系免疫球蛋白序列。本申请的鼠源抗体可以包含不由小鼠种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基，例如通过体外随机突变或点突变或通过体内体细胞突变而导入的突变。然而，术语“鼠源抗体”不包括在小鼠框架序列中插入得自其他哺乳动物物种的 CDR 序列的抗体。

在本申请中，术语“GARP 蛋白”或“GARP 抗原”可以互换使用，并且包括 GARP 的任何变体和同源物，其由细胞天然表达或在用 GARP 基因转染的细胞上表达。在本申请中，GARP 可以为人 GARP，其在 UniProt/Swiss-Prot 中的登录号为 Q14392。在本申请中，GARP 可在免疫细胞表面表达。例如，可在调节性 T 细胞（Treg）表面表达。

在本申请中，术语“TGF- $\beta$ 1”与“TGF $\beta$ 1”互换使用，通常与细胞生长调节和分化有关。在本

申请中, 所述 TGF- $\beta$ 1 是 TGF- $\beta$  的亚型。在本申请中, 所述“TGF- $\beta$ 1”可包括 TGF- $\beta$ 1 的任何变体和同源物, 其由细胞天然表达或在用 TGF- $\beta$ 1 基因转染的细胞上表达。在本申请中, 所述“TGF- $\beta$ 1”可以为人 TGF- $\beta$ 1, 其在 UniProt/Swiss-Prot 中的登录号为 P01137。在本申请中, 所述“TGF- $\beta$ 1”可被 GARP 激活, 并与 CD8+T 细胞上的 TGF $\beta$  受体结合抑制 CD8+T 细胞对肿瘤细胞的杀伤功能。

除了本文提到的特定蛋白质和核苷酸之外, 本申请还可包括其功能性变体、衍生物、类似物、同源物及其片段。

术语“功能性变体”指与天然存在序列具有基本上同一的氨基酸序列或由基本上同一的核苷酸序列编码并能够具有天然存在序列的一种或多种活性的多肽。在本申请的上下文中, 任何给定序列的变体是指其中残基的特定序列(无论是氨基酸或核苷酸残基)已经经过修饰而使得所述多肽或多核苷酸基本上保留至少一种内源功能的序列。可以通过天然存在的蛋白质和/或多核苷酸中存在的至少一个氨基酸残基和/或核苷酸残基的添加、缺失、取代、修饰、替换和/或变异来获得变体序列, 只要保持原来的功能活性即可。

在本申请中, 术语“衍生物”通常是指本申请的多肽或多核苷酸而言包括自/对序列的一个(或多个)氨基酸残基的任何取代、变异、修饰、替换、缺失和/或添加, 只要所得的多肽或多核苷酸基本上保留其至少一种内源功能。

在本申请中, 术语“类似物”通常对多肽或多核苷酸而言, 包括多肽或多核苷酸的任何模拟物, 即拥有该模拟物模拟的多肽或多核苷酸的至少一种内源功能的化学化合物。

通常, 可以进行氨基酸取代, 例如至少 1 个(例如, 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 20 个以上)氨基酸取代, 只要经修饰的序列基本上保持需要的活性或能力。氨基酸取代可包括使用非天然存在的类似物。

在本申请中, 术语“同源物”通常是指与天然存在序列具有一定同源性的氨基酸序列或核苷酸序列。术语“同源性”可以等同于序列“同一性”。同源序列可以包括可以与主题序列是至少 80%、85%、90%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或 99.9% 相同的氨基酸序列。通常, 同源物将包含与主题氨基酸序列相同的活性位点等。同源性可以根据相似性(即具有相似化学性质/功能的氨基酸残基)来考虑, 也可以在序列同一性方面表达同源性。在本申请中, 提及的氨基酸序列或核苷酸序列的 SEQ ID NO 中的任一项具有百分比同一性的序列是指在所提及的 SEQ ID NO 的整个长度上具有所述百分比同一性的序列。为了确定序列同一性, 可进行序列比对, 其可通过本领域技术人员了解的各种方式进行, 例如, 使用 BLAST、BLAST-2、ALIGN、NEEDLE 或 Megalign (DNASTAR) 软件等。本领域技术

人员能够确定用于比对的适当参数，包括在所比较的全长序列中实现最优比对所需要的任何算法。

用于本申请的蛋白质或多肽也可以具有氨基酸残基的缺失、插入或取代，所述氨基酸残基产生沉默的变化并导致功能上等同的蛋白质。可以根据残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两性性质的相似性进行有意的氨基酸取代，只要保留内源性功能即可。例如，带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸；带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸；并且含有相似亲水性值的不带电极性头基的氨基酸包括天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。

在本申请中，术语“肿瘤”通常是指在各种致癌因子作用下，局部组织细胞增生所形成的赘生物。例如，所述肿瘤可包括实体瘤。例如，所述肿瘤可包括与 GARP 的蛋白表达相关的肿瘤。术语“与 GARP 的蛋白表达相关的肿瘤”通常是指 GARP 表达导致疾病进展或逃避免疫监视而形成的肿瘤。所述与 GARP 的蛋白表达相关的肿瘤可以是 GARP 阳性的肿瘤。在 GARP 阳性的肿瘤中，与正常细胞相比，肿瘤细胞表面的 GARP 的蛋白表达量高约 1%，5%，10%，15%，20%，25%，30%，35%，40%，50%，60%，70%，80%或更高。例如，所述肿瘤可以是转移性结肠癌。例如，所述肿瘤可以是肝细胞癌。例如，所述肿瘤可以是晚期肾细胞癌。例如，所述肿瘤可以是非小细胞肺癌。例如，所述肿瘤可以是黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。

在本申请中，术语“黑色素瘤”通常是指黑色素细胞来源的一种高度恶性的肿瘤。在本申请中，所述黑色素瘤可发生于皮肤，也可见于黏膜和内脏。

在本申请中，术语“免疫缀合物”通常是指所述其他试剂（例如，化疗剂、放射性元素、细胞生长抑制剂和细胞毒性剂）与所述分离的抗原结合蛋白缀合（例如，通过连接分子共价相连）而形成的缀合物，该缀合物可以通过所述分离的抗原结合蛋白与靶细胞上的抗原的特异性结合，将所述其他试剂递送至靶细胞（例如，肿瘤细胞）。然后所述免疫缀合物经所述内化，最终进入靶细胞内部（例如，进入溶酶体等泡囊体），此时所述免疫缀合物中的连接分子可以裂解，释放所述其他试剂从而发挥其细胞毒性效应。此外，所述抗原也可以由所述靶细胞分泌，并位于所述靶细胞外的间隙。

在本申请中，术语“药学上可接受的治疗剂”通常是指可以抑制肿瘤和/或肿瘤细胞增殖的试剂。在本申请中，所述治疗剂可以是细胞毒性剂，也可以是细胞抑制剂。例如，所述治疗剂可以选自以下组：有丝分裂抑制剂、激酶抑制剂、烷基化试剂、抗代谢药、嵌入抗生素、生长因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、组蛋白脱乙酰基酶抑制剂、抗

存活剂、生物学应答调节剂。

在本申请中，术语“受试者”通常指人类或非人类动物，包括但不限于猫、狗、马、猪、奶牛、羊、兔、小鼠、大鼠或猴。

在本申请中，术语“核酸分子”通常是指从其天然环境中分离的或人工合成的任何长度的分离形式的核苷酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。

在本申请中，术语“载体”通常是指能够在合适的宿主中自我复制的核酸分子。所述载体可将插入的核酸分子转移到细胞中和/或细胞之间。所述载体可包括主要用于将 DNA 或 RNA 插入细胞中的载体、主要用于复制 DNA 或 RNA 的载体，以及主要用于 DNA 或 RNA 的转录和/或翻译的表达的载体。所述载体可以是当引入合适的细胞时能够转录并翻译成多肽的多核苷酸。通常，通过培养包含所述载体的合适的细胞，所述载体可以产生期望的表达产物。在本申请中，所述载体可包含慢病毒载体。

在本申请中，术语“细胞”通常是指可以或已经含有包括本申请所述的核酸分子的质粒或载体，或者能够表达本申请所述的多肽或本申请所述的抗原结合蛋白的个体细胞，细胞系或细胞培养物。所述细胞可以包括单个细胞的子代。由于天然的，意外的或故意的突变，子代细胞与原始亲本细胞在形态上或在基因组上可能不一定完全相同，但能够表达本申请所述的多肽或抗原结合蛋白即可。所述细胞可以通过使用本申请所述的载体体外转染细胞而得到。所述细胞可以是原核细胞（例如大肠杆菌），也可以是真核细胞（例如酵母细胞，例如 COS 细胞，中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，HeLa 细胞，HEK293 细胞，COS-1 细胞，NS0 细胞或骨髓瘤细胞）。在一些实施方式中，所述细胞可以是免疫细胞。例如，所述免疫细胞可以选自下组：T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞（NK 细胞）、巨噬细胞、NKT 细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、淋巴细胞、白细胞和/或外周血单个核细胞。例如，所述免疫细胞可以是 T 细胞。

在本申请中，术语“治疗”通常是指：(i) 预防可能易患疾病、病症和/或病状、但尚未诊断出患病的患者出现该疾病、病症或病状；(ii) 抑制该疾病、病症或病状，亦即遏制其发展；以及 (iii) 缓解该疾病、病症或病状，亦即使得该疾病、病症和/或病状和/或与该疾病、病症和/或病状相关联的症状消退。

在本申请中，术语“多肽”、“肽”、“蛋白”和“蛋白质”可互换地使用，通常是指具有任何长度的氨基酸的聚合物。该聚合物可以是直链或支链的，它可以包含修饰的氨基酸，并且可以被非氨基酸中断。这些术语还涵盖已经被修饰的氨基酸聚合物。这些修饰可以包含：二硫键形成、糖基化、脂化（lipidation）、乙酰化、磷酸化、或任何其他操纵（如与标记组分结合）。

术语“氨基酸”包括天然的和/或非天然的或者合成的氨基酸，包括甘氨酸以及 D 和 L 旋光异构体、以及氨基酸类似物和肽模拟物。

在本申请中，术语“多核苷酸”、“核苷酸”、“核苷酸序列”、“核酸”和“寡核苷酸”可互换地使用，通常是指具有任何长度的核苷酸的聚合形式，如脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸、或其类似物。多核苷酸可具有任何三维结构，并且可以执行已知或未知的任何功能。以下是多核苷酸的非限制性实例：基因或基因片段的编码区或非编码区、根据连接分析定义的多个座位（一个座位）、外显子、内含子、信使 RNA (mRNA)、转运 RNA、核糖体 RNA、短干扰 RNA (siRNA)、短发夹 RNA (shRNA)、micro-RNA (miRNA)、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的 DNA、任何序列的分离的 RNA、核酸探针、和引物。多核苷酸可以包含一个或多个经修饰的核苷酸，如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在，可以在聚合物组装之前或之后进行核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。多核苷酸可以在聚合后，如通过与标记的组分缀合来进一步修饰。

在本申请中，术语“ $K_D$ ”（同样地，“ $K_D$ ”或“KD”）通常指“亲和常数”或“平衡解离常数”，并指在滴定测量中在平衡时、或者通过将解离速率常数 ( $k_d$ ) 除以结合速率常数 ( $k_a$ ) 所获得的值。使用结合速率常数 ( $k_a$ )、解离速率常数 ( $k_d$ ) 和平衡解离常数 ( $K_D$ ) 表示结合蛋白（例如本申请所述的分离的抗原结合蛋白）对抗原（例如，GARP 蛋白）的结合亲和力。确定结合和解离速率常数的方法为本领域熟知。使用基于荧光的技术提供了高灵敏度以及在生理缓冲液中在平衡时检查样品的能力。例如，可以通过 Octet 测定所述  $K_D$  值，也可以使用其他实验途径和仪器例如 BIAcore（生物分子相互作用分析）测定（例如，可以从 BIAcore International AB, aGE Healthcare company, Uppsala, 瑞典获得的仪器）。另外，也可以使用可以从 Sapidyn Instruments (Boise, Idaho) 获得的 KinExA（动态排阻测定 (Kinetic Exclusion Assay)）测定所述  $K_D$  值，或者使用表面等离子共振仪 (SPR) 测定所述  $K_D$  值。

在本申请中，术语“和/或”应理解为意指可选项中的任一项或可选项的两项。

在本申请中，术语“包含”通常是指包括明确指定的特征，但不排除其他要素。在某些情形中，“包含”也涵盖仅包括指定的组分的情况。

在本申请中，术语“约”通常是指在指定数值以上或以下 0.5%-10% 的范围内变动，例如在指定数值以上或以下 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或 10% 的范围内变动。

在本申请中，术语“包括”通常是指包含、总括、含有或包涵的含义。在某些情况下，也表示“为”、“由……组成”的含义。

## 发明详述

### 本申请所述分离的抗原结合蛋白

一方面，本申请提供一种分离的抗原结合蛋白，其可以以约  $1.0E-12M$  或更低（例如，所述  $K_D$  不高于约  $1.0E-12M$ 、不高于约  $0.9E-12M$ 、不高于约  $0.8E-12M$ 、不高于约  $0.7E-12M$ 、不高于约  $0.6E-12M$ 、不高于  $0.5E-12M$ 、不高于  $0.4E-12M$ 、不高于  $0.3E-12M$ 、不高于  $0.2E-12M$  或不高于  $0.1E-12M$  或以下）的  $K_D$  值与人 GARP/人 TGF- $\beta$ 1 复合物结合。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可与参比抗体竞争结合所述人 GARP/人 TGF- $\beta$ 1 复合物，所述参比抗体可包含重链可变区 VH，所述 VH 可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 中的至少一个、两个或三个。

在本申请中，所述参比抗体的 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体的 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体的 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

例如，本申请所述参比抗体的 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；且所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 8H2D7B3 或与其具有相同 HCDR1-3 的抗体。

例如，本申请所述参比抗体的 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；且所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 JYB1907hz0 或与其具有相同 HCDR1-3 的抗体。

例如，本申请所述参比抗体的 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；且所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 JYB1907hz18 或与其具有相同 HCDR1-3 的抗体。

例如，所述参比抗体的 VH 可包含框架区 H-FR1，H-FR2，H-FR3 和 H-FR4。

在本申请中，所述参比抗体的 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列。

QVQLX<sub>1</sub>QSGAEX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>PGX<sub>5</sub>SVKX<sub>6</sub>SCKAS (SEQ ID NO: 46)，其中，X<sub>1</sub> 可以是 Q 或 V，X<sub>2</sub> 可以是 L 或 V，X<sub>3</sub> 可以是 K 或 V，X<sub>4</sub> 可以是 K 或 R，X<sub>5</sub> 可以是 A 或 S，X<sub>6</sub> 可以是 L 或 V。

在本申请中，所述参比抗体的 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 22 所示的氨

氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体的 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列。

WMYWVX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>PX<sub>3</sub>QGLEWIGSI (SEQ ID NO: 47)，其中，X<sub>1</sub>可以是 K 或 R，X<sub>2</sub>可以是 A 或 R，X<sub>3</sub>可以是 G 或 I。

在本申请中，所述参比抗体的 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体的 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列。

THYNQKFX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>RX<sub>3</sub>TVTVDK SX<sub>4</sub>RIVYMX<sub>5</sub>LSSLX<sub>6</sub>SEDX<sub>7</sub>AVYFCAR (SEQ ID NO: 48)，其中，X<sub>1</sub>可以是 Q 或 K，X<sub>2</sub>可以是 D 或 G，X<sub>3</sub>可以是 A 或 V，X<sub>4</sub>可以是 S 或 T，X<sub>5</sub>可以是 E 或 Q，X<sub>6</sub>可以是 R 或 T，X<sub>7</sub>可以是 S 或 T。

在本申请中，所述参比抗体的 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体的 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列。

WGX<sub>1</sub>GTX<sub>2</sub>VTVSS (SEQ ID NO: 49)，其中，X<sub>1</sub>可以是 Q 或 T，X<sub>2</sub>可以是 M 或 T。

在本申请中，所述参比抗体的 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体的 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列；所述 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列；所述 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列；且所述 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体的 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列；所述 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列；所述 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列；且所述 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 8H2D7B3 或与其具有相同 H-FR1-4 的抗体。

在本申请中，所述参比抗体的 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列；所述 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列；所述 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列；且所述 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 JYB1907hz0 或与其具有相同 H-FR1-4 的抗体。

在本申请中，所述参比抗体的 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列；所述 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列；所述 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 24 所示

的氨基酸序列；且所述 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 JYB1907hz18 或与其具有相同 H-FR1-4 的抗体。

在本申请中，所述参比抗体可包含重链可变区，所述重链可变区可包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列。

QVQLX<sub>1</sub>QSGAEX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>PGX<sub>5</sub>SVKX<sub>6</sub>SCKASGYTLSNYWMYWVX<sub>7</sub>QX<sub>8</sub>PX<sub>9</sub>QGLEWIGSI  
APSDSETHYNQKFX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>RX<sub>12</sub>TVTVDKXSX<sub>13</sub>RIVYMX<sub>14</sub>LSSLX<sub>15</sub>SEDX<sub>16</sub>AVYFCARGGFGYG  
SSHWYFDVWGX<sub>17</sub>GTX<sub>18</sub>VTVSS (SEQ ID NO: 50)，其中，X<sub>1</sub>可以是 Q 或 V，X<sub>2</sub>可以是 L  
或 V，X<sub>3</sub>可以是 K 或 V，X<sub>4</sub>可以是 K 或 R，X<sub>5</sub>可以是 A 或 S，X<sub>6</sub>可以是 L 或 V，X<sub>7</sub>可以是  
K 或 R，X<sub>8</sub>可以是 A 或 R，X<sub>9</sub>可以是 G 或 I，X<sub>10</sub>可以是 Q 或 K，X<sub>11</sub>可以是 D 或 G，X<sub>12</sub>可  
以是 A 或 V，X<sub>13</sub>可以是 S 或 T，X<sub>14</sub>可以是 E 或 Q，X<sub>15</sub>可以是 R 或 T，X<sub>16</sub>可以是 S 或 T，  
X<sub>17</sub>可以是 Q 或 T，X<sub>18</sub>可以是 M 或 T。

在本申请中，所述参比抗体的重链可变区可包含 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 21 中任  
一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体可包含重链恒定区，所述重链恒定区可包括源自 IgG 的恒定  
区或源自 IgY 的恒定区。

例如，所述参比抗体的重链恒定区可包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体可包括轻链可变区 VL，所述 VL 可包含 LCDR1、LCDR2 和  
LCDR3。

在本申请中，所述参比抗体的 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体的 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列。

GATSLEX<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 45)，其中，X<sub>1</sub>可以是 S 或 T。

在本申请中，所述参比抗体的 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 11 或 SEQ ID NO: 28 所示的  
氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体的 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列。

X<sub>1</sub>ASDHINKWLA (SEQ ID NO: 44)，其中，X<sub>1</sub>可以是 K 或 R。

在本申请中，所述参比抗体的 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 27 所示的  
氨基酸序列。

例如，本申请所述参比抗体的 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列；所述  
LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；且所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12  
所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 8H2D7B3 或与其具有相同 LCDR1-3 的

抗体。

例如，本申请所述参比抗体的 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；且所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 JYB1907hz0 或与其具有相同 LCDR1-3 的抗体。

例如，本申请所述参比抗体的 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列；且所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 JYB1907hz18 或与其具有相同 LCDR1-3 的抗体。

例如，所述参比抗体的 VL 可包含框架区 L-FR1, L-FR2, L-FR3 和 L-FR4。

在本申请中，所述参比抗体的 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列。

DIQMTQSX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>LSX<sub>4</sub>SX<sub>5</sub>GX<sub>6</sub>RVTITC (SEQ ID NO: 52)，其中，X<sub>1</sub> 可以是 P 或 S，X<sub>2</sub> 可以是 A 或 S，X<sub>3</sub> 可以是 T 或 Y，X<sub>4</sub> 可以是 A 或 V，X<sub>5</sub> 可以是 L 或 V，X<sub>6</sub> 可以是 D 或 G。

在本申请中，所述参比抗体的 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体的 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体的 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列。

GX<sub>1</sub>PSRFSGSGSGKDYTLX<sub>2</sub>IX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>LQX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>DX<sub>7</sub>ATYYC (SEQ ID NO: 53)，其中，X<sub>1</sub> 可以是 I 或 V，X<sub>2</sub> 可以是 T 或 S，X<sub>3</sub> 可以是 T 或 S，X<sub>4</sub> 可以是 G 或 S，X<sub>5</sub> 可以是 P 或 T，X<sub>6</sub> 可以是 D 或 E，X<sub>7</sub> 可以是 F 或 V。

在本申请中，所述参比抗体的 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 15 或 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体的 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。

FGX<sub>1</sub>GTKLEIK (SEQ ID NO: 54)，其中，X<sub>1</sub> 可以是 G 或 Q。

在本申请中，所述参比抗体的 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体的 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列；所述 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列；所述 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 15 或 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列；且所述 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体的 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列；所述 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列；所述 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列；且所述 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 8H2D7B3 或与其具有相同 L-FR1-4 的抗体。

在本申请中，所述参比抗体的 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列；所述 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列；所述 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列；且所述 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 JYB1907hz0 或与其具有相同 H-FR1-4 的抗体。

在本申请中，所述参比抗体的 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列；所述 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列；所述 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列；且所述 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 JYB1907hz18 或与其具有相同 L-FR1-4 的抗体。

在本申请中，所述参比抗体可包含轻链可变区，所述轻链可变区可包含 SEQ ID NO: 51 所示的氨基酸序列。

DIQMTQ $X_1$  $X_2$  $X_3$ LS $X_4$ S $X_5$ G $X_6$ RVTTTC $X_7$ ASDHINKWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSL  
EX $_8$ G $X_9$ PSRFSGSGSGKDYTL $X_{10}$ I $X_{11}$  $X_{12}$ LQ $X_{13}$  $X_{14}$ DX $_{15}$ ATYYCQQYWTTPYTFGX $_{16}$ GTKLEI  
K (SEQ ID NO: 51)，其中， $X_1$  可以是 P 或 S， $X_2$  可以是 A 或 S， $X_3$  可以是 T 或 Y， $X_4$  可以是 A 或 V， $X_5$  可以是 L 或 V， $X_6$  可以是 D 或 G， $X_7$  可以是 K 或 R， $X_8$  可以是 S 或 T， $X_9$  可以是 I 或 V， $X_{10}$  可以是 T 或 S， $X_{11}$  可以是 T 或 S， $X_{12}$  可以是 G 或 S， $X_{13}$  可以是 P 或 T， $X_{14}$  可以是 D 或 E， $X_{15}$  可以是 F 或 V， $X_{16}$  可以是 G 或 Q。

在本申请中，所述参比抗体的轻链可变区可包含 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 26 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体可包含轻链恒定区，所述轻链恒定区包括源自 Ig $\kappa$  的恒定区或源自 Ig $\lambda$  的恒定区。

例如，所述参比抗体的轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 18 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体可包含 HCDR1-3 和 LCDR1-3。例如，所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列；所述 LCDR1 可包括 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 8H2D7B3 或与其具有

相同 HCDR1-3 和 LCDR1-3 的抗原结合蛋白。

在本申请中，所述参比抗体可包含 HCDR1-3 以及 LCDR1-3。例如，所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列；所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 JYB1907hz0 或与其具有相同 HCDR1-3 和 LCDR1-3 的抗原结合蛋白。

在本申请中，所述参比抗体可包含 HCDR1-3 以及 LCDR1-3。例如，所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列；所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列；所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 JYB1907hz18 或与其具有相同 HCDR1-3 和 LCDR1-3 的抗原结合蛋白。

在本申请中，所述参比抗体可包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区可包含 HCDR1-3 以及 H-FR1-4，且所述轻链可变区可包含 LCDR1-3 以及 L-FR1-4。例如，所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列；所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。例如，所述 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列；所述 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列；所述 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列；所述 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列；所述 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列；所述 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列；所述 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列；所述 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体的重链可变区可包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗原结合片段 8H2D7B3 或与其具有相同重链可变区的抗原结合蛋白。例如，所述参比抗体的轻链可变区可包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 8H2D7B3 或与其具有相同轻链可变区的抗原结合蛋白。

在本申请中，所述参比抗体包含重链和轻链，所述参比抗体的重链可包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 8H2D7B3 或与其具有相同重链的抗原结合蛋白。例如，所述参比抗体的轻链可包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。例如，所述

参比抗体可包括抗体 8H2D7B3 或与其具有相同轻链的抗原结合蛋白。

在本申请中，所述参比抗体可包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区可包含 HCDR1-3 以及 H-FR1-4，且所述轻链可变区可包含 LCDR1-3 以及 L-FR1-4。例如，所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列；所述 LCDR1 可包括 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。例如，所述 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列；所述 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列；所述 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列；所述 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列；所述 L-FR1 可包括 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列；所述 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列；所述 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列；所述 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体的重链可变区可包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗原结合片段 JYB1907hz0 或与其具有相同重链可变区的抗原结合蛋白。例如，所述参比抗体的轻链可变区可包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 JYB1907hz0 或与其具有相同轻链可变区的抗原结合蛋白。

在本申请中，所述参比抗体可包含重链和轻链，所述参比抗体的重链可包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 JYB1907hz0 或与其具有相同重链的抗原结合蛋白。例如，所述参比抗体的轻链可包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 JYB1907hz0 或与其具有相同轻链的抗原结合蛋白。

在本申请中，所述参比抗体可包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区可包含 HCDR1-3 以及 H-FR1-4，且所述轻链可变区可包含 LCDR1-3 以及 L-FR1-4。例如，所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列；所述 LCDR1 可包括 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列；所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。例如，所述 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列；所述 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列；所述 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列；所述 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列；所述 L-FR1 可包括 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列；所述 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列；所述 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列；所述 L-FR4 可包含 SEQ ID

NO: 31 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体的重链可变区可包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗原结合片段 JYB1907hz18 或与其具有相同重链可变区的抗原结合蛋白。例如，所述参比抗体的轻链可变区可包含 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 JYB1907hz18 或与其具有相同轻链可变区的抗原结合蛋白。

在本申请中，所述参比抗体可包含重链和轻链。例如，所述参比抗体的重链可包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 JYB1907hz18 或与其具有相同重链的抗原结合蛋白。例如，所述参比抗体的轻链可包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体可包括抗体 JYB1907hz18 或与其具有相同轻链的抗原结合蛋白。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可与人 GARP/人 TGF- $\beta$ 1 复合物结合。

本申请所述分离的抗原结合蛋白可缓解或治疗治疗肿瘤，其中所述肿瘤可包括实体瘤。例如，可包括与 GARP 的表达相关的肿瘤。例如，所述肿瘤可以是转移性结肠癌。例如，所述肿瘤可以是肝细胞癌。例如，所述肿瘤可以是晚期肾细胞癌。例如，所述肿瘤可以是非小细胞肺癌。例如，所述肿瘤可以是黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。例如，所述肿瘤可以是黑色素瘤、乳腺癌和/或肺鳞癌。例如，所述肿瘤可以是黑色素瘤。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含重链可变区 VH，所述 VH 可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 中的至少一个、至少两个或至少三个。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

例如，本申请所述分离的抗原结合蛋白的 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；且所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。例如，所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 8H2D7B3 或与其具有相同 HCDR1-3 的抗体。

例如，本申请所述分离的抗原结合蛋白的 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；且所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。例如，所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 JYB1907hz0 或与其具有相同 HCDR1-3 的抗体。

例如，本申请所述分离的抗原结合蛋白的 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；且所述 HCDR3 可包含 SEQ

ID NO: 4 所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 JYB1907hz18 或与其具有相同 HCDR1-3 的抗体。

例如,所述抗原结合蛋白的 VH 可包含框架区 H-FR1, H-FR2, H-FR3 和 H-FR4。

在本申请中,所述抗原结合蛋白的 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列。

QVQLX<sub>1</sub>QSGAEX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>PGX<sub>5</sub>SVKX<sub>6</sub>SCKAS (SEQ ID NO: 46), 其中, X<sub>1</sub> 可以是 Q 或 V, X<sub>2</sub> 可以是 L 或 V, X<sub>3</sub> 可以是 K 或 V, X<sub>4</sub> 可以是 K 或 R, X<sub>5</sub> 可以是 A 或 S, X<sub>6</sub> 可以是 L 或 V。

在本申请中,所述抗原结合蛋白的 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述抗原结合蛋白的 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列。

WMYWVX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>PX<sub>3</sub>QGLEWIGSI (SEQ ID NO: 47), 其中, X<sub>1</sub> 可以是 K 或 R, X<sub>2</sub> 可以是 A 或 R, X<sub>3</sub> 可以是 G 或 I。

在本申请中,所述抗原结合蛋白的 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述抗原结合蛋白的 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列。

THYNQKFX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>RX<sub>3</sub>TVTVDKSX<sub>4</sub>RIVYMX<sub>5</sub>LSSLX<sub>6</sub>SEDX<sub>7</sub>AVYFCAR (SEQ ID NO: 48), 其中, X<sub>1</sub> 可以是 Q 或 K, X<sub>2</sub> 可以是 D 或 G, X<sub>3</sub> 可以是 A 或 V, X<sub>4</sub> 可以是 S 或 T, X<sub>5</sub> 可以是 E 或 Q, X<sub>6</sub> 可以是 R 或 T, X<sub>7</sub> 可以是 S 或 T。

在本申请中,所述抗原结合蛋白的 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述抗原结合蛋白的 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列。

WGX<sub>1</sub>GTX<sub>2</sub>VTVSS (SEQ ID NO: 49), 其中, X<sub>1</sub> 可以是 Q 或 T, X<sub>2</sub> 可以是 M 或 T。

在本申请中,所述抗原结合蛋白的 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述抗原结合蛋白的 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列;所述抗原结合蛋白的 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列;所述抗原结合蛋白的 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列;且所述抗原结合蛋白的 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述抗原结合蛋白的 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列;所

述抗原结合蛋白的 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列；所述抗原结合蛋白的 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列；且所述抗原结合蛋白的 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。例如，所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 8H2D7B3 或与其具有相同 H-FR1-4 的抗体。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列；所述抗原结合蛋白的 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列；所述抗原结合蛋白的 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列；且所述抗原结合蛋白的 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。例如，所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 JYB1907hz0 或与其具有相同 H-FR1-4 的抗体。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列；所述抗原结合蛋白的 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列；所述抗原结合蛋白的 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列；且所述抗原结合蛋白的 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列。例如，所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 JYB1907hz18 或与其具有相同 H-FR1-4 的抗体。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含重链可变区，所述重链可变区可包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列。

QVQLX<sub>1</sub>QSGAEX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>PGX<sub>5</sub>SVKX<sub>6</sub>SCKASGYTLSNYWMYWVX<sub>7</sub>QX<sub>8</sub>PX<sub>9</sub>QGLEWIGSI  
APSDSETHYNQKFX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>RX<sub>12</sub>TVTVDKXSX<sub>13</sub>RIVYMX<sub>14</sub>LSSLX<sub>15</sub>SEDX<sub>16</sub>AVYFCARGGFGYG  
SSHWYFDVWGX<sub>17</sub>GTX<sub>18</sub>VTVSS (SEQ ID NO: 50)，其中，X<sub>1</sub>可以是 Q 或 V，X<sub>2</sub>可以是 L 或 V，X<sub>3</sub>可以是 K 或 V，X<sub>4</sub>可以是 K 或 R，X<sub>5</sub>可以是 A 或 S，X<sub>6</sub>可以是 L 或 V，X<sub>7</sub>可以是 K 或 R，X<sub>8</sub>可以是 A 或 R，X<sub>9</sub>可以是 G 或 I，X<sub>10</sub>可以是 Q 或 K，X<sub>11</sub>可以是 D 或 G，X<sub>12</sub>可以是 A 或 V，X<sub>13</sub>可以是 S 或 T，X<sub>14</sub>可以是 E 或 Q，X<sub>15</sub>可以是 R 或 T，X<sub>16</sub>可以是 S 或 T，X<sub>17</sub>可以是 Q 或 T，X<sub>18</sub>可以是 M 或 T。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的重链可变区可包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含重链恒定区，所述重链恒定区可包括源自 IgG 的恒定区或源自 IgY 的恒定区。例如，所述重链恒定区可包括源自人 IgG1 和或 IgG4 的恒定区。

例如，所述抗原结合蛋白的轻链恒定区可包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包括轻链可变区 VL，所述 VL 可包含 LCDR1、

LCDR2 和 LCDR3。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列。

GATSLEX<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 45)，其中，X<sub>1</sub> 可以是 S 或 T。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 11 或 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列。

X<sub>1</sub>ASDHINKWLA (SEQ ID NO: 44)，其中，X<sub>1</sub> 可以是 K 或 R。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白的 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列；所述抗原结合蛋白的 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；且所述抗原结合蛋白的 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。例如，所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 8H2D7B3 或与其具有相同 LCDR1-3 的抗体。

例如，所述抗原结合蛋白的 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列；所述抗原结合蛋白的 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；且所述抗原结合蛋白的 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。例如，所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 JYB1907hz0 或与其具有相同 LCDR1-3 的抗体。

例如，所述抗原结合蛋白的 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列；所述抗原结合蛋白的 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列；且所述抗原结合蛋白的 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。例如，所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 JYB1907hz18 或与其具有相同 LCDR1-3 的抗体。

例如，所述抗原结合蛋白的 VL 可包含框架区 L-FR1, L-FR2, L-FR3 和 L-FR4。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列。

DIQMTQSX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>LSX<sub>4</sub>SX<sub>5</sub>GX<sub>6</sub>RVTTIC (SEQ ID NO: 52)，其中，X<sub>1</sub> 可以是 P 或 S，X<sub>2</sub> 可以是 A 或 S，X<sub>3</sub> 可以是 T 或 Y，X<sub>4</sub> 可以是 A 或 V，X<sub>5</sub> 可以是 L 或 V，X<sub>6</sub> 可以是 D 或 G。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列。

GX<sub>1</sub>PSRFSGSGSGKDYTLX<sub>2</sub>IX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>LQX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>DX<sub>7</sub>ATYYC (SEQ ID NO: 53), 其中, X<sub>1</sub>可以是 I 或 V, X<sub>2</sub>可以是 T 或 S, X<sub>3</sub>可以是 T 或 S, X<sub>4</sub>可以是 G 或 S, X<sub>5</sub>可以是 P 或 T, X<sub>6</sub>可以是 D 或 E, X<sub>7</sub>可以是 F 或 V。

在本申请中, 所述抗原结合蛋白的 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 15 或 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 所述抗原结合蛋白的 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。

FGX<sub>1</sub>GTKLEIK (SEQ ID NO: 54), 其中, X<sub>1</sub>可以是 G 或 Q。

在本申请中, 所述抗原结合蛋白的 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 所述抗原结合蛋白的 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列; 所述抗原结合蛋白的 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列; 所述抗原结合蛋白的 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 15 或 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列; 且所述抗原结合蛋白的 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 所述抗原结合蛋白的 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列; 所述抗原结合蛋白的 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列; 所述抗原结合蛋白的 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列; 且所述抗原结合蛋白的 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。例如, 所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 8H2D7B3 或与其具有相同 L-FR1-4 的抗体。

在本申请中, 所述抗原结合蛋白的 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列; 所述抗原结合蛋白的 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列; 所述抗原结合蛋白的 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列; 且所述抗原结合蛋白的 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。例如, 所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 JYB1907hz0 或与其具有相同 H-FR1-4 的抗体。

在本申请中, 所述抗原结合蛋白的 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列; 所述抗原结合蛋白的 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列; 所述抗原结合蛋白的 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列; 且所述抗原结合蛋白的 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列。例如, 所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 JYB1907hz18 或与其具有相同 L-FR1-4 的抗体。

在本申请中, 所述分离的抗原结合蛋白可包含轻链可变区, 所述轻链可变区可包含 SEQ ID NO: 51 所示的氨基酸序列。

DIQMTQ<sub>SX<sub>1</sub></sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>LSX<sub>4</sub>SX<sub>5</sub>GX<sub>6</sub>RVTITCX<sub>7</sub>ASDHINKWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSL  
EX<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>PSRFSGSGSGKDYTLX<sub>10</sub>IX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>LQX<sub>13</sub>X<sub>14</sub>DX<sub>15</sub>ATYYCQQYWTTPYTFGX<sub>16</sub>GTKLEI  
K (SEQ ID NO: 51), 其中, X<sub>1</sub>可以是 P 或 S, X<sub>2</sub>可以是 A 或 S, X<sub>3</sub>可以是 T 或 Y, X<sub>4</sub>可  
以是 A 或 V, X<sub>5</sub>可以是 L 或 V, X<sub>6</sub>可以是 D 或 G, X<sub>7</sub>可以是 K 或 R, X<sub>8</sub>可以是 S 或 T, X<sub>9</sub>  
可以是 I 或 V, X<sub>10</sub>可以是 T 或 S, X<sub>11</sub>可以是 T 或 S, X<sub>12</sub>可以是 G 或 S, X<sub>13</sub>可以是 P 或 T,  
X<sub>14</sub>可以是 D 或 E, X<sub>15</sub>可以是 F 或 V, X<sub>16</sub>可以是 G 或 Q。

在本申请中,所述抗原结合蛋白的轻链可变区可包含 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 26  
中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可包含轻链恒定区,所述轻链恒定区包括源自 Igκ  
的恒定区或源自 Igλ 的恒定区。

例如,所述抗原结合蛋白的轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR1-3 和 LCDR1-3。例如,所述 HCDR1  
可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列;所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸  
序列;所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列;所述 LCDR1 可包括 SEQ ID  
NO: 10 所示的氨基酸序列;所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列;所述  
LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白可包括抗  
体 8H2D7B3 或与其具有相同 HCDR1-3 和 LCDR1-3 的抗原结合蛋白。

在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR1-3 和 LCDR1-3。例如,所述 HCDR1  
可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列;所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸  
序列;所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列;所述 LCDR1 可包括 SEQ ID  
NO: 10 所示的氨基酸序列;所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列;所述  
LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白可包括抗  
体 JYB1907hz0 或与其具有相同 HCDR1-3 和 LCDR1-3 的抗原结合蛋白。

在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR1-3 和 LCDR1-3。例如,所述 HCDR1  
可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列;所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸  
序列;所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列;所述 LCDR1 可包括 SEQ ID  
NO: 27 所示的氨基酸序列;所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列;所述  
LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白可包括抗  
体 JYB1907hz18 或与其具有相同 HCDR1-3 和 LCDR1-3 的抗原结合蛋白。

在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变

区可包含 HCDR1-3 以及 H-FR1-4, 且所述轻链可变区可包含 LCDR1-3 以及 L-FR1-4。例如, 所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列; 所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列; 所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列; 所述 LCDR1 可包括 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列; 所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列; 所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。例如, 所述 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列; 所述 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列; 所述 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列; 所述 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列; 所述 L-FR1 可包括 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列; 所述 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列; 所述 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列; 所述 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。例如, 所述分离的抗原结合片段的重链可变区可包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。例如, 所述分离的抗原结合蛋白可包括抗原结合片段 8H2D7B3 或与其具有相同重链可变区的抗原结合蛋白。例如, 所述分离的抗原结合蛋白的轻链可变区可包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。例如, 所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 8H2D7B3 或与其具有相同轻链可变区的抗原结合蛋白。

在本申请中, 所述分离的抗原结合蛋白可包含重链和轻链。例如, 所述分离的抗原结合蛋白的重链可包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。例如, 所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 8H2D7B3 或与其具有相同重链的抗原结合蛋白。例如, 所述分离的抗原结合蛋白的轻链可包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。例如, 所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 8H2D7B3 或与其具有相同轻链的抗原结合蛋白。

在本申请中, 所述分离的抗原结合蛋白可包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区可包含 HCDR1-3 以及 H-FR1-4, 且所述轻链可变区可包含 LCDR1-3 以及 L-FR1-4。例如, 所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列; 所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列; 所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列; 所述 LCDR1 可包括 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列; 所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列; 所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。例如, 所述 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列; 所述 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列; 所述 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列; 所述 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列; 所述 L-FR1 可包括 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列; 所述 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列; 所述 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列; 所述 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。例如, 所述分离的抗原结合蛋白的重链可变区可包含 SEQ

ID NO: 1 所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白可包括抗原结合片段 JYB1907hz0 或与其具有相同重链可变区的抗原结合蛋白。例如,所述分离的抗原结合蛋白的轻链可变区可包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 JYB1907hz0 或与其具有相同轻链可变区的抗原结合蛋白。

在本申请中,所述的分离的抗原结合蛋白可包含重链和轻链。例如,所述分离的抗原结合蛋白的重链可包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 JYB1907hz0 或与其具有相同重链的抗原结合蛋白。例如,所述分离的抗原结合蛋白的轻链可包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 JYB1907hz0 或与其具有相同轻链的抗原结合蛋白。

在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区可包含 HCDR1-3 以及 H-FR1-4,且所述轻链可变区可包含 LCDR1-3 以及 L-FR1-4。例如,所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列;所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列;所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列;所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列;所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列;所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。例如,所述 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列;所述 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列;所述 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列;所述 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列;所述 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列;所述 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列;所述 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列;所述 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白的重链可变区可包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白可包括抗原结合片段 JYB1907hz18 或与其具有相同重链可变区的抗原结合蛋白。例如,所述分离的抗原结合蛋白的轻链可变区可包含 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 JYB1907hz18 或与其具有相同轻链可变区的抗原结合蛋白。

在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可包含重链和轻链。例如,所述分离的抗原结合蛋白的重链可包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 JYB1907hz18 或与其具有相同重链的抗原结合蛋白。例如,所述分离的抗原结合蛋白的轻链可包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白可包括抗体 JYB1907hz18 或与其具有相同轻链的抗原结合蛋白。

### 多肽和免疫缀合物

另一方面，本申请提供了一种或多种多肽，其可包含本申请的分离的抗原结合蛋白。

另一方面，本申请提供了一种或多种免疫缀合物，所述免疫缀合物可包含本申请的分离的抗原结合蛋白。在某些实施方式中，所述免疫缀合物还可包含药学上可接受的治疗剂。

在本申请中，所述治疗剂可以是细胞毒性剂，也可以是细胞抑制剂。例如，所述治疗剂可以选自以下组：有丝分裂抑制剂、激酶抑制剂、烷基化试剂、抗代谢药、嵌入抗生素、生长因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、组蛋白脱乙酰基酶抑制剂、抗存活剂、生物学应答调节剂。

### 核酸、载体和细胞

另一方面，本申请还提供了分离的一种或多种核酸分子，所述一种或多种核酸分子可编码本申请所述分离的抗原结合蛋白。例如，所述一种或多种核酸分子中的每一个核酸分子可以编码完整的所述抗原结合蛋白，也可以编码其中的一部分（例如，HCDR1-3、重链可变区中的一种或多种）。

本申请所述的核酸分子可以为分离的。例如，其可以通过以下方法产生或合成的：(i) 在体外扩增的，例如通过聚合酶链式反应（PCR）扩增产生的，(ii) 通过克隆重组产生的，(iii) 纯化的，例如通过酶切和凝胶电泳分级分离，或者 (iv) 合成的，例如通过化学合成。例如，所述分离的核酸可以通过重组 DNA 技术制备的核酸分子。

在本申请中，可以通过本领域已知的多种方法来制备编码所述分离的抗原结合蛋白的核酸，这些方法包括但不限于，采用逆转录 PCR 和 PCR 获得本申请所述分离的抗原结合蛋白的核酸分子。

另一方面，本申请提供了一种或多种载体，其包含本申请所述的一种或多种核酸分子。每种载体中可包含一种或多种所述核酸分子。此外，所述载体中还可包含其他基因，例如允许在适当的宿主细胞中和在适当的条件下选择该载体的标记基因。此外，所述载体还可包含允许编码区在适当宿主中正确表达的表达控制元件。这样的控制元件为本领域技术人员所熟知的，例如，可包括启动子、核糖体结合位点、增强子和调节基因转录或 mRNA 翻译的其他控制元件等。在某些实施方式中，所述表达控制序列为可调的元件。所述表达控制序列的具体结构可根据物种或细胞类型的功能而变化，但通常包含分别参与转录和翻译起始的 5' 非转录序列和 5' 及 3' 非翻译序列，例如 TATA 盒、加帽序列、CAAT 序列等。例如，5' 非转录表达控制序列可包含启动子区，启动子区可包含用于转录控制功能性连接核酸的启动子序列。所述表达控制序列还可包括增强子序列或上游活化子序列。在本申请中，适当的启动子可包括，例如用于 SP6、T3 和 T7 聚合酶的启动子、人 U6RNA 启动子、CMV 启动子及其人工杂合启

动子（如 CMV），其中启动子的某部分可与其他细胞蛋白（如人 GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶）基因启动子的某部分融合，其可包含或不包含另外的内含子。本申请所述的一种或多种核酸分子可以与所述表达控制元件可操作地连接。

所述载体可以包括，例如质粒、粘粒、病毒、噬菌体或者在例如遗传工程中通常使用的其他载体。例如，所述载体可为表达载体。例如，所述载体可为病毒载体。可以将病毒载体直接给予至患者（体内）或可以通过间接的形式，例如，在体外使用病毒处理细胞，然后将处理过的细胞给予至患者（离体）。病毒载体技术在本领域中是公知的，并在例如 Sambrook 等（2001 ,Molecular Cloning:A Laboratory Manual ,Cold Spring Harbor Laboratory ,New York）和其他病毒学和分子生物学手册中进行了描述。常规的基于病毒的系统可以包括用于基因转移的逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体以及单纯疱疹病毒载体。在某些情形中，可以用逆转录病毒、慢病毒和腺相关病毒的方法将基因转移整合进宿主基因组中，使插入的基因长期表达。慢病毒载体是能够转导或感染非分裂细胞并典型地产生较高病毒效价的逆转录病毒载体。慢病毒载体可包含长末端重复序列 5'LTR 和截短的 3'LTR、RRE、rev 应答元件（cPPT）、中央终止序列（CTS）和/或翻译后调控元件（WPRE）。本申请所述的载体可以被引入细胞。

另一方面，本申请提供了一种细胞。所述细胞可包含本申请所述的分离的抗原结合蛋白、所述的多肽、所述的免疫缀合物、一种或多种核酸分子和/或本申请所述的一种或多种载体。例如，每种或每个细胞可包含一个或一种本申请所述的核酸分子或载体。例如，每种或每个细胞可包含多个（例如，2 个或以上）或多种（例如，2 种或以上）本申请所述的核酸分子或载体。例如，可将本申请所述的载体引入所述宿主细胞中，例如原核细胞（例如，细菌细胞）、CHO 细胞、NS/O 细胞、HEK293T 细胞、293F 细胞或 HEK293A 细胞，或者其他真核细胞，如来自植物的细胞、真菌或酵母细胞等。可通过本领域已知的方法将本申请所述的载体引入所述宿主细胞中，例如电穿孔、lipofectine 转染、lipofectamin 转染等。例如，所述细胞可以包括酵母细胞。例如，所述细胞可以包括大肠杆菌细胞。例如，所述细胞可以包括哺乳动物细胞。例如，所述细胞可以包括免疫细胞。

所述细胞可以包括免疫细胞。在某些情形中，所述细胞可以包括免疫细胞。例如，所述细胞可包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤（NK）细胞、巨噬细胞、NKT 细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、淋巴细胞、白细胞和/或外周血单个核细胞。

### 药物组合物和药物组合

另一方面，本申请提供了一种药物组合物。所述药物组合物可包含本申请所述的分离的

抗原结合蛋白、所述的多肽、所述的免疫缀合物、所述分离的核酸分子、所述的载体、所述的细胞，和/或药学上可接受的佐剂和/或赋形剂。在本申请中，所述药学上可接受的佐剂可以包括缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、低分子量多肽、蛋白质、亲水聚合物、氨基酸、糖、螯合剂、反离子、金属复合物和/或非离子表面活性剂。除非与本申请所述的细胞不相容，否则任何常规介质或试剂均可以考虑用于本申请的药物组合物中。在本申请中，所述药学上可接受的赋形剂可以包括在药物制剂中除主药以外的附加物，也可称为辅料。例如，所述赋形剂可以包括片剂中的粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂。例如，所述赋形剂可以包括中药丸剂中的酒、醋、药汁等。例如，所述赋形剂可以包括半固体制剂软膏剂、霜剂中的基质部分。例如，所述赋形剂可以包括液体制剂中的防腐剂、抗氧剂、矫味剂、芳香剂、助溶剂、乳化剂、增溶剂、渗透压调节剂、着色剂。

另一方面，本申请提供了一种药物组合，其包含所述分离的抗原结合蛋白和免疫检查点抑制剂。

在本申请中，所述免疫检查点抑制剂可包括抑制 PD-1/PD-L1 相互作用的物质。例如，所述免疫检查点抑制剂可选自下组：PD-1/PD-L1 阻断剂、PD-1 拮抗剂、PD-L1 拮抗剂、PD-1 抑制剂和 PD-L1 抑制剂。

例如，所述 PD-1/PD-L1 阻断剂可选自下组：BMS202 (PD-1/PD-L1 抑制剂 2)、BMS-1(PD-1/PD-L1 抑制剂 1)、PD-1/PD-L1 抑制剂 3、BMS-1166 和 BMS-1001。

例如，所述 PD-1 抑制剂可包括抗 PD-1 抗体。例如，所述 PD-L1 抑制剂可包括 PD-L1 抗体。

例如，所述抗 PD-1 抗体可选自下组：Nivolumab (纳武单抗)、Pembrolizumab (派姆单抗)、Camrelizumab (卡瑞利珠单抗)、Toripalimab (特瑞普利单抗)、Sintilimab (信迪利单抗) 和 Tislelizumab (替雷利珠单抗)。例如，所述抗 PD-L1 抗体可选自下组：Durvalumab (德瓦鲁单抗)、Atezolizumab (阿替利珠单抗) 和 avelumab (阿维单抗)。

在本申请中，所述抗 PD-L1 抗体可包含选自下组的抗体的 HCDR3：Durvalumab (德瓦鲁单抗)、Atezolizumab (阿替利珠单抗) 和 avelumab (阿维单抗)。

在本申请中，所述抗 PD-L1 抗体可包含选自下组的抗体的 HCDR2：Durvalumab (德瓦鲁单抗)、Atezolizumab (阿替利珠单抗) 和 avelumab (阿维单抗)。

在本申请中，所述抗 PD-L1 抗体可包含选自下组的抗体的 HCDR1：Durvalumab (德瓦鲁单抗)、Atezolizumab (阿替利珠单抗) 和 avelumab (阿维单抗)。

在本申请中，所述抗 PD-L1 抗体可包含选自下组的抗体的 LCDR3：Durvalumab (德瓦鲁

单抗)、Atezolizumab (阿替利珠单抗) 和 avelumab (阿维单抗)。

在本申请中, 所述抗 PD-L1 抗体可包含选自下组的抗体的 LCDR2: Durvalumab (德瓦鲁单抗)、Atezolizumab (阿替利珠单抗) 和 avelumab (阿维单抗)。

在本申请中, 所述抗 PD-L1 抗体可包含选自下组的抗体的 LCDR1: Durvalumab (德瓦鲁单抗)、Atezolizumab (阿替利珠单抗) 和 avelumab (阿维单抗)。

在本申请中, 所述抗 PD-L1 抗体可包含选自下组的抗体的 VH: Durvalumab (德瓦鲁单抗)、Atezolizumab (阿替利珠单抗) 和 avelumab (阿维单抗)。

在本申请中, 所述抗 PD-L1 抗体可包含选自下组的抗体的 VL: Durvalumab (德瓦鲁单抗)、Atezolizumab (阿替利珠单抗) 和 avelumab (阿维单抗)。在本申请中, 所述抗 PD-L1 抗体可包含 HCDR3, 所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 所述抗 PD-L1 抗体包含 HCDR2, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 所述抗 PD-L1 抗体包含 HCDR1, 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 所述抗 PD-L1 抗体包含重链可变区 VH, 所述 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列; 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列; 以及所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。例如, 抗体可包括阿替利珠单抗或与其具有相同 HCDR1-3 的抗体。

在本申请中, 所述抗 PD-L1 抗体可包含重链可变区 VH, 所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 所述抗 PD-L1 抗体可包含 LCDR3, 所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 所述抗 PD-L1 抗体可包含 LCDR2, 所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 所述抗 PD-L1 抗体可包含 LCDR1, 所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 所述抗 PD-L1 抗体可包含轻链可变区 VL, 所述 VL 可包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列; 所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列; 以及所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。例如, 抗体可包括阿替利珠单抗或与其具有相同 LCDR1-3 的抗体。

在本申请中，所述抗 PD-L1 抗体可包含轻链可变区 VL，所述 VL 可包含 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗 PD-L1 抗体可包含重链和轻链，所述重链可包含 HCDR1-3 以及 H-FR1-4，且所述轻链可包含 LCDR1-3 以及 L-FR1-4。例如，所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列；所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列；所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列；所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列。例如，所述抗 PD-L1 抗体可包括阿替利珠单抗或与其具有相同 HCDR1-3 和 LCDR1-3 的抗原结合蛋白。例如，所述抗 PD-L1 抗体的重链可变区可包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。例如，所述抗 PD-L1 抗体可包括阿替利珠单抗或与其具有相同重链可变区的抗原结合蛋白。例如，所述抗 PD-L1 抗体的轻链可变区可包含 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列。例如，所述抗 PD-L1 抗体可包括阿替利珠单抗或与其具有相同轻链可变区的抗原结合蛋白。例如，所述抗 PD-L1 抗体的重链可包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列。例如，所述抗 PD-L1 抗体可包括阿替利珠单抗或与其具有相同重链的抗原结合蛋白。例如，所述抗 PD-L1 抗体的轻链可包含 SEQ ID NO: 43 所示的氨基酸序列。例如，所述抗 PD-L1 抗体可包括阿替利珠单抗或与其具有相同轻链的抗原结合蛋白。

### 试剂盒、用途和方法

另一方面，本申请提供了一种试剂盒，其包含所述的药物组合。

另一方面，本申请提供了分离的抗原结合蛋白、所述的多肽、所述的免疫缀合物、所述分离的核酸分子、所述的载体、所述的药物组合物用于预防、缓解和/或治疗肿瘤。

例如，所述肿瘤可包括实体瘤。例如，所述肿瘤可包括与 GARP 的蛋白表达相关的肿瘤。例如，所述肿瘤可以是转移性结肠癌。例如，所述肿瘤可以是肝细胞癌。例如，所述肿瘤可以是晚期肾细胞癌。例如，所述肿瘤可以是非小细胞肺癌。例如，所述肿瘤可以是黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。

另一方面，在本申请中，所述的试剂盒和/或所述的药物组合用于预防、缓解和/或治疗肿瘤。

例如，所述肿瘤可包括实体瘤。例如，所述肿瘤可包括与 GARP 的蛋白表达相关的肿瘤。例如，所述肿瘤可以是转移性结肠癌。例如，所述肿瘤可以是肝细胞癌。例如，所述肿瘤可以是晚期肾细胞癌。例如，所述肿瘤可以是非小细胞肺癌。例如，所述肿瘤可以是黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。

另一方面，本申请提供了一种所述的分离的抗原结合蛋白、所述的多肽、所述的免疫缀合物、所述的分离的核酸分子、所述的载体，所述的细胞和/或所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防、缓解和/或治疗肿瘤。

例如，所述肿瘤可包括实体瘤。例如，所述肿瘤可包括与 GARP 的蛋白表达相关的肿瘤。例如，所述肿瘤可以是转移性结肠癌。例如，所述肿瘤可以是肝细胞癌。例如，所述肿瘤可以是晚期肾细胞癌。例如，所述肿瘤可以是非小细胞肺癌。例如，所述肿瘤可以是黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。

另一方面，本申请提供了一种药物组合和/或试剂盒在制备药物中的用途，所述药物用于预防、缓解和/或治疗肿瘤。

例如，所述肿瘤可包括实体瘤。例如，所述肿瘤可包括与 GARP 的蛋白表达相关的肿瘤。例如，所述肿瘤可以是转移性结肠癌。例如，所述肿瘤可以是肝细胞癌。例如，所述肿瘤可以是晚期肾细胞癌。例如，所述肿瘤可以是非小细胞肺癌。例如，所述肿瘤可以是黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。

另一方面，本申请提供了一种预防和/或治疗疾病或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用所述的分离的抗原结合蛋白、所述的分离的核酸分子、所述的载体，所述的细胞、所述的药物组合物，其中所述疾病或病症包括肿瘤。

另一方面，本申请提供了一种预防和/或治疗疾病或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用所述的药物组合，其中所述疾病或病症包括肿瘤。

例如，所述肿瘤可包括实体瘤。例如，所述肿瘤可包括与 GARP 的蛋白表达相关的肿瘤。例如，所述肿瘤可以是转移性结肠癌。例如，所述肿瘤可以是肝细胞癌。例如，所述肿瘤可以是晚期肾细胞癌。例如，所述肿瘤可以是非小细胞肺癌。例如，所述肿瘤可以是黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。

本申请所述药物组合物、药物组合及方法可与其他类型的癌症疗法结合使用，诸如化学疗法、手术、放射、基因疗法等。本申请中所描述的药物组合物及方法可用于其他依赖于免疫反应的疾病病状，诸如炎症、免疫疾病及感染性疾病。

在本申请中，所述受试者可以包括人或非人动物。例如，所述非人动物可以选自下组：猴、鸡、鹅、猫、狗、小鼠和大鼠。此外，非人动物也可以包括任何除人以外的动物物种，例如家畜动物，或啮齿类动物，或灵长类动物，或家养动物，或家禽动物。所述人可以是高加索人、非洲人、亚洲人、闪族人，或其他种族，或各种种族的杂合体。又例如，所述人可以是老年、成年、青少年、儿童或者婴儿。

可以根据在实验动物中的有效量推测在人类中的有效量。例如, Freireich 等人描述了动物和人的剂量的相互关系(基于每平方米身体表面的毫克数)(Freireich et al., *Cancer Chemother. Rep.* 50, 219 (1966))。身体表面积可以从患者的身高和体重近似确定。参见例如 *Scientific Tables*, Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, N.Y., 537 (1970)。

不欲被任何理论所限, 下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请的融合蛋白、制备方法和用途等, 而不用来限制本申请发明的范围。

## 实施例

### 实施例 1 重组质粒制备及免疫细胞株构建

人 GARP (记为 hGARP) 全长氨基酸序列 (Uniprot#Q14392) 与人 Latent TGF- $\beta$  (记为 hTGF- $\beta$ 1) 全长氨基酸序列 (Uniprot#P01137) 经密码子优化, 合成的 DNA 序列按已建立的分子生物学方法分别被克隆到载体 pLVX-IRES.puro 和 pLVX-IRES.G418 中, 构建好的重组质粒通过慢病毒包装, 感染 293F 细胞, 经抗生素加压筛选, 挑单克隆得到过表达 hGARP/hTGF- $\beta$ 1 的 293F-hGARP/hTGF- $\beta$ 1 单克隆重组细胞株, 经流式抗人 GARP 抗体 (Enzo life science, ALX-804-867FI-0100) 和抗人 TGF- $\beta$ 1 抗体 (R&D Systems, FAB2463A) 染色, 流式细胞仪上机检测, 结果如表 1 所示, 挑取表达量高的 293F-hGARP/hTGF- $\beta$ 1 单克隆重组细胞株做免疫。类似方法用于 CHOK1-hGARP/hTGF- $\beta$ 1, 293T-hGARP 和 293T-hTGF- $\beta$ 1 单克隆重组细胞株的制备, 用于单克隆抗体的筛选和鉴定。

表 1 293F-hGARP/hTGF- $\beta$ 1 单克隆重组细胞株的流式检测结果

克隆号	平均荧光强度 (MFI)			
	同型对照-FITC	抗人 GARP 抗体-FITC	同型对照-APC	抗 LAP (TGF- $\beta$ 1)抗体-APC
2F4	101	8368	90	149969
2D3	103	6963	103	141919

### 实施例 2 鼠抗人 GARP 单克隆抗体的制备

#### 2.1 免疫

用 293F-hGARP/hTGF- $\beta$ 1 单克隆重组细胞株 2F4 和 2D3 分别免疫 Balb/c, SJL 小鼠 3-4 次,  $3-5 \times 10^6$  细胞/只, 间隔时间 2-3 周, 第三次免疫后第七天采血, 为免疫后血清。用 CHOK1-hGARP/hTGF- $\beta$ 1 和空细胞 CHOK1 检测免疫后血清的流式细胞结合程度, 计算 CHOK1-hGARP/hTGF- $\beta$ 1 和空细胞 CHOK1 流式结合平均荧光强度的比值, 比值较高的小鼠用于融合。融合前三天, 用  $3-5 \times 10^6$  细胞/只的 293F-hGARP/hTGF- $\beta$ 1 单克隆重组细胞株冲击免疫小鼠。

## 2.2 融合

融合当天，小鼠安乐死后，解剖、取脾、研磨并收集细胞，1500rpm，5min 离心，收集细胞，用 5 毫升红细胞裂解液悬浮细胞，4 度放置 5 分钟，用 DMEM+10%FBS 终止反应，计数。离心后用 40mlDMEM 悬浮细胞，静置 2~3min 后转移上清到另外一个 50 毫升离心管中。收集 SP2/0 细胞，按 SP2/0:脾细胞=1:5 的比例混合，离心，充分吸取上清后，拍松，混合细胞沉淀，用 DMEM 洗涤混合细胞两次，依照常规方法进行 PEG 融合或者电融合后，用 DMEM 培养基洗涤细胞并将其重悬于 DMEM+10%FBS+1×HAT 的筛选培养基中。将融合后的细胞加入 96 孔细胞培养板内，置 37°C、湿度 75%、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 9~10 天。

## 2.3 筛选及亚克隆，抗体纯化

用流式检测 96 孔细胞培养板中的杂交瘤上清对 CHOK1-hGARP/hTGF-β1 细胞的结合活性。

CHOK1-hGARP/hTGF-β1 单克隆重组细胞株在 T-75 细胞培养瓶中扩大培养至 90%汇合度，吸尽培养基，用 PBS 缓冲液（购自 Invitrogen）洗涤 2 次，然后用无酶细胞解离液（Versene solution, 15040066, 购自 Life technology 公司）处理和收集细胞。用 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次，进行细胞计数后将细胞用 PBS 缓冲液稀释至 2×10<sup>6</sup> 细胞每毫升，加入 FACS 缓冲液（含有 2% FBS 的 PBS），室温孵育 15 分钟，然后用 PBS 缓冲液离心洗涤 2 次。将收集的细胞用 FACS 缓冲液悬浮至 3×10<sup>6</sup> 细胞/mL。按每孔 100 微升加入到 96 孔 FACS 反应板中，加入 96 孔细胞培养板中的杂交瘤上清每孔 100 微升，4°C 孵育 1 小时。离心后，弃上清，加入每孔 100 微升荧光（Alexa 488）标记的二抗（购自 Invitrogen），4°C 孵育 1 小时。用 FACS 缓冲液离心洗涤 3 次，加入每孔 100 微升固定液[4%（v/v）多聚甲醛]悬浮细胞，10 分钟后用 FACS 缓冲液离心洗涤 2 次。用 30 微升 FACS 缓冲液悬浮细胞，用流式细胞仪 intellycite plus（购自 Sartorius 公司）检测和分析结果。

阳性的杂交瘤上清对应的细胞克隆转至 24 孔细胞培养板继续培养 2-4 天后，24 孔细胞培养板中的杂交瘤上清（对应的细胞克隆名称：8H2）用于检测与 CHOK1-hGARP/hTGF-β1 细胞的结合活性，结果如下表 2 所示。从 24 孔细胞培养板中挑取阳性细胞进行亚克隆及亚克隆筛选，直至得到稳定的可分泌结合 CHOK1-hGARP/hTGF-β1 的杂交瘤单克隆抗体细胞株 8H2D7B3，并采用常规无血清培养基进行 50 毫升小规模生产，常规 protein A 柱纯化得到纯化单克隆抗体做后续鉴定。

表 2 杂交瘤上清与 CHOK1-hGARP/hTGF-β1 细胞的结合活性的检测结果

克隆名称	平均荧光强度/ CHOK1-hGARP/hTGF-β1
8H2	2418591.5

#### 2.4 轻重链可变区氨基酸序列测定

离心搜集  $5 \times 10^7$  个杂交瘤细胞 8H2D7B3，常规 Trizol 法提取总 RNA。逆转录反应后得到的 cDNA 通过末端转移酶进行加 G 反应，后用 VH，VK 引物和 polyC 引物扩增含可变区序列的 DNA，做 T-A 克隆，测序后进行抗体序列分析。

### 实施例 3 鼠抗人 GARP 单克隆抗体的鉴定

3.1 流式鉴定鼠抗人 GARP 单克隆抗体结合 293F 细胞，293F-hGARP 细胞，293F-hTGF-β1 细胞和 293F-hGARP/hTGF-β1 复合物的功能。

细胞计数后 300g 离心 5min 丢弃上清，用 1×PBS 重悬清洗细胞，300g 离心 5min，弃上清，然后用 2% FBS 的 FACS buffer 重悬调成密度  $1 \times 10^6$ /mL。细胞铺板  $1 \times 10^5$ /孔，100μL/孔，4°C，0.5h，离心 300g，5min，弃上清。加待测抗体（2%FBS 的 FACS buffer 配置）15μg/mL 开始，1: 5 梯度稀释，7 个梯度，0μg/mL 为对照，100μL/孔，吹打混匀，4°C，1h，300g 离心 5min，弃上清。加 200μL/孔的 1×PBS，重悬细胞混匀，300g 离心 5min，弃上清，重复二遍。加二抗 Alexa 488（donkey anti-mouse IgG（H+L），lot: 2018296，Thermo Fisher）使用 2% FBS 的 FACS buffer 1: 1000 配制，100μL/well，4°C，避光 1h。加 200μL/孔的 1×PBS，重悬细胞混匀，300g 离心 5min，弃上清，重复二遍。2% FBS 的 FACS buffer 重悬，FACS 机器读值。利用软件作图并计算 EC50。其中，MHG8 为阳性对照，鼠 IgG1（mIgG1）为同型对照。结果如图 1A-1D 所示：图 1A 表示待测抗体与 293F 细胞的结合，图 1B 表示待测抗体与 293F-hGARP 细胞的结合，图 1C 表示待测抗体与 293F-hTGF-β1 细胞，图 1D 表示待测抗体与 293F-hGARP/hTGF-β1 复合物的，表明鼠源抗体 8H2D7B3 仅与 293F-hGARP/hTGF-β1 复合物结合。

3.2 流式检测鼠抗人 GARP 单克隆抗体阻断 MHG8（抗人 GARP 抗体）与 293F-hGARP/hTGF-β1 复合物结合功能

细胞计数 300g 离心 5min 丢弃上清，用 1×PBS 重悬清洗细胞，300g 离心 5min，弃上清，然后 2%FBS 的 FACS buffer 重悬调成密度  $1 \times 10^6$ /mL。细胞铺板  $1 \times 10^5$ /孔，100μL/孔，4°C，0.5h，300g 离心 5min，弃上清。加竞争抗体 MHG8 with alexa488（lot: 1905151702，1.39mg/mL）终浓度 30 μg/mL，每孔 50μL，加待测抗体（2%FBS 的 FACS buffer 配置）30μg/mL 开始，1: 5 梯度稀释，7 个梯度，0μg/mL 为对照，100μL/孔，吹打混匀，4°C，1h，300g 离心 5min，

弃上清。加 200 $\mu$ L/孔的 1 $\times$ PBS，重悬细胞混匀，300g 离心 5min，弃上清，重复二遍。加二抗 Alexa 488 (donkey anti-mouse IgG (h+L), lot: 2018296, Thermo Fisher)，使用 2%FBS 的 FACS buffer 1: 1000 配制，100 $\mu$ L/well，4 $^{\circ}$ C，避光 1h。加 200 $\mu$ L/well 的 1 $\times$ PBS，重悬细胞混匀，300g 离心 5min，弃上清，重复二遍。2%FBS 的 FACS buffer 重悬，FACS 机器读值。利用软件作图并计算 EC50。其中，MHG8 为阳性对照，鼠 IgG1 (mIgG1) 为同型对照。结果如图 2 所示，鼠源抗体 8H2D7B3 可阻断 MHG8 与 293F-hGARP/hTGF- $\beta$ 1 复合物的结合。

3.3 Western blot 和 Alpha Elisa 测定纯化后鼠抗人 GARP 单克隆抗体抑制 Treg 细胞中的 SMAD2 磷酸化

新鲜的 PBMC 细胞购至 ALLCELLS 公司，先将 PBMC 细胞 400g 离心 10min，然后用 1% FBS (Thermo Fisher, 10099-141) 和 50mmol EDTA (ThermoFisher, 15400054) 的 1 $\times$ PBS 培养基(Thermo Fisher, 10010049)重悬。PBMC 进行 Treg 细胞提取参考 Treg 提取试剂盒(Miltenyi, Cat: 130-091-301)操作步骤进行。Treg 细胞抗体处理：Treg 体外扩增 14 天，收集细胞计数， $1.5 \times 10^6$  个 Treg 细胞去除磁珠并用于阴性对照。24 孔板每孔  $1 \times 10^6$ /mL 铺板，每孔 1mL。待测抗体加入 24 孔板，浓度 25 $\mu$ g/mL。37 $^{\circ}$ C，二氧化碳培养箱培养 36h。

Alpha Elisa 检测：离心收集细胞，加入 50 $\mu$ L 的 Lysis buffer，裂解 30min。1300rpm 离心 5min，10 $\mu$ L 上清用于 Alpha Elisa 检测 (PerkinElmer, ALSU-PSM2-A500)。

Western Blot 检测：离心收集细胞，加入 50 $\mu$ L 的 Lysis buffer，裂解 30min。1300rpm 离心 5min，10 $\mu$ L 上清用于 Western blot 检测。结果如图 3A-3B 所示：图 3A 表示待测抗体抑制 Treg 细胞中的 SMAD2 磷酸化的 Western blot 检测结果，图 3B 表示待测抗体抑制 Treg 细胞中的 SMAD2 磷酸化的 Alpha Elisa 检测信号值，表明鼠源抗体与阳性对照抗 TGF- $\beta$ 1 和 MHG8 类似，均能抑制 Treg 细胞中 SMAD2 蛋白的磷酸化。

通过结合、阻断等功能鉴定，选择 8H2D7B3 作为鼠源候选抗体并进行人源化。

测得鼠抗人 GARP 单克隆抗体 8H2D7B3 可变区序列如下：

>8H2D7B3 VH

QVQLQQSGAELVRPGSSVKLSCKASGYTLSNYWVWVKQRPIQGLEWIGSIAPSDSE  
THYNQKFKDRATVTVDKSSRIVYMQLSSLTSEDSAVYFCARGGFGYSSHWYFDVWGTGT  
TVTSS

>8H2D7B3 VL

DIQMTQSSAYLSVSLGGRVTITCKASDHINKWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGIP  
SRFSGSGSGKDYTLITGLQTEDVATYYCQQYWTTPYTFGGGTKLEIK

鼠抗人 GARP 单克隆抗体 8H2D7B3 的重链及轻链 CDR 区如表 3 所示。

表 3 鼠抗人 GARP 单克隆抗体 8H2D7B3 的重链及轻链 CDR 区

重链		轻链	
HCDR1	GYTLSNY	LCDR1	KASDHINKWLA
HCDR2	APSDSE	LCDR2	GATSLET
HCDR3	GGFGYGSSHWFYFDV	LCDR3	QQYWTTPTYT

#### 实施例 4 鼠抗人 GARP 单克隆抗体的人源化

4.1 通过序列比对挑选与鼠抗人 GARP 单克隆抗体 8H2D7B3 最同源的人 Germline 抗体 (数据来源: IMGT) 作为人源化设计框架 (轻链以 IGKV3D-15\*01 或 IGKV1-5\*03, IGKJ2\*02 或 IGKJ4\*02 为框架, 重链以 IGHV3-7\*03 或 IGHV1-46\*03, IGHJ3\*01, 为框架), 对抗体轻重链可变区进行 Chothia 编号 [Chothia & Lesk, 1987], 定义抗体 CDR 区: CDRL1 (L24-L34), CDRL2 (L50-L56), CDRL3 (L89-L97), CDRH1 (H26-H32), CDRH2(H52-H56), CDRH3(H95-H97), 根据序列比对和可变区结构信息对抗体轻重链可变区氨基酸进行人源化突变。

#### 4.2 Germline 抗体序列信息

IGKV3D-15\*01:

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWP

IGKV1-5\*03:

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISWLAAYQQKPGKAPKLLIYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCQQYNSYS

IGHV3-7\*03:

EVQLVESGGGLVQPGLSLRSLCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDQSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAR

IGHV1-46\*03:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR

IGKJ2\*02:

CTFGQGTKLEIK

IGKJ4\*02:

LTFGGGTKVEIK

IGHJ3\*01:

DAFDVWGQGTMVTVSS

4.3 设计表达载体，基因合成，哺乳细胞表达纯化重组抗体，比较人源化抗体和嵌合抗体活性，理化性质的差异，进行 1-2 轮人源化优化，轻重链均以上述 Germline 抗体为框架 CDR 移植的人源化序列进行优化设计。得到的嵌合抗体命名为 JYB1907hz0，人源化抗体命名为 JYB1907hz18。

#### 4.4 人源化抗体表达和纯化

抗体工程优化设计序列后，全长 JYB1907hz18 轻重链蛋白质序列分别进行密码子优化，基因合成密码子优化后 DNA 片段（Genscript），克隆合成后基因片段到表达载体 pcDNA3.4（Life Technologies）。表达质粒扩增和质粒抽提后双质粒共转 ExpiCHO 细胞(ThermoFisher Scientific, A29133)，根据供应商 ExpiCHO 表达系统方法进行抗体瞬转表达，大致过程如下：在培养总体积 25ml 培养基中，36.5°C，8%二氧化碳浓度下培养 ExpiCHO 细胞到密度  $6 \times 10^6$ /mL，使用 ExpiFectamine 转染试剂各转 10 $\mu$ g 抗体轻重链表达质粒到细胞；转染一天后，各取 150 $\mu$ L 和 4mL ExpiCHO 增强剂和 ExpiCHO 辅料添加到培养细胞中，继续培养至 9 天，4°C，3500 转离心取上清。混合 AmMag<sup>TM</sup> Protein A 磁珠（Genscript, L00695）和抗体表达上清，室温孵育 2 小时，PBS 洗涤两次弃上清，加入适量洗脱缓冲液 Protein G or A Sefinose<sup>TM</sup> Elution buffer（Sangon, C600481），充分混匀后置于试管架上静止孵育 5 分钟，孵育期间重悬磁珠 2~3 次，重复洗脱 2 次，洗脱后，立即加入适量中和液 1M Tris-HCl, pH7.5(Sangon, B548124)中和备用。

#### 4.5 纯化后的人源化抗体的亲和力检测

4.5.1 采用 Octet RED96e（Fortebio）测定 JYB1907hz18 与 hGARP/hTGF- $\beta$ 1 复合物（恺作，货号：GAR-HM4TG）的亲和力，1907Hz18 与 hGARP/hTGF- $\beta$ 1 复合物均用 1xPBST（1xPBS：生工，B548117-0500；0.02%吐温 20：Sigma，P1379）稀释，hGARP/hTGF- $\beta$ 1 复合物的起始浓度为 100nM，3 倍梯度稀释，JYB1907hz18 使用浓度为 33.3nM。

4.5.2 样品上机检测（Octet Data Acquisition 11.1.0.11）：首先，将样品加入 96 孔板（Greiner bio-one, 655209），体系为 200  $\mu$ L/well。然后设置软件参数，板温设定为 30°C，收集标准动力学信号的频率为 5.0 HZ。接着，用 1xPBST 预湿 AHC 传感器（Fortebio，货号：18-0015）10 分钟，然后上机检测。每个循环包含以下步骤：1）浸入缓冲液 60 s；2）检测抗原（hGARP/hTGF- $\beta$ 1 复合物）是否与传感器有非特异性结合；3）10 mM pH1.7 的甘氨酸溶液

再生；4) 浸入缓冲液 60 s；5) 抗体 (JYB1907hz18) 固化在传感器上，时间为 25 s；6) 传感器浸入缓冲液 180 s；7) 抗原 (hGARP/hTGF- $\beta$ 1 复合物) 与抗体 (JYB1907hz18) 结合，时间 180 s；8) 抗原 (hGARP/hTGF- $\beta$ 1 复合物) 与抗体 (JYB1907hz18) 的解离，时间 10 分钟；9) 传感器再生。

#### 4.5.3 数据分析

采用 Fortebio 的 Data Analysis 12.0 软件，对抗原 (hGARP/hTGF- $\beta$ 1 复合物) -抗体 (JYB1907hz18) 以 1:1 的结合方式，测定结合速率 ( $K_a$ ) 和解离速率 ( $K_d$ )，以此计算抗体的平衡解离常数 ( $K_D$ )。结果如表 4 所示，JYB1907hz18 与 hGARP/hTGF- $\beta$ 1 结合的亲和力优于阳性对照抗体 MHG8。

表 4 JYB1907hz18 与 hGARP/hTGF- $\beta$ 1 的亲和力检测结果

候选抗体	$K_D$ (M)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)
JYB1907hz18	<1.0E-12	1.95E+05	<1.0E-07
MHG8	2.05E-10	1.39E+05	2.85E-05

#### 实施例 5 JYB1907hz18 抑制 Treg 细胞中的 SMAD2 磷酸化

新鲜的 PBMC 细胞购至 ALLCELLS 公司，先将 PBMC 细胞 400g 离心 10min，然后用 1%FBS (Thermo Fisher, 10099-141) 和 50mmol EDTA (ThermoFisher, 15400054) 的 1×PBS 培养基 (Thermo Fisher, 10010049) 重悬。PBMC 进行 Treg 细胞提取参考 Treg 提取试剂盒 (Miltenyi, Cat: 130-091-301) 操作步骤进行。Treg 细胞抗体处理：Treg 体外扩增 14 天，收集细胞计数， $1.5 \times 10^6$  个 Treg 细胞去除磁珠并用于阴性对照。24 孔板每孔  $1 \times 10^6$ /mL 铺板，每孔 1mL。待测抗体加入 24 孔板，浓度 25  $\mu$ g/mL。37°C，二氧化碳培养箱培养 36h。其中，抗 TGF- $\beta$ 1 和 MHG8 为阳性对照，人 IgG4 为同型对照。

Alpha Elisa 检测：离心收集细胞，加入 50 $\mu$ L 的 Lysis buffer，裂解 30min。1300rpm 离心 5min，10 $\mu$ L 上清用于 Alpha Elisa 检测 (PerkinElmer, ALSU-PSM2-A500)。

如上述方法评估，JYB1907hz18 抑制 Treg 细胞中的 SMAD2 磷酸化，结果如图 4 所示。

#### 实施例 6 JYB1907hz18 抑制 TGF $\beta$ 1 释放试验研究

293T-hGARP/hTGF- $\beta$ 1 细胞由上海睿智化学构建，LN229 细胞购至南京科佰 (货号：CBP60302)。待 2 种细胞生长至 70% 密度时分别用胰酶 (Thermo, 25200056) 消化，加入含有 10%FBS (Thermo Fisher, 10099-141) 和 1×Pen Strep (Thermo Fisher, 15140-122) 的新鲜 DMEM (Thermofisher, 11965092) 分别对每个细胞进行重悬，按每孔  $3 \times 10^6$  个细胞 (每孔 50 $\mu$ L)

依次加入 96 孔板中 (Corning, 3599)。每孔加入 50 $\mu$ L 梯度稀释的 JYB1907hz18 (终浓度 10 $\mu$ g/mL 起始, 2 倍梯度稀释, 最后一个孔抗体浓度为 0, 共 10 个点), 置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 5~6h。离心取上清, 使用 TGF- $\beta$ 1 ELISA 试剂盒 (Biolegend, 货号: 580709) 进行 TGF- $\beta$ 1 检测。其中, MHG8 为阳性对照, 人 IgG4 为同型对照。

如上述方法评估, JYB1907hz18 抑制 293T 细胞释放 TGF- $\beta$ 1, 结果如图 5 所示。

#### 实施例 7 JYB1907hz18 阻止 Treg 对外周血单个核细胞 (PBMC) 释放 IL-2 和 IFN- $\gamma$ 的抑制

新鲜的 PBMC 细胞购至 TPCS 公司, 先将 PBMC 细胞 400g 离心 10 min, 然后用 1% FBS (Thermo Fisher, 10099-141) 和 50mmol EDTA (ThermoFisher, 15400054) 的 1 $\times$ PBS 培养基 (Thermo Fisher, 10010049) 重悬。吸出少许 PBMC 用于后续实验, 剩余 PBMC 进行 Treg 细胞提取, 参考 Treg 提取试剂盒 (Miltenyi, Cat: 130-091-301) 操作步骤进行。将提取的 Treg 细胞和 PBMC 细胞计数并调整浓度为 5e5/mL, PBMC 组, 加入 50 $\mu$ L PBMC 和 48 $\mu$ L 的 1% HBS (TPCS, A515) 和 1 $\times$ Pen Strep (Thermo Fisher, 15140-122) 的 TexMACS<sup>TM</sup> Medium 培养基 (Miltenyi Biotec, 170-076-309) 以及 2 $\mu$ L 的 CD3/CD28 抗体磁珠 (Miltenyi Biotec, 130-095-345)。PBMC+Treg 细胞组, 加入 50 $\mu$ L PBMC 和 46 $\mu$ L 的 1% HBS (TPCS, A515) 和 1 $\times$ Pen Strep (Thermo Fisher, 15140-122) 的 TexMACS<sup>TM</sup> Medium 培养基 (Miltenyi Biotec, 170-076-309) 以及 4 $\mu$ L 的 CD3/CD28 抗体磁珠 (Miltenyi Biotec, 130-095-345)。加入待测抗体 JYB1907hz18, 每孔 50 $\mu$ L, 终浓度为 25 $\mu$ g/ml。置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 20-24h。离心取上清, 使用 IL-2 ELISA 和 IFN- $\gamma$  ELISA 试剂盒进行 IL-2 检测 (R&D, VAL110) 和 IFN- $\gamma$  检测 (R&D, DIF50C)。其中, MHG8 为阳性对照。

如上述方法评估, JYB1907hz18 阻止 Treg 对外周血单个核细胞 (PBMC) 释放白细胞介素-2 (IL-2) 和干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 的抑制, 结果如图 6A-6B 所示: 图 6A 表示待测抗体阻止 Treg 对外周血单个核细胞 (PBMC) 释放白细胞介素-2 (IL-2) 的抑制; 图 6B 表示待测抗体阻止 Treg 对外周血单个核细胞 (PBMC) 释放干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 的抑制。

#### 实施例 8 在人源化 FcRn 小鼠模型中药代动力学 (PK) 研究

以人源化 FcRn 小鼠为受试动物, 分别研究两个待试药物 MHG8 和 JYB1907hz18 单次皮下给药后的药代动力学指标。所有动物实验方案获得了 IACUC 审阅和批准。hFcRn 小鼠采购自北京百奥赛图, 雄性, 6~8 周龄, 体重 23~26g, 饲养于 SPF 级动物房, 标准颗粒饲料喂养, 自由进食及饮水, 室温 18~24 $^{\circ}$ C, 相对湿度 40%~50%, 每日 12h 昼夜交替。实验动物共 12

只,随机分为三组,每组四只动物,皮下单次给药,给药剂量为 10mg/kg,给药体积为 10 mL/kg。采血时间点为给药前,给药后 2h, 6h, 24h (第 1 天), 第 2 天, 第 3 天, 第 4 天, 第 7 天, 第 10 天, 第 14 天, 第 21 天, 第 28 天, 第 35 天和第 42 天。通过脸颊穿刺采集全血 60 $\mu$ L/只至 EP 管中,室温静置 30min,然后离心 (2000g, 4 $^{\circ}$ C, 5 min) 分离血清,每个样品分装为 2 份 (检测管和备份管), 10 $\mu$ L/管,置于-80 $^{\circ}$ C保存。

利用 Elisa 间接法检测,分析三种药下不同时间点药代动力学。包被抗原为鼠抗人 IgG4 Fc (abcam, lot:GR3248093-2, ab99820), 2 $\mu$ g/mL, 100 $\mu$ L/孔, 4 $^{\circ}$ C, 过夜。洗板后用 200 $\mu$ L/孔封闭液 4 $^{\circ}$ C过夜。血清样本加样, 50 $\mu$ L/孔, 37 $^{\circ}$ C, 1h。检测抗体为 hGARP/hTGF  $\beta$ 1-biotin (0.78mg/ml, lot: 030201) +Streptavidin-peroxidase (Sigma, lot:SLCB5784), 100 $\mu$ l/孔, 37 $^{\circ}$ C, 0.5h。TMB 显色液 (KPL, 货号: 52-00-03) 显色, 酶标仪 (Molecular Devices, SpectraMax M3) 读值 OD450。根据标准曲线获得药物浓度, PK Solver 非房室进行数据处理获得 PK 参数。

给药 MHG8 后,半衰期 ( $t_{1/2}$ ) =4.8 天,最高浓度 ( $C_{max}$ ) 为 50036ng/ml (如图 7B 所示); 给药 JYB1907hz18 后半衰期 ( $t_{1/2}$ ) =8.82 天,最高浓度 ( $C_{max}$ ) 为 139437ng/ml (如图 7A 所示)。

## 实施例 9 JYB1907hz18 理化性质研究

### 9.1 SEC-HPLC 纯度分析

9.1.1 将样品 (JYB1907hz18) 稀释至 1mg/mL, 混匀, 12000rpm 离心 5min, 取上清转至样品瓶, 放入 HPLC 样品盘。设置色谱条件如表 5 所示。

表 5 色谱条件

色谱条件	参数
色谱柱	TSK G3000SWxl
检测波长	280nm
柱温	25 $^{\circ}$ C
样品室温度	5 $^{\circ}$ C
流速	0.5ml/min

9.1.2 色谱柱采用流动相 (200mM 磷酸盐缓冲液, pH6.8) 平衡后, 进样分析, 用色谱软件进行数据分析, 峰面积归一化法计算各个峰的峰面积百分比。

### 9.2 HIC-HPLC 分析

9.2.1 将样品 (JYB1907hz18) 稀释至 1mg/ml, 离心取上清待测。设置色谱条件如表 6 所示。

表 6 色谱条件

色谱条件	参数
色谱柱	MABPac™HIC-10
检测波长	214nm
柱温	30°C
样品室温度	5 °C
流速	0.8ml/min

9.2.2 用流动相 A (50mM 磷酸盐缓冲液/1M 硫酸铵, pH 7.0) 和流动相 B(50mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.0)进行梯度洗脱, 记录主峰保留时间。

### 9.3 熔解温度 (T<sub>m</sub>) 值分析

将样品 (JYB1907hz18) 用样品缓冲液稀释至 1mg/mL, 然后按照 Protein Thermal Shift™ Starter Kit 说明书, 取样品 (JYB1907hz18) 溶液 13μL 加入至 PCR 管内, 加入 5μL Protein Thermal shift™ Buffer, 加入 2μL 10×染色液, 使反应体积为 20μL, 混匀后, 12000rpm 离心 5min 以去除气泡。将检测样品 (JYB1907hz18) 置于 PCR 仪内, 进行样品分析, 记录样品 (JYB1907hz18) 的 T<sub>m</sub> 值。

### 9.4 iCIEF 分析

取样品 (JYB1907hz18) 溶液加入到已经充分混匀的以下体系中: 1%的甲基纤维素 (MC) 70μl, 尿素 5M 80μl, 两性电解质 Pharmalyte pH 3-10 8μl, pI marker 5.5 和 9.5 各 2μl。补加适当体积超纯水至 200μl, 混匀。离心取上清进样分析。分析结束后, 将结果文件导入 ChromPerfect 软件进行图谱积分处理并计算各峰的等电点以及各峰百分比。

JYB1907hz18 的理化分析结果如表 7 所示。

表 7 JYB1907hz18 的理化分析结果

蛋白名称	理化性质						
	SEC%	T <sub>m</sub> °C Fab	HIC (min)	实测 pI	Acid Peaks (%)	Main Peak (%)	Basic Peaks (%)
JYB1907hz18	99.5	80.1	15.06	7.9	11.8	74.0	14.2

### 实施例 10 JYB1907hz18 抗体在小鼠 GvHD 模型中的研究

NOG 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 7-8 周龄, 雌性, 共 40 只。冻存 PBMC 购自妙通 (上海) 生物科技有限公司。从新鲜的 PBMC 中提取 Treg 细胞, Treg 细胞体外扩增培养方法同实施例 5。NOG 小鼠经过适应期后, 提前 3 天白消胺 25mg/kg 腹腔注射处理小鼠。随机选取 10 只小鼠, 复苏同批次冻存的 PBMC, 每只小鼠静脉注射 3×10<sup>6</sup> PBMC,

作为第一组。将复苏的 PBMC 与 Treg 细胞混合，其余 30 只小鼠每只尾静脉注射  $3 \times 10^6$  PBMC 和  $3 \times 10^6$  Treg 细胞，注射后当天，根据体重进行随机分组，分为第二、三、四组。分组后进行给药，第一组腹腔注射 Isotype Ctrl，第二组腹腔注射 Isotype Ctrl，第三组腹腔注射 MHG8（阳性对照），剂量为 20mg/kg，第四组腹腔注射 JYB1907hz18，剂量为 20mg/kg，给药频率一周两次，共给药 12 次。每周两次对小鼠进行称重，GvHD 评分，并统计生存率。GvHD 评分标准如表 8 所示。当小鼠体重减轻超过 25%，对小鼠进行安乐死处理。

表 8 GvHD 评分标准

体重减轻	-5%	-15%	-25%
	1 分	2 分	3 分
黄疸或贫血	1 分		
弓背	1 分		
活动度	活动度减少	不活动	
	1 分	2 分	
脱毛/炸毛	1 分		
死亡	8 分		

到第 42 天实验结束，第一组小鼠死亡 4 只，第二组小鼠死亡 3 只，第三组和第四组还有 5 只小鼠未死亡。第二组因为加入了 Treg 细胞，抑制了 PBMC 在体内的扩增，所以延缓了 GvHD 的发生时间，而给药 MHG8 和 JYB1907hz18 的第三组和第四组，药物抑制了 Treg 的作用，与第一组相比，GvHD 的评分和死亡率均较高，结果如图 8A-8B 所示：图 8A 表示待测抗体用于小鼠的 GvHD 的评分；图 8B 表示待测抗体用于小鼠的存活率。

#### 实施例 11 JYB1907hz18 抗体在人黑色素瘤 A375 小鼠肿瘤模型中的药效检测

NOG-DKO 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司，7-8 周龄，雌性，共 48 只。冻存 PBMC 购自妙通（上海）生物科技有限公司。A375 人黑色素瘤细胞购自 ATCC。复苏 PBMC，每只小鼠尾静脉注射  $6E6$  数量的 PBMC，建立人源化小鼠模型。一周后收集扩增培养后的 A375 细胞与基质胶混匀之后以  $2E6$  数量接种于 NOG-DKO 小鼠皮下。待肿瘤体积长到  $100\text{mm}^3$  进行随机分组，每组 8 只小鼠，当天给药。G1 组给药同型对照，剂量 20mg/kg；G2 组给药 MHG8（阳性对照），剂量 20mg/kg；G3 组给药 JYB1907hz18，剂量 20mg/kg；G4 组给药 Tencentriq，剂量 10mg/kg；G5 组给药 MHG8（剂量 20mg/kg）和 Tencentriq（剂量 10mg/kg）；G6 组给药 JYB1907hz18（剂量 20mg/kg）和 Tencentriq（剂量 10mg/kg）。所有给药方式均为腹腔注射，一周两次，共给药 8 次。

在分组后第 28 天，G1 组的平均肿瘤体积为  $1110 \pm 104 \text{ mm}^3$ ，G2 组的平均肿瘤体积为

1088±116 mm<sup>3</sup>，G3 组的平均肿瘤体积为 1000±233 mm<sup>3</sup>，G4 组的平均肿瘤体积为 834±155 mm<sup>3</sup>，G5 组的平均瘤重 611±146 mm<sup>3</sup>，G6 组平均肿瘤体积为 471±87 mm<sup>3</sup>，G5 组有 50%的抑瘤率，G6 组有 64%抑瘤率。G5 和 G6 组相对于 G1 组均有统计学差异（G5 vs G1, G6 vs G1），G5 vs G1, P<0.05; G6 vs G1, P<0.001. 其他组均无统计学差异。证明 MHG8 与 Tecentriq（抗 PD-L1 抗体），JYB1907hz18 与 Tecentriq（抗 PD-L1 抗体）联用均有抑制肿瘤生长的作用，结果如图 9 所示。

#### 实施例 12 JYB1907hz18 抗体在人乳腺癌 JIMT-1 小鼠肿瘤模型中的药效学研究

NOG-DKO 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司，7-8 周龄，雌性，共 24 只。冻存 PBMC 购自妙通（上海）生物科技有限公司。JIMT-1 人乳腺癌细胞购自 ATCC。复苏 PBMC，每只小鼠尾静脉注射 6E6 数量的 PBMC，建立人源化小鼠模型。一周后收集扩增培养后的 JIMT-1 细胞与基质胶混匀之后以 3E6 数量接种于 NOG-DKO 小鼠背部皮下。待肿瘤体积长到 100 mm<sup>3</sup> 左右进行随机分组，每组 8 只动物，当天给药。G1 组给药同型对照，剂量 20 mg/kg；G2 组给药 JYB1907hz18，剂量 20 mg/kg；G3 组给药 Tecentriq，剂量 10 mg/kg。所有给药方式均为腹腔注射，一周两次，共给药 8 次。

在分组后第 28 天，G1 组的平均肿瘤体积为 740±57 mm<sup>3</sup>，G2 组的平均肿瘤体积为 426±45 mm<sup>3</sup>，G3 组的平均肿瘤体积为 469±72 mm<sup>3</sup>，G2 组有 52%的抑瘤率，G3 组有 45%的抑瘤率。G2 和 G3 组相对于 G1 组（G2 vs G1, G3 vs G1）均有统计学差异，G2 vs G1, P<0.001；G3 vs G1, P<0.01。证明 JYB1907hz18 单用和 Tecentriq（抗 PD-L1 抗体）单用均有抑制肿瘤生长的作用，其中 JYB1907hz18 相比于 Tecentriq（抗 PD-L1 抗体）有更好的抑制肿瘤生长的作用，结果如图 10 所示。

#### 实施例 13 JYB1907hz18 抗体在人肺鳞癌 EBC-1 小鼠肿瘤模型中的药效学研究

NOG-DKO 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司，7-8 周龄，雌性，共 24 只。冻存 PBMC 购自妙通（上海）生物科技有限公司。EBC-1 人乳腺癌细胞购自 ATCC。复苏 PBMC，每只小鼠尾静脉注射 6E6 数量的 PBMC，建立人源化小鼠模型。一周后收集扩增培养后的 EBC-1 细胞与基质胶混匀之后以 3E6 数量接种于 NOG-DKO 小鼠背部皮下。待肿瘤体积长到 100 mm<sup>3</sup> 左右进行随机分组，每组 8 只动物，当天给药。G1 组给药同型对照，剂量 20 mg/kg；G2 组给药 JYB1907hz18，剂量 20 mg/kg；G3 组给药 Tecentriq，剂量 10 mg/kg。所有给药方式均为腹腔注射，一周两次，共给药 8 次。

在分组后第 24 天，G1 组的平均肿瘤体积为 1273±212 mm<sup>3</sup>，G2 组的平均肿瘤体积为

797±113 mm<sup>3</sup>, G3 组的平均肿瘤体积为 842±115 mm<sup>3</sup>, G2 组有 42%的抑瘤率, G3 组有 38%的抑瘤率。从肿瘤生长趋势图来看,在此癌种上 JYB1907hz 单用和 Tecentriq(抗 PD-L1 抗体)单用均有抑制肿瘤生长的趋势,结果如图 11 所示。

## 权利要求

1. 分离的抗原结合蛋白，其具有下述性质中的一种或多种：
  - a) 在 Octet 测定中，以约  $1.0E-12$  或更低的  $K_D$  值与人 GARP/人 TGF- $\beta$ 1 复合物结合；
  - b) 不与只表达人 GARP 的细胞或只表达人 TGF- $\beta$ 1 的细胞结合；
  - c) 抑制 Treg 细胞中的 SMAD2 磷酸化；
  - d) 抑制表达人 GARP/人 TGF- $\beta$ 1 的 HEK293T 细胞释放 TGF- $\beta$ 1；
  - e) 阻止 Treg 细胞对人外周血单个核细胞 (PBMC) 释放 IL-2 和 IFN- $\gamma$  的抑制；
  - f) 在人 PBMC 移植小鼠的 GvHD 模型中，阻断 Treg 细胞对所述人 PBMC 引起的 GvHD 的抑制作用。
2. 根据权利要求 1 所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 HCDR3，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 HCDR2，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 HCDR1，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含重链可变区 VH，所述 VH 包含所述 HCDR1、所述 HCDR2 和所述 HCDR3，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；以及所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 H-FR1，所述 H-FR1 的 C 末端与所述 HCDR1 的 N 末端直接或间接地相连，且所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列。
7. 根据权利要求 6 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 22 中任一项所示的氨基酸序列。
8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 H-FR2，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 与所述 HCDR2 之间，且所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列。
9. 根据权利要求 8 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 23 中任一项所示的氨基酸序列。
10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 H-FR3，所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 与所述 HCDR3 之间，且所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列。

11. 根据权利要求 10 所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 24 中任一项所示的氨基酸序列。
12. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含 H-FR4,所述 H-FR4 的 N 末端与所述 HCDR3 的 C 末端直接或间接地相连,且所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列。
13. 根据权利要求 12 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 25 中任一项所示的氨基酸序列。
14. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含 H-FR1, H-FR2, H-FR3 和 H-FR4,所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列;所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列;所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列;以及所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列。
15. 根据权利要求 1-14 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含 H-FR1, H-FR2, H-FR3 和 H-FR4,所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 22 中任一项所示的氨基酸序列;所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 23 中任一项所示的氨基酸序列;所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 24 中任一项所示的氨基酸序列;以及所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 25 中任一项所示的氨基酸序列。
16. 根据权利要求 15 所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 H-FR1、H-FR2、H-FR3 和 H-FR4 包含选自下述任意一组的氨基酸序列:
  - a) H-FR1: SEQ ID NO: 5, H-FR2: SEQ ID NO: 6, H-FR3: SEQ ID NO: 7 和 H-FR4: SEQ ID NO: 8;
  - b) H-FR1: SEQ ID NO: 22, H-FR2: SEQ ID NO: 23, H-FR3: SEQ ID NO: 24 和 H-FR4: SEQ ID NO: 25。
17. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含重链可变区 VH,所述 VH 包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列。
18. 根据权利要求 17 所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 VH 包含 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 21 中任一项所示的氨基酸序列。
19. 根据权利要求 1-18 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含 LCDR3,所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。
20. 根据权利要求 1-19 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含 LCDR2,所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列。

21. 根据权利要求 1-20 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其包含 LCDR2, 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 28 中任一项所示的氨基酸序列。
22. 根据权利要求 1-21 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其包含 LCDR1, 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列。
23. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其包含 LCDR1, 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 27 中任一项所示的氨基酸序列。
24. 根据权利要求 1-23 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其包含轻链可变区 VL, 所述 VL 包含所述 LCDR1、所述 LCDR2 和所述 LCDR3, 所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列; 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列; 以及所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列。
25. 根据权利要求 1-24 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其包含轻链可变区 VL, 所述 VL 包含所述 LCDR1、所述 LCDR2 和所述 LCDR3, 所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列; 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 28 中任一项所示的氨基酸序列; 以及所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 27 中任一项所示的氨基酸序列。
26. 根据权利要求 25 所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 包含选自下述任意一组的氨基酸序列:
  - a) LCDR1: SEQ ID NO: 10, LCDR2: SEQ ID NO: 11 和 LCDR3: SEQ ID NO: 12;
  - b) LCDR1: SEQ ID NO: 27, LCDR2: SEQ ID NO: 28 和 LCDR3: SEQ ID NO: 12。
27. 根据权利要求 1-26 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其包含 L-FR1, 所述 L-FR1 的 C 末端与所述 LCDR1 的 N 末端直接或间接地相连, 且所述 L-FR1 包含 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列。
28. 根据权利要求 27 所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 L-FR1 包含 SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 29 中任一项所示的氨基酸序列。
29. 根据权利要求 1-28 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其包含 L-FR2, 所述 L-FR2 位于所述 LCDR1 与所述 LCDR2 之间, 且所述 L-FR2 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。
30. 根据权利要求 1-29 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其包含 L-FR3, 所述 L-FR3 位于所述 LCDR2 与所述 LCDR3 之间, 且所述 L-FR3 包含 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列。

31. 根据权利要求 30 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 L-FR3 包含 SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 30 中任一项所示的氨基酸序列。
32. 根据权利要求 1-31 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 L-FR4，所述 L-FR4 的 N 末端与所述 LCDR3 的 C 末端直接或间接地相连，且所述 L-FR4 包含 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。
33. 根据权利要求 32 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 L-FR4 包含 SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 31 中任一项所示的氨基酸序列。
34. 根据权利要求 1-33 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 L-FR1，L-FR2，L-FR3 和 L-FR4，所述 L-FR1 包含 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列；所述 L-FR2 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列；所述 L-FR3 包含 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列；以及所述 L-FR4 包含 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。
35. 根据权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 L-FR1，L-FR2，L-FR3 和 L-FR4，所述 L-FR1 包含 SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 29 中任一项所示的氨基酸序列；所述 L-FR2 包含 SEQ ID NO: 14 中任一项所示的氨基酸序列；所述 L-FR3 包含 SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 30 中任一项所示的氨基酸序列；以及所述 L-FR4 包含 SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 31 中任一项所示的氨基酸序列。
36. 根据权利要求 35 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 L-FR1、L-FR2、L-FR3 和 L-FR4 包含选自下述任意一组的氨基酸序列：
  - a) L-FR1: SEQ ID NO: 13, L-FR2: SEQ ID NO: 14, L-FR3: SEQ ID NO: 15 和 L-FR4: SEQ ID NO: 16;
  - b) L-FR1: SEQ ID NO: 29, L-FR2: SEQ ID NO: 14, L-FR3: SEQ ID NO: 30 和 L-FR4: SEQ ID NO: 31。
37. 根据权利要求 1-36 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含轻链可变区 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 51 所示的氨基酸序列。
38. 根据权利要求 1-37 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含轻链可变区 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 26 中任一项所示的氨基酸序列。
39. 根据权利要求 1-38 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含重链恒定区，且所述重链恒定区包括源自 IgG 的恒定区或源自 IgY 的恒定区。
40. 根据权利要求 39 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述重链恒定区包括源自人 IgG4 的恒定区。

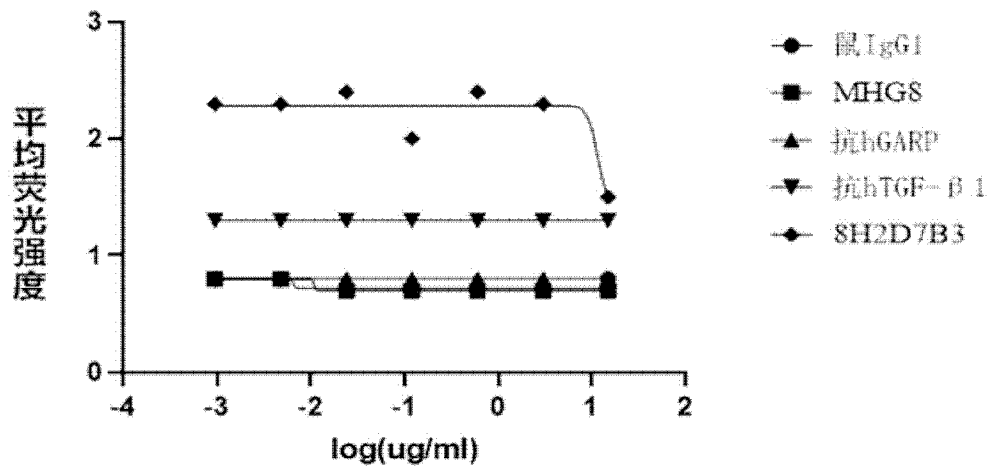
41. 根据权利要求 39-40 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。
42. 根据权利要求 1-41 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含轻链恒定区，且所述抗体轻链恒定区包括源自 Ig $\kappa$  的恒定区或源自 Ig $\lambda$  的恒定区。
43. 根据权利要求 42 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述轻链恒定区包括源自人 Ig $\kappa$  的恒定区。
44. 根据权利要求 42-43 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 18 中任一项所示的氨基酸序列。
45. 根据权利要求 1-44 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含重链 HC，所述 HC 包含 SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 32 中任一项所示的氨基酸序列。
46. 根据权利要求 1-45 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含轻链 LC，所述 LC 包含 SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 33 中任一项所示的氨基酸序列。
47. 根据权利要求 1-46 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 HC 和 LC，所述 HC 包含 SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 32 中任一项所示的氨基酸序列，且所述 LC 包含 SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 33 中任一项所示的氨基酸序列。
48. 根据权利要求 47 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 HC 和 LC 包含选自下述任意一组的氨基酸序列：
  - a) HC: SEQ ID NO: 19 和 LC: SEQ ID NO: 20;
  - b) HC: SEQ ID NO: 32 和 LC: SEQ ID NO: 33。
49. 根据权利要求 1-48 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包括抗体或其抗原结合片段。
50. 根据权利要求 49 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述抗原结合片段包括 Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, Fv 片段, F(ab')<sub>2</sub>, scFv, di-scFv, VHH 和/或 dAb。
51. 根据权利要求 49-50 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述抗体选自下组：单克隆抗体、单链抗体、鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。
52. 多肽，其包含权利要求 1-51 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白。
53. 免疫缀合物，其包含权利要求 1-51 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求 52 所述的多肽。
54. 根据权利要求 53 所述的免疫缀合物，其还包括药学上可接受的治疗剂。
55. 根据权利要求 54 所述的免疫缀合物，其中所述治疗剂选自下组：细胞毒性剂和细胞抑制剂。

56. 分离的核酸分子，其编码权利要求 1-51 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，或者权利要求 52 所述的多肽。
57. 载体，其包含权利要求 56 所述的分离的核酸分子。
58. 细胞，其包含权利要求 1-51 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，权利要求 52 所述的多肽，权利要求 53-55 中任一项所述的免疫缀合物，权利要求 56 所述的分离的核酸分子和/或权利要求 57 所述的载体。
59. 制备权利要求 1-51 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求 52 所述的多肽的方法，所述方法包括在使得权利要求 1-51 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求 52 所述的多肽表达的条件下，培养根据权利要求 58 所述的细胞。
60. 药物组合物，其包含权利要求 1-51 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，权利要求 52 所述的多肽，权利要求 53-55 中所述的免疫缀合物，权利要求 56 所述的分离的核酸分子，权利要求 57 所述的载体，权利要求 58 所述的细胞，和/或药学上可接受的佐剂和/或赋形剂。
61. 药物组合，其包含权利要求 1-51 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白和免疫检查点抑制剂。
62. 根据权利要求 61 所述的药物组合，其中所述免疫检查点抑制剂包括抑制 PD-1/PD-L1 相互作用的物质。
63. 根据权利要求 61-62 中任一项所述的药物组合，其中所述免疫检查点抑制剂选自下组：PD-1/PD-L1 阻断剂、PD-1 拮抗剂、PD-L1 拮抗剂、PD-1 抑制剂和 PD-L1 抑制剂。
64. 根据权利要求 61-63 中任一项所述的药物组合，其中所述免疫检查点抑制剂包括抗 PD-L1 抗体。
65. 根据权利要求 64 所述的药物组合，其中所述抗 PD-L1 抗体包含 HCDR3，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列。
66. 根据权利要求 64-65 中任一项所述的药物组合，其中所述抗 PD-L1 抗体包含 HCDR2，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。
67. 根据权利要求 64-66 中任一项所述的药物组合，其中所述抗 PD-L1 抗体包含 HCDR1，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。
68. 根据权利要求 64-67 中任一项所述的药物组合，其中所述抗 PD-L1 抗体包含重链可变区 VH，所述 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列；以及所述 HCDR1

- 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。
69. 根据权利要求 64-68 中任一项所述的药物组合，其中所述抗 PD-L1 抗体包含重链可变区 VH，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。
70. 根据权利要求 64-69 中任一项所述的药物组合，其中所述抗 PD-L1 抗体包含 LCDR3，所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列。
71. 根据权利要求 64-70 中任一项所述的药物组合，其中所述抗 PD-L1 抗体包含 LCDR2，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。
72. 根据权利要求 64-71 中任一项所述的药物组合，其中所述抗 PD-L1 抗体包含 LCDR1，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。
73. 根据权利要求 64-72 中任一项所述的药物组合，其中所述抗 PD-L1 抗体包含轻链可变区 VL，所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列；以及所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。
74. 根据权利要求 64-73 中任一项所述的药物组合，其中所述抗 PD-L1 抗体包含轻链可变区 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列。
75. 根据权利要求 64-74 中任一项所述的药物组合，其中所述抗 PD-L1 抗体包括阿替利珠单抗。
76. 根据权利要求 61-75 中任一项所述的药物组合，其可以是药物组合物。
77. 一种试剂盒，其包含权利要求 61-76 中任一项所述的药物组合。
78. 权利要求 1-51 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、权利要求 52 所述的多肽、权利要求 53-55 中任一项所述的免疫缀合物、权利要求 56 所述的分离的核酸分子、权利要求 57 所述的载体，权利要求 58 所述的细胞和/或权利要求 60 中任一项所述的药物组合物，其用于预防、缓解和/或治疗肿瘤。
79. 根据权利要求 78 所述的用途，其中所述肿瘤包括实体瘤。
80. 根据权利要求 78-79 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤包括与 GARP 的蛋白表达相关的肿瘤。
81. 根据权利要求 78-80 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤包括黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。
82. 权利要求 61-76 中任一项所述的药物组合和/或权利要求 77 所述的试剂盒，其用于预防、缓解和/或治疗肿瘤。

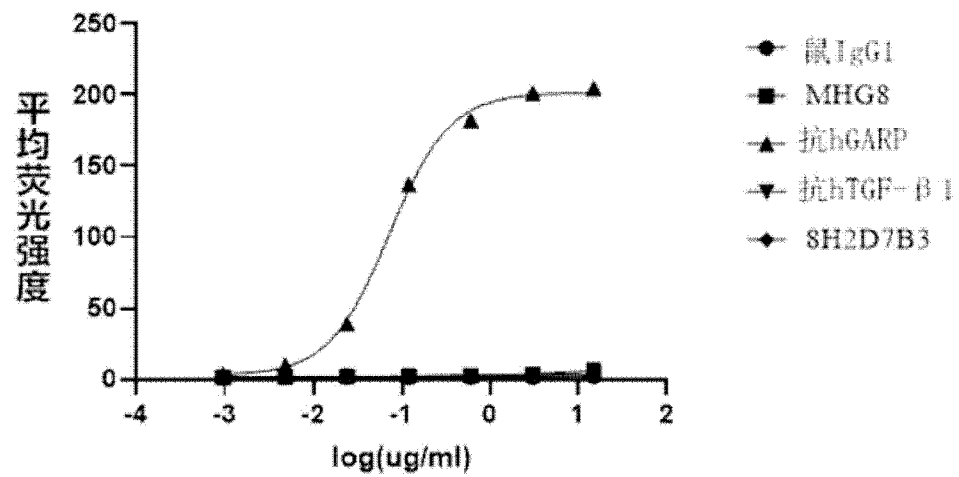
83. 根据权利要求 82 所述的用途，其中所述肿瘤包括实体瘤。
84. 根据权利要求 82-83 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤包括与 GARP 的表达相关的肿瘤。
85. 根据权利要求 82-84 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤包括黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。
86. 权利要求 1-51 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、权利要求 52 所述的多肽、权利要求 53-55 中任一项所述的免疫缀合物、权利要求 56 所述的分离的核酸分子、权利要求 57 所述的载体，权利要求 58 所述的细胞和/或权利要求 60 所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防、缓解和/或治疗肿瘤。
87. 根据权利要求 86 所述的用途，其中所述肿瘤包括实体瘤。
88. 根据权利要求 86-87 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤包括与 GARP 的表达相关的肿瘤。
89. 根据权利要求 86-88 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤包括黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。
90. 权利要求 61-76 中任一项所述的药物组合和/或权利要求 77 所述的试剂盒在制备药物中的用途，所述药物用于预防、缓解和/或治疗肿瘤。
91. 根据权利要求 90 所述的用途，其中所述肿瘤包括实体瘤。
92. 根据权利要求 90-91 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤包括与 GARP 的表达相关的肿瘤。
93. 根据权利要求 90-92 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤包括黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。
94. 一种预防和/或治疗疾病或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用有效量的权利要求 1-51 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、权利要求 52 所述的多肽、权利要求 53-55 所述的免疫缀合物、权利要求 56 所述的分离的核酸分子、权利要求 57 所述的载体，权利要求 58 所述的细胞、权利要求 60 所述的药物组合物，其中所述疾病或病症包括肿瘤。
95. 根据权利要求 94 所述的方法，其中所述肿瘤包括实体瘤。
96. 根据权利要求 94-95 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤包括与 GARP 的表达相关的肿瘤。
97. 根据权利要求 94-96 中任一项所述的方法，其中所述肿瘤包括黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。

98. 一种预防和/或治疗疾病或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用有效量的权利要求 61-76 中任一项所述的药物组合，其中所述疾病或病症包括肿瘤。
99. 根据权利要求 98 所述的方法，其中所述肿瘤包括实体瘤。
100. 根据权利要求 98-99 中任一项所述的方法，其中所述肿瘤包括与 GARP 的表达相关的肿瘤。
101. 根据权利要求 98-100 中任一项所述的方法，其中所述肿瘤包括黑色素瘤、乳腺肿瘤和/或肺肿瘤。



	最高值	EC50
鼠IgG1	N.A.	N.A.
MHG8	N.A.	N.A.
抗hGARP	N.A.	N.A.
抗hTGF-β1	N.A.	N.A.
8H2D7B3	N.A.	N.A.

图 1A



	最高值	EC50
鼠IgG1	N.A.	N.A.
MHG8	N.A.	N.A.
抗hGARP	201.513	0.072
抗hTGF-β1	N.A.	N.A.
8H2D7B3	N.A.	N.A.

图 1B

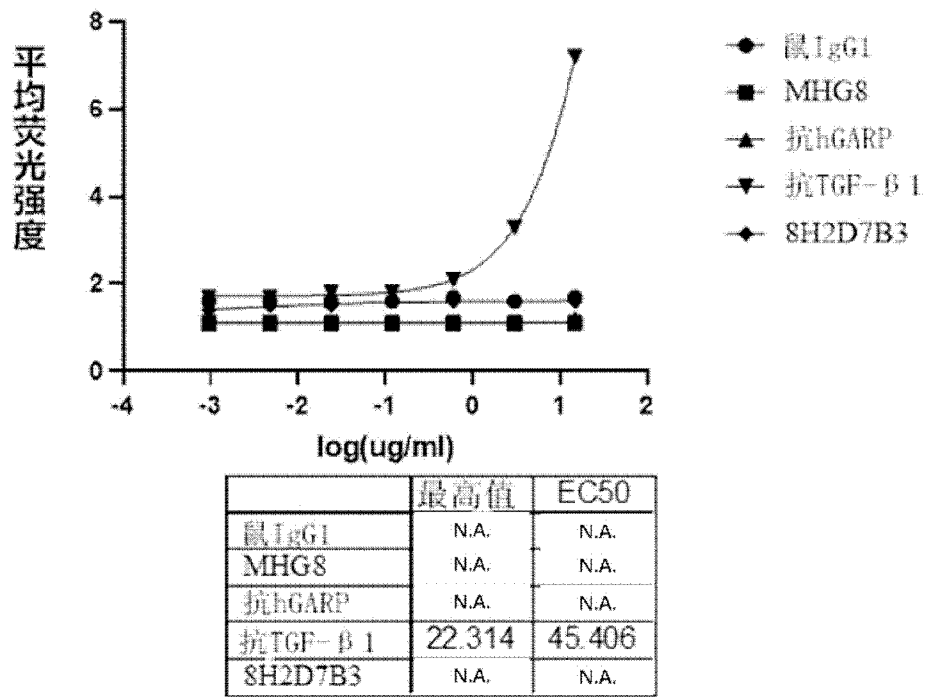


图 1C

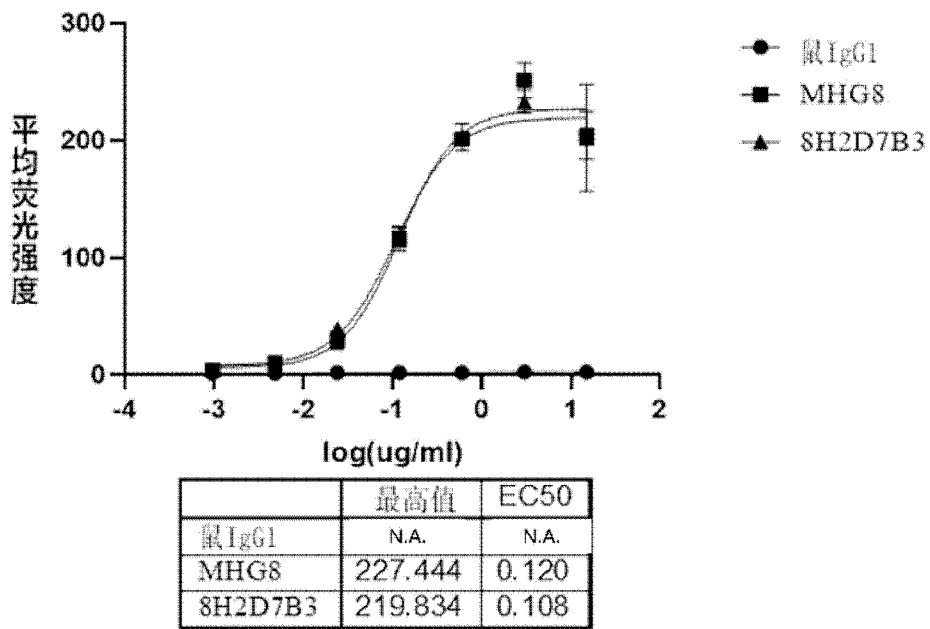


图 1D

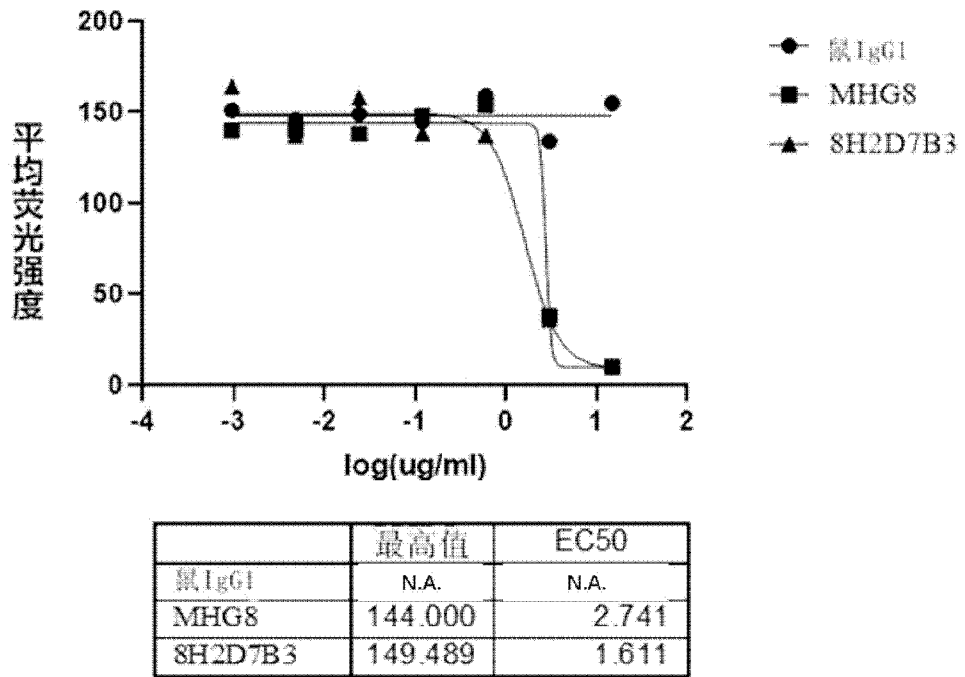


图 2

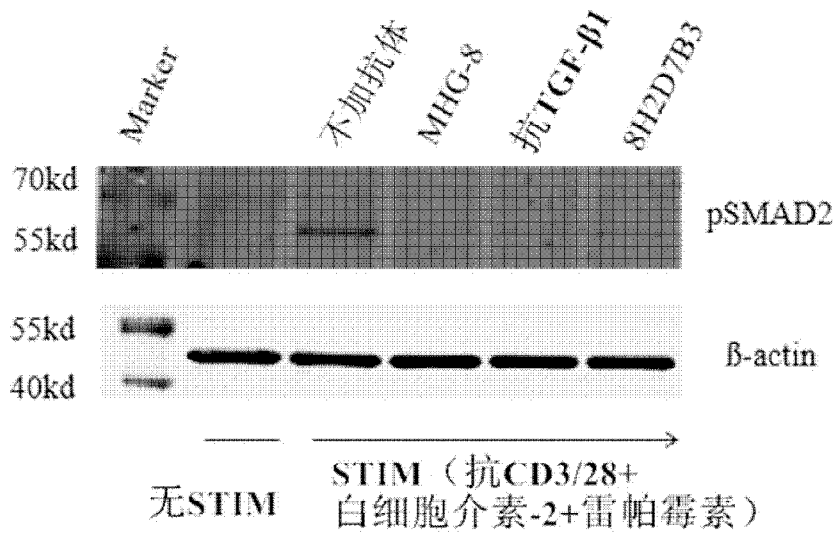


图 3A

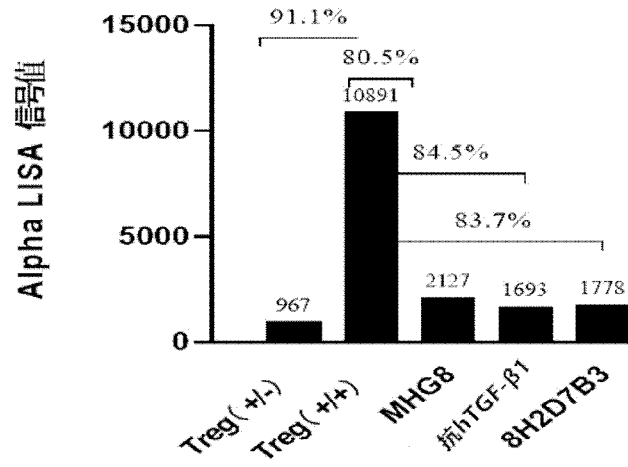


图 3B

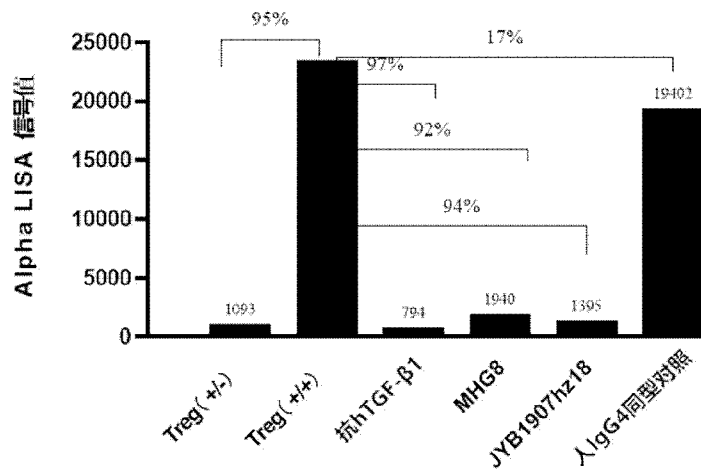


图 4

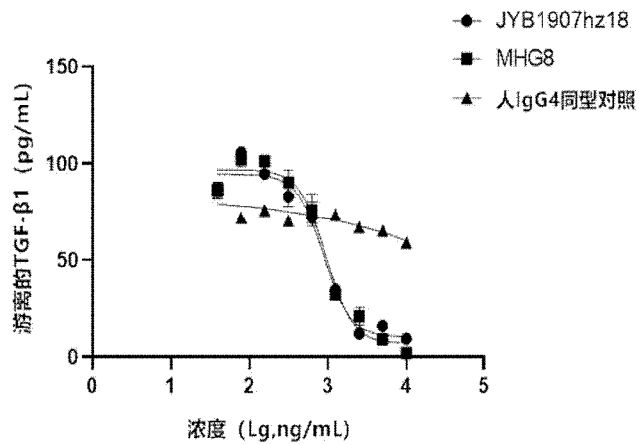


图 5

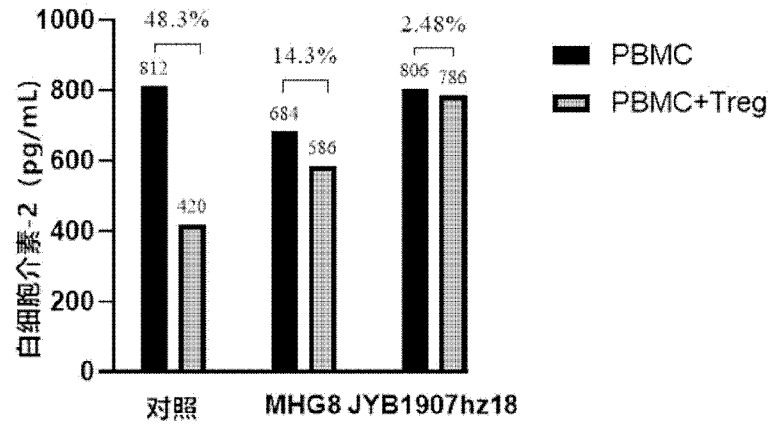


图 6A

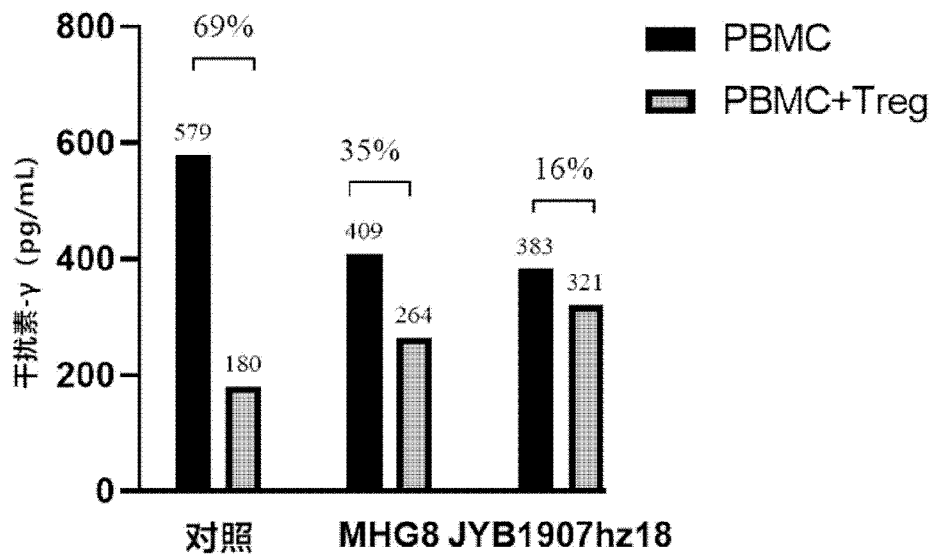


图 6B

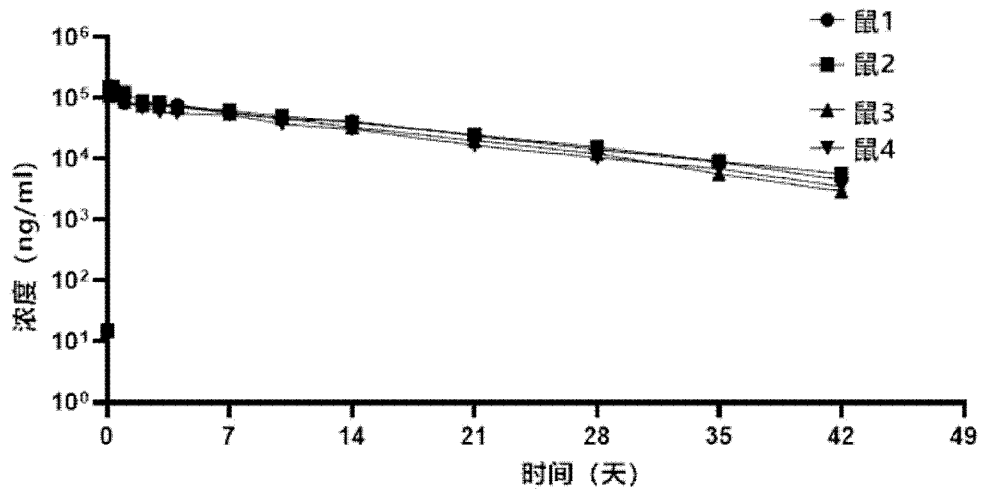


图 7A

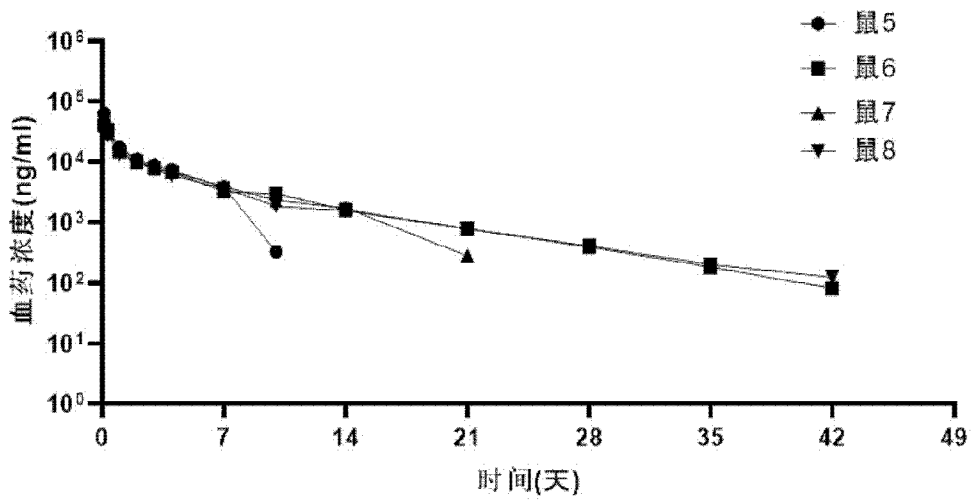


图 7B

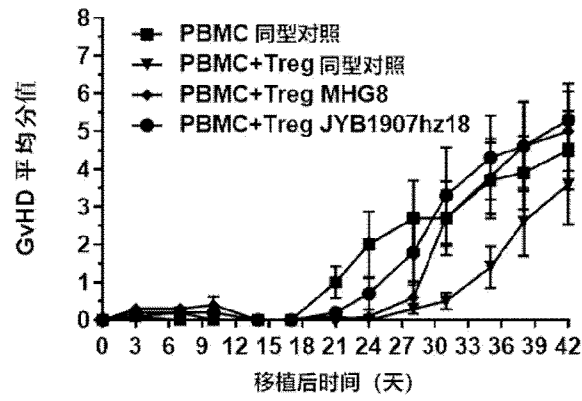


图 8A

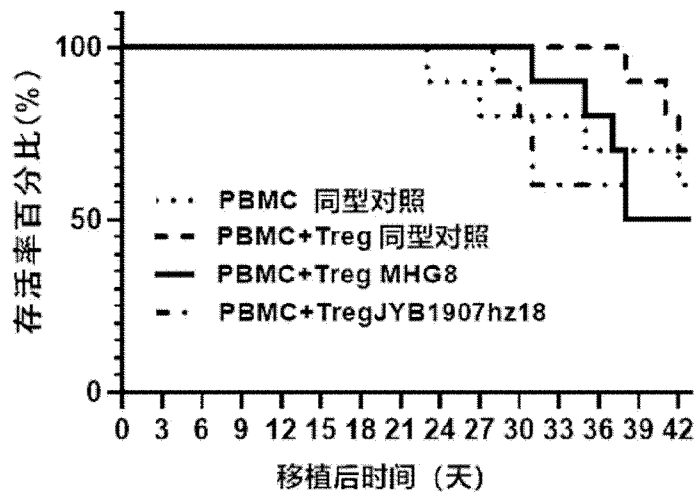


图 8B

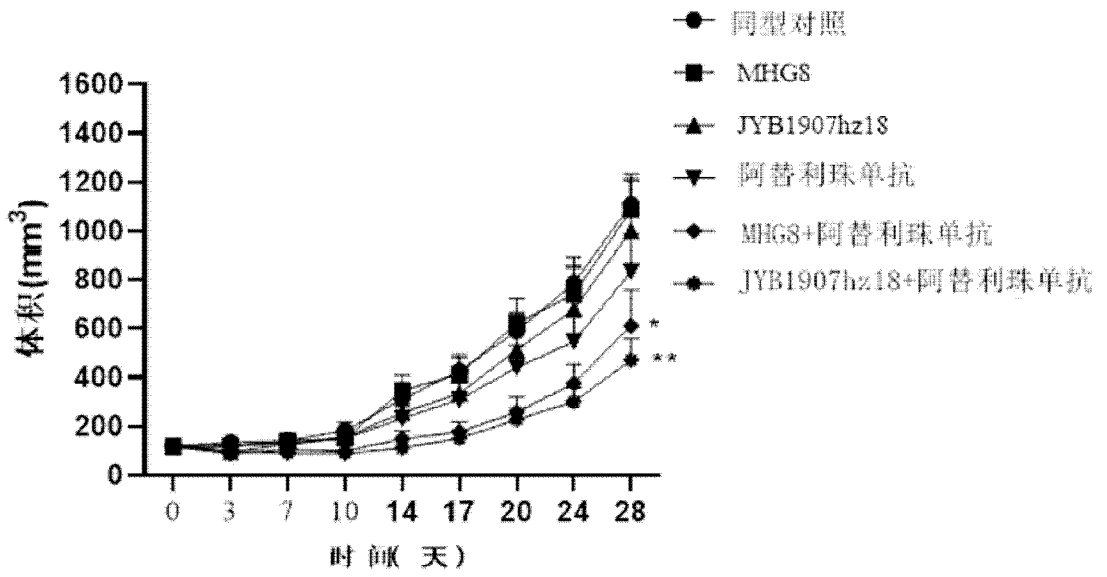


图 9

肿瘤体积

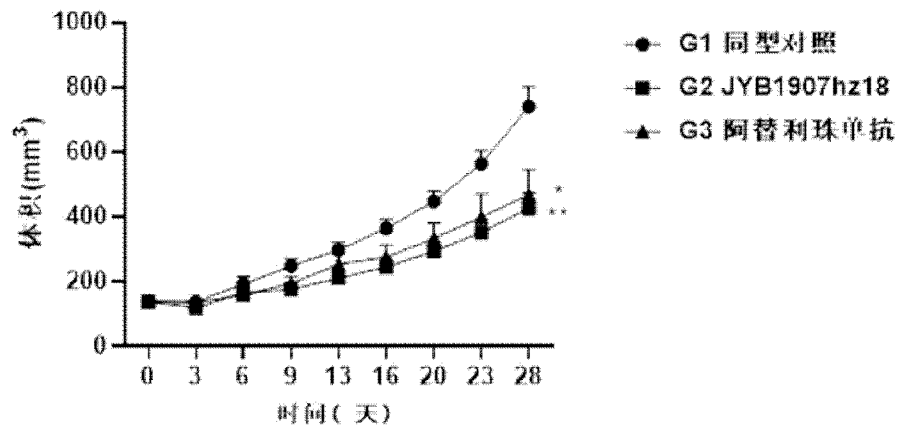


图 10

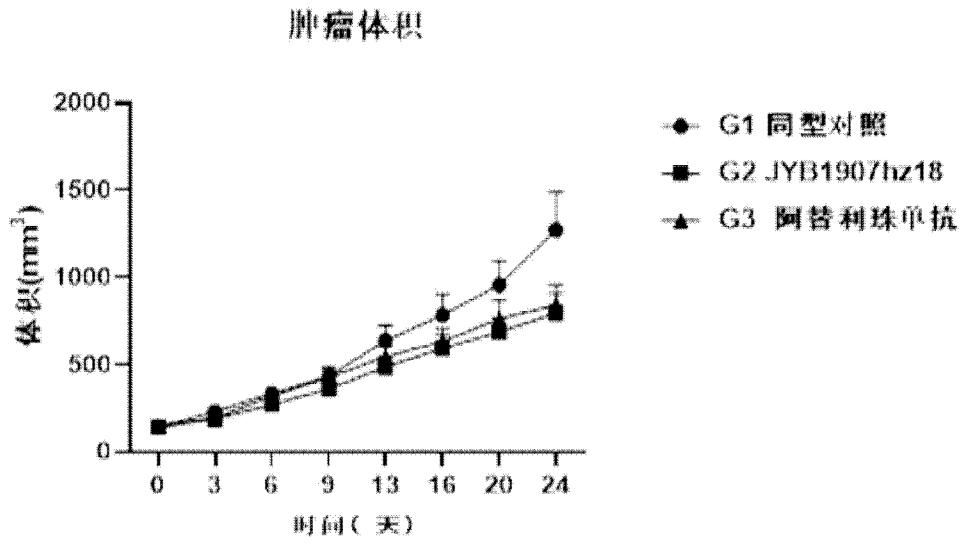


图 11

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/072265

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; 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) CNTXT, VEN, WPABSC, USTXT, NCBI, STN, CNKI, 万方, WANFANG, pubmed, BING, 百度学术, BAIDU SCHOLAR: 抗体, CDR, antibody, GARP, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ , complex, monoclonal antibody, tumor, cancer, PD-L1序列1-4, 11-12, 21, 22, 27, 28		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 110945027 A (ARGENX BVBA et al.) 31 March 2020 (2020-03-31) abstract, claims 1-38, and description, paragraphs 83, 96, 97, and 180-182	1, 39-101
X	CN 109071646 A (SCHOLAR ROCK, INC.) 21 December 2018 (2018-12-21) abstract and claims 1-74	1, 39-101
X	CN 105658666 A (UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN et al.) 08 June 2016 (2016-06-08) abstract and claims 1-19	1, 39-101
X	WO 2016125017 A1 (UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN et al.) 11 August 2016 (2016-08-11) abstract and claims 1-24	1, 39-101
X	CUENDE, J. et al. "Monoclonal Antibodies against GARP/TGF-b1 Complexes Inhibit the Immunosuppressive Activity of Human Regulatory T Cells In Vivo" <i>HUMAN IMMUNOLOGY</i> , Vol. 7, No. 284, 22 April 2015 (2015-04-22), p. 284ra56	1, 39-101
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>29 March 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>14 April 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer  Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	岭南现代临床外科编辑部 (Non-official translation: Editorial Department of Lingnan Modern Clinics in Surgery). "肿瘤逃逸相关蛋白TGF- $\beta$ 1受GARP调控的结构基础 (Non-official translation: Structural Basis for Regulation of Tumor Escaping-Related Protein TGF-B1 by GARP)" 岭南现代临床外科 ( <i>Lingnan Modern Clinics in Surgery</i> ), 21 October 2018 (2018-10-21), p. 1	1-101

**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:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**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.: **94-101**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  - [1] Claims 94-101 relate to a method for preventing and/or treating diseases or symptoms, which belongs to a method for treating diseases as defined in PCT Rule 39.1(iv). The present report is formed on the basis of a corresponding pharmaceutical use of the products such as antibodies.
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).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2022/072265**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110945027	A	31 March 2020	CL	2019003211	A1	24 April 2020
				GB	201707561	D0	28 June 2017
				US	2020095311	A1	26 March 2020
				CA	3061841	A1	15 November 2018
				BR	112019023735	A2	09 June 2020
				JP	2020519308	A	02 July 2020
				KR	20200027469	A	12 March 2020
				CR	20190561	A	04 April 2020
				US	2021324061	A1	21 October 2021
				EC	SP19087742	A	29 May 2020
				DO	P2019000285	A	15 July 2020
				EP	3606961	A1	12 February 2020
				AU	2021240255	A1	28 October 2021
				AU	2018265241	A1	21 November 2019
				CO	2019013669	A2	01 April 2020
				PE	20200618	A1	11 March 2020
				WO	2018206790	A1	15 November 2018
				US	2019375832	A1	12 December 2019
				RU	2019140602	A	11 June 2021
				US	2018327487	A1	15 November 2018
PH	12019502526	A1	20 July 2020				
SG	10201914130V	A	30 March 2020				
CN	109071646	A	21 December 2018	JP	2022028680	A	16 February 2022
				AU	2017230103	A1	06 September 2018
				JP	2022031403	A	18 February 2022
				WO	2017156500	A1	14 September 2017
				JP	2019509737	A	11 April 2019
				US	2019071493	A1	07 March 2019
				CA	3055555	A1	14 September 2017
				KR	20180122397	A	12 November 2018
				EP	3365368	A1	29 August 2018
				BR	112018068340	A2	15 January 2019
				SG	11201807176X	A	27 September 2018
				EA	201891909	A1	28 February 2019
				IL	261442	D0	31 October 2018
				MX	2018010948	A	20 June 2019
CN	105658666	A	08 June 2016	MX	2016001356	A	26 October 2016
				IL	276106	D0	31 August 2020
				SG	11201600741S	A	26 February 2016
				KR	20160056880	A	20 May 2016
				SG	10201800889S	A	28 March 2018
				ES	2860952	T3	05 October 2021
				EP	3786187	A1	03 March 2021
				US	2016272717	A1	22 September 2016
				CA	2919765	A1	05 February 2015
				EP	3027650	A1	08 June 2016
				US	2020181276	A1	11 June 2020
				US	2019016811	A1	17 January 2019
				US	2020087404	A1	19 March 2020
				AU	2021277761	A1	23 December 2021

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2022/072265**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		MX 2019011952 A	05 December 2019
		AU 2019268046 A1	05 December 2019
		JP 2020073504 A	14 May 2020
		AU 2014298373 A1	18 February 2016
		IL 243899 D0	21 April 2016
		EA 201690314 A1	29 July 2016
		CN 113583128 A	02 November 2021
		US 2016251438 A1	01 September 2016
		JP 2016529892 A	29 September 2016
		WO 2015015003 A1	05 February 2015
WO 2016125017 A1	11 August 2016	EP 3253796 A1	13 December 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/072265

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C07K 16/28 (2006.01) i; A61K 39/00 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i</p> <p>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</p>																							
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; A61K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNXTX, VEN, WPABSC, USTXT, NCBI, STN, CNKI, 万方, pubmed, BING, 百度学术: 抗体, CDR, antibody, GARP, TGF-β 1, TGF-β, complex, monoclonal antibody, tumor, cancer, PD-L1 序列 1-4, 11-12, 21, 22, 27, 28</p>																							
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 110945027 A (阿根思公司等) 2020年3月31日 (2020 - 03 - 31) 摘要、权利要求1-38及说明书第83、96、97、180-182段</td> <td>1, 39-101</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 109071646 A (供石公司) 2018年12月21日 (2018 - 12 - 21) 摘要及权利要求1-74</td> <td>1, 39-101</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 105658666 A (鲁汶大学等) 2016年6月8日 (2016 - 06 - 08) 摘要及权利要求1-19</td> <td>1, 39-101</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2016125017 A1 (UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN等) 2016年8月11日 (2016 - 08 - 11) 摘要及权利要求1-24</td> <td>1, 39-101</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CUENDE, J. 等. "Monoclonal antibodies against GARP/TGF-β1 complexes inhibit the immunosuppressive activity of human regulatory T cells in vivo" HUMAN IMMUNOLOGY, 第7卷, 第284期, 2015年4月22日 (2015 - 04 - 22), 第284ra56页</td> <td>1, 39-101</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>岭南现代临床外科编辑部. "肿瘤逃逸相关蛋白 TGF-β 1 受 GARP 调控的结构基础" 岭南现代临床外科, 2018年10月21日 (2018 - 10 - 21), 第1页</td> <td>1-101</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 110945027 A (阿根思公司等) 2020年3月31日 (2020 - 03 - 31) 摘要、权利要求1-38及说明书第83、96、97、180-182段	1, 39-101	X	CN 109071646 A (供石公司) 2018年12月21日 (2018 - 12 - 21) 摘要及权利要求1-74	1, 39-101	X	CN 105658666 A (鲁汶大学等) 2016年6月8日 (2016 - 06 - 08) 摘要及权利要求1-19	1, 39-101	X	WO 2016125017 A1 (UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN等) 2016年8月11日 (2016 - 08 - 11) 摘要及权利要求1-24	1, 39-101	X	CUENDE, J. 等. "Monoclonal antibodies against GARP/TGF-β1 complexes inhibit the immunosuppressive activity of human regulatory T cells in vivo" HUMAN IMMUNOLOGY, 第7卷, 第284期, 2015年4月22日 (2015 - 04 - 22), 第284ra56页	1, 39-101	A	岭南现代临床外科编辑部. "肿瘤逃逸相关蛋白 TGF-β 1 受 GARP 调控的结构基础" 岭南现代临床外科, 2018年10月21日 (2018 - 10 - 21), 第1页	1-101
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
X	CN 110945027 A (阿根思公司等) 2020年3月31日 (2020 - 03 - 31) 摘要、权利要求1-38及说明书第83、96、97、180-182段	1, 39-101																					
X	CN 109071646 A (供石公司) 2018年12月21日 (2018 - 12 - 21) 摘要及权利要求1-74	1, 39-101																					
X	CN 105658666 A (鲁汶大学等) 2016年6月8日 (2016 - 06 - 08) 摘要及权利要求1-19	1, 39-101																					
X	WO 2016125017 A1 (UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN等) 2016年8月11日 (2016 - 08 - 11) 摘要及权利要求1-24	1, 39-101																					
X	CUENDE, J. 等. "Monoclonal antibodies against GARP/TGF-β1 complexes inhibit the immunosuppressive activity of human regulatory T cells in vivo" HUMAN IMMUNOLOGY, 第7卷, 第284期, 2015年4月22日 (2015 - 04 - 22), 第284ra56页	1, 39-101																					
A	岭南现代临床外科编辑部. "肿瘤逃逸相关蛋白 TGF-β 1 受 GARP 调控的结构基础" 岭南现代临床外科, 2018年10月21日 (2018 - 10 - 21), 第1页	1-101																					
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年3月29日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年4月14日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>管冰</p> <p>电话号码 (86-10)53961945</p>																					

## 第1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列表进行的:
- a.  作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
  - 纸件或图形文件形式
- b.  根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c.  仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
  - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2.  另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
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：

1.  权利要求： 94-101  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
[1] 权利要求94-101涉及预防和/或治疗疾病或病症的方法，属于PCT细则39.1(iv)规定的疾病的治疗方法，本报告基于所述抗体等产品的相应制药用途作出。
2.  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：
3.  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。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/072265

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	110945027	A	2020年3月31日	CL	2019003211	A1	2020年4月24日
				GB	201707561	D0	2017年6月28日
				US	2020095311	A1	2020年3月26日
				CA	3061841	A1	2018年11月15日
				BR	112019023735	A2	2020年6月9日
				JP	2020519308	A	2020年7月2日
				KR	20200027469	A	2020年3月12日
				CR	20190561	A	2020年4月4日
				US	2021324061	A1	2021年10月21日
				EC	SP19087742	A	2020年5月29日
				DO	P2019000285	A	2020年7月15日
				EP	3606961	A1	2020年2月12日
				AU	2021240255	A1	2021年10月28日
				AU	2018265241	A1	2019年11月21日
				CO	2019013669	A2	2020年4月1日
				PE	20200618	A1	2020年3月11日
				WO	2018206790	A1	2018年11月15日
				US	2019375832	A1	2019年12月12日
				RU	2019140602	A	2021年6月11日
				US	2018327487	A1	2018年11月15日
				PH	12019502526	A1	2020年7月20日
				SG	10201914130V	A	2020年3月30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
				WO	2017156500	A1	2017年9月14日
				JP	2019509737	A	2019年4月11日
				US	2019071493	A1	2019年3月7日
				CA	3055555	A1	2017年9月14日
				KR	20180122397	A	2018年11月12日
				EP	3365368	A1	2018年8月29日
				BR	112018068340	A2	2019年1月15日
				SG	11201807176X	A	2018年9月27日
				EA	201891909	A1	2019年2月28日
				IL	261442	D0	2018年10月31日
				MX	2018010948	A	2019年6月20日
-----							
CN	105658666	A	2016年6月8日	MX	2016001356	A	2016年10月26日
				IL	276106	D0	2020年8月31日
				SG	11201600741S	A	2016年2月26日
				KR	20160056880	A	2016年5月20日
				SG	10201800889S	A	2018年3月28日
				ES	2860952	T3	2021年10月5日
				EP	3786187	A1	2021年3月3日
				US	2016272717	A1	2016年9月22日
				CA	2919765	A1	2015年2月5日
				EP	3027650	A1	2016年6月8日
				US	2020181276	A1	2020年6月11日
				US	2019016811	A1	2019年1月17日
				US	2020087404	A1	2020年3月19日
				AU	2021277761	A1	2021年12月23日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/072265

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)
		MX 2019011952 A	2019年12月5日
		AU 2019268046 A1	2019年12月5日
		JP 2020073504 A	2020年5月14日
		AU 2014298373 A1	2016年2月18日
		IL 243899 D0	2016年4月21日
		EA 201690314 A1	2016年7月29日
		CN 113583128 A	2021年11月2日
		US 2016251438 A1	2016年9月1日
		JP 2016529892 A	2016年9月29日
		WO 2015015003 A1	2015年2月5日
WO 2016125017 A1	2016年8月11日	EP 3253796 A1	2017年12月13日