



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202241955 A

(43) 公開日：中華民國 111 (2022) 年 11 月 01 日

(21) 申請案號：111101854 (22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 01 月 17 日

(51) Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01) A61K39/00 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2021/01/18 中國大陸 202110065290.8

(71) 申請人：大陸商上海濟煜醫藥科技有限公司 (中國大陸) SHANGHAI JEMINCARE
PHARMACEUTICAL CO., LTD (CN)
中國大陸
大陸商江西濟民可信集團有限公司 (中國大陸) JIANGXI JEMINCARE GROUP CO.,
LTD. (CN)
中國大陸

(72) 發明人：張建建 ZHANG, JIANJIAN (CN)；潘 忠宗 PAN, ZHONGZONG (US)；楊欣秀
YANG, XINXIU (CN)；劉小五 LIU, XIAOWU (CN)；楊璐 YANG, LU (CN)；劉
培培 LIU, PEIPEI (CN)；曹曉丹 CAO, XIAODAN (CN)；鄧 俗俊 DENG, SUJUN
(US)；王 學萍 WANG, XUEPING (US)

(74) 代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：26 項 圖式數：11 共 136 頁

(54) 名稱

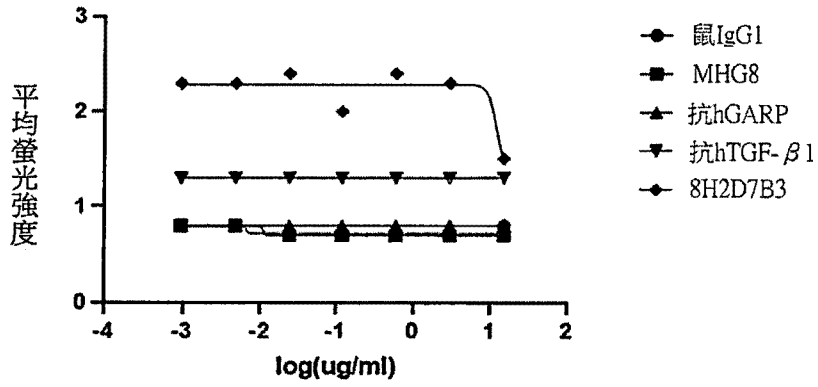
G A R P 蛋白抗體及其應用

(57) 摘要

本申請涉及一種 GARP 蛋白抗體，以及包含或表達該 GARP 蛋白抗體的細胞。該 GARP 蛋白抗體以約 $1.0E-12$ 或更低的 K_D 值與人 GARP/人 TGF- β 1 複合物結合。本申請還提供一種包含該 GARP 蛋白抗體和免疫檢查點抑制劑的藥物組合及其用途。

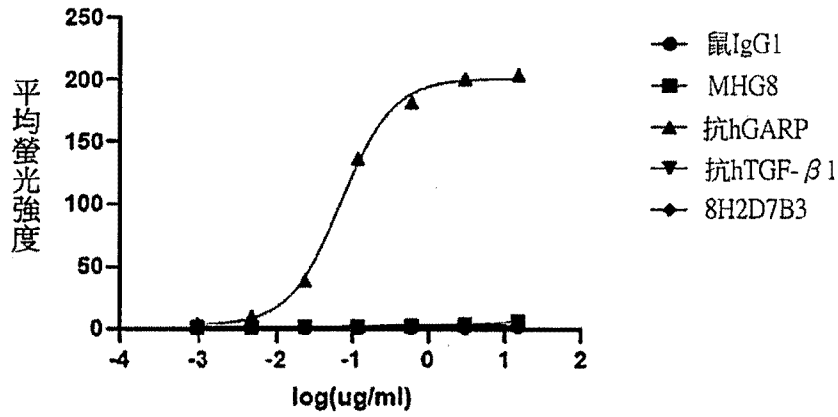
The present application relates to a GARP protein antibody, and cells comprising or expressing the GARP protein antibody. The GARP protein antibody binds to the human GARP/human TGF- β 1 complex with a K_D value of about $1.0E-12$ or less. The present application also provides a pharmaceutical combination comprising the GARP protein antibody and an immune checkpoint inhibitor and use thereof.

指定代表圖：



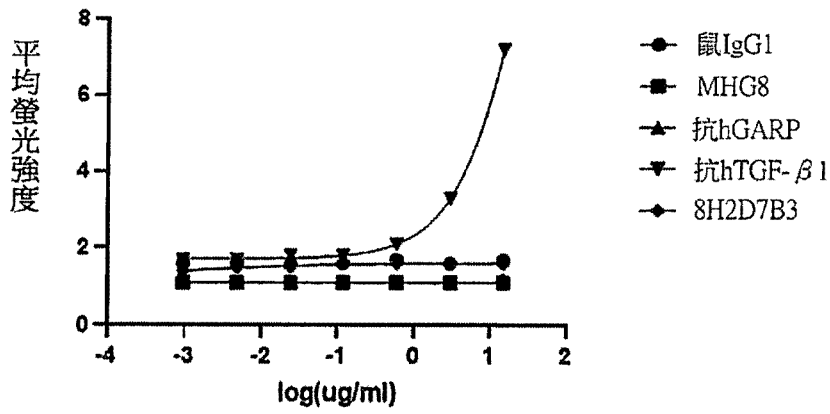
	最高值	EC50
鼠IgG1	N.A.	N.A.
MHG8	N.A.	N.A.
抗hGARP	N.A.	N.A.
抗hTGF-β1	N.A.	N.A.
8H2D7B3	N.A.	N.A.

【圖1A】



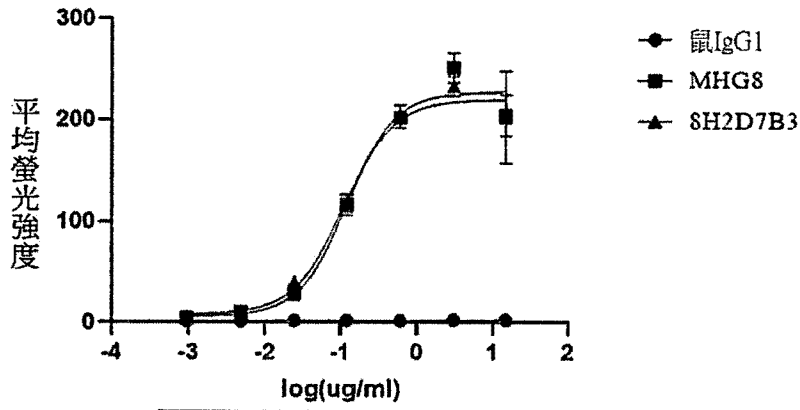
	最高值	EC50
鼠IgG1	N.A.	N.A.
MHG8	N.A.	N.A.
抗hGARP	201.513	0.072
抗hTGF-β1	N.A.	N.A.
8H2D7B3	N.A.	N.A.

【圖1B】



	最高值	EC50
鼠IgG1	N.A.	N.A.
MHG8	N.A.	N.A.
抗hGARP	N.A.	N.A.
抗hTGF-β1	22.314	45.406
8H2D7B3	N.A.	N.A.

【圖1C】



	最高值	EC50
鼠IgG1	N.A.	N.A.
MHG8	227.444	0.120
8H2D7B3	219.834	0.108

【圖1D】

【發明摘要】

【中文發明名稱】 GARP蛋白抗體及其應用

【英文發明名稱】 GARP PROTEIN ANTIBODY AND APPLICATION THEREOF

【中文】

本申請涉及一種GARP蛋白抗體，以及包含或表達該GARP蛋白抗體的細胞。該GARP蛋白抗體以約 $1.0E-12$ 或更低的 K_D 值與人GARP/人TGF- β 1複合物結合。本申請還提供一種包含該GARP蛋白抗體和免疫檢查點抑制劑的藥物組合及其用途。

【英文】

The present application relates to a GARP protein antibody, and cells comprising or expressing the GARP protein antibody. The GARP protein antibody binds to the human GARP/human TGF- β 1 complex with a K_D value of about $1.0E-12$ or less. The present application also provides a pharmaceutical combination comprising the GARP protein antibody and an immune checkpoint inhibitor and use thereof.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 GARP蛋白抗體及其應用

【英文發明名稱】 GARP PROTEIN ANTIBODY AND APPLICATION THEREOF

【技術領域】

【0001】 本申請涉及生物醫藥領域，具體的涉及一種GARP蛋白抗體及其應用。

【先前技術】

【0002】 調節性 T 細胞 (Treg) 與自身免疫性疾病和腫瘤發生關係密切，其異常活性可導致自身免疫性疾病或者腫瘤發生。Treg 細胞是近年來免疫學領域研究的熱點，其具有免疫應答低下和免疫抑制兩大特徵，藉由“主動”的方式抑制免疫系統從而發揮免疫負調作用。根據來源及作用機制，Treg 可分為天然產生的 CD4+CD25+Treg(自然調節性 T 細胞，nTreg)和誘導產生的適應性調節 T 細胞(aTreg 或 iTreg)。

【0003】 GARP (human glycoprotein A repetitions predominant) 蛋白是 80 kDa 的 I 型膜糖蛋白，屬於富含亮胺酸的重複蛋白家族。GARP 蛋白表達在巨核細胞，血小板和活化的調節性 T 細胞 (Treg 細胞) 上。TGF- β 與無活性結合蛋白 LAP 形成籠狀結構，處於非活性狀態，這種籠狀結構可以被 GARP，整合素，蛋白酶或其他基質激活，形成活性的 TGF- β ，藉由自分泌或旁分泌與受體結合激活細胞信號。TGF- β 信號被認為是導致腫瘤對檢查點阻斷療法產生耐藥

的主要原因。例如，TGF- β 增加腫瘤微環境中的免疫抑制細胞和免疫抑制因子。

【0004】 TGF- β 作為一種免疫抑制細胞因子，藉由不同的機制對免疫應答產生廣泛的抑制作用。TGF- β 降低 Th1、Th2 細胞和細胞毒性 T 淋巴細胞 (CTL) 的分化和功能，所有這些都提供重要的抗腫瘤效應。TGF- β 還藉由調節調節性 T (Treg) 細胞的數量和功能，增強免疫耐受和腫瘤逃避。此外，TGF- β 藉由抑制或刺激細胞增殖來調節免疫細胞的命運，從而影響胸腺和外周 T 細胞的發育。

【0005】 目前，臨床上的大部分抗體是中和所有 TGF- β 亞型，存在較大的安全性問題。藉由針對 GARP-TGF- β 1 複合物的療法可以抑制 Treg 釋放活性 TGF- β 1，提高 PD-1/PD-L1 的抗腫瘤活性。目前，亟需副作用小、安全性高的、對腫瘤微環境的不良影響比廣泛阻斷所有 TGF- β 亞型小的抗 GARP-TGF- β 1 複合物的新型抗體。

【發明內容】

【0006】 本申請提供了一種分離的抗原結合蛋白，其具有下列性質中的一種或多種：1) 在 Octet 測定中，以約 1.0E-12 或更低的 KD 值與人 GARP/人 TGF- β 1 複合物結合；2) 不與只表達人 GARP 的細胞或只表達人 TGF- β 1 的細胞結合；3) 抑制 Treg 細胞中的 SMAD2 磷酸化；4) 抑制表達人 GARP/人 TGF- β 1 的 HEK293T 細胞釋放 TGF- β 1；5) 阻止 Treg 細胞對人外周血單個核細胞 (PBMC) 釋放白細胞介素-2 (IL-2) 和干擾素- γ (IFN- γ) 的抑制；以及 6) 在人 PBMC 移植小鼠的 GvHD 模型中，阻斷 Treg 細胞對該人 PBMC 引起

的 GvHD 的抑制作用。一方面，本申請提供了一種分離的抗原結合蛋白，其包含 HCDR3，該 HCDR3 包含 SEQ ID NO：4 所示的胺基酸序列。

【0007】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 HCDR2，該 HCDR2 包含 SEQ ID NO：3 所示的胺基酸序列。

【0008】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 HCDR1，該 HCDR1 包含 SEQ ID NO：2 所示的胺基酸序列。

【0009】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含重鏈可變區 VH，該 VH 包含該 HCDR1、該 HCDR2 和該 HCDR3，該 HCDR3 包含 SEQ ID NO：4 所示的胺基酸序列；該 HCDR2 包含 SEQ ID NO：3 所示的胺基酸序列；以及該 HCDR1 包含 SEQ ID NO：2 所示的胺基酸序列。

【0010】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 H-FR1，該 H-FR1 的 C 末端與該 HCDR1 的 N 末端直接或間接地相連，且該 H-FR1 包含 SEQ ID NO：46 所示的胺基酸序列。

【0011】 在某些實施方式中，該抗原結合蛋白的 H-FR1 包含 SEQ ID NO：5 和 SEQ ID NO：22 中任一項所示的胺基酸序列。

【0012】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 H-FR2，該 H-FR2 位於該 HCDR1 與該 HCDR2 之間，且該 H-FR2 包含 SEQ ID NO：47 所示的胺基酸序列。

【0013】 在某些實施方式中，該抗原結合蛋白的 H-FR2 包含 SEQ ID NO：6 和 SEQ ID NO：23 中任一項所示的胺基酸序列。

【0014】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 H-FR3，該 H-FR3 位於該 HCDR2 與該 HCDR3 之間，且該 H-FR3 包含 SEQ ID NO：48 所示的胺基酸序列。

【0015】 在某些實施方式中，該抗原結合蛋白的 H-FR3 包含 SEQ ID NO：7 和 SEQ ID NO：24 中任一項所示的胺基酸序列。

【0016】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 H-FR4，該 H-FR4 的 N 末端與該 HCDR3 的 C 末端直接或間接地相連，且該 H-FR4 包含 SEQ ID NO：49 所示的胺基酸序列。

【0017】 在某些實施方式中，該抗原結合蛋白的 H-FR4 包含 SEQ ID NO：8 和 SEQ ID NO：25 中任一項所示的胺基酸序列。

【0018】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 H-FR1，H-FR2，H-FR3 和 H-FR4，該 H-FR1 包含 SEQ ID NO：46 所示的胺基酸序列；該 H-FR2 包含 SEQ ID NO：47 所示的胺基酸序列；該 H-FR3 包含 SEQ ID NO：48 所示的胺基酸序列；以及該 H-FR4 包含 SEQ ID NO：49 所示的胺基酸序列。

【0019】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 H-FR1，H-FR2，H-FR3 和 H-FR4，該 H-FR1 包含 SEQ ID NO：5 和 SEQ ID NO：22 中任一項所示的胺基酸序列；該 H-FR2 包含 SEQ ID NO：6 和 SEQ ID NO：23 中任一項所示的胺基酸序列；該 H-FR3 包含 SEQ ID NO：7 和 SEQ ID NO：24 中任一項所示的胺基酸序列；以及該 H-FR4 包含 SEQ ID NO：8 和 SEQ ID NO：25 中任一項所示的胺基酸序列。

【0020】 在某些實施方式中，該抗原結合蛋白的 H-FR1、H-FR2、H-FR3 和 H-FR4 包含選自下述任意一組的胺基酸序列：

【0021】 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 ;

【0022】 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 。

【0023】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含重鏈可變區 VH，該 VH 包含 SEQ ID NO : 50 所示的胺基酸序列。

【0024】 在某些實施方式中，該抗原結合蛋白的 VH 包含 SEQ ID NO : 1 和 SEQ ID NO : 21 中任一項所示的胺基酸序列。

【0025】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 LCDR3，該 LCDR3 包含 SEQ ID NO : 12 所示的胺基酸序列。

【0026】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 LCDR2，該 LCDR2 包含 SEQ ID NO : 45 所示的胺基酸序列。

【0027】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 LCDR2，該 LCDR2 包含 SEQ ID NO : 11 和 SEQ ID NO : 28 所示的胺基酸序列。

【0028】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 LCDR1，該 LCDR1 包含 SEQ ID NO : 44 所示的胺基酸序列。

【0029】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 LCDR1，該 LCDR1 包含 SEQ ID NO : 10 和 SEQ ID NO : 27 所示的胺基酸序列。

【0030】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含輕鏈可變區 VL，該 VL 包含該 LCDR1、該 LCDR2 和該 LCDR3，該 LCDR3 包含 SEQ ID NO : 12 所示的胺基酸序列；該 LCDR2 包含 SEQ ID NO : 45 所示的胺基酸序列；以及該 LCDR1 包含 SEQ ID NO : 44 所示的胺基酸序列。

【0031】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含輕鏈可變區 VL，該 VL 包含該 LCDR1、該 LCDR2 和該 LCDR3，該 LCDR3 包含 SEQ ID NO：12 所示的胺基酸序列；該 LCDR2 包含 SEQ ID NO：11 和 SEQ ID NO：28 中任一項所示的胺基酸序列；以及該 LCDR1 包含 SEQ ID NO：10 和 SEQ ID NO：27 中任一項所示的胺基酸序列。

【0032】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白中該 LCDR1、LCDR2、LCDR3 包含選自下述任意一組的胺基酸序列：

【0033】 a) LCDR1：SEQ ID NO: 10，LCDR2：SEQ ID NO: 11 和 LCDR3：SEQ ID NO: 12；

【0034】 b) LCDR1：SEQ ID NO: 27，LCDR2：SEQ ID NO: 28 和 LCDR3：SEQ ID NO: 12。

【0035】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 L-FR1，該 L-FR1 的 C 末端與該 LCDR1 的 N 末端直接或間接地相連，且該 L-FR1 包含 SEQ ID NO：52 所示的胺基酸序列。

【0036】 在某些實施方式中，該抗原結合蛋白的 L-FR1 包含 SEQ ID NO：13 和 SEQ ID NO：29 中任一項所示的胺基酸序列。

【0037】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 L-FR2，該 L-FR2 位於該 LCDR1 與該 LCDR2 之間，且該 L-FR2 包含 SEQ ID NO：14 所示的胺基酸序列。

【0038】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 L-FR3，該 L-FR3 位於該 LCDR2 與該 LCDR3 之間，且該 L-FR3 包含 SEQ ID NO：53 所示的胺基酸序列。

【0039】 在某些實施方式中，該抗原結合蛋白的 L-FR3 包含 SEQ ID NO：15 和 SEQ ID NO：30 中任一項所示的胺基酸序列。

【0040】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 L-FR4，該 L-FR4 的 N 末端與該 LCDR3 的 C 末端直接或間接地相連，且該 L-FR4 包含 SEQ ID NO：54 所示的胺基酸序列。

【0041】 在某些實施方式中，該抗原結合蛋白的 L-FR4 包含 SEQ ID NO：16 和 SEQ ID NO：31 中任一項所示的胺基酸序列。

【0042】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 L-FR1，L-FR2，L-FR3 和 L-FR4，該 L-FR1 包含 SEQ ID NO：52 所示的胺基酸序列；該 L-FR2 包含 SEQ ID NO：14 所示的胺基酸序列；該 L-FR3 包含 SEQ ID NO：53 所示的胺基酸序列；以及該 L-FR4 包含 SEQ ID NO：54 所示的胺基酸序列。

【0043】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 L-FR1，L-FR2，L-FR3 和 L-FR4，該 L-FR1 包含 SEQ ID NO：13 和 SEQ ID NO：29 中任一項所示的胺基酸序列；該 L-FR2 包含 SEQ ID NO：14 所示的胺基酸序列；該 L-FR3 包含 SEQ ID NO：15 和 SEQ ID NO：30 中任一項所示的胺基酸序列；以及該 L-FR4 包含 SEQ ID NO：16 和 SEQ ID NO：31 中任一項所示的胺基酸序列。

【0044】 在某些實施方式中，該抗原結合蛋白的 L-FR1、L-FR2、L-FR3 和 L-FR4 包含選自下述任意一組的胺基酸序列：

【0045】 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；

【0046】 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。

【0047】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含輕鏈可變區 VL，該 VL 包含 SEQ ID NO：51 所示的胺基酸序列。

【0048】 在某些實施方式中，該抗原結合蛋白的 VL 包含 SEQ ID NO：9 和 SEQ ID NO：26 中任一項所示的胺基酸序列。

【0049】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含重鏈恆定區，且該重鏈恆定區包括源自 IgG 的恆定區或源自 IgY 的恆定區。

【0050】 在某些實施方式中，該抗原結合蛋白的重鏈恆定區包括源自人 IgG4 的恆定區。

【0051】 在某些實施方式中，該抗原結合蛋白的重鏈恆定區包含 SEQ ID NO：17 所示的胺基酸序列。

【0052】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含輕鏈恆定區，且該抗體輕鏈恆定區包括源自 Ig κ 的恆定區或源自 Ig λ 的恆定區。

【0053】 在某些實施方式中，該抗原結合蛋白的輕鏈恆定區包括源自人 Ig κ 的恆定區。

【0054】 在某些實施方式中，該抗原結合蛋白的輕鏈恆定區包含 SEQ ID NO：18 所示的胺基酸序列。

【0055】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含重鏈 HC，該 HC 包含 SEQ ID NO：19 和 SEQ ID NO：32 中任一項所示的胺基酸序列。

【0056】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含輕鏈 LC，該 LC 包含 SEQ ID NO：20 和 SEQ ID NO：33 中任一項所示的胺基酸序列。

【0057】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包含 HC 和 LC，該 HC 包含 SEQ ID NO：19 和 SEQ ID NO：32 中任一項所示的胺基酸序列，且該 LC 包含 SEQ ID NO：20 和 SEQ ID NO：33 中任一項所示的胺基酸序列。

【0058】 在某些實施方式中，該抗原結合蛋白的 HC 和 LC 包含選自下述任意一組的胺基酸序列：

【0059】 a) HC：SEQ ID NO: 19 和 LC：SEQ ID NO: 20；

【0060】 b) HC：SEQ ID NO: 32 和 LC：SEQ ID NO: 33。

【0061】 在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白包括抗體或其抗原結合片段。

【0062】 在某些實施方式中，該抗原結合片段包括 Fab、Fab'、F(ab)₂、Fv 片段、F(ab')₂、scFv、di-scFv、VHH 和/或 dAb。

【0063】 在某些實施方式中，該抗體選自下組：單株抗體、單鏈抗體、鼠源抗體、嵌合抗體、人源化抗體和全人源抗體。

【0064】 另一方面，本申請提供了一種多肽，其包含該分離的抗原結合蛋白。

【0065】 另一方面，本申請提供了一種免疫綴合物，其包含該分離的抗原結合蛋白或該多肽。

【0066】 在某些實施方式中，該免疫綴合物還包括藥學上可接受的治療劑。

【0067】 在某些實施方式中，該治療劑選自下組：細胞毒性劑和細胞抑制劑。

【0068】 另一方面，本申請提供了一種分離的核酸分子，其編碼該分離的抗原結合蛋白，或者該多肽。

【0069】 另一方面，本申請提供了一種載體，其包含該分離的核酸分子。

【0070】 另一方面，本申請提供了一種細胞，其包含該分離的抗原結合蛋白，該多肽，該免疫綴合物，該分離的核酸分子和/或該載體。

【0071】 另一方面，本申請提供了一種製備該分離的抗原結合蛋白或該多肽的方法，該方法包括在使得該分離的抗原結合蛋白或該多肽表達的條件下，培養該細胞。

【0072】 另一方面，本申請提供了一種醫藥組成物，其包含該分離的抗原結合蛋白，該多肽，該免疫綴合物，該分離的核酸分子，該載體，該細胞，和/或藥學上可接受的佐劑和/或賦形劑。

【0073】 另一方面，本申請提供了一種藥物組合，其包含該分離的抗原結合蛋白和免疫檢查點抑制劑。

【0074】 在某些實施方式中，該免疫檢查點抑制劑包括抑制 PD-1/PD-L1 相互作用的物質。

【0075】 在某些實施方式中，該免疫檢查點抑制劑選自下組：PD-1/PD-L1 阻斷劑、PD-1 拮抗劑、PD-L1 拮抗劑、PD-1 抑制劑和 PD-L1 抑制劑。

【0076】 在某些實施方式中，該免疫檢查點抑制劑包括抗 PD-L1 抗體。

【0077】 在某些實施方式中，該抗 PD-L1 抗體包含 HCDR3，該 HCDR3 包含 SEQ ID NO：37 所示的胺基酸序列。

【0078】 在某些實施方式中，該抗 PD-L1 抗體包含 HCDR2，該 HCDR2 包含 SEQ ID NO：36 所示的胺基酸序列。

【0079】 在某些實施方式中，該抗 PD-L1 抗體包含 HCDR1，該 HCDR1 包含 SEQ ID NO：35 所示的胺基酸序列。

【0080】 在某些實施方式中，該抗 PD-L1 抗體包含重鏈可變區 VH，該 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，該 HCDR3 包含 SEQ ID NO：37 所示的胺基酸序列；該 HCDR2 包含 SEQ ID NO：36 所示的胺基酸序列；以及該 HCDR1 包含 SEQ ID NO：35 所示的胺基酸序列。

【0081】 在某些實施方式中，該抗 PD-L1 抗體包含重鏈可變區 VH，該 VH 包含 SEQ ID NO：34 所示的胺基酸序列。

【0082】 在某些實施方式中，該抗 PD-L1 抗體包含 LCDR3，該 LCDR3 包含 SEQ ID NO：41 所示的胺基酸序列。

【0083】 在某些實施方式中，該抗 PD-L1 抗體包含 LCDR2，該 LCDR2 包含 SEQ ID NO：40 所示的胺基酸序列。

【0084】 在某些實施方式中，該抗 PD-L1 抗體包含 LCDR1，該 LCDR1 包含 SEQ ID NO：39 所示的胺基酸序列。

【0085】 在某些實施方式中，該抗 PD-L1 抗體包含輕鏈可變區 VL，該 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，該 LCDR3 包含 SEQ ID NO：41 所示的胺基酸序列；該 LCDR2 包含 SEQ ID NO：40 所示的胺基酸序列；以及該 LCDR1 包含 SEQ ID NO：39 所示的胺基酸序列。

【0086】 在某些實施方式中，該抗 PD-L1 抗體包含輕鏈可變區 VL，該 VL 包含 SEQ ID NO：38 所示的胺基酸序列。

【0087】 在某些實施方式中，該抗 PD-L1 抗體包括阿替利珠單抗。

【0088】 在某些實施方式中，該藥物組合可以是醫藥組成物。

【0089】 另一方面，本申請提供了一種試劑盒，其包括該藥物組合。

【0090】 另一方面，本申請提供了該分離的抗原結合蛋白、該多肽、該免疫綴合物、該分離的核酸分子、該載體，該細胞和/或該醫藥組成物，其用於預防、緩解和/或治療腫瘤。

【0091】 在某些實施方式中，該腫瘤包括實體瘤。

【0092】 在某些實施方式中，該腫瘤包括與 GARP 的蛋白表達相關的腫瘤。

【0093】 在某些實施方式中，該腫瘤包括黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0094】 另一方面，本申請提供了該藥物組合和/或該試劑盒，其用於預防、緩解和/或治療腫瘤。

【0095】 在某些實施方式中，該腫瘤包括實體瘤。

【0096】 在某些實施方式中，該腫瘤包括與 GARP 的表達相關的腫瘤。

【0097】 在某些實施方式中，該腫瘤包括黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0098】 另一方面，本申請提供了該分離的抗原結合蛋白、該多肽、該免疫綴合物、該分離的核酸分子、該載體，該細胞和/或該醫藥組成物在製備藥物中的用途，該藥物用於預防、緩解和/或治療腫瘤。

【0099】 在某些實施方式中，該腫瘤包括實體瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0100】 在某些實施方式中，該腫瘤包括與 GARP 的表達相關的腫瘤。

【0101】 在某些實施方式中，該腫瘤包括黑色素瘤。

【0102】 另一方面，本申請提供了該藥物組合和/或該試劑盒在製備藥物中的用途，該藥物用於預防、緩解和/或治療腫瘤。

【0103】 在某些實施方式中，該腫瘤包括實體瘤。

【0104】 在某些實施方式中，該腫瘤包括與 GARP 的表達相關的腫瘤。

【0105】 在某些實施方式中，該腫瘤包括黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0106】 另一方面，本申請提供了一種預防和/或治療疾病或病症的方法，其包括向有需要的受試者施用有效量的該分離的抗原結合蛋白、該分離的核酸分子、該載體，該細胞、該醫藥組成物，其中該疾病或病症包括腫瘤。

【0107】 在某些實施方式中，該腫瘤包括實體瘤。

【0108】 在某些實施方式中，該腫瘤包括與 GARP 的表達相關的腫瘤。

【0109】 在某些實施方式中，該腫瘤包括黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0110】 另一方面，本申請提供了一種預防和/或治療疾病或病症的方法，其包括向有需要的受試者施用有效量的該藥物組合，其中該疾病或病症包括腫瘤。

【0111】 在某些實施方式中，該腫瘤包括實體瘤。

【0112】 在某些實施方式中，該腫瘤包括與 GARP 的表達相關的腫瘤。

【0113】 在某些實施方式中，該腫瘤包括黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0114】 所屬技術領域具有通常知識者能夠從下文的詳細描述中容易地洞察到本申請的其它方面和優勢。下文的詳細描述中僅顯示和描述了本申請的示例性實施方式。如所屬技術領域具有通常知識者將認識到的，本申請的內容使得所屬技術領域具有通常知識者能夠對所公開的具體實施方式進行改動而不脫離本申請所涉及發明的精神和範圍。相應地，本申請的附圖和說明書中的描述僅僅是示例性的，而非為限制性的。

【圖式簡單說明】

【0115】 本申請所涉及的發明的具體特徵如所附申請專利範圍所顯示。藉由參考下文中詳細描述的示例性實施方式和圖式能夠更好地理解本申請所涉及發明的特點和優勢。對附圖簡要說明如下：

【0116】 圖 1A 至圖 1D 顯示的是本申請所述抗原結合蛋白的抗原結合活性。

【0117】 圖 2 顯示的是本申請示例性的鼠源抗體 8H2D7B3 的阻斷實驗結果。

【0118】 圖 3A 及圖 3B 顯示的是本申請示例性的鼠源抗體 8H2D7B3 對 Treg 細胞中 SMAD2 磷酸化的影響。

【0119】 圖 4 顯示的是本申請示例性的 JYB1907hz18 抗體對 Treg 細胞中 SMAD2 磷酸化的影響。

【0120】 圖 5 顯示的是本申請示例性的 JYB1907hz18 抗體對 HEK293T 細胞釋放 TGF- β 1 的影響。

【0121】圖 6A 及圖 6B 顯示的是本申請示例性的 JYB1907hz18 抗體對 PBMC 釋放 IL-2 和 IFN- γ 的影響。

【0122】圖 7A 顯示的是本申請示例性的 JYB1907hz18 抗體在人源化 FcRn 小鼠模型中藥物代謝動力學 (PK) 研究曲線。

【0123】圖 7B 顯示的是本申請所述 MHG8 抗體在人源化 FcRn 小鼠模型中藥物代謝動力學 (PK) 研究曲線。

【0124】圖 8A 及圖 8B 顯示的是本申請示例性的 JYB1907hz18 抗體在小鼠 GvHD 模型中的研究結果。

【0125】圖 9 顯示的是本申請示例性的 JYB1907hz18 抗體在小鼠黑色素瘤模型中的藥效檢測結果。

【0126】圖 10 顯示的是本申請示例性的 JYB1907hz18 抗體在小鼠乳腺癌模型中的藥效檢測結果。

【0127】圖 11 顯示的是本申請示例性的 JYB1907hz18 抗體在小鼠肺鱗癌模型中的藥效檢測結果。

【實施方式】

【0128】以下由特定的具體實施例說明本申請發明的實施方式，熟悉此技術的人士可由本說明書所公開的內容容易地瞭解本申請發明的其他優點及效果。

【0129】術語定義

【0130】在本申請中，術語“分離的”通常指從天然狀態下經人工手段獲得的。如果自然界中出現某一種“分離”的物質或成分，那麼可能是其所處

的天然環境發生了改變，或從天然環境下分離出該物質，或二者情況均有發生。例如，某一活體動物體內天然存在某種未被分離的多聚核苷酸或多肽，而從這種天然狀態下分離出來的高純度的相同的多聚核苷酸或多肽即稱之為分離的。術語“分離的”不排除混有人工或合成的物質，也不排除存在不影響物質活性的其它不純物質。

【0131】 在本申請中，術語“抗原結合蛋白”通常是指一種能夠特異性識別和/或中和特定抗原的多肽分子。在本申請中，術語“抗原結合蛋白”可包括“抗體”或“抗原結合片段”。例如，該抗體可包含藉由二硫鍵相互連接的至少兩條重（H）鏈和兩條輕（L）鏈組成的免疫球蛋白，並且可包括任何包含其抗原結合部分的分子。術語“抗體”可包括單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，包括但不限於鼠源抗體、人抗體（全人源抗體）、人源化抗體、嵌合抗體、單鏈抗體（例如，scFv），以及與抗原結合的抗體片段（例如，Fab、Fab’和（Fab）₂片段）。術語“抗體”還可包括抗體的所有重組體形式，例如在原核細胞中表達的抗體、未糖基化的抗體以及本文所述的任何與抗原結合的抗體片段及其衍生物。每條重鏈可由重鏈可變區（VH）和重鏈恆定區構成。每條輕鏈可由輕鏈可變區（VL）和輕鏈恆定區構成。VH和VL區可進一步被區分為稱為互補決定區（CDR）的高變區，它們散佈在稱為構架區（FR）的更保守的區域中。每個VH和VL可由三個CDR和四個FR區構成，它們從胺基端至羧基端可按以下順序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。重鏈和輕鏈的可變區含有與抗原（例如，人GARP）相互作用的結合結構域。抗體的恆定區可介導該免疫球蛋白與宿主組織或因子的結合，該宿主組織或因子包括免疫系統的多種細胞（例如，效應細胞）和經典補體系統的第一成分

(Clq)。該CDRs的確切邊界已根據不同系統不同地限定。由Kabat(Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health，Bethesda，Md.(1987)和(1991))描述的系統，不僅提供了可應用於抗原結合片段的任何可變區的明確殘基編號系統，還提供了限定CDRs的精確殘基邊界。這些CDRs可以被稱為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))發現儘管在胺基酸序列層級上具有大的多樣性，但是Kabat CDRs內的某些亞部分採取幾乎相同的肽主鏈構象。這些亞部分命名為L1、L2和L3或H1、H2和H3，其中“L”和“H”分別指輕鏈和重鏈區域。這些區域可以被稱為Chothia CDRs，該Chothia CDRs具有與Kabat CDRs重疊的邊界。與Kabat CDRs重疊的限定CDRs的其他邊界已由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邊界定義可能不嚴格地遵循上述系統之一，但仍將與Kabat CDRs重疊，儘管按照特定殘基或殘基組或甚至整個CDRs並不顯著影響抗原結合的預測或實驗發現，它們可以縮短或加長。在本申請中，使用的是Chothia編號系統。

【0132】 在本申請中，術語“抗原結合片段”通常是指抗體中發揮特異性結合抗原功能的一個或多個片段。抗體的抗原結合功能可藉由抗體的全長片段來實現。抗體的抗原結合功能也可藉由以下來實現：包括Fv、ScFv、dsFv、Fab、Fab' 或F(ab')₂的片段的重鏈，或者，包括Fv、scFv、dsFv、Fab、Fab' 或F(ab')₂的片段的輕鏈。(1) Fab片段，即由VL、VH、CL和CH結構域組成的一價片段；(2) F(ab')₂片段，包含藉由鉸鏈區處的二硫鍵連接的兩個Fab片段的二價片段；(3) 由VH和CH結構域組成的Fd片段；(4) 由抗體

單臂的VL和VH結構域組成的Fv片段；（5）由VH結構域組成的dAb片段（Ward等，（1989）Nature 341：544-546）；（6）分離的互補決定區（CDR）和（7）可視需要地藉由接頭連接的兩個或以上分離的CDR的組合。例如，還可包括由VL和VH配對形成的一價單鏈分子Fv（scFv）（參見Bird等（1988）Science 242：423-426；以及Huston等（1988）Proc.Natl.Acad.Sci. 85：5879-5883）。例如，還可包括缺失抗體輕鏈而只有重鏈可變區的一類抗體VHH（例如，可參見康曉圳等，生物工程學報, 2018, 34(12): 1974-1984）。該“抗原結合部分”還可包括免疫球蛋白融合蛋白，該融合蛋白包含選自以下的結合結構域：（1）與免疫球蛋白鉸鏈區多肽融合的結合結構域多肽；（2）與鉸鏈區融合的免疫球蛋白重鏈CH2恆定區；和（3）與CH2恆定區融合的免疫球蛋白重鏈CH3恆定區。

【0133】 在本申請中，術語“單株抗體”通常是指一群基本同源的抗體，即包含該群各個抗體除了可能的以微量存在的天然發生的突變之外是相同的。單株抗體是高度特異性的，直接針對單個抗原性位點。例如，該單株抗體可以藉由融合瘤技術製備或者藉由使用重組DNA方法在細菌、真核動物或植物細胞中產生單株抗體也可以得自噬菌體抗體文庫，使用例如Clackson et al., Nature, 352:624-628（1991）和Marks et al., Mol.Biol., 222:581-597（1991）所述的技術進行。

【0134】 在本申請中，術語“嵌合抗體”通常是指這樣的抗體，其中每個重鏈或輕鏈胺基酸序列的一部分與來自特定物種的抗體中相應胺基酸序列同源，或者屬於特定的類別，而該鏈的其餘區段則與另一物種中的相應序列同源。例如，輕鏈和重鏈的可變區均來自一個動物物種（如小鼠、大鼠等）的抗

體的可變區，而恆定部分則與來自另一物種（如人）的抗體序列同源。例如，為獲得嵌合抗體，可利用非人源的B細胞或融合瘤細胞產生可變區，而與其組合的恆定區則來自人。該可變區具有易於製備的優點，並且其特異性不受與其組合的恆定區的來源的影響。同時，由於嵌合抗體的恆定區可來源於人類，因此嵌合在注射時抗體引發免疫應答的可能性會低於使用恆定區為非人來源的抗體。

【0135】 在本申請中，術語“人源化抗體”通常是指一種嵌合抗體，其含有較少的來自非人免疫球蛋白的序列，從而降低異種抗體引入到人類中時的免疫原性，同時保持抗體的完全抗原結合親和力和特異性。例如，可以使用CDR移植（Jones et al., Nature 321:522 (1986)）及其變體；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“貼面”（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（美國專利US5639641）等技術手段，對非人源的結合域進行人源化。如果其他區域，例如鉸鏈區和恆定區結構域也源自非人來源，則這些區域也可以被人源化。

【0136】 在本申請中，術語“鼠源抗體”通常是指可變區框架和CDR區得自小鼠種系免疫球蛋白序列的抗體。此外，如果抗體包含恆定區，其也得自小

鼠種系免疫球蛋白序列。本申請的鼠源抗體可以包含不由小鼠種系免疫球蛋白序列編碼的胺基酸殘基，例如藉由體外隨機突變或點突變或藉由體內體細胞突變而導入的突變。然而，術語“鼠源抗體”不包括在小鼠框架序列中插入得自其他哺乳動物物種的CDR序列的抗體。

【0137】 在本申請中，術語“GARP蛋白”或“GARP抗原可以互換使用，並且包括GARP的任何變體和同源物，其由細胞天然表達或在用GARP基因轉染的細胞上表達。在本申請中，GARP可以為人GARP，其在UniProt/Swiss-Prot中的登錄號為Q14392。在本申請中，GARP可在免疫細胞表面表達。例如，可在調節性T細胞（Treg）表面表達。

【0138】 在本申請中，術語“TGF- β 1”與“TGF β 1”互換使用，通常與細胞生長調節和分化有關。在本申請中，該TGF- β 1是TGF- β 的亞型。在本申請中，該“TGF- β 1”可包括TGF- β 1的任何變體和同源物，其由細胞天然表達或在用TGF- β 1基因轉染的細胞上表達。在本申請中，該“TGF- β 1”可以為人TGF- β 1，其在UniProt/Swiss-Prot中的登錄號為P01137。在本申請中，該“TGF- β 1”可被GARP激活，並與CD8+T細胞上的TGF β 受體結合抑制CD8+T細胞對腫瘤細胞的殺傷功能。

【0139】 除了本文提到的特定蛋白質和核苷酸之外，本申請還可包括其功能性變體、衍生物、類似物、同源物及其片段。

【0140】 術語“功能性變體”指與天然存在序列具有基本上同一的胺基酸序列或由基本上同一的核苷酸序列編碼並能夠具有天然存在序列的一種或多種活性的多肽。在本申請的上下文中，任何給定序列的變體是指其中殘基的特定序列（無論是胺基酸或核苷酸殘基）已經經過修飾而使得該多肽或多核苷酸

基本上保留至少一種內源功能的序列。可以藉由天然存在的蛋白質和/或多核苷酸中存在的至少一個胺基酸殘基和/或核苷酸殘基的添加、缺失、取代、修飾、替換和/或變異來獲得變體序列，只要保持原來的功能活性即可。

【0141】 在本申請中，術語“衍生物”通常是指本申請的多肽或多核苷酸而言包括自/對序列的一個（或多個）胺基酸殘基的任何取代、變異、修飾、替換、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種內源功能。

【0142】 在本申請中，術語“類似物”通常對多肽或多核苷酸而言，包括多肽或多核苷酸的任何模擬物，即擁有該模擬物模擬的多肽或多核苷酸的至少一種內源功能的化學化合物。

【0143】 通常，可以進行胺基酸取代，例如至少1個（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或20個以上）胺基酸取代，只要經修飾的序列基本上保持需要的活性或能力。胺基酸取代可包括使用非天然存在的類似物。

【0144】 在本申請中，術語“同源物”通常是指與天然存在序列具有一定同源性的胺基酸序列或核苷酸序列。術語“同源性”可以等同於序列“同一性”。同源序列可以包括可以與主題序列是至少80%、85%、90%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%相同的胺基酸序列。通常，同源物將包含與主題胺基酸序列相同的活性位點等。同源性可以根據相似性（即具有相似化學性質/功能的胺基酸殘基）來考慮，也可以在序列同一性方面表達同源性。在本申請中，提及的胺基酸序列或核苷酸序列的SEQ ID NO中的任一項具有百分比同一性的序列是指在所提及的SEQ ID NO的整個長度上具有該百分比同一性的序列。為了確定序列同一性，可進行序列比對，其可

藉由所屬技術領域具有通常知識者瞭解的各種方式進行，例如，使用BLAST、BLAST-2、ALIGN、NEEDLE或Megalign (DNASTAR) 軟體等。所屬技術領域具有通常知識者能夠確定用於比對的適當參數，包括在所比較的全長序列中實現最優比對所需要的任何算法。

【0145】 用於本申請的蛋白質或多肽也可以具有胺基酸殘基的缺失、插入或取代，該胺基酸殘基產生沉默的變化並導致功能上等同的蛋白質。可以根據殘基的極性、電荷、溶解性、疏水性、親水性和/或兩性性質的相似性進行有意的胺基酸取代，只要保留內源性功能即可。例如，帶負電荷的胺基酸包括天冬胺酸和谷胺酸；帶正電荷的胺基酸包括賴胺酸和精胺酸；並且含具有相似親水性值的不帶電極性頭基的胺基酸包括天冬醯胺、穀胺醯胺、絲胺酸、蘇胺酸和酪胺酸。

【0146】 在本申請中，術語“腫瘤”通常是指在各種致瘤因子作用下，局部組織細胞增生所形成的贅生物。例如，該腫瘤可包括實體瘤。例如，該腫瘤可包括與GARP的蛋白表達相關的腫瘤。術語“與GARP的蛋白表達相關的腫瘤”通常是指GARP表達導致疾病進展或逃避免疫監視而形成的腫瘤。該與GARP的蛋白表達相關的腫瘤可以是GARP陽性的腫瘤。在GARP陽性的腫瘤中，與正常細胞相比，腫瘤細胞表面的GAPR的蛋白表達量高約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%或更高。例如，該腫瘤可以是轉移性結腸癌。例如，該腫瘤可以是肝細胞癌。例如，該腫瘤可以是晚期腎細胞癌。例如，該腫瘤可以是非小細胞肺癌。例如，該腫瘤可以是黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0147】在本申請中，術語“黑色素瘤”通常是指黑色素細胞來源的一種高度惡性的腫瘤。在本申請中，該黑色素瘤可發生於皮膚，也可見於黏膜和內臟。

【0148】在本申請中，術語“免疫綴合物”通常是指該其他試劑（例如，化療劑、放射性元素、細胞生長抑制劑和細胞毒性劑）與該分離的抗原結合蛋白綴合（例如，藉由連接分子共價相連）而形成的綴合物，該綴合物可以藉由該分離的抗原結合蛋白與靶細胞上的抗原的特異性結合，將該其他試劑遞送至靶細胞（例如，腫瘤細胞）。然後該免疫綴合物經該內化，最終進入靶細胞內部（例如，進入溶酶體等泡囊體），此時該免疫綴合物中的連接分子可以裂解，釋放該其他試劑從而發揮其細胞毒性效應。此外，該抗原也可以由該靶細胞分泌，並位於該靶細胞外的間隙。

【0149】在本申請中，術語“藥學上可接受的治療劑”通常是指可以抑制腫瘤和/或腫瘤細胞增殖的試劑。在本申請中，該治療劑可以是細胞毒性劑，也可以是細胞抑制劑。例如，該治療劑可以選自以下組：有絲分裂抑制劑、激酶抑制劑、烷基化試劑、抗代謝藥、嵌入抗生素、生長因子抑制劑、細胞週期抑制劑、酶、拓撲異構酶抑制劑、組蛋白脫乙酰基酶抑制劑、抗存活劑、生物學應答調節劑。

【0150】在本申請中，術語“受試者”通常指人類或非人類動物，包括但不限於貓、狗、馬、豬、奶牛、羊、兔、小鼠、大鼠或猴。

【0151】在本申請中，術語“核酸分子”通常是指從其天然環境中分離的或人工合成的任何長度的分離形式的核苷酸、脫氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其類似物。

【0152】 在本申請中，術語“載體”通常是指能夠在合適的宿主中自我複製的核酸分子。該載體可將插入的核酸分子轉移到細胞中和/或細胞之間。該載體可包括主要用於將DNA 或RNA 插入細胞中的載體、主要用於複製DNA 或RNA 的載體，以及主要用於DNA 或RNA的轉錄和/或翻譯的表達的載體。該載體可以是當引入合適的細胞時能夠轉錄並翻譯成多肽的多核苷酸。通常，藉由培養包含該載體的合適的細胞，該載體可以產生期望的表達產物。在本申請中，該載體可包含慢病毒載體。

【0153】 在本申請中，術語“細胞”通常是指可以或已經含有包括本申請所述的核酸分子的質粒或載體，或者能夠表達本申請所述的多肽或本申請所述的抗原結合蛋白的個體細胞，細胞系或細胞培養物。該細胞可以包括單個細胞的子代。由於天然的，意外的或故意的突變，子代細胞與原始親本細胞在形態上或在基因組上可能不一定完全相同，但能夠表達本申請所述的多肽或抗原結合蛋白即可。該細胞可以藉由使用本申請所述的載體體外轉染細胞而得到。該細胞可以是原核細胞（例如大腸桿菌），也可以是真核細胞（例如酵母細胞，例如COS 細胞、中國倉鼠卵巢（CHO）細胞、HeLa 細胞、HEK293 細胞、COS-1 細胞、NS0 細胞或骨髓瘤細胞）。在一些實施方式中，該細胞可以是免疫細胞。例如，該免疫細胞可以選自下組：T細胞、B細胞、天然殺傷細胞（NK細胞）、巨噬細胞、NKT細胞、單核細胞、樹突狀細胞、粒細胞、淋巴細胞、白細胞和/或外周血單個核細胞。例如，該免疫細胞可以是T細胞。

【0154】 在本申請中，術語“治療”通常是指：（i）預防可能易患疾病、病症和/或病狀、但尚未診斷出患病的患者出現該疾病、病症或病狀；（ii）抑制該疾病、病症或病狀，亦即遏制其發展；以及（iii）緩解該疾病、病

症或病狀，亦即使得該疾病、病症和/或病狀和/或與該疾病、病症和/或病狀相關聯的症狀消退。

【0155】 在本申請中，術語“多肽”、“肽”、“蛋白”和“蛋白質”可互換地使用，通常是指具有任何長度的胺基酸的聚合物。該聚合物可以是直鏈或支鏈的，它可以包含修飾的胺基酸，並且可以被非胺基酸中斷。這些術語還涵蓋已經被修飾的胺基酸聚合物。這些修飾可以包含：二硫鍵形成、糖基化、脂化（lipidation）、乙醯化、磷酸化、或任何其他操縱（如與標記組分結合）。術語“胺基酸”包括天然的和/或非天然的或者合成的胺基酸，包括甘胺酸以及D和L旋光異構體、以及胺基酸類似物和肽模擬物。

【0156】 在本申請中，術語“多核苷酸”、“核苷酸”、“核苷酸序列”、“核酸”和“寡核苷酸”可互換地使用，通常是指具有任何長度的核苷酸的聚合形式，如脫氧核糖核苷酸或核糖核苷酸、或其類似物。多核苷酸可具有任何三維結構，並且可以執行已知或未知的任何功能。以下是多核苷酸的非限制性實例：基因或基因片段的編碼區或非編碼區、根據連接分析定義的多個座位（一個座位）、外顯子、內含子、信使RNA（mRNA）、轉運RNA、核糖體RNA、短干擾RNA（siRNA）、短髮夾RNA（shRNA）、micro-RNA（miRNA）、核酶、cDNA、重組多核苷酸、分支多核苷酸、質粒、載體、任何序列的分離的DNA、任何序列的分離的RNA、核酸探針、和引子。多核苷酸可以包含一個或多個經修飾的核苷酸，如甲基化的核苷酸和核苷酸類似物。如果存在，可以在聚合物組裝之前或之後進行核苷酸結構的修飾。核苷酸的序列可以被非核苷酸組分中斷。多核苷酸可以在聚合後，如藉由與標記的組分綴合來進一步修飾。

【0157】在本申請中，術語“ K_D ”（同樣地，“ K_D ”或“ KD ”）通常指“親和常數”或“平衡解離常數”，並指在滴定測量中在平衡時、或者藉由將解離速率常數（ k_d ）除以結合速率常數（ k_a ）所獲得的值。使用結合速率常數（ k_a ）、解離速率常數（ k_d ）和平衡解離常數（ K_D ）表示結合蛋白（例如本申請所述的分離的抗原結合蛋白）對抗原（例如，GARP蛋白）的結合親和力。確定結合和解離速率常數的方法為本領域熟知。使用基於熒光的技術提供了高靈敏度以及在生理緩衝液中在平衡時檢查樣品的能力。例如，可以藉由Octet測定該 K_D 值，也可以使用其他實驗途徑和儀器例如BIAcore（生物分子相互作用分析）測定（例如，可以從BIAcoreInternationalAB，aGEHealthcarecompany，Uppsala，瑞典獲得的儀器）。另外，也可以使用可以從SapidyneInstruments（Boise，Idaho）獲得的KinExA（動態排阻測定（KineticExclusionAssay））測定該 K_D 值，或者使用表面電漿共振儀（SPR）測定該 K_D 值。

【0158】在本申請中，術語“和/或”應理解為意指可選項中的任一項或可選項的兩項。

【0159】在本申請中，術語“包含”通常是指包括明確指定的特徵，但不排除其他要素。在某些情形中，“包含”也涵蓋僅包括指定的組分的情況。

【0160】在本申請中，術語“約”通常是指在指定數值以上或以下0.5%-10%的範圍內變動，例如在指定數值以上或以下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%的範圍內變動。

【0161】在本申請中，術語“包括”通常是指包含、總括、含有或包涵的含義。在某些情況下，也表示“為”、“由……組成”的含義。

【0162】 發明詳述

【0163】 本申請所述分離的抗原結合蛋白

【0164】 一方面，本申請提供一種分離的抗原結合蛋白，其可以以約 $1.0E-12M$ 或更低（例如，該 K_D 不高於約 $1.0E-12M$ 、不高於約 $0.9E-12M$ 、不高於約 $0.8E-12M$ 、不高於約 $0.7E-12M$ 、不高於約 $0.6E-12M$ 、不高於 $0.5E-12M$ 、不高於 $0.4E-12M$ 、不高於 $0.3E-12M$ 、不高於 $0.2E-12M$ 或不高於 $0.1E-12M$ 或以下）的 K_D 值與人GARP/人TGF- β 1複合物結合。

【0165】 在本申請中，該分離的抗原結合蛋白可與參比抗體競爭結合該人GARP/人TGF- β 1複合物，該參比抗體可包含重鏈可變區VH，該VH可包含HCDR1、HCDR2和HCDR3中的至少一個、兩個或三個。

【0166】 在本申請中，該參比抗體的HCDR3可包含SEQ ID NO：4所示的胺基酸序列。

【0167】 在本申請中，該參比抗體的HCDR2可包含SEQ ID NO：3所示的胺基酸序列。

【0168】 在本申請中，該參比抗體的HCDR1可包含SEQ ID NO：2所示的胺基酸序列。

【0169】 例如，本申請所述參比抗體的HCDR1可包含SEQ ID NO：2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO：3所示的胺基酸序列；且該HCDR3可包含SEQ ID NO：4所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體8H2D7B3或與其具有相同HCDR1-3的抗體。

【0170】 例如，本申請所述參比抗體的HCDR1可包含SEQ ID NO：2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO：3所示的胺基酸序列；且該HCDR3

可包含SEQ ID NO：4所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體 JYB1907hz0或與其具有相同HCDR1-3的抗體。

【0171】 例如，本申請所述參比抗體的HCDR1可包含SEQ ID NO：2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO：3所示的胺基酸序列；且該HCDR3可包含SEQ ID NO：4所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體 JYB1907hz18或與其具有相同HCDR1-3的抗體。

【0172】 例如，該參比抗體的VH可包含框架區H-FR1，H-FR2，H-FR3和H-FR4。

【0173】 在本申請中，該參比抗體的H-FR1可包含SEQ ID NO：46所示的胺基酸序列。

【0174】 QVQLX₁QSGAEX₂X₃X₄PGX₅SVKX₆SCKAS（SEQ ID NO：46），其中，X₁可以是Q或V，X₂可以是L或V，X₃可以是K或V，X₄可以是K或R，X₅可以是A或S，X₆可以是L或V。

【0175】 在本申請中，該參比抗體的H-FR1可包含SEQ ID NO：5或SEQ ID NO：22所示的胺基酸序列。

【0176】 在本申請中，該參比抗體的H-FR2可包含SEQ ID NO：47所示的胺基酸序列。

【0177】 WMYWVX₁QX₂PX₃QGLEWIGSI（SEQ ID NO：47），其中，X₁可以是K或R，X₂可以是A或R，X₃可以是G或I。

【0178】 在本申請中，該參比抗體的H-FR2可包含SEQ ID NO：6或SEQ ID NO：23所示的胺基酸序列。

【0179】 在本申請中，該參比抗體的H-FR3可包含SEQ ID NO：48所示的胺基酸序列。

【0180】 THYNQKFX₁X₂RX₃TVTVDKSX₄RIVYMX₅LSSLX₆SEDX₇AVYFCAR (SEQ ID NO：48)，其中，X₁可以是Q或K，X₂可以是D或G，X₃可以是A或V，X₄可以是S或T，X₅可以是E或Q，X₆可以是R或T，X₇可以是S或T。

【0181】 在本申請中，該參比抗體的H-FR3可包含SEQ ID NO：7或SEQ ID NO：24所示的胺基酸序列。

【0182】 在本申請中，該參比抗體的H-FR4可包含SEQ ID NO：49所示的胺基酸序列。

【0183】 WGX₁GTX₂VTVSS (SEQ ID NO：49)，其中，X₁可以是Q或T，X₂可以是M或T。

【0184】 在本申請中，該參比抗體的H-FR4可包含SEQ ID NO：8或SEQ ID NO：25所示的胺基酸序列。

【0185】 在本申請中，該參比抗體的H-FR1可包含SEQ ID NO：5或SEQ ID NO：22所示的胺基酸序列；該H-FR2可包含SEQ ID NO：6或SEQ ID NO：23所示的胺基酸序列；該H-FR3可包含SEQ ID NO：7或SEQ ID NO：24所示的胺基酸序列；且該H-FR4可包含SEQ ID NO：8或SEQ ID NO：25所示的胺基酸序列。

【0186】 在本申請中，該參比抗體的H-FR1可包含SEQ ID NO：5所示的胺基酸序列；該H-FR2可包含SEQ ID NO：6所示的胺基酸序列；該H-FR3可包含SEQ ID NO：7所示的胺基酸序列；且該H-FR4可包含SEQ ID NO：8所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體8H2D7B3或與其具有相同H-FR1-4的抗體。

【0187】 在本申請中，該參比抗體的H-FR1可包含SEQ ID NO：5所示的胺基酸序列；該H-FR2可包含SEQ ID NO：6所示的胺基酸序列；該H-FR3可包含SEQ ID NO：7所示的胺基酸序列；且該H-FR4可包含SEQ ID NO：8所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體JYB1907hz0或與其具有相同H-FR1-4的抗體。

【0188】 在本申請中，該參比抗體的H-FR1可包含SEQ ID NO：22所示的胺基酸序列；該H-FR2可包含SEQ ID NO：23所示的胺基酸序列；該H-FR3可包含SEQ ID NO：24所示的胺基酸序列；且該H-FR4可包含SEQ ID NO：25所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體JYB1907hz18或與其具有相同H-FR1-4的抗體。

【0189】 在本申請中，該參比抗體可包含重鏈可變區，該重鏈可變區可包含SEQ ID NO：50所示的胺基酸序列。

【0190】 QVQLX₁QSGAEX₂X₃X₄PGX₅SVKX₆SCKASGYTLSNYWMYWVX₇QX₈PX₉QGLEWIGSIAPSDSETHYNQKFX₁₀X₁₁RX₁₂TVTVDKSX₁₃RIVYMX₁₄LSSLX₁₅SEDX₁₆AVYFCARGGFGYGSSHWYFDVWGX₁₇GTX₁₈VTVSS（SEQ ID NO：50），其中，X₁可以是Q或V，X₂可以是L或V，X₃可以是K或V，X₄可以是K或R，X₅可以是A或S，X₆可以是L或V，X₇可以是K或R，X₈可以是A或R，X₉可以是G或I，X₁₀可以是Q或K，X₁₁可以是D或G，X₁₂可以是A或V，X₁₃可以是S或T，X₁₄可以是E或Q，X₁₅可以是R或T，X₁₆可以是S或T，X₁₇可以是Q或T，X₁₈可以是M或T。

【0191】 在本申請中，該參比抗體的重鏈可變區可包含SEQ ID NO：1和SEQ ID NO：21中任一項所示的胺基酸序列。

【0192】 在本申請中，該參比抗體可包含重鏈恆定區，該重鏈恆定區可包括源自IgG的恆定區或源自IgY的恆定區。

【0193】 例如，該參比抗體的重鏈恆定區可包含SEQ ID NO：17所示的胺基酸序列。

【0194】 在本申請中，該參比抗體可包括輕鏈可變區VL，該VL可包含LCDR1、LCDR2和LCDR3。

【0195】 在本申請中，該參比抗體的LCDR3可包含SEQ ID NO：12所示的胺基酸序列。

【0196】 在本申請中，該參比抗體的LCDR2可包含SEQ ID NO：45所示的胺基酸序列。

【0197】 GATSLEX₁ (SEQ ID NO：45)，其中，X₁可以是S或T。

【0198】 在本申請中，該參比抗體的LCDR2可包含SEQ ID NO：11或SEQ ID NO：28所示的胺基酸序列。

【0199】 在本申請中，該參比抗體的LCDR1可包含SEQ ID NO：44所示的胺基酸序列。

【0200】 X₁ASDHINKWLA (SEQ ID NO：44)，其中，X₁可以是K或R。

【0201】 在本申請中，該參比抗體的LCDR1可包含SEQ ID NO：10或SEQ ID NO：27所示的胺基酸序列。

【0202】 例如，本申請所述參比抗體的LCDR1可包含SEQ ID NO：10所示的胺基酸序列；該LCDR2可包含SEQ ID NO：11所示的胺基酸序列；且該LCDR3可包含SEQ ID NO：12所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體8H2D7B3或與其具有相同LCDR1-3的抗體。

【0203】 例如，本申請所述參比抗體的LCDR1可包含SEQ ID NO：10所示的胺基酸序列；該LCDR2可包含SEQ ID NO：11所示的胺基酸序列；且該LCDR3可包含SEQ ID NO：12所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體JYB1907hz0或與其具有相同LCDR1-3的抗體。

【0204】 例如，本申請所述參比抗體的LCDR1可包含SEQ ID NO：27所示的胺基酸序列；該LCDR2可包含SEQ ID NO：28所示的胺基酸序列；且該LCDR3可包含SEQ ID NO：12所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體JYB1907hz18或與其具有相同LCDR1-3的抗體。

【0205】 例如，該參比抗體的VL可包含框架區L-FR1、L-FR2、L-FR3和L-FR4。

【0206】 在本申請中，該參比抗體的L-FR1可包含SEQ ID NO：52所示的胺基酸序列。

【0207】 DIQMTQSX₁X₂X₃LSX₄SX₅GX₆RVTITC (SEQ ID NO：52)，其中，X₁可以是P或S，X₂可以是A或S，X₃可以是T或Y，X₄可以是A或V，X₅可以是L或V，X₆可以是D或G。

【0208】 在本申請中，該參比抗體的L-FR1可包含SEQ ID NO：13或SEQ ID NO：29所示的胺基酸序列。

【0209】 在本申請中，該參比抗體的L-FR2可包含SEQ ID NO：14所示的胺基酸序列。

【0210】 在本申請中，該參比抗體的L-FR3可包含SEQ ID NO：53所示的胺基酸序列。

【0211】 GX₁PSRFSGSGSGKDYTLX₂IX₃X₄LQX₅X₆DX₇ATYYC (SEQ ID NO: 53), 其中, X₁可以是I或V, X₂可以是T或S, X₃可以是T或S, X₄可以是G或S, X₅可以是P或T, X₆可以是D或E, X₇可以是F或V。

【0212】 在本申請中, 該參比抗體的L-FR3可包含SEQ ID NO: 15或SEQ ID NO: 30所示的胺基酸序列。

【0213】 在本申請中, 該參比抗體的L-FR4可包含SEQ ID NO: 54所示的胺基酸序列。

【0214】 FGX₁GTKLEIK (SEQ ID NO: 54), 其中, X₁可以是G或Q。

【0215】 在本申請中, 該參比抗體的L-FR4可包含SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 31所示的胺基酸序列。

【0216】 在本申請中, 該參比抗體的L-FR1可包含SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 29所示的胺基酸序列; 該L-FR2可包含SEQ ID NO: 14所示的胺基酸序列; 該L-FR3可包含SEQ ID NO: 15或SEQ ID NO: 30所示的胺基酸序列; 且該L-FR4可包含SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 31所示的胺基酸序列。

【0217】 在本申請中, 該參比抗體的L-FR1可包含SEQ ID NO: 13所示的胺基酸序列; 該L-FR2可包含SEQ ID NO: 14所示的胺基酸序列; 該L-FR3可包含SEQ ID NO: 15所示的胺基酸序列; 且該L-FR4可包含SEQ ID NO: 16所示的胺基酸序列。例如, 該參比抗體可包括抗體8H2D7B3或與其具有相同L-FR1-4的抗體。

【0218】 在本申請中, 該參比抗體的L-FR1可包含SEQ ID NO: 13所示的胺基酸序列; 該L-FR2可包含SEQ ID NO: 14所示的胺基酸序列; 該L-FR3可包含SEQ ID NO: 15所示的胺基酸序列; 且該L-FR4可包含SEQ ID NO: 16所示的

胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體JYB1907hz0或與其具有相同H-FR1-4的抗體。

【0219】 在本申請中，該參比抗體的L-FR1可包含SEQ ID NO：29所示的胺基酸序列；該L-FR2可包含SEQ ID NO：14所示的胺基酸序列；該L-FR3可包含SEQ ID NO：30所示的胺基酸序列；且該L-FR4可包含SEQ ID NO：31所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體JYB1907hz18或與其具有相同L-FR1-4的抗體。

【0220】 在本申請中，該參比抗體可包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區可包含SEQ ID NO：51所示的胺基酸序列。

【0221】 DIQMTQSX₁X₂X₃LSX₄SX₅GX₆RVTITCX₇ASDHINKWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLEX₈GX₉PSRFSGSGSGKDYTLX₁₀IX₁₁X₁₂LQX₁₃X₁₄DX₁₅ATYYCQQYWTTPYTFGX₁₆GTKLEIK（SEQ ID NO：51），其中，X₁可以是P或S，X₂可以是A或S，X₃可以是T或Y，X₄可以是A或V，X₅可以是L或V，X₆可以是D或G，X₇可以是K或R，X₈可以是S或T，X₉可以是I或V，X₁₀可以是T或S，X₁₁可以是T或S，X₁₂可以是G或S，X₁₃可以是P或T，X₁₄可以是D或E，X₁₅可以是F或V，X₁₆可以是G或Q。

【0222】 在本申請中，該參比抗體的輕鏈可變區可包含SEQ ID NO：9和SEQ ID NO：26中任一項所示的胺基酸序列。

【0223】 在本申請中，該參比抗體可包含輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包括源自Ig κ 的恆定區或源自Ig λ 的恆定區。

【0224】 例如，該參比抗體的輕鏈恆定區包含SEQ ID NO：18中任一項所示的胺基酸序列。

【0225】 在本申請中，該參比抗體可包含HCDR1-3和LCDR1-3。例如，該HCDR1可包含SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO: 3所示的胺基酸序列；該HCDR3可包含SEQ ID NO: 4所示的胺基酸序列；該LCDR1可包括SEQ ID NO: 10所示的胺基酸序列；該LCDR2可包含SEQ ID NO: 11所示的胺基酸序列；該LCDR3可包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體8H2D7B3或與其具有相同HCDR1-3和LCDR1-3的抗原結合蛋白。

【0226】 在本申請中，該參比抗體可包含HCDR1-3以及LCDR1-3。例如，該HCDR1可包含SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO: 3所示的胺基酸序列；該HCDR3可包含SEQ ID NO: 4所示的胺基酸序列；該LCDR1可包括SEQ ID NO: 10所示的胺基酸序列；該LCDR2可包含SEQ ID NO: 11所示的胺基酸序列；該LCDR3可包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體JYB1907hz0或與其具有相同HCDR1-3和LCDR1-3的抗原結合蛋白。

【0227】 在本申請中，該參比抗體可包含HCDR1-3以及LCDR1-3。例如，該HCDR1可包含SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO: 3所示的胺基酸序列；該HCDR3可包含SEQ ID NO: 4所示的胺基酸序列；該LCDR1可包括SEQ ID NO: 27所示的胺基酸序列；該LCDR2可包含SEQ ID NO: 28所示的胺基酸序列；該LCDR3可包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體JYB1907hz18或與其具有相同HCDR1-3和LCDR1-3的抗原結合蛋白。

【0228】 在本申請中，該參比抗體可包含重鏈可變區和輕鏈可變區，該重鏈可變區可包含HCDR1-3以及H-FR1-4，且該輕鏈可變區可包含LCDR1-3以及L-FR1-4。例如，該HCDR1可包含SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO: 3所示的胺基酸序列；該HCDR3可包含SEQ ID NO: 4所示的胺基酸序列；該LCDR1可包括SEQ ID NO: 10所示的胺基酸序列；該LCDR2可包含SEQ ID NO: 11所示的胺基酸序列；該LCDR3可包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。例如，該H-FR1可包含SEQ ID NO: 5所示的胺基酸序列；該H-FR2可包含SEQ ID NO: 6所示的胺基酸序列；該H-FR3可包含SEQ ID NO: 7所示的胺基酸序列；該H-FR4可包含SEQ ID NO: 8所示的胺基酸序列；該L-FR1可包括SEQ ID NO: 13的胺基酸序列；該L-FR2可包含SEQ ID NO: 14所示的胺基酸序列；該L-FR3可包含SEQ ID NO: 15所示的胺基酸序列；該L-FR4可包含SEQ ID NO: 16所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體的重鏈可變區可包含SEQ ID NO: 1所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗原結合片段8H2D7B3或與其具有相同重鏈可變區的抗原結合蛋白。例如，該參比抗體的輕鏈可變區可包含SEQ ID NO: 9所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體8H2D7B3或與其具有相同輕鏈可變區的抗原結合蛋白。

【0229】 在本申請中，該參比抗體包含重鏈和輕鏈，該參比抗體的重鏈可包含SEQ ID NO: 19所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體8H2D7B3或與其具有相同重鏈的抗原結合蛋白。例如，該參比抗體的輕鏈可包含SEQ ID NO: 20所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體8H2D7B3或與其具有相同輕鏈的抗原結合蛋白。

【0230】 在本申請中，該參比抗體可包含重鏈可變區和輕鏈可變區，該重鏈可變區可包含HCDR1-3以及H-FR1-4，且該輕鏈可變區可包含LCDR1-3以及L-FR1-4。例如，該HCDR1可包含SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO: 3所示的胺基酸序列；該HCDR3可包含SEQ ID NO: 4所示的胺基酸序列；該LCDR1可包括SEQ ID NO: 10所示的胺基酸序列；該LCDR2可包含SEQ ID NO: 11所示的胺基酸序列；該LCDR3可包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。例如，該H-FR1可包含SEQ ID NO: 5所示的胺基酸序列；該H-FR2可包含SEQ ID NO: 6所示的胺基酸序列；該H-FR3可包含SEQ ID NO: 7所示的胺基酸序列；該H-FR4可包含SEQ ID NO: 8所示的胺基酸序列；該L-FR1可包括SEQ ID NO: 13的胺基酸序列；該L-FR2可包含SEQ ID NO: 14所示的胺基酸序列；該L-FR3可包含SEQ ID NO: 15所示的胺基酸序列；該L-FR4可包含SEQ ID NO: 16所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體的重鏈可變區可包含SEQ ID NO: 1所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗原結合片段JYB1907hz0或與其具有相同重鏈可變區的抗原結合蛋白。例如，該參比抗體的輕鏈可變區可包含SEQ ID NO: 9所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體JYB1907hz0或與其具有相同輕鏈可變區的抗原結合蛋白。

【0231】 在本申請中，該參比抗體可包含重鏈和輕鏈，該參比抗體的重鏈可包含SEQ ID NO: 19所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體JYB1907hz0或與其具有相同重鏈的抗原結合蛋白。例如，該參比抗體的輕鏈可包含SEQ ID NO: 20所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體JYB1907hz0或與其具有相同輕鏈的抗原結合蛋白。

【0232】 在本申請中，該參比抗體可包含重鏈可變區和輕鏈可變區，該重鏈可變區可包含HCDR1-3以及H-FR1-4，且該輕鏈可變區可包含LCDR1-3以及L-FR1-4。例如，該HCDR1可包含SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO:3所示的胺基酸序列；該HCDR3可包含SEQ ID NO: 4所示的胺基酸序列；該LCDR1可包括SEQ ID NO: 27所示的胺基酸序列；該LCDR2可包含SEQ ID NO: 28所示的胺基酸序列；該LCDR3可包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。例如，該H-FR1可包含SEQ ID NO: 22所示的胺基酸序列；該H-FR2可包含SEQ ID NO: 23所示的胺基酸序列；該H-FR3可包含SEQ ID NO: 24所示的胺基酸序列；該H-FR4可包含SEQ ID NO: 25所示的胺基酸序列；該L-FR1可包括SEQ ID NO: 29的胺基酸序列；該L-FR2可包含SEQ ID NO: 14所示的胺基酸序列；該L-FR3可包含SEQ ID NO: 30所示的胺基酸序列；該L-FR4可包含SEQ ID NO: 31所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體的重鏈可變區可包含SEQ ID NO: 21所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗原結合片段JYB1907hz18或與其具有相同重鏈可變區的抗原結合蛋白。例如，該參比抗體的輕鏈可變區可包含SEQ ID NO: 26所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體JYB1907hz18或與其具有相同輕鏈可變區的抗原結合蛋白。

【0233】 在本申請中，該參比抗體可包含重鏈和輕鏈。例如，該參比抗體的重鏈可包含SEQ ID NO: 32所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體JYB1907hz18或與其具有相同重鏈的抗原結合蛋白。例如，該參比抗體的輕鏈可包含SEQ ID NO: 33所示的胺基酸序列。例如，該參比抗體可包括抗體JYB1907hz18或與其具有相同輕鏈的抗原結合蛋白。

【0234】 在本申請中，該分離的抗原結合蛋白可與人GARP/人TGF- β 1複合物結合。

【0235】 本申請所述分離的抗原結合蛋白可緩解或治療治療腫瘤，其中該腫瘤可包括實體瘤。例如，可包括與GARP的表達相關的腫瘤。例如，該腫瘤可以是轉移性結腸癌。例如，該腫瘤可以是肝細胞癌。例如，該腫瘤可以是晚期腎細胞癌。例如，該腫瘤可以是非小細胞肺癌。例如，該腫瘤可以是黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。例如，該腫瘤可以是黑色素瘤、乳腺癌和/或肺鱗癌。例如，該腫瘤可以是黑色素瘤。

【0236】 在本申請中，該分離的抗原結合蛋白可包含重鏈可變區VH，該VH可包含HCDR1、HCDR2和HCDR3中的至少一個、至少兩個或至少三個。

【0237】 在本申請中，該抗原結合蛋白的HCDR3可包含SEQ ID NO：4所示的胺基酸序列。

【0238】 在本申請中，該抗原結合蛋白的HCDR2可包含SEQ ID NO：3所示的胺基酸序列。

【0239】 在本申請中，該抗原結合蛋白的HCDR1可包含SEQ ID NO：2所示的胺基酸序列。

【0240】 例如，本申請所述分離的抗原結合蛋白的HCDR1可包含SEQ ID NO：2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO：3所示的胺基酸序列；且該HCDR3可包含SEQ ID NO：4所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體8H2D7B3或與其具有相同HCDR1-3的抗體。

【0241】 例如，本申請所述分離的抗原結合蛋白的HCDR1可包含SEQ ID NO：2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO：3所示的胺基酸序列；

且該HCDR3可包含SEQ ID NO：4所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體JYB1907hz0或與其具有相同HCDR1-3的抗體。

【0242】 例如，本申請所述分離的抗原結合蛋白的HCDR1可包含SEQ ID NO：2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO：3所示的胺基酸序列；且該HCDR3可包含SEQ ID NO：4所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體JYB1907hz18或與其具有相同HCDR1-3的抗體。

【0243】 例如，該抗原結合蛋白的VH可包含框架區H-FR1，H-FR2，H-FR3和H-FR4。

【0244】 在本申請中，該抗原結合蛋白的H-FR1可包含SEQ ID NO：46所示的胺基酸序列。

【0245】 QVQLX₁QSGAEX₂X₃X₄PGX₅SVKX₆SCKAS（SEQ ID NO：46），其中，X₁可以是Q或V，X₂可以是L或V，X₃可以是K或V，X₄可以是K或R，X₅可以是A或S，X₆可以是L或V。

【0246】 在本申請中，該抗原結合蛋白的H-FR1可包含SEQ ID NO：5或SEQ ID NO：22所示的胺基酸序列。

【0247】 在本申請中，該抗原結合蛋白的H-FR2可包含SEQ ID NO：47所示的胺基酸序列。

【0248】 WMYWVX₁QX₂PX₃QGLEWIGSI（SEQ ID NO：47），其中，X₁可以是K或R，X₂可以是A或R，X₃可以是G或I。

【0249】 在本申請中，該抗原結合蛋白的H-FR2可包含SEQ ID NO：6或SEQ ID NO：23所示的胺基酸序列。

【0250】 在本申請中，該抗原結合蛋白的H-FR3可包含SEQ ID NO：48所示的胺基酸序列。

【0251】 THYNQKFX₁X₂RX₃TVTVDKSX₄RIVYMX₅LSSLX₆SEDX₇AVYFCAR (SEQ ID NO：48)，其中，X₁可以是Q或K，X₂可以是D或G，X₃可以是A或V，X₄可以是S或T，X₅可以是E或Q，X₆可以是R或T，X₇可以是S或T。

【0252】 在本申請中，該抗原結合蛋白的H-FR3可包含SEQ ID NO：7或SEQ ID NO：24所示的胺基酸序列。

【0253】 在本申請中，該抗原結合蛋白的H-FR4可包含SEQ ID NO：49所示的胺基酸序列。

【0254】 WGX₁GTX₂VTVSS (SEQ ID NO：49)，其中，X₁可以是Q或T，X₂可以是M或T。

【0255】 在本申請中，該抗原結合蛋白的H-FR4可包含SEQ ID NO：8或SEQ ID NO：25所示的胺基酸序列。

【0256】 在本申請中，該抗原結合蛋白的H-FR1可包含SEQ ID NO：5或SEQ ID NO：22所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的H-FR2可包含SEQ ID NO：6或SEQ ID NO：23所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的H-FR3可包含SEQ ID NO：7或SEQ ID NO：24所示的胺基酸序列；且該抗原結合蛋白的H-FR4可包含SEQ ID NO：8或SEQ ID NO：25所示的胺基酸序列。

【0257】 在本申請中，該抗原結合蛋白的H-FR1可包含SEQ ID NO：5所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的H-FR2可包含SEQ ID NO：6所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的H-FR3可包含SEQ ID NO：7所示的胺基酸序列；且該抗

原結合蛋白的H-FR4可包含SEQ ID NO：8所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體8H2D7B3或與其具有相同H-FR1-4的抗體。

【0258】 在本申請中，該抗原結合蛋白的H-FR1可包含SEQ ID NO：5所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的H-FR2可包含SEQ ID NO：6所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的H-FR3可包含SEQ ID NO：7所示的胺基酸序列；且該抗原結合蛋白的H-FR4可包含SEQ ID NO：8所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體JYB1907hz0或與其具有相同H-FR1-4的抗體。

【0259】 在本申請中，該抗原結合蛋白的H-FR1可包含SEQ ID NO：22所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的H-FR2可包含SEQ ID NO：23所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的H-FR3可包含SEQ ID NO：24所示的胺基酸序列；且該抗原結合蛋白的H-FR4可包含SEQ ID NO：25所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體JYB1907hz18或與其具有相同H-FR1-4的抗體。

【0260】 在本申請中，該分離的抗原結合蛋白可包含重鏈可變區，該重鏈可變區可包含SEQ ID NO：50所示的胺基酸序列。

【0261】 QVQLX₁QSGAEX₂X₃X₄PGX₅SVKX₆SCKASGYTSLSNYWMYWVX₇QX₈PX₉QGLEWIGSIAPSDSETHYNQKFX₁₀X₁₁RX₁₂TVTVDKX₁₃RIVYMX₁₄LSSLX₁₅SEDX₁₆AVYFCARGGFGYGSSHWFYFDVWGX₁₇GTX₁₈VTVSS (SEQ ID NO：50)，其中，X₁可以是Q或V，X₂可以是L或V，X₃可以是K或V，X₄可以是K或R，X₅可以是A或S，X₆可以是L或V，X₇可以是K或R，X₈可以是A或R，X₉可以是G或I，X₁₀可以是Q或K，X₁₁可以是D或G，X₁₂可以是A或V，X₁₃可以是S或T，X₁₄可以是E或Q，X₁₅可以是R或T，X₁₆可以是S或T，X₁₇可以是Q或T，X₁₈可以是M或T。

【0262】 在本申請中，該抗原結合蛋白的重鏈可變區可包含SEQ ID NO：1或SEQ ID NO：21所示的胺基酸序列。

【0263】 在本申請中，該分離的抗原結合蛋白可包含重鏈恆定區，該重鏈恆定區可包括源自IgG的恆定區或源自IgY的恆定區。例如，該重鏈恆定區可包括源自人IgG1和或IgG4的恆定區。

【0264】 例如，該抗原結合蛋白的輕鏈恆定區可包含SEQ ID NO：17所示的胺基酸序列。

【0265】 在本申請中，該分離的抗原結合蛋白可包括輕鏈可變區VL，該VL可包含LCDR1、LCDR2和LCDR3。

【0266】 在本申請中，該抗原結合蛋白的LCDR3可包含SEQ ID NO：12所示的胺基酸序列。

【0267】 在本申請中，該抗原結合蛋白的LCDR2可包含SEQ ID NO：45所示的胺基酸序列。

【0268】 $GATSLEX_1$ (SEQ ID NO：45)，其中， X_1 可以是S或T。

【0269】 在本申請中，該抗原結合蛋白的LCDR2可包含SEQ ID NO：11或SEQ ID NO：28所示的胺基酸序列。

【0270】 在本申請中，該抗原結合蛋白的LCDR1可包含SEQ ID NO：44所示的胺基酸序列。

【0271】 $X_1ASDHINKWLA$ (SEQ ID NO：44)，其中， X_1 可以是K或R。

【0272】 在本申請中，該抗原結合蛋白的LCDR1可包含SEQ ID NO：10或SEQ ID NO：27所示的胺基酸序列。

【0273】 例如，該抗原結合蛋白的LCDR1可包含SEQ ID NO：10所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的LCDR2可包含SEQ ID NO：11所示的胺基酸序列；且該抗原結合蛋白的LCDR3可包含SEQ ID NO：12所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體8H2D7B3或與其具有相同LCDR1-3的抗體。

【0274】 例如，該抗原結合蛋白的LCDR1可包含SEQ ID NO：10所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的LCDR2可包含SEQ ID NO：11所示的胺基酸序列；且該抗原結合蛋白的LCDR3可包含SEQ ID NO：12所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體JYB1907hz0或與其具有相同LCDR1-3的抗體。

【0275】 例如，該抗原結合蛋白的LCDR1可包含SEQ ID NO：27所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的LCDR2可包含SEQ ID NO：28所示的胺基酸序列；且該抗原結合蛋白的LCDR3可包含SEQ ID NO：12所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體JYB1907hz18或與其具有相同LCDR1-3的抗體。

【0276】 例如，該抗原結合蛋白的VL可包含框架區L-FR1、L-FR2、L-FR3和L-FR4。

【0277】 在本申請中，該抗原結合蛋白的L-FR1可包含SEQ ID NO：52所示的胺基酸序列。

【0278】 DIQMTQ₁SX₁X₂X₃LSX₄SX₅GX₆RVTITC (SEQ ID NO：52)，其中，X₁可以是P或S，X₂可以是A或S，X₃可以是T或Y，X₄可以是A或V，X₅可以是L或V，X₆可以是D或G。

【0279】 在本申請中，該抗原結合蛋白的L-FR1可包含SEQ ID NO：13或SEQ ID NO：29所示的胺基酸序列。

【0280】 在本申請中，該抗原結合蛋白的L-FR2可包含SEQ ID NO：14所示的胺基酸序列。

【0281】 在本申請中，該抗原結合蛋白的L-FR3可包含SEQ ID NO：53所示的胺基酸序列。

【0282】 $GX_1PSRFSGSGSGKDYTLX_2IX_3X_4LQX_5X_6DX_7ATYYC$ (SEQ ID NO：53)，其中， X_1 可以是I或V， X_2 可以是T或S， X_3 可以是T或S， X_4 可以是G或S， X_5 可以是P或T， X_6 可以是D或E， X_7 可以是F或V。

【0283】 在本申請中，該抗原結合蛋白的L-FR3可包含SEQ ID NO：15或SEQ ID NO：30所示的胺基酸序列。

【0284】 在本申請中，該抗原結合蛋白的L-FR4可包含SEQ ID NO：54所示的胺基酸序列。

【0285】 $FGX_1GTKLEIK$ (SEQ ID NO：54)，其中， X_1 可以是G或Q。

【0286】 在本申請中，該抗原結合蛋白的L-FR4可包含SEQ ID NO：16或SEQ ID NO：31所示的胺基酸序列。

【0287】 在本申請中，該抗原結合蛋白的L-FR1可包含SEQ ID NO：13或SEQ ID NO：29所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的L-FR2可包含SEQ ID NO：14所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的L-FR3可包含SEQ ID NO：15或SEQ ID NO：30所示的胺基酸序列；且該抗原結合蛋白的L-FR4可包含SEQ ID NO：16或SEQ ID NO：31所示的胺基酸序列。

【0288】 在本申請中，該抗原結合蛋白的L-FR1可包含SEQ ID NO：13所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的L-FR2可包含SEQ ID NO：14所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的L-FR3可包含SEQ ID NO：15所示的胺基酸序列；且該抗原結合蛋白的L-FR4可包含SEQ ID NO：16所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體8H2D7B3或與其具有相同L-FR1-4的抗體。

【0289】 在本申請中，該抗原結合蛋白的L-FR1可包含SEQ ID NO：13所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的L-FR2可包含SEQ ID NO：14所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的L-FR3可包含SEQ ID NO：15所示的胺基酸序列；且該抗原結合蛋白的L-FR4可包含SEQ ID NO：16所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體JYB1907hz0或與其具有相同H-FR1-4的抗體。

【0290】 在本申請中，該抗原結合蛋白的L-FR1可包含SEQ ID NO：29所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的L-FR2可包含SEQ ID NO：14所示的胺基酸序列；該抗原結合蛋白的L-FR3可包含SEQ ID NO：30所示的胺基酸序列；且該抗原結合蛋白的L-FR4可包含SEQ ID NO：31所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體JYB1907hz18或與其具有相同L-FR1-4的抗體。

【0291】 在本申請中，該分離的抗原結合蛋白可包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區可包含SEQ ID NO：51所示的胺基酸序列。

【0292】 DIQMTQSX₁X₂X₃LSX₄SX₅GX₆RVTITCX₇ASDHINKWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLEX₈GX₉PSRFSGSGSGKDYTLX₁₀IX₁₁X₁₂LQX₁₃X₁₄DX₁₅ATYYCQQYWTTPYTFGX₁₆GTKLEIK (SEQ ID NO：51)，其中，X₁可以是P或S，X₂可以是A或S，X₃可以是T或Y，X₄可以是A或V，X₅可以是L或V，X₆可以是D或G，X₇可以是K或R，X₈可以是S或T，X₉可以是I或V，X₁₀可以是T或S，X₁₁可以是T或S，X₁₂

可以是G或S，X₁₃可以是P或T，X₁₄可以是D或E，X₁₅可以是F或V，X₁₆可以是G或Q。

【0293】 在本申請中，該抗原結合蛋白的輕鏈可變區可包含SEQ ID NO：9和SEQ ID NO：26中任一項所示的胺基酸序列。

【0294】 在本申請中，該分離的抗原結合蛋白可包含輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包括源自Ig κ 的恆定區或源自Ig λ 的恆定區。

【0295】 例如，該抗原結合蛋白的輕鏈恆定區包含SEQ ID NO：18所示的胺基酸序列。

【0296】 在本申請中，該分離的抗原結合蛋白可包含HCDR1-3和LCDR1-3。例如，該HCDR1可包含SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO: 3所示的胺基酸序列；該HCDR3可包含SEQ ID NO: 4所示的胺基酸序列；該LCDR1可包括SEQ ID NO: 10所示的胺基酸序列；該LCDR2可包含SEQ ID NO: 11所示的胺基酸序列；該LCDR3可包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體8H2D7B3或與其具有相同HCDR1-3和LCDR1-3的抗原結合蛋白。

【0297】 在本申請中，該分離的抗原結合蛋白可包含HCDR1-3和LCDR1-3。例如，該HCDR1可包含SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO: 3所示的胺基酸序列；該HCDR3可包含SEQ ID NO: 4所示的胺基酸序列；該LCDR1可包括SEQ ID NO: 10所示的胺基酸序列；該LCDR2可包含SEQ ID NO: 11所示的胺基酸序列；該LCDR3可包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體JYB1907hz0或與其具有相同HCDR1-3和LCDR1-3的抗原結合蛋白。

【0298】 在本申請中，該分離的抗原結合蛋白可包含HCDR1-3和LCDR1-3。例如，該HCDR1可包含SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO: 3所示的胺基酸序列；該HCDR3可包含SEQ ID NO: 4所示的胺基酸序列；該LCDR1可包括SEQ ID NO: 27所示的胺基酸序列；該LCDR2可包含SEQ ID NO: 28所示的胺基酸序列；該LCDR3可包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體JYB1907hz18或與其具有相同HCDR1-3和LCDR1-3的抗原結合蛋白。

【0299】 在本申請中，該分離的抗原結合蛋白可包含重鏈可變區和輕鏈可變區，該重鏈可變區可包含HCDR1-3以及H-FR1-4，且該輕鏈可變區可包含LCDR1-3以及L-FR1-4。例如，該HCDR1可包含SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO: 3所示的胺基酸序列；該HCDR3可包含SEQ ID NO: 4所示的胺基酸序列；該LCDR1可包括SEQ ID NO: 10所示的胺基酸序列；該LCDR2可包含SEQ ID NO: 11所示的胺基酸序列；該LCDR3可包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。例如，該H-FR1可包含SEQ ID NO: 5所示的胺基酸序列；該H-FR2可包含SEQ ID NO: 6所示的胺基酸序列；該H-FR3可包含SEQ ID NO: 7所示的胺基酸序列；該H-FR4可包含SEQ ID NO: 8所示的胺基酸序列；該L-FR1可包括SEQ ID NO: 13的胺基酸序列；該L-FR2可包含SEQ ID NO: 14所示的胺基酸序列；該L-FR3可包含SEQ ID NO: 15所示的胺基酸序列；該L-FR4可包含SEQ ID NO: 16所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合片段的重鏈可變區可包含SEQ ID NO: 1所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗原結合片段8H2D7B3或與其具有相同重鏈可變區的抗原結合蛋白。例如，該分離的抗原結合蛋白的輕鏈可變區可包含SEQ ID NO: 9所示的胺基酸序列。例如，

該分離的抗原結合蛋白可包括抗體8H2D7B3或與其具有相同輕鏈可變區的抗原結合蛋白。

【0300】 在本申請中，該分離的抗原結合蛋白可包含重鏈和輕鏈。例如，該分離的抗原結合蛋白的重鏈可包含SEQ ID NO: 19所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體8H2D7B3或與其具有相同重鏈的抗原結合蛋白。例如，該分離的抗原結合蛋白的輕鏈可包含SEQ ID NO: 20所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體8H2D7B3或與其具有相同輕鏈的抗原結合蛋白。

【0301】 在本申請中，該分離的抗原結合蛋白可包含重鏈可變區和輕鏈可變區，該重鏈可變區可包含HCDR1-3以及H-FR1-4，且該輕鏈可變區可包含LCDR1-3以及L-FR1-4。例如，該HCDR1可包含SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO: 3所示的胺基酸序列；該HCDR3可包含SEQ ID NO: 4所示的胺基酸序列；該LCDR1可包括SEQ ID NO: 10所示的胺基酸序列；該LCDR2可包含SEQ ID NO: 11所示的胺基酸序列；該LCDR3可包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。例如，該H-FR1可包含SEQ ID NO: 5所示的胺基酸序列；該H-FR2可包含SEQ ID NO: 6所示的胺基酸序列；該H-FR3可包含SEQ ID NO: 7所示的胺基酸序列；該H-FR4可包含SEQ ID NO: 8所示的胺基酸序列；該L-FR1可包括SEQ ID NO: 13的胺基酸序列；該L-FR2可包含SEQ ID NO: 14所示的胺基酸序列；該L-FR3可包含SEQ ID NO: 15所示的胺基酸序列；該L-FR4可包含SEQ ID NO: 16所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白的重鏈可變區可包含SEQ ID NO: 1所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗原結合片段JYB1907hz0或與其具有相同重鏈可變區的抗原結合蛋白。例如，該分離

的抗原結合蛋白的輕鏈可變區可包含SEQ ID NO: 9所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體JYB1907hz0或與其具有相同輕鏈可變區的抗原結合蛋白。

【0302】 在本申請中，該分離的抗原結合蛋白可包含重鏈和輕鏈。例如，該分離的抗原結合蛋白的重鏈可包含SEQ ID NO: 19所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體JYB1907hz0或與其具有相同重鏈的抗原結合蛋白。例如，該分離的抗原結合蛋白的輕鏈可包含SEQ ID NO: 20所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體JYB1907hz0或與其具有相同輕鏈的抗原結合蛋白。

【0303】 在本申請中，該分離的抗原結合蛋白可包含重鏈可變區和輕鏈可變區，該重鏈可變區可包含HCDR1-3以及H-FR1-4，且該輕鏈可變區可包含LCDR1-3以及L-FR1-4。例如，該HCDR1可包含SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO: 3所示的胺基酸序列；該HCDR3可包含SEQ ID NO: 4所示的胺基酸序列；該LCDR1可包括SEQ ID NO: 27所示的胺基酸序列；該LCDR2可包含SEQ ID NO: 28所示的胺基酸序列；該LCDR3可包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。例如，該H-FR1可包含SEQ ID NO: 22所示的胺基酸序列；該H-FR2可包含SEQ ID NO: 23所示的胺基酸序列；該H-FR3可包含SEQ ID NO: 24所示的胺基酸序列；該H-FR4可包含SEQ ID NO: 25所示的胺基酸序列；該L-FR1可包括SEQ ID NO: 29的胺基酸序列；該L-FR2可包含SEQ ID NO: 14所示的胺基酸序列；該L-FR3可包含SEQ ID NO: 30所示的胺基酸序列；該L-FR4可包含SEQ ID NO: 31所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白的重鏈可變區可包含SEQ ID NO: 21所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包

括抗原結合片段JYB1907hz18或與其具有相同重鏈可變區的抗原結合蛋白。例如，該分離的抗原結合蛋白的輕鏈可變區可包含SEQ ID NO: 26所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體JYB1907hz18或與其具有相同輕鏈可變區的抗原結合蛋白。

【0304】 在本申請中，該分離的抗原結合蛋白可包含重鏈和輕鏈。例如，該分離的抗原結合蛋白的重鏈可包含SEQ ID NO: 32所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體JYB1907hz18或與其具有相同重鏈的抗原結合蛋白。例如，該分離的抗原結合蛋白的輕鏈可包含SEQ ID NO: 33所示的胺基酸序列。例如，該分離的抗原結合蛋白可包括抗體JYB1907hz18或與其具有相同輕鏈的抗原結合蛋白。

【0305】 多肽和免疫綴合物

【0306】 另一方面，本申請提供了一種或多種多肽，其可包含本申請的分離的抗原結合蛋白。

【0307】 另一方面，本申請提供了一種或多種免疫綴合物，該免疫綴合物可包含本申請的分離的抗原結合蛋白。在某些實施方式中，該免疫綴合物還可包含藥學上可接受的治療劑。

【0308】 在本申請中，該治療劑可以是細胞毒性劑，也可以是細胞抑制劑。例如，該治療劑可以選自以下組：有絲分裂抑制劑、激酶抑制劑、烷基化試劑、抗代謝藥、嵌入抗生素、生長因子抑制劑、細胞週期抑制劑、酶、拓撲異構酶抑制劑、組蛋白脫乙酰基酶抑制劑、抗存活劑、生物學應答調節劑。

【0309】 核酸、載體和細胞

【0310】 另一方面，本申請還提供了分離的一種或多種核酸分子，該一種或多種核酸分子可編碼本申請所述分離的抗原結合蛋白。例如，該一種或多種核酸分子中的每一個核酸分子可以編碼完整的該抗原結合蛋白，也可以編碼其中的一部分（例如，HCDR1-3、重鏈可變區中的一種或多種）。

【0311】 本申請所述的核酸分子可以為分離的。例如，其可以是藉由以下方法產生或合成的：（i）在體外擴增的，例如藉由聚合酶鏈式反應（PCR）擴增產生的，（ii）藉由選殖重組產生的，（iii）純化的，例如藉由酶切和凝膠電泳分級分離，或者（iv）合成的，例如藉由化學合成。例如，該分離的核酸可以是藉由重組DNA技術製備的核酸分子。

【0312】 在本申請中，可以藉由本領域已知的多種方法來製備編碼該分離的抗原結合蛋白的核酸，這些方法包括但不限於，採用逆轉錄PCR和PCR獲得本申請所述分離的抗原結合蛋白的核酸分子。

【0313】 另一方面，本申請提供了一種或多種載體，其包含本申請所述的一種或多種核酸分子。每種載體中可包含一種或多種該核酸分子。此外，該載體中還可包含其他基因，例如允許在適當的宿主細胞中和在適當的條件下選擇該載體的標記基因。此外，該載體還可包含允許編碼區在適當宿主中正確表達的表達控制元件。這樣的控制元件為所屬技術領域具有通常知識者所熟知的，例如，可包括啟動子、核糖體結合位點、增強子和調節基因轉錄或mRNA翻譯的其他控制元件等。在某些實施方式中，該表達控制序列為可調的元件。該表達控制序列的具體結構可根據物種或細胞類型的功能而變化，但通常包含分別參與轉錄和翻譯起始的5' 非轉錄序列和5' 及3' 非翻譯序列，例如TATA盒、加帽序列、CAAT序列等。例如，5' 非轉錄表達控制序列可包含啟動子

區，啟動子區可包含用於轉錄控制功能性連接核酸的啟動子序列。該表達控制序列還可包括增強子序列或上游活化子序列。在本申請中，適當的啟動子可包括，例如用於SP6、T3和T7聚合酶的啟動子、人U6RNA啟動子、CMV啟動子及其人工雜合啟動子（如CMV），其中啟動子的某部分可與其他細胞蛋白（如人GAPDH，甘油醛-3-磷酸脫氫酶）基因啟動子的某部分融合，其可包含或不包含另外的內含子。本申請所述的一種或多種核酸分子可以與該表達控制元件可操作地連接。

【0314】 該載體可以包括，例如質粒、黏粒、病毒、噬菌體或者在例如遺傳工程中通常使用的其他載體。例如，該載體可為表達載體。例如，該載體可為病毒載體。可以將病毒載體直接給予至患者（體內）或可以藉由間接的形式，例如，在體外使用病毒處理細胞，然後將處理過的細胞給予至患者（離體）。病毒載體技術在本領域中是公知的，並在例如Sambrook等

（2001 ,Molecular Cloning:A Laboratory Manual ,Cold Spring Harbor Laboratory ,New York）和其他病毒學和分子生物學手冊中進行了描述。常規的基於病毒的系統可以包括用於基因轉移的逆轉錄病毒載體、慢病毒載體、腺病毒載體、腺相關病毒載體以及單純疱疹病毒載體。在某些情形中，可以用逆轉錄病毒、慢病毒和腺相關病毒的方法將基因轉移整合進宿主基因組中，使插入的基因長期表達。慢病毒載體是能夠轉導或感染非分裂細胞並典型地產生較高病毒效價的逆轉錄病毒載體。慢病毒載體可包含長末端重複序列5' LTR和截短的3' LTR、RRE、rev應答元件（cPPT）、中央終止序列（CTS）和/或翻譯後調控元件（WPRE）。本申請所述的載體可以被引入細胞。

【0315】 另一方面，本申請提供了一種細胞。該細胞可包含本申請所述的分離的抗原結合蛋白、所述的多肽、所述的免疫綴合物、一種或多種核酸分子和/或本申請所述的一種或多種載體。例如，每種或每個細胞可包含一個或一種本申請所述的核酸分子或載體。例如，每種或每個細胞可包含多個（例如，2個或以上）或多種（例如，2種或以上）本申請所述的核酸分子或載體。例如，可將本申請所述的載體引入該宿主細胞中，例如原核細胞（例如，細菌細胞）、CHO細胞、NS/O細胞、HEK293T細胞、293F細胞或HEK293A細胞，或者其他真核細胞，如來自植物的細胞、真菌或酵母細胞等。可藉由本領域已知的方法將本申請所述的載體引入該宿主細胞中，例如電穿孔、lipofectine轉染、lipofectamin轉染等。例如，該細胞可以包括酵母細胞。例如，該細胞可以包括大腸桿菌細胞。例如，該細胞可以包括哺乳動物細胞。例如，該細胞可以包括免疫細胞。

【0316】 該細胞可以包括免疫細胞。在某些情形中，該細胞可以包括免疫細胞。例如，該細胞可包括T細胞、B細胞、天然殺傷（NK）細胞、巨噬細胞、NKT細胞、單核細胞、樹突狀細胞、粒細胞、淋巴細胞、白細胞和/或外周血單個核細胞。

【0317】 醫藥組成物和藥物組合

【0318】 另一方面，本申請提供了一種醫藥組成物。該醫藥組成物可包含本申請所述的分離的抗原結合蛋白、所述的多肽、所述的免疫綴合物、所述分離的核酸分子、所述的載體、所述的細胞，和/或藥學上可接受的佐劑和/或賦形劑。在本申請中，該藥學上可接受的佐劑可以包括緩衝劑、抗氧化劑、防腐劑、低分子量多肽、蛋白質、親水聚合物、胺基酸、糖、螯合劑、反離子、

金屬複合物和/或非離子表面活性劑。除非與本申請所述的細胞不相容，否則任何常規介質或試劑均可以考慮用於本申請的醫藥組成物中。在本申請中，該藥學上可接受的賦形劑可以包括在藥物製劑中除主藥以外的附加物，也可稱為輔料。例如，該賦形劑可以包括片劑中的黏合劑、填充劑、崩解劑、潤滑劑。例如，該賦形劑可以包括中藥丸劑中的酒、醋、藥汁等。例如，該賦形劑可以包括半固體製劑軟膏劑、霜劑中的基質部分。例如，該賦形劑可以包括液體製劑中的防腐劑、抗氧劑、矯味劑、芳香劑、助溶劑、乳化劑、增溶劑、滲透壓調節劑、著色劑。

【0319】 另一方面，本申請提供了一種藥物組合，其包含該分離的抗原結合蛋白和免疫檢查點抑制劑。

【0320】 在本申請中，該免疫檢查點抑制劑可包括抑制PD-1/PD-L1相互作用的物質。例如，該免疫檢查點抑制劑可選自下組：PD-1/PD-L1阻斷劑、PD-1拮抗劑、PD-L1拮抗劑、PD-1抑制劑和PD-L1抑制劑。

【0321】 例如，該PD-1/PD-L1阻斷劑可選自下組：BMS202 (PD-1/PD-L1抑制劑2)、BMS-1(PD-1/PD-L1抑制劑1)、PD-1/PD-L1抑制劑3、BMS-1166和BMS-1001。

【0322】 例如，該PD-1抑制劑可包括抗PD-1抗體。例如，該PD-L1抑制劑可包括PD-L1抗體。

【0323】 例如，該抗PD-1抗體可選自下組：Nivolumab（納武單抗）、Pembrolizumab（派姆單抗）、Camrelizumab（卡瑞利珠單抗）、Toripalimab（特瑞普利單抗）、Sintilimab（信迪利單抗）和Tislelizumab（替雷利珠單抗）。例

如，該抗PD-L1抗體可選自下組：Durvalumab（德瓦魯單抗）、Atezolizumab（阿替利珠單抗）和avelumab（阿維單抗）。

【0324】 在本申請中，該抗PD-L1抗體可包含選自下組的抗體的HCDR3：Durvalumab（德瓦魯單抗）、Atezolizumab（阿替利珠單抗）和avelumab（阿維單抗）。

【0325】 在本申請中，該抗PD-L1抗體可包含選自下組的抗體的HCDR2：Durvalumab（德瓦魯單抗）、Atezolizumab（阿替利珠單抗）和avelumab（阿維單抗）。

【0326】 在本申請中，該抗PD-L1抗體可包含選自下組的抗體的HCDR1：Durvalumab（德瓦魯單抗）、Atezolizumab（阿替利珠單抗）和avelumab（阿維單抗）。

【0327】 在本申請中，該抗PD-L1抗體可包含選自下組的抗體的LCDR3：Durvalumab（德瓦魯單抗）、Atezolizumab（阿替利珠單抗）和avelumab（阿維單抗）。

【0328】 在本申請中，該抗PD-L1抗體可包含選自下組的抗體的LCDR2：Durvalumab（德瓦魯單抗）、Atezolizumab（阿替利珠單抗）和avelumab（阿維單抗）。

【0329】 在本申請中，該抗PD-L1抗體可包含選自下組的抗體的LCDR1：Durvalumab（德瓦魯單抗）、Atezolizumab（阿替利珠單抗）和avelumab（阿維單抗）。

【0330】 在本申請中，該抗PD-L1抗體可包含選自下組的抗體的VH：
Durvalumab（德瓦魯單抗）、Atezolizumab（阿替利珠單抗）和avelumab（阿維單抗）。

【0331】 在本申請中，該抗PD-L1抗體可包含選自下組的抗體的VL：
Durvalumab（德瓦魯單抗）、Atezolizumab（阿替利珠單抗）和avelumab（阿維單抗）。在本申請中，該抗PD-L1抗體可包含HCDR3，該HCDR3可包含SEQ ID NO：37所示的胺基酸序列。

【0332】 在本申請中，該抗PD-L1抗體包含HCDR2，該HCDR2包含SEQ ID NO：36所示的胺基酸序列。

【0333】 在本申請中，該抗PD-L1抗體包含HCDR1，該HCDR1包含SEQ ID NO：35所示的胺基酸序列。

【0334】 在本申請中，該抗PD-L1抗體包含重鏈可變區VH，該VH包含HCDR1、HCDR2和HCDR3，該HCDR3包含SEQ ID NO：37所示的胺基酸序列；該HCDR2包含SEQ ID NO：36所示的胺基酸序列；以及該HCDR1包含SEQ ID NO：35所示的胺基酸序列。例如，抗體可包括阿替利珠單抗或與其具有相同HCDR1-3的抗體。

【0335】 在本申請中，該抗PD-L1抗體可包含重鏈可變區VH，該VH可包含SEQ ID NO：34所示的胺基酸序列。

【0336】 在本申請中，該抗PD-L1抗體可包含LCDR3，該LCDR3可包含SEQ ID NO：41所示的胺基酸序列。

【0337】 在本申請中，該抗PD-L1抗體可包含LCDR2，該LCDR2可包含SEQ ID NO：40所示的胺基酸序列。

【0338】 在本申請中，該抗PD-L1抗體可包含LCDR1，該LCDR1可包含SEQ ID NO：39所示的胺基酸序列。

【0339】 在本申請中，該抗PD-L1抗體可包含輕鏈可變區VL，該VL可包含LCDR1、LCDR2和LCDR3，該LCDR3可包含SEQ ID NO：41所示的胺基酸序列；該LCDR2可包含SEQ ID NO：40所示的胺基酸序列；以及該LCDR1可包含SEQ ID NO：39所示的胺基酸序列。例如，抗體可包括阿替利珠單抗或與其具有相同LCDR1-3的抗體。

【0340】 在本申請中，該抗PD-L1抗體可包含輕鏈可變區VL，該VL可包含SEQ ID NO：38所示的胺基酸序列。

【0341】 在本申請中，該抗PD-L1抗體可包含重鏈和輕鏈，該重鏈可包含HCDR1-3以及H-FR1-4，且該輕鏈可包含LCDR1-3以及L-FR1-4。例如，該HCDR1可包含SEQ ID NO: 35所示的胺基酸序列；該HCDR2可包含SEQ ID NO: 36所示的胺基酸序列；該HCDR3可包含SEQ ID NO: 37所示的胺基酸序列；該LCDR1可包括SEQ ID NO: 39所示的胺基酸序列；該LCDR2可包含SEQ ID NO: 40所示的胺基酸序列；該LCDR3可包含SEQ ID NO: 41所示的胺基酸序列。例如，該抗PD-L1抗體可包括阿替利珠單抗或與其具有相同HCDR1-3和LCDR1-3的抗原結合蛋白。例如，該抗PD-L1抗體的重鏈可變區可包含SEQ ID NO: 34所示的胺基酸序列。例如，該抗PD-L1抗體可包括阿替利珠單抗或與其具有相同重鏈可變區的抗原結合蛋白。例如，該抗PD-L1抗體的輕鏈可變區可包含SEQ ID NO: 38所示的胺基酸序列。例如，該抗PD-L1抗體可包括阿替利珠單抗或與其具有相同輕鏈可變區的抗原結合蛋白。例如，該抗PD-L1抗體的重鏈可包含SEQ ID NO: 42所示的胺基酸序列。例如，該抗PD-L1抗體可包括阿替利珠單抗或與其具有相

同重鏈的抗原結合蛋白。例如，該抗PD-L1抗體的輕鏈可包含SEQ ID NO: 43所示的胺基酸序列。例如，該抗PD-L1抗體可包括阿替利珠單抗或與其具有相同輕鏈的抗原結合蛋白。

【0342】 試劑盒、用途和方法

【0343】 另一方面，本申請提供了一種試劑盒，其包含所述的藥物組合。

【0344】 另一方面，本申請提供了分離的抗原結合蛋白、所述的多肽、所述的免疫綴合物、所述分離的核酸分子、所述的載體、所述的醫藥組成物用於預防、緩解和/或治療腫瘤。

【0345】 例如，該腫瘤可包括實體瘤。例如，該腫瘤可包括與GARP的蛋白表達相關的腫瘤。例如，該腫瘤可以是轉移性結腸癌。例如，該腫瘤可以是肝細胞癌。例如，該腫瘤可以是晚期腎細胞癌。例如，該腫瘤可以是非小細胞肺癌。例如，該腫瘤可以是黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0346】 另一方面，在本申請中，該試劑盒和/或該藥物組合用於預防、緩解和/或治療腫瘤。

【0347】 例如，該腫瘤可包括實體瘤。例如，該腫瘤可包括與GARP的蛋白表達相關的腫瘤。例如，該腫瘤可以是轉移性結腸癌。例如，該腫瘤可以是肝細胞癌。例如，該腫瘤可以是晚期腎細胞癌。例如，該腫瘤可以是非小細胞肺癌。例如，該腫瘤可以是黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0348】 另一方面，本申請提供了一種所述的分離的抗原結合蛋白、所述的多肽、所述的免疫綴合物、所述的分離的核酸分子、所述的載體、所述的

細胞和/或所述的醫藥組成物在製備藥物中的用途，該藥物用於預防、緩解和/或治療腫瘤。

【0349】 例如，該腫瘤可包括實體瘤。例如，該腫瘤可包括與GARP的蛋白表達相關的腫瘤。例如，該腫瘤可以是轉移性結腸癌。例如，該腫瘤可以是肝細胞癌。例如，該腫瘤可以是晚期腎細胞癌。例如，該腫瘤可以是非小細胞肺癌。例如，該腫瘤可以是黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0350】 另一方面，本申請提供了一種藥物組合和/或試劑盒在製備藥物中的用途，該藥物用於預防、緩解和/或治療腫瘤。

【0351】 例如，該腫瘤可包括實體瘤。例如，該腫瘤可包括與GARP的蛋白表達相關的腫瘤。例如，該腫瘤可以是轉移性結腸癌。例如，該腫瘤可以是肝細胞癌。例如，該腫瘤可以是晚期腎細胞癌。例如，該腫瘤可以是非小細胞肺癌。例如，該腫瘤可以是黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0352】 另一方面，本申請提供了一種預防和/或治療疾病或病症的方法，其包括向有需要的受試者施用該分離的抗原結合蛋白、該分離的核酸分子、該載體，該細胞、該醫藥組成物，其中該疾病或病症包括腫瘤。

【0353】 另一方面，本申請提供了一種預防和/或治療疾病或病症的方法，其包括向有需要的受試者施用該藥物組合，其中該疾病或病症包括腫瘤。

【0354】 例如，該腫瘤可包括實體瘤。例如，該腫瘤可包括與GARP的蛋白表達相關的腫瘤。例如，該腫瘤可以是轉移性結腸癌。例如，該腫瘤可以是肝細胞癌。例如，該腫瘤可以是晚期腎細胞癌。例如，該腫瘤可以是非小細胞肺癌。例如，該腫瘤可以是黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0355】 本申請所述醫藥組成物、藥物組合及方法可與其他類型的癌症療法結合使用，諸如化學療法、手術、放射、基因療法等。本申請中所描述的醫藥組成物及方法可用於其他依賴於免疫反應的疾病病狀，諸如炎症、免疫疾病及感染性疾病。

【0356】 在本申請中，該受試者可以包括人或非人動物。例如，該非人動物可以選自下組：猴、雞、鵝、貓、狗、小鼠和大鼠。此外，非人動物也可以包括任何除人以外的動物物種，例如家畜動物，或齧齒類動物，或靈長類動物，或家養動物，或家禽動物。該人可以是高加索人、非洲人、亞洲人、閃族人，或其他種族，或各種種族的雜合體。又例如，該人可以是老年、成年、青少年、兒童或者嬰兒。

【0357】 可以根據在實驗動物中的有效量推測在人類中的有效量。例如，Freireich等人描述了動物和人的劑量的相互關係（基於每平方米身體表面的毫克數）（Freireich et al., Cancer Chemother. Rep. 50, 219 (1966)）。身體表面積可以從患者的身高和體重近似確定。參見例如Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, N.Y., 537 (1970)。

【0358】 不欲被任何理論所限，下文中的實施例僅僅是為了闡釋本申請的融合蛋白、製備方法和用途等，而不用於限制本申請發明的範圍。

【0359】 實施方案

【0360】 1. 分離的抗原結合蛋白，其具有下述性質中的一種或多種：

【0361】 a) 在Octet測定中，以約 $1.0E-12$ 或更低的 K_D 值與人GARP/人TGF- β 1複合物結合；

【0362】 b) 不與只表達人GARP的細胞或只表達人TGF- β 1的細胞結合；

【0363】 c) 抑制Treg細胞中的SMAD2磷酸化；

【0364】 d) 抑制表達人GARP/人TGF- β 1的HEK293T細胞釋放TGF- β 1；

【0365】 e) 阻止Treg細胞對人外周血單個核細胞（PBMC）釋放IL-2和IFN- γ 的抑制；

【0366】 f) 在人PBMC移植小鼠的GvHD模型中，阻斷Treg細胞對該人PBMC引起的GvHD的抑制作用。

【0367】 2. 根據實施方案1所述的分離的抗原結合蛋白，其包含HCDR3，該HCDR3包含SEQ ID NO: 4所示的胺基酸序列。

【0368】 3. 根據實施方案1或2所述的分離的抗原結合蛋白，其包含HCDR2，該HCDR2包含SEQ ID NO: 3所示的胺基酸序列。

【0369】 4 根據實施方案1至3中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含HCDR1，該HCDR1包含SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列。

【0370】 5. 根據實施方案1至4中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含重鏈可變區VH，該VH包含該HCDR1、該HCDR2和該HCDR3，該HCDR3包含SEQ ID NO: 4所示的胺基酸序列；該HCDR2包含SEQ ID NO: 3所示的胺基酸序列；以及該HCDR1包含SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列。

【0371】 6. 根據實施方案1至5中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含H-FR1，該H-FR1的C末端與該HCDR1的N末端直接或間接地相連，且該H-FR1包含SEQ ID NO: 46所示的胺基酸序列。

【0372】 7. 根據實施方案6所述的分離的抗原結合蛋白，其中該H-FR1包含SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 22中任一項所示的胺基酸序列。

【0373】 8. 根據實施方案1至7中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含H-FR2，該H-FR2位於該HCDR1與該HCDR2之間，且該H-FR2包含SEQ ID NO: 47所示的胺基酸序列。

【0374】 9. 根據實施方案8所述的分離的抗原結合蛋白，其中該H-FR2包含SEQ ID NO: 6和SEQ ID NO: 23中任一項所示的胺基酸序列。

【0375】 10. 根據實施方案1至9中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含H-FR3，該H-FR3位於該HCDR2與該HCDR3之間，且該H-FR3包含SEQ ID NO: 48所示的胺基酸序列。

【0376】 11. 根據實施方案10所述的分離的抗原結合蛋白，其中該H-FR3包含SEQ ID NO: 7和SEQ ID NO: 24中任一項所示的胺基酸序列。

【0377】 12. 根據實施方案1至11中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含H-FR4，該H-FR4的N末端與該HCDR3的C末端直接或間接地相連，且該H-FR4包含SEQ ID NO: 49所示的胺基酸序列。

【0378】 13. 根據實施方案12所述的分離的抗原結合蛋白，其中該H-FR4包含SEQ ID NO: 8和SEQ ID NO: 25中任一項所示的胺基酸序列。

【0379】 14. 根據實施方案1至13中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含H-FR1，H-FR2，H-FR3和H-FR4，該H-FR1包含SEQ ID NO: 46所示的胺基酸序列；該H-FR2包含SEQ ID NO: 47所示的胺基酸序列；該H-FR3包含SEQ ID NO: 48所示的胺基酸序列；以及該H-FR4包含SEQ ID NO: 49所示的胺基酸序列。

【0380】 15. 根據實施方案1至14中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含H-FR1，H-FR2，H-FR3和H-FR4，該H-FR1包含SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 22中任一項所示的胺基酸序列；該H-FR2包含SEQ ID NO: 6和SEQ ID NO: 23中任

一項所示的胺基酸序列；該H-FR3包含SEQ ID NO: 7和SEQ ID NO: 24中任一項所示的胺基酸序列；以及該H-FR4包含SEQ ID NO: 8和SEQ ID NO: 25中任一項所示的胺基酸序列。

【0381】 16. 根據實施方案15所述的分離的抗原結合蛋白，其中該H-FR1、H-FR2、H-FR3和H-FR4包含選自下述任意一組的胺基酸序列：

【0382】 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；

【0383】 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。

【0384】 17. 根據實施方案1至16中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含重鏈可變區VH，該VH包含SEQ ID NO: 50所示的胺基酸序列。

【0385】 18. 根據實施方案17所述的分離的抗原結合蛋白，其中該VH包含SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 21中任一項所示的胺基酸序列。

【0386】 19. 根據實施方案1至18中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含LCDR3，該LCDR3包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。

【0387】 20. 根據實施方案1至19中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含LCDR2，該LCDR2包含SEQ ID NO: 45所示的胺基酸序列。

【0388】 21. 根據實施方案1至20中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含LCDR2，該LCDR2包含SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 28中任一項所示的胺基酸序列。

【0389】 22. 根據實施方案1至21中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含LCDR1，該LCDR1包含SEQ ID NO: 44所示的胺基酸序列。

【0390】 23. 根據實施方案1至22中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含LCDR1，該LCDR1包含SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO: 27中任一項所示的胺基酸序列。

【0391】 24. 根據實施方案1至23中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含輕鏈可變區VL，該VL包含該LCDR1、該LCDR2和該LCDR3，該LCDR3包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列；該LCDR2包含SEQ ID NO: 45所示的胺基酸序列；以及該LCDR1包含SEQ ID NO: 44所示的胺基酸序列。

【0392】 25. 根據實施方案1至24中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含輕鏈可變區VL，該VL包含該LCDR1、該LCDR2和該LCDR3，該LCDR3包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列；該LCDR2包含SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 28中任一項所示的胺基酸序列；以及該LCDR1包含SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO: 27中任一項所示的胺基酸序列。

【0393】 26. 根據實施方案25所述的分離的抗原結合蛋白，其中該LCDR1、LCDR2、LCDR3包含選自下述任意一組的胺基酸序列：

【0394】 a) LCDR1：SEQ ID NO: 10，LCDR2：SEQ ID NO: 11和LCDR3：SEQ ID NO: 12；

【0395】 b) LCDR1：SEQ ID NO: 27，LCDR2：SEQ ID NO: 28和LCDR3：SEQ ID NO: 12。

【0396】 27. 根據實施方案1至26中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含L-FR1，該L-FR1的C末端與該LCDR1的N末端直接或間接地相連，且該L-FR1包含SEQ ID NO: 52所示的胺基酸序列。

【0397】 28. 根據實施方案27所述的分離的抗原結合蛋白，其中該L-FR1包含SEQ ID NO: 13和SEQ ID NO: 29中任一項所示的胺基酸序列。

【0398】 29. 根據實施方案1至28中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含L-FR2，該L-FR2位於該LCDR1與該LCDR2之間，且該L-FR2包含SEQ ID NO: 14所示的胺基酸序列。

【0399】 30. 根據實施方案1至29中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含L-FR3，該L-FR3位於該LCDR2與該LCDR3之間，且該L-FR3包含SEQ ID NO: 53所示的胺基酸序列。

【0400】 31. 根據實施方案30所述的分離的抗原結合蛋白，其中該L-FR3包含SEQ ID NO: 15和SEQ ID NO: 30中任一項所示的胺基酸序列。

【0401】 32. 根據實施方案1至31中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含L-FR4，該L-FR4的N末端與該LCDR3的C末端直接或間接地相連，且該L-FR4包含SEQ ID NO: 54所示的胺基酸序列。

【0402】 33. 根據實施方案32所述的分離的抗原結合蛋白，其中該L-FR4包含SEQ ID NO: 16和SEQ ID NO: 31中任一項所示的胺基酸序列。

【0403】 34. 根據實施方案1至33中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含L-FR1，L-FR2，L-FR3和L-FR4，該L-FR1包含SEQ ID NO: 52所示的胺基酸序列；該L-FR2包含SEQ ID NO: 14所示的胺基酸序列；該L-FR3包含SEQ ID NO: 53所示的胺基酸序列；以及該L-FR4包含SEQ ID NO: 54所示的胺基酸序列。

【0404】 35. 根據實施方案1至34中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含L-FR1，L-FR2，L-FR3和L-FR4，該L-FR1包含SEQ ID NO: 13和SEQ ID NO: 29中任一項所示的胺基酸序列；該L-FR2包含SEQ ID NO: 14中任一項所示的胺

基酸序列；該L-FR3包含SEQ ID NO: 15和SEQ ID NO: 30中任一項所示的胺基酸序列；以及該L-FR4包含SEQ ID NO: 16和SEQ ID NO: 31中任一項所示的胺基酸序列。

【0405】 36. 根據實施方案35所述的分離的抗原結合蛋白，其中該L-FR1、L-FR2、L-FR3和L-FR4包含選自下述任意一組的胺基酸序列：

【0406】 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；

【0407】 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。

【0408】 37. 根據實施方案1至36中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含輕鏈可變區VL，該VL包含SEQ ID NO: 51所示的胺基酸序列。

【0409】 38. 根據實施方案1至37中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含輕鏈可變區VL，該VL包含SEQ ID NO: 9和SEQ ID NO: 26中任一項所示的胺基酸序列。

【0410】 39. 根據實施方案1至38中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含重鏈恆定區，且該重鏈恆定區包括源自IgG的恆定區或源自IgY的恆定區。

【0411】 40. 根據實施方案39所述的分離的抗原結合蛋白，其中該重鏈恆定區包括源自人IgG4的恆定區。

【0412】 41. 根據實施方案39或40所述的分離的抗原結合蛋白，其中該重鏈恆定區包含SEQ ID NO: 17所示的胺基酸序列。

【0413】 42. 根據實施方案1至41中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含輕鏈恆定區，且該抗體輕鏈恆定區包括源自Ig κ 的恆定區或源自Ig λ 的恆定區。

【0414】 43. 根據實施方案42所述的分離的抗原結合蛋白，其中該輕鏈恆定區包括源自人Ig κ 的恆定區。

【0415】 44. 根據實施方案42或43所述的分離的抗原結合蛋白，其中該輕鏈恆定區包含SEQ ID NO: 18中任一項所示的胺基酸序列。

【0416】 45. 根據實施方案1至44中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含重鏈HC，該HC包含SEQ ID NO: 19和SEQ ID NO: 32中任一項所示的胺基酸序列。

【0417】 46. 根據實施方案1至45中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含輕鏈LC，該LC包含SEQ ID NO: 20和SEQ ID NO: 33中任一項所示的胺基酸序列。

【0418】 47. 根據實施方案1至46中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含HC和LC，該HC包含SEQ ID NO: 19和SEQ ID NO: 32中任一項所示的胺基酸序列，且該LC包含SEQ ID NO: 20和SEQ ID NO: 33中任一項所示的胺基酸序列。

【0419】 48. 根據實施方案47所述的分離的抗原結合蛋白，其中該HC和LC包含選自下述任意一組的胺基酸序列：

【0420】 a) HC：SEQ ID NO: 19和LC：SEQ ID NO: 20；

【0421】 b) HC：SEQ ID NO: 32和LC：SEQ ID NO: 33。

【0422】 49. 根據實施方案1至-48中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包括抗體或其抗原結合片段。

【0423】 50. 根據實施方案49所述的分離的抗原結合蛋白，其中該抗原結合片段包括Fab，Fab'，F(ab)2，Fv片段，F(ab')2，scFv，di-scFv，VHH和/或dAb。

【0424】 51. 根據實施方案49或50所述的分離的抗原結合蛋白，其中該抗體選自下組：單株抗體、單鏈抗體、鼠源抗體、嵌合抗體、人源化抗體和全人源抗體。

【0425】 52. 多肽，其包含實施方案1至51中任一項所述的分離的抗原結合蛋白。

【0426】 53. 免疫綴合物，其包含實施方案1至51中任一項所述的分離的抗原結合蛋白或實施方案52所述的多肽。

【0427】 54. 根據實施方案53所述的免疫綴合物，其還包括藥學上可接受的治療劑。

【0428】 55. 根據實施方案54所述的免疫綴合物，其中該治療劑選自下組：細胞毒性劑和細胞抑制劑。

【0429】 56. 分離的核酸分子，其編碼實施方案1至51中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，或者實施方案52所述的多肽。

【0430】 57. 載體，其包含實施方案56所述的分離的核酸分子。

【0431】 58. 細胞，其包含實施方案1至51中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，實施方案52所述的多肽，實施方案53至55中任一項所述的免疫綴合物，實施方案56所述的分離的核酸分子和/或實施方案57所述的載體。

【0432】 59. 製備實施方案1至51中任一項所述的分離的抗原結合蛋白或實施方案52所述的多肽的方法，該方法包括在使得實施方案1至51中任一項所述的

分離的抗原結合蛋白或實施方案52所述的多肽表達的條件下，培養根據實施方案58所述的細胞。

【0433】 60. 醫藥組成物，其包含實施方案1至51中任一項所述的分離的抗原結合蛋白、實施方案52所述的多肽、實施方案53至55中任一項所述的免疫綴合物、實施方案56所述的分離的核酸分子、實施方案57所述的載體、實施方案58所述的細胞，和/或藥學上可接受的佐劑和/或賦形劑。

【0434】 61. 藥物組合，其包含實施方案1至51中任一項所述的分離的抗原結合蛋白和免疫檢查點抑制劑。

【0435】 62. 根據實施方案61所述的藥物組合，其中該免疫檢查點抑制劑包括抑制PD-1/PD-L1相互作用的物質。

【0436】 63. 根據實施方案61或62所述的藥物組合，其中該免疫檢查點抑制劑選自下組：PD-1/PD-L1阻斷劑、PD-1拮抗劑、PD-L1拮抗劑、PD-1抑制劑和PD-L1抑制劑。

【0437】 64. 根據實施方案61至63中任一項所述的藥物組合，其中該免疫檢查點抑制劑包括抗PD-L1抗體。

【0438】 65. 根據實施方案64所述的藥物組合，其中該抗PD-L1抗體包含HCDR3，該HCDR3包含SEQ ID NO: 37所示的胺基酸序列。

【0439】 66. 根據實施方案64或65所述的藥物組合，其中該抗PD-L1抗體包含HCDR2，該HCDR2包含SEQ ID NO: 36所示的胺基酸序列。

【0440】 67. 根據實施方案64至66中任一項所述的藥物組合，其中該抗PD-L1抗體包含HCDR1，該HCDR1包含SEQ ID NO: 35所示的胺基酸序列。

【0441】 68. 根據實施方案64至67中任一項所述的藥物組合，其中該抗PD-L1抗體包含重鏈可變區VH，該VH包含HCDR1、HCDR2和HCDR3，該HCDR3包含SEQ ID NO: 37所示的胺基酸序列；該HCDR2包含SEQ ID NO: 36所示的胺基酸序列；以及該HCDR1包含SEQ ID NO: 35所示的胺基酸序列。

【0442】 69. 根據實施方案64至68中任一項所述的藥物組合，其中該抗PD-L1抗體包含重鏈可變區VH，該VH包含SEQ ID NO: 34所示的胺基酸序列。

【0443】 70. 根據實施方案64至69中任一項所述的藥物組合，其中該抗PD-L1抗體包含LCDR3，該LCDR3包含SEQ ID NO: 41所示的胺基酸序列。

【0444】 71. 根據實施方案64至70中任一項所述的藥物組合，其中該抗PD-L1抗體包含LCDR2，該LCDR2包含SEQ ID NO: 40所示的胺基酸序列。

【0445】 72. 根據實施方案64至71中任一項所述的藥物組合，其中該抗PD-L1抗體包含LCDR1，該LCDR1包含SEQ ID NO: 39所示的胺基酸序列。

【0446】 73. 根據實施方案64至72中任一項所述的藥物組合，其中該抗PD-L1抗體包含輕鏈可變區VL，該VL包含LCDR1、LCDR2和LCDR3，該LCDR3包含SEQ ID NO: 41所示的胺基酸序列；該LCDR2包含SEQ ID NO: 40所示的胺基酸序列；以及該LCDR1包含SEQ ID NO: 39所示的胺基酸序列。

【0447】 74. 根據實施方案64至73中任一項所述的藥物組合，其中該抗PD-L1抗體包含輕鏈可變區VL，該VL包含SEQ ID NO: 38所示的胺基酸序列。

【0448】 75. 根據實施方案64至74中任一項所述的藥物組合，其中該抗PD-L1抗體包括阿替利珠單抗。

【0449】 76. 根據實施方案61至75中任一項所述的藥物組合，其可以是醫藥組成物。

【0450】 77. 一種試劑盒，其包含實施方案61至76中任一項所述的藥物組合。

【0451】 78. 實施方案1至51中任一項所述的分離的抗原結合蛋白、實施方案52所述的多肽、實施方案53至55中任一項所述的免疫綴合物、實施方案56所述的分離的核酸分子、實施方案57所述的載體，實施方案58所述的細胞和/或實施方案60中任一項所述的醫藥組成物，其用於預防、緩解和/或治療腫瘤。

【0452】 79. 根據實施方案78所述的用途，其中該腫瘤包括實體瘤。

【0453】 80. 根據實施方案78或79所述的用途，其中該腫瘤包括與GARP的蛋白表達相關的腫瘤。

【0454】 81. 根據實施方案78至80中任一項所述的用途，其中該腫瘤包括黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0455】 82. 實施方案61至76中任一項所述的藥物組合和/或實施方案77所述的試劑盒，其用於預防、緩解和/或治療腫瘤。

【0456】 83. 根據實施方案82所述的用途，其中該腫瘤包括實體瘤。

【0457】 84. 根據實施方案82或83所述的用途，其中該腫瘤包括與GARP的表達相關的腫瘤。

【0458】 85. 根據實施方案82至84中任一項所述的用途，其中該腫瘤包括黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0459】 86. 實施方案1至51中任一項所述的分離的抗原結合蛋白、實施方案52所述的多肽、實施方案53至55中任一項所述的免疫綴合物、實施方案56所述的分離的核酸分子、實施方案57所述的載體，實施方案58所述的細胞和/或實

施方案60所述的醫藥組成物在製備藥物中的用途，該藥物用於預防、緩解和/或治療腫瘤。

【0460】 87. 根據實施方案86所述的用途，其中該腫瘤包括實體瘤。

【0461】 88. 根據實施方案86或87所述的用途，其中該腫瘤包括與GARP的表達相關的腫瘤。

【0462】 89. 根據實施方案86-88中任一項該用途，其中該腫瘤包括黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0463】 90. 實施方案61至76中任一項所述的藥物組合和/或實施方案77所述的試劑盒在製備藥物中的用途，該藥物用於預防、緩解和/或治療腫瘤。

【0464】 91. 根據實施方案90所述的用途，其中該腫瘤包括實體瘤。

【0465】 92. 根據實施方案90或91所述的用途，其中該腫瘤包括與GARP的表達相關的腫瘤。

【0466】 93. 根據實施方案90至92中任一項所述的用途，其中該腫瘤包括黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0467】 94. 一種預防和/或治療疾病或病症的方法，其包括向有需要的受試者施用有效量的實施方案1至51中任一項所述的分離的抗原結合蛋白、實施方案52所述的多肽、實施方案53至55中任一項所述的免疫綴合物、實施方案56所述的分離的核酸分子、實施方案57所述的載體，實施方案58所述的細胞、實施方案60所述的醫藥組成物，其中該疾病或病症包括腫瘤。

【0468】 95. 根據實施方案94所述的方法，其中該腫瘤包括實體瘤。

【0469】 96. 根據實施方案94或95所述的用途，其中該腫瘤包括與GARP的表達相關的腫瘤。

【0470】 97. 根據實施方案94至96中任一項所述的方法，其中該腫瘤包括黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0471】 98. 一種預防和/或治療疾病或病症的方法，其包括向有需要的受試者施用有效量的實施方案61至76中任一項所述的藥物組合，其中該疾病或病症包括腫瘤。

【0472】 99. 根據實施方案98所述的方法，其中該腫瘤包括實體瘤。

【0473】 100. 根據實施方案98或99所述的方法，其中該腫瘤包括與GARP的表達相關的腫瘤。

【0474】 101. 根據實施方案98至100中任一項所述的方法，其中該腫瘤包括黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【0475】 實施例

【0476】 實施例1 重組質粒製備及免疫細胞株構建

【0477】 人GARP（記為hGARP）全長胺基酸序列（Uniprot#Q14392）與人Latent TGF- β （記為hTGF- β 1）全長胺基酸序列（Uniprot#P01137）經密碼子優化，合成的DNA序列按已建立的分子生物學方法分別被選殖到載體pLVX-IRES.puro和pLVX-IRES.G418中，構建好的重組質粒藉由慢病毒包裝，感染293F細胞，經抗生素加壓篩選，挑單株得到過表達hGARP/hTGF- β 1的293F-hGARP/hTGF- β 1單株重組細胞株，經流式抗人GARP抗體（Enzo life science，ALX-804-867FI-0100）和抗人TGF- β 1抗體（R&D Systems，FAB2463A）染色，流式細胞儀上機檢測，結果如表1所示，挑取表達量高的293F-hGARP/hTGF- β 1單株重組細胞株做免疫。類似方法用於CHOK1-hGARP/hTGF- β 1，293T-hGARP和293T-hTGF- β 1單株重組細胞株的製備，用於單株抗體的篩選和鑑定。

【0478】表1 293F-hGARP/hTGF- β 1單株重組細胞株的流式檢測結果

株號	平均熒光強度 (MFI)			
	同型對照- FITC	抗人GARP抗體- FITC	同型對照- APC	抗LAP (TGF- β 1)抗體- APC
2F4	101	8368	90	149969
2D3	103	6963	103	141919

【0479】實施例2 鼠抗人GARP單株抗體的製備

【0480】2.1 免疫

【0481】用293F-hGARP/hTGF- β 1單株重組細胞株2F4和2D3分別免疫Balb/c, SJL小鼠3-4次， $3-5 \times 10^6$ 細胞/隻，間隔時間2-3週，第三次免疫後第七天採血，為免疫後血清。用CHOK1-hGARP/hTGF- β 1和空細胞CHOK1檢測免疫後血清的流式細胞結合程度，計算CHOK1-hGARP/hTGF- β 1和空細胞CHOK1流式結合平均熒光強度的比值，比值較高的小鼠用於融合。融合前三天，用 $3-5 \times 10^6$ 細胞/隻的293F-hGARP/hTGF- β 1單株重組細胞株衝擊免疫小鼠。

【0482】2.2 融合

【0483】融合當天，小鼠安樂死後，解剖、取脾、研磨並收集細胞，1500rpm，5min離心，收集細胞，用5毫升紅細胞裂解液懸浮細胞，4度放置5分鐘，用DMEM+10%FBS終止反應，計數。離心後用40mlDMEM懸浮細胞，靜置2~3min後轉移上清到另外一個50毫升離心管中。收集SP2/0細胞，按SP2/0:脾細胞=1:5的比例混合，離心，充分吸取上清後，拍鬆，混合細胞沉澱，用DMEM洗滌混合細胞兩次，依照常規方法進行PEG融合或者電融合後，用DMEM培養

基洗滌細胞並將其重新懸浮於DMEM+10%FBS+1xHAT的篩選培養基中。將融合後的細胞加入96孔細胞培養板內，置37°C、濕度75%、5%CO₂培養箱內培養9~10天。

【0484】 2.3 篩選及亞選殖，抗體純化

【0485】 用流式檢測96孔細胞培養板中的融合瘤上清對CHOK1-hGARP/hTGF- β 1細胞的結合活性。

【0486】 CHOK1-hGARP/hTGF- β 1單株重組細胞株在T-75細胞培養瓶中擴大培養至90%匯合度，吸盡培養基，用PBS緩衝液（購自Invitrogen）洗滌2次，然後用無酶細胞解離液（Versene solution，15040066，購自Life technology公司）處理和收集細胞。用PBS緩衝液洗滌細胞2次，進行細胞計數後將細胞用PBS緩衝液稀釋至 2×10^6 細胞每毫升，加入FACS緩衝液（含有2% FBS的PBS），室溫孵育15分鐘，然後用PBS緩衝液離心洗滌2次。將收集的細胞用FACS緩衝液懸浮至 3×10^6 細胞/mL。按每孔100微升加入到96孔FACS反應板中，加入96孔細胞培養板中的融合瘤上清每孔100微升，4°C孵育1小時。離心後，棄上清，加入每孔100微升熒光（Alexa 488）標記的二抗（購自Invitrogen），4°C孵育1小時。用FACS緩衝液離心洗滌3次，加入每孔100微升固定液[4%（v/v）多聚甲醛]懸浮細胞，10分鐘後用FACS緩衝液離心洗滌2次。用30微升FACS緩衝液懸浮細胞，用流式細胞儀intellicyte plus（購自Sartorius公司）檢測和分析結果。

【0487】 陽性的融合瘤上清對應的細胞株轉至24孔細胞培養板繼續培養2-4天後，24孔細胞培養板中的融合瘤上清（對應的細胞株名稱：8H2）用於檢測與CHOK1-hGARP/hTGF- β 1細胞的結合活性，結果如下表2所示。從24孔細胞培養板中挑取陽性細胞進行亞選殖及亞選殖篩選，直至得到穩定的可分泌結合

CHOK1-hGARP/hTGF- β 1的融合瘤單株抗體細胞株8H2D7B3，並採用常規無血清培養基進行50毫升小規模生產，常規protein A柱純化得到純化單株抗體做後續鑑定。

【0488】 表2 融合瘤上清與CHOK1-hGARP/hTGF- β 1細胞的結合活性的檢測結果

株名稱	平均熒光強度/ CHOK1-hGARP/hTGF- β 1
8H2	2418591.5

【0489】 2.4 輕重鏈可變區胺基酸序列測定

【0490】 離心搜集 5×10^7 個融合瘤細胞8H2D7B3，常規Trizol法提取總RNA。逆轉錄反應後得到的cDNA藉由末端轉移酶進行加G反應，後用VH，VK引子和polyC引子擴增含可變區序列的DNA，做T-A株，測序後進行抗體序列分析。

【0491】 實施例3 鼠抗人GARP單株抗體的鑑定

【0492】 3.1 流式鑑定鼠抗人GARP單株抗體結合293F細胞，293F-hGARP細胞，293F-hTGF- β 1細胞和293F-hGARP/hTGF- β 1複合物的功能。

【0493】 細胞計數後300g離心5min丟棄上清，用1xPBS重新懸浮清洗細胞，300g離心5min，棄上清，然後用2% FBS的FACS buffer重新懸浮調成密度 1×10^6 /mL。細胞鋪板 1×10^5 /孔， 100μ L/孔， 4°C ，0.5h，離心300g，5min，棄上清。加待測抗體（2%FBS的FACS buffer配置） 15μ g/mL開始，1：5梯度稀釋，7個梯度， 0μ g/mL為對照， 100μ L/孔，吹打混勻， 4°C ，1h，300g離心5min，棄上清。加 200μ L/孔的1xPBS，重新懸浮細胞混勻，300g離心5min，棄上清，重複二遍。加二抗 Alexa 488（donkey anti-mouse IgG（H+L），lot：2018296，Thermo

Fisher) 使用2% FBS的FACS buffer 1 : 1000配製, 100 μ L/well, 4°C, 避光1h。加200 μ L/孔的1 \times PBS, 重新懸浮細胞混勻, 300g離心5min, 棄上清, 重複二遍。2% FBS的FACS buffer重新懸浮, FACS機器讀值。利用軟體作圖並計算EC50。其中, MHG8為陽性對照, 鼠IgG1 (mIgG1) 為同型對照。結果如圖1A至圖1D所示: 圖1A表示待測抗體與293F細胞的結合, 圖1B表示待測抗體與293F-hGARP細胞的結合, 圖1C表示待測抗體與293F-hTGF- β 1細胞, 圖1D表示待測抗體與293F-hGARP/hTGF- β 1複合物的, 表明鼠源抗體8H2D7B3僅與293F-hGARP/hTGF- β 1複合物結合。

【0494】 3.2 流式檢測鼠抗人GARP單株抗體阻斷MHG8 (抗人GARP抗體) 與293F-hGARP/hTGF- β 1複合物結合功能

【0495】 細胞計數300g離心5min丟棄上清, 用1 \times PBS重新懸浮清洗細胞, 300g離心5min, 棄上清, 然後2%FBS的FACS buffer重新懸浮調成密度1e6/mL。細胞鋪板1e5/孔, 100 μ L/孔, 4°C, 0.5h, 300g離心5min, 棄上清。加競爭抗體MHG8 with alexa488 (lot : 1905151702, 1.39mg/mL) 終濃度30 μ g/mL, 每孔50 μ L, 加待測抗體 (2%FBS的FACS buffer配置) 30 μ g/mL開始, 1 : 5梯度稀釋, 7個梯度, 0 μ g/mL為對照, 100 μ L/孔, 吹打混勻, 4°C, 1h, 300g離心5min, 棄上清。加200 μ L/孔的1 \times PBS, 重新懸浮細胞混勻, 300g離心5min, 棄上清, 重複二遍。加二抗 Alexa 488 (donkey anti-mouse IgG (h+L), lot : 2018296, Thermo Fisher), 使用2%FBS的FACS buffer 1 : 1000配製, 100 μ L/well, 4°C, 避光1h。加200 μ L/well的1 \times PBS, 重新懸浮細胞混勻, 300g離心5min, 棄上清, 重複二遍。2% FBS的FACS buffer重新懸浮, FACS機器讀值。利用軟體作圖並計算EC50。其中, MHG8為陽性對照, 鼠IgG1 (mIgG1) 為

99416 第 78 頁, 共 93 頁(發明說明書)

同型對照。結果如圖2所示，鼠源抗體8H2D7B3可阻斷MHG8與293F-hGARP/hTGF- β 1複合物的結合。

【0496】 3.3 Western blot和Alpha Elisa測定純化後鼠抗人GARP單株抗體抑制Treg細胞中的SMAD2磷酸化

【0497】 新鮮的PBMC細胞購至ALLCELLS公司，先將PBMC細胞400g離心10min，然後用1% FBS（Thermo Fisher，10099-141）和50mmol EDTA（ThermoFisher，15400054）的1×PBS培養基（Thermo Fisher，10010049）重新懸浮。PBMC進行Treg細胞提取參考Treg提取試劑盒(Miltenyi, Cat：130-091-301)操作步驟進行。Treg細胞抗體處理：Treg體外擴增14天，收集細胞計數， 1.5×10^6 個Treg細胞去除磁珠並用於陰性對照。24孔板每孔 1×10^6 /mL鋪板，每孔1mL。待測抗體加入24孔板，濃度 $25 \mu\text{g/mL}$ 。37°C，二氧化碳培養箱培養36h。

【0498】 Alpha Elisa檢測：離心收集細胞，加入 $50 \mu\text{L}$ 的Lysis buffer，裂解30min。1300rpm離心5min， $10 \mu\text{L}$ 上清用於Alpha Elisa檢測（PerkinElmer，ALSU-PSM2-A500）。

【0499】 Western Blot檢測：離心收集細胞，加入 $50 \mu\text{L}$ 的Lysis buffer，裂解30min。1300rpm離心5min， $10 \mu\text{L}$ 上清用於Western blot檢測。結果如圖3A及圖3B所示：圖3A表示待測抗體抑制Treg細胞中的SMAD2磷酸化的Western blot檢測結果，圖3B表示待測抗體抑制Treg細胞中的SMAD2磷酸化的Alpha Elisa檢測信號值，表明鼠源抗體與陽性對照抗TGF- β 1和MHG8類似，均能抑制Treg細胞中SMAD2蛋白的磷酸化。

【0500】 藉由結合、阻斷等功能鑒定，選擇8H2D7B3作為鼠源候選抗體並進行人源化。

【0501】 測得鼠抗人GARP單株抗體8H2D7B3可變區序列如下：

【0502】 >8H2D7B3 VH

【0503】 QVQLQQSGAELVRPGSSVKLSCKASGYTLSNYWMYWVKQRPIQ
GLEWIGSIAPSDSETHYNQKFKDRATVTVDKSSRIVYMQLSSLTSEDSAVYFCARG
GFGYGSSHWYFDVWGTGTTVTVSS

【0504】 >8H2D7B3 VL

【0505】 DIQMTQSSAYLSVSLGGRVTTTCKASDHINKWLAWYQQKPGNAP
RLISGATSLETGIPSRFSGSGSGKDYTLTITGLQTEDVATYYCQQYWTTTPYTFGGG
TKLEIK

【0506】 鼠抗人GARP單株抗體8H2D7B3的重鏈及輕鏈CDR區如表3所示。

【0507】 表3 鼠抗人GARP單株抗體8H2D7B3的重鏈及輕鏈CDR區

重鏈		輕鏈	
HCDR1	GYTLSNY	LCDR1	KASDHINKWLA
HCDR2	APSDSE	LCDR2	GATSLET
HCDR3	GFGYGSSHWYFDV	LCDR3	QQYWTTTPYT

【0508】 實施例4 鼠抗人GARP單株抗體的人源化

【0509】 4.1 藉由序列比對挑選與鼠抗人GARP單株抗體8H2D7B3最同源的人Germline抗體(數據來源：IMGT)做為人源化設計框架(輕鏈以IGKV3D-15*01或IGKV1-5*03，IGKJ2*02或IGKJ4*02為框架，重鏈以IGHV3-7*03或IGHV1-46*03，IGHJ3*01，為框架)，對抗體輕重鏈可變區進行Chothia編號[Chothia & Lesk, 1987],定義抗體CDR區：CDRL1 (L24-L34)，CDRL2 (L50-L56)，CDRL3

(L89-L97) , CDRH1 (H26-H32) , CDRH2(H52-H56) , CDRH3(H95-H97) , 根據序列比對和可變區結構信息對抗體輕重鏈可變區胺基酸進行人源化突變。

【0510】 4.2 Germline抗體序列信息

【0511】 IGKV3D-15*01 :

【0512】 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPR
LLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWP

【0513】 IGKV1-5*03 :

【0514】 DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTTCRASQSISWVLAHWYQQKPGKAPK
LLIYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYS

【0515】 IGHV3-7*03 :

【0516】 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKG
LEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

【0517】 IGHV1-46*03 :

【0518】 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFSSYMHWRQAPGQ
GLEWMGIINPSGGSTSYAQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAR

【0519】 IGKJ2*02 :

【0520】 CTFGQGTKLEIK

【0521】 IGKJ4*02 :

【0522】 LTFGGGTKVEIK

【0523】 IGHJ3*01 :

【0524】 DAFDVWGQGTMVTVSS

【0525】 4.3設計表達載體，基因合成，哺乳細胞表達純化重組抗體，比較人源化抗體和嵌合抗體活性，理化性質的差異，進行1-2輪人源化優化，輕重鏈均以上述Germline抗體為框架CDR移植的人源化序列進行優化設計。得到的嵌合抗體命名為JYB1907hz0，人源化抗體命名為JYB1907hz18。

【0526】 4.4 人源化抗體表達和純化

【0527】 抗體工程優化設計序列後，全長JYB1907hz18輕重鏈蛋白質序列分別進行密碼子優化，基因合成密碼子優化後DNA片段（Genscript），株合成後基因片段到表達載體pcDNA3.4（Life Technologies）。表達質粒擴增和質粒抽提後雙質粒共轉ExpiCHO 細胞(ThermoFisher Scientific, A29133)，根據供應商ExpiCHO表達系統方法進行抗體瞬轉表達，大致過程如下：在培養總體積25ml培養基中，36.5°C，8%二氧化碳濃度下培養ExpiCHO細胞到密度 6×10^6 /mL，使用ExpiFectamine轉染試劑各轉10 μ g抗體輕重鏈表達質粒到細胞；轉染一天後，各取150 μ L和4mL ExpiCHO增強劑和ExpiCHO輔料添加到培養細胞中，繼續培養至9天，4°C，3500轉離心取上清。混合AmMag™ Protein A磁珠（Genscript，L00695）和抗體表達上清，室溫孵育2小時，PBS洗滌兩次棄上清，加入適量沖提緩衝液Protein G or A Sefinose™ Elution buffer（Sangon, C600481），充分混勻後置於試管架上靜止孵育5分鐘，孵育期間重新懸浮磁珠2~3次，重複沖提2次，沖提後，立即加入適量中和液1M Tris-HCl, pH7.5(Sangon, B548124)中和備用。

【0528】 4.5 純化後的人源化抗體的親和力檢測

【0529】 4.5.1 採用Octet RED96e（Fortebio）測定JYB1907hz18與hGARP/hTGF- β 1複合物（愷佶，貨號：GAR-HM4TG）的親和力，1907Hz18與hGARP/hTGF- β 1複合物均用1xPBST（1xPBS：生工，B548117-0500；0.02%吐溫99416

20 : Sigma , P1379) 稀釋, hGARP/hTGF- β 1複合物的起始濃度為100nM, 3倍梯度稀釋, JYB1907hz18使用濃度為33.3nM。

【0530】 4.5.2 樣品上機檢測 (Octet Data Acquisition 11.1.0.11) : 首先, 將樣品加入96孔板 (Greiner bio-one, 655209), 體系為200 μ L/well。然後設置軟體參數, 板溫設定為30°C, 收集標準動力學信號的頻率為5.0 HZ。接著, 用1xPBST預濕AHC傳感器 (Fortébio, 貨號: 18-0015) 10分鐘, 然後上機檢測。每個循環包含以下步驟: 1) 浸入緩衝液60 s; 2) 檢測抗原 (hGARP/hTGF- β 1複合物) 是否與傳感器有非特異性結合; 3) 10 mM pH1.7的甘胺酸溶液再生; 4) 浸入緩衝液60 s; 5) 抗體 (JYB1907hz18) 固化在傳感器上, 時間為25 s; 6) 傳感器浸入緩衝液180 s; 7) 抗原 (hGARP/hTGF- β 1複合物) 與抗體 (JYB1907hz18) 結合, 時間180 s; 8) 抗原 (hGARP/hTGF- β 1複合物) 與抗體 (JYB1907hz18) 的解離, 時間10分鐘; 9) 傳感器再生。

【0531】 4.5.3 數據分析

【0532】 採用Fortebio的Data Analysis 12.0軟體, 對抗原 (hGARP/hTGF- β 1複合物) -抗體(JYB1907hz18)以1:1的結合方式, 測定結合速率 (Ka) 和解離速率 (Kd), 以此計算抗體的平衡解離常數 (KD)。結果如表4所示, JYB1907hz18與hGARP/hTGF- β 1結合的親和力優於陽性對照抗體MHG8。

【0533】 表4 JYB1907hz18與hGARP/hTGF- β 1的親和力檢測結果

候選抗體	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

【0534】 實施例5 JYB1907hz18抑制Treg細胞中的SMAD2磷酸化

【0535】新鮮的PBMC細胞購至ALLCELLS公司，先將PBMC細胞400g離心10min，然後用1%FBS（Thermo Fisher，10099-141）和50mmolEDTA（ThermoFisher，15400054）的1×PBS培養基（Thermo Fisher，10010049）重新懸浮。PBMC進行Treg細胞提取參考Treg提取試劑盒(Miltenyi, Cat：130-091-301)操作步驟進行。Treg細胞抗體處理：Treg體外擴增14天，收集細胞計數， 1.5×10^6 個Treg細胞去除磁珠並用於陰性對照。24孔板每孔 1×10^6 /mL鋪板，每孔1mL。待測抗體加入24孔板，濃度 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。37°C，二氧化碳培養箱培養36h。其中，抗TGF- β 1和MHG8為陽性對照，人IgG4為同型對照。

【0536】Alpha Elisa檢測：離心收集細胞，加入50 μL 的Lysis buffer，裂解30min。1300rpm離心5min，10 μL 上清用於Alpha Elisa檢測（PerkinElmer，ALSU-PSM2-A500）。

【0537】如上述方法評估，JYB1907hz18抑制Treg細胞中的SMAD2磷酸化，結果如圖4所示。

【0538】實施例6 JYB1907hz18抑制TGF β 1釋放試驗研究

【0539】293T-hGARP/hTGF- β 1細胞由上海睿智化學構建，LN229細胞購至南京科佰（貨號：CBP60302）。待2種細胞生長至70%密度時分別用胰酶（Thermo，25200056）消化，加入含有10%FBS（Thermo Fisher，10099-141）和1×Pen Strep（Thermo Fisher，15140-122）的新鮮DMEM(Thermofisher, 11965092)分別對每個細胞進行重新懸浮，按每孔 3×10^6 個細胞（每孔50 μL ）依次加入96孔板中（Corning，3599）。每孔加入50 μL 梯度稀釋的JYB1907hz18（終濃度10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 起始，2倍梯度稀釋，最後一個孔抗體濃度為0，共10個點），置於37°C，5%CO₂培養箱培養5~6 h。離心取上清，使用TGF- β 1 ELISA試劑盒99416

(Biolegend, 貨號: 580709) 進行TGF- β 1檢測。其中, MHG8為陽性對照, 人IgG4為同型對照。

【0540】 如上述方法評估, JYB1907hz18抑制293T細胞釋放TGF- β 1, 結果如圖5所示。

【0541】 實施例7 JYB1907hz18阻止Treg對外周血單個核細胞 (PBMC) 釋放IL-2和IFN- γ 的抑制

【0542】 新鮮的PBMC細胞購至TPCS公司, 先將PBMC細胞400g離心10 min, 然後用1% FBS (Thermo Fisher, 10099-141) 和50mmol EDTA (ThermoFisher, 15400054) 的1 \times PBS培養基 (Thermo Fisher, 10010049) 重新懸浮。吸出少許PBMC用於後續實驗, 剩餘PBMC進行Treg細胞提取, 參考Treg提取試劑盒(Miltenyi, Cat: 130-091-301)操作步驟進行。將提取的Treg細胞和PBMC細胞計數並調整濃度為 5×10^5 /mL, PBMC組, 加入50 μ LPBMC和48 μ L的1% HBS (TPCS, A515) 和1 \times Pen Strep (Thermo Fisher, 15140-122) 的TexMACS™ Medium培養基 (Miltenyi Biotec, 170-076-309) 以及2 μ L的CD3/CD28抗體磁珠 (Miltenyi Biotec, 130-095-345)。PBMC+Treg細胞組, 加入50 μ LPBMC和46 μ L的1% HBS (TPCS, A515) 和1 \times Pen Strep (Thermo Fisher, 15140-122) 的TexMACS™ Medium培養基 (Miltenyi Biotec, 170-076-309) 以及4 μ L的CD3/CD28抗體磁珠 (Miltenyi Biotec, 130-095-345)。加入待測抗體JYB1907hz18, 每孔50 μ L, 終濃度為25 μ g/ml。置於37°C, 5%CO₂培養箱培養20-24h。離心取上清, 使用IL-2 ELISA和IFN- γ ELISA試劑盒進行IL-2檢測 (R&D, VAL110) 和IFN- γ 檢測 (R&D, DIF50C)。其中, MHG8為陽性對照。

【0543】如上述方法評估，JYB1907hz18阻止Treg對外周血單個核細胞（PBMC）釋放白細胞介素-2（IL-2）和干擾素- γ （IFN- γ ）的抑制，結果如圖6A及圖6B所示：圖6A表示待測抗體阻止Treg對外周血單個核細胞（PBMC）釋放白細胞介素-2（IL-2）的抑制；圖6B表示待測抗體阻止Treg對外周血單個核細胞（PBMC）釋放干擾素- γ （IFN- γ ）的抑制。

【0544】實施例8 在人源化FcRn小鼠模型中藥物代謝動力學（PK）研究

【0545】以人源化FcRn小鼠為受試動物，分別研究兩個待試藥物MHG8和JYB1907hz18單次皮下給藥後的藥物代謝動力學指標。所有動物實驗方案獲得了IACUC審閱和批准。hFcRn小鼠採購自北京百奧賽圖，雄性，6~8週齡，體重23~26g，飼養於SPF級動物房，標準顆粒飼料餵養，自由進食及飲水，室溫18~24℃，相對濕度40%~50%，每日12h晝夜交替。實驗動物共12隻，隨機分為三組，每組四隻動物，皮下單次給藥，給藥劑量為10mg/kg，給藥體積為10 mL/kg。採血時間點為給藥前，給藥後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。藉由臉頰穿刺採集全血60 μ L/隻至EP管中，室溫靜置30min，然後離心（2000g，4℃，5 min）分離血清，每個樣品分裝為2份（檢測管和備份管），10 μ L/管，置於-80℃保存。

【0546】利用Elisa間接法檢測，分析三種藥下不同時間點藥物代謝動力學。包被抗原為鼠抗人IgG4 Fc（abcam，lot:GR3248093-2，ab99820），2 μ g/mL，100 μ L/孔，4℃，過夜。洗板後用200 μ L/孔封閉液4℃過夜。血清樣本加樣，50 μ L/孔，37℃，1h。檢測抗體為hGARP/hTGF β 1-biotin

（0.78mg/ml，lot：030201）+Streptavidin-peroxidase（Sigma，lot:SLCB5784），

100 μ l/孔，37°C，0.5h。TMB顯色液（KPL，貨號：52-00-03）顯色，酶標儀（Molecular Devices，SpectraMax M3）讀值OD450。根據標準曲線獲得藥物濃度，PK Solver非房室進行數據處理獲得PK參數。

【0547】給藥MHG8後，半衰期（ $t_{1/2}$ ）=4.8天，最高濃度（ C_{max} ）為50036ng/ml（如圖7B所示）；給藥JYB1907hz18後半衰期（ $t_{1/2}$ ）=8.82天，最高濃度（ C_{max} ）為139437ng/ml（如圖7A所示）。

【0548】實施例9 JYB1907hz18理化性質研究

【0549】9.1 SEC-HPLC純度分析

【0550】9.1.1 將樣品（JYB1907hz18）稀釋至1mg/mL，混勻，12000rpm離心5min，取上清轉至樣品瓶，放入HPLC樣品盤。設置色譜條件如表5所示。

【0551】表5 色譜條件

色譜條件	參數
色譜管柱	TSK G3000SWxl
檢測波長	280nm
管柱溫度	25°C
樣品室溫度	5°C
流速	0.5ml/min

【0552】9.1.2 色譜管柱採用流動相（200mM磷酸鹽緩衝液，pH6.8）平衡後，進樣分析，用色譜軟體進行數據分析，峰面積歸一化法計算各個峰的峰面積百分比。

【0553】9.2 HIC-HPLC分析

【0554】 9.2.1 將樣品 (JYB1907hz18) 稀釋至1mg/ml，離心取上清待測。設置色譜條件如表6所示。

【0555】 表6 色譜條件

色譜條件	參數
色譜管柱	MAbPac™HIC-10
檢測波長	214nm
管柱溫度	30°C
樣品室溫度	5 °C
流速	0.8ml/min

【0556】 9.2.2 用流動相 A (50mM 磷酸鹽緩衝液/1M 硫酸銨，pH 7.0) 和流動相 B(50mM 磷酸鹽緩衝液，pH 7.0)進行梯度沖提，記錄主峰保留時間。

【0557】 9.3 熔解溫度 (T_m) 值分析

【0558】 將樣品 (JYB1907hz18) 用樣品緩衝液稀釋至 1mg/mL，然後按照 Protein Thermal Shift™ Starter Kit 說明書，取樣品 (JYB1907hz18) 溶液 13μL 加入至 PCR 管內，加入 5μL Protein Thermal shift™ Buffer，加入 2μL 10×染色液，使反應體積為 20μL，混勻後，12000rpm 離心 5min 以去除氣泡。將檢測樣品 (JYB1907hz18) 置於 PCR 儀內，進行樣品分析，記錄樣品 (JYB1907hz18) 的 T_m 值。

【0559】 9.4 iCIEF 分析

【0560】 取樣品 (JYB1907hz18) 溶液加入到已經充分混勻的以下體系中：1%的甲基纖維素 (MC) 70μl，尿素 5M 80μl，兩性電解質 Pharmalyte pH 3-10 8μl，pI marker 5.5 和 9.5 各 2μl。補加適當體積超純水至 200μl，混勻。離心取

上清進樣分析。分析結束後，將結果文件導入 ChromPerfect 軟體進行圖譜積分處理並計算各峰的等電點以及各峰百分比。

【0561】 JYB1907hz18 的理化分析結果如表 7 所示。

【0562】 表 7 JYB1907hz18 的理化分析結果

蛋白名稱	理化性質						
	SEC%	Tm°C	HIC (min)	實測 pI	Acid Peaks (%)	Main Peak (%)	Basic Peaks (%)
		Fab					
JYB1907hz18	99.5	80.1	15.06	7.9	11.8	74.0	14.2

【0563】 實施例 10 JYB1907hz18 抗體在小鼠 GvHD 模型中的研究

【0564】 NOG 小鼠購自北京維通利華實驗動物技術有限公司，7-8 週齡，雌性，共 40 隻。凍存 PBMC 購自妙通（上海）生物科技有限公司。從新鮮的 PBMC 中提取 Treg 細胞，Treg 細胞體外擴增培養方法同實施例 5。NOG 小鼠經過適應期後，提前 3 天白消胺 25mg/kg 腹腔注射處理小鼠。隨機選取 10 隻小鼠，復蘇同批次凍存的 PBMC，每隻小鼠靜脈注射 3×10^6 PBMC，作為第一組。將復蘇的 PBMC 與 Treg 細胞混合，其餘 30 隻小鼠每隻尾靜脈注射 3×10^6 PBMC 和 3×10^6 Treg 細胞，注射後當天，根據體重進行隨機分組，分為第二、三、四組。分組後進行給藥，第一組腹腔注射 Isotype Ctrl，第二組腹腔注射 Isotype Ctrl，第三組腹腔注射 MHG8（陽性對照），劑量為 20mg/kg，第四組腹腔注射 JYB1907hz18，劑量為 20mg/kg，給藥頻率一週兩次，共給藥 12 次。每週兩次對小鼠進行稱重，GvHD 評分，並統計生存率。GvHD 評分標準如表 8 所示。當小鼠體重減輕超過 25%，對小鼠進行安樂死處理。

【0565】表 8 GvHD 評分標準

體重減輕	-5%	-15%	-25%
	1分	2分	3分
黃疸或貧血	1分		
弓背	1分		
活動度	活動度減少	不活動	
	1分	2分	
脫毛/炸毛	1分		
死亡	8分		

【0566】到第 42 天實驗結束，第一組小鼠死亡 4 隻，第二組小鼠死亡 3 隻，第三組和第四組還有 5 隻小鼠未死亡。第二組因為加入了 Treg 細胞，抑制了 PBMC 在體內的擴增，所以延緩了 GvHD 的發生時間，而給藥 MHG8 和 JYB1907hz18 的第三組和第四組，藥物抑制了 Treg 的作用，與第一組相比，GvHD 的評分和死亡率均較高，結果如圖 8A 及圖 8B 所示：圖 8A 表示待測抗體用於小鼠的 GvHD 的評分；圖 8B 表示待測抗體用於小鼠的存活率。

【0567】實施例 11 JYB1907hz18 抗體在人黑色素瘤 A375 小鼠腫瘤模型中的藥效檢測

【0568】NOG-DKO 小鼠購自北京維通利華實驗動物技術有限公司，7-8 週齡，雌性，共 48 隻。凍存 PBMC 購自妙通（上海）生物科技有限公司。A375 人黑色素瘤細胞購自 ATCC。復蘇 PBMC，每隻小鼠尾靜脈注射 $6E6$ 數量的 PBMC，建立人源化小鼠模型。一週後收集擴增培養後的 A375 細胞與基質膠混勻之後以 $2E6$ 數量接種於 NOG-DKO 小鼠皮下。待腫瘤體積長到 100mm^3 進

行隨機分組，每組 8 隻小鼠，當天給藥。G1 組給藥同型對照，劑量 20mg/kg；G2 組給藥 MHG8（陽性對照），劑量 20mg/kg；G3 組給藥 JYB1907hz18，劑量 20mg/kg；G4 組給藥 Tencentriq，劑量 10mg/kg；G5 組給藥 MHG8（劑量 20mg/kg）和 Tencentriq（劑量 10mg/kg）；G6 組給藥 JYB1907hz18（劑量 20mg/kg）和 Tencentriq（劑量 10mg/kg）。所有給藥方式均為腹腔注射，一週兩次，共給藥 8 次。

【0569】 在分組後第 28 天，G1 組的平均腫瘤體積為 $1110 \pm 104 \text{ mm}^3$ ，G2 組的平均腫瘤體積為 $1088 \pm 116 \text{ mm}^3$ ，G3 組的平均腫瘤體積為 $1000 \pm 233 \text{ mm}^3$ ，G4 組的平均腫瘤體積為 $834 \pm 155 \text{ mm}^3$ ，G5 組的平均瘤重 $611 \pm 146 \text{ mm}^3$ ，G6 組平均腫瘤體積為 $471 \pm 87 \text{ mm}^3$ ，G5 組有 50% 的抑瘤率，G6 組有 64% 抑瘤率。G5 和 G6 組相對於 G1 組均有統計學差異（G5 vs G1, G6 vs G1），G5 vs G1, $P < 0.05$; G6 vs G1, $P < 0.001$ 。其他組均無統計學差異。證明 MHG8 與 Tencentriq（抗 PD-L1 抗體），JYB1907hz18 與 Tencentriq（抗 PD-L1 抗體）聯用均有抑制腫瘤生長的作用，結果如圖 9 所示。

【0570】 實施例 12 JYB1907hz18 抗體在人乳腺癌 JIMT-1 小鼠腫瘤模型中的藥效學研究

【0571】 NOG-DKO 小鼠購自北京維通利華實驗動物技術有限公司，7-8 週齡，雌性，共 24 隻。凍存 PBMC 購自妙通（上海）生物科技有限公司。JIMT-1 人乳腺癌細胞購自 ATCC。復蘇 PBMC，每隻小鼠尾靜脈注射 6×10^6 數量的 PBMC，建立人源化小鼠模型。一週後收集擴增培養後的 JIMT-1 細胞與基質膠混勻之後以 3×10^6 數量接種於 NOG-DKO 小鼠背部皮下。待腫瘤體積長到 100

mm³左右進行隨機分組，每組 8 隻動物，當天給藥。G1 組給藥同型對照，劑量 20 mg/kg；G2 組給藥 JYB1907hz18，劑量 20 mg/kg；G3 組給藥 Tecentriq，劑量 10 mg/kg。所有給藥方式均為腹腔注射，一週兩次，共給藥 8 次。

【0572】 在分組後第 28 天，G1 組的平均腫瘤體積為 740±57 mm³，G2 組的平均腫瘤體積為 426±45 mm³，G3 組的平均腫瘤體積為 469±72 mm³，G2 組有 52%的抑瘤率，G3 組有 45%的抑瘤率。G2 和 G3 組相對於 G1 組（G2 vs G1, G3 vs G1）均有統計學差異，G2 vs G1，P<0.001；G3 vs G1，P<0.01。證明 JYB1907hz18 單用和 Tecentriq（抗 PD-L1 抗體）單用均有抑制腫瘤生長的作用，其中 JYB1907hz18 相比於 Tecentriq（抗 PD-L1 抗體）有更好的抑制腫瘤生長的作用，結果如圖 10 所示。

【0573】 實施例 13 JYB1907hz18 抗體在人肺鱗癌 EBC-1 小鼠腫瘤模型中的藥效學研究

【0574】 NOG-DKO 小鼠購自北京維通利華實驗動物技術有限公司，7-8 週齡，雌性，共 24 隻。凍存 PBMC 購自妙通（上海）生物科技有限公司。EBC-1 人乳腺癌細胞購自 ATCC。復蘇 PBMC，每隻小鼠尾靜脈注射 6E6 數量的 PBMC，建立人源化小鼠模型。一週後收集擴增培養後的 EBC-1 細胞與基質膠混勻之後以 3E6 數量接種於 NOG-DKO 小鼠背部皮下。待腫瘤體積長到 100 mm³左右進行隨機分組，每組 8 隻動物，當天給藥。G1 組給藥同型對照，劑量 20 mg/kg；G2 組給藥 JYB1907hz18，劑量 20 mg/kg；G3 組給藥 Tecentriq，劑量 10 mg/kg。所有給藥方式均為腹腔注射，一週兩次，共給藥 8 次。

【0575】 在分組後第 24 天，G1 組的平均腫瘤體積為 $1273 \pm 212 \text{ mm}^3$ ，G2 組的平均腫瘤體積為 $797 \pm 113 \text{ mm}^3$ ，G3 組的平均腫瘤體積為 $842 \pm 115 \text{ mm}^3$ ，G2 組有 42% 的抑瘤率，G3 組有 38% 的抑瘤率。從腫瘤生長趨勢圖來看，在此癌種上 JYB1907hz 單用和 Tecentriq（抗 PD-L1 抗體）單用均有抑制腫瘤生長的趨勢，結果如圖 11 所示。

【符號說明】

無。

【序列表】

<110> 大陸商上海濟滢醫藥科技有限公司(SHANGHAI JEMINCARE PHARMACEUTICAL CO., LTD.)
大陸商江西濟民可信集團有限公司(JIANGXI JEMINCARE GROUP CO., LTD.)

<120> GARP 蛋白抗體及其應用

<130> 0134-PA-024TW

<160> 54

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 8H2D7B3 VH;1907hz0 VH

<400> 1

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

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

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

Gly Ser Ile Ala Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Phe Gly Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 8H2D7B3 HCDR1;1907hz0 HCDR1;JYB1907hz18 HCDR1

<400> 2

Gly Tyr Thr Leu Ser Asn Tyr
1 5

<210> 3

<211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 8H2D7B3 HCDR2;JYB1907hz0 HCDR2;JYB1907hz18 HCDR2

<400> 3

Ala Pro Ser Asp Ser Glu
 1 5

<210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 8H2D7B3 HCDR3;JYB1907hz0 HCDR3;JYB1907hz18 HCDR3

<400> 4

Gly Gly Phe Gly Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 5
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 8H2D7B3 H-FR1;1907hz0 H-FR1

<400> 5

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

<210> 6
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 8H2D7B3 H-FR2;1907hz0 H-FR2

<400> 6

Trp Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Ile Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 1 5 10 15

Gly Ser Ile

<210> 7
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 8H2D7B3 H-FR3;1907hz0 H-FR3

<400> 7

Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Ala Thr Val Thr Val Asp
 1 5 10 15

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

Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
 35 40

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 8H2D7B3 H-FR4;1907hz0 H-FR4

<400> 8

Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 8H2D7B3 VL;1907hz0 VL

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ala Tyr Leu Ser Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Lys Trp
 20 25 30

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

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Gly Leu Gln Thr
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 8H2D7B3 LCDR1;1907Hz0 LCDR1

<400> 10

Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Lys Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 8H2D7B3 LCDR2;1907Hz0 LCDR2

<400> 11

Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 8H2D7B3 LCDR3;1907Hz0 VL LCDR3;JYB1907hz18 LCDR3

<400> 12

Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 13

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 8H2D7B3 L-FR1;1907hz0 L-FR1

<400> 13

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ala Tyr Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 8H2D7B3 L-FR2;1907hz0 L-FR2;1907hz18 L-FR2

<400> 14

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile Ser
1 5 10 15

<210> 15
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 8H2D7B3 L-FR3; 1907Hz0 L-FR3

<400> 15

Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr
 1 5 10 15

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

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 8H2D7B3 L-FR4;1907Hz0 L-FR4

<400> 16

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 17
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 重鏈恆定區

<400> 17

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 輕鏈恆定區

<400> 18

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 19
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 1907hz0 重鏈

<400> 19

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

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

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

Gly Ser Ile Ala Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Phe Gly Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

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

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

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

195

200

205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 21
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> JYB1907hz18 VH

<400> 21

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

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

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

Gly Ser Ile Ala Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Phe Gly Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 1907Hz18 H-FR1

<400> 22

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 23
<211> 19
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 1907Hz18 H-FR2

<400> 23

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10 15

Gly Ser Ile

<210> 24

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 1907Hz18 H-FR3

<400> 24

Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Val Asp
1 5 10 15

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

Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
35 40

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 1907Hz18 H-FR4

<400> 25

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> JYB1907hz18 VL

<400> 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp His Ile Asn Lys Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile

<220>

<223> 1907Hz18 L-FR3

<400> 30

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 1907Hz18 L-FR4

<400> 31

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 32

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> JYB1907hz18 重鏈

<400> 32

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

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

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

Gly Ser Ile Ala Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Phe Gly Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser

	130		135		140															
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val					
145					150					155					160					
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe					
				165					170					175						
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val					
			180					185					190							
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val					
		195					200						205							
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys					
	210					215					220									
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly					
225					230					235					240					
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile					
				245					250					255						
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu					
			260					265					270							
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His					
		275					280					285								
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg					
		290				295					300									
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys					
305					310					315					320					
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu					
				325					330					335						
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr					
			340					345					350							
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu					
		355					360					365								
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp					
	370					375					380									
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val					
385					390					395					400					
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp					
				405					410					415						

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 33

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> JYB1907hz18 輕鏈

<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp His Ile Asn Lys Trp
20 25 30

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

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Tyr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 34
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 抗PD-L1 抗體 VH

<400> 34

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 抗PD-L1 抗體 HCDR1

<400> 35

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
 1 5 10

<210> 36
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗 PD-L1 抗體 HCDR2

<400> 36

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗 PD-L1 抗體 HCDR3

<400> 37

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗 PD-L1 抗體 VL

<400> 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗PD-L1 抗體 LCDR1

<400> 39

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗PD-L1 抗體 LCDR2

<400> 40

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗PD-L1 抗體 LCDR3

<400> 41

Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
 1 5

<210> 42

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗PD-L1 抗體 重鏈

<400> 42

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

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

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

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

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

<210> 43
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 抗PD-L1 抗體 輕鏈

<400> 43

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
 85 90 95

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

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

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

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

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa = Lys 或 Val

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa = Lys 或 Arg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa = Ala 或 Ser

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa = Leu 或 Val

<400> 46

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

Ser Val Lys Xaa Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

<210> 47
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 8H2D7B3 H-FR2; 1907Hz0 H-FR2; 1907Hz18 H-FR2 通式

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa = Lys 或 Arg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa = Ala 或 Arg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa = Gly 或 Ile

<400> 47

Trp Met Tyr Trp Val Xaa Gln Xaa Pro Xaa Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 1 5 10 15

Gly Ser Ile

<210> 48
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 8H2D7B3 H-FR3; 1907Hz0 H-FR3; 1907Hz18 H-FR3 通式

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa = Lys 或 Gln

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa = Asp 或 Gly

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> Xaa = Ala 或 Val

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> Xaa = Ser 或 Thr

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> Xaa = Glu 或 Gln

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> Xaa = Arg 或 Thr

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Ser 或 Thr

<400> 48

Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Xaa Xaa Arg Xaa Thr Val Thr Val Asp
1 5 10 15

Lys Ser Xaa Arg Ile Val Tyr Met Xaa Leu Ser Ser Leu Xaa Ser Glu
20 25 30

Asp Xaa Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
35 40

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 8H2D7B3 H-FR4; 1907Hz0 H-FR4; 1907Hz18 H-FR4 通式

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa = Gln 或 Thr

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa = Met 或 Thr

<400> 49

Trp Gly Xaa Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 50
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

 <220>
 <223> 8H2D7B3 VH; 1907Hz0 VH; JYB1907hz18 VH 通式

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = Gln 或 Val

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = Leu 或 Val

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa = Lys 或 Val

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa = Lys 或 Arg

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa = Ala 或 Ser

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa = Leu 或 Val

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> Xaa = Lys 或 Arg

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> Xaa = Ala 或 Arg

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (42)..(42)
 <223> Xaa = Gly 或 Ile

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (65)..(65)
 <223> Xaa = Lys 或 Gln

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (66)..(66)
 <223> Xaa = Asp 或 Gly

 <220>
 <221> misc_feature

<222> (68).. (68)
 <223> Xaa = Ala 或 Val

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (76).. (76)
 <223> Xaa = Ser 或 Thr

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (82).. (82)
 <223> Xaa = Glu 或 Gln

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (87).. (87)
 <223> Xaa = Arg 或 Thr

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (91).. (91)
 <223> Xaa = Ser 或 Thr

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (115).. (115)
 <223> Xaa = Gln 或 Thr

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (118).. (118)
 <223> Xaa = Met 或 Thr

<400> 50

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

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

Trp Met Tyr Trp Val Xaa Gln Xaa Pro Xaa Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ser Ile Ala Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Xaa Xaa Arg Xaa Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Xaa Arg Ile Val Tyr
 65 70 75 80

Met Xaa Leu Ser Ser Leu Xaa Ser Glu Asp Xaa Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Phe Gly Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Xaa Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 51
 <211> 107
 <212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 8H2D7B3 VL; 1907Hz0 VL; JYB1907hz18 VL 通式

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Pro 或 Ser

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa = Ala 或 Ser

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa = Thr 或 Tyr

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> Xaa = Ala 或 Val

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> Xaa = Leu 或 Val

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> Xaa = Asp 或 Gly

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> Xaa = Lys 或 Arg

<220>
<221> misc_feature
<222> (56)..(56)
<223> Xaa = Ser 或 Thr

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(58)
<223> Xaa = Ile 或 Val

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(74)
<223> Xaa = Ser 或 Thr

<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(76)
<223> Xaa = Ser 或 Thr

<220>
<221> misc_feature
<222> (77)..(77)
<223> Xaa = Gly 或 Ser

<220>
<221> misc_feature
<222> (80)..(80)
<223> Xaa = Pro 或 Thr

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (81)..(81)
 <223> Xaa = Asp 或 Glu

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (83)..(83)
 <223> Xaa = Phe 或 Val

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (100)..(100)
 <223> Xaa = Gly 或 Gln

<400> 51

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Xaa Xaa Xaa Leu Ser Xaa Ser Xaa Gly
 1 5 10 15

Xaa Arg Val Thr Ile Thr Cys Xaa Ala Ser Asp His Ile Asn Lys Trp
 20 25 30

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

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Xaa Gly Xaa Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Xaa Ile Xaa Xaa Leu Gln Xaa
 65 70 75 80

Xaa Asp Xaa Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 52
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 8H2D7B3 L-FR1; 1907Hz0 L-FR1; 1907Hz18 L-FR1 通式

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa = Pro 或 Ser

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa = Ala 或 Ser

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa = Thr 或 Tyr

<220>
 <221> misc_feature

<222> (13).. (13)
 <223> Xaa = Ala 或 Val

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15).. (15)
 <223> Xaa = Leu 或 Val

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17).. (17)
 <223> Xaa = Asp 或 Gly

<400> 52

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Xaa Xaa Xaa Leu Ser Xaa Ser Xaa Gly
 1 5 10 15

Xaa Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 53
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 8H2D7B3 L-FR3; 1907Hz0 L-FR3; 1907Hz18 L-FR3 通式

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2).. (2)
 <223> Xaa = Ile 或 Val

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18).. (18)
 <223> Xaa = Ser 或 Thr

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20).. (20)
 <223> Xaa = Ser 或 Thr

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21).. (21)
 <223> Xaa = Gly 或 Ser

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24).. (24)
 <223> Xaa = Pro 或 Thr

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25).. (25)
 <223> Xaa = Asp 或 Glu

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27).. (27)
 <223> Xaa = Phe 或 Val

<400> 53

Gly Xaa Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr
 1 5 10 15

Leu Xaa Ile Xaa Xaa Leu Gln Xaa Xaa Asp Xaa Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 8H2D7B3 L-FR4; 1907Hz0 L-FR4; 1907Hz18 L-FR4 通式

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Gly 或 Gln

<400> 54

Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種分離的抗原結合蛋白，其具有下述性質中的一種或多種：

a) 在 Octet 測定中，以約 $1.0E-12$ 或更低的 K_D 值與人 GARP/人 TGF- β 1 複合物結合；

b) 不與只表達人 GARP 的細胞或只表達人 TGF- β 1 的細胞結合；

c) 抑制 Treg 細胞中的 SMAD2 磷酸化；

d) 抑制表達人 GARP/人 TGF- β 1 的 HEK293T 細胞釋放 TGF- β 1；

e) 阻止 Treg 細胞對人外周血單個核細胞 (PBMC) 釋放 IL-2 和 IFN- γ 的抑制；

f) 在人 PBMC 移植小鼠的 GvHD 模型中，阻斷 Treg 細胞對該人 PBMC 引起的 GvHD 的抑制作用。

【請求項2】 如請求項 1 所述的分離的抗原結合蛋白，其包含 HCDR3、HCDR2 和/或 HCDR1，該 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 4 所示的胺基酸序列；該 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 3 所示的胺基酸序列；以及該 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 2 所示的胺基酸序列。

【請求項3】 如請求項 1 或 2 所述的分離的抗原結合蛋白，其包含重鏈可變區 VH，該 VH 包含 SEQ ID NO: 50 所示的胺基酸序列。

【請求項4】 如請求項 3 所述的分離的抗原結合蛋白，其中該 VH 包含 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 21 中任一項所示的胺基酸序列。

【請求項5】 如請求項 1 至 4 中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含 LCDR3、LCDR2 和/或 LCDR1，該 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 12 所示的胺基酸序列；該 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 45 所示的胺基酸序列；以及該 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 44 所示的胺基酸序列。

【請求項6】 如請求項 1 至 5 中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含 LCDR2，該 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 28 中任一項所示的胺基酸序列。

【請求項7】 如請求項 1 至 6 中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含 LCDR1，該 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 27 中任一項所示的胺基酸序列。

【請求項8】 如請求項 5 或 6 所述的分離的抗原結合蛋白，其中該 LCDR1、LCDR2、LCDR3 包含選自下述任意一組的胺基酸序列：

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。

【請求項9】 如請求項 1 至 8 中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含輕鏈可變區 VL，該 VL 包含 SEQ ID NO: 51 所示的胺基酸序列。

【請求項10】 如請求項 1 至 9 中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含輕鏈可變區 VL，該 VL 包含 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 26 中任一項所示的胺基酸序列。

【請求項11】 如請求項 1 至 10 中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含重鏈 HC，該 HC 包含 SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 32 中任一項所示的胺基酸序列。

【請求項12】 如請求項 1 至 11 中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包含輕鏈 LC，該 LC 包含 SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 33 中任一項所示的胺基酸序列。

【請求項13】 如請求項 12 所述的分離的抗原結合蛋白，其中該 HC 和 LC 包含選自下述任意一組的胺基酸序列：

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

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

【請求項14】 如請求項 1 至 13 中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，其包括抗體或其抗原結合片段。

【請求項15】 一種多肽，其包含如請求項 1 至 14 中任一項所述的分離的抗原結合蛋白。

【請求項16】 一種免疫綴合物，其包含如請求項 1 至 14 中任一項所述的分離的抗原結合蛋白或如請求項 15 所述的多肽。

【請求項17】 一種分離的核酸分子，其編碼如請求項 1 至 14 中任一項所述的分離的抗原結合蛋白，或者如請求項 15 所述的多肽。

【請求項18】 一種載體，其包含如請求項 17 所述的分離的核酸分子。

【請求項19】 一種細胞，其包含如請求項 1 至 14 中任一項所述的分離的抗原結合蛋白、如請求項 15 所述的多肽、如請求項 16 所述的免疫綴合物、如請求項 17 所述的分離的核酸分子和/或如請求項 18 所述的載體。

【請求項20】 一種醫藥組成物，其包含如請求項 1 至 14 中任一項所述的分離的抗原結合蛋白、如請求項 15 所述的多肽、如請求項 16 所述的免疫綴合物、如請求項 17 所述的分離的核酸分子、如請求項 18 所述的載體、如請求項 19 所述的細胞，和/或藥學上可接受的佐劑和/或賦形劑。

【請求項21】 一種藥物組合，其包含如請求項 1 至 14 中任一項所述的分離的抗原結合蛋白和免疫檢查點抑制劑。

【請求項22】 一種試劑盒，其包含如請求項 21 所述的藥物組合。

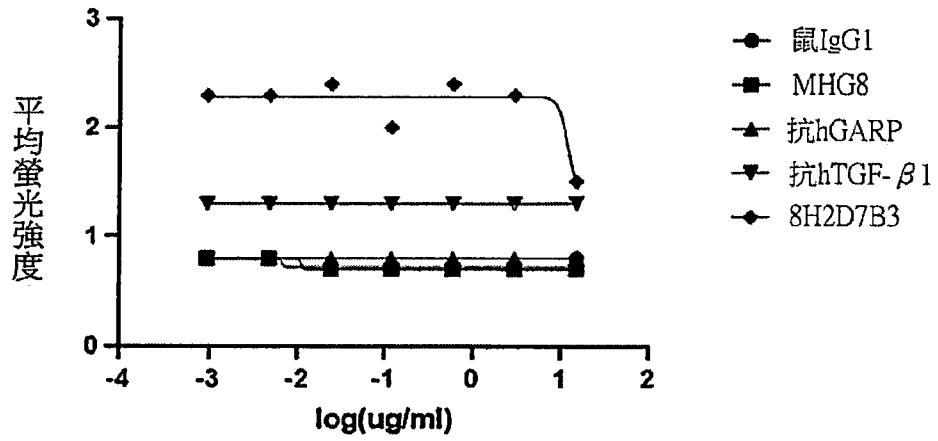
【請求項23】 如請求項 1 至 14 中任一項所述的分離的抗原結合蛋白、如請求項 15 所述的多肽、如請求項 16 所述的免疫綴合物、如請求項 17 所述的分離的核酸分子、如請求項 18 所述的載體，如請求項 19 所述的細胞、如請求項 20 所述的醫藥組成物、如請求項 21 所述的藥物組合和/或如請求項 22 所述的試劑盒在製備藥物中的用途，該藥物用於預防、緩解和/或治療腫瘤。

【請求項24】 如請求項 23 所述的用途，其中該腫瘤包括實體瘤。

【請求項25】 如請求項 23 或 24 所述的用途，其中該腫瘤包括與 GARP 的表達相關的腫瘤。

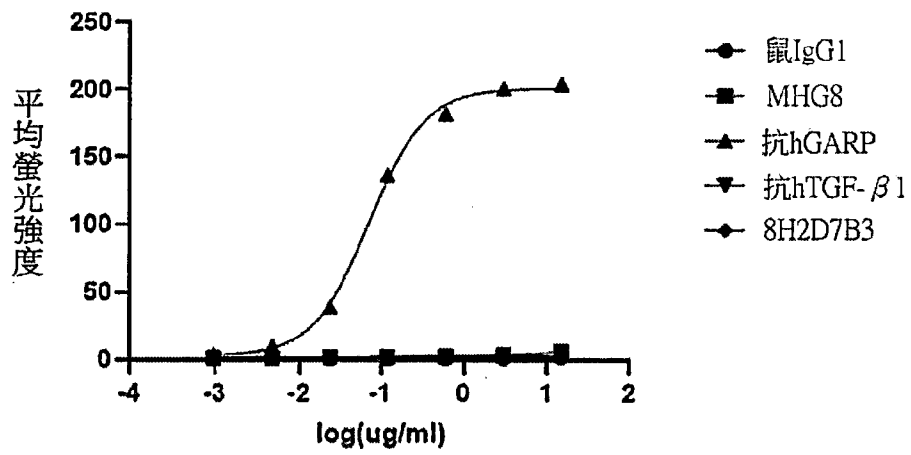
【請求項26】 如請求項 23 至 25 中任一項所述的用途，其中該腫瘤包括黑色素瘤、乳腺腫瘤和/或肺腫瘤。

【發明圖式】



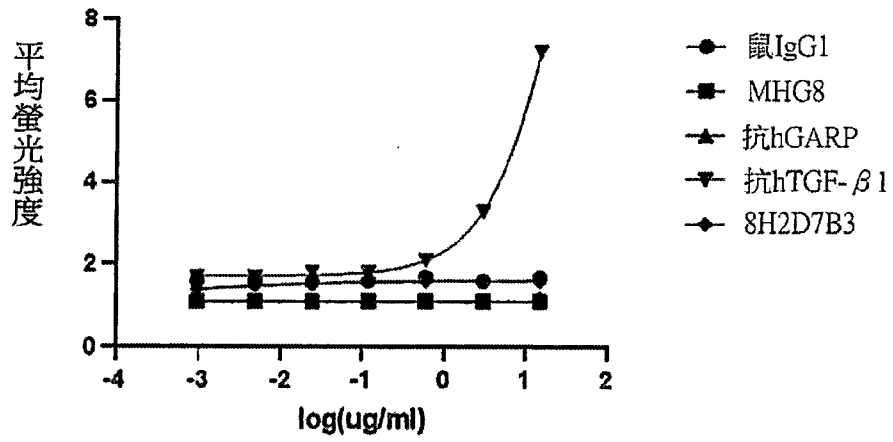
	最高值	EC50
鼠IgG1	N.A.	N.A.
MHG8	N.A.	N.A.
抗hGARP	N.A.	N.A.
抗hTGF-β1	N.A.	N.A.
8H2D7B3	N.A.	N.A.

【圖1A】



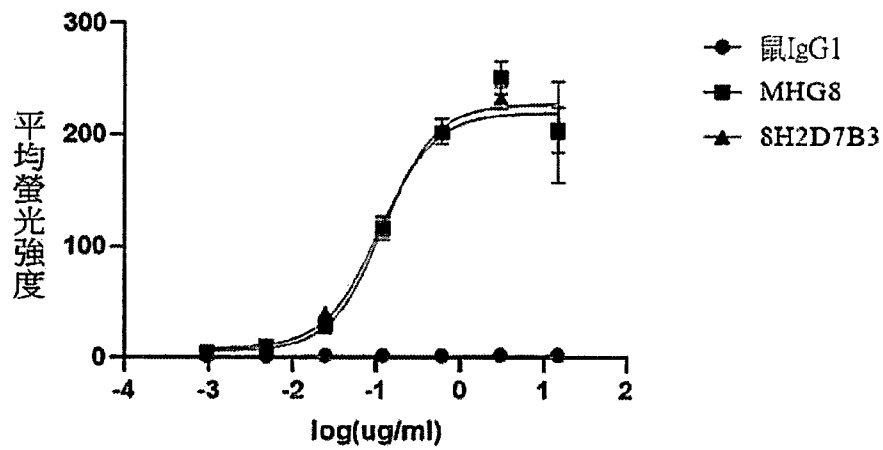
	最高值	EC50
鼠IgG1	N.A.	N.A.
MHG8	N.A.	N.A.
抗hGARP	201.513	0.072
抗hTGF-β1	N.A.	N.A.
8H2D7B3	N.A.	N.A.

【圖1B】



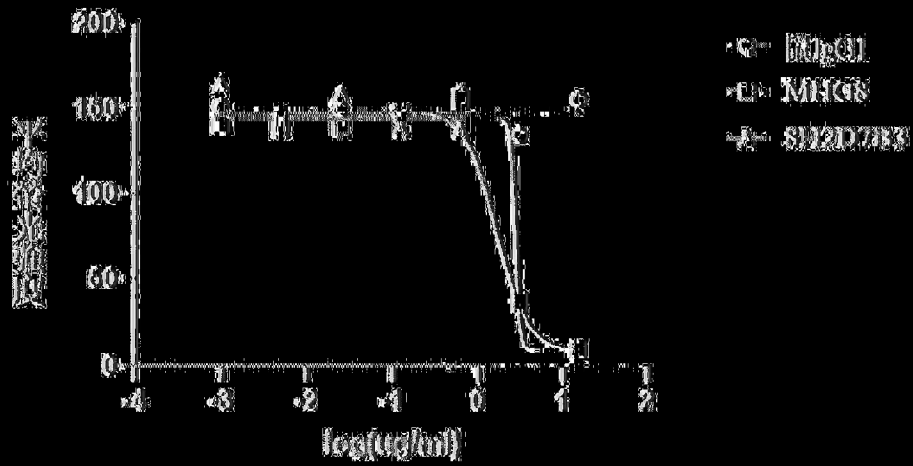
	最高值	EC50
鼠IgG1	N.A.	N.A.
MHG8	N.A.	N.A.
抗hGARP	N.A.	N.A.
抗hTGF-β1	22.314	45.406
8H2D7B3	N.A.	N.A.

【圖1C】



	最高值	EC50
鼠IgG1	N.A.	N.A.
MHG8	227.444	0.120
8H2D7B3	219.834	0.108

【圖1D】



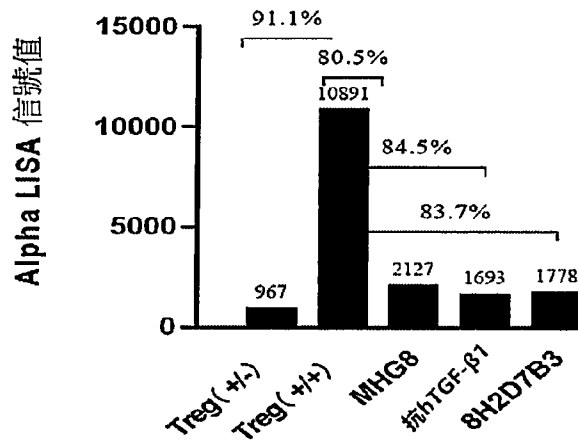
	MNG-31	MNG-8	S1202783
IC50	NA	1.650	NA
MDG8	177.000	2.744	
S1202783		1.46489	1.644

[M12]

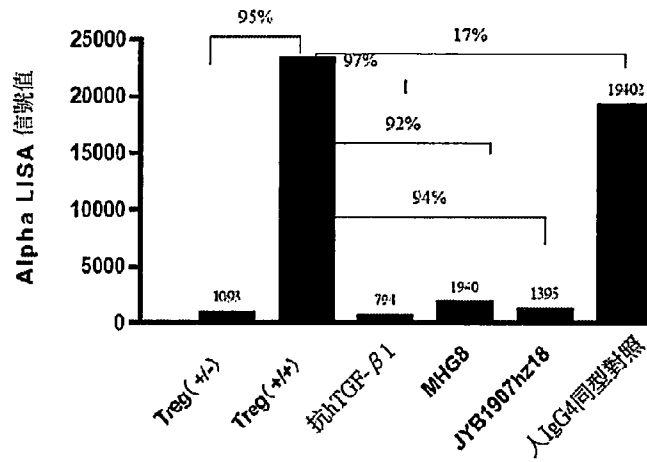


SYNTH. (C) CIP8/284
 (F) MNG-31 24 MNG-8/284

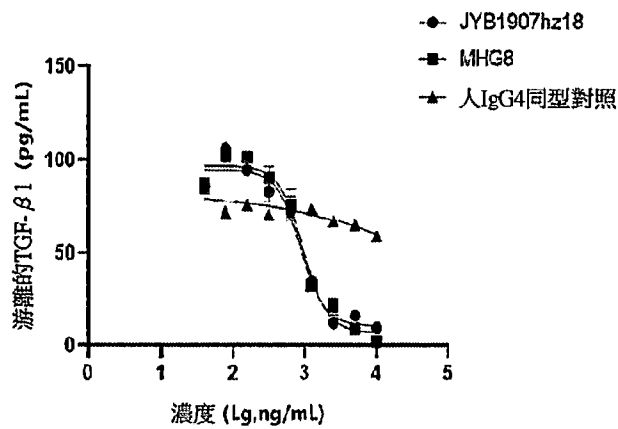
[M13A]



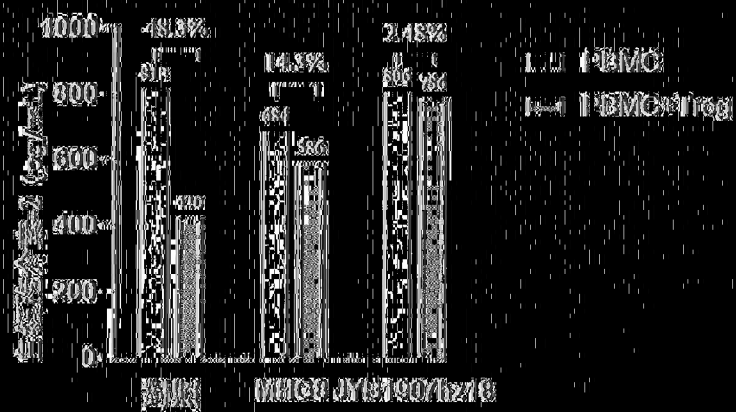
【圖3B】



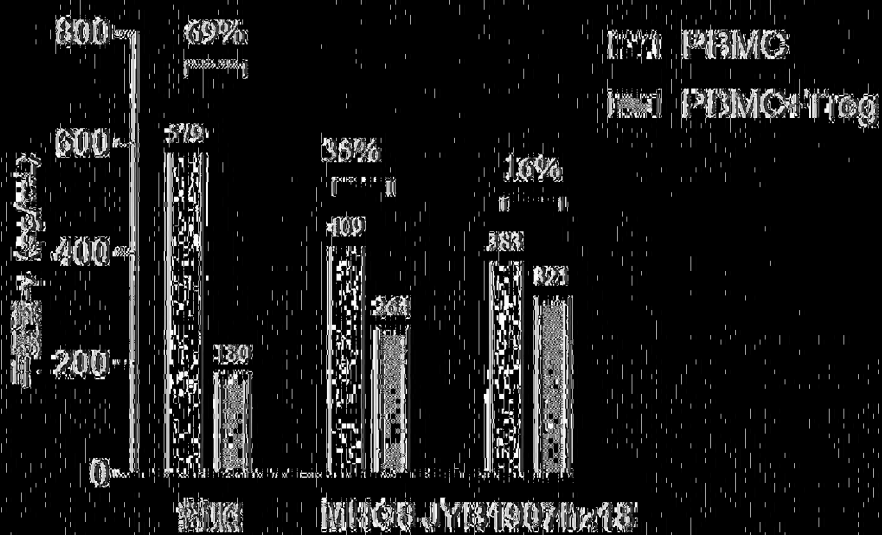
【圖4】



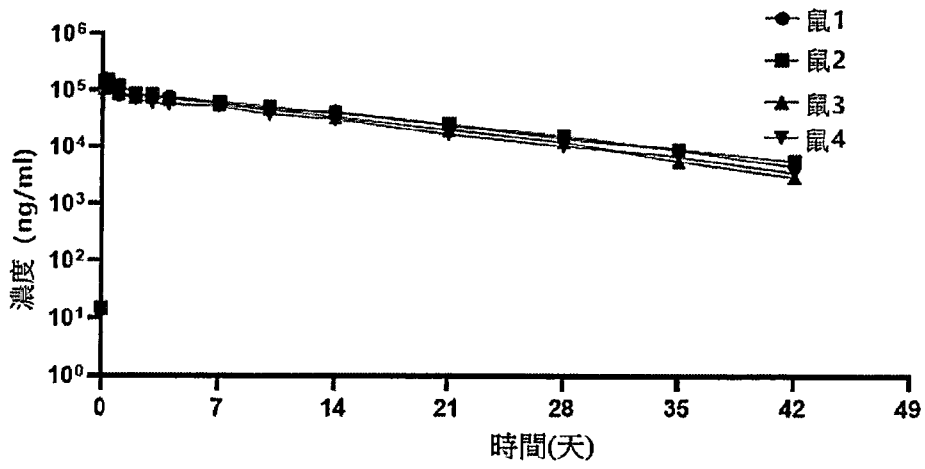
【圖5】



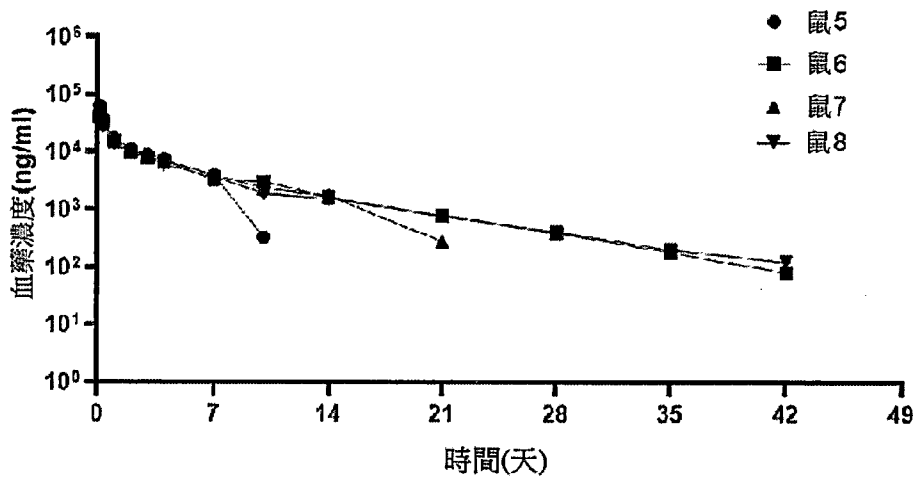
(Figure 6A)



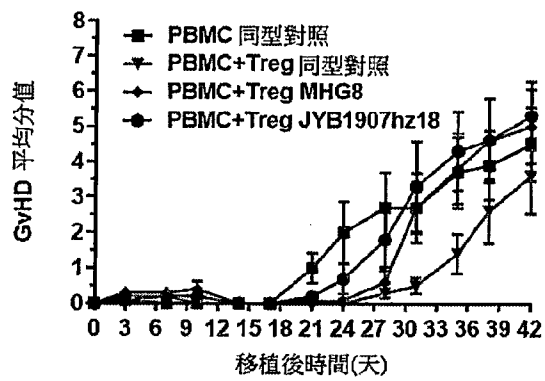
(Figure 6B)



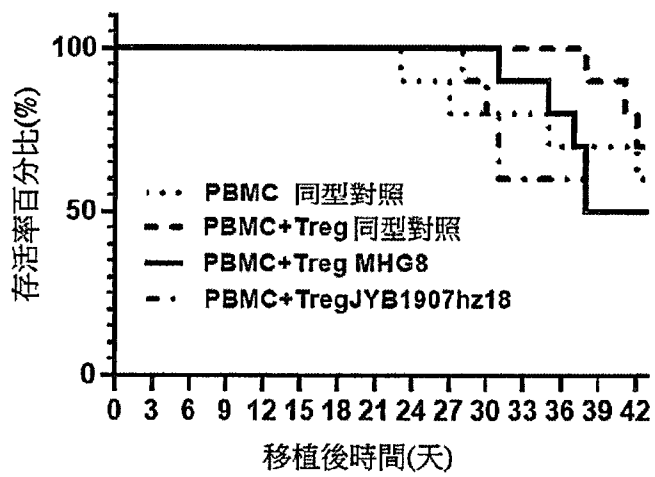
【圖7A】



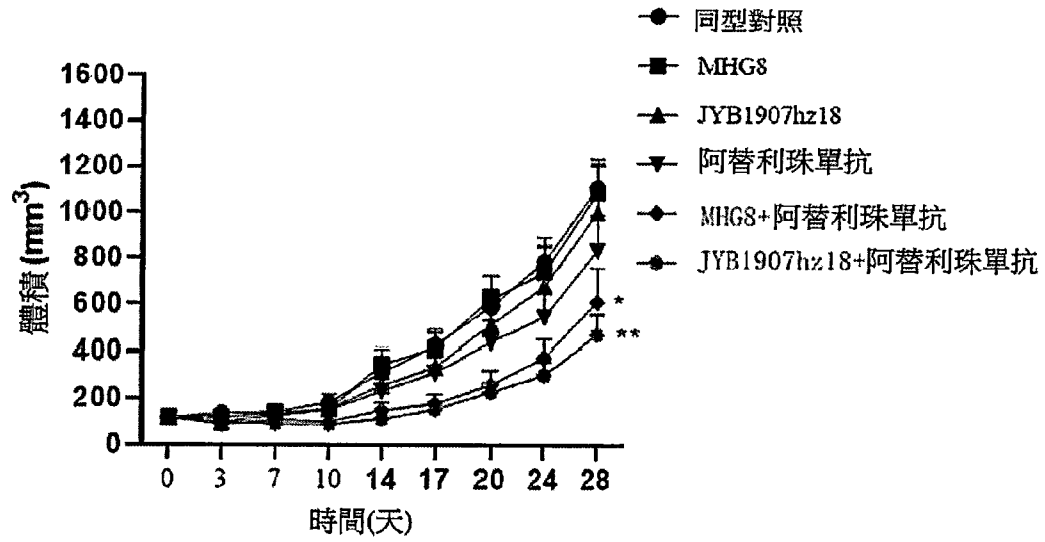
【圖7B】



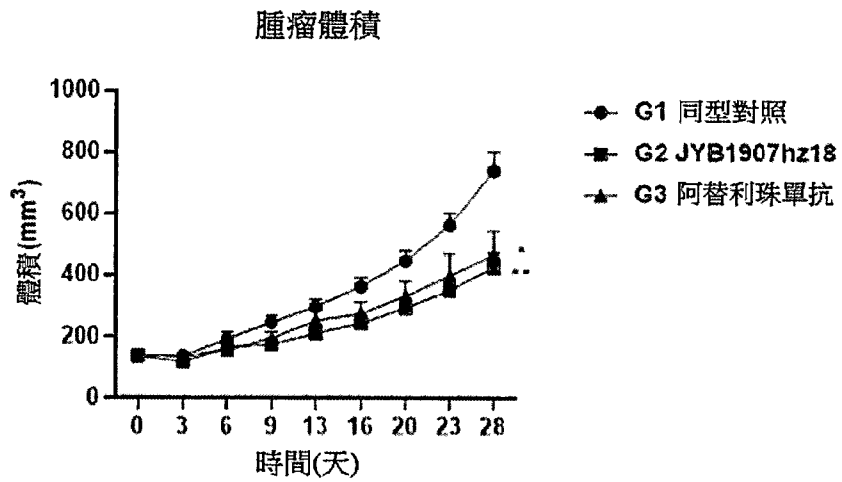
【圖8A】



【圖8B】

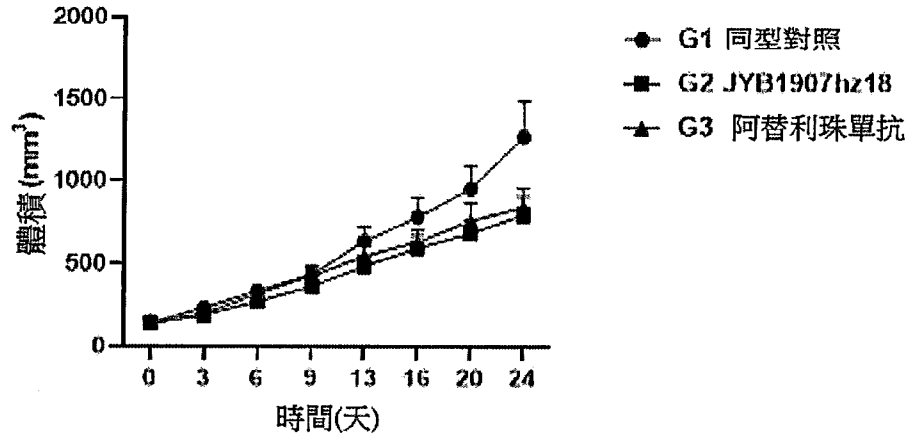


【圖9】



【圖10】

腫瘤體積



【圖11】