



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 113573728 A

(43) 申请公布日 2021.10.29

(21) 申请号 201980087951.8

(22) 申请日 2019.11.13

(30) 优先权数据

62/767,509 2018.11.14 US

62/820,718 2019.03.19 US

62/886,872 2019.08.14 US

62/931,746 2019.11.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.07.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/061278 2019.11.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/102422 EN 2020.05.22

(71) 申请人 安驰肿瘤公司

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 R·普罗 P·T·曼宁

R·W·卡尔 R·R·希布施

B·J·卡波恰 G·安德烈耶娃

(74) 专利代理机构 北京市路盛律师事务所

11326

代理人 冯云 李宓

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

权利要求书8页 说明书56页 附图34页

(54) 发明名称

治疗性SIRP α 抗体

(57) 摘要

提供了具有不同功能特征的抗SIRP α 单克隆抗体(抗SIRP α mAb),包括多特异性SIRP α 抗体,以及相关组合物和使用抗SIRP α mAb作为治疗剂来预防和治疗实体癌和血液癌的方法。还提供了示例性抗SIRP α 单克隆抗体的氨基酸序列。

1. 一种特异性结合人SIRP α 的单克隆抗体或其抗原结合片段,该单克隆抗体或其抗原结合片段包含三个轻链互补决定区 (LCDR1、LCDR2、LCDR3) 和三个重链互补决定区 (HCDR1、HCDR2、HCDR3), 其中LCDR1、LCDR2、LCDR3选自:

LCDR1		LCDR2		LCDR3	
SEQ ID NO: 1	RASSGVNYMY	SEQ ID NO: 2	YTSILAP	SEQ ID NO: 3	QQFTSSPYT
SEQ ID NO: 4	RASQSIGTSIH	SEQ ID NO: 5	YGSESI	SEQ ID NO: 6	QQSNTWPLT
SEQ ID NO: 7	SASSIIGSDFLH	SEQ ID NO: 8	RTSILAS	SEQ ID NO: 9	QQGSGLPLT
SEQ ID NO: 10	KASQDINSHLS	SEQ ID NO: 11	RANRLAD	SEQ ID NO: 12	LQYDEFPYT
SEQ ID NO: 13	SASSSVSYMY	SEQ ID NO: 14	LTSNLAS	SEQ ID NO: 15	QQWSGNPFT
SEQ ID NO: 16	RASENIYSYLT	SEQ ID NO: 17	NAKTLAE	SEQ ID NO: 18	QHHYGSPT
SEQ ID NO: 19	SASSSISSNFLH	SEQ ID NO: 20	RTSILAS	SEQ ID NO: 21	QQGSGLPLT
SEQ ID NO: 22	SSVS	SEQ ID NO: 23	DTS	SEQ ID NO: 24	QQWSSFPWT
SEQ ID NO: 25	EDIYDR	SEQ ID NO: 26	GTA	SEQ ID NO: 27	QQYWTPWT
SEQ ID NO: 28	SSVNY	SEQ ID NO: 29	YTS	SEQ ID NO: 30	QQFTSSPFT
		SEQ ID NO: 31	RANRLAT	SEQ ID NO: 32	QQYDEFPYT

并且其中HCDR1、HCDR2、和HCDR3选自:

HCDR1		HCDR2		HCDR3	
SEQ ID NO: 33	KYWIE	SEQ ID NO: 34	EILPGSVITNYNEKFKG	SEQ ID NO: 35	WGLYDSDDGVDY
SEQ ID NO: 36	GCTMS	SEQ ID NO: 37	YISNGGDITYYPDTVKG	SEQ ID NO: 38	LDGYYYAMDF
SEQ ID NO: 39	SYVMH	SEQ ID NO: 40	YINPYNDGPKYNEKFKG	SEQ ID NO: 41	WDYFNSASGFAF
SEQ ID NO: 42	DYFLN	SEQ ID NO: 43	RINPYNGDSFINQNRD	SEQ ID NO: 44	GGYDGYFIAYFDY
SEQ ID NO: 45	SYTMH	SEQ ID NO: 46	YINPTIGYTEYNQKFKD	SEQ ID NO: 47	LVITSVLGRAMDY
SEQ ID NO: 48	DYGVN	SEQ ID NO: 49	WVNTNTRESTYVEDFKG	SEQ ID NO: 50	GAYDAYYYYYYGM DY
SEQ ID NO: 51	TYVMH	SEQ ID NO: 52	YINPNNDGPNYNEKFKG	SEQ ID NO: 53	WDSYNSAAGFAY
SEQ ID NO: 54	GFTLSTYT	SEQ ID NO: 55	ITSGDTYT	SEQ ID NO: 56	TRDRPLFH

HCDR1		HCDR2		HCDR3	
SEQ ID NO: 57	GYTFTDYE	SEQ ID NO: 58	IHPGSGGT	SEQ ID NO: 59	TRAVSGYYAMDY
SEQ ID NO: 60	GYTFSNYL	SEQ ID NO: 61	IYPGDNNT	SEQ ID NO: 62	AGGTDYDGFAN
		SEQ ID NO: 34	EILPGSVITNYNEKFKG	SEQ ID NO: 63	ARAVSGYYAMDY

2. 如权利要求1所述的单克隆抗体或其抗原结合片段, 其中该单克隆抗体或其抗原结

合片段是嵌合的或人源化的。

3. 如权利要求1-2中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段, 该单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域(V_H)和轻链可变结构域(V_L)的组合, 其中该组合选自自由以下组成的组:

i. 包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:64的轻链可变结构域;

ii. 包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:65的轻链可变结构域;

iii. 包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:66的轻链可变结构域;

iv. 包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:67的轻链可变结构域;

v. 包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:68的轻链可变结构域;

vi. 包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:69的轻链可变结构域;

vii. 包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:70的轻链可变结构域;

viii. 包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:71的轻链可变结构域;

ix. 包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:72的轻链可变结构域;

x. 包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:73的轻链可变结构域;

xi. 包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:74的轻链可变结构域;

xii. 包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:75的轻链可变结构域;

xiii. 包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:76的轻链可变结构域;

xiv. 包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:74的轻链可变结构域;

xv. 包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:75的轻链可变结构域;

xvi. 包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:76的轻链可变结构域;

xvii. 包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:74的轻链可变结构域;

xviii. 包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID

NO:75的轻链可变结构域;

xix.包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:76的轻链可变结构域;

xx.包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:74的轻链可变结构域;

xxi.包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:75的轻链可变结构域;

xxii.包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:76的轻链可变结构域;

xxiii.包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:77的轻链可变结构域;

xxiv.包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:78的轻链可变结构域;

xxv.包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的轻链可变结构域;

xxvi.包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的轻链可变结构域;

xxvii.包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:78的轻链可变结构域;

xxviii.包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的轻链可变结构域;

xxix.包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的轻链可变结构域;

xxx.包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:78的轻链可变结构域;

xxxii.包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的轻链可变结构域;

xxxiii.包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的轻链可变结构域;以及

xxxiiii.包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:72的轻链可变结构域。

4.如权利要求1-3中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,该单克隆抗体或其抗原结合片段包含选自由以下组成的组的至少一条重链和至少一条轻链:

i.包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:98的轻链;

ii.包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:99的轻链;

iii.包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:100的轻链;

iv.包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:101的轻链;

- v. 包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:102的轻链；
- vi. 包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:103的轻链；
- vii. 包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:101的轻链；
- viii. 包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:102的轻链；
- ix. 包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:103的轻链；
- x. 包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:101的轻链；
- xi. 包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:102的轻链；
- xii. 包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:103的轻链；
- xiii. 包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:101的轻链；
- xiv. 包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:102的轻链；
- xv. 包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:103的轻链；
- xvi. 包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:104的轻链；
- xvii. 包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的轻链；
- xviii. 包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:106的轻链；
- xix. 包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:107的轻链；
- xx. 包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的轻链；
- xxi. 包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:106的轻链；
- xxii. 包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:107的轻链；
- xxiii. 包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的轻链；
- xxiv. 包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:106的轻链；
- xxv. 包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:107的轻链；

链;以及

xxvi. 包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:108的轻链。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该单克隆抗体或其抗原结合片段包含选自IgG1、IgG1-N297Q、IgG2、IgG4、IgG4 S228P、IgG4 PE的IgG同种型及其变体。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,除了人SIRP α 以外,该单克隆抗体或其抗原结合片段还结合人SIRP γ 。

7. 如权利要求1-5中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,该单克隆抗体或其抗原结合片段选择性结合人SIRP α 。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,该单克隆抗体或其抗原结合片段表现出抗肿瘤活性。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,该单克隆抗体或其抗原结合片段增加人肿瘤细胞的吞噬作用。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该单克隆抗体或其抗原结合片段是双特异性抗体。

11. 如权利要求10所述的双特异性抗体,其中该双特异性抗体识别第一抗原和第二抗原,其中该第一抗原是SIRP α ,并且该第二抗原是CD47表达细胞的标记。

12. 如权利要求10所述的双特异性抗体,其中该双特异性抗体识别第一抗原和第二抗原,其中该第一抗原是SIRP α ,并且该第二抗原选自CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD30、CD33、CD40、CD44、HER2、CD52、CD56、CD70、CD96、CD97、CD99、CD123、CD279 (PD-1)、CD117、C-Met、PTHR2、EGFR、RANKL、SLAMF7、PD-L1、CD38、CD19/CD3、HAVCR2 (TIM3)、和GD2。

13. 如权利要求1-9中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,该单克隆抗体或其抗原结合片段与针对细胞靶标的第二抗体组合来增加人肿瘤细胞的吞噬作用,该细胞靶标选自:CD47 (分化簇47)、CD70 (分化簇70)、CD200 (OX-2膜糖蛋白,分化簇200)、CD154 (分化簇154,CD40L,CD40配体,分化簇40配体)、CD223 (淋巴细胞激活基因3,LAG3,分化簇223)、KIR (杀伤细胞免疫球蛋白样受体)、GITR (TNFRSF18,糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白,激活诱导的TNFR家族受体,AITR,肿瘤坏死因子受体超家族成员18)、CD20 (分化簇)、CD28 (分化簇28)、CD40 (分化簇40,Bp50,CDW40,TNFRSF5,肿瘤坏死因子受体超家族成员5,p50)、CD86 (B7-2,分化簇86)、CD160 (分化簇160,BY55,NK1,NK28)、CD258 (LIGHT,分化簇258,肿瘤坏死因子配体超家族成员14,TNFSF14,疱疹病毒入侵介质配体 (HVEM-L)、CD270 (HVEM,肿瘤坏死因子受体超家族成员14,疱疹病毒入侵介质,分化簇270,LIGHTR,HVEA)、CD275 (ICOSL,ICOS配体,诱导型T细胞共刺激物配体,分化簇275)、CD276 (B7-H3,B7同系物3,分化簇276)、OX40L (OX40配体)、B7-H4 (B7同系物4,VTCN1,含有V-set结构域的T细胞激活抑制剂1)、GITRL (糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体-配体,糖皮质激素诱导的TNFR-配体)、4-1BBL (4-1BB配体)、CD3 (分化簇3,T3D)、CD25 (IL2R α ,分化簇25,白介素-2受体 α 链,IL-2受体 α 链)、CD48 (分化簇48,B-淋巴细胞激活标记,BLAST-1,信号传导淋巴细胞激活分子2,SLAMF2)、CD66a (Ceacam-1,癌胚抗原相关细胞粘附分子1,胆汁糖蛋白,BGP,BGP1,BGPI,分化簇66a)、CD80 (B7-1,分化簇80)、CD94 (分化簇94)、NKG2A (自然杀伤组2A,杀伤细胞凝集素

样受体亚家族D成员1, KLRD1)、CD96(分化簇96, TActILE, T细胞激活增加的晚期表达)、CD112(PVRL2, 粘连蛋白, 脊髓灰质炎病毒受体相关2, 疱疹病毒入侵介质B, HVEB, 粘连蛋白-2, 分化簇112)、CD115(CSF1R, 集落刺激因子1受体, 巨噬细胞集落刺激因子受体, M-CSFR, 分化簇115)、CD205(DEC-205, LY75, 淋巴细胞抗原75, 分化簇205)、CD226(DNAM1, 分化簇226, DNAX辅助分子-1, PTA1, 血小板和T细胞激活抗原1)、CD244(分化簇244, 自然杀伤细胞受体2B4)、CD262(DR5, TrailR2, TRAIL-R2, 肿瘤坏死因子受体超家族成员10b, TNFRSF10B, 分化簇262, KILLER, TRICK2, TRICKB, ZTNFR9, TRICK2A, TRICK2B)、CD284(Toll样受体-4, TLR4, 分化簇284)、CD288(Toll样受体-8, TLR8, 分化簇288)、白血病抑制因子(LIF)、TNFSF15(肿瘤坏死因子超家族成员15, 血管内皮细胞生长抑制因子, VEGI, TL1A)、TD02(色氨酸2, 3-加双氧酶, TPH2, TRP0)、IGF-1R(1型胰岛素样生长因子)、GD2(双唾液酸神经节苷脂2)、TMIGD2(跨膜和含免疫球蛋白结构域的蛋白质2)、RGM B(RGM结构域家族, 成员B)、VISTA(T细胞激活的含V-结构域免疫球蛋白的抑制因子, B7-H5, B7同系物5)、BTNL2(嗜乳脂蛋白样蛋白2)、Btlr(嗜乳脂蛋白家族)、TIGIT(具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体, Vstm3, WUCAM)、Siglecs(唾液酸结合Ig样凝集素)(即SIGLEC-15)、神经营养蛋白、VEGFR(血管内皮生长因子受体)、ILT家族(LIR, 免疫球蛋白样转录家族, 白细胞免疫球蛋白样受体)、NKG家族(自然杀伤组家族, C型凝集素跨膜受体)、MICA(MHC I类多肽相关序列A)、TGFβ(转化生长因子β)、STING途径(干扰素基因途径的刺激因子)、精氨酸酶(精氨酸脒基酶, 刀豆氨酸酶, L-精氨酸酶, 精氨酸转脒基酶)、EGFRvIII(表皮生长因子受体变体III)、以及HLA2(B7-H7, B7y, HERV-H LTR相关蛋白2, B7同系物7)、PD-1的抑制剂(程序性细胞死亡蛋白1, PD-1, CD279, 分化簇279)、PD-L1(B7-H1, B7同系物1, 程序性死亡-配体1, CD274, 分化簇274)、PD-L2(B7-DC, 程序性细胞死亡1配体2, PDCD1LG2, CD273, 分化簇273)、CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4, CD152, 分化簇152)、BTLA(B淋巴细胞和T淋巴细胞衰减因子, CD272, 分化簇272)、吡哆胺2, 3-加双氧酶(IDO, IDO1)、TIM3(HAVCR2, 甲型肝炎病毒细胞受体2, T细胞免疫球蛋白粘蛋白-3, KIM-3, 肾损伤分子3, TIMD-3, T细胞免疫球蛋白粘蛋白-结构域3)、A2A腺苷受体(ADO受体)、CD39(外核苷三磷酸二磷酸水解酶-1, 分化簇39, ENTPD1)、以及CD73(外-5'-核苷酸酶, 5'-核苷酸酶, 5'-NT, 分化簇73)、CD27(分化簇27)、ICOS(CD278, 分化簇278, 诱导性T细胞共刺激因子)、CD137(4-1BB, 分化簇137, 肿瘤坏死因子受体超家族成员9, TNFRSF9)、OX40(CD134, 分化簇134)、TNFSF25(肿瘤坏死因子受体超家族成员25)、IL-10(白介素-10, 人细胞因子合成抑制因子, CSIF)、和半乳凝素。

14. 如权利要求1-9中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段, 该单克隆抗体或其抗原结合片段与靶向肿瘤细胞上抗原的促进调理作用的单克隆抗体组合来增加人肿瘤细胞的吞噬作用。

15. 如权利要求14所述的单克隆抗体或其抗原结合片段, 其中该促进调理作用的单克隆抗体选自利妥昔单抗(抗CD20)、曲妥珠单抗(抗HER2)、阿仑单抗(抗CD52)、西妥昔单抗(抗EGFR)、帕尼单抗(抗EGFR)、奥法木单抗(抗CD20)、地诺单抗(抗RANKL)、帕妥珠单抗(抗HER2)、帕尼单抗(EGFR)、帕妥珠单抗(HER2)、艾洛珠单抗(SLAMF7)、阿特殊单抗(抗PD-L1)、阿维鲁单抗(抗PD-L1)、德瓦鲁单抗(抗PD-L1)、耐昔妥珠单抗(抗EGFR)、达雷木单抗(抗CD38)、阿妥珠单抗(抗CD20)、博纳吐单抗(抗CD19/CD3)、地努图希单抗(抗GD2)。

16. 如权利要求14所述的单克隆抗体或其抗原结合片段, 其中该促进调理作用的单克

隆抗体靶向选自CD20、EGFR、和PD-L1的肿瘤细胞上的抗原。

17. 如权利要求1-9中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,用于在制造预防或治疗易感癌症的药物中使用。

18. 一种用于预防或治疗人类中的易感癌症的方法,该方法包括施用有效量的如权利要求1-9中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。

19. 如权利要求18所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组:白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌、结肠癌(结肠直肠癌)、直肠癌、膀胱癌、尿路上皮癌、肺癌(非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌)、支气管癌、骨癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、肝细胞癌、胆囊癌、胆管癌、食道癌、肾细胞癌、甲状腺癌、头颈部鳞状细胞癌(头颈癌)、睾丸癌、内分泌腺癌、肾上腺癌、脑下垂体癌、皮肤癌、软组织癌、血管癌、脑癌、神经癌、眼癌、脑膜瘤、口咽癌、下咽部癌、宫颈癌、以及子宫癌、成胶质细胞瘤、成神经管细胞瘤、星形细胞瘤、胶质瘤、脑膜瘤、胃泌素瘤、成神经细胞瘤、黑色素瘤、骨髓增生异常综合征、以及肉瘤。

20. 如权利要求18所述的方法,其中所述白血病选自:全身性肥大细胞增多症、急性淋巴细胞(成淋巴细胞)白血病(ALL)、T细胞-ALL、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、骨髓增生障碍/赘生物、骨髓增生异常综合征、单核细胞白血病、以及浆细胞白血病。

21. 如权利要求18所述的方法,其中所述淋巴瘤选自:组织细胞性淋巴瘤和T细胞淋巴瘤、B细胞淋巴瘤,包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤,如低级别/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、细胞淋巴瘤(FCC)、套细胞淋巴瘤(MCL)、弥漫性大细胞淋巴瘤(DLCL)、小淋巴细胞性(SL)NHL、中等级别/滤泡性NHL、中等级别的弥漫性NHL、高级别成免疫细胞NHL、高级别成淋巴细胞NHL、高级别小非裂细胞NHL、巨大肿块NHL、以及瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症。

22. 如权利要求18所述的方法,其中所述肉瘤选自:骨肉瘤、尤因肉瘤、平滑肌肉瘤、滑膜肉瘤、腺泡状软组织肉瘤、血管肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、以及软骨肉瘤。

23. 一种用于预防或治疗人类中的易感癌症的方法,该方法包括施用结合SIRP α 并且防止SIRP α 与CD47结合的如权利要求1-9中任一项所述的第一单克隆抗体或其抗原结合片段,和选择性结合CD47的第二抗体。

24. 一种用于预防或治疗人类中的易感癌症的方法,该方法包括施用结合SIRP α 并且防止SIRP α 与CD47结合的如权利要求1-9中任一项所述的第一单克隆抗体或其抗原结合片段,和选择性结合EGFR的第二抗体。

25. 一种用于预防或治疗人类中的易感癌症的方法,该方法包括施用结合SIRP α 并且防止SIRP α 与CD47结合的如权利要求1-9中任一项所述的第一单克隆抗体或其抗原结合片段,和选择性结合PD-1的第二抗体。

26. 一种用于预防或治疗人类中的易感癌症的方法,该方法包括施用结合SIRP α 并且防止SIRP α 与CD47结合的如权利要求1-9中任一项所述的第一单克隆抗体或其抗原结合片段,和选择性结合PD-L1的第二抗体。

27. 一种用于预防或治疗人类中的易感癌症的方法,该方法包括施用结合SIRP α 并且防止SIRP α 与CD47结合的如权利要求1-9中任一项所述的第一单克隆抗体或其抗原结合片段,和选择性结合CTLA-4的第二抗体。

28. 一种使用如权利要求1-5中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段测定肿瘤

和/或免疫细胞中的SIRP α 表达的方法,该单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合SEQ ID NO:121和/或SEQ ID NO:122的序列内的表位。

29.如权利要求28所述的方法,该方法包括:获得患者样品、使该患者样品与特异性结合SEQ ID NO:121和/或SEQ ID NO:122的序列内的表位的单克隆抗体或其抗原结合片段接触、以及测定该抗体与该患者样品的结合,其中该抗体与该患者样品的结合用于诊断患者样品中的SIRP α 表达。

30.如权利要求28所述的方法,其中该肿瘤是癌症肿瘤或转移性癌症肿瘤。

31.如权利要求28所述的方法,其中对该抗体或其抗原结合片段与该患者样品结合的测定利用了组织样品的免疫组织化学标记。

32.如权利要求28所述的方法,其中对该抗体或其抗原结合片段与该患者样品结合的测定利用了酶联免疫吸附测定(ELISA)。

33.如权利要求28所述的方法,其中对该抗体或其抗原结合片段与该患者样品结合的测定利用了流式细胞术。

34.如权利要求28所述的方法,其中该患者样品包含肿瘤细胞,并且该测定包含测定该抗体或其抗原结合片段与该患者样品中肿瘤细胞的结合。

35.一种药物组合物,该药物组合物包含如权利要求1-9中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,以及药学上或生理学上可接受的载体、稀释剂、或赋形剂。

治疗性SIRP α 抗体

技术领域

[0001] 本申请要求2018年11月14日提交的美国临时申请号62/767,509、2019年3月19日提交的美国临时申请号62/820,718、2019年8月14日提交的美国临时申请号62/886,872、以及2019年11月6日提交的美国临时申请号62/931,746的优先权权益,将其披露内容以其全文通过引用如同本文写出一样特此并入。

[0002] 本披露涉及免疫疗法领域。本披露提供了破坏SIRP α 和CD47之间的相互作用、增强肿瘤细胞的吞噬作用、引起免疫应答的免疫调节的抗SIRP α 抗体(抗SIRP α),以及用于产生抗SIRP α 抗体和使用抗SIRP α 抗体作为治疗剂来预防和治疗血液癌和实体癌以及癌症的方法。

背景技术

[0003] 靶向适应性免疫(包括T细胞检查点、PD-1、PD-L1和CTLA-4)以增强T细胞免疫应答的细胞毒活性的治疗性抗体已经为患有转移性疾病的患者提供了长期缓解或甚至治愈的前景(Hodi 2010,McDermott 2015)。尽管取得了积极的结果,但是仍然有绝大多数患者群体对这些检查点抑制剂没有应答(原发性抗性),或有应答但是最终发展为疾病进展(获得抗性)(Pitt 2016,Restifo 2016,Sharma 2017)。最近的研究表明,抗性机制可能既是肿瘤细胞内在的(包括缺乏独特的肿瘤抗原蛋白或抑制肿瘤抗原呈递),也可能是肿瘤细胞外在的(涉及肿瘤微环境中不存在浸润性T细胞、多余的抑制性检查点和/或存在免疫抑制性细胞)(Sharma 2017)。即使在被认为对检查点抑制剂敏感的肿瘤中,或将抗CTLA-4和抗PD-1/PDL-1药剂组合时,约50%的患者不会经历肿瘤缩小,并且所有治疗的患者的中值治疗持续时间或无进展生存期仍相对较短(约2-5个月)(Kazandjian,2016)。此外,若干最普遍的实体瘤和大多数血液恶性肿瘤在使用这些检查点抑制剂时显示出令人失望的结果。特别地,激素受体阳性的乳腺癌、结肠直肠癌(非微卫星不稳定性)和前列腺癌似乎对这种类型的免疫操作不敏感,并且可以从不同的免疫疗法途径中受益(Le 2015,Dirix 2015,Topalian 2012,Graff 2016)。这些发现强调,还需要靶向另外的检查点的替代方法或协同方法来激活除适应性免疫应答以外的先天性免疫应答,从而进一步改善临床结果。肿瘤细胞和髓样细胞(巨噬细胞、树突细胞、单核细胞来源的抑制细胞、粒细胞)上存在先天性免疫应答的若干个检查点,它们是影响肿瘤进展、转移和整体结果的肿瘤微环境的重要细胞组分(Barclay和van den Berg 2014,Yanagita 2017)。

[0004] 信号调节蛋白(SIRP)- α 或SIRP α ,也称为CD172a、BIT或SHPS-1,是紧密相关的SIRP蛋白的SIRP配对的受体家族的成员。SIRP α 主要由造血细胞(包括巨噬细胞、树突细胞和粒细胞)表达,并且还表达于神经元上,尤其是脑细胞、神经胶质细胞、平滑肌细胞和内皮细胞以及一些肿瘤细胞上(Barclay和van den Berg 2014)。SIRP α 是一种跨膜蛋白,具有含有三个Ig样结构域的胞外结构域,以及含有免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)的胞质区。编码人SIRP α 的基因是多态性的,具有鉴定的两种常见变体:SIRP α V1和SIRP α V2,表面氨基酸发生改变,但是似乎并不影响与其配体(分化簇47(CD47))的结合(Barclay和van den Berg

2014)。SIRP α (由髓样细胞表达) 与CD47 (在许多肿瘤细胞以及正常细胞上表达或过表达) 的相互作用是调节髓样细胞功能 (包括粘附、迁移、激活和抑制活性) 的先天应答的重要免疫检查点。CD47/SIRP α 相互作用调节发送抑制性“别吃我信号”至吞噬细胞的靶细胞的巨噬细胞和树突细胞吞噬作用。CD47与SIRP α 的结合启动了抑制性信号级联反应, 导致在其细胞质ITIM的磷酸化后吞噬作用的抑制 (Oldenborg 2000, Oldenborg 2001, Okazawa 2005)、SHP-1和SHP-2 (含Src同源结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶) 的募集和结合 (Veillette 1998, Oldenborg 2001)、非肌肉肌球蛋白IIA和最终吞噬功能的抑制 (Tsai和Discher 2008, Barclay和van den Berg 2014, Murata 2014, Veillette和Chen 2018, Matazaki 2009)。CD47作为“别吃我”信号的作用的一个重要推论是它作为“自我标记”的作用。这给自身吞噬作用提供了重大障碍, 并且阻断了随后的自身免疫应答 (Oldenborg, 2002, Oldenborg 2004)。癌细胞使用CD47来掩盖自身的“自我性 (selfness)”, 从而逃避了先天性免疫系统和适应性免疫系统两者。阻断先天性免疫细胞 (例如巨噬细胞和树突细胞) 上的SIRP α 与肿瘤细胞上的CD47的相互作用已经成为癌症疗法中的可行靶标。临床前数据指示, 类似于抗CD47抗体, 阻断SIRP α /CD47相互作用的抗SIRP α 抗体无论是作为单一疗法还是与其他药剂组合都在小鼠肿瘤模型中表现出抗肿瘤功效 (Gauttier, 2017; Ring, 2017; Yanigita, 2017; Poirier, 2018; 以及Guattier, 2018)。重要的是, 在中断SIRP α /CD47相互作用后, 除了先天性免疫应答以外, 产生适应性免疫应答似乎对获得稳健的抗肿瘤应答至关重要 (Tseng 2013, Li 2015, Xu 2017)。

[0005] DC细胞上的SIRP α 表达及其与T细胞上CD47的相互作用在诱导适应性免疫应答方面是重要的。据报道, SIRP α /CD47相互作用的阻断会影响DC刺激抗原特异性CD8⁺ T细胞应答的能力, 并且这与对肿瘤DNA的DC介导的应答增强相关 (Liu 2015, Xu 2017)。

[0006] 配对的受体的SIRP家族的另一成员SIRP- γ 在人 (而不是啮齿动物) T细胞的表面上选择性表达, 具有由4个氨基酸组成的短胞质区。SIRP- γ 也结合CD47, 并且对于介导T细胞和APC之间的粘附以及对于T细胞功能 (包括增殖和激活) 是重要的 (Barclay和van den Berg 2014; 以及Piccio, 2005)。因此, 阻断SIRP α 和CD47之间、而不是SIRP- γ 和CD47之间的相互作用可以提供保护T细胞功能的优点。

[0007] 本披露描述了具有不同功能特征的抗SIRP α mAb。本披露的抗体可用于治疗人类中与SIRP α 相关的疾病和病症的不同治疗方法, 该方法包括使用抗SIRP α mAb作为治疗剂来预防和治疗实体癌和血液癌。本披露的抗体也可用作确定组织样品中抗SIRP α 表达水平的诊断工具。本披露的实施例包括分离的抗体及其免疫活性结合片段; 包含一种或多种抗SIRP α 单克隆抗体、优选嵌合或人源化形式的所述抗体的药物组合物; 以及此类抗SIRP α 单克隆抗体的治疗性使用方法。

[0008] 本披露的实施例包括通过参考特异性结构特征 (即CDR或整个重链可变结构域和轻链可变结构域或整个重链和轻链的指定氨基酸序列) 来定义的mAb或其抗原结合片段。所有本文披露的这些抗体结合SIRP α 、SIRP γ 、或SIRP α 和SIRP γ 。

[0009] 单克隆抗体或其抗原结合片段可包含至少一个、通常至少三个如本文所提供的CDR序列, 这些序列通常与来自人可变区的框架序列组合或呈分离的CDR肽的形式。在一些实施例中, 抗体包含至少一条轻链和至少一条重链, 该至少一条轻链包含本文提供的位于可变区框架中的三个轻链CDR序列, 该可变区框架可以是但不限于鼠或人可变区框架, 该至

少一条重链包含本文提供的位于可变区框架中的三个重链CDR序列,该可变区框架可以是但不限于人或鼠可变区框架。

[0010] 在一些实施例中,6个CDR的组合包括但不限于可变重链CDR1 (HCDR1)、可变重链CDR2 (HCDR2)、可变重链CDR3 (HCDR3)、可变轻链CDR1 (LCDR1)、可变轻链CDR2 (LCDR2)、和可变轻链CDR3 (LCDR3)的组合,该组合选自:

[0011] 包含SEQ ID NO:33的HCDR1、包含SEQ ID NO:34的HCDR2、包含SEQ ID NO:35的HCDR3、包含SEQ ID NO:1的LCDR1、包含SEQ ID NO:2的LCDR2、包含SEQ ID NO:3的LCDR3;

[0012] 包含SEQ ID NO:36的HCDR1、包含SEQ ID NO:37的HCDR2、包含SEQ ID NO:38的HCDR3、包含SEQ ID NO:4的LCDR1、包含SEQ ID NO:5的LCDR2、包含SEQ ID NO:6的LCDR3;

[0013] 包含SEQ ID NO:39的HCDR1、包含SEQ ID NO:40的HCDR2、包含SEQ ID NO:41的HCDR3、包含SEQ ID NO:7的LCDR1、包含SEQ ID NO:8的LCDR2、包含SEQ ID NO:9的LCDR3;

[0014] 包含SEQ ID NO:42的HCDR1、包含SEQ ID NO:43的HCDR2、包含SEQ ID NO:44的HCDR3、包含SEQ ID NO:10的LCDR1、包含SEQ ID NO:11的LCDR2、包含SEQ ID NO:12的LCDR3;

[0015] 包含SEQ ID NO:45的HCDR1、包含SEQ ID NO:46的HCDR2、包含SEQ ID NO:47的HCDR3、包含SEQ ID NO:13的LCDR1、包含SEQ ID NO:14的LCDR2、包含SEQ ID NO:15的LCDR3;

[0016] 包含SEQ ID NO:48的HCDR1、包含SEQ ID NO:49的HCDR2、包含SEQ ID NO:50的HCDR3、包含SEQ ID NO:16的LCDR1、包含SEQ ID NO:17的LCDR2、包含SEQ ID NO:18的LCDR3;

[0017] 包含SEQ ID NO:51的HCDR1、包含SEQ ID NO:52的HCDR2、包含SEQ ID NO:53的HCDR3、包含SEQ ID NO:19的LCDR1、包含SEQ ID NO:20的LCDR2、包含SEQ ID NO:21的LCDR3。

[0018] 包含SEQ ID NO:54的HCDR1、包含SEQ ID NO:55的HCDR2、包含SEQ ID NO:56的HCDR3、包含SEQ ID NO:22的LCDR1、包含SEQ ID NO:23的LCDR2、包含SEQ ID NO:24的LCDR3。

[0019] 包含SEQ ID NO:57的HCDR1、包含SEQ ID NO:58的HCDR2、包含SEQ ID NO:59的HCDR3、包含SEQ ID NO:25的LCDR1、包含SEQ ID NO:26的LCDR2、包含SEQ ID NO:27的LCDR3。

[0020] 包含SEQ ID NO:60的HCDR1、包含SEQ ID NO:61的HCDR2、包含SEQ ID NO:62的HCDR3、包含SEQ ID NO:28的LCDR1、包含SEQ ID NO:29的LCDR2、包含SEQ ID NO:30的LCDR3。

[0021] 包含SEQ ID NO:42的HCDR1、包含SEQ ID NO:43的HCDR2、包含SEQ ID NO:44的HCDR3、包含SEQ ID NO:10的LCDR1、包含SEQ ID NO:31的LCDR2、包含SEQ ID NO:12的LCDR3。

[0022] 包含SEQ ID NO:42的HCDR1、包含SEQ ID NO:43的HCDR2、包含SEQ ID NO:44的HCDR3、包含SEQ ID NO:10的LCDR1、包含SEQ ID NO:31的LCDR2、包含SEQ ID NO:32的LCDR3。

[0023] 包含SEQ ID NO:57的HCDR1、包含SEQ ID NO:58的HCDR2、包含SEQ ID NO:63的

HCDR3、包含SEQ ID NO:25的LCDR1、包含SEQ ID NO:26的LCDR2、包含SEQ ID NO:27的LCDR3。

[0024] 在一些实施例中,抗SIRP α 抗体包括包含具有选自以下的氨基酸序列的重链可变结构域(V_H)的抗体或其抗原结合片段:SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:96、和SEQ ID NO:97的氨基酸序列,以及与所述序列中的一个表现出至少85%、90%、95%、97%、98%、或99%序列同一性的氨基酸序列。可替代地或此外,包括抗体或其抗原结合片段的抗SIRP α 抗体可以包含具有选自以下的氨基酸序列的轻链可变结构域(V_L):SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、和SEQ ID NO:80的氨基酸序列,以及与所述序列中的一个表现出至少85%、90%、95%、97%、98%、或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0025] 尽管选自以上所列出的 V_H 结构域和 V_L 结构域序列组的 V_H 结构域和 V_L 结构域的所有可能的配对均是可允许的,但是披露了 V_H 和 V_L 结构域的某些组合。因此,抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段是包含重链可变结构域(V_H)和轻链可变结构域(V_L)的组合的那些,其中该组合选自:

i. 包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:64的轻链可变结构域;

ii. 包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:65的轻链可变结构域;

iii. 包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:66的轻链可变结构域;

iv. 包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:67的轻链可变结构域;

v. 包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:68的轻链可变结构域;

vi. 包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:69的轻链可变结构域;

vii. 包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:70的轻链可变结构域;

viii. 包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:71的轻链可变结构域;

ix. 包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:72的轻链可变结构域;

x. 包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:73的轻链可变结构域;

xi. 包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID

NO:74的轻链可变结构域;

xii.包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:75的轻链可变结构域;

xiii.包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:76的轻链可变结构域;

xiv.包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:74的轻链可变结构域;

xv.包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:75的轻链可变结构域;

xvi.包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:76的轻链可变结构域;

xvii.包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:74的轻链可变结构域;

xviii.包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:75的轻链可变结构域;

xix.包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:76的轻链可变结构域;

xx.包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:74的轻链可变结构域;

xxi.包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:75的轻链可变结构域;

xxii.包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:76的轻链可变结构域;

xxiii.包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:77的轻链可变结构域;

xxiv.包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:78的轻链可变结构域;

xxv.包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的轻链可变结构域;

xxvi.包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的轻链可变结构域;

xxvii.包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:78的轻链可变结构域;

xxviii.包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的轻链可变结构域;

xxix.包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的轻链可变结构域;

xxx.包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:78的轻链可变结构域;

xxxii. 包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的轻链可变结构域;

xxxiii. 包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的轻链可变结构域;以及

xxxiiii. 包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的重链可变结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:72的轻链可变结构域。

[0026] 在一些实施例中,抗SIRPα抗体或其抗原结合片段也可包含重链可变结构域和轻链可变结构域的組合,其中该重链可变结构域包含与以上(i)至(xxxiii)所示出的重链氨基酸序列具有至少85%序列同一性,或至少90%序列同一性,或至少95%序列同一性,或至少97%、98%或99%序列同一性的 V_H 序列,和/或该轻链可变结构域包含与以上(i)至(xxxiii)所示出的轻链氨基酸序列具有至少85%序列同一性,或至少90%序列同一性,或至少95%序列同一性,或至少97%、98%或99%序列同一性的 V_L 序列。在(i)至(xxxiii)部分中的特定 V_H 和 V_L 配对或組合对于具有与这些参考序列具有特定序列同一性百分比的 V_H 和 V_L 结构域序列的抗SIRPα抗体而言可能是保守性的。

[0027] 对于所有实施例,抗体或其抗原结合片段的重链可变结构域和/或轻链可变结构域通过与参考序列的特定序列同一性百分比来定义, V_H 和/或 V_L 结构域可以保留与参考序列中存在的那些相同的CDR序列,以使得变化仅存在于框架区域内。

[0028] 在另一个实施例中,抗SIRPα抗体或其抗原结合片段是包含重链(HC)和轻链(LC)的組合的那些,其中该組合选自:

i. 包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:98的轻链;

ii. 包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:99的轻链;

iii. 包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:100的轻链;

iv. 包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:101的轻链;

v. 包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:102的轻链;

vi. 包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:103的轻链;

vii. 包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:101的轻链;

viii. 包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:102的轻链;

ix. 包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:103的轻链;

x. 包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:101的轻链;

xi.包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:102的轻链;

xii.包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:103的轻链;

xiii.包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:101的轻链;

xiv.包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:102的轻链;

xv.包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:103的轻链;

xvi.包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:104的轻链;

xvii.包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的轻链;

xviii.包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:106的轻链;

xix.包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:107的轻链;

xx.包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的轻链;

xxi.包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:106的轻链;

xxii.包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:107的轻链;

xxiii.包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的轻链;

xxiv.包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:106的轻链;

xxv.包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:107的轻链;以及

xxvi.包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:108的轻链。

[0029] 披露了不同形式的抗SIRP α mAb。例如,抗CD47 mAb可以是具有同种型IgA、IgD、IgE、IgG和IgM(更特别是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)的人框架和恒定区并且在一些情况下具有改变Fc受体功能或防止Fab臂交换的不同突变的全长人源化抗体,或者如本文所披露的抗体片段,例如F(ab')₂片段、F(ab)片段、单链Fv片段(scFv)等。

[0030] 在一些实施例中,抗SIRP α mAb或其抗原结合片段包含选自IgG1、IgG1-N297Q、IgG2、IgG4、IgG4 S228P、IgG4 PE的IgG同种型及其变体。

[0031] 在一些实施例中,除了人SIRP α 以外,抗SIRP α mAb或其抗原结合片段还结合人SIRP

γ。

[0032] 在一些实施例中,抗SIRPαAb或其抗原结合片段选择性地结合人SIRPα。

[0033] 在一些实施例中,抗SIRPαAb或其抗原结合片段增加人肿瘤细胞的吞噬作用。

[0034] 在一些实施例中,如本文所披露的抗SIRPαAb是特异性结合SIRPα和至少一种第二抗原的多特异性抗体,其中该第二抗原是CD47表达细胞的标记。

[0035] 在一些实施例中,多特异性抗体的第二抗原选自CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD30、CD33、CD40、CD44、HER2、CD52、CD56、CD70、CD96、CD97、CD99、CD123、CD279 (PD-1)、CD117、C-Met、PTHR2、EGFR、RANKL、SLAMF7、PD-L1、CD38、CD19/CD3、HAVCR2 (TIM3)、和GD2。

[0036] 在一些实施例中,抗SIRPαAb或其抗原结合片段增加人肿瘤细胞的吞噬作用,并且与靶向肿瘤细胞上抗原的促进调理作用的单克隆抗体 (opsonizing monoclonal antibody) 组合施用。

[0037] 在一些实施例中,抗SIRPαAb或其抗原结合片段增加人肿瘤细胞的吞噬作用,并且与靶向肿瘤细胞上抗原的促进调理作用的单克隆抗体组合施用,其中该促进调理作用的单克隆抗体选自利妥昔单抗 (rituximab) (抗CD20)、曲妥珠单抗 (trastuzumab) (抗HER2)、阿仑单抗 (alemtuzumab) (抗CD52)、西妥昔单抗 (cetuximab) (抗EGFR)、帕尼单抗 (panitumumab) (抗EGFR)、奥法木单抗 (ofatumumab) (抗CD20)、地诺单抗 (denosumab) (抗RANKL)、帕妥珠单抗 (pertuzumab) (抗HER2)、帕尼单抗 (panitumumab) (EGFR)、帕妥珠单抗 (pertuzumab) (HER2)、艾洛珠单抗 (elotuzumab) (SLAMF7)、阿特珠单抗 (atezolizumab) (抗PD-L1)、阿维鲁单抗 (avelumab) (抗PD-L1)、德瓦鲁单抗 (durvalumab) (抗PD-L1)、耐昔妥珠单抗 (necitumumab) (抗EGFR)、达雷木单抗 (daratumumab) (抗CD38)、阿妥珠单抗 (obinutuzumab) (抗CD20)、博纳吐单抗 (blinatumomab) (抗CD19/CD3)、地努图希单抗 (dinutuximab) (抗GD2)。

[0038] 在一些实施例中,促进调理作用的单克隆抗体靶向CD20、EGFR、和PD-L1。

[0039] 在一些实施例中,抗SIRPαAb或其抗原结合片段表现出抗肿瘤活性。

[0040] 在一些实施例中,将抗SIRPαAb或其抗原结合片段与抗CD47抗体组合施用,其中该抗CD47抗体描述于美国专利10,239,945中,并且将其通过引用以其全文特此并入。

[0041] 在一些实施例中,将抗SIRPαAb或其抗原结合片段与抗EGFR抗体组合施用。

[0042] 在一些实施例中,将抗SIRPαAb或其抗原结合片段与抗PD-1抗体组合施用。

[0043] 在一些实施例中,将抗SIRPαAb或其抗原结合片段与抗CTLA-4抗体组合施用。

[0044] 在一些实施例中,本披露提供了药物组合物,该药物组合物包含本文披露的抗SIRPαAb或抗原结合片段(任选地呈嵌合或人源化形式)中的一种或多种以及药学上或生理学上可接受的载体、稀释剂、或赋形剂。

[0045] 在一些实施例中,将抗SIRPαAb或其抗原结合片段用于在人类疗法中使用。

[0046] 在一些实施例中,将抗SIRPαAb或其抗原结合片段用于在预防或治疗人类患者中的癌症中使用。

[0047] 在本披露之前,需要鉴定具有如本文所述的功能特征的抗SIRPαAb。本披露的抗SIRPαAb表现出使得mAb特别有利于在人类疗法中使用、特别是在预防和/或治疗实体癌和血液癌中使用的特性的组合。

[0048] 在一些实施例中,癌症选自白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、乳腺癌、子宫

内膜癌、结肠癌(结肠直肠癌)、直肠癌、膀胱癌、尿路上皮癌、肺癌(非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌)、支气管癌、骨癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、肝细胞癌、胆囊癌、胆管癌、食道癌、肾细胞癌、甲状腺癌、头颈部鳞状细胞癌(头颈癌)、睾丸癌、内分泌腺癌、肾上腺癌、脑下垂体癌、皮肤癌、软组织癌、血管癌、脑癌、神经癌、眼癌、脑膜癌、口咽癌、下咽部癌、宫颈癌、以及子宫癌、成胶质细胞瘤、成神经管细胞瘤、星形细胞瘤、胶质瘤、脑膜瘤、胃泌素瘤、成神经细胞瘤、黑色素瘤、骨髓增生异常综合征、以及肉瘤。

[0049] 在一些实施例中,白血病选自由以下组成的组的白血病:全身性肥大细胞增多症、急性淋巴细胞(成淋巴细胞)白血病(ALL)、T细胞-ALL、急性髓性白血病(AML)、粒细胞性白血病、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、骨髓增生障碍/赘生物、骨髓增生异常综合征、单核细胞白血病、以及浆细胞白血病;其中所述淋巴瘤选自由以下组成的组:组织细胞性淋巴瘤和T细胞淋巴瘤、B细胞淋巴瘤,包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤,如低级别/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、细胞淋巴瘤(FCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、弥漫性大细胞淋巴瘤(DLCL)、小淋巴细胞性(SL) NHL、中等级别/滤泡性NHL、中等级别的弥漫性NHL、高级别成免疫细胞NHL、高级别成淋巴细胞NHL、高级别小非裂细胞NHL、巨大肿块NHL、以及瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia);并且其中所述肉瘤选自由以下组成的组:骨肉瘤、尤因肉瘤、平滑肌肉瘤、滑膜肉瘤、腺泡状软组织肉瘤、血管肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、以及软骨肉瘤。

[0050] 在一些实施例中,披露了使用抗SIRP α 单克隆抗体或其抗原结合片段测定肿瘤和/或免疫细胞中的SIRP α 表达的方法,该单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合SEQ ID NO:121的序列内的表位。

[0051] 在一些实施例中,该方法包括获得患者样品、使患者样品与特异性结合SEQ ID NO:121的序列内的表位的抗SIRP α 单克隆抗体或其抗原结合片段接触、以及测定抗体与患者样品的结合,其中抗体与患者样品的结合用于诊断患者样品中的SIRP α 表达。

[0052] 在一些实施例中,披露了使用抗SIRP γ 单克隆抗体或其抗原结合片段测定肿瘤和/或免疫细胞中的SIRP γ 表达的方法,该单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合SEQ ID NO:122的序列内的表位。

[0053] 在一些实施例中,该方法包括获得患者样品、使患者样品与特异性结合SEQ ID NO:122的序列内的表位的抗SIRP γ 单克隆抗体或其抗原结合片段接触、以及测定抗体与患者样品的结合,其中抗体与患者样品的结合用于诊断患者样品中的SIRP γ 表达。

[0054] 在一些实施例中,肿瘤是原发性癌症肿瘤或转移性癌症肿瘤。

[0055] 在一些实施例中,对抗SIRP α 单克隆抗体或其抗原结合片段与患者样品结合的测定利用了组织样品的免疫组织化学标记、酶联免疫吸附测定(ELISA)或流式细胞术。

[0056] 在一些实施例中,该方法包括肿瘤细胞,并且该测定包含测定抗SIRP α 单克隆抗体或其抗原结合片段与患者样品中肿瘤细胞的结合。

[0057] 根据下文提供的详细说明,本披露可应用性的另外范围将变得明显。然而,应当理解,详细说明和具体实例,在指示本披露的实施例的同时,仅以说明的方式给出,因为根据本详细说明,在本披露的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员而言将变得明显。

附图说明

[0058] 根据以下结合附图的详细说明,将更好地理解本披露的以上和其他方面、特征、以及优点,所有这些附图都仅以说明的方式给出,而不受限于本披露。

[0059] 图1A-图1V. 抗SIRP抗体与人SIRP α 的结合。通过固相ELISA确定抗SIRP抗体与重组人SIRP α 的结合。将高结合ELISA板用重组人SIRP α 包被,并且添加增加浓度的抗SIRP抗体持续1小时。将孔洗涤并且然后与HRP标记的第二抗体一起孵育1小时,随后添加过氧化物酶底物,并且测量在450nm的吸光度。

[0060] 图2. 杂交瘤来源的mAb (SIRP1、SIRP2和SIRP3) 与表达SIRP α 的THP1细胞的结合。确定SIRP1、SIRP2、和SIRP3与THP-1单核细胞系的结合。将细胞与增加浓度的抗体一起孵育1hr。将细胞洗涤并且然后与Alexafluor 647标记的第二抗体一起孵育1hr。将细胞洗涤并使用流式细胞术测量抗体结合。

[0061] 图3A-图3V. 抗SIRP抗体与人SIRP γ 的结合。通过固相ELISA确定抗SIRP抗体与重组人SIRP伽玛(SIRP γ)的结合。将高结合ELISA板用重组人SIRP γ 包被,并且添加增加浓度的抗SIRP抗体持续1小时。将孔洗涤并且然后与HRP标记的第二抗体一起孵育1小时,随后添加过氧化物酶底物,并且测量在450nm的吸光度。

[0062] 图4A-图4B. SIRP mAb与表达SIRP γ 的Jurkat T细胞的结合。确定SIRP1、SIRP2、SIRP3、SIRP4和SIRP9与Jurkat T-ALL细胞的结合。将细胞与增加浓度的抗体(图4A)或与10 μ g/ml的抗SIRP抗体一起孵育1hr(图4B)。将细胞洗涤并且然后与Alexafluor 647标记的第二抗体一起孵育1hr。将细胞洗涤并使用流式细胞术测量抗体结合。

[0063] 图5A-图5G. 通过抗SIRP抗体阻断人CD47/SIRP α 结合。通过固相ELISA确定抗SIRP抗体阻断CD47和重组人SIRP α 之间的相互作用的能力。将高结合ELISA板用重组人SIRP α 包被,并且添加增加浓度的抗SIRP抗体持续1小时。将孔洗涤,并且然后与Fc标记的人CD47一起孵育1小时。将孔洗涤并且然后与HRP标记的第二抗体一起孵育1小时,随后添加过氧化物酶底物,并且测量在450nm的吸光度。

[0064] 图6A-图6H. 通过抗SIRP抗体阻断人CD47/SIRP γ 结合。通过固相ELISA确定抗SIRP抗体阻断CD47和重组人SIRP γ 之间的相互作用的能力。将高结合ELISA板用重组人SIRP γ 包被,并且添加增加浓度的抗SIRP抗体持续1小时。将孔洗涤,并且然后与Fc标记的人CD47一起孵育1小时。将孔洗涤并且然后与HRP标记的第二抗体一起孵育1小时,随后添加过氧化物酶底物,并且测量在450nm的吸光度。

[0065] 图7A-图7B. 抗SIRP抗体增强吞噬作用。将人巨噬细胞以 3×10^4 个细胞/孔的浓度接种在96孔板中并且使其贴壁生长24小时。将 8×10^4 CFSE (1 μ M) 标记的人Jurkat T细胞和增加浓度的抗SIRP抗体(图7A)或10 μ g/ml的抗SIRP抗体(图7B)添加至巨噬细胞培养物中,并且在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时。去除未被吞噬的Jurkat细胞并且洗涤巨噬细胞培养物。将巨噬细胞胰酶消化并且针对CD14进行染色。使用流式细胞术确定总CD14 $^{+}$ 群体中CD14 $^{+}$ /CFSE $^{+}$ 细胞的百分比。

[0066] 图8A-图8J. 抗SIRP抗体与抗CD47抗体组合来增强吞噬作用。将人巨噬细胞以 3×10^4 个细胞/孔的浓度接种在96孔板中并且使其贴壁生长24小时。将 8×10^4 CFSE (1 μ M) 标记的人Jurkat T细胞和增加浓度的单独的抗SIRP抗体、单独的抗CD47抗体、或抗SIRP抗体与抗CD47抗体的组合添加至巨噬细胞培养物中,并且在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时。去除未被吞噬的

Jurkat细胞并且洗涤巨噬细胞培养物。将巨噬细胞胰酶消化并且针对CD14进行染色。使用流式细胞术确定总CD14⁺群体中CD14⁺/CFSE⁺细胞的百分比。

[0067] 图9A-图9D. 抗SIRP抗体与抗CD20抗体组合来增强吞噬作用。将人巨噬细胞以3x10⁴个细胞/孔的浓度接种在96孔板中并且使其贴壁生长24小时。将8x10⁴CFSE (1μM) 标记的人RAJI淋巴瘤细胞和增加浓度的单独的抗SIRP抗体、单独的抗CD20抗体Rituxan、或抗SIRP抗体与Rituxan的组合添加至巨噬细胞培养物中, 并且在37°C下孵育3小时。去除未被吞噬的RAJI细胞并且洗涤巨噬细胞培养物。将巨噬细胞胰酶消化并且针对CD14进行染色。使用流式细胞术确定总CD14⁺群体中CD14⁺/CFSE⁺细胞的百分比。

[0068] 图10A-图10B. 抗SIRP抗体与抗EGFR和抗PD-L1抗体组合来增强吞噬作用。将人巨噬细胞以3x10⁴个细胞/孔的浓度接种在96孔板中并且使其贴壁生长24小时。将8x10⁴CFSE (1μM) 标记的人FaDu HNSCC和增加浓度的单独的抗SIRP抗体、单独的抗EGFR抗体Erbix、或抗SIRP抗体与Erbix组合或与阿维鲁单抗组合添加至巨噬细胞培养物中, 并且在37°C下孵育3小时。去除未被吞噬的FaDu细胞并且洗涤巨噬细胞培养物。将巨噬细胞胰酶消化并且针对CD14进行染色。使用流式细胞术确定总CD14⁺群体中CD14⁺/CFSE⁺细胞的百分比。

[0069] 图11. 抗SIRP抗体结合巨噬细胞和树突细胞上的SIRPα。确定抗SIRP抗体结合人巨噬细胞或树突细胞。将人单核细胞来源的巨噬细胞与增加浓度的抗SIRP抗体一起孵育1hr。将细胞洗涤并且然后与AF647标记的第二抗体一起孵育45min, 洗涤, 并且使用流式细胞术测量抗体结合。

[0070] 图12A-图12C. 抗SIRP抗体结合原始的和激活的T细胞上的SIRPγ。通过流式细胞术确定在抗CD3包被的板上激活3天后, 抗SIRP抗体与原始的T细胞(图12A和图12B) 或激活的T细胞(图12C) 的结合。将T细胞与增加浓度的抗SIRP抗体一起孵育1h, 洗涤细胞, 并且添加FITC标记的抗小鼠第二抗体持续1小时。将细胞洗涤并使用流式细胞术测量抗体结合。

[0071] 图13. 在巨噬细胞上通过抗SIRP抗体阻断人CD47/SIRPα结合。通过流式细胞术确定抗SIRP抗体阻断重组人CD47和巨噬细胞表达的SIRPα之间的相互作用的能力。在与10μg/ml的抗SIRP抗体一起孵育之前, 阻断巨噬细胞上的Fc受体。使用AF647标记的抗人第二抗体测量可溶性Fc标记的人CD47 (20μg/ml) 的结合。

[0072] 图14A-图14B. 抗SIRP抗体在同种异体树突细胞刺激后不抑制T细胞增殖。通过在10μg/ml抗SIRP抗体存在下, 以1:5T细胞:DC比率, 用同种异体人单核细胞来源的树突细胞激活CellTrace Violet标记的人CD3 T细胞来确定抗SIRP抗体对T细胞增殖的作用。使用流式细胞术确定6-7天共培养后增殖的CD3 T细胞的百分比。虚线表示hIgG4P对照的增殖。

[0073] 图15. 抗SIRP抗体不抑制抗原回忆应答 (recall response)。使用来自人巨细胞病毒血清反应阳性供体的PBMC评估了抗SIRP抗体对T细胞抗原回忆应答的作用。在增加浓度的CMV抗原存在下, 将CellTrace Violet染料标记的PBMC与10μg/ml的抗SIRP抗体一起孵育5天。使用流式细胞术, 通过CD4⁺ T细胞群体内的CellTrace Violet染料稀释来确定T细胞增殖。

具体实施方式

定义

[0074] 除非另有定义, 否则结合本披露使用的科技术语应当具有本领域的普通技术人员

通常所了解的意义。另外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数并且复数术语应包括单数。总体而言,与本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、以及蛋白质和寡核苷酸或多核苷酸化学及杂交学结合使用的命名法及其技术是本领域中众所周知并且常用的那些。

[0075] 如本文所用,术语“SIRP α ”和“含Src同源性2 (SH2) 结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶底物1 (SHPS-1)”是同义词并且可以互换使用。

[0076] 术语“抗SIRP α 抗体”是指本披露的抗体,其旨在用作治疗剂或诊断剂,并且特异性结合SIRP α ,特别是人SIRP α 。

[0077] 术语“抗SIRP”是指本披露的抗体,其旨在用作治疗剂或诊断剂,并且特异性结合SIRP α (特别是人SIRP α),特异性结合鉴定的两种常见变体SIRP α V1和SIRP α V2中的一种或全部两种和/或SIRP γ 及其抗体变体。

[0078] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白 (Ig) 分子的免疫活性部分,即含有特异性结合抗原(与抗原免疫反应)的抗原结合位点的分子。与.....或针对.....的“特异性结合”或“免疫反应”意指抗体与所希望的抗原的一个或多个抗原决定簇反应并且不与其他多肽反应或以低得多的亲和力结合 ($K_d > 10^{-6} M$)。抗体包括但不限于多克隆、单克隆、嵌合、Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、单链Fv片段、以及单臂抗体。

[0079] 如本文所用,如应用于本发明抗SIRP α 化合物的术语“单克隆抗体”(mAb)是指抗体,该抗体来源于单个拷贝或克隆,包括例如任何真核、原核、或噬菌体克隆,而不是产生它的方法。本披露的单克隆抗体优选地以同质的或基本上同质的群体而存在。完整的mAb含有2条重链和2条轻链。

[0080] “抗体片段”是指非完整抗体的分子,其包含完整抗体的一部分并结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0081] 如本文所披露,“抗体化合物”是指mAb及其抗原结合片段。根据本披露表现出类似功能特性的另外的抗体化合物可通过常规方法生成。例如,可以用人SIRP α 或其片段免疫小鼠,可回收并纯化得到的抗体,并且可以通过在实例中披露的方法评估确定它们是否具有与本文披露的抗体化合物相似或相同的结合与功能特性。也可以通过常规方法制备抗原结合片段。用于产生和纯化抗体和抗原结合片段的方法是本领域熟知的并可以例如发现于Harlow和Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual* [抗体:实验室手册], Cold Spring Harbor Laboratory Press [冷泉港实验室出版社], 冷泉港, 纽约, 第5-8章和第15章。

[0082] 如本文所披露,“多特异性抗体”是例如双特异性、三特异性或四特异性抗体。在一些实施例中,多特异性抗体在一个分子中靶向SIRP α 和/或SIRP γ 和至少一种其他抗原结合特异性。在一些实施例中,多特异性抗体可以同时靶向SIRP α 和/或SIRP γ , 和至少一个第二抗原(双特异性)、或至少一个第二和第三抗原(三特异性)、或至少一个第二、第三和第四抗原(四特异性),其中该第二抗原、第三抗原、和第四抗原在如本文所披露的肿瘤细胞上。

[0083] 双特异性抗体是在一个分子中具有两种不同抗原结合特异性的抗体。因此,三特异性抗体是在一个分子中具有三种不同抗原结合特异性的抗体。四特异性抗体是在一个分子中具有四种不同抗原结合特异性的抗体。在一个实施例中,如本文所披露的抗SIRP α 抗体是如本文所披露的靶向SIRP α 和/或SIRP γ 和肿瘤细胞上第二抗原的双特异性抗体。

[0084] 单克隆抗体涵盖其中重链和/或轻链的一部分与鼠抗体(具体地是鼠CDR)中的相应序列相同或同源,同时该链或这些链的其余部分与人抗体中的相应序列相同或同源的抗体。本披露的其他实施例包括这些单克隆抗体的表现出与单克隆抗体类似或相同的结合和生物特性的抗原结合片段。本披露的抗体可以包含 κ 或 λ 轻链恒定区和重链IgA、IgD、IgE、IgG、或IgM恒定区,包括IgG子类IgG1、IgG2、IgG3、以及IgG4和在一些情况下具有改变Fc受体功能的不同突变的那些。

[0085] 含有目前披露的鼠CDR的单克隆抗体可以通过本领域技术人员已知的不同方法中的任一种来制备,这些方法包括重组DNA方法。

[0086] 用于抗体工程化和改进的当前方法的回顾可以例如发现于P.Chames编辑,(2012) Antibody Engineering:Methods and Protocols[抗体工程化:方法和方案],第二版(Methods in Molecular Biology[分子生物学方法],第907册),Humana Press[胡玛纳出版社],ISBN-10:1617799734;C.R.Wood编辑,(2011) Antibody Drug Discovery (Molecular Medicine and Medicinal Chemistry,Book 4)[抗体药物发现(分子药物和药物化学,第4册)],Imperial College Press[帝国学院出版社];R.Kontermann和S.Dubel编辑,(2010) Antibody Engineering Volumes 1and 2(Springer Protocols)[抗体工程化第1卷和第2卷(施普林格协议)],第二版;以及W.Strohl和L.Strohl(2012) Therapeutic antibody engineering:Current and future advances driving the strongest growth area in the pharmaceutical industry[治疗性抗体工程化:驱动制药工业中的最强增长区域的当前和未来进展],Woodhead Publishing[伍德海德出版社]。

[0087] 用于产生和纯化抗体和抗原结合片段的方法是本领域熟知的并可以例如发现于Harlow和Lane(1988) Antibodies,A Laboratory Manual[抗体:实验室手册],Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],冷泉港,纽约,第5-8章和第15章。

[0088] 当其存在时,全长抗体天然地是“Y”型免疫球蛋白(Ig)分子,其包含四条多肽链:通过二硫键互相连接的两条相同的重(H)链和两条相同的轻(L)链。每条链的氨基末端部分(称为片段抗原结合区(FAB))包括具有大约100-110个或更多个氨基酸的可变区,其经由包含在其中的互补决定区(CDR)主要负责抗原识别。每条链的羧基末端部分限定恒定区(“Fc”区),主要负责效应子功能。

[0089] 这些CDR散布有更为保守的区域,称为框架(“FR”)。许多FR的氨基酸序列是本领域熟知的。每个轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR)由3个CDR和4个FR组成,按以下顺序从氨基端到羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。轻链的3个CDR被称为“LCDR1、LCDR2、和LCDR3”并且重链的3个CDR被称为“HCDR1、HCDR2、和HCDR3”。这些CDR含有形成与抗原的特异性相互作用的大多数残基。在LCVR和HCVR区域内的CDR氨基酸残基的编号和定位遵循众所周知的Kabat编号规则,Kabat等人,(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫意义的蛋白质序列],第五版.NIH公开号91-3242)。

[0090] 如本文所述,“抗原结合位点”也可以被定义为“高变区”、“HVR”或“HV”,并且是指抗体可变结构域的结构高变区,如Chothia和Lesk所定义的(Chothia和Lesk,Mol.Biol.[分子生物学]196:901-917,1987)。存在六个HVR,三个在VH中(H1、H2、H3)并且三个在VL中(L1、L2、L3)。本文中使用了由Kabat定义的CDR,除了在H-CDR1(扩展到包括H1)中。

[0091] 存在五种类型的哺乳动物免疫球蛋白(Ig)重链,其由希腊字母 α (阿尔法)、 δ (德尔

塔)、 ϵ (埃普西隆)、 γ (伽马)、以及 μ (谬) 表示, 这些重链将抗体的类别或同种型分别限定为 IgA、IgD、IgE、IgG、或 IgM。IgG 抗体可以进一步分为亚类, 例如 IgG1、IgG2、IgG3、以及 IgG4。

[0092] 每个重链类型由具有本领域熟知的序列的特定恒定区来表征。恒定区在相同同种型的所有抗体中均是相同的, 但是在不同同种型的抗体中是不同的。重链 γ 、 α 和 δ 具有由三个串联免疫球蛋白 (Ig) 结构域组成的恒定区和用于增加柔性的铰链区。重链 μ 和 ϵ 具有由四个 Ig 结构域组成的恒定区。

[0093] 铰链区是连接抗体的 Fc 部分和 Fab 部分的柔性氨基酸片段。此区域含有可以形成二硫键从而将两条重链连接在一起的半胱氨酸残基。

[0094] 重链的可变区在由不同 B 细胞产生的抗体中是不同的, 但对于由单个 B 细胞或单独的 B 细胞产生的所有抗体而言是相同的。每条重链的可变区是大约 110 个氨基酸长度并且由单个 Ig 结构域组成。

[0095] 在哺乳动物中, 轻链分为卡帕 (κ) 或兰布达 (λ), 并且其由本领域已知的特定恒定区表征。轻链具有两个连续的结构域: 氨基末端处的一个可变结构域, 和羧基末端处的一个恒定结构域。每种抗体含有一直相同的两条轻链; 哺乳动物中的每种抗体仅存在一种类型的轻链, κ 或 λ 。

[0096] 由根据抗体类别构成三个或四个恒定结构域的两条重链组成的 Fc 区在调节免疫细胞活性方面起作用。通过结合特异性蛋白, Fc 区确保每种抗体都对给定抗原生成适当免疫应答。Fc 区还结合不同细胞受体 (如 Fc 受体) 和其他免疫分子 (如补体蛋白)。通过这样做, 它介导了不同的生理效应, 包括调理作用, 细胞裂解, 以及肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞的去颗粒化作用。

[0097] 如本文所用, 术语“表位”是指位于抗体或抗体片段结合到其上的肽或蛋白质上的氨基酸的特异性排列。表位通常由分子 (如氨基酸或糖侧链) 的化学活性表面基团组成, 并且通常具有特异性三维结构特征, 以及特异性电荷特征。表位可以是线性的, 即涉及与氨基酸的单个序列结合, 或者可以是构象性的, 即涉及与抗原的不同区域中的在线性序列可能不一定相邻的氨基酸的两个或更多个序列结合。

[0098] 如本文所用, 如应用于本发明抗体化合物的术语“特异性地结合”、“特异地结合”、“特异结合”等, 是指特异性结合剂 (如抗体) 相比于结合到其他分子种类上而优先结合到靶分子种类上的能力, 藉此使该特异性结合剂与靶分子种类混合。当特异性结合剂能特异性结合到靶分子种类上时, 它被看作特异性识别该靶标。

[0099] 如本文所用, 术语“结合亲和力”是指一个分子在该分子上的一个位点处结合到另一个分子上的强度。如果特定的分子将结合到另一个特定的分子上或者与之特异性地缔合, 则这两个分子被看作表现出对于彼此而言的结合亲和力。结合亲和力与一对分子的缔合常数和离解常数有关, 但这对于本文的这些方法不是关键的, 因为这些常数可以测量或测定。相反, 用来描述在这些所述方法的分子之间的相互作用的如本文所用的亲和力通常是在经验研究中观察到的表观亲和力 (除非另有说明), 其可以用来比较一个分子 (例如, 抗体或其他特异性结合配偶体) 将藉此结合两个其他分子 (例如, 肽的两种形式或变体) 的相对强度。结合亲和力、缔合常数、和离解常数的概念是熟知的。

[0100] 如本文所用, 术语“序列同一性”表示当将序列进行比对使得序列匹配最大化时 (即, 考虑空位和插入), 在两个或更多个序列中的相应位置处的相同核苷酸或氨基酸残基

的百分比。同一性可以通过已知方法来容易地计算,这些方法包括但不限于在以下中描述的那些:Computational Molecular Biology[计算分子生物学],Lesk,A.M.编辑,Oxford University Press[牛津大学出版社],纽约,1988;Biocomputing:Informatics and Genome Projects[生物计算:信息学和基因组项目],Smith,D.W.编辑,Academic Press[学术出版社],New York[纽约],1993;Computer Analysis of Sequence Data[序列数据的计算机分析],第I部分,Griffin,A.M.,和Griffin,H.G.编辑,Humana Press[胡玛纳出版社],新泽西州,1994;Sequence Analysis in Molecular Biology[分子生物学的序列分析],von Heinje,G.,Academic Press[学术出版社],1987;以及Sequence Analysis Primer[序列分析引物],Gribskov,M.和Devereux,J.编辑,M Stockton Press[斯托克顿出版社],纽约,1991;以及Carillo,H.和Lipman,D.,SIAM J.Applied Math.[工业和应用数学学会应用数学杂志],48:1073(1988)。用于确定同一性的方法被设计为在测试的序列之间给出最大的匹配。此外,确定同一性的方法被编纂在可公开获得的计算机程序中。

[0101] 例如,通过Smith和Waterman的局部同源性算法,通过同源性比对算法,通过相似性搜索方法,或者通过这些算法的计算机化执行(在GCG威斯康星软件包(Wisconsin Package)中的GAP、BESTFIT、PASTA、和TFASTA,可获自阿森尼克斯公司(Accelrys, Inc.),圣地亚哥(San Diego),加利福尼亚州,美国),或者通过目测检查,可以进行用于比较的最佳序列比对。通常参见Altschul,S.F.等人,J.Mol.Biol[分子生物学杂志]215:403-410(1990)和Altschul等人Nucl.Acids Res.[核酸研究]25:3389-3402(1997)。

[0102] 适合于确定序列同一性百分比和序列相似性的算法的一个实例是BLAST算法,其描述于Altschul,S.等人,NCBI NLM NIH马里兰州贝塞斯达.20894;以及Altschul,S.等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]215:403-410(1990)。用于执行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开地获得。这种算法涉及首先通过鉴定查询序列中具有长度W的短字符而识别高评分序列对(HSP),这些短字符当与数据库序列中具有相同长度的字比对时匹配或满足某个正值的阈值评分T。T被称为相邻词得分阈。

[0103] 这些初始的相邻字符命中作为启动检索的基础,用于发现含有它们的更长HSP。然后,在可以增加累加比对评分的前提下,将字符命中在两个方向上沿每一序列延伸。对于核苷酸序列,使用参数M(一对匹配残基的奖励分;总是;0)和N(错配残基的罚分;总是;0)计算累积评分。对于氨基酸序列,使用评分矩阵来计算累加评分。当出现以下情况时停止每一方向的字符命中延伸:累积比对评分由其达到的最大值降低数量X、由于一个或者多个负评分残基比对的积累而使累积评分降至0或者以下、或者达到任一序列的末端。BLAST算法的参数W、T和X决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(对核苷酸序列来说)使用字长(W)为11、期望值(E)为10、截止值(cutoff)为100、M=5、N=-4、以及两条链的比较作为默认值。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用字长(W)为3、期望值(E)为10、以及BLOSUM62得分矩阵作为默认值。

[0104] 除计算序列同一性百分比之外,BLAST算法还进行两个序列之间相似性的统计分析。由BLAST算法提供的相似性的一个量度是最小总和概率(P(N)),它提供了由此将偶然发生在两个核苷酸序列或氨基酸序列之间的匹配的概率的一个指示。例如,如果在测试核酸序列与参考核酸序列的比较中的最小总和概率在一个实施例中小于约0.1、在另一个实施

例中小于约0.01、并且在又一个实施例中小于约0.001,则认为测试核酸序列与参考序列相似。

[0105] 如本文所用,术语“人源化的”、“人源化”等是指将本文所披露的鼠单克隆抗体CDR移植到人FR和恒定区。这些术语还涵盖通过例如以下分别披露的方法对鼠CDR和人FR进行的可能的进一步修饰:Kashmiri等人(2005)Methods[方法]36(1):25-34和Hou等人(2008)J.Biochem.[生物化学杂志]144(1):115-120,以改进不同抗体特性,如下文所讨论的。

[0106] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指mAb及其抗原结合片段,包括本文披露的这些抗体化合物,它们具有根据本披露的类似于本文披露的那些的结合和功能特性,并且具有在来源于非人抗体的CDR周围的基本上为人或完全为人的FR和恒定区。

[0107] 如本文所用,术语“FR”或“框架序列”是指FR 1至4中的任一种。由本披露涵盖的人源化的抗体和抗原结合片段包括其中FR 1至4中的任意一个或多个基本上或完全是人的分子,即,其中单独的基本上或完全为人的FR 1至4的可能组合中的任一种是存在的。例如,这包括其中FR1和FR2;FR1和FR3;FR1、FR2和FR3等基本上或完全为人的分子。基本上为人的框架区是与已知的人种系框架序列具有至少80%序列同一性的那些。优选地,基本上为人的框架区与本文披露的框架序列、或已知的人种系框架序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%的序列同一性。

[0108] 完全为人的框架区是与已知的人种系框架序列完全相同的那些。人FR种系序列可以获得自国际ImMunoGeneTics (IMGT) 数据库以及Marie-Paule Lefranc和Gerard Lefranc The Immunoglobulin FactsBook[免疫球蛋白丛书],Academic Press[学术出版社],2001,将其内容通过引用以其全文并入本文。

[0109] 免疫球蛋白丛书(The Immunoglobulin Facts Book)是用于创建人抗体谱的人种系免疫球蛋白基因的概略,并且包括203种基因和459种等位基因的条目,总计有837个展现的序列。个别条目包含所有人免疫球蛋白恒定基因和具有至少一个功能性或开放阅读框等位基因并位于三个主要基因座中的种系可变基因、多样性基因和连接基因。例如,种系轻链FR可以选自由以下组成的组:IGKV3D-20、IGKV2-30、IGKV2-29、IGKV2-28、IGKV1-27、IGKV3-20、IGKV1-17、IGKV1-16、1-6、IGKV1-5、IGKV1-12、IGKV1D-16、IGKV2D-28、IGKV2D-29、IGKV3-11、IGKV1-9、IGKV1-39、IGKV1D-39和IGKV1D-33和IGKJ1-5,并且种系重链FR可以选自由以下组成的组:IGHV1-2、IGHV1-18、IGHV1-46、IGHV1-69、IGHV2-5、IGHV2-26、IGHV2-70、IGHV1-3、IGHV1-8、IGHV3-9、IGHV3-11、IGHV3-15、IGHV3-20、IGHV3-66、IGHV3-72、IGHV3-74、IGHV4-31、IGHV3-21、IGHV3-23、IGHV3-30、IGHV3-48、IGHV4-39、IGHV4-59和IGHV5-51和IGHJ1-6。

[0110] 基本上为人的FR是与已知的人种系FR序列具有至少80%序列同一性的那些。优选地,基本上为人的框架区与本文披露的框架序列、或已知的人种系框架序列具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%的序列同一性。

[0111] 由本披露涵盖的CDR不但包括本文具体披露的那些,而且还包括与本文披露的CDR序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%序列同一性、或至少99%序列同一性的CDR序列。可替代地,由本披露涵盖的CDR不仅包括本文具体披露的那些,而且还包括与本文披露的CDR序列相比在相应位置具有1、2、3、4、或5个氨基酸

变化的CDR序列。这种序列相同的、或氨基酸修饰的CDR优选地结合到由完整抗体识别的抗原上。

[0112] 可使用几种不同的方法来生成除了本文披露的那些之外的展现出根据本披露的类似功能特性的人源化抗体,Almagro等人Frontiers in Biosciences[生物科学前沿] Humanization of antibodies[抗体人源化] (2008) 1月1日;13:1619-33。在一个方法中,将亲本抗体化合物CDR移植到与该亲本抗体化合物框架具有高度序列同一性的人框架上。该新框架的序列同一性大体上将是与亲本抗体化合物中的相应框架的序列具有至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%序列同一性。在具有少于100个氨基酸残基的框架的情况下,可以改变一个、二个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、或十个氨基酸残基。这种移植可导致与亲本抗体相比的结合亲和力的降低。如果情况如此,可以基于由Queen等人(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]88:2869披露的具体标准将该框架在某些位置处回复突变为亲本框架。描述了可用于基于同源性和回复突变产生人源化变体的方法的另外参考文献包括如以下所述的:Olimpieri等人Bioinformatics.[生物信息学]2015年2月1日;31(3):434-435和美国专利4,816,397、5,225,539和5,693,761;以及Winter和同事的方法(Jones等人(1986)Nature[自然]321:522-525;Riechmann等人(1988)Nature[自然]332:323-327;和Verhoeyen等人(1988)Science[科学]239:1534-1536)。

[0113] 人源化开始于嵌合,其是在20世纪80年代前半期开发的方法(Morrison,S.L., M.J.Johnson,L.A.Herzenberg和V.T.Oi:Chimeric human antibody molecules:mouse antigen-binding domains with human constant region domains.[嵌合人抗体分子:具有人恒定区结构域的小鼠抗原结合结构域]Proc.Natl.Acad.Sci.USA.[美国国家科学院院刊],81,6851-5(1984)),该方法由以下组成:包括将鼠抗体的可变(V)结构域与人恒定(C)结构域组合,以产生具有约70%人内容物的分子。

[0114] 使用几种不同方法生成本文所述的人源化抗体。在一种方法中,将亲本抗体化合物CDR移植到与该亲本抗体化合物框架具有高度序列同一性的人类FR中。该新FR的序列同一性大体上将是与亲本抗体化合物中的相应FR的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%同一性。在具有少于100个氨基酸残基的FR的情况下,可以改变一个、二个、三个、四个、五个或更多个氨基酸残基。这种移植可导致与亲本抗体相比的结合亲和力的降低。如果情况如此,可以基于由Queen等人(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]88:2869披露的具体标准将该FR在某些位置处回复突变为亲本框架。描述了可用于基于同源性和回复突变产生人源化变体的方法的另外参考文献包括如以下所述的:Olimpieri等人Bioinformatics.[生物信息学]2015年2月1日;31(3):434-435和美国专利4,816,397、5,225,539和5,693,761;以及Winter和同事的方法(Jones等人(1986)Nature[自然]321:522-525;Riechmann等人(1988)Nature[自然]332:323-327;和Verhoeyen等人(1988)Science[科学]239:1534-1536)。

[0115] 可以如下所述进行考虑回复突变的残基的鉴定。当氨基酸落入以下分类时,正在被使用的人种系序列的框架氨基酸(“受体FR”)由来自该亲本抗体化合物的框架的框架氨基酸(“供体FR”)进行置换:

[0116] (a) 受体框架的人FR中的氨基酸在该位置处对于人框架而言是不寻常的,而供体免疫球蛋白中的相应氨基酸在该位置处对于人框架而言是典型的;

[0117] (b) 氨基酸的位置紧邻着这些CDR之一;或者

[0118] (c) 框架氨基酸的任何侧链原子处于三维免疫球蛋白模型的CDR氨基酸的任何原子的约5-6埃(中心距(center-to-center))内。

[0119] 当在该受体框架的人FR中的每个氨基酸和该供体框架中的相应氨基酸总体上对于在那个位置的人框架而言为罕见的时候,这样的氨基酸可以由对于在那个位置的人框架而言为典型的氨基酸进行置换。这种回复突变标准使人们能够恢复该亲本抗体化合物的活性。

[0120] 生成展现出与本文披露的这些抗体化合物相似的功能特性的人源化抗体的另一种方法涉及使这些移植的CDR之内的氨基酸随机突变而不改变该框架,并且筛选得到的就结合亲和力和其他功能特性而言与这些亲本抗体化合物一样好或更好的分子。还可以在每个CDR内的每个氨基酸位置处引入单个突变,随后评估这样的突变对结合亲和力和其他功能特性的作用。可以将产生改进特性的单个突变进行组合,以便评估它们彼此组合的作用。

[0121] 此外,两种前述方法的组合是可能的。在CDR移植之后,除了在这些CDR中引入氨基酸变化之外,可以使具体的FR回复突变。这种方法描述于Wu等人(1999) J. Mol. Biol [分子生物学杂志]. 294:151-162。

[0122] 应用本披露的传授内容,本领域技术人员可以使用普通的技术,例如定向诱变,来取代在当前披露的CDR和FR序列之内的氨基酸,并且由此生成来源于当前序列的其他可变区氨基酸序列。多至所有天然存在的氨基酸可以引入特定取代位点处。然后,可以使用本文披露的这些方法来筛选这些另外的可变区氨基酸序列,以便鉴定具有所指示的体内功能的序列。以这样的方式,可以鉴定出适合于制备根据本披露的人源化抗体及其抗原结合片段的其他序列。优选地,在框架之内的氨基酸取代局限于本文披露的四个轻链和/或重链FR的任何一个或多个之内的一个、二个、三个、四个、或五个位置。优选地,在CDR之内的氨基酸取代局限于三个轻链和/或重链CDR的任何一个或多个之内的一个、二个、三个、四个、或五个位置。在以上所述的这些FR和CDR之内的各种变化的组合也是可能的。

[0123] 可以通过本文所披露的实例中的这些方法来证实通过引入以上讨论的氨基酸修饰而生成的、与本文所披露的具体分子所表现出的功能特性一致的这些抗体化合物的功能特性。

[0124] 如以上所述,为了避免在患者中引起人抗鼠抗体(HAMA)应答的问题,已遗传操纵鼠抗体,以通过将其互补决定区(CDR)移植到人免疫球蛋白分子的可变轻(V_L)链和可变重(V_H)链框架上同时保留认为对于抗原结合位点的完整性所必需的那些鼠框架残基来用存在于其人对应物中的氨基酸残基逐渐置换其鼠内容物。然而,人源化抗体的异种移植CDR可在患者中引起抗独特型(抗Id)应答。

[0125] 为了使抗Id应答最小化,已开发通过仅将抗体-配体相互作用中最重要的CDR残基移植到人框架上(称为“SDR移植”)来使异种移植抗体人源化的程序,其中仅CDRS的重要的特异性决定残基(SDR)移植到人框架上。Kashmiri等人(2005) Methods [方法] 36 (1):25-34所述的此程序涉及藉由已知结构的抗原抗体复合物的三维结构的数据库的帮助或者通过对抗体结合位点进行突变分析来鉴别SDR。涉及保留更多CDR残基的可替代人源化方法是基

于包括所有SDR的CDR残基片段即“缩短的”CDR的移植。Kashmiri等人还披露了评估人源化抗体与来自自己施用鼠抗体的患者的血清的反应性的程序。

[0126] Hou等人(2008) J.Biochem[生物化学杂志].144(1):115-120披露了用于构建具有改进的免疫原特性的人抗体变体的另一种策略。这些作者通过使用藉由计算机辅助同源性建模建立的4C8分子模型进行CDR移植来由鼠抗人CD34单克隆抗体4C8开发人源化抗体。使用此分子模型,这些作者鉴定抗原结合中具有潜在重要性的FR残基。通过将这些关键性鼠FR残基连同鼠CDR残基转移到人抗体框架上来生成人源化形式的4C8,该人抗体框架基于与鼠抗体FR的同源性来选择。所得人源化抗体已显示具有与初始鼠抗体类似的抗原结合亲和力和特异性,这表明它可以是临床上常规使用的鼠抗CD34抗体的替代方案。

[0127] 本披露的实施例涵盖创建为避免被人免疫系统识别的抗体,该抗体含有本文所述的呈任何组合形式的CDR,使得所涵盖的mAb可以含有来自本文披露的单个鼠mAb的CDR集合、或者含有包含来源于两种或三种所披露鼠mAb的个别CDR的CDR集合的轻链和重链。此类mAb可以通过分子生物学的标准技术来创建并且使用本文所述的测定筛选其所希望的活性。以这种方式,本披露提供创建新型mAb的“混合配对”方法,该新型mAb包含来自所披露鼠mAb的CDR混合物,以实现新的或改进的治疗活性。

[0128] 由本披露所涵盖的、与本文披露的这些分子“竞争”的单克隆抗体或其抗原结合片段是在一个或多个位点结合人SIRP α 的那些,该一个或多个位点与本发明分子结合的一个或多个位点相同或与之重叠。例如,可以通过抗体竞争测定来鉴定竞争性单克隆抗体或其抗原结合片段。例如,可以将纯化的或部分纯化的人SIRP α 胞外结构域的样品结合到固体支持物上。然后,加入本披露的抗体化合物或其抗原结合片段、以及疑似能够与这种披露的抗体化合物竞争的单克隆抗体或其抗原结合片段。将这两种分子之一进行标记。如果经标记的化合物和未标记的化合物结合到SIRP α 上的分开且离散的位点,则经标记的化合物将结合相同的水平,而不论该疑似的竞争性化合物是否存在。然而,如果相互作用的这些位点是相同的或者重叠的,则未标记的化合物将竞争,并且经标记的化合物结合到抗原上的量将被降低。如果未标记的化合物以过量存在,则很少(如果有的话)的经标记的化合物将结合。出于本披露的目的,竞争性单克隆抗体或其抗原结合片段是使本发明抗体化合物与SIRP α 的结合减少约50%、约60%、约70%、约80%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、或约99%的那些。用于进行此类竞争测定的程序的详情是本领域熟知的并且可以例如发现于Harlow和Lane(1988) Antibodies, A Laboratory Manual[抗体:实验室手册], Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社], 冷泉港, 纽约。通过使用纯化抗体,这样的测定可以是定量的。通过针对自身滴定一种抗体来建立标准曲线,即,同一种抗体用于该标记物和该竞争物两者。滴定了未标记的竞争性单克隆抗体或其抗原结合片段抑制该标记分子结合到板上的能力。将这些结果绘图,并且比较了实现所希望的结合抑制程度所需要的浓度。

[0129] 通过这些方法,结合在以下实例2-7中描述的这些方法,可以确定与在此类竞争测定中的本披露的抗体化合物竞争的mAb或其抗原结合片段是否具有与本发明的抗体化合物相同或相似的功能特性。在不同实施例中,用于在本文涵盖的治疗性方法中使用的竞争性抗体与本文所披露的抗体化合物相比具有约50%至约100%或约125%或更大范围内的如本文所述的生物活性。在一些实施例中,竞争性抗体与本文所披露的抗体化合物相比具有

约50%、约60%、约70%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、或相同的生物活性,如通过以下呈现的实例所披露的方法确定的。

[0130] mAb或其抗原结合片段、或适用于这些组合物和方法中的竞争性抗体可以是本文所述的任何同种型。此外,任何这些同种型可进一步包含如下氨基酸修饰。

[0131] 单克隆抗体或其抗原结合片段、或本文所述的竞争性抗体可以是人IgG1同种型。

[0132] 单克隆抗体、其抗原结合片段、或本文所述的竞争性抗体的人IgG1恒定区可以被修饰以改变抗体半衰期。大部分通过与新生Fc受体的Fc依赖性相互作用来调节抗体半衰期(Roopenian和Alikes,2007)。单克隆抗体、其抗原结合片段、或竞争性抗体的人IgG1恒定区可以被修饰以增加半衰期,该修饰包括但不限于氨基酸修饰N434A、T307A/E380A/N434A(Petkova等人,2006,Yeung等人,2009);M252Y/S254T/T256E(Dall'Acqua等人,2006);T250Q/M428L(Hinton等人,2006);以及M428L/N434S(Zalevsky等人,2010)。

[0133] 与增加半衰期不同,存在需要减小半衰期的一些情况,如减少与高抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)抗体相关的不良事件的可能性(Presta 2008)。单克隆抗体、其抗原结合片段、或本文所述的竞争性抗体的人IgG1恒定区可以被修饰以减小半衰期和/或减小内源性IgG,该修饰包括但不限于氨基酸修饰I253A(Petkova等人,2006);P257I/N434H、D376V/N434H(Datta-Mannan等人,2007);以及M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F(Vaccaro等人,2005)。

[0134] 单克隆抗体、其抗原结合片段、或本文所述的竞争性抗体的人IgG1恒定区可以被修饰以增加或减小抗体效应子功能。这些抗体效应子功能包括但不限于抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、C1q结合、以及改变的与Fc受体的结合。

[0135] 单克隆抗体、其抗原结合片段、或本文所述的竞争性抗体的人IgG1恒定区可以被修饰以增加抗体效应子功能,该修饰包括但不限于氨基酸修饰S298A/E333A/K334(Shields等人,2001);S239D/I332E和S239D/A330L/I332E(Lazar等人,2006);F234L/R292P/Y300L、F234L/R292P/Y300L/P393L、以及F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L(Stevenhagen等人,2007);G236A/G236A/S239D/I332E、以及G236A/S239D/A330L/I332E(Richards等人,2008);K326A/E333A、K326A/E333S和K326W/E333S(Idusogie等人,2001);S267E和S267E/L328F(Smith等人,2012);H268F/S324T、S267E/H268F、S267E/S234T、以及S267E/H268F/S324T(Moore等人,2010);S298G/T299A(Sazinsky等人,2008);E382V/M428I(Jung等人,2010)。

[0136] 单克隆抗体、其抗原结合片段、或本文所述的竞争性抗体的人IgG1恒定区可以被修饰以减小抗体效应子功能,该修饰包括但不限于氨基酸修饰N297A和N297Q(Bohl等人,1993,Walker等人,1989);L234A/L235A(Xu等人,2000);K214T/E233P/L234V/L235A/G236-缺失/A327G/P331A/D356E/L358M(Ghevaert等人,2008);C226S/C229S/E233P/L234V/L235A(McEarchern等人,2007);S267E/L328F(Chu等人,2008)。

[0137] 单克隆抗体、其抗原结合片段、或本文所述的竞争性抗体的人IgG1恒定区可以被修饰以减小抗体效应子功能,该修饰包括但不限于氨基酸修饰V234A/G237A(Cole等人,1999);E233D/G237D、P238D、H268Q、H268D、P271G、V309L、A330S、A330R、P331S、H268Q/A330S/V309L/P331S、H268D/A330S/V309L/P331S、H268Q/A330R/V309L/P331S、H268D/

A330R/V309L/P331S、E233D/A330R、E233D/A330S、E233D/P271G/A330R、E233D/P271G/A330S、G237D/H268D/P271G、G237D/H268Q/P271G、G237D/P271G/A330R、G237D/P271G/A330S、E233D/H268D/P271G/A330R、E233D/H268Q/P271G/A330R、E233D/H268D/P271G/A330S、E233D/H268Q/P271G/A330S、G237D/H268D/P271G/A330R、G237D/H268Q/P271G/A330R、G237D/H268D/P271G/A330S、G237D/H268Q/P271G/A330S、E233D/G237D/H268D/P271G/A330R、E233D/G237D/H268Q/P271G/A330R、E233D/G237D/H268D/P271G/A330S、E233D/G237D/H268Q/P271G/A330S、P238D/E233D/A330R、P238D/E233D/A330S、P238D/E233D/P271G/A330R、P238D/E233D/P271G/A330S、P238D/G237D/H268D/P271G、P238D/G237D/H268Q/P271G、P238D/G237D/P271G/A330R、P238D/G237D/P271G/A330S、P238D/E233D/H268D/P271G/A330R、P238D/E233D/H268Q/P271G/A330R、P238D/E233D/H268D/P271G/A330S、P238D/E233D/H268Q/P271G/A330S、P238D/G237D/H268D/P271G/A330R、P238D/G237D/H268Q/P271G/A330R、P238D/G237D/H268D/P271G/A330S、P238D/G237D/H268Q/P271G/A330S、P238D/E233D/G237D/H268D/P271G/A330R、P238D/E233D/G237D/H268Q/P271G/A330R、P238D/E233D/G237D/H268D/P271G/A330S、P238D/E233D/G237D/H268Q/P271G/A330S (An等人, 2009, Mimoto, 2013)。

[0138] 单克隆抗体或其抗原结合片段、或本文所述的竞争性抗体可以是人IgG2同种型。

[0139] 单克隆抗体、其抗原结合片段、或本文所述的竞争性抗体的人IgG2恒定区可以被修饰以增加或减小抗体效应子功能。这些抗体效应子功能包括但不限于抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)、补体依赖性细胞毒性 (CDC)、抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP)、以及C1q结合、以及改变的与Fc受体的结合。

[0140] 单克隆抗体、其抗原结合片段、或本文所述的竞争性抗体的人IgG2恒定区可以被修饰以增加抗体效应子功能,该修饰包括但不限于氨基酸修饰K326A/E333S (Idusogie等人,2001)。

[0141] 单克隆抗体、其抗原结合片段、或本文所述的竞争性抗体的人IgG2恒定区可以被修饰以减小抗体效应子功能，该修饰包括但不限于氨基酸修饰V234A/G237A(Cole等人，1999)；E233D、G237D、P238D、H268Q、H268D、P271G、V309L、A330S、A330R、P331S、H268Q/A330S/V309L/P331S、H268D/A330S/V309L/P331S、H268Q/A330R/V309L/P331S、H268D/A330R/V309L/P331S、E233D/A330R、E233D/A330S、E233D/P271G/A330R、E233D/P271G/A330S、G237D/H268D/P271G、G237D/H268Q/P271G、G237D/P271G/A330R、G237D/P271G/A330S、E233D/H268D/P271G/A330R、E233D/H268Q/P271G/A330R、E233D/H268D/P271G/A330S、E233D/H268Q/P271G/A330S、G237D/H268D/P271G/A330R、G237D/H268Q/P271G/A330R、G237D/H268D/P271G/A330S、G237D/H268Q/P271G/A330S、E233D/G237D/H268D/P271G/A330R、E233D/G237D/H268Q/P271G/A330S、E233D/G237D/H268D/P271G/A330S、E233D/G237D/H268Q/P271G/A330R、P238D/E233D/A330R、P238D/E233D/A330S、P238D/E233D/P271G/A330R、P238D/E233D/P271G/A330S、P238D/G237D/H268D/P271G、P238D/G237D/H268Q/P271G、P238D/G237D/P271G/A330R、P238D/G237D/P271G/A330S、P238D/E233D/H268D/P271G/A330R、P238D/E233D/H268Q/P271G/A330R、P238D/E233D/H268D/P271G/A330S、P238D/E233D/H268Q/P271G/A330S、P238D/G237D/H268D/P271G/A330R、P238D/G237D/H268Q/P271G/A330R、P238D/G237D/H268D/P271G/A330S、P238D/G237D/H268Q/P271G/A330R、P238D/G237D/H268D/P271G/A330S、P238D/G237D/H268Q/P271G/A330R、P238D/G237D/H268D/P271G/A330S、P238D/G237D/H268Q/P271G/A330R、P238D/G237D/H268D/P271G/A330S、

H268Q/P271G/A330S、P238D/E233D/G237D/H268D/P271G/A330R、P238D/E233D/G237D/H268Q/P271G/A330R、P238D/E233D/G237D/H268D/P271G/A330S、P238D/E233D/G237D/H268Q/P271G/A330S (An等人, 2009, Mimoto, 2013)。

[0142] 单克隆抗体、其抗原结合片段、或本文所述的竞争性抗体的人IgG2的Fc区可以被修饰以改变同种型和/或激动活性, 该修饰包括但不限于氨基酸修饰C127S (C_{H1}结构域)、C232S、C233S、C232S/C233S、C236S、以及C239S (White等人, 2015, Lightle等人, 2010)。

[0143] 单克隆抗体、其抗原结合片段、或本文所述的竞争性抗体的人IgG2的Fc区可以被修饰, 从而表现出减弱的Fc γ R结合能力, 但是具有保守的FcRn结合。这些IgG Fc突变体使得能够对可溶性或细胞表面抗原进行治疗性靶向, 同时使免疫效应子功能和补体介导的细胞毒性的Fc相关参与最小化。在一个实施例中, IgG2 Fc突变体包含根据EU编号系统的V234A、G237A、P238S。在另一个实施例中, IgG2 Fc突变体包含根据EU编号系统的V234A、G237A、H268Q、或H268A、V309L、A330S、P331S。在特定方面, IgG2 Fc突变体包含根据EU编号系统的V234A、G237A、P238S、H268A、V309L、A330S、P331S、和任选地P233S。

[0144] 单克隆抗体或其抗原结合片段、或本文所述的竞争性抗体可以是人IgG3同种型。

[0145] 单克隆抗体、或其抗原结合片段的人IgG3恒定区, 其中单克隆抗体、或其抗原结合片段的所述人IgG3恒定区可以在一个或多个氨基酸处被修饰以增加抗体半衰期、抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)、补体依赖性细胞毒性 (CDC)、或细胞凋亡活性。

[0146] 单克隆抗体、或其抗原结合片段的人IgG3恒定区, 其中单克隆抗体、或其抗原结合片段的所述人IgG3恒定区可以在氨基酸R435H处被修饰以增加抗体半衰期。

[0147] 单克隆抗体或其抗原结合片段、或本文所述的竞争性抗体可以是人IgG4同种型。

[0148] 单克隆抗体、其抗原结合片段、或本文所述的竞争性抗体的人IgG4恒定区可以被修饰以减小抗体效应子功能。这些抗体效应子功能包括但不限于抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 和抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP)。

[0149] 单克隆抗体、其抗原结合片段、或本文所述的竞争性抗体的人IgG4恒定区可以被修饰以防止Fab臂交换和/或减小抗体效应子功能, 该修饰包括但不限于氨基酸修饰F234A/L235A (Alegre等人, 1994); S228P、L235E和S228P/L235E (Reddy等人, 2000)。

[0150] 如本文所用, 术语“肿瘤”是指无论恶性还是良性的所有赘生性细胞生长和增殖、以及所有癌前期与癌性细胞和组织。

[0151] 术语“癌症”、“癌性的”以及“肿瘤”不相互排除地如本文所用。

术语“癌症”和“癌性的”是指或描述在哺乳动物中典型地以异常细胞生长/增殖为特征的生理状况。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤 (即霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、多发性骨髓瘤、胚细胞瘤、肉瘤、以及白血病。此类癌症的更具体实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌 (liver cancer)、膀胱癌、肝细胞癌 (hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌 (liver cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝脏癌 (hepatic carcinoma)、白血病和其他淋巴增生性障碍、以及不同类型的头颈部癌。

[0152] 如本文所用, 术语“易感癌症 (susceptible cancer)”是指其细胞表达CD47、IRP α 、或CD47和SIRP α 并且响应于用防止CD47和SIRP α 之间的相互作用的来自本披露的抗体或其

抗原结合片段、或竞争性抗体或其抗原结合片段进行治疗的癌症。

[0153] 如本文所用,术语“自身免疫性疾病”是指身体免疫系统针对自身并且错误地攻击健康细胞的情况。

[0154] 如本文所用,术语“炎性疾病”是指特征为炎症的疾病,该炎症是由以下组成的基础病理学过程:响应于由物理、化学或生物药剂引起的损失或异常刺激而发生于受累血管和相邻组织中的组织学上清楚的细胞学变化、细胞浸润以及介质释放的动态复杂过程,包括局部反应和所得形态学变化;有害材料的破坏或移除;以及引起修复和愈合的应答。

[0155] 如本文所用,术语“自身炎性疾病”是指当先天性免疫系统出于未知原因引起炎症时导致的疾病。

[0156] 如本文所用,术语“治疗(treating或treat或treatment)”表示减缓、中断、阻止、控制、停止、减轻、或逆转体征、症状、障碍、病症、或疾病的进展或严重性,但不一定涉及所有疾病相关体征、症状、病症、或障碍的完全消除。术语“治疗(treating)”等是指在疾病已开始发展后改善疾病或病理状况的体征或症状的治疗干预。

[0157] 如本文所用,术语“有效量”是指本披露的抗体化合物在以单个或多个剂量施用至患者或器官之后提供所希望的治疗或预防的量或剂量。

[0158] 对于任何特定受试者精确的有效量将取决于其大小和健康状况、其病症的性质和程度、以及选择用于施用的治疗剂或治疗剂的组合。对于给定患者的有效量可通过常规实验来确定并且处于临床医师的判断范围内。本发明抗体化合物的治疗有效量还可以在施用至收获的器官或患者的每个单剂量中包含从约0.1mg/kg至约150mg/kg、从约0.1mg/kg至约100mg/kg、从约0.1mg/kg至约50mg/kg、或从约0.05mg/kg至约10mg/kg的范围的量。已知基于抗体的药物在此方面提供指导。例如,通过静脉内输注21mg/ml溶液来施用HerceptinTM,其中初始负荷剂量为每千克体重4mg并且每周维持剂量为每千克体重2mg;例如,RituxanTM以375mg/m²每周施用一次。

[0159] 对于任何个别患者的治疗有效量可以由健康护理提供者通过监测抗体化合物对肿瘤消退、循环肿瘤细胞、肿瘤干细胞或抗肿瘤应答的作用来确定。通过这些方法获得的数据的分析允许在疗法期间修改治疗方案,使得最佳量的本披露的抗体化合物被施用(无论是单独地采用或者是彼此组合、或者与另一种治疗剂组合,或两者),并且使得还可以确定治疗持续时间。以这种方式,在疗程中可以修改给药/治疗方案,使得表现出满意的效果的最低量的抗体化合物(单独使用或组合使用)被施用,并且使得继续施用这样的化合物,时长只要是对于成功治疗患者必要的即可。已知基于抗体的药物提供关于施用频率的指导,例如,药物是否应每日、每周、每月等施用。频率和剂量还可取决于症状的严重性。

[0160] 在一些实施例中,本披露的抗体化合物可以用作人医学和兽医学中的药物,该药物通过多种路径施用,包括但不限于口服、静脉内、肌肉内、动脉内、髓内、腹膜内、囊内、心室内、经皮、经皮肤、局部、皮下、肿瘤内、鼻内、肠内、舌下、阴道内、血管内或直肠路径。组合物还可以直接施用至病灶(如肿瘤)内。剂量治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。皮下注射器也可以用于施用药物组合物。典型地,这些治疗组合物可以制备为可注射剂,即或者作为液体溶液或者悬浮液。也可以制备在注射前适于溶于或悬浮于液体媒介物中的固体形式。兽医应用包括治疗伴侣/宠物动物,如猫和狗;役用动物,如导盲犬或服务犬,以及马;运动动物,如马和狗;动物园动物,如灵长类动物、猫科动物(如狮子和老虎)、熊科动物等;以

及其他圈养的珍稀动物。

[0161] 可以通过本领域中熟知的方法制备此类药物组合物。参见例如, Remington: The Science and Practice of Pharmacy [雷明顿: 药学科学与实践], 第21版 (2005), Lippincott Williams & Wilkins [利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司], 费城, 宾夕法尼亚州, 并且包含本文披露的一种或多种抗体化合物、以及药学上可接受的 (例如生理学上可接受的) 载体、稀释剂、或赋形剂。

癌症适应证

[0162] 目前披露了有效作为癌症治疗剂的抗SIRP α mAb及其抗原结合片段, 这些治疗剂优选胃肠外施用至患有易感性血液癌和实体瘤的患者, 这些癌症包括但不限于白血病, 包括全身性肥大细胞增多症、急性淋巴细胞 (成淋巴细胞) 白血病 (ALL)、T细胞-ALL、急性髓性白血病 (AML)、粒细胞性白血病、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、慢性髓性白血病 (CML)、骨髓增生障碍/赘生物、单核细胞白血病、以及浆细胞白血病; 多发性骨髓瘤 (MM); 瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症; 淋巴瘤, 包括组织细胞性淋巴瘤和T细胞淋巴瘤、B细胞淋巴瘤, 包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤, 如低级别/滤泡性非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、细胞淋巴瘤 (FCL)、套细胞淋巴瘤 (MCL)、弥漫性大细胞淋巴瘤 (DLCL)、小淋巴细胞性 (SL) NHL、中等级别/滤泡性NHL、中等级别的弥漫性NHL、高级别成免疫细胞NHL、高级别成淋巴细胞NHL、高级别小非裂细胞NHL、巨大肿块 (bulky disease) NHL; 实体瘤, 包括卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌、结肠癌 (结肠直肠癌)、直肠癌、膀胱癌、尿路上皮癌、肺癌 (非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌)、支气管癌、骨癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、肝细胞癌 (肝癌、肝细胞瘤)、胆囊癌、胆管癌、食道癌、肾细胞癌、甲状腺癌、头颈部鳞状细胞癌 (头颈癌)、睾丸癌、内分泌腺癌、肾上腺癌、脑下垂体癌、皮肤癌、软组织癌、血管癌、脑癌、神经癌、眼癌、脑膜癌、口咽癌、下咽部癌、宫颈癌、以及子宫癌、成胶质细胞瘤、成神经管细胞瘤 (medulloblastoma)、星形细胞瘤、胶质瘤、脑膜瘤、胃泌素瘤、成神经细胞瘤、骨髓增生异常综合征、以及肉瘤, 该肉瘤包括但不限于骨肉瘤、尤因肉瘤、平滑肌肉瘤、滑膜肉瘤、腺泡状软组织肉瘤、血管肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、以及软骨肉瘤 (chondrosarcoma); 以及黑色素瘤。

癌症的治疗

[0163] 如本领域普通技术人员熟知的, 当单个药剂疗法或程序不能充分地治疗或治愈疾病或病症时, 常常在癌症治疗中采用组合疗法。常规的癌症治疗常常涉及手术、放射治疗、细胞毒性药物的组合以实现相加作用和协同作用、或者任何或所有这些方法的组合。特别有用的化学治疗与生物疗法组合采用通过不同的作用机制起作用的药物, 从而增加癌细胞控制或杀死, 增加免疫系统控制癌细胞生长的能力, 降低在疗法期间的抗药性的可能, 并且通过允许使用降低剂量的各种药物而将可能的重叠毒性降低到最低限度。

[0164] 可用于由本发明方法涵盖的组合疗法的常规抗肿瘤和抗赘生物药剂的类别披露于: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics [古德曼和吉尔曼的治疗学的药理学基础], 第十二版 (2010) L.L. Brunton, B.A. Chabner 和 B.C. Knollmann 编辑, 第VIII部分, "Chemotherapy of Neoplastic Diseases [肿瘤性疾病的化疗]", 第60-63章, 第1665-1770页, McGraw-Hill [麦格劳希尔集团], 纽约, 包括但不限于蒽环类、铂类、紫杉酚、拓扑异构酶抑制剂、抗代谢药、抗肿瘤抗生素、有丝分裂抑制剂、和烷化剂。

[0165] 除了前述内容之外, 本披露的这些方法与癌症适应证的治疗相关, 并且进一步包

括经由手术、放射、和/或向有需要的患者施用有效量的化学小分子或生物药物来治疗患者,该化学小分子或生物药物包括但不限于,常规使用的或目前正在开发的用来治疗肿瘤病症的肽、多肽、蛋白质、核酸治疗剂。这包括除了本文披露的那些之外的抗体及其抗原结合片段、细胞因子、反义寡核苷酸、siRNA、以及miRNA。

[0166] 本文披露和要求保护的治疗方法包括使用本文披露的单独抗体、和/或彼此的组合、和/或与本披露的结合SIRP α 的其抗原结合片段的组合、和/或还与表现出适当的生物/治疗活性的竞争性抗体的组合,例如,这些抗体化合物实现最大治疗功效的所有可能组合。

[0167] 另外,本治疗方法还涵盖这些抗体、其抗原结合片段、其竞争性抗体和组合、与以下项的进一步组合的用途:(1)选自手术、放射、抗肿瘤和抗赘生物药剂的一种或多种抗肿瘤治疗性治疗,或者任何这些的组合;或者(2)抗肿瘤生物剂中的一种或多种;或者(3)对于本领域普通技术人员显而易见的处于一种或多种适当组合中的(1)或(2)的任何前述内容的等效物,以便针对特定适应证实现所希望的治疗性治疗作用。

[0168] 通过调节影响对肿瘤抗原的T细胞应答的共刺激性或抑制性相互作用增加对癌症的免疫应答的抗体和小分子药物(包括免疫检验点的抑制剂和共刺激分子的调节剂)在由本文所涵盖的组合治疗方法的背景下也具有特别的意义并且包括但不限于其他抗SIRP α 抗体。向患者施用结合SIRP α 蛋白质的治疗剂,例如结合SIRP α 并且防止CD47与SIRP α 之间的相互作用的抗体或小分子的施用,从而使得癌细胞经由吞噬作用清除。结合SIRP α 蛋白的治疗剂与针对一种或多种另外的细胞靶标的治疗剂(例如抗体、化学小分子或生物药物)组合,该一种或多种另外的细胞靶标选自:CD47(分化簇47)、CD70(分化簇70)、CD200(OX-2膜糖蛋白,分化簇200)、CD154(分化簇154,CD40L,CD40配体,分化簇40配体)、CD223(淋巴细胞激活基因3,LAG3,分化簇223)、KIR(杀伤细胞免疫球蛋白样受体)、GITR(TNFRSF18,糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白,激活诱导的TNFR家族受体,AITR,肿瘤坏死因子受体超家族成员18)、CD20(分化簇20)、CD28(分化簇28)、CD40(分化簇40,Bp50,CDW40,TNFRSF5,肿瘤坏死因子受体超家族成员5,p50)、CD86(B7-2,分化簇86)、CD160(分化簇160,BY55,NK1,NK28)、CD258(LIGHT,分化簇258,肿瘤坏死因子配体超家族成员14,TNFSF14,疱疹病毒入侵介质配体(HVEM-L)、CD270(HVEM,肿瘤坏死因子受体超家族成员14,疱疹病毒入侵介质,分化簇270,LIGHTR,HVEA)、CD275(ICOSL,ICOS配体,诱导型T细胞共刺激物配体,分化簇275)、CD276(B7-H3,B7同系物3,分化簇276)、OX40L(OX40配体)、B7-H4(B7同系物4,VTCN1,含有V-set结构域的T细胞激活抑制剂1)、GITRL(糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体-配体,糖皮质激素诱导的TNFR-配体)、4-1BBL(4-1BB配体)、CD3(分化簇3,T3D)、CD25(IL2R α ,分化簇25,白介素-2受体 α 链,IL-2受体 α 链)、CD48(分化簇48,B-淋巴细胞激活标记,BLAST-1,信号传导淋巴细胞激活分子2,SLAMF2)、CD66a(Ceacam-1,癌胚抗原相关细胞粘附分子1,胆汁糖蛋白,BGP,BGP1,BGPI,分化簇66a)、CD80(B7-1,分化簇80)、CD94(分化簇94)、NKG2A(自然杀伤组2A,杀伤细胞凝集素样受体亚家族D成员1,KLRD1)、CD96(分化簇96,TActiLE,T细胞激活增加的晚期表达)、CD112(PVRL2,粘连蛋白,脊髓灰质炎病毒受体相关2,疱疹病毒入侵介质B,HVEB,粘连蛋白-2,分化簇112)、CD115(CSF1R,集落刺激因子1受体,巨噬细胞集落刺激因子受体,M-CSFR,分化簇115)、CD205(DEC-205,LY75,淋巴细胞抗原75,分化簇205)、CD226(DNAM1,分化簇226,DNAX辅助分子-1,PTA1,血小板和T细胞激活抗原1)、CD244(分化簇244,自然杀伤细胞受体2B4)、CD262(DR5,TrailR2,TRAIL-R2,肿瘤坏死因子受体超家族成员

10b, TNFRSF10B, 分化簇262, KILLER, TRICK2, TRICKB, ZTNFR9, TRICK2A, TRICK2B)、CD284 (Toll样受体-4, TLR4, 分化簇284)、CD288 (Toll样受体-8, TLR8, 分化簇288)、白血病抑制因子 (LIF)、TNFSF15 (肿瘤坏死因子超家族成员15, 血管内皮细胞生长抑制因子, VEGI, TL1A)、TD02 (色氨酸2,3-加双氧酶, TPH2, TRPO)、IGF-1R (1型胰岛素样生长因子)、GD2 (双唾液酸神经节苷脂2)、TMIGD2 (跨膜和含免疫球蛋白结构域的蛋白质2)、RGMB (RGM结构域家族, 成员B)、VISTA (T细胞激活的含V-结构域免疫球蛋白的抑制因子, B7-H5, B7同系物5)、BTNL2 (嗜乳脂蛋白样蛋白2)、Btn (嗜乳脂蛋白家族)、TIGIT (具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体, Vstm3, WUCAM)、Siglecs (唾液酸结合Ig样凝集素) (即SIGLEC-15)、神经营养蛋白 (Neurophilin)、VEGFR (血管内皮生长因子受体)、ILT家族 (LIR, 免疫球蛋白样转录家族, 白细胞免疫球蛋白样受体)、NKG家族 (自然杀伤组家族, C型凝集素跨膜受体)、MICA (MHC I类多肽相关序列A)、TGFB (转化生长因子β)、STING途径 (干扰素基因途径的刺激因子)、精氨酸酶 (精氨酸脒基酶, 刀豆氨酸酶, L-精氨酸酶, 精氨酸转脒基酶)、EGFRvIII (表皮生长因子受体变体III)、以及HLA2 (B7-H7, B7y, HERV-H LTR相关蛋白2, B7同系物7)、PD-1的抑制剂 (程序性细胞死亡蛋白1, PD-1, CD279, 分化簇279)、PD-L1 (B7-H1, B7同系物1, 程序性死亡-配体1, CD274, 分化簇274)、PD-L2 (B7-DC, 程序性细胞死亡1配体2, PDCD1LG2, CD273, 分化簇273)、CTLA-4 (细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4, CD152, 分化簇152)、BTLA (B淋巴细胞和T淋巴细胞衰减因子, CD272, 分化簇272)、吡哆胺2,3-加双氧酶 (IDO, IDO1)、TIM3 (HAVCR2, 甲型肝炎病毒细胞受体2, T细胞免疫球蛋白粘蛋白-3, KIM-3, 肾损伤分子3, TIMD-3, T细胞免疫球蛋白粘蛋白-结构域3)、A2A腺苷受体 (ADO受体)、CD39 (外核苷三磷酸二磷酸水解酶-1, 分化簇39, ENTPD1)、以及CD73 (外-5'-核苷酸酶, 5'-核苷酸酶, 5'-NT, 分化簇73)、CD27 (分化簇27)、ICOS (CD278, 分化簇278, 诱导性T细胞共刺激因子)、CD137 (4-1BB, 分化簇137, 肿瘤坏死因子受体超家族成员9, TNFRSF9)、OX40 (CD134, 分化簇134)、TNFSF25 (肿瘤坏死因子受体超家族成员25)、IL-10 (白介素-10, 人细胞因子合成抑制因子, CSIF)、和半乳凝素。

[0169] **ERBITUX[®]** (西妥昔单抗, 百时美施贵宝 (Bristol-Meyers Squibb)) 是批准的重组人/小鼠嵌合的单克隆抗体的实例, 该单克隆抗体特异性结合人表皮生长因子受体 (EGFR) 的胞外结构域。

[0170] **RITUXAN[®]** (利妥昔单抗, 百健艾迪公司 (Biogen IDEC) / 基因泰克公司 (Genentech)) 是批准的抗CD20抗体的实例。

[0171] **YERVOY[®]** (易普利姆玛; 百时美施贵宝) 是批准的抗CTLA-4抗体的实例。

[0172] **KEYTRUDA[®]** (派姆单抗; 默克公司 (Merck) 和**OPDIVO[®]** (纳武单抗; 百时美施贵宝公司) 是批准的抗PD-1抗体的实例。

[0173] **TECENTRIQ[™]** (阿特珠单抗, 罗氏公司 (Roche)) 是批准的抗PD-L1抗体的实例。

[0174] **BAVENCIO[™]** (阿维鲁单抗; 默克公司 (Merck KGaA)、辉瑞公司 (Pfizer) 和礼来公司 (Eli Lilly)) 是批准的抗PD-L1抗体的实例。

[0175] **IMFINZI[™]** (德瓦鲁单抗; 英商梅迪缪思有限公司 (Medimmune) / 阿斯利康公司 (AstraZeneca)) 是批准的抗PD-L1抗体的实例。

[0176] 这些实例展示了本披露的不同实施例, 但是它们不应当被视为将本披露仅限制为这些具体披露的实施例。

实例
实例 1
氨基酸序列

轻链 CDR

LCDR1		LCDR2		LCDR3	
SEQ ID NO:1	RASSGVNYMY	SEQ ID NO:2	YTSILAP	SEQ ID NO:3	QQFTSSPYT
SEQ ID NO:4	RASQSIGTSIH	SEQ ID NO:5	YGSEIS	SEQ ID NO:6	QQSNTWPLT
SEQ ID NO:7	SASSIIGSDFLH	SEQ ID NO:8	RTSILAS	SEQ ID NO:9	QQGSGGLPLT
SEQ ID NO:10	KASQDINSHLS	SEQ ID NO:11	RANRLAD	SEQ ID NO:12	LQYDEFPYT
SEQ ID NO:13	SASSSVSYMY	SEQ ID NO:14	LTSNLAS	SEQ ID NO:15	QQWSGPNPFT
SEQ ID NO:16	RASENIYSYLT	SEQ ID NO:17	NAKTLAE	SEQ ID NO:18	QHHYGSPT
SEQ ID NO:19	SASSISSNFLH	SEQ ID NO:20	RTSILAS	SEQ ID NO:21	QQGSGGLPLT
SEQ ID NO:22	SSVSY	SEQ ID NO:23	DTS	SEQ ID NO:24	QQWSSFPWT
SEQ ID NO:25	EDIYDR	SEQ ID NO:26	GTA	SEQ ID NO:27	QQYWTTTPWT
SEQ ID NO:28	SSVNY	SEQ ID NO:29	YTS	SEQ ID NO:30	QQFTSSPFT
		SEQ ID NO:31	RANRLAT	SEQ ID NO:32	QQYDEFPYT

重链 CDR

HCDR1		HCDR2		HCDR3	
SEQ ID NO:33	KYWIE	SEQ ID NO:34	EILPGSVITNNEKFKG	SEQ ID NO:35	WGLYDSDDGVDY
SEQ ID NO:36	GCTMS	SEQ ID NO:37	YISNGGDITYYPDTVKG	SEQ ID NO:38	LDGYYYAMDF
SEQ ID NO:39	SYVMH	SEQ ID NO:40	YINPYNDGPKYNEKFKG	SEQ ID NO:41	WDYFNSASGFAF
SEQ ID NO:42	DYFLN	SEQ ID NO:43	RINPYNGDSFINQNFRD	SEQ ID NO:44	GGYDGYFIA YFDY
SEQ ID NO:45	SYTMH	SEQ ID NO:46	YINPTIGYTEYNQKFKD	SEQ ID NO:47	LVITSVLGRAMDY
SEQ ID NO:48	DYGVN	SEQ ID NO:49	WVNTNTRESTYVEDFKG	SEQ ID NO:50	GAYDAYYYY YGMDY
SEQ ID NO:51	TYVMH	SEQ ID NO:52	YINPNNDGPNYNEKFKG	SEQ ID NO:53	WDSYNSAAGFAY
SEQ ID NO:54	GFTLSTYT	SEQ ID NO:55	ITSGDITYT	SEQ ID NO:56	TRDRPLFH
SEQ ID NO:57	GYTFTDYE	SEQ ID NO:58	IHPGSGGT	SEQ ID NO:59	TRAVSGYYAMDY
SEQ ID NO:60	GYTFSNYL	SEQ ID NO:61	IYPGDNNT	SEQ ID NO:62	AGGTDYDGFAN
				SEQ ID NO:63	ARAVSGYYAMDY

鼠轻链 (V_L) 可变结构域序列和人轻链 (V_L) 可变结构域序列

SEQ ID NO:64	ENVLTQSPAIMSASLGEKVTMSCRASSGVNMYWYQQKSDASPKLLIYYTSILAPGVPARFSGSGSG NSYSLTISSMEGEDAATYYCQQFTSSPYTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:65	DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIHWWYQRTNGSPRLLIKYGSEISIGIPSRFSGSGGTDFT LSINSVESEDIADYYCQQSNTWPLTFGDGDKLEIK
SEQ ID NO:66	EIVLTQSPPTTMAASPGEKITHICSASSIIGSDFLHWYQQRPQGFSPKFLIYRTSILASGVPTRTFTGSGSGTSY SLTIGTMEAEADVATYYCQQGSGLPLTFGSGTKLEMK
SEQ ID NO:67	DIKLTQSQSSMYSSLGQRVTITCKASQDINSHLSWFQEKPGKSPKTLIYRANRLADGVPSRFSGSGSGQ DYFLTISSELYEDVGIIYYCLQYDEFPTYTFGGGDKLEIK
SEQ ID NO:68	QIVLTQSPALMSAPGEKVTMTCSASSSVSYMYWFQQKPRSSPKPWLYLTSLNLSGVPARFSGSGSGT SYSLTISSMEAEADAATYYCQQWQSGNPFTFGSGTKLEIK
SEQ ID NO:69	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLTWYKQKQKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSG TQFSLKINSLOPEDFGSYYCQHHYGSPTTFGGGDKLEIK
SEQ ID NO:70	EIVLTQSPPTTMAASPGEKITHICSASSISSNFLHWYQQKPGFSPRFLIYRTSILASGVPTRTFTGSGSGTSY SLTIDTMEAEADVATYYCQQGSGLPLTFGSGTKLEIK
SEQ ID NO:71	QIVLTQSPAIMSAPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLIYDTSNLASGVVPRFSGSGSGTS YSLTISRMEAEADAATYYCQQWSSFPWTFGGGDKLEIK
SEQ ID NO:72	DIQMTQSSSFSGSLGDRLTINCKASEDIYDRVAWYQQKPGNAPRLISGTASLETGVLSRFSGSGSGK DYTLsinglQAEDVATYYCQQYWTTPWTFGGGDKLEIK
SEQ ID NO:73	ENVLTQSPAIMSASLGEKVTMSCRASSSVNMYWYQQKSDASPKLWYYTSKLAPGVPARFSGSGSG NSYSLTISSMEGEDAATYYCQQFTSSPFTFGSGTKLEIK

SEQ ID NO:74	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSHLSWYQQKPGKAPKLLIYRANRLATGVPSTRFSGSGGT DFTFTISLQPEDIAITYYCLQYDEFPYTFGGGKLEIK
SEQ ID NO:75	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSHLSWYQQKPGKAPKLLIYRANRLATGVPSTRFSGSGGT DFTFTISLQPEDIAITYYCLQYDEFPYTFGGGKLEIK
SEQ ID NO:76	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSHLSWYQQKPGKAPKLLIYRANRLATGVPSTRFSGSGGT DFTFTISLQPEDIAITYYCCQYDEFPYTFGGGKLEIK
SEQ ID NO:77	DIKMTQSPSSMYASLGQRVTITCKASQDINSHLSWYQQKPGKSPKTLIYRANRLADGVPSRFSGSGSG QDYFLTISLQPEDIAITYYCLQYDEFPYTFGGGKLEIK
SEQ ID NO:78	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASEDIYDRVAWYQQKPGKAPKLLIYGTASLETGVPSTRFSGSGGT DFTFTISLQPEDIAITYYCCQYWTTPWTFGGGKVEIK
SEQ ID NO:79	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASEDIYDRVAWYQQKPGKAPKLLIYGTASLETGVPSTRFSGSGGT DFTFTISLQPEDIAITYYCCQYWTTPWTFGGGKVEIK
SEQ ID NO:80	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASEDIYDRVAWYQQKPGKAPKLLIYGTASLETGVLSTRFSGSGSG TDFTLTISLQAEDEATYYCCQYWTTPWTFGGGKVEIK

鼠重链 (V_H) 可变结构域序列和人重链 (V_H) 可变结构域序列

SEQ ID NO:81	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYSFTKYWIEWVKQRPQGHGLEWIGELPGSVITNYYNEKFKGK ATFTADTSSNTVYMQLSLTSSEDSAVYYCTKWGLYDSDDGVYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO:82	EVKLVEGGGLVQPGSLKLSCAASGFSFGCTMSWIRQTPERRLEWVAYISNGGDITYYPDPTVKGRF TISRDNAKNSLYLQMSSLKSEDTAMYYCARLDGYYAMDFWGQGTSTVTVSS
SEQ ID NO:83	EVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGPKYNEKFKG KATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYFCARWDYFNASGFAFWGQGTLLTVSA
SEQ ID NO:84	EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSTFDYFLNWVKQSHGKSLSEWIGRINPYNGDSFINQNRDKA TLTVDKSSTTAHMDLLSLTSEDSAIYYCGRGGYDGYFIAYFDYWGQGSLLTVSA
SEQ ID NO:85	QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASGYTFTSYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPTIGYTEYNQKFKD KTTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCVRLVITSLGRAMDYWGQGTSTVTVSS
SEQ ID NO:86	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYGVNWVKQKPGKDLQWMGWVNTNTRESTYVEDFKG RFAFSLETSASTAYLQINNKLKNESSSTYFCARGAYDAYYYGMDYWGQGTSTVTVSS
SEQ ID NO:87	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTSYVMHWIKHRPGQGLEWIGYINPNNDGPNYNEKFKG KATLTSDISSSTAYMELSSLTSEDSAVYFCRWDSYNSAAGFAYWGHGTLTVSA
SEQ ID NO:88	EVQLQESGGGLVKPGSLKLSCAASGFTLSTYTMWVRQTPEKRLWVAITSGDTYTYYPDSVKGRF TISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTGMYYCTDRPLFWGQGTTLTVST
SEQ ID NO:89	EVQLQESGAELVRPGASVKLSCKALGYTFTDYEIHWWKETPVYGLEWIGDIHPGSGGTANNQKFKGK ATLTADKSSNTAYMELSSLTSEDSAVYYCTRAVSGYYAMDYWGQGTSTVTVSS
SEQ ID NO:90	EVQLQESGAELVRPGTSVKMSCKAAGYTFSTNYLIGWIKQRPQGHGLEWIGDIYPGDNNTNYNEKFRVK ATLTADTSSNTAYMHLTSLTSEDSAIYYCAGGTDYDGFANWGQGTLLTVSA

SEQ ID NO:91	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYFLNWVRQAPGQGLEWMGRINPYNGDSFINQNFRD RVTMTTRDTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARGGYDGYFIA YFDYWGAGTTTVTVSS
SEQ ID NO:92	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSTFDYFLNWVRQAPGQGLEWMGRINPYNGDSFINQNFRD RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGYDGYFIA YFDYWGAGTTTVTVSS
SEQ ID NO:93	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSTFDYFLNWVRQMPGKGLEWMGRINPYNGDSFINQNFRDQ VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYDGYFIA YFDYWGAGTTTVTVSS
SEQ ID NO:94	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYFLNWVRQAPGQGLEWMGRINPYNGDSFINQNFRD RVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARGGYDGYFIA YFDYWGAGTTTVTVSS
SEQ ID NO:95	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWMGDIHPGSGGTANNQKFK GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARAVSGYYAMDYWGQGTLLVTVSS
SEQ ID NO:96	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWMGDIHPGSGGTANNQKFKG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARAVSGYYAMDYWGQGTLLVTVSS
SEQ ID NO:97	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWMGDIHPGSGGTANNQKFK GRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCTRAVSGYYAMDYWGQGTLLVTVSS

鼠轻链 (LC) 序列和人轻链 (LC) 序列

SEQ ID NO:98	ENVLTQSPAIMSASLGEKVTMSCRASSGVNMYWYQQKSDASPKLLIYTSILAPGVPARFSGSGG NSYSLTISSMEGEDAATYYCQQTSSPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLN NFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTST PIVKSFNRRNEC
SEQ ID NO:99	DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIHWYQQRNTGSPRLLIKYGSEISGIPSRFSGSGGTDFT LSINSVESEDIADYYCQQSNTWPLTFGDGKLELKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFP KDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTPIVKS FNRNEC
SEQ ID NO:100	EIVLTQSPPTMAASPGEKITITCSASSIIGSDFLHWYQQRPGFSPKFLIYRTSILASGVPTFRFTGSGGTSY SLTIGTMEAEADVATYYCQGGGLPLTFGSGTKLEMKRADAAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFP YPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTPIV KSFNRRNEC
SEQ ID NO:101	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSHLSWYQQKPGKAPKLLIYRANRLATGVPSRFSGSGG TDFTFITISLQPEDIAATYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO:102	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSHLSWYQQKPGKAPKLLIYRANRLATGVPSRFSGSGG TDFTFITISLQPEDIAATYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

SEQ ID NO:103	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSHLSWYQQKPGKAPKLLIYRANRLATGVPSPRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIATYYCQYDEFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:104	DIKMTQSPSSMYASLGQRVTITCKASQDINSHLSWFQEKPGKSPKTLIYRANRLADGVPSPRFSGSGSG QDYFLTISSLEYEDVGIIYCLQYDEFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:105	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASEDIYDRVAWYQQKPGKAPKLLIYGTALETGVPSPRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIATYYCQYWTTPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:106	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASEDIYDRVAWYQQKPGKAPKLLIYGTALETGVPSPRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQYWTTPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:107	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASEDIYDRVAWYQQKPGKAPKLLIYGTALETGVLSPRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDEATYYCQYWTTPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:108	DIQMTQSSSFGSLGDRLTINCKASEDIYDRVAWYQQKPGNAPRLISGTASLETGVLRSFGSGSG KDYTLSINGLQAEDVATYYCQYWTTPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
---------------	---

鼠重链（HC）序列和人重链（HC）序列

SEQ ID NO:109	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYSFTKYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSVITNRYNEKFKGK ATFTADTSSNTVYMQLSLTSEDSAVYYCTKWGLYDSDDDGVDYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLA PGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPPSSTWPSETV TCNVAHPASSTKVDDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEV QFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKG RPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYS KLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK
SEQ ID NO:110	EVKLVEGGGLVQPGGSLKLSCAAAGFSFGCTMSWIRQTPERRLEWVAYSISNGGDITYYPDTVKGRF TISRDNAKNSLYLQMSSLKSEDTAMYYCARLDGYYYAMDFWGGQTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGS AAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPPSSTWPSETVTCN VAHPASSTKVDDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFS WVVDDEVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPK APQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

SEQ ID NO:111	EVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGPKYNEKFK GKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYFCARWDYFNSASGFAFWGQGLTVTVSAAKTTTPPSVYPL APGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSSET VTCNV AHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPE VQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQNFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTK GRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTIDGSGYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK
SEQ ID NO:112	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKKASGYSTFDYFLNWWVRQAPGQGLEWMGRINPYNGDSFINQNFRD RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYDGYFIAFYFDYWGAGTTTVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKT YTCNVVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVDSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSRLTVDDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK
SEQ ID NO:113	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKKASGYSTFDYFLNWWVRQAPGQGLEWMGRINPYNGDSFINQNFRD RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYDGYFIAFYFDYWGAGTTTVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKT YTCNVVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVDSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSRLTVDDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO:114	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISKCKSGYSFTDYFLNWWVRQMPGKGLEWMGRINPYNGDSFINQNFRD QVTISADKISISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYDGYFIAFYFDYWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVDSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNNYKTTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVTDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
SEQ ID NO:115	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKKASGYSTFDYFLNWWVRQAPGQGLEWMGRINPYNGDSFINQNFRD RVTMTVDSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYDGYFIAFYFDYWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVDSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNNYKTTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVTDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
SEQ ID NO:116	EVQLQQSGPDLVKPGASVKISKCKASGYSTFDYFLNWWVKQSHGKSLSEWIGRINPYNGDSFINQNFRDK ATLTVDKSSTTAHMDLLSLTSEDSAIYYCGRGGYDGYFIAFYFDYWGGSLVTVSAASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTY TCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVDSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNNYKTTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVTDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO:117	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEIHWRQAPGQGLEWMGDIHPGSGGTANNQKFK GRVTMTTRDTSTVYMELSSLRSEDTA VYICARAVSGYYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTY TCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDPKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK
SEQ ID NO:118	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYEIHWRQAPGQGLEWMGDIHPGSGGTANNQKFK GRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYICARAVSGYYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDPKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK
SEQ ID NO:119	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEIHWRQAPGQGLEWMGDIHPGSGGTANNQKFK GRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYICTRAVSGYYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTY TCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDPKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO:120	EVQLQESGAELVRPGASVKLSCKALGYTFTDYEIHVVKETPVYGLEWIGDIHPGSGGTANNQKFKGK ATLTADKSSNTAYMELSSLTSEDSAVYYCTRAVSGYYAMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVTDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLGK
---------------	--

SIRP α 和 SIRP γ 序列

SEQ ID NO:121	SIRP α	EEELQVIQDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVS ESTKRENMDFSISINITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAAR ATPQHTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVVLTREDV HSQVICEVAHVTLQGDPLRG TANLSETIRVPPTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQ LTWLENGNVSR TETASTVTENKDGTYNWM SWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKS HDLKVSAHPKEQGSNTAAENTGSNERNIYIVGVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTS STRLHEPEKNAREITQD TNDITYADLNLPGKKPAPQAAEPNNHTEYASIQTSPQASEDTLT YADLDMVHNLNRTPKQAPKPEPSFSEYASVQVPRK
SEQ ID NO:122	SIRP γ	EEELQMIQPEKLLLVTVGK TATLHCTVTSLLPVGPVLWFRGVGPGRELIYNQKEGHFPRVTT VSDLTKRNNMDFSIRISSITPADVGTYYCVKFRKGS PENVEFKSGPGTEMALGAKPSAPVVLG PAA RTTPEHTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPTGQSVAYSIRSTARVVLD PWDVRSQVICEVAHVTLQGDPLRG TANLSEAIRVPPTLEVTQQPMRVGNQVNVTCQVRKFY

		PQSLQLTWSNGNVQCQRETASTLTENKDGTYNWTWSWFLVNISDQRDDVVLTCQVKHHDGQL AVSKRLALEVTVHQDQSSDATPGPASSLTALLIAVLLGPIYVPWKQKT
人IgG Fc序列		
人 Fc IgG1 SEQ ID NO:123		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
人 Fc IgG1-N297Q SEQ ID NO:124		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
人 Fc-IgG2 SEQ ID NO:125		ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVVDHKPSNTKVDKTVVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK

人 Fc-IgG3 SEQ ID NO:126	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCP RCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESS GQPENNYNTTPPMLDSDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNRFTQKSLSLSPG K
人 Fc-IgG4 SEQ ID NO:127	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEAL HNHYTQKSLSLGLG
人 Fc-IgG4 S228P SEQ ID NO:128	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEAL HNHYTQKSLSLGLG
人 Fc-IgG4 PE SEQ ID NO:129	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPPEFEGGPSVFLFPPKP

	KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKISKAQGPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGK
人 Fc-IgG4 PE' SEQ ID NO:130	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVVDHDKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPAEFEFGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKISKAQGPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLG
人 κLC SEQ ID NO:131	RTVAAPSVFIFPPPSDEQLKSGTASVVCVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

实例2
SIRP单克隆抗体与SIRPα的结合

[0177] 通过固相ELISA,使用Fc标记的人SIRP α 来确定本披露的抗SIRP单克隆抗体(mAb)与SIRP阿尔法(SIRP α)的结合。体外测量了可溶性抗SIRP抗体的结合。

[0178] 在4℃下,将Fc标记的人SIRP α (ACR0#SIG-H5251,基因型变体1)以1 μ g/ml的浓度在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释,吸附到高结合微量滴定板上过夜。去除包被溶液,将孔洗涤并且然后在室温下、伴随振荡、在含有0.5%Tween 20的PBS(PBST)中用75%酪蛋白阻断60分钟。去除阻断溶液,将孔洗涤并且在室温下、伴随振荡、与按30 μ g/ml起始浓度并且以3倍连续稀释降低浓度在PBST中稀释的鼠或人抗SIRP mAb一起孵育60分钟。将孔用PBST洗涤三次,并且在室温下、伴随振荡、与1:10,000在PBST中稀释的HRP标记的驴抗小鼠或抗人第二抗体(杰克逊免疫研究实验室有限公司(Jackson ImmunoResearch Laboratories))一起孵育60分钟。将孔洗涤并且然后与过氧化物酶底物一起孵育,并且测量在450nm的吸光度。使用非线性拟合模型(GraphPad Prism)计算表观亲和力。

[0179] 如表1所示,所有可溶性抗SIRP mAb以皮摩尔至纳摩尔范围的表观亲和力结合人SIRP α 。图1A-图1V展示了本披露的抗体的代表性结合曲线。

表1. 抗SIRP抗体与人SIRP α 的结合。

	人 SIRP α 结合 K _d (pM)
SIRP1	39
SIRP2	182
SIRP3	289
SIRP4	161
SIRP5	65
SIRP6	131
SIRP7	197
SIRP8	57

SIRP9	583
SIRP10	> 10,000
SIRP11	194
SIRP12	165
SIRP13	1,565
SIRP14	565
SIRP15	608
SIRP16	> 40,000
SIRP17	326
SIRP18	364
SIRP19	> 19,000
SIRP20	157
SIRP21	274
SIRP22	> 11,000
SIRP23	164

实例3

小鼠抗SIRP mAb与表达SIRP α 的THP-1细胞的结合

[0180] 通过流式细胞术确定杂交瘤来源的小鼠SIRP抗体SIRP1、SIRP2和SIRP3与表达SIRP α 但不表达SIRP γ 的THP-1细胞的结合活性。

[0181] 在37℃下,将THP-1细胞与PBS (pH 7.2) 中稀释的增加浓度的mAb一起孵育60min。然后将细胞用PBS洗涤,并且与PBS中的Alexa Fluor-647标记的驴抗小鼠抗体(杰克逊免疫研究实验室有限公司)一起再孵育一小时。洗涤细胞,并且使用C6 Accuri流式细胞仪(碧迪公司(Becton Dickinson))分析结合。

[0182] 如图2所示,所有抗体以浓度依赖性方式结合表达SIRP α 的THP-1细胞。

实例4

SIRP mAb与SIRP γ 的结合

[0183] 通过ELISA,使用Fc标记的人SIRP γ 来确定本披露的抗SIRP抗体与SIRP伽马 (SIRP γ) 的结合。体外测量了可溶性抗SIRP抗体的结合。

[0184] 在4℃下,将Fc标记的人SIRP γ (ACRO#SIG-H5253) 以在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中1 μ g/ml的浓度,吸附到高结合微量滴定板上过夜。去除包被溶液,将孔洗涤并且然后在室温下、伴随振荡、在含有0.5% Tween 20的PBS (PBST) 中用75%酪蛋白阻断60分钟。去除阻断溶液,将孔洗涤并且在室温下、伴随振荡、与按30 μ g/ml起始浓度并且以3倍连续稀释降低浓度在PBST中稀释的抗SIRP mAb一起孵育60分钟。将孔用PBST洗涤三次,并且在室温下、伴随振荡、与1:10,000在PBST中稀释的HRP标记的驴抗小鼠或抗人第二抗体(杰克逊免疫研究实验室有限公司(Jackson ImmmonResearch Laboratories))一起孵育60分钟。将孔洗涤并且然后与过氧化物酶底物一起孵育,并且确定在450nm的吸光度。使用非线性拟合模型(GraphPad Prism)计算表观亲和力。

[0185] 如表2所示,可溶性抗SIRP mAb SIRP2、SIRP3、SIRP4、SIRP5、SIRP6、SIRP7、SIRP9、SIRP10、SIRP11、SIRP12、SIRP16、SIRP17、SIRP18、SIRP20、SIRP21和SIRP23以皮摩尔或纳摩尔范围的表观亲和力结合人SIRP γ 。此外,抗SIRP mAb SIRP1、SIRP8、SIRP13、SIRP14、SIRP15、SIRP19、和SIRP22在高达30 μ g/ml的mAb浓度下均未明显结合人SIRP γ 。图3A-图3V展示了来源于本披露的抗体的代表性结合曲线。

表2. 抗SIRP抗体与人SIRP γ 的结合。

	人 SIRP γ 结合 K_d (pM)
SIRP1	*NB
SIRP2	734
SIRP3	170
SIRP4	274
SIRP5	126
SIRP6	183
SIRP7	99
SIRP8	*NB
SIRP9	510
SIRP10	> 10,000
SIRP11	7,223
SIRP12	> 12,000
SIRP13	*NB
SIRP14	*NB
SIRP15	> 14,000

SIRP16	*NB
SIRP17	> 15,000
SIRP18	> 34,000
SIRP19	*NB
SIRP20	> 29,000
SIRP21	> 21,000
SIRP22	*NB
SIRP23	225

*NB- 在高达30 μ g/ml的mAb浓度下未检测到结合

实例5

小鼠mAb与表达SIRP γ 的Jurkat T细胞的结合

[0186] 通过流式细胞术确定小鼠杂交瘤来源的SIRP mAb与表达SIRP γ 但不表达SIRP α 的Jurkat细胞的结合活性。

[0187] 在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下,将Jurkat细胞与磷酸盐缓冲盐水(PBS) (pH 7.2) 中稀释的增加浓度的抗SIRP mAb一起孵育60min。然后将细胞用PBS洗涤,并且与PBS中的Alexa Fluor-647标记的驴抗小鼠抗体(杰克逊免疫研究实验室有限公司)一起再孵育一小时。洗涤细胞,并且使用C6Accuri流式细胞仪(碧迪公司(Becton Dickinson))分析结合。可替代地,在37 $^{\circ}$ C下,将细胞与PBS(康宁公司(Corning))中含有1mM EDTA(西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich))、1%FBS(BioWest公司(Biowest))的结合缓冲液中具有10 μ g/ml饱和浓度的SIRP mAb一起孵育1h。然后洗涤细胞,并且在相同条件下,用驴抗小鼠IgG异硫氰酸荧光素(FITC)连接的第二抗体(杰克逊免疫研究实验室有限公司)染色45min。然后洗涤细胞,并且通过流式细胞术(Attune,生命技术公司(Life Technologies))进行分析。

[0188] 如图4A所示, SIRP3结合表达SIRP γ 的Jurkat细胞, 而SIRP2或SIRP1表现为无结合。此外, 如图4B所示, SIRP9以10 μ g/ml的浓度结合Jurkat细胞, 这与先前已经显示出结合SIRP γ 的KWAR-23相当, 而SIRP4表现为不结合Jurkat细胞上的SIRP γ 。

实例6

抗SIRP mAb阻断CD47/SIRP α 结合

[0189] 为了体外评估本披露的抗SIRP抗体阻断CD47与SIRP α 的结合的能力, 使用组氨酸(HIS)标记的人SIRP α 包被的ELISA板进行以下方法。

[0190] 在4 $^{\circ}$ C下, 将HIS标记的人SIRP α (ACRO#SIG-H5225) 以在PBS中稀释的1 μ g/ml的浓度, 吸附到高结合微量滴定板上过夜。去除包被溶液, 将孔洗涤并且然后在室温下、伴随振荡、在含有0.5% Tween 20的PBS (PBST) 中用75% 酪蛋白阻断60分钟。去除阻断溶液, 将孔洗涤并且在室温下、伴随振荡、与按30 μ g/ml起始浓度并且以3倍连续稀释降低浓度在PBST中稀释的抗SIRP mAb一起孵育60分钟。将孔用PBST洗涤三次, 并且在室温下、伴随振荡、与PBST中250ng/ml浓度的FC标记的人CD47 (ACRO#CD7-H5256) 一起孵育60分钟。将孔用PBST洗涤三次, 并且在室温下、伴随振荡、与1:20,000在PBST中稀释的HRP标记的驴抗小鼠或抗人第二抗体 (杰克逊免疫研究实验室有限公司) 一起孵育60分钟。将孔洗涤并且然后与过氧化物酶底物一起孵育, 并且确定在450nm的吸光度。使用非线性拟合模型 (GraphPad Prism) 计算IC₅₀。

[0191] 如表3所示, 可溶性抗SIRP mAb SIRP2、SIRP3、SIRP4、和SIRP7以纳摩尔范围的IC₅₀值阻断人SIRP α 与人CD47的结合。此外, 在高达30 μ g/ml的mAb浓度下, 可溶性抗SIRP mAb SIRP1、SIRP5、SIRP6、SIRP8、和SIRP10不能阻断人SIRP α 与人CD47的结合。图5A-图5G展示了来源于本披露的抗体的代表性抑制曲线。

表3. 通过抗SIRP抗体阻断CD47/SIRP α 结合。

	SIRPα 阻断 (IC₅₀ nM)
SIRP1	*NB
SIRP2	3
SIRP3	2.7
SIRP4	0.71
SIRP5	*NB
SIRP6	*NB
SIRP7	1.1
SIRP8	*NB
SIRP10	*NB

*NB- 在高达30 μ g/ml的mAb浓度下未检测到阻断

实例7

抗SIRP单克隆抗体阻断CD47/SIRP γ 结合

[0192] 为了体外评估本披露的抗SIRP mAb对CD47与SIRP γ 的结合的作用, 使用HIS标记的人CD47包被的ELISA板进行以下方法。

[0193] 在4℃下,将HIS标记的人CD47 (ACRO#CD7-H5227) 以在PBS中稀释的2μg/ml的浓度,吸附到高结合微量滴定板上过夜。去除包被溶液,将孔洗涤并且然后在室温下、伴随振荡、在含有0.5%Tween 20的PBS (PBST) 中用75%酪蛋白阻断60分钟。去除阻断溶液,将孔洗涤并且在室温下、伴随振荡、与按30μg/ml起始浓度并且以3倍连续稀释降低浓度在PBST中稀释的抗SIRP mAb和0.5μg/ml的人SIRP γ (ACRO#SIG-H5253) 一起孵育60分钟。将孔用PBST洗涤三次,并且在室温下、伴随振荡、与1:20,000在PBST中稀释的HRP标记的驴抗小鼠或抗人第二抗体(杰克逊免疫研究实验室有限公司) 一起孵育60分钟。将孔洗涤并且然后与过氧化物酶底物一起孵育,并且确定在450nm的吸光度。使用非线性拟合模型(GraphPad Prism) 计算IC₅₀。

[0194] 如表4所示,可溶性抗SIRP mAb SIRP2、SIRP3、SIRP4、SIRP5、SIRP6、和SIRP7以纳摩尔范围的IC₅₀值阻断人SIRP γ 与人CD47的结合。此外,在高达30μg/ml的mAb浓度下,可溶性抗SIRP mAb SIRP1、SIRP8、SIRP9、和SIRP10不能阻断人SIRP γ 与人CD47的结合。图6A-图6H展示了来源于本披露的抗体的代表性抑制曲线。

表4. 通过抗SIRP抗体阻断CD47/SIRP γ 结合。

	SIRPγ 阻断 (IC ₅₀ nM)
SIRP1	*NB
SIRP2	3.5
SIRP3	0.96
SIRP4	0.44
SIRP5	0.163
SIRP6	0.86
SIRP7	0.63
SIRP8	*NB
SIRP9	*NB
SIRP10	*NB

*NB-在高达30μg/ml的mAb浓度下未检测到阻断

实例8

抗SIRP mAb诱导吞噬作用

[0195] 为了体外评估抗SIRP mAb对通过巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的作用,使用流式细胞术进行以下方法。

[0196] 人单核细胞来源的巨噬细胞来源于健康人外周血的白细胞除去,并且将这些巨噬细胞在补充有50ng/ml M-CSF(生物传奇公司(Biolegend)) 的AIM-V培养基(生命技术公司) 中孵育七天。对于体外吞噬作用测定,将巨噬细胞以3x10⁴个细胞/孔的浓度重新接种在96孔板中补充有50ng/ml M-CSF的100μl的AIM-V培养基中,并且使其贴壁生长24小时。一旦效应子巨噬细胞贴壁至培养皿,则将靶向的人癌细胞(Jurkat) 用1μM 5(6)-羧基荧光素二乙酸N-琥珀酰亚胺酯(CFSE;西格玛奥德里奇公司) 进行标记,并且添加到在没有补充剂的100 μl的AIM-V培养基中具有8x10⁴个细胞的浓度的巨噬细胞培养物中。在靶细胞和效应子细胞

混合后立即以各种浓度(图7A)或10 μ g/ml(图7B)添加抗SIRP mAb,并且使其在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时。在3小时之后,去除所有未被吞噬细胞并且将其余细胞用PBS洗涤三次。然后将细胞在Accutase(干细胞技术公司(Stemcell Technologies))中孵育从而分离巨噬细胞,收集到微量离心管中,并且在100ng别藻蓝蛋白(APC)标记的CD14抗体(BD生物科学公司(BD biosciences))中孵育30分钟,洗涤一次,并且通过流式细胞术(Attune,生命技术公司)分析CD14 $^{+}$ 细胞的百分比,这些细胞也是CFSE $^{+}$,指示了完全吞噬作用。

[0197] 如图7A和图7B所示,与鼠IgG1对照抗体(生物传奇公司)相比,可溶性抗SIRP mAb SIRP4、SIRP9、SIRP11、SIRP12、SIRP13、SIRP14、SIRP15、SIRP16、SIRP17、SIRP18、SIRP19、SIRP20、SIRP21、SIRP22和SIRP23诱导人巨噬细胞对Jurkat细胞的吞噬作用。相反,可溶性抗SIRP mAb SIRP1、SIRP2、SIRP3、SIRP7、SIRP8和SIRP10并不诱导人巨噬细胞对Jurkat细胞的吞噬作用。

实例9

当与抗CD47抗体组合时,抗SIRP mAb诱导吞噬作用

[0198] 为了体外评估抗SIRP mAb和抗CD47 mAb组合对诱导巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的作用,使用流式细胞术进行以下方法。

[0199] 人单核细胞来源的巨噬细胞来源于健康人外周血的白细胞除去,并且将这些巨噬细胞在补充有50ng/ml M-CSF(生物传奇公司(Biolegend))的AIM-V培养基(生命技术公司)中孵育七天。对于体外吞噬作用测定,将巨噬细胞以3 $\times 10^4$ 个细胞/孔的浓度重新接种在96孔板中补充有50ng/ml M-CSF的100 μ l的AIM-V培养基中,并且使其贴壁生长24小时。一旦效应子巨噬细胞贴壁至培养皿,则将靶向的人癌细胞(Jurkat)用1 μ M 5(6)-羧基荧光素二乙酸N-琥珀酰亚胺酯(CFSE;西格玛奥德里奇公司)进行标记,并且添加到在没有补充剂的100 μ l的AIM-V培养基中具有8 $\times 10^4$ 个细胞的浓度的巨噬细胞培养物中。在靶细胞和效应子细胞混合后立即以各种浓度添加单独的抗SIRP mAb、单独的抗CD47 mAb(已知诱导吞噬作用)、或抗SIRP和抗CD47 mAb组合,并且使其在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时。在3小时之后,去除所有未被吞噬细胞并且将其余细胞用PBS洗涤三次。然后将细胞在Accutase(干细胞技术公司(Stemcell Technologies))中孵育从而分离巨噬细胞,收集到微量离心管中,并且在100ng别藻蓝蛋白(APC)标记的CD14抗体(BD生物科学公司(BD biosciences))中孵育30分钟,洗涤一次,并且通过流式细胞术(Attune,生命技术公司)分析CD14 $^{+}$ 细胞的百分比,这些细胞也是CFSE $^{+}$,指示了完全吞噬作用。

[0200] 如图8A-图8J所示,与任一单独的药剂相比,当与抗CD47mAb组合时,所有可溶性抗SIRP mAb SIRP1、SIRP2、SIRP3、SIRP4、SIRP5、SIRP7、SIRP12、SIRP20、SIRP21和SIRP22在更大程度上增加了人巨噬细胞对Jurkat细胞的吞噬作用。

实例10

抗SIRP mAb与Rituxan组合诱导吞噬作用

[0201] 为了体外评估抗SIRP mAb和抗CD20 mAb组合对诱导巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的作用,使用流式细胞术进行以下方法。

[0202] 人单核细胞来源的巨噬细胞来源于健康人外周血的白细胞除去,并且将这些巨噬细胞在补充有50ng/ml M-CSF(生物传奇公司(Biolegend))的AIM-V培养基(生命技术公司)中孵育七天。对于体外吞噬作用测定,将巨噬细胞以3 $\times 10^4$ 个细胞/孔的浓度重新接种在96

孔板中补充有50ng/ml M-CSF的100 μ l的AIM-V培养基中,并且使其贴壁生长24小时。一旦效应子巨噬细胞贴壁至培养皿,则将靶向的人癌细胞(RAJI)用1 μ M 5(6)-羧基荧光素二乙酸N-琥珀酰亚胺酯(CFSE;西格玛奥德里奇公司)进行标记,并且添加到在没有补充剂的100 μ l的AIM-V培养基中具有 8×10^4 个细胞的浓度的巨噬细胞培养物中。在靶细胞和效应子细胞混合后立即以各种浓度添加单独的抗SIRP mAb、单独的抗CD20 mAb(Rituxan,罗氏公司)、或抗SIRP和抗CD20 mAb组合,并且使其在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时。在3小时之后,去除所有未被吞噬细胞并且将其余细胞用PBS洗涤三次。然后将细胞在Accutase(干细胞技术公司(Stemcell Technologies))中孵育从而分离巨噬细胞,收集到微量离心管中,并且在100ng别藻蓝蛋白(APC)标记的CD14抗体(BD生物科学公司(BD biosciences))中孵育30分钟,洗涤一次,并且通过流式细胞术(Attune,生命技术公司)分析CD14 $^{+}$ 细胞的百分比,这些细胞也是CFSE $^{+}$,指示了完全吞噬作用。

[0203] 如图9A-图9D所示,与任一单独的药剂相比,当与抗CD20 mAb组合时,所有可溶性抗SIRP mAb SIRP1、SIRP2、SIRP3、和SIRP7在更大程度上增加了人巨噬细胞对RAJI细胞的吞噬作用。

实例11

抗SIRP mAb与Erbix和艾维鲁单抗组合诱导吞噬作用

[0204] 为了体外评估抗SIRP mAb和抗EGFR mAb或抗PD-L1 mAb组合对诱导巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的作用,使用流式细胞术进行以下方法。

[0205] 人单核细胞来源的巨噬细胞来源于健康人外周血的白细胞除去,并且将这些巨噬细胞在补充有50ng/ml M-CSF(生物传奇公司(Biolegend))的AIM-V培养基(生命技术公司)中孵育七天。对于体外吞噬作用测定,将巨噬细胞以 3×10^4 个细胞/孔的浓度重新接种在96孔板中补充有50ng/ml M-CSF的100 μ l的AIM-V培养基中,并且使其贴壁生长24小时。一旦效应子巨噬细胞贴壁至培养皿,则将靶向的人癌细胞(FaDu或ES-2)用1 μ M 5(6)-羧基荧光素二乙酸N-琥珀酰亚胺酯(CFSE;西格玛奥德里奇公司)进行标记,并且添加到在没有补充剂的100 μ l的AIM-V培养基中具有 8×10^4 个细胞的浓度的巨噬细胞培养物中。在靶细胞和效应子细胞混合后立即以各种浓度添加单独的抗SIRP mAb、单独的抗EGFR mAb(Erbix,百时美施贵宝)、抗PD-L1 mAb(艾维鲁单抗,辉瑞公司)、或抗SIRP和抗EGFR mAb组合,并且使其在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时。在3小时之后,去除所有未被吞噬细胞并且将其余细胞用PBS洗涤三次。然后将细胞在Accutase(干细胞技术公司(Stemcell Technologies))中孵育从而分离巨噬细胞,收集到微量离心管中,并且在100ng别藻蓝蛋白(APC)标记的CD14抗体(BD生物科学公司(BD biosciences))中孵育30分钟,洗涤一次,并且通过流式细胞术(Attune,生命技术公司)分析CD14 $^{+}$ 细胞的百分比,这些细胞也是CFSE $^{+}$,指示了完全吞噬作用。

[0206] 如图10A所示,与任一单独的药剂相比,当与抗EGFR mAb组合时,可溶性抗SIRP mAb SIRP4在更大程度上增加了人巨噬细胞对FaDu细胞的吞噬作用。如图10B所示,与任一单独的药剂相比,当与抗PD-L1 mAb组合时,可溶性抗SIRP mAb SIRP4在更大程度上增加了人巨噬细胞对ES-2细胞的吞噬作用。

实例12

抗SIRP mAb结合人巨噬细胞和树突细胞

[0207] 为了评估抗SIRP mAb与表达SIRP α 的细胞(例如人巨噬细胞和树突细胞)的结合,

使用流式细胞术进行以下方法。

[0208] 从外周血单个核细胞 (Astarte Biologics公司 (Astarte Biologics)) 分离的人 CD14⁺单核细胞在体外经七天分化为巨噬细胞或树突细胞。对于巨噬细胞分化,将单核细胞在补充有50ng/ml M-CSF (生物传奇公司) 的AIM-V培养基 (生命技术公司) 中孵育七天。对于树突细胞分化,在10%人AB血清 (Valley Biomedical公司 (Valley Biomedical))、200ng/ml GM-CSF (生物传奇公司) 和50ng/ml IL-4 (生物传奇公司) 存在下,将单核细胞在AIM-V培养基 (生命技术公司) 中孵育。在37℃、5%CO₂下,将细胞与PBS (康宁公司) 中含有1mM EDTA (西格玛奥德里奇公司) 和1%FBS (BioWest公司) 的结合缓冲液中连续稀释的SIRP mAb一起孵育1h。然后洗涤细胞,并且在相同条件下,用驴抗小鼠IgG异硫氰酸荧光素 (FITC) 连接的第二抗体 (杰克逊免疫研究实验室有限公司) 染色45min。随后在冰上用缀合至Alexa Fluor 647荧光团的抗CD14或抗CD11c (分别来自生命技术公司和生物传奇公司) 将细胞染色30min,洗涤并且通过流式细胞术 (Attune,生命技术公司) 进行分析。将结合评估为从仅用第二抗体染色的细胞中减去CD14⁺或CD11c⁺细胞的中值FITC荧光强度。

[0209] 如表5所示,可溶性抗SIRP mAb SIRP3、SIRP4、SIRP5和SIRP9、以及0SE-18D5和KWAR-23以皮摩尔范围的表观亲和力与树突细胞和/或巨噬细胞上的细胞表达的SIRPα结合。图11展示了来源于本披露的抗体的代表性结合曲线。

表5. 抗SIRP mAb与表达SIRPα的人细胞的结合。

	人巨噬细胞结合 K _d (pM)	人树突细胞结合 K _d (pM)
SIRP3	ND*	3.47
SIRP4	20.7	50
SIRP5	ND*	770
SIRP9	93.7	ND*
18D5	37.3	41.2
KWAR-23	ND*	23.4

*未确定

实例13

抗SIRP mAb表现出与人CD3⁺ T细胞的可变结合

[0210] 为了评估在人CD3⁺ T细胞上的抗SIRP mAb的结合,使用流式细胞术进行以下方法。

[0211] 在37℃、5%CO₂下,在96孔V底板中,以2.5×10⁵个细胞/孔,将从外周血单个核细胞 (Astarte Biologics公司) 分离的人CD3⁺ T细胞与PBS (康宁公司) 中含有1mM EDTA (西格玛奥德里奇公司)、1%FBS (BioWest公司) 的结合缓冲液中连续稀释的SIRP mAb一起孵育1h。然后洗涤细胞,并且在相同条件下,用驴抗小鼠IgG异硫氰酸荧光素 (FITC) 连接的第二抗体 (杰克逊免疫研究实验室有限公司) 染色45min。随后在冰上用缀合至3-羧基-6,8-二氟-7-羟基香豆精 (太平洋蓝 (Pacific Blue)) 荧光团 (生物传奇公司) 的抗CD3将细胞染色30min,洗涤并且通过流式细胞术 (Attune,生命技术公司) 进行分析。将结合评估为从仅用第二抗体染色的CD3⁺细胞中减去CD3⁺细胞的中值FITC荧光强度。除了LSB2.20 (生物传奇公司) 外,所有SIRP抗体均在内部产生。对于激活的T细胞,在结合测定之前,在0.5μg/ml抗CD28 (克隆CD28.2;生物传奇公司) 存在下,在用10μg/ml抗CD3 (克隆UCHT1;生物传奇公司) 包被的96孔

平底板中,以 1×10^5 个细胞/孔,将CD3 T细胞激活72h。

[0212] 如表6所示,可溶性SIRP3、SIRP7、SIRP9、KWAR-23、和SIRP γ 特异性抗体LSB2.20以皮摩尔范围的亲和力结合T细胞。抗SIRP mAb SIRP4、SIRP5和OSE-18D5的亲和力远远更低,并且在纳摩尔范围内。图12A、图12B、和图12C展示了来源于本披露的抗体的代表性结合曲线。

表6. 抗SIRP抗体与表达SIRP γ 的人T细胞的结合。

	人 T 细胞结合 K_d (pM)	人 T 细胞结 合 K_d (pM)	人 T 细胞结合 K_d (pM)
	原始的	原始的	激活的
SIRP3	80.7	ND	ND
SIRP4	NC*	NC*	NC*
SIRP5	NC*	NC*	NC*
SIRP7	83.9	ND	ND
SIRP9	ND	1410	263
18D5	8410	NC*	NC*
KWAR-23	4.04	1.59	6.22
LSB2.20	750	1260	950

*NC: 未计算; 平均荧光强度与mIgG1背景水平相当

**未确定。

实例14

抗SIRP mAb不阻断可溶性CD47/细胞SIRP γ 结合

[0213] 为了评估本披露的抗SIRP抗体对阻断可溶性CD47与表达SIRP γ 的细胞的结合的作用,使用可溶性人IgG1 Fc标记的人CD47进行以下方法。

[0214] 在37°C、5%CO₂下,将人T-ALL细胞(Jurkat)以 2.5×10^5 细胞/孔与PBS(康宁公司)中含有1mM EDTA(西格玛奥德里奇公司)、1%FBS(Biowest公司)的结合缓冲液中10 μ g/ml的抗SIRP mAb一起孵育1h。此后,添加可溶性人IgG1 Fc标记的人CD47(ACRO#CD7-H5256),终浓度为50 μ g/ml,并且将细胞如前所述再孵育1h。然后充分洗涤细胞,并且在相同条件下用缀合至Alexa Fluor 647的驴抗人抗体(杰克逊免疫研究实验室有限公司)染色45min。通过流式细胞术(Attune,生命技术公司)分析样品。对于分析,从中值Alexa Fluor 647荧光强度中减去不存在可溶性Fc标记的CD47时的背景人IgG1 Fc染色。将阻断评估为与鼠IgG1(生物传奇公司,MOPC-21)对照相比,在SIRP mAb存在下,Alexa Fluor 647的背景校正中值荧光强度的降低。

[0215] 如表7中所示,可溶性抗SIRP mAb SIRP4、SIRP9、和OSE18D5不阻断细胞表达的SIRP γ 与可溶性人CD47的结合。KWAR-23确实阻断的Jurkat细胞表达的SIRP γ 与可溶性人CD47的结合。

表7. 通过抗SIRP抗体阻断CD47/SIRP γ 结合。

	阻断 Jurkat 上可溶性 CD47 与 SIRP γ 的结合
SIRP4	不阻断
SIRP9	不阻断
OSE 18D5	不阻断
KWAR-23	阻断

实例15

抗SIRP mAb阻断可溶性CD47/细胞SIRP α 结合

[0216] 为了评估本披露的抗SIRP抗体对可溶性CD47与表达SIRP α 的细胞的结合的作用,使用人巨噬细胞和可溶性人IgG1 Fc标记的人CD47进行以下方法。

[0217] 在补充有50ng/ml M-CSF (生物传奇公司)的AIM-V培养基 (生命技术公司)中,将从外周血单个核细胞 (Astarte Biologics公司)分离的人CD14⁺单核细胞在体外分化七天。然后在室温下用人Fc受体阻断溶液 (生物传奇公司)阻断巨噬细胞Fc受体20min。然后洗涤细胞,并且在37°C、5%CO₂下,将细胞与PBS (康宁公司)中含有1mM EDTA (西格玛奥德里奇公司)、1%FBS (BioWest公司)的结合缓冲液中10 μ g/ml的抗SIRP mAb一起孵育1h。此后,添加可溶性人IgG1 Fc标记的人CD47 (ACRO#CD7-H5256),终浓度为20 μ g/ml,并且将细胞如前所述再孵育1h。然后充分洗涤细胞,并且在相同条件下用缀合至Alexa Fluor 647的驴抗人抗体 (杰克逊免疫研究实验室有限公司)染色45min。通过流式细胞术 (Attune,生命技术公司)分析样品。对于分析,从中值Alexa Fluor 647荧光强度中减去不存在可溶性Fc标记的CD47时的背景人IgG1 Fc染色。将阻断评估为与鼠IgG1 (生物传奇公司,MOPC-21)对照相比,在SIRP mAb存在下,Alexa Fluor 647的背景校正中值荧光强度的降低。在这些测定中使用了四种不同的单核细胞供体,其中每个测试的抗体至少三种供体。

[0218] 如图13所示,可溶性抗SIRP mAb SIRP4和SIRP9阻断巨噬细胞上细胞表达的SIRP α 与可溶性人CD47的结合。OSE 18D5 mAb不阻断细胞表达的SIRP α 与可溶性人CD47的结合。

实例16

抗SIRP mAb不抑制T细胞增殖

[0219] 为了体外评估抗SIRP mAb对同种异体树突细胞诱导的T细胞增殖的作用,使用流式细胞术进行以下方法。

[0220] 通过在补充有10%人AB血清 (Valley Biomedical公司)、200ng/ml GM-CSF (生物传奇公司)和50ng/ml IL-4 (生物传奇公司)的AIM-V培养基 (生命技术公司)中,孵育CD14⁺单核细胞 (Astarte Biologics公司) 六天 (其中在第2天添加供应新鲜细胞因子的培养基),以产生人单核细胞来源的树突细胞。对于同种异体树突细胞和T细胞共培养测定,将未成熟的树突细胞以每孔1 $\times 10^5$ 个细胞的浓度重新接种到96孔板上。将来自四种不同的供体 (Astarte Biologics公司)的CellTrace™ Violet (生命技术公司)荧光细胞增殖染料标记的同种异体健康供体来源的CD3⁺T细胞以1:5DC:T细胞比率添加到培养物中。立即以10 μ g/ml的饱和浓度添加抗SIRP mAb,并且将细胞在37°C、5%CO₂下以200 μ l的总体积孵育6-7天。然后通过用移液管尖端刮擦孔使细胞分离,并且在荧光激活的细胞分选缓冲液 (1%FBS, BioWest公司,在PBS中)中洗涤。然后将细胞与PerCP-Cy5.5荧光染料标记的CD3抗体 (生物

传奇公司) 在冰上一起孵育30分钟, 洗涤一次, 并且通过流式细胞术 (Attune, 生命技术公司) 进行分析。通过CD3⁺细胞群体内的CellTrace™ Violet染料稀释来测量T细胞增殖。

[0221] 如图14A和图14B所示, 与对照抗体 (生物传奇公司) 相比, 抗SIRP mAb SIRP3、SIRP4、SIRP5、SIRP9、SIRP11、SIRP12、SIRP13、SIRP14、SIRP15、SIRP17、SIRP18、SIRP20、SIRP21、SIRP23和OSE-18D5对T细胞增殖没有显著作用。相反, 同时阻断SIRP α 和SIRP γ 与CD47的结合的KWAR-23抑制T细胞增殖。

实例17

抗SIRP mAb不抑制抗原特异性T细胞回忆应答

[0222] 为了体外评估抗SIRP mAb对T细胞中抗原回忆应答的作用, 使用流式细胞术进行以下方法。

[0223] 将来自巨细胞病毒血清反应阳性供体 (Astarte Biologics公司) 的人外周血单个核细胞用CellTrace™ Violet (生命技术公司) 荧光细胞增殖染料标记, 并且以200,000个细胞/孔接种在96孔板中。然后在补充有10%人AB血清 (Valley Biomedical公司) 的AIM-V培养基 (生命技术公司) 中将细胞与不同浓度的巨细胞病毒抗原 (Astarte Biologics公司) 一起孵育, 这诱导T细胞增殖的抗原依赖性刺激。立即以10 μ g/ml的饱和浓度添加抗SIRP mAb以及抗CD47 mAb克隆B6H12 (生物传奇公司), 并且将细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育五天。通过CD4⁺细胞群体内的CellTrace™ Violet染料稀释来测量T细胞增殖。

[0224] 如图15所示, 可溶性抗SIRP mAb SIRP4、SIRP5和SIRP9不抑制T细胞引发CMV抗原回忆应答的能力。相反, 与鼠IgG1对照抗体 (生物传奇公司) 相比, 已知抑制T细胞应答的抗CD47抗体克隆B6H12减少了T细胞增殖。

实例 18
SIRPα 抗体序列

抗体	<u>LCDR1</u> (SEQ ID NO:)	<u>LCDR2</u> (SEQ ID NO:)	<u>LCDR3</u> (SEQ ID NO:)	<u>HCDR1</u> (SEQ ID NO:)	<u>HCDR2</u> (SEQ ID NO:)	<u>HCDR3</u> (SEQ ID NO:)
SIRP1	1	2	3	33	34	35
SIRP2	4	5	6	36	37	38
SIRP3	7	8	9	39	40	41
SIRP4	10	11	12	42	43	44
SIRP5	13	14	15	45	46	47
SIRP6	16	17	18	48	49	50
SIRP7	19	20	21	51	52	53
SIRP8	22	23	24	54	55	56
SIRP9	25	26	27	57	58	59
SIRP10	28	29	30	60	61	62
SIRP11	10	31	12	42	43	44
SIRP12	10	31	12	42	43	44
SIRP13	10	31	32	42	43	44
SIRP14	10	31	12	42	43	44
SIRP15	10	31	12	42	43	44
SIRP16	10	31	32	42	43	44
SIRP17	10	31	12	42	43	44
SIRP18	10	31	12	42	43	44
SIRP19	10	31	32	42	43	44
SIRP20	10	31	12	42	43	44
SIRP21	10	31	12	42	43	44
SIRP22	10	31	32	42	43	44
SIRP23	10	11	12	42	43	44
SIRP24	25	26	27	57	58	63

	<u>LCDR1</u> (SEQ ID NO:)	<u>LCDR2</u> (SEQ ID NO:)	<u>LCDR3</u> (SEQ ID NO:)	<u>HCDR1</u> (SEQ ID NO:)	<u>HCDR2</u> (SEQ ID NO:)	<u>HCDR3</u> (SEQ ID NO:)
抗体						
SIRP25	25	26	27	57	58	63
SIRP26	25	26	27	57	58	63
SIRP27	25	26	27	57	58	63
SIRP28	25	26	27	57	58	63
SIRP29	25	26	27	57	58	63
SIRP30	25	26	27	57	58	59
SIRP31	25	26	27	57	58	59
SIRP32	25	26	27	57	58	59
SIRP33	25	26	27	57	58	63
	<u>V_L (SEQ ID NO:)</u>	<u>V_H (SEQ ID NO:)</u>	<u>LC (SEQ ID NO:)</u>	<u>HC (SEQ ID NO:)</u>		
SIRP1	64	81	98	109		
SIRP2	65	82	99	110		
SIRP3	66	83	100	111		
SIRP4	67	84				
SIRP5	68	85				
SIRP6	69	86				
SIRP7	70	87				
SIRP8	71	88				
SIRP9	72	89				
SIRP10	73	90				
SIRP11	74	91	101	112		
SIRP12	75	91	102	112		
SIRP13	76	91	103	112		
SIRP14	74	92	101	113		
SIRP15	75	92	102	113		
SIRP16	76	92	103	113		
SIRP17	74	93	101	114		

	<u>LCDR1</u> (SEQ ID NO:)	<u>LCDR2</u> (SEQ ID NO:)	<u>LCDR3</u> (SEQ ID NO:)	<u>HCDR1</u> (SEQ ID NO:)	<u>HCDR2</u> (SEQ ID NO:)	<u>HCDR3</u> (SEQ ID NO:)
抗体						
SIRP18	75	93	102	114		
SIRP19	76	93	103	114		
SIRP20	74	94	101	115		
SIRP21	75	94	102	115		
SIRP22	76	94	103	115		
SIRP23	77	84	104	116		
SIRP24	78	95	105	117		
SIRP25	79	95	106	117		
SIRP26	80	95	107	117		
SIRP27	78	96	105	118		
SIRP28	79	96	106	118		
SIRP29	80	96	107	118		
SIRP30	78	97	105	119		
SIRP31	79	97	106	119		
SIRP32	80	97	107	119		
SIRP33	72	89	108	120		

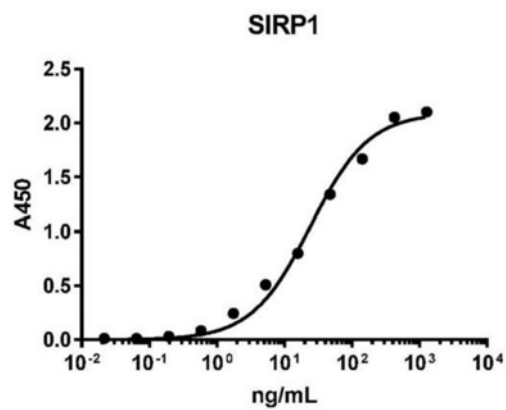


图1A

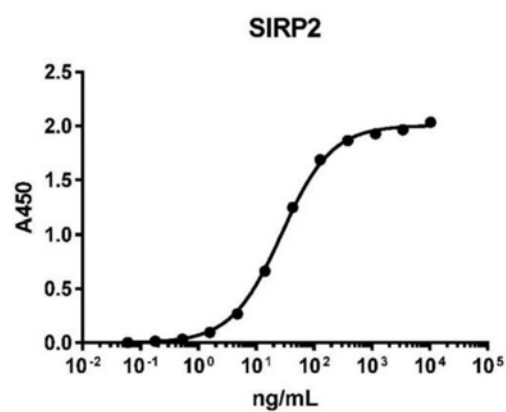


图1B

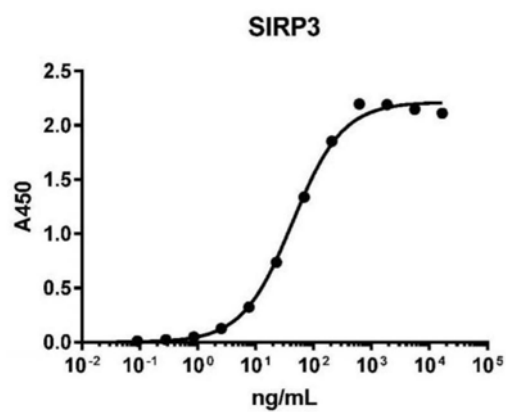


图1C

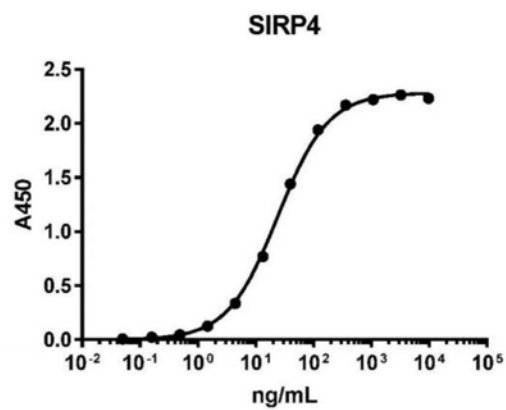


图1D

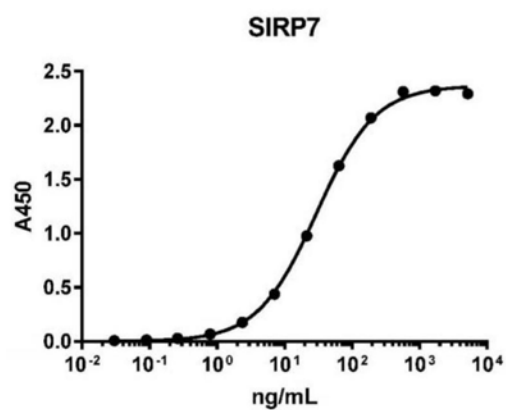


图1E

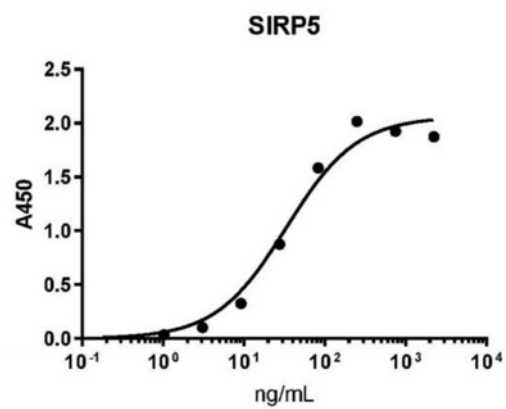


图1F

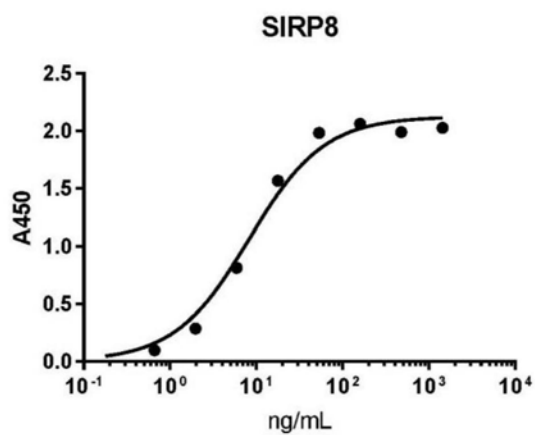


图1G

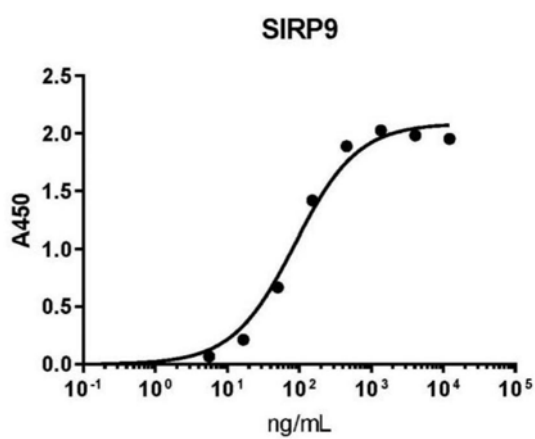


图1H

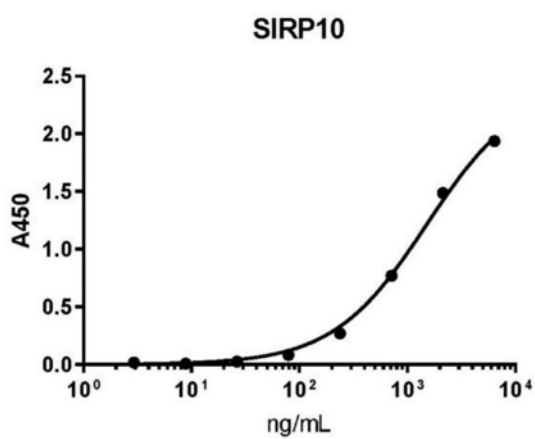


图1I

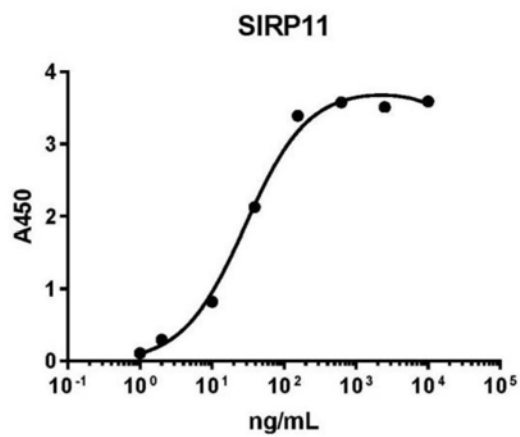


图1J

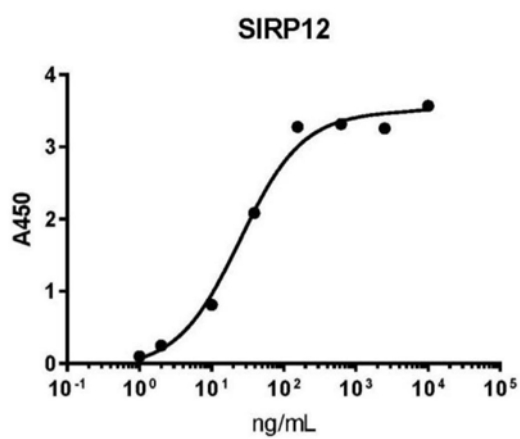


图1K

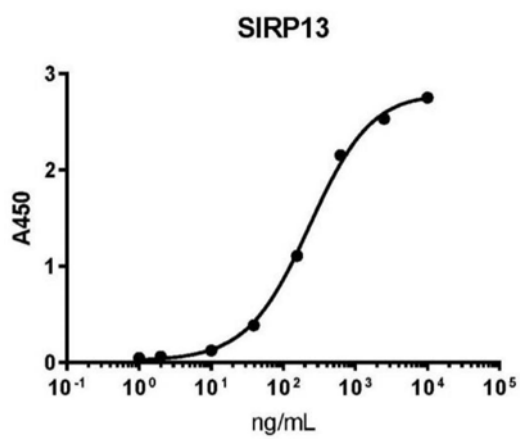


图1L

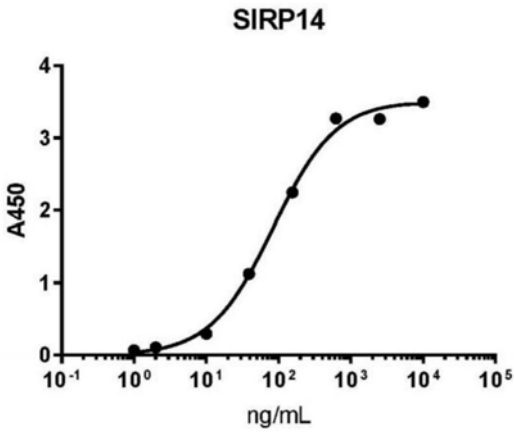


图1M

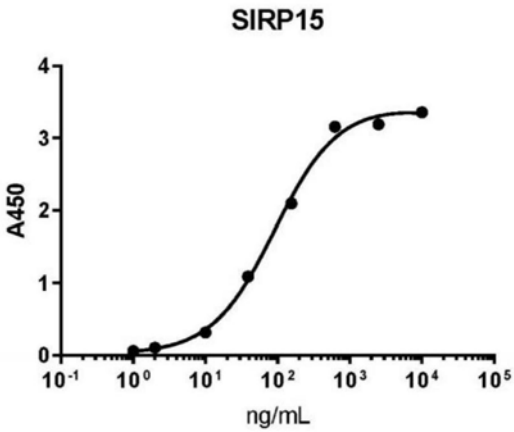


图1N

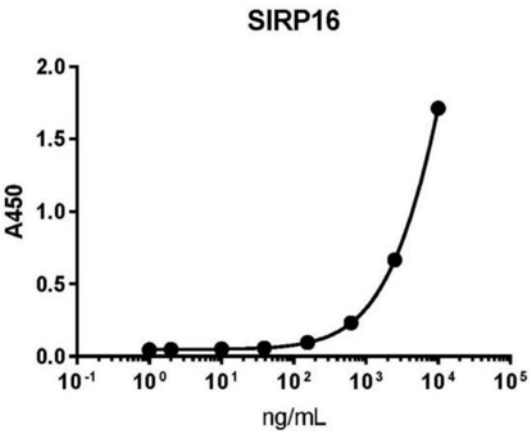


图10

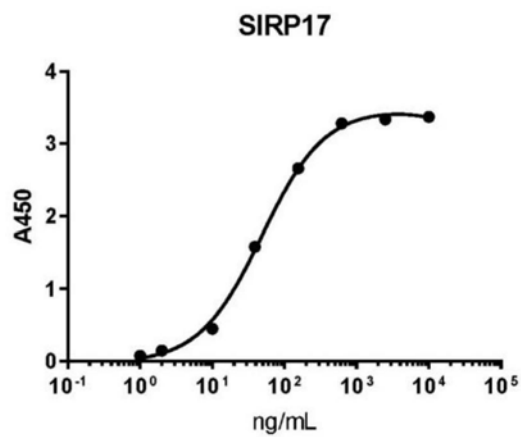


图1P

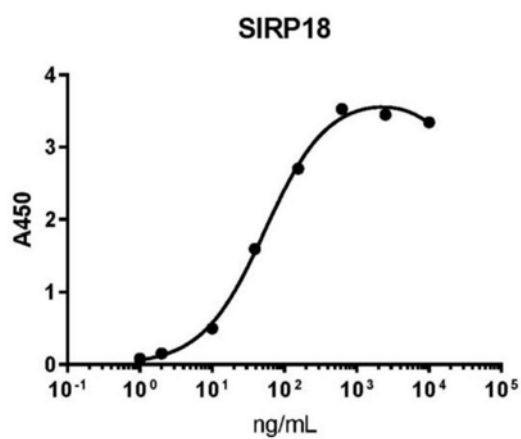


图1Q

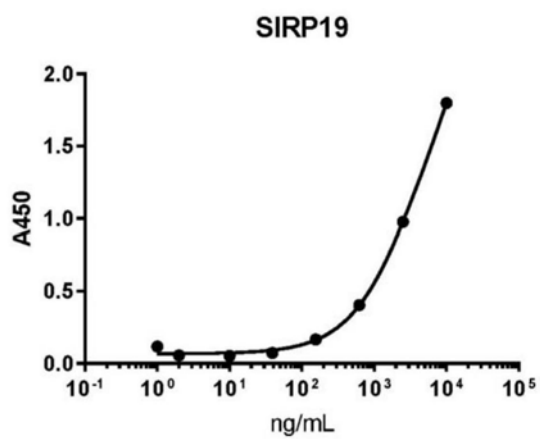


图1R

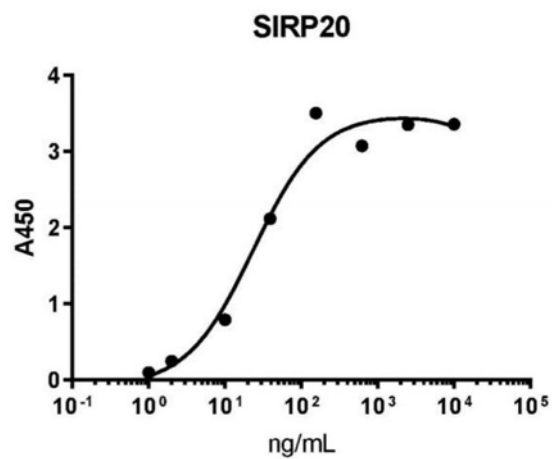


图1S

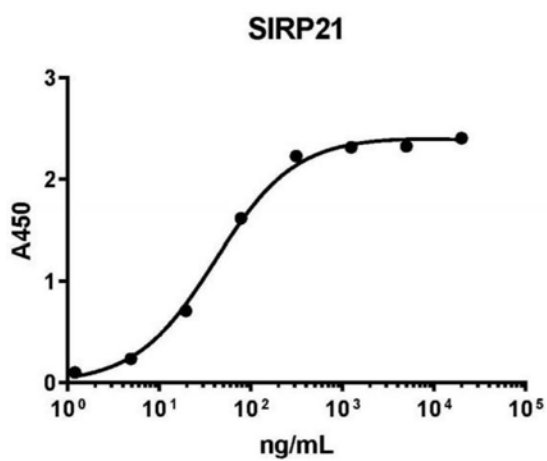


图1T

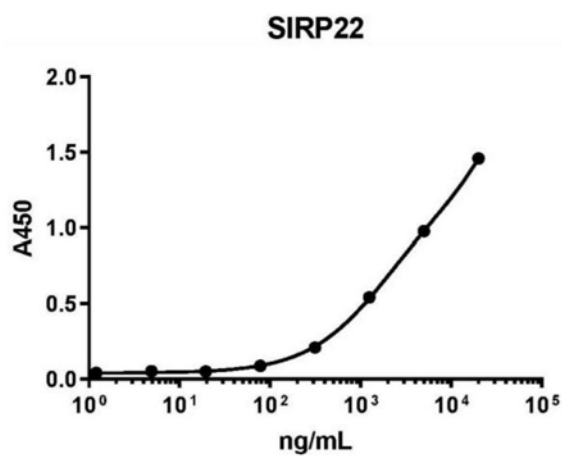


图1U

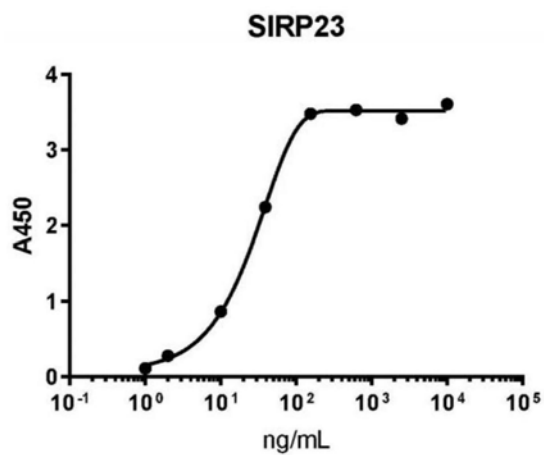


图1V

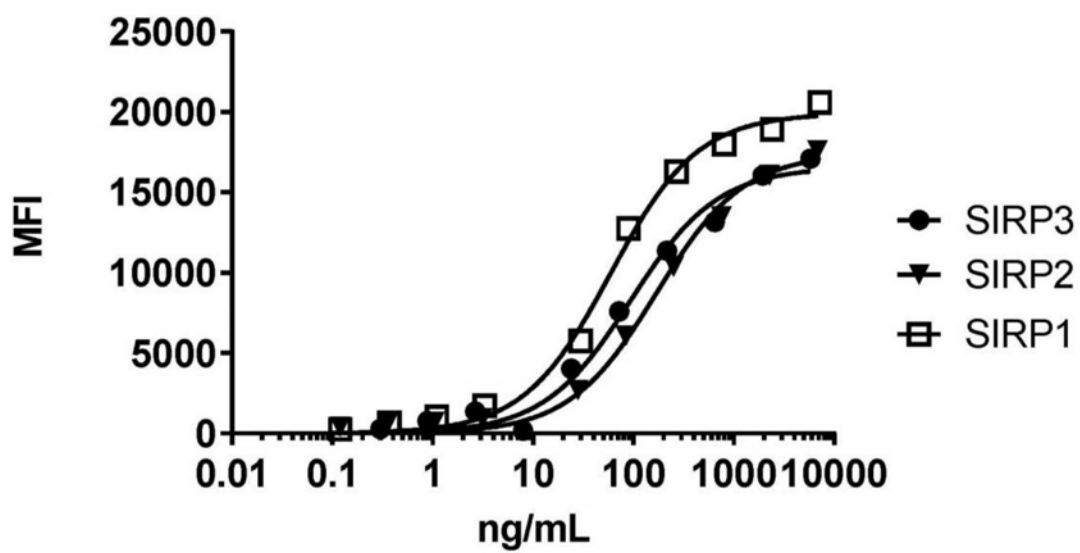


图2

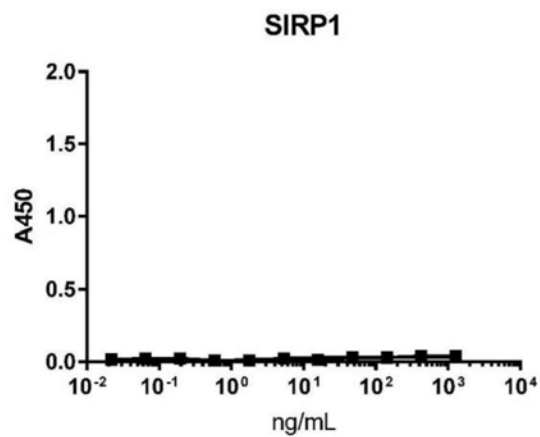


图3A

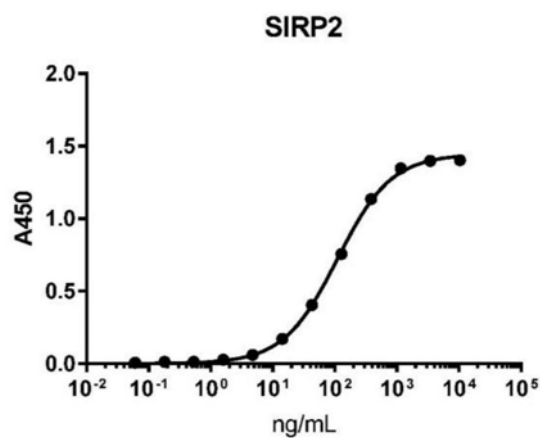


图3B

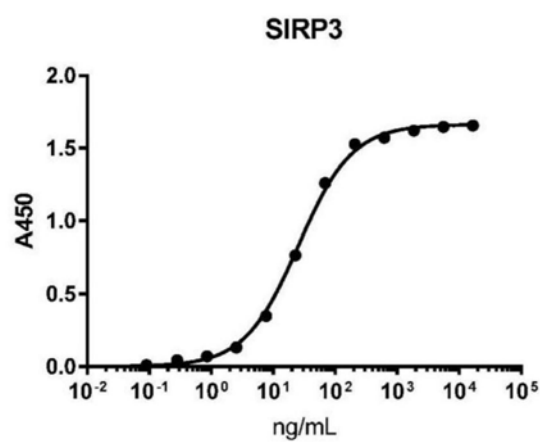


图3C

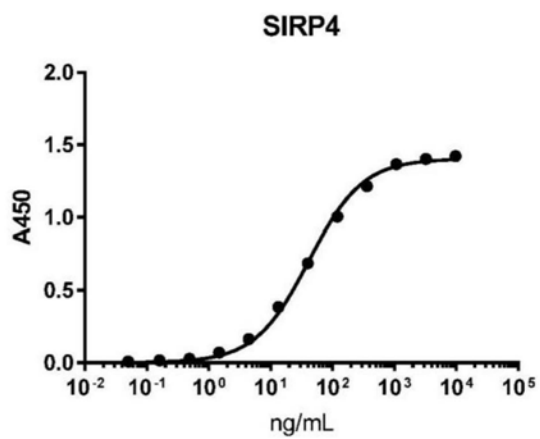


图3D

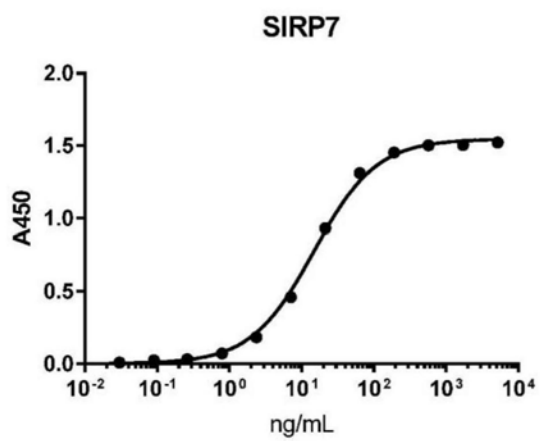


图3E

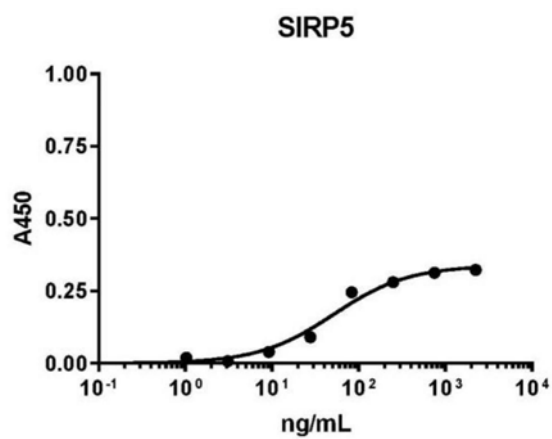


图3F

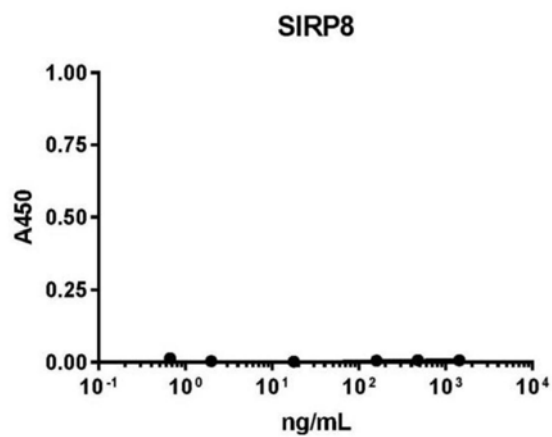


图3G

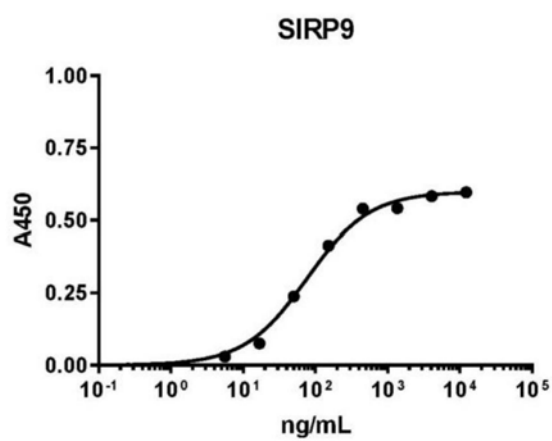


图3H

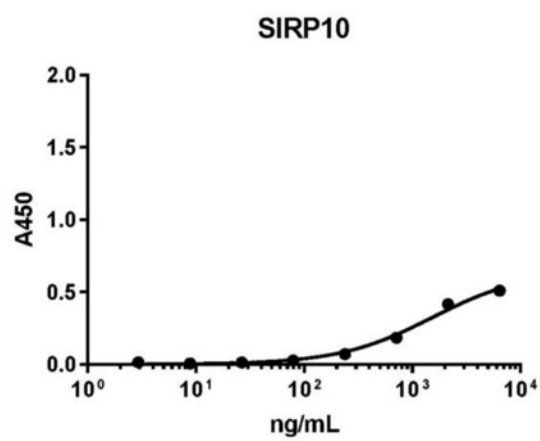


图3I

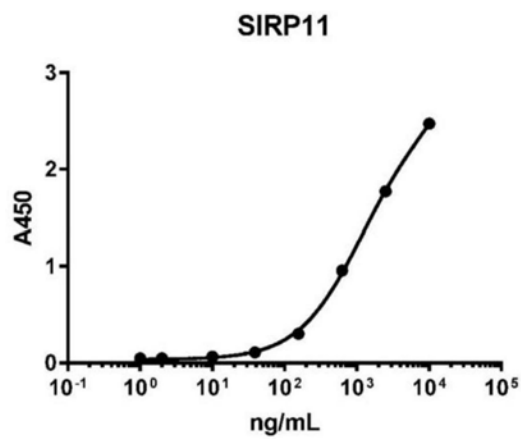


图3J

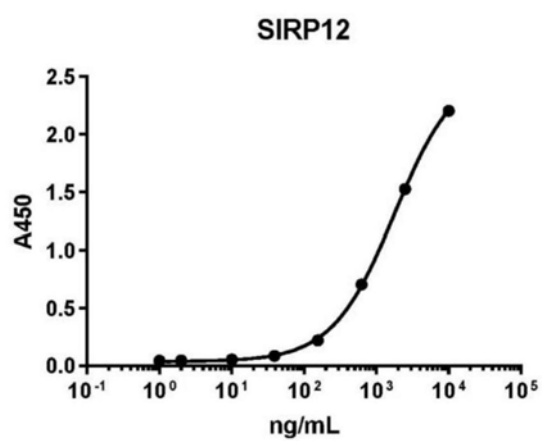


图3K

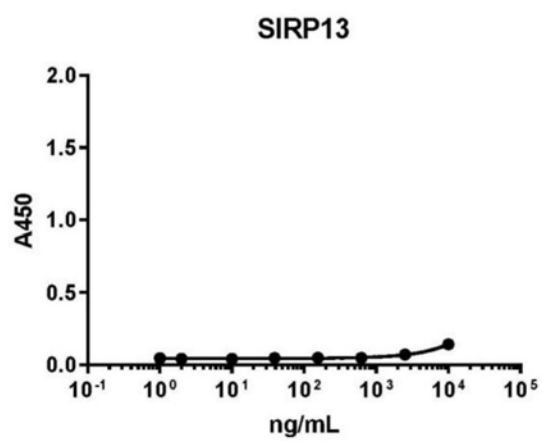


图3L

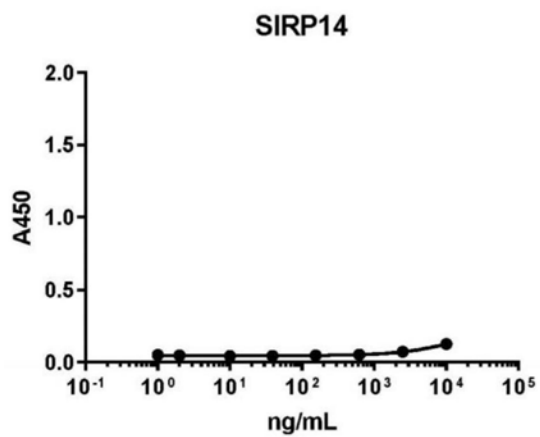


图3M

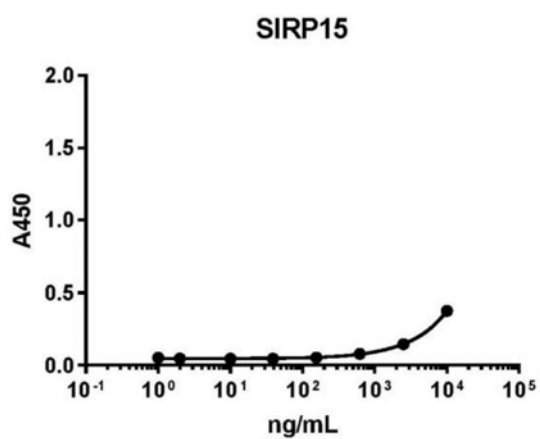


图3N

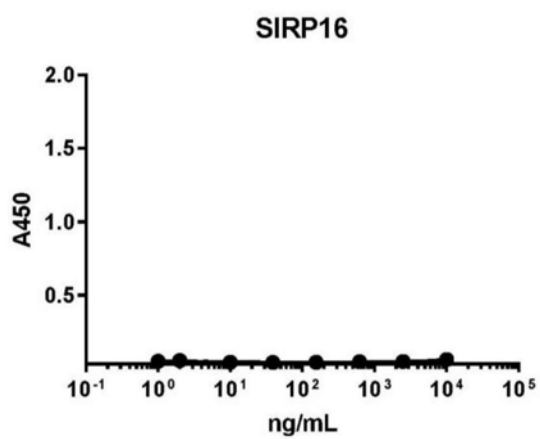


图3O

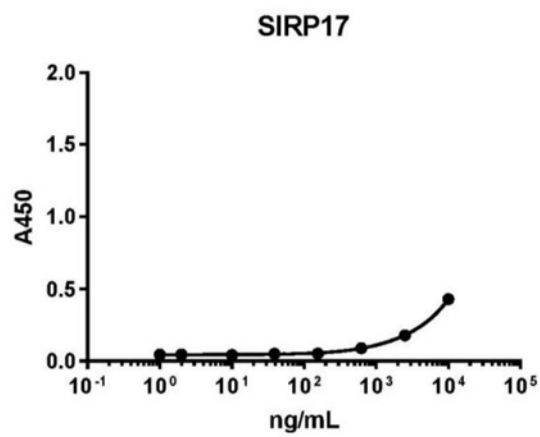


图3P

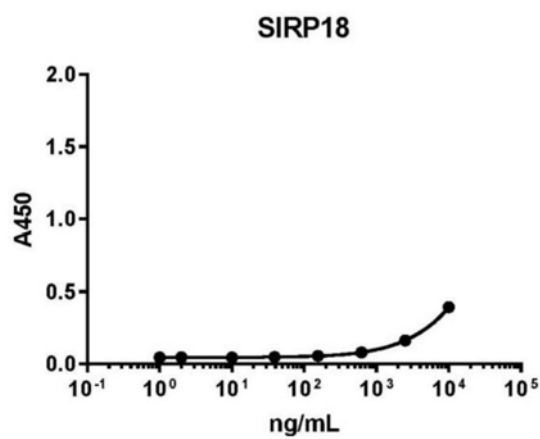


图3Q

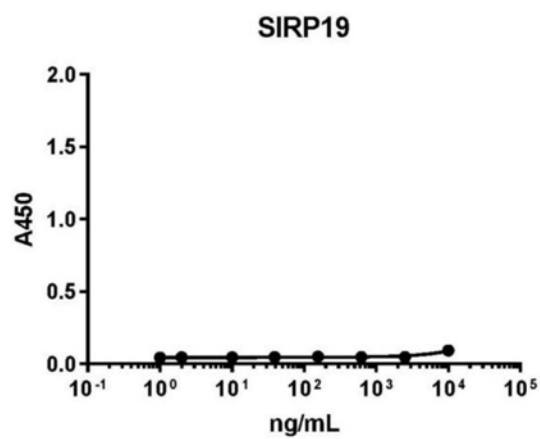


图3R

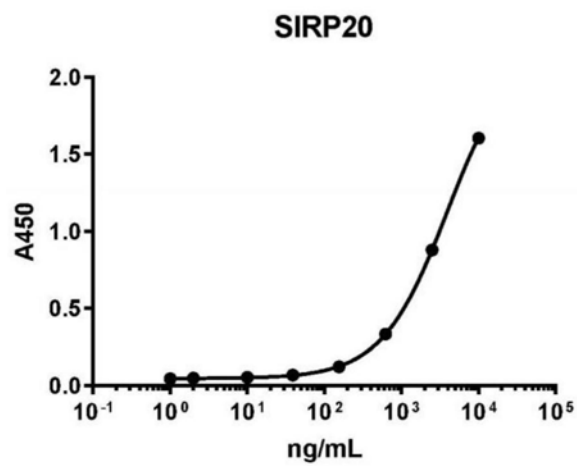


图3S

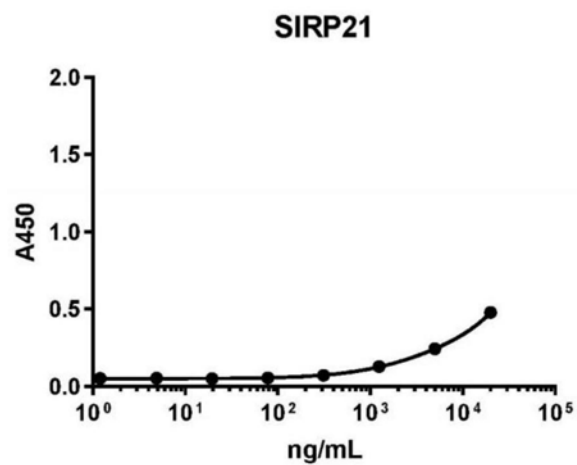


图3T

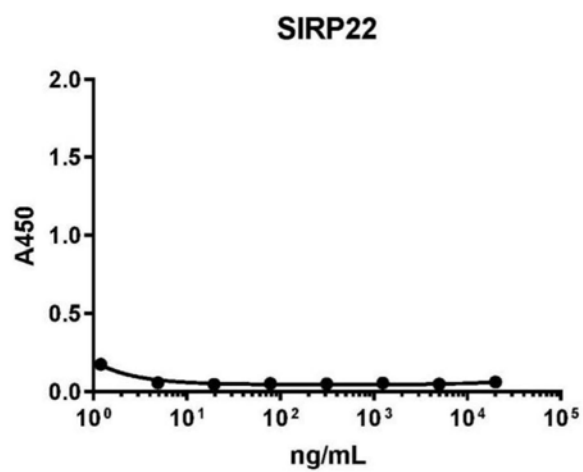


图3U

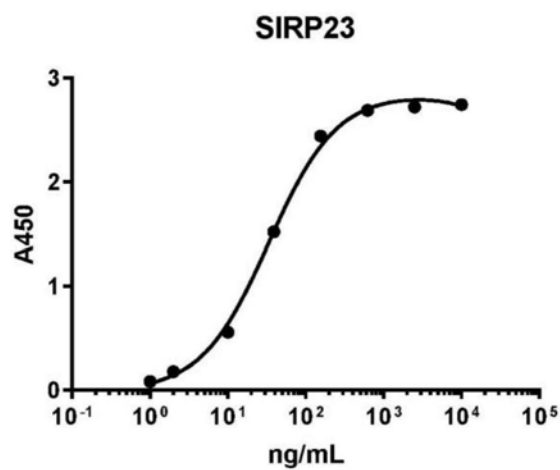


图3V

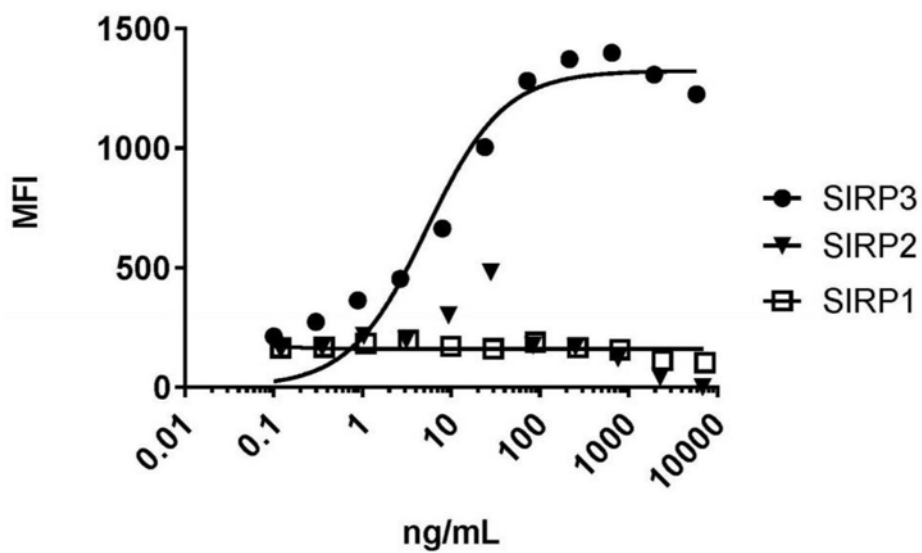


图4A

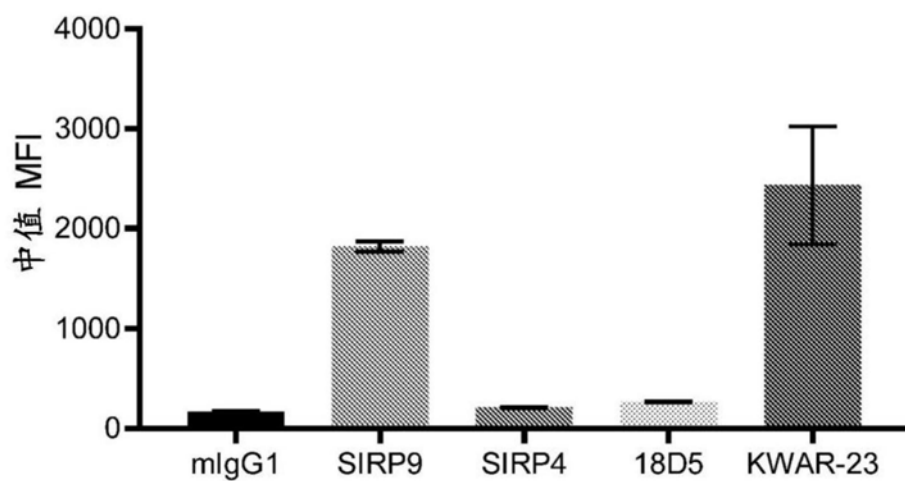


图4B

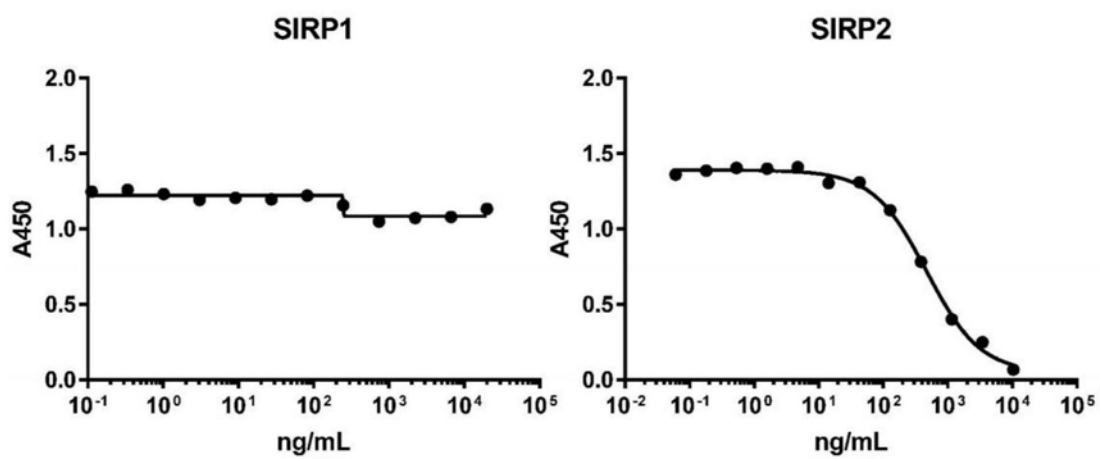


图 5A

图 5B

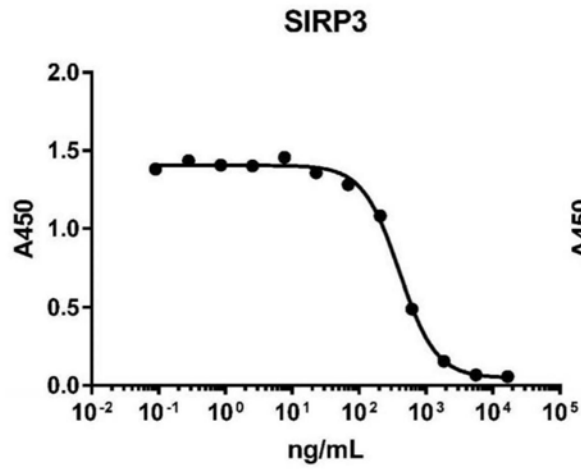


图 5C

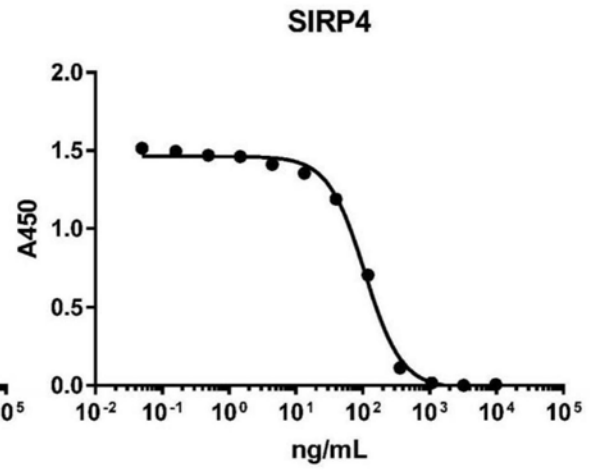


图 5D

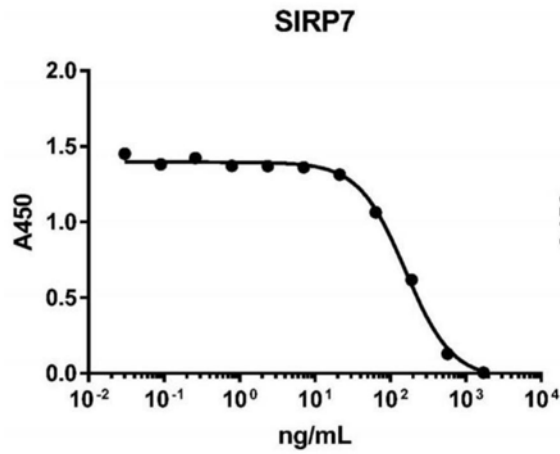


图 5E

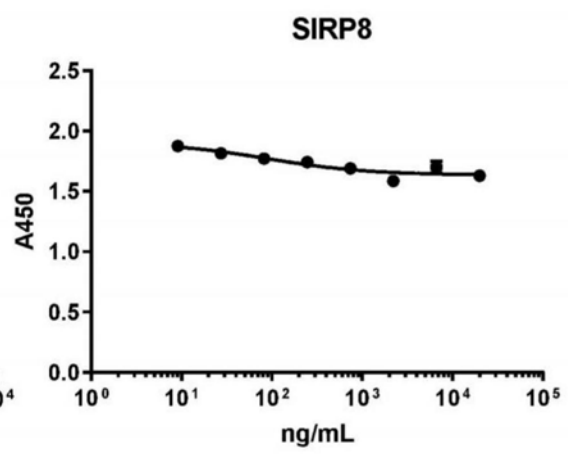


图 5F

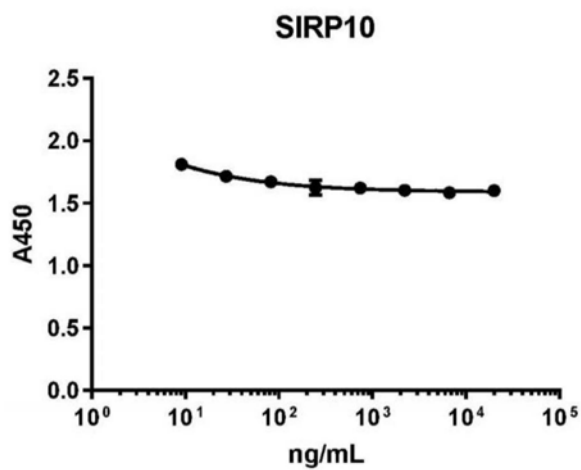


图5G

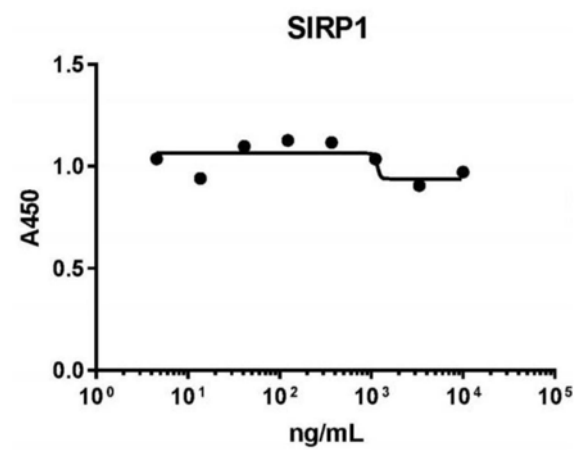


图6A

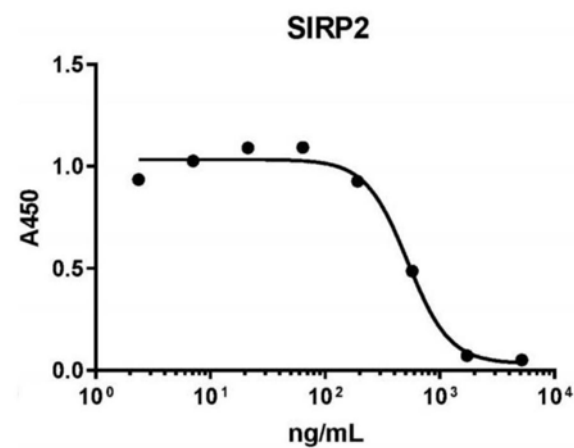


图6B

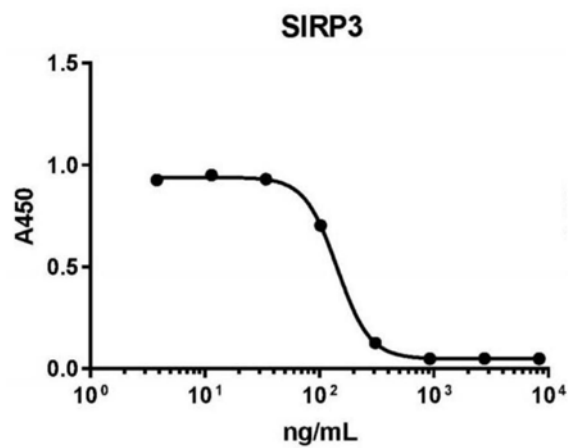


图6C

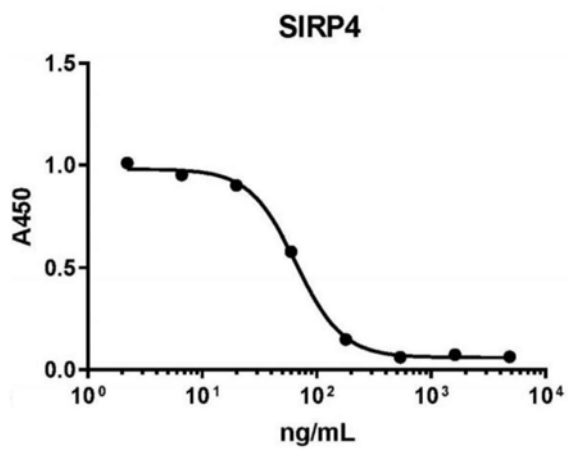


图6D

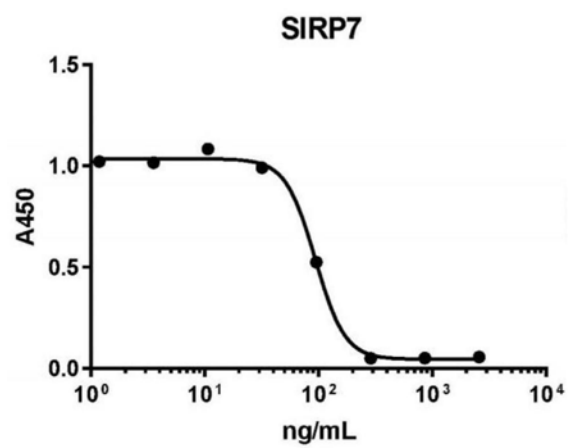


图6E

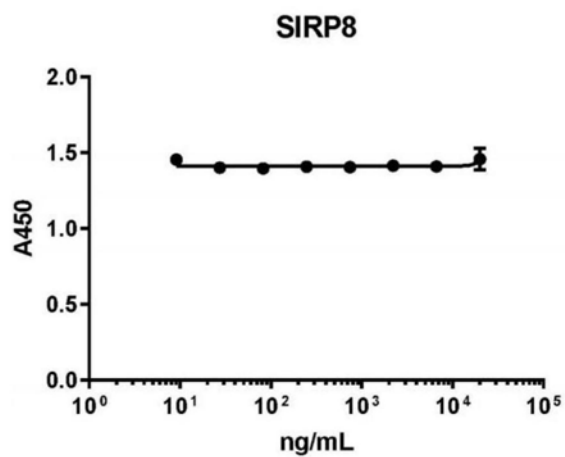


图6F

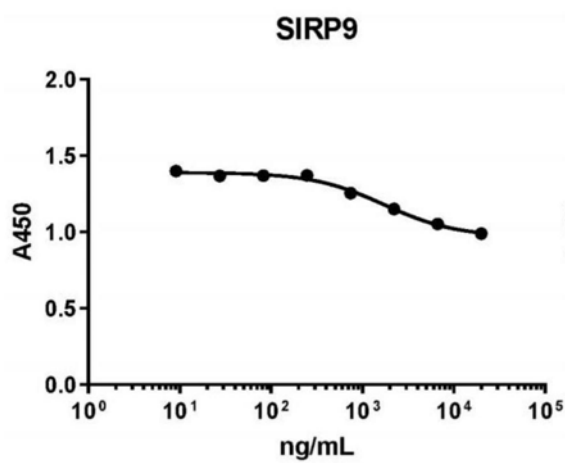


图6G

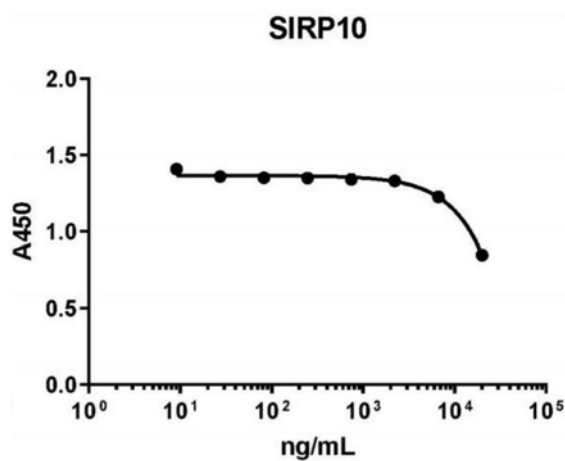


图6H

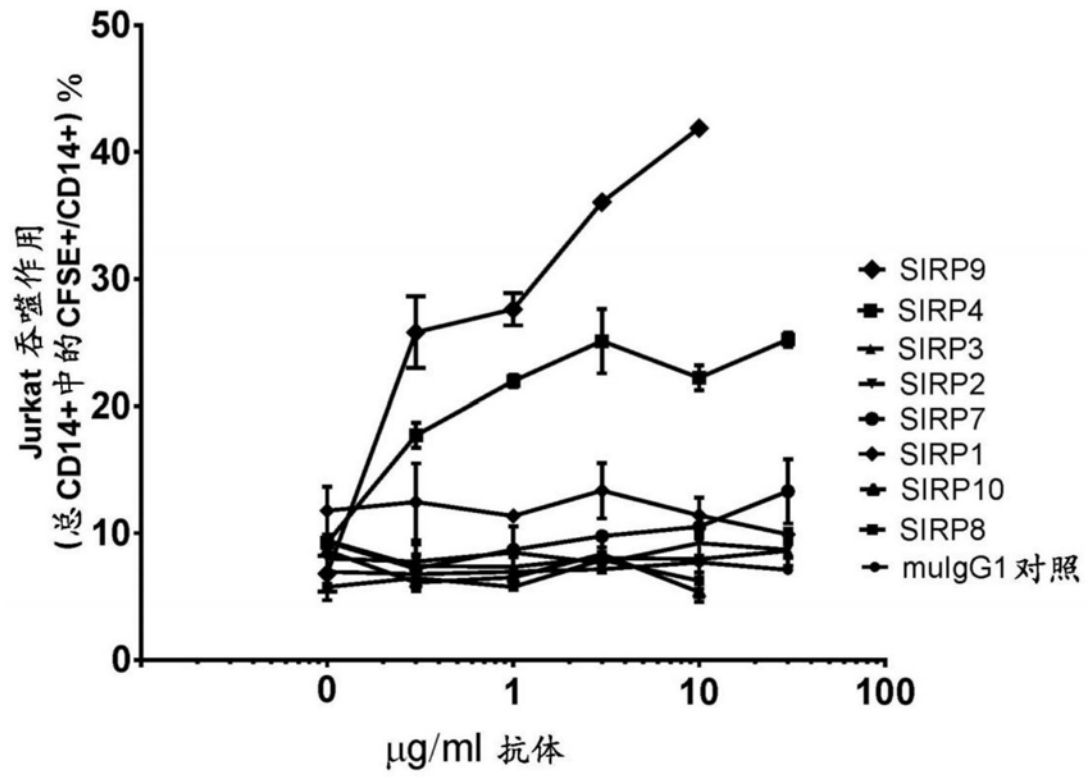


图7A

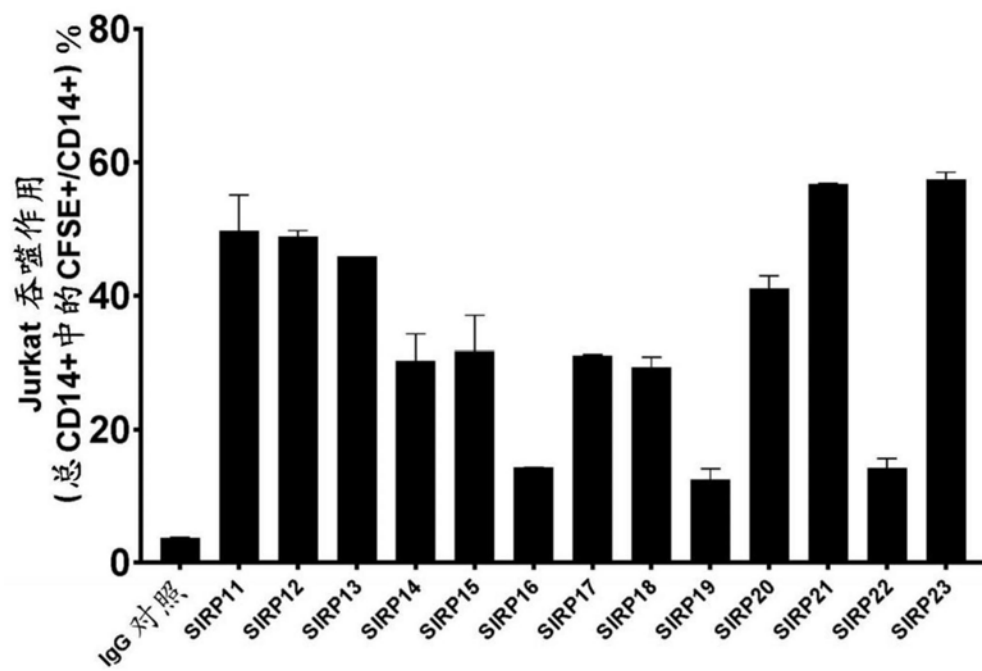


图7B

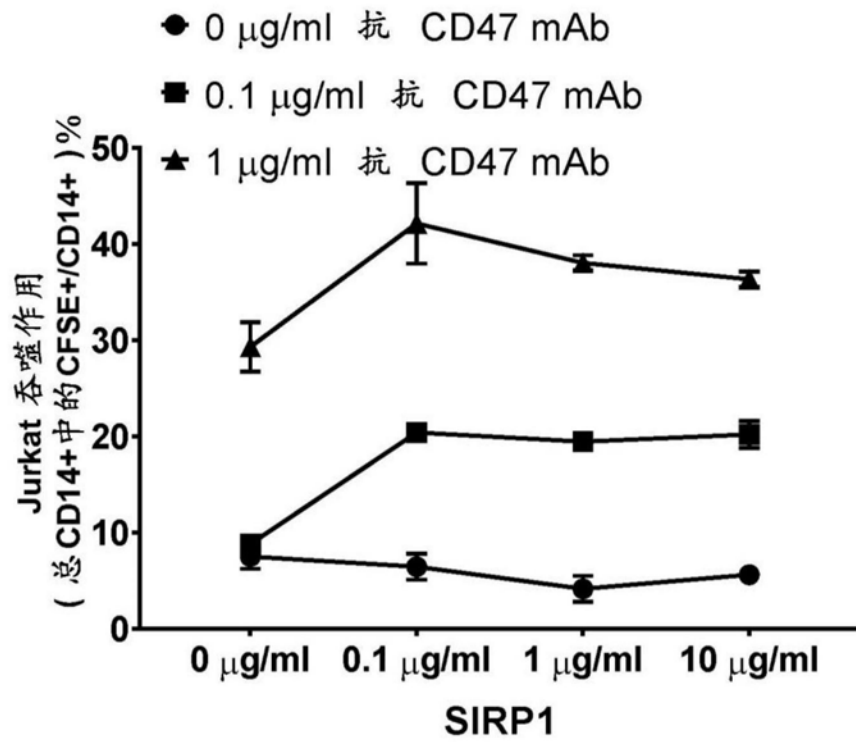


图8A

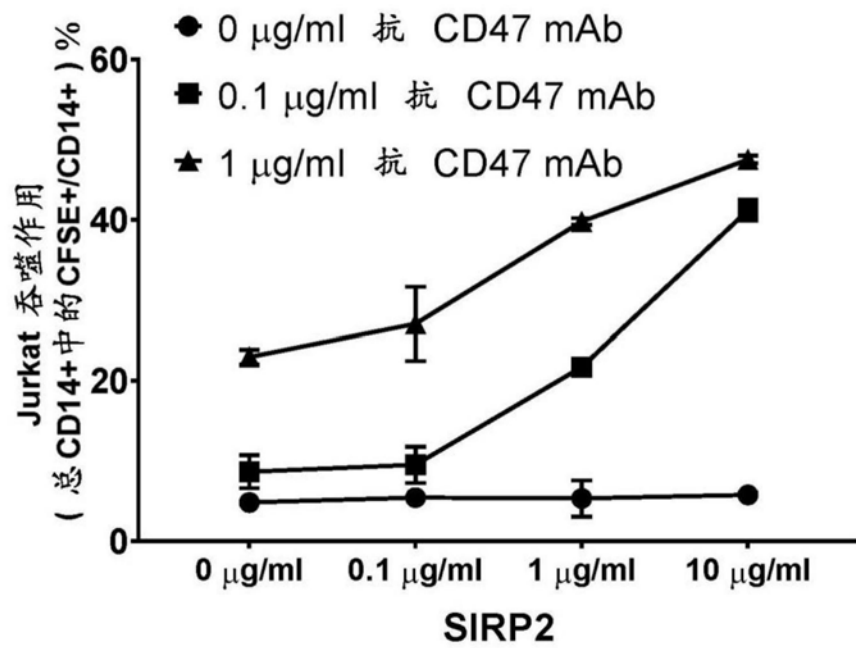


图8B

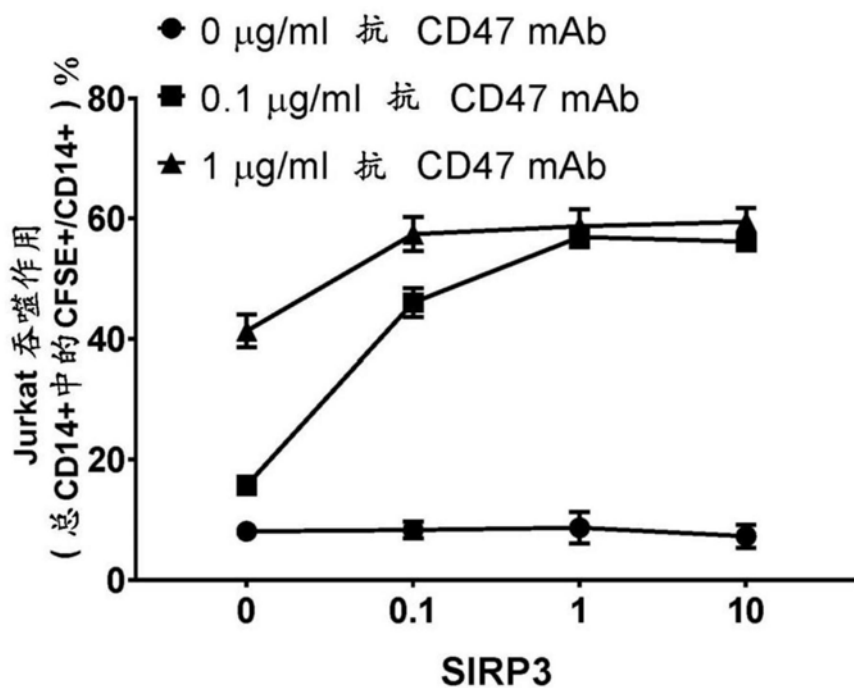


图8C

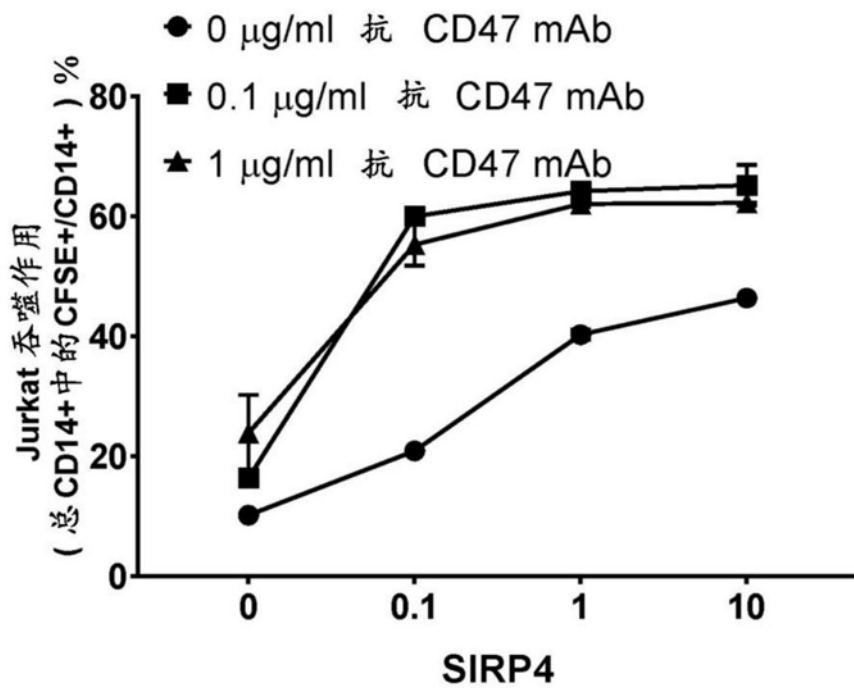


图8D

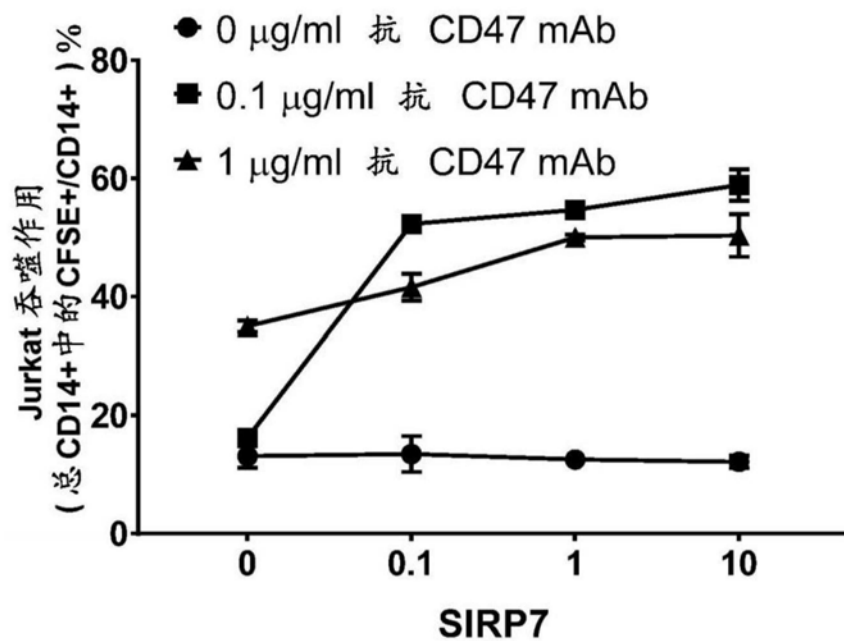


图8E

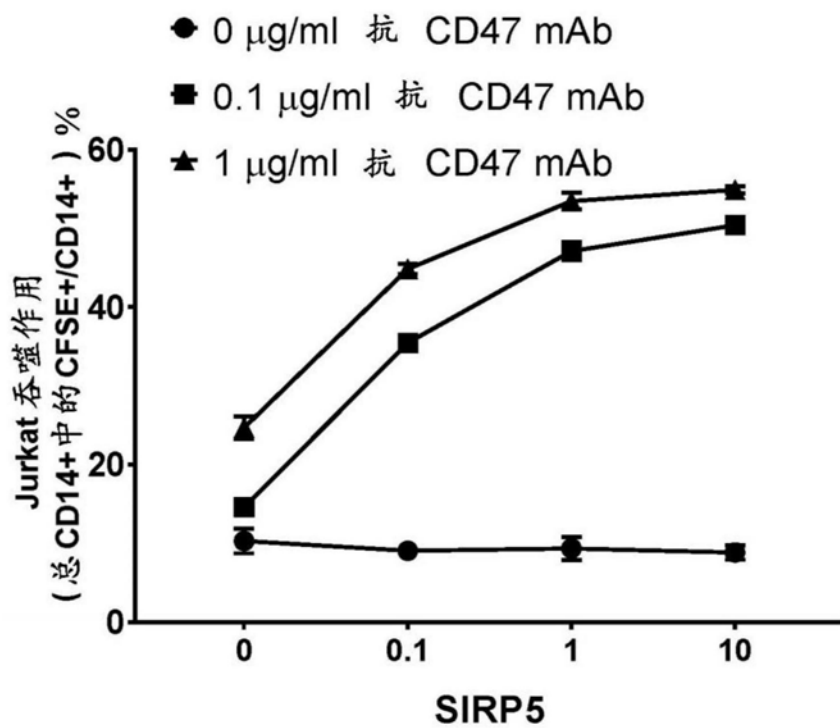


图8F

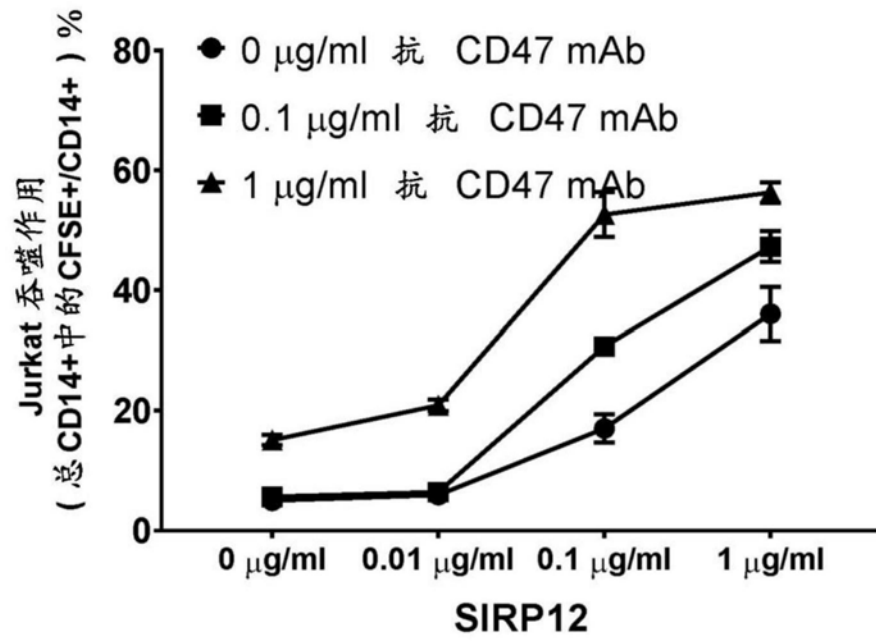


图8G

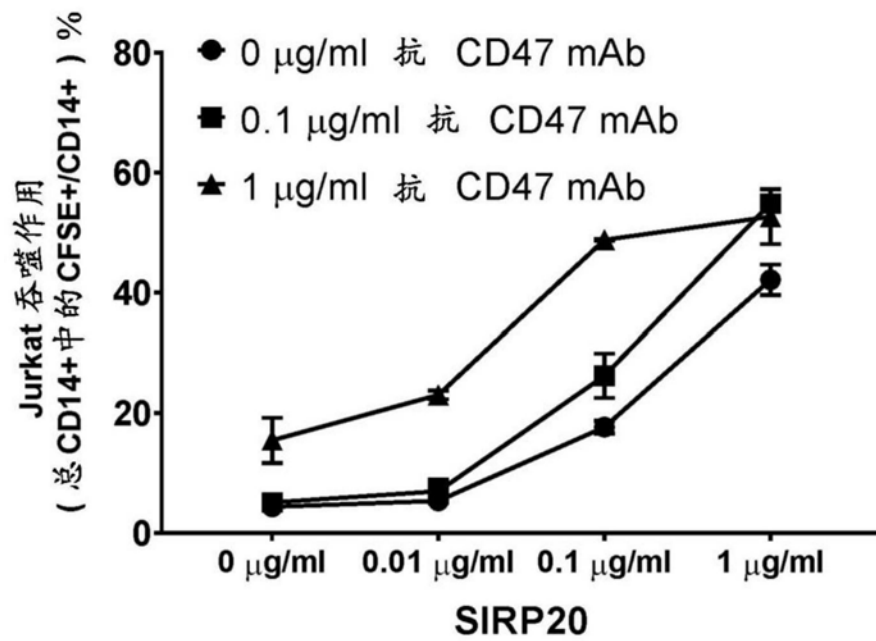


图8H

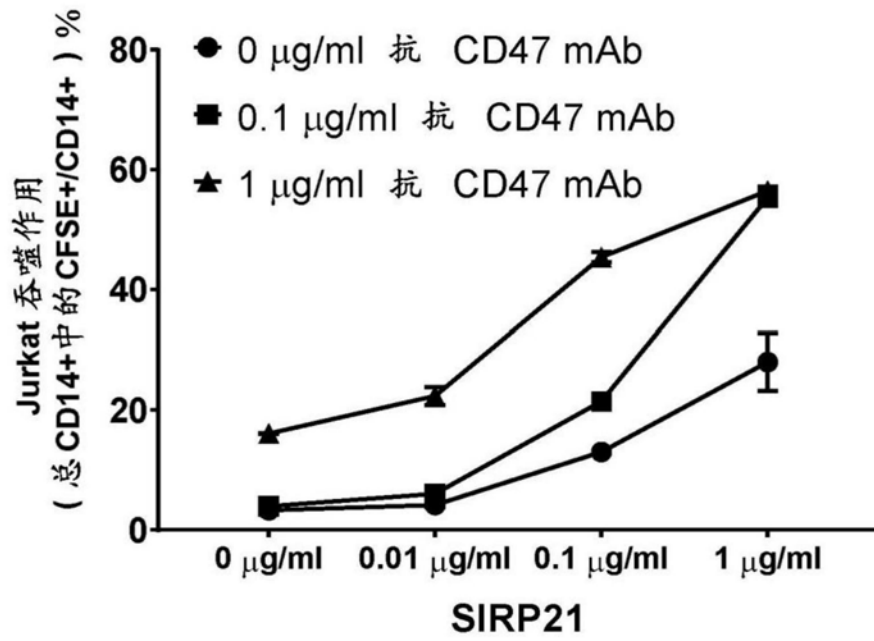


图8I

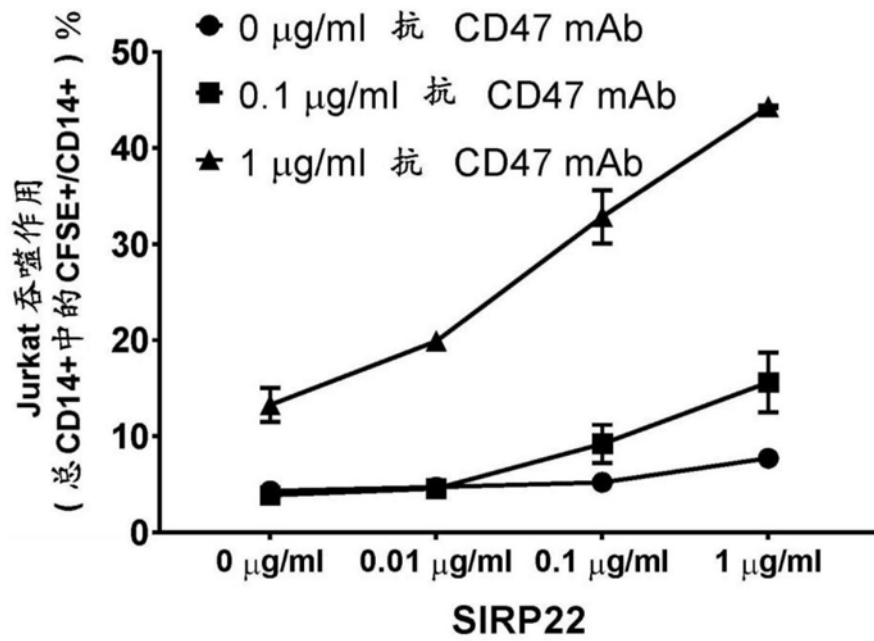


图8J

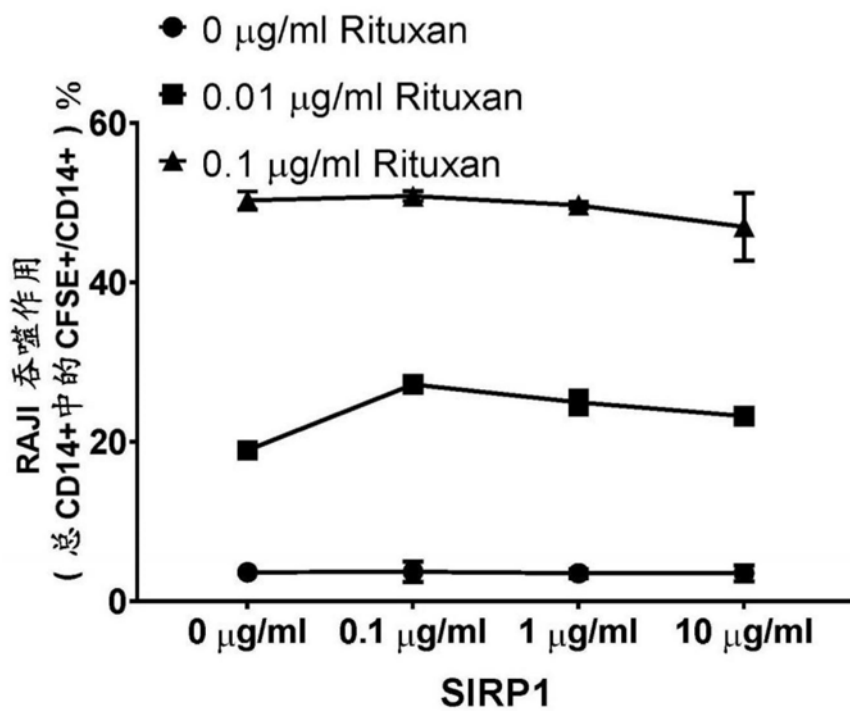


图9A

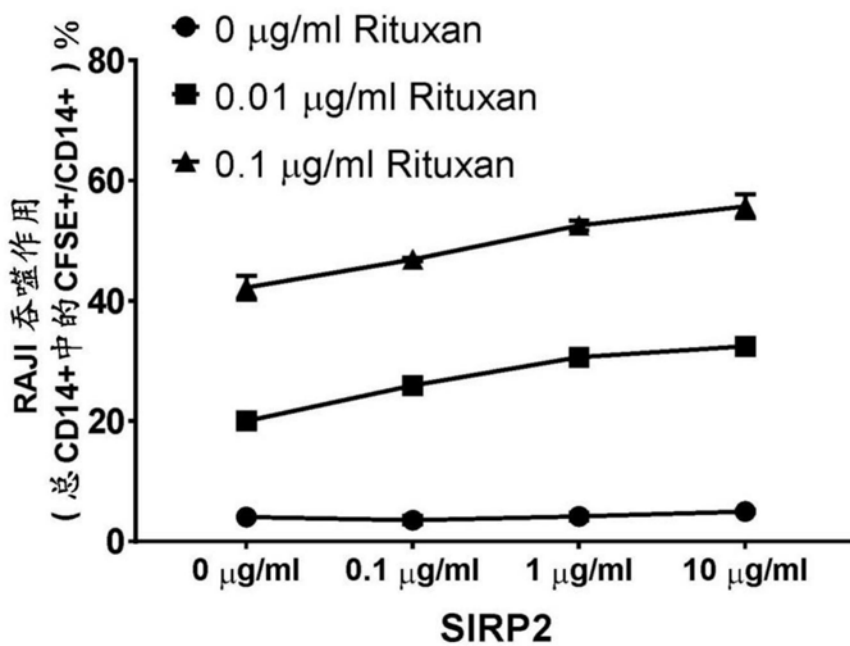


图9B

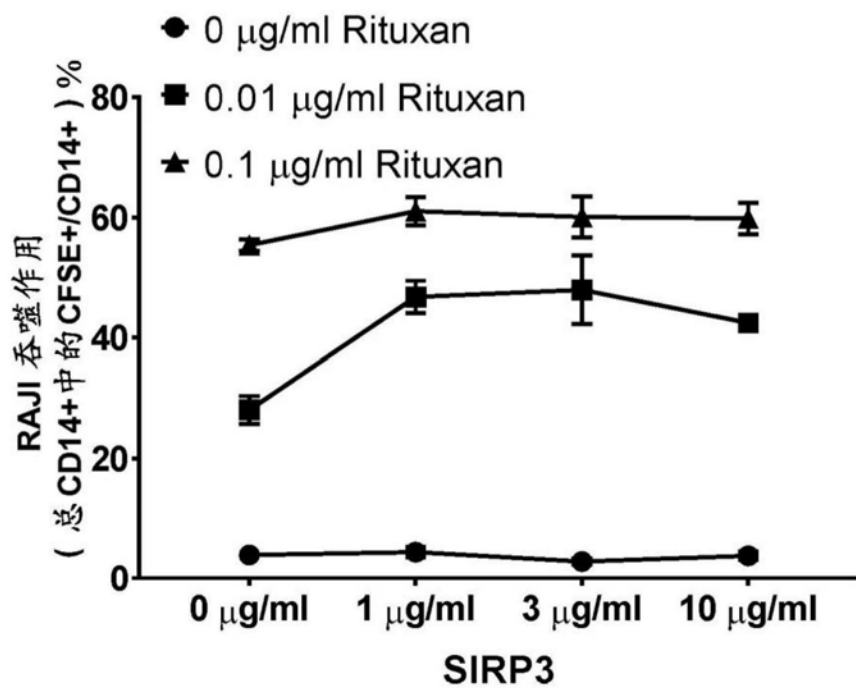


图9C

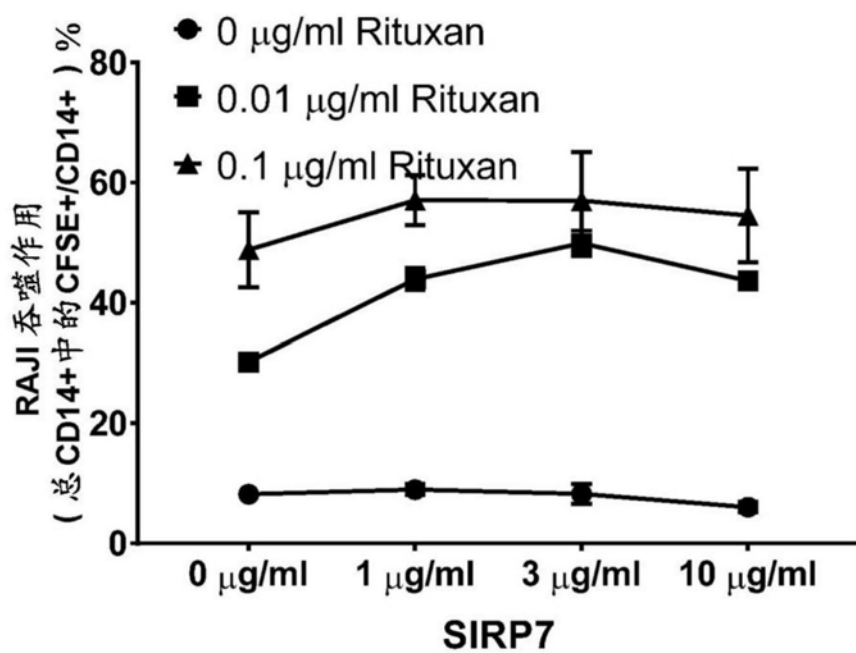


图9D

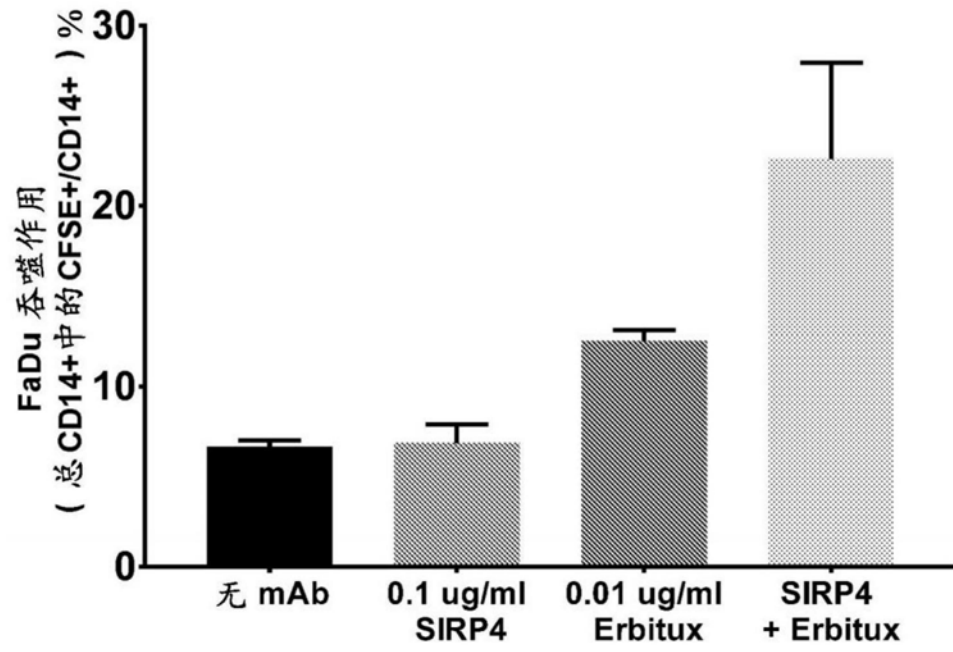


图10A

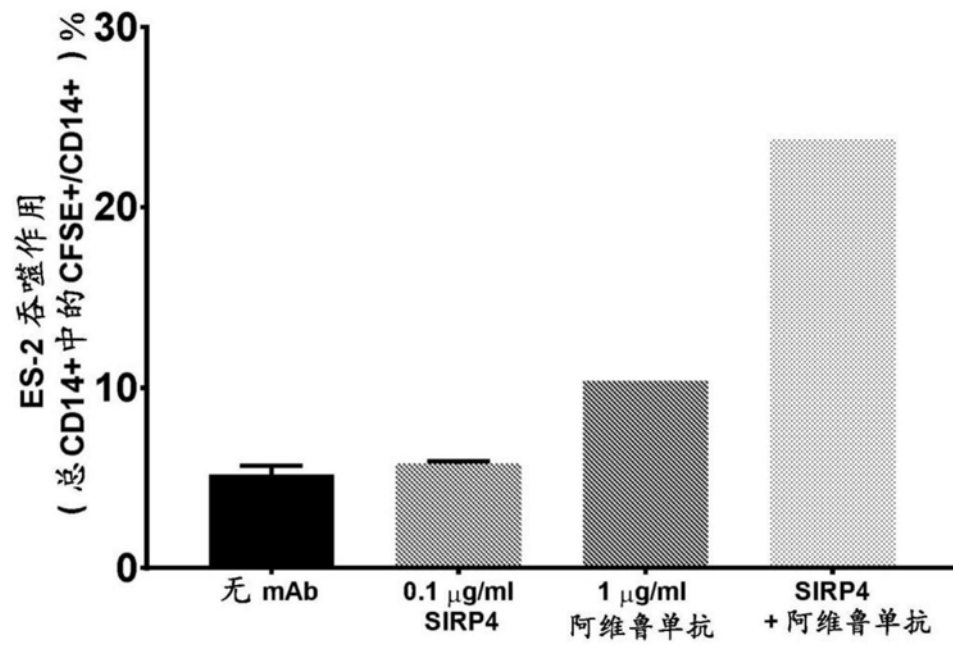


图10B

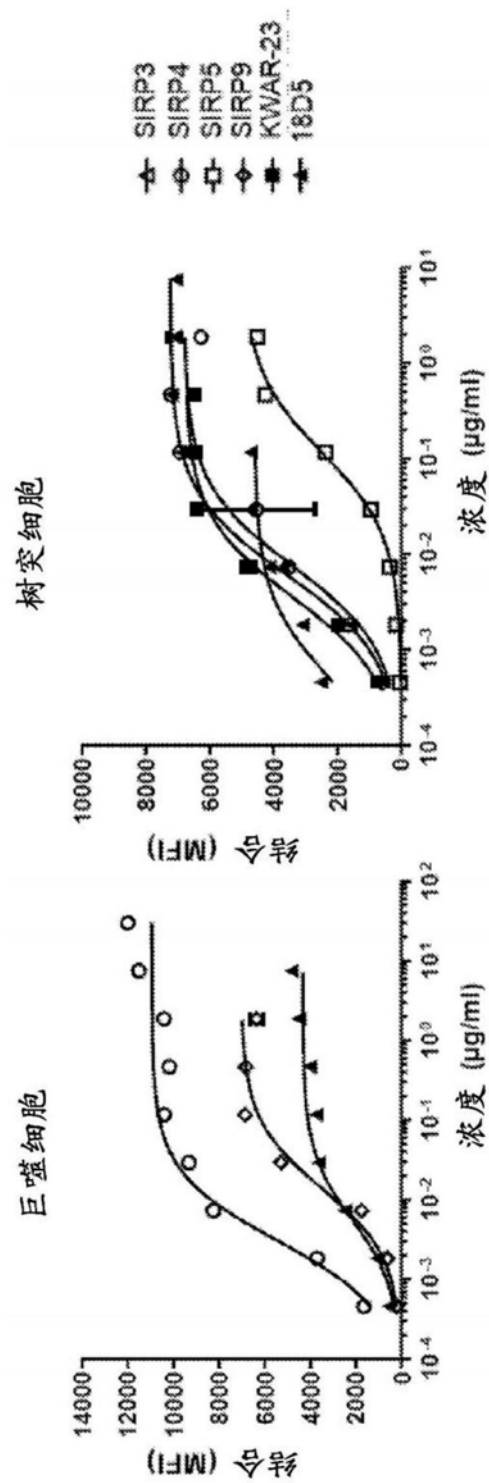


图11

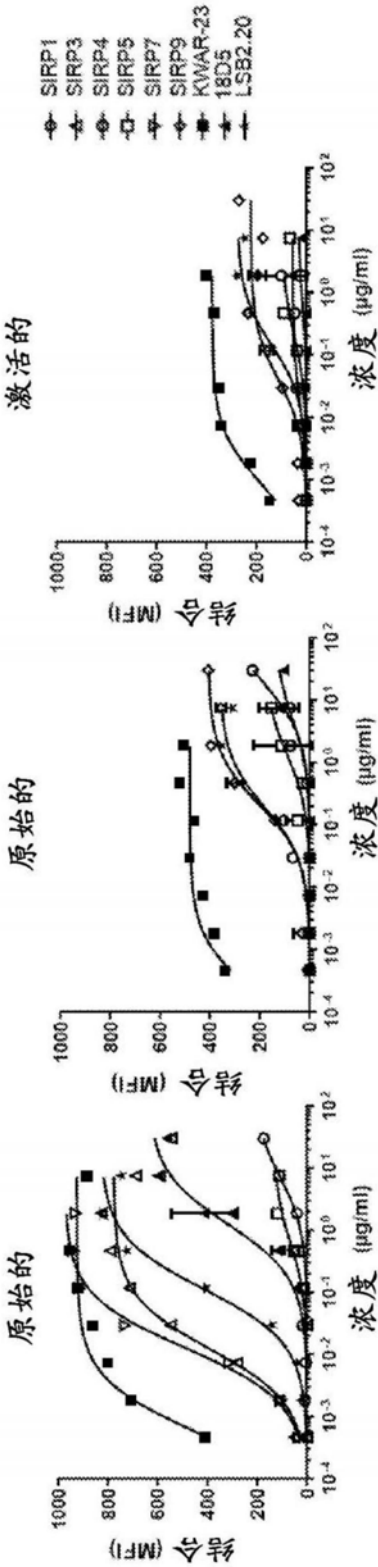


图 12C

图 12B

图 12A

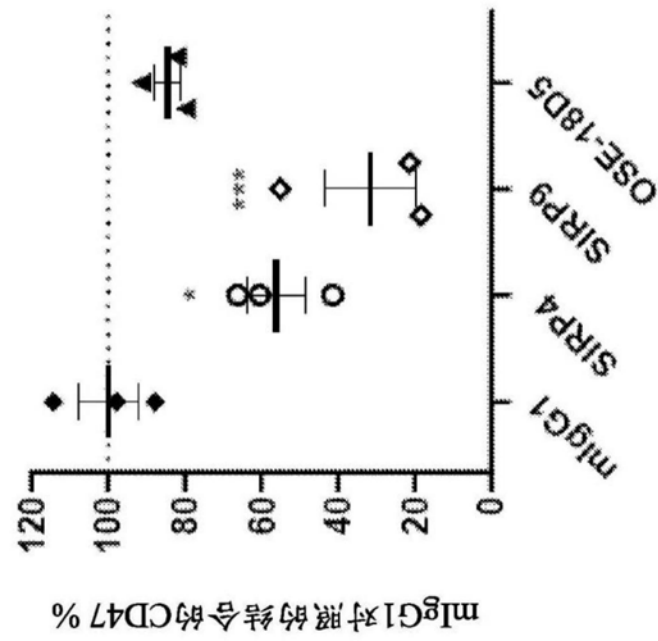


图13

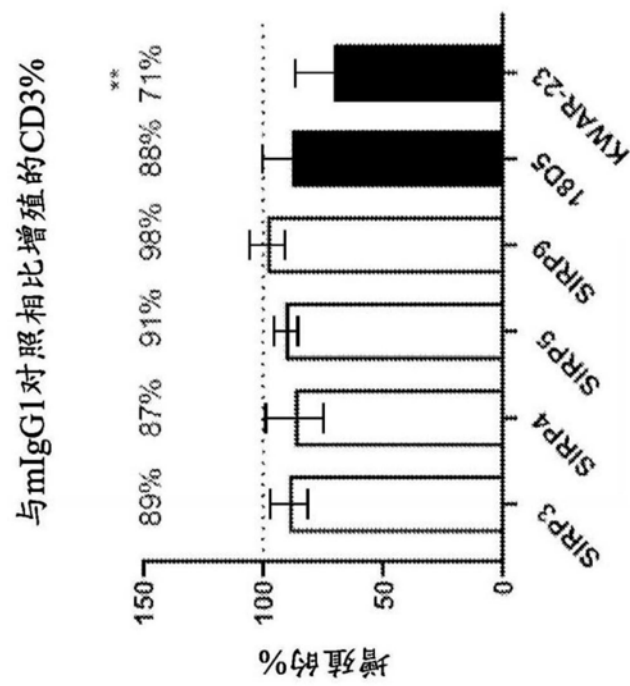


图14A

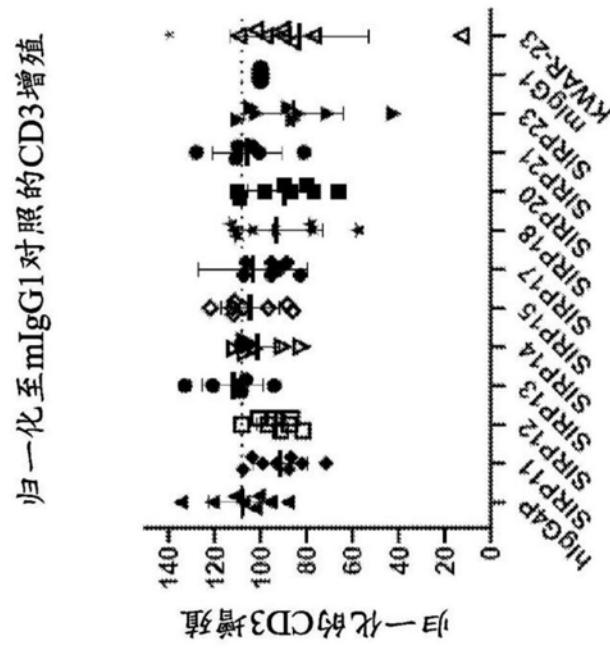


图14B

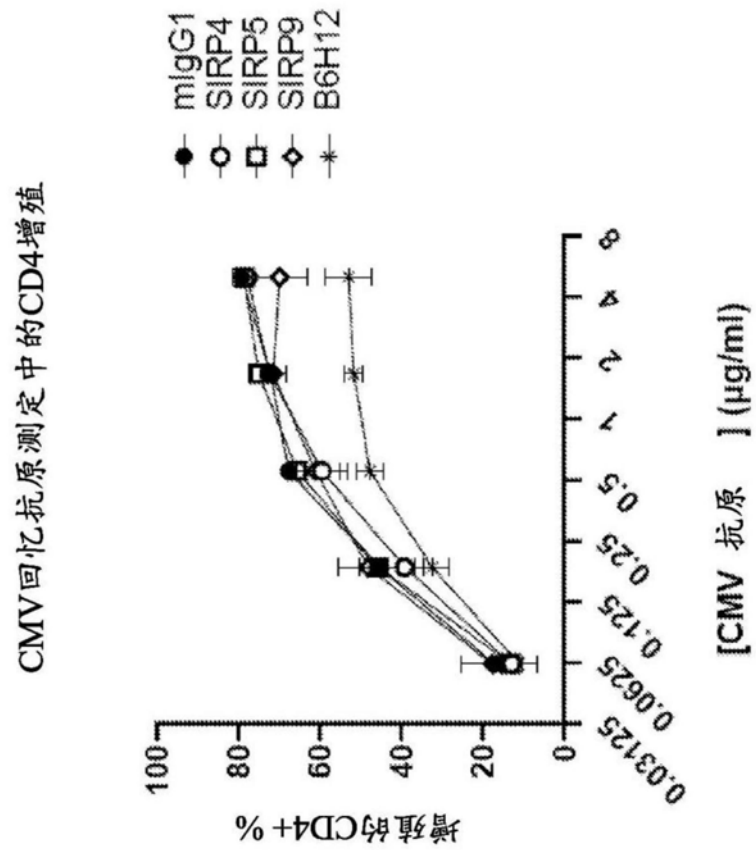


图15