



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105073780 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201380073010. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 12. 17

C07K 19/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 38/16(2006. 01)

61/738, 008 2012. 12. 17 US

A61K 38/45(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 35/02(2006. 01)

2015. 08. 14

C07K 14/705(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C07K 16/00(2006. 01)

PCT/CA2013/001046 2013. 12. 17

C12N 15/62(2006. 01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/094122 EN 2014. 06. 26

(71) 申请人 特里姆治疗公司

地址 加拿大安大略

(72) 发明人 罗伯特·亚当·尤格尔

彭卡·斯拉夫彻娃·斯拉沃娃-皮特

洛娃

庞昕黎

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理

有限公司 11112

代理人 王静 丁业平

权利要求书1页 说明书21页

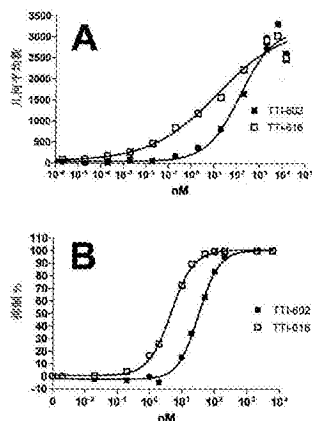
序列表5页 附图6页

(54) 发明名称

用 SIRP α -Fc 融合蛋白处理 CD47+ 疾病细胞

(57) 摘要

本申请公开了利用通过 SIRP α /CD47 轴来阻断信号转导的试剂处理 CD47+ 疾病细胞 (如 CD47+ 癌细胞)。所述试剂为显示出可忽略的 CD47 激动作用和可忽略的红细胞结合作用的人 SIRP α 融合蛋白。该融合蛋白包含人 SIRP α 的变体 2 的 IgV 结构域、和具有效应子功能的 Fc。所述 IgV 结构域以这样的亲和性与人 CD47 结合, 该亲和性比人 SIRP α 的整个胞外区域的亲和性高至少 5 倍。该融合蛋白的有效性比缺乏效应子功能的对应物高至少 5 倍。



1. 一种用于抑制 CD47+ 疾病细胞的生长和 / 或增殖的人 SIRP α 融合蛋白, 所述融合蛋白具有可忽略的 CD47 激动作用和可忽略的红细胞结合作用, 所述融合蛋白包含: 能够以这样的亲和性有效结合人 CD47 的人 SIRP α 结构域, 该亲和性比人 SIRP α 的整个胞外区域的亲和性高至少 5 倍; 和具有效应子功能的人 IgG 恒定区 (Fc), 所述融合蛋白的有效性比由缺乏效应子功能的 Fc 区形成的 SIRP α Fc 融合蛋白的有效性高至少 5 倍, 其中所述人 SIRP α 结构域是包含人 SIRP α 变体 2 的残基 32-137[SEQ ID No. 1] 的 IgV 结构域。

2. 根据权利要求 1 所述的人 SIRP α 融合蛋白, 其中所述人 SIRP α 结构域由人 SIRP α 变体 2 的残基 31-148[SEQ ID No. 22] 构成。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的人 SIRP α 融合蛋白, 其中所述具有效应子功能的 Fc 选自 (a) 人 IgG1 抗体的恒定区、以及 (b) 人 IgG4 抗体的恒定区。

4. 根据权利要求 3 所述的人 SIRP α 融合蛋白, 其中所述具有效应子功能的 Fc 为人 IgG1 抗体的恒定区。

5. 根据权利要求 4 所述的人 SIRP α 融合蛋白, 其中所述人 IgG1 抗体的恒定区包含 SEQ ID No. 2。

6. 根据权利要求 5 所述的人 SIRP α 融合蛋白, 包含 SEQ ID No. 3。

7. 根据权利要求 5 所述的人 SIRP α 融合蛋白, 包含 SEQ ID No. 25。

8. 根据权利要求 3 所述的人 SIRP α 融合蛋白, 其中所述具有效应子功能的 Fc 为人 IgG4 抗体的恒定区。

9. 根据权利要求 8 所述的人 SIRP α 融合蛋白, 其中所述 Fc 包含 Ser²²⁸Pro (EU) 突变。

10. 根据权利要求 9 所述的融合蛋白, 其中所述 Fc 包含 SEQ ID No. 24。

11. 根据权利要求 10 所述的融合蛋白, 包含 SEQ ID No. 26。

12. 根据权利要求 1 至 11 所述的融合蛋白, 还包含能被检测的标签。

13. 一种药物组合物, 包含可药用的载体和能够有效地抑制 CD47+ 疾病细胞的生长或增殖的量的根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的融合蛋白。

14. 根据权利要求 13 所述的药物组合物, 其中所述融合蛋白包含 SEQ ID No. 25。

15. 根据权利要求 13 所述的药物组合物, 其中所述融合蛋白包含 SEQ ID No. 26。

16. 一种抑制有需要的对象中的 CD47+ 疾病细胞生长的方法, 包括向所述对象施用根据权利要求 13 至 15 中任一项所述的组合物的步骤。

17. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中所述疾病细胞为 CD47+ 癌细胞。

18. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中所述疾病细胞为 CD47+ 血液癌细胞。

19. 根据权利要求 18 所述的方法, 其中所述疾病细胞为 CD47+ 白血病细胞。

20. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中所述疾病细胞为含有 CD47+ 癌细胞的实体瘤。

19. 一种 DNA 构建体, 其包含编码根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的人 SIRP α 融合蛋白的核苷酸序列。

20. 一种生产蛋白质的宿主细胞, 包含以可表达的方式引入其中的根据权利要求 19 所述的 DNA 构建体。

21. 一种用于制备人 SIRP α 融合蛋白的方法, 包括培养生产蛋白质的宿主细胞, 该生产蛋白质的宿主细胞中引入有用于在其中表达编码根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的人 SIRP α Fc 融合蛋白的多核苷酸。

用 SIRP α -Fc 融合蛋白处理 CD47+ 疾病细胞

技术领域

[0001] 本发明涉及治疗性的 Fc 融合蛋白,其特别用于治疗具有 CD47+ 疾病细胞的对象。所述融合蛋白基于人 SIRP α 的胞外区域中的结构域,并且融合了增强该融合蛋白的抗癌效果的 Fc 区。

背景技术

[0002] 信号调节蛋白 α (SIRP α) 是属于免疫球蛋白超家族的跨膜蛋白,并且其是 CD47 的受体。Ullrich 等在 US 6541615 中描述了人类 SIRP α 的克隆与表达。Sarfati 等在 W01999/040940 中以及 Van den Berg 等在 W000/66159 中暗示了 SIRP α 和 CD47 参与了癌症及其他疾病的病原学,并且 Van den Berg 等还提出了 SIRP α 抑制剂的治疗应用。最近, Jaiswal 等在 W02009/091601 中提出了 CD47 抗体在治疗血癌中的应用。SIRP α 和 CD47 之间的相互作用在调节巨噬细胞对白血病细胞和白血病干细胞 (LSC) 的吞噬作用中起到十分重要的作用。已经示出了阻断抗 CD47 抗体能够促进巨噬细胞对 LSC 的吞噬作用。此外,在 W0 2010/130053 中,Wang 等提出了基于 SIRP α 融合蛋白的癌症治疗。对于治疗免疫功能紊乱,Smith 等在 US2008/0131431 中提出了使用基于 CD47 的 Fc 融合蛋白。Raymond 等在 W02010/070047 中也教导了治疗炎症和免疫功能紊乱。

[0003] 提供通过 SIRP α /CD47 轴抑制信号转导的制剂以用于治疗癌症和其他疾病是有用的。

发明内容

[0004] 本发明提供了作为 Fc 融合蛋白的 SIRP α ,其中选择了所述融合蛋白中的成分以使得对 CD47/SIRP α 轴实现最佳抑制。本发明的发明人已经发现,人 SIRP α 胞外区内的特定的单一结构域对 CD47 的结合亲和性大于人 SIRP α 的完整的胞外区。此外,本发明证明了当恒定 (Fc) 区具有效应子功能时,SIRP α Fc 融合蛋白在体内的效力令人惊奇地大幅度提高,尽管对 CD47/SIRP α 轴的抑制应该不需要这样的活性,并且尽管体外实验表明无效应子的 Fc 区应该是优选的。

[0005] 本发明的 SIRP α Fc 融合蛋白还显示了可忽略的 CD47 激动作用 (agonism),这允许它们在体内作为 SIRP α 介导的信号转导的专一性抑制剂。作为进一步的特征,所述融合蛋白显示了可忽略的红细胞 (red blood cell) 结合作用。这与该轴的其他抑制剂形成鲜明对比,例如 CD47 抗体,其与红细胞强结合,在一些情况下引起血细胞凝集。通过使用本发明的融合蛋白,不需要为了“沉积 (sink)”效应来计算剂量,在“沉积”效应中,所施用的药物以 RBC 结合的形式变得被螯合并失活,或者不需要为了由 RBC 相互作用引起的任何不利事件来计算剂量。

[0006] 在本发明的一个方面,提供了 SIRP α Fc 融合蛋白,其用于抑制 SIRP α 介导的细胞-结合 CD47 的刺激作用,该融合蛋白包含: SIRP α 蛋白成分,以及与其融合的抗体恒定区 (Fc) 成分,其中所述 SIRP α 蛋白成分由人 SIRP α 的 V 结构域构成或包含人 SIRP α 的

V 结构域,并且 Fc 成分为具有效应子功能的 IgG 恒定区。在一些实施方案中,Fc 选自 IgG1 抗体或 IgG4 抗体的恒定区。

[0007] 在一个相关方面,提供了一种多核苷酸,其编码作为单链多肽的 SIRP α Fc 融合蛋白的可分泌形式。在另一个相关方面,提供了用于生产 SIRP α Fc 融合蛋白的细胞宿主,该宿主具有被引入并可在其中表达的多核苷酸。以及,在另一个实施方案中,提供了用于获得 SIRP α Fc 融合蛋白的方法,包括培养所述宿主或使所述宿主生长,以及回收作为二聚体蛋白的 SIRP α Fc 融合蛋白。在一些实施方案中,所述宿主为来自任意物种的能使所表达的蛋白糖基化的真核宿主。

[0008] 在另一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其用于治疗具有 CD47+ 疾病细胞的对象,所述组合物包括可药用的载体和能够有效地抑制 CD47+ 疾病细胞的生长或增殖的量的 SIRP α Fc 融合蛋白。

[0009] 在另一个方面,本发明提供了用于治疗具有 CD47+ 疾病细胞的对象的方法,该方法包括向该对象施用能够有效地抑制所述疾病细胞的生长和 / 或增殖的量的 SIRP α Fc 融合蛋白。在一个相关方面,本发明提供了 SIRP α Fc 蛋白在治疗其中存在 CD47+ 疾病细胞的癌症或任意其他疾病中的应用。本发明还提供了 SIRP α Fc 蛋白在制备用于治疗其中存在 CD47+ 疾病细胞的癌症或任意其他疾病的药物中的应用。相似地,本发明提供了一种用于处理 CD47+ 疾病细胞的药物组合物,包含 SIRP α -Fc 蛋白和可药用的载体。在一些实施方案中,疾病细胞为 CD47+ 癌细胞,特别包括 CD47+ 白血病细胞,如 AML。

附图说明

[0010] 现在将结合附图更加详细地描述本发明的这些和其他方面,其中:

[0011] 图 1 利用直接结合检验(图 1A)和间接竞争检验(图 1B)比较了被标示为 TTI-602 和 TTI-616 的 SIRP α 融合蛋白与人 CD47 的结合。更具体而言,比较了具有单一 N 端 SIRP α V 结构域的 SIRP α Fc (TTI-616) 的结合作用和由所有三个 (V-C-C) 细胞外 SIRP α 结构域构成的融合蛋白 (TTI-602) 的结合作用。A) 直接结合检验。将 CD47+ 人 Jurkat T 细胞与滴定的量的 TTI-602 或 TTI-616 孵育,并利用多克隆抗 IgG 抗体通过流式细胞仪分析结合。B) 竞争性抑制检验。在滴定的量的冷的竞争物 TTI-602 或 TTI-616 的存在下,将 Jurkat 细胞与生物素化的 SIRP α Fc (TTI-601) 孵育。通过流式细胞仪测定结合,并将结果转化为百分比抑制率,将 0% 定义为不存在竞争物时的结合。

[0012] 图 2 示出了三种不同 SIRP α 融合蛋白的结合谱 (Kd)。所示出的是非常相似的结合谱,其提供了几乎相同的亲和性结合 (Kd) 值 (2.3-2.4nM)。这是预测的,因为所有三种蛋白含有相同的 SIRP α 区,并且预计 Fc 区不会影响配体结合。更具体而言,将 CD47+ 人 Jurkat T 细胞与滴定的量的融合蛋白孵育,并利用多克隆抗 IgG 抗体通过流式细胞仪分析结合。然后标准化几何平均数,并且使用非线性回归使数据拟合单位点结合模型,通过 Prism(Graphpad) 生成结合曲线和 Kd 值。

[0013] 图 3(也参见图 6) 示出了 TTI-621 和 TTI-622 表现出相似的促吞噬 (pro-phagocytosis) 活性,而 TTI-616 明显较弱(在 10nM 剂量时特别明显)。这表明野生型 IgG4 或 IgG1Fc 区是 SIRP α Fc 引发的通过巨噬细胞的肿瘤细胞杀伤作用最大化所需的。更具体而言,通过在单核细胞集落刺激因子的存在下,培养人外周血 CD14+ 单核细胞

至少一周来产生巨噬细胞,然后用干扰素- γ (过夜)和 LPS(1h)活化。用 CFSE 标记 OCI/AML-2 细胞,并与 SIRP α Fc 融合蛋白以指定浓度孵育 30 分钟,或与 1mM 对照 Fc 蛋白(突变 hIgG4Fc(TTI-401)或 hIgG1Fc(TTI-402))孵育 30 分钟,或是不进行处理(UT)。然后 AML-2 细胞和巨噬细胞共孵育 2 小时,巨噬细胞用麦胚凝集素 Alexa Fluor® 555 缀合物染色,并用共聚焦显微镜分析。将吞噬指数定义为每 100 个巨噬细胞所吞噬的 AML 细胞数,每个样品对至少 200 个巨噬细胞计数。具有突变的 hIgG4Fc 区的融合蛋白用白色棒表示,野生型 hIgG4 用灰色棒表示,野生型 IgG1 用黑色棒表示。* $p < 0.05$, * $p < 0.01$ 对同种型对照(单因素 ANOVA 以及 Dunnett's post-检验)。

[0014] 图 4 示出了具有 IgG1Fc 区的 TTI-621 融合蛋白是唯一能够在移植处(注射的股骨)介导抗白血病效应的蛋白。在未注射的骨髓中,有明显的 Fc 依赖效应,其中 TTI-621(完全 Fc 活性) $>$ TTI-622(低 Fc 活性) $>$ TTI-616(无 Fc 活性)。用源于 137C g- 辐照器的 275cGy 以亚致死量照射 NOD/ShiLtJ-Prkdc^{scid}(NOD.SCID)小鼠(8-12 周龄),并且在经股骨内注射从人白血病患者收集的 AML 细胞之前用抗 CD122 抗体处理(以消耗 NK 细胞)。移植后三周开始,用 SIRP α Fc 融合蛋白处理小鼠(8mg/kg IP 每周三次),或用相等剂量的对照 Fc 蛋白 TTI-401(突变的人 IgG4)或 TTI-402(人 IgG1)处理。处理四周之后,杀死小鼠,并用流式细胞仪分析注射的股骨中的、未注射的骨髓中的、和脾中的人白血病细胞,染色以观察人 CD45 和人 CD33 标记物的表达。以在各腔室中的人 CD45+CD33+ 细胞的百分比来表示 AML 移入。

[0015] 图 5:将 CD47+ 人 Jurkat T 细胞与 SIRP α Fc 融合蛋白或对照 Fc(3mM)共孵育过夜、或不处理(UT)过夜,然后对 Annexin-V 染色并用流式细胞仪分析。使用 1mM 的促凋亡试剂星形孢菌素(Staur)作为阳性对照。含有 TTI-602 的样品用阻断 CD47 的抗体 B6H12 预处理。

[0016] 图 6 示出了使用图 3 中所述的方法得到的结果,但是数据集更详细。

[0017] 图 7A) 人红细胞用滴定量的抗 CD47 抗体 B6H12 或 TTI-616 染色并用流式细胞仪分析。B) 人红细胞用一组抗 CD47 单克隆抗体(2D3、B6H12、BRIC126 和 CC2C6)或 SIRP α Fc 融合蛋白 TTI-622 染色,并用流式细胞仪分析。每种试剂以之前的优化实验中确定的饱和浓度使用。TTI-401 用作对照 Fc。所示数据采集自六个提供者。C) AML-2 肿瘤细胞用 CD47 抗体或 TTI-622 染色,并用流式细胞仪分析。对每种试剂的单一高剂量(660nM)示出数据。

[0018] 发明详述

[0019] 本发明涉及人 SIRP α 蛋白,其为直接或间接与抗体恒定区或 Fc 区融合的形式。除非另有说明,本发明所使用的术语“人 SIRP α ”是指野生型、内源的成熟形式的人 SIRP α 。在人类中,发现 SIRP α 蛋白主要有两种形式。一种形式(变体 1 或 V1 型)的氨基酸序列作为 NCBI RefSeq NP_542970.1 列出(残基 27-504 构成成熟型)。另一种形式(变体 2 或 V2 型)有 13 个氨基酸不同并且氨基酸序列在 GenBank 中作为 CAA71403.1 列出(残基 30-504 构成成熟型)。这两种形式的 SIRP α 构成了存在于人类中的大约 80%的各种类型的 SIRP α ,并且上述这两种形式均被本发明的术语“人 SIRP α ”涵盖。本发明的术语“人 SIRP α ”还包括 SIRP α 的少数形式,其是人类内源性的、并且具有相同的通过与 CD47 结合而通过 CD47 引发信号转导的特性。本发明更具体地涉及变体 2 型或 V2。

[0020] 本发明的 SIRP α Fc 融合蛋白包括位于人 SIRP α 胞外区域中的三个所谓的免疫

球蛋白 (Ig) 结构域之一。更具体而言,本发明的 SIRP α Fc 蛋白包括人 SIRP α 的残基 32-137(106-mer),根据目前的命名法,其构成并定义了 V2 型的 IgV 结构域。该 SIRP α 序列如下所示,在本文中称为 SEQ ID No. 1。

[0021] EELQVIQPKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRE
NMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPTDFKSGA[SEQ ID No. 1]

[0022] 在一个优选的实施方案中, SIRP α Fc 融合蛋白引入了如 SEQ ID No. 1 所述的 IgV 结构域,除此以外还引入了该 SIRP α 序列中的相邻的侧翼残基。该优选形式的 IgV 结构域由 V2 型人 SIRP α 的残基 31-148 表示,其为具有如下所示的 SEQ ID No. 22 的 118-mer:

[0023] EEELQVIQPKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR
ENMDFISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVRAKPS[SEQ ID No. 22]

[0024] 令人惊奇的是,发现在 CD47 结合亲和性方面,相对于 SIRP α 的整个胞外结构域的 CD47 结合亲和性而言, V2 型人 SIRP α 的活性更高。该结合亲和性比整个胞外结构域的结合亲和性高至少 2 倍。在一些实施方案中, V2 结构域的亲合性比整个胞外结构域高至少 3 倍、4 倍、5 倍或更高。在本文实施例 1 记载的直接结合检验中,引入该 SIRP α 结构域的融合蛋白的结合亲和性比引入整个 SIRP α 胞外结构域的融合蛋白的结合亲和性高大约 10 倍。类似地,在本文实施例 1 记载的间接竞争检验中, V2/IgV 单一结构域融合蛋白提供了比引入 SIRP α 的整个胞外结构域的融合蛋白更高的 CD47 结合亲和性。因此,基于该优选的 V 结构域的 SIRP α Fc 融合蛋白在抑制通过与 SIRP α 结合而促进的 CD47 信号转导中有潜力具有更高的有效性。

[0025] 本发明的 SIRP α 融合蛋白还引入了具有效应子功能的 Fc 区。对效应子功能的偏好是完全令人惊讶地,并且用关于 CD47/SIRP α 轴的现有信息很难解释。可以预料的是,无效应子 Fc 区的活性足以抑制该轴,并且整合效应子功能不会获得更多的效果。然而,本文特别是实施例 5 所示的数据清楚地示出,在融合蛋白的体内抗白血病活性方面,效应子活性 Fc 是有利的。根据实施例 4 所示的结果,这是特别令人惊奇的,在实施例 4 中,融合蛋白的体外吞噬活性对于融合蛋白是基于效应子活性的 Fc 成分还是基于无效应子的 Fc 成分没有显示出特别的偏好。

[0026] 因此,在本发明的 SIRP α Fc 融合蛋白中,合适的 Fc 成分是具有效应子功能的那些。“具有效应子功能”的 Fc 成分是具有至少某些效应子功能的 Fc 成分,例如至少对抗体依赖的细胞毒性有一些贡献或锚定补体的一些能力。此外,该 Fc 至少会结合至 Fc 受体。这些特性可以通过针对该目的而建立的检验而体现。功能性检验包括检测靶细胞裂解的标准铬释放试验。通过这种确定方式,野生型 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区具有效应子功能,而突变为消除了效应子功能(例如通过引入一系列包括 Pro233、Val234、Ala235 的改变以及删除 Gly236(EU))的人 IgG4 的 Fc 区被认为不具有效应子功能。在一个优选的实施方案中, Fc 基于 IgG1 同种型的人抗体。这些抗体的 Fc 区是本领域技术人员容易确认的。在一些实施方案中, Fc 区包括下部的铰链 -CH2-CH3 结构域。

[0027] 在一个具体的实施方案中, Fc 区基于在 UniProtKB/Swiss-Prot 中作为 P01857 列出的人 IgG1 的氨基酸序列,残基 104-330,并且具有如下所示的氨基酸序列,本文中记为 SEQ ID No. 2:

[0028] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*[SEQ ID No. 2]

[0029] 因此,在一些实施方案中,Fc 区具有 IgG1 恒定区的野生型序列或共有序列。在可选的实施方案中,融合蛋白中引入的 Fc 区来源于具有典型效应子活性恒定区的任意 IgG1 抗体。这样的 Fc 区的序列可以对应于例如如下任意 IgG1 序列(均引自 GenBank)的 Fc 区,例如 :BAG65283(残基 242-473)、BAC04226.1(残基 247-478)、BAC05014.1(残基 240-471)、CAC20454.1(残基 99-320)、BAC05016.1(残基 238-469)、BAC85350.1(残基 243-474)、BAC85529.1(残基 244-475)和 BAC85429.1(残基 238-469)。

[0030] 在其他实施方案中,Fc 区具有野生型人 IgG4 恒定区的序列。在可选的实施方案中,融合蛋白中引入的 Fc 区来源于具有有效效应子活性的恒定区的任意 IgG4 抗体,所述效应子活性存在但天然地显著弱于 IgG1Fc 区。这样的 Fc 区的序列可以对应于例如如下任意 IgG4 序列的 Fc 区:来自 UniProtKB/Swiss-Prot 的 P01861(残基 99-327)和来自 GenBank 的 CAC20457.1(残基 99-327)。

[0031] 在一个具体的实施方案中,Fc 区基于 UniProtKB/Swiss-Prot 中作为 P01861 列出的人 IgG4 的氨基酸序列,残基 99-327,并且具有如下所示的氨基酸序列并且记为 SEQ ID No. 23:

[0032] ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK[SEQ ID No. 23]

[0033] 在一些实施方案中,Fc 区引入一个或多个改变,通常不多于约 5 个这样的改变,包括影响某些 Fc 特性的氨基酸置换。在一个具体并优选的实施方案中,Fc 区在第 228 位(EU 编号方式)引入改变,其中该位的丝氨酸被脯氨酸置换(S²²⁸P),由此稳定 Fc 二聚体内的二硫键。Fc 区内的其他改变可以包括改变糖基化的置换,如用甘氨酸或丙氨酸置换 Asn²⁹⁷;半衰期增强的改变,如 US62777375 中教导的 T²⁵²L、T²⁵³S 和 T²⁵⁶F;以及许多其他的改变。特别有用的是在保持构象不变(例如保持 Fc 受体结合性)的同时能增强 Fc 特性的那些改变。

[0034] 在一个具体的实施方案中,在 Fc 成分为 IgG4Fc 的情况下,Fc 至少引入了 S²²⁸P 突变,并且具有如下所示的氨基酸序列并且记为 SEQ ID No. 24:

[0035] ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK[SEQ ID No. 24]

[0036] 因此,本发明提供了有利于抑制人 SIRP α 与人 CD47 结合的融合蛋白,从而抑制或减少了通过 SIRP α - 结合的 CD47 介导的信号传送,该融合蛋白包含人 SIRP α 成分,以及与其融合的 Fc 成分,其中 SIRP α 成分包含人 SIRP α V2 的单一 IgV 结构域或由人 SIRP α V2 的单一 IgV 结构域构成,并且 Fc 成分为具有效应子功能的人 IgG 恒定区。

[0037] 在一个实施方案中,融合蛋白包含 SIRP α 成分,该 SIRP α 成分至少由 V2 型的野生型人 SIRP α 的残基 32-137 构成,即 SEQ ID No. 1。在一个优选的实施方案中,SIRP α

成分由 V2 型的人 SIRP α 的残基 31-148 构成,即 SEQ ID No. 22。在另一个实施方案中,Fc 成分是记为 P01857 的人 IgG1 的 Fc 成分,在一个具体的实施方案中,具有引入其下部的铰链 -CH2-CH3 区的氨基酸序列,即 SEQ ID No. 2。

[0038] 因此,在一个优选的实施方案中,本发明提供了作为表达的单链多肽和作为分泌的二聚体融合体这两种形式的 SIRP α Fc 融合蛋白,其中该融合蛋白引入了具有 SEQ ID No. 1 (并且优选 SEQ ID No. 22) 的 SIRP α 成分,以及与其融合的具有效应子功能且具有 SEQ ID No. 2 的 Fc 区。当所述 SIRP α 成分为 SEQ ID No. 1 时,该融合蛋白包含如下所示的 SEQ ID No. 3 :

[0039] EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSVIPVGP IQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR
ENMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*[SEQ ID No. 3]

[0040] 当所述 SIRP α 成分为 SEQ ID No. 22 时,该融合蛋白包含如下所示的 SEQ ID No. 25 :

[0041] EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSVIPVGP IQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR
ENMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK[SEQ ID No. 25]

[0042] 在可选的实施方案中,所述融合蛋白的 Fc 成分基于 IgG4,优选基于引入了 S²²⁸P 突变的 IgG4。在融合蛋白引入了 SEQ ID No. 22 所示的优选的 SIRP α IgV 结构域的情况下,所得的基于 IgG4 的 SIRP α -Fc 蛋白具有如下所示的 SEQ ID No. 26 :

[0043] EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSVIPVGP IQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR
ENMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVRAKPSSESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK[SEQ ID No. 26]

[0044] 在本发明的优选实施方案中,融合蛋白包含 SEQ ID No. 22 所示的序列作为该融合蛋白的 SIRP α IgV 结构域。优选的 SIRP α Fc 为 SEQ ID No. 25。

[0045] 在 SIRP α Fc 融合蛋白中,SIRP α 成分和 Fc 成分直接或间接融合以提供单链多肽,其最终以二聚体形式产生,其中所述单链多肽通过在 Fc 区内形成的链内二硫键连接。融合区的性质不是关键的。融合可以是两个成分之间直接融合,其中 SIRP 成分构成融合蛋白的 N 末端并且 Fc 成分构成 C 末端。或者,融合可以通过连接物间接形成,所述连接物由一个或多个氨基酸,理想的是遗传编码的氨基酸构成,如由 2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸构成,或者由介于 5 个和 100 个之间的氨基酸(例如介于 5 个和 50 个之间、介于 5 个和 30 个之间、或介于 5 个和 20 个之间的氨基酸)中的任意数目的氨基酸构成。连接物可包括由构建有限制酶位点的 DNA 编码的多肽,所述限制酶位点如 BamHI、ClaI、EcoRI、HindIII、PstI、SalI 和 XhoI 位点等。

[0046] 通常并且理想的是,连接物氨基酸提供一定的柔性,从而使Fc和SIRP成分能够采取其活性构象。允许这样的柔性的残基通常为Gly、Asn和Ser,由此实际上连接物中的这些残基(特别是Gly和Ser)的任意组合都可能提供期望的连接效果。在一个例子中,这样的连接物基于所谓的G₄S序列(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser),其可作为(G₄S)_n重复,其中n为1、2、3或更大;或基于(Gly)_n、(Ser)_n、(Ser-Gly)_n或(Gly-Ser)_n等。在另一个实施方案中,连接物为GTELSVRAKPS(SEQ ID No. 21)。该序列以C端侧翼连接IgV结构域而构成SIRP α 序列(应当理解为该侧翼序列可以被认为是连接物,或者当与上文所述的IgV最小序列连接时可以被认为是IgV结构域的不同形式)。仅仅融合区域或连接物使得所述成分采取其活性构象是必需的,这可以通过用于本领域的任意形式的连接物来实现。

[0047] SIRP α Fc融合蛋白有利于抑制SIRP α 和CD47之间的相互作用,从而阻断通过该轴的信号传递。已知SIRP α 通过CD47对巨噬细胞的刺激作用能够通过使肌球蛋白-II和收缩性细胞骨架活性失活来抑制巨噬细胞介导的吞噬作用,所述肌球蛋白-II和收缩性细胞骨架活性参与将目标拉入巨噬细胞。因此,该级联反应的激活对于CD47+疾病细胞的存活是重要的,并且阻断该通路能使巨噬细胞消灭CD47+疾病细胞群。

[0048] 术语“CD47+”用于表示由本发明的多肽结合的靶细胞的表型。CD47+的细胞可使用CD47抗体作为亲和配体通过流式细胞仪来鉴定。用于该目的的带有合适的标记的CD47抗体是市购可得的(例如克隆B6H12可购自Santa Cruz Biotechnology公司)。用于检验CD47表型的细胞可包括标准肿瘤活组织检查样品,其包括(特别是)从被怀疑具有内源性CD47+癌细胞的对象中获得的血液样品。特别关注的作为本发明的融合蛋白治疗靶标的CD47疾病细胞为“过表达”CD47的那些。这些CD47+细胞通常为疾病细胞,并且在其表面具有密度超过指定细胞类型所具有的正常CD47密度的CD47。不同细胞类型的CD47过表达程度不同,但在本文中是指,(例如)通过本文所示例的流式细胞仪或通过免疫染色或通过基因表达分析等被确定为高于具有CD47表型的相应细胞的对于该细胞类型而言正常可检测水平的任意CD47水平。

[0049] 因此,对于治疗应用,本发明提供了一种药物组合物,包括可药用的载体和治疗有效量的本发明所述的SIRP α Fc融合蛋白。如本文所用,“可药用的载体”是指在蛋白质/抗体制剂领域中任意和所有的生理学相容且有益的溶剂、分散介质、包覆层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。可药用的载体的例子包括水、盐水、磷酸盐缓冲液、葡萄糖、甘油、乙醇等中的一者或多者、及其它们的组合。在许多情况中,在组合物中优选地包括等渗剂,例如:糖类、多元醇(如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。可药用的载体还可包括少量的辅助物质,如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,其增加药理学试剂的保质期或有效性。在一些实施方案中,采用治疗抗体制剂领域的实践标准来配制SIRP α Fc融合蛋白。适合静脉给药(如注射或输注)的溶液是特别有用的。

[0050] 可通过将所需量的活性化合物混入适当的溶剂中,根据需要加入上述成分中的一种或组合,然后灭菌微孔过滤,从而制备无菌注射液。通常,通过将活性化合物混入含有基本分散介质的无菌载体,加入所需的选自上文所列举的例子中的其他成分,从而制备分散体。在用于制备的无菌粉末为真空干燥和冷冻干燥(冻干)的情况中,从预先灭菌过滤的溶液中产生活性成分以及任何其他所需成分的粉末。

[0051] 如本文所用,“有效量”是指经过必要的特定时期达到所需治疗效果的有效剂量。

药剂的治疗有效量可根据各种因素而变化,如个体的疾病状态、年龄、性别和重量、以及所述药剂在个体中引起所需反应的能力。治疗有效量还具有如下特性:药剂的治疗有益效果超过药剂的任何毒性或不利影响。

[0052] 可通过用于蛋白质递送的任何途径向对象施用 SIRP α Fc 融合蛋白,特别是经静脉、皮内和皮下注射或输注、或是经口或鼻内给药。通常以 0.5mg/kg 至 15mg/kg 受试者体重的剂量每天施用融合蛋白。应当理解有效量(治疗疾病或病症的有效量,其通过癌细胞或癌细胞团的生长或增殖速度减缓或尺寸减小而体现)根据包括受试者的年龄和总体健康状况、以及待治疗疾病的严重程度等一系列因素而不同。

[0053] 可与载体材料组合以制备单一剂量形式的活性成分的量会根据待治疗的对象以及给药的具体方式而不同。用于制备单一单位剂量形式所需的活性成分的量通常是组合物产生治疗效果的量。通常,以活性成分和可药用载体的量为 100% 计,所述有效量为约 0.01% 至约 99% 的活性成分,优选为约 0.1% 至约 70%,例如约 1% 至约 30% 的活性成分。

[0054] 可以利用本领域已知的各种方法中的一种或多种,通过一种或多种给药途径来施用本发明的组合物。本领域技术人员将能够理解,给药途径和/或方式根据所需结果的不同而不同。施用本发明所述的融合蛋白的优选途径包括:(例如)通过注射或输注,经静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其他肠胃外途径给药。术语“肠胃外给药”包括例如经静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0055] 可供选择地,本发明的融合蛋白可以通过非肠胃外途径给药,例如,(例如)经鼻内、口腔、阴道、直肠或舌下通过滴注给药或通过局部、表皮或粘膜途径给药。

[0056] 调整剂量方案以提供最佳的期望响应(例如,治疗响应)。例如,可以施用单一的剂量,或者在一定时间内施用几个分开的剂量,或者该剂量可随着治疗情况而适当地减少或增加。特别有利地是,配制单位剂量形式的肠胃外组合物以易于给药和保证剂量的均一性。本文所用的“单位剂量形式”是指适合作为用于待治疗对象的单位剂量的物理上独立的单位;每个单位包含预定量的、经计算与所需的药用载体一起产生期望的治疗效果的活性化合物。本发明的单位剂量形式的规格由以下因素确定并且直接取决于以下因素:(a) 活性化合物的独特性质以及期望实现的特定治疗效果,以及 (b) 本领域对于个体治疗敏感性而对利用该活性化合物的固有限制。

[0057] 对于施用该融合蛋白,单位剂量在约 0.0001mg/kg 至 100mg/kg 宿主体重,更通常在 0.01mg/kg 至 5mg/kg 宿主体重的范围内。例如,剂量可以为 0.3mg/kg 体重、1mg/kg 体重、3mg/kg 体重、5mg/kg 体重或 10mg/kg 体重,或在 1mg/kg 至 10mg/kg 体重的范围内。示例性治疗方案限定每周给药一次、每两周给药一次、每三周给药一次、每四周给药一次、每月给药一次、每三个月给药一次或每三个月至六个月给药一次。本发明融合蛋白的优选的剂量方案包括通过静脉施用 1mg/kg 体重或 3mg/kg 体重,其中采用以下给药方案之一施用该融合蛋白;(i) 每四周六个剂量,然后每三个月;(ii) 每三周;(iii) 一次 3mg/kg 体重,然后每三周 1mg/kg 体重。在一些方法中,调整剂量以实现血浆融合蛋白浓度为约 1 μ g/ml 至 1000 μ g/ml,在一些方法中为约 25 μ g/ml 至 300 μ g/ml。

[0058] 本发明的融合蛋白显示出与血红细胞可忽略的结合。因此,当建立有效剂量方案时,不需要计算 RBC“沉积”。相对于与 RBC 结合的其他 SIRP α /CD47 抑制剂,预计本发明的

SIRP-Fc 融合蛋白在小于药物（如 CD47 抗体）变得与 RBC 结合所需剂量的一半的剂量下是有效的。

[0059] 此外,所述 SIRP α -Fc 融合蛋白是 SIRP α 介导的信号的特一拮抗剂,当其于 CD47 结合时其表现出可忽略的 CD47 激动作用。因此,在建立医学有用的单位剂量方案时,不需要计算由该药物诱导的任何刺激作用。

[0060] 所述融合蛋白也可以作为持续释放制剂施用,在这种情况下,不需要频繁的给药。剂量和频率根据融合蛋白在患者体内的半衰期而改变。给药的剂量和频率可以根据该处理是预防性的还是治疗性的而改变。在预防性应用中,在长的时间内以较少的时间间隔施用较低的剂量。一些患者在他们的余生中持续接受处理。在治疗性应用中,有时需要以较短的时间间隔施用较高的剂量,直到疾病进程减轻或终止,并且优选直到患者表现出疾病症状部分或完全改善。此后,可以使用预防性方案处理患者。

[0061] 本发明的 SIRP α Fc 蛋白在处理各种 CD47+ 疾病细胞中是有益的。这些特别包括 CD47+ 癌细胞,包括液体和实体瘤。在一个实施方案中, SIRP α Fc 蛋白用于抑制血液癌症的生长或增殖。如本文所用,“血液癌症”是指血液的癌症,其中包括白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。“白血病”是指血液的一种癌症,其中产生了过多的对抵抗感染不起作用的白细胞,由此挤占了组成血液的其他部分,如血小板和红细胞。可以理解,白血病的例子分为急性的或慢性的。白血病的某些形式可以为(例如)急性淋巴细胞白血病(ALL);急性髓细胞白血病(AML);慢性淋巴细胞白血病(CLL);慢性粒细胞白血病(CML);骨髓增殖性失调/肿瘤(MPDS);和骨髓增生异常综合征。“淋巴瘤”可以指霍奇金淋巴瘤、惰性和侵袭性非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、和滤泡性淋巴瘤(小细胞和大细胞)等。骨髓瘤可指多发性骨髓瘤(MM)、巨细胞骨髓瘤、重链骨髓瘤(heavy chain myeloma)、和轻链骨髓瘤(light chain myeloma)或本斯-琼斯氏骨髓瘤(Bence-Jones myeloma)。

[0062] 在一些实施方案中,用 SIRP α Fc 蛋白处理的血液癌症为优选选自急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病和骨髓增生异常综合征中的 CD47+ 白血病,优选为人急性髓细胞白血病。

[0063] 在其他实施方案中,用 SIRP α Fc 蛋白处理的血液癌症为选自霍奇金淋巴瘤、惰性和侵袭性非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤(小细胞和大细胞)、多发性骨髓瘤(MM)、巨细胞骨髓瘤、重链骨髓瘤、和轻链骨髓瘤或本斯-琼斯氏骨髓瘤以及平滑肌肉瘤中的 CD47+ 淋巴瘤或骨髓瘤。

[0064] 实体瘤也可用本发明的融合蛋白处理以减小其尺寸、数量或生长速率以及控制癌干细胞的生长。这样的实体瘤包括位于膀胱、脑、胸、肺、结肠、卵巢、前列腺、肝和其他组织中的 CD47+ 肿瘤。

[0065] SIRP α Fc 蛋白可作为单一疗法单独施用,或是与用于治疗目的适应症的任意其他试剂组合施用。

[0066] SIRP α Fc 蛋白还用于检测 CD47+ 细胞的存在。这可通过首先将该蛋白与检测细胞以及融合蛋白共孵育,然后用可与融合蛋白结合的可检测试剂进行探查、或者直接提供标记形式的融合蛋白来实现。

[0067] 在另一方面,本发明的特征在于所述融合蛋白与诊断或治疗基团缀合,所述诊断或治疗基团例如可检测的标记物、细胞毒素、药物或放射性毒素。包含一种或多种细胞毒素

的缀合物称为“免疫毒素”或药物缀合物。细胞毒素或细胞毒性试剂包括对细胞不利（如杀伤）的任意试剂。实例包括紫杉醇、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、阿霉素、道诺霉素、米托蒽醌、光辉霉素和放线菌素 D。治疗剂还包括（例如）：抗代谢物（例如氨甲蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤和阿糖胞苷）；烷化剂（例如环磷酰胺、白消安、丝裂霉素 C 和顺铂）；葱环类药物（例如道诺霉素和阿霉素）；以及抗生素（例如更生霉素（dactinomycin, 前述放线菌素）、博来霉素、光辉霉素和氨基霉素（AMC））；以及抗有丝分裂剂（例如长春新碱和长春花碱）。

[0068] 融合蛋白可与其缀合的可检测标记物的非限制性例子包括：荧光素、花青苷、Cy-3、生物素、放射性同位素（包括 I-¹²³和 I-¹²⁵）等。可通过本领域已知的方法用这样的可检测标记物标记融合蛋白。

[0069] 可利用本领域已知的连接物技术将细胞毒素与本发明的融合蛋白缀合。已用于将细胞毒素与融合蛋白缀合的连接物种类的例子包括但不限于：含有胺、硫醚、酯、二硫化物和肽的连接物。

[0070] 本发明的融合蛋白还可与放射性同位素缀合，从而产生细胞毒性放射性药物，也称为放射性缀合物。可与融合蛋白缀合以用于诊断或治疗的放射性同位素的例子包括但不限于：碘¹³¹、钬¹¹¹、钇⁹⁰和镱¹⁷⁷。制备放射性缀合物的方法是本领域已有的。

[0071] 在一个实施方案中，融合蛋白可以用于检测 CD47 的水平、或在其膜表面含有 CD47 的细胞的水平。可以通过例如在允许融合蛋白与 CD47 之间形成复合物的条件下，将样品（如体外样品）和对照样品与融合蛋白接触来实现利用 SIRP α Fc 融合蛋白检测 CD47。检测样品和对照中的融合蛋白与 CD47 之间所形成的任意复合物，并进行比较。可以对本发明的组合物进行（例如）本领域公知的标准检测方法，例如 ELISA 和流式细胞法检验。

[0072] 因此，所述融合蛋白有利于诊断目的，包括样品检测和体内成像，并且有利于治疗目的以治疗以具有 CD47 上调的疾病细胞为特点的疾病。

[0073] 对于每种目的，所述融合蛋白可与合适的试剂缀合以形成药物缀合物。适合用于治疗疾病的试剂包括细胞毒试剂，如化疗剂和放疗剂。对于诊断目的，合适的试剂为可检测的标记物，其包括用于全身成像的放射性同位素、和用于样品检测的放射性同位素、酶、荧光素标记物和其他合适的抗体标签。

[0074] 对于 CD47 检测，可检测的标记物可以为目前用于体外诊断领域中的各种类型的任意标记物，包括：颗粒标记物，包括金属溶胶（如胶体金）；同位素，如（例如）与 N2S2、N3S 或 N4 型的肽螯合剂共存的 I¹²⁵或 Tc⁹⁹；生色基团，包括荧光标记物、发光标记物、磷光标记物等；以及酶标记物，其将给定底物转化为可检测的标记物；和多核苷酸标签，其通过如聚合酶链式反应在扩增后示出。合适的酶标记物包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等。例如，所述标记物可以为碱性磷酸酶，其通过以下方法检测：使 1, 2- 二氧杂环丁烷底物（如金刚烷基甲氧基磷酰氧基苯基二氧环丁烷（AMPPD）、3-(4-(甲氧基螺{1, 2-二氧杂环丁烷-3, 2'-(5'-氯)三环{3.3.1.1.3, 7}癸基}-4-基)苯基磷酸二钠（CSPD）、以及 CDP 和 CDP-**star**®或本领域已知的其他发光底物（如合适的镧系元素如铽（III）和铈（III）的螯合物）转化后，测量化学发光的存在或产生。检测手段由所选的标记物决定。当标记物为颗粒物并以合适的水平积累的情况下，可用肉眼观察标记物或其反应产物的显现，或者使用诸如分光光度计、光度计、荧光计等仪器，均根据标准实践操作。

[0075] 对于基于 SIRP α Fc 融合蛋白的治疗, 细胞毒素可通过非共价相互作用与融合蛋白缀合, 但是更期望的是, 直接或更优选地通过合适的连接物通过共价连接缀合。在一个优选的实施方案中, 所述缀合物包括细胞毒素和融合蛋白。利用以下物质制备融合蛋白和细胞毒素的缀合物: 各种双官能蛋白偶联试剂, 如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二巯基) 丙酸酯、亚胺基硫烷; 亚氨酸酯的双官能衍生物, 如二甲基己二酰亚胺盐 HCl (dimethyl adipimidate HCl); 活性酯, 如二琥珀酰亚胺辛二酸酯; 醛, 如戊二醛; 双叠氮化合物, 如双-(p-重氮苯甲酰基)-乙二胺; 二异氰酸酯, 如甲苯 2,6-二异氰酸酯; 以及双活性氟化合物, 如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯。C¹⁴-标记的 1-异硫氰苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 为适合用于放射性核素与抗体缀合的螯合剂。

[0076] 免疫缀合物的细胞毒素成分可以为化疗剂、治疗抗体、毒素 (例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段、或小分子毒素)、或放射性同位素 (如 ²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、¹¹¹In、⁹⁰Y 和 ¹⁸⁶Re)、或能够抑制癌细胞生长或增殖的任意其他试剂。

[0077] 用于产生这样的药物缀合物的化疗剂包括: 美登素类化合物, 包括 DM-1 和 DM-4、阿里他汀 (auristatins)、多柔比星 (adriamycin)、阿霉素、表柔比星、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷 (“Ara-C”)、环磷酰胺、噻替哌、白消安、细胞毒素、紫杉烷类物质 (如紫杉醇和多西他奇)、泰素帝、氨基蝶呤、顺铂、美法仑、长春花碱、博来霉素、依托泊苷、异环磷酰胺 (ifosamide)、丝裂霉素 C、米托蒽醌、长春新碱、长春瑞滨、卡铂、替尼泊苷、道诺霉素、洋红霉素、氨基蝶呤、更生菌素、丝裂霉素、埃斯培拉霉素、5-FU、6-硫代鸟嘌呤、6-巯基嘌呤、放线菌素 D、VP-16、苯丁酸氮芥、美法仑以及其他相关的氮芥类物质。还包括调控或抑制荷尔蒙对肿瘤的作用的激素类试剂, 如它莫西芬和奥那司酮。可使用的毒素及其片段包括: 白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、霍乱毒素、肉毒毒素、外毒素 A 链 (来自绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒素 A 链、蒴莲根毒素 A 链、 α -八叠球菌素、油桐 (*Aleurites fordii*) 蛋白、石竹素 (dianthin) 蛋白、美洲商陆蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草、芦笋抑制剂、白树毒素、皂草素、mitogellin、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素和单端孢霉烯。小分子毒素包括: 例如卡奇霉素、美登素类化合物、水螅毒素和 CC1065。

[0078] 融合蛋白选择性地与目的抗原 CD47 结合, 并且根据本发明的一个方面用于筛选癌症和其他疾病细胞以检测高密度呈现 CD47 抗原的那些。在一个优选的实施方案中, 对取自作为 SIRP α Fc 融合蛋白治疗候选人的受试者的癌细胞样品进行筛选。然后可安排被检测为高密度呈现 CD47 抗原的癌细胞阳性的受试者使用本发明的融合蛋白或其缀合杂合物来进行治疗。可以与本发明所述的融合蛋白组合, 使用标准技术来筛选癌细胞。期望地, 该融合蛋白包括可检测的标记物。所述标记物可以自身可被检测到 (如放射性同位素标记物或荧光标记物), 或者在酶标记物的情况中, 可催化可检测的底物化合物或组合物发生化学改变。可用作可检测的标记物的放射性核素包括 (例如) I-¹³¹、I-¹²³、I-¹²⁵、Y-⁹⁰、Re-¹⁸⁸、Re-¹⁸⁶、At-²¹¹、Cu-⁶⁷、Bi-²¹² 和 Pd-¹⁰⁹。

[0079] 可利用本发明的抗体或其片段, 通过免疫荧光或免疫电子显微技术进行与 CD47+ 癌细胞的结合的原位检测。为了该目的, 从患者中取出组织标本, 并且对其施用标记形式的融合蛋白, 优选将抗体覆盖在生物样品上。该过程还使分布的 CD47 抗原在活检肿瘤组织中被检测。对本领域技术人员显而易见的是, 广泛的各种组织学方法都可用于原位检测。

[0080] 更具体而言,利用标准检测分析,本发明的 SIRP α Fc 融合蛋白可用于监测在生物样品(如组织活检样品、细胞或体液)中融合蛋白的反应性存在与否。免疫学检验可包括直接检测,并且特别适合筛选大量的样品以检测 CD47+ 癌细胞的存在。例如,所述融合蛋白可在任意标准免疫检验形式(如 ELISA、蛋白质印迹、免疫沉淀、流式细胞检验或 RIA 检验)中用作任何抗体,从而检测复合物的形成。可用于这些检验分析中的直接或间接可视的任何合适的标记物包括但不限于:任何放射性标记、荧光标记、发色标记(如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶)、或化学发光标记、或可利用标记的半抗原特异性抗体可视化的半抗原(例如毛地黄毒苷或生物素)或其他结合伴侣(如亲和素)。示例性免疫检验在如文献“Ausubel et al., supra, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Approach*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1988)”以及“Moynagh and Schimmel, *Nature*400:105, 1999”中有描述。例如,利用本文所述的融合蛋白,利用标准流式细胞法可在细胞表面容易地检测到高密度的 CD47。将发现含有标记的复合物的样品与合适的对照样品比较以指示高密度 CD47 的存在,由此指示可用本发明的融合蛋白治疗的癌症或其他疾病。

[0081] 应当理解,本发明的融合蛋白包括两个分子,均包含融合有 SIRP α 蛋白成分和 Fc 成分的单链多肽。当单链多肽从产生它们的宿主细胞中分泌出来时,Fc 成分之间形成二硫键,从而使单链多肽融合以形成二聚体。因此,形成融合蛋白的产物是通过两分子的融合有 Fc 成分和 SIRP α 成分的单链多肽之间的二硫键而形成的二聚体蛋白。

[0082] 因此,本发明不仅提供了其中 SIRP α 蛋白成分与 Fc 区(即 CH 成分)融合的单链多肽,还提供了其中两个拷贝的所述单链多肽通过它们各自的 Fc 成分而融合的二聚体融合蛋白。其中多于两个拷贝的多肽发生融合的多聚体形式也包括在本发明的范围内。

[0083] 为了制备本发明的 SIRP α Fc 融合蛋白,获得编码可分泌形式的所述单链多肽的 DNA,插入合适的表达/分泌载体,然后转染入合适的生产宿主。培养所得转染子,产生二聚体融合蛋白作为分泌产物,然后可以收集并纯化,所有方法均总体上根据已有的实践以及本文所示例的那些方法进行。类似地,可以获得单链形式的多肽,但是需要在诸如原核生物的宿主中在没有分泌信号的帮助下产生,这样不会发生二聚化,并且该多肽可回收作为细胞内蛋白质。

[0084] 因此,本发明还提供了表达产生可分泌形式的构成本发明融合蛋白的单链多肽的多核苷酸(包括 DNA 和 RNA)。编码优选且可分泌的单链多肽的多核苷酸包含具有 SEQ ID No. 8 的 DNA 序列,其中前 90 个残基编码天然人 SIRP α 的 30-mer 分泌信号,其余核酸残基(SEQ ID No. 7)编码单链 FSIRP α Fc 多肽。一些实施方案包括其中一个或多个密码子被同义密码子置换的多核苷酸,以及所示出的那些。

[0085] 在相关的实施方案中,提供了编码可分泌形式的基于 IgG1 的融合蛋白(具有 SEQ ID No. 25)的多核苷酸,该多核苷酸包含 SEQ ID No. 27。本发明还提供了编码可分泌形式的基于 IgG4 的融合蛋白(具有 SEQ ID No. 26)的多核苷酸,该多核苷酸包含 SEQ ID No. 28。

[0086] 应当理解,可以利用标准基因合成和克隆以及扩增技术从头合成所述多核苷酸,从而装配完整的多核苷酸。或者,例如,可由可用公共来源的下述这些基因,通过 PCR 扩增来获得编码 SIRP α 蛋白成分的多核苷酸(例如 SEQ ID No. 5)以及编码选定 Fc 成分的多核苷酸(例如 SEQ ID No. 6),并且所扩增的多核苷酸可采用连接技术而直接连接,或者通过编码一个或多个不损害生物学活性的氨基酸残基的连接物而连接,均根据已有技术以及本

文所示例的那些方法进行。

[0087] 为了表达,将编码分泌形式的单链多肽的多核苷酸并入载体,如适合在所选的产生融合蛋白的宿主中表达该多核苷酸的质粒。这样的载体可市购获得,并且通常被构建为允许引入编码可分泌的融合蛋白的多核苷酸,该多核苷酸直接受到在该所选宿主中有效启动表达的启动子的控制。宿主细胞的转染方法是本领域已有的,包括载体和用于该载体的表达宿主的表达系统是市售可得的。其包括适合共转染入宿主 293、CHO 或 NS0 以在 CMV 启动子的控制下表达编码融合蛋白的多核苷酸的 pcDNA 载体(可得自 Invitrogen 公司);以及在 CMV 启动子的控制下用于表达融合蛋白链的、来自宿主 293、CHO 或 NS0 的双顺反子 RNA 的 pTandem-1 载体系统(也可得自 Invitrogen 公司)。在本文实施例中所描述的一个有用的表达系统采用了 CMV 启动子,并且可购自加拿大蒙特利尔市的生物技术研究所(Biotechnology Research Institute)。

[0088] 用于本发明的融合蛋白的合适的生产宿主是通过瞬时转染或稳定转染而引入了编码分泌形式的融合蛋白形成用单链多肽的多核苷酸的细胞。融合蛋白的表达形式引入了能使各融合蛋白链从宿主中分泌出来的信号序列,由此使得可以在所产生的融合蛋白链内和之间形成期望的二硫键,从而提供功能性融合蛋白。分泌信号可由在选定宿主中发挥作用的任何这样的信号编码。在一个实施方案中,分泌信号是通常与 SIRP α 蛋白成分相关的分泌信号。

[0089] 用于表达本发明的重组融合蛋白的合适的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞,包括 dhfr-CHO 细胞和 CHOcTA 细胞)、NS0 骨髓瘤细胞、SOS 细胞和 SP2 细胞。在一个具体的实施方案中,宿主为 CHO 细胞系,如 CHO-S 细胞系。对于使用 NS0 骨髓瘤细胞,另一个优选的表达系统为 WO 87/04462、WO 89/01036 和 EP 338,841 中公开的 GS 基因表达系统。通过培养经转染的宿主细胞一段时间,以足以使融合蛋白分泌到宿主细胞生长的培养介质中,从而制备融合蛋白。可利用标准蛋白纯化方法从培养介质中回收融合蛋白,所有操作如本文所示例。

实施例

[0090] 在如下的描述中,参照融合蛋白的编号。为了方便起见,所述及的融合蛋白的功能性成分总结如下:

[0091] 表 1:

[0092]

蛋白	SIRP α 区域	Fc 区	Fc 效应子活性
TTI-601	hSIRP α V1, 3 结构域(340 aa)	hIgG4 (mut)	无
TTI-602	hSIRP α V2, 3 结构域(339 aa)	hIgG4 (mut)	无
TTI-616	hSIRP α V2, 1 结构域(118 aa)	hIgG4 (mut)	无
TTI-620	hSIRP α V2, 1 结构域(114 aa)	hIgG4 (WT)*	低
TTI-621	hSIRP α V2, 1 结构域(118 aa)	hIgG1 (WT)	高
TTI-622	hSIRP α V2, 1 结构域(118 aa)	hIgG4 (WT)	低
TTI-623	hSIRP α V2, 1 结构域(118 aa) FD6 突变 [^]	hIgG4 (mut)	无
TTI-624	hSIRP α V2, 1 结构域(118 aa) CV1 突变 [^]	hIgG4 (mut)	无
R&D**	hSIRP α V1, 3 结构域(339 aa)	hIgG1 (WT)	高

[0093] 所有人 IgG4Fc 区具有使铰链稳定的 S²²⁸P 突变,除了标记星号 (*) 的以外。标记为“mut”的 IgG4Fc 在 233-236 位 (EU 编号系统) 含有突变,其进一步降低 Fc γ R 的结合 (Armour et al,1999Eur. J. Immunol. 29:2613)。文献“Weiskopf et al. 2013Science 341:88”中记载了 [^]FD6 突变 (L4V、V6I、A27I、I31F、E47V、K53R、E54Q、H56P、V63I、L66T、K68R、V92I) 和 CV1 突变 (V6I、A27I、I31F、E47V、K53R、E54Q、H56P、L66T、V92I)。** 市售可得的蛋白质, R&D Systems 公司销售 (Cat#4546-SA-050)。

[0094] 1、SIRP α -Fc 融合蛋白的制备

[0095] 利用如下所示的引物,由三段克隆 (three-stage cloning) 法制备 SIRP α Fc 构建体:

[0096] P#5863 :GGCGCTAGCCACCATGGAGC SEQ ID No. 9

[0097] P#5929 :GGTGAAGCTCACTGTGTGCTG SEQ ID No. 10

[0098] P#5930 :CAGCACACAGTGAGCTTCACC SEQ ID No. 11

[0099] P#1035 :CCGGATCCTCATTTACCCAG SEQ ID No. 12

[0100] P#0874 :GGACTCAGAGGGTTTGGCACGCACAGA SEQ ID No. 13

[0101] P#0875 :CCCTCTGAGTCCAAATATGGTCCCCA SEQ ID No. 14

[0102] P#4197 :AGTTTTGTGTCAGAGGGTTTGGCACGCACAGA SEQ ID No. 15

[0103] P#4198 :AAACCTCTGACAAAACACACATGCCA SEQ ID No. 16

[0104] P#1737 :CACGGATCCTCATTTACCCGG SEQ ID No. 17

[0105] P#4195 :AGGTGCTGGGCATGGTGGGCATGGGG SEQ ID No. 18

[0106] P#4196 :CCCCATGCCACCATGCCAGCACCT SEQ ID No. 19

[0107] P#2058 :CACGGATCCTCATTTACCCAGACAGGG SEQ ID No. 20

[0108] 在第一组 PCR 反应中,根据如下反应条件,利用 platinum Pfx DNA 聚合酶 (Invitrogen 公司)、1mM MgSO₄、每种 dNTP 0.4mM 和各引物 20pmol,扩增 100ng 模板 DNA (合成的人 SIRP α GenBank#AAH26692, 得自 Blue Heron Biotechnology 公司):

[0109] TTI-602 :引物 P#5863 和 P#5929 ;首先在 94 $^{\circ}$ C 解链 5 分钟,然后进行 30 个循环,每个循环为 94 $^{\circ}$ C 持续 1 分钟、56 $^{\circ}$ C 持续 2 分钟以及 68 $^{\circ}$ C 持续 2 分钟。

[0110] TTI-616 :引物 P#5863 和 P#0874 ;首先在 94 $^{\circ}$ C 解链 5 分钟,然后进行 30 个循环,每个循环为 94 $^{\circ}$ C 持续 1 分钟、50 $^{\circ}$ C 持续 1.5 分钟以及 63 $^{\circ}$ C 持续 3 分钟。

[0111] TTI-621 :引物 P#5863 和 P#4197 ;首先在 94 $^{\circ}$ C 解链 5 分钟,然后进行 30 个循环,每

个循环为 94℃持续 0.5 分钟、50℃持续 1.5 分钟以及 63℃持续 3 分钟。

[0112] TTI-622 :引物 P#5863 和 P#4195 ;首先在 94℃解链 5 分钟,然后进行 30 个循环,每个循环为 94℃持续 0.5 分钟、50℃持续 1.5 分钟以及 63℃持续 3 分钟。

[0113] 然后将反应在 72℃保持 10 分钟,冷却至 4℃。将反应产物电泳通过 1-1.4%琼脂糖凝胶,并用溴化乙锭使其可视。

[0114] 接下来,在如下反应条件下,利用 Pfx DNA 聚合酶 (Invitrogen 公司)、1mM MgSO₄、每种 dNTP 0.4mM、各引物 20pmol 和 100ng 模板 DNA(人 IgG1 和人 IgG4,之前克隆获得),在反应 PCR2 中扩增 IgG Fc 片段:

[0115] TTI-602 :引物 P#5930 和 P#1035 ;首先在 94℃解链 5 分钟,然后进行 30 个循环,每个循环为 94℃持续 1 分钟、56℃持续 2 分钟以及 72℃持续 2 分钟。

[0116] TTI-616 :引物 P#0875 和 P#1035 ;首先在 94℃解链 5 分钟,然后进行 30 个循环,每个循环为 94℃持续 1 分钟、50℃持续 1.5 分钟以及 63℃持续 3 分钟。

[0117] TTI-621 :引物 P#4198 和 P#1737 ;首先在 94℃解链 5 分钟,然后进行 30 个循环,每个循环为 94℃持续 0.5 分钟、60℃持续 0.5 分钟以及 68℃持续 0.5 分钟。

[0118] TTI-622 :引物 P#4196 和 P#2058 ;首先在 94℃解链 5 分钟,然后进行 30 个循环,每个循环为 94℃持续 0.5 分钟、50℃持续 1.5 分钟以及 63℃持续 3 分钟。

[0119] 然后将反应在 72℃保持 10 分钟,冷却至 4℃。将反应产物电泳通过 1-1.4%琼脂糖凝胶,并用溴化乙锭使其可视。

[0120] 最后,在反应 PCR3 中通过重叠 PCR 装配 SIRP α 和 Fc 的 cDNA。在 94℃下将 PCR1 和 PCR2 的产物 (100ng) 与 platinum Pfx DNA 聚合酶 (Invitrogen 公司)、1mM MgSO₄、每种 dNTP 0.4 - 0.8mM 共孵育 5 分钟,然后进行 10 个循环,每个循环为 94℃持续 30 秒至 1 分钟,然后 52-60℃持续 80 秒 -3 分钟,冷却至 4℃。然后向第一反应加入引物 (各引物 20-40pmol),并且在如下条件进行第二阶段的反应:在 94℃解链 5 分钟,然后进行 30 个循环,每个循环为 94℃持续 30 秒 -1 分钟、50-56℃持续 30 秒 -3 分钟、以及 30 秒。以下详细描述各条件:

[0121] TTI-602 :利用引物 P#5863 和 P#1035,进行 10 个循环,每个循环为 94℃持续 1 分钟并且 56℃持续 3 分钟,然后进行 30 个循环,每个循环为 94℃持续 1 分钟、55℃持续 2.5 分钟以及 72℃持续 3 分钟。

[0122] TTI-616 :不进行第一 PCR 循环;利用引物 P#5863 和 P#1035 进行 30 个循环,每个循环为 94℃持续 1 分钟、50℃持续 2 分钟以及 63℃持续 3.5 分钟。

[0123] TTI-621 :利用引物 P#5863 和 P#1737 进行 10 个循环,每个循环为 94℃持续 1 分钟并且 52℃持续 3 分钟,然后进行 30 个循环,每个循环为 94℃持续 1 分钟、52℃持续 2 分钟以及 63℃持续 4 分钟。

[0124] TTI-622 :利用引物 P#5863 和 P#2058 进行 10 个循环,每个循环为 94℃持续 1 分钟并且 60℃持续 3 分钟,然后进行 30 个循环,每个循环为 94℃持续 1 分钟、52℃持续 2 分钟以及 63℃持续 4 分钟。

[0125] 然后将反应在 68-72℃保持 7-8 分钟,冷却至 4℃。通过 1-1.4%琼脂糖凝胶将反应产物分离,并用溴化乙锭使其可视,并根据如下方式连接入 pMPG 表达载体 (加拿大蒙特利尔市的生物技术研究所在):利用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen 公司),从琼脂糖凝胶中切割并纯化经 PCR 扩增的目的 DNA 条带。用 NheI 和 BamHI 限制性内切酶 (New England

BioLabs 公司)对经纯化的 PCR 产物进行酶切,并利用 Qiaquick 凝胶纯化试剂盒(Qiagen 公司)从凝胶中进行纯化。然后用 T4DNA 连接酶(Invitrogen 公司)将该片段连接入已经相似地经 NheI 和 BamHI 酶酶切的 pMPG 表达质粒。该 pMPG 质粒使用 CMV 启动子和 TK Poly A 终止子,并且含有潮霉素抗性选择标记。然后根据制造商的说明书,用 2 μ l 的连接产物转化 25 μ l 的感受态 E. coli DH5 α 细胞(Invitrogen 公司)。将转化细胞散布在含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素(Sigma 公司)的 LB 琼脂平板上,然后在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 20 小时。利用 QIAprep Spin mini-prep 试剂盒(Qiagen 公司)从小规模的 E. coli 培养物中提取并纯化质粒 DNA,并利用荧光染料缀合的 ddNTPs(Core Molecular Biology Facility, York 大学)通过自动测序来鉴定 DNA 序列。为了转染,利用 EndoFree Plasmid Maxi 试剂盒(Qiagen 公司)制备大量的质粒 DNA,然后利用荧光染料缀合的 ddNTPs(Core Molecular Biology Facility, York 大学)通过自动测序再次鉴定序列。

[0126] 细胞系的制备

[0127] 利用 CHO-S 细胞系(Invitrogen 公司)产生稳定转染株。简言之,用 XbaI(New England BioLabs 公司)将分离的质粒 DNA 线性化,并用 QIAGEN 柱(Qiagen 公司)纯化。CHO-S 细胞在补充有 8mM L-谷氨酰胺和 1xHT-补充物的不含血清的化学成分确定的培养基(CD-CHO, Invitrogen 公司)中生长,利用 Lipofectamine 2000 试剂(Invitrogen 公司)用线性化的质粒转染该细胞。48 小时后,将细胞转移到 96 孔板中,以在含有 600 μ g/mL 潮霉素 B(Invitrogen 公司)的培养基中的不同浓度(10000、5000 或 2000 个细胞/孔)接种。空白转染对照在相同的方式进行,但是未向混合物中加入 DNA。转染 2-3 周后,挑取一组抗药性寡克隆,根据如下方法利用 ELISA 对经 48h 表达研究的上清进行筛选:用 0.1 μ g/孔的捕获 Ab(羊抗人 IgGFc)包被 96 孔板,并在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。洗涤所述孔,并用 200 μ l 的含有 2% BSA 的 PBST 在室温下封闭所述孔 1 小时。洗涤后,100 μ l 样品用含有 1% BSA 的 PBST 稀释,加入孔中,孵育 1 小时,洗涤,然后在室温下用 HRP 偶联的检测 Ab(HRP 偶联的羊抗人 IgGFc)孵育 1 小时。然后洗涤所述孔,并加入 TMB 底物(Moss 公司),在室温下孵育 3 至 5 分钟。利用 iMark 微板阅读器(Biorad)在 450nm/655nm 波长下测量吸光度,并利用已知量的纯化融合蛋白构建标准曲线。在含有 600 μ g/mL 潮霉素 B 的完全 CD-CHO 培养基中,以更低的细胞浓度(0.1、0.25 和 0.5 个细胞/孔)对 3 个表达最高的寡克隆进行第二次有限稀释。2-3 周后,如上所述通过 ELISA 对抗药克隆再次进行产生重组蛋白的评价。生产率以 pg/细胞/天表示,对于人 SIRP α 融合蛋白,生产率在 1.4 至 23.9pg/细胞/天的范围内。用表达最高的单细胞克隆在 WAVE 生物反应器系统中进行上清液批量生产。在一些情况中,在达到单克隆阶段之前,利用最佳的寡克隆进行生产。

[0128] 蛋白质纯化

[0129] 为了快速生产小批量蛋白质,在瞬时转染的 293F 细胞中制备一些 SIRP α -Fc 批次。简言之,在 293F 培养基(Invitrogen 公司)中培养 FreeStyle 293F 细胞(Invitrogen 公司),该细胞用非线性的质粒 DNA 和 293Fectin 试剂(Invitrogen 公司)转染,并以 80-100mL/瓶的体积在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下在摇瓶中使其生长 3 至 6 天。每天监测细胞密度和生活力直到细胞生活力降至 90%。成批收获时细胞生活力在 85-90%的范围内。

[0130] 对于从 CHO-S 细胞中的纯化,在 WAVE 一次性袋式生物反应器系统 Base20/50EHT(GE Healthcare 公司)中由稳定转染的高表达寡细胞克隆或单细胞克隆产

生 5 或 10L 培养上清。简言之, CHO-S 转染株在 37°C 下在完全生长培养基 (补充了 8mM L-谷氨酰胺、1xHT- 补充物和 600 μ g/mL 潮霉素 B 的 CD-CHO) 中在静态 T150 瓶中生长, 从而制备足够的细胞数以开始以 0.5x10⁶ 个细胞 /mL 进行的 1L 或 2L 的培养, 从而分别进行 5L 或 10L 的试验。将细胞接种于生物反应器袋, 然后在 37°C、10% CO₂ 下, 以摇速 15-20rpm、角度 7°、气流 0.2-0.4Lpm 孵育。当培养物达到 2 至 2.5x10⁶ 个细胞 /mL 的密度 (通常在接种 2-3 天之内) 时, 进一步扩大生物反应器至 5L 或 10L, 并继续在 37°C、10% CO₂ 下, 以摇速 15-20rpm、角度 7°、气流 0.2-0.4Lpm 下孵育。当细胞达到 1 至 1.5x10⁶ 个细胞 /mL 的密度时, 将温度降至 30°C, 并且培养物进一步在上述条件下继续孵育 7 至 10 天。从第 0 天开始, 在 30°C 下, 每两天对培养物供应 1% CHO 生物反应器供给补充物 (feed bioreactor supplement) (Sigma 公司), 并且在细胞生活力降至约 90% 时收获培养物。收集上清液, 在 4°C 下以 3000x g 离心 40 分钟, 并在 -20°C 下冷冻直至纯化。

[0131] 所有蛋白质用两步法纯化, 首先采用蛋白 A 层析。缓冲液置换的上清液用结合缓冲液 (20mM Na-P&3M NaCl, pH 7.8) 稀释 9 倍, 并在 4°C 下以 2-3mL/ 分钟的流速 (根据上样体积和上样时间确定) 装载入 rProtein A 柱 (GE Healthcare 公司) 过夜。然后所述柱用结合缓冲液洗涤 (3mL/ 分钟, 20 倍体积), 并用 0.1M 柠檬酸 pH 4.0 和 pH 2.2 以 3mL/ 分钟洗脱蛋白质。洗脱物质以 1M 调节 pH 至中性, 然后用 HiTrap Phenyl HP 色谱纯化。简言之, 将蛋白质稀释至少 4 倍至 0.2M 硫酸铵 pH 7.5, 并以 2-3mL/ 分钟的流速 (根据上样体积和上样时间确定) 装载入 HiTrap Phenyl HP 柱 (GE Healthcare 公司)。收集流过组分中的未聚集的 SIRP α Fc 蛋白。采用利用 BioMax 10 膜 (Millipore 公司) 的切向流过滤将蛋白质浓缩并缓冲液置换至 PBS pH 7.4 中。用 SDS-PAGE、利用羊抗 IgGFc 抗体和兔抗羊 IgG HRP 缀合物的蛋白质印迹以及 HPLC 分析来确定各蛋白质的品质。利用 N 端测序和质谱法鉴定所有蛋白质。

[0132] 1. 比较单结构域 SIRP α Fc 融合蛋白和 3 结构域 SIRP α Fc 融合蛋白

[0133] SIRP α 由 3 个细胞外免疫球蛋白 (Ig) 样结构域构成, 然而与 CD47 的结合定位于 N 端结构域。为了确定 SIRP α Fc 融合蛋白的最佳 SIRP α 区, 我们制备了引入所有 3 个细胞外 SIRP α 结构域 (TTI-602) 或仅引入单一的 N 端结构域 (TTI-616) 的蛋白质。

[0134] 两种蛋白都是在缺乏效应子功能的突变的人 IgG4Fc 骨架上构建的。我们使用直接结合检验 (图 1A) 和间接竞争检验 (图 1B) 比较了 TTI-602 和 TTI-616 与人 CD47 的结合。对于直接结合检验, CD47+ 人 Jurkat 细胞分别与不同浓度 (如所示出的) 的 hSIRP α Fc 蛋白在冰上孵育 1 小时。然后洗涤细胞以去除任何未结合的蛋白, 然后将细胞与抗 hIgG Fc_g 特异性 (Fab')₂ FITC 抗体在冰上孵育 1 小时。然后洗涤细胞, 并通过与 2% 多聚甲醛溶液过夜孵育来固定细胞。然后洗掉固定液, 并且用流式细胞仪 (BD FACScan) 分析细胞。采用非线性回归将数据拟合为单一位点结合模型。对于间接检验, 将固定化的饱和量的生物素化的人 SIRP α Fc (TTI-601) 单独孵育, 或与滴定量的 TTI-602 或 TTI-616 在冰上孵育 15 分钟。然后将该混合物加入人 CD47+Jurkat 细胞, 在冰上孵育 1 小时, 洗涤以除去未结合的蛋白, 然后与饱和量的链霉亲和素 PE 在冰上在黑暗中孵育 1h。然后洗涤细胞, 如上所述固定并用流式细胞仪分析。对几何平均数进行归一化, 其中 100% 抑制是单独链霉亲和素 -PE 的几何平均数, 0% 抑制是单独生物素化的 TTI601 的几何平均数。通过非线性回归分析, 采用 S 形剂量 - 反应曲线拟合获得最佳拟合线 (Prism, Graphpad)。

[0135] 图 1A 和 1B 中的数据清楚地示出 TTI-602 和 TTI-616 之间的结合差异,在两个试验中 TTI-616 具有更高的结合亲和性。在直接结合检验中,TTI-616 的结合亲和性比 TTI-602 高 10 倍 (EC_{50} 值:13.4nm 对 139nm)。在间接结合检验中,TTI-616 的结合亲和性是 TTI-602 的 7 倍 (EC_{50} 值:4.5nM 对 32.1nM)。这些结果是出乎意料的,因为之前公布的数据显示, SIRP α 的 N 端结构域与包含所有三个胞外结构域的 SIRP α 具有相当的 CD47 结合亲和性 (Hatherley et al,2007J. Biol. Chem. 282:14567)。

[0136] 2. 设计具有不同 Fc 区的人 SIRP α Fc 融合蛋白

[0137] 已经确定了引入单个 SIRP α 结构域的融合蛋白是优选的,本发明进一步进行研究以确定最佳 Fc 区。制备了三种不同的人 SIRP α Fc 融合蛋白,其含有相同的 SIRP α 区 (31-148),但是是在具有不同效应子活性的不同 Fc 成分的基础上构建的。设计细节总结在下表 2 中。标注的 DNA 和蛋白质序列在附录 1 中示出。

[0138] 表 2:人 SIRP α Fc 融合蛋白的设计。

[0139]

蛋白质	SIRP α 区	Fc 同种型	效应子活性
TTI-621	V2 IgV 结构域	人 IgG1 (下部的铰链-CH2-CH3 结构域)	高
TTI-622	V2 IgV 结构域	在 158*位有 Ser-Pro 突变的人 IgG4 (铰链-CH2-CH3 结构域)	低
TTI-616	V2 IgV 结构域	具有如下突变的人 IgG4 (铰链-CH2-CH3 结构域): Ser158Pro*; Glu163Pro; Phe164 Val; Leu165Ala; 以及 Gly166**缺失	无

[0140] *对应于 EU 编号系统的 228 位,旨在稳定 IgG4 铰链区域并防止导致形成单体的链内二硫键的形成 (Angal et al,1993Mol. Immunol. 30:105) ;

[0141] **对应于 EU 编号系统的 233-236 位,旨在进一步降低 Fc γ 受体结合 (Armour et al,1999Eur. J. Immunol. 29:2613)。

[0142] 3. SIRP α Fc 融合蛋白与 CD47 的结合

[0143] 比较三种 SIRP α Fc 融合蛋白与细胞表面人 CD47 的结合。简言之,CD47+ 人 Jurkat 细胞分别与不同浓度 (如所示出) 的 hSIRP α Fc 蛋白在冰上孵育 1 小时。然后洗涤细胞去除任何未结合的蛋白,然后将细胞与抗 hIgG Fc γ 特异性 (Fab')₂FITC 抗体在冰上孵育 1 小时。然后洗涤细胞,并通过与 2% 多聚甲醛溶液过夜孵育来固定细胞。然后洗掉固定液,并且用流式细胞仪 (BD FACScan) 分析细胞。对几何平均数进行归一化,并利用 Prism(Graphpad) 通过非线性回归将数据拟合为单一位点结合模型生成结合曲线和 Kd 值。

[0144] 如图 2 所示,3 种融合蛋白示出非常类似的结合曲线,产生几乎相同的亲和结合 (Kd) 值 (2.3-2.4nM)。这是可以预期的,因为所有三种蛋白均含有相同的 SIRP α 区,并且预计 Fc 区不会影响配体结合。

[0145] 4. SIRP α Fc 融合蛋白的体外促吞噬作用

[0146] 用 SIRP α Fc 阻断 CD47 增强了活化的人巨噬细胞对人急性髓细胞白血病 (AML) 肿瘤细胞的吞噬作用。在体外比较 3 种融合蛋白的促吞噬活性从而确定 Fc 区是否影响 AML 吞噬作用。首先利用磁性选择 (magnetic selection),从 Ficoll 纯化的人外周血单核的细胞中分离 CD14+ 单核细胞,由此得到人巨噬细胞。在含 20ng/ml 人单核细胞集落刺激因子的 X-vivo 培养基中培养单核细胞至少 1 周以促进其发育成巨噬细胞。然后将巨噬细胞

接种到 24 孔培养板中的玻片上,并与人干扰素 γ 过夜孵育。第二天,洗涤所述孔,并加入 LPS 至少 1 小时。对人 AML 细胞计数,并用 CFSE 标记。标记后,AML 细胞在室温下 (RT) 与 PBS、SIRP α Fc 蛋白或同种型对照孵育 15 分钟。然后将 AML 细胞添加到各孔中,混合,并在 37°C、5% CO₂ 加湿细胞孵育器中孵育 2 小时。孵育后,洗涤所述孔,并在 RT 下用麦胚凝集素 Alexa Fluor® 555 缀合物 (Invitrogen 公司, cat#w32464) 标记巨噬细胞 15 分钟,同时摇动。然后洗涤所述孔,并用 2% 多聚甲醛在 RT 下固定 30 分钟。然后洗涤所述孔,并保留在黑暗、4°C 下过夜。用扫描共聚焦显微镜 (Quorum Wave FX-X1 Spinning Disc 共聚焦系统, Quorum Technologies 公司, Guelph, ON, 加拿大) 分析玻片。使用吞噬指数对 AML 细胞的吞噬作用进行定量,如下: (巨噬细胞中的 AML 细胞的数目 / 巨噬细胞的数目) \times 100; 每个样品计数至少 200 个巨噬细胞。如图 3 所示, TTI-621 和 TTI-622 示出相似的促吞噬活性,而 TTI-616 明显较弱 (在 10nm 的剂量下特别明显)。这表明野生型 IgG4 或 IgG1 的 Fc 区是使 SIRP α Fc 引发的巨噬细胞对肿瘤细胞的杀伤最大化所需的。

[0147] 利用 AML 细胞系 OCI/AML-2 作为靶标评价扩大样本的 SIRP α Fc 融合蛋白的吞噬活性。如图 6 所示,数据清楚地表明 AML-2 吞噬的最高水平是由含有单一 SIRP α 结构域和野生型 IgG4 或 IgG1 的 Fc 区的融合蛋白诱导的 (即, TTI-622、-620 或 TTI-621)。缺乏任何 Fc 效应子功能的融合蛋白 (例如, TTI-616) 可以触发吞噬,但效果显著较弱。这与图 3 报告的数据是一致的。具有三个胞外结构域的 SIRP α Fc (TTI-601、TTI-602 和 R&D) 也表现出只有低水平的促吞噬活性,并且在 R&D 融合蛋白的情况中,该差的活性不能通过 IgG1Fc 区克服。此外,与具有相同 Fc 区的野生型 SIRP α Fc (TTI-616) 相比,含有提供显著较高的 CD47 结合活性的突变 SIRP α 序列的融合蛋白 (TTI-623 和 TTI-624) 不导致更高的吞噬活性。这些结果表明,超过野生型单一 SIRP α 结构域所能实现的水平的增加的 CD47 结合亲和性在体外不能导致任何进一步的效果。这一结论是出乎意料的,因为据报道,与 IgG4Fc 连接的、FD6 和 CV1 突变的 SIRP α 比野生型 SIRP α -IgG4 具有更高的促吞噬活性 (Weiskopf et al, 2013 Science 341:88)。

[0148] 5. SIRP α Fc 融合蛋白的体内抗白血病活性

[0149] 在标准异种移植模型中,检测三种 SIRP α Fc 融合蛋白控制人 AML 肿瘤细胞生长的能力。用 137Cs γ -辐照器以 275cGy 以亚致死剂量辐射 NOD/ShiLtJ-Prkdcscid (NOD. SCID) 小鼠 (8-12 周龄) 24h,然后股骨内 (intrafemoral) 注射从人白血病患者收集的 AML 细胞。从移植后 3 周开始,用 SIRP α Fc 融合蛋白 (8mg/kg, IP, 每周三次) 或等摩尔剂量的对照 Fc 蛋白 TTI-401 (突变的人 IgG4) 或 TTI-402 (人 IgG1) 处理小鼠。处理 4 周后,处死小鼠,通过流式细胞仪分析,检测被注射的股骨、未注射的骨髓、和脾脏中的人白血病细胞,染色以检测人 CD45 和人 CD33 标记物的表达。AML 的植入以各腔室的人 CD45+CD33+ 细胞的百分比表示。

[0150] 如图 4 所示,具有 IgG1Fc 区的 TTI-621 融合蛋白是唯一能够在移植部位 (注射的股骨) 介导抗白血病效应的蛋白。在未注射的骨髓中,存在明显的 Fc 依赖效应,其中 TTI-621 (全 Fc 活性) > TTI-622 (低 Fc 活性) > TTI-616 (无 Fc 活性)。所有三种融合蛋白在脾脏中表现出抗白血病活性,虽然该位点的活性测试不太严格 (因为其整体植入水平 (如对照小鼠中那样) 远低于在注射的或未注射的骨髓)。总的来说,这些结果表明,具有人 IgG1Fc 区的 SIRP α Fc 蛋白在人 AML 异种移植模型中具有最大活性。不能基于体外吞噬数

据来预料基于 IgG1 的融合蛋白的较优的体内活性 (图 2), 在体外吞噬数据中, TTI-621 和 TTI-622 显示出相似的活性。

[0151] 6. SIRP α Fc 融合蛋白的血细胞凝集活性

[0152] 利用来自健康供体的肝素化的全血来制备人红细胞。将 4ml 全血吸入 15ml 锥形管中, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 加满, 室温下以 200x g 离心 10 分钟, 以去除血小板。吸去血小板部分后, 用 PBS 加满所述管至 15ml, 上下颠倒所述管以混合内容物, 在 1500rpm 下离心 5 分钟使 RBC 成团。再重复 3 次洗涤。最后一次洗涤后吸去上清, 向成团的红细胞中加入足量的 PBS 以制备 10% RBC 溶液 (例如, 如果得到 1ml 成团的红细胞, 进一步用 9ml PBS 稀释以制备 10% RBC 溶液)。存储在 4°C 的 10% RBC 溶液在一个星期内是可用的。在进行血细胞凝集检验之前即刻制备新鲜的 1% RBC 溶液。

[0153] 对在 CHO 或 293 细胞中表达的 SIRP α Fc 蛋白进行分析以检验其使人 RBC 凝集的能力, 这由 RBC 聚集和抑制形成 RBC 团来证实。该检验在 96 孔非组织培养物处理的、低蛋白结合的圆底平板中进行。在进行血细胞凝集检验之前, 即刻制备新鲜的 1% RBC 溶液。将 50 μ L 的 1% RBC 溶液转移到各孔中。向合适的孔中加入 50 μ L 每孔的 3 倍系列稀释 (以 3 μ M 终浓度开始稀释) 的人 SIRP α -Fc 融合蛋白或载体对照。轻柔地混合所述孔, 并在 37°C、5% CO₂ 下孵育过夜。孵育过夜后, 对所述平板拍照。在没有交联的情况下, 红细胞滚动到孔底部并呈现为紧密的小团。血细胞凝集由存在非固定的 RBC 来证实, 其与界限清楚的 RBC 团相比外观模糊。引发血细胞凝集的 SIRP α 融合蛋白会抑制 RBC 团的形成, 由此产生弥漫或模糊的结构。结果表明, 与单结构域融合蛋白相比, 三结构域的 SIRP α Fc 融合蛋白 TTI-601 和 TTI-602 显示出增加的诱导血细胞凝集的趋势。这表明单结构域 SIRP α Fc 在体内导致 RBC 毒性的可能性低。

[0154] 7. SIRP α Fc 融合蛋白的 CD47 激动活性

[0155] 人 Jurkat T 细胞 Clone E6-1 购自 ATCC (CAT#TIB-152), 并在补充有 10% FBS、2mM L-谷氨酰胺、1mM 丙酮酸钠、10mM HEPES 和 1.5g/L 碳酸氢钠的 RPMI 1640 中生长。通过流式细胞仪证明细胞表面结合有抗 CD47mAb clone B6H12、2D3、BRIC126 和 CC2C6, 从而分析 CD47 的表达。在激动性检验之前, 以 3×10^5 个细胞 /mL 的浓度将 Jurkat 细胞接种在 T75/T150 组织培养瓶中的完全生长培养基中。

[0156] 收获高生活力 (>95%) 的 Jurkat T 细胞, 并以每孔 2×10^5 个细胞 /200 μ L 铺板于圆底 96 孔组织培养板的完全生长培养基中。在 37°C、5% CO₂ 下, 用单独的培养基或每孔 12.5 μ g/20 μ L 的 CD47 阻断抗体 clone B6H12 预处理细胞 1 小时。加入 3 μ M 终浓度、20 μ L/孔的 SIRP α Fc 融合蛋白或对照 Fc, 并且加入 1 μ M 20 μ L/孔的促凋亡剂十字孢碱作为阳性对照。未处理的细胞 (UT) 仅加入 20 μ L/孔的培养基。在 37°C、5% CO₂ 下孵育细胞过夜。孵育过夜后, 用购自 eBiosciences 公司的 Annexin-V:FITC/7-AAD 凋亡检测试剂盒 (Cat#88-8005-75) 根据制造商的说明对细胞染色, 并在染色 4 小时之内用流式细胞仪分析以检测对凋亡进程的抑制。

[0157] 如图 5 所示, 与单一结构域融合蛋白 TTI-616 和 TTI-620 相比, 三结构域融合蛋白 TTI-602 诱导了明显更高水平的 Jurkat 凋亡。由于细胞用 CD47 阻断抗体 B6H12 进行了预处理以进行中和, 因此 TTI-602 的效果明显是 CD47 特异的。这些结果表明, 在使 CD47 激动活性最小化方面, 单一结构域 SIRP α Fc 融合蛋白优于三结构域 SIRP α Fc。

[0158] 8. 红细胞结合

[0159] 对基于 CD47 的治疗的关注点之一在于靶标在红细胞表面 (RBC) 的表达, 其有潜力作为大的抗原沉积并引起血液学毒性。的确, 已经报道, 用高亲和性 SIRP α Fc 变体和 CD47 特异性抗体处理的动物发生了贫血。因此, 用流式细胞仪评价了 SIRP α Fc 融合蛋白与人红细胞的结合。利用肝素化的全血制备人 RBC。全血在室温下以 200x g 离心 10 分钟以除去血小板。吸去血小板部分后, 用 PBS 加满所述管至原体积, 上下颠倒所述管以充分混合内容物, 在 1500rpm 下离心 5 分钟以使 RBC 成团。洗涤再重复 3 至 5 次。最后一次洗涤后吸去上清, 用 PBS 加满所述管至原血液体积。采用血细胞计数器对 RBC 计数, 并在 RBC 结合检验之前, 以 5×10^8 个细胞 / mL 将 RBC 重悬。利用流式细胞仪, 利用抗人 CD235a (eBiosciences 公司 Cat#12-9978) 评价红细胞的纯度。

[0160] 据观察, 含野生型 SIRP α 序列的融合蛋白与人红细胞的结合非常差, 即使在高浓度下, 所产生的信号也高于背景不到 2 倍。相比之下, CD47 单克隆抗体的结合通常高于背景超过 100 倍。SIRP α Fc 和 CD47 抗体之间的与 RBC 结合的显著差异如图 7A 所示, 其中比较了在一系列浓度范围内, TTI-616 与 CD47 抗体 B6H12 的结合。为了证明这种现象并不是 B6H12 独有的, 对另外三种 CD47 抗体 (2D3、BRIC126 和 CC2C6) 进行了评价。如图 7B 显示, 所有四种抗体以比 SIRP α Fc 显著更高的水平与人 RBC 结合。注意到无论 Fc 同种型或单一或三个结构域结构的情况如何, SIRP α Fc 融合蛋白均较差地与人 RBC 结合 (数据未示出)。此外, 由于 SIRP α Fc 和 CD47 抗体这两种蛋白与 AML 肿瘤细胞系相似地结合 (见图 7C), 因此 SIRP α Fc 和 CD47 抗体对红细胞结合的差异并不是简单地反映出对 CD47 亲和性的差异。

[0161] 由这些研究获得了一些出乎意料的结果。首先, 与三结构域 SIRP α Fc 相比, 单结构域 SIRP α Fc 具有更优的结合亲和性与已公开的文献是不一致的。第二, Fc 区在体内消除白血病细胞方面的强的作用与其他人发表的数据不一致, 他们提出 CD47 抗体的有效性归因于阻断了 CD47-SIRP α 相互作用。同样, 不能基于体外吞噬数据来预料 TTI-621 (IgG1) 的更优的体内有效性。此外, 单结构域 SIRP α Fc 对红细胞非常低的结合性、以及低的 CD47 激动活性均支持本文教导的与其他 CD47 抑制剂相比, SIRPaFc 具有更有的医疗用途。

[0162] 总之, 这些数据表明, 最佳的人 SIRP α Fc 融合蛋白应当包含与具有效应子功能的 Fc 区 (例如优选地, 人 IgG1 的 Fc 区, 或者合适地, 人 IgG4 的 Fc 区) 连接的单一 (N 端) SIRP α 结构域。

[0001]

附录 1
序列表总结

ID	序列类型	序列来源
1	氨基酸	SIRP α V2 型 IgV 区
2	氨基酸	基于 P01857 的人 IgG1 序列的 Fc 区
3	氨基酸	成熟 SIRP α Fc 的完整序列
4	氨基酸	可分泌的 SIRP α Fc 的完整序列
5	DNA	人 SIRP α V2 型的类 IgV 区的编码序列
6	DNA	人 IgG1 的 Fc 区的编码序列, 名为 P018
7	DNA	成熟的 SIRP α Fc 的编码序列
8	DNA	可分泌的 SIRP α Fc 的编码序列
9	DNA	SIRP α Fc 基因构建中所用的引物
10	DNA	SIRP α Fc 基因构建中所用的引物
11	DNA	SIRP α Fc 基因构建中所用的引物
12	DNA	SIRP α Fc 基因构建中所用的引物
13	DNA	SIRP α Fc 基因构建中所用的引物
14	DNA	SIRP α Fc 基因构建中所用的引物
15	DNA	SIRP α Fc 基因构建中所用的引物
16	DNA	SIRP α Fc 基因构建中所用的引物
17	DNA	SIRP α Fc 基因构建中所用的引物
18	DNA	SIRP α Fc 基因构建中所用的引物
19	DNA	SIRP α Fc 基因构建中所用的引物
20	DNA	SIRP α Fc 基因构建中所用的引物
21	氨基酸	连接物序列
22	氨基酸	人 SIRP α V2 IgV 结构域
23	氨基酸	野生型 IgG4 Fc 的序列
24	氨基酸	改变的 IgG4 Fc 的序列
25	氨基酸	基于 IgG1 的 SIRP α Fc 的序列
26	氨基酸	基于 IgG4 的 SIRP α Fc 的序列
27	DNA	SEQ ID No. 25 的编码序列
28	DNA	SEQ ID No. 26 的编码序列

[0002]

序列表信息SIRP α V2 型 IgV [SEQ ID No.1]

EELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYCYCVKFRKGSPTDFKSGA

IgG1 Fc 区 [SEQ ID No.2]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

成熟的 SIRP α G1 [SEQ ID No.3]

EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYCYCVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

可分泌的 SIRP α G1 [SEQ ID No.4]

MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYCYCVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

成熟的 SIRP α G1 的编码序列 [SEQ ID No. 5]

GAG GAG CTG CAG GTG ATT CAG CCT GAC AAG TCC GTA TCA GTT GCA GCT GGA GAG TCG GCC ATT CTG CAC TGC
ACT GTG ACC TCC CTG ATC CCT GTG GGG CCC ATC CAG TGG TTC AGA GGA GCT GGA CCA GCC CGG GAA TTA ATC
TAC AAT CAA AAA GAA GGC CAC TTC CCC CGG GTA ACA ACT GTT TCA GAG TCC ACA AAG AGA GAA AAC ATG GAC
TTT TCC ATC AGC ATC AGT AAC ATC ACC CCA GCA GAT GCC GGC ACC TAC TAC TGT GTG AAG TTC CGG AAA GGG
AGC CCT GAC ACG GAG TTT AAG TCT GGA GCA

人 IgG1 Fc 区自身的编码序列 [SEQ ID No.6]

GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCA
CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC
GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG
GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC
AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA
GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC
CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG
AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC AAG CTC ACC GTG
GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC
ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA

[0003]

成熟的 SIRPαG1 的编码序列 [SEQ ID No.7]

GAG CAG CTG CAG CTG ATT CAG CCT GAC AAG TCC GTA TCA GTT GCA GCT GGA CAG TCG GCC ATT CTG CAC TGG
ACT GTG ACC TCC CTG ATC CCT GTG GGG CCG ATC CAG TGG TTC AGA GGA GCT GGA CCA GCC UGG GAA TTA ATC
TAC AAT CAA AAA GAA GGC CAC TTC CCC CGG GTA ACA ACT GTT TCA GAG TCC ACA AAG AGA GAA AAC ATG CAC
TTT TCC ATC AGG ATC AGT AAC ATC ACC CCA GCA GAT GGC GGC ACC TAC TAC TGT GTG AAG TTC CGG AAA GGG
AGC CCT GAC ACG GAG TTT AAG TCT GGA GCA GGC ACT GAG CTG TCT GTG CGT GCC AAA CCC TCT GAC AAA ACT
CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCA CCA AAA CCC
AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC CTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT
GAG CTC AAG TTC AAC TGG TAC CTG GAC GGC CTG GAG CTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG
TAC AAT AGG ACG TAC CTT GTG GTC AGC CTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC
AAG TCC AAG CTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC
CCA GAA CCA CAG CTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC
CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC CTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC
AAG ACC ACG CTT CCC CTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC
ACG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC CTG ATG CAT CAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG
AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA

可分泌的 SIRPαG1 的编码序列 [SEQ ID No.8]

ATG GAG CCC GGC GGC GCG GCG GCG GCG GCG CTC GGG CCG CTG CTC TGC CTG CTG CTC GCC GCG TCC TGC GCC
TGG TCA GGA GTG GCG GGT GAG GAG GAG CTG CAG GTG ATT CAG CCT GAC AAG TCC GTA TCA GTT GCA GCT GGA
GAG TCG GCC ATT CTG CAC TCC ACT GTG ACC TCC CTG ATC CCT CTG GGG CCC ATC CAG TGG TTC AGA GGA GCT
GCA CCA GCG CGG GAA TTA ATC TAC AAT CAA AAA GAA GGC CAC TTC CCC CGG GTA ACA ACT GTT TCA GAG TCC
ACA AAG AGA GAA AAC ATG GAC TTT TCC ATC AGC ATC AGT AAC ATC ACC CCA CCA GAT GCC GGC ACC TAC TAC
TGT GTG AAG TTC CGG AAA GGG AGC CCT GAC ACG GAG TTT AAG TCT GGA GCA GGC ACT GAG CTG TCT GTG CGT
GCC AAA CCC TCT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA CCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA CTC
TTC CTC TTC CCA CCA AAA CCG AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT CAG GTG ACA TGC GTG GTG GTG
GAC CTG AGC CAG GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC CTG GAC GGC CTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG
ACA AAG CCG CGG GAG GAG GAG TAC AAC AGC ACG TAC CTT GTG CTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG CAC
TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC
TCC AAA GGC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG CTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG
AAG CAG GTC AGC CTG ACC TCC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC CCC CTG GAG TGG GAG AGC AAT
GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC CTG CTG CAC TCC GAC GGG TCC TTC TTC CTC TAT AGC
AAG CTC ACC CTG GAC AAG ACC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG
CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG ACC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA

优选的 SIRPα IgV 结构域 [SEQ ID No.22]

EEE LQVIQPKSVSVAAGESAILHCTVTS LIPVGP IQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRE
NMDFSISISNITPADAGTY YCVKFRKGS PDTEFKSGAGTELSVR AKPS [SEQ ID No.22]

IgG4 序列本身 [SEQ ID No.23]

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTP EVTCVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKFREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSLGK [SEQ ID No.23]

改变的 IgG4 序列本身 [SEQ ID No. 24]

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTP EVTCVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKFREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSLGK [SEQ ID No.24]

[0004]

SIRP α G1 [SEQ ID No. 25]

EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRE
 NMDFSISISNITPADAGTYCCKFRKGS PDTEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPELGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK [SEQ
 ID No.25]

SIRP α G4 [SEQ ID No. 26]

EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRE
 NMDFSISISNITPADAGTYCCKFRKGS PDTEFKSGAGTELSVRAKPSESKYPPCPPAPEFLGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
 QDWLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK
 [SEQ ID No.26]

SEQ ID No.25 的可分泌型式 SIRP α G1 的编码序列[SEQ ID No.27]

ATG GAG CCC GCC GGC CCG GCC CCC GGC CGC CTC GGG CCG CTG CTC TGC CTG CTG CTC GCC GCG
 TCC TGC GCC TGG TCA GGA GTG GCG GGT GAG GAG GAG CTG CAG GTG ATT CAG CCT GAC AAG TCC
 GTA TCA GTT GCA GCT GGA GAG TCG GCC ATT CTG CAC TGC ACT GTG ACC TCC CTG ATC CCT GTG
 GGG CCC ATC CAG TGG TTC AGA GGA GCT GGA CCA GCC CGG GAA TTA ATC TAC AAT CAA AAA GAA
 GGC CAC TTC CCC CGG GTA ACA ACT GTT TCA GAG TCC ACA AAG AGA GAA AAC ATG GAC TTT TCC
 ATC AGC ATC AGT AAC ATC ACC CCA GCA GAT GCC GGC ACC TAC TAC TGT GTG AAG TTC CGG AAA
 GGG AGC CCT GAC ACG GAG TTT AAG TCT GGA GCA GGC ACT GAG CTG TCT GTG CGT GCC AAA CCC
 TCT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC
 TTC CTC TTC CCA CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC
 GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG
 GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC
 AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC
 AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA
 CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC
 TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG
 GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC
 AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT
 GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA

[0005]

SEQ ID No.26 的可分泌型式 SIRP α G4 的编码序列[SEQ ID No.28]

```

ATG GAG CCC GCC GGC CCG GCC CCC GGC CGC CTC GGG CCG CTG CTC TGC CTG CTG CTC GCC GCG
TCC TGC GCC TGG TCA GGA GTG GCG GGT GAG GAG GAG CTG CAG GTG ATT CAG CCT GAC AAG TCC
GTA TCA GTT GCA GCT GGA GAG TCG GCC ATT CTG CAC TGC ACT GTG ACC TCC CTG ATC CCT GTG
GGG CCC ATC CAG TGG TTC AGA GGA GCT GGA CCA GCC CGG GAA TTA ATC TAC AAT CAA AAA GAA
GGC CAC TTC CCC CGG GTA ACA ACT GTT TCA GAG TCC ACA AAG AGA GAA AAC ATG GAC TTT TCC
ATC AGC ATC AGT AAC ATC ACC CCA GCA GAT GCC GGC ACC TAC TAC TGT GTG AAG TTC CGG AAA
GGG AGC CCT GAC ACG GAG TTT AAG TCT GGA GCA GGC ACT GAG CTG TCT GTG CGT GCC AAA CCC
TCT GAG TCC AAA TAT GGT CCC CCA TGC CCA CCA TGC CCA GCA CCT GAG TTC CTG GGG GGA CCA
TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC
ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT
GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CGT
GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG
GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC
CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC
CTG ACC TGC CTG GTC AAG GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG
CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC
TAC AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG
ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA

```

SIRP α Fc TTI-621 区域成分总结

区	特征	核苷酸	氨基酸
SIRP α *	全部胞外区	1-444	1-148
	SIRP α 信号肽	1-90	1-30
	SIRP α IgV 结构域	94-411	32-137
人 IgG1 Fc**	全部区域	445-1125	149-375
	下部的铰链区	445-465	149-155
	CH2 + CH3 结构域	466-1125	156-375

*基于 AAH26692 的人 SIRP α 序列。

**基于 P01857 的人 IgG1 序列。

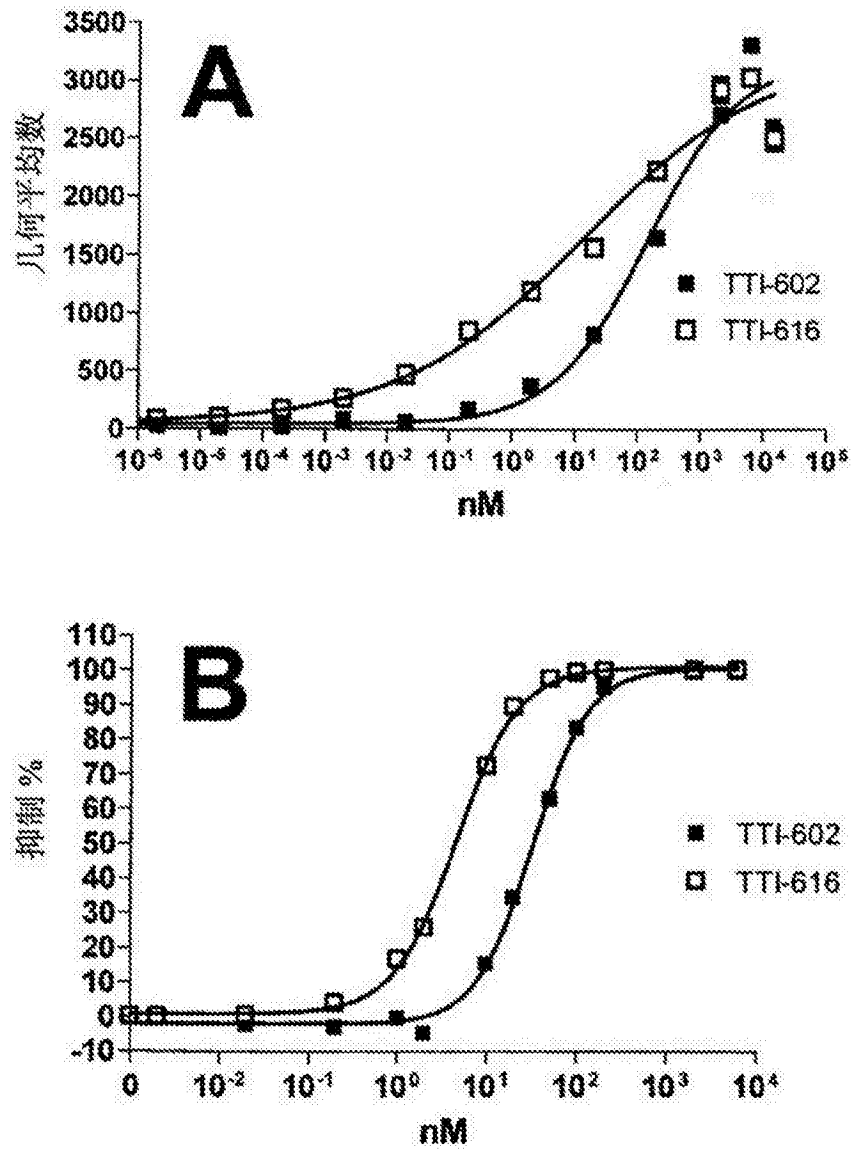


图 1

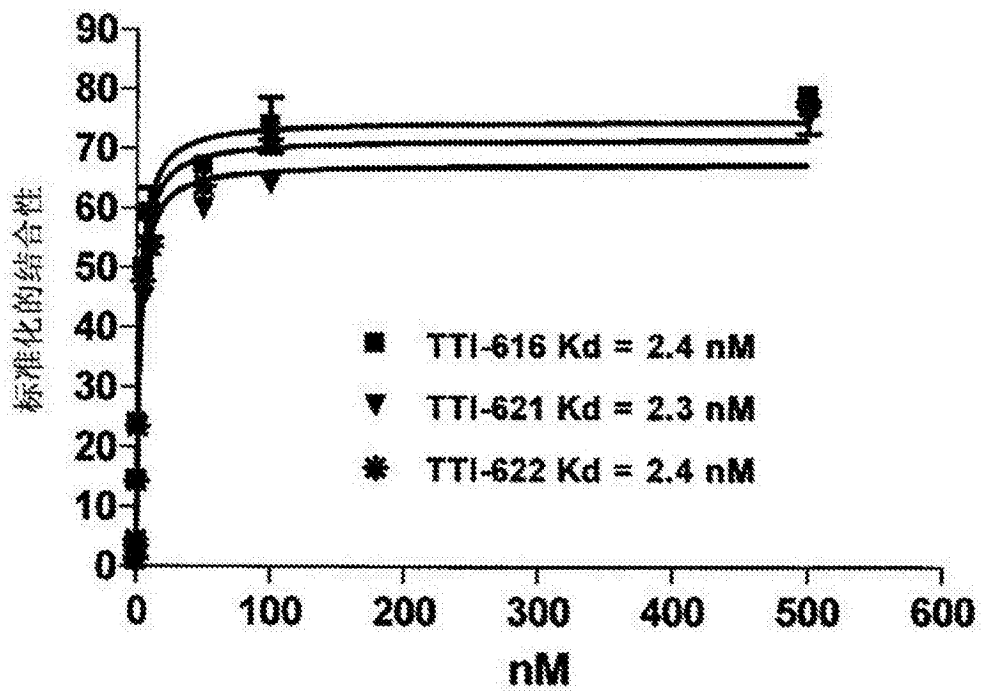


图 2

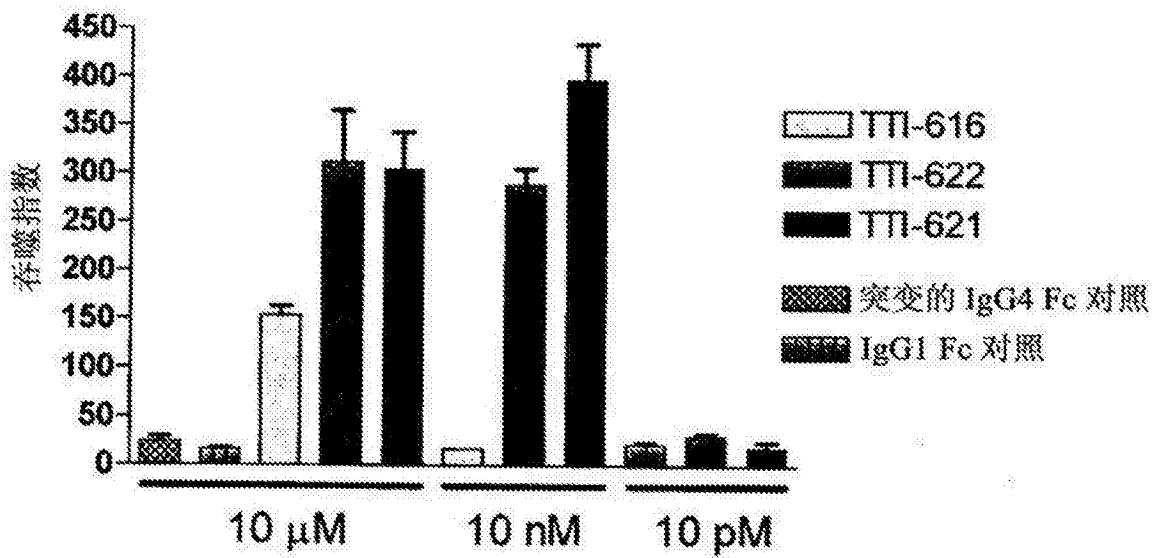


图 3

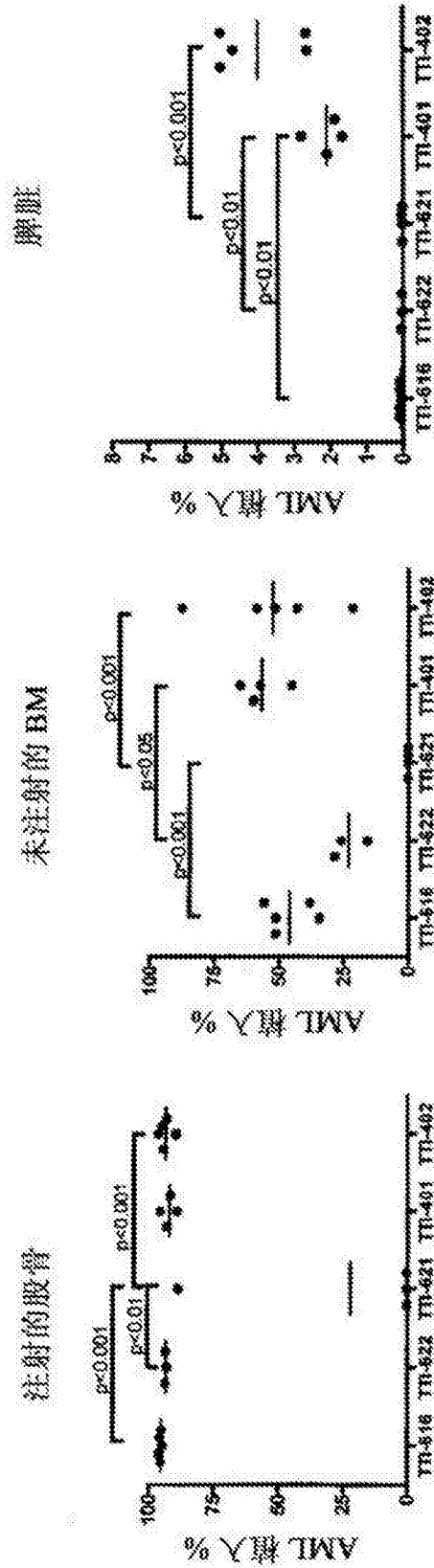
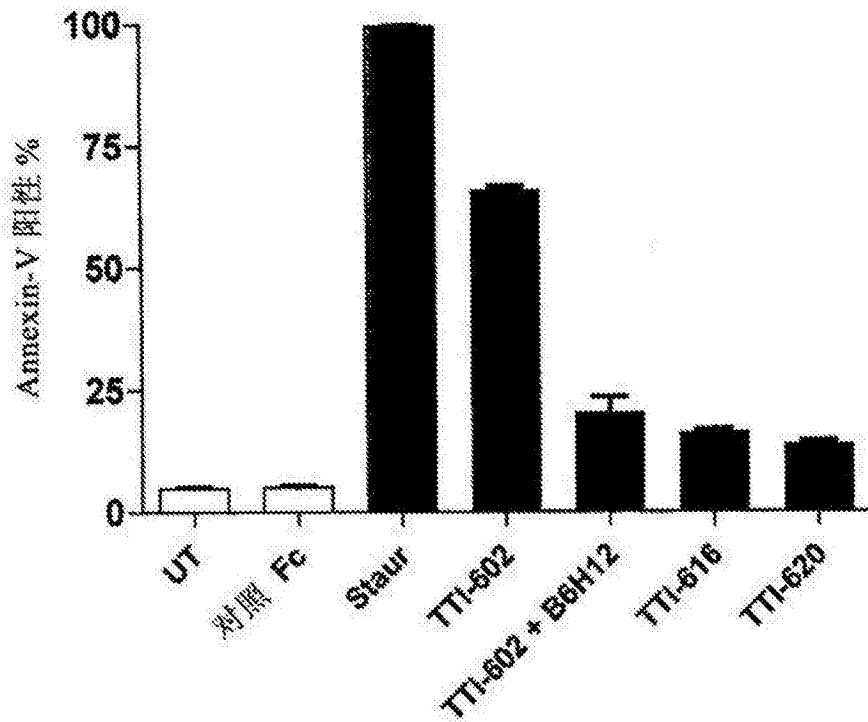


图 4



CD47+ 人 Jurkat T 细胞与 SIRP α Fc 融合蛋白或对照 Fc (3 μ M) 一起孵育, 或不进行处理 (UT), 过夜后以 Annexin-V 和 7-AAD 染色, 并用流式细胞仪分析。包括 1 μ M 的促凋亡试剂十字孢碱 (Staur) 作为阳性对照。含有 TTI-602 的样品用 CD47 阻断抗体 B6H12 预处理 [数据得自 Exp #280]。

图 5

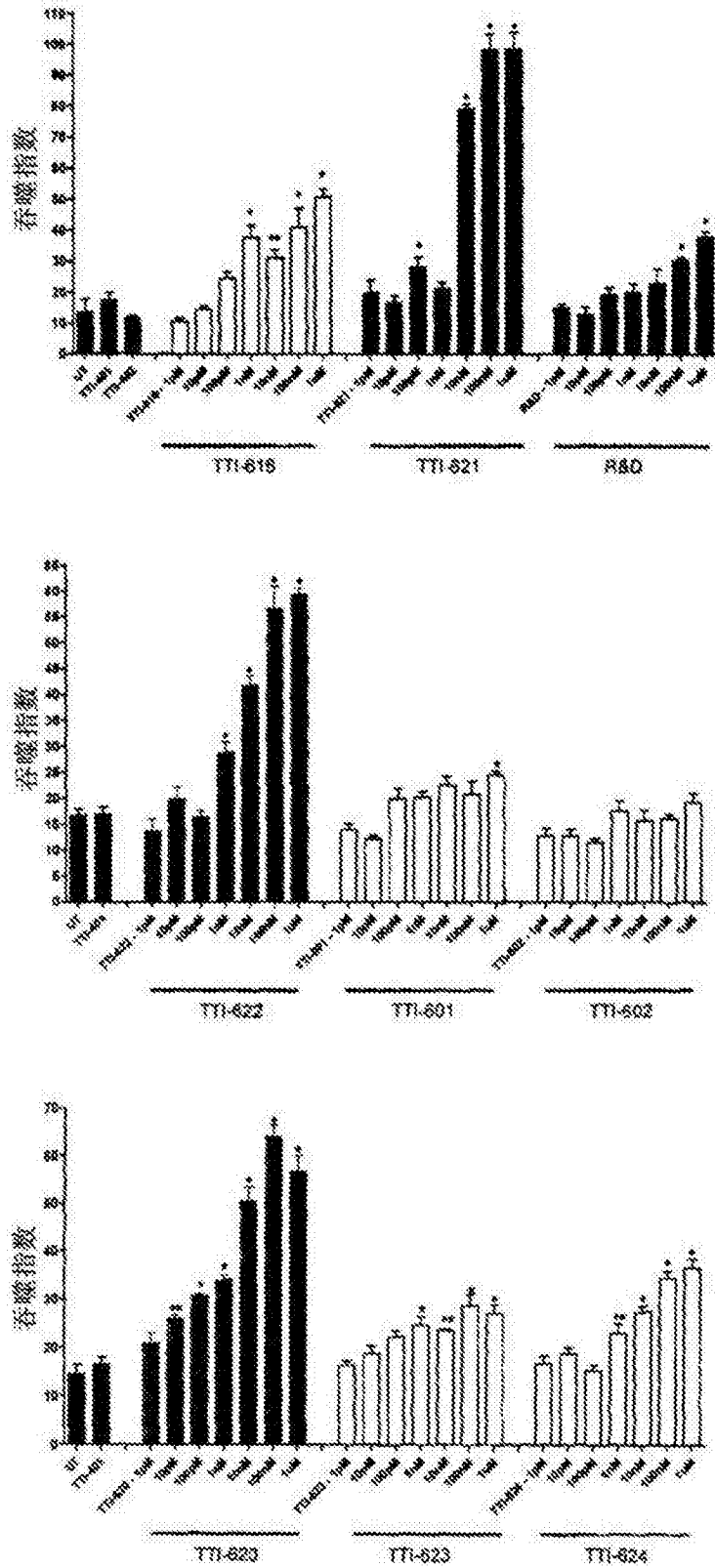


图 6

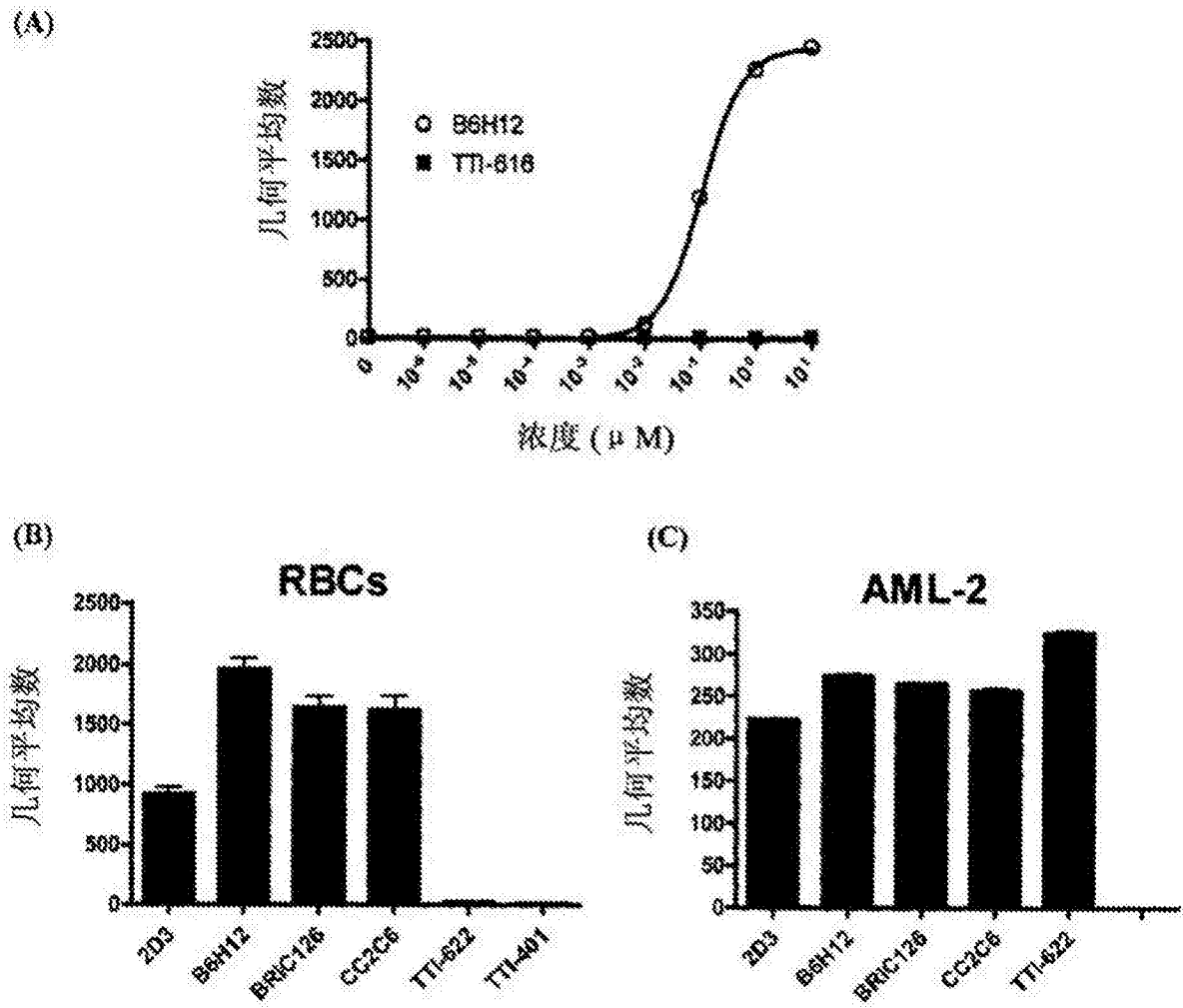


图 7