(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114206912 B
(45)授权公告日 2025.02.11

(21)申请号 202080041810.5

(22)申请日 2020.06.05

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114206912 A

(43)申请公布日 2022.03.18

(30)优先权数据
62/858,871 2019.06.07 US
62/934,395 2019.11.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.12.06

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/036425 2020.06.05

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/247820 EN 2020.12.10

(73)专利权人 ALX肿瘤生物技术公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 万虹 J·庞斯 S·兰多夫 B·J·希姆

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51)Int.Cl.
C07K 14/47(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/80(2006.01)

(56)对比文件
WO 2016187226 A1,2016.11.24
Randall W.Velliquette.“Monoclonal anti-CD47 interference in red cell and platelet testing”.《Transfusion》.2018,第59卷(第1期),摘要、讨论、表3.
McCudden CR等.“interference of Monoclonal Antibody Therapies with Serum Protein Electrophoresis”.《Clin Chem》.2010,第56卷(第12期),第1897-1898页.

审查员 敖愿

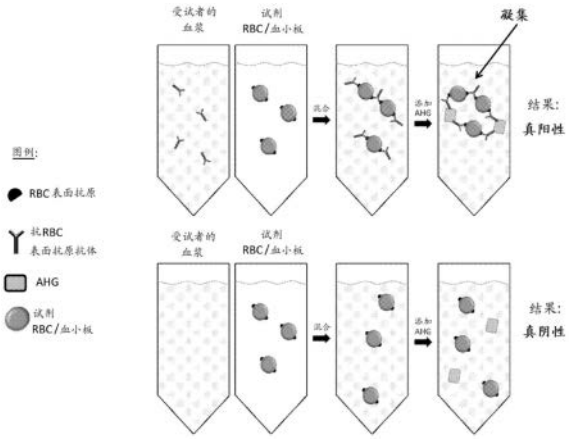
权利要求书1页 说明书31页
序列表11页 附图12页

(54)发明名称

用于在血清学测定中减少结合CD47的药物的干扰的方法和试剂

(57)摘要

提供了在血清学测定中减少和/或防止药物干扰的方法,所述药物包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的部分。



CN 114206912 B

1.一种用于非诊断目的的在使用试剂红细胞(RBC)或试剂血小板的输血前血清学测定中减少药物干扰的方法,所述方法包括:

(a)将抗SIRPα抗体或其抗原结合片段添加至来自已接受干扰所述血清学测定的药物治疗的受试者的血浆样品;以及

(b)在步骤(a)之后使用所述试剂RBC或所述试剂血小板进行所述血浆样品的所述血清学测定,

其中所述药物包含(i)人抗体Fc区和(ii)由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的SIRPα胞外结构域,且

其中所述抗SIRPα抗体或其抗原结合片段包含:

(a)由SEQ ID NO:6组成的重链可变结构域(V_H)和由SEQ ID NO:7组成的轻链可变结构域(V_L);

(b)由SEQ ID NO:21组成的重链可变结构域(V_H)和由SEQ ID NO:22组成的轻链可变结构域(V_L);或

(c)由SEQ ID NO 23组成的重链可变结构域(V_H)和由SEQ ID NO:24组成的轻链可变结构域(V_L)。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述抗SIRPα抗体或其抗原结合片段以相对于所述血浆样品中药物的量摩尔过量的量添加至所述血浆样品。

3.如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述药物的所述人抗体Fc区是人IgG Fc区。

4.如权利要求3所述的方法,其中所述人IgG Fc区是IgG1、IgG2或IgG4 Fc区。

5.如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述血清学测定是ABO/Rh分型测定。

6.如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述血清学测定是立即离心(IS)测定。

7.如权利要求1所述的方法,其中所述血清学测定是使用检测IgG和补体C3的多特异性试剂的直接抗球蛋白(DAT)测定。

8.如权利要求1所述的方法,其中所述血清学测定是使用检测补体C3的单特异性试剂的直接抗球蛋白(DAT)测定。

9.如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述血清学测定是PEG增强的血清学测定。

10.如权利要求7-8中任一项所述的方法,其中所述血清学测定是在所述DAT测定之后进行的洗脱液测试。

用于在血清学测定中减少结合CD47的药物的干扰的方法和试剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年6月7日提交的美国临时申请第62/858,871号和2019年11月12日提交的美国临时申请第62/934,395号的优先权权益,所述申请各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[0003] 关于ASCII文本文件的序列表的提交

[0004] 关于ASCII文本文件的以下提交的内容以引用的方式整体并入本文:序列表的计算机可读形式(CRF)(文件名:757972000940SEQL IST.TXT,记录日期:2020年6月3日,大小:26KB)。

技术领域

[0005] 本发明涉及用于在血清学测定中减少包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的部分的药物的干扰的方法和试剂。

背景技术

[0006] 越来越多的基于抗体的药物被开发作为包括癌症在内的各种疾病的治疗。如果治疗性抗体的靶标也在血细胞如红细胞(RBC)、白细胞(WBC)和/或血小板上表达,则此类治疗可能干扰血型分型和血清学测定。

[0007] 例如,CD47(结合至信号调控蛋白-α(SIRPα)并抑制吞噬作用的一种广泛表达的细胞表面蛋白)(Jaiswal等人,Trends Immunol(2010)31(6):212-219;Brown等人,Trends Cell Biol(2001)11(3):130-135)在包括血液肿瘤和实体瘤在内的多种恶性肿瘤上以高水平表达。CD47表达升高也与侵袭性疾病相关(Willingham等人,Proc Natl Acad Sci USA(2012)109(17):6662-6667)。已经开发了靶向CD47的几种癌症疗法(例如包含抗体Fc区的抗体和融合蛋白)以阻断SIRPα-CD47相互作用,从而允许巨噬细胞发挥其吞噬功能以清除肿瘤细胞。

[0008] 重要的是,由于CD47也在表面血细胞如红细胞(RBC)和血小板上表达(Oldenborg等人,Science(2000)288(5473):2051-2054),所以包含靶向CD47的抗体Fc区的药物可能干扰血型分型和血清学测试。此外,由于接受CD47靶向药物(例如用于治疗癌症)的患者通常需要输血来治疗同时发生的贫血和/或血小板减少症,因此抗CD47药物对血清学和血型分型测定的干扰是重要的患者安全性问题。因此,本领域需要开发方法和试剂以减少包含抗体Fc区的CD47靶向药物对血清学测定的干扰。

发明内容

[0009] 提供了一种在使用试剂红细胞(RBC)或试剂血小板的血清学测定中减少药物干扰的方法,所述方法包括:(a)将药物中和剂添加至来自已接受药物治疗的受试者的血浆样品,所述药物中和剂结合至所述药物并阻止所述药物结合所述试剂RBC或所述试剂血小板;

以及(b)在步骤(a)之后使用所述试剂RBC或所述试剂血小板进行所述血浆样品的血清学测定,其中所述药物包含(i)人抗体Fc区或其变体和(ii)结合至人CD47的部分。

[0010] 在一些实施方案中,所述药物的结合至人CD47的部分包含野生型SIRPα、SIRPα变体或所述野生型SIRPα或所述SIRPα变体的片段。在一些实施方案中,所述药物的结合至人CD47的部分包含SIRPα变体,并且其中所述SIRPα变体相对于野生型SIRPα包含一个或多个氨基酸取代、插入、缺失、N-末端延伸和/或C-末端延伸。在一些实施方案中,所述药物的结合至人CD47的部分包含SIRPα变体的片段,并且其中所述片段包含所述SIRPα变体的胞外结构域。在一些实施方案中,所述药物中和剂是能够结合野生型SIRPα、SIRPα变体或所述野生型SIRPα或所述SIRPα变体的片段的抗SIRPα抗体。

[0011] 在一些实施方案中,所述药物的结合至人CD47的部分包含野生型SIRPγ、SIRPγ变体或所述野生型SIRPγ或所述SIRPγ变体的片段。在一些实施方案中,所述药物的结合至人CD47的部分包含SIRPγ变体,并且其中所述SIRPγ变体相对于野生型SIRPγ包含一个或多个氨基酸取代、插入、缺失、N-末端延伸、C-末端延伸或前述的任何组合。在一些实施方案中,所述药物的结合至人CD47的部分包含SIRPγ变体的片段,并且其中所述片段包含所述SIRPγ变体的胞外结构域。在一些实施方案中,所述药物中和剂是能够结合野生型SIRPγ、SIRPγ变体或所述野生型SIRPγ或所述SIRPγ变体的片段的抗SIRPγ抗体。

[0012] 在一些实施方案中,所述药物的结合至人CD47的部分包含SIRPβ变体或所述SIRPβ变体的片段。在一些实施方案中,所述药物的结合至人CD47的部分包含SIRPβ变体,并且其中所述SIRPβ变体相对于野生型SIRPγ包含一个或多个氨基酸取代、插入、缺失、N-末端延伸、C-末端延伸或前述的任何组合。在一些实施方案中,所述药物的结合至人CD47的部分包含SIRPβ变体的片段,并且其中所述片段包含所述SIRPβ变体的胞外结构域。在一些实施方案中,所述药物中和剂是能够结合SIRPγ变体或所述SIRPβ变体的片段的抗SIRPβ抗体。

[0013] 在一些实施方案中,所述药物是抗CD47抗体。在一些实施方案中,所述药物中和剂是结合抗CD47抗体的抗原结合部分的抗独特型抗体。

[0014] 在一些实施方案中,所述药物中和剂是能够结合所述药物的结合至人CD47的部分的CD47多肽。在一些实施方案中,所述CD47多肽是单体、二聚体或低聚体。在一些实施方案中,所述CD47多肽是人CD47、小鼠CD47、大鼠CD47、恒河猴CD47或食蟹猴CD47。在一些实施方案中,所述CD47多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述CD47多肽是CD47变体,所述CD47变体相对于野生型CD47包含一个或多个氨基酸取代、插入、缺失、N-末端延伸或C-末端延伸。在一些实施方案中,所述CD47变体包含SEQ ID NO:2-5中的任一个中所列的氨基酸序列。

[0015] 在一些实施方案中,所述药物中和剂对所述药物的亲和力高于所述药物对人CD47的亲和力。在一些实施方案中,所述药物中和剂以相对于血浆样品中药物的量摩尔过量的量添加至所述血浆样品。

[0016] 还提供了一种在含有红细胞(RBC)和/或血小板的血液样品的血清学测定中减少药物干扰的方法,所述方法包括:(a)将抗SIRPα抗体添加至来自已接受药物治疗的受试者的血液样品;和(b)在步骤(a)之后进行所述血液样品的血清学测定,其中所述药物包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的野生型SIRPα或其变体的胞外结构域,并且其中所述抗SIRPα抗体片段取代与所述血液样品中的RBC表面上的CD47结合的药物。在一些实施方案

中,所述抗SIRPα抗体包含(a)包含SEQ ID NO:6的重链可变结构域(V_H)和包含SEQ ID NO:7的轻链可变结构域(V_L);(b)包含SEQ ID NO:21的重链可变结构域(V_H)和包含SEQ ID NO:22的轻链可变结构域(V_L);或(c)包含SEQ ID NO:23的重链可变结构域(V_H)和包含SEQ ID NO:24的轻链可变结构域(V_L)。在一些实施方案中,所述药物包含野生型SIRPα的细胞外结构域的变体。在一些实施方案中,所述变体相对于所述野生型SIRPα的胞外结构域包含一个或多个氨基酸取代、插入、缺失、N-末端延伸和/或C-末端延伸。

[0017] 在一些实施方案中,所述抗SIRPα抗体以相对于血液样品中药物的量摩尔过量的量添加至所述血液样品。

[0018] 还提供了一种在使用试剂红细胞(RBC)、试剂血小板或其组合的血清学测定中减少药物干扰的方法,所述方法包括:(a)将细胞结合剂添加至所述试剂红细胞(RBC)、试剂血小板或其组合,其中所述细胞结合剂结合至人CD47并且不包含抗体Fc区;(b)使用步骤(a)的所述试剂红细胞(RBC)、试剂血小板或其组合进行血浆样品的血清学测定,其中所述血浆样品来自已接受药物治疗的受试者,并且其中所述药物包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的部分。

[0019] 此外,提供了一种在使用试剂红细胞(RBC)、试剂血小板或其组合的血清学测定中减少药物干扰的方法,所述方法包括:(a)将细胞结合剂添加至来自已接受药物治疗的受试者的血浆样品,其中所述细胞结合剂至人CD47并且不包含抗体Fc区;和(b)在步骤(a)之后使用所述试剂红细胞(RBC)、试剂血小板或其组合进行所述血浆样品的血清学测定,其中所述药物包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的部分。

[0020] 还提供了一种在含有试剂红细胞(RBC)、试剂血小板或其组合的血液样品的血清学测定中减少药物干扰的方法,所述方法包括:(a)将结合至人CD47并且不包含的抗体Fc区的细胞结合剂添加至来自已接受药物治疗的受试者的血液样品;和(b)在步骤(a)之后进行所述血液样品的血清学测定,其中所述药物包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的部分。

[0021] 在一些实施方案中,所述细胞结合剂包含能够结合人CD47的野生型SIRPα、野生型SIRPγ、或者所述野生型SIRPα或所述野生型SIRPγ的片段。在一些实施方案中,所述细胞结合剂包含能够结合人CD47或其CD47结合片段的SIRPα变体。在一些实施方案中,所述SIRPα变体相对于野生型SIRPα包含一个或多个氨基酸取代、插入、缺失、N-末端延伸、C-末端延伸或前述的任何组合。在一些实施方案中,所述细胞结合剂包含能够结合人CD47或其CD47结合片段的SIRPβ变体。在一些实施方案中,所述SIRPβ变体相对于野生型SIRPβ包含一个或多个氨基酸取代、插入、缺失、N-末端延伸、C-末端延伸或前述的任何组合。在一些实施方案中,所述细胞结合剂包含能够结合人CD47或其CD47结合片段的SIRPγ变体。在一些实施方案中,所述SIRPγ变体相对于野生型SIRPγ包含一个或多个氨基酸取代、插入、缺失、N-末端延伸、C-末端延伸或前述的任何组合。在一些实施方案中,所述变体包含SEQ ID NO:8-16中任一个的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方案中,所述细胞结合剂包含抗CD47抗体的抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗原结合片段是Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')2、Fv、scFv或双特异抗体。

[0023] 在一些实施方案中,所述细胞结合剂对人CD47的亲和力高于所述药物对人CD47的亲和力。在一些实施方案中,所述细胞结合剂以相对于血浆样品中药物的量摩尔过量的量添加至所述试剂RBC和/或试剂血小板。在一些实施方案中,所述细胞结合剂以相对于血浆

样品中药物的量摩尔过量的量添加至所述血浆样品。在一些实施方案中,所述SIRPα剂以相对于所述血液样品中药物的量摩尔过量的量添加至所述血液样品。

[0024] 在一些实施方案中,所述药物的抗体Fc区是人IgG Fc区或其变体。在一些实施方案中,所述人IgG Fc区是IgG1、IgG2或IgG4 Fc区,或IgG1、IgG2或IgG4 Fc区的变体。

[0025] 在一些实施方案中,所述血清学测定是ABO/Rh分型测定。在一些实施方案中,所述血清学测定是立即离心(IS)测定。在一些实施方案中,所述血清学测定是使用检测IgG和补体C3的多特异性试剂的直接抗球蛋白(DAT)测定。在一些实施方案中,所述血清学测定是使用检测补体C3的单特异性试剂的直接抗球蛋白(DAT)测定。在一些实施方案中,所述血清学测定是PEG增强的血清学测定。在一些实施方案中,所述血清学测定是在DAT测定之后进行的洗脱液测试。

[0026] 还提供了包含SEQ ID NO:11-20中任一个的多肽。

[0027] 本文引用的所有参考文献,包括专利申请、专利公布和UniProtKB/Swiss-Prot登录号,均以引用的方式整体并入本文,其程度如同每个单独参考文献具体地且单独地被指明以引用的方式并入。

附图说明

[0028] 图1A示出血清学测定,其中将从受试者获得的血浆样品与试剂红细胞(即已知表达特定细胞表面抗原或细胞表面抗原组的红细胞(“RBC”))混合以检测所述血浆样品中是否存在结合所述RBC表面抗原的抗体。可替代地,可使用试剂血小板(即已知表达特定细胞表面抗原或细胞表面抗原组的血小板)代替试剂RBC进行此类血清学测定。

[0029] 图1B示出血浆样品中包含(i)抗体Fc区和(ii)结合人CD47的部分的药物的存在如何干扰图1A的测定。

[0030] 图1C示出血清学测定,其中自受试者获得的血液样品与试剂血浆/抗血清(即含有针对已知RBC表面抗原或已知血小板表面抗原的抗体的血浆或抗血清)混合,以便检测所述受试者的RBC和/或血小板上是否存在所述抗原。

[0031] 图1D示出血液样品中包含(i)抗体Fc区和(ii)结合人CD47的部分的药物的存在如何干扰图1C的测定。

[0032] 图2示出在血清学测定中减少干扰的方法,所述方法包括将药物中和剂添加至从已用药物治疗的受试者获得的血浆样品。简言之,所述药物中和剂结合所述血浆样品中的药物,使得几乎没有或没有游离药物可用于结合试剂RBC或试剂血小板表面上的CD47。

[0033] 图3A示出在血清学测定中减少干扰的方法,所述方法包括将抗SIRPα抗体添加至来自已接受药物治疗的受试者的血浆样品。所述抗SIRPα抗体结合所述血浆样品中的药物,使得几乎没有或没有游离药物可用于结合试剂RBC或试剂血小板表面上的CD47。

[0034] 图3B示出在血清学测定中减少干扰的方法,所述方法包括将抗SIRPα抗体添加至来自已接受药物治疗的受试者的血液样品。所述抗SIRPα抗体取代与所述受试者的RBC和/或血小板表面上的CD47结合的药物,并且使所述患者的血液样品中药物结合的RBC和/或药物结合的血小板的量最小化(或消除所述样品中药物结合的RBC和/或药物结合的血小板)。

[0035] 图4A示出在血清学测定中减少干扰的方法,所述方法包括向试剂RBC或试剂血小板添加细胞结合剂。简言之,结合人CD47且不包含抗体Fc区的细胞结合剂结合至所述试剂

RBC或试剂血小板表面上的CD47。细胞结合剂对试剂RBC(或试剂血小板)的结合阻止药物结合试剂RBC(或试剂血小板)。

[0036] 图4B示出在血清学测定中减少干扰的方法,所述方法包括将细胞结合剂添加至来自已接受药物治疗的受试者的血浆。简言之,所述细胞结合剂与所述药物竞争结合至试剂RBC或试剂血小板表面上表达的CD47,并且使所述测定中药物结合的试剂RBC或药物结合的试剂血小板的量最小化(或消除所述测定中药物结合的试剂RBC和/或药物结合的试剂血小板)。

[0037] 图4C示出在血清学测定中减少干扰的方法,所述方法包括将细胞结合剂添加至来自已接受药物治疗的受试者的血液样品。简言之,所述细胞结合剂与所述药物竞争结合至所述受试者的RBC和/或血小板表面上表达的CD47,并且使所述测定中药物结合的RBC和/或药物结合的血小板的量最小化(或消除)。

[0038] 图5A示出为确定抗体A(阻断SIRPα与CD47之间的相互作用的示例性抗SIRPα抗体)是否减轻与红细胞表面上的CD47结合的药物A的干扰而进行的血细胞凝集实验的结果。

[0039] 图5B示出为确定抗体A是否取代与DLD-1细胞表面上的CD47结合的药物A而进行的实验的结果。

具体实施方式

[0040] 减轻输血前血清学测定中的干扰的方法

[0041] CD47是与血小板反应蛋白-1(TSP-1)以及免疫细胞上的几种分子(包括信号调控蛋白α(SIRPα))相互作用的跨膜蛋白。与CD47结合后,SIRPα起始信号级联,所述信号级联抑制吞噬作用并防止免疫系统对健康细胞的吞噬去除。然而,许多癌症过度表达CD47并逃避吞噬清除。因此,靶向CD47的药物(如包含抗体Fc区和结合CD47的部分的抗CD47抗体和融合蛋白)具有重要的治疗意义。CD47也在人红细胞(RBC)和血小板的表面上表达。因此,在向受试者施用包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的部分的药物后,存在于受试者血浆中或与受试者的RBC和/或血小板结合的药物可能导致常规输血前血清学测定中的干扰。

[0042] 例如,图1A示出血清学测定,其中将从受试者获得的血浆样品与试剂RBC或“参考RBC”(即已知表达特定细胞表面抗原或细胞表面抗原组的RBC)或试剂血小板或“参考血小板”(即已知表达特定细胞表面抗原或细胞表面抗原组的血小板)混合以检测所述血浆样品中是否存在结合已知在所述试剂RBC或试剂血小板上表达的细胞表面抗原的抗体。在血浆样品与试剂RBC(或试剂血小板)混合后,添加抗人球蛋白(AHG),并且如果血浆样品含有结合RBC表面抗原(或血小板表面抗原)的抗体,则发生试剂RBC(或试剂血小板)的凝集(例如,凝结)。然而,包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至受试者血浆中的人CD47的部分的药物的存在可能干扰测定并产生假阳性结果。如图1B所示,在受试者的血浆与试剂RBC(或试剂血小板)混合后,所述药物可结合试剂RBC(或试剂血小板)表面上表达的CD47。将AHG添加至混合物中导致试剂RBC(或试剂血小板)的凝集。

[0043] 图1C示出血清学测定,其中来自受试者的血液样品与试剂血浆/抗血清(即含有针对已知RBC表面抗原或已知血小板表面抗原的抗体的血浆或抗血清)混合,以便检测所述受试者的RBC和/或血小板上是否存在所述抗原。在将试剂血浆/抗血清和来自受试者的样品混合后,如果由所述试剂血浆/抗血清中的抗体识别的抗原在所述受试者的RBC和/或血小

板上表达,则添加AHG将导致凝集。在包含受试者的RBC和/或血小板的样品中,包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的部分的药物的存在可能干扰所述测定并产生假阳性结果。如图1D所示,在将AHG添加至包含受试者的血液样品和试剂血浆/抗血清的混合物之后,与受试者的RBC或血小板上的CD47结合的药物将引起凝集。

[0044] 下文描述的方法减少(并且,在一些实施方案中,消除)由药物引起的干扰,即,如图1B和1D所示。

[0045] A.使用药物中和剂减轻输血前血清学测定中的干扰的方法

[0046] 在一些实施方案中,所述方法包括(a)将结合药物(即,结合至药物的包含与人CD47结合的部分的部分)的药物中和剂添加至来自已接受药物治疗的受试者的血浆样品,和(b)在步骤(a)后使用试剂RBC(即已知表达特定细胞表面抗原或细胞表面抗原组的RBC)和/或试剂血小板(即,已知表达特定细胞表面抗原或细胞表面抗原组的血小板)进行所述血浆样品的血清学测定,其中所述药物包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的部分。此类实施方案在图2中概括地描绘。如图2所示,药物中和剂结合至受试者的血浆样品中的药物(例如,结合至药物的与人CD47结合的部分)并阻止药物结合试剂RBC和/或试剂血小板。几乎没有或没有游离药物可用于结合至试剂RBC和/或试剂血小板表面上的CD47。药物与试剂RBC和/或试剂血小板结合将导致的干扰(如图1B所示)被最小化(或者,在一些实施方案中,被消除),从而防止血清学测定中的假阳性结果。在一些实施方案中,在进行血清学测定之前,还将药物中和剂添加至试剂RBC和/或试剂血小板。

[0047] 在一些实施方案中,药物中和剂是能够结合药物并阻止药物结合试剂RBC和/或试剂血小板的任何剂。在一些实施方案中,在进行血清学测定之前,将药物中和剂添加至试剂RBC和/或试剂血小板(例如,仅添加至试剂RBC和/或试剂血小板)。

[0048] 在一些实施方案中,所述方法在溶液中进行,例如,其中药物中和剂是可溶性的。在一些实施方案中,在进行所述方法之前,通过吸附至基质或表面、共价偶联或非共价偶联将药物中和剂固定至固相。在一些实施方案中,药物中和剂能够在固定至固相后结合药物。用于固定的固相或表面可以是基本上不溶于水且可用于免疫测定中的任何惰性支持物或载体,包括呈例如表面、颗粒、多孔基质、纤维素聚合物海绵(ImmunoCAP®,Phadia)等形式的支持物。通常使用的支持物的实例包括由聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯等制成的小片、Sephadex、聚氯乙烯、塑料珠、微颗粒、测定板或试管。在一些实施方案中,将药物中和剂涂覆在微量滴定板上,如可用于同时分析多个样品的多孔微量滴定板。

[0049] 在一些实施方案中,药物包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的SIRPα变体、SIRPβ变体或SIRPγ变体,并且药物中和剂包含CD47多肽,所述CD47多肽能够结合至所述SIRPα变体、SIRPβ变体或SIRPγ变体。在一些实施方案中,所述药物包含抗CD47抗体(例如,抗人CD47抗体),并且药物中和剂包含能够结合至抗人CD47抗体的CD47多肽。在一些实施方案中,CD47多肽包含野生型CD47的胞外结构域(“WT CD47-ECD”),或WT CD47-ECD的能够结合药物并阻止药物结合试剂RBC和/或试剂血小板的部分。在一些实施方案中,CD47多肽包含CD47单体、CD47二聚体或CD47低聚体。在一些实施方案中,CD47低聚体是(例如,体外)自发形成的低聚体。在一些实施方案中,CD47低聚体是工程化的低聚体,例如,通过肽键或接头连接的CD47多肽的连接链,已经工程化以包含促进多聚化的结构域的CD47,或已经工程化以包含促进CD47与固体支持物(例如珠、玻璃边等)结合的标签的CD47。在一些实施方案

中,CD47多肽包含融合多肽,例如包含CD47(或其片段)的融合多肽。在一些实施方案中,融合多肽包含CD47(或其片段)和抗体Fc区。在一些实施方案中,CD47多肽包含人CD47、小鼠CD47、大鼠CD47、恒河猴CD47、食蟹猴CD47或能够结合至药物并阻止药物结合试剂RBC和/或试剂血小板的任何来源的CD47。在一些实施方案中,CD47多肽包含任何来源的人CD47、小鼠CD47、大鼠CD47、恒河猴CD47、食蟹猴CD47或CD47的片段,条件是所述片段能够结合至药物并阻止药物结合试剂RBC和/或试剂血小板。在一些实施方案中,CD47多肽是野生型CD47的变体(或其片段,例如WT CD47-ECD的变体),条件是所述变体能够结合至药物。在一些实施方案中,所述变体(或其片段)相对于野生型CD47(例如,野生型人、大鼠、小鼠、恒河猴或食蟹猴CD47)包含一个或多个氨基酸取代、缺失、插入、N-末端添加和/或C-末端添加。在一些实施方案中,所述变体(即,“CD47变体”)中存在的一个或多个氨基酸取代、缺失、插入、N-末端添加和/或C-末端添加相对于野生型CD47(例如,野生型人、大鼠、小鼠、恒河猴或食蟹猴CD47)改变CD47变体的糖基化模式。在一些实施方案中,CD47变体中存在的一个或多个氨基酸取代、缺失、插入、N-末端添加和/或C-末端添加相对于野生型CD47(例如,野生型人、大鼠、小鼠、恒河猴或食蟹猴CD47)增加CD47变体对药物的亲和力。

[0050] 在一些实施方案中,CD47变体包含以下SEQ ID NO:1-5中任一个的氨基酸序列:

QLLFNKTKSV EFTFSNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SQLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE LTREGETIIE LKYRVVS (SEQ ID NO: 1)

WQLPLLFNKT KSVEFTFGND TVVIPCFVTN MEAQNTTEVY VKWKFKGRDI YTFDGDKNKS TVPTDFSSAK IEVSQLLKGD ASLKMDKSDA VSHTGNYTCE VTELTREGET IIELKYRVVS (SEQ ID NO: 2)

[0051] WQPPLLFNKT KSVEFTFGND TVVIPCFVTN MEAQNTTEVY VKWKFKGRDI YTFDGQANKS TVPTDFSSAK IEVSQLLKGD ASLKMDKSDA VSHTGNYTCE VTELTREGET IIELKYRVVS (SEQ ID NO: 3)

WQPPLLFNKT KSVEFTFCND TVVIPCFVTN MEAQNTTEVY VKWKFKGRDI YTFDGQANKS TVPTDFSSAK IEVSQLLKGD ASLKMDKSDA VSHTGNYTCE VTELTREGET IIELKYRVVS (SEQ ID NO: 4)

WQPPLLFNKT KSVEFTCGND TVVIPCFVTN MEAQNTTEVY VKWKFKGRDI YTFDGQANKS TVPTDFSSAK IEVSQLLKGD ASLKMDKSDA VSHTGNYTCE VTELTREGET IIELKYRVVS (SEQ ID NO: 5)

[0052] 关于可用作本文所述的方法中的药物中和剂的示例性CD47变体的另外细节提供于Ho等人(2015)“‘Velcro’Engineering of High Affinity CD47 Ectodomain as Signal Regulatory Protein a(SIRPα)Antagonists That Enhance Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis.”J Biol Chem.290:12650-12663和WO 2016/179399中,其内容以引用的方式整体并入本文。

[0053] 在一些实施方案中,所述药物包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的SIRPα变体,并且药物中和剂是抗SIRPα抗体(或其抗原结合片段)。在一些实施方案中,所述方法包括(a)将抗SIRPα抗体(或其抗原结合片段)添加至来自接受药物治疗的受试者的血浆样品,和(b)在步骤(a)后使用试剂RBC和/或试剂血小板进行所述血浆样品的血清学测定。如图3A所示,抗SIRPα抗体(或其抗原结合片段)结合受试者的血浆中存在的游离药物并减少(或者在一些实施方案中,消除)试剂RBC和/或试剂血小板表面上可用于CD47的游离药物的量。药

物与试剂RBC和/或试剂血小板结合将导致的干扰(如图1B所示)被最小化(或者,在一些实施方案中,被消除),从而防止血清学测定中的假阳性结果。在一些实施方案中,在进行血清学测定之前将抗SIRPα抗体(或其抗原结合片段)添加至试剂RBC和/或试剂血小板以及受试者的血浆。由于SIRPα、SIRPβ和SIRPγ的胞外结构域高度同源,所以与SIRPα和/或抗SIRPγ抗体交叉反应的抗SIRPβ抗体可与SIRPα交叉反应。因此,在一些实施方案中,在该方法中使用与SIRPα交叉反应的抗SIRPβ抗体和/或抗SIRPγ抗体。

[0054] 在一些实施方案中,所述方法包括(a)将抗SIRPα抗体(或其抗原结合片段)添加至来自接受药物治疗的受试者的血液样品,和(b)在步骤(a)后使用试剂血浆和/或抗血清进行所述血液样品的血清学测定。如图3B中总体描绘的,抗SIRPα抗体(或其片段)取代与受试者的RBC和/或血小板表面上的CD47结合的药物,从而减少(并且在一些实施方案中消除)由药物引起的干扰,例如,如图1D所示。在一些实施方案中,在进行血清学测定之前,将抗SIRPα抗体(或其片段)添加至试剂血浆/抗血清以及受试者的RBC和/或血小板。由于SIRPα、SIRPβ和SIRPγ的胞外结构域高度同源,所以抗SIRPβ抗体和/或抗SIRPγ抗体可与SIRPα交叉反应。因此,在一些实施方案中,在所述方法中使用与SIRPα交叉反应的抗SIRPβ抗体和/或与SIRPα交叉反应的抗SIRPγ抗体。在一些实施方案中,抗SIRPα抗体(或与SIRPα交叉反应的抗SIRPβ抗体或与SIRPα交叉反应的抗SIRPγ抗体)包含不结合至用于血清学测定中的抗人球蛋白试剂(AHG)。在本文其他地方提供了关于血清学测定和在此类测定中使用的试剂的进一步细节。

[0055] 在一些实施方案中,抗SIRPα抗体(例如,如与SIRPα交叉反应的抗SIRPβ抗体和/或与SIRPα交叉反应的抗SIRPγ抗体)是全长抗体。在一些实施方案中,抗SIRPα抗体的抗原结合片段是例如但不限于Fab、Fab'、F(ab')$_2$、Fab'-SH、Fv、双特异抗体、单臂抗体、scFv、scFv-Fc、单结构域抗体、单重链抗体等。在一些实施方案中,抗SIRPα抗体(或其抗原结合片段)是结合至药物(即,药物的包含SIRPα变体的部分)的ADA(抗药物抗体)或NAb(中和抗体)。在一些实施方案中,抗SIRPα抗体(或其抗原结合片段)包含重链可变结构域(VH),所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;和轻链可变结构域(VL),所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗SIRPα抗体(或其抗原结合片段)包含重链可变结构域(VH),所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;和轻链可变结构域(VL),所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗SIRPα抗体(或其抗原结合片段)包含重链可变结构域(VH),所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列;和轻链可变结构域(VL),所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

DVQLVESGGG VVRPGESLRL SCAASGFSFS SYAMNWVRQA PGEGLEWVSR INSGGGGTDY AESVKGRFTI SRDNSENTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKQY DWNSFFDYWG LGALVTVSS (SEQ ID NO: 6)

ETVLTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQTVG SKLAWHQQKP GQAPRLLIYD ATNRATGISD RFSGSGSGTD FTLTISSLQT EDSAVYYCQQ YYYWPPYRFG GGTKVEIK (SEQ ID NO: 7)

DVQLVESGGG VVRPGESLRL SCEASGFTFS SNAMSWVRQA PGKGLEWVAG ISSGSDTYYG DSVKGRLTIS RDNSKNILYL QMNSLTAEDT AVYYCARETW NHLFDYWGQG TLVTVSS

[0056] (SEQ ID NO: 21)

SYELTQPPSV SVSPGQTARI TCSGGSYSSY YYAWYQQKPG QAPVTLIYSD DKRPSNIPER FSGSSSGTTV TLTISGVQAE DEADYYCGGY DQSSYTNPFG GGTKLTVL (SEQ ID NO: 22)

DVQLVESGGG VVRPGESLRL SCAASGFTFS SYDMNWVRQA PGEGLEWVSL ISGSGEIIYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKEN NRYRFFDDWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 23)

ETVLTQSPGT LTLSPGERAT LTCRASQSVY TYLAWYQEKP GQAPRLLIYG ASSRATGIPD RFSGSGSGTE FTLTISSLQS EDFAVYYCQQ YYDRPPLTFG GGTKVEIK (SEQ ID NO: 24)

[0057] 可用作本文所述的方法中的药物中和剂的其他示例性抗SIRP抗体(例如,抗SIRPα抗体、抗SIRPβ抗体和/或与SIRPα交叉反应的抗SIRPγ抗体)是本领域中已知的。关于此类抗体的进一步细节提供于例如WO 2018/057669;US-2018-0105600-A1;US20180312587;WO2018107058;WO2019023347;US20180037652;WO2018210795;WO2017178653;WO2018149938;WO2017068164;和WO2016063233中,其内容以引用的方式整体并入本文。

[0058] 在一些实施方案中,所述药物包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的SIRPβ变体,并且药物中和剂是抗SIRPβ抗体(或其抗原结合片段)。在一些实施方案中,所述方法包括(a)将抗SIRPβ抗体(或其抗原结合片段)添加至来自接受药物治疗的受试者的血浆样品,和(b)在步骤(a)后使用试剂RBC和/或试剂血小板进行所述血浆样品的血清学测定。在一些实施方案中,在进行血清学测定之前将抗SIRPβ抗体(或其抗原结合片段)添加至试剂RBC和/或试剂血小板以及受试者的血浆。在一些实施方案中,抗SIRPβ抗体是全长抗体。在一些实施方案中,抗SIRPβ抗体的抗原结合片段是例如但不限于Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fab'-SH、Fv、双特异抗体、单臂抗体、scFv、scFv-Fc、单结构域抗体、单重链抗体等。由于SIRPα、SIRPβ和SIRPγ的胞外结构域高度同源,所以抗SIRPα抗体和/或抗SIRPγ抗体可与SIRPβ交叉反应。因此,在一些实施方案中,在所述方法中使用与SIRPβ交叉反应的抗SIRPα抗体和/或与SIRPβ交叉反应的抗SIRPγ抗体。

[0059] 在一些实施方案中,所述药物包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的SIRPγ变体,并且药物中和剂是抗SIRPγ抗体(或其抗原结合片段)。在一些实施方案中,所述方法包括(a)将抗SIRPγ抗体(或其抗原结合片段)添加至来自接受药物治疗的受试者的血浆样品,和(b)在步骤(a)后使用试剂RBC和/或试剂血小板进行所述血浆样品的血清学测定。在一些实施方案中,在进行血清学测定之前将抗SIRPγ抗体(或其抗原结合片段)添加至试剂RBC和/或试剂血小板以及受试者的血浆。在一些实施方案中,抗SIRPγ抗体是全长抗体。在一些实施方案中,抗SIRPγ抗体的抗原结合片段是例如但不限于Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fab'-SH、Fv、双特异抗体、单臂抗体、scFv、scFv-Fc、单结构域抗体、单重链抗体等。由于SIRPα、SIRPβ和SIRPγ的胞外结构域高度同源,所以抗SIRPβ抗体和/或抗SIRPα抗体可与SIRPγ交

叉反应。因此,在一些实施方案中,在所述方法中使用与SIRPγ交叉反应的抗SIRPα抗体和/或与SIRPγ交叉反应的抗SIRPβ抗体。

[0060] 在一些实施方案中,所述药物包含抗CD47抗体,并且药物中和剂是结合抗CD47抗体的抗原结合部分的抗独特型抗体(或其抗原结合片段)。在一些实施方案中,所述方法包括(a)将抗独特型抗体(或其抗原结合片段)添加至来自接受抗CD47抗体治疗的受试者的血浆样品,和(b)在步骤(a)后使用试剂RBC和/或试剂血小板进行所述血浆样品的血清学测定。在一些实施方案中,在进行血清学测定之前将抗独特型抗体(或其抗原结合片段)添加至试剂RBC和/或试剂血小板以及受试者的血浆。在一些实施方案中,所述抗独特型抗体是全长抗体。在一些实施方案中,所述抗独特型抗体的抗原结合片段是例如但不限于Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fab'-SH、Fv、双特异抗体、单臂抗体、scFv、scFv-Fc、单结构域抗体、单重链抗体等。

[0061] 在一些实施方案中,所述药物对药物中和剂的亲和力高于所述药物对人CD47(例如,在表面试剂RBC上表达的人CD47)对药物的亲和力。在一些实施方案中,所述药物中和剂对药物的亲和力是人CD47对所述药物的亲和力的至少约10倍、25倍、50倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、550倍、600倍、650倍、700倍、750倍、800倍、850倍、900倍、950倍或1000倍中的任一个。

[0062] 在一些实施方案中,添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC和/或血小板的样品、试剂血浆/抗血清、试剂RBC和/或试剂血小板的药物中和剂的量是足以实现相对于受试者的血浆中或包含受试者的RBC和/或血小板的样品中药物的量过量的药物中和剂的量。在一些实施方案中,添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC和/和或血小板的样品、试剂血浆/抗血清、试剂RBC和/或试剂血小板的药物中和剂的量是足以结合受试者的血浆中或包含受试者RBC和/或血小板的样品中的基本上所有(如全部)药物的量。在一些实施方案中,添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC和/和或血小板的样品、试剂血浆/抗血清、试剂RBC和/或试剂血小板的药物中和剂的量是足以实现相对于受试者的血浆中或包含受试者的RBC和/或血小板的样品中药物的量约例如,2倍、5倍、10倍、25倍、50倍、75倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、550倍、600倍、650倍、700倍、750倍、800倍、850倍、900倍、950倍、1000倍、1500倍、2000倍、2500倍、3000倍、3500倍、4000倍、4500倍或5000倍中的任一个(包括这些值之间的任何范围)摩尔过量(如摩尔比或当量)的药物中和剂的量。在一些实施方案中,添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC和/和或血小板的样品、试剂血浆/抗血清、试剂RBC和/或试剂血小板的药物中和剂的量是足以实现约100μg/ml、200μg/ml、300μg/ml、400μg/ml、500μg/ml、600μg/ml、700μg/ml、800μg/ml、900μg/ml、1mg/ml、1.25mg/ml、1.5mg/ml、1.75mg/ml、2mg/ml、2.25mg/ml、2.5mg/ml、2.75mg/ml、3mg/ml、3.25mg/ml、3.5mg/ml、3.75mg/ml、4mg/ml 4.25mg/ml、4.5mg/ml、4.75mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、20mg/ml、30mg/ml、40mg/ml、50mg/ml、60mg/ml、70mg/ml、80mg/ml、90mg/ml、100mg/ml、150mg/ml、200mg/ml、250mg/ml、300mg/ml、350mg/ml、400mg/ml、450mg/ml、500mg/ml、550mg/ml、600mg/ml、650mg/ml、700mg/ml、750mg/ml、800mg/ml、850mg/ml、900mg/ml、1000mg/ml、1100mg/ml、1150mg/ml、1200mg/ml、1250mg/ml、1300mg/ml、1350mg/ml、1400mg/ml、1450mg/ml、1500mg/ml、1550mg/ml、1600mg/ml、1650mg/ml、1700mg/ml、1750mg/ml、1800mg/ml、1850mg/ml、1900mg/ml或2000mg/ml中的任一个(包括这些值之间的

任何范围)的药物中和剂的浓度的量。在一些实施方案中,将至少约5μg、10μg、50μg、100μg、200μg、300μg、400μg、500μg、600μg、700μg、800μg、900μg、1mg、1.25mg、1.5mg、1.75mg、2mg、2.25mg、2.5mg、2.75mg、3mg、3.25mg、3.5mg、3.75mg、4mg、4.25mg、4.5mg、4.75mg、5mg、10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、1000mg、1100mg、1150mg、1200mg、1250mg、1300mg、1350mg、1400mg、1450mg、1500mg、1550mg、1600mg、1650mg、1700mg、1750mg、1800mg、1850mg、1900mg或2000mg中的任一个的药物中和剂添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC和/和或血小板的样品、试剂血浆/抗血清、试剂RBC和/或试剂血小板。在一些实施方案中,将药物中和剂以实现药物对人CD47的K_D的至少约4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍或100倍中的任一个(包括这些值之间的任何范围)过量的量添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC和/和或血小板的样品、试剂血浆/抗血清和/或试剂RBC。在一些实施方案中,将药物中和剂以实现药物对人CD47的K_D的至少约500倍、1000倍、5000倍、10^4倍、10^5倍、10^6倍、10^7倍、10^8倍、10^9倍或10^{10}倍中的任一个(包括这些值之间的任何范围)过量的量添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC和/和或血小板的样品、试剂血浆/抗血清和/或试剂RBC。在一些实施方案中,将药物中和剂以实现药物中和剂对药物的K_D的约4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍或100倍中的任一个(包括这些值之间的任何范围)过量的量添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC和/和或血小板的样品、试剂血浆/抗血清和/或试剂RBC。在一些实施方案中,将药物中和剂以实现药物中和剂对药物的K_D的约500倍、1000倍、5000倍、10^4倍、10^5倍、10^6倍、10^7倍、10^8倍、10^9倍或10^{10}倍中的任一个(包括这些值之间的任何范围)过量的量添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC和/和或血小板的样品、试剂血浆/抗血清和/或试剂RBC。

[0063] 在一些实施方案中,药物中和剂是能够结合药物的Fc区的任何剂。在一些实施方案中,药物中和剂是SP-A(表面活性剂蛋白A)或SP-D(表面活性剂蛋白D)。

[0064] 在一些实施方案中,所述方法包括使用两种或更多种本文所述的药物中和剂。例如,在一些实施方案中,本文提供的方法包括添加例如两种或更多种不同的CD47变体(或其能够结合至药物的片段)、两种或更多种不同的抗SIRPα抗体(或其抗原结合片段)、两种或更多种不同的抗SIRPβ抗体(或其抗原结合片段)、两种或更多种不同的抗SIRPγ抗体(或其抗原结合片段)、两种或更多种不同的抗独特型抗CD47抗体(或其抗原结合片段)或两种或更多种使药物的Fc区结合至来自已接受药物治疗的受试者的血浆样品的剂。在一些实施方案中,本文提供的方法包括添加不同药物中和剂的组合,例如包含可溶性CD47剂和/或抗SIRPα抗体(或其抗原结合片段)、和/或抗SIRPβ抗体(或其抗原结合片段)、和/或抗SIRPβ2抗体(或其抗原结合片段)、和/或抗SIRPγ抗体(或其抗原结合片段)、和/或抗独特型抗CD47抗体(或其抗原结合片段)、和/或使药物的Fc区结合至来自已接受药物治疗的受试者的血浆样品的剂的组合。在一些实施方案中,所述方法包括将两种或更多种不同的抗SIRPγ抗体(或其抗原结合片段)添加至受试者的血浆样品、包含受试者的RBC和/或血小板的样品、试剂血浆/抗血清、试剂RBC和/或试剂血小板。

[0065] B.在输血前血清学测定中使用细胞结合剂减轻干扰的方法

[0066] 在一些实施方案中,所述方法包括(a)将结合人CD47且不包含抗体Fc区的细胞结合剂添加至试剂RBC(即,已知表达特定细胞表面抗原或细胞表面抗原组的RBC)和/或试剂血小板(即,已知表达特定细胞表面抗原或细胞表面抗原组的血小板),和(b)在步骤(a)之后使用所述试剂RBC和/或试剂血小板进行血浆样品的血清学测定,其中所述血浆样品来自已接受药物治疗的受试者,并且其中所述药物包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的部分。此类实施方案在图4A中概括地描绘。如图4A所示,细胞结合剂与在试剂RBC(和/或试剂血小板)的表面上表达的CD47结合,并阻止药物与试剂RBC(和/或试剂血小板)结合,从而最小化(或者,在一些实施方案中,消除)药物与试剂RBC和/或试剂血小板的结合将导致的干扰(如图1B所示)。在一些实施方案中,在进行血清学测定之前,将细胞结合剂添加至受试者的血浆以及试剂RBC和/或试剂血小板。

[0067] 在一些实施方案中,所述方法包括(a)将结合至人CD47且不包含抗体Fc区的细胞结合剂添加至来自已接受药物治疗的受试者的血浆样品,和(b)在步骤(a)之后使用试剂RBC和/或试剂血小板进行所述血浆样品的血清学测定,其中所述药物包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的部分。如图4B所示,细胞结合剂与药物竞争结合至在试剂RBC(和/或试剂血小板)的表面上表达的CD47,从而最小化(或者,在一些实施方案中,消除)药物与试剂RBC和/或试剂血小板的结合将导致的干扰(如图1B所示)。

[0068] 在一些实施方案中,所述方法包括(a)将结合至人CD47且不包含抗体Fc区的细胞结合剂添加至来自已接受药物治疗的受试者的血液样品,和(b)在步骤(a)之后使用试剂血浆/抗血清进行所述血液样品的血清学测定,其中所述药物包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的部分。如图4C所示,细胞结合剂与药物竞争结合至在受试者的RBC和/或血小板的表面上表达的CD47,从而最小化(或者,在一些实施方案中,消除)药物与受试者的RBC和/或血小板的结合将导致的干扰(如图1D所示)。在一些实施方案中,在进行血清学测定之前,将细胞结合剂添加至试剂血浆/抗血清以及来自受试者的血液样品。

[0069] 在一些实施方案中,细胞结合剂是结合CD47并阻止药物结合CD47的任何剂。如上所述,细胞结合剂不包含抗体Fc区。在替代实施方案中,细胞结合剂包含不结合AHG的抗体Fc区变体。

[0070] 在一些实施方案中,所述方法在溶液中进行,例如,其中细胞结合剂是可溶性的。在一些实施方案中,在进行所述方法之前,通过吸附至基质或表面、共价偶联或非共价偶联将细胞结合剂固定至固相。在一些实施方案中,细胞结合剂能够在固定至固相后结合CD47。用于固定的固相或表面可以是基本上不溶于水且可用于免疫测定中的任何惰性支持物或载体,包括呈例如表面、颗粒、多孔基质、纤维素聚合物海绵(ImmunoCAP®,Phadia)等形式的支持物。通常使用的支持物的实例包括由聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯等制成的小片、Sephadex、聚氯乙烯、塑料珠、微颗粒、测定板或试管。在一些实施方案中,将细胞结合剂涂覆在微量滴定板上,如可用于同时分析多个样品的多孔微量滴定板。

[0071] 在一些实施方案中,细胞结合剂包含SIRPα或SIRPγ。在一些实施方案中,细胞结合剂包含能够结合至CD47的SIRPα或SIRPγ的片段(例如,野生型SIRPα的胞外结构域("WT SIRPα-ECD")或其D1结构域,例如,野生型SIRPγ的胞外结构域("WT SIRPγ-ECD")或其D1结构域)。在一些实施方案中,细胞结合剂包含人SIRPα、人SIRPγ、小鼠SIRPα、小鼠SIRPγ、

大鼠SIRPα、大鼠SIRPγ、恒河猴SIRPα、恒河猴SIRPγ、食蟹猴SIRPα、食蟹猴SIRPγ、任何来源的SIRPα或任何来源的SIRPγ,前提是SIRPα或SIRPγ能够结合至CD47(例如,在试剂RBC和/或试剂血小板的表面上表达的人CD47)。在一些实施方案中,细胞结合剂包含人SIRPα、人SIRPγ、小鼠SIRPα、小鼠SIRPγ、大鼠SIRPα、大鼠SIRPγ、恒河猴SIRPα、恒河猴SIRPγ、食蟹猴SIRPα、食蟹猴SIRPγ、任何来源的SIRPα或任何来源的SIRPγ的片段,前提是所述片段能够结合至CD47(例如,在试剂RBC和/或试剂血小板的表面上表达的人CD47)。在一些实施方案中,细胞结合剂是能够结合至人CD47的SIRPα变体(或其片段,如WT SIRPα-ECD或其D1结构域的变体)、可溶性SIRPβ变体(或其片段,如WT SIRPβ-ECD或其D1结构域的变体)或可溶性SIRPγ变体(或其片段,如WT SIRPγ-ECD或其D1结构域的变体)。在一些实施方案中,SIRPα变体、SIRPβ变体或SIRPγ变体(或前述任一者的能够结合CD47的片段)分别相对于野生型SIRPα、野生型SIRPβ或野生型SIRPγ包含一个或多个氨基酸取代、缺失、插入、N-末端添加和/或C-末端添加。在一些实施方案中,SIRPα变体、SIRPβ变体或SIRPγ变体(或前述中任一者的能够结合CD47的片段)中存在的一个或多个氨基酸取代、缺失、插入、N-末端添加和/或C-端添加改变SIRPα变体、可溶性SIRPβ变体或可溶性SIRPγ变体分别相对于野生型SIRPα、野生型SIRPβ或野生型SIRPγ的糖基化模式。在一些实施方案中,SIRPα变体、SIRPβ变体或SIRPγ变体(或前述中任一者的能够结合CD47的片段)中存在的一个或多个氨基酸取代、缺失、插入、N-末端添加和/或C-端添加分别相对于野生型SIRPα、野生型SIRPβ或野生型SIRPγ增加SIRPα变体、SIRPβ变体或SIRPγ变体对人CD47的亲和力。在一些实施方案中,细胞结合剂是单体(例如,野生型SIRPα单体、野生型SIRPγ单体、SIRPα变体单体、SIRPβ变体单体、SIRPγ单体或前述中任一者的能够结合CD47的片段)。在一些实施方案中,细胞结合剂是二聚体(例如,包含例如野生型SIRPα、野生型SIRPγ、SIRPα变体、SIRPβ变体、SIRPγ变体或前述中任一者的能够结合CD47的片段的任何组合的同二聚体或异二聚体)。在一些实施方案中,细胞结合剂是低聚体(例如,包含例如一种或多种野生型SIRPα、野生型SIRPγ、SIRPα变体、SIRPβ变体、SIRPγ变体和/或前述中任一者的能够结合CD47的片段的任何组合的同低聚体或异低聚体。

[0072] 在一些实施方案中,细胞结合剂包含SIRPα变体、SIRPβ变体或SIRPγ变体。在一些实施方案中,SIRPα变体、SIRPβ变体或SIRPγ变体包含以下SEQ ID NO:8-16中任一个的氨基酸序列。

EEELQIIQPD KSVLVAAGET ATLRCTITSL FPVGPIQWFR GAGPGRVLIY NQRQGPFPRV
TTVSDTTKRN NMDFSIRIGA ITPADAGTYY CIKFRKGSPD DVEFKSGAGT ELSVRAKPS
(SEQ ID NO: 8)

EEELQIIQPD KSVLVAAGET ATLRCTITSL FPVGPIQWFR GAGPGRELIY NQREGPFPRV
TTVSDTTKRN NMDFSIRIGA ITPADAGTYY CVKFRKGSPD DVEFKSGAGT ELSVRAKPS
(SEQ ID NO: 9)

EEELQIIQPD KSVLVAAGET ATLRCTITSL FPVGPIQWFR GAGPGRVLIY NQREGPFPRV
TTVSDTTKRN NMDFSIRIGA ITPADAGTYY CIKFRKGSPD DVEFKSGAGT ELSVRAKPS
(SEQ ID NO: 10)

EDELQIIQPE KSVSVAAGES ATLRCAITSL FPVGPIQWFR GAGAGRVLIY NQRQGPFPRV
TTVSETTKRN NLDFSISISN ITPADAGTYY CIKFRKGSPD DVEFKSGAGT ELSVRAKPS
(SEQ ID NO: 11)

EEELQIIQPD KSISVAAGES ATLHCTITSL FPVGPIQWFR GAGPGRVLIY NQRQGPFPRV
TTVSDTTKRN NMDFSIRISN ITPADAGTYY CIKFRKGSPD DVEFKSGAGT ELSVRAKPS
(SEQ ID NO: 12)

EEELQIIQPE KLLLVTVGKT ATLHCTITSL FPVGPIQWFR GVGPGRVLIY NQRDGPFPRV
TTVSDGTKRN NMDFSIRISS ITPADVGTYY CVKFRKGTPE DVEFKSGPGT EMALGAKPS
(SEQ ID NO: 13)

[0073] EEELQIIQPE KLLLVTVGKT ATLHCTITSL FPVGPIQWFR GVGPGRVLIY NQKDGPFPRV
TTVSDGTKRN NMDFSIRISS ITPADVGTYY CVKFRKGSPE DVEFKSGPGT EMALGAKPS
(SEQ ID NO: 14)

EEELQIIQPE KLLLVTVGKT ATLHCTITSL FPVGPIQWFR GVGPGRVLIY NQKDGHFPRV
TTVSDGTKRN NMDFSIRISS ITPADVGTYY CVKFRKGSPE DVEFKSGPGT EMALGAKPS
(SEQ ID NO: 15)

EEELQIIQPE KLLLVTVGKT ATLHCTITSH FPVGPIQWFR GVGPGRVLIY NQKDGHFPRV
TTVSDGTKRN NMDFSIRISS ITPADVGTYY CVKFRKGSPE DVEFKSGPGT EMALGAKPS
(SEQ ID NO: 16)

EEELQIIQPE KLLLVTVGKT ATLHCTITSL FPVGPVLWFR GVGPGRVLIY NQRQGPFPRV
TTVSDTTKRN NMDFSIRISS ITPADVGTYY CVKFRKGTPE DVEFKSGPGT EMALGAKPS
(SEQ ID NO: 17)

EEELQIIQPE KLLLVTVGKT ATLHCTITSL FPVGPIQWFR GVGPGRELIY NAREGRFPRV
TTVSDLTKRN NMDFSIRISS ITPADVGTYY CVKFRKGSPE DVEFKSGPGT EMALGAKPS
(SEQ ID NO: 18)
EEELQIIQPE KLLLVTVGKT ATLHCTITSL LPVGPIQWFR GVGPGRELIY NQRDGPFPRV
TTVSDGTKRN NMDFSIRISS ITPADVGTYY CVKFRKGTPE DVEFKSGPGT EMALGAKPS
(SEQ ID NO: 19)

EEELQIIQPD KSVLVAAGET ATLRCTITSL FPVGPIQWFR GAGPGRVLIY NQRQGPFPRV
TTVSDTTKRN NMDFSIRIGN ITPADAGTYY CIKFRKGSPD DVEFKSGAGT ELSVRAKPS
(SEQ ID NO: 20)

[0074] 其他示例性可溶性SIRPα变体、可溶性SIRPβ变体和SIRPγ变体是本领域已知的并且描述于WO 2013/109752;US 2015/0071905;USP 9,944,911;WO 2016/023040;WO 2017/027422;US 2017/0107270;USP 10,259,859;US9845345;WO2016187226;US20180155405;WO2017177333;WO2014094122;US2015329616;US20180312563;WO2018176132;WO2018081898;WO2018081897;US20180141986A1;和EP3287470A1中,其内容以引用的方式整体并入本文。

[0075] 在一些实施方案中,细胞结合剂是不包含Fc区的抗CD47抗体的片段。在一些实施方案中,此类片段包括但不限于例如Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')2、Fv、scFv或双特异抗体。可与本文提供的方法一起使用的示例性抗CD47抗体片段包括但不限于例如鼠5F9(参见Liu等人(2015)PLoS One.10(9):e0137345)、Hu5F9-G4(Forty Seven,Inc.)、B6H12.2、CC2C6、8H7、BRIC 126和其他。在一些实施方案中,抗CD47抗体包含不结合AHG的Fc区。

[0076] 在一些实施方案中,细胞结合剂对人CD47的亲和力高于药物对人CD47(例如,在表面试剂RBC和/或血小板上表达的人CD47)对药物的亲和力。在一些实施方案中,所述细胞结合剂对人CD47的亲和力是所述药物对CD47的亲和力的至少约10倍、25倍、50倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、550倍、600倍、650倍、700倍、750倍、800倍、850倍、900倍、950倍或1000倍中的任一个(包括这些值之间的任何范围)。

[0077] 在一些实施方案中,添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC/血小板的样品、试剂血浆/抗血清、试剂RBC和/或试剂血小板的细胞结合剂的量是足以实现相对于在受试者的RBC/血小板、试剂RBC和/或试剂血小板上表达的CD47的量过量的量的细胞结合剂的量。在一些实施方案中,添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC/血小板的样品、试剂血浆/抗血清、试剂RBC和/或试剂血小板的细胞结合剂的量是足以结合基本上所有(如所有)在受试者的RBC/血小板上、在试剂RBC和/或试剂血小板上表达的CD47的量。在一些实施方案中,添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC/血小板的样品、试剂血浆/抗血清、试剂RBC和/或试剂血小板的细胞结合剂的量是足以实现相对于在受试者的RBC/血小板上、在试剂RBC和/或试剂血小板上表达的CD47的量约例如,2倍、5倍、10倍、25倍、50倍、75倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、550倍、600倍、650倍、700倍、750倍、800倍、850倍、900倍、950倍、1000倍、1500倍、2000倍、2500倍、3000倍、3500倍、4000倍、4500倍或5000倍中的任一个(包括这些值之间的任何范围)摩尔过量(如摩尔比或当量)的细胞结合剂的量。在一些实施方案中,添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC/血小板的样品、试剂血浆/抗血清、试剂RBC和/或试剂血小板的细胞结合剂的量是足以实现约100μg/ml、200μg/ml、300μg/ml、400μg/ml、500μg/ml、600μg/ml、700μg/ml、800μg/ml、900μg/ml、1mg/ml、1.25mg/ml、1.5mg/ml、1.75mg/ml、2mg/ml、2.25mg/ml、2.5mg/ml、2.75mg/ml、3mg/ml、3.25mg/ml、3.5mg/ml、3.75mg/ml、4mg/ml、4.25mg/ml、4.5mg/ml、4.75mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、20mg/ml、30mg/ml、40mg/ml、50mg/ml、60mg/ml、70mg/ml、80mg/ml、90mg/ml、100mg/ml、150mg/ml、200mg/ml、250mg/ml、300mg/ml、350mg/ml、400mg/ml、450mg/ml、500mg/ml、550mg/ml、600mg/ml、650mg/ml、700mg/ml、750mg/ml、800mg/ml、850mg/ml、900mg/ml、1000mg/ml、1100mg/ml、1150mg/ml、1200mg/ml、1250mg/ml、1300mg/ml、1350mg/ml、1400mg/ml、1450mg/ml、1500mg/ml、1550mg/ml、1600mg/ml、1650mg/ml、1700mg/ml、1750mg/ml、1800mg/ml、1850mg/ml、1900mg/ml或2000mg/ml中的任一个(包括这些值之间的任何范围)的细胞结合剂浓度的量。在一些实施方案中,将至少约5μg、10μg、50μg、100μg、200μg、300μg、400μg、500μg、600μg、700μg、800μg、900μg、1mg、1.25mg、1.5mg、1.75mg、2mg、2.25mg、2.5mg、2.75mg、3mg、3.25mg、3.5mg、3.75mg、4mg、4.25mg.4.5mg、4.75mg、5mg、10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、1000mg、1100mg、1150mg、1200mg、1250mg、1300mg、1350mg、1400mg、1450mg、1500mg、1550mg、1600mg、1650mg、1700mg、1750mg、

1800mg、1850mg、1900mg或2000mg中的任一个的细胞结合剂添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC的样品、试剂血浆/抗血清和/或试剂RBC。在一些实施方案中,添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC/血小板的样品、试剂血浆/抗血清、试剂RBC和/或试剂血小板的细胞结合剂的量是药物对人CD47的K_D的至少约约4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍或100倍中的任一个(包括这些值之间的任何范围)过量。在一些实施方案中,添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC/血小板的样品、试剂血浆/抗血清、试剂RBC和/或试剂血小板的细胞结合剂的量是药物对人CD47的K_D的至少约500倍、1000倍、5000倍、10^4倍、10^5倍、10^6倍、10^7倍、10^8倍、10^9倍或10^{10}倍中的任一个(包括这些值之间的任何范围)过量。在一些实施方案中,添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC/血小板的样品、试剂血浆/抗血清、试剂RBC和/或试剂血小板的细胞结合剂的量是细胞结合剂对人CD47的K_D的至少约4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍或100倍中的任一个(包括这些值之间的任何范围)过量。在一些实施方案中,添加至受试者的血浆、包含受试者的RBC/血小板的样品、试剂血浆/抗血清、试剂RBC和/或试剂血小板的细胞结合剂的量是细胞结合剂对人CD47的K_D的至少约500倍、1000倍、5000倍、10^4倍、10^5倍、10^6倍、10^7倍、10^8倍、10^9倍或10^{10}倍中的任一个(包括这些值之间的任何范围)过量。

[0078] C.示例性药物

[0079] 本文提供的方法减少(或者,在一些实施方案中,消除)血清学测定中由从已接受药物治疗的受试者获得的包含血浆或RBC/血小板的样品中包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的部分的药物的存在引起的干扰。在一些实施方案中,所述药物包含IgG Fc区,如人IgG Fc区,例如IgG1、IgG2或IgG4 Fc区。在一些实施方案中,所述药物包含经修饰的Fc区(如经修饰的IgG Fc区),所述经修饰的Fc区相对于野生型人Fc区(例如,野生型人IgG Fc区)包含一个或多个氨基酸取代、缺失、插入、N-末端添加和/或C-末端添加。示例性Fc区描述于WO2017177333;WO2014094122;US2015329616;WO 2017/027422;US 2017/0107270;和USP 10,259,859中,其内容以引用的方式整体并入本文。

[0080] 在一些实施方案中,结合至人CD47的部分是缺乏跨膜结构域的野生型SIRPα(例如,能够结合人CD47的任何野生型SIRPα的胞外结构域)。在一些实施方案中,结合至人CD47的部分是能够结合人CD47并且缺乏跨膜结构域的SIRPα变体。在一些实施方案中,所述SIRPα变体相对于野生型SIRPα的胞外结构域包含一个或多个氨基酸取代、缺失、插入、N-末端添加和/或C-末端添加。在一些实施方案中,所述SIRPα变体是SIRPα-d1结构域变体。在一些实施方案中,所述SIRPα变体对人CD47的亲和力高于野生型SIRPα对人CD47的亲和力。

[0081] 在一些实施方案中,结合至人CD47的部分是缺乏跨膜结构域的野生型SIRPγ(例如,能够结合人CD47的任何野生型SIRPγ的胞外结构域)。在一些实施方案中,结合至人CD47的部分是能够结合人CD47并且缺乏跨膜结构域的SIRPγ变体。在一些实施方案中,所述SIRPγ变体相对于野生型SIRPγ的胞外结构域包含一个或多个氨基酸取代、缺失、插入、N-末端添加和/或C-末端添加。在一些实施方案中,所述SIRPγ变体是SIRPγ-d1结构域变体。在一些实施方案中,所述SIRPγ变体对人CD47的亲和力高于野生型SIRPγ对人CD47的

亲和力。

[0082] 在一些实施方案中,结合至人CD47的部分是能够结合人CD47并且缺乏跨膜结构域的SIRPβ变体。在一些实施方案中,所述SIRPγβ变体相对于野生型SIRPβ的胞外结构域包含一个或多个氨基酸取代、缺失、插入、N-末端添加和/或C-末端添加。在一些实施方案中,所述SIRPβ变体是SIRPβ-d1结构域变体。

[0083] 示例性SIRPα变体、SIRPβ变体和SIRPγ变体是本领域已知的并且描述于WO 2013/109752;US 2015/0071905;USP 9,944,911;WO 2016/023040;WO 2017/027422;US 2017/0107270;USP 10,259,859;US9845345;WO2016187226;US20180155405;WO2017177333;WO2014094122;US2015329616;US20180312563;WO2018176132;WO2018081898;WO2018081897;US20180141986A1;和EP3287470A1中,其内容以引用的方式整体并入本文。

[0084] 在以上描述的任何方法的一些实施方案中,药物是抗CD47抗体。在一些实施方案中,抗CD47抗体是AO-176、CC-90002、Hu5F9-G4(也称为5F9)、SHR-1603、NI-1701、SRF231、TJC4或IBI188。关于这些和其他治疗性抗CD47抗体的详细信息提供于WO2018175790A1;US20180142019;US20180171014;US20180057592;US20170283498;US9,518,116;US9,518,117;US20150274826;US20160137733;US9,221,908;US20140161799;US20160137734;WO2015191861;WO2014093678;WO2014123580;WO2013119714;US9,045,541;WO2016109415;WO2018183182;WO2018009499;WO2017196793;US9663575;US20140140989;WO2018237168;US20180037652;US20190023784;WO2018095428;EP3411071;WO2019042285;WO2016081423;WO2011076781;WO2012172521;WO2014087248;US20140303354;WO2016156537;US20160289727;US20190062428;US20180201677;US9352037;US20170044258;US9650441;和US20180105591中。

[0085] 用于输血前测试的血清学测定

[0086] 进行输血前测试以确保意图用于输血的血液制品与受试者(即输血受体)的血液相容。输血前测试涵盖用于确认供体血液和与受体血液之间的ABO相容性的血清学测定,以及用于检测与供体RBC和/或供体血小板上的抗原反应的最具临床意义的RBC/血小板同种抗体的血清学测定(参考Technical Manual,第18版,AABB,Bethesda,MD,2014)。对其进行血清学测定以确定供体/受体输血相容性的其他示例性血型抗原包括但不限于例如Kell血型抗原、Duffy血型抗原、Knops血型抗原、Cartwright血型抗原、Scianna血型抗原、印第安血型抗原、恒河猴血型抗原、Dombrock血型抗原、Landsteiner-Wiener血型抗原和VEL血型抗原。本文提供的方法减少或防止本领域已知的许多血清学测定中的药物干扰(例如,由包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的部分的药物引起的干扰)。可使用所述方法的示例性血清学测定包括(但不限于)下文更详细描述的那些血清学测定。

[0087] 通常,使用来自需要输血的受试者(例如,已接受药物治疗的受试者,所述药物包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的部分)的包含例如非溶血血液、血浆(例如,已在EDTA中用抗凝血剂处理的血浆样品)、凝固的血液或血清。一般来说,首先确定受试者的ABO血型和Rh类型。接下来,使用抗体筛选方法来检测可能存在于受试者血浆中的任何具有临床意义的意外非ABO血型抗体。如果筛选测试揭示存在这种抗体,则使用抗体鉴定组确定所述抗体的特异性。在确定抗体的特异性后,针对相应抗原筛选合适的ABO血型和Rh类型的供体单位。对所述抗原呈阴性的单位与需要输血的受试者进行交叉配型以确保相容性。

[0088] 血清学测定可在试管中、载玻片上、凝胶柱上或微量滴定孔板中进行,并且溶血和凝集是指示阳性(不相容)测试结果的信号。凝集(反映用抗体包被的相邻RBC之间的联系的一种反应)可在最常用的试管方法中从宏观和/或微观上且以0-4+的标度进行评分。零分指示没有反应性,并且其特征是光滑且易于分散的细胞。4+的分数指示强烈反应性,并且其特征是一种不易分散的固体凝集物。1+、2+或3+的分数指示中等水平的反应性,其特征是具有较高分数的凝集物的大小逐渐增加。当使用柱中含有抗IgG抗体的凝胶柱(凝胶卡)或含有结合的红细胞抗原的微量滴定孔板(固相)进行血清学测定时,可应用类似的凝集评分原则。目前有多种技术可用于以不同灵敏度检测抗体-RBC抗原相互作用。在一些实施方案中,手动进行血清学测定。在一些实施方案中,通过自动化机器进行血清学测定。

[0089] 例如,立即离心(IS)(也称为“立即离心交叉配型”)是需要将例如试剂血浆/抗血清(即,含有针对已知RBC和/或血小板表面抗原的抗体的血浆)和受试者的血细胞混合、立即将所述混合物在室温或37℃下离心约15-30秒并目视检查试管的直接凝集的测定。直接凝集表明血浆中的抗体与RBC表面抗原之间存在强相互作用。可替代地,受试者的血浆和试剂RBC(即,已知表达特定细胞表面抗原或细胞表面抗原组的RBC)和/或试剂血小板(即已知表达特定细胞表面抗原或细胞表面抗原组的血小板)可进行混合、离心且目测评估直接凝集。

[0090] 抗人球蛋白(AHG)用于检测不产生直接凝集的抗体结合的RBC。AHG是在另一种物种中产生的二级抗人球蛋白抗体。AHG试剂可对单一类别的人Ig(例如IgG)具有特异性,或者是多特异性的,即能够结合至多种人Ig类别(例如,IgG、IgM、IgA)和补体。AHG血清可用于直接抗球蛋白测试(DAT)和/或间接抗球蛋白测试(IAT)。DAT证明红细胞在体内的致敏作用,并通过用AHG直接测试洗涤过的患者红细胞样品来进行。IAT证明红细胞与抗体之间的体外反应。在IAT中,将血清(或血浆)与红细胞一起孵育,然后洗涤以除去未结合的球蛋白。添加AHG情况下存在凝集表明抗体与特异性红细胞抗原的结合。一些方法涉及添加增效剂试剂(增强),如盐水、白蛋白、低离子强度盐水(LISS)或聚乙二醇(PEG),然后在AHG测试之前将样品在37℃下孵育10-60分钟。

[0091] ABO分型包括使用抗A和抗B抗血清(正向定型)测试受体的红细胞中是否存在A和B抗原。使用已知A型和B型红细胞(反向定型)测试受体血浆中是否存在抗A和抗B抗体也是常规ABO血型测试的一部分。

[0092] 输血接受者的Rh(D)型通过用抗D测试受体红细胞来确定。ABO定型通常使用立即离心(IS)进行测试。

[0093] 个体红细胞上不存在的针对抗原的同种抗体可能在因怀孕或输血暴露于外来红细胞抗原的任何人身中产生。为了检测针对非A组或B组抗原的抗体,将患者的血浆或血清样品针对所选的商业O型红细胞进行测试,所述O型红细胞表达除A和B之外的大多数有临床意义的抗原。

[0094] 在阳性抗体筛查的情况下,需要使用扩展组的商业O型试剂RBC进行进一步的血清学测试,以鉴定具有临床意义的抗体。然后,一旦已知抗体的特异性,就必须针对相应抗原筛选供体单位,以选择缺乏抗原的那些单位。

[0095] 还可进行受体红细胞的抗原分型(表型分型)以确定个体可能产生哪些红细胞抗体。用于RBC表型分型的血清学测试包括将受体细胞与含有特定抗体的商业试剂抗血清混

合。

[0096] 有或无增强的IAT(例如,盐水、LISS、PEG)用于抗体检测和抗体鉴定。

[0097] “交叉配型”是指确认患者的血液(血浆)与供体红细胞之间的相容性的方法。交叉配型主要是为了检测和防止ABO不相容。血清交叉配型测定(IS交叉配型或AHG相交叉配型)涉及将供体红细胞与受体血浆直接混合,并在立即离心或AHG测试后进行溶血和凝集评分。

[0098] 本说明书被认为足以使本领域的技术人员能够实践本发明。除本文所示和所述的那些修改之外,根据先前描述,本发明的各种修改将变得为本领域技术人员显而易知,并且属于随附权利要求的范围。本文引用的所有公布、专利和专利申请出于所有目的据此以引用的方式整体并入本文。

[0099] 实施例

[0100] 实施例1:包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的部分的药物干扰常规血清学测定

[0101] CD47是结合至信号调控蛋白-α(SIRPα)并抑制吞噬作用的一种广泛表达的细胞表面蛋白(Jaiswal等人,Trends Immunol(2010)31(6):212-219;Brown等人,Trends Cell Biol(2001)11(3):130-135)。多种恶性肿瘤(包括血液肿瘤和实体瘤)表现出升高的CD47表达,其与侵袭性疾病相关(Willingham等人,Proc Natl Acad Sci USA(2012)109(17):6662-6667)。已经开发了靶向CD47的几种癌症疗法以阻断SIRPα-CD47相互作用,从而允许巨噬细胞发挥其吞噬功能以清除肿瘤细胞。重要的是,由于CD47也在表面血细胞如红细胞(RBC)和血小板上表达(Oldenborg等人,Science(2000)288(5473):2051-2054),所以CD47结合药物可能干扰血型分型和血清学测试。

[0102] 例如,CD47靶向药物可通过阻断和/或引起血细胞(包括RBC和血小板)表面上的空间干扰而干扰血型分型和血清学测试。此外,包含Fc区的抗CD47药物(如抗CD47抗体)可与血清学测试中使用的试剂相互作用,从而导致血细胞凝集和错误反应性读数。

[0103] 药物A用于确定靶向CD47的基于抗体的药物干扰血型分型和血清学测定的程度。药物A是示例性CD47结合药物,其包含SIRPα变体(即,源自人SIRPα的CD47结合结构域)和源自人免疫球蛋白IgG1的Fc区的Fc变体。

[0104] 材料和方法

[0105] 检测血液分型和血清学测定中药物A的干扰

[0106] 将药物A与5mL的A、B和O型供体血液样品以0.1μg/mL、0.5μg/mL、1μg/mL、5μg/mL或10μg/mL的浓度混合。将混合物在2-8℃下孵育过夜。然后根据Bonfils参考实验室程序使用试管法确定药物A对以下血型分型和血清学测试的干扰:

[0107] 血型分型测定

[0108] 回收与药物A(如上所述)一起孵育的供体血液样品,并使用载玻片测试用已知表达特定细胞表面抗原的试剂RBC进行ABO和RhD分型,并对凝集进行评分。

[0109] 抗免疫球蛋白和补体测定

[0110] 从与药物A一起孵育的每个供体血液样品中回收血浆样品。然后将血浆样品与试剂RBC(Immucor)一起用于血清学测试。通过将血浆样品与试剂RBC混合、立即离心混合物并检查经离心混合物以检测凝集来进行立即离心交叉配型(或立即离心阶段)。还使用PEG增强(11.5%PEG w/v)、然后添加抗人球蛋白(AHG)试剂对血浆样品进行抗体测试。使用PEG增

强(11.5%PEG w/v)然后添加AHG试剂对血浆样品进行另一组抗体测试以确定二硫苏糖醇(DTT)、无花果蛋白酶和/或同种异体吸附处理对读数的影响。对于每个测定使用标准方案,并且并行进行自动对照(即,其中将来自含有药物A的供体样品的血清与来自含有药物A的供体样品的RBC混合)。

[0111] 此外,从与药物A一起孵育的每个供体血液样本中回收RBC样品。然后将所述RBC样品用于直接抗球蛋白测试(DAT),其需要将RBC与多特异性AHG试剂(其结合IgG和补体)或AHG试剂(其仅结合至补体)组合。此外,每个样品中与RBC结合的抗体被洗脱并用试剂RBC进行测试,即检测/鉴定自身抗体和/或同种抗体。使用标准方案。

[0112] 结果

[0113] 如表1所示,在所测试的药物A的任何浓度(至多10μg/mL)下,药物A都不会干扰ABO/RhD分型或使用立即离心交叉配型(IS)的抗体筛选。然而,在10μg/mL的最高剂量下,药物A确实干扰使用AHG试剂和PEG增强的抗体筛选,显示反应水平为3+。使用AHG试剂和PEG增强的抗体筛选测定也使用自动对照抗体进行,从而揭示药物A以剂量依赖性方式增加反应性水平(从0.1μg/mL药物A下的弱反应性至10μg/mL药物A下的4+反应性)。

[0114] 在使用AHG试剂和PEG增强的抗体筛选测定中,DTT和无花果蛋白酶两者都不能消退由10μg/mL药物A引起的反应性。相比之下,同种异体吸附测试在使用PEG增强的抗体筛选测定中消退了由药物A引起的反应性,从而表明药物A对血清学测定的干扰可通过试剂血细胞上的饱和结合来减少或消退。

[0115] 针对IgG的DAT测试显示药物A以剂量依赖性方式引起反应性(从0.1μg/mL药物A下的弱反应性至10μg/mL药物A下的3+反应性)。相比之下,在所测试药物A的任何浓度(至多10μg/mL)下针对补体的DAT测试期间均未观察到反应性,从而表明药物A干扰是由IgG抗体-抗原相互作用而不是补体相互作用引起的。在所有测试的药物A浓度的洗脱液测试中均观察到中等反应性(2+至3+的反应性)。

[0116] 表1:药物A的存在对血清学测试的反应性的影响

[0117]

掺杂的药物A的浓度(μg/ml)	ABO/Rh分型	通过IS进行的Ab筛选	使用PEG增强的AB筛选在AHG下	使用PEG增强的自动对照在AHG下	DAT聚和IgG	DAT补体	洗脱液测试
0.1	NI	NI	NI	弱	弱	NI	2+
0.5	NI	NI	NI	1+	1+	NI	2+
1.0	NI	NI	NI	3+	2+至3+	NI	2+至3+
5.0	NI	NI	NI	3+	2+至3+	NI	2+至3+
10.0	NI	NI	3+	4+	3+	NI	2+至3+

NI = 无干扰
ANG = 抗人球蛋白
DTT和无花果蛋白酶处理没有消退在PEG增强情况下观察到的反应性
吸附测试消退了在PEG增强情况下观察到的反应性

[0118] 上文论述和表1中呈现的结果表明药物A干扰常规血清学测定。这种干扰可能是由于血浆药物A与血细胞上CD47的结合所致,其随后通过血清学测试中常用的IgG特异性试剂(如AHG)进行检测。

[0119] 实施例2:减轻由含Fc的蛋白引起的对血清学测试的干扰

[0120] 实施例1中呈现的结果表明,包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD47的部分的药物能够干扰常规血液分型和血清学测定。这种干扰可能通过导致延迟向需要输血的患者发放供体血液制品而危及患者的安全。如下文所述评估试剂B(一种包含CD47单体的示例性药物中和剂)防止或减少药物A在血清学测试中的干扰的能力。

[0121] 材料和方法

[0122] 将药物A与5mL供体全血以10μg/mL的浓度混合,并在约2℃-8℃下孵育过夜。从掺杂药物A的供体全血中的每一个获得血浆样品并进行等分。然后使用浓度为2.75mg/mL或0.275mg/mL的试剂B,以1:9的比例(9滴血浆与1滴试剂B)将试剂B添加至血浆样品。每个血浆样品中试剂B的最终浓度分别为17.5μM或1.75μM。将血浆样品/试剂B混合物在室温下孵育约30分钟。然后对用试剂B处理的血浆样品进行实施例1中所述的血清学测试。

[0123] 结果

[0124] 如表2所示,浓度为17.5μM的试剂B减轻了药物A(10μg/mL)在实施例1中描述的血清学测定中的干扰(参见表1)。然而,在1.7μM的较低浓度下,试剂B并未消除与在药物A情况下观察到的反应性(参见表2)。

[0125] 表2:用CD47剂B中和药物A以消退反应性

[0126]

药物 A 的浓度	剂 B 的浓度	结果
10 μg/mL	1.7 μM，以 1:9 的比例	在利用 PEG 增强的抗体筛选中观察到反应性。

[0127]

10 μg/mL	17.5 μM，以 1:9 的比例	在利用 PEG 增强的抗体筛选中未观察到反应性。

[0128] 因此,上文论述的结果表明CD47剂B可中和药物A并减轻其对血清学测试的干扰。

[0129] 实施例3.使用剂B(一种示例性可溶性CD47单体或剂C(一种示例性可溶性SIRPa单体)减轻常规血清学测试中包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD4的部分的药物的干扰。

[0130] 引言

[0131] CD47是充当自我标志物并通过与信号调控蛋白-α(SIRPα)(巨噬细胞上的其天然受体)结合而提供“不要吃掉我”信号以抑制吞噬作用的广泛表达的细胞表面蛋白(Jaiswal等人,Trends Immunol(2010)31(6):212-219;Brown等人,Trends Cell Biol(2001)11(3):130-135)。肿瘤细胞过表达CD47以逃避免疫监视(Willingham等人,Proc Natl Acad Sci USA(2012)109(17):6662-6667)。已经在多种恶性肿瘤(包括血液肿瘤和实体瘤)中观察到了丰富CD47表达,其中CD47表达升高与侵袭性疾病和存活可能性降低相关(Willingham等人,Proc Natl Acad Sci USA(2012)109(17):6662-6667;Chao等人Cell.(2010)142(4):699-713)。

[0132] CD47在人RBC的表面上广泛表达(Oldenborg等人,Science(2000)288(5473):2051-2054)。在患者中给药后循环药物A存在的情况下,有可能来自受体患者的药物A可结

合至试剂或供体RBC上的CD47。如实施例1和2中所讨论的,药物A是示例性CD47结合药物,其包含SIRPα变体(即,源自人SIRPα的CD47结合结构域)和源自人免疫球蛋白IgG1的Fc区的Fc变体。由于药物A含有IgG1的Fc区,所以它与RBC表面CD47的结合可类似于抗体-抗原相互作用,从而导致对用于输血前血库测试的常规血型分型和筛查血清学测试的测定干扰。先前的体外研究表明,血浆中药物A的存在不会干扰ABO/Rh分型和使用立即离心的抗体筛选。然而,在10μg/mL的浓度下,血浆中的药物A干扰使用PEG增强的抗体筛选。

[0133] 进行下述实验以评估是否能够通过添加CD47单体(即,实施例2及下文中描述的剂B)或高亲和力SIRPα单体(即,剂C,这将在下文更详细地描述)中和由较高浓度下的药物A诱导的干扰。进行相关流式细胞术分析以评估是否能够通过添加可溶性CD47单体(剂B)或可溶性高亲和力SIRPα单体(剂C)来消除药物A与RBC的结合。

[0134] 材料和方法

[0135] 剂B和剂C各自使用Expi293表达系统(Thermofisher)基于制造商的方案进行表达。两种构建体都含有C-末端His6标签,并通过固定化金属亲和色谱法(IMAC)进行纯化。所有纯化均使用GE AktaAvant25或Avant150进行。所使用的IMAC树脂是Ni Sepharose6Fast Flow(GE目录号17-5318-01)。首先,使用平衡缓冲液(20mM Tris pH7,500mM NaCl,5mM咪唑)对树脂进行平衡。通过树脂负载含有his标记的蛋白质的粗上清液。将树脂用约20-30柱体积的平衡缓冲液再平衡,然后用20-30柱体积的洗涤缓冲液(20mM Tris pH7,500mM NaCl,40mM咪唑)重新平衡。用约10柱体积的洗脱缓冲液(20mM Tris pH7,500mM NaCl,250mM咪唑)洗脱蛋白质。将洗脱的蛋白质立即通过凝胶过滤改进并重悬于1xPBS(137mM氯化钠,2.7mM氯化钾,4.3mM磷酸钠(二元,无水),1.4mM磷酸钾(一元,无水))中。

[0136] 此研究中使用的患者血清样品是在医院环境中作为常规护理的一部分收集的。

[0137] 抗E是经常鉴定的具有临床意义的同种抗体。具有抗E阳性结果的合并患者血清是从医院输血服务处获得的,用于研究。

[0138] 此研究中使用的RBC试剂细胞获自Biorad ID-DiaCell I-II-III。

[0139] 实验方案

[0140] 使用BioRad抗体筛选细胞I和II在抗人球蛋白(AHG)相进行柱凝集试验(CAT)

[0141] 评估了药物A在高达500μg/mL的浓度下干扰血清学血库测试的潜力。使用RBC试剂细胞ID-DiaCell I-II(Biorad)通过凝胶IAT(ID-Card LISS/Coombs,BIO-RAD)对掺杂药物A的血清进行抗体筛选。具体地,将25μL掺杂药物A的血清(0.1、1.0、10.0、100.0和500.0μg/mL)和50μL的悬浮于低离子强度盐水(LISS)中的0.8%试剂RBC添加至LISS/Coombs卡。在37℃下孵育15分钟后,将卡以1,030rpm离心10分钟。将凝集的强度分级为0(无凝集)、0.5+(极弱凝集)、1+(弱凝集)、2+(中度凝集)、3+(强凝集)或4+(极强凝集)。

[0142] 药物A与RBC结合的流式细胞术分析

[0143] 进行流式细胞术以测量药物A与试剂RBC的结合以及通过使用剂B或剂C结合的减少。将25μL掺杂药物A的血清(0.1、1.0、10.0、100.0和500.0μg/mL)或对意外抗体测试呈阴性的正常血清添加至50μL试剂RBC(ID-DiaCell I)。将25μL与10、30和50倍摩尔过量的剂B预孵育的掺杂药物A的血清(500.0μg/mL)添加至50μL测试RBC(ID-DiaCell I)。将25μL掺杂药物A的血清(500.0μg/mL)添加至50μL与10、50、100、300和500倍摩尔过量的剂C预孵育的试剂RBC(ID-DiaCell I)。将混合物在37℃下孵育15分钟,然后用PBS洗涤四次。将经洗涤的

混合物与0.5μL的FITC缀合的$F(ab')_2$片段山羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch,West Grove,PA)一起在4℃下孵育30分钟,然后用PBS洗涤两次。在FACSCanto II流式细胞仪(BD Biosciences,San Jose,CA)上获得每个样本至少20,000个事件,并且通过前向和侧向散射参数对RBC进行门控。

[0144] 结果

[0145] 由于药物A所致的干扰的确认

[0146] 基于关于药物A干扰RBC抗体筛选的潜力的先前结果(参见例如,实施例1),将药物A掺杂到已确认为不含红细胞抗体的正常混合血清中。此研究中使用的患者血清样品是在医院环境中作为常规护理的一部分收集的。药物A的最终浓度是0.1、1、10、100和500μg/mL。在人患者中观察到的10mg/kg QW剂量水平下观察到的最高浓度超过了247±32.5μg/mL的平均C_{max}(参见Jin等人"Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Characterization of DRUG A,a CD47 Blocker,in Patients with Advanced Malignancy and Non-Hodgkin Lymphoma."(Poster)Society for Immunotherapy of Cancer Annual Meeting,Washington,D.C.,2018年11月7-11日)。

[0147] 使用BioRad抗体筛选细胞I和II在抗人球蛋白(AHG)相下进行柱凝集试验(CAT)。在所测试的药物A浓度中观察到按0至4+的标度在2+至3+范围内的反应强度,从而表明药物A与RBC的结合以及药物A的Fc部分与AHG试剂的相互作用所致的干扰(表3)。

[0148] 表3.掺杂药物A的血清在抗人球蛋白(AHG)相下的柱凝集测试中测试呈阳性

[0149]

掺杂的药物A浓度(μg/mL)	I细胞(0.8% RBC)	II细胞(0.8% RBC)
500	+3	+3
100	+3	+3
10	+3	+3
1	+2	+2
0.1	+2	+2

[0150] 使用剂B减轻干扰

[0151] 剂B是包含IgSF结构域的CD47单体。假设剂B与溶液中药物A的结合将形成剂B-药物A复合物。还假设剂B-药物A复合物将不能结合至RBC上表达的内源性CD47,从而防止药物A干扰RBC抗体筛选测试。为了测试这种可能性,将浓度对应于与药物A的10X至500X摩尔比的剂B添加至掺杂药物A的血清。在室温(RT)下孵育30分钟后,再次使用BioRad抗体筛选细胞I和II进行AHG相下的CAT。在剂B的40X至100X摩尔比下实现了药物A干扰的消退(表4)。

[0152] 表4.剂B在抗人球蛋白(AHG)相下的柱凝集测试中减轻由于药物A所致的干扰

[0153]

	X10		X20		X30		X40	
掺杂的药物A (μg/mL)	I细胞(0.8% RBC)	II细胞(0.8% RBC)	I细胞(0.8% RBC)	II细胞(0.8% RBC)	I细胞(0.8% RBC)	II细胞(0.8% RBC)	I细胞(0.8% RBC)	II细胞(0.8% RBC)
500	+1	+1	+/-	+/-	-/+	-/+	-	-
100	+1	+1	+1	+/-	1+	-/+	-	-
10	+1	+1	+1	+1	+1	-/+	-	-
1	+2	+2	+1	+1	+1	+1	+1	+1
0.1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

	X50		X100		X200		X300	
掺杂的药物A (μg/mL)	I细胞(0.8% RBC)	II细胞(0.8% RBC)	I细胞(0.8% RBC)	II细胞(0.8% RBC)	I细胞(0.8% RBC)	II细胞(0.8% RBC)	II细胞(0.8% RBC)	I细胞(0.8% RBC)
500	-	-	NT*	NT*	NT*	NT*	NT*	NT*
100	-	-	NT*	NT*	NT*	NT*	NT*	NT*
10	-	-	NT*	NT*	NT*	NT*	NT*	NT*
1	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
0.1	-/+	+/-	-	-	-	-	-	-

[0154]

	X50	
掺杂的药物A (μg/mL)	I细胞(0.8% RBC)	I细胞(0.8% RBC)
500	NT*	NT*
100	NT*	NT*
10	NT*	NT*
1	NT*	NT*
0.1	NT*	NT*

*NT: 未测试

209.82 μM剂B (3.32 mg/mL)用于中和。具体地,将25 μL掺杂药物A的血浆(500 μg/mL,160 pmol)与8、16、24、32和40 μL剂B (10X,1.6 nmol; 20X,3.2nmol;30X,4.8nmol;

40X,6.4nmol;50X,8.0nmol)一起孵育。将25μL掺杂药物A的血浆(100μg/mL,32pmol)与1.6、3.2、4.8、6.4和8.0μL剂B(10X,320pmol;20X,640pmol;30X,960pmol;40X,1.28nmol;50X,1.6nmol)一起孵育。将25μL掺杂药物A的血浆(10μg/mL,3.2pmol)与160、320、480、640和800nL剂B(10X,32pmol;20X,64pmol;30X,96pmol;40X,128pmol;50X,160pmol)一起孵育。将25μL掺杂药物A的血浆(1μg/mL,320fmol)与16、32、48、64、80、160、320和480nL剂B(10X,3.2pmol;20X,6.4pmol;30X,9.6pmol;40X,12.8pmol;50X,16.0pmol;100X,32.0pmol;200X,64.0pmol;300X,96.0pmol)一起孵育。将25μL掺杂药物A的血浆(0.1μg/mL,32fmol)与1.6、3.2、4.8、6.4、8.0、16.0、32.0和48.0nL剂B(10X,320fmol;20X,640pmol;30X,960fmol;40X,1.28pmol;50X,1.60pmol;100X,3.2pmol;200X,6.4pmol;300X,9.6pmol)一起孵育。

[0155] 使用剂C减轻干扰

[0156] 剂C是重组高亲和力SIRPα单体(对人CD47的Kd=14.4pM)。据推测,剂与RBC上表达的CD47的结合将阻止药物A结合RBC上表达的CD47,从而防止药物A干扰RBC抗体筛选测试。为了测试这种可能性,将BioRad抗体筛选细胞I和II与浓度对应于与药物A的10x至500x摩尔比的剂C一起孵育。在室温(RT)下孵育30分钟后,在使用掺杂药物A的血清的AHG相的CAT中测试了剂C孵育的试剂RBC。在剂C的300X摩尔比下实现了药物A干扰的消退(表5)。

[0157] 表5:剂C在抗人球蛋白(AHG)相下的柱凝集测试中减轻由于药物A所致的干扰

[0158]

	X10		X20		X30		X40	
掺杂的药物A(μg/mL)	I细胞(0.8% RBC)	II细胞(0.8% RBC)	I细胞(0.8% RBC)	II细胞(0.8% RBC)	I细胞(0.8% RBC)	II细胞(0.8% RBC)	I细胞(0.8% RBC)	II细胞(0.8% RBC)
500	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2
100	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
10	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2
1	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2
0.1	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2

	X50		X100		X200		X300	
掺杂的药物A(μg/mL)	I细胞(0.8% RBC)	II细胞(0.8% RBC)	I细胞(0.8% RBC)	II细胞(0.8% RBC)	I细胞(0.8% RBC)	II细胞(0.8% RBC)	I细胞(0.8% RBC)	II细胞(0.8% RBC)
500	+1	+1	+1	+/-	+1	+1	+1	+/-
100	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
10	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
0.1	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+1	+1

	X500	
掺杂的药物A(μg/mL)	I细胞(0.8% RBC)	I细胞(0.8% RBC)
500	NT*	NT*
100	-	-
10	-	-
1	-	-
0.1	-	-

[0159] NT:未测试

[0160] 345.66μM剂C(4.77mg/mL)用于掩蔽试剂RBC的CD47上的药物A结合位点。具体地,将25μL掺杂药物A的血浆(500μg/mL,160pmol)与5、10、15、20、25、50和150μL剂C(10X,1.6nmol;20X,3.2nmol;30X,4.8nmol;40X,6.4nmol;50X,8.0nmol;100X,16.0nmol;300X,48.0nmol)一起孵育。将25μL掺杂药物A的血浆(100μg/mL,32pmol)与1、2、3、4、5、10、30和50μL剂C(10X,320pmol;20X,640pmol;30X,960pmol;40X,1.28nmol;50X,1.6nmol;100X.3.2nmol;300X,9.6nmol;500X,16nmol)一起孵育。将25μL掺杂药物A的血浆(10μg/mL,3.2pmol)与0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1.0、3.0和5.0μL剂C(10X,32pmol;20X,64pmol;30X,96pmol;40X,128pmol;50X,160pmol;100X,320pmol;300X,960pmol;500X,1.6nmol)一起孵育。将25μL掺杂药物A的血浆(1μg/mL、320fmol)与10、20、30、40、50、100、300和500nL剂C(10X,3.2pmol;20X,6.4pmol;30X,9.6pmol;40X,12.8pmol;50X,16.0pmol;100X,32.0pmol;300X,96.0pmol;500X,160.0pmol)一起孵育。将25μL掺杂药物A的血浆(0.1μg/mL,32fmol)与1、2、3、4、5、10、30和50nL剂C(10X,320fmol;20X,640pmol;30X,960fmol;40X,1.28pmol;50X,1.60pmol;100X,3.2pmol;300X,9.6pmol;500X,16.0pmol)一起孵育。

[0161] 使用剂B或剂C减轻干扰允许检测患者血清中的RBC同种抗体

[0162] 为了研究剂B或剂C对药物A干扰的减轻是否将允许检测真正的RBC同种抗体,将含有抗E的合并人血清(一种示例性RBC同种抗体)用于与上述实验类似的实验中。抗E是通常鉴定的具有临床意义的同种抗体,并且具有抗E阳性结果的合并患者血清是从医院输血服务处获得的,用于研究。此研究中使用的患者血清样品是作为常规护理的一部分收集的。将含有抗E的患者血清中掺杂0.1至500μg/mL的药物A。使用Biorad I和II细胞进行AHG相下的CAT。虽然Biorad II细胞为E阳性,但在所有药物A浓度下,在两种试剂细胞情况下均观察到泛阳性(表6A)。然而,在室温下与32μL剂B(3.32mg/mL)(其为25μL药物A(500μg/ml)的摩尔比的40x)一起孵育30分钟后,AHG向下的CAT仅揭示BioradII细胞阳性,从而表明仅检测到抗E活性,并且在所有测试的药物A浓度下都消退了药物A干扰(表6B)。

[0163] 用剂C观察到类似的结果。将BioRad抗体筛选细胞I和II与150μL剂C(4.77mg/mL)(其是25μL药物A(500μg/ml)的摩尔比的300x)一起在室温下孵育30分钟。使用含有抗E的掺杂药物A的患者血清进行AHG相下的CAT,并且仅揭示Biorad II细胞呈阳性,从而表明仅检测到抗E活性,并且在所有测试的药物A浓度下都消退了药物A干扰(表6C)。

[0164] 表6A-6C.使用剂B或剂C减轻干扰允许检测患者血清中的RBC同种抗体

[0165] 表6A.

[0166]

掺杂的药物A (μg/mL)	I细胞 (0.8% RBC)	II细胞 (0.8% RBC)*
500	+3	+4
100	+3	+4
10	+3	+4
1	+2	+4
0.1	+2	+4

[0167] *Biorad II细胞是E阳性。

[0168] 表6B#

[0169]

	X40 剂B (6.4 nmol)	
掺杂的药物A (μg/mL)	I细胞 (0.8% RBC)	II细胞 (0.8% RBC)*
500	-	+4
100	-	+4
10	-	+4
1	-	+4
0.1	-	+4

[0170] *Biorad II细胞是E阳性。

[0171] ‡6.4nmol剂B(500μg/mL药物A的40x摩尔比)用于所有测试的药物A浓度。

[0172] 表6C‡.

[0173]

	X300 剂C (48.0 nmol)	
掺杂的药物A (μg/mL)	I细胞 (0.8% RBC)	II细胞 (0.8% RBC)*
500	-	+4
100	-	+4
10	-	+4
1	-	+4
0.1	-	+4

[0174] *Biorad II细胞是E阳性。

[0175] ‡48nmol剂C(500μg/mL药物A的300x摩尔比)用于所有测试的药物A浓度。

[0176] 通过流式细胞术对药物A与RBC结合的相关性分析

[0177] 为了确定药物A与试剂RBC上表达的CD47的结合是否因可溶性高亲和力SIRPα(剂C)或可溶性CD47(剂B)的存在而实际上降低,如下进行流式细胞术分析:将药物A以0(阴性对照)、0.1、1.0、10、100和500μg/mL掺杂到正常血清中。将BioRAD I细胞与掺杂药物A的血清样品一起在37℃下孵育15分钟。将FITC缀合的抗人IgG用于染色药物A结合的RBC。通过流式细胞术分析细胞并测定MFI(平均荧光强度)。

[0178] 为了评估剂B对药物A与RBC结合的影响,将掺杂药物A的血清样品和未掺杂的阴性对照样品与剂B(浓度范围为药物A的10x至50x摩尔比)一起孵育在室温下孵育15分钟。将BioRAD I细胞与血清样品一起在37℃下孵育15分钟,然后进行流式细胞术分析。

[0179] 为了评估剂C对药物A与RBC的结合的影响,将剂C(浓度范围为药物A的10x至500x摩尔比)在37℃下添加至BioRAD I细胞15分钟。将细胞与掺杂药物A的血清样品以及未掺杂的阴性对照样品在37℃下进一步孵育15分钟,然后进行流式细胞术分析。

[0180] RBC与血清中所含的药物A结合,如通过增加的FITC信号所指示。随着掺杂到血清

中的药物A浓度增加,观察到MFI的浓度依赖性增加(表7A)。剂B和剂C两者＝有效且以浓度依赖性方式减少药物A与RBC的结合(表7B和7C)。

[0181] 表7A-7C.剂B和剂C减少药物A与RBC的结合

[0182] 表7A.

[0183]

	浓度	MFI (FITC 通道)
药物 A	0	8
	0.1	403
	1	2941
	10	3308
	100	4084
	500	4858

[0184] 表7B.

[0185]

药物 A 浓度(μg/ml)	剂 B 摩尔比	剂 Bmol	MFI (FITC 通道)
0.1	10x	0.32 pmol	125
	30x	0.96 nmol	105
	50x	1.6 pmol	77
1	10x	3.2 pmol	212
	30x	9.6 pmol	52
	50x	16.0 pmol	26
10	10x	32 pmol	184
	30x	96 pmol	99
	50x	160 pmol	41
100	10x	320 pmol	90
	30x	960 pmol	28
	50x	1600 pmol	22
500	10x	1.6 nmol	67
	30x	4.8 nmol	71
	50x	8.0 nmol	40

[0186] 表7C.

[0187]

药物 A 浓度(μg/ml)	剂 C 摩尔比	剂 C mol	MFI (FITC 通道)
0.1	10x	0.32 pmol	62

[0188]

药物A浓度(μg/ml)	剂C摩尔比	剂C mol	MFI (FITC通道)
	50x	1.6 pmol	40
	100x	3.2 pmol	28
	300x	9.6 pmol	16
	500x	16.0 pmol	7
1	10x	3.2 pmol	87
	50x	16.0 pmol	41
	100x	32.0 pmol	15
	300x	96.0 pmol	16
	500x	160 pmol	10
10	10x	32 pmol	138
	50x	160 pmol	8
	100x	320 pmol	47
	300x	960 pmol	15
	500x	1.6 nmol	15
100	10x	320 pmol	111
	50x	1.6 nmol	20
	100x	3.2 nmol	35
	300x	9.6 nmol	31
	500x	16.0 nmol	19
500	10x	1.6 nmol	89
	50x	8.0 nmol	42
	100x	16.0 nmol	50
	300x	48.0 nmol	40
	500x	80.0 nmol	42

[0189] 结论

[0190] 在使用BioRad抗体筛选细胞I和II的抗人球蛋白(AHG)相下的柱凝集测试(CAT)中,血清中浓度至多500μg/mL的药物A干扰测试并产生假阳性结果。使用重组CD47单体(剂B)或高亲和力SIRPα单体(剂C),这种干扰得到消退。此外,抗E(一种临床相关的同种抗体)在用剂B或剂C消退药物A的干扰后可在血清中检测到。相关流式细胞术分析表明药物A以浓度依赖性方式结合至RBC。剂B和剂C两者都减少了药物A与RBC的结合,这与结合RBC上表达的CD47的药物A干扰的中和一致。

[0191] 参考文献

[0192] Brown EJ,Frazier WA.Integrin-associated protein(CD47)and its ligands.Trends Cell Biol.2001 Mar;11(3):130-5.

[0193] Chao MP,Alizadeh AA,Tang C,Myklebust JH,Varghese B,Gill S,et al.Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis ad eradicate non-Hodgkin lymphoma.Cell.2010 Sep 3;142(4):699-713.

[0194] Jaiswal S,Chao MP,Mejeti R and Weissman IL.Macrophagesas mediators oftumor immunosurveillance.Trends Immmunol.2010June;31(6):212-219.

[0195] Oldenborg PA.Zheleznyak A,Fang YF,Lagenaur CF,Greshan HD et al.Role ofCD47 as a marker of self on red blood cells.Science 2000 Jun 16;288(5473):

2051-4.

[0196] Weiskopf K,Ring AM,Ho CC,Volkmer J-P,Levin AM,Volkmer AK,et al.Engineered SIRPαvariants as immunotherapeutic adjuvants to anticancer antibodies.Science.2013 Jul 5;341(6141):88-91.

[0197] Willingham SB,Volkmer JP,Gentles AJ,Sahoo D,Dalerba P,Mitra SS,et al.The CD47-signal regulatory protein alpha(SIRPα)interaction is a therapeutic target for human solid tumors.Proc Natl Acad Sci USA.2012 Apr 24;109(17):6662-7.

[0198] Zhao XW,Van Beek EM,Schornagela K,Van der Maadenb H,Houdta MV;CD47-signal regulatory protein-α(SIRPα)interactions form a barrier for antioody-mediated tumor cell destruction.Proc Natl Acad Sci USA.2011Nov 8;108(45):18342-7.

[0199] Technical Manual.Current Edition.Bethesda:AABB.

[0200] 总结

[0201] 在使用BioRad抗体筛选细胞I和II的抗人球蛋白(AHG)相下的柱凝集测试(CAT)中,血清中药物A的存在显示出对测试的干扰并导致假阳性结果。使用重组CD47单体(剂B)或高亲和力SIRPα单体(剂C),这种干扰得到消退。此外,抗E(一种临床相关的同种抗体)在通过剂B或剂C消退的干扰后仍检测到。相关流式细胞术分析表明药物A以浓度依赖性方式结合至RBC。剂B和剂C两者均降低了药物A与RBC的结合,与ALX干扰的中和一致。

[0202] 实施例4.使用抗SIRPα抗体(或其抗原结合片段)减轻常规血清学测试中包含(i)抗体Fc区和(ii)结合至人CD4的部分的药物的干扰进行下述实验以评估是否能够通过添加抗SIRPα抗体(或其Fab片段)来中和由较高浓度的药物A诱导的干扰。进行相关流式细胞术分析以评估与RBC表面上的CD47结合的药物A是否能够通过添加抗SIRPα抗体(或其Fab片段)被取代。

[0203] 如下进行血凝测定:将在3%-3.4%改良的阿尔塞弗氏溶液(Bio-Rad)中合并的人红细胞以每孔40μl添加在96孔板(Falcon)中。将孔与250ng/mL的PBS(Gibco)或药物A一起在37℃下孵育1小时,且随后在PBS中洗涤3次,每次洗涤后充分倾析。将抗体A和C的Fab片段(即阻断SIRPα与CD47之间的相互作用的示例性抗SIRPα抗体)以1:2的比例从100μg/mL或625μg/mL开始滴定,并与药物A包被的红细胞一起在37℃下孵育1小时,然后用PBS洗涤3次,并充分倾析剩余液体。然后将两滴抗人球蛋白抗IgG(Bio-Rad)添加至每个孔中并以800G离心30秒,然后轻轻地移出沉淀并捕获jpeg图像。抗体A包含含有SEQ ID NO:6的重链可变结构域(V_H)和含有SEQ ID NO:7的轻链可变结构域(V_L)。抗体C包含含有SEQ ID NO:21的重链可变结构域(V_H)和含有SEQ ID NO:22的轻链可变结构域(V_L)。用抗体B(即不阻断SIRPα与CD47之间的相互作用的示例性抗SIRPα抗体)进行平行实验。抗体B包含含有SEQ ID NO:23的重链可变结构域(V_H)和含有SEQ ID NO:24的轻链可变结构域(V_L)。抗体A、B和C中的每一者都与SIRPβ和SIRPγ交叉反应。与PBS或单独药物A一起孵育的红细胞分别充当测定的阴性和阳性对照。

[0204] 如图5A所示,抗体C(其阻断SIRPα与CD47之间的相互作用)当以相对于药物A的量200倍和400倍摩尔过量添加至药物A包被的红细胞时阻止血凝。抗体A(其也阻断SIRPα与

CD47之间的相互作用)当以相对于药物A的量2500倍摩尔过量添加至药物A包被的红细胞中时阻止血凝。添加抗体B(一种不会阻断SIRPa与CD47两者之间的相互作用的抗SIRPα抗体)当以相对于药物A的量400倍摩尔过量添加至药物A包被的红细胞时阻止血凝。图5A中所示的结果表明,抗体A、抗体B和抗体C的Fab各自通过取代来自CD47红细胞的药物A阻止了血凝。红细胞表面上的CD47。

[0205] 为了确认抗体A和抗体C的Fab能够取代与红细胞表面上的CD47结合的药物A,如下进行流式细胞术实验:根据制造商的说明,使用Alexa Fluor 647蛋白质标记试剂盒(Thermo Fisher Scientific)对药物A进行荧光标记。将DLD-1人结肠上皮细胞在染色缓冲液(PBS,2%FBS)中洗涤一次,并在PBS中用可固定的活/死染色剂(Invitrogen)在4℃下染色1小时。然后将细胞在染色缓冲液中洗涤,并在96孔板(Falcon)中与100ng/mL的标记的药物A和未标记的抗体A Fab或未标记的抗体C Fab以50μg/mL开始1:2滴定下共孵育。在4℃下孵育1小时后,将细胞在染色缓冲液中洗涤两次并固定在0.5%多聚甲醛中。在Attune(ThermoScientific)上分析细胞,且随后使用Flowjo10.6进行数据分析。药物A与DLD-1细胞表面上的CD47的结合由Alexa Fluor 647的中值荧光强度指示。如图5B所示,向结合药物A的细胞添加抗体A和抗体C降低了药物A与DLD-1细胞表面上的CD47的结合。这些结果表明抗体A和抗体C能够取代与DLD-1细胞表面上的CD47结合的药物A。

[0206] 总之,此实施例中的结果表明,抗体A、B和C可通过取代与血细胞表面上的CD47结合的药物A而防止常规血清学测定中的干扰。这些结果还表明,与SIRPα、SIRPβ和SIRPγ交叉反应的抗体可通过取代与血细胞表面上的CD47结合的药物A来防止常规血清学测定中的干扰。

[0207] 除非明确有相反的指示,否则本文描述的每个实施方案都可与任何其他一个或多个实施方案组合。具体地,除非明确有相反的指示,否则指示为优选或有利的任何特征或实施方案都可与指示为优选或有利的任何一个或多个其他特征或实施方案组合。

[0208] 本申请中引用的所有参考文献都被以引用方式明确并入本文中。

序列表

<110> ALX 肿瘤生物技术公司(ALX ONCOLOGY INC)

<120> 用于在血清学测定中减少结合 CD47 的药物的干扰的方法和试剂

<130> 75797-20009.40

<140> 尚未分配
<141> 同时随同提交

<150> US 62/934,395
<151> 2019-11-12

<150> US 62/858,871
<151> 2019-06-07

<160> 24

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

[0001]

<400> 1

```
Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Ser Asn
 1               5                  10                  15
Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn
            20                  25                  30
Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr
        35                  40                  45
Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser
    50                  55                  60
Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu
65                  70                  75                  80
Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys
                85                  90                  95
Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys
            100                 105                 110
Tyr Arg Val Val Ser
        115
```

<210> 2
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 2

```
Trp Gln Leu Pro Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr
 1               5                  10                  15
```

Phe Gly Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu
20 25 30
Ala Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg
35 40 45
Asp Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Asp Lys Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr
50 55 60
Asp Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp
65 70 75 80
Ala Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn
85 90 95
Tyr Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile
100 105 110
Glu Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser
115 120

<210> 3
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 3
Trp Gln Pro Pro Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr
1 5 10 15
Phe Gly Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu
20 25 30
[0002] Ala Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg
35 40 45
Asp Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Gln Ala Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr
50 55 60
Asp Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp
65 70 75 80
Ala Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn
85 90 95
Tyr Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile
100 105 110
Glu Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser
115 120

<210> 4
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 4
Trp Gln Pro Pro Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr
1 5 10 15
Phe Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu
20 25 30
Ala Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg
35 40 45
Asp Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Gln Ala Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr
50 55 60

Asp Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp
65 70 75 80
Ala Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn
85 90 95
Tyr Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile
100 105 110
Glu Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser
115 120

<210> 5
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 5
Trp Gln Pro Pro Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr
1 5 10 15
Cys Gly Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu
20 25 30
Ala Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg
35 40 45
Asp Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Gln Ala Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr
50 55 60
Asp Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp
65 70 75 80
[0003] Ala Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn
85 90 95
Tyr Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile
100 105 110
Glu Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser
115 120

<210> 6
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 6
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Arg Ile Asn Ser Gly Gly Gly Gly Thr Asp Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gln Tyr Asp Trp Asn Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Leu Gly
100 105 110

Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 7
Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Val Gly Ser Lys
20 25 30
Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Thr Asn Arg Ala Thr Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Thr
65 70 75 80
Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Tyr Trp Pro Pro
85 90 95
Tyr Arg Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 8
[0004] <211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 8
Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala
1 5 10 15
Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
20 25 30
Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Val Leu
35 40 45
Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60
Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Ala
65 70 75 80
Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys
85 90 95
Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
100 105 110
Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
115

<210> 9
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 9
Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala
1 5 10 15
Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
20 25 30
Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu
35 40 45
Ile Tyr Asn Gln Arg Glu Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60
Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Ala
65 70 75 80
Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
85 90 95
Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
100 105 110
Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
115

<210> 10
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

[0005]

<400> 10
Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala
1 5 10 15
Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
20 25 30
Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Val Leu
35 40 45
Ile Tyr Asn Gln Arg Glu Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60
Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Ala
65 70 75 80
Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys
85 90 95
Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
100 105 110
Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
115

<210> 11
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 11
Glu Asp Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Glu Lys Ser Val Ser Val Ala
1 5 10 15

Ala Gly Glu Ser Ala Thr Leu Arg Cys Ala Ile Thr Ser Leu Phe Pro
20 25 30
Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Ala Gly Arg Val Leu
35 40 45
Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60
Glu Thr Thr Lys Arg Asn Asn Leu Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Asn
65 70 75 80
Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys
85 90 95
Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
100 105 110
Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
115

<210> 12
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 12
Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser Ile Ser Val Ala
1 5 10 15
Ala Gly Glu Ser Ala Thr Leu His Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
20 25 30
[0006] Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Val Leu
35 40 45
Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60
Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Ser Asn
65 70 75 80
Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys
85 90 95
Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
100 105 110
Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
115

<210> 13
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 13
Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Glu Lys Leu Leu Leu Val Thr
1 5 10 15
Val Gly Lys Thr Ala Thr Leu His Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
20 25 30
Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Val Gly Pro Gly Arg Val Leu
35 40 45
Ile Tyr Asn Gln Arg Asp Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60

Asp Gly Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Ser Ser
65 70 75 80
Ile Thr Pro Ala Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
85 90 95
Gly Thr Pro Glu Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Pro Gly Thr Glu Met
100 105 110
Ala Leu Gly Ala Lys Pro Ser
115

<210> 14
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 14
Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Glu Lys Leu Leu Leu Val Thr
1 5 10 15
Val Gly Lys Thr Ala Thr Leu His Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
20 25 30
Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Val Gly Pro Gly Arg Val Leu
35 40 45
Ile Tyr Asn Gln Lys Asp Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60
Asp Gly Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Ser Ser
65 70 75 80
[0007] Ile Thr Pro Ala Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
85 90 95
Gly Ser Pro Glu Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Pro Gly Thr Glu Met
100 105 110
Ala Leu Gly Ala Lys Pro Ser
115

<210> 15
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 15
Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Glu Lys Leu Leu Leu Val Thr
1 5 10 15
Val Gly Lys Thr Ala Thr Leu His Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
20 25 30
Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Val Gly Pro Gly Arg Val Leu
35 40 45
Ile Tyr Asn Gln Lys Asp Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60
Asp Gly Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Ser Ser
65 70 75 80
Ile Thr Pro Ala Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
85 90 95
Gly Ser Pro Glu Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Pro Gly Thr Glu Met
100 105 110

Ala Leu Gly Ala Lys Pro Ser
115

<210> 16
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 16
Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Glu Lys Leu Leu Leu Val Thr
1 5 10 15
Val Gly Lys Thr Ala Thr Leu His Cys Thr Ile Thr Ser His Phe Pro
20 25 30
Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Val Gly Pro Gly Arg Val Leu
35 40 45
Ile Tyr Asn Gln Lys Asp Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60
Asp Gly Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Ser Ser
65 70 75 80
Ile Thr Pro Ala Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
85 90 95
Gly Ser Pro Glu Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Pro Gly Thr Glu Met
100 105 110
Ala Leu Gly Ala Lys Pro Ser
115

[0008]

<210> 17
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 17
Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Glu Lys Leu Leu Leu Val Thr
1 5 10 15
Val Gly Lys Thr Ala Thr Leu His Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
20 25 30
Val Gly Pro Val Leu Trp Phe Arg Gly Val Gly Pro Gly Arg Val Leu
35 40 45
Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60
Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Ser Ser
65 70 75 80
Ile Thr Pro Ala Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
85 90 95
Gly Thr Pro Glu Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Pro Gly Thr Glu Met
100 105 110
Ala Leu Gly Ala Lys Pro Ser
115

<210> 18
<211> 119
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 18
Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Glu Lys Leu Leu Leu Val Thr
 1   5   10   15
Val Gly Lys Thr Ala Thr Leu His Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
            20   25   30
Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Val Gly Pro Gly Arg Glu Leu
        35   40   45
Ile Tyr Asn Ala Arg Glu Gly Arg Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
    50   55   60
Asp Leu Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Ser Ser
65   70   75   80
Ile Thr Pro Ala Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
                85   90   95
Gly Ser Pro Glu Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Pro Gly Thr Glu Met
            100   105   110
Ala Leu Gly Ala Lys Pro Ser
        115

<210> 19
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0009]
<220>
<223> 合成构建体

<400> 19
Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Glu Lys Leu Leu Leu Val Thr
 1   5   10   15
Val Gly Lys Thr Ala Thr Leu His Cys Thr Ile Thr Ser Leu Leu Pro
            20   25   30
Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Val Gly Pro Gly Arg Glu Leu
        35   40   45
Ile Tyr Asn Gln Arg Asp Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
    50   55   60
Asp Gly Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Ser Ser
65   70   75   80
Ile Thr Pro Ala Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
                85   90   95
Gly Thr Pro Glu Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Pro Gly Thr Glu Met
            100   105   110
Ala Leu Gly Ala Lys Pro Ser
        115

<210> 20
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 20

Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala
1 5 10 15
Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
20 25 30
Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Val Leu
35 40 45
Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60
Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn
65 70 75 80
Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys
85 90 95
Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
100 105 110
Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
115

<210> 21
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 21
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Gly Ile Ser Ser Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ile Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Glu Thr Trp Asn His Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

[0010]

<210> 22
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 22
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Ser Tyr Tyr Tyr
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Thr Leu Ile Tyr
35 40 45

Ser Asp Asp Lys Arg Pro Ser Asn Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gly Tyr Asp Gln Ser Ser Tyr Thr
85 90 95
Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 23
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 23
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Asp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Leu Ile Ser Gly Ser Gly Glu Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
[0011] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Glu Asn Asn Arg Tyr Arg Phe Phe Asp Asp Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体

<400> 24
Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Thr Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Thr Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Arg Pro Pro
85 90 95
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

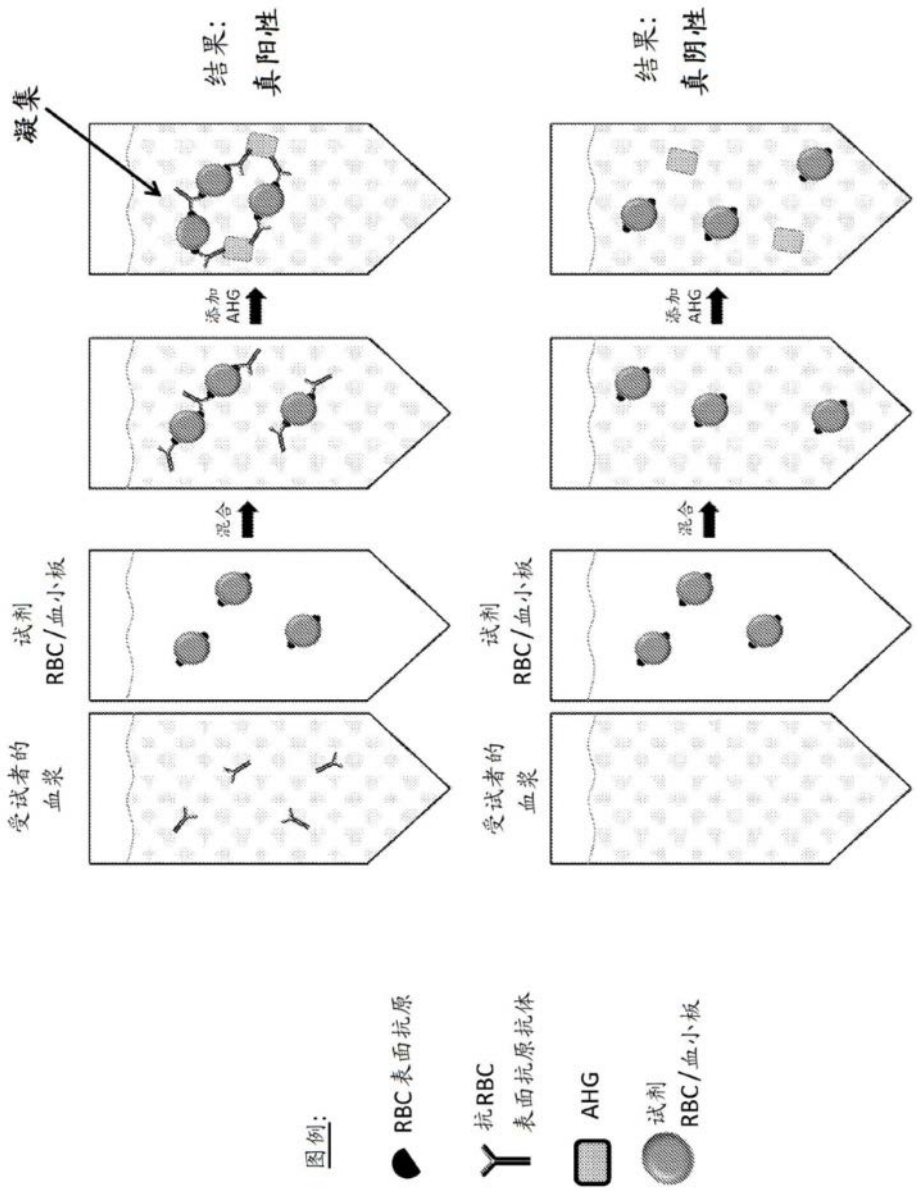

凝集
结果：
真阳性
添加
AHG
混合
试剂
RBC/血小板
受试者的
血浆
结果：
真阴性
添加
AHG
混合
试剂
RBC/血小板
受试者的
血浆
图例：
RBC表面抗原
抗RBC
表面抗原抗体
AHG
试剂
RBC/血小板

图1A

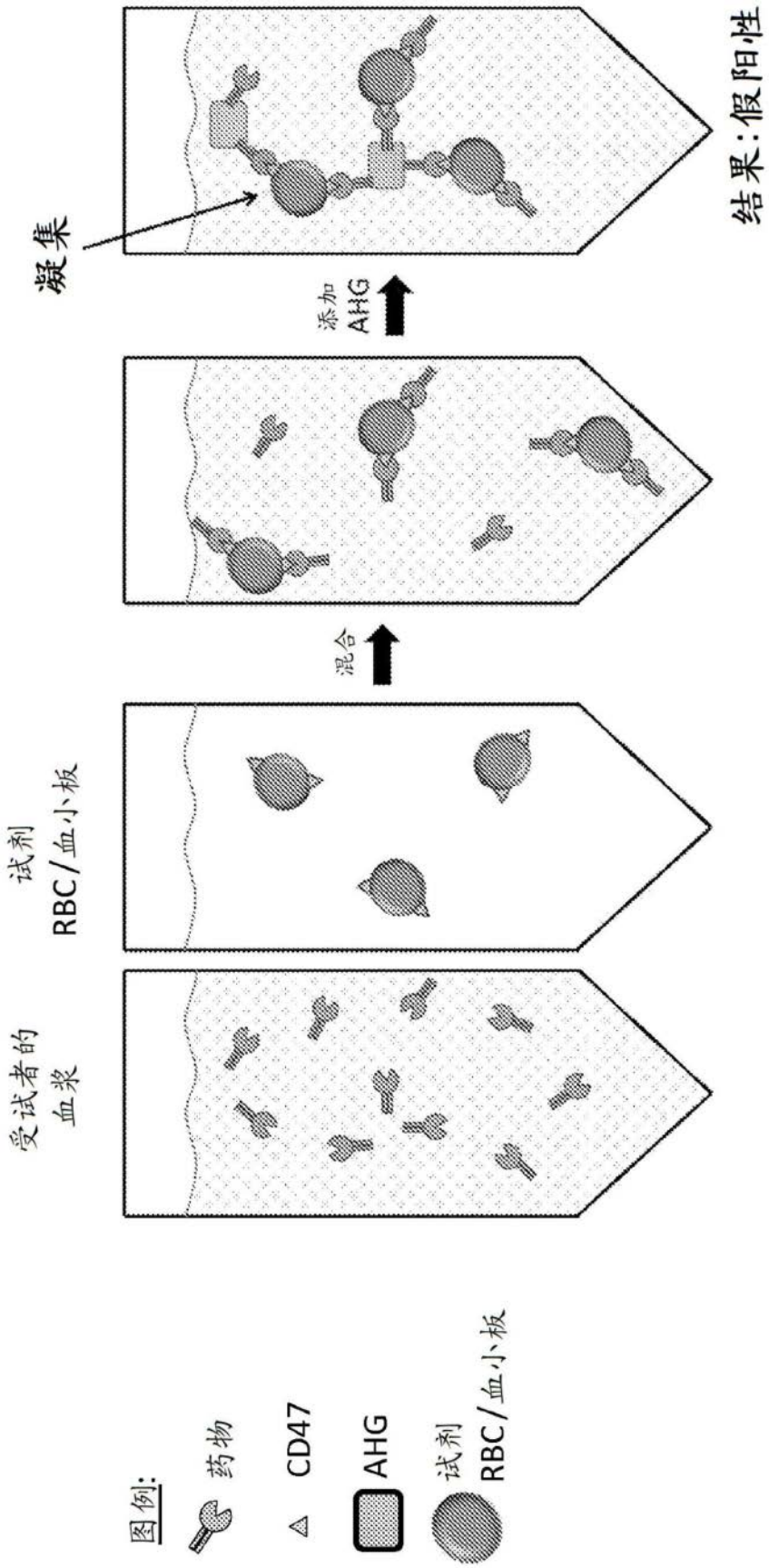


图1B

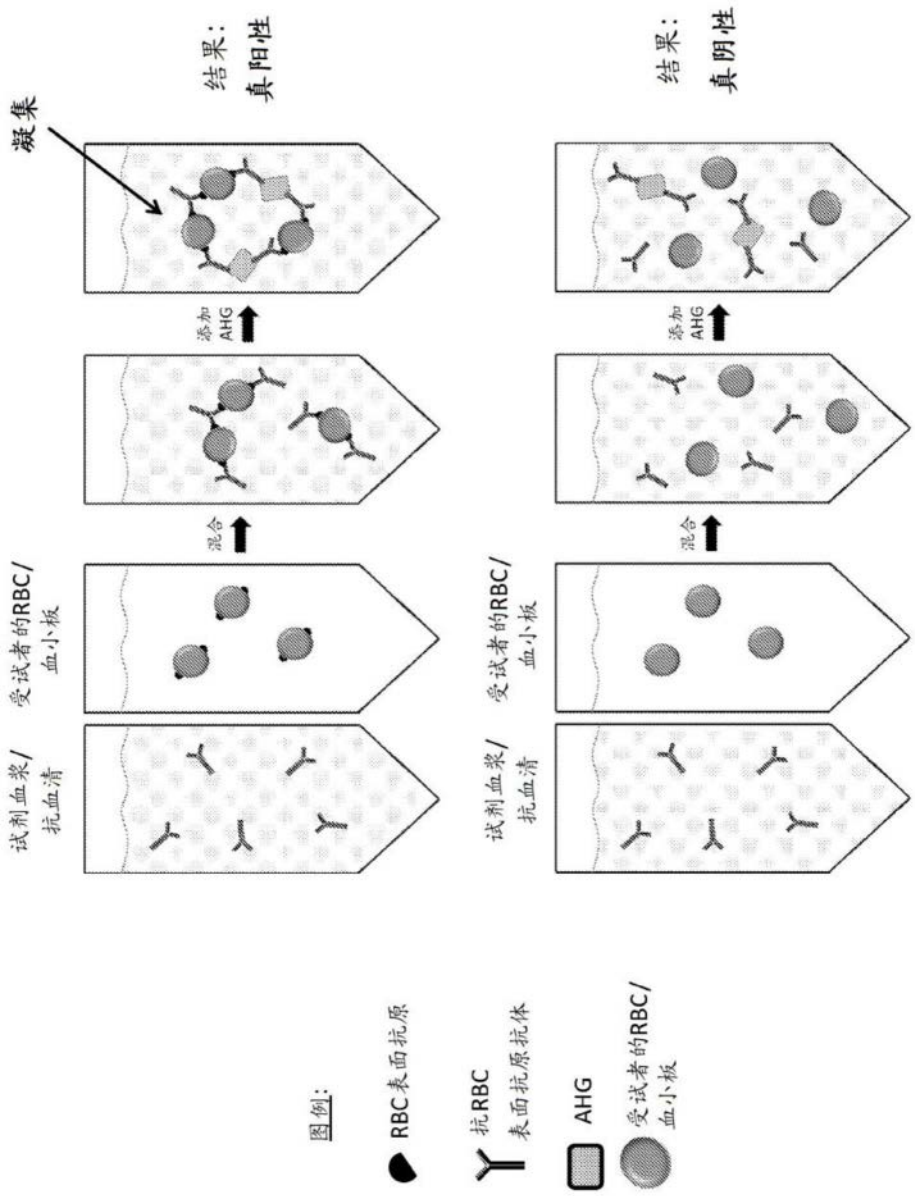

凝集
结果：
真阳性
添加
AHG
混合
试剂血浆/
抗血清
受试者的RBC/
血小板
结果：
真阴性
添加
AHG
混合
试剂血浆/
抗血清
受试者的RBC/
血小板
图例：
RBC表面抗原
抗RBC
表面抗原抗体
AHG
受试者的RBC/
血小板

图1C

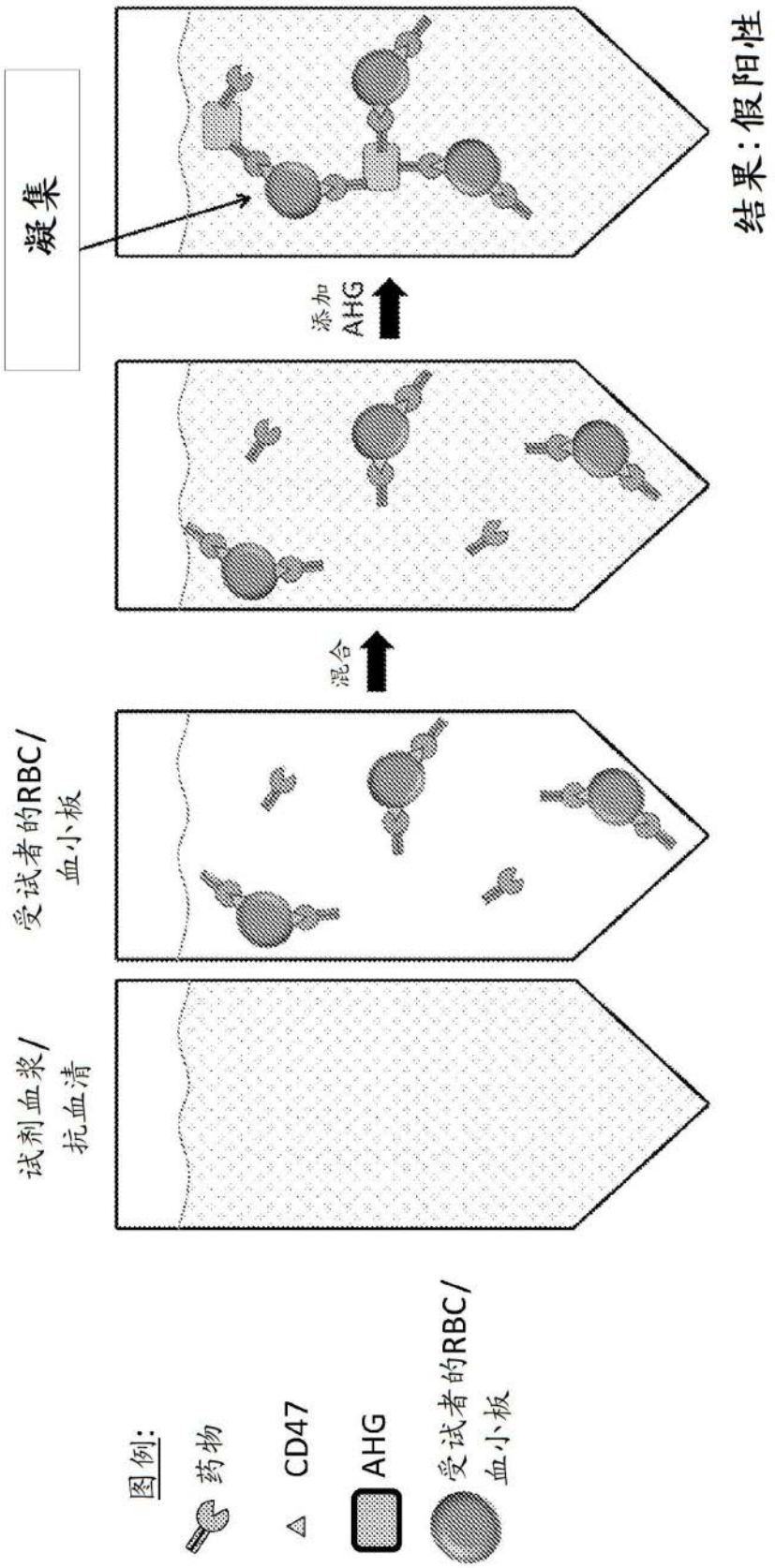

试剂血浆/
抗血清
受试者的RBC/
血小板
混合
添加
AHG
凝集
结果:假阳性
图例:
药物
CD47
AHG
受试者的RBC/
血小板

图1D

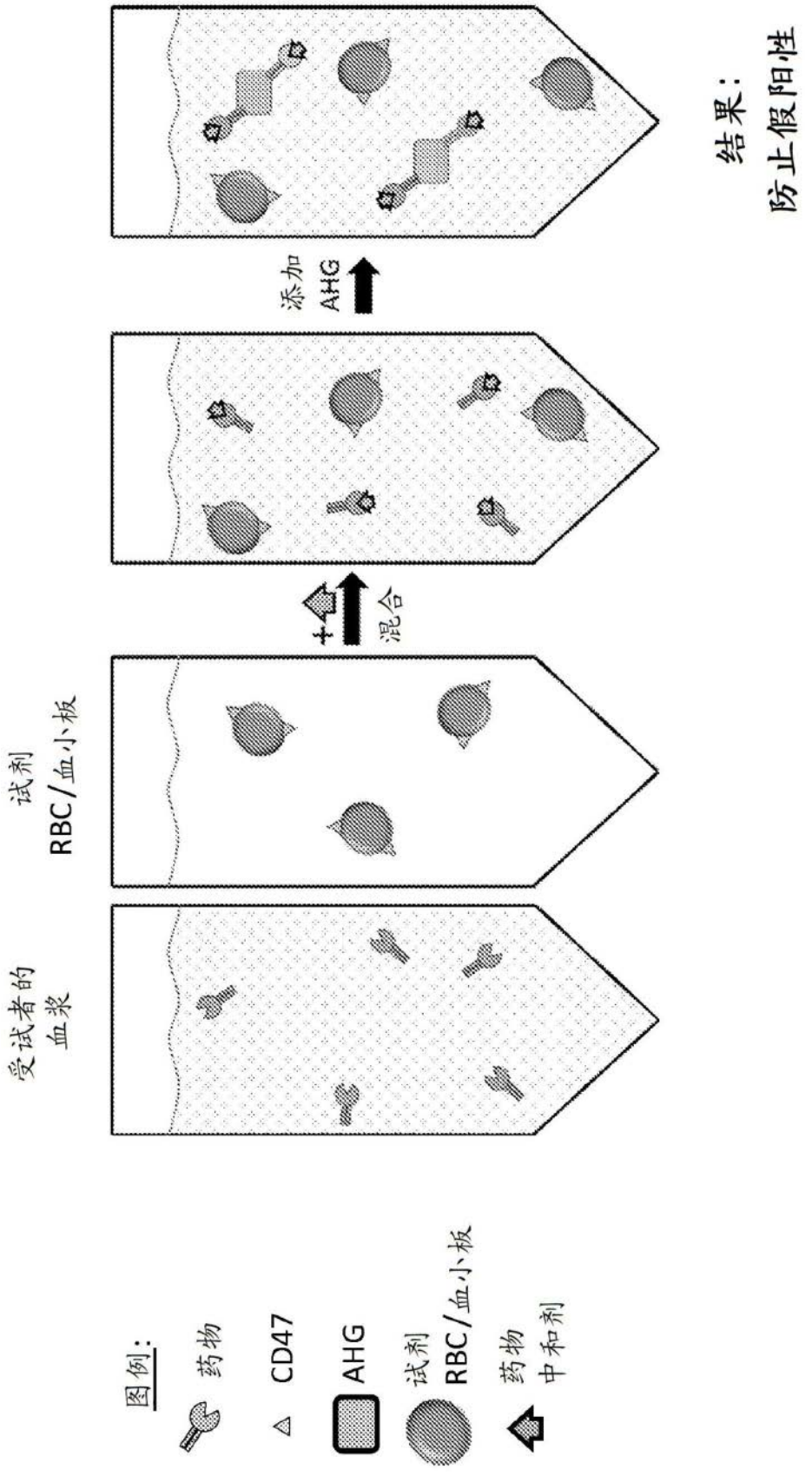

受试者的血浆
试剂
RBC/血小板
混合
添加
AHG
结果：
防止假阳性
图例：
药物
CD47
AHG
试剂
RBC/血小板
药物
中和剂

图2

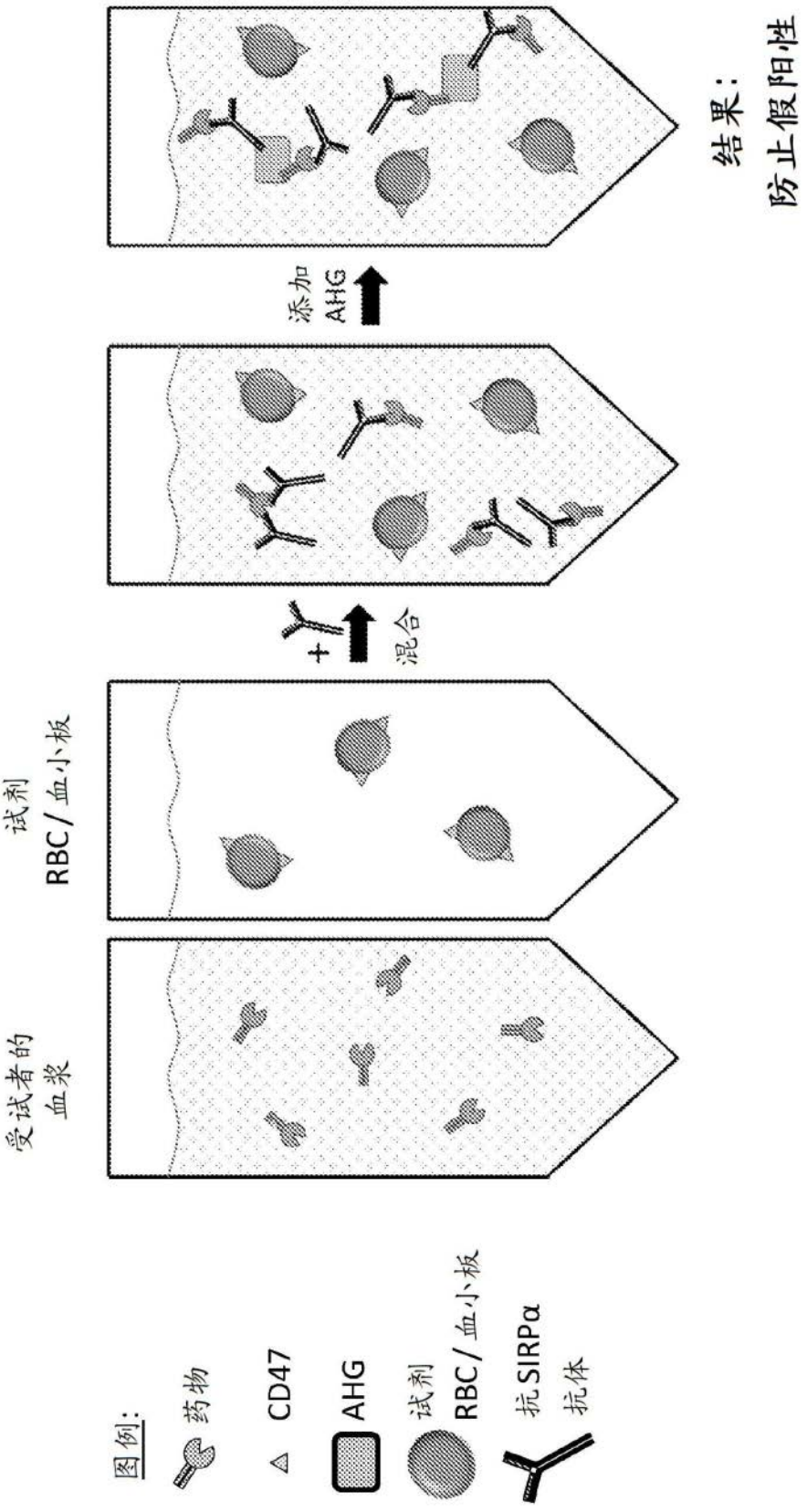

受试者的血浆
试剂 RBC/血小板
混合
添加 AHG
结果：防止假阳性
图例：
药物
CD47
AHG
试剂 RBC/血小板
抗SIRPα抗体

图3A

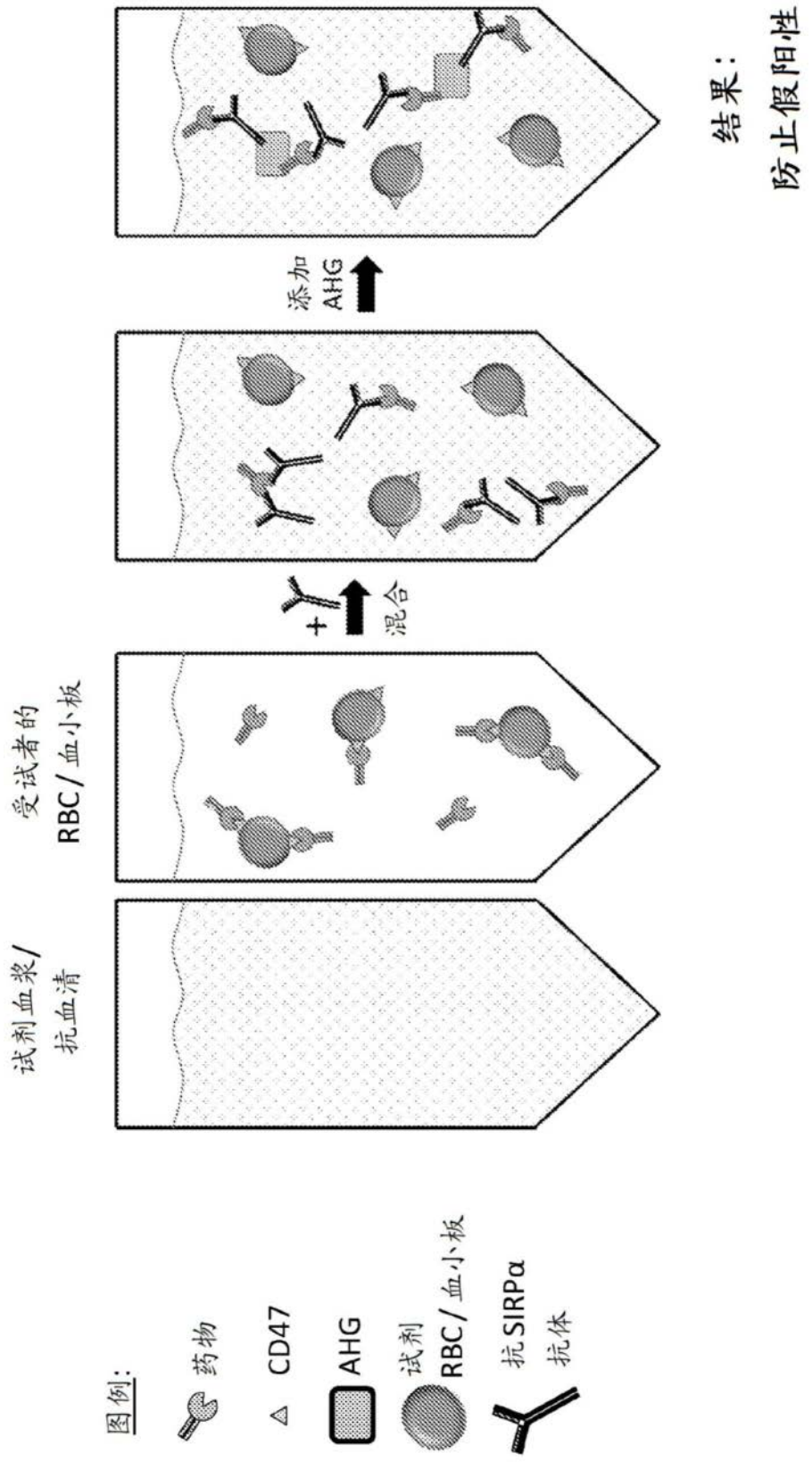

试剂血浆/
抗血清
受试者的
RBC/血小板
混合
添加
AHG
结果：
防止假阳性
图例：
药物
CD47
AHG
试剂
RBC/血小板
抗SIRPα
抗体

图3B

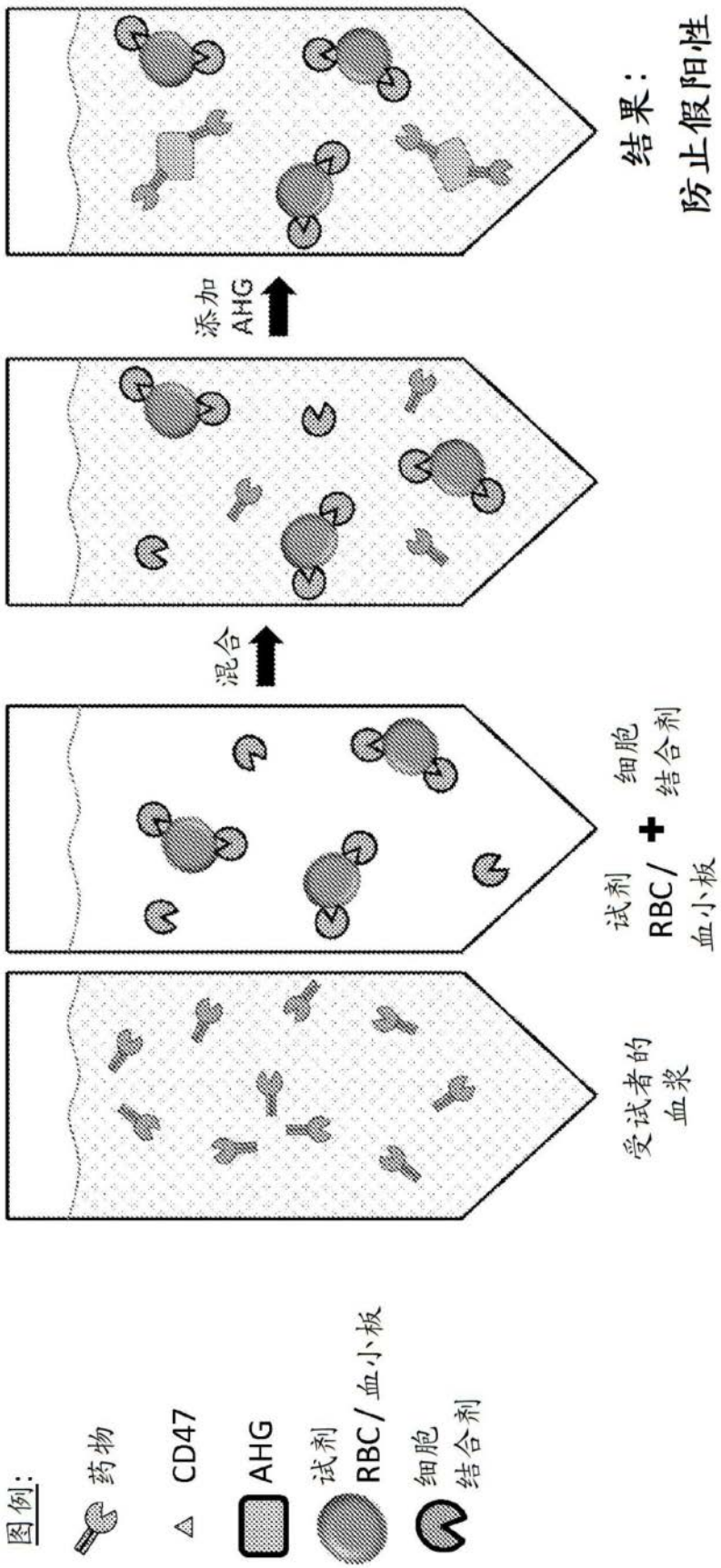

图例:
药物
CD47
AHG
试剂
RBC/血小板
细胞
结合剂
受试者的
血浆
试剂
RBC/
血小板
+
细胞
结合剂
混合
添加
AHG
结果:
防止假阳性

图4A

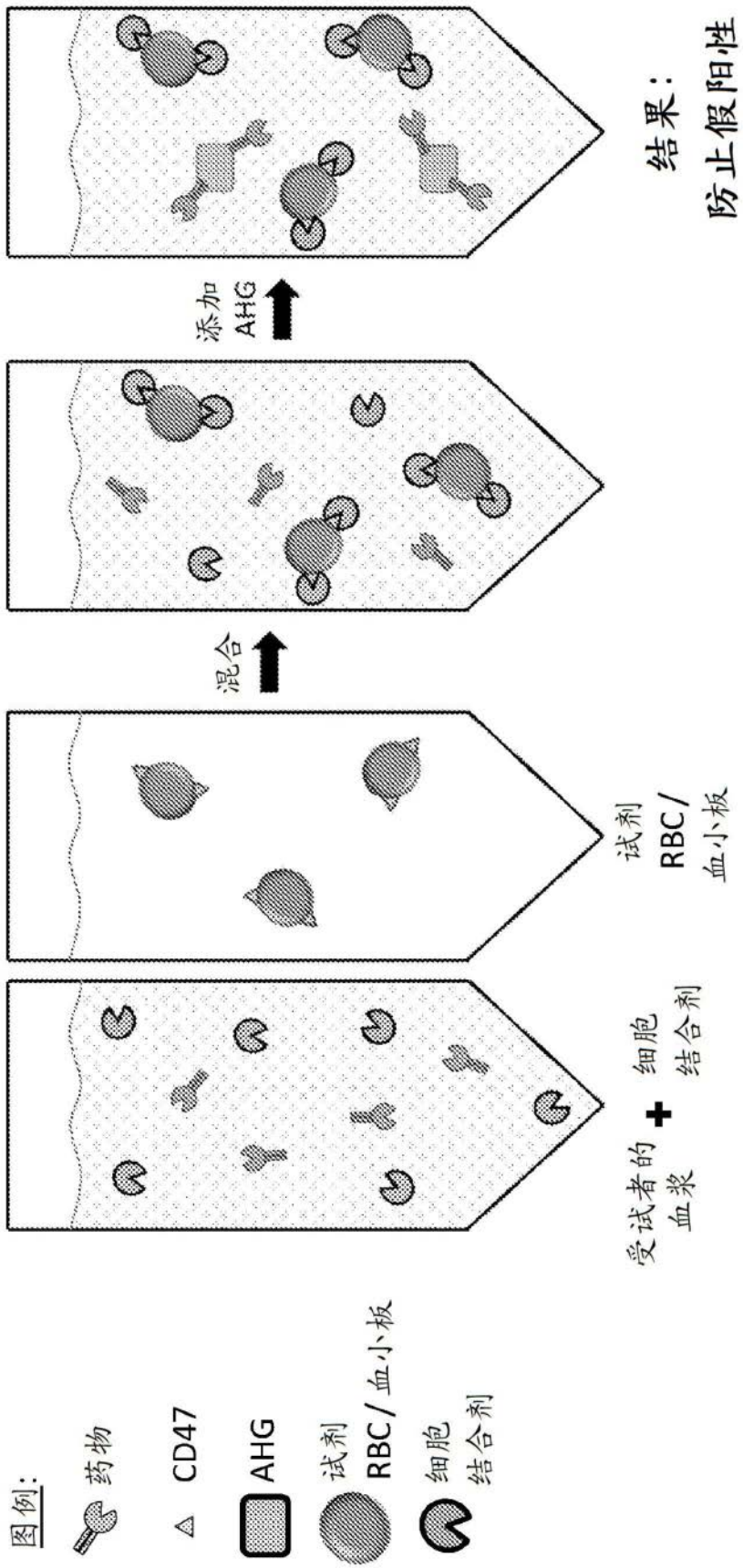

图例:
药物
CD47
AHG
试剂 RBC/血小板
细胞 结合剂
受试者的 血浆
细胞 结合剂
试剂 RBC/ 血小板
混合
添加 AHG
结果:
防止假阳性

图4B

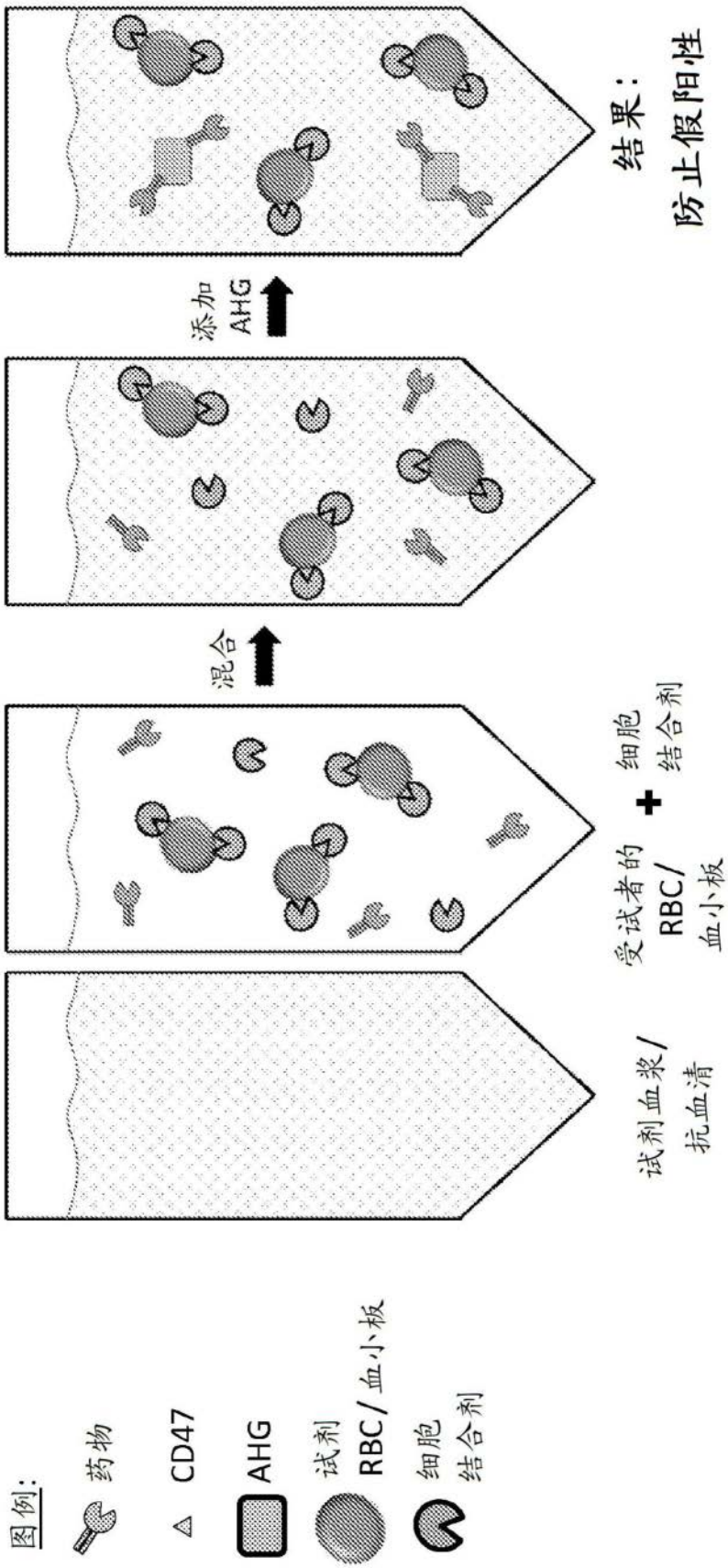

图例:
药物
CD47
AHG
试剂
RBC/血小板
细胞
结合剂
试剂血浆/
抗血清
受试者的
RBC/
血小板
细胞
结合剂
混合
添加
AHG
结果:
防止假阳性

图4C

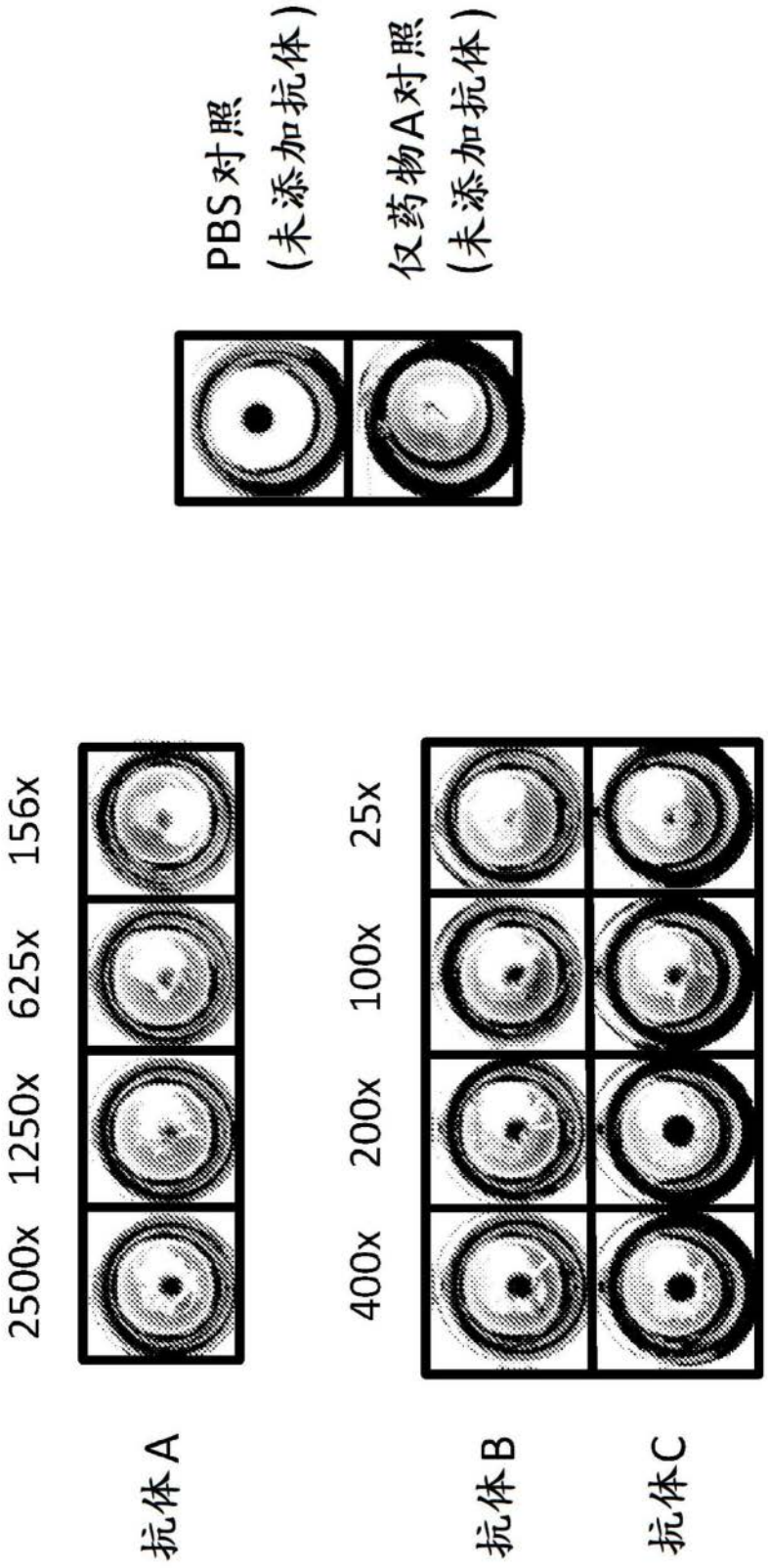

PBS对照
(未添加抗体)
仅药物A对照
(未添加抗体)
2500x
1250x
625x
156x
400x
200x
100x
25x
抗体A
抗体B
抗体C

图5A

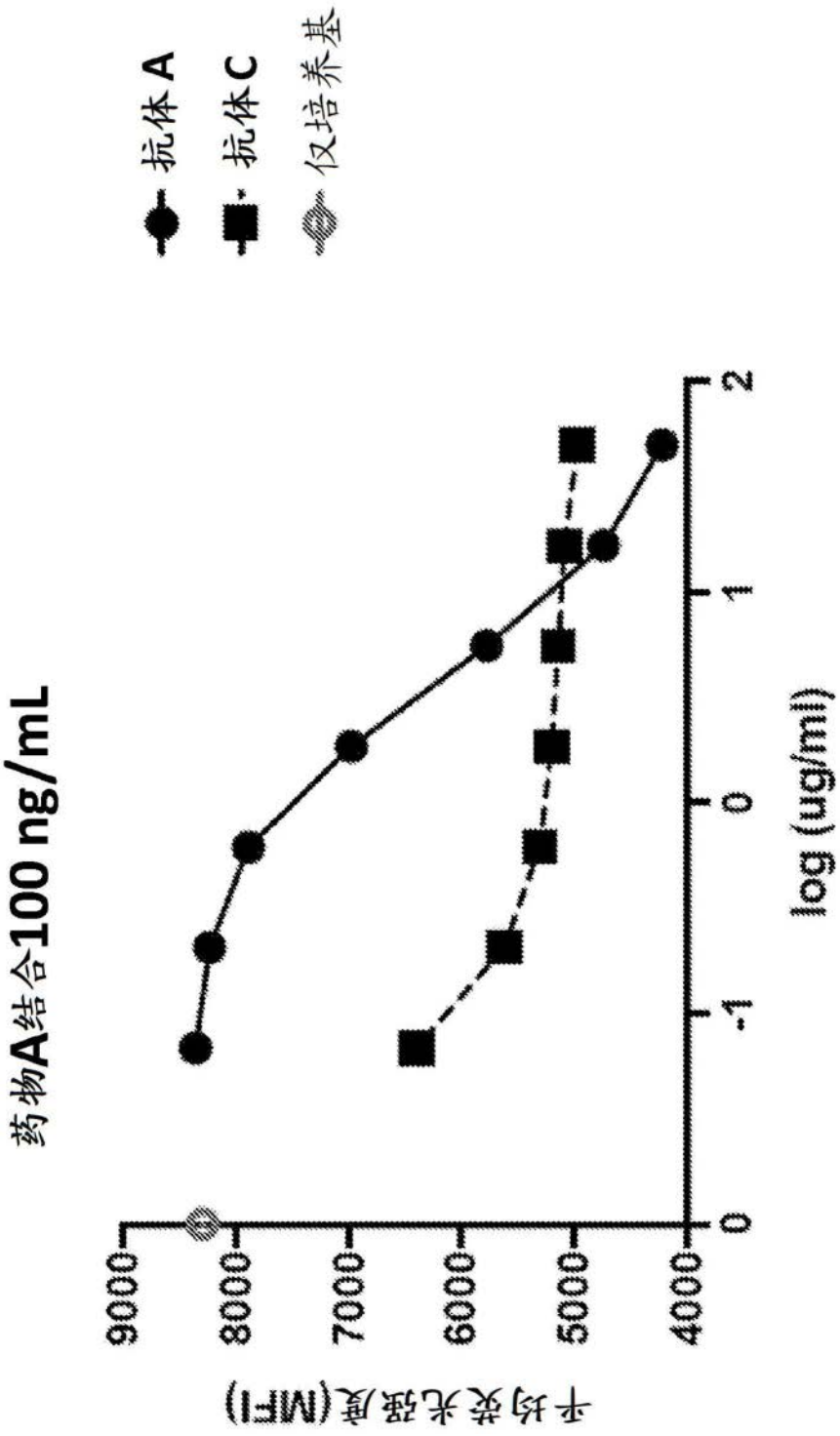

抗体A
抗体C
仅培养基
药物A结合100 ng/mL
平均荧光强度(MFI)
9000
8000
7000
6000
5000
4000
0
-1
0
1
2
log (ug/ml)

图5B