



(12) 发明专利

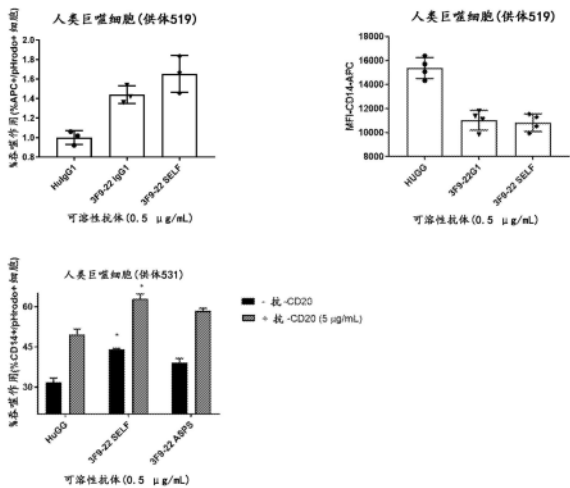
(10) 授权公告号 CN 112218893 B

(45) 授权公告日 2025. 01. 14

(21) 申请号 201980034624.6	(72) 发明人 A·品斯狄克 W-H·何 P·卡普 A·罗森塔尔
(22) 申请日 2019.05.24	
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 112218893 A	(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494 专利代理师 岑晓东
(43) 申请公布日 2021.01.12	(51) Int.Cl. C07K 16/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
(30) 优先权数据 62/676,813 2018.05.25 US	(56) 对比文件 CN 105026426 A, 2015.11.04 CN 107106679 A, 2017.08.29
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.11.23	审查员 戎晓媛
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2019/033884 2019.05.24	
(87) PCT国际申请的公布数据 W02019/226973 EN 2019.11.28	
(73) 专利权人 艾利妥 地址 美国加利福尼亚州	权利要求书5页 说明书106页 序列表49页 附图40页

(54) 发明名称
抗-SIRPA抗体及其使用方法

(57) 摘要
本公开大体上关于包括特异性结合SIRPA多肽(例如:哺乳动物SIRPA或人类SIRPA)的抗体(例如:单克隆抗体、抗体片段,等等)的组合物,及此类组合物在预防、降低风险或治疗有此需要的个体中的用途。



1. 一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,其中该重链可变区包含:HVR-H1,其如SEQ ID NO:20的氨基酸序列所示;HVR-H2,其如SEQ ID NO:21的氨基酸序列所示;HVR-H3,其如选自SEQ ID NO:22、23及24的氨基酸序列所示;且该轻链可变区包含:HVR-L1,其如SEQ ID NO:9的氨基酸序列所示;HVR-L2,其如SEQ ID NO:10的氨基酸序列所示;及HVR-L3,其如选自SEQ ID NO:11、12、13、14、15、16、17、18及19的氨基酸序列所示。

2. 权利要求1的抗体,其中该重链可变区包含一、二、三或四个框架区,其选自如SEQ ID NO:25的氨基酸序列所示的VH FR1、如SEQ ID NO:26的氨基酸序列所示的VH FR2、如SEQ ID NO:27的氨基酸序列所示的VH FR3及如SEQ ID NO:28的氨基酸序列所示的VH FR4。

3. 权利要求1的抗体,其中该轻链可变区包含一、二、三或四个框架区,其选自如SEQ ID NO:29的氨基酸序列所示的VL FR1、如SEQ ID NO:30的氨基酸序列所示的VL FR2、如SEQ ID NO:31的氨基酸序列所示的VL FR3及如SEQ ID NO:32的氨基酸序列所示的VL FR4。

4. 权利要求1的抗体,其中该重链可变区包含一、二、三或四个框架区,其选自如SEQ ID NO:25的氨基酸序列所示的VH FR1、如SEQ ID NO:26的氨基酸序列所示的VH FR2、如SEQ ID NO:27的氨基酸序列所示的VH FR3及如SEQ ID NO:28的氨基酸序列所示的VH FR4;且其中该轻链可变区包含一、二、三或四个框架区,其选自如SEQ ID NO:29的氨基酸序列所示的VL FR1、如SEQ ID NO:30的氨基酸序列所示的VL FR2、如SEQ ID NO:31的氨基酸序列所示的VL FR3及如SEQ ID NO:32的氨基酸序列所示的VL FR4。

5. 权利要求1的抗体,其中该重链可变区包含与选自SEQ ID NO:33、34及35的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,且其中该轻链可变区包含与选自SEQ ID NO:36、37、38、39、40、41、42、43及44的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

6. 权利要求1的抗体,其中该重链可变区包含与选自SEQ ID NO:33、34及35的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,且其中该轻链可变区包含与选自SEQ ID NO:36、37、38、39、40、41、42、43及44的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

7. 权利要求1的抗体,其中该重链可变区包含与选自SEQ ID NO:33、34及35的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列,且其中该轻链可变区包含与选自SEQ ID NO:36、37、38、39、40、41、42、43及44的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。

8. 权利要求1的抗体,其中

(1) 该重链可变区包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,

(2) 该重链可变区包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,

(3) 该重链可变区包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,

(4) 该重链可变区包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,

(5) 该重链可变区包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列,

(6) 该重链可变区包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:

38的氨基酸序列,

(7) 该重链可变区包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列,

(8) 该重链可变区包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列,

(9) 该重链可变区包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列,

(10) 该重链可变区包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列,

(11) 该重链可变区包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列,

(12) 该重链可变区包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列,

(13) 该重链可变区包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列,

(14) 该重链可变区包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列,

(15) 该重链可变区包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列,

(16) 该重链可变区包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列,

(17) 该重链可变区包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列,

(18) 该重链可变区包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列,

(19) 该重链可变区包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列,

(20) 该重链可变区包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列,

(21) 该重链可变区包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列,

(22) 该重链可变区包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列,

(23) 该重链可变区包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列,

(24) 该重链可变区包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列,或

(25) 该重链可变区包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列。

9. 一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,其中该重链可变区如选自SEQ ID NO:33、34及35的氨基酸序列所示,且其中该轻链可变区如选自SEQ ID NO:36、37、38、39、40、41、42、43及44的氨基酸序列所示。

10. 权利要求1至9中任一项的抗体,其中该抗体为单克隆抗体。

11. 权利要求1至9中任一项的抗体,其中该抗体为人类化抗体。

12. 权利要求1至9中任一项的抗体,其中该抗体为Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv或scFv片段。

13. 权利要求1至9中任一项的抗体,其中该抗体为多价抗体。

14. 权利要求1至9中任一项的抗体,其中该抗体属于IgG类、IgM类或IgA类。

15. 权利要求14的抗体,其中该抗体属于IgG类且呈IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。

16. 权利要求1至9和15中任一项的抗体,其中该抗体与抑制性Fc受体结合。

17. 权利要求16的抗体,其中该抑制性Fc受体为抑制性Fc- γ 受体IIB(Fc γ RIIB)。

18. 权利要求17的抗体,其中该抗体降低Fc γ RIIB的细胞水平。

19. 权利要求1至9、15和17中任一项的抗体,其中该抗体具有人类IgG1同种型且包含在Fc区中选自由以下组成的群的一或多个氨基酸取代:N297A、D265A、D270A、L234A、L235A、G237A、P238D、L328E、E233D、G237D、H268D、P271G、A330R、C226S、C229S、E233P、L234V、L234F、L235E、P331S、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T、T256E、N297Q、P238S、P238A、A327Q、A327G、P329A、K322A、T394D及其任何组合,其中位置的编号是根据EU编号,或包含在该Fc区中在对应于甘氨酸236的位置处的氨基酸缺失。

20. 权利要求1至9、15和17中任一项的抗体,其中该抗体具有人类IgG1同种型且包含在Fc区中选自由以下组成的群的一或多个氨基酸取代:C127S、L234A、L234F、L235A、L235E、S267E、K322A、L328F、A330S、P331S、E345R、E430G、S440Y及其任何组合,其中位置的编号是根据EU或Kabat编号。

21. 一种结合人类SIRPA的经分离抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中该重链如SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列且该轻链如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列。

22. 一种结合人类SIRPA的经分离抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中该重链如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列且该轻链如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列。

23. 一种结合人类SIRPA的经分离抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中该重链如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列且该轻链如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列。

24. 一种结合人类SIRPA的经分离抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中该重链如SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列且该轻链如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列。

25. 一种结合人类SIRPA的经分离抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中该重链如SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列且该轻链如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列。

26. 一种结合人类SIRPA的经分离抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中该重链如SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列且该轻链如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列。

27. 一种结合人类SIRPA的经分离抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中该重链如SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列且该轻链如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列。

28. 一种结合人类SIRPA的经分离抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中该重链如SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列且该轻链如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列。

29. 一种结合人类SIRPA的经分离抗体, 其中该抗体包含重链及轻链, 其中该重链如SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列且该轻链如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列。

30. 一种结合人类SIRPA的经分离抗体, 其中该抗体包含重链及轻链, 其中该重链如SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列且该轻链如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列。

31. 权利要求1至30中任一项的抗体制备用于治疗个体中的乳腺癌、结肠癌、直肠癌、肾癌、白血病、肺癌、黑色素瘤、淋巴瘤、胰腺癌、卵巢癌、食道癌或间皮瘤的药物的用途。

32. 权利要求1至30中任一项的抗体制备用于治疗个体中的非小细胞肺癌、胰腺腺癌、肾细胞癌、非霍奇金氏淋巴瘤、急性髓样白血病(AML)、骨髓发育不良综合征、头颈部鳞状细胞癌或肝细胞癌的药物的用途。

33. 权利要求31或32的用途, 其中向该个体施用治疗剂, 该治疗剂抑制或增效PD1、PDL1、CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、CTLA4、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HVEM、LIGHT、BTLA、CD30、TIGIT、VISTA、KIR、GAL9、TIM1、TIM3、TIM4、A2AR、LAG3、DR-5、CD2、CD5、CD39或CD73。

34. 权利要求31或32的用途, 其中向该个体施用至少一种与抑制性检查点分子特异性结合的抗体及/或一或多种标准或调查性抗癌疗法。

35. 权利要求34的用途, 其中向该个体施用至少一种与抑制性检查点分子特异性结合的抗体。

36. 权利要求35的用途, 其中该至少一种与抑制性检查点分子特异性结合的抗体是选自抗-PD-L1抗体、抗-CTLA4抗体、抗-PD-L2抗体、抗-PD-1抗体、抗-B7-H3抗体、抗-B7-H4抗体及抗-HVEM抗体、抗-B-及T-淋巴细胞弱化因子(BTLA)抗体、抗杀手细胞抑制性受体(KIR)抗体、抗-GAL9抗体、抗-TIM-1抗体、抗-TIM3抗体、抗-TIM-4抗体、抗-A2AR抗体、抗-CD39抗体、抗-CD73抗体、抗-LAG-3抗体、抗磷脂酰丝氨酸抗体、抗-CD27抗体、抗-CD30抗体、抗-TNF α 抗体、抗-CD33抗体、抗-Siglec-5抗体、抗-Siglec-7抗体、抗-Siglec-9抗体、抗-Siglec-11抗体、拮抗性抗-TREM1抗体、拮抗性抗-TREM2抗体、抗-TIGIT抗体、抗-VISTA抗体、抗-CD2抗体、抗-CD5抗体及其任何组合。

37. 权利要求36的用途, 其中该一或多种标准或调查性抗癌疗法是选自放射疗法、细胞毒性化学疗法、靶向疗法、伊马替尼(imatinib)疗法、曲妥珠单抗(trastuzumab)疗法、依那西普(etanercept)疗法、过继性细胞转移(ACT)疗法、嵌合抗原受体T细胞转移(CAR-T)疗法、疫苗疗法及细胞因子疗法。

38. 权利要求31或32的用途, 其中向该个体施用至少一种与抑制性细胞因子特异性结合的抗体。

39. 权利要求38的用途, 其中该至少一种与抑制性细胞因子特异性结合的抗体是选自抗-CCL2抗体、抗-CSF-1抗体、抗-IL-2抗体及其任何组合。

40. 权利要求31或32的用途, 其中向该个体施用至少一种与刺激性检查点蛋白特异性结合的增效性抗体。

41. 权利要求40的用途, 其中该至少一种与刺激性检查点蛋白特异性结合的增效性抗体是选自增效剂抗-CD40抗体、增效剂抗-OX40抗体、增效剂抗-ICOS抗体、增效剂抗-CD28抗体、增效性抗-TREM1抗体、增效性抗-TREM2抗体、增效剂抗-CD137/4-1BB抗体、增效剂抗-CD27抗体、增效剂抗-糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白GITR抗体、增效剂抗-CD30抗体、增效

剂抗-BTLA抗体、增效剂抗-HVEM抗体、增效剂抗-CD2抗体、增效剂抗-CD5抗体及其任何组合。

42. 权利要求31或32的用途,其中向该个体施用至少一种刺激性细胞因子。

43. 权利要求42的用途,其中该至少一种刺激性细胞因子是选自IFN- α 4、IFN- β 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP、IL-20家族成员、LIF、IFN- γ 、OSM、CNTF、GM-CSF、IL-11、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、CXCL10、IL-33、MCP-1、MIP-1- β 及其任何组合。

44. 一种经分离核酸,其包含编码权利要求1至30中任一项的抗体的核酸序列。

45. 一种载体,其包含权利要求44的核酸。

46. 一种经分离宿主细胞,其包含权利要求44的核酸或权利要求45的载体。

47. 一种经分离宿主细胞,其表达权利要求1至30中任一项的抗体。

48. 一种产生与人类SIRPA结合的抗体的方法,其包含培养权利要求46或47的细胞,使得该抗体产生。

49. 权利要求48的方法,其进一步包含回收由该细胞产生的抗体。

50. 一种药物组合物,其包含权利要求1至30中任一项的抗体及药物学上可接受的载剂。

抗-SIRPA抗体及其使用方法

[0001] 对相关申请的交叉援引

[0002] 本申请主张2018年5月25日提交的美国临时申请第62/676,813号的优先权,其出于任何目的以引用的方式并入本文中。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,该序列表已以ASCII格式电子提交且以全文引用的方式并入本文中。该ASCII复本创建于2019年5月14日,命名为40004-PCT_SL.txt且大小为99,798个字节。

发明领域

[0005] 本公开是关于抗-SIRPA抗体及此类抗体的治疗用途。

[0006] 发明背景

[0007] 吞噬细胞,诸如巨噬细胞(M Φ)及树突状细胞(DC),通过调节细胞活化状态、增殖及/或效应功能的复杂细胞表面受体阵列来区分健康细胞与异常细胞。诸多此等受体识别不同的配体,该配体标记不合需要的细胞以便移除(所谓的“吃我(eat-me)”信号),或者保护正常细胞免受破坏(所谓的“不吃我(don't-eat-me)”信号)。近年来,SIRP α -CD47轴已成为在从癌细胞存活至造血细胞移植的成功植入范围内的各种临床配置中通过巨噬细胞进行程序性细胞移除的关键决定因素。影响此途径的治疗剂可满足改善在诸多类型的人类癌症中具有特定相关性的疾病的相关医学需求。

[0008] 信号调节蛋白- α (signal regulatory protein- α ,SIRP α)属于跨膜受体的SIRP家族,其主要在髓样细胞谱系(包括M Φ 、DC、粒细胞等)内表达且其特征在于含有2个近膜IgC域及一远程IgV域的细胞外区域。SIRP α 是此家族中独一无二的,含有细胞内细胞质免疫受体酪氨酸基抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif,ITIM)。在受体交联后,酪氨酸磷酸化的ITIM位点募集并活化SHP磷酸酶以负调节细胞功能,诸如吞噬作用或炎性细胞因子释放。CD47充当SIRP α 的主要配体,且其在包括内皮细胞/上皮细胞、白细胞及红细胞在内的大多数细胞类型中的广泛表达表明其介导“不吃我”信号,以保护健康细胞免受吞噬细胞依赖性清除。为了支持此观点,若干研究表明,将来自CD47敲除小鼠的血红细胞或白细胞过继性转移至野生型接受者中导致CD47缺陷的细胞的快速清除。反之,接受人类造血细胞的多株免疫受损小鼠的位置遗传分析将NOD小鼠中的Sirp α 等位基因鉴定为异种移植模型中成功植入的因果因素。后续研究表明,仅在NOD小鼠中表达的SIRP α 的等位基因变异体保留了结合在人类造血干细胞上表达的人类CD47的能力,且因此抑制了巨噬细胞依赖性移植排斥反应。

[0009] SIRP α 及CD47的经调节表达建立了用以调节吞噬细胞活性的稳态控制机制。例如,凋亡细胞下调CD47的表达以促进常驻巨噬细胞的吞噬,同时活细胞保持不受伤害。同样地,诸如LPS的发炎刺激物降低巨噬细胞及树突状细胞(DC)中的SIRP α 表达,以增强其在炎症期间的活化。然而,如癌症中所见,SIRP α 及CD47表达的失调导致免疫相关疾病。几种肿瘤相对于非癌细胞显著增加CD47的表达,以便避开通常消除恶性细胞的免疫监视机制。临床前研

究揭示,诸如B16F10黑色素瘤的同基因肿瘤模型中CD47的遗传敲低足以抑制免疫胜任小鼠中的肿瘤生长。在移植至免疫受损小鼠中的CD47敲低的人类癌细胞系的情况下观察到类似的结果。或者,破坏SIRP α -CD47相互作用的生物制剂,诸如抗-CD47抗体,亦增强小鼠模型中的肿瘤清除。与标准单一疗法相比,当与诸如曲妥珠单抗(trastuzumab)或利妥昔单抗(rituximab)的商业抗肿瘤抗原抗体组合时,抗-CD47抗体促进抗肿瘤反应的协同增加。然而,鉴于CD47的普遍表达,抗-CD47抗体由于脱靶效应而冒着严重的毒性负担风险,限制了其治疗功效。然而,此等研究确定了SIRP α -CD47途径在调节髓样细胞方面的关键作用,在癌症免疫疗法中具有潜在的应用。

[0010] 抗-SIRPA抗体先前已在例如以下的国际专利申请公开中有所描述:第W02018/057669号、第W02018/026600号、第W02017/178653号、第W02017/068164号、第W02016/063233号、第W02016/205042号、第W02015/138600号、第W02013/0956352号、第W02009/091547号、第W02009/131453号及第W02009/046541号。

[0011] 因此,需要治疗性抗-SIRPA抗体来治疗与不当的SIRPA活性有关的疾病、病症及病状。

[0012] 本文所引用的所有参考文献,包括专利申请及公开,皆以全文引用的方式并入本文中。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明大体上关于包括特异性结合人类SIRPA的抗体的组合物,该抗体例如单克隆抗体、嵌合抗体、人类化抗体、抗体片段等,及此类组合物的使用方法。

[0015] 本发明的某些态样至少部分地基于具有改善及/或增强的功能特征(例如,相对于具有包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区的抗-SIRPA抗体)的抗-SIRPA抗体的鉴定,包括例如改善及/或增强的降低细胞上的SIRPA的细胞表面水平的能力,及/或具有改善及/或增强的结合动力学,及/或具有改善及/或增强的KD,及/或具有改善及/或增强的EC50值。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体所具有的对人类SIRPA的KD比具有包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区的抗-SIRPA抗体低至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍或至少10倍。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体对人类SIRPA具有小于6nM、小于5nM、小于4nM、小于3nM、小于2nM、小于1nM、小于0.9nM、小于0.8nM、小于0.7nM、小于0.6nm或小于0.5nM的KD。

[0016] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体在体外降低SIRPA的细胞表面表达量,其EC50比具有包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区的抗-SIRPA抗体低至少约20%、至少约30%、至少约40%或至少约50%。有利地,本发明的抗-SIRPA抗体以在约0.4nM至约0.5nM范围内的半数最大有效浓度(EC50)在体外降低SIRPA的细胞水平。有利地,本发明的抗-SIRPA抗体对人类SIRPA具有在约0.6nM至0.7nM范围内的解离常数(KD)。

[0017] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体结合人类SIRP α v1。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体结合人类SIRP α v2。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体结合人类SIRPB(SIRP β) v3。在可以与本文中的实施例中的任一

一者组合的一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体不结合人类SIRPB v1。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体不结合鼠类SIRPA。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体不结合人类SIRP γ 。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体结合食蟹猕猴SIRPA。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体不结合食蟹猕猴SIRPB1。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体结合狨猴SIRPA。

[0018] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体结合人类SIRPA、人类SIRPA v1、人类SIRPA v2、食蟹猕猴SIRPA、狨猴SIRPA及人类SIRP β 3。

[0019] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,其中重链可变区包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;及HVR-H3,其包含选自SEQ ID NO:22、23及24的氨基酸序列。

[0020] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,其中重链可变区包含:HVR-L1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;及HVR-L3,其包含选自SEQ ID NO:11、12、13、14、15、16、17、18及19的氨基酸序列。

[0021] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,其中重链可变区包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;HVR-H3,其包含选自SEQ ID NO:22、23及24的氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;及HVR-L3,其包含选自SEQ ID NO:11、12、13、14、15、16、17、18及19的氨基酸序列。

[0022] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,其中重链可变区包含与选自SEQ ID NO:33、34及35的氨基酸序列至少90%或至少95%或至少99%相同的氨基酸序列。

[0023] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,其中轻链可变区包含与选自SEQ ID NO:36、37、38、39、40、41、42、43及44的氨基酸序列至少90%或至少95%或至少99%相同的氨基酸序列。

[0024] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,其中重链可变区包含一、二、三或四个框架区,其选自包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VH FR1、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VH FR2、包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH FR3及包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VH FR4。

[0025] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,其中轻链可变区包

含一、二、三或四个框架区,其选自包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL FR1、包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL FR2、包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VL FR3及包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VL FR4。

[0026] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,其中重链可变区包含一、二、三或四个框架区,其选自包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VH FR1、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VH FR2、包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH FR3及包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VH FR4;且其中轻链可变区包含一、二、三或四个框架区,其选自包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL FR1、包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL FR2、包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VL FR3及包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VL FR4。

[0027] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,其中重链可变区包含选自SEQ ID NO:33、34及35的氨基酸序列。

[0028] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,其中轻链可变区包含选自SEQ ID NO:36、37、38、39、40、41、42、43及44的氨基酸序列。

[0029] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,其中重链可变区包含选自SEQ ID NO:33、34及35的氨基酸序列,且其中轻链可变区包含选自SEQ ID NO:36、37、38、39、40、41、42、43及44的氨基酸序列。

[0030] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,其中重链可变区包含抗体3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24或3F9-25的HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3(如表8中所示)。

[0031] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,其中轻链可变区包含抗体3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24或3F9-25的HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3(如表7中所示)。

[0032] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,其中重链可变区包含抗体3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24或3F9-25的HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3(如表8中所示);且其中轻链可变区包含抗体3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24或3F9-25的HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3(如表7中所示)。

[0033] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人

类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,重链可变区包含HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3,轻链可变区包含HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3,其中该抗体包含抗体3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24或3F9-25的HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3(如表7及8中所示)。

[0034] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链可变区及轻链可变区,其中重链可变区包含一、二、三或四个选自VH FR1、VH FR2、VH FR3及VH FR4的框架区,其中:VH FR1包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列;VH FR2包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;VH FR3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;且VH FR4包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列;及/或轻链可变区包含一、二、三或四个选自VL FR1、VL FR2、VL FR3及VL FR4的框架区,其中VL FR1包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;VL FR2包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列;VL FR3包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列;且VL FR4包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0035] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中重链包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列且轻链包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0036] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中重链包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列且轻链包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0037] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种经分离抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中重链包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列且轻链包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0038] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种经分离抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中重链包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列且轻链包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0039] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种经分离抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中重链包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列且轻链包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0040] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种经分离抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中重链包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列且轻链包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0041] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种经分离抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中重链包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列且轻链包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0042] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种经分离抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中重链包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列且轻链包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0043] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种经分离抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中重链包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列

且轻链包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0044] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种经分离抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中重链包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列且轻链包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0045] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种经分离抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中重链包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列且轻链包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0046] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体为单克隆抗体。

[0047] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体为人类化抗体。

[0048] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体为Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv或scFv片段。

[0049] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体为多价抗体。

[0050] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体属于IgG类、IgM类或IgA类。

[0051] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体属于IgG类且呈IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。

[0052] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体与抑制性Fc受体结合。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,抑制性Fc受体为抑制性Fc- γ 受体IIB(Fc γ RIIB)。

[0053] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体降低Fc γ RIIB的细胞水平。

[0054] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体具有人类或小鼠IgG1同种型且包含在Fc区中在选自由以下组成的群的氨基酸残基处的一或多个氨基酸取代:N297A、D265A、D270A、L234A、L235A、G237A、P238D、L328E、E233D、G237D、H268D、P271G、A330R、C226S、C229S、E233P、L234V、L234F、L235E、P331S、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T、T256E、N297Q、P238S、P238A、A327Q、A327G、P329A、K322A、T394D及其任何组合,其中残基的编号是根据EU编号,或包含在Fc区中在对应于甘氨酸236的位置处的氨基酸缺失。

[0055] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体包含在Fc区中在选自由以下组成的群的残基位置处的一或多个氨基酸取代:C127S、L234A、L234F、L235A、L235E、S267E、K322A、L328F、A330S、P331S、E345R、E430G、S440Y及其任何组合,其中氨基酸残基的编号是根据EU编号。

[0056] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体降低SIRPA的细胞表面水平,降低SIRPA的细胞内水平,降低SIRPA的总细胞水平或其任何组合。

[0057] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人

类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体诱导SIRPA降解,诱导SIRPA裂解,诱导SIRPA内化,诱导SIRPA脱落,诱导SIRPA表达的下调或其任何组合。

[0058] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体在体外降低SIRPA的细胞表面水平。

[0059] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体在体内降低SIRPA的细胞表面水平。

[0060] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体下调SIRPA在人类单核细胞中的表达。

[0061] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体下调SIRPA在人类巨噬细胞中的表达。

[0062] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体将SIRPA在人类巨噬细胞中的表达下调约70-95%。

[0063] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体对人类SIRPA具有小于6nM、小于5nM、小于4nM、小于3nM、小于2nM或小于1nM的亲和力(KD)。

[0064] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体对人类SIRPA具有约0.1nM至2nM的亲和力(KD)。

[0065] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体对人类SIRPA具有亲和力,其KD比包含含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区及含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区的抗-SIRPA抗体对人类SIRPA的亲和力低至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍或至少10倍。

[0066] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体在体外降低SIRPA v1的细胞表面水平,其中半数最大有效浓度(EC50)为约0.05nM至2nM或约0.4nM至约0.5nM,如通过流动式细胞测量术所测量。

[0067] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体在体外降低SIRPA的细胞表面水平,其中对人类SIRPA v1的半数最大有效浓度(EC50)为约0.05至0.20nM,对人类SIRPA v2的半数最大有效浓度为约0.05至0.10nM,及/或对食蟹猕猴SIRPA的半数最大有效浓度为约0.05至1nM,如通过流动式细胞测量术所测量。

[0068] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体与SEQ ID NO:1的人类SIRPA v1的D3域结合。

[0069] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体与SEQ ID NO:1的人类SIRPA v1的氨基酸残基R282、Q284及G337结合。

[0070] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体增加巨噬细胞中的肿瘤细胞吞噬作用,增

加M1巨噬细胞中的肿瘤细胞吞噬作用,增加M2巨噬细胞中的肿瘤细胞吞噬作用,下调巨噬细胞中的CD14表达及/或其任何组合。

[0071] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体增强T细胞增殖。

[0072] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体阻断SIRPA与表面活性剂蛋白D(SP-D)的相互作用或结合。

[0073] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体不阻断SIRPA与CD47的相互作用或结合。

[0074] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体下调CD32A/B的细胞表面表达。

[0075] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体下调CD14的细胞表面表达。

[0076] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体增强T细胞增殖而不阻断SIRP γ 及CD47的相互作用。

[0077] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体刺激单核细胞中的ROS产生及/或增加单核细胞中的IL-8表达。

[0078] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体在体内抑制肿瘤生长。

[0079] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体减少外周血液中CD14+髓样细胞的数量及/或增加肿瘤中CD14+髓样细胞的数量。

[0080] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体结合人类SIRPA,但不实质上阻断CD47与SIRPA的结合。

[0081] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体识别第一抗原及第二抗原,其中第一抗原为SIRPA且第二抗原为:

[0082] (a) 促进跨血脑屏障转运的抗原;

[0083] (b) 选自运铁蛋白受体 (TR)、胰岛素受体 (HIR)、胰岛素样生长因子受体 (IGFR)、低密度脂蛋白受体相关蛋白1及2 (LPR-1及2) 及白喉毒素受体的促进跨血脑屏障转运的抗原;

[0084] (c) 选自致病肽或致病蛋白、致病核酸的致病原,其中该致病核酸为反义GGCCCC (G2C4) 重复序列扩充RNA,该致病蛋白是选自淀粉样蛋白 β 、寡聚淀粉样蛋白 β 、淀粉样蛋白 β 斑块、淀粉样蛋白前体蛋白质或其片段、滔蛋白 (Tau)、IAPP、 α -突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、C9orf72 (染色体9可读框72)、c9RAN蛋白、朊病毒蛋白 (prion protein)、PrPSc、亨廷顿蛋白 (huntingtin)、降血钙素、超氧化物歧化酶、共济失调蛋白 (ataxin)、共济失调蛋白1、共济失调蛋白2、共济失调蛋白3、共济失调蛋白7、共济失调蛋白8、共济失调蛋白10、路易体

(Lewy body)、心房利尿钠因子、胰岛淀粉样蛋白多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样蛋白A、medin、泌乳素、运甲状腺素蛋白、溶菌酶、 β 2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、胱抑素、免疫球蛋白轻链AL、S-IBM蛋白、重复相关的非ATG(RAN)翻译产物、二肽重复(DPR)肽、甘氨酸-丙氨酸(GA)重复肽、甘氨酸-脯氨酸(GP)重复肽、甘氨酸-精氨酸(GR)重复肽、脯氨酸-丙氨酸(PA)重复肽、泛蛋白及脯氨酸-精氨酸(PR)重复肽;及

[0085] (d) 在免疫细胞上表达的配体及/或蛋白质,其中该配体及/或蛋白质选自PD1/PDL1、CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA4、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、HVEM、LIGHT、BTLA、CD30、TIGIT、VISTA、KIR、GAL9、TIM1、TIM3、TIM4、A2AR、LAG3、DR-5、CD2、CD5、CD39、CD73及磷脂酰丝氨酸;及在一或多个肿瘤细胞上表达的蛋白质、脂质、多糖或糖脂。

[0086] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体与促进跨血脑屏障转运的肽缀合。在一些实施例中,该肽是选自CRM197、蛋白质转导域、TAT、Syn-B、穿膜肽(penetratin)、聚精氨酸肽、angiopep肽及ANG1005。

[0087] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体为调理素化抗体(opsonizing antibody)。

[0088] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体为缀合抗体。

[0089] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体与可检测标记物、毒素或治疗剂缀合。

[0090] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体与选自以下的毒素缀合:蓖麻毒素、蓖麻毒素A链、多柔比星(doxorubicin)、道诺霉素(daunorubicin)、类美登素(maytansinoid)、紫杉醇(taxol)、溴化乙锭(ethidium bromide)、丝裂霉素(mitomycin)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、秋水仙碱(colchicine)、二羟基炭疽菌素二酮、放线菌素(actinomycin)、白喉毒素、绿脓杆菌外毒素(Pseudomonas exotoxin, PE) A、PE40、相思子毒素(abrin)、相思子毒素A链、蒴莲根毒素(modeccin)A链、 α 帚曲菌素(sarcin)、白树素(gelonin)、有丝分裂素(mitogellin)、局限曲菌素(retstrictocin)、酚霉素(phenomycin)、伊诺霉素(enomycin)、麻疯树蛋白(curicin)、巴豆毒素(croton)、刺孢霉素(calicheamicin)、肥皂草(Saponaria officinalis)抑制剂、糖皮质激素、奥瑞他汀(auristatin)、金霉素(auromycin)、钆、铋、考布他汀(combrestatin)、倍癌霉素(duocarmycins)、多拉他汀(dolastatin)、cc1065及顺铂(cisplatin)。

[0091] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗-SIRPA抗体与一或多种特异性结合选自以下的致病蛋白的抗体组合使用:淀粉样蛋白 β 、寡聚淀粉样蛋白 β 、淀粉样蛋白 β 斑块、淀粉样蛋白前体蛋白质或其片段、滔蛋白、IAPP、 α -突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、C9orf72(染色体9可读框72)、朊病毒蛋白、PrPSc、亨廷顿蛋白、降血钙素、超氧化物歧化酶、共济失调蛋白、共济失调

蛋白1、共济失调蛋白2、共济失调蛋白3、共济失调蛋白7、共济失调蛋白8、共济失调蛋白10、路易体、心房利尿钠因子、胰岛淀粉样蛋白多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样蛋白A、medin、泌乳素、运甲状腺素蛋白、溶菌酶、 β 2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、胱抑素、免疫球蛋白轻链AL、S-IBM蛋白、重复相关的非ATG (RAN) 翻译产物、二肽重复 (DPR) 肽、甘氨酸-丙氨酸 (GA) 重复肽、甘氨酸-脯氨酸 (GP) 重复肽、甘氨酸-精氨酸 (GR) 重复肽、脯氨酸-丙氨酸 (PA) 重复肽、泛蛋白及脯氨酸-精氨酸 (PR) 重复肽及其任何组合；或与一或多种结合选自自由以下组成的群的免疫调节蛋白的抗体组合使用：PD1/PDL1、CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA4、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、HVEM、LIGHT、BTLA、CD30、TIGIT、VISTA、KIR、GAL9、TIM1、TIM3、TIM4、A2AR、LAG3、DR-5、CD2、CD5、CD39、CD73、TREM1、TREM2、CD33、Siglec-5、Siglec-7、Siglec-9、Siglec-11、磷脂酰丝氨酸、致病核酸、反义GGCCCC (G2C4) 重复序列扩充RNA及其任何组合。

[0092] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中，本发明提供一种预防、降低风险或治疗癌症的方法，其中该方法包含向有需要的个体施用治疗有效量的本发明的抗-SIRPA抗体，从而治疗癌症。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中，本发明提供一种预防、降低风险或治疗具有疾病、病症或损伤的个体的方法，其中该疾病、病症或损伤为癌症，该方法包含向该个体施用治疗有效量的本发明的抗-SIRPA抗体，从而预防、降低风险或治疗该个体。

[0093] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中，本发明提供一种治疗癌症的方法，其中该方法包含向有需要的个体施用治疗有效量的本发明的抗-SIRPA抗体，其中该癌症是选自肉瘤、膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾盂癌、白血病、肺癌、小细胞肺癌、黑色素瘤、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌及纤维肉瘤、多形性神经胶质母细胞瘤；肾透明细胞癌；肾上腺皮质癌；膀胱尿道上皮癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肺腺癌；胰腺腺癌、肾细胞癌、霍奇金氏淋巴瘤 (Hodgkin's lymphoma)、非霍奇金氏淋巴瘤、无痛性B细胞淋巴瘤、侵袭性B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、急性淋巴母细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL)、急性髓样白血病 (acute myeloid leukemia, AML)、慢性淋巴细胞性白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL)、慢性髓样白血病 (chronic myeloid leukemia, CML)、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良综合征、骨髓增生性赘生物、乳腺侵入性癌、子宫颈鳞状细胞癌、子宫颈内腺癌、胆管癌、结肠腺癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤、食道癌、头颈部鳞状细胞癌、肾难染细胞、肾乳头状细胞癌、较低级别神经胶质瘤、肝细胞癌、肺鳞状细胞癌、间皮瘤、卵巢浆液性囊腺癌、胰腺腺癌、嗜铬细胞瘤及副神经节瘤、前列腺腺癌、直肠腺癌、皮肤黑色素瘤、胃腺癌、睾丸生殖细胞肿瘤、甲状腺癌、胸腺瘤、子宫体子宫内膜癌、子宫癌肉瘤及葡萄膜黑色素瘤。

[0094] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中，本发明提供一种治疗癌症的方法，其中该方法包含向有需要的个体施用治疗有效量的本发明的抗-SIRPA抗体，该方法进一步包含施用抑制PD1、PDL1、CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、CTLA4、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HVEM、LIGHT、BTLA、CD30、TIGIT、VISTA、KIR、GAL9、TIM1、TIM3、TIM4、A2AR、LAG3、DR-5、CD2、CD5、CD39或CD73的治疗剂。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中，治疗剂为抑制PD1、PDL1、CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、CTLA4、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HVEM、LIGHT、BTLA、CD30、TIGIT、VISTA、KIR、GAL9、

TIM1、TIM3、TIM4、A2AR、LAG3、DR-5、CD2、CD5、CD39或CD73的抗体。

[0095] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种治疗癌症的方法,其中该方法包含向有需要的个体施用治疗有效量的本发明的抗-SIRPA抗体,该方法包含向该个体施用至少一种与抑制性检查点分子特异性结合的抗体及/或一或多种标准或调查性抗癌疗法。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,至少一种与抑制性检查点分子特异性结合的抗体是与抗-SIRPA抗体组合施用。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,该至少一种与抑制性检查点分子特异性结合的抗体是选自抗-PD-L1抗体、抗-CTLA4抗体、抗-PD-L2抗体、抗-PD-1抗体、抗-B7-H3抗体、抗-B7-H4抗体及抗-HVEM抗体、抗-B-及T-淋巴细胞弱化因子(BTLA)抗体、抗杀手细胞抑制性受体(KIR)抗体、抗-GAL9抗体、抗-TIM-1抗体、抗-TIM3抗体、抗-TIM-4抗体、抗-A2AR抗体、抗-CD39抗体、抗-CD73抗体、抗-LAG-3抗体、抗磷脂酰丝氨酸抗体、抗-CD27抗体、抗-CD30抗体、抗-TNF α 抗体、抗-CD33抗体、抗-Siglec-5抗体、抗-Siglec-7抗体、抗-Siglec-9抗体、抗-Siglec-11抗体、拮抗性抗-TREM1抗体、拮抗性抗-TREM2抗体、抗-TIGIT抗体、抗-VISTA抗体、抗-CD2抗体、抗-CD5抗体及其任何组合。

[0096] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,该一或多种标准或调查性抗癌疗法是选自放射疗法、细胞毒性化学疗法、靶向疗法、伊马替尼(imatinib)疗法、曲妥珠单抗疗法、依那西普(etanercept)疗法、过继性细胞转移(adoptive cell transfer,ACT)疗法、嵌合抗原受体T细胞转移(CAR-T)疗法、疫苗疗法及细胞因子疗法。

[0097] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种治疗癌症的方法,其中该方法包含向有需要的个体施用治疗有效量的本发明的抗-SIRPA抗体,其中该方法进一步包含向该个体施用至少一种与抑制性细胞因子特异性结合的抗体。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,该至少一种与抑制性细胞因子特异性结合的抗体是与抗-SIRPA抗体组合施用。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,该至少一种与抑制性细胞因子特异性结合的抗体是选自抗-CCL2抗体、抗-CSF-1抗体、抗-IL-2抗体及其任何组合。

[0098] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种治疗癌症的方法,其中该方法包含向有需要的个体施用治疗有效量的本发明的抗-SIRPA抗体,其中该方法进一步包含向该个体施用至少一种与刺激性检查点蛋白特异性结合的增效性抗体。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,该至少一种与刺激性检查点蛋白特异性结合的增效性抗体是与抗-SIRPA抗体组合施用。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,该至少一种与刺激性检查点蛋白特异性结合的增效性抗体是选自增效剂抗-CD40抗体、增效剂抗-OX40抗体、增效剂抗-ICOS抗体、增效剂抗-CD28抗体、增效性抗-TREM1抗体、增效性抗-TREM2抗体、增效剂抗-CD137/4-1BB抗体、增效剂抗-CD27抗体、增效剂抗糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白GITR抗体、增效剂抗-CD30抗体、增效剂抗-BTLA抗体、增效剂抗-HVEM抗体、增效剂抗-CD2抗体、增效剂抗-CD5抗体及其任何组合。

[0099] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种治疗癌症的方法,其中该方法包含向有需要的个体施用治疗有效量的本发明的抗-SIRPA抗体,该方法其进一步包含向该个体施用至少一种刺激性细胞因子。在一些实施例中,该至少一

种刺激性细胞因子是选自IFN- α 4、IFN- β 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP、IL-20家族成员、LIF、IFN- γ 、OSM、CNTF、GM-CSF、IL-11、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、CXCL10、IL-33、MCP-1、MIP-1- β 及其任何组合。

[0100] 在一些实施例中,本发明提供一种经分离核酸,其包含编码本发明的抗-SIRPA抗体的核酸序列。在一些实施例中,本发明提供一种包含经分离核酸的载体,该经分离核酸包含编码本发明的抗-SIRPA抗体的核酸序列。在一些实施例中,本发明提供一种经分离宿主细胞,其包含载体,该载体包含经分离核酸,该经分离核酸包含编码本发明的抗-SIRPA抗体的核酸序列。

[0101] 在一些实施例中,本发明提供制造与人类SIRPA结合的抗体的方法,其中该方法包含培养包含载体的宿主细胞以使得该抗体产生,该载体包含经分离核酸,该经分离核酸包含编码本发明的抗-SIRPA抗体的核酸序列。本发明进一步提供回收由细胞产生的抗体。

[0102] 在一些实施例中,本发明提供一种药物组合物,其包含本发明的抗-SIRPA抗体及药物学上可接受的载剂。

[0103] 附图简述

[0104] 图1显示人类SIRPA变异体1及来自各种物种的SIRPA蛋白质的细胞外域的氨基酸序列比对。所记录的一致性百分比展现细胞外区域内的高同源性。登录编号为P78324(人类SIRPA变异体1)、XP015313153(食蟹猕猴)、JAB51896(猕猴)、G1U0I5(兔)及XP005634938(犬)。图1按出现的次序分别揭示SEQ ID NO 59-63。

[0105] 图2A列举抗-SIRPA抗体3F9的重链可变域的潜在人类化序列。人类化序列是基于IGHV3-23*01接受体框架及IGHJ4*01连接区。图2A按出现的次序分别揭示SEQ ID NO 64-65、2、64及3-4。图2B列举抗-SIRPA抗体3F9的轻链可变域的潜在人类化序列。图2B按出现的次序分别揭示SEQ ID NO 66-67、5、66及68-70。

[0106] 图3阐述数据,其显示原代人类巨噬细胞上鼠类及人类化抗-SIRPA 3F9抗体的抗体介导的SIRPA下调。

[0107] 图4A阐述数据,其显示抗体介导的受体下调视N-连接型Fc聚糖而定。图4B阐述数据,其显示抗体介导的肿瘤细胞吞噬作用的增强视N-连接型Fc聚糖而定。

[0108] 图5A阐述数据,其显示人类化抗-SIRPA 3F9 IgG4抗体变异体未能诱导肿瘤细胞吞噬作用。图5B阐述数据,其显示人类化抗-SIRPA 3F9 IgG4抗体变异体未能下调巨噬细胞上的CD14表达。

[0109] 图6A显示抗-SIRPA抗体3F9 mIgG1处理下调原代人类巨噬细胞上的CD32A/B表达。图6B显示抗-SIRPA抗体3F9处理下调原代人类巨噬细胞上的CD32A及CD32B表达。

[0110] 图7A阐述数据,其显示CD32A/B阻断抑制原代人类巨噬细胞上抗-SIRPA抗体3F9介导的SIRPA下调。图7B阐述数据,其显示CD32A/B阻断抑制抗-SIRPA抗体3F9介导的肿瘤细胞吞噬作用的增强。

[0111] 图8阐述数据,其显示CD32A同种异型影响抗-SIRPA抗体3F9介导的SIRPA下调。图8A显示供体507及508为CD32A-R/H131杂合的;图8B显示供体516及517为CD32A-H/H131纯合的。

[0112] 图9A至图9B阐述数据,其显示抗体介导的受体下调导致SIRPA降解。在图9A中,将5 μ g、10 μ g及20 μ g全细胞裂解物加载至SDS-PAGE上且用抗-SIRPA细胞质域(α -SIRPA_{cyt})进行

免疫印迹法。在图9B中,将20 μ g全细胞裂解物加载至SDS-PAGE上且用 α -SIRPAct及抗-SHP2探测。

[0113] 图10A至图10B阐述数据,其比较抗-SIRPA抗体3F9-22的不同Fc变异体的吞噬活性的增强。在图10A中,用野生型人类IgG1主链上或具有S267E/L328F Fc突变的人类IgG1上的抗-SIRPA 3F9-22抗体或同种型对照抗体处理原代人类巨噬细胞。在图10B中,用具有S267E/L328F或A330S/P331S Fc突变的人类IgG1主链上的抗-SIRPA 3F9-22抗体或同种型对照抗体处理原代人类巨噬细胞。

[0114] 图11A至图11B阐述数据,其比较抗-SIRPA 3F9-22抗体的不同Fc变异体相对于抗-CD47在M1(图11B)及M2(图11A)巨噬细胞上的吞噬活性。

[0115] 图12A及图12B阐述数据,其显示经抗-SIRPA抗体3F9-22处理的巨噬细胞在体外降低实体肿瘤细胞活力。

[0116] 图13A阐述数据,其比较在双向MLR分析中抗-SIRPA抗体3F9-22的不同Fc变异体的T细胞增殖增强。图13B阐述数据,其比较在双向MLR分析中抗-SIRPA抗体3F9-22及抗-SIRPA抗体3F9-14的不同Fc变异体相对于抗-CD47 IgG4的T细胞增殖增强。

[0117] 图14A阐述数据,其比较在单向MLR分析中抗-SIRPA抗体3F9-22的不同Fc变异体相对于抗-CD47 IgG4的T细胞增殖增强。图14B显示单向MLR分析的代表性FACS图。

[0118] 图15A及图15B阐述数据,其比较抗-SIRPA抗体3F9-22的不同Fc变异体通过LPS预致敏巨噬细胞达成的TNF释放增强。

[0119] 图16阐述数据,其显示人类SIRPA模型中抗-SIRPA抗体的“关键”残基的鉴定及观测。

[0120] 图17A至图17C阐述数据,其显示同基因型小鼠结肠癌模型中抗-SIRPA抗体3F9-22与抗-PD-L1抗体的组合对肿瘤生长抑制的影响。图17A阐述FACS直方图,其显示小鼠CD47(上图)及人类CD47(下图)在野生型及工程化MC38细胞系中的表达。图17B阐述数据,其显示皮下植入有经工程化而缺乏小鼠CD47表达且过表达人类CD47的MC38细胞(MC38-mCD47KO/huCD47+)的huSIRPA/huCD47 BAC转基因小鼠的平均肿瘤生长曲线。图17C阐述图17B的各处理组中的各个别动物的意大利面条图(spaghetti plot)。

[0121] 图18A至图18B阐述数据,其显示经递增剂量的本公开的抗-SIRPA抗体处理的负载肿瘤BAC转基因小鼠的髓样细胞中的SIRPA的抗体介导的下调的动力学。图18A阐述数据,其显示肿瘤浸润性髓样细胞上的SIRPA表达随时间推移的相对变化。图18B阐述数据,其显示脾髓样细胞上的SIRPA表达随时间推移的相对变化。

[0122] 图19A显示负载A375肿瘤的人类化NOG-EXL小鼠中SIRPA研究的抗-SIRPA抗体介导的下调的处理条件。图19B阐述数据,其显示与本公开的抗-SIRPA抗体处理有关的SIRPA在人类肿瘤巨噬细胞上的表达水平,呈MFI值(左图)或标准化值(右图)形式。

[0123] 图20A至图20B显示M1巨噬细胞标志物HLA-DR/MHC第2类(图20A)及CD86(图20B)在经本发明的抗-SIRPA抗体处理后自负载A375肿瘤的人类化NOG-EXL小鼠分离的人类肿瘤巨噬细胞上的表达水平。图20A及图20B阐述数据,其分别显示HLA-DR/MHC第2类及CD86的表达,呈MFI值(左图)或标准化值(右图)形式。

[0124] 图21A至图21B显示自负载A375肿瘤的人类化NOG-EXL小鼠分离的脾单核细胞(图21A)及外周血液单核细胞(图21B)中的与本发明的抗-SIRPA抗体的施用有关的人类SIRPA

下调。图21A及图21B阐述数据,其显示人类SIRPA的表达,呈MFI值(左图)或标准化值(右图)形式。

[0125] 图22阐述数据,其显示原代人类巨噬细胞上抗-SIRPA 3F9-22抗体的不同Fc变异体的抗体介导的SIRPA下调。

[0126] 图23阐述数据,其比较抗-SIRPA抗体3F9-22的不同Fc变异体相比于抗-CD47阻断抗体的吞噬活性的增强。

[0127] 图24阐述数据,其显示施用对照IgG抗体、抗-SIRPA抗体3F9-22 PS、抗-SIRPA抗体3F9-22 IgG4、抗-SIRPA抗体3F9-IgG2及抗-SIRPA抗体3F9-22 NSLF的食蟹猕猴中的红细胞及血小板计数。

[0128] 应理解,可组合本文所描述的各种实施方案的一种、一些或所有特性以形成本发明的其他实施方案。本发明的此等及其他方面对本领域技术人员会变得显而易见。本发明的此等及其他实施方案通过下文的详述进一步描述。

[0129] 发明详述

[0130] 本发明是关于抗-SIRPA抗体(例如,单克隆抗体);此类抗体的制造及使用方法;包含此类抗体的药物组合物;编码此类抗体的核酸;及包含编码此类抗体的核酸的宿主细胞。

[0131] 本文所述或所提及的技术及程序通常很好理解且一般使用习知方法由本领域技术人员采用,诸如以下文献中所述的广泛使用的方法: Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*第3版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel等人编, (2003)); 丛书 *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M. J. MacPherson, B. D. Hames 及 G. R. Taylor 编 (1995)), Harlow 及 Lane 编 (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney 编 (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait 编, 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis 编, 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney) 编, 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather 及 P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths 及 D. G. Newell 编, 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir 及 C. C. Blackwell 编); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller 及 M. P. Calos 编, 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis 等人编, 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan 等人编, 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway 及 P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty. 编, IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd 及 C. Dean 编, Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow 及 D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti 及 J. D. Capra 编, Harwood Academic Publishers, 1995); 及 *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V. T. DeVita 等人编, J. B. Lippincott Company, 1993)。

[0132] 定义

[0133] 除非另外指明,否则术语“SIRP α ”或“SIRP α 多肽”或“SIRPA”或“SIRPA多肽”在本文中可互换使用,在本文中是指来自任何脊椎动物来源的任何天然SIRPA,脊椎动物来源包括哺乳动物,诸如灵长类动物(例如,人类及食蟹猕猴)及啮齿动物(例如,小鼠及大鼠)。在一些实施例中,该术语涵盖野生型序列及天然产生的变异序列,例如剪接变异体或等位基因变异体。在一些实施例中,该术语涵盖“全长”未加工SIRPA以及通过在细胞中加工产生的任何形式的SIRPA。在一些实施例中,SIRPA为人类SIRPA。在一些实施例中,例示性SIRPA的氨基酸序列为Uniprot登录号P78324,截至2018年4月25日。在一些实施例中,例示性人类SIRPA v1的氨基酸序列为SEQ ID NO:1。在一些实施例中,例示性人类SIRPA v2的氨基酸序列为GenBank CAA71403。

[0134] 术语“抗-SIRPA抗体”、“与SIRPA结合的抗体”及“特异性结合SIRPA的抗体”是指能够以足够使得抗体适用作靶向SIRPA时的诊断剂及/或治疗剂的亲和力结合SIRPA的抗体。在一个实施例中,抗-SIRPA抗体与不相关的非SIRPA多肽的结合程度小于抗体与SIRPA的结合的约10%,如例如通过放射免疫分析(RIA)所测量。在某些实施例中,与SIRPA结合的抗体具有<1 μ M、<100nM、<10nM、<1nM、<0.1nM、<0.01nM或<0.001nM(例如,10⁻⁸M或更小,例如10⁻⁸M至10⁻¹³M,例如10⁻⁹M至10⁻¹³M)的解离常数(KD)。在某些实施例中,抗-SIRPA抗体与来自不同物种的SIRPA中的保守的SIRPA的表位结合。

[0135] 关于抗体与目标分子的结合,术语“特异性结合”或“特异性地结合”或“特异性针对”特定多肽或特定多肽目标上的表位意谓可测量地与非特异性相互相用不同的结合。特异性结合可例如通过测定分子的结合对比对照分子的结合来测量。例如,特异性结合可以通过与类似于目标的对照分子的竞争来确定,例如过量的未标记目标。在此情况下,若经标记的目标与探针的结合受到过量的未标记目标的竞争性抑制,则指示特异性结合。如本文所用的术语“特异性结合”或“与特异性地结合”或“特异性针对”特定多肽或特定多肽目标上的表位可以例如由这样的分子来展现,该分子对目标具有约为10⁻⁴M或更低、10⁻⁵M或更低、10⁻⁶M或更低、10⁻⁷M或更低、10⁻⁸M或更低、10⁻⁹M或更低、10⁻¹⁰M或更低、10⁻¹¹M或更低、10⁻¹²M或更低中的任一者的KD,或在10⁻⁴M至10⁻⁶M或10⁻⁶M至10⁻¹⁰M或10⁻⁷M至10⁻⁹M的范围内的KD。如本领域技术人员将了解,亲和力与KD值成反比。通过低KD值测量对抗原的高亲和力。在一个实施例中,术语“特异性结合”是指这样的结合,其中分子与特定多肽或特定多肽上的表位结合而不与任何其他多肽或多肽表位实质上结合。

[0136] 在本文中,术语“免疫球蛋白”(Ig)可与“抗体”互换使用。术语“抗体”在本文中以最广泛含义使用且特别涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体),包括由至少两种完整抗体形成的抗体,及抗体片段,只要其展现所要生物活性即可。

[0137] “天然抗体”通常为约150,000道尔顿(Dalton)的杂四聚体糖蛋白,由两条相同轻(“L”)链及两条相同重(“H”)链构成。各轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而在不同免疫球蛋白同种型的重链中,二硫键的数目不同。各重链及轻链亦具有有规律地间隔的链内二硫桥键。各重链在一端具有可变域(V_H),其后为多个恒定域。各轻链在一端具有可变域(V_L)且在其另一端具有恒定域;轻链的恒定域与重链的第一恒定域对准,且轻链可变域与重链的可变域对准。认为特定氨基酸残基在轻链与重链可变域之间形成界面。

[0138] 关于不同类别抗体的结构及特性,参见例如Basic and Clinical Immunology,第8版,Daniel P.Stites,Abba I.Terr及Tristram G.Parslow(编),Appleton&Lange,

Norwalk, CT, 1994, 第71页及第6章。

[0139] 来自任何脊椎动物物种的轻链可基于其恒定域的氨基酸序列而归为两种明显不同类型中的一种,这两种明显不同类型称为卡帕(“ κ ”)及拉姆达(“ λ ”)。视免疫球蛋白的重链(CH)的恒定域的氨基酸序列而定,其可归为不同类别或同种型。存在五种类别的免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG及IgM,分别具有命名为阿尔法(“ α ”)、德耳塔(“ δ ”)、伊普西隆(“ ϵ ”)、伽马(“ γ ”)及谬(“ μ ”)的重链。基于CH序列及功能的相对较小差异,将 γ 及 α 类别进一步分成子类(同种型),例如人类表达以下子类:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构及三维构型是熟知的且大体描述于例如Abbas等人, *Cellular and Molecular Immunology*, 第4版(W.B.Saunders Co., 2000)中。

[0140] 抗体,诸如本发明的抗-SIRPA抗体的“可变区”或“可变域”是指抗体的重链或轻链的氨基端域。重链及轻链的可变域可分别称为“ V_H ”及“ V_L ”。此等域一般为抗体的最可变部分(相对于相同种类的其他抗体)且含有抗原结合位点。

[0141] 术语“可变”是指以下事实:在抗体,诸如本发明的抗-SIRPA抗体中,可变域的某些区段在序列上广泛不同。可变域介导抗原结合且限定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,可变性并非均匀分布于可变域的整体跨度内。相反,其集中在轻链可变域及重链可变域中的三个称为高变区(HVR)的区段中。可变域的较高度保守部分称为框架区(FR)。天然重链及轻链的可变域各自包含四个FR区,该FR区主要采用 β 片层构型,由三个HVR连接,其形成连接 β 片层结构的环且在一些情况下形成 β 片层结构的一部分。各链中的HVR通过FR区紧密地结合在一起,且与其他链的HVR一起,有助于形成抗体的抗原结合位点(参见Kabat等人, *Sequences of Immunological Interest*, 第五版, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991))。恒定域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现各种效应功能,诸如抗体依赖性细胞毒性中抗体的参与。

[0142] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指获自实质上均质抗体群体的抗体,亦即构成该群体的个别抗体除可少量存在的可能天然产生的突变及/或翻译后修饰(例如,异构化、酰胺化等)之外是相同的,诸如本发明的单克隆抗-SIRPA抗体。单克隆抗体具有高度特异性,是针对单一抗原位点。与通常包括针对不同决定子(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,各单克隆抗体是针对抗原上的单一决定子。除了其特异性之外,单克隆抗体的有利的处在于其是通过杂交瘤培养合成的,未被其他免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”指示抗体的特征为获自实质上均质抗体群体,且不应理解为需要通过任何特定方法产生该抗体。例如,待根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术制得,该技术包括例如杂交瘤方法、重组DNA方法及用于在具有部分或所有的编码人类免疫球蛋白序列的人类免疫球蛋白基因座或基因的动物中产生人类抗体或人类样抗体的技术。例如,待根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术制得,该技术包括例如噬菌体展示技术(参见例如Clackson等人, *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhu等人, *J. Mol. Biol.* 338 (2):299-310 (2004); Lee等人, *J. Mol. Biol.* 340 (5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 101 (34):12467-472 (2004); 及Lee等人, *J. Immunol. Methods* 284 (1-2):119-132 (2004))、杂交瘤方法(例如, Kohler及Milstein., *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo等人, *Hybridoma*, 14 (3):253-260 (1995); Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版

1988);Hammerling等人,Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier,N.Y.,1981))、重组DNA方法(参见例如美国专利第4,816,567号)、酵母展示技术(参见例如W02009/036379A2;W02010105256;W02012009568;及Xu等人,Protein Eng.Des.Sel.,26(10):663-70(2013))、及用于在具有部分或所有的编码人类免疫球蛋白序列的人类免疫球蛋白基因座或基因的动物中产生人类抗体或人类样抗体的技术(参见例如W0 1998/24893;W0 1996/34096;W0 1996/33735;W0 1991/10741;Jakobovits等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 90:2551(1993);Jakobovits等人,Nature 362:255-258(1993);Bruggemann等人,Year in Immunol.7:33(1993);美国专利第5,545,807号;第5,545,806号;第5,569,825号;第5,625,126号;第5,633,425号;及第5,661,016号;Marks等人,Bio/Technology 10:779-783(1992);Lonberg等人,Nature 368:856-859(1994);Morrison,Nature 368:812-813(1994);Fishwild等人,Nature Biotechnol.14:845-851(1996);Neuberger,Nature Biotechnol.14:826(1996);及Lonberg及Huszar,Intern.Rev.Immunol.13:65-93(1995))。

[0143] 术语“全长抗体”、“完整抗体”或“完全抗体”可互换使用,是指呈其实质上完整形式的抗体,诸如本发明的抗-SIRPA抗体,不是抗体片段。具体而言,完整抗体包括具有包括Fc区的重链及轻链的抗体。恒定域可为天然序列恒定域(例如,人类天然序列恒定域)或其氨基酸序列变异体。在一些情况下,完整抗体可以具有一或多种效应功能。

[0144] “抗体片段”是指不同于完整抗体,包含完整抗体中结合完整抗体所结合的抗原的部分的分子。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段;双抗体;线性抗体(参见美国专利5641870,实例2;Zapata等人,Protein Eng.8(10):1057-1062(1995));由抗体片段形成的单链抗体分子及多特异性抗体。

[0145] 木瓜蛋白酶消化抗体,诸如本发明的抗-SIRPA抗体,产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,及剩余的“Fc”片段,其名称反映容易结晶的能力。Fab片段由整条轻链连同重链的可变区域(V_H)及一条重链的第一恒定域(C_H1)一起组成。各Fab片段就抗原结合而言是单价的,亦即,其具有单一抗原结合位点。胃蛋白酶处理抗体产生单个大F(ab')₂片段,该片段大致对应于经二硫键连接的具有不同抗原结合活性的两个Fab片段且仍能够交联抗原。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于,Fab'片段在C_H1域的羧基端具有若干额外残基,包括一或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。Fab'-SH是恒定域的半胱氨酸残基具有游离硫醇基的Fab'在本文中的名称。F(ab')₂抗体片段最初以中间具有铰链半胱氨酸的Fab'片段对形式产生。抗体片段的其他化学偶联亦为已知的。

[0146] Fc片段包含通过二硫化物结合在一起的两条重链的羧基端部分。抗体的效应功能由Fc区中的序列决定,该区域亦由在某些类型的细胞上所发现的Fc受体(FcR)识别。

[0147] 抗体,诸如本发明的抗-SIRPA抗体的“功能片段”包含完整抗体的一部分,一般包括完整抗体的抗原结合区或可变区或抗体中保留或已修改FcR结合能力的Fc区。抗体片段的实例包括由抗体片段形成的线性抗体、单链抗体分子及多特异性抗体。

[0148] 术语“双抗体”是指通过在V_H与V_L域之间用短接头(约5-10个残基)构建sFv片段(参见上一段)制备的小抗体片段,使得达成可变域的链间而非链内配对,从而产生二价片段,亦即,具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双抗体是两个“互换(crossover)”sFv片段的杂二聚体,其中两个抗体的V_H及V_L域存在于不同的多肽链上。

[0149] 如本文所用的“嵌合抗体”是指一种抗体(免疫球蛋白),诸如本发明的嵌合抗-SIRPA抗体,其中重链及/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或子类的抗体中的对应序列相同或同源,而链的其余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或子类的抗体中的对应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要其展现所要生物活性即可。本文中感兴趣的嵌合抗体包括PRIMATIZED®抗体,其中抗体的抗原结合区衍生自通过例如用感兴趣的抗原使猕猴免疫而产生的抗体。如本文所用的“人类化抗体”是作为“嵌合抗体”的子集使用。

[0150] 非人类(例如,鼠类)抗体的“人类化”形式,诸如本发明的抗-SIRPA抗体的人类化形式,为包含来自非人类HVR的氨基酸残基及来自人类FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施例中,人类化抗体将包含至少一个且通常两个可变域的实质上所有,其中所有或实质上所有HVR(例如CDR)均与非人类抗体的HVR对应,且所有或实质上所有FR均与人类抗体的FR对应。人类化抗体任选地可包含衍生自人类抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如非人类抗体)的“人类化形式”是指已经历人类化的抗体。

[0151] “人类抗体”为具有与由人类产生的抗体,诸如本发明的抗-SIRPA抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列的抗体,及/或使用如本文中所揭示的用于制造人类抗体的技术中的任一者制得的抗体。人类抗体的此定义特别排除包含非人类抗原结合残基的人类化抗体。人类抗体可以使用此领域中已知的各种技术产生,包括噬菌体展示库及酵母展示库。人类抗体可以通过向转基因动物施用抗原来制备,该转基因动物已经修饰以响应于抗原攻击而产生此类抗体,但其内源性基因座失能,例如经免疫的异种小鼠(xenomice),以及经由人类B细胞杂交瘤技术产生。人类抗体可以使用此领域中已知的各种技术产生,该技术包括噬菌体展示库。Hoogenboom及Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks等人, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)。Cole等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 第77页 (1985); Boerner等人, J. Immunol., 147 (1):86-95 (1991) 中所述的方法亦可用于制备人类单克隆抗体。亦参见van Dijk及van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001)。人类抗体可以通过向转基因动物施用抗原来制备,该转基因动物已经修饰以响应于抗原攻击而产生此类抗体,但其内源性基因座失能,例如经免疫的异种小鼠(关于XENOMOUSE™技术,参见例如美国专利第6,075,181号及第6,150,584号)。关于经由人类B细胞杂交瘤技术产生的人类抗体,亦参见例如Li等人, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)。或者,人类抗体亦可以通过采用如例如W02009/036379A2; W02010105256; W02012009568; 及Xu等人, Protein Eng. Des. Sel., 26(10):663-70 (2013) 中所揭示的酵母库及方法来制备。

[0152] 术语“高变区”、“HVR”或“HV”当在本文中使用是指抗体可变域的区域,诸如本发明的抗-SIRPA抗体的区域,该区域在序列上是高变的及/或形成结构界定环。通常,抗体包含六个HVR;三个在V_H中(H1、H2、H3),且三个在V_L中(L1、L2、L3)。在天然抗体中,H3及L3呈现六个HVR的大部分多样性,且认为尤其是H3在赋予抗体精细特异性方面起到独特作用。仅由重链组成的天然产生的骆驼类抗体在无轻链存在下亦具有功能且稳定。

[0153] 已使用多种HVR描述且该描述涵盖于本文中。在一些实施例中,HVR可为基于序列变异性的Kabat互补决定区(CDR)且为最常用的(Kabat等人,同前)。在一些实施例中,HVR可为Chothia CDR。Chothia改为提及结构环的位置(Chothia及Lesk J. Mol. Biol. 196:901-

917 (1987))。在一些实施例中,HVR可为AbM HVR。AbM HVR表示Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷,且由Oxford Molecular的AbM抗体模型化软件使用。在一些实施例中,HVR可为“接触(contact)”HVR。“接触”HVR是基于可用复合晶体结构的分析。来自此等HVR中的每一者的残基标注如下。

	环	Kabat	AbM	Chothia	接触
[0154]	L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
	L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
	L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
	H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat编号)
	H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia编号)
	H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
	H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0155] HVR可包含如下“扩展HVR”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)及89-97或89-96(L3)及VH中的26-35(H1)、50-65或49-65(优选实施例)(H2)及93-102、94-102或95-102(H3)。关于此等扩展HVR定义中的每一者,可变域残基根据Kabat等人的同前文献编号。

[0156] “框架”或“FR”残基为除如本文所定义的HVR残基外的彼等可变域残基。

[0157] 短语“如EU或Kabat中的可变域残基编号”或“如EU或Kabat中的氨基酸位置编号”及其变体是指EU或Kabat等人的同前文献中用于抗体编译的重链可变域或轻链可变域的编号系统。使用此编号系统,实际线性氨基酸序列可含有对应于可变域的FR或HVR的缩短或插入的较少或额外氨基酸。例如,重链可变域可在H2的残基52之后包括单一氨基酸插入物(根据Kabat的残基52a)且在重链FR残基82之后包括插入的残基(例如根据Kabat的残基82a、82b及82c等)。对于给定抗体,可通过将抗体序列的同源区与“标准”Kabat编号序列比对来确定残基的EU或Kabat编号。

[0158] 通常在提及[0077]可变域中的残基(大约为轻链的残基1-107及重链的残基1-113)时使用EU或Kabat编号系统(例如Kabat等人,Sequences of Immunological Interest.第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))。通常在提及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时使用“EU或Kabat编号系统”或“EU索引”(例如,Kabat等人的同前文献中所报导的EU索引)。“如Kabat中的EU索引”是指人类IgG1 EU抗体的残基编号。除非本文中另外陈述,否则提及抗体可变域中的残基编号时意谓根据Kabat编号系统的残基编号。除非本文中另外陈述,否则提及抗体恒定域中的残基编号时意谓根据EU或Kabat编号系统的残基编号(例如,参见美国专利公开案第2010-280227号)。

[0159] 如本文所用的“接受体人类框架”为包含衍生自人类免疫球蛋白框架或人类共同框架的V_L或V_H框架的氨基酸序列的框架。“衍生自”人类免疫球蛋白框架或人类共同框架的接受体人类框架可以包含与其相同的氨基酸序列,或其可以包含预先存在的氨基酸序列变化。在一些实施例中,预先存在的氨基酸变化的数目为10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、或2个或更少。当在VH中存在预先存在的氨基酸变化时,优选的彼等变化出现在位置71H、73H及78H中的仅三个、两个或一个位置处;例如,在彼等位置处的氨基酸残基可为71A、73T及/或78A。在一个实施例中,V_L接受体人类框架在序列上与V_L人类免疫球蛋白框架序列或人类共同框架序列相同。

[0160] “人类共同框架”为表示人类免疫球蛋白V_L或V_H框架序列选集中最常出现的氨基酸残基的框架。通常,此人类免疫球蛋白V_L或V_H序列选集是来自可变域序列的亚群。通常,序列的亚群为如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中的亚群。实例包括对于V_L,亚群可为如Kabat等人的同前文献中的亚群κI、κII、κIII或κIV。另外,对于V_H,亚群可为如Kabat等人的同前文献中的亚群I、亚群II或亚群III。

[0161] 在例如本发明的抗-SIRPA抗体的指定位置处的“氨基酸修饰”是指指定残基的取代或缺失,或邻接指定残基的至少一个氨基酸残基的插入。“邻接”指定残基的插入意谓其一个至两个残基内的插入。插入可在指定残基的N端或C端。本文中的优选氨基酸修饰为取代。

[0162] “亲和力成熟的”抗体,诸如本发明的亲和力成熟的抗-SIRPA抗体,为在其一或多个HVR中具有一或多种改变的抗体,所述改变促使抗体对抗原的亲和力相比于不具有彼等改变的亲本抗体而言改善。在一个实施例中,亲和力成熟的抗体对目标抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔亲和力。亲和力成熟的抗体通过此领域中已知的程序产生。例如,Marks等人Bio/Technology 10:779-783(1992)描述通过V_H及V_L域改组的亲和力成熟。HVR及/或框架残基的随机诱变由例如以下描述:Barbas等人Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813(1994);Schier等人Gene 169:147-155(1995);Yelton等人J. Immunol. 155:1994-2004(1995);Jackson等人J. Immunol. 154(7):3310-9(1995);及Hawkins等人,J. Mol. Biol. 226:889-896(1992)。

[0163] “Fv”为包含完整的抗原识别及结合位点的最小抗体片段。此片段由紧密非共价缔合的一个重链可变区域与一个轻链可变区域的二聚体组成。由这两个域的折迭产生六个高变环(H链及L链各3个环),其提供用于抗原结合的氨基酸残基且赋予抗体抗原结合特异性。然而,即使单一可变域(或仅包含特异性针对抗原的三个HVR的半个Fv)仍具有识别及结合抗原的能力,尽管其亲和力低于整个结合位点。

[0164] “单链Fv”亦简称为“sFv”或“scFv”,为包含连接成单一多肽链的V_H及V_L抗体域的抗体片段。优选地,sFv多肽进一步包含在V_H与V_L域之间的多肽接头,其使得sFv能够形成用于抗原结合的所要结构。

[0165] 抗体“效应功能”是指可归因于抗体的Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变异Fc区)的彼等生物活性,且随抗体同种型而变化。

[0166] 术语“Fc区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的C端区,包括天然序列Fc区及变异Fc区。虽然免疫球蛋白重链的Fc区边界可变化,但人类IgG重链Fc区通常定义为自处于位置Cys226的氨基酸残基或自Pro230至其羧基端的延伸。可移除Fc区的C端赖氨酸(残基447,根据EU编号系统),例如在抗体的制造或纯化期间,或通过以重组方式工程化编码抗体的重链的核酸。因此,完整抗体的组合物可包含所有K447残基均被移除的抗体群体、没有K447残基被移除的抗体群体及具有含有及不含K447残基的抗体的混合物的抗体群体。适合用于本发明抗体中的天然序列Fc区包括人类IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。

[0167] “天然序列Fc区”包含与自然界中所发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人类Fc区包括天然序列人类IgG1 Fc区(非A及A同种异型);天然序列人类IgG2 Fc区;天然序列人类IgG3 Fc区;及天然序列人类IgG4 Fc区以及其天然产生的变异体。

[0168] “变异Fc区”包含因至少一个氨基酸修饰,优选一或多个氨基酸取代而不同于天然序列Fc区的氨基酸序列的氨基酸序列。优选地,变异Fc区相比于天然序列Fc区或相比于亲本多肽的Fc区具有至少一个氨基酸取代,例如在天然序列Fc区中或在亲本多肽的Fc区中约一个至约十个氨基酸取代,且优选约一个至约五个氨基酸取代。变异Fc区在本文中优选与天然序列Fc区及/或与亲本多肽Fc区具有至少约80%同源性,且最优选与其具有至少约90%同源性,更优选与其具有至少约95%同源性。

[0169] “Fc受体”或“FcR”描述与抗体Fc区结合的受体。优选的FcR为天然序列人类FcR。此外,优选的FcR为结合IgG抗体的受体(γ 受体)且包括Fc γ RI、Fc γ RII及Fc γ RIII子类的受体,包括此等受体的等位基因变异体及交替剪接形式,Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“活化受体”)及Fc γ RIIB(“抑制受体”),其具有主要在其细胞质域方面不同的类似氨基酸序列。活化受体Fc γ RIIA在其细胞质域中含有免疫受体酪氨酸基活化基序(“ITAM”)。抑制受体Fc γ RIIB在其细胞质域中含有免疫受体酪氨酸基抑制基序(“ITIM”)。本文术语“FcR”涵盖其他FcR,包括将来鉴定的FcR。FcR亦可以增加抗体的血清半衰期。

[0170] 可例如在表达人类FcRn的转基因小鼠或经转染人类细胞系中或在施用具有变异Fc区的多肽的灵长类动物中分析人类FcRn高亲和力结合多肽与FcRn的在体内结合及血清半衰期。WO 2004/42072(Presta)描述与FcR的结合改善或减弱的抗体变异体。亦参见例如Shields等人,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。

[0171] 如本文所用的关于肽、多肽或抗体序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”及“同源性”是指在比对序列且必要时引入空隙以达成最大序列同一性百分比之后,且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分,候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。出于确定氨基酸序列一致性百分比的目的的比对可以在此领域的技能范围内的各种方式达成,例如使用公开可用的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定用于测量比对的适当参数,包括用于达成所比较序列的全长内的最大比对所需的此领域中已知的任何算法。

[0172] 术语“竞争”当在竞争相同表位的抗体(例如,中和抗体)的情况下使用时意谓如通过分析所确定的抗体之间的竞争,其中待测试抗体阻止或抑制(例如,降低)参考分子(例如,配体或参考抗体)与共同抗原(例如,SIRPA或其片段)的特异性结合。可使用许多类型的竞争性结合分析来确定抗体是否与另一抗体竞争,例如:固相直接或间接放射免疫分析(RIA)、固相直接或间接酶免疫分析(EIA)、夹心竞争分析(参见例如Stahli等人,1983,Methods in Enzymology 9:242-253);固相直接生物素-亲合素EIA(参见例如Kirkland等人,1986,J.Immunol.137:3614-3619);固相直接标记分析、固相直接标记夹心分析(参见例如Harlow及Lane,1988,Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press);使用1-125标记的固相直接标记RIA(参见例如Morel等人,1988,Molec.Immunol.25:7-15);固相直接生物素-亲合素EIA(参见例如Cheung等人,1990,Virology 176:546-552);及直接标记RIA(Moldenhauer等人,1990,Scand.J.Immunol.32:77-82)。通常,此类分析涉及使用与具有未经标记的测试抗体及经标记的参考抗体中的任一者的固体表面或细胞结合的经纯化抗原。竞争性抑制是通过在测试抗体存在下测定与固体表面或细胞结合的标记的量来测量。通常,测试抗体过量存在。通过竞争分析(竞争抗体)鉴定的抗体包括与参考抗体结合至同一表位的抗体及结合至足够靠近参考抗体所结合的表位的相邻表位以产生位阻的抗

体。关于测定竞争性结合的方法的额外细节提供于本文中。通常,当竞争性抗体过量存在时,其将使参考抗体与共同抗原的特异性结合抑制(例如,降低)至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97.5%及/或接近100%。

[0173] 如本文所用,SIRPA多肽与第二多肽之间的“相互作用”涵盖(但不限于)蛋白质-蛋白质相互作用、物理相互作用、化学相互作用、结合、共价结合及离子结合。如本文所用,当抗体破坏、降低或完全消除两个多肽之间的相互作用时,抗体“抑制”两个多肽之间的“相互作用”。当本发明的抗体与两个多肽中的一者结合时,其“抑制”两个多肽之间的“相互作用”。在一些实施例中,可以将相互作用抑制至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97.5%及/或接近100%中的任一者。

[0174] 术语“表位”包括任何能够被抗体结合的决定子。表位为抗原的由靶向该抗原的抗体结合的区域,且当抗原为多肽时,包括直接接触抗体的特定氨基酸。表位最常存在于多肽上,但在一些情况下可存在于其他类型的分子,诸如核酸上。表位决定子可包括分子的化学活性表面基团,诸如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,且可具有特定三维结构特征及/或特定电荷特征。通常,特异性针对特定目标抗原的抗体将优先识别多肽及/或大分子的复杂混合物中的目标抗原上的表位。

[0175] “增效剂”抗体或“活化”抗体为在抗体结合抗原之后诱导(例如,增加)抗原的一或多种活性或功能的抗体。

[0176] “拮抗剂”抗体或“阻断”抗体或“抑制性”抗体为在抗体结合抗原之后降低、抑制及/或消除(例如,减少)与一或多种配体的抗原结合的抗体,及/或在抗体结合抗原之后降低、抑制及/或消除(例如,减少)抗原的一或多种活性或功能的抗体。在一些实施例中,拮抗剂抗体或阻断抗体或抑制性抗体实质上或完全抑制与一或多种配体的抗原结合及/或抗原的一或多种活性或功能。

[0177] “经分离”抗体,诸如本发明的经分离抗-SIRPA抗体,为已自其产生环境的组分鉴定、分离及/或回收(例如,天然地或重组地)的抗体。优选地,经分离抗体与所有其他来自其产生环境的污染物组分无关。来自其产生环境的污染物组分,诸如由经重组转染细胞产生的组分,为通常会干扰抗体的研究、诊断或治疗用途的物质,且可包括酶、激素及其他蛋白质或非蛋白质溶质。在优选实施例中,抗体将经纯化:(1)达到超过95重量%的抗体,如通过例如Lowry方法所测定,且在一些实施例中,达到超过99重量%;(2)达到通过使用自旋杯式测序仪足以获得N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或(3)通过SDS-PAGE在非还原或还原条件下使用库马斯蓝(Coomassie blue)或优选银染料,达到均质性。经分离抗体包括在重组T细胞内的原位抗体,因为抗体的天然环境的至少一种组分将不存在。然而,通常,经分离多肽或抗体将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0178] 编码抗体,诸如本发明的抗-SIRPA抗体的“经分离”核酸分子为自其产生环境中通常与其相关的至少一种污染物核酸分子鉴定及分离的核酸分子。优选地,经分离核酸与所有与产生环境有关的组分无关。本文中编码多肽及抗体的经分离核酸分子所呈形式不同于其在自然界中所发现的形式或环境。因此,经分离核酸分子与本文中天然存在于细胞中的编码多肽及抗体的核酸不同。

[0179] 如本文所用的术语“载体”意欲指能够转运其所连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体为“质粒”,其是指环状双链DNA,其中可连接有额外的DNA区段。另一类型的载体

为噬菌体载体。另一类型的载体为病毒载体,其中可将额外DNA区段连接至病毒基因组中。某些载体能够在其所引入的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体及游离型哺乳动物载体)。其他载体(例如非游离型哺乳动物载体)可在引入宿主细胞中时整合至宿主细胞的基因组中,且从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够导引与其可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”或简言之“表达载体”。一般而言,用于重组DNA技术中的表达载体常常呈质粒形式。在本说明书中,由于质粒为最常用的载体形式,因此“质粒”与“载体”可互换使用。

[0180] 如在本文中可互换地使用的“聚核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸的聚合物且包括DNA及RNA。核苷酸可为脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核苷酸或碱基及/或其类似物,或可通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应并入聚合物中的任何底物。

[0181] “宿主细胞”包括可为或已成为用于并入聚核苷酸插入物的载体的接受者的个别细胞或细胞培养物。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代,且后代可能因为自然、偶然或故意突变而不一定与原始亲本细胞完全相同(在形态或基因组DNA互补序列方面)。宿主细胞包括经本发明的聚核苷酸在体内转染的细胞。

[0182] 如本文所用的“载剂”包括药物学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂,其在所使用的剂量及浓度下对曝露于其的细胞或哺乳动物无毒。通常生理学上可接受的载剂为水性pH缓冲溶液。生理学上可接受的载剂的实例包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐及其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖醇,诸如甘露糖醇或山梨糖醇;成盐相对离子,诸如钠;及/或非离子型表面活性剂,诸如TWEENTM、聚乙二醇(PEG)及PLURONICSTM。

[0183] 如本文所用的术语“预防”包括提供关于个体中特定疾病、病症或病状的发生或复发的预防。个体可能倾向于患上、疑似患上特定疾病、病症或病状,或有患上此类疾病、病症或病状的风险,但尚未被诊断患有该疾病、病症或病状。

[0184] 如本文所用,“有”患上特定疾病、病症或病状的“风险”的个体可具有或不具有可侦测的疾病或疾病症状,且在本文所述的治疗方法之前可能已经显示或尚未显示可侦测的疾病或疾病症状。“有风险”表示个体具有一种或多种风险因素,其为与如此领域中已知的特定疾病、病症或病状的患上相关的可测量参数。具有此等风险因素中的一或多者的个体比没有此等风险因素中的一或多者的个体具有更高的患上特定疾病、病症或病状的机率。

[0185] 如本文所用的术语“治疗”是指旨在改变所治疗的个体在临床病理学过程中的自然过程的临床干预。所要治疗作用包括减小特定疾病、病症或病状的发展速率,改善或减轻其病理状态,及缓解或改善其预后。例如,若与特定疾病、病症或病状相关的一或多种症状得以减轻或消除,则个体被成功“治疗”。

[0186] “有效量”是指在所需剂量及时间段下,至少可有效达成所要治疗或预防结果的量。有效量可以一或多次投药提供。本文中的有效量可以根据诸如以下因素而变化:个体的疾病状态、年龄、性别及体重,以及治疗在个体中引发所要反应的能力。有效量亦为治疗有益作用超过治疗的任何毒性或有害作用的量。对于预防用途,有益或所要结果包括诸如以下的结果:消除或降低疾病的风险,减轻疾病的严重程度,或推迟疾病发作,疾病包括疾病

的生物化学、组织学及/或行为症状、其并发症及在疾病发展期间所呈现的中间病理学表型。对于治疗用途,有益或所要结果包括以下临床结果:诸如减少由疾病引起的一或多种症状,提高患病者的生活质量,降低治疗疾病所需的其他药物的剂量,增强另一药物的作用(诸如经由靶向),推迟疾病进展及/或延长存活时间。药物、化合物或药物组合物的有效量为足以直接或间接地完成预防性或治疗性治疗的量。如在临床背景下所了解的,药物、化合物或药物组合物的有效量可以或不连同另一药物、化合物或药物组合物一起达成。因此,可考虑在施用一或多种治疗剂的情形下的“有效量”,且若联合一或多种其他药剂可达成或达成了所要结果,则单一药剂可视为以有效量给予。

[0187] 用于治疗、预防或降低风险的目的的“个体”是指任何归类为哺乳动物的动物,包括人类、家畜与农畜及动物园动物、运动动物或宠物,诸如犬、马、兔、牛、猪、仓鼠、沙鼠、小鼠、雪貂、大鼠、猫及类似动物。在一些实施例中,个体为人类。

[0188] 如本文所用,“联合”另一化合物或组合物施用包括同时施用及/或在不同时间施用。联合施用亦涵盖作为共同调配物施用或作为分开的组合物施用,包括以不同给药频率或时间间隔,及使用相同施用途径或不同施用途径。在一些实施例中,联合施用为作为相同治疗方案的一部分施用。

[0189] 如本文所用的术语“约”是指此技术领域的技术人员易于知晓的相应值的常见误差范围。本文中提及“约”某一值或参数时包括(且描述)针对该值或参数本身的实施例。

[0190] 除非上下文另外明确规定,否则如本文及随附申请专利范围中所用的单数形式“一(a/an)”及“该”包括复数个提及物。例如,提及“抗体”是提及一种至多种抗体,诸如摩尔量,且包括本领域技术人员已知的其等效物,等等。

[0191] 应理解,本文所述的本发明的方面及实施例包括“包含”方面及实施例,“由”方面及实施例“组成”,及“本质上由”方面及实施例“组成”。

[0192] 抗-SIRPA抗体

[0193] 抗-SIRPA抗体结合区

[0194] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体可以结合构象表位。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体可以结合不连续SIRPA表位。在一些实施例中,不连续SIRPA表位包含两个或更多个肽、三个或更多个肽、四个或更多个肽、五个或更多个肽、六个或更多个肽、七个或更多个肽、八个或更多个肽、九个或更多个肽、或10个或更多个肽。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体可以结合包含一或多种肽的SIRPA表位。如本文中所揭示,SIRPA表位可以包含一或多种肽,其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、10个或更多个、11个或更多个、12个或更多个、13个或更多个、14个或更多个、15个或更多个、16个或更多个、17个或更多个、18个或更多个、19个或更多个、或20个或更多个氨基酸残基,或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列对应的哺乳动物SIRPA蛋白质上的五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、10个或更多个、11个或更多个、12个或更多个、13个或更多个、14个或更多个、15个或更多个、16个或更多个、17个或更多个、18个或更多个、19个或更多个、或20个或更多个氨基酸残基。

[0195] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体与人类SIRPA的表位结合,该表位与以下抗-SIRPA抗体所结合的SIRPA表位相同或重迭:包含含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链

SIRPA抗体。

[0197] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体竞争性地抑制至少一种选自表4、5、7、8及10中所列的抗体中的任一者的抗体的结合。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体竞争性地抑制至少一种选自以下的抗体的结合:m3F9、h3F9 H1/L1 (14.70.1)、h3F9 H1/L2 (14.70.2)、h3F9 H1/L3、h3F9 H2/L1 (14.70.4)、h3F9 H2/L2、h3F9 H2/L3、3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24、3F9-25及其任何组合。在一些实施例中,当本发明的抗-SIRPA抗体使一或多种选自m3F9、h3F9 H1/L1 (14.70.1)、h3F9 H1/L2 (14.70.2)、h3F9 H1/L3、h3F9 H2/L1 (14.70.4)、h3F9 H2/L2、h3F9 H2/L3、3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24、3F9-25及其任何组合的抗体与SIRPA的结合与不存在该抗-SIRPA抗体的情况下与SIRPA的结合相比降低约50%至100%范围内的量时,该抗-SIRPA抗体与一或多种选自m3F9、h3F9 H1/L1 (14.70.1)、h3F9 H1/L2 (14.70.2)、h3F9 H1/L3、h3F9 H2/L1 (14.70.4)、h3F9 H2/L2、h3F9 H2/L3、3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24、3F9-25及其任何组合的抗体竞争与SIRPA结合。在一些实施例中,当本发明的抗-SIRPA抗体使一或多种选自m3F9、h3F9 H1/L1 (14.70.1)、h3F9 H1/L2 (14.70.2)、h3F9 H1/L3、h3F9 H2/L1 (14.70.4)、h3F9 H2/L2、h3F9 H2/L3、3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24、3F9-25及其任何组合的抗体与SIRPA的结合与不存在该抗-SIRPA抗体的情况下与SIRPA的结合相比降低至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%时,该抗-SIRPA抗体与一或多种选自m3F9、h3F9 H1/L1 (14.70.1)、h3F9 H1/L2 (14.70.2)、h3F9 H1/L3、h3F9 H2/L1 (14.70.4)、h3F9 H2/L2、h3F9 H2/L3、3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24、3F9-25及其任何组合的抗体竞争与SIRPA结合。在一些实施例中,使一或多种选自m3F9、h3F9 H1/L1 (14.70.1)、h3F9 H1/L2 (14.70.2)、h3F9 H1/L3、h3F9 H2/L1 (14.70.4)、h3F9 H2/L2、h3F9 H2/L3、3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24、3F9-25及其任何组合的抗体与SIRPA的结合降低100%的本发明的抗-SIRPA抗体指示,该抗-SIRPA抗体基本上完全阻断一或多种选自m3F9、h3F9 H1/L1 (14.70.1)、h3F9 H1/L2 (14.70.2)、h3F9 H1/L3、h3F9 H2/L1 (14.70.4)、h3F9 H2/L2、h3F9 H2/L3、3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24、3F9-25及其任何组合的抗体与SIRPA的结合。在一些实施例中,该抗-SIRPA抗体及一或多种选自m3F9、h3F9 H1/L1 (14.70.1)、h3F9 H1/L2 (14.70.2)、h3F9 H1/L3、h3F9 H2/L1 (14.70.4)、h3F9 H2/L2、

h3F9 H2/L3、3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24、3F9-25及其任何组合的抗体是以对应于以下的量存在:10:1比率、9:1比率、8:1比率、7:1比率、6:1比率、5:1比率、4:1比率、3:1比率、2:1比率、1:1比率、0.75:1比率、0.5:1比率、0.25:1比率、0.1:1比率、0.075:1比率、0.050:1比率、0.025:1比率、0.01:1比率、0.0075:1比率、0.0050:1比率、0.0025:1比率、0.001:1比率、0.00075:1比率、0.00050:1比率、0.00025:1比率、0.0001:1比率、1:10比率、1:9比率、1:8比率、1:7比率、1:6比率、1:5比率、1:4比率、1:3比率、1:2比率、1:0.75比率、1:0.5比率、1:0.25比率、1:0.1比率、1:0.075比率、1:0.050比率、1:0.025比率、1:0.01比率、1:0.0075比率、1:0.0050比率、1:0.0025比率、1:0.001比率、1:0.00075比率、1:0.00050比率、1:0.00025比率或1:0.0001比率的抗-SIRPA抗体:一或多种选自m3F9、h3F9 H1/L1 (14.70.1)、h3F9 H1/L2 (14.70.2)、h3F9 H1/L3、h3F9 H2/L1 (14.70.4)、h3F9 H2/L2、h3F9 H2/L3、3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24、3F9-25及其任何组合的抗体。在一些实施例中,与一或多种选自m3F9、h3F9 H1/L1 (14.70.1)、h3F9 H1/L2 (14.70.2)、h3F9 H1/L3、h3F9 H2/L1 (14.70.4)、h3F9 H2/L2、h3F9 H2/L3、3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24、3F9-25及其任何组合的抗体的量相比,该抗-SIRPA抗体以在约1.5倍至100倍或大于100倍范围内的量过量存在。在一些实施例中,与一或多种选自m3F9、h3F9 H1/L1 (14.70.1)、h3F9 H1/L2 (14.70.2)、h3F9 H1/L3、h3F9 H2/L1 (14.70.4)、h3F9 H2/L2、h3F9 H2/L3、3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24、3F9-25及其任何组合的抗体的量相比,该抗-SIRPA抗体以过量约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9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倍的量存在。

[0198] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体与人类SIRPA的表位结合,该表位与由至少一种选自表4、5、7、8及10中所列的抗体中的任一者的抗体所结合的SIRPA表位相同或重迭。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体与人类SIRPA的表位结合,该表位与由至少一种选自m3F9、h3F9 H1/L1 (14.70.1)、h3F9 H1/L2 (14.70.2)、h3F9 H1/L3、h3F9 H2/L1 (14.70.4)、h3F9 H2/L2、h3F9 H2/L3、3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24、3F9-25的抗体所结合的SIRPA表位相同或重迭。

[0199] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体结合由至少一种选自表4、5、7、8及10中所列的抗体中的任一者的抗体所结合的基本上相同的SIRPA表位。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体结合由至少一种选自m3F9、h3F9 H1/L1 (14.70.1)、h3F9 H1/L2 (14.70.2)、h3F9 H1/L3、h3F9 H2/L1 (14.70.4)、h3F9 H2/L2、h3F9 H2/L3、3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-

16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24、3F9-25的抗体所结合的基本上相同的SIRPA表位。用于定位抗体所结合的表位的详细例示性方法提供于Morris (1996) “Epitope Mapping Protocols”, Methods in Molecular Biology第66卷 (Humana Press, Totowa, NJ) 中。

[0200] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体与一或多种选自m3F9、h3F9 H1/L1 (14.70.1)、h3F9 H1/L2 (14.70.2)、h3F9 H1/L3、h3F9 H2/L1 (14.70.4)、h3F9 H2/L2、h3F9 H2/L3、3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24、3F9-25及其任何组合的抗体竞争与SIRPA结合。

[0201] 此领域中已知的任何适合的竞争分析或SIRPA结合分析,诸如BIAcore分析、ELISA分析或流动式细胞测量术,皆可用于确定抗-SIRPA抗体是否与一或多种选自m3F9、h3F9 H1/L1 (14.70.1)、h3F9 H1/L2 (14.70.2)、h3F9 H1/L3、h3F9 H2/L1 (14.70.4)、h3F9 H2/L2、h3F9 H2/L3、3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24、3F9-25及其任何组合的抗体竞争与SIRPA结合。在例示性竞争分析中,在包含与SIRPA (例如,人类或非人类灵长类动物) 结合的第一经标记抗体及第二未标记抗体的溶液中温育细胞表面上经固定的SIRPA或表达SIRPA的细胞,以测试该第二未标记抗体与第一抗体竞争与SIRPA结合的能力。第二抗体可存在于杂交瘤上清液中。作为对照,在包含第一经标记抗体但不包含第二未标记抗体的溶液中温育经固定的SIRPA或表达SIRPA的细胞。在允许第一抗体与SIRPA结合的条件下温育之后,移除过量未结合抗体,且测量与经固定的SIRPA或表达SIRPA的细胞有关的标记的量。若测试样品中与经固定的SIRPA或表达SIRPA的细胞有关的标记的量相对于对照样品中大幅减少,则指示第二抗体与第一抗体竞争与SIRPA结合。参见Harlow及Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual第14章 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

[0202] 在一些实施例中,本文提供抗-SIRPA抗体,其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR,该HVR选自 (a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列; (b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列; (c) HVR-H3,其包含选自SEQ ID NO:22、23及24的氨基酸序列; (d) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列; (e) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列; 及 (f) HVR-L3,其包含选自SEQ ID NO:11、12、13、14、15、16、17、18及19的氨基酸序列。

[0203] 在一些实施例中,本文提供抗-SIRPA抗体,其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR,该HVR选自: (a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列; (b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列; (c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列; (d) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列; (e) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列; 及 (f) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列; (a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列; (b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列; (c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列; (d) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列; (e) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列; 及 (f) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列; (a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列; (b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列; (c) HVR-H3,其包

[illegible]

[illegible]

SEQ ID NO:24的氨基酸序列; (d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列; (e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列; 及(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0204] 在一些实施例中,本文提供抗-SIRPA抗体,其包含至少一个、至少两个或所有三个 V_H HVR序列,该 V_H HVR序列选自(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列; (b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列; 及(c)HVR-H3,其包含选自SEQ ID NO:22、23及24的氨基酸序列。

[0205] 在一些实施例中,本文提供抗-SIRPA抗体,其包含至少一个、至少两个或所有三个 V_L HVR序列,该 V_L HVR序列选自(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列; (b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列; 及(c)HVR-L3,其包含选自SEQ ID NO:11、12、13、14、15、16、17、18及19的氨基酸序列。

[0206] 在一些实施例中,本文提供抗-SIRPA抗体,其包含(a) V_H 域,该 V_H 域包含至少一个、至少两个或所有三个 V_H HVR序列,该 V_H HVR序列选自(i)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H2及(iii)包含选自SEQ ID NO:22、23及24的氨基酸序列的HVR-H3; 及(b) V_L 域,该 V_L 域包含至少一个、至少两个或所有三个 V_L HVR序列,该 V_L HVR序列选自(i)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-L2及(c)包含选自SEQ ID NO:11、12、13、14、15、16、17、18及19的氨基酸序列的HVR-L3。

[0207] 在一些实施例中,本文提供抗-SIRPA抗体,其包含(a) V_H 域,该 V_H 域包含(i)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H2及(iii)包含选自SEQ ID NO:22、23及24的氨基酸序列的HVR-H3; 及(b) V_L 域,该 V_L 域包含(i)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-L2及(c)包含选自SEQ ID NO:11、12、13、14、15、16、17、18及19的氨基酸序列的HVR-L3。

[0208] 在另一方面中,抗-SIRPA抗体包含与选自SEQ ID NO:33、34及35的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链可变域(V_H)序列。在某些实施例中,与选自SEQ ID NO:33、34及35的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的 V_H 序列相对于参考序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失,但包含该序列的抗-SIRPA抗体保留与SIRPA结合的能力。在某些实施例中,SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35中总共1至10个氨基酸已经取代、插入及/或缺失。在某些实施例中,SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35中总共1至5个氨基酸已经取代、插入及/或缺失。在某些实施例中,取代、插入或缺失发生在HVR外部区域中(亦即在FR中)。任选地,抗-SIRPA抗体包含SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35的 V_H 序列,包括该序列的翻译后修饰。在特定实施例中, V_H 包含一个、两个或三个选自以下的HVR: (a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列; (b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列; 及(c)HVR-H3,其包含选自SEQ ID NO:22、23及24的氨基酸序列。

[0209] 在另一方面中,提供一种抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含与选自SEQ ID NO:36、37、38、39、40、41、42、43及44的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变域(V_L)。在某些实施例中,与选自SEQ ID NO:36、37、38、39、40、41、42、43及44的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的 V_L 序列相对于参考序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失,但包含该序列的抗-SIRPA抗体保留与SIRPA结合的能力。在一些实施例中,SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:44中总共1至10个氨基酸已经取代、插入及/或缺失。在某些实施例中,SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:44中总共1至5个氨基酸已经取代、插入及/或缺失。在某些实施例中,取代、插入或缺失发生在HVR外部区域中(亦即在FR中)。任选地,抗-SIRPA抗体包含SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:44的 V_L 序列,包括该序列的翻译后修饰。在特定实施例中, V_L 包含一个、两个或三个选自以下的HVR:(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;及(c)HVR-L3,其包含选自SEQ ID NO:11、12、13、14、15、16、17、18及19的氨基酸序列。

[0210] 在一些实施例中,提供抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含如在以上所提供的实施例中的任一者中的 V_H 及如在以上所提供的实施例中的任一者中的 V_L 。在一些实施例中,本文提供抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含如在以上所提供的实施例中的任一者中的 V_H 及如在以上所提供的实施例中的任一者中的 V_L 。在一个实施例中,抗体包含分别在SEQ ID NO:33、34或35及SEQ ID NO:36、37、38、39、40、41、42、43或44中的 V_H 及 V_L 序列,包括彼等序列的翻译后修饰。

[0211] 在一些实施例中,本文提供抗-SIRPA抗体,其包含重链可变域(V_H)及轻链可变域(V_L),其中 V_H 及 V_L 选自由以下组成的群:包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的 V_H 及包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的 V_H

及包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的V_L;包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的V_H及包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的V_L;包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的V_H及包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的V_L;及包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的V_H及包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的V_L。

[0212] 本文进一步提供竞争性地抑制包含以下的抗-SIRPA抗体的结合及/或与包含以下的抗-SIRPA抗体竞争结合的抗-SIRPA抗体:(a)V_H域,该V_H域包含(i)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H2及(iii)包含选自SEQ ID NO:22、23及24的氨基酸序列的HVR-H3;及(b)V_L域,该V_L域包含(i)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-L2及(c)包含选自SEQ ID NO:11、12、13、14、15、16、17、18及19的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施例中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:33、34或35及SEQ ID NO:36、37、38、39、40、41、42、43或44中的VH及VL序列。

[0213] 本文提供与人类SIRPA的表位结合的抗-SIRPA抗体,该表位与由包含以下的抗-SIRPA抗体所结合的表位相同或重迭:(a)VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H2及(iii)包含选自SEQ ID NO:22、23及24的氨基酸序列的HVR-H3;及(b)VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-L2及(c)包含选自SEQ ID NO:11、12、13、14、15、16、17、18及19的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施例中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:33、34或35及SEQ ID NO:36、37、38、39、40、41、42、43及44中的V_H及V_L序列。在一些实施例中,人类SIRPA的表位为与由抗-SIRPA抗体所结合者相同的表位。

[0214] 在一些实施例中,根据以上实施例中的任一者的抗-SIRPA抗体为单克隆抗体,包括人类化抗体及/或人类抗体。在一些实施例中,抗-SIRPA抗体为抗体片段,例如Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体或F(ab')₂片段。在一些实施例中,抗-SIRPA抗体为实质上全长抗体,例如IgG1抗体、IgG2a抗体或如本文中所定义的其他抗体类别或同种型。

[0215] 在一些实施例中,根据以上实施例中的任一者的抗-SIRPA抗体可单独地或组合地并入如本文所述的任何特征。

[0216] 本文提供抗-SIRPA抗体。所提供抗体适用于例如诊断或治疗SIRPA介导的病症。

[0217] 本发明部分关于展现一或多种改善及/或增强功能特征(例如,相对于具有包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区的抗-SIRPA抗体)的抗-SIRPA抗体,包括例如能够降低SIRPA的细胞水平的抗-SIRPA抗体、能够降低SIRPA的细胞表面水平的抗-SIRPA抗体、能够降解SIRPA的抗-SIRPA抗体、能够降低CD32A/B的细胞水平的抗-SIRPA抗体、能够增加或增强吞噬作用的抗-SIRPA抗体、能够增加或增强巨噬细胞的肿瘤细胞吞噬作用的抗-SIRPA抗体、能够增加或增强抗癌疗法的抗肿瘤活性的抗-SIRPA抗体、能够增加或增强T细胞增殖的抗-SIRPA抗体、能够增加或增强巨噬细胞的促炎性细胞因子释放的抗-SIRPA抗体、及/或能够以改善/增强的动力学结合人类SIRPA的抗-SIRPA抗体;此类抗-SIRPA抗体的制造及使用方法;含有此类抗-SIRPA抗体的药物组合物;编码此类抗-SIRPA抗体的核酸;及含有编码此类抗-SIRPA抗体的核酸的宿主细胞。

[0218] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体可以具有一或多种至少部分归因于抗体

通过诱导SIRPA的降解、下调、裂解、受体脱敏及/或溶酶体靶向而降低SIRPA的细胞表达(例如,细胞表面表达)的能力的活性。在一些实施例中,降低SIRPA的细胞水平的本发明的抗-SIRPA抗体为展现以下特征中的一或多者的抗体:(1)抑制或降低一或多种SIRPA活性;(2)降低SIRPA表达细胞中的SIRPA表达(诸如在mRNA水平及/或在蛋白质水平)的能力;(3)与SIRPA蛋白质相互作用、结合或识别SIRPA蛋白质的能力;(4)与SIRPA蛋白质特异性地相互作用或结合的能力;及(5)治疗、改善或预防本文所述或所涵盖的疾病或病症的任何方面的能力。

[0219] 在一些实施例中,抗-SIRPA抗体展现以下特性中的一或多者:a)对人类SIRPA所具有的解离常数(KD)低于具有包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区的抗-SIRPA抗体的解离常数;b)与人类细胞,诸如人类单核细胞及巨噬细胞结合;c)降低SIRPA的细胞表面水平(例如,在体外降低人类巨噬细胞上SIRPA的细胞表面水平,其半数最大有效浓度(EC50)低于具有包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区的抗-SIRPA抗体的半数最大有效浓度;d)对人类SIRPA的解离常数(KD)可在约0.6nM至约0.7nM范围内;及/或e)降低SIRPA的细胞表面水平(例如,在体外降低人类巨噬细胞上SIRPA的细胞表面水平,其半数最大有效浓度(EC50)可在约0.4nM至约0.5nM范围内)。如本文中所揭示的半数最大有效浓度(EC50)是指本发明的抗-SIRPA抗体将细胞上或细胞中的SIRPA的细胞水平降低至未经处理的细胞的一半时的浓度,或该抗体与细胞上的SIRPA达成半数最大结合时的浓度。

[0220] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体在体外降低SIRPA的细胞表面水平,其对人类SIRPA v1的半数最大有效浓度(EC50)为约0.40nM至约0.5nM,如通过流动式细胞测量术所测量。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体在体外降低SIRPA的细胞表面水平,其对人类SIRPA v1的半数最大有效浓度(EC50)为约5nM、约4nM、约3nM、约2nM、约1nM、约0.9nM、约0.8nM、约0.7nM、约0.6nM、约0.5nM、约0.4nM、约0.3nM、约0.2nM或约0.1nM,如通过流动式细胞测量术所测量。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体在体外降低SIRPA的细胞表面水平,其对人类SIRPA v1的半数最大有效浓度(EC50)在以下范围内:约5nM至1nM、约1nM至0.9nM、约1nM至0.8nM、约1nM至0.7nM、约1nM至0.6nM、约1nM至0.5nM、约1nM至0.4nM、约1nM至0.3nM、约1nM至0.2nM、约1nM至0.1nM、约0.9nM至0.8nM、约0.9nM至0.7nM、约0.9nM至0.6nM、约0.9nM至0.5nM、约0.9nM至0.4nM、约0.9nM至0.3nM、约0.9nM至0.2nM、约0.9nM至0.1nM、约0.8nM至0.6nM、约0.8nM至0.5nM、约0.8nM至0.4nM、约0.8nM至0.3nM、约0.8nM至0.2nM、约0.8nM至0.1nM、约0.7nM至0.5nM、约0.7nM至0.4nM、约0.7nM至0.3nM、约0.7nM至0.2nM、约0.7nM至0.1nM、约0.6nM至0.4nM、约0.6nM至0.3nM、约0.6nM至0.2nM、约0.6nM至0.1nM、约0.5nM至0.3nM、约0.5nM至0.2nM、约0.5nM至0.1nM、约0.4nM至0.2nM、约0.4nM至0.1nM或约0.3nM至0.1nM,如通过流动式细胞测量术所测量。

[0221] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体在体外降低SIRPA的细胞表面水平,其中对人类SIRPA v1的半数最大有效浓度(EC50)为约0.093nM,对人类SIRPA v2的半数最大有效浓度

为约0.080nM,及/或对食蟹猕猴SIRPA的半数最大有效浓度为约0.879nM,如通过流动式细胞测量术所测量。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体在体外降低SIRPA的细胞表面水平,其对人类SIRPA v1或对人类SIRPA v2的半数最大有效浓度(EC50)在以下范围内:约2nM至0.05nM、约1nM至0.05nM、约0.9nM至0.05nM、约0.8nM至0.05nM、约0.7nM至0.05nM、约0.6nM至0.05nM、约0.5nM至0.05nM、约0.4nM至0.05nM、约0.3nM至0.05nM、约0.20nM至0.05nM、约0.15nM至0.05nM、约0.10nM至0.05nM、约0.09nM至0.05nM、约0.08nM至0.05nM、约0.07nM至0.05nM、约0.06nM至0.05nM、约0.20nM至0.06nM、约0.15nM至0.06nM、约0.10nM至0.06nM、约0.09nM至0.06nM、约0.08nM至约0.06nM、约0.07nM至0.06nM、约0.20nM至0.07nM、约0.15nM至0.07nM、约0.10nM至约0.07nM、约0.09nM至0.07nM、约0.08nM至0.7nM、约0.20nM至0.08nM、约0.15nM至0.08nM、约0.10nM至0.08nM、约0.09nM至0.08nM、约0.20nM至0.09nM、约0.15nM至0.09nM或约0.10nM至0.9nM,如通过流动式细胞测量术所测量。

[0222] 在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,本发明提供一种与人类SIRPA结合的经分离抗体,其中该抗体在体外降低SIRPA的细胞表面水平,其中对人类SIRPA v1的半数最大有效浓度(EC50)为约0.107nM,对人类SIRPA v2的半数最大有效浓度为约0.082nM,及/或对食蟹猕猴SIRPA的半数最大有效浓度为约0.107nM,如通过流动式细胞测量术所测量。

[0223] 有利地,与对照抗-SIRPA抗体(例如,具有包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区的对照抗-SIRPA抗体)相比,本发明的抗-SIRPA抗体更有效地(例如,以更低的EC50)降低SIRPA的细胞表面表达。此外,有利地,与对照抗-SIRPA抗体(例如,具有包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区的对照抗-SIRPA抗体)相比,本发明的抗-SIRPA抗体对SIRPA具有更高的亲和力(例如,高至高大约100倍的亲和力)(例如,更低的KD值,如通过表面等离子共振所测量)。

[0224] 本发明的某些方面至少部分地基于展现一或多种改善的及/或增强的功能特征(例如,相对于具有包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区的抗-SIRPA抗体)的抗-SIRPA抗体的鉴定,该功能特征包括改善的/增强的降低细胞上的SIRPA的细胞表面水平的能力,引起一或多种SIRPA活性的降低、中和、预防或控制,包括(但不限于)减少单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突状细胞及/或微神经胶质细胞的细胞生长;减少由树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、单核细胞、微神经胶质细胞、M1微神经胶质细胞、活化M1微神经胶质细胞、M2微神经胶质细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化M1巨噬细胞及/或M2巨噬细胞诱导的T细胞增殖;降低嗜中性细胞、树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、微神经胶质细胞、M1微神经胶质细胞、活化M1微神经胶质细胞及/或M2微神经胶质细胞的存活率;减少嗜中性细胞、树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、微神经胶质细胞、M1微神经胶质细胞、活化M1微神经胶质细胞及/或M2微神经胶质细胞的增殖;抑制嗜中性细胞、树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、

破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、微神经胶质细胞、M1微神经胶质细胞、活化M1微神经胶质细胞及/或M2微神经胶质细胞的迁移；降低嗜中性细胞、树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、微神经胶质细胞、M1微神经胶质细胞、活化M1微神经胶质细胞及/或M2微神经胶质细胞的一或多种功能；减少单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突状细胞、嗜中性细胞及/或微神经胶质细胞的增殖；降低单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突状细胞、嗜中性细胞及/或微神经胶质细胞的整体功能性；抑制针对选自膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑色素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、急性髓样白血病、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤及甲状腺癌的不同类型的癌症的有益免疫反应；抑制针对选自痴呆、额颞叶型痴呆、阿兹海默氏病(Alzheimer's disease)、血管性痴呆、混合型痴呆症、库贾氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、常压性水脑症、肌肉萎缩性侧索硬化、亨廷顿氏病(Huntington's disease)、滔蛋白病变疾病(tauopathy disease)、那哈氏病(Nasu-Hakola disease)、中风、急性创伤、慢性创伤、原发性震颤、白塞氏病(Behcet's disease)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、路易体痴呆、多发性系统萎缩症、夏-崔综合征(Shy-Drager syndrome)、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、类肉瘤病、衰老病、癫痫、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关的黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性 & 多发性硬化症的不同类型的神经病症的有益免疫反应；与肿瘤细胞上的SIRPA配体结合；与树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、单核细胞、微神经胶质细胞、T细胞、嗜中性细胞及/或巨噬细胞上的SIRPA配体结合；抑制微神经胶质细胞、巨噬细胞、树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、嗜中性细胞、T细胞、T辅助细胞或细胞毒性T细胞中的一或多者的肿瘤细胞杀伤；抑制微神经胶质细胞、巨噬细胞、树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、嗜中性细胞、T细胞、T辅助细胞或细胞毒性T细胞中的一或多者的抗肿瘤细胞增殖活性；抑制微神经胶质细胞、巨噬细胞、树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、嗜中性细胞、T细胞、T辅助细胞或细胞毒性T细胞中的一或多者的抗肿瘤细胞转移活性；调节一或多种在微神经胶质细胞、巨噬细胞、树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、嗜中性细胞、T细胞、T辅助细胞或细胞毒性T细胞中的一或多者上表达的发炎性受体(诸如CD86)的表达；增强免疫抑制性树突状细胞、免疫抑制性巨噬细胞、骨髓衍生的抑制性细胞、肿瘤相关巨噬细胞、免疫抑制性嗜中性细胞及调节性T细胞中的一或多者至肿瘤中的浸润；增加肿瘤、外周血液或其他淋巴器官中的促肿瘤髓样/粒细胞性免疫抑制细胞的数量；增强骨髓衍生的抑制性细胞的促肿瘤活性；降低具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的活化；降低具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的浸润；增加肿瘤生长速率；增加肿瘤复发率；降低一或多种调节抗肿瘤T细胞反应的免疫疗法的功效，任选地其中该一或多种免疫疗法为靶向一或多种选自CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA4、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、HVEM、LIGHT、BTLA、VISTA、KIR、GAL9、TIM1、TIM3、TIM4、A2AR、LAG3、DR-5、CD39、CD70、TREM1、TREM2、Siglec-5、Siglec-7、Siglec-9、Siglec-11、SirpA、CD447、CSF-1受体及其任何组合的蛋白质的免疫疗法，或降低一种或化学治疗剂及/或多种癌症疫苗的功效。

[0225] 在一些实施例中，用如本文所述的抗-SIRPA抗体治疗癌症可以：(i) 增加肿瘤浸润性CD3⁺ T细胞的数量；(ii) 降低非致瘤CD14⁺髓样细胞中的SIRPA的细胞水平，任选地其中

非致瘤CD14+髓样细胞为肿瘤浸润性细胞或任选地其中非致瘤CD14+髓样细胞存在于血液中；(iii)减少非致瘤CD14+髓样细胞的数目,任选地其中非致瘤CD14+髓样细胞为肿瘤浸润性细胞或任选地其中非致瘤CD14+髓样细胞存在于血液中；(iv)降低一或多种细胞中的PD-L1、PD-L2、B7-H7、B7-H3、CD200R、CD163及/或CD206水平,任选地其中该一或多种细胞为非致瘤骨髓衍生的抑制性细胞(MDSC)；(v)减小实体肿瘤的肿瘤生长速率；(vi)减小肿瘤体积；(vii)增加一或多种PD-1抑制剂的功效；(viii)增加一或多种检查点抑制剂疗法及/或免疫调节疗法的功效,任选地其中该一或多种检查点抑制剂疗法及/或免疫调节疗法靶向CTL4、腺苷途径、PD-L1、PD-L2、OX40、TIM3、LAG3或其任何组合中的一或多者；(ix)增加一或多种化学治疗剂的功效,任选地其中化学治疗剂中的一或多者为吉西他滨(gemcitabine)、卡培他滨(capecitabine)、蒽环霉素(anthracycline)、多柔比星(Adriamycin®)、表柔比星(epirubicin)(Ellence®)、紫杉烷(taxane)、帕利他赛(paclitaxel)(Taxol®)、多西他赛(docetaxel)(Taxotere®)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、环磷酰胺(Cytosan®)、卡铂(carboplatin)(Paraplatin®)及其任何组合；(x)增加T细胞在非致瘤骨髓衍生的抑制性细胞(MDSC)存在下的增殖；(xi)抑制非致瘤骨髓衍生的抑制性细胞(MDSC)的分化、存活及/或一或多种功能；及(xii)当与化学或放射性毒素缀合时杀伤实体肿瘤及相关血管中的表达CD33的免疫抑制性非致瘤髓样细胞及/或非致瘤CD14表达细胞。

[0226] 在一些实施例中,本发明的髓样细胞包括(但不限于)CD45+CD14+髓样细胞、CD14+髓样细胞及骨髓衍生的抑制性细胞(MDSC)。在一些实施例中,本发明的髓样细胞为非致瘤髓样细胞。免疫抑制性细胞有时亦称为骨髓衍生的抑制性细胞(MDSC)。在人类中,MDSC可以由以下标志物组合中的一者定义：(1) CD14+HLA-DR低/-；(2) CD14+IL4Rα+；(3) CD14+HLA-DR-IL4Rα+；(4) CD34+CD14+CD11b+CD33+；(5) CD11b+CD14+CD33+；(6) CD33+HLA-DR-；(7) Lin-HLA-DR-；(8) Lin-HLA-DR-CD33+；(9) Lin-HLA-DR-CD33+CD11b+；(10) Lin-CD33+CD11b+CD15+；(11) Lin-HLA-DR-CD33+CD11b+CD14-CD15+；(12) CD11b+CD14-CD33+；(13) CD11b+CD14-HLA-DR-CD33+CD15+；(14) CD33+HLA-DR-CD15+；(15) CD15+IL4Rα+；(16) CD11b+CD15+CD66b+；(17) CD15+FSC低SSC高；(18) CD15高CD33+；(19) CD11b+CD14-CD15+；(20) CD66b+SSC高；及(21) CD11b+CD15+ (亦参见Solito S等人Annals of the NY Academy of Sciences, 2014)。在小鼠中,MDSC可以由表面标志物CD45+、CD11b+、Gr1+及/或IL4Ra+的表达定义。额外例示性免疫抑制单核细胞谱系为CD45+、CD11b+、Gr1低；及CD45+、CD11c+。

[0227] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体降低SIRPA的细胞表面水平,降低SIRPA的细胞内水平,降低SIRPA的总细胞水平或其任何组合,仅在SIRPA天然配体或结合搭配物存在下。

[0228] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体预防、降低或抑制SIRPA配体或结合搭配物的SIRPA介导的活性,包括例如SIRPA配体或结合搭配物CD47、表面活性剂蛋白A及/或表面活性剂蛋白D。

[0229] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体选择性与人类SIRPA结合,该人类SIRPA包括人类等位基因变异体,本文中亦称为“多态性”变异体,包括人类SIRPA v1及人类SIRPA v2,结合人类SIRPβ3,结合食蟹猕猴SIRPA及结合狨猴SIRPA。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体不结合小鼠/鼠类SIRPA,不与SIRPB v1(SIRPβ1)结合,不结合兔SIRPA,且不结合

大鼠SIRPA。

[0230] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体选择性与人类SIRPA结合。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体选择性与人类SIRPA及食蟹猕猴SIRPA结合。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体与人类SIRPA v1、人类SIRPA v2及食蟹猕猴SIRPA结合。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体与人类SIRPA v1、人类SIRPA v2及食蟹猕猴SIRPA结合,但不与鼠类SIRPA结合。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体与人类SIRPA v1、人类SIRPA v2及食蟹猕猴SIRPA结合,但不与SIRPβ1结合。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体与人类SIRPA v1、人类SIRPA v2及食蟹猕猴SIRPA结合,但不与鼠类SIRPA结合且不与人类SIRPβ1结合。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体与人类SIRPA v1、人类SIRPA v2、食蟹猕猴SIRPA及人类SIRPβ3结合,但不结合鼠类SIRPA且不结合人类SIRPβ1。在以上实施例的任何组合中,本发明的抗-SIRPA抗体不阻断SIRPA及CD47的结合或相互作用。

[0231] 本发明的某些方面是关于下调,亦即降低SIRPA的细胞水平的抗-SIRPA抗体。在一些实施例中,抗-SIRPA抗体降低SIRPA的细胞水平,而不抑制、阻断或降低SIRPA与一或多种SIRPA配体(例如CD47)之间的相互作用(例如,结合)。

[0232] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体可以具有一或多种至少部分地归因于抗体通过诱导SIRPA的降解、下调、裂解、受体脱敏及/或溶酶体靶向而降低SIRPA的细胞水平(例如,细胞表面表达)的能力的活性。

[0233] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体下调细胞中的SIRPA表达。在一些实施例中,细胞中的SIRPA表达的下调为减少的SIRPA细胞表面表达。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体下调单核细胞(例如,人类单核细胞)中的SIRPA表达。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体下调巨噬细胞(例如,人类巨噬细胞)中的SIRPA表达。在一些实施例中,与不经本发明的抗-SIRPA抗体处理的巨噬细胞中的SIRPA细胞表面表达水平相比,本发明的抗-SIRPA抗体将SIRPA的巨噬细胞细胞表面表达下调大于70%、大于75%、大于80%、大于85%或大于95%。在一些实施例中,与不经本发明的抗-SIRPA抗体处理的巨噬细胞中的SIRPA细胞表面表达水平相比,本发明的抗-SIRPA抗体将SIRPA的巨噬细胞细胞表面表达下调约70-90%、约70-85%、约70-80%、约70-75%、约75-90%、约75-85%、约75-80%、约80-90%、约80-85%或约85-95%。在一些实施例中,巨噬细胞为人类巨噬细胞,包括(但不限于)人类M1巨噬细胞及人类M2巨噬细胞。

[0234] SIRPA的细胞水平可以指(但不限于)SIRPA的细胞表面水平、SIRPA的细胞内水平及SIRPA的总水平。在一些实施例中,SIRPA的细胞水平的降低包含SIRPA的细胞表面水平的降低。如本文所用,若抗-SIRPA抗体诱导SIRPA的细胞表面水平降低25%或更多,则其降低SIRPA的细胞表面水平,如通过本文所述或此领域中已知的任何在体外基于细胞的分析或适合的体内模型所测量,例如使用流动式细胞测量术,诸如荧光活化细胞分选(FACS)来测量SIRPA的细胞表面水平。在一些实施例中,SIRPA的细胞水平的降低包含SIRPA的细胞内水平的降低。如本文所用,若抗-SIRPA抗体诱导SIRPA的细胞内水平降低25%或更多,则其降低Siglec-9的细胞内水平,如通过本文所述或此领域中已知的任何在体外基于细胞的分析或适合的体内模型所测量,例如免疫染色、西方印迹分析(Western blot analysis)、免疫共沉淀及细胞血细胞计数法。在一些实施例中,SIRPA的细胞水平的降低包含SIRPA的总水平的降低。如本文所用,若抗-SIRPA抗体诱导SIRPA的总水平降低25%或更多,则其降低

SIRPA的总水平,如通过本文所述或此领域中已知的任何在体外基于细胞的分析或适合的体内模型所测量,例如免疫染色、西方印迹分析、免疫共沉淀及细胞血细胞计数法。在一些实施例中,抗-SIRPA抗体诱导SIRPA降解、SIRPA裂解、SIRPA内化、SIRPA脱落、SIRPA表达下调或其任何组合。在一些实施例中,使用SIRPA细胞分析测量原代细胞(例如,树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、单核细胞、微神经胶质细胞及巨噬细胞)上或细胞系上SIRPA的细胞水平。

[0235] 在一些实施例中,在将人类巨噬细胞在37℃下曝露于抗体4小时之后,下调性抗-SIRPA抗体具有200nM或更低,通常100nM或更低的IC₅₀(细胞表面上表达的SIRPA的50%下调)。在一些实施例中,在曝露于本发明抗体的至少24小时内,SIRPA保持下调。可使用任何技术,例如流动式细胞测量术分析细胞的SIRPA表面表达。

[0236] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体将SIRPA的细胞水平与在不存在该抗-SIRPA抗体的情况下SIRPA的细胞水平相比降低至少25%、至少26%、至少27%、至少28%、至少29%、至少30%、至少31%、至少32%、至少33%、至少34%、至少35%、至少36%、至少37%、至少38%、至少39%、至少40%、至少41%、至少42%、至少43%、至少44%、至少45%、至少46%、至少47%、至少48%、至少49%、至少50%、至少51%、至少52%、至少53%、至少54%、至少55%、至少56%、至少57%、至少58%、至少59%、至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更多。

[0237] 在可以与以上段落中概述的下调活性中的任一者组合的一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体抑制SIRPA的细胞表面丛集。

[0238] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体下调SIRPA,但不阻断、抑制或降低SIRPA配体(例如CD47)与SIRPA的结合。在本发明的上下文中,不阻断CD47与SIRPA的结合的针对SIRPA的抗体是指当抗体与CD47及表达SIRPA的细胞一起温育时不会引起与SIRPA结合的CD47显著减少的抗体。在与SIRPA结合的CD47的情况下“显著减少”是指与存在不结合SIRPA的同种型匹配对照抗体的情况下与SIRPA结合的CD47相比,结合减少30%或更低,通常至少25%、至少20%、至少15%或至少10%或更低。用于评定阻断活性的说明性分析阐述于本文实例中。例如,将表达人类SIRPA的细胞,例如人类巨噬细胞,或经修饰以重组表达人类SIRPA的细胞,诸如CHO细胞,以10⁵个细胞/孔种植于96孔板中,洗涤,且在含有1.0μg/ml的单克隆抗体或同种型对照的100μl缓冲液中温育以进行荧光活化细胞分选。随后将细胞在可溶性人类CD47中在冰上洗涤及温育30分钟。随后分析细胞的表面结合的CD47。

[0239] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体下调细胞中的CD32A/B表达(亦即,Fc γ RIIA/Fc γ RIIB)。在一些实施例中,细胞中的CD32A/B(亦即,Fc γ RIIA/Fc γ RIIB)表达的下调为降低的CD32A/B(亦即,Fc γ RIIA/Fc γ RIIB)细胞表面表达。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体下调巨噬细胞(例如,人类巨噬细胞)中的CD32A/B表达。在一些实施例中,本发明的抗-SIRP抗体下调巨噬细胞(例如,人类巨噬细胞)中的CD32A(亦即,Fc γ RIIA)表达。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体下调巨噬细胞(例如,人类巨噬细胞)中的CD32B

(亦即, Fc γ RIIB) 表达。在一些实施例中, 本发明的抗-SIRPA抗体将人类巨噬细胞中的CD32A(亦即, Fc γ RIIA) 的细胞表面表达与不经本发明的抗-SIRPA抗体处理的人类巨噬细胞中的CD32A细胞表面表达水平相比下调约75%、约80%或约85%。在一些实施例中, 本发明的抗-SIRPA抗体将人类巨噬细胞中的CD32A的细胞表面表达与不经本发明的抗-SIRPA抗体处理的人类巨噬细胞中的CD32A细胞表面表达水平相比下调约70-85%。在一些实施例中, 本发明的抗-SIRPA抗体将人类巨噬细胞中的CD32B(亦即, Fc γ RIIB) 的细胞表面表达下调至不可检测的水平。

[0240] 在一个方面中, 本发明提供抗体, 诸如经分离(例如, 单克隆) 抗体, 其与本发明的SIRPA蛋白质内的区域, 诸如表位相互作用或以其他方式与之结合。在一些实施例中, 抗体以改善的/增强的动力学(例如, 相对于具有包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区的抗-SIRPA抗体) 与本发明的SIRPA蛋白质内的区域, 诸如表位相互作用或以其他方式与之结合。在一些实施例中, 抗体与诸如树突状细胞、髓样细胞、单核细胞、巨噬细胞等人类细胞上的SIRPA蛋白质内的区域, 诸如表位相互作用或以其他方式与之结合, 其半数最大有效浓度(EC_{50}) 低于对照抗体(例如, 相对于具有包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区的抗-SIRPA抗体) 的半数最大有效浓度。在一些实施例中, 本发明的抗-SIRPA抗体与SIRPA蛋白质结合且在与SIRPA蛋白质结合之后调节一或多种SIRPA活性, 例如与细胞上的SIRPA表达有关的活性。本发明的SIRPA蛋白质包括(但不限于) 哺乳动物SIRPA蛋白质、人类SIRPA蛋白质、小鼠SIRPA蛋白质、食蟹猕猴SIRPA蛋白质及大鼠SIRPA蛋白质。

[0241] 在一些实施例中, 本发明的抗体可以pH依赖性方式结合SIRPA。在一些实施例中, 本发明的抗体可以在中性pH下与SIRPA结合且经内化而不与SIRPA蛋白质解离。或者, 在酸性pH下, 在本发明的抗体内化且随后通过内体/溶酶体途径降解之后, 该抗体可以与SIRPA解离。在某些实施例中, 抗-SIRPA抗体在以下范围内的pH下结合SIRPA: 5.5至8.0、5.5至7.5、5.5至7.0、5.5至6.5、5.5至6.0、6.0至8.0、6.5至8.0、7.0至8.0、7.5至8.0、6.0至7.5、6.0至7.0、6.5至7.5。在某些实施例中, 抗-SIRPA抗体在小于6.0、小于5.5、小于5.0、小于4.5、小于4.0、小于3.5、小于3.0、小于2.5或小于2.0的pH下与SIRPA解离。

[0242] SIRPA为单次通过I型膜蛋白(single-pass type I membrane protein)。在人类SIRPA的氨基酸序列(SEQ ID NO:1) 内, 细胞外域位于氨基酸残基31-373; 跨膜域位于氨基酸残基374-394; 且细胞内域位于氨基酸残基395-504。人类SIRPA包含单一V组及两个C1组Ig超家族(IgSF) 域, 分别称为D1域、D2域及D3域。D1域包含人类SIRPA的氨基酸残基32-137; D2域包含人类SIRPA的氨基酸残基148-247; 且D3域包含人类SIRPA的氨基酸残基254-348。如本领域技术人员将了解, 本发明域的开始及结束残基可以视为了确定域所用的计算机模型化程序或所用方法而变化。

[0243] 在一些实施例中, 本发明的抗-SIRPA抗体与SIRPA的D3域结合。在一些实施例中, 本发明的抗-SIRPA抗体与人类SIRPA的D3域结合, 该域包含SEQ ID NO:1的人类SIRPA氨基酸序列的氨基酸残基254-348。在一些实施例中, 本发明的抗-SIRPA抗体与人类SIRPA的D3域内的表位结合。在一些实施例中, 本发明的抗-SIRPA抗体与人类SIRPA的D3域内的表位结合, 其中该表位包含选自以下的氨基酸序列: SEQ ID NO:1的人类SIRPA氨基酸序列的氨基酸残基254-348、氨基酸残基254-274、氨基酸残基264-279、氨基酸残基274-289、氨基酸残

基273-331、氨基酸残基281-315、氨基酸残基281-337、氨基酸残基284-299、氨基酸残基294-309、氨基酸残基304-319、氨基酸残基314-329、氨基酸残基324-339及氨基酸残基334-348。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体与人类SIRPA的D3域内的表位结合,其中该表位包括人类SIRPA v1氨基酸序列(SEQ ID NO:1)的氨基酸残基R282、Q284及G337。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体与人类SIRPA的D3域内的表位结合,其中该表位包括人类SIRPA v1氨基酸序列(SEQ ID NO:1)的氨基酸残基Q281、R282、Q284、L285、W287、R295、E297、V302及W315。

[0244] 在一些实施例中,抗体与SIRPA,例如人类SIRPA的D3域结合。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体与由具有如本文所述命名为m3F9的抗体的CDR的抗体所结合的相同的SIRPA表位或SIRPA表位的一部分结合。因此,在一些实施例中,本发明的抗体与由具有如本文所述的命名为m3F9的抗体的CDR的抗体所结合的相同的SIRPA表位或SIRPA表位的一部分结合。

[0245] 本发明的某些方面至少部分地基于展现一或多种改善的及/或增强的功能特征(例如,相对于具有包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区的抗-SIRPA抗体)的抗-SIRPA抗体的鉴定,该功能特征包括改善的/增强的降低细胞上的SIRPA的细胞表面水平的能力,引起一或多种SIRPA活性的降低、中和、预防或控制,包括(但不限于)减少单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突状细胞及/或微神经胶质细胞的细胞生长;减少由树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、单核细胞、微神经胶质细胞、M1微神经胶质细胞、活化M1微神经胶质细胞、M2微神经胶质细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化M1巨噬细胞及/或M2巨噬细胞诱导的T细胞增殖;降低嗜中性细胞、树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、巨噬细胞、NK细胞、M1巨噬细胞、M1嗜中性细胞、M1 NK细胞、活化M1巨噬细胞、活化M1嗜中性细胞、活化M1 NK细胞、M2巨噬细胞、M2嗜中性细胞、M2 NK细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、微神经胶质细胞、M1微神经胶质细胞、活化M1微神经胶质细胞及/或M2微神经胶质细胞的存活率;减少或降低嗜中性细胞、树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、巨噬细胞、NK细胞、M1巨噬细胞、M1嗜中性细胞、M1 NK细胞、活化M1巨噬细胞、活化M1嗜中性细胞、活化M1 NK细胞、M2巨噬细胞、M2嗜中性细胞、M2 NK细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、微神经胶质细胞、M1微神经胶质细胞、活化M1微神经胶质细胞及/或M2微神经胶质细胞的增殖;抑制嗜中性细胞、树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、巨噬细胞、NK细胞、M1巨噬细胞、M1嗜中性细胞、M1 NK细胞、活化M1巨噬细胞、活化M1嗜中性细胞、活化M1 NK细胞、M2巨噬细胞、M2嗜中性细胞、M2 NK细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、微神经胶质细胞、M1微神经胶质细胞、活化M1微神经胶质细胞及/或M2微神经胶质细胞的迁移;降低或抑制嗜中性细胞、树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、巨噬细胞、NK细胞、M1巨噬细胞、M1嗜中性细胞、M1 NK细胞、活化M1巨噬细胞、活化M1嗜中性细胞、活化M1 NK细胞、M2巨噬细胞、M2嗜中性细胞、M2 NK细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、微神经胶质细胞、M1微神经胶质细胞、活化M1微神经胶质细胞及/或M2微神经胶质细胞的一或多种功能;减少单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突状细胞、嗜中性细胞及/或微神经胶质细胞的增殖;降低单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突状细胞、嗜中性细胞及/或微神经胶质细胞的整体功能性;抑制针对选自膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜

癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑色素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、急性髓样白血病、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤及甲状腺癌的不同类型的癌症的有益免疫反应；抑制针对选自痴呆、额颞叶型痴呆、阿兹海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆症、库贾氏病、常压性水脑症、肌肉萎缩性侧索硬化、亨廷顿氏病、滔蛋白病变疾病、那哈氏病、中风、急性创伤、慢性创伤、原发性震颤、白塞氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多发性系统萎缩症、夏-崔综合征、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、类肉瘤病、衰老病、癫痫、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关的黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性 & 多发性硬化症的不同类型的神经病症的有益免疫反应；与肿瘤细胞上的SIRPA配体结合；与树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、单核细胞、微神经胶质细胞、T细胞、嗜中性细胞及/或巨噬细胞上的SIRPA配体结合；抑制微神经胶质细胞、巨噬细胞、树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、嗜中性细胞、T细胞、T辅助细胞或细胞毒性T细胞中的一或多者的肿瘤细胞杀伤；抑制微神经胶质细胞、巨噬细胞、树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、嗜中性细胞、T细胞、T辅助细胞或细胞毒性T细胞中的一或多者的抗肿瘤细胞增殖活性；抑制微神经胶质细胞、巨噬细胞、树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、嗜中性细胞、T细胞、T辅助细胞或细胞毒性T细胞中的一或多者的抗肿瘤细胞转移活性；调节一或多种在微神经胶质细胞、巨噬细胞、树突状细胞、骨髓衍生的树突状细胞、嗜中性细胞、T细胞、T辅助细胞或细胞毒性T细胞中的一或多者上表达的发炎性受体（诸如CD86）的表达；增强免疫抑制性树突状细胞、免疫抑制性巨噬细胞、骨髓衍生的抑制性细胞、肿瘤相关巨噬细胞、免疫抑制性嗜中性细胞及调节性T细胞中的一或多者至肿瘤中的浸润；促进或拯救免疫抑制性树突状细胞、免疫抑制性巨噬细胞、免疫抑制性嗜中性细胞、免疫抑制性NK细胞、骨髓衍生的抑制性细胞、肿瘤相关巨噬细胞、肿瘤相关嗜中性细胞、肿瘤相关NK细胞及调节性T细胞中的一或多者的功能性；增加免疫抑制性树突状细胞、免疫抑制性巨噬细胞、免疫抑制性嗜中性细胞、免疫抑制性NK细胞、骨髓衍生的抑制性细胞、肿瘤相关巨噬细胞、肿瘤相关嗜中性细胞、肿瘤相关NK细胞、非致瘤CD45+CD14+髓样细胞及调节性T细胞中的一或多者至肿瘤中的浸润；增加肿瘤、外周血液或其他淋巴器官中的促肿瘤髓样/粒细胞性免疫抑制细胞的数量；增强骨髓衍生的抑制性细胞的促肿瘤活性；降低具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的活化；增强非致瘤骨髓衍生的抑制性细胞及/或非致瘤CD45+CD14+髓样细胞的存活；降低具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的浸润及/或活化；增加肿瘤生长速率；增加肿瘤复发率；降低一或多种调节抗肿瘤T细胞反应的免疫疗法的功效，任选地其中该一或多种免疫疗法为靶向一或多种选自CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA4、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、HVEM、LIGHT、BTLA、VISTA、KIR、GAL9、TIM1、TIM3、TIM4、A2AR、LAG3、DR-5、CD39、CD70、TREM1、TREM2、Siglec-5、Siglec-7、Siglec-9、Siglec-11、SIRPA、CD447、CSF-1受体及其任何组合的蛋白质的免疫疗法，或降低一种或化学治疗剂及/或多种癌症疫苗的功效。

[0246] 在可以与以上其他实施例中的任一者组合的一些实施例中，本发明的抗-SIRPA抗体诱导、增强或增加一或多种活性，包括：(i) 增加肿瘤浸润性CD3⁺ T细胞的数量；(ii) 降低非致瘤CD14⁺髓样细胞中的SIRPA的细胞水平，任选地其中非致瘤CD14⁺髓样细胞为肿瘤浸润性细胞或任选地其中非致瘤CD14⁺髓样细胞存在于血液中；(iii) 减少非致瘤CD14⁺髓样细胞的数量，任选地其中非致瘤CD14⁺髓样细胞为肿瘤浸润性细胞或任选地其中非致瘤CD14⁺髓

样细胞存在于血液中；(iv)降低一或多个细胞中的PD-L1、PD-L2、B7-H2、B7-H3、CD200R、CD163及/或CD206水平，任选地其中该一或多个细胞为非致瘤骨髓衍生的抑制性细胞(MDSC)；(v)减小实体肿瘤的肿瘤生长速率；(vi)减小肿瘤体积；(vii)增加一或多种PD-1抑制剂的功效；(viii)增加一或多种检查点抑制剂疗法及/或免疫调节疗法的功效，任选地其中该一或多种检查点抑制剂疗法及/或免疫调节疗法靶向CTL4、腺苷途径、PD-L1、PD-L2、OX40、TIM3、LAG3或其任何组合中的一或多个者；(ix)增加一或多种化学治疗剂的功效，任选地其中化学治疗剂中的一或多个者为吉西他滨、卡培他滨、蒽环霉素、多柔比星(Adriamycin®)、表柔比星(Ellence®)、紫杉烷、帕利他赛(Taxol®)、多西他赛(Taxotere®)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、环磷酰胺(Cytosan®)、卡铂(Paraplatin®)及其任何组合；(x)增加T细胞在非致瘤骨髓衍生的抑制性细胞(MDSC)存在下的增殖；(xi)抑制非致瘤骨髓衍生的抑制性细胞(MDSC)的分化、存活及/或一或多种功能；及(xii)当与化学或放射性毒素缀合时杀伤实体肿瘤及相关血管中的表达CD33的免疫抑制性非致瘤髓样细胞及/或非致瘤CD14表达细胞。

[0247] 在一些实施例中，本发明的抗-SIRPA抗体降低调节性T细胞、肿瘤嵌入式免疫抑制性树突状细胞、肿瘤嵌入式免疫抑制性巨噬细胞、骨髓衍生的抑制性细胞、肿瘤相关巨噬细胞、急性髓样白血病(AML)细胞、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)细胞或慢性髓样白血病(CML)的活性、功能性或存活。

[0248] 在一些实施例中，本发明的抗-SIRPA抗体诱导或促进个体中的一或多种免疫细胞，例如一或多种选自树突状细胞、巨噬细胞、嗜中性细胞、NK细胞、微神经胶质细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞及其任何组合的免疫细胞的存活、成熟、功能性、迁移或增殖。

[0249] 抗-SIRPA抗体结合亲和力

[0250] 在本文所提供的抗体中的任一者的一些实施例中，抗体具有<1 μ M、<100nM、<10nM、<1nM、<0.1nM、<0.01nM或<0.001nM(例如 10^{-8} M或更低，例如 10^{-8} M至 10^{-13} M，例如 10^{-9} M至 10^{-13} M)的解离常数(Kd)。解离常数可以通过任何分析技术测定，包括任何生物化学或生物物理技术，诸如ELISA、表面等离子共振(SPR)、生物层干涉法(参见例如ForteBio的Octet系统)、等温滴定量热法(ITC)、差示扫描量热法(DSC)、圆二色性(CD)、停流分析及比色或荧光蛋白解链分析。在一个实施例中，通过经放射性标记的抗原结合分析(RIA)测量Kd。在一些实施例中，用Fab形式的感兴趣的抗体及其抗原进行RIA，例如如Chen等人J.Mol.Biol.293:865-881(1999)中所述。在一些实施例中，使用BIAcore表面等离子共振分析测量Kd，例如，在25℃下，采用经固定的抗原CM5芯片，以约10个反应单位(RU)，使用BIAcore-2000或BIAcore-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)进行分析。在一些实施例中，使用单价抗体(例如，Fab)或全长抗体测定K_D。在一些实施例中，使用呈单价形式的全长抗体测定K_D。

[0251] 抗体片段

[0252] 在本文所提供的抗体中的任一者的一些实施例中，抗体为抗体片段。抗体片段包括(但不限于)Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv及scFv片段以及下文描述的其他片段。关于某些抗体片段的综述，参见Hudson等人Nat.Med.9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述，参见例如WO 93/16185；及美国专利第5571894号及第5587458号。关于包含救助受体结合表位残基及具有增加的在体内半衰期的Fab及F(ab')₂片段的论述，参见美国专利第5869046

号。

[0253] 双抗体为具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可为二价或双特异性的。参见例如EP404097;WO 1993/01161;Hudson等人Nat.Med.9:129-134(2003)。三抗体及四抗体亦描述于Hudson等人Nat.Med.9:129-134(2003)中。单域抗体为包含抗体的重链可变域的全部或一部分或轻链可变域的全部或一部分的抗体片段。在某些实施例中,单域抗体为人类单域抗体(参见例如美国专利第6248516号)。

[0254] 抗体片段可通过各种技术制得,包括(但不限于)蛋白分解消化完整抗体以及通过重组宿主细胞(例如大肠杆菌(E.coli)或噬菌体)产生,如本文所述。

[0255] 嵌合及人类化抗体

[0256] 在本文所提供的抗体中的任一者的一些实施例中,抗体为嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于例如美国专利第4816567号中。在一个实例中,嵌合抗体包含非人类可变区(例如,衍生自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人类灵长类动物(诸如猴)的可变区)及人类恒定区。在另一实例中,嵌合抗体为“类别转换”抗体,其中类别或子类已自亲本抗体的类别或子类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0257] 在本文所提供的抗体中的任一者的一些实施例中,抗体为人类化抗体。通常,对非人类抗体进行人类化以降低对人类的免疫原性,同时保留亲本非人类抗体的特异性及亲和力。在某些实施例中,人类化抗体在人类中实质上无免疫原性。在某些实施例中,人类化抗体与来自衍生出人类化抗体的另一物种的抗体对目标具有实质上相同的亲和力。参见例如美国专利第5530101号、第5693761号、第5693762号及第5585089号。在某些实施例中,鉴定可经修饰而不降低抗原结合域的天然亲和力同时降低其免疫原性的抗体可变域的氨基酸。参见例如美国专利第5766886号及第5869619号。通常,人类化抗体包含一或多个可变域,其中HVR(或其部分)衍生自非人类抗体,且FR(或其部分)衍生自人类抗体序列。人类化抗体任选地亦包含人类恒定区的至少一部分。在一些实施例中,人类化抗体中的一些FR残基经来自非人类抗体(例如衍生出HVR残基的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0258] 人类化抗体及其制造方法综述于例如Almagro等人Front.Biosci.13:161 9-1633(2008)中,且进一步描述于例如美国专利第5821337号、第7527791号、第6982321号及第7087409号中。可用于人类化的人类框架区包括(但不限于):使用“最佳拟合(best-fit)”法选择的框架区(参见例如Sims等人J.Immunol.151:2296(1993));衍生自具有轻链或重链可变区的特定亚群的人类抗体的共同序列的框架区(参见例如Carter等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285(1992);及Presta等人,J.Immunol.151:2623(1993));人类成熟(体细胞突变)框架区或人类生殖系框架区(参见例如Almagro及Fransson Front.Biosci.13:1619-1633(2008));及衍生自筛选FR库的框架区(参见例如Baca等人J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)及Rosok等人J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0259] 人类抗体

[0260] 在本文所提供的抗体中的任一者的一些实施例中,抗体为人类抗体。人类抗体可使用此领域中已知的各种技术产生。人类抗体一般描述于van Dijk等人Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)及Lonberg Curr.Opin.Immunol.20:450-459

(2008) 中。

[0261] 人类抗体可通过向已经修饰以响应于抗原攻击而产生完整人类抗体或具有人类可变区的完整抗体的转基因动物施用免疫原来制备。可以利用人类Ig基因座的大片段工程化缺乏小鼠抗体产生的小鼠品系,预期此类小鼠将产生人类抗体而没有小鼠抗体。大的人类Ig片段可保持大的可变基因多样性以及适当调节抗体产生及表达。通过利用小鼠机制进行抗体多样化及选择以及缺乏对人类蛋白质的免疫耐受性,此等小鼠品系中的再生人类抗体谱系可以产生针对任何感兴趣的抗原(包括人类抗原)的高亲和力完全人类抗体。使用杂交瘤技术,可产生且选择具有所要特异性的抗原特异性人类mAb。某些例示性方法描述于美国专利第5545807号、EP 546073及EP 546073中。此外,参见例如描述XENOMOUSE™技术的美国专利第6075181号及第6150584号;描述HUMAB®技术的美国专利第5770429号;描述K-MOUSE®技术的美国专利第7041870号;及描述VELOCIMOUSE®技术的美国专利申请公开案第US 2007/0061900号。来自此类动物产生的完整抗体的人类可变区可例如通过与不同人类恒定区组合而进一步修饰。

[0262] 人类抗体亦可通过基于杂交瘤的方法制得。已描述用于产生人类单克隆抗体的人类骨髓瘤及小鼠-人类异源骨髓瘤细胞系。(参见例如Kozbor J. Immunol. 133:3001 (1984); 及Boerner等人J. Immunol. 147:86 (1991))。经由人类B细胞杂交瘤技术产生的人类抗体亦描述于Li等人Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) 中。额外方法包括描述于例如美国专利第7189826号(描述自杂交瘤细胞系产生单克隆人类IgM抗体)中的方法。人类杂交瘤技术(三源杂交瘤技术(Trioma technology))亦描述于Vollmers等人Histology and Histopathology 20(3):927-937 (2005) 及Vollmers等人Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27(3):185-91 (2005) 中。人类抗体亦可通过分离选自人类衍生的噬菌体展示库的Fv克隆可变域序列产生。此类可变域序列随后可与所要人类恒定域组合。下文描述用于自抗体库选择人类抗体的技术。

[0263] 在本文所提供的抗体中的任一者的一些实施例中,抗体为通过在体外方法及/或筛选具有所要一或多种活性的抗体的组合库分离的人类抗体。适合实例包括(但不限于)噬菌体展示(CAT、Morphosys、Dyax、Biosite/Medarex、Xoma、Symphogen、Alexion(前称Proliferon)、Affimed)、核糖体展示(CAT)、酵母展示(Adimab)及类似方法。在某些噬菌体展示方法中,VH及VL基因的谱系分别通过聚合酶链反应(PCR)克隆且在噬菌体库中随机重组,随后可针对抗原结合噬菌体对其进行筛选,如Winter等人Ann. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994) 中所述。例如,此领域中已知多种方法用于产生噬菌体展示库及针对具有所要结合特征的抗体筛选此类库。亦参见Sidhu等人J. Mol. Biol. 338(2):299-310, 2004; Lee等人J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093, 2004; Fellouse Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); 及Lee等人J. Immunol. Methods 284(-2):119-132 (2004)。噬菌体通常以单链Fv(scFv)片段或Fab片段形式展示抗体片段。来自经免疫来源的库提供针对免疫原的高亲和力抗体而无需构建杂交瘤。或者,可克隆(例如自人类)原生谱系以提供针对广泛范围的非自体抗原以及自体抗原的单一抗体来源而无需任何免疫接种,如Griffiths等人EMBO J. 12:725-734 (1993) 所述。最后,亦可以通过克隆来自干细胞的未重排V-基因区段,及使用包含用以编码高度可变HVR3区及用以完成在体外重排的随机序列的PCR引物,以合成方式制得原生库,如Hoogenboom等人J. Mol. Biol., 227:381-388, 1992所述。描述人类

抗体噬菌体库的专利公开案包括例如：美国专利第5750373号及美国专利公开案第2007/0292936号及第2009/0002360号。自人类抗体库分离的抗体在本文中视为人类抗体或人类抗体片段。

[0264] 包括Fc区的恒定区

[0265] 在本文所提供的抗-SIRPA抗体中的任一者的一些实施例中，抗体包含Fc。在一些实施例中，Fc为人类IgG1、IgG2、IgG3及/或IgG4同种型。在一些实施例中，抗体属于IgG类、IgM类或IgA类。

[0266] 在本文所提供的抗-SIRPA抗体中的任一者的某些实施例中，抗体具有IgG2同种型。在一些实施例中，抗-SIRPA抗体含有人类IgG2恒定区。在一些实施例中，人类IgG2恒定区包括Fc区。在一些实施例中，抗-SIRPA抗体诱导一或多种SIRPA活性或独立于与Fc受体的结合。在一些实施例中，抗-SIRPA抗体结合抑制性Fc受体。在某些实施例中，抑制性Fc受体为抑制性Fc- γ 受体IIB(Fc γ IIB)。

[0267] 在本文所提供的抗体中的任一者的某些实施例中，抗体具有IgG1同种型。在一些实施例中，抗-SIRPA抗体含有小鼠IgG1恒定区。在一些实施例中，抗-SIRPA抗体含有人类IgG1恒定区。在一些实施例中，人类IgG1恒定区包括Fc区。在一些实施例中，抗-SIRPA抗体结合抑制性Fc受体。在某些实施例中，抑制性Fc受体为抑制性Fc- γ 受体IIB(Fc γ IIB)。

[0268] 在本文所提供的抗-SIRPA抗体中的任一者的某些实施例中，抗体具有IgG4同种型。在一些实施例中，抗-SIRPA抗体含有人类IgG4恒定区。在一些实施例中，人类IgG4恒定区包括Fc区。在一些实施例中，抗-SIRPA抗体结合抑制性Fc受体。在某些实施例中，抑制性Fc受体为抑制性Fc- γ 受体IIB(Fc γ IIB)。

[0269] 在本文所提供的抗-SIRPA抗体中的任一者的某些实施例中，抗体具有杂合IgG2/4同种型。在一些实施例中，抗-SIRPA抗体包括氨基酸序列，其包含人类IgG2的根据EU编号的氨基酸118至260及人类IgG4的根据EU编号的氨基酸261-447(WO 1997/11971;WO 2007/106585)。

[0270] 在一些实施例中，与包含不含氨基酸取代的Fc区的相应抗体相比，Fc区增加丛集而不活化补体。在一些实施例中，抗体诱导该抗体所特异性结合的目标的一或多种活性。在一些实施例中，抗体与SIRPA结合。

[0271] 亦可能需要修饰本发明的抗-SIRPA抗体以修饰效应功能及/或增加抗体的血清半衰期。例如，恒定区上的Fc受体结合位点可经修饰或突变以移除或降低对诸如Fc γ RI、Fc γ RII及/或Fc γ RIII的某些Fc受体的结合亲和力，以降低抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。在一些实施例中，通过移除抗体的Fc区(例如，在IgG的CH2域中)的N-糖基化而减弱效应功能。在一些实施例中，通过修饰人类IgG的诸如233-236、297及/或327-331的区域而减弱效应功能，如WO 99/58572及Armour等人Molecular Immunology 40:585-593(2003);Reddy等人J.Immunology 164:1925-1933(2000)中所述。在其他实施例中，亦可能需要修饰本发明的抗-SIRPA抗体以修饰效应功能，从而增加针对含ITIM的Fc γ RIIb(CD32b)的发现选择性，以增加相邻细胞上SIRPA抗体的丛集而不活化体液反应，包括抗体依赖性细胞介导的细胞毒性及抗体依赖性细胞吞噬作用。

[0272] 为了增加抗体的血清半衰期，可以将救助受体结合表位并入抗体(尤其是抗体片段)中，如例如美国专利5739277中所述。如本文所用的术语“救助受体结合表位”是指负责

增加IgG分子的在体内血清半衰期的IgG分子(例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄)的Fc区的表位。

[0273] 多特异性抗体

[0274] 多特异性抗体为对至少两种不同的表位,包括同一种或另一多肽(例如,本发明的一或多种SIRPA多肽)上的表位具有结合特异性的抗体。在一些实施例中,多特异性抗体可为双特异性抗体。在一些实施例中,多特异性抗体可为三特异性抗体。在一些实施例中,多特异性抗体可为四特异性抗体。此类抗体可以衍生自全长抗体或抗体片段(例如,F(ab')₂双特异性抗体)。在一些实施例中,多特异性抗体包含与SIRPA上的第一位点结合的第一抗原结合区且包含与SIRPA上的第二位点结合的第二抗原结合区。在一些实施例中,多特异性抗体包含与SIRPA结合的第一抗原结合区及与第二多肽结合的第二抗原结合区。

[0275] 本文提供多特异性抗体,其包含第一抗原结合区,其中第一抗原结合区包含本文所述的抗体的六个HVR,其与SIRPA结合;及第二抗原结合区,其与第二多肽结合。在一些实施例中,第一抗原结合区包含本文所述的抗体的V_H或V_L。

[0276] 在多特异性抗体中的任一者的一些实施例中,第二多肽为促进跨血脑屏障转运的抗原。此领域中已知多种促进跨血脑屏障转运的抗原及肽(参见例如Gabathuler R.Neurobiol.Dis.37:48-57(2010))。此类第二抗原及肽包括(但不限于)运铁蛋白受体(TR)、胰岛素受体(HIR)、胰岛素样生长因子受体(IGFR)、低密度脂蛋白受体相关蛋白1及2(LPR-1及2)、白喉毒素受体(包括CRM197(白喉毒素的无毒突变体))、TMEM 30(A)(翻转酶(Flippase))、蛋白质转导域(诸如TAT、Syn-B或穿膜肽)、聚精氨酸或通常带正电荷的肽、Angiopep肽(诸如ANG1005)(参见例如Gabathuler,2010)、及其他在血脑屏障内皮细胞上富集的细胞表面蛋白(参见例如Daneman等人PLoS One 5(10):e13741(2010))。

[0277] 在多特异性抗体中的任一者的一些实施例中,第二多肽为致病蛋白,其选自淀粉样蛋白 β 、寡聚淀粉样蛋白 β 、淀粉样蛋白 β 斑块、淀粉样蛋白前体蛋白质或其片段、滔蛋白、IAPP、 α -突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、C9orf72(染色体9可读框72)、c9RAN蛋白、朊病毒蛋白、PrPSc、亨廷顿蛋白、降血钙素、超氧化物歧化酶、共济失调蛋白、共济失调蛋白1、共济失调蛋白2、共济失调蛋白3、共济失调蛋白7、共济失调蛋白8、共济失调蛋白10、路易体、心房利尿钠因子、胰岛淀粉样蛋白多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样蛋白A、medin、泌乳素、运甲状腺素蛋白、溶菌酶、 β 2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、胱抑素、免疫球蛋白轻链AL、S-IBM蛋白、重复相关的非ATG(RAN)翻译产物、二肽重复(DPR)肽、甘氨酸-丙氨酸(GA)重复肽、甘氨酸-脯氨酸(GP)重复肽、甘氨酸-精氨酸(GR)重复肽、脯氨酸-丙氨酸(PA)重复肽、泛蛋白及脯氨酸-精氨酸(PR)重复肽;(d)在免疫细胞上表达的配体及/或蛋白质,其中该配体及/或蛋白质选自CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA-4、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2AR、LAG-3及磷脂酰丝氨酸;及/或(e)在一或多个肿瘤细胞上表达的蛋白质、脂质、多糖或糖脂;及其任何组合。

[0278] 多价抗体可以识别SIRPA抗原以及(但不限于)额外抗原,诸如A β 肽抗原、 α -突触核蛋白蛋白质抗原、滔蛋白抗原、TDP-43蛋白质抗原、朊病毒蛋白抗原、亨廷顿蛋白蛋白质抗原、RAN翻译产物抗原(包括由甘氨酸-丙氨酸(GA)、甘氨酸-脯氨酸(GP)、甘氨酸-精氨酸(GR)、脯氨酸-丙氨酸(PA)或脯氨酸-精氨酸(PR)构成的二肽重复序列(DPR肽))、胰岛素受体、胰岛素样生长因子受体或运铁蛋白受体或任何其他促进跨血脑屏障的抗体转移的抗原。在一些实施例中,第二多肽为运铁蛋白。在一些实施例中,第二多肽为滔蛋白。在一些实

施例中,第二多肽为A β 。在一些实施例中,第二多肽为TREM2。在一些实施例中,第二多肽为 α -突触核蛋白。

[0279] 多价抗体含有至少一条多肽链(及优选两条多肽链),其中多肽链包含两个或更多个可变域。例如,多肽链可以包含VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc,其中VD1为第一可变域,VD2为第二可变域,Fc为Fc区的一条多肽链,X1及X2表示氨基酸或多肽,且n为0或1。类似地,多肽链可以包含V_H-C_H1-柔性接头-V_H-C_H1-Fc区链;或V_H-C_H1-V_H-C_H1-Fc区链。多价抗体在本文中优选进一步包含至少两个(且优选四个)轻链可变域多肽。多价抗体在本文中例如包含约两个至约八个轻链可变域多肽。本文所涵盖的轻链可变域多肽包含轻链可变域且任选地进一步包含CL域。

[0280] 用于制造多特异性抗体的技术包括(但不限于)具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达(参见Milstein及Cuellar Nature 305:537(1983);WO 93/08829;及Traunecker等人EMBO J.10:3655(1991)),及“节入穴(knob-in-hole)”工程化(参见例如美国专利第5731168号)。亦参见WO 2013/026833(CrossMab)。多特异性抗体亦可通过以下制得:用于制造抗体Fc-异源二聚分子的工程化静电操纵效应(WO 2009/089004A1);使两个或更多个抗体交联(参见例如美国专利第4676980号);使用亮氨酸;使用用于制造双特异性抗体片段的“双抗体”技术(参见例如Hollinger等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993));及使用单链Fv(scFv)二聚体(参见例如Gruber等人J.Immunol.152:5368(1994));及制备三特异性抗体,如例如Tutt等人J.Immunol.147:60(1991)中所述。

[0281] 本文中亦包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程化抗体,包括“章鱼抗体”(参见例如US 2006/0025576)。抗体在本文中亦包括包含与多个SIRPA结合的抗原结合位点的“双重作用FAb(Dual Acting FAb)”或“DAF”(参见例如US 2008/0069820)。

[0282] 抗体变异体

[0283] 在本文所提供的抗体中的任一者的一些实施例中,涵盖抗体的氨基酸序列变异体。例如,可能需要改善抗体的结合亲和力及/或其他生物特性。

[0284] 取代、插入及缺失变异体

[0285] 在本文所提供的抗体中的任一者的一些实施例中,提供具有一或多个氨基酸取代的抗体变异体。抗体的氨基酸序列变异体可通过将适当修饰引入编码该抗体的核苷酸序列中或通过肽合成制备。此类修饰包括例如抗体的氨基酸序列内的残基的缺失及/或插入及/或取代。

[0286] 表1:氨基酸取代

	初始残基	例示性取代	优选取代
[0287]	Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
	Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
	Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
	Asp (D)	Glu; Asn	Glu
	Cys (C)	Ser; Ala	Ser
	Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
	Glu (E)	Asp; Gln	Asp
	Gly (G)	Ala	Ala
	His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
	Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
	Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
[0288]	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
	Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0289] 对抗体生物特性的实质性修饰是通过选择取代来实现,该取代在其维持以下作用方面显著不同:(a)取代区域中多肽主链的结构,例如片层或螺旋构象;(b)分子在目标位点处的电荷或疏水性;或(c)侧链体积。基于常见侧链特性将天然产生的残基分为以下几组:

[0290] (1)疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0291] (2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0292] (3)酸性:Asp、Glu;

[0293] (4)碱性:His、Lys、Arg;

[0294] (5)影响链取向的残基:Gly、Pro;及

[0295] (6)芳族:Trp、Tyr、Phe。

[0296] 例如,非保守取代可涉及以此等类别中的一者的成员交换另一类别的成员。此类经取代残基可例如引入至人类抗体的与非人类抗体同源的区域中,或引入至分子的非同源区域中。

[0297] 在对本文所述的多肽或抗体进行改变时,根据某些实施例,可以考虑氨基酸的亲水指数。各氨基酸已基于其疏水性及电荷特征来分配亲水指数。其为:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);及精氨酸(-4.5)。

[0298] 亲水氨基酸指数在赋予蛋白质相互作用生物功能方面的重要性在此领域中有所了解。Kyte等人J.Mol.Biol., 157:105-131 (1982)。已知某些氨基酸可取代具有类似亲水指数或评分的其他氨基酸且仍然保留类似生物活性。在基于亲水指数进行改变时,在某些实施例中,包括亲水指数在 ± 2 内的氨基酸的取代。在某些实施例中,包括亲水指数在 ± 1 内的氨基酸的取代,且在某些实施例中,包括亲水指数在 ± 0.5 内的氨基酸的取代。

[0299] 此领域中亦了解,类似氨基酸的取代可基于亲水性有效地进行,特别是当由此产生的生物学功能性蛋白质或肽意欲用于免疫学实施例中时,如在本发明的情况下。在某些实施例中,蛋白质的最大局部平均亲水性,如由其相邻氨基酸的亲水性所决定,与其免疫原性及抗原性,亦即与蛋白质的生物特性相关。

[0300] 已为此等氨基酸残基分配以下亲水性值:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0 $\pm$ 1);天冬氨酸(+3.0 $\pm$ 1);谷氨酸(+3.0 $\pm$ 1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5 $\pm$ 1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5)及色氨酸(-3.4)。在基于类似亲水性值进行改变时,在某些实施例中,包括亲水性值在 ± 2 内的氨基酸的取代,在某些实施例中,包括亲水性值在 ± 1 内的氨基酸的取代,且在某些实施例中,包括亲水性值在 ± 0.5 内的氨基酸的取代。亦可基于亲水性自一级氨基酸序列鉴定表位。此等区域亦称为“表位核心区”。

[0301] 在某些实施例中,取代、插入或缺失可发生在一或多个HVR内,只要此类改变不实质上降低抗体结合抗原的能力即可。例如,可在HVR中进行不实质上降低结合亲和力的保守改变(例如,如本文所提供的保守取代)。此类改变例如可在HVR中的抗原接触残基之外。在上文所提供的变异VH及VL序列的某些实施例中,各HVR未改变或含有不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0302] 氨基酸序列插入包括长度在一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽范围内的氨基端及/或羧基端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入变异体包括抗体的N端或C端与酶(例如,对于ADEPT而言)或增加抗体的血清半衰期的多肽的融合。

[0303] 不参与维持抗体的适当构象的任何半胱氨酸残基一般亦可经丝氨酸取代,以提高分子的氧化稳定性且防止异常交联。反之,可向抗体添加半胱氨酸键以提高其稳定性(特别是在抗体为诸如Fv片段的抗体片段的情况下)。

[0304] 糖基化变异体

[0305] 在本文所提供的抗体中的任一者的一些实施例中,改变抗体以增加或降低抗体糖基化的程度。向抗体中添加糖基化位点或使抗体缺失糖基化位点可通过改变氨基酸序列以便产生或移除一或多个糖基化位点来便利地实现。

[0306] 抗体的糖基化通常为N-连接型或O-连接型。N-连接型是指碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链连接。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸及天冬酰胺-X-苏氨酸,其中X为除脯氨酸外的任何氨基酸,为用于将碳水化合物部分酶促连接于天冬酰胺侧链的识别序列。因此,在多肽中此等三肽序列中的任一者的存在产生潜在糖基化位点。O连接型糖基化是指糖N-乙酰半乳糖、半乳糖或木糖中的一者与羟氨基酸,最通常是丝氨酸或苏氨酸的连接,但亦可使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。

[0307] 宜通过将氨基酸序列改变成使其含有上述三肽序列中的一或多个者来实现向抗体添加糖基化位点(对于N-连接型糖基化位点)。亦可通过原始抗体的序列中一或多个丝氨酸或苏氨酸残基的添加或取代来进行改变(对于O-连接型糖基化位点)。

[0308] 在抗体包含Fc区的情况下,可改变连接于其上的碳水化合物。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分支链双触角寡糖,其通常通过N键连接至Fc区的CH2域的根据Kabat编号的Asn297。寡糖可包括各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸,以及连接至双触角寡糖结构的“主干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施例中,可对本发明抗体中的寡糖进行修饰以便产生具有某些改良特性的抗体变异体。

[0309] 在一个实施例中,提供具有缺乏连接(直接或间接)于Fc区的岩藻糖的碳水化合物结构的抗体变异体。参见例如美国专利公开案第2003/0157108号及第2004/0093621号。与“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺乏”抗体变异体相关的出版物的实例包括:US 2003/0157108; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; Okazaki等人J.Mol.Biol.336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够产生去岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括缺乏蛋白质岩藻糖基化的Led 3 CHO细胞(Ripka等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986); US 2003/0157108),及敲除细胞系,诸如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除CHO细胞(参见例如Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004)及Kanda等人Biotechnol.Bioeng.94(4):680-688(2006))。

[0310] 经修饰的恒定区

[0311] 在本文所提供的抗-SIRPA抗体中的任一者的一些实施例中,抗体Fc为抗体Fc同种型及/或修饰。在一些实施例中,抗体Fc同种型及/或修饰能够与Fc γ 受体结合。

[0312] 例示性抗体Fc同种型及修饰提供于下表2中。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体能够结合Fc γ 受体,具有下表2中所列的Fc同种型。

[0313] 表2:能够结合Fc γ 受体的例示性抗-SIRPA抗体Fc同种型

[0314]

Fc同种型	突变(EU编号方案)
IgG1	N297A
IgG1	D265A及N297A
IgG1	D270A
IgG1	L234A及L235A L234A及G237A L234A及L235A及G237A
IgG1	D270A、及/或P238D、及/或L328E、及/或E233D、及/或G237D及/或H268D、及/或P271G、及/或A330R
IgG1	P238D及L328E及E233D及G237D及H268D及P271G及A330R
IgG1	P238D及L328E及G237D及H268D及P271G及A330R
IgG1	P238D及S267E及L328F及E233D及G237D及H268D及P271G及A330R
IgG1	P238D及S267E及L328F及G237D及H268D及P271G及A330R
IgG2	V234A及G237A
IgG4	L235A及G237A及E318A
IgG4	S228P及L236E
IgG2/4杂合	IgG2 aa 118至260及IgG4 aa 261至447
	H268Q及V309L; 及A330S及P331S
IgG1	C226S及C229S及E233P及L234V及L235A
IgG1	L234F及L235E及P331S
IgG2	C232S或C233S
IgG2	A330S及P331S
IgG1	S267E及L328F 单独的S267E
IgG2	S267E及L328F
IgG4	S267E及L328F
IgG2	WT HC与κ(轻链) LC HC C127S与κ LC κ LC C214S κ LC C214S及HC C233S

[0315]

	κ LC C214S及HC C232S 以上所列突变中的任一者连同P330S及P331S突变 WT IgG1的F(ab') ₂ 片段及以上所列突变中的任一者
IgG1	用IgG2的恒定重链1 (CH1)及铰链区取代IgG1的CH1及铰链区 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KCCVECPCP (SEQ ID NO: 58) 具有κ LC
IgG1	以上所列突变中的任一者连同A330L/A330S及/或L234F及/或L235E及/ 或P331S
IgG1、IgG2 或IgG4	以上所列突变中的任一者连同M252Y及/或S254T及/或T256E
小鼠IgG1、 小鼠IgG2a、 小鼠IgG2b	针对小鼠疾病模型
IgG4	WT
IgG1	以上所列突变中的任一者连同E430G、E430S、E430F、E430T、E345K、 E345Q、E345R、E345Y、S440Y、S440W及/或其任何组合。
IgG2	以上所列突变中的任一者连同E430G、E430S、E430F、E430T、E345K、 E345Q、E345R、E345Y、S440Y、S440W及/或其任何组合。

[0316] 除了表2中所述的同种型之外,且不希望受到理论限制,可以认为,结合人类中的Fcγ受体I、IIA、IIC、IIIA、IIIB及/或小鼠中的Fcγ受体I、III及IV的具有人类IgG1或IgG3同种型的抗体及其突变体(例如,Strohl(2009)Current Opinion in Biotechnology 2009, 20:685-691)亦可用作短暂性增效剂抗体。

[0317] 在一些实施例中,结合Fcγ受体的抗体属于IgG类、IgM类或IgA类。在一些实施例中,结合Fcγ受体的抗体具有IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。在一些实施例中,抗体包含Fc区中在选自自由以下组成的群的残基位置处的一或多个(例如,一或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、十个或更多个、11个或更多个、12个或更多个或所有十三个)氨基酸取代: C127S、L234A、L234F、L235A、L235E、S267E、K322A、L328F、A330S、P331S、E345R、E430G、S440Y,以任何组合(残基位置根据EU或Kabat编号)。在一些实施例中,Fc区包含在位置E430G处的氨基酸取代。在一些实施例中,Fc区包含在位置L243A、L235A及P331A处的氨基酸取代。在一些实施例中,Fc区包含在位置L243A、L235A、P331A处的氨基酸取代。在一些实施例中,Fc区包含在位置K322A及E430G处的氨基酸取代。在一些实施例中,Fc区包含在位置P331S及E430G处的氨基酸取代。在一些实施例中,Fc区包含在位置A330S、P331S及E430G处的氨基酸取代。在一些实施例中,Fc区包含在位置K322A、A330S及P331S处的氨基酸取代。在一些实施例中,Fc区包含在位置K322A、P331S及E430G处的氨基酸取代。在一些实施例中,Fc区包含在位置A330S、P331S及E430G处的氨基酸取代。在一些实施例中,Fc区包含在位置S267E及L328F处的氨基酸取代。在一些实施例中,Fc区包含在位置C127S处的氨基酸取代。在一些实施例中,Fc区包含在位置E345R、E430G及S440Y处的氨基酸取代。

[0318] 在某些实施例中,结合Fc γ 受体的抗体具有IgG2同种型。在一些实施例中,结合Fc γ 受体的抗体含有人类IgG2恒定区。在一些实施例中,人类IgG2恒定区包括Fc区。在一些实施例中,结合Fc γ 受体的抗体结合抑制性Fc受体。在某些实施例中,抑制性Fc受体为抑制性Fc- γ 受体IIB(Fc γ IIB)。在一些实施例中,Fc区含有一或多种修饰。例如,在一些实施例中,Fc区含有一或多个氨基酸取代(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。在一些实施例中,该一或多个氨基酸取代是选自V234A(Alegre等人,(1994)Transplantation 57:1537-1543.31;Xu等人,(2000)Cell Immunol,200:16-26)、G237A(Cole等人(1999)Transplantation,68:563-571)、H268Q、V309L、A330S、P331S(US 2007/0148167;Armour等人(1999)Eur J Immunol 29:2613-2624;Armour等人(2000)The Haematology Journal 1(增刊1):27;Armour等人(2000)The Haematology Journal 1(增刊1):27)、C232S及/或C233S(White等人(2015)Cancer Cell 27,138-148)、S267E、L328F(Chu等人,(2008)Mol Immunol,45:3926-3933)、M252Y、S254T及/或T256E,其中氨基酸位置是根据EU或Kabat编号惯例。

[0319] 在一些实施例中,结合Fc γ 受体的抗体具有IgG2同种型,其具有含有C127S氨基酸取代的重链恒定域,其中氨基酸位置是根据EU或Kabat编号惯例(White等人,(2015)Cancer Cell 27,138-148;Lightle等人,(2010)PROTEIN SCIENCE 19:753-762;及W02008079246)。

[0320] 在一些实施例中,结合Fc γ 受体的抗体具有IgG2同种型,其具有含有C214S氨基酸取代的 κ 轻链恒定域,其中氨基酸位置是根据EU或Kabat编号惯例(White等人,(2015)Cancer Cell 27,138-148;Lightle等人,(2010)PROTEIN SCIENCE 19:753-762;及W02008079246)。

[0321] 在某些实施例中,结合Fc γ 受体的抗体具有IgG1同种型。在一些实施例中,结合Fc γ 受体的抗体含有小鼠IgG1恒定区。在一些实施例中,结合Fc γ 受体的抗体含有人类IgG1恒定区。在一些实施例中,人类IgG1恒定区包括Fc区。在一些实施例中,结合Fc γ 受体的抗体结合抑制性Fc受体。在某些实施例中,抑制性Fc受体为抑制性Fc- γ 受体IIB(Fc γ IIB)。在一些实施例中,Fc区含有一或多种修饰。例如,在一些实施例中,Fc区含有一或多个氨基酸取代(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。在一些实施例中,该一或多个氨基酸取代是选自N297A(Bolt S等人(1993)Eur J Immunol 23:403-411)、D265A(Shields等人(2001)R.J.Biol.Chem.276,6591-6604)、D270A、L234A、L235A(Hutchins等人(1995)Proc Natl Acad Sci USA,92:11980-11984;Alegre等人,(1994)Transplantation 57:1537-1543.31;Xu等人,(2000)Cell Immunol,200:16-26)、G237A(Alegre等人(1994)Transplantation 57:1537-1543.31;Xu等人(2000)Cell Immunol,200:16-26)、P238D、L328E、E233D、G237D、H268D、P271G、A330R、C226S、C229S、E233P、L234V、L234F、L235E(McEarchern等人,(2007)Blood,109:1185-1192)、P331S(Sazinsky等人,(2008)Proc Natl Acad Sci USA 2008,105:20167-20172)、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T、T256E、N297Q、P238S、P238A、A327Q、A327G、P329A、K322A及/或T394D,其中氨基酸位置是根据EU或Kabat编号惯例。

[0322] 在一些实施例中,抗体包括IgG2同种型重链恒定域1(CH1)及铰链区(White等人,(2015)Cancer Cell 27,138-148)。在某些实施例中,IgG2同种型CH1及铰链区含有ASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYT CNVDHKPSNTKVDKTVRKCCVECPPCP的氨基酸序列(SEQ ID NO:58)。在一些实施例中,抗体Fc

区含有S267E氨基酸取代、L328F氨基酸取代或二者,及/或N297A或N297Q氨基酸取代,其中氨基酸位置是根据EU或Kabat编号惯例。

[0323] 在某些实施例中,结合Fc γ 受体的抗体具有IgG4同种型。在一些实施例中,结合Fc γ 受体的抗体含有人类IgG4恒定区。在一些实施例中,人类IgG4恒定区包括Fc区。在一些实施例中,结合Fc γ 受体的抗体结合抑制性Fc受体。在某些实施例中,抑制性Fc受体为抑制性Fc- γ 受体IIB (Fc γ IIB)。在一些实施例中,Fc区含有一或多种修饰。例如,在一些实施例中,Fc区含有一或多个氨基酸取代(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。在一些实施例中,该一或多个氨基酸取代是选自L235A、G237A、S228P、L236E (Reddy等人, (2000) J Immunol, 164:1925-1933)、S267E、E318A、L328F、M252Y、S254T及/或T256E,其中氨基酸位置是根据EU或Kabat编号惯例。

[0324] 在某些实施例中,结合Fc γ 受体的抗体具有杂合IgG2/4同种型。在一些实施例中,结合Fc γ 受体的抗体包括含有人类IgG2的根据EU或Kabat编号的氨基酸118至260及人类IgG4的根据EU或Kabat编号的氨基酸261-447的氨基酸序列(WO 1997/11971;WO 2007/106585)。

[0325] 在某些实施例中,抗体含有小鼠IgG4恒定区 (Bartholomaeus等人 (2014) .J. Immunol. 192, 2091-2098)。

[0326] 在一些实施例中,Fc区进一步含有一或多个选自根据EU或Kabat编号的A330L、L234F、L235E及P331S及其任何组合的额外氨基酸取代。

[0327] 在某些实施例中,抗体含有在Fc区中在选自C127S、L234A、L234F、L235A、L235E、S267E、K322A、L328F、A330S、P331S、E345R、E430G、S440Y及其任何组合的残基位置处的一或多个氨基酸取代,其中残基编号是根据EU或Kabat编号。在一些实施例中,Fc区含有在位置E430G、L243A、L235A及P331S处的氨基酸取代,其中残基位置的编号是根据EU编号。在一些实施例中,Fc区含有在位置E430G及P331S处的氨基酸取代,其中残基位置的编号是根据EU编号。在一些实施例中,Fc区含有在位置E430G及K322A处的氨基酸取代,其中残基位置的编号是根据EU编号。在一些实施例中,Fc区含有在位置E430G、A330S及P331S处的氨基酸取代,其中残基位置的编号是根据EU编号。在一些实施例中,Fc区含有在位置E430G、K322A、A330S及P331S处的氨基酸取代,其中残基位置的编号是根据EU编号。在一些实施例中,Fc区含有在位置E430G、K322A及A330S处的氨基酸取代,其中残基位置的编号是根据EU编号。在一些实施例中,Fc区含有在位置E430G、K322A及P331S处的氨基酸取代,其中残基位置的编号是根据EU编号。在一些实施例中,Fc区含有在位置S267E及L328F处的氨基酸取代,其中残基位置的编号是根据EU编号。在一些实施例中,Fc区含有在位置C127S处的氨基酸取代,其中残基位置的编号是根据EU编号。在一些实施例中,Fc区含有在位置E345R、E430G及S440Y处的氨基酸取代,其中残基位置的编号是根据EU编号。

[0328] 在一些实施例中,结合SIRPA蛋白质的抗体可以包括降低SIRPA的细胞水平(例如,SIRPA的细胞表面水平),抑制SIRPA及/或一或多个SIRPA配体之间的相互作用(例如,结合),及抑制SIRPA蛋白质的一或多种活性的抗体。此类抗体通过防止SIRPA与一或多个SIRPA配体之间的相互作用(例如,结合)或通过防止在一或多个SIRPA配体存在下自SIRPA的细胞外域信号转导至细胞质中而抑制SIRPA蛋白质的一或多种活性。抗体亦可以通过诱导SIRPA降解、SIRPA脱敏、SIRPA裂解、SIRPA内化、SIRPA脱落、SIRPA表达下调及/或SIRPA的

溶酶体降解而降低SIRPA的细胞表面水平来抑制SIRPA蛋白质的一或多种活性。在一些实施例中,此类抗-SIRPA抗体可不短暂活化SIRPA。

[0329] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体可以具有本发明的短暂性增效剂抗-SIRPA抗体的表位特异性,但具有不能够结合Fc γ 受体且因此不能例如短暂丛集且活化SIRPA的Fc域。

[0330] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体具有(但不限于)以下活性中的一或多者:降低SIRPA蛋白质与一或多种SIRPA配体的结合的能力,该配体诸如含唾液酸的糖脂或含唾液酸的糖蛋白;降低细胞因子信号传导(SOCS)蛋白质(例如,SOCS3蛋白质)的抑制因子与SIRPA蛋白质的结合的能力;增加SIRPA蛋白质的蛋白酶体降解的能力;降低SIRPA在循环的树突状细胞、巨噬细胞、单核细胞、T细胞及/或微神经胶质细胞的表面上的功能性表达的能力;降低诸如LCK及FYN的Src家族酪氨酸激酶对Tyr-340及Tyr-358的磷酸化的能力;降低酪氨酸特异性蛋白质磷酸酶SHP1及SHP2的募集及与其结合的能力;降低PLC-g1的募集及与其结合的能力,PLC-g1充当动力蛋白-1的鸟嘌呤核苷酸交换因子;降低Crk1的募集及与其结合的能力;降低脾脏酪氨酸激酶Syk的募集及与其结合的能力;降低SH3-SH2-SH3生长因子受体结合蛋白2(Grb2)的募集及与其结合的能力;降低多种含SH2蛋白质的募集及与其结合的能力;增加细胞内钙移动的能力;调节促炎性细胞因子IL-1 β 、IL-8及TNF- α 的产生的能力;降低磷酸肌醇3-激酶的活化的能力;增加单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、T细胞及/或微神经胶质细胞的生长的能力;增加单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、T细胞及/或微神经胶质细胞的存活的能力;增加多种细胞蛋白质上的酪氨酸磷酸化的能力;增加单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞及/或微神经胶质细胞的吞噬活性的能力;增加单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、T细胞及/或微神经胶质细胞的细胞增殖的能力;增加介导ITAM信号传导的信号传导分子的磷酸化的能力;增加模式识别受体的功能的能力;增加滔样受体(Toll-like receptor)的功能的能力;增加损伤相关分子模式(DAMP)受体的功能的能力;调节C-C趋化因子受体7(CCR7)的表达的能力;及增加细胞及蛋白质碎片的清除的能力。

[0331] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体具有显示与一或多种Fc γ 受体的结合降低的Fc区。此类Fc区及修饰的实例提供于下表3中。在一些实施例中,抗体具有下表3中所列的Fc同种型。

[0332] 在一些实施例中,与Fc γ 受体的结合降低的本发明的抗-SIRPA抗体具有下表3中所列的Fc同种型。

[0333] 表3:与Fc γ 受体的结合降低的例示性抗-SIRPA抗体Fc同种型

[0334]	Fc同种型	突变(EU编号方案)
	IgG1	N297A或N297Q及/或D270A
	IgG1	D265A、D270A及/或N297A
	IgG1	L234A及L235A
	IgG2	V234A及G237A
	IgG4	F235A及G237A及E318A E233P及/或F234V N297A或N297Q

[0335]

IgG4	S228P及L236E S241P S241P及L248E S228P及F234A及L235A
IgG2	H268Q及V309L及A330S及P331S
IgG1	C220S及C226S及C229S及P238S
IgG1	C226S及C229S及E233P及L234V及L235A
IgG1	E233P及L234V及L235A及G236缺失 P238A D265A N297A A327Q或A327G P329A
IgG1	K322A及L234A及L235A
IgG1	L234F及L235E及P331S
IgG1或IgG4	T394D
IgG2	C232S或C233S N297A或N297Q
IgG2	V234A及G237A及P238S及H268A及V309L及 A330S及P331S
IgG1、IgG2 或IgG4	δ a、b、c、ab、ac、g修饰
IgG1	以上所列突变中的任一者连同A330L或L234F及/或L235E及/或P331S
IgG1、IgG2 或IgG4	以上所列突变中的任一者连同M252Y及/或S254T及/或T256E

[0336] 在某些实施例中,抗-SIRPA抗体具有IgG1同种型。在一些实施例中,抗体含有小鼠IgG1恒定区。在一些实施例中,抗体含有人类IgG1恒定区。在一些实施例中,人类IgG1恒定区包括Fc区。在一些实施例中,Fc区含有一或多种修饰。例如,在一些实施例中,Fc区含有一或多个氨基酸取代(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。

[0337] 在一些实施例中,该一或多个氨基酸取代是选自N297A、N297Q(Bolt S等人(1993) Eur J Immunol 23:403-411)、D265A、D270A、L234A、L235A(McEarchern等人,(2007) Blood, 109:1185-1192)、C226S、C229S(McEarchern等人,(2007) Blood, 109:1185-1192)、P238S(Davis等人,(2007) J Rheumatol, 34:2204-2210)、E233P、L234V(McEarchern等人,(2007) Blood, 109:1185-1192)、P238A、A327Q、A327G、P329A(Shields RL等人,(2001) J Biol Chem. 276 (9):6591-604)、K322A、L234F、L235E(Hezareh等人,(2001) J Virol 75,12161-12168;Oganesyan等人,(2008) .Acta Crystallographica 64,700-704)、P331S(Oganesyan等人,(2008) Acta Crystallographica 64,700-704)、T394D(Wilkinson等人(2013) MAbs 5 (3):406-417)、A330L、M252Y、S254T及/或T256E,其中氨基酸位置是根据EU或Kabat编号惯例。在某些实施例中,Fc区进一步包括在与根据EU或Kabat编号惯例的甘氨酸236对应的位置处的氨基酸缺失。

[0338] 在一些实施例中,抗-SIRPA抗体具有IgG1同种型,其中重链恒定区含有根据EU或

Kabat编号惯例的C220S氨基酸取代。在一些实施例中,Fc区进一步含有一或多个选自根据EU或Kabat编号惯例的A330L、L234F、L235E及/或P331S的额外氨基酸取代。在某些实施例中,抗-SIRPA抗体具有IgG2同种型。在一些实施例中,抗-SIRPA抗体含有人类IgG2恒定区。在一些实施例中,人类IgG2恒定区包括Fc区。在一些实施例中,Fc区含有一或多种修饰。例如,在一些实施例中,Fc区含有一或多个氨基酸取代(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。在一些实施例中,该一或多个氨基酸取代是选自P238S、V234A、G237A、H268A、H268Q、H268E、V309L、N297A、N297Q、V309L、A330S、P331S、C232S、C233S、M252Y、S254T及/或T256E,其中氨基酸位置是根据EU或Kabat编号惯例(Vafa O.等人,(2014)Methods 65:114-126)。

[0339] 在某些实施例中,抗-SIRPA抗体具有IgG4同种型。在一些实施例中,抗-SIRPA抗体含有人类IgG4恒定区。在一些实施例中,人类IgG4恒定区包括Fc区。在一些实施例中,Fc区含有一或多种修饰。例如,在一些实施例中,Fc区含有一或多个氨基酸取代(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。在一些实施例中,该一或多个氨基酸取代是选自E233P、F234V、L235A、G237A、E318A(Hutchins等人(1995)Proc Natl Acad Sci USA,92:11980-11984)、S228P、L234A/F234A、L236E、S241P、L248E(Reddy等人,(2000)J Immunol,164:1925-1933;Angal等人,(1993)Mol Immunol.30(1):105-8;US 8614299 B2;Vafa O.等人,(2014)Methods 65:114-126)、T394D、M252Y、S254T、T256E、N297A及/或N297Q,其中氨基酸位置是根据EU或Kabat编号惯例。在一些实施例中,抗体具有IgG4同种型,且包含在残基位置228处的S228P氨基酸取代、在残基位置234处的F234A氨基酸取代及在残基位置235处的L235A氨基酸取代(残基位置根据EU编号)。

[0340] 在一些实施例中,Fc区进一步含有一或多个选自M252Y、S254T及/或T256E的额外氨基酸取代,其中氨基酸位置是根据EU或Kabat编号惯例。

[0341] 在本文所提供的抗体中的任一者的一些实施例中,经修饰抗体Fc为IgG1经修饰Fc。在一些实施例中,IgG1经修饰Fc包含一或多种修饰。例如,在一些实施例中,IgG1经修饰Fc包含一或多个氨基酸取代(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。在一些实施例中,该一或多个氨基酸取代是选自N297A(Bolt S等人(1993)Eur J Immunol 23:403-411)、D265A(Shields等人(2001)R.J.Biol.Chem.276,6591-6604)、L234A、L235A(Hutchins等人(1995)Proc Natl Acad Sci USA,92:11980-11984;Alegre等人,(1994)Transplantation 57:1537-1543.31;Xu等人,(2000)Cell Immunol,200:16-26)、G237A(Alegre等人(1994)Transplantation 57:1537-1543.31;Xu等人(2000)Cell Immunol,200:16-26)、C226S、C229S、E233P、L234V、L234F、L235E(McEarchern等人,(2007)Blood,109:1185-1192)、P331S(Sazinsky等人,(2008)Proc Natl Acad Sci USA 2008,105:20167-20172)、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T及/或T256E,其中氨基酸位置是根据EU编号惯例。

[0342] 在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号的N297A突变。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号的D265A及N297A突变。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号的D270A突变。在一些实施例中,IgG1经修饰Fc包含根据EU编号的L234A及L235A突变。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号的L234A及G237A突变。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号的L234A、L235A及G237A突变。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号的P238D、L328E、E233、G237D、H268D、P271G及A330R突变

中的一或多者(包括全部)。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号的S267E/L328F突变中的一或多者。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号的P238D、L328E、E233D、G237D、H268D、P271G及A330R突变。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号的P238D、L328E、G237D、H268D、P271G及A330R突变。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号的P238D、S267E、L328E、E233D、G237D、H268D、P271G及A330R突变。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号的P238D、S267E、L328E、G237D、H268D、P271G及A330R突变。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号的C226S、C229S、E233P、L234V及L235A突变。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号的L234F、L235E及P331S突变。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号的S267E及L328F突变。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号的S267E突变。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含将IgG1的恒定重链1(CH1)及铰链区以含κ轻链的IgG2的CH1及铰链区(根据EU编号,IgG2的氨基酸118-230)取代。

[0343] 在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包括两个或更多个氨基酸取代,与具有不包括两个或更多个氨基酸取代的Fc区的相应抗体相比,该氨基酸取代增加抗体从集而不活化补体。因此,在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,IgG1经修饰Fc为包含Fc区的抗体,其中该抗体包含在位置E430G处的氨基酸取代及一或多个在Fc区中在选自以下的残基位置处的氨基酸取代:L234F、L235A、L235E、S267E、K322A、L328F、A330S、P331S及其任何组合,根据EU编号。在一些实施例中,IgG1经修饰Fc包含在根据EU编号的位置E430G、L243A、L235A及P331S处的氨基酸取代。在一些实施例中,IgG1经修饰Fc包含在根据EU编号的位置E430G及P331S处的氨基酸取代。在一些实施例中,IgG1经修饰Fc包含在根据EU编号的位置E430G及K322A处的氨基酸取代。在一些实施例中,IgG1经修饰Fc包含在根据EU编号的位置E430G、A330S及P331S处的氨基酸取代。在一些实施例中,IgG1经修饰Fc包含在根据EU编号的位置E430G、K322A、A330S及P331S处的氨基酸取代。在一些实施例中,IgG1经修饰Fc包含在根据EU编号的位置E430G、K322A及A330S处的氨基酸取代。在一些实施例中,IgG1经修饰Fc包含在根据EU编号的位置E430G、K322A及P331S处的氨基酸取代。

[0344] 在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,IgG1经修饰Fc在本文中可以进一步包含可以与根据EU编号惯例的A330L突变(Lazar等人Proc Natl Acad Sci USA,103:4005-4010(2006))、或L234F、L235E及/或P331S突变中的一或多者(Sazinsky等人Proc Natl Acad Sci USA,105:20167-20172(2008))组合,以消除补体活化。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,IgG1经修饰Fc可以进一步包含根据EU编号的A330L、A330S、L234F、L235E及/或P331S中的一或多者。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,IgG1经修饰Fc可以进一步包含一或多个突变以增强人类血清中的抗体半衰期(例如,根据EU编号惯例的M252Y、S254T及T256E突变中的一或多者(包括全部))。在IgG1经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,IgG1经修饰Fc可以进一步包含根据EU编号的E430G、E430S、E430F、E430T、E345K、E345Q、E345R、E345Y、S440Y及/或S440W中的一或多者。

[0345] 本发明的其他方面是关于具有经修饰恒定区(亦即,Fc区)的抗体。依赖于与FcγR受体的结合而活化所靶向受体的抗体若经工程化以消除FcγR结合,则会失去其增效剂活性(参见例如Wilson等人Cancer Cell 19:101-113(2011);Armour等人Immunology 40:585-

593(2003);及White等人Cancer Cell 27:138-148(2015))。因此,可以认为,当具有恰当的表面特异性的本发明的抗-SIRPA抗体具有来自人类IgG2同种型的Fc域(CH1及铰链区)或另一类型的能够优先结合抑制性FcγRIIB r受体的Fc域或其变体时,该抗体可以活化目标抗原,具有最小的副作用。

[0346] 在本文所提供的抗体中的任一者的一些实施例中,经修饰抗体Fc为IgG2经修饰Fc。在一些实施例中,IgG2经修饰Fc包含一或多种修饰。例如,在一些实施例中,IgG2经修饰Fc包含一或多个氨基酸取代(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。在IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,该一或多个氨基酸取代是选自根据EU编号惯例的V234A(Alegre等人Transplantation 57:1537-1543(1994);Xu等人Cell Immunol,200:16-26(2000));G237A(Cole等人Transplantation,68:563-571(1999));H268Q、V309L、A330S、P331S(US 2007/0148167;Armour等人Eur J Immunol 29:2613-2624(1999);Armour等人The Haematology Journal 1(增刊1):27(2000);Armour等人The Haematology Journal 1(增刊1):27(2000))、C219S及/或C220S(White等人Cancer Cell 27,138-148(2015));S267E、L328F(Chu等人Mol Immunol,45:3926-3933(2008));及M252Y、S254T及/或T256E。在IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置V234A及G237A处的氨基酸取代。在IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置C219S或C220S处的氨基酸取代。在IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置A330S及P331S处的氨基酸取代。在IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置S267E及L328F处的氨基酸取代。

[0347] 在IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号惯例的C127S氨基酸取代(White等人,(2015)Cancer Cell 27,138-148;Lightle等人Protein Sci.19:753-762(2010);及WO 2008/079246)。在IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,该抗体具有IgG2同种型,其中κ轻链恒定域包含根据EU编号惯例的C214S氨基酸取代(White等人Cancer Cell 27:138-148(2015);Lightle等人Protein Sci.19:753-762(2010);及WO 2008/079246)。

[0348] 在IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号惯例的C220S氨基酸取代。在IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,抗体具有IgG2同种型,其中κ轻链恒定域包含根据EU编号惯例的C214S氨基酸取代。

[0349] 在IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号惯例的C219S氨基酸取代。在IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,抗体具有IgG2同种型,其中κ轻链恒定域包含根据EU编号惯例的C214S氨基酸取代。

[0350] 在IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包括IgG2同种型重链恒定域1(CH1)及铰链区(White等人Cancer Cell 27:138-148(2015))。在IgG2经修饰Fc中的任一者的某些实施例中,IgG2同种型CH1及铰链区包含根据EU编号118-230的氨基酸序列。在IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,抗体Fc区包含根据EU编号惯例的S267E氨基酸取代、L328F氨基酸取代或二者,及/或N297A或N297Q氨基酸取代。

[0351] 在IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc进一步包含在根据EU编号的位置E430G、E430S、E430F、E430T、E345K、E345Q、E345R、E345Y、S440Y及S440W处的一或多个氨基酸取代。在IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc可以进一步包含一或多个突变以

增强人类血清中的抗体半衰期(例如,根据EU编号惯例的M252Y、S254T及T256E突变中的一或多个(包括全部))。在IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc可以进一步包含A330S及P331S。

[0352] 在IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc为IgG2/4杂合Fc。在一些实施例中,IgG2/4杂合Fc包含IgG2 aa 118至260及IgG4 aa 261至447。在任何IgG2经修饰Fc的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置H268Q、V309L、A330S及P331S处的一或多个氨基酸取代。

[0353] 在IgG1及/或IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含一或多个选自根据EU编号的A330L、L234F、L235E或P331S及其任何组合的额外氨基酸取代。

[0354] 在IgG1及/或IgG2经修饰Fc中的任一者的某些实施例中,Fc包含在选自根据EU编号的C127S、L234A、L234F、L235A、L235E、S267E、K322A、L328F、A330S、P331S、E345R、E430G、S440Y及其任何组合的残基位置处的一或多个氨基酸取代。在IgG1及/或IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置E430G、L243A、L235A及P331S处的氨基酸取代。在IgG1及/或IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置E430G及P331S处的氨基酸取代。在IgG1及/或IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置E430G、A330S及P331S处的氨基酸取代。在IgG1及/或IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置E430G、K322A及A330S处的氨基酸取代。在IgG1及/或IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置E430G、K322A及A330S处的氨基酸取代。在IgG1及/或IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置E430G、K322A及A330S处的氨基酸取代。在IgG1及/或IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置E430G、K322A及A330S处的氨基酸取代。在IgG1及/或IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置S267E及L328F处的氨基酸取代。在IgG1及/或IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置C127S处的氨基酸取代。在IgG1及/或IgG2经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置E345R、E430G及S440Y处的氨基酸取代。

[0355] 在本文所提供的抗体中的任一者的一些实施例中,经修饰抗体Fc为IgG4经修饰Fc。在一些实施例中,IgG4经修饰Fc包含一或多种修饰。例如,在一些实施例中,IgG4经修饰Fc包含一或多个氨基酸取代(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。在IgG4经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,该一或多个氨基酸取代是选自根据EU编号惯例的L235A、G237A、S229P、L236E(Reddy等人J Immunol 164:1925-1933(2000))、S267E、E318A、L328F、M252Y、S254T及/或T256E。在IgG4经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc可以进一步包含根据EU编号惯例的L235A、G237A及E318A。在IgG4经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc可以进一步包含根据EU编号惯例的S228P及L235E。在IgG4经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,IgG4经修饰Fc可以进一步包含根据EU编号惯例的S267E及L328F。

[0356] 在IgG4经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,IgG4经修饰Fc包含可以与根据EU编号惯例的S228P突变(Angal等人Mol Immunol.30:105-108(1993))及/或与(Peters等人J Biol Chem.287(29):24525-33(2012))中所述的一或多个突变组合以增强抗体稳定化。

[0357] 在IgG4经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,IgG4经修饰Fc可以进一步包含一或

多个突变以增强人类血清中的抗体半衰期(例如,根据EU编号惯例的M252Y、S254T及T256E突变中的一或多者(包括全部))。

[0358] 在IgG4经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含根据EU编号的L235E。在IgG4经修饰Fc中的任一者的某些实施例中,Fc包含在选自根据EU编号的C127S、F234A、L235A、L235E、S267E、K322A、L328F、E345R、E430G、S440Y及其任何组合的残基位置处的一或多个氨基酸取代。在IgG4经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置E430G、L243A、L235A及P331S处的氨基酸取代。在IgG4经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置E430G及P331S处的氨基酸取代。在IgG4经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置E430G及K322A处的氨基酸取代。在IgG4经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置E430处的氨基酸取代。在IgG4经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc区包含在根据EU编号的位置E430G及K322A处的氨基酸取代。在IgG4经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置S267E及L328F处的氨基酸取代。在IgG4经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置C127S处的氨基酸取代。在IgG4经修饰Fc中的任一者的一些实施例中,Fc包含在根据EU编号的位置E345R、E430G及S440Y处的氨基酸取代。

[0359] 其他抗体修饰

[0360] 在抗体中的任一者的一些实施例中,抗体为衍生物。术语“衍生物”是指包括除氨基酸(或核酸)的插入、缺失或取代外的化学修饰的分子。在某些实施例中,衍生物包含共价修饰,包括(但不限于)与聚合物、脂质或其他有机或无机部分化学键结。在某些实施例中,经化学修饰的抗原结合蛋白可以具有比未经化学修饰的抗原结合蛋白更大的循环半衰期。在某些实施例中,经化学修饰的抗原结合蛋白可以具有针对所要细胞、组织及/或器官的改善的靶向能力。在一些实施例中,衍生的抗原结合蛋白经共价修饰以包括一或多个水溶性聚合物连接,包括(但不限于)聚乙二醇、聚氧乙二醇或聚丙二醇。参见例如美国专利第4640835号、第4496689号、第4301144号、第4670417号、第4791192号及第4179337号。在某些实施例中,衍生的抗原结合蛋白包含一或多种聚合物,包括(但不限于)单甲氧基-聚乙二醇、右旋糖酐、纤维素、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯酮、聚-1,3-二氧杂环戊烷、聚-1,3,6-三恶烷、乙烯/顺丁烯二酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、聚-(N-乙烯基吡咯酮)-聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如,甘油)及聚乙烯醇、以及此类聚合物的混合物。

[0361] 在某些实施例中,衍生物经聚乙二醇(PEG)亚基共价修饰。在某些实施例中,一或多个水溶性聚合物键结在衍生物的一或多个特定位置,例如氨基端。在某些实施例中,一或多个水溶性聚合物无规连接至衍生物的一或多个侧链。在某些实施例中,使用PEG来改善抗原结合蛋白的治疗能力。在某些实施例中,使用PEG来改善人类化抗体的治疗能力。某些此类方法论述于例如美国专利第6133426号中,其出于任何目的以引用的方式并入本文中。

[0362] 肽类似物常用于医学行业作为非肽药物,且性质类似于模板肽的性质。此等类型的非肽化合物称为“肽模拟物(peptide mimetic)”或“肽模拟物(peptidomimetic)”。Fauchere, J. Adv. Drug Res., 15:29(1986); 及Evans等人J. Med. Chem., 30:1229(1987), 其出于任何目的以引用的方式并入本文中。此类化合物通常借助于计算机化分子模型化来研发。在结构上类似于治疗上适用的肽的肽模拟物可用于产生类似治疗或预防作用。通常,肽

仿真物在结构上类似于范例多肽(亦即,具有生物化学特性或药理学活性的多肽),诸如人类抗体,但具有一或多个任选地通过此领域中熟知的方法经选自以下的连接置换的肽连接: $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2=\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}-\text{CH}-$ (顺式及反式)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 及 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 。在某些实施例中,可使用以相同类型的D-氨基酸(例如,D-赖氨酸代替L-赖氨酸)系统性取代共同序列的一或多个氨基酸以产生更稳定的肽。另外,可通过此领域中已知的方法(Rizo及Gierasch *Ann.Rev.Biochem.*,61:387(1992),出于任何目的以引用的方式并入本文中);例如,通过添加能够形成使肽环化的分子内二硫桥键的内部半胱氨酸残基,产生包含共同序列或实质上相同的共同序列变体的限制性肽。

[0363] 药物缀合涉及生物活性细胞毒性(抗癌)载荷或药物与特异性靶向某些肿瘤标志物(例如,理想地,仅在肿瘤细胞中或肿瘤细胞上发现的多肽)的抗体的偶联。抗体在体内一路追踪此等蛋白质且将自身与癌细胞表面连接。抗体与目标蛋白质(抗原)之间的生物化学反应触发肿瘤细胞中的信号,随后肿瘤细胞吸收或内化抗体以及细胞毒素。在ADC内化之后,细胞毒性药物释放出来且杀死癌症。由于此靶向,理想地,药物具有比其他化学治疗剂更低的副作用且给出更宽的治疗窗。缀合抗体的技术为此领域中已揭示的或已知的(参见例如Jane de Lartigue *OncLive* 2012年7月5日;ADC Review on antibody-drug conjugates;及Ducry等人*Bioconjugate Chemistry* 21(1):5-13(2010))。

[0364] 抗体框架

[0365] 本文所述的抗-SIRPA抗体中的任一者进一步包括框架(FR)。在一些实施例中,框架为人类免疫球蛋白框架。例如,在一些实施例中,抗体(例如,抗-SIRPA抗体)包含如任何以上实施例中的HVR且进一步包含接受体人类框架,例如人类免疫球蛋白框架或人类共同框架。人类免疫球蛋白框架可为人类抗体的一部分,或可以通过用人类框架区置换一或多个内源性框架而使非人类抗体人类化。可用于人类化的人类框架区包括(但不限于):使用“最佳拟合”法选择的框架区(参见例如Sims等人*J. Immunol.*151:2296(1993));衍生自具有轻链或重链可变区的特定亚群的人类抗体的共同序列的框架区(参见例如Carter等人*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,89:4285(1992);及Presta等人,*J. Immunol.*151:2623(1993));人类成熟(体细胞突变)框架区或人类生殖系框架区(参见例如Almagro及Fransson,*Front.Biosci.*13:1619-1633(2008));及衍生自筛选FR库的框架区(参见例如Baca等人,*J.Biol.Chem.*272:10678-10684(1997)及Rosok等人,*J.Biol.Chem.*271:22611-22618(1996))。

[0366] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体包含重链可变区,其包含一或多个(例如,一或多个、两个或更多个、三个或更多个或所有四个)选自VH FR1、VH FR2、VH FR3及VH FR4(如表9中所示)的框架区。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体包含含有VH FR1的重链可变区,其中VH FR1包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体包含含有VH FR2的重链可变区,其中VH FR2包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体包含含有VH FR3的重链可变区,其中VH FR3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体包含含有VH FR4的重链可变区,其中VH FR4包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体包含重链可变区,其包含含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VH FR1、含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VH FR2、含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH FR3及含有SEQ ID NO:28

的氨基酸序列的VH FR4。

[0367] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体包含重链可变区,其包含抗-SIRPA抗体3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24或3F9-25的VH FR1、VH FR2、VH FR3及VH FR4。

[0368] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体包含轻链可变区,其包含一或多个(例如,一或多个、两个或更多个、三个或更多个或所有四个)选自VL FR1、VL FR2、VL FR3及VL FR4(如表9中所示)的框架区。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体包含含有VL FR1的轻链可变区,其中VL FR1包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体包含含有VL FR2的轻链可变区,其中VL FR2包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体包含含有VL FR3的轻链可变区,其中VL FR3包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体包含含有VL FR4的轻链可变区,其中VL FR4包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体包含轻链可变区,其包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL FR1、含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL FR2、含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VL FR3及含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VL FR4。

[0369] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体包含轻链可变区,其包含抗-SIRPA抗体3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24或3F9-25的VL FR1、VL FR2、VL FR3及VL FR4。

[0370] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体包含重链可变区,其包含含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VH FR1、含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VH FR2、含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH FR3及含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VH FR4;及轻链可变区,其包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL FR1、含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL FR2、含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VL FR3及含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VL FR4。在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体包含重链可变区,其包含抗体3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24或3F9-25的VH FR1、VH FR2、VH FR3及VH FR4;及轻链可变区,其包含抗体3F9-1、3F9-2、3F9-3、3F9-4、3F9-5、3F9-6、3F9-7、3F9-8、3F9-9、3F9-10、3F9-11、3F9-12、3F9-13、3F9-14、3F9-15、3F9-16、3F9-17、3F9-18、3F9-19、3F9-20、3F9-21、3F9-22、3F9-23、3F9-24或3F9-25的VL FR1、VL FR2、VL FR3及VL FR4。

[0371] 在一些实施例中,本发明提供一种抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中重链包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列且轻链包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0372] 在一些实施例中,本发明提供一种抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中重链包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列且轻链包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0373] 在一些实施例中,本发明提供一种抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中重链包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列且轻链包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0374] 在一些实施例中,本发明提供一种抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其

中重链包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列且轻链包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0375] 在一些实施例中,本发明提供一种抗-SIRPA抗体,其中该抗体包含重链及轻链,其中重链包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列且轻链包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0376] 核酸、载体及宿主细胞

[0377] 本发明的抗-SIRPA抗体可以使用重组方法及组合物产生,例如如美国专利第4816567号中所述。在一些实施例中,提供具有编码本发明的抗-SIRPA抗体中的任一者的核苷酸序列的经分离核酸。此类核酸可以编码包含抗-SIRPA抗体的V_L的氨基酸序列及/或包含其V_H的氨基酸序列(例如,抗体的轻链及/或重链)。在一些实施例中,提供一或多种包含此类核酸的载体(例如,表达载体)。在一些实施例中,亦提供包含此类核酸的宿主细胞。在一些实施例中,宿主细胞包含(例如,已经以下转导):(1)包含编码包含抗体的V_L的氨基酸序列及包含抗体的V_H的氨基酸序列的核酸的载体;或(2)包含编码包含抗体的V_L的氨基酸序列的核酸的第一载体及包含编码包含抗体的V_H的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一些实施例中,宿主细胞为真核细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如Y0、NS0、Sp20细胞)。本发明的宿主细胞亦包括(但不限于)经分离细胞、在体外培养细胞及离体培养细胞。

[0378] 提供本发明的抗-SIRPA抗体的制造方法。在一些实施例中,该方法包括在适合于表达该抗体的条件下培养包含编码抗-SIRPA抗体的核酸的本发明的宿主细胞。在一些实施例中,随后自宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体。

[0379] 对于本发明的抗-SIRPA抗体的重组产生,将编码抗-SIRPA抗体的核酸分离且插入一或多个载体中,以便在宿主细胞中进行进一步克隆及/或表达。此类核酸可以使用习知程序容易地分离及测序(例如,通过使用能够与编码抗体的重链及轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。

[0380] 本文所述的包含编码本发明的抗-SIRPA抗体或其细胞表面表达片段或多肽(包括抗体)中的任一者的核酸序列的适合载体包括(但不限于)克隆载体及表达载体。适合克隆载体可根据标准技术构建,或可选自大量在此领域中可供使用的克隆载体。虽然所选择的克隆载体可以根据意欲使用的宿主细胞而变化,但是适用的克隆载体通常具有自我复制能力,可具有针对特定限制性核酸内切酶的单一目标,及/或可携带可用于选择包含载体的克隆的标志物的基因。适合实例包括质粒及细菌病毒,例如pUC18、pUC19、Bluescript(例如pBS SK+)及其衍生物、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、噬菌体DNA及穿梭载体(shuttle vector),诸如pSA3及pAT28。此等及许多其他克隆载体可购自诸如BioRad、Stratagene及Invitrogen的商业供货商。

[0381] 适于克隆或表达抗体编码载体的宿主细胞包括原核或真核细胞。例如,本发明的抗-SIRPA抗体可以在细菌中产生,特别是当不需要糖基化及Fc效应功能时。对于抗体片段及多肽在细菌中的表达,例如,美国专利第5648237号、第5789199号及第5840523号。在表达之后,抗体可以可溶性级分自细菌细胞糊状物分离且可经进一步纯化。

[0382] 除原核生物之外,诸如丝状真菌或酵母的真核微生物亦为适合抗体编码载体的克隆或表达宿主,包括糖基化途径已经“人类化”的真菌及酵母株,从而产生具有部分或完全人类糖基化型态的抗体(例如,Gerngross Nat.Biotech.22:1409-1414(2004);及Li等人 Nat.Biotech.24:210-215(2006))。

[0383] 适合表达糖基化抗体的宿主细胞亦可衍生自多细胞生物体(无脊椎动物及脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物及昆虫细胞。已鉴定众多可与昆虫细胞联合使用,尤其用于转染草地黏虫(*Spodoptera frugiperda*)细胞的杆状病毒株。植物细胞培养物亦可以用作宿主(例如,美国专利第5959177号、第6040498号、第6420548号、第7125978号及第6417429号,描述用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0384] 脊椎动物细胞亦可用作宿主。例如,适于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可为适用的。适用哺乳动物宿主细胞系的其他实例为经SV40转化的猴肾CV1株(COS-7);人类胚肾株(293或293细胞,如例如在Graham等人J.Gen Virol.36:59(1977)中所述);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠塞特利氏细胞(mouse sertoli cell)(TM4细胞,如例如在Mather, Biol.Reprod.23:243-251(1980)中所述);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人类宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);水牛鼠肝细胞(BRL 3A);人类肺细胞(W138);人类肝细胞(Hep G2);小鼠乳房肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,如例如在Mather等人Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中所述;MRC 5细胞;及FS4细胞。其他适用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR-CHO细胞(Urlaub等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));及骨髓瘤细胞系,诸如Y0、NS0及Sp2/0。关于适合于产生抗体的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见例如Yazaki及Wu,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编,Humana Press,Totowa,NJ),第255-268页(2003)。

[0385] 药物组合物/调配物

[0386] 本文中提供药物组合物及/或药物调配物,其包含本发明的抗-SIRPA抗体及药学上可接受的载剂。

[0387] 在一些实施例中,药学上可接受的载剂优选在所采用的剂量及浓度下对接受者无毒。本文所述的抗体可以调配成呈固体、半固体、液体或气体形式的制剂。此类调配物的实例包括(但不限于)锭剂、胶囊、散剂、颗粒剂、软膏、溶液、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶、微球体及气雾剂。视所要调配物而定,药学上可接受的载剂可以包括稀释剂的药学上可接受的无毒载剂,其为常用于调配用于动物或人类施用的药物组合物的媒剂。在某些实施例中,药物组合物可包含用于修饰、维持或保持组合物的例如pH、容积摩尔渗透浓度(osmolality)、黏度、澄清度、颜色、等张性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸附或渗透的调配物材料。

[0388] 在某些实施例中,药学上可接受的载剂包括(但不限于)氨基酸(诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);抗菌剂;抗氧化剂(诸如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲剂(诸如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸);膨化剂(诸如甘露糖醇或甘氨酸);螯合剂(诸如乙二胺四乙酸(EDTA));复合剂(诸如咖啡碱、聚乙烯吡咯啶酮、 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精);填充剂;单糖;双糖;及其他碳水化合物(诸如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白质(诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂、调味剂及稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物(诸如聚乙烯吡咯啶酮);低分子量多肽;成盐相对离子(诸如钠);防腐剂(诸如氯苄烷铵(benzalkonium chloride)、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定(chlorhexidine)、山梨酸或过氧化氢);溶剂(诸如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(诸如甘露糖醇或山梨糖醇);悬浮剂;表面活性剂或

湿润剂(诸如普洛尼克(pluronics)、PEG、脱水山梨糖醇酯、聚山梨醇酯(诸如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80)、曲拉通(triton)、缓血酸胺、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙泊(tyloxapal));稳定性增强剂(诸如蔗糖或山梨糖醇);张力增强剂(诸如碱金属卤化物,优选氯化钠或氯化钾、甘露糖醇、山梨糖醇);递送媒剂;稀释剂;赋形剂及/或药物佐剂。适合各种类型的施用的调配物的其他实例可见于Remington:The Science and Practice of Pharmacy, Pharmaceutical Press第22版(2013)中。关于药物递送方法的简要综述,参见Langer, Science 249:1527-1533(1990)。

[0389] 适合非经肠施用的调配物包括可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂及使调配物与预期接受者的血液等张的溶质的水性及非水性等张无菌注射溶液;及可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂及防腐剂的水性及非水性无菌悬浮液。

[0390] 调配物可经优化以在脑或中枢神经系统中保持及稳定化。当将药剂施用至颅区室中时,需要将药剂保留在该区室中,且不扩散或以其他方式跨越血脑屏障。稳定化技术包括交联、多聚化或与诸如聚乙二醇、聚丙烯酰胺、中性蛋白质载剂等基团连接以便达成分子量的增加。

[0391] 用于增加保持力的其他策略包括将抗体,诸如本发明的抗-SIRPA抗体包埋在生物可降解的或生物可侵蚀性植入物中。治疗活性剂的释放速率由经由聚合物基质的转运速率及植入物的生物降解速率来控制。植入物可为颗粒、片材、贴片、斑块、纤维、微胶囊等等且可具有与所选择的插入部位兼容的任何大小或形状。可采用的生物可降解的聚合物组合物可为有机酯或醚,其在降解时产生生理学上可接受的降解产物,包括单体。可以使用酸酐、酰胺、原酸酯等等本身或将其与其他单体组合使用。聚合物将为缩合聚合物。聚合物可为交联的或非交联的。特别令人感兴趣的是羟基脂族羧酸的聚合物,可为均聚物或共聚物,及多糖。在感兴趣的聚酯中包括D-乳酸、L-乳酸、外消旋乳酸、乙醇酸、聚己酸内酯及其组合的聚合物。感兴趣的多糖为海藻酸钙及功能化纤维素,特别是羧甲基纤维素酯,其特征在水不溶性、分子量约5kD至500kD等。在本发明的植入物中亦可采用生物可降解的水凝胶。水凝胶通常为共聚物材料,其特征在于吸收液体的能力。

[0392] 治疗用途

[0393] 如本文中所揭示,本发明的抗-SIRPA抗体可用于预防、降低风险或治疗疾病及病症。

[0394] 在本发明的一个方面中,下调SIRPA的药剂,例如抗-SIRPA抗体,是用作治疗剂。施用此类试剂以治疗、减轻及/或预防受试者中与SIRPA表达、活性及/或信号传导有关的疾病或病理。治疗方案是通过使用标准方法鉴定患有(或具有患上的风险)与SIRPA表达、活性及/或信号传导有关的疾病或病症(例如癌症或其他赘生性病)的受试者(例如人类患者)而进行。在一些实施例中,具有与SIRPA表达、活性及/或信号传导有关的病理的细胞表达SIRPA配体,例如CD47。在一些实施例中,具有与SIRPA表达、活性及/或信号传导有关的病理的细胞表达SIRPA。

[0395] 如下文进一步详述,下调SIRPA的药剂,例如抗-SIRPA抗体,可与用于治疗与SIRPA表达、活性或信号传导有关的疾病或病理的额外治疗剂组合使用。术语“组合”及“联合”在本发明中可互换使用。与抗-SIRPA抗体组合施用的额外治疗剂可在下调SIRPA的药剂,例如抗-SIRPA抗体之前、在此之后或与此同时施用。

[0396] 在本发明的一个方面中,向人类受试者施用抗-SIRPA抗体制剂,其例如包含降低SIRPA在细胞表面上的表达,但不实质上阻断配体(例如CD47)与SIRPA的结合的抗-SIRPA抗体。该抗体的施用可以消除或抑制或干扰SIRPA的由配体结合(例如CD47结合)介导的表达、活性及/或信号传导功能。

[0397] 在一个实施例中,与SIRPA表达有关的疾病或病症为癌症。在一些实施例中,向具有表达SIRPA的癌症,诸如髓样细胞的血液学增生性病症的患者施用抗-SIRPA抗体。在典型实施例中,向具有表达CD47的癌症的患者施用抗-SIRPA抗体。

[0398] 在某些实施例中,待通过本发明方法预防或治疗的癌症包括(但不限于)鳞状细胞癌(例如,上皮鳞状细胞癌)、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)、肺腺癌、肺鳞状癌、非鳞状NSCLC、神经胶质瘤、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胃癌(gastric cancer/stomach cancer),包括胃肠癌及胃肠基质癌、肾癌(例如,透明细胞癌)、卵巢癌、肝癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌(例如,肾细胞癌(RCC))、前列腺癌(例如,激素难治性前列腺腺癌)、甲状腺癌、神经母细胞瘤、胰腺癌、神经胶质母细胞瘤(多形性神经胶质母细胞瘤)、子宫颈癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌及头颈癌(或癌瘤)、胃癌、生殖细胞肿瘤、小儿肉瘤、鼻腔鼻窦自然杀手、黑色素瘤(例如,转移性恶性黑色素瘤,诸如皮肤或眼球内恶性黑色素瘤)、骨癌、皮肤癌、子宫癌、肛门区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、副甲状腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体肿瘤、输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)赘生物、原发性CNS淋巴瘤、骨髓发育不良综合征、结肠直肠赘生物、实体肿瘤、肿瘤血管生成、脊髓轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤;环境诱发的癌症,包括由石棉诱发的癌症;病毒相关癌症(例如,人类乳头状瘤病毒(HPV)相关肿瘤);及衍生自两个主要血球谱系中的任一者的血液科恶性疾病,这两个主要血球谱系亦即髓样细胞系(其产生粒细胞、红细胞、血小板、巨噬细胞及肥大细胞)或淋巴细胞系(其产生B、T、NK及浆细胞),该疾病诸如所有类型的白血病、淋巴瘤及骨髓瘤,例如急性、慢性、淋巴细胞性及/或髓样性白血病,诸如急性白血病(ALL)、急性髓样性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)及慢性髓样性白血病(CML)、未分化的AML(M0)、髓母细胞白血病(M1)、髓母细胞白血病(M2;细胞成熟)、前髓细胞性白血病(M3或M3变异体[M3V])、髓样单核细胞性白血病(M4或伴随嗜伊红细胞增多症的M4变异体[M4E])、单核细胞性白血病(M5)、红白血病(M6)、巨核母细胞白血病(M7)、分离粒细胞性肉瘤及绿色瘤;淋巴瘤,诸如霍奇金氏淋巴瘤(HL)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、无痛性淋巴瘤、大B细胞弥漫性淋巴瘤、B细胞血液科恶性疾病(例如B细胞淋巴瘤)、T细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞样淋巴瘤、单核细胞样B细胞淋巴瘤、黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤、多形性(例如,Ki 1+)大细胞淋巴瘤、成人T细胞淋巴瘤/白血病、套细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤、肠T细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、前体T淋巴母细胞淋巴瘤、T淋巴母细胞;及淋巴瘤/白血病(T-Lbly/T-ALL)、外周T细胞淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤、移植后淋巴增生性病症、真组织细胞性淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤(LBL)、淋巴谱系的造血肿瘤、急性淋巴母细胞白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)(包括原发性难治性DLBCL患者、利妥昔单抗(Rituximab)难治性、利妥昔单抗/CHOP(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱及强的松(prednisone))难治性、复发性或难治性(R/R)DLBCL及/或CAR-T

不合格的DLBCL患者)、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、滤泡性淋巴瘤、弥漫性组织细胞性淋巴瘤(DHL)、免疫母细胞大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤(CTLC)(亦称为蕈样霉菌病或塞扎莱综合征(Sezary syndrome))及伴随瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)的淋巴浆细胞淋巴瘤(LPL);骨髓瘤,诸如IgG骨髓瘤、轻链骨髓瘤、非分泌型骨髓瘤、和缓性骨髓瘤(亦称为无痛性骨髓瘤)、孤立性浆细胞瘤及多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞淋巴瘤;髓样谱系的造血肿瘤、间叶细胞源性肿瘤,包括纤维肉瘤及横纹肌肉瘤;精原细胞瘤、畸胎上皮癌、中枢及外周神经肿瘤,包括星形细胞瘤、神经鞘瘤(schwannomas);间叶细胞源性肿瘤,包括纤维肉瘤、横纹肌肉瘤及骨肉瘤;及其他肿瘤,包括黑色素瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、精原细胞瘤、甲状腺滤泡性癌症及畸胎上皮癌、淋巴谱系的造血肿瘤,例如T细胞及B细胞肿瘤,包括(但不限于)T细胞病症,诸如T前淋巴细胞性白血病(T-PLL),包括小细胞及脑状细胞类型的病症;优选T细胞类型的大颗粒淋巴细胞白血病(LGL);a/d T-NHL七叶性淋巴瘤;外周/胸腺后T细胞淋巴瘤(多形性及免疫母细胞亚型);血管中心性(鼻)T细胞淋巴瘤;头部或颈部的癌症、肾癌、直肠癌、甲状腺癌;急性髓样淋巴瘤,以及该癌症的任何组合。本发明的抗-SIRPA抗体亦可用于治疗转移癌。

[0399] 在一些实施例中,癌症是选自肉瘤、膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑色素瘤、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌及纤维肉瘤。在一些实施例中,癌症为三阴性乳腺癌。在一些实施例中,癌症可为早期癌症或晚期癌症。在一些实施例中,癌症可为原发性肿瘤。在一些实施例中,癌症可为在以上类型的癌症中的任一者所衍生的第二位点处的转移性肿瘤。

[0400] 在一些实施例中,癌症是选自多形性神经胶质母细胞瘤;肾透明细胞癌;肾上腺皮质癌;膀胱尿道上皮癌;弥漫性大B细胞淋巴瘤;肺腺癌;胰腺腺癌、肾细胞癌、非霍奇金氏淋巴瘤、急性淋巴母细胞白血病(ALL)、急性髓样白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓样白血病(CML)、多发性骨髓瘤、乳腺侵入性癌、子宫颈鳞状细胞癌、子宫颈内腺癌、胆管癌、结肠腺癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤、食道癌、头颈部鳞状细胞癌、肾难染细胞、肾乳头状细胞癌、较低级别神经胶质瘤、肝细胞癌、肺鳞状细胞癌、间皮瘤、卵巢浆液性囊腺癌、胰腺腺癌、嗜铬细胞瘤及副神经节瘤、前列腺腺癌、直肠腺癌、皮肤黑色素瘤、胃腺癌、睾丸生殖细胞肿瘤、甲状腺癌、胸腺瘤、子宫体子宫内膜癌、子宫癌肉瘤及葡萄膜黑色素瘤。

[0401] 在一些实施例中,本发明提供为患有癌症的个体预防、降低风险或治疗的方法,其中该个体难以用检查点抑制剂疗法治疗,该方法是通过向个体施用治疗有效量的本发明的抗-SIRPA抗体。

[0402] 在一些实施例中,本发明提供为患有癌症的个体预防、降低风险或治疗的方法,该方法是通过向个体施用治疗有效量的本发明的抗-SIRPA抗体。

[0403] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体可联合充当检查点抑制剂的治疗剂施用。在一些实施例中,该方法进一步包括向个体施用至少一种与抑制性免疫检查点分子特异性结合的抗体及/或另一标准或调查性抗癌疗法。在一些实施例中,抑制性检查点分子是选自PD1、PDL1、CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、CTLA4、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HVEM、LIGHT、BTLA、CD30、TIGIT、VISTA、KIR、GAL9、TIM1、TIM3、TIM4、A2AR、LAG3、DR-5、CD2、CD5、CD39及CD73。在典型实施例中,治疗剂为针对选自以下的检查点抑制剂的抗体:

D1、PDL1、CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、CTLA4、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HVEM、LIGHT、BTLA、CD30、TIGIT、VISTA、KIR、GAL9、TIM1、TIM3、TIM4、A2AR、LAG3、DR-5、CD2、CD5、CD39或CD73。在一些实施例中,该至少一种与抑制性检查点分子特异性结合的抗体是与本发明的抗-SIRPA抗体组合施用。在一些实施例中,针对检查点抑制剂的抗体的组合是联合本发明的抗-SIRPA抗体施用。

[0404] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体可联合至少一种与刺激性检查点蛋白特异性结合的增效性抗体施用,该至少一种增效性抗体例如增效剂抗-CD40抗体、增效剂抗-OX40抗体、增效剂抗-ICOS抗体、增效剂抗-CD28抗体、增效性抗-TREM1抗体、增效性抗-TREM2抗体、增效剂抗-CD137/4-1BB抗体、增效剂抗-CD27抗体、增效剂抗糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白GITR抗体、增效剂抗-CD30抗体、增效剂抗-BTLA抗体、增效剂抗-HVEM抗体、增效剂抗-CD2抗体、增效剂抗-CD5抗体及其任何组合。

[0405] 在一些实施例中,该方法进一步包括向个体施用至少一种与抑制性免疫检查点分子特异性结合的抗体及/或另一标准或调查性抗癌疗法。在一些实施例中,该至少一种与抑制性检查点分子特异性结合的抗体是与本发明的抗-SIRPA抗体组合施用。在一些实施例中,该至少一种与抑制性检查点分子特异性结合的抗体是选自抗-PD-L1抗体、抗-CTLA4抗体、抗-PD-L2抗体、抗-PD-1抗体、抗-B7-H3抗体、抗-B7-H4抗体及抗-HVEM抗体、抗-B-及T-淋巴细胞弱化因子(BTLA)抗体、抗杀手细胞抑制性受体(KIR)抗体、抗-GAL9抗体、抗-TIM3抗体、抗-A2AR抗体、抗-LAG-3抗体、抗磷脂酰丝氨酸抗体、抗-CD27抗体及其任何组合。在一些实施例中,标准或调查性抗癌疗法为一或多种选自放射疗法、细胞毒性化学疗法、靶向疗法、伊马替尼(Gleevec®)、曲妥珠单抗(Herceptin®)、过继性细胞转移(ACT)、嵌合抗原受体T细胞转移(CAR-T)、疫苗疗法及细胞因子疗法的疗法。在一些实施例中,该方法进一步包括向个体施用至少一种与抑制性细胞因子特异性结合的抗体。在一些实施例中,该至少一种与抑制性细胞因子特异性结合的抗体是与本发明的抗-SIRPA抗体组合施用。在一些实施例中,该至少一种与抑制性细胞因子特异性结合的抗体是选自抗-CCL2抗体、抗-CSF-1抗体、抗-IL-2抗体及其任何组合。

[0406] 在一些实施例中,该方法进一步包括向个体施用至少一种与刺激性免疫检查点蛋白特异性结合的增效性抗体。在一些实施例中,该至少一种与刺激性检查点蛋白特异性结合的增效性抗体是与本发明的抗-SIRPA抗体组合施用。在一些实施例中,该至少一种与刺激性检查点蛋白特异性结合的增效性抗体是选自增效剂抗-CD40抗体、增效剂抗-OX40抗体、增效剂抗-ICOS抗体、增效剂抗-CD28抗体、增效剂抗-CD137/4-1BB抗体、增效剂抗-CD27抗体、增效剂抗糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白GITR抗体及其任何组合。

[0407] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体是与放射疗法及/或化学治疗剂组合施用。化学治疗剂包括例如下组:抗代谢物/抗癌剂,诸如嘧啶类似物(5-氟尿嘧啶、氟尿苷、卡培他滨、吉西他滨及阿糖胞苷)及嘌呤类似物、叶酸拮抗剂及相关抑制剂(甲氨蝶呤(methotrexate)、培美曲塞(pemetrexed)、疏嘌呤、疏鸟嘌呤、喷司他汀(pentostatin)及2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨(cladribine))) ;抗增殖/抗有丝分裂剂,包括天然产物,诸如长春花属生物碱(长春碱、长春新碱及长春瑞滨(vinorelbine))、微管破裂剂,诸如紫杉烷(帕利他赛、多西他赛)、长春新碱、长春碱、诺考达唑(nocodazole)、埃博霉素(epothilones)、艾日布尔(eribulin)及温诺平(navelbine);表鬼臼毒素(epididodophyllotoxin)(依托泊苷、

替尼泊苷(teniposide));DNA损伤剂(放线菌素、安吡啶(amsacrine)、蒽环霉素、博来霉素(bleomycin)、白消安(busulfan)、喜树碱(camptothecin)、卡铂、氯芥苯丁酸(chlorambucil)、顺铂、环磷酰胺、Cytosan、放线菌素d、道诺霉素、多柔比星、表柔比星、六甲基三聚氰胺奥沙利铂(hexamethylmelamineoxaliplatin)、异环磷酰胺(iphosphamide)、美法仑(melphalan)、甲基二(氯乙基)胺(merchlorehtamine)、丝裂霉素、米托蒽醌(mitoxantrone)、亚硝基脲(nitrosourea)、普卡霉素(plicamycin)、丙卡巴肼(procarbazine)、泰素(taxol)、泰索帝(taxotere)、替莫唑胺(temozolamide)、替尼泊苷、三伸乙基硫代磷酰胺及依托泊苷(VP16));DNA甲基转移酶抑制剂(氮杂胞苷);抗生素,诸如放线菌素d(放线菌素D)、道诺霉素、多柔比星(阿德力霉素(adriamycin))、伊达比星(idarubicin)、蒽环霉素、米托蒽醌、博来霉素、普卡霉素(光神霉素(mithramycin))及丝裂霉素;酶(L-天冬酰胺酶,其全身性代谢L-天冬酰胺并剥夺不具有合成其自身天冬酰胺的能力的细胞);抗血小板剂;抗增殖/抗有丝分裂烷化剂,诸如氮芥(甲基二(氯乙基)胺、环磷酰胺及类似物、美法仑、氯芥苯丁酸)、乙烯亚胺及甲基三聚氰胺(六甲基三聚氰胺及噻替派(thiotepa))、烷基磺酸盐(白消安)、亚硝基脲(卡莫司汀(carmustine)(BCNU)及类似物、链佐霉素(streptozocin))、三氮烯(达喀尔巴嗪(dacarbazine)(DTIC));抗增殖/抗有丝分裂抗代谢物,诸如叶酸类似物(甲胺喋呤);铂配位复合物(顺铂、卡铂)、丙卡巴肼、羟基脲、米托坦(mitotane)、胺鲁米特(aminoglutethimide);激素、激素类似物(雌激素、他莫昔芬(tamoxifen)、戈舍瑞林(goserelin)、比卡鲁胺(bicalutamide)、尼鲁米特(nilutamide))及芳香酶抑制剂(来曲唑(letrozole)、阿那曲唑(anastrozole));抗凝血剂(肝素、合成肝素盐及凝血酶的其他抑制剂);纤维蛋白溶解剂(诸如组织纤维蛋白溶酶原活化因子、链球菌激酶及尿激酶)、阿司匹灵(aspirin)、双嘧达莫(dipyridamole)、噻氯匹定(ticlopidine)、氯吡格雷(clopidogrel)、阿昔单抗(abciximab);抗迁移剂;抗分泌剂(布瑞汀(breveldin));免疫抑制剂(环孢灵(cyclosporine)、他克莫司(tacrolimus)(FK-506)、西罗莫司(sirolimus)(雷帕霉素(rapamycin))、硫唑嘌呤(azathioprine)、霉酚酸吗啉乙酯(mycophenolate mofetil));抗血管生成化合物(TNP470、金雀异黄酮(genistein)、泊马度胺(pomalidomide))及生长因子抑制剂(血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂,诸如ziv-阿柏西普(aflibercept);纤维母细胞生长因子(FGF)抑制剂);细胞凋亡蛋白质(IAP)拮抗剂的抑制剂(比林纳潘特(birinapant));组蛋白脱乙酰基酶(HDAC)抑制剂(伏立诺他(vorinostat)、罗米地辛(romidepsin)、西达本胺(chidamide)、帕比司他(panobinostat)、莫塞诺他(mocetinostat)、阿贝司他(abexinostat)、贝林诺他(belinostat)、恩替诺特(entinostat)、雷米诺他(resminostat)、吉韦诺他(givinostat)、奎西诺他(quisinostat)、SB939);蛋白酶体抑制剂(依萨佐米(ixazomib));血管收缩素受体阻断剂;一氧化氮供体;反义寡核苷酸;抗体(曲妥珠单抗、帕尼单抗(panitumumab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、阿达木单抗(adalimumab)、戈利木单抗(golimumab)、英利昔单抗(infliximab)、利妥昔单抗、奥克珠单抗(ocrelizumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)、阿仑单抗(alemtuzumab)、阿昔单抗、阿利珠单抗(atlizumab)、达利珠单抗(daclizumab)、地诺单抗(denosumab)、依法利珠单抗(efalizumab)、埃罗妥珠单抗(elotuzumab)、罗维珠单抗(rovelizumab)、鲁利单抗(ruplizumab)、优特克单抗(ustekinumab)、维西珠单抗(visilizumab)、吉妥珠单抗奥佐米

星(gemtuzumab ozogamicin)、布伦妥昔单抗维多汀(brentuximab vedotin);嵌合抗原受体;细胞周期抑制剂(夫拉平度(flavopiridol)、罗斯维汀(roscovitine)、苔藓虫素(bryostatin)-1)及分化诱导剂(维甲酸(tretinoin));mTOR抑制剂、拓朴异构酶(topoisomerase)抑制剂(多柔比星(阿霉素)、安吡啶、喜树碱、道诺霉素、放线菌素d、艾尼西德(eniposide)、表柔比星、依托泊苷、伊达比星、伊立替康(irinotecan)(CPT-11)及米托蒽醌、拓朴替康(topotecan)、伊立替康)、皮质类固醇(皮质酮、地塞米松(dexamethasone)、氢皮质酮(hydrocortisone)、甲泼尼龙(methylprednisolone)、强的松及泼尼龙(prednisolone));PARP抑制剂(尼拉帕尼(niraparib)、奥拉帕尼(olaparib));局部黏着斑激酶(FAK)抑制剂(迪法替尼(defactinib)(VS-6063)、VS-4718、VS-6062、GSK2256098);生长因子信号转导激酶抑制剂(西地尼布(cediranib)、高伦替布(galunisertib)、罗西替尼(rociletinib)、凡德他尼(vandetanib)、阿法替尼(afatinib)、EGF816、AZD4547);c-Met抑制剂(卡普尼布(capmatinib)、INC280);ALK抑制剂(色瑞替尼(ceritinib)、克唑替尼(crizotinib));线粒体功能障碍诱导剂、毒素,诸如霍乱毒素(Cholera toxin)、蓖麻毒素、绿脓杆菌外毒素(Pseudomonas exotoxin)、百日咳博德氏杆菌(Bordetella pertussis)腺苷酸环化酶毒素或白喉毒素,及胰天蛋白酶活化剂;及染色质破裂剂。在一些实施例中,化学治疗剂为B-Raf抑制剂、MEK抑制剂、VEGF抑制剂、VEGFR抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、抗有丝分裂剂或其任何组合。

[0408] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体是与过继性细胞转移(ACT)疗法、嵌合抗原受体T细胞转移(CAR-T)疗法、疫苗疗法及/或细胞因子疗法组合施用。

[0409] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体是与至少一种与抑制性细胞因子特异性结合的抗体组合施用,例如抑制性细胞因子,诸如抗-CCL2抗体、抗-CSF-1抗体或抗-IL-2抗体。

[0410] 在一些实施例中,本发明的抗-SIRPA抗体是与至少一种刺激性细胞因子组合施用。在可以与本文中的实施例中的任一者组合的一些实施例中,该至少一种刺激性细胞因子是选自IFN- α 4、IFN- β 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP、IL-20家族成员、LIF、IFN- γ 、OSM、CNTF、GM-CSF、IL-11、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、CXCL10、IL-33、MCP-1、MIP-1- β 及其任何组合。

[0411] 在一些实施例中,下调SIRPA的药剂,例如抗-SIRPA抗体,是向患有神经病症的患者施用,或是为了降低风险、缓慢发作或预防神经病症而施用。在一些实施例中,神经病症为痴呆,包括痴呆、额颞叶型痴呆、阿兹海默氏病、血管性痴呆、轻度认知障碍、帕金森氏病、肌肉萎缩性侧索硬化(ALS)、亨廷顿氏病、滔蛋白病变疾病(Taupathy disease)或多发性硬化症。

[0412] 在一些实施例中,下调SIRPA的药剂,例如抗-SIRPA抗体,是向患有帕金森氏病、肌肉萎缩性侧索硬化、亨廷顿氏病、滔蛋白病变疾病或多发性硬化症的患者施用。在一些实施例中,该药剂是向患有以下疾病的患者施用:库贾氏病、常压性水脑症、那哈氏病、中风、感染、创伤性脑损伤、进行性核上性麻痹、拳击手型痴呆(dementia pugilistica)(慢性创伤性脑病)、与17号染色体相关的帕金森氏症、利波氏病(Lytico-Bodig disease)(关岛型帕金森氏症-痴呆综合征(Parkinson-dementia complex of Guam))、缠结为主型痴呆(tangle-predominant dementia)、神经节胶质细胞瘤及神经节瘤、脑膜血管瘤病、亚急性

硬化性全脑炎、铅毒脑病、结节性硬化症、哈雷伯登-斯巴兹病 (Hallervorden-Spatz disease)、脂褐质沉积症、匹克病 (Pick's disease)、皮质基底核退化症、嗜银性颗粒病 (Argyrophilic grain disease, AGD)、额颞叶退化症、路易体痴呆、多发性系统萎缩症、夏-崔综合征、进行性核上性麻痹或皮质基底核退化症。

[0413] 痴呆

[0414] 痴呆为非特异性综合征 (亦即, 一组体征及症状), 其表达为先前未受损伤的人的整体认知能力的严重丧失, 超出正常衰老所预期的。由于独特的整体脑损伤, 痴呆可为静态的。或者, 痴呆可为进行性的, 由于体内的损伤或疾病而导致长期恶化。虽然痴呆在老年人群中更为常见, 但其亦可发生在65岁之前。受痴呆影响的认知区域包括 (但不限于) 记忆力、注意广度、语言及问题解决。通常, 在个体被诊断患有痴呆之前, 症状必须存在至少六个月。

[0415] 痴呆的例示性形式包括 (但不限于) 额颞叶型痴呆、阿兹海默氏病、血管性痴呆、语意型痴呆及路易体痴呆。

[0416] 在一些实施例中, 施用本发明的抗-SIRPA抗体可以预防、降低风险及/或治疗痴呆。在一些实施例中, 抗-SIRPA抗体可以调节患有痴呆的个体中的一或多种SIRPA活性。

[0417] 额颞叶型痴呆

[0418] 额颞叶型痴呆 (FTD) 为由脑额叶的进行性恶化引起的病状。随时间推移, 退化可推进至颞叶。流行率仅次于阿兹海默氏病 (AD), FTD占早老性痴呆病例的20%。FTD的临床特征包括记忆缺失、行为异常、人格改变及语言障碍 (Cruts, M. & Van Broeckhoven, C., Trends Genet. 24:186-194 (2008); Neary, D. 等人, Neurology 51:1546-1554 (1998); Ratnavalli, E., Brayne, C., Dawson, K. & Hodges, J. R., Neurology 58:1615-1621 (2002))。

[0419] 大部分FTD病例以常染色体显性方式遗传, 但即使在一个家族中, 症状亦可以覆盖从伴有行为障碍的FTD至原发性进行性失语症至皮质基底核退化症的范围。与大多数神经退化性疾病一样, FTD的特征在于患病脑中特定蛋白质聚集体的病理性存在。从历史上看, FTD的首次描述认识到在神经原纤维缠结或匹克体 (Pick body) 中存在过磷酸化滔蛋白的神经元内累积。通过鉴定若干家族中编码滔蛋白的基因中的突变而支持微管相关蛋白滔蛋白的因果作用 (Hutton, M. 等人, Nature 393:702-705 (1998))。然而, 大多数FTD脑未显示过磷酸化滔蛋白的累积, 但展现出对泛蛋白 (Ub) 及TAR DNA结合蛋白 (TDP43) 的免疫反应性 (Neumann, M. 等人, Arch. Neurol. 64:1388-1394 (2007))。大多数具有Ub包涵体 (FTD-U) 的FTD病例显示在颗粒蛋白前体 (Progranulin) 基因中携带突变。

[0420] 在一些实施例中, 施用本发明的抗-SIRPA抗体可以预防、降低风险及/或治疗FTD。在一些实施例中, 施用抗-SIRPA抗体可以调节患有FTD的个体中的一或多种SIRPA活性。

[0421] 阿兹海默氏病

[0422] 阿兹海默氏病 (AD) 为最常见的痴呆形式。该疾病没有治愈方法, 其随着疾病的进展而恶化, 且最终导致死亡。AD最常在年龄超过65岁的人中被诊断出。然而, 较不普遍的早发型阿兹海默氏病的发生可以早发生。阿兹海默氏病的常见症状包括行为症状, 诸如难以记住最近发生的事件; 认知症状、混淆、烦躁及攻击性、情绪波动、语言障碍及长期记忆丧失。随着疾病的进展, 身体功能丧失, 最终导致死亡。阿兹海默氏病在变得完全明显之前需要一段未知且可变的时间来发展, 且其可以在未确诊的情况下进展多年。

[0423] 在一些实施例中, 施用本发明的抗-SIRPA抗体可以预防、降低风险及/或治疗阿兹

海默氏病。在一些实施例中,施用抗-SIRPA抗体可以调节患有阿兹海默氏病的个体中的一或多种SIRPA活性。

[0424] 帕金森氏病

[0425] 帕金森氏病可称为特发性或原发性帕金森氏症、运动过弱型强直综合征(hypokinetic rigid syndrome,HRS)或震颤麻痹,为影响运动系统控制的神经退化性脑部病症。脑中产多巴胺细胞的进行性死亡引起帕金森氏症的主要症状。帕金森氏病最常在年龄超过50岁的人中被诊断出。帕金森氏病在大多数人中为特发性的(没有已知病因)。然而,遗传因素亦在该疾病中发挥作用。

[0426] 帕金森氏病的症状包括(但不限于)手、手臂、腿、颌部及面部的震颤、四肢及躯干肌肉僵硬、移动缓慢(动作迟缓)、姿势不稳、行走困难、神经精神问题、说话或行为改变、抑郁、焦虑、疼痛、精神病、痴呆、幻觉及睡眠问题。

[0427] 在一些实施例中,施用本发明的抗-SIRPA抗体可以预防、降低风险及/或治疗帕金森氏病。在一些实施例中,施用抗-SIRPA抗体可以调节患有帕金森氏病的个体中的一或多种SIRPA活性。

[0428] 肌肉萎缩性侧索硬化(ALS)

[0429] 如本文所用,肌肉萎缩性侧索硬化(ALS)或运动神经元疾病或路格里克氏病(Lou Gehrig's disease)可互换使用且是指具有不同病因的使人衰弱的疾病,其特征在于快速进行性无力、肌肉萎缩及束化、肌肉痉挛、说话困难(发音困难)、吞咽困难(difficulty swallowing)(吞咽困难(dysphagia))及呼吸困难(difficulty breathing)(呼吸困难(dyspnea))。

[0430] 已证明,颗粒蛋白前体在ALS中起作用(Schymick,JC等人,(2007)J[0343]Neurol Neurosurg Psychiatry.;78:754-6)且又免受由导致ALS的蛋白质(诸如TDP-43)引起的损伤(Laird,AS等人,(2010).PLoS ONE 5:e13368)。亦证实,NGF前体诱导p75介导的脊髓损伤后寡树突细胞及皮质脊髓神经元的死亡(Beatty等人,Neuron(2002),36,第375-386页;Giehl等人,Proc.Natl.Acad.Sci USA(2004),101,第6226-30页)。

[0431] 在一些实施例中,施用本发明的抗-SIRPA抗体可以预防、降低风险及/或治疗ALS。在一些实施例中,施用抗-SIRPA抗体可以调节患有肌肉萎缩性侧索硬化的个体中的一或多种SIRPA活性。

[0432] 亨廷顿氏病

[0433] 亨廷顿氏病(HD)为由亨廷顿基因(HTT)中的常染色体显性突变引起的遗传性神经退化性疾病。在亨廷顿基因内细胞因子-腺嘌呤-鸟嘌呤(CAG)三联体重复序列的扩充导致产生由该基因编码的亨廷顿蛋白(Htt)的突变形式。此突变亨廷顿蛋白(mHtt)有毒且促使神经元死亡。亨廷顿氏病的症状最常在35岁与44岁之间出现,尽管其亦可在任何年龄出现。

[0434] 亨廷顿氏病的症状包括(但不限于)运动控制问题、急动、随机运动(舞蹈病)、异常眼球运动、平衡受损、癫痫、咀嚼困难、吞咽困难、认知问题、说话改变、记忆缺失、思考困难、失眠、疲劳、痴呆、人格改变、抑郁、焦虑及强迫行为。

[0435] 在一些实施例中,施用本发明的抗-SIRPA抗体可以预防、降低风险及/或治疗亨廷顿氏病(HD)。在一些实施例中,施用抗-SIRPA抗体可以调节患有亨廷顿氏病的个体中的一或多种SIRPA活性。

[0436] 滔蛋白病变疾病

[0437] 滔蛋白病变疾病或滔蛋白病变为由微管相关蛋白滔蛋白在脑内的聚集引起的一类神经退化性疾病。阿兹海默氏病 (AD) 为最熟知的滔蛋白病变疾病且涉及滔蛋白在神经元内以不溶性神经原纤维缠结 (NFT) 形式的累积。其他滔蛋白病变疾病及病症包括进行性核上性麻痹、拳击手型痴呆 (慢性创伤性脑病)、额颞叶型痴呆及与17号染色体相关的帕金森氏症、利波氏病 (关岛型帕金森氏症-痴呆综合征)、缠结为主型痴呆、神经节胶质细胞瘤及神经节瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅毒脑病、结节性硬化症、哈雷狒登-斯巴兹病、脂褐质沉积症、匹克病、皮质基底核退化症、嗜银性颗粒病 (AGD)、亨廷顿氏病及额颞叶退化症。

[0438] 在一些实施例中,施用本发明的抗-SIRPA抗体可以预防、降低风险及/或治疗滔蛋白病变疾病。在一些实施例中,施用抗-SIRPA抗体可以调节患有滔蛋白病变疾病的个体中的一或多种SIRPA活性。

[0439] 多发性硬化症

[0440] 多发性硬化症 (MS) 亦可称为播散性硬化症或播散性脑脊髓炎。MS为发炎性疾病,其中脑及脊髓的轴突周围的脂肪髓鞘受损,导致脱髓鞘及瘢痕形成以及广泛的体征及症状。MS影响脑及脊髓中的神经细胞有效地相互通信的能力。神经细胞通过向称为轴突的长纤维发送称为动作电位的电信号进行通信,该长纤维包含在称为髓鞘的绝缘物质中。在MS中,身体自身的免疫系统攻击并损害髓鞘。当髓鞘丢失时,轴突不再能够有效地传导信号。MS发病通常发生在青少年中,且在女性中更常见。

[0441] MS的症状包括(但不限于)感觉的变化,诸如丧失敏感性或麻刺感;刺痛或麻木,诸如感觉迟钝及感觉异常;肌肉无力;阵挛;肌肉痉挛;移动困难;协调及平衡方面的困难,诸如共济失调;说话问题,诸如发音困难,或吞咽问题,诸如吞咽困难;视觉问题,诸如眼球震颤、包括光幻视在内的视神经炎及复视;疲劳;急性或慢性疼痛;及膀胱及肠道困难;不同程度的认知障碍;抑郁或情绪不稳定的情绪症状;乌托夫现象 (Uhthoff's phenomenon),其为由于暴露于高于平时的环境温度而导致现有症状恶化;及拉密特氏征象 (Lhermitte's sign),其为在弯曲颈部时从背部向下蔓延的触电样感觉。

[0442] 在一些实施例中,施用本发明的抗-SIRPA抗体可以预防、降低风险及/或治疗多发性硬化症。在一些实施例中,施用抗-SIRPA抗体可以调节患有多发性硬化症的个体中的一或多种SIRPA活性。

[0443] 在一些实施例中,受试者/个体为哺乳动物。哺乳动物包括(但不限于)家养动物(例如牛、羊、猫、犬及马)、灵长类动物(例如人类及非人类灵长类动物,诸如猴)、兔及啮齿动物(例如小鼠及大鼠)。在一些实施例中,受试者/个体为人类。

[0444] 本文所提供的抗体(及任何额外治疗剂)可以通过任何适合方法施用,包括非经肠、肺内、鼻内、病灶内施用、脑脊髓内、颅内、脊柱内、滑膜内、鞘内、经口、局部或吸入途径。非经肠输注包括肌肉内、作为大丸剂或通过在一段时间内连续输注而静脉内施用、动脉内、关节内、腹膜内或皮下施用。在一些实施例中,该施用为静脉内施用。在一些实施例中,该施用为皮下施用。给药可通过任何适合途径,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射,部分地视投药是短期还是长期而定。本文中涵盖各种给药时程,包括(但不限于)单次投药或在不同时间点的多次投药、大丸剂投药及脉冲式输注。

[0445] 本文所提供的抗体将以符合良好医学规范的方式调配、给予及施用。在此情形下考虑的因素包括所治疗的特定病症、所治疗的特定哺乳动物、患者个体的临床病状、病症起因、药剂递送部位、施用方法、施用时程及医学从业者已知的其他因素。抗体不需要但任选地可与一或多种当前用于预防或治疗所讨论的病症的药剂一起调配。此类其他药剂的有效量视存在于调配物中的抗体的量、病症或治疗的类型及上文所论述的其他因素而定。此等药剂一般以相同剂量且以如本文所描述的施用途径使用,或以本文所描述的剂量的约1%至99%使用,或以任何剂量且通过凭经验/临床上确定为适当的任何途径使用。

[0446] 为预防或治疗疾病,本发明抗体的适当剂量(当单独或与一或多种其他额外治疗剂组合使用时)将视以下而定:待治疗疾病的类型、抗体类型、疾病的严重度及病程、抗体是出于预防还是治疗目的而施用的、先前疗法、患者的临床病史及对抗体的反应及主治医师的判断。适当地向患者一次性施用或历经一系列治疗施用抗体。

[0447] 视疾病的类型及严重程度而定,约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $15\text{mg}/\text{kg}$ (例如 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ - $10\text{mg}/\text{kg}$)的抗体可为向患者施用的初始候选剂量,不论是例如通过一或多次分开施用还是通过连续输注。视上文所提及的因素而定,一个典型的日剂量可在约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更大的范围内。对于历经数日或更长时间的重复投药,视病状而定,治疗通常将持续至发生疾病症状的所要抑制为止。抗体的一个例示性剂量将在约 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ 至约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的范围内。因此,可向患者施用约 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 或 $10\text{mg}/\text{kg}$ (或其任何组合)的一或多种剂量。此类剂量可间歇地施用,例如每周或每三周(例如以使得患者接受约二至约二十或例如约六个剂量的抗体)。在某些实施例中,给药频率为每天三次、每天两次、每天一次、每隔一天一次、每周一次、每两周一次、每四周一次、每五周一次、每六周一次、每七周一次、每八周一次、每九周一次、每十周一次或每月一次、每两个月一次、每三个月一次或更久。可施用初始较高加载剂量,接着可施用一或多个较低剂量。然而,其他给药方案可为适用的。此疗法的进程易于通过习知技术及分析来监测。

[0448] 诊断用途

[0449] 在抗体中的任一者的一些实施例中,本文所提供的抗-SIRPA抗体中的任一者适用于侦测样品或个体中SIRPA的存在。如本文所用的术语“侦测”涵盖定量或定性侦测。本文提供出于诊断目的使用本发明抗体的方法,诸如侦测个体或衍生自个体的组织样品中的SIRPA。在一些实施例中,个体为人类。

[0450] 侦测方法可涉及抗原结合抗体的定量。生物样品中的抗体侦测可以用此领域中已知的任何方法进行,包括免疫荧光显微术、免疫细胞化学、免疫组织化学、ELISA、FACS分析、免疫沉淀或微型正电子发射断层摄影术。在某些实施例中,抗体例如经 ^{18}F 放射性标记,且随后使用微型正电子发射断层摄影术分析侦测。亦可通过非侵袭性技术定量患者中的抗体结合,诸如正电子发射断层摄影术(PET)、X射线计算机断层摄影术、单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)、计算机断层摄影术(CT)及计算机轴向断层摄影术(CAT)。

[0451] 制品

[0452] 本文提供包含本文所述的抗-SIRPA抗体的制品(例如,试剂盒)。制品可以包括一或多个包含本文所述的抗体的容器。容器可为任何适合包装,包括(但不限于)小瓶、瓶子、广口瓶、软包装(例如密封聚酯薄膜(Mylar)或塑料袋)等等。容器可为单位剂量、散装包装(例如,多剂量包装)或次单位剂量。

[0453] 在一些实施例中,试剂盒可进一步包括第二药剂。在一些实施例中,第二药剂为药理学上可接受的缓冲剂或稀释剂,包括(但不限于)诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。在一些实施例中,第二药剂为如上所述的药物活性药剂。

[0454] 在制品中的任一者的一些实施例中,制品进一步包括根据本发明方法的使用说明书。说明书一般包括关于用于预期治疗的剂量、给药时程及施用途径的信息。在一些实施例中,此等说明书包含对根据本发明的任何方法施用本发明的经分离抗-SIRPA抗体(例如,本文所述的抗-SIRPA抗体)以预防、降低风险或治疗具有选自以下的疾病、病症或损伤的个体的描述:痴呆、额颞叶型痴呆、阿兹海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆症、库贾氏病、常压性水脑症、肌肉萎缩性侧索硬化、亨廷顿氏病、滔蛋白病变疾病、那哈氏病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性及慢性结肠炎、类风湿性关节炎、创伤愈合、克罗恩氏病(Crohn's disease)、发炎性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖、疟疾、原发性震颤、中枢神经系统狼疮、白塞氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多发性系统萎缩症、夏-崔综合征、进行性核上性麻痹、皮质基底核退化症、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、类肉瘤病、衰老病、癫痫、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关的黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼睛感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、成骨、骨性骨质硬化病、骨佩吉特氏病(Paget's disease),及癌症,包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑色素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性淋巴母细胞白血病(ALL)、急性髓样白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓样白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性多红细胞症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性骨髓硬化、骨髓衍生肿瘤、表达SIRPA的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)感染、黑热病利什曼原虫(*Leishmania donovani*)感染、B群链球菌感染、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)感染、脑膜炎双球菌(*Neisseria meningitidis*)感染、第I型HIV及流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenza*)。在一些实施例中,说明书包括抗-SIRPA抗体及第二药剂(例如,第二药物活性剂)的使用说明书。

[0455] 参考以下实施例将更充分地理解本发明。然而,该实施例不应视为限制本发明的范畴。本发明通篇所有引用在此明确地以引用的方式并入。

实施例

[0456] 以下实施例仅以说明而非作为限制的方式提供。本领域技术人员将容易想到可经改变或修改以产生基本类似的结果的多种参数。

[0457] 实施例1:产生抗-SIRPA抗体

[0458] 人类SIRPA蛋白质的氨基酸序列如下文SEQ ID NO:1所示。人类SIRPA含有位于SEQ ID NO:1的氨基残基1-30处的信号肽。人类SIRPA含有位于SEQ ID NO:1的氨基残基32-137处的细胞外类免疫球蛋白可变型(IgV)域;位于SEQ ID NO:1的氨基残基148-247及254-348处的额外细胞外类免疫球蛋白恒定型(IgC)域序列;位于SEQ ID NO:1的氨基残基374-394处的跨膜域;及位于SEQ ID NO:1的氨基残基395-504处的细胞内域。

[0459] 人类SIRPA v1氨基酸序列(SEQ ID NO:1):

	10	20	30	40	50
	MEPAGPAPGR	LGPLLCLLLA	ASCAWSGVAG	EEELQVIQPD	KSVLVAAGET
	60	70	80	90	100
[0460]	ATLRCTATSL	IPVGPIQWFR	GAGPGRELIY	NQKEGHFPRV	TTVSDLTKRN
	110	120	130	140	150
	NMDFSIRIGN	ITPADAGTYT	CVKFRKGSPD	DVEFKSGAGT	ELSVRAKPSA
	160	170	180	190	200
	PVVSGPAARA	TPQHTVSFTC	ESHGFSRPDI	TLKWFKNGNE	LSDFQTNVDP
	210	220	230	240	250
	VGESVSYSIH	STAKVVLTRE	DVHSQVICEV	AHVTLQGDPL	RGTANLSETI
	260	270	280	290	300
	RVPPTLEVTQ	QPVRAENQVN	VTCQVRKFYP	QRLQLTWLEN	GNVSRTEAS
	310	320	330	340	350
	TVTENDKGT	Y NWMSWLLVNV	SAHRDDVKLT	CQVEHDGQPA	VSKSHDLKVS
[0461]	360	370	380	390	400
	AHPKEQGSNT	AAENTGSNER	NIYIVVGVC	TLLVALLMAA	LYLVRIRQKK
	410	420	430	440	450
	AQGSTSSTRL	HEPEKNAREI	TQDTNDITYA	DLNLPKGKKP	APQAAEPNNH
	460	470	480	490	500
	TEYASIQTSP	QPASEDTLTY	ADLDMVHLNR	TPKQPAPKPE	PSFSEYASVQ

VPRK

[0462] SIRPA-CD47复合物的晶体结构分析将配体结合位点解析为连接SIRPA的IgV域中的β片层的可变环。CD47结合界面由SIRPA的氨基酸残基S59-P65、L96-F104及K123-D130组成。

[0463] 已鉴定SIRPA在人类中的多种多态性。因为序列中的大多数变异超出了CD47配体结合位点,所以所检查的大多数SIRPA变异体似乎以相似的亲和力结合CD47。SIRP家族的另一成员SIRPB1与SIRPA共享高序列同源性,但不能结合CD47。单一A57M取代足以重排S59-P65配体结合界面,防止SIRPB1与CD47结合。此外,SIRPA-CD47相互作用为高度物种特异性的。人类SIRPA不能结合小鼠或大鼠或牛CD47(在所测试物种中)且人类CD47仅识别由NOD小鼠品系表达的小鼠SIRPA的单一等位基因变异体。

[0464] 来自多个物种的SIRPA序列的蛋白质BLAST分析显示与人类SIRPA的显著程度的同一性(图1)。SIRP家族内的高序列同源性在产生SIRPA特异性抗体同时仍保持与非人类SIRPA抗原的交叉反应性方面提出了重大挑战。

[0465] 实施例2:表征人类化抗-SIRPA抗体

[0466] 本文中所论述的小鼠SIRPA抗体m3F9含有包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区。

[0467] 下表4及5列举鼠类抗-SIRPA抗体m3F9的杂交瘤衍生的重链可变区及轻链可变区氨基酸序列,以及相应的人类化序列(称为“h3F9”)。抗-SIRPA抗体3F9重链可变域的第一人

类化抗体序列(h3F9-H1)为不改变人类框架序列的“CDR-交换”。

[0468] 随后的人类化重链可变区序列(h3F9-H2)在某些CDR接合点处具有改变的框架残基。(参见图2A。)图2A列举抗-SIRPA抗体3F9的重链可变域的潜在人类化序列。人类化序列是基于IGHV3-23*01接受体框架及IGHJ4*01连接区。

[0469] 抗-SIRPA抗体3F9轻链可变域的第一人类化序列(h3F9-L1)为不改变人类框架序列的轻链可变域的“CDR-交换”。随后的人类化轻链可变区序列改变某些框架氨基酸残基(h3F9-L2及h3F9-L3)。(参见图2B。)图2B列举抗-SIRPA抗体3F9的轻链可变域的潜在人类化序列。

[0470] 人类化序列是基于IGKV3-11*01接受体框架及IGKJ2*01连接区。CDR序列以粗体表示。CDR定义为来自网站www.bioinf.org.uk/abs/的AbM。“b”表示内埋侧链;“p”表示部分内埋;“i”表示在VH与VL域之间的界面处的侧链。人类与鼠类生殖系之间的序列差异由星号(*)表示。框架中的潜在额外突变标注在序列下方。CDR序列中的潜在改变标注在各CDR序列下方。此等改变可以防止天冬酰胺(N)脱酰胺。将抗-SIRPA抗体3F9的所有六种不同的人类化版本(基于重链及轻链可变区的以下组合:h3F9-H1/L1;h3F9-H1/L2;h3F9-H1/L3;h3F9-H2/L1;h3F9-H2/L2;及h3F9-H2/L3)移植至人类IgG4主链上,在CHO-K1细胞中重组产生,且如下所述进一步表征。

[0471] 表4

抗体	重链可变区序列	SEQ ID NO:
m3F9 VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRL EWVATISDYGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKYTLYLQMSSLRSE DTALYYCARPPYDDYYGGFAYWGQGLVTVSA	2
[0472] h3F9-H1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSTISDYGGSYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKPPYDDYYGGFAYWGQGLVTVSS	3
h3F9-H2	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVATISDYGGSYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARPPYDDYYGGFAYWGQGLVTVSS	4

[0473] 表5

[0474]	抗体	轻链可变区序列	SEQ ID NO:
	m3F9 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSSGYSYMHWYQQKPG QPPKLLIYLASNLESGVPSRFGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATY YCQHNRELPCFTGGGQTKLEIK	5
	h3F9-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSVSSSGYSYMHWYQQKPG KAPKLLIYLASNLESGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQHNRELPCFTGGGQTKLEIK	6
	h3F9-L2	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSVSSSGYSYMHWYQQKPG KAPKLLIYLASNLESGVPSRFGSGSGTDFTLTISVQPEDFATY YCQHNRELPCFTGGGQTKLEIK	7
	h3F9-L3	DIQLTQSPSSLSVSGDRATITCRASKSVSSSGYSYMHWYQQKPG KAPKLLIYLASNLESGVPSRFGSGSGTDFTLTISVQPEDFATY YCQHNRELPCFTGGGQTKLEIK	8

[0475] 如下进行抗-SIRPA抗体的亲和力测量。在Pall ForteBio Octet RED96仪器上收集生物层干涉法 (BLI) 资料。使用9.0版ForteBio数据分析软件进行数据分析。使用标准动力学缓冲剂 (PBS, 0.1% BSA, 0.02% Tween-20, pH 7.2) 进行分析及用于制备试剂。在缓冲剂中进行传感器平衡之后, 将人类化3F9抗-SIRPA抗体中的每一者 (2.5 μ g/mL, 300秒加载时间) 捕捉在抗人类IgG Fc捕捉、浸渍及读数生物传感器 (Pall ForteBio, Menlo Park, CA) 上。随后使不同浓度 (0-200nM) 的组氨酸标记的人类SIRPA (Sino Biological, Beijing, China) 与所捕捉的抗-SIRPA表面结合 (300秒缔合时间, 600秒解离时间)。所得BLI信号作为与来自参考 (2.5 μ g/mL IgG+0nM SIRPA) 传感器的响应的差异而获得。零配体对照 (0 μ g/mL IgG+200nM SIRPA) 显示SIRPA与传感器尖端表面无可测量的非特异性结合。亲本m3F9抗体的亲和力测量使用类似方法进行, 但改用被捕捉在抗小鼠IgG Fc生物传感器上的抗体。使用1:1相互作用模型进行多浓度动力学分析以提取各抗体的缔合及解离速率常数 (分别为 k_a 及 k_d)。由比率 k_d/k_a 计算结合亲和力常数 (KD)。

[0476] 经固定的抗小鼠IgG Fc或抗人类IgG Fc抗体分别在生物传感器上捕捉鼠类抗-SIRPA抗体3F9及人类化抗-SIRPA抗体3F9。使递增浓度的组氨酸标记的huSIRPA同等型1 (10-500nM) 流经所捕捉的抗-SIRPA抗体3F9以记录迹线。自所得传感器图谱分析最佳拟合迹线以计算缔合速率、解离速率及亲和力值。所测试的三种人类化抗-SIRPA抗体3F9变异体为mAb 14.70.1 (SEQ ID NO:3的重链可变序列及SEQ ID NO:6的轻链可变序列)、mAb 14.70.2 (SEQ ID NO:3的重链可变序列及SEQ ID NO:7的轻链可变序列) 及mAb 14.70.4 (SEQ ID NO:4的重链可变序列及SEQ ID NO:6的轻链可变序列)。人类化抗-SIRPA 3F9抗体的所测量的结合动力学以所提取的 k_a 、 k_d 及KD值概述于下表6中。在所产生的六种h3F9变异体中, 3种抗-SIRPA抗体 (mAb 14.70.1:H1/L1;mAb 14.70.2:H1/L2;mAb 14.70.4:H2/L1) 对可溶性SIRPA抗原展现与亲本m3F9抗-SIRPA抗体 (SEQ ID NO:2的重链可变序列及SEQ ID NO:5的轻链可变序列) 类似的亲和力。

[0477] 表6

3F9抗体克隆	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)
亲本m3F9 IgG1	5.08E+04	1.00E-03	18

mAb 14.70.1	1.10E+05	2.00E-03	19
mAb 14.70.2	1.10E+05	2.20E-03	20
mAb 14.70.4	8.60E+04	9.40E-04	11

[0479] 除了结合可溶性抗原之外,亦进行基于细胞的亲和力测量以确定h3F9抗-SIRPA抗体相对于m3F9抗-SIRPA抗体对膜结合SIRPA v1抗原的表观亲和力。通过向过表达人类SIRPA的BWZ细胞添加递增浓度的抗-SIRPA 3F9抗体而给相对亲和力赋予EC50值。通过用抗小鼠IgG Fc APC或抗人类IgG PE二抗对细胞染色来侦测受体结合抗体。将单克隆抗体的连续稀释液添加至 10^5 个过表达huSIRPA的BWZ细胞(BWZ-huSIRPA)中且使其在4℃下达成结合平衡。在添加经荧光标记的二抗及简单的洗涤步骤之后,经由FACS分析记录作为所滴定的抗体浓度的函数的平均荧光强度(MFI)值。使用非线性回归分析用Graphpad Prism 6软件拟合曲线。采用h3F9抗-SIRPA抗体mAb 14.70.1、mAb 14.70.2及mAb 14.70.4的基于细胞的滴定实验分别得到1.065nM、0.9682nM及1.607nM的EC50值。人类化3F9抗-SIRPA抗体得到比m3F9抗-SIRPA抗体($EC_{50}=2.1nM$)低的EC50值,相对于鼠类3F9抗-SIRPA抗体所测定的结合亲和力,显示出人类化抗体的改善的结合亲和力。

[0480] 亦进行基于竞争的分析以计算抗-SIRPA抗体的IC50值,其中向BWZ-huSIRPA v1细胞添加递增浓度的人类化及鼠类3F9抗-SIRPA抗体以置换经荧光团标记的参考抗体。IC50值提供相对亲和力的另一比较。在基于竞争的分析中,向表达huSIRPA的细胞添加递增浓度的抗-SIRPA 3F9抗体以置换经荧光团标记的参考抗体。IC50值确定如下:m3F9=11.54nM;mAb 14.70.1=3.303nM;mAb 14.70.2=2.185nM;mAb 14.70.4=4.606nM。此等结果证实,相对于与SIRPA结合的参考m3F9抗-SIRPA抗体,本发明的人类化抗-SIRPA抗体为更有效的竞争者。

[0481] 在原代人类巨噬细胞(huMac)上评估h3F9抗-SIRPA抗体降低SIRPA的细胞表面表达的能力。自健康供体的外周血液分离人类单核细胞且通过用人类M-CSF补充生长培养基使其在体外分化成巨噬细胞。在分化后,收集huMac且将其接种至具有递增浓度的同种型对照或可溶性抗-SIRPA抗体的96孔组织培养板上且在37℃下温育过夜。使用属于与抗-SIRPA抗体3F9不同的表位仓的DyLight650缀合的抗人类SIRPA抗体(克隆SA56),通过流动式细胞测量术分析细胞的SIRPA表面表达。如图3中所示,h3F9抗-SIRPA抗体变异体(mAb 14.70.1(70.1)、mAb 14.70.2(70.2)及mAb 14.70.4(70.4))以剂量依赖性方式下调巨噬细胞中的SIRPA受体表达水平。然而,亲本m3F9抗-SIRPA抗体展现比人类化抗体更大的最大受体下调,尽管上文所论述的抗原结合特性类似。此等结果表明,除受体参与以外的抗-SIRPA抗体特性决定了抗-SIRPA抗体3F9在巨噬细胞上的功能活性。

[0482] 实施例3:抗-SIRPA抗体的功能活性需要Fc γ 受体(Fc γ R)

[0483] 人类与鼠类3F9抗-SIRPA抗体之间的主要差异为使Fc γ 受体(Fc γ R)参与的能力。将人类化抗-SIRPA抗体移植至已知具有不良Fc γ R结合特性的人类IgG4 Fc主链上。杂交瘤m3F9抗-SIRPA抗体尽管为鼠类IgG1抗体,但仍保留对某些人类Fc γ R的结合活性。为了验证Fc γ R调节抗-SIRPA抗体的功能活性,用EndoS处理m3F9抗-SIRPA抗体以酶促移除Asn297上的Fc聚糖,一种介导IgG-Fc γ R相互作用的关键决定子。将来自2个健康供体的原代人类巨噬细胞用递增浓度的糖基化或去糖基化m3F9抗-SIRPA抗体处理过夜。随后将细胞用与不同表位仓结合的DyLight650缀合的抗-SIRPA参考抗体(SA56-DyL650)染色且随后通过FACS分

析来分析其SIRPA表面表达。

[0484] 如图4A中所示,m3F9抗-SIRPA抗体的两种糖型均显著下调SIRPA的细胞表面表达。然而,在两种供体中,与抗体的糖基化形式所观测到的最大活性相比,去糖基化m3F9抗-SIRPA抗体变异体展现降低的最大活性。详言的,糖基化m3F9抗-SIRPA抗体在供体(Dnr) 413及供体414中分别使SIRPA表达下调多达90%及85%;而去糖基化m3F9抗-SIRPA抗体在相同的供体巨噬细胞中分别仅达成70%及75% SIRPA受体下调。此发现表明,抗-SIRPA抗体,特别是抗体m3F9,需要Fc γ R参与来增强SIRPA细胞表面表达的下调。图4A中的结果呈现为通过将经抗-SIRPA抗体处理的样品的MFI值除以经同种型对照处理的样品的MFI值得到的参考抗体结合百分比。

[0485] 除了如上文所揭示的抗体介导的受体下调之外,评估Fc γ R在3F9抗-SIRPA抗体介导增强肿瘤细胞吞噬作用方面的作用。基于pHrodo荧光开发肿瘤细胞吞噬作用分析。将原代人类巨噬细胞用同种型对照抗体(MOPC)或指定抗-SIRPA 3F9抗体变异体处理过夜。将经pHrodo染料标记的Raji细胞添加至巨噬细胞中且在37℃下温育2小时。红色亲合素(Invitrogen)为与pHrodo红色染料,一种获取酸性环境中的荧光的荧光标记物缀合的链霉亲合素分子,诸如吞噬体。对于目标肿瘤细胞标记,将500nM红色亲合素与15nM生物素标记的小扁豆凝集素(Lens Culinaris Agglutinin,LCA;Vector Labs)混合。随后将红色亲合素-LCA复合物以1:1体积比与400,000个Raji细胞在无血清RPMI培养基中在冰上混合。LCA的糖结合特性将红色亲合素与肿瘤细胞表面上的碳水化合物结构连接。在短暂的洗涤步骤之后,将红色亲合素-LCA标记的Raji细胞与单核细胞衍生的人类巨噬细胞在无血清RPMI培养基中混合且在37℃下温育2小时。随后收集巨噬细胞且在冰上在含有Fc γ R阻断抗体的FACS缓冲剂中用抗-CD14 APC染色。通过计数CD14/pHrodo双阳性巨噬细胞的百分比而测量吞噬活性。作为对照,将未标记Raji细胞与巨噬细胞混合以确定背景荧光水平。图4B中的结果呈现为pHrodo/CD14双阳性巨噬细胞群体的百分比的增加倍数。

[0486] 如图4B中所示,经糖基化m3F9抗-SIRPA抗体处理过夜的巨噬细胞展示肿瘤细胞吞噬作用相对于使用经同种型对照抗体处理的巨噬细胞所观测到的肿瘤细胞吞噬作用增加约2倍。经去糖基化m3F9抗-SIRPA抗体处理的巨噬细胞展示肿瘤细胞吞噬作用相对于经同种型对照处理的巨噬细胞增加约1.5倍。肿瘤细胞吞噬作用的此约1.5倍增加表示活性相对于用糖基化m3F9抗-SIRPA抗体所观测到的活性存在约50%的统计显著降低。此外,经h3F9 IgG4 (mAb 14.70.1或mAb 14.70.2)处理的巨噬细胞不展现任何增强肿瘤细胞吞噬作用高于基线水平的能力。

[0487] 先前的研究确定了在用3F9抗-SIRPA抗体刺激巨噬细胞后增加的吞噬活性与CD14下调之间的相关性。为了确定此相关性是否亦至少部分地视Fc γ R而定,将原代人类巨噬细胞用糖基化m3F9或h3F9 IgG4抗-SIRPA抗体变异体(mAb 14.70.1、mAb 14.70.2及mAb14.70.4)处理过夜且分析肿瘤细胞吞噬作用及CD14表达。如图5A中所示,仅经m3F9抗-SIRPA抗体处理的巨噬细胞显示Raji细胞的吞噬作用相对于在经同种型对照抗体处理的巨噬细胞下观测到的吞噬作用增强。结果呈现为pHrodo/CD14双阳性巨噬细胞群体的百分比的增加倍数。人类化抗-SIRPA IgG4抗体未能增强Raji细胞的吞噬作用。同样,仅m3F9抗-SIRPA抗体刺激下调巨噬细胞上的CD14表达,而h3F9 IgG4抗-SIRPA抗体变异体不改变CD14表达(图5B)。除了支持CD14表达水平与巨噬细胞中的吞噬活性之间的相关性之外,此等结

果亦证实3F9抗-SIRPA抗体的功能活性至少部分地依赖于Fc γ R。

[0488] 实施例4: 抗-SIRPA抗体的CD32下调

[0489] 除了感兴趣的目标抗原之外, 髓样谱系的细胞亦表达多个能够与治疗性抗体的Fc域结合的Fc受体。Fc γ 受体 (Fc γ R) 构成介导Fc依赖性效应功能的经最佳表征且最有效的受体类别。Fc γ R由ITAM相关活化受体 (CD64/Fc γ RI、CD32A/Fc γ RIIA及CD16A/Fc γ RIIIA) 及携带ITIM的抑制性受体 (CD32B/Fc γ RIIB) 组成, 且活化受体/抑制性受体在相同细胞上的共表达建立细胞活化的临限值。一般而言, 由免疫复合体连接活化Fc γ R引发若干信号传导级联, 其引起细胞活化且随后诱导效应功能。此等活性在髓样细胞类型之间变化, 但可以包括抗体依赖性细胞的细胞毒性、抗体依赖性细胞吞噬作用及若干促炎性细胞因子及趋化因子的上调等。相反, 由免疫复合体连接抑制性受体Fc γ RIIB抵消活化Fc γ R的免疫刺激信号, 支持维持组织稳态。例如, 若干研究确定, 在免疫复合体介导的炎症的鼠类模型中, 敲除Fc γ RIIB促使促炎性巨噬细胞活性增强。因为Fc γ RIIB为唯一具有抑制活性的Fc γ R, 所以其在通过髓样细胞调节Fc γ R介导的炎症中起重要作用。在肿瘤微环境的情况下, Fc γ RIIB表达水平可以确定肿瘤相关巨噬细胞的极化状态及在体内巨噬细胞效应功能的调节。

[0490] 为了确定哪种Fc γ R促成3F9抗-SIRPA抗体的在体外活性, 将获自两个健康供体的单核细胞衍生的巨噬细胞用同种型对照抗体或抗-SIRPA抗体m3F9处理过夜, 且随后评定Fc γ RIIIA (CD16)、Fc γ RI (CD64) 及Fc γ RIIA/B (CD32A/B) 的表面表达水平。如图6A中所示, 相对于经同种型对照抗体处理的巨噬细胞中所观测到的表面表达而言, m3F9抗-SIRPA抗体处理实质上降低CD32A/B的表面表达。因为用于测量Fc γ RII的表面水平的侦测抗体 (克隆FUN-2; Biolegend) 不区分活化受体Fc γ RIIA与抑制性受体Fc γ RIIB, 所以用受体特异性抗体重复此分析。如先前所描述, 将获自两个健康供体的单核细胞衍生的巨噬细胞用同种型对照抗体或3F9抗-SIRPA抗体的指定变异体处理过夜。图6B显示, 相对于在经同种型对照抗体处理的细胞中观测到的Fc γ RIIA, 抗-SIRPA抗体m3F9将巨噬细胞中的Fc γ RIIA显著下调约70-85%。此效应视Fc域而定, 因为h3F9 IgG4变异体 (mAb 14.70.2) 及鼠类抗体的去糖基化形式均消除Fc γ RIIA下调。

[0491] 当评定Fc γ RIIB的表面表达时, 相对于在经同种型对照抗体处理的巨噬细胞中观测到的表达, 抗-SIRPA抗体m3F9处理将抑制性受体的表达降低至几乎不可侦测的水平 (图6B)。相反, 在经抗-SIRPA抗体3F9处理的巨噬细胞上, 相对于经同种型对照处理的细胞, Fc γ RI/CD64或Fc γ RIIIA/CD16A明显无显著下调, 指示抗-SIRPA 3F9抗体处理不改变原代人类巨噬细胞上的CD16及CD64表达 (资料未示出)。

[0492] 为了确认抗-SIRPA抗体m3F9的功能活性需要CD32A/B, 进行选择性Fc γ R阻断实验以评定Fc γ R个体对抗体介导的SIRPA下调及肿瘤细胞吞噬作用的作用。在阻断实验中, 将来自两个健康供体的原代人类巨噬细胞与抗-CD16或抗-CD32A/B阻断抗体一起在冰上预温育15分钟。随后, 将细胞与同种型对照 (MOPC21) 或m3F9抗-SIRPA抗体一起温育过夜。用DyLight650缀合的抗-SIRPA参考抗体 (SA56-DyL650) 侦测SIRPA表达。结果呈现为通过将经抗-SIRPA抗体处理的样品的MFI值除以经同种型对照处理的样品的MFI值得到的参考抗体结合百分比。如图7A中所示, 相对于在不经Fc γ R阻断抗体处理的巨噬细胞中观测到的SIRPA下调, 在抗-SIRPA抗体m3F9处理之后, CD16阻断不破坏SIRPA下调。相反, 在与抗-CD32A/B阻断抗体一起预温育的巨噬细胞中, m3F9介导的SIRPA下调显著减弱。

[0493] 为了确定CD32A/B阻断是否亦阻碍吞噬作用,将原代人类巨噬细胞与抗-CD32A/B阻断抗体一起预温育且用同种型对照抗体或抗-SIRPA抗体m3F9处理过夜。将经pHrodo染料标记的Raji细胞与巨噬细胞混合且在37℃下温育2小时。结果呈现为pHrodo/CD14双阳性巨噬细胞群体的百分比的增加倍数。如图7B中所示,来自两个供体的经m3F9处理的巨噬细胞使Raji细胞的吞噬作用相对于在经同种型对照抗体处理的巨噬细胞中观测到的吞噬作用增强约2倍。然而,CD32A/B阻断部分或完全地阻断m3F9介导的肿瘤细胞吞噬作用的增强。综合而言,此等结果确定,CD32A/B参与在功能上为抗-SIRPA抗体m3F9的活性所需。

[0494] 实施例5:h3F9抗-SIRPA抗体的亲和力成熟

[0495] 进行人类化h3F9抗-SIRPA抗体的亲和力成熟。简言之,重链或轻链中的某些氨基酸残基经选择性诱变且通过额外几轮筛选选择结合改善的突变体。此方法同时改善特异性、物种交叉反应性及可开发性概况,允许精确调整所要作用机制、生物分析中的效力及临床前模型化中所涉及的特性。表征包括Forte Bio及MSD亲和力测量、细胞结合及若干可开发性分析。在第一轮亲和力成熟之后,具有改善的亲和力的抗体亦展现改善的多特异性反应性(PSR),其用于测定抗体的非特异性结合。因此,进行第二轮亲和力成熟以在不升高PSR的情况下改善亲和力。

[0496] 抗体重链及轻链可变域序列

[0497] 使用标准技术,测定本文所述的亲和力成熟抗体的轻链可变域及重链可变域的氨基酸序列。抗体的轻链HVR序列如表7至表8中所示。抗体的轻链HVR序列如表7中所示。抗体的重链HVR序列如表8中所示。抗体的轻链及重链框架(FR)序列如表9中所示。抗体的重链可变区及轻链可变区序列如下表10中所示。

[0498] 表7

[0499] 亲和力成熟抗-SIRPA抗体的轻链HVR序列

[0500]

		SEQ ID NO:	mAb ID (3F9-#)
HVR-L1	RASKSVSSGGYSYMH	9	1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24及25
HVR-L2	LASNLES	10	1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24及25
HVR-L3	QHNRELPST	11	1、10及18
	QHNRELPCT	12	2
	QHNRELPIT	13	3、11及19
	QHNRELPPT	14	4、12及20
	QHNRELP TT	15	5、13及21
	QHNRELPVT	16	6、14及22
	QHNRELPAT	17	7、15及23
	QHNRELPGT	18	8、16及24
	QHNRELPWT	19	9、17及25

[0501] 表8

[0502] 亲和力成熟抗-SIRPA抗体的重链HVR序列

[0503]

		SEQ ID NO:	mAb ID (3F9-#)
HVR-H1	GFTFSSYAMS	20	1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、 11、12、13、14、15、16、17、18、 19、20、21、22、23、24及25
HVR-H2	TISEYGGSYTTY AESVKG	21	1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、 11、12、13、14、15、16、17、18、 19、20、21、22、23、24及25
HVR-H3	PPYDDYYGGFAY	22	1、2、3、4、5、6、7、8及9
	PPYDDYYGGFRY	23	10、11、12、13、14、15、16及17
	PPYDDYYGGFQY	24	18、19、20、21、22、23、24及25

[0504] 表9

[0505] 亲和力成熟抗-SIRPA抗体的重链及轻链框架序列

[0506]

FR	VH	SEQ ID NO:	VL	SEQ ID NO:
FR 1	EVQLLESGLVQPGG SLRLSCAAS	25	DIQLTQSPSSLASV GDRVITIC	29
FR 2	WVRQAPGKGLEWVA	26	WYQQKPGKAPKLLIY	30
FR 3	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	27	GVPSRFSGSGSGTDFT LTISVQPEDFATYYC	31
FR 4	WGQGTLLTVSS	28	FGQGTKLEIK	32

[0507] 表10

[0508]

重链可变区		
	SEQ ID NO:	mAb ID (3F9-#)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAESVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR PPYDDYYGGFAYWGQGLTVTVSS	33	1、2、3、4、5、 6、7、8及9
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAESVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR PPYDDYYGGFRYWGQGLTVTVSS	34	10、11、12、13、 14、15、16及17
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAESVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR PPYDDYYGGFQYWGQGLTVTVSS	35	18、19、20、21、 22、23、24及25
轻链可变区		
	SEQ ID NO:	mAb ID (3F9-#)
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSSGG YSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISVQPEDFATYYCQHNRELP STFGQGTKLEIK	36	1、10及18
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSSGG YSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISVQPEDFATYYCQHNRELP CTFGQGTKLEIK	37	2
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSSGG YSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISVQPEDFATYYCQHNRELP ITFGQGTKLEIK	38	3、11及19
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSSGG YSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISVQPEDFATYYCQHNRELP PTFGQGTKLEIK	39	4、12及20
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSSGG YSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISVQPEDFATYYCQHNRELP TTFGQGTKLEIK	40	5、13及21
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSSGG YSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISVQPEDFATYYCQHNRELP VTFGQGTKLEIK	41	6、14及22

[0509]

DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASKSVSSGG YSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQHNRELP ATFGQGTKLEIK	42	7、15及23
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASKSVSSGG YSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQHNRELP GTFGQGTKLEIK	43	8、16及24
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASKSVSSGG YSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQHNRELP WTFGQGTKLEIK	44	9、17及25

[0510] 实施例6:表征亲和力成熟抗-SIRPA抗体

[0511] 本文所揭示的亲和力成熟抗-SIRPA抗体的初始表征包含使用生物层干涉法 (BLI) 在Pall ForteBio Octet RED96仪器上获取抗原亲和力测量。经固定的抗小鼠IgG Fc或抗人类IgG Fc抗体分别将鼠类抗-SIRPA 3F9抗体及人类化抗-SIRPA 3F9抗体捕捉在生物传感器上。用流经所捕捉抗体3F9的25nM huSIRPA[哪种变异体?]或50nM huSIRPB1进行单循环动力学以记录迹线。使用9.0版ForteBio数据分析软件进行数据分析。使用标准动力学缓冲剂(PBS, 0.1% BSA, 0.02% Tween-20, pH 7.2) 进行分析及用于制备试剂。在缓冲剂中进行传感器平衡之后, 将抗-SIRPA抗体h3F9 (2 μ g/mL, 300秒加载时间) 或抗-SIRPA抗体h3F9的亲和力成熟变异体捕捉在抗人类IgG Fc捕捉、浸渍及读数生物传感器 (Pall ForteBio, Menlo Park, CA) 上。随后使50nM经组氨酸标记的人类SIRPA v1或人类SIRPB1 (Novoprotein, Summit, NJ, USA) 与所捕捉的抗-SIRPA抗体涂布表面结合 (200秒缔合时间, 900秒解离时间)。所得BLI信号作为与来自参考 (2 μ g/mL 3F9+0nM SIRPA) 传感器的响应的差异而获得。零配体对照 (0 μ g/mL 3F9+200nM SIRPA) 显示SIRPA与传感器尖端表面无可测量的非特异性结合。使用1:1相互作用模型进行单曲线动力学分析以提取各抗体的缔合及解离速率常数 (分别为ka及kd)。由比率kd/ka计算亲和力常数 (KD)。获得与可溶性huSIRPA及huSIRPB1结合的25种抗-SIRPA后代抗体及一种亲本抗体的传感器图谱, 且使用最佳拟合迹线计算缔合速率、解离速率及亲和力值。衍生自由此等实验获得的传感器图谱的曲线拟合分析的亲和力测量结果 (ka、kd及KD) 概述于表11中。所有亲和力成熟抗-SIRPA抗体皆没有与huSIRPB1的任何可测量的交叉反应性 (资料未示出), 且六种亲和力成熟抗-SIRPA抗体 (3F9-18、3F9-12、3F9-23、3F9-14、3F9-22及3F9-20) 展现对可溶性huSIRPA的亲和力相对于亲本抗-SIRPA抗体h3F9所观测到的亲和力增加约10倍。

[0512] 表11

[0513] 亲和力成熟h3F9抗体的结合动力学

[0514]

Ab ID (3F9-#)	K _D (M)	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)
18	4.19E-10	1.37E+05	5.74E-05
12	4.29E-10	1.39E+05	5.96E-05
23	5.39E-10	1.69E+05	9.11E-05
14	6.18E-10	1.65E+05	1.02E-04

[0515]	22	6.46E-10	1.74E+05	1.13E-04
	20	8.50E-10	1.50E+05	1.28E-04
	16	1.27E-09	1.19E+05	1.51E-04
	21	1.03E-09	1.48E+05	1.52E-04
	24	1.07E-09	1.44E+05	1.55E-04
	25	1.06E-09	1.53E+05	1.62E-04
	7	1.81E-09	9.92E+04	1.80E-04
	19	1.29E-09	1.41E+05	1.81E-04
	11	1.43E-09	1.34E+05	1.92E-04
	6	1.65E-09	1.16E+05	1.92E-04
	13	1.38E-09	1.46E+05	2.01E-04
	10	1.51E-09	1.34E+05	2.01E-04
	4	1.79E-09	1.13E+05	2.03E-04
	1	2.09E-09	1.06E+05	2.22E-04
	2	2.06E-09	1.08E+05	2.22E-04
	17	1.70E-09	1.40E+05	2.38E-04
	5	2.95E-09	9.36E+04	2.76E-04
	8	3.60E-09	7.66E+04	2.76E-04
	9	3.38E-09	8.94E+04	3.02E-04
	15	6.28E-09	5.76E+04	3.62E-04
	3	4.43E-09	9.39E+04	4.16E-04
	h3F9	6.48E-09	1.84E+05	1.19E-03

[0516] 亦进行基于细胞的亲和力测量以确定亲和力成熟3F9抗-SIRPA抗体与细胞表面表达的抗原的表观亲和力。将抗-SIRPA单克隆抗体中的每一者的连续稀释液添加至 10^5 个BWZ-huSIRPA细胞且使其在4℃下达成结合平衡。在添加经荧光标记的二抗及简单的洗涤步骤之后,经由FACS分析记录作为所滴定的抗体浓度的函数的MFI值。通过向过表达人类SIRPA的BWZ细胞添加递增浓度的3F9抗体变异体而给相对亲和力赋予EC50值(列于下文)。通过用抗人类IgG PE二抗对细胞染色来侦测受体结合抗体。使用非线性回归分析用Graphpad Prism 6软件拟合曲线。采用鼠类3F9及人类化亲和力成熟抗-SIRPA抗体的基于细胞的滴定实验显示人类化亲和力成熟抗-SIRPA抗体的EC50值改善;两种抗-SIRPA抗体显示EC50值显著改善($mAb\ 3F9-14=0.42nM$ 且 $mAb\ 3F9-22=0.49nM$),相比于用抗-SIRPA 3F9 mIgG1抗体所观测到的EC50值(0.72nM)而言。参见下表12。

[0517] 表12

[0518]		3F9-14	3F9-17	3F9-18	3F9-20	3F9-21	3F9-22	3F9-25	3F9 mIgG1
	EC50 (nM)	0.42	0.61	0.51	0.49	0.64	0.49	0.96	0.72

[0519] 实施例7:亲和力成熟抗-SIRPA抗体与SIRPA抗原变异体的交叉反应性

[0520] 人类SIRPA的CD47结合域为高度多态性的,其会妨碍能够识别在人类群体中表达的所有SIRPA等位基因变异体的CD47阻断性抗-SIRPA抗体的发展。事实上,人类SIRPA的两种最常见的等位基因(v1及v2)在序列方面亦为最不同的,在IgV域中有13个残基不同。因为CD47竞争研究确定,抗-SIRPA抗体m3F9结合不同于CD47配体结合位点的区域,所以进行结

合分析以验证人类SIRPA v1与v2之间的交叉反应性以及跨物种反应性,从而确定用于毒理学研究的相关动物模型。

[0521] 在ELISA分析中,如所指示,在4℃下在PBS中用给定物种的His或Fc标记的SIRPA以1μg/mL包被96孔Immulon HBX培养板过夜。在PBS中的5% (w/v) 牛血清白蛋白中封闭培养板1小时,之后将其用PBS/0.05% Tween 20 (PBS/T) 洗涤3次。将抗-SIRPA抗体以稀释系列添加至培养板且在室温下温育2小时,之后通过用PBS/T洗涤移除未结合抗体。随后向孔中添加辣根过氧化物酶缀合的抗小鼠IgG或抗人类κ轻链(Jackson ImmunoResearch)且温育30分钟。通过用PBS/T洗涤移除未结合抗体,之后使用四甲基联苯胺(TMB) 检测结合抗体。用2N H₂SO₄ 停止反应,之后在A450下读取培养板。

[0522] 亲本鼠类3F9抗-SIRPA抗体以类似EC₅₀值(分别为0.695及0.789nM) 结合人类SIRPA-Fc的v1及v2形式二者。在经His标记的人类抗原的情况下观测到表观亲和力部分降低,表明与Fc标记的SIRPA的更大的亲合结合。另外,亲本鼠类3F9抗-SIRPA抗体展现与Fc及His标记的食蟹猕猴SIRPA的弱交叉反应性(EC₅₀=1.09nM)。未观测到与大鼠SIRPA的可检测结合。

[0523] 在如上所述的亲本抗体的亲和力成熟之后,针对同一组SIRPA抗原筛选两种后代抗-SIRPA抗体mAb 3F9-14及mAb 3F9-22以评定交叉反应性。如同抗-SIRPA抗体m3F9一样,人类化及亲和力成熟抗-SIRPA抗体均保留针对人类SIRPA v1及v2的结合活性,但EC₅₀值显著较低,证实了在以上所述的生物传感器测量及细胞结合分析中所观测到的亲和力增加。尽管对人类SIRPA v1及v2的亲和力增加,但是抗-SIRPA抗体3F9-14展现与食蟹猕猴SIRPA的弱交叉反应性;结合曲线得到EC₅₀值(EC₅₀=0.879nM),类似于在抗-SIRPA抗体m3F9的情况下所观测到的EC₅₀值。相反,抗-SIRPA抗体3F9-22证实对食蟹猕猴SIRPA的结合活性与人类SIRPA的两种变异体等效(EC₅₀=0.107nM)。3F9-14及3F9-22抗体均不与大鼠SIRPA结合(数据未示出)。自结合曲线计算的EC₅₀列于下文且确定所有抗-SIRPA抗体皆结合人类SIRPA的两种等位基因变异体。仅抗-SIRPA抗体hu3F9-22结合食蟹猕猴SIRPA,其亲和力类似于与人类SIRPA的结合。下表13显示抗-SIRPA抗体针对各种SIRPA蛋白质的EC₅₀值(nM)。

[0524] 表13

ELISA	huSIRPA v.1 CAA71403.1	huSIRPA v.2 NP542970.1	食蟹猕猴SIRPA XPO15313153.1
3F9 mIgG1	0.789	0.695	1.089
3F9-14	0.093	0.080	0.879
3F9-22	0.108	0.082	0.107

[0526] 进行类似ELISA实验以确定抗-SIRPA抗体9C2(关于抗-SIRPA抗体9C2氨基酸序列,参见下文)及3F9针对一组不同SIRPA及SIRPB蛋白质的EC₅₀值。下表14显示此等抗-SIRPA抗体针对各种SIRP蛋白质的EC₅₀值(nM)。

[0527] 表14

	SIRPA v2	SIRPB1- Fc iso. 1	SIRPB1- Fc iso. 3	SIRPB1- His iso. 3	食蟹猕猴 SIRPA	食蟹猕猴 SIRPB1
mAb 9C2	0.3578	n.b	0.3822	0.4251	7.439	n.b.
mAb 3F9	0.3528	n.b.	0.3188	0.4353	0.6582	n.b.

[0529] 登录号:CAA71403.1 (SIRPA v2);000241.5 (SIRPB1 iso.1);Q5TFQ8.1 (SIRPB1 iso.3);NP_001271679.1 (食蟹猕猴SIRPA);XP_005568598 (食蟹猕猴SIRPB1);n.b.=无结合

[0530] 鉴于来自多个物种的SIRPA蛋白质之间的高序列类似性,如图1中所示,亦筛选抗-SIRPA抗体后代克隆针对来自各种哺乳动物物种的额外SIRPA抗原的交叉反应性。将Fc标记的猕猴SIRPA (登录号JAB51896) 或犬SIRPA (登录号XP005634938) 或兔SIRPA (登录号G1U0I5) 包被在培养板上且与递增浓度的抗-SIRPA抗体hu3F9-14及hu3F9-22一起温育。抗-SIRPA mAb 3F9-14及mAb 3F9-22二者均识别猕猴及犬SIRPA,尽管亲和力低于在人类SIRPA的情况下所观测到的亲和力。例如,3F9-14结合猕猴及犬SIRPA的EC50值分别为1.2nM及0.64nM。同样,3F9-22结合猕猴及犬SIRPA的EC50值分别为4.3nM及0.83nM。抗-SIRPA抗体克隆3F9-14及3F9-22均不结合兔SIRPA。

[0531] 实施例8:亲和力成熟抗-SIRPA抗体下调SIRPA及CD32A/B

[0532] 先前实验确定,抗-SIRPA抗体m3F9通过降低SIRPA表面表达而非竞争性地拮抗CD47与SIRPA的结合,其促使刺激巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力与CD47阻断性抗-SIRPA抗体相比增加。针对对鼠类抗体的类似功能特性的保持性,分析亲和力成熟抗-SIRPA抗体。

[0533] 因为抗-SIRPA抗体m3F9(在小鼠IgG1主链上)以Fc依赖性方式下调SIRPA及CD32A/B,所以产生嵌合抗体,其中亲本抗-SIRPA抗体m3F9的Fab序列与野生型人类IgG1的Fc域(3F9 huIgG1)或在重链中携带S267E/L328F突变的人类IgG1 Fc(3F9-SELF)融合。相对于野生型人类IgG1 Fc,Fc SELF突变使与人类Fc γ R2B/CD32B的结合增强>100倍。自健康供体的外周血液分离人类单核细胞且通过用人类M-CSF使其在体外分化成巨噬细胞。在分化后,收集huMac且将其接种至具有递增浓度的同种型对照或可溶性抗-SIRPA抗体的96孔组织培养板上且在37℃下温育过夜。使用DyLight650缀合的抗人类SIRPA抗体(克隆SA56)及FITC标记的抗-CD32A/B(FUN-2),通过流动式细胞测量术分析细胞的SIRPA及CD32A/B表面表达。与先前观测结果一致,抗-SIRPA抗体3F9 mIgG1展现SIRPA及CD32A/B的稳固的剂量依赖性下调。然而,嵌合抗-SIRPA 3F9 huIgG1抗体显示受体下调效力相比于鼠类抗体减弱(数据未示出)。此等结果提供进一步证据,抗体的Fc域在活性中起重要作用。将SELF突变工程化至嵌合3F9的Fc域上(3F9-SELF)可恢复将SIRPA及CD32A/B下调至与抗-SIRPA抗体3F9 mIgG1所观测到的类似水平的能力。此结果证实CD32A/B充当巨噬细胞上的m3F9活性的重要共受体。

[0534] 早期实验揭示,移植至人类IgG4主链上的抗-SIRPA抗体3F9的人类化变异体丧失功能活性。在人类IgG1主链上产生亲和力成熟抗-SIRPA抗体3F9变异体且评估其下调SIRPA及CD32A/B的能力,与亲本抗-SIRPA抗体m3F9及嵌合抗-SIRPA抗体3F9 huIgG1相比较。用抗-SIRPA DyLight650(克隆SA56)及抗-CD32A/B FITC(克隆FUN2)检测SIRPA及CD32A/B表达。亲和力成熟抗体3F9-14、3F9-18、3F9-20及3F9-22将SIRPA下调至与亲本抗-SIRPA m3F9抗体所观测到的类似水平(数据未示出)。然而,相同的亲和力成熟抗-SIRPA抗体仅最低限度地改善CD32A/B下调,相比于嵌合抗-SIRPA 3F9 huIgG1抗体所观测到的下调而言。此等结果指示,增强抗体与抗原的亲和力可补偿对目标受体(亦即SIRPA)下调的Fc依赖性,但不补偿与Fc γ R的Fc介导的相互作用。

[0535] 为了确定Fc工程化是否进一步增强亲和力成熟抗-SIRPA抗体的SIRPA下调,将

SELF点突变引入抗-SIRPA 3F9-22 huIgG1抗体的Fc域中。将来自4个健康供体的原代人类巨噬细胞用递增浓度的携带野生型人类IgG1 Fc或人类IgG1 S267E/L328F Fc (SELF)的人类化抗-SIRPA 3F9-22抗体处理过夜。用抗-SIRPA DyLight650 (克隆SA56) 侦测SIRPA表达。通过qPCR针对CD32A-R/H131多态性对血液供体进行基因分型。图8A及图8B展示此等实验的典型结果,比较两种Fc变异体的活性。在CD32A-H131等位基因纯合 (通过qPCR验证供体516及517) 的个体之中,抗-SIRPA 3F9-22抗体的两种Fc变异体均将SIRPA下调至与在人类巨噬细胞上观测到的水平类似的水平 (图8B)。此结果指示,增强与Fc γ R2B的结合无法增强抗体介导的SIRPA下调。

[0536] 在CD32A-H131及-R131等位基因二者均杂合的个体中,抗-SIRPA 3F9-22 hIgG1 Fc变异体显示比用SELF Fc变异体所观测到的下调更大的最大SIRPA下调 (图8A)。SELF Fc可以限制此功能,而非增强SIRPA下调。值得注意的是,SELF突变增强对CD32B以及CD32A-R131等位基因的Fc亲和力。鉴于人类巨噬细胞的CD32A表达水平大于CD32B的表达水平,来自表达CD32A-R131的个体的巨噬细胞可以隔绝抗-SIRPA抗体3F9-22远离SIRPA或CD32B以限制最大下调活性。

[0537] 下表15提供人类巨噬细胞系U937上抗体介导的SIRPA及CD32下调结果的汇总。在此等研究中,比较本发明的抗-SIRPA抗体与先前所述的抗-SIRPA抗体KWAR23 (揭示于国际专利申请公开案第W02015/138600号中)。如表15中所示,本发明的抗-SIRPA抗体下调或降低U937细胞中SIRPA的细胞表面表达,且最大下调百分比介于68%与76%之间。通过比较,抗-SIRPA抗体KWAR23仅能够将SIRPA的细胞表面表达下调9%。

[0538] 表15亦显示,本发明的抗-SIRPA抗体有效下调或降低CD32在U937细胞中的细胞表面表达。如表中所示,本发明的抗-SIRPA抗体以介于49%与73%之间的最大下调百分比下调或降低此等细胞中的CD32细胞表面表达。

[0539] 表15

抗体	SIRPA		CD32	
	IC50 (nM)	最大% DR	IC50 (nM)	最大% DR
3F9 huIgG1	0.804	68%	0.9807	49%
3F9 mIgG1	0.105	75%	0.005609	73%
3F9-14	1.17	69%	2.028	50%
3F9-18	2.19	71%	4.861	52%
3F9-20	0.152	75%	0.2706	58%
3F9-22	0.187	76%	0.4305	60%
KWAR23	15.52	9%	0.07118	63%

[0541] 实施例9:亲和力成熟抗-SIRPA抗体在巨噬细胞中降解SIRPA

[0542] 通过FACS测量抗体介导的受体下调证实,抗-SIRPA抗体的靶向参与降低细胞表面表达。为了确定内化受体是否降解及随后是否再循环至细胞表面,通过西方印迹法 (western blotting) 如下分析人类巨噬细胞的总SIRPA蛋白质水平。将单核细胞衍生的原代人类巨噬细胞用5 μ g/ml的同种型对照或抗-SIRPA 3F9-22 A330S/P331S (ASPS) Fc变异体处理过夜。收集细胞,将其用冷PBS洗涤,且用补充有HALT蛋白酶/磷酸酶抑制剂的RIPA缓冲剂在冰上裂解15分钟。将裂解细胞离心以沉淀细胞膜部分且收集涵盖总细胞裂解物的上清

液部分。如图9A中所示,将来自经同种型对照抗体或抗-SIRPA抗体3F9-22处理的巨噬细胞的递增量的细胞裂解物部分加载至SDS-PAGE上且用抗原特异性抗体对SIRPA蛋白质进行免疫印迹法。在图9A中,将5 μ g、10 μ g及20 μ g全细胞裂解物加载至SDS-PAGE上且用抗-SIRPA细胞质域(α -SIRPAct)进行免疫印迹法。在经同种型对照处理的巨噬细胞中检测到随SIRPA的预测分子量迁移的条带,但未在经抗-SIRPA 3F9-22抗体处理的巨噬细胞中观测到该条带。在类似实验中,将来自经同种型对照处理或经抗体3F9-22 ASPS处理的巨噬细胞的细胞裂解物加载至SDS-PAGE上且对SIRPA及SHP-2进行免疫印迹法,SHP-2为可以与SIRPA及其他ITIM受体缔合的酪氨酸磷酸酶。在图9B中,将20 μ g全细胞裂解物加载至SDS-PAGE上且用 α -SIRPAct及抗-SHP2探测。印迹法表明,通过mAb 3F9-22处理,SIRPA蛋白质水平降低。如图9B中所示,抗-SIRPA抗体3F9-22刺激导致SIRPA而非SHP2的降解。

[0543] 实施例10:亲和力成熟抗-SIRPA抗体刺激巨噬细胞中的肿瘤细胞吞噬作用

[0544] 先前实验证实,亲和力成熟抗-SIRPA抗体保留下调SIRPA及CD32A/B的能力,导致SIRPA在人类巨噬细胞中降解。分析本发明的亲和力成熟抗体诱导肿瘤细胞吞噬作用的能力。将原代人类巨噬细胞用同种型对照或3F9-22人类IgG1或3F9-22 SELF处理过夜以评定对抗体功能的Fc依赖性作用。将经pHrodo标记的Raji细胞与巨噬细胞混合且在37 $^{\circ}$ C下温育2小时。通过计数CD14/pHrodo双阳性巨噬细胞的百分比而测量吞噬活性。结果呈现为pHrodo/CD14双阳性巨噬细胞群体的百分比的增加倍数。另外,显示吞噬作用后的CD14表达水平。如图10A中所示,抗-SIRPA抗体3F9-22的两种Fc变异体均增强Raji细胞吞噬作用,相对于经同种型对照处理的巨噬细胞而言。尽管抗体3F9-22 SELF似乎诱导比抗体3F9-22 huIgG1更大的吞噬作用,但此差异未达到统计显著性。另外,两种抗-SIRPA 3F9-22Fc变异体均将CD14表达下调至类似程度,其指示吞噬活性及巨噬细胞活化状态的类似诱导。

[0545] 拮抗SIRPA-CD47信号传导轴的标志为调理素化肿瘤细胞的抗体依赖性吞噬作用的增强。在图10B中,评定经抗-SIRPA抗体3F9-22处理的巨噬细胞上在添加或不添加调理素化抗-CD20 huIgG1的情况下Raji细胞的吞噬作用。在经同种型对照处理的巨噬细胞中,含抗-CD20 huIgG1的调理素化Raji细胞使肿瘤细胞的吞噬作用相比于非调理素化Raji细胞增强约50%。结果呈现为pHrodo/CD14双阳性巨噬细胞群体的百分比。如先前所示,经抗-SIRPA抗体3F9-22 SELF或3F9-22 ASPS刺激的巨噬细胞将非调理素化Raji细胞的吞噬作用相对于经同种型对照处理的巨噬细胞增强约30-40%。类似地,经抗-SIRPA抗体3F9-22处理的巨噬细胞将吞噬作用相对于与抗-CD20调理素化Raji细胞混合的经对照处理的巨噬细胞增强约30%。向经抗-SIRPA抗体3F9-22处理的巨噬细胞添加抗-CD20调理素化Raji细胞显示对吞噬作用的累加效应相对于用与非调理素化Raji细胞混合的经对照处理的巨噬细胞观测到的累加效应增加约2倍。尽管抗体3F9-22的两种Fc变异体均诱导肿瘤细胞吞噬作用,但SELF Fc变异体展现比ASPS Fc变异体统计显著更大的吞噬活性。此等结果证实,本发明的亲和力成熟抗-SIRPA抗体通过拮抗SIRPA-CD47途径增强巨噬细胞中的肿瘤细胞吞噬作用。

[0546] 下表16提供关于在人类原代巨噬细胞中抗体介导的SIRPA及CD32下调测定的IC₅₀值的汇总。另外,表16显示人类原代巨噬细胞中与本发明的各种抗-SIRPA抗体有关的吞噬作用的增加倍数。在此等研究中,比较本发明的抗-SIRPA抗体与先前所述的抗-SIRPA抗体HEFLB(揭示于国际专利申请公开案第W02017/178653号中)。如表16中所示,本发明的抗-

SIRPA亲和力成熟抗体具有较低的IC50值,相比于用抗-SIRPA 3F9 huIgG1抗体观测到的IC50值而言。另外,抗-SIRPA抗体3F9-14、3F9-18、3F9-20及3F9-22显示比抗-SIRPA抗体HEFLB低的IC50值。类似地,相比于抗-SIRPA抗体HEFLB,本发明的抗-SIRPA抗体显示优选的吞噬作用活性。

[0547] 表16

抗体	SIRPA		CD32		吞噬作用*
	IC50 (nM)	最大% DR	IC50 (nM)	最大% DR	
3F9 huIgG1	0.1722	90%	0.679	67%	1.77
3F9 mIgG1	0.00905	89	0.0623	82%	1.51
3F9-14	0.0372	89%	0.135	62%	1.56
3F9-18	0.0174	90%	0.0915	65%	1.52
3F9-20	0.0283	90%	0.114	66%	1.62
3F9-22	0.0542	91%	0.133	66%	1.68
OSE HEFLB	0.0959	13%	n.d.	n.d.	1.05

[0549] n.d. = 未测定,*相对于基线活性的增加倍数

[0550] 实施例11:亲和力成熟抗-SIRPA抗体刺激M1及M2巨噬细胞中的肿瘤细胞吞噬作用

[0551] 巨噬细胞响应于微环境线索而经历深刻的表型转化,获得不同的促炎(M1)或抗炎(M2)表型。评估本发明的抗-SIRPA抗体在稳态(类M2)巨噬细胞及炎性(类M1)巨噬细胞中诱导肿瘤细胞吞噬作用的能力。使用经Ficoll1的密度梯度离心,自健康志愿者的血液分离单核细胞。通过在GM-CSF (800U/ml;Peprotech)或M-CSF (25ng/ml;Peprotech)存在下培养单核细胞6天,产生类M1及类M2巨噬细胞。将极化巨噬细胞用同种型对照抗体或抗-SIRPA抗体3F9-22 Fc变异体处理过夜。将经荧光标记的Raji细胞在存在或不存在调理素化抗-CD20 huIgG1的情况下与巨噬细胞在37℃下混合2小时。或者,将Raji细胞用单独的抗-CD47 IgG4(克隆hu5F9)或用抗-CD47及抗-CD20 huIgG1调理素化且添加至未经处理的巨噬细胞。通过计数CD14/pHrodo双阳性巨噬细胞的百分比而测量吞噬活性。

[0552] 如图11A中所示,经抗体3F9-22处理的类M2巨噬细胞的两种Fc变异体相对于经对照处理的巨噬细胞均增强肿瘤细胞吞噬作用。与先前的观测结果一致,相比于抗体3F9-22huIgG1,SELF Fc变异抗体显示非调理素化及调理素化Raji细胞的吞噬作用在统计学上显著更大的增加。此外,经抗-SIRPA抗体3F9-22 SELF处理的类M2巨噬细胞将非调理素化及调理素化Raji细胞的吞噬作用增强至与经抗-CD47 IgG4处理的Raji细胞类似的程度。

[0553] 自在GM-CSF存在下培养的单核细胞分化的类M1巨噬细胞具有不同于MCSF衍生的类M2巨噬细胞的特性。例如,GM-CSF衍生的类M1巨噬细胞降低CD14、CD32A/B及SIRPA的表达。另外,类M1巨噬细胞似乎以比衍生自相同健康供体的类M2巨噬细胞(图11B)更高的速率吞噬非调理素化Raji细胞。在用任一抗-SIRPA抗体3F9-22 Fc变异体刺激后,相对于经对照处理的巨噬细胞,类M1巨噬细胞将非调理素化Raji细胞的吞噬作用增加约50%。用抗-CD20 huIgG1调理素化Raji细胞不显示对经抗体3F9-22处理的类M1巨噬细胞的吞噬作用的累加效应,其与用类M2巨噬细胞获得的观测结果形成对比。类似地,在存在或不存在抗-CD20 huIgG1的情况下经抗-CD47 IgG4调理素化的Raji细胞当添加至类M1巨噬细胞中时亦不增加吞噬作用超过基线水平(图11B)。因为GM-CSF衍生的巨噬细胞下调FcγR表达,所以此等细

胞可具有较低的介导抗体依赖性吞噬作用的潜力。此等结果亦表明,抗-SIRPA抗体3F9-22通过拮抗SIRPA以诱导M1及M2巨噬细胞二者中的吞噬作用而起作用,而抗-CD47抗体主要充当调理素化剂,其需要类M2巨噬细胞上的FcγR的参与以诱导吞噬作用。

[0554] 实施例12: 组合疗法增强亲和力成熟抗-SIRPA抗体的抗肿瘤活性

[0555] 称为肿瘤起始细胞(tumor-initiating cell,TIC)或癌症干细胞(cancer stem cell,CSC)的癌细胞小子集形成自我维持癌细胞的储库,其具有自我更新及维持肿瘤体积的能力。有证据表明,人类实体肿瘤细胞及CSC上调CD47表达以避免免疫监视机制,允许肿瘤细胞增殖及转移。肿瘤球培养模型,其中癌细胞作为三维球状细胞丛生长,被广泛用于分析CSC的自我更新能力及更好地模拟在体内细胞生长条件。肿瘤球形成是基于在补充有生长因子,诸如表皮生长因子及碱性纤维母细胞生长因子的无血清培养基中将癌细胞培养至超低附着培养板上。将肿瘤球与原代人类巨噬细胞共培养允许关于肿瘤细胞活力评定作为单一药剂或与其他抗肿瘤疗法组合的抗-SIRPA抗体。

[0556] MDA-MB-231细胞系为先前显示形成肿瘤球的经充分表征的人类三阴性乳腺癌细胞系。为了在共培养分析中测量肿瘤细胞活力,采用用于萤光素酶及GFP的组成性表达的慢病毒转导MDA-MB-231细胞(MB231-Luc)。关于肿瘤球形成,将10,000个MB231-Luc细胞/孔接种至96孔板上补充有肝素及氢皮质酮的StemXVivo无血清肿瘤球培养基(R&D Systems)中。肿瘤球培养基亦补充有MCSF以支持巨噬细胞活力。将MB231-Luc单独或在50,000个巨噬细胞/孔存在下培养2-3天。通过添加至各孔的OneGlo试剂(Promega)测量萤光素酶活性且将样品在室温下在培养板震荡器上温育3分钟,定量肿瘤细胞活力。使用GEN5™ 2.04软件,用BioTek Synergy™微量培养板读取器侦测发光信号。

[0557] 将组成性表达萤光素酶的MDA-MB-231乳腺癌细胞单独地或在人类巨噬细胞存在下在补充有MCSF的无血清肿瘤球培养基中培养。将细胞在37℃下存在或不存在抗-SIRPA抗体3F9-22的情况下用抗-EGFR(2μg/mL)、抗-PDL1(2μg/mL)或帕利他赛(0.5μM)处理2天。作为比较,用抗-CD47 IgG4处理单独的或在巨噬细胞存在下的肿瘤细胞。通过用OneGlo底物试剂测量萤光素酶活性而定量肿瘤细胞活力。如图12A中所示,基于发光值,MB231-Luc细胞在含或不含巨噬细胞的培养物中增殖。抗-SIRPA抗体3F9-22仅在MB231-Luc细胞在巨噬细胞存在下形成肿瘤球时抑制肿瘤细胞活力。此结果证实,巨噬细胞在针对肿瘤活力优化的培养条件下保留肿瘤破坏潜力。在类似条件下,抗-CD47 IgG4不显著抑制MB231-Luc活力。

[0558] 在此肿瘤球活力分析中验证抗-SIRPA抗体3F9-22的单一药剂功效之后,进行额外研究以展现组合治疗的效果。因为肿瘤细胞活力依赖于培养基中所存在的EGF,所以当MB231-Luc细胞单独培养时,添加抗-EGFR阻断抗体显示出对肿瘤生长的显著抑制。在未经处理的巨噬细胞存在下,抗-EGFR抗体的抗肿瘤活性未增强。然而,经抗-SIRPA抗体3F9-22处理的巨噬细胞将抗-EGFR抗体的抗肿瘤活性增强至统计显著程度。在类似培养条件下,抗-PDL1抗体通过诱导强烈的肿瘤细胞凋亡而显示出意想不到的表型,无论巨噬细胞是否存在。当曝露于500nM帕利他赛时,MB231-Luc细胞活力亦降低,帕利他赛为常用于治疗多种癌症的微管稳定化学治疗剂。将帕利他赛与经抗-SIRPA抗体3F9-22处理的巨噬细胞组合亦显示肿瘤细胞活力统计显著减小。此等结果证实,本发明的抗-SIRPA抗体增强通过除肿瘤细胞调理素化以外的各种作用机制起作用的抗肿瘤疗法的活性。

[0559] 将组成性表达萤光素酶的MDA-MB-231乳腺癌细胞单独地或在人类巨噬细胞存在下在补充有MCSF或MCSF+IL-4+IL-10的无血清肿瘤球培养基中培养。如有指示,将细胞用抗-SIRPA抗体3F9-22或抗-CD47 IgG4在37℃下处理3天。通过测量在添加含有萤光素酶底物的OneGlo试剂后的发光值,定量肿瘤细胞活力。偶尔,与MB231-Luc细胞共培养的来自健康志愿者的单核细胞衍生的巨噬细胞在无处理的情况下抑制肿瘤细胞活力(图12B)。为了确保与MB231-Luc细胞共培养的巨噬细胞采用更像肿瘤的免疫抑制表型,给肿瘤球培养基补充IL-4及IL-10。如图12B中所示,单独培养的MB231-Luc细胞在补充有MCSF或MCSF加IL-4及IL-10的培养基中同样良好地增殖。然而,在仅补充有MCSF的培养基中,来自供体570的巨噬细胞将肿瘤细胞活力降低至统计显著程度。此抑制通过添加IL-4及IL-10反转,证明不同培养策略极化巨噬细胞以调节肿瘤细胞生长。重要的是,在两种生长条件下,抗-SIRPA抗体3F9-22处理巨噬细胞均显著降低肿瘤细胞活力。

[0560] 实施例13:亲和力成熟抗-SIRPA抗体增强T细胞增殖

[0561] T细胞与抗原呈递细胞(APC)形成免疫突触以起始T细胞活化及增殖。T细胞上的CD47表达可通过经由SIRPA向APC传递抑制信号来抵抗活化。然而,T细胞亦表达SIRPG,SIRP家族的能够结合在APC上表达的CD47的另一成员。SIRPG(T细胞)-CD47(APC)相互作用已显示稳定免疫突触及促进T细胞活化及增殖。尽管抗-CD47抗体阻断经由SIRPA递送的抑制信号,但是抗-CD47抗体亦阻断来自SIRPG结合的刺激效应,且因此,可以证明在产生有效的抗肿瘤T细胞反应方面是有害的。因此,拮抗性抗-SIRPA抗体通过抑制SIRPA信号传导而不破坏免疫突触中的关键相互作用来避开此潜在缺点。为了测试此假设,在单向及双向MLR分析中评估抗-SIRPA抗体。

[0562] MLR分析的原理为:衍生自一个供体的APC,通常为DC,将MHC分子上的肽呈递给自另一供体分离的T细胞。一小部分T细胞将表达能够识别MHC:肽复合物的TCR且在协同刺激后增殖。在此单向MLR中,来自一个供体的细胞参与抗原呈递且来自另一供体的细胞通过增殖作出反应。在双向MLR中,两种供体均为反应贡献APC及T细胞;因此,两个分开的T细胞群体通过增殖作出反应。

[0563] 抗-SIRPA抗体对T细胞增殖的影响最初在双向MLR分析中评定。将PBMC自健康供体分离且在递增浓度的3F9-22 Fc变异体或同种型对照存在下共培养3天。通过定量代谢活性细胞的存在作为细胞数量的指示而估计T细胞增殖。用CellTiter Glo试剂(Promega)定量代谢活性,该试剂产生与所存在的ATP的量成比例的发光信号。如图13A中所示,经抗-SIRPA抗体3F9-22处理的PBMC显示发光相对于经同种型处理的PBMC增加约1.5倍,其表明T细胞增殖增加。相比于先前所述的吞噬作用分析,抗体3F9-22 huIgG1 Fc变异体倾向于比SELF Fc变异体更有效地刺激T细胞增殖。

[0564] 为了确定抗-SIRPA抗体3F9-22所观测到的增加的发光是否特异性针对抗-SIRPA抗体,用抗-CD47抗体重复双向MLR分析。自两个健康供体分离PBMC且将100,000个来自各供体的细胞与递增浓度的测试抗体或同种型对照抗体混合在一起。在共培养3天后,用CellTiter Glo试剂测量细胞增殖。如图13B中所示,抗-SIRPA抗体3F9-14及3F9-22 huIgG1及ASPS Fc变异体将发光信号相对于经同种型对照抗体处理的PBMC所观测到的发光信号增加约70%。在相同条件下,SELF Fc上的抗-SIRPA抗体(3F9-14 SELF及3F9-22 SELF)未能相对于对照增加发光信号,建立对抗体功能的另一Fc依赖性作用。相比于抗体3F9-22huIgG1,

抗-CD47处理显示发光存在约10%的边际增加。综合而言,来自双向MLR实验的结果表明,用抗-SIRPA抗体3F9-22 huIgG1拮抗SIRPA可促进T细胞增殖。

[0565] 因为双向MLR中的定量代谢活性为T细胞增殖的间接量度,所以进行更传统的单向MLR分析以确认用抗-SIRPA抗体3F9-22 huIgG1所观测到的刺激效应。原代人类树突状细胞(DC)是衍生自健康供体的单核细胞且与经CFSE染料标记的同种异体T细胞以1:5比率共培养。将树突状细胞用抗-SIRPA抗体3F9-22 Fc变异体或抗-CD47(hu5F9)或同种型对照抗体处理且在37℃下温育5天。通过用抗CD3 APC对T细胞染色且对CFSE低群体进行闸控(gating)来测量T细胞增殖。图14A显示,相对于经同种型或抗-CD47处理的DC,经抗体3F9-22 huIgG1或ASPS处理的来自不同供体的DC将T细胞增殖增加约50%。此T细胞增殖增加与双向MLR中经抗体3F9-22 huIgG1处理的PBMC所观测到的发光增加成比例。图14B显示图14A中所呈现的资料的代表性FACS图。来自单向及双向MLR的结果由此表明,用抗-SIRPA抗体3F9-22 huIgG1拮抗SIRPA而不阻断SIRPG-CD47相互作用可促进T细胞增殖。

[0566] 实施例14:亲和力成熟抗-SIRPA抗体增强促炎性细胞因子释放

[0567] 为了进一步区分抗-SIRPA抗体3F9-22 Fc变异体的活性,将来自两个健康志愿者的原代人类巨噬细胞用丢失剂量LPS与抗-SIRPA抗体3F9-22或同种型对照抗体组合刺激过夜。在图15A中,将来自2个健康供体的原代人类巨噬细胞在37℃下用0.5ng/mL LPS与抗-SIRPA抗体3F9-22 Fc变异体或同种型对照抗体组合刺激过夜。将上清液部分收集且通过ELISA分析TNF α 水平。在图15B中,将原代人类巨噬细胞在37℃下用0.5ng/mL LPS与递增浓度的抗-SIRPA抗体3F9-22 Fc变异体或同种型对照抗体组合刺激过夜。将上清液部分收集且通过ELISA分析TNF α 释放。如图15A及图15B中所示,相对于经同种型对照抗体或抗体3F9-22 SELF协同刺激的细胞,经抗体3F9-22 ASPS协同刺激的巨噬细胞展现TNF α 分泌显著增加。抗体3F9-22 SELF Fc变异体显示最小协同刺激活性。滴定抗-SIRPA抗体显示类似模式,其中抗体3F9-22 huIgG1及ASPS变异体通过LPS预致敏巨噬细胞以剂量依赖性方式明显增加TNF α 释放,而抗体3F9-22 SELF显示TNF α 反应减弱且具有高变异性。此等结果证实,非CD47阻断抗-SIRPA抗体以Fc依赖性方式拮抗SIRPA以自ITIM信号传导释放抑制。

[0568] 实施例15:抗-SIRPA抗体结合位点的表位作图

[0569] 使用通过人类SIRPA cDNA序列的枪型诱变产生的丙氨酸扫描库进行抗-SIRPA抗体的表位作图。对编码C端V5表位标签的SIRPA表达构建体进行高通量丙氨酸扫描诱变(概述于Davidson及Doranz,2014Immunology 143,13-20中)以产生全面突变库。使代表SIRPA细胞外域的残基中的每一者(SEQ ID NO:1的氨基酸31-374)突变,大多数突变为丙氨酸,而丙氨酸密码子突变为丝氨酸。

[0570] 将排列在384孔微量培养板中的SIRPA突变体库克隆单独地转染至HEK-293T细胞中且使其表达22小时。消化抗体以产生Fab,之后将细胞与在10%正常山羊血清(normal goat serum,NGS)(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)中稀释的Fab一起温育。在库筛选之前,使用针对表达野生型SIRPA的细胞的独立免疫荧光滴定曲线确定初级Fab浓度以确保信号在线性侦测范围内。使用10%NGS中的7.5 μ g/ml AlexaFluor488缀合的二抗(Jackson ImmunoResearch Laboratories,Westgrove,PA)侦测Fab。将细胞用PBS洗涤两次且再悬浮于含0.1%BSA(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)的Cellstripper(Cellgro,Manassas,VA)中。在一些情况下,使用较为严格的条件,包括增加的pH、增加的温度及增加的解离时间。使用

Intellicyt高通量流式细胞仪 (HTFC, Intellicyt, Albuquerque, NM) 侦测平均细胞荧光。通过减去来自经模拟物转染的对照的信号且相对于来自经野生型SIRPA转染的对照的信号标准化, 相对于野生型SIRPA蛋白质反应性计算针对各突变克隆的Fab反应性。

[0571] 若库克隆内的突变残基不支持测试Fab的反应性, 但确实支持市售参考抗体MAB4546 (R&D Systems) 或额外抗-SIRPA Fab的反应性, 则将其鉴定为对Fab结合表位是“关键”的。此反向筛选 (counter-screen) 策略有助于排除局部折迭异常或具有表达缺陷的SIRPA突变体。

[0572] 国际专利申请案第PCT/US2017/65366号中描述抗-SIRPA抗体9C2。

[0573] mAb 9C2: 重链可变域序列

[0574] EFQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYSLTGYNMNWVKQSRGKSLEWIGNINPHYGSSTYNQNFKDKA TLTVDKSSSAAYMQFNLSLTSSEDSAVYYCAREGYDGVFDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 45)

[0575] mAb 9C2: 轻链可变域序列

[0576] QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIVTSNLASGVPTRFSGSGGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 46)

[0577] 下表17描绘被鉴定为在筛选中关键的所有残基的平均结合反应性及范围。初级关键残基定义为突变对于测试抗体结合为阴性 (与WT的结合<30%), 但对于对照抗体为阳性 (>80%WT) 的残基。图16描绘SIRPA的晶体结构模型 (PDB ID 2WNG; Hatherley等人, 2009, J Biol Chem, 284:26613-9), 以阴影球形式突出对于结合抗-SIRPA抗体3F9及9C2而言关键的残基。

[0578] 如表18中所指示, 抗-SIRPA抗体3F9的结合中所涉及的关键SIRPA残基包括以上所示的人类SIRPA v1序列的氨基酸残基R282、Q284及G337。抗体9C2 (如国际专利申请案第PCT/US2017/65366号中所揭示) 的结合中所涉及的关键SIRPA残基包括以上所揭示的人类SIRPA v1序列的氨基酸残基Q281、R282、Q284、L285、W287、R295、E297、V302及W315。此等残基位于SIRPA的近膜Ig域内, 该近膜Ig域在SIRPA科学文献中称为D3域, 此等残基与人类SIRPA v1序列的氨基酸254-348对应。多份已公开报导表明, 人类SIRPA的D3域与胶原凝集素 (collectin) 家族中的模式识别分子结合, 该模式识别分子亦即表面活性剂蛋白D及A (分别为Sp-D及Sp-A)。

[0579] 表17: 3F9及9C2的结合的关键残基

[0580]

结合反应性(WT%)		
突变	3F9 Fab	9C2 Fab
Q281A	151.1 (14)	14.1 (11)
R282A	3.8 (2)	4.7 (2)
Q284A	3.3 (1)	6.5 (5)
L285A	107.0 (12)	17.9 (1)
W287A	124.8 (12)	2.4 (2)
R295A	120.9 (10)	1.8 (2)
E297A	116.9 (14)	5.3 (0)
V302A	92.3 (29)	4.9 (0)
W315A	117.3 (10)	19.0 (6)
G337A	17.9 (9)	36.3 (68)

[0581] 表18:抗-SIRPA抗体结合中所涉及的残基

[0582]	抗体	关键SIRPA残基
	3F9	R282、Q284、G337
	9C2	Q281、R282、Q284、L285、W287、R295、E297、V302、W315

[0583] 实施例16:在同基因型肿瘤模型中抗-SIRP α 抗体增强检查点抑制剂的抗肿瘤活性

[0584] 靶向SIRPA-CD47途径的治疗性抗体可依靠异种移植肿瘤模型进行概念验证研究,其中免疫缺陷型NOD或NOG小鼠维持植入的人类癌细胞的生长。因为由NOD小鼠表达的鼠类SIRPA的等位基因变异体结合人类CD47,所以此相互作用允许将人类细胞植入鼠类宿主。然而,此等小鼠亦可夸大该途径的作用,因为NOD SIRPA以比人类SIRPA更大的亲和力结合人类CD47。此外,免疫缺陷型小鼠品系中的Prkdc^{SCID}及IL2R γ ^{Null}突变消除T细胞、B细胞及NK细胞,从而使得髓样细胞及先天免疫系统成为可供用于抑制肿瘤生长的仅有的效应细胞。肿瘤异种移植模型不允许询问靶向先天免疫细胞的疗法以引发或增强适应性抗肿瘤免疫反应。因此,为了在免疫胜任型动物宿主的情况下评估本发明的人类抗-SIRPA抗体,将人类SIRPA及人类CD47的基因引入C57BL6/J小鼠品系中。

[0585] 简言之,使用UCSC基因组浏览器及来自NCBI的CloneDB鉴定人造细菌染色体(Bacterial Artificial Chromosome, BAC),其携带编码人类SIRPA或编码人类CD47的核酸,且具有侧接序列以包括相关人类基因调节组件。鉴定一种BAC克隆(BACRP11-636L228),预测其含有用于人类SIRPA基因的编码序列。鉴定另一BAC克隆(BACRP11-671F8),预测其含有用于人类CD47基因的编码序列。随后通过使用标准原核注射(pronuclear injection)技术将经纯化的BAC DNA注射至小鼠C57BL6/J合子中,产生携带感兴趣的BAC克隆的小鼠。合子返回至雌性小鼠,且针对所要转基因的存在,对所得鼠类幼仔进行基因分型。随后将含有转基因的创始动物(founder animal)温育成非转基因动物,且通过PCR使用标准技术且另外通过来自动物的外周血液细胞的FACS染色,针对转基因的表达筛选后代。使携带感兴趣的各个别基因的BAC转基因小鼠异种交配以便产生表达人类SIRPA及人类CD47的“人类化”小鼠。

[0586] 除了如上所述工程化小鼠以表达人类SIRPA及人类CD47之外,亦工程化同基因型肿瘤细胞系以用人类CD47替换小鼠CD47。简言之,利用CRISPR-Cas9技术将Cas9/导引RNA(gRNA)复合物引入MC38目标细胞中。Cas9/gRNA介导被靶向区域(小鼠CD47的外显子2)处的插入或缺失形成,引起框移及/或过早停止,从而敲除内源性小鼠CD47基因的表达。在转染gRNA及Cas9之后,通过测序筛选单细胞衍生的克隆且扩增含有所要突变的纯合克隆。如图17A(上图)中所示,经抗小鼠CD47抗体染色的亲本MC38细胞及小鼠CD47敲除细胞系(MC38-mCD47K0)的FACS分析证实此等工程化细胞中缺失小鼠CD47表达。随后,用含有人类CD47基因插入的慢病毒转导MC38-mCD47K0细胞。以嘌呤霉素(puromycin)选择且扩增MC38-mCD47K0-huCD47+细胞。图17A(下图)显示FACS直方图,验证人类CD47在所选细胞群体中的表达。

[0587] 采用植入有MC38-mCD47K0-huCD47+细胞与T细胞检查点抑制剂的组合的huSIRPA/huCD47 BACtg小鼠,使用小鼠结肠癌模型在体内评估本发明的抗-SIRPA抗体的抗肿瘤作用。在此等小鼠的右侧腹皮下注射500,000个MC38细胞。当在细胞移植后大约十天将小鼠随机分组时或当肿瘤达成80mm³的平均体积时,开始抗体疗法。小鼠每周接受两次10mg/kg抗-

SIRPA抗体3F9 mIgG1或抗-SIRPA抗体3F9 mIgG2A的腹膜内(IP)注射,持续3周,与5mg/kg次最佳剂量的抗小鼠PDL1抗体(克隆10F.9G2,Bioxcell)组合。当肿瘤达到约2000mm³的体积时,将动物处死。

[0588] 图17B显示皮下植入有经工程化而缺乏小鼠CD47表达且过表达人类CD47的MC38细胞(MC38-mCD47K0/huCD47+)的huSIRPa/huCD47 BAC转基因小鼠的平均肿瘤生长曲线。将小鼠用同种型对照抗体、抗小鼠PDL1抗体、抗-SIRPA抗体3F9 mIgG1加抗小鼠PDL1抗体或抗-SIRPA抗体3F9 mIgG2A加抗小鼠PDL1抗体处理,如所指示。当肿瘤平均值为80mm³时,开始处理。如图17B中所示,相对于经同种型对照抗体处理的动物,抗-PDL1抗体处理将肿瘤生长抑制20%,其不达成统计显著性。然而,抗-PDL1抗体与抗-SIRPA抗体3F9 mIgG1或抗-SIRPA抗体3F9 mIgG2A的组合疗法在此等动物中进一步分别将肿瘤生长抑制40%及47%。图17C显示处理组内各动物的肿瘤体积的细面图。除了少许不良反应者以外,在组合疗法处理组中的大多数动物中肿瘤体积不超过1000mm³,而同种型对照组或抗-PDL1抗体单一疗法组中的若干动物中的肿瘤达到2000mm³限制。

[0589] 此等结果证实,本发明的抗-SIRPA 3F9抗体在编码人类SIRPA-CD47途径的免疫胜任型动物模式中可有效增强检查点抑制剂的抗肿瘤活性。此等结果指示,本发明的抗-SIRPA抗体适用于增强检查点抑制剂的抗肿瘤活性。因此,本发明的抗-SIRPA抗体当与检查点抑制剂疗法组合使用时可有效治疗癌症。

[0590] 实施例17:抗-SIRPα抗体下调小鼠同基因型肿瘤中的肿瘤浸润性髓样细胞上的SIRPA表达

[0591] 先前实施例证实本发明的抗-SIRPA抗体在人类SIRPA/CD47 BAC转基因小鼠中的抗肿瘤活性。为了验证抗肿瘤活性与肿瘤巨噬细胞上由抗体介导的SIRPA下调相关,在药物施用后表征肿瘤髓样细胞。

[0592] 在人类SIRPA/huCD47 BAC转基因小鼠的右侧腹皮下植入500,000个MC38-mCD47K0/huCD47+细胞。在施用抗体之前,小鼠中的肿瘤生长至约400mm³的平均体积。小鼠以3mg/kg、10mg/kg或30mg/kg间隔三天接受两次抗-SIRPA抗体3F9-22mIgG2A的IP注射。对照小鼠以10mg/kg接受2次mIgG2A同种型的IP注射。在施用第二剂量抗体之后1天、4天及8天,自小鼠收集肿瘤组织及脾脏。通过用70μm细胞过滤器进行机械解离,将脾脏处理成单细胞悬浮液。随后用PBS洗涤细胞且用ACK裂解缓冲液裂解红细胞。随后,将细胞再悬浮于由PBS/2%FBS组成的FACS缓冲液中且准备用于染色。类似地,通过用gentleMACS™解离剂(Miltenyi Biotec)进行酶促及机械解离,将肿瘤组织处理成单细胞悬浮液。将组织匀浆经由70μm细胞过滤器过滤且再悬浮于由PBS/2%FBS组成的FACS缓冲液中用于染色。根据下图对细胞染色:

[0593] 表19

[0594]

荧光染料	标志物	克隆
AmCyan (BV510)	活的/死的	
PECy7	mCD45	30-F11
Pacific Blue (BV421)	mCD11b	M1/70
PerCp/Cy5.5	mF4/80	BM8
APC/Cy7	mLy6G	1A8

AF488 (FITC)	mLy6C	HK1.4
APC	hSIRPa	SE5A5

[0595] 图18A显示在肿瘤浸润性髓样细胞(单核细胞及巨噬细胞)上SIRPA的表达随时间推移的相对变化。肿瘤相关巨噬细胞定义为CD45+CD11b+F4/80+Ly6C-Ly6G-细胞,而肿瘤浸润性单核细胞定义为CD45+CD11b+F4/80-Ly6C+Ly6G-细胞。相比于施用同种型对照抗体的动物,施用抗-SIRPA抗体的动物在抗体施用后1天显示肿瘤单核细胞及肿瘤巨噬细胞二者上的细胞表面SIRPA表达几乎降低80%。在4天或8天后,在分别施用3mg/kg或10mg/kg抗-SIRPA抗体3F9-22 mIgG2A的小鼠中,SIRPA表达返回至基线水平。在施用30mg/kg抗-SIRPA抗体3F9-22 mIgG2A的小鼠中,SIRPA表达水平稳定在低于基线约50%。

[0596] 亦对脾区室进行免疫分析以确定是否可以确定与肿瘤微环境的任何相关性。相对于在肿瘤单核细胞中观测到的情况,脾单核细胞似乎对抗体介导的受体下调更具抗性(图18B)。脾单核细胞定义为CD45+CD11b+F4/80-Ly6C+Ly6G-细胞。脾红髓巨噬细胞定义为CD45+CD11b-F4/80+Ly6C-细胞。脾单核细胞在抗体施用后一天显示约40%的最大SIRPA下调且在稍后的时间点快速恢复受体表达。另一方面,脾红髓巨噬细胞遵循与肿瘤巨噬细胞所观测到的类似的SIRPA受体表达模式。

[0597] 综合而言,此等结果证实,本发明的抗-SIRPA抗体可有效降低(下调)巨噬细胞,特别是肿瘤相关巨噬细胞上的SIRPA水平,且巨噬细胞上SIRPA水平的减小或下调与本发明的抗-SIRPA抗体的抗肿瘤活性相关。

[0598] 实施例18:在人类免疫系统(HIS)小鼠中抗-SIRPA抗体下调肿瘤浸润性髓样细胞上的SIRPA表达

[0599] 因为抗-SIRPA抗体的Fc域在受体下调及抗体功能中起作用,所以采用经人类免疫系统复原的小鼠来比较不同Fc变异体与本发明的抗-SIRPA抗体的活性。HIS小鼠模型需要在用亚致死辐射预处理后将获自脐带血的CD34+人类造血干细胞(hHSC)植入免疫缺陷小鼠(亦即NOG品系)中。HSC在外周血液、骨髓、胸腺及脾脏(以及其他组织)中稳定地发展大量的细胞谱系,尤其是淋巴细胞群体。经工程化以表达人类GM-CSF及人类IL-3的NOG小鼠(NGO-EXL;Taconic)与其他小鼠品系相比提供支持更大的髓样细胞分化的额外优点。HIS小鼠提供在植入有人类癌细胞系的小鼠中在体内研究人类肿瘤-免疫系统相互作用的机会。另外,HIS小鼠有助于评估治疗性抗体候选物在体内环境中的作用机制。

[0600] 在小鼠的侧腹区域以 3×10^6 个细胞/小鼠的细胞密度采用50%基质胶(目录354234;Corning)皮下接种A375人类黑色素瘤细胞。肿瘤生长至400mm³的平均体积,随后小鼠以10mg/kg间隔三天接受2次3F9-22 huIgG1 P331S(PS)、3F9-22 huIgG1 N325S/L328F(NSLF)或huIgG1同种型对照的IP注射。在第二次注射抗体之后1天,收集血液、脾脏及肿瘤组织。通过用70μm细胞过滤器进行机械解离,将脾脏处理成单细胞悬浮液。用PBS洗涤细胞且用ACK裂解缓冲液裂解红细胞。随后,将细胞再悬浮于由PBS/2%FBS组成的FACS缓冲液中且准备用于染色。类似地,通过用gentleMACS™解离剂(Miltenyi Biotec)进行酶促及机械解离,将肿瘤组织处理成单细胞悬浮液。将组织匀浆经由70μm细胞过滤器过滤且再悬浮于由PBS/2%FBS组成的FACS缓冲液中用于染色。用ACK裂解缓冲液处理外周血液细胞以溶解RBC且将其再悬浮于由PBS/2%FBS组成的FACS缓冲液中。根据下图对细胞染色:

[0601] 表20

	荧光染料	标志物	克隆
[0602]	PERCPCY5	CD3	SK7
	PERCPCY5	CD19	HIB19
[0603]	FITC	CD14	M5E2
	PE-Cy7	CD11b	ICRF44
	Alexa700	人类CD45	2D1
	AmCyan	活的/死的	
	APC/DyL650	SIRPA	内标
	BV421	CD16	3G8
	BUV395	HLA-DR	L243
	PE-CF594	CD163	GHI/61
	PE	CD86	IT2.2
	APC-Cy7	小鼠CD45	30-F11

[0604] 对NOG-EXL小鼠植入来自两个不同供体(供体A及B)的人类脐带血衍生的CD34+造血干细胞(HSC)。对所有小鼠皮下植入300万个A375细胞,一种人类黑色素瘤细胞系。在抗体施用之前,肿瘤生长至约400mm³的平均体积。小鼠以10mg/kg间隔三天接受两次抗-SIRPA抗体的IP注射。对照小鼠以10mg/kg接受2次huIgG1同种型的IP注射。在施用第二剂量的抗体之后1天,自小鼠收集肿瘤组织。

[0605] 图19显示在此等研究中在携带A375肿瘤的人类化NOG-EXL小鼠中抗体介导的SIRPA下调的研究设计及结果。图19A显示,对8只小鼠植入来自供体A的CD34+HSC且对29只小鼠植入来自供体B的CD34+HSC。简言之,自Taconic, NY获得植入有来自2个不同供体的CD34+HSC的40只小鼠。在植入后10周,在装运之前,通过流动式细胞测量术针对人类白细胞复原对小鼠进行质量检查。大多数小鼠(36/40)在外周血液中含有>50%huCD45+细胞。

[0606] NOG-EXL小鼠中的肿瘤相关巨噬细胞定义为CD45+CD11b+CD14+CD16+CD3-CD19-细胞。图19B显示SIRPA在人类肿瘤巨噬细胞上的表达水平,描绘为MFI值(左图)或标准化值(右图)。相比于同种型对照组,抗-SIRPA抗体处理引起来自两个供体的人类肿瘤巨噬细胞中SIRPA显著下调。各供体的标准化MFI值揭示SIRPA表达减少约70%,其近似在在体外单核细胞衍生的巨噬细胞中及在BAC转基因小鼠中的肿瘤巨噬细胞中观测到的下调程度。在此等实验中,在抗-SIRPA 3F9-22 PS Fc变异体与抗-SIRPA抗体的NSLF Fc变异体之间未观测到显著的活性差异。

[0607] 除了SIRPA表达之外,亦分析来自此等实验的肿瘤巨噬细胞以检查M1标志物的表达。肿瘤巨噬细胞定义为huCD45+huCD11b+CD14+huCD16+细胞。如图20A中所示,本发明的抗-SIRPA抗体上调HLA-DR的表达。各供体的标准化MFI值显示,抗-SIRPA抗体3F9-22 PS Fc变异体将两个供体中的HLA-DR表达相对于在同种型对照抗体处理的情况下观测到的表达增加约3倍。相比之下,抗-SIRPA抗体3F9-22 NSLF Fc变异体将HLA-DR表达相对于在同种型对照抗体处理的情况下观测到的表达增加约1.5-2倍。通过抗-SIRPA抗体3F9-22 NSLF Fc变异体,只有在供体B巨噬细胞上测量到的增加达到统计显著性。类似地,本发明的抗-SIRPA抗体仅增加在来自供体B的肿瘤巨噬细胞上的CD86表达(图20B)。尽管PS及NSLF Fc变异体二者均使CD86表达相对于同种型对照抗体组增加约40%,但是关于增加的CD86表达,

仅PS Fc变异体达成统计显著性。此等结果证实,抗-SIRPA抗体3F9-22的PS及NSLF Fc变异体二者均在人类肿瘤巨噬细胞上下调SIRPA及增加M1标志物;然而,在此等实验中,PS变异体似乎在某种程度上比NSLF变异体更有效。

[0608] 为了比较本发明的抗-SIRPA抗体在肿瘤及外周免疫区室中的活性,亦评定外周血液单核细胞及脾单核细胞中抗体介导的SIRPA下调。人类单核细胞群体定义为CD45+CD11b+CD14+CD16-CD3-CD19-细胞。小鼠以10mg/kg间隔三天接受两次抗-SIRPA抗体的IP注射。对照小鼠以10mg/kg接受2次huIgG1对照抗体的IP注射。在施用第二剂量的抗体之后1天,自小鼠收集脾脏及血液。如图21A中所示,相比于抗-SIRPA抗体3F9-22 PS Fc变异体在脾单核细胞中所观测到的SIRPA下调,抗-SIRPA抗体3F9-22 NSLF Fc变异体展现优选的SIRPA下调。然而,在外周血液单核细胞中,两种Fc变异体展现类似的活性(图21B)。本发明的抗-SIRPA抗体在衍生自供体B的单核细胞中比在衍生自供体A的单核细胞中显示更大的受体下调,其可能与SIRPA在供体B中的单核细胞上比在供体A中的单核细胞上的基线表达更高有关。

[0609] 综合而言,此等结果证实,本发明的抗-SIRPA抗体可有效下调外周血液单核细胞以及脾单核细胞中的SIRPA水平。

[0610] 实施例19: 针对选择性FcR参与工程化的抗-SIRPA抗体保留抗体介导的受体下调活性

[0611] 为了进一步评估FcR在本发明的抗-SIRPA抗体的活性方面的作用,用具有不同的FcR结合概况的不同的Fc域表达抗-SIRPA抗体3F9-22的可变域。使用生物层干涉法(BLI)在Pall ForteBio Octet RED96仪器上获得抗-SIRPA抗体Fc变异体的FcR亲和力测量。经固定的抗人类Fab-CH1抗体将人类化抗-SIRPA抗体3F9-22 Fc变异体捕捉在生物传感器上(10μg/mL,300秒加载时间)。用流经所捕捉的抗体的100nM可溶性人类FcR进行单循环动力学以记录迹线(300秒缔合时间,300秒解离时间)。使用9.0版ForteBio数据分析软件进行数据分析。使用标准动力学缓冲剂(PBS,0.1%BSA,0.02%Tween-20,pH 7.2)进行分析及用于制备试剂。

[0612] 衍生自由此等实验获得的传感器图谱的曲线拟合分析的相对亲和力测量结果概述于下表19中。Fc变异体展现所预测的FcR结合模式。例如,LALAPS Fc突变消除与除了高亲和力受体FcγR1之外的所有FcR的结合。N325S/L328F(NSLF)Fc突变特异性地消除与人类FcγR3A的结合。类似地,IgG2及IgG4同种型无法结合FcγR3A且仅IgG4保留与FcγR1的结合。

[0613] 表19

Fc变异体	FcγR1	FcγR2A	FcγR2A	FcγR2B	FcγR3A	FcγR3A
		H131	R131		F158	V158
IgG1 LALAPS	+	-	-	-	-	-
IgG1 NSLF	++	+	++	++	-	-
IgG2	-	+	+	-	-	-
IgG 4 SP	++	+	++	++	-	-

[0615] 随后评定抗-SIRPA抗体3F9-22 Fc变异体下调人类单核细胞衍生的巨噬细胞中的SIRPA表达或水平的能力。如先前所描述,自健康供体的外周血液分离人类单核细胞且通过用人类M-CSF补充生长培养基使其在体外分化成巨噬细胞。在分化后,收集人类巨噬细胞且将其接种至具有递增浓度的对照抗体或可溶性抗-SIRPA抗体的96孔组织培养板上且在37

℃下温育过夜。使用属于与抗-SIRPA抗体3F9-22不同的表位仓的DyLight650缀合的抗人类SIRPA抗体,通过流动式细胞测量术分析细胞的SIRPA细胞表面表达。

[0616] 如图22中所示及表20中所概述,抗-SIRPA抗体3F9-22的大多数Fc变异体以类似的IC50值最大限度地下调巨噬细胞上的SIRPA细胞表面水平。然而,抗-SIRPA抗体3F9-22LALAPS仅部分下调SIRPA细胞表面水平,证实在增强抗-SIRPA抗体的此活性方面涉及FcR参与。另外,因为不结合FcγR3A的Fc变异体显示与结合所有FcR的抗-SIRPA抗体3F9-22 PS类似的受体下调,表明FcγR3A参与对于抗体介导的受体内化是非必需的。

[0617] 表20

Fc变异体	IC50 (nM)	最大DR %
3F9-22 PS	0.04701	73.825
3F9-22 LALAPS	0.04468	41.575
3F9-22 NSLF	0.045125	74.61
3F9-22 IgG2	0.02185	67.955
3F9-22 IgG4	0.032415	70.455

[0619] 实施例20: 针对选择性FcR参与工程化的抗-SIRPA抗体增强巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用

[0620] 除了如上文所揭示的抗体介导的受体下调之外,采用抗-SIRPA抗体3F9-22的不同Fc变异体评估FcR在抗-SIRPA抗体介导增强肿瘤细胞吞噬作用方面的作用。另外,平行评定靶向此途径的其他抗体的吞噬活性。

[0621] 将原代人类巨噬细胞用对照抗体或指定测试抗体处理过夜。将肿瘤细胞用CFSE染料标记且添加至巨噬细胞中,在37℃下过夜。第二天,将巨噬细胞收集且在冰上用抗-CD14APC在含有FcR阻断抗体的FACS缓冲液中染色。通过计数CD14/CFSE双阳性巨噬细胞的百分比而测量吞噬活性。

[0622] 此等实验的结果显示于图23中且呈现为CD14/CFSE双阳性巨噬细胞群体的百分比的增加倍数。如图23中所示及下表21中所概述,抗-SIRPA抗体3F9-22 PS及抗-SIRPA抗体3F9-22 NSLF变异体二者均显著地增强A375黑色素瘤细胞的吞噬作用,相对于在经对照抗体处理的巨噬细胞中观测到的吞噬作用而言。所观测到的吞噬作用增强似乎与在此等研究中测试的抗-CD47抗体(aCD47)相当,其主要通过针对ADCP调理素化表达CD47的肿瘤细胞起作用。相比之下,两种不同的CD47阻断抗-SIRPA抗体KWAR23 (参见W02015/138600) 及18D5 (参见W02017/178653) 未能显示肿瘤细胞吞噬作用的任何增强。此等结果证实,抗-SIRPA抗体3F9-22的PS及NSLF Fc变异体二者均保留在不存在调理素化抗肿瘤抗原抗体的情况下增强肿瘤细胞吞噬作用的特性。因为本发明的抗-SIRPA抗体关于SIRPA/CD47相互作用是非阻断的,所以此等结果亦显示,相比于用非阻断抗-SIRPA抗体KWAR23及18D5所观测到的肿瘤细胞吞噬作用,本发明的非阻断抗-SIRPA抗体可有效增加或增强肿瘤细胞吞噬作用。

[0623] 表21

抗体	EC50 (nM)	最大值*
3F9-22PS	0.1144575	2.06925
3F9-22NSLF	0.457625	1.774
KWAR23	0.3631	1.126

18D5	2.148	1.06446667
aCD47	0.777775	2.6235

[0625] *吞噬作用相对于基线活性的增加倍数

[0626] 实施例21:抗-SIRPA抗体3F9-22变异体不诱导红细胞及血小板计数改变

[0627] 已有报导指出,施用至非人类灵长类动物的抗-CD47抗体5F9造成贫血(Liu等人,2015,PLoS ONE,DOI:10.1371/journal.pone.0137345)且施用至人类的抗-SIRPAFc TTI-621造成血小板剂量依赖性降低(Ansell等人,2016,Blood 128:1812)。为了检查本发明的抗-SIRPA抗体是否对体内红细胞计数或血小板计数造成任何影响,进行以下研究。将雌性食蟹猴分为五组且施用对照抗体、抗-SIRPA抗体3F9-22 PS、抗-SIRPA抗体3F9-22 IgG4、抗-SIRPA抗体3F9-22 IgG2或抗-SIRPA抗体3F9-22 NSLF,如下表22中所指示。通过静脉内输注经由隐静脉向动物施用抗体。

[0628] 表22

组别	雌兽数目	测试物品	给药途径	目标剂量水平	目标剂量浓度	目标剂量体积	
				(mg/kg)	(mg/mL)	(mL/kg)	
[0629]	1	3	IgG	IV	10	2.5	4
	2	3	3F9-22 PS	IV	10	2.5	4
	3	3	3F9-22 IgG4	IV	10	2.5	4
	4	3	3F9-22 IgG2	IV	10	2.5	4
	5	3	3F9-22 NSLF	IV	10	2.5	4

[0630] IV=静脉内;以推注方式给予。

[0631] 注意:第1组及第2组中的动物在第1天、第8天、第15天、第22天及第29天给药一次(总共5个剂量)。

[0632] 第3组、第4组及第5组中的动物在第1天及第29天给药一次(总共2个剂量)。

[0633] 在给药前阶段期间且随后在抗体施用后大约72、168、240、408、576、672及744小时,经由股静脉自动物收集血液一次用于红细胞(RBC)计数及血小板计数。

[0634] 如图24中所示,在此等实验的过程中,抗-SIRPA抗体3F9-22 PS、3F9-22 IgG4、3F9-22 IgG2及3F9-22 NSLF中的任一者皆不改变红细胞及血小板计数。

[0635] 本发明的某些额外抗-SIRPA抗体序列如下所示。加底线的氨基酸指示以下抗-SIRPA抗体的氨基酸序列中的某些差异。

[0636] 3F9-22-IgG1 WT重链(SEQ ID NO:47)

[0637] EVQLLES^{GGGLVQPGGSLRL}SCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAESVKGRFTISRDN^{SKNTLYLQMN}SLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFQYWGQGT^{LVTVSS}ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVT^{SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV}PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTH^{TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV}SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYK^{TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV}FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0638] 3F9-22 huIgG1 PS重链(SEQ ID NO:48)

[0639] EVQLLES^{GGGLVQPGGSLRL}SCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAESVKGRFTISRDN^{SKNTLYLQMN}SLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFQYWGQGT^{LVTVSS}ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA

LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0640] 3F9-22 SELF重链 (SEQ ID NO:49)

[0641] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAAESVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYGGFQYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFAPAIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0642] 3F9-22 hIgG1 NSLF重链 (SEQ ID NO:53)

[0643] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAAESVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYGGFQYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFAPAIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0644] 3F9-22 hIgG1 LALAPS重链 (SEQ ID NO:54)

[0645] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAAESVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYGGFQYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0646] 3F9-22 huIgG1轻链 (SEQ ID NO:50)

[0647] DIQLTQSPSSLSASVGRVTITCRASKSVSSGGYSYMHWYQQKPKGAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQHNRELPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0648] 3F9-14 huIgG1 WT重链 (SEQ ID NO:51)

[0649] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAAESVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYGGFRYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0650] 3F9-14 PS重链 (SEQ ID NO:57)

[0651] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAAESVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYGGFRYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA

LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0652] 3F9-14 SELF重链 (SEQ ID NO:52)

[0653] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAAESVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYGGFRYWGGTGLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0654] 3F9-14 NSLF重链 (SEQ ID NO:55)

[0655] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAAESVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYGGFRYWGGTGLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0656] 3F9-14 LALAPS重链 (SEQ ID NO:56)

[0657] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAAESVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYGGFRYWGGTGLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0658] 3F9-14 huIgG1轻链 (SEQ ID NO:50)

[0659] DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSSGGYSYMHYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFGSGS
GSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQHNRELPTFGGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

[0001]	序列表															
[0002]	<110> 艾利妥 (ALECTOR LLC)															
[0003]	<120> 抗-SIRPA抗体及其使用方法															
[0004]	<130> 40004-PCT															
[0005]	<140>															
[0006]	<141>															
[0007]	<150> 62/676,813															
[0008]	<151> 2018-05-25															
[0009]	<160> 70															
[0010]	<170> PatentIn version 3.5															
[0011]	<210> 1															
[0012]	<211> 504															
[0013]	<212> PRT															
[0014]	<213> 人 (Homo sapiens)															
[0015]	<400> 1															
[0016]	Met	Glu	Pro	Ala	Gly	Pro	Ala	Pro	Gly	Arg	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Cys
[0017]	1				5					10					15	
[0018]	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ser	Cys	Ala	Trp	Ser	Gly	Val	Ala	Gly	Glu	Glu
[0019]					20					25					30	
[0020]	Glu	Leu	Gln	Val	Ile	Gln	Pro	Asp	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Ala	Ala	Gly
[0021]					35					40					45	
[0022]	Glu	Thr	Ala	Thr	Leu	Arg	Cys	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Ile	Pro	Val	Gly
[0023]					50					55					60	
[0024]	Pro	Ile	Gln	Trp	Phe	Arg	Gly	Ala	Gly	Pro	Gly	Arg	Glu	Leu	Ile	Tyr
[0025]	65					70						75				80
[0026]	Asn	Gln	Lys	Glu	Gly	His	Phe	Pro	Arg	Val	Thr	Thr	Val	Ser	Asp	Leu
[0027]						85						90				95
[0028]	Thr	Lys	Arg	Asn	Asn	Met	Asp	Phe	Ser	Ile	Arg	Ile	Gly	Asn	Ile	Thr
[0029]						100						105				110
[0030]	Pro	Ala	Asp	Ala	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Val	Lys	Phe	Arg	Lys	Gly	Ser
[0031]						115									120	125
[0032]	Pro	Asp	Asp	Val	Glu	Phe	Lys	Ser	Gly	Ala	Gly	Thr	Glu	Leu	Ser	Val
[0033]						130									135	140
[0034]	Arg	Ala	Lys	Pro	Ser	Ala	Pro	Val	Val	Ser	Gly	Pro	Ala	Ala	Arg	Ala
[0035]	145						150					155				160
[0036]	Thr	Pro	Gln	His	Thr	Val	Ser	Phe	Thr	Cys	Glu	Ser	His	Gly	Phe	Ser
[0037]							165								170	175
[0038]	Pro	Arg	Asp	Ile	Thr	Leu	Lys	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Ser

[0039]	180	185	190
[0040]	Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser Tyr Ser		
[0041]	195	200	205
[0042]	Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val His Ser		
[0043]	210	215	220
[0044]	Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp Pro Leu		
[0045]	225	230	235
[0046]	Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro Thr Leu		
[0047]	245	250	255
[0048]	Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn Val Thr		
[0049]	260	265	270
[0050]	Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr Trp Leu		
[0051]	275	280	285
[0052]	Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val Thr Glu		
[0053]	290	295	300
[0054]	Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val Asn Val		
[0055]	305	310	315
[0056]	Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu His Asp		
[0057]	325	330	335
[0058]	Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser Ala His		
[0059]	340	345	350
[0060]	Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly Ser Asn		
[0061]	355	360	365
[0062]	Glu Arg Asn Ile Tyr Ile Val Val Gly Val Val Cys Thr Leu Leu Val		
[0063]	370	375	380
[0064]	Ala Leu Leu Met Ala Ala Leu Tyr Leu Val Arg Ile Arg Gln Lys Lys		
[0065]	385	390	395
[0066]	Ala Gln Gly Ser Thr Ser Ser Thr Arg Leu His Glu Pro Glu Lys Asn		
[0067]	405	410	415
[0068]	Ala Arg Glu Ile Thr Gln Asp Thr Asn Asp Ile Thr Tyr Ala Asp Leu		
[0069]	420	425	430
[0070]	Asn Leu Pro Lys Gly Lys Lys Pro Ala Pro Gln Ala Ala Glu Pro Asn		
[0071]	435	440	445
[0072]	Asn His Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Gln Thr Ser Pro Gln Pro Ala Ser		
[0073]	450	455	460
[0074]	Glu Asp Thr Leu Thr Tyr Ala Asp Leu Asp Met Val His Leu Asn Arg		
[0075]	465	470	475
[0076]	Thr Pro Lys Gln Pro Ala Pro Lys Pro Glu Pro Ser Phe Ser Glu Tyr		
[0077]	485	490	495

[0078]	Ala Ser Val Gln Val Pro Arg Lys
[0079]	500
[0080]	<210> 2
[0081]	<211> 122
[0082]	<212> PRT
[0083]	<213> 人工序列
[0084]	<220>
[0085]	<221> 来源
[0086]	<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"
[0087]	<400> 2
[0088]	Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[0089]	1 5 10 15
[0090]	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0091]	20 25 30
[0092]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
[0093]	35 40 45
[0094]	Ala Thr Ile Ser Asp Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser
[0095]	50 55 60
[0096]	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Tyr Thr Leu
[0097]	65 70 75 80
[0098]	Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
[0099]	85 90 95
[0100]	Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp
[0101]	100 105 110
[0102]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
[0103]	115 120
[0104]	<210> 3
[0105]	<211> 122
[0106]	<212> PRT
[0107]	<213> 人工序列
[0108]	<220>
[0109]	<221> 来源
[0110]	<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"
[0111]	<400> 3
[0112]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0113]	1 5 10 15
[0114]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0115]	20 25 30
[0116]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0117]	35	40	45
[0118]	Ser Thr Ile Ser Asp Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser		
[0119]	50	55	60
[0120]	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
[0121]	65	70	75
[0122]	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
[0123]	85	90	95
[0124]	Cys Ala Lys Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp		
[0125]	100	105	110
[0126]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0127]	115	120	
[0128]	<210> 4		
[0129]	<211> 122		
[0130]	<212> PRT		
[0131]	<213> 人工序列		
[0132]	<220>		
[0133]	<221> 来源		
[0134]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"		
[0135]	<400> 4		
[0136]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0137]	1	5	10
[0138]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0139]	20	25	30
[0140]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0141]	35	40	45
[0142]	Ala Thr Ile Ser Asp Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser		
[0143]	50	55	60
[0144]	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
[0145]	65	70	75
[0146]	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
[0147]	85	90	95
[0148]	Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp		
[0149]	100	105	110
[0150]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0151]	115	120	
[0152]	<210> 5		
[0153]	<211> 111		
[0154]	<212> PRT		
[0155]	<213> 人工序列		

[0156] <220>
 [0157] <221> 来源
 [0158] <223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"
 [0159] <400> 5
 [0160] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 [0161] 1 5 10 15
 [0162] Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser
 [0163] 20 25 30
 [0164] Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 [0165] 35 40 45
 [0166] Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 [0167] 50 55 60
 [0168] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 [0169] 65 70 75 80
 [0170] Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg
 [0171] 85 90 95
 [0172] Glu Leu Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0173] 100 105 110
 [0174] <210> 6
 [0175] <211> 111
 [0176] <212> PRT
 [0177] <213> 人工序列
 [0178] <220>
 [0179] <221> 来源
 [0180] <223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"
 [0181] <400> 6
 [0182] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [0183] 1 5 10 15
 [0184] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser
 [0185] 20 25 30
 [0186] Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 [0187] 35 40 45
 [0188] Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 [0189] 50 55 60
 [0190] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 [0191] 65 70 75 80
 [0192] Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg
 [0193] 85 90 95
 [0194] Glu Leu Pro Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0195]	100	105	110
[0196]	<210> 7		
[0197]	<211> 111		
[0198]	<212> PRT		
[0199]	<213> 人工序列		
[0200]	<220>		
[0201]	<221> 来源		
[0202]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"		
[0203]	<400> 7		
[0204]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0205]	1	5	10
[0206]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser		
[0207]	20	25	30
[0208]	Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro		
[0209]	35	40	45
[0210]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser		
[0211]	50	55	60
[0212]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
[0213]	65	70	75
[0214]	Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg		
[0215]	85	90	95
[0216]	Glu Leu Pro Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0217]	100	105	110
[0218]	<210> 8		
[0219]	<211> 111		
[0220]	<212> PRT		
[0221]	<213> 人工序列		
[0222]	<220>		
[0223]	<221> 来源		
[0224]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"		
[0225]	<400> 8		
[0226]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Val Gly		
[0227]	1	5	10
[0228]	Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser		
[0229]	20	25	30
[0230]	Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro		
[0231]	35	40	45
[0232]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser		
[0233]	50	55	60

[0234]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[0235]	65 70 75 80
[0236]	Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg
[0237]	85 90 95
[0238]	Glu Leu Pro Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0239]	100 105 110
[0240]	<210> 9
[0241]	<211> 15
[0242]	<212> PRT
[0243]	<213> 人工序列
[0244]	<220>
[0245]	<221> 来源
[0246]	<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
[0247]	<400> 9
[0248]	Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Gly Gly Tyr Ser Tyr Met His
[0249]	1 5 10 15
[0250]	<210> 10
[0251]	<211> 7
[0252]	<212> PRT
[0253]	<213> 人工序列
[0254]	<220>
[0255]	<221> 来源
[0256]	<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
[0257]	<400> 10
[0258]	Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
[0259]	1 5
[0260]	<210> 11
[0261]	<211> 9
[0262]	<212> PRT
[0263]	<213> 人工序列
[0264]	<220>
[0265]	<221> 来源
[0266]	<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
[0267]	<400> 11
[0268]	Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Ser Thr
[0269]	1 5
[0270]	<210> 12
[0271]	<211> 9
[0272]	<212> PRT

[0273] <213> 人工序列
[0274] <220>
[0275] <221> 来源
[0276] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
[0277] <400> 12
[0278] Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Cys Thr
[0279] 1 5
[0280] <210> 13
[0281] <211> 9
[0282] <212> PRT
[0283] <213> 人工序列
[0284] <220>
[0285] <221> 来源
[0286] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
[0287] <400> 13
[0288] Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Ile Thr
[0289] 1 5
[0290] <210> 14
[0291] <211> 9
[0292] <212> PRT
[0293] <213> 人工序列
[0294] <220>
[0295] <221> 来源
[0296] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
[0297] <400> 14
[0298] Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Pro Thr
[0299] 1 5
[0300] <210> 15
[0301] <211> 9
[0302] <212> PRT
[0303] <213> 人工序列
[0304] <220>
[0305] <221> 来源
[0306] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
[0307] <400> 15
[0308] Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Thr Thr
[0309] 1 5
[0310] <210> 16
[0311] <211> 9

[0312] <212> PRT
[0313] <213> 人工序列
[0314] <220>
[0315] <221> 来源
[0316] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
[0317] <400> 16
[0318] Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Val Thr
[0319] 1 5
[0320] <210> 17
[0321] <211> 9
[0322] <212> PRT
[0323] <213> 人工序列
[0324] <220>
[0325] <221> 来源
[0326] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
[0327] <400> 17
[0328] Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Ala Thr
[0329] 1 5
[0330] <210> 18
[0331] <211> 9
[0332] <212> PRT
[0333] <213> 人工序列
[0334] <220>
[0335] <221> 来源
[0336] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
[0337] <400> 18
[0338] Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Gly Thr
[0339] 1 5
[0340] <210> 19
[0341] <211> 9
[0342] <212> PRT
[0343] <213> 人工序列
[0344] <220>
[0345] <221> 来源
[0346] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
[0347] <400> 19
[0348] Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Trp Thr
[0349] 1 5
[0350] <210> 20

[0351] <211> 10
[0352] <212> PRT
[0353] <213> 人工序列
[0354] <220>
[0355] <221> 来源
[0356] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
[0357] <400> 20
[0358] Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
[0359] 1 5 10
[0360] <210> 21
[0361] <211> 18
[0362] <212> PRT
[0363] <213> 人工序列
[0364] <220>
[0365] <221> 来源
[0366] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
[0367] <400> 21
[0368] Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
[0369] 1 5 10 15
[0370] Lys Gly
[0371] <210> 22
[0372] <211> 12
[0373] <212> PRT
[0374] <213> 人工序列
[0375] <220>
[0376] <221> 来源
[0377] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
[0378] <400> 22
[0379] Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr
[0380] 1 5 10
[0381] <210> 23
[0382] <211> 12
[0383] <212> PRT
[0384] <213> 人工序列
[0385] <220>
[0386] <221> 来源
[0387] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
[0388] <400> 23
[0389] Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Arg Tyr

[0390]	1	5	10
[0391]	<210> 24		
[0392]	<211> 12		
[0393]	<212> PRT		
[0394]	<213> 人工序列		
[0395]	<220>		
[0396]	<221> 来源		
[0397]	<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"		
[0398]	<400> 24		
[0399]	Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln Tyr		
[0400]	1	5	10
[0401]	<210> 25		
[0402]	<211> 25		
[0403]	<212> PRT		
[0404]	<213> 人工序列		
[0405]	<220>		
[0406]	<221> 来源		
[0407]	<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"		
[0408]	<400> 25		
[0409]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0410]	1	5	10 15
[0411]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser		
[0412]	20		25
[0413]	<210> 26		
[0414]	<211> 14		
[0415]	<212> PRT		
[0416]	<213> 人工序列		
[0417]	<220>		
[0418]	<221> 来源		
[0419]	<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"		
[0420]	<400> 26		
[0421]	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala		
[0422]	1	5	10
[0423]	<210> 27		
[0424]	<211> 32		
[0425]	<212> PRT		
[0426]	<213> 人工序列		
[0427]	<220>		
[0428]	<221> 来源		

[0429] <223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"
 [0430] <400> 27
 [0431] Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 [0432] 1 5 10 15
 [0433] Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 [0434] 20 25 30
 [0435] <210> 28
 [0436] <211> 11
 [0437] <212> PRT
 [0438] <213> 人工序列
 [0439] <220>
 [0440] <221> 来源
 [0441] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
 [0442] <400> 28
 [0443] Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0444] 1 5 10
 [0445] <210> 29
 [0446] <211> 23
 [0447] <212> PRT
 [0448] <213> 人工序列
 [0449] <220>
 [0450] <221> 来源
 [0451] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
 [0452] <400> 29
 [0453] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [0454] 1 5 10 15
 [0455] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 [0456] 20
 [0457] <210> 30
 [0458] <211> 15
 [0459] <212> PRT
 [0460] <213> 人工序列
 [0461] <220>
 [0462] <221> 来源
 [0463] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
 [0464] <400> 30
 [0465] Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 [0466] 1 5 10 15
 [0467] <210> 31

[0468]	<211>	32
[0469]	<212>	PRT
[0470]	<213>	人工序列
[0471]	<220>	
[0472]	<221>	来源
[0473]	<223>	/注释=“人工序列的描述：合成多肽”
[0474]	<400>	31
[0475]	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
[0476]	1 5 10 15	
[0477]	Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys	
[0478]	20 25 30	
[0479]	<210>	32
[0480]	<211>	10
[0481]	<212>	PRT
[0482]	<213>	人工序列
[0483]	<220>	
[0484]	<221>	来源
[0485]	<223>	/注释=“人工序列的描述：合成肽”
[0486]	<400>	32
[0487]	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[0488]	1 5 10	
[0489]	<210>	33
[0490]	<211>	122
[0491]	<212>	PRT
[0492]	<213>	人工序列
[0493]	<220>	
[0494]	<221>	来源
[0495]	<223>	/注释=“人工序列的描述：合成多肽”
[0496]	<400>	33
[0497]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[0498]	1 5 10 15	
[0499]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
[0500]	20 25 30	
[0501]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[0502]	35 40 45	
[0503]	Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser	
[0504]	50 55 60	
[0505]	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu	
[0506]	65 70 75 80	

[0507]	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[0508]	85 90 95
[0509]	Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp
[0510]	100 105 110
[0511]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0512]	115 120
[0513]	<210> 34
[0514]	<211> 122
[0515]	<212> PRT
[0516]	<213> 人工序列
[0517]	<220>
[0518]	<221> 来源
[0519]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"
[0520]	<400> 34
[0521]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0522]	1 5 10 15
[0523]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0524]	20 25 30
[0525]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0526]	35 40 45
[0527]	Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
[0528]	50 55 60
[0529]	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
[0530]	65 70 75 80
[0531]	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[0532]	85 90 95
[0533]	Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Arg Tyr Trp
[0534]	100 105 110
[0535]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0536]	115 120
[0537]	<210> 35
[0538]	<211> 122
[0539]	<212> PRT
[0540]	<213> 人工序列
[0541]	<220>
[0542]	<221> 来源
[0543]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"
[0544]	<400> 35
[0545]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0546]	1	5	10	15
[0547]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
[0548]	20	25	30	
[0549]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0550]	35	40	45	
[0551]	Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser			
[0552]	50	55	60	
[0553]	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu			
[0554]	65	70	75	80
[0555]	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
[0556]	85	90	95	
[0557]	Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln Tyr Trp			
[0558]	100	105	110	
[0559]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0560]	115	120		
[0561]	<210> 36			
[0562]	<211> 111			
[0563]	<212> PRT			
[0564]	<213> 人工序列			
[0565]	<220>			
[0566]	<221> 来源			
[0567]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"			
[0568]	<400> 36			
[0569]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[0570]	1	5	10	15
[0571]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Gly			
[0572]	20	25	30	
[0573]	Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro			
[0574]	35	40	45	
[0575]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser			
[0576]	50	55	60	
[0577]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
[0578]	65	70	75	80
[0579]	Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg			
[0580]	85	90	95	
[0581]	Glu Leu Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0582]	100	105	110	
[0583]	<210> 37			
[0584]	<211> 111			

[0585]	<212>	PRT
[0586]	<213>	人工序列
[0587]	<220>	
[0588]	<221>	来源
[0589]	<223>	/注释="人工序列的描述：合成多肽"
[0590]	<400>	37
[0591]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0592]	1 5 10 15	
[0593]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Gly	
[0594]	20 25 30	
[0595]	Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
[0596]	35 40 45	
[0597]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser	
[0598]	50 55 60	
[0599]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
[0600]	65 70 75 80	
[0601]	Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg	
[0602]	85 90 95	
[0603]	Glu Leu Pro Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[0604]	100 105 110	
[0605]	<210>	38
[0606]	<211>	111
[0607]	<212>	PRT
[0608]	<213>	人工序列
[0609]	<220>	
[0610]	<221>	来源
[0611]	<223>	/注释="人工序列的描述：合成多肽"
[0612]	<400>	38
[0613]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0614]	1 5 10 15	
[0615]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Gly	
[0616]	20 25 30	
[0617]	Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
[0618]	35 40 45	
[0619]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser	
[0620]	50 55 60	
[0621]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
[0622]	65 70 75 80	
[0623]	Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg	

[0624]		85		90		95
[0625]	Glu Leu Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
[0626]		100		105		110
[0627]	<210> 39					
[0628]	<211> 111					
[0629]	<212> PRT					
[0630]	<213> 人工序列					
[0631]	<220>					
[0632]	<221> 来源					
[0633]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"					
[0634]	<400> 39					
[0635]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly					
[0636]	1	5		10		15
[0637]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Gly					
[0638]		20		25		30
[0639]	Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro					
[0640]		35		40		45
[0641]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser					
[0642]		50		55		60
[0643]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser					
[0644]	65	70		75		80
[0645]	Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg					
[0646]		85		90		95
[0647]	Glu Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
[0648]		100		105		110
[0649]	<210> 40					
[0650]	<211> 111					
[0651]	<212> PRT					
[0652]	<213> 人工序列					
[0653]	<220>					
[0654]	<221> 来源					
[0655]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"					
[0656]	<400> 40					
[0657]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly					
[0658]	1	5		10		15
[0659]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Gly					
[0660]		20		25		30
[0661]	Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro					
[0662]		35		40		45

[0663] Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 [0664] 50 55 60
 [0665] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 [0666] 65 70 75 80
 [0667] Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg
 [0668] 85 90 95
 [0669] Glu Leu Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0670] 100 105 110
 [0671] <210> 41
 [0672] <211> 111
 [0673] <212> PRT
 [0674] <213> 人工序列
 [0675] <220>
 [0676] <221> 来源
 [0677] <223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"
 [0678] <400> 41
 [0679] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [0680] 1 5 10 15
 [0681] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Gly
 [0682] 20 25 30
 [0683] Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 [0684] 35 40 45
 [0685] Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 [0686] 50 55 60
 [0687] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 [0688] 65 70 75 80
 [0689] Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg
 [0690] 85 90 95
 [0691] Glu Leu Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0692] 100 105 110
 [0693] <210> 42
 [0694] <211> 111
 [0695] <212> PRT
 [0696] <213> 人工序列
 [0697] <220>
 [0698] <221> 来源
 [0699] <223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"
 [0700] <400> 42
 [0701] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0702]	1	5	10	15
[0703]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Gly			
[0704]	20	25	30	
[0705]	Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro			
[0706]	35	40	45	
[0707]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser			
[0708]	50	55	60	
[0709]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
[0710]	65	70	75	80
[0711]	Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg			
[0712]	85	90	95	
[0713]	Glu Leu Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0714]	100	105	110	
[0715]	<210> 43			
[0716]	<211> 111			
[0717]	<212> PRT			
[0718]	<213> 人工序列			
[0719]	<220>			
[0720]	<221> 来源			
[0721]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"			
[0722]	<400> 43			
[0723]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[0724]	1	5	10	15
[0725]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Gly			
[0726]	20	25	30	
[0727]	Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro			
[0728]	35	40	45	
[0729]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser			
[0730]	50	55	60	
[0731]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
[0732]	65	70	75	80
[0733]	Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg			
[0734]	85	90	95	
[0735]	Glu Leu Pro Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0736]	100	105	110	
[0737]	<210> 44			
[0738]	<211> 111			
[0739]	<212> PRT			
[0740]	<213> 人工序列			

[0741] <220>
 [0742] <221> 来源
 [0743] <223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"
 [0744] <400> 44
 [0745] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [0746] 1 5 10 15
 [0747] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Gly
 [0748] 20 25 30
 [0749] Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 [0750] 35 40 45
 [0751] Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 [0752] 50 55 60
 [0753] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 [0754] 65 70 75 80
 [0755] Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg
 [0756] 85 90 95
 [0757] Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0758] 100 105 110
 [0759] <210> 45
 [0760] <211> 118
 [0761] <212> PRT
 [0762] <213> 人工序列
 [0763] <220>
 [0764] <221> 来源
 [0765] <223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"
 [0766] <400> 45
 [0767] Glu Phe Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 [0768] 1 5 10 15
 [0769] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Leu Thr Gly Tyr
 [0770] 20 25 30
 [0771] Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Arg Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 [0772] 35 40 45
 [0773] Gly Asn Ile Asn Pro His Tyr Gly Ser Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe
 [0774] 50 55 60
 [0775] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr
 [0776] 65 70 75 80
 [0777] Met Gln Phe Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0778] 85 90 95
 [0779] Ala Arg Glu Gly Tyr Asp Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

[0780]		100		105		110
[0781]	Thr Leu Thr Val Ser Ser					
[0782]		115				
[0783]	<210> 46					
[0784]	<211> 106					
[0785]	<212> PRT					
[0786]	<213> 人工序列					
[0787]	<220>					
[0788]	<221> 来源					
[0789]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"					
[0790]	<400> 46					
[0791]	Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly					
[0792]	1	5		10		15
[0793]	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met					
[0794]		20		25		30
[0795]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr					
[0796]		35		40		45
[0797]	Val Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser					
[0798]		50		55		60
[0799]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu					
[0800]	65	70		75		80
[0801]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Arg Thr					
[0802]		85		90		95
[0803]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
[0804]		100		105		
[0805]	<210> 47					
[0806]	<211> 452					
[0807]	<212> PRT					
[0808]	<213> 人工序列					
[0809]	<220>					
[0810]	<221> 来源					
[0811]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"					
[0812]	<400> 47					
[0813]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly					
[0814]	1	5		10		15
[0815]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr					
[0816]		20		25		30
[0817]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val					
[0818]		35		40		45

[0819]	Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
[0820]	50 55 60
[0821]	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
[0822]	65 70 75 80
[0823]	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[0824]	85 90 95
[0825]	Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln Tyr Trp
[0826]	100 105 110
[0827]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[0828]	115 120 125
[0829]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
[0830]	130 135 140
[0831]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[0832]	145 150 155 160
[0833]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[0834]	165 170 175
[0835]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[0836]	180 185 190
[0837]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
[0838]	195 200 205
[0839]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
[0840]	210 215 220
[0841]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
[0842]	225 230 235 240
[0843]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[0844]	245 250 255
[0845]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[0846]	260 265 270
[0847]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[0848]	275 280 285
[0849]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
[0850]	290 295 300
[0851]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
[0852]	305 310 315 320
[0853]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
[0854]	325 330 335
[0855]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[0856]	340 345 350
[0857]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

[0858]	355	360	365
[0859]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
[0860]	370	375	380
[0861]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
[0862]	385	390	395
[0863]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
[0864]	405	410	415
[0865]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
[0866]	420	425	430
[0867]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
[0868]	435	440	445
[0869]	Ser Pro Gly Lys		
[0870]	450		
[0871]	<210> 48		
[0872]	<211> 452		
[0873]	<212> PRT		
[0874]	<213> 人工序列		
[0875]	<220>		
[0876]	<221> 来源		
[0877]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"		
[0878]	<400> 48		
[0879]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0880]	1	5	10
[0881]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0882]	20	25	30
[0883]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0884]	35	40	45
[0885]	Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser		
[0886]	50	55	60
[0887]	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
[0888]	65	70	75
[0889]	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
[0890]	85	90	95
[0891]	Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln Tyr Trp		
[0892]	100	105	110
[0893]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
[0894]	115	120	125
[0895]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
[0896]	130	135	140

[0897]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[0898]	145 150 155 160
[0899]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[0900]	165 170 175
[0901]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[0902]	180 185 190
[0903]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
[0904]	195 200 205
[0905]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
[0906]	210 215 220
[0907]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
[0908]	225 230 235 240
[0909]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[0910]	245 250 255
[0911]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[0912]	260 265 270
[0913]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[0914]	275 280 285
[0915]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
[0916]	290 295 300
[0917]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
[0918]	305 310 315 320
[0919]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
[0920]	325 330 335
[0921]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[0922]	340 345 350
[0923]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
[0924]	355 360 365
[0925]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[0926]	370 375 380
[0927]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[0928]	385 390 395 400
[0929]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
[0930]	405 410 415
[0931]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[0932]	420 425 430
[0933]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[0934]	435 440 445
[0935]	Ser Pro Gly Lys

[0936]	450															
[0937]	<210> 49															
[0938]	<211> 452															
[0939]	<212> PRT															
[0940]	<213> 人工序列															
[0941]	<220>															
[0942]	<221> 来源															
[0943]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"															
[0944]	<400> 49															
[0945]	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
[0946]	1				5					10					15	
[0947]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
[0948]				20					25					30		
[0949]	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
[0950]			35					40					45			
[0951]	Ala	Thr	Ile	Ser	Glu	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Ser
[0952]		50					55					60				
[0953]	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu
[0954]	65					70				75						80
[0955]	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
[0956]					85					90					95	
[0957]	Cys	Ala	Arg	Pro	Pro	Tyr	Asp	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Phe	Gln	Tyr	Trp
[0958]				100					105					110		
[0959]	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
[0960]			115					120					125			
[0961]	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
[0962]		130					135					140				
[0963]	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
[0964]	145					150					155					160
[0965]	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
[0966]					165					170					175	
[0967]	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
[0968]				180					185					190		
[0969]	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
[0970]			195					200					205			
[0971]	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
[0972]		210					215					220				
[0973]	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
[0974]	225					230					235					240

[0975]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
[0976]		245	250
[0977]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu		
[0978]		260	265
[0979]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
[0980]		275	280
[0981]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
[0982]		290	295
[0983]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
[0984]	305	310	315
[0985]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro		
[0986]		325	330
[0987]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
[0988]		340	345
[0989]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val		
[0990]		355	360
[0991]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
[0992]		370	375
[0993]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
[0994]	385	390	395
[0995]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
[0996]		405	410
[0997]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
[0998]		420	425
[0999]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
[1000]		435	440
[1001]	Ser Pro Gly Lys		
[1002]		450	
[1003]	<210> 50		
[1004]	<211> 218		
[1005]	<212> PRT		
[1006]	<213> 人工序列		
[1007]	<220>		
[1008]	<221> 来源		
[1009]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"		
[1010]	<400> 50		
[1011]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[1012]	1	5	10
[1013]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Gly		

[1053]	Ala	Thr	Ile	Ser	Glu	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Ser
[1054]	50						55					60				
[1055]	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu
[1056]	65					70				75					80	
[1057]	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
[1058]					85					90					95	
[1059]	Cys	Ala	Arg	Pro	Pro	Tyr	Asp	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Phe	Arg	Tyr	Trp
[1060]				100					105					110		
[1061]	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
[1062]				115					120					125		
[1063]	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
[1064]		130					135					140				
[1065]	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
[1066]	145					150				155						160
[1067]	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
[1068]				165					170						175	
[1069]	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
[1070]				180					185					190		
[1071]	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
[1072]			195					200					205			
[1073]	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
[1074]		210					215					220				
[1075]	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
[1076]	225					230				235						240
[1077]	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
[1078]				245					250					255		
[1079]	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
[1080]				260					265					270		
[1081]	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
[1082]			275					280					285			
[1083]	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
[1084]		290					295					300				
[1085]	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
[1086]	305					310				315						320
[1087]	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
[1088]				325					330				335			
[1089]	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
[1090]				340				345					350			
[1091]	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val

[1092]	355	360	365
[1093]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
[1094]	370	375	380
[1095]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
[1096]	385	390	395 400
[1097]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
[1098]	405	410	415
[1099]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
[1100]	420	425	430
[1101]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
[1102]	435	440	445
[1103]	Ser Pro Gly Lys		
[1104]	450		
[1105]	<210> 52		
[1106]	<211> 452		
[1107]	<212> PRT		
[1108]	<213> 人工序列		
[1109]	<220>		
[1110]	<221> 来源		
[1111]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"		
[1112]	<400> 52		
[1113]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[1114]	1 5 10 15		
[1115]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[1116]	20 25 30		
[1117]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[1118]	35 40 45		
[1119]	Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser		
[1120]	50 55 60		
[1121]	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
[1122]	65 70 75 80		
[1123]	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
[1124]	85 90 95		
[1125]	Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Arg Tyr Trp		
[1126]	100 105 110		
[1127]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
[1128]	115 120 125		
[1129]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
[1130]	130 135 140		

[1131]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[1132]	145 150 155 160
[1133]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[1134]	165 170 175
[1135]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[1136]	180 185 190
[1137]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
[1138]	195 200 205
[1139]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
[1140]	210 215 220
[1141]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
[1142]	225 230 235 240
[1143]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[1144]	245 250 255
[1145]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
[1146]	260 265 270
[1147]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[1148]	275 280 285
[1149]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
[1150]	290 295 300
[1151]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
[1152]	305 310 315 320
[1153]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
[1154]	325 330 335
[1155]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[1156]	340 345 350
[1157]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
[1158]	355 360 365
[1159]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[1160]	370 375 380
[1161]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[1162]	385 390 395 400
[1163]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
[1164]	405 410 415
[1165]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[1166]	420 425 430
[1167]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[1168]	435 440 445
[1169]	Ser Pro Gly Lys

[1209]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
[1210]		245	250
[1211]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
[1212]		260	265
[1213]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
[1214]		275	280
[1215]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
[1216]		290	295
[1217]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
[1218]	305	310	315
[1219]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Ala Phe Pro Ala Pro		
[1220]		325	330
[1221]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
[1222]		340	345
[1223]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val		
[1224]		355	360
[1225]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
[1226]		370	375
[1227]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
[1228]	385	390	395
[1229]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
[1230]		405	410
[1231]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
[1232]		420	425
[1233]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
[1234]		435	440
[1235]	Ser Pro Gly Lys		
[1236]		450	
[1237]	<210> 54		
[1238]	<211> 452		
[1239]	<212> PRT		
[1240]	<213> 人工序列		
[1241]	<220>		
[1242]	<221> 来源		
[1243]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"		
[1244]	<400> 54		
[1245]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[1246]	1	5	10
[1247]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		

[1248]	20	25	30
[1249]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[1250]	35	40	45
[1251]	Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser		
[1252]	50	55	60
[1253]	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
[1254]	65	70	75
[1255]	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
[1256]	85	90	95
[1257]	Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln Tyr Trp		
[1258]	100	105	110
[1259]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
[1260]	115	120	125
[1261]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
[1262]	130	135	140
[1263]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
[1264]	145	150	155
[1265]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
[1266]	165	170	175
[1267]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
[1268]	180	185	190
[1269]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
[1270]	195	200	205
[1271]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
[1272]	210	215	220
[1273]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala		
[1274]	225	230	235
[1275]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
[1276]	245	250	255
[1277]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
[1278]	260	265	270
[1279]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
[1280]	275	280	285
[1281]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
[1282]	290	295	300
[1283]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
[1284]	305	310	315
[1285]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser		
[1286]	325	330	335

[1287]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[1288]	340 345 350
[1289]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
[1290]	355 360 365
[1291]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[1292]	370 375 380
[1293]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[1294]	385 390 395 400
[1295]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
[1296]	405 410 415
[1297]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[1298]	420 425 430
[1299]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[1300]	435 440 445
[1301]	Ser Pro Gly Lys
[1302]	450
[1303]	<210> 55
[1304]	<211> 452
[1305]	<212> PRT
[1306]	<213> 人工序列
[1307]	<220>
[1308]	<221> 来源
[1309]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"
[1310]	<400> 55
[1311]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1312]	1 5 10 15
[1313]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1314]	20 25 30
[1315]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1316]	35 40 45
[1317]	Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
[1318]	50 55 60
[1319]	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
[1320]	65 70 75 80
[1321]	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[1322]	85 90 95
[1323]	Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Arg Tyr Trp
[1324]	100 105 110
[1325]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

[1326]	115	120	125
[1327]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
[1328]	130	135	140
[1329]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
[1330]	145	150	155
[1331]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
[1332]	165	170	175
[1333]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
[1334]	180	185	190
[1335]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
[1336]	195	200	205
[1337]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
[1338]	210	215	220
[1339]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
[1340]	225	230	235
[1341]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
[1342]	245	250	255
[1343]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
[1344]	260	265	270
[1345]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
[1346]	275	280	285
[1347]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
[1348]	290	295	300
[1349]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
[1350]	305	310	315
[1351]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Ala Phe Pro Ala Pro		
[1352]	325	330	335
[1353]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
[1354]	340	345	350
[1355]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val		
[1356]	355	360	365
[1357]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
[1358]	370	375	380
[1359]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
[1360]	385	390	395
[1361]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
[1362]	405	410	415
[1363]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
[1364]	420	425	430

[1365]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[1366]	435 440 445
[1367]	Ser Pro Gly Lys
[1368]	450
[1369]	<210> 56
[1370]	<211> 452
[1371]	<212> PRT
[1372]	<213> 人工序列
[1373]	<220>
[1374]	<221> 来源
[1375]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"
[1376]	<400> 56
[1377]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1378]	1 5 10 15
[1379]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1380]	20 25 30
[1381]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1382]	35 40 45
[1383]	Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
[1384]	50 55 60
[1385]	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
[1386]	65 70 75 80
[1387]	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[1388]	85 90 95
[1389]	Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Arg Tyr Trp
[1390]	100 105 110
[1391]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[1392]	115 120 125
[1393]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
[1394]	130 135 140
[1395]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[1396]	145 150 155 160
[1397]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[1398]	165 170 175
[1399]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[1400]	180 185 190
[1401]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
[1402]	195 200 205
[1403]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

[1404]	210	215	220
[1405]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala		
[1406]	225	230	235 240
[1407]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
[1408]	245	250	255
[1409]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
[1410]	260	265	270
[1411]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
[1412]	275	280	285
[1413]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
[1414]	290	295	300
[1415]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
[1416]	305	310	315 320
[1417]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser		
[1418]	325	330	335
[1419]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
[1420]	340	345	350
[1421]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val		
[1422]	355	360	365
[1423]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
[1424]	370	375	380
[1425]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
[1426]	385	390	395 400
[1427]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
[1428]	405	410	415
[1429]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
[1430]	420	425	430
[1431]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
[1432]	435	440	445
[1433]	Ser Pro Gly Lys		
[1434]	450		
[1435]	<210> 57		
[1436]	<211> 452		
[1437]	<212> PRT		
[1438]	<213> 人工序列		
[1439]	<220>		
[1440]	<221> 来源		
[1441]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"		
[1442]	<400> 57		

[1443]	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
[1444]	1				5					10					15	
[1445]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
[1446]				20					25					30		
[1447]	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
[1448]			35					40					45			
[1449]	Ala	Thr	Ile	Ser	Glu	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Ser
[1450]		50					55					60				
[1451]	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu
[1452]	65					70				75					80	
[1453]	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
[1454]				85					90						95	
[1455]	Cys	Ala	Arg	Pro	Pro	Tyr	Asp	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Phe	Arg	Tyr	Trp
[1456]			100					105					110			
[1457]	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
[1458]			115					120					125			
[1459]	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
[1460]		130					135					140				
[1461]	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
[1462]	145					150				155					160	
[1463]	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
[1464]				165				170							175	
[1465]	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
[1466]			180					185					190			
[1467]	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
[1468]		195					200						205			
[1469]	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
[1470]		210					215					220				
[1471]	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
[1472]	225					230				235					240	
[1473]	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
[1474]				245				250						255		
[1475]	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
[1476]			260					265					270			
[1477]	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
[1478]			275					280					285			
[1479]	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
[1480]		290					295					300				
[1481]	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn

[1482]	305	310	315	320
[1483]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser			
[1484]		325	330	335
[1485]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
[1486]		340	345	350
[1487]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val			
[1488]		355	360	365
[1489]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
[1490]		370	375	380
[1491]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
[1492]	385	390	395	400
[1493]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr			
[1494]		405	410	415
[1495]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
[1496]		420	425	430
[1497]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
[1498]		435	440	445
[1499]	Ser Pro Gly Lys			
[1500]	450			
[1501]	<210> 58			
[1502]	<211> 110			
[1503]	<212> PRT			
[1504]	<213> 人工序列			
[1505]	<220>			
[1506]	<221> 来源			
[1507]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"			
[1508]	<400> 58			
[1509]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg			
[1510]	1	5	10	15
[1511]	Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
[1512]		20	25	30
[1513]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
[1514]		35	40	45
[1515]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
[1516]		50	55	60
[1517]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr			
[1518]	65	70	75	80
[1519]	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
[1520]		85	90	95

[1521]	Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro		
[1522]		100	105 110
[1523]	<210>	59	
[1524]	<211>	343	
[1525]	<212>	PRT	
[1526]	<213>	人 (Homo sapiens)	
[1527]	<400>	59	
[1528]	Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala		
[1529]	1	5	10 15
[1530]	Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro		
[1531]		20	25 30
[1532]	Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu		
[1533]		35	40 45
[1534]	Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser		
[1535]		50	55 60
[1536]	Asp Leu Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn		
[1537]	65	70	75 80
[1538]	Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys		
[1539]		85	90 95
[1540]	Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu		
[1541]		100	105 110
[1542]	Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala		
[1543]		115	120 125
[1544]	Arg Ala Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly		
[1545]		130	135 140
[1546]	Phe Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu		
[1547]	145	150	155 160
[1548]	Leu Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser		
[1549]		165	170 175
[1550]	Tyr Ser Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val		
[1551]		180	185 190
[1552]	His Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp		
[1553]		195	200 205
[1554]	Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro		
[1555]		210	215 220
[1556]	Thr Leu Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn		
[1557]	225	230	235 240
[1558]	Val Thr Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr		
[1559]		245	250 255

[1560]	Trp	Leu	Glu	Asn	Gly	Asn	Val	Ser	Arg	Thr	Glu	Thr	Ala	Ser	Thr	Val
[1561]				260				265					270			
[1562]	Thr	Glu	Asn	Lys	Asp	Gly	Thr	Tyr	Asn	Trp	Met	Ser	Trp	Leu	Leu	Val
[1563]				275				280					285			
[1564]	Asn	Val	Ser	Ala	His	Arg	Asp	Asp	Val	Lys	Leu	Thr	Cys	Gln	Val	Glu
[1565]		290						295					300			
[1566]	His	Asp	Gly	Gln	Pro	Ala	Val	Ser	Lys	Ser	His	Asp	Leu	Lys	Val	Ser
[1567]	305					310					315					320
[1568]	Ala	His	Pro	Lys	Glu	Gln	Gly	Ser	Asn	Thr	Ala	Ala	Glu	Asn	Thr	Gly
[1569]					325					330					335	
[1570]	Ser	Asn	Glu	Arg	Asn	Ile	Tyr									
[1571]				340												
[1572]	<210>	60														
[1573]	<211>	342														
[1574]	<212>	PRT														
[1575]	<213>	食蟹猕猴(Macaca fascicularis)														
[1576]	<400>	60														
[1577]	Glu	Glu	Glu	Leu	Gln	Val	Ile	Gln	Pro	Glu	Lys	Ser	Val	Ser	Val	Ala
[1578]	1			5						10				15		
[1579]	Ala	Gly	Asp	Ser	Ala	Thr	Leu	Asn	Cys	Thr	Val	Ser	Ser	Leu	Ile	Pro
[1580]				20						25				30		
[1581]	Val	Gly	Pro	Ile	Gln	Trp	Phe	Arg	Gly	Ala	Gly	Pro	Gly	Arg	Glu	Leu
[1582]				35						40				45		
[1583]	Ile	Tyr	Asn	Leu	Lys	Glu	Gly	His	Phe	Pro	Arg	Val	Thr	Pro	Val	Ser
[1584]		50						55					60			
[1585]	Asp	Pro	Thr	Lys	Arg	Asn	Asn	Met	Asp	Phe	Ser	Ile	Arg	Ile	Ser	Asn
[1586]	65					70					75					80
[1587]	Ile	Thr	Pro	Ala	Asp	Ala	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Val	Lys	Phe	Arg	Lys
[1588]					85					90					95	
[1589]	Gly	Ser	Pro	Asp	Val	Glu	Leu	Lys	Ser	Gly	Ala	Gly	Thr	Glu	Leu	Ser
[1590]				100						105				110		
[1591]	Val	Arg	Ala	Lys	Pro	Ser	Ala	Pro	Val	Val	Ser	Gly	Pro	Ala	Val	Arg
[1592]				115						120				125		
[1593]	Ala	Thr	Ala	Glu	His	Thr	Val	Ser	Phe	Thr	Cys	Glu	Ser	His	Gly	Phe
[1594]		130						135					140			
[1595]	Ser	Pro	Arg	Asp	Ile	Thr	Leu	Lys	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu
[1596]	145					150					155					160
[1597]	Ser	Asp	Phe	Gln	Thr	Asn	Val	Asp	Pro	Ala	Gly	Lys	Ser	Val	Ser	Tyr
[1598]					165					170						175

[1599]	Ser Ile Arg Ser Thr Ala Arg Val Val Leu Thr Arg Arg Asp Val His
[1600]	180 185 190
[1601]	Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp Pro
[1602]	195 200 205
[1603]	Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Ala Ile Arg Val Pro Pro Phe
[1604]	210 215 220
[1605]	Leu Glu Val Thr Gln Gln Ser Met Arg Ala Asp Asn Gln Val Asn Val
[1606]	225 230 235 240
[1607]	Thr Cys Gln Val Thr Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr Trp
[1608]	245 250 255
[1609]	Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Met Ala Ser Ala Leu Pro
[1610]	260 265 270
[1611]	Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Thr Ser Trp Leu Leu Val Asn
[1612]	275 280 285
[1613]	Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu His
[1614]	290 295 300
[1615]	Asp Gly Gln Pro Ala Val Asn Lys Ser Phe Ser Val Lys Val Ser Ala
[1616]	305 310 315 320
[1617]	His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly Thr
[1618]	325 330 335
[1619]	Asn Glu Arg Asn Ile Tyr
[1620]	340
[1621]	<210> 61
[1622]	<211> 343
[1623]	<212> PRT
[1624]	<213> 狢猴(Callithrix jacchus)
[1625]	<400> 61
[1626]	Glu Glu Glu Leu Gln Val Val Gln Pro Glu Lys Ser Val Ser Val Ala
[1627]	1 5 10 15
[1628]	Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu His Cys Thr Val Thr Ser Leu Val Pro
[1629]	20 25 30
[1630]	Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu
[1631]	35 40 45
[1632]	Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly Gln Phe Pro Arg Val Thr Ala Val Ala
[1633]	50 55 60
[1634]	Asp Gln Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp His Ser Ile Arg Ile Ser Asn
[1635]	65 70 75 80
[1636]	Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
[1637]	85 90 95

[1638]	Ala Ser Pro Ile Asp Val Glu Leu Lys Ser Gly Pro Gly Thr Glu Leu
[1639]	100 105 110
[1640]	Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Thr
[1641]	115 120 125
[1642]	Arg Val Thr Pro Glu Asp Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly
[1643]	130 135 140
[1644]	Phe Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Ala Asn Glu
[1645]	145 150 155 160
[1646]	Leu Ser Ala Leu Gln Thr Thr Val Asp Pro Ala Gly Glu Ser Val Ser
[1647]	165 170 175
[1648]	Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Ala Arg Val Gly Leu Thr Arg Gly Asp Val
[1649]	180 185 190
[1650]	Arg Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp
[1651]	195 200 205
[1652]	Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Ala Ile Arg Val Pro Pro
[1653]	210 215 220
[1654]	Thr Leu Glu Val Thr His Gln Pro Met Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn
[1655]	225 230 235 240
[1656]	Val Thr Cys Gln Val Lys Lys Phe Tyr Pro Gln Ser Leu Gln Leu Thr
[1657]	245 250 255
[1658]	Trp Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Leu
[1659]	260 265 270
[1660]	Ile Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Ala Ser Trp Leu Leu Val
[1661]	275 280 285
[1662]	Asn Ser Ser Ala His Arg Asp Gly Val Val Leu Thr Cys Gln Val Glu
[1663]	290 295 300
[1664]	His Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser Leu Arg Leu Glu Val Ser
[1665]	305 310 315 320
[1666]	Ala His Arg Lys Glu Gln Gly Ser Asp Thr Ala Ala Glu Lys Thr Gly
[1667]	325 330 335
[1668]	Thr Asn Glu Arg Asn Ile Tyr
[1669]	340
[1670]	<210> 62
[1671]	<211> 342
[1672]	<212> PRT
[1673]	<213> 穴兔(<i>Oryctolagus cuniculus</i>)
[1674]	<400> 62
[1675]	Gln Glu Lys Leu Gln Val Thr Gln Pro Asp Arg Trp Val Ser Val Ala
[1676]	1 5 10 15

[1677]	Glu Gly Glu Ala Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Asn Thr Leu Leu Pro		
[1678]		20	25
[1679]	Val Gly Pro Met Lys Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Asp Arg Lys Met		30
[1680]		35	40
[1681]	Ile Tyr Asn Phe Lys Gly Asp Gln Asp Pro Arg Val Thr Asn Val Ser		45
[1682]		50	55
[1683]	Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Arg Asp		60
[1684]	65	70	75
[1685]	Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Gln Lys		80
[1686]		85	90
[1687]	Lys Gly Ala Asp Asp Glu Glu Phe Lys Ser Gly Gly Gly Thr Gln Val		95
[1688]		100	105
[1689]	Ser Val Ser Ala Lys Pro Ser Thr Pro Lys Val Ser Gly Pro Gly Ala		110
[1690]		115	120
[1691]	Arg Ser Thr Pro Glu Gln Thr Val Asp Phe Thr Cys Glu Ser His Gly		125
[1692]		130	135
[1693]	Phe Ser Pro Arg Asn Ile Ser Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu		140
[1694]	145	150	155
[1695]	Leu Pro Ala Phe Gln Thr Ser Val Tyr Pro Ala Gly Glu Ser Val Ser		160
[1696]		165	170
[1697]	Tyr Asn Val Thr Ser Thr Val Lys Val Ala Leu Ala Ser Ser Asp Val		175
[1698]		180	185
[1699]	His Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Ile Thr Leu Gln Gly Gly		190
[1700]		195	200
[1701]	Ser Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro		205
[1702]		210	215
[1703]	Pro Thr Val Glu Val Thr Gln Gln Pro Met Gly Ala Gly Thr Gln Val		220
[1704]	225	230	235
[1705]	Asn Val Thr Cys His Val Asp Lys Phe Tyr Pro Arg Asp Met Gln Leu		240
[1706]		245	250
[1707]	Ser Trp Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Trp Thr		255
[1708]		260	265
[1709]	Leu Val Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Arg Thr Ser Trp Leu Leu		270
[1710]		275	280
[1711]	Val Asn Ser Ser Ala His Arg Glu Asp Val Val Leu Ser Cys Gln Val		285
[1712]		290	295
[1713]	Glu His Asp Gly Gln Pro Ala Val Thr Arg Ser His Thr Leu Gln Val		300
[1714]	305	310	315
[1715]	Ser Ala Pro Pro Lys Glu Gln Gly Thr Asp Thr Ser Leu Asp Gln Ala		320

[1716]		325		330		335
[1717]	Asp Asn Trp Asn Val Phe					
[1718]		340				
[1719]	<210> 63					
[1720]	<211> 343					
[1721]	<212> PRT					
[1722]	<213> 家犬(Canis familiaris)					
[1723]	<400> 63					
[1724]	Glu Ala Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Glu Lys Ser Val Ser Val Ala					
[1725]	1	5		10		15
[1726]	Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Leu Thr Ser Leu Ile Pro					
[1727]		20		25		30
[1728]	Val Gly Lys Val Glu Trp Phe Arg Gly Thr Gly Pro Gly Arg Glu Leu					
[1729]		35		40		45
[1730]	Ile Phe His Phe Lys Gly Gly His Phe Pro Arg Val Thr Asn Val Ser					
[1731]	50		55		60	
[1732]	Asp Ser Thr Lys Arg Asn Asn Thr Asp Phe Ser Ile Arg Ile Ser Asn					
[1733]	65		70		75	80
[1734]	Ile Thr Pro Ala Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Gln Lys					
[1735]		85		90		95
[1736]	Gly Asn Pro Asp Val Glu Leu Lys Ser Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr					
[1737]		100		105		110
[1738]	Val Ser Ala Lys Pro Ser Pro Pro Val Val Ser Gly Pro Thr Ala Arg					
[1739]		115		120		125
[1740]	Ala Thr Pro Gln Gln Thr Val Asn Phe Thr Cys Lys Ser His Gly Phe					
[1741]	130		135		140	
[1742]	Ser Pro Arg Asn Ile Thr Leu Arg Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu					
[1743]	145		150		155	160
[1744]	Thr Ala Ser Gln Thr Thr Val Tyr Pro Glu Glu Asp Asn Ala Ser Tyr					
[1745]		165		170		175
[1746]	Ser Ile Ser Ser Thr Thr Lys Leu Val Leu Ala Pro Gly Asp Val Arg					
[1747]		180		185		190
[1748]	Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Gly Pro					
[1749]		195		200		205
[1750]	Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Leu Arg Val Pro Pro					
[1751]	210		215		220	
[1752]	Thr Leu Glu Val Ser Gln His Pro Met Ala Gly Asp Gln Val Asn Val					
[1753]	225		230		235	240
[1754]	Thr Cys Gln Val Lys Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr Trp					

[1755]					245					250					255		
[1756]	Leu	Glu	Asn	Gly	Asn	Val	Ser	Arg	Thr	Glu	Thr	Pro	Ser	Val	Ala	Ser	
[1757]					260					265					270		
[1758]	Asn	Leu	Leu	Glu	Asn	Lys	Asp	Gly	Thr	Phe	Asn	Trp	Thr	Ser	Trp	Leu	
[1759]					275					280					285		
[1760]	Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Val	Val	Phe	Thr	Cys	Gln	
[1761]					290					295					300		
[1762]	Val	Gln	His	Asp	Gly	Gln	Pro	Ala	Val	Thr	Lys	Asn	His	Thr	Leu	Val	
[1763]	305							310					315				320
[1764]	Ala	Ser	Ala	Arg	Gln	Lys	Asp	Gln	Glu	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Asn	
[1765]					325						330					335	
[1766]	Asn	Asp	Ser	Arg	Ser	Ile	Phe										
[1767]					340												
[1768]	<210>	64															
[1769]	<211>	98															
[1770]	<212>	PRT															
[1771]	<213>	人工序列															
[1772]	<220>																
[1773]	<221>	来源															
[1774]	<223>	/注释="人工序列的描述：合成多肽"															
[1775]	<400>	64															
[1776]	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
[1777]	1				5					10					15		
[1778]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
[1779]					20					25					30		
[1780]	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
[1781]					35					40					45		
[1782]	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
[1783]		50						55					60				
[1784]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
[1785]	65						70					75				80	
[1786]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
[1787]					85					90						95	
[1788]	Ala	Lys															
[1789]	<210>	65															
[1790]	<211>	15															
[1791]	<212>	PRT															
[1792]	<213>	人工序列															
[1793]	<220>																

[1794]	<221>	来源
[1795]	<223>	/注释="人工序列的描述：合成肽"
[1796]	<400>	65
[1797]	Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[1798]	1	5 10 15
[1799]	<210>	66
[1800]	<211>	96
[1801]	<212>	PRT
[1802]	<213>	人工序列
[1803]	<220>	
[1804]	<221>	来源
[1805]	<223>	/注释="人工序列的描述：合成多肽"
[1806]	<400>	66
[1807]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
[1808]	1	5 10 15
[1809]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr	
[1810]	20	25 30
[1811]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	
[1812]	35	40 45
[1813]	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly	
[1814]	50	55 60
[1815]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro	
[1816]	65	70 75 80
[1817]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro	
[1818]	85	90 95
[1819]	<210>	67
[1820]	<211>	12
[1821]	<212>	PRT
[1822]	<213>	人工序列
[1823]	<220>	
[1824]	<221>	来源
[1825]	<223>	/注释="人工序列的描述：合成肽"
[1826]	<400>	67
[1827]	Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[1828]	1	5 10
[1829]	<210>	68
[1830]	<211>	111
[1831]	<212>	PRT
[1832]	<213>	人工序列

[1833]	<220>
[1834]	<221> 来源
[1835]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"
[1836]	<400> 68
[1837]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[1838]	1 5 10 15
[1839]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser
[1840]	20 25 30
[1841]	Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
[1842]	35 40 45
[1843]	Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
[1844]	50 55 60
[1845]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[1846]	65 70 75 80
[1847]	Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg
[1848]	85 90 95
[1849]	Glu Leu Pro Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1850]	100 105 110
[1851]	<210> 69
[1852]	<211> 111
[1853]	<212> PRT
[1854]	<213> 人工序列
[1855]	<220>
[1856]	<221> 来源
[1857]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"
[1858]	<400> 69
[1859]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[1860]	1 5 10 15
[1861]	Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser
[1862]	20 25 30
[1863]	Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
[1864]	35 40 45
[1865]	Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
[1866]	50 55 60
[1867]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[1868]	65 70 75 80
[1869]	Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg
[1870]	85 90 95
[1871]	Glu Leu Pro Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[1872]	100	105	110
[1873]	<210> 70		
[1874]	<211> 111		
[1875]	<212> PRT		
[1876]	<213> 人工序列		
[1877]	<220>		
[1878]	<221> 来源		
[1879]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"		
[1880]	<400> 70		
[1881]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[1882]	1	5	10
[1883]	Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser		
[1884]	20	25	30
[1885]	Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro		
[1886]	35	40	45
[1887]	Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala		
[1888]	50	55	60
[1889]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
[1890]	65	70	75
[1891]	Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg		
[1892]	85	90	95
[1893]	Glu Leu Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[1894]	100	105	110

人类 食蟹猕猴 猴猴 兔 犬	100.0% 88.6% 86.0% 71.2% 71.8%	EZEELQVQFDRSVVAAGETATXCTATSLIPVQPIQFPGAGFGRELIYNQKRGHPRV EZEELQVQFDRSVVAAGETATXCTATSLIPVQPIQFPGAGFGRELIYNQKRGHPRV EZEELQVQFDRSVVAAGETATXCTATSLIPVQPIQFPGAGFGRELIYNQKRGHPRV QENLQVQFDRSVVAAGETATXCTATSLIPVQPIQFPGAGFGRELIYNQKRGHPRV EAEELQVQFDRSVVAAGETATXCTATSLIPVQPIQFPGAGFGRELIYNQKRGHPRV * : * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : *
人类 食蟹猕猴 猴猴 兔 犬	100.0% 88.6% 86.0% 71.2% 71.8%	TPVSDPTKNNNDGIRIGNITFADAGTYCVKFKGSPDVPFKSGAGTSLSVRAKPSA TPVSDPTKNNNDGIRIGNITFADAGTYCVKFKGSPD-VPLKSGAGTSLSVRAKPSA TVADQTKNNNDGIRIGNITFADAGTYCVKFKGSPDVPFKSGAGTSLSVRAKPSA TVADQTKNNNDGIRIGNITFADAGTYCVKFKGSPDVPFKSGAGTSLSVRAKPSA TVSDSTHNNNDGIRIGNITFADAGTYCVKFKGSPDVPFKSGAGTSLSVRAKPSA * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : *
人类 食蟹猕猴 猴猴 兔 犬	100.0% 88.6% 86.0% 71.2% 71.8%	PVSGPRAAATQRTVSTCEHGFSPRDTLKWFKGNELSGFQTNVDVQGESVSYSH PVSGPRAAATQRTVSTCEHGFSPRDTLKWFKGNELSGFQTNVDVQGESVSYSH PVSGPRAAATQRTVSTCEHGFSPRDTLKWFKGNELSGFQTNVDVQGESVSYSH PVSGPRAAATQRTVSTCEHGFSPRDTLKWFKGNELSGFQTNVDVQGESVSYSH PVSGPRAAATQRTVSTCEHGFSPRDTLKWFKGNELSGFQTNVDVQGESVSYSH * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : *
人类 食蟹猕猴 猴猴 兔 犬	100.0% 88.6% 86.0% 71.2% 71.8%	STAKVLRDVRHVSQVCEVAVTLQGGPFLKSTANLSETLRVPTTLEVTQPMRANQV STARVLRDVRHVSQVCEVAVTLQGGPFLKSTANLSETLRVPTTLEVTQPMRANQV STARVLRDVRHVSQVCEVAVTLQGGPFLKSTANLSETLRVPTTLEVTQPMRANQV STARVLRDVRHVSQVCEVAVTLQGGPFLKSTANLSETLRVPTTLEVTQPMRANQV STARVLRDVRHVSQVCEVAVTLQGGPFLKSTANLSETLRVPTTLEVTQPMRANQV * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : *
人类 食蟹猕猴 猴猴 兔 犬	100.0% 88.6% 86.0% 71.2% 71.8%	WVTCQVREXPQRLQTLWLENVSRTEASALP---ENKDGTYNNWSLWLVNSAHRD WVTCQVREXPQRLQTLWLENVSRTEASALP---ENKDGTYNNWSLWLVNSAHRD WVTCQVREXPQRLQTLWLENVSRTEASALP---ENKDGTYNNWSLWLVNSAHRD WVTCQVREXPQRLQTLWLENVSRTEASALP---ENKDGTYNNWSLWLVNSAHRD WVTCQVREXPQRLQTLWLENVSRTEASALP---ENKDGTYNNWSLWLVNSAHRD * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : *
人类 食蟹猕猴 猴猴 兔 犬	100.0% 88.6% 86.0% 71.2% 71.8%	VKLTQVREXPQRLQTLWLENVSRTEASALP---ENKDGTYNNWSLWLVNSAHRD VKLTQVREXPQRLQTLWLENVSRTEASALP---ENKDGTYNNWSLWLVNSAHRD VKLTQVREXPQRLQTLWLENVSRTEASALP---ENKDGTYNNWSLWLVNSAHRD VKLTQVREXPQRLQTLWLENVSRTEASALP---ENKDGTYNNWSLWLVNSAHRD VKLTQVREXPQRLQTLWLENVSRTEASALP---ENKDGTYNNWSLWLVNSAHRD * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : *

图1

基于IGHV3-23*01接受体框架的潜在人源化序列(AbM CDR定义)
 IGHV3-23*01 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKG
 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK

连接区 IMGT J00256 | IGHJ4*01 | YFDYWGQGLTVTVSS

seq	10	20	30	40	50	60
AbM	10	20	30	40	50	ab

b b b	p	p b b b	b b	b b i	i i b b	b
SB-3F9	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS	GFTFSSYAMS	WVRQTPPEKRLWVA	TISDYGGSYTY		
	* * *	*	* * *	*		

IGHV3-23*01	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	AISG-SGGSTY
hSB-3F9-H1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	TISDYGGSYTY
hSB-3F9-H2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYAMS	WVRQAPGKGLEWVA	TISDYGGSYTY

seq	70	80	90	100	110	120
AbM	60	70	80	abc	90	100abcd
	i b	b b b x	b b b b	b i b i b b	i b b b	
SB-3F9	YPDSVKGRFTISRDN AKYTLYLQMSSLRSEDTALYYCAR	PPYDDYYGGFAY	WGQGLTVTVSA			
	*	* * *	* * *	*	*	*

IGHV3-23*01	YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
hSB-3F9-H1	YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
hSB-3F9-H1	YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
	P
	L

图2A

基于IGKV3-11*01接受体框架的潜在人源化序列(AbM CDR定义)

IGKV3-11*01 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT

GIPARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYQCQQRSNWPP

IMGT J00242|IGKJ2*01|YTFGGGTKLEIK

连接区

seq	10	20	30	40	50	60
AbM	10	20	30	40	50	60
	b b b	p p	b b b	b b b	bi bi i	ii ibbi i
SB-3F9	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSSGYSYMH WYQQKPGQPPKLLIY LASNLES					
	*	* * * *	*	*	*	*
3-11*01	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVS---SYLA WYQQKPGQAPRLLIY DASNRAT					
hSB-3F9-L1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASKSVSSSGYSYMH WYQQKPGQAPRLLIY LASNLES					
hSB-3F9-L2	EIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASKSVSSSGYSYMH WYQQKPGQAPRLLIY LASNLES					
hSB-3F9-L3	EIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASKSVSSSGYSYMH WYQQKPGQAPRLLIY LASNLES					

V

P

#

seq	70	80	90	100	110
AbM	60	70	80	90	100
	b b	b b b	b b b	ib bi i	b b b
SB-3F9	GVPARFSGSGGTDFLTINHPVEEEDAATYCC QHNRELPCFT FGGGTKLEIK				
	*	*	*	*	*
3-11*01	GIPARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYCC QQRSNWPP				
hSB-3F9-L1	GIPARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYCC QHNRELPCFT FGGGTKLEIK				
hSB-3F9-L2	GVPARFSGSGGTDFLTITSSVEPEDFAVYCC QHNRELPCFT FGGGTKLEIK				
hSB-3F9-L3	GVPARFSGSGGTDFLTITSSVEPEDFAVYCC QHNRELPCFT FGGGTKLEIK				

A

#

^

图2B

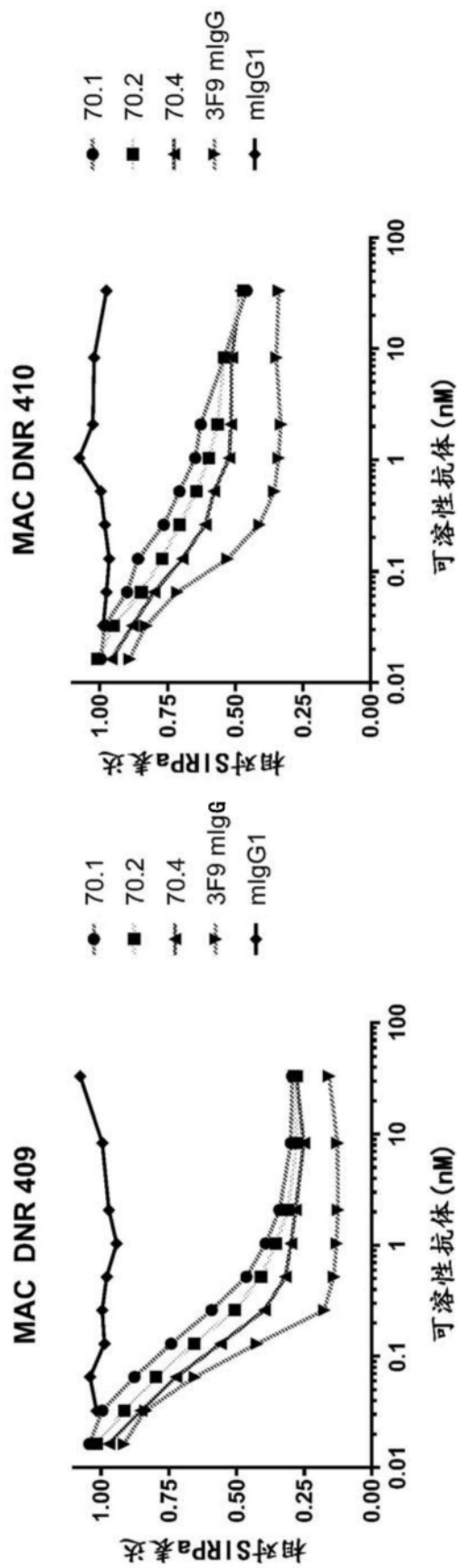


图3

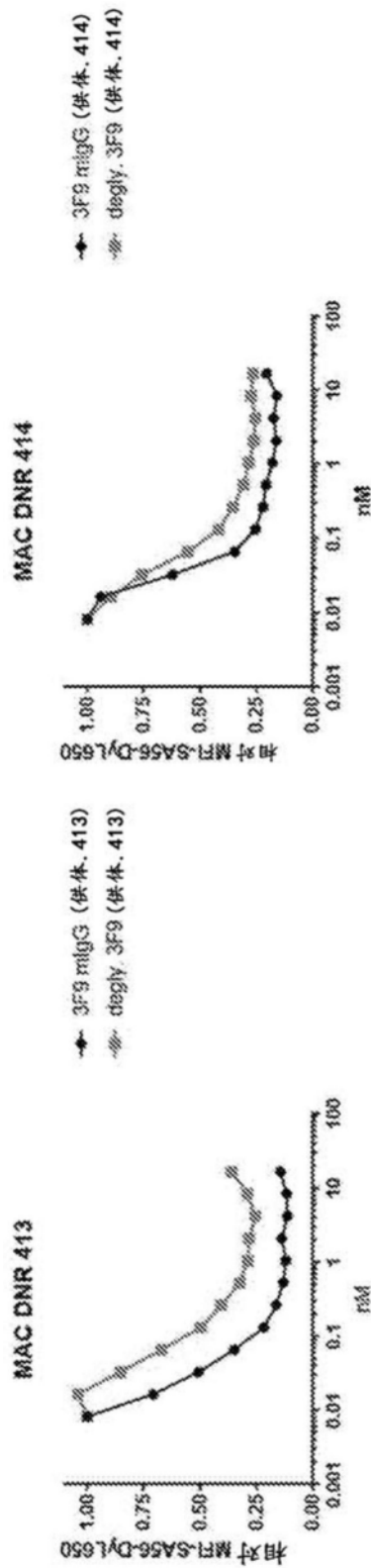


图4A

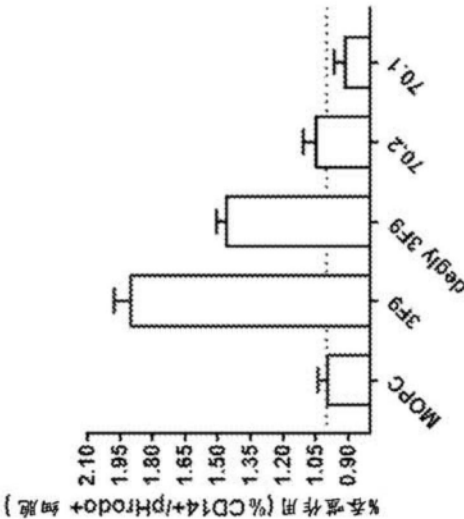


图4B

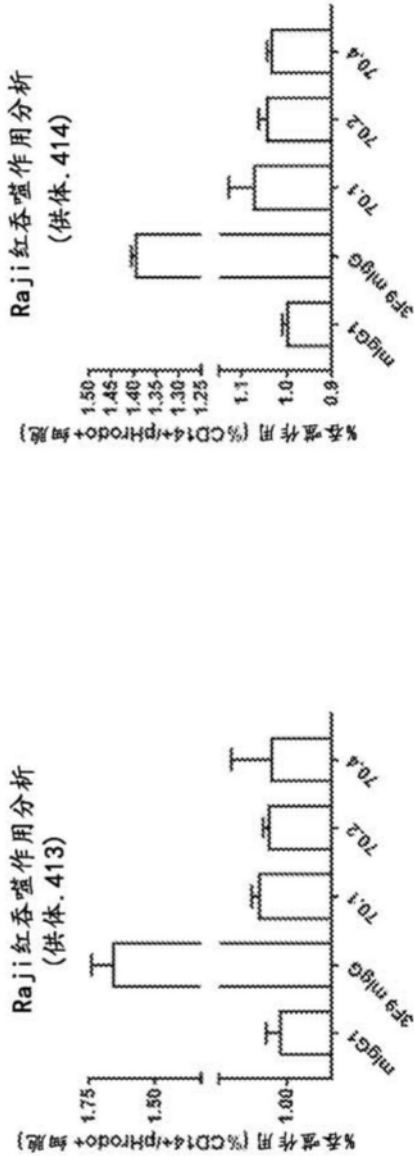


图5A

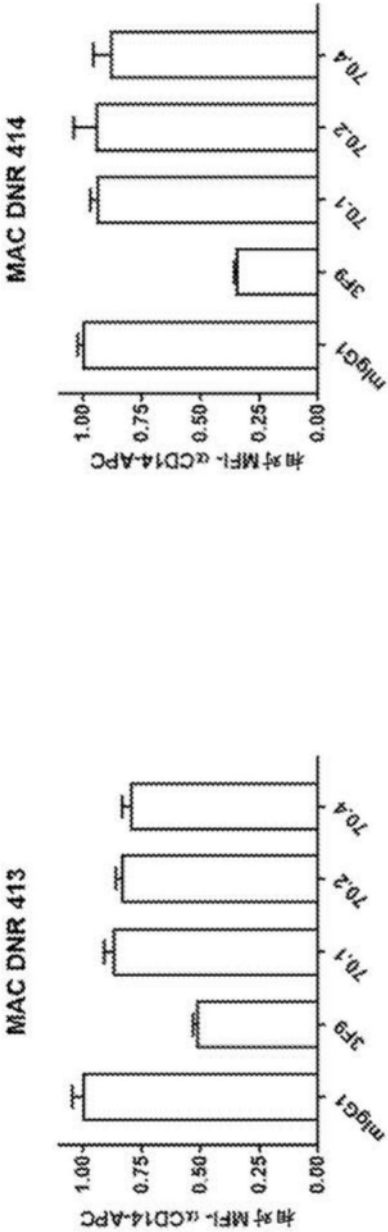


图5B

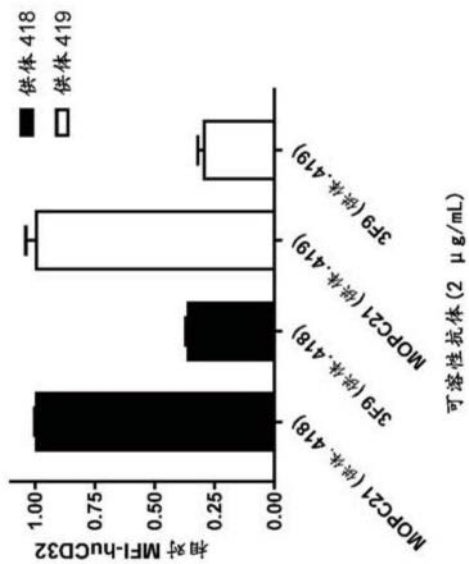


图6A

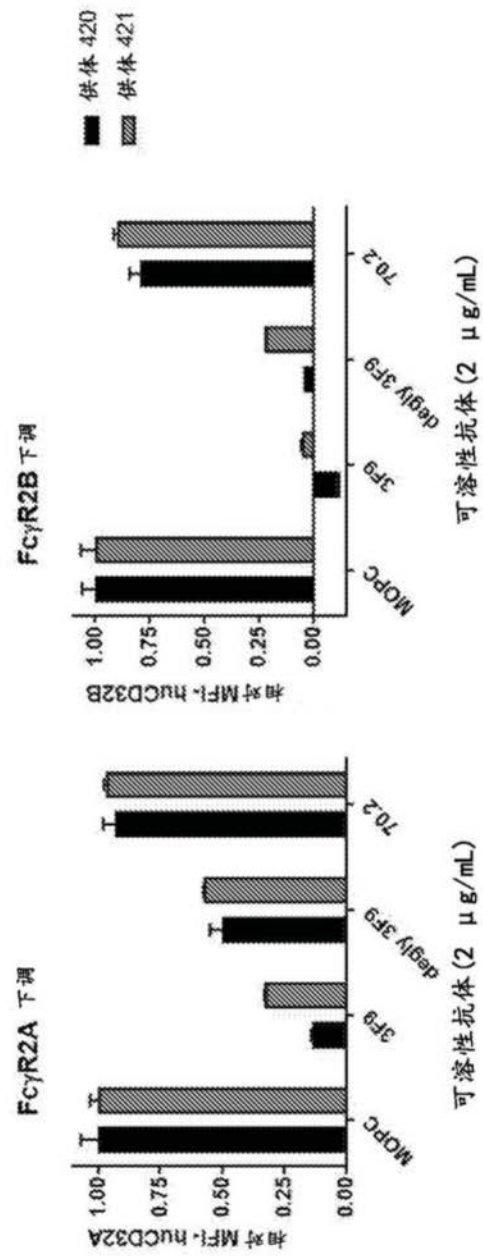


图6B

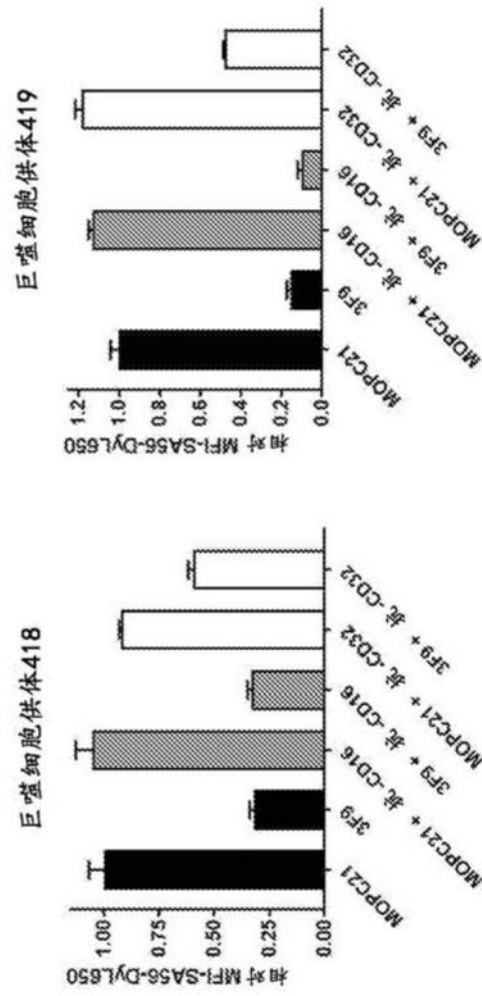


图7A

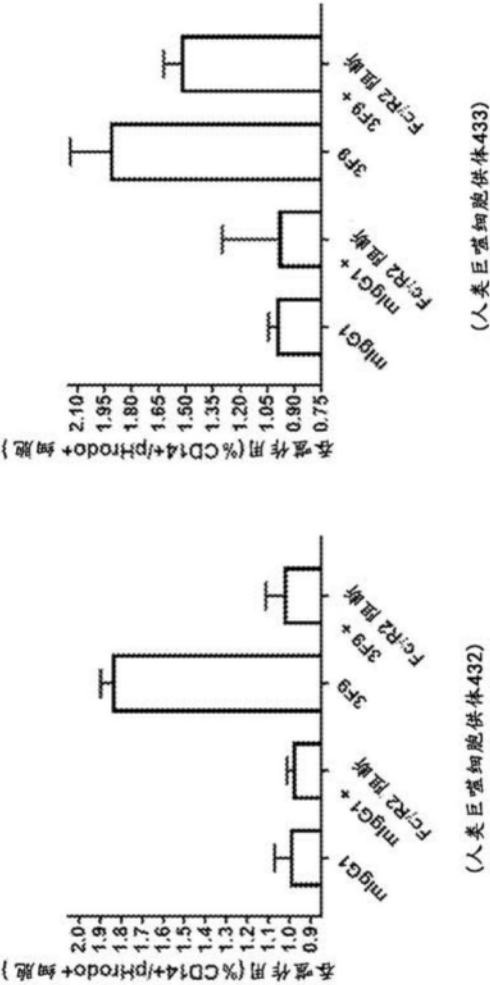


图7B

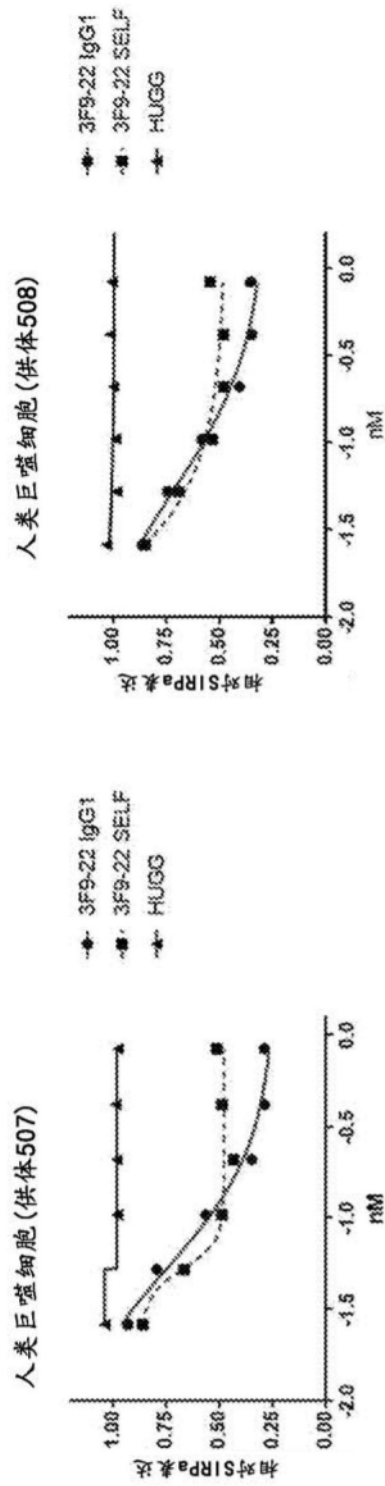


图8A

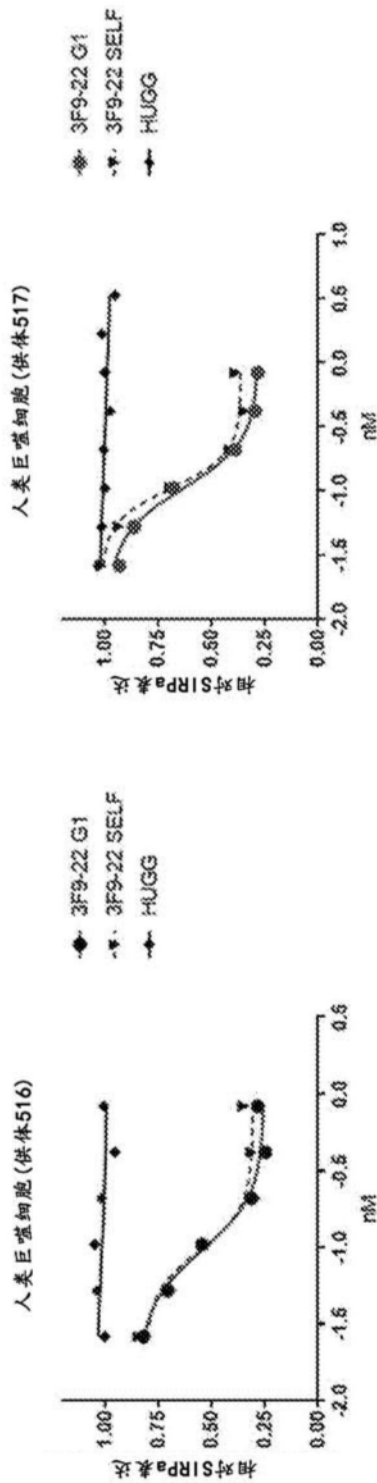


图8B

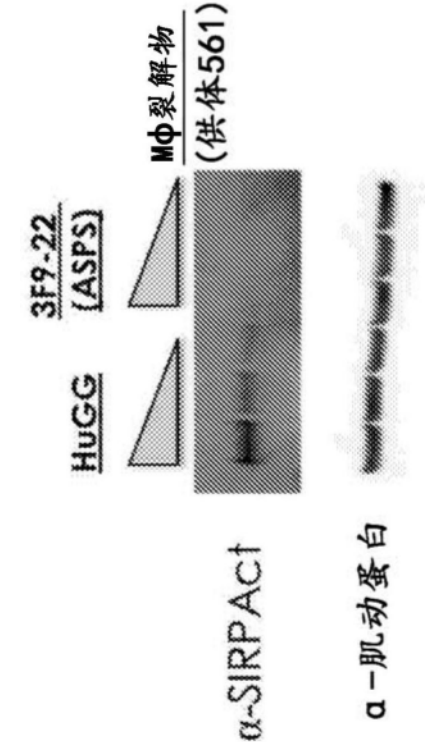


图9A

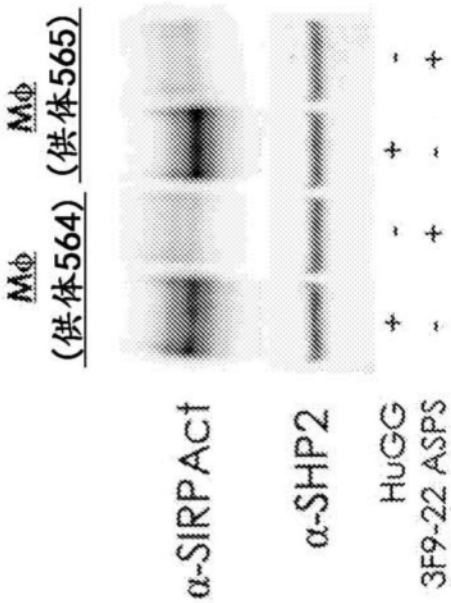


图9B

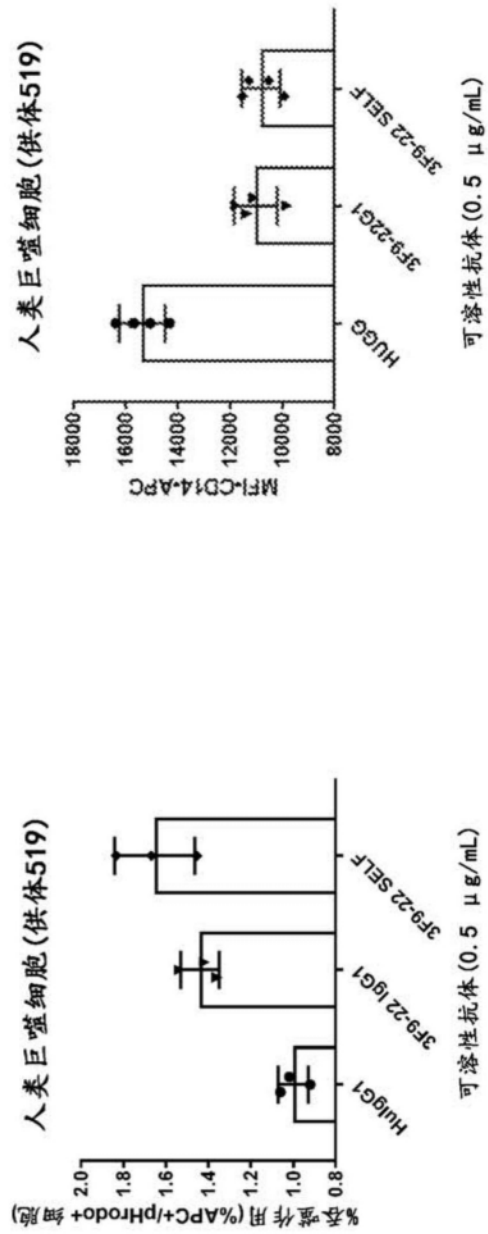


图10A

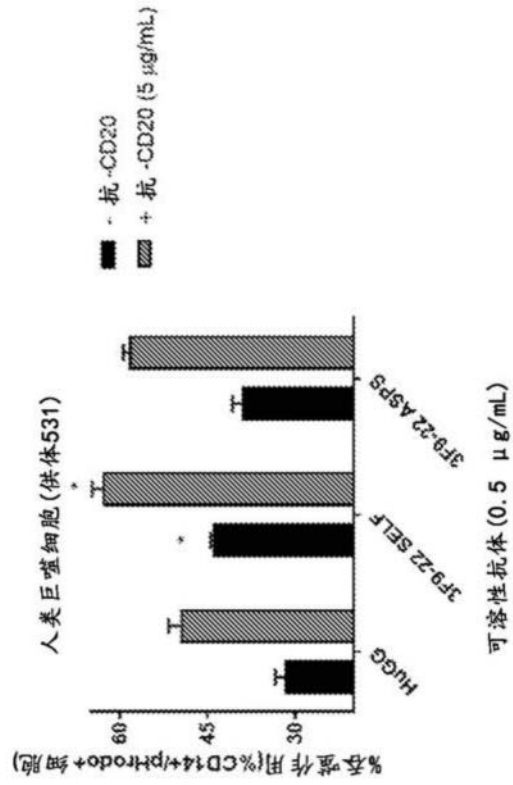


图10B

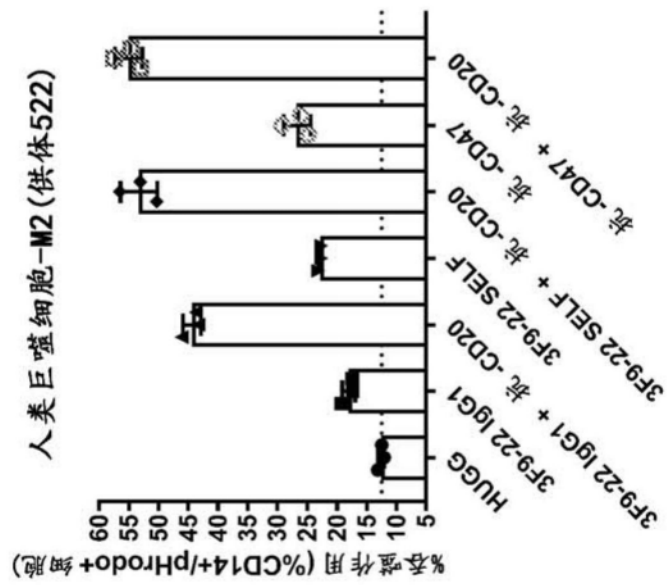


图11A

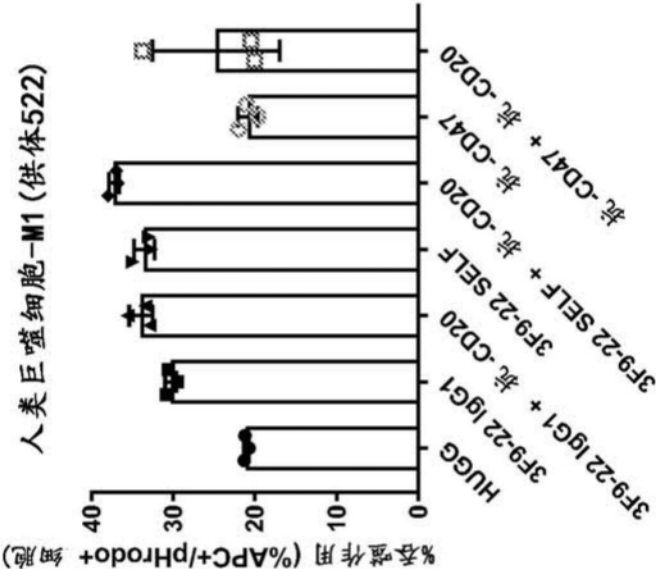


图11B

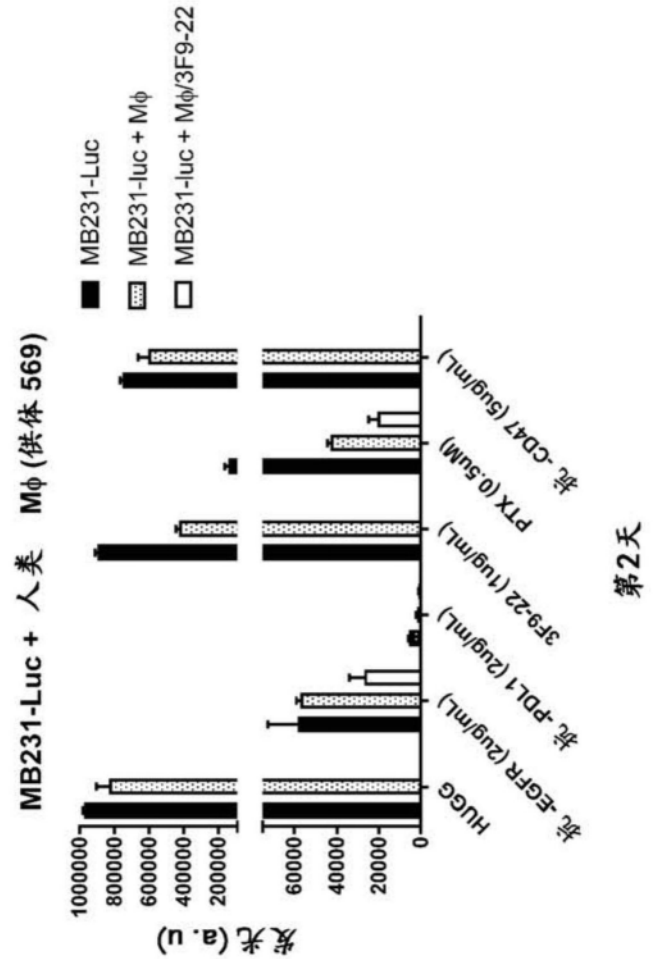


图12A

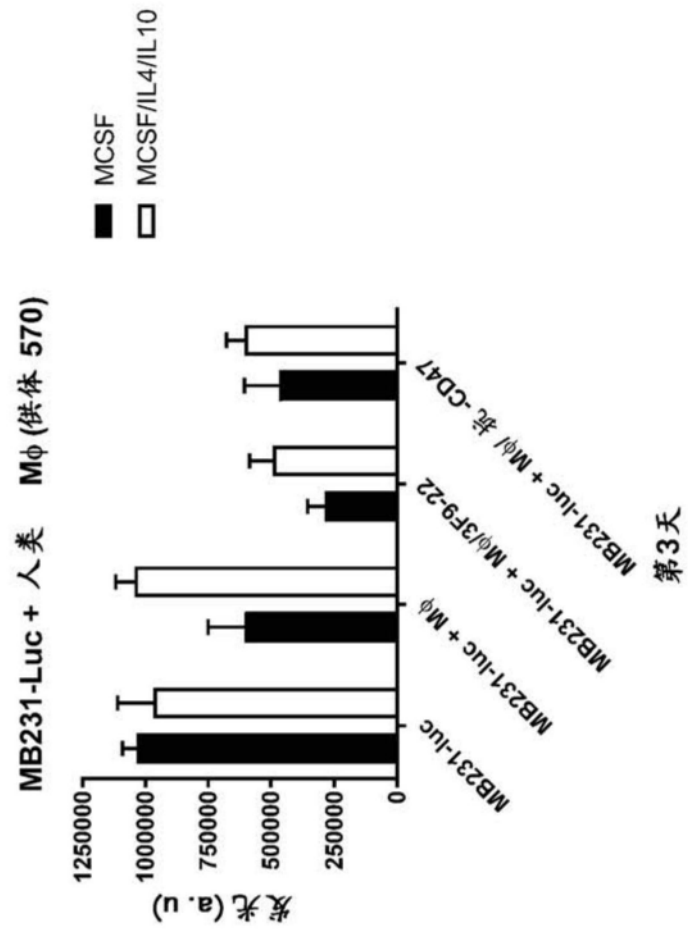


图12B

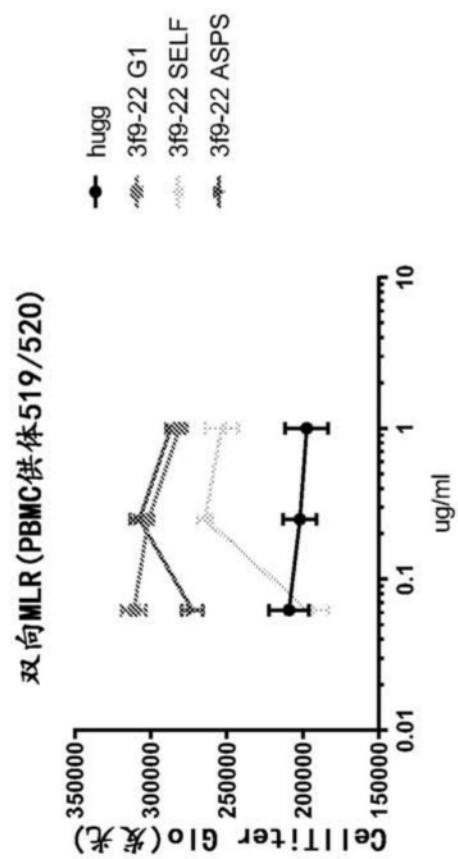


图13A

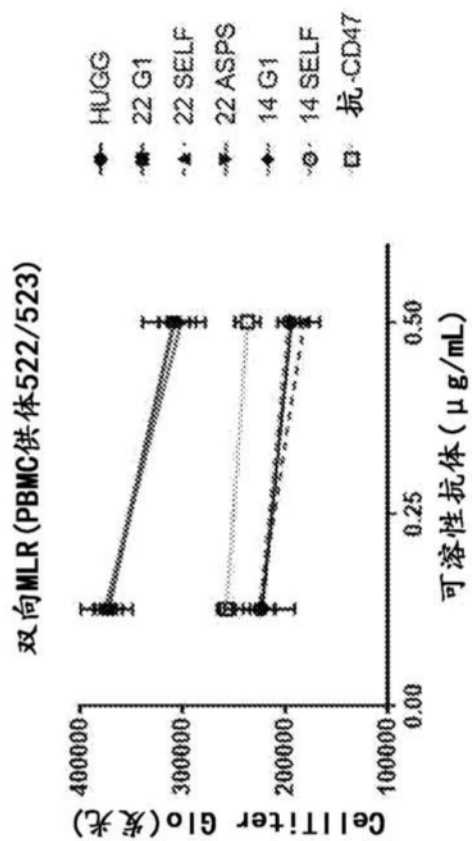


图13B

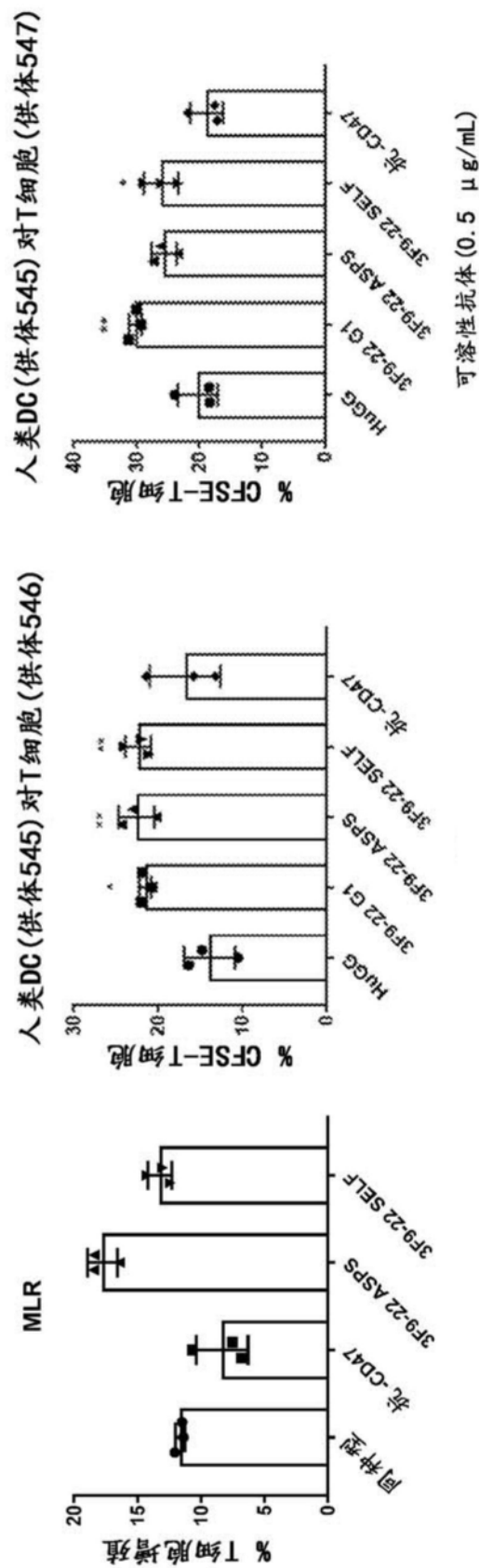


图14A

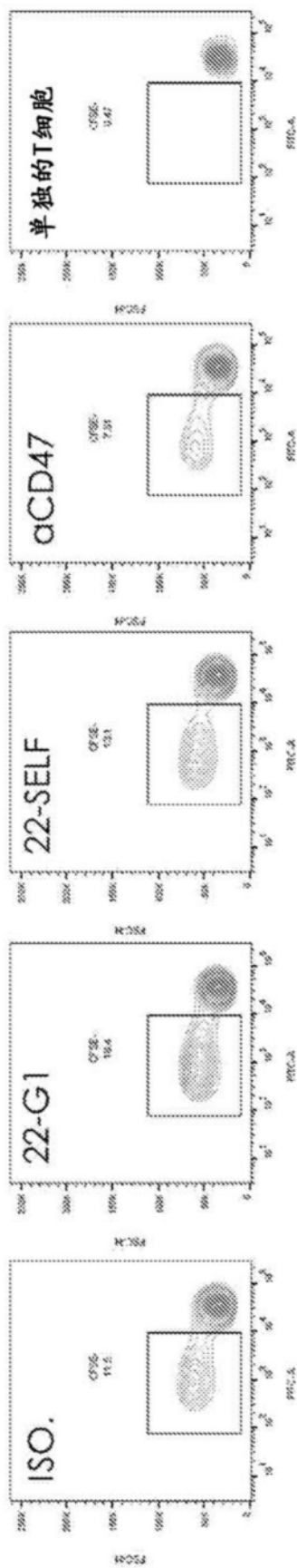


图14B

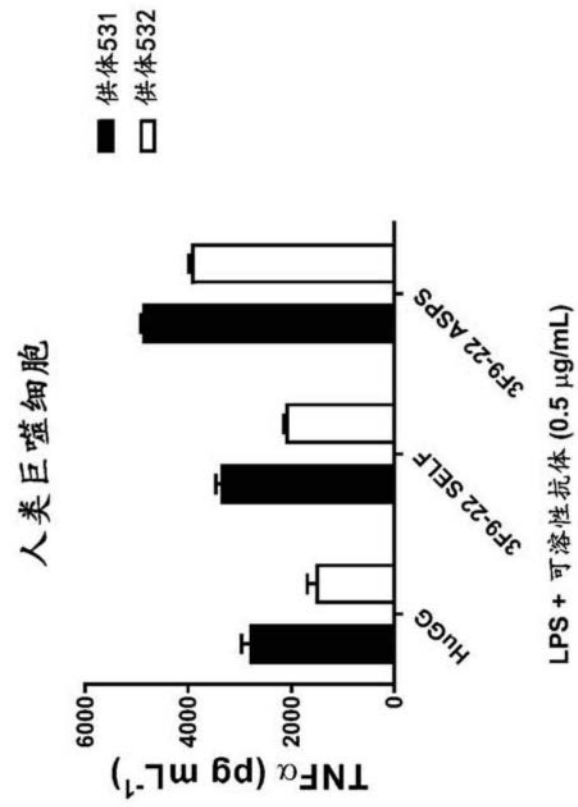


图15A

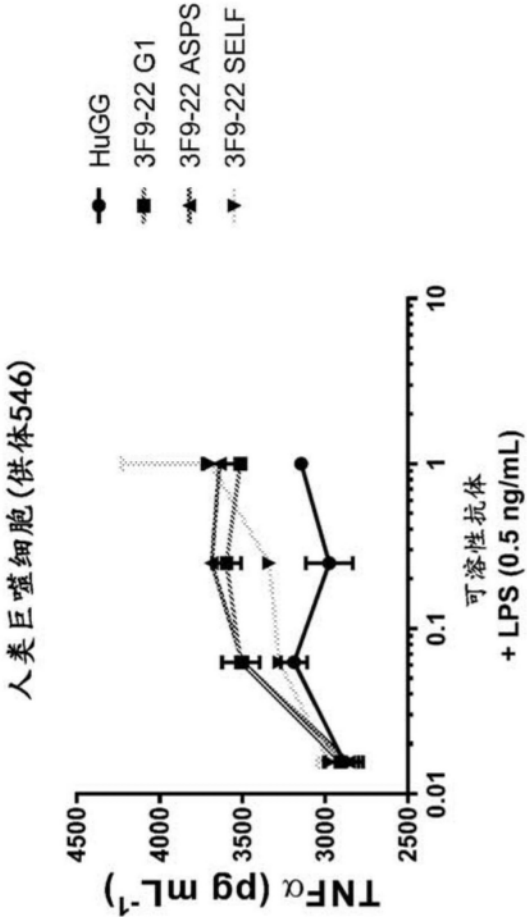


图15B

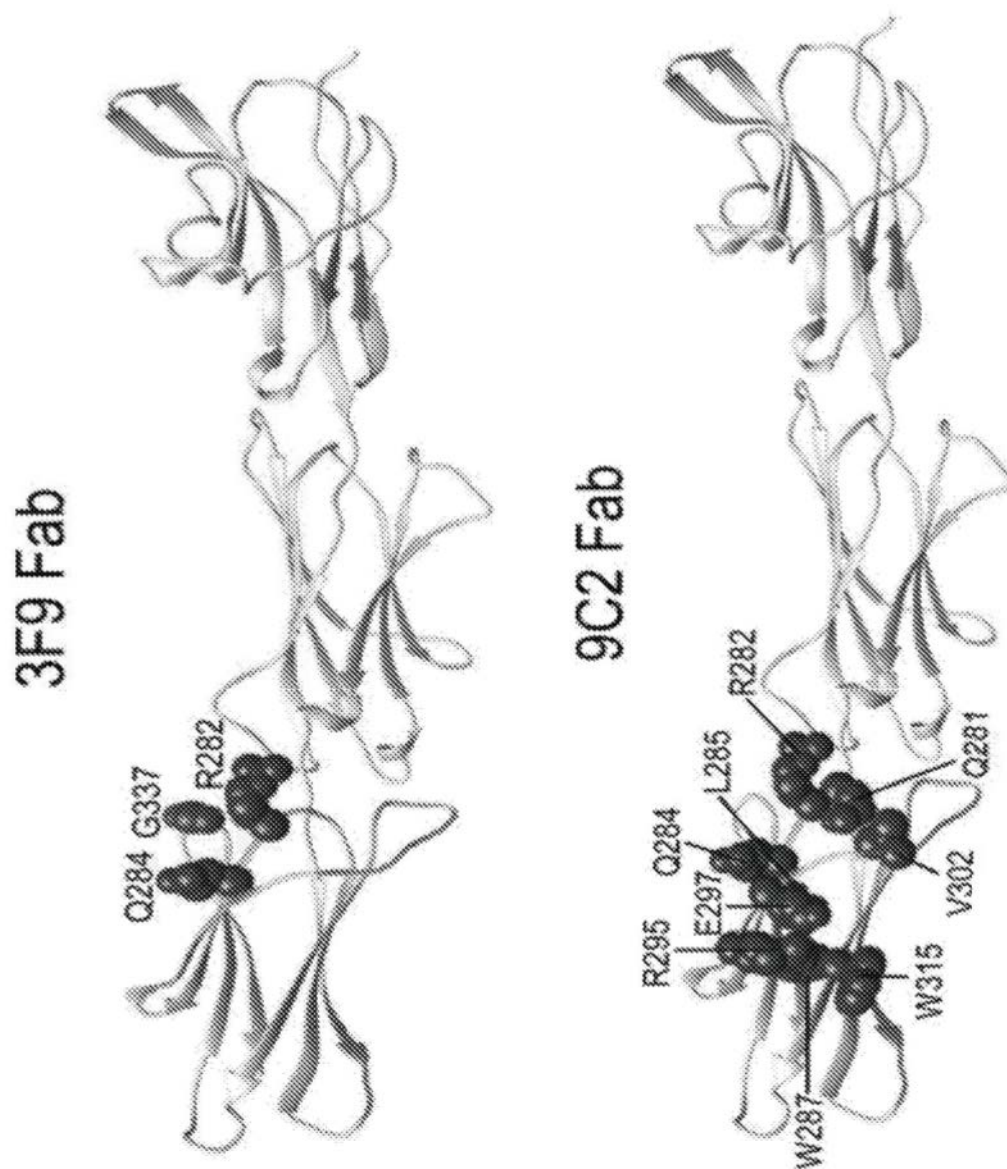


图16

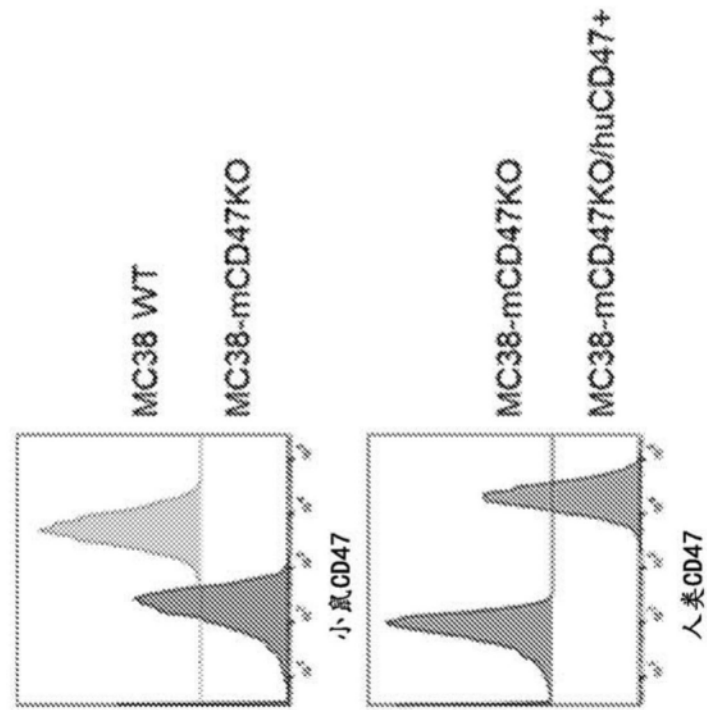


图17A

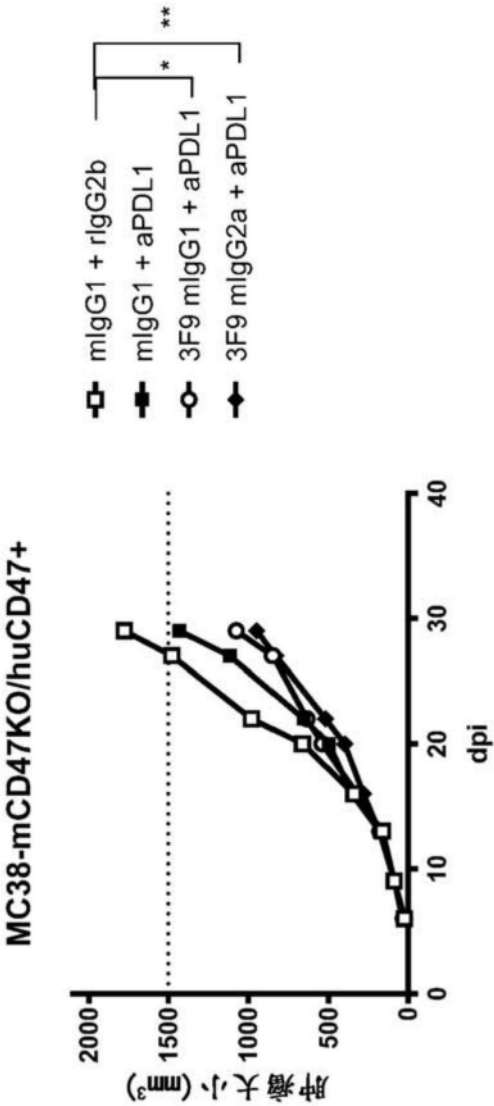


图17B

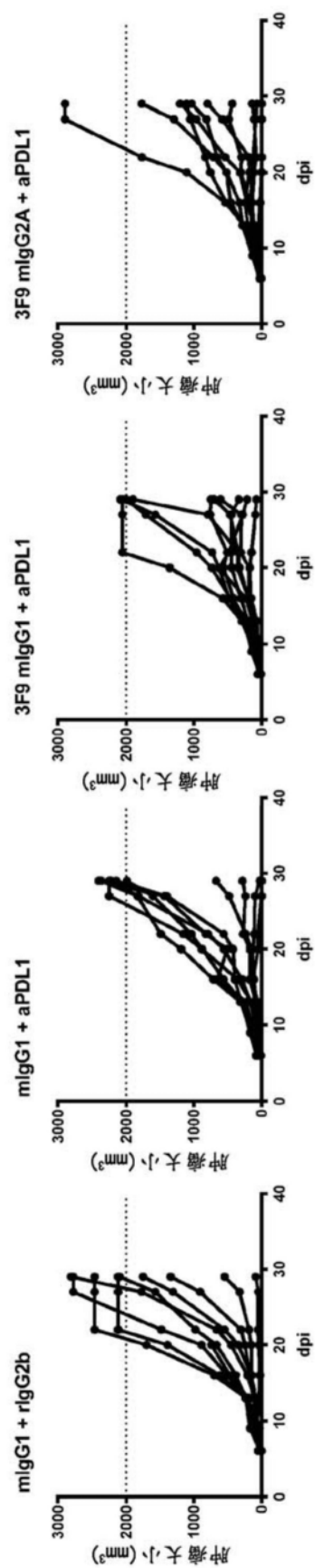


图17C

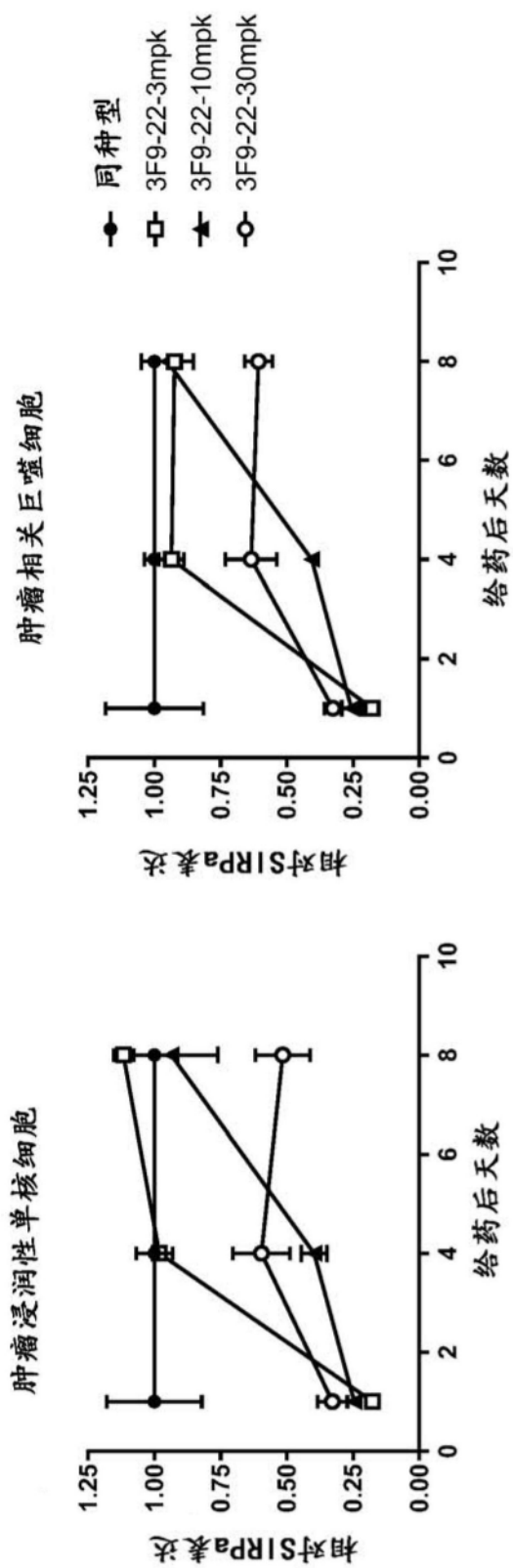


图18A

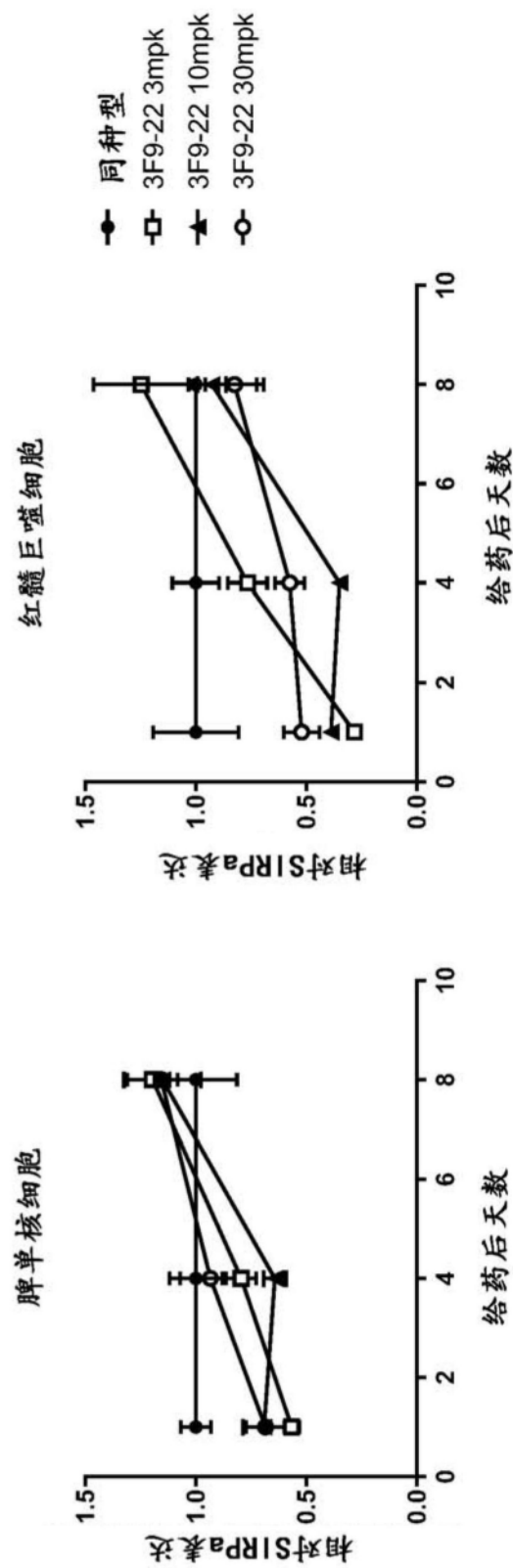


图18B

组	CD34+ HSC 供体A 小鼠数目	CD34+ HSC 供体B 小鼠数目	抗体 处理	剂量	日程	接种物
1	2	9	hulgG1	10 mpk	q3dx2	3百万个 A375细胞
2	3	10	3F9-22 PS	10 mpk	q3dx2	3百万个 A375细胞
3	3	10	3F9-22 NSLF	10 mpk	q3dx2	3百万个 A375细胞

图19A

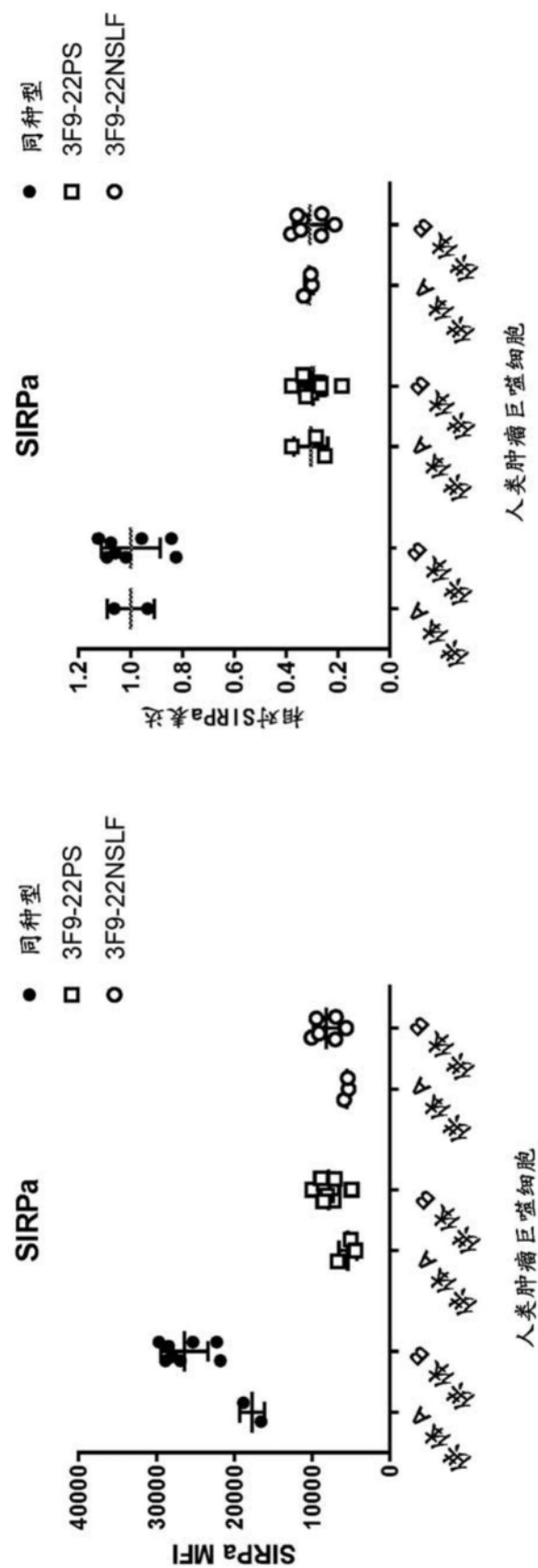


图19B

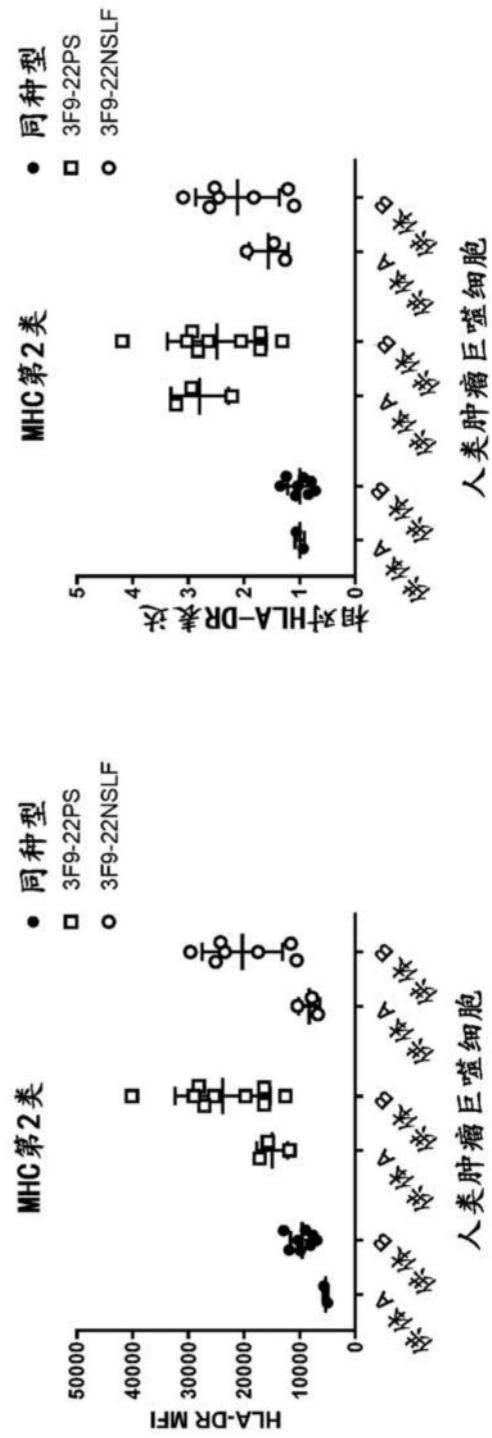


图20A

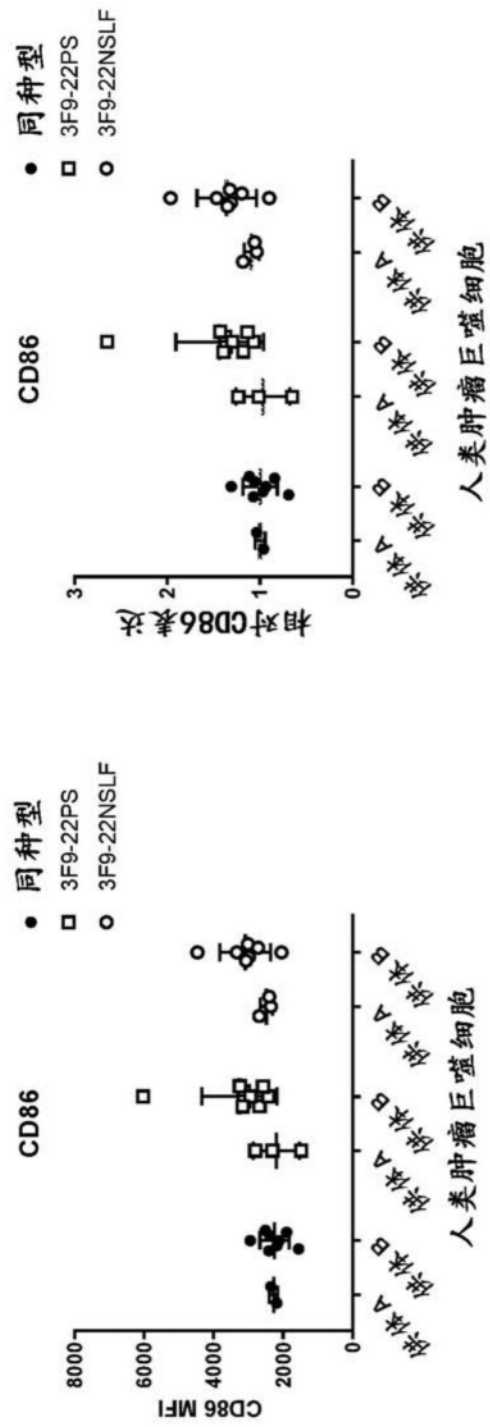


图20B

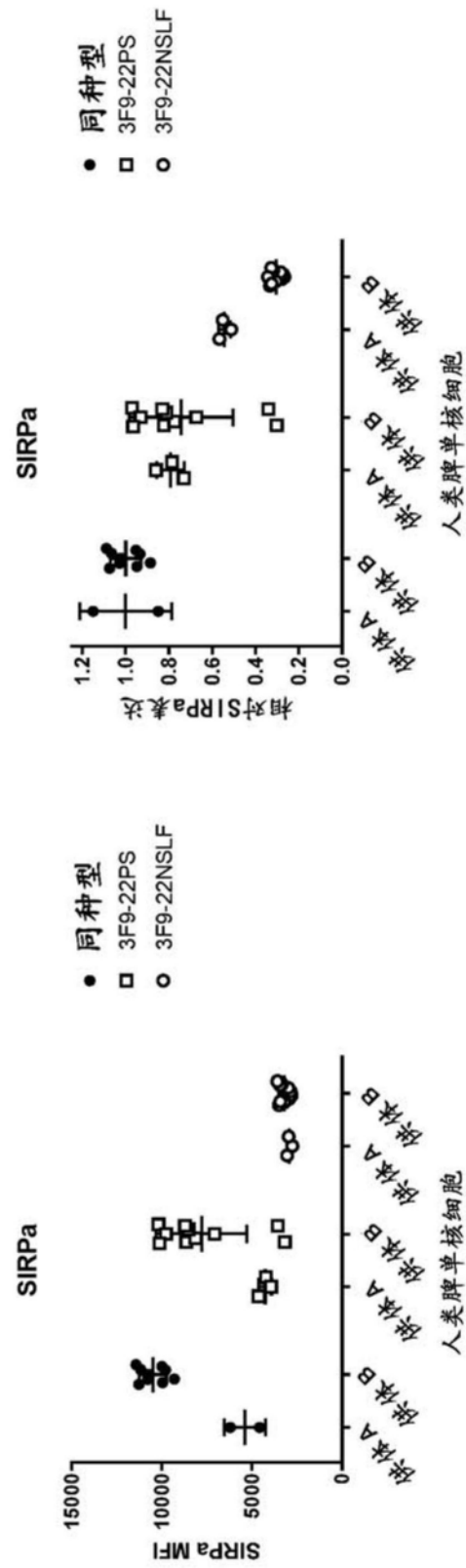


图21A

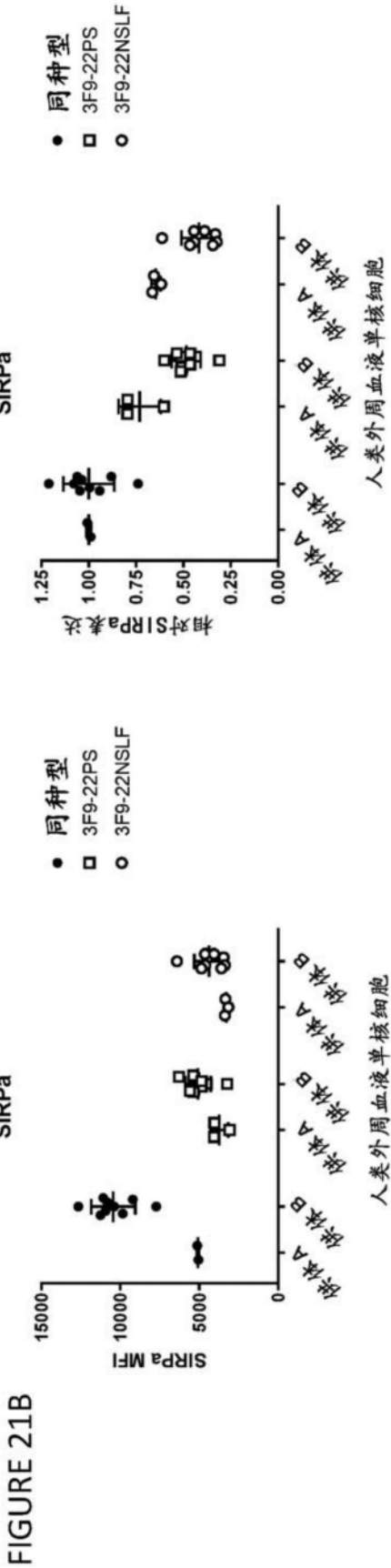


图21B

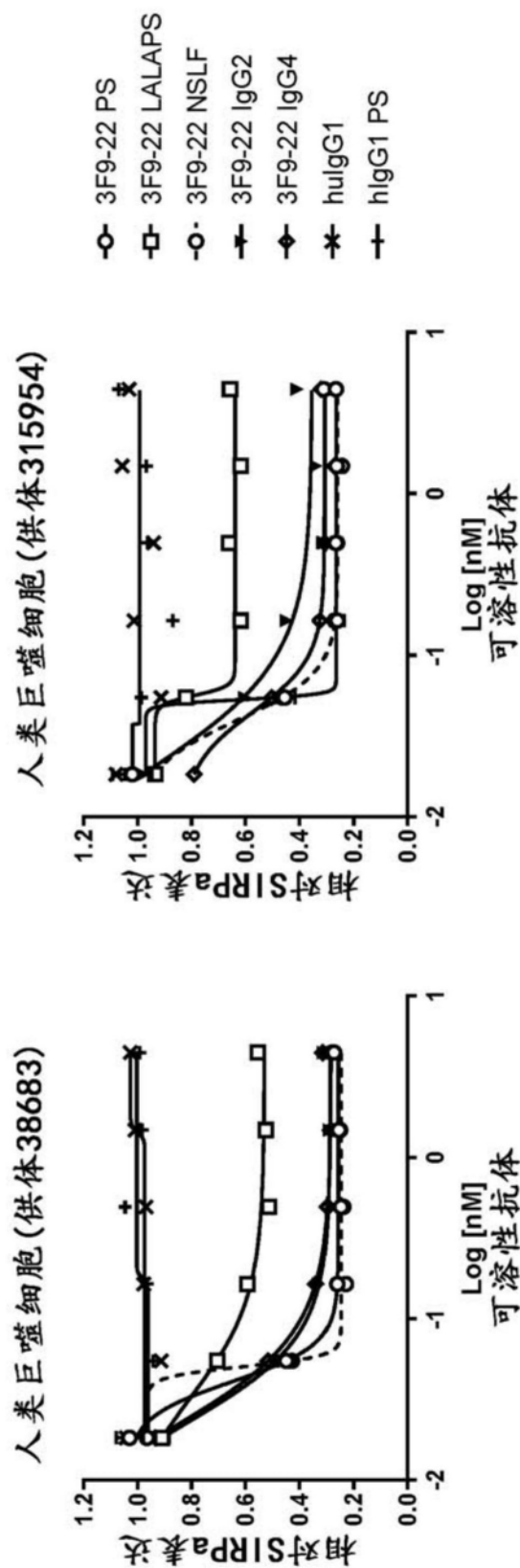


图22

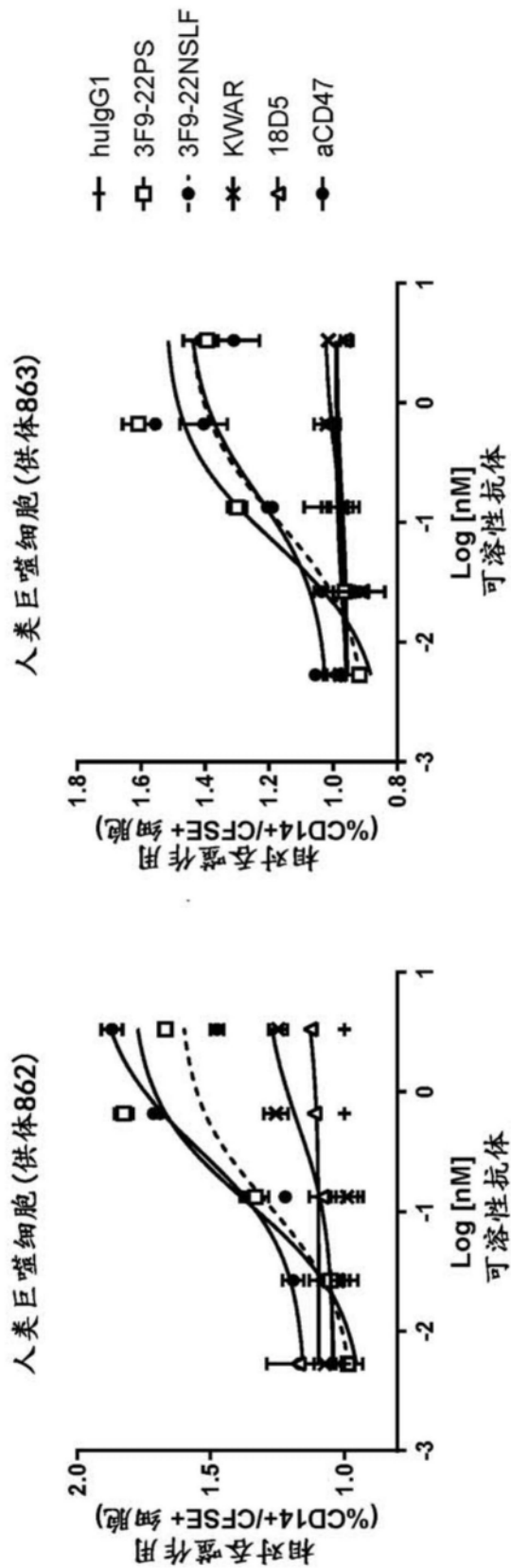


图23

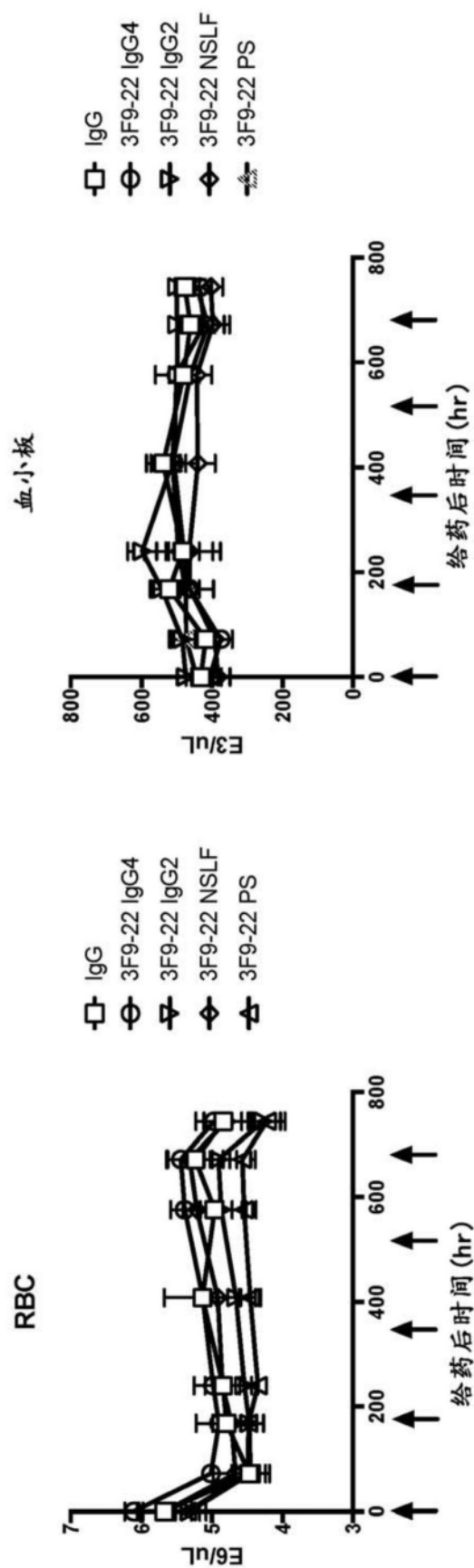


图24