



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119497722 A

(43) 申请公布日 2025.02.21

(21) 申请号 202380052100.6

(22) 申请日 2023.05.31

(30) 优先权数据

63/347,939 2022.06.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.01.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/067697 2023.05.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/235754 EN 2023.12.07

(71) 申请人 ALX肿瘤生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J·庞斯 S·兰多夫

M·维尔杰克 A·蒂亚提斯

H·刘 M·李 A·S-R·陈

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494  
专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/68 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书89页  
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

用于治疗尿路上皮癌的组合疗法

(57) 摘要

本发明提供了治疗癌症(例如尿路上皮癌)的方法,所述方法包括施用包含SIRP  $\alpha$ -D1结构域变体和Fc结构域变体的多肽(例如融合多肽)与抗体-药物缀合物(例如维恩妥尤单抗)的组合。还提供了相关的试剂盒。

1. 一种治疗个体的尿路上皮癌的方法,其包括向所述个体施用(a)有效量的包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体和Fc结构域变体的融合多肽,和(b)有效量的维恩妥尤单抗,

其中所述融合多肽的所述SIRP $\alpha$ D1结构域变体包含SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:85的氨基酸序列;并且

其中所述融合多肽的Fc结构域变体是

(i) 包含L234A、L235A、G237A和N297A突变的人IgG1 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引;

(ii) 包含A330S、P331S和N297A突变的人IgG2 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引;

(iii) 包含S228P、E233P、F234V、L235A和delG236突变的人IgG4 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引;或者

(iv) 包含S228P、E233P、F234V、L235A、delG236和N297A突变的人IgG4 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述尿路上皮癌是局部晚期尿路上皮癌或转移性尿路上皮癌。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述尿路上皮癌为膀胱癌、肾盂癌、输尿管癌或尿道癌。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述个体接受过使用免疫检查点抑制剂(CPI)的先前治疗。

5. 如权利要求4所述的方法,其中所述CPI是PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂。

6. 如权利要求4或5所述的方法,其中所述CPI是阿特珠单抗、派姆单抗、德瓦鲁单抗、阿维鲁单抗或纳武单抗。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述个体接受过使用含铂化疗的先前治疗。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述个体在接受最近的先前疗法期间或之后具有尿路上皮癌的进展或复发。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述个体未接受过使用基于单甲基奥里斯他汀(MMAE)的抗体-药物缀合物的先前治疗。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述个体未接受过使用维恩妥尤单抗的先前治疗。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述个体未接受过使用阻断CD47与SIRP $\alpha$ 之间的相互作用的治疗剂的先前治疗。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述维恩妥尤单抗在一个或多个28天周期中向所述个体施用,并且其中所述维恩妥尤单抗在每个28天周期的第1天、第8天和第15天以1.25mg/kg IV的剂量向所述个体施用。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述维恩妥尤单抗是静脉内施用的。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述融合多肽以高达约60mg/kg的剂量向所述个体施用。

15. 如权利要求14所述的方法,其中所述融合多肽以约30mg/kg的剂量每两周一次(q2w)向所述个体施用。

16. 如权利要求14所述的方法,其中所述融合多肽以约20mg/kg的剂量每两周一次

(q2w)施用。

17. 如权利要求14所述的方法,其中所述融合多肽以约15mg/kg的剂量每两周一次(q2w)施用。

18. 如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述融合多肽是静脉内施用的。

19. 如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述SIRP $\alpha$ D1结构域变体包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列。

20. 如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述SIRP $\alpha$ D1结构域变体包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。

21. 如权利要求1-20中任一项所述的方法,其中所述Fc结构域变体是包含L234A、L235A、G237A和N297A突变的人IgG1 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引。

22. 如权利要求21所述的方法,其中所述Fc结构域变体包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列。

23. 如权利要求1-19和21-22中任一项所述的方法,其中所述融合多肽包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列。

24. 如权利要求1-18和20-22中任一项所述的方法,其中所述融合多肽包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列。

25. 如权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述融合多肽形成同二聚体。

26. 如权利要求1-25中任一项所述的方法,其中所述个体是人。

27. 一种试剂盒,其包含在药学上可接受的载体中的多肽,所述多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体和Fc结构域变体,所述多肽用于与维恩妥尤单抗组合用于治疗有需要的个体的尿路上皮癌,

其中所述SIRP $\alpha$ D1结构域变体包含SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:85的氨基酸序列;

其中所述Fc结构域变体是

(i) 包含L234A、L235A、G237A和N297A突变的人IgG1 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引;

(ii) 包含A330S、P331S和N297A突变的人IgG2 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引;

(iii) 包含S228P、E233P、F234V、L235A和delG236突变的人IgG4 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引;或者

(iv) 包含S228P、E233P、F234V、L235A、delG236和N297A突变的人IgG4 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引,

并且其中所述试剂盒包含用于向所述个体施用包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体和Fc结构域变体的所述多肽与维恩妥尤单抗的组合的说明书。

## 用于治疗尿路上皮癌的组合疗法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年6月1日提交的美国临时申请号63/347,939的优先权权益,该申请的公开内容全文据此通过并入。

[0003] 对电子序列表的引用

[0004] 电子序列表(757972001900SEQLIST.xml;大小:365,943字节;创建日期:2023年5月25日)的内容通过引用全文并入本文。

### 技术领域

[0005] 本发明涉及治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的个体施用阻断CD47(例如,hCD47)和SIRP $\alpha$ (例如,hSIRP $\alpha$ )之间的相互作用的药剂与抗体药物缀合物(例如,维恩妥尤单抗(enfortumab vedotin))的组合。

### 背景技术

[0006] 膀胱癌是美国(US)第六大常见癌症。根据美国国家癌症研究所的估计,2021年诊断出超过83,000例新的尿路上皮癌病例,并且在美国超过17,000人死于该疾病(SEER Cancer Stat Facts:Bladder Cancer,2021.National Cancer Institute.Bethesda,MD, [https://seer\(dot\)ca ncer\(dot\)gov/statfacts/html/urinb\(dot\)html](https://seer(dot)ca ncer(dot)gov/statfacts/html/urinb(dot)html).在2022年3月09日访问)。膀胱癌主要发生在超过55岁的人群中,诊断时的中位年龄为73岁。发展此癌症的男:女比率为大约4:1。白种人比非洲裔美国人或西班牙裔美国人更容易被诊断为膀胱癌(SEER Cancer Stat Facts:Bladder Cancer,2021.National Cancer Institute.Bethesda,MD, [https://seer\(dot\)cancer\(dot\)gov/statfacts/html/urinb\(dot\)html](https://seer(dot)cancer(dot)gov/statfacts/html/urinb(dot)html).在2022年3月09日访问)。大约90%的膀胱癌是尿路上皮癌;如果癌症在诊断时已是晚期,则预后不良(Simeone JC,Nordstrom BL,Patel K,Mann H,Klein AB,Horne L.Treatment patterns and overall survival in metastatic urothelial carcinoma in a real-world,US setting.Cancer Epidemiol.2019;60:121-7)。大多数尿路上皮癌在非肌肉浸润阶段被诊断。在此阶段,疾病管理包括切除,伴有或没有囊内疗法。尽管进行了这种治疗,患者通常会发展成无法治愈的更晚期疾病,最终导致死亡。大约12%的患者在诊断时患有局部晚期或转移性疾病(SEER Cancer Stat Facts:Bladder Cancer,2021.National Cancer Institute.Bethesda,MD, [https://seer\(dot\)cancer\(dot\)gov/statfacts/html/urinb\(dot\)html](https://seer(dot)cancer(dot)gov/statfacts/html/urinb(dot)html).在2022年3月09日访问)。

[0007] 肾功能充足患者的局部晚期或转移性尿路上皮癌的一线疗法由以下组成:基于顺铂的组合,诸如与甲氨蝶呤、长春碱、多柔比星和顺铂(MVAC)或吉西他滨加顺铂的组合,其表现出总缓解率高达50%,包括大约10%至15%的完全缓解(CR)(Bellmunt J,Orsola A,Wiegel T,Guix M,De Santis M,Kataja V;ESMO Guidelines Working Group.Bladder cancer:ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis,treatment and follow-up.Ann Oncol.2011年9月;v22增补版6:vi45-9.doi:10(dot)1093/annonc/mdr376(dot)

PMID:21908503)。卡铂和吉西他滨通常用于不适合顺铂的患者,但结果通常较差。尽管存在初始化疗敏感性,但患者并未治愈,并且这些方案后转移性尿路上皮癌的结果很差:中位进展时间仅为7个月,并且中位总存活期(OS)为14个月。大约15%的患者存活至少5年,并且在具有内脏转移且5年OS率为7%的患者中预后特别差(von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, 等人 Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. J Clin Oncol. 2005; 23(21):4602-8)。尽管最近在尿路上皮癌的治疗方面取得了进展,但是本领域仍迫切需要用于患有局部晚期或转移性尿路上皮癌且在用基于铂的方案和免疫疗法治疗后复发的患者。

[0008] 本文引用的所有参考文献(包括专利申请、专利公开和UniProtKB/Swiss-Prot登记号)均通过引用全文并入本文,就好像每个单独的参考文献都被具体和单独地指出通过引用并入一样。

### 发明内容

[0009] 在一些实施方案中,本文提供了一种治疗个体尿路上皮癌的方法,其包括向所述个体施用(a)有效量的包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体和Fc结构域变体的融合多肽,和(b)有效量的维恩妥尤单抗,其中所述融合多肽的SIRP $\alpha$ D1结构域变体包含SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:85的氨基酸序列;并且其中所述融合多肽的Fc结构域变体是(i)包含L234A、L235A、G237A和N297A突变的人IgG1 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引;(ii)包含A330S、P331S和N297A突变的人IgG2 Fc区,其中编号根据Kabat的EU索引;(iii)包含S228P、E233P、F234V、L235A和de1G236突变的人IgG4 Fc区,其中编号根据Kabat的EU索引;或(iv)包含S228P、E233P、F234V、L235A、de1G236和N297A突变的人IgG4 Fc区,其中编号根据Kabat的EU索引。

[0010] 在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,尿路上皮癌是局部晚期尿路上皮癌或转移性尿路上皮癌。在一些实施方案中,尿路上皮癌是膀胱癌、肾盂癌、输尿管癌或尿道癌。在一些实施方案中,个体接受过使用免疫检查点抑制剂(CPI)的先前治疗。在一些实施方案中,CPI是PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂。在一些实施方案中,CPI是阿特殊单抗(atenzolizumab)、派姆单抗(pembrolizumab)、德瓦鲁单抗(durvalumab)、阿维鲁单抗(avelumab)或纳武单抗(nivolumab)。在一些实施方案中,个体接受过使用含铂化疗的先前治疗。在一些实施方案中,个体在接受最近的先前治疗期间或之后患有尿路上皮癌的进展或复发。在一些实施方案中,个体未接受过使用基于单甲基奥里斯他汀(monomethylauristatin, MMAE)的抗体-药物缀合物的先前治疗。在一些实施方案中,个体未接受过使用维恩妥尤单抗的先前治疗。在一些实施方案中,个体未接受过使用阻断CD47与SIRP $\alpha$ 之间的相互作用的的治疗剂的先前治疗。

[0011] 在一些实施方案中,在一个或多个28天周期中向个体施用维恩妥尤单抗,并且其中在每个28天周期的第1天、第8天和第15天以1.25mg/kg的剂量向个体IV施用维恩妥尤单抗。在一些实施方案中,维恩妥尤单抗静脉内施用。在一些实施方案中,融合多肽以高达约60mg/kg的剂量施用于个体。在一些实施方案中,融合多肽以约30mg/kg的剂量每两周一次

(q2w)施用于个体。在一些实施方案中,融合多肽以约20mg/kg的剂量每两周(q2w)施用一次。在一些实施方案中,融合多肽以约15mg/kg的剂量每两周(q2w)施用一次。在一些实施方案中,静脉内施用融合多肽。

[0012] 在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc结构域变体是包含L234A、L235A、G237A和N297A突变的人IgG1 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施方案中,Fc结构域变体包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列。在一些实施方案中,融合多肽包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列。在一些实施方案中,融合多肽包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列。在一些实施方案中,融合多肽形成同二聚体。

[0013] 在一些实施方案中,提供了一种试剂盒,其包含多肽,所述多肽在药学上可接受的载体中包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体和Fc结构域变体,所述多肽与维恩妥尤单抗组合用于治疗有需要的个体的尿路上皮癌,其中所述SIRP $\alpha$ D1结构域变体包含SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:85的氨基酸序列;其中Fc结构域变体是(i)包含L234A、L235A、G237A和N297A突变的人IgG1 Fc区,其中编号根据Kabat的EU索引;(ii)包含A330S、P331S和N297A突变的人IgG2 Fc区,其中编号根据Kabat的EU索引;(iii)包含S228P、E233P、F234V、L235A和delG236突变的人IgG4 Fc区,其中编号根据Kabat的EU索引;或(iv)包含S228P、E233P、F234V、L235A、delG236和N297A突变的人IgG4 Fc区,其中编号根据Kabat的EU索引,并且其中所述试剂盒包含用于将包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体和Fc结构域变体的多肽与维恩妥尤单抗组合施用于个体的说明书。

[0014] 应了解,本文所述的各种实施方案的一种、一些或全部性质可加以组合以形成本发明的其他实施方案。本发明的这些和其他方面对于本领域技术人员来说将变得显而易见。本发明的这些和其他实施方案通过以下详细描述进一步描述。

## 附图说明

[0015] 图1A示出了实验的结果,使用衍生自第一人供体的单核细胞的巨噬细胞以及T47D导管癌细胞和OE19食管腺癌细胞作为靶细胞进行所述实验,以确定药物A是否增强药物B和药物C的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)活性。

[0016] 图1B示出了实验的结果,使用衍生自从第二人供体获得的单核细胞的巨噬细胞以及T47D导管癌细胞和OE19食管腺癌细胞作为靶细胞进行所述实验,以确定药物A是否增强药物B和药物C的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)活性。

[0017] 图2示出了实验的结果,进行所述实验以确定药物A对于衍生自由第三人供体获得的单核细胞的巨噬细胞对OE19食管腺癌细胞的药物B-依赖性(左图)或药物C-依赖性(右图)ADCP的影响。

[0018] 图3示出了测定的结果,进行测定以确定药物A对于衍生自由第三人供体获得的单核细胞的巨噬细胞对HT-1376膀胱癌细胞的药物B-依赖性(左图)或药物C-依赖性(右图)ADCP的影响。

[0019] 图4提供了实施例3中描述的1期临床试验的研究设计。

## 具体实施方式

[0020] 以下描述阐述了示例性方法、参数等。然而,应该认识到,这种描述并不旨在限制本公开的范围,而是作为示例性实施方案的描述来提供。

[0021] 本文提供的标题并非对各个方面或实施方案的限制,所述各个方面或实施方案可通过整体参考本说明书而得。因此,如下直接定义的术语通过整体参考说明书被更充分地定义。

[0022] 定义

[0023] 术语“约”或“大约”是指由本领域普通技术人员确定的特定值在可接受的误差范围内,这部分取决于如何测量或确定所述值,即,测量系统的限制。例如,根据本领域的实践,“约”可以表示在1个或多于1个标准偏差内。替代地,“约”可以表示给定值的高达20%、高达10%、高达5%或高达1%的范围。替代地,特别是就生物系统或过程而言,所述术语可以表示在一个数量级内,优选在一个值的5倍内,并且更优选在2倍内。当在申请和权利要求中描述特定值时,除非另有说明,否则术语“约”应被认为是特指特定值在可接受的误差范围内。

[0024] 本文使用的术语仅仅是为了描述特定的情况的目的,而不旨在进行限制。如本文所使用,单数形式“一(a/an)”和“所述”旨在也包括复数形式,除非上下文清楚地另外指出。此外,就详细描述或权利要求中使用的术语“包括(including/includes)”、“具有(having/has/with)”或其变体而言,这些术语旨在以类似于术语“包含(comprising)”的方式包括在内。

[0025] 术语“治疗(treat/treating/treatment)”在涉及哺乳动物的某种疾病状况时,是指在患有疾病状况的哺乳动物中产生期望的或有益的效果。期望的或有益的效果可以包括降低疾病的一种或多种症状的频率或严重性(即,肿瘤生长和/或转移,或由免疫细胞的数量和/或活性介导的其他效果等),或阻止或抑制疾病、病状或病症的进一步发展。在治疗哺乳动物的癌症的情况下,期望的或有益的效果可包括抑制癌细胞的进一步生长或扩散、癌细胞死亡、抑制癌症复发、减轻与癌症相关的疼痛或提高哺乳动物的存活率。这种效果可以是主观的或客观的。例如,如果哺乳动物是人,人可能会注意到活力或生命力的改善或疼痛的减轻,作为改善或对治疗响应的主观症状。或者,临床医生可能会注意到基于身体检查、实验室参数、肿瘤标记物或放射影像学发现的肿瘤大小或肿瘤负荷的减少。此外,临床医生可以观察到可检测的肿瘤标记物的减少。或者,可以使用其他测试来评估客观改善,诸如计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)等。

[0026] 如本文所使用,术语“接头”指两个元件(例如蛋白质结构域)之间的连接。在一些实施方案中,接头可以是共价键或间隔区。术语“间隔区”指出现在两个多肽或多肽结构域之间的部分(例如,聚乙二醇(PEG)聚合物)或氨基酸序列(例如,1-200个氨基酸序列),以在两个多肽或多肽结构域之间提供空间或柔性(或空间和柔性两者)。在一些实施方案中,氨基酸间隔区是多肽一级序列的部分(例如,经由多肽主链连接到间隔的多肽或多肽结构域)。

[0027] 如本文所使用,术语“药物组合物”是指包含活性成分以及赋形剂或稀释剂(或赋形剂和稀释剂两者)并能使活性成分通过合适的施用方法施用的医学或药物配方。在一些实施方案中,本文公开的药物组合物包含与多肽相容的药学上可接受的组分。在一些实施

方案中,药物组合物呈用于口服施用的片剂或胶囊形式,或呈用于静脉内或皮下施用(例如通过注射)的水性形式。

[0028] 如本文所使用,术语“受试者”、“个体”和“患者”可互换使用,指脊椎动物,例如哺乳动物。哺乳动物包括但不限于老鼠、猿猴、人类、农场动物、运动动物和宠物。还涵盖体内获得或体外培养的生物实体的组织、细胞及其后代。这些术语都不包含对医疗专业人员的监督。

[0029] 如本文所使用,术语“亲和力”或“结合亲和力”是指两个分子之间的结合相互作用的强度。通常,结合亲和力指分子与其结合配偶体(诸如SIRP $\alpha$ D1结构域变体和CD47)之间的非共价相互作用的总和强度。除非另有说明,否则结合亲和力是指固有的结合亲和力,其反映结合对成员之间的1:1相互作用。两个分子之间的结合亲和力通常用解离常数( $K_D$ )或缔合常数( $K_A$ )来描述。对彼此具有低结合亲和力的两个分子通常结合缓慢,易于解离,并且表现出大的 $K_D$ 。对彼此具有高亲和力的两个分子通常容易结合,倾向于保持结合更长时间,并且表现出小的 $K_D$ 。在一些实施方案中,使用已知的方法和技术(例如,表面等离子体共振(SPR))来确定两个相互作用的分子的 $K_D$ 。 $K_D$ 可以计算为 $k_{off}/k_{on}$ 的比率。

[0030] 如本文所使用,术语“ $K_D$ 小于”是指数值上更小的 $K_D$ 值和相对于所述 $K_D$ 值增加的结合亲和力。如本文所使用,术语“ $K_D$ 大于”是指数值上更大的 $K_D$ 值和相对于所述 $K_D$ 值降低的结合亲和力。

[0031] “有效量”是指以必要的剂量在必要的时间段内实现一种或多种期望或指示的效果(包括治疗或预防结果)的至少有效的量。可在一次或多次施用中提供有效量。出于本公开的目的,抗体、药物、化合物或药物组合物的有效量是足以直接或间接实现预防性或治疗性治疗的量。如在临床上下文中所理解的,药物、化合物或药物组合物的有效量可以或可以不与另一种药物、化合物或药物组合物结合实现(例如,作为单一疗法或组合疗法施用的有效量)。因此,可在施用一种或多种治疗剂的情形下考虑“有效量”,并且如果与一种或多种其他药剂联合,可实现或实现了合乎需要的结果,那么单一药剂可被视为以有效量给与。

[0032] 除非另有说明,否则本公开的方法和技术通常根据本领域熟知的方法进行,并且如在本说明书全文中引用和讨论的各种一般和更具体的参考文献中所述。这些参考文献包括例如Sambrook和Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Approach*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), Ausubel等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons, NY (2002), 以及Harlow和Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书进行,如本领域通常完成的或如本文所述的。与本文所述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学结合使用的术语和其实验室程序和技术是本领域中熟知和常用的。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和给药以及患者治疗。

[0033] 如本文所用,二十种常规氨基酸及其缩写遵循常规用法。参见 *Immunology—A Synthesis* (第2版, E.S. Golub和D.R. Gren编辑, Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))。

[0034] 本文所引用的所有参考文献(包括专利申请和公布)均据此通过引用全文并入。

[0035] 概述

[0036] 本文提供了一种治疗个体(例如,人类个体)的癌症(例如,尿路上皮癌)的方法,所述方法包括向所述个体施用(a)有效量的阻断CD47(例如,hCD47)和SIRP $\alpha$ (例如,hSIRP $\alpha$ )之间的相互作用的药剂,和(b)有效量的抗体-药物缀合物。

[0037] 在一些实施方案中,阻断CD47(例如,hCD47)与SIRP $\alpha$ (例如,hSIRP $\alpha$ )之间的相互作用的药剂是CD47-SIRP $\alpha$ 途径的小分子抑制剂(例如,RRX-001和其他物)。CD47-SIRP $\alpha$ 途径的示例性小分子抑制剂包括但不限于例如Miller等人(2019)“Quantitative high-throughput screening assays for the discovery and development of SIRP $\alpha$ -CD47 interaction inhibitors.” PLoS ONE 14(7):e0218897以及Sasikumar等人ACR-NCI-EORTC International Conference:Molecular Targets and Cancer Therapeutics;2017年10月26-30日;Philadelphia,PA;摘要B007。

[0038] 在一些实施方案中,阻断CD47(例如,hCD47)与SIRP $\alpha$ (例如,hSIRP $\alpha$ )之间的相互作用的药剂结合CD47(例如,hCD47)。在一些实施方案中,所述药剂以约10nM或更好(诸如至少约9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、3nM、2nM、1nM、750pM、500pM、250pM、200pM、100pM、50pM、25pM、20pM、10pM或小于10pM中的任何一种)的 $K_D$ 结合CD47(例如,hCD47)。在一些实施方案中,结合CD47(例如,hCD47)的药剂在人类受试者中表现出至少约50%的CD47受体占有率(例如,至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或约100%中的任何一种)。在一些实施方案中,结合CD47(例如,hCD47)的药剂具有约80ng/ml或更低,例如约75ng/ml、70ng/ml、65ng/ml、60ng/ml、55ng/ml、50ng/ml、45ng/ml、40ng/ml、35ng/ml、30ng/ml、25ng/ml、20ng/ml、15ng/ml、10ng/ml或5ng/ml中的任何一种的EC<sub>50</sub>。在一些实施方案中,结合CD47(例如,hCD47)的药剂是多肽。在一些实施方案中,结合CD47(例如,hCD47)的药剂是抗CD47抗体(例如,治疗性抗CD47抗体)或其抗原结合片段。在一些实施方案中,抗CD47抗体的抗原结合片段是Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、单臂抗体或双价抗体(diabody)。在一些实施方案中,抗CD47抗体是单特异性抗体。在一些实施方案中,抗CD47抗体是多特异性(例如,双特异性)抗体。在一些实施方案中,术语“抗CD47抗体”涵盖基于抗体的构建体(诸如多特异性构建体),包括但不限于三功能抗体(triomab)、DART(即,双亲和力和再靶向抗体)、TandAb(即,串联双价抗体)、串联scFv、CrossMab、DNL(即,停靠和锁定抗体)、DVD-Ig(即,双可变结构域免疫球蛋白)、四价双特异性IgG、纳米抗体、双靶向结构域和ART-Ig(即,不对称再造技术-免疫球蛋白)。关于示例性抗体构建体(单特异性和多特异性两者)的额外细节提供于Husain等人(2018)Biodrugs 32(5):441-464和Spiess等人(2015)Molecular Immunology 67(2):95-106中。在一些实施方案中,抗CD47抗体是全长抗体,例如Hu5F9-G4、B6H12.2、BRIC126、CC-90002、SRF231或IBI188(来自Innovent Biologics)(关于这些抗CD47抗体的额外信息,参见例如Zhao等人(2011),PNAS USA 108:18342-18347;Chao等人(2010)Cell 142:699-713;Kim等人(2012)Leukemia 26:2538-2545;Chao等人(2011)Blood 118:4890-4891;Goto等人(2014)Eur J.Cancer 50:1836-1846;和Edris等人(2012)PNAS USA 109:6656-61)。

[0039] 在一些实施方案中,阻断CD47(例如,hCD47)与SIRP $\alpha$ (例如,hSIRP $\alpha$ )之间的相互作用的药剂结合SIRP $\alpha$ (例如,hSIRP $\alpha$ )。在一些实施方案中,所述药剂以约10nM或更好(诸如至少约9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、3nM、2nM、1nM、750pM、500pM、250pM、200pM、100pM、50pM、25pM、20pM、10pM或小于10pM中的任何一种)的 $K_D$ 结合SIRP $\alpha$ (例如,hSIRP $\alpha$ )。在一些实施方案中,

结合SIRP $\alpha$  (例如, hSIRP $\alpha$ ) 的药剂在人类受试者中表现出至少约50%的SIRP $\alpha$ 受体占有率 (例如, 至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或约100%中的任何一种)。在一些实施方案中, 结合SIRP $\alpha$  (例如, hSIRP $\alpha$ ) 的药剂具有约80ng/ml或更低, 例如约75ng/ml、70ng/ml、65ng/ml、60ng/ml、55ng/ml、50ng/ml、45ng/ml、40ng/ml、35ng/ml、30ng/ml、25ng/ml、20ng/ml、15ng/ml、10ng/ml或5ng/ml中的任何一种的EC<sub>50</sub>。在一些实施方案中, 结合SIRP $\alpha$  (例如, hSIRP $\alpha$ ) 的药剂是多肽。在一些实施方案中, 结合SIRP $\alpha$  (例如, hSIRP $\alpha$ ) 的药剂是抗SIRP $\alpha$ 抗体 (例如, 治疗性抗SIRP $\alpha$ 抗体) 或其抗原结合片段。在一些实施方案中, 抗SIRP $\alpha$ 抗体的抗原结合片段是Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、单臂抗体或双价抗体 (diabody)。在一些实施方案中, 抗SIRP $\alpha$ 抗体是单特异性抗体或单特异性抗体构建体 (包括但不限于上述那些)。在一些实施方案中, 抗SIRP $\alpha$ 抗体是多特异性 (例如, 双特异性) 抗体或多特异性抗体构建体 (包括但不限于上述那些)。在一些实施方案中, 抗SIRP $\alpha$ 抗体是全长抗体, 例如KWAR23、SE12C3, 040或MY-1 (关于这些抗SIRP $\alpha$ 抗体的额外信息, 参见例如Ring等人 (2017) PNAS USA 114 (49) :E10578-E10585); Murata等人 (2018) Cancer Sci 109 (5) :1300-1308; 和Yanigata等人 (2017) JCI Insight 2:e89140)。在一些实施方案中, 抗SIRP $\alpha$ 抗体是WO 2018/057669、US-2018-0105600-A1、US20180312587、W02018107058、W02019023347、US20180037652、W02018210795、W02017178653、W02018149938、W02017068164和W02016063233中描述的抗体, 其内容通过引用全文并入本文。

[0040] 在一些实施方案中, 阻断CD47 (例如, hCD47) 与SIRP $\alpha$  (例如, hSIRP $\alpha$ ) 之间的相互作用的药剂是抗SIRP $\beta$ 抗体或抗SIRP $\gamma$ 抗体 (例如, 能够结合SIRP $\alpha$ 的抗SIRP $\beta$ 抗体或抗SIRP $\gamma$ 抗体) 或其抗原结合片段。在一些实施方案中, 所述药剂是能够结合SIRP $\alpha$ 、SIRP $\beta$ 和SIRP $\gamma$ 中的两种或更多种的抗体 (或其抗原结合片段)。在一些实施方案中, 此类抗体 (或其抗原结合片段) 以约10nM或更好 (诸如至少约9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、3nM、2nM、1nM、750pM、500pM、250pM、200pM、100pM、50pM、25pM、20pM、10pM或小于10pM中的任何一种) 的K<sub>D</sub>结合SIRP $\alpha$  (例如, hSIRP $\alpha$ )。在一些实施方案中, 抗体 (或其抗原结合片段) 在人类受试者中表现出至少约50%的SIRP $\alpha$ 受体占有率 (例如, 至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或约100%中的任何一种)。在一些实施方案中, 抗体 (或其抗原结合片段) 具有约80ng/ml或更低, 例如约75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10或5ng/ml中的任一者的EC<sub>50</sub>。在一些实施方案中, 抗原结合片段是Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、单臂抗体或双价抗体 (diabody)。在一些实施方案中, 抗体是单特异性抗体或单特异性抗体构建体 (包括但不限于上述那些)。在一些实施方案中, 抗体是多特异性 (例如, 双特异性) 抗体或多特异性抗体构建体 (包括但不限于上述那些)。

[0041] 在一些实施方案中, 阻断CD47 (例如, hCD47) 与SIRP $\alpha$  (例如, hSIRP $\alpha$ ) 之间的相互作用的药剂是包含结合CD47的部分的融合多肽。在一些实施方案中, 融合多肽包含抗体Fc区和结合CD47的部分。在一些实施方案中, 结合CD47的融合多肽部分 (例如, hCD47) 以约10nM或更好 (诸如至少约9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、3nM、2nM、1nM、750pM、500pM、250pM、200pM、100pM、50pM、25pM、20pM、10pM或小于10pM中的任何一种) 的K<sub>D</sub>结合CD47 (例如, hCD47)。在一些实施方案中, 融合多肽在人类受试者中表现出至少约50%的CD47受体占有率 (例如, 至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或约100%中的任何一种)。在一些实施方案中, 融合多肽具有约80ng/ml或更低, 例如约75ng/ml、70ng/ml、65ng/ml、

60ng/ml、55ng/ml、50ng/ml、45ng/ml、40ng/ml、35ng/ml、30ng/ml、25ng/ml、20ng/ml、15ng/ml、10ng/ml或5ng/ml中的任一种的EC50。在一些实施方案中,融合多肽包含野生型人抗体Fc区。在一些实施方案中,融合多肽包含Fc变体(例如,野生型人抗体Fc区的变体),所述变体相对于野生型人抗体Fc区的氨基酸序列包含一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代。在一些实施方案中,与WT Fc区相比,Fc变体表现出降低的(例如,诸如消除的)效应子功能。示例性的Fc变体描述于WO 2017/027422和US2017/0107270中,其内容通过引用全文并入本文。在一些实施方案中,融合蛋白的结合CD47(例如hCD47)的部分是WT SIRP $\alpha$ (例如,hSIRP $\alpha$ )或WT SIRP $\gamma$ (例如,hSIRP $\gamma$ )。在一些实施方案中,结合CD47(例如,hCD47)的部分是WT SIRP $\alpha$ (例如,hSIRP $\alpha$ )或WT SIRP $\gamma$ (例如,hSIRP $\gamma$ )的CD47结合片段(例如,D1结构域)。在一些实施方案中,结合CD47(例如,hCD47)的部分是SIRP $\alpha$ 变体、SIRP $\gamma$ 变体、SIRP $\beta$ 变体或其CD47结合片段(例如,D1结构域)。在一些实施方案中,分别相对于任何前述的野生型SIRP $\alpha$ 、SIRP $\gamma$ 、SIRP $\beta$ 或其CD47结合片段的氨基酸序列,任何前述的SIRP $\alpha$ 变体、SIRP $\gamma$ 变体、SIRP $\beta$ 变体或其CD47结合片段(例如,D1结构域)包含一个或多个氨基酸插入、缺失或取代。示例性的SIRP $\gamma$ 变体和SIRP $\beta$ 变体描述于例如WO 2013/109752、US 2015/0071905、USP 9,944,911、WO 2016/023040、WO 2017/027422、US2017/0107270、USP 10,259,859、US9845345、WO2016187226、US20180155405、WO2017177333、WO2014094122、US2015329616、US20180312563、WO2018176132、WO2018081898、WO2018081897、PCT/US2019/048921、US20180141986A1和EP3287470A1,其内容通过引用全文并入本文。示例性SIRP $\alpha$ 变体在本文其他地方有更详细的描述。

[0042] 在一些实施方案中,阻断CD47(例如,hCD47)与SIRP $\alpha$ (例如,hSIRP $\alpha$ )之间的相互作用的药剂是包含抗体Fc区和SIRP $\alpha$ 变体的融合多肽。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ 变体以约10nM或更好(诸如至少约9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、3nM、2nM、1nM、750pM、500pM、250pM、200pM、100pM、50pM、25pM、20pM、10pM或小于10pM中的任何一种)的K<sub>d</sub>结合CD47(例如,hCD47)。在一些实施方案中,融合多肽在人类受试者中表现出至少约50%的CD47受体占有率(例如,至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或约100%中的任何一种)。在一些实施方案中,融合多肽具有约80ng/ml或更低,例如约75ng/ml、70ng/ml、65ng/ml、60ng/ml、55ng/ml、50ng/ml、45ng/ml、40ng/ml、35ng/ml、30ng/ml、25ng/ml、20ng/ml、15ng/ml、10ng/ml或5ng/ml中的任一种的EC50。在一些实施方案中,融合多肽包含WT人抗体Fc区。在一些实施方案中,融合多肽包含Fc变体(例如,WT人抗体Fc区的变体),其与WT Fc区相比表现出降低的(例如,诸如消除的)效应子功能,诸如本文引用的参考文献中所述的那些。在一些实施方案中,融合多肽包含描述于WO 2013/109752、US2015/0071905、WO 2016/023040、WO 2017/027422、US2017/0107270、USP 10,259,859、US9845345、WO2016187226、US20180155405、WO2017177333、WO2014094122、US2015329616、US20180312563、WO2018176132、WO2018081898、WO2018081897、US20180141986A1和EP3287470A1中的SIRP $\alpha$ 变体,其内容通过引用全文并入本文。在一些实施方案中,包含抗体Fc区和SIRP $\alpha$ 变体的融合多肽是TTI-621、TTI-622或IMM01(参见例如,Petrova等人(2017)Clin Cancer Res 23:1086-1079;Russ等人(2018)Blood Rev S0268-960X(17)30093-0;Zhang,X,Chen,W,Fan,J等人Disrupting CD47-SIRP $\alpha$ axis alone or combined with autophagy depletion for the therapy of glioblastoma.Carcinogenesis 2018;39:689-99)。

[0043] 在一些实施方案中,阻断CD47(例如,hCD47)与SIRP $\alpha$ (例如,hSIRP $\alpha$ )之间的相互作用的药剂是融合多肽,其包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体(例如,本文所述的SIRP $\alpha$ D1结构域变体)和Fc结构域变体(例如,本文所述的Fc结构域变体)。下文提供了关于此类融合多肽的进一步细节。

[0044] 包含信号调控蛋白 $\alpha$ (SIRP $\alpha$ )D1结构域变体和Fc变体的示例性融合多肽

[0045] 信号调控蛋白 $\alpha$ (SIRP $\alpha$ )D1结构域变体

[0046] 在一些实施方案中,融合多肽包含信号调控蛋白 $\alpha$ (SIRP $\alpha$ )D1结构域或其变体。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体相对于野生型SIRP $\alpha$ D1结构域的氨基酸序列包含一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代。在一些实施方案中,本文公开了包含信号调控蛋白 $\alpha$ (SIRP- $\alpha$ )D1变体的多肽(例如融合多肽),所述变体包含SIRP $\alpha$ D1结构域或其CD47结合片段,其包含相对于野生型SIRP $\alpha$ D1结构域(例如,SEQ ID NO:1或2中所示的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域)在位置80处的氨基酸突变;和相对于野生型SIRP $\alpha$ D1结构域(例如,SEQ ID NO:1或2中所示的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域)在选自以下组成的组的氨基酸位置处的至少一个额外氨基酸突变:残基6、残基27、残基31、残基47、残基53、残基54、残基56、残基66和残基92。

[0047] 在一些实施方案中,本文还公开了包含Fc结构域变体的融合多肽,其中Fc结构域变体二聚体包含两个Fc结构域变体,其中每个Fc结构域变体独立地选自(i)由突变L234A、L235A、G237A和N297A组成的人IgG1 Fc区;(ii)由突变A330S、P331S和N297A组成的人IgG2 Fc区;或(iii)包含突变S228P、E233P、F234V、L235A、delG236和N297A的人IgG4 Fc区。

[0048] 信号调控蛋白 $\alpha$ (“SIRP- $\alpha$ ”或“SIRP- $\alpha$ ”)是属于广泛表达于骨髓细胞膜上的Ig超家族的跨膜糖蛋白。SIRP $\alpha$ 与CD47相互作用,CD47是一种广泛表达于体内许多细胞类型上的蛋白质。SIRP $\alpha$ 与CD47的相互作用阻止了“自身”细胞的吞噬,否则“自身”细胞可以被免疫系统识别。已经观察到,在急性髓性白血病和几种实体瘤癌症中,肿瘤细胞上CD47的高表达可以作为存活的负预后因素。

[0049] 天然SIRP $\alpha$ 包含3个高度同源的免疫球蛋白(Ig)样胞外结构域:D1、D2和D3。SIRP $\alpha$ D1结构域(“D1结构域”)是指SIRP $\alpha$ 的膜远端胞外结构域并介导SIRP $\alpha$ 与CD47的结合。如本文所使用,术语“SIRP $\alpha$ 多肽”是指能够结合至CD47的任何SIRP $\alpha$ 多肽或其片段。野生型人类SIRP $\alpha$ 至少有十种变体。表1显示了天然存在的野生型人SIRP $\alpha$ D1结构域变体(SEQ ID NO:1和2)的D1结构域的氨基酸序列。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ 多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ 多肽包含野生型D1结构域,诸如SEQ ID NO:1和2中提供的那些。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ 多肽包含野生型人SIRP $\alpha$ 的D2或D3结构域(或D2和D3结构域两者)(参见表3)。

[0050] 表1.野生型SIRP $\alpha$ D1结构域的序列

SEQ ID NO:	描述	氨基酸序列
1	野生型 D1 结构域变体 1	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRC TATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIY NQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMD FSIRIGNITPADAGTY YCVKFRKGS PDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
[0051] 2	野生型 D1 结构域变体 2	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHC TVTSLIPVGPIQWFRGAGPARELIY NQKEGHFPRVTTVSESTKRENMD SISISNITPADAGTY YCVKFRKGS DTEFKSGAGTELSVRAKPS
11	野生型泛 D1 结构域	EEX <sub>1</sub> LQVIQPDKX <sub>2</sub> VX <sub>3</sub> VAAGEX <sub>4</sub> A X <sub>5</sub> LX <sub>6</sub> CTX <sub>7</sub> TSLIPVGPIQWFRGAGP X <sub>8</sub> RELIYNQKEGHFPRVTTV SX <sub>9</sub> X <sub>10</sub> TKRX <sub>11</sub> NMDFX <sub>12</sub> IX <sub>13</sub> IX <sub>14</sub> NITPADA GTYYCVKFRKGSX <sub>15</sub> X <sub>16</sub> DX <sub>17</sub> EFKS GAGTELSVRX <sub>18</sub> KPS
[0052]	相对于 SEQ ID NO: 11 的氨基酸取代	X <sub>1</sub> 是 E 或 G; X <sub>2</sub> 是 S 或 F; X <sub>3</sub> 是 L 或 S; X <sub>4</sub> 是 T 或 S; X <sub>5</sub> 是 T 或 I; X <sub>6</sub> 是 R、H 或 L; X <sub>7</sub> 是 A 或 V; X <sub>8</sub> 是 G 或 A; X <sub>9</sub> 是 D 或 E; X <sub>10</sub> 是 L 或 S; X <sub>11</sub> 是 N 或 E 或 D; X <sub>12</sub> 是 S 或 P; X <sub>13</sub> 是 R 或 S; X <sub>14</sub> 是 G 或 S; X <sub>15</sub> 是 P 或不存在; X <sub>16</sub> 是 D 或 P; X <sub>17</sub> 是 V 或 T; 并且 X <sub>18</sub> 是 A 或 G

[0053] 如本文所使用,术语“SIRP $\alpha$ D1结构域变体”是指包含SIRP $\alpha$ D1结构域或SIRP $\alpha$ 多肽的CD47结合部分的多肽,其对CD47的亲合力高于野生型SIRP $\alpha$ 。SIRP $\alpha$ D1结构域变体相对于野生型SIRP $\alpha$ 的氨基酸序列包含至少一个氨基酸取代、缺失或插入(或其组合)。

[0054] 在一些实施方案中,融合多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体,所述变体相对于SEQ ID NO: 1和2中所示的野生型D1结构域包含一个或多个氨基酸取代、插入、添加或缺失。表2列出了每个SIRP $\alpha$ D1结构域变体(SEQ ID NO: 13-14)中的示例性氨基酸取代。在一些实施方案中,融合多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体的片段(例如,CD47结合片段)。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体的片段(例如,CD47结合片段)包含长度小于10个氨基酸、长度约10个氨基酸、长度约20个氨基酸、长度约30个氨基酸、长度约40个氨基酸、长度约50个氨基酸、长度约60个氨基酸、长度约70个氨基酸、长度约80个氨基酸、长度约90个氨基酸、长度约100个氨基酸或长度超过约100个氨基酸的氨基酸序列。

[0055] 在一些实施方案中,包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体的融合多肽与CD47的结合亲合力高于野生型人SIRP $\alpha$ D1结构域。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体以比天然存在的D1结构域的亲合力至少1倍(例如,至少1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、5倍或大于5倍)的亲

和力结合至人CD47。在一些实施方案中，SIRP $\alpha$ D1结构域变体以比天然存在的D1结构域的亲合力至少1倍(例如，至少10倍、100倍、1000倍或大于1000倍)的亲合力结合至人CD47。

[0056] 如本文所使用，术语“优化的亲合力”或“优化的结合亲合力”是指本文公开的融合多肽(例如，包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体的融合多肽)与CD47之间的结合相互作用的优化强度。例如，在一些实施方案中，融合多肽主要或以较高的亲合力结合至癌细胞上的CD47，并且基本上不结合或以较低的亲合力结合至非癌细胞上的CD47。在一些实施方案中，融合多肽与CD47之间的结合亲合力被优化，使得与以最大亲合力结合的变体相比，相互作用不会引起临床相关的毒性或降低毒性。在一些实施方案中，为了在融合多肽与CD47之间实现优化的结合亲合力，包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体的融合多肽被开发成具有比最大可实现的结合亲合力更低的与CD47的结合亲合力。在一些实施方案中，融合多肽包含与啮齿类动物CD47(例如，小鼠CD47或大鼠CD47)、非人灵长类动物(NHP)CD47(例如，食蟹猴CD47)和人CD47交叉反应的SIRP $\alpha$ D1结构域变体。

[0057] 如本文所使用，术语“免疫原性”是指蛋白质(例如，治疗性蛋白质)的特性，其在宿主中引起免疫响应，如同其是外源抗原一样。蛋白质的免疫原性可以用多种不同的方式，诸如通过体外T细胞增殖测定在体外测定。

[0058] 如本文所使用，术语“最小免疫原性”是指比引入氨基酸取代之前的免疫原性(例如，未修饰的蛋白质)低(例如，至少低10%、25%、50%或100%)的已经例如通过氨基酸取代而被修饰的多肽(例如，治疗性多肽)的免疫原性。在一些实施方案中，融合多肽(例如，包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体和Fc变体的多肽)被修饰成具有最小的免疫原性，并且在受试者(例如，人类受试者)中不引起或引起非常小的免疫应答，即使它可能被受试者的免疫系统识别为外源抗原。

[0059] 在一些实施方案中，包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体的融合多肽表现出最小的免疫原性。在一些实施方案中，施用于受试者的融合多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体，其具有与受试者的内源性SIRP $\alpha$ 相同的氨基酸序列，除了增加SIRP $\alpha$ D1结构域变体的亲和力的氨基酸变化。在一些实施方案中，融合多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体，与抗CD47抗体或野生型SIRP $\alpha$ 相比，其降低了副作用的风险。在一些实施方案中，融合多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体，与抗CD47抗体或野生型SIRP $\alpha$ 相比，其降低了贫血的风险。在一些实施方案中，融合多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体，其在啮齿类动物或非人灵长类动物(NHP)研究中不引起急性贫血。

[0060] 表2列出了相对于每个D1结构域序列SIRP $\alpha$ D1结构域变体中的特定氨基酸取代。在一些实施方案中，融合多肽的SIRP $\alpha$ D1结构域变体包含表2中所列的一个或多个(例如，两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个或更多个)取代。在一些实施方案中，融合多肽的SIRP $\alpha$ D1结构域变体相对于野生型D1结构域包含至多十五个氨基酸取代。在一些实施方案中，融合多肽的SIRP $\alpha$ D1结构域变体相对于野生型D1结构域包含至多十个氨基酸取代。在一些实施方案中，融合多肽的SIRP $\alpha$ D1结构域变体相对于野生型D1结构域包含至多七个氨基酸取代。在一些实施方案中，融合多肽包含与野生型D1结构域的序列具有至少90%(例如，至少92%、95%、97%或大于97%)的氨基酸序列同一性的SIRP $\alpha$ D1结构域变体。

[0061] 在一些实施方案中，融合多肽包含嵌合SIRP $\alpha$ D1结构域变体，例如包含两个或多个野生型D1结构域或其变体的一部分的变体(例如，来自第一物种的第一野生型D1结构域(或

其变体)的一部分,或来自第二物种的第二野生型D1结构域(或其变体)的一部分)。在一些实施方案中,嵌合SIRP $\alpha$ D1结构域变体包括来自至少两个(例如,两个、三个、四个、五个或更多部分)野生型D1结构域(或其变体)的部分,其中每个部分来自不同野生型D1结构域(例如,每个野生型D1结构域来自不同物种)。在一些实施方案中,融合多肽包含嵌合SIRP $\alpha$ D1结构域变体,所述变体还包含表2中列出的一个或多个氨基酸取代。

[0062] 表2.SIRP $\alpha$ D1结构域变体中的氨基酸取代

SEQ ID NO:	描述	氨基酸序列
13	D1 结构域 v1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVLVAAGETX <sub>3</sub> TLR CTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PVGPIQWFRGAGPGRX <sub>6</sub> L IYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSDX <sub>10</sub> TX <sub>11</sub> RN NMDFSIRIGNITPADAGTYCYX <sub>12</sub> KX <sub>13</sub> RKGSPDDVEX <sub>14</sub> KSGAGTELSVRAKP S
-	相对于 SEQ ID NO: 13 的氨基酸取代	X <sub>1</sub> =L、I、V; X <sub>2</sub> =V、L、I; X <sub>3</sub> =A、V; X <sub>4</sub> =A、I、L; X <sub>5</sub> =I、T、S、F; X <sub>6</sub> =E、V、L; X <sub>7</sub> =K、R; X <sub>8</sub> =E、Q; X <sub>9</sub> =H、P、R; X <sub>10</sub> =L、T、G; X <sub>11</sub> =K、R; X <sub>12</sub> =V、I; X <sub>13</sub> =F、L、V; X <sub>14</sub> =F、V
[0063] 14	D1 结构域 v2	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVSVAAGESX <sub>3</sub> ILHC TX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PVGPIQWFRGAGPARX <sub>6</sub> LI YNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSEX <sub>10</sub> TX <sub>11</sub> REN MDFSISISNITPADAGTYCYX <sub>12</sub> KX <sub>13</sub> R KGSPDTEX <sub>14</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	相对于 SEQ ID NO: 14 的氨基酸取代	X <sub>1</sub> =L、I、V; X <sub>2</sub> =V、L、I; X <sub>3</sub> =A、V; X <sub>4</sub> =V、I、L; X <sub>5</sub> =I、T、S、F; X <sub>6</sub> =E、V、L; X <sub>7</sub> =K、R; X <sub>8</sub> =E、Q; X <sub>9</sub> =H、P、R; X <sub>10</sub> =S、T、G; X <sub>11</sub> =K、R; X <sub>12</sub> =V、I; X <sub>13</sub> =F、L、V; X <sub>14</sub> =F、V
23	泛 D1 结构域	EEX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> QX <sub>3</sub> IQPDKX <sub>4</sub> VX <sub>5</sub> VAAGEX <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> LX <sub>9</sub> CTX <sub>10</sub> TSLX <sub>11</sub> PVGPIQWFRGAG PX <sub>12</sub> RX <sub>13</sub> LIYNQX <sub>14</sub> X <sub>15</sub> GX <sub>16</sub> FPRVTTVS X <sub>17</sub> X <sub>18</sub> TX <sub>19</sub> RX <sub>20</sub> NMDFX <sub>21</sub> IX <sub>22</sub> IX <sub>23</sub> NITP ADAGTYCYX <sub>24</sub> KX <sub>25</sub> RKGSPDX <sub>26</sub> X <sub>27</sub> E X <sub>28</sub> KSGAGTELSVRX <sub>29</sub> KPS

[0064]	- 相对于 SEQ ID NO: 23 的氨基酸取代	X <sub>1</sub> =E、G; X <sub>2</sub> =L、I、V; X <sub>3</sub> =V、L、I; X <sub>4</sub> =S、F; X <sub>5</sub> =L、S; X <sub>6</sub> =S、T; X <sub>7</sub> =A、V; X <sub>8</sub> =I、T; X <sub>9</sub> =H、R; X <sub>10</sub> =A、V、I、L; X <sub>11</sub> =I、T、S、F; X <sub>12</sub> =A、G; X <sub>13</sub> =E、V、L; X <sub>14</sub> =K、R; X <sub>15</sub> =E、Q; X <sub>16</sub> =H、P、R; X <sub>17</sub> =D、E; X <sub>18</sub> =S、L、T、G; X <sub>19</sub> =K、R; X <sub>20</sub> =E、D; X <sub>21</sub> =S、P; X <sub>22</sub> =S、R; X <sub>23</sub> =S、G; X <sub>24</sub> =V、I; X <sub>25</sub> =F、L、V; X <sub>26</sub> =D 或不存 在; X <sub>27</sub> =T、V; X <sub>28</sub> =F、V; 并且 X <sub>29</sub> =A、G
--------	-------------------------------	---

[0065] 在一些实施方案中,融合多肽包含含有以下的序列的SIRP $\alpha$ D1结构域变体:EEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPKSVLVAAGETX<sub>3</sub>TLRCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSDX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RNNMDFSIRIGNITPADAGTYXCX<sub>12</sub>KX<sub>13</sub>RKGSPDDVEX<sub>14</sub>KSGAGTELSVRKPS (SEQ ID NO:13),其中X<sub>1</sub>是L、I或V;X<sub>2</sub>是V、L或I;X<sub>3</sub>是A或V;X<sub>4</sub>是A、I或L;X<sub>5</sub>是I、T、S或F;X<sub>6</sub>是E、V或L;X<sub>7</sub>是K或R;X<sub>8</sub>是E或Q;X<sub>9</sub>是H、P或R;X<sub>10</sub>是L、T或G;X<sub>11</sub>是K或R;X<sub>12</sub>是V或I;X<sub>13</sub>是F、L或V;并且X<sub>14</sub>是F或V;并且其中所述变体相对于包含SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含至少一个氨基酸取代。

[0066] 在一些实施方案中,融合多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体,其包含SEQ ID NO:13的序列,其中X<sub>1</sub>是L、I或V。在任何前述实施方案中,X<sub>2</sub>是V、L或I。在一些实施方案中,X<sub>3</sub>是A或V。在一些实施方案中,X<sub>4</sub>是A、I或L。在一些实施方案中,X<sub>5</sub>是I、T、S或F。在一些实施方案中,X<sub>6</sub>是E、V或L。在一些实施方案中,X<sub>7</sub>是K或R。在一些实施方案中,X<sub>8</sub>是E或Q。在一些实施方案中,X<sub>9</sub>是H、P或R。在一些实施方案中,X<sub>10</sub>是L、T或G。在一些实施方案中,X<sub>11</sub>是K或R。在一些实施方案中,X<sub>12</sub>是V或I。在一些实施方案中,X<sub>13</sub>是F、L、V。在一些实施方案中,X<sub>14</sub>是F或V。在一些实施方案中,融合多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体(或其CD47结合片段),所述变体相对于包含SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含不超过六个氨基酸取代。

[0067] 在一些实施方案中,融合多肽结合CD47的结合亲和力比包含SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少10倍。在一些实施方案中,多肽结合CD47的结合亲和力比包含SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少100倍。在一些实施方案中,融合多肽结合CD47的结合亲和力比包含SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少1000倍。在一些实施方案中,融合多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体或其CD47结合片段,其结合至CD47的K<sub>D</sub>小于1x 10<sup>-8</sup>M、小于5x 10<sup>-9</sup>M、小于1x 10<sup>-9</sup>M、小于5x 10<sup>-10</sup>M、小于1x 10<sup>-10</sup>M或小于1x 10<sup>-11</sup>M。在一些实施方案中,融合多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体或其CD47结合片段,其结合至CD47的K<sub>D</sub>在约500nM和100nM之间、在约100nM和50nM之间、在约50nM和10nM之间、在约10nM和5nM之间、在约5nM和1nM之间、在约1nM和500pM之间、在约500pM和100pM之间、在约100pM和50pM之间或在约50pM和10pM之间。

[0068] 在一些实施方案中,融合多肽包含含有以下的序列的SIRP $\alpha$ D1结构域变体:EEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPKSVSVAAGESX<sub>3</sub>ILHCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPARX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSEX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RENN

DFSISISNITPADAGTYXC<sub>12</sub>KX<sub>13</sub>RKGSPDEX<sub>14</sub>KSGAGTELSVRKPS (SEQ ID NO:14), 其中X<sub>1</sub>是L、I或V; X<sub>2</sub>是V、L或I; X<sub>3</sub>是A或V; X<sub>4</sub>是V、I或L; X<sub>5</sub>是I、T、S或F; X<sub>6</sub>是E、V或L; X<sub>7</sub>是K或R; X<sub>8</sub>是E或Q; X<sub>9</sub>是H、P或R; X<sub>10</sub>是S、T或G; X<sub>11</sub>是K或R; X<sub>12</sub>是V或I; X<sub>13</sub>是F、L或V; 并且X<sub>14</sub>是F或V; 并且其中所述变体相对于包含SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRPαD1结构域包含至少一个氨基酸取代。

[0069] 在一些实施方案中,融合多肽包含SEQ ID NO:14的序列,其中X<sub>1</sub>是L、I或V。在一些实施方案中,X<sub>2</sub>是V、L或I。在一些实施方案中,X<sub>3</sub>是A或V。在一些实施方案中,X<sub>4</sub>是V、I或L。在一些实施方案中,X<sub>5</sub>是I、T、S或F。在一些实施方案中,X<sub>6</sub>是E、V或L。在一些实施方案中,X<sub>7</sub>是K或R。在一些实施方案中,X<sub>8</sub>是E或Q。在一些实施方案中,X<sub>9</sub>是H、P或R。在一些实施方案中,X<sub>10</sub>是S、T或G。在一些实施方案中,X<sub>11</sub>是K或R。在一些实施方案中,X<sub>12</sub>是V或I。在一些实施方案中,X<sub>13</sub>是F、L或V。在一些实施方案中,X<sub>14</sub>是F或V。在一些实施方案中,融合多肽包含SIRPαD1结构域变体(或其CD47结合片段),所述变体相对于包含SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRPαD1结构域包含不超过六个氨基酸取代。

[0070] 在一些实施方案中,融合多肽结合CD47的结合亲和力比包含SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRPαD1结构域高至少10倍。在一些实施方案中,融合多肽结合CD47的结合亲和力比包含SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRPαD1结构域高至少100倍。在一些实施方案中,融合多肽结合CD47的结合亲和力比包含SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRPαD1结构域高至少1000倍。在一些实施方案中,融合多肽包含SIRPαD1结构域变体或其CD47结合片段,其结合至CD47的K<sub>d</sub>小于1x 10<sup>-8</sup>M、小于5x 10<sup>-9</sup>M、小于1x 10<sup>-9</sup>M、小于5x 10<sup>-10</sup>M、小于1x 10<sup>-10</sup>M或小于1x 10<sup>-11</sup>M。在一些实施方案中,融合多肽包含SIRPαD1结构域变体或其CD47结合片段,其结合至CD47的K<sub>d</sub>在约500nM和100nM之间、在约100nM和50nM之间、在约50nM和10nM之间、在约10nM和5nM之间、在约5nM和1nM之间、在约1nM和500pM之间、在约500pM和100pM之间、在约100pM和50pM之间或在约50pM和10pM之间。

[0071] 在一些实施方案中,融合多肽包含含有以下的序列的SIRPαD1结构域变体:EEX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>QX<sub>3</sub>IQPKX<sub>4</sub>VX<sub>5</sub>VAAGEX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>LX<sub>9</sub>CTX<sub>10</sub>TSLX<sub>11</sub>PVGPIQWFRGAGPX<sub>12</sub>RX<sub>13</sub>LIYNQX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GX<sub>16</sub>FPRVTTVSX<sub>17</sub>X<sub>18</sub>TX<sub>19</sub>RX<sub>20</sub>NMDFX<sub>21</sub>IX<sub>22</sub>IX<sub>23</sub>NITPADAGTYXCX<sub>24</sub>KX<sub>25</sub>RKGSPDX<sub>26</sub>X<sub>27</sub>EX<sub>28</sub>KSGAGTELSVRX<sub>29</sub>KPS (SEQ ID NO:23), 其中X<sub>1</sub>是E或G; X<sub>2</sub>是L、I或V; X<sub>3</sub>是V、L或I; X<sub>4</sub>是S或F; X<sub>5</sub>是L或S; X<sub>6</sub>是S或T; X<sub>7</sub>是A或V; X<sub>8</sub>是I或T; X<sub>9</sub>是H或R; X<sub>10</sub>是A、V、I或L; X<sub>11</sub>是I、T、S或F; X<sub>12</sub>是A或G; X<sub>13</sub>是E、V或L; X<sub>14</sub>是K或R; X<sub>15</sub>是E或Q; X<sub>16</sub>是H、P或R; X<sub>17</sub>是D或E; X<sub>18</sub>是S、L、T或G; X<sub>19</sub>是K或R; X<sub>20</sub>是E或D; X<sub>21</sub>是S或P; X<sub>22</sub>是S或R; X<sub>23</sub>是S或G; X<sub>24</sub>是V或I; X<sub>25</sub>是F、L、V; X<sub>26</sub>是D或不存在; X<sub>27</sub>是T或V; X<sub>28</sub>是F或V; 并且X<sub>29</sub>是A或G; 并且其中所述变体相对于具有SEQ ID NO:1或2的序列的野生型SIRPαD1结构域包含至少一个氨基酸取代。

[0072] 在本公开的此方面的任何前述实施方案中,X<sub>2</sub>是L、I或V。在任何前述实施方案中,X<sub>3</sub>是V、L或I。在实施方案中,X<sub>4</sub>是S或F。在一些实施方案中,X<sub>5</sub>是L或S。在一些实施方案中,X<sub>6</sub>是S或T。在一些实施方案中,X<sub>7</sub>是A或V。在一些实施方案中,X<sub>8</sub>是I或T。在一些实施方案中,X<sub>9</sub>是H或R。在一些实施方案中,X<sub>10</sub>是A、V、I或L。在一些实施方案中,X<sub>11</sub>是I、T、S或F。在一些实施方案中,X<sub>12</sub>是A或G。在一些实施方案中,X<sub>13</sub>是E、V或L。在一些实施方案中,X<sub>14</sub>是K或R。在一些实施方案中,X<sub>15</sub>是E或Q。在一些实施方案中,X<sub>16</sub>是H、P或R。在一些实施方案中,X<sub>17</sub>是D或E。在一些实施方案中,X<sub>18</sub>是S、L、T或G。在一些实施方案中,X<sub>19</sub>是K或R。在一些实施方案中,X<sub>20</sub>是E或D。在一些实施方案中,X<sub>21</sub>是S或P。在一些实施方案中,X<sub>22</sub>是S或R。在一些实施方案中,

$X_{23}$ 是S或G。在一些实施方案中, $X_{24}$ 是V或I。在一些实施方案中, $X_{25}$ 是F、L、V。在一些实施方案中, $X_{26}$ 是D或不存在。在一些实施方案中, $X_{27}$ 是T或V。在一些实施方案中, $X_{28}$ 是F或V。在一些实施方案中, $X_{29}$ 是A或G。在一些实施方案中,融合多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体(或其CD47结合片段),所述变体相对于具有SEQ ID NO:1或2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域具有不超过六个氨基酸取代。

[0073] 在一些实施方案中,融合多肽结合CD47的结合亲和力比具有SEQ ID NO:1或2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少10倍。在一些实施方案中,融合多肽结合CD47的结合亲和力比具有SEQ ID NO:1或2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少100倍。在一些实施方案中,融合多肽结合CD47的结合亲和力比具有SEQ ID NO:1或2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少1000倍。在一些实施方案中,融合多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体或其CD47结合片段,其结合至CD47的 $K_D$ 小于 $1 \times 10^{-8}M$ 、小于 $5 \times 10^{-9}M$ 、小于 $1 \times 10^{-9}M$ 、小于 $5 \times 10^{-10}M$ 、小于 $1 \times 10^{-10}M$ 或小于 $1 \times 10^{-11}M$ 。在一些实施方案中,融合多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体或其CD47结合片段,其结合至CD47的 $K_D$ 在约500nM和100nM之间、在约100nM和50nM之间、在约50nM和10nM之间、在约10nM和5nM之间、在约5nM和1nM之间、在约1nM和500pM之间、在约500pM和100pM之间、在约100pM和50pM之间或在约50pM和10pM之间。

[0074] 在一些实施方案中,融合多肽包含含有SEQ ID NO:24的序列的SIRP $\alpha$ D2结构域或具有SEQ ID NO:25的序列的SIRP $\alpha$ D3结构域。在一些实施方案中,融合多肽包含含有SEQ ID NO:24的SIRP $\alpha$ D2结构域和含有SEQ ID NO:25的D3结构域(参见表3)。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体还包含D2结构域的片段或变体或D3结构域的片段或变体。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体还包含D2结构域的片段或变体和D3结构域的片段或变体。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体通过接头与D2或D3结构域接合。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体通过接头与D2和D3结构域接合。

[0075] 表3. SIRP $\alpha$ D2和D3结构域的氨基酸序列

SEQ ID NO:	描述	氨基酸序列
24	SIRP $\alpha$ D2 结构域	APVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFS PRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVG ESVSYSIHSTAKVVLTRDVDHSQVICE VAHVTLQGDPLRGTANLSETIR
25	SIRP $\alpha$ D3 结构域	VPPTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVR KFYPQRLQLTWLENGNVSRTETASTV TENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDD VKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVS

[0078] 在一些实施方案中,融合多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体,其与Fc结构域或Fc结构域变体附接(例如,融合,诸如遗传融合)。在一些实施方案中,融合多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体,其与不能二聚化的Fc结构域变体附接(例如,融合,诸如遗传融合)。在一些实施方案中,与不包含Fc结构域或Fc结构域变体的融合多肽相比,包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体和Fc结构域或Fc结构域变体的融合多肽表现出改善的药代动力学性质,例如增加的血清半衰期。在一些实施方案中,包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体的融合多肽不包含表4中所示的SEQ ID NO:26-36中任一者的序列。

[0079] 表4. 示例性SIRP $\alpha$ D1结构域变体

SEQ ID NO:	氨基酸序列
26	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLIPVGPIQ WFRGAGPARELIYNQREGHFPRVTTVSETTRRENM DFSISISNITPADAGTY YCVKFRKGGSPDTEVKSGAG TELSVRAKPS
[0080] 27	EEEVQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTLTSLIPVGPIQ WFRGAGPARVLIYNQRQGHFPRVTTVSEGTRRENM DFSISISNITPADAGTY YCIKFRKGGSPDTEFKSGAGT ELSVRAKPS
28	EEEVQIIQPDKSVSVAAGESVILHCTITSLTPVGPIQ WFRGAGPARLLIYNQREGPFPRVTTVSETTRRENM DFSISISNITPADAGTY YCVKLRKGGSPDTEFKSGAGT ELSVRAKPS
29	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLSPVGPIQW FRGAGPARVLIYNQRQGPFRVTTVSEGTKRENMD FSISISNITPADAGTY YCIKLRKGGSPDTEFKSGAGTE LSVRAKPS
30	EEEIQVIQPDKSVSVAAGESVIIHCTVTSLFPVGPIQ WFRGAGPARVLIYNQRQGRFPRVTTVSEGTKRENM DFSISISNITPADAGTY YCVKVRKGGSPDTEVKSGAG TELSVRAKPS
31	EEEVQIIQPDKSVSVAAGESIILHCTVTSLFPVGPIQ WFRGAGPARVLIYNQREGRFPRVTTVSEGTRRENM DFSISISNITPADAGTY YCIKLRKGGSPDTEFKSGAGT ELSVRAKPS
32	EEEVQLIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLFPVGPIQ WFRGAGPARVLIYNQREGPFPRVTTVSEGTKRENM DFSISISNITPADAGTY YCIKFRKGGSPDTEVKSGAGT ELSVRAKPS
[0081] 33	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQW FRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNNMD FSIRIGNITPADAGTY YCIKFRKGGSPDDVEFKSGAGT ELSVRAKPS
34	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQW FRGAGPARLLIYNQRQGPFRVTTVSETTKRENMD FSISISNITPADAGTY YCVKFRKGGSPDTEFKSGAGTE LSVRAKPS
35	EEEVQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPARVLIYNQKQGPFRVTTISETTRRENM DFSISISNITPADAGTY YCIKFRKGGSPDTEFKSGAGT ELSVRAKPS
36	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLTPVGPIQW FRGAGPARVLIYNQRQGPFRVTTVSEGTRRENMD FSISISNITPADAGTY YCIKFRKGGSPDTEVKSGAGTE LSVRAKPS

[0082] 在一些实施方案中,本文所述的融合多肽在体外用于结合测定,例如免疫测定。例如,在一些实施方案中,本文所述的融合多肽在液相中使用或结合到固相载体上。在一些实施方案中,用于免疫测定的融合多肽以各种方式可检测地标记。

[0083] 在一些实施方案中,本文所述的融合多肽与各种载体结合,并用于检测特异性抗原表达细胞的存在。载体的实例包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁矿。载体的性质可以是可溶的或不可溶的。

[0084] 各种不同的标记和标记方法是已知的。标记的实例包括酶、放射性同位素、荧光化合物、胶体金属、化学发光化合物和生物发光化合物。使标记结合至本文公开的多肽的各种技术是可用的。

[0085] 在一些实施方案中,融合多肽与低分子量半抗原偶联。然后通过第二次反应特异性地检测这些半抗原。例如,在一些实施方案中,半抗原生物素与抗生物素蛋白一起使用,或者半抗原二硝基酚、吡哆醛或荧光素用特异性抗半抗原抗体(例如,分别为抗二硝基酚抗体、抗吡哆醛抗体和抗荧光素抗体)检测。

[0086] 糖基化模式改变的SIRP $\alpha$ D1结构域变体

[0087] 在一些实施方案中,本文公开了包含信号调控蛋白 $\alpha$  (SIRP- $\alpha$ ) D1变体的多肽,所述变体包含SIRP $\alpha$ D1结构域或其片段,其具有相对于野生型SIRP $\alpha$ D1结构域(例如,SEQ ID NO: 1或2中所示的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域)在残基80处的氨基酸突变;和相对于野生型SIRP $\alpha$ D1结构域(例如,SEQ ID NO: 1或2中所示的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域)在选自以下组成的组的残基处的至少一个额外氨基酸突变:残基6、残基27、残基31、残基47、残基53、残基54、残基56、残基66和残基92。

[0088] 在一些实施方案中,本文还公开了包含Fc结构域变体的多肽,其中Fc结构域变体二聚体包含两个Fc结构域变体,其中每个Fc结构域变体独立地选自(i)由突变L234A、L235A、G237A和N297A组成的人IgG1 Fc区;(ii)由突变A330S、P331S和N297A组成的人IgG2Fc区;或(iii)包含突变S228P、E233P、F234V、L235A、de1G236和N297A的人IgG4 Fc区。

[0089] 在一些实施方案中,本文公开的组合物中的多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体,其具有降低的或最小的糖基化。表1中的SEQ ID NO: 1和2的D1结构域各自含有序列N80ITP中的氨基酸N80处的单个潜在的N-连接的糖基化位点。SIRP $\alpha$ D1结构域在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中的表达导致16kDa(非糖基化)的主要条带和较高分子量的次要条带,其被Endo Hf去除。Endo Hf是内切糖苷酶H和麦芽糖结合蛋白的重组蛋白融合体。Endo Hf在高甘露糖的壳二糖核心和一些来自N-连接糖蛋白的杂合寡糖内裂解。这意味着氨基酸位置83处的脯氨酸可以降低糖基化的效率,导致蛋白质具有不同程度的糖基化并因此具有异质性。对于药物开发来说,异质性会给过程开发带来挑战。因此,为了研究产生同源、非糖基化形式的SIRP $\alpha$ D1结构域变体的可能性,在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1变体的氨基酸N80突变为A1a。在一些实施方案中,为了制备非糖基化的SIRP $\alpha$ D1结构域变体,SIRP $\alpha$ D1结构域变体中的氨基酸N80被任何氨基酸取代,包括任何天然和非天然存在的氨基酸,例如N80A和N80Q。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体包含N80A突变和至少1个额外突变(例如,至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个额外突变或更多个突变)。在一些实施方案中,额外突变在CD47结合位点中。在一些实施方案中,额外突变在D1结构域的疏水核心中。

[0090] 在一些实施方案中,本文公开的组合物中的多肽包含相对于野生型SIRP $\alpha$ D1结构域具有增加的糖基化的SIRP $\alpha$ D1结构域变体。增加最终产物同质性的另一个选择是提高氨基酸N80处的糖基化效率,并且产生相对于野生型具有增加的糖基化的SIRP $\alpha$ D1结构域变体。在一些实施方案中,序列NITP83中的氨基酸P83影响氨基酸N80处的糖基化程度。在一些实施方案中,将P83变为任何氨基酸增加了N80处的糖基化效率。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体中的氨基酸P83被任何氨基酸取代,包括天然和非天然氨基酸,例如P83V, P83A, P83I和P83L。在一些实施方案中,本公开的多肽在细胞中表达,所述细胞例如通过遗传工程化细胞系(例如,遗传工程化酵母或哺乳动物宿主)或改变细胞培养条件(诸如添加基夫碱(kifunensine))或通过使用天然非糖基化宿主(例如原核生物(大肠杆菌等))被优化为不糖基化由这种细胞表达的蛋白质。

[0091] 表5列出了相对于每个D1结构域变体序列SIRP $\alpha$ D1结构域变体中的特定氨基酸取代。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体包含表5中所列的一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个或更多个)取代。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体未被糖基化或被最低程度地糖基化。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体被完全糖基化或几乎完全糖基化。在一些实施方案中,相对于野生型D1结构域,SIRP $\alpha$ D1结构域变体包含至多十四个氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型D1结构域,SIRP $\alpha$ D1结构域变体包含至多十个氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型D1结构域,SIRP $\alpha$ D1结构域变体包含至多七个氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的SIRP $\alpha$ D1结构域变体与野生型D1结构域的序列具有至少90%(例如,至少92%,95%,97%或大于97%)的氨基酸序列同一性。

[0092] 在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体是嵌合的SIRP $\alpha$ D1结构域变体,其包括两个或更多个野生型D1结构域或其变体的一部分(例如,一个野生型D1结构域或其变体的一部分和另一个野生型D1结构域或其变体的一部分)。在一些实施方案中,嵌合SIRP $\alpha$ D1结构域变体包括野生型D1结构域或其变体的至少两个部分(例如,三个、四个、五个或更多个部分),其中每个部分来自不同的野生型D1结构域。在一些实施方案中,嵌合SIRP $\alpha$ D1结构域变体还包含表5中列出的一个或多个氨基酸取代。

[0093] 表5. SIRP $\alpha$ D1结构域变体中的氨基酸取代

SEQ ID NO:	描述	氨基酸序列
[0094] 37	D1 结构域 v1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVLVAAGETX <sub>3</sub> TLRCTX <sub>4</sub> T SLX <sub>5</sub> PVGPIQWFRGAGPGRX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> G X <sub>9</sub> FPRVTTVSDX <sub>10</sub> TX <sub>11</sub> RNNMDF SIRIGX <sub>12</sub> IT

[0095]

		X <sub>13</sub> ADAGTYYCX <sub>14</sub> KX <sub>15</sub> RKGSPDDVEX <sub>16</sub> KS GAGTELSVRAKPS
-	相对于 SEQ ID NO: 37 的氨基 酸取代	X <sub>1</sub> =L、I、V; X <sub>2</sub> =V、L、I; X <sub>3</sub> =A、V; X <sub>4</sub> =A、I、L; X <sub>5</sub> =I、T、S、F; X <sub>6</sub> =E、V、 L; X <sub>7</sub> =K、R; X <sub>8</sub> =E、Q; X <sub>9</sub> =H、P、R; X <sub>10</sub> =L、T、G; X <sub>11</sub> =K、R; X <sub>12</sub> =N、A、C、 D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、 R、S、T、V、W、Y; X <sub>13</sub> =P、A、C、D、 E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、 S、T、V、W、Y; X <sub>14</sub> =V、I; X <sub>15</sub> =F、L、 V; X <sub>16</sub> =F、V
38	D1 结构域 v2	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPKSVSVAAGESX <sub>3</sub> ILHCTX <sub>4</sub> TS LX <sub>5</sub> PVGPIQWFRGAGPARX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSEX <sub>10</sub> TX <sub>11</sub> RENMDFSISISX <sub>12</sub> ITX <sub>13</sub> ADAGTYYCX <sub>14</sub> KX <sub>15</sub> RKGSPDTE X <sub>16</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	相对于 SEQ ID NO: 38 的氨基 酸取代	X <sub>1</sub> =L、I、V; X <sub>2</sub> =V、L、I; X <sub>3</sub> =A、V; X <sub>4</sub> =V、I、L; X <sub>5</sub> =I、T、S、F; X <sub>6</sub> =E、V、 L; X <sub>7</sub> =K、R; X <sub>8</sub> =E、Q; X <sub>9</sub> =H、P、R; X <sub>10</sub> =S、T、G; X <sub>11</sub> =K、R; X <sub>12</sub> =N、A、C、 D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、 R、S、T、V、W、Y; X <sub>13</sub> =P、A、C、D、 E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、 S、T、V、W、Y; X <sub>14</sub> =V、I; X <sub>15</sub> =F、L、 V; X <sub>16</sub> =F、V
47	泛 D1 结构域	EEX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> QX <sub>3</sub> IQPKX <sub>4</sub> VX <sub>5</sub> VAAGEX <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> LX <sub>9</sub> CTX <sub>10</sub> TSL X <sub>11</sub> PVGPIQWFRGAGPX <sub>12</sub> RX <sub>13</sub> LIYNQX <sub>14</sub> X <sub>15</sub> GX <sub>16</sub> FPRVTTVSX <sub>17</sub> X <sub>18</sub> TX <sub>19</sub> RX <sub>20</sub> NMDFX <sub>21</sub> IX <sub>22</sub> IX <sub>23</sub> X <sub>24</sub> ITX <sub>25</sub> ADAGTYYCX <sub>26</sub> KX <sub>27</sub> RKGSPDX X <sub>28</sub> X <sub>29</sub> EX <sub>30</sub> KSGAGTELSVRX <sub>31</sub> KPS
-	相对于 SEQ ID NO: 47 的氨基 酸取代	X <sub>1</sub> =E、G; X <sub>2</sub> =L、I、V; X <sub>3</sub> =V、L、I; X <sub>4</sub> =S、F; X <sub>5</sub> =L、S; X <sub>6</sub> =S、T; X <sub>7</sub> =A、V; X <sub>8</sub> =I、T; X <sub>9</sub> =H、R、L; X <sub>10</sub> =A、V、I、L; X <sub>11</sub> =I、T、S、F; X <sub>12</sub> =A、G; X <sub>13</sub> =E、V、 L; X <sub>14</sub> =K、R; X <sub>15</sub> =E、Q; X <sub>16</sub> =H、P、R; X <sub>17</sub> =D、E; X <sub>18</sub> =S、L、T、G; X <sub>19</sub> =K、R; X <sub>20</sub> =E、N; X <sub>21</sub> =S、P; X <sub>22</sub> =S、R; X <sub>23</sub> =S、 G; X <sub>24</sub> =任何氨基酸; X <sub>25</sub> =任何氨基酸; X <sub>26</sub> =V、I; X <sub>27</sub> =F、L、V; X <sub>28</sub> =D 或不存在; X <sub>29</sub> =T、V; X <sub>30</sub> =F、V; 并且 X <sub>31</sub> =A、G
48	泛 D1 结构域	EEELQX <sub>1</sub> IQPKSVX <sub>2</sub> VAAGEX <sub>3</sub> AX <sub>4</sub> LX <sub>5</sub> CTX <sub>6</sub> TSLX <sub>7</sub> PVGPIQWFRGAGPX <sub>8</sub> RX <sub>9</sub> LIYNQX <sub>10</sub> X <sub>1</sub>

[0096]

		$_1GX_{12}FPRVTTVSX_{13}X_{14}TKRX_{15}NMDFSIX_{16}IX_{17}X_{18}ITPADAGTYCYX_{19}KFRKGX_{20}X_{21}X_{22}DX_{23}EFKSGAGTELSVRAKPS$
-	相对于 SEQ ID NO: 48 的氨基酸取代	$X_1=V, I; X_2=L, S; X_3=T, S; X_4=T, I; X_5=R, H; X_6=A, V, I; X_7=I, R, Y, K, F; X_8=G, A; X_9=E, V; X_{10}=K, R; X_{11}=E, D, Q; X_{12}=H, P; X_{13}=D, E; X_{14}=S, L, T; X_{15}=N, E; X_{16}=R, S; X_{17}=G, S; X_{18}=N, A; X_{19}=V, I; X_{20}=S, I, M; X_{21}=P$ 或不存在; $X_{22}=D, P$ ; 并且 $X_{23}=V, T$
49	泛 D1 结构域	EEELQX <sub>1</sub> IQPKSVLVAAGETATLRCTX <sub>2</sub> TSLX <sub>3</sub> PVGPIQWFRGAGPGRX <sub>4</sub> LIYNQX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> GX <sub>7</sub> FPRVTTVSDX <sub>8</sub> TKRNNMDFSIRIGX <sub>9</sub> ITPADAGTYCYX <sub>10</sub> KFRKGGPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
-	相对于 SEQ ID NO: 49 的氨基酸取代	$X_1=V, I, L; X_2=A, I, V, L; X_3=I, F, S, T; X_4=E, V, L; X_5=K, R; X_6=E, Q; X_7=H, P, R; X_8=L, T, S, G; X_9=A$ ; 并且 $X_{10}=V, I$
50	泛 D1 结构域	EEELQX <sub>1</sub> IQPKSVSVAAGESAILHCTX <sub>2</sub> TSLX <sub>3</sub> PVGPIQWFRGAGPARX <sub>4</sub> LIYNQX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> GX <sub>7</sub> FPRVTTVSEX <sub>8</sub> TKRENMDFSISIX <sub>9</sub> ITPADAGTYCYX <sub>10</sub> KFRKGGPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
-	相对于 SEQ ID NO: 50 的氨基酸取代	$X_1=V, I; X_2=V, I; X_3=I, F; X_4=E, V; X_5=K, R; X_6=E, Q; X_7=H, P; X_8=S, T; X_9=N, A$ ; 并且 $X_{10}=V, I$
51	泛 D1 结构域	EEELQX <sub>1</sub> IQPKSVLVAAGETATLRCTX <sub>2</sub> TSLX <sub>3</sub> PVGPIQWFRGAGPGRX <sub>4</sub> LIYNQX <sub>5</sub> EGX <sub>6</sub> FP RVTTVSDX <sub>7</sub> TKRNNMDFSIRIGX <sub>8</sub> ITPADAGTYCYX <sub>9</sub> KFRKGGPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
-	相对于 SEQ ID NO: 51 的氨基酸取代	$X_1=V, I; X_2=A, I; X_3=I, F; X_4=E, V; X_5=K, R; X_6=H, P; X_7=L, T; X_8=N, A$ ; 并且 $X_9=V, I$
52	泛 D1 结构域	EEELQX <sub>1</sub> IQPKSVLVAAGETATLRCTX <sub>2</sub> TSLX <sub>3</sub> PVGPIQWFRGAGPGRELIYNQX <sub>4</sub> EGX <sub>5</sub> FP RVTTVSDX <sub>6</sub> TKRNNMDFSIRIGX <sub>7</sub> ITPADAGTYCYVKFRKGGPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
-	相对于 SEQ ID NO: 52 的氨基酸取代	$X_1=V, L, I; X_2=A, I, L; X_3=I, T, S, F; X_4=K, R; X_5=H, P, R; X_6=L, T, G;$

	酸取代	并且 X <sub>7</sub> =N、A
212	泛 D1 结构域	EEELQX <sub>1</sub> IQPKSVSVAAGESAILHCTX <sub>2</sub> TSL X <sub>3</sub> PVGPIQWFRGAGPARELIYNQX <sub>4</sub> EGX <sub>5</sub> FPR VTTVSEX <sub>6</sub> TKRENMDFSISISX <sub>7</sub> ITPADAGTY YCVKFRKGGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
-	相对于 SEQ ID NO: 212 的氨基 酸取代	X <sub>1</sub> =V、L、I; X <sub>2</sub> =V、I、L; X <sub>3</sub> =I、T、S、 F; X <sub>4</sub> =K、R; X <sub>5</sub> =H、P、R; X <sub>6</sub> =S、T、G; 并且 X <sub>7</sub> =N、A
218	泛 D1 结构域	EEELQX <sub>1</sub> IQPKSVLVAAGETATLRCTX <sub>2</sub> TSL X <sub>3</sub> PVGPIQWFRGAGPGRX <sub>4</sub> LIYNQX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> GX <sub>7</sub> F PRVTTVSDX <sub>8</sub> TKRNNMDFSIRIGX <sub>9</sub> X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> ADAGTYCYCX <sub>13</sub> KFRKGGSPDDVEFKSGAGTE LSVRAKPS
[0097] -	相对于 SEQ ID NO: 218 的氨基 酸取代	X <sub>1</sub> =V、L 或 I; X <sub>2</sub> =A、V、L 或 I; X <sub>3</sub> =I、 S、T 或 F; X <sub>4</sub> =E、L 或 V; X <sub>5</sub> =K 或 R; X <sub>6</sub> =E 或 Q; X <sub>7</sub> =H、R 或 P; X <sub>8</sub> =S、G、L 或 T; X <sub>9</sub> =任何氨基酸; X <sub>10</sub> =任何氨基酸; X <sub>11</sub> = 任何氨基酸; X <sub>12</sub> =任何氨基酸; 并且 X <sub>13</sub> =V 或 I
219	泛 D1 结构域	EEELQX <sub>1</sub> IQPKSVLVAAGETATLRCTX <sub>2</sub> TSL X <sub>3</sub> PVGPIQWFRGAGPGRX <sub>4</sub> LIYNQX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> GX <sub>7</sub> F PRVTTVSDX <sub>8</sub> TKRNNMDFSIRIGX <sub>9</sub> ITX <sub>10</sub> AD AGTYCYCX <sub>11</sub> KFRKGGSPDDVEFKSGAGTELS VRAKPS
-	相对于 SEQ ID NO: 219 的氨基 酸取代	X <sub>1</sub> =V、L 或 I; X <sub>2</sub> =A、V、L 或 I; X <sub>3</sub> =I、S、 T 或 F; X <sub>4</sub> =E、L 或 V; X <sub>5</sub> =K 或 R; X <sub>6</sub> =E 或 Q; X <sub>7</sub> =H、R 或 P; X <sub>8</sub> =S、G、L 或 T; X <sub>9</sub> =N; X <sub>10</sub> =除 P 以外的任何氨基酸; 并且 X <sub>11</sub> =V 或 I

[0098] 在一些实施方案中,多肽包含具有以下的序列的SIRPαD1结构域变体:EEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQ  
PKSVLVAAGETX<sub>3</sub>TLRCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSDX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RNNMDFSIR  
IGX<sub>12</sub>ITX<sub>13</sub>ADAGTYCYCX<sub>14</sub>KX<sub>15</sub>RKGSPDDVEX<sub>16</sub>KSGAGTELSVRAKPS (SEQ ID NO: 37), 其中X<sub>1</sub>是L、I或  
V; X<sub>2</sub>是V、L或I; X<sub>3</sub>是A或V; X<sub>4</sub>是A、I或L; X<sub>5</sub>是I、T、S或F; X<sub>6</sub>是E、V或L; X<sub>7</sub>是K或R; X<sub>8</sub>是E或Q; X<sub>9</sub>是  
H、P或R; X<sub>10</sub>是L、T或G; X<sub>11</sub>是K或R; X<sub>12</sub>是N、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W或Y; X<sub>13</sub>是  
P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y; X<sub>14</sub>是V或I; X<sub>15</sub>是F、L或V; 并且X<sub>16</sub>是F或V; 并  
且其中所述变体相对于具有SEQ ID NO: 1的序列的野生型SIRPαD1结构域包含至少一个氨  
基酸取代。

[0099] 在本公开的这方面中的一些实施方案中,多肽包含具有SEQ ID NO: 37的序列的  
SIRPαD1结构域变体,其中X<sub>1</sub>是L、I或V。在一些实施方案中,X<sub>2</sub>是V、L或I。在一些实施方案中,  
X<sub>3</sub>是A或V。在一些实施方案中,X<sub>4</sub>是A、I或L。在一些实施方案中,X<sub>5</sub>是I、T、S或F。在一些实施  
方案中,X<sub>6</sub>是E、V或L。在一些实施方案中,X<sub>7</sub>是K或R。在一些实施方案中,X<sub>8</sub>是E或Q。在一些实

实施方案中,  $X_9$ 是H、P或R。在一些实施方案中,  $X_{10}$ 是L、T或G。在一些实施方案中,  $X_{11}$ 是K或R。在一些实施方案中,  $X_{12}$ 是N、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W或Y。在一些实施方案中,  $X_{13}$ 是P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y。在一些实施方案中,  $X_{14}$ 是V或I。在一些实施方案中,  $X_{15}$ 是F、L、V。在一些实施方案中,  $X_{16}$ 是F或V。

[0100] 在一些实施方案中, 本文提供的多肽相对于具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含不超过十个氨基酸取代。在一些实施方案中, 本文提供的多肽相对于具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含不超过七个氨基酸取代。

[0101] 在一些实施方案中, 多肽以比具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少10倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中, 多肽以比具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少100倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中, 多肽以比具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少1000倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中, SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽或其片段以小于 $1 \times 10^{-8}$ M、小于 $5 \times 10^{-9}$ M、小于 $1 \times 10^{-9}$ M、小于 $5 \times 10^{-10}$ M、小于 $1 \times 10^{-10}$ M或小于 $1 \times 10^{-11}$ M的 $K_D$ 结合至CD47。在一些实施方案中, SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽或其片段以约500nM与100nM之间、约100nM与50nM之间、约50nM与10nM之间、约10nM与5nM之间、约5nM与1nM之间、约1nM与500pM之间、约500pM与100pM之间、约100pM与50pM之间或约50pM与10pM之间的 $K_D$ 结合至CD47。

[0102] 在一些实施方案中, 多肽包含具有以下序列的SIRP $\alpha$ D1结构域变体:

[0103] EEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPKSVSVAAGESX<sub>3</sub>ILHCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPARX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSEX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RENDFSISISX<sub>12</sub>ITX<sub>13</sub>ADAGTYXCX<sub>14</sub>KX<sub>15</sub>RKGSPDTEX<sub>16</sub>KSGAGTELSVRKPS (SEQ ID NO: 38), 其中 $X_1$ 是L、I或V;  $X_2$ 是V、L或I;  $X_3$ 是A或V;  $X_4$ 是V、I或L;  $X_5$ 是I、T、S或F;  $X_6$ 是E、V或L;  $X_7$ 是K或R;  $X_8$ 是E或Q;  $X_9$ 是H、P或R;  $X_{10}$ 是S、T或G;  $X_{11}$ 是K或R;  $X_{12}$ 是N、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W或Y;  $X_{13}$ 是P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y;  $X_{14}$ 是V或I;  $X_{15}$ 是F、L或V; 并且 $X_{16}$ 是F或V; 并且其中所述变体相对于具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含至少一个氨基酸取代。

[0104] 在本公开的这方面中的一些实施方案中, 多肽包含具有SEQ ID NO:38的序列的SIRP $\alpha$ D1结构域变体, 其中 $X_1$ 是L、I或V。在一些实施方案中,  $X_2$ 是V、L或I。在一些实施方案中,  $X_3$ 是A或V。在一些实施方案中,  $X_4$ 是V、I或L。在一些实施方案中,  $X_5$ 是I、T、S或F。在一些实施方案中,  $X_6$ 是E、V或L。在一些实施方案中,  $X_7$ 是K或R。在一些实施方案中,  $X_8$ 是E或Q。在一些实施方案中,  $X_9$ 是H、P或R。在一些实施方案中,  $X_{10}$ 是S、T或G。在一些实施方案中,  $X_{11}$ 是K或R。在一些实施方案中,  $X_{12}$ 是N、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W或Y。在一些实施方案中,  $X_{13}$ 是P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y。在一些实施方案中,  $X_{14}$ 是V或I。在一些实施方案中,  $X_{15}$ 是F、L或V。在一些实施方案中,  $X_{16}$ 是F或V。

[0105] 在一些实施方案中, 多肽包含相对于具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域具有不超过十个氨基酸取代的SIRP $\alpha$ D1结构域变体。在一些实施方案中, 多肽包含相对于具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域具有不超过七个氨基酸取代的SIRP $\alpha$ D1结构域变体。

[0106] 在一些实施方案中, 多肽以比具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少10倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中, 多肽以比具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少100倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中, 多肽以比

具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少1000倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽或其片段以小于 $1 \times 10^{-8}$ M、小于 $5 \times 10^{-9}$ M、小于 $1 \times 10^{-9}$ M、小于 $5 \times 10^{-10}$ M、小于 $1 \times 10^{-10}$ M或小于 $1 \times 10^{-11}$ M的 $K_D$ 结合至CD47。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽或其片段以约500nM与100nM之间、约100nM与50nM之间、约50nM与10nM之间、约10nM与5nM之间、约5nM与1nM之间、约1nM与500pM之间、约500pM与100pM之间、约100pM与50pM之间或约50pM与10pM之间的 $K_D$ 结合至CD47。

[0107] 在另一个方面,本公开的特征在于包含具有以下序列的SIRP $\alpha$ D1结构域变体的多肽:

[0108] EEX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>QX<sub>3</sub>IQPDKX<sub>4</sub>VX<sub>5</sub>VAAGEX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>LX<sub>9</sub>CTX<sub>10</sub>TSLX<sub>11</sub>PVGPIQWFRGAGPX<sub>12</sub>RX<sub>13</sub>LIYNQX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GX<sub>16</sub>FPRVTTVSX<sub>17</sub>X<sub>18</sub>TX<sub>19</sub>RX<sub>20</sub>NMDFX<sub>21</sub>IX<sub>22</sub>IX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>ITX<sub>25</sub>ADAGTYXCX<sub>26</sub>KX<sub>27</sub>RKGSPDX<sub>28</sub>X<sub>29</sub>EX<sub>30</sub>KSGAGTELX<sub>31</sub>KPS (SEQ ID NO:47), 其中X<sub>1</sub>是E或G;X<sub>2</sub>是L、I或V;X<sub>3</sub>是V、L或I;X<sub>4</sub>是S或F;X<sub>5</sub>是L或S;X<sub>6</sub>是S或T;X<sub>7</sub>是A或V;X<sub>8</sub>是I或T;X<sub>9</sub>是H、R或L;X<sub>10</sub>是A、V、I或L;X<sub>11</sub>是I、T、S或F;X<sub>12</sub>是A或G;X<sub>13</sub>是E、V或L;X<sub>14</sub>是K或R;X<sub>15</sub>是E或Q;X<sub>16</sub>是H、P或R;X<sub>17</sub>是D或E;X<sub>18</sub>是S、L、T或G;X<sub>19</sub>是K或R;X<sub>20</sub>是E或N;X<sub>21</sub>是S或P;X<sub>22</sub>是S或R;X<sub>23</sub>是S或G;X<sub>24</sub>是任何氨基酸;X<sub>25</sub>是任何氨基酸;X<sub>26</sub>是V或I;X<sub>27</sub>是F、L、V;X<sub>28</sub>是D或不存在;X<sub>29</sub>是T或V;X<sub>30</sub>是F或V;并且X<sub>31</sub>是A或G;并且其中所述变体相对于具有SEQ ID NO:1或2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含至少一个氨基酸取代。

[0109] 在一些实施方案中,多肽包含SEQ ID NO:47的序列,其中X<sub>1</sub>是E或G。在本公开的这方面中的前述实施方案中的任一个中,X<sub>2</sub>是L、I或V。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>3</sub>是V、L或I。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>4</sub>是S或F。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>5</sub>是L或S。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>6</sub>是S或T。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>7</sub>是A或V。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>8</sub>是I或T。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>9</sub>是H或R。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>10</sub>是A、V、I或L。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>11</sub>是I、T、S或F。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>12</sub>是A或G。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>13</sub>是E、V或L。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>14</sub>是K或R。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>15</sub>是E或Q。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>16</sub>是H、P或R。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>17</sub>是D或E。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>18</sub>是S、L、T或G。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>19</sub>是K或R。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>20</sub>是E或N。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>21</sub>是S或P。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>22</sub>是S或R。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>23</sub>是S或G。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>24</sub>是N、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W或Y。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>25</sub>是P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>26</sub>是V或I。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>27</sub>是F、L、V。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>28</sub>是D或不存在。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>29</sub>是T或V。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>30</sub>是F或V。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>31</sub>是A或G。

[0110] 在一些实施方案中,本公开的这方面的多肽相对于具有SEQ ID NO:1或2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含不超过十个氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的这方面的多肽相对于具有SEQ ID NO:1或2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含不超过七个氨基酸取代。

[0111] 在一些实施方案中,多肽以比具有SEQ ID NO:1或2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少10倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中,多肽以比具有SEQ ID NO:1或2

的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少100倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中,多肽以比具有SEQ ID NO:1或2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域的结合亲和力高至少1000倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽或其片段以小于 $1 \times 10^{-8}$ M、小于 $5 \times 10^{-9}$ M、小于 $1 \times 10^{-9}$ M、小于 $5 \times 10^{-10}$ M、小于 $1 \times 10^{-10}$ M或小于 $1 \times 10^{-11}$ M的 $K_D$ 结合至CD47。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽或其片段以约500nM与100nM之间、约100nM与50nM之间、约50nM与10nM之间、约10nM与5nM之间、约5nM与1nM之间、约1nM与500pM之间、约500pM与100pM之间、约100pM与50pM之间或约50pM与10pM之间的 $K_D$ 结合至CD47。

[0112] 在一些实施方案中,多肽包含具有以下序列的SIRP $\alpha$ D1结构域变体:

[0113] EEELQX<sub>1</sub>IQPKSVX<sub>2</sub>VAAGEX<sub>3</sub>AX<sub>4</sub>LX<sub>5</sub>CTX<sub>6</sub>TSLX<sub>7</sub>PVGPIQWFRGAGPX<sub>8</sub>RX<sub>9</sub>LIYNQX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>GX<sub>12</sub>FPVTTVSX<sub>13</sub>X<sub>14</sub>TKRX<sub>15</sub>NMDFSIX<sub>16</sub>IX<sub>17</sub>X<sub>18</sub>ITPADAGTYXCX<sub>19</sub>KFRKGX<sub>20</sub>X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>DX<sub>23</sub>EFKSGAGTELSVRAKPS (SEQ ID NO:48),其中X<sub>1</sub>是V或I;X<sub>2</sub>是L或S;X<sub>3</sub>是T或S;X<sub>4</sub>是T或I;X<sub>5</sub>是R或H;X<sub>6</sub>是A、V或I;X<sub>7</sub>是I、R、Y、K或F;X<sub>8</sub>是G或A;X<sub>9</sub>是E或V;X<sub>10</sub>是K或R;X<sub>11</sub>是E、D或Q;X<sub>12</sub>是H或P;X<sub>13</sub>是D或E;X<sub>14</sub>是S、L或T;X<sub>15</sub>是N或E;X<sub>16</sub>是R或S;X<sub>17</sub>是G或S;X<sub>18</sub>是N或A;X<sub>19</sub>是V或I;X<sub>20</sub>是S、I或M;X<sub>21</sub>是P或不存在;X<sub>22</sub>是D或P;并且X<sub>23</sub>是V或T,或其片段。

[0114] 在另一方面,本公开的特征在于一种多肽,其包含具有以下序列的SIRP $\alpha$ D1结构域变体:

[0115] EEELQX<sub>1</sub>IQPKSVLVAAGETATLRCTX<sub>2</sub>TSLX<sub>3</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>4</sub>LIYNQX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>GX<sub>7</sub>FPRVTTVSDX<sub>8</sub>TKRNNMDFSIRIGX<sub>9</sub>ITPADAGTYXCX<sub>10</sub>KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS (SEQ ID NO:49),其中X<sub>1</sub>是V、L或I;X<sub>2</sub>是A、I、V或L;X<sub>3</sub>是I、F、S或T;X<sub>4</sub>是E、V或L;X<sub>5</sub>是K或R;X<sub>6</sub>是E或Q;X<sub>7</sub>是H、P或R;X<sub>8</sub>是L、T、S或G;X<sub>9</sub>是A;并且X<sub>10</sub>是V或I;并且其中所述变体相对于具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含至少一个氨基酸取代。

[0116] 在一些实施方案中,所述多肽包含SEQ ID NO:49的序列,其中X<sub>1</sub>是V、L或I。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中,X<sub>2</sub>是A、I、V或L。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>3</sub>是I、F、S或T。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>4</sub>是E、V或L。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>5</sub>是K或R。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>6</sub>是E或Q。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>7</sub>是H、P或R。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>8</sub>是L、T、S或G。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>9</sub>是A。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>10</sub>是V或I。

[0117] 在一些实施方案中,多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域,其包含与SEQ ID NO:49至少85%的序列同一性(例如,至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性),其中X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub>、X<sub>9</sub>和X<sub>10</sub>中的每一个都不是野生型氨基酸。

[0118] 在一些实施方案中,本公开的这个方面的多肽相对于具有SEQ ID NO:1中的任一个的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含不超过十个氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的这个方面的多肽相对于具有SEQ ID NO:1中的任一个的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含不超过七个氨基酸取代。

[0119] 在一些实施方案中,多肽以比具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少10倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中,多肽以比具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少100倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中,多肽以比具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少1000倍的结合亲和力结合CD47。在

一些实施方案中, SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽或其片段以小于 $1 \times 10^{-8}$ M、小于 $5 \times 10^{-9}$ M、小于 $1 \times 10^{-9}$ M、小于 $5 \times 10^{-10}$ M、小于 $1 \times 10^{-10}$ M或小于 $1 \times 10^{-11}$ M的 $K_D$ 结合至CD47。在一些实施方案中, SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽或其片段以约500nM与100nM之间、约100nM与50nM之间、约50nM与10nM之间、约10nM与5nM之间、约5nM与1nM之间、约1nM与500pM之间、约500pM与100pM之间、约100pM与50pM之间或约50pM与10pM之间的 $K_D$ 结合至CD47。

[0120] 在另一方面, 本公开的特征在于一种多肽, 其包含具有以下序列的SIRP $\alpha$ D1结构域变体:

[0121] EEELQX<sub>1</sub>IQPKSVSVAAGESAILHCTX<sub>2</sub>TSLX<sub>3</sub>PVGPIQWFRGAGPARX<sub>4</sub>LIYNQX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>GX<sub>7</sub>FPRVTTVSEX<sub>8</sub>TKRENMDFSISIX<sub>9</sub>ITPADAGTYXCX<sub>10</sub>KFRKGGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS, (SEQ ID NO:50), 其中X<sub>1</sub>是V或I; X<sub>2</sub>是V或I; X<sub>3</sub>是I或F; X<sub>4</sub>是E或V; X<sub>5</sub>是K或R; X<sub>6</sub>是E或Q; X<sub>7</sub>是H或P; X<sub>8</sub>是S或T; X<sub>9</sub>是N或A; 并且X<sub>10</sub>是V或I; 并且其中所述变体相对于具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含至少一个氨基酸取代。

[0122] 在一些实施方案中, 多肽包含SEQ ID NO:50的序列, 其中X<sub>1</sub>是V或I。在本公开的这方面中的前述实施方案中的任一个中, X<sub>2</sub>是V或I。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>3</sub>是I或F。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>4</sub>是E或V。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>5</sub>是K或R。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>6</sub>是E或Q。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>7</sub>是H或P。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>8</sub>是S或R。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>9</sub>是N或A。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>10</sub>是V或I。

[0123] 在一些实施方案中, 多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域, 其包含与SEQ ID NO:50至少85%的序列同一性(例如, 至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性), 其中X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub>、X<sub>9</sub>和X<sub>10</sub>中的每一个都不是野生型氨基酸。

[0124] 在一些实施方案中, 本公开的这方面的多肽相对于具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含不超过十个氨基酸取代。在一些实施方案中, 本公开的这方面的多肽相对于具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含不超过七个氨基酸取代。

[0125] 在一些实施方案中, 多肽以比具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少10倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中, 多肽以比具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少100倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中, 多肽以比具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少1000倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中, SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽或其片段以小于 $1 \times 10^{-8}$ M、小于 $5 \times 10^{-9}$ M、小于 $1 \times 10^{-9}$ M、小于 $5 \times 10^{-10}$ M、小于 $1 \times 10^{-10}$ M或小于 $1 \times 10^{-11}$ M的 $K_D$ 结合至CD47。在一些实施方案中, SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽或其片段以约500nM与100nM之间、约100nM与50nM之间、约50nM与10nM之间、约10nM与5nM之间、约5nM与1nM之间、约1nM与500pM之间、约500pM与100pM之间、约100pM与50pM之间或约50pM与10pM之间的 $K_D$ 结合至CD47。

[0126] 在另一个方面, 本公开的特征在于一种多肽, 其包含具有以下序列的SIRP $\alpha$ D1结构域变体:

[0127] EEELQX<sub>1</sub>IQPKSVLVAAGETATLRCTX<sub>2</sub>TSLX<sub>3</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>4</sub>LIYNQX<sub>5</sub>EGX<sub>6</sub>FPRVTTVSDX<sub>7</sub>TKRNNMDFSIRIGX<sub>8</sub>ITPADAGTYXCX<sub>9</sub>KFRKGGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS (SEQ ID NO:51), 其中

$X_1$ 是V或I;  $X_2$ 是A或I;  $X_3$ 是I或F;  $X_4$ 是E或V;  $X_5$ 是K或R;  $X_6$ 是H或P;  $X_7$ 是L或T;  $X_8$ 是N或A; 并且 $X_9$ 是V或I; 并且其中所述变体相对于具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含至少一个氨基酸取代。

[0128] 在一些实施方案中,多肽包含SEQ ID NO:51的序列,其中 $X_1$ 是V或I。在本公开的这方面中的前述实施方案中的任一个中, $X_2$ 是A或I。在前述实施方案中的任一个中, $X_3$ 是I或F。在前述实施方案中的任一个中, $X_4$ 是E或V。在前述实施方案中的任一个中, $X_5$ 是K或R。在前述实施方案中的任一个中, $X_6$ 是H或P。在前述实施方案中的任一个中, $X_7$ 是L或T。在前述实施方案中的任一个中, $X_8$ 是N或A。在前述实施方案中的任一个中, $X_9$ 是V或I。在一个实施方案中, $X_4$ 不是V。

[0129] 在一些实施方案中,所述多肽包含SEQ ID NO:51的序列,其中 $X_8$ 是A。在本公开的这方面中的前述实施方案中的任一个中, $X_8$ 是A并且 $X_1$ 是V或I。在本公开的这方面中的前述实施方案中的任一个中, $X_8$ 是A并且 $X_2$ 是A或I。在前述实施方案中的任一个中, $X_8$ 是A并且 $X_3$ 是I或F。在前述实施方案中的任一个中, $X_8$ 是A并且 $X_4$ 是E或V。在一个实施方案中, $X_4$ 不是V。在前述实施方案中的任一个中, $X_8$ 是A并且 $X_5$ 是K或R。在前述实施方案中的任一个中, $X_8$ 是A并且 $X_6$ 是H或P。在前述实施方案中的任一个中, $X_8$ 是A并且 $X_7$ 是A或V。在前述实施方案中的任一个中, $X_8$ 是A并且 $X_9$ 是V或I。

[0130] 在一些实施方案中,所述多肽包含SEQ ID NO:51的序列,其中 $X_8$ 是A。在本公开的这方面中的前述实施方案中的任一个中, $X_8$ 是A并且 $X_1$ 是I。在本公开的这方面中的前述实施方案中的任一个中, $X_8$ 是A并且 $X_2$ 是I。在前述实施方案中的任一个中, $X_8$ 是A并且 $X_3$ 是F。在前述实施方案中的任一个中, $X_8$ 是A并且 $X_4$ 是V。在前述实施方案中的任一个中, $X_8$ 是A并且 $X_5$ 是R。在前述实施方案中的任一个中, $X_8$ 是A并且 $X_6$ 是P。在前述实施方案中的任一个中, $X_8$ 是A并且 $X_7$ 是T。在前述实施方案中的任一个中, $X_8$ 是A并且 $X_9$ 是I。

[0131] 在一些实施方案中,多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体,其包含与SEQ ID NO:51至少85%的序列同一性(例如,至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性),其中 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 、 $X_6$ 、 $X_7$ 、 $X_8$ 和 $X_9$ 中的每一个都不是野生型氨基酸。

[0132] 在一些实施方案中,本公开的这方面的多肽相对于具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含不超过十个氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的这方面的多肽相对于具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含不超过七个氨基酸取代。

[0133] 在一些实施方案中,多肽以比具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少10倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中,多肽以比具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少100倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中,多肽以比具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域的结合亲和力高至少1000倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽或其片段以小于 $1 \times 10^{-8}$ M、小于 $5 \times 10^{-9}$ M、小于 $1 \times 10^{-9}$ M、小于 $5 \times 10^{-10}$ M、小于 $1 \times 10^{-10}$ M或小于 $1 \times 10^{-11}$ M的 $K_D$ 结合至CD47。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽或其片段以约500nM与100nM之间、约100nM与50nM之间、约50nM与10nM之间、约10nM与5nM之间、约5nM与1nM之间、约1nM与500pM之间、约500pM与100pM之间、约100pM与50pM之间或约50pM与10pM之间的 $K_D$ 结合至CD47。

[0134] 在另一个方面,本公开的特征在于一种多肽,其包含具有以下的序列的SIRP $\alpha$ D1结构域变体:

[0135] EEELQX<sub>1</sub>IQPKSVLVAAGETATLRCTX<sub>2</sub>TSLX<sub>3</sub>PVGPIQWFRGAGPGRELIYNQX<sub>4</sub>EGX<sub>5</sub>FPRVTTVSDX<sub>6</sub>TKRNNMDFSIRIGX<sub>7</sub>ITPADAGTYCYVKFRKGSPPDVEFKSGAGTELSVRAKPS (SEQ ID NO:222),其中X<sub>1</sub>是V、L或I;X<sub>2</sub>是A、I或L;X<sub>3</sub>是I、T、S或F;X<sub>4</sub>是K或R;X<sub>5</sub>是H或P;X<sub>6</sub>是L、T或G;X<sub>7</sub>是N或A;并且其中所述变体相对于具有根据SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含至少一个氨基酸取代。

[0136] 在一些实施方案中,所述多肽包含SEQ ID NO:222的序列,其中X<sub>1</sub>是V、L或I。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中,X<sub>2</sub>是A、I或L。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>3</sub>是I、T、S或F。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>4</sub>是K或R。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>5</sub>是H或P。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>6</sub>是L、T或G。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>7</sub>是N或A。

[0137] 在一些实施方案中,所述多肽包含SEQ ID NO:222的序列,其中X<sub>1</sub>是V或I。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中,X<sub>2</sub>是A或I。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>3</sub>是I或F。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>4</sub>是K或R。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>5</sub>是H或P。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>6</sub>是L或T。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>7</sub>是N或A。

[0138] 在一些实施方案中,所述多肽包含SEQ ID NO:222的序列,其中X<sub>7</sub>是A。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中,X<sub>7</sub>是A并且X<sub>1</sub>是V或I。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中,X<sub>7</sub>是A并且X<sub>2</sub>是A或I。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>7</sub>是A并且X<sub>3</sub>是I或F。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>7</sub>是A并且X<sub>4</sub>是K或R。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>7</sub>是A并且X<sub>5</sub>是H或P。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>7</sub>是A并且X<sub>6</sub>是L或T。

[0139] 在一些实施方案中,所述多肽包含SEQ ID NO:222的序列,其中X<sub>7</sub>是A。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中,X<sub>7</sub>是A并且X<sub>1</sub>是I。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中,X<sub>7</sub>是A并且X<sub>2</sub>是I。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>7</sub>是A并且X<sub>3</sub>是F。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>7</sub>是A并且X<sub>4</sub>是R。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>7</sub>是A并且X<sub>5</sub>是P。在前述实施方案中的任一个中,X<sub>7</sub>是A并且X<sub>6</sub>是T。

[0140] 在一些实施方案中,多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域,其包含与SEQ ID NO:222至少85%的序列同一性(例如,至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性),其中X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub>和X<sub>7</sub>中的每一个都不是野生型氨基酸。

[0141] 在一些实施方案中,本公开的这个方面的多肽相对于具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含不超过十个氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的这个方面的多肽相对于具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含不超过七个氨基酸取代。

[0142] 在一些实施方案中,多肽以比具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少10倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中,多肽以比具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少100倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中,多肽以比具有SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少1000倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中,片段包含长度小于10个氨基酸、长度约10个氨基酸、长度约20个氨基酸、

长度约30个氨基酸、长度约40个氨基酸、长度约50个氨基酸、长度约60个氨基酸、长度约70个氨基酸、长度约80个氨基酸、长度约90个氨基酸、长度约100个氨基酸或长度超过约100个氨基酸的多肽。片段保留了与CD47结合的能力。优选地, SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽及其片段以比SIRP $\alpha$ 多肽结合CD47更高的亲和力结合至CD47。例如, 在一些实施方案中, SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽或其片段以小于 $1 \times 10^{-8}$ M、小于 $5 \times 10^{-9}$ M、小于 $1 \times 10^{-9}$ M、小于 $5 \times 10^{-10}$ M、小于 $1 \times 10^{-10}$ M或小于 $1 \times 10^{-11}$ M的 $K_D$ 结合至CD47。在一些实施方案中, SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽或其片段以约500nM与100nM之间、约100nM与50nM之间、约50nM与10nM之间、约10nM与5nM之间、约5nM与1nM之间、约1nM与500pM之间、约500pM与100pM之间、约100pM与50pM之间或约50pM与10pM之间的 $K_D$ 结合至CD47。

[0143] 在另一个方面, 本公开的特征在于一种多肽, 其包含具有以下序列的SIRP $\alpha$ D1结构域变体:

[0144] EEELQX<sub>1</sub>IQPKSVSVAAGESAILHCTX<sub>2</sub>TSLX<sub>3</sub>PVGPIQWFRGAGPARELIYNQX<sub>4</sub>EGX<sub>5</sub>FPRVTTVSEX<sub>6</sub>TKRENMDFSISISX<sub>7</sub>ITPADAGTYCYVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVRKPS (SEQ ID NO:212), 其中X<sub>1</sub>是V、L或I; X<sub>2</sub>是V、I或L; X<sub>3</sub>是I、T、S或F; X<sub>4</sub>是K或R; X<sub>5</sub>是H、P或R; X<sub>6</sub>是S、T或G; X<sub>7</sub>是N或A; 并且其中所述变体相对于具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含至少一个氨基酸取代。

[0145] 在一些实施方案中, 所述多肽包含SEQ ID NO:212的序列, 其中X<sub>1</sub>是V、L或I。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中, X<sub>2</sub>是V、I或L。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>3</sub>是I、T、S或F。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>4</sub>是K或R。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>5</sub>是H或P。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>6</sub>是S、T或G。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>7</sub>是N或A。

[0146] 在一些实施方案中, 所述多肽包含SEQ ID NO:212的序列, 其中X<sub>1</sub>是V或I。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中, X<sub>2</sub>是V或I。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>3</sub>是I或F。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>4</sub>是K或R。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>5</sub>是H或P。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>6</sub>是S或T。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>7</sub>是N或A。

[0147] 在一些实施方案中, 所述多肽包含SEQ ID NO:212的序列, 其中X<sub>7</sub>是A。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中, X<sub>7</sub>是A并且X<sub>1</sub>是V或I。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中, X<sub>7</sub>是A并且X<sub>2</sub>是V或I。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>7</sub>是A并且X<sub>3</sub>是I或F。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>7</sub>是A并且X<sub>4</sub>是K或R。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>7</sub>是A并且X<sub>5</sub>是H或P。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>7</sub>是A并且X<sub>6</sub>是S或T。

[0148] 在一些实施方案中, 所述多肽包含SEQ ID NO:212的序列, 其中X<sub>7</sub>是A。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中, X<sub>7</sub>是A并且X<sub>1</sub>是I。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中, X<sub>7</sub>是A并且X<sub>2</sub>是I。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>7</sub>是A并且X<sub>3</sub>是F。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>7</sub>是A并且X<sub>4</sub>是R。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>7</sub>是A并且X<sub>5</sub>是P。在前述实施方案中的任一个中, X<sub>7</sub>是A并且X<sub>6</sub>是T。

[0149] 在一些实施方案中, 多肽包含与SEQ ID NO:212具有至少85%序列同一性的SIRP $\alpha$ D1结构域(例如, 至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性), 其中X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub>和X<sub>7</sub>中的每一个都不是野生型氨基酸。

[0150] 在一些实施方案中,本公开的这个方面的多肽相对于具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含不超过十个氨基酸取代。在一些实施方案中,本公开的这个方面的多肽相对于具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含不超过七个氨基酸取代。

[0151] 在一些实施方案中,多肽以比具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少10倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中,多肽以比具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少100倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中,多肽以比具有SEQ ID NO:2的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域高至少1000倍的结合亲和力结合CD47。在一些实施方案中,片段包含长度小于10个氨基酸、长度约10个氨基酸、长度约20个氨基酸、长度约30个氨基酸、长度约40个氨基酸、长度约50个氨基酸、长度约60个氨基酸、长度约70个氨基酸、长度约80个氨基酸、长度约90个氨基酸、长度约100个氨基酸或长度超过约100个氨基酸的多肽。片段保留了与CD47结合的能力。优选地,SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽及其片段以比SIRP $\alpha$ 多肽结合CD47更高的亲和力结合至CD47。例如,在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽或其片段以小于 $1 \times 10^{-8}$ M、小于 $5 \times 10^{-9}$ M、小于 $1 \times 10^{-9}$ M、小于 $5 \times 10^{-10}$ M、小于 $1 \times 10^{-10}$ M或小于 $1 \times 10^{-11}$ M的 $K_D$ 结合至CD47。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽或其片段以约500nM与100nM之间、约100nM与50nM之间、约50nM与10nM之间、约10nM与5nM之间、约5nM与1nM之间、约1nM与500pM之间、约500pM与100pM之间、约100pM与50pM之间或约50pM与10pM之间的 $K_D$ 结合至CD47。

[0152] 在一些实施方案中,本文描述了包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体的多肽,所述变体具有根据以下的序列:

[0153] EEELQX<sub>1</sub>IQPKSVLVAAGETATLRCTX<sub>2</sub>TSLX<sub>3</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>4</sub>LIYNQX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>GX<sub>7</sub>FPRVTTVSDX<sub>8</sub>TKRNNMDFSIRIGX<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>ADAGTYXCX<sub>13</sub>KFRKGGSPDDVEFKSGAGTELSVRKPS (SEQ ID NO: 218),其中X<sub>1</sub>是V、L或I;X<sub>2</sub>是A、V、L或I;X<sub>3</sub>是I、S、T或F;X<sub>4</sub>是E、L或V;X<sub>5</sub>是K或R;X<sub>6</sub>是E或Q;X<sub>7</sub>是H、R或P;X<sub>8</sub>是S、G、L或T;X<sub>9</sub>是任何氨基酸;X<sub>10</sub>是任何氨基酸;X<sub>11</sub>是任何氨基酸;X<sub>12</sub>是任何氨基酸;并且X<sub>13</sub>是V或I;并且其中所述SIRP $\alpha$ D1结构域变体相对于具有根据SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含至少两个氨基酸取代。

[0154] 在一些实施方案中,所述多肽包含SEQ ID NO:212的序列,其中X<sub>1</sub>,其中X<sub>9</sub>是A。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中,X<sub>9</sub>是N。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中,X<sub>10</sub>是I。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中,X<sub>9</sub>是N并且X10是P。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中,X<sub>9</sub>是N并且X11是除S、T或C以外的任何氨基酸。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中,X<sub>11</sub>是T。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中,X<sub>11</sub>是除T以外的氨基酸。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中,X<sub>12</sub>是P。在本公开的这个方面中的前述实施方案中的任一个中,X<sub>9</sub>是N并且X<sub>12</sub>是除P以外的任何氨基酸。

[0155] 在一些实施方案中,本文描述了包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体的多肽,所述变体具有根据以下的序列:

[0156] EEELQX<sub>1</sub>IQPKSVLVAAGETATLRCTX<sub>2</sub>TSLX<sub>3</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>4</sub>LIYNQX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>GX<sub>7</sub>FPRVTTVSDX<sub>8</sub>TKRNNMDFSIRIGX<sub>9</sub>ITX<sub>10</sub>ADAGTYXCX<sub>11</sub>KFRKGGSPDDVEFKSGAGTELSVRKPS (SEQ ID NO: 219),其中X<sub>1</sub>是V、L或I;X<sub>2</sub>是A、V、L或I;X<sub>3</sub>是I、S、T或F;X<sub>4</sub>是E、L或V;X<sub>5</sub>是K或R;X<sub>6</sub>是E或Q;X<sub>7</sub>是H、R或

P; X<sub>8</sub>是S、G、L或T; X<sub>9</sub>是N; X<sub>10</sub>是除P以外的任何氨基酸; 并且X<sub>11</sub>是V或I; 并且其中所述SIRPαD1结构域变体相对于具有根据SEQ ID NO:1的序列的野生型SIRPαD1结构域包含至少两个氨基酸取代。

[0157] 在本公开的另一方面, 本文公开了包含具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的SIRPαD1结构域变体多肽或其片段的组合物。在一些实施方案中, SIRPαD1结构域变体多肽或其片段以比SIRPα多肽结合至CD47的亲和力更高的亲和力结合至CD47。在一些实施方案中, SIRPαD1结构域变体多肽以小于 $1 \times 10^{-8}$ M、小于 $1 \times 10^{-9}$ M、小于 $1 \times 10^{-10}$ M或小于 $1 \times 10^{-11}$ M的K<sub>d</sub>结合至CD47。在一些实施方案中, 上述SIRPαD1结构域变体多肽与第二多肽连接或融合。在一些实施方案中, 第二多肽包括但不限于Fc多肽、Fc变体或前述的片段。

[0158] 不限制前述内容, 在一些实施方案中, SIRPαD1结构域变体多肽选自表6中所示的SEQ ID NO:53-87和213中的任一种。

[0159] 表6. 示例性SIRPαD1结构域变体多肽

SEQ ID NO:	氨基酸序列
[0160] 53	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPARVLIYNQRQGPFPVTTVSETTKREN MDFSISISNITPADAGTYCYCIKFRKGGSPDTEFKSGA GTELSVRAKPS
54	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLFPVGPI

[0161]

	QWFRGAGPARELIYNQRQGPFRVTTVSESTKREN MDFSISISNITPADAGTY YCVKFRK GSPDTEFKSGA GTELSVRAKPS
55	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPARVLIYNQRQGPFRVTTVSETTKREN MDFSISISNITPADAGTY YCIKFRK GSPDTEFKSGA GTELSVRAKPS
56	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLFPVGPIQ WFRGAGPARVLIYNQRQGPFRVTTVSETTKREN MDFSISISNITPADAGTY YCIKFRK GSPDTEFKSGA GTELSVRAKPS
57	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLIPVGPIQ WFRGAGPARVLIYNQRQGPFRVTTVSETTKREN MDFSISISNITPADAGTY YCIKFRK GSPDTEFKSGA GTELSVRAKPS
58	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPARELIYNQRQGPFRVTTVSETTKREN MDFSISISNITPADAGTY YCIKFRK GSPDTEFKSGA GTELSVRAKPS
59	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPARVLIYNQKQGPFRVTTVSETTKREN MDFSISISNITPADAGTY YCIKFRK GSPDTEFKSGA GTELSVRAKPS
60	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPARVLIYNQREGPFPRVTTVSETTKREN MDFSISISNITPADAGTY YCIKFRK GSPDTEFKSGAGT ELSVRAKPS
61	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPARVLIYNQRQGHFPRVTTVSETTKREN MDFSISISNITPADAGTY YCIKFRK GSPDTEFKSGA GTELSVRAKPS
62	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPARVLIYNQRQGPFRVTTVSESTKREN MDFSISISNITPADAGTY YCIKFRK GSPDTEFKSGAGT ELSVRAKPS
63	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPARVLIYNQRQGPFRVTTVSETTKREN MDFSISISNITPADAGTY YCVKFRK GSPDTEFKSGA GTELSVRAKPS
64	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQ WFRGAGPARELIYNQREGPFPRVTTVSESTKREN MDFSISISNITPADAGTY YCVKFRK GSPDTEFKSGAG

[0162]

	TELSVRAKPS
65	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLFPVGPI QWFRGAGPARELIYNQREGPFPRVTTVSESTKREN MDFSISISNITPADAGTY YCVKFRKGGSPDTEFKSGA GTELSVRAKPS
66	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPARELIYNQREGPFPRVTTVSESTKRENM DFSISISNITPADAGTY YCVKFRKGGSPDTEFKSGAG TELSVRAKPS
67	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPARELIYNQREGPFPRVTTVSETTKRENM DFSISISNITPADAGTY YCVKFRKGGSPDTEFKSGAG TELSVRAKPS
68	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPARELIYNQREGPFPRVTTVSESTKRENM DFSISISNITPADAGTY YCVKFRKGGSPDTEFKSGAG TELSVRAKPS
69	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLIPVGPIQ WFRGAGPARELIYNQREGPFPRVTTVSESTKRENM DFSISISNITPADAGTY YCVKFRKGGSPDTEFKSGAG TELSVRAKPS
70	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPARELIYNQREGPFPRVTTVSETTKRENM DFSISISNITPADAGTY YCVKFRKGGSPDTEFKSGAG TELSVRAKPS
71	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQRQGPFPRVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTY YCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
72	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTY YCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
73	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTY YCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
74	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTY YCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
75	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ

[0163]

	WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTYVCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
76	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTYVCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
77	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPS
78	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYYCIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPS
79	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQRQGPFRVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYVCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
80	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYYCIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPS
81	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYVCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
82	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYVCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
83	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYVCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
84	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYVCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
85	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYVCVKFRKGGSPDDVEFKS

[0164]

	GAGTELSVRAKPS
86	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTYCYKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPS
87	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTYCYKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
195	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTMTSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCYKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
196	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLKPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCYKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
197	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLRPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCYKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
198	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLYPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCYKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
199	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQRDGPFRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCYKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
200	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCYKFRKGIPDDVEFKSG AGTELSVRAKPS
201	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCYKFRKGMPPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
202	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCYKFRKGGSPDVEFKSG AGTELSVRAKPS
203	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ

	WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRKGSSEP DVEFKS GAGTELSVRAKPS
204	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLRPV GPIQ WFRGAGPGRELIYNQRDGPFP RVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRKGS PDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
205	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLRPV GPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRKGI PDDVEFKSG AGTELSVRAKPS
206	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLRPV GPIQ WFRGAGPGRELIYNQRDGPFP RVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRKGI PDDVEFKSG AGTELSVRAKPS
[0165] 207	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLY PVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQRDGPFP RVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRKGS PDDVEFKS GAGTELSVRAKPS
208	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLY PVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRKGI PDDVEFKSG AGTELSVRAKPS
209	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLY PVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQRDGPFP RVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRKGI PDDVEFKSG AGTELSVRAKPS
210	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLF PVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQRDGPFP RVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRKGI PDDVEFKSG AGTELSVRAKPS
213	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLF PVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQRQGPFP RVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGNITVADAGTY YCVKFRKGS PDDVEFKS GAGTELSVRAKPS

[0166] 在一些实施方案中,多肽包含与表6中提供的任何变体具有至少85%序列同一性(例如,至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)的SIRP $\alpha$ D1结构域变体。

[0167] 在一些实施方案中,多肽包含与表6中的SEQ ID NO:80、81或85具有至少85%序列同一性(例如,至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)的SIRP $\alpha$ D1结构域。

[0168] Fc结构域变体

[0169] 本文公开的融合多肽包含信号调控蛋白 $\alpha$  (SIRP- $\alpha$ ) D1变体 (或其CD47结合片段) 和Fc结构域变体。在一些实施方案中, Fc结构域变体是或包含 (i) 包含L234A、L235A、G237A和N297A突变的人IgG1Fc区 (其中氨基酸编号根据EU索引); (ii) 包含A330S、P331S和N297A突变的人IgG2 Fc区 (其中氨基酸编号根据EU索引); 或 (iii) 包含S228P、E233P、F234V、L235A、delG236和N297A突变的人IgG4 Fc区 (其中氨基酸编号根据EU索引)。

[0170] 靶向细胞表面抗原的抗体可以触发与免疫细胞上的Fc受体 (FcR) 缔合相关的免疫刺激和效应子功能。存在对特定类别的抗体具有特异性的许多Fc受体, 包括IgG ( $\gamma$  受体)、IgE ( $\eta$ 受体)、IgA ( $\alpha$ 受体) 和IgM ( $\mu$ 受体)。Fc区与细胞表面上的Fc受体的结合可以触发许多生物响应, 包括抗体包被颗粒的吞噬作用 (抗体依赖性细胞介导的吞噬作用, 或ADCP)、免疫复合物的清除、杀伤细胞对抗体包被细胞的裂解 (抗体依赖性细胞介导的细胞毒性, 或ADCC) 以及炎症介体的释放、胎盘转移和免疫球蛋白产生的控制。此外, 补体的C1组分与抗体的结合可以活化补体系统。补体的活化对于细胞病原体的裂解可能是重要的。然而, 补体的活化也可以刺激炎性响应, 并且还可以参与自身免疫性超敏反应或其他免疫病症。结合某些Fc受体的能力降低或消除的变体Fc区可用于开发治疗性抗体和Fc融合多肽构建体, 其通过靶向、活化或中和配体功能而起作用, 同时不损伤或破坏局部细胞或组织。

[0171] 在一些实施方案中, 融合蛋白包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体 (或其CD47结合片段), 所述变体与Fc结构域变体连接 (例如, 融合, 诸如遗传融合), 从而形成具有消除的或减少的效应子功能的Fc结构域。

[0172] 在一些实施方案中, Fc结构域变体是指包含第二和第三抗体恒定结构域 (例如, CH2和CH3) 的多肽链。在一些实施方案中, Fc结构域变体还包括铰链结构域。在一些实施方案中, Fc结构域变体属于任何免疫球蛋白抗体同种型, 包括IgG、IgE、IgM、IgA和IgD。此外, 在一些实施方案中, Fc结构域变体属于任何IgG亚型 (例如, IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3和IgG4)。在一些实施方案中, Fc结构域变体包含相对于野生型Fc结构域单体序列 (例如, 1-10个、1-8个、1-6个、1-4个氨基酸取代、添加或插入、缺失或其组合) 的多达十个氨基酸修饰 (例如, 插入、缺失和/或取代), 其改变了Fc结构域与Fc受体之间的相互作用。

[0173] 如本文所使用, 术语“Fc结构域二聚体”是指两个Fc结构域或两个Fc结构域变体的二聚体。在野生型Fc结构域二聚体中, 两个野生型Fc结构域通过两个CH3抗体恒定结构域之间的相互作用以及在两个二聚化Fc结构域的铰链结构域之间形成的一个或多个二硫键而二聚化。

[0174] 如本文所使用, 术语“Fc结构域二聚体变体”包含两个Fc结构域变体。在一些实施方案中, Fc结构域二聚体变体包含经突变而缺乏效应子功能的Fc结构域变体, 例如“死Fc结构域二聚体变体”。在一些实施方案中, Fc结构域二聚体变体中的每个Fc结构域包含CH2和/或CH3抗体恒定结构域中的氨基酸取代, 以减少Fc结构域二聚体变体与Fc受体, 诸如Fc  $\gamma$  受体 (Fc  $\gamma$  R)、Fc $\alpha$ 受体 (Fc $\alpha$ R) 或Fc $\epsilon$  (Fc $\epsilon$ R) 之间的相互作用或结合。

[0175] 在一些实施方案中, 融合多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体 (例如, 表2、5和6中描述的任何变体), 其与免疫球蛋白的Fc结构域变体或这种Fc结构域变体的片段融合 (例如, 遗传融合)。在一些实施方案中, 融合多肽包含免疫球蛋白 (或其片段) 的Fc结构域变体, 其能够与另一种Fc结构域变体形成Fc结构域二聚体。在一些实施方案中, 融合多肽包含免疫球蛋

白(或其片段)的Fc结构域变体,其不能与另一种Fc结构域变体形成Fc结构域二聚体。在一些实施方案中,与不包含Fc结构域变体(或其片段)的多肽相比,包含Fc结构域变体(或其片段)的融合多肽显示出多肽的血清半衰期增加。在一些实施方案中,融合多肽包含Fc结构域变体(或其片段),其与第二Fc结构域变体二聚化以形成结合Fc受体的Fc结构域二聚体变体。在一些实施方案中,融合多肽包含Fc结构域变体(或其片段),其与第二Fc结构域变体二聚化以形成不结合Fc受体的Fc结构域二聚体变体。在一些实施方案中,融合多肽包含Fc结构域变体(或其片段),其在施用于受试者(例如,人类受试者)后不诱导任何免疫系统相关性响应。

[0176] 在一些实施方案中,融合多肽包含与第一Fc结构域变体接合的SIRP $\alpha$ D1结构域或其变体和与第二Fc结构域变体接合的抗体可变结构域,其中第一和第二Fc结构域变体联合形成Fc结构域二聚体变体(例如,异二聚Fc结构域二聚体变体)。在一些实施方案中,融合多肽包含与第一Fc结构域变体连接(例如,融合,例如遗传融合)的SIRP $\alpha$ D1结构域变体和与第二Fc结构域变体连接(例如,融合,例如遗传融合)的第二SIRP $\alpha$ D1结构域变体,其中第一Fc结构域变体和第二Fc结构域变体组合以形成Fc结构域二聚体变体(例如,异二聚体Fc结构域二聚体变体)。在一些实施方案中,本文的融合多肽包含同二聚体,其包含与第一Fc结构域连接(例如融合,如遗传融合)的第一SIRP $\alpha$ D1结构域变体。

[0177] Fc结构域二聚体是在免疫球蛋白的C末端发现的蛋白质结构。Fc结构域二聚体包括通过CH3抗体恒定结构域之间的相互作用而二聚化的两个Fc结构域。野生型Fc结构域二聚体形成结合至Fc受体的最小结构,例如Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RIIa、Fc  $\gamma$  RIIb、Fc  $\gamma$  RIIIa、Fc  $\gamma$  RIIIb和Fc  $\gamma$  RIV。

[0178] Fc结构域二聚体不直接参与抗体与其靶标的结合,但可能参与各种效应子功能,诸如抗体参与抗体依赖性细胞毒性。在一些实施方案中,融合多肽包含Fc结构域变体,所述变体相对于相应野生型Fc结构域的氨基酸序列包含氨基酸取代、添加或插入、缺失或其任何组合,导致效应子功能降低,例如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)降低、补体依赖性细胞溶解(CDC)降低、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)降低或其任何组合。在一些实施方案中,融合多肽的特征在于与人Fc受体的结合降低(例如,最小结合或不存在结合),以及与补体蛋白C1q的结合降低(例如,最小结合或不存在结合)。在一些实施方案中,融合多肽的特征在于与人Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RIIA、Fc  $\gamma$  RIIIB、Fc  $\gamma$  RIIIIB或其任意组合以及C1q的结合降低(例如,最小结合或不存在结合)。为了改变或减少抗体依赖性效应子功能,例如ADCC、CDC、ADCP或其任何组合,在一些实施方案中,融合多肽包含人IgG Fc结构域变体,其包含在E233、L234、L235、G236、G237、D265、D270、N297、E318、K320、K322、A327、A330、P331或P329处的一个或多个氨基酸取代(根据Kabat的EU索引(Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))编号)。

[0179] 在一些实施方案中,融合多肽包含非天然Fc结构域(例如,Fc结构域变体),当二聚化以形成Fc结构域二聚体变体时,与包含天然Fc结构域二聚体的融合多肽相比,所述融合多肽表现出与Fc  $\gamma$  受体CD16a、CD32a、CD32b、CD32c和CD64中的至少一种的结合降低或消除。在一些情况下,当二聚化(例如,同源二聚化或异源二聚化)时,融合多肽表现出与CD16a、CD32a、CD32b、CD32c和CD64 Fc  $\gamma$  受体的结合降低或消除。

[0180] CDC是指一种细胞毒性形式,其中补体级联被结合至抗体Fc结构域的补体组分C1q活化。在一些实施方案中,融合多肽包含Fc结构域变体,其当二聚化以形成Fc结构域二聚体变体时,与包含野生型Fc区的多肽构建体相比,表现出至少5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大的C1q结合降低。在一些实施方案中,融合多肽包含Fc结构域变体,其当二聚化以形成Fc结构域二聚体变体时,与包含野生型Fc结构域的多肽构建体相比,表现出降低的CDC。在一些实施方案中,融合多肽包含Fc结构域变体,其当二聚化以形成Fc结构域二聚体变体时,与包含野生型Fc结构域的融合多肽相比,表现出至少5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大的CDC降低。在一些实施方案中,融合多肽包含Fc结构域变体,其当二聚化以形成Fc结构域二聚体变体时,与包含野生型Fc区的多肽构建体相比,表现出可忽略的CDC。

[0181] 在一些实施方案中,融合多肽包含相对于野生型Fc结构域被最少糖基化或具有降低的糖基化的Fc结构域变体。在一些实施方案中,去糖基化通过N297A(其中氨基酸编号是根据EU索引)的突变或通过N297突变为任何非N的氨基酸来完成。在一些实施方案中,去糖基化通过破坏基序N-Xaa1-Xaa2-Xaa3来完成,其中N=天冬酰胺;Xaa1=除P(脯氨酸)以外的任何氨基酸;Xaa2=T(苏氨酸)、S(丝氨酸)或C(半胱氨酸);Xaa3=除P(脯氨酸)以外的任何氨基酸。在一个实施方案中,N-Xaa1-Xaa2-Xaa3基序是指残基297-300,如根据Kabat等人,1991年所指定。在一些实施方案中,N、Xaa1、Xaa2或Xaa3中任何一个或多个的突变导致Fc结构域变体的去糖基化。

[0182] 在一些实施方案中,融合多肽包含IgG Fc结构域变体,其当二聚化时表现出降低的特异性结合Fc  $\gamma$  受体的能力或降低的诱导吞噬作用的能力。例如,在一些实施方案中,融合多肽包含Fc结构域变体(例如,IgG Fc结构域变体),其在二聚化时缺乏“死”Fc结构域变体(例如,“死”IgG Fc结构域变体)的典型功能。例如,在一些实施方案中,Fc结构域变体(例如,IgG Fc结构域变体)包含已知使Fc结构域二聚体和Fc  $\gamma$  受体之间的相互作用最小化的氨基酸取代。在一些实施方案中,融合多肽包含Fc结构域变体(例如,IgG Fc结构域变体),其包含氨基酸取代L234A、L235A、G237A和N297A中的一个或多个(如根据Kabat等人,1991的EU编号系统所指定)。在一些实施方案中,Fc结构域变体包含一个或多个额外突变。人IgG1 Fc结构域变体的此类额外突变的非限制性实例包括E318A和K322A(其中氨基酸编号根据EU索引)。在一些实施方案中,融合多肽包含Fc结构域变体(例如IgG Fc结构域变体),与野生型人IgG1结构域的氨基酸序列相比,所述变体总共包含多达12、11、10、9、8、7、6、5或4个或更少突变。在一些实施方案中,Fc结构域变体还包含一个或多个额外缺失。例如,在一些实施方案中,表7中的SEQ ID NO:88中提供的Fc结构域IgG1重链恒定区的C末端赖氨酸缺失,例如以在多肽在细菌或哺乳动物细胞中产生时增加多肽的同质性。在一些实施方案中,与野生型人IgG1序列相比,人IgG1 Fc结构域变体总共包含多达12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个或4个或更少的缺失(参见例如,SEQ ID NO:161,如下)。在一些实施方案中,融合多肽包含SEQ ID NO:135、SEQ ID NO:136或SEQ ID NO:137中任一者所示的序列。

[0183] DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:161)

[0184] 在一些实施方案中,Fc结构域变体是人IgG2或人IgG4抗体Fc结构域的变体。在一些实施方案中,IgG2变体或IgG4变体包含氨基酸取代A330S、P331S或A330S和P331S两者(其中氨基酸编号根据EU索引)。在一些实施方案中,IgG2 Fc结构域变体包含人IgG2 Fc结构域,所述结构域包含A330S、P331S和N297A氨基酸取代中的一个或多个(如根据Kabat等人(1991)的EU编号系统所指定)。在一些实施方案中,IgG2 Fc结构域变体包含一个或多个额外突变。此类额外突变的非限制性实例包括但不限于例如V234A、G237A、P238S、V309L和H268A(如根据Kabat等人(1991)的EU编号系统所指定)。在一些情况下,与野生型人IgG2序列相比,人IgG2 Fc结构域变体总共包含多达12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个或更少的突变。在一些实施方案中,野生型人IgG2 Fc结构域(例如,表7中的SEQ ID NO:89)的C-末端赖氨酸被缺失以产生IgG2 Fc结构域变体。在一些实施方案中,与野生型人IgG2序列相比,IgG2 Fc结构域变体总共包含多达12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个或4个或更少的缺失(参见例如,SEQ ID NO:162,如下)。

[0185] ERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:162)。

[0186] 在一些实施方案中,Fc结构域变体是IgG4 Fc结构域变体。在一些实施方案中,IgG4 Fc结构域变体包含S228P突变(其中氨基酸编号根据EU索引)。在一些实施方案中,与野生型人IgG4 Fc结构域的氨基酸序列相比,IgG4 Fc结构域变体总共包含多达12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个突变。在一些实施方案中,Fc结构域变体包含S228P、E233P、F234V、L235A和de1G236中的一个或多个(其中氨基酸编号根据Kabat等人(1991)的EU编号系统指定)。在一些实施方案中,Fc结构域变体包含S228P、E233P、F234V、L235A、de1G236和N297A氨基酸取代中的一个或多个(如根据Kabat等人(1991)的EU编号系统所指定)。

[0187] 在一些实施方案中,Fc结构域变体是人IgG1 Fc结构域单体的变体,其包含选自由L234A、L235A、G237A和N297A组成的组的至少一个突变(例如两个、三个或全部四个突变)。在一些实施方案中,Fc结构域变体是人IgG2 Fc结构域单体的变体,其包含选自由A330S、P331S和N297A组成的组的至少一个突变(例如两个或所有三个突变)。

[0188] 在一些实施方案中,与野生型人IgG Fc结构域相比,Fc结构域变体表现出减少的与Fc受体的结合。在一些实施方案中,与野生型人IgG Fc结构域相比,Fc结构域变体表现出消除的与受试者的Fc受体的结合。在一些实施方案中,与野生型人IgG Fc结构域相比,Fc结构域变体表现出介导吞噬作用的能力降低。在一些实施方案中,与野生型人IgG Fc结构域相比,Fc结构域变体表现出消除的吞噬作用。

[0189] SEQ ID NO:88和SEQ ID NO:89分别是IgG1和IgG2 Fc结构域的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc结构域变体包含(或是)如表7中所示的SEQ ID NO:90-95中的任一者。

[0190] 表7.Fc结构域变体的氨基酸序列

[0191]

SEQ ID NO:	氨基酸序列
88	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
89	STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPCP APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K

[0192]

90	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
91	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG
92	VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF ASTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKG FYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
93	VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF ASTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKG FYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
94	ERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCTVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFASTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
95	ERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCTVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFASTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG

[0193] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (在本文中也称为ADCC) 是指一种细胞毒性形式, 其中分泌的Ig结合到存在于某些细胞毒性细胞 (例如, 天然杀手 (NK) 细胞和嗜中性粒细胞)

上的Fc受体 (FCR) 上,使这些细胞毒性效应子细胞能够特异性结合至携带抗原的靶细胞并随后杀死靶细胞。抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(在本文中也称为ADCP)是指一种细胞毒性形式,其中分泌的Ig结合到存在于某些吞噬细胞(例如,巨噬细胞)上的Fc受体(FCR)上,使这些吞噬效应子细胞能够特异性结合至携带抗原的靶细胞并随后吞没和消化所述靶细胞。针对靶细胞的表面的配体特异性高亲和力IgG抗体可刺激细胞毒性或吞噬细胞并可用于此类杀伤。在一些实施方案中,与包含野生型Fc结构域(例如,野生型Fc结构域二聚体)的多肽(例如,融合多肽)相比,本文提供的多肽(例如,融合多肽)包含表现出降低的ADCC或ADCP的Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体。在一些实施方案中,本文提供的多肽(例如,融合多肽)包含Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体,其与包含野生型Fc结构域的多肽(例如,融合多肽)相比,表现出约5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大的ADCC或ADCP降低中的任一种。在一些实施方案中,与包含野生型Fc区的多肽(例如,融合多肽)相比,本文提供的多肽(例如,融合多肽)包含Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体,所述变体表现出消除的ADCC或ADCP。

[0194] 补体介导的细胞毒性(在本文中也称为CDC)是指一种细胞毒性形式,其中补体级联被与抗体Fc结构域结合的补体组分C1q活化。在一些实施方案中,本文提供的多肽(例如,融合多肽)包含Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体,与包含野生型Fc区的多肽(例如,融合多肽)相比,所述变体表现出约至少5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大的C1q结合降低中的任一种。在一些实施方案中,与包含野生型Fc区的多肽(例如,融合多肽)相比,本文提供的多肽(例如,融合多肽)包含Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体,所述变体表现出降低的CDC。在一些实施方案中,本文提供的多肽(例如,融合多肽)包含Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体,与包含野生型Fc区的多肽(例如,融合多肽)相比,所述变体表现出至少5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大的CDC降低。在一些情况下,本文提供的多肽(例如,融合多肽)包含Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体,与包含野生型Fc区的多肽构建体相比,所述变体表现出可忽略的CDC。

[0195] 本文中的Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体与野生型人IgG Fc区相比表现出降低的与Fc  $\gamma$  受体的结合。例如,在一些实施方案中,Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体对Fc  $\gamma$  受体的亲和力低于野生型IgG Fc结构域对Fc  $\gamma$  受体的亲和力,如实施例所述。在一些实施方案中,与野生型Fc结构域与Fc  $\gamma$  受体的结合相比,本文所述的Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体与Fc  $\gamma$  受体的结合降低约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(完全消除的效应子功能)。在一些实施方案中,降低的结合是针对选自由CD16a、CD32a、CD32b、CD32c和CD64组成的组的任一种或多种Fc  $\gamma$  受体。

[0196] 在一些实施方案中,与野生型人IgG Fc区相比,本文公开的Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体表现出降低的吞噬作用。在一些实施方案中,与野生型Fc结构域的结合相比,本文所述的Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体介导吞噬作用的能力降低约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中的任一种。在一些情况下,Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体与野生型人IgG Fc区相比表现出消除的吞噬作用。

[0197] 在一些实施方案中, SIRP $\alpha$ 变体经由接头序列与Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体序列连接。在一些实施方案中, 接头序列通常包含少量的氨基酸, 诸如少于十个氨基酸, 尽管也使用较长的接头。在一些情况下, 接头的长度小于10个、9个、8个、7个、6个或5个氨基酸或更短。在一些情况下, 接头具有至少10个、11个、12个、13个、14个、15个、20个、25个、30个或35个氨基酸或更长的长度。任选地, 在一些实施方案中, 采用可裂解的接头。

[0198] 在一些实施方案中, 本文的多肽(例如, 融合多肽)包含靶向或信号序列, 其将多肽导向至所需细胞位置或细胞外环境。在一些实施方案中, 某些信号传导序列靶向要分泌到生长培养基中或位于细胞的内膜与外膜之间的周质空间中的多肽。在一些实施方案中, 多肽(例如, 融合多肽)包含能够进行纯化或筛选的表位或标签。此类表位或标签包括但不限于聚组氨酸标签(His标签)(例如His6(HHHHHH SEQ ID NO:223)和His10(HHHHHHHHHH SEQ ID NO:224))或与固定化金属亲和色谱(IMAC)系统(例如, Ni<sup>+2</sup>亲和柱)一起使用的其他标签、GST融合体、MBP融合体、Strep标签、细菌酶BirA的BSP生物素化靶序列以及被抗体靶向的表位标签(例如c-myc标签、flag标签等)。在一些实施方案中, 此类标签可用于纯化、筛选或两者。例如, 在一些实施方案中, 使用His标签通过将其固定到Ni<sup>+2</sup>亲和柱上来纯化多肽(例如, 融合多肽), 然后在纯化后, 使用相同的His标签将抗体固定到Ni<sup>+2</sup>包被的板上, 以进行ELISA或如本文别处所述的其他结合测定。

[0199] 在一些实施方案中, 融合配偶体使得能够使用选择方法来筛选如本文所述的Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体。可获得实现多种选择方法的各种融合配偶体。例如, 通过将Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体文库的成员与基因III蛋白融合, 可以采用噬菌体展示。在一些实施方案中, 融合配偶体Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体将被标记。替代地, 在一些实施方案中, 融合配偶体结合至表达载体上的特定序列, 使得融合配偶体和相关的Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体能够与编码其的核酸共价或非共价连接。

[0200] 在一些实施方案中, 当融合配偶体是治疗性部分时, 治疗性部分是例如肽、蛋白质、抗体、siRNA或小分子。与本公开的Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体偶联的治疗性抗体的非限制性实例包括但不限于识别CD47的抗体。与本公开的Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体偶联的治疗性多肽的非限制性实例包括但不限于CD47结合多肽, 包括SIRP $\alpha$ 多肽。在此类情况下, CD47结合多肽连接或融合到本公开的Fc结构域变体或Fc结构域二聚体变体。CD47结合多肽的实例包括但不限于抗CD47抗体或其片段, 以及CD47的配体, 诸如SIRP $\alpha$ 或其片段。CD47结合多肽的额外实例包括但不限于天然存在形式的SIRP $\alpha$ 以及其突变体。

[0201] 在一些实施方案中, 本文公开了包含Fc结构域二聚体变体的多肽, 其中Fc结构域二聚体变体包含两个Fc结构域变体, 其中每个Fc结构域变体独立地选自(i)由突变L234A、L235A、G237A和N297A组成的人IgG1 Fc区; (ii)由突变A330S、P331S和N297A组成的人IgG2 Fc区; 或(iii)包含突变S228P、E233P、F234V、L235A、de1G236和N297A的人IgG4 Fc区。在一些实施方案中, Fc结构域变体是相同的(即, 同二聚体)。在一些实施方案中, Fc结构域变体是不同的(即, 异二聚体)。在一些实施方案中, Fc结构域二聚体中的至少一个Fc结构域变体是由突变L234A、L235A、G237A和N297A组成的人IgG1Fc区。在一些实施方案中, Fc结构域二聚体中的至少一个Fc结构域变体是由突变A330S、P331S和N297A组成的人IgG2 Fc区。在一些实施方案中, 与人IgG Fc区的野生型形式相比, Fc结构域二聚体变体表现出消除的或降低的与Fc $\gamma$ 受体的结合。在一些实施方案中, 与人IgG Fc区的野生型形式相比, Fc结构域二

聚体变体表现出消除的或降低的与CD16a、CD32a、CD32b、CD32c和CD64 Fc  $\gamma$  受体的结合。在一些实施方案中,与人IgG Fc融合体的野生型形式相比,Fc结构域二聚体变体表现出消除的或降低的与C1q的结合。在一些实施方案中,Fc结构域二聚体变体中的至少一个是包含突变S228P、E233P、F234V、L235A、de1G236和N297A的人IgG4 Fc区。在一些实施方案中,与野生型人IgG4 Fc区相比,Fc结构域二聚体变体表现出消除的或降低的与Fc  $\gamma$  受体的结合。在一些实施方案中,与其人IgG4 Fc区的野生型形式相比,Fc结构域二聚体变体表现出消除的或降低的与CD16a和CD32b Fc  $\gamma$  受体的结合。在一些实施方案中,Fc结构域二聚体变体以大于约 $5 \times 10^{-6}$ M的 $K_D$ 结合至Fc  $\gamma$  受体。

[0202] 在一些实施方案中,Fc结构域二聚体变体还包含CD47结合多肽。在一些实施方案中,与人IgG Fc区的野生型形式相比,Fc结构域二聚体变体表现出消除的或降低的与Fc  $\gamma$  受体的结合。在一些实施方案中,CD47结合多肽不会在啮齿动物和非人灵长类动物中引起急性贫血。在一些实施方案中,CD47结合多肽不会在人中引起急性贫血。

[0203] 在一些实施方案中,CD47结合多肽是信号调控蛋白 $\alpha$  (SIRP- $\alpha$ ) 多肽或其片段。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ 多肽包含含有以下氨基酸序列的SIRP $\alpha$ D1结构域变体:EEELQX<sub>1</sub>IQPK SVLVAAGETATLRCTX<sub>2</sub>TSLX<sub>3</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>4</sub>LIYNQX<sub>5</sub>EGX<sub>6</sub>FPRVTTVSDX<sub>7</sub>TKRNNDFSIRIGX<sub>8</sub>IT PADAGTYXCX<sub>9</sub>KFRKGSPPDVEFKSGAGTELSVRAKPS (SEQ ID NO:221),其中X<sub>1</sub>是V或I;X<sub>2</sub>是A或I;X<sub>3</sub>是I或F;X<sub>4</sub>是E或V;X<sub>5</sub>是K或R;X<sub>6</sub>是H或P;X<sub>7</sub>是L或T;X<sub>8</sub>是除N以外的任何氨基酸;并且X<sub>9</sub>是V或I。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ 多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体,其中X<sub>1</sub>是V或I;X<sub>2</sub>是A或I;X<sub>3</sub>是I或F;X<sub>4</sub>是E;X<sub>5</sub>是K或R;X<sub>6</sub>是H或P;X<sub>7</sub>是L或T;X<sub>8</sub>不是N;并且X<sub>9</sub>是V。

[0204] 在一些实施方案中,本文公开了一种多肽,其包含:SIRP $\alpha$ D1结构域变体,其中SIRP $\alpha$ D1结构域变体是非天然存在的高亲和力SIRP $\alpha$ D1结构域,其中SIRP $\alpha$ D1结构域变体以比天然存在的D1结构域的亲合力大至少10倍的亲合力结合至人CD47;和Fc结构域变体,其中所述Fc结构域变体与包含第二Fc结构域变体的第二多肽连接,以形成Fc结构域二聚体变体,其中所述Fc结构域二聚体变体具有消除的或降低的效应子功能。在一些实施方案中,非天然存在的高亲和力SIRP $\alpha$ D1结构域包含残基80处的氨基酸突变。

[0205] 在一些实施方案中,本文公开了一种SIRP $\alpha$ D1结构域变体,其中SIRP $\alpha$ D1结构域变体以小于250nM的KD结合来自第一物种的CD47;并且其中SIRP $\alpha$ D1结构域变体以小于250nM的KD结合来自第二物种的CD47;并且来自第一物种的CD47的KD和来自第二物种的CD47的KD彼此在100倍以内;其中第一物种和第二物种选自由以下组成的组:人、啮齿动物和非人灵长类动物。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体结合来自至少3种不同物种的CD47。在一些实施方案中,非人灵长类动物是食蟹猴。

[0206] 在一些实施方案中,本文公开了一种多肽,其包含(a)以小于250nM  $K_D$ 结合人CD47的SIRP $\alpha$ D1结构域;和(b)与SIRP $\alpha$ D1结构域的N末端或C末端连接的Fc结构域或其变体,其中所述多肽不会在啮齿类动物和非人灵长类动物中引起急性贫血。在一些实施方案中,多肽是人SIRP- $\alpha$ 的非天然存在的变体。在一些实施方案中,体内施用多肽导致施用后的第一周期间血红蛋白减少少于50%。在一些实施方案中,在人类中施用多肽导致在施用后的第一周期间血红蛋白减少少于50%。在一些实施方案中,多肽进一步包含至少一种Fc结构域二聚体变体,其中Fc结构域二聚体变体包含选自以下的Fc结构域变体:(i)由突变L234A、L235A、G237A和N297A组成的人IgG1 Fc区;(ii)由突变A330S、P331S和N297A组成的人IgG2

Fc区;或(iii)包含突变S228P、E233P、F234V、L235A、delG236和N297A的人IgG4 Fc区。在一些实施方案中,Fc结构域变体是由突变L234A、L235A、G237A和N297A组成的人IgG1 Fc区。在一些实施方案中,Fc结构域变体是由突变A330S、P331S和N297A组成的人IgG2 Fc区。

[0207] 本公开的SIRP $\alpha$ 构建体包括SIRP $\alpha$ 结构域或其变体,其C末端通过使用常规遗传或化学手段(例如,化学缀合)的接头接合到Fc结构域或其变体的N末端。在一些实施方案中,将接头(例如,间隔区)插入多肽与Fc结构域或其变体之间。在一些实施方案中,包括SIRP $\alpha$ D1结构域变体的本公开的多肽与不能形成二聚体的Fc结构域变体融合。在一些实施方案中,本公开的多肽与能够与另一Fc结构域或其变体形成二聚体(例如,异二聚体)的Fc结构域或其变体融合。在一些实施方案中,本发明的多肽与Fc结构域或其变体融合,并且此融合蛋白形成同二聚体。在一些实施方案中,本公开的多肽与第一Fc结构域或其变体融合,并且不同的蛋白质或肽(例如,抗体可变区)与第二Fc结构域或其变体融合。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域或其变体与第一Fc结构域或其变体接合,并且治疗性蛋白质(例如,细胞因子、白介素、抗原、类固醇、抗炎剂或免疫调控剂)与第二Fc结构域或其变体接合。在一些实施方案中,第一和第二Fc结构域或其变体形成异二聚体。

[0208] 在不限制前述内容的情况下,在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽(例如,表2、5和6中描述的任何变体)与Fc多肽或Fc变体多肽(诸如Fc结构域或其变体)融合。包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽和融合Fc结构域变体多肽的多肽的实例包括但不限于表8中所示的SEQ ID NO:96-137、214和216。

[0209] 表8. 包含与Fc结构域变体融合的SIRP $\alpha$ D1结构域变体的多肽

SEQ ID NO:	氨基酸序列
[0210] 96	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0211]

<p>97</p>	<p>EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPV GPIQ                  WFRGAGPGRELIYNQRQGPFP RVTTVSDLT KRNN                  MDFSIRIGNITPADAGTY YCVKFRK GSPDDVEFKS                  GAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFL                  FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW                  YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQ                  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP                  QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW                  ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR                  WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>98</p>	<p>EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPV GPIQ                  WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFP RVTTVSDTT KRNN                  MDFSIRIGAITPADAGTY YCIKFRK GSPDDVEFKSG                  AGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLF                  PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW                  YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQ                  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP                  QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW                  ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR                  WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>99</p>	<p>EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPV GPIQ                  WFRGAGPGRELIYNQRQGPFP RVTTVSDLT KRNN                  MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRK GSPDDVEFKS                  GAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFL                  FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW                  YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQ                  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP                  QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW                  ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR                  WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>100</p>	<p>EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPV GPIQ                  WFRGAGPGRELIYNQREGPFP RVTTVSDLT KRNN                  MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRK GSPDDVEFKS                  GAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFL                  FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW                  YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQ                  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP                  QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW                  ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR                  WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

[0212]

101	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
102	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
103	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
104	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0213]

<p>105</p>	<p>EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPSVECPAPPVAGPSVFLFPPPKP DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFASTFRVVSVLTVVHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>106</p>	<p>EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQRQGPFPRTTVSDLTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTYCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSVECPAPPVAGPSVFLFPPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFASTFRVVSVLTVVHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>107</p>	<p>EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCYCIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPSVECPAPPVAGPSVFLFPPPKP DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFASTFRVVSVLTVVHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>108</p>	<p>EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQRQGPFPRTTVSDLTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSVECPAPPVAGPSVFLFPPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFASTFRVVSVLTVVHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

[0214]

<p>109</p>	<p>EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGP                  IQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLT                  KRNNMDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRK                  GSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSVECP                  PCAPPVAGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPE                  VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG VEVH                  NAKTKPREEQFASTFRVVS VLTVVHQD                  WLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTK                  GQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCL                  VKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTP                  PMLSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQ                  GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>110</p>	<p>EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGP                  IQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLT                  KRNNMDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRK                  GSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSVECP                  PCAPPVAGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPE                  VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG VEVH                  NAKTKPREEQFASTFRVVS VLTVVHQD                  WLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTK                  GQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCL                  VKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTP                  PMLSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQ                  GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>111</p>	<p>EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGP                  IQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLT                  KRNNMDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRK                  GSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSVECP                  PCAPPVAGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPE                  VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG VEVH                  NAKTKPREEQFASTFRVVS VLTVVHQD                  WLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTK                  GQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCL                  VKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTP                  PMLSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQ                  GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>112</p>	<p>EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGP                  IQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTT                  KRNNMDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRK                  GSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSVECP                  PCAPPVAGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPE                  VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG VEVH                  NAKTKPREEQFASTFRVVS VLTVVHQD                  WLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTK                  GQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCL                  VKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTP                  PMLSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQ                  GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

[0215]

<p>113</p>	<p>EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCYVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFASTFRVVSVLTVVHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>114</p>	<p>EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPFRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPSERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>115</p>	<p>EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQRQGPFPFRVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTYCYVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>116</p>	<p>EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPFRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCYIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPSERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

[0216]

<p>117</p>	<p>EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQRQGPFPRTTVSDLTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYVCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSERKSSVECPAPPVAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>118</p>	<p>EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYVCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSERKSSVECPAPPVAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>119</p>	<p>EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYVCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSERKSSVECPAPPVAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>120</p>	<p>EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYVCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSERKSSVECPAPPVAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

[0217]

121	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSERKSSVECPAPVAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
122	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSERKSSVECPAPVAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
123	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTY YCIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
124	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTY YCIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0218]

125	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
126	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPSERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
127	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPSERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
128	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPSERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0219]

<p>129</p>	<p>EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPSERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>130</p>	<p>EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSVIPVGPIQ WFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKREN MDFSISISNITPADAGTYCYCVKFRKGGSPDTEFKSGA GTELSVRAKPSSESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p>
<p>131</p>	<p>EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCYCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSSESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p>
<p>132</p>	<p>EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCYCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSSESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p>

[0220]

133	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSSESKYGPCCPPCPAPPVAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
134	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPFRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTY YCIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPSAAAPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
135	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
136	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTY YCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0221]

137	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCYCIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
211	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLRPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQRDGPFRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCYCVKFRKGIPDDVEFKSG AGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
214	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCYCVKFRKGGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPSERKSSVECPAPPVAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
216	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQ WFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGGSPDDVEFKSG AGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0222]	217	<pre> EELQIIQPKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGP IQ WFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNN MDFSIRIGAITPADAGTYCYCVKFRKGS PDDVEFKS GAGTELSVRAKPSEKTHTCPECPAPEAAGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK </pre>
--------	-----	---

[0223] 在一些实施方案中,多肽包含与表8中提供的任何变体具有至少85%序列同一性(例如,至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)的SIRP $\alpha$ D1变体结构域。

[0224] 在一些实施方案中,多肽包含与表8中的SEQ ID NO:98-104、107-113、116-122或135-137具有至少85%序列同一性(例如,至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)的SIRP $\alpha$ D1结构域变体。

[0225] 在一些实施方案中,多肽包含(a)信号调控蛋白 $\alpha$ (SIRP- $\alpha$ )D1变体,其中SIRP $\alpha$ D1结构域变体包含氨基酸序列,

[0226] EEX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>QX<sub>3</sub>IQPKX<sub>4</sub>VX<sub>5</sub>VAAGEX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>LX<sub>9</sub>CTX<sub>10</sub>TSLX<sub>11</sub>PVGPIQWFRGAGPX<sub>12</sub>RX<sub>13</sub>LIYNQX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GX<sub>16</sub>FPRVTTVSX<sub>17</sub>X<sub>18</sub>TX<sub>19</sub>RX<sub>20</sub>NMDFX<sub>21</sub>IX<sub>22</sub>IX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>ITX<sub>25</sub>ADAGTYCX<sub>26</sub>KX<sub>27</sub>RKGSPDX<sub>28</sub>X<sub>29</sub>EX<sub>30</sub>KSGAGTEL SVRX<sub>31</sub>KPS(SEQ ID NO:47),其中X<sub>1</sub>是E或G;X<sub>2</sub>是L、I或V;X<sub>3</sub>是V、L或I;X<sub>4</sub>是S或F;X<sub>5</sub>是L或S;X<sub>6</sub>是S或T;X<sub>7</sub>是A或V;X<sub>8</sub>是I或T;X<sub>9</sub>是H、R或L;X<sub>10</sub>是A、V、I或L;X<sub>11</sub>是I、T、S或F;X<sub>12</sub>是A或G;X<sub>13</sub>是E、V或L;X<sub>14</sub>是K或R;X<sub>15</sub>是E或Q;X<sub>16</sub>是H、P或R;X<sub>17</sub>是D或E;X<sub>18</sub>是S、L、T或G;X<sub>19</sub>是K或R;X<sub>20</sub>是E或N;X<sub>21</sub>是S或P;X<sub>22</sub>是S或R;X<sub>23</sub>是S或G;X<sub>24</sub>是任何氨基酸;X<sub>25</sub>是任何氨基酸;X<sub>26</sub>是V或I;X<sub>27</sub>是F、L或V;X<sub>28</sub>是D或不存在;X<sub>29</sub>是T或V;X<sub>30</sub>是F或V;并且X<sub>31</sub>是A或G;并且其中所述SIRP $\alpha$ D1结构域变体相对于具有根据SEQ ID NO:1至10中的任一个的序列的野生型SIRP $\alpha$ D1结构域包含至少两个氨基酸取代;和(b)具有两个Fc结构域变体的Fc结构域二聚体变体,其中每个Fc结构域变体独立地是(i)包含N297A突变的人IgG1 Fc区;(ii)包含L234A、L235A和G237A突变的人IgG1 Fc区;(iii)包含L234A、L235A、G237A和N297A突变的人IgG1 Fc区;(iv)包含N297A突变的人IgG2 Fc区;(v)包含A330S和P331S突变的人IgG2 Fc区;(vi)包含A330S、P331S和N297A突变的人IgG2 Fc区;(vii)包含S228P、E233P、F234V、L235A和delG236突变的人IgG4 Fc区;或(viii)包含S228P、E233P、F234V、L235A、delG236和N297A突变的人IgG4 Fc区。

[0227] 在一些实施方案中,多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体,其中SIRP $\alpha$ D1结构域变体包含根据SEQ ID NO:47的氨基酸序列;具有两个Fc结构域的Fc结构域二聚体,其中Fc结构域中的一个包含含有L234A、L235A、G237A和N297A突变的人IgG1 Fc区的Fc结构域变体。

[0228] Fc结构域的二聚化

[0229] 在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽(例如,表2、5和6中描述的任何变体)在N末端或C末端处与第一Fc结构域(例如,Fc结构域变体)融合。在一些实施方案中,第一Fc结构域是不能形成二聚体的变体。在一些实施方案中,第一Fc结构域与第二Fc结构域形成二聚体。在一些实施方案中,第一和第二Fc结构域包含促进第一和第二结构域Fc结构域之

间的异二聚化的氨基酸取代。

[0230] 在一些实施方案中, Fc结构域二聚体中的两个Fc结构域中的每一个都包括促进两个单体的异二聚化的氨基酸取代。在一些实施方案中, SIRP $\alpha$ 构建体由例如包括与第一Fc结构域融合SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽的第一亚基和包括第二Fc结构域的第二亚基(例如, 没有SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽或任何其他多肽)形成。在一些实施方案中, 构建体具有与Fc结构域二聚体(例如, 单臂)连接的单个SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽。在一些实施方案中, 构建体具有与Fc结构域二聚体(例如, 双臂)连接的两个SIRP $\alpha$ D1结构域变体多肽。在一些实施方案中,  $K_D$ 为约500nM的SIRP $\alpha$ D1结构域变体在双臂构建体中特别有用。在一些实施方案中,  $K_D$ 为约50nM的SIRP $\alpha$ D1结构域变体在双臂构建体中特别有用。在一些实施方案中,  $K_D$ 为约5nM的SIRP $\alpha$ D1结构域变体在双臂构建体和单臂构建体中是有用的。在一些实施方案中,  $K_D$ 为约500pM的SIRP $\alpha$ D1结构域变体在双臂构建体和单臂构建体中是有用的。在一些实施方案中,  $K_D$ 为约100pM的SIRP $\alpha$ D1结构域变体在双臂构建体和单臂构建体中是有用的。在一些实施方案中,  $K_D$ 为约50pM的SIRP $\alpha$ D1结构域变体在双臂构建体和单臂构建体中是有用的。在一些实施方案中,  $K_D$ 为约10pM的SIRP $\alpha$ D1结构域变体在双臂构建体和单臂构建体中是有用的。

[0231] 在一些实施方案中, 通过在两个Fc结构域(诸如“杵-臼(knob-into-hole)”残基对和电荷残基对)中引入不同但相容的取代来促进Fc结构域的异二聚化。杵和臼相互作用有利于异二聚体形成, 而杵-杵(knob-knob)和臼-臼(hole-hole)相互作用由于空间冲突和有利相互作用的缺失而阻碍同二聚体形成。臼是指当蛋白质中的原始氨基酸被具有较小侧链体积的不同氨基酸替换时产生的空隙。杵是指当蛋白质中的原始氨基酸被具有较大侧链体积的不同氨基酸替换时产生的凸块。例如, 在一些实施方案中, 被替换的氨基酸位于Fc结构域的CH3抗体恒定结构域中并参与两个Fc结构域的二聚化。在一些实施方案中, 产生一个CH3抗体恒定结构域中的臼以容纳另一个CH3抗体恒定结构域中的杵, 使得杵和臼氨基酸起到促进或有利于两个Fc结构域的异二聚化的作用。在一些实施方案中, 产生一个CH3抗体恒定结构域中的臼以更好地容纳另一个CH3抗体恒定结构域中的原始氨基酸。在一些实施方案中, 产生一个CH3抗体恒定结构域中的杵以与另一个CH3抗体恒定结构域中的原始氨基酸形成额外的相互作用。

[0232] 在一些实施方案中, 通过用具有较小侧链的氨基酸(诸如丙氨酸、缬氨酸或苏氨酸)替换具有较大侧链的氨基酸(诸如酪氨酸或色氨酸)来构建臼, 例如CH3抗体恒定结构域中的Y407V突变。类似地, 在一些实施方案中, 通过用具有较大侧链的氨基酸替换具有较小侧链的氨基酸来构建杵, 例如CH3抗体恒定结构域中的T366W突变。在一些实施方案中, 一个Fc结构域包括杵突变T366W, 并且另一个Fc结构域包括臼突变T366S、L358A和Y407V。在一些实施方案中, 包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体的本公开的多肽与包含杵突变T366W的Fc结构域融合以限制不想要的杵-杵同二聚体形成。表9中包括但不限于杵-臼氨基酸对的实例, 并且表10中提供了杵-臼Fc结构域变体和SIRP $\alpha$ -Fc融合体的实例。

[0233] 表9. 杵-臼突变

[0234]

第一 Fc 结构域	Y407T	Y407A	F405A	T394S	T366S L358A Y407V	T394W Y407T	T394S  Y407A	T366W T394S
第二 Fc 结构域	T366Y	T366W	T394W	F405W	T366W	T366Y F405A	T366W F405W	F405W Y407A

[0235] 表10. 示例性Fc结构域变体和SIRP $\alpha$ D1结构域变体-Fc结构域变体融合多肽

SEQ ID NO:	氨基酸序列
[0236] 138	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWF RGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKRNNMDFSI RIGAITPADAGTYCYCIKFRKGGSPDDVEFKSGAGTELS VRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
139	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE

[0237]

	VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSPGK
140	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWF RGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKRNNMDFSI RIGAITPADAGTYCYCIKFRKGGPDDVEFKSGAGTELS VRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT PPVLDSGGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKLSLSPGK
141	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSPGK
142	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWF RGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKRNNMDFSI RIGAITPADAGTYCYCIKFRKGGPDDVEFKSGAGTELS VRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT PPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKLSLSPGK
143	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWF RGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKRNNMDFSI RIGAITPADAGTYCYCIKFRKGGPDDVEFKSGAGTELS VRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT PPVLDSGGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE

[0238]

	ALHNHYTQKSLSLSPGK
144	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFSTRSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCRKTHTCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
145	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWF RGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSI RIGAITPADAGTYICVKFRKGGSPDDVEFKSGAGTELS VRAKPSEKTHTCPECPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSINKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
146	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQW FRGAGPGRELIYNQRQGPFPRVTTVSDLTKRNNMDF SIRIGNITPADAGTYICVKFRKGGSPDDVEFKSGAGTE LSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLWCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
147	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
148	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQW

[0239]	FRGAGPGRELIYNQRQGPFRVTTVSDLTKRNNMDF SIRIGNITPADAGTYCYCVKFRKGGSPDDVEFKSGAGTE LSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKD TLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
149	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTP ETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK

[0240] 除杵-臼策略以外,在一些实施方案中,静电操纵也用于控制Fc结构域的二聚化。静电操纵是指利用肽、蛋白质结构域和蛋白质中带相反电荷的氨基酸之间有利的静电相互作用来控制更高级蛋白质分子的形成。具体而言,为了使用静电操纵控制Fc结构域的二聚化,组成CH3-CH3界面的一个或多个氨基酸残基被带正电或带负电的氨基酸残基替换,使得相互作用根据引入的特定带电荷氨基酸而变得静电有利或不利。在一些实施方案中,界面中带正电荷的氨基酸(诸如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)被带负电荷的氨基酸(诸如天冬氨酸或谷氨酸)替换。在一些实施方案中,界面中带负电荷的氨基酸被带正电荷的氨基酸替换。在一些实施方案中,将带电荷的氨基酸引入相互作用的CH3抗体恒定结构域中的一个或两个中。在一些实施方案中,将带电荷的氨基酸引入两个Fc结构域的相互作用的CH3抗体恒定结构域中促进Fc结构域的异二聚体的选择性形成,如由带电氨基酸之间的相互作用产生的静电操纵效应所控制。表11中包括但不限于静电操纵氨基酸对的实例。

[0241] 表11. 静电操纵氨基酸突变

[0242]	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="304 1456 416 1581"><b>Fc 结构域单 体 1</b></td> <td data-bbox="416 1456 496 1581">K40 9D</td> <td data-bbox="496 1456 600 1581">K409 D</td> <td data-bbox="600 1456 703 1581">K409 E</td> <td data-bbox="703 1456 807 1581">K409 E</td> <td data-bbox="807 1456 911 1581">K392 D</td> <td data-bbox="911 1456 1015 1581">K392 D</td> <td data-bbox="1015 1456 1118 1581">K392 E</td> <td data-bbox="1118 1456 1222 1581">K39 2E</td> <td data-bbox="1222 1456 1326 1581">K409 D K392 D</td> <td data-bbox="1326 1456 1404 1581">K370E K409D K439E</td> </tr> <tr> <td data-bbox="304 1581 416 1709"><b>Fc 结 构域单 体 2</b></td> <td data-bbox="416 1581 496 1709">D39 9K</td> <td data-bbox="496 1581 600 1709">D399 R</td> <td data-bbox="600 1581 703 1709">D399 K</td> <td data-bbox="703 1581 807 1709">D399 R</td> <td data-bbox="807 1581 911 1709">D399 K</td> <td data-bbox="911 1581 1015 1709">D399 R</td> <td data-bbox="1015 1581 1118 1709">D399 K</td> <td data-bbox="1118 1581 1222 1709">D39 9R</td> <td data-bbox="1222 1581 1326 1709">D399 K D356 K</td> <td data-bbox="1326 1581 1404 1709">D356K E357K D399K</td> </tr> </table>	<b>Fc 结构域单 体 1</b>	K40 9D	K409 D	K409 E	K409 E	K392 D	K392 D	K392 E	K39 2E	K409 D K392 D	K370E K409D K439E	<b>Fc 结 构域单 体 2</b>	D39 9K	D399 R	D399 K	D399 R	D399 K	D399 R	D399 K	D39 9R	D399 K D356 K	D356K E357K D399K
<b>Fc 结构域单 体 1</b>	K40 9D	K409 D	K409 E	K409 E	K392 D	K392 D	K392 E	K39 2E	K409 D K392 D	K370E K409D K439E													
<b>Fc 结 构域单 体 2</b>	D39 9K	D399 R	D399 K	D399 R	D399 K	D399 R	D399 K	D39 9R	D399 K D356 K	D356K E357K D399K													

[0243] 可获得用于控制Fc结构域的异二聚化的其他方法,尤其是在构建双特异性抗体的情形下。

[0244] 在一些实施方案中,第一Fc结构域和第二Fc结构域相对于人IgG1的序列各自包含以下氨基酸取代中的一个或多个:T366W、T366S、L368A、Y407V、T366Y、T394W、F405W、Y349T、Y349E、Y349V、L351T、L351H、L351N、L351K、P353S、S354D、D356K、D356R、D356S、E357K、E357R、E357Q、S364A、T366E、L368T、L368Y、L368E、K370E、K370D、K370Q、K392E、K392D、

T394N、P395N、P396T、V397T、V397Q、L398T、D399K、D399R、D399N、F405T、F405H、F405R、Y407T、Y407H、Y407I、K409E、K409D、K409T和K409I。

[0245] 在一些实施方案中,Fc结构域包含:(a)相对于野生型人IgG1的以下氨基酸取代中的一个:T366W、T366S、L368A、Y407V、T366Y、T394W、F405W、Y349T、Y349E、Y349V、L351T、L351H、L351N、L351K、P353S、S354D、D356K、D356R、D356S、E357K、E357R、E357Q、S364A、T366E、L368T、L368Y、L368E、K370E、K370D、K370Q、K392E、K392D、T394N、P395N、P396T、V397T、V397Q、L398T、D399K、D399R、D399N、F405T、F405H、F405R、Y407T、Y407H、Y407I、K409E、K409D、K409T或K409I;或(b)(i)相对于人IgG1 Fc区的N297A突变;(ii)相对于人IgG1 Fc区的L234A、L235A和G237A突变;(iii)相对于人IgG1 Fc区的L234A、L235A、G237A和N297A突变;(iv)相对于人IgG2 Fc区的N297A突变;(v)相对于人IgG2 Fc区的A330S和P331S突变;(vi)相对于人IgG2 Fc区的A330S、P331S和N297A突变;(vii)相对于人IgG4 Fc区的S228P、E233P、F234V、L235A和delG236突变;或(viii)相对于人IgG4 Fc区的S228P、E233P、F234V、L235A、delG236和N297A突变。在一些实施方案中,Fc结构域变体包含:(a)相对于野生型人IgG1的以下氨基酸取代中的一个:T366W、T366S、L368A、Y407V、T366Y、T394W、F405W、Y349T、Y349E、Y349V、L351T、L351H、L351N、L351K、P353S、S354D、D356K、D356R、D356S、E357K、E357R、E357Q、S364A、T366E、L368T、L368Y、L368E、K370E、K370D、K370Q、K392E、K392D、T394N、P395N、P396T、V397T、V397Q、L398T、D399K、D399R、D399N、F405T、F405H、F405R、Y407T、Y407H、Y407I、K409E、K409D、K409T或K409I;和(b)还包含(i)相对于人IgG1 Fc区的N297A突变;(ii)相对于人IgG1 Fc区的L234A、L235A和G237A突变;(iii)相对于人IgG1 Fc区的L234A、L235A、G237A和N297A突变;(iv)相对于人IgG2 Fc区的N297A突变;(v)相对于人IgG2 Fc区的A330S和P331S突变;(vi)相对于人IgG2 Fc区的A330S、P331S和N297A突变;(vii)相对于人IgG4 Fc区的S228P、E233P、F234V、L235A和delG236突变;或(viii)相对于人IgG4 Fc区的S228P、E233P、F234V、L235A、delG236和N297A突变。

[0246] 在一些实施方案中,第一和第二Fc结构域包含不同的氨基酸取代。在一些实施方案中,第一Fc结构域包括T366W。在一些实施方案中,第二Fc结构域包括T366S、L368A和Y407V。在一些实施方案中,第一Fc结构域包括D399K。在一些实施方案中,第二Fc结构域包括K409D。

[0247] 连接多肽或蛋白质结构域

[0248] 在一些实施方案中,本文公开了包含信号调控蛋白 $\alpha$  (SIRP- $\alpha$ ) D1变体的多肽,所述变体包含SIRP $\alpha$ D1结构域或其片段,其具有相对于野生型SIRP $\alpha$ D1结构域在残基80处的氨基酸突变;和相对于野生型SIRP $\alpha$ D1结构域在选自以下组成的组的残基处的至少一个额外氨基酸突变:残基6、残基27、残基31、残基47、残基53、残基54、残基56、残基66和残基92。

[0249] 在一些实施方案中,本文还公开了包含Fc变体的多肽,其中Fc变体包含含有两个Fc结构域变体的Fc结构域二聚体,其中每个Fc结构域变体独立地选自(i)由突变L234A、L235A、G237A和N297A组成的人IgG1 Fc区;(ii)由突变A330S、P331S和N297A组成的人IgG2 Fc区;或(iii)包含突变S228P、E233P、F234V、L235A、delG236和N297A的人IgG4 Fc区。

[0250] 在一些实施方案中,信号调控蛋白 $\alpha$  (SIRP- $\alpha$ ) D1变体和Fc变体连接。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体的C末端连接到Fc结构域变体的N末端,使得两种多肽彼此串联合。

[0251] 在一些实施方案中,信号调控蛋白 $\alpha$  (SIRP- $\alpha$ ) D1变体和Fc变体通过共价键,例如肽键、合成聚合物或由化学反应(例如化学缀合)产生的任何种类的键来连接。当经由肽键连接时,在一些实施方案中,一个蛋白质结构域(例如,SIRP $\alpha$ D1结构域变体)的C-末端的羧酸基团与另一个蛋白质结构域(例如,Fc变体)的N-末端的氨基在缩合反应中反应以形成肽键。在一些实施方案中,肽键通过常规有机化学反应由合成手段形成,或通过宿主细胞的天然产生形成,其中编码串联的两种蛋白质的DNA序列(例如,Fc结构域变体和SIRP $\alpha$ D1结构域变体)的核酸分子可通过宿主细胞中必要的分子机制(例如,DNA聚合酶和核糖体)直接转录并翻译成编码两种蛋白质的连续多肽。

[0252] 当信号调控蛋白 $\alpha$  (SIRP- $\alpha$ ) D1变体和Fc变体通过合成聚合物连接时,在一些实施方案中,聚合物在每一端用反应性化学官能团官能化,以与两种蛋白质的连接端处的末端氨基酸反应。

[0253] 在一些实施方案中,信号调控蛋白 $\alpha$  (SIRP- $\alpha$ ) D1变体和Fc变体通过除肽键以外的键,例如通过化学反应形成的键来连接,在一些实施方案中,化学官能团(例如胺、羧酸、酯、叠氮化物或其他官能团)分别合成连接至一种蛋白质的C末端和另一种蛋白质的N末端。在一些实施方案中,两个官能团然后通过合成化学手段反应以形成化学键,从而将两个蛋白质连接在一起。

[0254] 间隔区

[0255] 在本公开中,在一些实施方案中,Fc结构域单体与本公开的SIRP $\alpha$ D1变体多肽之间的接头是包括约1-200个氨基酸的氨基酸间隔区。合适的肽间隔区包括含有柔性氨基酸残基(诸如甘氨酸和丝氨酸)的肽接头。接头序列的实例提供于表12中。在一些实施方案中,间隔区含有GS、GG、GGS、GGG、GGGS (SEQ ID NO:163)、GGSG (SEQ ID NO:164) 或SGGG (SEQ ID NO:165)的基序,例如多个或重复基序。在一些实施方案中,间隔区含有2至12个氨基酸,包括GS,例如GS、GSGS (SEQ ID NO:166)、GSGSGS (SEQ ID NO:167)、GSGSGSGS (SEQ ID NO:168)、GSGSGSGSGS (SEQ ID NO:169) 或GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:170)的基序。在一些实施方案中,间隔区含有3至12个氨基酸,包括GGS,例如、GGS、GGSGGS (SEQ ID NO:171)、GGSGSGGS (SEQ ID NO:172) 和GGSGSGSGSGGS (SEQ ID NO:173)的基序。在一些实施方案中,间隔区含有4至12个氨基酸,包括GGSG (SEQ ID NO:164),例如GGSG (SEQ ID NO:164)、GGSGGGSG (SEQ ID NO:174) 或GGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO:175)的基序。在一些实施方案中,间隔区含有GGGG (SEQ ID NO:163),例如GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:176)的基序。在一些实施方案中,间隔区包含除甘氨酸和丝氨酸之外的氨基酸,例如AAS (SEQ ID NO:177)、AAAL (SEQ ID NO:178)、AAAK (SEQ ID NO:179)、AAAR (SEQ ID NO:180)、EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO:181)、GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO:182)、AEAAAKEAAKA (SEQ ID NO:183)、KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO:184)、GGGGAGGGG (SEQ ID NO:185)、GENLYFQSGG (SEQ ID NO:186)、SACYCELS (SEQ ID NO:187)、RSIAT (SEQ ID NO:188)、RPACKIPNDLKQKVMNH (SEQ ID NO:189)、GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (SEQ ID NO:190)、AAANSSIDLISVPVDSR (SEQ ID NO:191) 或GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS (SEQ ID NO:192)。

[0256] 在一些实施方案中,间隔区含有EAAK (SEQ ID NO:193)的基序,例如多个或重复基序。在一些实施方案中,间隔区含有富含脯氨酸序列(诸如(XP)<sub>n</sub>,其中X是任何氨基酸(例如,A、K或E),并且n是1-5)和PAPAP (SEQ ID NO:194)的基序,例如多个或重复基序。

[0257] 表12.接头序列

SEQ ID NO:	氨基酸序列
163	GGGGS
164	GGSG
165	SGGG
166	GSGS
167	GSGSGS
168	GSGSGSGS
169	GSGSGSGSGS
170	GSGSGSGSGSGS
171	GGSGGS
172	GGSGGSGGS
173	GGSGGSGGSGGS
174	GGSGGGSG
175	GGSGGGSGGGSG
176	GGGGSGGGGSGGGGS
177	AAS
178	AAAL
179	AAAK
180	AAAR
181	EGKSSGSGSESKST
182	GSAGSAAGSGEF
183	AEAAAKEAAKA
184	KESGSVSSEQLAQFRSLD
185	GGGGAGGGG
186	GENLYFQSGG
187	SACYCELS
188	RSIAT

[0258]

SEQ ID NO:	氨基酸序列
189	RPACKIPNDLKQKVMNH
190	GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSG TGSG
191	AAANSSIDLISVPVDSR
192	GGSGGGSEGSGGGSEGSGGGSEGSGGGSEGSGG SGGGS
193	EAAAK
194	PAPAP

[0259]

[0260] 在一些实施方案中,所用的肽间隔区和氨基酸的长度根据所涉及的两种蛋白质和最终蛋白质融合多肽中所需的柔性程度进行调整。在一些实施方案中,调节间隔区的长度

以确保蛋白质正确折叠并避免聚集体形成。在一些实施方案中,间隔区是A或AAAL (SEQ ID NO:178)。

[0261] 载体、宿主细胞和蛋白质产生

[0262] 在一些实施方案中,本文公开了包含信号调控蛋白 $\alpha$  (SIRP- $\alpha$ ) D1变体的多肽,所述变体包含SIRP $\alpha$ D1结构域或其片段,其具有相对于野生型SIRP $\alpha$ D1结构域在残基80处的氨基酸突变;和相对于野生型SIRP $\alpha$ D1结构域在选自以下组成的组的残基处的至少一个额外氨基酸突变:残基6、残基27、残基31、残基47、残基53、残基54、残基56、残基66和残基92。

[0263] 在一些实施方案中,本文还公开了包含Fc变体的多肽,其中Fc变体包含具有两个Fc结构域单体的Fc结构域二聚体,其中每个Fc结构域单体独立地选自(i)由突变L234A、L235A、G237A和N297A组成的人IgG1 Fc区;(ii)由突变A330S、P331S和N297A组成的人IgG2 Fc区;或(iii)包含突变S228P、E233P、F234V、L235A、de1G236和N297A的人IgG4 Fc区。

[0264] 在一些实施方案中,本公开的多肽从宿主细胞产生。宿主细胞是指包括从其相应核酸表达本文所述的多肽和融合多肽所需要的必需的细胞组分(例如,细胞器)的媒介物。在一些实施方案中,核酸包括于通过转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射、感染等引入宿主细胞的核酸载体中。在一些实施方案中,核酸载体的选择取决于待使用的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞属于原核(例如,细菌)或真核(例如,哺乳动物)来源。

[0265] 在一些实施方案中,多肽(例如包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体(例如,表2、5和6中提供的任何变体)和融合配偶体(诸如Fc变体)的多肽构建体)是通过在合适的条件下培养用核酸转化的宿主细胞来产生的,所述核酸优选为表达载体,含有编码多肽构建体(例如,Fc变体,接头和融合配偶体)的核酸,以诱导或引起多肽构建体的表达。在一些实施方案中,适于表达的条件随着所选择的表达载体和宿主细胞而变化。在一些实施方案中,使用多种合适的宿主细胞,包括但不限于哺乳动物细胞、细菌、昆虫细胞和酵母。例如,可从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)获得的ATCC<sup>®</sup>细胞系目录中描述了可用于本公开的多种细胞系。在一些实施方案中,本公开的Fc结构域变体在细胞中表达,所述细胞通过细胞系的遗传工程化或细胞培养条件的修改(诸如添加基夫碱)或通过使用天然非糖基化宿主(诸如原核生物)(大肠杆菌等)被优化为不糖基化由此类细胞表达的蛋白质,并且在一些情况下,不需要修饰Fc中的糖基化序列。

[0266] 核酸载体构建和宿主细胞

[0267] 可以通过多种方法来制备编码本公开的多肽的氨基酸序列的核酸序列。这些方法包括但不限于寡核苷酸介导的(或定点)突变成形和PCR突变成形。在一些实施方案中,使用标准技术(例如,基因合成)获得编码本公开的多肽的核酸分子。替代地,使用标准技术(例如,QuikChange<sup>™</sup>突变成形)突变编码野生型SIRP $\alpha$ D1结构域的核酸分子,以包括特定的氨基酸取代。在一些情况下,使用核苷酸合成仪或PCR技术合成核酸分子。

[0268] 在一些实施方案中,将编码多肽构建体(例如,包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体(例如,表2、5和6中提供的任何变体)和融合配偶体(诸如Fc变体)的多肽构建体)的核酸并入表达载体中,以表达蛋白质。多种表达载体可用于蛋白质表达。表达载体可以包含自我复制的染色体外载体或整合到宿主基因组中的载体。载体还可以包括各种组分或元件。例如,在一些实施方案中,载体组分包括但不限于转录和翻译调控序列,诸如启动子序列、核糖体结合位点、信号序列、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列、3'和5'非翻译区(UTR)以及增强

子或活化子序列;复制起点;选择标记物基因;和编码感兴趣多肽的核酸序列,以及转录终止序列。在一些实施方案中,表达载体包含与控制或调控序列、选择性标记物、任何融合配偶体、额外元件或其任何组合可操作地连接的蛋白质。术语“可操作地连接”是指核酸与另一个核酸序列处于功能关系。通常,这些表达载体包括与编码Fc变体的核酸有效连接的转录和翻译调控核酸,并且通常适合用于表达蛋白质的宿主细胞。选择基因或标记物(诸如但不限于抗生素抗性基因或荧光蛋白基因)可用于选择含有表达载体的宿主细胞,例如通过抗生素或荧光表达。各种选择基因是可用的。

[0269] 在一些实施方案中,载体的组分或元件被优化,使得表达载体与宿主细胞类型相容。在本公开中找到用途的表达载体包括但不限于那些能够在哺乳动物细胞、细菌、昆虫细胞、酵母和体外系统中进行蛋白质表达的载体。

[0270] 在一些实施方案中,使用哺乳动物细胞作为宿主细胞来产生本公开的多肽。哺乳动物细胞类型的实例包括但不限于人胚胎肾(HEK)(例如,HEK293,HEK 293F),中国仓鼠卵巢(CHO)、HeLa、COS、PC3、Vero、MC3T3、NS0、Sp2/0、VERY、BHK、MDCK、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、T47D、NS0(一种不内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030和HsS78Bst细胞。在一些实施方案中,大肠杆菌细胞被用作宿主细胞来产生本公开的多肽。大肠杆菌菌株的实例包括但不限于大肠杆菌294(ATCC<sup>®</sup>31,446)、大肠杆菌λ1776(ATCC<sup>®</sup>31,537)、大肠杆菌BL21(DE3)(ATCC<sup>®</sup>BAA-1025)和大肠杆菌RV308(ATCC<sup>®</sup>31,608)。

[0271] 不同的宿主细胞具有蛋白质产物翻译后加工和修饰的特征性和特异性机制(例如,糖基化)。在一些实施方案中,选择合适的细胞系或宿主系统以确保所表达的多肽的正确修饰和加工。一旦载体被引入宿主细胞以用于蛋白质产生,宿主细胞就在常规营养培养基中培养,所述培养基被改良为适于诱导启动子、选择转化体或扩增编码所需序列的基因。

[0272] 在一些实施方案中,多肽构建体(例如包含SIRPαD1结构域变体(例如,表2、5和6中提供的任何变体)和融合配偶体(诸如Fc变体)的多肽构建体)在哺乳动物表达系统中表达,包括其中使用病毒(诸如逆转录病毒或腺病毒)将表达构建体引入哺乳动物细胞中的系统。在一些实施方案中,利用人、小鼠、大鼠、仓鼠或灵长类动物细胞。合适的细胞还包括已知的研究细胞,包括但不限于Jurkat T细胞、NIH3T3、CHO、COS和293细胞。或者,在一些实施方案中,蛋白质在细菌细胞中表达。细菌表达系统是本领域众所周知的,并且包括大肠杆菌(*Escherichia coli*/E.coli)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、乳脂链球菌(*Streptococcus cremoris*)和变铅青链球菌(*Streptococcus lividans*)。在一些情况下,包含Fc结构域变体的多肽构建体在昆虫细胞(诸如但不限于Sf9和Sf21细胞)或酵母细胞(诸如但不限于来自酵母属(*Saccharomyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)和耶氏酵母属(*Yarrowia*)的生物体)中产生。在一些情况下,使用无细胞翻译系统在体外表达包含Fc结构域变体的多肽构建体。来源于原核(例如,大肠杆菌)和真核(例如,小麦胚芽、兔网织红细胞)细胞的体外翻译系统是可用的,并且在一些实施方案中,基于感兴趣的蛋白质的表达水平和功能特性进行选择。例如,如本领域技术人员所理解的,一些展示技术(例如核糖体展示)需要体外翻译。此外,在一些实施方案中,Fc结构域变体通过化学合成方法产生,诸如但不限于液相肽合成和固相肽合成。在使用非糖基化系统(诸如细菌提取物)进行体外转录的情况下,即使存在天然糖基化

位点, Fc也不会被糖基化, 因此将等同地获得Fc的失活。

[0273] 在一些实施方案中, 多肽构建体包括非天然氨基酸、氨基酸类似物、氨基酸模拟物或其任意组合, 其以与天然存在的氨基酸相似的方式起作用。天然编码的氨基酸通常指20种常见的氨基酸(丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸)以及吡咯赖氨酸和硒代半胱氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物, 例如与氢、羧基、氨基和R基团键结的碳, 诸如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基硫。在一些实施方案中, 此类类似物具有经修饰的R基团(诸如, 正亮氨酸)或经修饰的肽主链, 但通常保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。

[0274] 蛋白质生产、回收和纯化

[0275] 在一些实施方案中, 使用于产生本公开的多肽的宿主细胞在适于培养所选宿主细胞的培养基中生长。用于哺乳动物宿主细胞的合适培养基的实例包括最低必需培养基(Minimal Essential Medium; MEM)、杜皮克氏改良爱哥尔氏培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM)、Expi293™表达培养基、补充胎牛血清(FBS)的DMEM和RPMI-1640。用于细菌宿主细胞的合适培养基的实例包括鲁利亚肉汤(Luria broth; LB)加必要的补充物, 诸如选择剂, 例如氨苄青霉素(ampicillin)。在一些实施方案中, 在合适的温度(诸如约20°C至约39°C, 例如约25°C至约37°C, 优选37°C)和CO<sub>2</sub>水平(诸如约5%至10%)下培养宿主细胞。在一些实施方案中, 培养基的pH为约pH 6.8至pH7.4, 例如pH 7.0, 主要取决于宿主生物体。如果在表达载体中使用诱导型启动子, 可以在适用于活化启动子的条件下诱导蛋白质表达。

[0276] 在一些实施方案中, 蛋白质回收包括破坏宿主细胞, 例如通过渗透休克、超声处理或裂解。一旦细胞被破坏, 通过离心或过滤去除细胞碎片。然后可以进一步纯化蛋白质。在一些实施方案中, 通过各种蛋白质纯化方法, 例如通过色谱(例如, 离子交换色谱、亲和色谱和尺寸排阻柱色谱)、离心、差异溶解或通过任何其他用于蛋白质纯化的标准技术来纯化本公开的多肽。例如, 在一些实施方案中, 通过适当选择和组合亲和柱, 诸如蛋白质A柱(例如, POROS蛋白质A色谱)与色谱柱(例如, POROS HS-50阳离子交换色谱)、过滤、超滤、脱盐和透析程序来分离和纯化蛋白质。在一些实施方案中, 多肽与标记物序列(诸如肽)缀合, 以便于纯化。标记物氨基酸序列的实例为六组氨酸肽(His6-tag), 其可以微摩尔的亲和力结合至镍功能化的琼脂糖亲和柱。作为替代, 可以使用血凝素“HA”标签, 其对应于衍生自流感血凝素蛋白的表位。

[0277] 在一些实施方案中, 例如在基因疗法的情形下, 通过施用含有编码本公开的多肽的核酸分子的载体, 诸如病毒载体(例如, 逆转录病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体(例如, 痘苗病毒载体, 诸如改良的安卡拉痘苗(Modified Vaccinia Ankara; MVA))、腺相关病毒载体和甲病毒载体), 本公开的多肽(例如包含SIRPαD1结构域变体(例如, 表2、5和6中提供的任何变体)和融合配偶体(诸如Fc变体)的多肽构建体)由受试者(例如, 人)的细胞产生。一旦载体进入受试者的细胞(例如, 通过转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射、感染等)可用于表达本文公开的多肽。在一些情况下, 多肽从细胞中分泌出来。在一些实施方案中, 如果疾病或病症的治疗是期望的结果, 则不需要进一步的行动。在一些实施方案中, 如

果需要收集蛋白质,则从受试者收集血液并通过各种方法从血液中纯化蛋白质。

[0278] 治疗尿路上皮癌的方法

[0279] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如,人类个体)的癌症(例如,尿路上皮癌,诸如尿路上皮癌)的方法,所述方法包括向所述个体施用(a)有效量的阻断CD47(例如,hCD47)和SIRP $\alpha$ (例如,hSIRP $\alpha$ )之间的相互作用的药剂,和(b)有效量的抗体-药物缀合物(ADC)。在一些实施方案中,尿路上皮癌是组织学上确认的、不可切除的局部晚期或转移性尿路上皮癌。另外或替代地,尿路上皮癌是膀胱癌、肾盂癌、输尿管癌或尿道癌。在一些实施方案中,所述个体患有鳞状分化或混合细胞类型的移行细胞癌,其中尿路上皮癌是主要组织学。在一些实施方案中,个体未患有小细胞癌或神经内分泌组织学。

[0280] 在一些实施方案中,ADC包含与细胞毒性药物连接的特异性结合粘连蛋白-4(例如,人粘连蛋白-4)的抗体。在一些实施方案中,抗粘连蛋白-4抗体是恩诺单抗(enfortumab),其也被称为AGS-22C3(CAS登记号1448664-46-7)。在一些实施方案中,细胞毒性药物是小分子微管破坏剂单甲基奥里斯他汀-E(MMAE),也称为贝多汀(vedotin)或SGD-1006(CAS登记号474645-27-7)。在一些实施方案中,ADC是维恩妥尤单抗(也称为PADCEV<sup>®</sup>,CAS登记号1346452-25-2)。维恩妥尤单抗是粘连蛋白-4导向抗体-药物缀合物(ADC),其包含通过蛋白酶可裂解的马来酰亚胺基丙氨酰缬氨酸-瓜氨酸(vc)接头与MMAE缀合的完全人抗粘连蛋白-4IgG1 $\kappa$ 单克隆抗体。抗体重链上的半胱氨酸残基发生缀合,产生药物抗体比(DAR)为约3.8:1的产物。分子量为大约152kDa。在一些实施方案中,向个体施用ADC(例如,维恩妥尤单抗)持续一个或多个28天周期。在一些实施方案中,在一个或多个28天周期的第1天、第8天和第15天的每一天以1.25mg/kg的剂量施用ADC(例如,维恩妥尤单抗)。在一些实施方案中,向个体施用ADC(例如,维恩妥尤单抗)持续一个或多个28天周期。在一些实施方案中,ADC(例如,维恩妥尤单抗)以每3周(Q3W)1.25mg/kg的剂量施用。在一些实施方案中,ADC(例如,维恩妥尤单抗)通过静脉输注施用。在一些实施方案中,在一个或多个28天周期的第1天、第8天和第15天的每一天,在30分钟时间段内通过静脉输注施用ADC(例如,维恩妥尤单抗)。在一些实施方案中,在一个或多个28天周期的第1天、第8天和第15天的每一天,向个体施用最大剂量的ADC(例如,维恩妥尤单抗),最大剂量高达125mg。在一些实施方案中,根据当地包装插页上提供的方案(对于美国,参见例如[https://astellas\(dot\)us/docs/PADCEV\(underscore\)label\(dot\)pdf](https://astellas(dot)us/docs/PADCEV(underscore)label(dot)pdf))施用ADC(例如维恩妥尤单抗)。关于ADC作用机制的细节也可以在包装插页上找到。

[0281] 在一些实施方案中,阻断CD47与SIRP $\alpha$ 之间的相互作用的药剂是本文别处描述的药剂(例如,任何药剂)。在一些实施方案中,阻断CD47与SIRP $\alpha$ 之间的相互作用的药剂是包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体(例如,本文所述的SIRP $\alpha$ D1结构域变体)和Fc结构域变体(例如,本文所述的Fc结构域变体)的多肽(例如,融合多肽)。在一些实施方案中,融合多肽的SIRP $\alpha$ D1结构域变体(例如,本文所述的SIRP $\alpha$ D1结构域变体)的C末端与Fc结构域变体的N末端融合。在一些实施方案中,多肽(例如,融合多肽)包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体,所述变体包含SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:85的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc结构域变体是(i)包含L234A、L235A、G237A和N297A突变的人IgG1 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引;(ii)包含A330S、P331S和N297A突变的人IgG2 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引;(iii)包含S228P、E233P、F234V、L235A和de1G236突变的人IgG4 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索

引;或(iv)包含S228P、E233P、F234V、L235A、delG236和N297A突变的人IgG4 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引(例如,其中SIRP $\alpha$ D1结构域变体的C末端与Fc结构域变体的N末端融合)。在一些实施方案中,施用于个体的多肽(例如,融合多肽)包含SEQ ID NO:136或SEQ ID NO:135的氨基酸序列。在一些实施方案中,多肽(例如,融合多肽)形成二聚体,例如同二聚体。在一些实施方案中,多肽以高达约60mg/kg的剂量(例如,诸如约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60mg/kg中的任一种,包括这些值之间的任何范围)施用于个体(例如,人类个体)。在一些实施方案中,多肽通过静脉输注施用于个体。在一些实施方案中,多肽以约15mg/kg的剂量施用于个体。在一些实施方案中,多肽以约15mg/kg q2w的剂量(即,每两周一次或每14天一次)施用于个体。在一些实施方案中,多肽以约20mg/kg的剂量施用于个体。在一些实施方案中,多肽以约20mg/kg q2w的剂量(即,每两周一次或每14天一次)施用于个体。在一些实施方案中,多肽以约30mg/kg的剂量施用于个体。在一些实施方案中,多肽以约30mg/kg q2w的剂量(即,每两周一次或每14天一次)施用于个体。在一些实施方案中,多肽在60小时的时间段内以15、20或30mg/kg q2w(即,每两周一次或每14天一次)通过静脉输注施用。在一些实施方案中,融合多肽在1000mg/50ml I型透明玻璃小瓶中提供使用(例如,静脉内施用),所述玻璃小瓶用20mm特氟隆涂覆的橡胶隔膜塞和防篡改铝密封件密封。在一些实施方案中,融合多肽在使用前(例如,制备用于静脉内施用)储存在2-8°C (36-46°F)的原始容器中。

[0282] 在一些实施方案中,在多肽(例如,融合多肽)和ADC(例如,维恩妥尤单抗)的施用重叠时,在ADC之前施用多肽。在一些实施方案中,在多肽施用完成后大约30分钟(例如,约20分钟至约40分钟、25分钟至约45分钟或约30分钟至50分钟)施用ADC(例如,维恩妥尤单抗)。

[0283] 在一些实施方案中,受试者已接受使用免疫检查点抑制剂(CPI)的先前治疗用于局部晚期尿路上皮癌或转移性尿路上皮癌。在一些实施方案中,受试者已在新辅助环境或辅助环境中接受用于尿路上皮癌的CPI,并且在CPI治疗期间或在CPI治疗完成后12个月内患有复发性或进行性疾病。在一些实施方案中,CPI疗法包括或者是程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)抑制剂或程序性细胞死亡配体1(PD-L1)抑制剂。在一些实施方案中,PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂是治疗性抗体。在一些实施方案中,治疗性抗PD-1抗体或治疗性抗PD-L1抗体是或包含阿特珠单抗、派姆单抗、德瓦鲁单抗、阿维鲁单抗和纳武单抗中的一种或多种。在一些实施方案中,受试者已接受用含铂化疗治疗尿路上皮癌的先前治疗。在一些实施方案中,受试者在辅助环境或新辅助环境中接受用于尿路上皮癌的含铂化疗,并且在完成后12个月内患有复发性或进行性疾病。在一些实施方案中,受试者已接受用于转移性尿路上皮癌或不可切除的局部晚期尿路上皮癌的含铂化疗。在一些实施方案中,含铂化疗是或包含顺铂、卡铂、奥沙利铂、奈达铂、四硝酸三铂、菲铂(phenanthriplatin)、吡铂和赛特铂中的一种或多种。

[0284] 在一些实施方案中,受试者已在接受最近的尿路上皮癌先前治疗期间或之后发展(例如,受试者的尿路上皮癌已表现出疾病进展)。在一些实施方案中,受试者的癌症在接受最近的治疗期间或之后复发(例如,证实复发)。在一些实施方案中,受试者没有接受使用维恩妥尤单抗的先前治疗。在一些实施方案中,受试者没有接受基于单甲基奥里斯他汀

(MMAE) (例如,基于贝多汀)的抗体-药物缀合物(ADC)的治疗。在一些实施方案中,受试者没有接受使用破坏hCD47和hSIRP $\alpha$ 之间的相互作用的药剂,例如抗CD47剂和/或抗SIRP $\alpha$ 剂的先前治疗。在一些实施方案中,受试者对维恩妥尤单抗或维恩妥尤单抗的药物制剂中所含有的任何赋形剂(包括组氨酸、海藻糖二水合物和聚山梨醇酯20)没有超敏反应。在一些实施方案中,受试者对中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中产生的生物药物没有超敏反应。在一些实施方案中,受试者对抗体或输注的治疗性蛋白质没有不耐受或没有严重的变态或过敏反应。在一些实施方案中,受试者对多肽制剂中包含的任何物质没有不耐受或没有严重的变态或过敏反应。

[0285] 在一些实施方案中,通过本文提供的方法治疗的癌症是尿路上皮癌、头颈癌、胃癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、不过表达(或表达)HER2的激素受体阳性乳腺癌(例如HR<sup>+</sup>HER2<sup>-</sup>乳腺癌)。

[0286] 试剂盒和制品

[0287] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含多肽(例如,本文所述的融合多肽)的制品或试剂盒,所述多肽包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体和Fc结构域变体。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体用于与抗体-药物缀合物(例如,维恩妥尤单抗)组合,用于治疗个体(例如,人类个体)的尿路上皮癌。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体用于与抗体-药物缀合物(例如,维恩妥尤单抗)组合,用于治疗个体(例如,人类个体)的尿路上皮。在一些实施方案中,SIRP $\alpha$ D1结构域变体包含选自SEQ ID NO:81和SEQ ID NO:85的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc结构域变体是(i)包含L234A、L235A、G237A和N297A突变的人IgG1 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引;(ii)包含A330S、P331S和N297A突变的人IgG2 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引;(iii)包含S228P、E233P、F234V、L235A和delG236突变的人IgG4 Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引;或(iv)包含S228P、E233P、F234V、L235A、delG236和N297A突变的人IgG4Fc区,其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施方案中,Fc结构域变体包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列。在一些实施方案中,多肽包含SEQ ID NO:135或SEQ ID NO:136的氨基酸序列。在一些实施方案中,包含SIRP $\alpha$ D1结构域变体和Fc结构域变体的多肽形成同二聚体。在一些实施方案中,试剂盒或制品根据本文提供的治疗方法使用。

[0288] 在一些实施方案中,试剂盒或制品还包含抗体-药物缀合物(ADC)。在一些实施方案中,ADC包含抗粘连蛋白-4抗体(例如恩诺单抗)。在一些实施方案中,ADC包含与细胞毒性药物连接的特异性结合粘连蛋白-4(例如,人粘连蛋白-4)的抗体。在一些实施方案中,细胞毒性药物是小分子微管破坏剂单甲基奥里斯他汀-E(MMAE),也称为贝多汀。在一些实施方案中,ADC是维恩妥尤单抗。在一些实施方案中,多肽(例如,融合多肽)和ADC提供于相同的容器或单独的容器中。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、袋子和注射器。容器可由诸如玻璃、塑料(诸如聚氯乙烯或聚烯烃)或金属合金(诸如不锈钢或哈氏合金)的多种材料形成。在一些实施方案中,容器上或与其相关的配方和标签可指示使用方向。

[0289] 制品或试剂盒还可包括从商业和使用者角度来看所需的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头、注射器和具有使用说明书的包装插页。在一些实施方案中,所述试剂盒包括包装插页或标签,其具有使用所述多肽(例如,融合多肽)与所述抗体-药物缀合物(例如,维恩妥尤单抗)的组合来治疗或延缓个体(例如,人类个体)的癌症(例如,尿路上皮癌,例如本文别处进一步详细描述尿路上皮癌)的说明书。在一些实施方案中,包装插

页或标签提供了将多肽(例如,融合多肽)以高达60mg/kg的剂量施用于有需要的个体的说明书。在一些实施方案中,包装插页或标签提供以20mg/kg的剂量每2周(q2w)一次或每14天一次向个体施用多肽(例如,融合多肽)的说明书。在一些实施方案中,包装插页或标签提供以30mg/kg的剂量每2周一次(q2w)或每14天一次向有需要的个体施用多肽(例如,融合多肽)的说明书。在一些实施方案中,包装插页或标签提供以15mg/kg的剂量每2周一次(q2w)或每14天一次向有需要的个体施用多肽(例如,融合多肽)的说明书。

[0290] 合适的容器包括例如瓶子、小瓶、袋子和注射器。容器可由诸如玻璃、塑料(诸如聚氯乙烯或聚烯烃)或金属合金(诸如不锈钢或哈氏合金)的多种材料形成。在一些实施方案中,容器上或与其相关的配方和标签可指示使用方向。制品或试剂盒还可包括从商业和使用者角度来看所需的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头、注射器和具有使用说明书的包装插页。在一些实施方案中,制品还包括一种或多种另一种药剂(例如,化疗剂、抗肿瘤剂、治疗性抗体等)。用于一种或多种药剂的合适容器包括例如瓶子、小瓶、袋子和注射器。

[0291] 本说明书被认为足以使本领域技术人员实践本发明。除了在此示出和描述的那些以外,本发明的各种修改对于本领域技术人员来说从前面的描述中将变得显而易见,并且落入所附权利要求的范围内。出于所有目的,本文引用的所有出版物、专利和专利申请均据此通过引用全文并入本文。

[0292] 实施例

[0293] 通过参考以下实施例,将更全面地理解本公开。然而,这些实施例不应被解释为限制本公开的范围。应当理解,本文所述的实施例和实施方案仅用于说明目的,并且将建议本领域技术人员根据这些其进行各种修改或变化,并且各种修改或变化将被包括在本申请的精神和范围以及所附权利要求的范围内。

[0294] 实施例1:评估人Fc $\gamma$ 受体与药物B和药物C的结合。

[0295] 概述

[0296] IgG抗体通过引发抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)或抗体依赖性细胞毒性(ADCC),经由效应细胞(例如巨噬细胞)上Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)的缔合来介导靶肿瘤细胞的吞噬作用。大多数效应细胞表达多个Fc $\gamma$ R。抗体IgG1类的Fc $\gamma$ 受体是Fc $\gamma$ RI/CD64、Fc $\gamma$ RII/CD32和Fc $\gamma$ RIII/CD16。Fc $\gamma$ RI/CD64是高亲和力受体,而Fc $\gamma$ RII和Fc $\gamma$ RIII是低亲和力受体。在人类中,Fc $\gamma$ RIIA具有H/R131单核苷酸多态性,并且一个充分表征的Fc $\gamma$ RIII单核苷酸多态性是V/F158。IgG Fc结构域以不同的亲和力结合至多个Fc $\gamma$ R,甚至参与高亲和力免疫复合物的低亲和力相互作用有助于靶细胞清除(Armour等人(2003)Mol. Immunol. 40: 585-593; Nagelkerke等人(2019)Front Immunol. 10:2237; Kang等人(2019)Front Immunol. doi(dot)org/10(dot)3389/fimmu(dot)2019(dot)00562)。人IgG1同种型结合人FcRn的在25 $^{\circ}$ C、pH 5.8下公开的K<sub>D</sub>为760+/-60nM(Abdiche等人(2015)MAbs. 7(2):331-43)。

[0297] 抗体药物缀合物(ADC)维恩妥尤单抗包含与链间半胱氨酸缀合的mc-vc-PAB-MMAE接头有效载荷。此缀合可能会限制恩诺单抗的Fc区与Fc受体的结合,并影响ADC介导抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的能力。为了确定接头有效载荷的缀合是否影响恩诺单抗的Fc区保留其效应子功能的能力(例如,通过结合人Fc- $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)和新生儿Fc受体(FcRn)),通过表面等离子共振(SPR)评估hFc $\gamma$ Ia、hFc $\gamma$ IIa-H131、hFc $\gamma$ IIa-R131、hFc $\gamma$ IIIa、Fc $\gamma$

IIIaV158F和hFcRn对药物B(即,恩诺单抗类似物)和药物C(即维恩妥尤单抗类似物)的亲合力。

[0298] 材料和方法

[0299] 药物B单克隆抗体基因合成、抗体表达和纯化

[0300] 药物B(即特异性结合人粘连蛋白-4的恩诺单抗类似抗体)的氨基酸序列是基于可公开获得的恩诺单抗氨基酸序列(参见KEGG数据库条目D1154;CAS:1448664-46-7;PubChem数据库条目384585500)。通过基因合成产生药物B的抗体重链和抗体轻链序列(参见下文),并针对在哺乳动物细胞(ATUM)中的表达进行密码子优化。将重链和轻链基因克隆到单独的哺乳动物表达载体中,并瞬时共转染到Expi293F细胞(ThermoFisher)中。在Expi293表达培养基中进行抗体表达,并在转染后5天收获细胞培养上清液。使用MABSELECT Prisma树脂(Cytiva)纯化药物B,并将缓冲液换成1x磷酸盐缓冲盐水(pH 7.4)。分析性尺寸排阻色谱(Cytiva,Superdex 200 10/300)数据表明药物B是约99%的单体。

[0301] 药物B轻链和药物B重链的氨基酸序列提供如下。轻链可变结构域和重链可变结构域加下划线。

[0302] 药物B轻链:

[0303] DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGISGLAWYQQKPKGAPKFLIYAASTLSGVPSRFSGSGSGTDFLTLISSLPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:225)

[0304] 药物B重链:

[0305] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLSLQMNSLRDEDTAVYYCARAYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:226)

[0306] 人粘连蛋白-4胞外结构域(ECD)和食蟹猴粘连蛋白-4ECD的氨基酸序列提供如下。His6(HHHHHH SEQ ID NO:223)与人和食蟹猴粘连蛋白-4ECD的C-末端结构域融合(下文以粗体指示)。

[0307] 人粘连蛋白-4-ECD

[0308] GELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGQVAWARVDAGEGAQELALLHSKYGLHVSPAYEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRRLRVLVPPLPSLNPGPALEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDTEVKGTTSSRSFKHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDQRITHILHVSFLAEASVRGLEDQNLWHIGREGAMLKCLSEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVDGDTLGFPPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVDVLDPQEDSGKQVDLVSASHHHHHH (SEQ ID NO:227)

[0309] 食蟹猴粘连蛋白-4-ECD

[0310] GELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGQVAWARADAGEGAQELALLHSKYGLHVSPAYEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRRLRVLVPPLPSLNPGPALEEGQGLTLAASCTAEG

SPAPSVTDWTEVKGTTSSRSFKHSRRAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDQRITHILHVSFLAEASVR  
GLEDQNLWHVREGAMLKCLSEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVDGDTLGFPPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQ  
VTVDVLDPQEDSGKQVDLVSASHHHHHH (SEQ ID NO:228)

[0311] 药物B对粘连蛋白-4的亲合力测定

[0312] 所有实验均在25℃和37℃下使用配备有S型传感器芯片的Biacore 8K高通量、高灵敏度SPR系统(Cytiva,Global Life Sciences Solutions USA LLC,Marlborough,MA)进行。所有动力学数据分析均使用Biacore Insight评估软件版本3.0.12.15655完成。

[0313] 运行缓冲液是10mM HEPES (pH7.4)、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05% (v/v) 表面活性剂P20 (HBS-EP+)。所有分析物(人和食蟹猴粘连蛋白-4-ECD)均以其标称浓度使用,如通过A280吸光度并使用其摩尔计算的消光系数确定。所使用的动力学注射方法是“单循环动力学”(也称为“动力学滴定”(Karlsson等人(2006)Analytical Bio chemistry.349(1):136-147)。

[0314] 通过使粘连蛋白-4-ECD流过Biacore系列S传感器芯片蛋白A上捕获的药物B(200-400RU)来分析药物B(即抗粘连蛋白-4单克隆抗体)与人粘连蛋白-4的细胞外结构域(ECD)的相互作用。分别地,药物B在10μL/min的流速下以约1μg/mL的浓度捕获在每个通道的流动池2中持续60秒接触时间,而缓冲液用于流动池1。将人粘连蛋白-4-ECD分析物制备成5元3倍稀释系列,最高标称浓度为300nM,并且使用单循环动力学方法按浓度上升的顺序注射每个分析物系列。在30μL/min流速下,分别监测120s和1800s的缔合和解离时间。在30μL/min流速下使用两次15s脉冲用pH 1.6的75mM磷酸来使表面再生。

[0315] 为了分析数据,应用了以下处理步骤。从来自流动池2(反应表面)的活性响应中减去来自流动池1(参考表面)的参考响应,以获得相减数据(2-1)。然后从参考相减数据(2-1)中减去最新(及时)缓冲液空白进样的响应,得到“双参考”数据(Myszka,D.G.(1999).J.Mol.Recognit.12,279-284)。这些双参考数据整体上拟合至具有质量转移的简单1:1Langmuir结合模型,以确定表观缔合速率常数( $k_a$ )和解离速率常数( $k_d$ )。然后从其比率推导出表观平衡解离或“亲和力”常数( $K_D$ ), $K_D = k_d/k_a$ 。药物B结合人粘连蛋白-4-ECD, $K_D$ 在37℃下为大约 $36.3 \pm 3.3$ nM,并且在25℃下为大约 $14.5 \pm 0.7$ nM。药物B结合食蟹猴粘连蛋白-4-ECD, $K_D$ 在37℃下为大约 $50.7 \pm 1.6$ nM,并且在25℃下为大约 $22.6 \pm 1.7$ nM。结果表明,恩诺单抗和药物B具有相似的与人粘连蛋白-4-ECD结合的表现亲和力(在25℃下对于维恩妥尤单抗SPR测定的 $K_D$ 为约16nM(Satpayev D,Morrison RK,Morrison KJM,Gudas J,Jakobovits A,Torgov M,An Z.2018.Antibody drug conjugates (ADC) that bind to 191P4D12 proteins.US9962454B2)对比对于药物B测定的 $K_D$ 为约14.5nM)。

[0316] 药物C的产生

[0317] 为了产生类似于维恩妥尤单抗(CAS Number 1346452-25-2)的抗体药物缀合物药物C,将恩诺单抗类似抗体药物B通过抗体的链间半胱氨酸缀合到马来酰亚胺基丙酰基-缬氨酰-瓜氨酰-对氨基苄氧羰基-单甲基奥里斯他汀E接头-有效载荷(MC-Val-Cit-PAB-MMAE,CAS 646502-53-6;从BroadPharm获得)。简言之,通过在20℃下添加相对于单克隆抗体20摩尔当量的TCEP(ThermoFisher)20分钟,部分还原在1×PBS pH 7.4、10%蔗糖、5mM EDTA、30mM Tris-HCL pH 7.5中的2.2mg/ml药物B单克隆抗体。将MC-Val-Cit-PAB-MMAE溶解在100% DMSO中,并作为5%v/v的DMSO溶液以相对于单克隆抗体10摩尔当量的量添加到

反应混合物中,将反应溶液在20℃下摆动2小时。之后,添加相对于接头-有效载荷1摩尔当量的N-乙酰半胱氨酸(SigmaAldrich),并将反应混合物在20℃下孵育20分钟。通过阳离子交换色谱(Cytiva,HiTrap SP HP树脂)从抗体-药物缀合物中分离过量猝灭的MC-Val-Cit-PAB-MMAE,在10%蔗糖、150mM NaCl、12.5mM乙酸钠pH 5.0缓冲液中洗脱药物C抗体-药物缀合物。分析尺寸排阻色谱(Cytiva,Superdex 200 10/300)显示,药物C是约99%的单体。

#### [0318] 药物C的药物抗体比(DAR)的测定

[0319] 维恩妥尤单抗(CAS号1346452-25-2)的平均药物抗体比(DAR)为大约3.8:1(参见PADCEV®,美国包装插页,2019)。CRO Novatia,LLC(USA)使用液相色谱质谱法(LC-MS)测定药物C(即维恩妥尤单抗ADC类似物)的DAR。简言之,使用PNG酶F处理(New England Biolabs Rapid PNGase F)对药物C的样品进行去糖基化和还原,然后通过反相液相色谱与质谱联用(RPLC-MS)进行分析。HPLC是联用Halo Diphenyl柱2.1x50 mm、2.7mm的Acquity I-Class UPLC。A相是0.05% TFA的水溶液,B相是0.05%三氟乙酸的乙腈溶液。梯度为在1分钟内10-20%溶液B、在9分钟内20-50%溶液B,0.5mL/min,80℃。质谱仪是Waters Xevo G2-XS Q-Tof。Novatia ProMass HR使用MassLynx软件处理数据。结果显示,药物C的平均药物抗体比为3.85:1,类似于维恩妥尤单抗的DAR值(3.8:1)。

#### [0320] 人Fc $\gamma$ R与药物B和药物C的结合

[0321] 所有SPR实验均在25℃下使用配备S型传感器芯片的Biacore8K进行,并使用Biacore Insight评估软件进行动力学数据分析。

[0322] 对于所有hFc $\gamma$ R相互作用,运行缓冲液是HBS-EP+(10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05%(v/v)表面活性剂P20)。所有hFc $\gamma$ R分析物均以其由A280吸光度确定的标称浓度使用,并使用其摩尔计算的消光系数。

[0323] 药物B和药物C与人Fc $\gamma$ R的相互作用通过使hFc $\gamma$ R的细胞外结构域(ECD)流过在粘连蛋白-4包被的CM5芯片上捕获的药物B或药物C来分析。按照Cytiva胺偶联试剂盒说明,使用胺化学将高达2400RU的人粘连蛋白-4ECD固定在CM5芯片的两个流动池(1和2)上。将药物B和药物C在HBS-EP+(100-200RU)中以10 $\mu$ L/min、2 $\mu$ g/mL捕获在每个通道的流动池2上持续120秒。使用单循环动力学模式在捕获方法中注射分析物,hFc $\gamma$ RI(CD64)的标称最高浓度为30nM且3倍系列稀释,或hFc $\gamma$ RIIa(CD32a)或hFc $\gamma$ RIIIa(CD16a)的标称最高浓度为3000nM且3倍系列稀释。监测120s的缔合时间,并且监测600s的解离时间(解离时间为1800s的hFc $\gamma$ RI除外)。在30 $\mu$ L/min流速下使用两次15s脉冲用pH1.6的75mM磷酸来使表面再生。

[0324] 使用Biacore 8K评估软件版本3.0.12.15655(Cytiva,Global Life Sciences Solutions USA LLC,Marlborough,MA)处理并分析数据。从来自流动池2的活性响应中减去来自流动池1的参考响应,以获得相减数据(2-1)。然后从参考相减数据(2-1)中减去最新缓冲液空白进样的响应,得到双参考数据。对于hFc $\gamma$ RI,这些双参考数据拟合至具有质量转移的简单1:1Langmuir结合模型,以确定表观缔合速率常数( $k_a$ )和解离速率常数( $k_d$ )。然后基于其比率计算表观平衡解离常数或亲和常数,( $K_D = k_d/k_a$ )。由于其快速缔合速率和快速解离速率,使用“稳态”(或“平衡结合”)方法分析所有其他hFc $\gamma$ R相互作用(hFc $\gamma$ IIa-H131、hFc $\gamma$ IIa-R131、hFc $\gamma$ IIIa和Fc $\gamma$ IIIaV158F)的结合亲和力 $K_D$ 值。

#### [0325] 人FcRn与药物B和药物C的结合

[0326] 所有实验均在25℃下使用配备S型传感器芯片的Biacore 8K进行,并使用Biacore

Insight评估软件进行动力学数据分析。用于hFcRn相互作用的运行缓冲液是含0.01% Tween-20的PBS pH 5.8,并且用于捕获的运行缓冲液是HBS-EP+。分析物hFcRn ECD蛋白以其标称浓度使用。使用“单循环动力学”注射模式。

[0327] 药物B和药物C与hFcRn的相互作用通过使hFcRn ECD蛋白流过在粘连蛋白-4包被的CM5芯片上捕获的药物B或药物C来分析。按照Cytiva胺偶联试剂盒说明,使用胺化学将高达2400RU的人粘连蛋白-4ECD固定在CM5芯片的两个流动池(1和2)上。在表面制备方法中,将药物B或药物C在HBS-EP+(100-200RU)中以10 $\mu$ L/min、2 $\mu$ g/mL捕获在每个通道的流动池2上持续120秒。在含0.01% Tween-20的PBS pH 5.8中进行hFcRn运行。将hFcRn分析物制备成5元3倍系列稀释液,最高标称浓度为3000nM,并使用单循环模式按浓度上升的顺序注射这些样品。分别监测120s和600s的缔合时间和解离时间。在30 $\mu$ L/min流速下使用两次30s脉冲用PBS pH 7.4来使表面再生。中性pH缓冲液有效去除hFcRn,同时将捕获的抗体保留在芯片上。

[0328] 使用Biacore 8K评估软件版本3.0.12.15655(Cytiva,Global Life Sciences Solutions USA LLC,Marlborough,MA)处理并分析数据。从来自流动池2的活性响应中减去来自流动池1的参考响应,以获得相减数据(2-1)。然后从参考相减数据(2-1)中减去最新缓冲液空白进样的响应,得到双参考数据。由于其快速缔合速率和快速解离速率,使用“稳态”(或“平衡结合”)方法分析结合亲和力 $K_D$ 值。

[0329] 结果

[0330] 人Fc $\gamma$ R与药物B和药物C的结合

[0331] 发现药物C(即维恩妥尤单抗类似物)和药物B(即未缀合的恩诺单抗类似物)具有类似的与hFc $\gamma$ R结合的 $k_a$ 、 $k_d$ 和表观亲和力 $K_D$ 。参见下表A。

[0332] 人FcRn与药物B和药物C的结合

[0333] 发现药物C(即维恩妥尤单抗类似物)和药物B(即未缀合的恩诺单抗类似物)具有类似的与hFcR结合的 $k_a$ 、 $k_d$ 和表观亲和力 $K_D$ 。参见下表A。

[0334] 表A.Fc $\gamma$ R和FcRn对药物B和药物C的亲和力( $K_D$ )

Fc 受体	药物 B (恩诺单抗类似 Ab)	药物 C (维恩妥尤单抗类似 ADC)
hFc $\gamma$ Ia	56 pM	91 pM
[0335] hFc $\gamma$ IIa-H131	772 nM	921 nM
hFc $\gamma$ IIa-R131	783 nM	846 nM
hFc $\gamma$ IIIa	316 nM	429 nM
Fc $\gamma$ IIIaV158F	983 nM	1205 nM
hFcRn	767 nM	812 nM

[0336] 结论

[0337] 比较药物B(恩诺单抗类似mAb)和药物C(维恩妥尤单抗类似ADC)与人hFc $\gamma$ R和hFcRn的结合的SPR动力学结果显示,药物B(即恩诺单抗类似物)和药物C(即维恩妥尤单抗类似物)以类似亲和力与人hFc $\gamma$ R和hFcRn结合。因此,与平均药物抗体比为3.85:1的维恩妥尤单抗的链间半胱氨酸缀合的接头-有效载荷mc-vc-PAB-MMAE的存在似乎不影响药物C

结合人Fc $\gamma$ R和人FcRn受体的能力。

[0338] 实施例2:评估药物A与药物B或药物C的组合对抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的影响

[0339] 概述

[0340] 维恩妥尤单抗-ejfv是粘连蛋白-4导向的抗体-药物缀合物(ADC),其包含通过蛋白酶可裂解的马来酰亚胺基丙氨酰缬氨酸-瓜氨酸接头缀合至小分子微管破坏剂单甲基奥里斯他汀E的完全人抗粘连蛋白-4IgG1 $\kappa$ 单克隆抗体(本文称为mc-vc-PAB-MMAE)。维恩妥尤单抗接头-有效载荷缀合至包含抗体链间二硫键的链间半胱氨酸残基,以产生药物抗体比为大约3.8:1的产物(参见**PADCEV®**,美国包装插页)。在人IgG1抗体结构中,重-重链间半胱氨酸位于铰链区,并且重链-轻链链间半胱氨酸位于人IgG1抗体重链结构域CH1和人IgG1轻链 $\kappa$ 恒定结构域(CK)的界面处。因此,维恩妥尤单抗中接头-有效载荷mc-vc-PAB-MMAE与链间半胱氨酸的缀合可能对Fc区与Fc $\gamma$ R和FcRn受体的结合造成空间位阻。

[0341] 本实验的目的是评估药物C的Fc和Fc近端区域中接头有效载荷的存在是否影响介导ADCP的Fc效应子功能。因此,在以不同水平表达人粘连蛋白-4的三种人癌细胞系中,评估了药物A与药物B(即,恩诺单抗类似物)和药物C(即,维恩妥尤单抗类似物)的组合对抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的影响。药物A是示例性SIRP $\alpha$ 变体-Fc变体融合多肽,其对人CD47具有高亲和力,但缺乏Fc效应子功能。

[0342] 材料和方法

[0343] 细胞系

[0344] 将OE19(Sigma 96071721-1VL)和T47D(ATCC HTB-133)细胞维持在包含RPMI-1640(Thermo Fisher Scientific 11875119)的生长培养基中,所述培养基补充有10% FBS(Thermo Fisher Scientific 26140079)、1%青霉素/链霉素(Thermo Fisher Scientific 15140163)和1% GlutaMAX(Thermo Fisher Scientific 35050061)。OE19是人食管腺癌细胞系。T47D是人乳腺癌(浸润性导管癌)细胞系。关于OE19和T47D的粘连蛋白-4表达水平的信息提供在表B中。

[0345] 将HT-1376(ATCC CRL-1472)细胞维持在包含DMEM(Thermo Fisher Scientific 11965092)的生长培养基中,所述培养基补充有10%FBS(Millipore TMS-013-B)、1%青霉素/链霉素(Thermo Fisher Scientific 15140163)和1% GlutaMAX(Thermo Fisher Scientific 35050061)。HT-1376是人膀胱癌细胞系。关于HT-1376的粘连蛋白-4表达水平的信息提供在表B中。

[0346] 受体定量

[0347] 用TryPLE select(Thermo Fisher Scientific 12563029)收获细胞系,计数并将 $2 \times 10^5$ 个细胞接种到U形底96孔板(Falcon 353227)中。离心后,用冰冷的FACS缓冲液洗涤细胞,所述缓冲液包含具有0.5%BSA的PBS(Thermo Fisher Scientific 15260-037)。将10  $\mu$ g/mL的粘连蛋白-4-AF647缀合抗体(克隆337516,R&D Systems FAB2659R)与细胞在4°C下孵育。孵育1小时后,将细胞悬浮液用冰冷的FACS缓冲液洗涤两次,并以 $400 \times g$ 离心5分钟。将样品重悬于100  $\mu$ L FACS缓冲液中,并在Attune NxT细胞计数器(Thermo Fisher Scientific)上分析细胞。通过使用SIMPLE CELLULAR® 抗人IgG珠(Bangs Laboratories 816A)来确定有效的荧光团与蛋白质比率(F/P)。将一滴SIMPLE

CELLULAR®抗人IgG珠添加到100 $\mu$ L的10 $\mu$ g/ml粘连蛋白-4-AF647溶液中。将混合物在冰上避光孵育30分钟。然后将样品用2mL冰冷的FACS缓冲液洗涤两次,并以400 $\times$ g离心5分钟。将500 $\mu$ L FACS缓冲液添加到样品中,然后在细胞分析的同一天在Attune NxT细胞计数器上进行分析。总共记录了10,000个事件,并使用FlowJo (BD) 进行分析。

[0348] 人单核细胞衍生性巨噬细胞的衍生和培养

[0349] 将人去白细胞全血(Vitalant血液中心)用PBS(Thermo Scientific10010072)1:3稀释。稀释的血液下面有10mL Ficoll-Paque Premium(Cytiva 17-5442-02)。管以400 $\times$ g离心30分钟。从界面收集PBMC,通过添加40mL PBS洗涤两次,以400 $\times$ g离心10分钟,并重悬于磁激活细胞分选(MACS)缓冲液(含0.5% BSA(Thermo Fisher Scientific15260-037)、2mM EDTA(Teknova E0307-06)的PBS)。根据制造商的方案,通过使用单核细胞分离试剂盒II(Miltenyi Biotec 130-091-153)和LS柱(Miltenyi Biotec 130-042-401)进行阴性选择来纯化CD14<sup>+</sup>单核细胞。将CD14<sup>+</sup>单核细胞以每个培养皿1000万个细胞接种到150mm组织培养皿(Falcon 353025)的25mL培养基中,所述培养基包含RPMI-1640,补充有10% FBS(Thermo Fisher Scientific 26140079)、1%青霉素/链霉素(Thermo Fisher Scientific 15140163)、1% GlutaMAX(Thermo Fisher Scientific 35050061)和50ng/mL M-CSF(Miltenyi 130-096-492)。将细胞培养七天。

[0350] 体外吞噬测定

[0351] 通过用10mL PBS洗涤一次并在37 $^{\circ}$ C下在5mL TrypLE Select中孵育10分钟,从培养板上分离HT-1376、T47-D和OE19细胞。将细胞在PBS中洗涤两次,并重悬于PBS中。将HT-1376、T-47D和OE19细胞用Celltrace CFSE细胞增殖试剂盒(Thermo Fisher Scientific C34554)根据制造商的说明在含有150nM CFSE的悬浮液中标记,并重悬于RPMI-1640中。通过用10mL PBS洗涤一次并在37 $^{\circ}$ C下在5mL TrypLE Select中孵育20分钟,从培养板中分离巨噬细胞。将细胞用细胞刮刀(Corning 3008)去除,在PBS中洗涤,并且重悬于RPMI-1640中。

[0352] 将CFSE标记的T47-D和OE19靶细胞以每孔100,000个细胞添加到超低附着U形底96孔板中。以40ng/mL或8ng/mL的浓度添加药物B或药物C,并以6.25nM、0.40nM或90pM的浓度添加药物A。为了确定EC<sub>50</sub>,将CFSE标记的HT-1376和OE19靶细胞以每孔100,000个细胞添加到超低附着U形底96孔板(Corning 7007)中。以200ng/ml的浓度添加药物B或药物C。接着,添加药物A在100nM和0.1pM之间的十倍系列稀释液。在添加50,000个巨噬细胞之前,将含有靶细胞、药物A和药物B或药物C的板在37 $^{\circ}$ C下在含有5%二氧化碳的湿润培养箱中孵育20分钟。20分钟后,添加培养的巨噬细胞,将板在37 $^{\circ}$ C下在含5%二氧化碳的湿润培养箱中再培养两小时。将细胞通过以400g离心五分钟而沉淀并在4 $^{\circ}$ C下在以1:5000稀释于PBS中的100 $\mu$ L可固定活性染料eFluor 780(ebioscience 65-0865-14)中染色30分钟。在200 $\mu$ L FACS缓冲液(PBS+2% FBS)中洗涤细胞,并在含有2 $\mu$ L人FcR封闭试剂(Miltenyi Biotec 130-059-901)、0.5 $\mu$ L BV421抗CD163(Clone GHI/61, Biologend 333612)、0.5 $\mu$ L PE-Cyanine7 CD11b(clone ICRF44, Thermo Scientific 25-0118-42)和0.5 $\mu$ L PE CD326(Clone 9C4, Biologend 324206)的50 $\mu$ L FACS缓冲液中在冰上染色60分钟。将细胞在250 $\mu$ L FACS缓冲液中洗涤两次,并在100 $\mu$ L 0.5%多聚甲醛(Electron Microscopy Sciences 15710)PBS溶液在4 $^{\circ}$ C下固定过夜。在FACS Canto II (BD Biosciences)上分析细胞,随后通过Flowjo

10.8(BD) 进行数据分析。通过对e780阴性群体进行门控来排除死亡细胞。将巨噬细胞鉴定为对谱系标记物CD11b和CD163呈阳性的细胞。在这个群体中,将吞噬了肿瘤细胞的巨噬细胞鉴定为对CFSE呈阳性的细胞。为了从分析中排除未被吞噬的CFSE标记的肿瘤细胞,不包括对上皮细胞标记物CD326呈阳性的细胞。吞噬百分比计算为活的CD11b<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>人单核细胞衍生性巨噬细胞的百分比,所述巨噬细胞对靶细胞标记物(CD326<sup>-</sup>)呈阴性染色并且对CFSE呈阳性染色。

[0353] 绘制数据,确定最大吞噬值,并用Prism 9软件(Graphpad)计算EC<sub>50</sub>值。用Excel(Microsoft)计算平均吞噬水平和平均EC<sub>50</sub>值。误差条代表相对于平均值的标准偏差。

[0354] 结果

[0355] 表B提供了所测试细胞系的粘连蛋白-4受体数量的总结。在表B中测试的细胞系的细胞表面上表达的粘连蛋白-4受体的数量(例如平均数量)范围为高至110,312到低至43,784。

[0356] 表B:人肿瘤细胞系的粘连蛋白-4受体数量

细胞系	粘连蛋白4受体
HT-1376	110,312
T47D	86,139
OE19	43,784

[0358] 表C提供了药物B、药物C、药物A+药物B和药物A+药物C对于衍生自从人供体获得的单核细胞的巨噬细胞对TROP2表达细胞系的巨噬作用的影响的总结。

[0359] 表C. 药物B、药物C、药物A+药物B和药物A+药物C对表达TROP2的人细胞系的ADCP的ADCP活性的总结

细胞系	药物 B ADCP <sup>a</sup>	药物 C ADCP <sup>a</sup>	药物 A +药物 B ADCP <sup>b</sup>	药物 A +药物 C ADCP <sup>b</sup>	药物 A +药物 B EC50, pM <sup>c</sup>	药物 A +药物 C EC50, pM <sup>c</sup>
<b>HT-1376</b>	1.84	1.55	2.73	2.15	25.01	0.50
<b>T47D</b>	1.43	1.19	1.68	1.62	nd	nd
<b>T47D</b>	1.37	1.14	1.75	1.39	nd	nd
<b>OE19</b>	1.05	1.13	2.39	2.11	nd	nd
<b>OE19</b>	1.34	1.51	3.23	3.84	nd	nd
<b>OE19</b>	1.43	1.40	2.73	3.02	24.06	11.88
<b>平均值</b>	1.41	1.32	2.42	2.36	24.54	6.19
<b>标准偏差</b>	0.23	0.17	0.55	0.84	0.33	4.02

[0361] <sup>a</sup>对药物B或药物C有响应的吞噬靶细胞的巨噬细胞的百分比归一化为单独用培养基处理的吞噬靶细胞的巨噬细胞的百分比。

[0362] <sup>b</sup>对药物A加药物B或药物C有响应的吞噬靶细胞的巨噬细胞的最大百分比归一化为单独用培养基处理的吞噬靶细胞的巨噬细胞的百分比。

[0363] <sup>c</sup>计算接受药物A加药物B或药物C的细胞的EC<sub>50</sub>值。

[0364] nd=未确定

[0365] 注意:每一行代表来自不同供体的数据。

[0366] 在没有药物A、药物B和药物C的情况下,相对于单独培养基,各自将ADCP刺激平均

1.37倍。相对于单独培养基,药物A与药物B或药物C的组合将所有细胞系的ADCP平均增强了2.39倍。药物A增强了药物B和药物C在OE19和HT-1376中的ADCP,总体平均 $EC_{50}$ 分别为24.54pM和6.19pM。

[0367] 使用T-47D和OE19以及两种不同的供体,药物A增强药物B和药物C的体外吞噬作用的结果示出在图1A和图1B中。图1A示出了药物A增强从第一供体获得的人单核细胞衍生性巨噬细胞对OE19和T47D细胞的药物B或药物C诱导的吞噬作用。吞噬百分比,定义为吞噬CFSE标记的OE19细胞或T47D细胞的活巨噬细胞的百分比,显示在y轴上。单一药剂或组合参数显示在x轴上。图1B示出了药物A增强从第二供体获得的人单核细胞衍生性巨噬细胞对OE19和T47D细胞的药物B或药物C诱导的吞噬作用。吞噬百分比,定义为吞噬CFSE标记的OE19细胞或T47D细胞的活巨噬细胞的百分比,显示在y轴上。单一药剂或组合参数显示在x轴上。图2中示出了使用OE19细胞的体外吞噬测定的 $EC_{50}$ 结果。在图2中,吞噬百分比,定义为吞噬CFSE标记的OE19细胞的活巨噬细胞的百分比,显示在y轴上。药物A的浓度(nM)显示在x轴上。仅用药物B、仅用药物C或仅用培养基处理的细胞的吞噬百分比以0nM药物A显示,并用箭头表示。示出了用药物A+药物B(空心圆形)、药物A+药物C(实心圆形)和单独药物A(空心方形)处理的细胞的吞噬百分比。误差条代表三次技术复制的标准偏差。根据S形剂量响应、可变斜率拟合计算每条曲线的 $EC_{50}$ 。图3示出使用HT-1376的体外吞噬测定的 $EC_{50}$ 结果。在图3中,吞噬百分比,定义为吞噬CFSE标记的肿瘤细胞的活巨噬细胞的百分比,显示在y轴上。药物A的浓度(nM)显示在x轴上。仅用药物B、仅用药物C或仅用培养基处理的细胞的吞噬百分比以0nM药物A显示,并用箭头表示。示出了用药物A+药物B(空心圆形)或药物A+药物C(实心圆形)和单独药物A(空心方形)处理的细胞的吞噬百分比。误差条代表三次技术复制的标准偏差。根据S形剂量响应、可变斜率拟合计算每条曲线的 $EC_{50}$ 。

[0368] 结论

[0369] 通过基于流式细胞术的体外吞噬测定来评估药物A对药物B和药物C的ADCP的影响。在表达多种粘连蛋白-4受体的多种肿瘤细胞系中,药物A增强了药物B和药物C的ADCP,总体平均 $EC_{50}$ 分别为24.54和6.19pM。相对于用仅培养基对照观察到的背景水平,作为单一药剂,药物B和药物C刺激跨细胞系的ADCP分别为平均1.41倍和1.32倍。相对于仅培养基对照,药物A与药物B的组合以及药物A与药物C的组合分别将ADCP平均增强了2.42倍和2.36倍。总之,平均药物抗体比为3.85:1的与药物C的链间半胱氨酸缀合的接头-有效载荷mc-vc-PAB-MMAE的存在似乎不影响药物C单独或与药物A组合时介导ADCP的能力。

[0370] 实施例3:在患有尿路上皮癌的受试者中药物A与维恩妥尤单抗的组合的1期安全性、药代动力学、药效动力学研究

[0371] 本实施例描述了在患有局部晚期或转移性尿路上皮癌的受试者中药物A与维恩妥尤单抗的组合的1期临床研究

[0372] (A) 研究设计

[0373] 本研究包括剂量递增部分(1a期)和剂量扩展部分(1b期)。研究设计呈现于图4中。招募大约30名成年受试者(即18岁或以上)。本研究旨在确定药物A与维恩妥尤单抗的安全性和耐受性、最大耐受剂量(MTD)、推荐的2期剂量(RP2D)、单剂量和多剂量PK概况以及PD标记物(包括但不限于靶占有率),并确定药物A与维恩妥尤单抗的组合的初步活性(例如治疗活性)。

[0374] 药物A在递增剂量水平群组中静脉内 (IV) 施用,起始剂量为20mg/kg,每2周施用一次 (Q2W),与维恩妥尤单抗组合,在每个28天周期的第1天、第8天和第15天以1.25mg/kg IV的维恩妥尤单抗标准剂量和时间表给予。

[0375] 使用贝叶斯最佳区间 (Bayesian optimal interval,BOIN) 设计逐步增加药物A剂量,并评估剂量限制毒性 (DLT) 的发生率 (参见Liu等人 (2015) Journal of the Royal Statistical Society.Series C:Applied Statistics.64 (3) :507-523以及Yuan等人 (2016) Clin Cancer Res.22 (17) :4291-4301)。评估2个剂量水平的药物A:20mg/kg Q2W和30mg/kg Q2W。如果不能耐受20mg/kg Q2W,则评估药物A的较低剂量水平 (即15mg/kg Q2W)。可评估最大耐受剂量 (MTD) 或以下的其他剂量水平和/或时间表。

[0376] 在剂量递增期间,采用BOIN设计,MTD的目标剂量限制毒性 (DLT) 率设定为0.25。招募3名受试者的群组,并评估DLT。评估每个群组的DLT,并在下文中进一步详细描述。在第1周期的28天评估窗口期间评估DLT。BOIN设计使用以下过量剂量控制规则来指导剂量增加/减少:

[0377] • 如果在当前剂量下观察到的DLT率 $\leq 0.197$ ,则剂量递增到下一个更高的剂量水平;

[0378] • 如果观察到的DLT $> 0.298$ ,则剂量递降到下一个较低的剂量水平;

[0379] • 否则,保持当前剂量水平。

[0380] MTD的选择是基于Liu等人 (2015) Journal of the Royal Statistical Society.Series C:Applied Statistics.64 (3) :507-523中指定的保序回归。具体而言,MTD被选择为DLT率的保序估计值最接近目标DLT率的剂量。如果有平局,当保序估计值低于目标DLT率时,选择较高剂量水平,而当保序估计值大于或等于目标DLT率时,选择较低剂量水平。

[0381] 一旦安全性审查委员会 (SRC) 审查并批准剂量水平,在回填群组中在同一剂量水平下招募更多受试者,以进一步表征药物A和维恩妥尤单抗的安全性、PK、PD和初步抗肿瘤活性,从而优化剂量。未评估回填群组中招募的患者的DLT。在1a期部分,包括剂量递增和回填群组,每个剂量水平有大约15名受试者接受治疗。为了选择RP2D,发起人与SRC一起审查了来自1a期部分的所有可用的安全性、PK、PD和初步抗癌活性数据,包括剂量递增和回填群组,以推荐在2期环境中使用药物A与维恩妥尤单抗的组的剂量。

[0382] 根据SRC的决定,进行剂量扩展以在选定受试者群体中进一步评估药物A和维恩妥尤单抗的安全性、耐受性并表征初步抗癌活性 (参见图4)。在剂量扩展部分,表征其他抗癌药诸如检查点抑制剂与药物A和维恩妥尤单抗的组的安全性和耐受性。

[0383] 为了评估肿瘤内药效动力学终点,需要对回填群组和扩展群组进行新的治疗前和治疗中活检。对于剂量递增群组中招募的受试者,这些活检是任选的。受试者有最多28天的时间来完成筛选评估,并用药物A和维恩妥尤单抗的组治疗,直到 (a) 疾病进展, (b) 受试者或医生决定停止治疗, (c) 出现不可接受的毒性, (d) 撤销同意书,或 (e) 研究终止。在基线时和在研究的治疗阶段期间大约每8周进行肿瘤评估。如果研究者认为受试者 (i) 从研究治疗中获得了临床益处,并证明不存在指示具有临床意义的疾病进展的临床症状或体征; (ii) 表现状态 (PS) 没有下降; (iii) 证明不存在快速疾病进展或对需要紧急替代医疗干预的重要器官或关键解剖部位的威胁;以及 (iv) 未显示与研究治疗相关的显著的、不可接受

的或不可逆的毒性,则患者可在影像学进展后继续治疗。治疗结束(EOT)访视发生在大约4周(至少28天且不超过35天),或在开始下一次癌症治疗之前,在最后一剂量的药物A之后,以审查/收集伴随药物、生命体征、不良事件(AE)和严重不良事件(SAE),并评估任何治疗相关毒性的解决情况。此后,随访由在24个月内每3个月通过电话收集的总体存活数据组成。

[0384] 本研究按照方案、良好临床实践(GCP)和适用的监管要求来进行。

[0385] (B) 研究目的和终点

[0386] 本研究的主要目的是:(1) 评估药物A与维恩妥尤单抗的组合在先前接受过局部晚期或转移性尿路上皮癌治疗的受试者中的安全性和耐受性;和(2) 确定药物A与维恩妥尤单抗的组合的最大耐受剂量(MTD)和2期推荐剂量(RP2D)。

[0387] 本研究的次要目的是:(1) 评估药物A与维恩妥尤单抗的组合的总体安全性概况;(2) 表征药物A与维恩妥尤单抗的组合的单剂量和多剂量药代动力学(PK);(3) 评估药物A的免疫原性;并(4) 评估药物A与维恩妥尤单抗的组合的抗肿瘤活性的证据。

[0388] 本研究的探索性目的是:(1) 探索药物A与维恩妥尤单抗的组合的药效动力学(PD)效果;和(2) 评估在用于血液制品输血的血清学测试中减少药物A干扰的方法。

[0389] 本研究的主要终点是(1) 第一周期剂量限制性毒性(DLT),如下文进一步详细描述;和(2) 不良事件(AE),如通过类型、频率、严重性(根据美国国家癌症研究所不良事件通用术语标准(National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events, NCI CTCAE v.5.0,参见例如[https://ctep\(dot\)cancer\(dot\)gov/protocoldevelopment/electronic\(underscore\)applications/docs/CTCAE\(underscore\)v5\(underscore\)Quick\(underscore\)Reference\(underscore\)5x7\(dot\)pdf](https://ctep(dot)cancer(dot)gov/protocoldevelopment/electronic(underscore)applications/docs/CTCAE(underscore)v5(underscore)Quick(underscore)Reference(underscore)5x7(dot)pdf)分级)、时间、严重性和与研究疗法的关系来表征。

[0390] 本研究的次要终点是(1) 如通过类型、频率、严重性(根据NCICTCAE v.5.0分级)和时间表征的实验室异常;(2) 药物A的药代动力学参数,诸如最大血清浓度( $C_{max}$ )、达到最大血清浓度的时间( $T_{max}$ )、药物随时间的暴露量(曲线下面积或AUC)、清除率(CL)和数据允许的半衰期( $t_{1/2}$ ), (3) 使用实体瘤的缓解评估标准(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)进行评估(RECIST 1.1,参见例如Eisenhauer等人(2009)Eur J Cancer 45: 228-247);(4) 疾病控制率(DCR)、最佳总缓解(BOR)、缓解持续时间(DOR)、肿瘤进展时间(TTP)、无进展存活期(PFS)和总体存活期(OS)。

[0391] 本研究的探索性终点是(1) 药效动力学效果,包括(a) 外周血中CD47靶占有率的药物A前剂量水平和药物A后剂量水平;(b) 循环白细胞群体的免疫表型;(c) 研究治疗前后肿瘤活检组织中的肿瘤标记物表达、浸润性白细胞群体和免疫调节分子;(d) 治疗前后外周血和/或肿瘤活检样品中的探索性分子分析(包括但不限于肿瘤和免疫标记物);和(2) 在药物A治疗期间用于减轻间接抗球蛋白测试(IAT)和直接抗球蛋白测试(DAT)中的药物A干扰的方法的表征。

[0392] (C) 研究群体

[0393] 纳入标准

[0394] 受试者必须满足以下纳入标准,才有资格参加本研究:

[0395] • 受试者患有经组织学证实的、不可切除的局部晚期或转移性尿路上皮癌(即膀胱癌、肾盂癌、输尿管癌或尿道癌)。具有鳞状分化或混合细胞类型的尿路上皮癌(移行细

胞)受试者符合条件,前提是尿路上皮癌是主要组织学。排除具有任何小细胞或神经内分泌组织学成分的受试者。

[0396] • 在局部晚期或转移性尿路上皮癌背景下,受试者接受过使用免疫检查点抑制剂(CPI)的先前治疗。在新辅助/辅助环境中接受CPI治疗并在治疗期间或治疗结束后12个月内出现复发性或进展性疾病的受试者符合资格。CPI被定义为程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)抑制剂或程序性细胞死亡配体1(PD-L1)抑制剂(包括但不限于:阿特珠单抗、派姆单抗、德瓦鲁单抗、阿维鲁单抗和纳武单抗)。

[0397] • 受试者接受过使用含铂化疗的先前治疗,定义为在辅助/新辅助环境中接受铂治疗并在完成治疗后12个月内出现复发性或进展性疾病,或在转移性环境中接受铂治疗或治疗不可切除的局部晚期疾病。

[0398] • 受试者在接受最近一次治疗期间或之后出现尿路上皮癌进展或复发。

[0399] • 根据RECIST(版本1.1),受试者必须患有可测量的疾病。先前辐射场中的损伤必须在放射治疗后发展,才能被认为是可测量的。

[0400] • 骨髓功能充足,如由以下实验室数值证明,并适于所研究的疾病:

[0401] • 中性粒细胞绝对计数(ANC)  $\geq 1,500/\text{mm}^3$  ( $\geq 1.5 \times 10^9/\text{L}$ );

[0402] • 血小板  $\geq 100,000/\text{mm}^3$  ( $\geq 100 \times 10^9/\text{L}$ );

[0403] • 血红蛋白  $\geq 9\text{g/dL}$  ( $\geq 90\text{g/L}$ )

[0404] • 通过科克罗夫特-高尔特方程(Cockcroft-Gault equation)或其他医学上可接受的公式(诸如肾脏疾病饮食调整(Modification of Diet in Renal Disease,MDRD)或慢性肾脏疾病流行病学协作(Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration,CKD-EPI))估算的肌酐清除率  $\geq 30\text{mL/min}$ 证明肾功能充足。

[0405] • 肝功能充足,如由以下实验室数值证明,并适于所研究的疾病:

[0406] • 血清总胆红素  $\leq 1.5$ 倍正常值上限(ULN)(如果受试者记录了Gilbert综合征,则  $\leq 3.0 \times \text{ULN}$ );

[0407] • 对于肝转移受试者,天冬氨酸和丙氨酸转氨酶(AST和ALT)  $\leq 3.0 \times \text{ULN}$ 或  $\leq 5.0 \times \text{ULN}$ ;

[0408] • 对于骨或肝转移受试者,碱性磷酸酶  $\leq 2.5 \times \text{ULN}$ 或  $\leq 5.0 \times \text{ULN}$ 。

[0409] • 对  $\leq 480\text{ms}$ 的心率Fridericia方程(QTcF)间期进行校正的QT间期(基于三次心电图[ECG]的平均值)。

[0410] • 年龄  $\geq 18$ 岁。

[0411] • 东部肿瘤协作组(Eastern Cooperative Oncology Group,ECOG)表现状态为0或1。

[0412] • 剂量递增群组中的受试者在进入研究前提供可用的存档(或新鲜)活检样品。回填群组和扩展群组中的受试者具有可用于后续活检的肿瘤,并愿意提供新鲜的治疗前和研究中肿瘤组织活检(需要针芯活检或切除)。

[0413] • 筛选时血清妊娠测试(针对有生育能力的女性)呈阴性。

[0414] • 具有生育能力的男性和女性受试者同意在整个研究期间以及最后一个剂量的研究治疗后至少4个月内使用高效避孕方法。

[0415] 排除标准

- [0416] 在本研究中不包括具有以下任何特征/状况的受试者：
- [0417] • 先前存在的感觉或运动神经病变等级 $\geq 2$ ；
- [0418] • 存在有症状或不受控制的中枢神经系统 (CNS) 转移。如果符合所有以下条件，则允许接受CNS转移治疗的受试者参与研究：
- [0419] • 在筛选之前至少6周，CNS转移已在临床上稳定；
- [0420] • 如果CNS转移需要类固醇治疗，受试者接受稳定剂量 $\leq 20\text{mg/天}$ 的泼尼松或等效药物治疗至少2周；
- [0421] • 基线扫描显示没有新的或扩大的脑转移的证据；并且
- [0422] • 受试者没有软脑膜疾病
- [0423] • 使用维恩妥尤单抗或其他基于单甲基奥里斯他汀 (MMAE) 的抗体-药物缀合物 (ADC) 的先前治疗
- [0424] • 使用任何抗CD47或抗信号调控蛋白- $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) 剂的先前治疗。
- [0425] • 已知对维恩妥尤单抗或维恩妥尤单抗的药物制剂中包含的任何赋形剂 (包括组氨酸、海藻糖二水合物和聚山梨醇酯20) 具有超敏性；或者受试者已知对中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中产生的生物药物具有超敏性。
- [0426] • 对抗体或输注的治疗性蛋白质不耐受或对其有严重变态或过敏反应，或对药物A中包含的任何物质有严重变态或过敏反应的受试者。
- [0427] • 与先前治疗 (包括全身疗法、放疗或手术) 相关的持续临床显著毒性 (2级或更高级，脱发除外)。患有 $\leq 2$ 级免疫疗法相关性甲状腺功能减退或全垂体功能减退的受试者在接受稳定剂量的激素替代疗法 (如有指示) 后得到良好维持/控制时招募。排除患有正在进行的 $\geq 3$ 级免疫治疗相关性甲状腺功能减退或全垂体功能减退的受试者。排除患有正在进行的免疫疗法相关性结肠炎、葡萄膜炎、心肌炎或肺炎的受试者，或患有需要高剂量类固醇 ( $>20\text{mg/天}$ 的泼尼松或等效药物) 的其他免疫疗法相关AE的受试者。
- [0428] • 目前针对活动性感染 (病毒、细菌或真菌) 的全身性抗微生物治疗。允许常规抗微生物预防。
- [0429] • 已知的活动性未控制的乙型肝炎 (HBV)、丙型肝炎 (HCV) 和人免疫缺陷病毒 (HIV) 感染。
- [0430] • 在过去6个月内出现以下任何情况：心肌梗死、严重/不稳定型心绞痛、冠状动脉/外周动脉旁路移植术、纽约心脏协会 (New York Heart Association, NYHA) II级或更高级别的充血性心力衰竭、未控制的高血压、脑血管意外、短暂性脑缺血发作、深静脉血栓形成 (除了被认为与装置相关且无临床意义的血栓)、动脉血栓形成、症状性肺栓塞或任何其他重大血栓栓塞。
- [0431] • 任何其他介入性治疗临床研究中的当前积极治疗。
- [0432] • 在第一剂量的研究药物之前14天内进行放疗或大手术。
- [0433] • 在第一剂量的研究药物之前28天或5个半衰期 (以较短者为准) 内未完成的化疗、生物制剂、研究药物和/或免疫疗法抗肿瘤治疗。
- [0434] • 在第一剂量的研究药物之前的最后28天内的任何实验性抗体或活疫苗。活疫苗的实例包括但不限于以下：麻疹、流行性腮腺炎、风疹、水痘/带状疱疹、黄热病、狂犬病、卡介苗 (Bacillus Calmette-Guérin, BCG) 和伤寒疫苗。注射用季节性流感疫苗通常为灭活病

毒疫苗,并且允许使用;但是,鼻内流感疫苗(例如FluMist®)是活减毒疫苗,并且不允许使用。

[0435] • 在第一剂量的研究药物之前3年内有其他恶性肿瘤病史,或先前诊断的恶性肿瘤残留疾病的任何证据的受试者。允许患有非黑色素瘤皮肤癌、接受治愈意图治疗但无进展迹象的局限性前列腺癌、处于积极监测/观察等待中但无治疗意图的低风险或极低风险(根据标准指南)局限性前列腺癌、或任何类型的原位癌(如果进行完全切除术)的受试者。

[0436] • 患有活动性自身免疫性疾病,在过去1年中需要全身性治疗(即使用疾病缓解剂、皮质类固醇或免疫抑制药物)的受试者。替代疗法(例如,针对肾上腺或垂体功能不全的甲状腺素、胰岛素或生理性皮质类固醇替代疗法)不被视为全身治疗的一种形式,并且是允许的。

[0437] • 其他严重的急性或慢性医学或精神疾患,包括最近(在过去一年内)或活跃的自杀意念或行为,或可能增加与参与研究或施用研究药物相关的风险或可能干扰研究结果的解释并使受试者不适合参与本研究的实验室异常。

[0438] • 自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少症或溶血性输血反应史。

[0439] • 已知的活动性角膜炎或角膜溃疡。如果病症得到充分治疗,允许患有浅层点状角膜炎的受试者。

[0440] • 在第一剂量的研究药物后3个月内有未控制的糖尿病史。未控制的糖尿病定义为血红蛋白A1C(HbA1c)  $\geq 8\%$  或HbA1c在7%和 $<8\%$ 之间,伴有未以其他方式解释的相关糖尿病症状(例如多尿或烦渴)。

[0441] • 目前怀孕或哺乳。

[0442] (D) 研究医药产品、剂量和施用方式

[0443] 在本研究的剂量递增部分,药物A的初始起始剂量为20mg/kg IV Q2W,并且如果认为安全,药物A的剂量递增至方案规定的最大剂量30mg/kg IV Q2W。如果不能耐受20mg/kg Q2W,则可评估较低剂量水平的药物A(即15mg/kg IV Q2W)。可以评估MTD或低于MTD的其他剂量水平和/或时间表。剂量递增群组和回填群组确定药物A推荐2期剂量(RP2D)与维恩妥尤单抗的组合的最佳剂量和时间表。在本研究的剂量扩展部分,药物A以等于或低于MTD与本研究的剂量递增部分中确定的维恩妥尤单抗的组合施用。在每个28天周期的第1天、第8天和第15天,以1.25mg/kg IV的标准剂量施用维恩妥尤单抗。参见下表D。

[0444] 表D. 剂量递增剂量和施用时间表

群组	药物A的剂量、施用途径和施用时间表(mg/kg)	维恩妥尤单抗的剂量、施用途径和施用时间表(mg/kg)
<b>28天周期</b>		
1	20 mg/kg, IV, Q2W	在每个28天周期的第1天、第8天和第15天, 1.25 mg/kg
2	30 mg/kg, IV, Q2W	在每个28天周期的第1天、第8天和第15天, 1.25 mg/kg
减去1	15 mg/kg, IV, Q2W	在每个28天周期的第1天、第8天和第15天, 1.25 mg/kg

[0445]

[0446] 如本文别处所述,贝叶斯最佳区间 (BOIN) 设计 (参见Liu等人 (2015) Journal of the Royal Statistical Society.Series C:Applied Statistics.64 (3) :507-523以及 Yuan等人 (2016) Clin Cancer Res.22 (17) :4291-4301) 用于寻找最大耐受剂量 (MTD)。BOIN 设计以类似于传统3+3设计的简单方式实现,但更灵活,并具有可与更复杂的基于模型的设计诸如连续再评估方法 (CRM)) 相比的优异操作特征 (参见Zhou等人 (2018) Clin Cancer Res.24 (18) :4357-4364)。

[0447] 药物A装在1000mg/50mL 1型透明玻璃小瓶中,用20mm聚四氟乙烯涂层橡胶血清塞和防篡改铝密封件密封。每个一次性小瓶可递送1000mg药物A (50mL),并预期用于静脉内 (IV) 施用。

[0448] 关于维恩妥尤单抗剂型和包装的完整信息可在美国或当地包装插页中找到。对于美国,参见例如[https://astellas\(dot\)us/docs/PADCEV\(underscore\)label\(dot\)pdf](https://astellas(dot)us/docs/PADCEV(underscore)label(dot)pdf)。

[0449] 在门诊基础上,药物A以IV输注方式每2周施用一次。在大约60分钟内输注剂量。使用输液泵是确保准确递送研究药物的首选施用方法,但也允许重力滴注。

[0450] 周期被定义为从第1天剂量到下一个第1天剂量的时间。如果没有治疗延迟,一个周期为28天,每2周给药一次。在门诊基础上,施用所有试验治疗。在第1周期的第1天输注后,受试者在诊所接受至少2小时观察,之后根据临床指征进行观察。

[0451] 不需要药物A的术前用药。根据维恩妥尤单抗美国或当地包装插页,遵循维恩妥尤单抗输注指南。维恩妥尤单抗的推荐剂量为1.25mg/kg (对于 $\geq 100$ kg的受试者,最大剂量为125mg),在28天周期的第1天、第8天和第15天以静脉内输注的方式施用30分钟,直至疾病进展或出现不可接受的毒性。

[0452] 在与给药时间表一致的施用当天,维恩妥尤单抗在药物A疗法结束后大约30分钟开始施用。

[0453] 对于毒性,允许中断和调整剂量。药物A的剂量调整可以三种方式之一发生:

[0454] • 在一个周期内:在给定治疗周期期间,(对于仅药物A的每2周一次给药) 中断给药直至充分恢复和剂量降低(如果需要);

[0455] • 周期之间:新周期开始时,由于持续毒性,可能会延迟下一周期施用;

[0456] • 在下一个周期:基于前一个周期中经历的毒性,可能需要在下一个周期降低剂量。

[0457] 如果药物A永久停用,如果研究者认为受试者获得了临床益处,则受试者可以继续接受维恩妥尤单抗。如果维恩妥尤单抗过早地永久停用,如果研究者认为受试者从药物A中获得了临床益处,则受试者可以继续使用药物A。

[0458] 在剂量递增期间,受试者被连续分配到下一个可用的治疗时段,其剂量水平和时间表在前一个群组的安全性评估后确定。

[0459] (E) 统计方法

[0460] 本研究中总共招募大约30名成年受试者。招募取决于观察到的安全性概况,其决定了每个剂量水平的受试者数量和探索的剂量水平数量。1期的样品量取决于潜在的剂量毒性概况和实际数据实现的可变性。剂量递增部分中每个剂量 (即3至15之间) 下治疗的受试者数量是基于BOIN (贝叶斯最佳区间) 设计 (参见例如Yuan等人 (2016) Clin Cancer Res.22 (17) :4291-4301)。

[0461] 一旦安全性审查委员会 (SRC) 确定剂量水平是安全和可耐受的,则在回填群组中以相同剂量水平招募其他受试者,以在先前接受局部晚期或转移性尿路上皮癌治疗的受试者中进一步评估施用的药物A与维恩妥尤单抗的组的安全性、药代动力学、药效动力学和初步抗肿瘤活性。在这些回填群组中没有进行DLT评估。在剂量递增部分,包括回填群组,每个剂量水平有大约15名受试者接受治疗。

[0462] 为了选择RP2D,发起人与SRC一起审查了来自1a期的所有可用的安全性、药代动力学、药效动力学和初步抗癌活性数据,包括剂量递增和回填群组,以推荐在2期环境中使用的药物A的剂量。

[0463] (F) 安全性

[0464] 根据研究者的判断,不良事件(AE)的出现有无因果关系。描述了所有不良事件的时间、总体毒性频率和严重性,按毒性等级1至5分类。根据CTCAE版本5.0对不良事件的严重性进行分级(参见例如[https://ctep\(dot\)cancer\(dot\)gov/protocoldevelopment/electronic\(underscore\)applications/docs/CTCAE\(underscore\)v5\(underscore\)Quick\(underscore\)Reference\(underscore\)5x7\(dot\)pdf](https://ctep(dot)cancer(dot)gov/protocoldevelopment/electronic(underscore)applications/docs/CTCAE(underscore)v5(underscore)Quick(underscore)Reference(underscore)5x7(dot)pdf)。对于观察到的频率较高或被视为严重不良事件(例如,海氏定律(Hy's Law)案例)的AE,还提供了其他总结。

[0465] 在研究期间,持续审查和总结不良事件、心电图(ECG)、血压(BP)、脉率、心脏监测和安全性实验室数据,以评估受试者的安全性。安全性数据以表格和/或图表的形式呈现,并在适当的情况下进行描述性总结。

[0466] 本研究使用由研究者和发起人代表组成的试验SRC,对AE进行持续监测。定期评估在研究期间发生并被认为与研究药物相关的AE、严重不良事件(SAE)和安全性实验室值,以确定继续给药是否会危及未来受试者的安全性。

[0467] (G) 剂量限制毒性(DLT)

[0468] 剂量限制性毒性(DLT) - 评估期为治疗的前28天(即第1周期)。所有符合以下定义的第1周期AE均被视为DLT,除非明显且无疑地与药物A无关。

[0469] • 血液学:

[0470] • 持续>7天的4级中性粒细胞减少症。

[0471] • 发热性中性粒细胞减少症(定义为中性粒细胞减少症 $\geq$ 3级,并且单一体温 $>38.3^{\circ}\text{C}$ 或持续温度 $\geq 38^{\circ}\text{C}$ 超过一小时)。

[0472] •  $\geq$ 3级中性粒细胞减少症伴有感染。

[0473] • 与临床显著出血相关的3级血小板减少症。

[0474] • 4级血小板减少症。

[0475] • 符合海氏定律标准的案例

[0476] •  $\geq$ 3级的非血液学毒性,但以下情况除外:

[0477] • 3级恶心、呕吐或腹泻,在下次输注前消退至 $\leq$ 1级(3级恶心、呕吐或腹泻,持续 $>72$ 小时,伴有足够止吐,并且其他支持性护理应视为DLT)。

[0478] • 3级疲劳,7天内消退至 $\leq$ 2级。

[0479] •  $\geq$ 3级的实验室异常,在24小时内消退至 $\leq$ 1级,或研究者认为无临床意义。

[0480] • 3级输注反应,如果管理成功,并在72小时内消退(3级输注反应尽管术前用药仍复发或发生,应视为DLT)。

[0481] • 由于可归因于药物A的持续毒性,延迟超过2周接受预定的第2周期第1天药物A剂量。

[0482] 此外,临床上重要的或持续的2级毒性可被视为DLT。

[0483] (H) 功效

[0484] 在本研究中,初步抗肿瘤活性是次要目的。如果数据允许,在全分析集(FAS)群体和可评估群体中分析总缓解率(ORR)、最佳总缓解(BOR)、疾病控制率(DCR)、缓解持续时间(DOR)、肿瘤进展时间(TTP)、无进展存活期(PFS)和总体存活期(OS)。

[0485] 肿瘤评估包括所有已知或疑似的疾病部位。计算机断层扫描(CT)是优选的成像方式,但也使用磁共振成像(MRI)。成像包括胸部、腹部和骨盆(头部和颈部是任选的)。对于已知或疑似有脑转移的受试者,应进行脑CT或MRI扫描。在以下肿瘤评估中,采用与在基线时用于表征每个已鉴别和报告的病变相同的成像技术。

[0486] 通过在基线、治疗期间、疑似疾病进展时(例如,症状恶化)和停止治疗时进行的放射性肿瘤评估来评估抗肿瘤活性。根据研究者的评估,使用RECIST版本1.1(参见例如Eisenhauer等人(2009)Eur J Cancer 45:228-247)对相关次要终点的响应进行评估。肿瘤大小的变化分类为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、病情稳定(SD)或疾病进展,后者包括新病变的出现。

[0487] (I) 肿瘤活检标记物

[0488] 在中央参考实验室进行活检组织的分析。分析包括粘连蛋白-4表达、PD-L1状态和额外免疫组织化学(IHC)评估,诸如CD47表达,以及浸润性免疫细胞诸如T细胞和肿瘤相关巨噬细胞(TAM)的频率和位置。如果活检材料足够,则进行额外多重免疫荧光测定以及肿瘤、免疫和检查点标记物的探索性分子测定。

[0489] (J) 药代动力学/药效动力学

[0490] 收集血液样品以提供用于PK分析的血清。尽一切努力在相对于给药的准确标称时间获得药代动力学样品。使用经过验证的方法测量药物A的药物浓度。使用标准非房室方法由相应浓度时间数据确定药代动力学(PK)参数。将样品收集时间用于参数计算。对于药物A,计算药代动力学参数,包括最大浓度( $C_{max}$ )、达到最大浓度的时间( $T_{max}$ )、从时间0到最后一次测量时间的浓度时间曲线下面积( $AUC_{1ast}$ )、从时间0到无穷大的AUC( $AUC_{inf}$ )和/或剂量间隔( $\tau$ )期间的血浆浓度-时间曲线下面积( $AUC_{\tau}$ )。适当时,计算其他PK参数,包括清除率(CL)、分布体积( $V_z$ )、终末消除半衰期( $t_{1/2}$ )和累积比( $R_{ac}$ )。药物A的药物浓度以图表形式总结,并按剂量、周期和标称PK采样时间进行描述性统计。按剂量和周期对非房室PK参数进行描述性总结。药效动力学数据以图表形式总结,并按时间和剂量进行描述性统计。使用适当的基于模型的方法进行PK/PD分析,以更好地了解暴露-响应关系,并且结果可单独报告。

[0491] 收集全血样品用于CD47靶占有率、循环白细胞免疫表型、外周血循环肿瘤DNA(ctDNA)和探索性分子分析。

[0492] 保留在基线访视时收集的血液样品以及在其他访视时收集的任何剩余血液,用于与药物响应相关的潜在药物基因组学分析。例如,可以检查SIRP $\alpha$ 基因多态性、假定的安全性生物标记物、药物代谢酶基因、药物转运蛋白基因或被认为与药物作用机制相关的基因。

[0493] (K) 评估用于输血前交叉配血测试的中和试剂

[0494] 因为红细胞(RBC)表达CD47,所以药物A除了以未结合形式存在于受试者的血清或

血浆中之外,还可以与患者的循环RBC结合。开始用药物A治疗后,由于抗人球蛋白(AHG)与药物A的Fc部分结合,包括间接抗球蛋白测试(IAT)和直接抗球蛋白测试(DAT)在内的抗体筛选可报告为假阳性,从而潜在地影响输血前交叉配血的解释。评估了用于中和这种干扰的潜在缓解方法。因此,在为RBC输血进行ABO Rh分型、抗体筛选和交叉配血时,可向各地血库提供研究用中和试剂,或将血液样品发送到指定的参考实验室以通过探索性中和测定进行测试。

[0495] 前述实施例仅出于说明目的提供,并不旨在以任何方式限制本发明的范围。除了在此示出和描述的那些以外,本发明的各种修改对于本领域技术人员来说从前面的描述中将变得显而易见,并且落入所附权利要求的范围内。

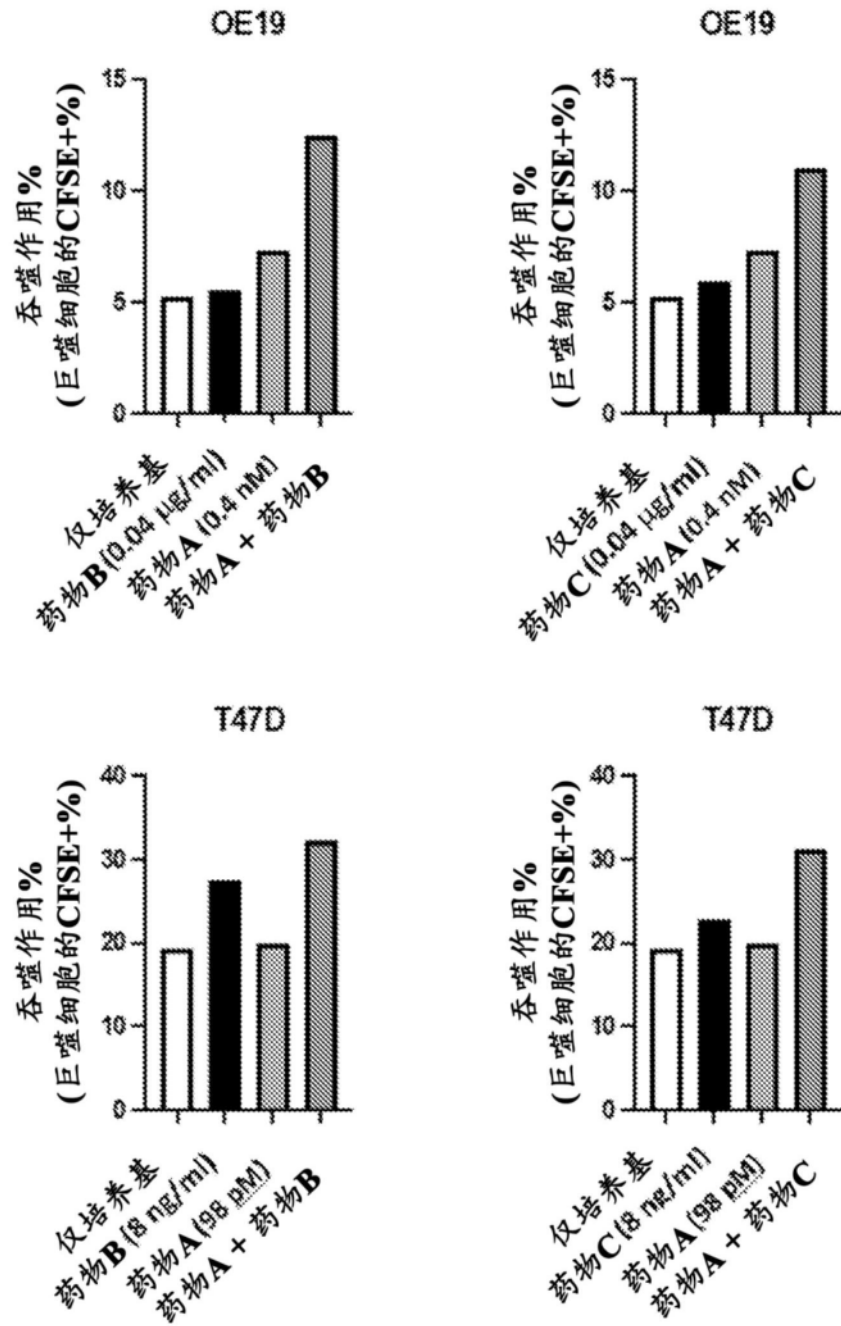


图1A

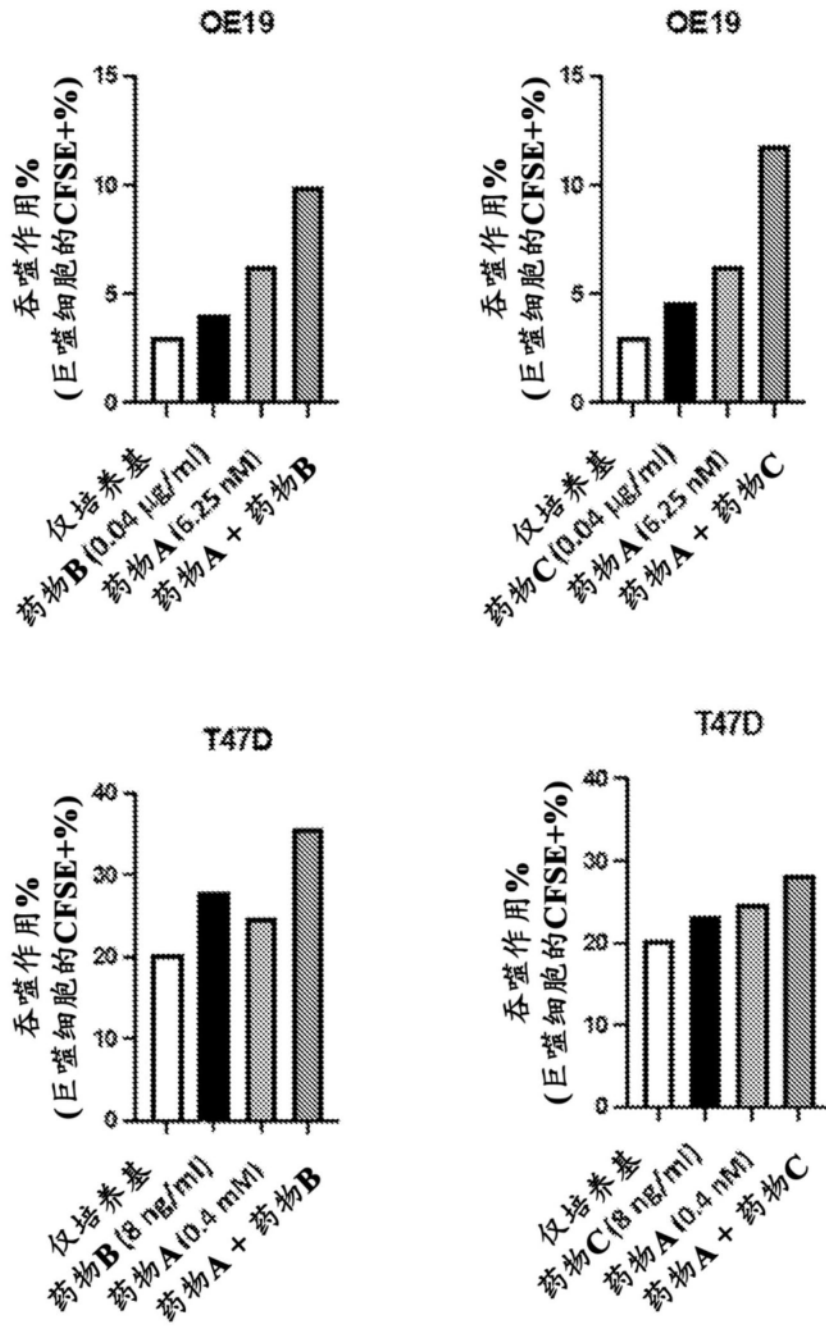


图1B

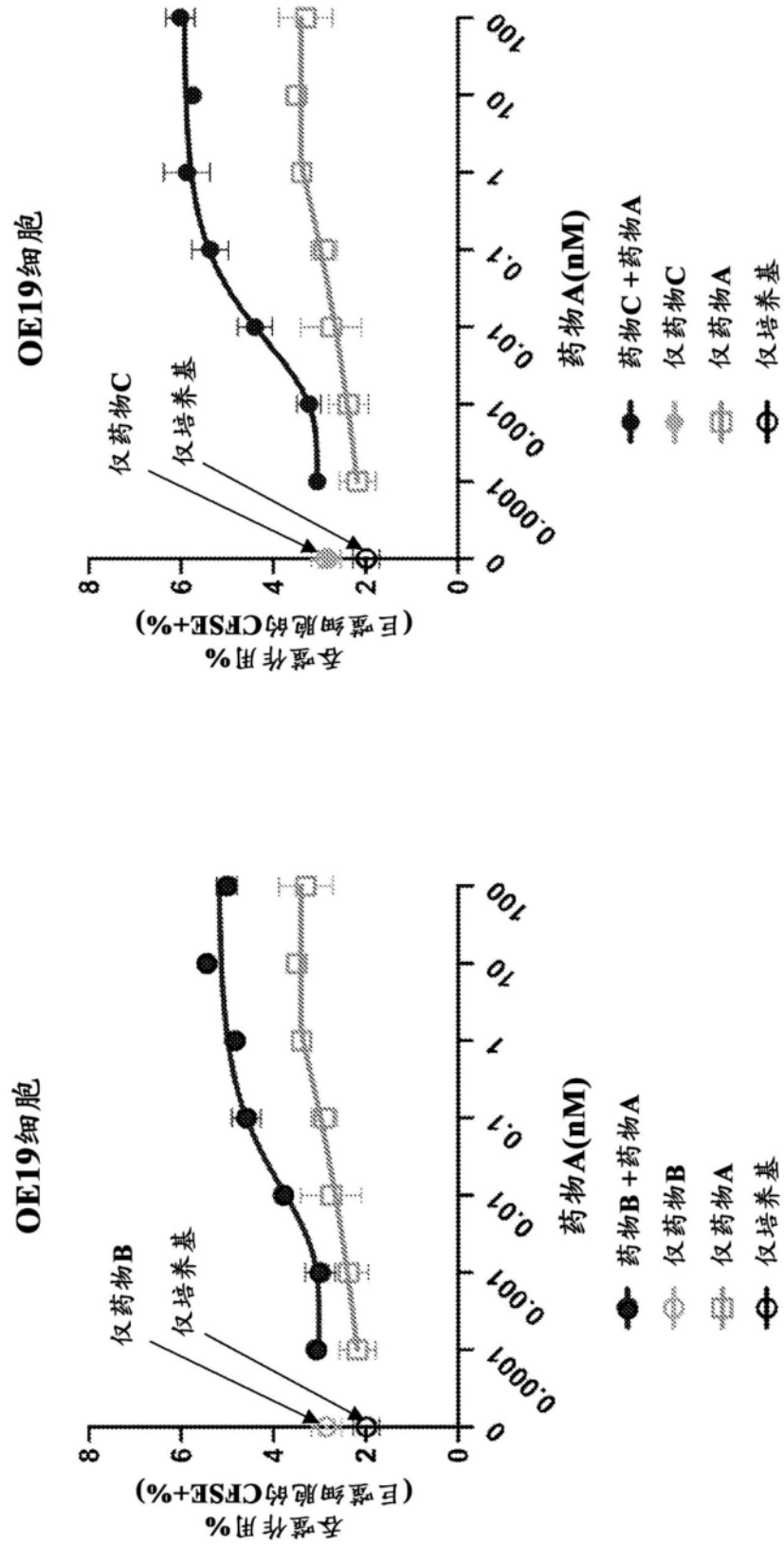


图2

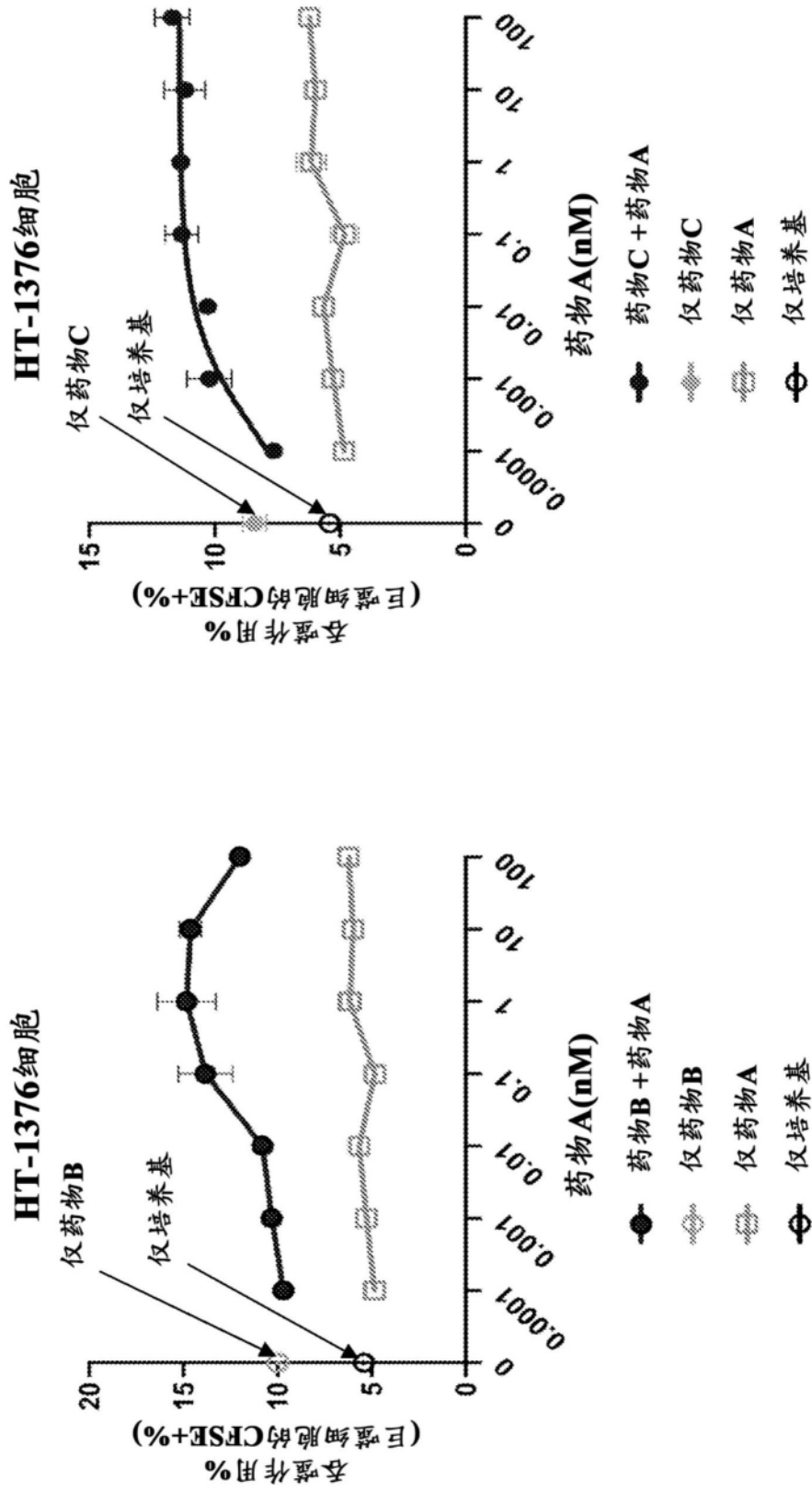


图3

**1a期: 剂量递增**

- BOIN设计; N=大约30 (每个剂量水平15名)
- 先前治疗的局部晚期或转移性尿路上皮癌

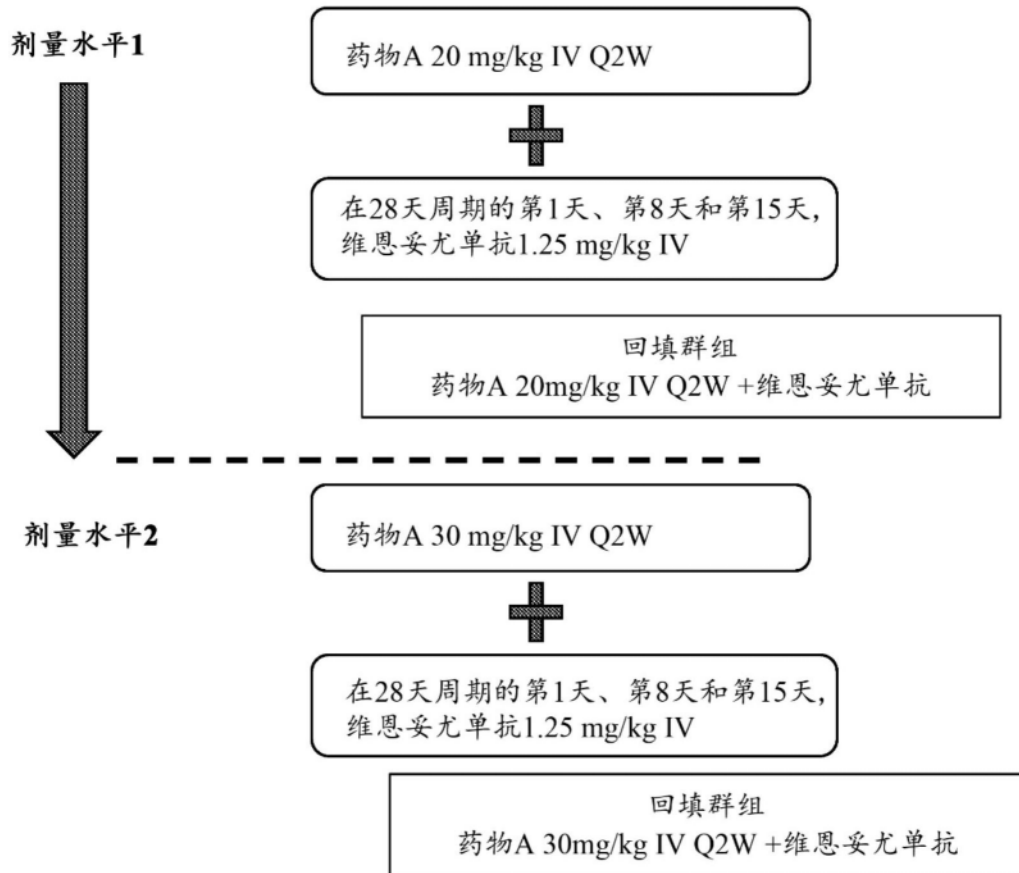


图4