



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119032108 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 26

(21) 申请号 202380034177.0

(22) 申请日 2023.04.20

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2022/088000 2022.04.20 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2023/089551 2023.04.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/202672 EN 2023.10.26

(71) 申请人 博奥信生物技术(南京)有限公司

地址 210061 江苏省南京市江北新区龙山路3-1号中丹园二期D座5层

(72) 发明人 陈明久 马志清 彭则羽 刘劲禹

(74) 专利代理机构 上海段和段律师事务所

31334

专利代理师 夏思秋

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

权利要求书2页 说明书40页

序列表(电子公布) 附图18页

(54) 发明名称

靶向SIRP α 的抗体及其用途

(57) 摘要

本申请提供一种与人SIRP α 特异性结合的分离的单克隆抗体、或其抗原结合部分。还提供编码该抗体或其抗原结合部分的核酸分子,用于表达该抗体或其抗原结合部分的表达载体、宿主细胞和方法。本申请还提供包含该抗体或其抗原结合部分的双特异性分子、免疫偶联物、嵌合抗原受体、溶瘤病毒和药物组合物,以及使用该SIRP α 抗体或其抗原结合部分的治疗方法。

1. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其与信号调节蛋白 α (SIRP α) 结合,包含:

(i) 重链可变区,其包含VH CDR1区、VH CDR2区和VH CDR3区,其中该VH CDR1区、VH CDR2区和VH CDR3区分别包含与(1)SEQ ID NOs:1、2($X_1=N, X_2=G; X_1=N, X_2=A; X_1=A, X_2=G$)和3;(2)SEQ ID NOs:9($X=Y$)、10($X_1=N, X_2=G; X_1=N, X_2=A; X_1=A, X_2=G$)和11;或(3)SEQ ID NOs:9($X=F$)、10($X_1=N, X_2=G$)和11具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;和/或

(ii) 轻链可变区,其包含VL CDR1区、VL CDR2区和VL CDR3区,其中该VL CDR1区、VL CDR2区和VL CDR3区分别包含与(1)SEQ ID NOs:4、5($X=N; X=A$)和6;或(2)SEQ ID NOs:12、13和14具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

2. 如权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,包含重链可变区和轻链可变区,其中该VH CDR1区、VH CDR2区、VH CDR3区、VL CDR1区、VL CDR2区和VL CDR3区分别包含与(1)SEQ ID NOs:1、2($X_1=N, X_2=G$)、3、4、5($X=N$)和6;(2)SEQ ID NOs:1、2($X_1=N, X_2=A$;或 $X_1=A, X_2=G$)、3、4、5($X=A$)和6;(3)SEQ ID NOs:9($X=Y$)、10($X_1=N, X_2=G; X_1=N, X_2=A; X_1=A, X_2=G$)、11、12、13和14;或(4)SEQ ID NOs:9($X=F$)、10($X_1=N, X_2=G$)、11、12、13和14具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中该重链可变区包含与SEQ ID NOs:7($X_1=N, X_2=G; X_1=N, X_2=A; X_1=A, X_2=G$)、15($X_1=N, X_2=G; X_1=N, X_2=A; X_1=A, X_2=G$)或17具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

4. 如权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中该轻链可变区包含与SEQ ID NOs:8($X=N; X=A$)、16($X=N; X=S$)或18具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

5. 如权利要求2所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中该重链可变区和该轻链可变区分别包含与(1)SEQ ID NOs:7($X_1=N, X_2=G$)和8($X=N$);(2)SEQ ID NOs:7($X_1=N, X_2=A$)和8($X=A$);(3)SEQ ID NOs:7($X_1=A$ 、

$X_2=G$)和8($X=A$);(4)SEQ ID NOs:15($X_1=N, X_2=G$)和16($X=N$);(5)

SEQ ID NOs:15($X_1=N, X_2=A$)和16($X=S$);(6)SEQ ID NOs:15($X_1=A, X_2=G$)和16($X=S$);或(7)SEQ ID NOs:17和18具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

6. 如权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其为IgG1、IgG2或IgG4同种型。

7. 如权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含重链恒定区和轻链恒定区,其中该重链恒定区包含SEQ ID NO:19或38($X_1=M, X_2=S, X_3=T; X_1=Y, X_2=T, X_3=E$)所示的氨基酸序列且与该重链可变区相连,其中该轻链恒定区包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列且与该轻链可变区相连。

8. 如权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其(a)结合人SIRP α ; (b)

结合猴SIRP α ; (c) 不结合小鼠SIRP α ; (d) 结合人SIRP β ; (e) 不结合人SIRP γ ; (f) 阻断SIRP α 与CD47结合; (g) 能被表达SIRP α 的细胞内化; (h) 诱导巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬; 和/或 (i) 具有体内抗肿瘤活性。

9. 如权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其为嵌合、或人源化抗体。

10. 一种核酸分子, 其编码权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分。

11. 一种表达载体, 其包含权利要求10所述的核酸分子。

12. 一种宿主细胞, 其包含权利要求11所述的表达载体、或在其基因组中整合有核酸分子。

13. 一种药物组合物, 其包含权利要求1至9中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分、权利要求10所述的核酸分子、权利要求11所述的表达载体、或权利要求12所述的宿主细胞, 以及药学上可接受的载体。

14. 一种在有需求的受试者中治疗与SIRP α 相关的癌症的方法, 包括向该受试者施用治疗有效量的权利要求13所述的药物组合物。

15. 如权利要求14所述的方法, 其中癌症是实体癌或血液癌。

16. 如权利要求15所述的方法, 其中癌症是非小细胞肺癌、乳癌、卵巢癌、肾细胞癌、结肠直肠癌或胰腺癌。

17. 如权利要求14所述的方法, 其中还向该受试者施用靶向肿瘤相关抗原的抗体。

18. 如权利要求17所述的方法, 其中该肿瘤相关抗原选自CD19、CD20、CD22、CD4、CD24、CD38、CD123、CD228、CD138、BCMA、GPC3、CEA、叶酸受体 (FR α)、间皮素、CD276、gp100、5T4、GD2、EGFR、MUC-1、PSMA、EpCAM、MCSP、SM5-1、MICA、MICB、ULBP和HER-2。

19. 如权利要求14所述的方法, 其中还向受试者施用靶向抑制性免疫检查点的抗体。

20. 一种在有需求的受试者中增强免疫反应的方法, 包括向该受试者施用权利要求13所述的药物组合物。

靶向SIRP α 的抗体及其用途

[0001] 本申请要求2022年4月20日提交的国际专利申请PCT/CN2022/088000的优先权。

发明领域

[0002] 本申请大体上涉及分离的单克隆抗体,特别是嵌合或全人源单克隆抗体,或其抗原结合部分,其与SIRP α 结合,具有高亲和力和功能性。还提供编码该抗体或其抗原结合部分的核酸分子,用于表达该抗体或其抗原结合部分的表达载体、宿主细胞和方法。本申请还提供可以包含该抗体或其抗原结合部分的双特异性分子、免疫偶联物、嵌合抗原受体、溶瘤病毒和药物组合物,以及使用本申请SIRP α 抗体或其抗原结合部分的治疗方法。

背景技术

[0003] 免疫检查点是免疫系统的调节器,其中免疫细胞必须通过刺激性和/或抑制性免疫检查点,才能继续进行激活或失能。抑制性的免疫检查点对自身耐受特别重要,可阻止免疫系统攻击正常细胞。它们经常被例如肿瘤细胞操纵,以逃避免疫监视。在过去的几十年中,抑制性免疫检查点阻断已在例如癌症免疫疗法中广泛研究,PD-1和/或CTLA-4的抑制剂已临床批准用于治疗多种癌症。

[0004] 信号调节蛋白 α (SIRP- α ,也称为SIRP α)是先天免疫细胞的抑制性免疫检查点,主要表达在骨髓细胞,包括巨噬细胞、树突状细胞和中性粒细胞。其在细胞质结构区含有免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)。CD47(在几乎所有细胞类型上表达的膜蛋白)与SIRP α 一经结合,ITIM变得磷酸化并募集抑制性分子例如SHP-1和SHP-2,对细胞激活发挥抑制作用(Veillette A,Chen J. (2018) Trends Immunol.39(3):173-184)。很多肿瘤细胞过表达CD47分子,抑制免疫细胞的吞噬作用。

[0005] 到目前为止,已发现10个人SIRP α 等位基因,人SIRP α 亚型1(或V1)、亚型2(或V2)和亚型8(或V8)占人中表达的80%。

[0006] SIRP α 具有两个接近的SIRP家族成员,表达于巨噬细胞和中性粒细胞的SIRP β ,和表达于淋巴细胞和自然杀伤细胞的SIRP γ 。SIRP β 不结合CD47,但是一种刺激性受体,而SIRP γ 以低亲和力结合CD47,但是一种非信号转导受体(Barclay,A.N.and Brown,M.H. (2006) Nat. Rev. Immunol.6(6):457-464;Takahashi S. (2018) Biomedical Reports.9(1):3-7)。

[0007] 临床前研究显示,破坏SIRP α -CD47相互作用,可例如借助于癌细胞上的促吞噬受体如SLAMF7和Mac-1,促进巨噬细胞对癌细胞的吞噬吸收(Chen,J.et al. (2017) 544:493-497)。吞噬过程中产生的来自癌细胞的抗原肽,可随后启动适应性免疫反应。目前处于临床试验的大多数SIRP α -CD47阻断药物,靶向CD47分子,并且能够诱导FcR介导的吞噬作用,例如重组SIRP α -Fc融合蛋白,或IgG1 CD47抗体。这些药物也可能损害正常的表达CD47的造血细胞和非造血细胞,造成贫血、血小板减少和/或白细胞减少,正如在非人模型中观察到的(Veillette A,Chen J. (2018) 同上)。因此,使用针对SIRP α 的阻断型抗体,存在一些好处,SIRP α 的组织学分布更加受限,造成的毒性有限。甚至还发现,SIRP α 在某些实体瘤包括肾细

胞瘤和黑色素瘤中异常表达, SIRP α 抗体可以直接对这些肿瘤细胞启动FcR介导的吞噬作用(Yanagita, T. et al. (2017) JCI Insight 2(1):e89140)。

[0008] 据报道, KWAR23, 一种经位于CD47-SIRP α 界面上的表位结合SIRP α 的SIRP α 抗体, 在体外单独使用或与西妥昔单抗(Cetuximab)联合使用时, 以浓度依赖的方式, 增强巨噬细胞介导的对结直肠腺癌细胞的吞噬作用。BI 765063 (Boehringer Ingelheim/OSE), 一种选择性抑制SIRP α 并恢复肿瘤相关巨噬细胞以及树突状细胞对肿瘤细胞应答的活性的SIRP α 抗体, 目前正作为单药或与PD-1拮抗剂联合, 在1期临床试验中, 在晚期实体瘤患者中进行测试。CC-95251 (Celgene) 也单独或联合西妥昔单抗或利妥昔单抗(Rituximab), 处于治疗晚期实体瘤和血液瘤的1期临床试验中(Uger R, Johnson L. (2020) Expert Opin Biol Ther. 20(1):5-8; Zhang W et al. (2020) Front Immunol. 11:18)。

[0009] 研究表明, 针对SIRP α 的阻断型抗体可影响SIRP家族其他成员的功能, 人类SIRP α 的多态性可能使抗体在某些受试者中疗效较低(Yanagita, T. et al. (2017) 同上; Barclay, A.N. and Van den Berg, T.K. (2014) Annu. Rev. Immunol. 32:25-50)。因此, 总是需要更多具有所需特性的单克隆抗体。

[0010] 本申请中对于任何文件的引用或标识, 并不是承认这些文件是本发明的现有技术。

发明内容

[0011] 本申请的发明人发现了拮抗型的SIRP α 抗体或其抗原结合部分, 其(a)特异性结合SIRP α (例如, 人和猴SIRP α , 包括亚型1 (V1)、亚型2 (V2) 和亚型8 (V8)), 与现有技术SIRP α 抗体例如KWAR23和BI-765063相比, 具有相当的(如果不是更高的话)结合亲和力/活性; (b)与SIRP β 交叉反应, 与现有技术SIRP α 抗体例如KWAR23和BI-765063相比, 具有相当的(如果不是更高的话)结合亲和力/活性; (c)不结合SIRP γ ; (d)不结合小鼠SIRP α ; (e)阻断SIRP α 结合CD47, 与现有技术抗体相比, 具有相当的(如果不是更高的话)阻断活性; (f)能被表达SIRP α 的细胞内化; (g)诱导巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬, 与现有技术SIRP α 抗体例如KWAR23和BI-765063相比, 具有相当的(如果不是更高的话)活性; 和/或(h)显示出体内抗肿瘤活性。

[0012] 本申请的抗体或其抗原结合部分可以用于多种应用, 包括体外对人或猴SIRP α 蛋白的检测以及癌症(包括实体瘤和血液瘤)的治疗。

[0013] 因此, 一方面, 本申请涉及结合SIRP α 的分离的单克隆抗体(例如, 嵌合或全人源抗体)或其抗原结合部分, 其包含(i)重链可变区, 其可以包含VH CDR1区、VH CDR2区和VH CDR3区, 其中该VH CDR1区、VH CDR2区和VH CDR3区可以分别包含与(1)SEQ ID NOs: 1、2 (X1=N、X2=G; X1=N、X2=A; X1=A、X2=G)和3; (2)SEQ ID NOs: 9 (X=Y)、10 (X1=N、X2=G; X1=N、X2=A; X1=A、X2=G)和11; 或(3)SEQ ID NOs: 9 (X=F)、10 (X1=N、X2=G)和11具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列; 和/或(ii)轻链可变区, 其可以包含VL CDR1区、VL CDR2区和VL CDR3区, 其中该VL CDR1区、VL CDR2区和VL CDR3区可以分别包含与(1)SEQ ID NOs: 4、5 (X=N; X=A)和6; 或(2)SEQ ID NOs: 12、13和14具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0014] 本申请的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分可以包含具有VH CDR1区、VH CDR2区和VH CDR3区的重链可变区,和具有VL CDR1区、VL CDR2区和VL CDR3区的轻链可变区,其中VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3可以分别包含与(1) SEQ ID NOs:1、2 (X1=N、X2=G)、3、4、5 (X=N) 和6; (2) SEQ ID NOs:1、2 (X1=N、X2=A;或X1=A、X2=G)、3、4、5 (X=A) 和6; (3) SEQ ID NOs:9 (X=Y)、10 (X1=N、X2=G;X1=N、X2=A;X1=A、X2=G)、11、12、13和14;或(4) SEQ ID NOs:9 (X=F)、10 (X1=N、X2=G)、11、12、13和14具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0015] 本申请的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分可以包含重链可变区,其可以包含与SEQ ID NOs:7 (X1=N、X2=G;X1=N、X2=A;X1=A、X2=G)、15 (X1=N、X2=G;X1=N、X2=A;X1=A、X2=G) 或17具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0016] 本申请的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分可以包含轻链可变区,其可以包含与SEQ ID NOs:8 (X=N;X=A)、16 (X=N;X=S) 或18具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0017] 本申请的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分可以包含重链可变区和轻链可变区,重链可变区和轻链可变区可以分别包含与(1) SEQ ID NOs:7 (X1=N、X2=G) 和8 (X=N); (2) SEQ ID NOs:7 (X1=N、X2=A) 和8 (X=A); (3) SEQ ID NOs:7 (X1=A、X2=G) 和8 (X=A); (4) SEQ ID NOs:15 (X1=N、X2=G) 和16 (X=N); (5) SEQ ID NOs:15 (X1=N、X2=A) 和16 (X=S); (6) SEQ ID NOs:15 (X1=A、X2=G) 和16 (X=S);或(7) SEQ ID NOs:17和18具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0018] 本申请的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分可以包含通过二硫键连接的重链和轻链,该重链可以包含重链可变区和重链恒定区,该轻链可以包含轻链可变区和轻链恒定区,其中重链可变区的C端与重链恒定区的N端相连,轻链可变区的C端与轻链恒定区的N端相连,其中重链可变区和轻链可变区可以包含上述的氨基酸序列,该抗体或其抗原结合部分与SIRP α 结合。

[0019] 重链恒定区可以是具有FcR结合亲和力的重链恒定区,例如基因改造的人IgG4恒定区,或人IgG1恒定区。重链恒定区可以改造为具有增强的FcR结合亲和力和/或增强的抗体结构稳定性。在一些实施方式中,重链恒定区可以是具有例如SEQ ID NO:19所示氨基酸序列的人IgG4恒定区,或其功能片段。在一些实施方式中,重链恒定区可以是具有例如SEQ ID NO:38 (X1=M、X2=S、X3=T;X1=Y、X2=T、X3=E) 所示氨基酸序列的人IgG1恒定区。重链恒定区也可以是具有弱或无FcR结合亲和力的重链恒定区,例如IgG4恒定区,或改造的IgG1恒定区。轻链恒定区可以是具有例如SEQ ID NO.:20所示氨基酸序列的人 κ 恒定区。

[0020] 在一些实施方式中,本申请的抗体可以包含两条重链和两条轻链,或者由两条重链和两条轻链组成,其中各重链可以包含上述重链恒定区、重链可变区或CDR序列,各轻链可以包含上述轻链恒定区、轻链可变区或CDR序列,其中抗体与SIRP α 结合。在其他实施方式中,本申请的抗体或其抗原结合部分可以是单链可变片段(scFv)抗体、或抗体片段例如Fab或F(ab')₂片段。

[0021] 本申请还提供双特异性分子,其可以包含本申请抗体或其抗原结合部分,连接于具有不同于该抗体或其抗原结合部分的结合特异性的第二功能基团(例如,第二抗体),例如靶向肿瘤相关抗原(例如CD19、CD20、CD22、CD4、CD24、CD38、CD123、CD228、CD138、BCMA、GPC3、CEA、叶酸受体(FR α)、间皮素、CD276、gp100、5T4、GD2、EGFR、MUC-1、PSMA、EpCAM、MCSP、SM5-1、MICA、MICB、ULBP和HER-2)的第二功能片段。本申请还提供免疫偶联物,例如抗体-药物偶联物,其可以包含本申请的抗体或其抗原结合部分,连接于治疗剂例如细胞毒素,例如,名为DT3C且具有SEQ ID NO:36氨基酸序列的重组蛋白。在另一方面,本申请的抗体或其抗原结合部分可以作为嵌合抗原受体(CAR)的一部分。还提供可以包含该抗原嵌合受体的免疫细胞,其例如T细胞和NK细胞。本申请的抗体或其抗原结合部分也可以由溶瘤病毒编码或与溶瘤病毒一起使用。

[0022] 本申请还提供编码本申请抗体或其抗原结合部分的核酸分子,以及可包含该核酸分子的表达载体、和可包含该表达载体或在其基因组中整合有将核酸分子的宿主细胞。还提供采用该宿主细胞制备本申请的SIRP α 抗体或其抗原结合部分的方法,其可以包括(i)在该宿主细胞中表达抗体、以及(ii)从该宿主细胞或其细胞培养物中分离抗体的步骤。

[0023] 还提供一种组合物,例如药物组合物,其可以包含本申请的抗体或其抗原结合部分、或免疫偶联物、双特异性分子、含CAR的免疫细胞、溶瘤病毒、核酸分子、表达载体或宿主细胞,以及可选地药学上可接受的载体。在一些实施方式中,药物组合物还可以包含用于治疗癌症的治疗剂,例如抗癌剂。在一些实施方式中,组合物还包含Claudin18.2抗体或CD20抗体。

[0024] 在另一方面,本申请提供一种在有需求的受试者中治疗癌症的方法,其可以包括向受试者施用治疗有效量的本申请组合物。癌症可以是实体癌或血液癌,包括,但不限于,非小细胞肺癌、乳癌、卵巢癌、肾细胞癌、结直肠癌和胰腺癌。组合物可以包含本申请的抗体或其抗原结合部分、双特异性分子、免疫偶联物、带CAR的免疫细胞、溶瘤病毒、核酸分子、表达载体或宿主细胞。如果组合物包含具有强FcR结合亲和力的抗体或其抗原结合部分、免疫偶联物、含CAR的免疫细胞、或溶瘤病毒,优选将组合物局部递送至肿瘤部位。在一些实施方式中,还可以施用至少一种其他的抗癌抗体,例如靶向肿瘤相关抗原例如CD19、CD20、CD22、CD4、CD24、CD38、CD123、CD228、CD138、BCMA、GPC3、CEA、叶酸受体(FR α)、间皮素、CD276、gp100、5T4、GD2、EGFR、MUC-1、PSMA、EpCAM、MCSP、SM5-1、MICA、MICB、ULBP和HER-2的抗体,或靶向抑制性免疫检查点例如LAG-3、PD-1、VISTA或CTLA-4的抗体。在另一实施方式中,本申请的抗体或其抗原结合部分与细胞因子(例如IL-2和/或IL-21)或共刺激抗体(例如,CD137和/或GITR抗体)一起施用。在另一实施方式中,本申请的抗体或其抗原结合部分与化疗剂一起施用,其可以是细胞毒性剂,例如,表阿霉素、奥沙利铂和/或5-氟尿嘧啶(5-FU)。在一些实施方式中,本申请的抗体或其抗原结合部分可以与Claudin18.2抗体或CD20抗体一起施用。本申请的抗体或其抗原结合部分可以是例如嵌合的或全人源的。在一些实施方式中,受试者是人。

[0025] 在另一方面,本申请提供一种在有需求的受试者中调节或增强免疫应答的方法,包括向受试者施用本申请的组合物,从而受试者的免疫应答得到调节/增强。组合物包含本申请的具有弱FcR结合重链恒定区的抗体或其抗原结合部分、双特异性分子、核酸分子或表达载体。本申请的抗体或其抗原结合部分可以是例如嵌合的或全人源的。在一些实施方式

中,受试者是人。

[0026] 基于以下具体描述和实施例,当前公开内容的其他特征和优势之处将会是明晰的,具体描述和实施例不应解读为限制性的。在本申请中引用的所有文献、Genbank条目、专利和已公开专利申请的内容通过引用的方式明确地并入本文。

[0027] 因而,本申请的目标是不在本申请中包含任何先前已知的产品、制造该产品的工艺或使用该产品的方法,从而申请人保留权利,并在此公开对任何先前已知的产品、过程或方法的弃权声明。需要进一步指出的是,本申请并不打算在本申请的范围内包含任何不符合USPTO (35U.S.C. §112, 第一段) 或EPO (EPC, 第83条) 书面描述要件和可实施性要求的产品、工艺、或产品制造方法或产品使用方法,从而申请人保留权利,并在此公开对任何先前描述的产品、产品制备工艺、或产品使用方法的弃权声明。在本发明的实施中,符合EPC第53条(c)和EPC细则第28条(b)和(c)是有利的。明确保留对本申请同族或任何其他同族或任何第三方在先申请中涉及本申请人任何已授权专利的主题的任何实施方式做出明确的弃权声明的所有权利。本文中的任何内容都不应被解释为承诺。

[0028] 应当注意的是,在本申请中,特别是在权利要求和/或段落中,术语例如“包含”、“包括”等可以具有美国专利法所赋予的意义;例如它们可以表示“包含在内”等;且术语例如“基本由…组成”或“基本由…构成”具有美国专利法所赋予的意义,例如它们允许没有明确表述的元素的存在,但将现有技术中存在的元素、或影响本发明基本或新特性的元素排除在外。

附图说明

[0029] 以下以示例方式给出但不意在将本发明限制于所述具体实施方式的具体描述,可以结合附图更好地理解。

[0030] 图1示出抗体E1D5E1F1、E1F1B1C3和E1H10B7C7在捕获ELISA中与人SIRP α 的结合力。

[0031] 图2示出抗体E1D5E1F1、E1F1B1C3和E1H10B7C7在间接ELISA中与猴SIRP α 的结合力。

[0032] 图3示出抗体E1D5E1F1、E1F1B1C3和E1H10B7C7在间接ELISA中与人SIRP α -亚型2的结合力。

[0033] 图4示出抗体E1D5E1F1、E1F1B1C3和E1H10B7C7在基于细胞的FACS结合检测中与表达人SIRP α 的HEK293细胞的结合力。

[0034] 图5示出抗体E1D5E1F1、E1F1B1C3和E1H10B7C7在基于细胞的FACS结合检测中与表达人SIRP β 的HEK293细胞的结合力。

[0035] 图6示出抗体E1D5E1F1、E1F1B1C3和E1H10B7C7在基于细胞的FACS结合检测中与表达人SIRP γ 的Jurkat细胞的结合力。

[0036] 图7示出抗体E1D5E1F1、E1F1B1C3和E1H10B7C7在基于细胞的FACS阻断检测中阻断人CD47与细胞表面SIRP α 结合的能力。

[0037] 图8示出抗体E1D5E1F1、E1F1B1C3和E1H10B7C7在竞争ELISA检测中阻断人SIRP α -CD47结合的能力。

[0038] 图9示出E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1H10B7-CDRV1-IgG1在间接ELISA中与猴

SIRP α 的结合力。

[0039] 图10示出抗体E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1在间接ELISA中与猴SIRP α 的结合力。

[0040] 图11示出抗体E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1H10B7-CDRV1-IgG1在间接ELISA中与小鼠SIRP α 的结合力。

[0041] 图12示出抗体E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1在间接ELISA中与小鼠SIRP α 的结合力。

[0042] 图13示出抗体E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1H10B7-CDRV1-IgG1在间接ELISA中与人SIRP α -V8的结合力。

[0043] 图14示出抗体E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1在间接ELISA中与人SIRP α -V8的结合力。

[0044] 图15示出抗体E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1H10B7-CDRV1-IgG1在间接ELISA中与人SIRP α -亚型2的结合力。

[0045] 图16示出抗体E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1在间接ELISA中与人SIRP α -亚型2的结合力。

[0046] 图17示出抗体E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1H10B7-CDRV1-IgG在基于细胞的FACS结合检测中与表达人SIRP α 的293F细胞的结合力。

[0047] 图18示出抗体E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1在基于细胞的FACS结合检测中与表达人SIRP α 的293F细胞的结合力。

[0048] 图19示出抗体E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1H10B7-CDRV1-IgG在基于细胞的FACS结合检测中与表达人SIRP β 的293F细胞的结合力。

[0049] 图20示出抗体E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1在基于细胞的FACS结合检测中与表达人SIRP β 的293F细胞的结合力。

[0050] 图21示出抗体E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1H10B7-CDRV1-IgG在基于细胞的FACS结合检测中与表达人SIRP γ 的Jurkat细胞的结合力。

[0051] 图22示出抗体E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1在基于细胞的FACS结合检测中与表达人SIRP γ 的Jurkat细胞的结合力。

[0052] 图23示出抗体E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1H10B7-CDRV1-IgG在基于细胞的FACS阻断检测中阻断人CD47与细胞表面SIRP α 结合的能力。

[0053] 图24示出抗体E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1在基于细胞的FACS阻断检测中阻断人CD47与细胞表面SIRP α 结合的能力。

[0054] 图25示出抗体E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1H10B7-CDRV1-IgG在基于细胞的FACS阻断检测中阻断人SIRP α 与细胞表面CD47结合的能力。

[0055] 图26示出抗体E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1在基于细胞的FACS阻断检测中阻断人SIRP α 与细胞表面CD47结合的能力。

[0056] 图27示出抗体E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 诱导巨噬细胞介导的Raji细胞吞噬的能力。

[0057] 图28示出抗体E1H10B7-CDRV1-IgG1和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1对THP1细胞中SIRP α 磷酸化的作用。

[0058] 图29示出抗体E1H10B7-CDRV1-IgG1、E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE)、E1F1B1C3-CDRV1-IgG1和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 对THP1细胞中CD47介导的SIRP α 磷酸化的作用。

[0059] 图30示出表达SIRP α 的细胞对抗体E1H10B7-CDRV1-IgG1、E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE)、E1F1B1C3-CDRV1-IgG1和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 的内化。

[0060] 图31示出注射B-luc-GFP-Raji淋巴瘤细胞并用本申请抗体处理的B-NDG hSIRPA小鼠的体重。

[0061] 图32示出注射B-luc-GFP-Raji淋巴瘤细胞并用本申请抗体处理的B-NDG hSIRPA小鼠的肿瘤信号强度。

[0062] 图33示出注射B-luc-GFP-Raji淋巴瘤细胞并用不同剂量本申请抗体处理的B-NDG hSIRPA小鼠的肿瘤信号强度。

[0063] 图34示出注射小鼠结肠癌细胞并用本申请抗体处理的C57BL/6-hSIRPA (2) /hCD47小鼠的肿瘤大小。

具体实施方式

[0064] 为确保更容易地理解本申请,首先定义一些术语。其他的定义贯穿具体描述而给出。

[0065] 术语“SIRP α ”是指信号调节蛋白 α ,又称为CD172a或含Src同源2结构域的磷酸酶底物-1。术语“SIRP α ”可以包含变体、异构体、同源物、直系同源体和旁系同源体。例如,对人SIRP α 蛋白特异的抗体,在某些情况下,可以与除人以外物种例如猴的SIRP α 蛋白交叉反应。在其他实施方式中,对人SIRP α 蛋白特异的抗体可以完全地对人SIRP α 蛋白特异,并呈现为与其他物种或其他类型没有交叉反应性,或者可以与某些其他物种但非所有其他物种的SIRP α 交叉反应。

[0066] 术语“人SIRP α ”是指具有来自人的氨基酸序列的SIRP α 蛋白,例如具有NCBI登录号NP_001035111.1的人SIRP α 氨基酸序列 (Burgess TL et al., (2020), PLoS ONE 15 (4) : e0226661)。术语“猴SIRP α ”或“食蟹猴SIRP α ”是指具有来自猴的氨基酸序列的SIRP α 蛋白,例如具有NCBI登录号NP_001271679.1的氨基酸序列 (Wang HY et al., (2007), PLoS Biol. 5 (2) : e13)。术语“小鼠SIRP α ”是指具有来自小鼠的氨基酸序列的SIRP α 蛋白,例如具有GenBank登录号AAH62197.1的小鼠SIRP α 氨基酸序列 (Strausberg, R.L. et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26) : 16899-16903)。

[0067] 本文所用的术语“抗体”是指通过至少一个抗原结合位点而识别和特异性结合靶标 (例如, SIRP α) 的免疫球蛋白分子,其中抗原结合位点通常位于免疫球蛋白分子的可变区内。如本文所用的,术语包括完整的多克隆抗体、完整的单克隆抗体、单链Fv (scFv) 抗体、重链抗体 (HCAb)、轻链抗体 (LCAb)、多特异性抗体、双特异性抗体、单特异性抗体、单价抗体、包含抗体的抗原结合位点的融合蛋白、和任何其他修饰的包含抗原结合位点的免疫球蛋白分子 (例如,双可变结构域免疫球蛋白分子),只要抗体表现出所需的生物活性。抗体也包括,但不限于,小鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人源抗体。基于其分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链恒定结构域的特征,抗体可以是五类主要免疫球蛋白类IgA、IgD、IgE、IgG和IgM或其亚类 (同种型) (例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2) 中的任意种。不同种类的免疫球蛋白具有不同的众所周知的亚基结构和三维构象。抗体可以是裸露的或与其他分子偶

联,其他分子包括但不限于毒素和放射性同位素。除非另有明确说明,本文所用的术语“抗体”包括完整抗体的“抗原结合部分”。IgG是可以包含经二硫键而内部连接的两条重链(H)和两条轻链(L)的糖蛋白。各重链可以由重链可变区(缩写成VH)和重链恒定区组成。重链恒定区可以由CH1、CH2和CH3这三个结构域组成。各轻链可以由轻链可变区(本文中缩写成VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区可以由CL这一个结构域组成。VH和VL区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间穿插着更加保守的称为骨架区(FR)的区域。各VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基端到羧基端以FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4的顺序排布。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子,包括多种免疫系统细胞(例如,效应细胞)和传统补体系统的第一组分(C1q),的结合。

[0068] 本文所用的术语,抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”),是指抗体上保留有特异性结合抗原(例如,SIRP α 蛋白)能力的一个或多个片段。已显示出,抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段完成。包含在术语抗体的“抗原结合部分”中的结合片段的例子包括,(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域构成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,可包含由铰链区二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1结构域构成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域构成的Fv片段;(v) 由VH结构域构成的dAb片段(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546);(vi) 分离的互补决定区(CDR);以及(viii) 纳米抗体,包含单个可变结构域的重链可变区和两个恒定结构域。此外,尽管Fv片段的两个结构域,VL和VH,由不同的基因编码,它们可以通过重组的方法经合成接头而连接,其中合成的接头使得它们可以制备为单个蛋白链,其中VL和VH区配对形成单价分子。这样的单链抗体也意在包括在术语抗体的“抗原结合部分”中。这些抗体片段通过本领域技术人员已知的常用技术得到,且片段经与完整抗体相同的方式进行应用筛选。

[0069] 本文所用的“分离的抗体”意在指基本不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,分离的与SIRP α 蛋白特异性结合的抗体,基本不含特异结合SIRP α 蛋白之外抗原的抗体)。然而,特异性结合人SIRP α 蛋白的分离抗体可以与其他抗原,例如其他物种的SIRP α 蛋白,有交叉反应性。此外,分离的抗体可以基本不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0070] 本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本均质的抗体群中得到的抗体,即,除可能存在少量的可能的自然发生突变和/或翻译后修饰(例如异构化、酰胺化)外,含该群体的个体抗体是相同的。单克隆抗体为高度特异性,针对单一的抗原位点。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制品不同,各单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除其特异性外,单克隆抗体的优点是,它们由杂交瘤培养合成,未被其他免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表明该抗体从基本均质的抗体群中获得的特性,不应解释为需要用任何特定的方法生产该抗体。例如,根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,包括例如,杂交瘤方法。

[0071] 本文所用的术语“人抗体”或“全人抗体”意在包括骨架和CDR区得自人种系免疫球蛋白序列的可变区的抗体。此外,如果抗体包含恒定区,恒定区也得自人种系免疫球蛋白序列。本申请的人抗体可以包含不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机突变或点突变或通过体内体细胞突变而引入的突变)。然而,本文所用的术语“人抗体”不意在包括在人骨架序列中植入得自另一哺乳动物物种种系的CDR序列的抗体。

[0072] 术语“嵌合抗体”是指通过组合非人来源遗传物质与人遗传物质而制备的抗体。或者更笼统地说,嵌合抗体是含有某一物种的遗传物质以及另一物种遗传物质的抗体。

[0073] 术语“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别(如IgM或IgG1)。

[0074] 词组“识别抗原的抗体”以及“对抗原特异的抗体”在本文中术语“特异结合抗原的抗体”交替使用。

[0075] 如本文所用的,“特异结合人SIRP α ”的抗体是指与人SIRP α 蛋白(以及可能来自一种或多种非人物种的SIRP α 蛋白)结合但基本不与非SIRP α 蛋白结合的抗体。优选地,抗体以“高亲和力”,即以 K_D 值为 1.0×10^{-7} M以下,更优选 5.0×10^{-8} M以下,更优选 1.0×10^{-8} M以下,结合人SIRP α 蛋白。

[0076] 如本文所用的,术语“基本不结合”蛋白或细胞是指,不与蛋白或细胞结合,或者不以高亲和力与其结合,即以 K_D 为 1×10^{-6} M以上,更优选 1×10^{-5} M以上,更优选 1×10^{-4} M以上,更优选 1×10^{-3} M以上,甚至更优选 1×10^{-2} M以上,结合蛋白或细胞。

[0077] 术语“高亲和性”对于IgG抗体而言,是指抗体对于靶抗原的 K_D 为 1.0×10^{-7} M以下,更优选 5.0×10^{-8} M以下。然而,对于其他抗体同种型而言,“高亲和性”结合可能会变化。例如,IgM亚型的“高亲和性”结合是指抗体的 K_D 为 10^{-6} M以下,优选 10^{-7} M以下,甚至更优选 10^{-8} M以下。

[0078] 本文所用术语“ K_{assoc} ”或“ K_a ”是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率,而本文所用的术语“ K_{dis} ”或“ K_d ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。如本文所用,术语“ K_D ”是指从 K_d 与 K_a 的比值(即 K_d/K_a)获得的解离常数,表达为摩尔浓度(M)。可以使用本领域公知的方法确定抗体的 K_D 值。用于确定抗体 K_D 的优选方法是使用表面等离子体共振,优选使用生物传感器系统如BiacoreTM系统。

[0079] 术语“EC₅₀”,也称为半最大效应浓度,是指在特定暴露时间后引起在基线和最高值之间的中间值反应的抗体浓度。

[0080] 术语“IC₅₀”,也称为半最大抑制浓度,是指相对于不存在抗体而言,抑制50%特定生物或生化功能的抗体浓度。

[0081] 术语“拮抗的”是指本申请的抗体或其抗原结合部分能结合SIRP α ,阻断由CD47接合所启动的SIRP α 信号转导。

[0082] 术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳类和非哺乳类,例如非人灵长类、羊、狗、猫、牛、马、鸡、两栖类、和爬行类,尽管优选哺乳动物,例如非人灵长类、羊、狗、猫、牛和马。

[0083] 术语“治疗有效量”是指足以防止或减缓与疾病或病症(例如慢性炎症)相关的症状和/或减轻疾病或病症的严重程度的本申请抗体或抗原结合部分的量。治疗有效量在所治疗疾病的背景下进行理解,其中本领域技术人员可以方便地判别出实际有效量。

[0084] 本申请的抗体或其抗原结合部分,(a) 特异性结合SIRP α (例如,人和猴SIRP α),与现有技术SIRP α 抗体例如KWAR23和BI-765063相比,具有相当的(如果不是更高的话)结合亲和力/活性;(b) 与SIRP β 交叉反应,与现有技术SIRP α 抗体例如KWAR23和BI-765063相比,具有相当的(如果不是更高的话)结合亲和力/活性;(c) 不结合SIRP γ ;(d) 不结合小鼠SIRP α ;(e) 阻断SIRP α 结合CD47,与现有技术抗体相比,具有相当的(如果不是更高的话)阻断活性;(f) 能被表达SIRP α 的细胞内化;和/或(g) 示出体内抗肿瘤活性。本申请的抗体是嵌合和人

源单克隆抗体。

[0085] 本申请的抗体或其抗原结合部分在以下以及之后实施例中进行结构和化学表征。本申请的重/轻链可变区和CDR的氨基酸序列ID NO总结于以下表1,一些抗体享有相同的VH或VL。抗体的重链恒定区可以是具有例如SEQ ID NO:19所示氨基酸序列的人IgG4重链恒定区,具有例如SEQ ID NO:38(X1=M、X2=S、X3=T;X1=Y、X2=T、X3=E)所示氨基酸序列的人IgG1重链恒定区,经修饰以具有增强的FcR结合亲和力和/或抗体稳定性。重链恒定区也可以具有弱FcR结合亲和力。抗体的轻链恒定区可以是具有例如SEQ ID NO:20所示氨基酸序列的人κ恒定区。本申请的抗体也可以包含人λ轻链恒定区。

[0086]

表1. 重/轻链可变区和CDR的氨基酸序列IDNO

	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VH	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	VL
E1F1B1C3	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2, X1=N, X2=G	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 7, X1=N, X2=G	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5, X=N	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8, X=N
E1F1B1C3- CDRV1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2, X1=N, X2=A	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 7, X1=N, X2=A	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5, X=A	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8, X=A
E1F1B1C3- CDRV2	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2, X1=A, X2=G	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 7, X1=A, X2=G	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5, X=A	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8, X=A
E1H10B7C7	SEQ ID NO: 9, X=Y	SEQ ID NO: 10, X1=N, X2=G	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 15, X1=N, X2=G	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16, X=N
E1H10B7- CDRV1	SEQ ID NO: 9, X=Y	SEQ ID NO: 10, X1=N, X2=A	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 15, X1=N, X2=A	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16, X=S
E1H10B7- CDRV2	SEQ ID NO: 9, X=Y	SEQ ID NO: 10, X1=A, X2=G	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 15, X1=A, X2=G	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16, X=S
E1D5E1F1	SEQ ID NO: 9, X=F	SEQ ID NO: 10, X1=N, X2=G	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 18

[0087] 表1中的重链可变区CDR和轻链可变区CDR已由Kabat编号体系确定。然而,如本领域所公知的,CDR区也可以基于重链/轻链可变区序列经其他体系例如Chothia、和IMGT、AbM

或Contact编号体系/方法确定。

[0088] 结合人SIRP α 的其他SIRP α 抗体的V_H和V_L序列(或CDR序列)可以与本公开的SIRP α 抗体的V_H和V_L序列(或CDR序列)“混合和匹配”。优选地,当V_H和V_L链(或这些链中的CDR)混合并匹配时,来自特定V_H/V_L配对的V_H序列被结构上相似的V_H序列代替。同样地,优选来自特定V_H/V_L配对的V_L序列经结构类似的V_L序列替换。

[0089] 因此,在一个实施方式中,本申请的抗体或其抗原结合部分可以包含:

[0090] (a) 可包含表1中所列氨基酸序列的重链可变区;和

[0091] (b) 可包含表1中所列氨基酸序列的轻链可变区、或另一SIRP α 抗体的V_L,其中该抗体特异性结合人SIRP α 。

[0092] 在另一实施方式中,本申请的抗体或其抗原结合部分可以包含:

[0093] (a) 列于表1中的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3区;和

[0094] (b) 列于表1中的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3区,或者另一SIRP α 抗体的CDR,其中该抗体特异结合人SIRP α 。

[0095] 在另一实施方式中,抗体或其抗原结合部分包括SIRP α 抗体的重链可变CDR2区,结合有其他结合人SIRP α 抗体的CDR,例如不同SIRP α 抗体的重链可变区CDR1和/或CDR3、和/或轻链可变区CDR1、CDR2和/或CDR3。

[0096] 另外,如本领域所公知的,CDR3结构域,独立于CDR1和/或CDR2结构域,可以单独决定抗体对同源抗原的结合特异性,且基于相同的CDR3序列,可预见能产生具有相同结合特异性的多个抗体。参见例如Klimka et al., British J. of Cancer 83(2):252-260(2000); Beiboer et al., J. Mol. Biol. 296:833-849(2000); Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:8910-8915(1998); Barbas et al., J. Am. Chem. Soc. 116:2161-2162(1994); Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:2529-2533(1995); Ditzel et al., J. Immunol. 157:739-749(1996); Berezov et al., BIAjournal 8: Scientific Review 8(2001); Igarashi et al., J. Biochem (Tokyo) 117:452-7(1995); Bourgeois et al., J. Virol 72:807-10(1998); Levi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:4374-8(1993); Polymenis and Stoller, J. Immunol. 152:5218-5329(1994)以及Xu and Davis, Immunity 13:37-45(2000)。也可参见美国专利6,951,646;6,914,128;6,090,382;6,818,216;6,156,313;6,827,925;5,833,943;5,762,905 and 5,760,185。这些参考文献中的每一个都通过引用的方式整体并入本文。

[0097] 因而,在另一个实施方式中,本申请的抗体可以包含SIRP α 抗体重链可变区的CDR2,和SIRP α 抗体重链和/或轻链可变区的至少CDR3,或另一SIRP α 抗体重链和/或轻链可变区的CDR3,其中该抗体能够与人SIRP α 特异性结合。优选这些抗体(a) 竞争结合SIRP α ; (b) 保留功能特性; (c) 结合相同表位;和/或 (d) 具有与本申请SIRP α 抗体相似的结合亲和力。在另一实施方式中,抗体还可以包含SIRP α 抗体轻链可变区的CDR2、或另一SIRP α 抗体轻链可变区的CDR2,其中该抗体能够与人SIRP α 特异性结合。在另一实施方式中,本申请的抗体可以包含SIRP α 抗体的重链和/或轻链可变区的CDR1,或另一SIRP α 抗体的重链和/或轻链可变区的CDR1,其中该抗体能够与人SIRP α 特异性结合。

[0098] 在另一个实施方式中,本申请的抗体可以包含CDR1、CDR2和CDR3序列与本申请SIRP α 抗体相比具有一个或多个保守修饰的重链和/或轻链可变区序列。如本领域所理解

的,可以做出一些不消除抗原结合的保守序列修饰。参见例如Brummell et al., (1993) Biochem 32:1180-8;de Wildt et al., (1997) Prot.Eng.10:835-41;Komissarov et al., (1997) J.Biol.Chem.272:26864-26870;Hall et al., (1992) J.Immunol.149:1605-12;Kelley and O'Connell (1993) Biochem.32:6862-35;Adib-Conquy et al., (1998) Int.Immunol.10:341-6以及Beers et al., (2000) Clin.Can.Res.6:2835-43。

[0099] 因而,在一个实施方式中,抗体可以包含可具有CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区和/或可具有CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区,其中:

[0100] (a) 重链可变区CDR1序列可以包含如上表1所列的序列,和/或其保守修饰;和/或

[0101] (b) 重链可变区CDR2序列可以包含如上表1所列的序列,和/或其保守修饰;和/或

[0102] (c) 重链可变区CDR3序列可以包含如上表1所列的序列,及其保守修饰;和/或

[0103] (d) 轻链可变区CDR1、和/或CDR2、和/或CDR3序列可以包含如上表1所列的序列,和/或其保守修饰;且

[0104] (e) 该抗体特异结合人SIRP α 。

[0105] 本申请的抗体具有以下一个或多个上述的功能特性,例如结合人SIRP α 的高亲和力、以及对SIRP α -PD-L1结合的阻断活性。

[0106] 在多个实施方式中,抗体可以是例如人源、人源化或嵌合抗体。

[0107] 本文所用的术语“保守的序列修饰”是指不会显著影响或改变含有这些氨基酸序列的抗体的结合特性的氨基酸修饰。这样的保守修饰包括氨基酸替换、添加和缺失。可以通过领域内已知的标准技术,例如点突变和PCR介导的突变,将修饰引入本申请抗体中。保守氨基酸替换是指将氨基酸残基用具有相似侧链的氨基酸残基替换。领域内已定义出具有相似侧链的氨基酸残基组。这些组包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β -支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,本申请抗体的CDR区中的一个或多个氨基酸残基可以用同一侧链组的其他氨基酸残基替换,且改造后的抗体可以使用本文所述的功能检测测试其保留下来的功能(即上述的功能)。

[0108] 本申请的抗体可以使用具备本申请SIRP α 抗体的一个或多个V_H/V_L序列的抗体作为起始原料来制备,以工程改造出修饰的抗体。抗体可以通过修饰一个或两个可变区(即,V_H和/或V_L)内(例如,在一个或多个CDR区和/或一个或多个骨架区内)的一个或多个残基来进行基因修饰。此外以及可选地,抗体可以通过修饰恒定区的残基来进行工程改造,以例如改变抗体的效应功能。

[0109] 在某些实施方式中,CDR植入可以用来工程改造抗体的可变区。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶标抗原进行相互作用。出于这个原因,在个体抗体之间,CDR内的氨基酸序列比CDR外的序列更加多样。因为CDR序列负责大部分抗体-抗原相互作用,可以通过构建包含有将来自特定天然抗体的CDR序列植入到具有不同特性的不同抗体的骨架序列中的表达载体,来表达模拟特定天然抗体的特性的重组抗体(参见例如Riechmann et al., (1998) Nature 332:323-327;Jones et al., (1986) Nature 321:522-525;Queen et al., (1989) Proc.Natl.Acad.又可参见U.S.A.86:10029-10033;

U.S.Pat.Nos.5,225,539;5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0110] 因此,本申请的另一实施方式涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其可以包含重链可变区和/或轻链可变区,重链可变区可以包含可具有本申请上述序列的CDR1、CDR2和CDR3序列,轻链可变区可以包含可具有本申请上述序列的CDR1、CDR2和CDR3序列。尽管这些抗体包含本申请单克隆抗体的 V_H 和 V_L CDR序列,它们可以含有不同的骨架序列。

[0111] 这些骨架序列可以从包括种系抗体基因序列的公开DNA数据库或公开参考文献中获得。例如,人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在“VBase”人种系序列数据库获得(可得自www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase),也可以在Kabat et al., (1991),同上; Tomlinson et al., (1992) J.Mol.Biol.227:776-798;和Cox et al., (1994) Eur.J.Immunol.24:827-836获得;上述文件各自的内容通过引用的方式明确并入本文。作为另一个例子,用于人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在Genbank数据库中得到。例如,下列HCo7 HuMAb小鼠中的重链种系序列可得自所附的Genbank登录号1-69(NG—0010109、NT--024637&BC070333)、3-33(NG--0010109&NT--024637)和3-7(NG--0010109&NT--024637)。作为另一例子,以下来自Hco12 HuMAb小鼠的重链种系序列可得自Genbank登录号1-69(NG—0010109、NT--024637&BC070333)、5-51(NG--0010109&NT--024637)、4-34(NG--0010109&NT--024637)、3-30.3(CAJ556644)&3-23(AJ406678)。

[0112] 通过使用本领域公知的一种称为空格BLAST的序列相似性搜索方法(Altschul et al., (1997),同上),将抗体蛋白序列与汇编蛋白序列数据库进行比较。

[0113] 用于本申请抗体的优选骨架序列,是结构上与本申请抗体所用的骨架序列相似的那些。 V_H CDR1、CDR2和CDR3序列可以植入到与得到该骨架序列的种系免疫球蛋白基因具有相同序列的骨架区中,或者CDR序列可以植入到与种系序列相比包含一个或多个突变的骨架区中。例如,发现了,在一些情况下,为保持或增强抗体的抗原结合能力,在骨架区中突变残基是有益的(参见例如美国专利5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0114] 另一类的可变区修饰是将 V_H 和/或 V_L CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基进行突变,从而改进目标抗体的一种或多种结合特性(例如,亲和力)。可以进行点突变或PCR介导的突变来引入突变,且其对于抗体结合或其他目标功能特性的影响可以在本领域所知的体外或体内检测中进行评价。优选地,引入(本领域所知的)保守修饰。突变可以是氨基酸替换、添加或缺失,但优选为替换。此外,通常对CDR区的改变不多于一个、两个、三个、四个或五个残基。

[0115] 此外,在另一实施方式中,本申请提供分离的SIRP α 单克隆抗体或其抗原结合部分,其可以包含重链可变区,其可包含:(a) V_H CDR1区,其可包含本申请的序列,或含有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列;(b) V_H CDR2区,其可包含本申请的序列,或含有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列;(c) V_H CDR3区,其可包含本申请的序列,或含有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列;(d) V_L CDR1区,其可包含本申请的序列,或含有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列;(e) V_L CDR2区,其可包含本申请的序列,或含有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列;和(f) V_L CDR3区,其可包含本申请的序列,或含有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列。

[0116] 本申请的基因改造抗体包括,例如为提高抗体特性,在 V_H 和/或 V_L 的骨架残基中做出修饰的抗体。通常而言,做出这些骨架修饰,以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是将一个或多个骨架残基“回复突变”成相应的种系序列。更加具体而言,经历体细胞突变的抗体可能包含不同于已得到抗体的种系序列的骨架残基。这些残基可以通过比较抗体骨架序列和得到抗体的种系序列而识别出来。

[0117] 另一类的骨架修饰涉及对骨架区的、或者甚至一个或多个CDR区的一个或多个残基进行突变,以去除T细胞表位,从而减少抗体的潜在免疫原性。该方法也称为“去免疫化”,在美国专利公开20030153043中有更加详细的描述。

[0118] 此外,或者作为对骨架或CDR区内修饰的另一种选择,本申请的抗体可以基因修饰成包含Fc区内的修饰,通常是为改变抗体的一个或多个功能特性,例如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合、和/或抗体依赖的细胞毒性。此外,可以对本申请的抗体进行化学修饰(例如,可以向抗体附加一个或多个化学基团),或者修饰成改变其糖基化,同样是为改变抗体的一个或多个功能特性。

[0119] 在一个实施方式中, C_{H1} 铰链区经修饰,改变,例如增加或减少,铰链区半胱氨酸残基的数量。该方法在美国专利5,677,425中作进一步描述。改变 C_{H1} 铰链区中的半胱氨酸残基的数量,以例如促进轻链和重链的组装或者增加或降低抗体的稳定性。

[0120] 在另一个实施方式中,抗体的Fc铰链区经突变,以降低抗体的生物半衰期。更加具体地,将一个或多个氨基酸突变引入Fc铰链片段的 C_{H2} - C_{H3} 结构域连接区,从而相较于与天然Fc-铰链结构域的金黄色葡萄球菌蛋白A(SpA)结合,该抗体具有削弱的SpA结合。该方法在美国专利6,165,745中有更详细的描述。

[0121] 在另一实施方式中,对抗体的糖基化进行修饰。例如,可以制备去糖基化的抗体(即,抗体缺少糖基化)。可以改变糖基化,例如增加抗体对抗原的亲合性。这样的糖化修饰可以通过例如改变抗体序列中的一个或多个糖基化位点来达成。例如,可以进行一个或多个氨基酸替换,以消除一个或多个可变区骨架糖基化位点,从而消除该位置的糖基化。这样的去糖基化可以增加抗体对抗原的亲合性。参见,例如美国专利5,714,350和6,350,861。

[0122] 另外地或者可选地,可以制备糖基化类型改变的抗体,例如岩藻糖残基量减少的低岩藻糖基抗体或者具有增加的平头型GlcNac结构的抗体。经证实,这些改变的糖基化形式增加或降低抗体的ADCC活性。这样的糖基化修饰可以通过例如在糖基化系统改变的宿主细胞中表达抗体而完成。糖基化系统改变的细胞在领域中已知,且可以用作表达本申请重组抗体的宿主细胞,以制备糖基化改变的抗体。例如,细胞系Ms704、Ms705和Ms709缺乏岩藻糖基转移酶基因FUT8($\alpha(1,6)$ -岩藻糖基转移酶),从而在Ms704、Ms705和Ms709细胞系中表达的抗体在其糖中缺失岩藻糖。使用两种替换载体靶向破坏CHO/DG44细胞的FUT8基因,制备Ms704、Ms705和Ms709 FUT8^{-/-}细胞系(参见美国专利公开20040110704和Yamane-Ohnuki et al., (2004)Biotechnol Bioeng 87:614-22)。作为另一个例子,EP 1,176,195记载了具有功能破坏的FUT8基因(其编码岩藻糖基转移酶)的细胞系,从而通过降低或消除 α -1,6键相关酶,在该细胞系中表达的抗体表现出低岩藻糖基化。EP 1,176,195也描述了一种细胞系,其具有较低的向结合抗体Fc区的N-乙酰氨基葡萄糖中添加岩藻糖的活性,或不具有酶活性,例如大鼠骨髓瘤细胞系YB2/0(ATCC CRL 1662)。PCT公开文本W0 03/035835描述了CHO变体细胞系,Lec13细胞,其向Asn(297)-连接糖添加岩藻糖的能力降低,从而使得宿主

细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(参见Shields et al., (2002) J.Biol.Chem.277: 26733-26740)。具有改变的糖基化图谱的抗体也可以在鸡蛋中制备,如在PCT公开文本W0 06/089231中所述的。或者,具有改变的糖基化图谱的抗体可以在植物细胞如浮萍中制备。在植物体系中制备抗体的方法在对应Alston&Bird LLP律师记录号040989/314911的2006年8月11日提交的美国专利申请中有过记载。使用岩藻糖苷酶可以切除抗体的岩藻糖残基,例如 α -L-岩藻糖苷酶从抗体移除岩藻糖残基(Tarentino et al., (1975) Biochem.14: 5516-23)。

[0123] 包含在本申请中的本文抗体的另一修饰是聚乙二醇化。抗体可以聚乙二醇化,例如增加抗体的生物(例如,血清)半衰期。为使抗体聚乙二醇化,抗体或其片段通常与聚乙二醇(PEG),例如PEG的活性酯或醛类衍生物,在使一个或多个PEG基团附于抗体或抗体片段的条件下反应。优选地,聚乙二醇化通过与活性PEG分子(或类似的有反应性的水溶性聚合物)的酰化反应或烷化反应进行。本文中所用的术语“聚乙二醇”意在包括任何形式的用于衍生其他蛋白的PEG,例如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基聚乙二醇或聚乙二醇马来酰亚胺。在某些实施方式中,需要聚乙二醇化的抗体是去糖基化的抗体。蛋白聚乙二醇化的方法在领域内已知,且可以应用于本申请的抗体。参见,例如EP0 154 316和EP 0 401 384。

[0124] 本申请的抗体可以用它们的多种物理特性进行表征,以检测和/或区别其不同类别。

[0125] 例如,抗体可以在轻链或重链可变区包含一个或多个糖基化位点。这些糖基化位点可能引起抗体的免疫原性增高,或由于抗原结合的改变引起抗体的pK变化(Marshall et al(1972) Annu Rev Biochem 41:673-702; Gala and Morrison(2004) JImmunol 172:5489-94; Wallick et al(1988) J Exp Med 168:1099-109; Spiro(2002) Glycobiology 12:43R-56R; Parekh et al(1985) Nature 316:452-7; Mimura et al., (2000) Mol Immunol 37: 697-706)。已知糖基化发生在含有N-X-S/T序列的基序中。在一些情况下,优选不包含可变区糖基化的SIRP α 抗体。这可以通过选择在可变区不包含糖基化基序的抗体或者通过使糖基化区域内的残基发生突变来实现。

[0126] 在优选实施方式中,抗体不包含天冬酰胺异构位点。天冬酰胺的脱酰胺可能发生在N-G或D-G序列处,引起异天冬氨酸残基的生成,其向多肽链引入链接并降低其稳定性(异天冬氨酸效果)。

[0127] 各抗体将具有独特的等电点(pI),其基本落在6-9.5的pH范围内。IgG1抗体的pI通常落在7-9.5的pH范围内,而IgG4抗体的pI基本落在6-8的pH范围内。推测pI在正常范围外的抗体可能在体内条件下具有一些展开结构和不稳定性。因此,优选pI值落在正常范围内的SIRP α 抗体。这可以通过选择pI在正常范围内的抗体或通过突变带电表面残基来实现。

[0128] 在另一方面,本申请提供编码本申请抗体重链和/或轻链可变区或CDR的核酸分子。核酸可以存在于完整细胞、细胞裂解液中或处于部分纯化或基本纯化的形式。当通过标准技术从其他细胞组分或者其他污染物例如其他细胞核酸或蛋白中纯化出来时,核酸是“分离的”或“呈处于基本纯化的状态”。本申请的核酸可以为例如DNA或RNA,且可以包含或不包含内含子序列。在优选实施方式中,核酸是cDNA分子。

[0129] 本申请的核酸可以使用标准的分子生物学技术获得。对于由杂交瘤(例如,由携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备的杂交瘤,下文会进一步描述)表达的抗体,编码杂交

瘤制备的抗体的轻链和重链的cDNA可以通过标准PCR扩增或cDNA克隆技术获得。对于(例如使用噬菌体展示技术)从免疫球蛋白基因库获得的抗体,可以从基因库中回收编码这类抗体的核酸。

[0130] 优选的本申请核酸分子包括编码SIRP α 单克隆抗体的V_H和V_L序列或CDR的那些。一旦获得了编码V_H和V_L的DNA片段,这些DNA片段可以进一步通过标准的重组DNA技术进行操作,例如将可变区基因转变为全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操作中,编码V_L或V_H的DNA片段与编码另一蛋白(例如抗体恒定区或柔性接头)的另一DNA片段可操作地连接。在上下文中使用术语“可操作地连接”是指两个DNA片段连接在一起,从而使这两个DNA片段编码的氨基酸序列都在框内。

[0131] 编码V_H区的分离DNA可以通过可操作地连接编码V_H的DNA与编码重链恒定区(C_{H1}、C_{H2}和C_{H3})的另一DNA分子而转变成全长重链基因。人重链恒定区基因的序列在领域内已知,且包括这些区域的DNA片段可以通过标准PCR扩增而获得。重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,但是最优选为IgG1或IgG4恒定区。对于Fab片段重链基因,编码V_H区的DNA可以可操作地与仅编码重链C_{H1}恒定区的另一DNA分子连接。

[0132] 编码V_L区的分离DNA可以通过可操作地连接编码V_L的DNA与编码轻链恒定区C_L的另一DNA分子而转变成全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列在领域内已知,且包括这些区域的DNA片段可以通过标准PCR扩增而获得。在优选实施方式中,轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区。

[0133] 为创建scFv基因,编码V_H和V_L的DNA片段可以可操作地与编码柔性接头例如编码氨基酸序列(Gly4-Ser)₃的另一片段连接,从而V_H和V_L序列可以表达成一个连续的单链蛋白,其中V_L和V_H区域通过该柔性接头连接(参见,例如Bird et al., (1988) Science 242:423-426;Huston et al., (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554)。

[0134] 可以使用Kohler and Milstein(1975)Nature 256:495的本领域所公知的体细胞杂交(杂交瘤)技术制备本申请的单克隆抗体(mAb)。制备单克隆抗体的其他实施方式包括B淋巴细胞的病毒或致癌性转化以及噬菌体展示技术。嵌合的或人源化的抗体是本领域公知的。参见例如,美国专利4,816,567;5,225,539;5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370,其中的内容通过引用的方式整体并入本文。

[0135] 本申请的抗体还可以使用例如本领域所公知的重组DNA技术和基因转染方法的组合在宿主细胞转染瘤中产生(例如,Morrison,S.(1985)Science 229:1202)。在一个实施方式中,将通过标准分子生物技术获得的编码部分或全长轻链和重链的DNA插入到一个或多个表达载体中,从而使基因可操作地与转录和翻译调控序列相连接。在此背景下,术语“可操作地连接”是指将抗体基因连接到载体中,从而使载体内的转录和翻译控制序列发挥其调控抗体基因的转录和翻译的预期功能。

[0136] 术语“调控序列”意在包括控制抗体基因的转录或翻译的启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,多腺苷酸化信号)。这样的调控序列在例如Goeddel(Gene Expression Technology.Methods in Enzymology 185,Academic Press,San Diego,Calif.(1990))中有过描述。优选的用于哺乳动物宿主细胞表达的调控序列包括在哺乳动物细胞中引导高水平蛋白表达的病毒元件,例如得自巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)、腺病毒如腺病毒

主要晚期启动子 (AdMLP) 和多瘤病毒的启动子和/或增强子。或者, 可以使用非病毒调控序列, 例如泛素启动子或 β -珠蛋白启动子。另外, 调控元件由不同来源的序列构成, 例如SR α 启动子系统, 其包含来自SV40早期启动子的序列和人T细胞白血病I型病毒的长末端重复 (Takebe et al., (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。选择与使用的表达宿主细胞兼容的表达载体和表达控制序列。

[0137] 抗体轻链基因和抗体重链基因可以插入到同一或不同的表达载体中。在优选实施方式中, 通过将可变区插入到已经编码所需同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中来构建任意抗体同种型的全长抗体基因, 从而 V_H 部分与载体中的 C_H 部分可操作地连接, V_L 部分与载体中的 C_L 部分可操作地连接。此外或者另外地, 重组表达载体可以编码促进抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。抗体链基因可以克隆到载体中, 进而信号肽在框内连接到抗体链基因的氨基端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽 (即, 来自非免疫球蛋白的信号肽)。

[0138] 除抗体链基因和调控序列外, 本申请的重组表达载体可以携带其他序列, 例如, 在宿主细胞中调控载体复制的序列 (例如, 复制起始点) 和可选择标记物基因。可选择标记物基因促进已导入载体的宿主细胞的选择 (参见例如, 美国专利4,399,216; 4,634,665和5,179,017)。例如, 通常而言, 可选择标记物基因赋予已导入载体的宿主细胞对药物如G418、潮霉素、或甲氨喋呤的抗性。优选的可选择标记物基因包括二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因 (用于具有甲氨喋呤选择/扩增的dhfr宿主细胞) 和neo基因 (用于G418选择)。

[0139] 对于轻链和重链的表达, 编码重链和轻链的表达载体通过标准技术转染到宿主细胞中。多种形式的术语“转染”意在包括多种将外源DNA导入原核或真核宿主细胞的常用技术, 例如, 电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。尽管在原核或真核宿主细胞中表达本申请抗体在理论上是可行的, 在真核细胞中表达抗体是最优选的, 最优选在哺乳动物宿主细胞, 因为这些真核细胞, 特别是哺乳动物细胞, 比原核细胞更可能组装并分泌出适当折叠且有免疫活性的抗体。

[0140] 优选的用于表达本申请重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢 (CHO细胞) (包括与DHFR可选择标记物一起使用的dhfr-CHO细胞, dhfr-CHO细胞在Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220中有过描述, DHFR可选择标记物在例如R.J.Kaufman and P.A.Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621中有过描述)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞。特别在使用NS0骨髓瘤细胞时, 另一优选的表达系统是GS基因表达系统, 记载于WO 87/04462、WO 89/01036和EP 338,841。当编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞时, 通过培养宿主细胞一段足以在宿主细胞中表达抗体的时间, 或优选将抗体分泌在宿主细胞生长的培养液中, 来制备抗体。使用标准的蛋白纯化方法从培养基中回收抗体。

[0141] 本申请的抗体或其抗原结合部位可以与治疗剂结合, 形成例如抗体-药物偶联物 (ADC) 的免疫偶联物。合适的治疗剂包括细胞毒素、烷基化剂、DNA小沟结合物、DNA插入剂、DNA交联剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、核输出抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶I或II抑制剂、热休克蛋白抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、抗生素和抗有丝分裂剂。在ADC中, 抗体和治疗剂优选地通过可切割的接头结合, 例如肽类接头、二硫类接头或脲类接头。更优选地, 接头是肽类接头, 例如Val-Cit、Ala-Val、Val-Ala-Val、Lys-Lys、Pro-Val-Gly-Val-Val、

Ala-Asn-Val、Val-Leu-Lys、Ala-Ala-Asn、Cit-Cit、Val-Lys、Lys、Cit、Ser或Glu。ADC可以按照美国专利7,087,600;6,989,452;和7,129,261;PCT公开W0 02/096910;W0 07/038,658;W0 07/051,081;W0 07/059,404;W0 08/083,312;和W0 08/103,693;美国专利公开20060024317;20060004081;和20060247295中的描述进行制备,上述文献的公开内容通过引用的方式并入本文。

[0142] 另一方面,本公开涉及双特异性分子,其可以包含一个或多个本申请抗体,与至少一个其他功能性分子例如另一个肽或蛋白(例如,另一抗体或受体的配体)相连,以生成与至少两个不同的结合位点或靶分子结合的双特异性分子。因此,如本文所用的,“双特异性分子”包括有三种或更多种特异性的分子。

[0143] 在一个实施方式中,除Fc结合特异性和SIRP α 结合特异性外,双特异性分子还具有第三特异性。第三特异性可以是针对肿瘤相关抗原,例如CD19、CD20、CD22、CD4、CD24、CD38、CD123、CD228、CD138、BCMA、GPC3、CEA、叶酸受体(FR α)、间皮素、CD276、gp100、5T4、GD2、EGFR、MUC-1、PSMA、EpCAM、MCSP、SM5-1、MICA、MICB、ULBP和HER-2。

[0144] 双特异性分子可以以多种不同形式和尺寸出现。在尺寸谱的一端,双特异性分子保持传统抗体形式,除其具有两条结合臂且各臂具有不同特异性,而非具有两条相同特异性的结合臂外。在另一个极端的是,由两个经肽链连接的单链抗体片段(scFv)构成的双特异性分子,即所谓的Bs(scFv)₂构建体。中间尺寸的双特异性分子包括由肽类接头连接的两个不同F(ab)片段。这些和其他形式的双特异性分子可以通过基因改造、体细胞杂交或化学方法进行制备。参见例如,Kufer et al,同上;Cao and Suresh,Bioconjugate Chemistry,9(6),635-644(1998);和van Spriël et al.,Immunology Today,21(8),391-397(2000),以及其中引用的文献。

[0145] 溶瘤病毒优先侵染并杀灭癌细胞。本申请的抗体可以与溶瘤病毒一起使用。或者,编码本申请抗体的溶瘤病毒可以引入到人体中。

[0146] 本文还提供包含抗SIRP α scFv的嵌合抗原受体(CAR),该SIRP α scFv包含本文所述的CDR和重/轻链可变区。

[0147] 抗SIRP α 的CAR可以包含(a)可包含抗SIRP α scFv的胞外抗原结合域;(b)跨膜结构域;和(c)胞内信号结构域。

[0148] CAR可以在胞外抗原结合域的N端含有指导新生受体进入内质网的信号肽,以及在胞外抗原结合域的N-端的使受体更容易结合的铰链肽。CAR优选地在胞内信号转导结构域包含主要的胞内信号转导域和一个或多个共刺激信号转导域。主要使用的和最有效的主要胞内信号转导域是包含ITAM的CD3- ζ 胞质结构域,其磷酸化会引起T细胞活化。共刺激信号转导域可以衍生自共刺激蛋白,例如CD28、CD137和OX40。

[0149] CAR还可以添加增强T细胞扩增、持续性和抗肿瘤活性的因子,例如细胞因子和共刺激配体。

[0150] 还提供基因修饰的免疫效应细胞,其可以包含本文提供的CAR。在一些实施方式中,免疫效应细胞是T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、或胚胎干细胞。在一些实施方式中,免疫效应细胞是T细胞。

[0151] 在另一方面,本申请提供一种药物组合物,其可以包含与药学上可接受的载体配制在一起的本申请的一种或多种抗体(或其抗原结合部分、或双特异性分子、带CAR的免疫

细胞、免疫偶联物、溶瘤病毒、或表达这些的核酸分子或表达载体)。当组合物中含有多于一种抗体(或其抗原结合部分、或双特异性分子、带CAR的免疫细胞、免疫偶联物、溶瘤病毒、或表达这些的核酸分子或表达载体)时,抗体(或其抗原结合部分、或双特异性分子、带CAR的免疫细胞、免疫偶联物、溶瘤病毒、或表达这些的核酸分子或表达载体)可分开给药。组合物可以任选地包含一种或多种其他药学上的活性成分,例如另一抗体或药物,例如抗肿瘤药物。

[0152] 药物组合物可以包含任何数量的赋形剂。可以使用的赋形剂包括载体、表面活性剂、增稠或乳化剂、固体粘合剂、分散或混悬剂、增溶剂、染色剂、矫味剂、包衣、崩解剂、润滑剂、甜味剂、防腐剂、等渗剂及其组合。在Gennaro,ed.,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,20th Ed.(Lippincott Williams&Wilkins 2003)中,对合适赋形剂的选择和使用有所讲解,其公开内容通过引用的方式并入本文。

[0153] 优选地,该药物组合物适合于静脉内、肌内、皮下、肠道外、脊柱或表皮给药(例如通过注射或输注)。基于给药途径的不同,有效成分可以包在材料中,以保护其免受酸和其他可能使其失活的自然条件的影响。本文所用的术语“肠道外给药”是指非肠内和非局部外用的给药方式,通常通过注射进行,包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊膜下、蛛网膜下腔、椎管内、硬膜外和胸骨内注射和输注。或者,本申请的抗体可以通过非肠道外的途径给药,例如外用、表皮或粘膜给药,例如鼻内、经口、阴道、直肠、舌下、或局部外用。

[0154] 药物组合物可呈无菌水溶液或分散液的形式。它们也可以配制成微乳液、脂质体或其他适合于高药物浓度的有序结构。

[0155] 可与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将随治疗主体和特定给药方式而变,且通常是产生疗效的组合物的量。一般来说,以百分比计,这个量的范围是与药学上可接受的载体一起的约0.01%-约99%的活性成分,优选为约0.1%-约70%,最优选为约1%-约30%的活性成分。

[0156] 调整给药方案以提供最佳的所需的应答(例如,治疗应答)。例如,可以施用快速灌注剂,可以随时间推移施用多个分剂量,或者剂量可以随治疗情况的危急程度成比例降低或提高。特别有利的是,以方便施用和剂量均匀,配置剂量单位型的肠道外组合物。如本文所用的剂量单位形式是指适合作为剂量单位用于待治疗个体的物理离散单位;每一单位含有经计算以结合所需药物载体产生期望治疗效果的预定量的活性成分。另外,抗体也可以缓释剂型给药,这种情况下需要的给药频率较低。

[0157] 对于组合物的给药,剂量范围可以为约0.0001-100mg/kg。示例性治疗方案是每周给药一次。

[0158] “治疗有效剂量”的本申请SIRP α 抗体或其抗原结合部分、或双特异性分子、带CAR的免疫细胞、免疫偶联物、溶瘤病毒、或表达这些的核酸分子或表达载体,优选地引起疾病症状严重程度的降低、疾病无症状期频率和持久度的增加,或预防疾病折磨造成的损伤或残疾。例如,对于荷瘤受试者的治疗,与未接受治疗的受试者相比,“治疗有效剂量”优选将炎症消除至少约20%、更优选为至少约40%,甚至更优选为至少约60%,更优选为至少约80%。

[0159] 药物组合物可以是控释剂型,包括植入体、经皮贴剂和微胶囊递送系统。可以使用

生物可降解、生物相容的聚合物,例如乙烯-醋酸乙烯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。参见,例如,Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems.J.R.Robinson,ed.,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978。

[0160] 治疗组合物可以经医学设备来给药,例如(1)无针皮下注射设备(例如,美国专利5,399,163;5,383,851;5,312,335;5,064,413;4,941,880;4,790,824和4,596,556);(2)微量输液泵(美国专利4,487,603);(3)经皮给药设备(美国专利4,486,194);(4)推注设备(美国专利4,447,233和4,447,224);和(5)渗透设备(美国专利4,439,196和4,475,196),上述文献的公开内容通过引用的方式并入本文。

[0161] 在某些实施方式中,可以配制本申请的单克隆抗体或其抗原结合部位,以确保在体内的合适分布。例如,为确保本申请的治疗抗体可以穿越血脑屏障,它们可以配制在脂质体中,其还可以额外地包含靶向功能基团,以增强对特定细胞或器官的选择性输送。参见,例如美国专利4,522,811;5,374,548;5,416,016;和5,399,331;V.V.Ranade (1989) J.Clin.Pharmacol.29:685;Umezawa et al., (1988) Biochem.Biophys.Res.Comm.153:1038;Bloeman et al., (1995) FEBS Lett.357:140;M.Owais et al., (1995) Antimicrob.Agents Chemother.39:180;Briscoe et al., (1995) Am.J.Physiol.1233:134;Schreier et al., (1994) J.Biol.Chem.269:9090;Keinanen and Laukkanen (1994) FEBS Lett.346:123;和Killion and Fidler (1994) Immunomethods 4:273。

[0162] 本申请可包含抗体或其抗原结合部分、或双特异性分子、带CAR的免疫细胞、免疫偶联物、溶瘤病毒、或表达这些的核酸分子或表达载体的药物组合物,具有多种体外和体内用途,涉及例如癌症的治疗。

[0163] 本申请提供一种治疗与SIRP α 信号转导相关的癌症的方法,其可以包括向受试者施用治疗有效量的本申请药物组合物。

[0164] 癌症可以是实体癌或血液癌,包括,但不限于,非小细胞肺癌、乳癌、卵巢癌、肾细胞癌、结直肠癌和胰腺癌。组合物包含本申请的具有弱或强FcR结合的重链恒定区的抗体或其抗原结合部分、双特异性分子、免疫偶联物、带CAR的免疫细胞、溶瘤病毒、核酸分子、或表达载体。如果组合物包含具有强FcR结合亲和力的抗体或其抗原结合部分、免疫偶联物、带CAR的免疫细胞或溶瘤病毒,优选将组合物局部递送至肿瘤部位。本申请抗体可以是例如嵌合或人源抗体。在一些实施方式中,受试者是人。在一些实施方式中,可以进一步施用至少一种其他的抗癌抗体,例如靶向肿瘤相关抗原例如CD19、CD20、CD22、CD4、CD24、CD38、CD123、CD228、CD138、BCMA、GPC3、CEA、叶酸受体(FR α)、间皮素、CD276、gp100、5T4、GD2、EGFR、MUC-1、PSMA、EpCAM、MCSP、SM5-1、MICA、MICB、ULBP和HER-2的抗体,或靶向抑制性免疫检查点例如LAG-3、PD-1、VISTA或CTLA-4的抗体。在另一实施方式中,本申请的抗体或其抗原结合部分与细胞因子(例如IL-2和/或IL-21)或共刺激抗体(例如,CD137和/或GITR抗体)一起施用。在另一实施方式中,本申请的抗体或其抗原结合部分与化疗剂一起施用,其可以是细胞毒性剂,例如,表阿霉素、奥沙利铂和/或5-氟尿嘧啶(5-FU)。

[0165] 在另一方面,本申请提供一种在受试者中调节或增强免疫应答的方法,包括向受试者施用本申请组合物,从而受试者的免疫应答得以调节/增强。组合物包含本申请的具有弱FcR结合的重链恒定区的抗体或其抗原结合部分、双特异性分子、核酸分子或表达载体。本申请的抗体可以是例如嵌合或人源抗体。在一些实施方式中,受试者是人。

[0166] 在另一个方面,本申请提供联合治疗的方法,其中本申请的药物组合物与一种或多种对抑制受试者肿瘤生长有效的其他抗体共同施用。在一个实施方式中,本申请提供一种在受试者中抑制受试者肿瘤生长的方法,其可以包括向受试者施用本申请的药物组合物和一种或多种其他抗体,例如靶向肿瘤相关抗原例如CD19、CD20、CD22、CD4、CD24、CD38、CD123、CD228、CD138、BCMA、GPC3、CEA、叶酸受体(FR α)、间皮素、CD276、gp100、5T4、GD2、EGFR、MUC-1、PSMA、EpCAM、MCSP、SM5-1、MICA、MICB、ULBP和HER-2的抗体,或靶向抑制性免疫检查点例如LAG-3、PD-1、VISTA或CTLA-4的抗体。SIRP α 通路阻断还可以与标准肿瘤治疗相结合。例如,SIRP α 通路阻断可以与化疗方案组合。例如,化疗剂可以与SIRP α 抗体一起施用,其可以是细胞毒性剂。例如,向接受SIRP α 治疗的患者施用表阿霉素、奥沙利铂和5-FU。任选地,SIRP α 抗体与一种或多种其他抗体的联合可进一步联用免疫原性剂,例如癌细胞、纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白、多肽和碳水化合物分子)和转染有编码免疫刺激细胞因子的基因的细胞(He et al., (2004) J. Immunol. 173:4919-28)。可用的肿瘤疫苗的非限制性实例包括黑色素瘤抗原,例如gp100肽、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶,或转染而表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞。可与SIRP α 抗体联合的其他疗法包括,但不限于,白介素-2(IL-2)注射、放疗、手术或激素剥夺。

[0167] 本文讨论的治疗剂的联合可以作为在药学上可接受载体中的单一组合物同步给药,或者作为在各药物处于药学上可接受载体中的单独组合物同步给药。在另一个实施方式中,治疗剂的联用可以按序施用。

[0168] 此外,如果多于一剂的联合疗法需按序施用,按序给药的顺序可以在每个给药时间点颠倒或者保持相同的顺序,按序给药可以与同步给药相结合,或者任意组合。

[0169] 尽管已经对本申请及其优势进行了详细的阐述,应当理解的是,可以在不脱离在所附权利要求中限定的本发明宗旨和范围的情况下,在本文中做出多种改变、替换和变动。

[0170] 本申请在以下实施例中进行进一步阐明,实施例不应当解读为进一步的限制。所有附图和贯穿本申请引用的所有参考文献、Genbank序列、专利和公开的专利申请的内容,均通过引用的方式明确地并入本文。

[0171] 实施例

[0172] 实施例1.使用杂交瘤技术制备SIRP α 单克隆抗体

[0173] 免疫

[0174] 根据E Harlow,D.Lane,Antibody:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1998中所述的方法,免疫AceMouseTM小鼠(AceMab Ltd.,Hunan Province,China),其基因改造成生产具有人源重链和轻链可变区和小鼠恒定区的抗体。将重组人SIRP α -Fc蛋白(内部制备,SEQ ID NO:21)用作免疫原,并用于确定抗血清效价和用于筛选分泌抗原特异性抗体的杂交瘤。

[0175] 对于初次和增强免疫,免疫剂量包含22.5 μ g重组人SIRP α -Fc蛋白/小鼠/注射。为增加免疫应答,在初次和增强免疫中分别使用弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂(Sigma, St.Louis,Mo.,USA)。简而言之,将抗原以0.23-0.3mg/ml的浓度配制在PBS或盐水中,然后将计算量的抗原加到所需量的佐剂中,将所得的混合物经轻柔涡旋而混合2min,生成油包水乳状液。之后将佐剂-抗原乳化物抽吸到合适的注射器中,进行动物注射。以150-200 μ l的体积,共注射22.5 μ g抗原。对各个动物进行免疫,之后基于抗血清效价进行3-4次加强。在融

合前,通过腹腔注射对经ELISA测定具有较好效价的动物进行最后一次加强。

[0176] 杂交瘤融合和筛选

[0177] 培养小鼠骨髓瘤细胞系(SP2/0-Ag14,ATCC#CRL-1581)的细胞,在细胞融合前达到对数生长期阶段。以无菌方式制备免疫小鼠脾细胞,并根据Kohler G, and Milstein C, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity," *Nature*, 256:495-497 (1975)中提到的方法与小鼠骨髓瘤细胞融合。之后将融合的“杂交细胞”在DMEM/20% FCS/HAT培养基中于96孔板中铺板。融合后的7-10天,在显微镜下观察存活的杂交瘤群落。在两周后,使用内部制备的生物素标记的人SIRP α -Fc蛋白,对各孔的上清液进行捕获ELISA。选出分泌与人SIRP α -Fc蛋白结合的抗体的阳性杂交瘤,并转移到24孔板中。进一步测试这些杂交瘤阻断人SIRP α 结合细胞表面人CD47的活性。通过有限稀释,对产生显示出人SIRP α -Fc高特异性结合和人SIRP α -细胞表面人CD47阻断活性的抗体的杂交瘤克隆进行亚克隆,以确保细胞系的单克隆源性,之后纯化单克隆抗体。简单而言,使用5-10倍柱体积的PBS缓冲液,冲洗蛋白A琼脂糖色谱柱(bestchrom (Shanghai) Biosciences, Cat#AA0273)。使单克隆杂交瘤的细胞上清液流经柱子,然后用PBS缓冲液冲洗柱子,直至蛋白吸光度达到基线。用洗脱缓冲液(0.1M甘氨酸-HCl, pH 2.7)洗脱柱子,并立即收集到含有中性缓冲液(1M Tris-HCl, pH 9.0)的管中。将含有免疫球蛋白的部分进行集中,并于4°C在PBS中透析过夜。

[0178] 实施例2. SIRP α 单克隆抗体的结合活性

[0179] 通过捕获ELISA、间接ELISA和流式细胞术(FACS),表征实施例1中产生的纯化后SIRP α 单克隆抗体,包括E1D5E1F1、E1F1B1C3和E1H10B7C7,对人SIRP α 、猴SIRP α 和人SIRP β 的结合活性。KWAR23(记载于“Ring NG, et al. Anti-SIRP α antibody immunotherapy enhances neutrophil and macrophage antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017 Dec 5; 114(49):E10578-E10585”,在本文称为BM,内部制备,重链和轻链氨基酸序列分别如SEQ ID NOs:32和33所示),和BI-765063(Boehringer Ingelheim International GmbH,在本文称为BM5,内部制备,重链和轻链氨基酸序列分别如SEQ ID NOs:34和35所示)用作阳性对照。

[0180] 2.1 捕获ELISA

[0181] 简而言之,用100 μ l 2 μ g/ml亲和纯化F(ab')₂片段特异山羊抗小鼠IgG(Jackson Immuno Research, Cat#115-005-072)的PBS溶液包被96孔板,37°C 2小时。板用洗涤缓冲液(PBS+0.05% v/v吐温-20, PBST)冲洗,再于4°C用200 μ l封闭缓冲液(含5% w/v脱脂牛奶的PBST)封闭过夜。再次冲洗板,分别与100 μ l梯度稀释的本申请SIRP α 抗体、阳性对照和阴性对照(hIgG, 静脉注射用人免疫球蛋白(pH 4), 华兰生物工程有限公司)(5倍稀释于含2.5% w/v脱脂牛奶的PBST中,起始于66.7nM) 37°C孵育40分钟,再次冲洗4次。含有捕获SIRP α 抗体的板与100 μ l生物素标记的人SIRP α -Fc蛋白(内部制备, SEQ ID NO:21, 3.8ng/mL于含2.5% w/v脱脂牛奶的PBST中)于37°C孵育40分钟,洗涤4次,与链霉亲和素结合的HRP(1:10000稀释于PBST, Jackson Immuno Research, Cat#016-030-084, 100 μ l/孔),于37°C孵育40分钟。在终洗后,板与100 μ l TMB(Innoreagents, Cat#TMB-S-002)于室温孵育。3分钟后用50 μ l/孔1M H₂SO₄终止反应,在酶标仪中对各孔读取吸光度,使用双波长模式,450nm用于TMB, 630nm作为参照波长。用OD(450-630)值和抗体浓度做图。使用Graphpad Prism对数据进行分析,

得出EC₅₀值。结果如图1所示。

[0182] 2.2间接ELISA

[0183] 简而言之,用100μl含2μg/ml食蟹猴SIRPα-his蛋白(内部制备,SEQ ID NO:25)或2μg/ml人SIRPα-亚型2-his蛋白(内部制备,SEQ ID NO:28)的碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液(pH 9.6)包被96孔板,37℃2小时。板用洗涤缓冲液(PBS+0.05%v/v吐温-20,PBST)冲洗一次,再于4℃用200μl/孔封闭缓冲液(含5%w/v脱脂牛奶的PBST)封闭过夜。再次冲洗板,与100μl梯度稀释的本申请SIRPα抗体或对照(起始于66.7nM,5倍梯度稀释于含2.5%w/v脱脂牛奶的PBST中)于37℃孵育40分钟。再次冲洗板4次,与过氧化物酶亲和纯化Fc γ片段特异的山羊抗小鼠IgG(1:5000稀释于PBST缓冲液,Jackson ImmunoResearch,Cat#115-035-071,100μl/孔)于37℃孵育40分钟。在终洗后,板用100μl TMB(Innoreagents)于室温孵育。在3-10分钟后用50μl 1M H₂SO₄终止反应,在酶标仪中对各孔的吸光度进行读数,使用双波长模式,450nm用于TMB,630nm作为参照波长。用OD(450-630)值和抗体浓度做图。使用Graphpad Prism对数据进行分析,得出EC₅₀值。结果如图2和图3所示。

[0184] 2.3基于细胞的结合FACS

[0185] 使用博奥信内部制备的HEK293-SIRPα细胞(在细胞膜上表达全长人SIRPα, uniprot#P78324)、HEK293-SIRPβ细胞(在细胞膜上表达全长人SIRPβ, uniprot#000241)和购自ATCC的Jurkat细胞(在细胞膜上内源性地表达全长人SIRP γ),经流式细胞术(FACS)检测本申请SIRPα抗体与细胞表面人SIRPα、人SIRPβ或人SIRP γ的结合活性。根据lipofectamine 3000转染试剂(Thermo Fisher)的说明,通过用分别插入有人SIRPα和人SIRPβ编码序列的pCMV-T-P质粒转染HEK293细胞,来制备HEK293-SIRPα细胞和HEK293-SIRPβ细胞。从细胞培养瓶中收获细胞,洗涤两次,在含2%v/v胎牛血清的PBS(FACS缓冲液)中重悬。之后,在96孔板中,每孔1×10⁵个细胞,在冰上,与100μl含梯度稀释的本申请SIRPα抗体或对照(起始于10μg/mL,5倍梯度稀释)的FACS缓冲液孵育50分钟。细胞用FACS缓冲液洗涤两次,并加入100μL R-藻红蛋白亲和纯化F(ab')₂片段山羊抗小鼠IgG(H+L)(1:1000稀释于FACS缓冲液,Jackson Immuno Research,Cat#115-116-146)。4℃避光孵育50分钟后,细胞洗3次并用FACS缓冲液重悬。使用Becton Dickinson FACS Canto II-HTS设备进行荧光测定,用MFI(平均荧光强度)与抗体浓度作图。采用Graphpad Prism进行数据分析,得出EC₅₀值。结果如图4-6所示。

[0186] 从图1和图3可以看出,抗体E1D5E1F1、E1F1B1C3和E1H10B7C7特异性结合人SIRPα,且以比阳性对照更高的B_{max}(最大结合)和更低的EC₅₀与人SIRPα-亚型2交叉反应。与BM和BM5不同,抗体E1D5E1F1和E1H10B7C7示出更高的食蟹猴SIRPα结合活性(图2)。特别地,在基于细胞的FACS结合检测中,抗体E1F1B1C3对表达人SIRPα的细胞(图4)和表达人SIRPβ的细胞(图5)均表现出高结合活性。根据图6,抗体E1D5E1F1、E1F1B1C3和E1H10B7C7不结合人SIRP γ。

[0187] 实施例3.SIRPα抗体对SIRPα-CD47相互作用的阻断活性

[0188] 3.1基于细胞的配体阻断FACS

[0189] 采用内部制备的293F-SIRPα细胞,经FACS评测本申请SIRPα抗体阻断CD47蛋白与细胞表面SIRPα结合的能力。简而言之,按照lipofectamine 3000转染试剂(Thermo Fisher)的说明,用在EcoRI和XbaI之间有编码人SIRPα(NP_542970.1)的核苷酸序列的

pCMV-T-P质粒构建体,转染293F细胞。

[0190] 从细胞培养瓶中收获293F-SIRP α 细胞,洗涤两次,在含2% v/v胎牛血清的PBS (FACS缓冲液)中重悬。之后,96孔板中每孔 1×10^5 细胞,与100 μ l梯度稀释的本申请SIRP α 抗体或对照(起始于10 μ g/mL,5倍梯度稀释于FACS缓冲液)4 $^{\circ}$ C孵育50分钟。板用FACS缓冲液洗涤两次,然后向板加入100 μ l/孔含生物素标记的人CD47-Fc蛋白(内部制备,SEQ ID NO:31, 148ng/mL)的FACS缓冲液,板于4 $^{\circ}$ C孵育60分钟。板用FACS缓冲液洗涤两次,然后加入100 μ l R-藻红蛋白链霉亲和素(1:500稀释于FACS缓冲液, Jackson ImmunoResearch, Cat#016-110-084),4 $^{\circ}$ C避光孵育40分钟。细胞洗涤两次,并用FACS缓冲液重悬。使用Becton Dickinson FACS Canto II-HTS设备进行荧光测定,用MFI(平均荧光强度)与抗体浓度作图。采用Graphpad Prism进行数据分析,得出IC₅₀值。结果如图7所示。

[0191] 3.2配体阻断ELISA

[0192] 在竞争ELISA检测中,测定SIRP α 抗体阻断人SIRP α -CD47结合的能力。简而言之,用100 μ l含2 μ g/mL人SIRP α -his蛋白(内部制备,SEQ ID NO:22)的PBS包被96孔微孔板,37 $^{\circ}$ C2小时。板用洗涤缓冲液(PBS+0.05%吐温-20,PBST缓冲液)冲洗一次,用200 μ l封闭缓冲液(含5% w/v脱脂牛奶的PBST)37 $^{\circ}$ C封闭2小时。封闭时,将本申请SIRP α 抗体或对照用含2.5%脱脂牛奶的PBST稀释,起始于10 μ g/mL,5倍梯度稀释,并加至板中,每孔100 μ l,37 $^{\circ}$ C孵育40分钟。板洗涤3次后,将0.8mg/mL生物素标记的人CD47-his蛋白(SEQ ID NO:30)1:5000稀释于2.5%牛奶中,将得到的溶液加入到板中,每孔100 μ l。37 $^{\circ}$ C孵育40分钟后,用清洗缓冲液洗板,加入100 μ l链霉亲和素结合的HRP,于37 $^{\circ}$ C孵育40分钟,以检测与SIRP α 结合的生物素标记人CD47-his。板用清洗缓冲液再次冲洗,加入TMB,用1M H₂SO₄终止反应。在酶标仪中对各孔的吸光度进行读数,使用双波长模式,450nm用于TMB,630nm作为参照波长,用OD(450-630)值和抗体浓度做图。使用Graphpad Prism对数据进行分析,得出IC₅₀值。结果如图8所示。

[0193] 从图7可以看出,SIRP α 抗体E1D5E1F1、E1F1B1C3和E1H10B7C7能够阻断人CD47与细胞表面人SIRP α 的结合,阻断活性与BM5相当。

[0194] 图8示出SIRP α 抗体E1D5E1F1、E1F1B1C3和E1H10B7C7能够阻断人SIRP α -CD47结合,具有与BM和BM5相当的阻断活性。

[0195] 实施例4.SIRP α 抗体的工程化

[0196] SIRP α 抗体E1F1B1C3和E1H10B7C7在天冬酰胺(Asn,N)残基后紧跟甘氨酸残基(Gly,G)从而很可能发生脱酰胺的CDR和骨架区进行工程化改造。特别地,抗体E1H10B7C7最初在重链CDR2区有一个N-G残基组合,且在轻链骨架3区有一个也作为糖基化位点的N-G残基组合,因此在这两个位点进行基因改造以消除脱酰胺和糖基化风险,如下表2-1所示。抗体E1F1B1C3具有两个高风险脱酰胺位点,即,在重链CDR2区有一个N-G残基组合,在轻链CDR2-FR3区有一个N-G残基组合,因此在这两个位点改造,如下表2-2所示。基因改造后的重链和轻链可变区的氨基酸序列如表1所示。

[0197] 表2-1.hIgG4形式的工程化E1H10B7C7抗体

[0198]

mAb	重链	轻链	恒定区
E1H10B7C7	无突变	无突变	hIgG4(S228P+YTE+K447 Del)/h κ
E1H10B7-CDRV1-IgG4	G56A	N65S	hIgG4(S228P+YTE+K447 Del)/h κ

	E1H10B7-CDRV2-IgG4	N55A	N65S	hIgG4 (S228P+YTE+K447 Del) /hκ
--	--------------------	------	------	--------------------------------

[0199] 表2-2.hIgG4形式的工程化E1F1B1C3抗体

[0200]	mAb	重链	轻链	恒定区
	E1F1B1C3	无突变	无突变	hIgG4 (S228P+YTE+K447 Del) /hκ
	E1F1B1C3-CDRV1-IgG4	G56A	N56A	hIgG4 (S228P+YTE+K447 Del) /hκ
	E1F1B1C3-CDRV2-IgG4	N55A	N56A	hIgG4 (S228P+YTE+K447 Del) /hκ

[0201] 工程化抗体与人IgG4 (S228P+YTE+K447 Del) 恒定区 (SEQ ID NO:19) 和人κ恒定区 (SEQ ID NO:20) 进行表达,其中人IgG4 (S228P+YTE+K447 Del) 恒定区,与野生型相比,可以减少IgG4抗体中臂交换的发生,并延长抗体的半衰期。

[0202] 工程化抗体也与人IgG1 (AQQ+K447 Del或AQQ+YTE+K447 Del) 恒定区 (SEQ ID NO:38 (X1=M、X2=S、X3=T;或X1=Y、X2=T、X3=E)) 和人κ恒定区 (SEQ ID NO:20) 进行表达,如表3-1和表3-2所示,其中具有上述修饰的IgG1恒定区具有增强的Fc γ 受体结合亲和力(因此具有延长的半衰期)和增强的抗体稳定性(即,降低的抗体异质性)。

[0203] 表3-1.hIgG1形式的工程化E1H10B7C7抗体

[0204]	mAb	重链	轻链	恒定区
	E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE)	G56A	N65S	hIgG1 (AQQ+YTE+K447 Del) /hκ
	E1H10B7-CDRV1-IgG1	G56A	N65S	hIgG1 (AQQ+K447 Del) /hκ

[0205] 表3-2.hIgG1形式的工程化E1F1B1C3抗体

[0206]	mAb	重链	轻链	恒定区
	E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE)	G56A	N56A	hIgG1 (AQQ+YTE+K447 Del) /hκ
	E1F1B1C3-CDRV1-IgG1	G56A	N56A	hIgG1 (AQQ+K447 Del) /hκ

[0207] 实施例5.工程化抗体的表征

[0208] 实施例4制备的抗体,E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE)、E1H10B7-CDRV1-IgG1、E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1,如上所述进行纯化,并按照前述实施例或以下描述的方法步骤,在BIAcore、间接ELISA、基于细胞的结合FACS、以及基于细胞的配体阻断FACS中进行测定。

[0209] 5.1使用BIAcore表面等离子体共振确定结合亲和力

[0210] 工程化SIRPα抗体,经Biacore T200系统 (GE healthcare,Pittsburgh,PA,USA) 对其结合亲和力和结合动力学进行表征。

[0211] 简单地说,使用蛋白A芯片 (GE healthcare,Cat#Cytiva 29127555)。本申请的工程化抗体或对照以2μg/ml流经芯片,流速为10μL/min。然后,将梯度稀释的人SIRPα-his蛋白 (内部制备,氨基酸序列为SEQ ID NO:22)、人SIRPβ-his蛋白 (内部制备,氨基酸序列为SEQ ID NO:23)、人SIRP γ -his蛋白 (内部制备,氨基酸序列为SEQ ID NO:24)、或猴SIRPα-his (内部制备,氨基酸序列为SEQ ID NO:25),2倍稀释于HBS-EP⁺缓冲液 (Biacore提供),起始于200nM,以30μL/min的流速分别流到芯片上。抗原-抗体结合动力学观测2分钟,解离动力学观测10分钟。用BIAcore评估软件将结合与解离曲线拟合到1:1Langmuir结合模型中。确定K_D、K_a和K_d值,并总结在以下表4-1和表4-2中。

[0212] 表4-1.工程化SIRPα抗体与人SIRPα和人SIRPβ的结合亲和力

mAb ID#	Biacore动力学						
	人SIRP α			人SIRP β			
	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (M)	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (M)	
[0213] E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE)	1.29E+05	1.88E-03	1.46E-08	BDL	BDL	BDL	
E1H10B7-CDRV1-IgG1	1.34E+05	1.18E-03	8.78E-09	BDL	BDL	BDL	
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE)	1.28E+06	1.05E-03	8.24E-10	7.13E+05	2.00E-03	2.81E-09	
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1	1.17E+06	4.02E-04	3.44E-10	7.73E+05	9.07E-04	1.17E-09	
BM5	2.90E+05	7.75E-03	2.67E-08	3.04E+05	9.28E-03	3.05E-08	

[0214] BDL: 低于检测限

[0215] 表4-2. 工程化SIRP α 抗体与猴SIRP α 的结合亲和力

mAb ID#	猴SIRP α		
	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (M)
[0216] E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE)	2.64E+04	1.46E-02	5.53E-07
E1H10B7-CDRV1-IgG1	3.50E+04	1.32E-02	3.76E-07
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE)		低结合	
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1		低结合	
BM5		不结合	

[0217] 表4-3. 工程化SIRP α 抗体与FcRn的结合亲和力

mAb ID#	FcRn	
	pH 6.0下的 K_D (M)	pH 7.4下的 K_D (M)
[0218] E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE)	2.88E-08	1.29E-07
E1H10B7-CDRV1-IgG1	9.41E-08	不结合
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE)	2.68E-08	6.51E-07
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1	5.67E-08	不结合

[0219] 对于本申请的工程化SIRP α 单克隆抗体与人FcRn蛋白 (Cat#FCM-H5286, Acrobiosystems Inc.) 的结合亲和力, 使用共价连接有人FcRn蛋白的CM5芯片 (羧甲基右旋糖包被的芯片, GE healthcare, Cat#BR-1005-30)。工程化SIRP α 单克隆抗体, 2倍稀释于HBS-EP⁺缓冲液 (Biacore提供), 起始于62.5 μ g/ml, 以30 μ L/min的流速流经芯片。测定 K_D 、 K_a 和 K_d 值, 并总结在以下表4-3中。

[0220] BIACore检测数据显示, 抗体E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1H10B7-CDRV1-IgG1特异性结合人SIRP α , 但不结合人SIRP β 或人SIRP γ (数据未显示), 而抗体E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1结合人SIRP α 和人SIRP β 但不结合人SIRP γ 。此外, 抗体E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 在pH 6.0显示出高于其各自未经YTE改造的对应抗体的FcRn结合亲和力, 因此很可能在人体内有更长的半衰期。

[0221] 5.2通过间接ELISA、基于细胞的结合FACS和基于细胞的配体阻断FACS确定工程化SIRP α 抗体的结合活性

[0222] 按照实施例2的操作规程, 进行测试抗体对小鼠SIRP α -his (内部制备, SEQ ID NO: 37, 小鼠SIRP α (BAA20376.1, Met 1-Phe 363)) 的结合活性的间接ELISA, 其中使用过氧化物酶亲和纯化Fc γ 片段特异F(ab')₂片段山羊抗人IgG (Jackson ImmunoResearch, Cat#109-

036-098), 替代过氧化物酶亲和纯化Fc γ 片段特异山羊抗小鼠IgG, 100 μ l/孔。

[0223] 按照实施例2的操作规程, 用间接ELISA测试本申请SIRP α 抗体与人SIRP α -V8的交叉反应, 其中用100 μ l含2 μ g/ml人SIRP α -V8-his蛋白(内部制备, SEQ ID NO:29)的碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液(pH 9.6)包被96孔微孔板。

[0224] 间接ELISA的结果如图9-16所示。

[0225] 对于基于细胞的结合FACS, 使用R-藻红蛋白亲和纯化Fc γ 片段特异山羊抗人IgG (Jackson Immunoresearch, Cat#109-115-098) 代替R-藻红蛋白亲和纯化F(ab')₂片段山羊抗小鼠IgG (H+L), 1:1000稀释于FACS缓冲液, 100 μ l/孔。按照相似的操作规程, 经流式细胞术(FACS)测试SIRP α 抗体与人SIRP α 、人SIRP β 和人SIRP γ 的结合活性。基于细胞的结合FACS的结果如图17-22所示。

[0226] 对于基于细胞的配体阻断FACS, SIRP α 抗体阻断CD47蛋白与细胞表面人SIRP α 结合以及阻断SIRP α 蛋白与细胞表面人CD47结合的能力经FACS评估, 分别使用内部制备的293F-SIRP α 细胞和293F-CD47细胞。简单地说, 用含有编码人SIRP α (NP_542970.1) 或人CD47 (Uniprot#Q08722) 的核苷酸序列的pCMV-T-P质粒构建体转染293F细胞。基于细胞的配体阻断FACS测试结果如图23-26所示。

[0227] 在间接ELISA中, E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE)、E1H10B7-CDRV1-IgG1、E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1特异性结合猴SIRP α (图9-10)、人SIRP α -V8 (图13-14) 以及人SIRP α -亚型2 (图15-16), 而不结合小鼠SIRP α (图11-12)。

[0228] 在基于细胞的结合FACS测试中, 数据显示, E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1H10B7-CDRV1-IgG1, 与BM和BM5相比, 示出相当的与细胞表面人SIRP α 的结合活性 (图17) 以及较弱的与细胞表面人SIRP β 的结合活性 (图19), 而E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1显示出高于BM和BM5的对细胞表面人SIRP α 和人SIRP β 的结合活性, 如图18和图20所示。与BM5相似, E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE)、E1H10B7-CDRV1-IgG1、E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1不结合表达在Jurkat细胞上的人SIRP γ , 而BM与之结合 (图21-22)。

[0229] 抗体E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1H10B7-CDRV1-IgG1能够以与BM5相当的活性, 阻断人CD47与细胞表面人SIRP α 的结合 (图23) 以及人SIRP α 与细胞表面人CD47的结合 (图25)。抗体E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1能够以与BM相当的活性, 阻断人CD47与细胞表面人SIRP α 的结合 (图24) 以及人SIRP α 与细胞表面人CD47的结合 (图26)。这些结果表明, 本申请的SIRP α 单克隆抗体具有较高的SIRP α -CD47阻断活性。

[0230] 5.3 SIRP α 抗体的熔融温度

[0231] 还测试了抗体E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE)、E1H10B7-CDRV1-IgG1、E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) 和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1的热稳定性。简单地说, 使用GloMelt™热迁移蛋白稳定试剂盒 (Biotium, Cat#33022-T), 用蛋白热迁移法测定T_m (熔融温度)。简单地说, 使GloMelt™染料融化, 达到室温。将包含染料的小瓶进行涡旋振荡和离心。然后, 通过向95 μ L PBS加入5 μ L 200 $\times$ 染料, 制备10 $\times$ 染料。之后, 加入2 μ L 10 $\times$ 染料和10 μ g抗体, 加入PBS至20 μ L总反应体积。简单旋转含有染料和抗体的管子, 并置于实时PCR热循环仪 (Roche, LightCycler 480II) 中, 其设置为具有表5参数的熔融曲线程序。

[0232] 表5. 熔融曲线程序参数

[0233]	大概步骤	温度	升温速率	保持时间
	初始保持	25°C	NA	30s
	熔融曲线	25-99°C	0.1°C/s	NA

[0234] 结果示于表6,表明本申请的抗体在人体内很可能是稳定的。

[0235] 表6.SIRP α 抗体的熔融温度

	mAb ID#	T _m (熔融温度) °C	
		T _{m1}	T _{m2}
[0236]	E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE)	67.5	NA
	E1H10B7-CDRV1-IgG1	68.0	NA
	E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE)	78.0	NA
	E1F1B1C3-CDRV1-IgG1	78.0	NA

[0237] 实施例6.SIRP α 抗体的基于细胞的功能活性

[0238] 6.1SIRP α 抗体增强巨噬细胞吞噬Raji细胞

[0239] 通过阴性选择,将CD14⁺单核细胞从正常人PBMC中分离,并在补充有10% FBS、1%青霉素-链霉素和75ng/mL M-CSF的RPMI-1640培养基中分化成巨噬细胞。第5天用AccutaseTM收集巨噬细胞,并接种于96孔平板,过夜(10⁴细胞/孔,100 μ l)。次日,将Raji细胞(ATCC#CCL-86,2 $\times$ 10⁶细胞/mL)用1.25 μ M CFSE于37°C标记20分钟,在补充有10% FBS的RPMI-1640培养液中,调整至最终细胞浓度8 $\times$ 10⁵细胞/mL。将标记的Raji细胞(40 μ l)和利妥昔单抗(Roche Inc.,4 μ g/mL,40 μ l)加入至96孔U底板中,室温孵育30分钟。除去巨噬细胞板中的上清液,向板中加入20 μ g/mL本申请SIRP α 抗体,50 μ l/孔,室温孵育30分钟。将CFSE标记的Raji细胞和利妥昔单抗的混合物(50 μ l/孔)加至含巨噬细胞和SIRP α 抗体的板中,37°C孵育4小时。然后,用AccutaseTM收集所有细胞,转移至96孔V底板中。将细胞与人FcX阻断剂(Biolegend,Cat#422302)4°C孵育20分钟,以阻断Fc受体,然后与APC-CD11b(Biolegend,Cat#B325845)4°C孵育30分钟。离心后,将细胞在50 μ l染色缓冲液中重悬,加入10 μ L PI(碘化丙啶P3566,Thermo,Cat#2229176)。吞噬作用测定为PI⁻CD11b⁺CFSE⁺巨噬细胞与总PI⁻CD11b⁺巨噬细胞的比。结果如图27所示,其示出,本申请的抗体增强了巨噬细胞对Raji细胞的吞噬作用,活性高于BM5。

[0240] 6.2SIRP α 抗体不诱导THP1细胞中的SIRP α 磷酸化

[0241] 在基于细胞的检测中,测试本申请SIRP α 抗体的激动活性。简单地说,将100 μ l含梯度稀释的本申请SIRP α 抗体或100 μ l含梯度稀释的人CD47-Fc(内部制备,SEQ ID NO:31)的补充10% FBS的RPMI-1640培养基(3倍稀释,终浓度从3nM至0.004nM),铺板至96孔PCR板。然后,向板中加入于100 μ l补充10% FBS的RPMI-1640中的10⁶THP1细胞(ATCC#TIB-202),4°C孵育15分钟。将板离心,除去上清液,并用PBS冲洗一次。向板中加入含蛋白酶/磷酸酶抑制剂的NP-40裂解缓冲液(1:100),220 μ l/孔,在冰上孵育15分钟。收集上清液,-80°C储存。

[0242] 为检测细胞裂解液样本中SIRP α 蛋白的磷酸化,将SIRP α 多克隆抗体(INVITROGEN,Cat#PA5-81024,1:1000于PBS中),每孔100 μ l,铺于96孔ELISA板中,室温孵育过夜。次日,板用冲洗缓冲液(含0.05%吐温20的PBS,pH7.2至7.4)冲洗四次,用5%牛奶(250 μ l/孔)室温封闭2小时。板用冲洗缓冲液冲洗四次,加入上述获得的细胞裂解液(100 μ l/孔),室温孵育2小时。冲洗四次后,向板中加入抗pY-HRP(RD systems Inc.,Cat#HAM1676,1:5000,100 μ l/

孔),避光室温孵育2小时。冲洗后,向板中加入TMB(100 μ l/孔),室温孵育约20分钟。加入1M H₂SO₄(50 μ l/孔)后,测定OD450值。结果示于图28,其示出,本申请的抗体不诱导THP1细胞中的SIRP α 磷酸化,表明抗体没有激动活性。

[0243] 6.3 SIRP α 抗体拮抗CD47介导的THP1细胞SIRP α 磷酸化

[0244] 将梯度稀释于补充有10% FBS的RPMI-1640培养基中的的本申请SIRP α 抗体(4倍稀释,终浓度从66.7nM至0.065nM),在96孔板中铺板(50 μ l/孔)。向板中加入100 μ l含10⁶THP1细胞的补充有10% FBS的RPMI-1640,4 $^{\circ}$ C孵育60分钟,加入于补充有10% FBS的RPMI-1640中的人CD47-Fc(终浓度为0.625nM,50 μ l/孔),4 $^{\circ}$ C孵育15分钟。将板离心,除去上清液,每孔中的细胞用PBS冲洗一次。然后,加入含蛋白酶/磷酸酶抑制剂的NP-40裂解缓冲液(1:100),220 μ l/孔,将板在冰上孵育15分钟。收集上清液,-80 $^{\circ}$ C储存。将SIRP α 多克隆抗体(INVITROGEN,Cat#PA5-81024,1:1000于PBS中)每孔100 μ l,铺于96孔ELISA板中,室温孵育过夜。次日,板用冲洗缓冲液(含0.05%吐温20的PBS,pH7.2至7.4)冲洗四次,再用5%牛奶(250 μ l/孔)室温封闭2小时。板用冲洗缓冲液冲洗四次。然后,向板中加入上述获得的细胞裂解液,100 μ l/孔,室温孵育2小时。冲洗四次后,加入抗pY-HRP(RD systems Inc.,Cat#HAM1676,1:5000,100 μ l/孔),板避光室温孵育2小时。冲洗后,向板中加入TMB(100 μ l/孔),室温孵育约20分钟。加入1M H₂SO₄(50 μ l/孔)后,测定OD450值。

[0245] 如图29所示,数据显示,本申请的抗体是拮抗性的。

[0246] 6.4内化试验

[0247] 简单地说,将含293F-SIRP α 细胞的100 μ l含10% FBS的FreeStyle 293培养基,在96孔白色/透明底板中铺板,1500细胞/孔,在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下孵育过夜。本申请的抗体和重组毒素蛋白(DT3C,内部制备,SEQ ID NO:36)用FreeStyle 293培养基分别稀释,混合(体积比1:1,摩尔比1:2.2),室温孵育30分钟。将梯度稀释的混合物加入至含有293F-SIRP α 细胞的板中,100 μ l每孔,在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下孵育3天。加入Luminescent细胞活力检测试剂(Vendor#Vazyme Inc.,Cat#DD1101-02),测得RLU(板底部用箔包裹)。结果如图30所示。结果显示,本申请的抗体以与BM以及BM5相似的水平 and 速率内化至细胞中。

[0248] 实施例7. SIRP α 抗体在小鼠肿瘤模型中的体内抗肿瘤效力

[0249] 7.1 SIRP α 抗体与CD20单克隆抗体联合的抗肿瘤活性

[0250] 在B-NDG hSIRPA小鼠(Beijing Biocytogen Co.,Ltd)中测试抗体E1H10B7-CDRV1-IgG1(YTE)和E1F1B1C3-CDRV1-IgG1(YTE)的体内抗肿瘤活性。

[0251] Raji细胞购自ATCC,并由百奥赛图(北京)医药科技股份有限公司基因改造成表达荧光素酶(命名为B-luc-GFP-Raji细胞)。将B-luc-GFP-Raji细胞在含10%灭活胎牛血清的RPMI 1640培养基中,37.0 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养,经尾静脉注射至42只雌性B-NDG hSIRPA小鼠,每只小鼠1 $\times$ 10⁵细胞/0.2mL。Raji细胞注射后的第3天,平均肿瘤信号强度达到1.5 $\times$ 10⁶p/sec,基于肿瘤信号强度和体重,将小鼠随机分成四组,每组6只,这天设定为第1天。从第1天起,溶剂组(G2)的动物注射Dulbecco's磷酸盐缓冲液(也称为DPBS),组1(G1)的动物腹腔内注射E1H10B7-CDRV1-IgG1(YTE),一周两次,剂量为10mg/kg,以及每两周静脉注射CD20抗体利妥昔单抗,0.1mg/kg。组3(G3)的动物腹腔内注射DPBS,一周两次,以及每两周静脉注射利妥昔单抗,0.1mg/kg,而组4(G4)的动物腹腔内注射E1F1B1C3-CDRV1-IgG1(YTE),一周两次,10mg/kg,以及每两周静脉注射利妥昔单抗,0.1mg/kg。

[0252] 在研究期间,每周两次测量小鼠的肿瘤信号强度和体重。该研究于第27天结束。根据肿瘤信号强度计算肿瘤抑制率(TGI),在研究结束时生成存活曲线。

[0253] 在第21天,溶剂组的动物相比于第1天具有明显的体重减轻(-2.2g,10.8%)。此外,与溶剂组相比,G1和G3动物的体重变化没有明显区别,而G4小鼠的平均重量明显更高(表7-1)。

[0254] 表7-1.B-NDG hSIRPA小鼠的体重变化

组别	药物	重量（g） ^a			D21的体重变化（g）	
		给药前	D21	p ^b		
[0255]	G1	E1H10B7-CDRV1-IgG1（YTE） +利妥昔单抗	19.7±0.8	19.9±0.9	0.3355	+0.2
	G2	DPBS	20.3±0.7	18.1±0.7	-	-2.2
	G3	利妥昔单抗	20.4±0.7	19.0±0.8	0.8259	-1.4
	G4	E1F1B1C3-CDRV1-IgG1（YTE） +利妥昔单抗	20.2±0.7	21.6±0.6	*0.0140	+1.4

[0256] a:均值±SEM;b:基于第21天小鼠体重的单因素方差统计分析(给药组与G2组比)*p<0.05。

[0257] 表7-2.肿瘤生长抑制

[0258]

组别	药物	肿瘤信号强度 (p/sec) ^a			P ^b
		处理前	D21	TGI _{TV} (%)	
G1	E1H10B7-CDRV1-IgG1 (YTE) +利妥昔单抗	1.54E+06	8.39E+08	76.6	***0.0001
		±1.04E+05	±1.54E+08		
G2	DPBS	1.56E+06	3.58E+09	-	-
		±1.74E+05	±3.08E+08		
G3	利妥昔单抗	1.54E+06	2.77E+09	22.5	0.2367
		±1.58E+05	±5.48E+08		
G4	E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) +利妥昔单抗	1.54E+06	5.94E+08	83.4	***0.0001
		±1.70E+05	±1.46E+08		

[0259] a:均值±SEM

[0260] b:基于第21天肿瘤信号强度的单因素方差统计分析(给药组与G2组比)***p<0.001。

[0261] 在第21天,溶剂组的平均肿瘤信号强度为 3.58×10^9 p/sec,G1和G4组的分别为 8.39×10^8 p/sec和 5.94×10^8 p/sec。此外,G1和G4的TGI_{TV}分别是76.6%和83.4%(表7-2)。

[0262] 从表7-1、7-2和图31-32可以看出,本申请的SIRPα抗体,在10mg/kg的剂量时,与利妥昔单抗联用显示出较高的疗效。

[0263] 7.2 SIRPα抗体在动物模型中的剂量依赖性抗肿瘤活性

[0264] 根据7.1中所述的实验方案,进一步测试E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE)的体内抗肿瘤活性。

[0265] 具体地,基于肿瘤信号强度和体重,将小鼠随机分成5组(每组六只)。从第1天起,溶剂组(G2)的动物注射DPBS;组3(G3)的动物腹腔内注射E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE),一周

两次,剂量为10mg/kg,且每两周静脉注射利妥昔单抗,1mg/kg;组5(G5)的动物腹腔内注射E1F1B1C3-CDRV1-IgG1(YTE),一周两次,剂量为3mg/kg,且每两周静脉注射利妥昔单抗,0.1mg/kg。组1(G1)的动物腹腔内注射DPBS,一周两次,并每两周静脉注射利妥昔单抗,0.1mg/kg一次,而组4(G4)的动物腹腔内注射BM5,10mg/kg,一周两次,且每两周静脉注射利妥昔单抗,0.1mg/kg。结果示于表7-3。

[0266] 表7-3.肿瘤生长抑制

组别	药物	肿瘤信号强度 (p/sec) ^a			
		处理前	D17	TGI _{TV} (%)	P ^b
[0267]	G1 利妥昔单抗	1.42E+06 ±1.93E+05	2.28E+09± 4.96E+08	31.31	0.1538
	G2 DPBS	1.43E+06 ±1.40E+05	3.32E+09 ±4.56E+08	/	/
	G3 E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) +利妥昔单抗	1.42E+06 ±2.04E+05	9.12E+07 ±3.72E+07	97.25	0.00003***
	G4 BM5 +利妥昔单抗	1.41E+06 ±1.59E+05	2.93E+08 ±1.42E+08	91.18	0.00008***
	G5 E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) +利妥昔单抗	1.42E+06 ±1.90E+05	6.23E+08 ±3.28E+08	81.25	0.0007***

[0268] a: 均值±SEM

[0269] b: 基于第17天肿瘤信号强度的单因素方差统计分析(给药组与G2组比)***p<0.001。

[0270] 在第17天,溶剂组的平均肿瘤信号强度为 3.32×10^9 p/sec, G3和G5组的分别为 9.12×10^7 p/sec和 6.23×10^8 p/sec。G3和G5的TGI_{TV}分别为97.25%和81.25%(表7-3)。

[0271] 从表7-3和图33可以看出,本申请SIRPα抗体示出剂量依赖性的抗肿瘤活性。此外,在10mg/kg剂量下与利妥昔单抗联用时,本申请SIRPα抗体的抗肿瘤效力高于BM5。

[0272] 7.3 SIRPα抗体在实体瘤模型中的抗肿瘤活性

[0273] 在移植结肠肿瘤的C57BL/6-hSIRPA(2)/hCD47小鼠(Shanghai Model Organisms Center, Inc.)中测试E1F1B1C3-CDRV1-IgG1(YTE)的体内抗肿瘤活性。

[0274] 将MC38-hCLDN18.2/hCD47细胞,一种小鼠结肠癌细胞系(NM-S13-TM19, Shanghai Model Organisms Center, Inc.), 37°C、5%CO₂培养在EMEM/High+10%胎牛血清培养基中,经右侧胁腹皮下注射至48只雌性C57BL/6-hSIRPA(2)/hCD47小鼠,每只小鼠 3×10^6 细胞/0.1mL。当平均肿瘤体积达到75-95mm³时,基于肿瘤体积和体重,将小鼠随机分为4组,每组8只,这一天定为第1天。从第1天起,溶剂组(G2)的动物腹腔内注射DPBS,组1(G1)的动物腹腔内注射CLDN18.2抗体(内部制备,重链和轻链为SEQ ID NOs:39和40),一周两次,剂量为10mg/kg。组3(G3)的动物腹腔内注射E1F1B1C3-CDRV1-IgG1(YTE),一周两次,10mg/kg,而组4(G4)的动物腹腔内注射E1F1B1C3-CDRV1-IgG1(YTE),10mg/kg,一周两次,和CLDN18.2抗体,10mg/kg,一周两次。

[0275] 在研究期间,每周两次测量肿瘤体积和体重。根据肿瘤体积计算肿瘤抑制率(TGI),结果示于表7-4。

[0276] 在第17天,溶剂组的平均肿瘤体积为 924.72mm^3 ,G3和G4组的分别为 693.94mm^3 和 355.15mm^3 。G3和G4的 TGI_{TV} 分别为23.83%和66.05%。

[0277] 从表7-4和图34可以看出,本申请的SIRP α 抗体,与CLDN18.2抗体联用抑制实体瘤生长时,表现出较高的抗肿瘤活性。

[0278] 表7-4.肿瘤生长抑制

组别	药物	肿瘤体积 (mm^3) ^a		TGI_{TV} (%)	P ^b
		处理前	D17		
[0279]	G1 CLDN18.2抗体	79.40±2.99	1112.58±225.10	-16.95	0.4685
	G2 DPBS	80.15±3.54	924.72±49.10	/	/
	G3 E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE)	79.45±2.93	693.94±147.58	23.83	0.2003
	G4 E1F1B1C3-CDRV1-IgG1 (YTE) +CLDN18.2抗体	79.50±2.86	355.15±262.39	66.05	0.0095**

[0280] a:均值±SEM

[0281] b:基于第17天肿瘤尺寸的单因素方差统计分析(给药组与G2组比)** $p < 0.01$ 。

[0282] 尽管本申请已经结合一个或多个实施方式在以上进行了阐述,应当理解的是,本申请不限于那些实施方式,且说明书意在涵盖包括在所附权利要求的宗旨和范围内的所有可选方案、修改和等同物。所有本文中引用的文献均通过引用的方式进一步全文并入。

[0283] 本申请中的序列总结如下。

[0284]	描述/ 序列/SEQ ID NO.
	嵌合和全人源E1F1B1C3、E1F1B1C3-CDRV1和E1F1B1C3-CDRV2的VH CDR1 SNAMH (SEQ ID NO: 1)
	嵌合和全人源E1F1B1C3的VH CDR2 WIKAGX1X2EIKYSQKFQG (SEQ ID NO: 2) X1=N, X2=G WIKAGNGEIKYSQKFQG
	E1F1B1C3-CDRV1的VH CDR2 SEQ ID NO: 2, X1=N, X2=A WIKAGNAEIKYSQKFQG
	E1F1B1C3-CDRV2的VH CDR2 SEQ ID NO: 2, X1=A, X2=G WIKAGAGEIKYSQKFQG
	嵌合和全人源E1F1B1C3、E1F1B1C3-CDRV1和E1F1B1C3-CDRV2的VH CDR3 GDYYYYYMDV (SEQ ID NO: 3)
	嵌合和全人源E1F1B1C3、E1F1B1C3-CDRV1和E1F1B1C3-CDRV2的VL CDR1

[0285]

RASQISDFLN (SEQ ID NO: 4)
嵌合和全人源E1F1B1C3的VL CDR2 AASSLQX (SEQ ID NO: 5) X=N AASSLQN E1F1B1C3-CDRV1和E1F1B1C3-CDRV2的VH CDR2 SEQ ID NO: 5, X=A AASSLQA
嵌合和全人源E1F1B1C3、E1F1B1C3-CDRV1和E1F1B1C3-CDRV2的VL CDR3 QQSYSTPLS (SEQ ID NO: 6)
嵌合和人源E1F1B1C3的VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSNAMHWVRQVPGQGLEWMGWIKAGX1 X2EIKYSQKFQGRVTITRDTSATTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGDYDDYYMDVWGKG TTVTVSS (SEQ ID NO: 7) X1=N, X2=G QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSNAMHWVRQVPGQGLEWMGWIKAGNG EIKYSQKFQGRVTITRDTSATTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGDYDDYYMDVWGKGTT VTVSS
E1F1B1C3-CDRV1的VH SEQ ID NO: 7, X1=N, X2=A QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSNAMHWVRQVPGQGLEWMGWIKAGNA EIKYSQKFQGRVTITRDTSATTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGDYDDYYMDVWGKGTT VTVSS
E1F1B1C3-CDRV2的VH SEQ ID NO: 7, X1=A, X2=G QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSNAMHWVRQVPGQGLEWMGWIKAGAG EIKYSQKFQGRVTITRDTSATTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGDYDDYYMDVWGKGTT VTVSS
嵌合和人源E1F1B1C3的VL DIQVTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQISDFLNWYQKPGKAPKLLIHAASSLQXGVPSR FSGSGSGTDFSLTINSLQPEDFATYYCQQSYSTPLSFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 8) X=N DIQVTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQISDFLNWYQKPGKAPKLLIHAASSLQNGVPSR FSGSGSGTDFSLTINSLQPEDFATYYCQQSYSTPLSFGGGTKVEIK
E1F1B1C3-CDRV1和E1F1B1C3-CDRV2的VL SEQ ID NO: 8, X=A DIQVTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQISDFLNWYQKPGKAPKLLIHAASSLQAGVPSR FSGSGSGTDFSLTINSLQPEDFATYYCQQSYSTPLSFGGGTKVEIK
嵌合和全人源E1H10B7C7、E1H10B7-CDRV1和E1H10B7-CDRV2的VH CDR1 SXAMQ (SEQ ID NO: 9) X=Y SYAMQ
嵌合和全人源E1H10B7C7的VH CDR2 WIIAGX1X2DTKYSQNFQD (SEQ ID NO: 10) X1=N, X2=G WIIAGNGDTKYSQNFQD E1H10B7-CDRV1的VH CDR2 SEQ ID NO: 10, X1=N, X2=A WIIAGNADTKYSQNFQD

[0286]

E1H10B7-CDRV2的VH CDR2 SEQ ID NO: 10, X1=A, X2=G WIIAGAGDTKYSQNFQD
嵌合和全人源E1H10B7C7、E1H10B7-CDRV1和E1H10B7-CDRV2的VH CDR3 GSGFSGYGYFDK (SEQ ID NO: 11)
嵌合和全人源E1H10B7C7、E1H10B7-CDRV1和E1H10B7-CDRV2的VL CDR1 RASHSISSYLN (SEQ ID NO: 12)
嵌合和全人源E1H10B7C7、E1H10B7-CDRV1和E1H10B7-CDRV2的VL CDR2 ASSSLQS (SEQ ID NO: 13)
嵌合和全人源E1H10B7C7、E1H10B7-CDRV1和E1H10B7-CDRV2的VL CDR3 QQSHSIPLT (SEQ ID NO: 14)
嵌合和全人源E1H10B7C7的VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMQWVRQAPGQRLEWMGWIIAGXIX 2DTKYSQNFQDRVTLTRDTSANTAYMDLSGLRSEDTAVYYCARGSGFSGYGYFDKWGQ GTLTVTVSS (SEQ ID NO: 15) X1=N, X2=G QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMQWVRQAPGQRLEWMGWIIAGNGD TKYSQNFQDRVTLTRDTSANTAYMDLSGLRSEDTAVYYCARGSGFSGYGYFDKWGQGT LTVTVSS
E1H10B7-CDRV1的VH SEQ ID NO: 15, X1=N, X2=A QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMQWVRQAPGQRLEWMGWIIAGNAD TKYSQNFQDRVTLTRDTSANTAYMDLSGLRSEDTAVYYCARGSGFSGYGYFDKWGQGT LTVTVSS
E1H10B7-CDRV2的VH SEQ ID NO: 15, X1=A, X2=G QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMQWVRQAPGQRLEWMGWIIAGAGD TKYSQNFQDRVTLTRDTSANTAYMDLSGLRSEDTAVYYCARGSGFSGYGYFDKWGQGT LTVTVSS
嵌合和全人源E1H10B7C7的VL DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASHSISSYLNWYQKPGKVPKLLIYASSSLQSGVPSRF SGXGSGTDFTLISSLQPEDFATYYCQQSHSIPLTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 16) X=N DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASHSISSYLNWYQKPGKVPKLLIYASSSLQSGVPSRF SGNGSGTDFTLISSLQPEDFATYYCQQSHSIPLTFGGGGTKVEIK
E1H10B7-CDRV1和E1H10B7-CDRV2的VL SEQ ID NO: 16, X=S DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASHSISSYLNWYQKPGKVPKLLIYASSSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLISSLQPEDFATYYCQQSHSIPLTFGGGGTKVEIK
嵌合和人源E1D5E1F1的VH CDR1 SEQ ID NO: 9, X=F SFAMQ
嵌合和人源E1D5E1F1的VH CDR2 SEQ ID NO: 10, X1=N, X2=G WIIAGNGDTKYSQNFQD

[0287]

嵌合和人源E1D5E1F1的VH CDR3 GSGFSGYGYFDK (SEQ ID NO: 11)
嵌合和人源E1D5E1F1的VL CDR1 RASHSISSYLN (SEQ ID NO: 12)
嵌合和人源E1D5E1F1的VL CDR2 ASSSLQS (SEQ ID NO: 13)
嵌合和人源E1D5E1F1的VL CDR3 QQSHSIPLT (SEQ ID NO: 14)
嵌合和人源E1D5E1F1的VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSFAMQWVRRAPGQRLEWMGWIIAGNGD TKYSQNFQDRVTLTRDTSANTAYMDLSGLRSED TAVYYCARGSGFSGYGYFDK WGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 17)
嵌合和人源E1D5E1F1的VL DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASHSISSYLNWYQQKPGKVPKLLIYASSSLQSGVPSRF SGNGSGTDFTLISSLQPEDFATYYCQQSHSIPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 18)
重链恒定区-IgG4 (S228P+YTE+K447 Del) ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLYITREPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSL SLG (SEQ ID NO: 19)
轻链恒定区 RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSL STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 20)
人SIRP α -Fc蛋白 MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATS LIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTRNNMDFSIRIGNITPADAGTYY CVKFRK GSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFSPR DIT LKWF KNGNELSDFQTNVDPVGESVSY SIHSTAKV VLTR EDVHSQVICEVAHVTLQGDPL RGTANLSETIRVPPTLEV TQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGN VSRTETA STVTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLT CQVEHDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQ GSNTAAENTGSNEREPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 21)
人SIRP α -his MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATS LIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTRNNMDFSIRIGNITPADAGTYY CVKFRK GSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFSPR DIT LKWF KNGNELSDFQTNVDPVGESVSY SIHSTAKV VLTR EDVHSQVICEVAHVTLQGDPL RGTANLSETIRVPPTLEV TQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGN VSRTETA STVTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLT CQVEHDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQ

[0288]

GSNTAAENTGSNERHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 22)
人SIRPβ-his MDMRVPAQLLGLLLWFPGRCEDELQVIQPEKSVSVAAGESATLRCAMTSLIPVGPIM WFRGAGAGRELIYNQKEGHFPRVTTVSELTKRNNLDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGS PDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAVRATPEHTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNG NELSDFQTNVDPAGDSVSYSIHSTARVVLTRGDVHSQVICEIAHITLQGDPLRG TANLSEA IRVPPTLEVTTQPMRAENQANVTCQVSNFYPRGLQLTWLENGNVSRTETASTLIENKDGT YNWMSWLLVNTCAHRDDVVLTCQVEHDGQQA VSKSYALEISAHQKEHGS DITHEAALA PTAPLHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 23)
人SIRPγ-his MPVPASWPHPPGPFLLLTLLGLTEVAGEEELQMIQPEKLLLVTVGKTATLHCTVTSLLP VGPVLWFRGVGP GRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTRNNMDFSIRISSITPADVGTYCYV KFRKGSPENVEFKSGPGTEMALGAKPSAPVVLGPAARTTPEHTVSFTCESHGFSPRDITLK WFKNGNELSDFQTNVDPTGQSVAYSIRSTARVVLDPWDVRSQVICEVAHVTLQGDPLRG TANLSEAIRVPPTLEVTTQPMRVGNQVNVTCQVRKFYPQSLQLTWS ENGNVCQRETAST LTENKDGTYNWTSWFLVNISDQRDDVVLTCQVKHDGQLAVSKRLALEVT VHQKDQSSD ATPGPASHHHHHH (SEQ ID NO: 24)
猴SIRPα-his MEPAGPAPGRLGPLLCLLLTASCAWSGVLGEEELQVIQPEKSVSVAAGDSATLNCTVSSL IPVGPIQWFRGAGPGRELIYNLKEGHFPRVTAVSDPTKRNNMDFSIRISNITPADAGTYCY VKFRKGSPDVELKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAVRATAEHTVSFTCESHGFSPRDITLK WFKNGNELSDVQTNVDPAGKSVSYSIHSTARVLLTRRDVHSQVICEVAHVTLQGDPLRG TANLSEAIRVPPFLEVTTQSMRADNQVNVTCQVTKFYPQRLQLTWLENGNVSRT EMASA LPENKDGTYNWTSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVNKSFSVKVSAHPKEQGS NTAAENTGTNERHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 25)
全长人SIRPα MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKSVLVAAGETATLRCTATS LIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCY CVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDIT LKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTR EDVHSQVICEVAHVTLQGDPL RG TANLSETIRVPPTLEVTTQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVSRTETA STVTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQ GSNTAAENTGSNERNIYIVVG VVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKN AREITQDTNDITYADLNLPGKGPAPQAAEPNNHTEYASIQTSQPASEDTLTYADLDMV HLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVPRKYPYDVPDYA (SEQ ID NO: 26)
全长人CD47 MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKW KFKGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKG DASLKM DKSDAVSHTGNYTCEVTE LTREGETIIE LKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLV AGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQ VIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRNN (SEQ ID NO: 27)
人SIRPα-亚型2-his MGWSCILFLVATATGVHSEELQVIQPKSVSVAAGESAILHCTVTS LIPVGPIQWFRGA GPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPDTEF

[0289]

KSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFS PRDITLKWFKNGNELSDF
QTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVL TREDVHSQVICEVAHVTLQGDPLRG TANLSETIRVPPT
LEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVSR TETASTVTENKDGTYNW
MSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTAAENTGSNER
HHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 28)

人SIRP α -V8-his

MGWSCILFLVATATGVHSGVAGEEELQVIQPKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQ
WFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTY YCVKFRKGS
PDTEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFS PRDITLKWFKNGN
ELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVL TREDVHSQVICEVAHVTLQGDPLRG TANLSETI
RVPPTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVSR TETASTVTENKDG
TYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTAAENTG
SNERHHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 29)

人CD47-his

MDMRVPAQLLGLLLWFPGRSCLL FNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEA QNTTEVY
VKWKFKGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKG DASLKM DKS DAVSHTGNYTC
EVT ELTREGETIIE LKYRVVSWFSPHHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 30)

人CD47-Fc

QLL FNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEA QNTTEVYVKWKFKGRDIYTFD GALNKSTV
PTDFSSAKIEVSQLLKG DASLKM DKS DAVSHTGNYTC EVELTREGETIIE LKYRVVSWF
PEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ
ID NO: 31)

BM的重链

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYIHWVQQRTEQGLEWIGRIDPEDGETK
YAPKFQDKATITADTSSNTAYLHLSSLTSEDAVYYCARWGAYWGQGLTVT VSAASTK
GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
SSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 32)

BM的轻链

QIVLTQSPAIMASPGKEKVTLTCSASSSVSSSYLYWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPA
RFGSGSGTSYSLTISSMEAEDAASYFCHQWSSYPRTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 33)

BM5的重链

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTSYVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPSDS
HYSPTSFQGHVTLSDKSISTAYLQLSSLKASDTAMYYCVRRGTGT LAYFAYWGQGLTV
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS

[0290]

TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 34)
BM5的轻链 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWFQQRPGQSPRLLIYRVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGTHVPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 35)
DT3C蛋白 MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNVDDDWKGFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKRGQD AMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCLNDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSSEPN KTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGF AAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKHIDEILALPKTDTYKLILNGKTLKGETTTE AVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVI NGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTEKPEVIDASE LTPAVTTYKLVIINGKTLKGETTTKAVIDAATAEKAFKQYANDNGVDGVWYDDATKTFT VTELEHHHHHHH (SEQ ID NO: 36)
小鼠SIRP α -his MEPAGPAPGRLGPLLLCLLSASCFTGATGTEVKVTQPEKSVSVAAGDSTILNCTVTSLL PVGPIRWYRGVQSRLLIYSFTGEHFPRVRNVSDTTKRNNMDFSIRISNVTPEAGTYYC VKFQSGSSEPDTEIQSGGGTEVYVLAKPSPPEVSGPADRGIPDQKVNFTCKSHGFSRNPIT LKWFKDGQELHPLETTVNPSGKNVSYNISSTVRVVLNSMDVNSKVICEVAHITLDRSPLR GIANLSNFIRVSPTVKVTQQPPTSMNQVNLTCRAERFYPEDLQLIWLENGNVSRNDTPKN LTKNTDGTNYNTSLFLVNSSAHREDVFTCQVKHDQQAIRNHTVLGLAHSSDQGSMDQ TFHHHHHHHHHH* (SEQ ID NO: 37)
重链恒定区-IgG1 (AQQ+K447 Del) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAQGG PSVFLFPPKPKDTLX1IX2RX3PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 38) X1=M, X2=S, X3=T ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAQGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
重链恒定区-IgG1 (AQQ+YTE+K447 Del) SEQ ID NO: 38, X1=Y, X2=T, X3=E ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAQGG

[0291]

PSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

CLDN18.2抗体的重链

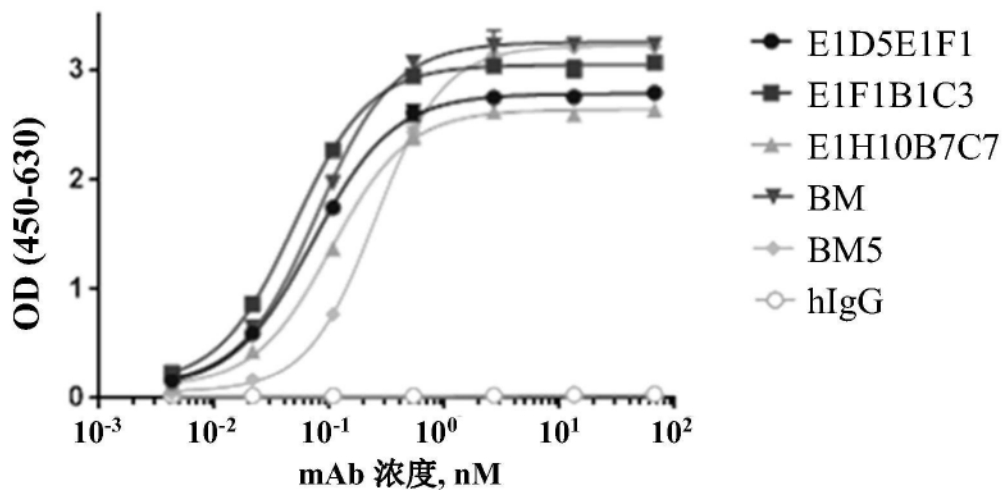
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTNYWVNWVRQAPGQGLEWIGMVHPSGSE
TRLNQQFKDKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVWSGNAFDYWGQGTLV
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 39)

CLDN18.2抗体的轻链

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCLSSQSLLASGNQRNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
DSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYCQNGFSFPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 40)

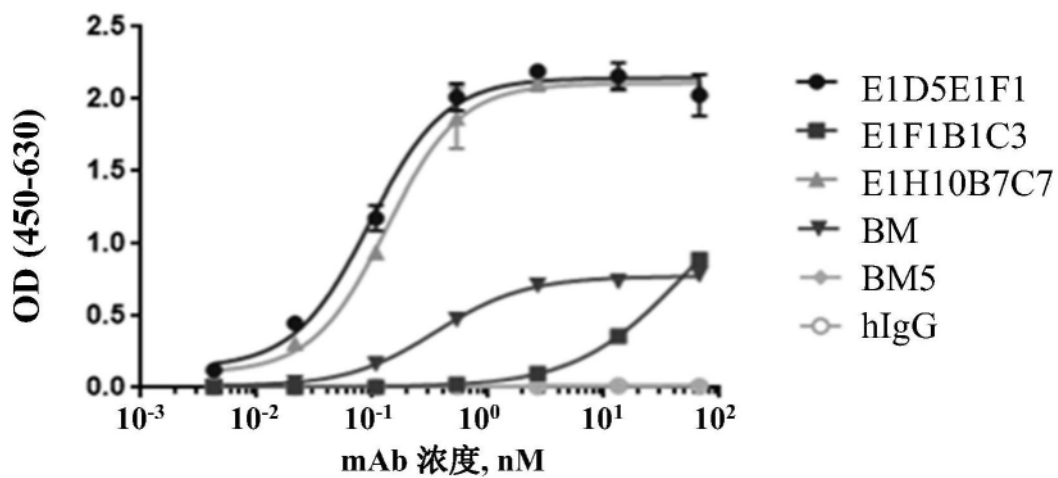
[0292] ***

[0293] 已经在本发明的优选实施方式中进行了具体阐述,应当理解的是,由上述段落定义的本发明不限于在上述描述中列出的特定细节,可以在不脱离本发明宗旨和范围的情况下做出很多明显的变形。



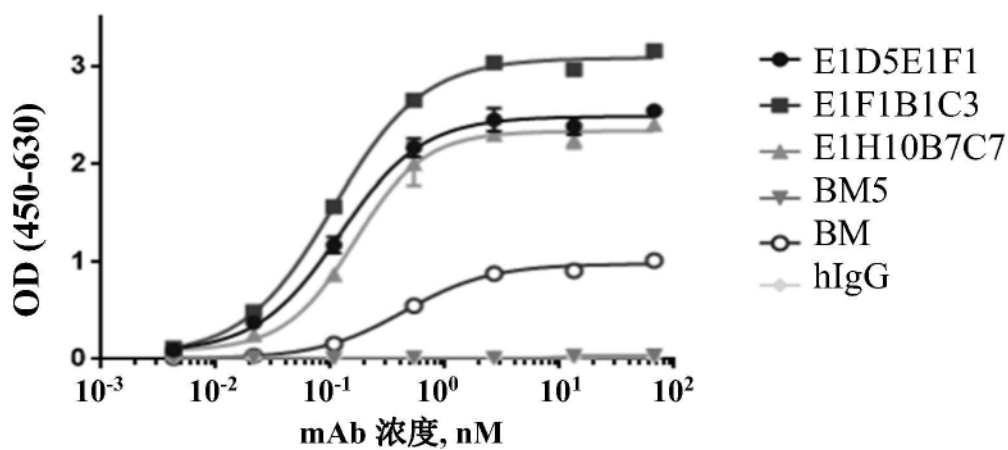
	EC ₅₀
E1D5E1F1	0.07147
E1F1B1C3	0.04912
E1H10B7C7	0.1026
BM	0.07739
BM5	0.2488

图1



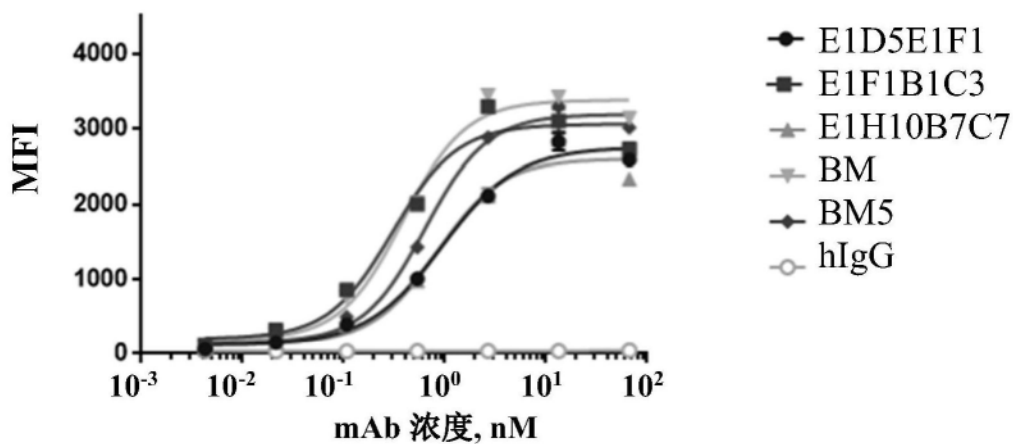
	EC ₅₀
E1D5E1F1	0.09401
E1F1B1C3	48.12
E1H10B7C7	0.1312
BM	0.3518
BM5	~2.582e+037

图2



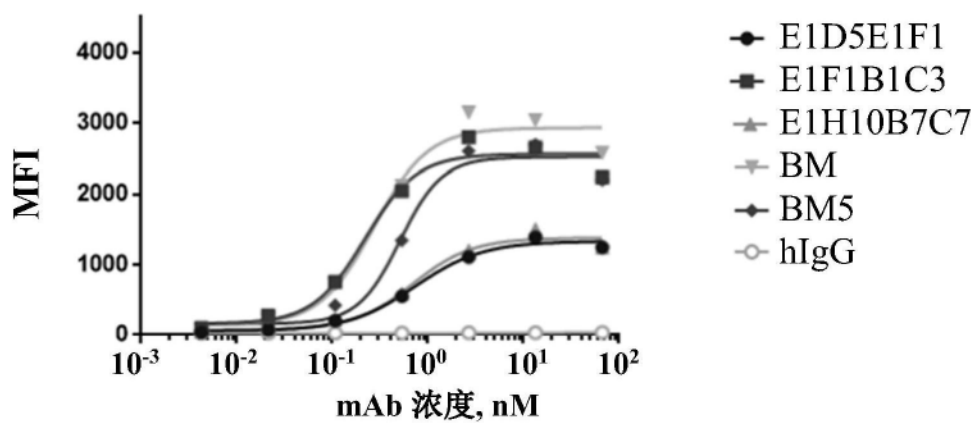
	EC ₅₀
E1D5E1F1	0.1194
E1F1B1C3	0.1055
E1H10B7C7	0.1618
BM5	~ 10.97
hIgG	18.82
BM	0.4359

图3



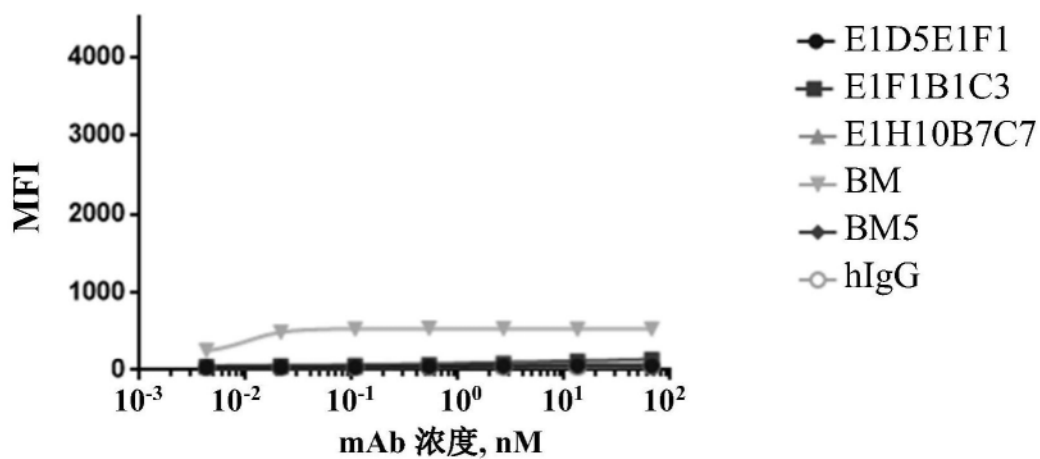
	EC ₅₀
E1D5E1F1	0.9269
E1F1B1C3	0.3031
E1H10B7C7	0.8415
BM	0.3833
BM5	0.633

图4



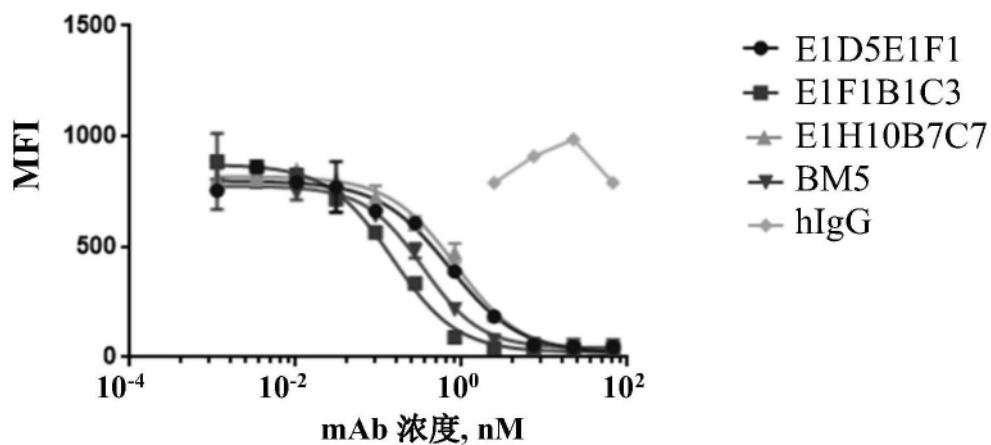
	EC ₅₀
E1D5E1F1	0.7382
E1F1B1C3	0.2174
E1H10B7C7	0.6894
BM	0.272
BM5	0.509

图5



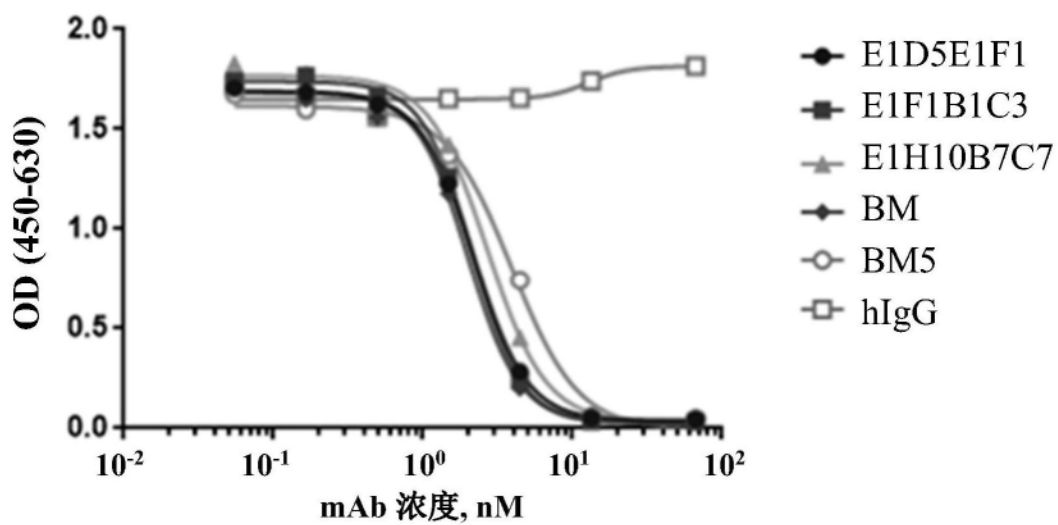
	EC ₅₀
E1D5E1F1	0.6297
E1F1B1C3	106.3
E1H10B7C7	0.4996
BM	0.01021
BM5	5.459

图6



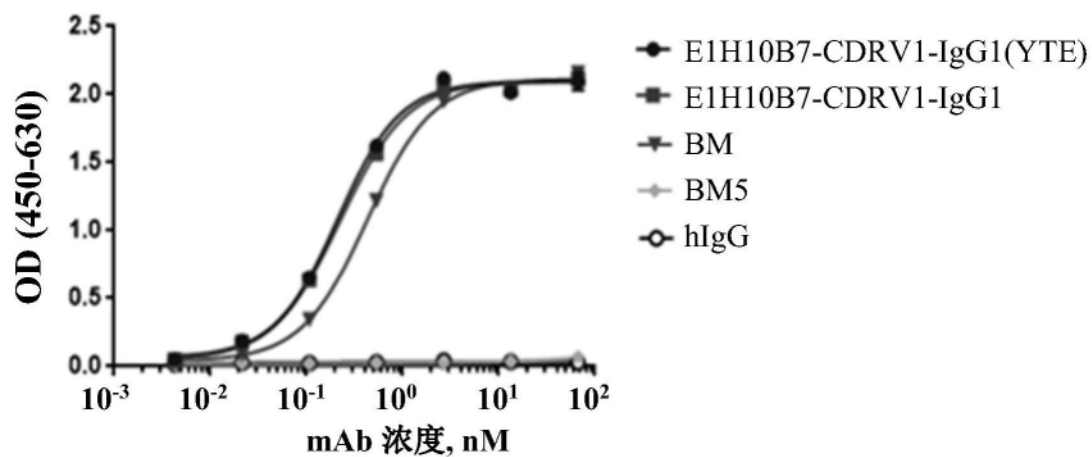
	IC ₅₀
E1D5E1F1	0.7058
E1F1B1C3	0.146
E1H10B7C7	0.8532
BM5	0.3382

图7



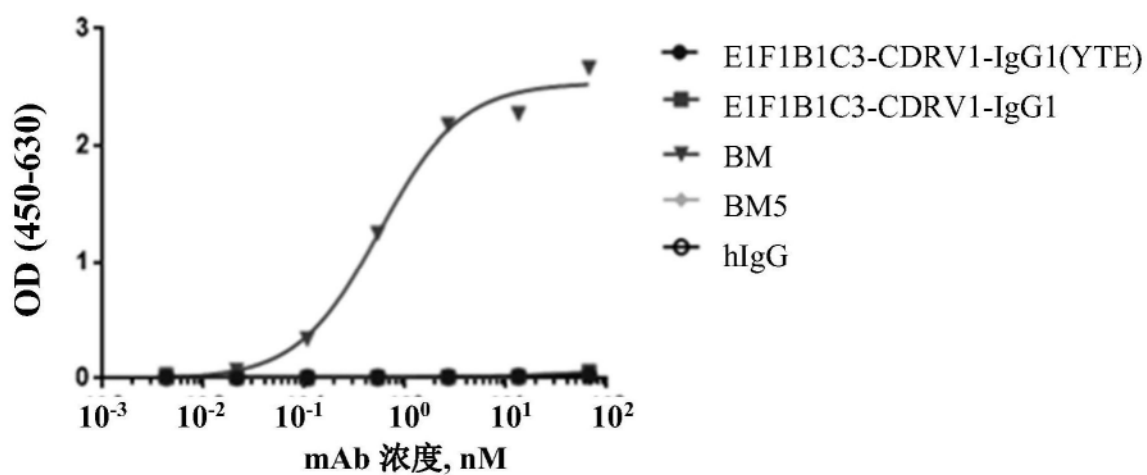
	IC ₅₀
E1D5E1F1	2.175
E1F1B1C3	2.132
E1H10B7C7	2.683
BM	1.996
BM5	3.919

图8



	EC ₅₀
E1H10B7-CDRV1-IgG1(YTE)	0.209
E1H10B7-CDRV1-IgG1	0.2236
BM	0.4271
BM5	~7835

图9



	EC ₅₀
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1(YTE)	86.65
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1	~2931
BM	0.5551
BM5	~16.55

图10

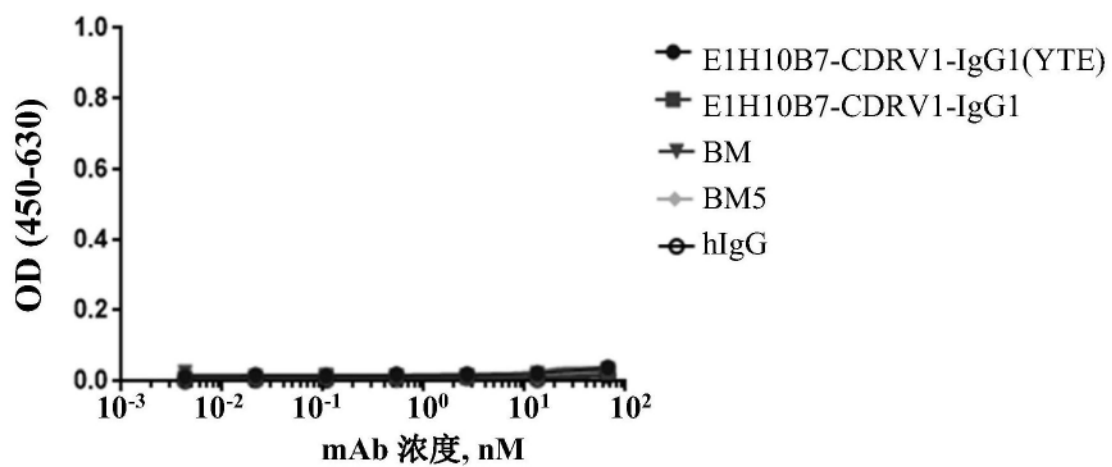


图11

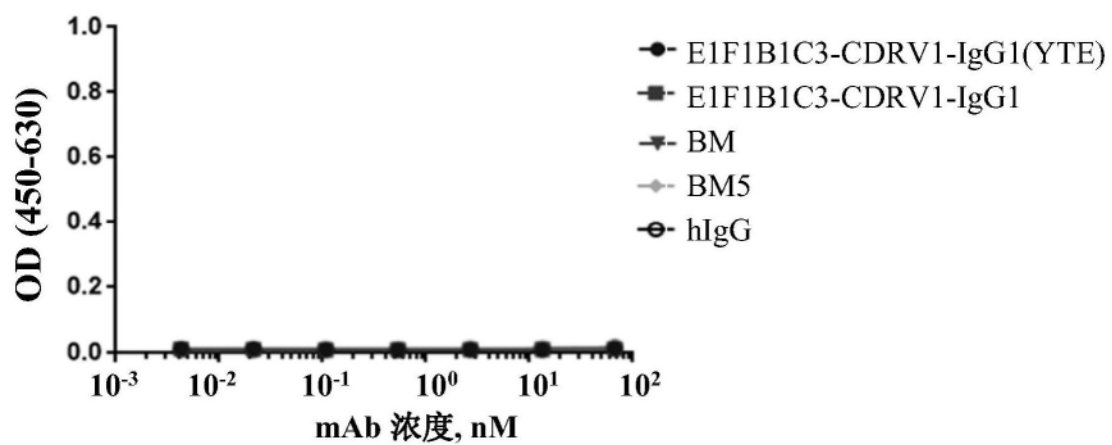
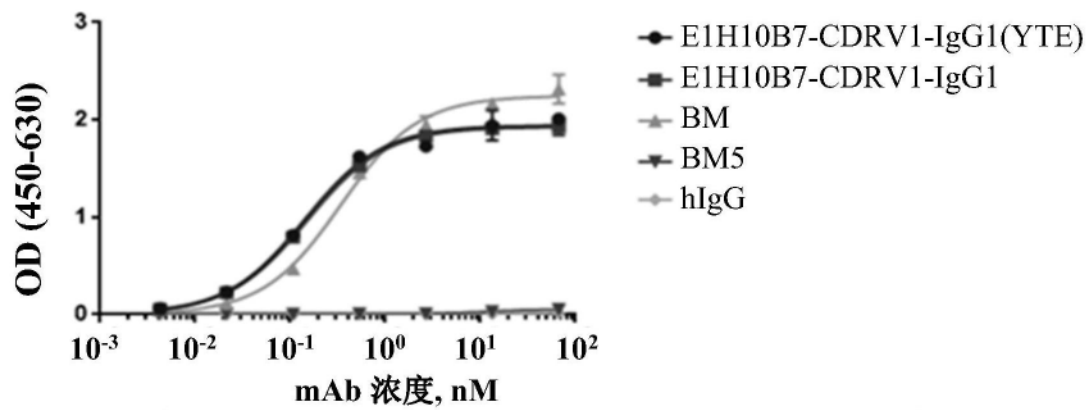
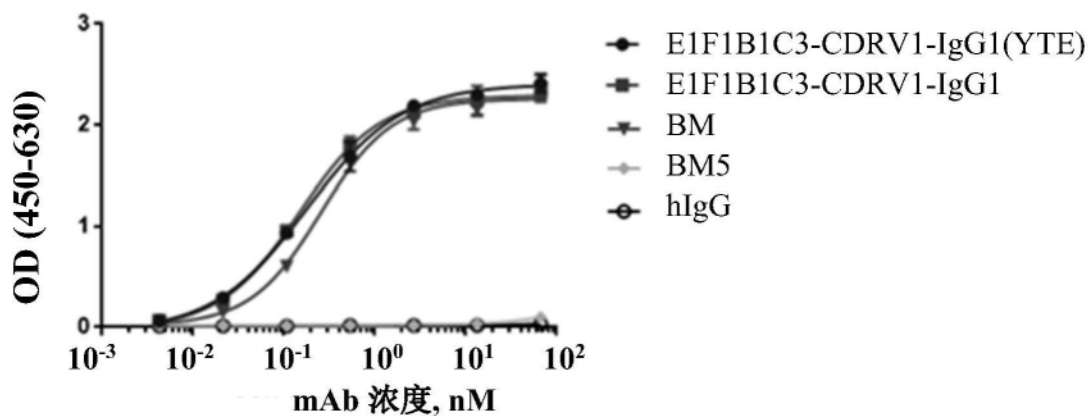


图12



	EC ₅₀
E1H10B7-CDRV1-IgG1(YTE)	0.1414
E1H10B7-CDRV1-IgG1	0.1506
BM	0.3389
BM5	12.25

图13



	EC ₅₀
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1(YTE)	0.1791
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1	0.1482
BM	0.2548
BM5	~167

图14

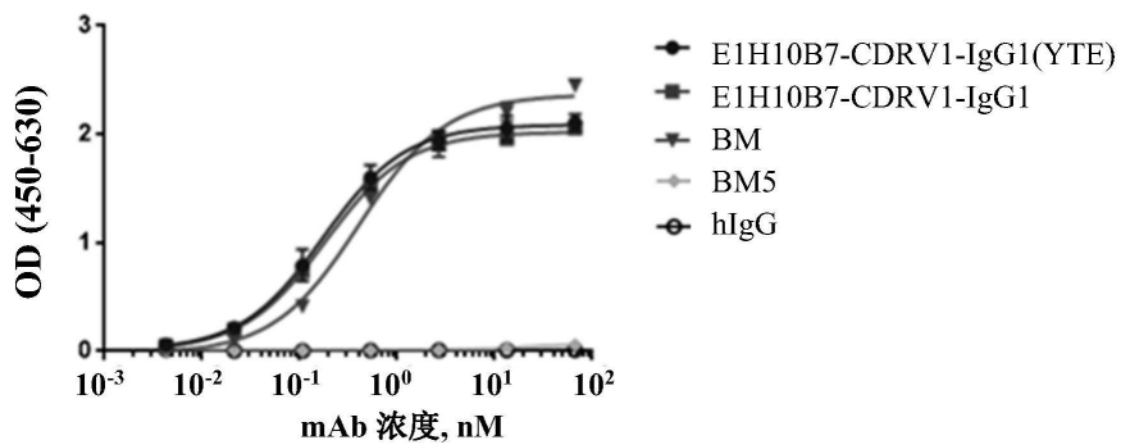


图15

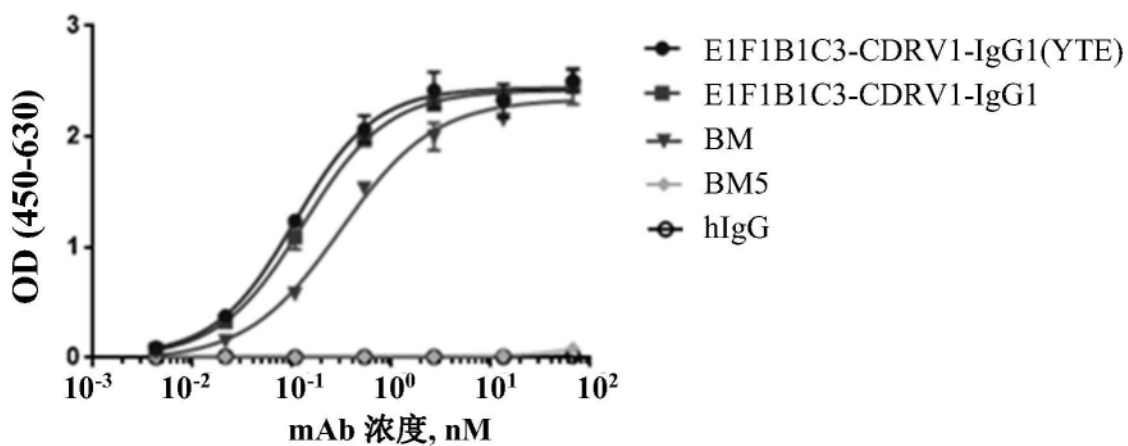
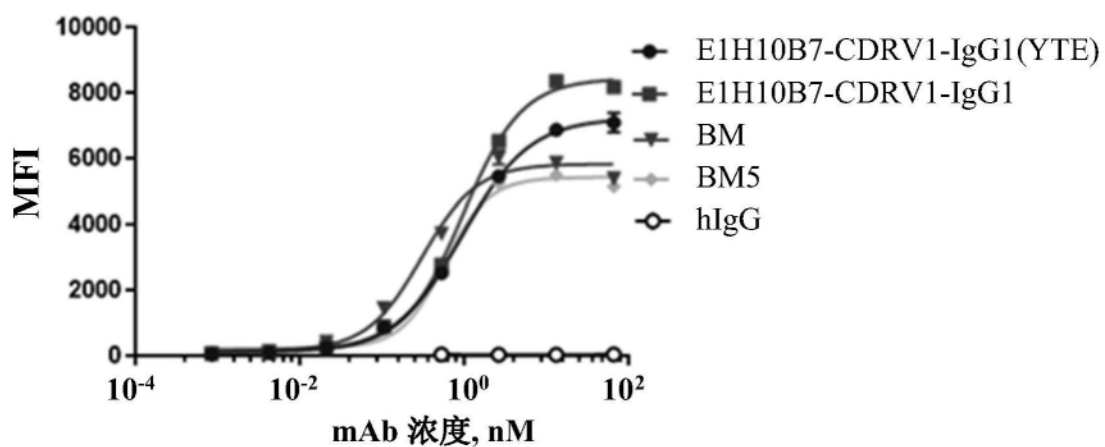
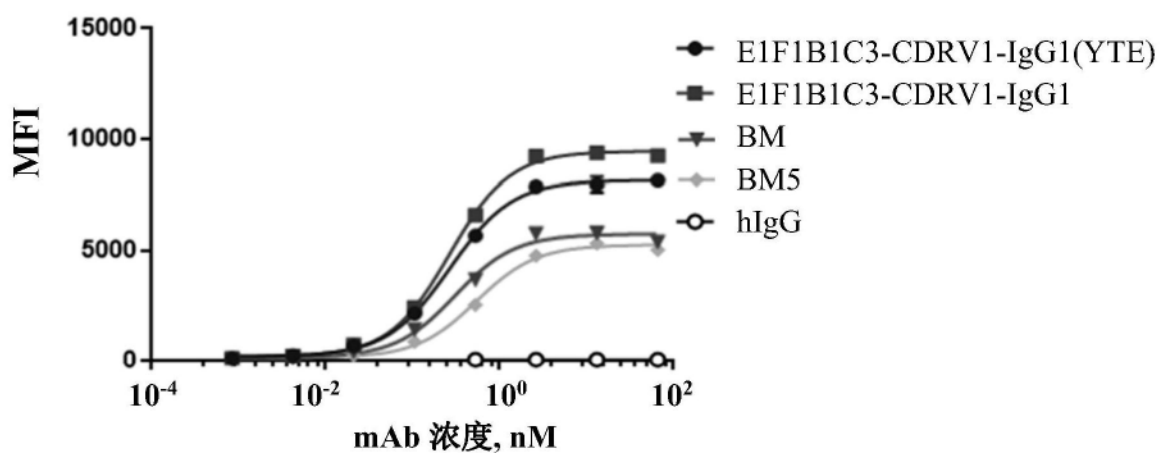


图16



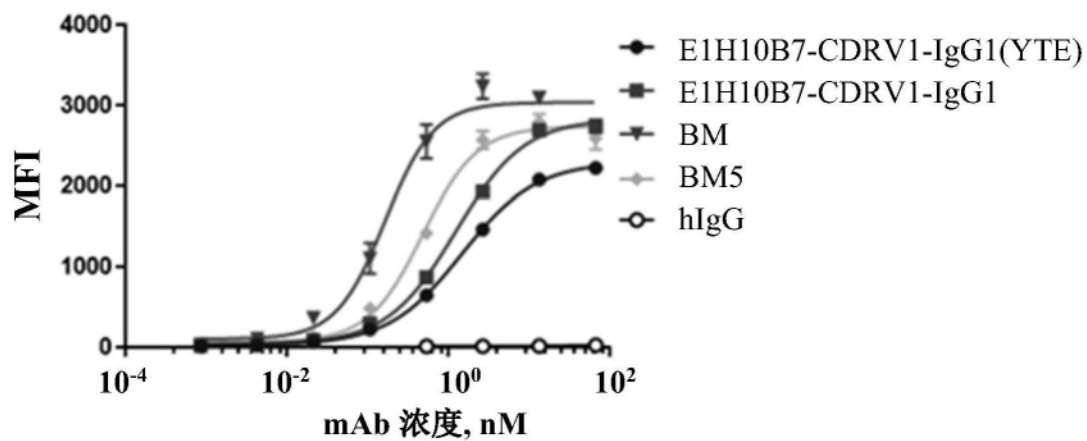
	EC ₅₀
E1H10B7-CDRV1-IgG1(YTE)	0.9564
E1H10B7-CDRV1-IgG1	0.9731
BM	0.3068
BM5	0.5845

图17



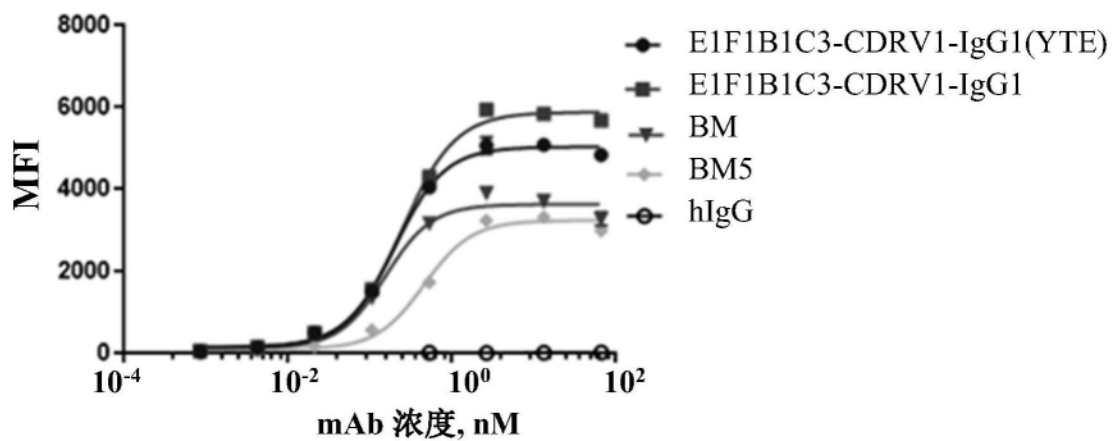
	EC ₅₀
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1(YTE)	0.27
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1	0.2698
BM	0.3095
BM5	0.5451

图18



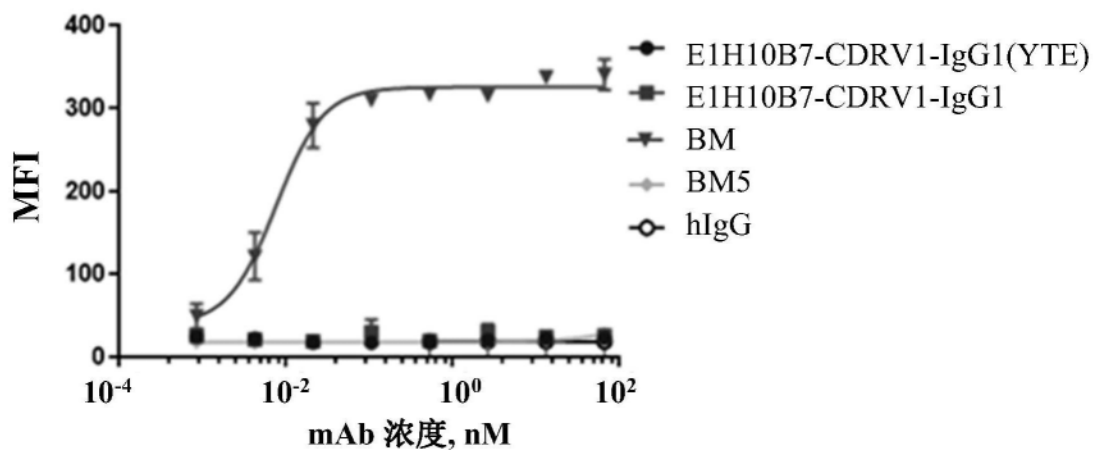
	EC ₅₀
E1H10B7-CDRV1-IgG1(YTE)	1.471
E1H10B7-CDRV1-IgG1	1.23
BM	0.1644
BM5	0.4821

图19



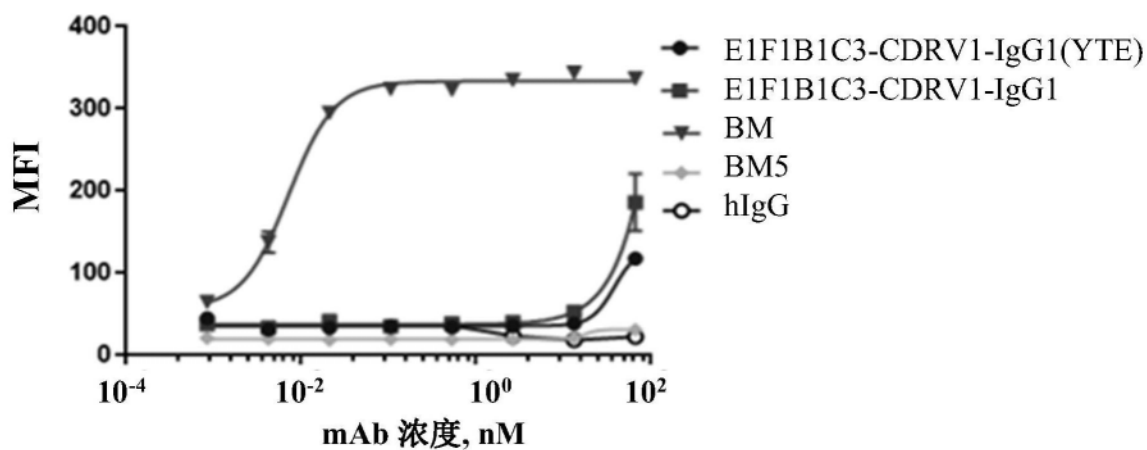
	EC ₅₀
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1(YTE)	0.2002
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1	0.2476
BM	0.1558
BM5	0.4603

图20



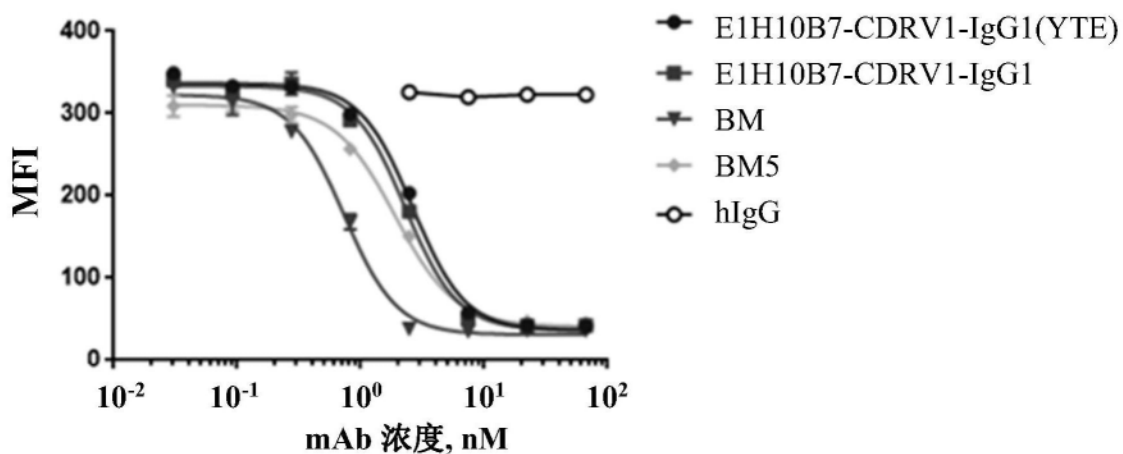
	EC ₅₀
E1H10B7-CDRV1-IgG1(YTE)	
E1H10B7-CDRV1-IgG1	
BM	0.007607
BM5	~2553

图21



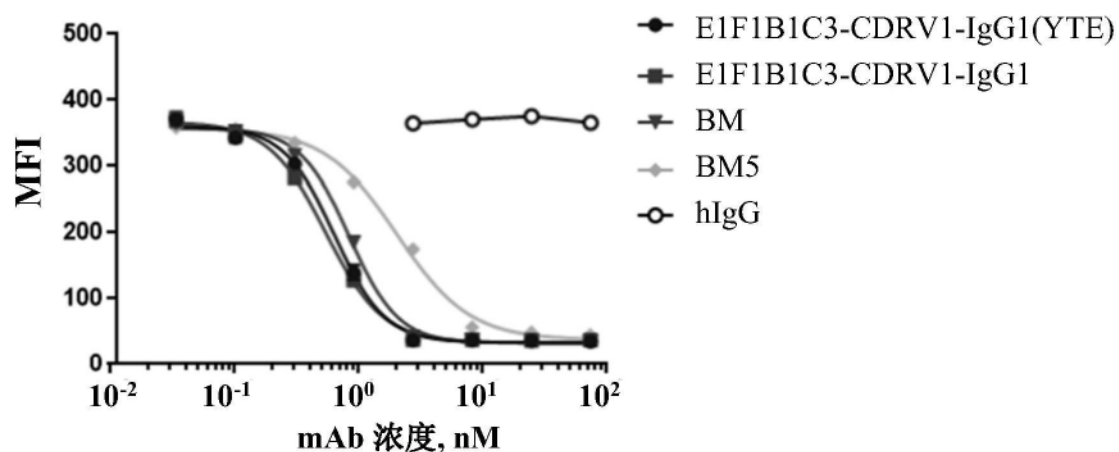
	EC ₅₀
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1(YTE)	~38.59
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1	~953.9
BM	0.007245
BM5	~17.64

图22



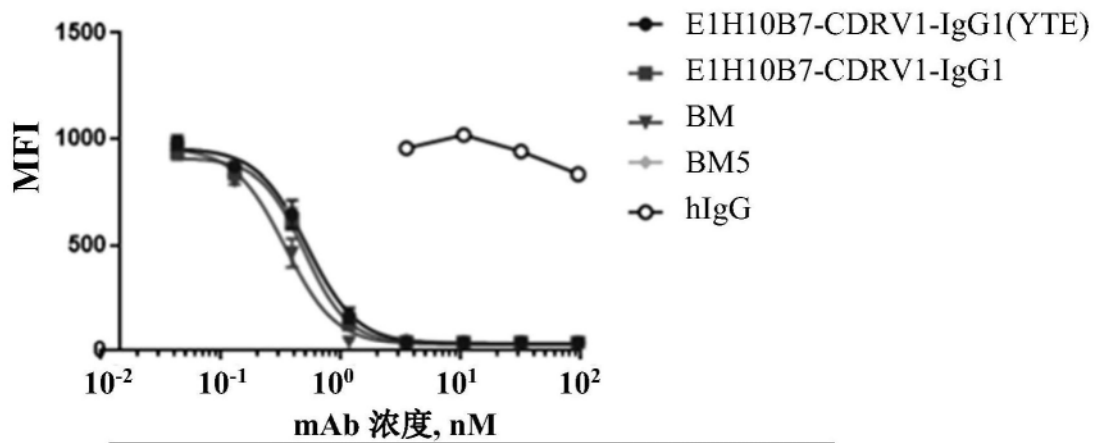
	IC ₅₀
E1H10B7-CDRV1-IgG1(YTE)	2.621
E1H10B7-CDRV1-IgG1	2.297
BM	0.7305
BM5	1.897

图23



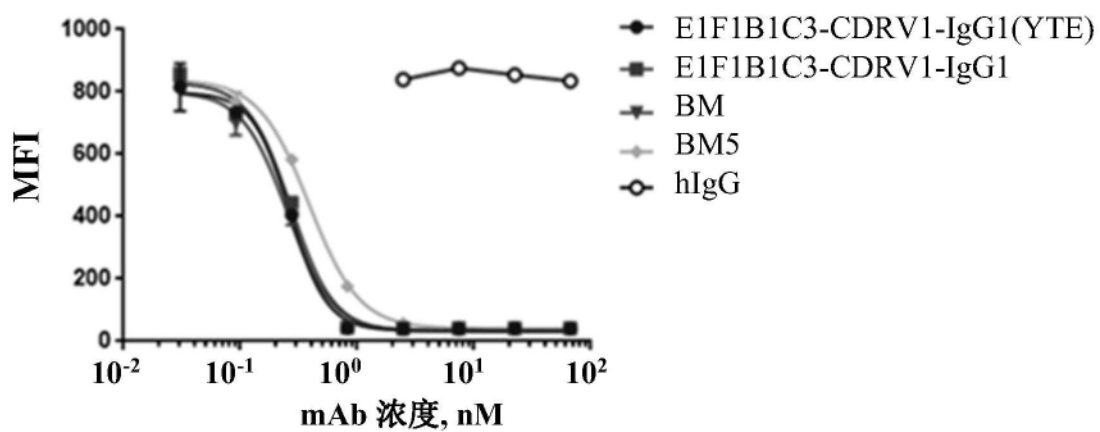
	IC ₅₀
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1(YTE)	0.5726
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1	0.4879
BM	0.7526
BM5	1.835

图24



	IC ₅₀
E1H10B7-CDRV1-IgG1(YTE)	0.3682
E1H10B7-CDRV1-IgG1	0.3468
BM	0.241
BM5	0.3606

图25



	IC ₅₀
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1(YTE)	0.2637
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1	0.2701
BM	0.2501
BM5	0.3862

图26

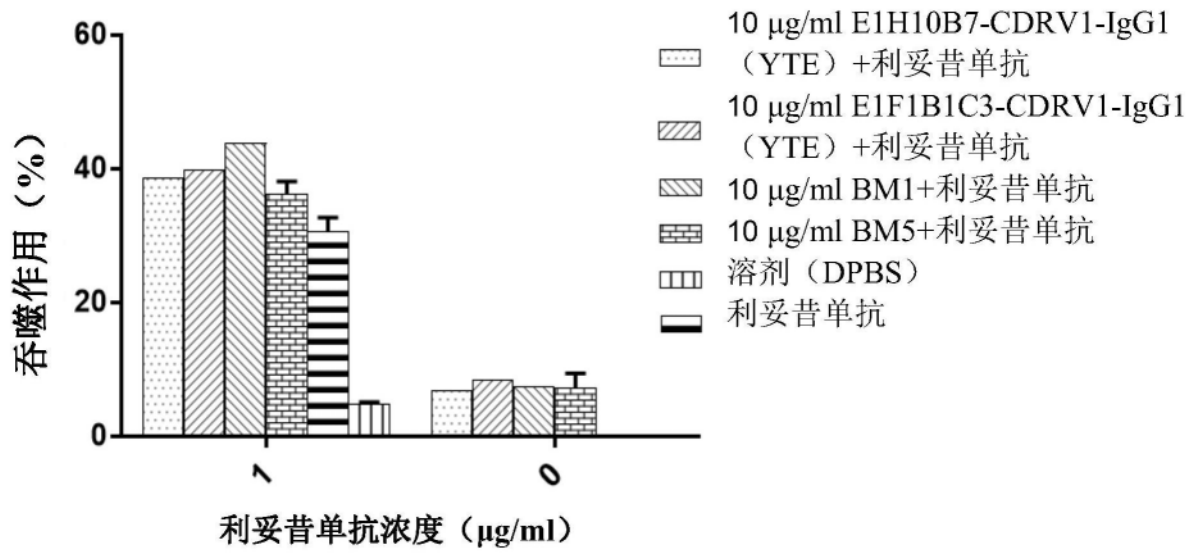


图27

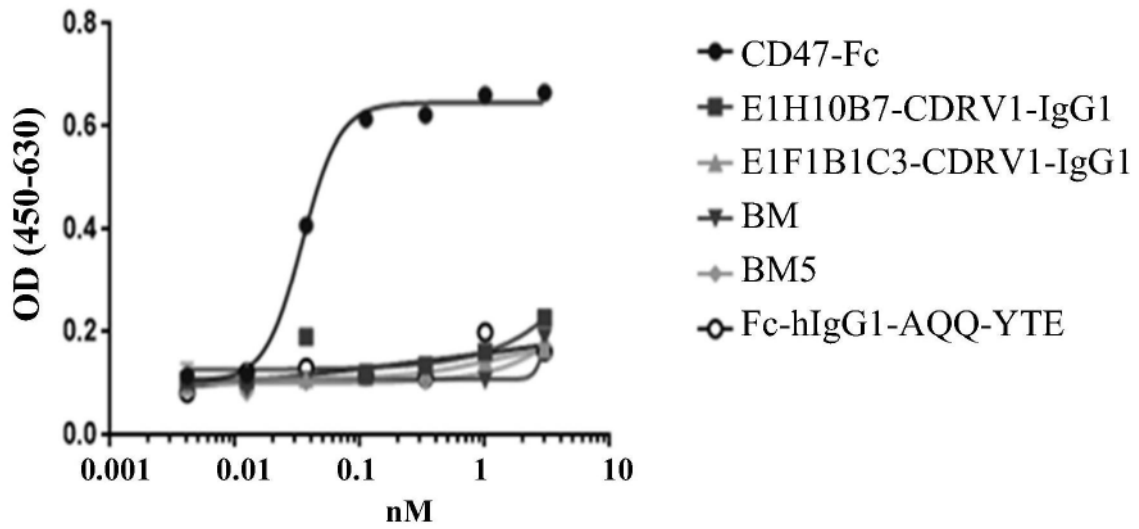


图28

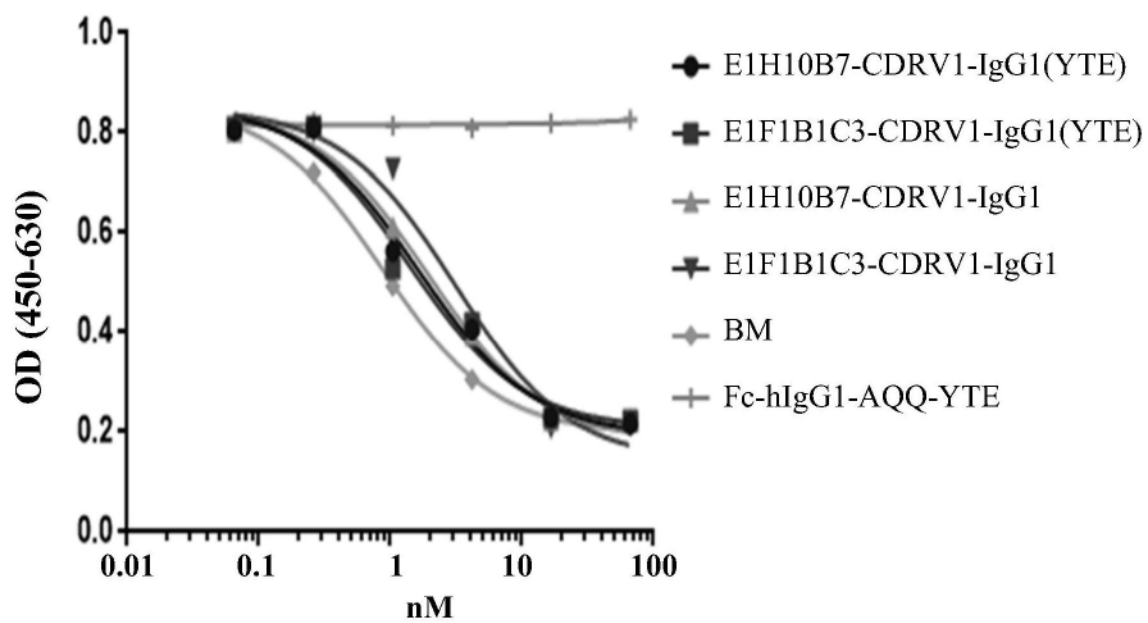
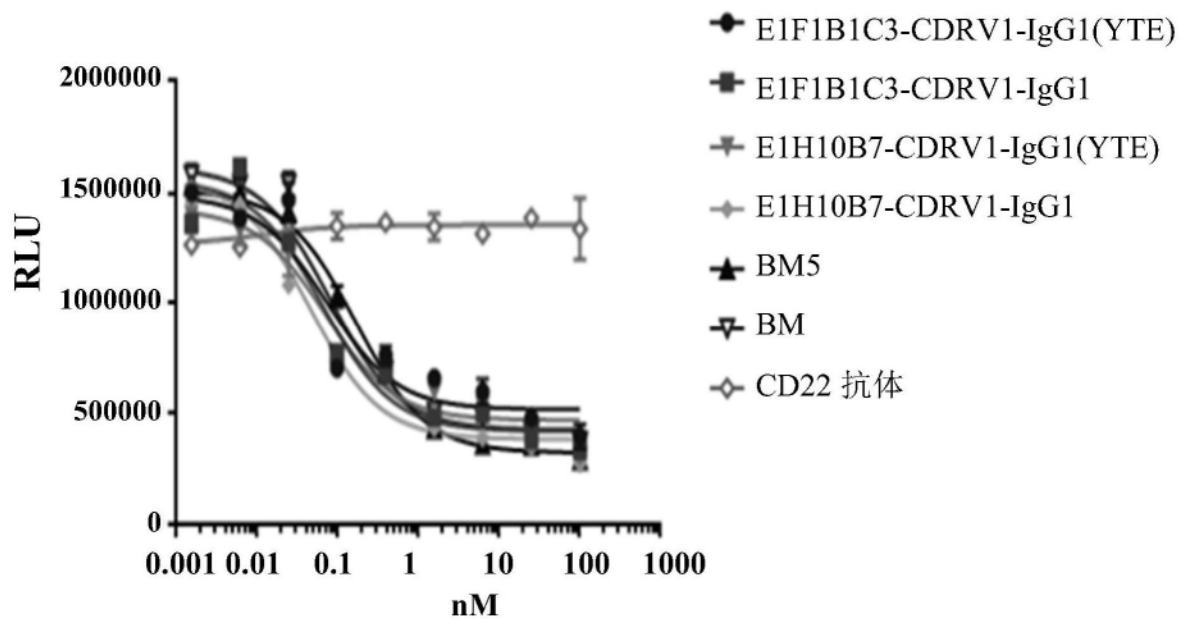


图29



	IC ₅₀
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1(YTE)	0.07338
E1F1B1C3-CDRV1-IgG1	0.06469
E1H10B7-CDRV1-IgG1(YTE)	0.07037
E1H10B7-CDRV1-IgG1	0.04576
BM5	0.1654
BM1	0.07958
CD22 抗体	0.01166

图30

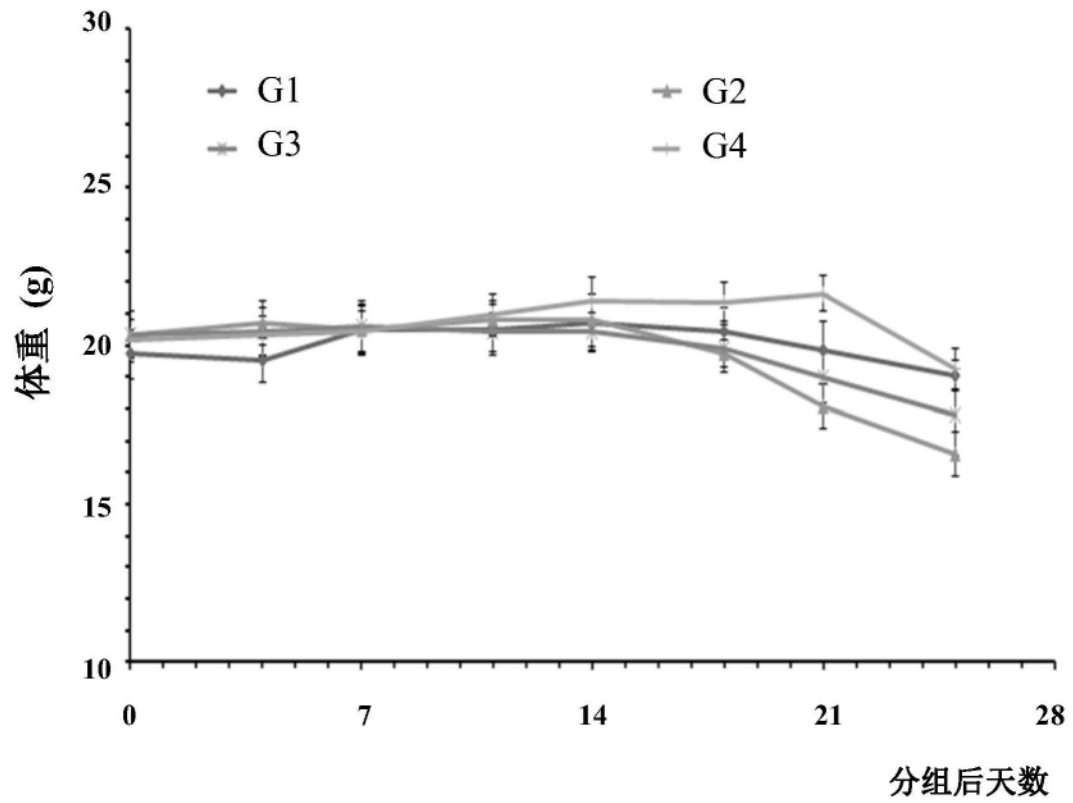


图31

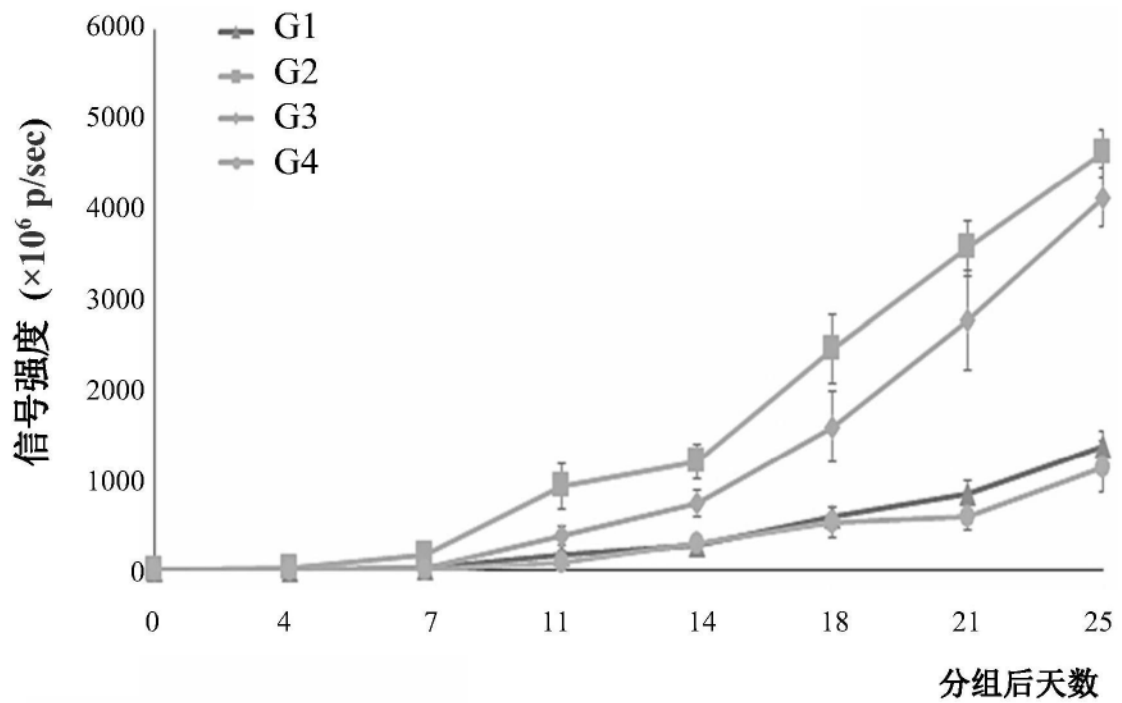


图32

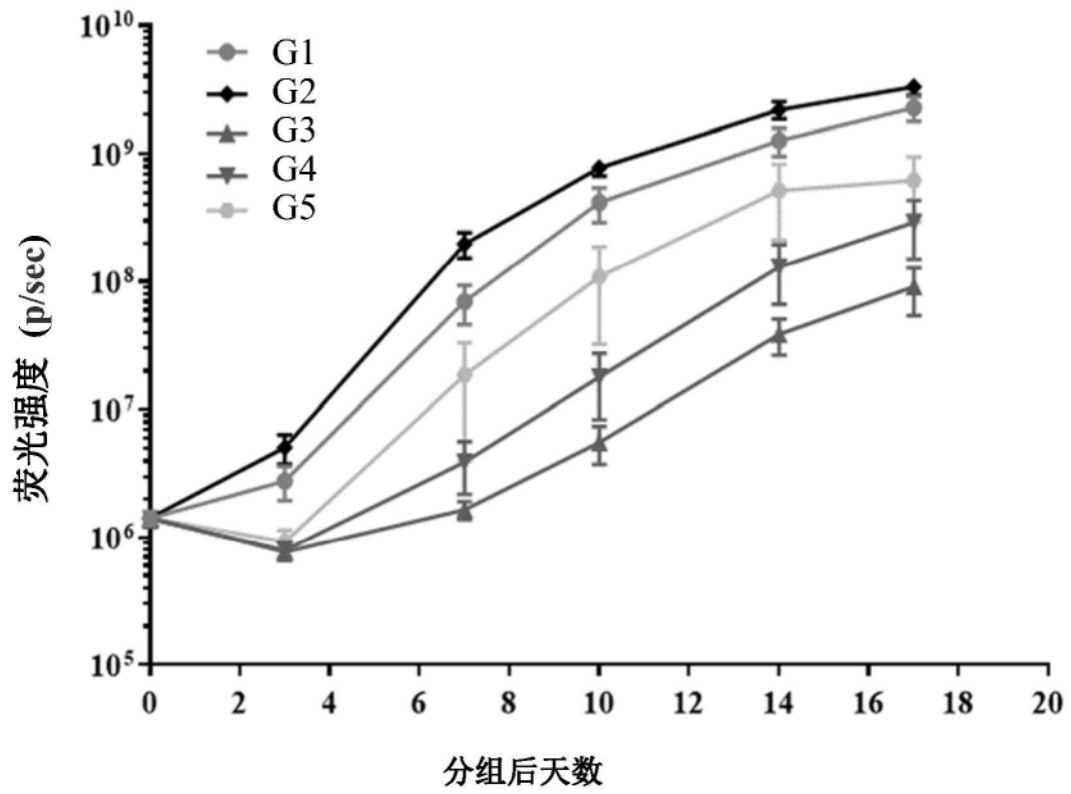


图33

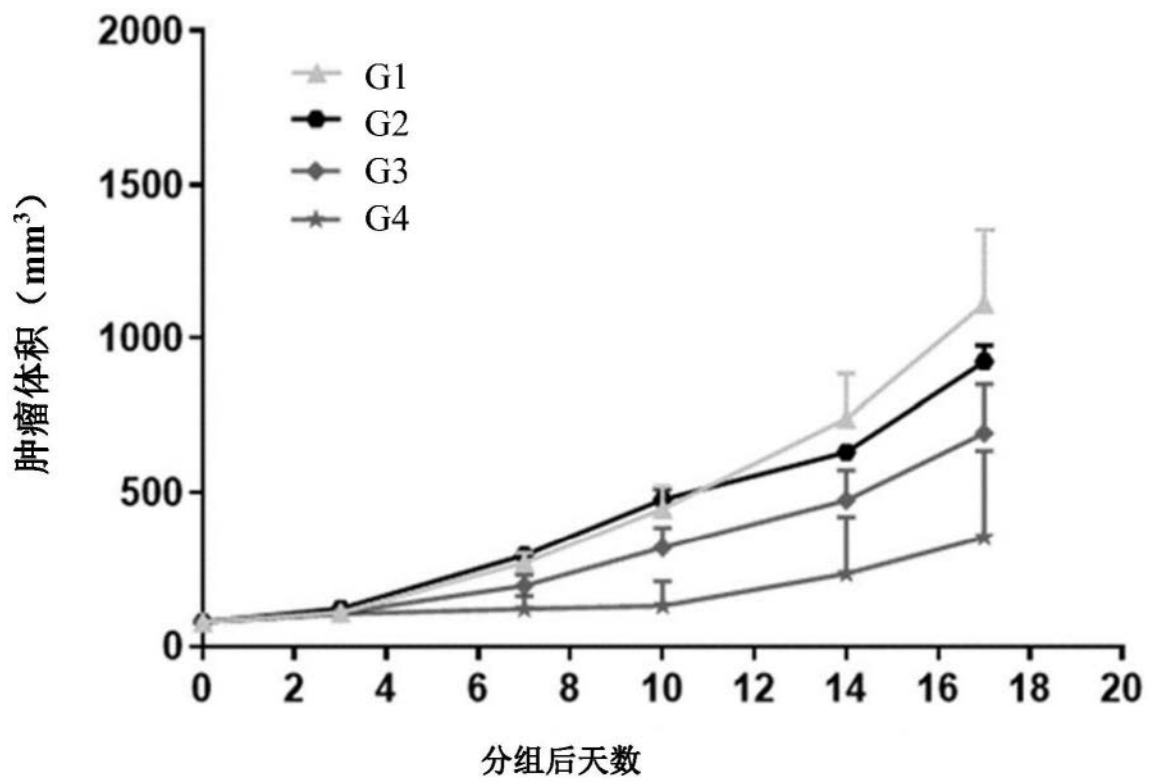


图34