

结合 CD47 蛋白的融合蛋白及其应用

技术领域

本申请涉及一种结合 CD47 蛋白的融合蛋白及其应用。所述融合蛋白可特异性地阻断 CD47 蛋白与 SIRP α 的相互作用，不引起凝血反应，且可抑制肿瘤或肿瘤细胞的生长和/或增殖。

背景技术

CD47 蛋白是一种跨膜糖蛋白，属于免疫球蛋白超家族成员，在包括红细胞在内许多细胞表面表达。CD47 的配体包括整合素（integrins）、凝血栓蛋白 1（thrombospondin-1）以及信号调节蛋白（SIRPs）。CD47 影响多种生物学功能，包括细胞迁移，T 细胞、树突状细胞活化，轴突发育等。除此之外，CD47 通过与 SIRP α 相互作用可抑制巨噬细胞的吞噬作用，保护血细胞等正常细胞不被巨噬细胞吞噬。研究发现，除正常组织细胞表达 CD47 以外，许多肿瘤细胞过度表达 CD47，并通过与巨噬细胞表面的 SIRP α 相结合而阻止巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬，这被视为肿瘤逃避机体免疫监视的一种机制。阻断 CD47 蛋白和 SIRP α 的相互作用，可抑制肿瘤增长（Theocharides APA, et al., 2012）。

然而，现有的用于阻断 CD47 蛋白和 SIRP α 相互作用的试剂识别活性有限，其与 CD47 蛋白的亲和力往往不足，且对肿瘤的抑制能力有限。另一方面，现有靶向 CD47 的抗体类药物存在引起贫血反应或者血小板减少的副作用（白银鹏等，Chin J Clin Oncol., 2017 Vol 44. No.7）。亟需开发能够有效阻断 CD47 蛋白和 SIRP α 相互作用、且副作用小的新型疗法。

发明内容

本申请提供了一种结合 CD47 蛋白的融合蛋白及其应用。所述融合蛋白可以特异性结合 CD47 蛋白。本申请所述的融合蛋白具有下列性质中的至少一种：1) 以较高的亲和力特异性与 CD47 蛋白相结合；2) 特异性阻断 CD47 蛋白与 SIRP α 的相互作用；3) 不引起凝血反应；4) 抑制肿瘤或肿瘤细胞的生长和/或增殖；5) 阻断由 CD47/SIRP α 相互作用而诱导的凋亡信号；和/或，6) 对受试者安全没有伤害身体的副作用。本申请还提供了所述融合蛋白的制备方法和应用。

一方面，本申请提供了一种融合蛋白，其可特异性结合 CD47 蛋白，并且具有以下特征中的至少一项：1) 以 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 K_D 值与 CD47 蛋白相结合；2) 特异性阻断 CD47 蛋白与 SIRP α 的相互作用；3) 不引起凝血反应；以及 4) 抑制肿瘤或肿瘤细胞的生长和/或增

殖。

在某些实施方式中，所述 CD47 蛋白为人 CD47 蛋白。

在某些实施方式中，所述 CD47 蛋白为在细胞表面表达的 CD47 蛋白。

在某些实施方式中，所述肿瘤或肿瘤细胞为 CD47 阳性。

在某些实施方式中，所述肿瘤选自下组：CD47 阳性血液肿瘤和/或 CD47 阳性实体瘤。

在某些实施方式中，所述融合蛋白包括能够特异性结合所述 CD47 蛋白的人 SIRP α 结构域和免疫球蛋白 Fc 区，其中所述人 SIRP α 结构域与所述免疫球蛋白 Fc 区直接或间接相连。

在某些实施方式中，所述人 SIRP α 结构域包含人 SIRP α 的胞外结构域、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体。在某些实施方式中，所述人 SIRP α 结构域包含人 SIRP α 的 IgV 结构域、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体。在某些实施方式中，所述人 SIRP α 结构域包含人 SIRP α 变体 1 的结构域、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体。在某些实施方式中，所述人 SIRP α 结构域包含人 SIRP α 变体 1 的 IgV 结构域、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体。在某些实施方式中，所述人 SIRP α 结构域包含人 SIRP α 变体 1 中第 33 位-第 149 位的氨基酸残基、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体。

在某些实施方式中，本申请所述人 SIRP α 结构域包含下述任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO: 1-20、62-65，以及，与其具有至少 80%（例如，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同源性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，本申请所述的融合蛋白包含下述任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO: 21-61 中，以及，与其具有至少 80%（例如，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同源性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述人 SIRP α 结构域、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体包含 1 个或几个氨基酸残基的取代、缺失或添加。

在某些实施方式中，所述突变体在选自下组的一个或多个残基处包含氨基酸取代：I61、V63、E77、Q82、K83、E84、V93、D95、D96、K98、N100、R107、G109 和 V132。

在某些实施方式中，所述突变体包含一个或多个选自下组的氨基酸取代：R22C、I29L、I61L/V/F、V63I、E77I/N/Q/K/H/M/R/N/V/L、Q82S/R/G/N、K83R、E84K/H/D/R/G、V93L/A、D95H/R/E、D96S/T、K98R、N100G/K/D/E、R107N/S、G109R/H 和 V132L/R/I/S。

在某些实施方式中,所述人 SIRP α 结构域包含下述任一项所示的氨基酸序列:SEQ ID NO: 1-20、62-65。

在某些实施方式中,所述免疫球蛋白 Fc 区包含 IgG 的 Fc 区。

在某些实施方式中,所述 IgG 为人 IgG。在某些实施方式中,所述 IgG 选自下组: IgG1 和/或 IgG4。

在某些实施方式中,所述人 SIRP α 结构域位于所述免疫球蛋白 Fc 区的 N 端。

在某些实施方式中,所述人 SIRP α 结构域与所述免疫球蛋白 Fc 区通过连接子相连。

在某些实施方式中,所述免疫球蛋白 Fc 区包含包含下述任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 67- 68。

在某些实施方式中,所述融合蛋白包含下述任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO:21-61。

另一方面,本申请提供了核酸分子,其编码本申请所述的融合蛋白。

另一方面,本申请提供了载体,其包含本申请所述的核酸分子。

另一方面,本申请提供了宿主细胞,其包含本申请所述的核酸分子或本申请所述的载体。

另一方面,本申请提供了制备本申请所述的融合蛋白的方法,所述方法包括在使得所述融合蛋白表达的条件下,培养本申请所述的宿主细胞。

另一方面,本申请提供了组合物,其包含本申请所述的融合蛋白、核酸分子、载体和/或宿主细胞,以及任选地药学上可接受的佐剂。

另一方面,本申请提供了本申请所述的融合蛋白、核酸分子、载体、宿主细胞和/或组合物在制备药物和/或试剂盒中的用途,其中所述药物和/或试剂盒用于预防或治疗肿瘤或自身免疫疾病。在某些实施方式中,所述肿瘤选自下组: CD47 阳性血液肿瘤或 CD47 阳性实体瘤。在某些实施方式中,所述自身免疫疾病选自下组: 克罗恩氏病、过敏性哮喘和类风湿性关节炎。

另一方面,本申请提供了阻断 CD47 蛋白与 SIRP α 相互作用的方法,所述方法包括施用本申请所述的融合蛋白或组合物。

另一方面,本申请提供了抑制肿瘤或肿瘤细胞生长和/或增殖的方法,所述方法包括使本申请所述的融合蛋白或组合物与所述肿瘤或肿瘤细胞接触。在某些实施方式中,所述接触在体外发生。

另一方面,本申请提供了预防或治疗受试者中的肿瘤或自身免疫疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本申请所述的融合蛋白或组合物。在某些实施方式中,所述肿瘤选自下组: CD47 阳性血液肿瘤或 CD47 阳性实体瘤。在某些实施方式中,所述自身免疫疾病选自下组: 克罗恩氏病、过敏性哮喘和类风湿性关节炎。

本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本公开的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本公开的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的，本公开的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行修改而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地，本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的，而非为限制性的。

附图说明

本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述示例性实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明书如下：

图 1 显示的是载体 pTM 的物理结构示意图。

图 2 显示的是检测 SIRP α 截短结构域及其突变体与 CD47 间相互作用的方法示意图。

图 3 显示的是 SIRP α 截短结构域突变体流式富集筛选结果。

图 4 显示的是 SIRP α 截短结构域及其变体的序列比对情况。

图 5 显示的是本申请所述融合蛋白识别 CD47 蛋白的结果。

图 6A-6B 显示的是本申请所述融合蛋白识别人 CD47 蛋白的特异性。

图 7 显示的是本申请所述融合蛋白对人 CD47 蛋白及其他蛋白的识别情况。

图 8 显示的是本申请所述融合蛋白与 TTI-621 竞争性阻断 CD47 蛋白与其配体 SIRP α 的结合。

图 9A-9C 显示的是本申请所述融合蛋白识别 Raji 细胞、Jurkat 细胞及 A549 细胞表面 CD47 蛋白的结果。

图 10A-10C 显示的是本申请所述融合蛋白和 TTI-621 识别 Raji 细胞、Jurkat 细胞及 A549 细胞表面 CD47 蛋白的结果。

图 11 显示的是本申请所述融合蛋白和 Hu5F9-G4 抗凝血反应的结果。

图 12A-12B 显示的是本申请所述融合蛋白抑制肿瘤的活性。

图 13A-13B 显示的是比较本申请所述融合蛋白和 TTI-621 对红细胞和血小板的影响。

图 14 显示的是本申请所述融合蛋白识别 CD47 蛋白的结果。

图 15 显示的是本申请所述融合蛋白竞争性阻断 CD47 蛋白与其配体 SIRP α 的结合。

图 16 显示的是本申请所述融合蛋白和 Hu5F9-G4 抗凝血反应的结果。

图 17 显示的是本申请所述融合蛋白有效阻断 CD47-Fc 诱导的 Jurkat-CSR 细胞凋亡。

图 18A 显示的是本申请所述融合蛋白对小鼠外周血中红细胞含量的影响。

图 18B 显示的是本申请所述融合蛋白对小鼠外周血中血小板含量的影响。

图 19 显示的是本申请所述融合蛋白对小鼠体内肿瘤生长的抑制作用。

图 20 显示的是本申请所述融合蛋白对小鼠体重的影响。

具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

融合蛋白

一方面，本申请提供了一种融合蛋白，其可以特异性结合 CD47 蛋白，以 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 K_D 值与 CD47 蛋白相结合，例如：所述 K_D 值不高于 $9 \times 10^{-9} \text{M}$ 、不高于 $8 \times 10^{-9} \text{M}$ 、不高于 $7 \times 10^{-9} \text{M}$ 、不高于 $6.2 \times 10^{-9} \text{M}$ 、不高于 $6 \times 10^{-9} \text{M}$ 、不高于 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、不高于 $4.8 \times 10^{-9} \text{M}$ 、不高于 $4.5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、不高于 $2 \times 10^{-9} \text{M}$ 、不高于 $1.5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、或不高于 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 或更低。

在某些情形中，本申请所述的融合蛋白也可特异性阻断 CD47 蛋白与 SIRP α 的相互作用，从而激活巨噬细胞吞噬肿瘤细胞，或者抑制某些特定细胞凋亡的凋亡信号。此外，本申请所述的融合蛋白可不引起凝血反应，例如，用血凝板进行测试，向其中加入所述融合蛋白和红细胞溶液后，红细胞沉于孔底而不平铺呈网状。所述融合蛋白还可以抑制肿瘤或肿瘤细胞的生长和/或增殖，例如，可以使肿瘤面积或肿瘤体积减少，或可以使携带肿瘤的受试者的存活率提高。所述融合蛋白还可以安全地向受试者施用，其不会对受试者的体重和/或死亡率产生负面影响。此外，本申请所述的融合蛋白易于制备和获得，并不局限于特定的免疫球蛋白 Fc 区来源。

在本申请中，术语“融合蛋白”通常是指一种复合多肽，即由两种（或更多种）多肽组成的单个连续氨基酸序列。融合蛋白一般可以使用重组核酸的方法或化学合成的方法人工制备得到。

在本申请中，术语“CD47 蛋白”又称整联蛋白相关蛋白（integrin associated protein, IAP），其属于免疫球蛋白超家族。所述 CD47 蛋白可与膜整合素（membrane integrins）、凝血栓蛋白-1（thrombospondin-1, TSP-1）或信号调节蛋白 α （signal-regulatory protein alpha, SIRP α ）结合。CD47 蛋白可以表达于细胞膜表面。所述 CD47 蛋白可以由特定的整联蛋白、G 蛋白及胆固醇组成的超分子复合物。在本申请中，所述 CD47 蛋白可为人 CD47 蛋白，其在 GenBank 数据库的登录号为 CEJ95640.1。在本申请中，所述 CD47 蛋白可包含 SEQ ID NO:66 所示的氨基酸序列。

在本申请中，术语“CD47 阳性”通常是指在生物体或细胞表面表达 CD47 蛋白、其片段，

或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体 的特性。CD47 阳性细胞可以为过表达 CD47 的细胞。所述 CD47 阳性细胞通常可以作为疾病的指示。例如在疾病情况下，所述 CD47 阳性细胞表面 CD47 蛋白密度会超过该种细胞在正常条件下所具有的 CD47 蛋白密度。在某些实施方式中，所述肿瘤或肿瘤细胞可为 CD47 阳性。例如，所述肿瘤可选自下组：CD47 阳性血液肿瘤和/或或 CD47 阳性实体瘤。

在本申请中，术语“ K_D ”可与“ K_D ”互换使用，通常是指特定的抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，单位为 M (mol/L)。 K_D 可通过物质 AB 和其解离得到的物质 A 和物质 B 的浓度来计算： $K_D = c(A) * c(B) / c(AB)$ 。由该公式可知， K_D 值越大，说明解离越多，代表物质 A、B 之间的亲和力越弱；反之， K_D 值越小，说明解离越少，代表物质 A、B 之间的亲和力越强。

在本申请中，术语“SIRP α ”通常是指来自 SIRP 家族的调节性膜糖蛋白。所述 SIRP α 能够识别 CD47 蛋白，可作为 CD47 蛋白的配体。SIRP α 是一种跨膜蛋白，其胞外区可具有 3 个免疫球蛋白超家族样区域，其中 N 末端的区域介导与 CD47 的结合。所述 SIRP α 主要表达于巨噬细胞、树突状细胞和神经细胞表面。所述 SIRP α 的细胞质区域 (cytoplasmic region) 在大鼠、小鼠和人中高度保守。所述 SIRP α 存在多态性 (polymorphism)，但是不影响其与 CD47 蛋白的识别和结合。

在本申请中，术语“人 SIRP α 结构域”通常包括人 SIRP α 、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体。在本申请中，所述人 SIRP α 结构域可以包含人 SIRP α 的胞外结构域、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体。所述人 SIRP α 结构域可以包含人 SIRP α 的 IgV 结构域、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体。所述人 SIRP α 结构域可以包含人 SIRP α 变体 1 的结构域、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体。所述人 SIRP α 结构域可以包含人 SIRP α 变体 1 中第 33 位-第 149 位的氨基酸残基、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体。在人类中，SIRP α 蛋白主要有两种形式，一种形式 (人 SIRP α 变体 1 或 V1 型) 的氨基酸序列在 GenBank 中的登录号为 NP_542970.1 (其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 62 所示，其中第 31-504 位氨基酸残基可构成成熟型 SIRP α 结构域)。另一种形式 (变体 2 或 V2 型) 与所述变体 1 或 V1 型有 13 个不同的氨基酸，并且其氨基酸序在 GenBank 中的登录号为 CAA71403.1。

在本申请中，所述人 SIRP α 结构域可包含人 SIRP α 的胞外结构域、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体。

在本申请中，术语“胞外结构域”通常是指蛋白中位于细胞膜外的功能结构区域。在某些

实施方式中，所述胞外结构域可以指人 SIRP α 结构域的胞外结构域、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体。例如，所述人 SIRP α 结构域的胞外结构域可以包含三个免疫球蛋白超家族 (IgSF) 结构域和多个糖基化位点。所述人 SIRP α 结构域的胞外结构域可以与特异性配体（例如 CD47 蛋白）相结合，实现信号转导功能。所述人 SIRP α 结构域的胞外结构域也可以被多种有丝分裂原活化而发生磷酸化，如血清、胰岛素、生长因子、EGF、PDGF 以及神经营养因子等。

在本申请中，所述人 SIRP α 结构域可包含人 SIRP α 的 IgV 结构域、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体。在本申请中，所述人 SIRP α 结构域可包含人 SIRP α 变体 1、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体。例如，所述人 SIRP α 结构域可以包含人 SIRP α 变体 1 中第 33 位-第 149 位的氨基酸残基、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体。

在本申请中，术语“IgV 结构域”通常是指类似于抗体可变结构域的 Ig 样结构域。免疫球蛋白结构域可分为四类：IgV、IgC1、IgC2 和 IgI。IgV 结构域可存在于不同的蛋白质家族中，包括免疫球蛋白的轻链和重链，T 细胞受体等。人 SIRP α 可以在所述 IgV 结构域呈高度多态性。例如，所述人 SIRP α 变体 1 的 IgV 结构域可以介导人 SIRP α 结构域与人 CD47 蛋白的结合 (Seiffert, M. et al. (2001) Blood 97, 2741-9; Vernon-ffilson, E.F. et al. (2000) Eur J Immunol 30, 2130-7)。

例如，所述人 SIRP α 变体 1、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体可包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列。例如，所述人 SIRP α 结构域可包含人 SIRP α 变体 1 的 IgV 结构域、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体。例如，所述人 SIRP α 变体 1 的 IgV 结构域、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体可包含 SEQ ID NO: 65 所示的氨基酸序列（即 SEQ ID NO: 62 所示氨基酸序列中的第 38-145 位残基）。又例如，所述人 SIRP α 结构域可包含人 SIRP α 变体 1 的截短结构域、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体。所述人 SIRP α 变体 1 的截短结构域、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体可包含如 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列（即 SEQ ID NO: 62 所示氨基酸序列中的第 33-149 位残基）。

本申请所述的人 SIRP α 结构域可包含选自下述任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO: 1-20、62-65。

在本申请中，术语“突变体”通常是指发生突变的蛋白质、多肽或氨基酸序列。所述突变可以指与野生型相比的不同之处。例如，所述突变可以为在野生型基础上发生了氨基酸序列

的结构性变化。例如，所述野生型可以为缺乏所述结构性变化的典型表型。例如，所述突变体可以将人 SIRP α 结构域、其片段（包括人 SIRP α 的 IgV 结构域、其片段、人 SIRP α 变体 1 的结构域、其片段或人 SIRP α 变体 1 中第 33 位-第 149 位的氨基酸残基、其片段）视为野生型，突变后得到的突变体。

在本申请中，所述突变体可在选自下组的一个或多个残基处包含氨基酸取代：I61、V63、E77、Q82、K83、E84、V93、D95、D96、K98、N100、R107、G109、V132。所述氨基酸取代中氨基酸残基的位置可以是根据 SEQ ID NO: 62 所示氨基酸序列为基准确定的残基编号。其中，“残基 X_n”是指相应于 SEQ ID NO: 62 所示氨基酸序列中第 n 位的残基 X，其中 n 为正整数，X 为任意氨基酸残基的缩写。例如，“残基 I61”表示相应于 SEQ ID NO: 62 所示氨基酸序列中第 61 位的氨基酸残基 I。

在本申请中，“氨基酸取代 X_n”是指在相应于 SEQ ID NO: 62 所示氨基酸序列中第 n 位的残基 X 处发生氨基酸取代，其中 n 为正整数，X 为任意氨基酸残基的缩写。例如，“氨基酸取代 I61”表示在相应于 SEQ ID NO: 62 所示氨基酸序列中第 61 位的氨基酸残基 I 处发生氨基酸取代。

在本申请中，某氨基酸序列中的某氨基酸残基“相应于”另一氨基酸序列中的某氨基酸残基通常是指，在优化条件下进行氨基酸序列比对时所得到的氨基酸残基对应关系。所述序列比对可通过本领域技术人员了解的方式进行，例如，使用 BLAST、BLAST-2、ALIGN、NEEDLE 或 Megalign (DNASTAR) 软件等。本领域技术人员能够确定用于比对的适当参数，包括在所比较的全长序列中实现最优比对所需要的任何算法。

本申请所述的氨基酸取代可以为非保守取代。所述非保守取代可包括以非保守的形式改变目标蛋白或多肽中的氨基酸残基，例如将具有某种侧链大小或某种特性（例如，亲水性）的氨基酸残基变为具有不同侧链大小或不同特性（例如，疏水性）的氨基酸残基。

所述氨基酸取代也可以为保守取代。所述保守取代可包括以保守的形式改变目标蛋白或多肽中的氨基酸残基，例如将具有某种侧链大小或某种特性（例如，亲水性）的氨基酸残基变为具有相同或相似侧链大小或者相同或相似特性（例如，仍为亲水性）的氨基酸残基。这样的保守取代通常不会对所产生的蛋白质的结构或功能带来很大影响。在本申请中，作为所述融合蛋白、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体 的氨基酸序列变体可包括不显著改变蛋白质结构或其功能（例如，阻断 CD47 与其配体结合的能力）的保守氨基酸取代。

作为示例，下述各组中每组内各氨基酸间的相互取代在本申请中可被认为是保守取代：

具有非极性侧链的氨基酸组：丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。

不带电荷、具有极性侧链的氨基酸组：甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸，半胱氨酸，酪氨酸，天冬酰胺和谷氨酰胺。

带负电荷、具有极性侧链的氨基酸组：天冬氨酸和谷氨酸。

带正电荷的碱性氨基酸：赖氨酸、精氨酸和组氨酸。

带苯基的氨基酸：苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。

在某些实施方式中，所述突变体可包含一个或多个选自下组的一个或多个氨基酸取代：I61L/V/F、V63I、E77I/N/Q/K/H/M/R/N/V/L、Q82S/R/G/N、K83R、E84K/H/D/R/G、V93L/A、D95H/R/E、D96S/T、K98R、N100G/K/D/E、R107N/S、G109R/H 和 V132L/R/I/S。

在本申请中，氨基酸取代“X_nY/Z”是指相应于 SEQ ID NO: 62 所示氨基酸序列中第 n 位的残基 X 被取代为氨基酸残基 Y 或者氨基酸残基 Z，其中 n 为正整数，X、Y 和 Z 分别独立地为任意氨基酸残基的缩写，且 X 不同于 Y 或 Z。例如，氨基酸取代“I61L/V/F”是指相应于 SEQ ID NO: 62 所示氨基酸序列中第 61 位的残基 I 被取代为氨基酸残基 L、V 或 F。

例如，本申请所述的融合蛋白可包括选自下述的氨基酸取代组：

- (1) I61L、V63I、E77I、E84K、V93L、L96S、K98R、N100G 和 V132L；
- (2) I61V、E77N、Q82S、K83R 和 E84H；
- (3) I61F、V63I、K83R、E84K 和 V132I；
- (4) I61L、E77Q、E84D、R107N 和 V132I；
- (5) I61L、V63I、E77K、K83R、E84D 和 N100G；
- (6) I61V、E77H、Q82R、K83R、E84H 和 R107S；
- (7) I61L、E77I、Q82G、E84R、V93L、L96T、N100G、R107S、G109R 和 V132R；
- (8) I61L、E77M、Q82G、K83R、E84D 和 V132L；
- (9) I61L；
- (10) I61F、D95H、L96S、G109H 和 V132S；
- (11) I61F、D95H、L96S、K98R、G109H 和 V132S；
- (12) I61L、E77Q、E84D、V93A、R107N 和 V132I；
- (13) E77K、L96S、N100K、G109H 和 V132L；
- (14) I61L、V63I、Q82G、E84G、D95R、L96S、N100D 和 V132I；
- (15) I61L、E77R、Q82N、K83R、E84G、V93L、D95E、L96T、K98R、N100D 和 V132L；

- (16) I61V、E77N、Q82S、K83R、E84H 和 V93A;
- (17) I61V、V63I、E77V、K83R、E84D、D95E、L96T、K98R 和 N100E;
- (18) I61L、V63I、E77V、K83R、D95E、L96S、K98R、N100D 和 G109R;
- (19) I61V、E77L、Q82G、E84G、V93L、D95E、L96T、K98R 和 N100G; 和,
- (20) I61L、V63I、E77N、Q82G 和 E84G。

在本申请中, 在人 SIRP α 变体 1 的截短结构域 (如 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列, 即 SEQ ID NO: 62 所示氨基酸序列中的第 33-149 位残基) 的基础上, 分别包含以上 (1)-(20) 的氨基酸取代组的 SIRP α 结构域的变体可依次被命名为 M1、M5、M12、M35、M37、M41、M57、M67、M81、M82、M84、M91、M99、M102、M111、M122、M126、M130、M135 和 M145。这些突变体可依次包含如 SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO:20 中一项所示的氨基酸序列。

在本申请中, 包含人 SIRP α 变体 1 的截短结构域 (如 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列, 即 SEQ ID NO: 62 所示氨基酸序列中的第 33-149 位残基) 和人 IgG1 Fc (如 SEQ ID NO: 67 所示的氨基酸序列) 的融合蛋白可被命名为 SS002, 其包含如 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 术语“免疫球蛋白 Fc 区”通常是指抗体结构 Y 形结构的基座区域, 又叫做片段可结晶区 (Fragment crystallizable region, Fc region)。在 IgG、IgA 和 IgD 抗体同种型中, Fc 区可由两个相同的蛋白质片段组成, 其来自抗体两条重链的第二和第三恒定结构域; IgM 和 IgE 的 Fc 区可在每条多肽链中含有三个重链恒定结构域。IgG 的 Fc 区具有高度保守的 N-糖基化位点。在某些实施方式中, 所述免疫球蛋白 Fc 区可包含 IgG 的 Fc 区。在某些实施方式中, 所述免疫球蛋白 Fc 区可包含重链恒定区的 CH2 和 CH3 区域。在某些实施方式中, 所述免疫球蛋白 Fc 区可包含铰链区。例如, 所述免疫球蛋白 Fc 区可包含选自下述任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO:67-68。

在本申请中, 术语“IgG”通常是指免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G)。IgG 是人的免疫球蛋白之一。根据 IgG 分子中的 γ 链抗原性差异, 人 IgG 有四个亚型: IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。在本申请中, 术语“IgG1”通常是指 IgG 中占比最高的一类亚型, 与 Fc 受体有较高亲和性。例如, 所述 IgG 可为人 IgG。又例如, 所述 IgG 可选自下组: IgG1 和/或 IgG4。

在本申请中, 所述融合蛋白包括能够特异性结合所述 CD47 蛋白的人 SIRP α 结构域和免疫球蛋白 Fc 区, 其中所述人 SIRP α 结构域可以与所述免疫球蛋白 Fc 区直接或间接相连。例如, 所述人 SIRP α 结构域可位于所述免疫球蛋白 Fc 区的 N 端。例如, 所述人 SIRP α 结构域的 C 端可以与所述免疫球蛋白 Fc 的 N 端直接或间接连接。例如, 所述人 SIRP α 结构域可以

与所述免疫球蛋白 Fc 通过连接子相连。在本申请中，所述连接子可以为肽连接子。

在本申请中，在所述 SS002 的基础上，分别包含以上 (1) - (20) 中一项氨基酸取代组的本申请所述融合蛋白可依次被命名为 SS002M1、SS002M5、SS002M12、SS002M35、SS002M37、SS002M41、SS002M57、SS002M67、SS002M81、SS002M82、SS002M84、SS002M91、SS002M99、SS002M102、SS002M111、SS002M122、SS002M126、SS002M130、SS002M135 和 SS002M145。这些融合蛋白可依次包含如 SEQ ID NO: 21-SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。

在本申请中，包含在人 SIRP α 变体 1 的截短结构域（其包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列，即 SEQ ID NO: 62 所示氨基酸序列中的第 33-149 位残基）基础上分别含有以上 (1) - (20) 中一项的氨基酸取代组和人 IgG4 Fc（如 SEQ ID NO: 68 所示的氨基酸序列）的本申请所述融合蛋白可依次被命名为 SS002M1G4、SS002M5G4、SS002M12G4、SS002M35G4、SS002M37G4、SS002M41G4、SS002M57G4、SS002M67G4、SS002M81G4、SS002M82G4、SS002M84G4、SS002M91G4、SS002M99G4、SS002M102G4、SS002M111G4、SS002M122G4、SS002M126G4、SS002M130G4、SS002M135G4 和 SS002M145G4。这些融合蛋白可依次包含如 SEQ ID NO: 41-SEQ ID NO: 60 中一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，本申请所述的融合蛋白可包含下述任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO: 21-SEQ ID NO: 61。

在本申请中涉及的蛋白质、多肽和/或氨基酸序列，还应理解为至少包含以下的范围：与该所述蛋白质或多肽具备相同或类似功能的变体或同源物。

在本申请中，所述变体可以为，在所述蛋白质和/或所述多肽（例如，人 SIRP α 结构域、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体；或所述融合蛋白）的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽。例如，所述功能性变体可包含已经通过至少 1 个，例如 1-30 个、1-20 个或 1-10 个，又例如 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸取代、缺失和/或插入而具有氨基酸改变的蛋白质或多肽。所述功能性变体可基本上保持改变（例如取代、缺失或添加）之前的所述蛋白质或所述多肽的生物学特性。例如，所述功能性变体可保持改变之前的所述蛋白质或所述多肽的至少 60%，70%，80%，90%，或 100% 的生物学活性（例如特异性结合 CD47 蛋白的能力）。

在本申请中，所述同源物可以为，与所述蛋白质和/或所述多肽（例如，人 SIRP α 结构域、其片段，或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体；或所述融合蛋白）的氨基酸序列具有至少约 80%（例如，具有至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、

约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或更高的) 序列同源性的蛋白质或多肽。

在本申请中, 所述同源性通常是指两个或多个序列之间的相似性、类似或关联。可以通过以下方式计算“序列同源性百分比”: 将两条待比对的序列在比较窗中进行比较, 确定两条序列中存在相同核酸碱基(例如, A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(例如, Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys 和 Met)的位置的数目以得到匹配位置的数目, 将匹配位置的数目除以比较窗中的总位置数(即, 窗大小), 并且将结果乘以 100, 以产生序列同源性百分比。为了确定序列同源性百分数而进行的比对, 可以按本领域已知的多种方式实现, 例如, 使用可公开获得的计算机软件如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适宜参数, 包括为实现正在比较的全长序列范围内或目标序列区域内最大比对所需要的任何算法。所述同源性也可以通过以下的方法测定: FASTA 和 BLAST。对 FASTA 算法的描述可以参见 W. R. Pearson 和 D. J. Lipman 的“用于生物学序列比较的改进的工具”, 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci.), 85: 2444-2448, 1988; 和 D. J. Lipman 和 W. R. Pearson 的“快速灵敏的蛋白质相似性搜索”, Science, 227: 1435-1441, 1989。对 BLAST 算法的描述可参见 S. Altschul、W. Gish、W. Miller、E. W. Myers 和 D. Lipman 的“一种基本的局部对比 (alignment) 搜索工具”, 分子生物学杂志, 215: 403-410, 1990。

核酸分子、载体、宿主细胞

在另一方面, 本申请提供一种或多种核酸分子, 其可编码本申请所述的融合蛋白。

在某些实施方式中, 所述核酸分子可以完整编码本申请所述的融合蛋白。例如, 利用一种核酸分子即可获得所述的融合蛋白。在某些实施方式中, 所述核酸分子可以编码本申请所述融合蛋白的一部分。例如, 利用两种以上不同的所述核酸分子可获得所述的融合蛋白。例如, 所述的核酸分子可以编码本申请所述的融合蛋白中所述人 SIRP α 结构域(例如, 所述人 SIRP α 的胞外结构域、其片段, 或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体、所述人 SIRP α 的 IgV 结构域、其片段, 或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体、所述人 SIRP α 变体 1 的结构域、其片段, 或者其中经过 1 个或多个氨基酸取代的其突变体)。又例如, 所述核酸分子可以编码所述融合蛋白中所述免疫球蛋白 Fc 区。

在另一方面, 本申请提供一种或多种载体, 其可包含本申请所述的一种或多种核酸分子。

在另一方面, 本申请提供一种细胞(例如宿主细胞), 其可包含本申请所述的核酸分子或本申请所述的载体。

在本申请中，术语“核酸分子”通常是指从其天然环境中分离的或人工合成的任何长度的分离形式的核苷酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。本申请所述的核酸分子可以为分离的。例如，其可以是通过以下方法产生或合成的：（i）在体外扩增的，例如通过聚合酶链式反应（PCR）扩增产生的，（ii）通过克隆重组产生的，（iii）纯化的，例如通过酶切和凝胶电泳分级分离，或者（iv）合成的，例如通过化学合成。在某些实施方式中，所述分离的核酸是通过重组 DNA 技术制备的核酸分子。在本申请中，可以通过本领域已知的多种方法来制备编码所述抗体或其抗原结合片段的核酸，这些方法包括但不限于，采用限制性片段操作或采用合成性寡核苷酸的重叠延伸 PCR，具体操作可参见 Sambrook 等人，Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989；和 Ausube 等人 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York N.Y., 1993。

在本申请中，术语“载体”通常是指能够在合适的宿主中自我复制的核酸分子，其将插入的核酸分子转移到宿主细胞中和/或宿主细胞之间。所述载体可包括主要用于将 DNA 或 RNA 插入细胞中的载体、主要用于复制 DNA 或 RNA 的载体，以及主要用于 DNA 或 RNA 的转录和/或翻译的表达的载体。所述载体还包括具有多种上述功能的载体。所述载体可以是当引入合适的宿主细胞时能够转录并翻译成多肽的多核苷酸。通常，通过培养包含所述载体的合适的宿主细胞，所述载体可以产生期望的表达产物。在本申请中，所述载体中可包含一种或多种所述核酸分子。例如，所述载体可以含有所有编码所述融合蛋白所需的核酸分子。此时，获得本申请所述的融合蛋白只需使用一个所述载体。在某些实施方式下，所述载体可以包含一个编码所述融合蛋白的部分的核酸分子，例如，包含编码本申请所述的融合蛋白中所述人 SIRP α 结构域的核酸分子；又例如，所述载体可包含编码所述融合蛋白中所述免疫球蛋白 Fc 区的核酸分子。此时，获得本申请所述的融合蛋白需要使用两个以上不同的载体。

此外，所述载体中还可包含其他基因，例如允许在适当的宿主细胞中和在适当的条件下选择该载体的标记基因。此外，所述载体还可包含允许编码区在适当宿主中正确表达的表达控制元件。这样的控制元件为本领域技术人员所熟知的，例如，可包括启动子、核糖体结合位点、增强子和调节基因转录或 mRNA 翻译的其他控制元件等。在某些实施方式中，所述表达控制序列为可调的元件。所述表达控制序列的具体结构可根据物种或细胞类型的功能而变化，但通常包含分别参与转录和翻译起始的 5' 非转录序列和 5' 及 3' 非翻译序列，例如 TATA 盒、加帽序列、CAAT 序列等。例如，5' 非转录表达控制序列可包含启动子区，启动子区可包含用于转录控制功能性连接核酸的启动子序列。在本申请中，所述载体可以是 pTM 载体。

在本申请中，术语“宿主细胞”、“细胞”、“宿主”可以互换地使用，通常是指可以或已经含有包括本申请所述的核酸分子的质粒或载体，或者能够表达本申请所述的融合蛋白、其片段或变体的个体细胞，细胞系或细胞培养物。所述宿主细胞可以包括单个宿主细胞的子代。由于天然的、意外的或故意的突变，子代细胞与原始亲本细胞在形态上或在基因组上可能不一定完全相同，但能够表达本申请所述的抗体或其抗原结合片段即可。所述宿主细胞可以通过使用本申请所述的载体体外转染细胞而得到。所述宿主细胞可以是原核细胞（例如大肠杆菌），也可以是真核细胞（例如酵母细胞，例如 COS 细胞，中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，HeLa 细胞，HEK293 细胞，COS-1 细胞，NS0 细胞或骨髓瘤细胞）。在本申请中，所述宿主细胞可以是 CHO 细胞。

组合物、制备方法及应用

在另一方面，本申请可提供制备所述融合蛋白的方法，所述方法可包括在使得所述融合蛋白表达的条件下，培养宿主细胞。

在另一方面，本申请可提供一种组合物，其可包含所述的融合蛋白、所述的核酸分子、所述的载体和/或所述的宿主细胞，以及任选地药学上可接受的佐剂。

在本申请中，术语“药学上可接受的佐剂”可以包括缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、低分子量多肽、蛋白质、亲水聚合物、氨基酸、糖、螯合剂、反离子、金属复合物和/或非离子表面活性剂等。

所述药学上可接受的佐剂可以包括缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、低分子量多肽、蛋白质、亲水聚合物、氨基酸、糖、螯合剂、反离子、金属复合物和/或非离子表面活性剂等。

在本申请中，可按照本领域的常规技术手段将所述药物组合物与可药用载体或稀释剂以及任何其他已知的辅剂和赋形剂配制在一起，例如按照 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第十九版, Gennaro 编辑, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995 中公开的技术进行操作。

在本申请中，所述组合物可被配制用于口服给药，静脉内给药，肌肉内给药，在肿瘤部位的原位给药，吸入，直肠给药，阴道给药，经皮给药或通过皮下储存库给药。

在本申请中，所述组合物可以用于抑制肿瘤生长。例如，本申请的组合物可以抑制或延缓疾病（例如肿瘤或自身免疫疾病）的发展或进展，（例如，可以减小肿瘤大小，甚至基本消除肿瘤），和/或可以减轻和/或稳定疾病状态。

本申请所述的药物组合物可以包含治疗有效量的所述融合蛋白。所述治疗有效量是能够预防和/或治疗（至少部分治疗）患有或具有发展风险的受试者中疾病（例如肿瘤或自身免疫疾

病)和/或其任何并发症而所需的剂量。

另一方面,本申请提供本申请所述的融合蛋白、核酸分子、载体、宿主细胞和/或组合物在制备药物和/或试剂盒中的用途,其中所述药物和/或试剂盒可用于预防或治疗肿瘤或自身免疫疾病。

在本申请中,术语“肿瘤”通常是指机体局部组织细胞增生所形成的新生物,由于这种新生物多呈占位性块状凸起,也称赘生物。根据新生物的细胞特性及对机体的危害性程度,又将肿瘤分为良性肿瘤和恶性肿瘤两类,癌症是恶性肿瘤的总称。本申请中所述的肿瘤可以所述肿瘤选自下组:CD47 阳性血液肿瘤和/或 CD47 阳性实体瘤。

在本申请中,术语“CD47 阳性血液肿瘤”通常是指过表达 CD47 的血液肿瘤,其中可包括各类白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。所述“白血病”通常是指血液的一种癌症,其中产生了对抵抗感染不起作用的白细胞,由此挤占了组成血液的其他部分,如血小板和红细胞。白血病可分为急性或慢性白血病。白血病的某些形式可以为,例如,急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓细胞白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性粒细胞白血病(CML)、骨髓增殖性失调/肿瘤(MPDS)和骨髓增生异常综合征。所述“淋巴瘤”可以指霍奇金淋巴瘤、惰性和侵袭性非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤(小细胞和大细胞)等。所述骨髓瘤可以指多发性骨髓瘤(MM)、巨细胞骨髓瘤、重链骨髓瘤(heavy chain myeloma)、轻链骨髓瘤(light chain myeloma)或本斯-琼斯氏骨髓瘤(Bence-Jones myeloma)。

在本申请中,术语“CD47 阳性实体瘤”通常是指过表达 CD47 的实体瘤或有形瘤,其可以通过临床检查,例如,X线摄片、CT扫描、B超或者触诊检查出有形肿块。主要类别可包括癌症(carcinoma)和肉瘤(sarcoma)。例如,所述 CD47 阳性实体瘤可以包括尤文氏肉瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、膀胱癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、乳腺癌、胰腺癌、星形细胞癌、胶质母细胞瘤和肾细胞癌等。

在本申请中,所述自身免疫疾病可包括克罗恩氏病、过敏性哮喘和类风湿性关节炎。

在本申请中,术语“克罗恩氏病”通常是指一种原因不明的肠道炎症性疾病,在胃肠道的任何部位均可发生。所述克罗恩氏病和慢性非特异性溃疡性结肠炎两者统称为炎症性肠病(IBD)。

在本申请中,术语“过敏性哮喘”通常是指由多种细胞特别是肥大细胞、嗜酸性粒细胞和T淋巴细胞参与的慢性气道炎症。

在本申请中,术语“类风湿性关节炎”通常是指一种以关节病变为主的慢性全身自身免疫性疾病。

另一方面，本申请所述的融合蛋白、核酸分子、载体、宿主细胞和/或组合物。其可用于预防或治疗所述肿瘤或所述自免疫疾病。

另一方面，本申请提供了预防或治疗肿瘤或自免疫疾病的方法，所述方法包括向受试者施用本申请所述的融合蛋白、核酸分子、载体、宿主细胞和/或组合物。

另一方面，本申请提供了一种阻断 CD47 蛋白与 SIRP α 相互作用的方法，所述方法可包括施用（例如，向有需要的受试者或细胞或生物学样品施用）本申请所述的融合蛋白或组合物。

另一方面，本申请提供了一种抑制肿瘤或肿瘤细胞生长和/或增殖的方法，所述方法可包括使本申请所述的融合蛋白或组合物与所述肿瘤或肿瘤细胞接触。例如，所述接触可在体外发生。

在本申请中，术语“受试者”通常是指任何人或非人动物。术语“非人动物”可包括所有脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物，例如非人灵长类动物、山羊、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

在本申请中，术语“约”通常是指在指定数值以上或以下 0.5%-10% 的范围内变动，例如在指定数值以上或以下 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或 10% 的范围内变动。

在本申请中，术语“包含”通常是指包括、总括、含有或包涵的含义。在某些情况下，也表示“为”、“由……组成”的含义。

不欲被任何理论所限，下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请的装置、方法和系统的工作方式，而不适用于限制本申请发明的范围。

实施例

实施例 1 变体的筛选

获取人 SIRP α 变体 1 (NP_542970.1) 的截短结构域，其氨基酸序列如 SEQ ID NO:63 所示（即 SEQ ID NO:62 中第 33-149 位残基），用 Discovery Studio（创腾科技）软件构建该截短结构域中与人 CD47 (CEJ95640.1) 相互作用的结构，理论分析两个蛋白中参与相互作用的位点以及相互作用模式，确定该截短结构域中直接或间接参与与 CD47 相互作用的氨基酸位点为 I61、V63、E77、Q82、K83、E84、V93、D95、D96、K98、N100、R107、G109、V132（其中，这些氨基酸取代中氨基酸残基的位置以 SEQ ID NO: 62 所示氨基酸序列为准进行计数编号）。对这些作用位点进行随机突变，并构建突变体库。然后，将该突变体库克隆到载体 pTM 上。所述 pTM 载体含有信号肽、跨膜区序列（如图 1 所示），其可在细胞表面展示

克隆入该载体的基因。

将构建的突变体库表达载体转染至 CHO 细胞 (ATCC)，使突变体库展示表达在细胞表面上。然后，用 FITC 荧光标记 CD47 蛋白 (义翘神州) 获得 CD47-FITC，根据 CD47-FITC 与 CHO 细胞表面该截短结构域的突变体之间结合活性强弱，利用流式细胞技术富集筛选能与 CD47-FITC 结合的突变体。筛选的具体原理可参见图 2，其中该截短结构域及突变体与带荧光分子 CD47 蛋白结合，结合的结果即可以通过荧光分子水平的高低来体现。

经过四轮筛选富集，收集与 CD47-FITC 结合较强的细胞 (如图 3 所示)。然后提取其 mRNA，反转录后获得 cDNA，对该截短结构域突变体的基因进行测序分析 (如图 4 所示)。测序结果显示，前述位点 I61、V63、E77、Q82、K83、E84、V93、D95、D96、K98、N100、R107、G109、V132 存在不同的突变位点组合。

从结果可知，在 I61、V63、E77、Q82、K83、E84、V93、D95、D96、K98、N100、R107、G109 和/或 V132 残基处引入不同的突变位点组合，可获得可特异性识别 CD47 的人 SIRP α 变体 1 截短结构域的突变体。

进一步分析后确定上述突变位点可能的突变后的氨基酸种类：I61L/V/F、V63I、E77I/N/Q/K/H/M/R/N/V/L、Q82S/R/G/N、K83R、E84K/H/D/R/G、V93L/A、D95H/R/E、D96S/T、K98R、N100G/K/D/E、R107N/S、G109R/H、V132L/R/I/S。

将包含这些突变的突变体分别命名为 M1、M5、M12、M35、M37、M41、M57、M67、M81、M82、M84、M91、M99、M102、M111、M122、M126、M130、M135 和 M145，其分别依次包括如 SEQ ID NO:1-20 中任一项所示的氨基酸序列，同时，这些其突变体在 SEQ ID NO: 63 所示氨基酸序列的基础上分别依次具有如下的氨基酸突变组合：

- (1) I61L、V63I、E77I、E84K、V93L、L96S、K98R、N100G 和 V132L；
- (2) I61V、E77N、Q82S、K83R 和 E84H；
- (3) I61F、V63I、K83R、E84K 和 V132I；
- (4) I61L、E77Q、E84D、R107N 和 V132I；
- (5) I61L、V63I、E77K、K83R、E84D 和 N100G；
- (6) I61V、E77H、Q82R、K83R、E84H 和 R107S；
- (7) I61L、E77I、Q82G、E84R、V93L、L96T、N100G、R107S、G109R 和 V132R；
- (8) I61L、E77M、Q82G、K83R、E84D 和 V132L；
- (9) I61L；
- (10) I61F、D95H、L96S、G109H 和 V132S；

- (11) I61F、D95H、L96S、K98R、G109H 和 V132S;
- (12) I61L、E77Q、E84D、V93A、R107N 和 V132I;
- (13) E77K、L96S、N100K、G109H 和 V132L;
- (14) I61L、V63I、Q82G、E84G、D95R、L96S、N100D 和 V132I;
- (15) I61L、E77R、Q82N、K83R、E84G、V93L、D95E、L96T、K98R、N100D 和 V132L;
- (16) I61V、E77N、Q82S、K83R、E84H 和 V93A;
- (17) I61V、V63I、E77V、K83R、E84D、D95E、L96T、K98R 和 N100E;
- (18) I61L、V63I、E77V、K83R、D95E、L96S、K98R、N100D 和 G109R;
- (19) I61V、E77L、Q82G、E84G、V93L、D95E、L96T、K98R 和 N100G; 和,
- (20) I61L、V63I、E77N、Q82G 和 E84G。

实施例 2 融合蛋白结合活性测定

将实施例 1 中的人 SIRPα 变体 1 的截短结构域（或称为野生型 SIRPα 截短结构域）和实施例 1 获得的人 SIRPα 结构域的突变体（即 M1、M5、M12、M35、M37、M41、M57、M67、M81、M82、M84、M91、M99、M102、M111、M122、M126、M130、M135 和 M145）分别与人 IgG1-Fc（其氨基酸序列如 SEQ ID NO:67 所示）融合表达，获得其所对应的 SIRPα 突变体 1 的截短结构域-人 Fc 融合蛋白（简称融合蛋白），将这些融合蛋白分别命名为 SS002、SS002M1、SS002M5、SS002M12、SS002M35、SS002M37、SS002M41、SS002M57、SS002M67、SS002M81、SS002M82、SS002M84、SS002M91、SS002M99、SS002M102、SS002M111、SS002M122、SS002M126、SS002M130、SS002M135 和 SS002M145。这些融合蛋白分别包含 SEQ ID NO:61、21-40 中任一项所示的氨基酸序列。

表 1 SIRPα 突变体 1 的截短结构域及突变体和对应的融合蛋白

SIRPα 突变体 1 的截短结构域或其突变体	融合蛋白
野生型 SIRPα 截短结构域	SS002
M1	SS002M1
M5	SS002M5
M12	SS002M12
M35	SS002M35
M37	SS002M37
M41	SS002M41
M57	SS002M57
M67	SS002M67
M81	SS002M81
M82	SS002M82
M84	SS002M84

M91	SS002M91
M99	SS002M99
M102	SS002M102
M111	SS002M111
M122	SS002M122
M126	SS002M126
M130	SS002M130
M135	SS002M135
M145	SS002M145

作为举例，选择融合蛋白 SS002、SS002M12、SS002M5、SS002M82、SS002M84、SS002M91、SS002M102、SS002M130 进行生物学活性分析。

利用 ELISA 法测定 SS002、SS002M5、SS002M12、SS002M82、SS002M84、SS002M91、SS002M102、SS002M130 等各融合蛋白与 CD47 分子的亲和力。

用 1g/ml 靶抗原 CD47-His 包被 ELISA 板条，于 4℃过夜。用 PBST 洗涤后，加入 10%的胎牛血清，于 37℃封闭 1 小时。然后分别向其加入 SS002、SS002M5、SS002M82、SS002M84、SS002M91、SS002M102、SS002M130，于 37℃反应 1 小时。然后，用 PBST 洗涤，加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 二抗（Goat Anti human IgG HRP，Thermo Fisher Scientific），于室温反应 30 分钟。然后，用 PBST 重复洗板 5 遍，用吸水纸尽量拍干残留液。每孔加入 100 ml TMB（eBioscience），室温（20±5℃）避光放置 1-5min；每孔加入 100 mL 2N H₂SO₄ 终止底物反应。用酶标仪于 450 nm 处读取 OD 值，分析各融合蛋白与 CD47 分子的亲和力（如图 5 所示）。

图 5 的结果显示，SS002、SS002M5、SS002M12、SS002M82、SS002M84、SS002M91、SS002M102、SS002M130 等各融合蛋白均能有效识别 CD47 分子。

实施例 3 亲和力分析

作为举例，利用 Biacore 方法测定 SS002、SS002M5、SS002M12、SS002M82、SS002M84、SS002M91、SS002M102、SS002M130 等各融合蛋白与 CD47 分子的亲和力，结果如下表 2 所示。

表 2 与 CD47 结合亲和力

融合蛋白	K _a (10 ⁶ 1/Ms)	K _d (10 ⁻⁴ 1/s)	K _D (10 ⁻⁹ M)
SS002	1.32±0.09	63.00±1.35	4.80±0.20
SS002M5	1.72±0.12	86.20±9.65	5.00±0.22
SS002M12	1.87±0.05	86.10±2.94	4.62±0.08
SS002M82	1.29±0.05	21.13±0.42	1.65±0.03
SS002M84	1.10±0.02	14.30±0.20	1.30±0.02
SS002M91	1.56±0.13	2.72±0.44	0.18±0.04

SS002M102	1.79±0.20	28.97±7.83	1.60±0.24
SS002M130	1.43±0.09	88.20±8.67	6.20±0.99

表 2 的结果显示, SS002、SS002M5、SS002M12、SS002M82、SS002M84、SS002M91、SS002M102、SS002M130 等各融合蛋白均可高亲和力识别 CD47 分子。

实施例 4 融合蛋白种属识别特异性

以融合蛋白 SS002 和 SS002M91 为例, 进行特异性识别活性分析。

为进行融合蛋白的种属分析, 将 1mg/mL 人 (Human) CD47 和小鼠 (Mouse) CD47 (北京义翘神州生物技术有限公司) 分别包被 ELISA 板条, 于 4°C 过夜; 用 PBST 洗涤后, 加入 10% 的胎牛血清, 于 37°C 封闭 1 小时。然后分别加入 SS002、SS002M91, 于 37°C 反应 1 小时。用 PBST 洗涤后, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 二抗 (Goat Anti human IgG HRP, Thermo Fisher Scientific), 于室温反应 30 分钟。然后, 用 PBST 重复洗板 5 遍, 用吸水纸尽量拍干残留液滴。然后每孔加入 100 ml TMB (eBioscience), 于室温 (20±5°C) 避光放置 1-5min; 每孔加入 100 mL 2N H₂SO₄ 终止底物反应。用酶标仪于 450 nm 处读取 OD 值, 分析融合蛋白与不同种属 CD47 的结合能力 (融合蛋白 SS002 和 SS002M91 的实验结果分别如图 6A、6B 所示)。

图 6A-6B 的结果显示, SS002、SS002M91 均能特异性识别人 CD47 分子, 且不识别小鼠 CD47 分子。

实施例 5 融合蛋白特异性识别靶抗原

以融合蛋白 SS002 和 SS002M91 为例, 将 1mg/ml SS002、SS002M91 与牛奶 (北京博迈德生物技术有限公司)、BSA (BOVOGEN)、CD19 (北京义翘神州生物技术有限公司)、TROP2 (北京义翘神州生物技术有限公司)、CD47 (北京麦格珀尔生物科技有限公司)、CD38 (北京义翘神州生物技术有限公司)、Gas6 (R&D) 等各蛋白以及 AXL (ACRO Biosystems) 分别包被 ELISA 板条, 于 4°C 过夜; PBST 洗涤后, 加入 10% 的胎牛血清, 37°C 封闭 1 小时; 分别加入 SS002 或 SS002M91, 37°C 反应 1 小时; PBST 洗涤后, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 二抗 (Goat Anti human IgG HRP, Thermo Fisher Scientific), 室温反应 30 分钟; PBST 重复洗板 5 遍, 在吸水纸上尽量拍干残留液滴; 每孔加入 100 ml TMB (eBioscience), 室温 (20±5°C) 避光放置 1-5min; 每孔加入 100 mL 2N H₂SO₄ 终止底物反应, 酶标仪 450nm 处读取 OD 值, 分析融合蛋白与上述各蛋白结合能力 (如图 7 所示)。

图 7 的结果显示, 融合蛋白 SS002、SS002M91 只识别人 CD47 分子, 并且与其他的各种

蛋白均无交叉反应。

实施例 6 融合蛋白特异性阻断 CD47/SIRP α 相互作用

以 SS002M91 为例，进行特异性阻断 CD47/SIRP α 相互作用活性分析，并将表达美国同类品种 TTI-621（参见 CN105073780A）作为阳性对照。

将 1 μ g/ml SIRP α -His 包被 ELISA 板条，于 4°C 过夜；用 PBST 洗涤后，加入 10% 的胎牛血清，37°C 封闭 1 小时；使用 10% 的胎牛血分别梯度稀释 SS002M91 和 TTI-621，并在样品中加入 Biotin-Fc-CD47 至终浓度 2 μ g/ml，于 37°C 预孵育 30min，作为一抗。用 PBST 洗涤 ELISA 板条后，加入一抗，于 37°C 孵育 1 小时。然后，用 PBST 洗 5 遍，加入辣根过氧化物酶标记的亲合素（Streptavidin-HRP，嘉暄生物），于 37°C 孵育 30 分钟；用 PBST 洗 5 遍，每孔加入 100 μ L TMB（eBioscience），室温（20 $\pm$ 5°C）避光放置 1-5min；每孔加入 100 μ L 2N H₂SO₄ 终止底物反应，用酶标仪于 450 nm 处读取 OD 值，分析 SIRP α 融合蛋白对 CD47/SIRP α 的阻断作用（如图 8 所示）。

图 8 的结果显示，SS002M91、TTI-621 均能竞争性阻断 CD47 与其配体 SIRP α 的结合，然而，融合蛋白 SS002M91 阻断活性显著高于 TTI-621。SS002M91 的 IC₅₀ 值为 5.47 μ g/mL，而 TTI-621 的 IC₅₀ 值为 493.5 μ g/mL。

实施例 7 融合蛋白特异性识别肿瘤细胞表面的 CD47 分子

以融合蛋白 SS002 和 SS002M91 为例，进行肿瘤细胞表面的 CD47 分子识别活性分析。

利用流式分析技术（BD Calibur）分别检测 SS002、SS002M91 特异性识别 Raji 细胞、Jurkat 细胞及 A549 细胞表面的 CD47 分子的活性。分别收集对数生长期对的前述细胞，调整细胞密度至 5 $\times$ 10⁶ 个/mL，冰上预冷 10min。用含 2%FBS 的预冷的生理盐水将 SIRP α 融合蛋白 SS002、SS002M91 稀释成不同浓度。取 100 μ L 细胞，加入等体积前述稀释 SIRP α 融合蛋白，于 4°C 避光反应 30min。结束后，用含 2%FBS 的预冷的生理盐水洗涤细胞两次。用 100 μ L 稀释的 PE 标记山羊抗人 IgG-Fc 二抗（PE-Goat anti-human IgG Fc Secondary Antibody，eBioscience）重悬细胞，于 4°C 避光反应 30min。反应结束后，用含 2%FBS 的预冷的生理盐水洗涤细胞两次。用 400 μ L 1%多聚甲醛重悬细胞。流式细胞仪（BD Calibur）分析融合蛋白与细胞表面 CD47 的结合能力（如图 9A-9C 所示，图 9A-9C 分别显示融合蛋白 SS002 和 SS002M91 特异性识别 Raji 细胞、Jurkat 细胞及 A549 细胞的表面 CD47）。

结果显示，融合蛋白 SS002M91 能特异性识别 Raji 细胞、Jurkat 细胞及 A549 细胞表面 CD47，该识别活性明显高于 SS002 且呈剂量依赖性。其中对于与 Raji 细胞结合的 EC₅₀ 值，

SS002M91 为 197.0ng/mL, SS002 为 1140.0ng/mL (如图 9A 所示)。对于与 Jurkat 细胞结合的 EC50 值, SS002M91 为 796.0ng/mL, SS002 为 4529.0ng/mL (如图 9B 所示)。对于与 A549 细胞结合的 EC50 值, SS002M91 为 321.9ng/mL, SS002 为 1655.0ng/mL (如图 9C 所示)。

同样地, 用本实施例中所述方法, 比较 SS002M91 与 TTI-621 的识别 Raji 细胞 (如图 10A 所示)、Jurkat 细胞 (如图 10B 所示)、A549 细胞 (如图 10C 所示) 细胞表面 CD47 分子的活性。结果显示, 一方面, SS002M91 特异性识别肿瘤细胞表面的 CD47 分子的最高荧光强度明显高于 TTI-621: SS002M91 与 Raji 细胞结合的最高荧光强度约为 1200, 而 TTI-621 与 Raji 细胞结合的最高荧光强度约为 600; SS002M91 与 Jurkat 细胞结合的最高荧光强度约为 5000, 而 TTI-621 与 Jurkat 细胞结合的最高荧光强度约为 3000; SS002M91 与 A549 细胞结合的最高荧光强度约为 180, 而 TTI-621 与 A549 细胞结合的最高荧光强度约为 60。另一方面, SS002M91 特异性识别肿瘤细胞表面的 CD47 分子的半数优效剂量显著优势于 TTI-621: SS002M91 与 Raji 细胞结合的 EC50 值为 13.06ng/mL, 而 TTI-621 与 Raji 细胞结合的 EC50 值为 40.37ng/mL; SS002M91 与 Jurkat 细胞结合的 EC50 值为 28.09ng/mL, 而 TTI-621 与 Jurkat 细胞结合的 EC50 值为 53.92ng/mL; SS002M91 与 A549 细胞结合的 EC50 值为 26.95ng/mL, 而 TTI-621 与 A549 细胞结合的 EC50 值为 1003 ng/mL。可见 SS002M91 特异性识别肿瘤细胞表面的 CD47 分子显著优于 TTI-621。

实施例 8 凝血反应检测

以 SS002 和 SS002M91 为例, 进行凝血活性分析, 以 CD47 抗体 Hu5F9-G4 (参见 Guerriero J L, Sotayo A, Ponichtera H E, et al. Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages.[J]. Nature, 2017, 543(7645): 428.432 以及 Gholamin S, Mitra SS, Feroze AH et al. Disrupting the CD47-SIRP α anti-phagocytic axis by a humanized anti-CD47 antibody is an efficacious treatment for malignant pediatric brain tumors. Sci. Transl. Med 2017) 作为对照。

利用来自健康供体的全血来制备人红细胞 (采集自志愿者的外周血)。用 PBS 将全血稀释 5 倍后, 洗涤 3 次, 并制备成新鲜的 1% 红细胞溶液。向血凝板各孔中加入 50 μ L 的不同浓度的 SIRP α 融合蛋白 SS002、SS002M91 及抗 CD47 抗体 Hu5F9-G4, 再向每孔中加入 50 μ L 1% 的红细胞溶液, 轻轻混匀, 并于 37°C、5%CO₂ 条件下孵育过夜。然后, 以红细胞全部凝集, 沉于孔底, 平铺呈网状, 即为 100% 凝集 (++++); 红细胞沉于孔底呈点状即为不凝集 (-) 为标准, 对所述平板拍照判读 (如图 11 所示)。

图 11 的结果显示, 融合蛋白 SS002M91 与 SS002 没有诱导红细胞凝集, 而 CD47 抗体

Hu5F9-G4 在一定的剂量范围内可显著引起红细胞凝集。

实施例 9 体内抑制肿瘤活性能力检测

以融合蛋白 SS002M91 为例，进行体内抑制肿瘤活性分析。

通过 B-NSG 小鼠接种 Raji-Luc 细胞建立肿瘤模型，评价 SS002M91 抗体抑制肿瘤活性。选择雌性、8 周龄的 B-NSG 小鼠（北京百奥赛图基因生物技术有限公司）作为实验动物、Raji-Luc 细胞（北京百奥赛图基因生物技术有限公司）进行检测。将 Raji-Luc 细胞转入荧光素报告基因获得的稳定细胞系，复苏培养至所需数量后，收集对数期生长细胞，悬浮至 5×10^6 个/0.2mL 浓度。然后，按 0.2mL/只通过尾静脉接种到 B-NSG 小鼠。接种后，于第 0 天、第 3 天用小动物成像仪观察肿瘤生长情况及体重，并于第 3 天挑选肿瘤成像信号适中（约 1.00×10^6 P/S）的 12 只小鼠，将其随机分组分配到 2 个组中，每组 6 只，分为溶剂对照组（G1，生理盐水）和实验组（G2，SS002M91），实验组给药剂量为 10mg/kg，并在分组当天以及分组后第 3 天给药，共给药 2 次。观察小鼠肿瘤生长情况以及小鼠生存率（分别如图 12A、12B 所示）。

结果显示，分组给药后第 10 天，对照组的肿瘤平均荧光强度为 6.75×10^8 P/S，而给药组的肿瘤平均荧光强度为 1.76×10^6 P/S，抑制率约 95%。

实施例 10 对红细胞及血小板的影响检测

以融合蛋白 SS002M91 为例，以 B-NSG 小鼠为模型，进行体内安全性初步评价。

挑选 18 只雌性、8 周龄的 B-NSG 小鼠（北京百奥赛图基因生物技术有限公司），随机分组分配到 3 个组中：溶剂对照组（施用生理盐水）、实验组（施用融合蛋白 SS002M91）和阳性对照组（施用 TTI-621），每组 6 只；对小鼠进行给药，给药剂量为 10mg/kg，在分组当天、第 3 天、第 7 天给药，共给药 3 次；在第 3 次给药后次日（即第 8 天），分析小鼠外周血中红细胞以及血小板含量（红细胞含量和血小板含量分别如图 13A 和图 13B 所示）。

结果显示，与对照组相比，SS002M91 没有引起红细胞（ $P=0.4483$ ）、血小板（ $P=0.9199$ ）显著降低；而 TTI-621 尽管对血小板影响较小（ $P=0.9447$ ），却引起了红细胞降低（ $P=0.0246$ ）。

实施例 11 不同亚型 IgG Fc 融合对融合蛋白活性的影响

根据实施例 2 中融合蛋白构建方法，将实施例 1 获得的 SIRP α 结构域的突变体 M1、M5、M12、M35、M37、M41、M57、M67、M81、M82、M84、M91、M99、M102、M111、M122、M126、M130、M135 和 M145 分别与人 IgG4-Fc（其氨基酸序列如 SEQ ID NO:68 所示）融合

表达, 获得其所对应的 SIRP α 突变体 1 的截短结构域-人 Fc 融合蛋白(简称融合蛋白), 将这些融合蛋白分别命名为 SS002M1G4、SS002M5G4、SS002M12G4、SS002M35G4、SS002M37G4、SS002M41G4、SS002M57G4、SS002M67G4、SS002M81G4、SS002M82G4、SS002M84G4、SS002M91G4、SS002M99G4、SS002M102G4、SS002M111G4、SS002M122G4、SS002M126G4、SS002M130G4、SS002M135G4 和 SS002M145G4(其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 41-60 所示)。

作为举例, 选择融合蛋白 SS002M91G4 进行生物学活性分析。

根据实施例 2 中结合活性测定方法, 分析 SS002M91G4 结合抗原 CD47 的活性, 结果如图 14 所示。图 14 的结果说明, SS002M91G4 具有良好的结合 CD47 抗原的活性, EC50 值为 0.0157 μ g/mL, 与 SS002M91 的 EC50 (0.0195 μ g/mL) 基本一致。

根据实施例 6 中特异性阻断 CD47/SIRP α 相互作用分析方法, 分析 SS002M91G4 阻断 CD47/SIRP α 相互作用的活性, 结果如图 15 所示。图 15 的结果说明, SS002M91G4 具有良好的阻断 CD47/SIRP α 相互作用的活性, IC50 值为 3.46 μ g/mL, 与 SS002M91 的 IC50 值 (5.47 μ g/mL) 基本一致。

由以上的结果可知, 不同亚型 IgG Fc 融合对本申请所构建的融合蛋白的活性并无明显影响。

实施例 12 融合蛋白凝血反应检测

以 SS002M91G4 为例, 参考实施例 8 中凝血反应检测的方法, 评价基于 IgG4 Fc 的所述融合蛋白的凝血反应。利用来自健康供体的全血来制备人红细胞。将全血用磷酸盐缓冲液(PBS)进行 5 倍稀释后, 洗涤 3 次, 并制备成新鲜的 1%红细胞溶液。向血凝板各孔中加入 50 μ L 的不同浓度融合蛋白 SS002M91G4、阳性对照 TTI-621 及抗 CD47 抗体 Hu5F9-G4, 再向每孔中加入 50 μ L 1%红细胞溶液, 轻轻混匀, 并在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下孵育过夜。孵育过夜后, 对所述平板拍照判读。判读标准: 红细胞全部凝集, 沉于孔底, 平铺呈网状, 即为 100%凝集(++++), 红细胞沉于孔底呈点状即为不凝集者(-)。

结果如图 16 所示。结果说明基于 IgG4 Fc 的融合蛋白 SS002M91G4 与 TTI-621 没有引起红细胞凝集, 而 CD47 抗体 Hu5F9-G4 则在一定的剂量范围内显著引起红细胞凝集。

实施例 13 融合蛋白生物学活性分析

以 SS002M91G4 为例, 利用 Jurkat-CSR 细胞(宜明昂科生物医药技术(上海)有限公司)体系, 评价基于 IgG4 Fc 的所述融合蛋白的生物学活性, 同时以 TTI-621 作为阳性对照。

将 CD47-Fc 蛋白 (Cat#12283-H02H, Sino Biological) 稀释至 0.2 μ g/mL, 每孔加入 50 μ L 蛋白稀释液; 再分别将 TTI-621 及 SS002M91G4 稀释至 0.4mg/mL, 随后梯度稀释至不同浓度, 每孔加入 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中与 CD47-Fc 共孵育 45min。取 Jurkat-CSR 细胞调整密度至 5 $\times$ 10⁵/mL, 每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 同时设置空白对照组, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中与蛋白混合液共培养 20 小时。培养结束后, 每孔加入 20 μ L CCK-8 (Dojindo, 日本同仁化学研究所), 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 4 小时。酶标仪 450nm 波长下测定 OD 值, 以下列公式计算细胞生长抑制率:

$$\text{抑制率}\% = \frac{(\text{OD}_{450}(\text{样品}) - \text{OD}_{450}(\text{空白}))}{(\text{OD}_{450}(\text{Jurkat-CSR}) - \text{OD}_{450}(\text{空白}))} \times 100$$

根据 Jurkat-CSR 细胞体系的原理, CD47/SIRP α 相互作用, 可以诱导靶细胞凋亡; 加入抑制 CD47/SIRP α 相互作用的抑制剂, 该凋亡信号被阻断。抑制剂的作用越强, 凋亡信号被阻断地越充分。结果如图 17 所示。结果显示, SS002M91G4 能显著阻断 CD47-Fc 诱导的 Jurkat-CSR 细胞凋亡, 阻断效果强于 TTI-621, IC₅₀ 约为 TTI-621 的 1/100。由此可见, SS002M91G4 阻断 CD47/SIRP α 相互作用的生物学活性显著优于 TTI-621。

实施例 14 不同 IgG 亚型 Fc 融合蛋白体内抑制肿瘤活性及对红细胞血小板的影响

以融合蛋白 SS002M91、SS002M91G4 为例, 进行体内抑制肿瘤活性分析及对红细胞血小板的影响。

通过 NOD/SCID 小鼠皮下接种 Raji 细胞, 建立人淋巴瘤皮下移植肿瘤模型, 评价 SS002M91、SS002M91G4 的体内抑制肿瘤活性。

选择雌性、6-7 周龄 NOD/SCID 小鼠 (上海灵畅生物科技有限公司), Raji 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中。收集指数生长期的 1 $\times$ 10⁷ Raji 细胞, PBS 重悬至适合浓度并与 matrigel (BD Matrigel™) 1:1 混合后用于小鼠皮下肿瘤接种。接种后, 待肿瘤平均体积大约为 98.6 mm³ 时, 根据肿瘤大小随机分为 4 组 (即溶媒对照组、SS002M91 组、SS002M91G4 组和 TTI-621 组), 每组 6 只。腹腔注射给药 (上述 4 组分别对应给药 PBS 溶液、SS002M91、SS002M91G4 和 TTI-621), 每次给药剂量为 10mg/kg, 每周给药两次, 共给药两周。

末次给药后 6 天结束实验, 取血进行血常规检测, 分析小鼠外周血中红细胞以及血小板含量 (红细胞含量和血小板含量分别如图 18A 和图 18B 表示)。给药期间观察小鼠肿瘤生长情况, 根据相对肿瘤抑制率 (TGI) 进行疗效评价 (结果如图 19 所示), 同时根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价 (结果如图 20 所示)。TGI (%), 即相对肿瘤抑制率的计

算公式如下： $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$ 。其中 T 和 C 分别为治疗组（例如 SS002M91 组、SS002M91G4 组和 TTI-621 组）和对照组（即溶媒对照组）在某一特定时间点的相对肿瘤体积（RTV）或瘤重（TW）。

结果说明，SS002M91 组、SS002M91G4 组、TTI-621 组（10mg/kg）在停药后第六天时均表现出显著的抑瘤作用，相对肿瘤抑制率 TGI(%)分别为 74.09%，66.65%和 54.75%，相对溶媒对照组统计学上均有显著性差异（p 值均<0.01）。SS002M91 组、SS002M91G4 组抑瘤作用相似且优于阳性对照 TTI-621 组。

治疗期间均无动物死亡，没有表现明显的药物毒性，耐受良好。血常规检测结果显示，与阳性对照 TTI-621 组相比，SS002M91 组红细胞及血小板有所降低，TTI-621 组血小板也略有下降，然而 SS002M91G4 对红细胞影响无明显影响。

前述详细说明是以解释和举例的方式提供的，并非要限制所附权利要求的范围。目前本文所列举的实施方式的多种变化对本领域普通技术人员来说是显而易见的，且保留在所附的权利要求和其等同方案的范围内。