

一种融合蛋白及其用途

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种多特异性融合蛋白，还涉及其在治疗肿瘤和/或自身免疫疾病中的用途。

背景技术

目前，在肿瘤治疗领域，存在施用靶向药物和免疫治疗两大方法。这两种治疗方法可能有相互作用，导致更强的细胞毒性作用，稳定而持续地缓解肿瘤。然而，靶向药物和免疫治疗之间的相互作用是非常复杂的，种类、剂量、顺序、剂型等各种因素都可能会影响联合治疗的整体抗肿瘤效果和毒性特征。

程序性死亡蛋白 1 (programmed death 1, PD-1) 抗体是一种免疫疗法。PD-1 表达于活化的 T 细胞，B 细胞及髓系细胞，其有两个配体，即程序性死亡分子配体-1 (programmed death ligand 1, PD-L1) 和 PD-L2。PD-1 和/或 PD-L1 抑制剂能够特异性地和肿瘤细胞上的 PD-L1 结合来达到抗肿瘤作用，然而其临床反应率低，还会带来一些副作用，如引发肺炎、结肠炎、肝炎等。

CD47 蛋白是一种跨膜糖蛋白，属于免疫球蛋白超家族成员，除正常组织细胞表达 CD47 以外，许多肿瘤细胞过度表达 CD47。肿瘤细胞表面的 CD47 与巨噬细胞表面的 SIRP α 相结合会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。

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，对肿瘤的抑制能力有限。同时，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。亟待获得同时特异性靶向 CD47 蛋白和相关肿瘤抗原的有效疗法。

发明内容

本申请提供了一种融合蛋白，其包含特异性结合 PD-L1 的第一结合域和特异性结合 CD47 蛋白的第二结合域。本申请还提供包含该融合蛋白的免疫缀合物；编码该融合蛋白的核酸分子；能够包含和/或表达该融合蛋白的载体、组合物和细胞；以及制备所述融合蛋白的方法。本申请的融合蛋白、免疫缀合物、核酸分子、载体、组合物和细胞具有以下一种或多种性质：

1) 能够同时特异性结合 CD47 蛋白和 PD-L1；2) 能够特异性阻断 CD47 蛋白与 SIRP α 的相

互作用；3）能够特异性阻断 PD-1 与 PD-L1 的相互作用；4）能够有效抑制肿瘤或肿瘤细胞的生长和/或增殖。

一方面，本申请提供了一种融合蛋白，所述融合蛋白包含特异性结合 PD-L1 的第一结合域；以及特异性结合 CD47 蛋白的第二结合域；其中，所述第二结合域包含人 SIRP α 变体 1 的突变体，所述突变体与 SEQ ID NO:29 所示的序列相比，在第 33 位至第 149 位中的一个或多个位置包含氨基酸残基的取代、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氨基酸残基处包含氨基酸取代：R22、I29、I61、V63、E77、Q82、K83、E84、V93、D95、L96、K98、N100、R107、G109 和 V132。

在某些实施方式中，所述突变体在选自下组的氨基酸残基处包含氨基酸取代：（1）I61、V63、E77、E84、V93、L96、K98、N100 和 V132；（2）I61、E77、Q82、K83 和 E84；（3）I61、V63、K83、E84 和 V132；（4）I61、E77、E84、R107 和 V132；（5）I61、V63、E77、K83、E84 和 N100；（6）I61、E77、Q82、K83、E84 和 R107；（7）I61、E77、Q82、E84、V93、L96、N100、R107、G109 和 V132；（8）I61、E77、Q82、K83、E84 和 V132；（9）I61；（10）I61、D95、L96、G109 和 V132；（11）I61、D95、L96、K98、G109 和 V132；（12）I61、E77、E84、V93、R107 和 V132；（13）E77、L96、N100、G109 和 V132；（14）I61、V63、Q82、E84、D95、L96、N100 和 V132；（15）I61、E77、Q82、K83、E84、V93、D95、L96、K98、N100 和 V132；（16）I61、E77、Q82、K83、E84 和 V93；（17）I61、V63、E77、K83、E84、D95、L96、K98 和 N100；（18）I61、V63、E77、K83、D95、L96、K98、N100 和 G109；（19）I61、E77、Q82、E84、V93、D95、L96、K98 和 N100；和，（20）I61、V63、E77、Q82 和 E84。

在某些实施方式中，所述突变体包含选自下组的一个或多个氨基酸取代：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、L96S/T、K98R、N100G/K/D/E、R107N/S、G109R/H 和 V132L/R/I/S。

在某些实施方式中，所述突变体包含选自下组的氨基酸取代：（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。

在某些实施方式中, 所述突变体包含如 SEQ ID NO: 30-49 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述第一结合域包含抗体或其抗原结合片段或变体。在某些实施方式中, 所述抗体选自下组: 单克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。在某些实施方式中, 所述抗原结合片段选自下组: Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, dAb, 分离的互补决定区 CDR, Fv 和 scFv。

在某些实施方式中, 所述所述 PD-L1 为人 PD-L1。

在某些实施方式中, 所述抗体包含抗体重链或其片段, 所述抗体重链或其片段包含 HCDR1-3, 所述 HCDR1 包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 18。在某些实施方式中, 所述 HCDR2 包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 19。在某些实施方式中, 所述 HCDR3 包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 20。在某些实施方式中, 所述抗体重链或其片段包含重链可变区 VH, 且所述重链可变区 VH 包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 22。在某些实施方式中, 所述抗体重链或其片段包含重链恒定区, 且所述重链恒定区包含 IgG。在某些实施方式中, 所述 IgG 选自下组: IgG1 和 IgG4。在某些实施方式中, 所述抗体重链包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 27。

在某些实施方式中, 所述抗体包含抗体轻链或其片段, 所述抗体轻链或其片段包含 LCDR1-3, 所述 LCDR1 包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 15。在某些实施方式中, 所述 LCDR2 包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 16。在某些实施方式中, 所述 LCDR3 包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 17。在某些实施方式中, 所述抗体轻链或其片段包含轻链可变区 VL, 且所述轻链可变区 VL 包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 21。在某些实施方式中, 所述抗体轻链或其片段包含轻链恒定区, 且所述轻链恒定区包含 Igκ。在某些实施方式中, 所述抗体轻链包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 25。

在某些实施方式中，所述第一结合域位于所述第二结合域的 N 端。在某些实施方式中，所述融合蛋白还包含连接子，所述连接子位于所述第一结合域的 C 端且位于所述第二结合域的 N 端。在某些实施方式中，所述连接子包含如 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的融合蛋白包含至少 2 个所述第二结合域。在某些实施方式中，所述每个所述第二结合域分别位于所述第一结合域的 C 端。

另一方面，本申请提供了一种免疫缀合物，其包含所述的融合蛋白。

另一方面，本申请提供了一个或多个分离的核酸分子，其编码所述的融合蛋白或者所述的免疫缀合物。

另一方面，本申请提供了一个或多个载体，其包含所述的核酸分子。

另一方面，本申请提供了一种组合物，其包含所述的融合蛋白，所述的免疫缀合物，或所述的核酸分子，以及任选地药学上可接受的赋形剂。

另一方面，本申请提供了一种细胞，其包含所述的融合蛋白，所述的免疫缀合物，所述的核酸分子，或所述的载体。

另一方面，本申请提供了制备所述的融合蛋白的方法，其包括在使得所述融合蛋白能够表达的条件下培养所述的细胞。

另一方面，本申请提供了所述的融合蛋白，所述的免疫缀合物，所述的核酸分子，所述的载体，所述的组合物，或所述的细胞在制备药物中的用途，其中所述药物用于治疗肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤和非实体瘤。

在某些实施方式中，所述实体瘤和非实体瘤包括多发性骨髓瘤、白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、神经胶质瘤、生殖细胞瘤、肉瘤、见皮瘤、胎盘瘤、脑癌、骨癌、皮肤癌、鼻咽癌、肺癌、口腔癌、食道癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、肠癌、乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌和睾丸癌、上颌窦瘤、下咽癌、嗅母细胞瘤、舌癌、牙龈癌、壶腹癌、结肠癌、直肠癌、肾癌、输尿管癌、膀胱癌、阴茎癌、输卵管癌、眼睑癌、视母细胞瘤。

另一方面，本申请提供了所述的融合蛋白，所述的免疫缀合物，所述的核酸分子，所述的载体，所述的组合物，或所述的细胞，其治疗肿瘤。

另一方面，本申请提供了一种阻断 PD-L1 蛋白与 PD-1 相互作用的方法，其包括向有需要的受试者施用有效量的所述的融合蛋白，所述的免疫缀合物，所述的核酸分子，所述的载体，所述的组合物，或所述的细胞。

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，其包括向有需要的受试者施用有效量的所述的融合蛋白，所述的免疫缀合物，所述的核酸分子，所述的载体，所述的组合物，或所述的细胞。

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，其包括向有需要的受试者施用有效量的所述的融合蛋白，所述的免疫缀合物，所述的核酸分子，所述的载体，所述的组合物，或所述的细胞。

另一方面，本申请提供了一种预防或治疗受试者中的肿瘤的方法，其包括向有需要的受试者施用有效量的所述的融合蛋白，所述的免疫缀合物，所述的核酸分子，所述的载体，所述的组合物，或所述的细胞。

另一方面，本申请提供了所述的融合蛋白，所述的免疫缀合物，所述的核酸分子，所述的载体，所述的组合物，或所述的细胞，其预防或治疗受试者中的肿瘤。

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申请的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本申请的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的，本申请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改动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 显示的是本申请所述融合蛋白的结构示例。

图 2-3 显示的是本申请所述融合蛋白与 PD-L1 的结合能力。

图 4 显示的是本申请所述融合蛋白与 CD47 的结合能力。

图 5 显示的是本申请所述融合蛋白与 PD-L1 和 CD47 同时结合的能力。

图 6 显示的是本申请所述融合蛋白竞争性阻断 CD47 与其配体 SIRP α 的结合。

图 7-8 显示的是本申请所述融合蛋白竞争性阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合。

图 9-10 显示的是利用本申请所述的融合蛋白在小鼠人淋巴瘤肿瘤模型中抑制肿瘤体积的增长。

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。

在本申请中，术语“融合蛋白”通常指由两个或更多个蛋白或多肽融合得到的蛋白。融

合蛋白可通过重组 DNA 技术人工制备。例如，编码所述两个或更多个蛋白或多肽的基因或核酸分子可彼此连接而形成融合基因或融合的核酸分子，该融合基因或融合的核酸分子可编码所述融合蛋白。所述融合基因的翻译可以产生单一多肽，其可以具有融合前的所述两个或更多个蛋白或多肽中至少一个、甚至每一个的性质。

在本发明中，术语“特异性结合”通常是指两分子间的非随机结合反应，如抗体和产生该抗体的抗原间的反应。一个某抗原特异性抗体是指以亲和力（KD） $\leq 10^{-5}$ M（如 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M 等）结合该抗原，其中 KD 指解离率与结合率的比值（ k_{off}/k_{on} ），其可以采用本领域技术人员熟悉的方法进行测定。

在本申请中，术语“结合域”通常是可以特异性结合和/或识别靶标（例如抗原）上的特定表位的结构域。在本申请中，术语“结构域”通常是指蛋白质亚基结构中明显分开的紧密球状结构区域。例如，多肽链首先可以是在某些区域相邻的氨基酸残基形成有规则的二级结构，然后，又可以由相邻的二级结构片段组装在一起形成超二级结构，在此基础上多肽链可以折叠成近似于球状的三级结构。对于较大的蛋白质分子或亚基，多肽链往往可以由两个或多个在空间上可明显区分的、相对独立的区域性结构缔合而成三级结构，这种相对独立的区域性结构可以称为结构域。

在本申请中，术语“第一结合域”和“第二结合域”中的所述“第一”、“第二”可以只是为了在描述上进行区分。

在本申请中，术语“CD47 蛋白”通常是指整联蛋白相关蛋白（IAP），其为一种属于免疫球蛋白超家族的多次跨膜受体。例如，CD47 蛋白可与膜整合素（membrane integrins）结合，并与其配体凝血栓蛋白-1（thrombospondin-1, TSP-1）和信号调节蛋白 α （signal-regulatory protein α , SIRP α ）结合。CD47 蛋白广泛表达于细胞膜表面。在本申请中，所述 CD47 蛋白可包括人 CD47 的任何变体、同种型和物种同系物。人 CD47 蛋白的氨基酸序列在 GenBank 中作为 CEJ95640.1 列出。所述 CD47 蛋白可以由细胞天然表达或在用 CD47 基因转染的细胞上表达。

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，其可作为 CD47 蛋白的配体。在本申请中，所述 SIRP α 可包括人 SIRP α 。例如，SIRP α 变体 1 和 SIRP α 变体 2。所述 SIRP α 变体 2 与所述 SIRP α 变体 1 有 13 个氨基酸不同，并且其氨基酸序列在 GenBank 中作为 CAA71403.1 列出。在本申请中，术语“SIRP α 变体 1”通常是指氨基酸序列作为 NCBI RefSeq NP_542970.1 列出（残基 31-504 构成成熟型）的 SIRP α 蛋白，此时 SIRP α 变体 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:29 所示。

术语“抗体”通常是指包含一个或多个基本上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段编

码的多肽的蛋白质。例如，免疫球蛋白基因可以包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因，以及无数的免疫球蛋白可变区基因。例如，轻链可被分类为 κ 或 λ ，其可以分别定义免疫球蛋白类型：Ig κ 和 Ig λ 。重链可被分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ，其依次分别定义免疫球蛋白类别：IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。例如，抗体可具有包含四聚体的结构单元，每个四聚体可由两对相同的多肽链组成，每对具有一条“轻”链（约 25 kD）和一条“重”链（约 50-70 kD），每个成员的 N 末端可以界定约 100 至 110 个或更多个氨基酸的可变区，其主要负责抗原识别。例如，术语“轻链可变区（VL）”和“重链可变区（VH）”通常分别指轻链和重链的可变区区域。抗体可作为完整免疫球蛋白存在或作为通过用各种肽酶消化或从头表达产生的许多充分表征的片段存在。

在本发明中，术语“抗原结合片段”通常是指全长抗体的一个或多个部分，所述部分基本上保持结合抗体所结合的相同抗原（例如，PD-L1）的能力，能够与全长抗体竞争对抗原的特异性结合。通常参见，Fundamental Immunology, Ch. 7（Paul, W., ed., 第 2 版，Raven Press, N.Y.（1989）），并且将其全文通过引用并入本申请。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗原结合片段。在一些情况下，抗原结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、(Fab)₂、Fd、Fv、dAb 和互补决定区（CDR）片段、单链抗体（例如，scFv）、嵌合抗体、双抗体（diabody）和这样的多肽，其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。可使用本领域技术人员已知的常规技术（例如，重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法）从给定的抗体获得抗体的抗原结合片段，并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。例如，胃蛋白酶可以消化铰链区中二硫键以下的抗体以产生 F(ab')₂。

在本申请中，术语“Fab”通常指由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的抗体片段。

在本申请中，术语“Fab”通常是指与 Fab 片段相比在 CH1 结构域的羧基末端具有几个额外的残基的抗体片段。例如，Fab'可包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。

在本申请中，术语“F(ab)₂”通常是指由半胱氨酸相连接的成对的 Fab 片段所得到的抗原结合片段。

在本申请中，术语“dAb 片段”通常是指由 VH 结构域组成的抗体片段（Ward 等人, Nature 341:544-546（1989））。

在本申请中，术语“互补决定区 CDR”通常是指轻链可变区（VL）与重链可变区（VH）的 3 个高变区（HVR），该部位因在空间结构上可与抗原决定簇形成精密的互补，故高变区又称互补性决定区。

在本申请中，术语“Fv 片段”通常是指由抗体的单臂的 VL 和 VH 结构域组成的抗体片段。

在本申请中，术语“scFv”通常是指是由抗体重链可变区和轻链可变区通过短肽连接子（linker）连接而成的分子，又称为单链抗体。

在本申请中，术语“单克隆抗体”通常是指一群基本同源的抗体，包含于该群各个抗体除了可能的以微量存在的天然发生的突变之外可以是相同的。单克隆抗体是高度特异性的，直接针对单个抗原性位点。此外，与包括针对不同决定簇（表位）的不同抗体的多克隆抗体制备物相反，每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇修饰语“单克隆”不是被解释为需要通过任何特殊方法产生抗体。例如，所述单克隆抗体可以通过杂交瘤技术制备或者通过使用重组 DNA 方法在细菌、真核动物或植物细胞中产生单克隆抗体，也可以得自噬菌体抗体文库，使用例如 Clarkson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) 和 Marks et al., *Mol.Biol.*, 222:581-597 (1991) 所述的技术进行。

在本申请中，术语“嵌合抗体”通常是指这样的抗体，其中每个重链或轻链氨基酸序列的一部分与来自特定物种的抗体中相应氨基酸序列同源，或者属于特定的类别，而该链的其余区段则与另一物种中的相应序列同源。例如，轻链和重链的可变区均来自一个动物物种（如小鼠、大鼠等）的抗体的可变区，而恒定部分则与来自另一物种（如人）的抗体序列同源。例如，为获得嵌合抗体，可利用非人源的 B 细胞或杂交瘤细胞产生可变区，而与其组合的恒定区则来自人。所述可变区具有易于制备的优点，并且其特异性不受与其组合的恒定区的来源的影响。同时，由于嵌合抗体的恒定区可来源于人类，因此嵌合抗体在注射时抗体引发免疫应答的可能性会低于使用恒定区为非人来源的抗体。

在本申请中，术语“人源化抗体”通常是指将衍生自非人物种（例如小鼠或大鼠）的抗体、免疫球蛋白结合蛋白和多肽对人体的免疫原性降低，同时仍保留原始抗体的抗原结合特性的改造抗体。例如，可以使用遗传工程技术制备人源化抗体，可以使用 CDR 移植（Jones et al., *Nature* 321:522 (1986)）及其变体；包括“重塑”（reshaping），（Verhoeyen, et al., 1988 *Science* 239:1534-1536; Riechmann, et al., 1988 *Nature* 332:323-337; Tempest, et al., *Bio/Technol* 1991 9:266-271），“高度加成”（hyperchimerization），（Queen, et al., 1989 *Proc Natl Acad Sci USA* 86:10029-10033; Co, et al., 1991 *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2869-2873; Co, et al., 1992 *J Immunol* 148:1149-1154）和“贴面”（veneering），（Mark, et al., “Derivation of therapeutically active humanized and veneered anti-CD18 antibodies.” In: Metcalf B W, Dalton B J, eds. *Cellular adhesion: molecular definition to therapeutic potential*. New York: Plenum Press, 1994: 291-312）等技术手段，对非人源的结合域进行人源化。如果其他区域，例如铰链区和恒定区结构域也源自非人来源，则这些区域也可以被人源化。

在本申请中，术语“全人源抗体”通常是指由基因工程改造的抗体基因缺失动物中表达编

码人类抗体的基因得到的抗体。例如，可以将人类抗体基因通过转基因或转染色体技术，将编码人类抗体的基因全部转移至基因工程改造的抗体基因缺失动物中，使动物表达的人类抗体

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，特异性结合 PD-L1 蛋白的抗体或其片段）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（例如抗原结合能力）。例如，所述取代可以为保守取代。

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，特异性结合 PD-L1 蛋白的抗体或其片段）的氨基酸序列具有至少约 85%（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。

在本申请中，术语“PD-L1”通常是指程序性死亡蛋白-1（programmed death-1, PD-1）蛋白的配体，其又可称为 CD274、B7-H 或 B7H1。PD-1 通过与特异性配体（PD-L）相互作用负调节 T 细胞抗原受体信号传导。所述 PD-L1 可以为多种肿瘤的预后指标。在本申请中，所述 PD-L1 可以为人类 PD-L1。所述人类 PD-L1 在 GenBank 的 Gene ID 为 29126。

在本申请中，术语“PD-1”通常是指突触核蛋白家族的成员，其又可称为 NACP、PARK1 或 PARK4。在本申请中，所述 PD1 可以为人类 PD1。所述人类 PD1 在 GenBank 的 Gene ID 为 6622。

通常情况下，在多肽链中，氨基与多肽链中的另一个羧基相连可以使其成为一个链，但是在蛋白质的两个末端，分别剩余没有成肽键的氨基酸残基，分别是携带游离的氨基的多肽链末端和携带羧基的多肽链末端。在本申请中，术语“N 端”通常是指氨基酸残基携带游离的氨基的多肽链的末端。在本申请中，术语“C 端”通常是指氨基酸残基携带游离的羧基的多肽链的末端。

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。

在本申请中，术语“免疫缀合物”通常是指缀合了一个或多个异源分子（包括但不限于细胞毒素）的具有免疫功能的多肽分子。在本申请中，“缀合”和“连接”、“融合”在本申请中可以互换使用，并且通常是指将两个或更多个化学元素、序列或组分连接在一起，例如通过包括化学缀合或重组手段。所述异源分子可以是细胞毒素、化疗药物等。例如，将本申请所述的融合蛋白缀合一个或多个异源分子（例如，细胞毒素）可以得到所述的免疫缀合物。

在本发明中，术语“载体”指的是，可将编码某蛋白的多聚核苷酸插入其中并使蛋白获得表达的一种核酸运载工具。载体可通过转化、转导或转染宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内表达得以表达。举例来说，载体包括：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 来源的人工染色体（PAC）；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类有逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。一种载体可能含有多种控制表达的元件，包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。载体还有可能包括有协助其进入细胞的成分，如病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳，

但不仅仅只有这些物质。

在本申请中，术语“肿瘤”通常是指哺乳动物中的机体（例如，细胞或其组成部分）在各种致癌因子作用下，局部组织细胞增生所形成的赘生物。在本申请中，肿瘤可以包括实体瘤和非实体瘤。实体瘤可以包括神经胶质瘤、生殖细胞瘤、肉瘤、见皮瘤、胎盘瘤、脑癌、骨癌、皮肤癌、鼻咽癌、肺癌、口腔癌、食道癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、肠癌、乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌和睾丸癌。在申请中，非实体瘤可以包括多发性骨髓瘤、白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤。

在本申请中，术语“包含”通常是指包括明确指定的特征，但不排除其他要素。

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。

融合蛋白

一方面，本申请提供一种融合蛋白，所述融合蛋白可包含第一结合域以及第二结合域。所述第一结合域可以特异性结合 PD-L1；所述第二结合域可以特异性结合 CD47 蛋白，所述第二结合域可以包含人 SIRP α 变体 1 的突变体，所述突变体与 SEQ ID NO:29 所示的序列相比，在第 33 位至第 149 位中的一个或多个（例如，1-2 个、1-3 个、1-4 个、1-5 个、1-6 个、1-7 个、1-8 个、1-9 个、1-10 个或更多个）位置包含氨基酸残基的取代、缺失或添加。本申请所述的融合蛋白能够同时特异性结合肿瘤相关抗原和 CD47 蛋白，从而起到治疗肿瘤和/或自身免疫疾病的作用。

在本申请中，术语“第一结合域”通常是指可以特异性结合 PD-L1 的结构域。术语“第二结合域”通常是指可以特异性结合 CD47 蛋白的结构域。

特异性结合 CD47 的第二结合域

在本申请中，所述突变体（例如特异性结合 CD47 蛋白的人 SIRP α 变体 1 的突变体）在选自下组的一个或多个（例如，1-2 个、1-3 个、1-4 个、1-5 个、1-6 个、1-7 个、1-8 个、1-9 个、1-10 个或更多个）氨基酸残基处包含氨基酸取代：R22、I29、I61、V63、E77、Q82、K83、E84、V93、D95、L96、K98、N100、R107、G109 和 V132。

在本申请中，所述氨基酸取代中氨基酸残基的位置是以 SEQ ID NO: 29 所示氨基酸序列为基准确定的残基编号。

在本申请中，“氨基酸取代 X_n”是指在相应于 SEQ ID NO: 29 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: 29 所示氨基酸序列中第 61 位的残基 I 处发生氨基酸取代。

本申请中，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。

本申请中，所述的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，作为所述融合蛋白或其片段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 与特异性结合 CD47 蛋白的人 SIRP α 变体 1 的突变体）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。

在本申请中，所述突变体可以在选自下组的氨基酸残基处包含氨基酸取代：（1）I61、V63、E77、E84、V93、L96、K98、N100 和 V132；（2）I61、E77、Q82、K83 和 E84；（3）I61、V63、K83、E84 和 V132；（4）I61、E77、E84、R107 和 V132；（5）I61、V63、E77、K83、E84 和 N100；（6）I61、E77、Q82、K83、E84 和 R107；（7）I61、E77、Q82、E84、V93、L96、N100、R107、G109 和 V132；（8）I61、E77、Q82、K83、E84 和 V132；（9）I61；（10）I61、D95、L96、G109 和 V132；（11）I61、D95、L96、K98、G109 和 V132；（12）I61、E77、E84、V93、R107 和 V132；（13）E77、L96、N100、G109 和 V132；（14）I61、V63、Q82、E84、D95、L96、N100 和 V132；（15）I61、E77、Q82、K83、E84、V93、D95、L96、K98、N100 和 V132；（16）I61、E77、Q82、K83、E84 和 V93；（17）I61、V63、E77、K83、E84、D95、L96、K98 和 N100；（18）I61、V63、E77、K83、D95、L96、K98、N100 和 G109；（19）I61、E77、Q82、E84、V93、D95、L96、K98 和 N100；和，（20）I61、V63、E77、Q82 和 E84。

在本申请中，所述突变体可以包含选自下组的一个或多个（例如，1-2 个、1-3 个、1-4 个、

1-5 个、1-6 个、1-7 个、1-8 个、1-9 个、1-10 个或更多个)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、L96S/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: 29 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:29 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。

在本申请中,所述突变体可以包含选自下组的氨基酸取代:(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 (如 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列,即人 SIRP α 的氨基酸序列中的第 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 变体 1 的突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。所述 SIRP α 变体 1 的突变体可依次包含如 SEQ ID NO: 30-49 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述 SIRP α 变体 1 的突变体是 M91,所述 SIRP α 变体 1 的突变体包含如 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列。

特异性结合 PD-L1 的第一结合域

在本申请中,所述第一结合域可以包含抗体或其抗原结合片段或变体。例如,所述抗体

可以选自下组：单克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。例如，所述抗原结合片段选自下组：Fab，Fab'，(Fab')₂，F(ab)₂，dAb，分离的互补决定区 CDR，Fv 和 scFv。

本申请所述的抗体或其抗原结合片段，可通过与 PD-L1 蛋白特异性结合而杀伤肿瘤细胞和/或抑制肿瘤生长。例如，所述肿瘤可以包括 PD-L1 阳性的肿瘤。如，所述 PD-L1 阳性的肿瘤可以选自以下组：胃癌、乳腺癌、宫颈癌、肺癌、头颈部肿瘤、黑素瘤、胶质瘤、淋巴上皮瘤、食管癌或结直肠癌。在本申请中，所述抗体、其抗原结合片段可以杀伤胃癌、乳腺癌、宫颈癌、肺癌、头颈部肿瘤、黑素瘤、胶质瘤、淋巴上皮瘤、食管癌或结直肠癌细胞或抑制胃癌、乳腺癌、宫颈癌、肺癌、头颈部肿瘤、黑素瘤、胶质瘤、淋巴上皮瘤、食管癌或结直肠癌细胞生长。

本申请所述的 PD-L1 蛋白可为人 PD-L1 蛋白或其功能片段。例如，所述的 PD-L1 蛋白可以不为小鼠 PD-L1 蛋白，或者可以不为大鼠 PD-L1 蛋白。在某些实施方式中，本申请所述的抗体、其抗原结合片段基本上不结合小鼠 PD-L1 蛋白或大鼠 PD-L1 蛋白。

本申请所述的抗体、其抗原结合片段，可以与参比抗体竞争结合所述 PD-L1 蛋白。所述参比抗体可以包含轻链可变区和重链可变区。例如，所述参比抗体的轻链可变区可包含 LCDR1-3，所述 LCDR1 可包含下组任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO：1 和 SEQ ID NO：15；所述 LCDR2 可包含下组任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO：2 和 SEQ ID NO：16；所述 LCDR3 可包含下组任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO：3 和 SEQ ID NO：17。所述参比抗体的重链可变区可包含 HCDR1-3，所述 HCDR1 可包含下组任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO：4 和 SEQ ID NO：18；所述 HCDR2 可包含下组任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO：5 和 SEQ ID NO：19；所述 HCDR3 可包含下组任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO：6 和 SEQ ID NO：20。

例如，所述参比抗体的轻链可变区的氨基酸序列可以包含下组任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO：7 和 SEQ ID NO：21，且所述参比抗体的重链可变区的氨基酸序列可以包含下组任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO：8 和 SEQ ID NO：22。又例如，所述参比抗体的轻链可包含下组任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO：11 和 SEQ ID NO：25；且所述参比抗体的重链可包含下组任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO：13 和 SEQ ID NO：27。例如，所述参比抗体的轻链可包含如 SEQ ID NO：11 所示的氨基酸序列，且所述参比抗体的重链可包含如 SEQ ID NO：13 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体的轻链可包含如 SEQ ID NO：25 所示的氨基酸序列，且所述参比抗体的重链可包含如 SEQ ID NO：27 所示的氨基酸序列。

本申请所述的抗体、其抗原结合片段可包含抗体轻链或其片段。例如，所述抗体轻链或

其片段可包括 Igκ 恒定区，例如可包含人 Igκ 恒定区。

例如，所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR1，且所述 LCDR1 可包含如下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 1。所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR2，且所述 LCDR2 可包含如下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 2。所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR3，且所述 LCDR3 可包含如下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 3。又例如，所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR1，且所述 LCDR1 可包含如下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 15。所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR2，且所述 LCDR2 可包含如下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 16。所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR3，且所述 LCDR3 可包含如下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 17。

本申请所述抗体的轻链或其片段可包含轻链可变区 VL，且所述轻链可变区 VL 的氨基酸序列可以为：SEQ ID NO: 7。在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段的氨基酸序列可以为：SEQ ID NO: 11。又例如，所述轻链可变区 VL 的氨基酸序列可以为：SEQ ID NO: 21。在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段的氨基酸序列可以为：SEQ ID NO: 25。

本申请所述的抗体或其抗原结合片段可包含抗体重链或其片段。例如，所述抗体重链或其片段还包含人恒定区。其中，所述人恒定区可包括人 IgG 恒定区。其中，所述 IgG 恒定区可包含人 IgG1 恒定区或 IgG4。

例如，所述抗体重链或其片段可包含 HCDR1，且所述 HCDR1 可包含如下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 4。所述抗体重链或其片段可包含 HCDR2，且所述 HCDR2 可包含如下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 5。所述抗体重链或其片段可包含 HCDR3，且所述 HCDR3 可包含如下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 6。又例如，所述抗体重链或其片段可包含 HCDR1，且所述 HCDR1 可包含如下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 18。所述抗体重链或其片段可包含 HCDR2，且所述 HCDR2 可包含如下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 19。所述抗体重链或其片段可包含 HCDR3，且所述 HCDR3 可包含如下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 20。

所述抗体重链或其片段可包含重链可变区 VH，且所述重链可变区 VH 可包含如下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 8。在某些实施方式中，所述抗体重链可包含如下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 13。又例如，所述重链可变区 VH 可包含如下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 22。在某些实施方式中，所述抗体重链可包含如下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 27。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体或其抗原结合片段的轻链的氨基酸序列包括 SEQ ID NO: 11；并且其重链的氨基酸序列包括 SEQ ID NO: 13；或者本申请所述的抗体或其抗原结合片段的轻链的氨基酸序列包括 SEQ ID NO: 25；并且其重链的氨基酸序列包括 SEQ ID NO: 27。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体或其抗原结合片段中 LCDR1 的氨基酸序列可包

括 SEQ ID NO: 1; LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO: 2; LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO: 3; 且 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO: 4 或; HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO: 5; HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO: 6。例如, 该抗体或其抗原结合片段可包括抗体 SG1201 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些实施方式中, 本申请所述的抗体或其抗原结合片段的轻链可包含轻链可变区, 所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO: 7; 且其中重链可包含重链可变区, 所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO: 8。例如, 该抗体或其抗原结合片段可包括抗体 SG1201 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中, 本申请所述的抗体或其抗原结合片段可包含轻链和重链, 所述轻链的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示且所述重链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示。例如, 该抗体或其抗原结合片段可包括抗体 SG1201 或与其具有相同的轻链及重链氨基酸序列。

在某些实施方式中, 本申请所述的抗体可以为 SG1201。抗体 SG1201 的 LCDR1-3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示; VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示; 轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示; HCDR1-3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示; VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示; 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示。

在某些实施方式中, 本申请所述的抗体或其抗原结合片段中 LCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO: 15; LCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO: 16; LCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO: 17; 且 HCDR1 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO: 18; HCDR2 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO: 19; HCDR3 的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO: 20。例如, 该抗体或其抗原结合片段可包括抗体 SG1202 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些实施方式中, 本申请所述的抗体或其抗原结合片段的轻链可包含轻链可变区, 所述轻链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO: 21; 且其中重链可包含重链可变区, 所述重链可变区的氨基酸序列可包括 SEQ ID NO: 22。例如, 该抗体或其抗原结合片段可包括抗体 SG1202 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中, 本申请所述的抗体或其抗原结合片段可包含轻链和重链, 所述轻链的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示且所述重链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示。例如, 该抗体或其抗原结合片段可包括抗体 SG1202 或与其具有相同的轻链及重链氨基酸序列。

在某些实施方式中, 本申请所述的抗体可以为 SG1202。抗体 SG1202 的 LCDR1-3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 17 所示; VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示; HCDR1-3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19 和

SEQ ID NO: 20 所示; VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示; 轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示; 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示。

本申请所述的抗体或其抗原结合片段, 还可以在 SG1201 和/或 SG1202 的轻链和/或重链的氨基酸序列中包含一个或多个随机突变(例如, 一个或多个、如一个或数个氨基酸取代)。例如, 所述抗体、其抗原结合片段可在 SG1201 和/或 SG1202 的轻链可变区的框架区 L-FR1-4 的一个或多个位点包含一个或多个随机突变(例如, 一个或多个, 如一个或数个氨基酸取代), 和/或在 SG1201 和/或 SG1202 的重链可变区的框架区 H-FR1-4 的一个或多个位点包含一个或多个随机突变(例如, 一个或多个, 如一个或数个氨基酸取代)。

第一结合域和第二结合域的连接

在本申请中, 所述第一结合域可以位于所述第二结合域的 N 端。例如, 所述第一结合域的 C 端可以通过连接子间接连接于所述第二结合域的 N 端。在某些情形中, 所述第一结合域的 C 端也可以直接(例如, 在框内)连接于第二结合域的 N 端。

在本申请中, 所述融合蛋白还可以包含连接子, 所述连接子可以位于所述第一结合域的 C 端且位于所述第二结合域的 N 端。例如, 在所述融合蛋白中, 第一结合域的 C 端可以连接连接子的 N 端, 连接子的 C 端可以连接第二结合域的 N 端。例如, 在所述融合蛋白中, 从 N 端到 C 端, 可以依次包含第一结合域、连接子和第二结合域。

在本申请中, 所述连接子可以包含如 SEQ ID NO:52 所示的氨基酸序列。

在某些情形中, 所述融合蛋白可以包含至少 2 个(例如, 至少 2 个, 至少 3 个, 至少 4 个, 至少 5 个, 至少 6 个, 至少 7 个, 至少 8 个, 至少 9 个, 至少 10 个, 或更多)所述第二结合域。在本申请中, 所述每个所述第二结合域可以分别位于所述第一结合域的 C 端。在本申请中, 所述 2 个以上的第二结合域可以分别直接或间接连接于所述第一结合域的 C 端。

在本申请中, 所述融合蛋白可以包含特异性结合 PD-L1 的第一结合域, 以及特异性结合 CD47 蛋白的第二结合域, 其中所述第二结合域可以包含人 SIRP α 变体 1 的突变体, 特异性结合 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段或变体的 C 端可以直接或者间接连接人 SIRP α 变体 1 的突变体的 N 端。例如, 所述第二结合域可以包含至少 2 个人 SIRP α 变体 1 的突变体, 且 2 个人 SIRP α 变体 1 的突变体的 N 端分别连接特异性结合 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段或变体的 C 端。

例如, 如图 1 所示, 所述融合蛋白(SG12473)的第一结合域可以包含 SG1201, 第二结合域可以包含 2 个 SIRP α 变体 1 的突变体 M91, 采用的连接子 1 的序列如 SEQ ID NO:52 所示, 2 个 M91 的 N 端分别通过连接子 1 连接于 SG1201 的 2 条重链的 C 端, 在所述融合蛋白

中，M91 连接 SG1201 重链的 C 端可以得到第二多肽链，SG1201 的轻链可以命名为第一多肽链。SG12473 的所述第二多肽链和所述第一多肽链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:53 和 SEQ ID NO:11 所示。

例如，如图 1 所示，所述融合蛋白（SG12474）的第一结合域可以包含 SG1202，第二结合域可以包含 2 个 SIRP α 变体 1 的突变体 M91，采用的连接子 1 的序列如 SEQ ID NO:52 所示，2 个 M91 的 N 端分别通过连接子 1 连接于 SG1202 的 2 条重链的 C 端，在所述融合蛋白中，M91 连接 SG1202 重链的 C 端可以得到第二多肽链，SG1202 的轻链可以命名为第一多肽链。SG12474 的所述第二多肽链和所述第一多肽链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:25 所示。

核酸分子、载体和细胞及制备方法

另一方面，本申请提供一个或多个分离的核酸分子，其编码所述的融合蛋白或者所述的免疫缀合物。例如，所述一种或多种核酸分子中的每一个核酸分子可以编码完整的所述抗体或其抗原结合片段，也可以编码其中的一部分（例如，HCDR1-3、LCDR1-3、VL、VH、轻链或重链中的一种或多种）。

本申请所述的核酸分子可以为分离的。例如，其可以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。

重组 DNA 和分子克隆技术包括由 Sambrook, J., Fritsch, E. F. 和 Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, (1989) (Maniatis) 和由 T. J. Silhavy, M. L. Bannan 和 L. W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1984) 以及由 Ausubel, F. M. 等, Current Protocols in Molecular Biology, pub. by Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) 描述的那些技术。简而言之，可从基因组 DNA 片段、cDNA 和 RNA 制备所述核酸，所有这些核酸可直接从细胞中提取或通过各种扩增方法（包括但不限于 PCR 和 RT-PCR）重组产生。

核酸的直接化学合成通常涉及将 3'-封闭的和 5'-封闭的核苷酸单体依次添加至生长中的核苷酸聚合物链的末端 5'-羟基，其中每次添加通过亲核攻击所添加的单体的 3'-位上的生长链的末端 5'-羟基来实现，所述单体通常是磷衍生物，诸如磷酸三酯、亚磷酰胺等。参见，例如，Matteucci 等, Tet. Lett. 521:719 (1980)；属于 Caruthers 等的美国专利第 4,500,707 号；和属

于 Southern 等的美国专利第 5,436,327 号和第 5,700,637 号；在另一方面，本申请提供了包含本申请的分离的多核苷酸的载体。所述载体可以是任何线性核酸、质粒、噬菌粒、粘粒、RNA 载体、病毒载体等。病毒载体的非限制性实例可包括逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒。在一些实施方案中，所述载体是表达载体，例如，噬菌体展示载体。

另一方面，本申请提供一个或多个载体，其包含所述的核酸分子。例如，所述载体可以包含本申请所述的一种或多种核酸分子。每种载体中可包含一种或多种所述核酸分子。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。所述表达控制序列还可包括增强子序列或上游活化子序列。在本申请中，适当的启动子可包括，例如用于 SP6、T3 和 T7 聚合酶的启动子、人 U6RNA 启动子、CMV 启动子及其人工杂合启动子（如 CMV），其中启动子的某部分可与其他细胞蛋白（如人 GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶）基因启动子的某部分融合，其可包含或不包含另外的内含子。本申请所述的一种或多种核酸分子可以与所述表达控制元件可操作地连接。

所述载体可以包括，例如质粒、粘粒、病毒、噬菌体或者在例如遗传工程中通常使用的其他载体。在某些实施方式中，所述载体可以为表达载体。

所述载体还可含有一个或多个选择标记基因，其在表达后赋予可用于选择或以其它方式鉴定携带载体的宿主细胞的一个或多个表型性状。用于真核细胞的合适的选择标记的非限制性实例包括二氢叶酸还原酶和新霉素抗性。

另一方面，本申请提供一种细胞，所述细胞包含所述的融合蛋白，所述的免疫缀合物，所述的核酸分子，或所述的载体。所述细胞可以是宿主细胞。例如，所述细胞可以包括如下许多细胞类型，如大肠杆菌或枯草菌等原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa 细胞，BHK 细胞，HEK 293 细胞或人细胞的动物细胞。

例如，可通过多种已建立的技术将所述载体稳定地或瞬时引入宿主细胞。例如，一种方法涉及氯化钙处理，其中通过钙沉淀引入载体。也可以按照类似方法使用其它盐，例如磷酸钙。另外，可以用电穿孔（即，施加电流以增加细胞对核酸的渗透性）。转化方法的其它实

例包括显微注射、DEAE 葡聚糖介导的转化和在乙酸锂存在下的热休克。脂质复合物、脂质体和树状聚合物也可用于转染宿主细胞。

在将异源序列引入宿主细胞中时，可实施多种方法来鉴定已向其中引入了载体的宿主细胞。一种示例性选择方法包括将单个细胞继代培养以形成单个菌落，然后测试所需蛋白质产物的表达。另一种方法需要基于通过载体内包含的选择标记基因的表达赋予的表型性状选择含有异源序列的宿主细胞。

例如，将本申请的各种异源序列引入宿主细胞可通过方法诸如 PCR、Southern 印迹或 Northern 印迹杂交来确认。例如，可从所得宿主细胞制备核酸，并且可使用对目标序列是特异的引物，通过 PCR 扩增特定目标序列。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳或毛细管电泳，然后用溴化乙锭、SYBR Green 溶液等染色，或用 UV 检测来检测 DNA。或者，可在杂交反应中使用对目标序列是特异的核酸探针。特定基因序列的表达可以通过与 PCR，Northern 印迹杂交或通过使用与编码的基因产物反应的抗体的免疫测定的反转录检测相应的 mRNA 来确定。示例性免疫测定包括但不限于 ELISA、放射免疫测定和夹心免疫测定。

此外，将本申请的各种异源序列引入宿主细胞可以通过异源序列编码的酶（例如，酶促标志物）的酶促活性来确认。可通过本领域已知的多种方法测定酶。通常，酶促活性可通过产物的形成或正在研究的酶促反应的底物的转化来确定。所述反应可在体外或体内进行。

另一方面，本申请提供一种制备所述的融合蛋白的方法，其可以包括在使得所述融合蛋白能够表达的条件下培养所述的细胞。例如，可通过使用适当的培养基、适当的温度和培养时间等，这些方法是本领域普通技术人员所了解的。

在某些情形中，所述方法还可包括分离和/或纯化所述融合蛋白的步骤。例如，可以采用蛋白 G-琼脂糖或蛋白 A-琼脂糖进行亲和层析，还可通过凝胶电泳和/或高效液相色谱等来纯化和分离本申请所述的融合蛋白。

免疫缀合物、组合物和应用

另一方面，本申请提供一种免疫缀合物，其包含所述的融合蛋白。例如，所述免疫缀合物可以为融合蛋白-药物缀合物（ADC），其中本申请所述的融合蛋白与一种或多种治疗剂缀合，所述治疗剂包括但不限于细胞毒性剂、放射性毒性剂（例如，放射性同位素）和/或免疫抑制剂（例如，通过抑制免疫应答等途径杀伤细胞的任何药剂）等。在某些实施方式中，所述治疗剂可以为能够治疗肿瘤相关的疾病或病症的治疗剂。

所述缀合可通过肽连接子（例如，可切割连接子）或其它方式进行，例如，所述连接子

可以为酸不稳定连接子、肽酶敏感连接子、光不稳定连接子等。

另一方面，本申请提供一种组合物，所述组合物包含所述的融合蛋白，所述的免疫缀合物，或所述的核酸分子，以及任选地药学上可接受的赋形剂。

例如，所述药学上可接受的赋形剂可以包括缓冲剂、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组合物与药学上可接受的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。

例如，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的发展或进展，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。

例如，本申请所述的组合物可以为适于口服给药的形式，如片剂，胶囊剂，丸剂，粉剂，缓释制剂，溶液剂，混悬剂，或者用于肠胃外注射，如无菌溶液剂，混悬剂或乳剂，或者用于软膏或乳膏局部给药或作为栓剂直肠给药。所述组合物可以是适合精确剂量单次给药的单位剂量形式。所述组合物可以进一步包含常规的药物载体或赋形剂。此外，所述组合物可以包括其他药物或药剂，载体，佐剂等。

本申请所述的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的病症或病症（例如肿瘤）和/或其任何并发症而所需的剂量。所述剂量的具体量/浓度可以根据施用方法和患者需要而变化，并且可以基于例如患者体积，粘度和/或体重等来确定。例如，合适的剂量可以是约 0.1mg 或 1mg/kg/天至约 50mg/kg/天；有时，剂量可能会更高。应当理解的是，基于特定患者，制剂和/或疾病的状况，本领域技术人员（例如，医生或药剂师）可以方便地调整这些特定剂量。

在本申请中，术语“治疗”或“医治”或“缓解”或“改善”在本申请中可互换使用，并且是指获得有益或所需的结果（包括但不限于治疗益处和/或预防益处）的方法。在本申请中，治疗益处通常是指根除或减轻所治疗的潜在病症的严重性。此外，通过根除、减轻严重性或减少与潜在病症相关的一种或多种生理症状的发生率，以使得在受试者中观察到改善（尽管受试者仍然可能受到潜在病症折磨）来实现治疗益处。对于预防益处，可向处于发展特定疾病的风险中的受试者，或报告疾病的一种或多种生理症状的受试者施用组合物，即使可能尚未进行该疾病的诊断。

另一方面，本申请提供了所述的融合蛋白，所述的免疫缀合物，所述的核酸分子，所述的载体，所述的组合物，或所述的细胞在制备药物中的用途，其中所述药物可以用于治疗肿瘤。

另一方面，本申请所述的融合蛋白、免疫缀合物、核酸分子、载体、组合物或细胞可以用于治疗所述肿瘤。

另一方面，本申请提供了治疗肿瘤的方法，所述方法包括向受试者施用本申请所述的融合蛋白、免疫缀合物、核酸分子、载体、组合物或细胞。

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，本申请提供了一种阻断 PD-L1 与 PD1 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。

另一方面，本申请提供了一种可以抑制肿瘤或肿瘤细胞生长和/或增殖的方法，其可以包括向有需要的受试者施用有效量的所述的融合蛋白，所述的免疫缀合物，所述的核酸分子，所述的载体，所述的组合物，或所述的细胞。

在某些实施方式中，所述肿瘤可以包括实体瘤和非实体瘤。

在某些实施方式中，所述实体瘤和非实体瘤可以包括多发性骨髓瘤、白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、神经胶质瘤、生殖细胞瘤、肉瘤、见皮瘤、胎盘瘤、脑癌、骨癌、皮肤癌、鼻咽癌、肺癌、口腔癌、食道癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、肠癌、乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌和睾丸癌、上颌窦瘤、下咽癌、嗅母细胞瘤、舌癌、牙龈癌、壶腹癌、结肠癌、直肠癌、肾癌、输尿管癌、膀胱癌、阴茎癌、输卵管癌、眼睑癌、视母细胞瘤。

另一方面，本申请提供了所述的融合蛋白，所述的免疫缀合物，所述的核酸分子，所述的载体，所述的组合物，或所述的细胞，其可以治疗肿瘤或自身免疫疾病。

在本申请中，术语“受试者”通常是指人或非人动物，包括但不限于猫、狗、马、猪、牛、绵羊、山羊、兔、小鼠、大鼠或猴。

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融合蛋白、制备方法和用途等，而不适用于限制本申请发明的范围。

实施例

实施例 1 构建融合蛋白

参照如图 1 所示的融合蛋白结构，以罗氏 PD-L1 抗体 Atezolizumab (SG1201)、SIRP α 变体 1 的突变体 M91 (SEQ ID: NO 41) 为例，从 N 端到 C 端，选用选择连接子 1 (SEQ ID: NO 52)，依次连接 SG1201、连接子和 2 个 M91，其中 2 个 M91 的 N 端分别和 SG1201 的重链的 C 端连接，得到融合蛋白 SG12473。

抗体 SG1201 的 LCDR1-3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示；VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示；编码 VL 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示；抗体 SG1201 的 HCDR1-3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示；VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示；编码 VH 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示。抗体 SG1201 的轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示；编码其轻链的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示。抗体 SG1201 的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示；编码其重链的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示。

所述融合蛋白 SG12473 由第一多肽链和第二多肽链构成，第一多肽链即 SG1201 的轻链，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示，第二多肽链即具备 Fc 区突变的 SG1201 的重链和 M91 通过连接子 1 连接得到的多肽链，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 53 所示。

参照如图 1 所示的融合蛋白结构，以阿斯利康 PD-L1 抗体 Durvalumab (SG1202)、SIRP α 变体 1 的突变体 M91 (SEQ ID: NO 41) 为例，从 N 端到 C 端，选用选择连接子 1 (SEQ ID: NO 52)，依次连接 SG1202、连接子和 2 个 M91，其中 2 个 M91 的 N 端分别和 SG1202 的重链的 C 端连接，得到融合蛋白 SG12474。

抗体 SG1202 的 LCDR1-3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 17 所示；VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示；编码 VL 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示；抗体 SG1202 的 HCDR1-3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 所示；VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示；编码 VH 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示。抗体 SG1202 的轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示；编码其轻链的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示。抗体 SG1202 的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示；编码其重链的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 28 所示。

所述融合蛋白 SG12474 由第一多肽链和第二多肽链构成，第一多肽链即 SG1202 的轻链，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示，第二多肽链即具备 Fc 区突变的 SG1202 的重链和 M91 通过连接子 1 连接得到的多肽链，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示。

其中，IgG1-Fc 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示；具备突变的 Fc 的氨基酸序列如 SEQ

ID NO: 51 所示。

SIRP α 变体 1 的突变体 M91 (SEQ ID: NO 41) 与 IgG1-Fc 融合蛋白 SS002M91 为同二聚体, 其单体的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 55 所示。

实施例 2 与双抗原结合的活性检测

(1) 以抗不同抗原的人源化抗体为对照, ELISA 评价相应双功能蛋白和相关抗原的结合活性。

将 PD-L1 (人源, 购买自 Sino Biological 公司的 PD-L1/B7-H1/CD274 Protein (His Tag)) 包被 ELISA 板条, 4℃ 过夜; PBST 洗涤后, 加入 10% 的胎牛血清, 37℃ 封闭 1 小时; 加入不同浓度的抗体 SG1201、融合蛋白 SG12473; 或者, 不同浓度的抗体 SG1202、融合蛋白 SG12474, 37℃ 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), 37℃ 反应 30 分钟; PBST 洗涤 5 次; 每孔加入 100 μ L TMB (eBioscience), 室温 (20 $\pm$ 5℃) 避光放置 1~2min; 随后每孔加入 100 μ L 2N H₂SO₄ 终止液终止底物反应, 酶标仪 450 nm 处读取 OD 值, 分析双功能蛋白与相关靶抗原结合能力。

结果如图 2-3 所示。图 2-3 显示融合蛋白 SG12473 和融合蛋白 SG12474 中虽然 PD-L1 的抗体种类不同, 但并不影响融合蛋白 SG12473 和融合蛋白 SG12474 与 PD-L1 的结合能力。

(2) 以 CD47 受体突变体 M91 为对照, ELISA 评价相应双功能蛋白和 CD47 的结合活性。

将 CD47 (人源, 购买自 Sino Biological 公司的 CD47 Protein (His Tag)) 包被 ELISA 板条, 4℃ 过夜; PBST 洗涤后, 加入 10% 的胎牛血清, 37℃ 封闭 1 小时; 加入不同浓度的融合蛋白 SS002M91、融合蛋白 SG12473 和融合蛋白 SG12474, 37℃ 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), 37℃ 反应 30 分钟; PBST 洗涤 5 次; 每孔加入 100 μ L TMB (eBioscience), 室温 (20 $\pm$ 5℃) 避光放置 1~2min; 随后每孔加入 100 μ L 2N H₂SO₄ 终止液终止底物反应, 酶标仪 450 nm 处读取 OD 值, 分析融合蛋白 SG12473 和融合蛋白 SG12474 与 CD47 结合能力。

结果如图 4 所示。图 4 显示融合蛋白 SG12473 和融合蛋白 SG12474 中虽然 PD-L1 的抗体种类不同, 但并不影响融合蛋白 SG12473 和融合蛋白 SG12474 与 CD47 的结合力。

实施例 3 同时与双抗原结合的活性检测

以抗不同抗原的人源化抗体为对照, ELISA 分析融合蛋白 SG12473 和融合蛋白 SG12474 同时结合双抗原的生物学活性。

将 PD-L1 包被 ELISA 板条, 4℃ 过夜; PBST 洗涤后, 加入 10% 的胎牛血清, 37℃ 封闭 1 小时; 分别加入不同浓度的抗体 SG1201、融合蛋白 SG12473、抗体 SG1202、融合蛋白 SG12474, 37℃ 反应 1 小时; PBST 洗涤后, 加入生物素标记 CD47 (Biotin-Fc-CD47), 37℃ 反应 30 分钟; PBST 洗涤 5 次; 加入辣根过氧化物酶标记的亲和素 (Streptavidin-HRP, 嘉暄生物), 37℃ 反应 30 分钟; PBST 洗涤 5 次; 每孔加入 100μL TMB (eBioscience), 室温 (20±5℃) 避光放置 1~2min; 随后每孔加入 100 μL 2N H₂SO₄ 终止液终止底物反应, 酶标仪 450 nm 处读取 OD 值, 分析融合蛋白 SG12473 和融合蛋白 SG12474 与 PD-L1 和 CD47 同时结合的能力。

结果如图 5 所示, 图 5 显示融合蛋白 SG12473 和融合蛋白 SG12474 中虽然 PD-L1 的抗体种类不同, 但并不影响融合蛋白 SG12473 和融合蛋白 SG12474 与 PD-L1 和 CD47 同时结合的能力。

实施例 4 阻断 CD47/SIRPα 相互作用的活性分析

以融合蛋白 SS002M91 为对照, 评价融合蛋白 SG12473、SG12474 阻断 CD47/SIRPα 相互作用的生物学活性。

将 SIRPα-His 包被酶联板, 1μg/ml, 4℃ 过夜; PBST 洗涤后, 加入 10% 的胎牛血清, 37℃ 封闭 1 小时; 使用 10% 的胎牛血分别梯度稀释 SS002M91、SG12473、SG12474, 并在样品中加入 Biotin-Fc-CD47 至终浓度 2μg/ml, 37℃ 预孵育 30min, 作为一抗; PBST 洗涤酶联板后, 加入一抗, 37℃ 孵育 1 小时; PBST 洗 5 遍, 加入辣根过氧化物酶标记的亲和素 (Streptavidin-HRP, 嘉暄生物), 37℃ 孵育 30 分钟; PBST 洗 5 遍, 每孔加入 100μL TMB (eBioscience), 室温 (20±5℃) 避光放置 1-5min; 每孔加入 100μL 2N H₂SO₄ 终止液终止底物反应, 酶标仪 450 nm 处读取 OD 值, 分析 SS002M91、SG12473、SG12474 对 CD47/SIRPα 的阻断作用。

结果如图 6 所示, 图 6 显示融合蛋白 SG12473、SG12474 与融合蛋白 SS002M91 一样可以竞争性阻断 CD47 与其配体 SIRPα 的结合。其中 SG12473 的 IC₅₀ 值为 1.26nM, SG12474 的 IC₅₀ 值为 0.77nM, SS002M91 的 IC₅₀ 值为 1.16nM。

实施例 5 阻断 PD-1/PD-L1 相互作用的活性分析

以 SG1201、SG1202 为对照, 评价融合蛋白 SG12473、SG12474 阻断 PD-1/PD-L1 相互作用的生物学活性。

将 PD-L1-Fc 包被酶联板, 2μg/ml, 4℃ 过夜; PBST 洗涤后, 加入 10% 的胎牛血清, 37℃ 封闭 1 小时; 使用 10% 的胎牛血分别梯度稀释 SG1201、SG12473、SG1202 和 SG12474, 并在样品中加入 Biotin-Fc-PD1 至终浓度 1μg/ml, 37℃ 预孵育 30min, 作为一抗; PBST 洗涤酶

联板后，加入一抗，37℃孵育 1 小时；PBST 洗 5 遍，加入辣根过氧化物酶标记的亲和素（Streptavidin-HRP，嘉暄生物），37℃孵育 30 分钟；PBST 洗 5 遍，每孔加入 100μL TMB (eBioscience)，室温（20±5℃）避光放置 1-5min；每孔加入 100μL 2N H₂SO₄ 终止液终止底物反应，酶标仪 450 nm 处读取 OD 值，分析 SG1201、SG12473、SG1202 和 SG12474 对 PD-1/PD-L1 的阻断作用。

从图 7-8 中可以看出，融合蛋白 SG12473、SG12474 与 SG1201、SG1202 一样可以竞争性阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合。其中 SG1201 的 IC₅₀ 值为 11.23nM，SG12473 的 IC₅₀ 值为 13.22nM，SG1202 的 IC₅₀ 值为 10.89nM，SG12474 的 IC₅₀ 值为 9.12nM。

实施例 6 融合蛋白体内抑制肿瘤活性

人源淋巴瘤 KARPAS-299 细胞株皮下异种移植雌性 NCG 小鼠 MiXeno 动物模型，评价融合蛋白 SG12473 抑制肿瘤活性的效果。

选择雌性，6~8 周龄的 NCG 小鼠（购自江苏集萃药康生物技术有限公司）进行试验。小鼠于皮下接种 KARPAS-299 细胞，定期观察肿瘤生长情况，待肿瘤生长至平均体积 35mm³ 时根据肿瘤大小和小鼠体重随机分组给药。分组当天（约 Day4）经尾静脉接种新鲜人 PBMC（来源于捐献者），建立 KARPAS-299 人源化小鼠模型。

试验分为溶媒对照组、SG1201 组以及 SG12473 低、中、高剂量组，每组 12 只，每 6 只小鼠使用同一起来源的 PBMC。腹腔注射给药，每周给药两次，共给药三周。具体地，

组 1A 和组 1B：溶媒对照组

组 2A 和组 2B：SG1201 组，SG1201 5mg/Kg

组 3A 和组 3B：SG12473 低剂量组，SG12473 5mg/Kg

组 4A 和组 4B：SG12473 中剂量组，SG12473 10mg/Kg

组 5A 和组 5B：SG12473 高剂量组，SG12473 20mg/Kg；

根据相对肿瘤抑制率（TGI）进行疗效评价，根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

结果显示，使用捐献者 A 来源的 PBMC 的小鼠中，SG12473 低、中、高剂量组均表现出显著的抑瘤作用。图 9 的结果显示，SG12473 低、中、高剂量组在给药完成时 TGI 分别为 44.71%、47.16%和 96.49%，在给药完成 4 天后 TGI 分别为 43.71%、47.92%和 95.94%，相对溶媒对照组统计学上均有显著性差异（p 值均<0.01）。SG1201 在测试剂量下没有表现出明显的抑瘤作用。

使用捐献者 B 来源的 PBMC 的小鼠中，SG12473 低、中、高剂量组均表现出显著的抑瘤

作用。图 10 的结果显示, SG12473 低、中、高剂量组在给药完成时 TGI 分别为 36.96%、62.06% 和 98.90%, 在给药完成 4 天后 TGI 分别为 33.44%、57.57%和 98.83%, 相对溶媒对照组统计学上均有显著性差异 (p 值均<0.01)。SG1201 在测试剂量下没有表现出明显的抑瘤作用。

各治疗组均无动物死亡, 没有表现明显的药物毒性, 治疗期间耐受良好。

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。目前本申请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。

权 利 要 求 书

1.融合蛋白，其包含：

特异性结合 PD-L1 的第一结合域；以及

特异性结合 CD47 蛋白的第二结合域；

其中，所述第二结合域包含人 SIRP α 变体 1 的突变体，所述突变体与 SEQ ID NO:29 所示的序列相比，在第 33 位至第 149 位中的一个或多个位置包含氨基酸残基的取代、缺失或添加。

2.根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其中所述突变体在选自下组的一个或多个氨基酸残基处包含氨基酸取代：R22、I29、I61、V63、E77、Q82、K83、E84、V93、D95、L96、K98、N100、R107、G109 和 V132。

3.根据权利要求 2 所述的融合蛋白，其中所述突变体在选自下组的氨基酸残基处包含氨基酸取代：

- (1) I61、V63、E77、E84、V93、L96、K98、N100 和 V132；
- (2) I61、E77、Q82、K83 和 E84；
- (3) I61、V63、K83、E84 和 V132；
- (4) I61、E77、E84、R107 和 V132；
- (5) I61、V63、E77、K83、E84 和 N100；
- (6) I6、E77、Q82、K83、E84 和 R107；
- (7) I61、E77、Q82、E84、V93、L96、N100、R107、G109 和 V132；
- (8) I61、E77、Q82、K83、E84 和 V132；
- (9) I61；
- (10) I61、D95、L96、G109 和 V132；
- (11) I6、D95、L96、K98、G109 和 V132；
- (12) I61、E77、E84、V93、R107 和 V132；
- (13) E77、L96、N100、G109 和 V132；
- (14) I61、V63、Q82、E84、D95、L96、N100 和 V132；
- (15) I61、E77、Q82、K83、E84、V93、D95、L96、K98、N100 和 V132；
- (16) I61、E77、Q82、K83、E84 和 V93；
- (17) I61、V63、E77、K83、E84、D95、L96、K98 和 N100；
- (18) I61、V63、E77、K83、D95、L96、K98、N100 和 G109；
- (19) I61、E77、Q82、E84、V93、D95、L96、K98 和 N100；和，
- (20) I61、V63、E77、Q82 和 E84。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的融合蛋白，其中所述突变体包含选自下组的一个或多个氨基酸取代：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、L96S/T、K98R、N100G/K/D/E、R107N/S、G109R/H 和 V132L/R/I/S。

5. 根据权利要求 4 所述的融合蛋白，其中所述突变体包含选自下组的氨基酸取代：

- (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。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的融合蛋白，其中所述突变体包含如 SEQ ID NO:30-49 中任一项所示的氨基酸序列。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的融合蛋白，其中所述第一结合域包含抗体或其抗原结合片段。

8. 根据权利要求 7 所述的融合蛋白，其中所述抗体选自下组：单克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。

9.根据权利要求 7-8 中任一项所述的融合蛋白,其中所述抗原结合片段选自下组: Fab, Fab', F(ab)₂, dAb, 分离的互补决定区 CDR, Fv 和 scFv。

10.根据权利要求 1-9 中任一项所述的融合蛋白,其中所述 PD-L1 为人 PD-L1。

11.根据权利要求 7-10 中任一项所述的融合蛋白,其中所述抗体包含抗体重链或其片段,所述抗体重链或其片段包含 HCDR1-3,所述 HCDR1 包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 18。

12.根据权利要求 11 所述的融合蛋白,其中所述 HCDR2 包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 19。

13.根据权利要求 11-12 中任一项所述的融合蛋白,其中所述 HCDR3 包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 20。

14.根据权利要求 11-13 中任一项所述的融合蛋白,其中所述抗体重链或其片段包含重链可变区 VH,且所述重链可变区 VH 包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 22。

15.根据权利要求 11-14 中任一项所述的融合蛋白,其中所述抗体重链或其片段包含重链恒定区,且所述重链恒定区包含 IgG。

16.根据权利要求 15 所述的融合蛋白,其中所述 IgG 选自下组: IgG1 和 IgG4。

17.根据权利要求 11-16 中任一项所述的融合蛋白,其中所述抗体重链包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 27。

18.根据权利要求 6-17 中任一项所述的融合蛋白,其中所述抗体包含抗体轻链或其片段,所述抗体轻链或其片段包含 LCDR1-3,所述 LCDR1 包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 15。

19.根据权利要求 18 所述的融合蛋白,其中所述 LCDR2 包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 16。

20.根据权利要求 18-19 中任一项所述的融合蛋白,其中所述 LCDR3 包含下组任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 17。

21.根据权利要求 18-20 中任一项所述的融合蛋白,其中所述抗体轻链或其片段包含轻链可变区 VL,且所述轻链可变区 VL 包含下组中任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 21。

22.根据权利要求 18-21 中任一项所述的融合蛋白,其中所述抗体轻链或其片段包含轻链恒定区,其所述轻链恒定区包含 Igκ。

23.根据权利要求 18-22 中任一项所述的融合蛋白,其中所述抗体轻链包含下组任一项所

示的氨基酸序列：SEQ ID NO：11 和 SEQ ID NO：25。

24.根据权利要求 1-23 中任一项所述的融合蛋白，其中所述第一结合域位于所述第二结合域的 N 端。

25.根据权利要求 1-24 中任一项所述的融合蛋白，其中所述融合蛋白还包含连接子，所述连接子位于所述第一结合域的 C 端且位于所述第二结合域的 N 端。

26.根据权利要求 25 所述的融合蛋白，其中所述连接子包含如 SEQ ID NO:52 所示的氨基酸序列。

27.根据权利要求 1-26 中任一项所述的融合蛋白，其包含至少 2 个所述第二结合域。

28.根据权利要求 27 所述的融合蛋白，其中所述每个所述第二结合域分别位于所述第一结合域的 C 端。

29.免疫缀合物，其包含根据权利要求 1-28 中任一项所述的融合蛋白。

30.一个或多个分离的核酸分子，其编码根据权利要求 1-28 中任一项所述的融合蛋白或者根据权利要求 29 所述的免疫缀合物。

31.一个或多个载体，其包含权利要求 30 所述的核酸分子。

32.组合物，其包含根据权利要求 1-28 中任一项所述的融合蛋白，根据权利要求 30 所述的免疫缀合物，或根据权利要求 30 所述的核酸分子，以及任选地药学上可接受的赋形剂。

33.细胞，其包含权利要求 1-28 中任一项所述的融合蛋白，权利要求 29 所述的免疫缀合物，权利要求 30 所述的核酸分子，或权利要求 31 所述的载体。

34.制备根据权利要求 1-28 中任一项所述的融合蛋白的方法，其包括在使得所述融合蛋白能够表达的条件下培养根据权利要求 33 所述的细胞。

35.权利要求 1-28 中任一项所述的融合蛋白，权利要求 29 所述的免疫缀合物，权利要求 30 所述的核酸分子，权利要求 31 所述的载体，权利要求 32 所述的组合物，或权利要求 33 所述的细胞在制备药物中的用途，其中所述药物用于治疗肿瘤。

36.根据权利要求 35 所述的用途，其中所述肿瘤包括实体瘤和非实体瘤。

37.根据权利要求 36 所述的用途，其中所述实体瘤和非实体瘤包括多发性骨髓瘤、白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、神经胶质瘤、生殖细胞瘤、肉瘤、见皮瘤、胎盘瘤、脑瘤、骨瘤、皮肤瘤、鼻咽癌、肺癌、口腔癌、食道癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、肠癌、乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌和睾丸癌、上颌窦瘤、下咽癌、嗅母细胞瘤、舌癌、牙龈癌、壶腹癌、结肠癌、直肠癌、肾癌、输尿管癌、膀胱癌、阴茎癌、输卵管癌、眼睑癌、视母细胞瘤。

38.权利要求 1-28 中任一项所述的融合蛋白，权利要求 29 所述的免疫缀合物，权利要求

30 所述的核酸分子，权利要求 31 所述的载体，权利要求 32 所述的组合物，或权利要求 33 所述的细胞，其治疗肿瘤。

39. 阻断 PD-L1 蛋白与 PD-1 相互作用的方法，其包括向有需要的受试者施用有效量的权利要求 1-28 中任一项所述的融合蛋白，权利要求 29 所述的免疫缀合物，权利要求 30 所述的核酸分子，权利要求 31 所述的载体，权利要求 32 所述的组合物，或权利要求 33 所述的细胞。

40. 阻断 CD47 蛋白与 SIRP α 相互作用的方法，其包括向有需要的受试者施用有效量的权利要求 1-28 中任一项所述的融合蛋白，权利要求 29 所述的免疫缀合物，权利要求 30 所述的核酸分子，权利要求 31 所述的载体，权利要求 32 所述的组合物，或权利要求 33 所述的细胞。

41. 抑制肿瘤或肿瘤细胞生长和/或增殖的方法，其包括向有需要的受试者施用有效量的权利要求 1-28 中任一项所述的融合蛋白，权利要求 29 所述的免疫缀合物，权利要求 30 所述的核酸分子，权利要求 31 所述的载体，权利要求 32 所述的组合物，或权利要求 33 所述的细胞。