

中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this office of
the application as originally filed which is identified hereunder：

申請 日：西元 2015 年 08 月 10 日
Application Date Aug. 10, 2015

申請 案 號：104125902
Application No.

申請 人：艾雷索製藥股份有限公司
Applicant(s) (西元2016年9月14日艾雷索國際製藥有限公司將本
案之申請權讓與艾雷索製藥股份有限公司)

發明 人：戴明 蘿拉、古德曼 柯瑞、波恩 強、西姆 邦
Inventor(s) 簡尼特、維勒基奇 馬利嘉

局 長
Director General

洪淑敏

西元 2016 年 09 月 19 日
Sep. 19, 2016

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】（中文/英文）

信號調節蛋白 α (signal-regulatory protein α , SIRP- α)變體構築物及其用途/SIRP-ALPHA VARIANT CONSTRUCTS AND USES THEREOF

【中文】

本發明係關於包括 SIRP- α 變體之 SIRP- α 變體構築物的組合物及方法。該 SIRP- α 變體構築物可以各種方式設計以應對環境因子，例如 pH、低氧及/或腫瘤關連酵素或腫瘤關連抗原之存在。本發明之 SIRP- α 變體構築物可用於治療各種疾病，例如癌，較佳為固體腫瘤或血液性癌。

【英文】

The invention relates to compositions and methods of SIRP- α variant constructs including SIRP- α variants. The SIRP- α variant constructs may be engineered in a variety of ways to respond to environmental factors, such as pH, hypoxia, and/or the presence of tumor-associated enzymes or tumor-associated antigens. The SIRP- α variant constructs of the invention may be used to treat various diseases, such as cancer, preferably solid tumor or hematological cancer.

3

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：
無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】 (中文/英文)

信號調節蛋白 α (signal-regulatory protein α , SIRP- α)變體
構築物及其用途/SIRP-ALPHA VARIANT CONSTRUCTS AND
USES THEREOF

【技術領域】

【0001】信號調節蛋白 α (SIRP- α)係在骨髓細胞的膜上廣泛表現的蛋白質。SIRP- α 會與 CD47 交互作用，CD47 為一種在體內許多類型的細胞廣泛表現之蛋白質。SIRP- α 與 CD47 之交互作用會防止“自體”細胞的吞噬，否則該自體細胞會被免疫系統辨識。SIRP- α 首先是以 SHP-2(一種含有酪胺酸磷酸酶的 SH-2 分域(domain))之結合子被發現。CD47 已被表徵為卵巢癌細胞中過度表現的抗原。

【先前技術】

【0002】於西元 2000 年，Oldenborg 等人顯示將 CD47 缺損的紅血球(RBCs)投予(administration)於小鼠模型中會造成紅血球從系統中快速被清除，證明 CD47 在某些“自體”細胞之次組(subset)為一“保護”信號。因此，SIRP- α 與癌症間的潛在關係進一步被了解。據發現已作用的癌細胞上有高度表現的 CD47，其在急性骨髓性白血病(AML)和數種固體腫瘤癌症之中作為存活的負預後因子(negative prognostic factor)。針對破壞 CD47 與 SIRP- α 間交互作用的策略，例如投予會遮蔽 CD47 或 SIRP- α 之藥劑，已被發現是一種有潛力的抗癌療法。

5

【0003】然而，考量到這些治療策略時，有一課題在於：SIRP- α 可能會結合至人體內多種不同細胞類型上的 CD47。因此，需要設計 SIRP- α 使其只優先結合於患病細胞或細胞上的患病部位之 CD47。

【發明內容】

【0004】本發明係關於信號調節蛋白 α (SIRP- α)變體構築物 (variant construct)。該 SIRP- α 變體構築物包括 SIRP- α 變體。於一些實施例，該 SIRP- α 變體構築物在患病的部位有優先的活性(例如在腫瘤部位優先於非患病的部位)。於特定實施例，該 SIRP- α 變體構築物對於患病的細胞(例如癌細胞)上的 CD47 具有較高的結合親和性。於一些實施例，相較於在生理條件下，該 SIRP- α 變體在酸性 pH(例如低於約 pH 7)及/或在缺氧條件下對於 CD47 有較高之親和性。於一些實施例，該 SIRP- α 變體包括以組胺酸殘基或其他胺基酸取代之一或多個胺基酸取代，可容許 SIRP- α 變體構築物優先結合於患病的部位。於一些實施例，該 SIRP- α 變體構築物可藉由阻斷胜肽以防止其在非患病的部位結合至 CD47。於一些實施例，該 SIRP- α 變體構築物藉由靶向結構(targeting moiety)(例如導向腫瘤相關抗原或抗體結合胜肽之抗體)以靶向至(target to)患病的部位(例如腫瘤)。本發明也關於含有 SIRP- α 變體構築物之方法及醫藥組合物，以用於治療諸如癌各種疾病，特別是固體腫瘤癌及血液性癌。

【0005】於一態樣，本發明係關於信號調節蛋白 α (SIRP- α)變體構築物，其中該 SIRP- α 變體構築物優先結合於患病細胞

或患病部位上之 CD47 而不是非患病的細胞。於一些實施例，該 SIRP- α 變體構築物對於患病細胞或患病部位的 CD47 之結合親和性高於對非患病的細胞。

【0006】於一些實施例，該 SIRP- α 變體構築物包括附著於阻斷胜肽之 SIRP- α 變體。於一些實施例，該阻斷胜肽對於野生型(wild-type)SIRP- α 之結合親和性高於對 SIRP- α 變體。於一些實施例，該 SIRP- α 變體對於野生型 CD47 之結合親和性高於對阻斷胜肽。

【0007】於一些實施例，該阻斷胜肽為 CD47 系阻斷胜肽。於一些實施例，該 CD47 系阻斷胜肽包括與 CD47 之 IgSF 分域 (SEQ ID NO: 35)或其片段之野生型序列至少有 80%胺基酸序列同一性(identity)之部分。於一些實施例，該 CD47 系阻斷胜肽之序列為 SEQ ID NO: 38 或 40。

【0008】在此提供一種 SIRP- α 變體構築物，包括在此敘述之 SIRP- α 變體，其中該 SIRP- α 變體利用至少一連結子(linker)(例，可裂解的連結子)附著於所述之阻斷胜肽。於一些實施例，該 SIRP- α 變體可包括與野生型 SIRP- α 相同的 CD47 結合部位。於一些實施例，該 SIRP- α 變體相較於野生型 SIRP- α 可包括一或多個突變或插入。於一些實施例，該 SIRP- α 變體可為野生型 SIRP- α 之截短形(truncated form)。於一些實施例，該阻斷胜肽可為 CD47 模擬物(mimic)、變體、或在此描述之片段。於一些實施例，該阻斷胜肽對於野生型 SIRP- α 之親和性高於對 SIRP- α 變體結構中之 SIRP- α 變體之親和性。於一些實施例，該阻斷胜肽可為 CD47 變體多肽，相較於野生型 CD47，

其對於 SIRP- α 變體具有較低之親和性。於一些實施例，SIRP- α 變體與阻斷胜肽間之連結子可為被一或多種蛋白酶選擇性地裂解之至少一連結子。於一些實施例，該連結子亦可選擇性地包括一或多個分隔子。

【0009】於一些實施例，該 SIRP- α 變體藉由可裂解的連結子及可選的一或多個分隔子來附著於阻斷胜肽。於一些實施例，該可裂解的連結子在酸性 pH 及/或缺氧條件下被裂解。於一些實施例，該可裂解的連結子被腫瘤關連酵素裂解。於一些實施例，該腫瘤關連酵素為蛋白酶。於一些實施例，該蛋白酶選自以下構成的群組：蛋白裂解酶(matriptase, MTSP1)、尿型胞漿素元活化劑(plasminogen activator, uPA)、天冬氨酸內肽酶(legumain)、前列腺特定抗原(PSA)(也稱為 KLK3，激肽釋放酶關連肽酶-3(kallikrein-related peptidase-3))、基質金屬蛋白酶-2(MMP-2)、MMP9、人類嗜中性彈性蛋白酶(neutrophil elastase, HNE)及蛋白酶 3(Pr3)。於一些實施例，該蛋白酶為蛋白裂解酶(matriptase)。於一些實施例，該可裂解的連結子之序列為 LSGRSDNH(SEQ ID NO: 47)或表 7 列出之任一序列。於一些實施例，該可裂解的連結子包括以下序列的一種或其組合(例如：見表 7)：PRFKIIGG、PRFRIIGG、SSRHRRALD、RKSSIIIRMRDVVL、SSSFDKGKYKKGDDA、SSSFDKGKYKRGDDA、IEGR、IDGR、GGSIDGR、PLGLWA、GPLGIAGI、GPEGLRVG、YGAGLGVV、AGLGVVER、AGLGISST、DVAQFVLT、VAQFVLTE、AQFVLTEG、PVQPIGPQ、L/S/G-/R--/S-/D/N/H、-/s/gs/Rk-/rv/-/-/-、SGR-SA、L/S/G-/R--/S-/D/N/H、r/-/-/Rk-/v/-/-/g/-、RQAR-VV、

r/-/-/Rk/v/-/g 、 /Kr/RKQ/gAS/RK/A 、 L/S/G-/R-/S-/D/N/H 、
-/-/-/N/-/-/- 、 AAN-L 、 ATN-L 、 si/sq/-/yqrs/s/-/- 、 S/S/K/L/Q 、
-/p/-/-/li/-/-/- 、 g/pa/-/gl/-/g/- 、 G/P/L/G/I/A/G/Q 、 P/V/G/L/I/G 、
H/P/V/G/L/L/A/R 、 -/-/-/viat/-/-/-及 -/y/y/vta/-/-/- ， 其中“-“代
表任意胺基酸(即，任意自然存在的胺基酸)，大寫字母代表對
該胺基酸有強優先性，小寫字母代表對該胺基酸有弱優先性，
分隔胺基酸的位置以防有多於一種胺基酸在鄰近“/”之位置的
可能性。

【0010】於一些實施例，該 SIRP- α 變體附著於抗體結合胜肽。於一些實施例，該抗體結合胜肽可逆或不可逆地結合於抗體的不變區(constant region)。於一些實施例，該抗體結合胜肽以可逆或不可逆地結合於抗體之抗原結合片段(Fab)區。於一些實施例，該抗體結合胜肽以可逆或不可逆地結合於抗體之可變區。於一些實施例，該抗體為爾必得舒(Cetuximab)。於一些實施例，該抗體結合胜肽與疾病局部化胜肽(disease localization peptide, DLP)(CQFDLSTRRLKC(SEQ ID NO: 64)或 CQYNLSSRALKC (SEQ ID NO: 65))或其片段之序列有至少 75%胺基酸序列同一性。於一些實施例，該抗體結合胜肽之序列為 SEQ ID NO: 64。

【0011】於一些實施例，該 SIRP- α 變體附著於 Fc 分域單元體。於一些實施例，該 SIRP- α 變體附著於人類血清白蛋白(HSA)。於一些實施例，HSA 包括 C34S 及/或 K573P 之胺基酸取代，對應於 SEQ ID NO: 67。於一些實施例，該 HSA 之序列為：

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDH

5

VKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLR
ETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVM
CTAFHDNEETFLKKYLYEIIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT
ECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGE
RAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDL
LECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVE
NDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYA
RRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEF
KPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVST
PTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCV
LHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVM
DDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLV AASQAALGL(SEQ
ID NO: 68)。

【0012】於一些實施例，該 SIRP- α 變體附著於白蛋白結合 (albumin-binding) 胜肽。於一些實施例，該白蛋白結合胜肽之序列為 SEQ ID NO: 2。於一些實施例，該 SIRP- α 變體附著於聚合物，其中該聚合物為聚乙二醇(PEG)鏈或聚唾液酸鏈。

【0013】於一些實施例，該 SIRP- α 變體附著於抗體。於一些實施例，該抗體為腫瘤專一性抗體。於一些實施例，該抗體 (例如腫瘤專一性抗體) 選自由以下構成的群組：cetuximab、pembrolizumab、nivolumab、pidilizumab、MEDI0680、MEDI6469、Ipilimumab、tremelimumab、urelumab、vantictumab、varlilumab、mogamalizumab、抗 CD20 抗體、抗 CD19 抗體、抗 CS1 抗體、

herceptin、trastuzumab 及 pertuzumab。於一些實施例，該抗體(例如腫瘤專一性抗體)可結合於以下之一或多種分子：5T4、AGS-16、ALK1、ANG-2、B7-H3、B7-H4、c-fms、c-Met、CA6、CD123、CD19、CD20、CD22、EpCAM、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CD74、CD79b、CD98、CEA、CEACAM5、CLDN18.2、CLDN6、CS1、CXCR4、DLL-4、EGFR、EGP-1、ENPP3、EphA3、ETBR、FGFR2、纖網蛋白(fibronectin)、FR-alpha、GCC、GD2、glypican-3、GPNMB、HER-2、HER3、HLA-DR、ICAM-1、IGF-1R、IL-3R、LIV-1、mesothelin、MUC16、MUC1、NaPi2b、Nectin-4、Notch 2、Notch 1、PD-L1、PD-L2、PDGFR- α 、PS、PSMA、SLTRK6、STEAP1、TEM1、VEGFR、CD25、CD27L、DKK-1 及/或 CSF-1R。

【0014】於一些實施例，SIRP- α 變體構築物中之 SIRP- α 變體與 SEQ ID NO: 3-12 及 24-34 之任一序列有至少 80%(例如至少 85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%)之序列同一性。

【0015】於一些實施例，SIRP- α 變體構築物之 SIRP- α 變體之序列為：

EEEX₁QX₂IQPDKSVLVAAGETX₃TLRCTX₄TSLX₅PVGPIQ
WFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDF
SIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDDVEX₁₆KSGAGTE
LSVRAKPS(SEQ ID NO: 13)，其中 X₁ 為 L、I 或 V；X₂ 為 V、
L，或 I；X₃ 為 A 或 V；X₄ 為 A、I 或 L；X₅ 為 I、T、S 或 F；
X₆ 為 E、V 或 L；X₇ 為 K 或 R；X₈ 為 E 或 Q；X₉ 為 H、P 或 R；

X₁₀ 為 L、T 或 G；X₁₁ 為 K 或 R；X₁₂ 為 N、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y；X₁₃ 為 P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W 或 Y；X₁₄ 為 V 或 I；X₁₅ 為 F、L 或 V；X₁₆ 為 F 或 V。

【0016】於一些實施例，SIRP- α 變體構築物中之該 SIRP- α 變體之序列為：EEGX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILHCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFSIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDDVE X₁₆KSGAGTELSVRAKPS(SEQ ID NO: 16)，其中 X₁ 為 L、I 或 V；；X₂ 為 V、L 或 I；；X₃ 為 A 或 V；X₄ 為 A、I 或 L；X₅ 為 I、T、S 或 F；X₆ 為 E、V 或 L；X₇ 為 K 或 R；X₈ 為 E 或 Q；X₉ 為 H、P 或 R；X₁₀ 為 L、T 或 G；X₁₁ 為 K 或 R；X₁₂ 為 N、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y；X₁₃ 為 P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W 或 Y；X₁₄ 為 V 或 I；X₁₅ 為 F、L 或 V；X₁₆ 為 F 或 V。

【0017】於一些實施例，SIRP- α 變體構築物中之該 SIRP- α 變體之序列為：EEEX₁QX₂IQPDKFVLVAAGETX₃TLRCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFSIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDDVE X₁₆KSGAGTELSVRAKPS(SEQ ID NO: 17)，其中 X₁ 為 L、I 或 V；X₂ 為 V、L 或 I；X₃ 為 A 或 V；X₄ 為 A、I 或 L；X₅ 為 I、T、S 或 F；X₆ 為 E、V 或 L；X₇ 為 K 或 R；X₈ 為 E 或 Q；X₉ 為 H、P 或 R；X₁₀ 為 L、T 或 G；X₁₁ 為 K 或 R；X₁₂ 為 N、A、

C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W
或 Y；X₁₃ 為 P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、
Q、R、S、T、V、W 或 Y；X₁₄ 為 V 或 I；X₁₅ 為 F、L 或 V；
X₁₆ 為 F 或 V。

【0018】於一些實施例，SIRP- α 變體構築物中之該 SIRP- α
變體之序列為：EEEX₁QX₂IQPDKSVLVAAGETX₃TLRCTX₄
TSLX₅PVGPIQWFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSDX₁₀
TX₁₁RNNMDFPIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDDVE
X₁₆KSGAGTELSVRAKPS(SEQ ID NO: 18)，其中 X₁ 為 L、I 或
V；X₂ 為 V、L，或 I；X₃ 為 A 或 V；X₄ 為 A、I 或 L；X₅ 為 I、
T、S 或 F；X₆ 為 E、V 或 L；X₇ 為 K 或 R；X₈ 為 E 或 Q；X₉
為 H、P 或 R；X₁₀ 為 L、T 或 G；X₁₁ 為 K 或 R；X₁₂ 為 N、A、
C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W
或 Y；X₁₃ 為 P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、
Q、R、S、T、V、W 或 Y；X₁₄ 為 V 或 I；X₁₅ 為 F、L 或 V；
X₁₆ 為 F 或 V。

【0019】於一些實施例，SIRP- α 變體構築物中之該 SIRP- α
變體之序列為：EEEX₁QX₂IQPDKSVLVAAGETX₃TLRCTX₄
TSLX₅PVGPIQWFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSDX₁₀
TX₁₁RNNMDFSIRISX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDDVE
X₁₆KSGAGTELSVRAKPS(SEQ ID NO: 21)，其中 X₁ 為 L、I 或
V；X₂ 為 V、L，或 I；X₃ 為 A 或 V；X₄ 為 A、I 或 L；X₅ 為 I、
T、S 或 F；X₆ 為 E、V 或 L；X₇ 為 K 或 R；X₈ 為 E 或 Q；X₉
為 H、P 或 R；X₁₀ 為 L、T 或 G；X₁₁ 為 K 或 R；X₁₂ 為 N、A、
S

C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W
或 Y；X₁₃ 為 P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、
Q、R、S、T、V、W 或 Y；X₁₄ 為 V 或 I；X₁₅ 為 F、L 或 V；
X₁₆ 為 F 或 V。

【0020】於一些實施例，SIRP- α 變體構築物中之該 SIRP- α
變體之序列為：EEEX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILHCTX₄
TSLX₅PVGPIQWFRGAGPARX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSEX₁₀
TX₁₁RENMDFSISISX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDTEX₁
6KSGAGTELSVRAKPS(SEQ ID NO: 14)，其中 X₁ 為 L、I 或 V；
X₂ 為 V、L，或 I；X₃ 為 A 或 V；X₄ 為 V、I 或 L；X₅ 為 I、T、
S 或 F；X₆ 為 E、V 或 L；X₇ 為 K 或 R；X₈ 為 E 或 Q；X₉ 為 H、
P 或 R；X₁₀ 為 S、T 或 G；X₁₁ 為 K 或 R；X₁₂ 為 N、A、C、D、
E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y；
X₁₃ 為 P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、
S、T、V、W 或 Y；X₁₄ 為 V 或 I；X₁₅ 為 F、L 或 V；X₁₆ 為 F
或 V；

【0021】於一些實施例，SIRP- α 變體構築物中之該 SIRP- α
變體之序列為：EEEX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILLCTX₄
TSLX₅PVGPIQWFRGAGPARX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSEX₁₀
TX₁₁RENMDFSISISX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDTEX₁
6KSGAGTELSVRAKPS(SEQ ID NO: 15)，其中 X₁ 為 L、I 或 V；
X₂ 為 V、L 或 I；X₃ 為 A 或 V；X₄ 為 V、I 或 L；X₅ 為 I、T、
S 或 F；X₆ 為 E、V 或 L；X₇ 為 K 或 R；X₈ 為 E 或 Q；X₉ 為 H、
P 或 R；X₁₀ 為 S、T 或 G；X₁₁ 為 K 或 R；X₁₂ 為 N、A、C、D、

E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y；
X₁₃ 為 P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、
S、T、V、W 或 Y；X₁₄ 為 V 或 I；X₁₅ 為 F、L 或 V；X₁₆ 為 F
或 V。

【0022】於一些實施例，SIRP- α 變體構築物中之該 SIRP- α
變體之序列為：EEEX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILHCTX₄
TSLX₅PVGPIQWFRGAGPARX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSEX₁₀
TX₁₁RENMDFSISISX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDTEX₁
6KSGAGTELSVRGKPS(SEQ ID NO: 19)，其中 X₁ 為 L、I 或 V；
X₂ 為 V、L 或 I；X₃ 為 A 或 V；X₄ 為 V、I 或 L；X₅ 為 I、T、
S 或 F；X₆ 為 E、V 或 L；X₇ 為 K 或 R；X₈ 為 E 或 Q；X₉ 為 H、
P 或 R；X₁₀ 為 S、T 或 G；X₁₁ 為 K 或 R；X₁₂ 為 N、A、C、D、
E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y；
X₁₃ 為 P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、
S、T、V、W 或 Y；X₁₄ 為 V 或 I；X₁₅ 為 F、L 或 V；X₁₆ 為 F
或 V。

【0023】於一些實施例，SIRP- α 變體構築物中之該 SIRP- α
變體之序列為：EEEX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILHCTX₄
TSLX₅PVGPIQWFRGAGPARX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSEX₁₀
TX₁₁RENMDFSISISX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDTEX₁
6KSGAGTELSVRAKPS(SEQ ID NO: 22)，其中 X₁ 為 L、I 或 V；
X₂ 為 V、L 或 I；X₃ 為 A 或 V；X₄ 為 V、I 或 L；X₅ 為 I、T、
S 或 F；X₆ 為 E、V 或 L；X₇ 為 K 或 R；X₈ 為 E 或 Q；X₉ 為 H、
P 或 R；X₁₀ 為 S、T 或 G；X₁₁ 為 K 或 R；X₁₂ 為 N、A、C、D、 S

E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y；
X₁₃ 為 P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、
S、T、V、W 或 Y；X₁₄ 為 V 或 I；X₁₅ 為 F、L 或 V；X₁₆ 為 F
或 V。

【0024】於一些實施例，SIRP- α 變體構築物中之該 SIRP- α
變體之序列為：EEEX₁QX₂IQPDKSVLVAAGETX₃TLRCTX₄
TSLX₅PVGPIQWFRGAGPARX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSEX₁₀
TX₁₁RENMDFSISISX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDTEX₁
6KSGAGTELSVRAKPS(SEQ ID NO: 20)，其中 X₁ 為 L、I 或 V；
X₂ 為 V、L 或 I；X₃ 為 A 或 V；X₄ 為 A、I 或 L；X₅ 為 I、T、
S 或 F；X₆ 為 E、V 或 L；X₇ 為 K 或 R；X₈ 為 E 或 Q；X₉ 為 H、
P 或 R；X₁₀ 為 S、T 或 G；X₁₁ 為 K 或 R；X₁₂ 為 N、A、C、D、
E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y；
X₁₃ 為 P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、
S、T、V、W 或 Y；X₁₄ 為 V 或 I；X₁₅ 為 F、L 或 V；X₁₆ 為 F
或 V。

【0025】於一些實施例，SIRP- α 變體構築物中之該 SIRP- α
變體之序列為：

EEX₁X₂QX₃IQPDKX₄VX₅VAAGEX₆X₇X₈LX₉CTX₁₀TSLX₁₁
PVGPIQWFRGAGPX₁₂RX₁₃LIYNQX₁₄X₁₅GX₁₆FPRVTTVSX₁₇X₁
8TX₁₉RX₂₀NMDFX₂₁IX₂₂IX₂₃X₂₄ITX₂₅ADAGTYCYCX₂₆KX₂₇RKG
SPDX₂₈X₂₉EX₃₀KSGAGTELSVRX₃₁KPS(SEQ ID NO: 23)，其中
X₁ 為 E 或 G；X₂ 為 L、I 或 V；X₃ 為 V、L，或 I；X₄ 為 S 或 F；
X₅ 為 L 或 S；X₆ 為 S 或 T；X₇ 為 A 或 V；X₈ 為 I 或 T；X₉ 為

H 或 R；X₁₀ 為 A、V、I 或 L；X₁₁ 為 I、T、S 或 F；X₁₂ 為 A 或 G；X₁₃ 為 E、V 或 L；X₁₄ 為 K 或 R；X₁₅ 為 E 或 Q；X₁₆ 為 H、P 或 R；X₁₇ 為 D 或 E；X₁₈ 為 S、L、T 或 G；X₁₉ 為 K 或 R；X₂₀ 為 E 或 N；X₂₁ 為 S 或 P；X₂₂ 為 S 或 R；X₂₃ 為 S 或 G；X₂₄ 為 N、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y；X₂₅ 為 P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W 或 Y；X₂₆ 為 V 或 I；X₂₇ 為 F、L、V；X₂₈ 為 D 或不存在；X₂₉ 為 T 或 V；X₃₀ 為 F 或 V；X₃₁ 為 A 或 G。

【0026】於一些實施例，SIRP- α 變體構築物之 SIRP- α 變體與 SEQ ID NO: 13-23 之任一序列有至少 80%(例如至少 85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99%)之序列同一性。

【0027】於一些實施例，SIRP- α 變體構築物之 SIRP- α 變體不包括 SEQ ID NO: 3-12 及 24-34 之任一序列。

【0028】於一些實施例，SIRP- α 變體構築物中之 SIRP- α 變體包括以組胺酸殘基取代之一或多個胺基酸殘基取代。於一些實施例，該以組胺酸殘基取代之一或多個胺基酸殘基取代位在以下一或多個胺基酸位置：29、30、31、32、33、34、35、52、53、54、66、67、68、69、74、93、96、97、98、100、4、6、27、36、39、47、48、49、50、57、60、72、74、76、92、94、103，對應於 SEQ ID NO: 3-12 之任一序列。

【0029】於一些實施例，該 SIRP- α 變體構築物對於在患病細胞或患病部位之 CD47 的結合親和性相對於非患病細胞為至

少 2 倍，至少 4 倍或至少 6 倍。

【0030】於一些實施例，該 SIRP- α 變體構築物在酸性 pH 下對於 CD47 之結合親和性相對於在中性 pH 下為至少 2 倍，至少 4 倍或至少 6 倍。

【0031】於一些實施例，該 SIRP- α 變體構築物在缺氧條件下對於 CD47 之結合親和性相對於在生理條件下為至少 2 倍，至少 4 倍或至少 6 倍。

【0032】於一些實施例，該患病細胞為患癌的癌細胞。

【0033】於一些實施例，該酸性 pH 介於約 4 至約 7。

【0034】於另一態樣，本發明係關於一核酸分子，其編碼為在此記載的 SIRP- α 變體構築物。

【0035】於另一態樣，本發明係關於一載體，其包括編碼為在此記載的之 SIRP- α 變體構築物的核酸分子。

【0036】於另一態樣，本發明關於一寄主細胞，其表現於在此記載的 SIRP- α 變體構築物，其中該寄主細胞包括編碼為在此記載的 SIRP- α 變體構築物之核酸分子或具有此核酸分子之載體，其中該核酸分子或載體在該寄主細胞中表現。

【0037】於另一態樣，本發明係關於在此記載的 SIRP- α 變體構築物之製備方法，其中該方法包括：a)提供一寄主細胞，其包括編碼為在此記載的 SIRP- α 變體構築物之核酸分子或具有該核酸分子之載體；b)於容許該 SIRP- α 變體構築物形成的條件下在該寄主細胞中表現該核酸分子或載體；及 c)回復(recover)該 SIRP- α 變體構築物。

【0038】於另一態樣，本發明係關於一種醫藥組合物，包

括具有治療有效量的在此記載之 SIRP- α 變體構築物。於一些實施例，該醫藥組合物包括一或多種醫藥上可接受之載具(carrier)或賦形劑。

【0039】於另一態樣，本發明關於一種增加受試者之標靶細胞的吞噬作用之方法，包括對受試者投予在此記載的 SIRP- α 變體構築物或含有治療有效量的 SIRP- α 變體構築物之醫藥組合物。於一些實施例，該標靶細胞為癌細胞。

【0040】於另一態樣，本發明係關於一種消除受試者之調節性 T 細胞之方法，包括：對該受試者投予在此記載的 SIRP- α 變體構築物或含有治療有效量的在此記載之 SIRP- α 變體構築物的醫藥組合物。

【0041】於另一態樣，本發明係關於殺死癌細胞之方法，該方法包括使該癌細胞接觸在此記載的 SIRP- α 變體構築物或該含有治療有效量的 SIRP- α 變體構築物之醫藥組合物。

【0042】於另一態樣，本發明係關於治療一受試者其與 SIRP- α 及/或 CD47 活性相關之疾病的方法，該方法包括對該受試者投予治療有效量之在此記載的 SIRP- α 變體構築物或含有治療有效量的在此記載之 SIRP- α 變體構築物的醫藥組合物。

【0043】於另一態樣，本發明係關於治療受試者其與 SIRP- α 及/或 CD47 活性關連之疾病的方法，該方法包括：(a) 決定該受試者的 SIRP- α 之胺基酸序列；及(b)對該受試者投予治療有效量的在此記載之 SIRP- α 變體構築物；其中 SIRP- α 變體構築物之 SIRP- α 變體與該受試者之 SIRP- α 具有相同的胺基酸序列。

【0044】於另一態樣，本發明係關於治療一受試者其與 SIRP- α 及/或 CD47 活性相關之疾病的方法，該方法包括：(a) 決定該受試者的 SIRP- α 之胺基酸序列；(b)對該受試者投予治療有效量的在此記載之 SIRP- α 變體構築物；其中 SIRP- α 變體構築物之 SIRP- α 變體在該受試者中具有最小的免疫原性 (immunogenicity)。

【0045】於另一態樣，本發明係關於一種治療受試者其與 SIRP- α 及/或 CD47 活性有關之疾病的方法，該方法包括：對該受試者投予在此記載的 SIRP- α 變體構築物，其中該 SIRP- α 變體構築物會優先結合於患病細胞或患病部位上之 CD47 而不是非患病細胞上之 CD47。

【0046】於一些實施例，該疾病為癌。於一些實施例，該癌選自於：固體腫瘤癌、血液性癌、急性骨髓性白血病、慢性淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴細胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、多發性骨髓瘤、膀胱癌、胰腺癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、肺癌、支氣管癌、肝癌、卵巢癌、結腸和直腸癌、胃癌、胃癌、膽囊癌、胃腸道間質腫瘤癌、甲狀腺癌、頭和頸癌、口咽癌、食道癌、黑色素瘤、非黑色素瘤皮膚癌、默克爾細胞癌、病毒誘導的癌症、神經母細胞瘤、乳癌、前列腺癌、腎癌、腎細胞癌、腎盂癌、白血病、淋巴瘤、肉瘤、神經膠質瘤、腦腫瘤及肝癌。於一些實施例，該癌為固體腫瘤癌。於一些實施例，該癌為血液性癌。

【0047】於一些實施例，該疾病為免疫疾病。於一些實施例，該免疫疾病為自體免疫疾病或發炎性疾病。於一些實施

例，該自體免疫疾病或發炎性疾病為：多發性硬化症、類風濕關節炎、脊柱關節病、全身性紅斑狼瘡、抗體中介之發炎性或自體免疫疾病、移植物抗宿主病、膿毒症、糖尿病、牛皮癬、動脈粥樣硬化、Sjogren 氏綜合症、進行性全身性硬化症、硬皮病、急性冠狀動脈症候群、缺血再灌注、克羅恩病、子宮內膜異位症、腎小球腎炎、重症肌無力、特發性肺纖維化、哮喘、急性呼吸窘迫症候群（ARDS）、血管炎或發炎性自體免疫肌炎。

【0048】於另一態樣，本發明係關於增加一受試者之造血幹細胞植入(hematopoietic stem cell engraftment)之方法，包括：藉由對該受試者投予在此記載之 SIRP- α 變體或含有治療有效量的在此記載之 SIRP- α 變體之醫藥組合物，以調控該受試者中 SIRP- α 與 CD47 之交互作用。

【0049】於另一態樣，本發明係關於改變一受試者之免疫反應(response)之方法，包括：對該受試者投予在此記載的 SIRP- α 變體構築物或含有治療有效量的在此記載之 SIRP- α 變體構築物的醫藥組合物，從而改變該受試者之免疫反應。於一些實施例，該免疫反應包括抑制該免疫反應。

【0050】於一些實施例，受試者為哺乳動物，較佳為人。

【0051】定義

在此使用的用語“患病的細胞”及“患病的組織”係指例如癌細胞及組織。具體而言，該癌可為固體腫瘤癌或血液性癌。例如，若該癌為固體腫瘤癌，該患病的細胞為固體腫瘤的細胞。患病的細胞通常生活在患病部位之特定條件下，例如酸性 s

pH 與缺氧。“患病的細胞”與“患病的組織”常會和其他疾病相關，包括但不限於癌。“患病的細胞”與“患病的組織”也可和免疫疾病或失調、關連心血管疾病或失調、代謝疾病或失調或增殖性疾病或失調關連。免疫失調包括發炎性疾病或失調及自體免疫疾病或失調。

【0052】在此使用的用語“非患病的細胞”係指身體正常、健康的細胞。非患病的細胞通常生活在生理條件，例如中性 pH 及充足的氧濃度，以維持細胞的正常代謝及調節性功能。

【0053】在此使用的用語“患病的部位”係指接近體內患病處的位置或區域。例如，若該疾病為位在肝的固體腫瘤癌，則患病的部位為肝中接近腫瘤的部位和區域。患病的部位之細胞可包括患病的細胞以及在該患病的部位支持該疾病的細胞。例如，若該患病的部位為腫瘤部位，則在腫瘤部位之細胞包括患病的細胞(例如癌細胞)及在該腫瘤部位支持腫瘤生長的細胞。同樣地，用語“癌部位”係指體內的癌之位置。

【0054】在此使用的用語“SIRP- α D1 分域”或“D1 分域”係指 SIRP- α 之膜末端及胞外分域。該 SIRP- α D1 分域位在全長、野生型 SIRP- α 的 N-端且間接結合至 CD47。D1 分域之胺基酸序列顯示於表 1。

【0055】在此使用的用語“SIRP- α D2 分域”或“D2 分域”係指 SIRP- α 之第二胞外分域。該 SIRP- α D2 分域包括全長、野生型 SIRP- α 其約胺基酸 119 至 220。

【0056】在此使用的用語“SIRP- α D3 分域”或“D3 分域”係指 SIRP- α 之第三胞外分域。該 SIRP- α D3 分域包括全長、野

生型 SIRP- α 其約胺基酸 221 至 320。

【0057】在此使用的用語“SIRP- α 多肽”係指野生型 SIRP- α 及 SIRP- α 變體，各用語在此分別定義及記載。

【0058】在此使用的用語“SIRP- α 變體(variant)”係指含有 SIRP- α D1 分域或全長 SIRP- α 之 CD47 結合部分的多肽。於一些實施例，該 SIRP- α 變體與 SEQ ID NO: 3-12 及 24-34 中任一序列具有至少 80%(例如至少 85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%)之序列同一性。於一些實施例，相較於野生型 SIRP- α ，SIRP- α 變體對於 CD47 具有更高之親和性。於一些實施例，SIRP- α 變體包括部分野生型人類 SIRP- α (較佳為野生型 SIRP- α 之 CD47 結合部分)及/或具有一或多個胺基酸取代。例如，SIRP- α 變體相對於野生型 SIRP- α 可能含有一或多個(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 等，最多 20)胺基酸殘基之取代。例如，SIRP- α 變體可能含有以組胺酸取代之一或多個(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 等，最多 20)胺基酸殘基取代。於一些實施例，SIRP- α 變體與野生型人類 SIRP- α 或在此記載的任一 SIRP- α 變體(例如野生型人類 SIRP- α 之 CD47 結合部分之序列)之序列具有至少 80%(例如至少 85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%)的胺基酸序列同一性。野生型 SIRP- α 之 CD47 結合部分包括野生型 SIRP- α 之 D1 分域(SEQ ID NO: 3-12 中任一序列)。

【0059】在此使用的用語“SIRP- α 變體構築物(variant construct)”係指一多肽，其含有，附著於例如阻斷胜肽、Fc 分

域單元體、HAS、白蛋白結合胜肽、聚合物、抗體結合胜肽、抗體的 SIRP- α 變體。於一些實施例，SIRP- α 變體構築物在患病的部位具有優先的活性。於一些實施例，SIRP- α 變體構築物在患病的部位有優先的活性，且包括 SIRP- α 變體，其部分與野生型人類 SIRP- α 或在此記載之任一 SIRP- α 變體之序列(例如與野生型人類 SIRP- α 之 CD47 結合部分之序列)具有至少 80%(例如至少 85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%)的胺基酸序列同一性。

【0060】在此使用的用語“同一性百分比(% identity)”係指諸如 SIRP- α 變體的候選序列(candidate sequence)之胺基酸(或核酸)殘基，其相同於諸如野生型人類 SIRP- α 或其 CD47 結合部分的參考序列之胺基酸(或核酸)殘基；若有需要，在排列序列並導入缺口(gaps)之後可達成最大的同一性百分比(即，可對候選和參考序列其中之一或二者導入缺口以供最佳排列，且爲了比較之目的，可忽略非同源序列)。爲了達成決定同一性百分比之排列目的可利用該技術領域中已知的多種方式，例如，使用諸如 BLAST、ALIGN 或 Megalign(DNASTAR)軟體等公開可取得之電腦軟體。該技術領域中有通常知識者可決定適當的參數以供測量排列，包括任意演算法，其須達到超過待比對之全長序列的最大排列。於一些實施例，給定的候選序列相比(to)、以及(with)或相對(against)於給定的參考序列之胺基酸(或核酸)序列同一性百分比(或也可說成：給定的候選序列相比、以及或相對於給定的參考序列具有或包括特定的胺基酸(或核酸)序列同一性百分比)可依以下方式計算：

100 x (A/B 之比例)

其中，A 代表在候選序列與參考序列之排列中被評定為相同之胺基酸(或核酸)殘基數，B 代表在參考序列中胺基酸(或核酸)殘基之總數。於一些實施例，若候選序列長度與參考序列長度不相等，則候選序列對參考序列之胺基酸(或核酸)序列同一性百分比可能不等於參考序列對候選序列之胺基酸(或核酸)序列同一性百分比。

【0061】於特定實施例，為了與候選序列比較而排列之參考序列可顯示：候選序列在候選序列之全長或選定的鄰近部分之胺基酸(或核酸)殘基中呈現 50%至 100%的同一性。用以比較而排列之候選序列長度為參考序列長度之至少 30%，例如至少 40%，例如至少 50%，60%，70%，80%，90%或 100%。若候選序列之位置和相對應之參考序列之位置被相同胺基酸(或核酸)殘基佔據，則該位置具有相同的分子。

【0062】在此使用的用語“腫瘤關連蛋白酶(tumor-associated protease)”或“腫瘤酵素(tumor enzyme)”係指諸如蛋白酶的酵素，其於諸如固體腫瘤癌的癌中之存在水平增加。於一些實施例，該腫瘤關連蛋白酶可裂解可裂解的連結子。

【0063】在此使用的用語“阻斷胜肽(blocking peptide)”係指可結合於 SIRP- α 變體並阻斷或“遮蔽”SIRP- α 變體之 CD47 結合部分的胜肽。於 SIRP- α 變體構築物中，該阻斷胜肽可藉由可選擇性裂解之連結子及可選的一或多個分隔子來附著於 SIRP- α 變體。阻斷胜肽可藉由非共價鍵來偶合(couple)至 SIRP- α 變體，並在患病的部位或患病的細胞處被裂解。於一些

電穿孔、磷酸鈣沉澱、直接微注射等)。寄主細胞可為原核細胞，例如細菌細胞或諸如哺乳動物細胞的真核細胞(例如 CHO 細胞)。如在此所述，寄主細胞被用來表現一或更多 SIRP- α 變體構築物。

【0073】在此使用的用語“醫藥組合物 (pharmaceutical composition)”係指一種醫學或藥學配方，包括有效成分及賦形劑並稀釋使有效成分能夠適合於投藥的方法。本發明之醫藥組合物包括與 SIRP- α 變體構築物相容之醫藥上可接受的成分。該醫藥組合物可為口服投予之錠劑或膠囊，或靜脈或皮下投予之水性劑型。

【0074】在此使用的用語“和 SIRP- α 及/或 CD47 活性關連疾病”係指由 SIRP- α 及/或 CD47 活性所導致及/或與其相關之任何疾病症或失調。例如，由 SIRP- α 及/或 CD47 活性所導致及/或與其增加及/或減少相關之疾病或失調。與 SIRP- α 及/或 CD47 活性關連之疾病的實例包括但不限於癌及免疫疾病(例如自體免疫疾病及發炎性疾病)。

【0075】在此使用的用語“治療有效量 (therapeutically effective amount)”係指本發明之 SIRP- α 變體構築物或含有本發明 SIRP- α 變體構築物之醫藥組合物的量，其在治療具有諸如癌(例如固體腫瘤或血液性癌)的疾病之患者時能有效地達到期望的療效。具體而言，SIRP- α 變體構築物之治療有效量可避免不利的副作用。

【0076】在此使用的用語“最佳親和性 (optimized affinity)”或“最佳結合親和性 (optimized binding affinity)”係指 SIRP- α

變體與 CD47 間之結合交互作用的最佳強度。於一些實施例，該 SIRP- α 變體構築物主要對於患病部位(即癌細胞)之細胞上的 CD47 結合或以較高親和性結合，且對於非患病部位(即非癌細胞)之細胞上的 CD47 基本上不結合或以較低親和性結合。最佳化 SIRP- α 變體與 CD47 間之結合親和性使得交互作用不會導致臨床相關的毒性。於一些實施例，爲了達成 SIRP- α 變體與 CD47 間之最佳結合親和性，可發展 SIRP- α 變體使其較最大可達到之對 CD47 的結合親和性具有更低之親和性。

【0077】在此使用的用語“免疫原性(immunogenicity)”係指蛋白質(例如治療蛋白質)其在寄主中被視爲外來抗原而造成免疫反應的性質。蛋白質之免疫原性可在活體外(in vitro)以各種不同方式分析，特別係藉由活體外 T 細胞增殖分析(見例如 Jawa et al., *Clinical Immunology* 149:534-555, 2013)，其中有些分析爲市面上可得(見例如 Proimmune 提供的免疫原性分析服務)。

【0078】在此使用的用語“最小免疫原性(minimal immunogenicity)”係指蛋白質(例如治療蛋白質)之免疫原性，其可被修飾(即胺基酸取代)以使其較導入胺基酸之前具有更低的免疫原性(例如至少低 10%、25%、50%或 100%)。蛋白質(例如治療蛋白質)被修飾成具有最小之免疫原性，係指即便爲外來抗原也不會或極少造成寄主產生免疫反應。

【0079】在此使用的用語“最佳藥物動力學(optimized pharmacokinetics)”係指一般和蛋白質之藥物動力學有關之參數被改善及修飾以產生供活體外及/或活體內(in vivo)使用的 s

相對於 SEQ ID NO: 18 之胺基酸取代	X ₁ =L·I·V; X ₂ =V·L·I; X ₃ =A·V; X ₄ =A·I·L; X ₅ =I·T·S·F; X ₆ =E·V·L; X ₇ =K·R; X ₈ =E·Q; X ₉ =H·P·R; X ₁₀ =L·T·G; X ₁₁ =K·R; X ₁₂ =N·A·C·D·E·F·G·H·I·K·L·M·P·Q·R·S·T·V·W·Y; X ₁₃ =P·A·C·D·E·F·G·H·I·K·L·M·N·Q·R·S·T·V·W·Y; X ₁₄ =V·I; X ₁₅ =F·L·V; X ₁₆ =F·V
D1 分域 v7 (SEQ ID NO: 19)	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVSVAAGESX ₃ ILHCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRGAGPARX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSEX ₁₀ TX ₁₁ RENMDFSISISX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYYCX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDTEX ₁₆ KSGAGTELSVRGKPS
相對於 SEQ ID NO: 19 之胺基酸取代	X ₁ =L·I·V; X ₂ =V·L·I; X ₃ =A·V; X ₄ =V·I·L; X ₅ =I·T·S·F; X ₆ =E·V·L; X ₇ =K·R; X ₈ =E·Q; X ₉ =H·P·R; X ₁₀ =S·T·G; X ₁₁ =K·R; X ₁₂ =N·A·C·D·E·F·G·H·I·K·L·M·P·Q·R·S·T·V·W·Y; X ₁₃ =P·A·C·D·E·F·G·H·I·K·L·M·N·Q·R·S·T·V·W·Y; X ₁₄ =V·I; X ₁₅ =F·L·V; X ₁₆ =F·V
D1 分域 v8 (SEQ ID NO: 20)	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVLVAAGETX ₃ TLRCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRGAGPARX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSEX ₁₀ TX ₁₁ RENMDFSISISX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYYCX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDTEX ₁₆ KSGAGTELSVRKPS
相對於 SEQ ID NO: 20 之胺基酸取代	X ₁ =L·I·V; X ₂ =V·L·I; X ₃ =A·V; X ₄ =A·I·L; X ₅ =I·T·S·F; X ₆ =E·V·L; X ₇ =K·R; X ₈ =E·Q; X ₉ =H·P·R; X ₁₀ =S·T·G; X ₁₁ =K·R; X ₁₂ =N·A·C·D·E·F·G·H·I·K·L·M·P·Q·R·S·T·V·W·Y; X ₁₃ =P·A·C·D·E·F·G·H·I·K·L·M·N·Q·R·S·T·V·W·Y; X ₁₄ =V·I; X ₁₅ =F·L·V; X ₁₆ =F·V
D1 分域 v9 (SEQ ID NO: 21)	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVLVAAGETX ₃ TLRCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRGAGPGRX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSDX ₁₀ TX ₁₁ RNNMDFSIRISX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYYCX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDDEX ₁₆ KSGAGTELSVRKPS
相對於 SEQ ID NO: 21 之胺基酸取代	X ₁ =L·I·V; X ₂ =V·L·I; X ₃ =A·V; X ₄ =A·I·L; X ₅ =I·T·S·F; X ₆ =E·V·L; X ₇ =K·R; X ₈ =E·Q; X ₉ =H·P·R; X ₁₀ =L·T·G; X ₁₁ =K·R; X ₁₂ =N·A·C·D·E·F·G·H·I·K·L·M·P·Q·R·S·T·V·W·Y; X ₁₃ =P·A·C·D·E·F·G·H·I·K·L·M·N·Q·R·S·T·V·W·Y; X ₁₄ =V·I; X ₁₅ =F·L·V; X ₁₆ =F·V
D1 分域 v10 (SEQ ID NO: 22)	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVSVAAGESX ₃ ILHCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRGAGPARX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSEX ₁₀ TX ₁₁ RENMDFSISISX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYYCX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDTEX ₁₆ KSGAGTELSVRKPS
相對於 SEQ ID NO: 22 之胺基酸取代	X ₁ =L·I·V; X ₂ =V·L·I; X ₃ =A·V; X ₄ =V·I·L; X ₅ =I·T·S·F; X ₆ =E·V·L; X ₇ =K·R; X ₈ =E·Q; X ₉ =H·P·R; X ₁₀ =S·T·G; X ₁₁ =K·R; X ₁₂ =N·A·C·D·E·F·G·H·I·K·L·M·P·Q·R·S·T·V·W·Y; X ₁₃ =P·A·C·D·E·F·G·H·I·K·L·M·N·Q·R·S·T·V·W·Y; X ₁₄ =V·I; X ₁₅ =F·L·V; X ₁₆ =F·V
Pan D1 分域 (SEQ ID NO: 23)	EEX ₁ X ₂ QX ₃ IQPDKX ₄ VX ₅ VAAGEX ₆ X ₇ X ₈ LX ₉ CTX ₁₀ TSLX ₁₁ PVGPIQWFRGAGPX ₁₂ RX ₁₃ LIYNQX ₁₄ X ₁₅ GX ₁₆ FPRVTTVSX ₁₇ X ₁₈ TX ₁₉ RX ₂₀ NMDFX ₂₁ IX ₂₂ IX ₂₃ X ₂₄ ITX ₂₅ ADAGTYYCX ₂₆ KX ₂₇ RKGSPDX ₂₈ X ₂₉ EX ₃₀ KSGAGTELSVRX ₃₁ KPS

相對於 SEQ ID NO: 23 之胺基酸 取代	X ₁ =E·G; X ₂ =L·I·V; X ₃ =V·L·I; X ₄ =S·F; X ₅ =L·S; X ₆ =S·T; X ₇ =A·V; X ₈ =I·T; X ₉ =H·R; X ₁₀ =A·V·I·L; X ₁₁ =I·T·S·F; X ₁₂ =A·G; X ₁₃ =E·V·L; X ₁₄ =K·R; X ₁₅ =E·Q; X ₁₆ =H·P·R; X ₁₇ =D·E; X ₁₈ =S·L·T·G; X ₁₉ =K·R; X ₂₀ =E·N; X ₂₁ =S·P; X ₂₂ =S·R; X ₂₃ =S·G; X ₂₄ =N·A·C·D·E·F·G·H·I·K·L·M·P·Q·R·S·T·V·W·Y; X ₂₅ =P·A·C·D·E·F·G·H·I·K·L·M·N·Q·R·S·T·V·W·Y; X ₂₆ =V·I; X ₂₇ =F·L·V; X ₂₈ =D 或不存在; X ₂₉ =T·V; X ₃₀ =F·V; 及 X ₃₁ =A·G
---------------------------------	--

【0088】 表 3. SEQ ID NO: 24-34

SEQ ID NO	序列
24	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQ REGHFPRVTTVSETTRRENMDFSISISNITPADAGTYICVKFRKGSPDTEVK SGAGTELSVRAKPS
25	EEEVQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTLTSLIPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ RQGHFPRVTTVSEGTRRENMDFSISISNITPADAGTYICIKFRKGSPDTEFK SGAGTELSVRAKPS
26	EEEVQIIQPDKSVSVAAGESVILHCTITSLTPVGPIQWFRGAGPARLLIYNQ REGPFPRVTTVSETTRRENMDFSISISNITPADAGTYICVKLRKGSPDTEFK SGAGTELSVRAKPS
27	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLSPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ RQGFPRVTTVSEGTKRENMDFSISISNITPADAGTYICIKLRKGSPDTEFK SGAGTELSVRAKPS
28	EEEIQVIQPDKSVSVAAGESVIIHCTVTSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ RQGRFPRVTTVSEGTKRENMDFSISISNITPADAGTYICVKVRKGSPDTEVK SGAGTELSVRAKPS
29	EEEVQIIQPDKSVSVAAGESIILHCTVTSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ REGRFPRVTTVSEGTRRENMDFSISISNITPADAGTYICIKLRKGSPDTEFK SGAGTELSVRAKPS
30	EEEVQLIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ REGPFPRVTTVSEGTKRENMDFSISISNITPADAGTYICIKFRKGSPDTEVK SGAGTELSVRAKPS
31	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYICIKFRKGSPDDVEF KSGAGTELSVRAKPS
32	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARLLIYNQ RQGFPRVTTVSETTKRENMDFSISISNITPADAGTYICVKFRKGSPDTEFK SGAGTELSVRAKPS
33	EEEVQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ KQGFPRVTTISETTRRENMDFSISISNITPADAGTYICIKFRKGSPDTEFK SGAGTELSVRAKPS
34	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLTPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ RQGFPRVTTVSEGTRRENMDFSISISNITPADAGTYICIKFRKGSPDTEVK SGAGTELSVRAKPS

【0089】 理想地，該本發明之 SIRP-α 變體構築物在諸如癌

部位的患病部位(例如腫瘤內)之特性條件下對 CD47 之親和性高於在生理條件下(例如中性 pH 及充足氧濃度)。諸如癌部位的患病部位(例如腫瘤內)之特性條件為例如酸性 pH 及缺氧。於一些實施例，本發明之 SIRP- α 變體構築物可設計成優先結合於患病的細胞而非患病的細胞。具體而言，該患病的細胞可為癌疾病之癌細胞，例如固體腫瘤或血液性癌。較佳地，該 SIRP- α 變體構築物對 CD47 之親和性在酸性 pH(例如低於約 pH 7)高於中性 pH，例如 pH 7.4。較佳地，該 SIRP- α 變體構築物對 CD47 之親和性在缺氧條件高於充足氧濃度之條件。於一些實施例，SIRP- α 變體構築物包括附於阻斷胜肽之 SIRP- α 變體。於一些實施例，可藉由使用可裂解的連結子將該阻斷胜肽附著於該 SIRP- α 變體，使得該 SIRP- α 變體構築物之該 SIRP- α 變體可優先結合至患病細胞或患病部位上的 CD47，其中該可裂解的連結子在該患病的細胞或患病的部位會被裂解。於一些實施例，可藉由附著該阻斷胜肽於該 SIRP- α 變體，使得該 SIRP- α 變體構築物之該 SIRP- α 變體優先結合至患病細胞或患病部位上的 CD47，其中於該患病的細胞或患病的部位之該阻斷胜肽可從該 SIRP- α 變體脫離或簡單地解離。

【0090】於一些實施例，SIRP- α 變體構築物包括 SIRP- α 變體與阻斷胜肽。於一些實施例，SIRP- α 變體可經由連結子(例如可裂解的連結子)而附著於阻斷胜肽。該阻斷胜肽之功用為阻斷該 SIRP- α 變體之 CD47 結合部位以防止 SIRP- α 變體在生理條件下(例如中性 pH 與充足氧濃度)結合於 CD47。該可裂解的連結子為只能在患病的部位(例如癌部位，例如腫瘤內)之特

性條件下被裂解之連結子，例如在酸性 pH 與缺氧下。於一些實施例，該可裂解的連結子在患病的部位被腫瘤關連蛋白酶裂解。於一些實施例，該連結子在患病的部位未被裂解而只是該阻斷胜肽簡單地從患病部位的該 SIRP- α 變體解離，以使該 SIRP- α 變體可自由地結合至鄰近患病細胞(例如腫瘤細胞)上的 CD47。因此，只有當在患病的部位，該 SIRP- α 變體才會從阻斷胜肽中釋放且能自由地結合至鄰近患病細胞(例如癌細胞)上的 CD47。之後將對阻斷胜肽與連結子(例如可裂解的連結子)做進一步的詳述。

【0091】於一些實施例，SIRP- α 變體構築物包括 SIRP- α 變體及靶向結構。於一些實施例，SIRP- α 變體可附著於諸如抗體的靶向結構(例如腫瘤專一性抗體)或其他的蛋白質或胜肽(例如能對患病的細胞顯示其結合親和性之抗體結合胜肽)。在投予後，該腫瘤專一性抗體或抗體結合胜肽作為靶向結構以將該 SIRP- α 變體帶到諸如癌部位的患病部位(例如固體腫瘤內)，於此處該 SIRP- α 能與患病細胞上的 CD47 專一性地交互作用。於一些實施例，SIRP- α 變體可融合至蛋白質或胜肽，例如能結合於抗體(例如腫瘤專一性抗體)之抗體結合胜肽，即結合於該抗體之不變區或可變區。能夠與一或更多抗體結合之 SIRP- α 變體將於後做進一步詳述。於其他實施例，其他的 SIRP- α 變體，例如 International Publication No. WO2013109752(在此引入作為參考)所記載，其可附於腫瘤專一性抗體或蛋白質或胜肽，例如能結合於腫瘤專一性抗體之抗體結合胜肽。於一些實施例，該 SIRP- α 變體可於活體外(於對人類投予前)或於活體內

5

(投予後)附於該抗體。

【0092】於一些實施例，SIRP- α 變體可更包括野生型人類 SIRP- α 之 D2 及/或 D3 分域。於一些實施例，SIRP- α 變體可附著於 Fc 分域單元體、人類血清白蛋白(HSA)、血清結合蛋白質或胜肽或諸如聚合物(例如聚乙二醇(PEG))的有機分子，以便改善該 SIRP- α 變體之藥物動力學性質，例如增加半衰期。作用為增加本發明之 SIRP- α 變體之血清半衰期的 Fc 分域單元體、HSA 蛋白質、血清結合蛋白質或胜肽及諸如 PEG 的有機分子將於後做進一步詳述。於一些實施例，SIRP- α 變體不包括 SEQ ID NO:3-12 與 24-34 中任一序列。

【0093】II. SIRP- α 變體中之以組胺酸殘基取代之胺基酸取代

於一些實施例，除了表 2 列出之 SIRP- α 變體中之胺基酸取代，該 SIRP- α 變體可包括以組胺酸殘基取代之一或更多胺基酸取代。包括 SIRP- α 變體之該 SIRP- α 變體構築物在患病的細胞或患病的部位比起在非患病的細胞對 CD47 具有較高之親和性，且在患病的部位之特性條件下(例如酸性 pH，缺氧)比在生理條件下具有較高之親和性。欲以組胺酸殘基取代之胺基酸殘基可利用組胺酸掃描突變法、蛋白質晶體結構及模擬設計與模型建立法來鑑別(identify)。可用在產生 SIRP- α 變體之技術與方法及用來決定其在患病與非患病細胞上與 CD47 的結合親和性之方法將於後做進一步詳述。組胺酸殘基取代可位在 SIRP- α 變體與 CD47 之交界，或位在 SIRP- α 變體之內部區域。較佳地，組胺酸殘基取代位在 SIRP- α 變體與 CD47 之交界。

表 4 列出可以用組胺酸殘基取代之特定 SIRP- α 胺基酸。表 4 之胺基酸號碼係相對於 SEQ ID NO: 3 之序列；SEQ ID NO: 4-12 中任一序列之對應位置的一或更多胺基酸也可被取代為組胺酸殘基。接觸殘基係指位在 SIRP- α 變體與 CD47 交界的胺基酸。核心殘基係指未直接涉及 SIRP- α 變體與 CD47 間之結合的內部胺基酸。該 SIRP- α 變體可包括一或更多(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 等或全部)表 4 列出之取代。該 SIRP- α 變體可包括最多 20 個組胺酸取代。

【0094】表 4. SIRP- α 胺基酸取代(胺基酸編號係相對於 SEQ ID NO: 3 之序列)

接觸殘基	S29H, L30H, I31H, P32H, V33H, G34H, P35H, Q52H, K53H, E54H, L66H, T67H, K68H, R69H, F74H, K93H, K96H, G97H, S98H, D100H
核心殘基	L4H, V6H, A27H, I36H, F39H, E47H, L48H, I49H, Y50H, F57H, V60H, M72H, F74H, I76H, V92H, F94H, E103H

【0095】III. pH 依存性(pH-dependent)結合

研究顯示腫瘤細胞媒介的致癌代謝會產生大量乳酸和質子，造成腫瘤組織中胞外 pH 值降至 6 之低(Icard et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1826:423-433, 2012)。於一些實施例，設計(engineer)包括 SIRP- α 變體之該 SIRP- α 變體構築物使其在酸性 pH 比起在中性 pH(例如約 pH 7.4)對 CD47 有較高親和性。因此，設計本發明之 SIRP- α 變體構築物使其選擇性地結合至患病細胞(例如癌細胞)或患病部位之細胞(例如在支持腫瘤生長之腫瘤微環境中的細胞)上的 CD47 而不是非患病細胞上之 CD47。

【0096】於一實施例，為了設計本發明之 SIRP- α 變體構築

物的 pH 依存性結合，可對該 SIRP- α 變體實行組胺酸突變，特別是在與 CD47 交互作用的 SIRP- α 之區域。可使用 SIRP- α 與 CD47 複合體(見例如 PDB ID No. 2JJS)之晶體結構及電腦模型使 SIRP- α 與 CD47 之三維結合部位可視化(visualize)。對於設計具有 pH 敏感性結合特性的蛋白質之有用的電腦設計與模型化方法在文獻已為習知，並記載於例如 Strauch et al., *Proc Natl Acad Sci* 111:675-80, 2014，在此將其全文引入作為參考。於一些實施例，可使用電腦模擬來鑑別 SIRP- α 與 CD47 之交界的關鍵接觸殘基。可使用能取得之蛋白質設計軟體(例如 RosettaDesign)將被鑑別出的關鍵接觸殘基以組胺酸殘基取代，其可產生各種蛋白質設計，且可基於計算出的結合能量及外觀互補性來最佳化、過濾及排序。因此，可使用電腦設計方法來鑑別特定胺基酸位置上其能量上有利之組胺酸取代。也可使用電腦模擬以預測 SIRP- α 之三維結構的改變。可避免 SIRP- α 之三維結構中會產生明顯改變的組胺酸取代。

【0097】一旦鑑別出能量上及結構上最佳的胺基酸取代，可將此等胺基酸系統性地取代為組胺酸殘基。於一些實施例，可將 SIRP- α 之一或更多(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 等，最大為 20)胺基酸取代成組胺酸殘基。具體而言，可以將位在 SIRP- α 與 CD47 交界處的胺基酸，較佳為直接涉及於 SIRP- α 與 CD47 之結合的胺基酸取代成組胺酸殘基。該 SIRP- α 變體可包括一或更多(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 等，最多為 20)組胺酸殘基取代。於其他實施例，可將 SIRP- α 之自然存在的組胺酸殘基取代成其他的胺基酸殘基。於其他的

實施例，可以將 SIRP- α 之一或更多胺基酸取代成非組胺酸殘基，以影響自然存在或被取代的組胺酸殘基與 CD47 之結合。例如，將圍繞自然存在之組胺酸殘基的氨基酸取代成其他的胺基酸可能會“掩藏(bury)”此自然存在之組胺酸殘基。於一些實施例，亦可將未直接涉及與 CD47 結合之胺基酸(即內部胺基酸，例如位在 SIRP- α 之核心之胺基酸)取代為組胺酸殘基。表 4 列出可以取代成組胺酸或非組胺酸殘基的特定 SIRP- α 胺基酸。接觸殘基係位在 SIRP- α 與 CD47 之交界的胺基酸。核心殘基為未直接涉及 SIRP- α 與 CD47 之結合的內部胺基酸。該 SIRP- α 變體可包括一或更多(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 等或全部)表 4 列出之取代。

【0100】可以於不同的 pH 條件(例如 pH 5、5.5、6、6.5、7、7.4、8)測試包括一或更多(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 等，最多數目為 20)組胺酸殘基取代之 SIRP- α 變體其對 CD47 之結合。於一些實施例，可使用純化的 CD47 蛋白質來測試結合。可使用本技術領域中具有通常知識者已知的各種技術以在不同的 pH 條件下(例如 pH 5、5.5、6、6.5、7、7.4、8)測量 SIRP- α 變體/CD47 複合體之親和性常數(K_A)或解離常數(K_D)。於較佳的實施例中，可使用表面電漿共振(surface plasmon resonance)(例如 Biacore 3000™ surface plasmon resonance (SPR) system, Biacore, INC, Piscataway N.J.)來決定 SIRP- α 變體對 CD47 之結合親和性。於一例示性實施例，在 pH 6 較在 pH 7.4 對 CD47 具有較高專一性親和性之具有 pH 依存性結合的 SIRP- α 變體，其在 pH 6 較在 pH 7.4 呈現較低的 s

K_D。

【0101】 IV. 缺氧依存性(Hypoxia-dependent)結合

腫瘤缺氧係指癌細胞的氧氣被剝奪的狀態。隨著腫瘤生長，其血液供給會持續地重新導向腫瘤生長最快的部分，而使腫瘤部分的氧濃度明顯低於健康的組織。

【0102】 於一些實施例，可以將 SIRP- α 變體附著於缺氧-活化(hypoxia-activated)的前驅藥，其作用為增加 SIRP-alpha 變體在特定缺氧條件下對抗相關疾病的細胞之功效。缺氧-活化的前驅物在諸如 Kling 等人 (*Nature Biotechnology*, 30:381,2012)的文獻中為已知，在此將引入作為參考。

【0103】 V. 抗體結合

另一種提供選擇性 SIRP- α 活性於患病的部位而非非患病的部位之策略係將該 SIRP- α 蛋白質附著於會結合抗體之區域的蛋白質或胜肽。較佳地，該抗體對諸如腫瘤細胞的患病細胞具有專一性。例如，該抗體可專一地結合於諸如腫瘤細胞的患病細胞上之細胞表面蛋白質。該 SIRP- α 蛋白質可以可逆或不可逆地結合於該抗體。

【0104】 一般抗體結合

於一些實施例，為了設計能夠結合於不同抗體而不管抗體專一性之 SIRP- α 蛋白質，可以將該 SIRP- α 蛋白質融合於會辨識抗體之不變區的蛋白質或胜肽，例如辨識抗體之 Fc 分域的 C_H2 或 C_H3 不變分域。SIRP- α 蛋白質能結合於 CD47 並對野生型 SIRP- α 的序列(例如變體 1(SEQ ID NO: 1，如下所示))或野生型 SIRP- α 之 CD47 結合部分的序列(例如表 1 列出之 SEQ ID

NO: 3-12 之任一序列)具有至少 50%的胺基酸序列同一性。

SEQ ID NO: 1

```
1 MEPAGPAPGR LGPLLCLLLA ASCAWSGVAG EEELQVIQPD KSVLVAAGET ATLRCTATSL
61 IPVGPIQWFR GAGPGRELIY NQKEGHFPRV TTVSDLTKRN NMDFSIRIGN ITPADAGTY
121 CVKFRKGS PD DVEFKSGAGT ELSVRAKPSA PVVSGPAARA TPQHTVSFTC ESHGFSPRDI
181 TLKWFKNGNE LSDFQTNVDP VGESVSYSIH STAKVVL TRE DVHSQVICEV AHVTLQGDPL
241 RGTANLSETI RVPPTLEVTQ QPVRANQVN VTCQVRKFYP QRLQLTWLEN GNVSR TETAS
301 TVTENKDGTY NWMSWLLVNV SAHRDDVKLT CQVEHDGQPA VSKSHDLKVS AHPKEQGSNT
361 AAENTGSNER NIYIVVGVC TLLVALLMAA LYLVRIRQKK AQGSTSSTRL HEPEKNAREI
421 TQDTNDITYA DLNLPKGKKP APQAAEPNNH TEYASIQTSP QPASEDTLTY ADLDMVHLNR
481 TPKQPAPKPE PSFSEYASVQ VPRK
```

【0105】野生型 SIRP- α 之 CD47 結合部分包括野生型 SIRP- α 之 D1 分域(例如表 1 列出之 SEQ ID NO: 3-12 之任一序列)。對抗體不變區呈一般結合的蛋白質與胜肽在該技術領域為已知。例如，諸如蛋白質 A、G 及 L 的細菌性抗體結合蛋白質會結合於抗體之不變區。蛋白質 A 與 G 結合至該 Fc 分域，而蛋白質 L 結合至輕鏈之不變區。於一例示性實施例，蛋白質 A、G 或 L 可融合至 SIRP- α 蛋白質之 N-或 C 端。較佳地，於此實施例，可以將蛋白質 A、G 或 L 及 SIRP- α 蛋白質之融合蛋白質(fusion protein)在投予前經由化學接合使其附著於抗體，以防止該融合蛋白質在血清中結合於其他的各種抗體。也可使用此領域習知的技術(即，導向的發展(evolution)及展示庫)來開發及篩選蛋白質 A、G 或 L，以使其對抗體不變區具有更高之結合親和性。於一些實施例，可使用該技術領域習知的基因或化學接合技術直接將 SIRP- α 蛋白質附著於抗體。於其他實施例，也可利用分隔子將 SIRP- α 蛋白質附著於抗體，其容許該蛋白質有額外的結構及空間上的可撓性(flexibility)。在此將進一步詳述各種分隔子。於一些實施例，該 SIRP- α 蛋白質可以可逆或非可逆地直接或經由抗體-結合蛋白質或胜肽而結

5

合於該抗體。再者，可利用於本發明實施例之經過修飾的抗體之篩選可依如美國專利公開號 US 20100189651 所記載之方式實施。

【0106】能結合於抗體不變區之其他蛋白質或胜肽以及篩選蛋白質或胜肽之方法，記載於美國專利公開號 US20120283408，在此將其全文引入作為參考。

【0107】專一性抗體結合

於一些實施例，為了提供選擇性靶向 SIRP- α 變體於患病的部位並設計 SIRP- α 變體使其能夠結合於諸如腫瘤專一性抗體的特定抗體，該 SIRP- α 變體構築物可包括 SIRP- α 變體及抗體專一性蛋白質或胜肽。該 SIRP- α 變體可融合於抗體專一性蛋白質或胜肽(例如抗體結合胜肽)。較佳地，該蛋白質或胜肽專一性地結合於腫瘤專一性抗體。於一些實施例，該 SIRP- α 變體與該抗體結合蛋白質或胜肽的融合蛋白質可以於組合療法中與腫瘤專一性抗體共同投予。於其他實施例，該融合蛋白質與該腫瘤專一性抗體可以分開投予(即，彼此間隔數小時內)，較佳為先投予該抗體。於其他的實施例，在投予前先使用該技術領域習知的基因或化學方法將融合蛋白質共價地附著於該腫瘤專一性抗體。

【0108】抗體結合胜肽的實例包括患病的局部化胜肽(DLP)(SEQ ID NO: 64 或 65)，其係能結合於 Cetuximab 之片段抗原結合(Fab)區之中心的小胜肽(見例如 Donaldson et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: 17456-17461, 2013)。Cetuximab 為抗上皮生長因子受體(EGFR)IgG1 抗體。可融合於 SIRP- α 變體之

【0110】於一些實施例，包括 SIRP- α 變體與 DLP 之 SIRP- α 變體構築物可以進一步與在此記載之 CD47 系阻斷胜肽組合，以使構築物在到達該患病的部位之前阻斷構築物中該 SIRP- α 變體之結合，可裂解的連結子可能於該患病的部位裂解。於這些實施例，當包括 SIRP- α 變體、CD47 系阻斷胜肽及 DLP 之該 SIRP- α 變體構築物在該患病的部位累積時，治療窗 (therapeutic window) 可以擴張，且其在只在連結子被蛋白酶 (例如腫瘤專一性蛋白酶) 誘發後或於該患病部位之其他特徵 (例如酸性 pH，缺氧) 下會具有活性。

【0111】於一些實施例，有能力結合於腫瘤專一性抗體之蛋白質或胜肽可使用該技術領域習知的技術來鑑別，例如導向的發展及展示庫 (例如噬菌體展示庫)。鑑別有能力結合於腫瘤專一性抗體之方法和技術為該技術領域所習知，例如 Donaldson 等 (*Proc Natl Acad Sci* 110:17456-61, 2013) 所記載，在此將引入其全文作為參考。於噬菌體展示庫，有潛力的抗體專一性蛋白質或胜肽通常會共價連結在細菌噬菌體包覆蛋白質。此連結是由於編碼為融合於該包覆蛋白質之蛋白質或胜肽的核酸轉譯。呈現該胜肽之細菌噬菌體可使用標準的噬菌體製備方法來生長及收集，例如從生長培養基進行 PEG 沉澱。這些呈現的噬菌體可於之後用其他諸如腫瘤專一性抗體的蛋白質來篩選以檢測該呈現的蛋白質與該腫瘤專一性抗體之間的交互作用。一旦鑑別出腫瘤專一性蛋白質或胜肽，可於放大後將該編碼為選出之腫瘤專一性蛋白質或胜肽的核酸從被選出之噬菌體或噬菌體本身所感染的細胞中分離。可挑取個別的菌

落或溶菌斑(plaques)且可分離出核酸並定序。當鑑別及分離出該抗體-專一性蛋白質或胜肽後，可將該蛋白質或胜肽融合於 SIRP- α 變體之 N-或 C 端。於一些實施例，可以使用該技術領域習知的基因或化學接合技術將 SIRP- α 變體直接附著到腫瘤專一性抗體。於其他實施例，可將 SIRP- α 變體利用分隔子附著於腫瘤專一性抗體，此分隔子能容許該蛋白質有更多結構及空間上的可撓性。之後將進一步詳述各種分隔子。於一些實施例，該 SIRP- α 變體可直接或經由抗體結合蛋白質或胜肽以可逆或不可逆地結合於該抗體。

【0112】於其他實施例，野生型 SIRP- α 或野生型 SIRP- α 之胞外 D1 分域(例如表 1 列出之 SEQ ID NO: 3-12 中之任一序列)可附著於腫瘤專一性抗體。較佳地，SIRP- α 之 D1 分域附著於該腫瘤專一性抗體。該腫瘤專一性抗體作為靶向結構以將野生型 SIRP- α 或該 D1 分域帶到諸如癌部位的患病部位(例如固體腫瘤內)，其中該野生型 SIRP- α 或該 D1 分域能與患病細胞上的 CD47 交互作用。於一些實施例，野生型 SIRP- α 或該野生型 SIRP- α 之胞外 D1 分域能使用該技術領域習知的基因或化學接合技術而直接附著於腫瘤專一性抗體。於其他實施例，野生型 SIRP- α 或該野生型 SIRP- α 之胞外 D1 分域可藉由分隔子附著於腫瘤專一性抗體，分隔子能容許該蛋白質有更多的結構及空間可撓性。以下將進一步詳述各種分隔子。於其他實施例，野生型 SIRP- α 或該野生型 SIRP- α 之胞外 D1 分域可融合於能結合於腫瘤專一性抗體之前述蛋白質或胜肽。於其他實施例，諸如國際公開號 WO2013109752(在此引入作為參考)所述 5

之其他 SIRP- α 多肽可附著於腫瘤專一性抗體或能結合於腫瘤專一性抗體之蛋白質或胜肽。於一些實施例，該野生型 SIRP- α 或該 D1 分域可直接或經由抗體結合蛋白質或胜肽以可逆或不可逆地結合於該抗體。

【0113】 VI. 阻斷胜肽

阻斷胜肽可藉由可裂解的連結子附著於 SIRP- α 變體。於一些實施例，阻斷胜肽也可非共價地附著於 SIRP- α 變體。該阻斷胜肽之作用為阻斷該 SIRP- α 變體之 CD47 結合部位，以使得該 SIRP- α 變體在生理條件下(例如中性 pH 及充足氧濃度)無法結合於非患病細胞之細胞表面上的 CD47。在諸如癌部位的患病部位(例如腫瘤內)之異常條件下(即，在酸性及/或缺氧環境或蛋白酶表現增加之環境)，該可裂解的連結子可被裂解以將該 SIRP- α 變體從該阻斷胜肽釋出。該 SIRP- α 變體便能自由地接合鄰近癌細胞上的 CD47。以下將進一步詳述可裂解的連結子之實例。

【0114】於一些實施例，該阻斷胜肽對野生型 SIRP- α 較對設計後的 SIRP- α 變體具有更高之親和性。一旦連結子被裂解，阻斷胜肽從該 SIRP- α 變體中解離且可結合於野生型 SIRP- α 。對野生型 SIRP- α 及 SIRP- α 變體具有不同結合親和性的阻斷胜肽可使用該技術領域中一般的方法及技術來鑑別，例如導向的發展及展示庫(例如噬菌體或酵母菌庫)。於一例示性實施例，可將編碼為該 SIRP- α 之 CD47 結合區之核苷酸或編碼為抗 SIRP- α 抗體可變區之核苷酸使用諸如錯誤傾向(error-prone)PCR 與 DNA 曳步(shuffling)的技術加以突變及/或隨機重組以創造

基因變體的大型資料庫。一旦製作出基因庫，核苷酸編碼之突變胜肽可使用諸如噬菌體或酵母菌呈現來篩選其結合於野生型 SIRP- α 及 SIRP- α 變體的能力。可將被鑑別出能結合至野生型 SIRP- α 及 SIRP- α 變體的胜肽進行第二次篩選處理，以分離出對野生型 SIRP- α 較對 SIRP- α 變體具有較高親和性的蛋白質。一旦該被鑑別出的胜肽結合於野生型 SIRP- α 或 SIRP- α 變體，會防止 CD47 結合於野生型 SIRP- α 或 SIRP- α 變體。可使用各種該技術領域中具有通常知識者已知的各種技術來測量 SIRP- α 變體/阻斷胜肽複合體或野生型 SIRP- α /阻斷胜肽複合體之親和性常數 (K_A) 或解離常數 (K_D)。阻斷胜肽對野生型 SIRP- α 較對 SIRP- α 變體具有高出至少 3 倍的親和性。

【0115】CD47 系阻斷胜肽

阻斷胜肽可為能結合於在此記載之 SIRP- α 變體的 CD47 模擬多肽或 CD47 片段。有些阻斷胜肽可結合至 SIRP- α 變體其不同於 CD47 結合部位的位置。有些阻斷胜肽能以不同於 CD47 結合位置的方式結合至 SIRP- α 變體。在一些情況下，該阻斷胜肽可包含至少一個安定的雙硫鍵。阻斷胜肽可包含 CERVIGTGWVRC 之多肽序列或其片段或變體。變體阻斷胜肽可包括一或更多保守 (conservative) 或非保守的修飾。在一些情況下，變體阻斷胜肽可包括將半胱胺酸修飾為絲胺酸及/或將一或更多天冬醯胺酸修飾為麩醯胺酸。阻斷胜肽可結合至 SIRP- α 變體其相同於包含 CERVIGTGWVRC 之多肽序列或其變體或片段之胜肽的同一位置。阻斷胜肽可包含 GNYTCEVTELTREGETIIEIK 之多肽序列或其片段或變體。阻斷胜肽可結合至 SIRP- α 變體其相同於包含 S

GNYTCEVTELTREGETIIEELK 之多肽序列或其變體或片段之多肽的同一位置。在一些情況下，阻斷胜肽可包含 EVTELTREGE 之多肽序列或其片段或變體。阻斷胜肽可結合至 SIRP- α 變體其相同於包含 EVTELTREGE 之多肽序列或其變體或片段之胜肽的同一位置。在一些情況下，阻斷胜肽可包含 CEVTELTREGECEC 之多肽序列或其片段或變體。阻斷胜肽可結合至 SIRP- α 變體其相同於包含 CEVTELTREGECEC 之多肽序列或其變體或片段之胜肽的同一位置。

【0116】在此提供一 SIRP- α 變體構築物，其包含 SIRP- α 變體及阻斷胜肽，其中該阻斷胜肽可包含 SEVTELTREGET 之多肽序列或其片段或變體。阻斷胜肽可結合至 SIRP- α 變體其相同於包含 SEVTELTREGET 之多肽序列或其變體或片段之胜肽的同一位置。在一些情況下，該阻斷胜肽可包含 GQYTSEVTELTREGETIIEELK 之多肽序列或其片段或變體。阻斷胜肽可結合至 SIRP- α 變體其相同於包含 GQYTSEVTELTREGETIIEELK 之多肽序列或其變體或片段之胜肽的同一位置。

【0117】在一些情況下，該阻斷胜肽可為 CD47 變體多肽，其對野生型 SIRP- α 較對 SIRP- α 變體顯示較高之親和性。相較於野生型 CD47，該阻斷多肽可包含至少一種下列之突變：T102Q、T102H、L101Q、L101H，及 L101Y。相較於野生型 CD47，該阻斷多肽可包括在 N 端或接近 N 端處導入額外的甘胺酸殘基。可導入甘胺酸於 CD47 的 N 端或接近 N 端處之臨近麩醯胺酸及/或白胺酸的位置。在一些情況下，阻斷胜肽可為 CD47 變體多肽，其相較於野生型 CD47 對 SIRP- α 變體具有較

低之親和性。此類 CD47 變體多肽可輕易地使用在此記載的方法來鑑別及測試。

【0118】在此提供之 SIRP- α 變體構築物包括在此記載之 SIRP- α 變體，其中該 SIRP- α 變體利用至少一個連結子連接至在此記載之阻斷胜肽。該 SIRP- α 變體可包括如同於野生型 SIRP- α 之相同 CD47 結合部位。該 SIRP- α 變體相較於野生型 SIRP- α 可包含一或更多突變或插入。該 SIRP- α 變體可為野生型 SIRP- α 之截短形。該阻斷胜肽可為在此記載之 CD47 模擬物、變體或片段。相較於該 SIRP- α 變體構築物之 SIRP- α 變體，該阻斷胜肽對野生型 SIRP- α 顯示較高之親和性。該阻斷胜肽可為 CD47 變體多肽，其對 SIRP- α 變體較對野生型 CD47 具有較低之親和性。該連結子可為至少一個連結子，其選擇性地被一或更多蛋白酶裂解並選擇性地包含一或更多分隔子。該可裂解的連結子可包含序列 LSGRSDNH。該分隔子可包含一或更多甘胺酸-絲胺酸分隔子單元，其各單元可包含序列 GGGGS。

【0119】於一些實施例，藉由可裂解的連結子附著於 SIRP- α 變體之該阻斷胜肽為衍生自 CD47 之 SIRP- α -結合胜肽(即，CD47 系阻斷胜肽)。於一些實施例，該 CD47 系阻斷胜肽係衍生自 CD47 之 SIRP- α 結合部分。CD47 的 SIRP- α 結合部分經常被稱為 CD47 之免疫球蛋白超家族(IgSF)分域，其序列顯示於下方(SEQ ID NO: 35; Ref. NP_0017681)。

SEQ ID NO: 35: 野生型，人類 CD47 之 IgSF 分域

1-50 QLLFNKTKSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF
51-100 DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SQLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE
101-123 LTREGETIIE LKYRVVSWFS PNE

5

【0120】於一些實施例，該 CD47 系阻斷胜肽包括 CD47(SEQ ID NO: 35)之全長、IgSF 分域或其片段。於一些實施例，該 CD47 系阻斷胜肽相對於野生型 CD47 的 IgSF 分域(SEQ ID NO: 35)或其片段，包括一或更多的胺基酸取代，刪除及/或加成。於一些實施例，CD47 系阻斷胜肽和野生型 CD47 之 IgSF 分域(SEQ ID NO: 35)或其片段之序列具有至少 80%(例如 83%、86%、90%、93%、96%等)的胺基酸序列同一性。

【0121】於一些實施例，CD47 系阻斷胜肽中之胺基酸取代、刪除及/或加成造成 CD47 系阻斷胜肽對 SIRP- α 變體具有較低之結合親和性且對野生型 SIRP- α 具有相對較高之結合親和性。於一些實施例，CD47 系阻斷胜肽中之胺基酸取代位在 CD47 與 SIRP- α 之交界。例如，CD47 的 IgSF 分域之胺基酸取代 T102Q 與 SIRP- α 變體之胺基酸取代 A27I 在空間上產生衝突，而具有 A27 之野生型 SIRP- α 與胺基酸取代 T102Q 在空間上沒有衝突(見第 2 圖)。因此，相較於對具有 A27I 之 SIRP- α 變體，具有 T102Q 之 CD47 系阻斷胜肽對具有 A27 之野生型 SIRP- α 具有較高之結合親和性。CD47 系阻斷胜肽中可能會和 SIRP- α 變體之特定胺基酸產生空間上衝突的胺基酸取代之實例列於表 5。CD47 系阻斷胜肽中的每個此類胺基酸取代可能會減小 CD47 系阻斷胜肽對 SIRP- α 變體之結合親和性，取決於該 SIRP- α 變體在該 SIRP- α -CD47 交界處的特定胺基酸。

【0122】表 5：CD47 系阻斷胜肽中可能與 SIRP- α 變體之特定胺基酸產生空間上衝突的胺基酸取代之實例

CD47 系阻斷胜肽中之胺基酸取代 (胺基酸號係相對於 SEQ ID NO: 35)	SIRP- α 變體中之胺基酸 (胺基酸號係相對於 SEQ ID NO: 13-23 中任一者)
T102Q	27I
T102H	27I
L101Q	31F
L101H	31F
L101Y	31F

【0123】除了在 CD47 系阻斷胜肽與 SIRP- α 變體之間產生空間上衝突之外，也可使用胺基酸取代、加成及/或刪除來破壞 CD47 系阻斷胜肽與 SIRP- α 變體間的特定非共價交互作用，以減少 CD47 系阻斷胜肽對該 SIRP- α 變體之結合親和性。於一些實施例，藉由一或更多胺基酸(例如一個胺基酸)、或直接增加一或更多胺基酸到 N 端及/或插入一或更多胺基酸於 N 端之其他胺基酸之間來延長 CD47 系阻斷胜肽之 N 端，會破壞 CD47 系阻斷胜肽之 N 端與 SIRP- α 變體之間的非共價交互作用(例如氫鍵交互作用)。例如，於 CD47 系阻斷胜肽 N 端之諸如甘胺酸加成的胺基酸加成，將會阻止麩醯胺酸在 N 端環化成焦麩胺酸鹽，並且會產生不期望之接觸及交互作用，其可能會破壞 CD47 系阻斷胜肽之 N-端焦麩胺酸鹽與野生型 SIRP- α 之胺基酸 L66 或 SIRP- α 變體之胺基酸取代 L66T 之間的氫鍵交互作用(亦見實施例 5)。於一些實施例，諸如甘胺酸的胺基酸殘基係加成在 CD47 系阻斷胜肽之 N 端，以使 CD47 之 N 端從 QLLFNK 轉變為 GQLLFNK 或 QGLLFNK。CD47 系阻斷胜肽之胺基酸取代、刪除及/或加成之選擇係取決於 SIRP- α 變體之特定胺基酸取代。

【0124】此外，將 CD47 系阻斷胜肽之 N 端經由可裂解的

5

連結子及可選的一或更多分隔子融合於 SIRP- α 變體之 C 端亦會影響 CD47 系阻斷胜肽與該 SIRP- α 變體間之結合交互作用，並減低 CD47 系阻斷胜肽對該 SIRP- α 變體的結合親和性。於一些實施例，SIRP- α 變體構築物中，CD47 系阻斷胜肽之 N 端係藉由可裂解的連結子及可選的一或更多分隔子融合於 SIRP- α 變體之 C 端。於一些實施例，SIRP- α 變體構築物中，CD47 系阻斷胜肽之 C 端藉由可裂解的連結子及可選的一或更多分隔子融合於 SIRP- α 變體之 N 端。以下將進一步詳述可裂解的連結子及分隔子。

【0125】CD47 系阻斷胜肽之顯示於表 6。於一些實施例，該 CD47 系阻斷胜肽具有或包括序列 SEVTELTREGET(SEQ ID NO: 38)。於一些實施例，該 CD47 系阻斷胜肽具有或包括序列 GQYTSEVTELTREGETIIE LK(SEQ ID NO: 40)。

表 6

SEQ ID NO	CD47 系阻斷胜肽	CD47 IgSF 分域之部分
36	EVTELTREGE	SEQ ID NO: 35 之胺基酸 97-106
37	CEVTELTREGE C	SEQ ID NO: 35 之胺基酸 96-107，帶有 T125C
38	SEVTELTREGET	SEQ ID NO: 35 之胺基酸 96-107，帶有 C96S
39	GNYTCEVTELTREGETIIE LK	SEQ ID NO: 35 之胺基酸 92-112
40	GQYTSEVTELTREGETIIE LK	SEQ ID NO: 35 之胺基酸 92-112，帶有 N93Q 與 C96S
41	QLLFNKTKSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SQLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE Q TREGETIIE LKYRVVSWFS PNE	CD47 IgSF 分域，帶有 L101Q

SEQ ID NO	CD47 系阻斷胜肽	CD47 IgSF 分域之部分
42	QLLFNKTKSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SQLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE YTREGETIIE LKYRVVSWFS PNE	CD47 IgSF 分域，帶有 L101Y
43	QLLFNKTKSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SQLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE HTREGETIIE LKYRVVSWFS PNE	CD47 IgSF 分域，帶有 L101H
44	QLLFNKTKSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SQLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE LQREGETIIE LKYRVVSWFS PNE	CD47 IgSF 分域，帶有 T102Q
45	QLLFNKTKSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SQLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE LHREGETIIE LKYRVVSWFS PNE	CD47 IgSF 分域，帶有 T102H
46	GQLLFNKTKSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SQLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE LTREGETIIE LKYRVVSWFS PNE	CD47 IgSF 分域，N 端附加甘胺酸

【0126】 VII. 可裂解的連結子

於一些實施例，SIRP- α 變體構築物包括附於阻斷胜肽之 SIRP- α 變體。於一些實施例，SIRP- α 變體構築物包括附於阻斷胜肽之野生型 SIRP- α 。用於融合 SIRP- α 變體或野生型 SIRP- α 與阻斷胜肽之連結子可為可裂解的連結子或非可裂解的連結子。於一些實施例，可藉由使用可裂解的連結子附著該阻斷胜肽到該 SIRP- α 變體，使得 SIRP- α 變體構築物中之 SIRP- α 變體優先結合至患病細胞或患病部位上之 CD47，該可裂解的連結子會在該患病的細胞或患病的部位被裂解。

【0127】於一些實施例，使用可裂解的連結子於 SIRP- α 變體與阻斷胜肽之間。於一些實施例，可設置可裂解的連結子於阻斷胜肽之中，其能與 SIRP- α 變體非共價地連繫以阻斷生理條件下 SIRP- α 變體對 CD47 之結合。可裂解的連結子能在特 s

定條件下被裂解。若可裂解的連結子位在阻斷胜肽中，則連結子之裂解會使該阻斷胜肽失活。在諸如癌部位(例如腫瘤內)的患病部位之特性條件下，連結子會被裂解以將該 SIRP- α 變體從該阻斷胜肽中釋放，使得該 SIRP- α 變體能結合於鄰近諸如癌細胞的患病細胞其細胞表面上的 CD47。在這種方式下，在包括 SIRP- α 變體與阻斷胜肽之 SIRP- α 構築物中，SIRP- α 變體只能結合於患病細胞(例如癌細胞)或患病部位細胞(例如於腫瘤微環境下支持腫瘤生長之細胞)上之 CD47，且無法在生理條件下結合於非患病細胞上之 CD47，原因是可裂解的連結子在生理條件會保持安定，且該阻斷胜肽會阻斷 SIRP- α 變體之 CD47-結合部位。可裂解的連結子可包括胺基酸、有機小分子或胺基酸與有機小分子的組合，其能在患病部位諸如酸性 pH、缺氧及蛋白酶表現增加之特性條件下，裂解或誘導連結子之裂解。可裂解的連結子在生理條件下(例如中性 pH 及充足氧濃度)為安定。於一些實施例，可裂解的連結子並不會裂解，且阻斷胜肽在患病的部位可簡單地從該 SIRP- α 變體中解離，使得 SIRP- α 變體自由地結合至鄰近諸如癌細胞的患病細胞，上之 CD47。於這些實施例，該 SIRP- α 變體可設計成對 CD47 有 pH 依存性結合，其細節已於前方描述。可設計該 SIRP- α 變體使其在患病部位之酸性 pH 下較在非患病部位之中性 pH(例如約 pH 7.4)下對 CD47 具有較高之親和性。因此，該阻斷胜肽(例如 CD-47 系阻斷胜肽或 CD47 IgSF 分域阻斷蛋白質)可在患病部位之酸性 pH 下從 SIRP- α 變體中解離出來。於一些實施例，為了設計 tSIRP- α 變體對 CD47 其在患病部位之 pH 依存

性結合，可實行組胺酸突變於該 SIRP- α ，特別是實行於 SIRP- α 與 CD47 交互作用的區域。

【0128】*pH* 依存性可裂解的連結子

諸如腫瘤內的癌部位之特性之一為酸性 *pH*。於一些實施例，連結子會於酸性 *pH*(例如低於約 *pH* 7)下裂解。酸敏感性連結子在生理 *pH*(例如約 *pH* 7.4)下係為安定。在酸性 *pH* 下之裂解可藉由酸水解或藉由在存在蛋白質且諸如癌部位的患病部位，(例如腫瘤內)之酸性 *pH* 的情況下活化。酸敏感性連結子可包括諸如能在酸性 *pH* 下水解的化學官能基或化合物之結構。酸敏感性化學官能基及化合物包括但不限於例如：縮醛、縮酮、硫順丁烯二酸醯胺鹽(thiomaleamate)、胺及雙硫鍵。酸敏感性連結子以及可用在構築酸敏感性連結子之酸敏感性化學基及化合物係該技術領域所習知，且記載於美國專利號 8,748,399、5,306,809，及 5,505,931、Laurent 等人(*Bioconjugate Chem.* 21:5-13,2010)、Castaneda 等人(*Chem. Commun.* 49:8187-8189,2013)、Ducry 等人(*Bioconjug. Chem.* 21:5-13,2010)，在此分別引入其全文作為參考。於一實施例，可使用肽合成器及/或習知的化學合成技術於可裂解的連結子中置入雙硫鍵。於其他實施例，可使用硫順丁烯二酸醯胺酸連結子(Castaneda et al. *Chem. Commun.* 49:8187-8189,2013)作為可裂解的連結子。於此實施例，為了將硫順丁烯二酸醯胺酸連結子插入 SIRP- α 變體與肽之間，可將硫順丁烯二酸醯胺酸連結子的兩個硫醇基之一(見例如圖示 2，Castaneda 等人)附著於 SIRP- α 變體之 C 端，而將硫順丁烯二酸醯胺酸連結子之酯基附著於該

5

阻斷胜肽之 N 端。將於此引入參考出版品的完整內容作為參考。

【0129】 缺氧依存性可裂解的連結子

於一些實施例，連結子可於缺氧條件下裂解，其為諸如腫瘤內的癌部位之另一特性。藉由缺氧敏感性連結子附著於阻斷胜肽之 SIRP- α 變體會防止其結合於非患病的細胞之 CD47，該連結子在生理條件(例如中性 pH 及充足氧濃度)下為安定。一旦融合蛋白質位在諸如腫瘤內的癌部位，此處的氧濃度明顯低於健康組織，則該連結子會被裂解以將該 SIRP- α 變體從該阻斷胜肽中釋放，使其能進而結合於癌細胞的細胞表面上之 CD47。該缺氧敏感性連結子可包括諸如胺基酸或能在缺氧條件下裂解的化學官能基之結構。可在缺氧條件下被裂解(即可藉由還原而裂解)的化學結構之一些實例包括但不限於：醌、N-氧化物及雜芳香族硝基。可使用傳統的化學及胜肽合成技術以將這些化學結構置於可裂解的連結子中。缺氧敏感性胺基酸之實例為該技術領域所習知，例如 Shigenaga 等人(*European Journal of Chemical Biology* 13:968-971,2012)所記載，在此引入其全文作為參考。

【0130】 於較佳實施例，可將 Shigenaga 等人(*European J. Chem, Biol.* 13:968-971,2012)記載之缺氧敏感性胺基酸插入 SIRP- α 變體與阻斷胜肽之間。例如，該缺氧敏感性胺基酸之胺基可藉由胜肽鍵附著於該 SIRP- α 變體之 C 端，同樣地，該缺氧敏感性胺基酸之羧酸基可藉由胜肽鍵附著於該阻斷胜肽之 N 端。於缺氧條件下，硝基的還原會誘發該缺氧敏感性胺基酸

與該阻斷胜肽 N 端之間的胜肽鍵之裂解，因此能成功地將該 SIRP- α 變體從該阻斷胜肽中釋出。該 SIRP- α 變體可結合於癌細胞上之 CD47。

【0131】於另一實施例，可將 Duan 等人(*J. Med. Chem.* 51:2412-2420,2008)記載之缺氧敏感性 2-硝基咪唑基插入到 SIRP- α 變體與阻斷胜肽之間，或置入已插入到 SIRP- α 變體與阻斷胜肽間之可裂解的連結子內。於缺氧條件下，硝基之還原會誘發進一步的還原，最終導致 2-硝基咪唑基從其諸如 SIRP- α 變體、阻斷胜肽或可裂解的連結子之附著體中消失。

【0132】*腫瘤關連酵素依存性可裂解的連結子*

於其他實施例，SIRP- α 變體構築物可包括 SIRP- α 變體，其藉由連結子(例如可裂解的連結子)及可選的一或更多分隔子(分隔子之實例將於後進一步詳述)附著於阻斷胜肽。於一些實施例，該連結子(例如可裂解的連結子)可被腫瘤關連酵素裂解。於一些實施例，可被腫瘤關連酵素裂解的連結子可被包括在阻斷胜肽中，該阻斷胜肽可非共價地附於 SIRP- α 變體。一旦融合蛋白質位在諸如腫瘤內的癌部位，則該連結子會被腫瘤關連酵素裂解，以將該 SIRP- α 變體從該阻斷胜肽中釋出，接著其可結合於癌細胞之細胞表面上之 CD47。對於連結子敏感的腫瘤關連酵素可包括諸如蛋白質受質的結構，其可專一性地被諸如蛋白酶的酵素裂解，其只存在於諸如的癌部位。該結構可依酵素類型選擇，例如存在於諸如腫瘤內的癌部位之蛋白酶。可被腫瘤關連酵素裂解之例示性可裂解的連結子為 LSGRSDNH(SEQ ID NO: 47)，其可被多種蛋白酶裂解，例如

matriptase(MTSP1)、尿型胞漿素原活化因子(uPA)、legumain、PSA(也稱為 KLK3，激肽釋放素相關肽解酶-3)，基質金屬蛋白酶-2(MMP-2)、MMP9、人嗜中性彈性酶(HNE)，及蛋白酶3(Pr3)。亦可獲得其它容易被酵素(例如蛋白酶)裂解的可裂解連結子。除了上提及之蛋白酶，其它可裂解可裂解的連結子之酵素(例如蛋白酶)包括但不限於尿激酶、組織胞漿素原活化因子、胰蛋白酶、胞漿質及其它有蛋白分解活性的酵素。根據本發明之一些實施例，藉由容易被諸如尿激酶、組織胞漿素原活化因子、胞漿質或胰蛋白酶等具有蛋白分解活性之酵素所裂解的連結子(例如可裂解的連結子)，可將 SIRP- α 變體或野生型 SIRP- α 附著於阻斷胜肽。

【0133】於一些實施例，可藉由將數個序列依不同酵素優先性放在一起，以衍生並選擇可裂解的連結子之序列。數種有潛力的蛋白酶及其對應之蛋白酶部位的非限定實例顯示於表7。表7中，“-”代表任意胺基酸(即，任意自然存在的胺基酸)，大寫字母係指對該胺基酸具有強優先性，小寫字母係指對該胺基酸具有弱優先性，“/”係分隔胺基酸的位置以防有多於一種胺基酸在“/”鄰近位置的可能性。其他可裂解的序列包括但不限於來自人肝膠原蛋白(α 1(III)鏈之序列(例如 GPLGIAGI(SEQ ID NO: 100))、來自人肝膠原蛋白(α 1(III)鏈之序列(例如 GPLGIAGI))、來自人 PZP 之序列(例如 YGAGLG VV(SEQ ID NO: 101)；AGLG VVER(SEQ ID NO: 102)或 AGLGISST(SEQ ID NO: 103))，及其他自溶的序列(例如 VAQFVLTE(SEQ ID NO: 104)、AQFVLTEG(SEQ ID NO: 105)或 PVQPIGPQ(SEQ ID NO: 106))。

【0134】 表 7

蛋白酶	有潛力的蛋白酶部位
uPA:	L/S/G-/R--/S-/D/N/H(SEQ ID NO: 69); -/s/gs/Rk-/rv-/--/(SEQ ID NO: 70); SGR-SA(SEQ ID NO: 71)
Matriptase:	L/S/G-/R--/S-/D/N/H(SEQ ID NO: 72); r/--/Rk-/v-/g/(SEQ ID NO: 73); RQAR-VV(SEQ ID NO: 74); r/--/Rk/v-/g(SEQ ID NO: 75); /Kr/RKQ/gAS/RK/A(SEQ ID NO: 76)
Legumain:	L/S/G-/R--/S-/D/N/H(SEQ ID NO: 77); ---/--/N-/--/(SEQ ID NO: 78); AAN-L(SEQ ID NO: 79); ATN-L(SEQ ID NO: 80)
PSA	si/sq-/yqr s/s/--/(SEQ ID NO: 81); S/S/K/L/Q(SEQ ID NO: 82)
MMP2	-/p/--/li/--/(SEQ ID NO: 83)
MMP9	g/pa-/gl-/g/(SEQ ID NO: 84); G/P/L/G/I/A/G/Q(SEQ ID NO: 85); P/V/G/L/I/G(SEQ ID NO: 86); H/P/V/G/L/L/A/R(SEQ ID NO: 87)
HNE	--/--viat/--/--/(SEQ ID NO: 88)
Pr3	-/y/y/vta --/--/(SEQ ID NO: 89)
尿激酶原	PRFKIIGG(SEQ ID NO: 90); PRFRIIGG(SEQ ID NO: 91)
TGFβ	SSRHRRALD(SEQ ID NO: 92)
胞漿素原	RKSSIIIRMRDVVL(SEQ ID NO: 93)
葡萄球菌激酶 (Staphylokinase)	SSSFDKGKYKKGDDA(SEQ ID NO: 94); SSSFDKGKYKRGDDA(SEQ ID NO: 95)
Xa 因子	IEGR; IDGR(SEQ ID NO: 96); GGSIDGR(SEQ ID NO: 97)
明膠酶	PLGLWA(SEQ ID NO: 98)
人纖維母細胞膠原 蛋白酶	DVAQFVLT(SEQ ID NO: 99)

【0135】 文獻中有報導指出在諸如固體腫瘤的的各種癌症類型中，中，具有已知受質的酵素水平增加。請參見例如 La Rocca et al.,*Brit. J. Cancer* 90:1414-1421 及 Ducry et al., *Bioconjug. Chem.* 21:5-13,2010，將於此引入其全文作為參考。亦可使用該技術領域習知的傳統技術來鑑別腫瘤關連酵素，例如癌細胞之免疫組織化學技術。於一例示性實施例，連結子中之酵素敏感性結構可為基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)受質，其可被存在於諸如腫瘤內的癌部位之 MMP 裂解。於另一例示性實施例，連結子中之該酵素敏感性結構可為含馬來醯亞胺基之二胜肽連結子(見例如 Ducry et al.之表 1)，其可藉由存在於特定腫瘤中水平增加之蛋白酶(例如細胞自溶酵素

5

(cathepsin)或胞漿質)的蛋白分解作用而裂解(Koblinski et al., *Chim. Acta* 291:113-135,2000)。於此實施例，該含馬來醯亞胺基之二胜肽連結子(maleimido-containing dipeptide linker)之馬來醯亞胺基可接合於(conjugate to)該 SIRP- α 變體之半胱胺酸殘基，且該含馬來醯亞胺基之二胜肽連結子 C 端之羧酸基可接合於該阻斷胜肽 N 端之胺基。同樣地，該含馬來醯亞胺基之二胜肽連結子的馬來醯亞胺基可接合於該阻斷胜肽的半胱胺酸殘基，且該含馬來醯亞胺基之二胜肽連結子 C 端之羧基可接合於該 SIRP- α 變體 N 端之胺基。可使用質譜及其他在蛋白質體學領域可得之技術以確認該腫瘤關連酵素依存性的可裂解連結子之裂解。其他酵素敏感性結構記載於美國專利號 8,399,219，在此引入其全文作為參考。於一些實施例，可藉由該技術領域習知的傳統分子細胞生物學及化學接合技術將諸如蛋白質受質的腫瘤關連酵素敏感之結構插入到 SIRP- α 變體與阻斷胜肽之間。

【0136】 VIII. 血清白蛋白

融合於血清白蛋白能改善蛋白質醫藥之藥物動力學，特別是在此記載之 SIRP- α 變體可與血清白蛋白連接。血清白蛋白為球蛋白，其為哺乳動物最多的血液蛋白質。血清白蛋白係於肝生產且佔約一半的血清蛋白質。其為單元體且可溶於血液。血清白蛋白一些最關鍵的功能包括運送荷爾蒙、脂肪酸及其他體內的蛋白質、緩衝 pH，以及維持在血管及體組織間適當分配體液所需之滲透壓。於一些實施例，SIRP- α 變體可融合於血清白蛋白。於較佳實施例，血清白蛋白為人類血清白蛋白

(HSA)。於本發明之一些實施例，將 HSA 之 N 端連接於該 SIRP- α 變體之 C 端以增加該 SIRP- α 變體之血清半衰期。HAS 可直接或經由連結子連接到該 SIRP- α 變體之 C 端。連接 HSA 之 N 端到該 SIRP- α 變體之 C 端可維持該 SIRP- α 變體之 N 端自由地與 CD47 交互作用，且 HAS 端之近端可與 FcRn 交互作用。可使用在此處記載之方法與組合物之 HAS 為該技術領域一般所習知。於一些實施例，該 HSA 包括 UniProt ID NO: P02768 之序列之胺基酸 25-609 (SEQ ID NO: 67)。於一些實施例，該 HAS 相對於 SEQ ID NO: 67 包括一或更多胺基酸取代(例如 C34S 及/或 K573P)。於一些實施例，該 HSA 有 SEQ ID NO: 68 之序列。

【0137】 IX. 白蛋白結合胜肽

結合於血清蛋白質能改善蛋白質醫藥之藥物動力學，特別是在此記載之該 SIRP- α 變體可與血清蛋白質結合胜肽或蛋白質融合。於一些實施例，SIRP- α 變體可融合至對血清白蛋白呈現結合活性的白蛋白結合胜肽，以增加該 SIRP- α 變體之半衰期。可用在此處記載之方法及組合物的白蛋白結合胜肽為該技術領域一般所習知。請參見例如 Dennis et al., *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043, 2002 及 Miyakawa et al., *J. Pharm. Sci.* 102:3110-3118, 2013。於一實施例，白蛋白結合胜肽包括序列 DICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 2)。白蛋白結合胜肽可基因上地融合於 SIRP- α 變體或經由諸如化學接合的化學方式附著於 SIRP- α 變體。若有需要，可將分隔子插入該 SIRP- α 變體與白蛋白結合胜肽之間以容許融合蛋白質有更多結構及空間上的

S

可撓性。特定的分隔子及其胺基酸序列將於之後進一步詳述。於一些實施例，白蛋白結合胜肽可融合於 SIRP- α 變體之 N-或 C 端。於一實例，白蛋白結合胜肽之 C 端可直接或經由胜肽鍵融合於該 SIRP- α 變體之 N 端。於另一實例，白蛋白結合胜肽之 N 端可直接或經由胜肽鍵融合於該 SIRP- α 變體之 C 端。於另一實例，白蛋白結合胜肽 C 端之羧酸可使用習知的化學接合技術以融合於內部胺基酸殘基，即該 SIRP- α 變體之離胺酸殘基之側鏈殘基。不拘泥於理論，可期待將白蛋白結合胜肽融合於 SIRP- α 變體能藉由結合於血清白蛋白以導致治療蛋白質之長期保存。

【0138】 X. Fc 分域

於一些實施例，SIRP- α 變體構築物可包括 SIRP- α 變體及 Fc 分域單元體。於一些實施例，SIRP- α 變體可融合於免疫球蛋白之 Fc 分域單元體或 Fc 分域單元體之片段。如同該技術領域所習知，Fc 分域為在免疫球蛋白之 C 端發現的蛋白質結構。Fc 分域包括 2 個 Fc 分域單元體，其藉由 C_H3 抗體不變分域間的交互作用而二聚化(dimerized)。野生型 Fc 分域形成最小結構，其結合於諸如 Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb、Fc γ RIV 之 Fc 受體。於本發明，融合於 SIRP- α 變體以增加該 SIRP- α 變體之血清半衰期的 Fc 分域單元體或 Fc 分域之片段可包括 2 個 Fc 分域單元體之二聚體或 1 個 Fc 分域單元體，使得該 Fc 分域單元體能結合於該 Fc 受體(例如 FcRn 受體)。再者，融合於 SIRP- α 變體以增加該 SIRP- α 變體之血清半衰期的 Fc 分域單元體或 Fc 分域之片段不會引起任何免疫系

統相關的反應。於一些實施例，可將 Fc 分域突變成缺乏效應子功能，通常為“死”Fc 分域。例如，Fc 分域可包括已知會使該 Fc 分域與 Fc γ 受體間之交互作用最小化的特定胺基酸取代。於一些實施例，可利用習知的基因或諸如化學接合的化學方法以將 Fc 分域單元體或該 Fc 分域之片段融合於 SIRP- α 變體之 N-或 C 端。若有需要，可將連結子(例如分隔子)插入至該 SIRP- α 變體與該 Fc 分域單元體之間。

【0139】 Fc 分域單元體之異二聚化

於一些實施例，Fc 分域中之 2 個 Fc 分域單元體中各自包括會促進此 2 個單元體異二聚化的胺基酸取代。可藉由在 2 個 Fc 分域單元體中導入不同但可相容的取代(例如“旋鈕-進入-孔洞(knob-into-hole)”殘基對及帶電殘基對)以促進 Fc 分域單元體之異二聚化。“旋鈕-進入-孔洞”殘基對的使用記載於 Carter 及共同作者之文獻(Ridgway et al., *Protein Eng.* 9:617-612, 1996; Atwell et al., *J Mol Biol.* 270:26-35, 1997; Merchant et al., *Nat Biotechnol.* 16:677-681, 1998)。該旋鈕與孔洞的交互作用有利於形成異二元體，而旋鈕-旋鈕與孔洞-孔洞交互作用阻礙異二元體的形成，原因是空間上的衝突並消除了有利的交互作用。“旋鈕-進入-孔洞”的技術也記載於美國專利申請案公開號 8,216,805, Merchant et al., *Nature Biotechnology* 16:677-681, 1998 及 Merchant et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:E2987-E2996, 2013，在此各自引入其全文作為參考。孔洞為當蛋白質中原始胺基酸被取代成具有較小側鏈體積之不同胺基酸而產生之空隙。旋鈕為當蛋白質中原始胺基酸被取代成

具有較大側鏈體積之不同胺基酸而產生之突塊。具體而言，被取代之胺基酸係位在 Fc 分域單元體之 C_H3 抗體不變分域，且涉及 2 個 Fc 分域單元體之二聚化。於一些實施例，於 C_H3 抗體不變分域中形成孔洞以容納另一 C_H3 抗體不變分域中之旋鈕，使得此旋鈕及孔洞胺基酸具有促進或有利於該 2 個 Fc 分域單元體之異二聚化的作用。於一些實施例，於 C_H3 抗體不變分域中形成孔洞使其更能容納另一 C_H3 抗體不變分域中之原始胺基酸。於一些實施例，在 C_H3 抗體不變分域中形成旋鈕以與另一 C_H3 抗體不變分域之原始胺基酸形成額外的交互作用。

【0140】可藉由具有較大側鏈之諸如酪胺酸或色胺酸的胺基酸取代成具有較小側鏈之諸如丙胺酸、纈胺酸或蘇胺酸的胺基酸來建構孔洞，例如 C_H3 抗體不變分域之 Y407V 突變。同樣地，可藉由將具有較小側鏈之胺基酸取代成具有較大側鏈之胺基酸以建構旋鈕，例如 C_H3 抗體不變分域之 T366W。於較佳實施例，一 Fc 分域單元體包括旋鈕突變 T366W，另一 Fc 分域單元體包括孔洞突變 T366S、L358A 及 Y407V。本發明之 SIRP- α D1 變體可融合於包括旋鈕突變 T366W 的 Fc 分域單元體以限制不期望的旋鈕-旋鈕同二元體(homodimer)之形成。旋鈕-進入-孔洞胺基酸對之實例包括但不限於表 8 所示。

【0141】表 8

Fc 分域 單元體 1	Y407T	Y407A	F405A	T394S	T366S L358A Y407V	T394W Y407T	T394S Y407A	T366W T394S
Fc 分域 單元體 2	T366Y	T366W	T394W	F405W	T366W	T366Y F405A	T366W F405W	F405W Y407A

【0142】除了旋鈕-進入-孔洞策略，也可使用靜電操縱

(electrostatic steering)策略以控制 Fc 分域單元體之二聚化。靜電操縱係利用胜肽、蛋白質分域，及蛋白質帶正電胺基酸間有利之靜電交互作用以控制更高階蛋白質分子的形成。具體而言，爲了以靜電操縱控制 Fc 分域單元體之二聚化，將組成 C_H3-C_H3 交界的一或更多胺基酸殘基取代成帶正電或帶負電的胺基酸殘基，使得交互作用變爲靜電上有利或不利取決於導入的特定電荷之胺基酸。於一些實施例，將交界處之諸如離胺酸、精胺酸或組胺酸的帶正電胺基酸取代成諸如天冬胺酸或麩胺酸的帶負電胺基酸。於一些實施例，將交界的帶負電胺基酸取代成帶正電胺基酸。可將該帶電胺基酸導入相互作用的 C_H3 抗體不變分域其中之一或兩者。將帶電胺基酸導入 2 個 Fc 分域單元體之交互作用的 C_H3 抗體不變分域可促進選擇性形成 Fc 分域單元體之異二聚體，如同利用帶電胺基酸間之交互作用所產生之靜電操縱作用所控制。該靜電操縱技術亦揭示於美國專利申請公開號 20140024111, Gunasekaran et al., *J Biol Chem.* 285:19637-46, 2010，及 Martens et al., *Clin Cancer Res.* 12:6144-52, 2006，在此各自引入其全文作爲參考。靜電操縱胺基酸對之實例包括但不限於表 9 所示。

【0143】 表 9

Fc 分域 單元體 1	K409D	K409D	K409E	K409E	K392D	K392D	K392E	K392E	K409D K392D	K370E K409D K439E
Fc 分域 單元體 2	D399K	D399R	D399K	D399R	D399K	D399R	D399K	D399R	D399K D356K	D356K E357K D399K

【0144】 XI. 聚乙二醇(PEG)聚合物

於一些實施例，SIRP- α 變體可融合於諸如聚乙二醇(PEG)的聚合物。將聚合物附著於蛋白質醫藥能“遮蔽(mask)”該蛋白質醫藥使其遠離寄主免疫系統(Milla et al., *Curr Drug Metab.* 13:105-119, 2012)。此外，特定諸如親水性聚合物的聚合物也可對於疏水性蛋白質及藥物提供水溶性(Gregoriadis et al., *Cell Mol. Life Sci.* 57:1964-1969, 2000; Constantinou et al., *Bioconjug. Chem.* 19:643-650, 2008)。各種諸如 PEG、聚唾液酸鏈(Constantinou et al., *Bioconjug. Chem.* 19:643-650, 2008)及 PAS 鏈(Schlapschy et al., *Protein Eng. Des. Sel.* 26:489-501, 2013)的聚合物為該技術領域所習知且可使用在本發明。於一些實施例，諸如 PEG 的聚合物可使用諸如化學接合的傳統化學方法，共價地附著於 SIRP- α 變體之 N-或 C 端或內部位置。於一些實施例，諸如 PEG 的聚合物可共價地附著於該 SIRP- α 變體之半胱胺酸取代或加成物。該 SIRP- α 變體之半胱胺酸取代可為相對於 SEQ ID NO: 13-23 中任一序列之 I7C、A16C、S20C、T20C、A45C、G45C、G79C、S79C 或 A84C。可使用該技術領域習知的技術(例如胜肽合成、基因修飾及/或分子選殖)來導入 SIRP- α 變體中半胱胺酸殘基之加成。可使用該技術領域中具有通常知識者所習知的半胱胺酸-馬來醯亞胺接合以將諸如 PEG 的聚合物附著於半胱胺酸殘基。在此將引入參考出版物的內容之全文作為參考。

【0145】除了上述實施例，也可在本發明中使用其他半衰期延長技術以增加 SIRP- α 變體之血清半衰期。半衰期延長技術包括但不限於 EXTEN(Schellenberger et al., *Nat. Biotechnol.*

27:1186-1192,2009)及 Albu tag(Trussel et al.,*Bioconjug Chem.* 20:2286-2292,2009)。在此將引入參考出版物的內容之全文作為參考。

【0146】 XII. 分隔子

於一些實施例，分隔子可用於該 SIRP- α 變體構築物。例如，SIRP- α 變體構築物可包括藉由連結子(例如可裂解的連結子)附著於阻斷胜肽之 SIRP- α 變體。於此類 SIRP- α 構築物，分隔子可插入該 SIRP- α 變體與連結子(例如可裂解的連結子)之間及/或連結子(例如可裂解的連結子)與該阻斷胜肽之間。為了最佳化該 SIRP- α 變體與連結子之間的空間及/或連結子與該阻斷胜肽之間的空間，可使用下述任意之一或更多分隔子。

【0147】 於包括藉由連結子(例如可裂解的連結子)附著於阻斷胜肽之 SIRP- α 變體之 SIRP- α 變體構築物的實施例，該分隔子作用為使可裂解的連結子遠離該 SIRP- α 變體及該阻斷胜肽之核心，使得可裂解的連結子更容易被負責裂解的酵素接近。應當瞭解的是，SIRP- α 變體構築物中 2 個元件的附著，例如 SIRP- α 變體構築物中 SIRP- α 變體與連結子(例如可裂解的連結子)包括 SIRP- α 變體、連結子及阻斷胜肽(例如依此順序)，其不須為附著之特定模式或經由特定之反應。能提供 SIRP- α 變體構築物有適當安定性及生物可相容性的任意反應均可接受。

【0148】 分隔子係指 SIRP- α 變體構築物之 2 個元件間之連結，例如含有 SIRP- α 變體、連結子及阻斷胜肽(例如以此順序)之 SIRP- α 變體構築物中之 SIRP- α 變體及連結子(例如可裂解

的連結子)，含有 SIRP- α 變體、連結子及阻斷胜肽(例如以此順序)之 SIRP- α 變體構築物中之阻斷胜肽，以及諸如白蛋白結合胜肽的血清蛋白質結合胜肽或蛋白質。。分隔子也可指能夠插入於 SIRP- α 變體或野生型 SIRP- α 與諸如腫瘤專一性抗體或抗體結合胜肽的抗體之間的連結。分隔子可對該 SIRP- α 變體構築物提供額外結構上及/或空間上的可撓性。分隔子可為簡單的化學鍵，例如鹽胺鍵、小的有機分子(例如碳氫鍵)、胺基酸序列(例如 3-200 個胺基酸的序列)或小的有機分子(例如碳氫鍵)與胺基酸序列(例如 3-200 個胺基酸之序列)之組合。分隔子在生理條件(例如中性 pH 及充足氧濃度)下及在患病部位之特性條件(例如酸性 pH 與缺氧)下為安定。分隔子在諸如癌部位的患病部位(例如腫瘤內)中為安定。

【0149】分隔子可包括 3-200 個胺基酸。適合的胜肽分隔子為該技術領域所習知，包括例如含有諸如甘胺酸及絲胺酸的可撓性胺基酸殘基之之胜肽連結子。於特定實施例，分隔子可包括模體(motifs)，例如 GS、GGS、GGGS、GGSG 或 SGGG 之多個或重複的模體。於某些實施例，分隔子可包括含有 GS 的模體(例如 GS、GSGS、GSGSGS、GSGSGSGS、GSGSGSGSGS 或 GSGSGSGSGSGS)之 2 至 12 個胺基酸，於其他特定實施例，分隔子可包括含有 GGS 的模體(例如 GGS、GGSGGS、GGSGGSGGS 及 GGSGGSGGSGGS)之 3 至 12 個胺基酸。於其他實施例，分隔子可包括含有 GGSG 之模體(例如 GGSG、GGSGGGSG 或 GGSGGGSGGGSG)之 4 至 12 個胺基酸。於其他實施例，分隔子可包括(GGGGS)_n之模體，其中 n 為 1 至 10 之

整數。於其他實施例，分隔子可包括甘胺酸及絲胺酸以外的胺基酸，例如 GENLYFQSGG、SACYCELSRSIAT、RPACKIPNDLK QKVMNH、GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGS G、AAANSSIDLISVPVDSR 或 GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGS EGGGSEGGGSGGGGS。於本發明之一些實施例，可使用一或更多之 12-或 20-胺基酸胜肽分隔子於 SIRP- α 變體構築物中。該 12-與 20-胺基酸胜肽分隔子可分別包括序列 GGGSGGGSGGGGS 與 SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG。於一些實施例，可使用含有序列 GGSGGGSGGGSGGGSGGS 之一或更多 18-胺基酸胜肽分隔子於 SIRP- α 變體構築物中。

【0150】於一些實施例，分隔子亦可具有一般結構 $\text{H-W-(CH}_2\text{)}_n\text{-Q-H}$ ，其中 W 為 NH 或 CH₂，Q 為胺基酸或胜肽，n 為 0 至 20 之整數。

【0151】XIII. 將阻斷胜肽融合於 SIRP- α 變體

可利用諸如可裂解的連結子(例如 LSGRSDNH(SEQ ID NO: 47))之連結子，及可選的一或更多分隔子(例如 (GGGGS)_n，基因上地融合於連結子之 N-或 C 端，其中 n 為 1 至 10 之整數)將阻斷胜肽(例如表 6 中 SEQ ID NO: 36-46 任一序列之 CD47 系阻斷胜肽)融合於 SIRP- α 變體之 N-或 C 端。包括藉由可裂解的連結子與一或更多分隔子以將 CD47 系阻斷胜肽融合於 SIRP- α 變體的 SIRP- α 變體構築物之序列如 SEQ ID NO: 48-63 所示。可改變分隔子的長度以達成 CD47 系阻斷胜肽與該 SIRP- α 變體之間的最佳結合。

【0152】XIV. 生產 SIRP- α 變體構築物之方法

5

本發明之 SIRP- α 變體構築物可由寄主細胞產生。寄主細胞係指一載運體，其包括從對應的核酸中表現在此記載之多肽與構築物所需的必要細胞元件(例如胞器)。核酸可包括在核酸載體中，該載體可利用該技術領域習知的技術(例如轉形、轉染、電穿孔、磷酸鈣沉澱、直接微注射、感染等)導入到寄主細胞內。核酸載體的選擇有一部分取決於所使用的寄主細胞。一般而言，較好的寄主細胞為原核(例如細菌性)或真核(例如哺乳動物)起源。

【0153】 核酸載體構築及寄主細胞

可利用該技術領域已知的各種方法製備編碼為 SIRP- α 變體構築物之胺基酸序列的多核苷酸序列。此等方法包括但不限於寡核苷酸媒介(或部位導向)突變及 PCR 突變。編碼為本發明之 SIRP- α 變體構築物的多核苷酸分子可使用諸如基因合成的標準技術以獲得。另外，可將編碼為野生型 SIRP- α 之多核苷酸分子使用該技術領域諸如 QuikChangeTM 突變法的標準技術突變成含有特定的組胺酸取代。多核苷酸可使用核苷酸合成器或 PCR 技術合成。

【0154】 可以將編碼為 SIRP- α 變體構築物之多核苷酸序列插入到能在原核或真核寄主細胞內複製及表現此多核苷酸之載體。該技術領域有許多可得的載體可用於本發明之用途。各載體可含有各種元件，其可調整並最佳化以與特定的寄主細胞相容。例如，載體元件包括但不限於複製起點、選擇標記基因、啟動子、核糖體結合部位、信號序列、編碼為本發明 SIRP- α 變體構築物之多核苷酸序列，及轉錄中止序列。於一些實施

例，載體可包括內部核糖體進入部位(IRES)，此部位能容許多種 SIRP- α 變體構築物的表現。一些細菌表現載體例如包括但不限於 pGEX 系列載體(例如 pGEX-2T、pGEX-3X、pGEX-4T、pGEX-5X、pGEX-6P)、pET 系列載體(例如 pET-21、pET-21a、pET-21b、pET-23、pET-24)、pACYC 系列載體(例如 pACYCDuet-1)、pDEST 系列載體(例如 pDEST14、pDEST15、pDEST24、pDEST42)，及 pBR322 及其衍生物(見例如美國專利號 5,648,237)。哺乳動物表現載體之例包括但不限於 pCDNA3、pCDNA4、pNICE、pSELECT 及 pFLAG-CMV。其他類型的核酸載體包括用於在細胞(例如受試者之細胞)內表現蛋白質病毒載體。此類病毒載體包括但不限於反轉錄病毒載體、腺病毒載體、痘病毒載體(例如牛痘病毒載體，例如經修飾的安卡拉牛痘病毒(Modified Vaccinia Ankara(MVA))、腺關連病毒載體及 alpha 病毒載體。

【0155】於一些實施例，使用 *E. coli* 細胞作為本發明之寄主細胞。*E. coli* 菌株包括但不限於 *E. coli* 294(ATCC[®] 31,446)、*E. coli* λ 1776(ATCC[®] 31,537)、*E. coli* BL21(DE3)(ATCC[®] BAA-1025)及 *E. coli* RV308(ATCC[®] 31,608)。於其他實施例，使用哺乳細胞作為本發明之寄主細胞。哺乳動物細胞的類型之實例包括但不限於人類胚胎腎(HEK)細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、HeLa 細胞、PC3 細胞、綠猴腎(Vero)細胞及 MC3T3 細胞。不同的寄主細胞對蛋白質產物之轉譯後處理及修飾具有特有且特定的機制。可選擇適當的細胞株或寄主系統以確保表現的蛋白質有正確的修飾及處理。上述表現載體可使用該技術領

域習知的技術(例如轉形、轉染、電穿孔、磷酸鈣沉澱及直接微注射)以導入適當的寄主細胞。一旦將載體導入寄主細胞以供蛋白質生產，將寄主細胞培養於傳統的營養培養基，其被修飾以使其適於誘導啓動子、選擇性轉形體或放大編碼為期望之序列。

【0156】 蛋白質生產、回收及純化

用於生產本發明之 SIRP- α 變體構築物之寄主細胞可生長於該技術領域已知並適於培養選定寄主細胞的培養基。適合細菌寄主細胞之培養基的實例包括諸如選擇劑(例如安比西林(ampicilin))之 Luria broth(LB)附加必要補充物。適於哺乳動物寄主細胞之培養基之實例包括：Minimal Essential Medium(MEM)、Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)、具有補充胎牛血清(FBS)的 DMEM 及 RPMI-1640。

【0157】 培養寄主細胞於適當的溫度，例如約 20°C 至約 39°C (例如 25°C 至約 37°C)。培養基之 pH 主要取決於寄主有機體，一般約 6.8 至 7.4，例如 7.0。若表現載體係使用本發明之可誘導的啓動子，則蛋白質表現會被誘導於適合活化此啓動子之環境。

【0158】 蛋白質回復一般涉及寄主細胞的破壞，通常藉由滲透壓衝擊、音振作用(sonication)或溶解作用(lysis)。一旦細胞被破壞，可利用離心或過濾以去除細胞碎片。可將該蛋白質藉由諸如親和性樹脂層析的方法以進一步純化。可採用此技術領域已知的標準蛋白質純化方法。以下程序為適當純化程序之示範例：在免疫親和性或離子交換管柱上分餾(fractionation)、

乙醇沉澱、反相 HPLC、在矽膠或陽離子交換樹脂上層析、SDS-PAGE 及凝膠過濾。

【0159】另外，SIRP- α 變體構築物可利用受試者(例如人)之細胞生產，例如上下文之治療，藉由投予含有編碼為該 SIRP- α 變體構築物之核酸分子的載體(例如反轉錄病毒載體、腺病毒載體、痘病毒載體(例如諸如 Modified Vaccinia Ankara (MVA)的牛痘病毒載體)、腺關連病毒載體，及 alpha 病毒載體)。一旦載體在受試者之細胞內時(例如藉由轉形、轉染、電穿孔、磷酸鈣沉澱、直接微注射、感染等)，將會促進表現該 SIRP- α 變體構築物，然後從細胞分泌出來。

【0160】XV. 醫藥組合物及製備

於一些實施例，本發明之醫藥組合物可包括一或更多本發明之 SIRP- α 變體構築物作為治療蛋白質。除了治療量之該蛋白質，該醫藥組合物尚可包括醫藥上可接受的載具(carrier)或賦形劑，其可藉由該技術領域習知的方法來配製。於其他實施例，本發明之醫藥組合物可包括編碼為一或更多本發明之 SIRP- α 變體構築物之核酸分子(例如於諸如病毒載體的載體中)。可將編碼為 SIRP- α 變體構築物之核酸分子選殖(clone)到適當的表現載體，其可藉由基因療法中所習知的方法被遞送。

【0161】該醫藥組合物中可接受之載具及賦形劑於所採用的劑量及濃度中對受試者為無毒性。可接受之載具與賦形劑可包括諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽、HEPES 及 TAE 的緩衝液，諸如抗壞血酸及甲硫胺酸的抗氧化劑，諸如氯化六羥季銨(hexamethonium chloride)、十八基二甲基苄基氯化銨、間苯二

s

酚，羥基氯苯銨(benzalkonium chloride)的保存劑，諸如人血清白蛋白、明膠、葡聚糖及免疫球蛋白的蛋白質，諸如聚乙炔基吡咯酮(polyvinylpyrrolidone)的親水性聚合物，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、組胺酸及離胺酸的胺基酸，諸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖及山梨醇的碳水化合物。本發明之醫藥組合物可用可注射劑型的形式以非口服地投予。供注射之醫藥組合物可使用無菌溶液或任意醫藥上可接受之液體作為載運體來配製。醫藥上可接受之載運體包括但不限於無菌水、生理鹽液及細胞培養基(例如 Dulbecco' Modified Eagle Medium(DMEM)、 α -Modified EaglesMedium(α -MEM)、F-12 medium)。

【0162】該本發明之醫藥組合物可製備成諸如羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊的微膠囊。該本發明之醫藥組合物也可於其他藥物遞送系統製備，例如微脂體、白蛋白微球、微乳劑、奈米顆粒及奈米膠囊。此類技術記載於 Remington:The Science and Practice of Pharmacy 20th edition(2000)。用於活體內投予之該醫藥組合物必須為無菌。此條件可藉由無菌濾膜過濾而輕易達成。

【0163】該本發明之醫藥組合物也可製備成持續釋放的劑型。持續釋放的配方之適當實例包括：含有本發明之 SIRP- α 變體構築物的固體疏水聚合物之半通透性基質。持續釋放基質的實例包括：聚酯、水凝膠、聚乳酸(polyactides)(美國專利號 3,773,919)、L-麩胺酸與 γ L-麩胺酸乙酯的共聚物、非降解性乙炔-乙酸乙炔酯、諸如 LUPRON DEPOTTM 的降解性乳酸-甘醇酸共聚物及聚 D-(-)-3-羥基丁酸。有些持續釋放劑型能夠在數

個月期間，例如 1~6 個月的期間釋放分子，其他配方則在較短期間，例如數天至數週釋放本發明之醫藥組合物。

【0164】該醫藥組合物若有必要可形成單劑的劑型。包括在醫藥製備物的活性成分(例如本發明之 SIRP- α 變體構築物)之量係使其能提供設計範圍內的適當劑量(例如在 0.01-100 mg/kg 體重的範圍之劑量)。

【0165】用於基因治療的醫藥組合物可在能接受的稀釋劑內或可包含緩慢釋放的基質，於其中包覆有基因遞送載運體。可用於活體內之基因遞送載運體的載體包括但不限於反轉錄病毒載體、腺病毒載體、痘病毒載體(例如例如 Modified Vaccinia Ankara(MVA)的牛痘病毒載體)、腺關連病毒載體及 alpha 病毒載體。於一些實施例，載體可包括內部核糖體進入部位(IRES)，此部位能容許表現多種 SIRP- α 變體構築物。其他用於基因遞送的載運體及方法記載於美國專利號 5,972,707、5,697,901，及 6,261,554，在此各自引入其全文作為參考。

【0166】生產醫藥組合物的其他方法記載於例如美國專利號 5,478,925、8,603,778、7,662,367，及 7,892,558，均在此引入其全文作為參考。

【0167】XVI. 投予的途徑、劑量及時機

【0168】本發明之醫藥組合物包括一或更多 SIRP- α 變體構築物以作為治療蛋白質，可配製成非口服投予、皮下投予、靜脈內投予、肌肉內投予、動脈內投予、脊髓腔投予或腹膜內投予。該醫藥組合物也可配製或經由鼻、噴灑、口服、氣溶膠、

直腸或陰道來投予。投予治療蛋白質之方法係該技術領域所習知。請參見例如美國專利號 6,174,529、6,613,332、8,518,869、7,402,155 及 6,591,129，及美國專利申請公開號 US20140051634、WO1993000077 及 US20110184145，且將於此引入其全文作為參考。這些方法之一或更多可用於投予本發明之醫藥組合物，其包含本發明之一或更多 SIRP- α 變體構築物。針對可注射劑型，各種有效的醫藥載具為該技術領域所習知。請參見例如 *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, Pa., Banker and Chalmers, eds., pages 238-250 (1982) 及 *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4th ed., pages 622-630 (1986)。

【0169】本發明之醫藥組合物之劑量取決於一些因子，包括投予途徑、欲治療之疾病及生理特性，例如受試者之年紀、體重、總體健康。典型地，包含在單劑劑量內之本發明之 SIRP- α 變體構築物的含量可為有效治療疾病而不會誘導顯著毒性之含量。本發明之醫藥組合物可包括之 SIRP- α 變體構築物劑量為以下範圍：0.001 至 500 mg (例如 0.05、0.01、0.1、0.2、0.3、0.5、0.7、0.8、1 mg、2 mg、3 mg、4 mg、5 mg、10 mg、15 mg、20 mg、30 mg、50 mg、100 mg、250 mg 或 500 mg)，於一更特定實施例，為約 0.1 至約 100 mg，於一更特定實施例，約 0.2 至約 20 mg。劑量可由臨床醫師依照諸如疾病的程度及受試者的不同參數之習知因子加以調整。

【0170】本發明之醫藥組合物之投予量可為約 0.001 mg 至約 500 mg/kg/day (例如 0.05、0.01、0.1、0.2、0.3、0.5、0.7、

0.8、1 mg、2 mg、3 mg、4 mg、5 mg、10 mg、15 mg、20 mg、30 mg、50 mg、100 mg、250 mg 或 500 mg/kg/day)。含有 SIRP- α 變體構築物的本發明之醫藥組合物可對須投予之受試者以每日、每周、每半年、每年或醫療上所需時投予一或更多次(例如 1-10 次或更多次)。可以單次或多劑量投予方案提供劑量。例如，於一些實施例，有效量的劑量為每日約 0.1 至約 100 mg/kg/day 之範圍，約 0.2 mg 至約 20 mg 之 SIRP- α 變體構築物，每日約 1 mg 至約 10 mg 之 SIRP- α 變體構築物，每周約 0.7 mg 至約 210 mg 之 SIRP- α 變體構築物，每周約 1.4 mg 至約 140 mg 之 SIRP- α 變體構築物，每 3 天約 0.3 mg 至約 300 mg 之 SIRP- α 變體構築物，每隔一天約 0.4 mg 至約 40 mg 之 SIRP- α 變體構築物，每隔一天約 2 mg 至約 20 mg 之 SIRP- α 變體構築物。投予的間隔時間可隨醫療條件改善而減少或隨病患健康惡化而增加。

【0171】XVII. 治療方法

本發明提供醫藥組合物及治療方法，其可用於治療罹患與 SIRP- α 及/或 CD47 活性關連之疾病及失調症的病患，例如癌症及免疫疾病。於一些實施例，可將該在此記載的 SIRP- α 變體構築物投予至受試者以增加該對象之靶向細胞(例如癌細胞)之吞噬作用。於一些實施例，可將該 SIRP- α 變體構築物投予至受試者以消除該受試者的調節性 T 細胞。於一些實施例，可將該 SIRP- α 變體構築物投予至受試者以殺死該對象之癌細胞。於一些實施例，可將該 SIRP- α 變體構築物投予至受試者以治療該對象之 SIRP- α 及/或 CD47 活性關連之疾病，其中該 s

SIRP- α 變體構築物會優先結合於患病的細胞或患病的部位上之 CD47 而不是非患病的細胞上之 CD47。於一些實施例，可將該 SIRP- α 變體投予至受試者以增加該受試者之造血幹細胞植入(hematopoietic stem cell engraftment)，其中該方法包括調節該受試者之 SIRP- α 與 CD47 間之交互作用。於一些實施例，可將該 SIRP- α 變體構築物投予至受試者以改變該對象之免疫反應(即，抑制免疫反應)。

【0172】於一些實施例，在治療受試者之疾病(例如癌)之前，會先決定該受試者之 SIRP- α 的胺基酸序列，例如，從編碼為該 SIRP- α 基因的 2 個對偶基因。於本發明之方法，該方法決定來自該受試者之生物樣本中 SIRP- α 多肽之胺基酸序列，接著對受試者投予治療有效量的 SIRP- α 變體構築物。於此方法中，除了被導入以增加該 SIRP- α 變體之親和性的胺基酸改變之外，SIRP- α 變體構築物之該 SIRP- α 變體與該受試者之生物樣本的 SIRP- α 多肽具有相同的胺基酸序列。該 SIRP- α 變體構築物在投予後，該受試者具有最小免疫原性。

【0173】該 SIRP- α 變體構築物與本發明之醫藥組合物可使用於各種癌治療。適合依本發明治療之癌包括但不限於：固體腫瘤癌、血液性癌、急性骨髓性白血病、慢性淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴細胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、多發性骨髓瘤、膀胱癌、胰臟癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、肺癌、支氣管癌、肝癌、卵巢癌、大腸和直腸癌、胃癌、胃癌、膽囊癌、胃腸道間質腫瘤癌、甲狀腺癌、頭頸癌、口咽癌、食道癌、黑色素瘤、非黑色素皮膚癌、Merkel

細胞瘤、病毒引起之癌、神經胚細胞瘤、乳癌、前列腺癌、腎癌、腎細胞癌、腎盂癌、白血病、淋巴瘤、肉瘤、神經膠質瘤、腦瘤，瘤(carcinoma)。於一些實施例，適合依本發明治療之癌病症包括轉移性癌。於一些實施例，適合依本發明治療之癌為固體腫瘤或血液性癌。

【0174】本發明之 SIRP- α 變體構築物與醫藥組合物可用於治療免疫疾病的各種療法。於一些實施例，該免疫疾病為自體免疫疾病或發炎性疾病，例如多發性硬化症、類風濕性關節炎、脊椎關節患病的、全身性紅斑狼瘡、抗體媒介之免疫或自體免疫疾病、移植物抗寄主疾病、敗血症、糖尿病、牛皮癬、動脈粥樣硬化、Sjogren 氏症候群、進行性系統性硬化症、硬皮病、急性冠狀動脈症候群、缺血再灌注、Crohn 氏病、子宮內膜異位症、腎小球腎炎、重症肌無力、特發性肺纖維化、哮喘、急性呼吸窘迫症候群(ARDS)、血管炎或發炎性自體免疫肌炎。

【0175】實施例

實施例 1-方法

SIRP- α 變體構築物之生產

使用最適合在哺乳動物細胞表現之基因合成及密碼子(DNA2.0)來產生所有的基因構築物。將此等基因選殖到哺乳動物表現載體，並使用 CMVa-內子(intron)啟動子表現。於構築物之 N 端設計一引導(leader)序列以確保有適當用於分泌的信號及處理。SIRP- α 融合蛋白質之表現係使用 Expi293F™ 細胞(Life Technologies)來實行。細胞株適應於高密度、無血清的

懸浮培養液於 Expi293F™ Expression Medium，且能生產高產量的重組蛋白質。轉染程序依製造手冊實行。通常在轉染後 5~7 天收集上清液。該蛋白質構築物設計成帶有 6 個組胺酸親和性標籤(tag)，且此可容許其藉由親和性層析純化。先將管柱以 5 mM 咪唑、100 mM TrisHCl(pH 8)、500 mM NaCl 平衡。將表現各種 SIRP- α 變體構築物之澄清培養基載入 Avant 25(GE Healthcare)之 Hi-Trap Ni Sepharose excel 親和性樹脂。亦實行另一平衡步驟。之後，將管柱以 40 mM 咪唑、100 mM Tris、500mM NaCl 洗滌，接著以 250 mM 咪唑、100 mM Tris、500 mM NaCl 洗提(elute)。匯集(pool)含有該 SIRP- α 變體構築物之洗提組分(fraction)，然後將緩衝液交換成 1X PBS。

【0176】活體外裂解 SIRP- α 蛋白質

重組人類 uPA 及 matriptase 購買自 R&D systems 公司。如上所述，將 3 μ M 之 SIRP- α 蛋白質加入各別量之 uPA 與 matriptase(0.1 to 44 ng)於 50 mM TrisHCl(pH 8.5)，0.01% Tween。一般會將分解(digestion)反應物在 37 °C 溫育(incubate)18-24 小時。將 SDS-PAGE 載入染料(loding dye)添加到反應物並於 95°C 加熱 3 分鐘以停止反應。將已分解的樣本在 4-20% Tris-Glycine SDS-PAGE 分離以鑑定其裂解。

【0177】實施例 2-設計會專一性在腫瘤組織活化的 SIRP- α 變體構築物

目標為設計 SIRP- α 變體構築物，其將保持惰性直到局部活化以結合腫瘤組織中之 CD47。此將限制 SIRP- α 結合於非患病細胞之細胞表面上之 CD47，並防止不期望之“標靶上

(on-target)”“組織外(off tissue)”的毒性。爲了產生此類 SIRP- α 變體構築物，將該阻斷胜肽(例如 CD47 系阻斷胜肽)藉由可裂解的連結子基因地融合於該 SIRP- α 變體。該阻斷胜肽之探究係基於 CD47 對 SIRP- α 之交互作用部位，且此序列將記載於下方((a)-(c)段)。設計含有重複單元 GGGGS 之分隔子於可裂解的連結子之兩側，該可裂解的連結子之編碼通常爲蛋白酶辨識部位。於一些實施例，選定的該蛋白酶裂解部位爲 LSGRSDNH，但有許多其他可能性。選擇蛋白酶裂解部位 LSGRSDNH 係由於其對許多蛋白酶之敏感性，其對許多人類癌具有正調節之功用，例如 matriptase(MTSP1)、尿型胞漿素元活化劑(plasminogen activator(uPA))、legumain、PSA(也稱爲 KLK3，激肽釋放酶關連肽酶-3(kallikrein-related peptidase-3))、基質金屬蛋白酶-2(MMP-2)、MMP9、人類嗜中性彈性蛋白酶(neutrophil elastase(HNE)及蛋白酶 3(Pr3)(Ulissee et al., *Curr. Cancer Drug Targets* 9:32-71, 2009; Uhland et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 63:2968-2978, 2006; LeBeau et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:93-98, 2013; Liu et al., *Cancer Res.* 63:2957-2964, 2003)。

【0178】(a) 利用 CD47 系阻斷胜肽阻斷 SIRP- α

CD47 系阻斷胜肽已於前述。這些胜肽以不同的親和性與 SIRP- α 結合並阻斷其功能。CD47 之 N 端與 SIRP- α 之交互作用爲重要，故使用結構分析預測 SIRP- α 對 CD47C 端之融合。爲了更瞭解結果，以不同長度的分隔子探究 N 端與 C 端之融合。將不同的 CD-47 系阻斷胜肽(例如表 6 列出之胜肽)以可裂

解的連結子及一或更多分隔子融合於 SIRP- α 變體之 N-或 C 端。藉由可裂解的連結子及一或更多分隔子將含有融合至 SIRP- α 變體之 CD47 系阻斷胜肽的融合蛋白質之序列顯示於 SEQ ID NO: 48-56，其中，單底線部分代表 CD47 系阻斷胜肽，雙底線部分代表可裂解的連結子，粗線部分代表該 SIRP- α 變體。SEQ ID NO: 48-51 之序列包括 CD47 系阻斷胜肽，其包括 12 或 21 個胺基酸及 2-3 次 GGGGS 重複的分隔子。SEQ ID NO: 52-56 之序列包括 CD47 系阻斷胜肽，其包括具有 C15S 取代之 CD47 IgSF 分域(於 VVS 處截短)及 2-5 次 GGGGS 重複或 3-6 次 GGS 重複的分隔子。此外，於一些實施例，可以將 HAS 融合於 SEQ ID NO: 48-56 中任一序列之 C 端。再者，於一些實施例，可將 Fc 分域單元體或 HSA(SEQ ID NO: 68)融合於表 10 列出之任一融合蛋白質之 N-或 C 端。

【0179】表 10

SEQ ID NO	CD47 系阻斷胜肽與 SIRP- α 變體之融合蛋白質
48	SEVTELTREGETGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEELQIIQPDKSVLVA AGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKRNNM DFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKSGPDDVEFKSGAGTELSVRKPS
49	SEVTELTREGETGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEELQIIQPDK SVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTT KRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKSGPDDVEFKSGAGTELSVRKPS
50	GQYTSEVTELTREGETIIELGKGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEELQII QPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTV SDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKSGPDDVEFKSGAGTELSVRKPS
51	GQYTSEVTELTREGETIIELGKGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEE ELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFP RVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKSGPDDVEFKSGAGTELSV RAKPS
52	QLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFD GALNK STVPTDFSSAKIEVSQLLKGDA SLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELG YRVVSGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEELQIIQPDKSVLVAAG ETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKRNNMDF SIRIGNITPADAGTYCYIKFRKSGPDDVEFKSGAGTELSVRKPS

SEQ ID NO	CD47 系阻斷胜肽與 SIRP- α 變體之融合蛋白質
53	QLLEFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNK STVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELK YRVVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEELQIIQPDKSV LVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKR NNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
54	QLLEFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNK STVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELK YRVVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEELQIIQ PDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVS DTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
55	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGP FPRVTTTVSDTTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTEL SVRAKPSGGSGGGSGGSLSGRSDNHGGSGGGSGGGSGGSQLLEFNKTKSVEFTFSNDTVV IPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKG DASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVS
56	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGP FPRVTTTVSDTTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTEL SVRAKPSGGSGGGSGGSLSGRSDNHGGSGGGSGGGSGGSQLLEFNKTKSVE FTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVS

【0180】(b) 利用具有延長 N 端的低親和性 CD47 突變體來阻斷 SIRP- α 變體

由於該 SIRP- α 變體對 CD47 之高親和性，有可能在裂解連結子之後，該融合蛋白質未解離而該 SIRP- α 變體仍然被阻斷。為解決此問題，研究該 SIRP- α -CD47 複合體之結構，並設計出相較於對野生型 SIRP- α ，對 SIRP- α 變體具有降低的結合親合性之 CD47 突變體。因此，在連結子被蛋白酶裂解之後，CD47 突變體將從該 SIRP- α 變體中解離。以下記載設計的 CD47 突變體。起初的實驗係將該 SIRP- α 變體融合於野生型 CD47。這些包括 SIRP- α 變體及野生型 CD47 或 CD47 突變體的 SIRP- α 變體構築物將於活體外裂解，以 SDS-page 分析以確保其裂解，並由 biacore 測量以測定其對 CD47 的結合能力(即，在 CD47 突變體從該 SIRP- α 變體中解離之後，該 SIRP- α 變體結合至野

5

生型 CD47)。若表現出含有融合於野生型 CD47 之 SIRP- α 變體的起始 SIRP- α 變體構築物，其能夠在蛋白酶裂解前阻斷 CD47 結合並且能夠在蛋白酶裂解後結合 CD47，則可不須使用 CD47 突變體。若這些起始 SIRP- α 變體構築物失活(即，可被裂解但由於在蛋白酶裂解後不解離而不結合 CD47)，則測定其他含有融合於低親和性 CD47 突變體之 SIRP- α 變體的融合蛋白質。

【0181】於 CD47:SIRP- α (PDB: 4KJY, 4CMM)之共結晶結構中，CD47 之 N 端以焦麩胺酸鹽之形式存在且使 SIRP- α 變體之 Thr66 與野生型 SIRP- α 之 Leu66 產生氫鍵交互作用(第 1 圖)。假設藉由加成諸如甘胺酸的胺基酸來延長 CD47 之 N 端，將可防止麩醯胺酸環化成焦麩胺酸鹽，並防止產生其他不期望的接觸及交互作用其可能破壞其與 Thr66 或 Leu66 的氫鍵交互作用，因而擾亂 CD47 對 SIRP- α 之結合。含有低親和性 CD47 IgSF 分域突變體及 SIRP- α 變體序列之融合蛋白質之序列顯示於表 11 之 SEQ ID NO: 57-59，其中，單底線部分指相對於表 6 之 SEQ ID NO: 46，含有胺基酸 1-118 及 C15S 之低親和性 CD47 IgSF 分域突變體，雙底線部分代表可裂解的連結子，粗線部分代表該 SIRP- α 變體。SEQ ID NO: x10-x12 也包括 3-5 次 GGGGS 重複之分隔子。也可設計及表現類似 SEQ ID NO: x10-x12 之序列，其中，低親和性 CD47 IgSF 分域突變體係經由可裂解的連結子及一或更多分隔子以融合於 SIRP- α 變體之 C 端。

【0182】表 11

SEQ ID NO	有延長之 N 端甘胺酸之低親和性 CD47 IgSF 分域突變體與 SIRP- α 變體之融合蛋白質
57	GQLLENKTKSVEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAL NKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDA SL KMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETII ELKYRVVSGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSE EEL QIIQPDKSVL VAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKR NNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPPDVEFKSGAGTELSVRAKPS
58	GQLLENKTKSVEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAL NKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDA SL KMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETII ELKYRVVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSE EEL QIIQPD KSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVS DTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPPDVEFKSGAGTELSVRAKPS
59	GQLLENKTKSVEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAL NKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDA SL KMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETII ELKYRVVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSE EEL QIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFP RTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPPDVEFKSGAGTELSV RAKPS

【0183】(c) 利用具有胺基酸取代之低親和性 CD47 IgSF 分域突變體來阻斷 SIRP- α

CD47 結合於一深袋(deep pocket)至 SIRP- α (PDB 碼：4KJY 及 4CMM)。已實行電腦模擬以鑑別 CD47 袋區之胺基酸殘基，其中，其被突變成可能減小 CD47 對 SIRP- α 變體之結合親和性，但仍維持 CD47 對野生型 SIRP- α 之結合親和性。鑑別出的 CD47 殘基為 L101Q、101H、101Y、102Q 及 T102H。假設含有這些取代之之一的低親和性 CD47 IgSF 分域突變體能夠有效率地以栓繩模式(tethered mode)阻斷該 SIRP- α 變體。然而，一旦到達該腫瘤部位且於該連結子處被蛋白酶裂解，該低親和性 CD47 IgSF 分域突變體將從該 SIRP- α 變體中解離並結合至野生型 SIRP- α ，使得該 SIRP- α 變體可自由地結合於癌細胞之細胞表面上之 CD47。該解離的低親和性 CD47 IgSF 分域突變體此時可阻斷野生型 SIRP- α 之活化。此將有可能造成來自釋放

的低親和性 CD47 IgSF 分域突變體與該 SIRP- α 變體加強其雙重阻斷活性。爲了說明如何選擇胺基酸殘基及其如何造成野生型 SIRP- α 與 SIRP- α 變體的區別阻斷之原理，使用野生型 SIRP- α 之 Ala27 的實例顯示於下方(第 2 圖)。舉例來說，野生型 SIRP- α 之 Ala27 比起 SIRP- α 變體之 Ile27 爲較小之殘基。因此，藉由將野生型 CD47 之 Thr102 突變成較大諸如 Gln102 的胺基酸，低親和性 CD47 IgSF 分域突變體中的 Gln102 可能造成其與 Ile27 在相應的交互作用位置處之 SIRP- α 變體有空間上的衝突。然而，仍會保留具有 Thr102Gln 取代的 CD47 突變體與具有 Ala27 的野生型 SIRP- α 之間的交互作用。因此，CD47 突變體對該 SIRP- α 變體會有低的結合親和性且對野生型 SIRP- α 有相對較高的結合親和性。一些例示性低親和性的 CD47 IgSF 分域突變體之序列顯示於表 6 之 SEQ ID NO: 41-45。含有胺基酸取代之低親和性 CD47 IgSF 分域突變體與 SIRP- α 變體之該 SIRP- α 變體構築物之序列顯示於表 12 之 SEQ ID NO: 60-63，其中，單底線部分代表分別含有胺基酸取代 L101Q、101Y、T102Q 及 T102H 之低親和性 CD47 IgSF 分域突變體，雙底線部分代表可裂解的連結子，粗線部分代表該 SIRP- α 變體。SEQ ID NO: 60-63 也包括 3-5 次 GGGGS 重複的分隔子。可設計並表現類似 SEQ ID NO: 60-63 之序列，其中，低親和性 CD47 IgSF 分域突變體藉由可裂解的連結子及一或更多分隔子而融合於 SIRP- α 變體之 C 端。

【0184】表 12

SEQ ID NO	具有胺基酸取代之低親和性 CD47 IgSF 分域突變體與 SIRP- α 變體之融合蛋白質
-----------	---



60	QLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNK STVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEQTREGETIIELK YRVVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEEEELQIIQPDKSV LVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKR NNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKSGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
61	QLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNK STVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEYTREGETIIELK YRVVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEEEELQIIQPDKSV LVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKR NNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKSGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
62	QLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNK STVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELQREGETIIELK YRVVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEEEELQIIQPDKSV LVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKR NNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKSGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
63	QLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNK STVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELRHREGETIIELK YRVVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEEEELQIIQPDKSV LVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKR NNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKSGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS

【0185】實施例 3-表現及生產供活體外研究的 SIRP- α 變體構築物

將包括 SIRP- α 變體與 CD47 系阻斷胜肽之各種 SIRP- α 變體構築物 (SEQ ID NO: 48-56) 於 Expi293-F 哺乳動物細胞中表現。所有的構築物均設計成帶有引導序列，此序列能使其表現成會分泌到培養基之蛋白質。所有的構築物均以可溶解的形式表現，並使用單步驟 IMAC 分離來純化以得高純度 (第 3A 及 3B 圖)。第 3A 圖顯示 SEQ ID NO: 48-56 之 SIRP- α 變體構築物之還原的 SDS-PAGE 凝膠，第 3B 圖顯示該 SIRP- α 變體構築物之非還原的 SDS-PAGE 凝膠。尺寸排除數據指出該 SIRP- α 變體構築物未聚集 (數據未顯示)。

【0186】實施例 4-SIRP- α 與 CD47 融合蛋白質之活體外裂解

爲了決定該 SIRP- α 變體構築物 (例如 SEQ ID NO: 48-63) 5

是否會專一地於腫瘤組織活體內裂解，使用蛋白酶 uPA 與 matriptase 實行活體外實驗以裂解該 SIRP- α 變體構築物，其中此類蛋白酶在癌中為正調節已為習知。起始實驗使用 SIRP- α 變體構築物 (SEQ ID NO: 54) 以決定蛋白酶之裂解能力並最佳化裂解條件。第 4 圖顯示 uPA 與 matriptase 之裂解能力的測試結果。使用過量的 uPA 或 matriptase 在 37°C 將 3 μ M SIRP- α 變體構築物 (SEQ ID NO: 54) 溫育 18 小時。第 4 圖第 1 行顯示未添加蛋白酶的對照實驗，第 2 行與第 3 行分別顯示該 SIRP- α 變體構築物 (SEQ ID NO: 54) 分別以 uPA 及 matriptase 溫育。第 4 圖獲得之數據明確證明藉由在 37°C 下以過量 uPA 及 matriptase 分解 SIRP- α 變體構築物 18 小時以裂解該 SIRP- α 變體構築物 (SEQ ID No: 54) 並於活體外釋放。該裂解的 SIRP- α 變體遷移 (migrate) 成 ~17 KDa 之分子量帶。裂解的 CD47 以油污 (smeary) 帶狀遷移，可能是由於約 36-40 kDa 處之糖化作用。藉由比對第 4 圖之第 2 及 3 行之未裂解的 SIRP- α 變體構築物的量，顯示使用 matriptase 較使用 Upa 會獲得更完整的裂解。

【0187】因此只使用 matriptase 實行裂解條件之進一步的最佳化，其結果顯示於第 4B 圖。測試不同量的 matriptase，且於 37°C 實行裂解 18 小時。第 4B 圖之第 1 行顯示無添加 matriptase 的對照實驗，第 2-4 行分別顯示以 44 ng、0.44 ng 及 0.167 ng 的 matriptase 來實行裂解。獲得之數據顯示 0.44 ng 酵素足以在目前條件下完整裂解。接著，使用最佳的裂解條件來裂解其餘的 SIRP- α 變體構築物。實例顯示於第 4C 圖，使用

最佳的裂解條件以將各個 SIRP- α 變體構築物(SEQ ID NO: 57-63)利用 matriptase 於活體外成功地裂解。第 4C 圖之第 1-7 行分別相應於 SEQ ID NO: 57-63 之未裂解的融合蛋白質。第 4C 圖之第 8-14 行分別對應於以 matriptase 裂解之 SEQ ID NO: 57-63 之融合蛋白質。

【0188】實施例 5-SIRP- α 變體構築物之結合親和性

人類 CD47-hFc(R & D Systems, 型錄號 4670-CD)對 SIRP- α 變體構築物之結合係使用補充 0.01% Tween-20 之磷酸緩衝鹽液(pH 7.4)作為運行緩衝液以在 Biacore T100 儀器(GE Healthcare)上進行分析。

【0189】藉由標準胺偶合將 CD47-hFc 之 370 諧振單元(Resonance Unit, RU)固定於 CM4 感應晶片(GE Healthcare)的流動槽(flow cell)2。將流動槽 1 以 EDC/NHS 活化並阻斷(以乙醇胺)以供作參考。將所有的 SIRP- α 變體構築物以 50 nM 或 100 nM 並以流速 30 μ L/min 注射 2 分鐘,接著為 10 分鐘解離時間。在每次注射之後,使用 Pierce IgG 提取緩衝液(Life Technologies, 型錄號 21004)與 4 M NaCl 之 2:1 混合物以再生(regenerate)該表面。藉由在開始及結束實驗時注射該 SIRP- α 變體以確認已完全地再生該表面。所有的感應圖係利用流動槽 1 及緩衝液注射以雙重參照。

【0190】針對所有的樣本,藉由 SIRP- α 變體構築物之分子量來決定並標準化結合 50 秒後於 100 nM 之結合信號,並以最大結合反應之百分比來表現。使用藉由分子量(MW)標準化之於 100 nM 的該 SIRP- α 變體(SEQ ID NO: 31)之結合作為最大結

合反應。第 5A 圖之結果顯示 SIRP- α 變體構築物 (SEQ ID NO: 48-51) 不會阻斷 SIRP- α 變體在晶片上結合於 CD47。將連結子裂解後，結合活性適度地增加。SIRP- α 變體構築物 (SEQ ID NO: 52-54) 有效地阻斷該 SIRP- α 變體在晶片上結合於 CD47。然而連結子裂解後，該 SIRP- α 變體在晶片上對 CD47 之結合只有適度地增加，指出該 SIRP- α 變體與 CD47 之 IgSF 分域間的交互作用之高親和性維持該複合體在一起，因此 CD47 之 IgSF 分域即使在連結子裂解後仍持續阻斷該 SIRP- α 變體。令人意外地，當 CD47 之 IgSF 分域融合於 SIRP- α 之 C 端 (SEQ ID NO: 55)，會有效地阻斷完整的 SIRP- α 變體構築物結合於晶片上之 CD47 (SEQ ID NO: 52-54 之融合蛋白質亦同)，但連結子之裂解回復了 100% 之該 SIRP- α 變體在晶片上對 CD47 之結合，指出 CD47 之 IgSF 分域在連結子裂解後從該 SIRP- α 變體中解離，因此該 SIRP- α 變體自由地結合於晶片上之 CD47。之後測試另一構築物，其具有融合於 SIRP- α 變體 C 端之 CD47 (見第 5B 圖)。含有較長分隔子之此構築物 (SEQ ID NO: 56) 也於裂解後回復活性，確認了連結 CD47 系阻斷胜肽 N 端到 SIRP- α 變體 C 端的一般方法獲得 SIRP- α 構築物，其中 CD47 系阻斷胜肽有效地阻斷該 SIRP- α 變體，且於可裂解的連結子裂解後解離。

【0191】爲了進一步檢查 SIRP- α 變體構築物之結合親和性，依照前述同樣程序在 Biacore 儀器上分析 SEQ ID NO: 52-63 之 SIRP- α 變體構築物。SEQ ID NO: 52-54 之 SIRP- α 變體構築物包括具有胺基酸 1-117 及 C15S 的 CD47 IgSF 分域，其相對於經由可裂解的連結子 LSGRSDNH 及不同長度的多個分隔子

融合於該 SIRP- α 變體 (SEQ ID NO: 31) 之 N 端的野生型 CD47 (SEQ ID NO: 35)。SEQ ID NO: 55 及 56 之 SIRP- α 變體構築物包括具有胺基酸 1-117 及 C15S 的 CD47 IgSF 分域，其相對於經由可裂解的連結子 LSGRSDNH 及不同長度的多個分隔子融合於該 SIRP- α 變體 (SEQ ID NO: 31) 之 C 端的野生型 CD47 (SEQ ID NO: 35)。SEQ ID NO: 57-59 之 SIRP- α 變體構築物包括具有胺基酸 1-118 及 C15S 的 CD47 IgSF 分域，其相對於經由可裂解的連結子 LSGRSDNH 及不同長度的多個分隔子融合於該 SIRP- α 變體 (SEQ ID NO: 31) 之 N 端的表 6 之 SEQ ID NO: 46。SEQ ID NO: 60-63 之 SIRP- α 變體構築物包括具有表 6 之 SEQ ID NO: 41、42、44 及 45 之胺基酸 1-117 的 CD47 IgSF 分域，其分別經由可裂解的連結子 LSGRSDNH 及不同長度的多個分隔子融合於該 SIRP- α 變體 (SEQ ID NO: 31) 之 N 端。

【0192】第 5B 圖顯示有效地阻斷 SEQ ID NO: 55 及 56 之 SIRP- α 變體構築物在連結子裂解前結合於晶片上之 CD47，但連結子裂解後則回復 100% 的結合活性。類似的結果可於 SEQ ID NO: 57-63 之 SIRP- α 變體構築物中觀察到。可觀察到藉由 1 個甘胺酸殘基使 CD47 系阻斷胜肽之 N 端延長，所產生的 SIRP- α 變體構築物會在連結子裂解前有效率地被阻斷，且於蛋白酶處理後回復接近 100% 的 CD47 結合活性 (SEQ ID NO: 57-59)，證明連結子裂解後，CD47 系阻斷胜肽會從該 SIRP- α 變體中解離。

【0193】此結果指出經由可裂解的連結子與分隔子融合於 CD47 系阻斷胜肽之 N 端的 SIRP- α 變體可良好地運作。此可裂 s

解的連結子使融合複合體安定，且一旦被裂解，包括附著於 CD47 系阻斷胜肽 N 端的可裂解的連結子片段之 CD47 系阻斷胜肽的延長 N 端會阻止 CD47 系阻斷胜肽結合於該 SIRP- α 變體。同樣效果也可藉由由可裂解的連結子及一或更多分隔子以將具有一或更多諸如甘胺酸附加的胺基酸附加(例如表 6 中 SEQ ID NO: 46 之序列)於其 N 端之 CD47 系阻斷胜肽融合到 SIRP- α 變體之 C 端而獲得。同樣效果也可藉由可裂解的連結子及一或更多分隔子以融合 CD47 系阻斷胜肽至 SIRP- α 變體之 C 端而獲得，該 CD47 系阻斷胜肽包括一或更多胺基酸取代，例如 L101Q、L101Y、L101H、T102Q 或 T102H(例如表 6 之 SEQ ID NO: 41-45)。證明了 CD47 系阻斷胜肽能融合於 SIRP- α 變體之 C 端，並在結合子裂解前阻斷 SIRP- α 變體結合於 CD47，且於連結子裂解後釋放 SIRP- α 變體(見例如第 5A 圖之 SEQ ID NO: 55 及第 5B 圖之 SEQ ID NO: 55 及 56)。

【0194】基於上述資訊，可以製作 CD47 阻斷之 SIRP- α 變體融合蛋白質，即藉由選擇提供較佳藥物動力學、效力、安全性、產量及產物安定性之結果的取向(例如 N-或 C 端融合)來融合 Fc 分域單元體或 HAS 於 SIRP- α 變體。

【0195】實施例 6-經由抗體結合胜肽之 SIRP- α 變體之特定靶向

首先，使用已知其包括對具有 SEQ ID NO: 64 序列之 DLP 的結合部位之 Cetuximab 來檢驗包括 SIRP- α 變體及 DLP 之該 SIRP- α 變體構築物是否能集中於結合抗體。使用 EDC/NHS 化學藥品於 CM4 biacore 晶片(2000RU)上以固定 Cetuximab，並

使用 PBS 0.01% P20 作為運行及樣本緩衝液以將 100 nM 及 50 nM 的該 SIRP- α 變體構築物(SEQ ID NO: 66)以 30 μ L/min 流動到晶片(biacore T100)上。第 6 圖顯示該 SIRP- α 變體構築物而非僅有 SIRP- α 變體結合至晶片上。接著，注射 CD47-ECD 並觀察到當使用該 SIRP- α 變體構築物時會有 CD47 結合，證明該 SIRP- α 變體構築物能同時結合 EGFR 與 CD47(第 6 圖)。因此，包括 SIRP- α 變體與及注射至癌病患的 DLP 之 SIRP- α 變體構築物可集中在治療抗體(例如 Cetuximab)的部位，以增加療效並減少毒性。

【0196】接著，證明了包括 SIRP- α 變體及 DLP 之該 SIRP- α 變體構築物能可先結合於已結合到 EGFR 之 Cetuximab，然後再結合 CD47。結合複合體之圖顯示於第 7 圖。使用 EDC/NHS 化學藥品將 3000 RU 之 hrEGFR-Fc(R&D Systems)固定於 CM4 晶片。使用 PBS 0.01% P20 作為樣本及運行緩衝液，以 30 μ L/min(Biacore T100)注射不同濃度(4、20 及 100 nM)之 Cetuximab。可觀察到 Cetuximab 結合於固定化的 hrEGFR-Fc。然後注射 100 nM 之該 SIRP- α 變體構築物(SEQ ID NO: 66)並觀察其結合。當只單獨注射該 SIRP- α 變體時，並未觀察到其結合。接著注射 100 nM 之 CD47-ECD 並觀察到其結合。數據顯示於第 7B 圖及第 7C 圖。因此，證明了形成 SEQ ID NO: 66-CD47 之四級複合體 EGFR-Cetuximab-SIRP- α 變體構築物之為可能的。當構築物藉由專一性結合於腫瘤專一性抗體(例如 Cetuximab)以預先集中於該患病部位時，包括 SIRP- α 變體與 DLP 之 SIRP- α 變體構築物能結合並抑制 CD47。此外，依照同 s

樣的概念，當構築物藉由專一性結合於腫瘤專一性抗體(例如 Cetuximab)以預先集中於該患病的部位時，包括 SIRP- α 變體、DLP 及 CD47 系阻斷胜肽之 SIRP- α 變體構築物能夠結合並抑制 CD47。

【0197】實施例 7-吞噬作用分析

測試包括經由分隔子附著於 DLP 之 SIRP- α 變體的 SIRP- α 變體構築物(SEQ ID NO: 66)及 SIRP- α 變體(SEQ ID NO: 31)其在 DLD1 細胞之吞噬作用(第 8 圖)。吞噬作用分析依照例如 Weiskopf et al, *Science* 341:88-91, 2013 之記載來實行。實驗流程記載如下。推測由於在疾病細胞中之堆積較多，故該 SIRP- α 變體構築物(SEQ ID NO: 66)較單一 SIRP- α 變體(SEQ ID NO: 31)顯示較高之效力。

【0198】棕黃層(Buffy coat)係從史丹福血液中心之匿名捐贈者獲得，利用 Ficoll-Paque Premium(GE Healthcare)以密度梯度離心大量收集(enrich)周邊血液單核細胞。單核球使用 Macs Miltenyi Biotec Monocyte Isolation Kit II 依製造指示純化。此為間接的磁性標記系統以將單核球從人類 PBMC 中分離。將分離的單核球利用培養於補充 10%熱失活人類 AB 血清及 1% GlutaMax 及 1%盤尼西林及鏈黴素(GIBCO Life Technologies)的 RPMI 1640 培養基中 6-10 天以分化成巨噬體(macrophage)。為了吞噬作用分析，將 100,000 GFP+ DLD-1 細胞接種(plate)在超低附著 U 底 96 井盤(Corning 7007)之井中。將 50 μ L/well 之 4 μ g/ml IgG1k 同型對照或 4 μ g/ml 之 Cetuximab(Absolute Antibody, Ab00279-10.0)添加到 DLD-1 癌

細胞，並在室溫預先溫育 30 分鐘。接著，添加 50 μ L/well SIRP- α 變體，亦添加 50 μ L/well 巨噬體 (1×10^6 /ml)(50,000 巨噬體)到各個井中。抗體與 SIRP- α 構築物樣本之最終稀釋比為 1:4。Cetuximab 最終濃度為 1 μ g/ml。巨噬體、癌細胞、抗體及 SIRP- α 變體構築物在 37°C 共同溫育 2 小時。為了分析，將細胞樣本固定、染色並以 BD FACS Canto 分析。使用抗 CD14，抗 CD45 或抗 CD206 抗體 (BioLegend) 以流式細胞儀鑑別一級人類巨噬體。利用 DAPI (Sigma) 染色以排除死細胞於分析之外。吞噬作用係以 GFP+ 巨噬體之百分比來評估，並藉由各個獨立捐贈者對各個細胞株來標準化至最大反應。

【0199】 實施例 8-模擬 SIRP- α 變體對 CD47 之 pH 依存性結合

為了設計本發明之 SIRP- α 變體之 pH 依存性結合，可對該 SIRP- α ，特別對 SIRP- α 中與 CD47 交互作用之部分進行組胺酸突變。可使用 SIRP- α 與 CD47 複合體之晶體結構 (見例如 PDB ID No. 2JJS) 及電腦模擬以將 SIRP- α 與 CD47 之三維結合部位可見化。有用於設計蛋白質使其具有 pH 敏感結合性質之計算設計及模擬方法的文獻已為該技術領域所習知，並記載於例如 Strauch et al., *Proc Natl Acad Sci* 111:675-80, 2014，在此引入其全文作為參考。於一些實施例，可使用電腦模擬以鑑別 SIRP- α 與 CD47 之交界的關鍵接觸殘基。鑑別出的關鍵接觸殘基可使用蛋白質設計軟體 (例如 RosettaDesign) 以將其取代成組胺酸殘基，此軟體能產生各種蛋白質設計，其可被最佳化、過濾並以計算的結合能量及形狀互補性加以排序。因此，可使用計算

設計法來鑑別出在特定胺基酸部位之能量上有利的組胺酸取代。也可使用電腦模擬以預測 SIRP- α 之三維結構的改變。可避免會使 SIRP- α 之三維結構產生顯著改變的組胺酸取代。

【0200】一旦鑑別出能量上及結構上最佳的胺基酸取代，可將胺基酸系統性地取代為組胺酸殘基。於一些實施例，可將 SIRP- α 之一或更多(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 等，最多 20 個)胺基酸取代成組胺酸殘基。具體而言，可將位在 SIRP- α 與 CD47 之交界的胺基酸，較佳為直接涉及 SIRP- α 結合於 CD47 之胺基酸，可被取代為組胺酸殘基。本發明之該 SIRP- α 變體可包括一或更多(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 等，最多 20 個)組胺酸殘基取代。於其他實施例，可將 SIRP- α 之自然存在的組胺酸殘基取代成其他胺基酸殘基。於其他實施例，為了影響自然存在或取代的組胺酸殘基與 CD47 結合，可以將 SIRP- α 之一或更多胺基酸取代成非組胺酸殘基。例如，將圍繞自然存在之組胺酸殘基的胺基酸取代成其他的胺基酸可能會“掩藏(bury)”此自然存在之組胺酸殘基。於一些實施例，亦可將未直接涉及與 CD47 之結合之胺基酸，即內部胺基酸(例如位在 SIRP- α 之核心之胺基酸)取代為組胺酸殘基。表 4 列出可以取代成組胺酸的特定 SIRP- α 胺基酸。接觸殘基係位在 SIRP- α 與 CD47 之交界的胺基酸。核心殘基為未直接涉及 SIRP- α 與 CD47 間之結合的內部胺基酸。該 SIRP- α 變體可包括一或更多(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 等或全部)表 4 列出之取代。

實施例 9-產生及篩選對 CD47 具有 pH 依存性結合之

SIRP- α 變體

【0201】包括一或更多(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 等，最多 20 個)以組胺酸殘基取代之胺基酸取代之 SIRP- α 變體可使用傳統的分子選殖及蛋白質表現技術來產生。可將編碼爲本發明之 SIRP- α 變體的核酸分子使用習知的分子生物技術選殖到最適合在細菌表現的載體。接著可將該載體轉形到細菌細胞(例如 *E. coli* 細胞)，其可於蛋白質表現誘導前生長成最佳的密度。蛋白質表現誘導後(即，使用 IPTG)，可以使細菌細胞再生長額外的 24 小時。可收集細胞並將表現的 SIRP- α 變體蛋白質使用例如親和性管柱層析使其從細胞培養基之上清液純化。已純化的 SIRP- α 變體可利用 SDS-PAGE 分析，再利用 Coomassie Blue 染色以確認存在有期望的大小之蛋白質染色帶(band)。

【0202】已純化的 SIRP- α 變體可使用該技術領域可得的技術篩選其對 CD47 之 pH 依存性結合，例如噬菌體呈現、酵母菌呈現、表面電漿共振、鄰近閃爍分析(scintillation proximity assays)、ELISA，ORIGEN 免疫分析(IGEN)、螢光淬滅(fluorescence quenching)及/或螢光轉移。也可使用適當的生物分析來篩選其結合。期望的 SIRP- α 變體在酸性 pH(例如低於 pH 7(例如 pH 6))下比起在中性 pH(例如 pH 7.4)對 CD47 具有較高之結合親和性。SIRP- α /CD47 複合體在 pH 6 之 KD 低於 SIRP- α /CD47 複合體在 pH 7.4 之 KD。

【0203】實施例 10-在大鼠中測試對於 CD47 有 pH 依存性結合之 SIRP- α 變體

5

可使用諸如固體腫瘤與血液性癌之各種癌之基因改造小鼠模型以測定本發明之 SIRP- α 變體對 CD47 在小鼠模型之患病的部位之 pH 依存性結合。可將 SIRP- α 變體直接或間接注射到小鼠的患病部位，其可被解剖以檢測是否於該患病的部位存在 SIRP- α 變體與 CD47 之複合體。可使用專一於 SIRP- α 變體或 CD47 之抗體於檢測中。

【0204】其他實施例

所有以上提及的出版物、專利及專利申請案皆在此引入作為參考。對該技術領域中有通常知識者而言，不偏離本發明範疇及精神之本發明所記載之組合物及方法的各種修飾及變形係為顯而易見。雖然本發明已與特定實施例連結以描述，但應了解本發明並非意在限制此類特定實施例。事實上，用於實行本發明之對該技術領域中有通常知識者為顯而易見的發明上述方法之各種修飾意在本發明之範疇內。其他實施例包括在以下的申請專利範圍內。

【符號說明】

無。

申請專利範圍

1. 一種信號調節蛋白 α (SIRP- α)變體構築物，包括一 SIRP- α 變體，其中，該 SIRP- α 變體構築物較優先結合於患病細胞或患病部位而不是非患病細胞上之 CD47。
2. 如申請專利範圍第 1 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 SIRP- α 變體構築物結合於患病細胞或患病部位上之 CD47 較其結合於非患病細胞上之 CD47 具有更高之親和性。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 SIRP- α 變體利用至少一分隔子附著於一阻斷胜肽。
4. 如申請專利範圍第 3 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該阻斷胜肽對一野生型 SIRP- α 比起對該 SIRP- α 變體具有更高的結合親和性。
5. 如申請專利範圍第 3 或 4 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 SIRP- α 變體對一野生型 CD47 比起對該阻斷胜肽具有更高的結合親和性。
6. 如申請專利範圍第 3 至 5 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該阻斷胜肽為一 CD47 系阻斷胜肽。
7. 如申請專利範圍第 6 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 CD47 系阻斷胜肽對該野生型 CD47 之 IgSF 分域 (SEQ ID NO: 35) 或其片段之序列具有至少 80% 之胺基酸序列同一性。
8. 如申請專利範圍第 6 或 7 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 CD47 系阻斷胜肽具有 SEQ ID NO: 38 或 40 之序列。
9. 如申請專利範圍第 3 至 8 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 SIRP- α 變體利用一可裂解的連結子及可選的

5

- 一或更多分隔子附著於該阻斷胜肽。
- 10.如申請專利範圍第 9 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該可裂解的連結子於酸性 pH 及/或缺氧條件下被裂解。
 - 11.如申請專利範圍第 9 或 10 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該可裂解的連結子藉由一腫瘤關連酵素裂解。
 - 12.如申請專利範圍第 11 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該腫瘤關連酵素為蛋白酶。
 - 13.如申請專利範圍第 12 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該蛋白酶選自由以下構成的群組：matriptase(MTSP1)、尿型胞漿素元活化劑(plasminogen activator(uPA))、legumain、PSA(也稱為 KLK3，激肽釋放酶關連肽酶-3(kallikrein-related peptidase-3))、基質金屬蛋白酶-2(MMP-2)、MMP9、人類嗜中性彈性蛋白酶(neutrophil elastase(HNE)及蛋白酶 3(Pr3)。
 - 14.如申請專利範圍第 13 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該蛋白酶為 matriptase。
 - 15.如申請專利範圍第 9 至 14 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該可裂解的連結子具有 LSGRSDNH(SEQ ID NO: 47)之序列或列於表 7 之任一序列。
 - 16.如申請專利範圍第 1 至 15 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 SIRP- α 變體附著於一抗體結合胜肽。
 - 17.如申請專利範圍第 16 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該抗體結合胜肽可逆或不可逆地結合於一抗體之不變區。
 - 18.如申請專利範圍第 16 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該抗體結合胜肽可逆或不可逆地結合於一抗體之片段抗原結

合(Fab)區。

- 19.如申請專利範圍第 16 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該抗體結合胜肽可逆或不可逆地結合於一抗體之可變區。
- 20.如申請專利範圍第 16 至 19 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該抗體為 Cetuximab。
- 21.如申請專利範圍第 16 至 20 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該抗體結合胜肽與一疾病局部化胜肽(DLP)(SEQ ID NO: 64 或 65)或其片段之序列具有至少 75%之胺基酸序列同一性。
- 22.如申請專利範圍第 21 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該抗體結合胜肽有 SEQ ID NO: 64 之序列。
- 23.如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 SIRP- α 變體附著於一 Fc 分域單元體。
- 24.如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 SIRP- α 變體附著於一人類血清白蛋白(HSA)。
- 25.如申請專利範圍第 24 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 HSA 包括胺基酸取代 C34S 及 / 或 K573P，其相對於
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHV
KLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATL
RETYGEMADCCA KQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEV
DVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKR
YKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKC
ASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTK
VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK ₅

PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAE
AKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCC
AAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEY
KFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHP
EAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESL
VNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQI
KKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKAD
DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL(SEQ ID NO: 67)之序列。

26. 如申請專利範圍第 25 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 HSA 具有

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHV
KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL
RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRPVRPEV
DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKR
YKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKC
ASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTK
VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK
PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAE
AKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCC
AAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEY
KFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHP
EAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESL
VNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQI
KKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKAD
DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL(SEQ ID NO: 68)之序列。

- 27.如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 SIRP- α 變體附著於一白蛋白結合胜肽。
- 28.如申請專利範圍第 27 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該白蛋白結合胜肽具有 SEQ ID NO: 64 之序列。
- 29.如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 SIRP- α 變體附著於一聚合物，其中，該聚合物為聚乙二醇(PEG)鏈或聚唾液酸鏈。
- 30.如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 SIRP- α 變體附著於一抗體。
- 31.如申請專利範圍第 30 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該抗體為腫瘤專一性抗體。
- 32.如申請專利範圍第 30 或 31 項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該抗體選自由以下構成的群組：cetuximab、pembrolizumab、nivolumab、pidilizumab、MEDI0680、MEDI6469、Ipilimumab、tremelimumab、urelumab、vantictumab、varlilumab、mogamalizumab、抗 CD20 抗體、抗 CD19 抗體、抗 CS1 抗體、herceptin、trastuzumab、pertuzumab，及可結合於以下之一或更多分子之抗體：5T4、AGS-16、ALK1、ANG-2、B7-H3、B7-H4、c-fms、c-Met、CA6、CD123、CD19、CD20、CD22、EpCAM、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CD74、CD79b、CD98、CEA、CEACAM5、CLDN18.2、CLDN6、CS1、CXCR4、DLL-4、EGFR、EGP-1、ENPP3、EphA3、ETBR、FGFR2、纖網蛋白(fibronectin)、FR-alpha、GCC、GD2、glypican-3、

GPNMB、HER-2、HER3、HLA-DR、ICAM-1、IGF-1R、IL-3R、LIV-1、mesothelin、MUC16、MUC1、NaPi2b、Nectin-4、Notch 2、Notch 1、PD-L1、PD-L2、PDGFR- α 、PS、PSMA、SLTRK6、STEAP1、TEM1、VEGFR、CD25、CD27L、DKK-1及/或 CSF-1R。

33.如申請專利範圍第 1 至 32 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 SIRP- α 變體與 SEQ ID NO: 3-12 及 24-34 之任一序列具有至少 80%序列同一性。

34.如申請專利範圍第 1 至 33 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 SIRP- α 變體具有 EEEX₁QX₂IQPDKSVLVAAGETX₃TLRCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈GX₉FP RVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFSIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDDVEX₁₆KSGAGTELSVRAKPS(SEQ ID NO: 13)之序列，其中，X₁為 L、I 或 V；X₂為 V、L，或 I；X₃為 A 或 V；X₄為 A、I 或 L；X₅為 I、T、S 或 F；X₆為 E、V 或 L；X₇為 K 或 R；X₈為 E 或 Q；X₉為 H、P 或 R；X₁₀為 L、T 或 G；X₁₁為 K 或 R；X₁₂為 N、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y；X₁₃為 P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W 或 Y；X₁₄為 V 或 I；X₁₅為 F、L 或 V；且 X₁₆為 F 或 V。

35.如申請專利範圍第 1 至 33 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 SIRP- α 變體具有 EEGX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILHCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈GX₉FP

RVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFSIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄K
X₁₅RKGSPDDVEX₁₆KSGAGTELSVRAKPS(SEQ ID NO: 16)
之序列，其中，X₁為L、I或V；X₂為V、L，或I；X₃為
A或V；X₄為A、I或L；X₅為I、T、S或F；X₆為E、V
或L；X₇為K或R；X₈為E或Q；X₉為H、P或R；X₁₀
為L、T或G；X₁₁為K或R；X₁₂為N、A、C、D、E、F、
G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W或Y；X₁₃
為P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、
S、T、V、W或Y；X₁₄為V或I；X₁₅為F、L或V；且X₁₆
為F或V。

36.如申請專利範圍第1至33項中任一項之SIRP- α 變體構築物，
其中，該SIRP- α 變體具有EEEX₁QX₂IQPDKFVLVAAGETX₃
TLRCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈GX₉FP
RVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFSIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄K
X₁₅RKGSPDDVEX₁₆KSGAGTELSVRAKPS(SEQ ID NO: 17)
之序列，其中，X₁為L、I或V；X₂為V、L，或I；X₃為
A或V；X₄為A、I或L；X₅為I、T、S或F；X₆為E、V
或L；X₇為K或R；X₈為E或Q；X₉為H、P或R；X₁₀
為L、T或G；X₁₁為K或R；X₁₂為N、A、C、D、E、F、
G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W或Y；X₁₃
為P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、
S、T、V、W或Y；X₁₄為V或I；X₁₅為F、L或V；且X₁₆
為F或V。

37.如申請專利範圍第1至33項中任一項之SIRP- α 變體構築物，

其中，該 SIRP- α 變體具有 EEEX₁QX₂IQPDKSVLVAAGETX₃
TLRCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈GX₉FP
RVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFPIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄K
X₁₅RKGSPDDVEX₁₆KSGAGTELSVRAKPS(SEQ ID NO: 18)
之序列，其中，X₁ 為 L、I 或 V；X₂ 為 V、L，或 I；X₃ 為
A 或 V；X₄ 為 A、I 或 L；X₅ 為 I、T、S 或 F；X₆ 為 E、V
或 L；X₇ 為 K 或 R；X₈ 為 E 或 Q；X₉ 為 H、P 或 R；X₁₀
為 L、T 或 G；X₁₁ 為 K 或 R；X₁₂ 為 N、A、C、D、E、F、
G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y；X₁₃
為 P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、
S、T、V、W 或 Y；X₁₄ 為 V 或 I；X₁₅ 為 F、L 或 V；且 X₁₆
為 F 或 V。

38. 如申請專利範圍第 1 至 33 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，
其中，該 SIRP- α 變體具有 EEEX₁QX₂IQPDKSVLVAAGETX₃
TLRCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈GX₉FP
RVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFSIRISX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄K
X₁₅RKGSPDDVEX₁₆KSGAGTELSVRAKPS(SEQ ID NO: 21)
之序列，其中，X₁ 為 L、I 或 V；X₂ 為 V、L，或 I；X₃ 為
A 或 V；X₄ 為 A、I 或 L；X₅ 為 I、T、S 或 F；X₆ 為 E、V
或 L；X₇ 為 K 或 R；X₈ 為 E 或 Q；X₉ 為 H、P 或 R；X₁₀
為 L、T 或 G；X₁₁ 為 K 或 R；X₁₂ 為 N、A、C、D、E、F、
G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y；X₁₃
為 P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、
S、T、V、W 或 Y；X₁₄ 為 V 或 I；X₁₅ 為 F、L 或 V；且 X₁₆

為 F 或 V。

39. 如申請專利範圍第 1 至 33 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 SIRP- α 變體具有 EEEX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILHCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPARX₆LIYNQX₇X₈GX₉FP RVTTVSEX₁₀TX₁₁RENMDFSISISX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDTEX₁₆KSGAGTELSVRAKPS(SEQ ID NO: 14)之序列，其中，X₁為 L、I 或 V；X₂為 V、L，或 I；X₃為 A 或 V；X₄為 V、I 或 L；X₅為 I、T、S 或 F；X₆為 E、V 或 L；X₇為 K 或 R；X₈為 E 或 Q；X₉為 H、P 或 R；X₁₀為 S、T 或 G；X₁₁為 K 或 R；X₁₂為 N、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y；X₁₃為 P、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W 或 Y；X₁₄為 V 或 I；X₁₅為 F、L 或 V；且 X₁₆為 F 或 V。
40. 如申請專利範圍第 1 至 33 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 SIRP- α 變體具有 EEEX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILLCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPARX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPR VTTVSEX₁₀TX₁₁RENMDFSISISX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDTEX₁₆KSGAGTELSVRAKPS(SEQ ID NO: 15)之序列，其中，X₁為 L、I 或 V；X₂為 V、L，或 I；X₃為 A 或 V；X₄為 V、I 或 L；X₅為 I、T、S 或 F；X₆為 E、V 或 L；X₇為 K 或 R；X₈為 E 或 Q；X₉為 H、P 或 R；X₁₀為 S、T 或 G；X₁₁為 K 或 R；X₁₂為 N、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W 或 Y；X₁₃為 P、A、C、D、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W 或 Y；X₁₄為 V 或 I；X₁₅為 F、L 或 V；且 X₁₆為 F 或 V。

物包括一或更多醫藥上可接受之載具或賦形劑。

58.一種增加受試者之標靶細胞的吞噬作用之方法，包括對該受試者投予如申請專利範圍第 1 至 51 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物或如申請專利範圍第 56 或 57 項之醫藥組合物。

59.如申請專利範圍第 58 項之增加受試者之標靶細胞的吞噬作用之方法，其中該標靶細胞為癌細胞。

60.一種消除受試者之調節性 T 細胞之方法，包括對該受試者投予如申請專利範圍第 1 至 51 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物或如申請專利範圍第 56 或 57 項之醫藥組合物。

61.一種殺死癌細胞之方法，包括使該癌細胞接觸如申請專利範圍第 1 至 51 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物或如申請專利範圍第 56 或 57 項之醫藥組合物。

62.一種治療在受試者中與 SIRP- α 及/或 CD47 活性關連之疾病的方法，包括對該受試者投予治療有效量之如申請專利範圍第 1 至 51 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物或如申請專利範圍第 56 或 57 項之醫藥組合物。

63.一種治療受試者中與 SIRP- α 及/或 CD47 活性關連之疾病的方法，包括：

(a) 決定該受試者之 SIRP- α 的胺基酸序列；

(b) 對該受試者投予治療有效量之如申請專利範圍第 1 至 51 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物；

其中，該 SIRP- α 變體構築物之該 SIRP- α 變體與該受試者之 SIRP- α 具有相同的胺基酸序列。

64.一種治療受試者中與 SIRP- α 及/或 CD47 活性關連之疾病的

方法，包括：

- (a) 決定該受試者之 SIRP- α 的胺基酸序列；及
- (b) 對該受試者投予治療有效量之如申請專利範圍第 1 至 51 項中任一項之 SIRP- α 變體；

其中，該 SIRP- α 變體構築物之該 SIRP- α 變體在該受試者中具有最小之免疫原性。

65. 一種治療受試者中與 SIRP- α 及/或 CD47 活性關連之疾病的方法，包括：向該受試者投予如申請專利範圍第 1 至 51 項中任一項之 SIRP- α 變體構築物，其中，該 SIRP- α 變體構築物優先結合於患病細胞或患病部位上之 CD47 而不是非患病細胞上之 CD47。

66. 如申請專利範圍第 62 至 65 項中任一項之方法，其中，該疾病為癌。

67. 如申請專利範圍第 66 項之方法，其中，該癌係選自由以下構成的群組：固體腫瘤癌、血液性癌、急性骨髓性白血病、慢性淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴細胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、多發性骨髓瘤、膀胱癌、胰腺癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、肺癌、支氣管癌、肝癌、卵巢癌、結腸和直腸癌、胃癌、胃癌、膽囊癌、胃腸道間質腫瘤癌、甲狀腺癌、頭和頸癌、口咽癌、食道癌、黑色素瘤、非黑色素瘤皮膚癌、默克爾細胞癌、病毒誘導的癌症、神經母細胞瘤、乳癌、前列腺癌、腎癌、腎細胞癌、腎盂癌、白血病、淋巴瘤、肉瘤、神經膠質瘤、腦腫瘤及癌 (carcinoma)。

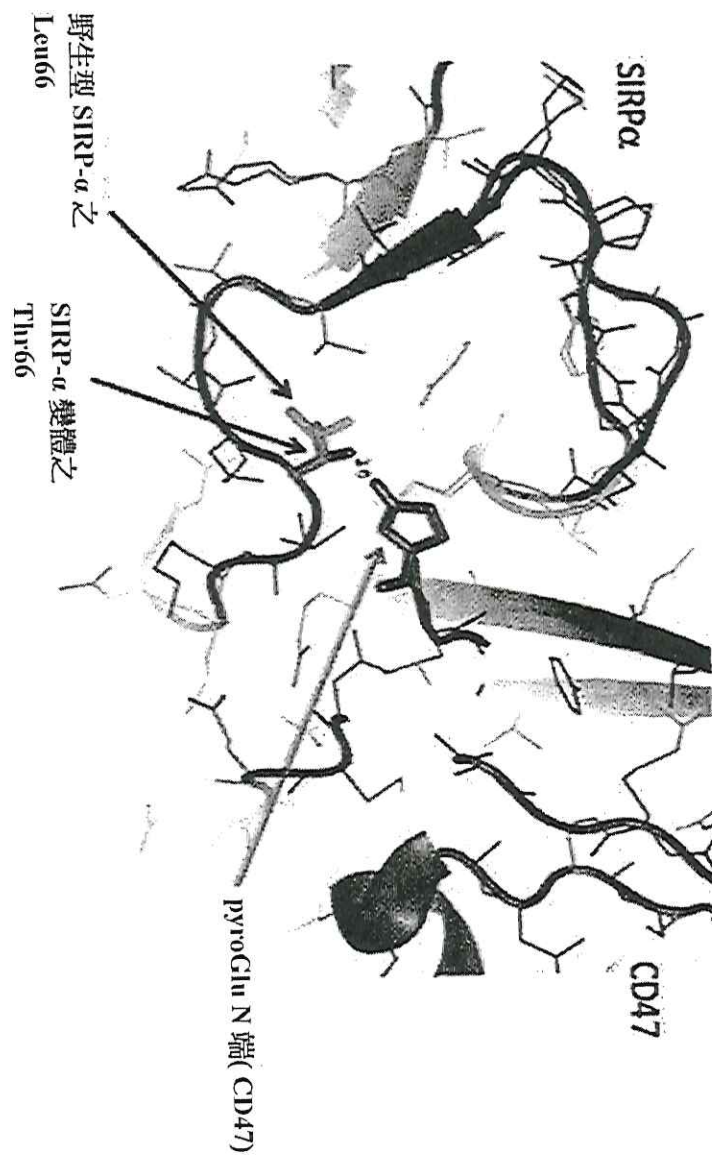
5

- 68.如申請專利範圍第 67 項之方法，其中，該癌為固體腫瘤癌。
- 69.如申請專利範圍第 67 項之方法，其中，該癌為血液性癌。
- 70.如申請專利範圍第 62 至 65 項中任一項之方法，其中，該疾病為一免疫疾病。
- 71.如申請專利範圍第 70 項之方法，其中，該免疫疾病為一自體免疫疾病或發炎性疾病。
- 72.如申請專利範圍第 71 項之方法，其中，該自體免疫或發炎性疾病為多發性硬化症、類風濕關節炎、脊柱關節病、全身性紅斑狼瘡、抗體中介之發炎性或自體免疫疾病、移植抗宿主病、膿毒症、糖尿病、牛皮癬、動脈粥樣硬化、Sjogren 氏綜合症、進行性全身性硬化症、硬皮病、急性冠狀動脈症候群、缺血再灌注、克羅恩病、子宮內膜異位症、腎小球腎炎、重症肌無力、特發性肺纖維化、哮喘、急性呼吸窘迫症候群（ARDS）、血管炎或發炎性自體免疫肌炎。
- 73.一種增加受試者之造血幹細胞植入之方法，包括藉由對該受試者投予如申請專利範圍第 1-51 中任一項之 SIRP- α 變體或如申請專利範圍第 56 或 57 項之醫藥組合物以調節該受試者之 SIRP- α 與 CD47 間之交互作用。
- 74.一種改變受試者之免疫反應之方法，包括對該受試者投予如申請專利範圍第 1-51 中任一項之 SIRP- α 變體構築物或如申請專利範圍第 56 或 57 項之醫藥組合物，從而改變該受試者之免疫反應。

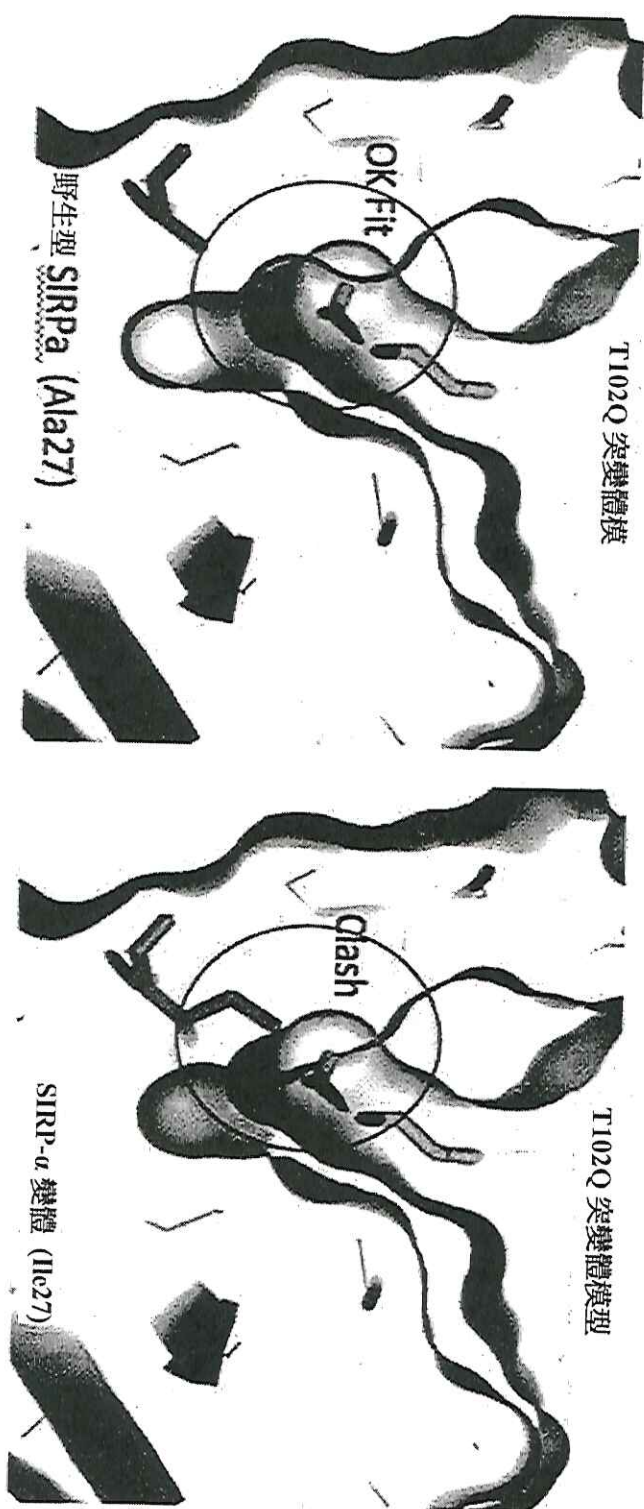
75.如申請專利範圍第 74 項之改變受試者之免疫反應答之方法，其中，改變該免疫反應包括抑制該免疫反應。

76.如申請專利範圍第 58 至 75 項中任一項之方法，其中，該受試者為哺乳動物，較佳為該哺乳動物為人。

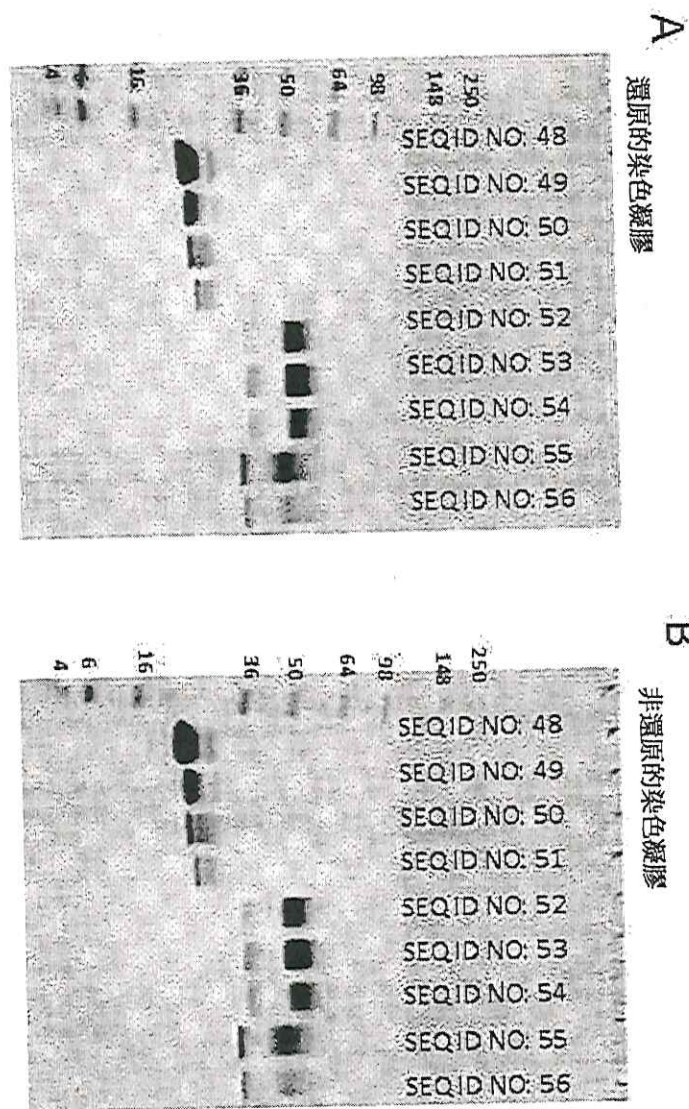
圖式



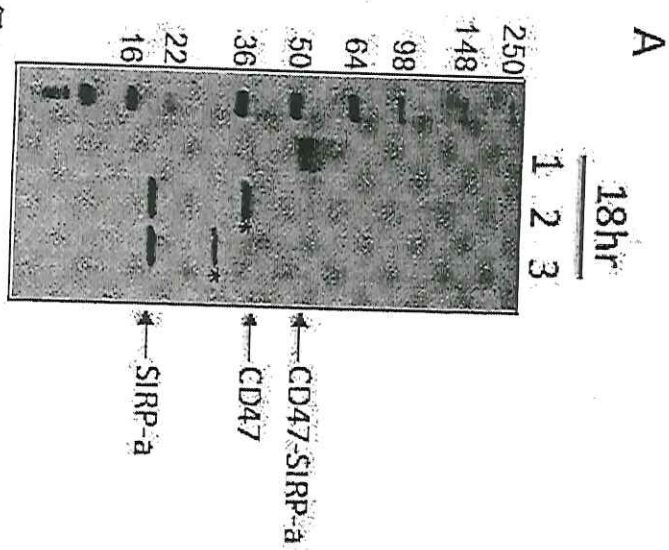
第 1 圖



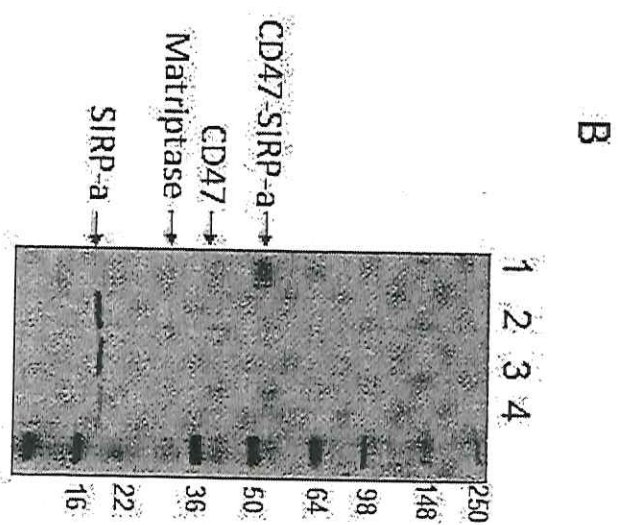
第 2 圖



第 3 圖



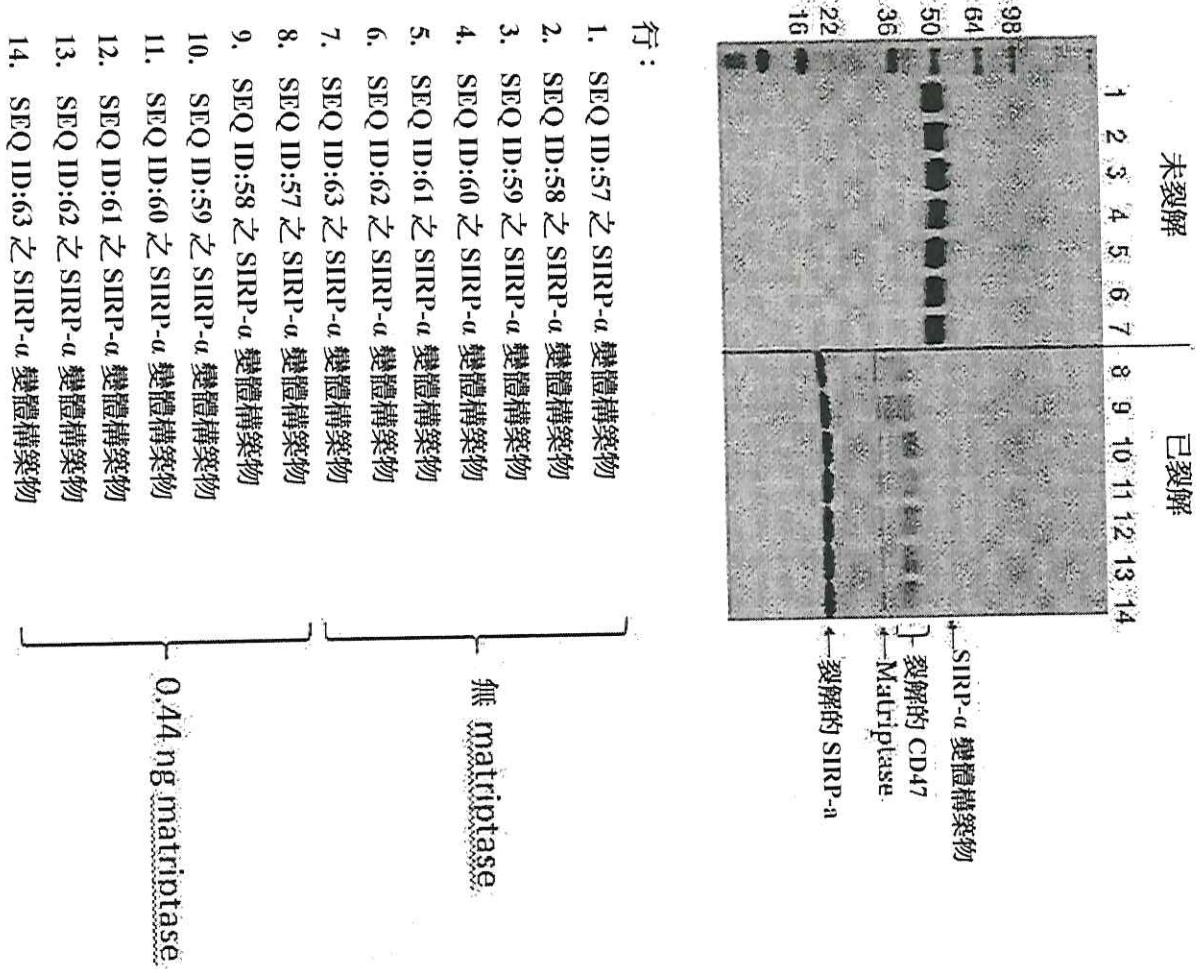
行：
1. 無蛋白酶
2. uPA
3. Matrilipase
*代表過量 uPA 或 matrilipase 的帶位置



行：
1. 無 matrilipase
2. 44 ng 之 matrilipase
3. 0.44 ng 之 matrilipase
4. 0.167 ng 之 matrilipase

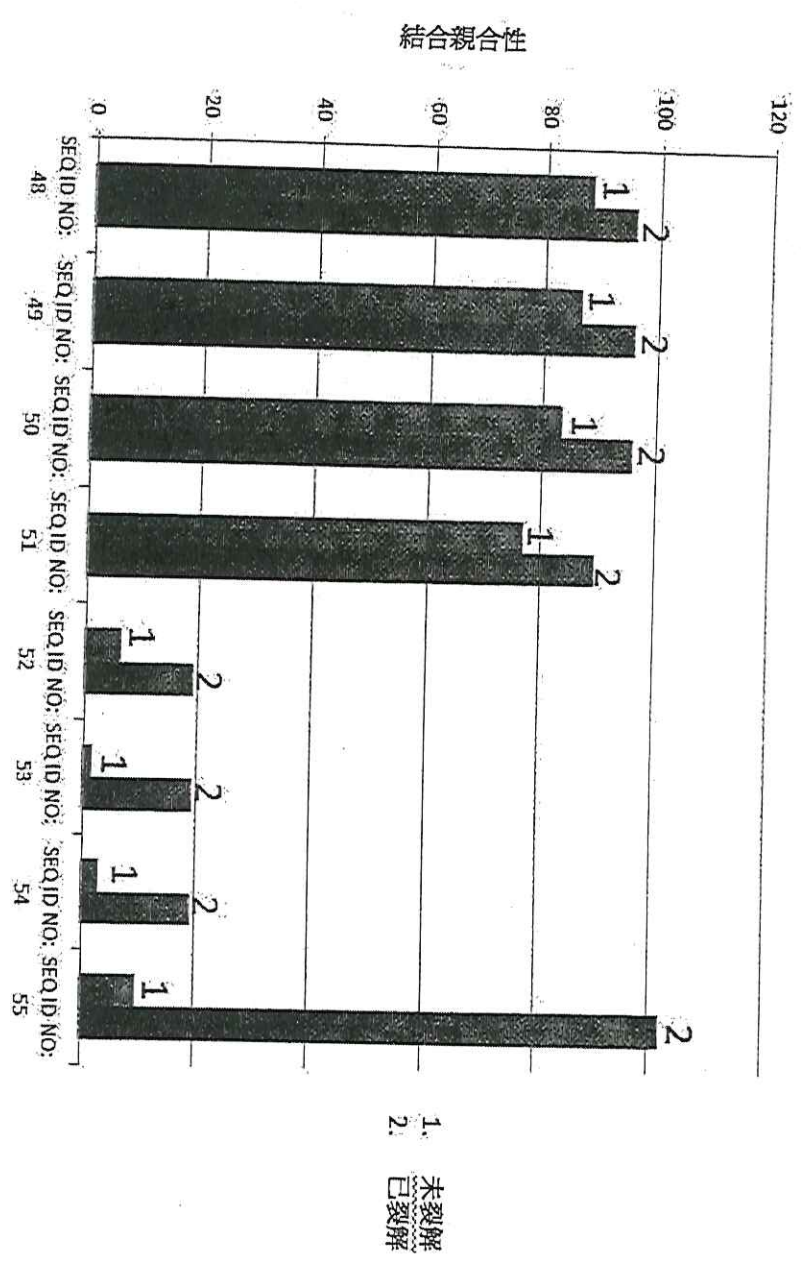
第 4 圖

C



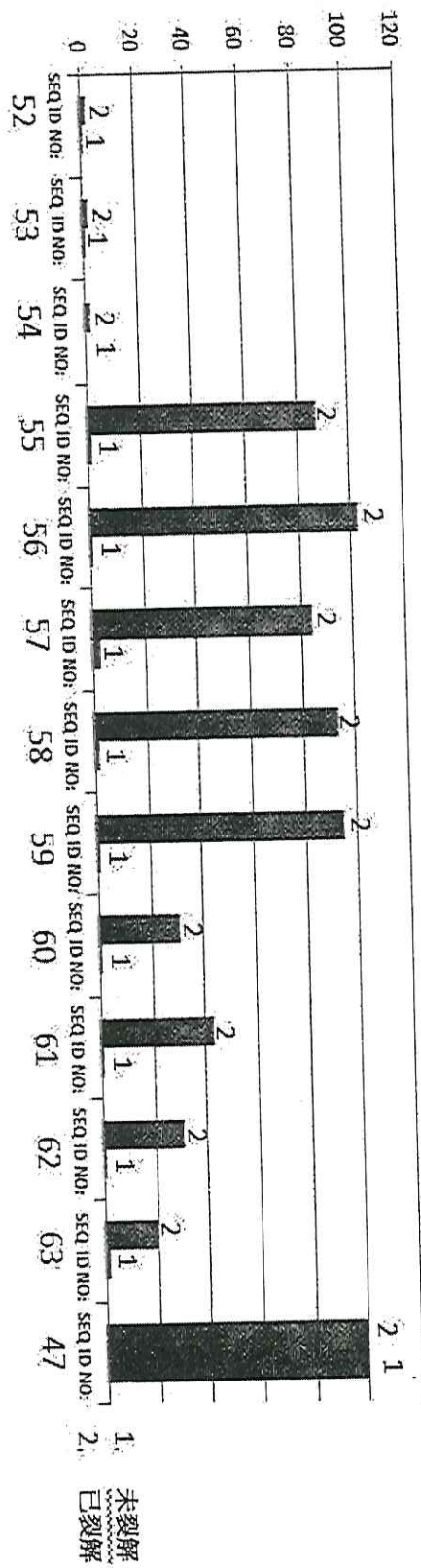
第 4 圖(續)

A

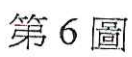


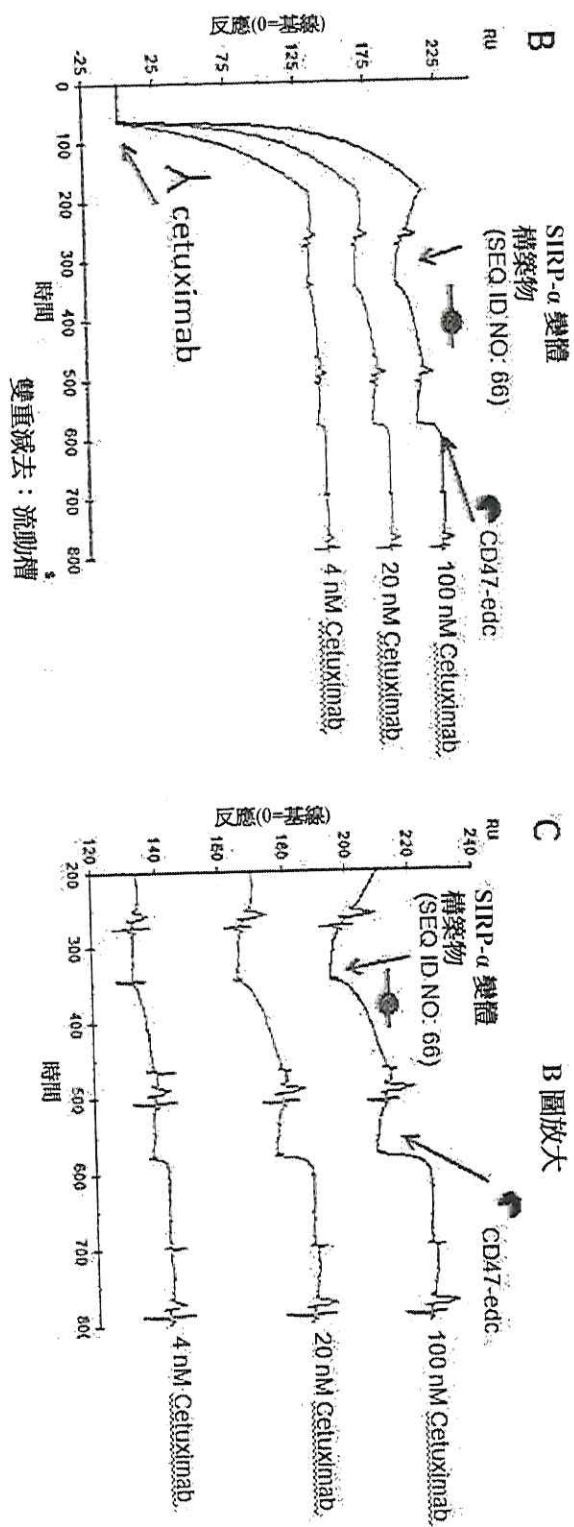
第 5 圖

B

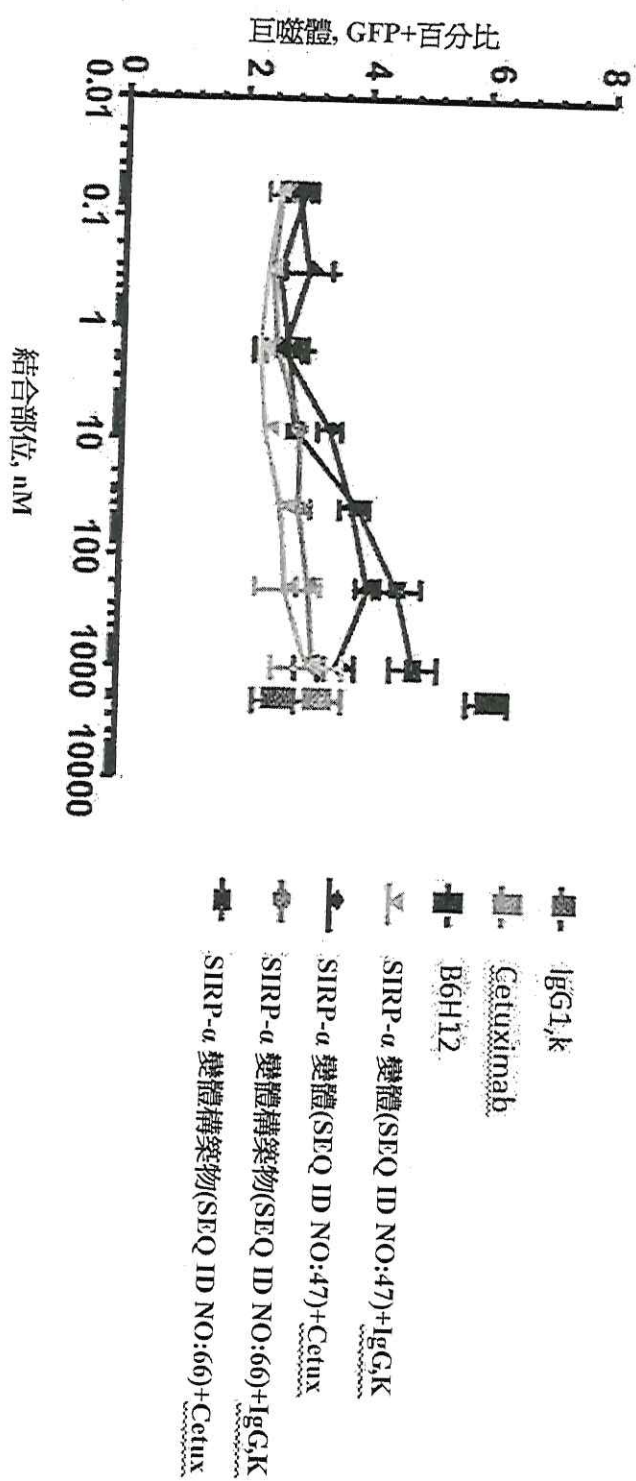


第 5 圖(續)





第 7 圖



第 8 圖

