



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020010020-0 A2



(22) Data do Depósito: 20/11/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 10/11/2020

(54) Título: UMA PROTEÍNA DE FUSÃO BIFUNCIONAL DIRECIONADA A CD47 E PD-L1

(51) Int. Cl.: C07K 19/00; A61K 39/395; A61K 39/44; A61P 35/00; A61P 37/02.

(71) Depositante(es): TAIZHOU MABTECH PHARMACEUTICAL CO., LTD.

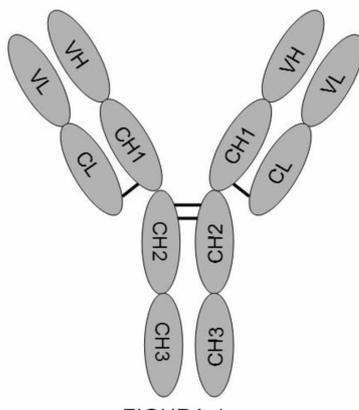
(72) Inventor(es): YAJUN GUO.

(86) Pedido PCT: PCT CN2017111828 de 20/11/2017

(87) Publicação PCT: WO 2019/095358 de 23/05/2019

(85) Data da Fase Nacional: 19/05/2020

(57) Resumo: Uma proteína de fusão bifuncional direcionada a CD47 e PD-L1, que pertence ao campo da biomedicina e resolve os problemas que o tratamento anti-PD-1/PD-L1 tem pouco efeito sobre os tumores imunogênicos baixos e o tratamento anti-CD47 tem propriedades de direcionamento ruins. A proteína de fusão consiste em uma fração de ligação a CD47 e uma fração de ligação a PD-L1 ligada por meio de uma ligação dissulfeto, pode bloquear tanto a ligação de CD47 a SIRPa quanto a ligação de PD-L1 a PD-1, não apenas ativando fagocitose de macrófagos de células tumorais e promoção da apresentação de antígenos na imunidade inata, mas também promovendo a ativação de células T específicas para tumores na imunidade adquirida, e apresenta menor toxicidade hematológica. A proteína de fusão tem melhor eficácia antitumoral e segurança hematológica do que a terapia anti-PD-L1 ou anti-CD47 sozinha, e os animais dos quais um tumor desapareceu após o tratamento da proteína de fusão produzem imunidade contra a reinoculação da mesma célula tumoral.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: **"UMA
PROTEÍNA DE FUSÃO BIFUNCIONAL DIRECIONADA A CD47 E PD-L1"**

CAMPO TÉCNICO

[001] A invenção pertence ao campo da biomedicina, mais especificamente, se refere a uma proteína de fusão recombinante direcionada às moléculas CD47 e moléculas PD-L1.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] Acredita-se que a "fuga imunológica" das células cancerígenas seja o principal mecanismo de aparecimento, desenvolvimento e resistência a medicamentos do tumor. Os tumores geralmente se protegem da remoção do sistema imunológico, inibindo direta ou indiretamente o sinal das células T. A terapia de pontos de verificação imunológicos ao tumor é uma classe de métodos terapêuticos para melhorar as respostas imunológicas antitumorais, modulando a atividade das células T através de uma série de vias, como sinais de co-inibição ou co-estimulação.

[003] O ponto de verificação imunológico desempenha um papel importante na regulação da amplitude e duração da resposta das células T e na manutenção da auto-tolerância por moléculas co-estimulantes e co-inibidoras no processo de resposta imunológica e na geração de sinal de resposta imunológica "ligado" ou "desligado", impedindo danos ao seu próprio tecido. As moléculas de pontos de verificação

imunológicos descobertas atualmente incluem PD-1/PD-L1, CD47/SIRP α , CTLA-4/CD80/CD86 etc.

[004] (1) PD-1/PD-L1

[005] PD-1 (proteína programada para morte celular 1) é um receptor de superfície celular expresso na superfície das células T e das células pré-B, reguladas positivamente nas células T ativadas, capazes de se ligar aos ligantes PD-L1 e PD-L2. A PD-1 é uma proteína de pontos de verificação imunológicos com uma função de regulação negativa, pode impedir a ativação de células T e desempenha um papel importante na redução da autoimunidade e na promoção da tolerância imunológica. A função da PD-1 é alcançada por duas vias, uma para promover a apoptose de células T específicas do antígeno nos linfonodos, a outra para reduzir a apoptose das células T reguladoras (Treg, também chamadas células T inibitórias).

[006] O PD-L1 (ligante de morte programado 1) é um dos ligantes do PD-1, também é uma proteína transmembranar, principalmente na placenta, coração, fígado, pulmão, rim, músculo esquelético e tecidos hematopoiéticos limitados, além de alguns padrões celulares de leucemia. O PD-L1 se liga a PD-1 para formar um complexo receptor-ligante e emitir um sinal inibitório, incluindo uma indução da geração de IL-10 (fator de inflamação e imunossupressor), gene anti-apoptótico de regulação negativa bcl-2 para promover uma

apoptose de células T específicas de antígeno e inibição da proliferação de células T CD8 + nos linfonodos, etc. O PD-L1 está relacionado à inibição do sistema imunológico em algumas situações especiais, como gravidez, transplante de tecido, doença auto-imune, hepatite etc. O PD-L1 também pode se ligar a um CD80 com uma afinidade mais fraca (valor de KD de 1,4 μ M), além de ser capaz de se ligar a um PD-1 com uma afinidade mais forte (valor de KD 770 nM).

[007] Verificou-se que PD-L1 é expresso em uma variedade de superfícies de células tumorais, de modo que as células tumorais escapam da morte do sistema imunológico e, portanto, podem ser usadas como alvos para imunoterapia antitumoral.

[008] (2) CD47/SIRP α

[009] O CD47 (antígeno de superfície de leucócitos 47), também chamado de proteína associada à integrina (IAP), é uma proteína transmembranar, associada às integrinas da membrana, também se liga à trombospondina-1 (TSP-1), proteína reguladora de sinal alfa (SIRP α). O CD47 é amplamente expresso em células somáticas humanas e superexpressado em várias células tumorais, participando de várias atividades celulares como apoptose, proliferação, adesão, migração e similares.

[0010] SIRP-alfa é uma glicoproteína do receptor transmembrana, expressa especificamente na superfície de células mieloides, como macrófagos, células dendríticas, tem

um efeito de regulação negativo na imunização e é capaz de inibir a fagocitose e a ativação de células T após a ligação ao CD47.

[0011] O CD47 se liga ao SIRP α e emite um sinal "Não me coma" ao sistema imunológico. Esse mecanismo pode proteger as células normais do corpo humano de serem mortas pelo sistema imunológico. Mas esse mecanismo também pode ser utilizado pelas células tumorais para obter escape imunológico.

[0012] Vários fármacos de pontos de verificação imunológicos, como Ipilimumabe (anti-CTLA-4), Nivolumabe (anti-PD-1), Pembrolizumabe (anti-PD-1), Atezolizumabe (anti-PD-L1), Avelumabe (anti-PD-L1), Durvalumabe (anti-PD-L1) estão atualmente aprovados para venda pela European or American Drug Administration.

[0013] No entanto, os seguintes problemas ainda existem nos medicamentos de ponto de verificação imunológicos:

[0014] Como a via de sinal PD-1/PD-L1 atua apenas na fase de efeito das células T, o efeito do medicamento anti-PD-1/PD-L1 requer a apresentação de antígenos tumorais, que serão clinicamente ineficazes por cerca de 70 % de tumores de baixa imunogenicidade e precisam ser usados em combinação com quimioterapia, radioterapia e Mabs; Enquanto isso, as células cancerígenas podem às vezes alcançar a fuga imunológica por diferentes vias ou rotas; o simples bloqueio

da via PD-1/PD-L1 pode ser inútil para a fuga imunológica de algumas células cancerígenas.

[0015] Os anticorpos direcionados para CD47 têm funções como ativar macrófagos, melhorar a apresentação do antígeno das células T e similares e são funcionalmente complementares ao anti-PD-1/PD-L1. No entanto, a expressão do CD47 não é estritamente específica do tumor e também é expressa na superfície dos glóbulos vermelhos saudáveis. A expressão de CD47 na superfície celular das células tumorais é apenas 3,3 vezes maior que as células normais. Portanto, o uso in vivo do anticorpo CD47 geralmente causa reações indesejáveis, como anemia. Para reduzir os efeitos colaterais, um mutante SIRP α com alta afinidade para CD47 só pode ser administrado como reforço imunológico, em combinação com outros anticorpos na forma de monômero sem Fc.

[0016] Se a eficácia do medicamento anti-PD-1/PD-L1 na cadeia pesada de baixa imunogenicidade puder ser melhorada e/ou a toxicidade no sangue do medicamento alvo CD47 puder ser reduzida, isso terá um grande significado na melhoria do efeito terapêutico em tumores malignos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0017] Um medicamento é fornecido na invenção, o referido medicamento combina os efeitos de dois medicamentos de pontos de controle imunológico (anti-PD-1/PD-L1 e anti-CD47/SIRP α) em diferentes estágios da imunização antitumoral, forma um

efeito sinérgico, gera maior eficácia e efeito terapêutico mais forte do que o de um único medicamento, melhorando a propriedade de direcionamento do medicamento para as células tumorais, reduzindo a toxicidade do sangue e resolvendo a insuficiência do efeito terapêutico ou da segurança do medicamento de pontos de verificação imunológicos existente.

[0018] Em particular, a invenção fornece uma proteína de fusão bifuncional direcionada a CD47 e PD-L1, que pode se ligar a PD-L1 para bloquear a via de sinalização PD-1/PD-L1, e também pode se ligar a CD47 para bloquear a via de sinalização CD47/SIRP α , tenha bom direcionamento e citotoxicidade para células cancerígenas (como ADCC e CDC) e resolva os problemas no efeito terapêutico e na segurança dos fármacos de anticorpos de pontos de verificação imunológicos existentes.

[0019] A invenção também fornece um método para reduzir a toxicidade do medicamento direcionado a CD47, que pode reduzir reações colaterais como anemia causada pela ligação do medicamento direcionado a CD47 às células vermelhas do sangue.

[0020] As soluções técnicas da presente invenção são as seguintes:

[0021] Proteína de fusão bifuncional direcionada a CD47 e PD-L1, que pode se ligar à molécula CD47 e à molécula PD-L1.

[0022] A proteína de fusão descrita acima (designada como IAB) consiste em duas porções ligadas por ligações dissulfeto (FIG. 2), em que uma pode se ligar a CD47, formada pela ligação do mutante de alta afinidade SIRP α (designado como SIRP α -m) a um segmento Fc do anticorpo (designado como SIRP α -m-Fc); o outro pode se ligar ao PD-L1, formado pela ligação de uma cadeia leve (designada como anti-PDL1-L) e uma cadeia pesada (designada como anti-PDL1-H) do anticorpo anti-PD-L1 por ligação dissulfeto.

[0023] Ambos os segmentos de anticorpo Fc contidos nas cadeias peptídicas SIRP2-m-Fc e anti-PDL1-H são do tipo IgG, preferencialmente subtipos de IgG1; Para evitar a formação de dímeros homólogos desnecessários no processo de expressão recombinante do IAB, é introduzida uma estrutura "knob-in-Hole" nos segmentos Fc das cadeias peptídicas SIRP α -m-Fc e anti-PDL1-H. A "estrutura knob-in-Hole" pode ser alcançada pelo seguinte: introdução de 2 mutações de aminoácidos no segmento Fc da cadeia peptídica anti-PDL1-H (T366W, S354C) (com base na sequência inata de IgG), formando Estrutura "knob" saliente. 4 mutações de aminoácidos (Y349C, T366S, L368A e Y407V) são introduzidas com base na sequência inata de IgG no segmento Fc das cadeias peptídicas SIRP α -m-Fc para formar a estrutura "Hole" recuada e o emparelhamento homólogo é impedido por um efeito de impedimento estérico (o sistema de numeração da UE de Kabat é usado para o local de mutação

de aminoácidos do segmento Fc acima, ou seja, o esquema de numeração da UE).

[0024] Mais especificamente, a cadeia peptídica SIRP α -m-Fc tem a sequência de aminoácidos como estabelecido na SEQ ID NO: 1; a cadeia peptídica anti-PDL1-L possui a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 2 e a cadeia peptídica anti-PDL1-H possui a sequência de aminoácidos definida na SEQ ID NO: 3.

[0025] Os IABs podem ser expressos por células CHO (ovário de hamster chinês) geneticamente modificadas. Particularmente, os IABs são expressos por células CHO-K1, e o vetor de expressão usado é pcDNA3.1 (+). O SIRP α -m-Fc é codificado pela sequência nucleotídica como estabelecido na SEQ ID NO: 4; a cadeia leve do anti-PDL1-L é codificada pela sequência nucleotídica como estabelecido na SEQ ID NO: 5; o anti-PDL1-H é codificado pela sequência nucleotídica como estabelecido na SEQ ID NO: 6; e as sequências estabelecidas nas SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 6 são inseridas por recombinação genética na estrutura de leitura aberta (ORF) do pcDNA3.1 (+), usando o vetor de expressão construído contendo a sequência de codificação da proteína alvo para transfectar células CHO-K1 e, em seguida, triagem para obter as cepas celulares capazes de expressar estavelmente o IAB para a expressão de IAB.

[0026] A proteína de fusão bifuncional mencionada acima, dirigida a CD47 e PD-L1, pode ser usada para a fabricação de drogas para tumores e drogas de imunorregulação.

[0027] Os anticorpos são produzidos pelo sistema imunológico do corpo estimulado por antígenos. Anticorpos são imunoglobulinas produzidas por células plasmáticas diferenciadas de linfócitos B. Um anticorpo é capaz de realizar uma reação de ligação específica com o antígeno correspondente. Os anticorpos também podem ser preparados por métodos *in vitro*, como hibridoma, engenharia genética e similares. De acordo com propriedades físicas e químicas e funções biológicas, os anticorpos podem ser divididos em 5 categorias, ou seja, IgM, IgG, IgA, IgE e IgD. O anticorpo IgG (imunoglobulina G) é o principal componente do anticorpo no soro, somando cerca de 75% das imunoglobulinas séricas, e também é o principal tipo de droga anticorpo existente na China e no exterior.

[0028] Tipicamente, um anticorpo completo do tipo IgG consiste em quatro cadeias peptídicas (FIG. 1), incluindo simetricamente duas cadeias pesadas e duas cadeias leves e ligadas entre si por ligações dissulfeto. Cada cadeia leve consiste em regiões variáveis (VLs) e regiões constantes (CLs), e a cadeia pesada consiste em regiões variáveis (VHs) e regiões constantes (CHs). As regiões constantes da cadeia pesada do anticorpo do tipo IgG podem

ser divididas em três partes: CH1, CH2 e CH3. As regiões variáveis (VLs e VHs) da cadeia leve e cadeia pesada são as porções que se ligam ao antígeno, e as regiões CH2, CH3 da cadeia pesada têm funções de efeito imunológico, como a ligação ao complemento, receptor Fc, proteína A e induz ADCC (citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos), CDC (citotoxicidade dependente de complemento) e similares; a região CH2 tem um local de glicosilação N297 ligado a N, a modificação de glicosilação neste local tem uma influência importante na citotoxicidade do anticorpo e similares e a remoção da referida glicosilação fará com que o anticorpo perca a função de induzir citotoxicidade, como ADCC. A cadeia leve está ligada à cadeia pesada através da ligação dissulfeto das regiões CL e CH1; a cadeia pesada é fornecida com uma região de dobradiça entre as regiões CH1 e CH2, que é fácil de esticar e dobrar, e as duas cadeias pesadas de um anticorpo são conectadas por meio de ligações dissulfeto na região de dobradiça. Depois que o anticorpo é digerido pela papaína, dois Fab (fragmentos de ligação ao antígeno) e 1 Fc (fragmento cristalizável) podem ser formados, em que o segmento Fab contém a cadeia leve completa e a cadeia pesada VH e CH1, e o segmento Fc contém CH2 e CH3.

[0029] A IgG humana possui quatro subtipos: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, em que a IgG1 tem forte capacidade de induzir

efeitos ADCC e CDC e meia-vida sérica mais longa e é o subtipo de anticorpo mais comum da droga, tal como o Rituximabe (anti-CD20), Trastuzumabe (anti-HER2); A IgG 2 e a IgG 4 têm habilidades mais fracas para induzir efeitos do ADCC e CDC e meia-vida sérica mais longa, que pode ser usada para desenvolver drogas de anticorpos cujos principais mecanismos de ação são o bloqueio, a regulação ou a neutralização de sinais, como o Nivolumabe (anti-PD-1), Pembrolizumabe (anti-PD-1).

[0030] A fim de atingir o objetivo de permitir que a mesma molécula de anticorpo atinja dois antígenos diferentes, CD47 e PD-L1, aqui a estrutura do anticorpo é modificada e uma proteína de fusão assimétrica semelhante a uma estrutura de anticorpo é construída através da tecnologia de engenharia genética (FIG 2) A proteína de fusão consiste em uma fração de ligação a CD47 e uma fração de ligação a PD-L1 ligada por uma ligação dissulfeto; em que a fração de ligação ao CD47 é formada pela ligação de um mutante SIRP α (SIRP α -m) com uma alta afinidade para CD47 e um segmento Fc do anticorpo (principalmente região CH2, CH3), e a fração de ligação ao PD-L1 é formada pela ligação de uma cadeia pesada e uma cadeia leve de anticorpo anti-PD-L1 por ligação dissulfeto.

[0031] O mutante SIRP α (SIRP α -m) na proteína de fusão pode se ligar ao antígeno CD47 com uma afinidade muito maior que a proteína SIRP α natural endógena, de modo que a ligação do

SIRP α natural na superfície do macrófago e do antígeno CD47 na superfície. As células cancerígenas podem ser bloqueadas, para evitar a inibição e a fuga das células cancerígenas para a fagocitose dos macrófagos.

[0032] O anticorpo anti-PD-L1 é capaz de se ligar a PD-L1 (altamente expresso na superfície das células cancerígenas) com alta afinidade, para bloquear a ligação de "PD-L1 na superfície das células cancerígenas a PD-1 na superfície das células T ativadas, para evitar a inibição e a fuga de células cancerígenas para as células T.

[0033] O PD-L1 é mais altamente expresso na superfície das células cancerígenas e a propriedade de direcionamento do anti-PD-L1 é mais forte, o que compõe as deficiências de que a especificidade do CD47 é ruim e o anti-CD47 é grave na toxicidade do sangue. As experiências mostram que a toxicidade sanguínea do BIA é muito menor do que a da proteína de fusão composta por SIRP α -me Fc, e com melhor segurança.

[0034] A proteína de fusão bifuncional direcionada a CD47 e PD-L1 da presente invenção serve tanto na imunidade inata inicial quanto para ativar a fagocitose de macrófagos das células tumorais e para melhorar a apresentação de antígeno tumoral e na imunidade adquirida como promover a ativação e proliferação de células T específicas do tumor, enquanto comparado com um único medicamento anti-CD47, com melhor

direcionamento para células tumorais e menor toxicidade no sangue. Experiências em animais mostram que a proteína de fusão bifuncional tem melhor efeito terapêutico antitumoral e segurança do sangue do que apenas o anti-PD-L1 ou anti-CD47. E, o sujeito com tumor desapareceu após o tratamento com BIA pode ter imunidade contra o mesmo tipo de células tumorais inoculadas posteriormente.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0035] A Fig. 1 é uma vista estrutural esquemática de um anticorpo do tipo IgG;

[0036] A Fig. 2 é um esquema estrutural da proteína de fusão bifuncional IAB direcionada a CD47 e PD-L1;

[0037] A Fig. 3 é um gráfico da eletroforese em SDS-PAGE não reduzida da proteína de fusão bifuncional IAB direcionada a CD47 e PD-L1;

[0038] A Fig. 4 é um gráfico da eletroforese reduzida em SDS-PAGE da proteína de fusão bifuncional IAB direcionada a CD47 e PD-L1;

[0039] A Fig. 5 é a espectrometria de massa que determina o peso molecular completo da proteína IAB e os principais tipos de açúcar;

[0040] A Fig. 6: proteína de fusão IAB e anticorpo monoespecífico anti-PD-L1 anti-PDL1 'combinam competitivamente PD-L1;

[0041] A Fig. 7: a proteína de fusão IAB e a proteína de fusão Fc mutante de alta afinidade SIRP α combinam CD47 competitivamente;

[0042] A Fig. 8: A proteína de fusão IAB aumenta a liberação de IL-2 por células PBMC estimuladas por SEB;

[0043] A Fig. 9: Citometria de fluxo para determinar que a proteína de fusão IAB promove a fagocitose das células MC38 in vitro por RAW264.7;

[0044] A Fig. 10: Microscopia de fluorescência para determinar que a proteína de fusão IAB promove a fagocitose de células MC38 por macrófagos derivados de mielóides de camundongo;

[0045] A Fig. 11 mostra o efeito ADCC da proteína de fusão IAB determinada pelo método indicador de cultura de células;

[0046] A Fig. 12 é o conteúdo de glóbulos vermelhos no sangue no soro de camundongos após injeção intraperitoneal de 100 mg/kg de medicamento;

[0047] A Fig. 13 é o hematócrito no sangue de ratos após injeção intraperitoneal de 100 mg/kg de medicamento;

[0048] A Fig. 14 mostra o conteúdo de hemoglobina no sangue de camundongos após injeção intraperitoneal de 100 mg/kg de medicamento;

[0049] A Fig. 15: Resultados experimentais para o tratamento da proteína de fusão IAB do modelo de tumor Balb/c Mice MC38;

[0050] A Fig. 16: Resultados experimentais da prevenção pela proteína de fusão IAB nos camundongos Balb/C inoculados duas vezes com células tumorais MC38;

[0051] A Fig. 17: Resultados experimentais do tratamento IAB de camundongos portadores de tumor MC38 (tipo de defeito de macrófago);

[0052] A Fig. 18: Resultados experimentais do tratamento IAB em camundongos portadores de tumor MC38 (tipo de defeito de célula T CD8 +);

[0053] A Fig. 19: A citometria de fluxo detecta a capacidade de ligação das células tumorais MC 38 às proteínas IAB;

[0054] A Fig. 20: A citometria de fluxo detecta a capacidade de ligação das células de leucemia HL 60 à proteína IAB.

Descrição Detalhada das Modalidades Preferidas

Exemplo 1. Construção e expressão da proteína de fusão bifuncional IAB direcionada a CD47 e PD-L1

[0055] De acordo com os ácidos nucleicos, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4 (codificando um peptídeo de fusão formado pela ligação do mutante SIRP α ao segmento Fc do anticorpo, com a estrutura de Orifício ("hole") formada pela mutação Y349 C, T366S, L368 A e Y407 V), SEQ ID NO: 5 (codificando cadeia leve de anticorpo anti-PD-L1) e SEQ ID NO: 6 (codificando cadeia pesada de anticorpo anti-PD-L1,

com estrutura Saliente ("knob") formada por mutações de T366W e S354C), os fragmentos de DNA correspondentes foram sintetizados respectivamente, e foram inseridos no vetor pcDNA3.1 (+) por tecnologia de engenharia genética. Os vetores de expressão construídos foram denominados pcDNA3.1-SIRP α -m-Fc, pcDNA3.1-antiPDL1-L e pcDNA3.1-antiPDL1-H. Três vetores de expressão foram co-transfectados com lipossomos para células hospedeiras CHO-K1, e as células transfectadas foram cultivadas em meio completo DMEM contendo 20% de soro fetal bovino (FBS) (disponível na Invitrogen Inc.) por 24 horas e depois rastreados sob pressão no meio de seleção contendo 1 mg/ml de G418, continuada para incubação por 2 semanas. A triagem por subclonagem foi realizada por ensaio de diluição limitada; comparar o conteúdo da proteína alvo no sobrenadante da cultura de células pelo teste Dot-Blot (o sobrenadante é transferido para uma membrana de nitrocelulose e, em seguida, adiciona-se um anticorpo Ig anti-humano para ratos marcado com peroxidase de rábano silvestre (HRP) e colorido por diaminobenzidina DAB após a selagem) e triagem de um clone com a expressão mais alta da proteína alvo IAB como a cepa da célula de expressão.

[0056] As cepas de células de expressão foram passadas em um meio de cultura misto consistindo em meio completo DMEM e meio isento de soro CHOM-B1 (disponível em Shanghai SINOMABE biotech Ltd., Shanghai) de diferentes proporções,

e a fração de meio completo foi reduzida de 100% a 0% e, em seguida, continuou-se a cultura em meio livre de soro CHOM-B1 para passagem. Quando o volume da cultura de células foi aumentado para 6L, a passagem foi interrompida, foi realizada a alimentação por fluxo, para a qual foi adicionada glicose de acordo com 2g/L por dia, o sobrenadante foi coletado após 7 dias, centrifugado a 9000 rpm e 4 °C por 10 min. O precipitado foi descartado, o sobrenadante foi filtrado com 0,2 micrometragem e mantido a 4 °C para purificação.

Exemplo 2. Purificação da proteína de fusão bifuncional IAB direcionada a CD47 e PD-L1

[0057] A proteína de fusão bifuncional IAB foi purificada pelo método da coluna de cromatografia de afinidade da proteína A, um líquido de equilíbrio de 10 vezes o volume da coluna (solução tampão de fosfato 20 mM contendo NaCl 150 mM, pH 7,0) foi usado para equilibrar o corpo da coluna e depois carregar o sobrenadante. Após o carregamento, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio de 5 a 10 vezes o volume da coluna até o equilíbrio de condutância. A eluição foi então realizada com eluente (tampão de ácido cítrico 50 mM, pH 3,5) e o pico de eluição foi coletado após OD 280 ser superior a 200 mAU. Após o eluente que continha a proteína alvo ser regulado com 1M Tris para pH 6,5-7,0, foi utilizado tampão de substituição da coluna de dessalinização em gel (tampão fosfato pH 7,4), seguido de filtração esterilizada.

Detectou a concentração de proteínas pelo método UV e armazenou a 4 °C para uso posterior.

Exemplo 3. Ensaio de eletroforese em SDS-PAGE de proteínas de fusão bifuncionais visando CD47 e PD-L1

[0058] O peso molecular completo da proteína e o peso molecular reduzido foram detectados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) sob condições de não redução (gel separador a 8%) e redução (gel separador a 12%), respectivamente, utilizando amostras de anticorpo purificadas. A formulação do reagente e o método operacional podem se referir a "Clonagem Molecular: Um Guia de Laboratório". Os resultados da eletroforese são mostrados na FIG. 3 (SDS-PAGE não reduzido) e FIG. 4 (SDS-PAGE reduzido) nas figuras da especificação.

[0059] No diagrama de eletroforese de SDS-PAGE não reduzido da FIG. 3, o peso molecular completo da proteína alvo da proteína IAB era de cerca de 120 kDa; no diagrama de eletroforese reduzido de SDS-PAGE da FIG. 4, o peso molecular parcial da cadeia pesada da proteína IAB (anti-PDL1-H) foi de cerca de 50 kDa, e a cadeia peptídica de fusão (SIRP α -m-Fc) possui um peso molecular parcial de cerca de 40 kDa, a fração da cadeia leve (anti-PDL1-L) era de 25 kDa, o que é substancialmente consistente com o valor teórico. A cadeia peptídica de fusão (SIRP α -m-Fc) na FIG. 4 exibe duas bandas de cerca de 40 kD, que podem estar associadas ao efeito de

modificações pós-traducionais e estrutura espacial na eletroforese.

Exemplo 4. Determinação do peso molecular completo da proteína IAB e do tipo de açúcar principal por ensaio de espectrometria de massa em tandem por cromatografia em fase líquida

[0060] A proteína de fusão IAB expressa e purificada foi dessalinizada em solução de NH_4HCO_3 50 mM e a solução proteica dessalinizada foi quantificada por UV (NH_4HCO_3 50 mM como controle em branco com um coeficiente de extinção de 1,60). A solução proteica dessalinizada foi adicionada a NH_4HCO_3 50 mM, diluída para 1 mg/mL para carregamento.

[0061] **Condições de cromatografia líquida:** Equipamento de fase líquida, sistema Waters ACQUITY UPLC; medidas cromatográficas: BEH 300,4 C4 1,7 μm , 2,1 × 50 mm; temperatura da coluna 60 °C; temperatura da câmara de amostra 15 °C; caudal de 0,4 ml/min; fase móvel A: 99,9% de água + 0,1% de ácido fórmico; fase móvel B: 99,9% de acetonitrilo + 0,1% de ácido fórmico; volume de carregamento: 5 μL ; detector ESI-Q-TOF.

[0062] **Condições do espectro de massa:** equipamento de espectrometria de massa: Águas; temperatura da fonte 120; ajuste de tensão capilar: 3000V; ajuste de tensão do cone primário: 40 V; ajuste de tensão do cone secundário: 4V; caudal do gás de cone: 50 L/H; intervalo de tempo de

aquisição 3-15 min; ajuste da temperatura de dessolvatação: 400°C. seleção da faixa de calibração de qualidade: 500-3000m/z; seleção da faixa de qualidade de aquisição 500-3000 m/z; tempo de varredura: 1,0 S.

[0063] Os resultados são mostrados na Figura 5. Os principais tipos de açúcar modificados após a tradução do IAB são -2KG0F (2) (peso molecular 113785), -2KG0FG1F (peso molecular 113949), -2KG1F (2) (peso molecular 114114), G0G2F (114216), sem produção significativa de tipos de açúcar indesejáveis. Seu peso molecular e peso molecular teórico (modificação pós-traducional) são consistentes.

Exemplo 5. Preparação e identificação do controle SIRP α -m-Fc ' e Anti-PDL1'

[0064] De acordo com as sequências de nucleotídeos de SEQ ID No:9 (que codifica o peptídeo de fusão formado pela ligação de SIRP α -m e FC do anticorpo IgG1, mas sem a estrutura "hole") e a SEQ ID NO:10 (que codifica a cadeia pesada do anticorpo anti-PD-L1, mas sem a estrutura "knob", e a modificação glicosil de Fc foi removida por mutação N297A), fragmentos de DNA correspondentes foram sintetizados, e inseridos em vetores pcDNA3.1 respectivamente aos vetores de constructo de expressão pcDNA3.1-SIRP α -m-Fc' and pcDNA3.1-antiPDL1-H '.

[0065] O pcDNA3.1-SIRP α -m-Fc' foi transfectado para células hospedeiras de expressão CHO-K1 de acordo com o

método do Exemplo 1. As cepas de alta expressão foram rastreadas e a proteína de fusão SIRP α -m-Fc de controle foi preparada usando os métodos de expressão e purificação de proteínas nos Exemplos 1 e 2, e a proteína foi denominada como SIRP α -m-Fc' com a sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7.

[0066] Um anticorpo anti-PD-L1 de controle foi preparado co-transfectando pcDNA3.1-antiPDL1-H' e pcDNA3.1-antiPDL1-L, preparado no Exemplo 1, na célula hospedeira de expressão CHO-K1 e na linhagem celular de pesquisa com alta expressão. O método de expressão e purificação de proteínas nos Exemplos 1 e 2 foi usado para preparar o referido anticorpo de controle antiPD-L1, que foi chamado de anti-PDL1' com a sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 8.

Exemplo 6. Determinação da capacidade de ligação ao antígeno da proteína de fusão IAB

[0067] (1) A determinação da capacidade de ligação do IAB à PD-L1 humana por ELISA competitivo

[0068] Foi utilizado anti-PDL1 'marcado com biotina. A proteína de fusão PD-L1-Fc humana expressa recombinante foi diluída com solução de NaHCO₃ 0,1 M (pH 9,6) para 5 μ g/ml, e revestiu as placas de microcavidades a 100 μ l/cavidade, lavou-se, bloqueou-as e depois marcou com biotina competidores anti-PDL1 'e gradiente diluído foram

adicionados a cada cavidade, em que os competidores foram proteínas anti-PDL1' ou IAB não marcadas, preparadas no Exemplo 2. As concentrações de competidor foram iniciadas respectivamente a partir de 1µg/ml e diluídas 2 vezes. Cada concentração foi repetida em cavidades em triplicado, incubada a 37°C por 1 hora, e então o líquido da reação foi descartado, as placas foram lavadas. Adicionou-se peroxidase de rábano marcado com avidina (Avidin-HRP) e substrato TMB para o desenvolvimento, mediu-se a absorção de OD450 nm. Os resultados foram plotados e mostrados na FIG. 6. O eixo x é a concentração do competidor (ng/ml) e o eixo y é o valor de DO, o triângulo oco é um dado de competição do anti-PDL1' e o círculo sólido é um dado de competição do IAB.

TABELA 1, Resultados competitivos do teste ELISA da proteína de fusão IAB e do anti-PDL1'

	Parâmetro	Valor estimado	S.D.	Intervalo de confiança
Resultado da ligação competitiva anti-PDL1' R2 = 0,999 IC50 = 0,948	A	2,119	0,019	[2,080, 2,158]
	B	0,939	0,024	[0,889, 0,989]
	C	0,948	0,029	[0,889, 1,007]
	D	0,001	0,010	[-0,019, 0,021]

Resultado da vinculação competitiva do IAB R2 = 0,999 IC50 = 11,76	A	1,999	0,011	[1,976, 2,022]
	B	0,912	0,028	[0,854, 0,970]
	C	11,76	0,425	[10,89, 12,63]
	D	-0,028	0,020	[-0,069, 0,014]

[0069] (2) A capacidade de ligação do IAB ao CD47 humano determinada por ELISA competitivo

[0070] A ligação da proteína IAB a CD47 foi determinada pelo mesmo método. A placa de microcavidades de revestimento de antígeno era uma proteína CD47 humana expressa recombinante, foram adicionados SIRP α -m-Fc' marcado com biotina e competidores diluídos em gradiente. Os concorrentes foram proteínas SIRP α -m-Fc' ou IAB não marcadas, preparadas no Exemplo 2. As concentrações do competidor foram iniciadas respectivamente a partir de 1 μ g/ml e diluídas 2 vezes. Cada concentração foi repetida em cavidades triplicados, após incubação, rábano e TMB foram utilizados para o desenvolvimento, a absorbância OD450 nm foi medida. Os resultados foram plotados e mostrados na FIG. 7. O eixo x é a concentração do competidor (ng/ml) e o eixo y é o valor de DO, o triângulo oco é um dado de competição do anti-PDL1' e o círculo sólido é um dado de competição do IAB.

[0071] Tabela 2 Resultados competitivos do teste ELISA da proteína de fusão IAB com SIRP α -m-Fc'

	Parâmetro	Valor Estimado	S.D.	Intervalo de confiança
Resultados da ligação competitiva SIRP α -m-Fc R2 = 0,996 IC50 = 0,918	A	1,166	0,015	[1,136, 1,196]
	B	1,770	0,105	[1,554, 1,987]
	C	0,918	0,035	[0,846, 0,991]
	D	0,007	0,009	[-0,011, 0,026]
Resultados da ligação competitiva do IAB R2 = 0,997 IC50 = 2,889	A	1,154	0,011	[1,131, 1,177]
	B	1,513	0,078	[1,352, 1,673]
	C	2,897	0,111	[2,688, 3,127]
	D	0,013	0,010	[-0,008, 0,033]

[0072] Os resultados das FIGs. 6 e 7 ilustram que a proteína de fusão IAB possui atividade de ligação a ambos os antígenos alvo PD-L1 e CD47 ao mesmo tempo e reconhece o mesmo epítipo de ligação que o protótipo de anticorpo ou ligante, tendo capacidade de ligação competitiva. No entanto, uma vez que a proteína IAB e o local de ligação são "monovalentes", sua afinidade é reduzida em comparação com o anticorpo protótipo ou ligante. A afinidade de IAB (IC50

= 11,76) para PD-L1 foi reduzida em quase 10 vezes em comparação com a afinidade de PD-L1' (IC 50 = 0,948); e a afinidade de IAB para CD47 (IC50 = 2,897) foi reduzida em aproximadamente 3 vezes em comparação com a afinidade de SIRP α -m-Fc' (IC50 = 0,918).

[0073] (3) Ensaio por citometria de fluxo para capacidade de ligação da proteína IAB a células cancerígenas

[0074] A ligação da proteína IAB a células MC38 (células de câncer de cólon de camundongo), células HL60 (células de leucemia humana) foi detectada usando citometria de fluxo e os resultados são mostrados nas FIGs. 19 e 20 (linhas pontilhadas representam controles em branco e linhas sólidas representam proteínas IAB, linhas tracejadas curtas representam anti-PDL1' e linhas tracejadas longas representam SIRP α -m-Fc') usando SIRP α -m-Fc' e anti-PDL1' como controle. Os resultados ilustram que a proteína IAB pode se ligar à superfície da célula MC38 e das células HL60.

Exemplo 7. Estudo da proteína de fusão bifuncional IAB visando a ativação de células T mediada por CD47 e PD-L1

[0075] Recolhem-se 20 ml de sangue venoso humano saudável e utiliza-se uma centrífuga com gradiente de densidade para separar as células mononucleares do sangue periférico (PBMC). O PBMC foi ressuspenso em meio RPMI 1640 contendo 10% de FBS, plaqueado em placas de cultura celular de 96

cavidades em 1×10^5 células/cavidade e, em seguida, adicionado a cada cavidade RPMI1640 meio compreendendo diferentes concentrações (0,01 ng/mL, 0,1 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL) Staphylococcus enterotoxina B (SEB) e 20µg/ml de proteína associada (BIA, anti-PDL1' ou SIRPα-m-Fc'), incubados por 72 h em 37 °C, incubadora de CO₂ a 5%. O status da célula era observado diariamente por um microscópio invertido. O sobrenadante foi tomado após 72 horas e a quantidade de secreção de IL-2 foi determinada por ELISA. Os resultados experimentais são mostrados na FIG. 8. A estimulação das células PBMC pelo SEB pode aumentar sua quantidade de secreção de IL-2 e exibe um perfil dependente da dose dentro de uma certa faixa de concentração de SEB (0-100ng/mL). A quantidade de IL-2 dos grupos IAB e anti-PDL 1 'em diferentes concentrações de SEB é significativamente maior que SIRPα-m-Fc'. Está provado que o BIA pode ativar células T in vitro.

Exemplo 8. Estudo da fagocitose de Raw 264,7 in Vitro mediada pela proteína de fusão bifuncional IAB direcionada a CD47 e PD-L1

[0076] 2×10^6 , a cepa de células de câncer de cólon de camundongo MC 38 foi incubada com 2000 µL de solução de 5 µM de CSFE (succinimidil-éster diacetato de 2-carboxifluoresceína, um corante fluorescente vivo) a 37 °C por 20 min e, em seguida, foram adicionados 10 mL de meio

completo, incubados por 5 min para remover o CSFE não ligado na solução. As células tumorais marcadas foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em meio completo para preparar a suspensão de células tumorais a uma concentração de 1×10^6 /mL.

[0077] Adicionou-se 1 ml de suspensão RAW264.7 (ATCC TIB-71) de macrófago de camundongo 5×10^4 células/ml a cada cavidade numa placa de 24 cavidades. Após a fixação dos macrófagos na parede, o meio de cultura na placa do cavidade foi descartado e, em seguida, foi adicionado meio de cultura sem soro para incubação por 2 horas. Em seguida, células tumorais marcadas com CFSE (2×10^5) foram adicionadas a cada cavidade, enquanto se adicionava proteína IAB, controle SIRP α -m-Fc', anti-PDL1', i.v. imunoglobulina humana (IgG1, disponível na China Biologic Products Holdings, Inc.) na concentração final de 10 μ g/ml, incubada a 37 °C por 2 h.

[0078] Os macrófagos foram digeridos com tripsina e depois coletados por centrifugação, lavados duas vezes com PBS. Depois de contar com hemocitômetro, a densidade celular foi ajustada para 1×10^6 /mL e ressuspensa em tampão PBS contendo 1% de FBS. A suspensão celular foi então adicionada ao tubo de ensaio de citometria de fluxo (100 μ L/tubo), centrifugada para descartar o sobrenadante e 100 μ L de anticorpo marcado com fluorescência (anticorpo anti-rato F4/80 marcado com PE) foi adicionado ao tubo de citometria

de fluxo, incubado em gelo no escuro por 45 min, lavado duas vezes com tampão PBS contendo 1% de FBS e ensaio na suspensão em 300 µl de PBS. O PE mono-positivo era macrófago, o CSFE mono-positivo era células tumorais MC38, as células duplo-positivas PE e CSFE eram macrófagos para fagocitose de células MC38. Foram calculadas as taxas de fagocitose de macrófagos sob a ação de diferentes proteínas.

[0079] Os resultados experimentais são mostrados na FIG. 9. No sistema de co-cultura de células de tumor de macrófagos, a eficiência da fagocitose de macrófagos no sistema de co-cultura é substancialmente a mesma (< 10%) ao comparar o anti-PDL1' com o controle negativo (IgG1). Embora para controle positivo (SIRPα-m-Fc') e proteína de fusão IAB, a eficiência da fagocitose de macrófagos no sistema de co-cultura possa ser bastante melhorada, em que a capacidade de promover a fagocitose da proteína de fusão IAB (36%) é menor que SIRPα-m-Fc' (49%), enquanto anti-PDL1' não tem a capacidade de promover a fagocitose de macrófagos.

[0080] Para verificar ainda mais a capacidade de promover a fagocitose da proteína de fusão IAB em macrófagos derivados de mielóide de camundongo, células mielóides de camundongo foram isoladas e cultivadas por 7 a 10 dias com a indução de M-CSF 50 ng/ml para preparar macrófagos derivados de mielóide de camundongo. Os macrófagos derivados do mielóide 5×10^4 foram misturados com 2×10^5 células tumorais MC38 marcadas

com CFSE, adicionando à proteína de fusão IAB, controle negativo (IgG1) e controle positivo SIRP α -m-Fc', incubadas a 37 °C por 2 horas, fotografadas com uma microscópio invertido e macrófagos com fluorescência verde na imagem eram macrófagos após fagocitose de células tumorais. Como mostrado na FIG. 10, os macrófagos (FIG. 10a) aderem à parede e esticam os pseudópodes no grupo de controle negativo adicionado com IgG1 (Fig. 10a), quase nenhum macrófago fagocitou células tumorais (fluorescência verde). Na combinação de IAB (FIG. 10c) e grupo de controle positivo SIRP α -m-Fc' (FIG. 10b), os macrófagos fagocitaram as células tumorais (fluorescência verde) (indicado pelas setas pretas). Os resultados acima verificam novamente que a proteína de fusão IAB tem a capacidade de promover a fagocitose de macrófagos de células tumorais in vitro.

Exemplo 9. Experimentos do gene repórter do ADCC

[0081] Diferentes concentrações de anticorpos a serem testados (proteína de fusão IAB, controle positivo SIRP α -m-Fc', controle negativo anti-PDL1') foram incubadas com células Jurkat (células efectoras) que expressam Fc γ IIIa transformada pelo gene repórter da luciferase e células tumorais MC38 (células alvo), incubadas a 37 °C em uma incubadora com 8% de CO₂ por 4 h; o substrato fluorescente foi adicionado, as leituras de fluorescência foram medidas

no ensaio de fluorescência em placa Glomax®well ELISA, e os resultados são mostrados na FIG. 11)

[0082] Os quadrados pretos na FIG. 11 são dados para proteínas de fusão IAB. Os círculos sólidos pretos são os dados de SIRP α -m-Fc' e os triângulos pretos são os dados de anti-PDL1'. Os dados ilustraram que a proteína de fusão IAB tem certo efeito ADCC, mas o seu efeito ADCC em doses equivalentes é menor que o de SIRP α -m-Fc', possivelmente em relação à estrutura Saliência-no-orifício. Devido à introdução da mutação N297A no local conservador de glicosilação no segmento Fc do anticorpo e sem modificação de glicosil, o efeito ADCC é perdido.

Exemplo 10. Ensaio de toxicidade no sangue da proteína de fusão bifuncional IAB direcionada a CD47 e PD-L1

[0083] 15 camundongos Balb/c saudáveis (6-8 semanas) foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (5 por grupo) em peso (em média cerca de 20 g). Cada grupo de camundongos foi administrado por via intraperitoneal (IAB, SIRP α -m-Fc' ou i.v. IgG humana) a uma dose de 100 mg/kg; após 24 horas de administração, os camundongos foram amostrados para sangue através do orbital de cerca de 500 μ l no tubo EP, e 1% de heparina sódica a 10 μ L foi adicionada imediatamente para evitar coagulação. A análise do sangue do rato foi realizada no Shanghai Model Organisms Center, Inc.. Ao monitorar a alteração de índices como glóbulos vermelhos, proteínas

sanguíneas, volume específico de glóbulos vermelhos, plaquetas e similares no sangue de camundongos após a administração, toxicidade sanguínea do anticorpo protótipo e a proteína de fusão IAB foram avaliadas, e os resultados são mostrados na FIG. 12, a FIG. 13 e FIG. 14. Os resultados sugerem que o conteúdo de glóbulos vermelhos ($9,1 \times 10^{12}/L$), HCT (43,0%), hemoglobina (137,8 g/L) do grupo experimental injetado com proteína IAB não apresenta diferença significativa do conteúdo de glóbulos vermelhos ($9,4 \times 10^{12}/L$), HCT (42,56%) e hemoglobina (142,4 g/L) do grupo controle injetado com IgG humana. Enquanto o grupo injetado com SIRP α -m-Fc' foi afetado pela toxicidade do sangue, os dados relevantes são o conteúdo de glóbulos vermelhos $8 \times 10^{12}/L$, HCT 35,07% e hemoglobina 121,6 g/L, significativamente diferentes dos outros dois grupos.

Exemplo 11. Estudo da atividade de inibição de tumores do IAB da proteína de fusão bifuncional visando CD47 e PD-L1 em camundongos

[0084] (1) O tratamento IAB do modelo de tumor Balb/c para ratos MC38:

[0085] Camundongos fêmeas Balb/c (6-8 semanas) foram inoculados com células tumorais MC38 (2×10^5 células/animal) por via subcutânea, totalizando 40 camundongos. Após a remoção de camundongos com tumores muito grandes ou muito pequenos no dia 6, os demais foram agrupados em 4 grupos de

acordo com o volume do tumor (cerca de 100 mm³), cada grupo com 8 camundongos. A proteína de fusão IAB, o controle irrelevante (IgG1 humana) ou o anticorpo protótipo (SIRP α -m-Fc', anti-PDL1') foram injetados no tumor a 10 mg/kg. A formação de tumores em camundongos foi observada duas vezes por semana, usando pinças para medir o diâmetro máximo (comprimento) e a distância vertical (largura) do tumor, com a fórmula de cálculo do volume do tumor: $\text{volume} = 0,5 \times \text{comprimento} \times \text{largura}^2$. o volume em camundongos era maior que 2000 mm³, ou grande área de úlcera aparecia no local do tumor; os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. A observação geralmente dura 21 dias. Os resultados experimentais são mostrados na FIG. 15.

[0086] Os resultados experimentais mostram que, após a administração do grupo controle com anticorpos irrelevantes (IgG1 humana iv), o tumor estava em crescimento progressivo e o volume médio do tumor no dia 21 atingiu 1472 mm³ no final da observação (21 dias após a inoculação), o grupo controle e os camundongos do grupo de tratamento SIRP α -m-Fc' estavam com a pele desanimada, fina, enrugada e com movimento lento. O tumor na parte de trás dos camundongos do grupo de tratamento anti-PDL1 'e IAB foi reduzido em várias extensões. O tamanho médio do tumor de camundongos do grupo de tratamento anti-PDL1' é 289 mm³. O tamanho médio do tumor dos camundongos do grupo de tratamento IAB é de 67 mm³ e o

tumor em alguns dos camundongos desapareceu completamente, indicando que a proteína de fusão IAB tem melhor efeito antitumoral que a proteína protótipo (anti-PDL1 'e SIRP α -m-Fc') no tratamento do modelo de tumor MC38. O efeito de supressão do tumor é da seguinte ordem: IAB > anti-PDL1' > SIRP α -m-Fc'. O resultado mostra que, sob a mesma dosagem e com a mesma via de administração, a proteína de fusão IAB tem um "efeito sinérgico" da supressão tumoral.

[0087] (2) O IAB impede o tumor nos camundongos Balb/c inoculados com o modelo de tumor MC38 (inoculação secundária):

[0088] Os murganhos tratados com grupos de tratamento com proteínas de fusão IAB cujo tumor desapareceu completamente (tocando os locais de inoculação sem tumores acessíveis) e camundongos BALB/c saudáveis foram submetidos a experiência de inoculação secundária com MC38. As células tumorais MC38 foram inoculadas por via subcutânea no outro lado do local de inoculação primário em camundongos, com tamanho de inóculo de 2×10^5 células/animal. A formação de tumores em camundongos foi observada duas vezes por semana, usando pinças para medir o diâmetro máximo (comprimento) e a distância vertical (largura) do tumor, com a fórmula de cálculo do volume do tumor: $\text{volume} = 0,5 \times \text{comprimento} \times \text{largura}^2$. o volume em camundongos era maior que 2000 mm³, ou grande área de úlcera aparecia no local do tumor; os

camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. A observação geralmente dura 21 dias. Os resultados experimentais são mostrados na FIG. 16

[0089] Os resultados experimentais mostraram que após a inoculação do grupo controle (camundongos Balb/c saudáveis) com células MC38, o tumor estava em crescimento progressivo e o volume médio do tumor no dia 21 atingiu 1453 mm³; no entanto, depois que os camundongos curados com proteína de fusão IAB foram inoculados com MC38, nenhum tumor acessível (menor que 30 mm³) pode ser encontrado no local da inoculação dentro de 21 dias. Apenas um rato apresentou evidência de crescimento tumoral no dia 10, mas desapareceu mais tarde. Os resultados acima mostraram que é possível que os camundongos curados tenham aliviado a adaptabilidade do tumor para MC38 e o estado inibitório da imunidade inata, e as células T específicas do antígeno geradas após a ativação imune adaptativa possam inibir a formação do tumor das células tumorais do MC38 pela segunda vez.

Exemplo 12. Estudos do mecanismo de ação da proteína de fusão bifuncional IAB direcionada a CD47 e PD-L1

[0090] (1) Tratamento IAB para camundongos portadores de tumor MC38 (tipo defeituoso para macrófagos):

[0091] As células tumorais MC38 foram inoculadas por via subcutânea em 15 camundongos fêmeas BALB/C saudáveis de 6-8 semanas a 2×10^5 células. No dia 6, os camundongos foram

agrupados de acordo com o volume médio do tumor em três grupos, cada grupo constituído por 5 camundongos, e designados como grupo experimental, grupo controle 1 e grupo controle 2. O grupo experimental foi injetado com Clofosoma (um removedor de macrófagos, disponível na Shanghai BangLv Biotech Co., Ltd) a 200 μ L/camundongo, depois a 100 μ L/camundongo a cada dois dias; A proteína de fusão IAB foi injetada no tumor na dose de 10 mg/kg no dia 7 e no dia 10. O grupo controle 1 foi injetado com lipossomo em branco em vez de clofosoma para injetar no camundongo, e a proteína de fusão IAB foi injetada no tumor a 10 mg/kg dose no dia 7 e dia 10; O Grupo Controle 2 foi injetado com lipossomo em branco em vez de Clofosoma, e anticorpo IgG humano irrelevante foi injetado no tumor na dose de 10 mg/kg nos dias 7 e 10. A formação de tumores em camundongos foi observada duas vezes por semana, usando pinças para medir a diâmetro máximo (comprimento) e distância vertical (largura) do tumor, com a fórmula de cálculo do volume do tumor: $\text{volume} = 0,5 \times \text{comprimento} \times \text{largura}^2$. Quando o volume do tumor em camundongos era maior que 2000 mm^3 , ou aparecia uma grande área de úlcera no local do tumor, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. A observação geralmente dura 21 dias. Os resultados experimentais são mostrados na FIG. 17.

[0092] Os resultados experimentais mostram que após a injeção dos camundongos sem remoção de macrófagos com anticorpos irrelevantes (ou seja, grupo controle 2), o tumor subcutâneo estava em crescimento progressivo e o volume médio do tumor no dia 20 atingiu 1419 mm³. Após a administração da proteína de fusão IAB (ou seja, o grupo controle 1), o tumor nos camundongos sem remoção de macrófagos foi efetivamente inibido, o tamanho médio do tumor no dia 20 foi de apenas 55,8 mm³. Após a administração da proteína de fusão IAB, os camundongos com remoção de macrófagos (ou seja, o grupo experimental), embora tenham parcialmente inibido o crescimento do tumor, e o tamanho médio do tumor no dia 21 seja 587 mm³, o efeito inibidor do tumor é significativamente menor que o grupo de camundongos saudáveis (grupo controle 1). A experiência acima sugere que o efeito inibidor do tumor in vivo da proteína de fusão IAB depende das células imunológicas inatas (Macrófagos).

[0093] (2) Tratamento do camundongo portador de tumor MC38 (tipo defeituoso de célula T CD8 +) pela IAB:

[0094] Cada camundongo BALB/c foi injetado duas vezes por semana com anticorpos anti-CD8 ou anticorpos IgG irrelevantes (200 µg/camundongo/tempo) para remover células T CD8 + positivas em camundongos.

[0095] As células tumorais MC38 foram inoculadas subcutaneamente em 5 camundongos Balb/c com a remoção de

células T CD8 + (grupo experimental), 10 camundongos fêmeas saudáveis (divididas nos grupos de controle 1 e 2) de 6-8 semanas a 2×10^5 células. No dia 6, o grupo experimental e o grupo controle 1 foram injetados com proteína de fusão IAB no tumor na dose de 10 mg/kg no dia 7 e no dia 10. O grupo controle 2 foi injetado com anticorpos IgG humanos irrelevantes na dose de 10 mg/kg no tumor no dia 7 e dia 10. A formação de tumores em camundongos foi observada duas vezes por semana, usando pinças para medir o diâmetro máximo (comprimento) e a distância vertical (largura) do tumor, com a fórmula de cálculo do volume do tumor: $\text{volume} = 0,5 \times \text{comprimento} \times \text{largura}^2$. Quando o volume do tumor em camundongos era maior que 2000 mm³, ou uma grande área de úlcera aparecia no local do tumor, os camundongos eram sacrificados por deslocamento cervical. A observação geralmente dura 21 dias. Os resultados experimentais são mostrados na FIG. 18

[0096] Nos resultados experimentais, após a administração do anticorpo irrelevante nos camundongos sem remoção das células T CD8 +, o tamanho do tumor MC38 estava em aumento progressivo e o volume médio do tumor no dia 21 atingiu 1269 mm³. Após a administração da proteína de fusão IAB aos camundongos sem a remoção das células T CD8 + (grupo controle 1), o tumor foi efetivamente inibido, o volume médio de tumor no dia 21 foi de apenas 64,9 mm³. Após a administração da

proteína de fusão IAB, os camundongos com remoção de células T CD8 + (grupo experimental) apresentam volume médio de tumor de 777mm³ no dia 21, cujo efeito inibitório do tumor é significativamente menor que o grupo de administração IAB de camundongos saudáveis (grupo Experimental). Os resultados da experiência acima sugerem que o efeito inibidor do tumor in vivo da proteína de fusão IAB também depende das células imunológicas adaptativas (células T CD8 +).

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão bifuncional **caracterizada** pelo fato de que a proteína de fusão bifuncional é direcionada a CD47 e PD-L1, pode se ligar a moléculas CD47 e a moléculas PD-L1.

2. Proteína de fusão bifuncional, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a fração da proteína de fusão bifuncional que se liga à molécula CD47 é um peptídeo SIRP α -m-Fc que é formado pela ligação de um SIRP α mutante e um segmento Fc de anticorpo; a fração que se liga à molécula de PD-L1 consiste na cadeia leve anti-PD-L1-L e na cadeia pesada anti-PD-L1-H de um anticorpo anti-PD-L1.

3. Proteína de fusão bifuncional, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que o segmento Fc do anticorpo da fração de ligação a CD47 e o anticorpo da fração de ligação a PD-L1 são ambos subtipos de IgG1.

4. Proteína de fusão bifuncional, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de fusão bifuncional tem uma estrutura "knob-in-hole".

5. Proteína de fusão bifuncional, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada** pelo fato de que a fração de ligação a CD47 SIRP α -m-Fc tem a estrutura de Orifício ("hole") da estrutura "knob-in-hole", a cadeia pesada anti-PD-L1-H da fração de ligação PD-L1 tendo uma estrutura

Saliente ("knob") que corresponde à referida estrutura de Orifício ("hole").

6. Proteína de fusão bifuncional, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de que a fração de ligação a CD47 tem uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 1; a cadeia leve anti-PD-L1-L da fração de ligação a PD-L1 possui uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2; e a cadeia pesada anti-PD-L1-H tem uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3.

7. Proteína de fusão bifuncional, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de que a fração de ligação a CD47 tem uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4; a cadeia leve anti-PD-L1-L da fração de ligação PD-L1 possui uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 5, e a cadeia pesada anti-PD-L1-H tem uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6.

8. Uso da proteína de fusão bifuncional conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7 **caracterizado** pelo fato de ser na preparação de medicamentos para prevenção ou tratamento de tumores.

9. Uso da proteína de fusão bifuncional conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7

caracterizado pelo fato de ser na preparação de fármacos imunomoduladores.

10. Uso da proteína de fusão bifuncional conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7 **caracterizado** pelo fato de ser na preparação de um fármaco que reduz a toxicidade do medicamento direcionado a CD47 no sangue.

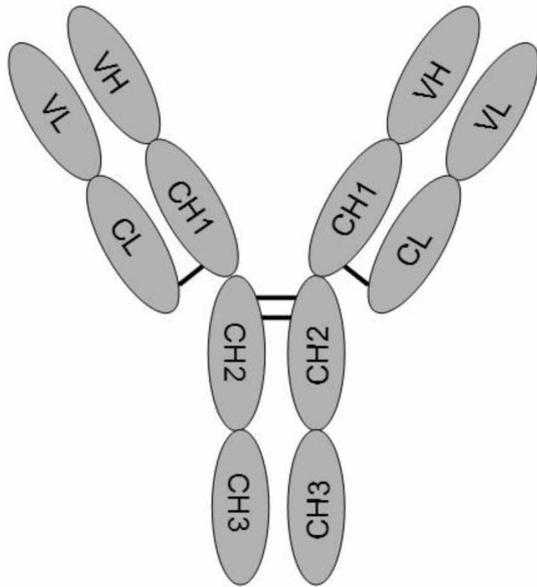


FIGURA 1

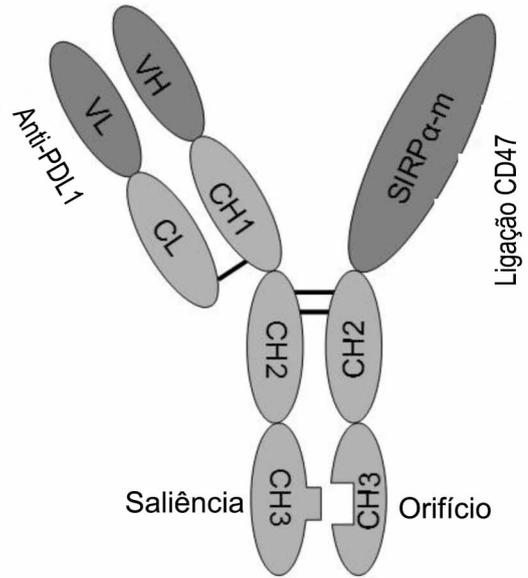


FIGURA 2

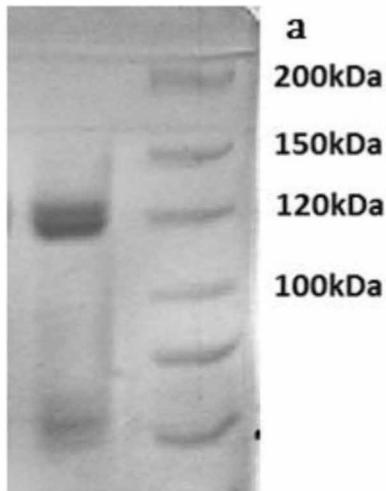


FIGURA 3

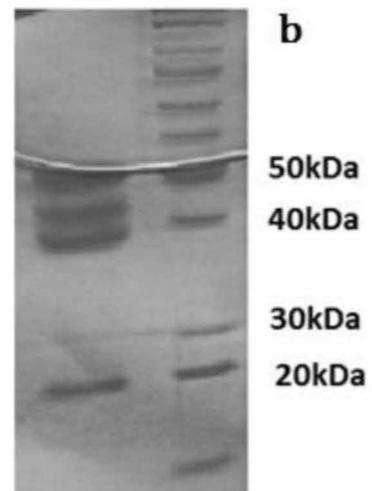


FIGURA 4

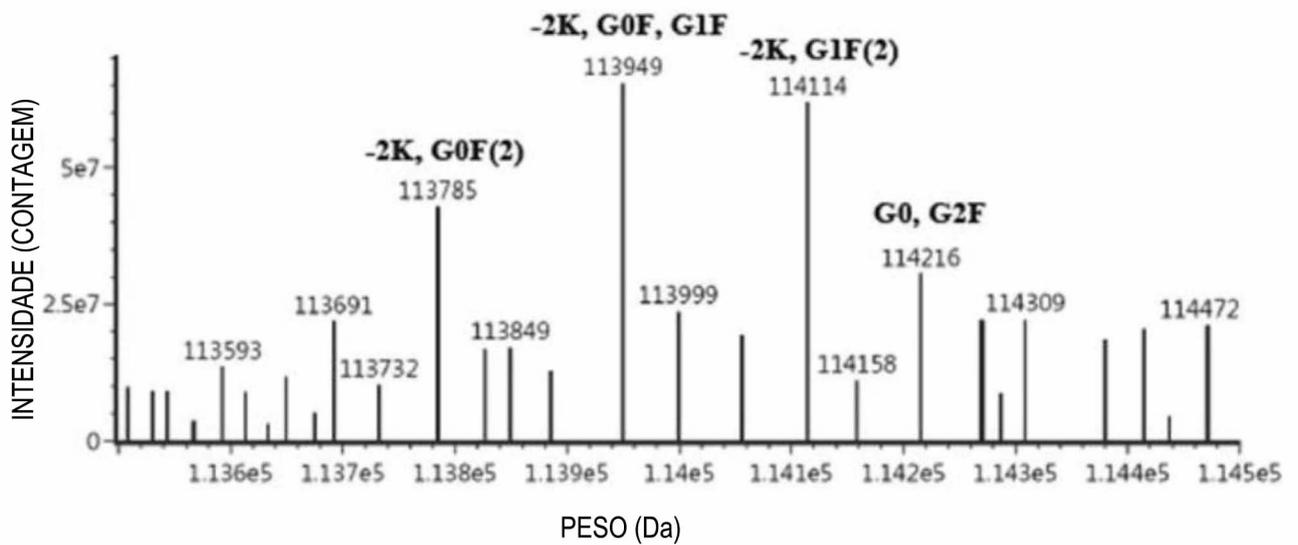


FIGURA 5

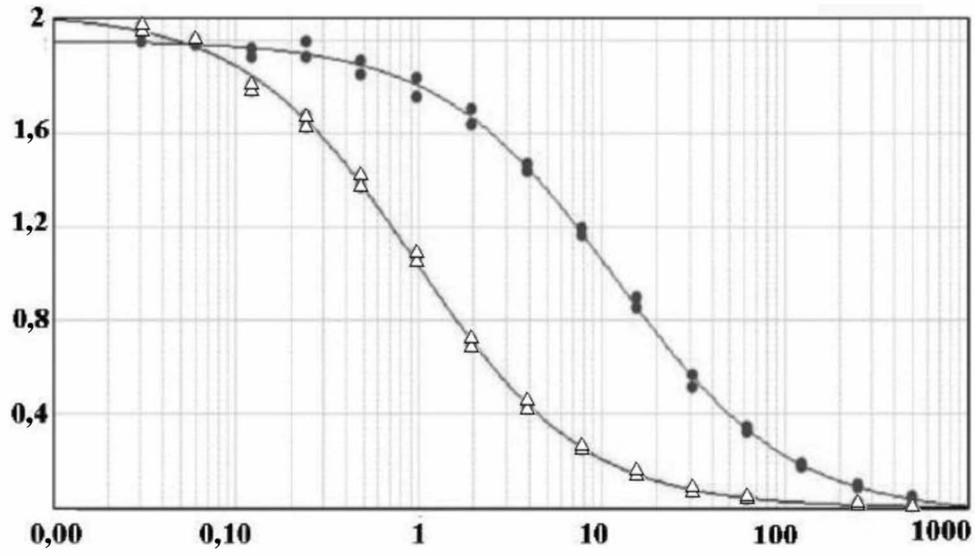


FIGURA 6

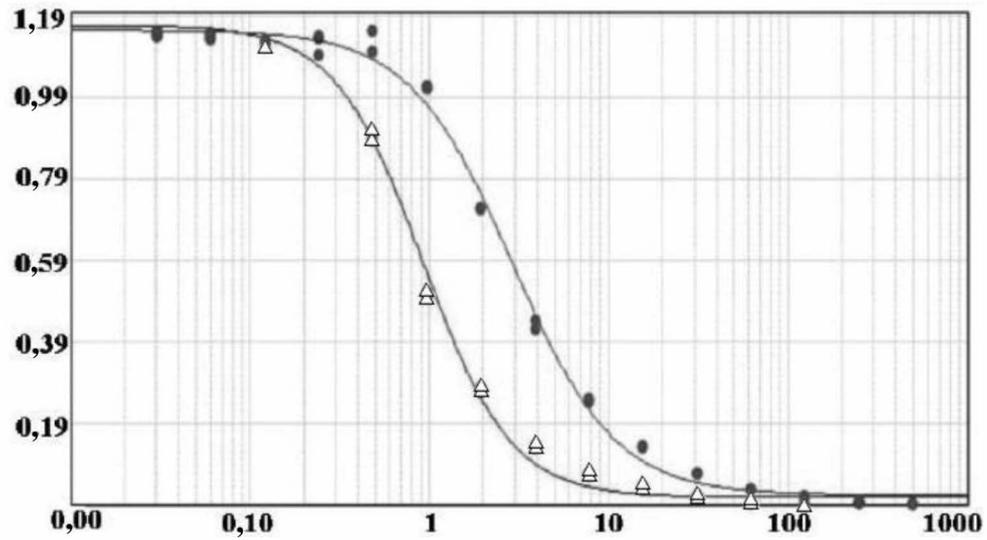


FIGURA 7

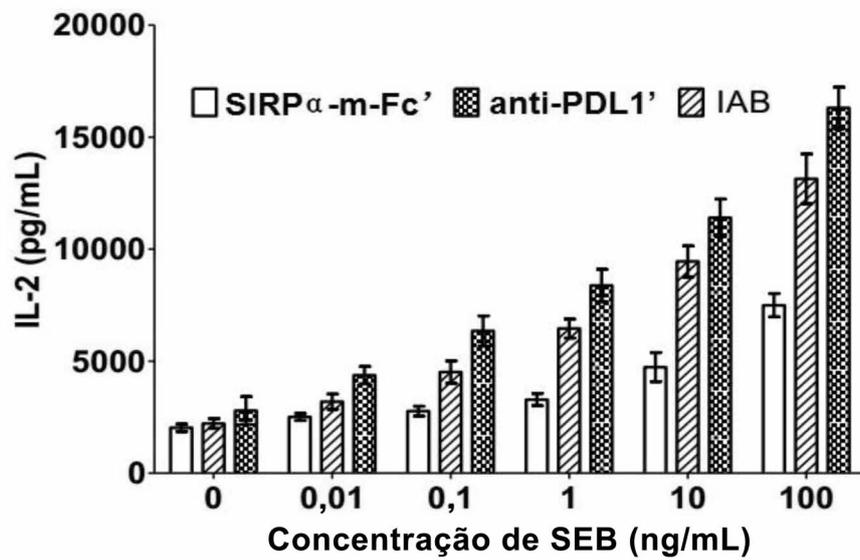


FIGURA 8

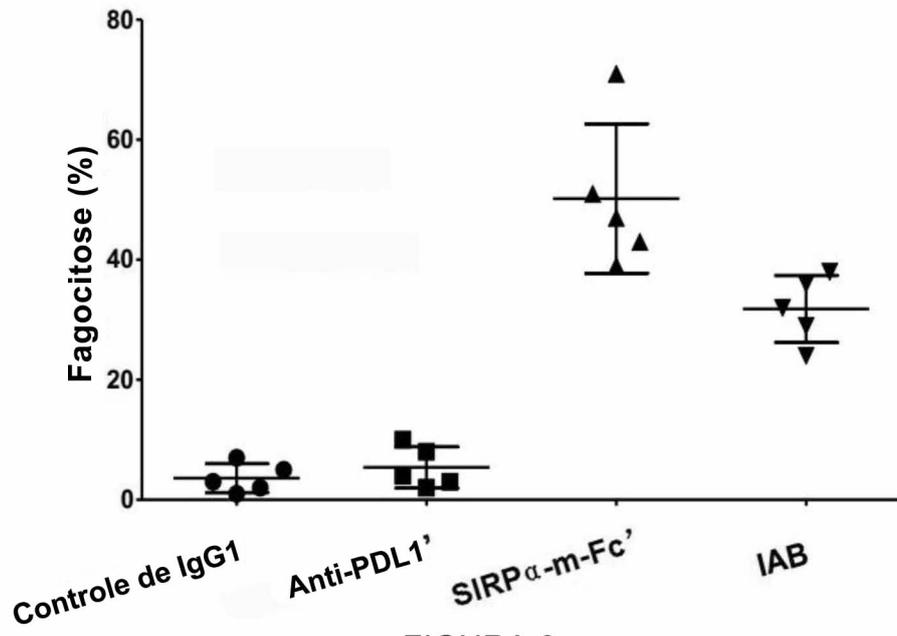


FIGURA 9

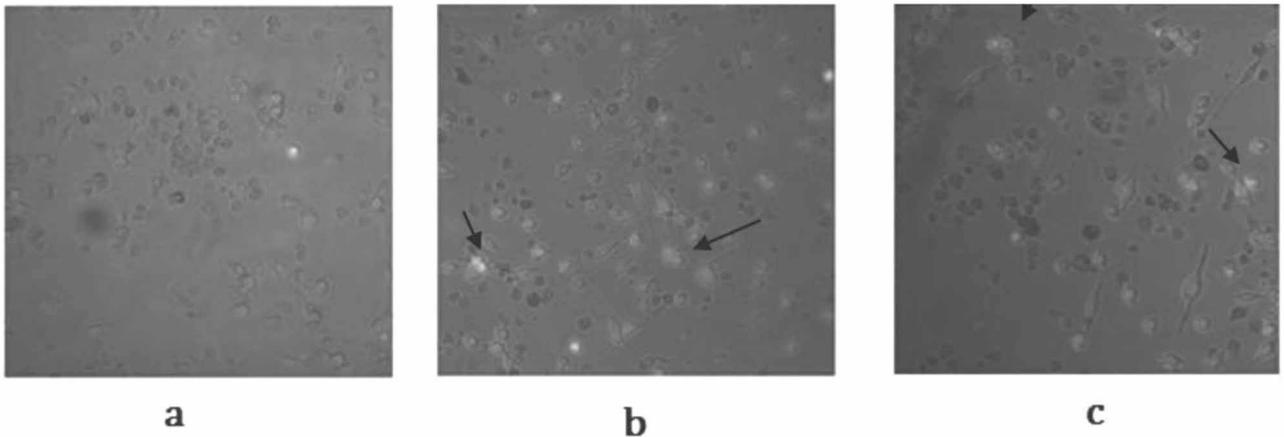


FIGURA 10

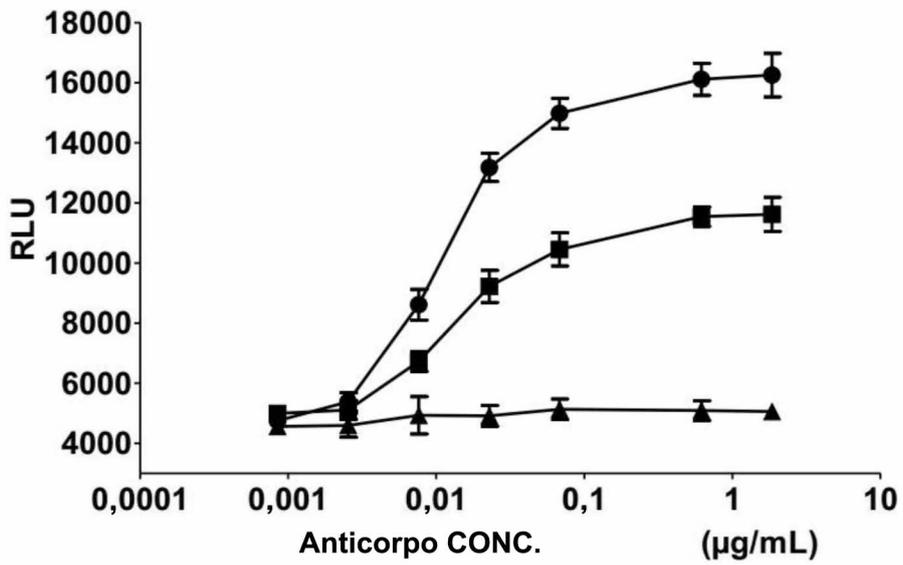


FIGURA 11

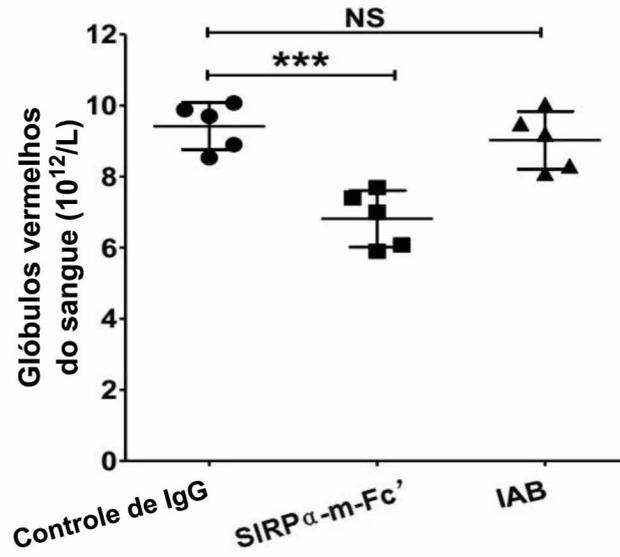


FIGURA 12

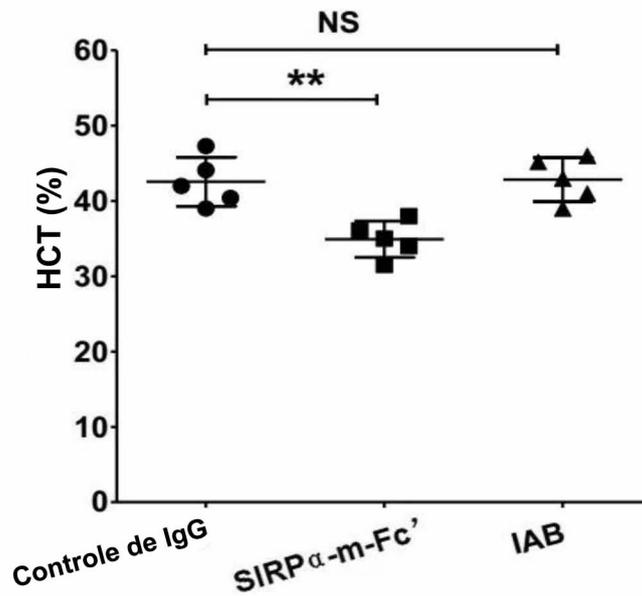


FIGURA 13

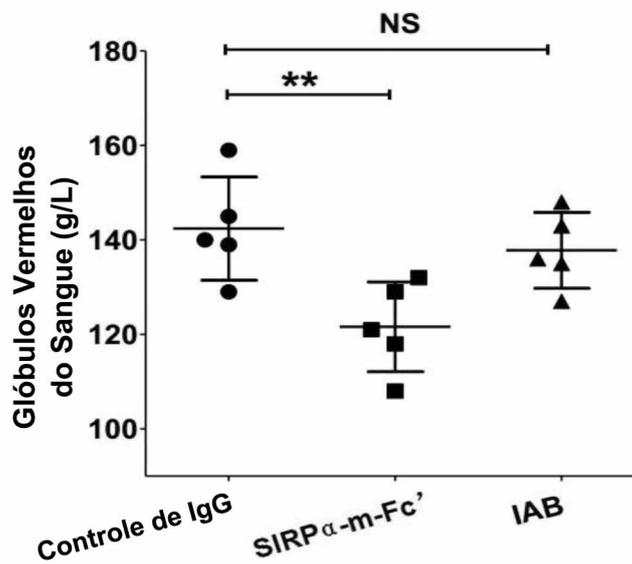


FIGURA 14

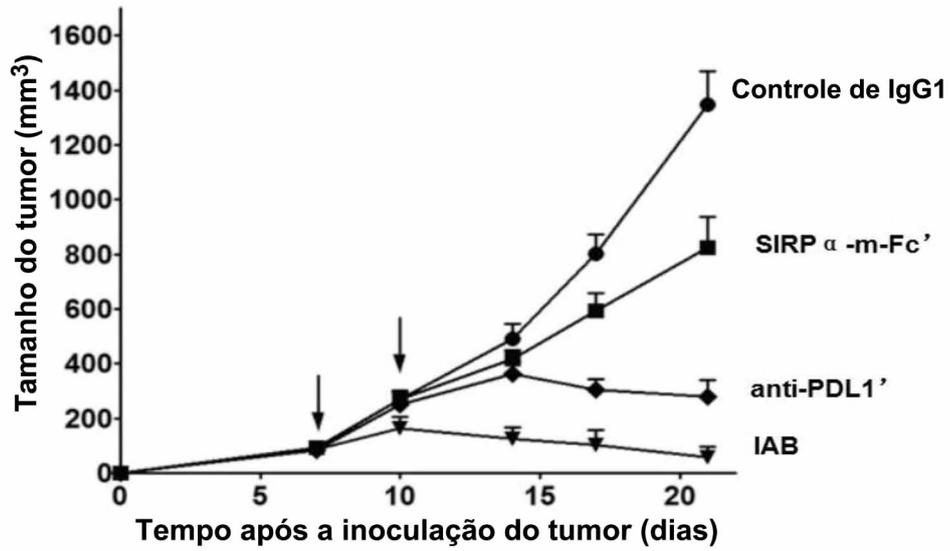


FIGURA 15

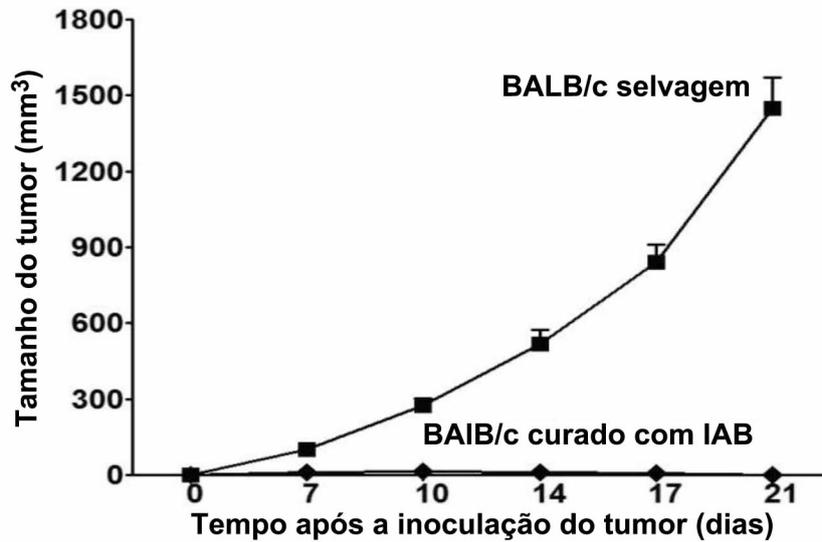


FIGURA 16

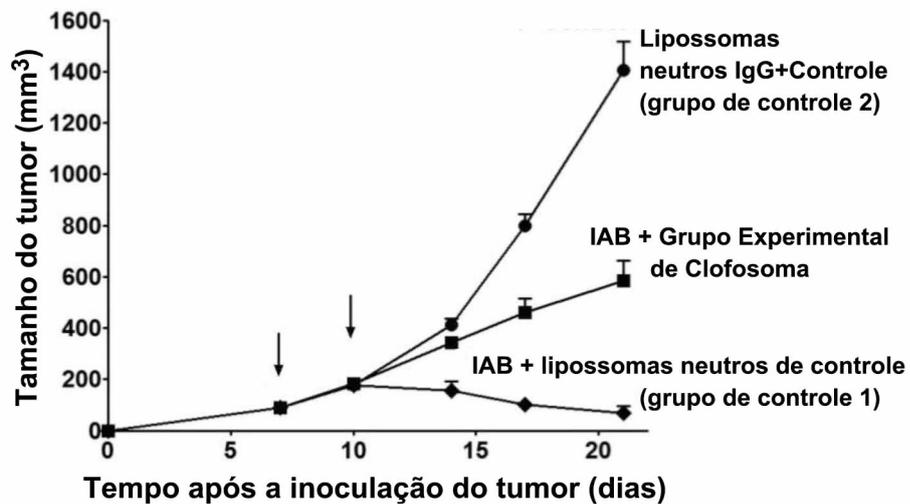


FIGURA 17

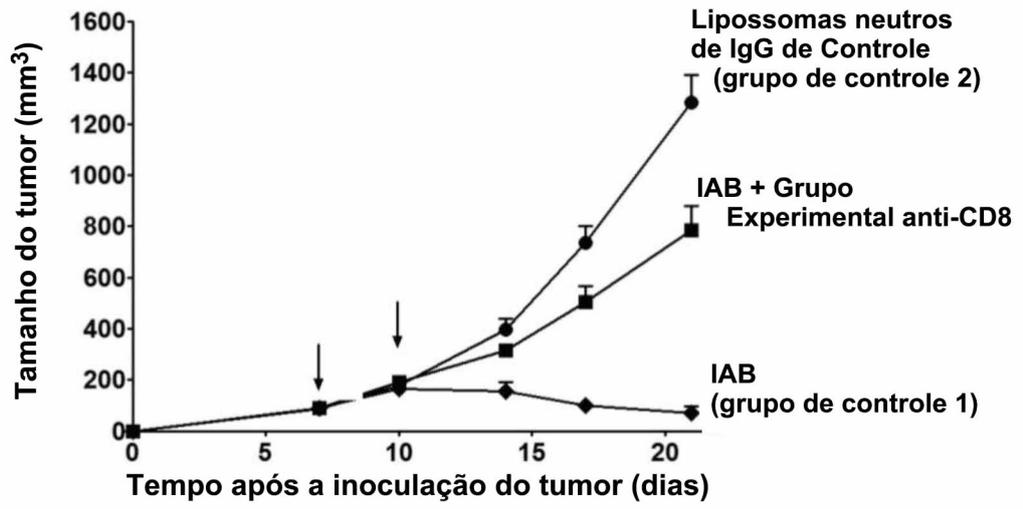


FIGURA 18

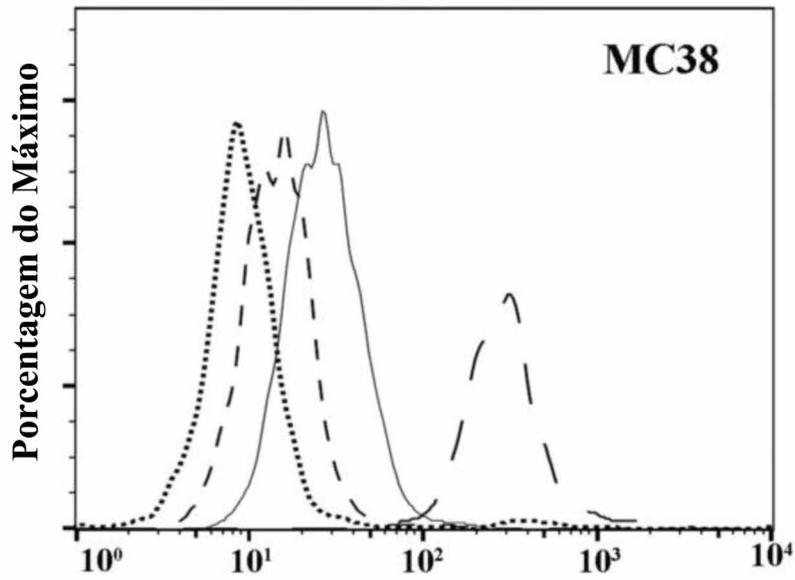


FIGURA 19

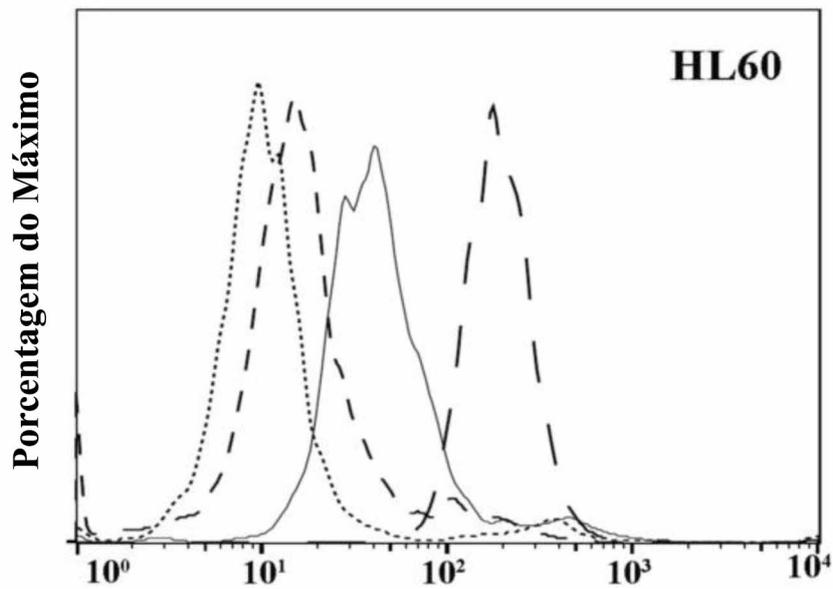


FIGURA 20

Resumo da Patente de Invenção para: **"UMA PROTEÍNA DE FUSÃO BIFUNCIONAL DIRECIONADA A CD47 E PD-L1"**

Uma proteína de fusão bifuncional direcionada a CD47 e PD-L1, que pertence ao campo da biomedicina e resolve os problemas que o tratamento anti-PD-1/PD-L1 tem pouco efeito sobre os tumores imunogênicos baixos e o tratamento anti-CD47 tem propriedades de direcionamento ruins. A proteína de fusão consiste em uma fração de ligação a CD47 e uma fração de ligação a PD-L1 ligada por meio de uma ligação dissulfeto, pode bloquear tanto a ligação de CD47 a SIRP α quanto a ligação de PD-L1 a PD-1, não apenas ativando fagocitose de macrófagos de células tumorais e promoção da apresentação de antígenos na imunidade inata, mas também promovendo a ativação de células T específicas para tumores na imunidade adquirida, e apresenta menor toxicidade hematológica. A proteína de fusão tem melhor eficácia antitumoral e segurança hematológica do que a terapia anti-PD-L1 ou anti-CD47 sozinha, e os animais dos quais um tumor desapareceu após o tratamento da proteína de fusão produzem imunidade contra a reinoculação da mesma célula tumoral.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequências S.26.002.PI-BR.txt
- Data de Geração do Código: 19/05/2020
- Hora de Geração do Código: 16:38:50
- Código de Controle:
 - Campo 1: FE8B44D93DDBA05E
 - Campo 2: 9EB512A0087AA5B6