



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104271757 B

(45)授权公告日 2020.06.09

(21)申请号 201380017900.0

(22)申请日 2013.02.06

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104271757 A

(43)申请公布日 2015.01.07

(30)优先权数据

61/595,216 2012.02.06 US

61/659,752 2012.06.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.09.29

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/024995 2013.02.06

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/119714 EN 2013.08.15

(73)专利权人 印希彼有限公司
地址 美国特拉华州

(72)发明人 B·埃克尔曼 J·蒂莫
A·拉扎伊 Q·德福罗 K·琼斯
P·L·恩古

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 余颖

(51)Int.Cl.

C12P 21/08(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

(56)对比文件

US 2005/0288491 A1,2005.12.29,

US 2009/0035322 A1,2009.02.05,

US 2011/0014119 A1,2011.01.20,

US 2011/0223107 A1,2011.09.15,

Babic等.SHPS-1 induces aggregation of
Ba/F3 Pro-B cells Via an interaction with
CD47.《the JOURNAL OF IMMUNOLOGY》.2000,第
164卷第3654页左栏倒数第1段至右栏第1段.

Babic等.SHPS-1 induces aggregation of
Ba/F3 Pro-B cells Via an interaction with
CD47.《the JOURNAL OF IMMUNOLOGY》.2000,第
164卷第3654页左栏倒数第1段至右栏第1段.

Pernilla.Osteoclast formation is
strongly reduced both in vivo and in
vitro in the absence of CD47/SIRP α -
interaction.《biochemicalBiochemical
research communications》.2007,第352卷第
445页右栏第2段.

X.W.ZHAO等.CD47-SIGNAL REGULATORY
PROTEIN-(SIRP) INTERACTIONS FORM A
BARRIER FOR ANTIBODY-MEDIATED TUMOR CELL
DESTRUCTION.《PROCEEDINGS OF THE NATIONAL
ACADEMY OF SCIENCE》.2011,第108卷(第45期),
全文.

审查员 张锦广

权利要求书8页 说明书50页

序列表49页 附图27页

(54)发明名称

CD47抗体及其使用方法

(57)摘要

本发明一般涉及识别CD47的单克隆抗体,更
具体地涉及不引起显著的细胞凝集的CD47抗体、
制备这些抗体的方法以及使用这些单克隆抗体
作为治疗物质的方法。

1. 一种分离的单克隆抗体或其免疫活性片段,其结合人CD47或其免疫活性片段,所述抗体或其免疫活性片段在给药后不会引起显著的血红细胞血凝反应,所述抗体或其免疫活性片段阻止CD47与信号调节蛋白 α 即SIRP α 相互作用,所述抗体或其免疫活性片段包含以下可变重链(VH)和可变轻链(VL)互补决定区(CDR):

i. SEQ ID NO:50所示VH-CDR1序列、SEQ ID NO:51所示VH-CDR2序列、SEQ ID NO:52所示VH-CDR3序列、SEQ ID NO:53所示VL-CDR1序列、SEQ ID NO:54所示VL-CDR2序列、SEQ ID NO:55所示VL-CDR3序列;

ii. SEQ ID NO:50所示VH-CDR1序列、SEQ ID NO:51所示VH-CDR2序列、SEQ ID NO:52所示VH-CDR3序列、SEQ ID NO:67所示VL-CDR1序列、SEQ ID NO:69所示VL-CDR2序列、SEQ ID NO:55所示VL-CDR3序列;

iii. SEQ ID NO:50所示VH-CDR1序列、SEQ ID NO:51所示VH-CDR2序列、SEQ ID NO:52所示VH-CDR3序列、SEQ ID NO:67所示VL-CDR1序列、SEQ ID NO:70所示VL-CDR2序列、SEQ ID NO:55所示VL-CDR3序列;

iv. SEQ ID NO:50所示VH-CDR1序列、SEQ ID NO:51所示VH-CDR2序列、SEQ ID NO:52所示VH-CDR3序列、SEQ ID NO:68所示VL-CDR1序列、SEQ ID NO:54所示VL-CDR2序列、SEQ ID NO:55所示VL-CDR3序列;

v. SEQ ID NO:50所示VH-CDR1序列、SEQ ID NO:72所示VH-CDR2序列、SEQ ID NO:52所示VH-CDR3序列、SEQ ID NO:53所示VL-CDR1序列、SEQ ID NO:71所示VL-CDR2序列、SEQ ID NO:55所示VL-CDR3序列;

vi. SEQ ID NO:50所示VH-CDR1序列、SEQ ID NO:72所示VH-CDR2序列、SEQ ID NO:52所示VH-CDR3序列、SEQ ID NO:68所示VL-CDR1序列、SEQ ID NO:54所示VL-CDR2序列、SEQ ID NO:55所示VL-CDR3序列;

vii. SEQ ID NO:50所示VH-CDR1序列、SEQ ID NO:72所示VH-CDR2序列、SEQ ID NO:52所示VH-CDR3序列、SEQ ID NO:68所示VL-CDR1序列、SEQ ID NO:71所示VL-CDR2序列、SEQ ID NO:55所示VL-CDR3序列;

viii. SEQ ID NO:50所示VH-CDR1序列、SEQ ID NO:76所示VH-CDR2序列、SEQ ID NO:52所示VH-CDR3序列、SEQ ID NO:68所示VL-CDR1序列、SEQ ID NO:54所示VL-CDR2序列、SEQ ID NO:55所示VL-CDR3序列;

ix. SEQ ID NO:50所示VH-CDR1序列、SEQ ID NO:76所示VH-CDR2序列、SEQ ID NO:52所示VH-CDR3序列、SEQ ID NO:68所示VL-CDR1序列、SEQ ID NO:71所示VL-CDR2序列、SEQ ID NO:55所示VL-CDR3序列;

x. SEQ ID NO:50所示VH-CDR1序列、SEQ ID NO:51所示VH-CDR2序列、SEQ ID NO:77所示VH-CDR3序列、SEQ ID NO:53所示VL-CDR1序列、SEQ ID NO:54所示VL-CDR2序列、SEQ ID NO:55所示VL-CDR3序列;

xi. SEQ ID NO:57所示VH-CDR1序列、SEQ ID NO:51所示VH-CDR2序列、SEQ ID NO:52所示VH-CDR3序列、SEQ ID NO:53所示VL-CDR1序列、SEQ ID NO:54所示VL-CDR2序列、SEQ ID NO:55所示VL-CDR3序列;

xii. SEQ ID NO:60所示VH-CDR1序列、SEQ ID NO:51所示VH-CDR2序列、SEQ ID NO:52所示VH-CDR3序列、SEQ ID NO:53所示VL-CDR1序列、SEQ ID NO:54所示VL-CDR2序列、SEQ

ID NO:55所示VL-CDR3序列;

xiii. SEQ ID NO:61所示VH-CDR1序列、SEQ ID NO:51所示VH-CDR2序列、SEQ ID NO:52所示VH-CDR3序列、SEQ ID NO:53所示VL-CDR1序列、SEQ ID NO:54所示VL-CDR2序列、SEQ ID NO:55所示VL-CDR3序列;或

xiv. SEQ ID NO:62所示VH-CDR1序列、SEQ ID NO:51所示VH-CDR2序列、SEQ ID NO:52所示VH-CDR3序列、SEQ ID NO:53所示VL-CDR1序列、SEQ ID NO:54所示VL-CDR2序列、SEQ ID NO:55所示VL-CDR3序列。

2. 如权利要求1所述的抗体或其免疫活性片段,所述抗体或其免疫活性片段以头对侧的方向结合CD47,所述抗体的VH链靠近表达CD47的细胞的细胞膜,且所述抗体的VL链封闭CD47上的SIRP α 结合位点。

3. 如权利要求1所述的抗体或其免疫活性片段,所述抗体或其免疫活性片段结合CD47上的不连续表位。

4. 如权利要求3所述的抗体或其免疫活性片段,所述抗体或其免疫活性片段结合包括SEQ ID NO:56的CD47环。

5. 如权利要求3所述的抗体或其免疫活性片段,所述不连续表位包含CD47的氨基酸残基Y37、K39、K41、K43、G44、R45、D46、D51、H90、N93、E97、T99、E104或E106,编号依据SEQ ID NO:147。

6. 如权利要求1所述的抗体或其免疫活性片段,所述抗体或其免疫活性片段以头对侧的方向结合CD47,所述抗体的VL链靠近表达CD47的细胞的细胞膜,且所述抗体的VH链封闭CD47上的SIRP α 结合位点。

7. 如权利要求1所述的抗体或其免疫活性片段,所述抗体或其免疫活性片段是选自IgG4P和IgG4PE的IgG同种型。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的抗体或其免疫活性片段,所述抗体或其免疫活性片段是嵌合或人源化的。

9. 如权利要求1-7中任一项所述的抗体或其免疫活性片段,所述抗体或其免疫活性片段促进巨噬细胞介导的对表达CD47的细胞的吞噬作用。

10. 如权利要求1-6中任一项所述的抗体或其免疫活性片段,所述抗体或其免疫活性片段是一种IgG同种型,所述IgG同种型选自下组: IgG1同种型、IgG2同种型、IgG3同种型和IgG4同种型。

11. 如权利要求1-7中任一项所述的抗体或其免疫活性片段,所述抗体或其免疫活性片段包含选自SEQ ID NO:5-30的可变重(VH)链区序列。

12. 如权利要求1-7中任一项所述的抗体或其免疫活性片段,所述抗体或其免疫活性片段包含选自SEQ ID NO:31-47的可变轻(VL)链区序列。

13. 如权利要求1-7中任一项所述的抗体或其免疫活性片段,所述抗体或其免疫活性片段包含SEQ ID NO:5-30中任一序列提供的VH区序列和SEQ ID NO:31-47中任一序列提供的VL区。

14. 如权利要求1-7中任一项所述的抗体或其免疫活性片段,所述抗体或其免疫活性片段包含SEQ ID NO:5、7、8、11、12、15-17、20-22和27-30中任一序列提供的VH区序列和SEQ ID NO:31、32、35、40、41、42、43、44和47中任一序列提供的VL区序列。

15. 如权利要求1-7中任一项所述的抗体或其免疫活性片段,所述抗体或其免疫活性片段包含选自以下所列组合的VH链区与VL链区的组合:

SEQ ID NO:5所示的VH链区与SEQ ID NO:31所示的VL链区;
SEQ ID NO:5所示的VH链区与SEQ ID NO:32所示的VL链区;
SEQ ID NO:7所示的VH链区与SEQ ID NO:33所示的VL链区;
SEQ ID NO:7所示的VH链区与SEQ ID NO:34所示的VL链区;
SEQ ID NO:7所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区;
SEQ ID NO:7所示的VH链区与SEQ ID NO:36所示的VL链区;
SEQ ID NO:7所示的VH链区与SEQ ID NO:37所示的VL链区;
SEQ ID NO:7所示的VH链区与SEQ ID NO:38所示的VL链区;
SEQ ID NO:7所示的VH链区与SEQ ID NO:39所示的VL链区;
SEQ ID NO:7所示的VH链区与SEQ ID NO:43所示的VL链区;
SEQ ID NO:8所示的VH链区与SEQ ID NO:39所示的VL链区;
SEQ ID NO:11所示的VH链区与SEQ ID NO:42所示的VL链区;
SEQ ID NO:11所示的VH链区与SEQ ID NO:43所示的VL链区;
SEQ ID NO:11所示的VH链区与SEQ ID NO:44所示的VL链区;
SEQ ID NO:11所示的VH链区与SEQ ID NO:47所示的VL链区;
SEQ ID NO:15所示的VH链区与SEQ ID NO:43所示的VL链区;
SEQ ID NO:15所示的VH链区与SEQ ID NO:44所示的VL链区;
SEQ ID NO:16所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区;
SEQ ID NO:17所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区;
SEQ ID NO:20所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区;
SEQ ID NO:21所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区;
SEQ ID NO:22所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区;
SEQ ID NO:27所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区;
SEQ ID NO:28所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区;
SEQ ID NO:29所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区;和
SEQ ID NO:30所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区。

16. 如权利要求1-7中任一项所述的抗体或其免疫活性片段,所述抗体或其免疫活性片段包含SEQ ID NO:50中所列的VH CDR1序列,SEQ ID NO:51中所列的VH CDR2序列,SEQ ID NO:52中所列的VH CDR3序列,SEQ ID NO:53中所列的VL CDR1序列,SEQ ID NO:54中所列的VL CDR2序列,以及SEQ ID NO:55中所列的VL CDR3序列。

17. 如权利要求1-7中任一项所述的抗体或其免疫活性片段,所述抗体或其免疫活性片段包含SEQ ID NO:50中所列的VH CDR1序列,SEQ ID NO:72中所列的VH CDR2序列,SEQ ID NO:52中所列的VH CDR3序列,SEQ ID NO:53中所列的VL CDR1序列,SEQ ID NO:71中所列的VL CDR2序列,以及SEQ ID NO:55中所列的VL CDR3序列。

18. 一种分离的单克隆抗体或其免疫活性片段,所述分离的单克隆抗体或其免疫活性片段结合CD47,包含以下可变重链(VH)和可变轻链(VL)互补决定区(CDR):

i. VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:5所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的

氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:31所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

ii.VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:5所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:32所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

iii.VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:7所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:33所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

iv.VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:7所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:34所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

v.VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:7所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:35所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

vi.VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:7所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:36所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

vii.VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:7所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:37所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

viii.VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:7所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:38所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

ix.VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:7所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:39所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

x.VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:7所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:43所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

xi. VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:8所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:39所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

xii. VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:11所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:42所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

xiii. VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:11所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:43所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

xiv. VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:11所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:44所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

xv. VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:11所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:47所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

xvi. VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:15所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:43所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

xvii. VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:15所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:44所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

xviii. VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:16所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:35所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

xix. VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:17所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:35所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成;

xx. VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:20所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成,且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:35所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨

基酸序列；

xxi.VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:21所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成，且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:35所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成；

xxii.VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:22所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成，且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:35所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成；

xxiii.VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:27所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成，且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:35所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成；

xxiv.VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:28所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成，且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:35所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成；

xxv.VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:29所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成，且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:35所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成；或

xxvi.VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别由SEQ ID NO:30所示VH链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成，且

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别由SEQ ID NO:35所示VL链区内CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列构成。

19.一种药物组合物，其包含权利要求1-7和18中任一项所述的抗体或其免疫活性片段以及运载体。

20.包含有效量的权利要求1所述抗体或其免疫活性片段的组合物在生产用于治疗对象中CD47+肿瘤的藥物中的应用。

21.如权利要求20所述的应用，所述抗体或其免疫活性片段以头对侧的方向结合CD47，其中，所述抗体的VH链靠近表达CD47的细胞的细胞膜，且所述抗体的VL链封闭CD47上的SIRP α 结合位点。

22.如权利要求20所述的应用，所述抗体或其免疫活性片段结合CD47上的不连续表位。

23.如权利要求22所述的应用，所述抗体或其免疫活性片段结合包括SEQ ID NO:56的CD47环。

24.如权利要求22所述的应用，所述不连续表位包含CD47的氨基酸残基Y37、K39、K41、K43、G44、R45、D46、D51、H90、N93、E97、T99、E104或E106，编号依据SEQ ID NO:147。

25.如权利要求20所述的应用，所述抗体或其免疫活性片段以头对侧的方向结合CD47，所述抗体的VL链靠近表达CD47的细胞的细胞膜，且所述抗体的VH链封闭CD47上的SIRP α 结

合位点。

26. 如权利要求20所述的应用,所述抗体或其免疫活性片段是选自IgG4P和IgG4PE的IgG同种型。

27. 有效量的含有权利要求18所述抗体或其免疫活性片段的组合物用于制造治疗CD47+肿瘤的药物的用途。

28. 如权利要求27所述的用途,其中,所述抗体或其免疫活性片段头对侧的方向结合CD47,所述抗体的VH链靠近表达CD47的细胞的细胞膜,且所述抗体的VL链封闭CD47上的SIRP α 结合位点。

29. 如权利要求27所述的用途,其中,所述抗体或其免疫活性片段结合CD47上的不连续表位。

30. 如权利要求29所述的用途,其中,所述抗体或其免疫活性片段结合包括SEQ ID NO: 56的CD47环。

31. 如权利要求29所述的用途,其中,所述不连续表位包含CD47的氨基酸残基Y37、K39、K41、K43、G44、R45、D46、D51、H90、N93、E97、T99、E104或E106,编号依据SEQ ID NO:147。

32. 如权利要求27所述的用途,其中,所述抗体或其免疫活性片段以头对侧的方向结合CD47,所述抗体的VL链靠近表达CD47的细胞的细胞膜,且所述抗体的VH链封闭CD47上的SIRP α 结合位点。

33. 如权利要求27所述的用途,其中,所述抗体或其免疫活性片段是选自IgG4P和IgG4PE的IgG同种型。

34. 如权利要求20-33中任一项所述的应用,所述对象是人。

35. 如权利要求20-33中任一项所述的应用,所述抗体或其免疫活性片段是嵌合或人源化的。

36. 如权利要求20-25和27-32中任一项所述的应用,所述抗体或其免疫活性片段是一种IgG同种型,所述IgG同种型选自下组: IgG1同种型、IgG2同种型、IgG3同种型和IgG4同种型。

37. 如权利要求20-33中任一项所述的应用,还包括进行化疗。

38. 如权利要求37所述的应用,所述化疗是放射疗法。

39. 如权利要求20-33中任一项所述的应用,所述抗体或其免疫活性片段包含选自SEQ ID NO:5-30的可变重(VH)链区序列。

40. 如权利要求20-33中任一项所述的应用,所述抗体或其免疫活性片段包含选自SEQ ID NO:31-47的可变轻(VL)链区序列。

41. 如权利要求20-33中任一项所述的应用,所述抗体或其免疫活性片段包含SEQ ID NO:5-30中任一序列提供的VH区序列和SEQ ID NO:31-47中任一序列提供的VL区。

42. 如权利要求20-33中任一项所述的应用,所述抗体或其免疫活性片段包含SEQ ID NO:5、7、8、11、12、15-17、20-22和27-30中任一序列提供的VH区序列和SEQ ID NO:31、32、35、40、41、42、43、44和47中任一序列提供的VL区序列。

43. 如权利要求20-33中任一项所述的应用,所述抗体或其免疫活性片段包含选自以下所列组合的VH链区与VL链区的组合:

SEQ ID NO:5所示的VH链区与SEQ ID NO:31所示的VL链区;

SEQ ID NO:5所示的VH链区与SEQ ID NO:32所示的VL链区；
SEQ ID NO:7所示的VH链区与SEQ ID NO:33所示的VL链区；
SEQ ID NO:7所示的VH链区与SEQ ID NO:34所示的VL链区；
SEQ ID NO:7所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区；
SEQ ID NO:7所示的VH链区与SEQ ID NO:36所示的VL链区；
SEQ ID NO:7所示的VH链区与SEQ ID NO:37所示的VL链区；
SEQ ID NO:7所示的VH链区与SEQ ID NO:38所示的VL链区；
SEQ ID NO:7所示的VH链区与SEQ ID NO:39所示的VL链区；
SEQ ID NO:7所示的VH链区与SEQ ID NO:43所示的VL链区；
SEQ ID NO:8所示的VH链区与SEQ ID NO:39所示的VL链区；
SEQ ID NO:11所示的VH链区与SEQ ID NO:42所示的VL链区；
SEQ ID NO:11所示的VH链区与SEQ ID NO:43所示的VL链区；
SEQ ID NO:11所示的VH链区与SEQ ID NO:44所示的VL链区；
SEQ ID NO:11所示的VH链区与SEQ ID NO:47所示的VL链区；
SEQ ID NO:15所示的VH链区与SEQ ID NO:43所示的VL链区；
SEQ ID NO:15所示的VH链区与SEQ ID NO:44所示的VL链区；
SEQ ID NO:16所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区；
SEQ ID NO:17所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区；
SEQ ID NO:20所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区；
SEQ ID NO:21所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区；
SEQ ID NO:22所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区；
SEQ ID NO:27所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区；
SEQ ID NO:28所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区；
SEQ ID NO:29所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区；和
SEQ ID NO:30所示的VH链区与SEQ ID NO:35所示的VL链区。

44. 如权利要求20-33中任一项所述的应用,所述抗体或其免疫活性片段包含SEQ ID NO:50中所列的VH CDR1序列,SEQ ID NO:51中所列的VH CDR2序列,SEQ ID NO:52中所列的VH CDR3序列,SEQ ID NO:53中所列的VL CDR1序列,SEQ ID NO:54中所列的VL CDR2序列,以及SEQ ID NO:55中所列的VL CDR3序列。

45. 如权利要求20-33中任一项所述的应用,所述抗体或其免疫活性片段包含SEQ ID NO:50中所列的VH CDR1序列,SEQ ID NO:72中所列的VH CDR2序列,SEQ ID NO:52中所列的VH CDR3序列,SEQ ID NO:53中所列的VL CDR1序列,SEQ ID NO:71中所列的VL CDR2序列,以及SEQ ID NO:55中所列的VL CDR3序列。

46. 如权利要求20-33中任一项所述的应用,所述抗体或其免疫活性片段促进巨噬细胞介导的对表达CD47的细胞的吞噬作用。

47. 一种多核苷酸,其编码权利要求1-7和18中任一项所述的抗体。

48. 一种宿主细胞,其包含编码权利要求1-7和18中任一项所述的抗体的核酸。

CD47抗体及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35 U.S.C. § 119 (e) 要求于2012年2月6日提交的美国临时申请第61/595,216号以及2012年6月14日提交的美国临时申请第61/659,752号的优先权,这些申请各通过引用全文纳入本文。

技术领域

[0003] 本发明一般涉及识别CD47的单克隆抗体、更具体地涉及不引起显著的人血红细胞血凝反应的CD47抗体、制备这些抗体的方法以及使用这些单克隆抗体作为治疗物质的方法。

[0004] 发明背景

[0005] CD47,也称作整联蛋白相关蛋白(IAP)、卵巢癌抗原OA3、Rh相关抗原和MER6,是一种属于免疫球蛋白超家族的多次跨膜受体。CD47的表达和/或活性涉及许多疾病和失调。因此,需要以CD47为目标的疗法。

发明内容

[0006] 本发明提供了识别并结合CD47(尤其是人CD47)的单克隆抗体。本发明的抗体能够调节(如阻断、抑制、减少、拮抗、中和或干扰)CD47的表达、活性和/或信号传递,且这些抗体不会导致人血红细胞(本文中也称作红细胞)出现显著的血凝反应。然而,本发明的抗体结合细胞表面的CD47且不产生细胞凝集现象的能力不限于血红细胞。本发明的抗体以不促进CD47阳性细胞凝集的方式特异性结合CD47。本发明的抗体及其衍生物能够调节(如阻断、抑制、减少、拮抗、中和或干扰)CD47与SIRP α (信号调节蛋白 α)之间的相互作用,且这些抗体不会导致人血红细胞出现显著的血凝反应。本发明所提供的抗体统称为“CD47抗体”。本发明的CD47抗体是现有的CD47抗体基础上的显著改进,现有的CD47抗体导致人血红细胞出现血凝反应(参见例如Kikuchi Y、Uno S、Yoshimura Y等,A bivalent single-chain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells.(抗CD47的二价单链Fv片段诱导白血病细胞发生凋亡),Biochem Biophys Res Commun 2004;315:912-8)。例如,本发明的CD47抗体是现有的CD47抗体B6H12、BRC126和CC2C6基础上的显著改进,上述每个抗体均阻断SIRP α ,但引起RBC的血凝反应,如下文详细描述。本发明的全IgG CD47抗体(例如2A1及其人源化衍生物,包括表1中所提供的抗体)不会以显著水平凝集细胞。例如,本发明的CD47抗体不会凝集血红细胞(RBC)。本文所描述的是全IgG形式的第一类CD47抗体,其阻断SIRP α 但不会导致显著的血凝反应。

[0007] 本发明的CD47抗体表现出多种需要的特性,如通过非限制性实施例的方式有效地阻断CD47与其配体SIRP α 的相互作用,同时不导致显著的红细胞血凝反应,以及有效的抗肿瘤活性。例如,与不存在本文所述CD47抗体时CD47与SIRP α 之间的相互作用水平相比,本发明的CD47抗体阻断了CD47与SIRP α 之间至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少95%或至少99%的相互作

用。

[0008] 本发明的CD47抗体不会导致显著的细胞凝集,例如本发明的CD47抗体不会导致显著的血红细胞血凝反应。在一些情况下,显著的细胞凝集指现有CD47抗体存在时的凝集水平。在一个方面,与现有CD47抗体存在时的凝集水平相比,本发明的CD47抗体存在时的凝集水平下降了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少99%。在一些实施方式中,如果与现有CD47抗体存在时的凝集水平相比,本发明的CD47抗体存在时的凝集水平下降了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少99%,则说明本发明的CD47抗体未导致显著的凝集水平。在其他实施方式中,如果与现有CD47抗体1B4(包括分别由SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:81提供的可变重链和可变轻链序列)存在时的凝集水平相比,本发明的CD47抗体存在时的凝集水平下降了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少99%,则说明本发明的CD47抗体未导致显著的凝集水平。优选地,在抗体浓度介于10pM和10μM之间(例如抗体浓度为50pM、100pM、1nM、10nM、50nM、100nM、1μM或5μM)时,本发明的CD47抗体不会导致显著的细胞凝集。

[0009] 与本领域已知的抗体相比,在肿瘤模型中本发明的抗体也显著有效。例如,与现有CD47抗体存在时巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力相比,本发明的CD47抗体存在时巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力升高了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少99%。

[0010] 本领域的技术人员会认识到人们可以不经过度实验对凝集水平进行定量,例如RBC的血凝反应。例如,本领域的技术人员会认识到可在本发明的CD47抗体存在的条件下进行血凝反应试验,其后测量RBC斑点的面积以确定血凝反应的水平,如下文实施例中所述。在一些情况下,对存在本发明的CD47抗体时的RBC斑点面积与不存在本发明的CD47抗体时(即零血凝反应条件下)的RBC斑点面积进行了比较。在这种方式下,相对于基线对照对血凝反应进行定量。RBC斑点的面积越大表明血凝反应的水平越高。或者,也可使用RBC斑点的密度分析对血凝反应进行定量。

[0011] 本文所述CD47抗体可用于治疗、延缓癌症或其他肿瘤病症的进展、避免其复发或缓解其症状。例如,本文所述CD47抗体可用于治疗血液恶性肿瘤和/或肿瘤,例如血液恶性肿瘤和/或肿瘤。例如,本文所述CD47抗体可用于治疗CD47+肿瘤。作为非限制性实施例,本文所述CD47抗体可用于治疗非霍奇金淋巴瘤(NHL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤(MM)、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、膀胱癌、黑素瘤、结直肠癌、胰腺癌、肺癌、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、胶质瘤、成胶质细胞瘤等。实体瘤包括例如乳腺癌、卵巢癌、肺癌、前列腺癌、黑素瘤、结直肠癌、肺癌、头颈癌、膀胱癌、食道癌、肝癌和肾癌。

[0012] 在本文中,“血液癌症”表示血液的癌症,包括白血病、淋巴瘤和骨髓瘤等。“白血病”表示一种血液癌症,其中制造了过多无法有效对抗感染的白细胞,从而排挤组成血液的其他部分,如血小板和红细胞。应理解可将白血病的病例分为急性或慢性。作为非限制性实施例,白血病的某些形式包括急性淋巴细胞性白血病(ALL);急性骨髓性白血病(AML);慢性淋巴细胞性白血病(CLL);慢性骨髓性白血病(CML);骨髓性增生疾病/肿瘤(MPDS);和脊

髓发育不良综合征。“淋巴瘤”可表示霍奇金淋巴瘤,无痛性和侵袭性非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤(小细胞和大细胞)等。骨髓瘤可表示多发性骨髓瘤(MM)、巨细胞骨髓瘤、重链骨髓瘤和轻链或本斯-琼斯骨髓瘤。

[0013] 本发明的示例性单克隆抗体包括例如本文所述抗体。示例性抗体包括具有选自SEQ ID NO:5-30的可变重链和选自SEQ ID NO:31-47的可变轻链的抗体。所述抗体还包括具有与SEQ ID NO:5-30中的至少一个序列有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的可变重链和与SEQ ID NO:31-47中的至少一个序列有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的可变轻链的抗体。优选地,所述抗体识别并结合人CD47且不导致显著的人血红细胞血凝反应。本文中,这些抗体分别被称作CD47抗体。CD47抗体包括全人单克隆抗体,以及人源化单克隆抗体和嵌合抗体。这些抗体显示出对人CD47的特异性,且其能够调节(如阻断、抑制、减少、拮抗、中和或干扰)CD47的表达、活性和/或信号传递,同时不会导致血红细胞出现显著的血凝反应。

[0014] 本发明提供的CD47抗体表现出抑制活性,例如抑制CD47的表达(如抑制细胞表面CD47的表达)、活性和/或信号传递,或干扰CD47和SIRP α 之间的相互作用。本发明提供的CD47抗体在结合CD47(如人CD47)或与其相互作用后完全或部分地降低或调节CD47的表达或活性。在抗体与人CD47多肽和/或肽之间相互作用后,CD47生物学功能的降低或调节是完全、显著或部分的。当与不存在同本文所述的抗体相互作用(如结合)时CD47的表达或活性水平相比,存在抗体时CD47的表达或活性水平降低了至少95%(例如降低了96%、97%、98%、99%或100%)时,所述抗体被认为能够完全抑制CD47的表达或活性。与不存在同本文所述的CD47抗体结合时CD47的表达或活性水平相比,存在CD47抗体时CD47的表达或活性水平降低了至少50%(例如降低了55%、60%、75%、80%、85%或90%),此时所述CD47抗体被认为能够显著抑制CD47的表达或活性。与不存在同本文所述的抗体相互作用(如结合)时CD47的表达或活性水平相比,存在抗体时CD47的表达或活性水平降低了少于95%(例如降低了10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、85%或90%),此时所述抗体被认为能够部分抑制CD47的表达或活性。

[0015] 本发明的抗体还包括特异性结合CD47的单克隆抗体,所述抗体不导致显著的凝集水平,例如血红细胞血凝反应(“RBC血凝反应”)。本发明的抗体以不促进CD47阳性细胞凝集的方式特异性结合CD47,但本发明的抗体在细胞表面结合CD47且不引起细胞凝集现象的能力不限于血红细胞。

[0016] 本发明的药物组合物可包括本发明的抗体和运载体。这些药物组合物可包括于试剂盒中,如诊断试剂盒。

[0017] 本发明提供了结合CD47或其免疫活性片段的单克隆抗体,所述抗体在给药后不导致显著的细胞凝集,例如所述抗体在给药后不导致显著的血红细胞血凝反应。在一些实施方式中,所述抗体是嵌合、人源化或全人的。在一些实施方式中,所述抗体结合人CD47。在一些实施方式中,所述抗体或其免疫活性片段阻止CD47与SIRP α 相互作用。与不存在同所述抗体相互作用(如与所述抗体结合)时CD47/SIRP α 的相互作用水平相比,存在抗体时CD47/SIRP α 的相互作用水平降低了至少95%(例如降低了96%、97%、98%、99%或100%),此时所述抗体被认为能够完全抑制CD47与SIRP α 之间的相互作用。与不存在同本文所述抗体相互作用(如与所述抗体结合)时CD47/SIRP α 的相互作用水平相比,存在抗体时CD47/SIRP α 的

相互作用水平降低了少于95% (例如降低了10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、85%或90%),此时所述抗体被认为能够部分抑制CD47/SIRP α 的相互作用。

[0018] 足够治疗或预防对象中癌症的抗体量为例如足够降低CD47信号的量(参见例如Yamauchi等,2013 Blood,Jan 4.[电子出版先于印刷出版];Soto-Pantoja等,2013 Expert Opin Ther Targets,17:89-103;Irandoost等,2013PLoS One,Epub Jan 8;Chao等,2012 Curr Opin Immunol,24:225-32;Theocharides等,2012 J Exp Med,209(10):1883-99;Csányi等,2012 Arterioscler Thromb Vasc Biol,32:2966-73;Maxhimer等,2009 Sci Transl Med,1:3ra7;Sarfati等,2008 Curr Drug Targets,9:842-850;Miyashita等,2004 Mol Biol Cell,15:3950-3963;E.J.Brown和W.A.Frazier,2001 Trends Cell Biol,11:130-135;Oldenborg等,2001 J Exp Med,193:855-862;Blazar等,2001 J Exp Med,194:541-549;Oldenborg等,2000 Science,288:2051-2054;以及Gao等,1996 J Biol Chem,271:21-24)。例如,足够治疗或预防对象中癌症的抗体量为足够降低巨噬细胞中由CD47/SIRP α 信号轴上的CD47/SIRP α 相互作用生成的吞噬细胞抑制信号的抗体量,即本发明的抗体促进了巨噬细胞介导的对表达CD47的细胞的吞噬作用。本文所用术语“下降”表示存在本发明的抗体时减少的CD47信号传递。CD47介导的信号传递下降指本发明的CD47抗体存在时CD47信号传递水平低于CD47的对照水平(即不存在抗体时的CD47信号传递水平),降低的幅度大于或等于5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、95%、99%或100%。可使用多种标准技术测量CD47信号传递水平,如作为非限制性实施例,测量下游基因激活和/或响应CD47激活的荧光素酶报告试验。本领域技术人员应理解可使用多种试验测量CD47信号传递水平,包括例如市售可得的试剂盒。

[0019] 在一些实施方式中,所述抗体或其免疫活性片段是IgG同种型。在一些实施方式中,所述抗体的恒定区是人IgG1同种型,具有如下氨基酸序列:

[0020] ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

[0021] HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP

[0022] KSCDKTHTCP PCPAPE[LL]GG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS

[0023] HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQY[N] STYRVVSVLT VLNQDWLNKG

[0024] EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC

[0025] LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW

[0026] QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:1)

[0027] 在一些实施方式中,对人IgG1恒定区上的氨基酸Asn297(加框,Kabat编号)进行修饰以避免抗体的糖基化,例如Asn297Ala(N297A)。在一些实施方式中,对抗体恒定区上的氨基酸Leu235(Kabat编号)进行修饰以改变Fc受体相互作用,例如Leu235Glu(L235E)或Leu235Ala(L235A)。在一些实施方式中,对抗体恒定区上的氨基酸Leu234(Kabat编号)进行修饰以改变Fc受体相互作用,例如Leu234Ala(L234A)。在一些实施方式中,对抗体恒定区上的氨基酸234和235同时进行修饰,例如Leu234Ala和Leu235Ala(L234A/L235A)(Kabat等,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest(《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》)中的EU索引)。

[0028] 在一些实施方式中,所述抗体的恒定区是人IgG2同种型,具有如下氨基酸序列:

[0029] ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

[0030] HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVR
[0031] KCCVECPPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
[0032] EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQF \square STFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC
[0033] KVSNGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG
[0034] FYPSDISVEW ESNGQPENNY KTTTPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
[0035] VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL LSLPGK (SEQ ID NO:2)

[0036] 在一些实施方式中,对人IgG2恒定区上的氨基酸Asn297 (加框,Kabat编号) 进行修饰以避免抗体的糖基化,例如Asn297Ala (N297A)。

[0037] 在一些实施方式中,所述抗体的恒定区是人IgG3同种型,具有如下氨基酸序列:

[0038] ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
[0039] HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRVEL
[0040] KTPLGDTTHT CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCPEPKSC
[0041] DTPPPCPRCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
[0042] PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK PREEQY \square STF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
[0043] CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK
[0044] GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
[0045] NIFSCSVMHE ALHN \square FTQKS LSLPGK (SEQ ID NO:3)

[0046] 在一些实施方式中,对人IgG3恒定区上的氨基酸Asn297 (加框,Kabat编号) 进行修饰以避免抗体的糖基化,例如Asn297Ala (N297A)。在一些实施方式中,对人IgG3恒定区上的氨基酸435进行修饰以延长半衰期,例如Arg435His (R435H) (Kabat等,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest (《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》) 中的EU索引)。

[0047] 在一些实施方式中,所述抗体的恒定区是人IgG4同种型,具有如下氨基酸序列:

[0048] ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
[0049] HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
[0050] KYGPPCP \square CP APEF \square GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
[0051] PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQF \square STY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
[0052] CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
[0053] GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
[0054] NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO:4)

[0055] 在一些实施方式中,对人IgG4恒定区内的铰链区进行修饰以避免或减少链交换,例如Ser228Pro (S228P)。在其他实施方式中,对人IgG4恒定区上的氨基酸235进行修饰以改变Fc受体相互作用,例如Leu235Glu (L235E)。在一些实施方式中,对人IgG4恒定区内的铰链区和氨基酸235进行修饰,例如Ser228Pro和Leu235Glu (S228P/L235E)。在一些实施方式中,对人IgG4恒定区上的氨基酸Asn297 (加框,Kabat编号) 进行修饰以避免抗体的糖基化,例如Asn297Ala (N297A)。(Kabat等,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest (《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》) 中的EU索引)。

[0056] 在一些实施方式中,对人IgG恒定区进行修饰以增强FcRn结合。增强对FcRn结合的Fc突变的示例是Met252Tyr、Ser254Thr、Thr256Glu (分别为M252Y、S254T、T256E) (Kabat编

号,Dall'Acqua等,2006,J.Biol Chem Vol 281(33)23514-23524)或Met428Leu和Asn434Ser(M428L、N434S)(Zalevsky等,2010 Nature Biotech,Vol 28(2)157-159)。(Kabat等,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest(《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》)中的EU索引)。在一些实施方式中,对人IgG恒定区进行修饰以改变抗体依赖的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖的细胞毒性(CDC),例如以下文献中所描述的氨基酸修饰:Natsume等,2008 Cancer Res,68(10):3863-72;Idusogie等,2001 J Immunol,166(4):2571-5;等,2010 mAbs,2(2):181-189;Lazar等,2006 PNAS,103(11):4005-4010;Shields等,2001 JBC,276(9):6591-6604;Stavenhagen等,2007 Cancer Res,67(18):8882-8890;Stavenhagen等,2008 Advan.Enzyme Regul.,48:152-164;Alegre等,1992 J Immunol,148:3461-3468;Kaneko和Niwa,2011 Biodrugs,25(1):1-11中综述。

[0057] 在一些实施方式中,对人IgG恒定区进行修饰以诱导异源二聚化。例如,对于CH3结构域中Thr366上的氨基酸修饰,当其被体积较大的氨基酸(如Try(T366W))代替时能够优先与第二个CH3结构域配对,所述第二个CH3结构域的Thr366、Leu368和Tyr407位置被体积较小的氨基酸(如分别为Ser、Ala和Val(T366S/L368A/Y407V))代替。通过引入二硫键可进一步稳定通过CH3修饰的异源二聚化,例如将相对的CH3结构域上的Ser354变为Cys(S354C)以及将Y349变为Cys(Y349C)(综述于Carter,2001 Journal of Immunological Methods,248:7-15)。

[0058] 本发明还提供了包括一种或多种结合CD47或其免疫活性片段的单克隆抗体的药物组合物,所述抗体在给药后不会导致显著的血红细胞血凝反应。

[0059] 血凝反应是同型相互作用的一个示例,其中使用二价CD47结合实体处理后引起表达CD47的细胞聚合或凝集。本发明的抗体结合细胞表面的CD47且不产生细胞凝集现象的能力不限于红血球细胞。我们观察到,本发明的抗体以不促进CD47阳性细胞系(如道迪细胞)凝集的方式特异性结合CD47。

[0060] 在一些情况下,所述抗体包括选自由SEQ ID NO:5-30组成的组的可变重链区(VH)。任选地,所述抗体包括选自由SEQ ID NO:31-47组成的组的可变轻链区(VL)。在一些情况下,所述抗体包括选自由SEQ ID NO:5-30组成的组的可变重链区(VH)和选自由SEQ ID NO:31-47组成的组的可变轻链区(VL)。本发明的抗体还包括与SEQ ID NO:5-30中的至少一个序列有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的可变重链和与SEQ ID NO:31-47中的至少一个序列有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的可变轻链的抗体。在其他方面,所述抗体包括SEQ ID NO:5、7、8、11、15-17、20-22和27-30中任意一个所提供的VH区和与之配对的SEQ ID NO:31-39、42、43、44和47中任意一个所提供的VL区。在另一个实施方式中,所述抗体包括SEQ ID NO:5、7、8、11、12、15-17、20-22和27-30中任意一个所提供的VH区和与之配对的SEQ ID NO:31、32、35、40、41、42、43、44和47任意一个所提供的VL区。而在另一方面,所述抗体包括选自表1所列组合的VH链区与VL链区的组合。

[0061] 在一些实施方式中,所述CD47抗体或其免疫活性片段包括序列为SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66的VH互补决定区1(CDR1)、序列为SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75或SEQ

ID NO:76的VH CDR2、序列为SEQ ID NO:52或SEQ ID NO:77的VH CDR3、序列为SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:68的VL CDR1、序列为SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70或SEQ ID NO:71的VL CDR2以及序列为SEQ ID NO:55的VL CDR3。例如,所述抗体或其免疫活性片段包括序列为SEQ ID NO:50的VH CDR1、序列为SEQ ID NO:51的VH CDR2、序列为SEQ ID NO:52的VH CDR3、序列为SEQ ID NO:53的VL CDR1、序列为SEQ ID NO:54的VL CDR2和序列为SEQ ID NO:55的VL CDR3。在另一个实施例中,所述抗体或其免疫活性片段包括序列为SEQ ID NO:50的VH CDR1、序列为SEQ ID NO:72的VH CDR2、序列为SEQ ID NO:52的VH CDR3、序列为SEQ ID NO:53的VL CDR1、序列为SEQ ID NO:71的VL CDR2和序列为SEQ ID NO:55的VL CDR3。

[0062] 在一个实施方式中,本发明的抗体以头靠侧(head to side)的方向结合CD47,所述方向使得重链靠近表达CD47的细胞的细胞膜,同时轻链阻碍了CD47上的SIRP α 结合位点。在另一个实施方式中,本发明的抗体以头靠侧(head to side)的方向结合CD47,所述方向使得轻链靠近表达CD47的细胞的细胞膜,同时重链阻碍了CD47上的SIRP α 结合位点。

[0063] 所述CD47抗体可与包括CD47的氨基酸残基1-116中任意一个氨基酸的表位结合,编码依据SEQ ID NO:147(即不包括信号序列(氨基酸1-18)的SEQ ID NO:48)。例如,本发明的抗体可结合包括CD47的氨基酸残基Q31、N32、T33、T34、E35、V36、Y37、V38、K39、W40、K41、F42、K43、G44、R45、D46、I47、Y48、T49、F50、D51、G52、A53、L54、N55、K56、S57、T58、V59、P60、T61、D62、F63、S64、S65、A66、K67、I68、E69、V70、S71、Q72、L73、L74、K75、G76、D77、A78、S79、L80、K81、M82、D83、K84、S85、D86、A87、V88、S89、H90、T91、G92、N93、Y94、T95、C96、E97、V98、T99、E100、L101、T102、R103、E104、G105、E106、T107、I108、I109和E110中一个或多个氨基酸残基的表位,编码依据SEQ ID NO:147。

[0064] 在一些情况下,本发明的抗体可结合包括CD47的氨基酸残基Y37、V38、K39、W40、K41、F42、K43、G44、R45、D46、I47、Y48、T49、F50和D51中一个或多个的不连续表位,编码依据SEQ ID NO:147。例如,本发明的抗体可结合包括CD47的氨基酸残基Y37、K39、K41、K43、G44、R45、D46、D51、H90、N93、E97、T99、E104或E106的不连续表位,编码依据SEQ ID NO:147。例如,本发明的抗体可结合至少包括CD47的氨基酸残基KGRD(SEQ ID NO:56)环(残基43-46)的不连续表位,编码依据SEQ ID NO:147。例如,本发明的抗体可结合至少包括CD47的氨基酸残基Y37、K39、K41、KGRD(SEQ ID NO:56)环(残基43-46)、D51、H90、N93、E97、T99、E104和E106的不连续表位,编码依据SEQ ID NO:147。例如,本发明的抗体可结合包括CD47的氨基酸残基Y37、K39、K41、KGRD(SEQ ID NO:56)环(残基43-46)、D51、H90、N93、E97、T99、E104和E106的不连续表位,编码依据SEQ ID NO:147。

[0065] 本文所述CD47抗体的VH区主要涉及结合CD47的KGRD(SEQ ID NO:56)环。因此,本发明的抗体所结合的特异表位位于CD47的侧面。与本领域已知的现有CD47抗体相反,细胞膜近端位置上的本文所述CD47抗体的VH结构域的方向是这些抗体能够通过限制抗体使其无法桥连至相邻细胞上的CD47分子从而防止细胞凝集(如血红细胞血凝反应)的关键特征。此外,由于本文所述CD47抗体的VK结构域与涉及SIRP α 结合的顶部残基(如Y37、T102和E104)相互作用,所以主要是VK结构域在物理上阻止了SIRP α 与CD47的结合。

[0066] 本发明还提供了分离的抗体或其免疫活性片段,其与本文所述CD47抗体竞争以阻止CD47与SIRP α 的相互作用。

[0067] 本发明提供了包括CD47的氨基酸残基Y37、K39、K41、K43、G44、R45、D46、D51、H90、N93、E97、T99、E104和E106的多肽,编码依据SEQ ID NO:147。还提供了包括CD47的氨基酸残基1-116中任意一个氨基酸的多肽,编码依据SEQ ID NO:147。例如,所述多肽可包括CD47的氨基酸残基Q31、N32、T33、T34、E35、V36、Y37、V38、K39、W40、K41、F42、K43、G44、R45、D46、I47、Y48、T49、F50、D51、G52、A53、L54、N55、K56、S57、T58、V59、P60、T61、D62、F63、S64、S65、A66、K67、I68、E69、V70、S71、Q72、L73、L74、K75、G76、D77、A78、S79、L80、K81、M82、D83、K84、S85、D86、A87、V88、S89、H90、T91、G92、N93、Y94、T95、C96、E97、V98、T99、E100、L101、T102、R103、E104、G105、E106、T107、I108、I109和E110中一个或多个,编码依据SEQ ID NO:147。本发明还提供了使用该多肽作为抗原(例如结合CD47抗体的抗原)的方法。

[0068] 本发明还提供了通过给予对象其所需的一种或多种结合CD47或其免疫活性片段的单克隆抗体从而缓解癌症或其他肿瘤病症症状的方法,所述抗体在给药后不会导致显著的血红细胞血凝反应。所述抗体的给药剂量应足够缓解对象中癌症或其他肿瘤病症症状。在一些实施方式中,所述对象是人。在一些实施方式中,所述抗体是嵌合、人源化或全人的。在一些实施方式中,所述抗体结合人CD47。在一些实施方式中,所述抗体或其免疫活性片段阻止CD47与SIRP α 相互作用。在一些实施方式中,所述抗体或其免疫活性片段是一种IgG同种型,所述IgG同种型选自由IgG1同种型、IgG2同种型、IgG3同种型和IgG4同种型组成的组。在一些实施方式中,所述抗体或其免疫活性片段是选自IgG4P和IgG4PE的IgG同种型。

[0069] 在一些实施方式中,本文所述CD47抗体与一种或多种其他试剂或其他试剂组合联用。合适的其他试剂包括现有的用于特定应用(如癌症)的药物和/或手术疗法。例如,所述CD47抗体与一种或多种其他化疗或抗肿瘤试剂联用。或者,其他化疗剂是放射疗法。在一些实施方式中,所述化疗剂是细胞死亡诱导剂。在一些实施方式中,所述化疗剂诱导跨质膜的磷脂不对称缺失,例如引起磷脂酰丝氨酸(PS)的细胞表面暴露。在一些实施方式中,所述化疗剂诱导内质网(ER)压力。在一些实施方式中,所述化疗剂是蛋白酶体抑制剂。在一些实施方式中,所述化疗剂诱导ER蛋白移位至细胞表面。在一些实施方式中,所述化疗剂诱导钙网蛋白的移位和细胞表面暴露。

[0070] 在一些实施方式中,所述CD47抗体和其他试剂被制备为单个治疗组合物,并同时给予所述CD47抗体和其他试剂。或者,所述CD47抗体和其他试剂彼此独立,例如分别制备为独立的治疗组合物,并同时给予所述CD47抗体和其他试剂,或在治疗方案期间在不同时间给予所述CD47抗体和其他试剂。例如,在给予其他试剂前给予所述CD47抗体,在给予其他试剂后给予所述CD47抗体,或在以交替的方式给予所述CD47抗体和其他试剂。本文中,以单个剂量或多个剂量给予所述CD47抗体和其他试剂。

[0071] 本领域技术人员应理解本发明的抗体有多种用途。例如,本发明的抗体可用作治疗剂、用作诊断试剂盒中的试剂或用作诊断工具、或用作竞争试验中的试剂以生成治疗剂。

[0072] 附图简要说明

[0073] 图1A描绘了由流式细胞术评估的杂交瘤上清中抗体与道迪细胞上CD47的结合。图1B显示了由ELISA确定的杂交瘤上清中一些C47抗体阻断重组人SIRP α 与重组人CD47结合的能力。

[0074] 图2为组图,描述了由流式细胞术分析的纯化的鼠CD47抗体与(A)拉吉细胞(一种来源于伯基特淋巴瘤的培养后淋巴母细胞系),以及(B) CCRF-CEM细胞、CD47阳性人T细胞淋

巴母细胞样细胞系的结合。该实验比较了本发明的鼠抗体与市售可得的CD47抗体B6H12和2D3的结合。

[0075] 图3为组图,描述了CD47抗体阻断SIRP α 结合的能力,分别使用(A) ELISA以及重组人蛋白,或(B)通过流式细胞术,使用CCRF-CEM细胞和重组人SIRP α 蛋白。

[0076] 图4为一系列照片、图片和一个表格,显示了CD47抗体导致的RBC血凝反应。外观模糊的样品孔表明出现了RBC血凝反应,而非凝集的RBC看上去是一个点。图4A表明在所测试的所有浓度下2A1抗体均未显示血凝反应。图中描绘了血凝反应指标。图4B表明在许多CD47抗体中2A1是稀有的,因为其无法凝集RBC。还表明2A1的人嵌合形式(2A1-xi)缺少凝集活性。图4C表明不阻断SIRP α 的CD47单克隆抗体2D3不会导致血凝反应。图4D显示了血凝反应试验中高浓度范围的CD47抗体并展示了前区效应(pro-zone effect)。图中描绘了血凝反应指标。图4E显示了CD47抗体1B4导致血凝反应的更窄的浓度范围,而2A1结合后该效果就消失了。图4F显示2A1、嵌合2A1(2A1-xi)和人源化变体不会导致血凝反应。多数实验中使用9E4抗体和商品化的B6H12抗体作为血凝反应的阳性对照。这些试验中使用的其他市售可得的抗体是SIRP α 阻断抗体BRC126和CC2C6以及非SIRP α 阻断抗体2D3。

[0077] 图5显示了由流式细胞术评估的2A1和B6H12与猕猴(cyno)猴B细胞和拉吉细胞的结合。2A1与人和猕猴CD47结合的亲和性相同,B6H12也是如此,但与人和猕猴CD47的亲和性低于2A1。

[0078] 图6描绘了由流式细胞术评估的2A1、2A1-xi和B6H12与拉吉细胞的结合。重要的是,从该图中可以看到,2A1的嵌合形式中正确地阐明了重链(VH)和轻链(VL)的可变区序列。

[0079] 图7A-7J为组图,显示了2A1的人源化变体与拉吉细胞的结合。大多数图中使用2A1-xi作为内部对照。如实施例8中所描述的,测试了多种重链和轻链组合。

[0080] 图8A为使用带有superdex200柱的AKTA FLPC获得的来自于排阻色谱的痕迹的图片。显示了AB6.12抗体的IgG1、IgG4P和IgG4PE变体。所有三种变体均为超过97%的单体。图8B是还原(R)和非还原(NR)条件下2A1的多种人源化变体的考马斯蓝染色的SDS-PAGE胶的照片。

[0081] 图9为组图,描绘了CD47抗体促进人单核细胞来源的巨噬细胞(MDM)吞噬人肿瘤细胞系的能力。图9A显示了吞噬指数,其中所用抗体为市售抗体B6H12、鼠2A1抗体、人源化变体AB2.05抗体和非阻断市售抗体2D3。图9B显示了吞噬指数,其中所用抗体为市售抗体B6H12、人源化抗体AB2.05(人IgG1)和人源化抗体AB6.12的IgG1、IgG4P和IgG4PE变体。这些实验中使用CCRF-CEM细胞作为CD47靶细胞系。

[0082] 图10为组图,显示了拉吉肿瘤模型中CD47抗体的抗肿瘤效果。图10A显示了鼠抗体9E4、1B4、2A1和市售抗体B6H12的效果。图10B显示了人源化抗体AB6.12的IgG1、IgG4P和IgG4PE同种型连同鼠2A1抗体的效果。在两个模型中,均使用200 μ g抗体剂量处理小鼠,一周三次。

[0083] 图11为CD47-IgV与SIRP α -IgV结构域(A)(蛋白质数据库编号2JJS)、B6H12(B)、和2A1(C)的共结晶复合物。2A1和B6H12以非常不同的方向结合并结合CD47上的不同表位,两者均与SIRP α 结合位点重叠。2A1抗体以头靠侧(head to side)的方向结合在CD47蛋白上。

[0084] 发明详述

[0085] 本发明提供了特异性结合CD47 (包括人CD47) 的单克隆抗体。本文中, 这些抗体被统称作CD47抗体。

[0086] CD47是一种属于免疫球蛋白超家族的多次跨膜受体, 与巨噬细胞上的SIRP α (信号调节蛋白 α) 相互作用以限制吞噬作用。进入该通路的癌细胞逃避了吞噬作用。如下文所详细叙述的那样, 这是一种新的肿瘤免疫逃避机制, 且治疗性地靶向CD47在多种癌症中有广泛的应用。

[0087] 在多种不同的恶性肿瘤中CD47的表达与较差临床结果相关, 包括非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、急性淋巴细胞性白血病 (ALL)、急性骨髓性白血病 (AML)、卵巢癌、胶质瘤、胶质细胞瘤等。此外, 在白血病和实体肿瘤中已将CD47鉴定为一种癌症干细胞标记 (Jaiswal等, 2009 Cell, 138 (2) : 271-85; Chan等, 2009 Proc Natl Acad Sci USA, 106 (33) : 14016-21; Chan等, 2010 Curr Opin Urol, 20 (5) : 393-7; Majeti R等, 2011 Oncogene, 30 (9) : 1009-19)。

[0088] CD47阻断抗体在多种体内肿瘤模型中表现出抗肿瘤活性。此外, 已表明在肿瘤模型中这些抗体与其他治疗抗体 (包括Rituxan®和Herceptin®) 协同作用。阻断CD47与SIRP α 的相互作用能够促进巨噬细胞吞噬表达CD47的细胞 (综述于Chao等, 2012 Curr Opin Immunol, 24 (2) : 225-32)。CD47缺失的小鼠显著地耐受放射治疗, 暗示靶向CD47与放疗之间联系 (Isenberg等, 2008 Am J Pathol, 173 (4) : 1100-1112; Maxhimer等, 2009 Sci Transl Med, 1 (3) : 3ra7)。此外, 这些小鼠中的同源肿瘤模型显示出低于野生型小鼠的骨转移 (Uluçkan等, 2009 Cancer Res, 69 (7) : 3196-204)。

[0089] 重要的是, 多数CD47抗体被报道引起人红细胞的血凝反应。血凝反应是同型相互作用的一个示例, 其中使用二价CD47结合实体处理后引起两个表达CD47的细胞聚合或凝集。例如, 作为一种全IgG或F(ab')₂, CD47抗体MABL被报道能够引起红细胞的血凝反应, 且仅当MABL变为scFv或二价scFv时该作用减弱。(参见例如Uno S、Kinoshita Y、Azuma Y等, Antitumor activity of a monoclonal antibody against CD47 in xenograft models of human leukemia (人白血病的异种移植模型中抗CD47单克隆抗体的抗肿瘤活性), Oncol Rep 2007; 17: 1189-94; Kikuchi Y、Uno S、Yoshimura Y等, A bivalent single-chain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells (抗CD47的二价单链Fv片段诱导白血病细胞的凋亡), Biochem Biophys Res Commun 2004; 315: 912-8)。其他已知的CD47抗体 (包括B6H12、BRC126和CC2C6) 也会引起RBC的血凝反应, 如下文所详细描述。因此, 细胞的凝集是使用现有的全IgG抗体治疗性地靶向CD47的主要限制。

[0090] 此外, CD47抗体的一个重要特征是阻断CD47与SIRP α 相互作用以促进巨噬细胞吞噬表达CD47的细胞的能力。许多现有的CD47抗体阻断SIRP α ; 然而在本发明之前, 现有的阻断SIRP α 抗体会导致如上文所述不需要的血凝反应副作用。其他现有的抗体 (如2D3) 不会引起血凝反应; 但这些抗体也不阻断SIRP α , 使得其无法有效地促进吞噬作用。因此, 在本发明之前, 人们迫切需要鉴定到能够阻断SIRP α 同时不导致细胞凝集的CD47抗体。

[0091] 本发明的CD47抗体避免了不需要的血凝反应, 从而增加治疗性地靶向CD47的效果, 并维持阻断CD47与SIRP α 相互作用的能力, 从而促进对表达CD47的细胞的吞噬作用。具体而言, 本发明的全IgG CD47抗体 (例如2A1及其人源化衍生物, 包括表1中所提供的抗体) 不会以显著水平凝集细胞。例如, 本发明的CD47抗体不会以显著水平凝集RBC。本文所描述的是

全IgG形式中的第一个CD47抗体,其阻断SIRP α 但不会引起显著的血凝反应。总之,在现有的CD47抗体中,本发明的抗体(如2A1抗体及其人源化衍生物)是独特的,其具有阻断SIRP α 但不导致显著的血凝反应的能力。

[0092] 本发明的CD47抗体表现出多种需要的特性,如通过非限制性实施例的方式有效地阻断CD47与其配体SIRP α 的相互作用,同时不导致或调节显著的红细胞凝集反应水平,以及有效的抗肿瘤活性。例如,与不存在本文所述CD47抗体时CD47与SIRP α 之间的相互作用水平相比,本发明的CD47抗体阻断了CD47与SIRP α 之间至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少95%或至少99%的相互作用。本发明的CD47抗体不会导致显著水平的细胞凝集,例如本发明的CD47抗体不会导致显著水平的红血球细胞凝集。例如,与现有CD47抗体存在时的凝集水平相比,本发明的CD47抗体存在时的凝集水平下降了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少99%。在一些实施方式中,如果与现有CD47抗体1B4(包括分别由SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:81提供的可变重链和可变轻链序列)存在时的凝集水平相比,本发明的CD47抗体存在时的凝集水平下降了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少99%,则说明本发明的CD47抗体未导致显著的凝集水平。与本领域已知的抗体相比,在肿瘤模型中本发明的抗体也显著有效。例如,与现有CD47抗体存在时巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力相比,本发明的CD47抗体存在时巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力升高了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少99%。

[0093] 本领域的技术人员会认识到人们可以不经过度实验对凝集水平进行定量,例如RBC的血凝反应。例如,本领域的技术人员会认识到可在本发明的CD47抗体存在的条件下进行血凝反应试验,其后测量RBC斑点的面积以确定血凝反应的水平,如下文实施例中所述。在一些情况下,对存在本发明的CD47抗体时的RBC斑点面积与不存在本发明的CD47抗体时(即零血凝反应条件下)的RBC斑点面积进行了比较。在这种方式下,相对于基线对照对血凝反应进行定量。RBC斑点的面积越大表明血凝反应的水平越高。或者,也可使用RBC斑点的密度分析对血凝反应进行定量。

[0094] 本发明的CD47抗体结合人CD47并阻断其与SIRP α 的相互作用(图1B、3和7J)。这些抗体不引起显著的人红细胞血凝反应(图4)。这些抗体能够促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞(图9)。此外,这些CD47抗体在人白血病的小鼠模型中显示出有效的抗肿瘤活性(图10)。因此,本发明的CD47抗体克服了用于治疗性靶向CD47的一个主要限制因素。因此,本发明的CD47抗体在治疗大量癌症方面至关重要。

[0095] 本发明的抗体特异性结合人CD47,阻断、抑制、破坏或调节人CD47与人SIRP α 的相互作用,同时不导致显著的红细胞血凝反应或对其进行调节。

[0096] 本发明的抗体与CD47表位结合的平衡结合常数(K_d) $\leq 1\mu\text{M}$,例如 $\leq 100\text{nM}$,优选 $\leq 10\text{nM}$,更优选 $\leq 1\text{nM}$ 。例如,本文所提供的CD47抗体表现出范围大致介于 $\leq 1\text{nM}$ 至约 1pM 之间的 K_d 值。

[0097] 本发明的CD47抗体用于调节、阻断、抑制、减少、拮抗、中和或干扰广泛分布的CD47的功能活性。CD47的功能活性包括例如通过与SIRP α 的相互作用传导信号、在细胞粘附至细

胞外基质后调节(如增加)细胞内钙离子浓度、与血小板反应蛋白的C端细胞结合结构域相互作用、与血纤蛋白原相互作用以及与多种整联蛋白相互作用。例如,CD47抗体通过部分或完全地调节、阻断、抑制、减少、拮抗、中和或干扰CD47与SIRP α 的结合从而完全或部分地抑制CD47的功能活性。

[0098] 相比于不与本文所述的CD47抗体结合时CD47的功能活性,存在CD47抗体时CD47的功能活性降低了至少95%(例如降低了96%、97%、98%、99%或100%),此时所述CD47抗体被认为能够完全地调节、阻断、抑制、减少、拮抗、中和或干扰CD47的功能活性。相比于不与本文所述的CD47抗体结合时CD47的活性,存在CD47抗体时CD47的活性降低了至少50%(例如降低了55%、60%、75%、80%、85%或90%),此时所述CD47抗体被认为能够显著地阻断、抑制、减少、拮抗、中和或干扰CD47的功能活性。相比于不与本文所述的CD47抗体结合时CD47的活性,存在CD47抗体时CD47的活性降低了小于95%(例如降低了10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、85%或90%)时,此时所述CD47抗体被认为能够部分地调节、阻断、抑制、减少、拮抗、中和或干扰CD47的功能活性。

[0099] 定义

[0100] 除非另有定义,本发明中使用的科学和技术术语的含义是本领域技术人员所通常理解的含义。此外,除非本文另外提供,单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。通常,本文所述的细胞和组织培养、分子生物学以及蛋白质和寡或多核苷酸化学及杂交中使用的命名和技术是本领域公知且普遍使用的。对于重组DNA、寡核苷酸合成和组织培养与转化(如电穿孔、脂质转染),使用了标准技术。酶促反应和纯化技术根据生产商的说明书或本领域普遍使用或本文所述的方法进行。前述技术和方法通常根据本领域公知且本说明书中引用和讨论的多部综合和较具体的文献中描述的那样使用。参见例如Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》)(第2版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约冷泉港(1989))。本文所述的分析化学、合成有机化学以及医学和药理学化学中使用的命名以及实验室方法和技术是本领域公知且普遍使用的。对于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及治疗患者,使用了标准技术。

[0101] 如本公开中所用,除非另有说明,以下术语应理解为具有以下含义:本文所用术语CD47、整联蛋白相关蛋白(IAP)、卵巢癌抗原OA3、Rh相关抗原和MER6是同义词并可互换使用。

[0102] 术语血红细胞和红细胞是同义词并可互换使用。

[0103] 术语凝集表示细胞结块,而术语血凝反应表示特定的一类细胞(即血红细胞)结块。因此,血凝反应是凝集的一种类型。

[0104] 本文所用术语“抗体”指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白(Ig)分子的免疫活性部分,即包含特异性结合抗原(与其免疫反应)的抗原结合位点的分子。“特异性结合”或“与……免疫反应”或“针对”表示抗体与所需抗原的一种或多种抗原决定簇反应而不与其他多肽反应或以很低的亲和性($K_d > 10^{-6}$)结合其他多肽。抗体包括但不限于多克隆、单克隆、嵌合、dAb(结构域抗体)、单链、Fab、Fab'和F(ab')₂片段、Fv、scFvs以及Fab表达文库。

[0105] 基本抗体的结构单位已知包含四聚体。各四聚体由两个相同的多肽链对组成,各对有一条“轻链”(约25kDa)和一条“重链”(约50-70kDa)。各链的氨基末端部分包含约100-

110或更多氨基酸的可变区,主要负责抗原识别。各链的羧基末端部分定义为主要负责效应物功能的恒定区。通常,获得自人的抗体分子涉及IgG、IgM、IgA、IgE和IgD的任何种类,它们之间的差异在于分子中重链的特性。某些种类也包括亚类,如IgG1、IgG2和其它。此外,在人类中,轻链可以是 κ 链或 λ 链。

[0106] 本文所用术语“单克隆抗体”(MAb)或“单克隆抗体组合物”表示仅包含一种分子种类的抗体分子的抗体分子群体,该抗体分子由独特的轻链基因产物和独特的重链基因产物组成。具体而言,单克隆抗体的互补决定区(CDR)在该群体的所有分子中均相同。MAb包含能够与抗原的特定表位发生免疫反应的抗原结合位点,所述免疫反应表征为与其独特的结合亲和性。

[0107] 通常,获得自人的抗体分子涉及IgG、IgM、IgA、IgE和IgD的任何种类,它们之间的差异在于分子中重链的特性。某些种类也包括亚类,如IgG1、IgG2和其它。此外,在人类中,轻链可以是 κ 链或 λ 链。

[0108] 术语“抗原结合位点”或“结合部分”表示免疫球蛋白分子中参与抗原结合的部分。抗原结合位点由重(“H”)链和轻(“L”)链的N端可变(“V”)区的氨基酸残基形成。重链和轻链的V区中三个高度分化的分支(被称作“高变区”)位于更保守的侧翼分支(被称作“框架区”或“FR”)之间。因此,术语“FR”表示免疫球蛋白中在天然情况下存在于高变区之间或邻近高变区的氨基酸序列。在抗体分子中,轻链的三个高变区和重链的三个高变区在三维空间中以相对彼此的位置排列以形成抗原结合表面。抗原结合表面与所结合抗原的三维表面互补,且每条重链和轻链的三个高变区均被称作“互补决定区”或“CDR”。氨基酸向每个结构域的分配是根据Kabat《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》(国立卫生研究院,马里兰州贝塞斯达(1987和1991))或Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987),Chothia等,Nature 342:878-883(1989)定义。

[0109] 本文所用术语“表位”包括任意能够特异性结合免疫球蛋白或其片段或T细胞受体的蛋白决定区。术语“表位”包括任意能够特异性结合免疫球蛋白或T细胞受体的蛋白决定区。表位决定区通常由分子的化学活性表面基团(如氨基酸或糖侧链)组成且通常有特定的三维结构性质以及特定的电荷性质。当解离常数 ≤ 1 M(例如 ≤ 100 nM、优选 ≤ 10 nM且更优选 ≤ 1 nM)时,即可称抗体特异性结合抗原。

[0110] 本文所用术语“免疫结合”和“免疫结合特性”表示发生在免疫球蛋白分子和对该免疫球蛋白具有特异性的抗原之间的非共价相互作用类型。免疫结合相互作用的强度或亲和性可用术语相互作用的解离常数(K_d)表示,其中 K_d 越小表面亲和性越高。可使用本领域熟知的方法对所选多肽的免疫结合特性进行定量。一种这类方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中速率依赖复合物参与者的浓度、相互作用的亲和性和几何参数,这些因素同等地两个方向的速率。因此“结合速率常数(k_{on})”和“解离速率常数(k_{off})”均可通过对浓度以及结合与解离的实际速率的计算确定。(参见Nature 361:186-87(1993))。 k_{off}/k_{on} 的比率能够滤除所有与亲和性不相关的参数,且等于解离常数 K_d 。(一般参见Davies等(1990)Annual Rev Biochem 59:439-473)。本发明的抗体据称能够特异性结合CD47,平衡结合常数(K_d) $\leq 1\mu$ M,优选 ≤ 100 nM,更优选 ≤ 10 nM且最优选为 ≤ 100 pM至约1pM,该数值由试验测得,如放射性配体结合试验、表面等离子共振(SPR)、流式细胞结合试验或本领域技术人员已知的类似试验。

[0111] 本文所用术语“分离的多核苷酸”表示基因组多核苷酸、cDNA或合成来源或其一些组合,从本义上说“分离的多核苷酸”(1)与全部或部分在自然中发现的“分离的多核苷酸”不相关,(2)可操作地连接至与自然无关的多核苷酸,或(3)不以较长序列一部分的形式出现在自然中。

[0112] 本文中术语“分离的蛋白质”表示cDNA、重组RNA或合成来源或其一些组合的蛋白质,从本义或派生含义上说“分离的蛋白质”(1)与自然中发现的蛋白质不相关,(2)不含同一来源的其他蛋白质(如不含海洋蛋白质),(3)通过来自其他物种的细胞表达,或(4)不存在于自然中。

[0113] 本文所用术语“多肽”是一个普通术语,表示天然蛋白质、片段或多肽序列的类似物。因此,天然蛋白质片段和类似物是多肽属中的种。

[0114] 本文中术语“天然形成”用于描述某一物体,表明某一物体是在自然中发现的这一事实。例如,可以从自然来源中分离且尚未被人类在实验室中或以其他方式有意修改的生物体(包括病毒)中存在的多肽或多核苷酸序列是天然形成的。

[0115] 本文所用术语“可操作地连接”表示组分的位置,其中如此描述的组分的关系允许其以所需方式发挥功能。“可操作地连接”至编码序列的控制序列以在与控制序列相容的条件下完成编码序列表达的方式连接。

[0116] 本文所用术语“控制序列”表示影响其连接的编码序列的表达和加工所必需的多核苷酸序列。这类控制序列的本质根据宿主生物而有所不同,在原核细胞中这类控制序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列,在真核细胞中这类控制序列通常包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”旨在最低限度包括其存在对表达和加工必要的组分,且还可包括其存在是有益的其他组分,例如前导序列和融合伙伴序列。本文所用术语“多核苷酸”表示长度为至少10个碱基的核苷酸多聚物,包括核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或这两种类型的核苷酸的修饰形式。该术语包括单链和双链形式的DNA。

[0117] 本文中术语“寡核苷酸”包括天然形成的核苷酸和通过天然形成和非天然形成的寡核苷酸连接相连的经修饰的核苷酸。寡核苷酸是多核苷酸的一个子集,通常包括200个碱基的长度或更短。寡核苷酸的长度优选为10至60个碱基,最优选的长度为12、13、14、15、16、17、18、19或20至40个碱基。寡核苷酸通常是单链的(例如用于探针),但寡核苷酸也可以是双链的(例如用于基因突变体的构建)。本发明的寡核苷酸是正义或反义寡核苷酸。

[0118] 本文中术语“天然形成的核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。本文中术语“经修饰的核苷酸”包括带有经修饰或经取代糖基的核苷酸等。本文中术语“寡核苷酸连接”包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺硫代磷酸酯、苯胺磷酸酯、氨基磷酸酯等寡核苷酸连接。参见例如LaPlanche等,Nucl.Acids Res.14:9081(1986); Stec等,J.Am.Chem.Soc.106:6077(1984);Stein等,Nucl.Acids Res.16:3209(1988);Zon等,Anti Cancer Drug Design 6:539(1991);Zon等,Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach(《寡核苷酸及类似物:实用方法》),第87-108页(F.Eckstein编,牛津大学出版社(Oxford University Press),英格兰牛津(1991));Stec等,美国专利号5,151,510;Uhlmann和Peyman,Chemical Reviews 90:543(1990)。如果需要,寡核苷酸可包括用于检测的标记。

[0119] 本文中术语“选择性杂交”表示可检测地和特异性地结合。在使可检测地结合至非

特异性核酸的量最小化的杂交和洗涤条件下,本发明的多核苷酸、寡核苷酸及其片段选择性地与核酸链杂交。可使用高严谨性条件以达到选择性杂交条件,如本领域已知和本文中讨论的那样。通常,本发明的多核苷酸、寡核苷酸及其片段与感兴趣的核酸序列之间的核酸序列同源性为至少80%,更普遍地,优选将同源性提高至至少85%、90%、95%、99%和100%。如果两条核酸序列之间存在部分或完全的同源性,则这两条序列是同源的。例如,85%的同源性表示当两条序列以最大配对排列时有85%的氨基酸是相同的。允许(在两条进行配对的序列中的任意一条上)出现缺口,配对缺口长度最多为5个,优选减至2个,更优选更少。或者,且优选地,如果使用带有突变数据矩阵和缺口罚分为6或更高的程序ALIGN时两条蛋白序列的排列分数大于5(标准偏差单位),则可使用术语“同源的”描述这两条蛋白序列(或来源于这两条蛋白序列的长度至少为30个氨基酸的多肽序列)。参见Dayhoff, M.O., Atlas of Protein Sequence and Structure (《蛋白质序列和结构图册》), 第101-110页(卷5, 国家生物医学研究基金会(National Biomedical Research Foundation) (1972)) 以及该卷附录2的第1-10页。如果使用ALIGN进行最优化排列时这两条序列或其部分的氨基酸存在大于或等于50%的同源性,则这两条序列或其部分为更优选同源。本文所用术语“对应于”表示多核苷酸序列与参考多核苷酸序列的全部或部分同源(即相同而非严格进化相关),或多肽序列与参考多肽序列相同。相反地,本文所用术语“与……互补”表示互补序列与参考序列的全部或部分同源。用于说明,核苷酸序列“TATAC”对应于参考序列“TATAC”且与参考序列“GTATA”互补。

[0120] 以下术语用于描述两条或多条多核苷酸或氨基酸序列之间的序列关系:“参考序列”、“比较窗”、“序列相同性”、“序列相同性百分比”和“基本相同”。“参考序列”是用作序列比较基础的设定序列,参考序列可以是更长序列的子集,例如作为全长cDNA或序列表中提供的基因序列的片段或者可包括完整的cDNA或基因序列。通常,参考序列的长度为至少18个核苷酸或6个氨基酸,常为至少24个核苷酸或8个氨基酸,且经常为至少48个核苷酸或16个氨基酸。由于两条多核苷酸或氨基酸序列可各(1) 包括一条在这两个分子之间相似的序列(即完整的多核苷酸或氨基酸序列的一部分),以及(2) 还可包括在这两条多核苷酸和氨基酸序列之间分化的序列,所以两个(或多个)分子之间的序列比较通常通过在“比较窗”中比较这两个分子的序列来进行,从而鉴定并比较序列局部区域的相似性。本文所用术语“比较窗”表示至少18个连续核苷酸位置或6个氨基酸的概念性片段,其中可将一条多核苷酸序列或氨基酸序列与至少18个连续核苷酸或6个氨基酸的序列比较,且与参考序列(其不包括添加或缺失)相比,比较窗中的部分多核苷酸序列可包括20%或更少的添加、缺失、取代等(即缺口),用于对两条序列进行最优比对。可通过,例如Smith和Waterman的局部同源性算法, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), 通过Needleman和Wunsch的同源性比对算法, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), 通过Pearson和Lipman的相似性搜索法, Proc. Nat’l Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), 通过计算机执行这些算法(威斯康星遗传学软件包(遗传学计算组(Genetics Computer Group), 科学大道575号(575Science Dr.), 威斯康星州麦迪逊) 发布版本7.0中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA、Geneworks或MacVector软件包), 或通过目测进行用于比对比较窗的最优序列比, 并选择多种方法所生成的最佳比对(即在比较窗中形成最高百分比的同源性)。

[0121] 术语“序列相同性”表示在比较窗中两条多核苷酸或氨基酸序列是相同的(即在核

核苷酸与核苷酸或残基与残基比较的基础上)。术语“序列相同性百分比”的计算方法为在比较窗中比较两条最优比对的序列,确定两条序列上出现的相同核酸碱基(例如A、T、C、G、U或I)或残基的位点数目以得出匹配位点的数目,将匹配位点的数目除以比较窗中总位点数目(即窗口大小),并将结果乘以100以得出序列相同性百分比。本文所用术语“基本相同”表示多核苷酸或氨基酸序列的一个特征,其中该多核苷酸或氨基酸包括在比较窗中与参考序列存在至少85%序列相同性、优选至少90%至95%序列相同性、更经常地至少99%序列相同性的序列,所述比较窗含有至少18个核苷酸(6个氨基酸)位点,通常含有至少24-48个核苷酸(8-16个氨基酸)位点,其中序列相同性百分比的计算方法为在比较窗中比较参考序列与包括缺失或添加的序列,所述缺失或添加总共为参考序列的20%或更少。参考序列可以是更长序列的一个子集。

[0122] 本文中使用的20种常规氨基酸及其缩写遵循常规用法。参见Immunology-A Synthesis (《免疫学—合成》)(第2版,E.S.Golub和D.R.Gren编,辛奥尔联合公司(Sinauer Associates),马萨诸塞州桑德兰(1991))。20种常规氨基酸的立体异构体(如D-氨基酸)、非天然氨基酸(如 α -, α -双取代氨基酸)、N-烷基氨基酸、乳酸和其他非常规氨基酸也可以是本发明的多肽的合适组分。非常规氨基酸的示例包括:4-羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、 ϵ -N,N,N-三甲基赖氨酸、 ϵ -N-乙酰赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、 σ -N-甲基精氨酸和其他类似氨基酸和亚氨基酸(如4-羟基脯氨酸)。在本文所用的多肽符号中,左手方向是氨基端方向,右手方向是羧基端方向,按照标准用法和常规。

[0123] 类似地,除非另有说明,单链多核苷酸序列的左手端为5'端,双链多核苷酸序列的左手端称作5'方向。新生RNA转录本的5'至3'方向称作转录方向,DNA链上序列RNA相同且为5'的序列区域至RNA转录本的5'端称作“上游序列”,DNA链上序列与RNA相同且为3'的序列区域至RNA转录本的3'端称作“下游序列”。

[0124] 应用于多肽时,术语“基本相同”表示进行最优比对(如通过程序GAP或BESTFIT,使用默认缺口权重)时两条多肽序列存在至少80%的序列相同性,优选至少90%的序列相同性,更优选至少95%的序列相同性,且最优选至少99%的序列相同性。

[0125] 优选地,不相同的残基位点是由于保守性氨基酸取代造成的。

[0126] 保守性氨基酸取代表示使用带有相似侧链的残基进行互换。例如,带有脂肪族侧链的氨基酸组是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;带有脂肪族-羟基侧链的氨基酸组是丝氨酸和苏氨酸;带有含酰胺侧链的氨基酸组是天冬酰胺和谷氨酰胺;带有芳香族侧链的氨基酸组是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;带有碱性侧链的氨基酸组是赖氨酸、精氨酸和组氨酸;以及带有含硫侧链的氨基酸组是半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守性氨基酸取代基团是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0127] 如本文所述,可将抗体或免疫球蛋白分子的氨基酸序列上的较小变异视作被本发明所包括,前提是氨基酸序列上的变异保持在至少75%,更优选至少80%、90%、95%,且最优选99%。特别地,考虑了保守性氨基酸取代。保守性取代是在侧链相关的氨基酸家族内发生的取代。遗传编码的氨基酸通常分为几个家族:(1)酸性氨基酸是天冬氨酸、谷氨酸;(2)碱性氨基酸是赖氨酸、精氨酸、组氨酸;(3)非极性氨基酸是丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨

酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸；和(4)不带电极性氨基酸是甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。亲水性氨基酸包括精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸和苏氨酸。疏水氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。其他氨基酸家族包括(i)丝氨酸和苏氨酸,属于脂肪族-羟基家族;(ii)天冬酰胺和谷氨酰胺,属于含酰胺家族;(iii)丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸,属于脂肪族家族;以及(iv)苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,属于芳香族家族。例如,能合理预期分别用异亮氨酸或缬氨酸取代亮氨酸,用谷氨酸取代天冬氨酸,用丝氨酸取代苏氨酸,或用结构上相关氨基酸类似地取代某氨基酸对结合功能或所得分子的属性不会产生大影响,尤其是取代不涉及框架位点内的氨基酸时。氨基酸改变是否产生功能肽能易于通过测定所述多肽衍生物的特异活性来测定。本文详细描述了试验。抗体或免疫球蛋白分子的片段或类似物能易于通过本领域普通技术制备。优选片段或类似物的氨基和羧基末端出现在功能结构域的边界附近。通过比较核苷酸和/或氨基酸序列数据与公共或专有的序列数据库能鉴定结构和功能结构域。优选使用计算机比较方法以鉴定在已知结构和/或功能的其他蛋白上出现的序列基序或预测蛋白构型结构域。鉴定折叠成已知三维结构的蛋白序列的方法是已知的。Bowie等,Science 253:164 (1991)。因此,上述实施例表明,本领域技术人员能够识别用于根据本发明定义结构和功能结构域的序列基序和结构构型。

[0128] 优选的氨基酸取代具有如下特性:(1)减少对蛋白水解的敏感性,(2)减少对氧化的敏感性,(3)改变用于形成蛋白复合物的结合亲和性,(4)改变结合亲和性,以及(4)给予或修饰这类类似物的其他理化或功能特性。类似物可包括多种不同于天然形成肽序列的序列突变蛋白。例如,可在天然形成的序列中(优选在形成分子间接触的结构域之外的多肽部分中)进行单个或多个氨基酸取代(优选保守性氨基酸取代)。保守性氨基酸取代不应显著改变母序列的结构特征(例如取代氨基酸不应打断母序列中存在的螺旋或破坏其他表征母序列的二级结构类型)。本领域公认的二级和三级结构示例描述于Proteins, Structures and Molecular Principles(《蛋白质、结构和分子原理》)(Creighton编,W.H.弗里曼公司(W.H.Freeman and Company),纽约(1984));Introduction to Protein Structure(《蛋白质结构简介》)(C.Branden和J.Toose编,加兰出版公司(Garland Publishing),纽约州纽约(1991));以及Thornton等,Nature 354:105(1991)。

[0129] 本文所用术语“多肽片段”表示带有氨基端和/或羧基端缺失的多肽,但剩余的氨基酸序列与全长cDNA序列推导出的天然形成序列的相应位置相同。片段的长度通常为至少5、6、8或10个氨基酸,优选至少14个氨基酸,更优选至少20个氨基酸,通常至少50个氨基酸,且更优选至少70个氨基酸。本文所用术语“类似物”表示由至少25个氨基酸的片段组成的多肽,其与推导出氨基酸序列的一部分基本相同且在适当结合条件下特异性结合CD47。通常,多肽类似物包括相对于天然形成序列的保守性氨基酸取代(或添加或缺失)。类似物的长度通常为至少20个氨基酸,优选为至少50个氨基酸或更长,且经常与全长的天然形成多肽一样长。

[0130] 肽类似物普遍在制药工业中用作特性与模板肽类似的非肽药物。这些类型的非肽化合物被称作“肽模拟物”。Fauchere,J.Adv Drug Res.15:29(1986);Veber和Freidinger,TINS p.392(1985);以及Evans等,J.Med.Chem.30:1229(1987)。经常在计算机化分子建模

的帮助下开发这类化合物。结构类似于治疗上有用的肽的肽模拟物可用于产生相同的治疗或预防效果。通常,肽类似物在结构上类似于范例性多肽(即具有生化特性或药物活性的多肽),如人抗体,但其中一个或多个肽连接方式通过本领域已知的方法被选自以下组的连接方式取代:--CH₂NH--、--CH₂S--、--CH₂-CH₂--、--CH=CH--(顺式和反式)、--COCH₂--、CH(OH)CH₂--和-CH₂SO--。使用同一类型的D-氨基酸对共有序列的一个或多个氨基酸进行系统性取代(例如D-赖氨酸取代L-赖氨酸)可用于生成更稳定的肽。此外,可使用本领域已知的方法制备包括共有序列或基本相同的共有序列变体的受限肽(Rizo和Gierasch, Ann.Rev.Biochem.61:387(1992));例如通过添加能够形成使肽环化的分子间二硫键桥的内部半胱氨酸残基。

[0131] 本文所用术语“试剂”表示化学化合物、化学化合物混合物、生物大分子或由生物材料制得的提取物。

[0132] 本文所用术语“标记”或“带标记的”表示整合可检测标记,例如通过整合带放射标记的氨基酸或将多肽连接至能够被带标记的亲合素(例如包含可由光学或量热法检测的含荧光标记或酶活性的链霉亲和素)检测到的生物素部分。在某些情况下,所述标记或标识也可以是治疗性的。多种标记多肽和糖蛋白的方法是本领域已知的且可以使用。多肽标记的示例包括但不限于下列:放射性同位素或放射性核素(如³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I)、荧光标记(如FITC、罗丹明、镧系元素磷光体)、酶标记(如辣根过氧化物酶、p-半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光物质、生物素基团、由第二报告物识别的预定多肽表位(如亮氨酸拉链对序列、二抗的结合位点、金属结合结构域、表位标记)。在一些实施方式中,标记通过长度各异的间隔臂连接以减少潜在的空间位阻。本文所用术语“药剂或药物”表示适当地给予患者后能够诱导产生所需治疗效果的化学化合物或组合物。

[0133] 本文所用术语“抗肿瘤剂”表示具有抑制人类肿瘤发展或进展的功能特性的试剂,尤其是恶性(癌性)病变,如癌、肉瘤、淋巴瘤或白血病。抑制转移通常是抗肿瘤剂的一个特性。

[0134] 本文中的其他化学术语根据本领域的常规用法使用,如The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(《麦格劳-希尔化学术语词典》)(Parker,S.编,格劳-希尔公司(McGraw-Hill),旧金山(1985))。

[0135] 在本文中,“基本纯的”表示目标物质是存在的主要物质(即与组合物中的任意其他单独物质相比,其摩尔基准更大),优选基本纯的馏分是目标物质构成存在的所有大分子物质的至少约50%(摩尔基准)的组合物。

[0136] 通常,基本纯的组合物可包括组合物中存在的所有大分子物质中的约80%以上,更优选约85%、90%、95%和99%以上。最优选地,所述目标物质纯化成本质同质的(通过常规检测方法在组合物中无法检测到污染物质),其中所述组合物基本上由单一的大分子物质构成。

[0137] CD47抗体

[0138] 本发明的单克隆抗体具有结合CD47的能力,以抑制SIRPα与CD47的结合,减少CD47-SIRPα介导的信号传递,促进吞噬作用并抑制肿瘤生长和/或转移。例如,可使用本文实施例中描述的细胞试验确定抑制作用。

[0139] 本发明的示例性抗体包括2A1抗体、2A1的嵌合版本和2A1的人源化变体。本发明的

示例性抗体包括含有序列选自SEQ ID NO:5-30的可变重 (VH) 链和序列选自SEQ ID NO:31-47的可变轻链 (VL) 的抗体。特别地,示例性抗体包括表1所提供的抗体。

[0140] 表1

[0141]

抗体	可变重 (VH) 链	可变轻 (VL) 链
2A1	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:31
2A1-xi	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:32
AB2.03	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:33
AB2.04	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:34
AB2.05	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:35
AB2.06	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:36
AB2.07	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:37
AB2.08	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:38
AB2.09	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:39
AB2.13	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:43
AB3.09	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:39
AB6.12	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:42
AB6.13	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:43
AB6.14	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:44
AB6.17	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:47
AB10.13	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:43
AB10.14	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:44
AB11.05	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:35
AB12.05	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:35
AB15.05	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:35
AB16.05	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:35
AB17.05	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:35
AB22.05	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:35
AB23.05	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:35

[0142]

AB24.05	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:35
AB25.05	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:35

[0143] 本发明还包括与本文所述CD47抗体结合同一表位的抗体。例如,本发明的抗体特异性结合包括人CD47上一个或多个氨基酸残基的表位(参见例如GenBank登录号Q08722.1)。

[0144] 下面提供了一种示例性人CD47的氨基酸序列(GenBank登录号Q08722.1(GI:1171879),其通过引用纳入本文)。信号序列(氨基酸1-18)用下划线表示。

[0145] 1 mwplvaalll gsaccgsaql lfnktsvef tfcndtvvip cfvtntmeaqn ttevyvkwkf

[0146] 61 kgrdiytdfg alnkstvptd fssakievsq llkgdaslkm dksdavshtg nytcevtelt

[0147] 121 regetiiek yrvvswfspn enilivifpi faillfwgqf giktlkyrsg gmdektiall

[0148] 181 vaglvitviv ivgailfvpg eyslknatgl glivtstgil illhyvfvst aigltsfvia

- [0149] 241 ilviqviayi lavvglslci aacipmhgpl lisglslal aqllglvymk fvasnqkti
[0150] 301 pprkaveep1 nafkeskgmm nde (SEQ ID NO:48)
- [0151] 为清楚起见,下面提供了排除了信号序列的一种示例性人CD47的氨基酸序列。
- [0152] 1 qlfnktskv eftfcndtvv ipcfvtnmea qnttevyvkw kfkgrdiytf dgalnkstvp
[0153] 61 tdfssakiev sqllkgdasl kmdksdavsh tgnytcevt ltregetiie lkyrvvswfs
[0154] 121 pnenilivif pifaillfwg qfgiktlkyr sggmdektia llvaglvitv ivivgailfv
[0155] 181 pgeyslknat glglivtstg ilillhyvfv staigltsfv iailviqvia yilavvglsl
[0156] 241 ciaacipmhg pllislgl sil alaqlglvy mkfvasnqkt iqpprkavee plnafkeskg
[0157] 301 mmnde (SEQ ID NO:147)
- [0158] 下面提供了一种示例性人CD47-IgV结构域的氨基酸序列:
- [0159] 19 qlfnktskv eftfcndtvv ipcfvtnmea qnttevyvkw kfkgrdiytf dgalnkstvp
[0160] 79 tdfssakiev sqllkgdasl kmdksdavsh tgnytcevt ltregetiie lkyrvv (SEQ ID NO:49)
- [0161] 本发明的示例性单克隆抗体包括例如含有下面序列所示可变重 (VH) 链区和/或可变轻 (VL) 链区的人源化抗体。
- [0162] 下面提供了CD47抗体的可变重 (VH) 链区。下面突出显示了CD47抗体的VH链的互补决定区 (CDR)。在一些实施方式中,VH CDR1的氨基酸序列是GFNIKDYLLH (SEQ ID NO:50)、GYTFTYYLLH (SEQ ID NO:57)、GFTFTYYLLH (SEQ ID NO:58)、GYNFTYYLLH (SEQ ID NO:59)、GYTITYYYLLH (SEQ ID NO:60)、GYTFKYLLH (SEQ ID NO:61)、GYTFTDYLLH (SEQ ID NO:62)、GFTFTDYLLH (SEQ ID NO:63)、GFTITDYLLH (SEQ ID NO:64)、GYTFKDYYLLH (SEQ ID NO:65) 或 GYTFKDYYLLH (SEQ ID NO:66)。在一些实施方式中,VH CDR2的氨基酸序列是WIDPDNGDTE (SEQ ID NO:51)、WIDPDQGDTE (SEQ ID NO:72)、WIDPDYGDTE (SEQ ID NO:73)、WIDPDSGDTE (SEQ ID NO:74)、WIDPDNADTE (SEQ ID NO:75) 或 WIDPDNTDTE (SEQ ID NO:76)。在一些实施方式中,VH CDR3的氨基酸序列是NAAYGSSYPMDY (SEQ ID NO:52) 或 NAAYGSSYPMDY (SEQ ID NO:77)。
- [0163] EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKRPEQGLEWIGWIDPDNGDTEFAPKFQGKA
TMTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCNAAYGSSYPMDYWGQGTSTVTV (SEQ ID NO:5)
- [0164] EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIDYLLHWVQAPGKGLEWMGWIDPDNGDTEYAEKFQGRV
TITADTSTDTAYMELSSLRSED TAVYYCNAAYGSSYPMDYWGQGTSTVTV (SEQ ID NO:6)
- [0165] QMQLVQSGAEVKKKGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRV
TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAVYYCNAAYGSSYPMDYWGQGTSTVTV (SEQ ID NO:7)
- [0166] EVQLVQSGAEVKKKGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRV
TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAVYYCNAAYGSSYPMDYWGQGTSTVTV (SEQ ID NO:8)
- [0167] QMQLVQSGAEVKKKGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQGRV
TMTADTSSNTAYMELSSLRSED TAVYYCNAAYGSSYPMDYWGQGTSTVTV (SEQ ID NO:9)
- [0168] QMQLVQSGAEVKKKGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQGRV
TMTEDTSTDTAYMELSSLRSED TAVYYCNAAYGSSYPMDYWGQGTSTVTV (SEQ ID NO:10)
- [0169] QMQLVQSGAEVKKKGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDQGDTEYAQKFQDRV
TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAVYYCNAAYGSSYPMDYWGQGTSTVTV (SEQ ID NO:11)
- [0170] QMQLVQSGAEVKKKGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDYGDTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:12)

[0171] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDN DTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:13)

[0172] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDN ADTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:14)

[0173] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDN TDTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:15)

[0174] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDN GDTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:16)

[0175] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASGYFTYYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDN GDTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:17)

[0176] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASGFTYYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDN GDTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:18)

[0177] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASGYNTYYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDN GDTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:19)

[0178] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASGYTITYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDN GDTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:20)

[0179] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASGYTFKYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDN GDTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:21)

[0180] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASGYTFTDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDN GDTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:22)

[0181] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASGFTFTDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDN GDTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:23)

[0182] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASGFTITDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDN GDTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:24)

[0183] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASGYTFKDYYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDN GDTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:25)

[0184] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASGFTFKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDN GDTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:26)

[0185] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDN GDTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYLQLSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:27)

[0186] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDN GDTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLTSED TAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:28)

[0187] EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFN IKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDN GDTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:29)

[0188] EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFN IKDYLLHWVQQAPGKGLEWMGWIDPDN GDTEYAQKFQDRV

TITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TVTV (SEQ ID NO:30)

[0189] 下面提供了CD47抗体的可变轻(VL)链区。下面突出显示了CD47抗体的VL链的CDR。在一些实施方式中,VL CDR1的氨基酸序列是KASQDIHRYLS (SEQ ID NO:53)、RASQDIHRYLA

(SEQ ID NO:67) 或 RARQGIHRYLS (SEQ ID NO:68)。在一些实施方式中, VL CDR2 的氨基酸序列是 RANRLVD (SEQ ID NO:54)、RANRLQS (SEQ ID NO:69)、RANRRAT (SEQ ID NO:70) 或 RANRLVS (SEQ ID NO:71)。在一些实施方式中, VL CDR3 的氨基酸序列是 LQYDEFPYT (SEQ ID NO:55)。

[0190] DIKMTQSPSSLYASLGERVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKSPKILYRANRLVDGVPSRFSGSGSG QDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEMK (SEQ ID NO:31)

[0191] DIKMTQSPSSLYASLGERVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKSPKILYRANRLVDGVPSRFSGSGSG QDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:32)

[0192] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKAPKLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSG TDFTFTISLQPEDATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:33)

[0193] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:34)

[0194] NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:35)

[0195] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKAPKRLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:36)

[0196] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHRYLAWYQQKPGKVPKLLIYRANRLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDVATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:37)

[0197] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHRYLAWYQQKPGQAPRLIYRANRRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSELPEDFAVYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:38)

[0198] DIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:39)

[0199] NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:40)

[0200] NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKILYRANRLVDGVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:41)

[0201] NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:42)

[0202] NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKILYRANRLVDGVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:43)

[0203] NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:44)

[0204] NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:45)

[0205] NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:46)

[0206] NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:47)

[0207] 在一些情况下, 本文所述 CD47 抗体包括选自 SEQ ID NO:5-30 的可变重链区和选自

SEQ ID NO:31-47的可变轻链区。示例性CD47抗体包括序列为SEQ ID NO:5的可变重链区和序列为SEQ ID NO:31的可变轻链区;序列为SEQ ID NO:7的可变重链区和序列为SEQ ID NO:35的可变轻链区;序列为SEQ ID NO:11的可变重链区和序列为SEQ ID NO:42的可变轻链区;序列为SEQ ID NO:5的可变重链区和序列为SEQ ID NO:32的可变轻链区;序列为SEQ ID NO:7的可变重链区和序列为SEQ ID NO:33的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:7的可变重链区和序列为SEQ ID NO:34的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:7的可变重链区和序列为SEQ ID NO:36的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:7的可变重链区和序列为SEQ ID NO:37的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:7的可变重链区和序列为SEQ ID NO:38的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:29的可变重链区和序列为SEQ ID NO:35的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:30的可变重链区和序列为SEQ ID NO:35的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:7的可变重链区和序列为SEQ ID NO:43的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:11的可变重链区和序列为SEQ ID NO:43的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:11的可变重链区和序列为SEQ ID NO:47的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:15的可变重链区和序列为SEQ ID NO:43的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:15的可变重链区和序列为SEQ ID NO:44的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:11的可变重链区和序列为SEQ ID NO:44的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:22的可变重链区和序列为SEQ ID NO:35的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:7的可变重链区和序列为SEQ ID NO:39的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:8的可变重链区和序列为SEQ ID NO:39的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:16的可变重链区和序列为SEQ ID NO:35的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:20的可变重链区和序列为SEQ ID NO:35的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:21的可变重链区和序列为SEQ ID NO:35的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:17的可变重链区和序列为SEQ ID NO:35的可变轻链区,序列为SEQ ID NO:28的可变重链区和序列为SEQ ID NO:35的可变轻链区,或序列为SEQ ID NO:27的可变重链区和序列为SEQ ID NO:35的可变轻链区。

[0208] 本文所述CD47抗体包括SEQ ID NO:5-30中任意一个所提供的VH区和与之配对的SEQ ID NO:31-47中任意一个所提供的VL区。具体而言,本文所述CD47抗体包括SEQ ID NO:5、7、8、11、15-17、20-22和27-30中任意一个提供的VH区和与之配对的SEQ ID NO:31-39、42、43、44和47中任意一个所提供的VL区。

[0209] 本文所述CD47抗体包括SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:66中任意一个提供的VH CDR1区,SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76中任意一个提供的VH CDR2区,SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:77中任意一个提供的VH CDR3区,SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:67和SEQ ID NO:68中任意一个提供的VL CDR1区,SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70和SEQ ID NO:71中任意一个提供的VL CDR2区,以及SEQ ID NO:55提供的VL CDR3区。

[0210] 本领域技术人员会认识到不需要过多的实验就可以确定一种单克隆抗体是否具有与本发明的单克隆抗体相同的特异性(例如2A1抗体或含有选自SEQ ID NO:5-31的可变重链区和选自SEQ ID NO:31-47的可变轻链区的抗体),具体方法为确定前者是否阻止了后者与CD47的结合。如果待测的单克隆抗体与本发明的单克隆抗体竞争,如本发明的单克隆抗体的结合下降所示,则两种单克隆抗体结合相同或密切相关的表位。

[0211] 确定单克隆抗体是否具有本发明的单克隆抗体的特异性的替代性方法是将本发

明的抗体与可溶的CD47蛋白(通常具有活性)预孵育,随后加入待测的单克隆抗体以确定待测的单克隆抗体在其结合CD47的能力方面是否遭到抑制。如果待测的单克隆抗体被抑制,则很可能其具有与本发明的单克隆抗体相同或功能等同的表位特异性。

[0212] 本发明的抗体

[0213] 还可进行对本发明的单克隆抗体的筛选,例如通过测量CD47-和/或CD47/SIRP α 介导的信号传递,并确定测试的单克隆抗体是否能够调节、阻断、抑制、降低、拮抗、中和或干扰CD47-和/或CD47/SIRP α 介导的信号传递。这些试验可包括竞争性结合试验。此外,这些试验可测量生物读数,例如促进巨噬细胞吞噬表达CD47的细胞的能力,如实施例9所述(图9)。

[0214] 可使用本领域中已知的多种方法以产生针对CD47或针对其衍生物、片段、类似物、同源物或直系同源物的单克隆抗体。(参见例如Antibodies:A Laboratory Manual(《抗体:实验室手册》),Harlow E,和Lane D,1998,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约冷泉港,其通过引用纳入本文)。全人抗体指轻链和重链的全部序列(包括CDR)均来源于人基因的抗体分子。本文中这类抗体被称作“人抗体”或“全人抗体”。例如,可使用下文实施例中描述的方法制备人单克隆抗体。还可使用杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术(参见Kozbor等,1983Immunol Today 4:72)制备人单克隆抗体;以及使用EBV杂交瘤技术以产生人单克隆抗体(参见Cole等,1985,MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY(《单克隆抗体和癌症疗法》),ARL有限公司(Alan R.Liss,Inc.),第77-96页)。可利用人单克隆抗体并可通过使用人杂交瘤(参见Cote等,1983.Proc Natl Acad Sci USA 80:2026-2030)或通过使用爱泼斯坦-巴尔二氏(Epstein Barr)病毒体外转化人B细胞(参见Cote等,1985,MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY(《单克隆抗体和癌症疗法》),ARL有限公司(Alan R.Liss,Inc.),第77-96页)以产生人单克隆抗体。

[0215] 可通过熟知的技术纯化抗体,如使用主要提供免疫血清的IgG部分的蛋白A或蛋白G进行亲和层析。随后或或者,可将作为免疫球蛋白目标的特异性抗原或其表位固定在柱子上以通过免疫亲和层析纯化免疫特异性抗体。例如,D.Wilkinson讨论了免疫球蛋白的纯化(The Scientist(《科学家》),科学家出版社(The Scientist,Inc.)出版,宾夕法尼亚州费城,卷14,第8期(2000年4月17日),第25-28页)。

[0216] 本发明的CD47抗体是单克隆抗体。产生了能够调节、阻断、抑制、降低、拮抗、中和或干扰CD47-和/或CD47/SIRP α 介导的细胞信号传递的单克隆抗体,例如通过使用膜结合和/或可溶的CD47(例如人CD47或其免疫原性片段、衍生物或变体)免疫动物。或者,使用细胞免疫动物,所述细胞转染有包含编码CD47的核酸分子的载体,使得CD47表达并联接在经转染的细胞表面。或者,通过筛选包含抗体或用于结合CD47的抗原结合结构域序列的文库以获得抗体。在例如噬菌体中制备该文库,蛋白质或肽与表达在组装的噬菌体颗粒表面上的噬菌体外壳蛋白融合,且编码的DNA序列包含在噬菌体颗粒内(即“噬菌体展示文库”)。随后筛选来源于骨髓瘤/B细胞融合的杂交瘤对CD47的反应性。

[0217] 例如,可采用杂交瘤法来制备单克隆抗体,所述方法例如由Kohler和Milstein,Nature 256:495(1975)所述的那些。在杂交瘤法中,通常用免疫剂免疫小鼠、仓鼠或其它合适的宿主动物,来引发产生或能够产生抗体的淋巴细胞,所述抗体会特异性地与所述免疫剂结合。或者,也可体外免疫淋巴细胞。

[0218] 所述免疫剂通常包括蛋白抗原、其片段或其融合蛋白。通常,如果需要人来源的细

胞则使用外周血淋巴细胞,如果需要非人哺乳动物来源则使用脾细胞或淋巴结细胞。随后使用合适的融合剂(如聚乙二醇)将淋巴细胞与永生细胞系融合以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (《单克隆抗体:原理与实践》),学术出版社(Academic Press), (1986) 第59-103页)。永生细胞系通常是经转染的哺乳动物细胞,尤其是啮齿动物、牛和人来源的骨髓瘤细胞。经常可使用大鼠或小鼠的骨髓瘤细胞。可在优选含有一种或多种能够抑制未融合、永生化的细胞生长或存活的物质的合适培养基中培养杂交瘤细胞。例如,如果亲本细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT),则杂交瘤培养基一般包含次黄嘌呤、氨蝶呤和胸苷(“HAT培养基”),这些物质能防止HGPRT缺陷细胞的生长。

[0219] 优选的永生细胞系是能有效地融合、支持所选抗体产生细胞稳定高水平地表达抗体并对培养基(如HAT培养基)敏感的那些细胞。更优选的永生细胞系是鼠骨髓瘤细胞系,可获自例如加利福尼亚州圣地亚哥的索尔克细胞销售中心(Salk Institute Cell Distribution Center)和弗吉尼亚州玛纳萨斯的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)。人骨髓瘤和鼠-人异源骨髓瘤细胞系也被描述用于产生单克隆抗体。(参见Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications (《单克隆抗体生产技术和应用》),马塞尔-德克公司(Marcel Dekker, Inc.), 纽约, (1987) 第51-63页)。

[0220] 随后可测定培养杂交瘤细胞的培养基中是否存在针对所述抗原的单克隆抗体。优选使用免疫沉淀或体外结合试验,例如放射免疫试验(RIA)或酶联免疫吸附试验(ELISA)测定杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。这类技术和试验是本领域已知的。可通过例如Munson和Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)的斯卡查德(Scatchard)分析确定单克隆抗体的结合亲和性。此外,在单克隆抗体的治疗应用中,重要之处在于鉴定对靶抗原具有高度特异性和高度亲和性的抗体。

[0221] 鉴定到所需的杂交瘤细胞后,通过限制稀释法对克隆进行亚克隆并通过标准方法使其生长。(参见Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (《单克隆抗体:原理与实践》),学术出版社(Academic Press), (1986) 第59-103页)。合适的用于该目的的培养基包括例如达氏修正伊氏培养基(Dulbecco's Modified Eagles Medium)和RPMI-1640培养基。或者,可以哺乳动物中腹水的形式在体内生长杂交瘤细胞。

[0222] 可用常规免疫球蛋白纯化方法(例如蛋白A-琼脂糖、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱)来从培养基或腹水中分离或纯化亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0223] 还可通过重组DNA法制备单克隆抗体,如美国专利第4,816,567号中所述。用常规方法(例如利用能特异性结合编码鼠抗体重链和轻链基因的寡核苷酸探针)可以容易地分离和测序编码本发明的单克隆抗体的DNA。本发明的杂交瘤细胞可用作这种DNA的优选来源。一旦分离后,即可将该DNA置于表达载体中,然后转移到宿主细胞(如中华仓鼠卵巢(CHO)、人胚胎肾(HEK293)细胞、猿COS细胞、PER.C6®、NS0细胞、SP2/0、YB2/0或不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞)中,从而在重组宿主细胞中完成单克隆抗体的合成。也可修饰该DNA,例如使用人重链和轻链恒定区的编码序列取代同源鼠序列(参见美国专利第4,816,567号;Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)),或通过将非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列共价连接于免疫球蛋白编码序列。这类非免疫球蛋白多肽可以被本发明抗体的恒

定区取代,或被本发明抗体的某一抗原结合位点的可变区取代以产生嵌合二价抗体。

[0224] 人抗体和抗体人源化

[0225] 本发明的单克隆抗体包括全人抗体或人源化抗体。这些抗体适于对人进行给药,同时不会因人针对所给予免疫球蛋白的抗性引起免疫反应。

[0226] 例如,可使用下文实施例中描述的方法制备CD47抗体。例如,可在小鼠并随后在杂交瘤中使用经修改的RIMMS(多位点重复免疫)免疫策略鉴定本发明的CD47抗体。

[0227] 在其他替代性方法中,例如使用噬菌体展示法开发CD47抗体,所述噬菌体展示法使用仅包含人序列的抗体。这类方法是本领域熟知的,例如在W092/01047和美国专利第6,521,404号中,其通过引用纳入本文。在该方法中,使用天然或重组来源的cd47或其片段筛选携带随机轻链和重链对的组合噬菌体组合文库。在另一个方法中,可通过某一过程产生CD47抗体,其中该过程的至少一个步骤包括使用人CD47蛋白免疫转基因非人动物。在该方法中,该异种非人动物的一些内源性重链和或 κ 轻链基因座被失活且无法进行制备编码响应抗原的免疫球蛋白的基因所需的重排。此外,至少一个人重链基因座和至少一个人轻链基因座已被稳定地转染至动物中。因此,作为对所给予抗原的响应,该人位点重排已提供编码对该抗原具有免疫特异性的人可变区的基因。因此,免疫后,转基因鼠产生分泌全人免疫球蛋白的B细胞。

[0228] 多种用于产生异种非人动物的技术是本领域熟知的。例如,参见美国专利第6,075,181号和第6,150,584号,其通过引用全文纳入本文。如1994年所发表的成果,其中展示了该一般策略连同第一个XenoMouse™种系的产生。参见Green等,Nature Genetics 7:13-21(1994),其通过引用全文纳入本文。也可参见美国专利第6,162,963;6,150,584;6,114,598;6,075,181;和5,939,598号以及日本专利第3068180B2、3068506B2和3068507B2号以及欧洲专利号EP 0463151B1以及国际专利申请号W0 94/02602、W0 96/34096、W0 98/24893、W0 00/76310和相关同族专利。

[0229] 在替代方法中,其他人利用了“微基因座”法,其中外源Ig基因座通过包含来自Ig基因座的片段(个体基因)来模拟。因此,一种或多种VH基因、一种或多种D_H基因、一种或多种J_H基因、 μ 恒定区和第二恒定区(优选 γ 恒定区)形成构建体以插入到动物中。参见例如,美国专利第5,545,806;5,545,807;5,591,669;5,612,205;5,625,825;5,625,126;5,633,425;5,643,763;5,661,016;5,721,367;5,770,429;5,789,215;5,789,650;5,814,318;5,877,397;5,874,299;6,023,010;和6,255,458号;以及欧洲专利号0546073B1;以及国际专利申请号W0 92/03918、W0 92/22645、W0 92/22647、W0 92/22670、W0 93/12227、W0 94/00569、W0 94/25585、W0 96/14436、W0 97/13852和W0 98/24884及相关同族专利。

[0230] 还证明了从小鼠生成抗体,其中通过微细胞(microcell)融合引入大片段染色体或整个染色体。参见欧洲专利申请号773,288和843,961。

[0231] 人抗小鼠抗体(HAMA)反应产生了制备嵌合或人源化抗体的产业。嵌合抗体具有人恒定区和免疫可变区,预期会观察到某些人抗嵌合抗体(HACA)反应,尤其在抗体的慢性或多剂量使用中。因此,人们希望提供抗CD47的全人抗体以削弱或缓和对HAMA或HACA反应的担忧和/或影响。

[0232] 还可通过人源化、嵌合化和使用适当文库的展示技术实现低免疫原性抗体的产生。应理解可使用本领域中熟知的技术人源化或灵长化鼠抗体或来自其他物种的抗体。参

考例如, Winter和Harris, *Immunol Today* 14:4346 (1993) 以及Wright等, *Crit, Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992)。可通过重组DNA技术改造感兴趣的抗体以使用相应的人序列取代CH1、CH2、CH3、铰链结构域和/或框架结构域(参见WO 92102190和美国专利第5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,792; 5,714,350; 和5,777,085号)。使用Ig cDNA以构建嵌合免疫球蛋白基因也是本领域已知的(Liu等, *P.N.A.S.* 84:3439 (1987) 和J. *Immunol.* 139:3521 (1987))。mRNA分离自产生抗体并用于产生cDNA的杂交瘤或其他细胞。可使用特异性引物通过聚合酶链式反应扩增感兴趣的cDNA(美国专利第4,683,195和4,683,202号)。或者, 制备并筛选文库以分离感兴趣的序列。随后将编码抗体可变区的DNA序列与人恒定区序列融合。人恒定区基因的序列可参见Kabat等(1991) *Sequences of Proteins of immunological Interest* (《感兴趣的免疫蛋白序列》), N.I.H. 公开号91-3242。可容易地从已知克隆中获得人C区基因。可使用所需效应功能(如补体固定)或在抗体依赖的细胞毒性中的活性指导同种型的选择。优选的同种型是IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。可使用人轻链恒定区、 κ 或 λ 。随后使用常规方法表达嵌合、人源化抗体。

[0233] 可通过切割完整蛋白, 如通过蛋白酶或化学切割制备抗体片段(如Fv、F(ab')₂和Fab)。或者, 设计截短基因。例如, 编码一部分F(ab')₂片段的嵌合基因包括编码CH1结构域和H链铰链区的DNA序列, 后接翻译终止密码子, 以产生截短分子。

[0234] 可使用H和L J区的共有序列以设计用作引物的寡核苷酸, 从而将有用的限制性位点导入J区中, 用于随后V区片段与人C区片段的连接。可使用定点诱变修改C区cDNA以在人序列中的类似位置设置限制性位点。

[0235] 表达载体包括质粒、逆转录病毒、YAC、EBV来源的附加体等。方便的载体指该载体编码功能完整的人CH或CL免疫球蛋白序列并带有适当限制性位点, 其经改造后能够容易地插入和表达任意VH或VL序列。在这类载体中, 剪接通常发生在插入的J区中的剪接供体位点和人C区之前的剪接受体位点之间, 还发生在人CH外显子中的剪切区域上。聚腺苷酸化和转录终止发生在编码区下游的天然染色体位点上。生成的嵌合抗体可连接至任意强启动子, 包括逆转录病毒LTR, 例如SV-40早期启动子(Okayama等, *Mol. Cell. Bio.* 3:280 (1983))、劳斯氏肉瘤病毒LTR(Gorman等, *P.N.A.S.* 79:6777 (1982)) 和莫罗尼鼠白血病毒LTR(Grosschedl等, *Cell* 41:885 (1985))。还应理解, 可使用天然Ig启动子等。

[0236] 此外, 可通过展示类型技术制备人抗体或来自其他物种的抗体, 包括但不限于噬菌体展示、逆转录病毒展示、核糖体展示和其他技术, 其中使用本领域熟知的技术并可对生成的分子进行额外成熟(如亲和成熟), 这类技术是本领域熟知的。Wright等, *Crit, Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992)、Hanes和Plückthun, *PNAS USA* 94:4937-4942 (1997) (核糖体展示)、Parmley和Smith, *Gene* 73:305-318 (1988) (噬菌体展示)、Scott, *TIBS*, vol. 17:241-245 (1992)、Cwirla等, *PNAS USA* 87:6378-6382 (1990)、Russel等, *Nucl. Acids Research* 21:1081-1085 (1993)、Hoganboom等, *Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992)、Chiswell和McCafferty, *TIBTECH* 10:80-8A (1992) 以及美国专利第5,733,743号。如果使用展示技术产生非人抗体, 可如上文所述对这类抗体进行人源化。

[0237] 可使用这些技术制备针对表达CD47的细胞、CD47的可溶形式、其表位或肽以及其表达文库的抗体(参见例如美国专利第5,703,057号), 随后可如上文所述根据本文所述的活性对这些抗体进行筛选。

[0238] 可通过包含编码上文所述单链抗体的DNA片段的载体表达本发明的CD47抗体。

[0239] 这些可包括载体、脂质体、裸DNA、佐剂协助的DNA、基因枪、导管等。载体包括具有靶向部分(如针对细胞表面受体的配体)和核酸结合部分(如聚赖氨酸)的化学偶联物(如WO 93/64701中所述)、病毒载体(如DNA或RNA病毒载体)、融合蛋白(如PCT/US95/02140(WO 95/22618)中所述,一种包含靶向部分(如对靶细胞特异的抗体)和核酸结合部分(如鱼精蛋白)的融合蛋白)、质粒、噬菌体等。所述载体可以是染色体的、非染色体的或合成的。

[0240] 优选载体包括病毒载体、融合蛋白和化学偶联物。逆转录病毒载体包括莫罗尼鼠白血病病毒。优选DNA病毒载体。这些载体包括痘病毒载体(如正痘病毒或禽痘病毒载体)、疱疹病毒载体(如I型单纯疱疹病毒(HSV)载体)(参见Geller,A.I.等,J.Neurochem,64:487(1995);Lim,F.等,in DNA Cloning:Mammalian Systems(《DNA克隆:哺乳动物系统》,D.Glover编(牛津大学出版社(Oxford Univ.Press),英格兰牛津))(1995);Geller,A.I.等,Proc Natl.Acad.Sci.:U.S.A.90:7603(1993);Geller,A.I.等,Proc Natl.Acad.Sci USA 87:1149(1990))、腺病毒载体(参见LeGal LaSalle等,Science,259:988(1993);Davidson等,Nat.Genet 3:219(1993);Yang等,J.Virol.69:2004(1995))以及腺相关病毒载体(参见Kaplitt,M.G.等,Nat.Genet.8:148(1994))。

[0241] 痘病毒载体将基因导入细胞质中。禽痘病毒载体导致核酸仅发生短期表达。腺病毒载体、腺相关病毒载体和单纯疱疹病毒(HSV)载体优选用于将核酸导入神经细胞中。腺病毒载体所引起的短期表达(约2个月)短于腺相关病毒(约4个月),后者又短于HSV载体。所选择的特定载体取决于靶细胞和所治疗的病症。可通过标准技术完成导入,例如感染、转染、转导或转化。基因转移模式的示例包括例如裸DNA、CaPO₄沉淀、DEAE葡聚糖、电穿孔、原生质体融合、脂质转染、细胞微注射和病毒载体。

[0242] 可使用这些载体以靶向任意所希望的靶细胞。例如,可使用立体定位注射将载体(如腺病毒、HSV)定位至希望的位置。此外,可使用微泵输注系统(如思科洛美(Synchromed)输注系统)通过脑室内(icv)输注递送颗粒。一种基于总体流动(术语为对流)的方法也被证明能够有效地将大分子递送至脑的扩展区域,并可用于将载体递送至靶细胞。(参见Bobo等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:2076-2080(1994);Morrison等,Am.J.Physiol.266:292-305(1994))。其他可以使用的方法包括导管、静脉内、胃肠道外、腹膜内和皮下注射以及口腔或其他已知的给药途径。

[0243] 可使用这些载体表达大量的能够以多种方式使用的抗体。例如,检测样品中是否存在CD47。所述抗体还可用于尝试结合和破坏CD47-和/或CD47/SIRPα相互作用以及CD47/SIRPα介导的信号传递。

[0244] 可调整技术使之适应对本发明的抗原蛋白特异的单链抗体的产生(参见例如美国专利第4,946,778号)。此外,可调整方法使之适应Fab表达文库的构建(参见例如Huse等,1989 Science 246:1275-1281),从而能够快速且有效地鉴定对某种蛋白质或其衍生物、片段、类似物或同源物具有所需特异性的单克隆Fab片段。包含针对蛋白抗原的同种型的抗体片段可使用本领域已知的技术产生,包括但不限于:(i)通过对抗体分子进行胃蛋白酶消化生成的F(ab')₂片段;(ii)通过还原F(ab')₂的二硫键桥生成的Fab片段;(iii)通过使用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子生成的Fab片段;以及(iv)F_v片段。

[0245] 本发明还包括F_v、Fab、Fab' 和F(ab')₂CD47片段、单链CD47抗体、单结构域抗体(如

纳米抗体或VHH)、双特异性CD47抗体和异源偶联CD47抗体。

[0246] 双特异性抗体是对至少两种不同抗原具有结合特异性的抗体。在本例中,其中一种结合特异性是针对CD47。第二结合靶标是任意其他抗原,优选是细胞表面蛋白质或受体或受体亚基。

[0247] 制备双特异性抗体的方法为本领域已知。通常,双特异性抗体的重组产生是基于共同表达两对免疫球蛋白重链/轻链对,其中两条重链具有不同的特异性(Millstein和Cuellar, *Nature*, 305:537-539 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四源杂交瘤)可能产生10种不同抗体分子的潜在混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常须用亲和层析步骤纯化该正确的分子。公开于1993年5月13日的WO 93/08829和Traunecker等, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991) 公开了相似方法。

[0248] 具有所需结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变结构域可以与免疫球蛋白恒定区序列融合。优选与含有至少部分绞链区、CH2和CH3区的免疫球蛋白重链恒定区融合。优选使含有结合轻链所必需位点的第一重链恒定区(CH1)出现在至少一个融合物中。将编码免疫球蛋白重链融合物,如果需要还有免疫球蛋白轻链的DNA,插入单独的表达载体中,共同转染到合适的宿主生物体中。产生双特异性抗体的进一步详情参见例如, Suresh等, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)。

[0249] 按照WO 96/27011所述的另一方法,可工程改造一对抗体分子之间的界面以最大程度提高从重组细胞培养物中回收的异源二聚体百分比。优选界面包含抗体恒定结构域的至少部分CH3区。在这种方法中,用较大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)取代第一抗体分子界面上的一个或多个较小氨基酸侧链。通过用较小氨基酸侧链(如丙氨酸或苏氨酸)取代较大氨基酸侧链,在第二抗体分子界面上产生与较大侧链相同或相似大小的补偿性“空穴”。这提供了提高异源二聚体相对于不希望的终产物如同源二聚体的产率的机制。

[0250] 可将双特异性抗体制备成长抗体或抗体片段(例如, $F(ab')_2$ 双特异性抗体)。文献中描述了从抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如,可使用化学连接制备双特异性抗体。Brennan等, *Science* 229:81 (1985) 描述了一种方法,其中通过蛋白水解切割完整抗体以产生 $F(ab')_2$ 片段。在二硫醇复合剂亚砷酸钠存在下还原这些片段可稳定邻近的二硫醇并阻止分子间二硫键形成。然后将产生的 Fab' 片段转变成巯基硝基苯甲酸酯(thionitrobenzoate, TNB) 衍生物。然后用巯基乙胺还原将 $Fab' - TNB$ 衍生物之一再转变成 $Fab' -$ 硫醇,与等摩尔量的另一 $Fab' - TNB$ 衍生物混合从而形成双特异性抗体。所产生的双特异性抗体可用作酶的选择性免疫试剂。

[0251] 此外,可从大肠杆菌中直接回收 Fab' 片段,将其化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby等, *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) 描述了一种全人源化双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子的产生。各 Fab' 片段分别从大肠杆菌分泌,对其进行体外定向化学偶连而形成双特异性抗体。由此形成的双特异性抗体能够结合过表达ErbB2受体和正常的人T细胞,并启动人细胞毒性淋巴细胞针对人乳腺癌靶标的裂解活性。

[0252] 从重组细胞培养物直接制备和分离双特异性抗体片段的各种技术也已有描述。例如,利用亮氨酸拉链产生双特异性抗体。Kostelny等, *J. Immunol.* 148 (5) :1547-1553 (1992)。Fos和Jun蛋白质的亮氨酸拉链肽通过基因融合连接于两种不同抗体的 Fab' 部分。在绞链区还原该同质二聚体抗体形成单体,然后再氧化形成异质二聚体抗体。也可用该方

法产生抗体同质二聚体。Hollinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) 所述的“双特异抗体”技术为制备双特异性抗体片段提供了替代机制。这些片段包含通过接头与轻链可变区 (VL) 相连的重链可变区 (VH), 所述接头短到不允许同一链上的两个结构域之间配对。因此, 一个片段的VH和VL结构域被迫与另一片段的互补VL和VH结构域配对, 从而形成两个抗原结合位点。还报道了另一使用单链Fv (sFv) 二聚体制备双特异性抗体片段的策略。参见Gruber等, *J. Immunol.* 152:5368 (1994)。

[0253] 考虑了二价以上价位的抗体。例如, 可制备三特异性抗体。Tutt等, *J. Immunol.* 147:60 (1991)。

[0254] 示例性双特异性抗体可结合两种不同的表位, 其中至少一个来源于本发明的蛋白抗原。或者, 可将免疫球蛋白分子的抗抗原性臂与结合至白细胞上引发分子 (如T细胞受体分子 (如CD2、CD3、CD28或B7) 或IgG的Fc受体 (Fc γ R, 如Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32) 和Fc γ RIII (CD16)) 的臂联合, 从而将细胞防御机制集中于表达特定抗原的细胞。也可利用双特异性抗体将细胞毒剂定位至表达特定抗原的细胞。这些抗体具有抗原结合臂和结合细胞毒剂或放射性核素螯合剂 (如EOTUBE、DPTA、DOTA或TETA) 的臂。另一个感兴趣的双特异性抗体结合本文所述蛋白抗原, 并且还结合组织因子 (TF)。

[0255] 异源偶联物抗体也在本发明的范围内。异源偶联物抗体有两个共价连接的抗体组成。例如, 计划用这类抗体使免疫系统细胞靶向不良细胞 (参见美国专利第4,676,980号), 并用于治疗HIV感染 (参见WO 91/00360、WO 92/200373和EP 03089)。预期可通过合成蛋白化学的已知方法来制备该抗体, 包括使用交联剂的那些方法。例如, 可使用二硫交换反应或通过形成硫醚键构建免疫毒素。用于该目的合适试剂的示例包括亚氨基硫醇和甲基-4-巯基丁酰亚氨酸以及例如美国专利第4,676,980号中公开的那些。

[0256] 希望相对于效应功能修饰本发明的抗体, 从而增强例如抗体在治疗异常CD47信号传递相关疾病和紊乱中的有效性。例如, 可将半胱氨酸残基引入Fc区, 从而在该区域中形成链间二硫键。如此产生的同源二聚体抗体可能具有改善的内化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。(参见Caron等, *J. Exp. Med.*, 176:1191-1195 (1992) 和Shopes, *J. Immunol.*, 148:2918-2922 (1992))。或者, 可工程改造具有双Fc区的抗体, 使其补体裂解能力和ADCC能力得到提高。(参见Stevenson等, *Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230 (1989))。

[0257] 本发明还涉及免疫偶联物, 所述免疫偶联物包括偶联有细胞毒性试剂如毒素 (如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段) 或放射性同位素 (即放射性偶联物) 的抗体。

[0258] 可以使用的酶活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链 (来自绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒素A链、 α -帚曲菌素、油桐 (*Aleurites fordii*) 蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 蛋白 (PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草 (*Saponaire officinalis*) 抑制剂、白树毒素、分裂毒素 (mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢霉烯族毒素 (tricothecenes)。多种放射性核素可用于放射性偶联抗体的产生。示例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

[0259] 所述抗体与细胞毒剂的偶联可利用多种双功能蛋白偶联剂完成, 例如N-琥珀酰亚

胺基-3-(2-吡啶二硫基)丙酸盐(SPDP)、亚氨基四氢噻吩(IT)、亚胺酸酯的双功能衍生物(如己二酸亚氨酸二甲酯HCL)、活性酯(如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)、醛(例如戊二醛)、双叠氮化合物(例如双(p-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(例如双-(p-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(例如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,蓖麻毒素免疫毒素可按Vitetta等,Science 238:1098(1987)中所述制备。碳-14-标记的1-异硫氰苄基-3-亚甲二氧基三胺五乙酸(MX-DTPA)为用于偶联放射性核素与抗体的示例性螯合剂。(参见W094/11026)。

[0260] 本领域普通技术人员应认识到可将大量可能的部分偶联至本发明的所得抗体。(参加例如“Conjugate Vaccines”, Contributions to Microbiology and Immunology (《“偶联疫苗”,对微生物学和免疫学的贡献》), J.M.Cruse和R.E.Lewis, Jr编, 卡吉尔出版社(Carger Press), 纽约, (1989), 其全部内容通过引用全文纳入本文)。

[0261] 可通过任意能够使两种分子结合的化学反应完成偶联, 前提是抗体和其他部分保持其各自的活性。该连接可包括许多化学机制, 例如共价结合、亲和结合、插层、协同结合和复合。但优选的结合是共价结合。可通过现有侧链的直接缩合或通过外部桥接分子的整合完成共价结合。许多二价或多价连接剂可用于将蛋白分子(如本发明的抗体)偶联至其他分子。例如, 代表性偶联剂可包括有机化合物, 如硫酯、碳二亚胺、琥珀酰亚胺酯、二异氰酸酯、戊二醛、重氮苯和1,6-己二胺。这一列表并不旨在穷尽各种本领域已知的偶联剂类别, 而是较常用偶联剂的示例。(参见Killen和Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen等, Immunological Reviews 62:185-216 (1982); 以及Vitetta等, Science 238:1098 (1987))。

[0262] 文献中描述了优选的接头。(参见例如Ramakrishnan, S.等, Cancer Res. 44:201-208 (1984), 其描述了MBS(间-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)用法)。还可参见美国专利第5,030,719号, 其描述了通过寡肽接头将卤化乙酰肼衍生物与抗体偶联。具体地, 优选接头包括: (i) EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基-丙基)碳二亚胺); (ii) SMPT(4-琥珀酰亚胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基二硫)-甲苯(皮尔斯化学公司(Pierce Chem.Co.), 目录号21558G); (iii) SPDP(琥珀酰亚胺基-6[3-(2-吡啶二硫)丙酰胺基]己酸乙酯, 皮尔斯化学公司(Pierce Chem.Co.), 目录号21651G); (iv) 磺基-LC-SPDP(磺基琥珀酰亚胺基-6[3-(2-吡啶二硫)丙酰胺基]己酸乙酯, 皮尔斯化学公司(Pierce Chem.Co.), 目录号2165-G); 和(v) 偶联至EDC的磺基-NHS(N-羟基磺基-琥珀酰亚胺: 皮尔斯化学公司(Pierce Chem.Co.), 目录号24510)。

[0263] 上文所述接头包含具有不同特性的组分, 从而导致偶联物具有不同的理化特性。例如, 烷基羧化物的磺基-NHS酯比芳香族羧化物的磺基-NHS酯更稳定。包含接头的NHS-酯的溶解性低于磺基-NHS酯。此外, 接头SMPT包含空间位阻的二硫键, 并可形成稳定性增加的偶联物。二硫接头通常不如其他接头稳定, 因为二硫接头会在体外被切割, 导致可用的偶联物较少。磺基-NHS特别能够增强碳二亚胺偶联的稳定性。与磺基-NHS联用时碳二亚胺偶联(如EDC)形成对水解的耐受力大于单独碳二亚胺偶联反应的酯。

[0264] 本文所公开的抗体还可配制为免疫脂质体。可通过本领域已知的方法制备包含抗体的脂质体, 例如Epstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); 以及美国专利第4,485,045和4,544,545号中所

述。美国专利第5,013,556号中公开了循环时间延长的脂质体。

[0265] 可通过反相蒸发方法,利用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG-衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物产生特别有用的脂质体。使脂质体通过孔隙大小确定的滤器挤出,以得到具有所需直径的脂质体。可以如Martin等,J.Biol.Chem.,257:286-288(1982)中所述,通过二硫互换反应将本发明抗体的Fab'片段偶联于脂质体。

[0266] 抗CD47抗体的使用

[0267] 应理解本发明的治疗实体可与整合至制剂中的合适的运载体、赋形剂和其他试剂联合给药,从而提供改善的转移、递送、耐受等。可从所有药物化学家已知的配方中找到许多合适的配方:Remington's Pharmaceutical Sciences《雷明顿药物科学》(第15版,马克出版公司(Mack Publishing Company),宾西马尼亚州伊斯顿,(1975)),特别是其中Blaug,Seymour所著的第87章。这些制剂包括例如粉末、糊剂、油膏剂、凝胶剂、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子)的囊泡(如LipofectinTM)、DNA偶联物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳液、乳液碳蜡(不同分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含碳蜡的半固体混合物。前述混合物中的任意一个均适用于根据本发明的治疗和疗法,前提是制剂中的活性成分并未受制剂影响而失活且该制剂是生理相容的且对给药途径耐受。还可参见Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development:the need for preclinical guidance(药物赋形剂发展:临床前指导的需要)"Regul.Toxicol Pharmacol.32(2):210-8(2000)、Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals(固体蛋白药物的冻干与开发)"Int.J.Pharm.203(1-2):1-60(2000)、Charman WN "Lipids,lipophilic drugs,and oral drug delivery-some emerging concepts(脂质、亲脂性药物和口服药物递送——一些新兴的概念)"J Pharm Sci.89(8):967-78(2000)、Powell等"Compendium of excipients for parenteral formulations(用于胃肠道外配方的赋形剂一览)"PDA J Pharm Sci Technol.52:238-311(1998)并且其中与制剂、赋形剂和运载剂相关的其他信息的文献是药物化学家们熟知的。

[0268] 在一个实施方式中,包括本发明的单克隆抗体的本发明的抗体可用作治疗剂。这类试剂通常用于诊断、预后、监控、治疗、缓和和/或预防对象中异常CD47表达、活性和/或信号传递相关的疾病或病变。通过使用标准方法鉴定患有异常CD47表达、活性和/或信号传递相关的疾病或病症(如癌症或其他肿瘤病症,或有疾病发展风险)的对象(如人类患者),可实施治疗方案。给予对象一种抗体制剂,优选对其靶抗原具有高特异性和高亲和性的制剂,由于其与靶标的结合该制剂通常具有效果。抗体的给药可消除或抑制或干扰靶标(如CD47)的表达、活性和/或信号传递功能。抗体的给药可消除或抑制或干扰靶标(如CD47)与其天然状态下结合的内源性配体(如SIRP α)的结合。例如,抗体与靶标结合并调节、阻断、抑制、降低、拮抗、中和或干扰CD47的表达、活性和/或信号传递。

[0269] 作为非限制性示例,涉及异常的CD47表达、活性和/或信号传递的疾病或病症包括血液癌症和/或固体肿瘤。血液癌症包括例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。作为非限制性示例,白血病的某些形式包括急性淋巴细胞性白血病(ALL);急性骨髓性白血病(AML);慢性淋巴细胞性白血病(CLL);慢性骨髓性白血病(CML);骨髓性增生疾病/肿瘤(MPDS);和脊髓发育不良综合征。作为非限制性示例,淋巴瘤的某些形式包括霍奇金淋巴瘤、无痛性和侵袭性非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤(小细胞和大细胞)。作为非限制性示例,骨髓

瘤的某些形式包括多发性骨髓瘤(MM)、巨细胞骨髓瘤、重链骨髓瘤和轻链或本斯-琼斯骨髓瘤。实体瘤包括例如乳腺癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、黑素瘤、结直肠癌、肺癌、头颈癌、膀胱癌、食道癌、肝癌和肾癌。

[0270] 癌症和其他肿瘤病症相关的症状包括例如炎症、发热、全身不适、发热、疼痛、局部区域经常性发炎(often localized to the inflamed area)、食欲下降、体重下降、水肿、头痛、疲劳、皮疹、贫血、肌无力、肌肉疲劳和腹部症状(例如腹痛、腹泻或便秘)。

[0271] 本发明的抗体的治疗有效量通常涉及达到治疗目标所需的量。如上所述,在某些情况下,抗体及其靶抗原之间的相互作用会干扰靶标的功能。给药所需的量进一步取决于抗体对其特异抗原的结合亲和性,还取决于在接受给药的对象中给予的抗体从自由体积耗尽的速率。作为非限制性示例,本发明的抗体或抗体片段的治疗有效剂量的常见范围为从约0.1mg/kg体重至约100mg/kg体重。常见的剂量频率范围是例如每天两次至每周一次。

[0272] 可连同任意用于诊断或治疗特定炎症相关病症的已知方法确定治疗的有效性。一种或多种炎症相关病症症状的缓解表明抗体具有临床益处。

[0273] 筛选具有所需特异性的抗体的方法包括但不限于酶联免疫吸附试验(ELISA)和其他本领域已知的免疫介导技术。

[0274] 在另一个实施方式中,针对CD47的抗体可用于本领域已知的与CD47定位和/或定量相关的方法中(例如用于测量合适的生理样品中CD47和/或CD47与SIRP α 的水平、用于诊断方法、用于蛋白质成像等)。在特定的实施方式中,包含来源于抗体的抗原结合结构域的特异性针对CD47的抗体或其衍生物、片段、类似物或同源物被用作药物活性化合物(下文称作“治疗”)。

[0275] 在另一个实施方式中,可通过标准方法(如免疫亲和、层析或免疫沉淀)使用CD47特异性的抗体分离CD47多肽。可在诊断中使用针对CD47蛋白(或其片段)的抗体作为临床测试流程的一部分以监控组织中的蛋白水平,从而例如确定特定治疗方案的有效性。将抗体与可检测物质偶联(即物理连接)可利于探测。可检测物质的例子包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适酶的例子包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的例子包括链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素;合适荧光材料的例子包括:伞形花内酯、荧光素、荧光素异硫氰酸酯、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的例子包括鲁米诺;生物发光材料的例子包括:萤光素酶、萤光素和发光蛋白;合适的放射性材料的例子包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

[0276] 而在另一个实施方式中,本发明的抗体可用作检测样品中CD47和/或CD47与SIRP α 蛋白(或其蛋白片段)是否存在的试剂。在一些实施方式中,所述抗体含有可检测标记。抗体是多克隆的,或更优选地,是单克隆的。使用了完整的抗体或其片段(如Fab、scFv或F(ab') $_2$)。关于探针或抗体的术语“标记”,意在包含通过偶联(即物理连接)可检测物质与探针或抗体而对探针或抗体进行的直接标记,和通过与直接标记的另一试剂反应而进行的探针或抗体的间接标记。间接标记的示例包括使用荧光标记的二抗检测一抗和使用生物素标记DNA探针末端使得可使用荧光标记的链霉亲和素对其进行检测。术语“生物样品”旨在包括从对象中分离的组织、细胞和生物液体,以及对象中存在的组织、细胞和生物液体。因此,血液和血液的部分或组分(包括血清、血浆或淋巴)包括在术语“生物样品”的用法中。换言之,本发明的检测方法可用于在体外及体内检测生物样品中的分析物mRNA、蛋白质或基因

组DNA。例如,用于体外检测分析物mRNA的技术包括Northern杂交和原位杂交。用于体外检测分析物蛋白质的技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、Western印迹、免疫沉淀和免疫荧光。用于体外检测分析物基因组DNA的技术包括Southern杂交。进行免疫试验的方法可参见例如“ELISA:Theory and Practice:Methods in Molecular Biology(《ELISA:理论与实践:分子生物学中的方法》)”,卷42,J.R.Crowther编,休曼出版社(Human Press),新泽西州托瓦它,1995;“Immunoassay(《免疫试验》)”,E.Diamandis和T.Christopoulus,学术出版社有限公司(Academic Press Inc.),加利福尼亚州圣地亚哥,1996;以及“Practice and Theory of Enzyme Immunoassays(《酶促免疫测定的实践及理论》)”,P.Tijssen,埃尔斯威尔科学公司(Elsevier Science),阿姆斯特丹,1985。此外,体内检测分析物蛋白质的技术包括将经标记的抗分析物蛋白质抗体导入对象中。例如,可使用放射性标记标记抗体,可通过标准成像技术检测对象中放射性标记的存在和位置。

[0277] CD47抗体的治疗性给药和制剂

[0278] 可将本发明的抗体(本文中也称作“活性化合物”)及其衍生物、片段、类似物和同源物整合至适于给药的药物组合物中。涉及制备这类组合物的原理和考虑以及组分选择的指导见于例如Remington's Pharmaceutical Sciences:The Science And Practice Of Pharmacy(《雷明顿药物科学:药物的科学和实践》)第19版(Alfonso R.Gennaro等编),马克出版公司(Mack Pub.Co.),宾夕法尼亚州伊斯顿,1995;Drug Absorption Enhancement:Concepts,Possibilities,Limitations,And Trends(《药物吸收增强:概念、可能性、限制和趋势》),哈伍德学术出版公司(Harwood Academic Publisher),宾夕法尼亚州兰霍恩,1994;以及Peptide And Protein Drug Delivery(《肽和蛋白质药物递送》)(Advances In Parenteral Sciences,卷4),1991,M.Dekker,纽约。

[0279] 这些组合物通常包括抗体和药学上可接受的运载体。使用抗体片段时,优选能够特异性结合靶蛋白的结合结构域的最小抑制性片段。例如,基于抗体的可变区序列,可设计肽分子使其保留结合靶蛋白序列的能力。可化学合成和/或通过重组DNA技术产生这类肽。(参见例如Marasco等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:7889-7893(1993))。

[0280] 本文所用术语“药学上可接受的运载体”旨在包括与药物给予相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。合适的运载体描述于《雷明顿药物科学》的最新版本中,这是本领域的标准参考资料,其通过引用纳入本文。这类运载体或稀释剂的优选示例包括但不限于水、盐水、林格溶液、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。还可使用脂质体和非水性载剂,如非挥发油。就药学活性物质使用这种介质和试剂为本领域熟知。除非任何常规介质或试剂都与活性化合物不相容,否则应考虑在组合物中使用这些介质或试剂。

[0281] 用于体内给药的制剂必须是无菌的。这可通过无菌滤膜过滤容易地实现。

[0282] 本发明的药物组合物配制为与其预期的给药途径相容。给药途径的示例包括胃肠道外给药,例如静脉内、皮内、皮下、口服(如吸入)、透皮(即局部)、经粘膜和直肠给药。用于胃肠道外、皮内或皮下应用的溶液或悬液可包括以下组分:无菌稀释剂如注射用水、盐水溶液、非挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;和调节张力的物质如氯化钠或右旋糖。pH可用酸或碱调节,例如盐酸或

氢氧化钠。胃肠道外制剂可封装在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0283] 适于注射应用的药物组合物包括无菌水溶液(水溶性时)或分散液,以及用于临时制备无菌注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内给药,合适的运载体包括生理盐水、抑菌水、克列莫佛EM™(新泽西州帕西潘尼的巴斯夫公司(BASF))或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。所有情况下,所述组合物必须无菌,并应该是达到存在易注射性(easy syringability)程度的流体。它在制造和贮存条件下必须是稳定的并且必须保持抵御微生物如细菌和真菌的污染作用。运载体可以是包含水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物的溶剂或分散介质。可维持合适的流动性,例如通过使用诸如卵磷脂的涂覆材料、分散液情况下通过保持所需粒度以及通过使用表面活性剂。也可通过各种抗菌剂和抗真菌剂,如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等实现防止微生物的作用。在许多情况下,组合物中优选包含等张剂,例如糖、多元醇(如甘露醇)、山梨醇、氯化钠。通过组合物中包含延迟吸收的试剂如单硬脂酸铝和明胶能延长可注射组合物的吸收。

[0284] 可将所需量的活性化合物和一种上述组分或其组合根据需要掺入合适溶剂后过滤灭菌,从而制备无菌注射液。通常,将活性化合物掺入含有碱性分散介质和上述其它所需成分的无菌载体中制备分散剂。在用于制备无菌注射液的无菌粉末情况中,制备方法是真空干燥和冷冻干燥,得到由其之前无菌过滤的溶液得到活性组分和任何其它所需组分的粉末。

[0285] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用运载体。它们可包封在凝胶胶囊中或压制成片剂。对于口服治疗给药目的,所述活性化合物可用赋形剂掺入并以片剂、含片或胶囊的形式使用。口服组合物也可使用液体运载体制备以用作漱口水,其中液体运载体中的所述化合物口服使用以及冲刷并吐出或吞咽。药学上可相容的结合剂和/或佐剂物质可作为组合物的一部分包含在内。片剂、丸剂、胶囊、含片等可含有任何以下成分或具有相似特性的化合物:粘合剂例如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂例如淀粉或乳糖,崩解剂例如海藻酸、羧甲基淀粉(Primogel)或玉米淀粉;润滑剂例如硬脂酸镁或完全氢化植物油(Sterotes);助流剂例如二氧化硅胶体;甜味剂例如蔗糖或糖精;或调味剂例如薄荷、水杨酸甲酯、橙调味剂。

[0286] 就吸入给药而言,所述化合物以来自含合适推进剂(例如,如二氧化碳气体)或喷雾剂的受压容器或分配器的气雾剂喷雾形式递送。

[0287] 也可通过经粘膜或透皮方法进行全身给药。对于经粘膜或透皮给药,在制剂中采用适合渗透屏障的渗透剂。该渗透剂通常为本领域已知,并包括例如用于经粘膜给药的去污剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。经粘膜给药可通过使用鼻喷雾或栓剂实现。对于透皮给药,所述活性化合物配制在药膏、软膏、凝胶或霜剂中,如本领域通常已知的那样。

[0288] 还可以栓剂(例如使用常规的栓剂基料,如可可油或其他甘油酯)或滞留灌肠剂的形式制备化合物用于直肠递送。

[0289] 在一个实施方式中,可使用运载体制备所述活性化合物,所述运载体保护所述化合物不被身体快速清除,例如缓释/控释制剂,包括植入和微囊化递送系统。可利用生物可降解的、生物相容的聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这类制剂的方法是本领域技术人员显而易见的。

[0290] 例如,可将活性成分包入微胶囊中,所述微胶囊通过例如凝聚技术或界面聚合制备,例子分别是羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊,或包入胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)或包入乳浊液(macroemulsion)中。

[0291] 可制备缓释制剂。缓释制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半渗透基质,其中该基质是成型制品形式,例如膜或微胶囊。缓释基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚丙交酯(美国专利第3,773,919号)、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物(如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林组成的可注射微球))以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够在超过100天中释放分子,但某些水凝胶能在较短时间内释放蛋白质。

[0292] 所述材料还可购自阿尔扎公司(Alza Corporation)和诺华制药股份有限公司(Nova Pharmaceuticals, Inc.)。也可使用脂质体悬液(包括以抗病毒抗原的单克隆抗体靶向感染细胞的脂质体)作为药学上可接受的运载体。这些可按本领域技术人员已知的方法制备,例如,如美国专利第4,522,811号中所述。

[0293] 尤其有益处的是配制成单位剂型的口服或肠道外组合物以便于给药和使剂量均一。本文所用的单位剂量形式指作为单一剂量用于待治疗对象的物理离散单位,每个单位包含预定量的活性化合物与所需药物运载体,该预定量经计算能够产生所需治疗效果。本发明单位剂型的具体规格受制于并直接取决于所述活性化合物的独特特点和需要达到的具体治疗效果,以及对这类活性化合物进行复合以进行个体治疗的本领域固有限制。

[0294] 所述药物组合物可与给药说明书一同包括在容器、包装或分配器内。

[0295] 根据所治疗特定适应症的需要,所述制剂也可含有一种以上活性化合物,优选相互间不会产生不良影响的具有补充活性的化合物。或者或此外,所述组合物可包括增强其功能的试剂,例如细胞毒剂、细胞因子、化疗剂或生长抑制剂。这种分子适合以有效用于所需目的的用量联合存在。

[0296] 在一个实施方式中,连同疗法给予所述活性化合物,即与用于治疗病理性疾病或病症(如各种类型的癌症、自身免疫性疾病和炎症性疾病)的其他试剂(如治疗剂)联用。术语“连同”在上下文中表示基本同时给予试剂,可同时给予或顺序给予。如果顺序给予,在第二化合物给药开始时,两种化合物中的第一种优选在治疗位点仍存在可检测的有效浓度。

[0297] 例如,联合疗法可包括本发明的一种或多种抗体并与一种或多种其他治疗剂共同配置和/或共同给药,例如一种或多种细胞因子和生长因子抑制剂、免疫抑制剂、消炎剂、代谢抑制剂、酶抑制剂和/或细胞毒剂或细胞生长抑制剂,如下文中更详细的描述。这类联合疗法优选能够采用较低剂量的所给予治疗剂,从而避免了多种单一疗法相关的潜在毒性或并发症。

[0298] 优选的与本发明的抗体联用的治疗剂是那些在炎症反应的不同阶段进行干扰的试剂。在一个实施方式中,本文所述一种或多种抗体可与一种或多种其他试剂共同配置和/或共同给药,如细胞因子或生长因子拮抗剂(如可溶的受体、肽抑制剂、小分子、配体融合物);或结合其他靶标的抗体或其抗原结合片段(如结合其他细胞因子或生长因子的抗体、其受体或其他细胞表面分子);以及抗炎细胞因子或其激动剂。

[0299] 在其他实施方式中,本发明的抗体被用作疫苗佐剂以对抗自身免疫性疾病、炎性疾病等。用于治疗这些类型疾病的佐剂组合适用于与涉及自体免疫的来自靶向自体抗原(即自身抗原)的多种抗原联用,例如髓磷脂碱性蛋白;炎性自体抗原(如淀粉样蛋白)或移植抗原(如同种抗原)。所述抗原可包括来源于蛋白质的肽或多肽,以及以下任意物质的片段:多糖、蛋白质、多核苷酸或寡核苷酸、自身抗原、淀粉样蛋白、移植抗原、变应原或其他大分子组分。在一些情况下,抗原组合中包括超过一种抗原。

[0300] 其他疗法的设计和产生

[0301] 根据本发明并基于本发明所产生并鉴定的抗体对于CD47的活性,容易设计超出抗体部分的其他治疗形式。这类形式包括但不限于高级抗体疗法(如双特异性抗体、免疫毒素和放射性标记疗法)、肽疗法、基因疗法、特别是胞内抗体、反义疗法和小分子的制备。

[0302] 例如,关于双特异性抗体,可制备双特异性抗体使其包括(i)两种抗体——一种对CD47具有特异性且另一种对偶联在一起的第二种分子具有特异性,(ii)一种单一抗体,其一条链对CD47具有特异性且第二条链对第二种分子具有特异性,或者(iii)对CD47和第二种分子具有特异性的单链抗体。可使用熟知的技术制备这类双特异性抗体,例如关于(i)和(ii)参见例如Fanger等,Immunol Methods 4:72-81(1994)和Wright等,Crit,Reviews in Immunol.12:125-168(1992),关于(iii)参见例如Traunecker等,Int.J.Cancer (Suppl.) 7:51-52(1992)。

[0303] 关于免疫毒素,可使用本领域中熟知的技术对抗体进行修饰使其以免疫毒素的形式发挥作用。参见例如Vitetta Immunol Today 14:252(1993)。还可参见美国专利第5,194,594号。关于放射性标记抗体的制备,也可利用本领域中熟知的技术容易地制备这类经修饰的抗体。参见例如Junghans等,Cancer Chemotherapy and Biotherapy(《癌症化疗和生物治疗》),655-686(第二版,Chafner和Longo编,林普科特瑞文出版社(Lippincott-Raven), (1996))。也可参见美国专利第4,681,581、4,735,210、5,101,827、5,102,990(RE 35,500)、5,648,471和5,697,902号。每种免疫毒素和放射性标记的分子均可能杀死表达CD47的细胞。

[0304] 关于治疗肽的产生,通过利用CD47及其抗体相关的结构信息(如本发明的抗体或肽文库的扫描),可制备针对CD47的治疗肽。肽疗法的设计和筛选见述于Houghten等,Biotechniques 13:412-421(1992)、Houghten PNAS USA 82:5131-5135(1985)、Pinalla等,Biotechniques 13:901-905(1992)、Blake和Litzi-Davis BioConjugate Chem.3:510-513(1992)。也可使用类似方法制备免疫毒素和放射性标记的分子,这与上文讨论的关于抗体的肽部分相关。假定CD47分子(或一种形式,如剪接变体或替代形式)在疾病过程中具有功能活性,则可能通过常规技术设计其基因和反义疗法。这类形式可用于调节CD47的功能。与此有关的本发明的抗体促进了与之相关的功能试验的设计和使用。国际专利申请号W0 94/29444中详细讨论了反义疗法的设计和策略。基因疗法的设计和策略是熟知的。然而,具体而言,使用涉及胞内抗体的基因治疗技术被证明尤其有效。参见例如Chen等,Human Gene Therapy 5:595-601(1994)和Marasco Gene Therapy 4:11-15(1997)。国际专利申请号W0 97/38137中也讨论了基因疗法相关的总体设计和考虑。

[0305] 从CD47分子的结构及其与本发明的其他分子(如SIRP α 和/或本发明的抗体)相互作用以及其他方面所获得的知识可用于合理地设计其他治疗形式。关于这一点,可使用合

理的 药物设计技术 (如X射线结晶、计算机辅助 (或协助) 的分子建模 (CMM)、定量或定性的结构活性关系 (QSAR) 和类似技术) 以集中药物发现的努力。合理的设计能够预测蛋白质或合成结构, 所述蛋白质或合成结构能够与可用于修饰或调节IL-6Rc活性的分子或其特定形式相互作用。可化学合成或在生物系统中表达这类结构。该方法综述于Capsey等, Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs (《遗传工程改造的人类治疗药物》) (斯托克顿出版社 (Stockton Press), 纽约, 1988)。此外, 可设计并合成联合文库, 并将其用于筛选程序, 如高通量筛选工作。

[0306] 筛选方法

[0307] 本发明提供了鉴定调节或干扰CD47与SIRPα结合的调节物质 (即候选或测试化合物或试剂 (如肽、肽模拟物、小分子或其他药物)) 或调节或干扰CD47和/或CD47-SIRPα信号传递功能的候选或测试物质或试剂的方法 (本文中也称作“筛选试验”)。还提供了鉴定用于治疗异常CD47和/或CD47-SIRPα表达、活性和/或信号传递相关疾病的方法。所述筛选方法可包括本领域中已知或使用或本文所述的那些方法。例如, 可将CD47固定在微量滴定板上并在SIRPα存在的条件下与候选或测试化合物 (如CD47抗体) 孵育。随后使用二抗检测结合的SIRPα, 可在酶标仪上检测吸光度。

[0308] 还提供了鉴定能够促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的化合物的方法。这些方法可包括本领域中已知或使用或本文所述的那些方法。例如, 在候选化合物 (如CD47抗体) 存在的情况下将巨噬细胞与经标记的肿瘤细胞孵育。一段时间后, 可观察巨噬细胞对于肿瘤标记的内化以鉴定吞噬作用。实施例中提供了关于这些方法的其他细节, 如SIRPα阻断试验和吞噬作用试验。

[0309] 本发明还包括本文所述筛选试验中鉴定到的化合物。

[0310] 在一个实施方式中, 本发明提供了筛选调节CD47的信号传递功能的候选或测试化合物的试验。可使用本领域已知的组合文库法的多种方法中任意一种获得本发明的测试化合物, 包括: 生物文库; 空间可寻址的平行固相或溶液相文库; 需要卷积的合成文库法; “一珠一化合物 (one-bead one-compound)” 文库法; 以及使用亲和层析选择的合成文库法。生物文库方法限制在肽文库, 而其他四种方法适用于肽、非肽寡聚体或小分子化合物文库。(参见例如Lam, 1997. Anticancer Drug Design 12:145)。

[0311] 本文所用“小分子”表示一种组合物, 其分子量低于约5kD且最优选低于约4kD。小分子可以是例如核酸、肽、多肽、肽模拟物、碳水化合物、脂质或其他有机或无机分子。化学和/或生物混合物 (如真菌、细菌或藻类抽提物) 的文库是本领域已知的并可使用本发明的任意试验筛选。

[0312] 用于分子文库合成的方法示例可在本领域中找到, 例如: DeWitt等, 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6909; Erb等, 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:11422; Zuckermann等, 1994. J. Med. Chem. 37:2678; Cho等, 1993. Science 261:1303; Carrell等, 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carrell等, 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; 以及Gallop等, 1994. J. Med. Chem. 37:1233。

[0313] 化合物的文库可存在于溶液中 (参见例如Houghten, 1992. Biotechniques 13:412-421)、或珠上 (参见Lam, 1991. Nature 354:82-84)、芯片上 (参见Fodor, 1993. Nature 364:555-556)、细菌中 (参见美国专利第5,223,409号)、孢子中 (参见美国专利5,233,409)、

质粒中(参见Cull等,1992.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:1865-1869)或噬菌体上(参见Scott和Smith,1990.Science 249:386-390;Devlin,1990.Science 249:404-406;Cwirla等,1990.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.87:6378-6382;Felici,1991.J.Mol.Biol.222:301-310;以及美国专利第5,233,409号)。

[0314] 在一个实施方式中,将候选化合物导入抗体-抗原复合物中并确定候选化合物是否破坏了抗体-抗原复合物,其中该复合物被破坏表明候选化合物调节了CD47的信号传递功能和/或CD47与SIRP α 之间的相互作用。在另一个实施方式中,提供了本发明的可溶性CD47和/或CD47与SIRP α 蛋白并将其暴露于至少一种中和性单克隆抗体。检测了抗体-抗原复合物的形成并将一种或多种候选化合物导入复合物中。如果导入一种或多种候选化合物后抗体-抗原复合物被破坏,则该候选化合物可用于治疗异常CD47和/或CD47-SIRP α 信号传递相关的疾病。

[0315] 确定测试化合物干扰或破坏抗体-抗原复合物的能力的方法可以是,例如将测试化合物与放射性同位素或酶促标记偶联,使得可以通过检测复合物中的标记化合物确定测试化合物与抗原或其生物活性部分的结合。例如,可用 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^3H 直接或间接标记测试化合物,并通过放射性发射直接计数或通过闪烁计数检测。或者,可使用例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或荧光素酶酶促标记测试化合物,并通过确定合适底物至产物的转化检测酶促标记。

[0316] 在一个实施方式中,所述试验包括使测试化合物接触抗体-抗原复合物并确定测试化合物与抗原相互作用或破坏现有抗体-抗原复合物的能力。在该实施方式中,确定测试化合物与抗原相互作用和/或破坏抗体-抗原复合物的能力包括确定测试化合物与抗体相比优先结合抗原或其生物活性部分的能力。

[0317] 在另一个实施方式中,所述试验包括使测试化合物接触抗体-抗原复合物并确定测试化合物调节抗体-抗原复合物的能力。可通过例如确定在测试化合物存在的条件下抗原结合抗体或与之相互作用的能力来确定测试化合物调节抗体-抗原复合物的能力。

[0318] 本领域技术人员应认识到,在本文所公开的任意筛选方法中,所述抗体可以是调节或干扰CD47活性和/或信号传递的中和性抗体。

[0319] 本文所公开的筛选方法可以基于细胞的试验或无细胞的试验方式进行。本发明的无细胞试验适用于可溶形式或膜结合形式的CD47及其片段。在包括膜结合形式的CD47的无细胞试验中,需要利用增溶剂使得膜结合形式的蛋白质维持在溶液中。这类增溶剂的示例包括非离子型去垢剂,如正辛基葡糖苷、正十二烷基葡萄糖苷、正十二烷基麦芽糖苷、辛酰-N-甲基葡糖酰胺、癸酰-N-甲基葡糖酰胺、曲通X-100、曲通X-114、Thesit[®]、异十三烷基聚(乙二醇酯)_n、N-十二烷基-N,N-二甲基-3-氨基-1-丙烷磺酸盐、3-(3-胆酰胺丙基)二甲基氨基-1-丙烷磺酸盐(CHAPS)或3-(3-胆酰胺丙基)二甲基氨基-2-羟基-1-丙烷磺酸盐(CHAPSO)。

[0320] 在超过一种实施方式中,需要固定抗体或抗原以在导入候选化合物后促进一种或全部两种复合形式与未复合形式的分离,以及适应试验的自动化。可在适于包含反应物的任意容器内完成存在或不存在候选化合物时对抗体-抗原复合物的观察。这类容器的示例包括微量滴定板、试管和微量离心管。在一个实施方式中,提供了融合蛋白,其添加了使得一种或全部两种蛋白与基质结合的结构域。例如,可将GST-抗体融合蛋白或GST-抗原融合

蛋白吸附到谷胱甘肽琼脂糖珠(西格玛化学公司(Sigma Chemical),密苏里州圣路易斯)或谷胱甘肽衍生的微量滴定板上,随后将其与测试化合物混合并将混合物在有利于复合物形成的条件下(如在生理的盐和pH条件下)孵育。孵育后,清洗珠或微量滴定板孔以除去所有未结合的组分,在珠存在的情况下基质被固定,即可直接或间接地确定复合物。或者,可将复合物与基质解离,可使用标准技术确定抗体-抗原复合物形成的水平。

[0321] 本发明的筛选试验中还可使用其他将蛋白固定在基质上的技术。例如,可利用生物素与链霉亲和素的偶联固定抗体(如2A1抗体,或具有选自SEQ ID NO:5-30的可变重链和选自SEQ ID NO:31-47的可变轻链的抗体)或抗原(如CD47蛋白)。可使用本领域中熟知的技术(如伊利诺斯州罗克福德的皮尔斯化学品公司(Pierce Chemicals,Rockford,Il1)的生物素化试剂盒)从生物素-NHS(N-羟基-琥珀酰亚胺)制备生物素化的抗体或抗原分子,并且固定于链霉亲和素包被的96孔板的孔内(皮尔斯化学品公司)。或者,可以将其他与感兴趣的抗体或抗原有反应性但不干扰感兴趣的抗体-抗原复合物形成的抗体衍生至平板的孔中,并通过抗体偶联将未结合的抗体或抗原截留在孔中。除了上文所述用于GST固定化复合物的方法外,检测这类复合物的方法还包括使用其他与抗体或抗原有反应性的抗体对复合物进行免疫检测。

[0322] 本发明还涉及前述筛选试验中任一个鉴定到的全新试剂和如本文所述这些试剂在治疗中的用途。

[0323] 诊断和预防制剂

[0324] 本发明的CD47MAb用于诊断和预防制剂。在一个实施方式中,将本发明的CD47 Mab给予具有罹患一种或多种前述疾病(包括但不限于癌症或其他肿瘤病症)风险的患者。可使用基因型、血清或生物化学标记确定患者或组织对前述癌症或其他肿瘤病症的倾向性。

[0325] 在本发明的另一个实施方式中,将CD47抗体给予经诊断具有一种或多种前述疾病(包括但不限于癌症或其他肿瘤病症)相关临床症状的人个体。诊断后,给予CD47抗体以减轻或反转一种或多种前述疾病相关临床症状的效果。

[0326] 本发明的抗体还用于检测患者样品中的CD47和/或SIRP α 并因此可用于诊断。例如,本发明的CD47抗体用于体外试验(如ELISA)以检测患者样品中的CD47和/或SIRP α 水平。

[0327] 在一个实施方式中,本发明的CD47抗体固定在固体支持物(如微量滴定板的孔)上。固定的抗体作为捕捉抗体,捕捉测试样品中可能存在的任何CD47和/或SIRP α 。在使固定的抗体接触患者样品前,清洗固相载体并使用封闭试剂(如牛奶蛋白或白蛋白)处理以避免分析物的非特异性吸附。

[0328] 随后使用可能含有抗原的测试样品或使用含有标准量抗原的溶液处理所述孔。这类样品是例如来自对象的血清样品,其可能具有被认为可诊断某一病变的循环抗原水平。洗去测试样品或标准品后,使用可检测标记的二抗处理固相支持物。标记的二抗用作检测抗体。测量可检测标记的水平,通过与标准样品所建立的标准曲线进行比较确定测试样品中CD47和/或SIRP α 的浓度。

[0329] 应理解基于使用本发明的CD47抗体在体外诊断试验中获得的结果,有可能基于CD47和/或SIRP α 的表达水平对对象的疾病进行分级(例如与缺血、自身免疫性或炎性疾病相关的临床症状)。对于特定的疾病,从被诊断处于疾病发展的多个阶段和/或处于疾病治疗的多个点上的对象中提取血液样品。使用对发展或疗法的各阶段提供统计显著性结果的

样品群体,确定了被认为是各阶段特征的抗原浓度范围。

[0330] 本文引用的所有出版物和专利文献都通过引用纳入本文,就好像每个所述出版物或文献都特定和单独表示通过引用纳入本文。对上述出版物和专利文献的引用并不表示承认上述任何内容是相关的在先技术,也并不表示承认其内容或日期。现在,本发明已以书面说明书方式描述,本领域技术人员应认识到可以多种实施方式实践本发明,而上文的说明书和下文的实施例旨在说明而非限制本发明的权利要求。

实施例

[0331] 提供以下实施例,包括执行的实验和获得的结果,仅用于说明目的,并且不构成对本发明的限制。

[0332] 实施例1:CD47抗体的制备和选择

[0333] 通过使用代表CD47-IgV(免疫球蛋白样可变型)重组蛋白免疫小鼠、在多个位点使用改进的快速免疫策略产生CD47抗体(Kilpatrick等(1997) Rapid development of affinity matured monoclonal antibodies using RIMMS(使用RIMMS进行的亲和成熟单克隆抗体的快速开发),Hybridoma 16,381-389)。此外,免疫组中一半的小鼠接受单一的抗小鼠GITR激动剂抗体DTA-1注射。免疫方案后,收集并解离来自所有小鼠(DTA-1处理和未处理)的淋巴结,从而驱动B细胞分离并随后融合到小鼠骨髓瘤细胞系。通过ELISA和通过流式细胞术在道迪(ATCC#CCL-213)细胞上就结合CD47筛选杂交瘤上清(图1A)。还就阻断CD47-SIRP α 相互作用的能力分析杂交瘤上清(图1B)。将重组CD47固定在Medisorp(NUNC)微量滴定板上并随后在融合到人IgG Fc结构域的重组人SIRP α -ECD存在的条件下与杂交瘤上清孵育。使用HRP偶联的抗人IgG Fc特异性二抗(杰生免疫研究实验室(Jackson Immuno Research))检测结合的SIRP α ,并在酶标仪中检测650nm处的吸光度。

[0334] 实施例2:CD47抗体的表征

[0335] 本发明的示例性鼠CD47抗体示于图2。在拉吉(ATCC#CCL-86)(图2A)和CCRF-CEM(ATCC#CCL-119)(图2B)细胞上通过流式细胞术对SIRP α 阻断CD47抗体进行亲和排序。使用FITC偶联的抗小鼠IgG二抗(杰生免疫研究实验室(Jackson ImmunoResearch))检测结合的CD47抗体。本领域已知的CD47抗体B6H12被包括作为阳性对照(参见例如美国专利5,057,604)。在图2B中,B6H12和2D3(已知市售可得的非SIRP α 阻断抗体)均与本发明产生的抗体比较。与B6H12和2D3抗体相比,本发明的抗体对内源(细胞表面)形式的CD47表现出更高的亲和性。

[0336] 实施例3:CD47抗体的SIRP α 阻碍活性

[0337] 通过ELISA测量了CD47抗体的SIRP α 阻断效力,其中将重组His-标签-CD47-IgV固定在Medisorp微量滴定板上。在CD47抗体量增加的条件监控融合至人IgG的Fc结构域的重组SIRP α 的结合。使用HRP偶联的抗人IgG(Fc特异性)(杰生免疫研究实验室(Jackson ImmunoResearch))二抗确定结合的SIRP α 。与B6H12抗体相比,本发明的抗体显示出增强的SIRP α 阻断效力。图3A显示了基于ELISA的SIRP α 阻断试验的代表性数据。

[0338] 通过流式细胞术分析了CD47抗体阻断重组SIRP α 结合至细胞表面CD47的能力。CCRF-CEM(ATCC#CCL-119)细胞用作试验中CD47的来源,并且在CD47抗体量增加的条件监控融合至人IgG的Fc结构域的重组SIRP α 的结合。使用APC偶联的抗人IgG(Fc特异性)(杰生

免疫研究实验室(Jackson ImmunoResearch))二抗确定结合的SIRP α (图3B)。B6H12和市售可得的非SIRP α 阻断CD47抗体2D3被分别用作阳性和阴性对照。

[0339] 实施例4:CD47抗体介导的同型相互作用

[0340] 分析了SIRP α 阻断CD47抗体诱导CD47阳性细胞之间发生细胞聚集(又称同型相互作用)的能力。道迪和拉吉细胞被用作候选的表达CD47的细胞系。在所检测的抗体中,本发明的2A1抗体是仅有的不促进表达CD47的细胞发生同型相互作用的SIRP α 阻断抗体。

[0341] 实施例5:CD47抗体的血凝反应活性

[0342] 同型相互作用的一个例子是血凝反应,如RBC凝集。通过观察抗体避免人RBC发生沉降的能力就RBC凝集对CD47抗体进行筛选。出乎意料的是,发现在其他CD47抗体中2A1抗体是独特的,其无法促进血凝反应,同时具有高亲和性和阻断SIRP α 的能力。其他显示出降低的血凝反应的抗体无法阻断SIRP α 结合至CD47。

[0343] 为评估CD47抗体的引发血凝反应的能力,将人RBC在PBS中稀释至10%并在37℃孵育2-6小时,将CD47抗体滴定在圆底96孔板中。存在未固定的RBC表明有血凝反应的迹象,与未发生血凝反应的RBC的清晰红点相比,发生血凝反应的RBC的外观模糊。出乎意料的是,如图4A所示,本发明的CD47抗体,尤其是在本文中被称作2A1的抗体,未表现出血凝反应活性。该图显示了血凝反应试验的定量结果,通过对存在抗体时RBC小球的面积进行定量并相对于不存在抗体时测得的数据进行标准化,确定了“血凝反应指数”。

[0344] 在所有测试浓度下,鼠9E4抗体引起了最显著的血凝反应。因此,虽然9E4抗体结合CD47并阻断了CD47与SIRP α 的相互作用,但9E4抗体引起显著的血凝反应。

[0345] 下面提供了9E4抗体的VH链区。

[0346] EVQLRQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYMYWVKQSRVRS^{LA}WIGRINPYTGATGYDQNF^{KA}KDSLIVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARGNRYDGWFAYWGQGT^{LV}TV (SEQ ID NO:78)

[0347] 下面提供了9E4抗体的VL链区。

[0348] EI^QMTQT^TSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFCQQGNALPPTFGGGTNLEIK (SEQ ID NO:79)

[0349] 对照抗体B6H12引起的血凝反应符合对SIRP α 阻断CD47抗体的预期。

[0350] 为研究2A1抗体的无血凝反应活性的独特性,在RBC血凝反应试验中筛选了多种其他CD47抗体(图4B)。该试验中包括了2A1抗体的嵌合形式(2A1-xi),其由鼠2A1的可变重链区、鼠2A1的可变轻链区(在氨基酸106位置有修饰,即M106I)和人IgG1和人Ig κ 的恒定区组成。表1提供了2A1抗体和2A1-xi抗体的VH和VL区序列。抗体在12.5、25、50和100nM浓度下测试。出乎意料的是,在图4B所测试的CD47抗体中2A1是罕见的,原因在于其是图4B中唯一血凝反应活性不存在或下降的抗体。图4E显示2A1、嵌合2A1(2A1-xi)和人源化变体不会导致血凝反应。

[0351] 图4C显示了在RBC血凝反应试验中筛选其他CD47抗体的结果。如图4C所示,不阻断SIRP α 的市售可得的CD47单克隆抗体2D3不会引起血凝反应。然而,阻断SIRP α 的其他市售可得的CD47抗体(如CC2C6、BRC126和B6H12)引起血凝反应(图4C)。因此,在本发明之前,现有的阻断SIRP α 的抗体引起血凝反应,而现有的不阻断SIRP α 的抗体(如2D3)不会引起血凝反应。总之,在现有的CD47抗体中,本发明的抗体(如2A1抗体及其人源化衍生物)是独特的,其具有阻断SIRP α 但不引起血凝反应的能力。

[0352] 在血凝反应试验中重新测试了高浓度范围的所选CD47抗体(图4D)。该试验揭示了B6H12和9E4所引起的血凝反应的前区效应(pro-zone effect),其中血凝反应在所测试浓度范围的高和低末端均有下降。血凝反应指数的示意图也强调了前区效应。前区效应在图4C和4E中也很明显。重要的是,在所有浓度下小鼠2A1和嵌合2A1CD47抗体均缺乏血凝反应活性。

[0353] 如图4E所示,鼠1B4抗体显示出狭窄的血凝反应范围。

[0354] 下面提供了1B4抗体的VH链区。

[0355] QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIHVVKQRPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNERFKGKALTATVATSSSTAYMQLSSLTSEDYAVYFCARREEDYFDYWGQGLTVTV (SEQ ID NO:80)

[0356] 下面提供了1B4抗体的VL链区。

[0357] DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLTWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDFRTGSGSGTDFTLTITSSVKAEDLAVYYCQQYYSYPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO:81)

[0358] 如上所述测试了来源于鼠2A1的人源化抗体的血凝反应能力。重要的是,多种人IgG同种型(IgG1、IgG4-S228P和IgG4-S228P/L235E)中的代表性人源化抗体AB6.12不会引起任何RBC血凝反应。包括2A1和2A1-xi用作无血凝反应抗体的对照,而包括B6H12和9E4用作血凝反应的阳性对照(图4F)。

[0359] 实施例6:结合至猕猴CD47

[0360] 评估了鼠2A1结合至猕猴(cyno)CD47的能力。B6H12抗体先前已被报道与猕猴CD47抗体存在交叉反应并在试验中被用作证明猕猴CD47抗体存在的阳性对照。设计了测量2A1与猕猴CD47结合的实验以比较猕猴B细胞与人细胞上2A1和CD47的结合,其中拉吉细胞系用作人CD47阳性细胞。通过菲科帕克(ficoll-paque)梯度离心从猕猴全血中分离猕猴外周血单核细胞(PBMC)。以10 μ g/ml使用人CD20抗体奥法木单抗(Arzerra)标记猕猴和人B细胞(拉吉),并将其与鼠CD47抗体2A1或B6H12的稀释系列反应。使用偶联至DyLite 649的多克隆抗人抗体检测使用人CD20抗体标记的B细胞,同时使用联至DyLite 488的多克隆抗小鼠抗体检测CD47鼠抗体。通过流式细胞术分析细胞,首先通过FSC和SSC在活细胞上选,随后在对FL4阳性(CD20阳性)的细胞上,最后测量中值FL1(CD47阳性)。在各细胞群体上,通过将各浓度下的信号除以各抗体的最大信号,对数据进行标准化。图5中显示的标准化结果表明2A1不与猕猴CD47发生交叉反应且具有与人CD47相同的亲和性。与上文显示的结果一致,B6H12对拉吉和猕猴B细胞上的细胞表面CD47的亲和性低于本发明的抗体。

[0361] 实施例7:嵌合抗体制备

[0362] 为鉴定鼠2A1抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的序列,从杂交瘤中分离核糖核酸(RNA)并在反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)(Phusion RT-PCR试剂盒,热科学公司(Thermo Scientific))中使用其制备第一条链cDNA。PCR中使用了覆盖完整的鼠抗体VH和VL前导序列的退行性引物组,其中第一条链cDNA用作模板。

[0363] 下面提供了正向引物(鼠IgG前导)。

名称	序列
VH1-1	CACTGCAGGTRTCCACTCC (SEQ ID NO: 82)
VH1-2	CATAGCAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 83)
VH1-3	CRCTACAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 84)
VH1-4	GCTACAGMTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 85)
VH1-5	CACTGCAGGTGTCCWMTCC (SEQ ID NO: 86)
VH1-6	CRCTRCAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 87)
VH1-7	GCTAWMGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 88)
VH1-8	CCTCAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 89)
VH1-9	GCTACAGGTGCTCACTCC (SEQ ID NO: 90)
[0364] VH1-10	CACTGCAGGTGTCCTCTCT (SEQ ID NO: 91)
VH1-11	CAYTGCAGGTGTCCAYTGC (SEQ ID NO: 92)
VH1-12	GCTAMMGGTGTCCACTTC (SEQ ID NO: 93)
VH1-13	CTCCTGTCAKTAACKCAGGT (SEQ ID NO: 94)
VH1-14	CAACTGCAGGTGTCTCTCT (SEQ ID NO: 95)
VH1-15	CRCTRCAGGYGTCCACTCT (SEQ ID NO: 96)
VH2-1	CCAAGCTGTATCCTTTCC (SEQ ID NO: 97)
VH2-2	CCAAGCTGTGTCCTRTCC (SEQ ID NO: 98)
VH3-1	CTTGACAGYCVTTCKGGT (SEQ ID NO: 99)
VH3-2	CTTCACAGCCTTTCCTGGT (SEQ ID NO: 100)
VH4	CTTAAAAGGGGTCCAGTGT (SEQ ID NO: 101)

	VH5-1	CAYTTTAAAAARGTGTCMAGTGT (SEQ ID NO: 102)
	VH5-2	GTTTTAAAAGGTGTCCTGTG (SEQ ID NO: 103)
	VH6	CTYTTAAAAGGKGTCAGWG (SEQ ID NO: 104)
	VH7-1	CYTTTAMATGGTATCCAGTGT (SEQ ID NO: 105)
	VH7-2	CTTTTACATGGTTTCAAGTGT (SEQ ID NO: 106)
[0365]	VH8	GTCCCTGCATATGTCYT (SEQ ID NO: 107)
	VH9	GATGGCAGCWGCYCAAAG (SEQ ID NO: 108)
	VH10	CTATCAAGGTGTGCATTGT (SEQ ID NO: 109)
	VH11	CTTTTAAAAGWTGTCCAGKGT (SEQ ID NO: 110)
	VH12	GTGACAGTCCTTCCTGGTAG (SEQ ID NO: 111)
	VH14	CTTCCTGATGGCAGTGGTT (SEQ ID NO: 112)
	VH15	GCTACAGGTATCCAATCC (SEQ ID NO: 113)
	[0366] 下面提供了反向引物(鼠IgG恒定)。	
[0367]	名称	序列
[0368]	HC-Rev	GCGTCTAGAAAYCTCCACACACAGGRRCCAGTGGATAGAC (SEQ ID NO:114)
[0369]	下面提供了正向引物(鼠Ig κ 前导)。	
	名称	序列
	VK1-1	CTGWTGTTCTGGATTCCTG (SEQ ID NO: 115)
	VK1-2	GGTCAGACAGTCAGCAGT (SEQ ID NO: 116)
	VK2	GTGCTCTGGATTCGGGAA (SEQ ID NO: 117)
	VK4/5-1	CAGCTTCYTGCTAATCAGTG (SEQ ID NO: 118)
[0370]	VK4/5-2	CTAATCAGTGCTTCAGGA (SEQ ID NO: 119)
	VK8-1	GTGGGTATCTGGTRCSTGTG (SEQ ID NO: 120)
	VK8-2	GGAAATTTAAAAGTACCTGTGGG (SEQ ID NO: 121)
	VK9A/9B-1	GGTTTCMAGGTRCCAGATGT (SEQ ID NO: 122)
	VK9A/9B-2	CTCTGGTTYCCAGGTATC (SEQ ID NO: 123)
	VK10	CTGTTTTCAAGGTRCCAGATGT (SEQ ID NO: 124)

	VK11	GTTGTAATGTCCAGAGGA (SEQ ID NO: 125)
	VK12/13-1	CTTACAGGTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 126)
	VK12/13-2	CTCAATTGTAGRTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 127)
	VK12/13-3	CACAGTAGGTGTCAGATGT (SEQ ID NO: 128)
	VK12/13-4	GTCGTAGTTGTCAGATGT (SEQ ID NO: 129)
	VK12/13-5	CCTCCTTCTTGGCCAAGA (SEQ ID NO: 130)
	VK19/28-1	CTTATATGGAGCTGATGGG (SEQ ID NO: 131)
	VK19/28-2	GTGTCTGGTGCTCATGGG (SEQ ID NO: 132)
	VK19/28-3	CTSTGGTTGTCTGGTGTGA (SEQ ID NO: 133)
	VK20	GTCTCTGATTCTAGGGCA (SEQ ID NO: 134)
[0371]	VK21-1	CTKCKCTGGGTTCCAG (SEQ ID NO: 135)
	VK21-2	GCAGGTGTTGACGGA (SEQ ID NO: 136)
	VK22-1	CAGGTGCCTCGTGAC (SEQ ID NO: 137)
	VK22-2	CTCTGGTGCTGTGCA (SEQ ID NO: 138)
	VK23	CTGGAYTYCAGCCTCCAGA (SEQ ID NO: 139)
	VK24/25-1	GWTCTCTRGAGTCAGTGGG (SEQ ID NO: 140)
	VK24/25-2	CTGGATCCCTGGAKCYACT (SEQ ID NO: 141)
	VK32	GTTCTGCTTTTTAGGTGTG (SEQ ID NO: 142)
	VK33/34	GATCCCAGGCATGATATGT (SEQ ID NO: 143)
	VK31/38C	CTTCATGGTGCTCAGTGT (SEQ ID NO: 144)
	VKRF	CCATATCAGGTGCCCAGTGT (SEQ ID NO: 145)

[0372] 下面提供了反向引物(鼠Ig κ 恒定)。

[0373] 名称 序列

[0374] LC-rev GCGTCTAGAACTGGATGGTGGAAGATGG (SEQ ID NO: 146)

[0375] 随后将扩增的VH和VL框内克隆至分别包含适当抗体分泌序列和人IgG1和Ig κ 恒定区的载体中以制备鼠:人嵌合DNA构建。将这些构建共转染至293Freestyle细胞(生命技术公司(Life Technologies))中并通过蛋白A层析从细胞培养液上清中纯化所得的抗体。为确定已鉴定到准确的VH和VL序列,在拉吉细胞上通过流式细胞术和CD47结合试验比较嵌合2A1(命名为2A1-xi)和鼠亲本2A1抗体(图6)。该试验中还包括作为阳性对照的B6H12。使用FITC偶联的抗人IgG二抗检测结合的2A1-xi。使用FITC偶联的抗小鼠IgG二抗检测结合的2A1和B6H12。通过多种抗体浓度下的中值荧光强度的非线性匹配(Prism,图形软件公司(Graphpad Software))确定表观亲和性(表2)。2A1-xi抗体对细胞表面CD47的结合亲和性与鼠2A1抗体类似,这表明已正确地鉴定到VH和VL序列。

[0376] 表2

[0377]		KD (表观) (pM)	标准误	R ²
	2A1-mIgG1	93.6	±10.1	0.9977
	2A1-xi	78	±14.9	0.9922
	B6H12	3786	±310	0.9998

[0378] 实施例8:抗体人源化

[0379] 对鼠2A1CD47抗体进行人源化以降低给予人患者时潜在的免疫原性。将2A1的VH和VL区与IMGT数据库中的人抗体序列比较。随后,使用与蛋白质数据库(PDB)中人源化和人抗体最密切相关的已知结构生成2A1VH和VL区的结构模型。固定2A1抗体的重链和轻链中的3个互补决定区(CDR)并使用多种最有可能维持CDR的合适方向的人框架代替鼠框架。通过基因合成制备各人源化2A1变体对应的构建并将其框内克隆至包含适当分泌序列和人IgG1和Igκ恒定区的载体中。将人源化重链和轻链的多种组合共转染至293Freestyle细胞(生命技术公司(Life Technologies))中并通过蛋白A层析从细胞培养液上清中纯化所得的抗体。

[0380] 通过流式细胞术测试人源化抗体结合拉吉细胞的能力(图7)。在多数这类试验中使用2A1-xi抗体作为对照以设置结合亲和性的基准。进一步最优化人源化抗体以增强表达并减少有问题的位点(包括潜在的异构化和脱酰胺化位点)。来源于鼠2A1抗体的最优化人源化抗体的一个示例被命名为AB6.12抗体,其表现出与2A1-xi抗体非常类似的结合亲和性(图7;表3)。通过多种抗体浓度下的中值荧光强度的非线性匹配(Prism,图形软件公司(Graphpad Software))确定表观亲和性。

[0381] 表3

[0382]		KD (表观) (pM)	标准误	R ²
	2A1-xi	36.4	±8.54	0.9908
	AB6.12	39.9	±5.54	0.9964

[0383] 随后通过取代重链的恒定结构域将AB6.12抗体从IgG1转化为其他人IgG同种型。如图7I所示,将IgG同种型改变为IgG4的铰链稳定形式(IgG4P:S228P)以及还原的铰链稳定IgG4的Fc受体结合变体(IgG4PE:S228P/L235E)不会改变人源化抗体对细胞表面CD47的结合亲和性(图7I;表4)。通过多种抗体浓度下的中值荧光强度的非线性匹配(Prism,图形软件公司(Graphpad Software))确定表观亲和性。

[0384] 表4

[0385]		KD (表现) (pM)	标准误	R ²
	AB6.12-IgG1	38.6	±10.5	0.9798
	AB6.12-IgG4P	35.7	±8.4	0.9841
	AB6.12-IgG4PE	34.6	±10.9	0.9727

[0386] 在人源化过程中,测试CD47抗体以确保SIRPα阻断功能是完整的。如图7J所示,使用上文实施例3中所述基于流式细胞术的方法,人源化抗体AB6.12的多种IgG同种型阻断了SIRPα:CD47相互作用。示例性CD47抗体及其对应的VH区和VL区包括表1中提供的那些。

[0387] 人源化过程中,可以确定在一些实施方式中位于VH CDR3(SEQ ID NO:52或SEQ ID NO:77)开始处的氨基酸序列基序“NA”对本文所述CD47抗体的结合至关重要。在一些实施方

式中,在位于VH CDR3 (SEQ ID NO:52或SEQ ID NO:77) 开始处的氨基酸残基“NA”缺失的情况下,本发明的CD47抗体无法结合其靶标或与其靶标的亲和性低于氨基酸残基“NA”存在时的情形。例如,当“NA”基序变为更典型的“AR”或“AT”基序时,结合大幅度下降(即大于10倍)。在其他实施方式中,在位于VH CDR3 (SEQ ID NO:52或SEQ ID NO:77) 开始处的氨基酸残基“NA”缺失的情况下,本发明的CD47抗体与其靶标的亲和性与氨基酸残基“NA”存在时的情形相当。

[0388] 本领域技术人员应认识到不需要过多的实验就可以确定本发明的CD47抗体序列中的某一氨基酸取代是否会导致该抗体具有基本相同的功能,例如具有阻断SIRP α 且不引起显著的血凝反应的能力的CD47抗体。

[0389] 图8A显示了使用带有superdex200柱的AKTA FLPC获得的来自于尺寸排阻色谱的痕迹的图片。显示了AB6.12抗体的IgG1、IgG4P和IgG4PE变体。所有三种变体均为超过98%的单体。图8B是还原(R)和非还原(NR)条件下2A1的多种人源化变体的考马斯蓝染色的SDS-PAGE胶的照片。

[0390] 实施例9:CD47抗体促进对肿瘤细胞系的吞噬作用

[0391] CD47是一种细胞表面受体,其在肿瘤细胞上上调并还被认为通过与其天然配体SIRP α 发生相互作用促进免疫逃逸。CD47与巨噬细胞上的SIRP α 的连接导致吞噬活性下降。如下文详细叙述,可以确定2A1抗体及其变体的CD47结合和SIRP α 的阻断活性是否在人巨噬细胞存在的情况下促进了肿瘤细胞吞噬作用。

[0392] PBMC分离自人血,通过在AIM-V培养基(生命技术公司(Life Technologies))中培养7天使单核细胞分化为巨噬细胞。这些单核细胞来源的巨噬细胞(MDM)变得具有粘附力,使其他细胞被清洗掉。刮下MDM并将其重新铺在12孔盘中,使其粘附24小时。选择人肿瘤细胞系CCRF-CEM作为靶标细胞类型,原因是其高CD47表达。使用0.3 μ M CFSE在37 $^{\circ}$ C标记CCRF-CEM细胞15分钟,随后清洗并将其以每个巨噬细胞四个肿瘤细胞的比例添加至MDM,并以多种浓度添加CD47抗体。对靶细胞进行3个小时的吞噬作用。随后使用PBS洗去未被吞噬的靶细胞。刮下剩余的巨噬细胞,使用针对偶联至DyLight 649(白乐津公司(Biolegend))的巨噬细胞标记CD14的抗体染色,并通过流式细胞术进行分析。通过在FL4阳性(CD14+)的活细胞上选随后评估FL1 (CFSE+) 阳性细胞百分比的方式测量吞噬作用。

[0393] 图9表明CD47抗体2A1及其人源化变体在MDM介导的肿瘤细胞吞噬作用方面显示出剂量依赖的增长。抗体2A1及其人源化变体AB2.05的独特之处在于其在66.7pM下诱导肿瘤细胞的吞噬作用的能力,而B6H12在该浓度下没有活性(图9A)。图9B显示了2A1及人源化变体AB2.05、AB6.12-IgG1、AB6.12-IgG4P和AB6.12-IgG4PE如何都在0.3 μ g/ml或2nM的浓度下诱导最大程度的吞噬作用,而B6H12需要更高的浓度。该数据证明CD47抗体2A1(及其人源化变体)诱导巨噬细胞介导的对CD47阳性肿瘤细胞的吞噬作用。在该实施例中,使用CCRF-CEM细胞作为CD47阳性靶细胞。

[0394] 实施例10:CD47抗体的抗肿瘤活性

[0395] 在淋巴瘤的拉吉模型中评估了鼠CD47抗体的抗肿瘤活性。将拉吉细胞植入NOD/SCID小鼠皮下,并随机分成5个组(每组10只小鼠,第0天)。第1组:载剂(仅缓冲液);第2组:B6H12(阳性对照);第3组:1B4;第4组:2A1;以及第五组:9E4。在肿瘤可触摸时(50mm³,第13天)使用各抗体或载剂(仅缓冲液)治疗,在肿瘤体积达到约1500mm³时处死小鼠。每周测量3

次肿瘤体积。静脉内 (IV) 给予抗体, 每个剂量为200 μ g, 每周3次共3周 (每只小鼠共9次剂量)。治疗于第13天开始并于第32天结束。

[0396] 如图10A所示, 本发明的CD47抗体, 尤其是2A1抗体, 在该淋巴瘤动物模型中表现出抗肿瘤活性。为达到1500mm³的肿瘤体积, 第1组 (仅载剂) 需要约25天; 第2组 (B6H12.2) 需要约45天; 第3组 (1B4) 需要约37天; 第4组 (2A1) 需要约85天; 第5组 (9E4) 需要约40天达到约1500mm³的肿瘤体积。这些数据表明抗体2A1显著强于所测试的全部CD47结合抗体, 包括已知结合CD47、阻断CD47与SIRP α 相互作用并在人癌症的小鼠模型中抑制肿瘤形成的B6H12。出乎意料的是, 这些CD47抗体的肿瘤抑制活性与基于已发表数据预测其结合CD47或阻断CD47与SIRP α 相互作用的效力并不相关。

[0397] 如实施例2和3中所述, 2A1、1B4和9E4对CD47具有类似的亲和性并在阻断CD47与SIRP α 相互作用方面具有类似的效力。此外, 无法通过所述抗体的Fc结构域的区别解释2A1的增强效果, 因为该研究中使用的全部抗体均由相同的小鼠IgG1结构域组成。因此, 除了物质的独特组成, 2A1抗体还具有出乎意料且独特的特征, 包括无法诱导与表达CD47的细胞 (如红细胞) 之间的同型相互作用, 且增强的肿瘤抑制活性无法使用与CD47的结合增强或阻断CD47与SIRP α 相互作用的能力增强来解释。

[0398] 为确认人源化2A1抗体维持了其抗肿瘤活性, 进行了类似的拉吉肿瘤研究。研究设计与上文所述相同。将拉吉细胞植入NOD/SCID小鼠皮下, 并随机分成5个组 (每组10只小鼠, 第0天)。在该研究中, 腹膜内 (IP) 给予抗体, 每个剂量为200 μ g, 每周3次共3周 (每只小鼠共9次剂量), 并每周测量3次肿瘤体积。然而, 对于该研究, 将小鼠IgG12A1抗体 (第2组) 与人源化衍生物AB6.12进行比较。对于该研究, 将AB6.12构建至人IgG1 (第3组)、人IgG4P (第4组) 和人IgG4PE (第4组) 中 (如实施例8中所述)。因此, 该实验被设计为研究2A1人源化对其肿瘤抑制活性的影响以及本领域中已知的促进多种抗体抗肿瘤活性的Fc结构域效应功能的潜在作用。已充分证明, 与人IgG4P相比, 人IgG1具有明显较强的效应功能。开发IgG4PE以进一步降低效应功能。如图10B所示, 2A1的人源化没有降低2A1的抗肿瘤活性, 实际上还有所增强。AB6.12-hIgG1、AB6.12-hIgG4P和AB6.12-hIgG4PE均显示出类似的抗肿瘤活性, 显著强于小鼠2A1 (2A1mIgG)。这一结果是出乎意料的, 因为2A1mIgG1、AB6.12-hIgG1、AB6.12-hIgG4P和AB6.12-hIgG4PE具有类似的CD47结合和SIRP α 阻断活性。此外, 由于AB6.12-hIgG1、AB6.12-hIgG4P和AB6.12-hIgG4PE具有类似的抗肿瘤活性, 似乎效应功能对于人源化2A1抗体AB6.12的效果是有作用的。

[0399] 实施例11: CD47抗体与CD47的共结晶

[0400] CD47是5次跨膜蛋白, 带有在6个位置上高度糖基化的单个细胞外IgV (免疫球蛋白样可变型) 结构域。CD47-IgV结构域的结构已在与其天然配体SIRP α 的IgV结构域的复合物中得到解析 (蛋白质数据库 (PDB) 编号2JJS; Hatherley等, 2008Mol Cell, 25; 31 (2): 266-77 (图11A))。该结构表明SIRP α -IgV在包括CD47的N端焦谷氨酸的顶部表位上结合至CD47-IgV。该结构充分地解释了两个细胞表面跨膜蛋白是如何以头对头的方向从相邻细胞进行相互作用的。图11B显示了在与B6H12Fab形成的复合物中CD47-IgV的X射线晶体结构。为清楚起见, 图中省略了Fab的恒定区 (CH1和CL), 仅显示Fv (VH和VL)。这揭示了一个顶部结合位点, 其将该抗体定位在极端远离细胞膜的表面上 (图11B)。从该结构中, B6H12介导的SIRP α 阻断机制是明显的。方向说明了细胞膜的相对位置, 如图11中虚线所示。

[0401] 为确定本发明抗体的靶表位,确定了CD47-IgV结构域与2A1-xi(具有人CH1和CL结构域的嵌合抗体)的Fab的共复合物的X射线晶体结构。为清楚起见,图中省略了Fab的恒定区(CH1和CL),仅显示Fv(VH和VL)。不同于先前确定的CD47以头对头方向结合SIRP α 的结构(图11A),以及B6H12抗体位于远离膜的顶部(图11B),在与CD47的复合物中2A1的结构揭示了在靠近膜处抗体与CD47的结合形式是出乎意料且独特的头对侧方向(图11C)。CD47上的2A1表位是不连续的,并包括CD47的残基Y37、K39、K41、KGRD(SEQ ID NO:56)环(残基43-46)、D51、H90、N93、E97、T99、E104和E106,编码依据SEQ ID NO:147(即除去信号序列(氨基酸1-18)的SEQ ID NO:48)。2A1结合至CD47的结构还表明,VH主要涉及与CD47的KGRD(SEQ ID NO:56)环的结合,而VK结构域与涉及SIRP α 结合的顶部残基(包括Y37、T102和E104)相互作用。因此,主要是VK结构域在物理上排除了SIRP α 与CD47的结合。这些结构研究暗示2A1结合的独特表位位于CD47的侧面。与本领域已知的CD47抗体相反,膜近端位置上2A1 VH区的方向是该抗体通过限制抗体使其无法连接相邻细胞上的CD47分子从而防止产生显著的红细胞血凝反应的关键特性。

序列表

<110> 印希彼有限责任公司 (InhibRx LLC)

<120> CD47抗体及其使用方法

<130> 42967-506001W0

<140> PCT/US2013/024995

<141> 2013-02-06

<150> US 61/595,216

<151> 2012-02-06

<150> US 61/659,752

<151> 2012-06-14

<160> 147

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 330

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

[0001]

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

[0002]

<210> 2
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

130	135	140
Val Ser His Glu Asp 145	Pro Glu Val Gln Phe 150	Asn Trp Tyr Val Asp Gly 155 160
Val Glu Val His 165	Asn Ala Lys Thr Lys 170	Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn 175
Ser Thr Phe Arg 180	Val Val Ser Val 185	Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp 190
Leu Asn Gly 195	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val 200	Ser Asn Lys Gly Leu Pro 205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr 210	Ile Ser Lys Thr Lys 215	Gly Gln Pro Arg Glu 220
Pro Gln Val Tyr Thr 225	Leu Pro Pro Ser Arg 230	Glu Glu Met Thr Lys Asn 235 240
Gln Val Ser Leu Thr 245	Cys Leu Val Lys Gly 250	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile 255
Ser Val Glu Trp 260	Glu Ser Asn Gly Gln 265	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr 270
Thr Pro Pro Met 275	Leu Asp Ser Asp Gly 280	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys 285
Leu Thr Val Asp Lys 290	Ser Arg Trp Gln Gln Gly 295	Asn Val Phe Ser Cys 300
Ser Val Met His 305	Glu Ala Leu His Asn His 310	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu 315 320
Ser Leu Ser Pro 325	Gly Lys	
<210>	3	
<211>	377	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	3	
Ala Ser Thr Lys 1	Gly Pro Ser Val Phe 5 10	Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg 15
Ser Thr Ser Gly 20	Gly Thr Ala Ala Leu 25	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr 30
Phe Pro Glu Pro 35	Val Thr Val Ser Trp 40	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser 45
Gly Val His Thr 50	Phe Pro Ala Val Leu 55	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 60
Leu Ser Ser Val 65	Val Thr Val Pro Ser 70	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr 75 80

[0003]

	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95
	Arg	Val	Glu	Leu	Lys	Thr	Pro	Leu	Gly	Asp	Thr	Thr	His	Thr	Cys	Pro	100	105	110
	Arg	Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	115	120	125
	Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	130	135	140
	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	145	150	155
	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	165	170	175
	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	180	185	190
	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Lys	Trp	Tyr	195	200	205
	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	210	215	220
[0004]	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	225	230	235
	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	245	250	255
	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	260	265	270
	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	275	280	285
	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	290	295	300
	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	305	310	315
	Tyr	Asn	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	325	330	335
	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Ile	340	345	350
	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	355	360	365
	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								370	375	

<210> 4
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

[0005]

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 5
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化CD47抗体的可变重链区

<400> 5

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

[0006]

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Phe Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val
115

<210> 6
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化CD47抗体的可变重链区

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Glu Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val
 115

<210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人源化CD47抗体的可变重链区
 <400> 7

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
 1 5 10 15

[0007]

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
 115

<210> 8
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人源化CD47抗体的可变重链区
 <400> 8

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 9
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

[0008]

<220>
<223> 人源化CD47抗体的可变重链区
<400> 9

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 10

<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化CD47抗体的可变重链区

<400> 10
Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30
Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
[0009] Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 11
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化CD47抗体的可变重链区

<400> 11
Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30
Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

	100	105	110
	Gly Thr Thr Val Thr Val 115		
	<210> 12 <211> 118 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变重链区		
	<400> 12		
	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser 1 5 10 15		
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr 20 25 30		
	Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met 35 40 45		
	Gly Trp Ile Asp Pro Asp Tyr Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe 50 55 60		
	Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80		
[0010]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln 100 105 110		
	Gly Thr Thr Val Thr Val 115		
	<210> 13 <211> 118 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变重链区		
	<400> 13		
	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser 1 5 10 15		
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr 20 25 30		
	Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met 35 40 45		
	Gly Trp Ile Asp Pro Asp Ser Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe 50 55 60		
	Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr		

	65	70	75	80
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	85	90	95
	Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln	100	105	110
	Gly Thr Thr Val Thr Val	115		
	<210> 14			
	<211> 118			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 人源化CD47抗体的可变重链区			
	<400> 14			
	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser	5	10	15
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr	20	25	30
	Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met	35	40	45
[0011]	Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Ala Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe	50	55	60
	Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr	65	70	75
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	85	90	95
	Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln	100	105	110
	Gly Thr Thr Val Thr Val	115		
	<210> 15			
	<211> 118			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 人源化CD47抗体的可变重链区			
	<400> 15			
	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser	5	10	15
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr	20	25	30
	Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met			

	35	40	45
	Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Thr Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe 50 55 60		
	Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80		
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln 100 105 110		
	Gly Thr Thr Val Thr Val 115		
	<210> 16 <211> 118 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变重链区		
	<400> 16		
	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser 1 5 10 15		
[0012]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr 20 25 30		
	Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met 35 40 45		
	Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe 50 55 60		
	Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80		
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln 100 105 110		
	Gly Thr Thr Val Thr Val 115		
	<210> 17 <211> 118 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变重链区		
	<400> 17		
	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser		

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr	20	25	30
Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met	35	40	45
Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe	50	55	60
Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr	65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	85	90	95
Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln	100	105	110
Gly Thr Thr Val Thr Val	115		

<210> 18
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0013]

<220>
 <223> 人源化CD47抗体的可变重链区
 <400> 18

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser	1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Tyr Tyr	20	25	30	
Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met	35	40	45	
Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe	50	55	60	
Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr	65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	85	90	95	
Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln	100	105	110	
Gly Thr Thr Val Thr Val	115			

<210> 19
 <211> 118
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化CD47抗体的可变重链区

<400> 19

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Tyr Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

[0014]

<210> 20

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化CD47抗体的可变重链区

<400> 20

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Tyr Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 21
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化CD47抗体的可变重链区

<400> 21

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Tyr Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0015]

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 22
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化CD47抗体的可变重链区

<400> 22

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 23
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化CD47抗体的可变重链区

<400> 23

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

[0016]

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 24
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化CD47抗体的可变重链区

<400> 24

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 25
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化CD47抗体的可变重链区

<400> 25

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr
20 25 30

[0017]

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 26
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化CD47抗体的可变重链区

<400> 26

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 27
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化CD47抗体的可变重链区

[0018]

<400> 27

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 28
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化CD47抗体的可变重链区
<400> 28
Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30
Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val
115

[0019]

<210> 29
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人源化CD47抗体的可变重链区
<400> 29
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30
Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val

	115
	<210> 30 <211> 118 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 人源化CD47抗体的可变重链区 <400> 30
	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15
	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr 20 25 30
	Tyr Leu His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met 35 40 45
	Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe 50 55 60
	Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys 85 90 95
[0020]	Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln 100 105 110
	Gly Thr Thr Val Thr Val 115
	<210> 31 <211> 107 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 人源化CD47抗体的可变轻链区 <400> 31
	Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Tyr Ala Ser Leu Gly 1 5 10 15
	Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr 20 25 30
	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Ile Leu Ile 35 40 45
	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60
	Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr 65 70 75 80
	Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr

	85	90	95
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys 100	105	
	<210> 32 <211> 107 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变轻链区		
	<400> 32		
	Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Tyr Ala Ser Leu Gly 1 5 10 15		
	Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr 20 25 30		
	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Ile Leu Ile 35 40 45		
	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60		
	Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr 65 70 75 80		
[0021]	Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr 85 90 95		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105		
	<210> 33 <211> 107 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变轻链区		
	<400> 33		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 1 5 10 15		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr 20 25 30		
	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile 35 40 45		
	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60		
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65 70 75 80		
	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr		

	85	90	95
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100105		
	<210> 34 <211> 107 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变轻链区		
	<400> 34		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 151015		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr 202530		
	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile 354045		
	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 505560		
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65707580		
[0022]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr 859095		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100105		
	<210> 35 <211> 107 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变轻链区		
	<400> 35		
	Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly 151015		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr 202530		
	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile 354045		
	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 505560		
	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65707580		
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr		

	85	90	95
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100	105	
<210>	36		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	人源化CD47抗体的可变轻链区		
<400>	36		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 1	10	15
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr 20	25	30
	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile 35	40	45
	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50	55	60
	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65	70	75
[0023]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr 85	90	95
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100	105	
<210>	37		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	人源化CD47抗体的可变轻链区		
<400>	37		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 1	10	15
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr 20	25	30
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile 35	40	45
	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50	55	60
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65	70	75
	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr		

	85	90	95
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100105		
	<210> 38 <211> 107 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变轻链区		
	<400> 38		
	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly 151015		
	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr 202530		
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile 354045		
	Tyr Arg Ala Asn Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly 505560		
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro 65707580		
[0024]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr 859095		
	Thr Gly Phe Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys 100105		
	<210> 39 <211> 107 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变轻链区		
	<400> 39		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly 151015		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr 202530		
	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile 354045		
	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 505560		
	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65707580		
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr		

	85	90	95
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100	105	
	<210> 40 <211> 107 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变轻链区		
	<400> 40		
	Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly 1 5 10 15		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr 20 25 30		
	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile 35 40 45		
	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60		
	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65 70 75 80		
[0025]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr 85 90 95		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100	105	
	<210> 41 <211> 107 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变轻链区		
	<400> 41		
	Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly 1 5 10 15		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr 20 25 30		
	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Ile Leu Ile 35 40 45		
	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60		
	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65 70 75 80		
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr		

	85	90	95
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100105		
	<210> 42 <211> 107 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变轻链区		
	<400> 42		
	Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly 151015		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr 202530		
	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile 354045		
	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 505560		
	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65707580		
[0026]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr 859095		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100105		
	<210> 43 <211> 107 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变轻链区		
	<400> 43		
	Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly 151015		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr 202530		
	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Ile Leu Ile 354045		
	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 505560		
	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65707580		
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr		

	85	90	95
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100105		
	<210> 44 <211> 107 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变轻链区		
	<400> 44		
	Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly 151015		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr 202530		
	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile 354045		
	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 505560		
	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65707580		
[0027]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr 859095		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100105		
	<210> 45 <211> 107 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变轻链区		
	<400> 45		
	Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly 151015		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr 202530		
	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile 354045		
	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 505560		
	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65707580		
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr		

	85	90	95
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100105		
	<210> 46 <211> 107 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变轻链区		
	<400> 46		
	Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly 15		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr 202530		
	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile 354045		
	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 505560		
	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65707580		
[0028]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr 859095		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100105		
	<210> 47 <211> 107 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人源化CD47抗体的可变轻链区		
	<400> 47		
	Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly 15		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr 202530		
	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile 354045		
	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 505560		
	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65707580		
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr		

	85	90	95
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100	105	
<210>	48		
<211>	323		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	48		
	Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly 1	10	15
	Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe 20	25	30
	Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala 35	40	45
	Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp 50	55	60
	Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp 65	70	75
	Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala 85	90	95
[0029]	Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr 100	105	110
	Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu 115	120	125
	Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu 130	135	140
	Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe 145	150	155
	Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr 165	170	175
	Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val 180	185	190
	Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr 195	200	205
	Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His 210	215	220
	Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala 225	230	235
	Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu 245	250	255

Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile
260 265 270

Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr
275 280 285

Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys
290 295 300

Ala Val Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met
305 310 315 320

Asn Asp Glu

<210> 49
<211> 116
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49

Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn
1 5 10 15

Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn
20 25 30

Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr
35 40 45

[0030]

Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser
50 55 60

Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu
65 70 75 80

Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys
85 90 95

Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys
100 105 110

Tyr Arg Val Val
115

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR1的氨基酸序列

<400> 50

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 51

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR2的氨基酸序列

<400> 51

Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 52
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR3的氨基酸序列

<400> 52

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL CDR1的氨基酸序列

<400> 53

[0031] Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL CDR2的氨基酸序列

<400> 54

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp
1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL CDR3的氨基酸序列

<400> 55

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 56
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 56

	Lys Gly Arg Asp 1
	<210> 57 <211> 10 <212> PRT <213> 人工序列
	<220> <223> VH CDR1的氨基酸序列
	<400> 57
	Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr Tyr Leu His 1 5 10
	<210> 58 <211> 10 <212> PRT <213> 人工序列
	<220> <223> VH CDR1的氨基酸序列
	<400> 58
	Gly Phe Thr Phe Thr Tyr Tyr Tyr Leu His 1 5 10
	<210> 59 <211> 10 <212> PRT <213> 人工序列
[0032]	<220> <223> VH CDR1的氨基酸序列
	<400> 59
	Gly Tyr Asn Phe Thr Tyr Tyr Tyr Leu His 1 5 10
	<210> 60 <211> 10 <212> PRT <213> 人工序列
	<220> <223> VH CDR1的氨基酸序列
	<400> 60
	Gly Tyr Thr Ile Thr Tyr Tyr Tyr Leu His 1 5 10
	<210> 61 <211> 10 <212> PRT <213> 人工序列
	<220> <223> VH CDR1的氨基酸序列
	<400> 61
	Gly Tyr Thr Phe Lys Tyr Tyr Tyr Leu His 1 5 10
	<210> 62 <211> 10

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR1的氨基酸序列

<400> 62

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR1的氨基酸序列

<400> 63

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR1的氨基酸序列

<400> 64

[0033] Gly Phe Thr Ile Thr Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR1的氨基酸序列

<400> 65

Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 66
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR1的氨基酸序列

<400> 66

Gly Phe Thr Phe Lys Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 67
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL CDR1的氨基酸序列

[0034]

<400> 67

Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL CDR1的氨基酸序列

<400> 68

Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL CDR2的氨基酸序列

<400> 69

Arg Ala Asn Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL CDR2的氨基酸序列

<400> 70

Arg Ala Asn Arg Arg Ala Thr
1 5

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL CDR2的氨基酸序列

<400> 71

Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser
1 5

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH CDR1的氨基酸序列

<400> 72

Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR1的氨基酸序列

<400> 73

Trp Ile Asp Pro Asp Tyr Gly Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 74
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR1的氨基酸序列

<400> 74

Trp Ile Asp Pro Asp Ser Gly Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR1的氨基酸序列

<400> 75

[0035]

Trp Ile Asp Pro Asp Asn Ala Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR1的氨基酸序列

<400> 76

Trp Ile Asp Pro Asp Asn Thr Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 77
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR3的氨基酸序列

<400> 77

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Pro Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 78
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0036]

<223> 9E4抗体的VH链区

<400> 78

Glu Val Gln Leu Arg Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser Arg Val Arg Ser Leu Ala Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Thr Gly Ala Thr Gly Tyr Asp Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ser Leu Ile Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Arg Asn Arg Tyr Asp Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val
115

<210> 79

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 9E4抗体的VL链区

<400> 79

Glu Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Asp Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Ala Leu Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 80

<211> 115

<212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 1B4抗体的VH链区

 <400> 80
 Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Glu Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val
 115

[0037]

<210> 81
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 1B4抗体的VL链区

 <400> 81
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

	Lys	
	<210> 82	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 82	
	cactgcaggt rtccactcc	19
	<210> 83	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 83	
	catagcaggt gtccactcc	19
	<210> 84	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
[0038]	<400> 84	
	crctacaggt gtccactcc	19
	<210> 85	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 85	
	gcyacagmtg tccactcc	18
	<210> 86	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 86	
	cactgcaggt gtccwmtcc	19
	<210> 87	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 87	
	crctrcaggt gtkactcc	19

	<p><210> 88 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物</p> <p><400> 88 gctawmggtg tccactcc</p>	18
	<p><210> 89 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物</p> <p><400> 89 cctcaggtgt ccactcc</p>	17
	<p><210> 90 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物</p> <p><400> 90 gctacaggtg ctactcc</p>	18
[0039]	<p><210> 91 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物</p> <p><400> 91 caetgcaggt gtcctctct</p>	19
	<p><210> 92 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物</p> <p><400> 92 caytgcaggt gtccaytgc</p>	19
	<p><210> 93 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物</p> <p><400> 93 gctammggtg tccacttc</p>	18
	<p><210> 94 <211> 21</p>	

[0040]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 94	
	ctcctgtcak taactkcagg t	21
	<210> 95	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 95	
	caactgcagg tgtctctct	19
	<210> 96	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 96	
	crctrcaggy gtccactct	19
	<210> 97	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 97	
	ccaagctgta tcctttcc	18
	<210> 98	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 98	
	ccaagctgtg tcctrtcc	18
	<210> 99	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 99	
	cttgacagyc vttcckggt	19
	<210> 100	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 化学合成的寡核苷酸引物 <400> 100 cttcacagcc tttcctggt	19
	<210> 101 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物 <400> 101 cttaaaagggt gccagtggt	19
	<210> 102 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物 <400> 102 caytttaaaa rgtgtcmagt gt	22
	<210> 103 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物 <400> 103 gttttaaaag gtgtcctgtg	20
[0041]	<210> 104 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物 <400> 104 ctyttaaaag gkggtccagwg	20
	<210> 105 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物 <400> 105 cytttamatg gtatccagtg t	21
	<210> 106 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物 <400> 106 cttttacatg gtttcaagtg t	21

	<210> 107	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 107	
	gtccctgcat atgtcyt	17
	<210> 108	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 108	
	gatggcagcw gcycaaag	18
	<210> 109	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 109	
	ctatcaaggt gtgcattgt	19
[0042]	<210> 110	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 110	
	cttttaaaag wtgtccagkg t	21
	<210> 111	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 111	
	gtgacagtcc ttctggtag	20
	<210> 112	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 112	
	cttctgatg gcagtgtt	19
	<210> 113	
	<211> 18	

[0043]	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物		
	<400> 113		
	gctacaggtg tccaatcc	18	
	<210> 114		
	<211> 39		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物		
	<400> 114		
	gcgtctagaa yctccacaca caggrccag tggatagac	39	
	<210> 115		
	<211> 19		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物		
	<400> 115		
	ctgwtgttct ggattcctg	19	
	<210> 116		
	<211> 18		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物		
	<400> 116		
	ggtcagacag tcagcagt	18	
	<210> 117		
	<211> 18		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物		
	<400> 117		
	gtgctctgga ttcgggaa	18	
	<210> 118		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物		
	<400> 118		
	cagcttctg ctaatcagt	20	
	<210> 119		
	<211> 18		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		

	<223> 化学合成的寡核苷酸引物 <400> 119 ctaatcagtg cttcagga	18
	<210> 120 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物 <400> 120 gtgggtatct ggtcstgtg	20
	<210> 121 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物 <400> 121 ggaaatttaa aagtacctgt ggg	23
	<210> 122 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物 <400> 122 ggtttcmagg trccagatgt	20
[0044]	<210> 123 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物 <400> 123 ctctggttyc caggtatc	18
	<210> 124 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物 <400> 124 ctgttttcaa ggtrccagat gt	22
	<210> 125 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 化学合成的寡核苷酸引物 <400> 125 gttgtaatgt ccagagga	18

	<210> 126	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 126	
	cttacaggtg ccagatgt	18
	<210> 127	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 127	
	ctcaattgta grtgccagat gt	22
	<210> 128	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 128	
	cacagtaggt gtcagatgt	19
[0045]	<210> 129	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 129	
	gtcgtagtgtg tcagatgt	18
	<210> 130	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 130	
	cctccttctt ggccaaga	18
	<210> 131	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 131	
	cttatatgga gctgatggg	19
	<210> 132	
	<211> 18	

[0046]	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物		
	<400> 132		
	gtgtctggtg ctcattggg	18	
	<210> 133		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物		
	<400> 133		
	ctstggttgt ctggtgtga	20	
	<210> 134		
	<211> 18		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物		
	<400> 134		
	gtctctgatt ctaggcca	18	
	<210> 135		
	<211> 16		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物		
	<400> 135		
	ctkckctggg ttccag	16	
	<210> 136		
	<211> 15		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物		
	<400> 136		
	gcaggtgttg acgga	15	
	<210> 137		
	<211> 16		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物		
	<400> 137		
	caggtgcctc gtgcac	16	
	<210> 138		
	<211> 16		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		

[0047]	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 138	
	ctctggtgcc tgtgca	16
	<210> 139	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 139	
	ctggaytyca gcctccaga	19
	<210> 140	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
[0047]	<400> 140	
	gwtctctrga gtcagtggg	19
	<210> 141	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 141	
	ctggatccct ggakcyact	19
	<210> 142	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 142	
	gttctgcttt ttagtgtg	19
[0047]	<210> 143	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 143	
	gatcccaggc atgatatgt	19
	<210> 144	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 化学合成的寡核苷酸引物	
	<400> 144	
	cttcatggtg ctcagtgt	18

<210> 145
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 化学合成的寡核苷酸引物

<400> 145
 ccataatcagg tgcccagtggt 20

<210> 146
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 化学合成的寡核苷酸引物

<400> 146
 gcgtctagaa ctggatggtg ggaagatgg 29

<210> 147
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 147

Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn
 1 5 10 15

[0048]

Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn
 20 25 30

Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr
 35 40 45

Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser
 50 55 60

Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys
 85 90 95

Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys
 100 105 110

Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu Ile Val
 115 120 125

Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe Gly Ile
 130 135 140

Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr Ile Ala
 145 150 155 160

Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val Gly Ala
 165 170 175

	Ile	Leu	Phe	Val	Pro	Gly	Glu	Tyr	Ser	Leu	Lys	Asn	Ala	Thr	Gly	Leu	
				180					185						190		
	Gly	Leu	Ile	Val	Thr	Ser	Thr	Gly	Ile	Leu	Ile	Leu	Leu	His	Tyr	Tyr	
		195						200						205			
	Val	Phe	Ser	Thr	Ala	Ile	Gly	Leu	Thr	Ser	Phe	Val	Ile	Ala	Ile	Leu	
		210					215						220				
	Val	Ile	Gln	Val	Ile	Ala	Tyr	Ile	Leu	Ala	Val	Val	Gly	Leu	Ser	Leu	
	225					230					235					240	
[0049]	Cys	Ile	Ala	Ala	Cys	Ile	Pro	Met	His	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Ser	Gly	
				245						250					255		
	Leu	Ser	Ile	Leu	Ala	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Val	Tyr	Met	Lys	
			260						265					270			
	Phe	Val	Ala	Ser	Asn	Gln	Lys	Thr	Ile	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Ala	Val	
		275						280					285				
	Glu	Glu	Pro	Leu	Asn	Ala	Phe	Lys	Glu	Ser	Lys	Gly	Met	Met	Asn	Asp	
		290					295					300					
	Glu																
	305																

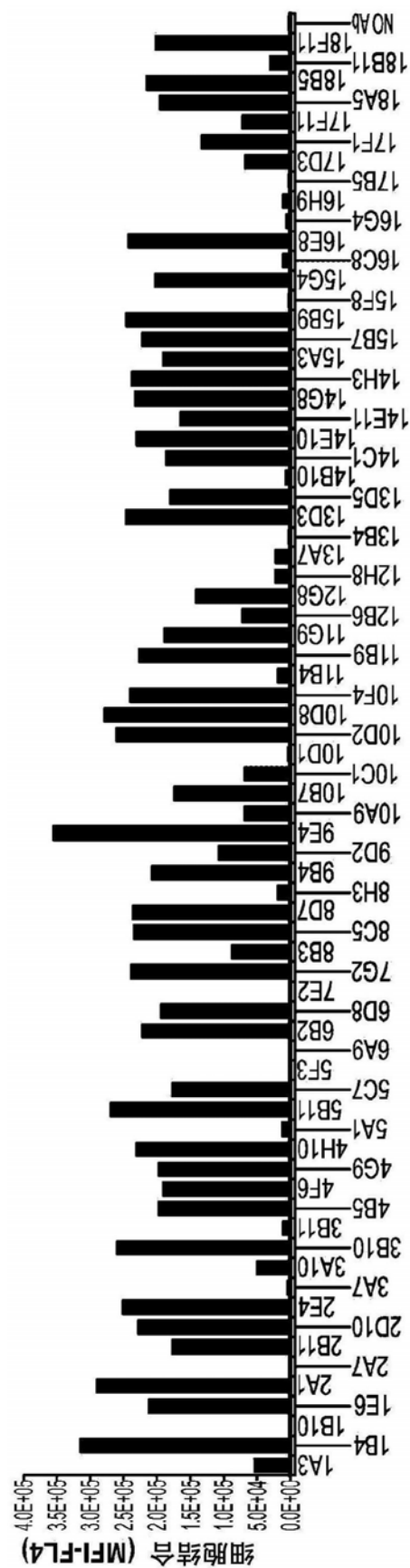


图1A

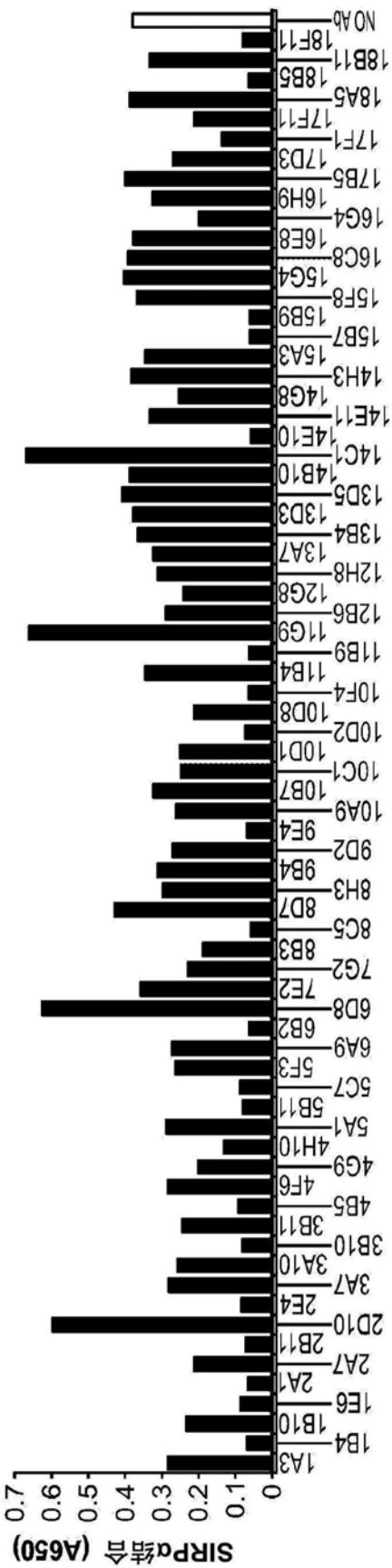


图1B

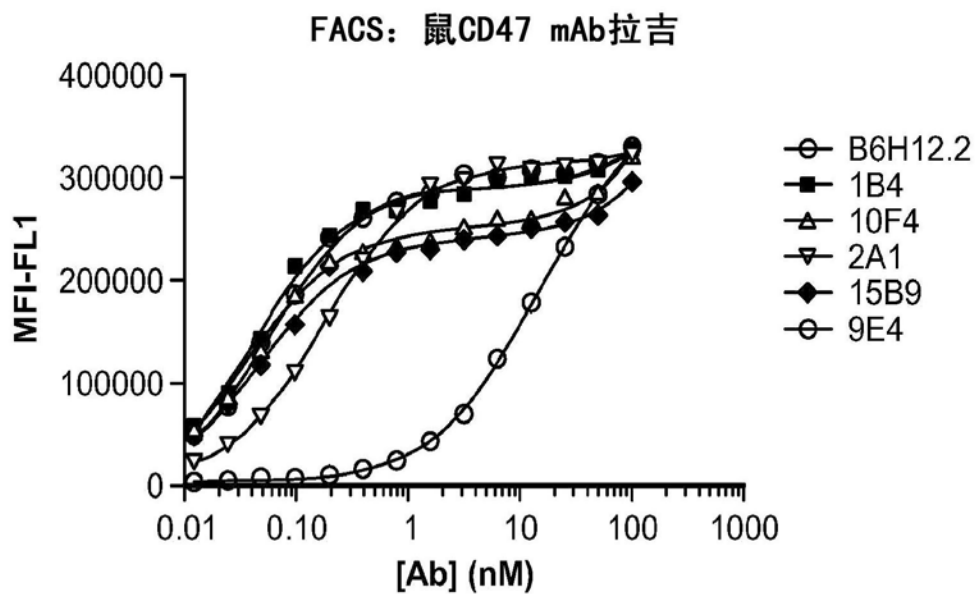


图2A

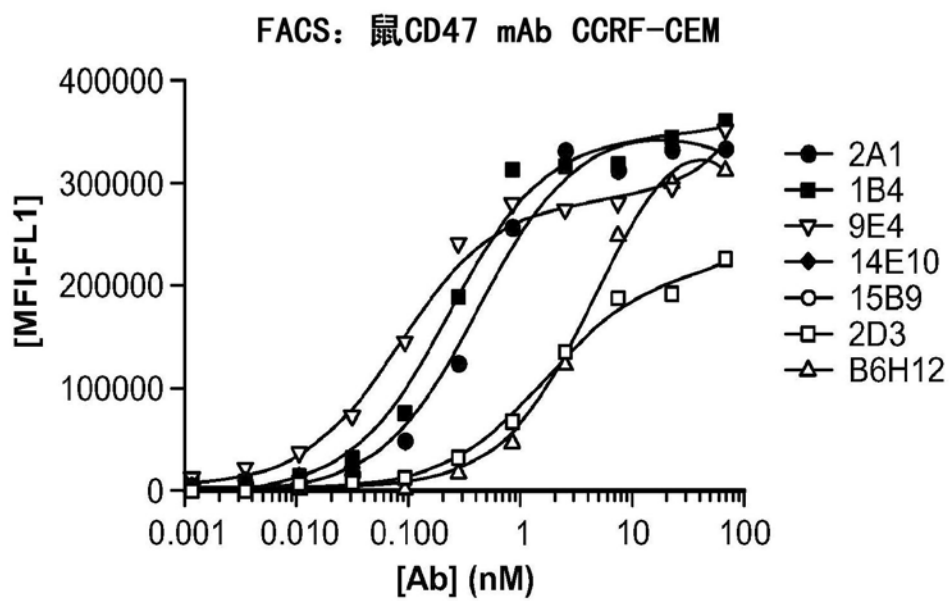


图2B

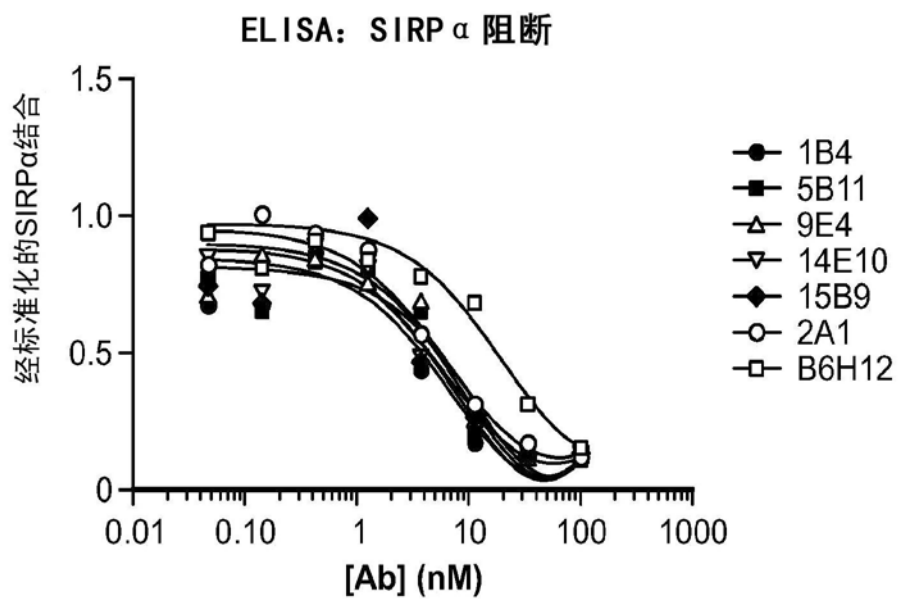


图3A

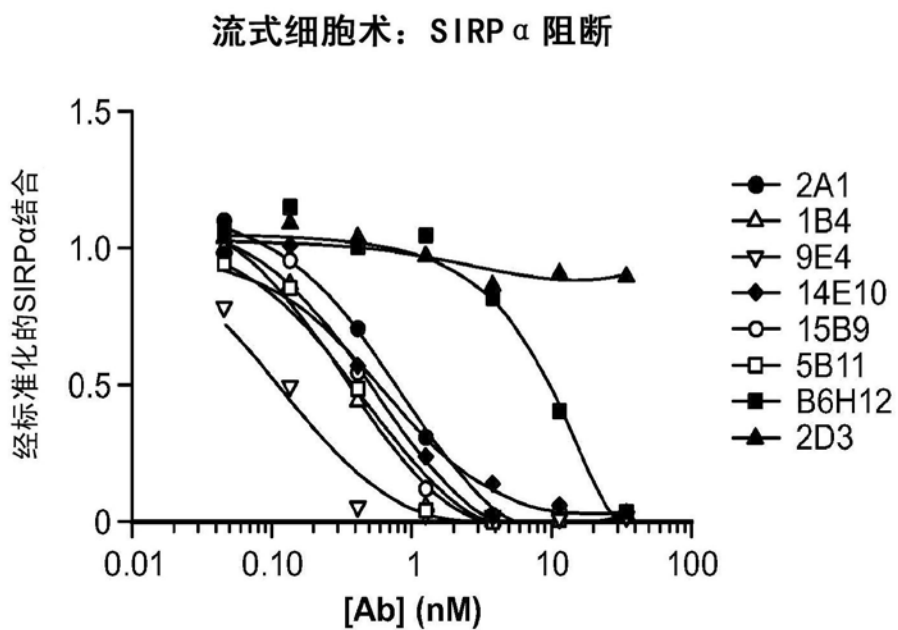


图3B

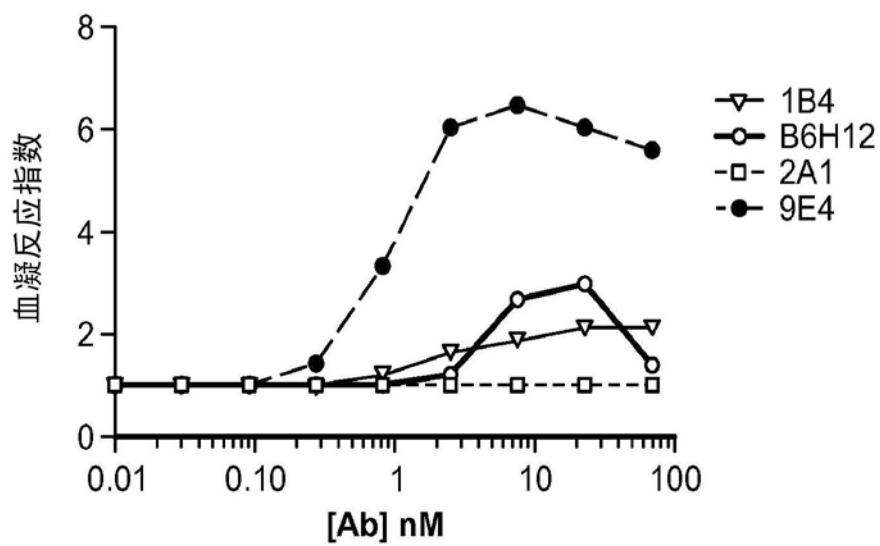
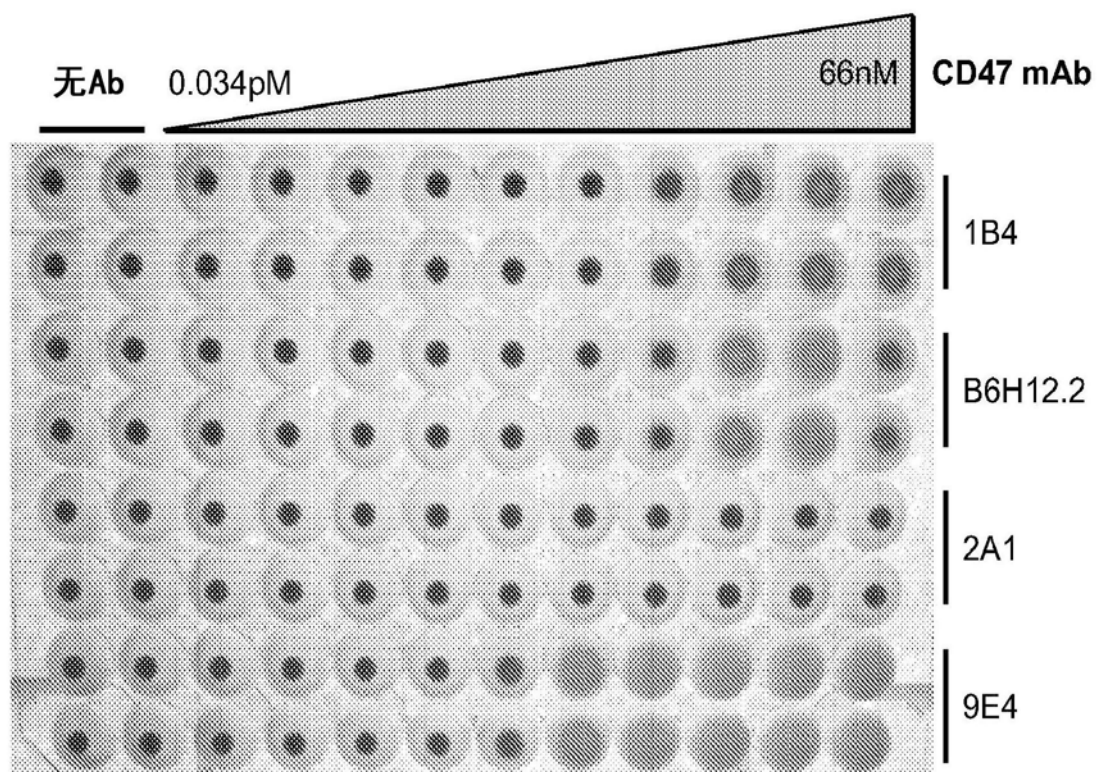


图4A

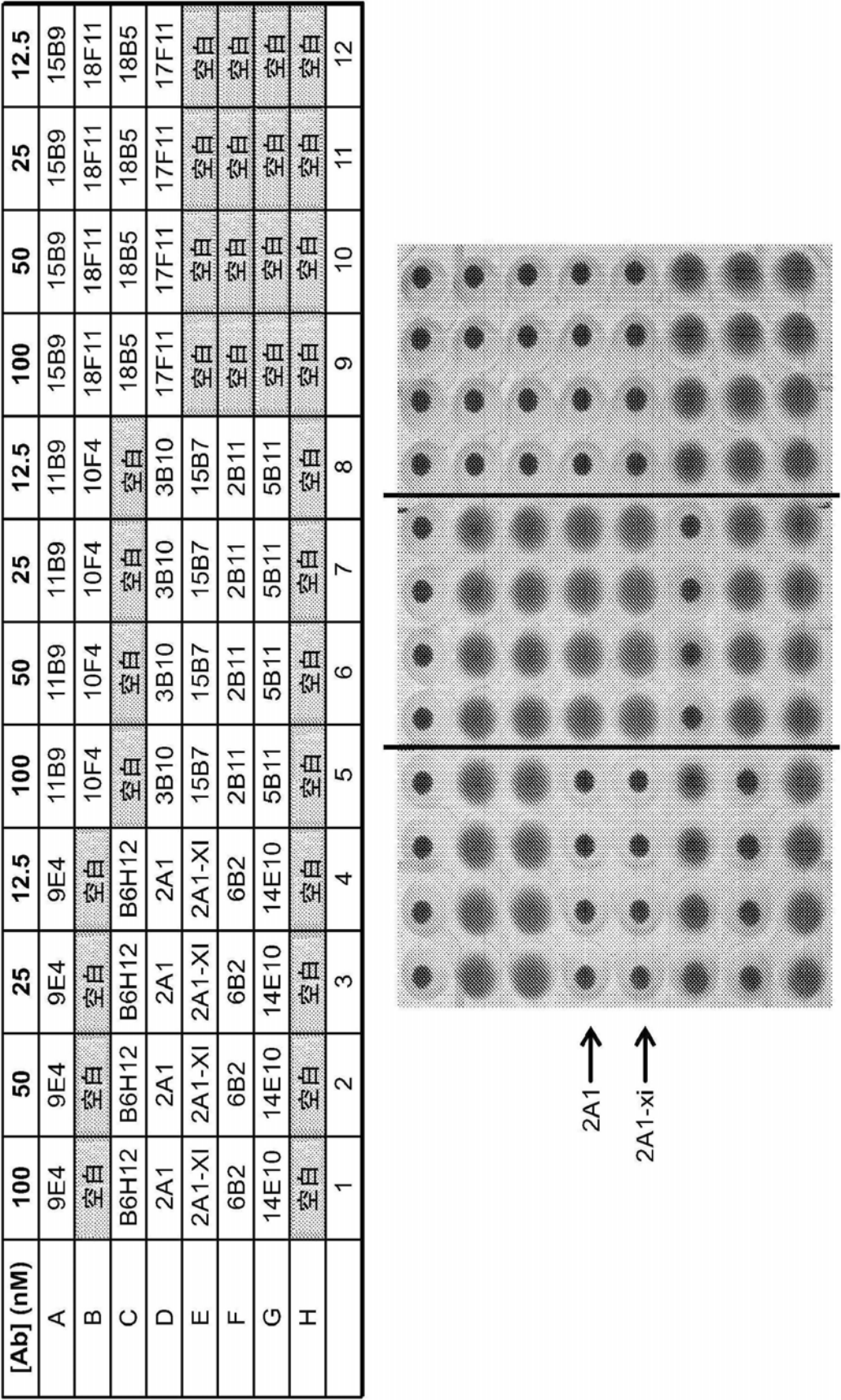


图4B

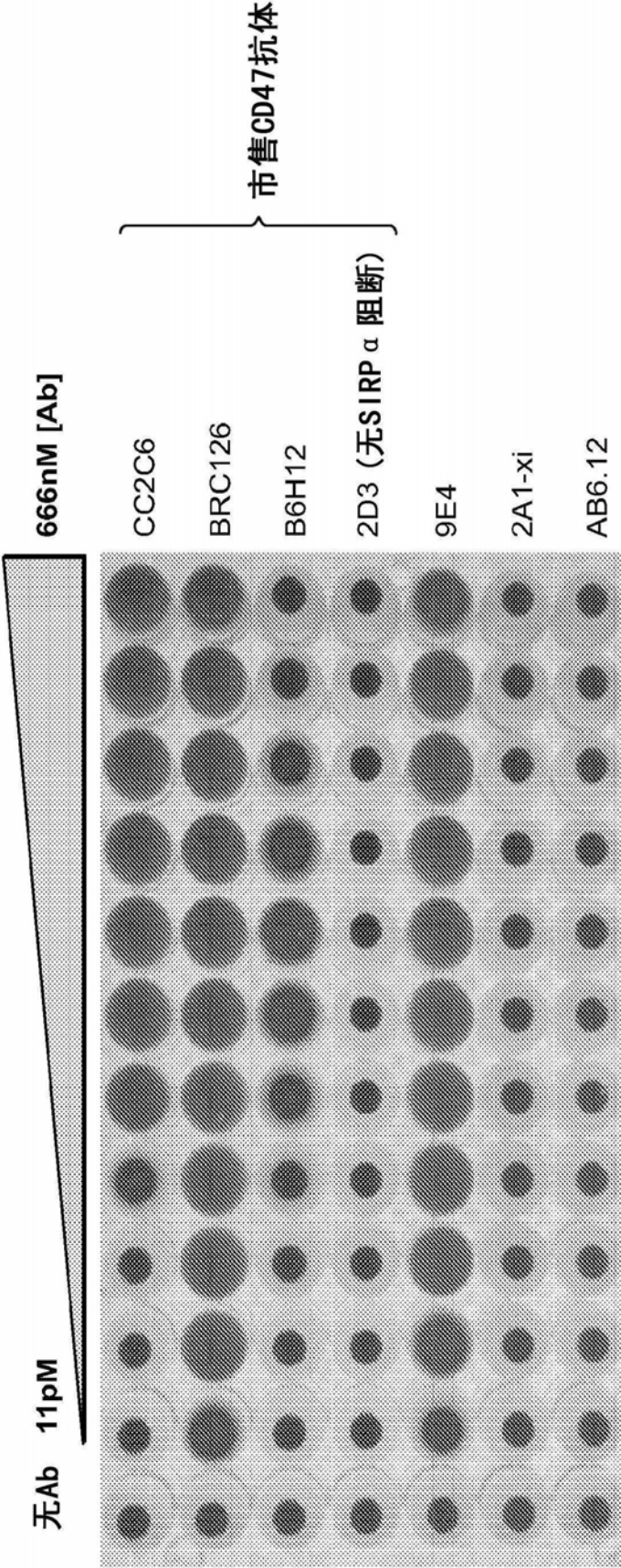


图4C

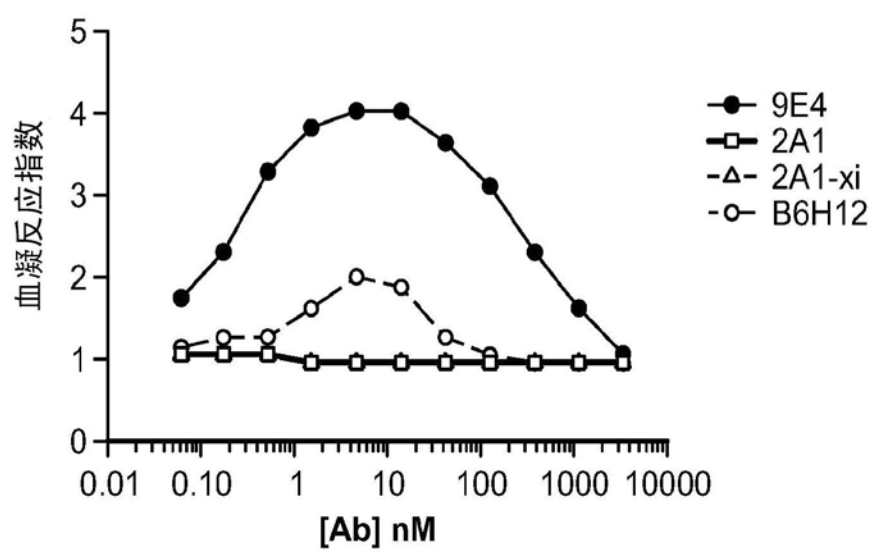
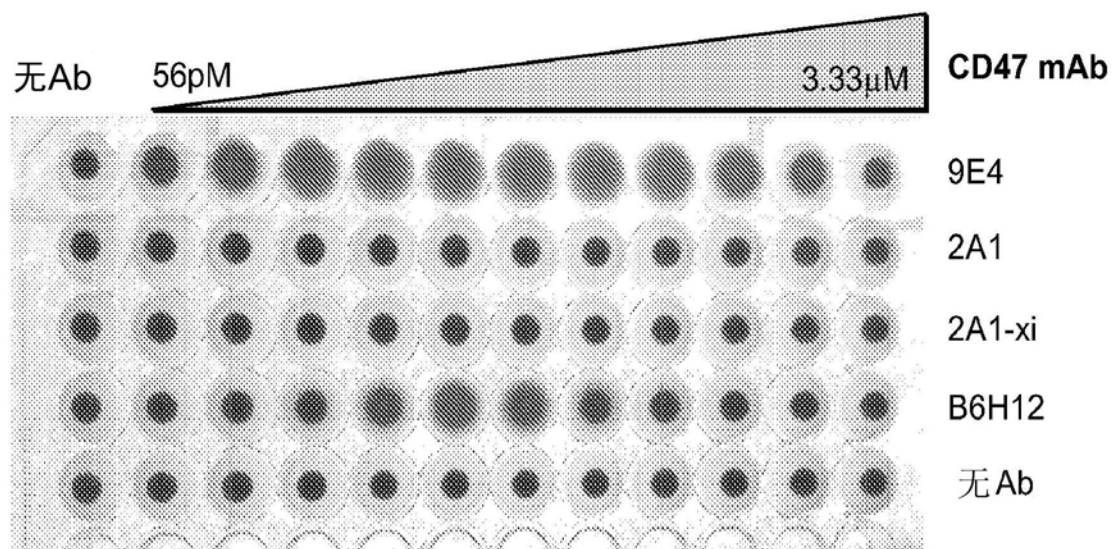


图4D

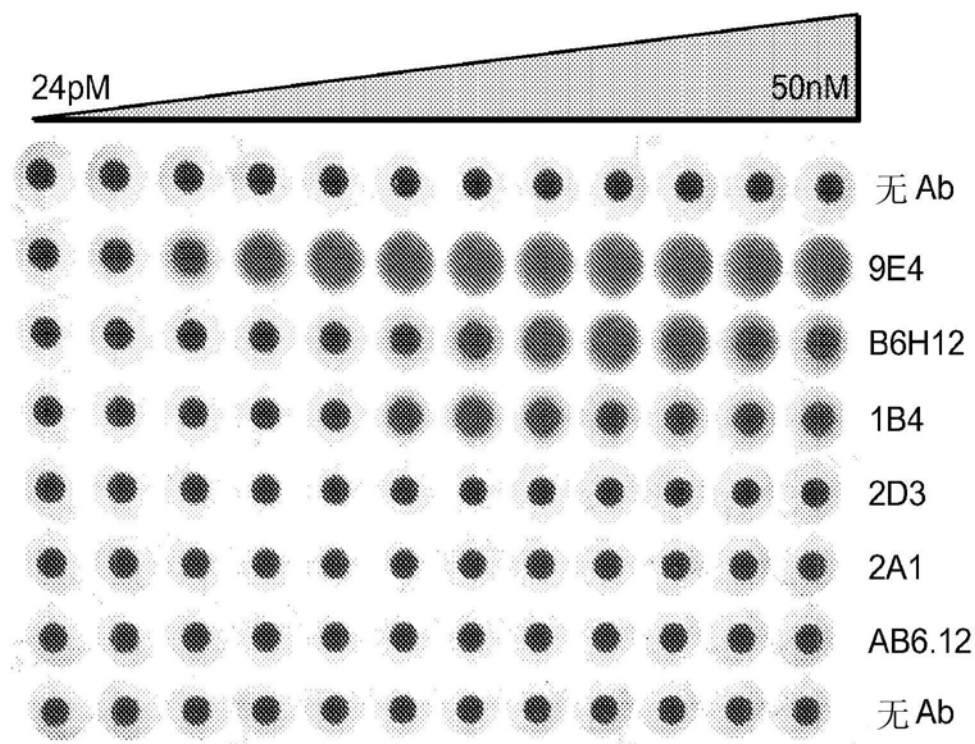


图4E

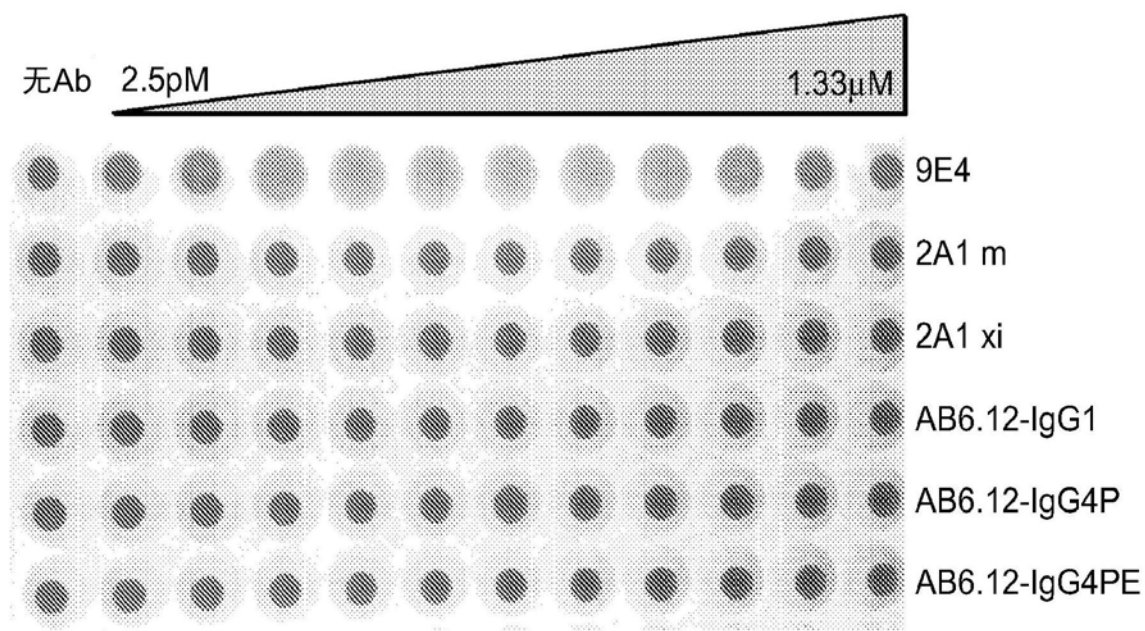


图4F

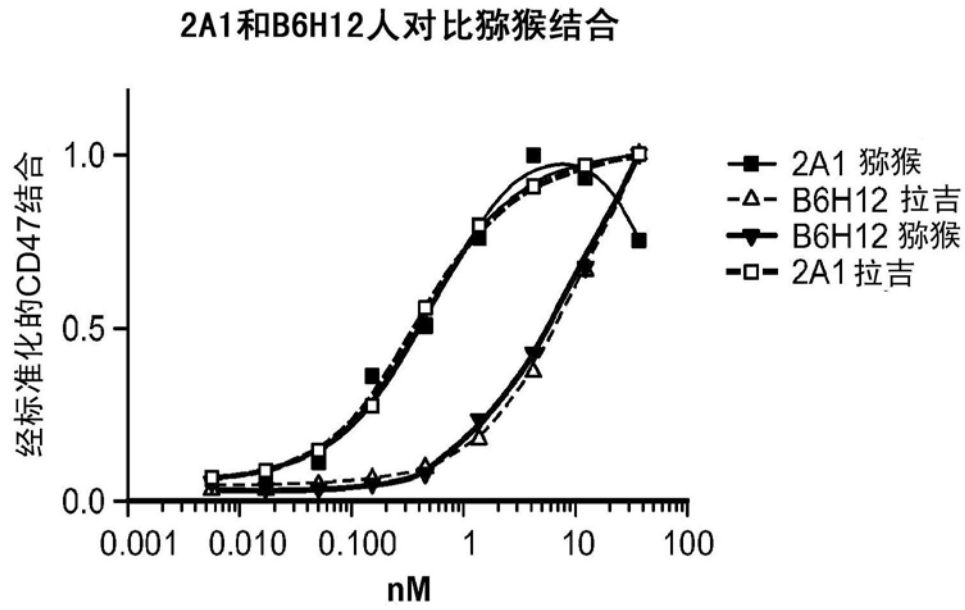


图5

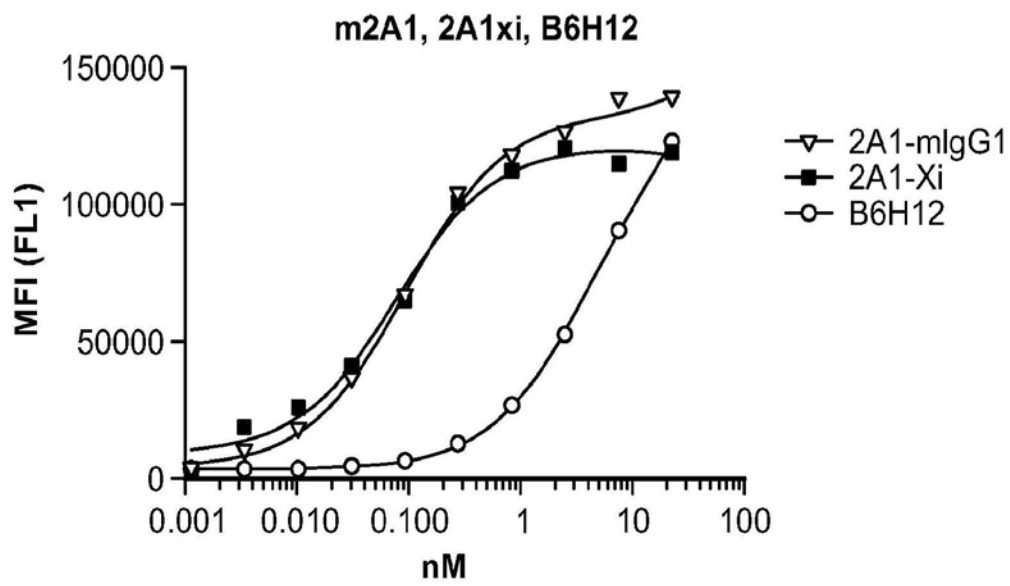


图6

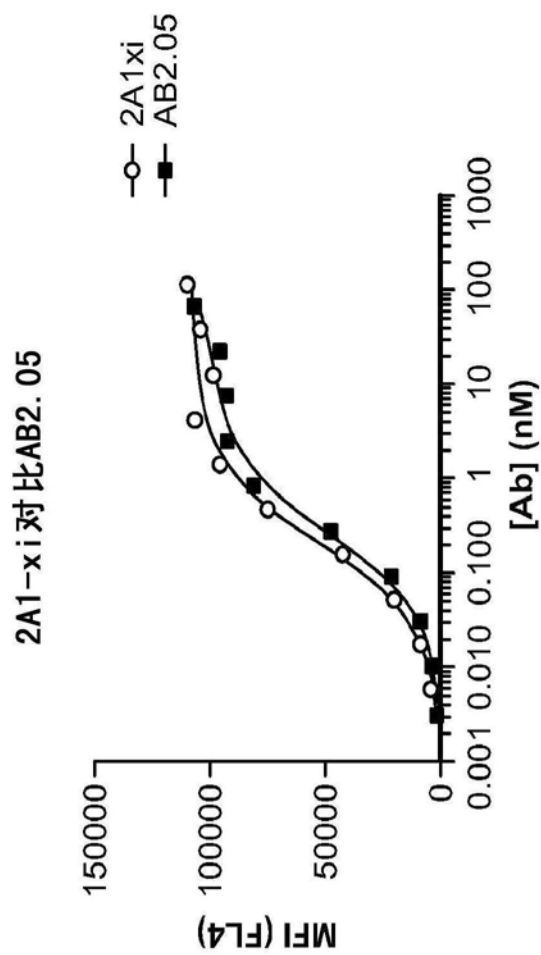


图7A

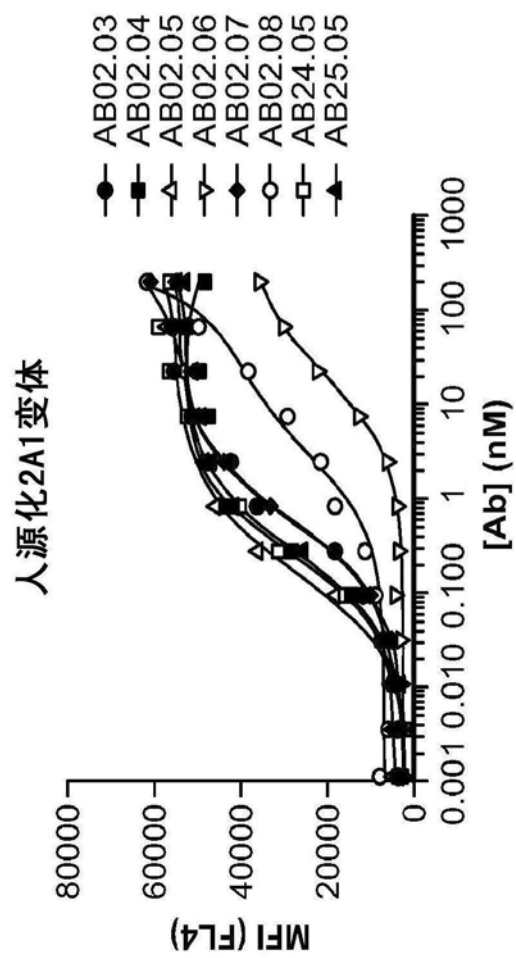


图7B

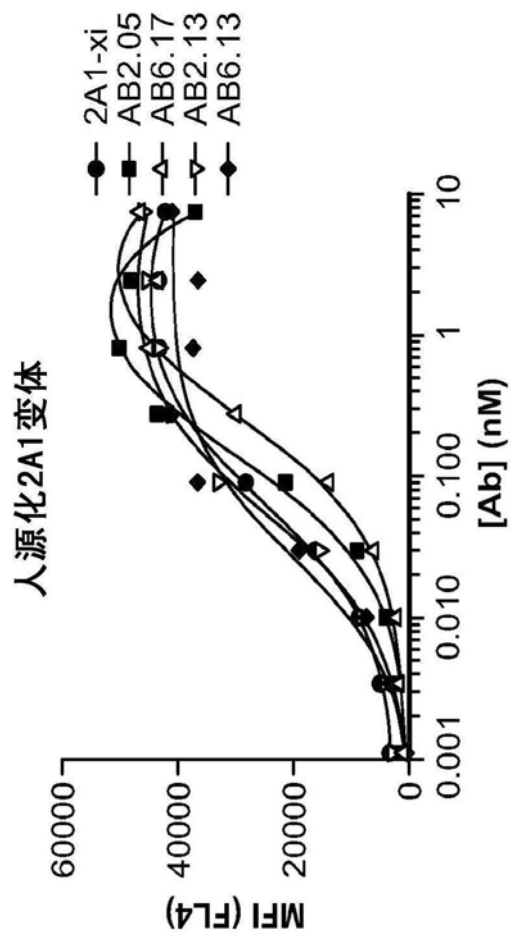


图7C

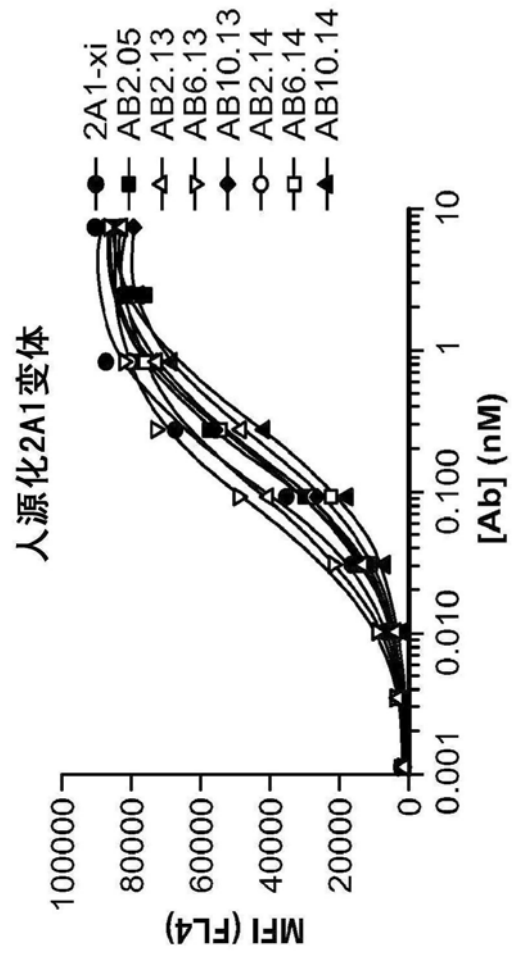


图7D

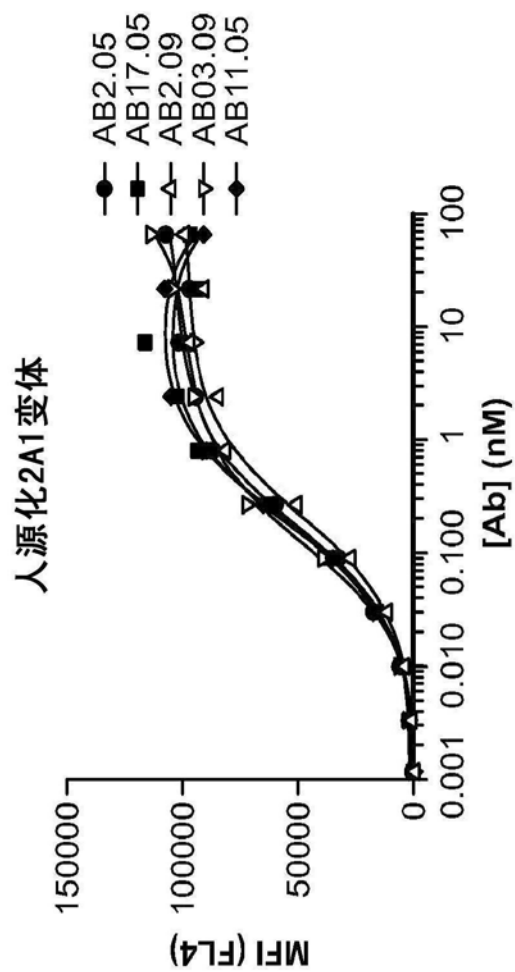


图7E

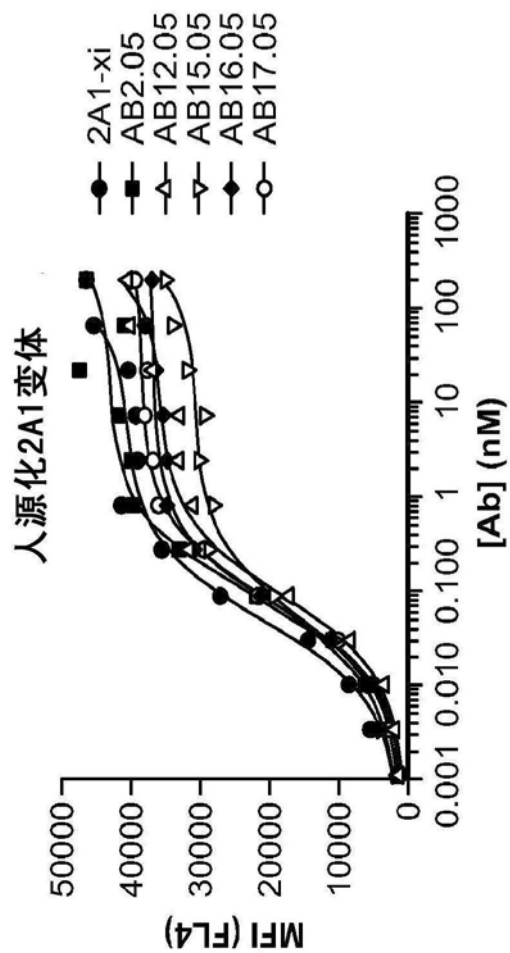


图7F

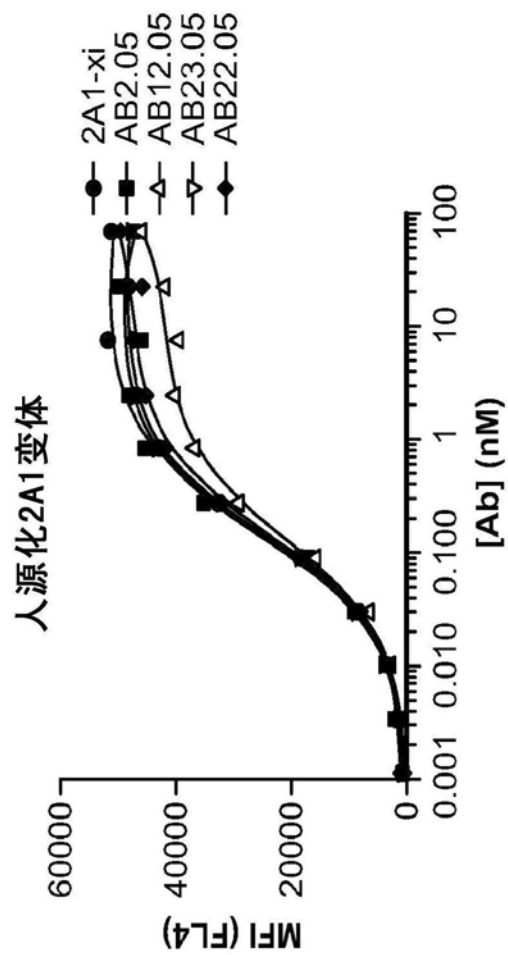


图7G

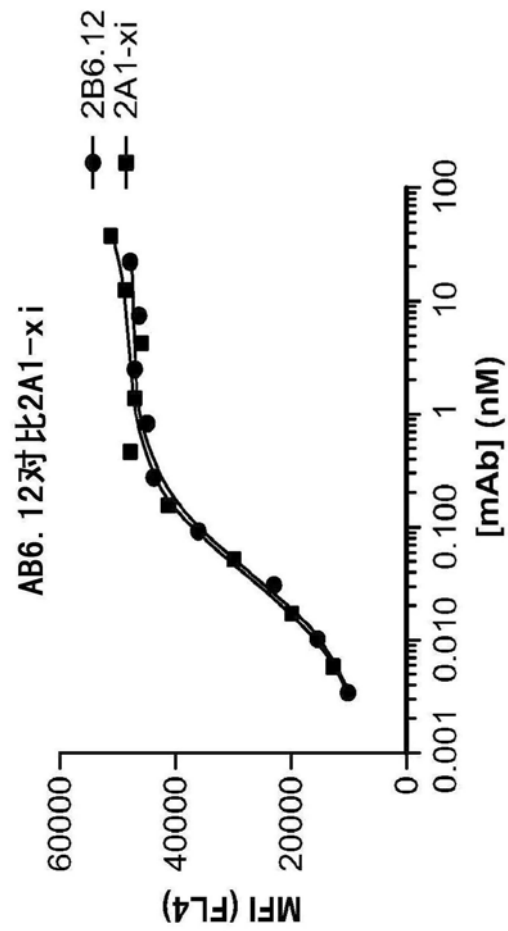


图7H

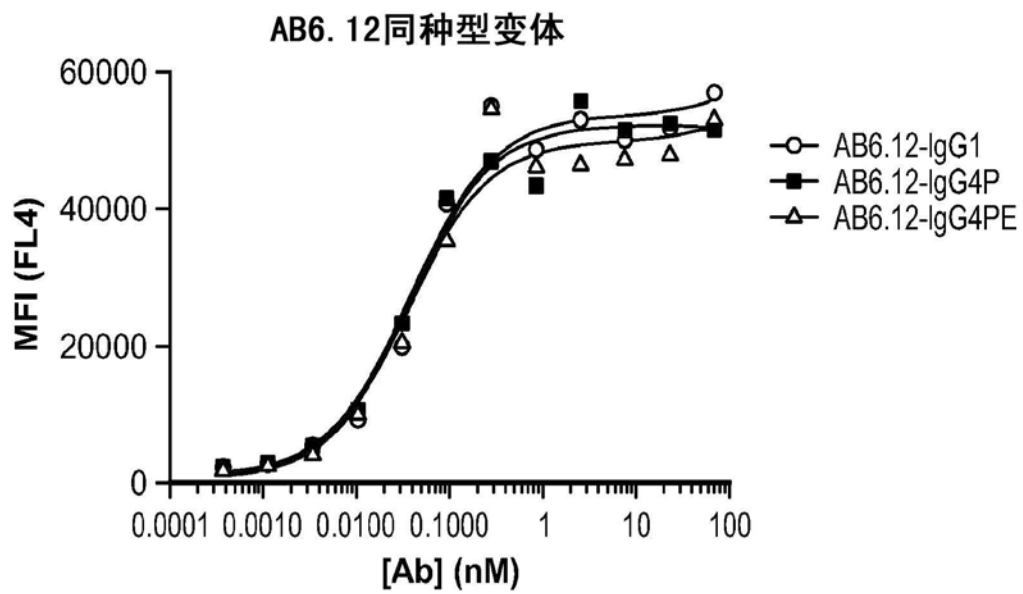


图7I

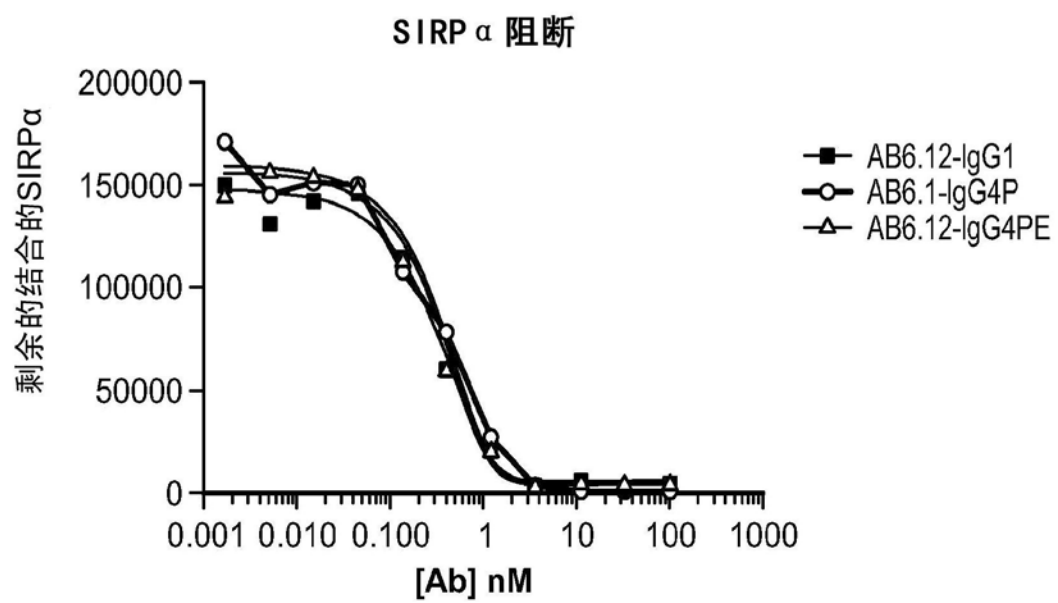


图7J

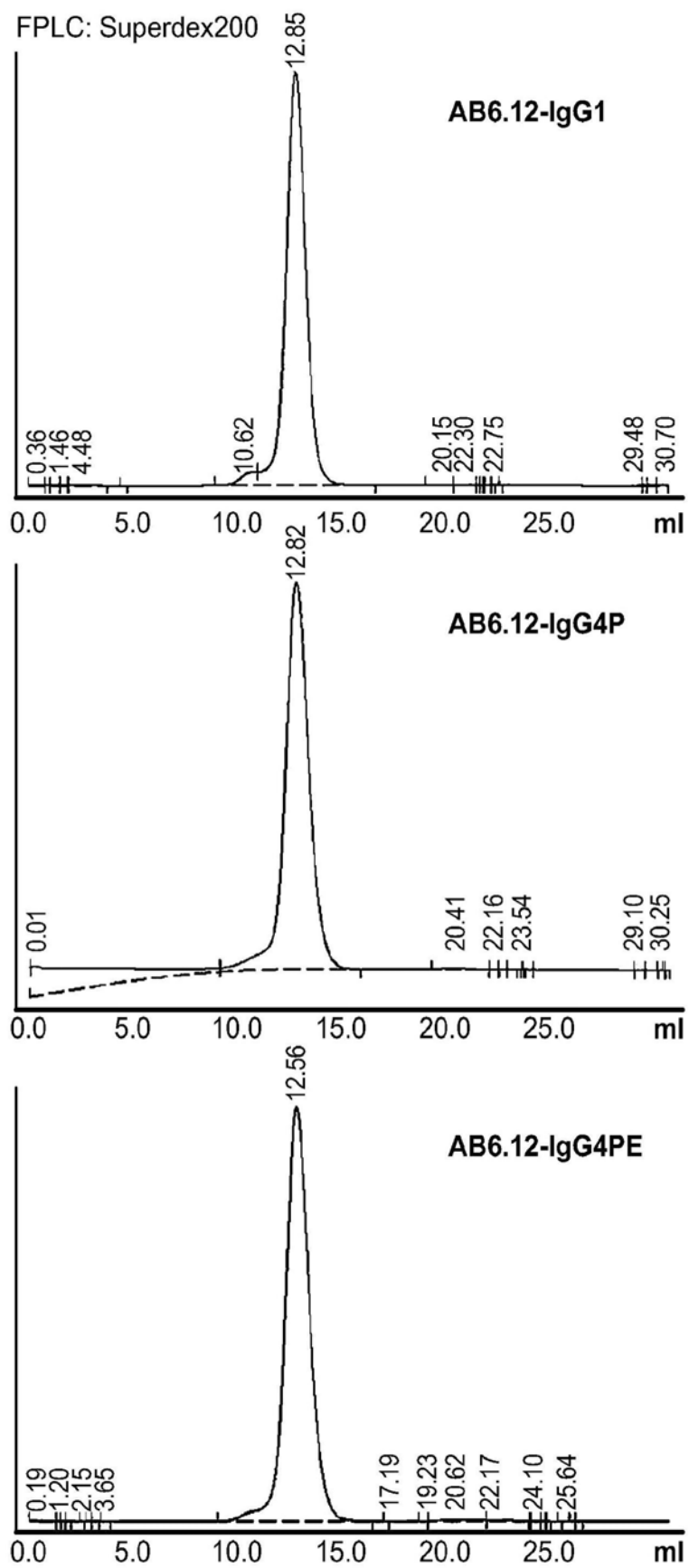


图8A

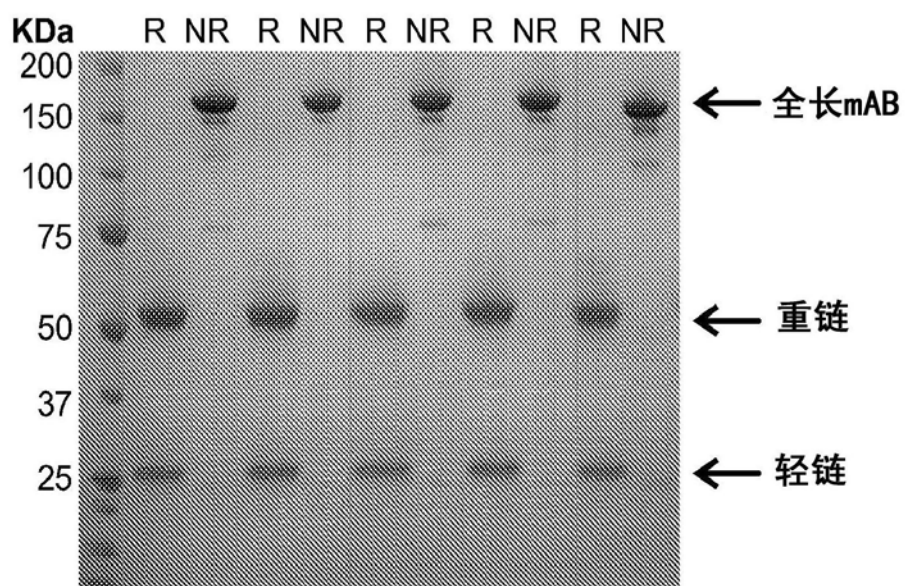


图8B

15/19

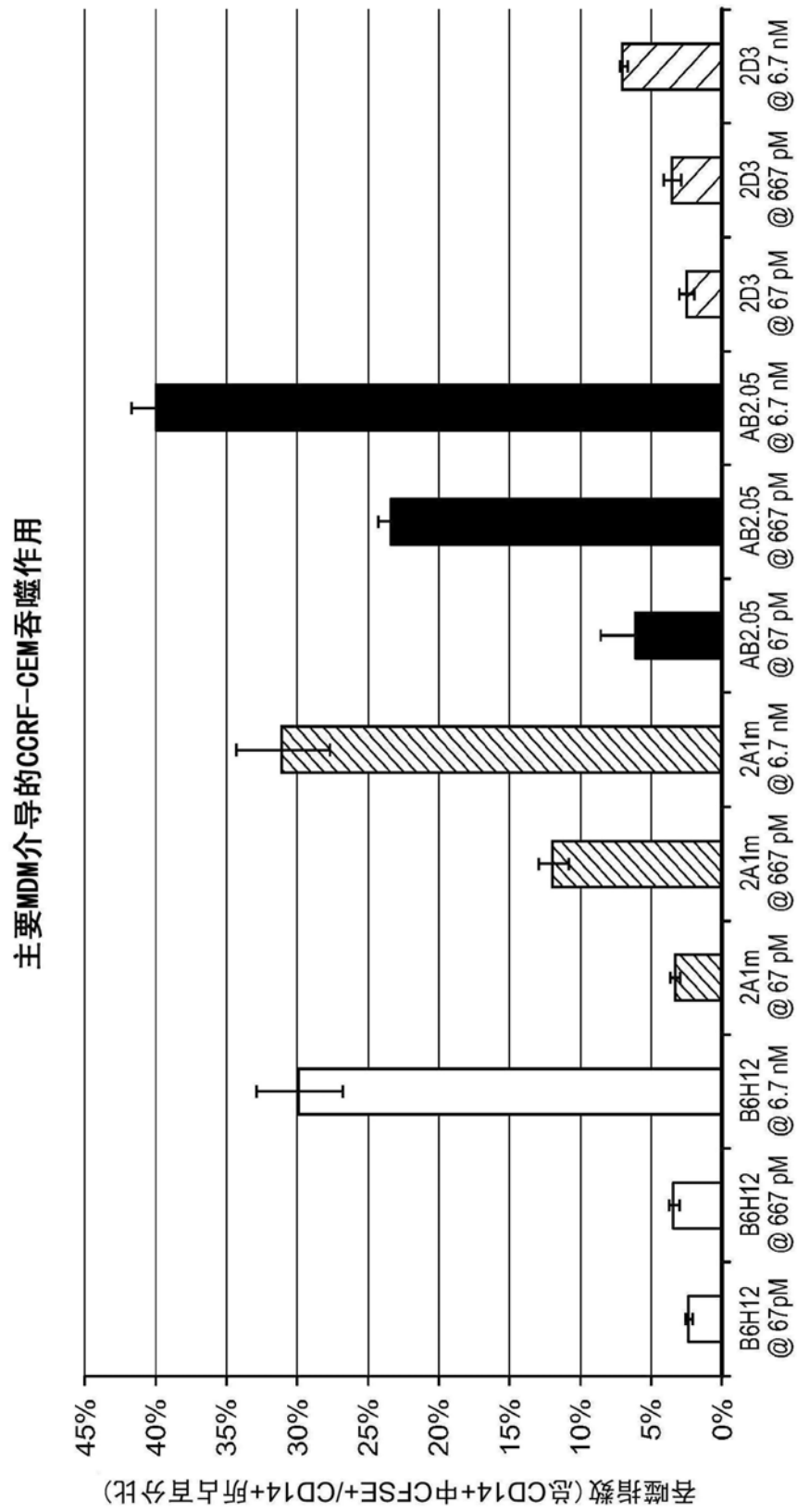


图9A

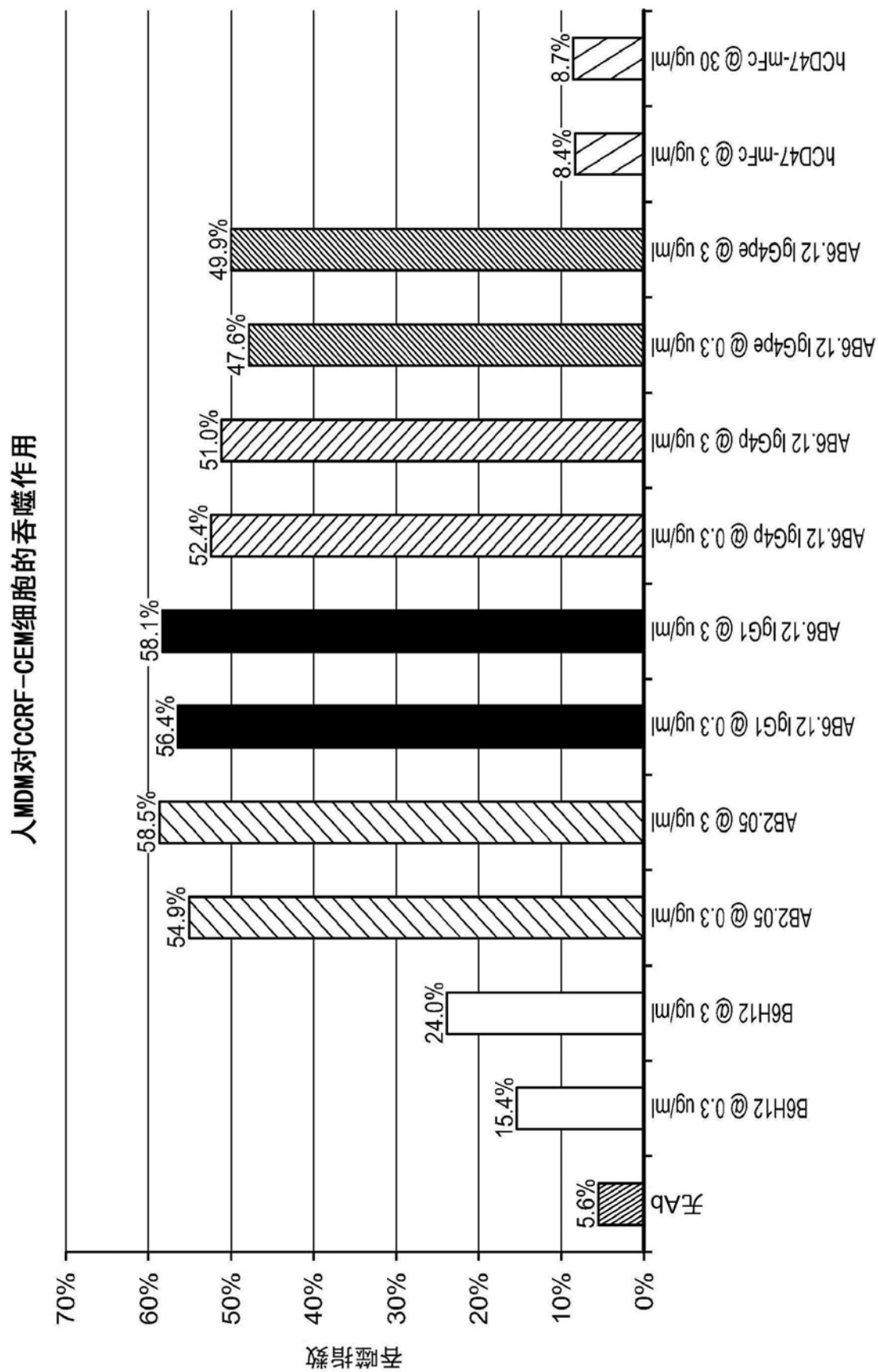


图9B

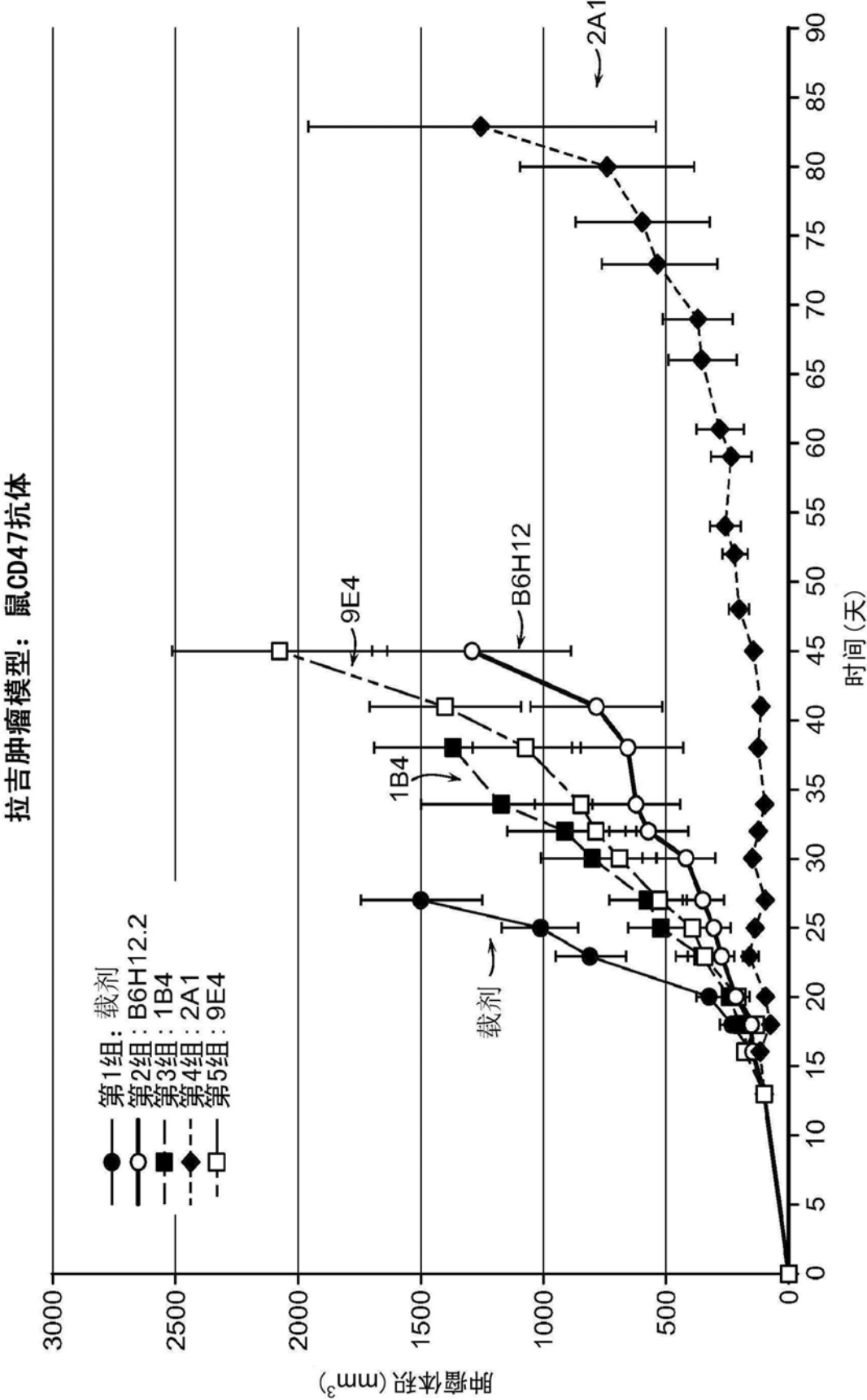


图10A

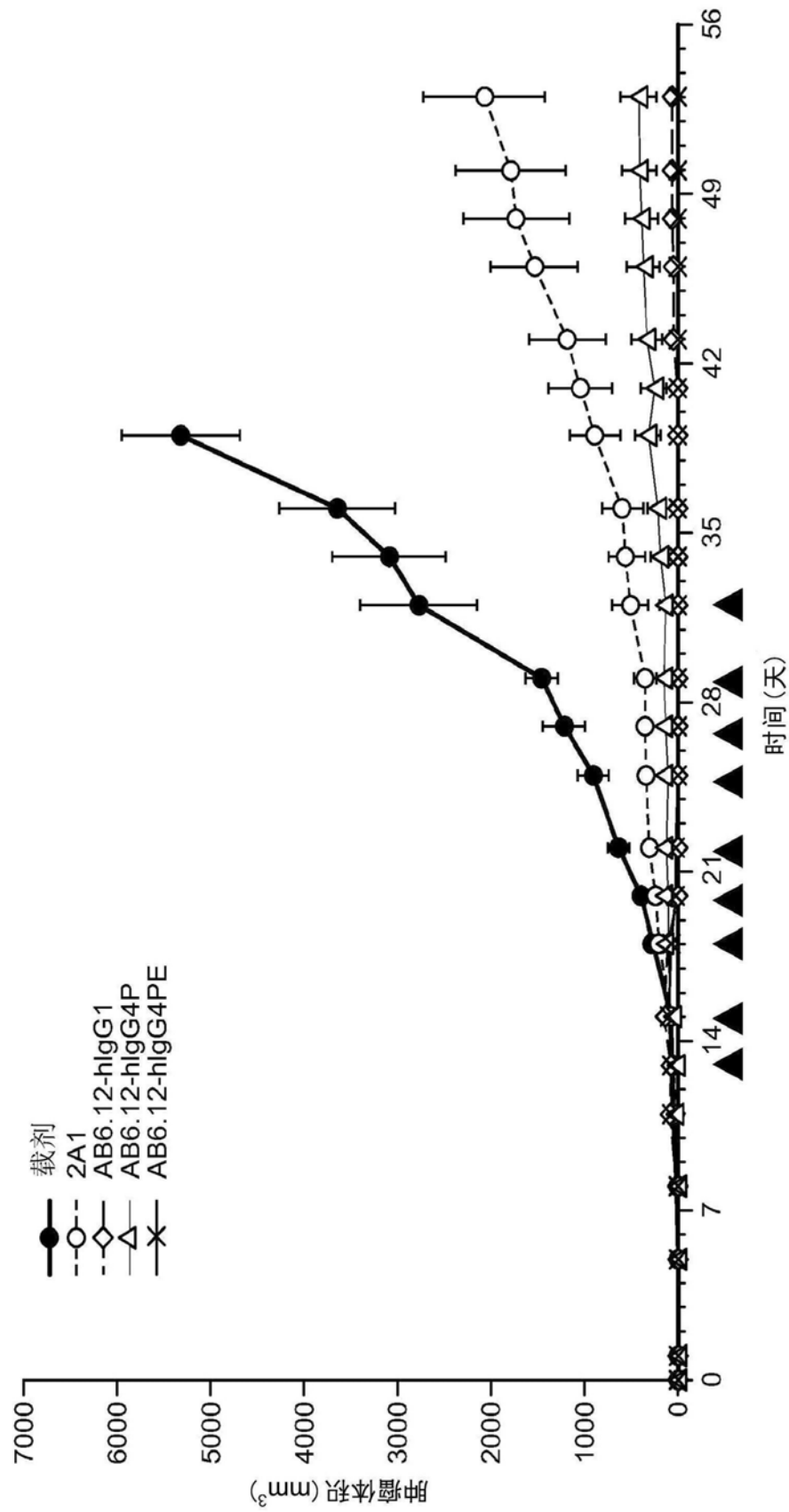


图10B

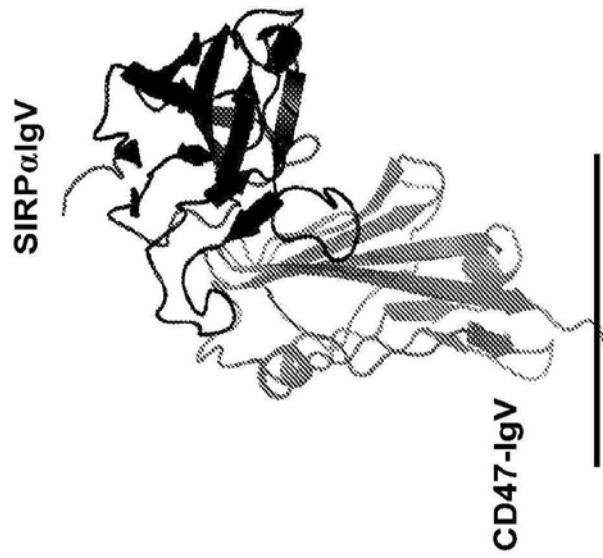


图11A

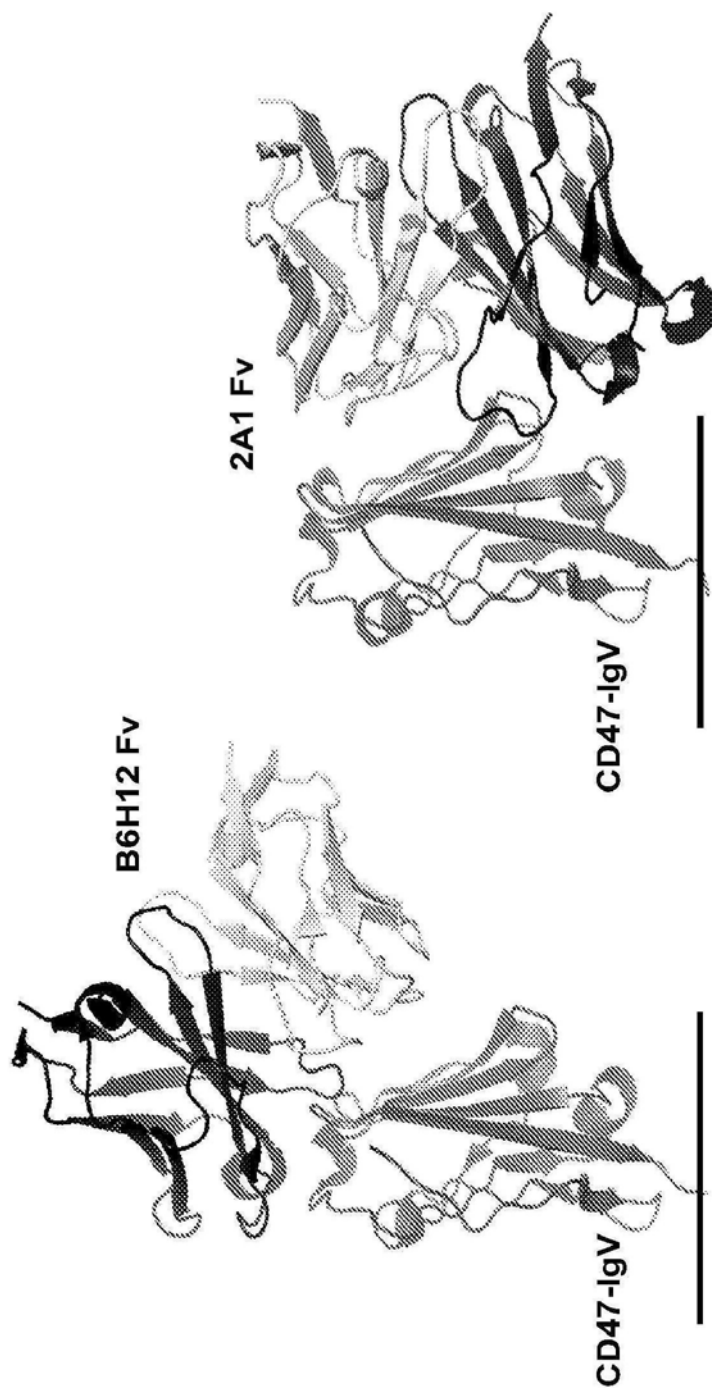


图 11B

图 11C