



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107921121 B

(45) 授权公告日 2022. 02. 08

(21) 申请号 201680024600.9

(22) 申请日 2016.03.04

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107921121 A

(43) 申请公布日 2018.04.17

(30) 优先权数据  
62/128,462 2015.03.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.10.27

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2016/020980 2016.03.04

(87) PCT国际申请的公布数据  
WO2016/141328 EN 2016.09.09

(73) 专利权人 索伦托药业有限公司  
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 B·A·斯汪森 J·D·格雷  
周贺钺

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所  
11517

代理人 赵昊 顾云峰

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2014087248 A2, 2014.06.12

WO 2011143624 A2, 2011.11.17

EP 2111869 A1, 2009.10.28

WO 2013119714 A1, 2013.08.15

US 2014120096 A1, 2014.05.01

US 2003206909 A1, 2003.11.06

Xiao XhenYu et al..Antibosy mediated  
therapy targeting CD47 inhibits tumor  
progression of hepatocellular carcinoma.  
《CANCER LETTERS》.2015,302-309.

Kikuchi Y et al..A bivalent single-  
chain Fv fragment against CD47 induces  
apoptosis for leukemic cells.《BIOCHEMICAL  
AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS》  
.2004,912-918.

审查员 宋梦

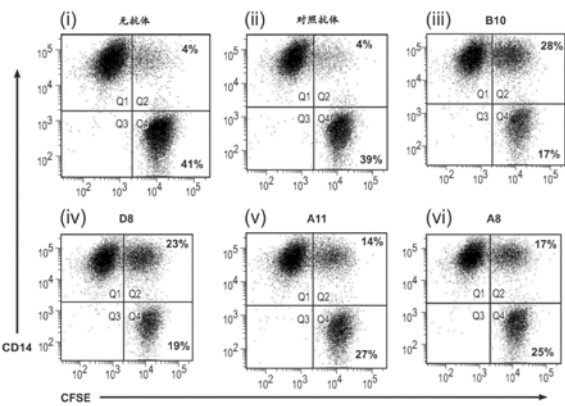
权利要求书1页 说明书46页  
序列表28页 附图4页

(54) 发明名称

结合CD47的抗体治疗剂

(57) 摘要

本文公开了涉及或源自抗CD47抗体的组合物和方法。更具体地,本文公开了结合CD47的全人抗体,这样的抗体的CD47抗体结合片段和衍生物,以及包含这样的片段的CD47结合多肽。此外,本文公开了编码这样的抗体、抗体片段和衍生物、和多肽的核酸,包含这样的多核苷酸的细胞,制备这样的抗体、抗体片段和衍生物、和多肽的方法,以及使用这样的抗体、抗体片段和衍生物、和多肽的方法,包括治疗疾病的方法。



1. 一种结合CD47表位的IgG种类的分离的全人抗CD47抗体,所述抗体包含:  
重链可变结构域,所述重链可变结构域包含如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;和  
轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。
2. 权利要求1所述的全人抗体,其中所述抗体具有至少 $1 \times 10^{-6}$ M的 $K_D$ 。
3. 一种抗CD47全人抗体Fab片段,其包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;并且  
包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。
4. 权利要求3所述的全人抗体Fab片段,其中所述抗体具有至少 $1 \times 10^{-6}$ M的 $K_D$ 。
5. 一种抗CD47单链人抗体,其包含通过肽接头连接的重链可变结构域和轻链可变结构域,其中所述重链可变结构域包含如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;并且  
所述轻链可变结构域包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。
6. 权利要求5所述的单链全人抗体,其中所述抗体具有至少 $1 \times 10^{-6}$ M的 $K_D$ 。
7. 权利要求1-6中任一项所述的抗CD47抗体或抗体片段在制备用于治疗癌症的药物中的用途,所述治疗包括向有需要的受试者施用有效量的所述抗CD47抗体或抗体片段。
8. 权利要求7所述的用途,其中所述癌症选自卵巢癌,结肠癌,乳腺癌,肺癌,骨髓瘤,神经母细胞衍生CNS肿瘤,单核细胞白血病,B细胞衍生白血病,T细胞衍生白血病,B细胞衍生淋巴瘤,T细胞衍生淋巴瘤和肥大细胞衍生肿瘤。
9. 一种分离的抗CD47抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含如SEQ ID NO:22所示的重链可变结构域氨基酸序列中的互补决定区;并且  
包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含如SEQ ID NO:8所示的轻链可变结构域氨基酸序列中的互补决定区。
10. 一种药物组合物,其包含权利要求1至6或9中任一项所述的抗CD47抗体或抗体片段,和药学上可接受的载体。
11. 权利要求9所述的抗CD47抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗有需要的人类受试者中的癌症的药物中的用途,所述治疗包括向所述受试者施用有效量的所述抗CD47抗体或其抗原结合片段,使得癌症被治疗。
12. 权利要求11所述的用途,其中所述癌症选自卵巢癌,结肠癌,乳腺癌,肺癌,骨髓瘤,神经母细胞衍生CNS肿瘤,单核细胞白血病,B细胞衍生白血病,T细胞衍生白血病,B细胞衍生淋巴瘤,T细胞衍生淋巴瘤和肥大细胞衍生肿瘤。

## 结合CD47的抗体治疗剂

### [0001] 相关应用

[0002] 本申请要求2015年3月4日提交的美国临时申请号62/128,462的优先权,其全部内容通过引用整体并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明提供涉及或源自抗CD47抗体的组合物和方法。更具体地,本发明提供结合CD47的全人抗体,这样的抗体的CD47抗体结合片段和衍生物,以及包含这样的片段的CD47结合多肽。此外,本发明提供编码这样的抗体、抗体片段和衍生物、和多肽的核酸,包含这样的多核苷酸的细胞,制备这样的抗体、抗体片段和衍生物、和多肽的方法,以及使用这样的抗体、抗体片段和衍生物、和多肽的方法,包括治疗疾病的方法。

### 背景技术

[0004] CD47,也称为整合素相关蛋白(IAP),卵巢癌抗原OA3,Rh相关抗原和MER6,是属于免疫球蛋白超家族的多跨度跨膜受体。CD47表达和/或活性已经涉及许多疾病和病症。因此,存在对靶向CD47的疗法的需要。以前的抗体中的这些和其它缺陷通过本发明提供对于CD47的全人抗体而克服。

### 发明内容

[0005] 在某些实施方式中,本发明提供结合亲和力为至少 $1 \times 10^{-6}$ M的结合CD47表位的IgG种类的全人抗体,其具有与选自以下的氨基酸序列至少95%相同的重链可变结构域序列:SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:32,及其组合,并且具有与以下氨基酸序列至少95%相同的轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30,及其组合。在一个实施方式中,所述全人抗体具有重链和轻链二者,其中所述抗体具有选自以下的重链/轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2(在本文中称为C47A8),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:4(在本文中称为C47B10),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5(在本文中称为C47B10-1H4S),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:6(在本文中称为C47B10-1F6S),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8(在本文中称为C47B10-1),SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8(在本文中称为C47B10-2A9S),SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:8(在本文中称为C47B10-2B11S),SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:4(在本文中称为C47B10-2B8S),SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:4(在本文中称为C47B10-2C1S),SEQ ID NO:12/SEQ ID NO:4(在本文中称为C47B10-2B9S),SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:4(在本文中称为2C4S),SEQ ID NO:14/SEQ ID NO:15(在本文中称为C47B10-B1C),SEQ ID NO:16/SEQ ID NO:15(在本文中称为C47B10-C6C),SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:15(在本文中称为

C47B10-C3C), SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:15(在本文中称为C47B10-D3C), SEQ ID NO:19/SEQ ID NO:15(在本文中称为C47B10-C11C), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:20(在本文中称为C47KD8), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:21(在本文中称为C47KD9), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8(C47B10-1H4S2), SEQ ID NO:32/SEQ ID NO:15(C47B10-C3C), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:19(C47K11), SEQ ID NO:22/SEQ ID NO:8(C47B10-H3-D4), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:23(C47B10-L1A-A10), SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:8(C47B10-H3-D3), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:25(C47B10-L1A-A4), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:26(C47B10-L3-B2), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:27(C47A8-CA), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:28(C47A8-CL), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:29(C47-A8-CQ)和SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:30(C47A8-CS), 及其组合。

[0006] 在一个实施方式中, 本发明提供Fab全人抗体片段, 其具有来自重链的可变结构域区和来自轻链的可变结构域区, 其中重链可变结构域序列与选自以下的氨基酸序列至少95%相同: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:32, 及其组合, 并且轻链可变结构域序列与以下氨基酸序列至少95%相同: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30, 及其组合。

[0007] 在一个实施方式中, 所述全人抗体Fab片段包含重链可变结构域区和轻链可变结构域区二者, 其中所述抗体具有选自以下的重链/轻链可变结构域序列: SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:12/SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:14/SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16/SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:32/SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:22/SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:30, 及其组合。

[0008] 在一个实施方式中, 本发明提供单链人抗体, 其具有来自重链的可变结构域区和来自轻链的可变结构域区和连接重链与轻链可变结构域区的肽接头, 其中重链可变结构域序列与选自以下的氨基酸序列至少95%相同: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:32, 并且轻链可变结构域序列与以下氨基酸序列至少95%相同: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30, 及其组合。在一个实施方式中, 所述单链全人抗体具有重链可变结

构域区和轻链可变结构域区二者,其中所述单链全人抗体具有选自以下的重链/轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:12/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:14/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:32/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:22/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:30,及其组合。

[0009] 本发明还提供用于治疗广谱哺乳动物癌症或广谱纤维化疾病的方法,其需要刺激免疫应答或抑制,所述方法包括施用抗CD47多肽,其中全人抗体具有与选自以下的氨基酸序列至少95%相同的重链可变结构域序列:SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:32,及其组合,并且具有与以下氨基酸至少95%相同的轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30,及其组合。在一个实施方式中,所述Fab全人抗体片段具有与选自以下的氨基酸序列至少95%相同的重链可变结构域序列:SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:32,及其组合;和与以下氨基酸序列至少95%相同的轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30,及其组合。在一个实施方式中,所述单链人抗体具有与选自以下的氨基酸序列至少95%相同的重链可变结构域序列:SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:32,及其组合;和与以下氨基酸序列至少95%相同的轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30,及其组合。

[0010] 在一个实施方式中,所述全人抗体具有重链和轻链二者,其中所述抗体具有选自以下的重链/轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2(在本文中称为C47A8),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:4(在本文中称为C47B10),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5(在本文中称为C47B10-1H4S),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:6(在本文中称为C47B10-1F6S),SEQ ID NO:1/SEQ

ID NO:8 (在本文中称为C47B10-1), SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8 (在本文中称为C47B10-2A9S), SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:8 (在本文中称为C47B10-2B11S), SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:4 (在本文中称为C47B10-2B8S), SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:4 (在本文中称为C47B10-2C1S), SEQ ID NO:12/SEQ ID NO:4 (在本文中称为C47B10-2B9S), SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:4 (在本文中称为2C4S), SEQ ID NO:14/SEQ ID NO:15 (在本文中称为C47B10-B1C), SEQ ID NO:16/SEQ ID NO:15 (在本文中称为C47B10-C6C), SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:15 (在本文中称为C47B10-C3C), SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:15 (在本文中称为C47B10-D3C), SEQ ID NO:19/SEQ ID NO:15 (在本文中称为C47B10-C11C), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:20 (在本文中称为C47KD8), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:21 (在本文中称为C47KD9), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8 (C47B10-1H4S2), SEQ ID NO:32/SEQ ID NO:15 (C47B10-C3C), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:19 (C47K11), SEQ ID NO:22/SEQ ID NO:8 (C47B10-H3-D4), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:23 (C47B10-L1A-A10), SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:8 (C47B10-H3-D3), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:25 (C47B10-L1A-A4), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:26 (C47B10-L3-B2), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:27 (C47A8-CA), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:28 (C47A8-CL), SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:29 (C47-A8-CQ) 和 SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:30 (C47A8-CS), 及其组合。在一个实施方式中, 所述单链全人抗体具有重链可变结构域区和轻链可变结构域区二者, 其中所述单链全人抗体具有选自以下的重链/轻链可变结构域序列: SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:12/SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:14/SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16/SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:32/SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:22/SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:30, 及其组合。

[0011] 在一个实施方式中, 待治疗的广谱哺乳动物癌症选自自卵巢癌, 结肠癌, 乳腺癌, 肺癌, 骨髓瘤, 神经母细胞衍生CNS肿瘤, 单核细胞白血病, B细胞衍生白血病, T细胞衍生白血病, B细胞衍生淋巴瘤, T细胞衍生淋巴瘤, 肥大细胞衍生肿瘤, 及其组合。

[0012] 在一个实施方式中, 待治疗的广谱纤维化疾病选自心肌梗塞, 心绞痛, 骨关节炎, 肺纤维化, 哮喘, 囊性纤维化, 支气管炎, 哮喘, 及其组合。

[0013] 本发明涉及能够结合CD47的结合蛋白, 包括抗CD47抗体, 及其抗原结合片段。

[0014] 在一个方面, 本发明提供结合亲和力为至少 $1 \times 10^{-6}$ M的结合CD47表位的IgG种类的分离的全人抗CD47抗体, 其具有与选自以下的氨基酸序列至少95%相同的重链可变结构域序列: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:32, 和与选自以下的氨基酸序列至少95%相同的轻链可变结构域序列: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ

ID NO:15,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30。在一个实施方式中,所述全人抗体具有重链和轻链二者,其中所述抗体具有选自以下的重链/轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2 (C47A8),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:4 (C47B10),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8 (C47B10-1),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5 (C47B10-1H4S),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:6 (C47B10-1F6S),SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8 (C47B10-2A9S),SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:8 (C47B10-2B11S),SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:4 (C47B10-2B8S),SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:4 (C47B10-2C1S),SEQ ID NO:12/SEQ ID NO:4 (C47B10-2B9S),SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:4 (2C4S),SEQ ID NO:14/SEQ ID NO:15 (C47B10-B1C),SEQ ID NO:16/SEQ ID NO:15 (C47B10-C6C),SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:15 (C47B10-D3C),SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:15 (C47B10-C11C),SEQ ID NO:19/SEQ ID NO:15 (C47B10-C11C),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:20 (C47KD8),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:21 (C47KD9),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8 (C47B10-1H4S2),SEQ ID NO:32/SEQ ID NO:15 (C47B10-C3C),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:19 (C47K11),SEQ ID NO:22/SEQ ID NO:8 (C47B10-H3-D4),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:23 (C47B10-L1A-A10),SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:8 (C47B10-H3-D3),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:25 (C47B10-L1A-A4),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:26 (C47B10-L3-B2),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:27 (C47A8-CA),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:28 (C47A8-CL),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:29 (C47-A8-CQ) 和SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:30 (C47A8-CS)。

[0015] 在另一个方面中,本发明提供抗CD47Fab全人抗体片段,其具有来自重链的可变结构域区和来自轻链的可变结构域区,其中重链可变结构域序列与选自以下的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:32,并且轻链可变结构域序列与以下氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30。在一个实施方式中,所述全人抗体Fab片段具有重链可变结构域区和轻链可变结构域区二者,其中所述抗体具有选自以下的重链/轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:12/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:14/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:32/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:22/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:30。

[0016] 在另一个方面,本发明提供抗CD47单链人抗体,其具有来自重链的可变结构域区

和来自轻链的可变结构域区和连接重链与轻链可变结构域区的肽接头,其中重链可变结构域序列与选自以下的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:32,并且轻链可变结构域序列与以下氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30。

[0017] 在一个实施方式中,所述单链全人抗体具有重链可变结构域区和轻链可变结构域区二者,其中所述单链全人抗体具有选自以下的重链/轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:12/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:14/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:32/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:22/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:30。

[0018] 本发明还包括分离的抗CD47抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含选自以下的重链可变区域氨基酸序列中的互补决定区(CDR):SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:32;并且包含轻链可变区,所述轻链可变区包含选自以下的轻链可变区氨基酸序列中的CDR:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30。

[0019] 本发明还提供用于治疗癌症或纤维化疾病的方法,所述方法包括施用抗CD47多肽,其中所述抗CD47多肽选自包含重链可变结构域和轻链可变结构域的结合CD47的IgG种类的分离的全人抗体;包含重链可变结构域和轻链可变结构域的抗CD47全人抗体Fab片段;和包含重链可变结构域和轻链可变结构域的单链人抗体,其中所述重链可变结构域和所述轻链可变结构域通过肽接头连接;其中所述重链可变结构域包含与选自以下的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:32,并且轻链可变结构域序列与选自以下的氨基酸至少95%相同:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30。



[0020] 在一个实施方式中,所述全人抗体或抗体片段具有重链和轻链二者,其中所述抗体或抗体片段包含选自以下的重链/轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:12/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:14/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:32/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:22/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:30。

[0021] 在某些实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段具有至少 $1 \times 10^{-6}$ M的 $K_D$ 。在其它实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段具有至少 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 。在其它实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段具有至少 $1 \times 10^{-8}$ M的 $K_D$ 。

[0022] 在某些实施方式中,所述抗体是IgG1同种型。在其它实施方式中,所述抗体是IgG4同种型。

[0023] 在某些实施方式中,本文所述的抗CD47抗体或抗原结合片段是重组的。在某些实施方式中,本文所述的抗CD47抗体或抗原结合片段是人抗体,或抗原结合片段。

[0024] 本发明还提供药物组合物,其包含有效量的本文公开的抗CD47抗体或片段,和药学上可接受的载体。

[0025] 在某些实施方式中,本发明的特征在于治疗有需要的人类受试者中的癌症或者纤维化疾病的方法,其包括向所述受试者施用有效量的本文公开的抗CD47抗体或其抗原结合片段,使得癌症被治疗。

[0026] 在一个实施方式中,所述癌症选自卵巢癌,结肠癌,乳腺癌,肺癌,骨髓瘤,神经母细胞衍生CNS肿瘤,单核细胞白血病,B细胞衍生白血病,T细胞衍生白血病,B细胞衍生淋巴瘤,T细胞衍生淋巴瘤和肥大细胞衍生肿瘤。

[0027] 在另一个实施方式中,所述纤维化疾病选自心肌梗塞,心绞痛,骨关节炎,肺纤维化,哮喘,囊性纤维化,支气管炎和哮喘。

## 附图说明

[0028] 图1显示抗CD47抗体但不是对照抗体促进K562的吞噬作用的能力。图1所示的结果来自流式细胞法试验。右上象限中的细胞群代表具有被吞噬的K562细胞的巨噬细胞。右下象限中的细胞是尚未被吞噬的K562细胞。图1中的小图代表以下:(i)无抗体;(ii)对照抗体(同种型匹配的阴性对照抗体(即,不仅不结合CD47而且还不结合细胞的抗体));(iii)B10;(iv)D8;(v)A11;(vi)A8。测试的所有抗CD47抗体都表现出一定活性,B10(iii)促进最多的吞噬作用。

[0029] 图2显示用于测定抗体A8和某些A8变体(A8-CL,A8-CA,A8-CS,A8-CQ)对CD47的结合特异性的ELISA试验结果。

[0030] 图3显示用于测定抗体B10和B10变体 (B10-H3-D3, B10-L3-B2, B10-H3-D4, B-10-L1A-A4, B10-L1A-A10) 对CD47的结合特异性的ELISA试验结果。

[0031] 图4显示用于测定抗体B10和B10变体 (B10-B1C, B10-C6C, B10-C11C, B10-D3C, B10-C3C, B10-2A9S, B10-F6S, B10-2B-9S) 对CD47的结合特异性的ELISA试验结果。

## 具体实施方式

### [0032] 定义

[0033] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”各自是指包含通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸残基的分子。这些术语包括例如天然和人造蛋白质、蛋白质序列的蛋白质片段和多肽类似物 (例如突变蛋白、变体和融合蛋白) 以及翻译后或在其他方面共价或非共价修饰的蛋白质。肽、多肽或蛋白质可以是单体的或聚合的。

[0034] 多肽的“变体” (例如, 抗体的变体) 包含氨基酸序列, 其中相对于另一个多肽序列, 一个或多个氨基酸残基被插入到该氨基酸序列中、被从该氨基酸序列删除, 和/或被置换到该氨基酸序列中。公开的变体包括例如融合蛋白。

[0035] 多肽的“衍生物”是已经化学修饰的多肽 (例如, 抗体), 例如通过缀合到另一化学部分 (例如聚乙二醇或白蛋白, 例如人血清白蛋白), 磷酸化和糖基化。除非另有说明, 术语“抗体”除了包含两条全长重链和两条全长轻链的抗体以外, 还包括其衍生物, 变体, 片段和突变蛋白, 其实例如下所述。

[0036] “抗原结合蛋白”是包含结合抗原的部分和, 任选地, 允许抗原结合部分采取促进抗原结合蛋白与抗原结合的构型的支架或框架部分的蛋白质。抗原结合蛋白的实例包括抗体, 抗体片段 (例如, 抗体的抗原结合部分), 抗体衍生物和抗体类似物。抗原结合蛋白可以包含例如具有移植的CDR或CDR衍生物的替代性蛋白支架或人造支架。这样的支架包括但不限于包含被引入以例如稳定抗原结合蛋白的三维结构的突变的抗体衍生支架以及包含例如生物相容性聚合物的全合成支架。参见, 例如, Korndorfer等, 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 第53卷, 第1期: 121-129; Roque等, 2004, *Biotechnol. Prog.* 20: 639-654。此外, 可以使用肽抗体模拟物 (“PAM”), 以及利用纤维连接蛋白成分作为支架的基于抗体模拟物的支架。

[0037] 抗原结合蛋白可以具有例如免疫球蛋白的结构。“免疫球蛋白”是由相同的两对多肽链组成的四聚体分子, 每对具有一个“轻”链 (约25kDa) 和一个“重”链 (约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包含主要负责抗原识别的具有约100至110个或更多个氨基酸的可变区。每个链的羧基末端部分定义主要负责效应子功能的恒定区。人类轻链被分类为 $\kappa$ 或 $\lambda$ 轻链。重链被分类为 $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ 或 $\epsilon$ , 并分别将抗体的同种型定义为IgM, IgD, IgG, IgA和IgE。在一个实施方式中, 本文公开的抗CD47抗体的特征在于其重 $V_H$ 和轻 $V_L$ 氨基酸序列中的可变结构域区序列。在轻链和重链中, 可变区和恒定区通过具有约12个或更多个氨基酸的“J”区连接, 重链还包含具有约10或更多个氨基酸的“D”区。通常参见, *Fundamental Immunology* Ch.7 (Paul, W. 编辑, 第2版, Raven Press, N.Y. (1989))。每个轻链/重链对的可变区形成抗体结合位点, 使得完整的免疫球蛋白具有两个结合位点。

[0038] 免疫球蛋白链的可变区显示出由也称为互补决定区或CDR的三个高变区连接的相对保守的框架区 (FR) 的相同通用结构。从N端到C端, 轻链和重链二者都包含结构域FR1,

CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3和FR4。氨基酸分配到每个结构域是根据Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,US Dept.of Health and Human Services,PHS,NIH,NIH Publication no.91-3242,1991中的定义。用于免疫球蛋白链中的氨基酸的其他编号系统包括IMGT.RTM.(国际ImMunoGeneTics信息系统;Lefranc等,Dev.Comp.Immunol.29:185-203;2005)和AHO(Honegger和Pluckthun,J.Mol.Biol.39(3):657-670;2001)。

[0039] 除非另有规定,否则“抗体”是指完整免疫球蛋白或指其与完整抗体竞争特异性结合的抗原结合部分。在一个实施方式中,抗体包含重链和轻链,所述重链包含重链可变结构域和重链恒定区 $C_{H1}$ , $C_{H2}$ 和 $C_{H3}$ ,所述轻链包含轻链可变结构域和轻链恒定区( $C_L$ )。重链和轻链可变结构域序列可以选自SEQ ID NO:1至32中所述的那些。

[0040] 抗体的抗原结合部分可以通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学切割产生。抗原结合部分包括,尤其是,Fab,Fab', $F(ab')_2$ ,Fv,结构域抗体(dAb)和互补决定区(CDR)片段,单链抗体(scFv),嵌合抗体,双抗体,三抗体,四抗体和含有免疫球蛋白的至少一部分的多肽,所述至少一部分足以赋予该多肽以特异性抗原结合。

[0041] 在某些实施方式中,抗体可以从含有具有不同抗原特异性的免疫球蛋白的来源例如血清或血浆获得。如果这样的抗体进行亲和纯化,则可以根据特定的抗原特异性富集它们。这种抗体富集制备物通常由小于约10%的具有针对特定抗原的特异性结合活性的抗体构成。使这些制备物进行多轮亲和纯化可以增加对该抗原具有特异性结合活性的抗体的比例。以这种方式制备的抗体通常被称为是“单特异性的”。

[0042] 如本文所用,术语“单特异性的”是指显示对一种特定表位的亲和力的抗体。单特异性抗体制备物可以由约10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,97%,99%,或99.9%的具有针对特定抗原的特异性结合活性的抗体构成。

[0043] “抗体片段”或“抗体的抗原结合片段”包含完整抗体的一部分,并且优选包含抗体抗原结合或可变结构域。抗体片段的实例包括Fab,Fab', $F(ab')_2$ ,Fv片段和线性抗体。

[0044] Fab片段是具有 $V_L$ , $V_H$ , $C_L$ 和 $C_{H1}$ 结构域的单价片段; $F(ab')_2$ 片段是具有在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;Fd片段具有 $V_H$ 和 $C_{H1}$ 结构域;Fv片段具有抗体的单臂的 $V_L$ 和 $V_H$ 结构域;并且dAb片段具有 $V_H$ 结构域, $V_L$ 结构域,或者 $V_H$ 或 $V_L$ 结构域的抗原结合片段(美国专利6,846,634;6,696,245,美国申请公布20/0202512;2004/0202995;2004/0038291;2004/0009507;2003/0039958和Ward等,Nature 341:544-546,1989)。

[0045] 单链抗体(scFv)是其中 $V_L$ 和 $V_H$ 区通过接头(例如,氨基酸残基的合成序列)连接以形成连续蛋白链的抗体,其中所述接头足够长以允许蛋白质链自身折叠并形成单价抗原结合位点(参见,例如,Bird等,1988,Science 242:423-26和Huston等,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,85:5879-83)。

[0046] 双抗体是包含两条多肽链的二价抗体,其中每条多肽链包含通过接头连接的 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域,所述接头太短而不允许同一链上的两个结构域之间配对,从而允许每个结构域与另一条多肽链上的互补结构域配对(参见,例如,Holliger等,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:6444-48,和Poljak等,1994,Structure 2:1121-23)。如果双抗体的两条多肽链相同,则由其配对产生的双抗体将具有两个相同的抗原结合位点。具有不同序列的多肽链可用于制备具有两个不同抗原结合位点的双抗体。类似地,三抗体和四

抗体分别是包含三条和四条多肽链的抗体,并分别形成可以相同或不同的三个和四个抗原结合位点。

[0047] 抗原结合蛋白,例如抗体,可以具有一个或多个结合位点。如果存在多于一个结合位点,则结合位点可以彼此相同或可以不同。例如,天然存在的人免疫球蛋白通常具有两个相同结合位点,而“双特异性”或“双功能”抗体具有两个不同结合位点。

[0048] 术语“人抗体”包括具有衍生自人免疫球蛋白序列的一个或多个可变区和恒定区的抗体。在一个实施方式中,抗体的所有可变和恒定结构域都衍生自人免疫球蛋白序列(称为“全人抗体”)。这些抗体可以以各种方式制备,其实例如下所述,包括通过用感兴趣的抗原对经遗传修饰以表达衍生自人重链和/或轻链编码基因的抗体的小鼠进行免疫。在优选实施方式中,使用重组方法制备全人抗体,使得抗体的糖基化模式与具有相同氨基酸序列的抗体(如果其存在于自然界中)不同。

[0049] “人源化抗体”具有与衍生自非人物种的抗体的序列相差一个或多个氨基酸置换、缺失和/或添加的序列,使得在其被施用于人受试者时,人源化抗体与非人物种抗体相比,更不可能诱导免疫应答,和/或诱导更不严重的免疫应答。在一个实施方式中,非人物种抗体的重链和/或轻链的框架和恒定结构域中的某些氨基酸被突变以产生人源化抗体。在另一个实施方式中,来自人抗体的恒定结构域与非人物种的可变结构域融合。在另一个实施方式中,非人抗体的一个或多个CDR序列中的一个或多个氨基酸残基被改变以减少非人抗体在其被施用于人受试者时的可能免疫原性,其中被改变的氨基酸残基对于抗体对其抗原的免疫特异性结合不是关键的,或者对氨基酸序列造成的变化是保守变化,使得人源化抗体与抗原的结合不显著差于非人抗体与抗原的结合。如何制备人源化抗体的实例可见于美国专利6,054,297,5,886,152和5,877,293。

[0050] 术语“嵌合抗体”是指含有来自一种抗体的一个或多个区域和来自一种或多种其它抗体的一个或多个区域的抗体。在一个实施方式中,CDR中的一个或多个衍生自人抗CD47抗体。在另一个实施方式中,所有CDR都衍生自人抗CD47抗体。在另一个实施方式中,来自多于一种人抗CD47抗体的CDR在嵌合抗体中混合并匹配。例如,嵌合抗体可以包含来自第一人抗CD47抗体的轻链的CDR1,来自第二人抗CD47抗体的轻链的CDR2和CDR3,以及来自第三抗CD47抗体的重链的CDR。其他组合是可能的。

[0051] 此外,框架区可以衍生自相同抗CD47抗体之一,衍生自一种或多种不同抗体,例如人抗体,或者衍生自人源化抗体。在嵌合抗体的一个实例中,重链和/或轻链的一部分与来自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体相同、同源、或衍生自其,而链的其余部分与来自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体相同、同源、或衍生自其。还包括的是表现出期望生物活性(即特异性结合CD47的能力)的这样的抗体的片段。

[0052] “抑制性抗体”是抑制CD47活性的抗体。在一个实施方式中,如果抗CD47抗体可以防止CD47与其配体信号调节蛋白- $\alpha$  (SIRP $\alpha$ )结合,则该抗体是抑制性抗体。在一个实施方式中,当过量的抗CD47抗体将CD47活化的量减少至少约20%时,抗CD47抑制性抗体抑制CD47的蛋白水解活化。CD47活化可以通过本领域已知的各种方法中的任一种测定,例如使用试验如本文实施例中所述的那些。在各种实施方式中,抗原结合蛋白将CD47的蛋白水解活化的量减少至少30%,40%,50%,60%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,97%,99%和99.9%。

[0053] “CDR移植抗体”是包含衍生自特定物种或同种型的抗体的一个或多个CDR和相同或不同物种或同种型的另一抗体的框架的抗体。

[0054] “多特异性抗体”是识别一个或多个抗原上的多于一个表位的抗体。这种类型的抗体的亚类是识别相同或不同抗原上的两个不同表位的“双特异性抗体”。

[0055] 如果抗原结合蛋白以1纳摩尔或更低的解离常数结合抗原(例如人CD47),则其“特异性结合”该抗原。

[0056] “抗原结合结构域”、“抗原结合区”或“抗原结合位点”是含有与抗原相互作用并有助于抗原结合蛋白对该抗原的特异性和亲和力的氨基酸残基(或其他部分)的抗原结合蛋白的一部分。对于特异性结合其抗原的抗体,这将包含其CDR结构域中的至少一个的至少部分。

[0057] 术语“Fc多肽”包括衍生自抗体的Fc区的多肽的天然和突变蛋白形式。还包括含有促进二聚化的铰链区的这样的多肽的截短形式。包含Fc部分(和由其形成的寡聚体)的融合蛋白提供容易通过在蛋白A或蛋白G柱上进行亲和色谱法纯化的优点。

[0058] “表位”是由抗原结合蛋白(例如抗体)结合的分子的部分。表位可以包含分子的不连续部分(例如,在多肽中,在多肽的一级序列中不连续,但在多肽的三级和四级结构的情况下彼此足够接近以被抗原结合蛋白结合的氨基酸残基)。

[0059] 通过使用默认参数,使用GAP计算机程序(GCG Wisconsin Package的一部分,10.3版(Accelrys, San Diego, Calif.))比较序列,测定两个多核苷酸或两个多肽序列的“百分比同一性”或“百分比同源性”。

[0060] 术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”可全文互换使用,并且包括DNA分子(例如cDNA或基因组DNA),RNA分子(例如mRNA),使用核苷酸类似物产生的DNA或RNA的类似物(例如肽核酸和非天然存在的核苷酸类似物),及其杂交物。核酸分子可以是单链或双链的。在一个实施方式中,本发明的核酸分子包含编码抗体或其片段,衍生物,突变蛋白或变体的连续开放阅读框。

[0061] 如果两个单链多核苷酸的序列可以在反向平行方向上对准,使得一个多核苷酸中的每个核苷酸都与其在其他多核苷酸中的互补核苷酸相反,而不引入间隙,并且在每一序列的5'或3'端没有未成对核苷酸,则它们是彼此的“补体”。如果两个多核苷酸可以在适度严格的条件下彼此杂交,则多核苷酸与另一多核苷酸“互补”。因此,多核苷酸可以与另一多核苷酸互补而不是其补体。

[0062] “载体”是可用于将与其连接的另外的核酸引入细胞的核酸。一种类型的载体是“质粒”,其是指其中可以连接另外的核酸片段的线性或圆形双链DNA分子。另一种类型的载体是病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),其中可将另外的DNA片段引入病毒基因组。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制(例如,包含细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其它载体(例如,非附加型哺乳动物载体)在引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。“表达载体”是可以指导选定多核苷酸的表达的一种载体。

[0063] 如果调控序列影响核苷酸序列的表达(例如,表达的水平、时机或位置),则核苷酸序列被“可操作地连接”到调控序列。“调控序列”是影响其可操作地连接的核酸的表达(例如,表达的水平、时机或位置)的核酸。调控序列可以例如直接对所调控的核酸发挥其作用,

或者通过一种或多种其它分子(例如结合调控序列和/或核酸的多肽)的作用发挥其作用。调控序列的实例包括启动子、增强子和其他表达控制元件(例如聚腺苷酸化信号)。调控序列的另一些实例描述于例如Goeddel,1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. 和Baron等,1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-06。

[0064] “宿主细胞”是可用于表达核酸(例如本发明的核酸)的细胞。宿主细胞可以是原核生物,例如大肠杆菌,或者它可以是真核生物,例如单细胞真核生物(例如,酵母或其他真菌),植物细胞(例如烟草或番茄植物细胞),动物细胞(例如人细胞,猴细胞,仓鼠细胞,大鼠细胞,小鼠细胞或昆虫细胞)或杂交瘤。宿主细胞的实例包括猴肾细胞的COS-7系(ATCC CRL 1651)(参见Gluzman等,1981, Cell 23:175),L细胞,C127细胞,3T3细胞(ATCC CCL 163),中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或其衍生物如素食CHO(Veggie CHO)和在无血清培养基中生长的相关细胞系(参见Rasmussen等,1998, Cytotechnology 28:31)或CHO品系DX-B11,其具有DHFR缺陷(参见Urlaub等,1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20),HeLa细胞,BHK(ATCC CRL 10)细胞系,衍生自非洲绿猴肾细胞系CV1的CV1/EBNA细胞系(ATCC CCL 70)(参见McMahan等,1991, EMBO J. 10:2821),人胚肾细胞如293,293EBNA或MSR 293,人表皮A431细胞,人Colo205细胞,其他转化灵长动物细胞系,正常二倍体细胞,衍生自原代组织的体外培养物的细胞品系,原代外植体,HL-60,U937,HaK或Jurkat细胞。在一个实施方式中,宿主细胞是哺乳动物宿主细胞,但不是人宿主细胞。通常,宿主细胞是可以用编码多肽的核酸转化或转染的培养细胞,其可以在宿主细胞中表达。短语“重组宿主细胞”可用于表示已经用待表达的核酸转化或转染的宿主细胞。宿主细胞还可以是包含核酸,但除非调控序列被引入宿主细胞,使得调控序列变得与核酸可操作地连接,否则不以期望水平表达核酸的细胞。应当理解,术语宿主细胞不仅指特定的受试细胞,而且还指这样的细胞的后代或潜在后代。因为由于例如突变或环境影响,在后续世代中可能发生某些修饰,所以这样的后代实际上可能不与母细胞相同,但仍被包括在本文所用术语的范围内。

[0065] 术语“重组抗体”是指从用包含抗体(或其部分)的编码序列的表达载体(或可能多于一种表达载体)转染的细胞或细胞系表达的抗体,其中所述编码序列不是天然地与细胞结合。在一个实施方式中,重组抗体具有与具有相同序列的抗体(如果其存在于自然界中)的糖基化模式不同的糖基化模式。在一个实施方式中,重组抗体在不是人宿主细胞的哺乳动物宿主细胞中表达。特别地,个体哺乳动物宿主细胞具有独特的糖基化模式

[0066] 本文所用的术语“有效量”是指结合CD47的抗体或其抗原结合部分的量,其足以在被施用于受试者时,实现对如本文所述的CD47依赖性信号传导相关疾病的治疗、预后或诊断。当单独使用或组合使用时,本文提供的抗体的治疗有效量将根据抗体的相对活性(例如,促进巨噬细胞介导的对表达CD47的癌细胞的吞噬作用),并且根据所治疗的受试者和疾病状况,受试者的体重和年龄,疾病状况的严重度,施用方式等而发生变化,其可以由本领域普通技术人员容易地确定。

[0067] 本文所用的术语“分离的”是指基本上不含其它细胞物质的蛋白质(例如抗体)。在一个实施方式中,分离的抗体基本上不含来自相同物种的其它蛋白质。在一个实施方式中,分离的抗体由来自不同物种的细胞表达,并且基本上不含来自所述不同物种的其它蛋白质。通过使用本领域熟知的蛋白质纯化技术进行分离,可以使蛋白质基本上不含天然相关

组分(或与用于产生抗体的细胞表达系统相关的组分)。在一个实施方式中,本发明的抗体或抗原结合片段是分离的。

#### [0068] CD47抗原结合蛋白

[0069] 本发明涉及结合CD47(例如人CD47)的CD47结合蛋白,特别是抗CD47抗体或其抗原结合部分,及其用途。本发明的各个方面涉及抗体和抗体片段,药物组合物,核酸,重组表达载体和用于制备这样的抗体和片段的宿主细胞。本发明还包括使用本发明的抗体检测人CD47,体外或体内抑制CD47活性,以及预防或治疗疾病如癌症的方法。

[0070] 如下表5所述,本发明包括的是包含对CD47具有特异性的重链和轻链可变区的新型抗体。在一个实施方式中,本发明提供抗CD47抗体,或其抗原结合片段,其包含重链,所述重链具有包含以下中的任一个所述的氨基酸序列的可变结构域:SEQ ID NO:1,7,9,10,11,12,13,14,16,17,18,22,24和32。在一个实施方式中,本发明提供抗CD47抗体,或其抗原结合片段,其包含轻链,所述轻链具有包含以下中的任一个所述的氨基酸序列的可变结构域:SEQ ID NO:2,4,5,6,8,15,19,20,21,23,25,26,27,28,29和30。在一个实施方式中,本发明提供抗CD47抗体,或其抗原结合片段,其包含轻链,所述轻链具有包含以下中的任一个所述的氨基酸序列的可变结构域:SEQ ID NO:2,4,5,6,8,15,19,20,21,23,25,26,27,28,29和30;并且包含重链,所述重链具有包含以下中的任一个所述的氨基酸序列的可变结构域:SEQ ID NO:1,7,9,10,11,12,13,14,16,17,18,22,24和32。

[0071] 已知互补决定区(CDR)是轻链和重链可变结构域二者中的高变区。可变结构域的更加高度保守的部分被称为框架(FR)。给定抗体的互补决定区(CDR)和框架区(FR)可以使用Kabat等,同上;Lefranc等,同上;和/或Honegger和Pluckthun,同上所描述的系统识别。本领域技术人员也熟悉Kabat等(1991,NIH Publication 91-3242,National Technical Information Service,Springfield,Va.)描述的编号系统。在这个方面,Kabat等定义了适用于任何抗体的可变结构域序列的编号系统。本领域普通技术人员可以毫无疑问地将该“Kabat编号”系统分配给任何可变结构域氨基酸序列,而不依赖于序列本身以外的任何实验数据。

[0072] 在某些实施方式中,本发明提供抗CD47抗体,其包含表5所述的重链和轻链可变结构域(SEQ ID NO:1至32)的CDR。例如,本发明提供抗CD47抗体,或其抗原结合片段,其包含重链可变区,所述重链可变区具有以下中的任一个所述的氨基酸序列中的CDR:SEQ ID NO:1,7,9,10,11,12,13,14,16,17,18,22,24和32。在一个实施方式中,本发明提供抗CD47抗体,或其抗原结合片段,其包含轻链可变区,所述轻链可变区具有以下中的任一个所述的氨基酸序列中的CDR:SEQ ID NO:2,4,5,6,8,15,19,20,21,23,25,26,27,28,29和30。在一个实施方式中,本发明提供抗CD47抗体,或其抗原结合片段,其包含轻链可变区,所述轻链可变区具有以下中的任一个所述的氨基酸序列中的CDR:SEQ ID NO:2,4,5,6,8,15,19,20,21,23,25,26,27,28,29和30;并且包含重链可变区,所述重链可变区具有以下中的任一个所述的氨基酸序列中的CDR:SEQ ID NO:1,7,9,10,11,12,13,14,16,17,18,22,24和32。

[0073] 一个或多个CDR可以共价或非共价地引入分子以使其成为抗原结合蛋白。抗原结合蛋白可以引入CDR作为较大多肽链的部分,可以将CDR共价连接到另一个多肽链,或者可以非共价地引入CDR。CDR允许抗原结合蛋白特异性结合感兴趣的特定抗原。

[0074] 在一个实施方式中,本发明提供IgG种类的全人抗体,其结合CD47表位,并且具有

与选自以下的氨基酸序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同或至少99%相同的重链可变结构域序列:SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:32,及其组合,并且具有与以下氨基酸序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同或至少99%的轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30,及其组合。在一个实施方式中,所述结合CD47表位的IgG种类的抗体具有 $10^{-6}$ M或更小的CD47结合亲和力和。在一个实施方式中,所述全人抗体具有重链和轻链二者,其中所述抗体具有选自以下的重链/轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2 (C47A8),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:4 (C47B10),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8 (C47B10-1),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5 (C47B10-1H4S),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:6 (C47B10-1F6S),SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8 (C47B10-2A9S),SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:8 (C47B10-2B11S),SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:4 (C47B10-2B8S),SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:4 (C47B10-2C1S),SEQ ID NO:12/SEQ ID NO:4 (C47B10-2B9S),SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:4 (2C4S),SEQ ID NO:14/SEQ ID NO:15 (C47B10-B1C),SEQ ID NO:16/SEQ ID NO:15 (C47B10-C6C),SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:15 (C47B10-D3C),SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:15 (C47B10-C11C),SEQ ID NO:19/SEQ ID NO:15 (C47B10-C11C),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:20 (C47KD8),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:21 (C47KD9),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8 (C47B10-1H4S2),SEQ ID NO:32/SEQ ID NO:15 (C47B10-C3C),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:19 (C47K11),SEQ ID NO:22/SEQ ID NO:8 (C47B10-H3-D4),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:23 (C47B10-L1A-A10),SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:8 (C47B10-H3-D3),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:25 (C47B10-L1A-A4),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:26 (C47B10-L3-B2),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:27 (C47A8-CA),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:28 (C47A8-CL),SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:29 (C47-A8-CQ)和SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:30 (C47A8-CS),及其组合。

[0075] 应注意,全文所述的抗CD47抗体是指在名称之前有或没有“C47”。例如,C47KD8在全文中可互换地指代C47KD8和KD8。

[0076] 在一个实施方式中,本发明提供抗CD47抗体,或其抗原结合片段,其包含重链,所述重链包含以下中的任一个中的CDR3结构域:SEQ ID NO:1,7,9,10,11,12,13,14,16,17,18,22,24和32,并且包含可变结构域,所述可变结构域包含与以下中的任一个所述的序列具有至少95%,至少96%,至少97%,至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:1,7,9,10,11,12,13,14,16,17,18,22,24和32。在一个实施方式中,本发明提供抗CD47抗体,或其抗原结合片段,其包含轻链,所述轻链包含以下中的任一个中的CDR3结构域:SEQ ID NO:2,4,5,6,8,15,19,20,21,23,25,26,27,28,29和30,并且具有轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含与以下中的任一个所述的序列至少95%,至少96%,至少97%,至少98%或至少99%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:2,4,5,6,8,15,19,20,21,23,25,26,27,28,29和30。因此,在某些实施方式中,CDR3结构域保持不变,同时可变性可被引入重链和/或轻链的其余CDR和/或框架区,同时抗体或其抗原结合片段保留结合CD47的能力并保留母



体的功能特性,例如结合亲和力。

[0077] 在一个实施方式中,在至少95%相同(或至少96%相同,或至少97%相同,或至少98%相同或至少99%相同)的重链或轻链中进行的置换是保守氨基酸置换。“保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有化学性质(例如电荷或疏水性)相似的侧链(R基团)的另一个氨基酸残基置换的置换。通常,保守氨基酸置换将基本上不改变蛋白质的功能性。在两个或更多个氨基酸序列彼此相差保守置换的情况下,可以向上调整百分比序列同一性或相似程度,以就置换的保守性质作出修正。用于进行该调整的方法是本领域技术人员熟知的。参见,例如,Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-331,其通过引用并入本文。具有化学性质相似的侧链的氨基酸的组的实例包括(1)脂族侧链:甘氨酸,丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸;(2)脂族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;(3)含酰胺侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)芳族侧链:苯丙氨酸,酪氨酸和色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸,精氨酸和组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸,和(7)含硫侧链是半胱氨酸和甲硫氨酸。

[0078] 在一个实施方式中,本发明涉及具有表5所述抗体中的任一个的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。

[0079] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47A8的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:1所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:2所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:1的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:2的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:1所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:2所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0080] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:1所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:4所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:1的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:4的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:1所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:4所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0081] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-1H4S的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:1所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:5所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:1的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:5的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:1所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与

SEQ ID NO:5所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0082] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-1的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:1所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:8所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:1的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:8的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:1所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:8所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0083] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-1F6S的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:1所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:6所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:1的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:6的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:1所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:6所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0084] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-2A9S的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:7所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:8所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:7的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:8的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:7所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:8所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0085] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-2B11S的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:9所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:8所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:9的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:8的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:9所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:8所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0086] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-2B8S的抗原结合区的抗体或其

抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:10所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:4所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:10的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:4的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:10所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:4所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0087] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-2C1S的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:11所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:4所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:11的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:4的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:11所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:4所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0088] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-2B9S的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:12所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:4所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:12的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:4的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:12所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:4所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0089] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-2C4S的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:13所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:4所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:13的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:4的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:13所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:4所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0090] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-B1C的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:14所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:15所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:14的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:15

的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:14所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:15所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0091] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-C6C的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:16所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:15所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:16的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:15的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:16所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:15所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0092] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-C3C的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:32所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:15所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:32的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:15的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:32所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:15所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0093] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-D3C的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:17所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:15所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:17的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:15的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:17所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:15所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0094] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-C11C的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:18所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:15所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:18的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:15的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:18所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与

SEQ ID NO:15所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0095] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47K11的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:1所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:19所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:1的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:19的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:1所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:19所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0096] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47KD8的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:1所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:20所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:1的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:20的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:1所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:20所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0097] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47KD8的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:1所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:21所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:1的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:21的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:1所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:21所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0098] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-H3-D4的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:1所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:19所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:1的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:19的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:1所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:19所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0099] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-L1A-A10的抗原结合区的抗体或

其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:1所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:23所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:1的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:23的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:1所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:23所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0100] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-H3-D3的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:24所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:8所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:24的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:8的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:24所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:8所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0101] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-L1A-A4的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:1所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:25所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:1的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:25的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:1所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:25所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0102] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47B10-L3-B2的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:1所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:26所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:1的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:26的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:1所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:26所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0103] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47A8-CA的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:1所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:27所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:1的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:27的CDR

的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:1所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:27所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0104] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47A8-CL的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:1所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:28所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:1的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:28的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:1所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:28所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0105] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47A8-CQ的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:1所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:29所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:1的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:29的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:1所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:29所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0106] 在一个实施方式中,本发明涉及具有抗体C47A8-CS的抗原结合区的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明提供包含如SEQ ID NO:1所示的重链可变结构域序列和如SEQ ID NO:30所示的轻链可变结构域序列的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,本发明涉及具有包含SEQ ID NO:1的CDR的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:30的CDR的轻链可变结构域的抗体。在一个实施方式中,本发明的特征在于分离的人抗体或其抗原结合片段,其包含具有与SEQ ID NO:1所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的重链可变区,并且包含具有与SEQ ID NO:30所示的序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列的轻链可变区。抗体还可以是IgG1或IgG4同种型。

[0107] 如表5所述,重链可变序列SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:32彼此具有至少95%同一性。

[0108] 如表5所述,许多轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:2至少95%相同的氨基酸序列,包括SEQ ID NO:27(如针对抗体C47A8-CA所述),SEQ ID NO:28(如针对抗体C47A8-CL所述),SEQ ID NO:29(如针对抗体C47A8-CQ所述)和SEQ ID NO:30(如针对抗体C47A8-CS所



述)。

[0109] 许多轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:27至少95%相同的氨基酸序列,包括SEQ ID NO:2(如针对抗体C47A8所述),SEQ ID NO:28(如针对抗体C47A8-CL所述),SEQ ID NO:29(如针对抗体C47A8-CQ所述)和SEQ ID NO:30(如针对抗体C47A8-CS所述)。

[0110] 许多轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:28至少95%相同的氨基酸序列,包括SEQ ID NO:2(如针对抗体C47A8所述),SEQ ID NO:27(如针对抗体C47A8-CA所述),SEQ ID NO:29(如针对抗体C47A8-CQ所述)和SEQ ID NO:30(如针对抗体C47A8-CS所述)。

[0111] 许多轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:29至少95%相同的氨基酸序列,包括SEQ ID NO:2(如针对抗体C47A8所述),SEQ ID NO:27(如针对抗体C47A8-CA所述),SEQ ID NO:28(如针对抗体C47A8-CL所述)和SEQ ID NO:30(如针对抗体C47A8-CS所述)。

[0112] 许多轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:30至少95%相同的氨基酸序列,包括SEQ ID NO:2(如针对抗体C47A8所述),SEQ ID NO:27(如针对抗体C47A8-CA所述),SEQ ID NO:28(如针对抗体C47A8-CL所述)和SEQ ID NO:29(如针对抗体C47A8-CQ所述)。

[0113] 许多轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:8至少95%相同的氨基酸序列,包括SEQ ID NO:26(如针对抗体C47B10-L3-B2所述),SEQ ID NO:25(如针对抗体C47B10-L1A-A4所述),SEQ ID NO:23(如针对抗体C47B10-L1A-A10所述),SEQ ID NO:15(如针对抗体C47B10-C11C,C47B10-D3C,C47B10-C3C,C47B10-C6C,C47B10-B1C所述),SEQ ID NO:6(如针对抗体C47B10-1F6S所述),SEQ ID NO:5(如针对抗体C47B10-1H4S所述)和SEQ ID NO:4(如针对抗体C47B10,C47B10-2B8S,C47B10-2C1S,C47B10-2B9S,C47B10-2C4S所述)。

[0114] 许多轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:4至少95%相同的氨基酸序列,包括SEQ ID NO:26(如针对抗体C47B10-L3-B2所述),SEQ ID NO:25(如针对抗体C47B10-L1A-A4所述),SEQ ID NO:23(如针对抗体C47B10-L1A-A10所述),SEQ ID NO:15(如针对抗体C47B10-C11C,C47B10-D3C,C47B10-C3C,C47B10-C6C,C47B10-B1C所述),SEQ ID NO:6(如针对抗体C47B10-1F6S所述),SEQ ID NO:5(如针对抗体C47B10-1H4S所述)和SEQ ID NO:8(如针对抗体C47B10-1,C47B10-2A9S,C47B10-2B11S,C47B10-H3-D4,C47B10-H3-D3所述)。

[0115] 许多轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:5至少95%相同的氨基酸序列,包括SEQ ID NO:26(如针对抗体C47B10-L3-B2所述),SEQ ID NO:25(如针对抗体C47B10-L1A-A4所述),SEQ ID NO:23(如针对抗体C47B10-L1A-A10所述),SEQ ID NO:15(如针对抗体C47B10-C11C,C47B10-D3C,C47B10-C3C,C47B10-C6C,C47B10-B1C所述),SEQ ID NO:6(如针对抗体C47B10-1F6S所述),SEQ ID NO:4(如针对抗体C47B10,C47B10-2B8S,C47B10-2C1S,C47B10-2B9S,C47B10-2C4S所述)和SEQ ID NO:8(如针对抗体C47B10-1,C47B10-2A9S,C47B10-2B11S,C47B10-H3-D4,C47B10-H3-D3所述)。

[0116] 许多轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:6至少95%相同的氨基酸序列,包括SEQ ID NO:26(如针对抗体C47B10-L3-B2所述),SEQ ID NO:25(如针对抗体C47B10-L1A-A4所述),SEQ ID NO:23(如针对抗体C47B10-L1A-A10所述),SEQ ID NO:15(如针对抗体C47B10-C11C,C47B10-D3C,C47B10-C3C,C47B10-C6C,C47B10-B1C所述),SEQ ID NO:5(如针对抗体C47B10-1H4S所述),SEQ ID NO:4(如针对抗体C47B10,C47B10-2B8S,C47B10-2C1S,C47B10-2B9S,C47B10-2C4S所述)和SEQ ID NO:8(如针对抗体C47B10-1,C47B10-2A9S,C47B10-2B11S,C47B10-H3-D4,C47B10-H3-D3所述)。



[0117] 许多轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:15至少95%相同的氨基酸序列,包括SEQ ID NO:26(如针对抗体C47B10-L3-B2所述),SEQ ID NO:25(如针对抗体C47B10-L1A-A4所述),SEQ ID NO:23(如针对抗体C47B10-L1A-A10所述),SEQ ID NO:5(如针对抗体C47B10-1H4S所述),SEQ ID NO:6(如针对抗体C47B10-1F6S所述),SEQ ID NO:4(如针对抗体C47B10,C47B10-2B8S,C47B10-2C1S,C47B10-2B9S,C47B10-2C4S所述)和SEQ ID NO:8(如针对抗体C47B10-1,C47B10-2A9S,C47B10-2B11S,C47B10-H3-D4,C47B10-H3-D3所述)。

[0118] 许多轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:23至少95%相同的氨基酸序列,包括SEQ ID NO:26(如针对抗体C47B10-L3-B2所述),SEQ ID NO:25(如针对抗体C47B10-L1A-A4所述),SEQ ID NO:15(如针对抗体C47B10-C11C,C47B10-D3C,C47B10-C3C,C47B10-C6C,C47B10-B1C所述),SEQ ID NO:5(如针对抗体C47B10-1H4S所述),SEQ ID NO:6(如针对抗体C47B10-1F6S所述),SEQ ID NO:4(如针对抗体C47B10,C47B10-2B8S,C47B10-2C1S,C47B10-2B9S,C47B10-2C4S所述)和SEQ ID NO:8(如针对抗体C47B10-1,C47B10-2A9S,C47B10-2B11S,C47B10-H3-D4,C47B10-H3-D3所述)。

[0119] 许多轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:25至少95%相同的氨基酸序列,包括SEQ ID NO:26(如针对抗体C47B10-L3-B2所述),SEQ ID NO:23(如针对抗体C47B10-L1A-A10所述),SEQ ID NO:15(如针对抗体C47B10-C11C,C47B10-D3C,C47B10-C3C,C47B10-C6C,C47B10-B1C所述),SEQ ID NO:5(如针对抗体C47B10-1H4S所述),SEQ ID NO:6(如针对抗体C47B10-1F6S所述),SEQ ID NO:4(如针对抗体C47B10,C47B10-2B8S,C47B10-2C1S,C47B10-2B9S,C47B10-2C4S所述)和SEQ ID NO:8(如针对抗体C47B10-1所述),C47B10-2A9S,C47B10-2B11S,C47B10-H3-D4,C47B10-H3-D3所述)。

[0120] 许多轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:26至少95%相同的氨基酸序列,包括SEQ ID NO:25(如针对抗体C47B10-L1A-A4所述),SEQ ID NO:23(如针对抗体C47B10-L1A-A10所述),SEQ ID NO:15(如针对抗体C47B10-C11C,C47B10-D3C,C47B10-C3C,C47B10-C6C,C47B10-B1C所述),SEQ ID NO:5(如针对抗体C47B10-1H4S所述),SEQ ID NO:6(如针对抗体C47B10-1F6S所述),SEQ ID NO:4(如针对抗体C47B10,C47B10-2B8S,C47B10-2C1S,C47B10-2B9S,C47B10-2C4S所述)和SEQ ID NO:8(如针对抗体C47B10-1,C47B10-2A9S,C47B10-2B11S,C47B10-H3-D4,C47B10-H3-D3所述)。

[0121] 抗原结合蛋白(例如,抗体,抗体片段,抗体衍生物,抗体突变蛋白和抗体变体)是结合CD47的多肽。

[0122] 本发明的抗原结合蛋白的抗原结合片段可以通过常规技术产生。这样的片段的实例包括但不限于Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段。

[0123] 单链抗体可以通过经由氨基酸桥(短肽接头)连接重链和轻链可变结构域(Fv区)片段形成,产生单个多肽链。这样的单链Fv(scFv)已经通过在编码两个可变结构域多肽(V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>)的DNA之间融合编码肽接头的DNA而制备。取决于两个可变结构域之间的柔性接头的长度,所得多肽可以自身折叠以形成抗原结合单体,或者它们可以形成多聚体(例如二聚体,三聚体或四聚体)(Kortt等,1997,Prot.Eng.10:423;Kortt等,2001,Biomol.Eng.18:95-108)。通过组合不同的包含V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>的多肽,可以形成结合不同表位的多聚体scFv(Kriangkum等,2001,Biomol.Eng.18:31-40)。开发用于生产单链抗体的技术包括美国专利4,946,778;Bird,1988,Science 242:423;Huston等,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:

5879;Ward等,1989,Nature 334:544,de Graaf等,2002,Methods Mol.Biol.178:379-87中所述的那些。

[0124] 在某些实施方式中,本发明提供Fab全人抗体片段,其具有来自重链的可变结构域区和来自轻链的可变结构域区,其中重链可变结构域序列与选自以下的氨基酸序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同:SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:32,及其组合,并且轻链可变结构域序列与以下氨基酸序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30,及其组合。在一个实施方式中,所述全人抗体Fab片段具有重链可变结构域区和轻链可变结构域区二者,其中所述抗体具有选自以下的重链/轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:12/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:14/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:32/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:22/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:30。

[0125] 在一个实施方式中,本发明提供单链人抗体,其具有来自重链的可变结构域区和来自轻链的可变结构域区和连接所述重链可变结构域区与轻链可变结构域区的肽接头,其中重链可变结构域序列与选自以下的氨基酸序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同:SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:32,并且轻链可变结构域序列与以下氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30。在一个实施方式中,所述单链全人抗体具有重链可变结构域区和轻链可变结构域区二者,其中所述单链全人抗体具有选自以下的重链/轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:12/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:14/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16/SEQ ID

NO:15,SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:32/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:22/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:30,及其组合。

[0126] 已知用于从感兴趣的抗体衍生不同亚类或同种型的抗体的技术,即亚类切换。因此,例如,IgG抗体可以衍生自IgM抗体,反之亦然。这样的技术允许制备具有给定抗体(母体抗体)的抗原结合性质,但也表现出和与母体抗体的抗体同种型或与亚类不同的抗体同种型或与亚类相关的生物学性质的新抗体。可以使用重组DNA技术。编码特定抗体多肽的克隆DNA可用于这样的程序,例如编码期望同种型的抗体的恒定结构域的DNA(Lantto等,2002,Methods Mol.Biol.178:303-16)。此外,如果IgG4是期望的,在铰链区中引入点突变(CPSC>CPPC)(分别为SEQ ID NO 3和31)(Bloom等,1997,Protein Science 6:407)以减轻形成可能导致IgG4抗体中的异质性的内部H链二硫键的趋势也可以是期望的。因此,在一个实施方式中,本发明的抗体是人IgG1抗体。因此,在一个实施方式中,本发明的抗体是人IgG4抗体。

[0127] 本发明提供结构特征在于其可变结构域区的氨基酸序列的许多抗体。然而,氨基酸序列可以经历一些改变,同时保持其与其特异性靶标的高度结合。更具体地,可变结构域区中的许多氨基酸可以用保守置换改变,并且可以预测所得抗体的结合特性与野生型抗体序列的结合特性将没有不同。抗体可变结构域中有许多氨基酸不与抗原直接相互作用或影响抗原结合,并且对于决定抗体结构不是关键性的。例如,所公开的抗体中的任一个的预测的非必需氨基酸残基优选被来自同一类别的另一个氨基酸残基替代。识别不消除抗原结合的氨基酸保守置换的方法是本领域公知的(参见,例如,Brummell等,Biochem.32:1180-1187(1993);Kobayashi等,Protein Eng.12(10):879-884(1999);和Burks等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:412-417(1997))。Near等,Mol.Immunol.30:369-377,1993解释了如何通过定点诱变影响或不影响结合。Near等只突变了他们认为具有改变抗原结合的高概率的残基。大多数对结合亲和力(Near等,表3)和结合不同形式的地高辛(Near等,表2)具有适度或负面影响。因此,在某些实施方式中,本发明还包括与本文公开的那些序列具有至少95%同一性的可变序列。

[0128] 在某些实施方式中,本文提供的抗CD47抗体或其抗原结合片段具有 $1 \times 10^{-6}$ M或更低; $5 \times 10^{-7}$ M或更低; $1 \times 10^{-7}$ M或更低; $5 \times 10^{-8}$ M或更低; $1 \times 10^{-8}$ M或更低; $5 \times 10^{-9}$ M或更低;或 $1 \times 10^{-9}$ M或更低的解离常数( $K_D$ )。在一个实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段的 $K_D$ 为 $1 \times 10^{-7}$ M至 $1 \times 10^{-10}$ M。在一个实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段的 $K_D$ 为 $1 \times 10^{-8}$ M至 $1 \times 10^{-10}$ M。

[0129] 本领域普通技术人员将意识到已知用于测定抗体或其片段的 $K_D$ 的标准方法。例如,在一个实施方式中,通过放射性标记抗原结合试验(RIA)测量 $K_D$ 。在一个实施方式中,用感兴趣的抗体的Fab版本及其抗原(例如,人CD47)进行RIA。例如,通过未标记的抗原的一系列滴定的存在下,用最小浓度的( $^{125}$ I)-标记的抗原使Fab平衡,然后用抗Fab抗体涂布的平板俘获结合的抗原,测量Fab对抗原的溶液结合亲和力(参见,例如,Chen等,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。根据另一个实施方式,使用BIAcore表面等离子体共振

试验测量 $K_D$ 。本文所用的术语“表面等离子体共振”是指允许通过检测生物传感器基质内的蛋白质浓度的变化分析实时相互作用的光学现象,例如使用BIAcore系统(Biacore Life Sciences Division, GE Healthcare, Piscataway, NJ)。

[0130] 在特别的实施方式中,本发明的抗原结合蛋白对CD47具有至少 $10^6 M^{-1}$ 的结合亲和力( $K_a$ )。在其它实施方式中,抗原结合蛋白表现出至少 $10^7 M^{-1}$ ,至少 $10^8 M^{-1}$ ,至少 $10^9 M^{-1}$ ,或至少 $10^{10} M^{-1}$ 的 $K_a$ 。在另一个实施方式中,抗原结合蛋白表现出与实施例中所描述的抗体基本上相同的 $K_a$ 。

[0131] 在另一个实施方式中,本发明提供具有低CD47解离速率的抗原结合蛋白。在一个实施方式中,抗原结合蛋白具有 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或更低的 $K_{off}$ 。在另一个实施方式中, $K_{off}$ 为 $5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 或更低。在另一个实施方式中, $K_{off}$ 与本文所述的抗体基本上相同。在另一个实施方式中,抗原结合蛋白以与本文所述的抗体基本上相同的 $K_{off}$ 结合CD47。

[0132] 在另一方面,本发明提供抑制CD47的活性的抗原结合蛋白。在一个实施方式中,抗原结合蛋白具有1000nM或更低的 $IC_{50}$ 。在另一个实施方式中, $IC_{50}$ 为100nM或更低;在另一个实施方式中, $IC_{50}$ 为10nM或更低。在另一个实施方式中, $IC_{50}$ 与实施例中所描述的抗体基本上相同。在另一个实施方式中,抗原结合蛋白以与本文所述抗体基本上相同的 $IC_{50}$ 抑制CD47的活性。

[0133] 在另一方面,本发明提供结合在细胞表面上表达的CD47,并且当这样结合时,抑制细胞中的CD47信号传导活性而不使细胞表面上CD47的量显著降低的抗原结合蛋白。可以使用用于测定或估计细胞表面上和/或内部中的CD47的量的任何方法。在其他实施方式中,抗原结合蛋白与CD47表达细胞的结合导致少于约75%,50%,40%,30%,20%,15%,10%,5%,1%或0.1%的细胞表面CD47被内化。

[0134] 在一个实施方式中,本文所述的抗CD47抗体和抗体片段结合CD47并促进巨噬细胞介导的对表达CD47的肿瘤细胞的吞噬作用。巨噬细胞的吞噬作用依赖于细胞对靶细胞上的促吞噬(“吃我”)和抗吞噬(“不吃我”)信号的识别。抗CD47阻断抗体和抗体片段(例如本文所述的那些)通过抑制抗吞噬信号而诱导癌细胞的巨噬细胞吞噬作用,使促吞噬信号成为主导(Majeti等(2009) Cell 138 (2):286-299;Willingham等(2012) Proc Natl Acad Sci USA 109 (17):6662-6667)。因此,在一个实施方式中,本文公开的抗体或抗体片段阻止CD47与CD47配体SIRP $\alpha$ 相互作用。

[0135] 在另一方面,本发明提供体外或体内(例如当被施用于受试者时)具有至少一天的半衰期的抗原结合蛋白。在一个实施方式中,抗原结合蛋白的半衰期为至少三天。在另一个实施方式中,抗原结合蛋白的半衰期为4天或更长。在另一个实施方式中,抗原结合蛋白的半衰期为8天或更长。在另一个实施方式中,抗原结合蛋白被衍生化或修饰,使得其与未衍生化的或未修饰的抗原结合蛋白相比具有更长的半衰期。在另一个实施方式中,抗原结合蛋白含有一个或多个点突变以增加血清半衰期,例如W000/09560中所述,其通过引用并入本文。

[0136] 本发明还提供多特异性抗原结合蛋白,例如双特异性抗原结合蛋白,例如通过两个不同抗原结合位点或区域结合CD47的两个不同表位或CD47的表位和另一个分子的表位的抗原结合蛋白。此外,本文公开的双特异性抗原结合蛋白可以包含来自本文所述抗体中的一种的CD47结合位点和来自本文所述抗体中的另一种的第二CD47结合区,所述本文所述

抗体包括本文参考其它出版物描述的那些。或者,双特异性抗原结合蛋白可以包含来自本文所述抗体中的一种的抗原结合位点和来自本领域已知的另一种CD47抗体或者来自通过已知方法或本文所述方法制备的抗体的第二抗原结合位点。

[0137] 制备双特异性抗体的许多方法是本领域已知的。这样的方法包括使用如Milstein等,1983,Nature 305:537所述的杂交-杂交瘤,和抗体片段的化学偶联(Brennan等,1985,Science 229:81;Glennie等,1987,J.Immunol.139:2367;美国专利6,010,902)。此外,双特异性抗体可以通过重组方法生产,例如通过使用亮氨酸拉链部分(即,来自Fos和Jun蛋白,其优先形成异二聚体;Kostelny等,1992,J.Immunol.148:1547)或其它锁和键交互式结构域结构,如美国专利5,582,996所述。另外的有用技术包括美国专利5,959,083和5,807,706中描述的那些。

[0138] 在另一方面,抗原结合蛋白包含抗体的衍生物。衍生抗体可以包含赋予抗体以期望性质(例如在特定用途中增加的半衰期)的任何分子或物质。衍生抗体可以包含例如可检测(或标记)部分(例如,放射性的,比色的,抗原或酶分子,可检测的珠粒(例如磁性的或电子致密的(例如,金)珠粒),或结合另一分子的分子(例如生物素或链霉抗生物素蛋白),治疗或诊断部分(例如,放射性的,细胞毒性的或药理学活性的部分),或增加抗体对特定用途(例如,施用于受试者,如人受试者,或其他体内或体外用途)的适合性的分子。可用于使抗体衍生化的分子的实例包括白蛋白(例如,人血清白蛋白)和聚乙二醇(PEG)。抗体的白蛋白连接衍生物和聚乙二醇化衍生物可以使用本领域熟知的技术制备,在一个实施方式中,抗体与转甲状腺素蛋白(TTR)或TTR变体缀合或以其他方式连接,TTR或TTR变体可以被例如选自葡聚糖,聚(正乙烯基吡咯烷酮),聚乙二醇,聚丙二醇(propylene glycol)均聚物,聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物,聚氧乙基化(polyoxyethylated)多元醇和聚乙烯醇的化学物质化学修饰。

[0139] 含有一种或多种抗原结合蛋白的寡聚体可以用作CD47拮抗剂。寡聚体可以是共价连接或非共价连接的二聚体、三聚体或更高级寡聚体的形式。设想使用包含两种或更多种抗原结合蛋白的寡聚体,一个实例是同二聚体。其它寡聚体包括异二聚体,同三聚体,异三聚体,同四聚体,异四聚体等。

[0140] 一个实施方式涉及包含通过与抗原结合蛋白融合的肽部分之间的共价或非共价相互作用连接的多个抗原结合蛋白的寡聚体。这样的肽可以是肽接头(间隔子)或具有促进寡聚化的性质的肽。衍生自抗体的亮氨酸拉链和某些多肽是在可以促进连接到其的抗原结合蛋白的寡聚化的肽中,如下文更详细描述。

[0141] 在特别的实施方式中,寡聚体包含2至4个抗原结合蛋白。寡聚体的抗原结合蛋白可以是任何形式,例如任何上述形式,例如变体或片段。优选地,寡聚体包含具有CD47结合活性的抗原结合蛋白。

[0142] 在一个实施方式中,使用衍生自免疫球蛋白的多肽制备寡聚体。包含融合到抗体衍生多肽的各种部分(包括Fc结构域)的某些异源多肽的融合蛋白的制备已经描述于,例如,Ashkenazi等,1991,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:10535;Byrn等,1990,Nature 344:677;和Hollenbaugh等,1992“Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins”,Current Protocols in Immunology,Suppl.4,第10.19.1-10.19.11页。

[0143] 一个实施方式涉及包含通过将抗CD47抗体的CD47结合片段融合到抗体的Fc区而

产生的两种融合蛋白的二聚体。所述二聚体可以通过例如以下方式制备,将编码融合蛋白的基因融合物插入合适的表达载体中,在用该重组表达载体转化的宿主细胞中表达该基因融合物,并使所表达的融合蛋白很像抗体分子那样组装,由此在Fc部分之间形成链间二硫键以产生所述二聚体。

[0144] 制备寡聚抗原结合蛋白的另一种方法涉及使用亮氨酸拉链。亮氨酸拉链结构域是促进其中发现它们的蛋白质的寡聚化的肽。亮氨酸拉链最初在多种DNA结合蛋白中识别出(Landschulz等,1988,Science240:1759),并且自那以后已经在多种不同蛋白质中发现。在已知亮氨酸拉链中的是二聚或三聚的天然存在的肽及其衍生物。WO94/10308中描述了适用于生产可溶性寡聚蛋白质的亮氨酸拉链结构域的实例,并且Hoppe等,1994,FEBS Letters 344:191描述了衍生自肺表面活性蛋白D (SPD) 的亮氨酸拉链。Fanslow等,1994, Semin.Immunol.6:267-78描述了使用允许与与其融合的异源蛋白质稳定三聚化的修饰的亮氨酸拉链。在一种方法中,在适合的宿主细胞中表达包含与亮氨酸拉链肽融合的抗CD47抗体片段或衍生物的重组融合蛋白,并从培养物上清液中回收形成的可溶性寡聚抗CD47抗体片段或衍生物。

[0145] 针对CD47的抗原结合蛋白可以例如体外或体内用于检测CD47多肽的存在的试验。抗原结合蛋白也可用于通过免疫亲和色谱法纯化CD47蛋白。阻断性抗原结合蛋白可用于本文公开的方法。用作CD47拮抗剂的这种抗原结合蛋白可用于治疗任何CD47诱导的病症,包括但不限于各种癌症。

[0146] 抗原结合蛋白可以在体外程序中使用,或体内施用以抑制CD47诱导的生物活性。因此可以治疗(直接或间接)受益于例如CD47的蛋白水解激活的疾病,其实例在本文中提供。在一个实施方式中,本发明提供治疗方法,其包括以有效降低CD47诱导的生物活性的量向有需要的哺乳动物体内施用CD47阻断性抗原结合蛋白。

[0147] 在本发明的某些实施方式中,抗原结合蛋白包括抑制CD47的生物活性(例如,CD47结合SIRPα)的全人单克隆抗体。

[0148] 抗原结合蛋白,包括本文所述的抗体和抗体片段,可以通过许多常规技术中的任一种制备。例如,使用本领域已知的任何技术,它们可以从天然表达它们的细胞中纯化(例如,抗体可以从产生它的杂交瘤中纯化),或者在重组表达系统中产生。参见,例如, Monoclonal Antibodies,Hybridomas:A New Dimension in Biological Analyzes, Kennet等(编辑),Plenum Press,New York(1980);和Antibodies:A Laboratory Manual, Harlow和Land(编辑),Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)。

[0149] 本领域已知的任何表达系统都可用于制备本发明的重组多肽,包括本文所述的抗体和抗体片段。通常,用包含编码期望多肽的DNA的重组表达载体转化宿主细胞。在可以使用的宿主细胞中的是原核生物、酵母或高等真核生物细胞。原核生物包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如大肠杆菌或芽孢杆菌。高等真核生物细胞包括昆虫细胞和哺乳动物来源的已建立的细胞系。适合的哺乳动物宿主细胞系的实例包括猴肾细胞的COS-7系(ATCC CRL 1651)(Gluzman等,1981,Cell 23:175),L细胞,293细胞,C127细胞,3T3细胞(ATCC CCL 163),中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,HeLa细胞,BHK(ATCC CRL 10)细胞系,和衍生自非洲绿猴肾细胞系CV1的CV1/EBNA细胞系(ATCC CCL 70),如McMahan等,1991,EMBO J.10:2821所述。

Pouwels等描述了与细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主一起使用的适合的克隆和表达载体(Cloning Vectors:A Laboratory Manual,Elsevier,N.Y.,1985)。

[0150] 可以在促进多肽表达的条件下培养转化细胞,并且通过常规蛋白质纯化程序回收多肽。一种这样的纯化程序包括使用亲和色谱法,例如在基质上,所述基质具有与其结合的CD47的全部或部分(例如细胞外结构域)。设想用于本文的多肽包括基本上同质的重组哺乳动物抗CD47抗体多肽,其基本上不含污染性内源性物质。

[0151] 可以通过许多已知技术中的任一种制备抗原结合蛋白并根据期望性质进行筛选。技术中的某一些涉及分离编码感兴趣的抗原结合蛋白(例如抗CD47抗体)的多肽链(或其部分)的核酸,并通过重组DNA技术操纵核酸。例如,核酸可以与感兴趣的另一个核酸融合,或者被改变(例如通过诱变或其他常规技术)以添加、删除或置换一个或多个氨基酸残基。

[0152] 本发明的多肽可以使用本领域已知的任何标准方法制备。在一个实例中,通过重组DNA方法通过将编码多肽的核酸序列(例如,cDNA)插入到重组表达载体中并在促进表达的条件下表达DNA序列而产生多肽。

[0153] 可以化学合成编码本文公开的各种多肽中的任一种的核酸。可以选择密码子使用以改善在细胞中的表达。这样的密码子使用将取决于所选择的细胞类型。已经为大肠杆菌和其他细菌以及哺乳动物细胞、植物细胞、酵母细胞和昆虫细胞开发了专门的密码子使用模式。参见,例如,Mayfield等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.2003 100(2):438-42;Sinclair等,Protein Expr.Purif.2002(1):96-105;Connell N D.Curr.Opin.Biotechnol.2001 12(5):446-9;Makrides等,Microbiol.Rev.199660(3):512-38;和Sharp等,Yeast.1991 7(7):657-78。

[0154] 用于核酸操纵的一般技术描述于,例如,Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第1-3卷,Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版,1989或F.Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology(Green Publishing and Wiley-Interscience:New York,1987)和定期的更新,其通过引用并入本文。编码多肽的DNA可操作地连接到衍生自哺乳动物、病毒或昆虫基因的适合的转录或翻译调控元件。这样的调控元件包括转录启动子,控制转录的任选的操纵子序列,编码适合的mRNA核糖体结合位点的序列,以及控制转录和翻译终止的序列。通常由复制起点赋予的在宿主中复制的能力以及促进转化体识别的选择基因被另外地引入。

[0155] 重组DNA还可以包括可用于纯化蛋白质的任何类型的蛋白质标签序列。蛋白质标签的实例包括但不限于组氨酸标签,FLAG标签,myc标签,HA标签或GST标签。与细菌,真菌,酵母和哺乳动物细胞宿主一起使用的适当的克隆和表达载体可见于Cloning Vectors:ALaboratory Manual(Elsevier,N.Y.,1985)。

[0156] 使用适合于宿主细胞的方法将表达构建体引入宿主细胞。将核酸引入宿主细胞的各种方法是本领域已知的,包括但不限于电穿孔;使用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其他物质的转染;微弹轰击;脂质体转染;和感染(其中载体是感染剂)。适合的宿主细胞包括原核生物,酵母,哺乳动物细胞或细菌细胞。

[0157] 适合的细菌包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如大肠杆菌或芽孢杆菌物种。酵母,优选来自酵母属物种,例如酿酒酵母,也可用于生产多肽。还可以使用各种哺乳动物或昆虫细胞培养系统表达重组蛋白。用于在昆虫细胞中产生异源蛋白的杆状病毒系统由

Luckow和Summers综述 (Bio/Technology, 6:47, 1988)。适合的哺乳动物宿主细胞系的实例包括内皮细胞, COS-7猴肾细胞, CV-1, L细胞, C127, 3T3, 中国仓鼠卵巢 (CHO), 人胚胎肾细胞, HeLa, 293, 293T和BHK细胞系。通过培养适合的宿主/载体系统表达重组蛋白而制备纯化多肽。对于许多应用, 本文公开的许多多肽的小尺寸将使在大肠杆菌中表达是优选的表达方法。然后从培养基或细胞提取物中纯化蛋白质。

[0158] 本文公开的蛋白质还可以使用细胞翻译系统产生。为了这样的目的, 编码多肽的核酸必须被修饰以允许体外转录以产生mRNA, 并允许mRNA在采用的特定无细胞系统中无细胞翻译(无真核生物(如哺乳动物或酵母)细胞翻译系统, 或无原核生物(如细菌)细胞翻译系统)。

[0159] 还可以通过化学合成产生CD47结合多肽(例如通过Solid Phase Peptide Synthesis, 第2版, 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.所述的方法)。对蛋白质的修饰也可以通过化学合成产生。

[0160] 本发明的多肽可以通过蛋白质化学领域中通常已知的蛋白质分离/纯化方法纯化。非限制性实例包括提取, 重结晶, 盐析(例如用硫酸铵或硫酸钠), 离心, 透析, 超滤, 吸附色谱, 离子交换色谱, 疏水色谱, 正相色谱, 反相色谱, 凝胶过滤, 凝胶渗透色谱, 亲和色谱, 电泳, 逆流分布或这些的任何组合。纯化后, 多肽可以通过本领域已知的多种方法(包括但不限于过滤和透析)中的任一种交换到不同缓冲液中和/或浓缩。

[0161] 纯化多肽优选至少85%纯, 更优选至少95%纯, 和最优选至少98%纯。不管纯度的确切数值如何, 多肽足够纯以用作药物产品。

[0162] 在某些实施方式中, 本发明提供结合CD47的单克隆抗体。单克隆抗体可以使用本领域已知的任何技术制备, 例如通过在免疫进度表完成后使从转基因动物收获的脾细胞永生化。可以使用本领域已知的任何技术使脾细胞永生化, 例如通过将它们与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤。用于产生杂交瘤的融合程序的骨髓瘤细胞优选不产生抗体, 具有高融合效率, 和具有使其不能在仅支持期望融合细胞(杂交瘤)的生长的某些选择培养基中生长的酶缺陷。用于小鼠融合的适合的细胞系的实例包括Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag41, Sp210-Ag14, F0, NS0/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7和S194/5XX0Bu1; 用于大鼠融合的细胞系的实例包括R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F和48210。可用于细胞融合的其他细胞系是U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2和UC729-6。

[0163] 本领域普通技术人员可以根据本说明书的教导和使用本领域已知的技术容易地制备抗体的片段或类似物。片段或类似物的优选氨基和羧基末端出现在功能结构域的边界附近。可以通过将核苷酸和/或氨基酸序列数据与公共或专有序列数据库进行比较而识别结构和功能结构域。计算机化比较方法可用于识别出现在具有已知结构和/或功能的其它蛋白质中的序列基序或预测的蛋白质构象结构域。识别折叠成已知三维结构的蛋白质序列的方法是已知的。参见Bowie等, 1991, Science 253:164。

[0164] 多肽的翻译后修饰

[0165] 在某些实施方式中, 本发明的结合多肽还可包含翻译后修饰。示例性的翻译后蛋白质修饰包括磷酸化, 乙酰化, 甲基化, ADP-核糖基化, 泛素化, 糖基化, 羧基化, SUMO化, 生物素化, 或者增加多肽侧链或疏水基团。结果, 修饰的可溶性多肽可以含有非氨基酸元件, 例如脂质, 多糖或单糖, 和磷酸盐。糖基化的优选形式是唾液酸化, 其将一个或多个唾液酸



部分与多肽缀合。唾液酸部分提高溶解度和血清半衰期,同时也降低蛋白质的可能免疫原性。参见Raju等,Biochemistry.2001 31;40 (30):8868-76。

[0166] 在一个实施方式中,本发明的可溶性多肽的修饰形式包括将本发明的可溶性多肽与非蛋白质类聚合物连接。在一个实施方式中,聚合物是聚乙二醇(“PEG”),聚丙二醇或聚氧化烯,以美国专利4,640,835;4,496,689;4,301,144;4,670,417;4,791,192或4,179,337所述的方式。

[0167] PEG是可商购的或可根据本领域熟知的方法通过乙二醇的开环聚合制备的水溶性聚合物(Sandler和Karo,Polymer Synthesis,Academic Press,New York,第3卷,第138-161页)。术语“PEG”广泛用于包括任何聚乙二醇分子,不考虑尺寸或PEG末端的修饰,并且可由下式表示: $X-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2OH$  (1),其中n为20至2300,并且X为H或末端修饰,例如 $C_{1-4}$ 烷基。在一个实施方式中,本发明的PEG在一端用羟基或甲氧基终止,即X为H或 $CH_3$ (“甲氧基PEG”)。PEG可以含有结合反应所必须的另外的化学基团;其是由分子的化学合成产生;或者其是分子的部分的最佳距离的间隔物。此外,这样的PEG可以由连接在一起的一个或多个PEG侧链组成。具有多于一个PEG链的PEG被称为多臂或支化PEG。支化PEG可以例如通过向各种多元醇(包括甘油,季戊四醇和山梨糖醇)中加入聚环氧乙烷而制备。例如,四臂支化PEG可以由季戊四醇和环氧乙烷制备。支化PEG描述于例如EP-A 0 473 084和美国专利5,932,462。PEG的一种形式包含通过赖氨酸的伯氨基连接的两个PEG侧链(PEG2)(Monfardini等,Bioconjugate Chem.6 (1995) 62-69)。

[0168] PEG修饰多肽的血清清除率相对于未修饰的结合多肽的清除率可以降低约10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%或甚至90%。PEG修饰多肽可以具有相对于未修饰蛋白的半衰期增强的半衰期( $t_{1/2}$ )。PEG结合多肽的半衰期相对于未修饰的结合多肽的半衰期可以增强至少10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,100%,125%,150%,175%,200%,250%,300%,400%或500%,或甚至1000%。在一些实施方式中,蛋白质半衰期在体外测定,例如在缓冲盐水溶液或血清中。在其它实施方式中,蛋白质半衰期是体内半衰期,例如蛋白质在动物的血清或其他体液中的半衰期。

#### [0169] 治疗方法、制剂和施用模式

[0170] 在某些实施方式中,本发明还提供用于治疗广谱哺乳动物癌症或广谱纤维化疾病的方法,其需要刺激免疫应答或抑制,所述方法包括施用抗CD47多肽。本文公开的抗体中的任一种都可用于这样的方法。例如,可以使用选自以下的抗CD47多肽实施所述方法:以至少 $10^{-6}M$ 的结合亲和力结合CD47表位的IgG种类的全人抗体,具有来自重链的可变结构域区和来自轻链的可变结构域区的Fab全人抗体片段,具有来自重链的可变结构域区和来自轻链的可变结构域区和连接重链与轻链可变结构域区的肽接头的单链人抗体,包括SEQ ID No: 1-32(表5)所述的重链和轻链可变区(和所述序列内的CDR)。

[0171] 例如,在一个实施方式中,本文公开的方法包括使用抗CD47全人抗体,所述全人抗体具有与选自以下的氨基酸序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的重链可变结构域序列:SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:32,并且具有与选自以下的氨基酸序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少

99%相同的轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30。

[0172] 在一个实施方式中,本文所述的方法包括使用抗CD47全人Fab抗体片段,其具有与选自以下的氨基酸序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的重链可变结构域序列:SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:32,并且具有与以下氨基酸序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30。

[0173] 在一个实施方式中,本文所述的方法包括使用抗CD47单链人抗体,其具有与选自以下的氨基酸序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的重链可变结构域序列:SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:32,并且具有与以下氨基酸序列至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30。

[0174] 在一个实施方式中,所述抗CD47全人抗体具有重链和轻链二者,其中所述抗体具有选自以下的重链/轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:12/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:14/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:32/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:22/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:30。

[0175] 在一个实施方式中,所述抗CD47全人抗体Fab片段具有重链可变结构域区和轻链可变结构域区二者,其中所述抗体具有选自以下的重链/轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:12/SEQ ID

NO:4,SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:14/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:32/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:22/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:30。

[0176] 在一个实施方式中,所述抗CD47单链全人抗体具有重链可变结构域区和轻链可变结构域区二者,其中所述单链全人抗体具有选自以下的重链/轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:12/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:14/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:32/SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:22/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:30。

[0177] 与正常细胞相比,CD47在癌细胞上高度表达(Majeti等,(2009)Cell 138(2):286-299;Willingham等,(2012)Proc Natl Acad Sci USA 109(17):6662-6667),并与巨噬细胞上的配体信号调节蛋白 $\alpha$ (SIRP- $\alpha$ )相互作用(Brown和Frazier(2001)Trends Cell Biol 11(3):130-135)。

[0178] 因此,在一个实施方式中,本发明的抗CD47抗体和抗体片段用于治疗广谱哺乳动物癌症。在一个实施方式中,本文描述的抗体和抗体片段用于治疗癌症,包括卵巢癌,结肠癌,乳腺癌,肺癌,骨髓瘤,神经母细胞衍生CNS肿瘤,单核细胞白血病,B细胞衍生白血病,T细胞衍生白血病,B细胞衍生淋巴瘤,T细胞衍生淋巴瘤,肥大细胞衍生肿瘤,及其组合。

[0179] 在一个实施方式中,本文所述的CD47抗体可用于治疗癌症或其他肿瘤病症(包括血液恶性肿瘤和/或CD47+肿瘤)的症状,延缓所述症状的进展,预防所述症状的复发,或缓解所述症状。

[0180] 在一个实施方式中,用本文公开的抗CD47抗体或抗体片段治疗具有过表达CD47的肿瘤的人受试者。在一个实施方式中,本文公开的方法用于治疗具有与异常(例如过表达)CD47表达,活性或信号传导相关的实体瘤的受试者。实体瘤包括例如乳腺肿瘤,卵巢肿瘤,肺肿瘤,胰腺肿瘤,前列腺肿瘤,黑素瘤肿瘤,结肠直肠肿瘤,肺肿瘤,头颈部肿瘤,膀胱肿瘤,食管肿瘤,肝肿瘤和肾肿瘤。

[0181] 本文所述的CD47抗体可用于治疗选自以下的癌症:B细胞衍生淋巴瘤,T细胞衍生淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤(NHL),急性淋巴细胞白血病(ALL),急性骨髓性白血病(AML),慢性淋巴细胞白血病(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,结肠直肠癌,胰腺癌,肺癌,平滑肌瘤,平滑肌肉瘤,神经胶质瘤,成胶质

细胞瘤和实体瘤,其中实体瘤选自乳腺肿瘤,卵巢肿瘤,肺肿瘤,胰腺肿瘤,前列腺肿瘤,黑色素瘤肿瘤,结肠直肠肿瘤,肺肿瘤,头颈部肿瘤,膀胱肿瘤,食管肿瘤,肝肿瘤,肾肿瘤,神经母细胞衍生CNS肿瘤和肥大细胞衍生肿瘤。

[0182] 在一个实施方式中,本发明的抗CD47抗体和抗体片段用于治疗广谱纤维化疾病。例如,在一个实施方式中,待治疗的纤维化疾病选自心肌梗塞,心绞痛,骨关节炎,肺纤维化,哮喘,囊性纤维化,支气管炎,哮喘及其组合。

[0183] 本发明的特征在于用于治疗或预防金黄色葡萄球菌感染的方法,其包括施用抗CD47多肽。用于施用的技术和剂量根据具体多肽的类型和被治疗的具体病症而不同,但本领域技术人员可以容易地确定。通常,监管机构要求将用作治疗剂的蛋白质试剂配制成具有可接受的低水平的热原。因此,通常将治疗制剂与其它制剂区分开来,因为它们是基本上无热原的,或至少含有不超过由适当的管理机构(例如FDA)确定的可接受水平的热原。

[0184] 本发明的治疗组合物可以以单位剂型与药学上可接受的稀释剂,载体或赋形剂一起施用。作为非限制性实例,施用可以是肠胃外(例如静脉内,皮下),口服或局部施用。此外,使用编码本发明的多肽的核酸,可以使用任何基因治疗技术,例如裸DNA递送,重组基因和载体,基于细胞的递送,包括患者细胞的离体操纵等。

[0185] 组合物可以是用于口服施用的丸剂,片剂,胶囊,液体或缓释片剂的形式;或用于静脉内,皮下或肠胃外施用的液体;用于局部施用的凝胶,洗剂,软膏,霜剂或聚合物或其它缓释载体。

[0186] 在某些实施方式中,所公开的抗体通过吸入施用,但由于其分子大小(~150kDa),全IgG抗体的雾化可能显示是有限的。为了充分利用可用的商业雾化装置,可能需要较小的Fab片段。

[0187] 用于制备制剂的本领域熟知的方法见于,例如,“Remington:TheScience and Practice of Pharmacy”(第20版,A.R.Gennaro A R.,2000,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,Pa.)。用于肠胃外施用的制剂可以例如含有赋形剂,无菌水,盐水,聚亚烷基二醇如聚乙二醇,植物来源的油,或氢化萘。生物相容性的、可生物降解的丙交酯聚合物,丙交酯/乙交酯共聚物,或聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物可用于控制化合物的释放。纳米颗粒制剂(例如可生物降解的纳米颗粒,固体脂质纳米颗粒,脂质体)可用于控制化合物的生物分布。其它可能有用的肠胃外递送系统包括乙烯-乙酸乙烯酯共聚物颗粒,渗透泵,可植入输注系统,和脂质体。制剂中化合物的浓度根据许多因素而变化,包括待施用的药物的剂量和施用途径。

[0188] 多肽可以任选地作为药学上可接受的盐施用,例如在制药工业中常用的无毒的酸加成盐或金属络合物。酸加成盐的实例包括有机酸如乙酸,乳酸,扑酸,马来酸,柠檬酸,苹果酸,抗坏血酸,琥珀酸,苯甲酸,棕榈酸,辛二酸,水杨酸,酒石酸,甲磺酸,甲苯磺酸或三氟乙酸等;聚合酸如单宁酸,羧甲基纤维素等;和无机酸如盐酸,氢溴酸,硫酸,磷酸等。金属络合物包括锌,铁等。在一个实例中,多肽在乙酸钠的存在下配制以增加热稳定性。

[0189] 用于口服使用的制剂包括含有活性成分的片剂,所述活性成分与无毒的药学上可接受的赋形剂一起在混合物中。这些赋形剂可以是例如惰性稀释剂或填充剂(例如蔗糖和山梨糖醇),润滑剂,助流剂和抗粘合剂(例如硬脂酸镁,硬脂酸锌,硬脂酸,二氧化硅,氢化植物油或滑石)。

[0190] 用于口服使用的制剂也可以作为咀嚼片,或作为其中活性成分与惰性固体稀释剂混合的硬明胶胶囊,或作为其中活性成分与水或油介质混合的软明胶胶囊提供。

[0191] 治疗有效剂量是指产生为此而施用的治疗效果的剂量。确切的剂量将取决于待治疗的疾病,并且可以由本领域技术人员使用已知技术确定。通常,多肽以每天约0.01 $\mu$ g/kg至约50mg/kg,优选每天0.01mg/kg至约30mg/kg,最优选每天0.1mg/kg至约20mg/kg施用。多肽可以每天施用(例如,每天一次,两次,三次或四次),或优选较不频繁地施用(例如,每周,每两周,每三周,每月或每季度)。此外,如本领域已知的,根据年龄以及体重,一般健康状况,性别,饮食,施用时间,药物相互作用以及疾病的严重程度进行调整可以是必要的,并且可以将由本领域技术人员用常规实验确定。

[0192] 本文公开的CD47结合多肽可以单独施用或与一种或多种另外的疗法(例如化疗,放疗,免疫治疗,外科手术干预或这些的任何组合)组合施用。如上所述,长期治疗与在其他治疗策略情况下的辅助治疗同样可能。

[0193] 在这样的方法的某些实施方式中,一种或多种多肽治疗剂可一起(同时)或在不同时间(依次)施用。此外,多肽治疗剂可以与用于治疗癌症或抑制血管生成的另外类型的化合物一起施用。

[0194] 在某些实施方式中,本发明的抗CD47抗体试剂可以单独使用。

[0195] 在某些实施方式中,出于诊断目的,可以标记或不标记结合多肽或其片段。通常,诊断试验需要检测由结合多肽与CD47的结合产生的复合物的形成。与抗体类似,结合多肽或片段可被直接标记。可以使用各种标记,包括但不限于放射性核素,荧光剂,酶,酶底物,酶辅因子,酶抑制剂和配体(例如生物素,半抗原)。许多适当的免疫测定法是本领域技术人员已知的(参见,例如,美国专利3,817,827;3,850,752;3,901,654和4,098,876)。当未作标记时,结合多肽可用于试验,例如凝集试验。未标记的结合多肽还可以与可用于检测结合多肽的另外的(一种或多种)适合试剂(例如具有与结合多肽的反应性的标记抗体或其他适合试剂(例如标记蛋白A))组合使用。

[0196] 在一个实施方式中,本发明的结合多肽可用于酶免疫测定,其中本发明的多肽与酶缀合。当包含CD47蛋白的生物样品与本发明的结合多肽组合时,在结合多肽与CD47蛋白之间发生结合。在一个实施方式中,将含有表达CD47蛋白的细胞(例如内皮细胞)的样品与本发明的抗体组合,并且在结合多肽与携带由结合多肽识别的CD47蛋白的细胞之间发生结合。可以将这些结合的细胞与未结合的试剂分离,并且可以例如通过使样品与当酶对其起作用时产生颜色或其它可检测变化的酶的底物接触而确定特异性结合细胞的结合多肽-酶缀合物的存在。在另一个实施方式中,本发明的结合多肽可以是未标记的,并且可以添加识别本发明的结合多肽的第二标记多肽(例如,抗体)。

[0197] 在某些方面,还可以制备用于检测生物样品中CD47蛋白存在的试剂盒。这样的试剂盒将包括与所述受体的CD47蛋白或一部分结合的CD47结合多肽,以及适用于检测结合多肽与受体蛋白或其部分之间的复合物的存在的一种或多种辅助试剂。本发明的多肽组合物可以单独或与对其它表位具有特异性的另外的抗体组合以冻干形式提供。可以被标记或未标记的结合多肽和/或抗体可以与辅助成分(例如,缓冲液,如Tris,磷酸盐和碳酸盐,稳定剂,赋形剂,杀生物剂和/或惰性蛋白质,如牛血清白蛋白)一起被包括在试剂盒中。例如,结合多肽和/或抗体可以与辅助成分作为冻干混合物提供,或者辅助成分可以单独提供以供

用户组合。通常,这些辅助材料将基于活性结合多肽或抗体的量以小于约5重量%存在,并且通常将基于多肽或抗体浓度以至少约0.001重量%的总量存在。当使用能够结合结合多肽的第二抗体时,可以在试剂盒中提供这样的抗体,例如在单独的小瓶或容器中。第二抗体(如果存在)通常被标记,并且可以以与上述抗体制剂类似的方式配制。

[0198] 多肽序列使用标准的一或三字母缩写表示。除非另有说明,否则每个多肽序列在左侧具有氨基末端而在右侧具有羧基末端;每个单链核酸序列和每个双链核酸序列的顶链在左侧具有5'末端而在右侧具有3'末端。也可以通过解释其如何与参比序列不同而描述特定的多肽序列。

[0199] 实施例

[0200] 实施例1

[0201] 识别了来自人抗CD47抗体(包括抗体C47B10,C47A8,C47A11和C47D8)的重链和轻链可变结构域氨基酸序列。这些抗体的重链和轻链可变结构域序列描述于下表5中(表5是本文公开的所有序列的总结)。

[0202] 以下实施例描述了抗CD47抗体介导的巨噬细胞对癌症的吞噬作用。具体地,抗体A8,B10,A11和D8对CD47的功能活性通过测量它们促进巨噬细胞介导的对肿瘤细胞的吞噬作用的能力而测定。

[0203] 通过在30ng/ml的含有巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)的培养基中培养纯化的CD14阳性单核细胞,制备巨噬细胞。培养5天后,细胞表现出巨噬细胞的特征,并用于吞噬试验。在吞噬试验前一天,用CFSE(羧基荧光素琥珀酰亚胺酯)标记K562靶细胞(人骨髓性白血病系)。在试验当天,将靶细胞与测试抗体以1微克/毫升预温育。15分钟后,将细胞洗涤并以两个巨噬细胞:一个靶细胞的比率加入巨噬细胞中。在37℃下3小时后,用藻红蛋白缀合的抗CD11b使细胞染色,并再孵育15分钟。然后从孔中取出细胞并通过流式细胞法分析。

[0204] 图1提供证明抗CD47抗体但不是对照抗体(同种型匹配的阴性对照抗体,即不仅不结合CD47而且还不结合细胞的抗体)促进对K562癌细胞的吞噬作用的能力的数据。图1右上象限中的细胞群代表具有被吞噬的K562细胞的巨噬细胞。右下象限中的细胞是尚未被吞噬的K562细胞。测试的所有抗CD47抗体都表现出一些活性,C47B10(图1中称为B10)促进最多的吞噬作用。

[0205] 实施例2

[0206] 进行C47B10抗体(或“B10”抗体)的种系突变以提高稳定性并降低免疫原性风险。B10抗体的种系化(germlining)涉及改变某些框架残基以匹配种系序列。当与种系序列相比时,轻链的第三个氨基酸不同于种系序列。这是使用已知种系数据库确定的。因此,B10抗体的轻链中的第三个氨基酸从V变为A。下表1显示C47B10野生型序列(SEQ ID NO.1/SEQ ID NO.4)和C47B10-1种系改变序列(SEQ ID NO.1/SEQ ID NO.8)。

[0207] 表1

名称	重链可变结构域区	轻链可变结构域区
[0208] C47B10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYMHWRQAPGQ GLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQG RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARSTLWFSEFDYWGQ GTLVTVSS SEQ ID NO.1	QSVLTQPASVSGSPGQSSISISCTGTSSD VGGHNYVSWYQQHPGKAPKLMYD VRNRPSGVSNRFGSGSKSGSTASLTISG LQTEDEADYYCNSYTGSRITYVFGSG TKLTVL SEQ ID NO.4
C47B10-1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYMHWRQAPGQ GLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQG RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARSTLWFSEFDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO.1)	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTGTSSD VGGHNYVSWYQQHPGKAPKLMYD VRNRPSGVSNRFGSGSKSGSTASLTISG LQTEDEADYYCNSYTGSRITYVFGSG TKLTVL (SEQ ID NO.8)

[0209] 实施例3

[0210] 改进的C47B10抗体

[0211] C47B10-1用作母体抗体作进一步突变以努力改善亲和力特性。简而言之,使C47B10-1的CDR(注意,C47B10和C47B10-1抗体具有相同的CDR,因为它们差别仅在于轻链可变区中的一个框架残基)内的单一氨基酸(由Chothia或Kabat编号定义)突变,使得每个CDR内的每个位置突变为所有可能的20种氨基酸。然后根据相对于C47B10-1母体抗体的亲和力变化,筛选这些B10变体抗体,并对显示结合差异的抗体进行测序。识别了相对于C47B10-1对CD47的亲和力更差的某些变体。这些亲和力更低的变体相对于C47B10-1仅具有单突变,并且被确定为抗体C47B10H3-D4,C47B10L1A-A10,C47B10H3-D3,C47B10L1A-A4和C47B10L3-B2。抗体C47B10H3-D4和C47B10L1A-A10显示根据ELISA选择和测试的变体的最低亲和力(下文更详细地描述)。还测序具有增加的亲和力的命中并将其包括在组合文库中,然后表达其并筛选甚至进一步改善的亲和抗体。C47B10-1变体(增加和减少的亲和力的变体;上文未提及的那些是亲和力更高的变体)的轻链和重链可变结构域氨基酸序列描述于下表2中。

[0212] 表2

	重链可变结构域区	轻链可变结构域区
[0213] C47B10-H3-D4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO.22)	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMYDVRNRPSGVSNRFGSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL (SEQ ID NO.8)
C47B10-L1A-A10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO.1)	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGWHNYVSWYQQHPGKA PKLMYDVRNRPSGVSNRFGSGSK SGSTASLTISGLQTEDEADYYCN SYTGSRITYVFGSGTKLTVL (SEQ ID NO.23)

[0214]

	重链可变结构域区	轻链可变结构域区
C47B10-H3-D3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DWWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO.24)	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRP SGVSNRFSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL (SEQ ID NO.8)
C47B10-L1A-A4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO.1)	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRP SGVSNRFSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL (SEQ ID NO.25)
C47B10-L3-B2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO.1)	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRP SGVSNRFSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCTS YTGSRTYVFGSGTKLTVL (SEQ ID NO.26)
C47B10-1H4S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.1	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSVDVGGHNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVRNRP SGVSNRFSGSK SGSTASLTISGLQTEDEADYYCN SYTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.5
C47B10-1F6S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.1	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRP SGVSNRFSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCLS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.6
C47B10-2A9S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.7	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRP SGVSNRFSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.8
C47B10-2B11S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSKLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.9	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRP SGVSNRFSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.8
C47B10-2B8S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWYSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.10	QSVLTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRP SGVSNRFSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.4



[0215]

	重链可变结构域区	轻链可变结构域区
C47B10-2 C1S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWTFEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.11	QSVLTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMYDVRNRP SGVSNRFSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.4
C47B10-2 B9S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSAF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.12	QSVLTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMYDVRNRP SGVSNRFSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.4
C47B10-2 C4S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSSF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.13	QSVLTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMYDVRNRP SGVSNRFSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.4
C47B10-B 1C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSRLWYTE FDYWGGQGTLLTVSS SEQ ID NO.14	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSVDVGGHNYVSWYQQHPGKA PKLMYDVRNRP SGVSNRFSGSK SGSTASLTISGLQTEDEADYYCLS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.15
C47B10-C 6C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSRLWYTA FDYWGGQGTLLTVSS SEQ ID NO.16	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSVDVGGHNYVSWYQQHPGKA PKLMYDVRNRP SGVSNRFSGSK SGSTASLTISGLQTEDEADYYCLS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.15
C47B10-C 3C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSKLWYTA FDYWGGQGTLLTVSS SEQ ID NO.32	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSVDVGGHNYVSWYQQHPGKA PKLMYDVRNRP SGVSNRFSGSK SGSTASLTISGLQTEDEADYYCLS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.15
C47B10-D 3C	VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIINP SGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCARSKLWYTEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.17	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSVDVGGHNYVSWYQQHPGKA PKLMYDVRNRP SGVSNRFSGSK SGSTASLTISGLQTEDEADYYCLS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.15
C47B10-C 11C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSRLWYSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.18	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSVDVGGHNYVSWYQQHPGKA PKLMYDVRNRP SGVSNRFSGSK SGSTASLTISGLQTEDEADYYCLS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.15

[0216] 鉴于体内血细胞凝集可导致急性贫血并应被避免,血细胞凝集测试可用作治疗性抗体的副作用的量度。因此,使用体外血细胞凝集试验测定上述B10变体抗体在血清中的活性。简而言之,将人红细胞在PBS中稀释到20%溶液,并将100微升该溶液加入到96孔圆底板的孔中。将PBS中的测试抗体的连续稀释物(100微升)加入到这些孔中并与红细胞混合。无抗体和同种型匹配的非CD47结合抗体用作对照。将板在37℃下孵育过夜,并在第二天目视

评估凝集(其是血细胞扣形物的形成)。相对于与母体抗体C47B10-1相比具有更高亲和力的C47B10变体抗体,亲和力更低的抗体C47B10H3-D4,C47B10L1A-A10,C47B10H3-D3,C47B10L1A-A4和C47B10L3-B2显示更低水平的血细胞凝集。

[0217] 改进的C47A8抗体

[0218] 还从C47A8抗体产生改良抗体。选择C47A8是因为它在体外血细胞凝集试验(如上所述)中显示低血细胞凝集。

[0219] C47A8在其轻链CDR3结构域中具有未配对的半胱氨酸。在该位置处用一系列点突变去除该半胱氨酸,以保持来自母体C47A8抗体的亲和力。C47A8的原始C47A8序列和变体描述于下表3中。在轻链中,表3中以粗体突出显示从半胱氨酸到A/L/Q/或S的氨基酸变化。

[0220] 表3

[0221]

名称	重链	轻链
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYMHWRQAPG QGLEWMGIINPSGGSTSYAQKF QGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCARSTLWFSEFDY WGQGTLVTVSS	QSVLTQPSSVSASPGQSITISCSGTSSD VGGHNYVSWYQQHPGKAPKLMIYD VTKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVS GLQAEDEADYYCCSYAGSRVYVFGT
C47A8	SEQ ID NO.1	GTKLTVL SEQ ID NO.2
C47A8-C A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYMHWRQAPG	QSVLTQPSSVSASPGQSITISCSGTSSD VGGHNYVSWYQQHPGKAPKLMIYD

[0222]

名称	重链	轻链
	QGLEWMGIINPSGGSTSYAQKF QGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCARSTLWFSEFDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO.1)	VTKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVS GLQAEDEADYYCASYAGSRVYVFGT GTKLTVL (SEQ ID NO.27)
C47A8-C L	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYMHWRQAPG QGLEWMGIINPSGGSTSYAQKF QGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCARSTLWFSEFDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO.1)	QSVLTQPSSVSASPGQSITISCSGTSSD VGGHNYVSWYQQHPGKAPKLMIYD VTKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVS GLQAEDEADYYCLSYAGSRVYVFGT GTKLTVL (SEQ ID NO.28)
C47A8-C Q	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYMHWRQAPG QGLEWMGIINPSGGSTSYAQKF QGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCARSTLWFSEFDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO.1)	QSVLTQPSSVSASPGQSITISCSGTSSD VGGHNYVSWYQQHPGKAPKLMIYD VTKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVS GLQAEDEADYYCQSYAGSRVYVFGT GTKLTVL (SEQ ID NO.29)
C47A8-C S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYMHWRQAPG QGLEWMGIINPSGGSTSYAQKF QGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCARSTLWFSEFDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO.1)	QSVLTQPSSVSASPGQSITISCSGTSSD VGGHNYVSWYQQHPGKAPKLMIYD VTKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVS GLQAEDEADYYCSSYAGSRVYVFGT GTKLTVL (SEQ ID NO.30)

[0223] 实施例4

[0224] 进行ELISA以评估抗体C47A8和C47A8变体(表3中示出)与人CD47的结合。用在PBS中的1 $\mu$ g/ml山羊抗人F<sub>D</sub>抗体将ELISA板在4℃下涂布过夜。第二天,用酪蛋白封闭板1.5小时,洗涤,在2小时内加入在酪蛋白中为1 $\mu$ g/ml的抗CD47IgG抗体。将生物素化的CD47与中性抗生物素蛋白-AP预复合20分钟,在酪蛋白中连续稀释并加入到ELISA板中。在室温下孵育1小时后,洗涤板,用对硝基苯基磷酸盐(PNPP)底物显色(develop),并测量吸光度。结果如图2所示。如图2所示,C47A8-CL比C47A8结合更多的CD47受体。在这些条件下,与C47A8相比,C47A8-CL看起来对抗原具有更好的结合,而其他抗体对CD47抗原具有比母体抗体C47A8略低的亲和力。

[0225] 还进行ELISA以评估所选择的C47B10变体与人CD47的结合。用在PBS中的1 $\mu$ g/ml山羊抗人 $\lambda$ 抗体将ELISA板在4℃下涂布过夜。第二天,用酪蛋白封闭板1.5小时。加入在酪蛋白中为1.3 $\mu$ g/ml的抗体,并在室温下孵育4小时。洗涤后,加入与中性抗生物素蛋白-AP预复合的连续稀释的生物素化CD47,并在室温下孵育1小时。洗涤后,将板与PBS-Tween一起孵育20分钟,然后洗涤,用PNPP底物显色并测量吸光度。结果如图3所示。如图3所示,这些B10变体

都显示比C47B10抗体更低的对人CD47的亲合力。在这些条件下,与C47B10相比,突变抗体看起来对抗原具有更弱的结合。

[0226] 还进行ELISA以评估其他所选择的C47B10变体(即识别为具有比母体抗体B10更高的亲和力的那些)的结合。用在PBS中的1 $\mu$ g/ml山羊抗 $\lambda$ 抗体将ELISA板在4 $^{\circ}$ C下涂布过夜。第二天,用酪蛋白封闭板2小时。加入在酪蛋白中为1 $\mu$ g/ml的抗体,并在室温下孵育2.5小时。洗涤后,加入连续稀释的生物素化CD47,并在室温下孵育1小时。洗涤后,将板与中性抗生物素蛋白-AP一起孵育25分钟,然后洗涤,用PNPP底物显色并测量吸光度。结果如图4所示。对照抗体是不结合抗原且用于显示在试验中没有非特异性结合的IgG1。如图4所示,与C47B10相比,测试的所有变体都结合更多的CD47靶标,C47B10-B1C(i),C47B10-C6C(ii),C47B10-C11C(iii),C47B10-DC3(iv)和C47B10-C3C(v)显示所测试的C47B10变体中的最高结合量。在这些条件下,与C47B10相比,突变抗体看起来对抗原具有更强的结合。

[0227] 在BIAcore亲合力研究中进一步研究抗体CD47B10和CD47A8和A8变体C47A8-CS和C47A8-CQ。使用表面等离子体共振(BIAcore)测定所测试的抗体对人CD47的亲合力。研究结果在下

[0228] 表4中提供。

[0229] 表4

[0230]

名称	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	KD (M)
C47A8	$5.76 \cdot 10^5$	0.047	$8.23 \cdot 10^{-8}$
C47B10	$1.06 \cdot 10^5$	$1.29 \cdot 10^{-3}$	$1.21 \cdot 10^{-8}$
C47A8-CS	$2.15 \cdot 10^5$	0.034	$1.56 \cdot 10^{-7}$
C47A8-CQ	$1.29 \cdot 10^5$	0.02	$1.56 \cdot 10^{-7}$

[0231] 表5. 重链和轻链可变结构域氨基酸序列

[0232]

	重链可变结构域区	轻链可变结构域区
C47A8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPQGGLWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.1	QSVLTQPSSVSASPGQSITISCSGT SSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVTKRPSGVPDRFSGSKS GNTASLTVSGLQAEDEADYYCC SYAGSRVYVFGTGKLTVL SEQ ID NO.2
C47B10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPQGGLWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.1	QSVLTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRPSGVSNRFGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.4
C47B10-1 H4S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPQGGLWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.1	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSVDVGGHNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVRNRPSGVSNRFGSK SGSTASLTISGLQTEDEADYYCN SYTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.5
C47B10-1 (germline changed)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPQGGLWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.1	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRPSGVSNRFGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.8
C47B10-1F 6S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPQGGLWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.1	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRPSGVSNRFGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCLS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.6

[0233]

	重链可变结构域区	轻链可变结构域区
C47B10-2 A9S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSRLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.7	QSALTQPASVSGSPGQSISSISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRP SGVSNRFSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.8
C47B10-2 B11S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSKLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.9	QSALTQPASVSGSPGQSISSISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRP SGVSNRFSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.8
C47B10-2 B8S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWYSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.10	QSVLTQPASVSGSPGQSISSISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRP SGVSNRFSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.4
C47B10-2 C1S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFTF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.11	QSVLTQPASVSGSPGQSISSISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRP SGVSNRFSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.4
C47B10-2 B9S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.12	QSVLTQPASVSGSPGQSISSISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRP SGVSNRFSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.4
C47B10-2 C4S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSSF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.13	QSVLTQPASVSGSPGQSISSISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRP SGVSNRFSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.4
C47B10-B 1C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSRLWYTE FDYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.14	QSALTQPASVSGSPGQSISSISCTG TSVDVGGHNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVRNRP SGVSNRFSGSK SGSTASLTISGLQTEDEADYYCLS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.15
C47B10-C 6C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSRLWYTA FDYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.16	QSALTQPASVSGSPGQSISSISCTG TSVDVGGHNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVRNRP SGVSNRFSGSK SGSTASLTISGLQTEDEADYYCLS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.15

[0234]

	重链可变结构域区	轻链可变结构域区
C47B10-C 3C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSKLWYTA FDYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.32	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSVDVGGHNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVRNRP SGVSNRFGSGSK SGSTASLTISGLQTEDEADYYCLS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.15
C47B10-D 3C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSKLWYTE FDYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.17	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSVDVGGHNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVRNRP SGVSNRFGSGSK SGSTASLTISGLQTEDEADYYCLS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.15
C47B10-C 11C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSLWYSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.18	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSVDVGGHNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVRNRP SGVSNRFGSGSK SGSTASLTISGLQTEDEADYYCLS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.15
C47K11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.1	DIQLTQSPSTLSASVGDRVITICR ATQTTNSWLAWYQQKPGKAPKL LIYKASSLD SGVPSRFGSGSGGTE FTLTISLQPD DFATYYCQQYNG FRMYTFGQGTKLEIK SEQ ID NO.19
C47KD8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.1	DIVMTQT PSSLASVGDRVITICR ASQISIRYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFGSGSGGTEF TLTISLQPD DFATYYCQQYNGF RMYTFGQGTKVEIK SEQ ID NO.20
C47KD9	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.1	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCR SSQSLLHKNGNNYLDWYLQRP QSPQLLIYLASNRASGV PDRFSGS GSGTDFTL EISRVQPEDVG VYYC MRGLQTPTFGPGTKVDIK SEQ ID NO.21
C47B10-H 3-D4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWVSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.22	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRP SGVSNRFGSGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.8
C47B10-L1 A-A10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHWRQAPGGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.1	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGWHNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVRNRP SGVSNRFGSGSK SGSTASLTISGLQTEDEADYYCN SYTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.23

[0235]

	重链可变结构域区	轻链可变结构域区
C47B10-H 3-D3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DWWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.24	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRPSGVSNRFGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.8
C47B10-L1 A-A4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.1	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRPSGVSNRFGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCNS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.25
C47B10-L3 -B2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.1	QSALTQPASVSGSPGQSSISISCTG TSSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVRNRPSGVSNRFGSKS GSTASLTISGLQTEDEADYYCTS YTGSRTYVFGSGTKLTVL SEQ ID NO.26
C47A8-CA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.1	QSVLTQPSSVSASPGQSITISCSGT SSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVTKRPSGVPDRFGSKS GNTASLTVSGLQAEDEADYYCA SYAGSRVYVFGTGKLTVL SEQ ID NO.27
C47A8-CL	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.1	QSVLTQPSSVSASPGQSITISCSGT SSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVTKRPSGVPDRFGSKS GNTASLTVSGLQAEDEADYYCL SYAGSRVYVFGTGKLTVL SEQ ID NO.28
C47A8-CQ	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.1	QSVLTQPSSVSASPGQSITISCSGT SSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVTKRPSGVPDRFGSKS GNTASLTVSGLQAEDEADYYCQ SYAGSRVYVFGTGKLTVL SEQ ID NO.29
C47A8-CS	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSTLWFSEF DYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO.1	QSVLTQPSSVSASPGQSITISCSGT SSDVGGHNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVTKRPSGVPDRFGSKS GNTASLTVSGLQAEDEADYYCSS YAGSRVYVFGTGKLTVL SEQ ID NO.30

[0236] 通过引用并入

[0237] 本申请各处引用的所有参考文件、专利、在审专利申请和已公布专利的内容通过引用特此明确并入。



## 序列表

<110> SORRENTO THERAPEUTICS, INC.

<120> 结合 CD47 的抗体治疗剂

<130> 126036-04920

<140> PCT/US2016/020980

<141> 2016-03-04

<150> 62/128,462

<151> 2015-03-04

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

[0001]

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 1

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

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

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Ser Thr Leu Trp Phe Ser Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 2			
<211> 110			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
[0002] <220>			
<223> 人工序列的描述：合成多肽			
<400> 2			
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Gln			
1	5	10	15
Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly His			
20	25	30	
Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu			
35	40	45	
Met Ile Tyr Asp Val Thr Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe			
50	55	60	
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu			
65	70	75	80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser  
85 90 95

Arg Val Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述：铰链区序列

<400> 3

Cys Pro Ser Cys

1

[0003]

<210> 4

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 4

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Ser Ile Ser Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly His  
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Arg Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Tyr Thr Gly Ser  
85 90 95

Arg Thr Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 5

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

[0004]

<400> 5

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Ser Ile Ser Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Val Asp Val Gly Gly His  
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Arg Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Tyr Thr Gly Ser

	85	90	95
	Arg Thr Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
	100	105	110
<210>	6		
<211>	110		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	人工序列的描述：合成多肽		
<400>	6		
	Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln		
	1 5 10 15		
[0005]	Ser Ile Ser Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly His		
	20 25 30		
	Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu		
	35 40 45		
	Met Ile Tyr Asp Val Arg Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe		
	50 55 60		
	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu		
	65 70 75 80		
	Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Ser Tyr Thr Gly Ser		
	85 90 95		
	Arg Thr Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
	100 105 110		

<210> 7  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 7  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

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

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

[0006] Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Arg Leu Trp Phe Ser Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 8  
 <211> 110  
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 8

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Ser Ile Ser Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly His  
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Arg Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
50 55 60

[0007]

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Tyr Thr Gly Ser  
85 90 95

Arg Thr Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

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

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述：合成多肽

&lt;400&gt; 10

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



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

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

[0009] Ala Arg Ser Thr Leu Trp Tyr Ser Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 11

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 11

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

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

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Thr Leu Trp Phe Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

[0010] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 12

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

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

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Thr Leu Trp Phe Ser Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

[0011]

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述：合成多肽

&lt;400&gt; 13

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

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

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

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

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

Ala Arg Ser Thr Leu Trp Phe Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

[0012]

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述：合成多肽

&lt;400&gt; 14

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

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

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Arg Leu Trp Tyr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 15

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

[0013] <220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 15

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Ser Ile Ser Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Val Asp Val Gly Gly His  
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Arg Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
65 70 75 80

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

Arg Thr Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 16

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 16

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

[0014] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Arg Leu Trp Tyr Thr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 17

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

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

[0015]

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Lys Leu Trp Tyr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述：合成多肽

&lt;400&gt; 18

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

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

[0016] Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Arg Leu Trp Tyr Ser Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115



<210> 19  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 19  
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1                  5                  10                  15

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                  35                  40                  45

[0017] Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Asp Ser 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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Gly Phe Arg Met  
                  85                  90                  95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                  100                  105

<210> 20  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 20

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser 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

[0018] Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Gly Phe Arg Met  
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 21

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 21

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Lys

20

25

30

Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Gln Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Arg Gly  
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
100 105 110

[0019]

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述：合成多肽

&lt;400&gt; 22

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

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

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Thr Leu Trp Val Ser Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

[0020] <210> 23

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 23

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Ser Ile Ser Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Trp His  
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Arg Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Tyr Thr Gly Ser  
85 90 95

Arg Thr Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 24

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 24

[0021] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

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

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Thr Leu Trp Phe Ser Glu Phe Asp Trp Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 25

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 25

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

[0022]

Ser Ile Ser Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Val Gly His  
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Arg Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Tyr Thr Gly Ser  
85 90 95

Arg Thr Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100

105

110

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述：合成多肽

&lt;400&gt; 26

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Ser Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly His

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

[0023]

Met Ile Tyr Asp Val Arg Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Thr Ser Tyr Thr Gly Ser

85 90 95

Arg Thr Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 27

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly His  
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Thr Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
50 55 60

[0024] Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Ala Gly Ser  
85 90 95

Arg Val Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 28

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 28

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15



Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly His  
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Thr Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Ser Tyr Ala Gly Ser  
85 90 95

[0025] Arg Val Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 29

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 29

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly His  
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35

40

45

Met Ile Tyr Asp Val Thr Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Gly Ser  
85 90 95

Arg Val Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

[0026]

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述：合成多肽

&lt;400&gt; 30

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly His  
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Thr Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Gly Ser  
85 90 95

Arg Val Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 31  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 未知的描述：铰链区序列

[0027] <400> 31  
Cys Pro Pro Cys  
1

<210> 32  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 32  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

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

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

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

[0028] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ser Lys Leu Trp Tyr Thr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

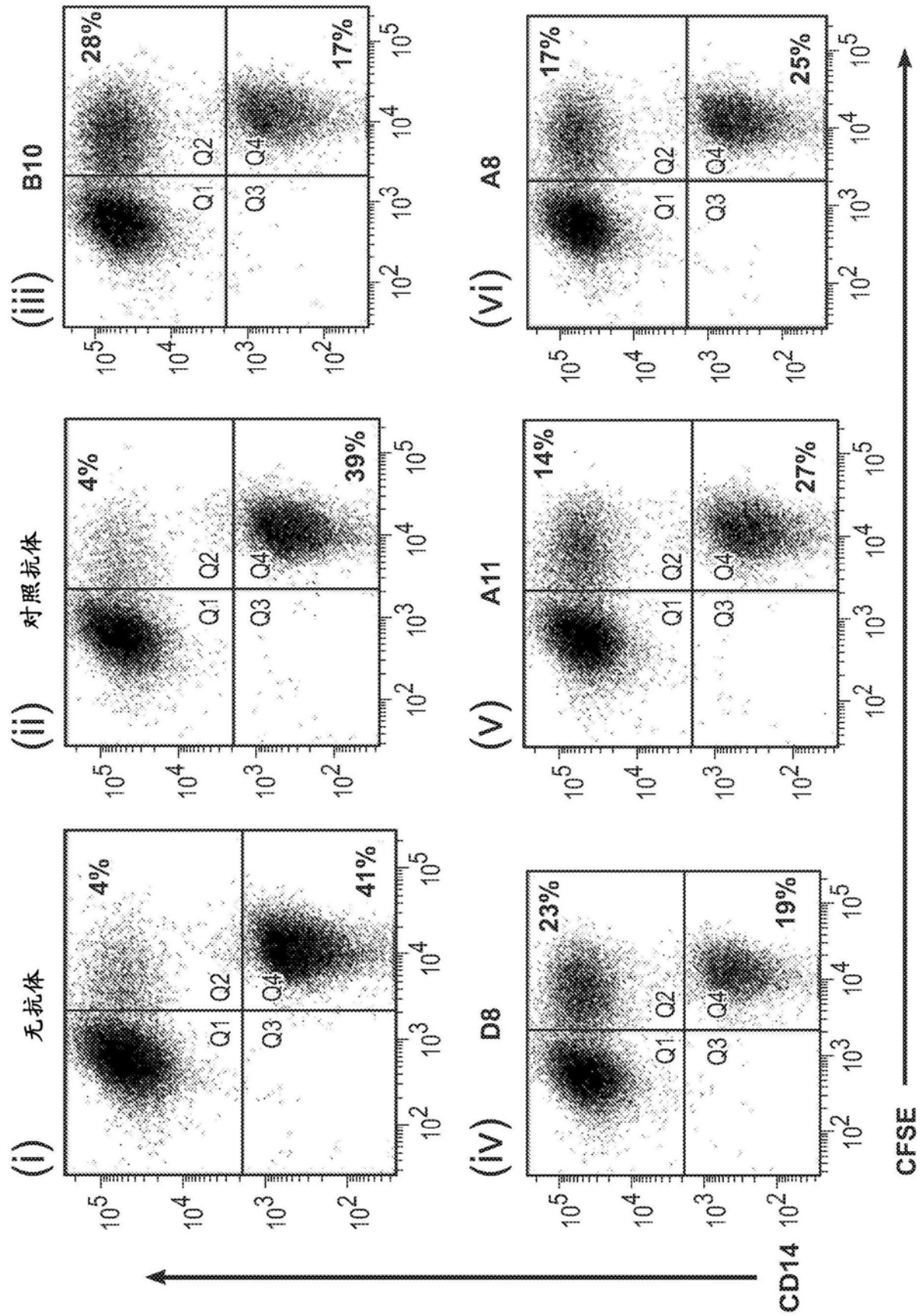


图1

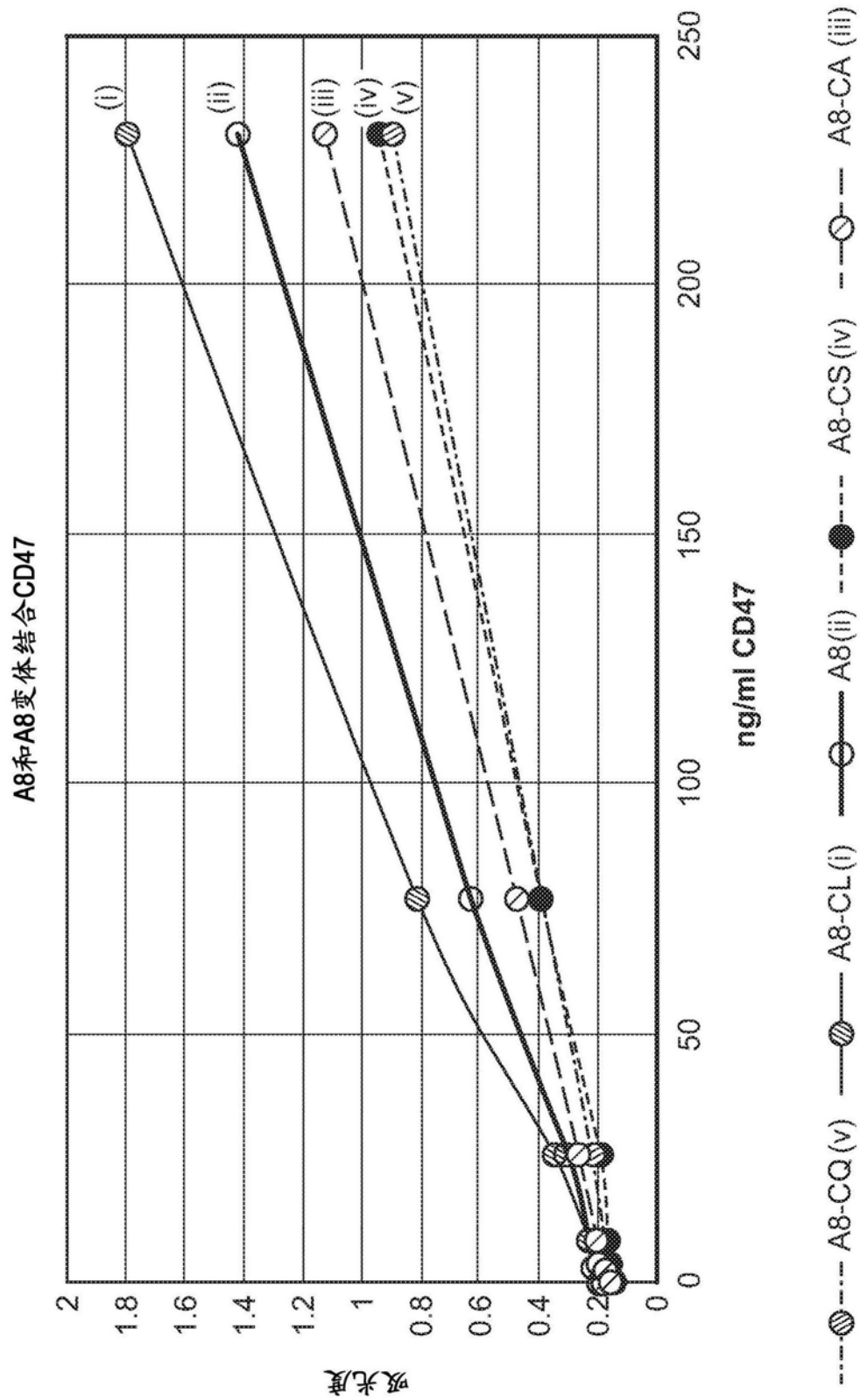


图2

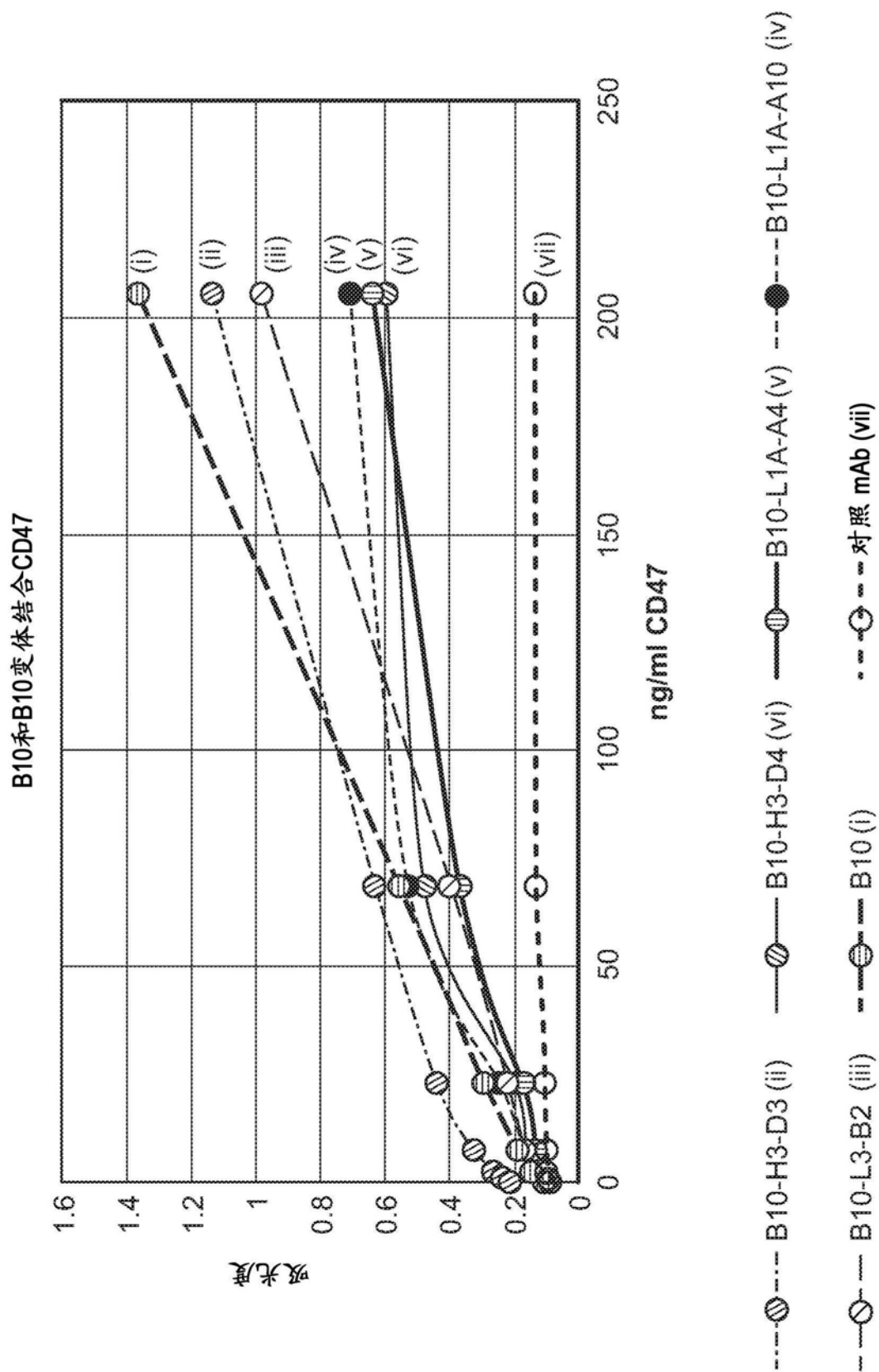


图3

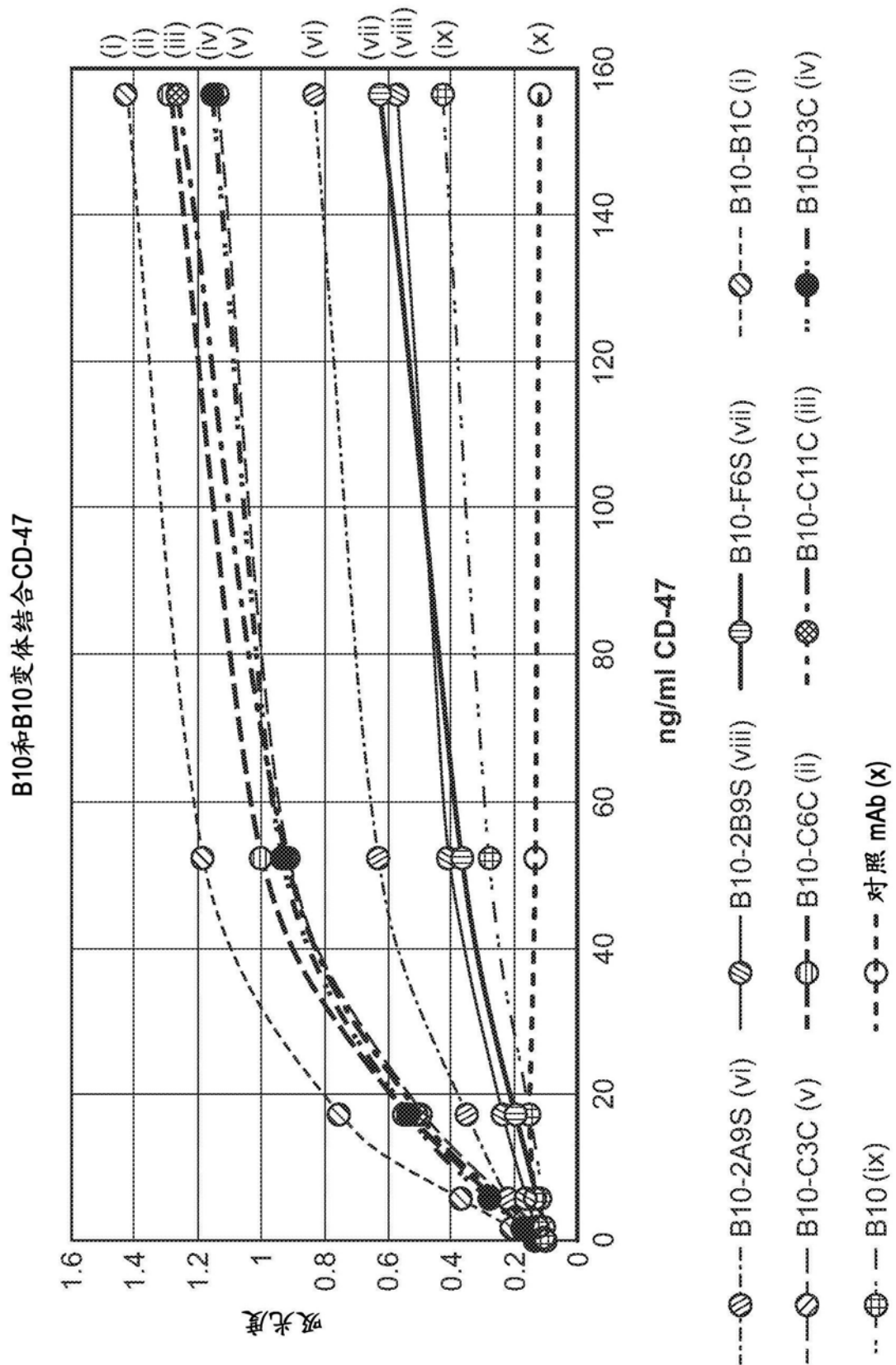


图4