



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 114716552 B

(45) 授权公告日 2024. 05. 24

(21) 申请号 202210449256.5

(22) 申请日 2017.01.11

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114716552 A

(43) 申请公布日 2022.07.08

(30) 优先权数据
16150808.0 2016.01.11 EP
16172651.8 2016.06.02 EP

(62) 分案原申请数据
201780006353.4 2017.01.11

(73) 专利权人 四十七公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 玛丽·查隆-科塔沃兹
迈赫迪·拉马尔 克劳斯·施瓦本
尼古拉·贝尔特拉梅利
斯戴芬妮·法洛 皮埃尔·加罗内

(74) 专利代理机构 北京弘权知识产权代理有限公司
11363
专利代理师 许伟群 李少丹

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2010239579 A1, 2010.09.23

US 2013142786 A1, 2013.06.06

CN 101133083 A, 2008.02.27

CN 101970478 A, 2011.02.09

CN 103665165 A, 2014.03.26

CN 104804093 A, 2015.07.29

CN 105121467 A, 2015.12.02

WO 0148020 A1, 2001.07.05

WO 2014123580 A1, 2014.08.14

审查员 王冬煌

权利要求书5页 说明书66页
序列表65页 附图29页

(54) 发明名称

人源化、小鼠或嵌合抗CD47单克隆抗体

(57) 摘要

提供了人源化、小鼠或嵌合抗CD47单克隆抗体。所述抗体以优化的K_{off}值结合人糖基化和去糖基化CD47,它们破坏人CD47-SIRP α 相互作用,并且具有在各种治疗、预防或诊断方法中的用途。本发明包括分离抗体及其衍生物和片段,包含一种或多种人源化或嵌合抗CD47单克隆抗体的药物制剂;以及产生这些单克隆抗体的细胞系。还提供了所述抗体的氨基酸和核苷酸序列。

1. 一种试剂盒, 包括抗CD47抗体和用于使用所述抗体的说明书, 其中所述抗体包括:

a. 重链及轻链, 根据Kabat注释, 在重链中, HCDR1序列由SEQ ID NO:49所示的序列组成、HCDR2序列由SEQ ID NO:50所示的序列组成及HCDR3序列由SEQ ID NO:51所示的序列组成, 以及在轻链中, LCDR1序列由SEQ ID NO:55所示的序列组成、LCDR2序列由SEQ ID NO:152所示的序列组成及LCDR3序列由SEQ ID NO:57所示的序列组成; 或者, 根据IMGT注释, 在重链中, HCDR1序列由SEQ ID NO:52所示的序列组成、HCDR2序列由SEQ ID NO:53所示的序列组成及HCDR3序列由SEQ ID NO:54所示的序列组成, 以及在轻链中, LCDR1序列由SEQ ID NO:58所示的序列组成、LCDR2序列由SEQ ID NO:153所示的序列组成及LCDR3序列由SEQ ID NO:60所示的序列组成; 或者

b. 重链及轻链, 根据Kabat注释, 在重链中, HCDR1序列由SEQ ID NO:49所示的序列组成、HCDR2序列由SEQ ID NO:50所示的序列组成及HCDR3序列由SEQ ID NO:51所示的序列组成, 以及在轻链中, LCDR1序列由SEQ ID NO:55所示的序列组成、LCDR2序列由SEQ ID NO:56所示的序列组成及LCDR3序列由SEQ ID NO:57所示的序列组成; 或者, 根据IMGT注释, 在重链中, HCDR1序列由SEQ ID NO:52所示的序列组成、HCDR2序列由SEQ ID NO:53所示的序列组成及HCDR3序列由SEQ ID NO:54所示的序列组成, 以及在轻链中, LCDR1序列由SEQ ID NO:58所示的序列组成、LCDR2序列由SEQ ID NO:59所示的序列组成及LCDR3序列由SEQ ID NO:60所示的序列组成。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其中所述抗CD47抗体为双特异性抗体。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒, 其中所述抗体包括:

a. 包含SEQ ID NO:142中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:159中所示的序列的VL序列;

b. 包含SEQ ID NO:143中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:156中所示的序列的VL序列;

c. 包含SEQ ID NO:143中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:157中所示的序列的VL序列;

d. 包含SEQ ID NO:144中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:158中所示的序列的VL序列;

e. 包含SEQ ID NO:144中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:159中所示的序列的VL序列;

f. 包含SEQ ID NO:141中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:146中所示的序列的VL序列;

g. 包含SEQ ID NO:141中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:147中所示的序列的VL序列;

h. 包含SEQ ID NO:141中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:148中所示的序列的VL序列;

i. 包含SEQ ID NO:141中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:149中所示的序列的VL序列;

j. 包含SEQ ID NO:141中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:150中所示的序列的VL序列;

k. 包含SEQ ID NO:142中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:146中所示的序列的VL序列;

l. 包含SEQ ID NO:142中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:147中所示的序列的VL序列;

m. 包含SEQ ID NO:142中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:148中所示的序列的VL序列;

n. 包含SEQ ID NO:142中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:149中所示的序列的VL序列;

o. 包含SEQ ID NO:142中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:150中所示的序列的VL序列;

p. 包含SEQ ID NO:143中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:146中所示的序列的VL序列;

q. 包含SEQ ID NO:143中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:147中所示的序列的VL序列;

r. 包含SEQ ID NO:143中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:148中所示的序列的VL序列;

s. 包含SEQ ID NO:143中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:149中所示的序列的VL序列;

t. 包含SEQ ID NO:143中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:150中所示的序列的VL序列;

u. 包含SEQ ID NO:144中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:146中所示的序列的VL序列;

v. 包含SEQ ID NO:144中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:147中所示的序列的VL序列;

w. 包含SEQ ID NO:144中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:148中所示的序列的VL序列;

x. 包含SEQ ID NO:144中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:149中所示的序列的VL序列;

y. 包含SEQ ID NO:144中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:150中所示的序列的VL序列;

z. 包含SEQ ID NO:145中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:146中所示的序列的VL序列;

aa. 包含SEQ ID NO:145中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:147中所示的序列的VL序列;

bb. 包含SEQ ID NO:145中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:148中所示的序列的VL序列;

cc. 包含SEQ ID NO:145中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:149中所示的序列的VL序列;或者

dd. 包含SEQ ID NO:145中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:150中所示的序列的

VL序列。

4. 根据权利要求1-2中任一项所述的试剂盒,其中所述抗体包括:包含SEQ ID NO:142中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:159中所示的序列的VL序列。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述抗体包括:由SEQ ID NO:165中所示的序列组成的重链和由具有SEQ ID NO:167中所示的序列组成的轻链。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述抗体包括:由具有SEQ ID NO:166中所示的序列组成的重链和由具有SEQ ID NO:167中所示的序列组成的轻链。

7. 一种试剂盒,包括抗CD47抗体和用于使用所述抗体的说明书,其中所述抗体包括:重链及轻链,根据Kabat注释,在重链中,HCDR1序列由SEQ ID NO:61所示的序列组成、HCDR2序列由SEQ ID NO:62所示的序列组成及HCDR3序列由SEQ ID NO:63所示的序列组成,以及在轻链中,LCDR1序列由SEQ ID NO:67所示的序列组成、LCDR2序列由SEQ ID NO:68所示的序列组成及LCDR3序列由SEQ ID NO:69所示的序列组成;或者,根据IMGT注释,在重链中,HCDR1序列由SEQ ID NO:64所示的序列组成、HCDR2序列由SEQ ID NO:65所示的序列组成及HCDR3序列由SEQ ID NO:66所示的序列组成,以及在轻链中,LCDR1序列由SEQ ID NO:70所示的序列组成、LCDR2序列由SEQ ID NO:71所示的序列组成及LCDR3序列由SEQ ID NO:72所示的序列组成。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其中所述抗CD47抗体为双特异性抗体。

9. 根据权利要求7或8所述的试剂盒,其中所述抗体包括:

a. 包含SEQ ID NO:168中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:172中所示的序列的VL序列;

b. 包含SEQ ID NO:168中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:173中所示的序列的VL序列;

c. 包含SEQ ID NO:168中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:174中所示的序列的VL序列;

d. 包含SEQ ID NO:168中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:175中所示的序列的VL序列;

e. 包含SEQ ID NO:169中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:172中所示的序列的VL序列;

f. 包含SEQ ID NO:169中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:173中所示的序列的VL序列;

g. 包含SEQ ID NO:169中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:174中所示的序列的VL序列;

h. 包含SEQ ID NO:169中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:175中所示的序列的VL序列;

i. 包含SEQ ID NO:170中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:172中所示的序列的VL序列;

j. 包含SEQ ID NO:170中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:173中所示的序列的VL序列;

k. 包含SEQ ID NO:170中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:174中所示的序列的

VL序列;

l. 包含SEQ ID NO:170中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:175中所示的序列的VL序列;

m. 包含SEQ ID NO:171中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:172中所示的序列的VL序列;

n. 包含SEQ ID NO:171中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:173中所示的序列的VL序列;

o. 包含SEQ ID NO:171中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:174中所示的序列的VL序列;或者

p. 包含SEQ ID NO:171中所示的序列的VH序列和包含SEQ ID NO:175中所示的序列的VL序列。

10. 根据权利要求1、2、7或8中任一项所述的试剂盒,其中所述抗体结合糖基化和非糖基化CD47,其中,所述抗体与CD47的结合不依赖于CD47的糖基化。

11. 根据权利要求10所述的试剂盒,其中:

a. 所述糖基化形式的人CD47在人CD47的氨基酸序列SEQ ID NO:151中的位置N23、N34、N50、N73、N111和/或N206处包含一个或多个N-糖基化残基;和/或

b. 所述非糖基化形式的人CD47包含已经用肽N-糖苷酶(PNGase)处理以除去N-糖基化的糖基化人CD47;和/或

c. 所述抗体特异性结合糖基化和非糖基化CD47并破坏CD47-SIRP α 相互作用。

12. 根据权利要求11所述的试剂盒,其中,所述抗体分别特异性结合糖基化和非糖基化人CD47并破坏人CD47-SIRP α 相互作用。

13. 根据权利要求1、2、7或8中任一项所述的试剂盒,其中,所述抗体是抗体片段。

14. 根据权利要求13所述的试剂盒,其中,所述抗体片段是F(ab')₂、scFv或Fab片段。

15. 根据权利要求1、2、7或8中任一项所述的试剂盒,其中,所述抗体具有人IgG4。

16. 根据权利要求15所述的试剂盒,其中,所述抗体具有:由SEQ ID NO:162所示的序列组成的人IgG4。

17. 根据权利要求16所述的试剂盒,其中,所述抗体具有:由SEQ ID NO:164所示的序列组成的人IgG4。

18. 根据权利要求1、2、7或8中任一项所述的试剂盒,其中:

a. 所述抗体结合CD47上的不连续表位;和/或

b. 所述抗体分别结合CD47单体和CD47二聚体。

19. 根据权利要求18所述的试剂盒,其中,所述CD47为人CD47。

20. 根据权利要求18所述的试剂盒,其中,所述不连续表位包括人CD47的SEQ ID:151中的氨基酸残基K59、R63、Y66、T67、H108、T109、T117和T120;或者所述不连续表位包括人CD47的SEQ ID:151中的氨基酸残基K59、K61、S107、H108、T117、T120和R121。

21. 根据权利要求1、2、7或8中任一项所述的试剂盒,其中:

a. 所述抗体与非糖基化及糖基化形式的CD47结合的EC50的比例小于4:1;和/或

b. 所述抗体与非糖基化及糖基化形式的CD47结合的EC95的比例小于25:1;和/或

c. 所述抗体以80pM或更低的平衡结合常数结合糖基化和非糖基化CD47中的每一个;

和/或

d.所述抗体与非糖基化CD47的最大结合能力是所述抗体与糖基化CD47的最大结合能力的至少60%。

22.根据权利要求21所述的试剂盒,其中,所述抗体与非糖基化及糖基化形式的CD47结合的EC50的比例在4:1至1:4的范围内。

23.根据权利要求21所述的试剂盒,其中,所述抗体与非糖基化及糖基化形式的CD47结合的EC50的比例在3:1至1:3的范围内。

24.根据权利要求21所述的试剂盒,其中,所述抗体与非糖基化及糖基化形式的CD47结合的EC50的比例在2:1至1:2的范围内。

25.根据权利要求21所述的试剂盒,其中,所述抗体与非糖基化及糖基化形式的CD47结合的EC95的比例在10:1至1:10的范围内。

26.根据权利要求21所述的试剂盒,其中,所述抗体与非糖基化及糖基化形式的CD47结合的EC95的比例在9:1至1:9的范围内。

27.根据权利要求21所述的试剂盒,其中,所述抗体以70pM或更低的平衡结合常数结合糖基化和非糖基化CD47中的每一个。

28.根据权利要求21所述的试剂盒,其中,所述抗体以60pM或更低的平衡结合常数结合糖基化和非糖基化CD47中的每一个。

29.根据权利要求1、2、7或8中任一项所述的试剂盒,其中,所述试剂盒包括:在一个或多个小瓶、注射器中或者被提供为单位剂量的预包装中的抗体。

30.根据权利要求29所述的试剂盒,其中,所述试剂盒包括被提供为具有稀释剂和递送装置的单位剂量的预包装中的抗体。

31.根据权利要求30所述的试剂盒,其中,所述递送装置是吸入器或注射器。

32.根据权利要求31所述的试剂盒,其中,所述递送装置是注射器。

人源化、小鼠或嵌合抗CD47单克隆抗体

[0001] 本申请是申请日为2017年1月11日、申请号为201780006353.4 (国际申请号为PCT/EP2017/050508)的发明申请的分案申请。

技术领域

[0002] 提供了人源化、小鼠或嵌合抗CD47单克隆抗体。抗体以优化的K_{off}值结合人糖基化和去糖基化CD47,它们破坏人CD47-SIRP α 相互作用,并且发现在各种治疗、预防或诊断方法中的用途。本发明包括分离抗体及其衍生物和片段,包含一种或多种人源化或嵌合抗CD47单克隆抗体的药物制剂;以及产生这些单克隆抗体的细胞系。还提供了这些抗体的氨基酸和核苷酸序列。

背景技术

[0003] 巨噬细胞通过吞噬作用以从血流中清除病原体和损伤或衰老的细胞。细胞表面CD47与巨噬细胞上的其受体SIRP α 相互作用以抑制正常、健康细胞的吞噬作用。CD47是广泛表达的具有单个Ig样结构域和五个跨膜区域的跨膜糖蛋白,其作为SIRP α 的细胞配体通过SIRP α 的NH₂-末端V样结构域介导的结合发挥作用。SIRP α 主要表达在髓样细胞上,包括巨噬细胞、粒细胞、髓样树突细胞(DC)、肥大细胞以及它们的前体,包括造血干细胞(HSC)。

[0004] SIRP α 通过巨噬细胞抑制宿主细胞的吞噬作用,其中宿主靶细胞上表达的CD47与巨噬细胞上SIRP α 的配合产生由SHP-1介导的抑制信号,其负调控吞噬作用。SIRP α 用作检测由“自己”提供的信号,以负控制针对这些细胞的天然免疫效应功能。

[0005] 与CD47的作用保持一致以抑制正常细胞的吞噬作用,有证据表明它在许多癌症中上调。癌细胞系例如髓系白血病上CD47的过表达通过允许其逃避吞噬作用以增加其致病性。因此,CD47上调是在炎症介导的动员过程中对正常HSC提供保护,并且癌细胞共同选择以逃避巨噬细胞杀伤的重要机制。

[0006] 本发明提供了抗CD47抗体,其显示用于在受试者例如人中治疗疾病如癌症的各种期望特征。

发明内容

[0007] 在一个方面,本发明涉及结合糖基化和非糖基化CD47的抗体,其中抗体与CD47的结合不依赖于CD47的糖基化。在一个实施方式中,抗体结合糖基化和去糖基化形式的人CD47。在另一个实施方式中,糖基化形式的人CD47在人CD47的氨基酸序列的位置N23、N34、N50、N73、N111和/或N206处包含一个或多个N-糖基化残基。去糖基化形式的人CD47可以包含已经用肽N-糖苷酶(PNGase)处理以除去N-糖基化的糖基化人CD47。

[0008] 在一个实施方式中,抗体对非糖基化与糖基化形式的CD47结合的EC₅₀的比例小于4:1、3:1或2:1,优选在4:1至1:4的范围内,更优选3:1至1:3,最优选2:1至1:2;或者抗体对非糖基化与糖基化形式的CD47结合的EC₉₅的比例小于25:1、20:1或10:1,优选在10:1至1:10的范围内,更优选9:1至1:9,最优选10:1至1:10。

[0009] 在另一个实施方式中,抗体以80pM或更低、优选70pM或更低、更优选60pM或更低的平衡结合常数结合糖基化和非糖基化CD47中的每一个。

[0010] 在另一个实施方式中,抗体与非糖基化CD47的最大结合能力($B_{\max_2}$)是抗体与糖基化CD47的最大结合能力($B_{\max_1}$)的至少60%。

[0011] 优选抗体具有约 $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (1/s) 或更高的结合糖基化和/或非糖基化CD47的Koff值。更优选抗体具有 $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 至 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 的结合糖基化和/或非糖基化CD47的Koff值。最优选抗体具有 $2.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 至 $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 的结合糖基化和/或非糖基化CD47的Koff值。

[0012] 在另一方面,本发明提供了结合CD47的抗体,其中抗体具有 $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 至 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 的结合CD47的Koff值。

[0013] 提供了与人源化或嵌合抗CD47单克隆抗体相关的组合物和方法。本发明的抗体结合CD47并具有独特的功能谱。具体而言,所述抗体具有以下特征中的至少一种:破坏人CD47-SIRP α 相互作用、抑制CD47-SIRP α 信号转导、增加某些CD47表达细胞的吞噬作用、不引起显著水平的细胞凝集以及发现用于各种治疗方法。优选为结合人CD47并且为IgG4形式的抗体。优选为结合人CD47的双特异性形式并且也可以为IgG4形式的抗体。优选为非激活抗体,其具有高Koff值(表明快速解离动力学)并且细胞凋亡谱和红细胞凝集活性(表明低毒性)弱或不存在。此外,优选为结合不同糖基化模式的人CD47和/或去糖基化形式的人CD47的抗体。本发明的实施方式包括分离抗体及其衍生物和片段,包含一种或多种人源化或嵌合抗CD47单克隆抗体中的药物制剂;以及产生这些单克隆抗体的细胞系。还提供了这些抗体的氨基酸和核苷酸序列。

[0014] 感兴趣的抗体包括所提供的人源化、工程化或嵌合抗体及其变体。本发明的单克隆抗体在人的与CD47相关的疾病的诊断和免疫治疗中发现特别的效用,特别是在癌症治疗如血液肿瘤和实体瘤中。本发明的单克隆抗体的优点来源于人源化过程。因此,本发明的单克隆抗体用于免疫治疗的体内用途大大减少了宿主对抗体显著免疫应答的问题。

[0015] 本文考虑了各种形式的抗体。例如抗CD47抗体可以是全长嵌合或人源化抗体,例如具有任意同种型的人免疫球蛋白恒定区,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA等,或抗体片段,例如单链抗体、F(ab')₂片段、F(ab)片段等。尽管IgG4形式是明显优选的形式,但包含CDR区域的片段也是感兴趣的,例如用于成像目的。对于双特异性方法,IgG形式可能也是合适的。此外,抗体可以用可检测标记来标记、固定在固相上和/或缀合有异源化合物。抗体还可以提供为与第二抗原(特别包括癌症抗原)具有反应性的双特异性或多特异性抗体。优选的双特异性抗体是与Her-2抗原具有功能反应性的抗体。优选使用的双特异性抗体是具有与人CD47结合的介质的那些,例如,候选物20和22及其变体(例如其人源化形式)。

[0016] 考虑了抗体的诊断和治疗用途,特别是涉及检测和消除不期望的CD47表达细胞。在一个诊断应用中,本发明提供了测定CD47表达癌细胞的存在的方法,包括将怀疑含有CD47表达癌细胞的患者样品暴露于抗CD47抗体并测定抗体与样品的结合。对于该用途,本发明提供了包括抗体和使用抗体的说明书的试剂盒。

[0017] 本发明的抗体在治疗疾病中特别有效,例如,增加CD47表达细胞的吞噬作用。治疗可以是全身或局部的,例如通过肿瘤内注射等递送。

[0018] 本发明的实施方式包括分离抗体及其衍生物和片段,其包含至少3个本文提供的

CDR序列,通常与来自人可变区的构架序列组合。在一些实施方式中,抗体包含至少一条轻链,其包含位于可以是但不限于人或小鼠可变区框架的可变区框架中的本文提供的3个轻链CDR序列;和至少一条重链,其包含位于可以是但不限于人或小鼠可变区框架的可变区框架中的本文提供的3个重链CDR序列。

[0019] 在其它实施方式中,抗体包含所提供的抗体的CDR的氨基酸序列变体,所述变体包含CDR残基内或附近的一个或多个氨基酸插入和/或CDR残基内或附近的缺失和/或CDR残基内或附近的置换(其中置换是用于产生这种变体的优选氨基酸改变类型)。此类变体将通常对人CD47具有至少约 10^{-8} M的结合亲和力(例如对人CD47的结合亲和力在2nM至15nM之间),破坏人CD47-SIRP α 相互作用,并且将与具有本文所述氨基酸序列的抗体相同的表位结合。本文考虑了各种形式的抗体。例如,抗体可以是全长抗体,例如具有任意同种型的人免疫球蛋白恒定区,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA,更优选IgG4,任选地具有突变或抗体片段,例如F(ab')₂片段、F(ab)片段等。此外,抗体可以用可检测标记来标记、固定在固相上和/或缀合有异源化合物。

[0020] 本发明的实施方式包括抗CD47抗体,其(i)不管抗体同种型(和效应功能)如何都能有效破坏人CD47-SIRP α 相互作用,(ii)能够通过人单核细胞衍生的巨噬细胞高效吞噬CD47表达肿瘤细胞,(iii)具有 $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 至 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 之间的优化Koff值(使得抗体对较高密度的CD47携带癌细胞具有低吸收效应和较高可用性)和/或(iv)显示了在过度表达靶CD47的异种移植小鼠模型中抑制肿瘤生长。本发明的优选实施方式是另外显示了弱红细胞凝集活性的一组抗CD47抗体,这表明另外的低毒性(候选物编号19、33、20)和/或不诱导(或仅轻微诱导)Jurkat细胞凋亡(候选物编号7、19、20、22、33)。此外,本发明的更优选实施方式是一组抗CD47抗体,其另外地细胞外结合糖基化和非糖基化CD47或结合其免疫活性及糖基化和非糖基化片段。此外,本发明的更优选实施方式是一组抗CD47抗体,其结合CD47单体和二聚体。此外,本发明的更优选实施方式是一组抗CD47抗体,其结合CD47上的特定表位,即特别是当根据SEQ ID NO:151进行编号时包含人CD47的K59、R63、Y66、T67、H108、T109、T117和T120的不连续表位(例如候选物20及其人源化和工程化形式)。本发明的实施方式的另一示例是一组抗CD47抗体,其结合CD47上的特定表位,特别是当根据SEQ ID NO:151进行编号时包含人CD47的K59、K61、S107、H108、T117、T120和R121的不连续表位(例如候选物22及其人源化和工程化形式)。

[0021] 本发明的实施方式包括抗CD47抗体,其(i)不管抗体同种型(和效应功能)如何都能有效破坏人CD47-SIRP α 相互作用,(ii)能够通过人单核细胞衍生的巨噬细胞高效吞噬CD47表达肿瘤细胞,(iii)具有 $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 至 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 之间的优化Koff值(使得抗体对较高密度的CD47携带癌细胞具有低吸收效应和更高可用性)和/或(iv)显示了在过度表达靶CD47的异种移植小鼠模型中抑制肿瘤生长,和/或(v)和如下表2和3所示的CDR组合,其中一个或多个CDR中的至多5个,更优选至多4、3、2或1个氨基酸被其它氨基酸置换,例如保守置换,然而其中抗体的总谱如上文的要素(i)至(iv)未改变或相似,即在标准生物变异的10%范围内。

[0022] 本发明进一步提供了:编码抗体及其变体的分离核酸;包含核酸的载体,任选地可操作连接至由用载体转化的宿主细胞识别的控制序列;包含该载体的宿主细胞;产生抗体的方法,包括培养宿主细胞使得核酸表达,并且任选地,从宿主细胞培养物(例如从宿主细

胞培养基)回收抗体。本发明还提供了包含一种或多种抗人CD47抗体和药学上可接受的载体或赋形剂的组合物。用于治疗用途的该组合物是无菌的并且可以是冻干的,例如提供为具有稀释剂的单位剂量和递送装置例如吸入器、注射器等的预先包装。

附图说明

[0023] 附图并未旨在按比例绘制。这些附图仅是说明性的,并不是实现本公开所必需的。为了清楚起见,并非每个组件都可以在每张图中标注。在附图中:

[0024] 图1 hSIRP α 与CHO细胞上表达的hCD47的结合被抗CD47抗体抑制。

[0025] 图2抗CD47抗体与Raji细胞上表达的hCD47的结合谱。

[0026] 图3 hSIRP α 与Raji细胞上表达的hCD47的结合被抗CD47抗体抑制。

[0027] 图4用抗CD47抗体增强人巨噬细胞对Raji细胞的吞噬作用。

[0028] 图5通过抗CD47抗体凝集纯化的人RBC。

[0029] 图6通过SPR测量的抗CD47抗体与hCD47的缔合和解离谱。

[0030] 图7与候选物20的小鼠VH序列的序列(VH0)比对的5种人源化VH变体(VH1至VH5)的氨基酸序列。CDR加下划线(使用KABAT和IMGT的组合定义)。

[0031] 图8与候选物20的小鼠VL序列的序列(VL0)比对的5种人源化VL变体(VL1至VL5)的氨基酸序列。CDR加下划线(使用KABAT和IMGT的组合定义)。

[0032] 图9抗CD47抗体对A) NOG小鼠中人Raji淋巴瘤细胞的生长和B) Raji肿瘤细胞植入后NOG小鼠的存活的影响(* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; Mantel-Cox检验)。

[0033] 图10单独或与**Herceptin[®]**或**Erbix[®]**组合的抗CD47候选物20对NOG小鼠中A2780/Luc人卵巢肿瘤生长的影响。将A2780/Luc细胞在NOG小鼠($n = 4$ 只/组)中腹膜内(IP)移植并且在移植1天后开始以10mg/kg抗体治疗达5周(3次注射/周, IP)。(A)第28天在每只小鼠中观察到的腹侧和背侧发光。(B)绘制生物发光强度(背侧+腹侧)针对肿瘤植入后时间的定量。通过使用GraphPad Prism软件的不成对t检验,在第28天将治疗组与载体组进行比较(** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$)。

[0034] 图11单独或与**Herceptin[®]**或**Erbix[®]**组合的抗CD47候选物20对NOG小鼠中A549人肺肿瘤细胞生长的影响。将A549细胞皮下移植于NOG小鼠($n = 4$ 只/组)中并且在当肿瘤是可触知的时候(第10天)开始以10mg/kg抗体治疗达10周(3次注射/周, IP)。(A)肿瘤细胞生长,通过相对于肿瘤植入后的时间绘制的每个组的平均肿瘤体积 $\pm$ SD(cm^3)来测量。通过使用Hather等人(Hather G., Liu R., Bandi S., Mettetal J.等人“Growth Rate Analysis and Efficient Experimental Design for Tumor Xenograft Studies.”Cancer Informatics 13(S4):65-72(2014))描述的基于速率的T/C方法将治疗组与载体组进行比较(* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$)。(B)小鼠的存活曲线。通过使用GraphPad Prism软件的对数秩(Mantel-Cox)检验,将治疗组与载体组进行比较(** $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)。

[0035] 图12通过流式细胞术测量的抗CD47候选物20的人源化变体在Raji细胞上的结合。具有VL-CDR2-F56Y突变的人源化变体(具有SEQ ID No:152(Kabat)和153(IMGT)的CDR2,即候选物20.26(h20-H2-L5Y)、20.27(h20-H3-L2Y)、20.28(h20-H3-L3Y)、20.29(h20-H4-L4Y)、20.30(h20-H4-L5Y))与不具有F56Y突变的相应变体候选物20.10(h20-H2-L5)、20.12

(h20-H3-L2)、20.13(h20-H3-L3)、20.19(h20-H4-L4)、20.20(h20-H4-L5)和与嵌合候选物20(所有抗体均为IgG4形式)进行比较。

[0036] 图13 hSIRP α 与Raji细胞上的hCD47的结合被抗CD47候选物20的人源化变体抑制。具有VL-CDR2-F56Y突变的人源化变体(具有SEQ ID No.:152(Kabat)和153(IMGt)的CDR2,即候选物20.26(h20-H2-L5Y)、20.27(h20-H3-L2Y)、20.28(h20-H3-L3Y)、20.29(h20-H4-L4Y)、20.30(h20-H4-L5Y))与不具有F56Y突变的相应变体候选物20.10(h20-H2-L5)、20.12(h20-H3-L2)、20.13(h20-H3-L3)、20.19(h20-H4-L4)、20.20(h20-H4-L5)进行比较。

[0037] 图14候选物20的VL-CDR2-F56Y人源化变体(即候选物20.26(h20-H2-L5Y)、20.27(h20-H3-L2Y)、20.28(h20-H3-L3Y)、20.29(h20-H4-L4Y)、20.30(h20-H4-L5Y))与抗体AB06.12和Hu5F9对Raji细胞在CD47结合测定中和在CD47/SIRP α 相互作用测定中的比较。

[0038] 图15候选物20和hCD47之间相互作用的表位作图。

[0039] 图16候选物22和hCD47之间相互作用的表位作图。

[0040] 图17通过SEC-HPLC分析可溶性hCD47显示了蛋白质制剂中的不均一性,其中存在CD47单体和二聚体。

[0041] 图18分别为~30kDa和>50kDa的纯化hCD47单体和二聚体级分的SDS-PAGE分析。

[0042] 图19通过结合ELISA测量的候选物20和22的hCD47单体和二聚体识别。

[0043] 图20抗CD47抗体在与RBC结合后的释放。首先在+4℃将人RBC用1 μ g/mL的小鼠抗CD47候选物14、19、20、22或用小鼠2A1或B6H12抗体染色。洗涤后,将RBC在无抗体培养基中在+37℃温育6小时(T+6h)或24小时(T+24h),并且用PE缀合的抗小鼠IgG抗体和流式细胞术显示固定在RBC上的小鼠抗CD47抗体的残余水平。结果表示为对用抗CD47抗体染色的RBC在T+6h或T+24h测量的平均荧光强度(MFI)与在6和24小时温育之前(T0)用相同抗体染色RBC所获得的MFI相比降低的百分比。

[0044] 图21抗CD47抗体在与Raji细胞结合后释放,并且Raji肿瘤细胞在由抗CD47抗体染色后吞噬作用减少。(A)首先将人Raji淋巴瘤细胞用1 μ g/mL的小鼠抗CD47候选物14、19、20、22或用小鼠2A1或B6H12抗体染色。洗涤后,将Raji细胞在无抗体培养基中在+37℃温育24小时(T+24h),然后洗涤并用PFA 4%固定。然后用PE缀合的抗小鼠IgG抗体和流式细胞术显示固定在Raji细胞上的小鼠抗CD47抗体的残余水平。结果表示为对用抗CD47抗体染色的RBC在T+24h测量的平均荧光强度(MFI)与在24小时温育之前(T0)用相同抗体染色PFA固定的Raji细胞所获得的MFI相比降低的百分比。(B)首先将CFSE标记的Raji淋巴瘤细胞用0.1或1 μ g/mL的小鼠抗CD47候选物14、19、20、22或用小鼠2A1或B6H12抗体染色。洗涤后,将Raji细胞在无抗体培养基中在+37℃温育24小时(T+24h),然后洗涤并用Far-Red标记的人巨噬细胞(hMDM)通过流式细胞术在吞噬测定中进行测试。结果表示为对用抗CD47抗体染色的Raji细胞在T24h测量的吞噬作用与在24小时温育之前(T0)用相同抗体染色Raji细胞所获得的吞噬作用相比降低的百分比。

[0045] 图22通过嵌合候选物20和22、人源化h20-H2L5Y抗体和人源化Hu5F9和AB06.12抗体识别人糖基化(A)和N-去糖基化(B)CD47,如通过ELISA在包覆有糖基化或N-去糖基化的CD47的平板上所测量的。所有抗体以hu-IgG4形式进行测试。

[0046] 图23单独或与**Herceptin**[®]组合的人源化h20-H2L5Y抗体在NOG小鼠的A549NSCLC异种移植模型中的功效。将A549细胞皮下移植于NOG小鼠(n=8只/组)中并且在当肿瘤大约

100mm³时(第14天)开始抗体治疗达10周。IP注射抗体(3次注射/周),其中h20-H2L5Y以hu-IgG4形式(h20-H2L5Y-G4)以10mg/kg/剂量注射,并且**Herceptin**[®](hu-IgG1)以2.5mg/kg/剂量注射。监测小鼠的存活并呈现存活曲线。通过使用GraphPad Prism软件的对数秩(Mantel-Cox)检验,将治疗组与载体组进行比较(**p<0.05;***p<0.005)。相比于用**Herceptin**[®]单独治疗的组,用h20-H2L5Y-G4和**Herceptin**[®]的组合治疗的小鼠的存活得到显著增强(p<0.01)。

[0047] 图24单独或与**Herceptin**[®]组合的人源化抗体h20-H2L5Y抗体在N0G小鼠的NCI-N87胃异种移植模型中的功效。将NCI-N87细胞(10×10^6)皮下移植于N0G小鼠(n=8只/组)中并且在当肿瘤大约100mm³时(第7天)开始抗体治疗达5周。IP注射抗体(3次注射/周),其中h20-H2L5Y以hu-IgG4-S228P-L235E形式(h20-H2L5Y-G4PE)以10mg/kg/剂量注射,并且**Herceptin**[®](hu-IgG1)以2.5mg/kg/剂量注射。通过测量肿瘤体积监测肿瘤细胞生长。每个组的平均肿瘤体积(cm³)+/-SD呈现为不同时间,直到第一只小鼠死亡或被处死到各组中。通过使用Hather等人(Hather G., Liu R., Bandi S., Mettetal J.等人“Growth Rate Analysis and Efficient Experimental Design for Tumor Xenograft Studies.” Cancer Informatics 13(S4):65-72(2014))描述的基于速率的T/C方法将治疗组与载体组进行比较(*p<0.05;***p<0.0005)。当与单独使用**Herceptin**[®]处理的动物相比时,用h20-H2L5Y-G4PE加**Herceptin**[®]组合处理的动物组中的NCI-N87肿瘤细胞的生长也显著降低(p<0.05)。

具体实施方式

[0048] 本发明涉及对CD47具有特异性的单克隆抗体。还公开了这些抗体的核酸和氨基酸序列。这些抗体发现在与CD47相关的治疗和诊断方法中的用途。

[0049] “治疗”是指治疗性治疗和预防或防止措施两者。需要治疗的患者包括已经患有疾病的患者以及需要预防疾病的患者。

[0050] 用于治疗目的的“哺乳动物”是指分类为哺乳动物的任何动物,包括人、家养动物和农场动物,以及动物园、运动或宠物动物,如狗、马、猫、牛等。优选地,哺乳动物是人。

[0051] 术语“抗体”以最广泛的含义使用并且具体涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出期望的生物活性即可。“抗体”(Ab)和“免疫球蛋白”(Ig)是具有相同结构特征的糖蛋白。虽然抗体对特定抗原表现出结合特异性,但免疫球蛋白包括缺乏抗原特异性的抗体和其它抗体样分子。后一种多肽例如由淋巴系统以低水平产生,并且由骨髓瘤以增加水平产生。

[0052] 如本发明所用,术语“表位”是指抗体的互补位结合的抗原上的任何抗原决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团组成,例如氨基酸或糖侧链,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。

[0053] “天然抗体和免疫球蛋白”通常是约150000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接,同时不同免疫球蛋白同种型的重链之间二硫键的数量不同。每条重链和轻链也具有规则间隔的链

内二硫桥。每条重链在一端具有可变结构域(VH),随后是多个恒定结构域。每条轻链在一端具有可变结构域(VL),在其另一端具有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对齐,并且轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐。据信特定的氨基酸残基在轻链和重链可变结构域之间形成界面(Clothia C,Novotný J,Bruccoleri R,Karplus M."Domain association in immunoglobulin molecules.The packing of variable domains."J.Mol.Biol.186:651-63(1985);Novotny J.和Haber E."Structural invariants of antigen binding:comparison of immunoglobulin VL-VH and VL-VL domain dimers."Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.82:4592-96(1985))。

[0054] 术语“可变”是指这样的事实,即可变结构域的某些部分在抗体间的序列中广泛不同,并且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性不是均匀分布在整个抗体的可变结构域中。它集中在轻链和重链可变结构域中称为互补决定区(CDR)或高变区的三个区段。可变结构域中的更高度保守的部分被称为框架(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR区,大部分采用 β -折叠构型,通过形成环连接的三个CDR连接,并且在一些情况下形成 β -折叠结构的一部分。每条链中的CDR通过FR区紧密靠近在一起,并与另一条链的CDR一起促成抗体的抗原结合位点的形成(对于KABAT注释,参见Kabat E.A.Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)或对于IMGT注释,参见<http://www.imgt.org>)。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出各种效应功能,例如抗体参与抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0055] 示例性抗CD47重链和轻链组合的CDR序列在序列表中示出,包括SEQ ID NO:1-120、152、153(参见表2和3,同上)。

[0056] 木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,每个片段具有单个抗原结合位点,和残余“Fc”片段,其名称反映了其容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点并仍能够交联抗原的F(ab')₂片段。

[0057] “Fv”是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。在双链Fv物种中,该区域由紧密非共价缔合的一个重链和一个轻链可变结构域的二聚体组成。在单链Fv物种(scFv)中,一个重链和一个轻链可变结构域可以通过柔性肽连接子共价连接,使得轻链和重链可以缔合成类似于双链Fv物种的“二聚体”结构中。正是在这种构型中,每个可变结构域的三个CDR相互作用以在VH-VL二聚体的表面上限定抗原结合位点。六个CDR共同地对抗体赋予抗原结合特异性。然而,甚至单个可变结构域(或仅包含三个特异的CDR的Fv的一半)具有识别和结合抗原的能力,尽管其亲和力低于整个结合位点。scFv的综述可参见Plückthun A.Antibodies from Escherichia coli,in“*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*”,by Rosenberg和Moore eds.,Springer-Verlag,New York,vol.113,pp.269-315(1994)。

[0058] Fab片段还含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域。Fab'片段与Fab片段的区别之处在于在重链CH1结构域的羧基末端添加了几个残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文对Fab'的命名,其中恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离巯基。F(ab')₂抗体片段最初是作为在它们之间具有铰链半胱氨酸的Fab'片段对产生的。其它抗体片段的化学偶联也是已知的。

[0059] 有五种主要类别的免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG和IgM, 其中几种可以进一步分成亚类(同种型), 例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是众所周知的。

[0060] 如本文所用, “抗体片段”及其所有语法变体定义为包含完整抗体的抗原结合位点或可变区的一部分完整抗体, 其中该部分不含完整抗体的Fc区的重链恒定结构域(即CH2、CH3和CH4, 取决于抗体同种型)。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂和Fv片段; 双体; 任何抗体片段, 其为具有由一个连续氨基酸残基的不间断序列组成的一级结构的多肽(在本文中称为“单链抗体片段”或“单链多肽”), 包括但不限于(1) 单链Fv(scFv)分子(2) 仅含有一个轻链可变结构域的单链多肽或其含有轻链可变结构域的三个CDR的片段, 而没有相关的重链部分; 和(3) 单链多肽, 其仅含有一个重链可变区或其含有重链可变区的三个CDR的片段, 而没有相关的轻链部分; 以及由抗体片段形成的多特异性或多价结构。在包含一条或多条重链的抗体片段中, 重链可以含有在完整抗体的非Fc区中发现的任何恒定结构域序列(例如IgG同种型中的CH1), 和/或可以含有在完整抗体中发现的任何铰链区序列, 和/或可以含有与铰链区序列或重链的恒定区序列融合或位于其中的亮氨酸拉链序列。

[0061] 除非特别指出相反, 否则如本文所述和要求保护的术语“缀合物”定义为通过将一个或多个抗体片段共价连接至一个或多个聚合物分子而形成的异质分子, 其中异质分子是水溶性的, 即可溶于生理流体如血液中, 并且其中异质分子不含任何结构化聚集体。目标缀合物是PEG。在前述定义的上下文中, 术语“结构化聚集体”是指(1) 水溶液中具有球体或球体壳结构的分子的任何聚集体, 使得异质分子不处于胶束或其它乳液结构中, 并且不锚定于脂质双层、囊泡或脂质体; 和(2) 固体或不溶形式的分子的任何聚集体, 例如色谱珠基质, 其在水相接触时不会将异质分子释放到溶液中。因此, 如本文所定义的术语“缀合物”涵盖沉淀物、沉积物、生物可侵蚀基质或其它能够在固体水合后将异质分子释放到水溶液中的固体的上述异质分子。

[0062] 如本文所用, 术语“单克隆抗体”(mAb) 是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体, 即除了可能以少量存在的天然存在的突变外, 包含该群体的单个抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的, 针对单个抗原位点。每个mAb针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性之外, 单克隆抗体的优点在于它们可以通过杂交瘤培养或哺乳动物细胞系合成, 不受其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征, 并且不被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如, 根据本发明使用的单克隆抗体可以在永生B细胞或其杂交瘤中制备, 或者可以通过重组DNA方法制备。

[0063] 本文中的单克隆抗体包括通过将抗CD47抗体的可变(包括高变) 结构域与恒定结构域(例如“人源化”抗体)、或将轻链与重链、或将来自一种物种的链与来自另一物种的链、或与异源蛋白质的融合物拼接产生的杂合和重组抗体, 不管起源物种或免疫球蛋白类别或亚类名称, 以及抗体片段(例如Fab、F(ab')₂和Fv), 只要它们表现出所期望的生物活性即可。

[0064] 本文中的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白), 其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源, 而链的其余部分与衍生自另一物种或属于另一种抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同

或同源,以及这些抗体的片段,只要它们表现出期望的生物活性即可。

[0065] “分离”抗体是从其天然环境的组分中鉴定和分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染组分是干扰抗体诊断或治疗用途的物质,可能包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。在一些实施方式中,通过SDS-PAGE在还原或非还原条件下使用考马斯蓝或优选银染,抗体将被纯化(1)至超过按Lowry法测定的抗体的75重量%,并且最优选超过80重量%、90重量%或99重量%,或(2)至均一的。分离抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为抗体天然环境的至少一种组分将不存在。然而,通常通过至少一个纯化步骤来制备分离抗体。

[0066] 当在本文中使用时,术语“表位标签的”是指与“表位标签”融合的抗CD47抗体。表位标签多肽具有足够的残基以提供针对其可制备抗体的表位,但足够短以至于不干扰CD47抗体的活性。表位标签优选足够独特,使得对该表位特异性的抗体基本上不与其它表位交叉反应。合适的标签多肽通常具有至少6个氨基酸残基并且通常约8-50个氨基酸残基(优选约9-30个残基)。实例包括c-myc标签和其8F9、3C7、6E10、G4、B7和9E10抗体(Evan G.I., Lewis G.K., Ramsay G.等人“Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product”, Mol. Cell. Biol. 5(12):3610-3616(1985));和单纯疱疹病毒糖蛋白D(gD)标签及其抗体(Paborsky L.R., Fendly B.M., Fisher K.L.等人“Mammalian cell transient expression of tissue factor for the production of antigen”, Protein Engineering 3(6):547-553(1990))。

[0067] 当在本文中使用时,词语“标记”是指直接或间接与抗体缀合的可检测化合物或组合物。标记本身可以是本身可检测的(例如放射性同位素标记或荧光标记),或者在酶标记的情况下,可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

[0068] “固相”是指本发明的抗体可以附着的非水性基质。本文涵盖的固相的实例包括部分或完全由玻璃(例如受控多孔玻璃)、多糖(例如琼脂糖)、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇和硅酮形成的那些。在某些实施方式中,取决于上下文,固相可以包含测定板的孔;在其它情况下,它是纯化柱(例如亲和色谱柱)。该术语还包括离散颗粒的不连续固相,例如在美国专利号4,275,149中所述的那些。

[0069] CD47的糖基化

[0070] CD47进行翻译后修饰,最显著的是糖基化。CD47具有许多直接影响细胞表面展示并调节与细胞外配体相互作用的N-末端糖基化位点。例如,去糖基化CD47对SIRP α 具有比糖基化CD47更高的亲和力,反之,去糖基化SIRP α 对CD47具有更高的亲和力(Subramanian S., Boder E.T., 和 Discher D.E. “Phylogenetic divergence of CD47 interactions with human signal regulatory protein α reveals locus of species specificity.” J. Biol. Chem. 282(3):1805-18(2007); Subramanian S., Parthasarathy R., Sen S., Boder E.T., 和 Discher D.E. “Species and cell type-specific interactions between CD47 and human SIRP α .” Blood 107(6):2548-56(2006))。相反,高糖基化SIRP α 可以破坏CD47/SIRP α 相互作用(Ogura T., Noguchi T., Murai-takebe R., Hosooka T., Honma N., 和 Kasuga M. “Resistance of B16 melanoma cells to CD47-induced negative regulation of motility as a result of aberrant N-glycosylation of SHPS-1.” J Biol Chem 279(14):13711-20(2004))。值得注意的是,N连接的糖基化位点的定点诱变抑制了CD47在酵母模型中的细胞表面定位(Parthasarathy R., Subramanian S., Boder

E.T.,和Discher D.E.“Post-Translational Regulation of Expression and Conformation of an Immunoglobulin Domain in Yeast Surface Display.”*Biothech Bioin* 93(1):159-68(2006)),尽管相似的诱变不影响人CD47在CHO细胞中的膜定位(Subramanian等,2006,同上)。CD47或SIRP α 的异常糖基化也可改变下游应答,差异糖基化SIRP α 使得B16黑素瘤细胞对CD47诱导的运动性抑制具有抗性(Ogura等,2004,同上)。此外,在原代和转化的T细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞中检测到重度糖基化(>250kD)形式的CD47(Kaur S.,Kuznetsova S.A.,Pendrak M.L.,Romeo M.J.,Li Z.,Zhang L.,和Roberts D.D.“Heparan Sulfate Modification of the Transmembrane Receptor CD47 Is Necessary for Inhibition of T Cell Receptor Signaling by Thrombospondin-1”,*J Biol Chem* 286(17):14991-15002(2011))。该修饰位于SIRP α 结合位点的远端,但是T细胞中TSP-1介导的抑制性信号传导所需的。

[0071] 由于肿瘤细胞可能表达异常的糖基化模式,因此希望提供不依赖于糖基化而与CD47结合的抗CD47抗体。然而,尽管已知的治疗相关抗CD47抗体通常有效地与糖基化CD47结合,但它们通常与非糖基化或去糖基化CD47结合较差(例如具有较低的结合亲和力/较高的平衡结合常数或降低的最大结合能力(B_{max}))。

[0072] 在一个方面,本发明的抗体结合糖基化和非糖基化CD47。例如,在一个实施方式中,抗体与CD47的结合不依赖于CD47的糖基化。这意味着CD47的糖基化不是抗体与CD47足够结合所需要的,例如,不管CD47的糖基化水平如何,抗体都显示出对CD47的显著特异性结合。换句话说,抗体与CD47的结合至少部分、显著或基本上不依赖于糖基化。

[0073] 如本文所用,“糖基化”CD47通常是指已经在一个或多个残基处N-糖基化的(例如人)CD47。人CD47可以在人CD47(SEQ ID NO:151)的氨基酸序列中位置N23、N34、N50、N73、N111和N206的一个或多个(例如天冬酰胺)残基处被N-糖基化。优选地,糖基化CD47在上述位置中的至少2、3、4、5或6个位置被糖基化。

[0074] “去糖基化”CD47是指其中已经除去了一个或多个聚糖链(例如N-聚糖)的CD47形式。CD47的去糖基化可以通过用诸如肽N-糖苷酶(PNGase)例如去除N-聚糖的PNGase F酶处理来实现。术语“非糖基化”和“去糖基化”在本文中可互换使用。因此,非糖基化或去糖基化形式通常在人CD47(SEQ ID NO:151)的氨基酸序列中位置N23、N34、N50、N73、N111和/或N206处缺少聚糖残基。

[0075] 在一个实施方式中,CD47的去糖基化不会显著影响抗体对(人)CD47的亲合力/亲和力和/或最大结合能力。糖基化和去糖基化形式的CD47的抗体的亲合力/亲和力和最大结合能力(B_{max})可以使用标准测定例如如下文的实施例中所示的进行确定。抗体对其靶表位的亲和力与其解离常数呈负相关。解离常数也可以和抗体与CD47结合的EC₅₀值直接相关。EC₅₀是提供半数最大结合的抗体浓度,即CD47上50%的结合位点结合的抗体浓度。此外,EC₉₅值是提供95%最大结合的抗体浓度,EC₉₅值表示CD47上95%的结合位点结合的抗体浓度。无论使用哪种测量,根据本发明的实施方式,对于糖基化和非糖基化形式获得的相对值是重要的,即不一定需要确定绝对值,条件是糖基化和非糖基化形式显示合理相似的结果。

[0076] 因此,在一些实施方式中,抗体对非糖基化和糖基化形式的CD47的亲和力可以通过确定抗体与每种形式结合的EC₅₀值或EC₉₅值的比例来比较。优选地,该比例小于5:1、4:

1:3:1或2:1,但对于EC95可以甚至更高,即可以是25:1、20:1、10:1,优选地在10:1至1:10的范围内,更优选9:1至1:9,最优选10:1至1:10。换句话说,抗体与非糖基化CD47结合的EC50可能不超过抗体与糖基化CD47结合的EC50值的3倍或2倍。抗体与非糖基化CD47结合的EC95可能不超过抗体与糖基化CD47结合的EC95值的9倍或10倍。在进一步的实施方式中,EC50的比例优选在3:1至1:3或2:1至1:2的范围内,最优选3:1至1:3;或者EC95的比例优选在10:1至1:10的范围内,更优选9:1至1:9,最优选10:1至1:10。在这样的实施方式中,据认为去糖基化不显著影响结合亲和力,即抗体与CD47的结合不依赖于糖基化。在一些实施方式中,抗体以80pM或更低、优选70pM或更低、更优选60pM或更低的平衡结合常数结合非糖基化CD47(并优选同时结合非糖基化和糖基化形式的CD47)。

[0077] 在其它实施方式中,CD47的去糖基化不会显著降低抗体对CD47的最大结合能力。例如,可以针对抗体与糖基化CD47的结合测定最大结合能力(即 B_{max_1})。 B_{max_1} 涉及抗体与CD47在过量抗体浓度下的结合水平,即抗体与CD47之间特异性结合的最大水平。因此, B_{max_1} 是糖基化CD47上抗体的可用结合位点浓度的量度。然后CD47可以(例如使用PNGase)去糖基化,再次测定与过量抗体浓度的CD47结合的水平(在样品中相同浓度的CD47)。因此,抗体对去糖基化CD47的最大结合能力(即 B_{max_2})是去糖基化CD47上抗体的可用结合位点浓度的量度。

[0078] 在优选实施方式中,抗体与非糖基化CD47的最大结合能力(即 B_{max_2})是抗体与糖基化CD47的最大结合能力(B_{max_1})的至少60%、或至少70%。在这样的实施方式中,据认为去糖基化不显著影响最大结合能力,即抗体与CD47的结合不依赖于糖基化。

[0079] 在进一步的实施方式中,可以基于EC95值的比例来比较抗体与糖基化和去糖基化形式的CD47的结合特性。EC95是CD47上95%的结合位点结合的抗体浓度。因此,在一些实施方式中,抗体对非糖基化和糖基化形式的CD47的亲和力可以通过确定抗体与每种形式结合的EC95值的比例来比较。优选该比例小于10:1或9:1。换句话说,抗体与非糖基化CD47结合的EC95可能不超过抗体与糖基化CD47结合的EC95值的10倍或9倍。

[0080] 抗体解离动力学

[0081] 在本发明的另一方面,提供了抗CD47抗体,其具有在规定范围内的CD47的解离速率(Koff)。具体而言,已经证明了具有表征为高于 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 的Koff值的高解离速率的抗CD47抗体与RBC强烈而迅速地分离,但是也迅速丧失其对肿瘤细胞的大部分功能活性例如增强肿瘤细胞的吞噬作用。相反,具有表征为低于 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 的Koff值的非常慢解离速率的抗CD47抗体与肿瘤细胞更慢分离,但将停留在红细胞上并因此可能具有显著的吸收效应并可能有更多的副作用。

[0082] 因此,具有表征为 1×10^{-4} 至 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 的Koff值的中等解离动力学的抗CD47抗体具有最佳的CD47结合/释放平衡,即提供弱吸收效应和副作用,同时保持它们的抗肿瘤功效。因此,在一方面,本发明提供了结合CD47并具有约 $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 至 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ 的结合CD47的Koff值的抗体。在具体实施方式中,抗体可以以该范围内的Koff值结合糖基化和/或非糖基化CD47。优选地,抗体具有包括 $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 至 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、 $2.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 至 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、 $2.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 至 $8.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $2.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 至 $5.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或 $3.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 至 $4.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 的结合(例如糖基化和/或非糖基化)CD47的Koff值。

[0083] 抗体

[0084] 一方面,本发明涉及与人CD47特异性结合的小鼠、人源化或嵌合单克隆抗体,以及产生这种抗体的细胞系。本发明的这些抗CD47抗体显示了各种用于癌症治疗的期望特征(但不限于此),例如不管抗体同种型(和效应功能)如何,强烈破坏CD47-SIRP α 相互作用,快速解离动力学,其Koff值在以下范围内: $1.0 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 至 $1.0 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 、 $2.0 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 至 $1.0 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 、 $2.5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 至 $8.0 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 、 $2.5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 至 $5.0 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或 $3.0 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 至 $4.5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ (其中基准抗体显示了 5.0 至 $8.9 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 的较低Koff值)。此外,本发明的抗体在与红细胞上的CD47结合后迅速释放(其中具有较低Koff值的基准抗体更缓慢地释放)。此外,本发明的抗CD47抗体能够通过人单核细胞衍生的巨噬细胞高效吞噬CD47表达肿瘤细胞。此外,本发明的抗CD47抗体在过度表达靶CD47的异种移植小鼠模型中显示了对肿瘤生长的抑制。此外,所述抗体具有以下特征中的至少一个:破坏CD47-SIRP α 相互作用,在对去糖基化CD47与糖基化CD47的EC50的比例不超过3.0和对去糖基化CD47与糖基化CD47的EC95的比例不超过10.0下结合糖基化和非糖基化CD47,抑制CD47-SIRP α 信号转导,增加对某些CD47表达细胞的吞噬作用,不引起细胞的显著水平凝集,并且发现在各种治疗和诊断方法中的用途。优选结合人CD47并且具有任选突变(例如,为了除去T细胞表位甚至在CDR区如CDR2中替换氨基酸)的IgG4形式的抗体。本发明的优选实施方式是另外显示弱红细胞凝集活性的一组抗CD47抗体,这表明另外的低毒性(候选物编号19、33、20(包括候选物20的人源化和进一步工程化抗体))和/或不诱导(或仅轻微诱导)Jurkat细胞凋亡(候选物编号7、19、20(包括候选物20的人源化和进一步工程化抗体)、22(包括候选物22的人源化和进一步工程化抗体)、33)。此外,本发明的更优选的实施方式是一组抗CD47抗体,其另外地细胞外结合糖基化和非糖基化CD47或结合其免疫活性及糖基化和非糖基化片段。此外,本发明的更优选的实施方式是一组抗CD47抗体,其结合CD47如人CD47单体和二聚体。此外,本发明的更优选的实施方式是一组抗CD47抗体,其结合CD47上的特定表位,特别是当根据SEQ ID NO:151进行编号时包含人CD47的K59、R63、Y66、T67、H108、T109、T117和T120的不连续表位(例如候选物20及其人源化和工程化形式)。本发明的另一实例的实施方式是一组抗CD47抗体组,其结合CD47上的特定表位,特别是当根据SEQ ID NO:151进行编号时包含人CD47的K59、K61、S107、H108、T117、T120和R121的不连续表位(例如候选物22及其人源化和工程化形式)。

[0085] 优选的候选物是候选物7、14、15、19、20、22、26和33。甚至更优选的候选物是候选物7、19、20、22和33。甚至更优选的候选物是候选物20和22。最优选的候选物是候选物20(包括候选物20的人源化和进一步工程化抗体,即候选物20.1至20.30)。提供了示例抗体(本文通常通过候选物编号或抗体名称表示)的CDR(以KABAT-(表2)和IMGT-(表3)注释)和可变区(表1)(IMGT注释是优选的)。感兴趣的抗体包括这些提供的组合,以及可变区与核实的恒定区或恒定区的片段的融合以例如产生F(ab)'抗体。感兴趣的抗体包括所提供的抗CD47抗体的至少一个CDR序列,其中CDR可以是3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个或更多个氨基酸。或者,感兴趣的抗体包括如所提供的抗体所示的可变区,或如本文所述的成对的可变区序列。这些抗体可以是全长抗体,例如具有任意同种型的人免疫球蛋白恒定区,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA,更优选IgG4,其任选地具有突变,例如其中一些或所有T细胞表位即使在CDR区域中,例如通过沉默保守氨基酸替换(也参见实施例的实验部分),诸如S228P和L235E突变的示例,即其中分别引入S228P和L235E突变以避免潜在的链交换并降低hIgG4对Fc γ 受体的亲和力。

[0086] 表1:选择的候选物具有候选物编号、抗体名称、重链可变区 (VH) SEQ ID NO和轻链可变区 (VL) SEQ ID NO:

候选物编号	抗体名称	重链可变区 (本文也称为“VH”) SEQ ID NO	轻链可变区 (本文也称为“VL”) SEQ ID NO
7	VT008-AL5-10G7-10K7	121	122
14	VT008-AL6-14G1-16K1	123	124
15	VT008-AL6-18G1-18K21	125	126
19	VL008-AL17-7G1-7K6	127	128
20	VL008-AL18-14G4-14K1	129	130
22	VL008-AL13-8G5-8K3	131	132
26	VT008-AL6-10G3-10K1	133	134
29	VT008-AL6-20G7-20K7	135	136
30	VT008-AL6-39G2-39K2	137	138
33	VL008-AL17-8G5-8K7	139	140
20.1	H20-VH1-VL1	141	146
20.2	H20-VH1-VL2	141	147
20.3	H20-VH1-VL3	141	148
20.4	H20-VH1-VL4	141	149
20.5	H20-VH1-VL5	141	150
20.6	H20-VH2-VL1	142	146
20.7	H20-VH2-VL2	142	147
20.8	H20-VH2-VL3	142	148
20.9	H20-VH2-VL4	142	149
20.10	H20-VH2-VL5	142	150
20.11	H20-VH3-VL1	143	146
20.12	H20-VH3-VL2	143	147
20.13	H20-VH3-VL3	143	148
20.14	H20-VH3-VL4	143	149
20.15	H20-VH3-VL5	143	150
20.16	H20-VH4-VL1	144	146
20.17	H20-VH4-VL2	144	147
20.18	H20-VH4-VL3	144	148
20.19	H20-VH4-VL4	144	149
20.20	H20-VH4-VL5	144	150
20.21	H20-VH5-VL1	145	146
20.22	H20-VH5-VL2	145	147
20.23	H20-VH5-VL3	145	148
20.24	H20-VH5-VL4	145	149
20.25	H20-VH5-VL5	145	150
20.26	H20-VH2-VL5,Y; h20-H2-L5Y	142	159
20.27	H20-VH3-VL2,Y; h20-H3-L2Y	143	156
20.28	H20-VH3-VL3,Y; h20-H3-L3Y	143	157
20.29	H20-VH4-VL4,Y; h20-H4-L4Y	144	158

[0087]

[0088]

20.30	H20-VH4-VL5,Y; h20-H4-L5Y	144	159
20,Y	VL008-AL18-14G4-14K1, Y	129	154
22.1	H22-VH1-VL1	168	172
22.2	H22-VH1-VL2	168	173
22.3	H22-VH1-VL3	168	174
22.4	H22-VH1-VL4	168	175
22.5	H22-VH2-VL1	169	172
22.6	H22-VH2-VL2	169	173
22.7	H22-VH2-VL3	169	174
22.8	H22-VH2-VL4	169	175
22.9	H22-VH3-VL1	170	172
22.10	H22-VH3-VL2	170	173
22.11	H22-VH3-VL3	170	174
22.12	H22-VH3-VL4	170	175
22.13	H22-VH4-VL1	171	172
22.14	H22-VH4-VL2	171	173
22.15	H22-VH4-VL3	171	174
22.16	H22-VH4-VL4	171	175

[0089] 表2:选择的候选物具有候选物编号、抗体名称、重链CDR (VH) SEQ ID NO和轻链CDR (VL) SEQ ID NO (KABAT注释):

[0090]

候选物 编号	抗体名称	VH 的 CDR1 的 SEQ ID NO	VH 的 CDR2 的 SEQ ID NO	VH 的 CDR3 的 SEQ ID NO	VL 的 CDR1 的 SEQ ID NO	VL 的 CDR2 的 SEQ ID NO	VL 的 CDR3 的 SEQ ID NO
7	VT008-AL5-10G7-10K7	1	2	3	7	8	9
14	VT008-AL6-14G1-16K1	13	14	15	19	20	21
15	VT008-AL6-18G1-18K21	25	26	27	31	32	33
19	VL008-AL17-7G1-7K6	37	38	39	43	44	45
20	VL008-AL18-14G4-14K1	49	50	51	55	56	57
22	VL008-AL13-8G5-8K3	61	62	63	67	68	69
26	VT008-AL6-10G3-10K1	73	74	75	79	80	81
29	VT008-AL6-20G7-20K7	85	86	87	91	92	93
30	VT008-AL6-39G2-39K2	97	98	99	103	104	105
33	VL008-AL17-8G5-8K7	109	110	111	115	116	117
20, 校 正的 T 细胞表 位	VL008-AL18-14G4-14K1, 校正的 T 细胞表位	49	50	51	55	152	57

[0091] 表3:选择的候选物具有候选物编号、抗体名称、重链CDR (VH) SEQ ID NO和轻链CDR (VL) SEQ ID NO (IMGT注释):

候选物 编号	抗体名称	VH 的 CDR1 的 SEQ ID NO	VH 的 CDR2 的 SEQ ID NO	VH 的 CDR3 的 SEQ ID NO	VL 的 CDR1 的 SEQ ID NO	VL 的 CDR2 的 SEQ ID NO	VL 的 CDR3 的 SEQ ID NO
7	VT008-AL5-10G7-10K7	4	5	6	10	11	12
14	VT008-AL6-14G1-16K1	16	17	18	22	23	24
15	VT008-AL6-18G1-18K21	28	29	30	34	35	36
[0092]	19	VL008-AL17-7G1-7K6	40	41	42	46	47
	20	VL008-AL18-14G4-14K1	52	53	54	58	59
	22	VL008-AL13-8G5-8K3	64	65	66	70	71
	26	VT008-AL6-10G3-10K1	76	77	78	82	83
	29	VT008-AL6-20G7-20K7	88	89	90	94	95
	30	VT008-AL6-39G2-39K2	100	101	102	106	107
	33	VL008-AL17-8G5-8K7	112	113	114	118	119
20, 校 正的 T 细胞表 位	VL008-AL18-14G4-14K1, 校正的 T 细胞表位	52	53	54	58	153	60

[0093] 除了Fab之外,本发明还考虑了对CD47的至少一个表位具有结合特异性的较小抗体片段和表位结合肽,并且也可以用于本发明的方法中。例如,单链抗体可以根据美国专利号4,946,778的方法构建,其全部内容通过引用并入本文。单链抗体包含通过柔性连接子部分连接的轻链和重链的可变区。然而更小的是称为单结构域抗体的抗体片段,其包含分离的VH单结构域。用于获得具有至少一些衍生它们的完整抗体的结合特异性的单结构域抗体的技术是本领域已知的。例如,Ward等人(Ward S.,Güssow D.,Griffiths A.D.,Jones P.T.,和Winter G."Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from Escherichia coli,"Nature 341:544-46(1989))公开了用于筛选以获得对其靶表位具有足够亲和力的抗体重链可变区(H单结构域抗体)以分离形式与其结合的方法。

[0094] 本发明还提供了编码人源化或嵌合抗CD47抗体的分离核酸,包含该核酸的载体和宿主细胞,以及用于生产该抗体的重组技术。感兴趣的核酸可以与所提供的核酸序列至少约80%,至少约85%,至少约90%,至少约95%,至少约99%相同或是相同的。这样的连续序列可以编码CDR序列,或可以编码完整的可变区。如本领域所知,可变区序列可以与任何适当的恒定区序列融合。

[0095] 为了重组生产抗体,将编码它的核酸插入到可复制载体中用于进一步克隆(扩增DNA)或用于表达。使用常规方法(例如,通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)容易地分离编码单克隆抗体的DNA并测序。许多载体都可用。载体组分通常包括但不限于以下的一种或多种:信号序列、复制起点、一种或多种标志物基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0096] 本发明的抗CD47抗体不仅可以直接重组产生,而且还可以作为具有异源或同源多肽的融合多肽产生,所述异源或同源多肽包括信号序列或在成熟蛋白质或多肽的N-末端具有特异性切割位点的其它多肽和免疫球蛋白恒定区序列等。优选选择的异源信号序列可以通过宿主细胞识别和加工(即通过信号肽酶切割)的信号序列。对于不识别和加工天然抗

体信号序列的原核宿主细胞,信号序列被选择的原核信号序列取代。

[0097] “分离”核酸分子是从至少一种通常与抗体核酸的天然来源相关的污染物核酸分子中鉴定和分离的核酸分子。分离核酸分子与天然存在的形式或环境不同。因此,分离核酸分子与存在于天然细胞中的核酸分子不同。然而,分离核酸分子包括通常表达抗体的细胞中含有的核酸分子,其中例如该核酸分子位于与天然细胞不同的染色体位置。

[0098] 用于克隆或表达DNA的合适宿主细胞是原核细胞、酵母细胞或高等真核细胞。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7,ATCC CRL 1651);人胚胎肾细胞(293或293细胞亚克隆用于在悬浮培养中生长,Graham F.L.和Smiley J.”Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5,”J.Gen.Virol.36:59-72(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞;中国仓鼠卵巢细胞/dhFr-(CHO/dhFr-,Urlaub G.和Chasin L.A.”Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity,”Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77(7):4216-20(1980));小鼠Sertoli细胞(TM4,Mather J.P.”Establishment and characterization of two distinct mouse testicular epithelial cell lines”,Biol.Reprod.23(1):243-251(1980));猴肾细胞(CV1,ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);水牛大鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳房肿瘤细胞(MMT 060562,ATCC CCL51);TR1 cells(Mather J.P.,Zhuang L.Z.,Perez-Infante V.,和Phillips D.M.”Culture of testicular cells in hormone-supplemented serum-free medium”,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982));MRC 5细胞;EB66细胞(参见例如EP 2150275B1);FS4细胞;和人肝癌细胞系(Hep G2)。用上述表达或克隆载体转化宿主细胞用于抗CD47抗体生产并在常规营养培养基中培养物,所述培养基修饰为适于诱导启动子,选择转化体或扩增编码所期望的序列的基因。

[0099] 从细胞制备的抗体组合物可以使用例如羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析和亲和色谱进行纯化,其中亲和色谱是优选的纯化技术。蛋白A作为亲和配体的适合性取决于存在于抗体中的任何免疫球蛋白Fc结构域的物种和同种型。蛋白A可以用于纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体(Lindmark R.,Thoren-Tolling K.,**Sjöquist** J.”Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera”,J.Immunol.Meth.62(1):1-13(1983))。建议蛋白G用于人 $\gamma 3$ (Guss M.,Eliasson M.,Olsson A.,Uhlén M.,Frej A.K.,**Jörnvall** H.,Flock J.I.,和Lindberg M.”Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G”,EMBO J.5(1):1567-1575(1986))。亲和配体所连接的基质通常是琼脂糖,但其它基质是可用的。机械稳定的基质如可控多孔玻璃或聚(苯乙烯-二乙烯基)苯允许比琼脂糖更快的流速和更短的处理时间。在抗体包含CH3结构域的情况下,Bakerbond ABXTM树脂(J.T.Baker,Phillipsburg,NJ)可用于纯化。取决于待回收的抗体,用于蛋白质纯化的其它技术如离子交换柱上的分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅上的色谱、肝素上的色谱、阴离子或阳离子交换树脂(例如聚天冬氨酸柱)上的SEPHAROSETM色谱,色谱聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀也是可用的。

[0100] 在任何初步纯化步骤之后,包含感兴趣的抗体和污染物的混合物可以使用pH介于

约2.5-4.5之间的洗脱缓冲液进行低pH疏水相互作用色谱,优选在低盐浓度(例如来自约0-0.25M盐)。

[0101] 使用方法

[0102] 本发明的人源化或嵌合单克隆抗体可用于调节吞噬作用,包括国际申请US2009/000319中提出的方法,其特别地通过引用整体并入本文。例如,可以施用抗体组合物以增加表达CD47的癌细胞的吞噬作用,因此适用于通过施用有效量的本发明的人源化或嵌合单克隆抗体来治疗受试者中的癌症。

[0103] 还提供了用于治疗癌症的药物组合物,其包含本发明的人源化或嵌合单克隆抗体和任选地药学上合适的赋形剂或载体。

[0104] 本发明的人源化或嵌合单克隆抗体可以在体外和体内用于监测CD47疾病治疗的过程。因此,例如通过测量表达CD47的细胞、特别是表达CD47的癌细胞的数量的增加或减少,可以确定旨在改善疾病的特定治疗方案是否有效。

[0105] 在优选的实施方式中,本发明的人源化或嵌合单克隆抗体可以作为单一疗法或与其它抗癌剂组合(组合治疗)用于治疗、延缓癌症进展,预防癌症复发或缓解癌症或其它赘生性病症的症状。如本文所用,术语“癌症”、“赘生物”和“肿瘤”是可互换的。癌症的实例包括但不限于胃癌,乳腺癌,肺癌,卵巢癌,宫颈癌,前列腺癌,膀胱癌,结直肠癌,胰腺癌,肝癌,肾癌,甲状腺癌,脑癌,头颈部癌,血液癌症,上皮恶性肿瘤,黑素瘤,平滑肌瘤,平滑肌肉瘤,神经胶质瘤,胶质母细胞瘤等。“血液癌症”是指血液的癌症,并且包括白血病、淋巴瘤和骨髓瘤等。实体瘤包括例如胃肿瘤,乳房肿瘤,肺肿瘤,卵巢肿瘤,前列腺肿瘤,膀胱肿瘤,结肠直肠肿瘤,胰腺肿瘤,肝肿瘤,肾肿瘤,甲状腺肿瘤,脑肿瘤,头颈部肿瘤,食管肿瘤和黑色素瘤肿瘤等。与癌症和其它赘生性疾病相关的症状包括但不限于炎症,发热,全身不适,疼痛,食欲不振,体重减轻,水肿,头痛,疲劳,皮疹,贫血,肌肉无力和肌肉疲劳。

[0106] 组合疗法可以包括与一种或多种另外的治疗剂共同配制和/或共同施用的本发明的一种或多种抗体,所述另外的治疗剂是例如化疗剂或抗肿瘤剂,例如细胞因子和生长因子抑制剂,免疫抑制剂,抗炎剂,代谢抑制剂,酶抑制剂和/或细胞毒性剂或细胞抑制剂。在本文中术语“组合”是指基本上同时或同时或依次给予药剂。示例性化疗剂包括但不限于阿地白介素,六甲蜜胺,氨磷汀,天冬酰胺酶,博来霉素,卡培他滨,卡铂,卡莫司汀,克拉屈滨,西沙必利,顺铂,环磷酰胺,阿糖胞苷,达卡巴嗪(DTIC),更生霉素,多西他赛,阿霉素,屈大麻酚,倍癌霉素,依托泊苷,非格司亭,氟达拉滨,氟尿嘧啶,吉西他滨,格拉司琼,羟基脲,伊达比星,异环磷酰胺,干扰素 α ,伊立替康,兰索拉唑,左旋咪唑,甲酰四氢叶酸,甲地孕酮,美司钠,甲氨蝶呤,甲氧氯普胺,丝裂霉素,米托坦,米托蒽醌,奥美拉唑,昂丹司琼,特素(TaxolTM),毛果芸香碱,原氯拉嗪,皂角蛋白,他莫昔芬,紫杉醇,盐酸托泊替康,长春花碱,长春新碱和酒石酸长春瑞滨。

[0107] 本发明的抗体可以与有效剂量的增加患者红细胞比容的药剂(例如促红细胞生成素刺激剂(ESA))组合。这样的试剂是本领域已知和使用的,包括例如 **Aranesp[®]**, **Epogen[®]** **NF/Procrit[®]**, **Omontys[®]**, **Procrit[®]**等。

[0108] 在其它实施方式中,本发明的抗体可与已用于治疗癌症的有效剂量的其它抗体组合,包括但不限于以下FDA批准的单克隆抗体:利妥昔单抗(**Rituxan[®]**, CD20:嵌合IgG1),曲

妥珠单抗 (**Herceptin®**, HER2: 嵌合 IgG1), 阿仑单抗 (**Campath®**, CD52: 人源化 IgG1), 替伊莫单抗 (**Zevalin®**, CD20: 鼠, IgG1, 放射性标记的 (钷90)), 托西莫单抗-I-131 (**Bexxar®**: CD20, 鼠, IgG2a, 放射性标记的 (碘131)), 西妥昔单抗 (**Erbitux®**, EGFR: cjimeric, IgG1), 贝伐单抗 (VEGF: 人源化, IgG4), 帕尼单抗 (**Vectibix®**, EGFR: 人 IgG2), 奥法木单抗 (**Arzerra®**, CD20: 人 IgG1), 易普利姆玛 (**Ypervoy®**, CTLA-4: 人 IgG1), brentiximab vedotin (**Alectris®**, CD30: 嵌合, IgG1, 药物缀合物), 帕妥珠单抗 (**Perjeta®**, HER2: 人源化 IgG1, 药物缀合物), 曲妥珠单抗美坦新 (**Kadcyla®**, HER2: 人源化, IgG1, 药物缀合物), 奥滨尤妥珠单抗 (**Gazyva®**, CD20: 人源化和二醇改造), 纳武单抗和派姆单抗 (抗PD-1) 等。曲妥珠单抗靶向HER-2抗原。在25%至35%的乳腺癌和转移性胃癌中可见该抗原。曲妥珠单抗被批准用于治疗过度表达HER2的乳腺癌和过表达HER2的转移性胃和胃食管交界腺癌。西妥昔单抗用于治疗转移性结直肠癌、转移性非小细胞肺癌和头颈部癌。纳武单抗和派姆单抗最近已被批准用于治疗转移性黑素瘤和非小细胞肺癌。它们在肺癌、肾细胞癌、淋巴瘤和间皮瘤的临床试验中进行了测试。目前在临床试验或研究中测试的其它癌症药物也可以组合使用。

[0109] 优选的组合是本发明的CD47抗体与i) 免疫检查点抑制剂, 或ii) 重编程巨噬细胞和树突细胞的抗肿瘤活性的免疫调节剂, 或iii) 针对抗肿瘤相关抗原的抗体的组合。本文描述了 **Herceptin®** 和 **Erbitux®** 的示例性组合, 其中与 **Herceptin®** 的组合由于其加和、合作或可能的协同作用而是优选的。其它药剂也可以是有用的组合。

[0110] 本发明的单克隆抗体可以在体外用于免疫测定中, 其中它们可以在液相中使用或者结合到固相载体上。另外, 这些免疫测定中的单克隆抗体可以以各种方式可检测地标记。可以利用本发明的单克隆抗体的免疫测定类型的例子是流式细胞术, 例如, FACS, MACS, 免疫组织化学, 直接或间接形式的竞争性和非竞争性免疫测定等。使用本发明的单克隆抗体检测抗原可以利用以正向、反向或同时模式运行的免疫测定来完成, 包括对生理样品的免疫组织化学测定。本领域技术人员将会知道或者可以容易地辨别出其它免疫测定形式, 而无需过度的实验。

[0111] 本发明的单克隆抗体可以与许多不同的载体结合并用于检测表达CD47的细胞的存在。众所周知的载体的实例包括玻璃, 聚苯乙烯, 聚丙烯, 聚乙烯, 葡聚糖, 尼龙, 淀粉酶, 天然和改性纤维素, 聚丙烯酰胺, 琼脂糖和磁石。出于本发明的目的, 载体的性质可以是可溶的或不可溶的。本领域技术人员将知道用于结合单克隆抗体的其它合适的载体, 或将能够使用常规实验来确定。

[0112] 本领域普通技术人员已知许多不同的标记和标记方法, 其可用作治疗方法中的示踪剂, 用于诊断方法等。为了诊断目的, 标记可以共价或非共价连接至本发明的抗体或其片段, 包括由CDR序列组成或包含CDR序列的片段。可用于本发明的标记类型的实例包括酶、放射性同位素、荧光化合物、胶体金属、化学发光化合物和生物发光化合物。本领域技术人员将知道用于结合本发明的单克隆抗体的其它合适的标记, 或将能够使用常规实验来确定。此外, 这些标记与本发明的单克隆抗体的结合可以使用本领域普通技术人员通用的标准技术完成。

[0113] 在一些实施方式中, 抗体或其片段连接至纳米颗粒, 例如用于成像。有用的纳米颗

粒是本领域已知的纳米颗粒,例如包括但不限于拉曼-二氧化硅-金-纳米颗粒(R-Si-Au-NP)。R-Si-Au-NP由拉曼有机分子组成,具有窄带谱特征,吸附在金核上。由于拉曼有机分子可以改变,每个纳米颗粒可以携带其自己的特征名,从而允许通过多路复用同时独立检测多个纳米颗粒。整个纳米颗粒被封装在二氧化硅壳中,以将拉曼有机分子保持在金纳米核上。R-Si-Au-NP的任选聚乙二醇(PEG)化增加了它们的生物利用度并提供了用于连接靶向部分的功能性“手柄”(参见Thakor A.S.,Luong R.,Paulmurugan R.等人“The fate and toxicity of raman-active silica-gold nanoparticles in mice”,Sci.Transl.Med.3(79):79ra33(2011);Jokerst J.V.,Miao Z.,Zavaleta C.,Cheng Z.,和Gambhir S.S.”Affibody-functionalized gold-silica nanoparticles for Raman molecular imaging of the epidermal growth factor receptor”,Small.7(5):625-33(2011);Gao J.,Chen K.,Miao Z.,Ren G.,Chen X.,Gambhir S.S.,Cheng Z.”Affibody-based nanoprobes for HER2-expressing cell and tumor imaging”,Biomaterials 32(8):2141-8(2011);每个通过引用具体并入本文)。

[0114] 为了本发明的目的,当CD47于生物体液中或在组织上时,可以通过本发明的单克隆抗体体内或体外检测到CD47。任何含有可检测量的CD47的样品均可使用。样品可以是诸如尿、唾液、脑脊液、血液和血清等的液体,或者诸如组织和粪便等的固体或半固体,或者可选地是诸如通常用于组织学诊断的固体组织的那些。

[0115] 另一种可能导致更高灵敏度的标记技术包括将抗体偶联到低分子量半抗原上。然后通过第二反应特异性检测这些半抗原。例如,使用与抗生物素蛋白或二硝基苯酚、吡哆醛或荧光素反应的半抗原如生物素是常见的,其可以与特定的抗半抗原抗体反应。

[0116] 为了方便起见,本发明的抗体可以以试剂盒提供,即以预定量的试剂的包装组合与用于进行诊断测定的说明书一起提供。在抗体用酶标记的情况下,试剂盒将包括酶所需的底物和辅因子(例如提供可检测发色团或荧光团的底物前体)。另外,可以包括其它添加剂,例如稳定剂、缓冲剂(例如封闭缓冲液或裂解缓冲液)等。各种试剂的相对量可以广泛地变化以提供基本上优化测定灵敏度的试剂溶液中的浓度。特别地,试剂可以作为干粉提供,通常是冻干的,包括在溶解时将提供具有合适浓度的试剂溶液的赋形剂。

[0117] 通过将具有所需纯度的抗体与以冻干制剂或水溶液的形式任选地生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences,16th edition,Osol,A.Ed.(1980))混合来制备包含本发明的一种或多种抗体的治疗制剂。抗体组合物将以符合良好医疗实践的方式配制、给药和施用。在这种情况下考虑的因素包括被治疗的具体病症、被治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床状况、病症的原因、药剂递送部位、施用方法、施用时间表以及医师已知的其它因素。待施用抗体的“治疗有效量”将受这些考虑因素支配,并且是预防CD47相关疾病所需的最小量。

[0118] 治疗剂量可以是至少约0.01mg/kg体重、至少约0.05mg/kg体重、至少约0.1mg/kg体重、至少约0.5mg/kg体重、至少约1mg/kg体重、至少约2.5mg/kg体重、至少约5mg/kg体重、至少约10mg/kg体重、和不超过约100mg/kg体重,优选0.1至20mg/kg体重。本领域技术人员将会理解,这样的指导方针将针对活性剂的分子量进行调节,例如在抗体片段的使用中,或在抗体缀合物的使用中。对于局部施用,剂量也可以变化,例如鼻内、吸入等,或用于全身施用,例如i.m.、i.p.和i.v.等。

[0119] 抗体不一定是,但是任选地用一种或多种增强活性的试剂配制,或者以其它方式增加治疗效果。它们通常以相同的剂量和上文所用的施用途径使用,或者为迄今所用剂量的约1至99%。

[0120] 可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者无毒,并且包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲铵氯化物;苯扎氯铵,苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖如蔗糖、甘露糖醇;海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。用于体内施用的制剂必须是无菌的。这很容易通过无菌过滤膜过滤完成。

[0121] 活性成分还可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如分别在胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)中或在粗滴乳液中的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。这些技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)。

[0122] 抗CD47抗体通过任何合适的手段施用,包括肠胃外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。另外,抗CD47抗体适合通过脉冲输注施用,特别是在剂量降低的抗体的情况下。

[0123] 为了预防或治疗疾病,抗体的合适剂量将取决于如上所定义的待治疗疾病的类型、疾病的严重程度和病程、抗体是否用于预防目的施用、先前的治、患者的临床病史和对抗体的反应以及主治医师的判断。将抗体一次性或通过一系列治疗适当地施用于患者。

[0124] 在本发明的另一个实施方式中,提供了含有用于治疗上述病症的材料的制品。制品包括容器和标记。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器和试管。容器可以从各种材料形成,如玻璃或塑料。容器容纳有效治疗病症的组合物,并且可以具有无菌进入端口(例如容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的活性成分是抗CD47抗体。容器上的标记或与容器相关的标记表示组合物用于治疗选择的病症。制品可以进一步包括第二容器,其包含药学上可接受的缓冲剂,如磷酸盐缓冲盐水、林格氏液和/或葡萄糖溶液。它可以进一步包括从商业和用户角度所需的其它材料,包括其它缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头、注射器和带有使用说明书的包装插页。

[0125] 现在已经充分描述了本发明,对于本领域的普通技术人员显而易见的是,在不脱离本发明的精神或范围的情况下可以进行各种改变和修改。

[0126] 序列

[0127] SEQ ID NO:1

[0128] VT008-AL5-10G7;重链;CDR1-Kabat

[0129] KYWMH

[0130] SEQ ID NO:2

[0131] VT008-AL5-10G7;重链;CDR2-Kabat

[0132] EINPSDTYTNYNQKFKG
[0133] SEQ ID NO:3
[0134] VT008-AL5-10G7;重链;CDR3-Kabat
[0135] VATMVARGFAY
[0136] SEQ ID NO:4
[0137] VT008-AL5-10G7;重链;CDR1-IMGT
[0138] GYTFTKYW
[0139] SEQ ID NO:5
[0140] VT008-AL5-10G7;重链;CDR2-IMGT
[0141] INPSDTYT
[0142] SEQ ID NO:6
[0143] VT008-AL5-10G7;重链;CDR3-IMGT
[0144] ARVATMVARGFAY
[0145] SEQ ID NO:7
[0146] VT008-AL5-10K7;轻链;CDR1-Kabat
[0147] KASQDVSGAVV
[0148] SEQ ID NO:8
[0149] VT008-AL5-10K7;轻链;CDR2-Kabat
[0150] LATYRYT
[0151] SEQ ID NO:9
[0152] VT008-AL5-10K7;轻链;CDR3-Kabat
[0153] QQYYSIPWT
[0154] SEQ ID NO:10
[0155] VT008-AL5-10K7;轻链;CDR1-IMGT
[0156] QDVSGA
[0157] SEQ ID NO:11
[0158] VT008-AL5-10K7;轻链;CDR2-IMGT
[0159] LATY
[0160] SEQ ID NO:12
[0161] VT008-AL5-10K7;轻链;CDR3-IMGT
[0162] QQYYSIPWT
[0163] SEQ ID NO:13
[0164] VT008-AL6-14G1;重链;CDR1-Kabat
[0165] NYWMY
[0166] SEQ ID NO:14
[0167] VT008-AL6-14G1;重链;CDR2-Kabat
[0168] WIDPNSGGTKYNEKFKS
[0169] SEQ ID NO:15
[0170] VT008-AL6-14G1;重链;CDR3-Kabat

[0171] GGYTMDY
[0172] SEQ ID NO:16
[0173] VT008-AL6-14G1;重链;CDR1-IMGT
[0174] GYTFTNYW
[0175] SEQ ID NO:17
[0176] VT008-AL6-14G1;重链;CDR2-IMGT
[0177] IDPNSGGT
[0178] SEQ ID NO:18
[0179] VT008-AL6-14G1;重链;CDR3-IMGT
[0180] ARGGYTMDY
[0181] SEQ ID NO:19
[0182] VT008-AL6-16K1;轻链;CDR1-Kabat
[0183] RASQSLVHSNGNTYLH
[0184] SEQ ID NO:20
[0185] VT008-AL6-16K1;轻链;CDR2-Kabat
[0186] KVSNRFS
[0187] SEQ ID NO:21
[0188] VT008-AL6-16K1;轻链;CDR3-Kabat
[0189] SQSTHVPLT
[0190] SEQ ID NO:22
[0191] VT008-AL6-16K1;轻链;CDR1-IMGT
[0192] QSLVHSNGNTY
[0193] SEQ ID NO:23
[0194] VT008-AL6-16K1;轻链;CDR2-IMGT
[0195] KVSN
[0196] SEQ ID NO:24
[0197] VT008-AL6-16K1;轻链;CDR3-IMGT
[0198] SQSTHVPLT
[0199] SEQ ID NO:25
[0200] VT008-AL6-18G1;重链;CDR1-Kabat
[0201] NYWIH
[0202] SEQ ID NO:26
[0203] VT008-AL6-18G1;重链;CDR2-Kabat
[0204] RIDPNTVDAKYNEKFS
[0205] SEQ ID NO:27
[0206] VT008-AL6-18G1;重链;CDR3-Kabat
[0207] GGYTMDY
[0208] SEQ ID NO:28
[0209] VT008-AL6-18G1;重链;CDR1-IMGT

[0210] GYTFINYW
[0211] SEQ ID NO:29
[0212] VT008-AL6-18G1;重链;CDR2-IMGT
[0213] IDPNTVDA
[0214] SEQ ID NO:30
[0215] VT008-AL6-18G1;重链;CDR3-IMGT
[0216] SRGGYTMDY
[0217] SEQ ID NO:31
[0218] VT008-AL6-18K21;轻链;CDR1-Kabat
[0219] RSSQSLVHSNGNTYLH
[0220] SEQ ID NO:32
[0221] VT008-AL6-18K21;轻链;CDR2-Kabat
[0222] KVSNRFS
[0223] SEQ ID NO:33
[0224] VT008-AL6-18K21;轻链;CDR3-Kabat
[0225] FQSTHVPWT
[0226] SEQ ID NO:34
[0227] VT008-AL6-18K21;轻链;CDR1-IMGT
[0228] QSLVHSNGNTY
[0229] SEQ ID NO:35
[0230] VT008-AL6-18K21;轻链;CDR2-IMGT
[0231] KVSN
[0232] SEQ ID NO:36
[0233] VL008-AL6-18K21;轻链;CDR3-IMGT
[0234] FQSTHVPWT
[0235] SEQ ID NO:37
[0236] VL008-AL17-7G1;重链;CDR1-Kabat
[0237] DYYIN
[0238] SEQ ID NO:38
[0239] VL008-AL17-7G1;重链;CDR2-Kabat
[0240] WIFPGSLTYYNKKFKG
[0241] SEQ ID NO:39
[0242] VL008-AL17-7G1;重链;CDR3-Kabat
[0243] PYYGSRWDYAMDY
[0244] SEQ ID NO:40
[0245] VL008-AL17-7G1;重链;CDR1-IMGT
[0246] VYTFTDYY
[0247] SEQ ID NO:41
[0248] VL008-AL17-7G1;重链;CDR2-IMGT

[0249] IFPGSGLT
[0250] SEQ ID NO:42
[0251] VL008-AL17-7G1;重链;CDR3-IMGT
[0252] ARPYYGSRWDYAMDY
[0253] SEQ ID NO:43
[0254] VL008-AL17-7K6;轻链;CDR1-Kabat
[0255] KSSQSLLNSNNQKNYLA
[0256] SEQ ID NO:44
[0257] VL008-AL17-7K6;轻链;CDR2-Kabat
[0258] FASTRES
[0259] SEQ ID NO:45
[0260] VL008-AL17-7K6;轻链;CDR3-Kabat
[0261] QQHYTTPYT
[0262] SEQ ID NO:46
[0263] VL008-AL17-7K6;轻链;CDR1-IMGT
[0264] QSLLNSNNQKNY
[0265] SEQ ID NO:47
[0266] VL008-AL17-7K6;轻链;CDR2-IMGT
[0267] FAST
[0268] SEQ ID NO:48
[0269] VL008-AL17-7K6;轻链;CDR3-IMGT
[0270] QQHYTTPYT
[0271] SEQ ID NO:49
[0272] VL008-AL18-14G4;重链;CDR1-Kabat
[0273] DYYIN
[0274] SEQ ID NO:50
[0275] VL008-AL18-14G4;重链;CDR2-Kabat
[0276] RIYPGIGNTYYNKKFKG
[0277] SEQ ID NO:51
[0278] VL008-AL18-14G4;重链;CDR3-Kabat
[0279] GHYGRGMDY
[0280] SEQ ID NO:52
[0281] VL008-AL18-14G4;重链;CDR1-IMGT
[0282] GYSFTDYY
[0283] SEQ ID NO:53
[0284] VL008-AL18-14G4;重链;CDR2-IMGT
[0285] IYPGIGNT
[0286] SEQ ID NO:54
[0287] VL008-AL18-14G4;重链;CDR3-IMGT

[0288] ARGHYGRGMDY
[0289] SEQ ID NO:55
[0290] VL008-AL18-14K1;轻链;CDR1-Kabat
[0291] KSSQSLLNSIDQKNYLA
[0292] SEQ ID NO:56
[0293] VL008-AL18-14K1;轻链;CDR2-Kabat
[0294] FASTKES
[0295] SEQ ID NO:57
[0296] VL008-AL18-14K1;轻链;CDR3-Kabat
[0297] QQHYSTPWT
[0298] SEQ ID NO:58
[0299] VL008-AL18-14K1;轻链;CDR1-IMGT
[0300] QSLLNSIDQKNY
[0301] SEQ ID NO:59
[0302] VL008-AL18-14K1;轻链;CDR2-IMGT
[0303] FAST
[0304] SEQ ID NO:60
[0305] VL008-AL18-14K1;轻链;CDR3-IMGT
[0306] QQHYSTPWT
[0307] SEQ ID NO:61
[0308] VL008-AL13-8G5;重链;CDR1-Kabat
[0309] TYWMH
[0310] SEQ ID NO:62
[0311] VL008-AL13-8G5;重链;CDR2-Kabat
[0312] MIHPNSGTTNYNEKFKS
[0313] SEQ ID NO:63
[0314] VL008-AL13-8G5;重链;CDR3-Kabat
[0315] SHYYDGHFSY
[0316] SEQ ID NO:64
[0317] VL008-AL13-8G5;重链;CDR1-IMGT
[0318] GYTFTTYW
[0319] SEQ ID NO:65
[0320] VL008-AL13-8G5;重链;CDR2-IMGT
[0321] IHPNSGTT
[0322] SEQ ID NO:66
[0323] VL008-AL13-8G5;重链;CDR3-IMGT
[0324] TRSHYYDGHFSY
[0325] SEQ ID NO:67
[0326] VL008-AL13-8K3;轻链;CDR1-Kabat

[0327] KSSQSLNSRTRKNYLA
[0328] SEQ ID NO:68
[0329] VL008-AL13-8K3;轻链;CDR2-Kabat
[0330] WASTRES
[0331] SEQ ID NO:69
[0332] VL008-AL13-8K3;轻链;CDR3-Kabat
[0333] KQSYNLWT
[0334] SEQ ID NO:70
[0335] VL008-AL13-8K3;轻链;CDR1-IMGT
[0336] QSLNSRTRKNY
[0337] SEQ ID NO:71
[0338] VL008-AL13-8K3;轻链;CDR2-IMGT
[0339] WAST
[0340] SEQ ID NO:72
[0341] VL008-AL13-8K3;轻链;CDR3-IMGT
[0342] KQSYNLWT
[0343] SEQ ID NO:73
[0344] VT008-AL6-10G3;重链;CDR1-Kabat
[0345] NYWIH
[0346] SEQ ID NO:74
[0347] VT008-AL6-10G3;重链;CDR2-Kabat
[0348] RIDPNSGGTKYNEKFKS
[0349] SEQ ID NO:75
[0350] VT008-AL6-10G3;重链;CDR3-Kabat
[0351] GGYTMDY
[0352] SEQ ID NO:76
[0353] VT008-AL6-10G3;重链;CDR1-IMGT
[0354] GYTFTNYW
[0355] SEQ ID NO:77
[0356] VT008-AL6-10G3;重链;CDR2-IMGT
[0357] IDPNSGGT
[0358] SEQ ID NO:78
[0359] VT008-AL6-10G3;重链;CDR3-IMGT
[0360] ARGGYTMDY
[0361] SEQ ID NO:79
[0362] VT008-AL6-10K1;轻链;CDR1-Kabat
[0363] RSSQSLLSNGNTYLH
[0364] SEQ ID NO:80
[0365] VT008-AL6-10K1;轻链;CDR2-Kabat

[0366] KVSYRFS
[0367] SEQ ID NO:81
[0368] VT008-AL6-10K1;轻链;CDR3-Kabat
[0369] FQSTHVPWT
[0370] SEQ ID NO:82
[0371] VT008-AL6-10K1;轻链;CDR1-IMGT
[0372] QSLLSNGNTY
[0373] SEQ ID NO:83
[0374] VT008-AL6-10K1;轻链;CDR2-IMGT
[0375] KVSY
[0376] SEQ ID NO:84
[0377] VT008-AL6-10K1;轻链;CDR3-IMGT
[0378] FQSTHVPWT
[0379] SEQ ID NO:85
[0380] VT008-AL6-20G7;重链;CDR1-Kabat
[0381] NYWIY
[0382] SEQ ID NO:86
[0383] VT008-AL6-20G7;重链;CDR2-Kabat
[0384] YINPRSDDTKYNQKFRD
[0385] SEQ ID NO:87
[0386] VT008-AL6-20G7;重链;CDR3-Kabat
[0387] GGFTMDF
[0388] SEQ ID NO:88
[0389] VT008-AL6-20G7;重链;CDR1-IMGT
[0390] GYTFINYW
[0391] SEQ ID NO:89
[0392] VT008-AL6-20G7;重链;CDR2-IMGT
[0393] INPRSDDT
[0394] SEQ ID NO:90
[0395] VT008-AL6-20G7;重链;CDR3-IMGT
[0396] ARGGFTMDF
[0397] SEQ ID NO:91
[0398] VT008-AL6-20K7;轻链;CDR1-Kabat
[0399] RSSQSLLSNGNTYLH
[0400] SEQ ID NO:92
[0401] VT008-AL6-20K7;轻链;CDR2-Kabat
[0402] KVSYRFS
[0403] SEQ ID NO:93
[0404] VT008-AL6-20K7;轻链;CDR3-Kabat

[0405] SQGTHVPYT
[0406] SEQ ID NO:94
[0407] VT008-AL6-20K7;轻链;CDR1-IMGT
[0408] QSLLHSNGNTY
[0409] SEQ ID NO:95
[0410] VT008-AL6-20K7;轻链;CDR2-IMGT
[0411] KVSY
[0412] SEQ ID NO:96
[0413] VT008-AL6-20K7;轻链;CDR3-IMGT
[0414] SQGTHVPYT
[0415] SEQ ID NO:97
[0416] VT008-AL6-39G2;重链;CDR1-Kabat
[0417] GYNIY
[0418] SEQ ID NO:98
[0419] VT008-AL6-39G2;重链;CDR2-Kabat
[0420] YIYPYNGISSYNQKFKD
[0421] SEQ ID NO:99
[0422] VT008-AL6-39G2;重链;CDR3-Kabat
[0423] GGYTMDY
[0424] SEQ ID NO:100
[0425] VT008-AL6-39G2;重链;CDR1-IMGT
[0426] GYSFTGYN
[0427] SEQ ID NO:101
[0428] VT008-AL6-39G2;重链;CDR2-IMGT
[0429] IYPYNGIS
[0430] SEQ ID NO:102
[0431] VT008-AL6-39G2;重链;CDR3-IMGT
[0432] ARGGYTMDY
[0433] SEQ ID NO:103
[0434] VT008-AL6-39K2;轻链;CDR1-Kabat
[0435] RSSQSLVKSNNGNTYLH
[0436] SEQ ID NO:104
[0437] VT008-AL6-39K2;轻链;CDR2-Kabat
[0438] KVSNRFS
[0439] SEQ ID NO:105
[0440] VT008-AL6-39K2;轻链;CDR3-Kabat
[0441] SQTTHVPYT
[0442] SEQ ID NO:106
[0443] VT008-AL6-39K2;轻链;CDR1-IMGT

[0444] QSLVKSNGNTY
[0445] SEQ ID NO:107
[0446] VT008-AL6-39K2;轻链;CDR2-IMGT
[0447] KVSN
[0448] SEQ ID NO:108
[0449] VT008-AL6-39K2;轻链;CDR3-IMGT
[0450] SQTTHVPYT
[0451] SEQ ID NO:109
[0452] VL008-AL17-8G5;重链;CDR1-Kabat
[0453] DYYIN
[0454] SEQ ID NO:110
[0455] VL008-AL17-8G5;重链;CDR2-Kabat
[0456] WIFPGSGLTYYNKKFKG
[0457] SEQ ID NO:111
[0458] VL008-AL17-8G5;重链;CDR3-Kabat
[0459] PYYGSRWDYTMDY
[0460] SEQ ID NO:112
[0461] VL008-AL17-8G5;重链;CDR1-IMGT
[0462] GYTFTDYY
[0463] SEQ ID NO:113
[0464] VL008-AL17-8G5;重链;CDR2-IMGT
[0465] IFPGSGLT
[0466] SEQ ID NO:114
[0467] VL008-AL17-8G5;重链;CDR3-IMGT
[0468] ARPYYGSRWDYTMDY
[0469] SEQ ID NO:115
[0470] VL008-AL17-8K7;轻链;CDR1-Kabat
[0471] KSSQNLLNSNNQKNHLA
[0472] SEQ ID NO:116
[0473] VL008-AL17-8K7;轻链;CDR2-Kabat
[0474] FASTRES
[0475] SEQ ID NO:117
[0476] VL008-AL17-8K7;轻链;CDR3-Kabat
[0477] QQHYTTPYT
[0478] SEQ ID NO:118
[0479] VL008-AL17-8K7;轻链;CDR1-IMGT
[0480] QNLLNSNNQKNH
[0481] SEQ ID NO:119
[0482] VL008-AL17-8K7;轻链;CDR2-IMGT

[0483] FAST
[0484] SEQ ID NO:120
[0485] VL008-AL17-8K7;轻链;CDR3-IMGT
[0486] QQHYTTPYT
[0487] SEQ ID NO:121
[0488] VT008-AL5-10G7;可变区重链
[0489] QVQLQQPGAELVMPGSSVKLSCKTSGYTFTKYWMHWKRRPGQGLEWIGEINPSDTYTNYNQKFKGKST
LTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVATMVARGFAYWGQGLTVTVSA
[0490] SEQ ID NO:122
[0491] VT008-AL5-10K7;可变区轻链
[0492] DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSGAVVWYQEKPGQSPNLLIYLATYRYTGVPDRFTGSGSGT
DFTLTIRSVQAEDMAVYYCQQYYSIPWTFGGGKLEIK
[0493] SEQ ID NO:123
[0494] VT008-AL6-14G1;可变区重链
[0495] QVQLQQPGAELVKPGASLRVSCASGYFTNYWYVVRQRPGRGLEWIGWIDPNSGGTKYNEKFKSKAT
LTVDKPSSTAYMQLSSLTSEDSAVYNCARGGYTMDYWGQGTSTVTVSS
[0496] SEQ ID NO:124
[0497] VT008-AL6-16K1;可变区轻链
[0498] DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRASQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELK
[0499] SEQ ID NO:125
[0500] VT008-AL6-18G1;可变区重链
[0501] QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYTFINYWIHWKQRPGRGLEWIGRIDPNTVDAKYNEKFKSKAT
LTVDKPSSIAYMQLSSLTSEDSAVYYCSRGGYTMDYWGQGTSTVTVSS
[0502] SEQ ID NO:126
[0503] VT008-AL6-18K21;可变区轻链
[0504] DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPDLLIYKVSNRFSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCFQSTHVPWTFGGGKLEIK
[0505] SEQ ID NO:127
[0506] VL008-AL17-7G1;可变区重链
[0507] QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASVYFTDYYINWVKQRPQGLEWVGWIFPGSLTYYNKKFKGKAT
LTVDKSSSTAYMLSSLTSEDSAVYFCARPYGSRWDYAMDYWGQGTSTVTVSS
[0508] SEQ ID NO:128
[0509] VL008-AL17-7K6;可变区轻链
[0510] DIVMTQSPSSLTMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLLYFASTRESGVPDRFI
GSGSGTDFLTISVQAEDLADYFCQQHYTTPYTFGGGKLEIK
[0511] SEQ ID NO:129
[0512] VL008-AL18-14G4;可变区重链
[0513] QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYSFTDYYINWVKQRPQGLEWIARIYPGIGNTYYNKKFKGKAT

LTAEKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCARGHYGRGMDYWGQGTSTVTVSS

[0514] SEQ ID NO:130

[0515] VL008-AL18-14K1;可变区轻链

[0516] DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTKESGVPDRFI
GSGSGTDFLTITSSVQAEDLADYFCQQHYSTPWTFGGGKLEIK

[0517] SEQ ID NO:131

[0518] VL008-AL13-8G5;可变区重链

[0519] QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTTYWMHWVKQRPQGQLEWIGMIHPNSGTTNYNEKFKSKAT
LTVDKSSSSTYMQLSSLTSEDSAVYYCTRSHYYDGHFSYWGQGTSLVTVSA

[0520] SEQ ID NO:132

[0521] VL008-AL13-8K3;可变区轻链

[0522] DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFT
GSGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGTRLEIK

[0523] SEQ ID NO:133

[0524] VT008-AL6-10G3;可变区重链

[0525] QVQLQQPGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWIHWLNQRPGRGLEWIGRIDPNSGGTKYNEKFKSKAI
LTVDKSSSTTYMQLSSLTSEDSAVYYCARGGYTMDYWGQGTSTVTVSS

[0526] SEQ ID NO:134

[0527] VT008-AL6-10K1;可变区轻链

[0528] DVVMPQTPLSLPVSLGDHASISCRSSQSLHNSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSYRFSGVPDRISG
SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYFCFQSTHVPWTFGGGKLEIK

[0529] SEQ ID NO:135

[0530] VT008-AL6-20G7;可变区重链

[0531] QVQLQQSGTELAKPGASVKLSCKASGYTFINYWIYVVKERPGQVLEWIGYINPRSDDTKYNQKFRDRAT
LTADKSSTTAYLQLNSLTNDDALYYCARGGFTMDFWGQGTSTVTVSS

[0532] SEQ ID NO:136

[0533] VT008-AL6-20K7;可变区轻链

[0534] DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLHNSNGNTYLHWYLQKPGQSPNLLIYKVSYRFSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYFCSQGTTHVPYTFGGGKLEIK

[0535] SEQ ID NO:137

[0536] VT008-AL6-39G2;可变区重链

[0537] EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYNIYVVKQSHGNILDWIGYIYPYNGISSYNQKFKDKAT
LTVDKSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYCARGGYTMDYGGQGTSTVTVSS

[0538] SEQ ID NO:138

[0539] VT008-AL6-39K2;可变区轻链

[0540] DVVMTQTPLSLPVSLGEQASISCRSSQSLVKSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQTTHVPYTFGGGKLEIK

[0541] SEQ ID NO:139

[0542] VL008-AL17-8G5;可变区重链

- [0543] LVQLQQSGPELVKPGTSVKISCRSSGYTFTDYYINWVQQRPGQGLEWVGWIFPGSLTYYNKKFKGKAT
LSVDKSSNTAYMLLSSLTSEDSAVYFCARPYYGSRWDYTMDYWGQGSTVTVSS
- [0544] SEQ ID NO:140
- [0545] VL008-AL17-8K7;可变区轻链
- [0546] DIVMTQSPSSLTMSVGQKATMSCKSSQNLLNSNNQKNHLAWYQQKPGQSPKLLLYFASTRESGVPDRFI
GSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYTTPYTFGGGTKLEIK
- [0547] SEQ ID NO:141
- [0548] VL008-AL18-14G4;人源化可变区重链;VH1
- [0549] QVQLLESGAVLARPGTSVKISCKASGYSFTDYYINWVKRPGQGLEWIGRIYPGIGNTYYNKKFKGRAK
LTAATSASIAYLEFSSLTNEDSAVYYCARGHYGRGMDYWGQGLTVTVSS
- [0550] SEQ ID NO:142
- [0551] VL008-AL18-14G4;人源化可变区重链;VH2
- [0552] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGRIYPGIGNTYYNKKFKGRVT
ITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGHYGRGMDYWGQGLTVTVSS
- [0553] SEQ ID NO:143
- [0554] VL008-AL18-14G4;人源化可变区重链;VH3
- [0555] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGRIYPGIGNTYYNKKFKGRVT
VTRDTSISTAHMELSSLRSDDTAVYYCARGHYGRGMDYWGQGTAVTVSS
- [0556] SEQ ID NO:144
- [0557] VL008-AL18-14G4;人源化可变区重链;VH4
- [0558] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGRIYPGIGNTYYNKKFKGRVT
ITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGHYGRGMDYWGQGTTVTVSS
- [0559] SEQ ID NO:145
- [0560] VL008-AL18-14G4;人源化可变区重链;VH5
- [0561] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGRIYPGIGNTYYNKKFKGRVT
MTRYTSISTAYMELSRLSDDTAVYFCARGHYGRGMDYWGQGTTVTVSS
- [0562] SEQ ID NO:146
- [0563] VL008-AL18-14K1;人源化可变区轻链;VL1
- [0564] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTKESGVPDRFS
GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK
- [0565] SEQ ID NO:147
- [0566] VL008-AL18-14K1;人源化可变区轻链;VL2
- [0567] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTKESGVPDRFS
GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK
- [0568] SEQ ID NO:148
- [0569] VL008-AL18-14K1;人源化可变区轻链;VL3
- [0570] EIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSIDQKNYLAWYQQKAGQSPKLLIYFASTKESGVPDRFS
GSGSGTDFTLTIDSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK
- [0571] SEQ ID NO:149

- [0572] VL008-AL18-14K1;人源化可变区轻链;VL4
- [0573] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTKESGVPDRFS
GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQHYSTPWTFGGGAKVEIK
- [0574] SEQ ID NO:150
- [0575] VL008-AL18-14K1;人源化可变区轻链;VL5
- [0576] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTKESGVPDRFS
GSGSGTDFTLTISGLQAEDVAVYFCQQHYSTPWTFGGGKVEIR
- [0577] SEQ ID NO:151
- [0578] CD47抗原(Rh-相关抗原,整合素相关的信号转导子),异形体CRA_b[智人],登录号:EAW79734.1
- [0579] MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTFD
GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIV
IFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILL
HYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQ
PPRKAVEEPLNAFKESKGMNDE
- [0580] SEQ ID NO:152
- [0581] VT008-AL18-14K1;轻链;CDR2-Kabat;CD4+ T细胞表位校正的
- [0582] YASTKES
- [0583] SEQ ID NO:153
- [0584] VT008-AL18-14K1;轻链;CDR2-IMGT;CD4+ T细胞表位校正的
- [0585] YAST
- [0586] SEQ ID NO:154
- [0587] VL008-AL18-14K1;可变区轻链;CD4+ T细胞表位校正的
- [0588] DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYYASTKESGVPDRFI
GSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPWTFGGGKLEIK
- [0589] SEQ ID NO:155
- [0590] VL008-AL18-14K1;人源化可变区轻链;VL1;CD4+ T细胞表位校正的
- [0591] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYYASTKESGVPDRFS
GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGKLEIK
- [0592] SEQ ID NO:156
- [0593] VL008-AL18-14K1;人源化可变区轻链;VL2;CD4+ T细胞表位校正的
- [0594] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYYASTKESGVPDRFS
GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGKVEIK
- [0595] SEQ ID NO:157
- [0596] VL008-AL18-14K1;人源化可变区轻链;VL3;CD4+ T细胞表位校正的
- [0597] EIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKAGQSPKLLIYYASTKESGVPDRFS
GSGSGTDFTLTIDSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGKVEIK
- [0598] SEQ ID NO:158
- [0599] VL008-AL18-14K1;人源化可变区轻链;VL4;CD4+ T细胞表位校正的

[0600] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYYASTKESGVPDRFS
GSGSGTDFLTITISSLQAEDVAVYFCQQHYSTPWTFGGGAKVEIK

[0601] SEQ ID NO:159

[0602] VL008-AL18-14K1;人源化可变区轻链;VL5;CD4+ T细胞表位校正的

[0603] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYYASTKESGVPDRFS
GSGSGTDFLTITISGLQAEDVAVYFCQQHYSTPWTFGGGKTKVEIR

[0604] SEQ ID NO:160

[0605] hu-sCD47-6His;具有6His-标签的人CD47抗原的胞外结构域

[0606] MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKEVEFTFCNDTVVIPCFTNMEAQNTTEVYVKKWKFKGRDIYTFD
GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPASSSGSS
SHHHHHH

[0607] SEQ ID NO:161

[0608] hu-IgG4 S228P;人恒定区重链IgG4 S228P突变体

[0609] GCTAGCACCAAGGGCCCCCTCTGTGTTTCTCTGGCCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAATCTACAGCC
GCTCTGGGCTGCCTCGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCAGCGG
AGTGCATACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCT
CTCTGGGCACCAAGACCTATACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAATCT
AAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGTCTCTGCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCAAA
GCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCAGGAAGATCCCG
AGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAGCCTCGGGAAGAACAGTTCAAC
TCCACCTACCGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGT
GTCCAACAAGGGCCTGCCAGCTCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGAACCCAGGTGT
ACACACTGCCTCCATCCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGATTCTACCCC
TCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACATAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCTCGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTGTTCTCCTGCT
CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCTGGGCAAG

[0610] SEQ ID NO:162

[0611] huIgG4_S228P;人恒定区重链IgG4 S228P突变体

[0612] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0613] SEQ ID NO:163

[0614] hu-IgG4 S228P-L235E;人恒定区重链IgG4 S228P-L235E突变体

[0615] GCTAGCACCAAGGGCCCCCTCTGTGTTTCTCTGGCCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAATCTACAGCC
GCTCTGGGCTGCCTCGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCAGCGG
AGTGCATACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCT
CTCTGGGCACCAAGACCTATACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAATCT

AAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCTCTGCCCCCTGAATTTGAAGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCTGTTCCCCCAAA
GCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCAGGAAGATCCCG
AGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAGCCTCGGGAAGAACAGTTCAAC
TCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGT
GTCCAACAAGGGCCTGCCAGCTCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGT
ACACACTGCCTCCATCCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGATTCTACCCC
TCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCTCGCCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTGTTCTCCTGCT
CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCTGGGCAAG

[0616] SEQ ID NO:164

[0617] huIgG4_S228P-L235E;人恒定区重链IgG4 S228P-L235E突变体

[0618] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK

[0619] SEQ ID NO:165

[0620] h20-H2-L5Y;huIgG4_S228P形式的重链

[0621] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYYINWVRQAPGQGLEWMGRIYPGIGNTYYNKKFKGRVT
ITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGHYGRGMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGLTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG

[0622] SEQ ID NO:166

[0623] h20-H2-L5Y;hu-IgG4_S228P-L325E形式的重链

[0624] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYYINWVRQAPGQGLEWMGRIYPGIGNTYYNKKFKGRVT
ITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGHYGRGMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGLTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG

[0625] SEQ ID NO:167

[0626] h20-H2-L5Y;轻链

[0627] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYYASTKESGVPDRFS
GSGSGTDFLTISGLQAEDVAVYFCQQHYSTPWFGGGTKVEIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

[0628] SEQ ID NO:168

[0629] VL008-AL13-8G5;人源化可变区重链;VH1m

- [0630] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVHQAPGQRLEWMGMIHPNSGTTNYNQKFQGRVT
ITVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRSHYYDGHFSYWGQGT LVTVSS
- [0631] SEQ ID NO:169
- [0632] VL008-AL13-8G5;人源化可变区重链;VH2m
- [0633] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGMIHPNSGTTNYNQKFQGRVT
MTVDKSASTAYMELSSLRSEDSAVYYCTRSHYYDGHFSYWGQGT LVTVSS
- [0634] SEQ ID NO:170
- [0635] VL008-AL13-8G5;人源化可变区重链;VH3
- [0636] QVQLQESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGMIHPNSGTTNYNEKFKSRVT
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTRSHYYDGHFSYWGQGT LVTVSS
- [0637] SEQ ID NO:171
- [0638] VL008-AL13-8G5;人源化可变区重链;VH4
- [0639] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGMIHPNSGTTNYNEKFKSRVT
LTRDTSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCTRSHYYDGHFSYWGQGT MVTVSS
- [0640] SEQ ID NO:172
- [0641] VL008-AL13-8K3;人源化可变区轻链;VL1
- [0642] DIVMTQSPGSLAVSLGERATFNCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGGG TKVEVK
- [0643] SEQ ID NO:173
- [0644] VL008-AL13-8K3;人源化可变区轻链;VL2
- [0645] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGGG TKLEIK
- [0646] SEQ ID NO:174
- [0647] VL008-AL13-8K3;人源化可变区轻链;VL3
- [0648] EIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKAGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGDFTLTIDSLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGGG TKVEIK
- [0649] SEQ ID NO:175
- [0650] VL008-AL13-8K3;人源化可变区轻链;VL4
- [0651] DIVMTQSPDSLVPVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFT
GSGSGDFTLTISALQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGGQ TRLEIK
- [0652] SEQ ID NO:176
- [0653] 人κ轻链恒定区
- [0654] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
- [0655] 实施例
- [0656] I.产生小鼠抗CD47抗体
- [0657] 1.免疫小鼠
- [0658] 为了产生针对人CD47(hCD47)的小鼠抗体并且可能与小鼠CD47(mCD47)交叉反应,
按照包含以2周间隔进行4次DNA注射,随后用CD47 DNA或用CD47表达载体转染的CHO细胞以

一周间隔进行两次最终增强的方案如下免疫NMRI野生型或CD47-KO (C57BL6) 小鼠:

[0659] - (5) WT小鼠; 原代人CD47 DNA+加强人CD47 DNA

[0660] - (3) CD47-/-小鼠; 原代人CD47 DNA+加强鼠CD47 CHO

[0661] - (3) CD47-/-小鼠; 原代鼠CD47 CHO+加强鼠CD47 CHO

[0662] 根据血清筛选结果进行动物处死。通过使用ELISA (包覆hCD47-人IgG1融合蛋白hCD47-Fc, 或包覆mCD47-人IgG1融合蛋白mCD47-Fc) 和通过流式细胞术对稳定表达HCD47或mCD47 (在用编码hCD47或mCD47的载体转染后获得, 随后选择稳定的CD47表达克隆, 未显示) 在免疫动物的血清中检测IgG结合人或小鼠CD47的存在和效价。处死表现出强抗CD47IgG效价的动物。提取其脾脏和淋巴结, 并将单核细胞 (MNC) 纯化并冷冻。

[0663] 2. 使用ISAAC技术进行单一B细胞筛选并产生重组抗CD47抗体

[0664] 描述于W02009/017226中的ISAAC技术是使用微阵列芯片检测单个抗体分泌细胞的独特方法, 其能够以单细胞为基础分析活细胞, 并提供快速、高效和高通量 (高达234000个个体细胞) 系统来识别和回收相关细胞。

[0665] 通过将先前从免疫小鼠的脾脏和淋巴结中纯化的小鼠MNC应用于微阵列芯片来制备单个活细胞阵列。芯片表面预先用靶抗原 (hCD47-人IgG1融合蛋白hCD47-Fc) 包覆, 由抗体分泌细胞分泌的抗CD47小鼠抗体被包覆在孔周围表面上的CD47捕获。洗涤后, 通过与Cy3偶联的抗小鼠IgG抗体和荧光显微镜检测与固定的CD47结合的小鼠IgG的存在。抗原与特异性抗体的结合形成不同的圆形斑点, 这很容易与非特异性信号区分。然后通过显微操作回收CD47特异性抗体分泌单细胞, 从单细胞中回收mRNA, 并通过RT-PCR扩增编码IgG重链 (VH) 和轻链 (VL) 的可变区的cDNA序列。然后将VH和VL序列克隆到含有小鼠 γ -2a恒定区 (Fc γ 2a) 和 κ 或 λ 恒定区的表达载体中。在CHO细胞中共转染H和L链表达载体后, 在来自细胞上清液的蛋白质A柱上纯化重组抗体并通过ELISA在hCD47-Fc或mCD47-Fc包覆的平板上并通过流式细胞术对转染或不转染hCD47或mCD47的CHO细胞测试以确认CD47的识别和特异性。

[0666] 总共鉴定了55种抗体, 其中生产和纯化了34种 (属于18种不同的种系家族)。在这34种抗体中, 19种识别人CD47, 1种抗体仅识别小鼠CD47, 14种抗体识别人和小鼠CD47。

[0667] II. 抗CD47候选物的序列

[0668] 表1至3 (同上) 提到了10种选定候选物的氨基酸序列。在列出的序列中, 根据Kabat和IMGT注释来识别CDR。

[0669] III. 重组小鼠抗CD47抗体的体外表征

[0670] 1. 通过ELISA的CD47结合测定

[0671] 测试所有抗体与包覆在ELISA平板上的重组hCD47-Fc和mCD47-Fc的结合能力。从这34种测试的纯化抗体中, 19种仅识别hCD47, 1种抗体仅识别mCD47, 14种抗体识别人和小鼠CD47 (数据未显示)。

[0672] 2. 通过流式细胞术对CD47转染的CHO细胞进行CD47结合测定以及与小鼠和食蟹猴CD47的交叉反应性。

[0673] 通过使用稳定表达人、小鼠或非人灵长类 (食蟹猴) 来源的CD47抗原的CHO细胞通过流式细胞术进一步分析所鉴定的小鼠抗CD47抗体识别细胞膜表达的人CD47以及来自其它物种的CD47蛋白的能力。CHO细胞表面物种特异性CD47的表达通过使用适当的抗CD47抗体染色和流式细胞术在非固定细胞上进行验证。使用抗体B6H12 (小鼠IgG1, Abcam) 确认人

和食蟹猴CD47、MIAP301 (大鼠IgG2a, BD Biosciences) 的表达以检查小鼠CD47的表达, 和MEM122 (小鼠IgM, abcam) 用于猴CD47的表达。

[0674] 将抗CD47抗体和同种型对照抗体在+4℃下以7.3μg/mL至3.3ng/mL的各种浓度与表达不同CD47种类的CHO细胞温育30分钟。2次洗涤后, 取决于一抗的同种型和Accuri-C6流式细胞仪 (BD Biosciences) 的分析, 通过与PE偶联的抗小鼠或抗人IgG抗体温育, 显示了与细胞膜CD47结合的抗体的存在。计算每种抗体浓度获得的平均荧光强度 (MFI) 和不存在一抗下获得的强度 (delta-MFI) 之间的差异并针对抗体浓度作图。在相同条件下测试不识别CD47的适当同种型 (mIgG1、mIgG2a、hIgG1、hIgG4) 的阴性对照抗体以测量背景抗体染色 (非特异性染色)。

[0675] 与我们的候选物平行测试了不同的抗hCD47基准抗体。这些包括来自Stanford University的小鼠B6H12, 嵌合5F9 (c5F9) 和人源化5F9 (hu5F9; vh2-v12) 抗体 (W02011/143624); 来自Inhibrx的小鼠2A1抗体及其人源化变体AB06.12 (US2013/0224188; W02014/123580); 来自Novimmune的小鼠5A3M3抗体 (W02014/087248); 和来自Frazier等人的小鼠VxP037-01LC1抗体 (W02014/093678)。

[0676] 对10个小鼠抗CD47抗体获得的结果总结在下表4中, 并与用基准抗体获得的结果进行比较。全部10个小鼠抗CD47候选物与表达人和食蟹猴CD47的CHO细胞强烈地结合, 但不与未转染的CHO细胞结合。此外, 5种候选物 (候选物14、15、26、29和30) 也强烈地结合表达小鼠CD47的CHO细胞, 而其它5种抗体不结合。这些结果显示了5种抗体特异性识别人和食蟹猴起源的CD47 (候选物7、19、20、22和33) 和5种其它抗体也与小鼠来源的CD47 (候选物14、15、26、29、30) 交叉反应, 表明这些抗体识别不同的表位。

[0677] 据报道, 2A1和B6H12基准识别hCD47并与cynoCD47交叉反应, 但不与mCD47交叉反应, 而VxP037-01LC1抗体与食蟹猴和小鼠CD47交叉反应, 以及可能针对在野生型CHO细胞上表达的仓鼠CD47。

[0678] 表4: 抗CD47抗体交叉反应性的总结

[0679]

抗体	CHO	CHO-hCD47	CHO-mCD47	CHO-cvnoCD47
B6H12	-	++	-	+++
c5F9	-	+++	-	+++
hu5F9	-	+++	-	+++
5A3M3	-	++	-	++
2A1	-	+++	-	+++
AB06.12	-	+++	-	+++
VxP037-01LC 1	++	+++	+++	+++
候选物7	-	+++	-	+++
候选物14	+	+++	+++	+++
候选物15	+	+++	+++	+++
候选物26	+/-	+++	+++	+++
候选物19	-	+++	-	+++
候选物33	-	+++	-	+++
候选物20	+/-	+++	+/-	+++

候选物22	+/-	+++	-	+++
候选物29	-	+++	+++	+++
候选物30	+/-	+++	+++	+++

[0680] -; +/-; +; ++; +++从“无”检测到“强”检测

[0681] 3. 通过ELISA抑制CD47/SIRP α 相互作用

[0682] 通过ELISA测试抗体破坏CD47-SIRP α 相互作用的能力。实验前一天,将hCD47-hIgG1融合蛋白包覆在96孔板的底部并在4℃温育过夜。然后将孔在室温下洗涤并饱和两小时。洗涤步骤后,在每个孔中加入抗原(hSIRP α -6HIS融合蛋白,Gentaur)以及待测抗体,并在室温下温育1小时。洗涤后,HRP缀合的抗-6His二抗(Bethyl)和过氧化物酶底物检测是否存在相互作用的SIRP α 。发现所有10种选择的抗体抑制hSIRP α 与hCD47的结合(数据未显示)。

[0683] 4. 通过流式细胞术对CHO细胞检测抑制CD47/SIRP α 相互作用

[0684] 然后根据通过ELISA和对CD47转染的CHO细胞(候选物7、14、15、19、20、22、26、33)的结合特征进一步选择八个最佳候选物,并测试其抑制人SIRP α (hSIRP α)对CHO细胞上表达的hCD47结合的能力。首先在+4℃下用连续稀释的抗CD47抗体或同种型对照抗体(以mIgG2a或mIgG1形式)将人CD47转染的细胞(3×10^5 个细胞/96孔板的孔)温育30分钟。然后洗涤细胞并在+4℃用10 μ g/mL His标记的hSIRP α (His-hSIRP α ,Gentaur)温育30分钟。洗涤后,通过与兔抗His抗体(Bethyl)温育,随后通过FITC缀合的山羊抗兔IgG(BD Biosciences)和流式细胞术分析在Accuri-C6流式细胞仪(BD Biosciences)上显示His-hSIRP α 与CHO细胞的结合。

[0685] 如下计算hSIRP α 与hCD47结合的抑制百分比:

[0686] 抑制百分比 = $(1 - (\text{MFI_wAb} - \text{MFI_wohSIRP}\alpha) / (\text{MFI_whSIRP}\alpha - \text{MFI_wohSIRP}\alpha)) \times 100$,其中MFI_wAb是用hCD47-CHO细胞与测试抗体和hSIRP α 温育获得平均荧光强度(MFI); MFI_wohSIRP α 是在不存在hSIRP α 的情况下获得的MFI(100%hSIRP α 结合抑制);而MFI_whSIRP α 是用hSIRP α 但没用抗体预温育的荧光(0%SIRP α 结合抑制)。将抑制百分比针对抗体浓度作图,使用GraphPad Prism软件的非线性回归分析模型计算IC50值。

[0687] 图1和下面的表5中显示的结果显示了8种选择的候选物(编号7、14、15、19、20、22、26和33)强烈地抑制了在CHO细胞上表达的hCD47上的hSIRP α ,其IC50值范围为0.36至1.10 μ g/mL(2.4至7.3nM)。8种抗CD47候选物优于B6H12和5A3M3抗体,并且与2A1和VxP037-01LC1抗体相似。

[0688] 表5:用CD47转染的CHO细胞进行的CD47/SIRP α 抑制测定和流式细胞术分析中的抗CD47抗体的IC50值(n次独立实验的平均值)

[0689]

抗体(mIgG 形式)	平均 IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	n
B6H12	4.920	7
2A1	0.739	7
VxP037-01LC1	0.759	6
5A3M3	4.798	4
候选物 7	0.657	6
候选物 14	0.737	5
候选物 15	0.605	5
候选物 19	0.858	5
候选物 20	0.440	2
候选物 22	0.482	2
候选物 26	0.359	4
候选物 33	1.108	4

[0690] 5. 抗CD47抗体对由Raji细胞表达的hCD47的结合。

[0691] 测试了8种进一步选择的候选物(编号7、14、15、19、20、22、26、33)与Raji人B淋巴瘤细胞系上表达的hCD47结合的能力。首先在+4℃下用连续稀释的抗CD47抗体或对照同种型抗体(以mIgG2a或mIgG1形式)将Raji细胞(ATCC-CLL-86; 2×10^5 个细胞/96孔板的孔)温育30分钟。然后洗涤细胞并在+4℃用PE缀合的F(ab)'₂山羊抗小鼠IgG抗体(1/100稀释, Beckman Coulter)温育30分钟。洗涤后,通过流式细胞术在Accuri-C6流式细胞仪(BD Biosciences)上分析细胞的荧光。

[0692] 对每种抗体浓度计算 ΔMFI ,其表示用测试抗体测量的强度与不存在抗体时的强度之间的差异,并将这些值针对抗体浓度作图。然后通过使用GraphPad Prism软件的非线性回归分析模型计算EC50值。

[0693] 图2和下面的表6中显示的结果显示了8种候选物(编号7、14、15、19、20、22、26和33)强烈地结合Raji细胞上表达的hCD47,其EC50值范围为0.03至0.17 $\mu\text{g/mL}$ (0.2至1.1nM)。8种抗CD47候选物优于B6H12和5A3M3抗体,并且与来自竞争者的2A1和VxP037-01LC1抗体相似。

[0694] 表6:用Raji细胞进行的CD47结合测定和流式细胞术分析中的抗CD47抗体的EC50值(n次独立实验的平均值)

[0695]

抗体 (mIgG形式)	平均EC50 ($\mu\text{g/mL}$)	n
B6H12	2.930	2
2A1	0.058	3
VxP037-01LC1	0.074	2

5A3M3	0.301	1
候选物7	0.058	2
候选物14	0.055	2
候选物15	0.031	2
候选物19	0.165	2
候选物20	0.096	3
候选物22	0.136	2
候选物26	0.070	2
候选物33	0.112	2

[0696] 6. 通过流式细胞术对Raji细胞检测抑制CD47/SIRP α 相互作用

[0697] 测试了8种进一步选择的候选物中的六种(编号14、15、19、20、22、33)抑制hSIRP α 与人B淋巴瘤Raji细胞上表达的hCD47结合的能力。为此,首先在+4℃下用连续稀释的抗CD47抗体或同种型对照抗体(以hIgG1或hIgG4形式产生的嵌合抗CD47候选物)将Raji细胞(ATCC-CCL-86; 2×10^5 个细胞/96孔板的孔)温育30分钟。然后洗涤细胞并在+4℃用2.5 μ g/mL His标记的hSIRP α (His-hSIRP α , Gentaur)温育30分钟。洗涤后,通过与小鼠抗His抗体(1/1000稀释度; Qiagen)温育,随后通过PE缀合的山羊抗小鼠IgG(1/100稀释度; Beckman Coulter)和流式细胞术分析在Accuri-C6流式细胞仪(BD biosciences)上显示His-hSIRP α 与Raji细胞的结合。

[0698] 如下计算hSIRP α 与hCD47结合的抑制百分比:

[0699] 抑制百分比 = $(1 - (\text{MFI_wAb} - \text{MFI_wohSIRP}\alpha) / (\text{MFI_whSIRP}\alpha - \text{MFI_wohSIRP}\alpha)) \times 100$, 其中MFI_wAb是用Raji细胞与测试抗体和hSIRP α 温育获得平均荧光强度(MFI); MFI_wohSIRP α 是在不存在hSIRP α 的情况下获得的MFI(100%hSIRP α 结合抑制); 而MFI_whSIRP α 是用hSIRP α 但没用抗体预温育的荧光(0%SIRP α 结合抑制)。将抑制百分比针对抗体浓度作图,使用GraphPad Prism软件的非线性回归分析模型计算IC50值。

[0700] 图3和下面的表7中显示的结果显示了6种选择的候选物(编号14、15、19、20、22和33)强烈地抑制了Raji细胞上表达的hCD47上的hSIRP α ,其IC50值范围为0.021至0.369 μ g/mL(0.14至2.46nM)。6种抗CD47候选物与嵌合B6H12和嵌合5F9抗体以及人源化5F9和AB06.12抗体相似或更好。

[0701] 表7:用CD47转染的Raji细胞进行的hCD47/hSIRP α 抑制测定和流式细胞术分析中的抗CD47抗体的IC50值(n次独立实验的平均值)

[0702]

抗体(hIgG 形式)	平均 IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	n
嵌合 B6H12	0.400	1
嵌合 c5F9	0.209	5
人源化 Hu5F9	0.109	3
人源化 AB06.12	0.082	4
候选物 14	0.021	2
候选物 15	0.021	2
候选物 19	0.369	3
候选物 20	0.110	6
候选物 22	0.233	4
候选物 33	0.110	3

[0703] 7. 人巨噬细胞对Raji细胞的吞噬作用

[0704] CD47被认为是“别吃我”的信号,它通过与具有吞噬活性的细胞如巨噬细胞上表达的SIRP α 相互作用来阻止表达CD47的细胞的吞噬作用。为了评估最佳候选物增加巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力,人B淋巴瘤Raji细胞首先装载5(6)-羧基荧光素N-羟基琥珀酰亚胺酯(CFSE, $2.5\mu\text{M}$, Abcam),然后与不同稀释度的抗CD47抗体或对照抗体(mIgG1形式)一起温育。然后洗涤细胞并置于存在 $10\mu\text{g/mL}$ M-CSF (Peprotech)的24孔板中预先从人外周血单核细胞分化的贴壁巨噬细胞的存在下9天。在 $+37^\circ\text{C}$ 温育4小时后,细胞混合物用冷PBS充分洗涤,贴壁巨噬细胞用PFA固定。在配备有HB050灯的Axiovert 40FL荧光显微镜(Zeiss)下检查固定的细胞。用数字AxioCam照相机监测绿色荧光(Raji细胞)和明场(巨噬细胞)的图片,并使用ZEN lite图像分析软件对每场的Raji细胞(绿色荧光)和巨噬细胞的数量进行计数。然后将吞噬指数计算为每100个巨噬细胞摄入的Raji细胞的数量。

[0705] 图4和下面的表8中显示的结果显示了8种选择的候选物(编号7、14、15、19、20、22、26和33)增强了人巨噬细胞对Raji细胞的吞噬作用。在次最佳浓度($0.125\mu\text{g/mL}$),候选物优于B6H12和5A3M3抗体,并且与2A1和VxP037-01LC1抗体相似。

[0706] 表8:用人巨噬细胞在Raji吞噬测定中抗CD47抗体($0.125\mu\text{g/mL}$)的吞噬指数

[0707]

抗体 (mIgG1形式)	平均	SD	n
B6H12	33.1	31.3	7
2A1	112.8	39.9	5
VxP037-01LC1	88.4	28.9	4
5A3M3	29.9	4.4	2
候选物7	123.6	14.9	3
候选物14	78.9	39.3	5
候选物15	74.4	35.6	4

候选物19	73.9	16.8	3
候选物20	118.6	36.6	4
候选物22	105.8	55.5	4
候选物26	85.3	15.1	2
候选物33	71.4	27.7	3

[0708] 8. 红细胞凝集测定

[0709] 对8种预先选择的候选物进行了诱导人红细胞 (RBC) 凝集的能力的测试,并将其与基准抗体进行比较。

[0710] 在第一系列实验中,将从人外周血纯化的RBC与连续稀释的抗CD47抗体或对照抗体一起在37℃在U底96孔板中温育1小时。温育后,红细胞凝集的证据通过出现雾状而非点状红细胞的非凝集红细胞来证明。基本上如W02014/123580中所述,测量RBC颗粒的面积并且通过不同抗体浓度下的RBC面积与没有抗体的RBC面积的比例计算血细胞凝集指数。如图5所示,将血凝集指数针对抗体浓度作图。发现候选物14和15以及较小程度上候选物26诱导了纯化的RBC的强烈凝集。值得注意的是,这3种抗体属于同一克隆家族并与mCD47交叉反应。相比之下,也如2A1抗体所观察到的以,候选物19、20和33当0.01nM至240nM (~ 1.5ng/mL至36μg/mL) 范围内的浓度进行测试时不诱导纯化的RBC的凝集。也如可以用抗体VxP037-01LC1和B6H12观察到的,发现候选物7和22在窄的浓度窗内诱导弱凝集。抗体5A3M3仅在高浓度下诱导纯化的RBC凝集。

[0711] 在第二组实验中,基本上如W02014/087248中所述,通过使用来自整个外周血的未纯化的RBC来测试8种选择的候选物诱导人RBC凝集的能力。为此,将人外周血液 (1/5最终稀释) 与连续稀释的抗CD47抗体或对照抗体在37℃下在平底96孔板中温育过夜。温育后,平板轻轻搅动,倾斜约30°,并使其静置10分钟。RBC凝集的证据通过在孔下边界周围出现月牙形式的块状沉积物来证明。测试了不同形式的抗CD47候选物并与基准抗体比较。也如2A1和AB06.12 (人源化2A1) 抗体观察到的,mIgG1或hIgG1嵌合形式的候选物20在0.023至50μg/mL (~ 0.15至330nM) 测试的浓度范围内不诱导RBC凝集。对于hIgG4形式的候选物20和AB06.12抗体,观察到浓度高于16μg/mL的弱RBC凝集。相反,当以hIgG1和hIgG4形式进行测试时,嵌合5F9 (c5F9) 和人源化5F9 (hu5F9, vh2/v12变体) 诱导更强的凝集。嵌合B6H12以hIgG1形式诱导红细胞凝集,但在hIgG4同种型中诱导更弱。

[0712] 在用全血进行的此测定中,发现候选物19、22和33在浓度高于5μg/mL时诱导红细胞凝集。这一观察与测试形式 (mIgG或嵌合hIgH) 无关。最后,候选物14和15以及候选物7和26在较小程度上引起未纯化RBC的强烈凝集。

[0713] RBC凝集测定数据总结于下表9中。

[0714] 表9: 抗CD47抗体的RBC凝集活性

[0715]

抗体	RBC 凝集是与				
	纯化 RBC	全血			
	mIgG 或 hIgG	mIgG1	mIgG2a	hIgG1	hIgG4
B6H12	+ / - (m, h)	+++	+++	+++	+ / ++
c5F9	Nd	nd	nd	+++	+++
hu5F9	Nd	nd	nd	+++	+++
5A3M3	+++ (m1)	+/-	nd	nd	nd
2A1	- (m1)	-	nd	nd	nd
AB06.12	Nd	nd	nd	-	+/-
VxP037-01LC1	+ (m1)	+	nd	nd	nd
候选物 7	++ (m1, m2a)	++	++	nd	++
候选物 14	++++ (m, h)	++++	++++	++++	++++
候选物 15	+++ (m, h)	++++	++++	++++	+++
候选物 26	++ (m2a)	nd	++	nd	++
候选物 19	- (m1, m2a)	+++	++	+++	+ / +++
候选物 33	-	+++	+++	+++	+++
候选物 20	-	-	-	-	+/-
候选物 22	+ / ++	+++	+++	+++	+++

[0716] nd: 未完成; m: mIgG; m1: mIgG1; m2a: mIgG2a; h: hIgG

[0717] +/-, 仅在50μg/mL抗体下观察到弱凝集; +, 在50μg/mL抗体下凝集; ++, 浓度≥16.7 μg/mL的凝集; +++, 浓度≥5.6μg/mL的凝集

[0718] 9. 最佳小鼠抗CD47候选物的亲和力

[0719] 在Biacore T200 (GE Healthcare) 上通过表面等离子体共振 (SPR), 使用加6His-标签 (SEQ ID NO:160) (hCD47-his蛋白) 的人CD47胞外结构域的可溶性制剂并与基准比较来进一步测量小鼠抗CD47候选物的动力学常数 (Kon&Koff) 和解离常数 (KD)。简而言之, 使用Biacore T200仪器的单循环动力学方案在+20℃下测量抗体与hCD47-his之间的结合亲和力。遵循制造商的说明书 (GE Healthcare), 首先使用人或小鼠抗体捕获和胺偶联试剂盒将抗人或抗小鼠IgG (Fc) 固定在Serie S传感器芯片CM5的表面上。这导致约10000个应答单位 (RU) 固定在表面上。然后将待测试的小鼠、嵌合或人源化抗体捕获到除用作对照的流动池1之外的所有流动细胞中的适当的抗小鼠或抗人IgG表面上, 调节浓度和接触时间使得 ~300RU捕获于表面上。通过以递增浓度的hCD47-his以一系列5次10分钟注射以30μL/min的速率通过所有流动池来研究结合动力学。使用三倍稀释直至最大浓度为270nM。最后一次注射后, 将缓冲液通过每个流动池60分钟 (小鼠) 或30分钟 (人) 以监测结合抗原的解离。在循环结束时通过以20μL/min的3M MgCl₂流动60s, 接着通过以10μl/min的10mM甘氨酸-HCl, pH 1.7流动180s (人) 或通过以10μl/min的10mM甘氨酸-HCl, pH 1.7流动360s (小鼠) 进行结合表面的再生。用相同抗体但不含抗原的第二个循环作为对照。动力学结合常数通过将感测图数据非线性拟合至由Biacore T200评估软件提供的1:1结合模型来估计。结果显示在下表10中。除了亲和力较弱的候选物22, KD为15.7nM, 所有候选者均显示出nM范围内的亲和力, KD介于0.9至4.2nM之间。如图6所示, 除了候选物33之外, 所有预先选择的候选物都不同于B6H12、2A1和VxP037-01LC1抗体, 其显示出更快速的解离动力学, 其中Koff值在 3.4×10^{-3}

至 $1.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$,与之相比,B6H12、2A1和VxP037-01LC1则为 5.0 至 $8.9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 。

[0720] 表10:通过Biacore测得的抗CD47抗体的动力学和亲和常数(独立实验的平均值)

[0721]	抗体	KD (M)	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	n
	B6H12	5.14×10^{-9}	1.29×10^4	6.59×10^{-5}	7
	VxP037-01LC1	2.56×10^{-10}	3.54×10^5	8.87×10^{-5}	3
	2A1	1.27×10^{-10}	4.01×10^5	4.99×10^{-5}	4
	候选物7	1.94×10^{-9}	1.90×10^5	3.70×10^{-4}	2
	候选物14	3.85×10^{-9}	8.74×10^5	3.37×10^{-3}	2
	候选物15	4.24×10^{-9}	5.65×10^5	2.39×10^{-3}	2
	候选物19	2.25×10^{-9}	7.90×10^4	1.76×10^{-4}	4
	候选物20	4.16×10^{-9}	1.01×10^5	4.18×10^{-4}	4
	候选物22	1.57×10^8	2.07×10^4	3.25×10^{-4}	2
	候选物26	1.87×10^{-9}	2.00×10^5	3.72×10^{-4}	2
	候选物33	8.98×10^{-10}	7.46×10^4	6.70×10^{-5}	2

[0722] 10. 结合人RBC或肿瘤细胞后释放抗CD47抗体,并且抗CD47抗体根据它们的Koff值对肿瘤细胞进行吞噬作用

[0723] CD47在循环血液细胞上,特别是在RBC上表达,并且代表可能显著影响药物代谢动力学和治疗性抗CD47抗体的功效的显著吸收效应的源,其通过降低可用于靶细胞如肿瘤细胞的游离抗体的量。此外,抗CD47抗体与RBC的显著和延长的结合还可能增加毒性如贫血的风险。抗体与其抗原结合相对于释放的动力学大部分取决于其结合和解离的动力学,其可以通过分别测量Kon和Koff值来定量,例如通过针对本发明的抗CD47抗体进行的SPR。为了体外评估抗CD47抗体对与RBC结合后对它们的释放的解离动力学的影响,用 $1 \mu\text{g/mL}$ 小鼠抗CD47候选物14、19、20或22或者用 $1 \mu\text{g/mL}$ 小鼠抗CD47抗体2A1或B6H12温育纯化的人RBC。选择这些抗CD47抗体是因为它们具有的Koff值优于 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 或者对于候选物14而言甚至优于 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (参见表10)。相反,抗CD47 2A1和B6H12基准的Koff值低于 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (表10)。在 $+4^\circ\text{C}$ 与抗体温育30分钟后,洗涤RBC,重悬于不含抗体的PBS/BSA/EDTA缓冲液中,并在 $+37^\circ\text{C}$ 下温育6小时或24小时。在不同的温育时间,在PBS/BSA/EDTA缓冲液中洗涤RBC并在 $+4^\circ\text{C}$ 下与PE缀合的山羊抗小鼠IgG温育。通过流式细胞术进一步分析小鼠抗CD47抗体对RBC的结合。对于每种抗体,记录通过在6小时(T+6h)或24小时(T+24h)之后门控存活RBC获得的平均荧光强度(MFI),并将其与正好在 $+37^\circ\text{C}$ 温育期之前对分析的RBC获得的MFI(T0)进行比较。结果表示为在 $+37^\circ\text{C}$ 温育T+6h或T+24h后记录的MFI与温育步骤前在T0记录的MFI相比降低的百分比。

[0724] 如图20所示,用候选物14、19、20和22染色的红细胞的MFI在 $+37^\circ\text{C}$ 温育6小时后已经显著降低,并且24小时后甚至更为强烈。这些结果表明候选物14、19、20和22在与膜表达的CD47抗原结合后逐渐从RBC中分离。相反,在 $+37^\circ\text{C}$ 温育6或24小时后,用抗体2A1或B6H12染色的RBC的MFI没有改变或仅有微弱改变,表明抗体2A1和B6H12强烈地粘附在RBC上,并且没有释放或仅缓慢释放于细胞外培养基中。

[0725] 值得注意的是,虽然用某些抗体(候选物14和22,抗体B6H12)观察到凝集,这并没有强烈影响到用流式细胞仪分析单个红细胞。

[0726] 这些结果表明,具有高于 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的高Koff值的解离动力学的抗CD47抗体如候选物14、19、20和22将更快地从红细胞释放到达靶细胞。因此,与具有Koff值低于 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的慢解离动力学的抗体如2A1或B6H12相比,抗CD47抗体如候选物14、19、20和22将更可用于到达靶向肿瘤细胞上表达的CD47。

[0727] 相反,与来自细胞表达CD47的解离速率高的抗体相比,解离速率较慢的抗体可能不足以增强肿瘤细胞的吞噬作用。为了解决这一问题,进行了类似于上述在RBC上进行的结合/释放实验的实验,以测量肿瘤细胞对抗CD47抗体的体外释放及其对肿瘤细胞吞噬作用的影响。为此,在+4℃下,将人Raji淋巴瘤细胞与小鼠抗CD47候选物14、19、20或22或用 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的小鼠抗CD47抗体B6H12或2A1温育30分钟,然后洗涤并在+37℃再次在无抗体培养基中温育24小时。在24小时温育时间(T+24h)后在PBS中洗涤并用4%PFA固定后收集细胞。作为染色的阳性对照,细胞在温育24小时之前(时间T0)也用4%PFA固定。在最后的温育时间后,将固定的细胞通过PE缀合的山羊抗小鼠IgG抗体染色并通过流式细胞术分析。对于每种抗体,记录在24小时(T+24h)温育后获得的平均荧光强度(MFI),并与+37℃温育期之前(T0)分析的Raji细胞上获得的MFI进行比较。结果表示为在+37℃温育T+24h后记录的MFI与温育步骤前在T0记录的MFI相比降低的百分比。

[0728] 如图21A所示,在37℃温育Raji细胞24小时后已经观察到候选物14的MFI的显著降低,而候选物19、20和22以及抗体2A1而不是B6H12中观察到较弱的减少。这些结果表明,具有非常快的解离动力学的抗CD47抗体如具有优于 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 的Koff值的候选物14,将更快更强地从Raji肿瘤细胞中分离,并且因此可能比具有较慢解离速率的抗CD47抗体如具有低于 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 的Koff值的候选物19、20和22更低效率地增强肿瘤细胞吞噬作用。

[0729] 为了解决这一问题,首先用CFSE染料标记Raji细胞,然后在+4℃用0.1或 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗CD47抗体染色30分钟。然后洗涤Raji细胞并如上所述在+37℃下在无抗体培养基中温育24小时。在24小时温育期(T+24h)后,通过使用流式细胞术吞噬作用测定,在吞噬作用测定中用hMDM测试Raji细胞,基本上如Tseng等人所述(Tseng D., Volkmer J-P., Willingham S.B., Contreras-Trujillo H.等人"Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response", PNAS 110(27):11103-08(2013))。在用抗CD47抗体染色之前,用CFSE染料预先染色的靶Raji肿瘤细胞与先前用Far-Red染料标记的hMDM一起温育。在37℃温育60分钟后,收集细胞,通过流式细胞术分析并监测CFSE和Far-Red荧光。出现CFSE和Far-Red双染的细胞群体对应于被巨噬细胞吞噬的靶肿瘤细胞。作为吞噬作用的阳性对照(时间T0),使用Far-Red标记的hMDM的相同制剂进行相同的实验,并与用0.1或 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的不同抗CD47抗体染色的CFSE标记的Raji细胞如上温育,但Raji细胞没有是在+37℃下温育24小时。这相当于在无抗体培养基中温育前的参考时间T0。通过CFSE和Far-Red在每种条件下双染的细胞的百分比来计算吞噬细胞的百分比。通过用不相关抗体减去在相同条件下处理的Raji细胞获得的吞噬百分比来计算对每种抗体特异性的吞噬作用的百分比。通过应用下式,结果最终表示为每种测试抗体在T+24h获得的特定吞噬作用相比于在T0测量的特定吞噬作用降低的百分比:吞噬作用降低的百分比 = $(1 - (\text{用抗体A在T+24h的特定吞噬作用的百分比} / \text{用抗体A在T0的特定吞噬作用的百分比})) \times 100$ 。

[0730] 如图21B所示,对于用抗CD47候选物14染色的Raji细胞观察到吞噬作用非常强的

降低,在用 $1\mu\text{g/mL}$ 候选物14染色后观察到吞噬作用降低约60%,并且在用 $0.1\mu\text{g/mL}$ 染色的Raji细胞上观察到甚至降低100%。相比之下,如同基准2A1和B6H12,用候选物19、20和22染色的Raji细胞仅观察到吞噬作用的微弱降低。

[0731] 总之,这些结果显示,具有高于 $1\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 的Koff值表征的高解离速率的抗CD47抗体(如候选物14)与RBC强烈而迅速地分离,但是也迅速丧失其对肿瘤细胞的大部分功能活性即(i.d.)增强肿瘤细胞的吞噬作用。因此,这些抗体可能具有较低的吸收/副作用,但也具有较弱的抗肿瘤功效。相反,以低于 $1\times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 的Koff值为特征的解离速率非常慢的抗CD47抗体(如2A1和B6H12)会与肿瘤细胞分离得更慢,但会停留在红细胞上并因此可能具有显著的吸收效应并可能有更多的副作用。因此,具有以 1×10^{-4} 至 $1\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 的Koff值表征的具有中等解离动力学的抗CD47抗体(如候选物19、20或22)将具有最佳的CD47结合/释放平衡,以提供弱吸收效应和副作用,同时保持它们的抗肿瘤功效。

[0732] 11. 用Jurkat细胞进行细胞凋亡测定

[0733] 在所测试的8种候选物中,发现候选物14和15诱导人Jurkat细胞(T细胞白血病细胞)的显著细胞凋亡,候选物26也诱导弱的细胞凋亡(数据未显示),而候选物20和22不诱导细胞凋亡。这些数据表明该抗体家族识别hCD47上的表位,其在CD47接合后将信号活性输送到CD47表达细胞中。这种类型的激动性抗体可以在体内诱导脱靶效应。

[0734] 12. 体外表征总结

[0735] 总之,已经产生了34种抗CD47抗体,在体外进行了纯化和评估以获得特异性和功能性。基于它们在结合和功能测定中的效力(抑制hCD47/hSIRP α 相互作用,诱导吞噬作用),预选了8种候选物(编号7、14、15、19、20、22、26、33),然后在测定中充分表征测量其亲和力和红细胞凝集活性。

[0736] 所有8种候选物都强烈识别hCD47和cynoCD47,并且以介于0.9至15.7nM范围内的亲和力结合hCD47。所有8种候选物均强烈抑制hCD47/hSIRP α 相互作用并且能够诱导人巨噬细胞吞噬Raji淋巴瘤细胞。

[0737] 属于相同克隆家族的三种抗体(候选物14、15、26)也与mCD47交叉反应,并且发现其诱导Jurkat肿瘤细胞的显著凋亡并诱导强烈的RBC凝集。这些候选物在体内注射时可能诱发潜在的毒性。

[0738] 候选物20(在其克隆家族中是独特的)具有最好的特征,具有强大的功能活性和非常弱但可检测到的RBC凝集,表明潜在毒性弱(如果有的话)。

[0739] 候选物19和33(同一克隆家族)以及候选物7和22(在各自克隆家族中是独特的)也显示出强烈的功能活性,并具有一些但可接受的RBC凝集,这取决于所测试的IgG形式。

[0740] Koff值在 1×10^{-4} 至 $1\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 的候选物19、20和22也显示一旦结合人RBC即迅速释放,但保持有效的功能活性,如通过人巨噬细胞吞噬肿瘤细胞所测量的。

[0741] IV. 选择的小鼠抗CD47候选物的体内表征

[0742] 在小鼠肿瘤异种移植模型中体内测试了对hCD47特异的所选候选物19、20和22。候选物14和15也在第一研究中作为mCD47交叉反应性抗CD47抗体在体内进行测试。

[0743] 1. 人淋巴瘤Raji模型

[0744] 使用移植了Raji细胞(在右侧皮下注射的150万个细胞)的NOG小鼠(每组 $n=8$),在人非霍奇金淋巴瘤异种移植模型中对抗CD47候选物14、19、20和22进行体内评估。细胞移植

10天后,肿瘤可触摸并且4种抗CD47候选物与阴性对照抗体和抗CD47基准抗体2A1、B6H12和VpX037-01LC1平行地开始抗体治疗(10mg/kg/剂量,腹膜内注射,每周3次,直到8周)。所有抗体均为mIgG1同种型形式。每2天监测肿瘤生长并记录小鼠存活。如基准B6H12和2A1而不是与小鼠CD47强烈交叉反应的VxP037-01LC1抗体那样,四种候选物14、19、20和22延迟了Raji细胞的生长(图9A)。如图9B所示,与对照组相比,如基准B6H12和2A1而不是VxP037-01LC1那样,候选物20和22也发现诱导小鼠的显著保护。

[0745] 这些结果表明,如先前报道的参考抗CD47抗体如B6H12,测试的四种候选物(候选物14、19、20和22)能够控制免疫受损小鼠中人NHL Raji肿瘤细胞的生长。候选物20和22比候选物14和19更有效延长小鼠存活时间。

[0746] 2. 人A2780卵巢异种移植模型

[0747] 在人A2780卵巢异种移植模型中以单独或与抗EGFR抗体西妥昔单抗(**Erbitux®**)或抗Her2抗体曲妥珠单抗(**Herceptin®**)的组合进一步评估抗CD47候选物20。通过结合候选物20检测的A2780细胞强烈表达CD47,以及通过结合**Herceptin®**检测到的Her2(数据未显示)。相比之下,通过**Erbitux®**染色(数据未显示)测量,A2780细胞在体外仅表达低水平的EGFR。用荧光素酶转染的A2780(A2780/Luc)细胞(腹膜内注射1000万个细胞)移植NOG小鼠(每组n=4)。细胞移植后一天,单独用抗CD47候选物20或与**Herceptin®**或**Erbitux®**的组合开始抗体治疗(10mg/kg/剂,腹腔注射,每周3次,直至5周)。

[0748] 每隔5天从腹侧和背侧位置监测生物发光强度(BLI)。图10中显示的结果显示了单独使用抗CD47候选物20的治疗延缓了A2780肿瘤细胞的生长。单独用**Herceptin®**也观察到肿瘤生长的延迟,但单独用**Erbitux®**则没有。此外,抗CD47候选物20与**Herceptin®**或**Erbitux®**的组合也延缓了A2780细胞的生长。

[0749] 这些结果表明候选物20在用作单一药剂时能够在NOG免疫受损小鼠体内控制A2780卵巢肿瘤细胞的生长,并且可以与抗Her-2抗体(**Herceptin®**)或抗EGFR抗体(**Erbitux®**)组合以显示协同效应。

[0750] 3. 人A549肺异种移植模型

[0751] 还在人A549肺腺癌异种移植模型中体内评估了单独抗CD47候选物20(Steiner P., Joynes C., Bassi R., Wang S., Tonra J.R.等人“Tumor Growth Inhibition with Cetuximab and Chemotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer Xenografts Expressing Wild-type and Mutated Epidermal Growth Factor Receptor”, Clin Cancer Res 13(5):1542-51(2007); Kellar A., Egan C., and Morris D. “Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications”, BioMed Res Int 2015, ID 621324(2015))或与抗EGFR抗体西妥昔单抗(**Erbitux®**)或抗Her2抗体曲妥珠单抗(**Herceptin®**)的组合。在体外,A549细胞(ATCC-CCL-185)强烈表达CD47,如通过候选者20的结合所检测到的,以及通过用**Erbitux®**染色测量的EGFR,以及用强度较弱的**Herceptin®**通过流式细胞术检测Her2(数据未显示)。用A549细胞(皮下注射1000万个细胞)移植NOG小鼠(每组n=4)。细胞移植后十天,一旦肿瘤可触摸(体积>30mm³),则单独用抗CD47候选物20

或与 **Herceptin®** 或 **Erbitux®** 的组合开始抗体治疗 (10mg/kg/剂, 腹腔注射, 每周3次, 直至10周)。

[0752] 如图11所示, 单独的抗CD47候选物20以及 **Erbitux®** 和 **Herceptin®** 能够延迟A549肿瘤细胞的生长, 如通过测量肿瘤体积所定量的 (图11A) 并且与载体组相比能够显著保护小鼠 (图11B)。抗CD47候选物20与 **Herceptin®** 的组合导致A549肿瘤细胞生长的更显著延迟 (图11A) 并且在存活分析中导致对小鼠的更强保护 (图11B)。

[0753] 这些结果表明, 抗CD47候选物20当用作单一药剂或与 **Herceptin®** 组合使用时, 能够在NOG小鼠体内延迟A549肺腺癌的体内生长。

[0754] V. 抗CD47候选物20的人源化

[0755] 1. 人源化抗CD47候选物20

[0756] 选择小鼠候选物20作为人源化的第一线。通过CDR植入到人受体框架中产生5种VH和5种VL变体。使用计算机算法以及存在翻译后修饰 (例如Fv糖基化和脱酰胺化) 分析序列以去除具有MHC II类高亲和力的潜在T细胞表位。在图7中示出了与候选物20的小鼠VH序列的序列 (VH0) 比对的5种人源化VH变体 (VH1至VH5) 的氨基酸序列。在图8中示出了与候选物20的小鼠VL序列的序列 (VL0) 比对的5种人源化VL变体 (VL1至VL5) 的氨基酸序列。

[0757] 将5种人源化VH变体克隆到含有人Fc γ 4-S228P主链 (SEQ ID NO:162) 的表达载体中, 并将5种人源化VL变体克隆到含有人 κ 主链 (SEQ ID NO:176) 的表达载体中, 以产生hIgG4/ κ 人源化变体。将突变S228P引入所有hIgG4抗体的Fc片段中以避免已经用hIgG4观察到的潜在链交换 (Angal S., King D.J., Bodmer M.W., Turner A., Lawson A.D., Roberts G., Pedley D., and Adair J.R. "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody", Mol Immunol 30 (1):105-8 (1993))。从用5种VH中的一种和5种VL载体中的一种共转染的CHO细胞中产生并纯化25种hIgG4/ κ 变体。得到的抗体命名为h20-VHx-VLx, 其中h20命名为人源化候选物20, VHx命名为具有人源化VH变体x的重链可变结构域 (VH1至VH5), Lx命名为具有人源化VL变体x的轻链可变结构域 (VL1至VL5)。测试25种纯化抗体对人Raji淋巴瘤细胞和转染或不转染hCD47或mCD47的CHO细胞的结合活性和特异性, 因为它们在抑制hSIRP α 与Raji细胞结合方面的功能活性以及它们在全血凝集测定中诱导人RBC凝集的能力。还通过SPR在Biacore上测量动力学 (Kon和Koff) 和亲和力 (KD) 常数。在所有测定中, 将25种人源化变体与通过将小鼠VH0和VL0序列克隆到含有人Fc γ 4-S228P和人 κ 主链的合适载体中产生的hIgG4嵌合候选物20进行比较。

[0758] 在不同测定中获得的所有结果总结在下表12和表13中。

[0759] 表12: 候选物20的人源化变体的特征

[0760]

候选物编号	抗体(hIgG4)	CD47 结合 (EC50 μg/mL)	CD47/SIRPα 抑制 (IC50 μg/mL)	吞噬作用 Raji / HDMC	RBC 凝集 (3 供体)
20	嵌合物 20	0.150	0.138	++	+/-
20.1	h20-VH1-VL1	0.193	0.161	++	++
20.2	h20-VH1-VL2	0.218	0.216	++	++
20.3	h20-VH1-VL3	0.184	0.228	++	+++ / ++++
20.4	h20-VH1-VL4	0.248	0.261	++	-
20.5	h20-VH1-VL5	0.206	0.111	++	+/+++
20.6	h20-VH2-VL1	0.177	0.098	++	+/+++
20.7	h20-VH2-VL2	0.156	0.076	Nd	+
20.8	h20-VH2-VL3	0.184	0.079	Nd	+
20.9	h20-VH2-VL4	0.173	0.123	Nd	+
20.10	h20-VH2-VL5	0.191	0.051	Nd	-
20.11	h20-VH3-VL1	0.145	0.118	++	+/-
20.12	h20-VH3-VL2	0.153	0.160	Nd	+/-
20.13	h20-VH3-VL3	0.147	0.173	Nd	+/-
20.14	h20-VH3-VL4	0.143	0.135	Nd	+
20.15	h20-VH3-VL5	0.143	0.113	Nd	+
20.16	h20-VH4-VL1	0.113	0.100	++	+/-
20.17	h20-VH4-VL2	0.124	0.086	Nd	+/-
20.18	h20-VH4-VL3	0.164	0.142	Nd	+/-
20.19	h20-VH4-VL4	0.139	0.192	Nd	-
20.20	h20-VH4-VL5	0.136	0.095	Nd	+/-
20.21	h20-VH5-VL1	0.190	0.169	++	+
20.22	h20-VH5-VL2	0.189	0.174	Nd	+/+++
20.23	h20-VH5-VL3	0.190	0.169	Nd	+/-
20.24	h20-VH5-VL4	0.177	0.133	Nd	+/+++
20.25	h20-VH5-VL5	0.159	0.112	Nd	+/-

[0761] nd: 未完成

[0762] 对于RBC凝集: +/-, 仅在50μg/mL抗体下观察到弱凝集; +, 在50μg/mL抗体下凝集; ++, 浓度≥16.7μg/mL的凝集; +++, 浓度≥5.6μg/mL的凝集

[0763] 表13: 通过Biacore测定的候选物20的人源化抗CD47抗体的动力学和亲和常数(独立实验的平均值)

[0764]

候选物编号	抗 体 (hIgG4)	平均 Kon (1/Ms) $\times 10^3$	平均 Koff (1/s) $\times 10^{-4}$	平均 KD (nM)
20	嵌合物 20	169.33	5.05	3.22
20.1	h20-H1-L1	118.40	6.34	5.85
20.2	h20-H1-L2	119.50	6.91	6.45
20.3	h20-H1-L3	136.50	11.05	7.82
20.4	h20-H1-L4	130.95	8.39	7.33
20.5	h20-H1-L5	126.30	7.72	7.58
20.6	h20-H2-L1	197.50	5.95	3.53
20.7	h20-H2-L2	193.00	6.27	3.67
20.8	h20-H2-L3	189.00	6.60	3.77
20.9	h20-H2-L4	189.00	6.28	3.65
20.10	h20-H2-L5	219.00	6.32	3.34
20.11	h20-H3-L1	222.00	5.61	2.79
20.12	h20-H3-L2	246.00	5.60	2.49
20.13	h20-H3-L3	213.50	5.94	3.05
20.14	h20-H3-L4	216.50	5.81	3.02
20.15	h20-H3-L5	242.00	5.28	2.36
20.16	h20-H4-L1	175.00	6.19	3.86
20.17	h20-H4-L2	167.50	6.34	4.18
20.18	h20-H4-L3	180.00	7.33	4.37
20.19	h20-H4-L4	179.00	6.85	4.15
20.20	h20-H4-L5	192.00	6.24	3.5
20.21	h20-H5-L1	115.90	9.79	9.2
20.22	h20-H5-L2	142.00	11.65	8.55
20.23	h20-H5-L3	104.20	8.41	9.93
20.24	h20-H5-L4	103.25	10.21	10.99
20.25	h20-H5-L5	126.40	10.86	9.69

[0765] 具有VH1和VH5序列的所有人源化变体具有比其它变体更低的亲和力(更高的KD)并低于嵌合候选物20的亲和力(更高的KD)。其它变体显示与嵌合候选物20的类似Kon、Koff和KD常数。与嵌合候选物20相比,没有任何变体显示出显著增加的对hCD47的亲和力。观察到所有人源化变体的Koff值在 5.3×10^{-4} 至 $11.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 的范围内。

[0766] 所有25种变体与Raji细胞上表达的CD47强烈结合,其EC50与嵌合候选物20的EC50相似。与嵌合候选物20一样,它们还特异性识别hCD47而不是在CHO细胞上表达的mCD47(未显示)。

[0767] 所有25种变体强烈抑制hSIRP α 与Raji细胞上表达的CD47的结合,其IC50与嵌合候选物20的IC50相同。具有VH2序列的变体具有比其它变体以及嵌合候选物20更低的IC50。

[0768] 所有测试的hIgG4变体都能够以与嵌合hIgG4候选物20相似的方式增强人巨噬细

胞对Raji细胞的吞噬作用。

[0769] VH1家族的一些变体(h20-VH1-VL1,h20-VH1-VL2,h20-VH1-VL3,h20-VH1-VL5),变体h20-VH2-VL1和变体h20-VH5-VL2和h20-VH5-VL4表现出比其它变体以及比嵌合候选物20诱导更多RBC凝集的倾向。

[0770] 2.人源化抗体和领先(lead)选择的优化

[0771] 对人源化变体的VH和VL序列内潜在的T细胞表位的分析揭示了在5种VL变体(VL1至VL5)的CDR2结构域内存在高亲和力CD4⁺ T细胞表位(LIYFASTKESGV)。也存在于小鼠VL0序列的CDR2内的这种潜在的T细胞表位在5种第一人源化VL变体中未被去除,以避免任何第一人源化候选物的亲和力和/或活性的损失。然而,VL序列56位(F56Y)处的单个点突变F至Y(无信号肽的氨基酸编号)足以去除该潜在T细胞表位(LIYFASTKESGV至LIYYASTKESGV)的免疫原性。因此将F56Y突变导入人源化VL1至VL5序列。这些新序列命名为VL1-F56Y至VL5-F56Y,并且通过将VH1至VH5变体之一与VL1-F56Y至VL5-F56Y变体之一组合产生的相应的人源化抗体命名为h20-Hx-LxY。选择五种人源化变体(候选物20.26(h20-H2-L5Y),20.27(h20-H3-L2Y),20.28(h20-H3-L3Y),20.29(h20-H4-L4Y),20.30(h20-H4-L5Y))并以含有已知稳定hIgG4蛋白的S22P突变(SEQ ID NO:162)的人IgG4形式产生(Angal S等人,Mol Immunol,1993)。纯化抗体在体外进一步表征为它们与Raji细胞上的hCD47的结合活性,它们在全血中抑制Raji细胞上的hCD47/hSIRP α 相互作用和它们的人RBC凝集活性的效力。还将5种人源化Hx-LxY变体与以hIgG4-S228P形式产生的嵌合候选物20以及克隆于hIgG4-S228P中的AB06.12和Hu5F9人源化抗体进行比较。

[0772] 如图12和13所示,五种F56Y突变变体与Raji细胞结合(图12),并以与它们未突变的对应物相似的效率抑制hSIRP α 与Raji细胞的结合(图13),并且与嵌合候选物20相似。五种F56Y突变的人源化变体在全血测定中具有比嵌合候选物20略高的RBC凝集活性,但仍低于Hu5F9基准(表14)。

[0773] 最后,与AB06.12和Hu5F9抗体类似,发现候选者20的五个F56Y突变的人源化变体在Raji细胞上表现出对hCD47的强烈识别,并且强烈抑制了hSIRP α 与Raji细胞上的hCD47的结合(图14)。下表14总结了在不同测定中获得的结果。

[0774] 表14:候选物20的人源化h20-Hx-LxY变体的特征(代表2个独立实验)

[0775]

抗体(hIgG4-S228P)	CD47 结合 (EC50, ng/mL)	CD47/SIRP α 抑制 (IC50, ng/mL)	RBC 凝集 (4 供体)
h20-H2-L5Y, 候选物 20.26	97.5	112.6	++; +; ++; +
h20-H3-L2Y, 候选物 20.27	85.4	101.1	+; +; ++; +/-
h20-H3-L3Y, 候选物 20.28	116.7	169.9	+; +; ++; +
h20-H4-L4Y, 候选物 20.29	146.6	180.7	+; +; ++; +/-
h20-H4-L5Y, 候选物 20.30	105.1	149.5	++; +; ++; ++
嵌合候选物 20	75.1	110.2	+; +/-; +; +/-
Hu5F9	80.0	122.8	+++; +; +++; +++
AB06.12	83.1	97.2	+; +/-; +/-; -

[0776] +/-, 仅在50 μ g/mL抗体下观察到弱凝集;+, 在50 μ g/mL抗体下凝集;++, 浓度 $\geq$ 16.7 μ g/mL的凝集;+++ , 浓度 $\geq$ 5.6 μ g/mL的凝集

[0777] 还通过SPR在Biacore上测定5种新入源化h20-Hx-LxY变体的动力学 (Kon和Koff) 和亲和力 (KD) 常数。表15中的结果显示, 类似于候选物20并类似于没有VL CDR2-F56Y突变的相应入源化变体, 具有VL CDR2-F56Y突变的5种入源化变体保持2.0至2.8nM的亲和力(表15)。

[0778] 表15:通过Biacore测量的具有VL CDR2-F56Y突变的候选物20的抗CD47入源化变体的动力学和亲和常数(2个独立实验的平均值)

[0779]

抗体(hIgG4 形式)	平均 Kon (1/Ms) $\times 10^3$	平均 Koff (1/s) $\times 10^{-4}$	平均 KD (nM)	平均 Rmax (RU)
h20-H2-L5Y, 候选物 20.26	306.5	6.99	2.32	124.8
h20-H3-L2Y, 候选物 20.27	292.0	5.84	2.06	106.6
h20-H3-L3Y, 候选物 20.28	264.0	5.73	2.32	119.9
h20-H4-L4Y, 候选物 20.29	305.5	7.61	2.61	102.4
h20-H4-L5Y, 候选物 20.30	254.5	6.93	2.82	111.6
嵌合候选物 20	225.0	5.43	2.48	144.6
Hu5F9-G4P	101.4	0.75	0.73	85.5

[0780] 如小鼠和候选人20观察到的, 具有VL CDR2-F56Y突变的5种入源化变体也保守了快速解离动力学, Koff值在 5.73×10^{-4} 至 $7.61 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 范围内(表13和15)。

[0781] 3. 抗CD47候选物22的入源化

[0782] 还选择了候选小鼠22用于入源化。特别是如小鼠候选物20所述, 通过CDR植入到人受体框架中产生4种VH和4种VL变体。使用计算机算法以及存在翻译后修饰(例如Fv糖基化和脱酰胺化)分析序列以去除具有MHC II类高亲和力的潜在T细胞表位。

[0783] 将2种入源化VH变体h22-VH3和h22-VH4克隆到含有人Fc γ 4-S228P主链(SEQ ID NO:162)的表达载体中, 并将4种入源化h22-VL变体克隆到含有人 κ 主链(SEQ ID NO:176)的表达载体中, 以产生hIgG4/ κ 入源化变体。从用h22-VH3或h22-VH4中的一种和4种h22-VL载

体中的一种共转染的CHO细胞中产生并纯化8种hIgG4/ κ 变体。得到的抗体命名为h22-VHx-VLx,其中h22命名为人源化候选物22,VHx命名为具有人源化VH变体x的重链可变结构域(VH3至VH4),Lx命名为具有人源化VH变体x的轻链可变结构域(VL1至VL4)。还通过SPR在Biacore上测定8种纯化抗体的动力学(Kon和Koff)和亲和力(KD)常数。还测试8种纯化抗体对人Raji淋巴瘤细胞的结合活性和特异性,因为它们在抑制hSIRP α 与Raji细胞结合方面的功能活性以及它们在全血中诱导人RBC凝集的能力。在所有测定中,将8种人源化变体与通过将候选物22的小鼠VH和VL序列克隆到含有人Fc γ 4-S228P和人 κ 主链的合适载体中产生的hIgG4嵌合候选物22进行比较。对于RBC凝集,还将8种人源化变体与Hu5F9抗体进行比较。

[0784] 在不同测定中获得的所有结果总结在下表16和表17中。

[0785] 表16:候选物22的人源化变体的特征

[0786]

候选物编号	抗体(hIgG4)	CD47 结合 (EC50 μ g/mL)	CD47/SIRP α 抑制 (IC50 μ g/mL)	RBC 凝集 (2 个供体)
22	嵌合物 22	0.122	0.140	++
22.9	h22-VH3-VL1	0.101	0.075	+++
22.10	h22-VH3-VL2	0.141	0.109	+++
22.11	h22-VH3-VL3	0.139	0.096	+++ /++++
22.12	h22-VH3-VL4	0.108	0.116	++++
22.13	h22-VH4-VL1	0.070	0.119	+++
22.14	h22-VH4-VL2	0.099	0.093	+++
22.15	h22-VH4-VL3	0.124	0.098	+++
22.16	h22-VH4-VL4	0.184	0.116	++++
-	Hu5F9	nt	nt	++ /+++

[0787] nt;未测试;

[0788] +/-,仅在50 μ g/mL抗体处观察到弱凝集;+,在50 μ g/mL抗体下凝集;++,浓度 $\geq$ 16.7 μ g/mL的凝集;+++ ,浓度 $\geq$ 5.6 μ g/mL的凝集;++++,浓度 $\geq$ 1.9 μ g/mL的凝集

[0789] 表17:通过Biacore测定的候选物22的人源化抗CD47抗体的动力学和亲和常数(2个独立实验的平均值)

候选物编号	抗体(hIgG4)	平均 Kon (1/Ms) $\times 10^3$	平均 Koff (1/s) $\times 10^{-4}$	平均 KD (nM)
22	嵌合物 22	31.15	3.81	12.20
22.9	h22-VH3-VL1	24.65	3.18	12.95
22.10	h22-VH3-VL2	28.75	3.15	11.05
22.11	h22-VH3-VL3	28.35	3.06	10.91
22.12	h22-VH3-VL4	25.25	2.52	10.00
22.13	h22-VH4-VL1	25.60	3.37	13.20
22.14	h22-VH4-VL2	31.25	3.25	10.44
22.15	h22-VH4-VL3	29.10	3.51	12.10
22.16	h22-VH4-VL4	28.15	2.63	9.37

[0791] 具有h22-VH3或h22-VH4序列与h22-VL1至h22-VL4序列组合的全部8种人源化变体显示了与嵌合候选物22类似的KON、Koff和KD常数。与嵌合候选物22相比,没有任何变体显示出显著增加的对hCD47的亲合力。观察到来自候选物22的所有人源化变体的Koff值在 2.5×10^{-4} 至 $3.8 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的范围内。

[0792] 所有8种变体与Raji细胞上表达的CD47强烈结合,其EC50与嵌合候选物22的EC50相似。

[0793] 所有8种变体强烈抑制hSIRP α 与Raji细胞上表达的CD47的结合,其IC50与嵌合候选物22的IC50在相同范围。

[0794] 所有8种变体均显示出比嵌合候选物22稍多的RBC凝集倾向。其中5种具有与Hu5F9基准相似的红细胞凝集倾向。

[0795] VI. 表位作图,二聚化和糖基化

[0796] 1. 表位作图

[0797] 通过使用由CovalX开发的高分辨率方法测定小鼠抗CD47候选物20和22在hCD47抗原上识别的表位(Bich C., Scott M., Panagiotidis A., Wenzel R.J., Nazabal A., Zenobi R. "Characterization of antibody-antigen interactions: Comparison between surface plasmon resonance measurements and high-mass matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry", Analytical Biochem 375:35-45, (2008))。抗CD47抗体与标记有6His-标签(SEQ ID NO:160)的人CD47胞外结构域的可溶制剂复合。

[0798] 然后将抗CD47抗体/hCD47复合物与氘交联剂一起温育并进行多酶裂解。在富集交联肽后,通过高分辨质谱法(nLC-Orbitrap MS)分析样品,并使用XQuest和Stavrox软件分析产生的数据。MALDI ToF MS分析使用CovalX的HM4相互作用模块与标准氮激光器进行,并聚焦于0-1500kDa的不同质量范围。

[0799] 如图15所示,化学交联分析显示,嵌合候选物20识别的hCD47上的表位是不连续的,并且包含氨基酸残基K59,R63,Y66,T67,H108,T109,T117和T120(SEQ ID:151)或hCD47的氨基酸残基xxK₅₉xxxR₆₃xxY₆₆T₆₇xx-----xxH₁₀₈T₁₀₉xxxxxxxT₁₁₇xxT₁₂₀xx(SEQ ID:151),其中"x"代表任何氨基酸残基(根据SEQ ID NO:151编号)。

[0800] 类似的分析显示,嵌合候选物22识别的hCD47上的表位(图16)也是不连续的,并且包含hCD47(SEQ ID NO:151)的K59,K61,S107,H108,T117,T120和R121(SEQ ID NO:151)或hCD47的氨基酸残基xxK₅₉xK₆₁xxxxxx-----xxxxxxxS₁₀₇H₁₀₈xxxxxxxT₁₁₇xxT₁₂₀R₁₂₁xx(SEQ ID:151),其中“x”代表任何氨基酸残基(根据SEQ ID NO:151编号)。

[0801] 使用相同的方法,也测定了AB06.12识别的hCD47上的表位,发现其与候选物20或22不同(数据未显示)。

[0802] 2.CD47的二聚化

[0803] 可溶性hCD47(细胞外IgV结构域)制剂的高质量MALDI ToF分析和SEC-HPLC分析显示存在体外天然形成的hCD47单体、二聚体和多聚体。为了进一步研究候选物20和22识别hCD47二聚体的能力,使用具有过量抗原的Cova1X's K200MALDI MS分析试剂盒交联抗CD47抗体/可溶性hCD47的混合物以交联。数据表明,候选物20可以结合hCD47的二聚体(60.8%)和单体(39.2%),而不能排除检测到一种抗体与2种单体的复合物(表18)。类似地,候选物22可与hCD47的二聚体(3.8%)和单体(5%)形成交联(表18)。进一步的实验证实了候选物20和22结合已通过SEC-HPLC纯化的人CD47单体和人CD47二聚体两者(参见图18和19)。通过SE-HPLC分析可溶性hCD47显示蛋白质制剂中的不均一性,其中存在推断的CD47单体和二聚体(图17)。单体和二聚体级分通过使用来自GE healthcare的Superdex 200Increase 10/300GL的半制备型SE-HPLC进一步纯化。非还原条件下的SDS-PAGE分析进一步证明了2种级分的纯度,对于对应于糖基化hCD47的预期大小的CD47单体级分观察到~30kDa的大条带,以及对于CD47二聚体级分观察到略高于50kDa的主要条带(图18)。然后将纯化的CD47单体和二聚体级分包覆在ELISA板上,并测试抗CD47抗体识别2种级分的能力。如图19所示,候选物20和22能够以相似的功效结合hCD47单体和二聚体。

[0804] 表18:分析可溶性hCD47与候选物20、候选物22以及可溶性hCD47与候选物20和候选物22之间的交联后的混合物

[0805]	类别	MW(kDa)	面积百分比
	候选物20	149.981	0
	候选物20和一个hCD47	176.412	39.2
	候选物20和两个hCD47	202.491	60.8
	候选物22	150.150	91.2
	候选物22和一个hCD47	176.750	5.0
	候选物22和两个hCD47	201.135	3.8

[0806] 3. 识别去糖基化的hCD47

[0807] 40多年来已知(参见Meezan E.,Wu H.C.,Black P.H.,Robbins P.W.“Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts.II Separation of glycoproteins and glycopeptides by Saphadex chromatography”,Biochemistry 8(6):2518-24(1969))可以在肿瘤细胞中修饰糖基化的机制,导致具有改变的糖基化模式的蛋白质的表达(对于最近的综述,另见Pinho S.S.and Reis C.A.“Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications”,Nat Rev Cancer 15:540-55(2015))。CD47是高度糖基化的跨膜蛋白,在位置N23,N34,N50,N73,N111,N206处具有6个N-糖基化位点

(Lindberg F.P., Gresham H.D., Schwarz E., and Brown E.J. "Molecular cloning of integrin-associated protein: An immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in $\alpha_v\beta_3$ -dependent ligand binding", J Cell Biol 123:485-96(1993))。

[0808] 由于CD47糖基化模式在肿瘤细胞中进行修饰,评估的一个关键方面是治疗性抗体是否依赖CD47糖基化水平来与靶标结合。为了解决这一问题,用PNGase处理可溶性hCD47以除去N-糖基化(Maley F., Trimble R.B., Tarentino A.L., and Plummer T.H. "Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases", Anal. Biochem 180:195-204(1989)),然后在室温180分钟期间使用DSS和K200将候选物20或22交联以产生抗CD47抗体/去糖基化-hCD47交联复合物。根据CovalX描述的方法,将这些复合物用于监测这些非共价相互作用的性质(Bich C., Scott M., Panagiotidis A., Wenzel R.J., Nazabal A., Zenobi R. "Characterization of antibody-antigen interactions: Comparison between surface plasmon resonance measurements and high-mass matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry", Analytical Biochem 375:35-45, (2008))。通过MALDI-ToF监测未复合和复合的分子后,我们成功鉴定了对应于过量添加的可溶性抗体(候选物20为148.944kDa,候选物22为149.173kDa)以及抗体-CD47复合物(分别为174.407kDa和163.440kDa)的峰,但未能鉴定出对应于未复合的去糖基化CD47的峰(15.901kDa;参见表19)。这些数据表明,所有可用的去糖基化hCD47与候选物20或候选物22复合,支持抗体20和22能够识别糖基化和N-去糖基化hCD47的观点。

[0809] 表19:质谱分析可溶性去糖基化hCD47与候选物20或候选物22的交联

[0810]	类别	MW (kDa)	面积百分比
	候选物 20	148.944	84.8
	候选物 20 和 单体去糖基化 hCD47	174.407	15.2
	单体去糖基化 hCD47	15.901	0
	候选物 22	149.173	92.8
	候选物 22 和 单体 hCD47	163.440	7.2
	单体去糖基化 hCD47	15.901	0

[0811] 为了确认和量化用CovalX方法观察到的候选物20和22对去糖基化hCD47的识别,通过ELISA对包覆的hCD47和去糖基化hCD47制剂测试抗体。通过尺寸排阻色谱分析证实了从hCD47成功除去N-聚糖(未示出)。抗人CD47候选物20和22以也在hu-IgG4同种型中的人源化变体h20-H2L5Y的平行嵌合hu-IgG4形式进行测试。将抗体与以hu-IgG4形式产生的AB06.12和Hu5F9人源化抗体一起进行测试以通过ELISA允许相同的识别效率。如图22A和表20、21和22所示,虽然Hu5F9和AB06.12显示出稍低的最大结合,但是所有抗体都以相似的情况以及EC50、EC95、平衡结合常数和最大特异性结合(Bmax)值(Bmax₁)与糖基化CD47强烈结合。相比之下,与嵌合候选物20、22和人源化变体h20-H2L5Y观察到的结合相比,Hu5F9和AB06.12与N-去糖基化CD47的结合强烈降低(图22B,表20、21和22)。事实上,嵌合候选物20、

22和人源化抗体h20-H2L5Y与去糖基化CD47结合的EC50值小于与糖基化CD47结合的EC50值的3.0倍和/或EC95值小于对糖基化CD47测量的10.0倍。相反,AB06.12和Hu5F9的EC50和EC95值分别高于对糖基化CD47测量的EC50和EC95值的3.0倍和10.0倍(表20)。此外,嵌合候选物20、22和人源化抗体h20-H2L5Y对糖基化和N-去糖基化CD47的平衡结合常数值均 $\leq 60\text{pM}$,而AB06.12和Hu5F9对N-脱糖基化CD47的平衡结合常数值在90-130pM范围内(表21)。最后,嵌合候选物20、22和人源化抗体h20-H2L5Y结合糖基化和N-脱糖基化CD47两者,其对糖基化($B_{\max_1}$)和去糖基化($B_{\max_2}$)CD47的最大特异性结合($B_{\max}$)值 $\geq 1.90D$,而AB06.12和Hu5F9对N-脱糖基化CD47的 $B_{\max_2}$ 值 $< 1.50D$ (表22)。

[0812] 这些结果进一步证明了候选物20、22和人源化h20-H2L5Y抗体对hCD47的识别不依赖于CD47的N-糖基化水平。相反,Hu5F9和AB06.12抗体显著失去对N-去糖基化CD47的结合能力。由于细胞表面蛋白的糖基化水平和性质可以在肿瘤细胞上进行修饰,所以可能的是CD47抗原的糖基化可以在肿瘤细胞表达或过度表达时也进行修饰。值得注意的是,CD47的糖基化模式对于其与SIRP α 的相互作用似乎不是必需的(Subramanian S., Boder E.T., and Discher D.E. "Phylogenetic divergence of CD47 interactions with human signal regulatory protein α reveals locus of species specificity." J.Biol.Chem.282 (3):1805-18(2007)),表明异常糖基化不会改变CD47/SIRP α 相互作用。因此,过度表达CD47的癌细胞将独自根据其糖基化模式保护自己免于吞噬作用。相反,hCD47的N-糖基化模式可能影响抗体结合并显著降低疗效。因此,我们预期通过使用抗CD47治疗性抗体如20、22,优选h20-H2L5Y,其与抗hCD47的结合不依赖于其糖基化水平,从而具有更广泛的抗肿瘤作用。

[0813] 表20:通过ELISA测量的糖基化-hCD47与抗CD47嵌合候选物20和22、人源化h20-H2L5Y抗体和基准抗体的N-去糖基化hCD47的结合特征。通过使用GraphPad Prism软件的非线性回归/1og(抗体)与应答(四参数)模型计算EC50和EC95值。

抗体 (hu-IgG4)	通过 ELISA 测量与糖基化 hCD47-His 结合		通过 ELISA 测量与 N-去糖基化 hCD47-His 的结合		EC 去糖基化/EC 糖基化的比例	
	EC50 (pM)	EC95 (pM)	EC50 (pM)	EC95 (pM)	EC50 的比例	EC95 的比例
[0814] 嵌合候选物 20	28.0	667.0	47.4	3335.0	1.7	5.0
h20-H2L5Y	44.0	1334.0	96.0	11339.0	2.2	8.5
嵌合候选物 22	38.7	4669.0	42.0	6670.0	1.1	1.4
AB06.12	75.4	2054.4	427.5	214782.0	5.7	107.4
Hu5F9	54.7	1961.0	253.5	54027.0	4.6	27.6

[0815] 表21:通过ELISA测量的糖基化-hCD47与抗CD47嵌合候选物20和22、人源化h20-H2L5Y抗体和基准抗体的N-去糖基化hCD47相比的平衡结合常数。通过使用GraphPad Prism软件的结合饱和/单位点结合模型(平均值 $\pm$ SD,一式三份)计算平衡结合常数值。

[0816]

抗体 (hu-IgG4)	对糖基化 hCD47 的平衡结合常数 (pM)		对去糖基化 hCD47 的平衡结合常数 (pM)	
	平均	SD	平均	SD
嵌合候选物 20	27.3	3.3	38.8	4.6
h20-H2L5Y	43.6	7.2	55.7	10.5
嵌合候选物 22	34.4	6.7	31.8	5.9
AB06.12	67.0	6.8	93.6	28.6
Hu5F9	49.0	4.9	129.0	43.2

[0817] 表22:通过ELISA测量的糖基化-hCD47 (B_{max_1}) 与抗CD47嵌合候选物20和22、人源化h20-H2L5Y抗体和基准抗体的N-去糖基化 (B_{max_2}) hCD47相比的最大特异性结合 (B_{max})。通过使用GraphPad Prism软件的结合饱和/单位点结合模型(平均值 $\pm$ SD,一式三份)计算 B_{max} 值。

[0818]

抗体 (hu-IgG4)	对糖基化 hCD47 的 B_{max_1} (OD 值)		对去糖基化 hCD47 的 B_{max_2} (OD 值)	
	平均	SD	平均	SD
嵌合候选物 20	2.90	0.07	2.20	0.05
h20-H2L5Y	2.85	0.09	1.97	0.07
嵌合候选物 22	2.85	0.11	2.57	0.09
AB06.12	2.48	0.05	0.97	0.06
Hu5F9	2.66	0.05	1.40	0.10

[0819] VII. 人源化抗CD47抗体h20-H2L5Y的体内功效

[0820] 如前所述,在A549肺腺癌异种移植模型中评估作为单一药剂和与抗Her2曲妥珠单抗(**Herceptin**[®])的组合物hu-IgG4形式(h20-H2L5Y-G4)的人源化变体h20-H2L5Y。用A549细胞(皮下注射1000万个细胞)移植NOG小鼠(每组n=8)。一旦肿瘤体积为约100mm³,在细胞移植后14天开始抗体治疗。将抗CD47抗体h20-H2L5Y和**Herceptin**[®]以10mg/kg/剂的剂量通过腹膜内注射而单独或组合注射,每周3次以至多10周。如图23所示,与注射载体的动物的对照组($p<0.005$)和与单独用**Herceptin**[®]治疗的动物相比($p<0.05$),抗-CD47抗体h20-H2L5Y-G4与**Herceptin**[®]的组合显著延长了治疗小鼠的存活期。因此,这些结果显示了人源化抗CD47 h20-H2L5Y抗体与**Herceptin**[®]的组合在用于控制NOG小鼠体内A549肺腺癌的生长中的效力增加,并证实了先前用小鼠抗CD47候选物20获得的结果。

[0821] 还在Her-2阳性胃癌的小鼠异种移植模型中评估了作为单一药剂和与批准用于治疗Her2-过度表达的转移性胃癌的抗Her2曲妥珠单抗(**Herceptin**[®])组合的人源化h20-H2L5Y抗体。对于该研究,选择人NCI-N87细胞系(ATCC CRL-5822)用于异种移植作为对**Herceptin**[®]治疗应答的Her-2阳性胃肿瘤(Matsui Y., Inomata M., Tojigamori M., Sonoda K., Shiraishi N., Kitano S. "Suppression of tumor growth in human gastric cancer with HER2 overexpression by an anti-HER2 antibody in a murine model", Int.J.Oncol.27 (3):681-5(2005))。在体外,这些细胞通过**Herceptin**[®]的结合检测到非常强烈表达Her-2,并且通过用h20-H2L5Y抗体染色和流式细胞术分析测量到强烈表达CD47(数据未显示)。研究在NOG小鼠中进行,并且以hu-IgG4-S228P-L235E形式(h20-H2L5Y-G4PE)测试了人源化h20-H2L5Y抗体。为此目的,在含有人Fc γ 4-S228P-L235E主链(SEQ ID NO:164)的表达载体中克隆h20-VH2变体后,人源化抗体h20-H2L5Y进一步以携带S228P和L235E突变的hu-IgG4形式产生。已显示L235E突变强烈降低hu-IgG4对Fc γ 受体(Fc γ R)的亲和力,并因此消除Fc效应子功能,例如ADCC或ADCP(Alegre ML, Collins AM, Pulito VL, Brosius RA, Olson WC等人"Effect of a single amino acid mutation on the activating and immunosuppressive properties of a "humanized" OKT3 monoclonal antibody", J.Immunol.148(11):3461-68(1992); Reddy MP, Kinney CAS., Chaikin MA, Fishman-Lobell J, Tsui P等人"Elimination of Fc Receptor-Dependent Effector Functions of a Modified IgG4 Monoclonal Antibody to Human CD4", J.Immunol.164:1925-33(2000))。因此,L235E突变将降低副作用的风险,例如吞噬或溶解经调理的正常细胞(如RBC、血小板等)。用NCI-N87细胞(皮下注射1000万个细胞)移植NOG小鼠(n=8/组),一旦肿瘤体积约100mm³,在细胞移植后7天开始抗体治疗。抗CD47抗体h20-H2L5Y-G4PE以10mg/kg/剂单独或组合注射,而**Herceptin**[®]以2.5mg/kg/剂的剂量单独或组合注射。通过腹腔内注射施用抗体,每周3次以至多5周。如图24所示,在用抗CD47抗体h20-H2L5Y-G4PE单独治疗的小鼠组中观察到NCI-N87生长的延迟,并且在用**Herceptin**[®]与抗-CD47h20-H2L5Y-G4PE抗体的组合治疗的小鼠中观察到NCI-N87生长的更强延迟(图24)。当在NOD/SCID小鼠中进行研究时获得了类似的结果(数据未显示)。与单独使用**Herceptin**[®]治疗的小鼠组相比时,用**Herceptin**[®]与抗CD47 h20-H2L5Y-G4PE的组合治疗的小鼠组中的NCI-N87肿瘤生长的这种降低在统计学上更高(p<0.05, Student's t-检验),因此证明了抗CD47 h20-H2L5Y抗体与**Herceptin**[®]之间用于控制体内NCI-N87肿瘤细胞的增殖以及潜在的其它Her-2阳性胃肿瘤的协同作用。其它方面:

[0822] 1. 抗体,其选自由以下组成的抗体组:

[0823] (a) 抗体组1,其包含具有SEQ ID NO:1-3(Kabat注释)或SEQ ID NO:4-6(IMGt注释)所示的每个CDR序列的重链和具有SEQ ID NO:7-9(Kabat注释)或SEQ ID NO:10-12(IMGt注释)所示的每个CDR序列的轻链;或

[0824] (b) 抗体组2,其包含具有SEQ ID NO:13-15(Kabat注释)或SEQ ID NO:16-18(IMGt注释)所示的每个CDR序列的重链和具有SEQ ID NO:19-21(Kabat注释)或SEQ ID NO:22-24

(IMGT注释)所示的每个CDR序列的轻链;或

[0825] (c) 抗体组3,其包含具有SEQ ID NO:25-27 (Kabat注释)或SEQ ID NO:28-30 (IMGT注释)所示的每个CDR序列的重链和具有SEQ ID NO:31-33 (Kabat注释)或SEQ ID NO:34-36 (IMGT注释)所示的每个CDR序列的轻链;或

[0826] (d) 抗体组4,其包含具有SEQ ID NO:37-39 (Kabat注释)或SEQ ID NO:40-42 (IMGT注释)所示的每个CDR序列的重链和具有SEQ ID NO:43-45 (Kabat注释)或SEQ ID NO:46-48 (IMGT注释)所示的每个CDR序列的轻链;或

[0827] (e) 抗体组5,其包含具有SEQ ID NO:49-51 (Kabat注释)或SEQ ID NO:52-54 (IMGT注释)所示的每个CDR序列的重链和具有SEQ ID NO:55-57 (Kabat注释)或SEQ ID NO:58-60 (IMGT注释)所示的CDR序列的轻链;或

[0828] (f) 抗体组6,其包含具有SEQ ID NO:61-63 (Kabat注释)或SEQ ID NO:64-66 (IMGT注释)所示的每个CDR序列的重链和具有SEQ ID NO:67-69 (Kabat注释)或SEQ ID NO:70-72 (IMGT注释)所示的每个CDR序列的轻链;或

[0829] (g) 抗体组7,其包含具有SEQ ID NO:73-75 (Kabat注释)或SEQ ID NO:76-78 (IMGT注释)所示的每个CDR序列的重链和具有SEQ ID NO:79-81 (Kabat注释)或SEQ ID NO:82-84 (IMGT注释)所示的每个CDR序列的轻链;或

[0830] (h) 抗体组8,其包含具有SEQ ID NO:85-87 (Kabat注释)或SEQ ID NO:88-90 (IMGT注释)所示的每个CDR序列的重链和具有SEQ ID NO:91-93 (Kabat注释)或SEQ ID NO:94-96 (IMGT注释)所示的每个CDR序列的轻链;或

[0831] (i) 抗体组9,其包含具有SEQ ID NO:97-99 (Kabat注释)或SEQ ID NO:100-102 (IMGT注释)所示的每个CDR序列的重链和具有SEQ ID NO:103-105 (Kabat注释)或SEQ ID NO:106-108 (IMGT注释)所示的每个CDR序列的轻链;或

[0832] (j) 抗体组10,其包含具有SEQ ID NO:109-111 (Kabat注释)或SEQ ID NO:112-114 (IMGT注释)所示的每个CDR序列的重链和具有SEQ ID NO:115-117 (Kabat注释)或SEQ ID NO:118-120 (IMGT注释)所示的每个CDR序列的轻链;

[0833] (k) 抗体组11,其包含具有SEQ ID NO:49-51 (Kabat注释)或SEQ ID NO:52-54 (IMGT注释)所示的每个CDR序列的重链和具有SEQ ID NO:55、152、57 (Kabat注释)或SEQ ID NO:58、153、60 (IMGT注释)所示的每个CDR序列的轻链;

[0834] (1) 并且其中优选的抗体组选自由以下组成的抗体组:抗体组5,其包含具有SEQ ID NO:49-51 (Kabat注释)或SEQ ID NO:52-54 (IMGT注释)中所示的每个CDR序列的重链和具有SEQ ID NO:55-57 (Kabat注释)或SEQ ID NO:58-60 (IMGT注释)中所示的每个CDR序列的轻链;抗体组6,其包含具有SEQ ID NO:61-63 (Kabat注释)或SEQ ID NO:64-66 (IMGT注释)中所示的每个CDR序列的重链和具有SEQ ID NO:67-69 (Kabat注释)或SEQ ID NO:70-72 (IMGT注释)中所示每个CDR序列的轻链;并且抗体组11是优选的,其包含具有SEQ ID NO:49-51 (Kabat注释)或SEQ ID NO:52-54 (IMGT注释)中所示的每个CDR序列的重链和具有SEQ ID NO:55、152、57 (Kabat注释)或SEQ ID NO:58、153、60 (IMGT注释)中所示的每个CDR序列的轻链。

[0835] 2. 根据方面1所述的抗体,其中所述抗体选自由以下组成的抗体组:

[0836] (a) 抗体组1,其包含具有SEQ ID NO:121中所示的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ

ID NO:122中所示的氨基酸序列的VL;或

[0837] (b) 抗体组2,其包含具有SEQ ID NO:123中所示的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:124中所示的氨基酸序列的VL;或

[0838] (c) 抗体组3,其包含具有SEQ ID NO:125中所示的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:126中所示的氨基酸序列的VL;或

[0839] (d) 抗体组4,其包含具有SEQ ID NO:127中所示的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:128中所示的氨基酸序列的VL;或

[0840] (e) 抗体组5,其包含具有SEQ ID NO:129中所示的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:130中所示的氨基酸序列的VL;或

[0841] (f) 抗体组6,其包含具有SEQ ID NO:131中所示的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:132中所示的氨基酸序列的VL;或

[0842] (g) 抗体组7,其包含具有SEQ ID NO:133中所示的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:134中所示的氨基酸序列的VL;或

[0843] (h) 抗体组8,其包含具有SEQ ID NO:135中所示的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:136中所示的氨基酸序列的VL;或

[0844] (i) 抗体组9,其包含具有SEQ ID NO:137中所示的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:138中所示的氨基酸序列的VL;或

[0845] (j) 抗体组10,其包含具有SEQ ID NO:139中所示的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:140中所示的氨基酸序列的VL;或

[0846] (k) 抗体组11,其包含具有SEQ ID NO:129中所示的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:154中所示的氨基酸序列的VL;

[0847] (1) 并且其中优选的抗体组选自自由以下组成的抗体组:抗体组5,其包含具有SEQ ID NO:129所述的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:130所述的氨基酸序列的VL;抗体组6,其包含具有SEQ ID NO:131所述的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:132所述的氨基酸序列的VL;以及抗体组11,其包含具有SEQ ID NO:129所述的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:154所述的氨基酸序列的VL。

[0848] 3. 根据方面1-2中任一个所述的抗体,其中抗体是全长嵌合、小鼠或人源化抗体。

[0849] 4. 根据方面3所述的抗体,其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:141中所示的氨基酸序列的VH和选自自由SEQ ID NO:146-150和/或SEQ ID NO:155-159中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL;或者其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:142中所示的氨基酸序列的VH和选自自由SEQ ID NO:146-150和/或SEQ ID NO:155-159中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL;或者其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:143中所示的氨基酸序列的VH和选自自由SEQ ID NO:146-150和/或SEQ ID NO:155-159中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL;或者其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:144中所示的氨基酸序列的VH和选自自由SEQ ID NO:146-150和/或SEQ ID NO:155-159中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL;或者其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:145中所示的氨基酸序列的VH和选自自由SEQ ID NO:146-150和/或SEQ ID NO:155-159中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL;或者其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:168中所示的氨基酸序列的VH和选自自由SEQ ID NO:172-175中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL;或者其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:169中所示的氨基酸序

列的VH和选自由SEQ ID NO:172-175中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL;或者其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:170中所示的氨基酸序列的VH和选自由SEQ ID NO:172-175中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL;或者其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:171中所示的氨基酸序列的VH和选自由SEQ ID NO:172-175中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL。

[0850] 5.根据方面1-4中任一个所述的抗体,其中抗体具有约 $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (1/s)或更高的Koff值。

[0851] 6.根据方面1-5中任一个所述的抗体,其具有人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgA恒定区,优选具有任选突变S228P的人IgG4(SEQ ID NO:162)和/或具有任选突变S228P-L235E的人IgG4(SEQ ID NO:164)。

[0852] 7.根据方面1-5中任一个所述的抗体,其中抗体是抗体片段,并且其中抗体片段任选地是F(ab')₂或Fab片段。

[0853] 8.根据方面1-7中任一个所述的抗体,其中抗体是双特异性抗体。

[0854] 9.根据方面1-8中任一个所述的抗体,其中抗体特异性结合人CD47并且结合后不激活CD47。

[0855] 10.根据方面1-9中任一个所述的抗体,其中抗体结合CD47、优选人CD47上的不连续表位。

[0856] 11.根据方面10所述的抗体,其中不连续表位包括氨基酸残基K59、R63、Y66、T67、H108、T109、T117和T120(SEQ ID:151);或者不连续表位包括CD47(SEQ ID NO:151)的氨基酸残基K59、K61、S107、H108、T117、T120和R121。

[0857] 12.根据方面1-11中任一个所述的抗体,其中抗体分别结合CD47单体和CD47二聚体,优选人CD47单体和二聚体。

[0858] 13.根据方面1-12中任一个所述的抗体,其中抗体分别结合糖基化和去糖基化形式的CD47,优选人CD47糖基化和去糖基化形式。

[0859] 14.多核苷酸,其编码根据方面1-13中任一个所示的抗体。

[0860] 15.细胞,其产生根据方面1-13中任一个所示的抗体。

[0861] 16.药物组合物,其包含根据方面1-13中任一个所示的抗体,任选地进一步包含药学上可接受的赋形剂。

[0862] 17.根据方面1-13中任一个所述的抗体或根据方面16所述的药物组合物在治疗受试者疾病中的用途。

[0863] 18.根据方面17所述的抗体或组合物的用途,其用于治疗癌症。

[0864] 19.根据方面27或根据方面18所述的抗体或组合物的用途,其用作单一疗法。

[0865] 20.根据方面27或根据方面18所述的抗体或组合物的用途,其用于组合疗法,优选与Her-2抑制剂或抗Her2抗体或EGFR抑制剂或抗EGFR抗体的组合。

[0866] 21.根据方面17-20所述的抗体或组合物的用途,其中受试者是人和/或非人动物。

[0867] 22.检测生物样品或组织中CD47存在的方法,该方法包括(i)使所述样品或组织与根据方面1-13中任一个所述的抗体接触,以及(ii)测定结合至所述组织或样品的抗体的存在。

[0868] 23.生产根据方面1-13中任一个所述的抗体的方法,其包括培养根据方面15所述

的细胞,使得根据方面14所述的核酸表达,以及任选地从细胞培养物回收抗体。

[0869] 24. 治疗或预防受试者中癌症的方法,其包括向患有或有风险发展癌症的受试者施用有效量的根据方面1-13所述的抗体。

[0870] 进一步的实施方式在以下编号的段落中定义:

[0871] 1. 结合糖基化和非糖基化CD47的抗体,其中抗体与CD47的结合不依赖于CD47的糖基化。

[0872] 2. 根据段落1所述的抗体,其中抗体适合用作治疗性抗体。

[0873] 3. 根据段落1或段落2所述的抗体,其中抗体结合糖基化和去糖基化形式的人CD47。

[0874] 4. 根据段落3所述的抗体,其中糖基化形式的人CD47在人CD47的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 151) 中的位置N23、N34、N50、N73、N111和/或N206处包含一个或多个N-糖基化残基。

[0875] 5. 根据任一前述段落所述的抗体,其中去糖基化形式的人CD47包含已经用肽N-糖苷酶(PNGase)处理以除去N-糖基化的糖基化人CD47。

[0876] 6. 根据任一前述段落所述的抗体,其中(i) 抗体和非糖基化与糖基化形式的CD47结合的EC₅₀的比例小于4、3、2、1、0.5、0.25,优选在4至1的范围内,更优选3至1,最优选2至1;和/或(ii) 抗体和非糖基化与糖基化形式的CD47结合的EC₉₅的比例小于25、20、10、1、0.5或0.25,优选在10至1的范围内,更优选9至1,最优选9至1。

[0877] 7. 根据任一前述段落所述的抗体,其中抗体以80pM或更低、优选70pM或更低、更优选60pM或更低的平衡结合常数结合糖基化和非糖基化CD47中的每一个。

[0878] 8. 根据任一前述段落所述的抗体,其中抗体与非糖基化CD47的最大结合能力(Bmax₂)是抗体与糖基化CD47的最大结合能力(Bmax₁)的至少60%。

[0879] 9. 根据任一前述段落所述的抗体,其中抗体具有约 $1.0 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ (1/s) 或更高的结合糖基化和/或非糖基化CD47的Koff值。

[0880] 10. 根据段落9所述的抗体,其中抗体具有 $1.0 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 至 $1.0 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 的结合糖基化和/或非糖基化CD47的Koff值。

[0881] 11. 根据段落10所述的抗体,其中抗体具有 $2.5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 至 $8.0 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的结合糖基化和/或非糖基化CD47的Koff值。

[0882] 12. 结合CD47的抗体,其中抗体具有 $1.0 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 至 $1.0 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 的结合CD47的Koff值。

[0883] 13. 抗体,其选自由以下组成的抗体组:(i) 包含具有SEQ ID NO:49-51 (Kabat注释)或SEQ ID NO:52-54 (IMGT注释)中所示的每个CDR序列的重链和具有SEQ ID NO:55-57 (Kabat注释)或SEQ ID NO:58-60 (IMGT注释)中所示的每个CDR序列的轻链的抗体组,(ii) 包含具有SEQ ID NO:61-63 (Kabat注释)或SEQ ID NO:64-66 (IMGT注释)中所示的每个CDR序列的重链和具有SEQ ID NO:67-69 (Kabat注释)或SEQ ID NO:70-72 (IMGT注释)中所示的每个CDR序列的轻链的抗体组,以及(iii) 包含具有SEQ ID NO:49-51 (Kabat注释)或SEQ ID NO:52-54 (IMGT注释)中所示的每个CDR序列的重链和具有SEQ ID NO:55、152、57 (Kabat注释)或SEQ ID NO:58、153、60 (IMGT注释)中所示的每个CDR序列的轻链的抗体组。

[0884] 14. 根据段落13所述的抗体,其中所述抗体选自由以下组成的抗体组:

[0885] (a) 包含具有SEQ ID NO:129中所示的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:130中所

示的氨基酸序列的VL的抗体组;或

[0886] (b) 包含具有SEQ ID NO:131中所示的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:132中所示的氨基酸序列的VL的抗体组;或

[0887] (c) 包含具有SEQ ID NO:129中所示的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:154中所示的氨基酸序列的VL的抗体组。

[0888] 15. 根据段落13-14中任一项所述的抗体,其中抗体是全长嵌合、小鼠或人源化抗体。

[0889] 16. 根据段落15所述的抗体,其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:141中所示的氨基酸序列的VH和选自由SEQ ID NO:146-150和/或SEQ ID NO:155-159中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL;或者其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:142中所示的氨基酸序列的VH和选自由SEQ ID NO:146-150和/或SEQ ID NO:155-159中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL;或者其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:143中所示的氨基酸序列的VH和选自由SEQ ID NO:146-150和/或SEQ ID NO:155-159中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL;或者其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:144中所示的氨基酸序列的VH和选自由SEQ ID NO:146-150和/或SEQ ID NO:155-159中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL;或者其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:145中所示的氨基酸序列的VH和选自由SEQ ID NO:146-150和/或SEQ ID NO:155-159中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL;或者其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:168中所示的氨基酸序列的VH和选自由SEQ ID NO:172-175中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL;或者其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:169中所示的氨基酸序列的VH和选自由SEQ ID NO:172-175中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL;或者其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:170中所示的氨基酸序列的VH和选自由SEQ ID NO:172-175中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL;或者其中人源化抗体包含具有SEQ ID NO:171中所示的氨基酸序列的VH和选自由SEQ ID NO:172-175中所示的氨基酸序列组成的VL组中的VL。

[0890] 17. 根据段落13-16中任一项所述的抗体,其中抗体具有约 $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 至 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 的Koff值。

[0891] 18. 根据段落13-17中任一项所述的抗体,其具有人IgG4,任选带有突变S228P(SEQ ID NO:162)或任选带有突变S228P-L235E(SEQ ID NO:164)。

[0892] 19. 根据段落13-18中任一项所述的抗体,其中抗体是抗体片段,并且其中抗体片段任选地是F(ab')₂或Fab片段。

[0893] 20. 根据段落13-19中任一项所述的抗体,其中抗体是双特异性抗体。

[0894] 21. 根据段落13-20中任一项所述的抗体,其中抗体分别特异性结合CD47并破坏CD47-SIRPα相互作用,优选抗体分别特异性结合人CD47并破坏人CD47-SIRPα相互作用。

[0895] 22. 根据段落13-21中任一项所述的抗体,其中抗体结合CD47、优选人CD47上的不连续表位。

[0896] 23. 根据段落22所述的抗体,其中不连续表位包括人CD47(SEQ ID:151)的氨基酸残基K59、R63、Y66、T67、H108、T109、T117和T120;或者不连续表位包括人CD47(SEQ ID NO:151)的氨基酸残基K59、K61、S107、H108、T117、T120和R121。

[0897] 24. 根据段落13-23中任一项所述的抗体,其中抗体分别结合CD47单体和CD47二聚

体,优选人CD47单体和二聚体。

[0898] 25.根据段落13-24中任一项所述的抗体,其中抗体分别结合糖基化和去糖基化形式的CD47,优选人CD47糖基化和去糖基化形式。

[0899] 26.多核苷酸,其编码根据段落1-24中任一项所示的抗体。

[0900] 27.细胞,其产生根据段落1-24中任一项所示的抗体。

[0901] 28.药物组合物,其包含根据段落1-24中任一项所示的抗体,任选地进一步包含药学上可接受的赋形剂。

[0902] 29.根据段落1-24中任一项所述的抗体或根据段落28所述的药物组合物在治疗受试者疾病中的用途。

[0903] 30.根据段落29所述的抗体或组合物的用途,其用于治疗癌症。

[0904] 31.根据段落30所述的抗体或组合物的用途,其用作单一疗法。

[0905] 32.根据段落30所述的抗体或组合物的用途,其用于组合疗法,优选与Her-2抑制剂或抗Her2抗体或EGFR抑制剂或抗EGFR抗体组合。

[0906] 33.根据段落29-32所述的抗体或组合物的用途,其中受试者是人或非人动物。

[0907] 34.检测生物样品或组织中CD47存在的方法,该方法包括(i)使所述样品或组织与根据段落1-24中任一方面所述的抗体接触,以及(ii)测定结合至所述组织或样品的抗体的存在。

[0908] 35.生产根据段落1-24中任一项所述的抗体的方法,其包括培养段落27所述的细胞,使得段落26所述的核酸表达,并且任选地从细胞培养物回收抗体。

[0909] 36.治疗或预防受试者中癌症的方法,其包括向患有或有风险发展癌症的受试者施用有效量的根据段落1-24所述的抗体。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 布林克生物学
- [0003] <120> 人源化、小鼠或嵌合抗CD47单克隆抗体
- [0004] <130> PAT017/PCT
- [0005] <160> 176
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 5
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 人
- [0011] <400> 1
- [0012] Lys Tyr Trp Met His
- [0013] 1 5
- [0014] <210> 2
- [0015] <211> 17
- [0016] <212> PRT
- [0017] <213> 人工序列
- [0018] <220>
- [0019] <223> VT008-AL5-10G7抗体;重链; CDR2-Kabat
- [0020] <400> 2
- [0021] Glu Ile Asn Pro Ser Asp Thr Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
- [0022] 1 5 10 15
- [0023] Gly
- [0024] <210> 3
- [0025] <211> 11
- [0026] <212> PRT
- [0027] <213> 人工序列
- [0028] <220>
- [0029] <223> VT008-AL5-10G7抗体;重链; CDR3-Kabat
- [0030] <400> 3
- [0031] Val Ala Thr Met Val Ala Arg Gly Phe Ala Tyr
- [0032] 1 5 10
- [0033] <210> 4
- [0034] <211> 8
- [0035] <212> PRT
- [0036] <213> 人工序列
- [0037] <220>
- [0038] <223> VT008-AL5-10G7抗体;重链; CDR1-IMGT

[0039]	<400> 4
[0040]	Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr Trp
[0041]	1 5
[0042]	<210> 5
[0043]	<211> 8
[0044]	<212> PRT
[0045]	<213> 人工序列
[0046]	<220>
[0047]	<223> VT008-AL5-10G7抗体;重链; CDR2-IMGT
[0048]	<400> 5
[0049]	Ile Asn Pro Ser Asp Thr Tyr Thr
[0050]	1 5
[0051]	<210> 6
[0052]	<211> 13
[0053]	<212> PRT
[0054]	<213> 人工序列
[0055]	<220>
[0056]	<223> VT008-AL5-10G7抗体;重链; CDR3-IMGT
[0057]	<400> 6
[0058]	Ala Arg Val Ala Thr Met Val Ala Arg Gly Phe Ala Tyr
[0059]	1 5 10
[0060]	<210> 7
[0061]	<211> 11
[0062]	<212> PRT
[0063]	<213> 人工序列
[0064]	<220>
[0065]	<223> VT008-AL5-10K7抗体;轻链; CDR1-Kabat
[0066]	<400> 7
[0067]	Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Gly Ala Val Val
[0068]	1 5 10
[0069]	<210> 8
[0070]	<211> 7
[0071]	<212> PRT
[0072]	<213> 人工序列
[0073]	<220>
[0074]	<223> VT008-AL5-10K7抗体;轻链; CDR2-Kabat
[0075]	<400> 8
[0076]	Leu Ala Thr Tyr Arg Tyr Thr
[0077]	1 5

[0078] <210> 9
[0079] <211> 9
[0080] <212> PRT
[0081] <213> 人工序列
[0082] <220>
[0083] <223> VT008-AL5-10K7抗体;轻链; CDR3-Kabat
[0084] <400> 9
[0085] Gln Gln Tyr Tyr Ser Ile Pro Trp Thr
[0086] 1 5
[0087] <210> 10
[0088] <211> 6
[0089] <212> PRT
[0090] <213> 人工序列
[0091] <220>
[0092] <223> VT008-AL5-10K7抗体;轻链; CDR1-IMGT
[0093] <400> 10
[0094] Gln Asp Val Ser Gly Ala
[0095] 1 5
[0096] <210> 11
[0097] <211> 4
[0098] <212> PRT
[0099] <213> 人工序列
[0100] <220>
[0101] <223> VT008-AL5-10K7抗体;轻链; CDR2-IMGT
[0102] <400> 11
[0103] Leu Ala Thr Tyr
[0104] 1
[0105] <210> 12
[0106] <211> 9
[0107] <212> PRT
[0108] <213> 人工序列
[0109] <220>
[0110] <223> VT008-AL5-10K7抗体;轻链; CDR3-IMGT
[0111] <400> 12
[0112] Gln Gln Tyr Tyr Ser Ile Pro Trp Thr
[0113] 1 5
[0114] <210> 13
[0115] <211> 5
[0116] <212> PRT

[0117] <213> 人工序列
 [0118] <220>
 [0119] <223> VT008-AL6-14G1抗体;重链; CDR1-Kabat
 [0120] <400> 13
 [0121] Asn Tyr Trp Met Tyr
 [0122] 1 5
 [0123] <210> 14
 [0124] <211> 17
 [0125] <212> PRT
 [0126] <213> 人工序列
 [0127] <220>
 [0128] <223> VT008-AL6-14G1抗体;重链; CDR2-Kabat
 [0129] <400> 14
 [0130] Trp Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 [0131] 1 5 10 15
 [0132] Ser
 [0133] <210> 15
 [0134] <211> 7
 [0135] <212> PRT
 [0136] <213> 人工序列
 [0137] <220>
 [0138] <223> VT008-AL6-14G1抗体;重链; CDR3-Kabat
 [0139] <400> 15
 [0140] Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr
 [0141] 1 5
 [0142] <210> 16
 [0143] <211> 8
 [0144] <212> PRT
 [0145] <213> 人工序列
 [0146] <220>
 [0147] <223> VT008-AL6-14G1抗体;重链; CDR1-IMGT
 [0148] <400> 16
 [0149] Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp
 [0150] 1 5
 [0151] <210> 17
 [0152] <211> 8
 [0153] <212> PRT
 [0154] <213> 人工序列
 [0155] <220>

[0156] <223> VT008-AL6-14G1抗体;重链; CDR2-IMGT
[0157] <400> 17
[0158] Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr
[0159] 1 5
[0160] <210> 18
[0161] <211> 9
[0162] <212> PRT
[0163] <213> 人工序列
[0164] <220>
[0165] <223> VT008-AL6-14G1抗体;重链; CDR3-IMGT
[0166] <400> 18
[0167] Ala Arg Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr
[0168] 1 5
[0169] <210> 19
[0170] <211> 16
[0171] <212> PRT
[0172] <213> 人工序列
[0173] <220>
[0174] <223> VT008-AL6-16K1抗体;轻链; CDR1-Kabat
[0175] <400> 19
[0176] Arg Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
[0177] 1 5 10 15
[0178] <210> 20
[0179] <211> 7
[0180] <212> PRT
[0181] <213> 人工序列
[0182] <220>
[0183] <223> VT008-AL6-16K1抗体;轻链; CDR2-Kabat
[0184] <400> 20
[0185] Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
[0186] 1 5
[0187] <210> 21
[0188] <211> 9
[0189] <212> PRT
[0190] <213> 人工序列
[0191] <220>
[0192] <223> VT008-AL6-16K1抗体;轻链; CDR3-Kabat
[0193] <400> 21
[0194] Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

[0195]	1	5
[0196]	<210>	22
[0197]	<211>	11
[0198]	<212>	PRT
[0199]	<213>	人工序列
[0200]	<220>	
[0201]	<223>	VT008-AL6-16K1抗体;轻链; CDR1-IMGT
[0202]	<400>	22
[0203]	Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr	
[0204]	1	5 10
[0205]	<210>	23
[0206]	<211>	4
[0207]	<212>	PRT
[0208]	<213>	人工序列
[0209]	<220>	
[0210]	<223>	VT008-AL6-16K1抗体;轻链; CDR2-IMGT
[0211]	<400>	23
[0212]	Lys Val Ser Asn	
[0213]	1	
[0214]	<210>	24
[0215]	<211>	9
[0216]	<212>	PRT
[0217]	<213>	人工序列
[0218]	<220>	
[0219]	<223>	VT008-AL6-16K1抗体;轻链; CDR3-IMGT
[0220]	<400>	24
[0221]	Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr	
[0222]	1	5
[0223]	<210>	25
[0224]	<211>	5
[0225]	<212>	PRT
[0226]	<213>	人工序列
[0227]	<220>	
[0228]	<223>	VT008-AL6-18G1抗体;重链; CDR1-Kabat
[0229]	<400>	25
[0230]	Asn Tyr Trp Ile His	
[0231]	1	5
[0232]	<210>	26
[0233]	<211>	17

[0234] <212> PRT
[0235] <213> 人工序列
[0236] <220>
[0237] <223> VT008-AL6-18G1抗体;重链; CDR2-Kabat
[0238] <400> 26
[0239] Arg Ile Asp Pro Asn Thr Val Asp Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[0240] 1 5 10 15
[0241] Ser
[0242] <210> 27
[0243] <211> 7
[0244] <212> PRT
[0245] <213> 人工序列
[0246] <220>
[0247] <223> VT008-AL6-18G1抗体;重链; CDR3-Kabat
[0248] <400> 27
[0249] Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr
[0250] 1 5
[0251] <210> 28
[0252] <211> 8
[0253] <212> PRT
[0254] <213> 人工序列
[0255] <220>
[0256] <223> VT008-AL6-18G1抗体;重链; CDR1-IMGT
[0257] <400> 28
[0258] Gly Tyr Thr Phe Ile Asn Tyr Trp
[0259] 1 5
[0260] <210> 29
[0261] <211> 8
[0262] <212> PRT
[0263] <213> 人工序列
[0264] <220>
[0265] <223> VT008-AL6-18G1抗体;重链; CDR2-IMGT
[0266] <400> 29
[0267] Ile Asp Pro Asn Thr Val Asp Ala
[0268] 1 5
[0269] <210> 30
[0270] <211> 9
[0271] <212> PRT
[0272] <213> 人工序列

[0273] <220>
[0274] <223> VT008-AL6-18G1抗体;重链; CDR3-IMGT
[0275] <400> 30
[0276] Ser Arg Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr
[0277] 1 5
[0278] <210> 31
[0279] <211> 7
[0280] <212> PRT
[0281] <213> 人工序列
[0282] <220>
[0283] <223> VT008-AL6-18K21抗体;轻链; CDR1-Kabat
[0284] <400> 31
[0285] Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
[0286] 1 5
[0287] <210> 32
[0288] <211> 7
[0289] <212> PRT
[0290] <213> 人工序列
[0291] <220>
[0292] <223> VT008-AL6-18K21抗体;轻链; CDR2-Kabat
[0293] <400> 32
[0294] Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
[0295] 1 5
[0296] <210> 33
[0297] <211> 9
[0298] <212> PRT
[0299] <213> 人工序列
[0300] <220>
[0301] <223> VT008-AL6-18K21抗体;轻链; CDR3-Kabat
[0302] <400> 33
[0303] Phe Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
[0304] 1 5
[0305] <210> 34
[0306] <211> 11
[0307] <212> PRT
[0308] <213> 人工序列
[0309] <220>
[0310] <223> VT008-AL6-18K21抗体;轻链; CDR1-IMGT
[0311] <400> 34

[0312]	Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
[0313]	1 5 10
[0314]	<210> 35
[0315]	<211> 4
[0316]	<212> PRT
[0317]	<213> 人工序列
[0318]	<220>
[0319]	<223> VT008-AL6-18K21抗体;轻链; CDR2-IMGT
[0320]	<400> 35
[0321]	Lys Val Ser Asn
[0322]	1
[0323]	<210> 36
[0324]	<211> 9
[0325]	<212> PRT
[0326]	<213> 人工序列
[0327]	<220>
[0328]	<223> VL008-AL6-18K21抗体;轻链; CDR3-IMGT
[0329]	<400> 36
[0330]	Phe Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
[0331]	1 5
[0332]	<210> 37
[0333]	<211> 5
[0334]	<212> PRT
[0335]	<213> 人工序列
[0336]	<220>
[0337]	<223> VL008-AL17-7G1抗体;重链; CDR1-Kabat
[0338]	<400> 37
[0339]	Asp Tyr Tyr Ile Asn
[0340]	1 5
[0341]	<210> 38
[0342]	<211> 17
[0343]	<212> PRT
[0344]	<213> 人工序列
[0345]	<220>
[0346]	<223> VL008-AL17-7G1抗体;重链; CDR2-Kabat
[0347]	<400> 38
[0348]	Trp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe Lys
[0349]	1 5 10 15
[0350]	Gly

[0390] <213> 人工序列
 [0391] <220>
 [0392] <223> VL008-AL17-7K6抗体;轻链; CDR1-Kabat
 [0393] <400> 43
 [0394] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Asn Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 [0395] 1 5 10 15
 [0396] Ala
 [0397] <210> 44
 [0398] <211> 7
 [0399] <212> PRT
 [0400] <213> 人工序列
 [0401] <220>
 [0402] <223> VL008-AL17-7K6抗体;轻链; CDR2-Kabat
 [0403] <400> 44
 [0404] Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 [0405] 1 5
 [0406] <210> 45
 [0407] <211> 9
 [0408] <212> PRT
 [0409] <213> 人工序列
 [0410] <220>
 [0411] <223> VL008-AL17-7K6抗体;轻链; CDR3-Kabat
 [0412] <400> 45
 [0413] Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr
 [0414] 1 5
 [0415] <210> 46
 [0416] <211> 12
 [0417] <212> PRT
 [0418] <213> 人工序列
 [0419] <220>
 [0420] <223> VL008-AL17-7K6抗体;轻链; CDR1-IMGT
 [0421] <400> 46
 [0422] Gln Ser Leu Leu Asn Ser Asn Asn Gln Lys Asn Tyr
 [0423] 1 5 10
 [0424] <210> 47
 [0425] <211> 4
 [0426] <212> PRT
 [0427] <213> 人工序列
 [0428] <220>

[0429] <223> VL008-AL17-7K6抗体;轻链; CDR2-IMGT
[0430] <400> 47
[0431] Phe Ala Ser Thr
[0432] 1
[0433] <210> 48
[0434] <211> 9
[0435] <212> PRT
[0436] <213> 人工序列
[0437] <220>
[0438] <223> VL008-AL17-7K6抗体;轻链; CDR3-IMGT
[0439] <400> 48
[0440] Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr
[0441] 1 5
[0442] <210> 49
[0443] <211> 5
[0444] <212> PRT
[0445] <213> 人工序列
[0446] <220>
[0447] <223> VL008-AL18-14G4抗体;重链; CDR1-Kabat
[0448] <400> 49
[0449] Asp Tyr Tyr Ile Asn
[0450] 1 5
[0451] <210> 50
[0452] <211> 17
[0453] <212> PRT
[0454] <213> 人工序列
[0455] <220>
[0456] <223> VL008-AL18-14G4抗体;重链; CDR2-Kabat
[0457] <400> 50
[0458] Arg Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe Lys
[0459] 1 5 10 15
[0460] Gly
[0461] <210> 51
[0462] <211> 9
[0463] <212> PRT
[0464] <213> 人工序列
[0465] <220>
[0466] <223> VL008-AL18-14G4抗体;重链; CDR3-Kabat
[0467] <400> 51

[0468]	Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr
[0469]	1 5
[0470]	<210> 52
[0471]	<211> 8
[0472]	<212> PRT
[0473]	<213> 人工序列
[0474]	<220>
[0475]	<223> VL008-AL18-14G4抗体;重链; CDR1-IMGT
[0476]	<400> 52
[0477]	Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Tyr
[0478]	1 5
[0479]	<210> 53
[0480]	<211> 8
[0481]	<212> PRT
[0482]	<213> 人工序列
[0483]	<220>
[0484]	<223> VL008-AL18-14G4抗体;重链; CDR2-IMGT
[0485]	<400> 53
[0486]	Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr
[0487]	1 5
[0488]	<210> 54
[0489]	<211> 11
[0490]	<212> PRT
[0491]	<213> 人工序列
[0492]	<220>
[0493]	<223> VL008-AL18-14G4抗体;重链; CDR3-IMGT
[0494]	<400> 54
[0495]	Ala Arg Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr
[0496]	1 5 10
[0497]	<210> 55
[0498]	<211> 17
[0499]	<212> PRT
[0500]	<213> 人工序列
[0501]	<220>
[0502]	<223> VL008-AL18-14K1抗体;轻链; CDR1-Kabat
[0503]	<400> 55
[0504]	Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu
[0505]	1 5 10 15
[0506]	Ala

[0507] <210> 56
[0508] <211> 7
[0509] <212> PRT
[0510] <213> 人工序列
[0511] <220>
[0512] <223> VL008-AL18-14K1抗体;轻链; CDR2-Kabat
[0513] <400> 56
[0514] Phe Ala Ser Thr Lys Glu Ser
[0515] 1 5
[0516] <210> 57
[0517] <211> 9
[0518] <212> PRT
[0519] <213> 人工序列
[0520] <220>
[0521] <223> VL008-AL18-14K1抗体;轻链; CDR3-Kabat
[0522] <400> 57
[0523] Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
[0524] 1 5
[0525] <210> 58
[0526] <211> 12
[0527] <212> PRT
[0528] <213> 人工序列
[0529] <220>
[0530] <223> VL008-AL18-14K1抗体;轻链; CDR1-IMGT
[0531] <400> 58
[0532] Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ile Asp Gln Lys Asn Tyr
[0533] 1 5 10
[0534] <210> 59
[0535] <211> 4
[0536] <212> PRT
[0537] <213> 人工序列
[0538] <220>
[0539] <223> VL008-AL18-14K1抗体;轻链; CDR2-IMGT
[0540] <400> 59
[0541] Phe Ala Ser Thr
[0542] 1
[0543] <210> 60
[0544] <211> 9
[0545] <212> PRT

[0546] <213> 人工序列
[0547] <220>
[0548] <223> VL008-AL18-14K1抗体;轻链; CDR3-IMGT
[0549] <400> 60
[0550] Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
[0551] 1 5
[0552] <210> 61
[0553] <211> 5
[0554] <212> PRT
[0555] <213> 人工序列
[0556] <220>
[0557] <223> VL008-AL13-8G5抗体;重链; CDR1-Kabat
[0558] <400> 61
[0559] Thr Tyr Trp Met His
[0560] 1 5
[0561] <210> 62
[0562] <211> 17
[0563] <212> PRT
[0564] <213> 人工序列
[0565] <220>
[0566] <223> VL008-AL13-8G5抗体;重链; CDR2-Kabat
[0567] <400> 62
[0568] Met Ile His Pro Asn Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[0569] 1 5 10 15
[0570] Ser
[0571] <210> 63
[0572] <211> 10
[0573] <212> PRT
[0574] <213> 人工序列
[0575] <220>
[0576] <223> VL008-AL13-8G5抗体;重链; CDR3-Kabat
[0577] <400> 63
[0578] Ser His Tyr Tyr Asp Gly His Phe Ser Tyr
[0579] 1 5 10
[0580] <210> 64
[0581] <211> 8
[0582] <212> PRT
[0583] <213> 人工序列
[0584] <220>

[0585] <223> VL008-AL13-8G5抗体;重链; CDR1-IMGT
 [0586] <400> 64
 [0587] Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp
 [0588] 1 5
 [0589] <210> 65
 [0590] <211> 8
 [0591] <212> PRT
 [0592] <213> 人工序列
 [0593] <220>
 [0594] <223> VL008-AL13-8G5抗体;重链; CDR2-IMGT
 [0595] <400> 65
 [0596] Ile His Pro Asn Ser Gly Thr Thr
 [0597] 1 5
 [0598] <210> 66
 [0599] <211> 12
 [0600] <212> PRT
 [0601] <213> 人工序列
 [0602] <220>
 [0603] <223> VL008-AL13-8G5抗体;重链; CDR3-IMGT
 [0604] <400> 66
 [0605] Thr Arg Ser His Tyr Tyr Asp Gly His Phe Ser Tyr
 [0606] 1 5 10
 [0607] <210> 67
 [0608] <211> 17
 [0609] <212> PRT
 [0610] <213> 人工序列
 [0611] <220>
 [0612] <223> VL008-AL13-8K3抗体;轻链; CDR1-Kabat
 [0613] <400> 67
 [0614] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
 [0615] 1 5 10 15
 [0616] Ala
 [0617] <210> 68
 [0618] <211> 7
 [0619] <212> PRT
 [0620] <213> 人工序列
 [0621] <220>
 [0622] <223> VL008-AL13-8K3抗体;轻链; CDR2-Kabat
 [0623] <400> 68

[0624] Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
[0625] 1 5
[0626] <210> 69
[0627] <211> 8
[0628] <212> PRT
[0629] <213> 人工序列
[0630] <220>
[0631] <223> VL008-AL13-8K3抗体;轻链; CDR3-Kabat
[0632] <400> 69
[0633] Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr
[0634] 1 5
[0635] <210> 70
[0636] <211> 12
[0637] <212> PRT
[0638] <213> 人工序列
[0639] <220>
[0640] <223> VL008-AL13-8K3抗体;轻链; CDR1-IMGT
[0641] <400> 70
[0642] Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
[0643] 1 5 10
[0644] <210> 71
[0645] <211> 4
[0646] <212> PRT
[0647] <213> 人工序列
[0648] <220>
[0649] <223> VL008-AL13-8K3抗体;轻链; CDR2-IMGT
[0650] <400> 71
[0651] Trp Ala Ser Thr
[0652] 1
[0653] <210> 72
[0654] <211> 8
[0655] <212> PRT
[0656] <213> 人工序列
[0657] <220>
[0658] <223> VL008-AL13-8K3抗体;轻链; CDR3-IMGT
[0659] <400> 72
[0660] Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr
[0661] 1 5
[0662] <210> 73

[0663] <211> 5
[0664] <212> PRT
[0665] <213> 人工序列
[0666] <220>
[0667] <223> VT008-AL6-10G3抗体;重链; CDR1-Kabat
[0668] <400> 73
[0669] Asn Tyr Trp Ile His
[0670] 1 5
[0671] <210> 74
[0672] <211> 17
[0673] <212> PRT
[0674] <213> 人工序列
[0675] <220>
[0676] <223> VT008-AL6-10G3抗体;重链; CDR2-Kabat
[0677] <400> 74
[0678] Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[0679] 1 5 10 15
[0680] Ser
[0681] <210> 75
[0682] <211> 7
[0683] <212> PRT
[0684] <213> 人工序列
[0685] <220>
[0686] <223> VT008-AL6-10G3抗体;重链; CDR3-Kabat
[0687] <400> 75
[0688] Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr
[0689] 1 5
[0690] <210> 76
[0691] <211> 8
[0692] <212> PRT
[0693] <213> 人工序列
[0694] <220>
[0695] <223> VT008-AL6-10G3抗体;重链; CDR1-IMGT
[0696] <400> 76
[0697] Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp
[0698] 1 5
[0699] <210> 77
[0700] <211> 8
[0701] <212> PRT

[0702] <213> 人工序列
[0703] <220>
[0704] <223> VT008-AL6-10G3抗体;重链; CDR2-IMGT
[0705] <400> 77
[0706] Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr
[0707] 1 5
[0708] <210> 78
[0709] <211> 9
[0710] <212> PRT
[0711] <213> 人工序列
[0712] <220>
[0713] <223> VT008-AL6-10G3抗体;重链; CDR3-IMGT
[0714] <400> 78
[0715] Ala Arg Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr
[0716] 1 5
[0717] <210> 79
[0718] <211> 16
[0719] <212> PRT
[0720] <213> 人工序列
[0721] <220>
[0722] <223> VT008-AL6-10K1抗体;轻链; CDR1-Kabat
[0723] <400> 79
[0724] Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
[0725] 1 5 10 15
[0726] <210> 80
[0727] <211> 7
[0728] <212> PRT
[0729] <213> 人工序列
[0730] <220>
[0731] <223> VT008-AL6-10K1抗体;轻链; CDR2-Kabat
[0732] <400> 80
[0733] Lys Val Ser Tyr Arg Phe Ser
[0734] 1 5
[0735] <210> 81
[0736] <211> 9
[0737] <212> PRT
[0738] <213> 人工序列
[0739] <220>
[0740] <223> VT008-AL6-10K1抗体;轻链; CDR3-Kabat

[0741] <400> 81
[0742] Phe Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
[0743] 1 5
[0744] <210> 82
[0745] <211> 12
[0746] <212> PRT
[0747] <213> 人工序列
[0748] <220>
[0749] <223> VT008-AL6-10K1抗体;轻链; CDR1-IMGT
[0750] <400> 82
[0751] Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Val
[0752] 1 5 10
[0753] <210> 83
[0754] <211> 4
[0755] <212> PRT
[0756] <213> 人工序列
[0757] <220>
[0758] <223> VT008-AL6-10K1抗体;轻链; CDR2-IMGT
[0759] <400> 83
[0760] Lys Val Ser Tyr
[0761] 1
[0762] <210> 84
[0763] <211> 9
[0764] <212> PRT
[0765] <213> 人工序列
[0766] <220>
[0767] <223> VT008-AL6-10K1抗体;轻链; CDR3-IMGT
[0768] <400> 84
[0769] Phe Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
[0770] 1 5
[0771] <210> 85
[0772] <211> 5
[0773] <212> PRT
[0774] <213> 人工序列
[0775] <220>
[0776] <223> VT008-AL6-20G7抗体;重链; CDR1-Kabat
[0777] <400> 85
[0778] Asn Tyr Trp Ile Tyr
[0779] 1 5

93

[0819] <212> PRT
[0820] <213> 人工序列
[0821] <220>
[0822] <223> VT008-AL6-20G7抗体;重链; CDR3-IMGT
[0823] <400> 90
[0824] Ala Arg Gly Gly Phe Thr Met Asp Phe
[0825] 1 5
[0826] <210> 91
[0827] <211> 16
[0828] <212> PRT
[0829] <213> 人工序列
[0830] <220>
[0831] <223> VT008-AL6-20K7抗体;轻链; CDR1-Kabat
[0832] <400> 91
[0833] Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
[0834] 1 5 10 15
[0835] <210> 92
[0836] <211> 7
[0837] <212> PRT
[0838] <213> 人工序列
[0839] <220>
[0840] <223> VT008-AL6-20K7抗体;轻链; CDR2-Kabat
[0841] <400> 92
[0842] Lys Val Ser Tyr Arg Phe Ser
[0843] 1 5
[0844] <210> 93
[0845] <211> 9
[0846] <212> PRT
[0847] <213> 人工序列
[0848] <220>
[0849] <223> VT008-AL6-20K7抗体;轻链; CDR3-Kabat
[0850] <400> 93
[0851] Ser Gln Gly Thr His Val Pro Tyr Thr
[0852] 1 5
[0853] <210> 94
[0854] <211> 11
[0855] <212> PRT
[0856] <213> 人工序列
[0857] <220>

[0858] <223> VT008-AL6-20K7抗体;轻链; CDR1-IMGT
[0859] <400> 94
[0860] Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
[0861] 1 5 10
[0862] <210> 95
[0863] <211> 4
[0864] <212> PRT
[0865] <213> 人工序列
[0866] <220>
[0867] <223> VT008-AL6-20K7抗体;轻链; CDR2-IMGT
[0868] <400> 95
[0869] Lys Val Ser Tyr
[0870] 1
[0871] <210> 96
[0872] <211> 9
[0873] <212> PRT
[0874] <213> 人工序列
[0875] <220>
[0876] <223> VT008-AL6-20K7抗体;轻链; CDR3-IMGT
[0877] <400> 96
[0878] Ser Gln Gly Thr His Val Pro Tyr Thr
[0879] 1 5
[0880] <210> 97
[0881] <211> 5
[0882] <212> PRT
[0883] <213> 人工序列
[0884] <220>
[0885] <223> VT008-AL6-39G2抗体;重链; CDR1-Kabat
[0886] <400> 97
[0887] Gly Tyr Asn Ile Tyr
[0888] 1 5
[0889] <210> 98
[0890] <211> 17
[0891] <212> PRT
[0892] <213> 人工序列
[0893] <220>
[0894] <223> VT008-AL6-39G2抗体;重链; CDR2-Kabat
[0895] <400> 98
[0896] Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Ile Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

[0897]	1	5	10	15
[0898]	Asp			
[0899]	<210> 99			
[0900]	<211> 7			
[0901]	<212> PRT			
[0902]	<213> 人工序列			
[0903]	<220>			
[0904]	<223> VT008-AL6-39G2抗体;重链; CDR3-Kabat			
[0905]	<400> 99			
[0906]	Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr			
[0907]	1	5		
[0908]	<210> 100			
[0909]	<211> 8			
[0910]	<212> PRT			
[0911]	<213> 人工序列			
[0912]	<220>			
[0913]	<223> VT008-AL6-39G2抗体;重链; CDR1-IMGT			
[0914]	<400> 100			
[0915]	Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn			
[0916]	1	5		
[0917]	<210> 101			
[0918]	<211> 8			
[0919]	<212> PRT			
[0920]	<213> 人工序列			
[0921]	<220>			
[0922]	<223> VT008-AL6-39G2抗体;重链; CDR2-IMGT			
[0923]	<400> 101			
[0924]	Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Ile Ser			
[0925]	1	5		
[0926]	<210> 102			
[0927]	<211> 9			
[0928]	<212> PRT			
[0929]	<213> 人工序列			
[0930]	<220>			
[0931]	<223> VT008-AL6-39G2抗体;重链; CDR3-IMGT			
[0932]	<400> 102			
[0933]	Ala Arg Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr			
[0934]	1	5		
[0935]	<210> 103			

[0936]	<211>	16
[0937]	<212>	PRT
[0938]	<213>	人工序列
[0939]	<220>	
[0940]	<223>	VT008-AL6-39K2抗体;轻链; CDR1-Kabat
[0941]	<400>	103
[0942]	Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Lys Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His	
[0943]	1	5 10 15
[0944]	<210>	104
[0945]	<211>	7
[0946]	<212>	PRT
[0947]	<213>	人工序列
[0948]	<220>	
[0949]	<223>	VT008-AL6-39K2抗体;轻链; CDR2-Kabat
[0950]	<400>	104
[0951]	Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser	
[0952]	1	5
[0953]	<210>	105
[0954]	<211>	9
[0955]	<212>	PRT
[0956]	<213>	人工序列
[0957]	<220>	
[0958]	<223>	VT008-AL6-39K2抗体;轻链; CDR3-Kabat
[0959]	<400>	105
[0960]	Ser Gln Thr Thr His Val Pro Tyr Thr	
[0961]	1	5
[0962]	<210>	106
[0963]	<211>	11
[0964]	<212>	PRT
[0965]	<213>	人工序列
[0966]	<220>	
[0967]	<223>	VT008-AL6-39K2抗体;轻链; CDR1-IMGT
[0968]	<400>	106
[0969]	Gln Ser Leu Val Lys Ser Asn Gly Asn Thr Tyr	
[0970]	1	5 10
[0971]	<210>	107
[0972]	<211>	4
[0973]	<212>	PRT
[0974]	<213>	人工序列

[0975] <220>
 [0976] <223> VT008-AL6-39K2抗体;轻链; CDR2-IMGT
 [0977] <400> 107
 [0978] Lys Val Ser Asn
 [0979] 1
 [0980] <210> 108
 [0981] <211> 9
 [0982] <212> PRT
 [0983] <213> 人工序列
 [0984] <220>
 [0985] <223> VT008-AL6-39K2抗体;轻链; CDR3-IMGT
 [0986] <400> 108
 [0987] Ser Gln Thr Thr His Val Pro Tyr Thr
 [0988] 1 5
 [0989] <210> 109
 [0990] <211> 5
 [0991] <212> PRT
 [0992] <213> 人工序列
 [0993] <220>
 [0994] <223> VL008-AL17-8G5抗体;重链; CDR1-Kabat
 [0995] <400> 109
 [0996] Asp Tyr Tyr Ile Asn
 [0997] 1 5
 [0998] <210> 110
 [0999] <211> 17
 [1000] <212> PRT
 [1001] <213> 人工序列
 [1002] <220>
 [1003] <223> VL008-AL17-8G5抗体;重链; CDR2-Kabat
 [1004] <400> 110
 [1005] Trp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe Lys
 [1006] 1 5 10 15
 [1007] Gly
 [1008] <210> 111
 [1009] <211> 14
 [1010] <212> PRT
 [1011] <213> 人工序列
 [1012] <220>
 [1013] <223> VL008-AL17-8G5抗体;重链; CDR3-Kabat

[1014]	<400> 111
[1015]	Pro Tyr Tyr Gly Ser Arg Trp Asp Tyr Thr Met Asp Tyr Val
[1016]	1 5 10
[1017]	<210> 112
[1018]	<211> 8
[1019]	<212> PRT
[1020]	<213> 人工序列
[1021]	<220>
[1022]	<223> VL008-AL17-8G5抗体;重链; CDR1-IMGT
[1023]	<400> 112
[1024]	Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
[1025]	1 5
[1026]	<210> 113
[1027]	<211> 8
[1028]	<212> PRT
[1029]	<213> 人工序列
[1030]	<220>
[1031]	<223> VL008-AL17-8G5抗体;重链; CDR2-IMGT
[1032]	<400> 113
[1033]	Ile Phe Pro Gly Ser Gly Leu Thr
[1034]	1 5
[1035]	<210> 114
[1036]	<211> 15
[1037]	<212> PRT
[1038]	<213> 人工序列
[1039]	<220>
[1040]	<223> VL008-AL17-8G5抗体;重链; CDR3-IMGT
[1041]	<400> 114
[1042]	Ala Arg Pro Tyr Tyr Gly Ser Arg Trp Asp Tyr Thr Met Asp Tyr
[1043]	1 5 10 15
[1044]	<210> 115
[1045]	<211> 17
[1046]	<212> PRT
[1047]	<213> 人工序列
[1048]	<220>
[1049]	<223> VL008-AL17-8K7抗体;轻链; CDR1-Kabat
[1050]	<400> 115
[1051]	Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Asn Ser Asn Asn Gln Lys Asn His Leu
[1052]	1 5 10 15

[1053] Ala
[1054] <210> 116
[1055] <211> 7
[1056] <212> PRT
[1057] <213> 人工序列
[1058] <220>
[1059] <223> VL008-AL17-8K7抗体;轻链; CDR2-Kabat
[1060] <400> 116
[1061] Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser
[1062] 1 5
[1063] <210> 117
[1064] <211> 9
[1065] <212> PRT
[1066] <213> 人工序列
[1067] <220>
[1068] <223> VL008-AL17-8K7抗体;轻链; CDR3-Kabat
[1069] <400> 117
[1070] Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr
[1071] 1 5
[1072] <210> 118
[1073] <211> 12
[1074] <212> PRT
[1075] <213> 人工序列
[1076] <220>
[1077] <223> VL008-AL17-8K7抗体;轻链; CDR1-IMGT
[1078] <400> 118
[1079] Gln Asn Leu Leu Asn Ser Asn Asn Gln Lys Asn His
[1080] 1 5 10
[1081] <210> 119
[1082] <211> 4
[1083] <212> PRT
[1084] <213> 人工序列
[1085] <220>
[1086] <223> VL008-AL17-8K7抗体;轻链; CDR2-IMGT
[1087] <400> 119
[1088] Phe Ala Ser Thr
[1089] 1
[1090] <210> 120
[1091] <211> 9

[1092]	<212>	PRT
[1093]	<213>	人工序列
[1094]	<220>	
[1095]	<223>	VL008-AL17-8K7抗体;轻链; CDR3-IMGT
[1096]	<400>	120
[1097]	Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr	
[1098]	1	5
[1099]	<210>	121
[1100]	<211>	120
[1101]	<212>	PRT
[1102]	<213>	人工序列
[1103]	<220>	
[1104]	<223>	VT008-AL5-10G7抗体;可变区重链
[1105]	<400>	121
[1106]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Met Pro Gly Ser	
[1107]	1	5 10 15
[1108]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr	
[1109]	20	25 30
[1110]	Trp Met His Trp Val Lys Arg Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[1111]	35	40 45
[1112]	Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asp Thr Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe	
[1113]	50	55 60
[1114]	Lys Gly Lys Ser Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
[1115]	65	70 75 80
[1116]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	
[1117]	85	90 95
[1118]	Ala Arg Val Ala Thr Met Val Ala Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln	
[1119]	100	105 110
[1120]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
[1121]	115	120
[1122]	<210>	122
[1123]	<211>	107
[1124]	<212>	PRT
[1125]	<213>	人工序列
[1126]	<220>	
[1127]	<223>	VT008-AL5-10K7抗体;可变区轻链
[1128]	<400>	122
[1129]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly	
[1130]	1	5 10 15

[1131]	Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Gly Ala
[1132]	20 25 30
[1133]	Val Val Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ser Pro Asn Leu Leu Ile
[1134]	35 40 45
[1135]	Tyr Leu Ala Thr Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
[1136]	50 55 60
[1137]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Val Gln Ala
[1138]	65 70 75 80
[1139]	Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Ile Pro Trp
[1140]	85 90 95
[1141]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1142]	100 105
[1143]	<210> 123
[1144]	<211> 116
[1145]	<212> PRT
[1146]	<213> 人工序列
[1147]	<220>
[1148]	<223> VT008-AL6-14G1抗体;可变区重链
[1149]	<400> 123
[1150]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[1151]	1 5 10 15
[1152]	Ser Leu Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
[1153]	20 25 30
[1154]	Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
[1155]	35 40 45
[1156]	Gly Trp Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[1157]	50 55 60
[1158]	Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr
[1159]	65 70 75 80
[1160]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Asn Cys
[1161]	85 90 95
[1162]	Ala Arg Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
[1163]	100 105 110
[1164]	Thr Val Ser Ser
[1165]	115
[1166]	<210> 124
[1167]	<211> 112
[1168]	<212> PRT
[1169]	<213> 人工序列

[1170]	<220>
[1171]	<223> VT008-AL6-16K1抗体;可变区轻链
[1172]	<400> 124
[1173]	Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
[1174]	1 5 10 15
[1175]	Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser
[1176]	20 25 30
[1177]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[1178]	35 40 45
[1179]	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[1180]	50 55 60
[1181]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[1182]	65 70 75 80
[1183]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
[1184]	85 90 95
[1185]	Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[1186]	100 105 110
[1187]	<210> 125
[1188]	<211> 116
[1189]	<212> PRT
[1190]	<213> 人工序列
[1191]	<220>
[1192]	<223> VT008-AL6-18G1抗体;可变区重链
[1193]	<400> 125
[1194]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
[1195]	1 5 10 15
[1196]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Asn Tyr
[1197]	20 25 30
[1198]	Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
[1199]	35 40 45
[1200]	Gly Arg Ile Asp Pro Asn Thr Val Asp Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[1201]	50 55 60
[1202]	Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Ile Ala Tyr
[1203]	65 70 75 80
[1204]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[1205]	85 90 95
[1206]	Ser Arg Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
[1207]	100 105 110
[1208]	Thr Val Ser Ser

[1209]	115															
[1210]	<210> 126															
[1211]	<211> 112															
[1212]	<212> PRT															
[1213]	<213> 人工序列															
[1214]	<220>															
[1215]	<223> VT008-AL6-18K21抗体;可变区轻链															
[1216]	<400> 126															
[1217]	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly
[1218]	1			5					10					15		
[1219]	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
[1220]				20				25					30			
[1221]	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
[1222]			35					40					45			
[1223]	Pro	Thr	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
[1224]		50					55				60					
[1225]	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
[1226]	65				70					75				80		
[1227]	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Ile	Tyr	Phe	Cys	Phe	Gln	Ser
[1228]				85					90					95		
[1229]	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
[1230]			100						105				110			
[1231]	<210> 127															
[1232]	<211> 122															
[1233]	<212> PRT															
[1234]	<213> 人工序列															
[1235]	<220>															
[1236]	<223> VL008-AL17-7K6抗体;可变区轻链															
[1237]	<400> 127															
[1238]	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
[1239]	1			5					10					15		
[1240]	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Val	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
[1241]			20					25					30			
[1242]	Tyr	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
[1243]			35					40					45			
[1244]	Gly	Trp	Ile	Phe	Pro	Gly	Ser	Gly	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Lys	Lys	Phe
[1245]		50					55				60					
[1246]	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
[1247]	65			70						75				80		

[1248]	Met	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
[1249]					85					90					95	
[1250]	Ala	Arg	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Arg	Trp	Asp	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp
[1251]					100					105					110	
[1252]	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
[1253]					115					120						
[1254]	<210>	128														
[1255]	<211>	113														
[1256]	<212>	PRT														
[1257]	<213>	人工序列														
[1258]	<220>															
[1259]	<223>	VL008-AL17-7K6抗体;可变区轻链														
[1260]	<400>	128														
[1261]	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Thr	Met	Ser	Val	Gly
[1262]	1				5					10					15	
[1263]	Gln	Lys	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser
[1264]					20					25					30	
[1265]	Asn	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
[1266]					35					40					45	
[1267]	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Leu	Tyr	Phe	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
[1268]					50					55					60	
[1269]	Pro	Asp	Arg	Phe	Ile	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
[1270]	65					70					75					80
[1271]	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln
[1272]					85						90				95	
[1273]	His	Tyr	Thr	Thr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile
[1274]					100						105				110	
[1275]	Lys															
[1276]	<210>	129														
[1277]	<211>	118														
[1278]	<212>	PRT														
[1279]	<213>	人工序列														
[1280]	<220>															
[1281]	<223>	VL008-AL18-14G4抗体;可变区重链														
[1282]	<400>	129														
[1283]	Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ala
[1284]	1				5					10					15	
[1285]	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Asp	Tyr
[1286]					20					25					30	

[1287]	Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[1288]	35 40 45
[1289]	Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe
[1290]	50 55 60
[1291]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Glu Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[1292]	65 70 75 80
[1293]	Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
[1294]	85 90 95
[1295]	Ala Arg Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[1296]	100 105 110
[1297]	Ser Val Thr Val Ser Ser
[1298]	115
[1299]	<210> 130
[1300]	<211> 113
[1301]	<212> PRT
[1302]	<213> 人工序列
[1303]	<220>
[1304]	<223> VL008-AL18-14K1抗体;可变区轻链
[1305]	<400> 130
[1306]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Met Ser Val Gly
[1307]	1 5 10 15
[1308]	Gln Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[1309]	20 25 30
[1310]	Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[1311]	35 40 45
[1312]	Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
[1313]	50 55 60
[1314]	Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[1315]	65 70 75 80
[1316]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln
[1317]	85 90 95
[1318]	His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[1319]	100 105 110
[1320]	Lys
[1321]	<210> 131
[1322]	<211> 119
[1323]	<212> PRT
[1324]	<213> 人工序列
[1325]	<220>

[1326]	<223> VL008-AL13-8G5抗体;可变区重链															
[1327]	<400> 131															
[1328]	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
[1329]	1				5					10					15	
[1330]	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Thr	Tyr
[1331]					20					25					30	
[1332]	Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[1333]					35					40					45	
[1334]	Gly	Met	Ile	His	Pro	Asn	Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
[1335]					50					55					60	
[1336]	Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Tyr
[1337]	65					70					75					80
[1338]	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[1339]					85					90						95
[1340]	Thr	Arg	Ser	His	Tyr	Tyr	Asp	Gly	His	Phe	Ser	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
[1341]					100					105					110	
[1342]	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala									
[1343]					115											
[1344]	<210> 132															
[1345]	<211> 112															
[1346]	<212> PRT															
[1347]	<213> 人工序列															
[1348]	<220>															
[1349]	<223> VL008-AL13-8K3抗体;可变区轻链															
[1350]	<400> 132															
[1351]	Asp	Ile	Val	Met	Ser	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Ala	Gly
[1352]	1				5					10					15	
[1353]	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser
[1354]					20					25					30	
[1355]	Arg	Thr	Arg	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
[1356]					35					40					45	
[1357]	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
[1358]					50					55					60	
[1359]	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
[1360]	65					70					75					80
[1361]	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Lys	Gln
[1362]					85					90					95	
[1363]	Ser	Tyr	Asn	Leu	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys
[1364]					100					105					110	

[1365]	<210>	133
[1366]	<211>	116
[1367]	<212>	PRT
[1368]	<213>	人工序列
[1369]	<220>	
[1370]	<223>	VT008-AL6-10G3抗体;可变区重链
[1371]	<400>	133
[1372]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
[1373]	1	5 10 15
[1374]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr	
[1375]	20 25 30	
[1376]	Trp Ile His Trp Leu Asn Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile	
[1377]	35 40 45	
[1378]	Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe	
[1379]	50 55 60	
[1380]	Lys Ser Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Thr Tyr	
[1381]	65 70 75 80	
[1382]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
[1383]	85 90 95	
[1384]	Ala Arg Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val	
[1385]	100 105 110	
[1386]	Thr Val Ser Ser	
[1387]	115	
[1388]	<210>	134
[1389]	<211>	112
[1390]	<212>	PRT
[1391]	<213>	人工序列
[1392]	<220>	
[1393]	<223>	VT008-AL6-10K1抗体;可变区轻链
[1394]	<400>	134
[1395]	Asp Val Val Met Pro Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly	
[1396]	1	5 10 15
[1397]	Asp His Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser	
[1398]	20 25 30	
[1399]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
[1400]	35 40 45	
[1401]	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Tyr Arg Phe Ser Gly Val Pro	
[1402]	50 55 60	
[1403]	Asp Arg Ile Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	

[1404]	65	70	75	80
[1405]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Ser			
[1406]		85	90	95
[1407]	Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[1408]		100	105	110
[1409]	<210> 135			
[1410]	<211> 116			
[1411]	<212> PRT			
[1412]	<213> 人工序列			
[1413]	<220>			
[1414]	<223> VT008-AL6-20G7抗体;可变区重链			
[1415]	<400> 135			
[1416]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala			
[1417]	1	5	10	15
[1418]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Asn Tyr			
[1419]		20	25	30
[1420]	Trp Ile Tyr Trp Val Lys Glu Arg Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile			
[1421]		35	40	45
[1422]	Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Asp Asp Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe			
[1423]		50	55	60
[1424]	Arg Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr			
[1425]	65	70	75	80
[1426]	Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Asn Asp Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys			
[1427]		85	90	95
[1428]	Ala Arg Gly Gly Phe Thr Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val			
[1429]		100	105	110
[1430]	Thr Val Ser Ser			
[1431]		115		
[1432]	<210> 136			
[1433]	<211> 112			
[1434]	<212> PRT			
[1435]	<213> 人工序列			
[1436]	<220>			
[1437]	<223> VT008-AL6-20K7抗体;可变区轻链			
[1438]	<400> 136			
[1439]	Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly			
[1440]	1	5	10	15
[1441]	Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser			
[1442]		20	25	30

[1443]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[1444]	35 40 45
[1445]	Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Tyr Arg Phe Ser Gly Val Pro
[1446]	50 55 60
[1447]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[1448]	65 70 75 80
[1449]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly
[1450]	85 90 95
[1451]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1452]	100 105 110
[1453]	<210> 137
[1454]	<211> 116
[1455]	<212> PRT
[1456]	<213> 人工序列
[1457]	<220>
[1458]	<223> VT008-AL6-39G2抗体;可变区重链
[1459]	<400> 137
[1460]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[1461]	1 5 10 15
[1462]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
[1463]	20 25 30
[1464]	Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Asn Ile Leu Asp Trp Ile
[1465]	35 40 45
[1466]	Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Ile Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
[1467]	50 55 60
[1468]	Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
[1469]	65 70 75 80
[1470]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[1471]	85 90 95
[1472]	Ala Arg Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr Gly Gly Gln Gly Thr Ser Val
[1473]	100 105 110
[1474]	Thr Val Ser Ser
[1475]	115
[1476]	<210> 138
[1477]	<211> 112
[1478]	<212> PRT
[1479]	<213> 人工序列
[1480]	<220>
[1481]	<223> VT008-AL6-39K2抗体;可变区轻链

[1482]	<400> 138
[1483]	Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
[1484]	1 5 10 15
[1485]	Glu Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Lys Ser
[1486]	20 25 30
[1487]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[1488]	35 40 45
[1489]	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[1490]	50 55 60
[1491]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[1492]	65 70 75 80
[1493]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Phe Cys Ser Gln Thr
[1494]	85 90 95
[1495]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1496]	100 105 110
[1497]	<210> 139
[1498]	<211> 122
[1499]	<212> PRT
[1500]	<213> 人工序列
[1501]	<220>
[1502]	<223> VL008-AL17-8G5抗体;可变区重链
[1503]	<400> 139
[1504]	Leu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
[1505]	1 5 10 15
[1506]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[1507]	20 25 30
[1508]	Tyr Ile Asn Trp Val Gln Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
[1509]	35 40 45
[1510]	Gly Trp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe
[1511]	50 55 60
[1512]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
[1513]	65 70 75 80
[1514]	Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
[1515]	85 90 95
[1516]	Ala Arg Pro Tyr Tyr Gly Ser Arg Trp Asp Tyr Thr Met Asp Tyr Trp
[1517]	100 105 110
[1518]	Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[1519]	115 120
[1520]	<210> 140

[1521]	<211>	113
[1522]	<212>	PRT
[1523]	<213>	人工序列
[1524]	<220>	
[1525]	<223>	VL008-AL17-8K7抗体;可变区轻链
[1526]	<400>	140
[1527]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Met Ser Val Gly	
[1528]	1 5 10 15	
[1529]	Gln Lys Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Asn Ser	
[1530]	20 25 30	
[1531]	Asn Asn Gln Lys Asn His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
[1532]	35 40 45	
[1533]	Ser Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val	
[1534]	50 55 60	
[1535]	Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	
[1536]	65 70 75 80	
[1537]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln	
[1538]	85 90 95	
[1539]	His Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile	
[1540]	100 105 110	
[1541]	Lys	
[1542]	<210>	141
[1543]	<211>	118
[1544]	<212>	PRT
[1545]	<213>	人工序列
[1546]	<220>	
[1547]	<223>	VL008-AL18-14G4抗体;人源化可变区重链;
[1548]	VH1	
[1549]	<400>	141
[1550]	Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr	
[1551]	1 5 10 15	
[1552]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr	
[1553]	20 25 30	
[1554]	Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[1555]	35 40 45	
[1556]	Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe	
[1557]	50 55 60	
[1558]	Lys Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr	
[1559]	65 70 75 80	

[1560]	Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[1561]	85 90 95
[1562]	Ala Arg Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[1563]	100 105 110
[1564]	Leu Val Thr Val Ser Ser
[1565]	115
[1566]	<210> 142
[1567]	<211> 118
[1568]	<212> PRT
[1569]	<213> 人工序列
[1570]	<220>
[1571]	<223> VL008-AL18-14G4抗体;人源化可变区重链;
[1572]	VH2
[1573]	<400> 142
[1574]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[1575]	1 5 10 15
[1576]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
[1577]	20 25 30
[1578]	Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[1579]	35 40 45
[1580]	Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe
[1581]	50 55 60
[1582]	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
[1583]	65 70 75 80
[1584]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1585]	85 90 95
[1586]	Ala Arg Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[1587]	100 105 110
[1588]	Leu Val Thr Val Ser Ser
[1589]	115
[1590]	<210> 143
[1591]	<211> 118
[1592]	<212> PRT
[1593]	<213> 人工序列
[1594]	<220>
[1595]	<223> VL008-AL18-14G4抗体;人源化可变区重链;
[1596]	VH3
[1597]	<400> 143
[1598]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

[1599]	1	5	10	15
[1600]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr			
[1601]	20	25	30	
[1602]	Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
[1603]	35	40	45	
[1604]	Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe			
[1605]	50	55	60	
[1606]	Lys Gly Arg Val Thr Val Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala His			
[1607]	65	70	75	80
[1608]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1609]	85	90	95	
[1610]	Ala Arg Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
[1611]	100	105	110	
[1612]	Ala Val Thr Val Ser Ser			
[1613]	115			
[1614]	<210> 144			
[1615]	<211> 118			
[1616]	<212> PRT			
[1617]	<213> 人工序列			
[1618]	<220>			
[1619]	<223> VL008-AL18-14G4抗体;人源化可变区重链;			
[1620]	VH4			
[1621]	<400> 144			
[1622]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser			
[1623]	1	5	10	15
[1624]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr			
[1625]	20	25	30	
[1626]	Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
[1627]	35	40	45	
[1628]	Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe			
[1629]	50	55	60	
[1630]	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
[1631]	65	70	75	80
[1632]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1633]	85	90	95	
[1634]	Ala Arg Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
[1635]	100	105	110	
[1636]	Thr Val Thr Val Ser Ser			
[1637]	115			

[1638]	<210>	145
[1639]	<211>	118
[1640]	<212>	PRT
[1641]	<213>	人工序列
[1642]	<220>	
[1643]	<223>	VL008-AL18-14G4抗体;人源化可变区重链;
[1644]	VH5	
[1645]	<400>	145
[1646]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[1647]	1	5 10 15
[1648]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr	
[1649]	20	25 30
[1650]	Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[1651]	35	40 45
[1652]	Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe	
[1653]	50	55 60
[1654]	Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Tyr Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr	
[1655]	65	70 75 80
[1656]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
[1657]	85	90 95
[1658]	Ala Arg Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
[1659]	100	105 110
[1660]	Thr Val Thr Val Ser Ser	
[1661]	115	
[1662]	<210>	146
[1663]	<211>	113
[1664]	<212>	PRT
[1665]	<213>	人工序列
[1666]	<220>	
[1667]	<223>	VL008-AL18-14K1抗体;人源化可变区轻链;
[1668]	VL1	
[1669]	<400>	146
[1670]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
[1671]	1	5 10 15
[1672]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser	
[1673]	20	25 30
[1674]	Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
[1675]	35	40 45
[1676]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val	

[1677]	50	55	60
[1678]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
[1679]	65	70	75
[1680]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln		80
[1681]	85	90	95
[1682]	His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
[1683]	100	105	110
[1684]	Lys		
[1685]	<210> 147		
[1686]	<211> 113		
[1687]	<212> PRT		
[1688]	<213> 人工序列		
[1689]	<220>		
[1690]	<223> VL008-AL18-14K1抗体;人源化可变区轻链;		
[1691]	VL2		
[1692]	<400> 147		
[1693]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
[1694]	1	5	10
[1695]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser		15
[1696]	20	25	30
[1697]	Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
[1698]	35	40	45
[1699]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val		
[1700]	50	55	60
[1701]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
[1702]	65	70	75
[1703]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln		80
[1704]	85	90	95
[1705]	His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile		
[1706]	100	105	110
[1707]	Lys		
[1708]	<210> 148		
[1709]	<211> 113		
[1710]	<212> PRT		
[1711]	<213> 人工序列		
[1712]	<220>		
[1713]	<223> VL008-AL18-14K1抗体;人源化可变区轻链;		
[1714]	VL3		
[1715]	<400> 148		

[1716]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[1717]	1 5 10 15
[1718]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[1719]	20 25 30
[1720]	Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln
[1721]	35 40 45
[1722]	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
[1723]	50 55 60
[1724]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[1725]	65 70 75 80
[1726]	Ile Asp Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
[1727]	85 90 95
[1728]	His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
[1729]	100 105 110
[1730]	Lys
[1731]	<210> 149
[1732]	<211> 113
[1733]	<212> PRT
[1734]	<213> 人工序列
[1735]	<220>
[1736]	<223> VL008-AL18-14K1抗体;人源化可变区轻链;
[1737]	VL4
[1738]	<400> 149
[1739]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[1740]	1 5 10 15
[1741]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[1742]	20 25 30
[1743]	Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[1744]	35 40 45
[1745]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
[1746]	50 55 60
[1747]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[1748]	65 70 75 80
[1749]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
[1750]	85 90 95
[1751]	His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Ala Lys Val Glu Ile
[1752]	100 105 110
[1753]	Lys
[1754]	<210> 150

[1755]	<211>	113
[1756]	<212>	PRT
[1757]	<213>	人工序列
[1758]	<220>	
[1759]	<223>	VL008-AL18-14K1抗体;人源化可变区轻链;
[1760]	VL5	
[1761]	<400>	150
[1762]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
[1763]	1 5 10 15	
[1764]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser	
[1765]	20 25 30	
[1766]	Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
[1767]	35 40 45	
[1768]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val	
[1769]	50 55 60	
[1770]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	
[1771]	65 70 75 80	
[1772]	Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln	
[1773]	85 90 95	
[1774]	His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile	
[1775]	100 105 110	
[1776]	Arg	
[1777]	<210>	151
[1778]	<211>	323
[1779]	<212>	PRT
[1780]	<213>	智人
[1781]	<400>	151
[1782]	Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly	
[1783]	1 5 10 15	
[1784]	Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe	
[1785]	20 25 30	
[1786]	Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala	
[1787]	35 40 45	
[1788]	Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp	
[1789]	50 55 60	
[1790]	Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp	
[1791]	65 70 75 80	
[1792]	Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala	
[1793]	85 90 95	

[1794]	Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
[1795]	100 105 110
[1796]	Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
[1797]	115 120 125
[1798]	Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu
[1799]	130 135 140
[1800]	Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe
[1801]	145 150 155 160
[1802]	Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr
[1803]	165 170 175
[1804]	Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val
[1805]	180 185 190
[1806]	Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr
[1807]	195 200 205
[1808]	Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His
[1809]	210 215 220
[1810]	Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala
[1811]	225 230 235 240
[1812]	Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu
[1813]	245 250 255
[1814]	Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile
[1815]	260 265 270
[1816]	Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr
[1817]	275 280 285
[1818]	Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys
[1819]	290 295 300
[1820]	Ala Val Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met
[1821]	305 310 315 320
[1822]	Asn Asp Glu
[1823]	<210> 152
[1824]	<211> 7
[1825]	<212> PRT
[1826]	<213> 人工序列
[1827]	<220>
[1828]	<223> VT008-AL18-14K1抗体;轻链; CDR2-Kabat;校正的CD4+ T细胞表位
[1829]	<400> 152
[1830]	Tyr Ala Ser Thr Lys Glu Ser
[1831]	1 5
[1832]	<210> 153

[1833] <211> 4
 [1834] <212> PRT
 [1835] <213> 人工序列
 [1836] <220>
 [1837] <223> VT008-AL18-14K1抗体;轻链; CDR2-IMGT;校正的CD4+ T细胞表位
 [1838] <400> 153
 [1839] Tyr Ala Ser Thr
 [1840] 1
 [1841] <210> 154
 [1842] <211> 113
 [1843] <212> PRT
 [1844] <213> 人工序列
 [1845] <220>
 [1846] <223> VL008-AL18-14K1抗体;可变区轻链;校正的CD4+ T细胞表位
 [1847] <400> 154
 [1848] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Met Ser Val Gly
 [1849] 1 5 10 15
 [1850] Gln Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 [1851] 20 25 30
 [1852] Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 [1853] 35 40 45
 [1854] Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Tyr Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
 [1855] 50 55 60
 [1856] Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 [1857] 65 70 75 80
 [1858] Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln
 [1859] 85 90 95
 [1860] His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 [1861] 100 105 110
 [1862] Lys
 [1863] <210> 155
 [1864] <211> 113
 [1865] <212> PRT
 [1866] <213> 人工序列
 [1867] <220>
 [1868] <223> VL008-AL18-14K1抗体;人源化可变区轻链;
 [1869] VL1; 校正的CD4+ T细胞表位
 [1870] <400> 155
 [1871] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

[1872]	1	5	10	15
[1873]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser			
[1874]	20	25	30	
[1875]	Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
[1876]	35	40	45	
[1877]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val			
[1878]	50	55	60	
[1879]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
[1880]	65	70	75	80
[1881]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln			
[1882]	85	90	95	
[1883]	His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
[1884]	100	105	110	
[1885]	Lys			
[1886]	<210> 156			
[1887]	<211> 113			
[1888]	<212> PRT			
[1889]	<213> 人工序列			
[1890]	<220>			
[1891]	<223> VL008-AL18-14K1抗体;人源化可变区轻链;			
[1892]	VL2;校正的CD4+ T细胞表位			
[1893]	<400> 156			
[1894]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
[1895]	1	5	10	15
[1896]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser			
[1897]	20	25	30	
[1898]	Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
[1899]	35	40	45	
[1900]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val			
[1901]	50	55	60	
[1902]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
[1903]	65	70	75	80
[1904]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln			
[1905]	85	90	95	
[1906]	His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile			
[1907]	100	105	110	
[1908]	Lys			
[1909]	<210> 157			
[1910]	<211> 113			

[1911]	<212>	PRT
[1912]	<213>	人工序列
[1913]	<220>	
[1914]	<223>	VL008-AL18-14K1抗体;人源化可变区轻链;
[1915]		VL3;校正的CD4+ T细胞表位
[1916]	<400>	157
[1917]		Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[1918]	1	5 10 15
[1919]		Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[1920]		20 25 30
[1921]		Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln
[1922]		35 40 45
[1923]		Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
[1924]		50 55 60
[1925]		Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[1926]		65 70 75 80
[1927]		Ile Asp Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
[1928]		85 90 95
[1929]		His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
[1930]		100 105 110
[1931]		Lys
[1932]	<210>	158
[1933]	<211>	113
[1934]	<212>	PRT
[1935]	<213>	人工序列
[1936]	<220>	
[1937]	<223>	VL008-AL18-14K1抗体;人源化可变区轻链;
[1938]		VL4;校正的CD4+ T细胞表位
[1939]	<400>	158
[1940]		Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[1941]	1	5 10 15
[1942]		Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[1943]		20 25 30
[1944]		Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[1945]		35 40 45
[1946]		Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
[1947]		50 55 60
[1948]		Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[1949]		65 70 75 80

[1950]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
[1951]	85 90 95
[1952]	His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Ala Lys Val Glu Ile
[1953]	100 105 110
[1954]	Lys
[1955]	<210> 159
[1956]	<211> 113
[1957]	<212> PRT
[1958]	<213> 人工序列
[1959]	<220>
[1960]	<223> VL008-AL18-14K1抗体;人源化可变区轻链;
[1961]	VL5;校正的CD4+ T细胞表位
[1962]	<400> 159
[1963]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[1964]	1 5 10 15
[1965]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[1966]	20 25 30
[1967]	Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[1968]	35 40 45
[1969]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
[1970]	50 55 60
[1971]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[1972]	65 70 75 80
[1973]	Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
[1974]	85 90 95
[1975]	His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
[1976]	100 105 110
[1977]	Arg
[1978]	<210> 160
[1979]	<211> 153
[1980]	<212> PRT
[1981]	<213> 人工序列
[1982]	<220>
[1983]	<223> hu-sCD47-6His;具有6His-标签的人CD47抗原的胞外域
[1984]	<400> 160
[1985]	Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly
[1986]	1 5 10 15
[1987]	Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
[1988]	20 25 30

[1989]	Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala	
[1990]	35	40
[1991]	Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp	
[1992]	50	55
[1993]	Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp	
[1994]	65	70
[1995]	Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala	
[1996]	85	90
[1997]	Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr	
[1998]	100	105
[1999]	Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu	
[2000]	115	120
[2001]	Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Ala Ser Ser Ser Gly	
[2002]	130	135
[2003]	Ser Ser Ser His His His His His His	
[2004]	145	150
[2005]	<210> 161	
[2006]	<211> 981	
[2007]	<212> DNA	
[2008]	<213> 人工序列	
[2009]	<220>	
[2010]	<223> hu-IgG4 S228P;人IgG4 S228P突变体的核酸序列	
[2011]	<400> 161	
[2012]	gctagcacca agggcccctc tgtgtttcct ctggcccctt gctcccggtc cacctccgaa	60
[2013]	tctacagccg ctctgggctg cctcgtgaaa gactacttcc ccgagcctgt gacagtgtcc	120
[2014]	tggaactctg gcgccctgac cagcggagtg cataccttcc ctgctgtgct gcagtcctcc	180
[2015]	ggcctgtact ccctgtcctc cgctcgtgaca gtgccctcca gctctctggg caccaagacc	240
[2016]	tatacctgca acgtggacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagag agtggaatct	300
[2017]	aagtacggcc ctccctgccc cccttgtcct gcccctgaat ttctgggcgg accctccgtg	360
[2018]	ttcctgttcc ccccaaagcc taaggacacc ctgatgatct cccggacccc cgaagtgacc	420
[2019]	tgcgtggtgg tggatgtgtc tcaggaagat cccgaggtgc agttcaattg gtacgtggac	480
[2020]	ggcgtggaag tgcataatgc caagaccaag cctcgggaag aacagttcaa ctccacctac	540
[2021]	cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggattggc tgaacggcaa agagtacaag	600
[2022]	tgcaaggtgt ccaacaaggg cctgcccagc tccatcgaaa agaccatctc caaggccaag	660
[2023]	ggccagcccc gggaacccca ggtgtacaca ctgcctccat ccaggaaga gatgaccaag	720
[2024]	aaccaggtgt ccttgacctg tctcgtgaag ggattctacc cctccgatat cgccgtggaa	780
[2025]	tgggagtcca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggactcc	840
[2026]	gacggctcct tcttctgtga ctctcgcctg accgtggaca agtcccgggtg gcaggaaggc	900
[2027]	aacgtgttct cctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc	960

[2028]	ctgtctctgt ccctgggcaa g 981
[2029]	<210> 162
[2030]	<211> 327
[2031]	<212> PRT
[2032]	<213> 人工序列
[2033]	<220>
[2034]	<223> huIgG4_S228P;人IgG4 S228P突变体的氨基酸序列
[2035]	<400> 162
[2036]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
[2037]	1 5 10 15
[2038]	Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
[2039]	20 25 30
[2040]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
[2041]	35 40 45
[2042]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[2043]	50 55 60
[2044]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
[2045]	65 70 75 80
[2046]	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
[2047]	85 90 95
[2048]	Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
[2049]	100 105 110
[2050]	Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[2051]	115 120 125
[2052]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[2053]	130 135 140
[2054]	Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[2055]	145 150 155 160
[2056]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
[2057]	165 170 175
[2058]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[2059]	180 185 190
[2060]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
[2061]	195 200 205
[2062]	Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[2063]	210 215 220
[2064]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
[2065]	225 230 235 240
[2066]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

[2067]	245	250	255
[2068]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
[2069]	260	265	270
[2070]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
[2071]	275	280	285
[2072]	Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser		
[2073]	290	295	300
[2074]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
[2075]	305	310	315
[2076]	Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		320
[2077]	325		
[2078]	<210> 163		
[2079]	<211> 981		
[2080]	<212> DNA		
[2081]	<213> 人工序列		
[2082]	<220>		
[2083]	<223> hu-IgG4 S228P-L235E;人IgG4 S228P双突变体的核酸序列		
[2084]	<400> 163		
[2085]	gctagcacca agggcccctc tgtgtttcct ctggcccctt gctcccggtc cacctccgaa	60	
[2086]	tctacagccg ctctgggctg cctcgtgaaa gactacttcc ccgagcctgt gacagtgtcc	120	
[2087]	tggaactctg gcgccttgac cagcggagtg cataccttcc ctgctgtgct gcagtcctcc	180	
[2088]	ggcctgtact ccctgtcctc cgtcgtgaca gtgccctcca gctctctggg caccaagacc	240	
[2089]	tatacctgca acgtggacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagag agtggaatct	300	
[2090]	aagtacggcc ctccctgccc cccttgctct gcccctgaat ttgaaggcgg accctccgtg	360	
[2091]	ttcctgttcc ccccaaagcc taaggacacc ctgatgatct cccggacccc cgaagtgacc	420	
[2092]	tgcgtggtgg tggatgtgtc tcaggaagat cccgaggtgc agttcaattg gtacgtggac	480	
[2093]	ggcgtggaag tgcataatgc caagaccaag cctcgggaag aacagttcaa ctccacctac	540	
[2094]	cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggattggc tgaacggcaa agagtacaag	600	
[2095]	tgcaaggtgt ccaacaaggg cctgcccagc tccatcgaaa agaccatctc caaggccaag	660	
[2096]	ggccagcccc gggaaccca ggtgtacaca ctgcctccat ccaggaaga gatgaccaag	720	
[2097]	aaccaggtgt ccctgacctg tctcgtgaag ggattctacc cctccgatat cgccgtggaa	780	
[2098]	tgggagtcca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggactcc	840	
[2099]	gacggctcct tcttctgtga ctctcgctg accgtggaca agtcccgggtg gcaggaaggc	900	
[2100]	aacgtgttct cctgtctcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc	960	
[2101]	ctgtctctgt ccctgggcaa g	981	
[2102]	<210> 164		
[2103]	<211> 327		
[2104]	<212> PRT		
[2105]	<213> 人工序列		

[2106]	<220>
[2107]	<223> huIgG4_S228P_L235E;人IgG4 S228P_L235E双突变体的氨基酸序列
[2108]	<400> 164
[2109]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
[2110]	1 5 10 15
[2111]	Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
[2112]	20 25 30
[2113]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
[2114]	35 40 45
[2115]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[2116]	50 55 60
[2117]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
[2118]	65 70 75 80
[2119]	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
[2120]	85 90 95
[2121]	Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
[2122]	100 105 110
[2123]	Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[2124]	115 120 125
[2125]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[2126]	130 135 140
[2127]	Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[2128]	145 150 155 160
[2129]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
[2130]	165 170 175
[2131]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[2132]	180 185 190
[2133]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
[2134]	195 200 205
[2135]	Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[2136]	210 215 220
[2137]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
[2138]	225 230 235 240
[2139]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[2140]	245 250 255
[2141]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[2142]	260 265 270
[2143]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[2144]	275 280 285

[2145]	Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
[2146]	290 295 300
[2147]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[2148]	305 310 315 320
[2149]	Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[2150]	325
[2151]	<210> 165
[2152]	<211> 444
[2153]	<212> PRT
[2154]	<213> 人工序列
[2155]	<220>
[2156]	<223> h20-H2-L5Y; huIgG4_S228P形式的重链
[2157]	<400> 165
[2158]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[2159]	1 5 10 15
[2160]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
[2161]	20 25 30
[2162]	Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[2163]	35 40 45
[2164]	Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe
[2165]	50 55 60
[2166]	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
[2167]	65 70 75 80
[2168]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2169]	85 90 95
[2170]	Ala Arg Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[2171]	100 105 110
[2172]	Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
[2173]	115 120 125
[2174]	Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
[2175]	130 135 140
[2176]	Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
[2177]	145 150 155 160
[2178]	Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
[2179]	165 170 175
[2180]	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
[2181]	180 185 190
[2182]	Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
[2183]	195 200 205

[2184]	Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
[2185]	210 215 220
[2186]	Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
[2187]	225 230 235 240
[2188]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
[2189]	245 250 255
[2190]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
[2191]	260 265 270
[2192]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
[2193]	275 280 285
[2194]	Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
[2195]	290 295 300
[2196]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
[2197]	305 310 315 320
[2198]	Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
[2199]	325 330 335
[2200]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
[2201]	340 345 350
[2202]	Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
[2203]	355 360 365
[2204]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
[2205]	370 375 380
[2206]	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
[2207]	385 390 395 400
[2208]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
[2209]	405 410 415
[2210]	Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
[2211]	420 425 430
[2212]	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[2213]	435 440
[2214]	<210> 166
[2215]	<211> 444
[2216]	<212> PRT
[2217]	<213> 人工序列
[2218]	<220>
[2219]	<223> h20-H2 ; hu-IgG4_S228P_L325E形式的重链
[2220]	<400> 166
[2221]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[2222]	1 5 10 15

[2223]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Asp	Tyr
[2224]				20					25					30		
[2225]	Tyr	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
[2226]			35					40					45			
[2227]	Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Ile	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Lys	Lys	Phe
[2228]		50					55					60				
[2229]	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
[2230]	65					70					75					80
[2231]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[2232]				85						90					95	
[2233]	Ala	Arg	Gly	His	Tyr	Gly	Arg	Gly	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
[2234]			100						105					110		
[2235]	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
[2236]			115					120					125			
[2237]	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
[2238]		130					135					140				
[2239]	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
[2240]	145					150				155						160
[2241]	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
[2242]				165						170					175	
[2243]	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
[2244]			180						185					190		
[2245]	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser
[2246]		195					200					205				
[2247]	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys
[2248]		210					215					220				
[2249]	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
[2250]	225					230				235						240
[2251]	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
[2252]				245					250					255		
[2253]	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
[2254]			260						265					270		
[2255]	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
[2256]			275					280					285			
[2257]	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
[2258]		290						295				300				
[2259]	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
[2260]	305					310					315					320
[2261]	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys

[2262]					325					330					335		
[2263]	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
[2264]					340					345					350		
[2265]	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
[2266]					355					360					365		
[2267]	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
[2268]					370					375					380		
[2269]	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
[2270]	385						390					395					400
[2271]	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
[2272]						405					410					415	
[2273]	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
[2274]						420					425					430	
[2275]	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly					
[2276]						435					440						
[2277]	<210> 167																
[2278]	<211> 220																
[2279]	<212> PRT																
[2280]	<213> 人工序列																
[2281]	<220>																
[2282]	<223> h20-L5Y抗体;轻链																
[2283]	<400> 167																
[2284]	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	
[2285]	1				5					10					15		
[2286]	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser	
[2287]					20					25					30		
[2288]	Ile	Asp	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	
[2289]					35					40					45		
[2290]	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Thr	Lys	Glu	Ser	Gly	Val	
[2291]			50					55					60				
[2292]	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	
[2293]	65						70					75				80	
[2294]	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	
[2295]						85					90					95	
[2296]	His	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	
[2297]					100					105					110		
[2298]	Arg	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	
[2299]						115				120					125		
[2300]	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	

[2301]	130	135	140
[2302]	Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
[2303]	145	150	155
[2304]	Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
[2305]	165	170	175
[2306]	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
[2307]	180	185	190
[2308]	Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
[2309]	195	200	205
[2310]	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[2311]	210	215	220
[2312]	<210> 168		
[2313]	<211> 119		
[2314]	<212> PRT		
[2315]	<213> 人工序列		
[2316]	<220>		
[2317]	<223> VL008-AL13-8G5抗体;人源化可变区重链;		
[2318]	VH1m		
[2319]	<400> 168		
[2320]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
[2321]	1	5	10
[2322]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr		
[2323]	20	25	30
[2324]	Trp Met His Trp Val His Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met		
[2325]	35	40	45
[2326]	Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe		
[2327]	50	55	60
[2328]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr		
[2329]	65	70	75
[2330]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[2331]	85	90	95
[2332]	Thr Arg Ser His Tyr Tyr Asp Gly His Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly		
[2333]	100	105	110
[2334]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[2335]	115		
[2336]	<210> 169		
[2337]	<211> 119		
[2338]	<212> PRT		
[2339]	<213> 人工序列		

[2340]	<220>
[2341]	<223> VL008-AL13-8G5抗体;人源化可变区重链;
[2342]	VH2m
[2343]	<400> 169
[2344]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[2345]	1 5 10 15
[2346]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
[2347]	20 25 30
[2348]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[2349]	35 40 45
[2350]	Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
[2351]	50 55 60
[2352]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
[2353]	65 70 75 80
[2354]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[2355]	85 90 95
[2356]	Thr Arg Ser His Tyr Tyr Asp Gly His Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly
[2357]	100 105 110
[2358]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[2359]	115
[2360]	<210> 170
[2361]	<211> 119
[2362]	<212> PRT
[2363]	<213> 人工序列
[2364]	<220>
[2365]	<223> VL008-AL13-8G5抗体;人源化可变区重链;
[2366]	VH3
[2367]	<400> 170
[2368]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[2369]	1 5 10 15
[2370]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
[2371]	20 25 30
[2372]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[2373]	35 40 45
[2374]	Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
[2375]	50 55 60
[2376]	Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
[2377]	65 70 75 80
[2378]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[2379]					85					90					95		
[2380]	Thr	Arg	Ser	His	Tyr	Tyr	Asp	Gly	His	Phe	Ser	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
[2381]				100					105					110			
[2382]	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
[2383]			115														
[2384]	<210>	171															
[2385]	<211>	119															
[2386]	<212>	PRT															
[2387]	<213>	人工序列															
[2388]	<220>																
[2389]	<223>	VL008-AL13-8G5抗体;人源化可变区重链;															
[2390]	VH4																
[2391]	<400>	171															
[2392]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
[2393]	1			5						10					15		
[2394]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Thr	Tyr	
[2395]			20						25					30			
[2396]	Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
[2397]		35					40					45					
[2398]	Gly	Met	Ile	His	Pro	Asn	Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	
[2399]	50					55					60						
[2400]	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
[2401]	65					70					75					80	
[2402]	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
[2403]				85					90					95			
[2404]	Thr	Arg	Ser	His	Tyr	Tyr	Asp	Gly	His	Phe	Ser	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
[2405]			100						105					110			
[2406]	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
[2407]		115															
[2408]	<210>	172															
[2409]	<211>	112															
[2410]	<212>	PRT															
[2411]	<213>	人工序列															
[2412]	<220>																
[2413]	<223>	VL008-AL13-8K3抗体;人源化可变区轻链;															
[2414]	VL1																
[2415]	<400>	172															
[2416]	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	
[2417]	1			5						10					15		

[2418]	Glu Arg Ala Thr Phe Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[2419]	20 25 30
[2420]	Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[2421]	35 40 45
[2422]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[2423]	50 55 60
[2424]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[2425]	65 70 75 80
[2426]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
[2427]	85 90 95
[2428]	Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
[2429]	100 105 110
[2430]	<210> 173
[2431]	<211> 112
[2432]	<212> PRT
[2433]	<213> 人工序列
[2434]	<220>
[2435]	<223> VL008-AL13-8K3抗体;人源化可变区轻链;
[2436]	VL2
[2437]	<400> 173
[2438]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[2439]	1 5 10 15
[2440]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[2441]	20 25 30
[2442]	Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[2443]	35 40 45
[2444]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[2445]	50 55 60
[2446]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[2447]	65 70 75 80
[2448]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
[2449]	85 90 95
[2450]	Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[2451]	100 105 110
[2452]	<210> 174
[2453]	<211> 112
[2454]	<212> PRT
[2455]	<213> 人工序列
[2456]	<220>

[2457]	<223> VL008-AL13-8K3抗体;人源化可变区轻链;															
[2458]	VL3															
[2459]	<400> 174															
[2460]	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
[2461]	1				5					10					15	
[2462]	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser
[2463]				20					25					30		
[2464]	Arg	Thr	Arg	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ala	Gly	Gln
[2465]			35					40					45			
[2466]	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
[2467]		50					55					60				
[2468]	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
[2469]	65					70				75					80	
[2470]	Ile	Asp	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Lys	Gln
[2471]					85					90					95	
[2472]	Ser	Tyr	Asn	Leu	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
[2473]				100					105					110		
[2474]	<210> 175															
[2475]	<211> 112															
[2476]	<212> PRT															
[2477]	<213> 人工序列															
[2478]	<220>															
[2479]	<223> VL008-AL13-8K3抗体;人源化可变区轻链;															
[2480]	VL4															
[2481]	<400> 175															
[2482]	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly
[2483]	1				5					10					15	
[2484]	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser
[2485]				20					25					30		
[2486]	Arg	Thr	Arg	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
[2487]			35					40					45			
[2488]	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
[2489]		50					55					60				
[2490]	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
[2491]	65					70				75					80	
[2492]	Ile	Ser	Ala	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Lys	Gln
[2493]					85					90					95	
[2494]	Ser	Tyr	Asn	Leu	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys
[2495]				100					105					110		

137

对CHO细胞的hCD47/hSIRPα结合抑制

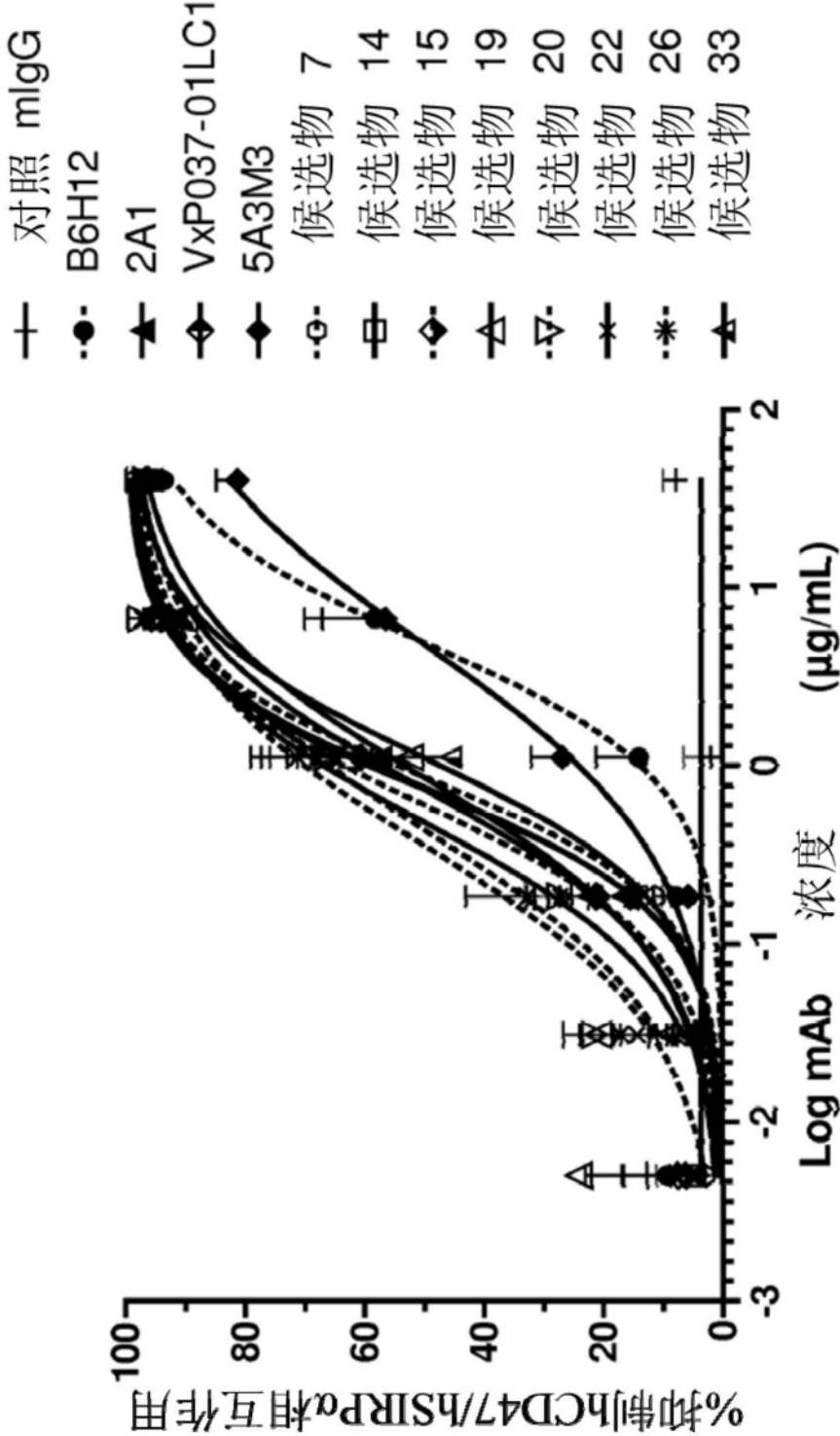


图1

对Raji细胞的结合

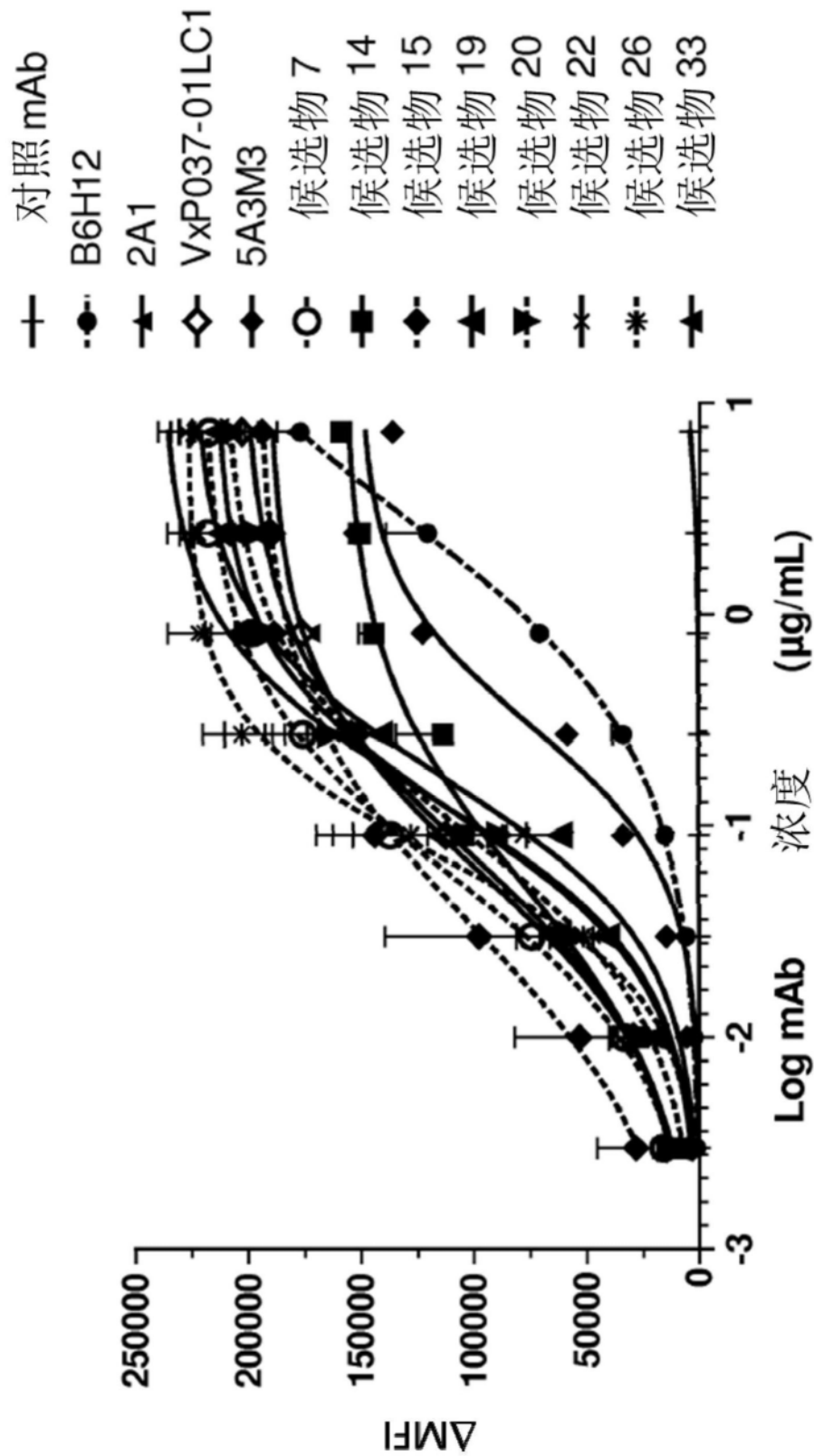


图2

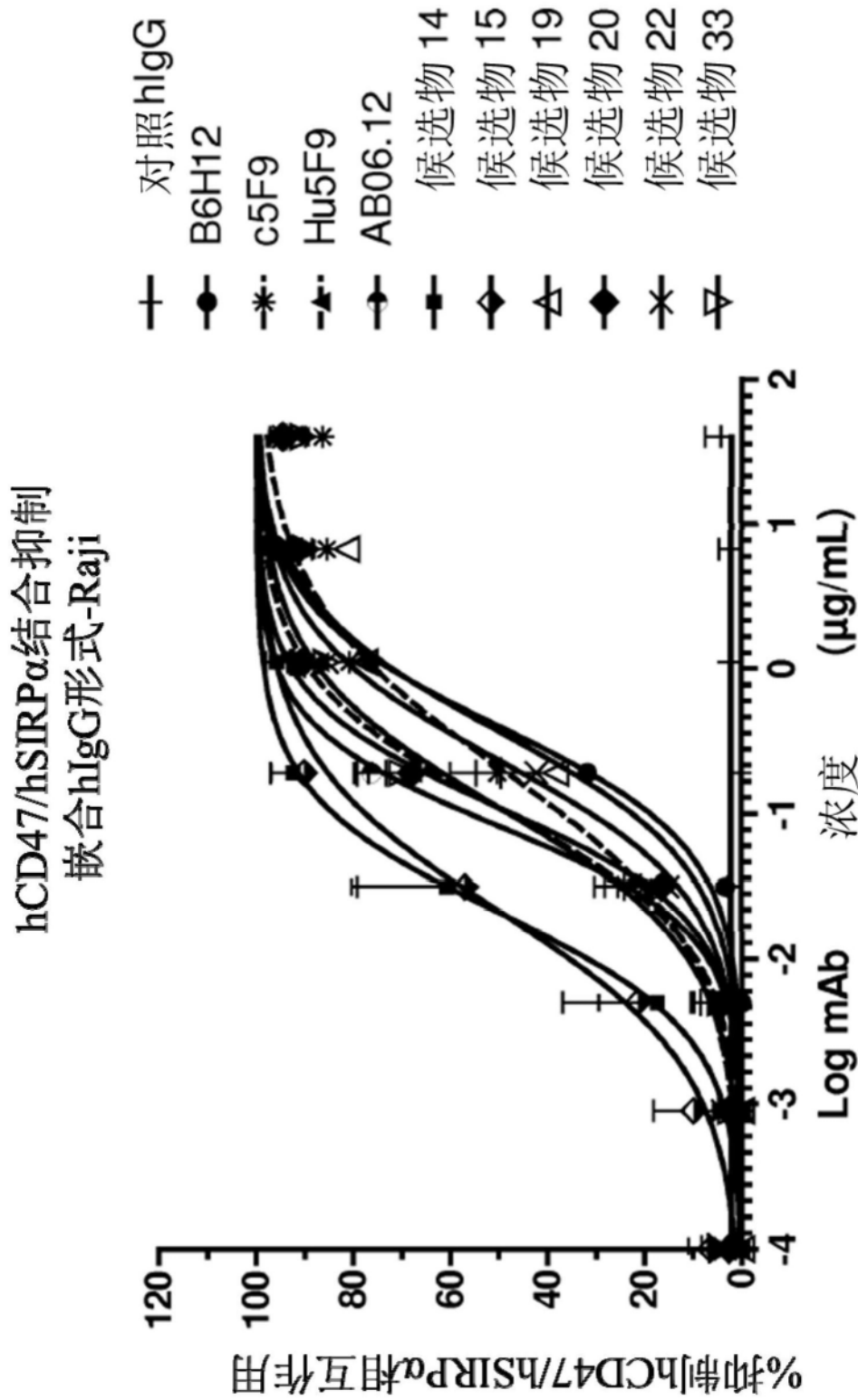


图3

人巨噬细胞对Raji细胞的吞噬作用

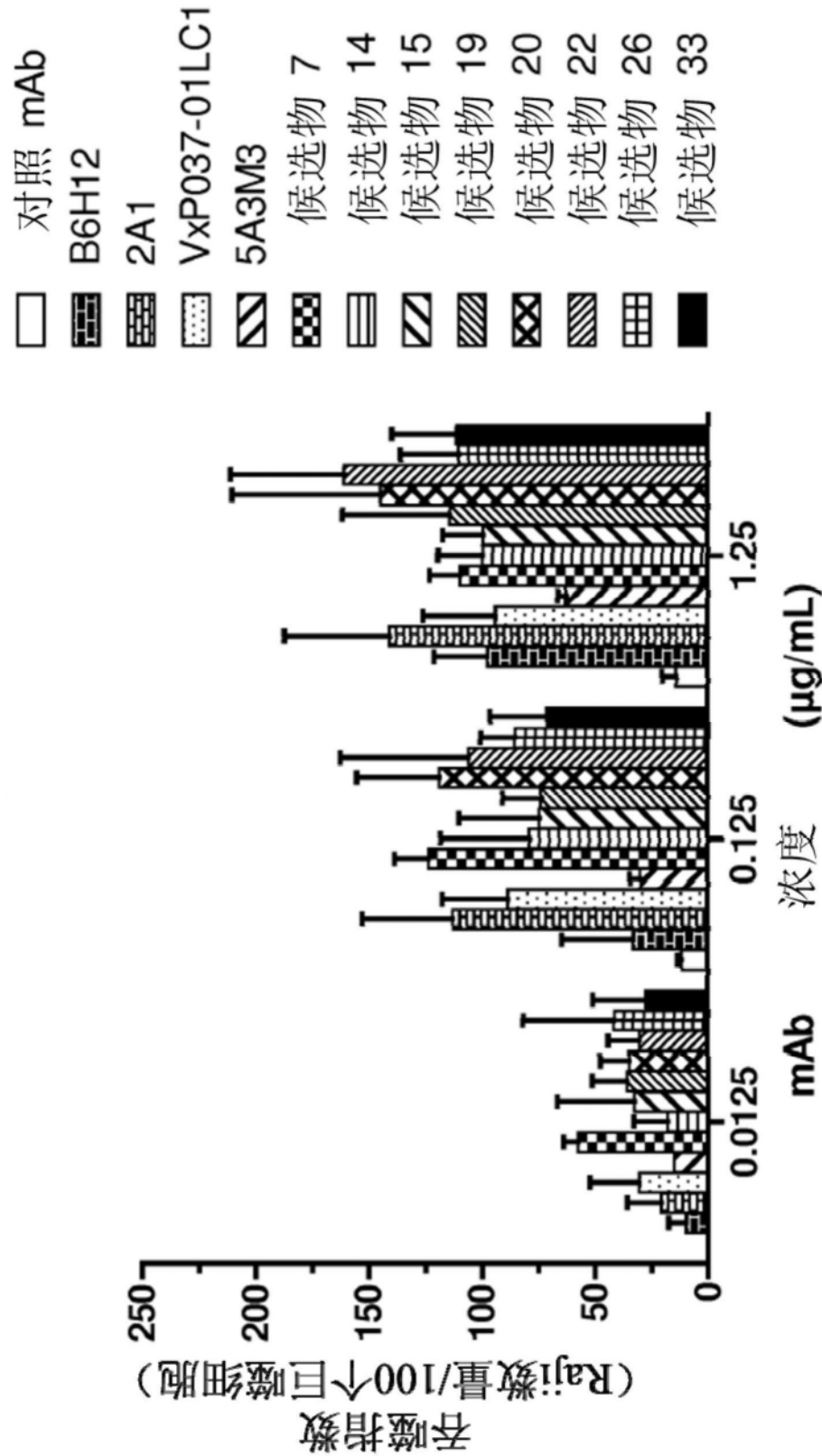


图4

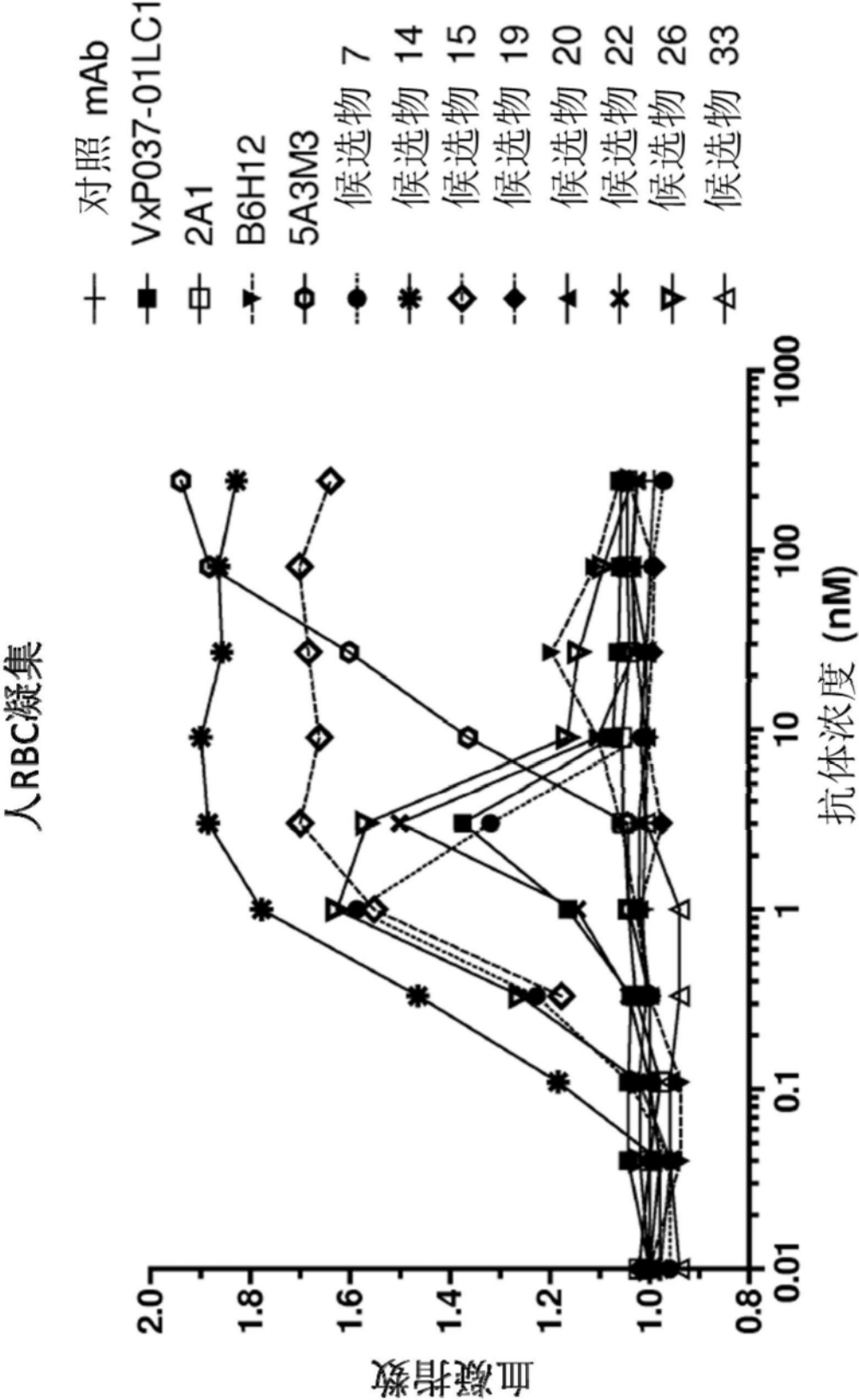


图5

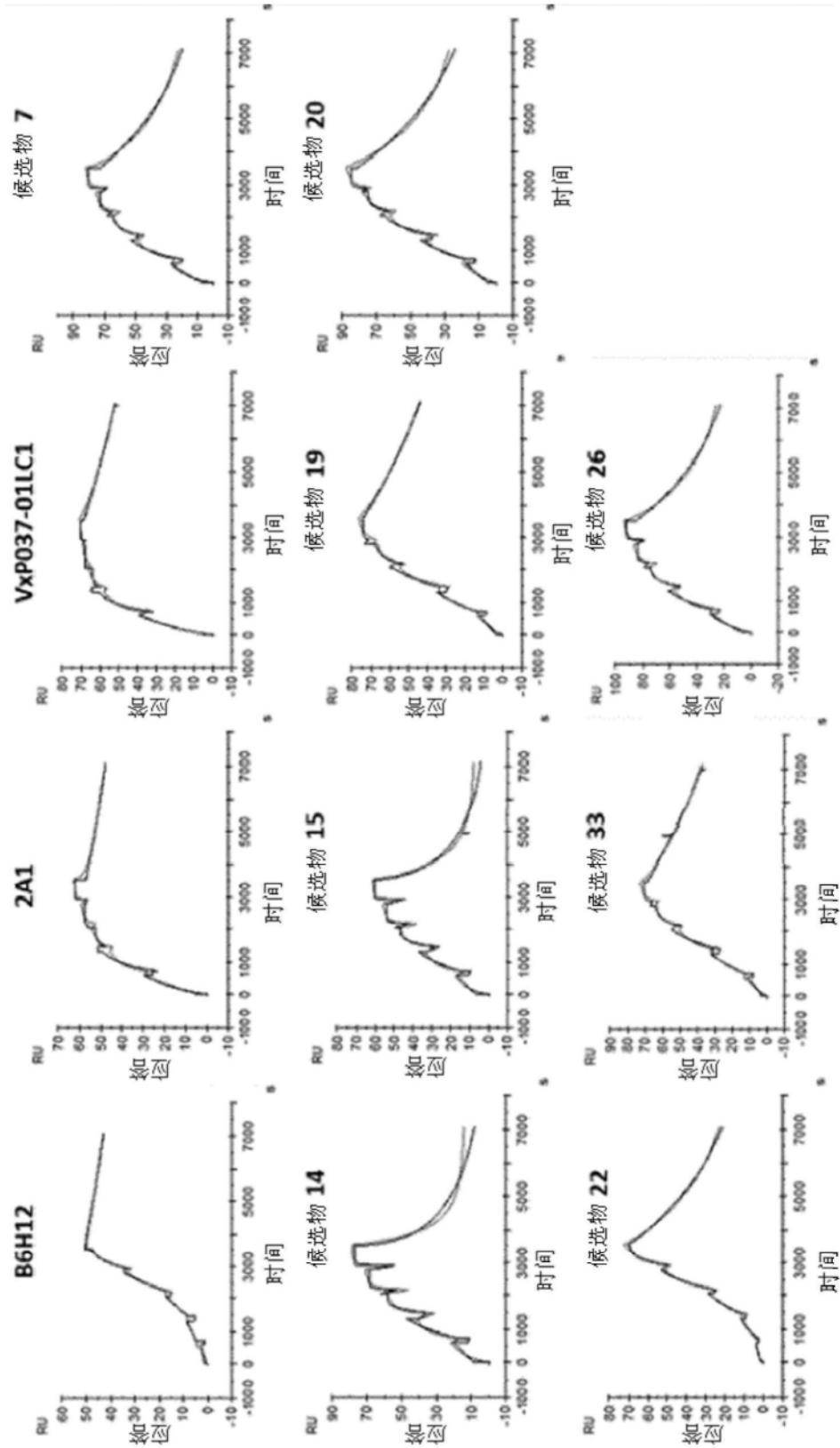


图6

VH0	(1)	1	QVQLKQSGAEELVRPGASVKLSCKASGYSFTDYINWVKQRPQGLEWIGR	50
VH1	(1)		QVQLIESGAVLARPGTSVKLSCKASGYSFTDYINWVKQRPQGLEWIGR	
VH2	(1)		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYINWVKQRPQGLEWIGR	
VH3	(1)		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYINWVKQRPQGLEWIGR	
VH4	(1)		QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYINWVKQRPQGLEWIGR	
VH5	(1)		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYINWVKQRPQGLEWIGR	
VH0	(51)	51	IYPGIGNTYYNKKFKGRVTLTAETKSSSTAYMQLNLSLTSEDSAVYFCARGH	100
VH1	(51)		IYPGIGNTYYNKKFKGRAKLTARTSAISAYLEFSSLTNEDSAVYFCARGH	
VH2	(51)		IYPGIGNTYYNKKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFCARGH	
VH3	(51)		IYPGIGNTYYNKKFKGRVTITRDTSISTAHMELSSLRSEDTAVYFCARGH	
VH4	(51)		IYPGIGNTYYNKKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARGH	
VH5	(51)		IYPGIGNTYYNKKFKGRVTMTETSISTAYMELSSLRSEDTAVYFCARGH	
VH0	(101)	101	YGRGMDYWGQGTSTVTVSS	118
VH1	(101)		YGRGMDYWGQGTSTVTVSS	
VH2	(101)		YGRGMDYWGQGTSTVTVSS	
VH3	(101)		YGRGMDYWGQGTSTVTVSS	
VH4	(101)		YGRGMDYWGQGTSTVTVSS	
VH5	(101)		YGRGMDYWGQGTSTVTVSS	

图7

VL0	(1)	1	DIVMTQSPSPSLAMSVGCKVTMNCCKSSQSLNLSIDQKNYLAWYQKPGQSP	50
VL1	(1)		DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSIDQKNYLAWYQKPGQPP	
VL2	(1)		DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSIDQKNYLAWYQKPGQPP	
VL3	(1)		EIVLTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSIDQKNYLAWYQKAGQSP	
VL4	(1)		DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSIDQKNYLAWYQKPGQPP	
VL5	(1)		DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSIDQKNYLAWYQKPGQPP	
VL0	(51)	51	KLIIYFASTKESGVPPDRFISGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYST	100
VL1	(51)		KLIIYFASTKESGVPPDRFISGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYVCQQHYST	
VL2	(51)		KLIIYFASTKESGVPPDRFISGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYVCQQHYST	
VL3	(51)		KLIIYFASTKESGVPPDRFISGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYVCQQHYST	
VL4	(51)		KLIIYFASTKESGVPPDRFISGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQHYST	
VL5	(51)		KLIIYFASTKESGVPPDRFISGSGSGTDFTLTISSGLQAEDVAVYFCQQHYST	
VL0	(101)	101	PWTFGGGGTKLEIK	113
VL1	(101)		PWTFGGGGTKLEIK	
VL2	(101)		PWTFGGGGTKVEIK	
VL3	(101)		PWTFGGGGTKVEIK	
VL4	(101)		PWTFGGGAKVEIK	
VL5	(101)		PWTFGGGGTKVEIR	

图8

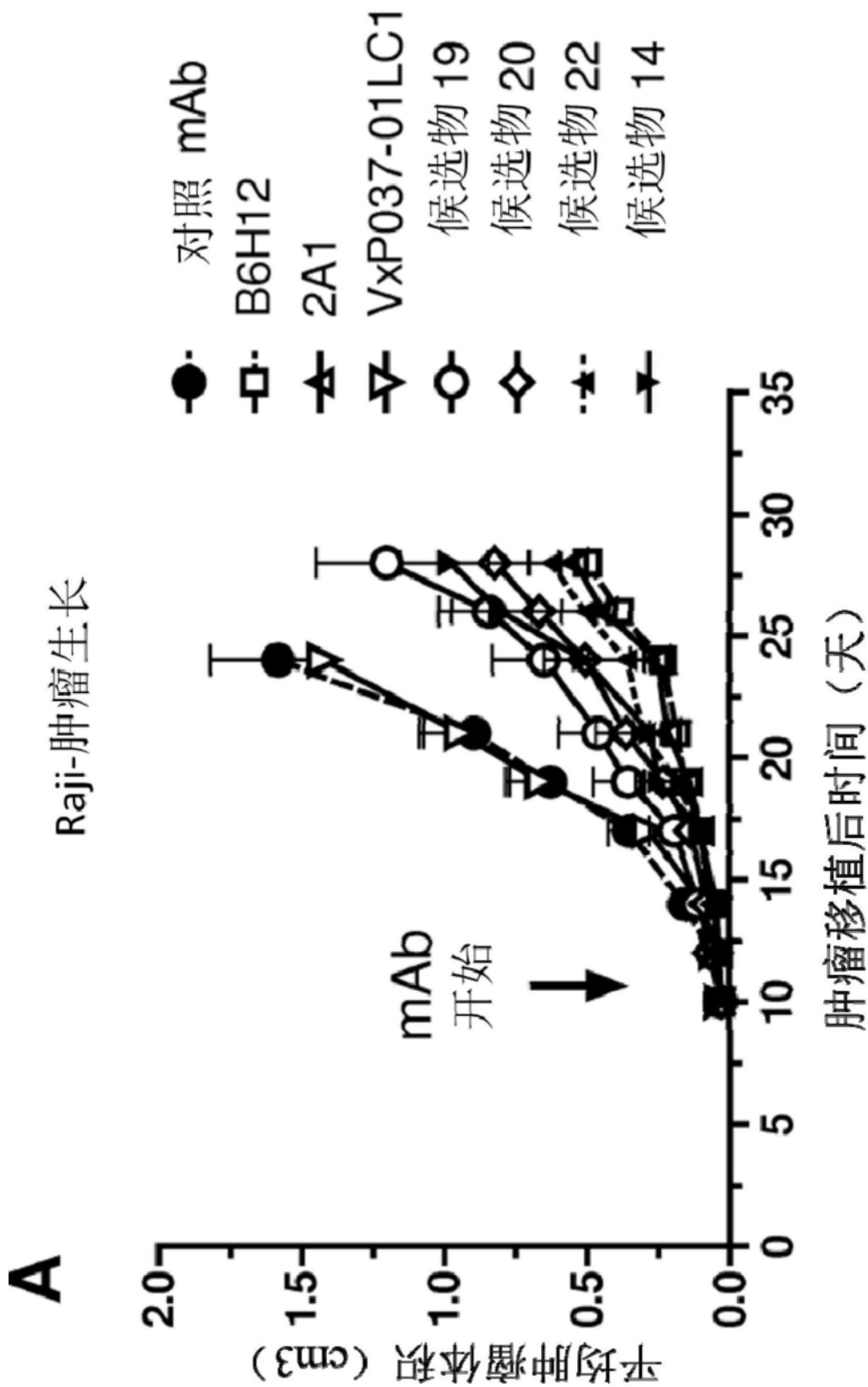


图9A

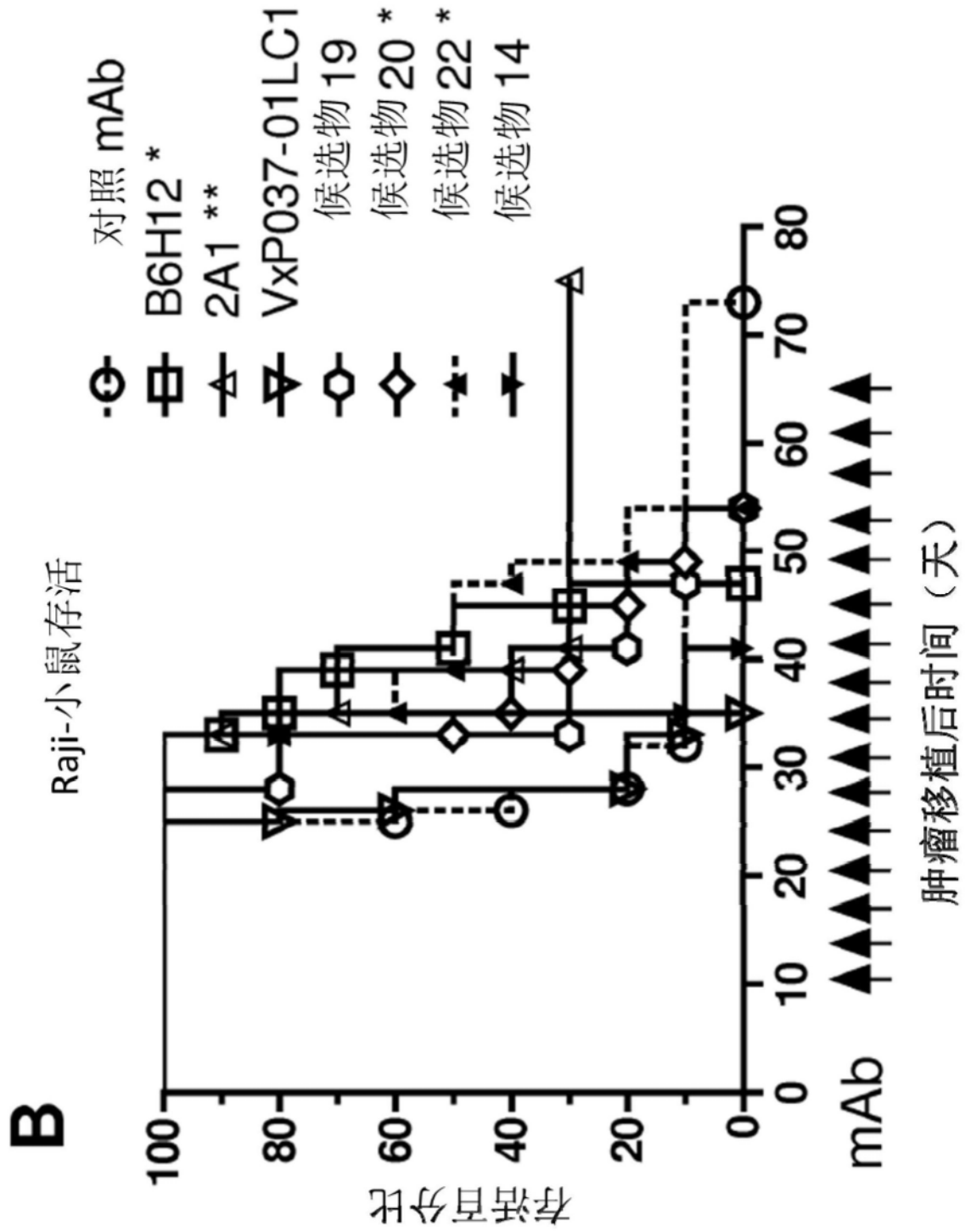


图9B

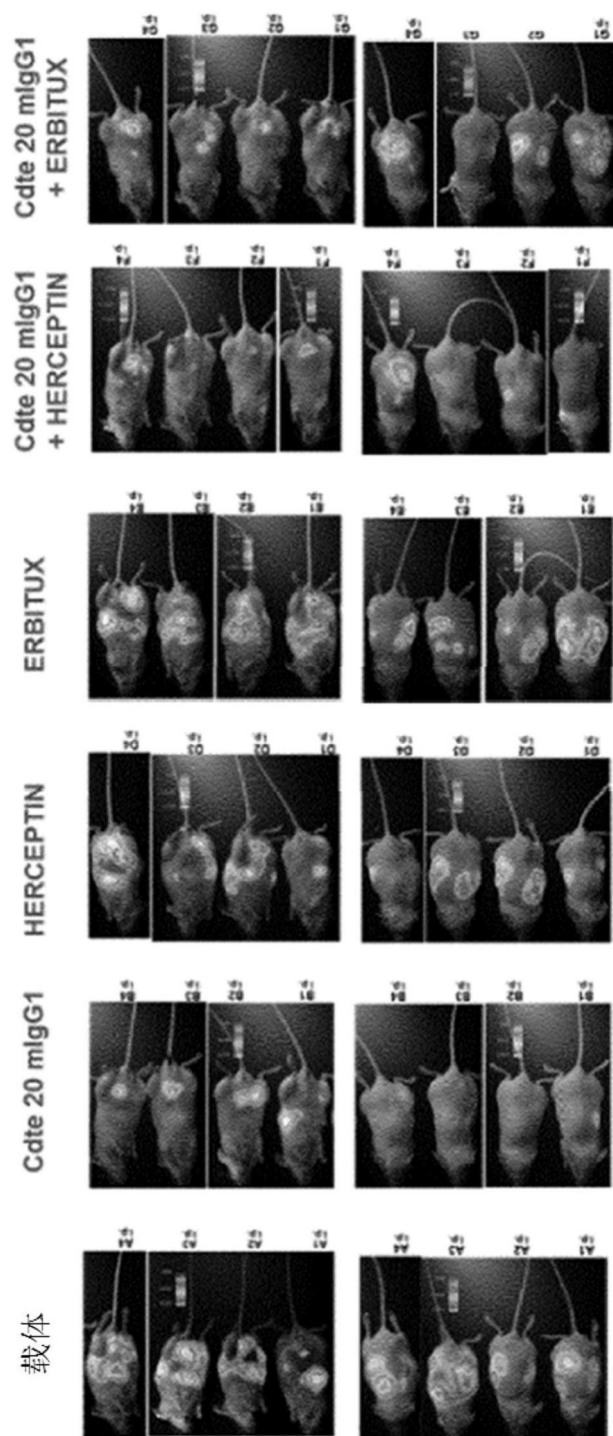


图10A

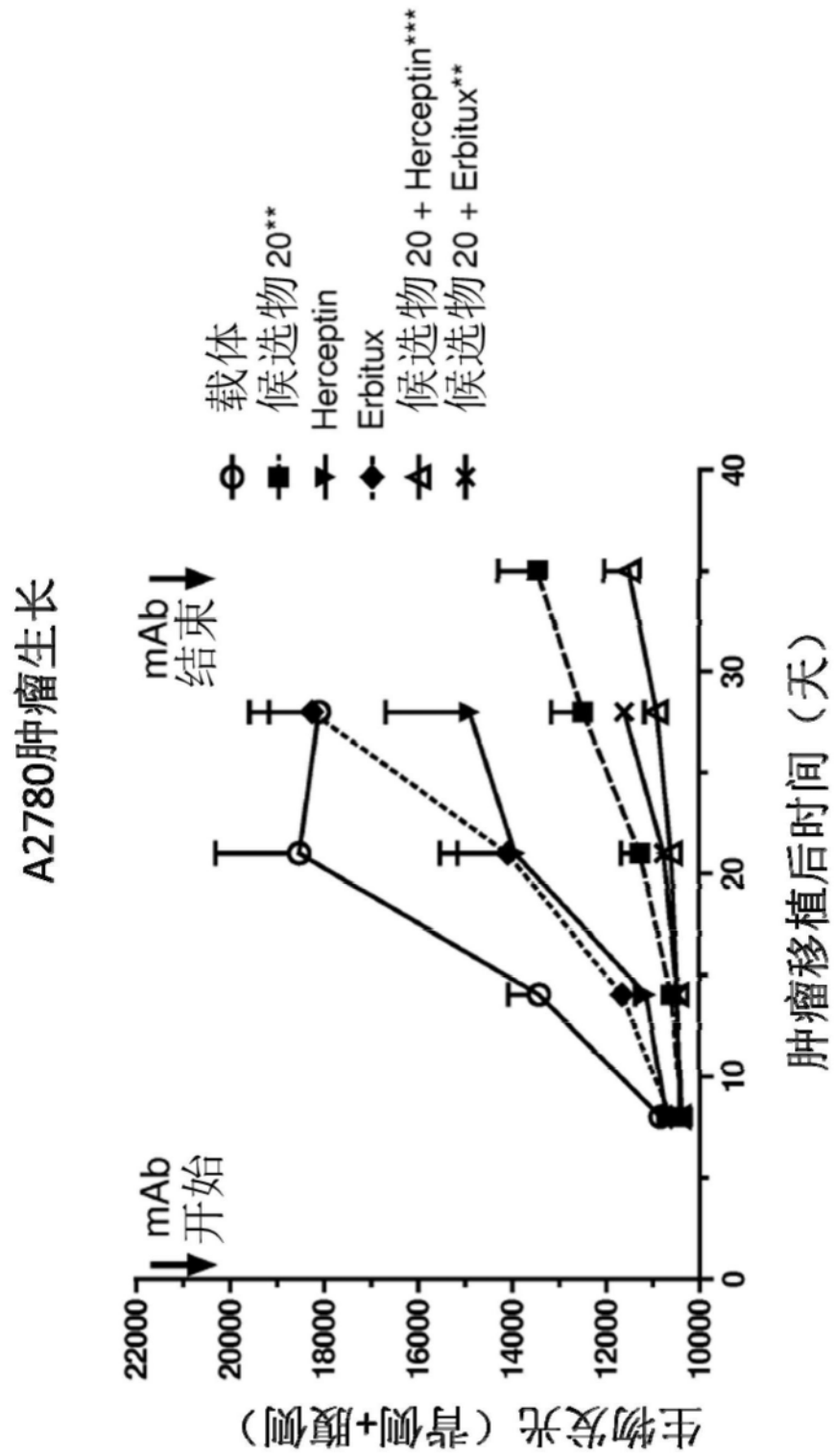


图10B

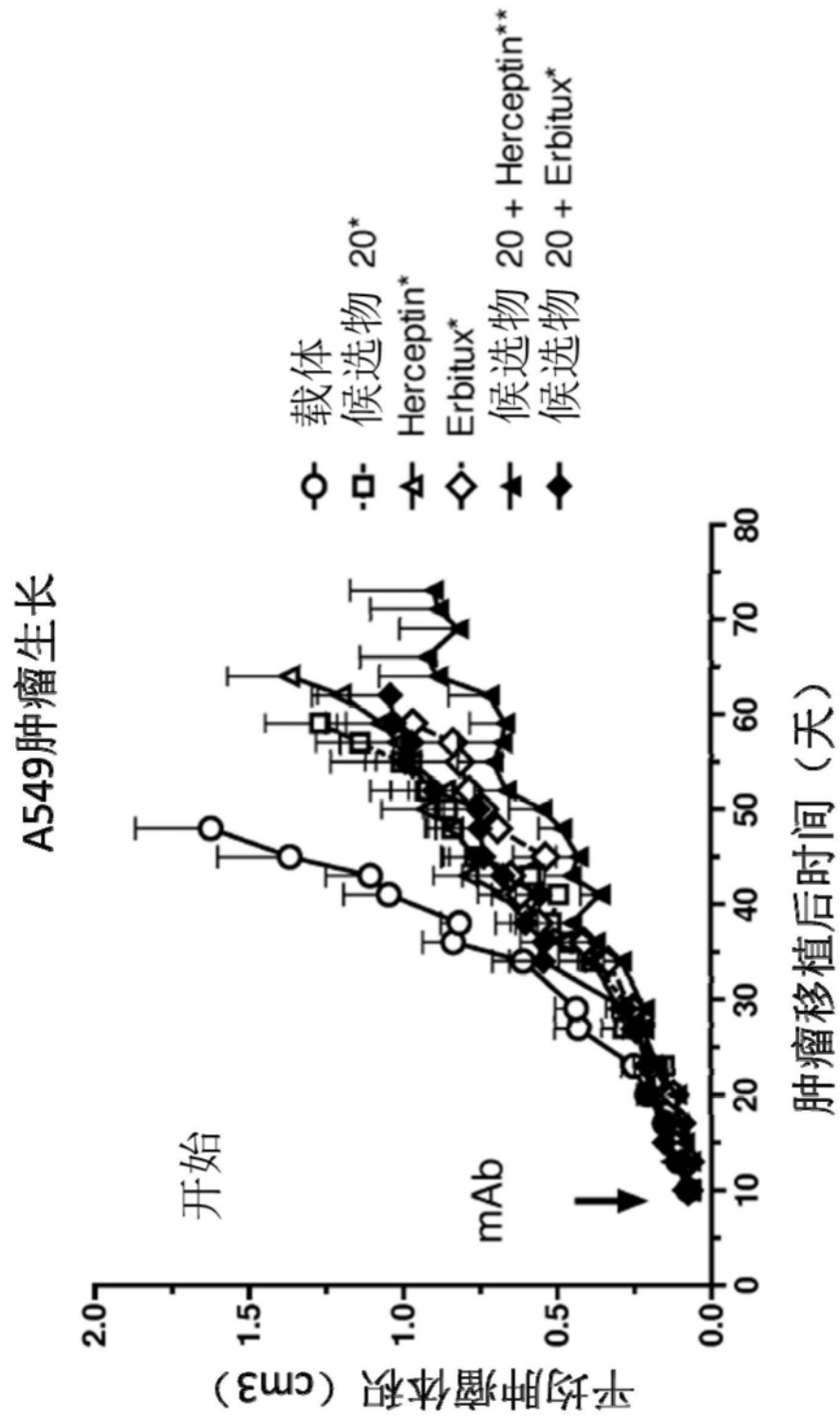


图11A

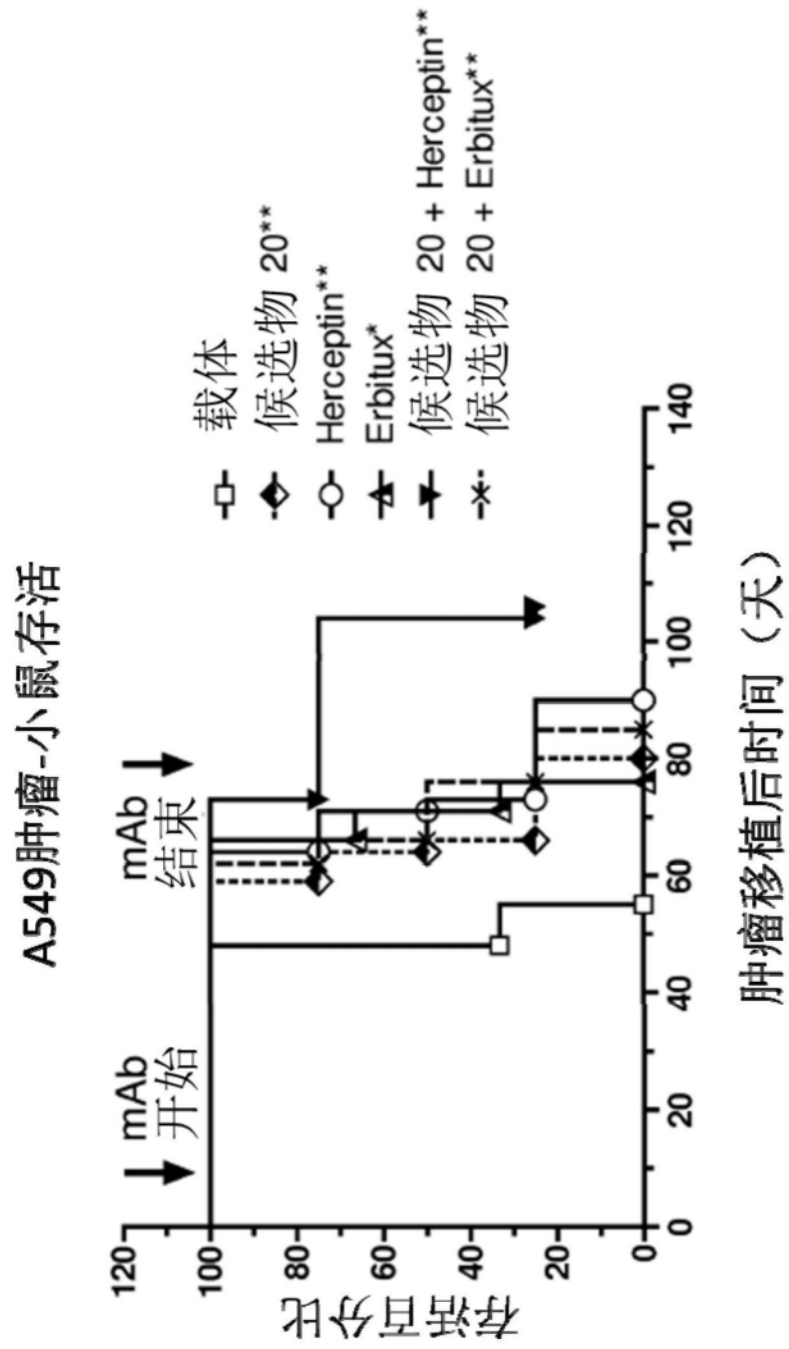


图11B

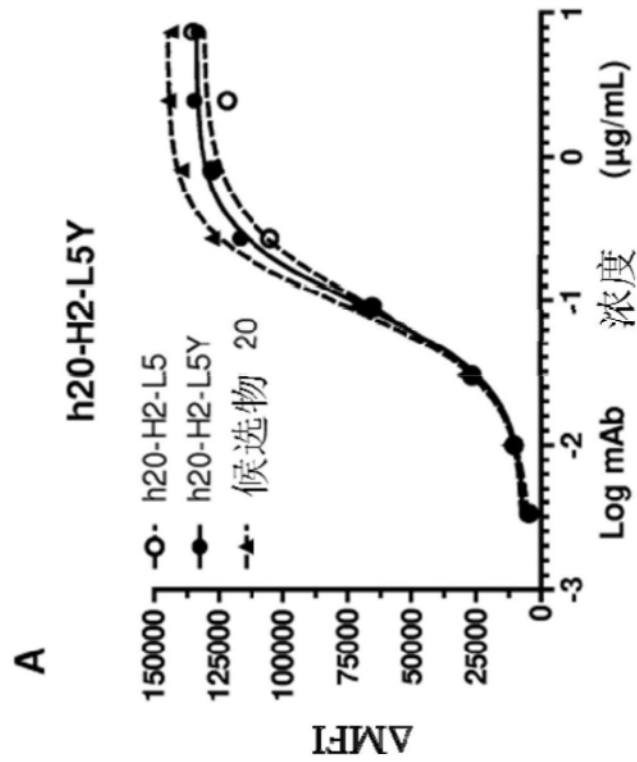


图12A

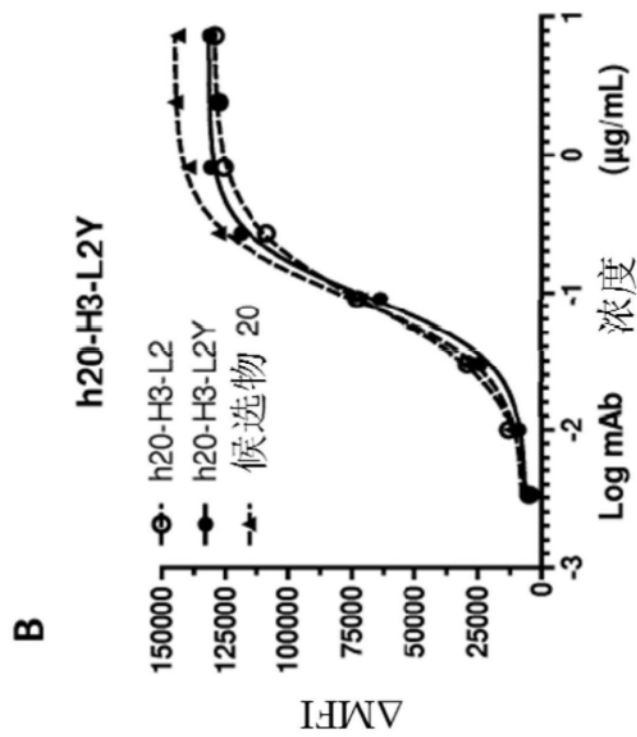


图12B

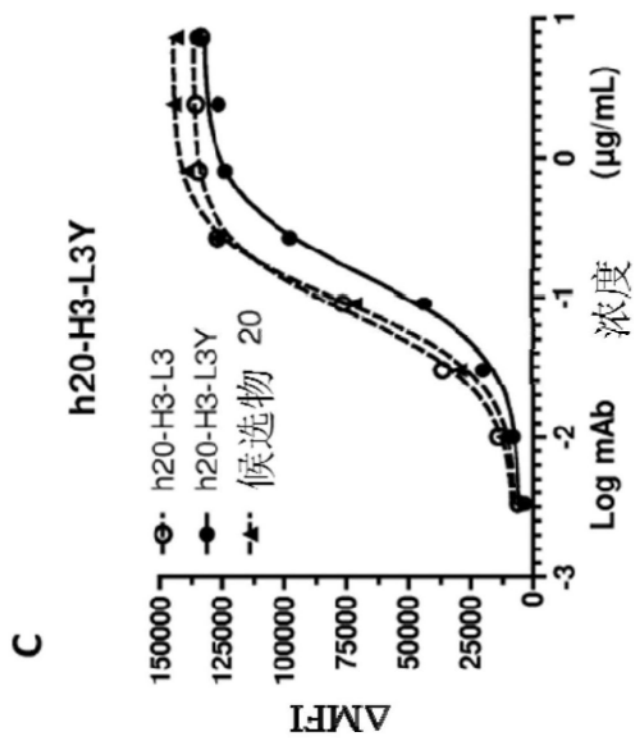


图12C

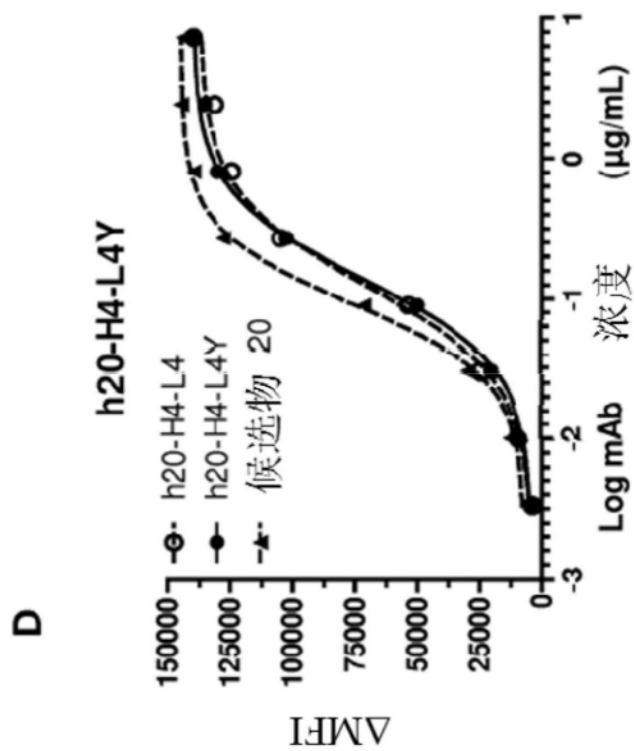


图12D

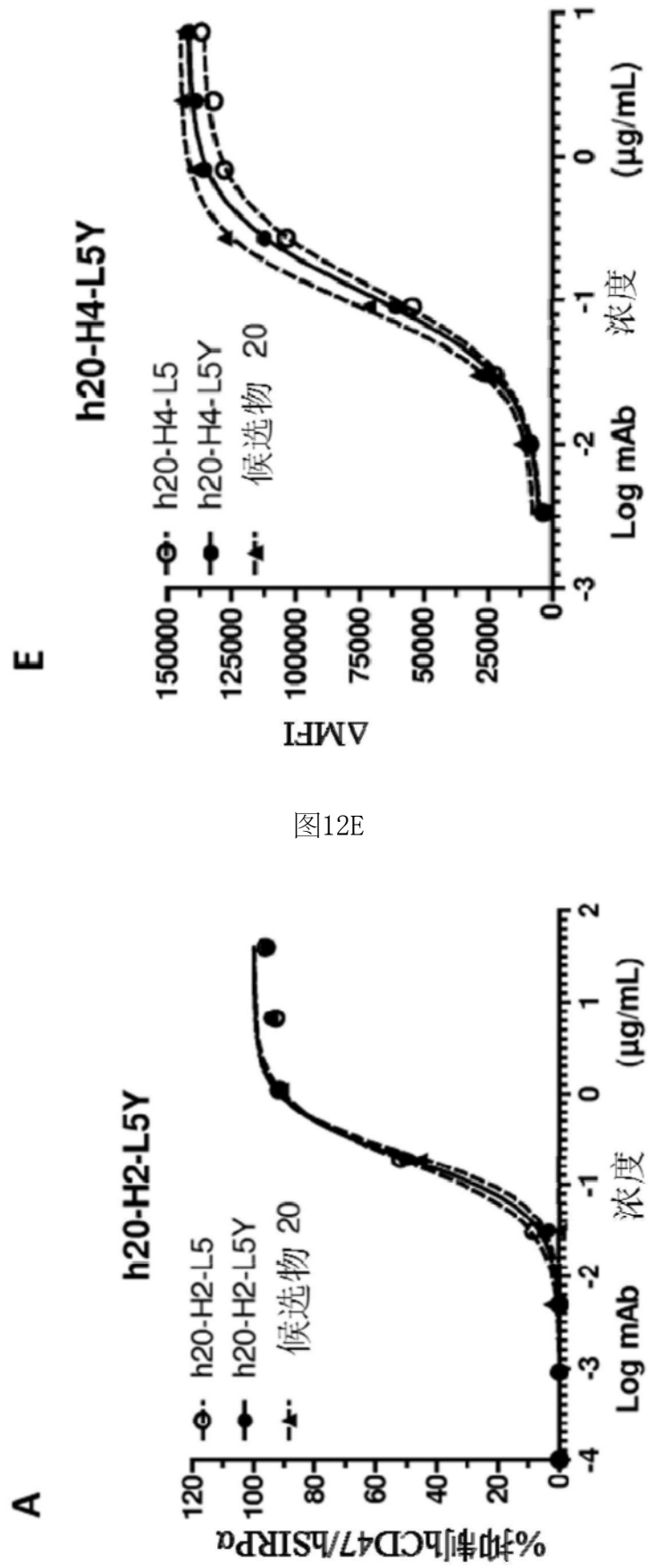


图12E

图13A

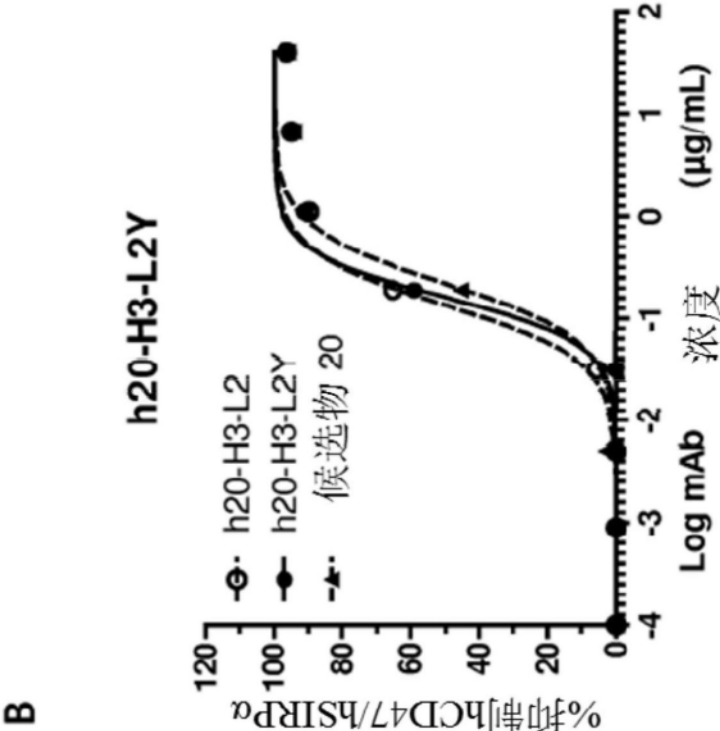


图13B

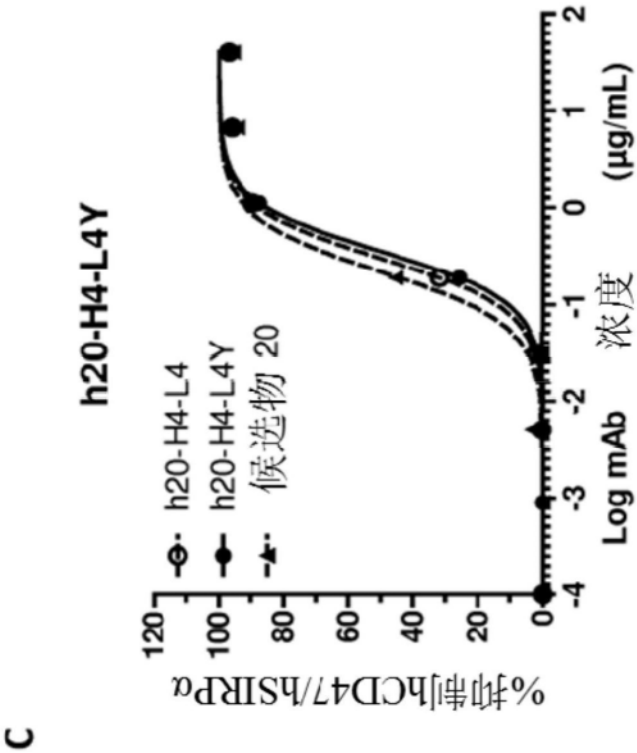


图13C

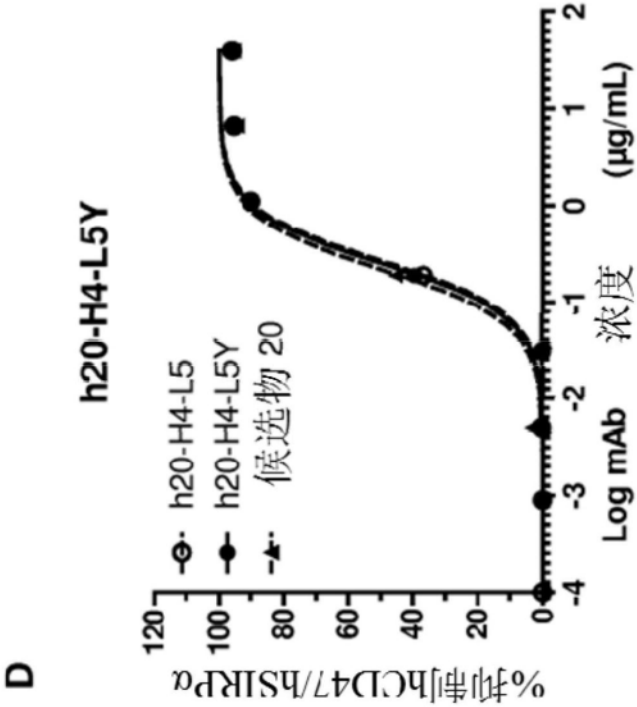


图13D

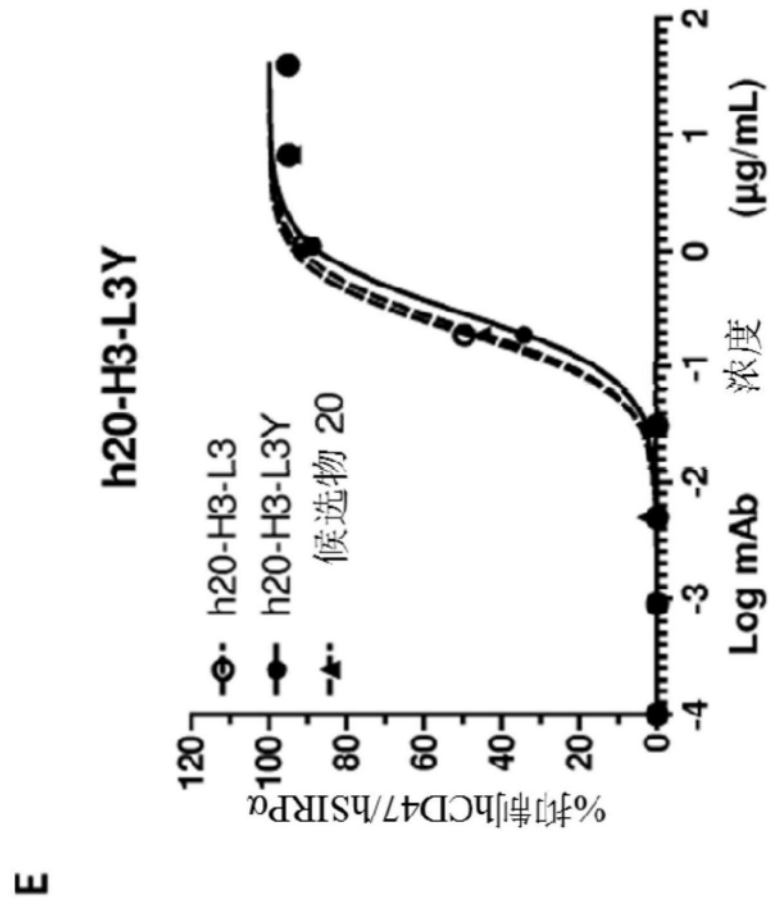


图13E

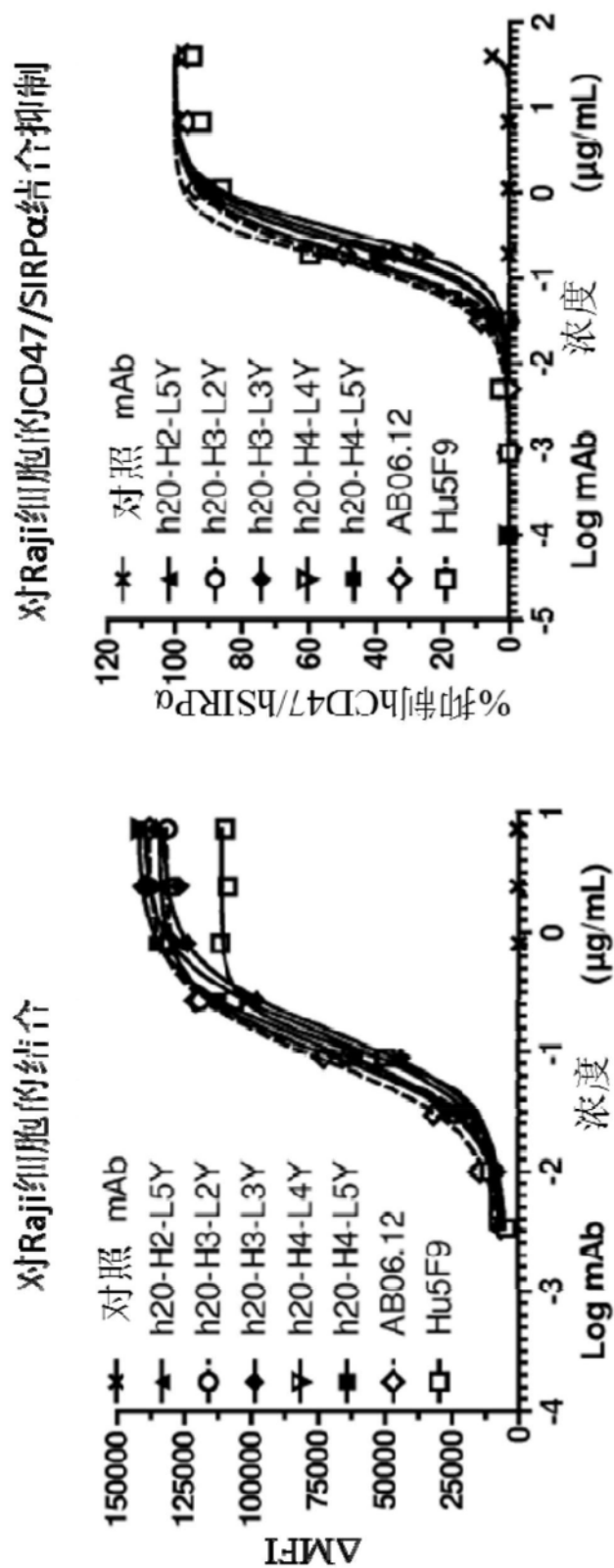


图14

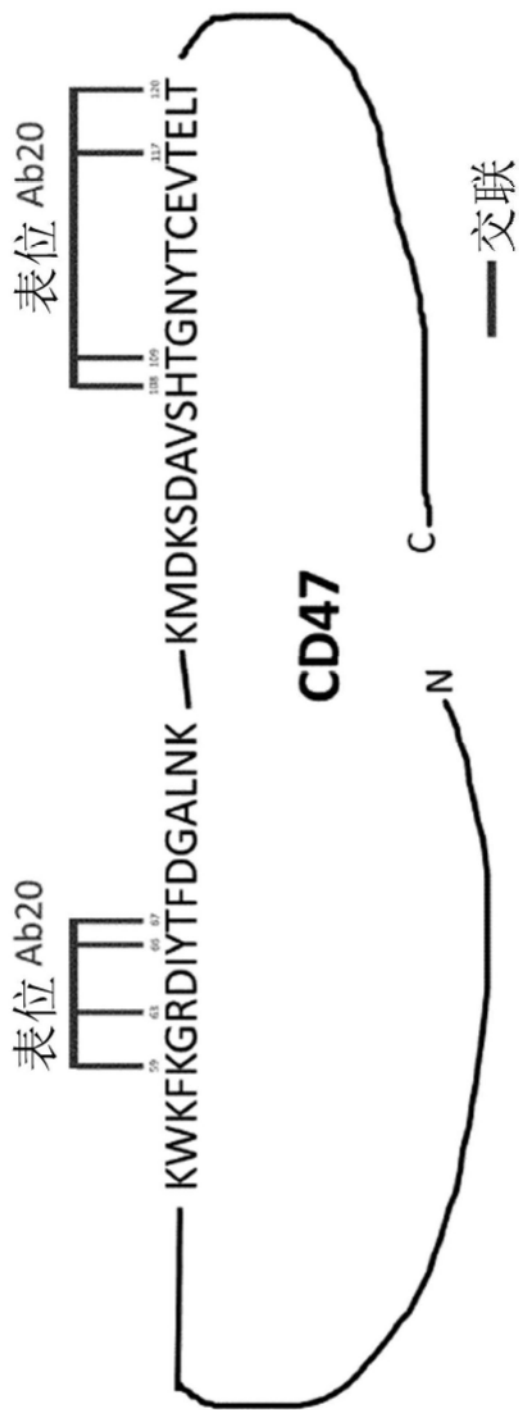


图15

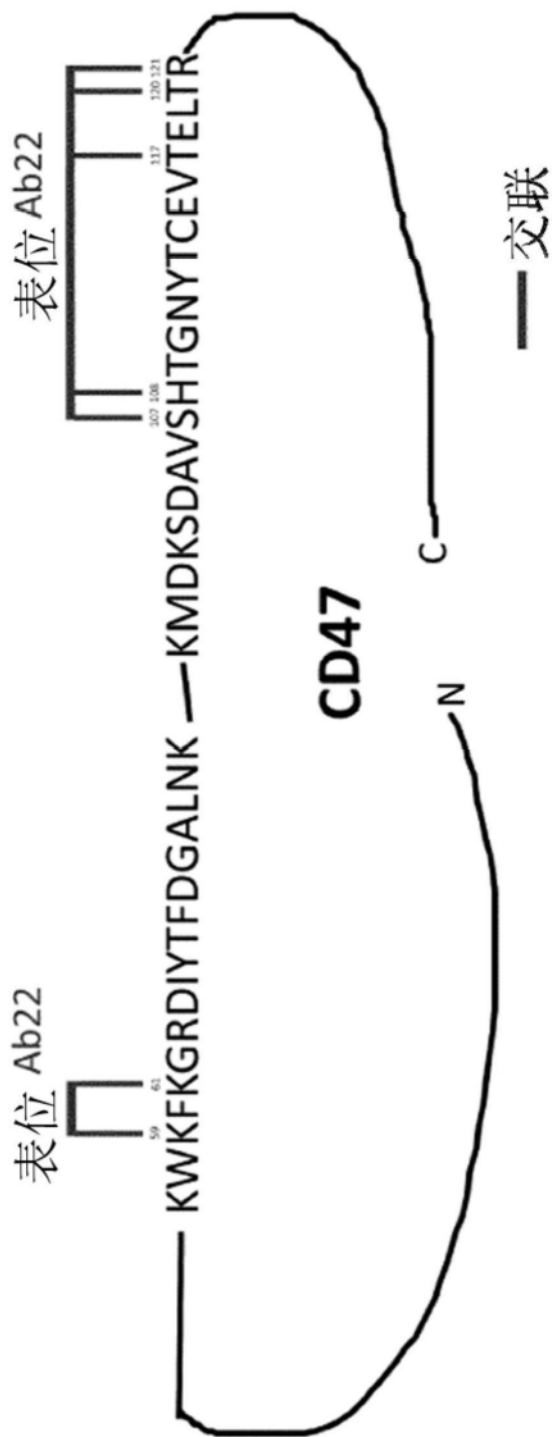


图16

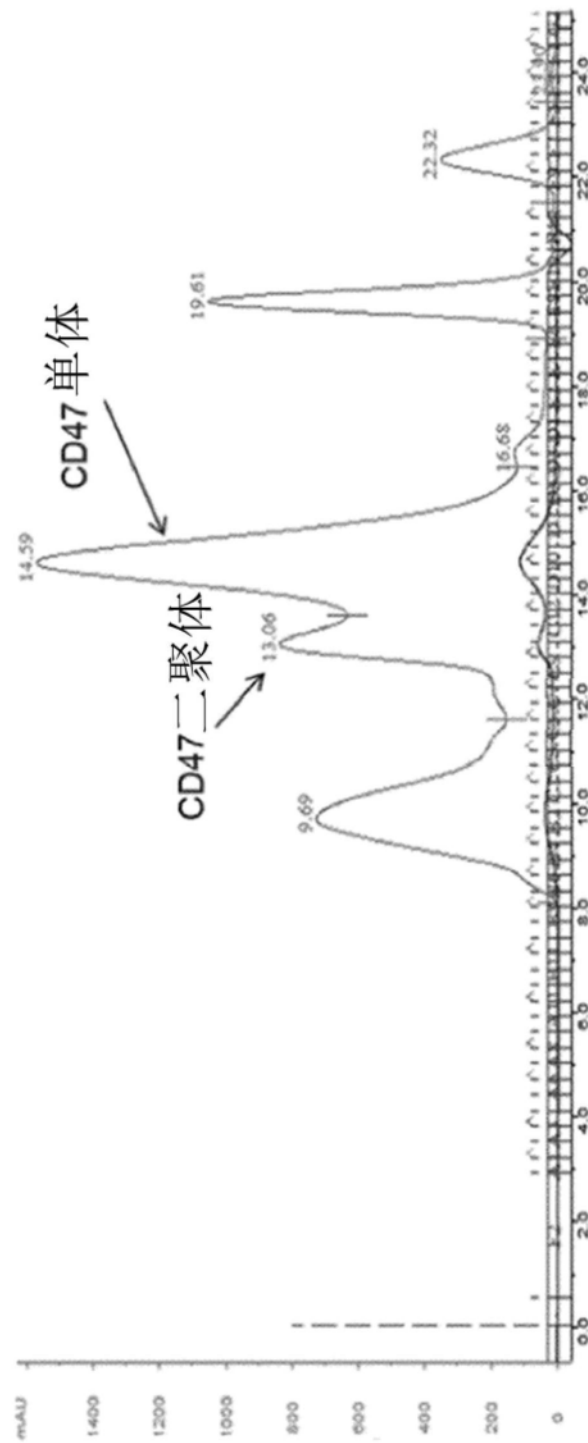


图17

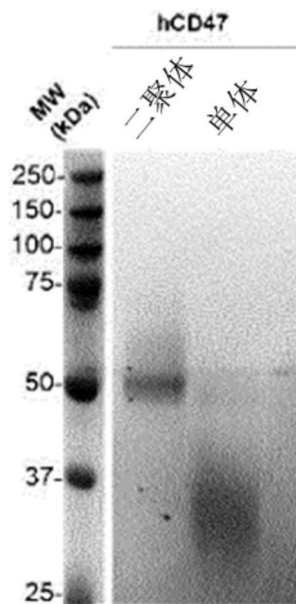


图18

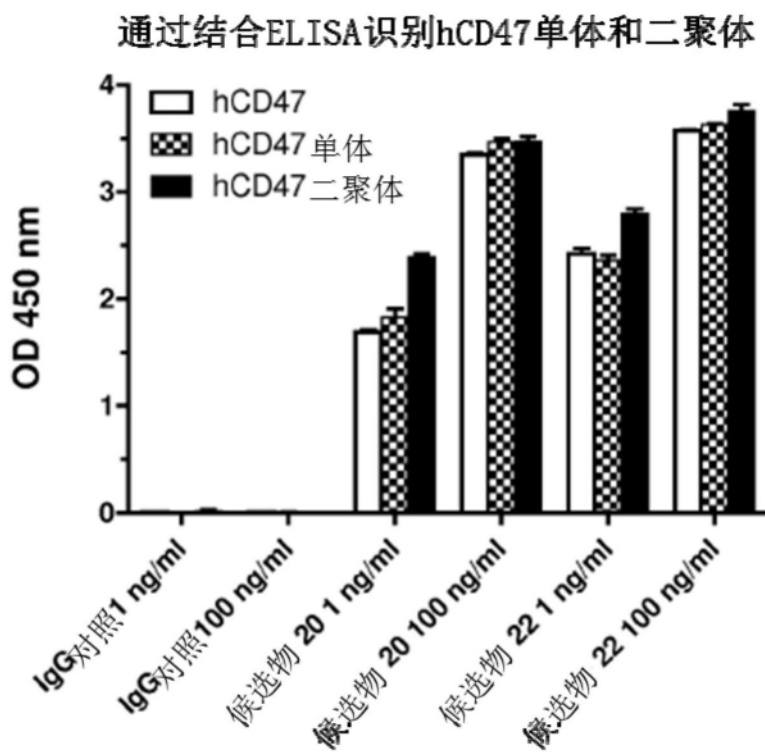


图19

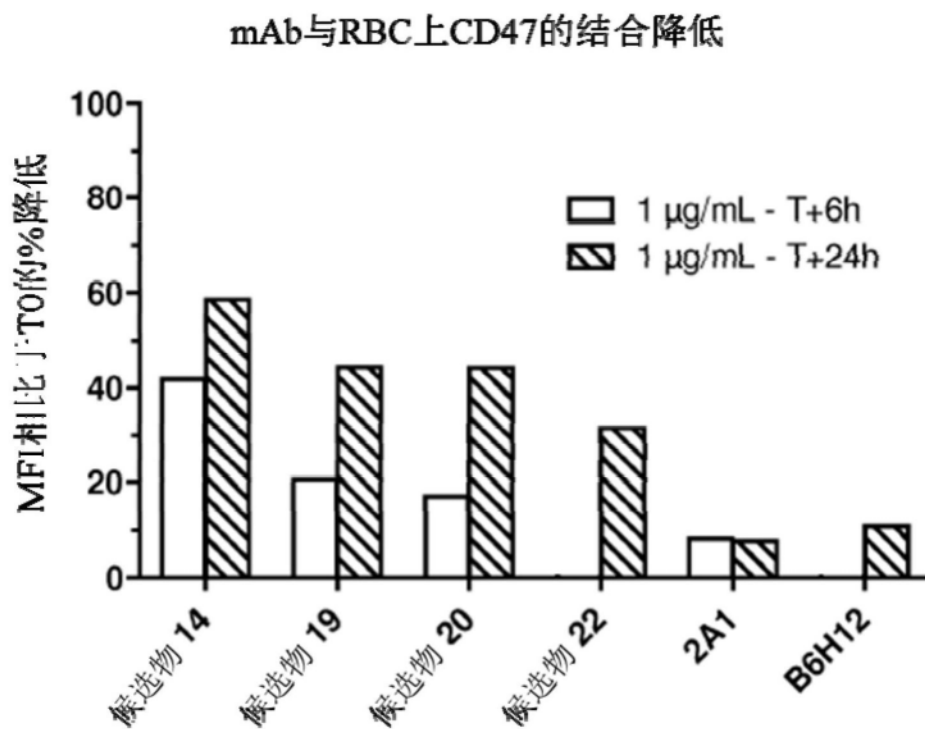


图20

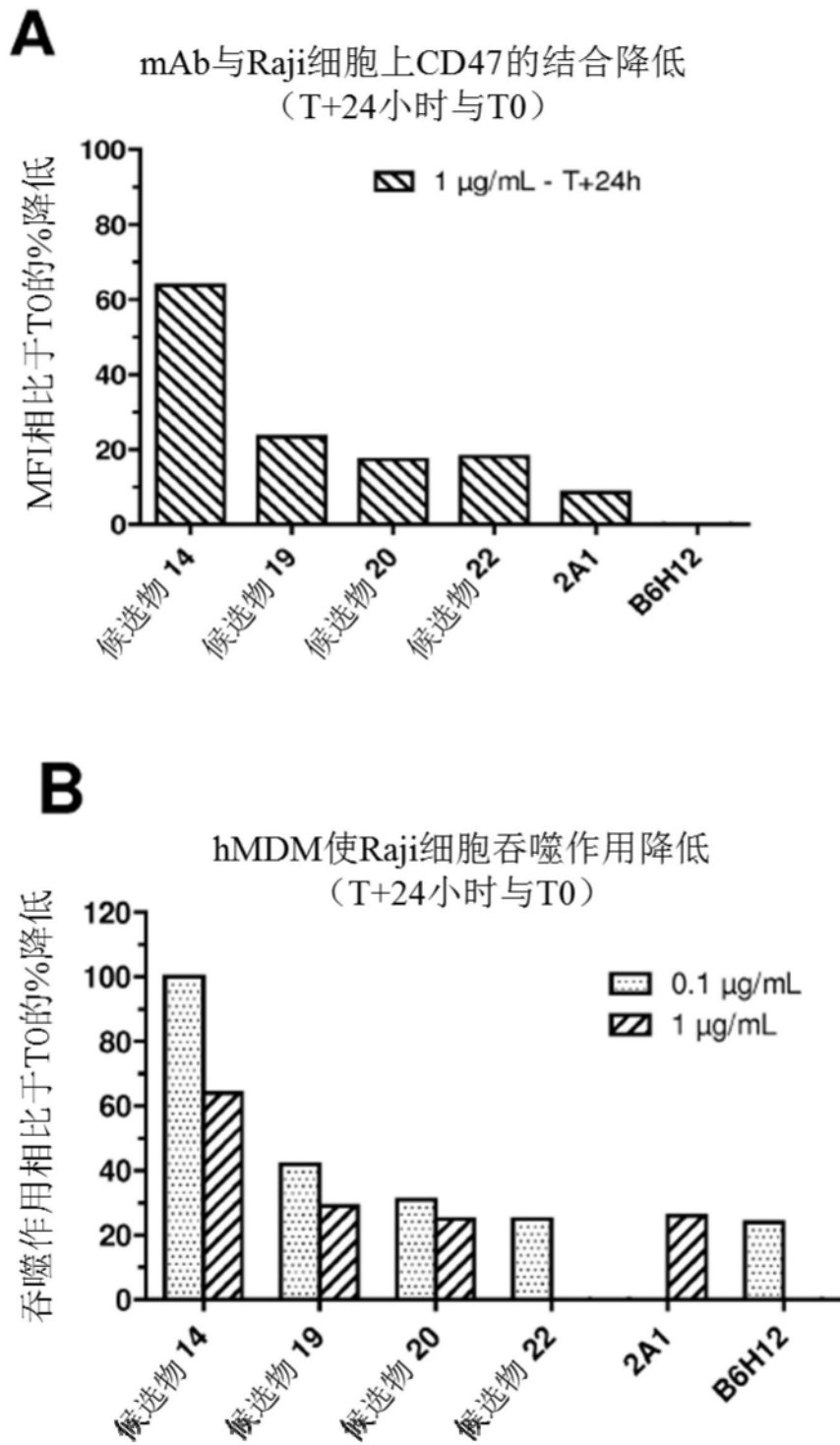


图21

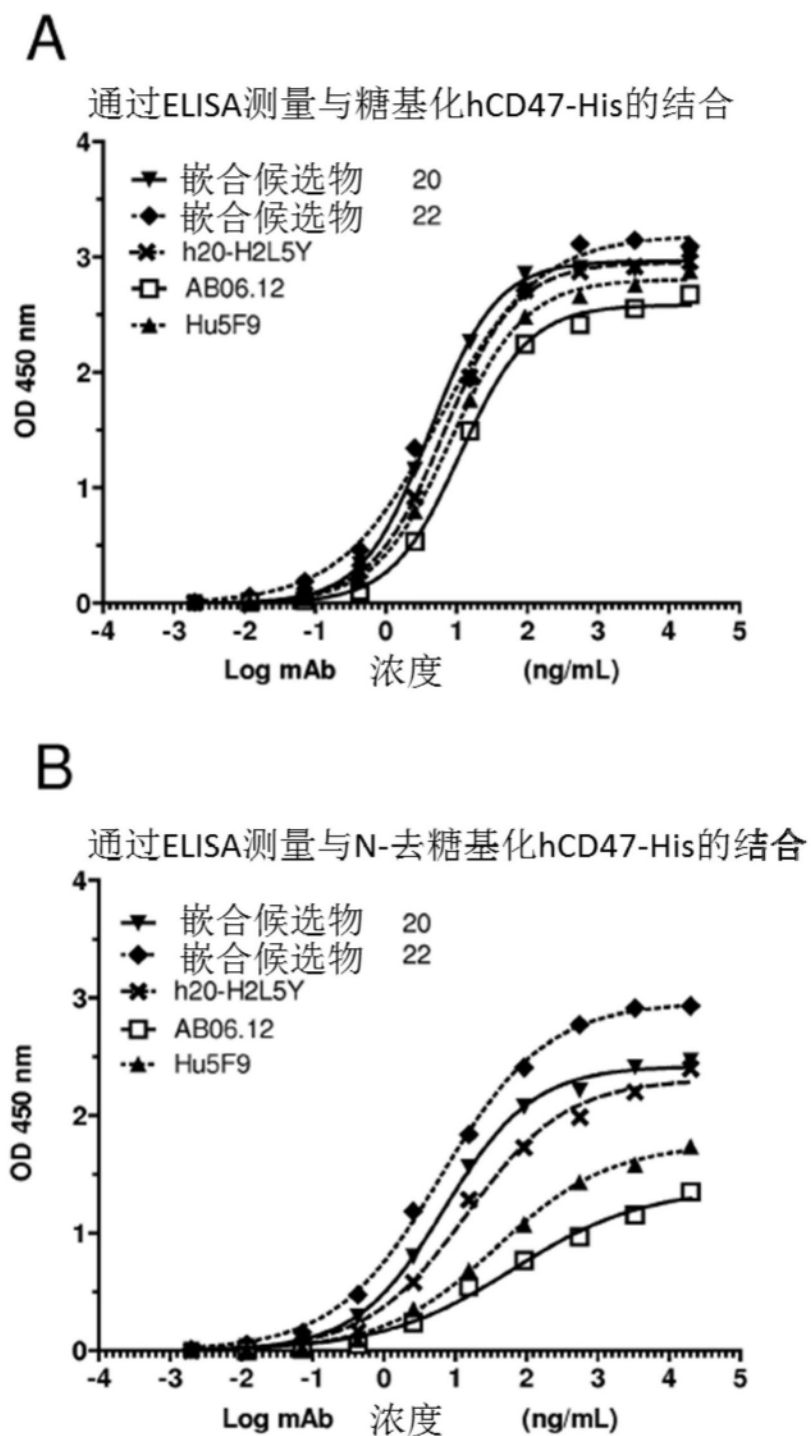


图22

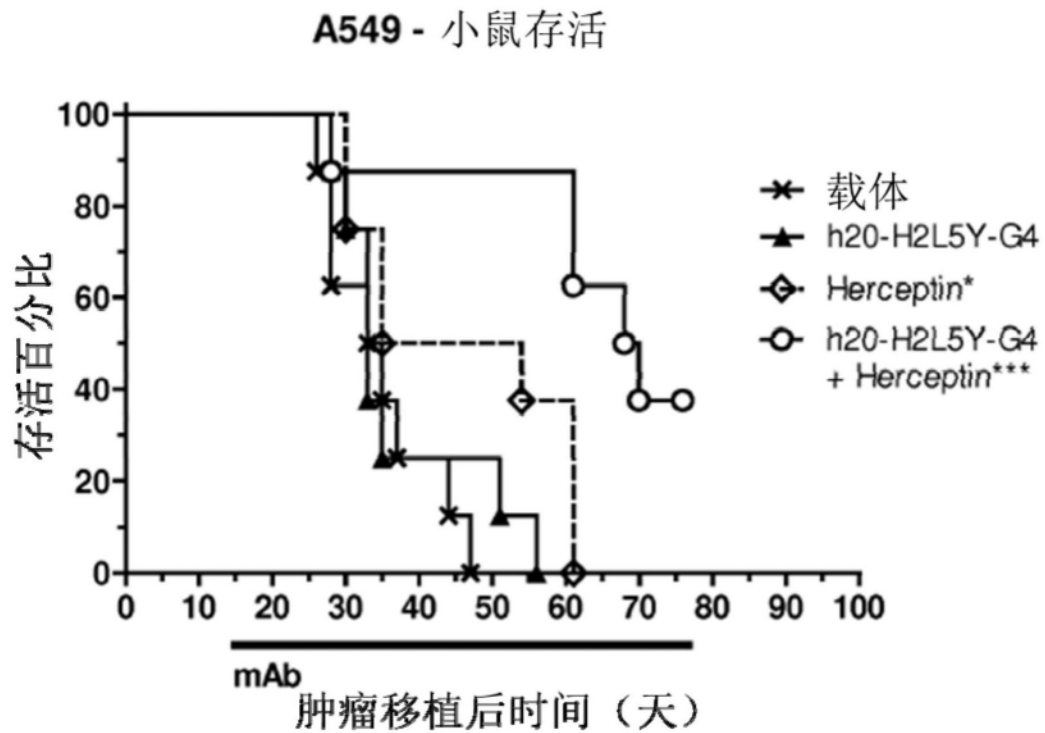


图23

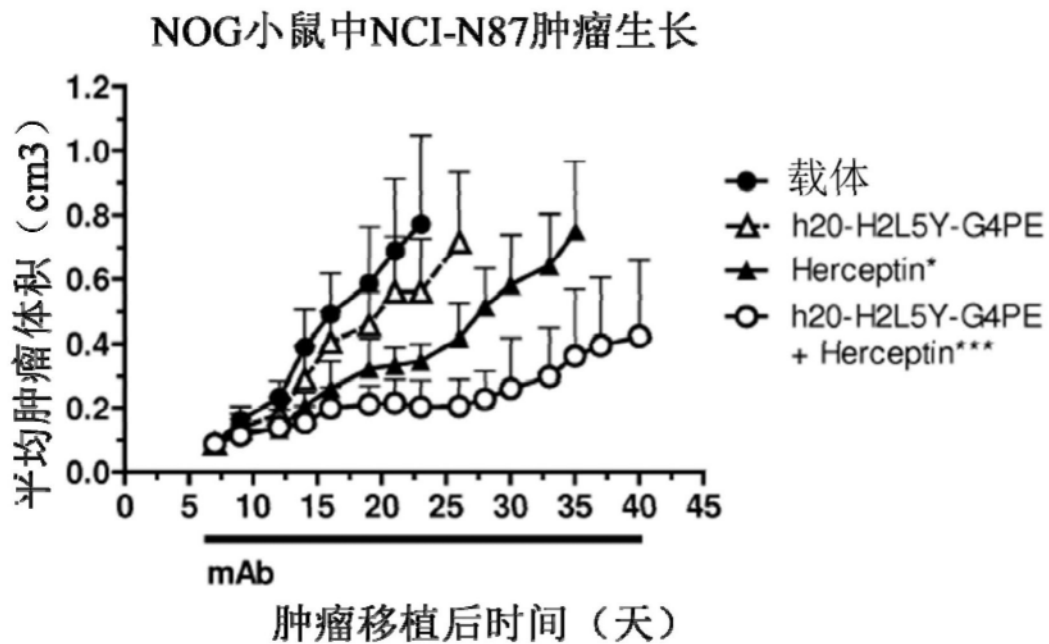


图24