



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107530421 B

(45) 授权公告日 2021. 07. 20

(21) 申请号 201580077136.5 杨俊豪

(22) 申请日 2015.12.28 (74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(65) 同一申请的已公布的文献号 代理人 郑霞
申请公布号 CN 107530421 A

(43) 申请公布日 2018.01.02 (51) Int.Cl.
A61K 39/395 (2006.01)

(30) 优先权数据 C07K 16/28 (2006.01)
62/098,291 2014.12.30 US C12N 15/13 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日 (56) 对比文件
2017.08.29 W0 2014123580 A8,2015.10.22
CN 104136037 A,2014.11.05

(86) PCT国际申请的申请数据 CN 103635490 A,2014.03.12
PCT/US2015/067642 2015.12.28 US 2013195867 A1,2013.08.01

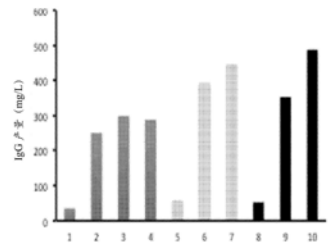
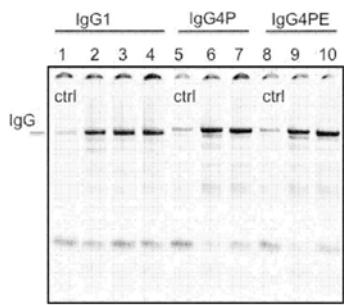
(87) PCT国际申请的公布数据 审查员 魏应亮
W02016/109415 EN 2016.07.07

(73) 专利权人 细胞基因公司 权利要求书3页 说明书52页
地址 美国新泽西州 序列表37页 附图9页

(72) 发明人 亚伦·萨托 赖安·斯塔福德

(54) 发明名称
抗CD47抗体及其用途

(57) 摘要
本文提供的是涉及特异性结合人CD47的抗体的组合物、方法和用途。还提供的是用途和方法,例如治疗方法、诊断方法,以及制造这样的抗体的方法。



1. 一种特异性结合人CD47的单克隆抗CD47抗体,其中所述抗CD47抗体包含:
 - (a) (i) 重链的重链可变区(VH),其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;和
 - (ii) 轻链的轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:13或在N-末端没有氨基酸M的SEQ ID NO:13的氨基酸序列;或
 - (b) (i) 重链的重链可变区(VH),其包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;和
 - (ii) 轻链的轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:13或在N末端没有氨基酸M的SEQ ID NO:13的氨基酸序列。
2. 如权利要求1所述的抗CD47抗体,其中所述抗体:
 - (i) 是人源化抗体;
 - (ii) 是IgG1抗体;
 - (iii) 是IgG4抗体;
 - (iv) 是包含根据EU编号索引的S228P氨基酸取代的IgG4抗体;或
 - (v) 是包含根据EU编号索引的S228P和L235E氨基酸取代的IgG4抗体。
3. 如权利要求1或2所述的抗CD47抗体,其中所述抗体包含重链,所述重链含有SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的氨基酸序列。
4. 如权利要求1-3的任一项所述的抗CD47抗体,其中所述抗体包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:13或在N-末端没有氨基酸M的SEQ ID NO:13的氨基酸序列。
5. 如权利要求1-4的任一项所述的抗CD47抗体,其中所述抗体包含:
 - (i) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:13或在N末端没有氨基酸M的SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链;
 - (ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:13或在N末端没有氨基酸M的SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链;
 - (iii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:13或在N末端没有氨基酸M的SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链;
 - (iv) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:13或在N末端没有氨基酸M的SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链;
 - (v) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:13或在N末端没有氨基酸M的SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链;
 - (vi) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:13或在N末端没有氨基酸M的SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链;或者
 - (vii) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:13或在N末端没有氨基酸M的SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链。
6. 如权利要求1-5的任一项所述的抗CD47抗体,其中所述抗体:
 - (i) 是双特异性抗体;和/或
 - (ii) 缀合到试剂,任选地其中所述试剂是标记或毒素。
7. 如权利要求1-6的任一项所述的抗CD47抗体,其中所述抗体是使用无细胞系统生产的,并且其中所述无细胞系统包含使用S30无细胞提取物,任选地其中所述S30无细胞提取

物包含原核的二硫键异构酶DsbC。

8. 一种药物组合物, 包含根据权利要求1-7的任一项所述的抗CD47抗体。

9. 如权利要求8所述的药物组合物, 进一步包含药学上可接受的载体。

10. 一种多核苷酸, 包含

(i) 编码权利要求1-7的任一项所述的抗CD47抗体的 V_L 与 V_H 的核苷酸序列或

(ii) 编码权利要求1-8的任一项所述的抗CD47抗体的重链和轻链的核苷酸序列, 其中任选地所述核苷酸序列包含编码重链的SEQ ID NO:26-32中的任一核苷酸序列、和编码轻链的SEQ ID NO:33的核苷酸序列。

11. 一种多核苷酸的群体, 其包含 (i) 第一多核苷酸, 包含编码权利要求1-7的任一项所述的抗CD47抗体的所述 V_H 或所述重链的核苷酸序列, 和 (ii) 第二多肽, 包含编码权利要求1-7的任一项所述的抗CD47抗体的所述 V_L 或所述轻链的核苷酸序列。

12. 如权利要求11所述的多核苷酸的群体, 其中所述第一多核苷酸可操作地连接到第一启动子, 以及其中第二多核苷酸可操作地连接到第二启动子。

13. 一种载体, 包含权利要求10的多核苷酸。

14. 一种载体的群体, 其包含 (i) 第一载体, 包含编码权利要求1-7的任一项所述的抗CD47抗体的所述 V_H 或所述重链的核苷酸序列, 和 (ii) 第二载体, 包含编码权利要求1-7的任一项所述的抗CD47抗体的所述 V_L 或所述轻链的核苷酸序列。

15. 一种用于无细胞蛋白表达的组合物, 包含无细胞提取物和权利要求13所述的一种或多种载体。

16. 如权利要求15所述的组合物, 进一步包含S30无细胞提取物。

17. 如权利要求15或16所述的组合物, 进一步包含原核二硫键异构酶DsbC。

18. 权利要求1-17的任一项所述的抗CD47抗体在制备用于治疗血液学癌症的药物中的用途。

19. 如权利要求18所述的用途, 其中所述血液学癌症是实体癌症。

20. 如权利要求18或19所述的用途, 其中所述药物被制备为与放射或化学治疗联合施用。

21. 如权利要求18、19或20所述的用途, 其中所述药物被制备为与另一种抗癌试剂联合施用。

22. 如权利要求18-21的任一项所述的用途, 其中所述癌症是多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤或急性骨髓性白血病 (AML)。

23. 一种分离的细胞, 其包含权利要求10所述的多核苷酸。

24. 一种分离的细胞, 其包含权利要求11或12所述的多核苷酸的群体。

25. 一种分离的细胞, 其包含权利要求13所述的载体。

26. 一种分离的细胞, 其包含权利要求14所述的载体的群体。

27. 一种产生权利要求1-7的任一项所述的抗CD47抗体或抗原结合片段的分离的细胞。

28. 一种宿主细胞的群体, 包含 (i) 包含多核苷酸的第一宿主细胞, 所述多核苷酸包含编码权利要求1-7的任一项所述的抗CD47抗体的所述 V_H 或所述重链的核苷酸序列, 和 (ii) 包含多核苷酸的第二宿主细胞, 所述多核苷酸包含编码权利要求1-7的任一项所述的抗CD47抗体的所述 V_L 或所述轻链的核苷酸序列。

29. 一种制造抗CD47抗体的方法,包括用权利要求15-17的任一项所述的用于无细胞蛋白质表达的组合物表达所述抗CD47抗体。

30. 一种制造抗CD47抗体的方法,包括用权利要求23-27的任一项所述的细胞表达所述抗CD47抗体。

31. 如权利要求29或30所述的方法,进一步包括纯化所述抗CD47抗体。

抗CD47抗体及其用途

[0001] 本申请要求2014年12月30日提交的美国临时专利申请No.62/098,291的权益,其公开内容通过引用全部合并在本文中。

[0002] 电子提交的序列表的参考

[0003] 本申请通过引用并入序列表,其是随本申请提交的,2015年12月27日创建的标题为“Sequence_Listing_12827-563-228.txt”的文本文件,大小是87,612字节。

[0004] 1.领域

[0005] 本文提供的是特异性结合CD47的抗体(抗CD47抗体),以及包含这样的抗体的组合物,包括药物组合物、诊断组合物和试剂盒。还提供的是用于治疗 and 诊断目的使用抗CD47抗体的方法,制造这样的抗CD47抗体的方法,例如,使用无细胞(CF)系统。

[0006] 2.背景

[0007] CD47也称为整联蛋白相关蛋白(IAP)、卵巢癌抗原OA3、Rh-相关抗原和MER6,是一种属于免疫球蛋白超家族的多跨的跨膜受体。巨噬细胞上表达的SIRP α (信号调节蛋白 α)与CD47相互作用,这种相互作用负控制先天免疫细胞的效应物功能,例如,宿主细胞吞噬作用。CD47表达和/或活性已经与许多疾病和失调相关联。因而,需要靶向CD47的治疗,以及制造这样的治疗的更好方法。

[0008] 3.概述

[0009] 在一个方面,本文提供的是抗体(例如,单克隆抗体),包括其抗原结合片段,其特异性地结合CD47(例如,人CD47),例如,CD47的细胞外结构域(ECD)。在具体的方面,这样的抗CD47抗体阻断CD47与SIRP α 的结合、促进吞噬作用、具有降低的或没有Fc效应物功能(例如,结合Fc γ R、ADCC或CDC),和/或具有很少的或没有凝集(例如,血细胞凝集)活性。

[0010] 在具体的方面,本文提供的是特异性结合人CD47的单克隆抗CD47抗体,其中所述抗CD47抗体是亲本抗体的变体,以及其中所述抗CD47抗体在使用无细胞(CF)表达系统生产时具有与在CF表达系统中生产时的所述亲本抗体相比更高的抗体表达滴度或产量。在特定的方面,本文提供的在CF系统中表达的抗CD47抗体是非糖基化的。

[0011] 在一个方面,本文提供的是特异性结合人CD47(例如,SEQ ID NO:38或39)的单克隆抗CD47抗体,其中所述抗CD47抗体在使用无细胞系统生产时,具有与使用无细胞系统生产的亲本抗体相比更高的抗体表达滴度或产量。在具体的方面,与所述亲本抗体相比,所述抗CD47抗体表达滴度或产量更高至少1倍、至少2倍或至少3倍。在具体的方面,与所述亲本抗体相比,所述抗CD47抗体表达滴度或产量更高至少25%、50%、75%或100%。在特定的方面,这样的抗CD47抗体是人源化抗体。在具体的方面,所述无细胞系统包含使用S30无细胞提取物。在特定的方面,这样的无细胞系统包含原核的二硫键异构酶DsbC。在某些方面这样的抗CD47抗体是IgG1抗体。在某些方面,这样的抗CD47抗体是IgG4抗体。在某些方面,这样的抗CD47抗体是包含根据EU编号索引的S228P氨基酸取代的IgG4抗体。在某些方面,这样的抗CD47抗体是包含根据EU编号索引的S228P和L235E氨基酸取代的IgG4抗体。

[0012] 在具体的方面,本文提供的抗CD47抗体的这样的亲本抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在某些方面,这样的亲本抗体包含轻链可变

区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在特定的方面,这样的亲本抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:2、3或4的氨基酸序列。

[0013] 在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体包含(i)包含抗体2A1的互补决定区(CDR)1、2和3的重链可变区;和(ii)包含抗体2A1的CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变区。

[0014] 在具体的方面,本文提供的抗CD47抗体包含(i)包含互补决定区(CDR)1、2和3的重链可变区,所述互补决定区1、2和3分别包含氨基酸序列GFNIKDYLLH(SEQ ID NO:14)、WIDPDQGDTE(SEQ ID NO:15)和NAAYGSSSYPM DY(SEQ ID NO:16);和(ii)包含CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变区,所述CDR1、CDR2和CDR3分别包含氨基酸序列KASQDIHRYLS(SEQ ID NO:17)、RANRLVS(SEQ ID NO:18)和LQYDEFPT(SEQ ID NO:19)。

[0015] 在特定的方面,本文提供的是抗CD47抗体,其包含相对于亲本抗体的一个或更多个氨基酸修饰(例如,氨基酸取代)。在具体的方面,这样的或更多个氨基酸取代处在重链可变区或轻链可变区的框架区之中。在具体的方面,这样的抗CD47抗体在重链可变区的框架区中包含13或14个氨基酸修饰(例如,氨基酸取代)。在特定的方面,这样的抗CD47抗体在重链可变区的框架区中包含1到15个氨基酸修饰(例如,氨基酸取代)。在特定的方面,这样的氨基酸修饰是保守性氨基酸取代。

[0016] 在具体的方面,本文提供的是单克隆抗CD47抗体,其特异性结合CD47(例如,人CD47,例如SEQ ID NO:38或39)并包含重链可变区(VH),所述重链可变区包含氨基酸序列: $X_1X_2QLVQSGAEVKKX_3GX_4SVKVSCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGX_5LEWMGWIDPDQGDTEYAQKX_6QX_7RVTX_8TX_9DX_{10}SX_{11}STAYMELX_{12}SLRSX_{13}DTAX_{14}YYCNAAYGSSSYPM DYWGQGTTVTV$ (SEQ ID NO:20),其中位置 X_1 处的氨基酸是任何氨基酸,或在位置 X_1 处没有氨基酸,以及其中位置 X_2-X_{14} 的每一个处的氨基酸是任何氨基酸。在某些方面, X_1 是M或在位置 X_1 处没有氨基酸, X_2 是具有疏水性侧链的氨基酸,例如M或V, X_3 是T或P, X_4 是S或A, X_5 是具有脂肪族侧链的氨基酸,例如A或G, X_6 是F或L, X_7 是D或G, X_8 是具有疏水性侧链的氨基酸,例如I或M, X_9 是R或T, X_{10} 是R或T, X_{11} 是M或T, X_{12} 是S或R, X_{13} 是带负电的氨基酸,例如E或D,以及 X_{14} 是具有疏水性侧链的氨基酸,例如M或V。在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体的VH包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在某些方面,本文提供的抗CD47抗体的VH包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在具体的方面,本文提供的抗CD47抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在某些方面,本文提供的抗CD47抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在具体的方面,本文提供的抗CD47抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在某些方面,本文提供的抗CD47抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0017] 在具体的方面,本文提供的抗CD47抗体包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:13列或在N-末端没有氨基酸M的SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0018] 在具体的方面,本文提供的是单克隆抗CD47抗体,其特异性结合CD47(例如,人CD47,例如SEQ ID NO:38或39),其中所述抗CD47抗体在施用后不引起或促进实质上的红血细胞减少、贫血、或红血细胞减少与贫血两者。在某些方面,这样的抗CD47抗体在施用后不引起或促进实质上的血小板减少。在特定的方面,这样的抗CD47抗体在施用后不引起或促

进实质上的细胞凝集。在具体的方面,这样的抗CD47抗体在施用后不引起或促进实质上的红血细胞的血细胞凝集。在某些方面,这样的抗CD47抗体抑制(例如,抑制至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%)CD47与信号调节蛋白 α (SIRP α)的相互作用。在特定的方面,这样的抗CD47抗体促进吞噬作用,例如表达CD47的细胞的巨噬细胞介导的吞噬作用。在某些方面,本文提供的这样的抗CD47抗体不引起或促进显著水平的效应物功能。在某些方面,本文提供的抗CD47抗体当使用无细胞系统表达时,与使用CHO细胞表达时相比,展现更低的(例如,更低至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%)对Fc γ R的结合亲和性,或不结合Fc γ R。在特定的方面,这样的更低的结合亲和性是更低至少1log,或更低至少2log。在某些方面,所述Fc γ R是Fc γ RI、Fc γ RIIA R131、Fc γ RIIAH131、Fc γ RIIB或Fc γ RIIIAV158。

[0019] 在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体是非糖基化的,或与在CHO细胞中表达时相比在使用无细胞系统表达时具有更低的(例如,更低至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%)糖基化。

[0020] 在具体的方面,本文提供的是单克隆抗CD47抗体,其特异性结合CD47(例如,人CD47,例如SEQ ID NO:38或39),其中所述抗CD47抗体(i)促进吞噬作用,例如表达CD47的细胞的巨噬细胞介导的吞噬作用;(ii)在施用后不引起或促进显著水平的红血细胞的血细胞凝集;(iii)不引起或促进显著水平的ADCC或CDC;和/或(iv)与在使用CHO细胞表达时相比,或与亲本抗体相比,展现更低的(例如,更低至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%)对Fc γ R的结合亲和性,或不结合Fc γ R。

[0021] 在某些方面,本文提供的抗CD47抗体是双特异性抗体。在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体缀合到试剂。在某些方面,所述试剂是标签或毒素。

[0022] 在特定的方面,本文提供的是药物组合物,其包含有效量的本文提供的抗CD47抗体或其抗原结合片段。在具体的方面,本文提供的所述药物组合物进一步包含药学上可接受的载体。

[0023] 在具体的方面,本文提供的是多核苷酸,其包含编码本文描述的抗CD47抗体的VH链区域、VL链区域、或VL链区域与VH链区域两者的核苷酸序列。在特定的方面,本文提供的是多核苷酸,其包含编码本文描述的抗CD47抗体的重链、轻链、或重链与轻链两者的核苷酸序列。在特定的方面,这样的多核苷酸包含编码重链的SEQ ID NO:26-32的任一个的核苷酸序列。在具体的方面,这样的多核苷酸包含编码轻链的SEQ ID NO:33的核苷酸序列。

[0024] 在特定的方面,本文提供的是多核苷酸的群体,其包含(i)第一多核苷酸,包含编码本文描述的抗CD47抗体的VH或重链的核苷酸序列,和(ii)第二多肽,包含编码本文描述的抗CD47抗体的VL或轻链的核苷酸序列。在某些方面,这样的第一多核苷酸可操作连接到第一启动子,这样的第二多核苷酸可操作连接到第二启动子。

[0025] 在特定的方面,本文提供的是包含本文描述的一个或更多个多核苷酸的载体。

[0026] 在具体的方面,本文提供的是载体的群体,其包含(i)第一载体,包含编码本文描述的抗CD47抗体的VH或重链的核苷酸序列,和(ii)第二载体,包含编码本文描述的抗CD47抗体的VL或轻链的核苷酸序列。

[0027] 在特定的方面,本文提供的是用于无细胞蛋白质表达的组合物,其包含无细胞提取物和本文描述的一种或更多种多核苷酸或载体。在具体的方面,所述组合物进一步包含

S30无细胞提取物。在特定的方面,本文提供的组合物进一步包含原核的二硫键异构酶DsbC。

[0028] 在具体的方面,本文提供的是治疗癌症的方法,其中所述方法包括以足够治疗所述对象的癌症的数量向有需要的对象施用本文描述的抗CD47抗体。

[0029] 在特定的方面,本文提供的是减轻癌症症状的方法,所述方法包括以足够减轻对象的癌症的一种或更多种症状的数量向有需要的对象施用本文描述的抗CD47抗体。

[0030] 在具体的方面,本文提供的这样的方法进一步包括施用放射或化学治疗。

[0031] 在具体的方面,本文提供的这样的方法进一步包括施用另一种抗癌试剂。

[0032] 在本文提供的方法的具体的方面,所述癌症是血液学癌症。在特定的方面,所述癌症是实体癌症。在某些方面,所述癌症是多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性白血病(AML)、乳腺癌、膀胱癌、非小细胞肺癌/恶性肿瘤、肝细胞癌(HCC)、肉瘤、或头颈癌症。

[0033] 在特定的方面,本文提供的是分离的细胞,其包含本文描述的一种或更多种多核苷酸或载体。

[0034] 在具体的方面,本文提供的是分离的细胞,其包含本文描述的多核苷酸或载体的群体。

[0035] 在具体的方面,本文提供的是分离的细胞,其产生本文描述的抗CD47抗体或抗原结合片段。

[0036] 在特定的方面,本文提供的是宿主细胞的群体,其包含(i)第一宿主细胞,包含编码本文描述的抗CD47抗体的VH或重链的核苷酸序列,和(ii)第二宿主细胞,包含编码本文描述的抗CD47抗体的VL或轻链的多核苷酸。

[0037] 在特定的方面,本文提供的是制造抗CD47抗体的方法,包括用本文描述的用于无细胞蛋白质表达的组合物表达本文描述的抗CD47抗体。在某些方面,这样的方法进一步包含纯化所述抗CD47抗体。

[0038] 在具体的方面,本文提供的是制造抗CD47抗体的方法,包括用本文描述的细胞表达所述抗CD47抗体。在某些方面,这样的方法进一步包含纯化所述抗CD47抗体。

[0039] 4.附图的简要说明

[0040] 附图1A描绘了用无细胞(CF)系统表达的抗CD47抗体的自体放射照片。样品1-10分别相应于CF表达的抗CD47IgG1(1)、IgG1-5m(2)、IgG1-13m(3)、IgG1-13mZ(4)、IgG4P(5)、IgG4P-5m(6)、IgG4P-13m(7)、IgG4PE(8)、IgG4PE-5m(9)和IgG4PE-13m(10)抗体。

[0041] 附图1B描绘的图形显示了从CF表达系统获得的抗CD47抗体滴度(mg/L)。样品1-10分别相应于CF表达的抗CD47IgG1(1)、IgG1-5m(2)、IgG1-13m(3)、IgG1-13mZ(4)、IgG4P(5)、IgG4P-5m(6)、IgG4P-13m(7)、IgG4PE(8)、IgG4PE-5m(9)和IgG4PE-13m(10)抗体。

[0042] 附图2A-2F描绘了单独的传感图,来自抗CD47IgG1-5m(2A)、IgG1-13m(2B)、IgG1-13mZ(2C)、IgG4P-5m(2D)、IgG4PE-5m(2E)和对照抗体(2F)的Biacore分析。

[0043] 附图3A-3C描绘的图形标绘了对照温度(°C)的比热容(kcal/mol/°C),来自抗CD47IgG1-13mZ(3A)、IgG1-13m(3B)和IgG1-5m(3C)抗体的使用差示扫描量热术(DSC)的热稳定性分析。

[0044] 附图4描绘的图形标绘了对照时间(小时)的抗CD47抗体血浆浓度(μg/ml),来自使用CHO细胞产生的抗CD47IgG4-PE抗体和通过CF表达系统产生的抗CD47IgG1和IgG1-5m抗体

的药物动力学研究。

[0045] 附图5描绘的图形标绘了对照RPMI8226肿瘤细胞接种后天数的肿瘤体积(mm³),来自使用CF表达系统产生的抗CD47IgG1-5m抗体、以1mg/kg、0.3mg/kg和0.1mg/kg(qwx3)的剂量进行的体内小鼠肿瘤异种移植研究。

[0046] 5. 详细说明

[0047] 在一个方面,本文提供的是特异性结合CD47(例如,人CD47)的抗体(例如,单克隆抗体)及其抗原结合片段。在具体的方面,这样的抗CD47抗体阻断CD47与SIRP α 的结合,促进吞噬作用,具有降低的Fc效应物功能或没有Fc效应物功能(例如,结合Fc γ R、ADCC或CDC),和/或具有很少的或没有凝集(例如,血细胞凝集)活性。

[0048] 在具体的方面,本文提供的是特异性结合人CD47的单克隆抗CD47抗体,其中所述抗CD47抗体是亲本抗体的变体,以及其中所述抗CD47抗体在使用无细胞(CF)表达系统生产时具有与在CF表达系统中表达时的所述亲本抗体相比更高的抗体表达滴度或产量。在特定的方面,本文提供的在CF系统中表达的抗CD47抗体是非糖基化的。

[0049] 如本文使用的,术语“CD47”或“整联蛋白相关蛋白”或“IAP”或“卵巢癌抗原”或“OA3”或“Rh相关抗原”或“MER6”可互换地使用,是指一种属于免疫球蛋白超家族的多跨的跨膜受体。在下文提供了示范性的人CD47的氨基酸序列(Genbank登录号No.Q08722.1(GI:1171879),通过引用合并在本文中)。信号序列(氨基酸1-18)是下划线的。

[0050] 1MWPLVAALLL GSACCGSAQL LFNKTKSVEF TFCNDTVVIP CFVTNMEAQN TTEVYVKWKF

[0051] 61KGRDIYTFDG ALNKSTVPTD FSSAKIEVSQ LLKGDASLKM DKSDAVSHTG NYTCEVTELT

[0052] 121REGETIIELEK YRVVSWFSPN ENILIVIFPI FAILLFWGQF GIKTLKYRSG GMDEKTIALL

[0053] 181VAGLVITVIV IVGAILFVPG EYSLKNATGL GLIVTSTGIL ILLHYVVFST AIGLTSFVIA

[0054] 241ILVIQVIAYI LAVVGLSLCI AACIPMHGPL LISGLSILAL AQLLGLVYMK FVASNQKTIQ

[0055] 301PPRKAVEEPL NAFKESKGMM NDE (SEQ ID NO:38)

[0056] 为了清楚起见,下文提供了除去信号序列的示范性的人CD47的氨基酸序列。

[0057] 1QLLFNKTGSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP

[0058] 61TDFSSAKIEV SLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE LTREGETIIE LKYRVVSWFS

[0059] 121PNENILIVIF PIFAILLFWG QFGIKTLKYR SGGMDEKTIA LLVAGLVITV IVIVGAILFV

[0060] 181PGEYSLKNAT GLGLIVTSTG ILILLHYVVF STAIGLTSFV IAILVIQVIA YILAVVGLSL

[0061] 241CIAACIPMHG PLLISGLSIL ALAQLLGLVY MKFVASNQKT IQPPRKAVEE PLNAFKESKG

[0062] 301MMNDE (SEQ ID NO:39)

[0063] 术语红血细胞和红血球是同义的,在本文中可互换地使用。

[0064] 术语凝集是指细胞的簇集,而术语血细胞凝集是指细胞的特定子集,即红血细胞的簇集。因而,血细胞凝集是凝集的一种。

[0065] 5.1 抗体

[0066] 在具体的方面,本文提供的是特异性结合CD47(例如,人CD47)的抗体。在特定的方面,本文提供的是包含一个或多个氨基酸残基中的修饰的抗CD47抗体(例如,重链可变区的框架区中5-13个氨基酸取代),与没有所述修饰的亲本抗体相比,其令人惊讶地容许在无细胞(CF)表达系统中更好的生产。在某些方面,在体内或在体外、或在体内与在体外两者,这样的抗CD47抗体抑制SIRP α 与CD47的相互作用,是非糖基化的,促进吞噬作用,具有抗肿

瘤活性(例如,不促进凝集,例如,血细胞凝集),和/或具有低的或没有Fc效应物功能(例如,结合Fc γ R、ADCC或CDC)。

[0067] 在某些实施方式中,本文描述的抗体或抗原结合片段可以包含不是天然存在于动物或哺乳动物(例如,人类)体内的抗体种系全集之内的序列。

[0068] 如本文使用的和除非另作说明,术语“约”或“大约”是指在给定值或范围的加或减10%之内。在需要整数的情况下,该术语是指在给定值或范围的加或减10%之内、向上或向下舍入到最接近的整数。

[0069] 如本文使用的,术语“抗体”和“免疫球蛋白”和“Ig”是技术术语,在本文中可互换地使用,是指一种具有特异性结合抗原的抗原结合位点的分子。

[0070] 抗体可以包括,例如,单克隆抗体、重组产生的抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、鼠抗体(例如,小鼠或大鼠抗体)、嵌合抗体、合成的抗体、以及包含两条重链和两条轻链分子的四聚的抗体。在具体的实施方式中,抗体可以包括,但不限于,抗体轻链单体、抗体重链单体、抗体轻链二聚体、抗体重链二聚体、抗体轻链-抗体重链对、内体(intrabodies)、杂共轭抗体、单结构域抗体和单价抗体。在具体的实施方式中,抗体可以包括抗原结合片段或表位结合片段,例如但不限于,单链抗体或单链Fv(scFv)(例如,包括单特异性的、双特异性的,等)、骆驼化的抗体、affybodies、Fab片段、F(ab')片段、F(ab')₂片段和二硫化物连接的Fv(sdFv)。在某些实施方式中,本文描述的抗体是指多克隆抗体群体。

[0071] 抗体可以是免疫球蛋白分子的任何型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY),任何类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1或IgA2),或任何子类(例如,IgG2a或IgG2b)。在某些实施方式中,本文描述的抗体是IgG抗体,或其类(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)或子类。在某些实施方式中,本文描述的抗体是IgG1抗体(例如,人IgG1)或其子类。在某些实施方式中,本文描述的IgG1抗体包含处在恒定区中的一个或多个氨基酸取代和/或删除。在某些实施方式中,本文描述的抗体是IgG4抗体(例如,人IgG4)或其子类。在某些实施方式中,本文描述的IgG4抗体包含处在恒定区中的一个或多个氨基酸取代和/或删除。

[0072] 如本文使用的,“抗原”是一种部分或分子,其含有抗体可以特异性结合的表位。因而,抗原也被抗体特异性地结合。

[0073] 如本文使用的,“表位”是本领域的术语,是指抗体可以特异性结合的抗原局部区域。表位可以是线性表位,或构象的、非线性的或不连续的表位。对于多肽抗原来说,例如,表位可以是所述多肽的连续氨基酸(“线性”表位),或表位可以包含来自所述多肽的两个或多个非连续区域的氨基酸(“构象”、“非线性”或“不连续”表位)。本领域技术人员将理解的是,一般地,线性表位可能或可能不依赖于二级、三级或四级结构。

[0074] 如本文使用的,术语“免疫特异性结合”、“免疫特异性识别”、“特异性结合”和“特异性识别”是抗体的上下文中类似的术语,是指分子结合抗原/表位,这样的结合是本领域的技术人员理解的。例如,特异性结合抗原的分子(例如,抗体)可以结合其他肽或多肽,一般以更低的亲和力结合,通过例如免疫分析、表面胞质团共振分析,例如BiacoreTM、KinExA平台(Sapidyne Instruments,Boise,ID)或本领域已知的其他分析所测定的。在具体的实施方式中,与分子结合其他抗原时的K_a相比,特异性结合抗原的分子以至少2logs、2.5logs、3logs、4logs或更大的K_a结合抗原。在另一个具体的实施方式中,特异性结合抗原

的分子不与其他蛋白质交叉反应。在另一个具体的实施方式中,特异性结合抗原的分子不与其他非CD47蛋白质交叉反应。

[0075] 如本文使用的,术语“单克隆抗体”是本领域公知的术语,是指从同质的或基本上同质的抗体的群体获得的抗体。术语“单克隆”不限于制造所述抗体的任何特定方法。一般地,单克隆抗体的群体可以通过细胞、细胞的群体或细胞系产生。在具体的实施方式中,如本文使用的“单克隆抗体”是由单个细胞或细胞系产生的抗体,其中所述抗体免疫特异性结合CD47表位,通过例如ELISA或本领域已知的其他抗原结合或竞争性结合分析、或在本文提供的实施例中测定。在特定的实施方式中,单克隆抗体可以是嵌合抗体或人源化抗体。在某些实施方式中,单克隆抗体是单价的抗体或多价的(例如,二价的)抗体。

[0076] 如本文使用的,术语“非天然氨基酸”是指不是生产蛋白质的氨基酸的氨基酸,或其翻译后修饰的变体。特别地,该术语是指不是20种常见氨基酸或吡咯赖氨酸或硒代半胱氨酸之一的氨基酸,或其翻译后修饰的变体。

[0077] 如本文使用的,术语“多克隆抗体”是指一种抗体群体,其包括多种不同的抗体,它们免疫特异性结合抗原内相同的和/或不同的表位或抗原。

[0078] 如本文使用的,术语“可变区”或“可变域”是指抗体的一部分,一般地,是指抗体轻链或重链的一部分,一般是成熟重链中大约氨基末端110到120个氨基酸,以及成熟轻链中大约氨基末端90到100个氨基酸。可变区包含互补决定区(CDR),其侧翼是框架区(FR)。一般地,CDR和FR的空间方向如下,在N-末端到C-末端的方向上:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。不希望受到任何特定机制或理论的限制,相信的是轻链和重链的CDR主要负责抗体与抗原的相互作用以及抗体对表位的特异性。在具体的实施方式中,本文描述的抗体的氨基酸位置的编号是根据Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242中的EU索引。在某些实施方式中,所述可变区是人可变区。在某些实施方式中,所述可变区包含鼠(例如,小鼠或大鼠)CDR和人框架区(FR)。在特定的实施方式中,所述可变区是灵长类(例如,人类或非人灵长类)可变区。在某些实施方式中,所述可变区包含鼠(例如,小鼠或大鼠)CDR和灵长类(例如,人类或非人灵长类)框架区(FR)。作为非限制性实例,本文描述的可变区是将人类序列的两个或更多个片段组合成复合的人类序列来获得的。

[0079] 在某些方面,抗体的CDR可以根据(i) Kabat编号系统(Kabat et al. (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391和Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242);或(ii) Chothia编号方案,其在本文中称为“Chothia CDR”(参见,例如Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917; Al-Lazikani et al., 1997, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948; Chothia et al., 1992, *J. Mol. Biol.*, 227:799-817; Tramontano A et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215(1):175-82;以及美国专利No. 7,709,226);或(iii) ImMunoGeneTics (IMGT) 编号系统,例如在Lefranc, M.-P., 1999, *The Immunologist*, 7:132-136 and Lefranc, M.-P. et al., 1999, *Nucleic Acids Res.*, 27:209-212 (“IMGT CDRs”);或(iv) MacCallum et al., 1996, *J. Mol. Biol.*, 262:732-745中描述的来确定。还参见,例如, Martin, A., “Protein Sequence and Structure Analysis of

Antibody Variable Domains,”in Antibody Engineering, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp.422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001)。

[0080] 对于Kabat编号系统,抗体重链分子内的CDR一般存在于氨基酸位置31到35,任选地其可以包括35之后的一个或两个其他氨基酸(在Kabat编号方案中称为35A和35B)(CDR1),氨基酸位置50到65(CDR2)和氨基酸位置95到102(CDR3)。使用Kabat编号系统,抗体轻链分子内的CDR一般存在于氨基酸位置24到34(CDR1)、氨基酸位置50到56(CDR2)和氨基酸位置89到97(CDR3)。技术人员公知的是,使用Kabat编号系统,由于FR和/或CDR的缩短或延长,抗体可变域的实际的线性氨基酸序列可以含有更少的或其他的氨基酸,因而,氨基酸的Kabat编号不必然地与它的线性氨基酸编号相同。

[0081] 本文提供的抗体可以是免疫球蛋白分子的任何型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY),任何类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1或IgA2),或任何子类(例如,IgG2a或IgG2b,或其混合物)。在某些实施方式中,本文描述的抗体是IgG抗体(例如,人IgG),或其类(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)或子类。

[0082] 在具体的方面,本文提供的是包含抗体轻链和重链,例如独立的轻链和重链的抗体。对于轻链而言,在具体的实施方式中,本文描述的抗体的轻链是kappa(κ)轻链。在另一个具体的实施方式中,本文描述的抗体的轻链是lambda(λ)轻链。在另一个实施方式中,轻链是混合的序列,例如,轻链的可变部分包含kappa轻链序列,轻链的恒定区包含lambda轻链序列,或反之。在某些实施方式中,本文描述的抗体的轻链是人类kappa轻链或人类lambda轻链。人类恒定区序列的非限制性实例已经在本领域中描述,例如,参见美国专利No.5,693,780和Kabat et al.(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242。

[0083] 在具体的方面,本文提供的是抗体,例如单克隆抗体,其特异性结合人CD47,其中这样的抗CD47抗体是亲本抗CD47抗体的变体,其中所述抗CD47抗体当使用无细胞(CF)表达系统生产时,与在CF系统中表达时的亲本抗CD47抗体相比,具有更高的抗体表达滴度或产量,以及其中所述抗CD47抗体包含相对于所述亲本抗CD47抗体的一个或更多个氨基酸修饰,例如1-15个氨基酸修饰。在特定的方面,所述一个或更多个氨基酸修饰,例如1-15个氨基酸修饰处在重链或VH(例如,SEQ ID NO:1)之内。在特定的方面,所述一个或更多个氨基酸修饰,例如1-15个氨基酸修饰处在VH(例如,SEQ ID NO:1)的框架区之内。在某些方面,本文提供的抗CD47抗体是包含亲本抗CD47抗体的CDR(例如,Kabat CDR)的亲本抗CD47抗体的变体。

[0084] 在具体的方面,本文提供的是抗体,例如单克隆抗体,其特异性结合人CD47,其中这样的抗CD47抗体是亲本抗CD47抗体的变体,其中所述抗CD47抗体当使用无细胞(CF)表达系统生产时,与在CF系统中表达时的亲本抗CD47抗体相比,具有更高的抗体表达滴度或产量,以及其中所述抗CD47抗体包含相对于所述亲本抗CD47抗体的一个或更多个氨基酸修饰,例如1-15个氨基酸修饰。在特定的方面,所述一个或更多个氨基酸修饰,例如5个或14个氨基酸修饰处在重链或VH(例如,SEQ ID NO:1)之内。在特定的方面,所述一个或更多个氨基酸修饰,例如5、10、13或14个氨基酸修饰处在VH(例如,SEQ ID NO:1)的框架区之内。在特定的方面,所述一个或更多个氨基酸修饰,例如5、13或14个氨基酸修饰处在VH(例如,SEQ

ID NO:1)的框架区之内。在某些方面,本文提供的抗CD47抗体是包含亲本抗CD47抗体的CDR(例如,Kabat CDR)的亲本抗CD47抗体的变体。在某些方面,这样的抗CD47抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型抗体。在某些方面,这样的抗CD47抗体是IgG1同种型抗体。在某些方面,这样的抗CD47抗体是IgG1Z异型同种型抗体。在某些方面,这样的抗CD47抗体是IgG4同种型抗体,例如IgG4P或IgG4PE。

[0085] 在具体的方面,本文提供的是抗体,例如单克隆抗体,其特异性结合人CD47,其中这样的抗CD47抗体是亲本抗CD47抗体的变体,其中所述抗CD47抗体当使用无细胞(CF)表达系统生产时,与在CF系统中表达时的亲本抗CD47抗体相比,具有更高的抗体表达滴度或产量。在具体的实施方式中,所述亲本抗CD47抗体是抗体AB6.12(参见,例如,美国申请公开No.US 2014/0140989A1,通过引用将其全部合并在本文中)。抗体AB6.12的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的氨基酸序列在下文提供,其中Kabat CDRs是下划线的。在某些方面,本文提供的抗CD47抗体是亲本抗体AB6.12的变体,并包含亲本抗体AB6.12的CDRs(例如,Kabat CDRs),例如SEQ ID NO:14-19。在某些方面,这样的抗CD47抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型抗体。在某些方面,这样的抗CD47抗体是IgG1同种型抗体。在某些方面,这样的抗CD47抗体是IgG1Z异型同种型抗体。在某些方面,这样的抗CD47抗体是IgG4同种型抗体,例如IgG4P或IgG4PE。

[0086] 抗CD47抗体AB6.12重链可变区(VH)(Kabat CDRs 1-3是下划线的,SEQ ID NO:14-16):

[0087] QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSCASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDQGDTEYAQKFQDRV TITRDRSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TTVTV (SEQ ID NO:1)

[0088] 抗CD47抗体AB6.12轻链可变区(VL)(Kabat CDRs 1-3是下划线的,SEQ ID NO:17-19):

[0089] NIQMTQSPSAMSASVGDRTITCKASQDIHRYLSWFFQKPKGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPPYTFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:12)

[0090] 在具体的实施方式中,本文描述的抗CD47包含一个或多个氨基酸修饰(例如,1-15个氨基酸修饰),例如处于亲本抗体的VH框架区中,例如,选自美国申请公开No.US 2014/0140989 A1中描述的抗CD47抗体的亲本抗体,通过引用将其完全合并在本文中,例如,美国申请公开No.US 2014/0140989 A1的表1中描述的抗CD47抗体(例如,抗CD47抗体2A1、AB2.03、AB2.04、AB2.05、AB2.06、AB2.07、AB2.08、AB2.09、AB2.13、AB3.09、AB6.12、AB6.13、AB6.14、AB6.17、AB10.13、AB10.14、AB11.05、AB12.05、AB15.05、AB16.05、AB17.05、AB22.05、AB23.05、AB24.05和AB25.05)。

[0091] 在具体的方面,本文提供的是抗体,例如单克隆抗体,其特异性结合人CD47,其中这样的抗CD47抗体是亲本抗CD47抗体的变体,其中所述抗CD47抗体当使用无细胞(CF)表达系统生产时,与在CF系统中表达时的亲本抗CD47抗体相比,具有更高的抗体表达滴度或产量,以及其中所述抗CD47抗体包含VH,所述VH包含以下的N-末端到C-末端序列: X_1QX_2QLVQS GAEVKK X_3GX_4 SVKVSCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQ X_5 LEWMGWIDPDQGDTEYAQK X_6QX_7 RVT $X_8TX_9DX_{10}SX_{11}$ STAYMEL $X_{12}SL$ RS X_{13} DTA X_{14} YYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TTVTV (SEQ ID NO:20),其中 X_1-X_{14} 的下划线的氨基酸残基是从N-末端到C-末端排列的,其中 X_1 是M或在位置 X_1 处没有氨基酸, X_2 是具有疏水性侧链的氨基酸,例如M或V, X_3 是T或P, X_4 是S或A, X_5 是具有脂肪族侧链的氨基酸,例

如A或G, X_6 是F或L, X_7 是D或G, X_8 是具有疏水性侧链的氨基酸,例如I或M, X_9 是R或T, X_{10} 是R或T, X_{11} 是M或T, X_{12} 是S或R, X_{13} 是带负电的氨基酸,例如E或D,以及 X_{14} 是具有疏水性侧链的氨基酸,例如M或V。

[0092] 在特定的方面,本文描述的抗CD47抗体包含VH,所述VH包含SEQ ID NO:20的序列,其中位置 X_1 处的氨基酸是任何氨基酸,例如M, X_2 不是M, X_3 不是T, X_4 不是S, X_5 不是A, X_6 不是F, X_7 不是D, X_8 不是I, X_9 不是R, X_{10} 不是R, X_{11} 不是M, X_{12} 不是S, X_{13} 不是E和/或 X_{14} 不是M。在特定的方面, X_1 到 X_{14} 的任何1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个不是这些氨基酸。在特定的方面,所述VH氨基酸序列不是抗体AB6.12的VH氨基酸序列,例如,所述VH氨基酸序列不是SEQ ID NO:1。

[0093] 在特定的方面,本文描述的抗CD47抗体包含VH,所述VH包含SEQ ID NO:20的序列,其中位置 X_7 处的氨基酸不是G, X_9 不是A和/或 X_{11} 不是S。在特定的方面, X_7 、 X_9 和 X_{11} 的任何1、2或3个不是这些氨基酸。在特定的方面,当位置 X_7 的氨基酸是G时,则 X_8 是M和/或 X_{10} 是T, X_9 不是A和/或 X_{11} 不是S。

[0094] 在特定的方面,本文描述的抗CD47抗体包含VH,所述VH包含SEQ ID NO:20的序列,其中位置 X_7 处的氨基酸不是G, X_8 不是M, X_9 不是E, X_{10} 不是T和/或 X_{11} 不是T。在特定的方面, X_7 到 X_{11} 的任何1、2、3或4个不是这些氨基酸。在特定的方面,当位置 X_7 的氨基酸是G时,则 X_8 是M、 X_{10} 是T, X_9 不是E以及 X_{11} 是T。

[0095] 在特定的方面,本文描述的抗CD47抗体包含VH,所述VH包含SEQ ID NO:20的序列,其中所述VH不包含美国申请公开No.US2014/0140989A1的SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30的氨基酸序列,通过引用将其全部合并在本文中。在特定的方面,本文描述的抗CD47抗体包含VH,所述VH包含SEQ ID NO:20的共有序列,其中所述VH不包含美国申请公开No.US2014/0140989A1的SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30的氨基酸序列的框架区,通过引用将其全部合并在本文中。

[0096] 在特定的方面, X_1 是M, X_2 是V, X_3 是P, X_4 是A, X_5 是G, X_6 是L, X_7 是G, X_8 是M, X_9 是T, X_{10} 是T, X_{11} 是T, X_{12} 是R, X_{13} 是D和/或 X_{14} 是V。在特定的实施方式中, X_1 到 X_{14} 的任何1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个是这些氨基酸。

[0097] 在特定的方面, X_1 是M, X_2 是M, X_3 是P, X_4 是S, X_5 是A, X_6 是F, X_7 是G, X_8 是I, X_9 是R, X_{10} 是R, X_{11} 是T, X_{12} 是R, X_{13} 是E和/或 X_{14} 是V。在特定的实施方式中, X_1 到 X_{14} 的任何1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个是这些氨基酸。

[0098] 在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体不是抗体AB6.12。在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体不包含抗体AB6.12的VH(例如,SEQ ID NO:1)和/或VL(例如,SEQ ID NO:12)。

[0099] 在具体的方面,本文提供的抗CD47抗体包含表1中呈现的以下VH氨基酸序列之一。

[0100] 表1:VH氨基酸序列

[0101]	SEQ ID NO:	说明	VH 氨基酸序列
	20	共有的	<u>X₁</u> Q <u>X₂</u> QLVQSGAEVKK <u>X₃</u> G <u>X₄</u> SVKVSCKASGFNIKDY <u>Y</u> Y <u>L</u> H <u>W</u> V <u>R</u> QAPGQ <u>X₅</u> LEWMGWIDPDQGDTEYAQK <u>X₆</u> Q <u>X₇</u> RVT <u>X₈</u> <u>T</u> <u>X₉</u> <u>D</u> <u>X₁₀</u> <u>S</u> <u>X₁₁</u> STAYMEL <u>X₁₂</u> SLRS <u>X₁₃</u> DTA <u>X₁₄</u> YYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TTVT
	21	13m	MQVQLVQSGAEVKK <u>P</u> GASVKVSCKASGFNIKDY <u>Y</u> Y <u>L</u> H <u>W</u> V <u>R</u> QAPGQ <u>G</u> LEWMGWIDPDQGDTEYAQK <u>L</u> Q <u>G</u> RVT <u>M</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>S</u> TAYMEL <u>R</u> SLRS <u>D</u> DTA <u>V</u> YYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TTVT
	22	5m	MQMQLVQSGAEVKK <u>P</u> GSSVKVSCKASGFNIKDY <u>Y</u> Y <u>L</u> H <u>W</u> V <u>R</u> QAPGQALEWMGWIDPDQGDTEYAQK <u>L</u> Q <u>G</u> RVTMTTDT <u>S</u> TAYMEL <u>R</u> SLRSDDTA <u>V</u> YYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TTVT

[0102] 在具体的方面,本文提供的是抗体,例如单克隆抗体,其特异性结合人CD47,其中这样的抗CD47抗体是亲本抗CD47抗体的变体,其中所述抗CD47抗体当使用无细胞(CF)表达系统生产时,与在CF系统中表达时的亲本抗CD47抗体相比,具有更高的抗体表达滴度或产量,以及其中所述抗CD47抗体包含VH,所述VH包含SEQ ID NO:21。在某些方面,这样的抗CD47抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型抗体。在某些方面,这样的抗CD47抗体是IgG1同种型抗体。在某些方面,这样的抗CD47抗体是IgG1Z异型同种型抗体。在某些方面,这样的抗CD47抗体是IgG4同种型抗体,例如IgG4P或IgG4PE。

[0103] 在具体的方面,本文提供的是抗体,例如单克隆抗体,其特异性结合人CD47,其中这样的抗CD47抗体是亲本抗CD47抗体的变体,其中所述抗CD47抗体当使用无细胞(CF)表达系统生产时,与在CF系统中表达时的亲本抗CD47抗体相比,具有更高的抗体表达滴度或产量,以及其中所述抗CD47抗体包含VH,所述VH包含SEQ ID NO:22。在某些方面,这样的抗CD47抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型抗体。在某些方面,

[0104] 这样的抗CD47抗体是IgG1同种型抗体。在某些方面,这样的抗CD47抗体是IgG1Z异型同种型抗体。在某些方面,这样的抗CD47抗体是IgG4同种型抗体,例如IgG4P或IgG4PE。

[0105] 在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体(IgG1-13m)包含IgG1重链,所述IgG1重链包含以下所列的氨基酸序列:

[0106] MQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYYYLHWVRQAPGQGLEWMGWIDPDQGDTEYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:5)

[0107] 在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体(IgG1-13mZ)包含IgG1-Z异型重链,所述IgG1-Z异型重链包含以下所列的氨基酸序列:

[0108] MQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYYYLHWVRQAPGQGLEWMGWIDPDQGDTEYAQKLQGR

VTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSLKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLS
PGK (SEQ ID NO:6)

[0109] 在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体(IgG1-5m)包含IgG1重链,所述IgG1重链包含以下所列的氨基酸序列:

[0110] MQMQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDQGDTEYAQKFQGR
VTITRDRSTSTAYMELRSLRSED TAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSLKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLS
PGK (SEQ ID NO:7)

[0111] 在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体(IgG4P-13m)包含IgG4P抗体,所述IgG4P抗体包含以下所列的氨基酸序列:

[0112] MQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQGLEWMGWIDPDQGDTEYAQKLQGR
VTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDK RVE
SKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
(SEQ ID NO:8)

[0113] 在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体(IgG4P-5m)包含IgG4P重链,所述IgG4P重链包含以下所列的氨基酸序列:

[0114] MQMQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDQGDTEYAQKFQGR
VTITRDRSTSTAYMELRSLRSED TAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDK RVE
SKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
(SEQ ID NO:9)

[0115] 在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体(IgG4PE-13m)包含IgG4PE重链,所述IgG4PE重链包含以下所列的氨基酸序列:

[0116] MQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQGLEWMGWIDPDQGDTEYAQKLQGR
VTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDK RVE
SKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ

FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
(SEQ ID NO:10)

[0117] 在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体(IgG4PE-5m)包含IgG4PE重链,所述IgG4PE重链包含以下所列的氨基酸序列:

[0118] MQMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDQGDTEYAQKFQGR
VTITRDRSTSTAYMELRSLRSEDTAVYYCNAAYGSSSYPMQYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
SKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSVQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
(SEQ ID NO:11)

[0119] 在具体的方面,本文提供的是抗体,例如单克隆抗体,其特异性结合人CD47,其中这样的抗CD47抗体是亲本抗CD47抗体的变体,其中所述抗CD47抗体当使用无细胞(CF)表达系统生产时,与在CF系统中表达时的亲本抗CD47抗体相比,具有更高的抗体表达滴度或产量,以及其中所述抗CD47抗体包含轻链,所述轻链包含kappa或lambda轻链恒定区(例如,人kappa或lambda轻链恒定区),例如,SEQ ID NO:13。

[0120] 在具体的方面,本文提供的是抗体,例如单克隆抗体,其特异性结合人CD47,其中这样的抗CD47抗体是亲本抗CD47抗体的变体,其中所述抗CD47抗体当使用无细胞(CF)表达系统生产时,与在CF系统中表达时的亲本抗CD47抗体相比,具有更高的抗体表达滴度或产量,以及其中所述抗CD47抗体包含(i)本文描述的VH(例如,SEQ ID NO:20、21或22)或本文描述的重链(例如,SEQ ID NO:5-11的任一个),和(ii)轻链,其包含kappa或lambda轻链恒定区(例如,人kappa或lambda轻链恒定区),例如,SEQ ID NO:13,例如,下文列出的(抗CD47抗体轻链(Igκ))、或在N-末端没有氨基酸M的SEQ ID NO:13:

[0121] MNIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGS
GTEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
ID NO:13)

[0122] 在具体的实施方式中,本文描述的抗CD47不是美国申请公开No.US2014/0140989中描述的抗CD47抗体,通过引用将其完全合并在本文中,例如该公开的表1中的任一个抗CD47抗体(例如,抗CD47抗体2A1、AB2.03、AB2.04、AB2.05、AB2.06、AB2.07、AB2.08、AB2.09、AB2.13、AB3.09、AB6.12、AB6.13、AB6.14、AB6.17、AB10.13、AB10.14、AB11.05、AB12.05、AB15.05、AB16.05、AB17.05、AB22.05、AB23.05、AB24.05和AB25.05),或包含该公开的SEQ ID NO:5-30的任一个的任何抗体。

[0123] 在某些实施方式中,本文提供的抗CD47抗体或其抗原结合片段是IgG同种型。在某些实施方式中,所述抗体的恒定区是人IgG1同种型,具有氨基酸序列:

	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS
	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT
	YICNVNHKPS	NTKVDDKKVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG
[0124]	PSVFLFPPKP	KDTLMIS RTP	EVTCTVVVDVS	HEDPEVKFNW
	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK
	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE
	LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTPPV

[0125] LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 34)

[0126] 在某些实施方式中,人IgG1恒定区在氨基酸Asn297处(方框的,Kabat编号)被修饰来防止抗体的糖基化,例如Asn297Ala (N297A)。在某些实施方式中,所述抗体的恒定区在氨基酸Leu235处(Kabat编号)被修饰来改变Fc受体相互作用,例如Leu235Glu (L235E)或Leu235Ala (L235A)。在某些实施方式中,所述抗体的恒定区在氨基酸Leu234处(Kabat编号)被修饰来改变Fc受体相互作用,例如,Leu234Ala (L234A)。在某些实施方式中,所述抗体的恒定区在氨基酸234和235两处被改变,例如,Leu234Ala和Leu235Ala (L234A/L235A) (Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest的EU索引)。

[0127] 在某些实施方式中,本文提供的抗CD47抗体的恒定区是人IgG2同种型,具有氨基酸序列:

	ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS
	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSNFGTQT
	YTCNVNDHKPS	NTKVDDKTVER	KCCVECPPCP	APPVAGPSVF
	LFPPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVVDVSHEDP	EVQFNWYVDG
[0128]	VEVHNAKTKP	REEQFNSTFR	VVSVLTVVHQ	DWLNGKEYKC
	KVSNKGLPAP	IEKTISKTKG	QPREPQVYTL	PPSREEMTKN
	QVSLTCLVKG	FYPSDISVEW	ESNGQPENNY	KTPPMLDSD
	GSFFLYSKLT	VDKSRWQQGN	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL
				SLSPGK

(SEQ ID NO: 35)

[0129] 在某些实施方式中,人IgG2恒定区在氨基酸Asn297处(方框的,Kabat编号)被修饰来防止抗体的糖基化,例如,Asn297Ala (N297A)。

[0130] 在某些实施方式中,本文提供的抗CD47抗体的恒定区是人IgG3同种型,具有氨基酸序列:

	ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS
	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT
	YTCNVNHKPS	NTKVDDKRVEL	KTPLGDTTHT	CPRCPEPKSC
	DTPPPCPRCP	EPKSCDTPPP	CPRCPEPKSC	DTPPPCPRCP
	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVQFKWYVD
[0131]	GVEVHNAKTK	PREEQYNSTF	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK
	CKVSNKALPA	PIEKTISKTK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK
	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESSGQPENN	YNTTPPMLDS
	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NIFSCSVMHE	ALHNRF
				FTQKS
				LSLSPGK

(SEQ ID NO: 36)

[0132] 在某些实施方式中,人IgG3恒定区在氨基酸Asn297处(方框的,Kabat编号)被修饰

来防止抗体的糖基化,例如,Asn297Ala (N297A)。在某些实施方式中,所述人IgG3恒定区在氨基酸435处被修饰来延长半衰期,例如,Arg435His (R435H) (Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest的EU索引)。

[0133] 在某些实施方式中,本文提供的抗CD47抗体的恒定区是人IgG4同种型,具有氨基酸序列:

	ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS
	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTKT
	YTCNVDHKPS	NTKVDKRVES	KYGPPCPSCP	APEFLGGPSV
	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSQED	PEVQFNWYVD
[0134]	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK
	CKVSNKGLPS	SIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK
	NQVSLTCLVK	GFYPDSIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS
	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG	NVFSCSV MHE	ALHNHYTQKS
				LSLSLGK

(SEQ ID NO: 37)

[0135] 在某些实施方式中,人IgG4恒定区在绞链区内被修饰来防止或降低链交换,例如,Ser228Pro (S228P)。在其他实施方式中,人IgG4恒定区在氨基酸235处被修饰来改变Fc受体相互作用,例如,Leu235Glu (L235E)。在某些实施方式中,人IgG4恒定区在绞链内和在氨基酸235处被修饰,例如,Ser228Pro和Leu235Glu (S228P/L235E)。在某些实施方式中,人IgG4恒定区在氨基酸Asn297处 (Kabat编号) 被修饰来防止抗体的糖基化,例如,Asn297Ala (N297A)。在本发明的某些实施方式中,人IgG4恒定区在氨基酸位置Ser228、Leu235和Asn297处被修饰 (例如,S228P/L235E/N297A)。(EU index of Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest的EU索引)。在本发明的其他实施方式中,所述抗体是人IgG4子类,并且缺乏糖基化。在这些实施方式中,糖基化可以通过在位置297处 (Kabat编号) 的突变来消除,例如,N297A。在其他实施方式中,所述糖基化通过在缺乏翻译后糖基化能力的宿主细胞中生产抗体来消除,例如,细菌或酵母衍生的系统,或修饰的哺乳动物细胞表达系统。

[0136] 在某些实施方式中,人IgG恒定区被修饰来改变抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC),例如,在Natsume et al.,2008Cancer Res,68(10):3863-72; Idusogie et al.,2001 J Immunol,166(4):2571-5;Moore et al.,2010 mAbs,2(2):181-189;Lazar et al.,2006 PNAS,103(11):4005-4010,Shields et al.,2001 JBC,276(9):6591-6604;Stavenhagen et al.,2007 Cancer Res,67(18):8882-8890;Stavenhagen et al.,2008 Advan.Enzyme Regul.,48:152-164;Alegre et al,1992 J Immunol,148:3461-3468中描述的氨基酸修饰;综述见Kaneko and Niwa,2011 Biodrugs,25(1):1-11。

[0137] 在某些实施方式中,人IgG恒定区被修饰以诱导杂二聚化。例如,在CH3结构域内在Thr366处带有氨基酸修饰,当其被更大体积的氨基酸例如Try替换时 (T366W),能够与位置Thr366、Leu368和Tyr407处氨基酸修饰为较小体积的氨基酸,例如分别为Ser、Ala和Val (T366S/L368A/Y407V) 的第二CH3结构域优先配对。通过CH3修饰的杂二聚化可以通过引入二硫键来进一步稳定化,例如,通过在相对的CH3结构域上将Ser354改变为Cys (S354C) 和Y349改变为Cys (Y349C) (综述见Carter,2001 Journal of Immunological Methods,248:7-15)。

[0138] 在其他方面,所述抗体缺乏糖基化,但是在氨基酸Asn297处(Kabat编号)不被修饰。在这些实施方式中,例如,所述糖基化可以通过在缺乏翻译后糖基化能力的宿主细胞中生产抗体来消除,例如,细菌或酵母衍生的系统,或修饰的哺乳动物细胞表达系统。在某些方面,这样的系统可以是CF表达系统。

[0139] 在某些实施方式中,本文描述的抗CD47抗体或其抗原结合片段包含相对于亲本抗体具有一定百分比同一性的氨基酸序列。

[0140] 可以使用数学算法来完成两个序列(例如,氨基酸序列或核酸序列)之间的同一性百分比的确定。用于比较两个序列的数学算法的非限制性实例是Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268的算法,在Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877中修改。这样的算法被合并并在Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403的NBLAST和XBLAST程序中。可以使用NBLAST核苷酸程序参数设置,例如,得分=100、字长=12进行BLAST核苷酸检索,来获得与本文描述的核酸分子同源的核苷酸序列。可以使用XBLAST程序参数设置,例如,得分50、字长=3进行BLAST蛋白质检索来获得与本文描述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的有缺口的对准,可以利用在Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402中描述的Gapped BLAST。做为选择,PSI BLAST可以用于进行迭代检索,其检测分子之间的远距离关系。当使用BLAST、Gapped BLAST和PSI Blast程序时,可以使用相应程序的(例如,XBLAST和NBLAST的)默认参数(参见,例如互联网上的National Center for Biotechnology Information (NCBI), ncbi.nlm.nih.gov)。用于序列比较的数学算法的另一个优选的非限制性实例是Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17的算法。这种算法被合并到ALIGN程序(版本2.0)中,其是GCG序列比对软件包中的一部分。当利用ALIGN程序来比较氨基酸序列时,可以使用PAM120加权残基表、12的缺口长度罚分和4的缺口罚分。

[0141] 两个序列之间的同一性百分比可以使用与上文描述的类似的、容许或不容许缺口的技术来确定。在计算同一性百分比时,一般仅对确切的匹配计数。

[0142] 在某些实施方式中,本文描述的抗体或其抗原结合片段包含VL结构域,所述VL结构域与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性,其中所述抗体特异性结合CD47。在某些实施方式中,本文描述的抗体或其抗原结合片段包含VL结构域,所述VL结构域与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性,其中所述抗体特异性结合CD47,以及其中所述抗体包含与SEQ ID NO:12的CDR(例如,VL CDR 1-3)(例如,SEQ ID NO:17-19)相同的CDR(例如,VL CDR 1-3)。

[0143] 在某些实施方式中,本文描述的抗体或其抗原结合片段包含轻链,所述轻链与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性,其中所述抗体特异性结合CD47。在某些实施方式中,本文描述的抗体或其抗原结合片段包含轻结构域,所述轻结构域与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性,其中所述抗体特异性结合CD47,以及其中所述抗体包含与SEQ ID NO:13的CDR(例如,VL CDR 1-3)(例如,SEQ ID NO:17-19)相同的CDR(例如,VL CDR 1-3)。

[0144] 在某些实施方式中,本文描述的抗体或其抗原结合片段包含VH结构域,所述VH结

构域与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性,其中所述抗体特异性结合CD47,以及其中所述抗CD47抗体当使用无细胞表达系统生产时,与在CF表达系统中生产时的亲本抗体相比,具有更高的抗体表达滴度或产量。在某些实施方式中,本文描述的抗体或其抗原结合片段包含VH结构域,所述VH结构域与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性,其中所述抗体特异性结合CD47,以及其中所述抗体包含与SEQ ID NO:1的CDR(例如,VL CDR 1-3)(例如,SEQ ID NO:14-16)相同的CDR(例如,VL CDR 1-3)。

[0145] 在某些实施方式中,本文描述的抗体或其抗原结合片段包含轻链,所述轻链与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性,其中所述抗体特异性结合CD47,以及其中所述抗CD47抗体当使用无细胞表达系统生产时,与在CF表达系统中生产时的亲本抗体相比,具有更高的抗体表达滴度或产量。在某些实施方式中,本文描述的抗体或其抗原结合片段包含重结构域,所述重结构域与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性,其中所述抗体特异性结合CD47,以及其中所述抗体包含与SEQ ID NO:2的CDR(例如,VL CDR 1-3)(例如,SEQ ID NO:17-19)相同的CDR(例如,VL CDR 1-3)。

[0146] 在某些实施方式中,本文描述的抗体或其抗原结合片段包含轻链,所述轻链与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性,其中所述抗体特异性结合CD47,以及其中所述抗CD47抗体当使用无细胞表达系统生产时,与在CF表达系统中生产时的亲本抗体相比,具有更高的抗体表达滴度或产量。在某些实施方式中,本文描述的抗体或其抗原结合片段包含重结构域,所述重结构域与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性,其中所述抗体特异性结合CD47,以及其中所述抗体包含与SEQ ID NO:3的CDR(例如,VL CDR 1-3)(例如,SEQ ID NO:17-19)相同的CDR(例如,VL CDR 1-3)。

[0147] 在某些实施方式中,本文描述的抗体或其抗原结合片段包含轻链,所述轻链与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性,其中所述抗体特异性结合CD47,以及其中所述抗CD47抗体当使用无细胞表达系统生产时,与在CF表达系统中生产时的亲本抗体相比,具有更高的抗体表达滴度或产量。在某些实施方式中,本文描述的抗体或其抗原结合片段包含重结构域,所述重结构域与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性,其中所述抗体特异性结合CD47,以及其中所述抗体包含与SEQ ID NO:4的CDR(例如,VL CDR 1-3)(例如,SEQ ID NO:17-19)相同的CDR(例如,VL CDR 1-3)。

[0148] 在某些方面,本文提供的抗CD47抗体展现一种或更多种期望的特征,例如,作为非限制性实例,阻断CD47与它的配体SIRP α 之间的相互作用和/或促进(例如,诱导或提高)吞噬作用,不促进(例如,诱导或提高)红血球的血细胞凝集,以及抗肿瘤活性。例如,与不存在本文描述的抗CD47抗体时CD47与SIRP α 之间的相互作用水平相比,本文提供的抗CD47抗体阻断CD47与SIRP α 之间的相互作用至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%至少95%或至少99%。

[0149] 在具体的方面,本文描述的抗CD47抗体促进(例如,诱导或提高)例如巨噬细胞对

细胞的吞噬作用,例如,表达CD47的细胞(例如,CCRF-CEM细胞)。在一个方面,与存在本文描述的抗CD47抗体的情况下细胞吞噬的水平相比,在存在本文描述的抗CD47抗体的情况下吞噬作用的水平提高至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少99%、至少150%、至少200%。

[0150] 在具体的方面,本文描述的抗CD47抗体不促进(例如,诱导或提高)、或不引起显著性水平的细胞凝集,例如,本文描述的抗CD47抗体不促进(例如,诱导或提高)、或不引起显著性水平的红血细胞的血细胞凝集。在一个方面,与在存在已知诱导凝集的抗CD47抗体,例如MCA911小鼠抗人CD47抗体(BRIC126)的情况下的凝集水平相比,在存在本文描述的抗CD47抗体的情况下凝集的水平被降低至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少99%。在某些方面,与存在已知诱导凝集的抗CD47抗体,例如MCA911小鼠抗人CD47抗体(BRIC126)的情况下的凝集水平相比,如果在存在本文描述的抗CD47抗体的情况下凝集的水平降低至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少99%,本文描述的抗CD47抗体不促进(例如,诱导或提高),或不引起显著水平的凝集。

[0151] 本文描述的抗CD47抗体还包括特异性结合CD47的单克隆抗体,其中所述抗体不促进(例如,诱导或提高)、或不引起显著水平的凝集,例如,红血细胞的血细胞凝集(“RBC血细胞凝集”)。

[0152] 在某些方面,通过在施用治疗例如本文描述的抗CD47抗体之后测量对象的RBC计数,来确定RBC减少的水平。在某些实施方式中,如果在施用本文描述的抗CD47抗体之后对象的RBC计数处在正常的健康对象的范围内,本文描述的抗CD47抗体不促进(例如,诱导或提高)、或不引起显著性水平的RBC减少。例如,正常的健康男性的RBC计数是每微升血液样品约4.7到约6.1百万个细胞。例如,正常的健康女性的RBC计数是每微升血液样品4.2到约5.4百万个细胞。在某些方面,如果在施用本文描述的抗CD47抗体之后(例如,5分钟、10分钟、30分钟、1h、2h、3h、4h、5h、12h、24h、2天、4天、6天、1周、2周、3周、1个月、2个月或更久)对象的RBC计数是施用之前的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%或99.5%,本文描述的抗CD47抗体不促进(例如,诱导或提高)、或不引起显著性水平的RBC减少。在具体的方面,如果在施用本文描述的抗47抗体之后(例如,5分钟、10分钟、30分钟、1h、2h、3h、4h、5h、12h、24h、2天、4天、6天、1周、2周、3周、1个月、2个月或更久)对象的RBC计数是施用安慰剂治疗(例如,载体)后对象的RBC计数的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%或99.5%,本文描述的抗CD47抗体不促进(例如,诱导或提高)、或不引起显著性水平的RBC减少。RBC计数通过本领域的标准方法确定。

[0153] 在具体的方面,本文描述的抗CD47抗体不促进(例如,诱导或提高),或不引起显著性水平的血小板减少。例如,施用本文描述的抗CD47抗体引起血小板的百分比剩余至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0154] 并且,本文描述的抗CD47抗体包括但不限于,不结合Fc γ 受体(Fc γ R)、或具有对Fc γ 受体(Fc γ R)低结合亲和力的抗体。例如,与例如当使用宿主细胞(例如,CHO细胞)表达系统生产时的抗CD47抗体恒定区相比,抗CD47抗体的恒定区,例如,当使用CF表达系统生产时,具有更低对Fc γ R的结合亲和力。

[0155] 本领域技术人员将认识到,有可能无需过度实验地测定凝集的水平,例如,RBC的

血细胞凝集水平。例如,本领域技术人员将认知到,如下文实施例中描述的,通过在存在所描述的抗CD47抗体的情况下进行血细胞凝集分析之后,测量RBC点的面积,来确定血细胞凝集的水平。在某些情况下,在存在本文描述的抗CD47抗体的情况下RBC点的面积,与不存在抗CD47抗体的情况下RBC点的面积,例如,零血细胞凝集的情况下进行比较。照这样,血细胞凝集相对于基线对照被定量。更大的RBC点面积相应于更高水平的血细胞凝集。做为选择,RBC点的光密度测定法也可以用于测定血细胞凝集。

[0156] 本领域技术人员将认识到,有可能无需过度实验地测定RBC减少的水平。例如,本领域技术人员将认识到,通过测量RBC计数(即,血液样品中RBC的总数),例如,通过使用细胞计数器或血球计,来确定RBC减少的水平。技术人员将认识到,血液样品中的RBC任选地可以通过在计数之前使用例如离心将全血分级来分离。在某些情况下,在存在本文描述的抗CD47抗体的情况下的RBC计数,与不存在抗CD47抗体的情况下的RBC计数,例如,零RBC减少的情况下进行比较。照这样,RBC减少的水平相对于基线对照被正常化。

[0157] 在具体的方面,本文提供的抗CD47抗体展现抑制活性,例如,通过抑制CD47表达(例如,抑制CD47的细胞表面表达)、活性和/或信号转导,或通过干扰CD47与SIRP α 之间的相互作用。在某些方面,在结合于CD47、或与CD47相互作用时,例如人CD47,本文提供的抗CD47抗体完全地或部分地降低或调节CD47表达或活性。在所述抗体与人CD47多肽和/或肽之间的相互作用时,CD47的生物学功能的降低或调节是完全的、显著的或部分的。当与不存在相互作用,例如,与本文描述的抗体结合时的CD47表达或活性水平相比,在存在所述抗体的情况下CD47表达或活性的水平降低至少95%,例如,96%、97%、98%、99%或100%时,本文描述的抗CD47抗体被认为完全抑制CD47表达或活性。在特定的方面,与不存在同本文描述的抗体结合的情况下CD47表达或活性水平相比,在存在所述CD47抗体的情况下CD47表达或活性的水平降低至少50%,例如,55%、60%、75%、80%、或90%时,抗CD47抗体被认为显著抑制CD47表达或活性。在某些方面,与不存在相互作用,例如,不存在与本文描述的抗体结合的情况下CD47表达或活性水平相比,在存在所述抗体的情况下CD47表达或活性的水平降低小于95%,例如,10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、85%或90%时,抗CD47抗体被认为部分抑制CD47表达或活性。

[0158] 在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体包含处在位点特异性位置的一个或多个非天然氨基酸残基。参见,例如,美国申请公开No.US2014/0046030A1,通过引用将其全部合并并在本文中。在具体的方面,位点特异性位置处的非天然氨基酸残基对于抗体生产产率、溶解度、结合亲和性和/或活性方面具有优势。已经描述了非天然氨基酸的非限制性实例,参见,例如,美国申请公开No.US 2014/0066598A1。

[0159] 在特定的方面,本文提供的是与结合部分或试剂,例如标记物或毒素结合的抗CD47抗体。结合部分可以是本领域技术人员认为有用的任何结合部分。例如,结合部分可以是聚合物,例如,聚乙二醇,其可以改善在体内或体外的抗体稳定性。结合部分可以具有治疗活性,从而产生抗体-药物结合物。结合部分可以是对目标细胞有害的分子载荷。结合部分可以是对于检测或诊断有用的标记物。在某些方面,结合部分通过直接共价键与抗体连接。在某些方面,结合部分通过接头连接到抗体。在特定的方面,结合部分或接头通过抗CD47抗体的非天然氨基酸之一附着。已经描述了示范性的结合部分和接头,例如,参见美国申请公开No.US2014/0046030A1,通过引用将其全部合并并在本文中。

[0160] 5.2抗体生产

[0161] 免疫特异性结合CD47 (例如,人CD47的ECD)的本文描述的抗体或抗原结合片段可以通过本领域已知的任何方法来生产,例如,通过化学合成或通过重组表达技术(例如,CF表达系统)。

[0162] 这样的方法可以采用熟练技术人员能力内的,分子生物学、微生物学、遗传分析、重组DNA、有机化学、生物化学、PCR、寡核苷酸合成和修饰、核酸杂交和相关领域中的常规技术。这些技术例如在本文引用的参考文献中描述,并且在文献中被充分解释。参见,例如,Maniatis et al.(1982)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press;Sambrook et al.(1989),Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Second Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press;Sambrook et al.(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY;Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons(1987and annual updates);Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons(1987and annual updates)Gait(ed.)(1984)Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach,IRL Press;Eckstein(ed.)(1991)Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach,IRL Press;Birren et al.(eds.)(1999)Genome Analysis:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press。

[0163] 在具体的方面,本文提供的抗CD47抗体可以使CF表达系统生产,例如,本领域已知的CF表达系统,例如,下文的实施例中描述的。例如,CF表达系统可以包括无细胞提取物,例如,S30无细胞提取物,以及DsbC和20种氨基酸(例如,天然的或非天然的),以及任选的,一种或更多种的碘乙酰胺、谷氨酸镁、谷氨酸铵、谷氨酸钾、丙酮酸钠、AMP、GMP、UMP和CMP、草酸钠、腐胺、亚精胺、磷酸钾、T7RNAP和氧化的(GSSG)谷胱甘肽。重链质粒和轻链质粒相应地加入到用于多肽生产和纯化的CF提取物组合物中。

[0164] 在某些方面,所述CF表达系统是如Yin et al.,mAbs,2012,4:217-225中描述的体外转录和翻译系统,通过引用完全合并。在某些方面,无细胞系统利用来自真核细胞的或来自原核细胞的无细胞提取物。在某些方面,所述原核细胞是E.coli。

[0165] 在特定的实施方式中,CF表达系统可以利用如美国申请公开No.US 2014/0315245中描述的系统,通过引用将其完全合并在本文中。例如,CF表达系统可以包含具有无细胞蛋白质合成所必需的氧化磷酸化系统和成分的细菌提取物,在某些实施方式中,可以进一步包含外源的蛋白质伴侣蛋白,例如,蛋白质二硫化物异构酶(PDI),或肽-脯氨酰顺式一反式异构酶。在具体的实施方式中,PDI是E.coli的Dsb(二硫键形成)家族的成员,例如,DsbA或DsbC。在某些实施方式中,CF表达系统包含E.coli菌株SBDG028、SBDG031或SBDG044的细胞提取物,如美国申请公开No.US 2014/0315245中描述的,例如,其可以根据Zawada et al.,Biotechnology and Bioengineering(2011)vol.108,No.7制备。

[0166] 在特定的方面,本文提供的抗CD47抗体包含氨基酸修饰,其容许比亲本抗体更好的、使用CF表达系统的抗体生产。在特定的方面,使用CF表达系统生产的、本文提供的抗CD47抗体是非糖基化的。

[0167] 例如,单克隆抗体可以使用本领域已知的各种技术来制备,包括使用杂交瘤、重组和噬菌体展示技术,或其组合。例如,单克隆抗体可以使用杂交瘤技术来产生,包括本领域

已知的那些和例如Harlow et al.,Antibodies:A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.1988);Hammerling et al., in:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981)中的教导。在此使用的术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。例如,单克隆抗体可以从宿主细胞重组地产生,所述宿主细胞被工程化以表达本文描述的抗体(例如,包含抗体Ab235-Ab255的任一个的CDR的抗CD47抗体)或其片段,例如,这样的抗体的轻链和/或重链。

[0168] 进一步,本文描述的抗体或其抗原结合片段可以利用本领域已知的各种噬菌体展示方法来产生。在噬菌体展示方法中,功能性抗体结构域被展示在噬菌体颗粒的表面,噬菌体颗粒携带编码它们的多核苷酸序列。可以用于产生本文描述的抗体的噬菌体展示方法的实例包括在Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic et al., 1997, Gene 187:9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology 57:191-280; PCT申请No. PCT/GB91/01 134; 国际公开Nos. WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401, 和WO97/13844; 以及美国专利Nos. 5,698,426、5,223,409、5,403,484、5,580,717、5,427,908、5,750,753、5,821,047、5,571,698、5,427,908、5,516,637、5,780,225、5,658,727、5,733,743和5,969,108中公开的那些。

[0169] 例如,本文描述的抗体可以包括嵌合抗体。嵌合抗体是一种分子,其中抗体的不同部分来自于不同的免疫球蛋白分子。例如,嵌合抗体可以含有与人类抗体的恒定区融合的、小鼠或大鼠单克隆抗体的可变区。产生嵌合抗体的方法是本领域已知的。参见,例如Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; 以及美国专利Nos. 5,807,715、4,816,567、4,816,397和6,331,415。

[0170] 利用例如本文描述的技术生产的抗体或抗原结合片段可以使用标准的公知的技术来分离。例如,通过常规的免疫球蛋白纯化过程,例如,蛋白A-琼脂糖、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析,可以从例如培养基、腹腔积液、血清、细胞溶胞产物、合成反应材料等适当地分离抗体或抗原结合片段。如本文使用的,“分离的”或“纯化的”抗体基本上不含来自得出该抗体的细胞或组织来源的细胞材料或其他蛋白质,或当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学品,或没有用于生产所述抗体的CF表达系统的成分。

[0171] 本文描述的抗体包括抗体片段,其特异性识别CD47抗原,可以通过本领域技术人员已知的任何技术产生。例如,本文描述的Fab和F(ab')₂片段可以通过利用酶例如木瓜蛋白酶(来产生Fab片段)或胃蛋白酶(来产生F(ab')₂片段)蛋白水解裂解免疫球蛋白分子来产生。Fab片段相应于抗体分子的两个相同的臂之一,含有与重链的VH和CH1结构域配对的完整的轻链。F(ab')₂片段含抗体分子的两个抗原结合臂,通过绞链区中的二硫键连接。做为选择,本文描述的抗体片段可以通过公知的重组表达技术常规地产生。参见,例如PCT公开No. WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, BioTechniques 12(6):864-869; Sawai et al., 1995, AJRI 34:26-34和Better et al., 1988, Science 240:1041-1043。

[0172] 例如,本文描述的抗体可以包括人源化抗体,例如,去免疫的或复合人抗体。人源化抗体可以包含人恒定区序列。在某些实施方式中,人源化抗体可以选自任何种类的免疫

球蛋白,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,以及任何同种型,包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在某些实施方式中,人源化抗体可以包含kappa或lambda轻链恒定序列。

[0173] 人源化抗体可以利用本领域已知的各种技术来产生,包括但不限于,CDR移植(欧洲专利NO.EP 239,400;国际公开No.WO 91/09967;和美国专利Nos.5,225,539、5,530,101和5,585,089)、镶饰(veneering)或重塑(resurfacing)(欧洲专利Nos.EP 592,106和EP 519,596;Padlan,1991,Molecular Immunology 28(4/5):489-498;Studnicka et al.,1994,Protein Engineering 7(6):805-814;以及Roguska et al.,1994,PNAS 91:969-973)、链混洗(美国专利No.5,565,332),以及例如美国专利No.6,407,213,美国专利No.5,766,886,WO 9317105,Tan et al.,J.Immunol.169:1119-1125(2002),Caldas et al.,Protein Eng.13(5):353-60(2000),Morea et al.,Methods 20(3):267-79(2000),Baca et al.,J.Biol.Chem.272(16):10678-84(1997),Roguska et al.,Protein Eng.9(10):895-904(1996),Couto et al.,Cancer Res.55(23Supp):5973s-5977s(1995),Couto et al.,Cancer Res.55(8):1717-22(1995),Sandhu JS,Gene 150(2):409-10(1994)和Pedersen et al.,J.Mol.Biol.235(3):959-73(1994)中公开的技术。还参见美国专利公开No.US 2005/0042664 A1(2005年2月24日),各自通过完全引用合并在本文中。

[0174] 例如,本文描述的抗体可以是多特异性的,例如,双特异性抗体。已经描述了产生多特异性(例如,双特异性抗体)的方法,参见,例如,美国专利No.7951917、7183076、8227577、5837242、5989830、5869620、6132992和8586713。

[0175] 单结构域抗体,例如缺乏轻链的抗体,可以通过本领域公知的方法来产生。参见Riechmann et al.,1999,J.Immunol.231:25-38;Nuttall et al.,2000,Curr.Pharm.Biotechnol.1(3):253-263;Muylderman,2001,J.Biotechnol.74(4):277302;美国专利No.6,005,079;和国际公开Nos.WO 94/04678,WO 94/25591和WO 01/44301。

[0176] 人类抗体可以使用本领域已知的任何方法来产生。例如,可以使用不能表达功能性的内源鼠免疫球蛋白、但可以表达人免疫球蛋白基因的公知的转基因小鼠。做为选择,例如,可以使用上文描述的噬菌体展示技术。此外,在某些实施方式中,例如,人类抗体可以使用鼠-人杂交瘤产生。例如,用Epstein-Barr病毒(EBV)转化的人类外周血淋巴细胞可以与小鼠骨髓瘤细胞融合来产生分泌人单克隆抗体的小鼠-人杂交瘤,可以筛选这些小鼠-人杂交瘤来确定分泌免疫特异性结合目标抗原(例如,人CD47的ECD)的人单克隆抗体的杂交瘤。这样的方法是已知的和在本领域中描述的,参见,例如,Shinmoto et al.,Cytotechnology,2004,46:19-23;Naganawa et al.,Human Antibodies,2005,14:27-31。

[0177] 具有期望的结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变域可以与免疫球蛋白恒定域序列融合。所述融合优选的是与免疫球蛋白重链恒定域融合,至少包含铰链、CH2和CH3区域的部分。优选的是含有轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区(CH1)存在于至少一种融合物中。将编码免疫球蛋白重链融合物的DNA,以及如果需要,编码免疫球蛋白轻链的DNA,插入到独立的表达载体中,共转染到适合的宿主生物中。产生双特异性抗体的进一步细节,参见,例如,Suresh等,Methods in Enzymology,121:210(1986)。

[0178] 根据WO 96/27011中描述的另一种方法,一对抗体分子之间的接触面可以被工程化的,来最大化从重组细胞培养物中回收的杂二聚体的百分比。优选的接触面至少包含抗体恒定区的CH3区的一部分。在这种方法中,来自第一抗体分子的接触面的一个或多个小的

氨基酸侧链被更大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替换。通过用小的氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)替换大的氨基酸侧链,在第二抗体分子的接触面上产生与大的侧链相同或类似大小的补偿“腔”。这提供了一种相对其他不需要的终产物例如同型二聚体、用于提高杂二聚体的产量的机制。

[0179] 双特异性抗体可以作为全长抗体或抗体片段来制备(例如F(ab')₂双特异性抗体)。已经在文献中描述了从抗体片段产生双特异性抗体的方法。例如,可以利用化学键来制备双特异性抗体。Brennan et al., Science 229:81 (1985) 描述了一种过程,其中完整的抗体被蛋白水解裂解以产生F(ab')₂片段。在存在二巯基化物络合剂亚砷酸钠的情况下这些片段被还原了,以稳定邻近的二巯基化物和阻止分子间的二硫化物形成。然后将产生的Fab'片段转变成三硝基苯(TNB)衍生物。通过用巯基乙胺还原,Fab'-TNB衍生物之一然后被重新转变为Fab'-硫醇,并与等摩尔数量的其他Fab'-TNB衍生物混合来形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可被用作用于酶的选择性固定化的试剂。

[0180] 5.2.1多核苷酸、细胞和载体

[0181] 在某些方面,本文提供的是多核苷酸,其包含编码特异性结合CD47抗原的本文描述的抗体或其片段(例如,可变轻链区和/或可变重链区)的核苷酸序列,载体,例如,包含这样的多核苷酸用于在宿主细胞(例如,E.coli和哺乳动物细胞)中重组表达的载体。在某些方面,本文提供的是细胞(例如,宿主细胞)。本文还提供的是制造本文描述的抗体和抗原结合片段的方法。

[0182] 在某些方面,本文提供的是包含核苷酸序列的多核苷酸,所述核苷酸序列编码本文描述的抗体的轻链或重链。在某些实施方式中,本文提供的是包含核苷酸序列的多核苷酸,所述核苷酸序列编码本文描述的抗体的轻链和重链。所述多核苷酸可以包含编码轻链的核苷酸序列,所述轻链包含本文描述的抗体的VL FR和CDR。所述多核苷酸可以包含编码重链的核苷酸序列,所述重链包含本文描述的抗体的VH FR和CDR。在具体的实施方式中,本文描述的多核苷酸编码SEQ ID NO:13或在N-末端没有氨基酸M的SEQ ID NO:13的VL链区域。在具体的实施方式中,本文描述的多核苷酸编码SEQ ID NO:5-11、20-22的任一个的VH链区域。在具体的实施方式中,本文描述的多核苷酸编码包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链。在具体的实施方式中,本文描述的多核苷酸编码包含SEQ ID NO:5-11的任一项的氨基酸序列的重链。

[0183] 在具体的实施方式中,本文描述的多核苷酸包含表2中提供的核苷酸序列,编码本文提供的抗CD47抗体的轻链或重链。

[0184] 表2:抗CD47抗体VH和VL核苷酸序列

[0185]

SEQ ID NO :	核苷酸序列
26	抗 CD47 IgG1-13m HC: ATGCAAGTCCAATTGGTCCAGAGCGGTGCGGAAGTCAAGAAACCGGGTG CAAGCGTCAAAGTTTCGTGCAAGGCGAGCGGTTTCAATATCAAAGACTAT TATCTGCACTGGGTTCGTACAGGCTCCGGGCCAAGGCCTGGAGTGGATGGG TTGGATCGATCCGGACCAGGGCGACACGGAGTACGCTCAGAAGCTGCAG GGTCGTGTTACCATGACCACCGACACCAGCACGAGCACCGCGTACATGG AACTGCGCTCTCTGCGTTCGGATGATACCGCGGTGTACTATTGCAACGCC GCGTACGGTAGCAGCAGCTATCCGATGGATTATTGGGGTCAAGGCACTAC GGTGACTGTCAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCGTCCGTGTTTCCGCTG GCGCCAAGCTCCAAGAGCACCGAGCGGTGGCACGGCCGCACTGGGTGTGTC TGGTAAAAGATTACTTTCTGAGCCGGTGACCGTGAGCTGGAATTCAGGT GCACTGACGTCCGGCGTTCACACGTTCCCGGCAGTTCTGCAGAGCTCCG GTTTGTACAGCCTGTCTAGCGTCGTGACGGTGCCGAGCAGCAGCCTGGGT ACCCAAACCTACATTTGCAACGTTAACCATAAGCCGAGCAATACCAAAGT TGACAAGAAAGTCGAACCTAAGAGCTGTGATAAGACGCATACCTGTCCG CCGTGCCCCGGCACCGGAAGTGTGGGCGGTCCGAGCGTGTTCTGTTCCT GCCGAAGCCGAAAGATACCCTGATGATTAGCCGCACCCCTGAGGTGACGT GCGTGGTGTGGACGTTAGCCATGAGGATCCAGAGGTCAAATTCAATTGG TATGTCGATGGTGTGAGGTTCAACAATGCCAAGACCAAACCGCGTGAAGA ACAGTACAATAGCACCTACCGCGTGGTGAGCGTGCTGACGGTCTCTGCACC AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGTAAGGTCAGCAACAAGG CGCTGCCAGCACCGATTGAAAAGACCATTTCTAAAGCGAAAGGTCAGCC GCGTGAGCCGCAAGTCTATACCTGCCGCGTCGCGCGATGAGCTGACTA AAAACCAGGTTAGCCTGACGTGCCTGGTGAAAGGTTTCTACCCGAGCGA CATCGCGGTGGAGTGGGAGAGCAACGGTCAACCGGAGAATAACTACAAA ACCACCCACCGGTCTTGGACTCCGATGGCAGCTTCTTTCTGTACTCTAA ACTGACCGTTGACAAAAGCCGTTGGCAACAGGGCAACGTCTTTAGCTGC AGCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAAAAATCCCTGAG CCTGAGCCCCGGTAAGTAA
27	抗 CD47 IgG1-13mZ HC: ATGCAAGTCCAATTGGTCCAGAGCGGTGCGGAAGTCAAGAAACCGGGTG CAAGCGTCAAAGTTTCGTGCAAGGCGAGCGGTTTCAATATCAAAGACTAT TATCTGCACTGGGTTCGTACAGGCTCCGGGCCAAGGCCTGGAGTGGATGGG TTGGATCGATCCGGACCAGGGCGACACGGAGTACGCTCAGAAGCTGCAG GGTCGTGTTACCATGACCACCGACACCAGCACGAGCACCGCGTACATGG AACTGCGCTCTCTGCGTTCGGATGATACCGCGGTGTACTATTGCAACGCC GCGTACGGTAGCAGCAGCTATCCGATGGATTATTGGGGTCAAGGCACTAC GGTGACTGTCAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCGTCCGTGTTTCCGCTG GCGCCAAGCTCCAAGAGCACCGAGCGGTGGCACGGCCGCACTGGGTGTGTC TGGTAAAAGATTACTTTCTGAGCCGGTGACCGTGAGCTGGAATTCAGGT GCACTGACGTCCGGCGTTCACACGTTCCCGGCAGTTCTGCAGAGCTCCG GTTTGTACAGCCTGTCTAGCGTCGTGACGGTGCCGAGCAGCAGCCTGGGT ACCCAAACCTACATTTGCAACGTTAACCATAAGCCGAGCAATACCAAAGGT

[0186]

	<p>TGACAAAAAAGTTGAACCGAAATCTTGTGATAAACTCATACCTGTCCGC CGTGCCCGGCGCCTGAGCTGTTGGGTGGTCCGTCCGTCTTTCTGTTCCCG CCGAAGCCGAAAGACACCCTGATGATTAGCCGCACCCCGGAAGTTACGT GCGTCGTCTGTGGATGTCAGCCACGAGGACCCGGAGGTTAAGTTCAATTG GTATGTCGATGGCGTGGAGGTTTACAACGCGAAAACCAAGCCGCGTGAG GAACAATACAATAGCACGTATCGCGTAGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCA CCAAGATTGGCTGAATGGTAAAGAATACAAGTGCAAAGTGAGCAACAAG GCATTGCCGGCACCGATCGAAAAGACGATCAGCAAAGCGAAAGGCCAAC CGCGTGAACCGCAGGTCTATACCCTGCCGCCGAGCCGTGAAGAAATGAC GAAAAACCAAGTTAGCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTTTACCCGAGC GACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCGGAAAACAATTACA AAACCACGCCGCCAGTCTTGACAGCGACGGTAGCTTCTTTCTGTATAGC AAGCTGACCGTCGATAAAAGCCGTTGGCAGCAGGGTAATGTGTTACAGCTG CAGCGTTATGCATGAGGCGCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCCTTGTC CCTGTCCCCGGGTAAGTAA</p>
28	<p>抗 CD47 IgG1-5m HC: ATGCAAATGCAATTGGTACAAAGCGGTGCGGAAGTAAAGAAACCGGGTT CGTCGGTAAAGGTTAGCTGTAAAGCTTCTGGCTTCAATATCAAGGATTACT ATCTGCACTGGGTGCGTCAGGCGCCAGGTCAGGCCTTGGAATGGATGGG CTGGATTGACCCGGATCAAGGTGACACCGAATATGCCAAAAGTTTCAGG GTCGTGTGACCATCACCCGTGACCGTAGCACCTCCACCGCATATATGGAG CTGCGTAGCCTGCGCAGCGAAGATACTGCGGTGTATTACTGCAATGCGGC CTATGGTAGCAGCTCCTATCCGATGGATTACTGGGGCCAGGGTACCACGGT GACGGTTAGCAGCGCAAGCACCAAGGGCCCGAGCGTTTTCCCTCTGGCG CCGAGCAGCAAAAGCACTAGCGGCGGTACGGCAGCCCTGGGTTGTCTGG TAAAGATTACTTTCCGGAACCGGTTACCGTGTCTGGAACCTCTGGCGCG CTGACCAGCGGTGTTTACACGTTTCCGGCGGTTCTGCAGAGCAGCGGTCT GTATTCTTTGAGCTCCGTCGTCACCGTCCCGTCTAGCTCGCTGGGCACGC AGACGTACATCTGCAATGTAAACCATAAGCCGAGCAATACCAAAGTTGAC AAGAAAGTCGAACCTAAGAGCTGTGATAAGACGCATACCTGTCCGCCGT GCCCGGCACCGGAACTGTTGGGCGGTCCGAGCGTGTTCTGTTTCCGCCG AAGCCGAAAGATAACCTGATGATTAGCCGCACCCCTGAGGTGACGTGCGT GGTTGTGGACGTTAGCCATGAGGATCCAGAGGTCAAATTCAATTGGTATG TCGATGGTGTGAGGTTTACAATGCCAAGACCAAAACCGCGTGAAGAACA GTACAATAGCACCTACCGCGTGGTGAGCGTGCTGACGGTCTGACACAGG ACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGTAAGGTCAGCAACAAGGCGCT GCCAGCACCGATTGAAAAGACCATTTCTAAAGCGAAAGGTCAGCCGCGT GAGCCGCAAGTCTATACCCTGCCGCCGTCGCGCGATGAGCTGACTAAAAA CCAGGTTAGCCTGACGTGCCTGGTGAAAGGTTTCTACCCGAGCGACATCG CGGTGGAGTGGGAGAGCAACGGTCAACCGGAGAATAACTACAAAACCAC CCCACCGGTCTTGGACTCCGATGGCAGCTTCTTTCTGTACTCTAAACTGAC CGTTGACAAAAGCCGTTGGCAACAGGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAAAAATCCCTGAGCCTGAG CCCGGGTAAGTAA</p>
29	<p>抗 CD47 IgG4-13m HC: ATGCAAGTCCAATTGGTCCAGAGCGGTGCGGAAGTCAAGAAACCGGGTG CAAGCGTCAAAGTTTCGTGCAAGGCGAGCGGTTTCAATATCAAAGACTAT TATCTGCACTGGGTTTCGTCAGGCTCCGGGCCAAGGCCTGGAGTGGATGGG TTGGATCGATCCGGACCAAGGGCGACACGGAGTACGCTCAGAAGCTGCAG GGTCGTGTTACCATGACCACCGACACCAAGCAGACGAGCACCGCGTACATGG AACTGCGCTCTCTGCGTTCGGATGATACCGCGGTGTACTATTGCAACGCC</p>

[0187]

	<p>GCGTACGGTAGCAGCAGCTATCCGATGGATTATTGGGGTCAAGGCACTAC GGTGACTGTCAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCGTCTGTGTTCCGTTG GCACCGTGCAGCCGTAGCACTAGCGAATCCACTGCAGCGCTGGGTTGCCT GGTTAAGGACTATTTCCCGGAGCCGGTTACCGTGTCTGGAACCTCTGGCG CCCTGACCAGCGGTGTTACACGTTTCCAGCCGTCTGCAGAGCAGCGG TCTGTACAGCCTGAGCTCGGTGGTGACCGTTCCGAGCAGCTCTCTGGGTA CCAAAACCTATACCTGTAATGTCGATCACAAACCGTCTAACACGAAGGTC GATAAACGTGTTGAAAGCAAGTACGGTCCGCCTTGTCGCGCCGTGCCCGGC ACCGGAGTTTCTGGGCGGTCCGTCCGTATTCTGTTCGCGCCGAAACCGA AAGATACCTTGATGATTAGCCGTACGCCAGAGGTCACGTGCGTCTGTGGTG GACGTTAGCCAAGAGGATCCGGAAGTCCAATTCAACTGGTACGTGGACG GTGTCGAGGTGCACAATGCCAAAACCAAGCCGCGTGAAGAACAGTTTAA CAGCACTTACCGCGTCTGTAGCGTCTGACCGTGCTGCACCAAGATTGGC TGAATGGTAAAGAGTACAAGTGCAAGGTTAGCAATAAGGGTCTGCCGAG CAGCATCGAGAAAACCATTAGCAAGGCGAAAGGTCAACCGCGCGAGCCA CAGGTCTACACGCTGCCGCCGAGCCAAGAAGAAATGACCAAAAATCAGG TTAGCCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCGAGCGATATTGCAGTT GAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTATAAGACGACCCCGC CAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTTTTGTATTCTCGTCTGACCGTGG ACAAGTCCCGTTGGCAAGAGGGCAATGTGTTTCAGCTGTTCTGTGCATGCAC GAAGCGCTGCATAACCATTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTGCTGGG CAAATAA</p>
30	<p>抗 CD47 IgG4P-5m HC: ATGCAAATGCAATTGGTACAAAGCGGTGCGGAAGTAAAGAAACCGGGTT CGTCGGTAAAGGTTAGCTGTAAAGCTTCTGGCTTCAATATCAAGGATTACT ATCTGCACTGGGTGCGTCAGGCGCCAGGTCAGGCCTTGGAATGGATGGG CTGGATTGACCCGGATCAAGGTGACACCGAATATGCCAAAAGTTTCAGG GTCGTGTGACCATCACCCGTGACCGTAGCACCTCCACCGCATATATGGAG CTGCGTAGCCTGCGCAGCGAAGATACTGCGGTGTATTACTGCAATGCGGC CTATGGTAGCAGCTCCTATCCGATGGATTACTGGGGCCAGGGTACCACGGT GACGGTTAGCAGCGCAAGCACCAAGGGCCCGTCTGTGTTTCCGTTGGCA CCGTGCAGCCGTAGCACTAGCGAATCCACTGCAGCGCTGGGTTGCCTGGT TAAGGACTATTTCCCGGAGCCGGTTACCGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCC TGACCAGCGGTGTTACACGTTTCCAGCCGTCTGCAGAGCAGCGGTCT GTACAGCCTGAGCTCGGTGGTGACCGTTCCGAGCAGCTCTCTGGGTACCA AAACCTATACCTGTAATGTCGATCACAAACCGTCTAACACGAAGGTCGAT AAACGTGTTGAAAGCAAGTACGGTCCGCCTTGTCGCGCCGTGCCCGGCAC CGGAGTTTCTGGGCGGTCCGTCCGTATTCTGTTCGCGCCGAAACCGAAA GATACCTTGATGATTAGCCGTACGCCAGAGGTCACGTGCGTCTGTGGTGGA CGTTAGCCAAGAGGATCCGGAAGTCCAATTCAACTGGTACGTGGACGGT GTCGAGGTGCACAATGCCAAAACCAAGCCGCGTGAAGAACAGTTTAAACA GCACTTACCGCGTCTGTAGCGTCTGACCGTGCTGCACCAAGATTGGCTG AATGGTAAAGAGTACAAGTGCAAGGTTAGCAATAAGGGTCTGCCGAGCA GCATCGAGAAAACCATTAGCAAGGCGAAAGGTCAACCGCGCGAGCCACA GGTCTACACGCTGCCGCCGAGCCAAGAAGAAATGACCAAAAATCAGGTT AGCCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCGAGCGATATTGCAGTTGA ATGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTATAAGACGACCCCGCCA GTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTTTTGTATTCTCGTCTGACCGTGGAC AAGTCCCGTTGGCAAGAGGGCAATGTGTTTCAGCTGTTCTGTGCATGCACGA AGCGCTGCATAACCATTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTGCTGGGCA AATAA</p>

[0188]

31	<p>抗 CD47 IgG4PE-13m HC:</p> <p>ATGCAAGTCCAATTGGTCCAGAGCGGTGCGGAAGTCAAGAAACCGGGTG CAAGCGTCAAAGTTTCGTGCAAGGCGAGCGGTTCAATATCAAAGACTAT TATCTGCACTGGGTTCGTGAGGCTCCGGGCCAAGGCCTGGAGTGGATGGG TTGGATCGATCCGGACCAGGGCGACACGGAGTACGCTCAGAAGCTGCAG GGTCGTGTTACCATGACCACCGACACCAGCACGAGCACCGCGTACATGG AACTGCGCTCTCTGCGTTCGGATGATACCGCGGTGTACTATTGCAACGCC GCGTACGGTAGCAGCAGCTATCCGATGGATTATTGGGGTCAAGGCACTAC GGTGACTGTCAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCGTCTGTGTTTCCGTTG GCACCGTGCAGCCGTAGCACTAGCGAATCCACTGCAGCGCTGGGTTGCCT GGTTAAGGACTATTTCCCGGAGCCGGTTACCGTGTCTGGAACCTCTGGCG CCCTGACCAGCGGTGTTACACGTTTCCAGCCGTCCTGCAGAGCAGCGG TCTGTACAGCCTGAGCTCGGTGGTGACCGTTCCGAGCAGCTCTCTGGGTA CCAAAACCTATACCTGTAATGTCGATCACAAACCGTCTAACACGAAGGTC GATAAACGTGTTGAAAGCAAGTACGGTCCGCCTTGTCGCCCGTGCCCGGC ACCGGAGTTTGAGGGCGGTCCGTCCGTATTCTGTTCCCGCCGAAACCGA AAGATACCTTGATGATTAGCCGTACGCCAGAGGTCACGTGCGTCGTGGTG GACGTTAGCCAAGAGGATCCGGAAGTCCAATTCAACTGGTACGTGGACG GTGTCGAGGTGCACAATGCCAAAACCAAGCCGCGTGAAGAACAGTTTAA CAGCACTTACCGCGTCGTTAGCGTCCTGACCGTGCTGCACCAAGATTGGC TGAATGGTAAAGAGTACAAGTGCAAGGTTAGCAATAAGGGTCTGCCGAG CAGCATCGAGAAAACCATTAGCAAGGCGAAAGGTCAACCGCGCGAGCCA CAGGTCTACACGCTGCCGCCGAGCCAAGAAGAAATGACCAAAAATCAGG TTAGCCTGACTTGCTGGTGAAAGGCTTCTACCCGAGCGATATTGCAGTT GAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTATAAGACGACCCCCG CAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTTTTGTATTCTCGTCTGACCGTGG ACAAGTCCCGTTGGCAAGAGGGCAATGTGTTTCAGCTGTTCTGTGCATGCAC GAAGCGCTGCATAACCATTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCGCTGGG CAAATAA</p>
32	<p>抗 CD47 IgG4PE-5m HC:</p> <p>ATGCAAATGCAATTGGTACAAAGCGGTGCGGAAGTAAAGAAACCGGGTT CGTCGGTAAAGGTTAGCTGTAAAGCTTCTGGCTTCAATATCAAGGATTACT ATCTGCACTGGGTGCGTCAGGCGCCAGGTCAGGCCTTGGAATGGATGGG CTGGATTGACCCGGATCAAGGTGACACCGAATATGCCAAAAGTTTCAGG GTCGTGTGACCATCACCCGTGACCGTAGCACCTCCACCGCATATATGGAG CTGCGTAGCCTGCGCAGCGAAGATACTGCGGTGTATTACTGCAATGCGGC CTATGGTAGCAGCTCCTATCCGATGGATTACTGGGGCCAGGGTACCACGGT GACGGTTAGCAGCGCAAGCACCAAGGGCCCGTCTGTGTTTCCGTTGGCA CCGTGCAGCCGTAGCACTAGCGAATCCACTGCAGCGCTGGGTTGCCTGGT TAAGGACTATTTCCCGGAGCCGGTTACCGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCC TGACCAGCGGTGTTACACGTTTCCAGCCGTCCTGCAGAGCAGCGGTCT GTACAGCCTGAGCTCGGTGGTGACCGTTCCGAGCAGCTCTCTGGGTACCA AAACCTATACCTGTAATGTCGATCACAAACCGTCTAACACGAAGGTCGAT AAACGTGTTGAAAGCAAGTACGGTCCGCCTTGTCGCCCGTGCCCGGCAC CGGAGTTTGAGGGCGGTCCGTCCGTATTCTGTTCCCGCCGAAACCGAAA GATACCTTGATGATTAGCCGTACGCCAGAGGTCACGTGCGTCGTGGTGGA CGTTAGCCAAGAGGATCCGGAAGTCCAATTCAACTGGTACGTGGACGGT GTCGAGGTGCACAATGCCAAAACCAAGCCGCGTGAAGAACAGTTTAAACA GCACTTACCGCGTCGTTAGCGTCCTGACCGTGCTGCACCAAGATTGGCTG AATGGTAAAGAGTACAAGTGCAAGGTTAGCAATAAGGGTCTGCCGAGCA GCATCGAGAAAACCATTAGCAAGGCGAAAGGTCAACCGCGCGAGCCACA</p>

	GGTCTACACGCTGCCGCCGAGCCAAGAAGAAATGACCAAAAATCAGGTT AGCCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCGAGCGATATTGCAGTTGA ATGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTATAAGACGACCCCGCCA GTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTTTTGTATTCTCGTCTGACCGTGGAC AAGTCCCGTTGGCAAGAGGGCAATGTGTTGAGCTGTTCTGTGTCATGCACGA AGCGCTGCATAACCATTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTGCGCTGGGCA AATAA
[0189]	33 抗 CD47 IgK: ATGAACATCCAAATGACTCAATCCCCATCCGCAATGTCCGCATCCGTAGGT GACCGCGTGACCATCACGTGCAAGGCGAGCCAGGATATTCATCGTTATCT GAGCTGGTTTCAACAGAAACCGGGCAAGGTTTCCTAAGCATCTGATTTACC GCGCGAACCGCTTGGTTAGCGGTGTTCCGAGCCGTTTTAGCGGCAGCGGT TCTGGCACCGAGTTCACCCTGACGATCTCCAGCCTGCAACCGGAAGATTT TGCGACGTACTACTGCCTGCAGTATGACGAGTTCCTGATACCTTTGGTGG TGGTACGAAGGTGGAAATCAAACGTACTGTGGCCGCTCCGAGCGTTTTCA TTTTTCCGCCGTCGGATGAGCAATTGAAATCTGGTACCGCGAGCGTCGTTT GTCTGCTGAACAATTTCTACCCGCGTGAGGCTAAGGTGCAATGGAAGGTC GATAACGCGCTGCAGAGCGGTAATAGCCAGGAAAGCGTCACCGAACAGG ATAGCAAAGACAGCACCTACTCTTTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAA GGCCGACTATGAGAAACACAAAGTTTACGCATGTGAGGTACGCACCAG GGCCTGAGCAGCCCGGTGACCAAAAGCTTCAATCGTGGCGAATGCTAA

[0190] 在某些实施方式中,本文提供的多核苷酸与启动子可操作连接,用于在宿主细胞中表达这样的多核苷酸序列。在某些实施方式中,所述启动子衍生自哺乳动物细胞的基因组(例如,金属硫蛋白启动子)或衍生自哺乳动物病毒(例如,腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子)。在具体的实施方式中,编码本文描述的抗体的核苷酸序列的表达受到组成型启动子、可诱导启动子或组织特异性启动子的调节。

[0191] 在具体的方面,本文提供的是包含核苷酸序列的多核苷酸,所述核苷酸序列编码抗体,所述抗体包含轻链和重链,例如,独立的轻链和重链。对于轻链,在具体的实施方式中,本文提供的多核苷酸包含编码kappa轻链的核苷酸序列。在另一个具体的实施方式中,本文提供的多核苷酸包含编码lambda轻链的核苷酸序列。在又一个具体的实施方式中,本文提供的多核苷酸包含编码本文描述的抗体的核苷酸序列,所述抗体包含人kappa轻链或人lambda轻链。例如,人恒定区序列可以是美国专利No.5,693,780中描述的那些。

[0192] 在特定的实施方式中,本文提供的多核苷酸包含编码本文描述的抗体的核苷酸序列,所述抗体特异性结合CD47多肽,其中所述抗体包含重链,其中所述重链的恒定区包含人gamma(γ)重链恒定区,例如,人gamma(γ)1重链恒定区、人gamma(γ)2重链恒定区、人gamma(γ)3重链恒定区或人gamma(γ)4重链恒定区。

[0193] 5.2.2细胞和载体

[0194] 在某些方面,本文提供的是表达(例如,重组地)本文描述的特异性结合CD47的抗体(或其抗原结合片段)的细胞(例如,宿主细胞),和相关的多核苷酸和表达载体,例如,适用于CF表达系统的多核苷酸和表达载体。本文提供的是包含多核苷酸的载体(例如,表达载体),所述多核苷酸包含编码抗CD47抗体或片段的核苷酸序列,用于在CF表达系统中重组表达。在特定的方面,本文提供的是产生本文描述的抗CD47抗体的方法,包括在例如产生改善的抗体表达滴度或产量的条件下,使用CF表达系统表达这样的抗体。

[0195] 在某些方面,本文提供的是包含多核苷酸的载体(例如,表达载体),所述多核苷酸包含编码抗CD47抗体或片段的核苷酸序列,用于在宿主细胞中,例如在哺乳动物细胞中重

组表达。本文还提供的是包含这样的载体的宿主细胞,用于重组地表达本文描述的抗CD47抗体(例如,人类或人源化抗体)。在特定的方面,本文提供的是产生本文描述的抗体的方法,包括使用宿主细胞表达这样的抗体。

[0196] 本文描述的特异性结合CD47的抗体(例如,本文描述的全长抗体、抗体的重链和/或轻链、或单链抗体)的重组表达涉及构建含有编码所述抗体的多核苷酸的表达载体。一旦获得了编码本文描述的抗体分子、抗体的轻链和/或重链、或其片段(例如,重链和/或轻链可变域)的多核苷酸,用于产生抗体分子的载体可以利用本领域公知的技术通过重组DNA技术产生。因而,本文描述了通过表达含有抗体或抗体片段(例如,轻链或重链)编码核苷酸序列来制备蛋白质的方法。本领域技术人员公知的方法可以用于构建表达载体,所述表达载体含有抗体或抗体片段(例如,轻链或重链)编码序列和适当的转录和翻译控制信号。这些方法包括,例如,体外重组DNA技术、合成技术和体内遗传重组。还提供的是包含与启动子可操作连接的核苷酸序列的可复制载体,所述核苷酸序列编码本文描述的抗体分子、抗体的重链或轻链、抗体或其片段的轻链或重链可变域、或重链或轻链CDR。例如,这样的载体可以包括编码抗体分子的恒定区的核苷酸序列(参见,例如,国际公开No. WO 86/05807和WO 89/01036;以及美国专利No. 5,122,464),抗体的可变域可以克隆到这样的载体中,用于完整的重链、完整的轻链、或完整重链和轻链两者的表达。

[0197] 表达载体可以通过常规技术转移到细胞(例如,宿主细胞),产生的细胞然后可以由常规技术培养来产生本文描述的抗体或其片段。因而,本文提供的是宿主细胞,其含有与启动子可操作连接的多核苷酸用于在宿主细胞中表达这样的序列,所述多核苷酸编码本文描述的抗体或其片段,或其重链或轻链、或其片段,或本文描述的单链抗体。在某些实施方式中,对于双链抗体的表达,分别编码重链和轻链的载体可以在宿主细胞中共同表达,用于表达整个免疫球蛋白分子,如下文详述的。在某些实施方式中,宿主细胞含有包含多核苷酸的载体,所述多核苷酸编码本文描述的抗体的重链和轻链两者,或其片段。在具体的实施方式中,宿主细胞含有两种不同的载体,第一载体包含编码本文描述的抗体的重链或重链可变区、或其片段的多核苷酸,第二载体包含编码本文描述的抗体的轻链或轻链可变区、或其片段的多核苷酸。在其他实施方式中,第一宿主细胞包含第一载体,其包含编码本文描述的抗体的重链或重链可变区、或其片段的多核苷酸,第二宿主细胞包含第二载体,其包含编码本文描述的抗体的轻链或轻链可变区、或其片段的多核苷酸。在具体的实施方式中,第一细胞表达的重链/重链可变区与第二细胞的轻链/轻链可变区缔合来形成本文描述的抗CD47抗体或其抗原结合片段。在某些实施方式中,本文提供的是包含这样的第一宿主细胞和这样的第二宿主细胞的宿主细胞的群体。

[0198] 在特定的实施方式中,本文提供的是包含第一载体和第二载体的群体,所述第一载体包含编码本文描述的抗CD47抗体的轻链/轻链可变区的多核苷酸,所述第二载体包含编码本文描述的抗CD47抗体的重链/重链可变区的多核苷酸。

[0199] 可以利用各种宿主-表达载体系统来表达本文描述的抗体分子(参见,例如,美国专利No. 5,807,715)。这样的宿主-表达系统表现为载体,通过所述载体可以产生和随后纯化目标编码序列,但还表现为细胞,当用合适的核苷酸编码序列转化或转染时,其可以原位表达本文描述的抗体分子。这些包括但不限于微生物,例如用含有抗体编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如,E. coli和枯草芽孢杆菌);用含有

抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,酵母菌属,毕赤氏酵母属);用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒,TMV)感染的、或用重组质粒表达载体(例如,Ti质粒)转化的植物细胞系统(例如,绿藻,如莱茵衣藻);或哺乳动物细胞系统(例如,COS、CHO、BHK、MDCK、HEK 293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、HeLa和NIH 3T3细胞),其携带含有来自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或来自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)。在具体的实施方式中,用于表达本文描述的抗体或其抗原结合片段的细胞是CHO细胞,例如,来自CHO GS System™(Lonza)的CHO细胞。在具体的实施方式中,哺乳动物表达载体是pOptiVEC™或pcDNA3.3。在特定的实施方式中,特别是对于完整重组抗体分子的表达,细菌细胞例如大肠杆菌,或真核细胞(例如,哺乳动物细胞)用于重组抗体分子的表达。例如,哺乳动物细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,以及载体,例如来自人类巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子元件,是抗体的有效表达系统(Foecking et al.,1986,Gene 45:101;以及Cockett et al.,1990,Bio/Technology 8:2)。在某些实施方式中,本文描述的抗体通过CHO细胞或NS0细胞产生。在具体的实施方式中,编码免疫特异性结合CD47的本文描述的抗体的核苷酸序列的表达是通过组成型启动子、可诱导启动子或组织特异性启动子调节的。

[0200] 在细菌系统中,取决于要表达的抗体分子的预定用途,可以有利地选择许多表达载体。例如,当要产生大量的这样的抗体时,用于抗体分子的药物组合物的生成,直接表达容易纯化的高水平的融合蛋白产物的载体可以是期望的。这种载体包括但不限于,E.coli表达载体pUR278(Ruther et al.,1983,EMBO 12:1791),其中抗体编码序列可以与lac Z编码区按读码框地分别连接到载体中,从而产生融合蛋白;pIN载体(Inouye&Inouye,1985,Nucleic Acids Res.13:3101-3109;Van Heeke&Schuster,1989,J.Biol.Chem.24:5503-5509);等等。例如,pGEX载体也可以用于表达外源的多肽,作为与谷胱甘肽5-转移酶(GST)的融合蛋白。一般地,这样的融合蛋白是可溶的,通过吸附和结合到基质谷胱甘肽琼脂糖珠子继之以在存在游离谷胱甘肽的情况下的洗脱,可以容易地从裂解的细胞制备。pGEX载体被设计以包括凝血酶或因子Xa蛋白酶裂解位点,从而克隆的目标基因产物可以从GST部分释放。

[0201] 在昆虫系统中,例如,苜蓿丫纹夜蛾(*Autographa californica*)核多角体病病毒(AcNPV)可以用作载体来表达外源基因。所述病毒在草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞中生长。抗体编码序列可以分别克隆到病毒的非关键区(例如,多角体蛋白基因)并置于AcNPV启动子(例如,多角体蛋白启动子)的控制之下。

[0202] 在哺乳动物宿主细胞中,可以利用许多基于病毒的表达系统。在腺病毒用作表达载体的情况下,目标抗体编码序列可以连接到腺病毒转录/翻译控制复合物,例如,晚期启动子和三联的前导序列。然后通过体外或体内重组将这种嵌合基因插入腺病毒基因组。在病毒基因组的非关键区(例如,区域E1或E3)中的插入将产生存活的和能在感染的宿主中表达抗体分子的重组病毒(参见,例如Logan&Shenk,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:355-359)。特定的起始信号也可能是插入的抗体编码序列的有效翻译所需的。这些信号包括ATG起始密码子和邻近的序列。此外,起始密码子必须与期望的编码序列的阅读框相符以确保完整插入物的翻译。这些外源的翻译控制信号和起始密码子可以是各种来源的,天

然的或合成的。通过包含合适的转录增强子元件、转录终止子,等等,可以增强表达的效力(参见,例如Bittner et al.,1987,Methods in Enzymol.153:51-544)。

[0203] 此外,可以选择宿主细胞菌株,其调节插入的序列的表达,或以期望的特定方式修饰和加工基因产物。蛋白产物的这种修饰(例如,糖基化)和加工(例如,裂解)对于蛋白质的功能可能是重要的。不同的宿主细胞对于翻译后加工和蛋白与基因产物的修饰具有特征性和特定的机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统来确保所表达的外源蛋白的正确修饰和加工。为此,可以使用真核的宿主细胞,其具有用于原始转录产物的适当加工、基因产物的糖基化和磷酸化的细胞机制。这样的哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、VERO、BHK、Hela、COS、MDCK、HEK 293、NIH 3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NS0(一种不内源地产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030和HsS78Bst细胞。在某些实施方式中,本文描述的抗CD47抗体(例如,包含抗体Ab235-Ab255的任一个的CDR的抗体)在哺乳动物细胞例如CHO细胞中生产。

[0204] 对于长期的、高产量的重组蛋白质生产,可以产生稳定的表达细胞。例如,稳定地表达本文描述的抗CD47抗体或其抗原结合片段的细胞系可以被工程化。在具体的实施方式中,本文提供的细胞稳定地表达轻链/轻链可变域以及重链/重链可变域,它们缔合形成本文描述的抗体或其抗原结合片段。

[0205] 在某些方面,不同于使用含有病毒复制起点的表达载体,可以用由适合的表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、多聚腺苷酸位点,等等)控制的DNA和选择标记来转化宿主细胞。在导入外源DNA/多核苷酸之后,可以容许工程化的细胞在富集培养基中生长1-2天,然后转移到选择培养基。重组质粒中的选择标记赋予了对选择的抗性,容许细胞将质粒稳定地整合到它们的染色体中,并生长形成病灶,其随后可被克隆和扩大成细胞系。这种方法可以有益地用于表达本文描述的抗CD47抗体或其片段的工程化细胞系。这种工程化细胞系在筛选和评估与所述抗体分子直接或间接作用的组合物中可能是特别有用的。

[0206] 可以使用许多选择系统,包括但不限于单纯性疱疹病毒胸苷激酶(Wigler et al.,1977,Cell 11:223)、次黄嘌呤-鸟嘌呤转磷酸核糖茎酶(Szybalska&Szybalski,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 48:202),和腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Lowy et al.,1980,Cell 22:8-17)基因,可以分别应用于tk细胞、hgpvt细胞或aprt细胞。并且,抗代谢物抗性可以用作以下基因的选择基础:dhfr,其赋予对甲氨蝶呤的抗性(Wigler et al.,1980,Natl.Acad.Sci.USA 77:357;O'Hare et al.,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:1527);gpt,其赋予对麦考酚酸的抗性(Mulligan&Berg,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:2072);neo,其赋予对氨基糖苷类G-418的抗性(Wu and Wu,1991,Biotherapy 3:87-95;Tolstoshev,1993,Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.32:573-596;Mulligan,1993,Science 260:926-932;以及Morgan and Anderson,1993,Ann.Rev.Biochem.62:191-217;May,1993,TIB TECH 11(5):155-215);以及hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre et al.,1984,Gene 30:147)。重组DNA技术领域公知的方法可以常规地用于选择期望的重组克隆,例如,在Ausubel et al.(eds.),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley& Sons,NY(1993);Kriegler,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press,NY(1990);and in Chapters 12and 13,Dracopoli et al.(eds.),

Current Protocols in Human Genetics, John Wiley&Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1 中描述了这样的方法, 通过引用将它们完全合并在本文中。

[0207] 通过载体扩增(对于综述, 参见 Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3 (Academic Press, New York, 1987)), 可以提高抗体分子的表达水平。当表达抗体的载体系统中的标记物是可扩增的时, 宿主细胞的培养物中存在的抑制物水平的提高将提高标记基因的拷贝数。由于扩增的区域与抗体基因相连, 抗体的生产也将提高(Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257)。

[0208] 可以用本文描述的两种或更多种表达载体共转染宿主细胞, 第一载体编码重链衍生的多肽, 第二载体编码轻链衍生的多肽。两种载体可以含有相同的选择标记, 其允许重链和轻链多肽的等量表达。宿主细胞可以用不同数量的两种或更多种表达载体共转染。例如, 宿主细胞可以用任一种以下比例的第一表达载体和第二表达载体转染: 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:12、1:15、1:20、1:25、1:35、1:40、1:45 或 1:50。

[0209] 做为选择, 可以使用单个载体, 其编码并且能够表达重链和轻链多肽两者。在这种情况下, 轻链应当置于重链之前以避免过量的毒性游离重链(Proudfoot, 1986, Nature 322:52; 以及 Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197-2199)。重链和轻链的编码序列可以包含 cDNA 或基因组 DNA。表达载体可以是单顺反子或多顺反子的。多顺反子核酸构建体可以编码 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个, 或 2-5、5-10 或 10-20 个基因/核苷酸序列。例如, 双顺反子核酸构建体可以按以下顺序包含启动子、第一基因(例如, 本文描述的抗体的重链)和第二基因(例如, 本文描述的抗体的轻链)。在这样的表达载体中, 两个基因的转录都可以被启动子驱动, 而来自第一基因的 mRNA 的翻译可以通过 cap 依赖性扫描机制, 来自第二基因的 mRNA 的翻译可以通过 cap 独立性机制, 例如, 通过 IRES。

[0210] 一旦通过重组表达产生了本文描述的抗体分子, 它可以通过本领域已知的用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法来纯化, 例如, 通过层析(例如, 离子交换、亲和性, 特别是通过对蛋白 A 特异性抗原的亲和性、以及大小柱层析)、离心、差分溶解、或通过纯化蛋白质的任何其他标准技术。进一步的, 本文描述的抗体可以融合到本文描述的或本领域已知的异源多肽序列以便于纯化。

[0211] 在具体的实施方式中, 本文描述的抗体或抗原结合片段是分离的或纯化的。一般地, 分离的抗体是一种抗体, 其基本上没有具有与所述分离的抗体不同的抗原特异性的其他抗体。例如, 在特定的实施方式中, 本文描述的抗体的制品基本上没有细胞材料和/或化学前体。用语“基本上没有细胞材料”包括抗体的制品, 其中所述抗体从细胞的细胞组分分离, 所述抗体分离自所述细胞或由所述细胞重组产生。因而, 基本上没有细胞材料的抗体包括抗体的制品, 其具有小于约 30%、20%、10%、5%、2%、1%、0.5% 或 0.1% (按干重) 的异源蛋白质(在本文中也称为“污染蛋白质”)和/或抗体的变体, 例如, 抗体的不同的翻译后修饰形式, 或抗体的其他不同版本(例如, 抗体片段)。当所述抗体是重组产生的时, 它一般还基本上没有培养基, 即, 培养基低于所述蛋白制品的体积的约 20%、10%、2%、1%、0.5% 或 0.1%。当所述抗体通过化学合成产生时, 它一般还基本上没有化学前体或其他化学物质, 即, 它与蛋白质合成中涉及的化学前体或其他化学物质分离。因而, 这样的抗体制品具有小

于约30%、20%、10%或5% (按干重) 的目标抗体以外的化学前体或化合物。在具体的实施方式中, 本文描述的抗体是分离的或纯化的。

[0212] 5.3 药物组合物和试剂盒

[0213] 本文提供的是包含本文描述的一种或更多种抗体 (例如, 抗CD47抗体)、或其抗原结合片段、或其结合物的组合物、药物组合物和试剂盒。在特定的方面, 本文描述的组合物 (例如, 药物组合物) 可以用于试管内、体内或体外的用途。用途的非限制性实例包括用于调节 (例如, 抑制或诱导/增强) CD47活性, 以及控制或治疗失调例如癌症的用途。在具体的实施方式中, 本文提供的是包含本文描述的抗体 (例如, 人源化抗体) (或其抗原结合片段) 以及药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。

[0214] 如本文使用的, 术语“药学上可接受的”是指由联邦或州政府的管理机构批准的, 或在美国药典、欧洲药典或其他一般公认的药典中列出的用于动物、更特别地用于人类的。

[0215] 通过混合具有期望纯度的抗体和任选的生理学可接受的载体、赋形剂或稳定剂 (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed. (2006) Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD), 可以制备含有本文提供的一种或更多种抗体或其抗原结合片段的制剂用于保存。例如, 这样的制剂可以是例如冻干制剂或水性溶液的形式。适合于施用本文提供的抗体的药物载体包括本领域技术人员已知适合于特定施用方式的任何这样的载体。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的, 包括缓冲剂, 例如磷酸、柠檬酸和其他有机酸; 和/或非离子表面活性剂, 例如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇 (PEG)。

[0216] 体内施用的制剂可以是无菌的。这可以容易地实现, 例如, 通过例如过滤除菌膜来过滤。

[0217] 在具体的方面, 本文提供的药物组合物含有处于药学上可接受的载体中的、治疗有效量的一种或更多种本文提供的抗体或抗原结合片段。这样的药物组合物在预防、治疗、管理或改善本文描述的状况或失调或其一种或更多种症状方面是有用的。

[0218] 本文提供的组合物可以含有一种或更多种本文提供的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中, 提供了组合物, 其中本文描述的抗体或抗原结合片段被配制到适合的药物制品中, 例如, 溶液、悬浮液、粉末、持续释放制剂或酞剂, 处于无菌溶液或悬浮液中用于胃肠外施用, 或作为穿皮肤的贴片制品和干粉吸入物。

[0219] 在一个实施方式中, 本文提供的组合物被配制用于单剂量施用。为了配制组合物, 化合物的重量分数以有效浓度溶解、悬浮、分散或混合入选定的载体, 使得被治疗的状况被缓解、预防, 或一种或更多种症状被改善。

[0220] 在某些方面, 本文提供的抗体以有效量被包括在药学上可接受的载体中, 其足以对被治疗的患者发挥治疗有用的作用, 而没有、或有最小的或可忽略的不希望的副作用。

[0221] 本文提供的药物组合物中抗CD47抗体的浓度将取决于, 例如, 抗体的物理化学特性、给药方案、施用数量以及其他因素。

[0222] 提供本文描述的药物组合物以单位剂型向人类或动物 (例如, 哺乳动物) 施用, 例如, 无菌的胃肠外的 (例如, 静脉内的) 溶液或悬浮液, 其含有适合量的所述化合物或其药学上可接受的衍生物。还提供了药物组合物用于以单位剂型向人类和动物施用, 例如, 含有适

合数量的抗CD47抗体或其药学上可接受的衍生物的片剂、胶囊剂、丸剂、粉末、颗粒剂以及口部或鼻部溶液或悬浮液,和水-油乳剂。在一个实施方式中,所述抗体以单位剂型或多次剂型配制和施用。如本文使用的,单位剂型是指适合于人类或动物(例如,哺乳动物)对象的物理上独立的单位,并独立地包装。每个单位剂量含有足以产生期望的治疗效果的预定数量的抗CD47抗体,与需要的药物载体、运载体或稀释剂相关联。单位剂型的实例包括安瓿瓶和注射器,以及独立包装的片剂或胶囊剂。单位剂型可以按部分施用或其多个施用。多次剂型是包装在单个容器中的多个相同的单位剂型,以按照分离的单位剂型施用。多剂量形式的实例包括小瓶、片剂或胶囊剂的瓶子、或瓶子。因此,在具体的方面,多次剂型是在包装中不分开多个单位剂型。

[0223] 在某些实施方式中,本文描述的一种或更多种抗CD47抗体或其抗原结合片段处于液体药物制剂中。液体的药学上可施用的组合物可以,例如,通过将抗体和任选的药物佐剂溶解、分散或混合于载体如水、盐水、葡萄糖水、甘油、甘醇等中,从而形成溶液或悬浮液来制备。在某些实施方式中,要施用的本文提供的药物组合物还可以含有微量的无毒的辅助物质,例如,润湿剂、乳化试剂、增溶剂和pH值缓冲剂,等。

[0224] 制备这样的剂型的方法是已知的,或对于本领域技术人员是明显的;参见,例如, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed. (2006) Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD.。

[0225] 在一个实施方式中,胃肠外施用的特征在于注射,皮下的、肌内的或静脉内的也是本文期待的。注射剂可以按常规形式制备,作为液体溶液或悬浮液,适用于注射之前的液体中的溶液或悬浮液的固体形式,或作为乳剂。注射剂、溶液和乳剂还含有一种或更多种赋形剂。适合的赋形剂是,例如,水、盐水、葡萄糖、甘油或乙醇。其他施用途径可以包括肠道施用、脑内施用、鼻部施用、动脉内施用、心内施用、骨内输注、鞘内施用和腹膜内施用。

[0226] 用于胃肠外施用的制品包括预备用于注射的无菌溶液、无菌的干燥可溶产品,例如,冻干粉,预备在使用前与溶剂组合,包括皮下的片剂、预备用于注射的无菌悬浮液,预备在使用前与运载体组合的无菌干燥不溶产品,和无菌乳剂。溶液可以是水性或非水性的。

[0227] 如果静脉内施用,适合的载体包括生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(PBS),以及含有增稠和增溶剂的溶液,例如,葡萄糖、聚乙二醇和聚丙烯乙二醇以及其混合物。

[0228] 胃肠外制品中使用的药学上可接受的载体包括水性载体、非水性载体、抗微生物剂、等渗试剂、缓冲剂、抗氧化剂、局部麻醉剂、悬浮和分散剂、乳化剂、隔离或螯合剂,以及其他药学上可接受的物质。

[0229] 药物载体还包括用于水溶性载体的乙醇、聚乙二醇和丙烯甘醇;以及用于pH值调整的氢氧化钠、盐酸、柠檬酸或乳酸。

[0230] 在某些实施方式中,含有本文描述的抗CD47抗体或片段的无菌水性溶液的静脉内或动脉内输注是有效的施用方式。另一个实施方式是含有本文描述的抗CD47抗体的无菌的水性或油性溶液或悬浮液,根据需要进行注射来产生期望的药理学效果。

[0231] 在具体的实施方式中,本文描述的抗CD47抗体可以以微粒的或其他适合的形式悬浮。产生的混合物的形式取决于多种因素,包括预期的施用方式以及化合物在选定的载体或运载体中的溶解度。

[0232] 在其他实施方式中,所述药物制剂是冻干粉,其可以被重构作为溶液、乳剂和其他混合物施用。它们还可以被重构和配制成固体或凝胶。

[0233] 例如,冻干粉可以通过将本文提供的抗CD47抗体溶解在适合的溶剂中来制备。在某些实施方式中,所述冻干粉是无菌的。适合的溶剂可以含有赋形剂,其改善所述粉末或从所述粉末制备的重构溶液的稳定性或其他药理部分。可以使用的赋形剂包括但不限于葡萄糖、山梨糖醇、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其它合适的试剂。适合的溶剂还可以含有缓冲剂,例如,柠檬酸盐、磷酸钠或磷酸钾,或本领域技术人员已知的其他这类缓冲剂,在一个实施方式中,是约中性pH值的。在本领域技术人员已知的标准条件下对溶液过滤除菌随后冻干,提供了制剂的实例。在一个实施方式中,产生的溶液将分装到小瓶中用于冻干。冻干粉可以在适当的条件下保存,例如,约4℃到室温下。

[0234] 用注射用水重构这种冻干粉提供了用于胃肠外施用的制剂。对于重构,冻干粉添加到无菌水或其他适合的载体中。

[0235] 在某些方面,本文提供的抗CD47抗体可以被配制用于局部施用或表面施用,例如,向皮肤和粘膜表面施用,例如,在眼中,以凝胶、乳膏剂和洗液的形式,用于向眼部应用或用于脑池内的或脊柱内的应用。对于穿表皮的递送以及对于向眼或粘膜施用,或对于吸入治疗,局部施用是期待的。也可以施用单独的、或与其他药学上可接受的赋形剂组合的活性化化合物的鼻部溶液。

[0236] 本文提供的抗CD47抗体和其他组合物还可以被配制靶向要治疗的对象的特定组织、器官或身体的其他区域。许多这样的靶向方法是本领域技术人员已知的。对于在当前组合物中使用,所有这样的靶向方法是本文期待的。靶向方法的非限制性实例参见,例如,美国专利No.6,316,652、6,274,552、6,271,359、6,253,872、6,139,865、6,131,570、6,120,751、6,071,495、6,060,082、6,048,736、6,039,975、6,004,534、5,985,307、5,972,366、5,900,252、5,840,674、5,759,542和5,709,874。在某些实施方式中,本文描述的抗CD47抗体被靶向(或施用)至视觉器官、骨髓、胃肠道、肺、脑或关节。在具体的实施方式中,本文描述的抗CD47抗体能够穿过血脑屏障。

[0237] 本文提供的是药物包装或试剂盒,其包含装有本文描述的药物组合物的一种或多种成分,例如本文提供的一种或更多种抗CD47抗体的一个或多个容器。任选的,与这种容器相关的可以是管理药物或生物产品的制造、使用或销售的政府机构所规定形式的注意事项,所述注意事项反映了所述制造、使用或销售的机构批准用于人类施用。

[0238] 本文还提供的包含本文描述的一种或更多种抗体或抗体片段的试剂盒。在一个实施方式中,试剂盒在一个或更多个容器中包含本文描述的抗体或抗体片段。在具体的实施方式中,本文描述的试剂盒含有基本上纯化的CD47抗原作为对照。在另一个具体的实施方式中,本文描述的试剂盒进一步包含不与CD47抗原反应的对照抗体。在另一个具体的实施方式中,本文描述的试剂盒含有用于检测修饰的抗体与CD47抗原的结合的一种或更多种成分(例如,抗体可以缀合到可检测的底物,例如荧光化合物、酶底物、放射性化合物或发光化合物,或识别所述第一抗体的第二抗体可以缀合到可检测的底物。在具体的实施方式中,本文提供的试剂盒可以包括重组生产的或化学合成的CD47抗原。试剂盒中提供的CD47抗原还可以附着到固相支持物。在更具体的实施方式中,上文描述的试剂盒的检测方式包括固相支持物,CD47抗原附着于所述固相支持物上。这样的试剂盒还可以包括非附着的、报告物标

记的抗人抗体或抗小鼠/大鼠抗体。在这个实施方式中,抗体与CD47抗原的结合可以所述报告物标记的抗体的结合来检测。

[0239] 在特定的方面,本文提供的是用本文描述的抗CD47抗体或其抗原结合片段调节CD47活性的方法。

[0240] 在具体的实施方式中,本文提供的是用本文描述的抗CD47抗体抑制(例如,部分地抑制)CD47活性的方法。在某些实施方式中,本文提供的是使用本文描述的抗CD47抗体管理或治疗状况或失调,例如,癌症的方法。在某些实施方式中,本文提供的是使用本文描述的抗CD47抗体保护对抗状况或失调,例如,癌症的方法。

[0241] 在特定的实施方式中,本文提供的是管理、治疗、预防或保护对抗癌症的方法,包括向有需要的对象施用治疗有效量的、本文描述的特异性结合CD47(例如,人CD47)的抗体或抗原结合片段。在某些实施方式中,本文提供的是减轻、抑制或降低与癌症相关的一种或更多种症状的发展或严重度的方法。

[0242] 如本文使用的,“施用(administer)”或“施用(administration)”是指通过例如粘膜的、局部的、真皮内的、胃肠外的、静脉内的、皮下的、肌肉内的递送和/或本文描述的或本领域已知的任何其他物理递送方法,向对象或患者(例如,人类)注射或物理地递送物质(例如,本文提供的人源化抗CD47抗体或其抗原结合片段)的行为。

[0243] 如本文使用的,“有效量”或“治疗有效量”是指足以降低和/或改善给定状况、失调或疾病(例如,癌症、转移或血管生成)和/或与之相关的症状的严重度和/或持续时间的治疗(例如,本文提供的抗体或药物组合物)的数量。这些术语还涵盖了降低、减缓或改善给定疾病的进展或发展,降低、减缓或改善给定疾病的复发、发展或发作,和/或改善或增强其他治疗(例如,不同于本文描述的抗CD47抗体的治疗)的预防或治疗效果所必需的数量。在某些实施方式中,本文使用的“有效量”还指实现指定结果的本文描述的本文描述的抗体的数量。

[0244] 如本文使用的,在施用其他治疗的上下文中术语“组合”是指使用超过一种治疗。术语“组合”的使用不限制施用治疗的顺序。例如,治疗可以连续地、次序地、同时地或相伴地施用。

[0245] 如本文使用的,术语“管理”是指对象得自治疗(例如,预防性或治疗性试剂)的有益作用,其不引起与CD47相关的状况的治愈。在某些实施方式中,对象被施用一种或更多种治疗(例如,预防性或治疗性试剂,例如,本文描述的抗体)来“管理”本文描述的状况或失调、其一种或更多种症状,以预防所述状况或失调的发展或恶化。

[0246] 如本文使用的,在本文提供的状况或失调(例如,自体免疫性失调、免疫学失调、癌症或炎症)的上下文中术语“阻碍”是指全部或部分抑制(例如,小于100%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%10%或5%)或阻断本文提供的状况或失调(例如,癌症、转移或血管生成)和/或与之相关的症状的发展、复发、发作或传播,其由施用本文提供的治疗或治疗组合(例如,预防性或治疗性试剂的组合,例如,本文描述的抗体)而引起。

[0247] 如本文使用的,术语“个体”、“对象”和“患者”可互换地使用。如本文使用的,对象是哺乳动物,例如非灵长类(例如,牛、猪、马、猫、狗、山羊、兔、大鼠、小鼠,等)或灵长类(例如,猴和人类),例如,人类。在一个实施方式中,所述对象是被诊断患有本文提供的状况或失调(例如,癌症、转移或血管生成)哺乳动物,例如,人类。在另一个实施方式中,所述对象

是有发生本文提供的状况或失调(例如,癌症、转移或血管生成)的风险的哺乳动物,例如,人类。在另一个实施方式中,所述对象是人类。

[0248] 在某些实施方式中,CD47在对象,例如人类对象的细胞中扩增。来自对象的样品中CD47扩增的鉴定可以通过本领域普通技术人员已知的分析来进行,例如,定量逆转录PCR、免疫印迹分析、DNA指纹图谱、染色体组型(例如,通过多色荧光原位杂交(mFISH))、比较基因组杂交和基因表达剖析。作为非限制性实例,肿瘤样品的蛋白质表达可以使用免疫组织化学分析测量样品中存在的CD47蛋白数量来表征。

[0249] 来自对象的样品中突变或删除的鉴定可以通过本领域普通技术人员已知的分析来进行,例如,DNA提取、互补DNA生成和cDNA测序。例如,可以利用cDNA序列通过本领域普通技术人员已知的方法获得翻译产物。例如,通过比较来自对象的样品的序列与野生型和/或共有序列,可以鉴定遗传的删除和氨基酸取代。

[0250] 在某些实施方式中,CD47在根据本文提供的方法治疗的对象中扩增。来自对象的样品中CD47扩增的鉴定通过本领域普通技术人员已知的分析来进行,例如,定量逆转录PCR或免疫印迹分析。来自对象的样品中突变或删除的鉴定可以通过本领域普通技术人员已知的分析来进行,例如,DNA提取、互补DNA生成和cDNA测序。例如,利用cDNA序列通过本领域普通技术人员已知的方法获得翻译产物。例如,通过比较来自对象的样品的序列与野生型和/或共有序列,鉴定遗传的删除和氨基酸取代。

[0251] 如本文使用的,术语“治疗”是指任何方案、方法、组合物、制剂和/或试剂,其可以用于预防、处置、管理或改善状况或失调或其症状(例如,本文提供的状况或失调(例如,癌症)或与之相关的一种或更多种症状或状况)。在某些实施方式中,术语“治疗”是指在处置、管理、预防或改善状况或失调或其一种或更多种症状(例如,癌症或与之相关的一种或更多种症状或状况)方面有用的药物治疗、辅助治疗、放射、手术、生物学治疗、支持治疗和/或其他治疗。在某些实施方式中,术语“治疗”是指与本文描述的抗CD47抗体或其药物组合物不同的治疗。在具体的实施方式中,“其他治疗”是指与使用本文描述的抗CD47抗体或其药物组合物的治疗不同的治疗。在具体的实施方式中,治疗包括使用本文描述的抗CD47抗体作为辅助治疗。例如,使用本文描述的抗CD47抗体与药物治疗、生物学治疗、手术和/或支持治疗组合。

[0252] 如本文使用的,“血液癌症”是指血液的癌症,包括白血病、淋巴瘤和骨髓瘤等。“白细胞”是指一种血液的癌症,其中产生了在对抗感染方面无效的过多白细胞,因而排挤了构成血液的其他部分例如血小板或红血细胞。要理解的是,白血病的病例被分类为急性或慢性。某些形式的白血病包括,作为非限制性实例,急性淋巴细胞性白血病(ALL);急性骨髓性白血病(AML);慢性淋巴细胞性白血病(CLL);慢性粒性白血病(CML);骨髓增生性失调/赘生物(MPDS);和脊髓发育不良综合征。“淋巴瘤”可以指霍奇金淋巴瘤、惰性和侵袭性的非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤(小细胞和大细胞)等。骨髓瘤可以指多发性骨髓瘤(MM)、巨细胞性骨髓瘤、重链骨髓瘤以及轻链或Bence-Jones骨髓瘤。

[0253] 可以用本文描述的抗CD47抗体治疗或管理的状况的非限制性实例包括血液癌症和/或实体肿瘤。

[0254] 与异常的CD47表达、活性和/或信号转导相关的疾病或失调包括,作为非限制性实例,血液癌症和/或实体肿瘤。血液癌症包括,例如,白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。某些形式的白

血病包括,作为非限制性实例,急性淋巴细胞性白血病(ALL);急性骨髓性白血病(AML);慢性淋巴细胞性白血病(CLL);慢性粒性白血病(CML);骨髓增生性失调/赘生物(MPDS);和脊髓发育不良综合征。某些形式的淋巴瘤包括,作为非限制性实例,霍奇金淋巴瘤、惰性和侵袭性的非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤(小细胞和大细胞)。某些形式的骨髓瘤包括,作为非限制性实例,多发性骨髓瘤(MM)、巨细胞性骨髓瘤、重链骨髓瘤以及轻链或Bence-Jones骨髓瘤。实体肿瘤包括,例如,乳腺肿瘤、卵巢肿瘤、肺肿瘤、胰腺肿瘤、前列腺肿瘤、黑素瘤、结肠直肠肿瘤、肺肿瘤、头颈肿瘤、膀胱肿瘤、食道肿瘤、肝脏肿瘤和肾脏肿瘤。

[0255] 与癌症和其他赘生性失调相关的症状包括,例如,炎症、发烧、全身不适、发烧、疼痛、经常局限于发炎区域、食欲不振、重量减轻、水肿、头痛、疲劳、皮疹、贫血、肌肉无力、肌肉疲劳、腹部症状,例如,腹痛、腹泻或便秘。

[0256] 在具体的方面,本文提供的是在癌症(例如,MM、NHL、AML、乳腺癌、膀胱癌、非小细胞肺癌/恶性肿瘤、肝细胞癌(HCC)、肉瘤和头颈癌症)的治疗、延迟发展、阻碍、预防复发或减轻症状方面有用的抗CD47抗体。例如,本文描述的CD47抗体在治疗血液恶性肿瘤和/或肿瘤,例如血液恶性肿瘤和/或肿瘤方面是有用的。例如,本文描述的CD47抗体在治疗CD47+肿瘤方面是有用的。作为非限制性实例,本文描述的CD47抗体在治疗非霍奇金淋巴瘤(NHL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性粒性白血病(CML)、多发性骨髓瘤(MM)、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、膀胱癌、黑素瘤、结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、胶质瘤、成胶质细胞瘤等方面是有用的。实体肿瘤包括,例如,乳腺肿瘤、卵巢肿瘤、肺肿瘤(例如,NSCLC)、胰腺肿瘤、前列腺肿瘤、黑素瘤、结肠直肠肿瘤、肺肿瘤、头颈肿瘤、膀胱肿瘤、食道肿瘤、肝脏肿瘤(例如,肝细胞癌)、肉瘤和肾脏肿瘤。

[0257] 在具体的实施方式中,本文提供的是治疗对象的癌症(例如,血液失调/癌症或实体癌症)的方法,包括向有需要的对象施用(例如,同时地或连续地施用)(i)特异性结合CD47例如人CD47的本文描述的抗CD47抗体或其抗原结合片段,和(ii)其他抗癌试剂。在某些实施方式中,所述抗癌试剂是化学治疗试剂(例如,微管分解阻断剂、抗代谢物、拓扑异构酶抑制物和DNA交联剂或破坏剂)在某些实施方式中,所述抗癌试剂是酪氨酸激酶抑制物(例如,**GLEEVEC®**(甲磺酸伊马替尼)或**SUTENT®**(SU11248或舒尼替尼))。酪氨酸激酶抑制物的其他非限制性实例包括706和AMN107(尼罗替尼)。RAD001、PKC412、吉非替尼(gefitinib,IRESSA™)、埃罗替尼(erlotinib,**TARCEVA®**)、索拉非尼(sorafenib,**NEXAVAR®**)、帕唑帕尼(pazopanib,VOTRIENT™)、西替尼(axitinib)、博舒替尼(bosutinib)、西地尼布(cediranib,**RECENTIN®**)、**SPRYCEL®**(达沙替尼,dasatinib)、拉帕替尼(lapatinib,**TYKERB®**)、来他替尼(lestaurtinib)、neratinib、尼洛替尼(nilotinib,**TASIGNA®**)、semaxanib、toceranib(PALLADIA™)、凡德他尼(vandetanib,ZACTIMA™)和瓦他拉尼(vatalanib)。

[0258] 在具体的方面,本文提供的是治疗对象的癌症(例如,血液失调/癌症或实体癌症)的方法,包括向有需要的对象施用(例如,同时地或连续地施用)(i)特异性结合CD47例如人CD47的本文描述的抗CD47抗体或其抗原结合片段,和(ii)放射治疗。

[0259] 在特定的方面,本文提供的是促进(例如,诱导或提高)吞噬作用,例如巨噬细胞介导的肿瘤细胞吞噬杀伤的方法,包括使有效量的特异性结合人CD47的本文描述的抗CD47抗体接触肿瘤细胞。本文还提供的是在有需要的对象(例如,具有肿瘤细胞,如表达CD47的肿瘤细胞的对象)中促进(例如,诱导或提高)吞噬作用,例如巨噬细胞介导的肿瘤细胞吞噬杀伤的方法,包括向所述对象施用有效量的特异性结合人CD47的本文描述的抗CD47抗体。

[0260] 在特定的方面,本文提供的是降低肿瘤体积的方法,包括使有效量的特异性结合人CD47的本文描述的抗CD47抗体与所述肿瘤接触。本文还提供的是在有需要的对象(例如,具有肿瘤,如表达CD47的肿瘤细胞的对象)中降低肿瘤体积的方法,包括向所述对象施用有效量的特异性结合人CD47的本文描述的抗CD47抗体。

[0261] 在特定的方面,本文提供的是抑制癌细胞生长或增殖的方法,包括使有效量的特异性结合人CD47的本文描述的抗CD47抗体与癌细胞接触。本文还提供的是在有需要的对象(例如,具有癌细胞,如表达CD47的癌细胞的对象)中抑制癌细胞生长或增殖的方法,包括向所述对象施用有效量的特异性结合人CD47的本文描述的抗CD47抗体。

[0262] 5.4.1 诊断用途

[0263] 在一个方面,特异性结合人CD47的ECD的、本文描述的抗CD47抗体及其抗原结合片段可以用于诊断目的,以检测、诊断或监视本文描述的状况(例如,涉及CD47和/或异常CD47信号转导和/或异常CD47表达的状况),例如,癌症(例如,结肠直肠癌、胃癌、肺癌或黑色素瘤)。在具体的实施方式中,用于诊断目的的本文描述的抗CD47抗体或其抗原结合片段是标记的。用于诊断目的以检测、诊断或监视本文描述的状况的本文提供的方法可以是试管内方法、原位方法或体外方法。用于诊断目的以检测、诊断或监视本文描述的状况的本文提供的方法可以是体内方法。

[0264] 在某些实施方式中,本文提供的是用于检测本文描述的状况例如癌症的方法,包括:(a)使用本文描述的一种或更多种抗体或其抗原结合片段分析对象的样品中CD47的表达;和(b)与对照水平,例如,正常组织样品(例如,来自不患有本文描述的状况的患者,或来自所述状况发作之前的同一患者)中的水平比较所述CD47表达水平,从而与CD47表达对照水平相比在所述分析的CD47表达水平中的提高或降低是本文描述的状况的指示。

[0265] 在某些实施方式中,本文提供的是检测表达CD47(例如,过量表达CD47)的癌症的方法,包括:(a)使用本文描述的一种或更多种抗体或其抗原结合片段分析对象的样品中CD47的表达;和(b)与对照水平,例如,正常样品(例如,来自不患有癌症的患者、患有不表达CD47的癌症的患者,或来自癌症发作之前的同一患者)中的水平比较所述CD47表达的水平。在具体的方面,与CD47表达对照水平相比所述分析的CD47表达水平的提高或降低是表达CD47的癌症的指示。

[0266] 在具体的实施方式中,本文提供的是诊断患者的表达CD47的癌症的方法,其中所述方法包括步骤:

[0267] (a)用本文描述的一种或更多种抗体或其抗原结合片段接触来自所述患者的生物样品;

[0268] (b)检测所述抗体或抗原结合片段与CD47的结合来测定所述来自患者的生物样品中的CD47蛋白质水平;和

[0269] (c)比较所述CD蛋白质水平和标准CD47蛋白质水平。

[0270] 在具体的实施方式中,本文提供的是在治疗患者的表达CD47的癌症期间监视CD47蛋白质水平的方法,其中所述方法包括步骤:

[0271] (a) 用本文描述的一种或更多种抗体或其抗原结合片段接触来自所述患者的生物样品;

[0272] (b) 检测所述抗体或抗原结合片段与CD47的结合来测定所述来自患者的生物样品中的CD47蛋白质水平;和

[0273] (c) 比较所述CD蛋白质水平和标准CD47蛋白质水平。

[0274] 来自对象的任何样品(例如,体液或组织样品)可以用于本文提供的诊断方法。可以用于本文提供的诊断方法的样品的非限制性实例包括,血清样品、血浆样品、组织样品、尿液样品、肿瘤样品和大便样品。

[0275] 使用本文描述的或本领域技术人员已知的标准免疫组织化学方法,本文描述的抗体可以用于分析生物样品中的CD47水平(例如,参见Jalkanen et al.,1985, J.Cell.Biol.101:976-985;以及Jalkanen et al.,1987,J.Cell.Biol.105:3087-3096)。对于检测蛋白质基因表达有用的其他基于抗体的方法包括免疫分析,例如,酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射免疫分析(RIA)。适合的抗体分析标记物是本领域已知的,包括酶标记物,例如,葡萄糖氧化酶;放射性同位素,例如,碘(^{125}I , ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{112}In)和锝($^{99\text{m}}\text{Tc}$);发光标记物,例如,鲁米诺;以及荧光标记物,例如荧光素和罗丹明,以及生物素。

[0276] 在一个实施方式中,本文描述的状况(例如,涉及CD47和/或异常CD47信号转导和/或异常CD47表达)例如癌症的监视,通过在初始诊断之后一段时间重复所述诊断方法来进行。

[0277] 对象中标记的分子的存在可以使用本领域已知的用于体内扫描的方法来检测。熟练的技术人员将能够确定用于检测特定标记物的适当方法。可用于本发明的诊断方法的方法和设备包括但不限于计算机断层摄影(CT)、全身扫描如位置发射断层摄影(PET)、磁共振成像(MRI)和超声检查。

[0278] 6. 实施例

[0279] 通过举例的方式,而不是限制的方式提供本章节(即,章节6)的实施例。

[0280] 6.1 实施例1:无细胞(CF)抗体生产

[0281] 当在无细胞(CF)系统中表达时已经观察到抗CD47抗体AB6.12的重链和轻链的无效组装。改进这一过程的一种方法包括向重链反应中预先添加成倍的轻链。在另一种方法中,重链框架序列修饰令人惊讶地引起CF系统中更高效的组装和抗CD47抗体重链和轻链的共表达。以下更详细地描述了具有重链框架序列修饰的这些抗CD47抗体的特征。

[0282] 小规模生产

[0283] 具有DsbC过量表达($2 \times \text{DsbC}$)的无细胞提取物解冻到室温,与 $50\mu\text{M}$ 碘乙酰胺孵育30分钟。在 30°C 运行无细胞反应达到10小时,含有30% (v/v) 碘乙酰胺处理的提取物,具有 8mM 谷氨酸镁、 10mM 谷氨酸铵、 130mM 谷氨酸钾、 35mM 丙酮酸钠、 1.2mM AMP、 0.86mM 的GMP、UMP和CMP每一种,除了酪氨酸之外所有19种氨基酸 2mM ,酪氨酸以 0.5mM 添加, 4mM 草酸钠、 1mM 腐胺、 1.5mM 亚精胺、 15mM 磷酸钾、 100nM T7RNAP和 2mM 氧化型(GSSG)谷胱甘肽。反应中重链质粒和轻链质粒的浓度分别是 $7.5\mu\text{g/ml}$ 和 $2.5\mu\text{g/ml}$ 。为了用 ^{14}C 标记合成的蛋白质,3.33% (v/

v) 1-[U-14C]-亮氨酸 (300mCi/mmole; GE Life Sciences, Piscataway, NJ) 也添加到反应中。在这个实验中,表达了与同一个轻链(LC) SEQ ID NO:13匹配的以下重链(HC)。

样品 #	IgG	HC说明	SEQ ID	抗体名称
			NO:	
1	IgG1	亲本	2	IgG1-parental
2	IgG1	5个突变	7	IgG1-5m
3	IgG1	13个突变	5	IgG1-13m
[0284] 4	IgG1	Z 13个突变 Z异型或	6	IgG1-13mZ
	allotype	13+2个突变		
5	IgG4P	亲本	3	IgG4P-parental
6	IgG4P	5个突变	9	IgG4P-5m
7	IgG4P	13个突变	8	IgG4P-13m
8	IgG4PE	亲本	4	IgG4PE-parental
9	IgG4PE	5个突变	11	IgG4PE-5m
10	IgG4PE	13个突变	10	IgG4PE-13m

[0285] 编码上述重链序列的示范性的核苷酸序列分别在SEQ ID NO:23、26、27、24、28、29、25、32和31中提供。

[0286] 对于非还原SDS-PAGE, 4μL样品、8μL去离子水(DI H₂O)和4μL的4×LDS缓冲液(Invitrogen, Carlsbad, CA)混合, 之后加载到凝胶上。为了还原凝胶, 混合4μL样品、1μL的1M DTT、7μL DI H₂O和4μL的4×LDS缓冲液(Invitrogen, Carlsbad, CA), 在热印迹中加热到70℃5分钟。根据厂家的推荐通过4~12%Bis-Tris SDS-PAGE凝胶(Invitrogen, Carlsbad, CA)分析样品。干燥凝胶, 通过放射自显影、使用Storm 840PhosphoImager, 在约16小时暴露之后进行分析。放射自显影在附图1A中显示。

[0287] 数据表明, 通过在它们的HC序列中进行5个突变和13个突变的工程化, IgG1、IgG4P和IgG4PE的CF表达滴度各自显著地改善。滴度在附图1B中报告。

[0288] IgG1变体的规模扩大生产

[0289] 进行IgG1变体抗体, 例如, IgG1-5m和IgG1-13mZ的规模扩大CF生产以及纯化。在下文的表格(例如, 表3-6)中更详细地描述了规模扩大条件。两种变体都以基本上相同的方法做出; 最显著的差异是反应温度。IgG1-5m在25℃下表达, IgG1-13mZ在30℃下运行。IgG1-13mZ在25℃和30℃下显示了相似的结果, 但是IgG1-5m在25℃下显示了比30℃更高的滴度。两种变体之间的反应时间方面的轻微差异仅仅是日程便利的结果, 对于所述过程可能没有任何显著影响。不同的提取物根据提取物可用性用于不同的变体, 而不是根据具体的提取物要求。具有DsbC过量表达的任何提取物预计对这些产品类似地起作用。

[0290] IgG1-13mZ (IgG1, VH1-18框架, 13+2个突变) 规模扩大表达:

[0291] S30无细胞提取物用50μM碘乙酰胺(IAM)在室温下处理30分钟。在这一处理之后, 提取物与表3中的试剂组合, 转移到生物反应器(Dci-BioLafitte Evo Bioreactor, 10L最

大工作体积)。如表4所列的配置生物反应器对照。在反应6小时之后,将另外5mM(终浓度)氧化型谷胱甘肽添加到反应中。在添加到反应器之前,氧化型谷胱甘肽制备为250mM贮备溶液,pH值调节到7和8之间。反应总共运行15小时,之后转移到下游过程。

[0292] 表3-无细胞反应成分

[0293]	试剂	CF 反应中的终浓度
	AMP	1.2 mM
	GMP	0.86 mM
	UMP	0.86 mM
	CMP	0.86 mM
	磷酸钠	15 mM

[0294]	19 种氨基酸 (除酪氨酸之外)	每种 2 mM
	草酸	4 mM
	腐胺	1 mM
	亚精胺	1.5 mM
	谷氨酸铵	10 mM
	谷氨酸钾	130 mM
	谷氨酸镁	8 mM
	酪氨酸	1 mM
	丙酮酸	35 mM
	氧化型谷胱甘肽	2 mM
	噬菌体 T7 RNA 聚合酶	0.02 g/L
	编码轻链蛋白的质粒	2.5 mg/L
	编码重链蛋白的质粒	7.5 mg/L
	Cipro	1 mg/L
	Pluronic-R 31R1	0.005% (v/v)
	来自 E.coli 菌株 SBDG028 的 IAM 处理的提取物	30% (v/v)

[0295] 表4-生物反应器对照设置 (5L反应体积)

[0296]

参数	设置点
温度	30°C
pH	无控制
空气流量（喷射器）	1.5 SLPM
DO	100%空气饱和
搅动	根据 DO 控制（主要 DO 级联）所需 200-400 RPM
氧气流量（喷射器）	根据 DO 控制（次级 DO 级联）所需 0-2 SLPM

[0297] 抗-CD47抗体IgG1-5m(IgG1,VH1-18框架,5个突变)规模扩大表达:

[0298] S30无细胞提取物用50 μ M碘乙酰胺(IAM)在室温下处理30分钟。在这一处理之后,提取物与表5中的试剂组合,转移到生物反应器(Sartorius Biostat Q Bioreactor,500mL最大工作体积)。如表6所列的配置生物反应器对照。在反应5.5小时之后,将另外5mM(终浓度)氧化型谷胱甘肽添加到反应中。在添加到反应器之前,氧化型谷胱甘肽制备为250mM储备溶液,pH值调节到7和8之间。反应总共运行15.7小时,之后转移到下游过程。

[0299] 表5-无细胞反应成分

[0300]

试剂	CF 反应中的终浓度
AMP	1.2 mM
GMP	0.86 mM
UMP	0.86 mM
CMP	0.86 mM
磷酸钠	15 mM
19 种氨基酸（除酪氨酸之外）	每种 2 mM
草酸	4 mM
腐胺	1 mM
亚精胺	1.5 mM
谷氨酸铵	10 mM
谷氨酸钾	130 mM
谷氨酸镁	8 mM
酪氨酸	1 mM
丙酮酸	35 mM
氧化型谷胱甘肽	2 mM
噬菌体 T7 RNA 聚合酶	0.02 g/L
编码轻链蛋白的质粒	2.5 mg/L
编码重链蛋白的质粒	7.5 mg/L
Cipro	1 mg/L
Pluronic-R 31R1	0.005% (v/v)
来自 E.coli 菌株 SBDG031 的 IAM 处理的提取物	30% (v/v)

[0301] 表6-生物反应器对照设置 (0.5L反应体积)

[0302]

参数	设置点
温度	25°C
pH	无控制
空气流量（喷射器）	0.25 SLPM
DO	80% 空气饱和
搅动	根据 DO 控制(主要 DO 级联)所需 200-400 RPM
氧气流量（喷射器）	根据 DO 控制（次级 DO 级联）所需 0-1 SLPM

[0303] 6.2实施例2:CD47结合的Biacore分析

[0304] 材料和方法:

[0305] 固定: 抗人Fc (AHC) 表面通过胺偶联单克隆小鼠抗人Fc IgG (包括在Biacore Human Antibody Capture Kit中, GE Life Sciences Cat#BR-1008-39) 到Biacore CM5传感器芯片表面来制备。用于固定过程的运行缓冲液是HBS-EP+ (10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% v/v P-20作为表面活性剂)。在所有四个流动池中进行以下的来制备表面胺偶联的抗人Fc IgG。CM5芯片表面通过以10μL/分钟注射400mM EDC与100mM NHS的1:1 (v/v) 混合物持续7分钟来活化。在这一处理之后, 抗人IgG在pH 5.0的10mM乙酸钠缓冲液中稀释到25μg/mL, 以10μL/分钟注射通过所有流动池持续7分钟。然后, 以10μL/分钟注射乙醇胺持续7分钟来封闭所有表面。这个过程产生在传感器芯片上~10,000-11,000RU的固定水平。

[0306] 动力学分析: 对于动力学分析, 将抗CD47抗体捕获在抗人Fc表面 (上文描述的表面处理) 上。对于具有人Fc的抗体的捕获, 抗体在HBS-EP+运行缓冲液中稀释到10μg/mL。以10μL/分钟的速度流过流动池2、3或4持续12秒来固定抗体变体。被分析物 (人CD47抗原) 稀释到运行缓冲剂中来制备连续稀释系列, 以2倍的稀释因数创建, 得到3.125、6.25、12.5、25和50nM的浓度。在抗CD47抗体捕获之后, CD47被分析物以50μL/分钟注射通过流动池持续180秒 (3分钟), 监视复合物解离持续900秒 (15分钟)。还运行缓冲剂空白, 用于在拟合之前参比被分析物结合数据。在每个被分析物结合周期之间, 抗人类Fc表面用30μL/分钟、3M MgCl₂ 的两次30秒注射来再生。

[0307] 动力学数据分析: 给定抗体-抗原相互作用的实验数据使用1:1结合模型、用全局R_{max}、全局k_a (缔合)、全局k_d (解离) 参数以及常数RI (体折射指数) 参数来拟合。使用以下公式确定部分活性 (% 配体活性), 来计算理论R_{max} (R_{max Theo}) 与实验R_{max} (R_{max exp}) 之间的关系。在该公式中, 化学当量代表抗体与抗原之间相互作用的情况, 例如, 当抗体是配体时, 每个抗体臂可以与抗原相互作用, 因而化学当量是2。

$$[0308] \quad R_{\max \text{ theo}} = \text{配体水平} \times \left(\frac{\text{MW被分析物}}{\text{MW配体}} \right) \times \text{化学当量}$$

$$[0309] \quad \% \text{配体活性} = \left(\frac{R_{\max \text{ exp}}}{R_{\max \text{ theo}}} \right) \times 100$$

[0310] 结果: Biacore分析显示, 具有5个突变的所有三种抗CD47抗体变体 (不考虑同种型) 具有类似的off率和亲和力, 部分活性 (% 配体活性) 约38%。并且, 具有5个突变的抗体变体的亲和力很好地符合亲本抗体。数据在下文表格 (表7) 中概述。

[0311] 表7: Biacore结果概述

# 突变	抗原	配体	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD (M)	R _{max} (RU)	Chi ² (RU ²)	% 配体活性
[0312] PGRTV 5 个突变	CD47	IgG1 - 5m	6.36E+05	2.60E-03	4.09E-09	123.4	1.83	37.4
	CD47	IgG4P - 5m	7.04E+05	2.54E-03	3.60E-09	106.5	1.86	38.2
	CD47	IgG4PE - 5m	5.94E+05	2.54E-03	4.27E-09	115.4	2.5	39.2
	对照抗体	CD47 抗-CD47 CF 对照	7.32E+05	2.31E-03	3.16E-09	99.68	1.36	39.4

[0313] 抗CD47抗体变体13m (具有13个突变) 和13mZ (具有13个突变和IgG1Z异型) 展现了

非常快速的off率,动力学参数分析没有产生基于1:1结合模型的可靠拟合。

[0314] 附图2A-2E描绘了抗体变体IgG1-5m(附图2A)、IgG1-13m(附图2B)、IgG1-13mZ(附图2C)、IgG4P-5m(附图2D)和IgG4PE-5m(附图2E)的单独的传感图,附图2F描绘了抗CD47对照抗体的传感图。

[0315] 6.3实施例3:直接CD47细胞结合分析

[0316] 为了获得结合曲线,样品变体在FACS缓冲液(PBS 2%FCS)中1:2滴定,每个样品从~66nM的高浓度开始。 0.1×10^6 CCRF-EM细胞平铺在96孔板中,在含有指定浓度的样品变体的50 μ l FACS缓冲液中在冰上孵育1小时。细胞然后用150 μ l FACS缓冲液洗涤,在含有1:100稀释的次级抗体(抗人IgG-PE, Jackson ImmunoResearch)的50 μ l FACS缓冲液中在冰上孵育1小时。细胞然后用FACS缓冲液洗涤,在2%PFA中固定,用于以LSR II, DB流式细胞计(BD Biosciences, San Jose, CA)获取。流式细胞计分析使用FloJo软件版本9.6.4进行。为了获得滴定曲线和Kd,相对于浓度(nM)标绘平均荧光强度(MFI)值。使用Prism 6,非线性回归曲线拟合分析, Hill斜率的单位点特异性结合,计算Kd值。

[0317] 结果:所有CHO和CF抗CD47单克隆抗体显示了在CCRF-CEM细胞的表面上相当的结合Kd, CCRF-CEM细胞是人T成淋巴细胞(ATCC® CCL-119™)。计算的Kd(nM)值在下文表格(表6)中呈现。

[0318] 表8:

抗-CD47Mabs	Kd (nM)
IgG1-parental-CHO	0.18
IgG1-parental-CF	0.14
IgG1-13m-CF	0.15
IgG1-13mZ-CF	0.21
IgG1-5m-CF	0.12
IgG4P-parental-CHO	0.18
IgG4P-5m-CF	0.14
IgG4PE-parental-CHO	0.21
IgG4PE-5m-CF	0.14
B6H12, mu anti-hu CD47	~16.0

[0320] 6.4实施例4:吞噬作用分析

[0321] 人类巨噬细胞的产生:人外周血单核细胞(PBMC)分离自淡黄层(在离心机中旋转沉淀之后全血的单位中红血细胞和血浆之间的白色层),购自Stanford Blood Center (Palo Alto, CA, USA)。淡黄层用2-倍PBS稀释,在50ml Leucosep试管(Greiner Bio One, Monroe, NC, USA)中在15ml NycoPrep 1.077 (Axis-Shield, Dundee, Scotland)上分层,以1,000 \times g离心20分钟。从分界面采集PBMC,用35ml PBS洗涤,在250 \times g离心5分钟。污染红血细胞用10ml ACK Lysing缓冲液(Lonza, Allendale, NJ, USA)裂解2分钟,细胞用40ml PBS稀释,穿过40 μ m细胞过滤器(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)。细胞在250 \times g离心5分钟,重悬浮在30ml含有10%FBS、2mM谷氨酰胺和青霉素-链霉素的RPMI培养基中。PBMC进行计数,在RPMI培养基中以 5×10^6 个细胞/mL培养过夜。次日,用CD14微珠(Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA)使用AutoMacs Pro分离CD14阳性单核细胞,在含有50ng/ml M-CSF

(Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) 的RPMI培养基中培养5-7天来获得分化的巨噬细胞。细胞在Recovery Cell Culture Freezing Medium (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 中冷冻。

[0322] 吞噬作用活性的测量: 冷冻的或新鲜的人类巨噬细胞在96-孔中培养过夜(补充有50ng/ml M-CSF的0.1ml RPMI培养基中20,000个细胞)。次日, 在一次洗涤之后, 培养基交换为没有M-CSF的50μl RPMI培养基。传代到低于 1.5×10^6 个细胞/ml密度的CD47阳性CCRF-CEM细胞(ATCC, Manassas, VA, USA)用10μM CellTrace Oregon Green 488 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 标记30分钟, 用RPMI培养基洗涤3次。标记的CCRF-CEM细胞(50μl中80,000个细胞)和50μl RPMI培养基中的抗CD47抗体添加到巨噬细胞中。抗CD47抗体以4ng/ml到10μg/ml的终浓度进行测试。平板简短地离心, 在37℃孵育3小时。巨噬细胞用PBS洗涤3次来除去CCRF-CEM细胞, 用50μl Accutase (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 在37℃脱离10分钟。采集巨噬细胞, 用FACS洗涤缓冲液(含有0.2%FBS的PBS)洗涤一次, 用抗-CD14-APC染色15分钟。洗涤细胞两次, 在4%多聚甲醛中固定10分钟。通过流式细胞计分析细胞来测定吞噬指数(Oregon Green标记的CD14阳性细胞的%)。使用GraphPad Prism分析数据来获得剂量反应曲线和用变斜率(4参数)非线性回归分析获得半数最大有效浓度(EC_{50})值。

[0323] 结果: 所有的IgG1变体(CF和CHO), 以及来自CHO的仅IgG4P和IgG4PE观察到吞噬作用活性。 EC_{50} 在下文表格中呈现(表9)。

[0324] 表9:

	抗-CD47 变体	EC_{50} (nM)
[0325]	IgG1	IgG1-parental-CHO
		IgG1-parental-CF
		IgG1-5m-CF (R&D)
		IgG1-5m-CF (PD)
	IgG4P	IgG4P—parental-CHO
		IgG4P-parental-CF
		IgG4P-5m-CF
	IgG4PE	IgG4PE-parental-CHO
		IgG4PE-parental-CF
		IgG4PE-5m-CF

[0326] 实施例5: 血细胞凝集分析

[0327] 公开的研究表面, 某些抗CD47抗体可能引起人红细胞(RBC)的血细胞凝集。因此, 进行血细胞凝集分析来表征抗CD47抗体促进RBC凝集的能力。

[0328] 人类RBC来源于Innovative Research (Cat#IPLA-WB3)。人类RBC(2mL)在10mL的 $1 \times dPBS$ (pH 7.4) 中洗涤, 在500g (1500rpm) 离心10分钟。吸出上清液, 洗涤人RBC两次, 重悬浮在8mL $1 \times dPBS$ 中用于20%RBC溶液。抗人RBC(兔)抗体(Rockland Immunochemicals Inc., Catalog#_109--4139, Lot 27233)的稀释物, 阳性对照, 是1:3连续稀释的1:64 ($10 \times$)。样品的起始浓度是1:3连续稀释 ($10 \times$) 的1000nM。每个抗体滴度移液(50μL)到U型底96

孔板的所有孔中。RBC溶液(50 μ L的20%RBC溶液)添加到平板的所有孔中,平板在37 $^{\circ}$ C孵育至少1.5小时到12小时(注意:在1.5和过夜之间的结果没有可视差异)。抗人RBC(兔)抗体和MCA911(小鼠抗人CD47(克隆BRIC 126,Abnova))充当阳性对照。从平板的顶部显现分析。阴性(非血细胞凝集)结果显现为完整的红色点,而阳性“血细胞凝集”结果显现为分散的红色垫。

[0329] 结果:仅阳性对照(兔抗人RBC抗体和MCA911(小鼠抗人CD47抗体))显示了血细胞凝集。CHO和无细胞(CF)表达的抗CD47单克隆抗体,包括IgG1-parental、IgG4P-parental、IgG4PE-parental、IgG1-13mZ-CF、IgG1-13m-CF、IgG1-5m-CF、IgG4P-5m-CF、IgG4PE-5m-CF没有显示血细胞凝集的证据。

[0330] 6.6实施例6:C1Q结合ELISA

[0331] 方法:96孔高蛋白结合ELISA平板(MaxSorp Nunc)在4 $^{\circ}$ C用0.05M碳酸氢钠缓冲液(pH 9)中稀释的样品抗CD47抗体变体包被过夜。样品以133.4nM(20 μ g/ml)的高浓度稀释,在11点稀释曲线中1:2滴定。平板在PBS、0.05%Tween 20中洗涤三次,在室温下用ELISA稀释剂(0.1M NaPO_4 、0.1M NaCl、0.1%明胶、0.05%Tween 20、0.05%ProClin300)封闭1小时。平板然后再洗涤三次,与ELISA稀释剂中稀释的2 μ g/mL人C1q(AbD Serotec 2221-5504, 1mg/mL储备)在室温下孵育两小时。平板然后洗涤三次,与ELISA稀释剂中1:200稀释的绵羊抗人C1q HRP(AbD Serotec 2221-5004P)在室温下孵育1小时来检测结合的C1q。平板然后洗涤三次,然后添加100 μ L的TBM溶液。通过添加100 μ L的1M磷酸来淬灭反应,在450nm下读取平板。使用Prism6作为非线性回归,用log(抑制物)对比反应“可变斜率”(四参数)来绘制数据。

[0332] 结果:IgG1-QN1-CHO显示了C1Q ELISA分析中的活性,而IgG4P、IgG4PE和scFv抗CD47单克隆抗体在C1Q ELISA分析中没有显示活性(“NA”)。EC₅₀在下文表格中呈现(表10)。

[0333] 表10:

[0334]

Sample	EC ₅₀ (nM)
IgG1-parental-CHO	3.6
IgG1-parental-CF	NA
IgG1-13mZ-CF	NA
IgG1-13m-CF	NA
IgG1-5m-CF	NA
IgG4P-parental-CHO	NA
IgG4P-parental-CF	NA
IgG4P-5m-CF	NA
Anti-CD47 B6H12 scFv	NA
IgG4PE-parental-CHO	NA
IgG4PE-parental-CF	NA
IgG4PE-5m-CF	NA

[0335] 6.7实施例7:补体-依赖性细胞毒性(CDC)分析

[0336] 方法:收获表达CD47的细胞系(Raji和/或CCRF),以每mL 0.3百万个细胞重悬浮在CDC缓冲液(RPMI 1640,L-谷氨酰胺(100 \times 储备)和1%BSA)中。细胞然后以10,000个细胞

每孔铺在96孔白色组织培养平板 (Falcon) 中,与CDC缓冲液中10 μ g/mL终浓度的样品抗CD47抗体变体在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。旋转滤器 (Costar SpinX微离心管) 用于除去残余的污染物。然后分别以2.5%和10%的终浓度添加兔 (7.5%) 或人 (30%) 血清,在37 $^{\circ}$ C孵育2小时。血清在CDC分析缓冲液中稀释。然后使用Cell Tox Glo试剂盒 (Promega G292) 并根据厂家的指导测量细胞死亡。在Envision发光平板读取器 (Luminescent 96孔全区域程序) 上读取平板,将百分比CDC活性处理为(处理的细胞-自发的细胞)/(总;裂解-自发裂解)*100。

[0337] 结果:在Bric 126抗体、抗CD20IgG1抗体和抗CD20IgG4抗体中观察到CDC活性,而在测试的任何其他抗体中没有观察到(“NA”)CDC活性。 EC_{50} 在下文表格中呈现(表11)。

[0338] 表11:

[0339]

名称	EC_{50} (nM)
CD20IgG1	0.21
BRIC 126 (抗CD47抗体)	0.0014
B6H12 (抗CD47抗体)	NA
IgG1-parental-CHO	NA
IgG4P-parental-CHO	NA
IgG4PE-parental-CHO	NA
IgG1-parental-CF	NA
IgG1-5m-CF	NA
IgG1-13m-CF	NA
IgG1-13mZ-CF	NA
IgG4P-parental-CF	NA
IgG4P-5m-CF	NA
对照IgG1同种型	NA
对照IgG4同种型	NA
IgG4PE-parental-CF	NA
IgG4PE-5m-CF	NA

[0340] 6.8实施例8:抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 分析

[0341] 方法:从淡黄层制备PBC。淡黄层用2-倍PBS稀释,在50ml Leucosep试管 (Greiner Bio One, Monroe, NC, USA) 中在15ml NycoPrep 1.077 (Axis-Shield, Dundee, Scotland) 上分层,以1,000 \times g离心20分钟。从分界面采集PBMC,用35ml PBS洗涤,在250 \times g离心5分钟。污染红血细胞用10ml ACK Lysing缓冲液 (Lonza, Allendale, NJ, USA) 裂解2分钟,细胞用40ml PBS稀释,穿过40 μ m细胞过滤器 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)。细胞在250 \times g离心5分钟,重悬浮在30ml含有10%FBS、2mM谷氨酰胺和青霉素-链霉素的RPMI培养基中。在96孔U底聚丙烯平板中,每个反应孔10,000个CCRF-CEM或SKBR3细胞与300,000个PBMC共同孵育。从来自Stanford血液中心的人类淡黄层制备PBC。三倍稀释度的样品变体一式两份添加到每个反应孔,从22.2nM的最高浓度开始,在37 $^{\circ}$ C孵育3小时。细胞然后在50 μ L Glo试剂中根据厂家的指导裂解。平板在Envision发光平板读取器 (Luminescent 96孔全区域程序) 上读取。百分比ADCC活性计算为(处理的细胞-自生的细胞)/(总裂解-自发的裂解)*100。

[0342] 结果:在曲妥珠单抗 (CHO) 和IgG1parental-CHO中观察到ADCC活性,两种都在CHO

细胞中表达;而在测试的任何其他抗CD47抗体(CHO细胞表达或CF表达)中没有观察到ADCC活性(“NA”)。EC₅₀在下文表格中呈现(表12)。

[0343] 表12:

抗体名称	IC ₅₀ (nM)
IgG1-parental-CHO	0.06
曲妥珠单抗(CHO)	0.001
曲妥珠单抗(CF)	NA
对照IgG1同种型	NA
IgG4P-parental-CHO	NA
IgG4PE-parental-CHO	NA
对照IgG4同种型	NA
IgG1-parental-CF	NA
IgG1-5m-CF	NA
IgG1-13m-CF	NA
IgG1-13mZ-CF	NA
IgG4P-parental-CF	NA
IgG4P-5m-CF	NA
IgG4PE-parental-CF	NA
IgG4PE-5m-CF	NA

[0345] 6.9实施例9:差示扫描量热术(DSC)(热稳定性)分析

[0346] 方法:差示扫描量热术(DSC)在GE VP Capillary DSC仪上进行。以60℃/小时的加热斜面从20-100℃进行分析。取消反馈模式,使用10s的过滤周期。预扫描恒温器设定为5分钟。所有样品在以下缓冲液中以1mg/mL的浓度进行测试:50mm L-组氨酸、150mM NaCl、2%海藻糖、pH 6.0。

[0347] 结果:通过DSC分析了三种不同的抗CD47IgG1抗体构建体:

[0348] 1) IgG1-13mZ

[0349] 2) IgG1-13m

[0350] 3) IgG1-5m

[0351] 特别地,鉴于三种抗体仅在位于Fab结构域中的残基不同,所以Fab结构域(TM2)的熔化转变是有意义的。如图3A所示,对于所有三种构建体的Fab转变观察到良好的协同解折叠,IgG1-5m表现出最高的TM2。

[0352] 以下表格(表13)概述了所有三种抗CD47IgG1构建体的三种不同的转变的转变温度。可以观察到,对于CH2(TM1)和CH3(TM3)转变,仅可以观察到微小的(<1.0℃)TM差异。然而,IgG1-5m的TM2显示了超过其他变体1.5℃的稳定性。

[0353] 表13

[0354]	变体	TM1 [°C]	TM2 [°C]	TM3 [°C]
	IgG1-13mZ	62.0	75.3	81.8
	IgG1-13m	62.5	75.3	82.5
	IgG1-5m	62.2	76.6	82.8

[0355] 特别地,当与CHO细胞培养物衍生的IgG4PE (CHO IgG4PE) 参考标准相比时,IgG1-5m展现了惊人地改善的热稳定性(附图3B)。可以观察到,CHO IgG4PE材料的所有热转化低于75°C,而IgG1-5m是显著稳定的,除了62.2°C的CH2结构域之外,在更高的温度下变性。

[0356] 为了查看IgG1情境下观察到的热稳定化是否也将转变到IgG4支架,通过DSC比较了以下三种抗CD47IgG4变体:

[0357] 1) IgG4PE-5m

[0358] 2) IgG4P-5m

[0359] 3) IgG4PE CHO

[0360] 在附图3C中呈现的热象图中可以看出,与IgG4PE CHO参考材料相比,通过引入5个突变,IgG4P和IgG4PE情境下的Fab区域熔化改善了9°C。

[0361] 合在一起,这些结果显示,Fab结构域的显著热稳定化可以通过引入选定突变来实现。由于在IgG1和IgG4支架之间Fab区域保持不变,热稳定性增强看起来从一个支架转移到另一个支架,表明这对其他IgG1同种型也是适用的。

[0362] 6.10实施例10:抗CD47抗体的药物动力学性质

[0363] 方法:抗CD47抗体IgG4-PE CHO、IgG1-CF和IgG1-5m-CF分别以3.0、3.0和2.5mg/kg的剂量水平通过推注静脉内注射施用给小鼠。在给药后直到28天(672小时)在选定时间采集血浆样品,通过免疫分析测定相应蛋白的浓度。然后用WinNonlin 'v' 5.3,Phoenix 64 (Certara,CA)使用非分区方法计算药物动力学参数。使用曲线的上升部分的线性梯形规则和下降部分的对数梯形法则来计算AUC。终末半衰期由血浆浓度对时间的对数的回归确定。通过使用至少三个终点时间点的数据的目视检查来确定用于回归的点数。从剂量/血浆浓度外推到零时计算初始分布体积。使用标准方法在WinNonlin中计算所有其他参数。

[0364] 结果:IgG4-PE CHO、IgG1-CF和IgG1-5m-CF的药物动力学相互类似。尽管分布体积也是低的,低的清除产生相对长的半衰期,对这类化合物是典型的。初始分布体积接近血液体积,而基于区域和处于稳态的分布体积是细胞外水的大约一半。

[0365]	结合物	C ₀ (μg/mL)	AUC _{last} (μg*h/mL)	AUC _∞ (μg*h/mL)	末 期 t _{1/2} (h)	Cl (mL/h/kg)	初始 V (mL/kg)	V _z (mL/kg)	V _{ss} (mL/kg)
	IgG4-PE CHO	76.13	10063	11391	218.8	0.26	39.40627873	83.2	80
	IgG1-CF	64.9	7009	7368	165	0.41	46.22496148	96.9	100.8
	IgG1(5 mut)-CF	48.8	7021	7789	193.1	0.32	51.2295082	89.4	92.4

[0366] 6.11实施例11:体内抗肿瘤活性

[0367] 使用人骨髓瘤细胞系RPMI8226的异种移植肿瘤模型体内测试无细胞系统生产的抗CD47抗体的抗肿瘤活性。

[0368] 方法:NOD/SCID小鼠皮下注射RPMI 8226细胞。随后,用载体对照、hIgG4、或CF抗CD47抗体,例如,抗CD47IgG1-5m治疗小鼠,以1mg/kg、0.3mg/kg或0.1mg/kg的剂量施用(qwx3)。监视肿瘤体积。

[0369] 结果:附图5描绘了肿瘤细胞接种之后肿瘤体积对比天数的图形。CF抗CD47IgG1-5m抗体在1mg/kg的剂量下实现了83%的肿瘤体积降低(TVR),在0.3mg/kg的剂量下实现50%的TVR。对于CF抗CD47IgG1-5m抗体的1mg/kg剂量,结束时无肿瘤小鼠的百分比是25%(2/8)。

[0370] 本文引用的所有参考文献(例如,公开物或专利或专利申请)为了所有目的通过将它们完全引用来合并在本文中,其程度与具体的和单独的指示为了所有目的通过将其完全引用来合并每个单独的参考文献(例如,公开物或专利或专利申请)相同。

[0371] 其他实施方式在以下的权利要求之中。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 细胞基因公司
[0003]	<120> 抗CD47抗体及其用途
[0004]	<130> 12827-563-228
[0005]	<140>
[0006]	<141>
[0007]	<160> 39
[0008]	<170> PatentIn version 3.5
[0009]	<210> 1
[0010]	<211> 118
[0011]	<212> PRT
[0012]	<213> 人工序列
[0013]	<220>
[0014]	<223> 抗CD47抗体AB6.12重链可变区
[0015]	<400> 1
[0016]	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
[0017]	1 5 10 15
[0018]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
[0019]	20 25 30
[0020]	Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
[0021]	35 40 45
[0022]	Gly Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
[0023]	50 55 60
[0024]	Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
[0025]	65 70 75 80
[0026]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
[0027]	85 90 95
[0028]	Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
[0029]	100 105 110
[0030]	Gly Thr Thr Val Thr Val
[0031]	115
[0032]	<210> 2
[0033]	<211> 451
[0034]	<212> PRT
[0035]	<213> 人工序列
[0036]	<220>
[0037]	<223> 抗CD47抗体IgG1重链
[0038]	<400> 2
[0039]	Met Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly
[0040]	1 5 10 15
[0041]	Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp

[0042]	20	25	30
[0043]	Tyr Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp		
[0044]	35	40	45
[0045]	Met Gly Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys		
[0046]	50	55	60
[0047]	Phe Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala		
[0048]	65	70	75
[0049]	Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr		
[0050]	85	90	95
[0051]	Cys Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly		
[0052]	100	105	110
[0053]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
[0054]	115	120	125
[0055]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
[0056]	130	135	140
[0057]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
[0058]	145	150	155
[0059]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
[0060]	165	170	175
[0061]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
[0062]	180	185	190
[0063]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
[0064]	195	200	205
[0065]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
[0066]	210	215	220
[0067]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
[0068]	225	230	235
[0069]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
[0070]	245	250	255
[0071]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
[0072]	260	265	270
[0073]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
[0074]	275	280	285
[0075]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
[0076]	290	295	300
[0077]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
[0078]	305	310	315
[0079]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
[0080]	325	330	335
[0081]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
[0082]	340	345	350
[0083]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		

[0084]	355	360	365
[0085]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[0086]	370	375	380
[0087]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
[0088]	385	390	395
[0089]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
[0090]	405	410	415
[0091]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
[0092]	420	425	430
[0093]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
[0094]	435	440	445
[0095]	Pro Gly Lys		
[0096]	450		
[0097]	<210> 3		
[0098]	<211> 448		
[0099]	<212> PRT		
[0100]	<213> 人工序列		
[0101]	<220>		
[0102]	<223> 抗CD47抗体IgG4P重链		
[0103]	<400> 3		
[0104]	Met Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly		
[0105]	1	5	10
[0106]	Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp		
[0107]	20	25	30
[0108]	Tyr Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp		
[0109]	35	40	45
[0110]	Met Gly Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys		
[0111]	50	55	60
[0112]	Phe Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala		
[0113]	65	70	75
[0114]	Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr		
[0115]	85	90	95
[0116]	Cys Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly		
[0117]	100	105	110
[0118]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
[0119]	115	120	125
[0120]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala		
[0121]	130	135	140
[0122]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
[0123]	145	150	155
[0124]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
[0125]	165	170	175

[0126]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[0127]	180 185 190
[0128]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
[0129]	195 200 205
[0130]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
[0131]	210 215 220
[0132]	Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
[0133]	225 230 235 240
[0134]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[0135]	245 250 255
[0136]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
[0137]	260 265 270
[0138]	Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[0139]	275 280 285
[0140]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[0141]	290 295 300
[0142]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[0143]	305 310 315 320
[0144]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
[0145]	325 330 335
[0146]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[0147]	340 345 350
[0148]	Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[0149]	355 360 365
[0150]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[0151]	370 375 380
[0152]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[0153]	385 390 395 400
[0154]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
[0155]	405 410 415
[0156]	Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[0157]	420 425 430
[0158]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0159]	435 440 445
[0160]	<210> 4
[0161]	<211> 448
[0162]	<212> PRT
[0163]	<213> 人工序列
[0164]	<220>
[0165]	<223> 抗CD47抗体IgG4PE重链 (包含S228P
[0166]	和L235E取代)
[0167]	<400> 4

[0168]	Met	Gln	Met	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Thr	Gly
[0169]	1				5					10					15	
[0170]	Ser	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp
[0171]					20					25					30	
[0172]	Tyr	Tyr	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu	Glu	Trp
[0173]					35					40					45	
[0174]	Met	Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Asp	Gln	Gly	Asp	Thr	Glu	Tyr	Ala	Gln	Lys
[0175]					50					55					60	
[0176]	Phe	Gln	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Arg	Ser	Met	Ser	Thr	Ala
[0177]	65									70					75	
[0178]	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr
[0179]										85					90	
[0180]	Cys	Asn	Ala	Ala	Tyr	Gly	Ser	Ser	Ser	Tyr	Pro	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly
[0181]										100					105	
[0182]	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
[0183]										115					120	
[0184]	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala
[0185]										130					135	
[0186]	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
[0187]	145									150					155	
[0188]	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
[0189]										165					170	
[0190]	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
[0191]										180					185	
[0192]	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His
[0193]										195					200	
[0194]	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly
[0195]										210					215	
[0196]	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser
[0197]	225									230					235	
[0198]	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
[0199]										245					250	
[0200]	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro
[0201]										260					265	
[0202]	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
[0203]										275					280	
[0204]	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
[0205]										290					295	
[0206]	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
[0207]	305									310					315	
[0208]	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr
[0209]										325					330	

[0210]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[0211]	340 345 350
[0212]	Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[0213]	355 360 365
[0214]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[0215]	370 375 380
[0216]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[0217]	385 390 395 400
[0218]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
[0219]	405 410 415
[0220]	Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[0221]	420 425 430
[0222]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0223]	435 440 445
[0224]	<210> 5
[0225]	<211> 451
[0226]	<212> PRT
[0227]	<213> 人工序列
[0228]	<220>
[0229]	<223> 抗CD47抗体IgG1-13m重链
[0230]	<400> 5
[0231]	Met Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
[0232]	1 5 10 15
[0233]	Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
[0234]	20 25 30
[0235]	Tyr Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
[0236]	35 40 45
[0237]	Met Gly Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys
[0238]	50 55 60
[0239]	Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala
[0240]	65 70 75 80
[0241]	Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[0242]	85 90 95
[0243]	Cys Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly
[0244]	100 105 110
[0245]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0246]	115 120 125
[0247]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
[0248]	130 135 140
[0249]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[0250]	145 150 155 160
[0251]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

[0252]	165								170					175					
[0253]	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val			
[0254]	180								185					190					
[0255]	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His			
[0256]	195								200					205					
[0257]	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys			
[0258]	210								215					220					
[0259]	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly			
[0260]	225								230					235				240	
[0261]	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met			
[0262]	245								250					255					
[0263]	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His			
[0264]	260								265					270					
[0265]	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val			
[0266]	275								280					285					
[0267]	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr			
[0268]	290								295					300					
[0269]	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly			
[0270]	305								310					315				320	
[0271]	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile			
[0272]	325								330					335					
[0273]	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val			
[0274]	340								345					350					
[0275]	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser			
[0276]	355								360					365					
[0277]	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu			
[0278]	370								375					380					
[0279]	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro			
[0280]	385								390					395				400	
[0281]	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val			
[0282]	405								410					415					
[0283]	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met			
[0284]	420								425					430					
[0285]	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser			
[0286]	435								440					445					
[0287]	Pro	Gly	Lys																
[0288]	450																		
[0289]	<210> 6																		
[0290]	<211> 451																		
[0291]	<212> PRT																		
[0292]	<213> 人工序列																		
[0293]	<220>																		

[0294]	<223> 抗CD47抗体IgG1-13mZ重链																			
[0295]	<400> 6																			
[0296]	Met	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly				
[0297]	1				5					10					15					
[0298]	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp				
[0299]				20					25					30						
[0300]	Tyr	Tyr	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp				
[0301]				35					40					45						
[0302]	Met	Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Asp	Gln	Gly	Asp	Thr	Glu	Tyr	Ala	Gln	Lys				
[0303]		50						55					60							
[0304]	Leu	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala				
[0305]	65					70					75					80				
[0306]	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr				
[0307]					85					90					95					
[0308]	Cys	Asn	Ala	Ala	Tyr	Gly	Ser	Ser	Ser	Tyr	Pro	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly				
[0309]				100					105					110						
[0310]	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser				
[0311]				115					120					125						
[0312]	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala				
[0313]		130						135					140							
[0314]	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val				
[0315]	145					150					155					160				
[0316]	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala				
[0317]					165					170					175					
[0318]	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val				
[0319]				180					185					190						
[0320]	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His				
[0321]				195					200					205						
[0322]	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys				
[0323]		210						215					220							
[0324]	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly				
[0325]	225					230					235					240				
[0326]	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met				
[0327]					245					250					255					
[0328]	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His				
[0329]				260					265					270						
[0330]	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val				
[0331]				275					280					285						
[0332]	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr				
[0333]		290						295					300							
[0334]	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly				
[0335]	305					310					315					320				

[0336]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[0337]	325 330 335
[0338]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[0339]	340 345 350
[0340]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
[0341]	355 360 365
[0342]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[0343]	370 375 380
[0344]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[0345]	385 390 395 400
[0346]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
[0347]	405 410 415
[0348]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[0349]	420 425 430
[0350]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[0351]	435 440 445
[0352]	Pro Gly Lys
[0353]	450
[0354]	<210> 7
[0355]	<211> 451
[0356]	<212> PRT
[0357]	<213> 人工序列
[0358]	<220>
[0359]	<223> 抗CD47抗体IgG1-5m重链
[0360]	<400> 7
[0361]	Met Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
[0362]	1 5 10 15
[0363]	Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
[0364]	20 25 30
[0365]	Tyr Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp
[0366]	35 40 45
[0367]	Met Gly Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys
[0368]	50 55 60
[0369]	Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala
[0370]	65 70 75 80
[0371]	Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[0372]	85 90 95
[0373]	Cys Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly
[0374]	100 105 110
[0375]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0376]	115 120 125
[0377]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

[0378]	130	135	140
[0379]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
[0380]	145	150	155 160
[0381]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
[0382]		165	170 175
[0383]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
[0384]		180	185 190
[0385]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
[0386]		195	200 205
[0387]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
[0388]	210	215	220
[0389]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
[0390]	225	230	235 240
[0391]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
[0392]		245	250 255
[0393]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
[0394]		260	265 270
[0395]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
[0396]		275	280 285
[0397]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
[0398]	290	295	300
[0399]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
[0400]	305	310	315 320
[0401]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
[0402]		325	330 335
[0403]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
[0404]		340	345 350
[0405]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
[0406]		355	360 365
[0407]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[0408]	370	375	380
[0409]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
[0410]	385	390	395 400
[0411]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
[0412]		405	410 415
[0413]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
[0414]		420	425 430
[0415]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
[0416]		435	440 445
[0417]	Pro Gly Lys		
[0418]	450		
[0419]	<210> 8		

[0420]	<211> 448
[0421]	<212> PRT
[0422]	<213> 人工序列
[0423]	<220>
[0424]	<223> 抗CD47抗体IgG4P-13m重链
[0425]	<400> 8
[0426]	Met Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
[0427]	1 5 10 15
[0428]	Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
[0429]	20 25 30
[0430]	Tyr Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
[0431]	35 40 45
[0432]	Met Gly Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys
[0433]	50 55 60
[0434]	Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala
[0435]	65 70 75 80
[0436]	Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[0437]	85 90 95
[0438]	Cys Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly
[0439]	100 105 110
[0440]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0441]	115 120 125
[0442]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
[0443]	130 135 140
[0444]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[0445]	145 150 155 160
[0446]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[0447]	165 170 175
[0448]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[0449]	180 185 190
[0450]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
[0451]	195 200 205
[0452]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
[0453]	210 215 220
[0454]	Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
[0455]	225 230 235 240
[0456]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[0457]	245 250 255
[0458]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
[0459]	260 265 270
[0460]	Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[0461]	275 280 285

[0462]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
[0463]	290	295	300
[0464]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
[0465]	305	310	315 320
[0466]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
[0467]	325	330	335
[0468]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
[0469]	340	345	350
[0470]	Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
[0471]	355	360	365
[0472]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
[0473]	370	375	380
[0474]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
[0475]	385	390	395 400
[0476]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
[0477]	405	410	415
[0478]	Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
[0479]	420	425	430
[0480]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[0481]	435	440	445
[0482]	<210> 9		
[0483]	<211> 448		
[0484]	<212> PRT		
[0485]	<213> 人工序列		
[0486]	<220>		
[0487]	<223> 抗CD47抗体IgG4P-5m重链		
[0488]	<400> 9		
[0489]	Met Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly		
[0490]	1	5	10 15
[0491]	Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp		
[0492]	20	25	30
[0493]	Tyr Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp		
[0494]	35	40	45
[0495]	Met Gly Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys		
[0496]	50	55	60
[0497]	Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala		
[0498]	65	70	75 80
[0499]	Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
[0500]	85	90	95
[0501]	Cys Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly		
[0502]	100	105	110
[0503]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		

[0504]	115	120	125
[0505]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala		
[0506]	130	135	140
[0507]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
[0508]	145	150	155
[0509]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
[0510]	165	170	175
[0511]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
[0512]	180	185	190
[0513]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His		
[0514]	195	200	205
[0515]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly		
[0516]	210	215	220
[0517]	Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser		
[0518]	225	230	235
[0519]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
[0520]	245	250	255
[0521]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro		
[0522]	260	265	270
[0523]	Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
[0524]	275	280	285
[0525]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
[0526]	290	295	300
[0527]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
[0528]	305	310	315
[0529]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
[0530]	325	330	335
[0531]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
[0532]	340	345	350
[0533]	Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
[0534]	355	360	365
[0535]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
[0536]	370	375	380
[0537]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
[0538]	385	390	395
[0539]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
[0540]	405	410	415
[0541]	Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
[0542]	420	425	430
[0543]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[0544]	435	440	445
[0545]	<210> 10		

[0546]	<211> 448
[0547]	<212> PRT
[0548]	<213> 人工序列
[0549]	<220>
[0550]	<223> 抗CD47抗体IgG4PE-13m重链
[0551]	<400> 10
[0552]	Met Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
[0553]	1 5 10 15
[0554]	Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
[0555]	20 25 30
[0556]	Tyr Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
[0557]	35 40 45
[0558]	Met Gly Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys
[0559]	50 55 60
[0560]	Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala
[0561]	65 70 75 80
[0562]	Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[0563]	85 90 95
[0564]	Cys Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly
[0565]	100 105 110
[0566]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0567]	115 120 125
[0568]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
[0569]	130 135 140
[0570]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[0571]	145 150 155 160
[0572]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[0573]	165 170 175
[0574]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[0575]	180 185 190
[0576]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
[0577]	195 200 205
[0578]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
[0579]	210 215 220
[0580]	Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
[0581]	225 230 235 240
[0582]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[0583]	245 250 255
[0584]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
[0585]	260 265 270
[0586]	Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[0587]	275 280 285

[0588]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[0589]	290 295 300
[0590]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[0591]	305 310 315 320
[0592]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
[0593]	325 330 335
[0594]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[0595]	340 345 350
[0596]	Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[0597]	355 360 365
[0598]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[0599]	370 375 380
[0600]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[0601]	385 390 395 400
[0602]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
[0603]	405 410 415
[0604]	Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[0605]	420 425 430
[0606]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0607]	435 440 445
[0608]	<210> 11
[0609]	<211> 448
[0610]	<212> PRT
[0611]	<213> 人工序列
[0612]	<220>
[0613]	<223> 抗CD47抗体IgG4PE-5m重链
[0614]	<400> 11
[0615]	Met Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
[0616]	1 5 10 15
[0617]	Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
[0618]	20 25 30
[0619]	Tyr Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp
[0620]	35 40 45
[0621]	Met Gly Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys
[0622]	50 55 60
[0623]	Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala
[0624]	65 70 75 80
[0625]	Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[0626]	85 90 95
[0627]	Cys Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly
[0628]	100 105 110
[0629]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

[0630]	115	120	125
[0631]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala		
[0632]	130	135	140
[0633]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
[0634]	145	150	155
[0635]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
[0636]	165	170	175
[0637]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
[0638]	180	185	190
[0639]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His		
[0640]	195	200	205
[0641]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly		
[0642]	210	215	220
[0643]	Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser		
[0644]	225	230	235
[0645]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
[0646]	245	250	255
[0647]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro		
[0648]	260	265	270
[0649]	Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
[0650]	275	280	285
[0651]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
[0652]	290	295	300
[0653]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
[0654]	305	310	315
[0655]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
[0656]	325	330	335
[0657]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
[0658]	340	345	350
[0659]	Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
[0660]	355	360	365
[0661]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
[0662]	370	375	380
[0663]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
[0664]	385	390	395
[0665]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
[0666]	405	410	415
[0667]	Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
[0668]	420	425	430
[0669]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[0670]	435	440	445
[0671]	<210> 12		

73

[0714]	115	120	125
[0715]	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu		
[0716]	130	135	140
[0717]	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser		
[0718]	145	150	155
[0719]	Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
[0720]	165	170	175
[0721]	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
[0722]	180	185	190
[0723]	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys		
[0724]	195	200	205
[0725]	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0726]	210	215	
[0727]	<210> 14		
[0728]	<211> 10		
[0729]	<212> PRT		
[0730]	<213> 人工序列		
[0731]	<220>		
[0732]	<223> VH CDR1		
[0733]	<400> 14		
[0734]	Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Leu His		
[0735]	1	5	10
[0736]	<210> 15		
[0737]	<211> 10		
[0738]	<212> PRT		
[0739]	<213> 人工序列		
[0740]	<220>		
[0741]	<223> VH CDR2		
[0742]	<400> 15		
[0743]	Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu		
[0744]	1	5	10
[0745]	<210> 16		
[0746]	<211> 13		
[0747]	<212> PRT		
[0748]	<213> 人工序列		
[0749]	<220>		
[0750]	<223> VH CDR3		
[0751]	<400> 16		
[0752]	Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr		
[0753]	1	5	10
[0754]	<210> 17		
[0755]	<211> 11		

[0756] <212> PRT
[0757] <213> 人工序列
[0758] <220>
[0759] <223> VL CDR1
[0760] <400> 17
[0761] Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr Leu Ser
[0762] 1 5 10
[0763] <210> 18
[0764] <211> 7
[0765] <212> PRT
[0766] <213> 人工序列
[0767] <220>
[0768] <223> VL CDR2
[0769] <400> 18
[0770] Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser
[0771] 1 5
[0772] <210> 19
[0773] <211> 9
[0774] <212> PRT
[0775] <213> 人工序列
[0776] <220>
[0777] <223> VL CDR3
[0778] <400> 19
[0779] Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr
[0780] 1 5
[0781] <210> 20
[0782] <211> 119
[0783] <212> PRT
[0784] <213> 人工序列
[0785] <220>
[0786] <223> 抗CD47抗体重链可变区共有序列
[0787] <220>
[0788] <221> misc_feature
[0789] <222> (1) .. (1)
[0790] <223> Xaa = 任何氨基酸或不存在
[0791] <220>
[0792] <221> misc_feature
[0793] <222> (3) .. (3)
[0794] <223> Xaa = 任何氨基酸
[0795] <220>
[0796] <221> misc_feature
[0797] <222> (15) .. (15)

[0798] <223> Xaa = 任何氨基酸
[0799] <220>
[0800] <221> misc_feature
[0801] <222> (17) .. (17)
[0802] <223> Xaa = 任何氨基酸
[0803] <220>
[0804] <221> misc_feature
[0805] <222> (45) .. (45)
[0806] <223> Xaa = 任何氨基酸
[0807] <220>
[0808] <221> misc_feature
[0809] <222> (65) .. (65)
[0810] <223> Xaa = 任何氨基酸
[0811] <220>
[0812] <221> misc_feature
[0813] <222> (67) .. (67)
[0814] <223> Xaa = 任何氨基酸
[0815] <220>
[0816] <221> misc_feature
[0817] <222> (71) .. (71)
[0818] <223> Xaa = 任何氨基酸
[0819] <220>
[0820] <221> misc_feature
[0821] <222> (73) .. (73)
[0822] <223> Xaa = 任何氨基酸
[0823] <220>
[0824] <221> misc_feature
[0825] <222> (75) .. (75)
[0826] <223> Xaa = Arg或Thr
[0827] <220>
[0828] <221> misc_feature
[0829] <222> (77) .. (77)
[0830] <223> Xaa = 任何氨基酸
[0831] <220>
[0832] <221> misc_feature
[0833] <222> (85) .. (85)
[0834] <223> Xaa = 任何氨基酸
[0835] <220>
[0836] <221> misc_feature
[0837] <222> (90) .. (90)
[0838] <223> Xaa = 任何氨基酸
[0839] <220>

[0840] <221> misc_feature
 [0841] <222> (94) .. (94)
 [0842] <223> Xaa = 任何氨基酸
 [0843] <400> 20
 [0844] Xaa Gln Xaa Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Xaa Gly
 [0845] 1 5 10 15
 [0846] Xaa Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
 [0847] 20 25 30
 [0848] Tyr Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Xaa Leu Glu Trp
 [0849] 35 40 45
 [0850] Met Gly Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys
 [0851] 50 55 60
 [0852] Xaa Gln Xaa Arg Val Thr Xaa Thr Xaa Asp Xaa Ser Xaa Ser Thr Ala
 [0853] 65 70 75 80
 [0854] Tyr Met Glu Leu Xaa Ser Leu Arg Ser Xaa Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr
 [0855] 85 90 95
 [0856] Cys Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly
 [0857] 100 105 110
 [0858] Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 [0859] 115
 [0860] <210> 21
 [0861] <211> 119
 [0862] <212> PRT
 [0863] <213> 人工序列
 [0864] <220>
 [0865] <223> 抗CD47抗体VH - 13m
 [0866] <400> 21
 [0867] Met Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 [0868] 1 5 10 15
 [0869] Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
 [0870] 20 25 30
 [0871] Tyr Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 [0872] 35 40 45
 [0873] Met Gly Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys
 [0874] 50 55 60
 [0875] Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala
 [0876] 65 70 75 80
 [0877] Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 [0878] 85 90 95
 [0879] Cys Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly
 [0880] 100 105 110
 [0881] Gln Gly Thr Thr Val Thr Val

[0882]	115
[0883]	<210> 22
[0884]	<211> 119
[0885]	<212> PRT
[0886]	<213> 人工序列
[0887]	<220>
[0888]	<223> 抗CD47抗体VH - 5m
[0889]	<400> 22
[0890]	Met Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
[0891]	1 5 10 15
[0892]	Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
[0893]	20 25 30
[0894]	Tyr Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp
[0895]	35 40 45
[0896]	Met Gly Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys
[0897]	50 55 60
[0898]	Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala
[0899]	65 70 75 80
[0900]	Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[0901]	85 90 95
[0902]	Cys Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly
[0903]	100 105 110
[0904]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
[0905]	115
[0906]	<210> 23
[0907]	<211> 1356
[0908]	<212> DNA
[0909]	<213> 人工序列
[0910]	<220>
[0911]	<223> 抗CD47抗体IgG1重链
[0912]	<400> 23
[0913]	atgcaaatgc aattggtaca aagcgggtgcg gaagtaaaga aaacgggttc gtcggttaaag 60
[0914]	gttagctgta aagcttcttg cttcaatatc aaggattact atctgcactg ggtgcgtcag 120
[0915]	gcgccaggtc aggccttga atggatgggc tggattgacc cggatcaagg tgacaccgaa 180
[0916]	tatgccccaa agtttcagga ccgtgtgacc atcaccctg accgtagcat gtccaccgca 240
[0917]	tatatggagc tgagcagcct gcgcagcgaa gatactgcga tgtattactg caatgcggcc 300
[0918]	tatggtagca gtcctatcc gatggattac tggggccagg gtaccacggt gacggttagc 360
[0919]	agcgcaagca ccaaggcccc gacggttttc cctctggcgc cgagcagcaa aagcactagc 420
[0920]	ggcggtacgg cagccctggg ttgtctggtt aaagattact ttccggaacc ggttaccgtg 480
[0921]	tcctggaact ctggcgcgct gaccagcggg gttcacacgt ttccggcggg tctgcagagc 540
[0922]	agcggctctgt attctttgag ctccgtcgtc accgtcccgt ctagctcgct gggcacgcag 600
[0923]	acgtacatct gcaatgttaa ccataagccg agcaatacca aagttgacaa gaaagtcgaa 660

[0924]	cctaagagct gtgataagac gcataacctgt ccgccgtgcc cggcaccgga actgttgggc	720
[0925]	gggtccgagcg tgttcctgtt tccgccgaag ccgaaagata ccctgatgat tagccgcacc	780
[0926]	cctgaggtga cgtgcgtggt tgtggacgtt agccatgagg atccagaggt caaattcaat	840
[0927]	tggtatgtcg atggtgttga ggttcacaat gccaaacca aaccgcgtga agaacagtac	900
[0928]	aatagcacct accgcgtggt gagcgtgctg acggctcctgc accaggactg gctgaacggc	960
[0929]	aaagagtaca agtgaaggt cagcaacaag gcgctgccag caccgattga aaagaccatt	1020
[0930]	tctaaagcga aaggtcagcc gcgtgagccg caagtctata ccctgccgcc gtgcgcgat	1080
[0931]	gagctgacta aaaaccaggt tagcctgacg tgcctggtga aaggtttcta cccgagcgac	1140
[0932]	atcgcggtgg agtgggagag caacggtcaa ccggagaata actacaaaac caccaccg	1200
[0933]	gtcttggact ccgatggcag cttctttctg tactctaaac tgaccgttga caaaagccgt	1260
[0934]	tggcaacagg gcaacgtctt tagctgcagc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac	1320
[0935]	acccaaaaat ccctgagcct gagccccgggt aagtaa	1356
[0936]	<210>	24
[0937]	<211>	1347
[0938]	<212>	DNA
[0939]	<213>	人工序列
[0940]	<220>	
[0941]	<223>	抗CD47抗体IgG4P重链
[0942]	<400>	24
[0943]	atgcagatgc aattggttca aagcgggtcg gaagttaaga aaacgggttc gtccgtgaag	60
[0944]	gtttcctgca aagccagcgg ttttaacatc aaggattact atctgcattg ggtacgtcag	120
[0945]	gcaccgggtc aagcgttga gtgatgggt tggatcgacc cggaccaggg tgatacggag	180
[0946]	tatgcgcaga aattccagga ccgcgttacc atcaccgcg accgcagcat gagcacggcg	240
[0947]	tacatggagc tgagcagcct gcgttccgaa gataccgcga tgtactactg taatgctgcg	300
[0948]	tatggtagca gcagctatcc aatggactat tggggccagg gcacgacggt caccgttagc	360
[0949]	agcgctagca ccaagggccc gtctgtgttt ccgttggcac cgtgcagccg tagcactagc	420
[0950]	gaatccactg cagcgtggtg ttgcctggtt aaggactatt tcccggagcc ggttaccgtg	480
[0951]	tcctggaact ctggcgcctt gaccagcgggt gttcacacgt ttccagccgt cctgcagagc	540
[0952]	agcggctctg acagcctgag ctccgttggtg accgttccga gcagctctct gggtaccaa	600
[0953]	acctatacct gtaatgtcga tcacaaaccg tctaacacga aggtcgataa acgtgttgaa	660
[0954]	agcaagtacg gtccgccttg tccgccgtgc ccggcaccgg agtttctggg cggctccgtc	720
[0955]	gtattcctgt tcccgccgaa accgaaagat accttgatga ttagccgtac gccagaggtc	780
[0956]	acgtgcgtcg tgggtggacgt tagccaagag gatccggaag tccaattcaa ctggtacgtg	840
[0957]	gacggtgtcg aggtgcacaa tgccaaaacc aagccgcgtg aagaacagtt taacagcact	900
[0958]	taccgcgtcg ttagcgtcct gaccgtgctg caccaagatt ggctgaatgg taaagagtac	960
[0959]	aagtgaagg ttagcaataa gggctctgcc agcagcatcg agaaaacat tagcaaggcg	1020
[0960]	aaaggtcaac cgcgcgagcc acaggtctac acgtgccgc cgagccaaga agaaatgacc	1080
[0961]	aaaaatcagg ttagcctgac ttgtctggtg aaaggttctt acccgagcga tattgcagtt	1140
[0962]	gaatgggaga gcaacggcca gcctgagaac aactataaga cgacccccgc agtgcgtggc	1200
[0963]	agcgatggca gcttcttttt gtattctcgt ctgaccgtgg acaagtcccg ttggcaagag	1260
[0964]	ggcaatgtgt tcagctgttc tgtcatgcac gaagcgtgc ataaccatta caccagaag	1320
[0965]	tcctgagcc tgcgtggtg caaataa	1347

[0966]	<210> 25
[0967]	<211> 1347
[0968]	<212> DNA
[0969]	<213> 人工序列
[0970]	<220>
[0971]	<223> 抗CD47抗体IgG4PE重链
[0972]	<400> 25
[0973]	atgcagatgc aattggttca aagcgggtgc gaagttaaga aaacgggttc gtcggtgaag 60
[0974]	gtttcctgca aagccagcgg ttttaacatc aaggattact atctgcattg ggtacgtcag 120
[0975]	gcaccgggtc aagcgttga gtggatgggt tggatcgacc cggaccaggg tgatacggag 180
[0976]	tatgcgcaga aattccagga ccgcgttacc atcaccgcgc accgcagcat gagcacggcg 240
[0977]	tacatggagc tgagcagcct gcgttccgaa gataccgcga tgtactactg taatgctgcg 300
[0978]	tatggtagca gcagctatcc aatggactat tggggccagg gcacgacggt caccgttagc 360
[0979]	agcgctagca ccaaggcccc gtctgtgttt ccgttggcac cgtgcagccg tagcactagc 420
[0980]	gaatccactg cagcgttggg ttgcctggtt aaggactatt tcccggagcc ggttaccgtg 480
[0981]	tcctggaact ctggcgccct gaccagcggg gtccacacgt ttccagccgt cctgcagagc 540
[0982]	agcggctctg acagcctgag ctcggtggtg accgttccga gcagctctct gggtaccaa 600
[0983]	acctatacct gtaatgtcga tcacaaaccg tctaacacga aggtcgataa acgtgttgaa 660
[0984]	agcaagtacg gtccgccttg tccgccgtgc ccggcaccgg agtttgaggg cgggtccgtc 720
[0985]	gtattcctgt tcccgccgaa accgaaagat accttgatga ttagccgtac gccagaggtc 780
[0986]	acgtgcgtcg tgggtggacgt tagccaagag gatccggaag tccaattcaa ctggtacgtg 840
[0987]	gacgggtgctg aggtgcacaa tgccaaaacc aagccgcgtg aagaacagtt taacagcact 900
[0988]	taccgcgtcg ttagcgtcct gaccgtgctg caccaagatt ggctgaatgg taaagagtac 960
[0989]	aagtgaagg ttagcaataa gggctctccg agcagcatcg agaaaaccat tagcaaggcg 1020
[0990]	aaaggtcaac cgcgcgagcc acaggtctac acgtgccgc cgagccaaga agaaatgacc 1080
[0991]	aaaaatcagg ttagcctgac ttgtctggtg aaaggttctt acccgagcga tattgcagtt 1140
[0992]	gaatgggaga gcaacggcca gcctgagaac aactataaga cgaccccgcc agtgctggac 1200
[0993]	agcgatggca gcttcttttt gtattctcgt ctgaccgtgg acaagtcccg ttggcaagag 1260
[0994]	ggcaatgtgt tcagctgttc tgtcatgcac gaagcgtgc ataaccatta caccagaag 1320
[0995]	tcctgagcc tgcgctggg caaataa 1347
[0996]	<210> 26
[0997]	<211> 1356
[0998]	<212> DNA
[0999]	<213> 人工序列
[1000]	<220>
[1001]	<223> 抗CD47抗体IgG1-13m重链
[1002]	<400> 26
[1003]	atgcaagtcc aattggtcca gagcgggtgc gaagtcaaga aaccgggtgc aagcgtcaaa 60
[1004]	gtttcgtgca aggcgagcgg tttcaatata aaagactatt atctgcactg ggttcgtcag 120
[1005]	gctccgggcc aaggcctgga gtggatgggt tggatcgatc cggaccaggg cgacacggag 180
[1006]	tacgtcaga agctgcaggg tcgtgttacc atgaccaccg acaccagcac gagcaccgcg 240
[1007]	tacatggaac tgcgctctct gcgttcggat gataccgcgg tgtactattg caacgccgcg 300

[1008]	tacggtagca gcagctatcc gatggattat tggggtaag gcactacggt gactgtcagc	360
[1009]	agcgccagca ccaagggccc gtccgtgttt ccgctggcgc caagctccaa gagcaccagc	420
[1010]	ggtggcacgg ccgcactggg ttgtctggta aaagattact ttctgagcc ggtgaccgtg	480
[1011]	agctggaatt caggtgcact gacgtccggc gttcacacgt tcccggcagt tctgcagagc	540
[1012]	tccggtttgt acagcctgtc tagcgtcgtg acgggtgccg gcagcagcct gggtagccaa	600
[1013]	acctacattt gcaacgttaa ccataagccg agcaatacca aagttgacaa gaaagtcgaa	660
[1014]	cctaagagct gtgataagac gcatacctgt ccgccgtgcc cggcaccgga actgttgggc	720
[1015]	ggtccgagcg tgttcctgtt tccgccgaag ccgaaagata ccctgatgat tagccgcacc	780
[1016]	cctgagggtga cgtgcgtggt tgtggacgtt agccatgagg atccagaggt caaattcaat	840
[1017]	tggtatgtcg atgggtgtga gggtcacaaat gccaaagaca aaccgcgtga agaacagtac	900
[1018]	aatagcacct accgcgtggt gagcgtcgtg acggctcctgc accaggactg gctgaacggc	960
[1019]	aaagagtaca agtctaaggt cagcaacaag gcgctgccag caccgattga aaagaccatt	1020
[1020]	tctaaagcga aaggtcagcc gcgtgagccg caagtctata ccctgccgcc gtcgcgcgat	1080
[1021]	gagctgacta aaaaccaggt tagcctgacg tgcctggtga aaggtttcta cccgagcgac	1140
[1022]	atcgcggtgg agtgggagag caacggtcaa ccggagaata actacaaaac caccaccg	1200
[1023]	gtcttggact ccgatggcag cttctttctg tactctaaac tgaccgttga caaaagccgt	1260
[1024]	tggcaacagg gcaacgtctt tagctgcagc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac	1320
[1025]	acccaaaaat ccctgagcct gagcccgggt aagtaa	1356
[1026]	<210>	27
[1027]	<211>	1356
[1028]	<212>	DNA
[1029]	<213>	人工序列
[1030]	<220>	
[1031]	<223>	抗CD47抗体IgG1-13mZ重链
[1032]	<400>	27
[1033]	atgcaagtcc aattggtcca gagcgggtgc gaagtcaaga aaccgggtgc aagcgtcaaa	60
[1034]	gtttcgtgca aggcgagcgg tttcaatatc aaagactatt atctgcaactg gggtcgtcag	120
[1035]	gctccgggcc aaggcctgga gtggatgggt tggatcgatc cggaccaggg cgacacggag	180
[1036]	tacgtcaga agctgcaggg tcgtgttacc atgaccaccg acaccagcac gagcaccgcg	240
[1037]	tacatggaac tgcgtctctc gcgttcggat gataccgcgg tgtactattg caacgccgcg	300
[1038]	tacggtagca gcagctatcc gatggattat tggggtaag gcactacggt gactgtcagc	360
[1039]	agcgccagca ccaagggccc gtccgtgttt ccgctggcgc caagctccaa gagcaccagc	420
[1040]	ggtggcacgg ccgcactggg ttgtctggta aaagattact ttctgagcc ggtgaccgtg	480
[1041]	agctggaatt caggtgcact gacgtccggc gttcacacgt tcccggcagt tctgcagagc	540
[1042]	tccggtttgt acagcctgtc tagcgtcgtg acgggtgccg gcagcagcct gggtagccaa	600
[1043]	acctacattt gcaacgttaa ccataagccg agcaatacca aggttgacaa aaaagttgaa	660
[1044]	ccgaaatctt gtgataaaac tcatacctgt ccgccgtgcc cggcgcctga gctgttgggt	720
[1045]	ggtccgtcgg tctttctgtt cccgccgaag ccgaaagaca ccctgatgat tagccgcacc	780
[1046]	ccggaagtta cgtgcgtcgt cgtggatgac agccacgagg acccgaggt taagttcaat	840
[1047]	tggtatgtcg atggcgtgga gggtcacaaat gcgaaaacca agccgcgtga ggaacaatac	900
[1048]	aatagcacgt atcgcgtagt gagcgtcgtg accgtgctgc accaagattg gctgaatggt	960
[1049]	aaagaataca agtgcaaagt gagcaacaag gcattgccgg caccgatcga aaagacgatc	1020

[1050]	agcaaagcga aaggccaacc gcgtgaaccg caggtctata ccctgccgcc gagccgtgaa	1080
[1051]	gaaatgacga aaaaccaagt tagcctgacc tgtctggtga agggctttta cccgagcgac	1140
[1052]	atcgccgtcg agtgggagtc taacggccag ccgaaaaca attacaaaac cagcccgcca	1200
[1053]	gtcctggaca gcgacggtag cttctttctg tatagcaagc tgaccgtcga taaaagccgt	1260
[1054]	tggcagcagg gtaatgtgtt cagctgcagc gttatgcatg aggcgctgca caatcactat	1320
[1055]	accagaaaat ccttgtccct gtccccgggt aagtaa	1356
[1056]	<210> 28	
[1057]	<211> 1356	
[1058]	<212> DNA	
[1059]	<213> 人工序列	
[1060]	<220>	
[1061]	<223> 抗CD47抗体IgG1-5m重链	
[1062]	<400> 28	
[1063]	atgcaaatgc aattggtaca aagcgggtcg gaagtaaaga aaccgggttc gtcggtaaag	60
[1064]	gttagctgta aagcttcttg cttcaatata aaggattact atctgcaact ggtgcgtcag	120
[1065]	gcgccaggtc aggccttga atggatgggc tggattgacc cggatcaagg tgacaccgaa	180
[1066]	tatgccccaa agtttcaggg tcgtgtgacc atcaccctg accgtagcac ctccaccgca	240
[1067]	tatatggagc tgcgtagcct gcgcagcgaa gatactgcgg tgtattactg caatgcggcc	300
[1068]	tatggtagca gtcctatcc gatggattac tggggccagg gtaccacggt gacggttagc	360
[1069]	agcgcaagca ccaaggcccc gagcgttttc cctctggcgc cgagcagcaa aagcactagc	420
[1070]	ggcggtacgg cagccctggg ttgtctggtt aaagattact ttccggaacc ggttaccgtg	480
[1071]	tcctggaact ctggcgcgt gaccagcggg gttcacacgt ttccggcggg tctgcagagc	540
[1072]	agcggctctgt attctttgag ctccgtcgtc accgtcccgt ctagctcgtg gggcacgcag	600
[1073]	acgtacatct gcaatgttaa ccataagccg agcaatacca aagttgacaa gaaagtcgaa	660
[1074]	cctaagagct gtgataagac gcatacctgt ccgccgtgcc cggcaccgga actgttgggc	720
[1075]	ggtccgagcg tgttcctgtt tccgccgaag ccgaaagata ccctgatgat tagccgcacc	780
[1076]	cctgaggtga cgtgcgtggt tgtggacgtt agccatgagg atccagaggt caaattcaat	840
[1077]	tggtatgtcg atggtgttga ggttcacaaat gccaaagacca aaccgcgtga agaacagtac	900
[1078]	aatagcacct accgcgtggt gagcgtgctg acggctcctgc accaggactg gctgaacggc	960
[1079]	aaagagtaca agtgtaaagg cagcaacaag gcgctgccag caccgattga aaagaccatt	1020
[1080]	tctaaagcga aaggtcagcc gcgtgagccg caagtctata ccctgccgcc gtcgcgcgat	1080
[1081]	gagctgacta aaaaccaggt tagcctgacg tgcctggtga aaggtttcta cccgagcgac	1140
[1082]	atcgcggtgg agtgggagag caacggtaaa ccggagaata actacaaaac caccaccg	1200
[1083]	gtcttggact ccgatggcag cttctttctg tactctaaac tgaccgttga caaaagccgt	1260
[1084]	tggcaacagg gcaacgtctt tagctgcagc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac	1320
[1085]	acccaaaaat ccctgagcct gagccccggg aagtaa	1356
[1086]	<210> 29	
[1087]	<211> 1347	
[1088]	<212> DNA	
[1089]	<213> 人工序列	
[1090]	<220>	
[1091]	<223> 抗CD47抗体IgG4P-13m重链	

[1092]	<400> 29	
[1093]	atgcaagtcc aattggtcca gagcgggtgc gaagtcaaga aaccgggtgc aagcgtcaaa	60
[1094]	gtttcgtgca aggcgagcgg tttcaatata aaagactatt atctgcactg ggttcgtcag	120
[1095]	gctccgggcc aaggcctgga gtggatgggt tggatcgatc cggaccaggg cgacacggag	180
[1096]	tacgctcaga agctgcaggg tcgtgttacc atgaccaccg acaccagcac gagcaccgcg	240
[1097]	tacatggaac tgcgctctct gcgttcggat gataccgcgg tgtactattg caacgccgcg	300
[1098]	tacggtagca gcagctatcc gatggattat tggggccaag gactacgggt gactgtcagc	360
[1099]	agcgccagca ccaagggccc gtctgtgttt ccgttggcac cgtgcagccg tagcactagc	420
[1100]	gaatccactg cagcgtggg ttgcctggtt aaggactatt tcccggagcc ggttaccgtg	480
[1101]	tcctggaact ctggcgcctt gaccagcgggt gttcacacgt ttccagccgt cctgcagagc	540
[1102]	agcggctctgt acagcctgag ctcggtggtg accgttccga gcagctctct gggtacccaa	600
[1103]	acctatacct gtaatgtcga tcacaaaccg tctaacacga aggtcgataa acgtgttgaa	660
[1104]	agcaagtacg gtccgccttg tccgccgtgc ccggcaccgg agtttctggg cggtcctgcc	720
[1105]	gtattcctgt tcccgccgaa accgaaagat accttgatga ttagccgtac gccagaggtc	780
[1106]	acgtgcgtcg tggtagcgt tagccaagag gatccggaag tccaattcaa ctggtacgtg	840
[1107]	gacgggtgctg aggtgcacaa tgccaaaacc aagccgcgtg aagaacagtt taacagcact	900
[1108]	taccgcgtcg ttagcgtcct gaccgtgctg caccaagatt ggctgaatgg taaagagtac	960
[1109]	aagtgaagg ttagcaataa gggctctgcc agcagcatcg agaaaaccat tagcaaggcg	1020
[1110]	aaaggtcaac cgcgcgagcc acaggtctac acgctgccgc cgagccaaga agaaatgacc	1080
[1111]	aaaaatcagg ttagcctgac ttgtctggtg aaaggttctt acccgagcga tattgcagtt	1140
[1112]	gaatgggaga gcaacggcca gcctgagaac aactataaga cgaccccgcc agtgcctggac	1200
[1113]	agcgatggca gcttcttttt gtattctcgt ctgaccgtgg acaagtcccg ttggcaagag	1260
[1114]	ggcaatgtgt tcagctgttc tgtcatgcac gaagcgtgc ataaccatta caccagaag	1320
[1115]	tcctgagcc tgcgtggtg caataa	1347
[1116]	<210> 30	
[1117]	<211> 1347	
[1118]	<212> DNA	
[1119]	<213> 人工序列	
[1120]	<220>	
[1121]	<223> 抗CD47抗体 IgG4P-5m重链	
[1122]	<400> 30	
[1123]	atgcaaatgc aattgttaca aagcgggtgc gaagtaaaga aaccgggttc gtcggtaaag	60
[1124]	gttagctgta aagcttcttg cttcaatata aaggattact atctgcactg ggtgcgtcag	120
[1125]	gcgccaggtc aggccttga atggatgggc tggattgacc cggatcaagg tgacaccgaa	180
[1126]	tatgccccaa agtttcaggg tcgtgtgacc atcaccctg accgtagcac ctccaccgca	240
[1127]	tatatggagc tgcgtagcct gcgcagcgaa gatactgcgg tgtattactg caatgcggcc	300
[1128]	tatggtagca gtcctatcc gatggattac tggggccagg gtaccacgggt gacggttagc	360
[1129]	agcgcaagca ccaagggccc gtctgtgttt ccgttggcac cgtgcagccg tagcactagc	420
[1130]	gaatccactg cagcgtggg ttgcctggtt aaggactatt tcccggagcc ggttaccgtg	480
[1131]	tcctggaact ctggcgcctt gaccagcgggt gttcacacgt ttccagccgt cctgcagagc	540
[1132]	agcggctctgt acagcctgag ctcggtggtg accgttccga gcagctctct gggtacccaa	600
[1133]	acctatacct gtaatgtcga tcacaaaccg tctaacacga aggtcgataa acgtgttgaa	660

[1134]	agcaagtacg gtccgccttg tccgccgtgc ccggcaccgg agtttctggg cgggtccgtcc	720
[1135]	gtattcctgt tcccgccgaa accgaaagat accttgatga ttagccgtac gccagaggtc	780
[1136]	acgtgcgtcg tggtagacgt tagccaagag gatccggaag tccaattcaa ctggtacgtg	840
[1137]	gacggtgtcg aggtgcacaa tgccaaaacc aagccgcgtg aagaacagtt taacagcact	900
[1138]	taccgcgtcg ttagcgtcct gaccgtgctg caccaagatt ggctgaatgg taaagagtac	960
[1139]	aagtgaagg ttagcaataa gggctctccg agcagcatcg agaaaacat tagcaaggcg	1020
[1140]	aaaggtcaac cgcgcgagcc acaggtctac acgctgccgc cgagccaaga agaaatgacc	1080
[1141]	aaaaatcagg ttagcctgac ttgtctggtg aaaggttctt acccgagcga tattgcagtt	1140
[1142]	gaatgggaga gcaacggcca gcctgagaac aactataaga cgaccccgcc agtgcctggac	1200
[1143]	agcgatggca gcttcttttt gtattctcgt ctgaccgtgg acaagtcccg ttggcaagag	1260
[1144]	ggcaatgtgt tcagctgttc tgtcatgcac gaagcgtgc ataaccatta caccagaag	1320
[1145]	tcctgagcc tgctcgtggg caaataa	1347
[1146]	<210>	31
[1147]	<211>	1347
[1148]	<212>	DNA
[1149]	<213>	人工序列
[1150]	<220>	
[1151]	<223>	抗CD47抗体IgG4PE-13m重链
[1152]	<400>	31
[1153]	atgcaagtcc aattggtcca gagcgggtcg gaagtcaaga aaccgggtgc aagcgtcaaa	60
[1154]	gtttctgtga aggcgagcgg tttcaatata aaagactatt atctgcactg ggttcgtcag	120
[1155]	gctccgggcc aaggcctgga gtggatgggt tggatcgatc cggaccaggc cgacacggag	180
[1156]	tacgtcaga agctgcaggc tcgtgttacc atgaccaccg acaccagcac gagcaccgcg	240
[1157]	tacatggaac tgcgtctctt gcgttcggat gataccgcgg tgtactattg caacgccgcg	300
[1158]	tacggtagca gcagctatcc gatggattat tggggtcaag gcaactacgt gactgtcagc	360
[1159]	agcggcagca ccaaggcccc gtctgtgttt ccgttggcac cgtgcagccg tagcactagc	420
[1160]	gaatccactg cagcgtggg ttgcctggtt aaggactatt tcccggagcc ggttaccgtg	480
[1161]	tcctggaact ctggcgcctt gaccagcggg gtacacacgt ttccagccgt cctgcagagc	540
[1162]	agcggctctg acagcctgag ctgggtggtg accgttccga gcagctctct gggtagcaaa	600
[1163]	acctatacct gtaatgtcga tcacaaaccg tctaacacga aggtcgataa acgtgttgaa	660
[1164]	agcaagtacg gtccgccttg tccgccgtgc ccggcaccgg agtttgaggg cgggtccgtcc	720
[1165]	gtattcctgt tcccgccgaa accgaaagat accttgatga ttagccgtac gccagaggtc	780
[1166]	acgtgcgtcg tggtagacgt tagccaagag gatccggaag tccaattcaa ctggtacgtg	840
[1167]	gacggtgtcg aggtgcacaa tgccaaaacc aagccgcgtg aagaacagtt taacagcact	900
[1168]	taccgcgtcg ttagcgtcct gaccgtgctg caccaagatt ggctgaatgg taaagagtac	960
[1169]	aagtgaagg ttagcaataa gggctctccg agcagcatcg agaaaacat tagcaaggcg	1020
[1170]	aaaggtcaac cgcgcgagcc acaggtctac acgctgccgc cgagccaaga agaaatgacc	1080
[1171]	aaaaatcagg ttagcctgac ttgtctggtg aaaggttctt acccgagcga tattgcagtt	1140
[1172]	gaatgggaga gcaacggcca gcctgagaac aactataaga cgaccccgcc agtgcctggac	1200
[1173]	agcgatggca gcttcttttt gtattctcgt ctgaccgtgg acaagtcccg ttggcaagag	1260
[1174]	ggcaatgtgt tcagctgttc tgtcatgcac gaagcgtgc ataaccatta caccagaag	1320
[1175]	tcctgagcc tgctcgtggg caaataa	1347

[1176]	<210> 32
[1177]	<211> 1347
[1178]	<212> DNA
[1179]	<213> 人工序列
[1180]	<220>
[1181]	<223> 抗CD47抗体IgG4PE-5m重链
[1182]	<400> 32
[1183]	atgcaaatgc aattggtaca aagcgggtgc gaagtaaaga aaccgggttc gtcggtaaag 60
[1184]	gtagctgta aagcttctgg cttcaatatc aaggattact atctgcactg ggtgcgtcag 120
[1185]	gcgccaggtc aggccttggga atggatgggc tggattgacc cggatcaagg tgacaccgaa 180
[1186]	tatgccccaa agtttcaggg tcgtgtgacc atcaccctg accgtagcac ctccaccgca 240
[1187]	tatatggagc tgcgtagcct gcgcagcgaa gatactgcgg tgtattactg caatgcggcc 300
[1188]	tatggtagca gtcctatcc gatggattac tggggccagg gtaccacggt gacggttagc 360
[1189]	agcgcaagca ccaaggcccc gtctgtgttt ccgttggcac cgtgcagccg tagcactagc 420
[1190]	gaatccactg cagcgtggg ttgcctggtt aaggactatt tcccgagcc ggttaccgtg 480
[1191]	tcctggaact ctggcgccct gaccagcggg gtccacacgt ttccagccgt cctgcagagc 540
[1192]	agcggctctg acagcctgag ctcggtggtg accgttccga gcagctctct gggtaccaa 600
[1193]	acctatacct gtaatgtcga tcacaaaccg tctaacacga aggtcgataa acgtgttgaa 660
[1194]	agcaagtacg gtccgccttg tccgccgtgc ccggcaccgg agtttgaggg cgggtccgtc 720
[1195]	gtattcctgt tcccgccgaa accgaaagat accttgatga ttagccgtac gccagaggtc 780
[1196]	acgtgcgtcg tgggtggacgt tagccaagag gatccggaag tccaattcaa ctggtacgtg 840
[1197]	gacgggtgctg aggtgcacaa tgccaaaacc aagccgcgtg aagaacagtt taacagcact 900
[1198]	taccgcgtcg ttagcgtcct gaccgtgctg caccaagatt ggctgaatgg taaagagtac 960
[1199]	aagtgcaagg ttagcaataa gggctctccg agcagcatcg agaaaaccat tagcaaggcg 1020
[1200]	aaaggtcaac cgcgcgagcc acaggtctac acgtgccgc cgagccaaga agaaatgacc 1080
[1201]	aaaaatcagg ttagcctgac ttgtctggtg aaaggttctt acccgagcga tattgcagtt 1140
[1202]	gaatgggaga gcaacggcca gcctgagaac aactataaga cgaccccgcc agtgcgtggc 1200
[1203]	agcgatggca gcttcttttt gtattctcgt ctgaccgtgg acaagtccc ttggcaagag 1260
[1204]	ggcaatgtgt tcagctgttc tgtcatgcac gaagcgtgc ataaccatta caccagaag 1320
[1205]	tcctgagcc tgcgtctggg caaataa 1347
[1206]	<210> 33
[1207]	<211> 648
[1208]	<212> DNA
[1209]	<213> 人工序列
[1210]	<220>
[1211]	<223> 抗CD47抗体(Igk)轻链
[1212]	<400> 33
[1213]	atgaacatcc aatgactca atccccatcc gcaatgtccg catccgtagg tgaccgcgtg 60
[1214]	accatcacgt gcaaggcgag ccaggatatt catcgttatc tgagctggtt tcaacagaaa 120
[1215]	ccgggcaagg ttctaagca tctgatttac cgcggaacc gcttggttag cgggtgtccg 180
[1216]	agccgtttta gcggcagcgg ttctggcacc gagttcacc tgacgatctc cagcctgcaa 240
[1217]	ccggaagatt ttgcgacgta ctactgcctg cagtatgacg agttcccgtg tacctttggt 300

[1218] ggtggtacga aggtggaaat caaacgtact gtggccgctc cgagcgtttt catttttccg 360
 [1219] ccgtcggatg agcaattgaa atctggtacc gcgagcgtcg tttgtctgct gaacaatttc 420
 [1220] taccgcgtg aggctaaggt gcaatggaag gtcgataacg cgctgcagag cggtaatagc 480
 [1221] caggaaagcg tcaccgaaca ggatagcaaa gacagcacct actctttgag cagcaccctg 540
 [1222] accctgagca aggccgacta tgagaaacac aaagtttacg catgtgaggt cacgcaccag 600
 [1223] ggccctgagca gcccggtgac caaaagcttc aatcgtggcg aatgctaa 648
 [1224] <210> 34
 [1225] <211> 330
 [1226] <212> PRT
 [1227] <213> 智人
 [1228] <220>
 [1229] <223> 人IgG1同种型
 [1230] <400> 34
 [1231] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 [1232] 1 5 10 15
 [1233] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 [1234] 20 25 30
 [1235] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 [1236] 35 40 45
 [1237] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 [1238] 50 55 60
 [1239] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 [1240] 65 70 75 80
 [1241] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 [1242] 85 90 95
 [1243] Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 [1244] 100 105 110
 [1245] Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 [1246] 115 120 125
 [1247] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 [1248] 130 135 140
 [1249] Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 [1250] 145 150 155 160
 [1251] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 [1252] 165 170 175
 [1253] Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 [1254] 180 185 190
 [1255] His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 [1256] 195 200 205
 [1257] Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 [1258] 210 215 220
 [1259] Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

[1260]	225	230	235	240
[1261]	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
[1262]		245	250	255
[1263]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
[1264]		260	265	270
[1265]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
[1266]		275	280	285
[1267]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
[1268]		290	295	300
[1269]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
[1270]	305	310	315	320
[1271]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
[1272]		325	330	
[1273]	<210> 35			
[1274]	<211> 326			
[1275]	<212> PRT			
[1276]	<213> 智人			
[1277]	<220>			
[1278]	<223> 人IgG2同种型			
[1279]	<400> 35			
[1280]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg			
[1281]	1	5	10	15
[1282]	Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
[1283]		20	25	30
[1284]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
[1285]		35	40	45
[1286]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
[1287]		50	55	60
[1288]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr			
[1289]	65	70	75	80
[1290]	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
[1291]		85	90	95
[1292]	Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
[1293]		100	105	110
[1294]	Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp			
[1295]		115	120	125
[1296]	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
[1297]		130	135	140
[1298]	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			
[1299]	145	150	155	160
[1300]	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn			
[1301]		165	170	175

[1302]	Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp		
[1303]	180	185	190
[1304]	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro		
[1305]	195	200	205
[1306]	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
[1307]	210	215	220
[1308]	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn		
[1309]	225	230	235
[1310]	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
[1311]	245	250	255
[1312]	Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
[1313]	260	265	270
[1314]	Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
[1315]	275	280	285
[1316]	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
[1317]	290	295	300
[1318]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
[1319]	305	310	315
[1320]	Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[1321]	325		
[1322]	<210> 36		
[1323]	<211> 377		
[1324]	<212> PRT		
[1325]	<213> 智人		
[1326]	<220>		
[1327]	<223> 人IgG3同种型		
[1328]	<400> 36		
[1329]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg		
[1330]	1	5	10
[1331]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
[1332]	20	25	30
[1333]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
[1334]	35	40	45
[1335]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
[1336]	50	55	60
[1337]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
[1338]	65	70	75
[1339]	Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
[1340]	85	90	95
[1341]	Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro		
[1342]	100	105	110
[1343]	Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg		

[1344]	115	120	125
[1345]	Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys		
[1346]	130	135	140
[1347]	Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro		
[1348]	145	150	155
[1349]	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
[1350]	165	170	175
[1351]	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
[1352]	180	185	190
[1353]	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr		
[1354]	195	200	205
[1355]	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
[1356]	210	215	220
[1357]	Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
[1358]	225	230	235
[1359]	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
[1360]	245	250	255
[1361]	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln		
[1362]	260	265	270
[1363]	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met		
[1364]	275	280	285
[1365]	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
[1366]	290	295	300
[1367]	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
[1368]	305	310	315
[1369]	Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		
[1370]	325	330	335
[1371]	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile		
[1372]	340	345	350
[1373]	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln		
[1374]	355	360	365
[1375]	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[1376]	370	375	
[1377]	<210> 37		
[1378]	<211> 327		
[1379]	<212> PRT		
[1380]	<213> 智人		
[1381]	<220>		
[1382]	<223> 人IgG4同种型		
[1383]	<400> 37		
[1384]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg		
[1385]	1	5	10
			15

[1386]	Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
[1387]	20 25 30
[1388]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
[1389]	35 40 45
[1390]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[1391]	50 55 60
[1392]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
[1393]	65 70 75 80
[1394]	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
[1395]	85 90 95
[1396]	Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
[1397]	100 105 110
[1398]	Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[1399]	115 120 125
[1400]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[1401]	130 135 140
[1402]	Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[1403]	145 150 155 160
[1404]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
[1405]	165 170 175
[1406]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[1407]	180 185 190
[1408]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
[1409]	195 200 205
[1410]	Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[1411]	210 215 220
[1412]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
[1413]	225 230 235 240
[1414]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[1415]	245 250 255
[1416]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[1417]	260 265 270
[1418]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[1419]	275 280 285
[1420]	Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
[1421]	290 295 300
[1422]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[1423]	305 310 315 320
[1424]	Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[1425]	325
[1426]	<210> 38
[1427]	<211> 323

[1428]	<212>	PRT
[1429]	<213>	智人
[1430]	<220>	
[1431]	<223>	示范性人CD47 (GenBank登录号Q08722.1
[1432]	(GI:1171879))	
[1433]	<400>	38
[1434]	Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly	
[1435]	1	5 10 15
[1436]	Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe	
[1437]	20	25 30
[1438]	Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala	
[1439]	35	40 45
[1440]	Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp	
[1441]	50	55 60
[1442]	Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp	
[1443]	65	70 75 80
[1444]	Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala	
[1445]	85	90 95
[1446]	Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr	
[1447]	100	105 110
[1448]	Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu	
[1449]	115	120 125
[1450]	Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu	
[1451]	130	135 140
[1452]	Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe	
[1453]	145	150 155 160
[1454]	Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr	
[1455]	165	170 175
[1456]	Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val	
[1457]	180	185 190
[1458]	Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr	
[1459]	195	200 205
[1460]	Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His	
[1461]	210	215 220
[1462]	Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala	
[1463]	225	230 235 240
[1464]	Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu	
[1465]	245	250 255
[1466]	Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile	
[1467]	260	265 270
[1468]	Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr	
[1469]	275	280 285

[1470]	Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys
[1471]	290 295 300
[1472]	Ala Val Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met
[1473]	305 310 315 320
[1474]	Asn Asp Glu
[1475]	<210> 39
[1476]	<211> 305
[1477]	<212> PRT
[1478]	<213> 智人
[1479]	<220>
[1480]	<223> 示范性人CD47出去信号序列
[1481]	<400> 39
[1482]	Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn
[1483]	1 5 10 15
[1484]	Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn
[1485]	20 25 30
[1486]	Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr
[1487]	35 40 45
[1488]	Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser
[1489]	50 55 60
[1490]	Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu
[1491]	65 70 75 80
[1492]	Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys
[1493]	85 90 95
[1494]	Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys
[1495]	100 105 110
[1496]	Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu Ile Val
[1497]	115 120 125
[1498]	Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe Gly Ile
[1499]	130 135 140
[1500]	Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr Ile Ala
[1501]	145 150 155 160
[1502]	Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val Gly Ala
[1503]	165 170 175
[1504]	Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr Gly Leu
[1505]	180 185 190
[1506]	Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His Tyr Tyr
[1507]	195 200 205
[1508]	Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala Ile Leu
[1509]	210 215 220
[1510]	Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu Ser Leu
[1511]	225 230 235 240

[1512]	Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile Ser Gly
[1513]	245 250 255
[1514]	Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr Met Lys
[1515]	260 265 270
[1516]	Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys Ala Val
[1517]	275 280 285
[1518]	Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met Asn Asp
[1519]	290 295 300
[1520]	Glu
[1521]	305

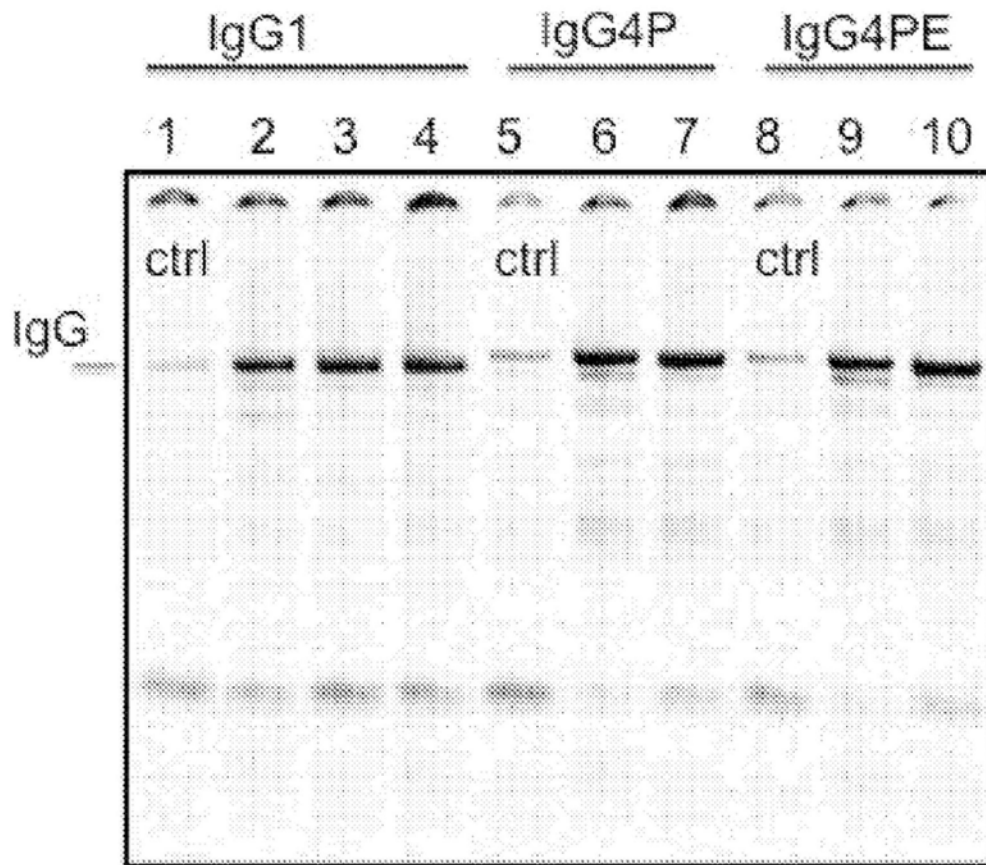


图1A

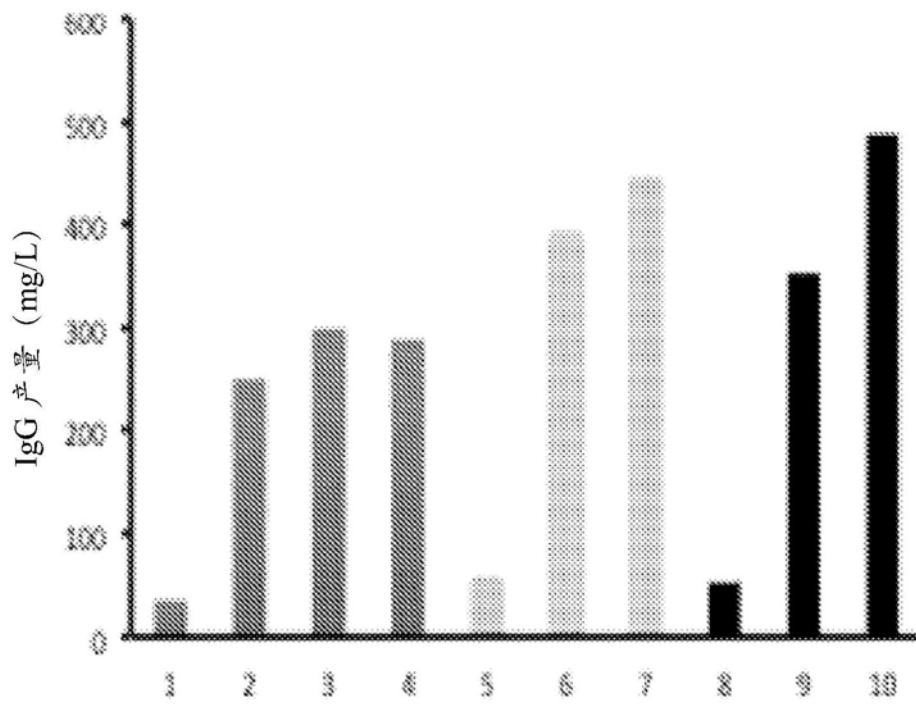


图1B

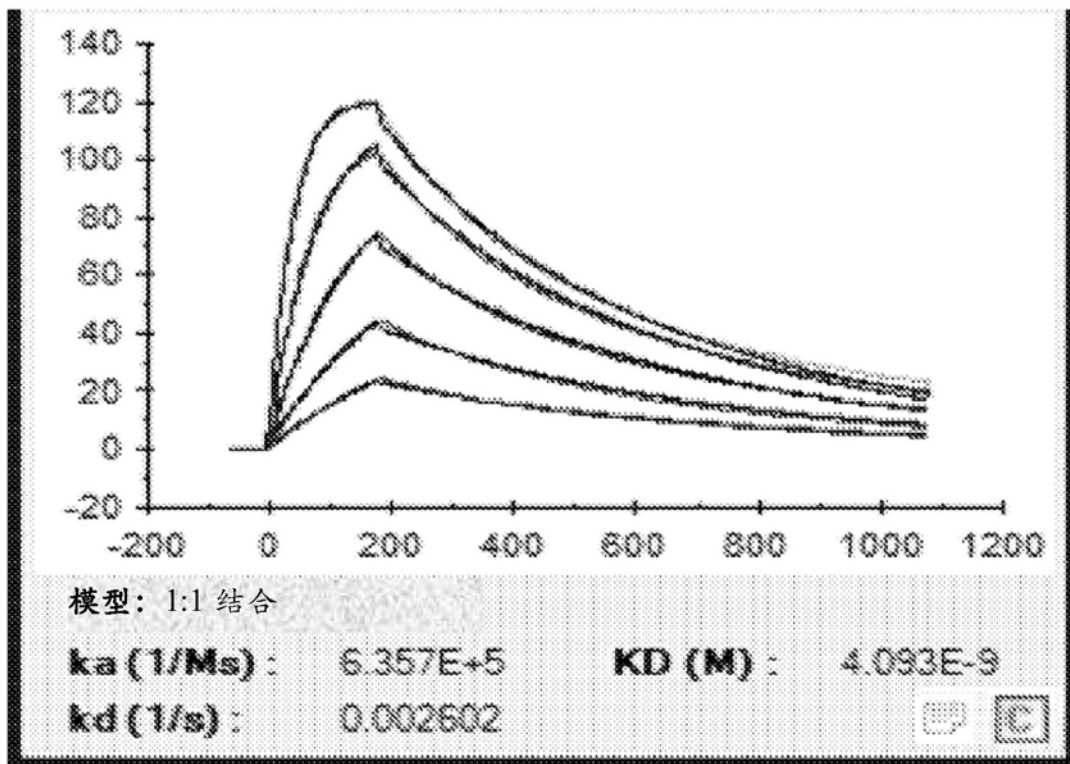


图2A

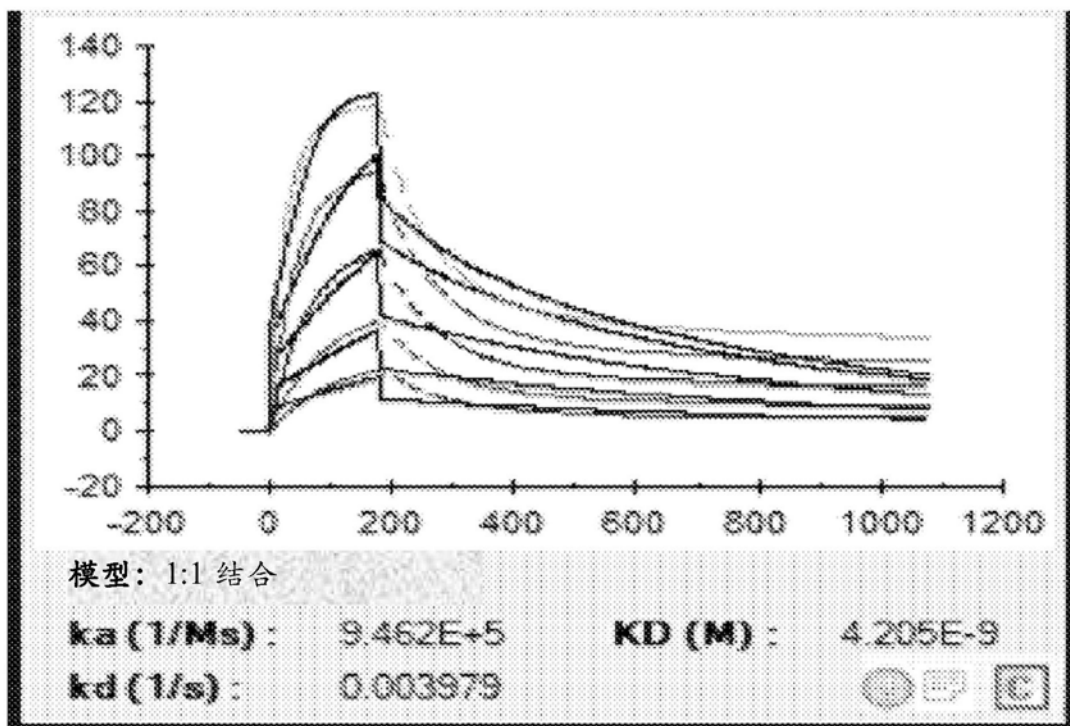


图2B

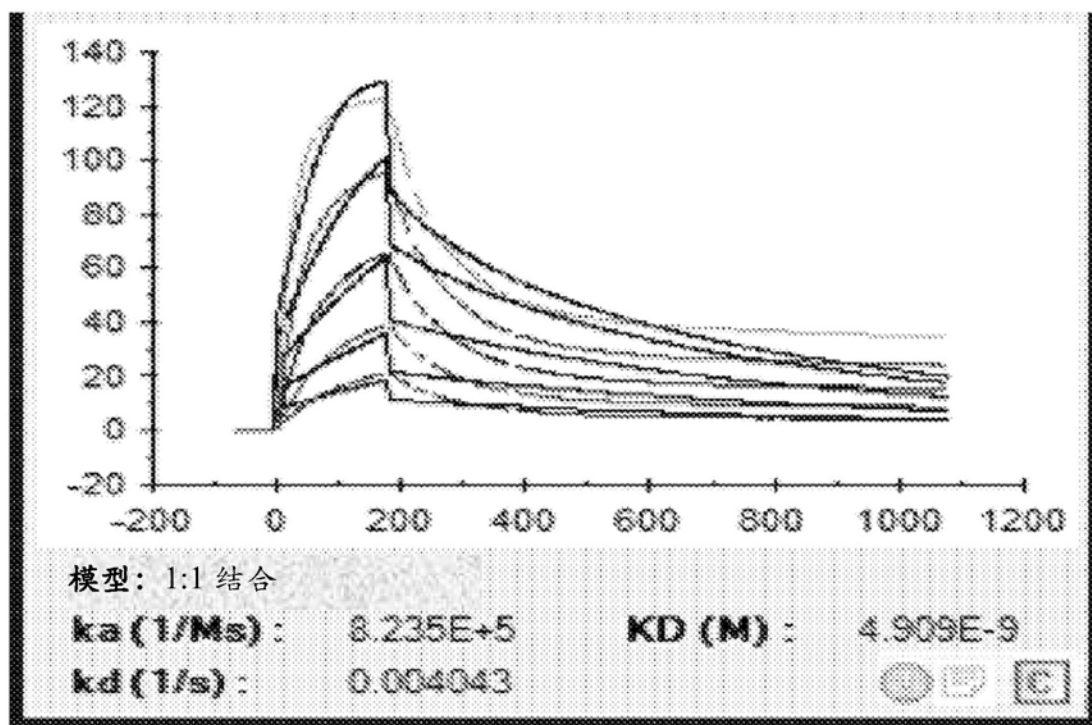


图2C

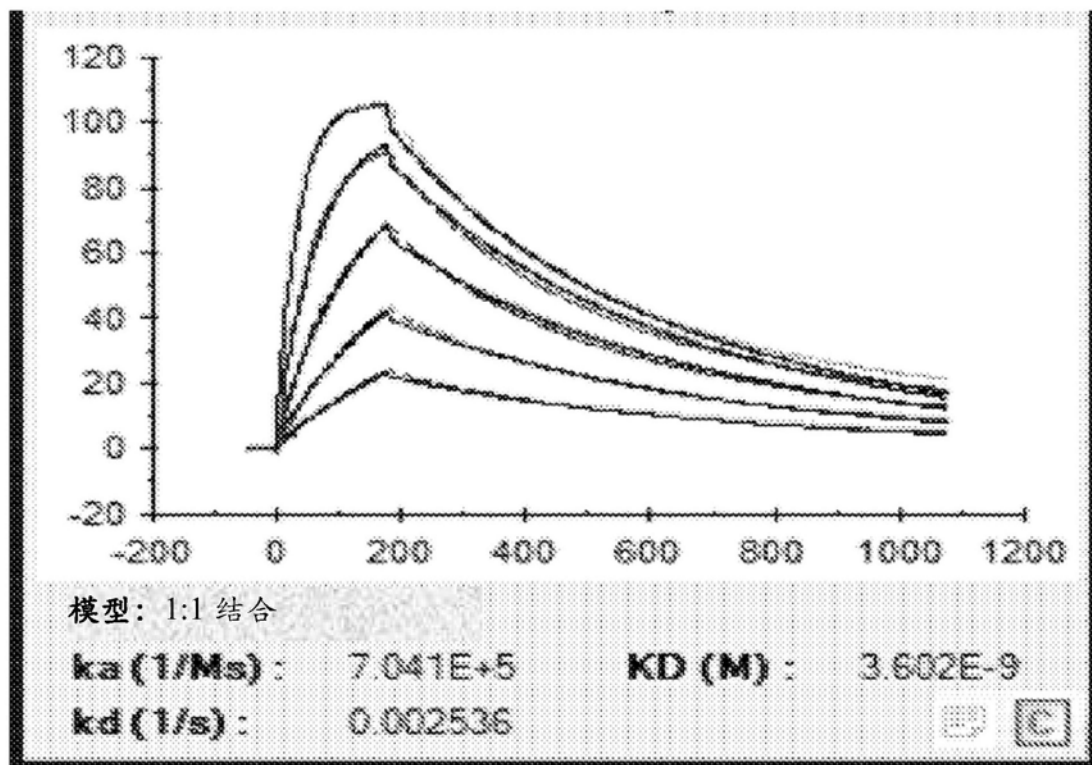


图2D

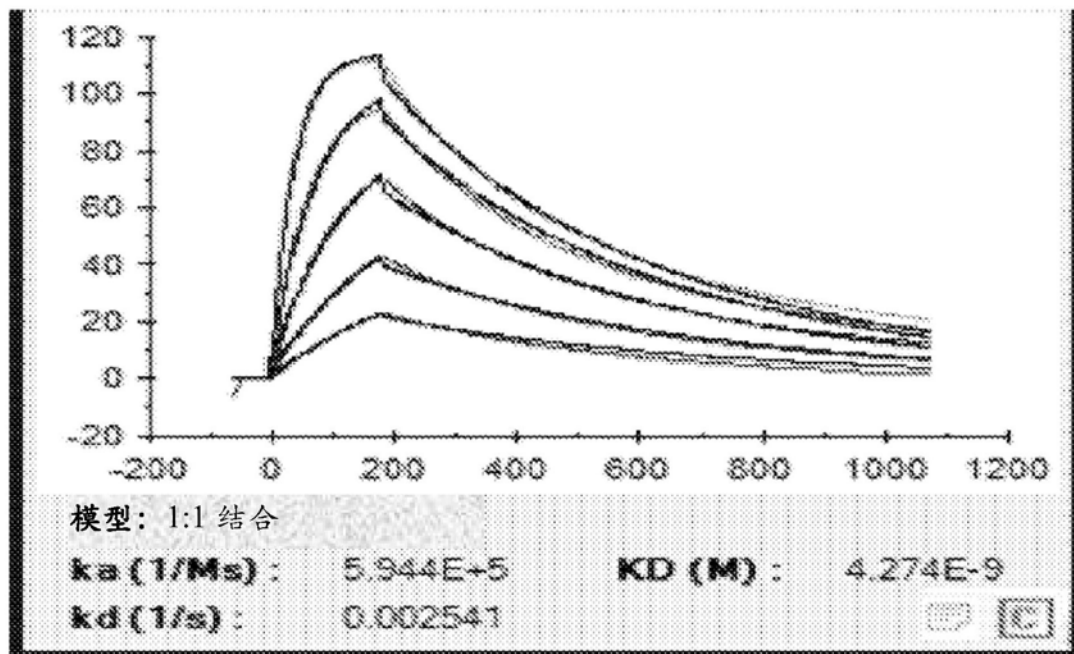


图2E

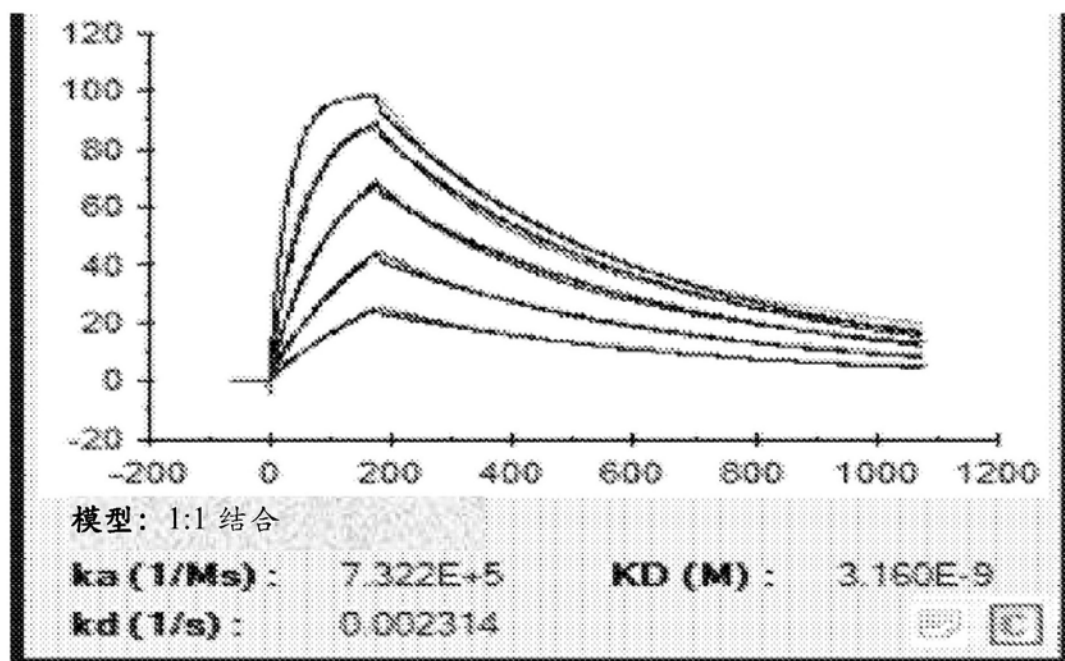


图2F

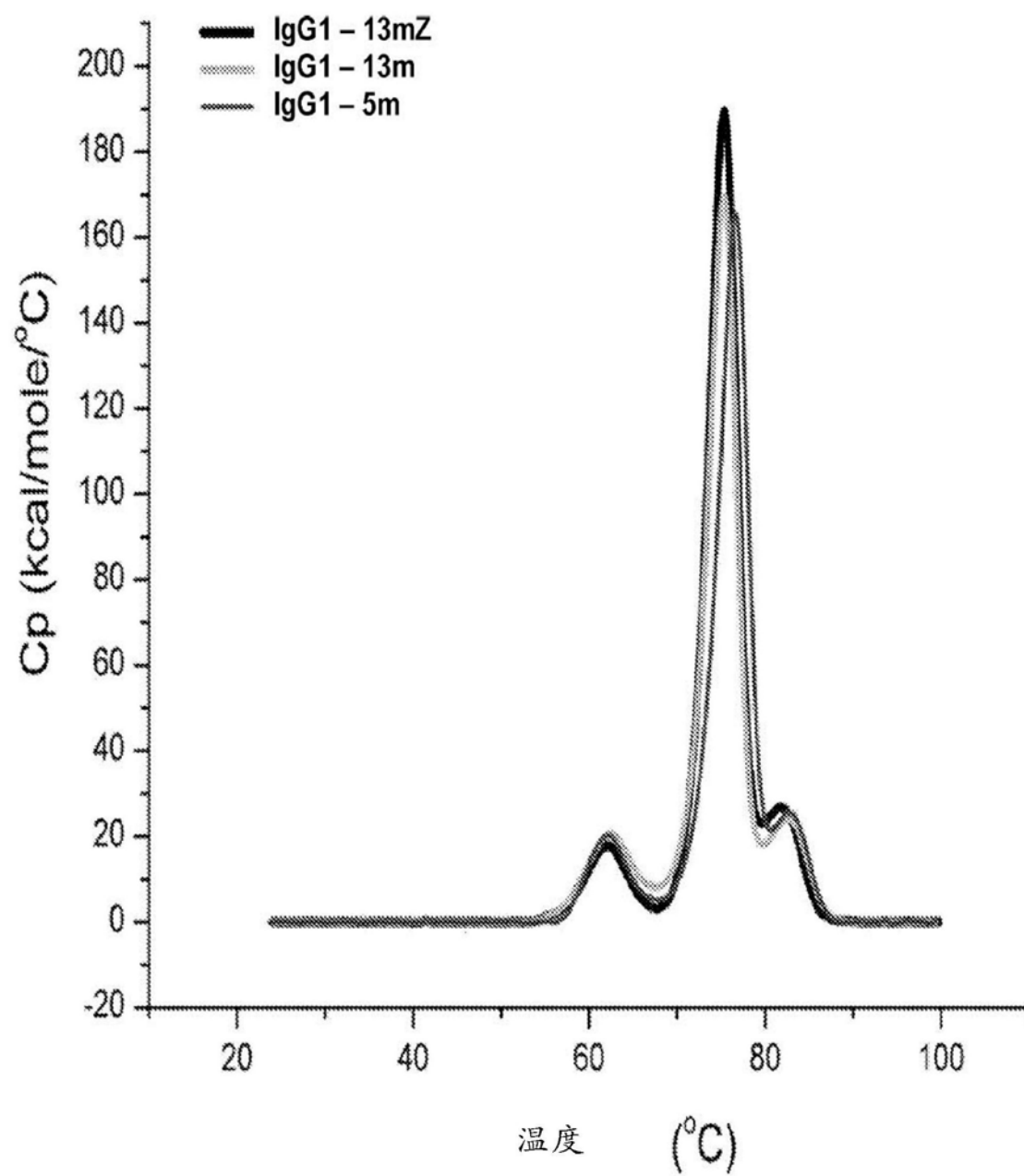


图3A

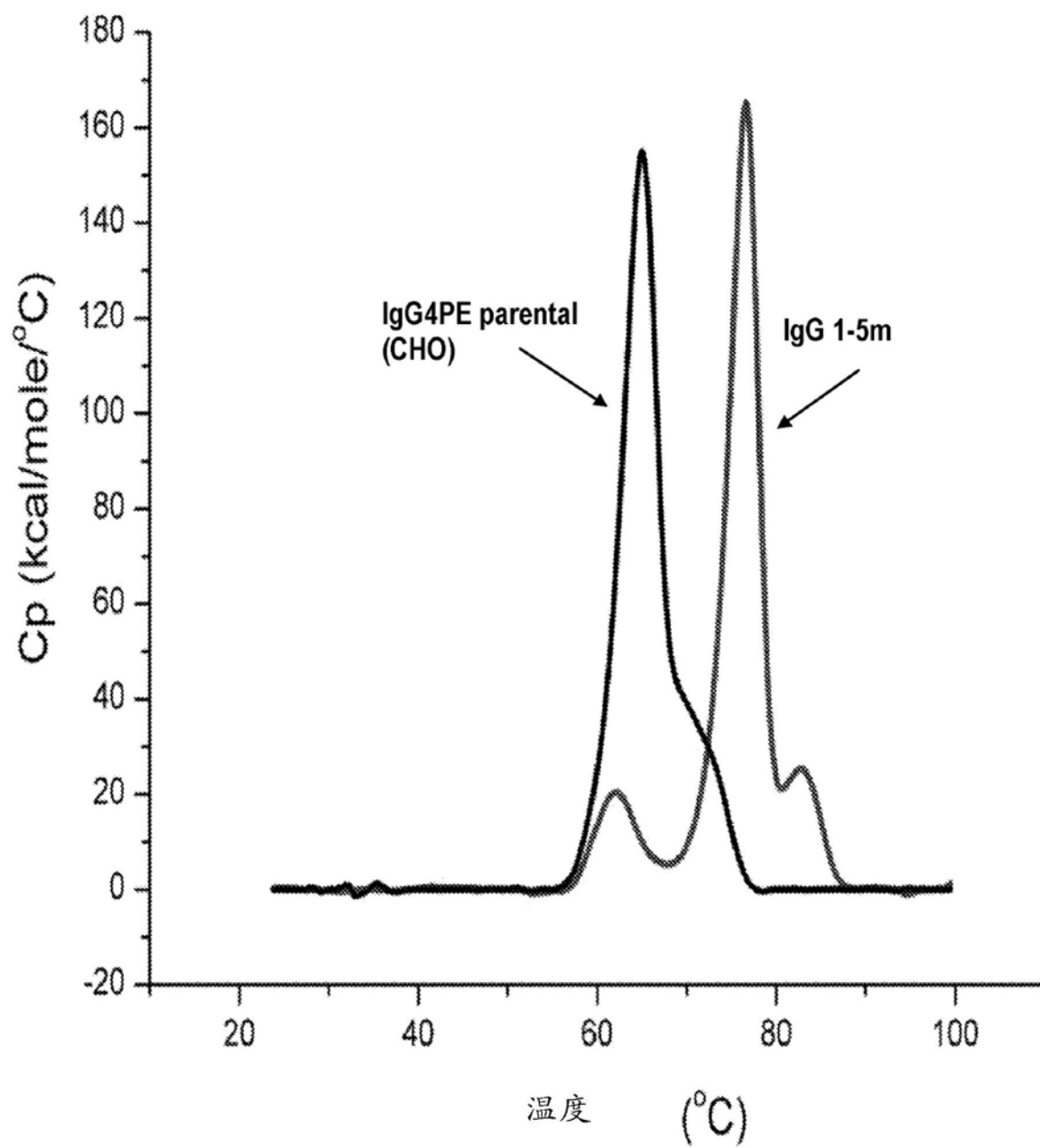


图3B

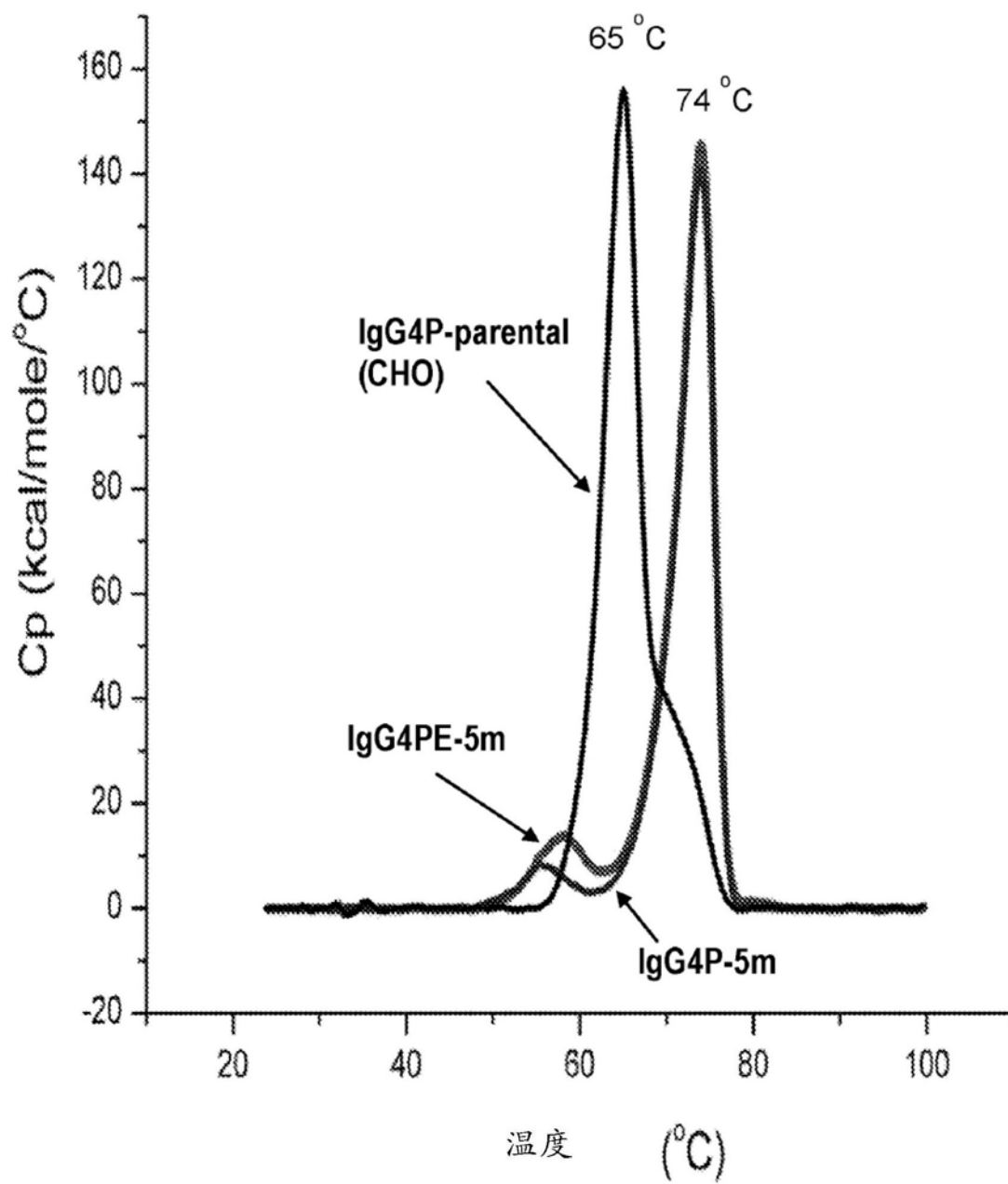


图3C

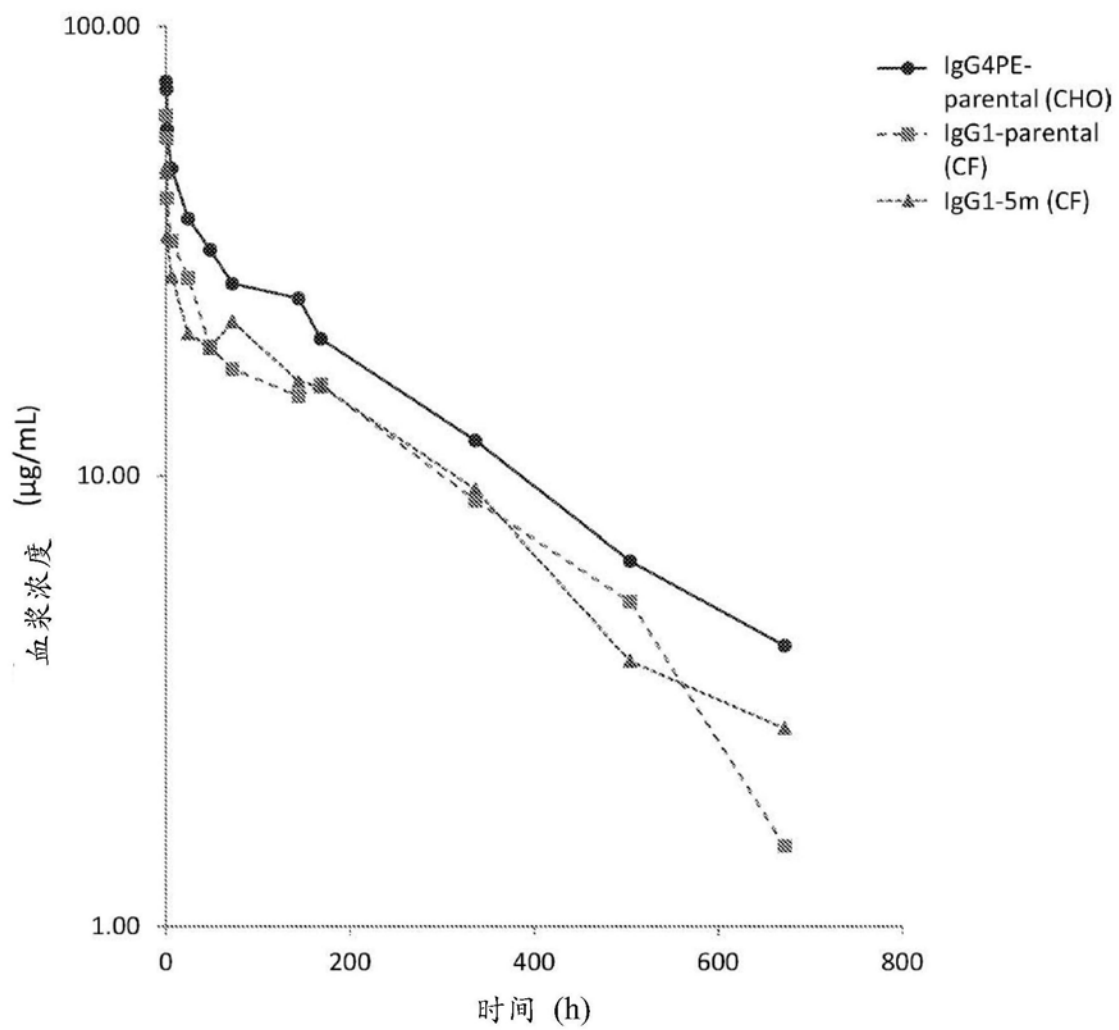


图4

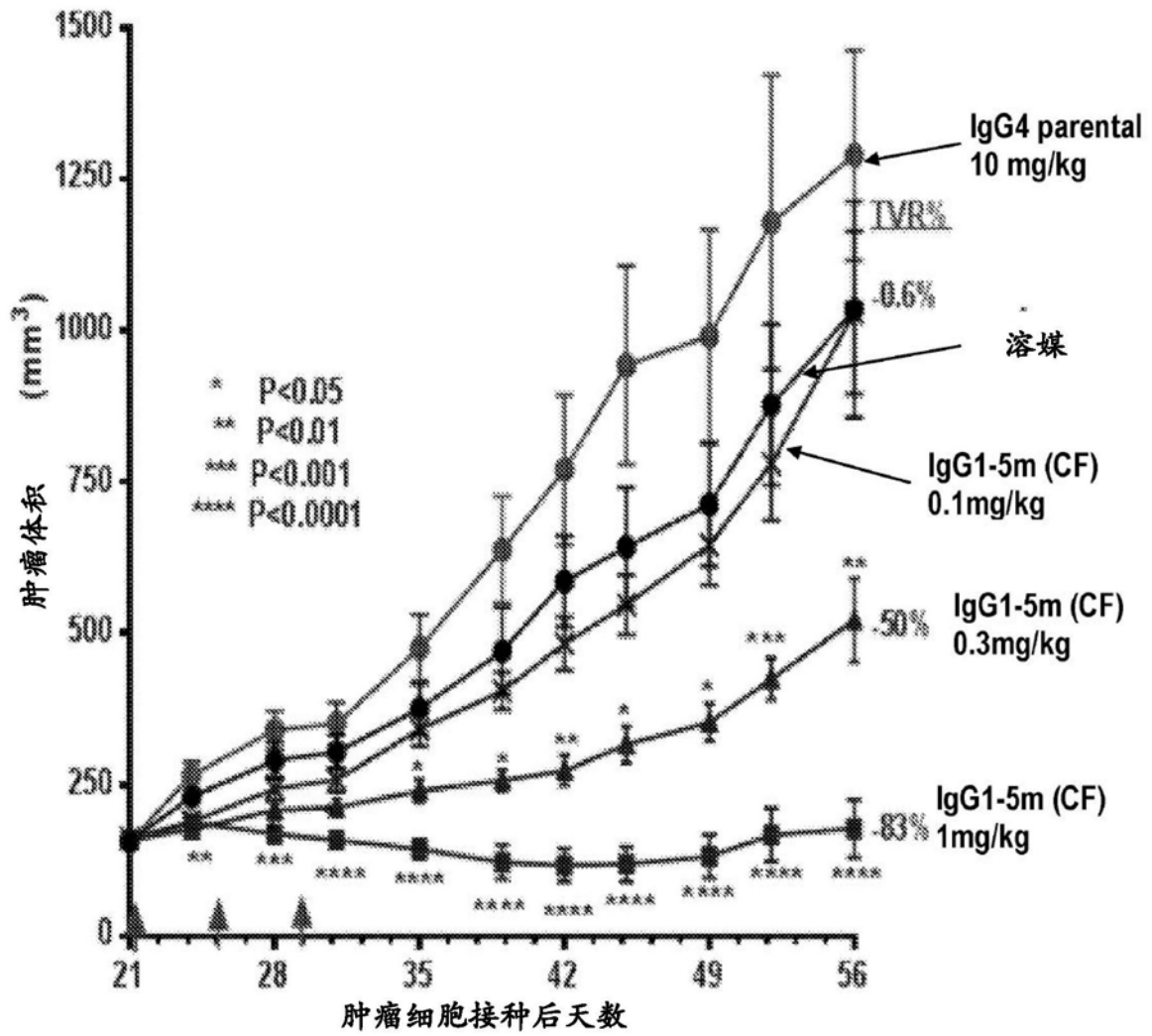


图5