(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2019 年 10 月 3 日 (03.10.2019)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2019/184912 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/079687

(22) 国际申请日: 2019 年 3 月 26 日 (26.03.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810259545.2 2018年3月27日 (27.03.2018) CN

(71) 申请人: 信达生物制药（苏州）有限公司 (INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

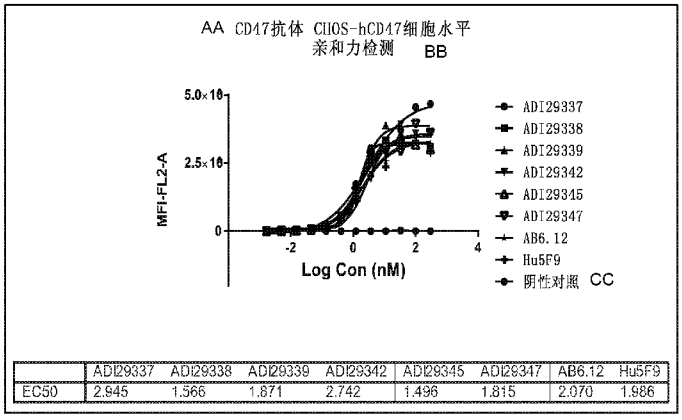
(72) 发明人: 刘丹丹(LIU, Dandan); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。 黄威峰(HUANG, Weifeng); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。 陈炳良(CHEN, Bingliang); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。 刘军建(LIU, Junjian); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所(ZHONGZI LAW OFFICE); 中国北京市西城区平安里西大街26号新时代大厦7层, Beijing 100034 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) **Title:** ANTI-CD47 ANTIBODY AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 抗CD47抗体及其用途



	ADI29337	ADI29338	ADI29339	ADI29342	ADI29345	ADI29347	AB6.12	Hu5F9
EC50	2.945	1.566	1.871	2.742	1.496	1.815	2.070	1.986

图 1

AA CD47 antibody
BB CHOS-hCD47 cellular level affinity detection
CC Negative control group

(57) **Abstract:** The present invention relates to a novel antibody and antibody fragment thereof that specifically binds to an integrin-associated protein (IAP), (also known as CD47), and a composition containing said antibody or antibody fragment thereof. The present invention also relates to a nucleic acid encoding said antibody or antibody fragment thereof, a host cell comprising same, and related uses thereof. The present invention further relates to uses thereof for treatment and diagnosis.

(57) 摘要: 本发明涉及特异性结合整联蛋白相关蛋白(IAP)，(也称为CD47)的新型抗体和抗体片段以及含有所述抗体或抗体片段的组合物。本发明还涉及编码所述抗体或其抗体片段的核酸及包含其的宿主细胞，以及相关用途。此外，本发明也涉及这些抗体和抗体片段的治疗和诊断用途。

WO 2019/184912 A1

[见续页]

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) **指定国**(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

抗 CD47 抗体及其用途

本发明涉及特异性结合整联蛋白相关蛋白(IAP),(也称为 CD47) 的新型抗体和抗体片段以及含有所述抗体或抗体片段的组合物。本发明还涉及编码所述抗体或其抗体片段的核酸及包含其的宿主细胞，以及相关用途。此外，本发明也涉及这些抗体和抗体片段的治疗和诊断用途。

背景技术

癌症免疫疗法是近年来生物科学领域的重头大戏，基于 T 细胞的 CTLA4 抗体、PD-1 抗体、PD-L1 抗体等的免疫检查点抑制剂疗法和 CAR-T、TCR-T 等细胞疗法皆是近年来大热的免疫疗法。这些无一例外是围绕如何恢复 T 细胞功能来进行，换句话说，主要围绕如何提高获得性免疫系统能力。但是以免疫检查点（checkpoint） 为靶点，激活 T 细胞功能，从而提高获得性免疫系统能力来攻克癌症这一道路仍充满曲折。然而固有免疫系统在肿瘤免疫治疗中的作用，却长期没有得到发挥。事实上在整个肿瘤浸润区域，巨噬细胞在肿瘤组织约占 50%，更重要的是巨噬细胞的数量同肿瘤的预后呈现反向联系，这进一步说明巨噬细胞在肿瘤中有很重要的作用。

巨噬细胞发挥吞噬效应需要两个信号同时起作用：一个是靶向细胞表面的“吃我”信号的激活，另一个是相同目标表面“别吃我”信号的失活。任何一个信号的缺少都不足以引发吞噬效应的发生。越来越多的证据表明，CD47 是一类“别吃我”信号，它通过与巨噬细胞表面的信号调节蛋白 α（Signal regulatory protein α, SIRPα）相互结合抑制巨噬细胞的吞噬作用。肿瘤细胞也可以通过 CD47 的表达逃避巨噬细胞吞噬作用（例如参见 EP2242512 及其中引用的相关文献）。

CD47 也被称为整联蛋白相关蛋白（IAP），是免疫球蛋白超家族成员。CD47 广泛的表达于细胞的表面，可与 SIRPα、血小板反应蛋白（thrombospondin-1，TSP1）以及整合素相互作用，介导凋亡、增殖、免疫等一系列的反应。TSP1 与细胞的增殖，生长和分化有关，CD47 与 TSP1 的结合在调节细胞迁移，细胞增殖和凋亡以及促进血管生成和炎症反应中发挥重要作用。此外 CD47 是细胞表面一个重要的自我识别标记。CD47 可以与巨噬细胞表面 SIRPα 结合，磷酸化其免疫受体酪氨酸抑制基序（ITIM）,随后招募 SHP-1 蛋白，产生一系列的级联反应抑制巨噬细胞的吞噬作用（例如参见 US9382320 及其中引用的相关文献）。

不同的研究表明，几乎所有的肿瘤细胞和组织都高表达 CD47。肿瘤细胞表面高表达的 CD47 通过与巨噬细胞表面 SIRPα 结合，释放“不要吃我”的信号，导致肿瘤组织浸润区的巨噬细胞不但同肿瘤细胞和谐相处，而且还会通过促进肿瘤内血管增殖，抑制效应 T 细胞发挥作用，促进肿瘤细胞扩增和生长。

CD47 在促进细胞增殖中的作用在很大程度上取决于细胞类型，因为 CD47 的活化和丧失可导致增强的增殖。使用 TSP-1 激活 CD47 可增加人 U87 和 U373 星形细胞瘤细胞的增殖，但不增加正常星形胶质细胞。此外，CD47 阻断抗体抑制未刺激的星形细胞瘤细胞的增殖，但不抑制正常的星形胶质细胞。虽然确切的机制尚不清楚，CD47 可能通过 PI3K / Akt 途径促进癌细胞增殖，但不能促进正常细胞的增殖（Sick E, Boukhari A, Deramaudt T, Rondé P, Bucher B, André P, Gies JP, Takeda K.，Activation of CD47 receptors causes

proliferation of human astrocytoma but not normal astrocytes via an Akt-dependent pathway, Glia. 2011 Feb, 59(2): 308-19: 308–19）。

CD47 连接导致许多正常和肿瘤细胞系通过凋亡或自噬的细胞死亡。CD47 的激活诱导 T 细胞的快速凋亡。用单克隆抗体 Ad22 孵育的 Jurkat 细胞和外周血单核细胞（PBMC）在 3 小时内导致凋亡。然而，用其他抗 CD47 抗体培养后未观察到细胞凋亡。CD47 的凋亡诱导功能似乎依赖于细胞外结构域上特异性表位的活化(Pettersen RD, Hestdal K, Olafsen MK, Lie SO, Lindberg FP (June 1999), CD47 signals T cell death, J. Immunol. 162 (12): 7031–40. PMID 10358145）。

目前已经报道了多个抗 CD47 抗体，例如美国专利 US2015/0183874 A1 报道了衍生自 B6H12 的人 IgG1 型嵌合单克隆抗体和通过 CDR 移植产生的人源化 B6H12 抗体，其相比较于已知抗体具有更低的免疫原性。美国专利 US 9045541 报道了一种不显著引起血凝反应的抗 CD47 抗体，并且该抗体与已知抗体相比，在肿瘤模型中显著有效，例如提高巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力。

现有技术中已知的绝大多数阻抗 CD47 与 SIRPα 结合的抗体在促进巨噬细胞的吞噬作用的同时，引起血红细胞的凝集，从而使得相应抗体的治疗效果大打折扣。

因此，在针对各种肿瘤和/或癌症的治疗中，仍然急需开发具有良好的靶点特异性、疗效优异（例如改善巨噬细胞的吞噬作用，抑制肿瘤生长、甚至使得肿瘤完全消失），且副作用较小的抗 CD47 抗体。本发明满足了这方面的要求。

发明概述

本发明提供抗 CD47 抗体、与抗 CD47 抗体相关的组合物、试剂盒、方法和用途。

本发明的发明人令人惊讶地发现，本发明开发的抗体具有显著的促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力，并且没有促进红细胞凝集的活性。

在一些实施方案中，本发明提供结合 CD47 或其片段(优选人 CD47 蛋白质)的抗 CD47 抗体或抗体片段（优选抗原结合片段）。

在一些实施方案中，本发明抗体包含表 B 所示任一抗体的 VH 区序列的一个、两个或三个 CDR（优选三个 CDR）、或其变体。在另一些实施方案中，本发明抗体包含表 B 所示任一抗体的 VL 区序列的一个、两个或三个 CDR（优选三个 CDR）、或其变体。在一些实施方案中，本发明抗体包含表 B 所示任一抗体的 6 个 CDR 区序列、或其变体。在一个实施方案中，抗体的 CDR 序列是表 A 所示的 CDR 序列。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD47 抗体或其抗原结合片段包含选自以下的一个至三个重链互补决定区 HCDR 或由所述序列组成：（i）HCDR1，其包含选自 SEQ ID NO:15、16、17、18、19、20 和 69 的氨基酸序列，或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 5 个氨基酸的氨基酸取代（例如保守性取代）、缺失或插入的序列，（ii）HCDR2，其包含选自 SEQ ID NO:21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 和 70 的氨基酸序列，或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 5 个氨基酸的氨基酸取代（例如保守性取代）、缺失或插入的序列，（iii）HCDR3，其包含选自 SEQ ID NO:31、32、33、34 和 35 的氨基酸序列，或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 5 个氨基酸的氨基酸取代（例如保守性取代）、缺失或插入的所述序列，其中包含所述修饰 CDR 的抗 CD47 抗体仍然具有结合 CD47 的能力。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD47 抗体或其抗原结合片段包含选自以下的一个至三个轻链互补决定区 LCDR 或由所述序列组成：（i）LCDR1，其包含选自 SEQ ID NO:36、37、38 或 71 的氨基酸序列，或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 5 个氨基酸的氨基酸取代（例如保守性取代）、缺失或插入的序列，（ii）LCDR2，其包含选自 SEQ ID NO:39、40 或 72 的氨基酸序列，或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 5 个氨基酸的氨基酸取代（例如保守性取代）、缺失或插入的序列，（iii）LCDR3，其包含选自 SEQ ID NO:41、42、43 或 44 所示的氨基酸序列，或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 5 个氨基酸的氨基酸取代（例如保守性取代）、缺失或插入的序列，其中包含所述修饰 CDR 的抗 CD47 抗体仍然具有结合 CD47 的能力。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD47 抗体或其抗原结合片段包含 A)选自以下的一个至三个重链互补决定区 HCDR：（i）HCDR1，其包含选自 SEQ ID NO:15、16、17、18、19、20 和 69 的氨基酸序列，或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 5 个氨基酸的氨基酸取代（例如保守性取代）、缺失或插入的序列，（ii）HCDR2，其包含选自 SEQ ID NO:21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 和 70 的氨基酸序列，或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 5 个氨基酸的氨基酸取代（例如保守性取代）、缺失或插入的序列，（iii）HCDR3，其包含选自 SEQ ID NO:31、32、33、34 和 35 的氨基酸序列，或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 5 个氨基酸的氨基酸取代（例如保守性取代）、缺失或插入的序列；和 B)选自以下的一个至三个轻链互补决定区 LCDR：（i）LCDR1，其包含选自 SEQ ID NO:36、37、38 或 71 的氨基酸序列，或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 5 个氨基酸的氨基酸取代（例如保守性取代）、缺失或插入的序列，（ii）LCDR2，其包含选自 SEQ ID NO:39、40 和 72 的氨基酸序列，或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 5 个氨基酸的氨基酸取代（例如保守性取代）、缺失或插入的序列，（iii）LCDR3，其包含选自 SEQ ID NO:41、42、43 和 44 所示的氨基酸序列，或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 5 个氨基酸的氨基酸取代（例如保守性取代）、缺失或插入的序列，其中包含所述修饰 CDR 的抗 CD47 抗体仍然具有结合 CD47 的能力。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD47 抗体或其抗原结合片段包含选自以下的一个至三个重链互补决定区 HCDR：（i）HCDR1，由选自 SEQ ID NO:15、16、17、18、19、20 和 69 的氨基酸序列组成，（ii）HCDR2，其由选自 SEQ ID NO:21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 和 70 的氨基酸序列组成，（iii）HCDR3，其由选自 SEQ ID NO:31、32、33、34 和 35 的氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD47 抗体或其抗原结合片段包含选自以下的一个至三个轻链互补决定区 LCDR：（i）LCDR1，其由选自 SEQ ID NO:36、37、38 或 71 的氨基酸序列组成，（ii）LCDR2，其由选自 SEQ ID NO:39、40 和 72 的氨基酸序列组成，（iii）LCDR3，其由选自 SEQ ID NO:41、42、43 和 44 的氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD47 抗体或其抗原结合片段包含 A)选自以下的一个或者多个重链互补决定区 HCDR：（i）HCDR1，其由选自 SEQ ID NO:15、16、17、18、19、20 和 69 的序列组成，（ii）HCDR2，其由选自 SEQ ID NO:21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 和 70 的氨基酸序列组成，（iii）HCDR3，其由选自 SEQ ID NO:31、32、33、34 和 35 的氨基酸序列组成；和 B)选自以下的一个至三个轻链互补决定区 LCDR：（i）LCDR1，其由选自 SEQ ID NO:36、37、38 或 71 的氨基酸序列组成，（ii）LCDR2，其由

选自 SEQ ID NO:39、40 和 72 的氨基酸序列组成，(iii) LCDR3，其由选自 SEQ ID NO:41、42、43 和 44 所示的氨基酸序列组成。

在一个优选的实施方案中，上述在 CDR 中的一个或多个氨基酸修饰包含不超过 5、4、3、2、1 或者 0 个氨基酸的氨基酸取代（例如保守性取代）、缺失或插入。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD47 抗体或其抗原结合片段包含重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含选自 SEQ ID NO:15、16、17、18、19、20 和 69 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含选自 SEQ ID NO:21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 和 70 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含选自 SEQ ID NO: 31、32、33、34 和 35 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD47 抗体或其抗原结合片段包含轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中 LCDR1 包含选自 SEQ ID NO:36、37、38 或 71 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含选自 SEQ ID NO:39、40 和 72 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；LCDR3 包含选自 SEQ ID NO:41、42、43 和 44 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD47 抗体或其抗原结合片段包含重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 和轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中 HCDR1 包含选自 SEQ ID NO:15、16、17、18、19、20 和 69 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含选自 SEQ ID NO:21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 和 70 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含选自 SEQ ID NO: 31、32、33、34 和 35 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；LCDR1 包含选自 SEQ ID NO:36、37、38 和 71 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含选自 SEQ ID NO:39、40 和 72 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；LCDR3 包含选自 SEQ ID NO:41、42、43 和 44 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其包含重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 和轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列或由其组成，且 HCDR3 包含 SEQ ID NO:31、32、33、34 或 35 所示的氨基酸序列或由其组成；其中 LCDR1 包含选自 SEQ ID NO:71 所示的氨基酸序列或由所述序列组成，LCDR2 包含选自 SEQ ID NO: 72 所示的氨基酸序列或由所述序列组成，LCDR3 包含选自 SEQ ID NO:41、42、43 和 44 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:31 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:39 所示的氨基酸序列或由其组成；且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:41 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:31 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:39 所示的氨基酸序列或由其组成；且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:41 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:31 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:39 所示的氨基酸序列或由其组成；且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:41 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:32 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:39 所示的氨基酸序列或由其组成；且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:42 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:39 所示的氨基酸序列或由其组成；且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:42 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:26 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:32 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:39 所示的氨基酸序列或由其组成；且 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列或由其组成；且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:43 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:37 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列或由其组成；且 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 43 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:38 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列或由其组成；且 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列或由其组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:38 所示的氨基酸序列或由其组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列或由其组成；且 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，本发明的抗CD47抗体或其抗原结合片段包含重链可变区HCVR，其包含与选自SEQ ID NO:45、46、47、48、49、50、51、52、53和54的氨基酸序列具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或者100%同一性的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，抗CD47抗体的重链可变区HCVR包含与选自SEQ ID NO:45、46、47、48、49、50、51、52、53和54的氨基酸序列相比具有一个或多个取代（例如保守性取代）、插入或缺失的氨基酸序列，但是包含所述HCVR的抗CD47抗体具有结合CD47的能力。

在一些实施方案中，本发明的抗CD47抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区LCVR，其包含与SEQ ID NO:65、66、67和68所示的氨基酸序列具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或者100%同一性的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，抗CD47抗体的轻链可变区LCVR包含与SEQ ID NO:65、66、67和68所示的氨基酸序列相比具有一个或多个取代（例如保守性取代）、插入或缺失的氨基酸序列，但是包含所述LCVR的抗CD47抗体具有结合CD47的能力。

在一些实施方案中，本发明的抗CD47抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（HCVR）和轻链可变区（LCVR），其中重链可变区HCVR包含与选自SEQ ID NO:45、46、47、48、49、50、51、52、53和54的氨基酸序列具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或者100%同一性的氨基酸序列或由所述序列组成；轻链可变区LCVR包含与SEQ ID NO:65、66、67和68所示的氨基酸序列具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或者100%同一性的氨基酸序列或由所述序列组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗CD47抗体或其抗原结合片段，其中重链可变区HCVR包含SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列或由其组成；轻链可变区LCVR包含SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗CD47抗体或其抗原结合片段，其中重链可变区HCVR包含SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列或由其组成；轻链可变区LCVR包含SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗CD47抗体或其抗原结合片段，其中重链可变区HCVR包含SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列或由其组成；轻链可变区LCVR包含SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗CD47抗体或其抗原结合片段，其中重链可变区HCVR包含SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列或由其组成；轻链可变区LCVR包含SEQ ID NO: 66所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗CD47抗体或其抗原结合片段，其中重链可变区HCVR包含SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列或由其组成；轻链可变区LCVR包含SEQ ID NO: 66所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗CD47抗体或其抗原结合片段，其中重链可变区

HCVR 包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列或由其组成；轻链可变区 LCVR 包含 SEQ ID NO: 66 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中重链可变区 HCVR 包含 SEQ ID NO:51 所示的氨基酸序列或由其组成；轻链可变区 LCVR 包含 SEQ ID NO:67 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中重链可变区 HCVR 包含 SEQ ID NO:52 所示的氨基酸序列或由其组成；轻链可变区 LCVR 包含 SEQ ID NO: 67 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中重链可变区 HCVR 包含 SEQ ID NO:53 所示的氨基酸序列或由其组成；轻链可变区 LCVR 包含 SEQ ID NO: 68 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中重链可变区 HCVR 包含 SEQ ID NO:54 所示的氨基酸序列或由其组成；轻链可变区 LCVR 包含 SEQ ID NO: 68 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD47 抗体或其抗原结合片段包含重链，其中重链包含与选自 SEQ ID NO:1、3、4、5、7、8、9、11、12 和 14 的氨基酸序列具有至少 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性或者 100%同一性的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，抗 CD47 抗体的重链包含与选自 SEQ ID NO:1、3、4、5、7、8、9、11、12 和 14 的氨基酸序列相比具有一个或多个取代（例如保守性取代）、插入或缺失的氨基酸序列，但是包含所述重链的抗 CD47 抗体具有结合 CD47 的能力。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD47 抗体或其抗原结合片段包含轻链，其中轻链包含与 SEQ ID NO:2、6、10 或 13 所示的氨基酸序列具有至少 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性或者 100%同一性的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，抗 CD47 抗体的轻链包含与选自 SEQ ID NO: 2、6、10 或 13 所示的氨基酸序列相比具有一个或多个取代（例如保守性取代）、插入或缺失的氨基酸序列，但是包含所述轻链的抗 CD47 抗体具有结合 CD47 的能力。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD47 抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链，其中重链包含与选自 SEQ ID NO:1、3、4、5、7、8、9、11、12 和 14 的氨基酸序列具有至少 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性或者 100%同一性的氨基酸序列或由所述序列组成；轻链包含与 SEQ ID NO: 2、6、10 或 13 所示的氨基酸序列具有至少 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性或者 100%同一性的氨基酸序列或由所述序列组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中重链包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或由其组成；轻链包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中重链包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或由其组成；轻链包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中重链包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或由其组成；轻链包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中重链包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列或由其组成；轻链包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中重链包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或由其组成；轻链包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中重链包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列或由其组成；轻链包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中重链包含 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由其组成；轻链包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中重链包含 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列或由其组成；轻链包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中重链包含 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或由其组成；轻链包含 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或由其组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其中重链包含 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列或由其组成；轻链包含 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，本发明的抗体还涵盖抗 CD47 抗体的氨基酸序列的变体、与上文所述的任何抗体竞争结合 CD47 的抗体、以及与上文所述的任何抗体结合 CD47 相同表位的抗体。

在一些实施方案中，抗 CD47 抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中，抗 CD47 抗体是人源化的。在一些实施方案中，抗 CD47 抗体是人抗体。在一些实施方案中，至少部分的抗 CD47 抗体的框架序列是人共有框架序列。在一个实施方案中，本发明的抗 CD47 抗体还涵盖其抗体片段，优选地选自以下的抗体片段：Fab、Fab'-SH、Fv、scFv 或$(Fab')_2$片段。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD47 抗体是阻断性抗体，阻断 CD47 与 SIRPα 的结合。

在一方面，本发明提供了编码以上任何抗 CD47 抗体或其片段的核酸。在一个实施方案中，提供包含所述核酸的载体。在一个实施方案中，载体是表达载体。在一个实施方案中，提供包含所述载体的宿主细胞。在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实

施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。在另一个实施方案中，宿主细胞是原核的。

在一个实施方案中，本发明提供制备抗 CD47 抗体或其片段（优选的抗原结合片段）的方法，其中所述方法包含在适于表达编码所述抗体或其片段（优选的抗原结合片段）的核酸的条件下培养所述宿主细胞，以及任选地分离所述抗体或其片段（优选地抗原结合片段）。在某个实施方案中，所述方法还包括从宿主细胞回收抗 CD47 抗体或其片段（优选地抗原结合片段）。

在一个实施方案中，本发明提供由本发明的方法制备的抗 CD47 抗体或其片段。

在一些实施方案中，本发明提供包含本文所述的任何抗 CD47 抗体或其片段（优选地其抗原结合片段）的组合物，优选地组合物为药物组合物。在一个实施方案中，所述组合物还包含药用载体。

在一方面中，本发明涉及在受试者中抑制 CD47 与 SIRPα 结合的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的本文的任何抗 CD47 抗体或其片段。本发明还涉及本文公开的任何抗 CD47 抗体或其片段制备用于在受试者中抑制 CD47 与 SIRPα 结合的组合物或药物的用途。

在一方面中，本发明涉及促进受试者的巨噬细胞发挥吞噬作用的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的本文任何的抗 CD47 抗体或其片段。本发明还涉及本文公开的任何抗 CD47 抗体或其片段制备用于促进受试者的巨噬细胞发挥吞噬作用的组合物或药物的用途。在一个实施方案中，本发明的抗 CD47 抗体相比较于对照，可以提高巨噬细胞的吞噬作用至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或 100%以上。

在另一方面中，本发明涉及治疗受试者的与 CD47 相关的病症的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的本文的任何抗 CD47 抗体或其片段。本发明还涉及本文的任何抗 CD47 抗体或其片段制备用于在受试者中治疗与 CD47 相关的病症的药物的用途。

在一些实施方案中，与 CD47 相关的病症是各种血液病和实体瘤，包括但不限于急性骨髓性白血病（AML），慢性骨髓性白血病，急性淋巴细胞白血病（ALL），非霍奇金淋巴瘤（NHL），多发性骨髓瘤（MM）、淋巴瘤、乳腺癌、胃癌、肺癌、食管癌、肠癌、卵巢癌、宫颈癌、肾癌、胰腺癌、膀胱癌、神经胶质瘤、黑素瘤和其他实体瘤。

在一方面中，本发明涉及以 CD47 为靶点的肿瘤免疫治疗方法，所述方法包括向受试者施用有效量的本文所述的任何抗 CD47 抗体或其片段。本发明还涉及本文公开的任何抗 CD47 抗体或其片段制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

在一方面中，本发明涉及治疗可以通过消除、抑制或降低 CD47 活性而被改善、减缓、抑制或预防的任何疾病或病症的方法。

在另一方面，本发明的方法还涉及通过联合疗法治疗肿瘤的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的本文所述的任何抗 CD47 抗体或其片段和一种或多种其它药物。在一些实施方案中，本文公开的方法还包括向受试者联合施用有效量的第二药物，其中本文公开的抗 CD47 抗体或其片段是第一药物。在一个实施方案中，第二药物是用于治疗相关疾病的化疗剂、放疗剂或者生物大分子药物。在一个实施方案中，该生物大分子药物例如是通过 T 细胞识别攻击肿瘤细胞的各种单克隆抗体药，例如利妥昔单抗、西妥昔单抗与曲妥珠单抗。如本文所用的表述“第二药物”并不意味着它是指第一药物之外的唯一药物。因此，第二药物不必是一种药物，而可以是构成或包含多于一种这类药物。

在一些实施方案中，受试者或个体是哺乳动物，优选地人。

在一些实施方案中，本发明提供的抗 CD47 抗体或其抗原结合片段可以有效促进巨噬细胞的吞噬作用。

在一个优选的实施方案中，与对照抗体相比，本发明提供的抗 CD47 抗体或其抗原结合片段令人惊讶地能够有效抑制肿瘤的生长。

在一个更优选的实施方案中，本发明提供的抗 CD47 抗体或其抗原结合片段在体外能够有效促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力，这是完全出乎意料的，也是现有技术中从未报道过的。

在一方面中，本发明涉及检测样品中 CD47 蛋白的方法，所述方法包括(a)将样品与本文所述的任何抗 CD47 抗体或其片段接触；和(b)检测抗 CD47 抗体或其片段和 CD47 蛋白间的复合物的形成。在某些实施方案中，CD47 是人 CD47。在一个实施方案中，该检测方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中，抗 CD47 抗体被用于选择适合利用抗 CD47 抗体的治疗的受试者。在一个实施方案中，抗 CD47 抗体是被可检测地标记的。

在另一方面，本发明涉及确定癌症疗法的有效性的方法，包括测量在治疗前后来自受试者样品中的表达 CD47 的癌症细胞的数目的步骤，治疗后表达 CD47 的癌症细胞减少表明该疗法有效。

本发明还涵盖本文所述的任何实施方案的任意组合。本文所述的任何实施方案或其任何组合适用于本文所述的发明的任何和所有抗 CD47 抗体或其片段、方法和用途。

附图说明：

图 1. 抗 CD47 抗体的细胞水平亲和力检测。

图 2. 抗 CD47 抗体的细胞水平亲和力检测。

图 3. 流式细胞术测定本发明的抗体对 SIRPα 与 CHO 细胞上表达的 CD47 的结合的阻断。

图 4. 流式细胞术测定本发明的抗体对 SIRPα 与 CHO 细胞上表达的 CD47 的结合的阻断。

图 5. 本发明的抗体促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力检测。

图 6. 本发明的抗体促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力检测。

图 7. 本发明抗 CD47 抗体促进红细胞凝集活性检测结果。

发明详述

1.1 定义

在下文详细描述本发明前，应理解本发明不限于本文中描述的特定方法学、方案和试剂，因为这些可以变化。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案，而并不意图限制本发明的范围，其仅会由所附权利要求书限制。除非另外定义，本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

为了解释本说明书，将使用以下定义，并且只要适当，以单数形式使用的术语也可以包括复数，并且反之亦然。要理解，本文所用的术语仅是为了描述具体的实施方案，并且不意欲是限制性的。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5%的下限和比

指定数字数值大 5%的上限的范围内的数字数值。

术语“保守取代”是指一个氨基酸经相同类别内的另一氨基酸取代，例如一个酸性氨基酸经另一酸性氨基酸取代，一个碱性氨基酸经另一碱性氨基酸取代，或一个中性氨基酸经另一中性氨基酸取代。示例性的取代如下表 I 所示：

表 I

原始残基	示例性置换	优选的置换
Ala (A)	Val；Leu；Ile	Val
Arg (R)	Lys；Gln；Asn	Lys
Asn (N)	Gln；His；Asp，Lys；Arg	Gln
Asp (D)	Glu；Asn	Glu
Cys (C)	Ser；Ala	Ser
Gln (Q)	Asn；Glu	Asn
Glu (E)	Asp；Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn；Gln；Lys；Arg	Arg
Ile (I)	Leu；Val；Met；Ala；Phe；正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸；Ile；Val；Met；Ala；Phe	Ile
Lys (K)	Arg；Gln；Asn	Arg
Met (M)	Leu；Phe；Ile	Leu
Phe (F)	Trp；Leu；Val；Ile；Ala；Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val；Ser	Ser
Trp (W)	Tyr；Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp；Phe；Thr；Ser	Phe
Val (V)	Ile；Leu；Met；Phe；Ala；正亮氨酸	Leu

术语“抗体”在本文中以最广意义使用并且涵盖多种抗体结构物，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)和抗体片段，只要它们显示出所需的抗原结合活性即可。完整抗体通常将包含至少两条全长重链和两条全长轻链，但在某些情况下可包括较少的链，例如骆驼中天然存在的抗体可仅包含重链。

如本文所用的术语“抗原结合部分”指与靶抗原特异性结合的部分。该术语包括能够与靶抗原特异性结合的抗体以及其他天然分子(例如受体，配体)或合成分子(例如，DARPin)。在一个优选的实施方案中，本发明抗体的抗原结合部分是抗体片段。

术语“全长抗体”、“完好抗体”和“完整抗体”在本文中可互换地用来指一种抗体，所述抗体具有基本上与天然抗体结构相似的结构或具有含有如本文定义的 Fc 区的重链。

如本文所用，术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指具有单一氨基酸组成的抗体分子的制备物，而不指其产生的方法。单克隆抗体或其抗原结合片段可以例如通过杂交瘤技术、重组技术、噬菌体展示技术、合成技术例如 CDR 嫁接、或此类或其它本领域已知的技术的组合来产生。

如本文所用，术语“结合”和“特异性结合”指抗体或抗原结合部分在体外测定法中，优选地在采用纯化的野生型抗原的生物光干涉测量（ForteBio）中与抗原表位结合。在某些实施方案中，在抗体或抗原结合部分优选地识别蛋白质和/或大分子的复杂混合物中其靶抗原时，将抗体或抗原结合部分称作特异性结合抗原。

取决于其重链恒定区的氨基酸序列，将抗体以“类”划分：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，并且这些类别中的几种可以进一步划分成亚类，如，IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4、IgA1 以

及 IgA2。对应于不同抗体类的重链恒定区分别称作 α、δ、ε、γ 和 μ。可以在全部五个抗体类中找到的轻链恒定区(CL)称作 κ 和 λ。在全长轻链和重链内，通常可变区和恒定区由约 12 个或更多个氨基酸的“J”区连接，且重链还包括约 10 个以上氨基酸的“D”区。参见例如 Fundamental Immunology，Ch.7(Paul，W.编辑，第二版，Raven Press，N.Y.(1989))(其为所有目的以其整体在此引作参考)。每一轻链/重链对的可变区通常形成抗原结合位点。

术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域通常具有相似的结构，其中每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个互补决定区。(参见，例如，Kindt 等 Kuby Immunology，6th ed.，W.H.Freeman and Co.91 页(2007))。单个 VH 或 VL 结构域可以足以给予抗原结合特异性。此外，可以使用来自与特定抗原结合的抗体的 VH 或 VL 结构域来分离结合所述抗原的抗体，以分别筛选互补 VL 或 VH 结构域的文库。参见，例如，Portolano 等，J.Immunol.150: 880-887(1993)；Clarkson 等，Nature 352: 624-628(1991)。

可变区通常表现出由三个高变区连接的相对保守的构架区(FR)的相同的一般结构，所述高变区也被称为“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”。通常通过构架区定位(align)来自每对的两条链的 CDR，所述 CDR 使得可结合特异性表位。两条轻链和重链可变区从 N-末端到 C-末端通常包含结构域 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”或“高变区”（在本文中与超变区“HVR”可以互换使用），是抗体可变区中主要负责与抗原表位结合的氨基酸区域。重链和轻链的 CDR 通常被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3，从 N-端开始顺序编号。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 被称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 被称作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

本领域公知多种用于在一个给定的 VH 或 VL 氨基酸序列中确定其 CDR 序列的方案：Kabat 互补决定区（CDR）是基于序列变异性确定的并且是最常用的(Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))，而 Chothia 指的是结构环的位置 (Chothia 等人, (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917； Chothia 等人(1989) Nature 342: 877-883)， AbM HVR 是 Kabat HVR 和 Chothia 结构环之间的折中，并且由 Oxford Molecular 的 AbM 抗体建模软件使用，“接触性”(Contact)HVR 基于对可获得的复杂晶体结构的分析。根据不同的 CDR 确定方案，这些 HVR 中的每一个 HVR/CDR 的残基如下所述。

CDR	Kabat 方案	AbM 方案	Chothia 方案	Contact 方案
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
HCDR1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Kabat 编号系统)				
HCDR1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia 编号系统)				

HCDR2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

(Kabat 编号系统)

本发明抗体的 CDR 可以根据本领域的任何方案或其组合及人为评估确定边界。

具有不同特异性(即，针对不同抗原的不同结合位点)的抗体具有不同的 CDR。然而，尽管 CDR 在抗体与抗体之间是不同的，但是 CDR 内只有有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。使用 Kabat, Chothia, AbM 和 Contact 方法中的至少两种，可以确定最小重叠区域，从而提供用于抗原结合的“最小结合单位”。最小结合单位可以是 CDR 的一个子部分。正如本领域技术人员明了，通过抗体的结构和蛋白折叠，可以确定 CDR 序列其余部分的残基。因此，本发明也考虑本文所给出的任何 CDR 的变体。例如，在一个 CDR 的变体中，最小结合单位的氨基酸残基可以保持不变，而根据 Kabat 或 Chothia 定义的其余 CDR 残基可以被保守氨基酸残基替代。

在一些实施方案中，本发明的抗体包含与表 B 所列任一抗体的对应 CDR 相同的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个 CDR，或其变体。在一些实施方案中，本发明的抗体包含与表 B 所列任一抗体的对应重链 CDR 相同的至少一个、两个、或三个 HCDR，或其变体。在一些实施方案中，本发明的抗体包含与表 B 所列任一抗体的对应轻链 CDR 相同的至少一个、两个、或三个 HCDR，或其变体。在本文中，“对应 CDR”是指在可变区氨基酸序列中位于基本相似位置上的 CDR。在本文中，CDR 变体是已经通过至少一个，例如 1 或 2 或 3 个氨基酸取代、缺失和/或插入而修饰的 CDR，其中包含 CDR 变体的抗原结合分子基本上保持包含未修饰 CDR 的抗原结合分子的生物学特性，例如，保持至少 60%, 70%, 80%, 90%, 或 100%的生物学活性(例如抗原结合能力)。可以理解，各 CDR 可以单独修饰或组合修饰。优选地，氨基酸修饰为氨基酸取代，尤其是保守氨基酸取代，例如说明书中所列出的优选保守氨基酸置换。

“抗体片段”是指不同于完整抗体的分子，其包含完整抗体的部分，所述部分结合完整抗体结合的抗原。

“亲和力”是指分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间全部非共价相互作用总和的强度。除非另有说明，在用于本文时，“结合亲和力”指反映结合对的成员(例如抗体与抗原)之间 1：1 相互作用的内在结合亲和力。分子 X 对其配偶体 Y 的亲和力通常可用平衡解离常数(K_D)来表述，平衡解离常数是解离速率常数和结合速率常数(分别是 k_{dis} 和 k_{on})的比值。亲和力可通过本领域知道的常用方法来测量，包括现有技术已知以及本文中所描述的那些。

当术语“竞争”用于竞争相同表位的抗原结合蛋白(例如中和抗原结合蛋白或中和抗体)的情况中时，意指在抗原结合蛋白之间竞争，其通过以下测定法来测定：在所述测定法中，待检测的抗原结合蛋白(例如抗体或其免疫学功能片段)防止或抑制(例如降低)参考抗原结合蛋白(例如配体或参考抗体)与共同抗原(例如 CD47 或其片段)的特异性结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗原结合蛋白是否与另一种竞争，这些测定例如：固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见例如 Stahli 等，1983，Methods in Enzymology 9：242-253)。通常所述测定法涉及使用结

合荷有未标记的检测抗原结合蛋白及标记的参考抗原结合蛋白任一种的固态表面或细胞的纯化的抗原。通过测量在所测抗原结合蛋白存在下结合固态表面或细胞的标记的量来测量竞争性抑制。通常所测抗原结合蛋白过量存在。由竞争性测定(竞争抗原结合蛋白)鉴定的抗原结合蛋白包括：结合与参考抗原结合蛋白同一表位的抗原结合蛋白；和结合充分接近参考抗原结合蛋白的结合表位的邻近表位的抗原结合蛋白，所述两个表位在空间上互相妨碍发生结合。在本文实施例中提供关于用于测定竞争性结合的方法的其它详细资料。通常当竞争的抗原结合蛋白过量存在时，其将抑制(例如降低)至少 40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或 75%或更多参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合。在某些情况下，结合被抑制至少 80-85%、85-90%、90-95%、95-97%或 97%或更多。

“人抗体”指具有这样的氨基酸序列的抗体，所述氨基酸序列对应于这样抗体的氨基酸序列，所述抗体由人或人细胞生成或来源于非人来源，其利用人抗体库或其它人抗体编码序列。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

“人共有框架”是指这样的框架，即在选择人免疫球蛋白 VL 或 VH 框架序列中，其代表最常出现的氨基酸残基。一般而言，对人免疫球蛋白 VL 或 VH 序列的选择是从可变结构域序列的亚型中选择。一般而言，该序列的亚型是如 Kabat 等，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第五版，NIH Publication 91-3242，Bethesda MD(1991)，1-3 卷中的亚型。在一个实施方案中，对于 VL，该亚型是如 Kabat 等(见上文)中的亚型 κ I。在一个实施方案中，对于 VH，该亚型是如 Kabat 等(见上文)中的亚型 III。

“人源化”抗体是指包含来自非人 HVR 的氨基酸残基和来自人 FR 的氨基酸残基的嵌合抗体。在一些实施方案中，人源化抗体将包含基本上所有的至少一个、通常两个可变结构域，其中所有或基本上所有的 HVR(例如，CDR)对应于非人抗体的那些，并且所有或基本上所有的 FR 对应于人抗体的那些。人源化抗体任选可以包含至少一部分的来源于人抗体的抗体恒定区。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经进行了人源化的抗体。

术语“双抗体(diabodies)”指具有两个抗原结合位点的抗体片段，所述片段在相同的多肽链(VH-VL)中包含与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。通过使用因为太短而不能在相同链上的两个结构域之间配对的接头，迫使所述结构域与另一条链的互补结构域配对从而产生两个抗原结合位点。双抗体可以是二价的或双特异性的。双抗体更充分地描述于例如 EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson 等，Nat.Med.9：129-134 (2003)；和 Hollinger 等，美国国家科学院学报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 90：6444-6448(1993)中。三抗体和四抗体同样描述于 Hudson 等，Nat.Med. 9：129-134(2003)中。

“效应子功能”指那些可归于抗体 Fc 区且随抗体同种型而变化的生物 学活性。抗体效应子功能的实例包括：C1q 结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)；Fc 受体结合；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；吞噬作用；细胞表面受体(例如 B 细胞受体)下调；和 B 细胞活化。

术语“有效量”、“治疗有效量”指本发明的抗体或抗原结合片段这样的量或剂量，其以单一或多次剂量施用患者后，在治疗的受试者中产生预期效果，这包括受试者病症的改善（例如，一个或多个症状的改善）和/或症状进展的延迟等。“有效量”、“治疗有效量”也可以指足够降低 CD47 信号的量(参见例如 Yamauchi 等，2013 Blood, Jan 4. ;Soto-Pantoja 等，2013 Expert Opin Ther Targets , 17: 89-103 ; Irandoust 等，2013 PLoS

One, Epub Jan 8 ;Chao 等， 2012 Curr Opin Immunol , 24:225-32 ;Theocharides 等，2012 J Exp Med, 209 (1 0) : 1883-99)，例如为足够降低巨噬细胞中由 CD47/SIRPα 信号轴上的 CD47/SIRPα相互作用生成的吞噬细胞抑制信号的抗体量，即本发明的抗体促进了巨噬细胞介导的对表达 CD47 的细胞的吞噬作用。

在一个实施方式中，相比较于对照，有效量的本发明 CD47 抗体可以促进/提高巨噬细胞的吞噬作用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 100%。

有效量可以由作为本领域技术人员的主治医师通过考虑以下多种因素来容易地确定：诸如哺乳动物的物种；它的大小、年龄和一般健康；涉及的具体疾病；疾病的程度或严重性；个体患者的应答；施用的具体抗体；施用模式；施用制剂的生物利用率特征；选择的给药方案；和任何伴随疗法的使用。

如上所述，在某些情况下，抗体及其靶抗原之间的相互作用会干扰靶标的功能。给药所需的量进一步取决于抗体对其特异抗原的结合亲和力，还取决于在接受给药的受试者中给予的抗体清除的速率。作为非限制性示例，本发明的抗体或抗体片段的治疗有效剂量的常见范围为从约 0.lmg/kg 体重至约 l00mg/kg 体重。在一些实施方式中，以 0.lmg/kg、0.5mg/kg、lmg/ kg、2mg/kg、5mg/kg、l0mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、50mg/kg、75mg/kg、l00mg/kg 或更高的剂量将本发明的抗体给予受试者。常见的剂量频率范围是例如每天两次至每周一次、每两周一次，每三周一次，每一月一次、每二月一次、每三月一次、每半年一次。

本文所用术语“阻断”表示存在本发明的抗体时减少的 CD47 信号传递。CD47 介导的信号传递阻断指本发明的 CD47 抗体存在时 CD47 信号传递水平低于 CD47 的对照水平(即不存在抗体时的 CD47 信号传递水平)，降低的幅度大于或等于 5% 、10% 、20% 、25% 、30% 、40% 、50% 、60% 、70% 、75% 、80% 、90% 、95% 、99% 或 100%。可使用多种标准技术测量 CD47 信号传递水平，如作为非限制性实施例，测量下游基因激活和/或响应 CD47 激活的荧光素酶报告试验。本领域技术人员应理解可使用多种试验测量 CD47 信号传递水平，包括例如市售可得的试剂盒。

术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可交换地使用且是指其中引入外源核酸的细胞，包括这种细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，其包括初级转化的细胞和来源于其的后代，而不考虑传代的数目。后代在核酸含量上可能与亲本细胞不完全相同，而是可以包含突变。本文中包括与在最初转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变体后代。

术语“细胞毒性剂”用在本发明中指抑制或防止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。

术语“载体”当在本文中使用时是指能够增殖与其相连的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及结合到已经引入其的宿主细胞的基因组中的载体。一些载体能够指导与其可操作相连的核酸的表达。这样的载体在本文中被称为“表达载体”。

“免疫缀合物”是与一个或多个异源分子(包括但不限于细胞毒性剂)缀合的抗体。

“个体”或“受试者”包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于，家养动物(例如，牛，羊，猫，狗和马)，灵长类动物(例如，人和非人灵长类动物如猴)，兔，以及啮齿类动物(例如，小鼠和大鼠)。在一些实施方案中，个体或受试者是人。

“分离的”抗体是这样的抗体，其已经与其天然环境的组分分离。在一些实施方案中，将抗体纯化至超过95％或99％纯度，如通过例如电泳(例如，SDS-PAGE，等电聚焦(IEF)，毛细管电泳)或层析(例如，离子交换或反相HPLC)确定的。对于用于评估抗体纯度的方法的综述，参见，例如，Flatman等，J.Chromatogr.B848：79-87(2007)。

“分离的”核酸是指这样的核酸分子，其已经与其天然环境的组分分离。分离的核酸包括包含在通常包含该核酸分子的细胞中的核酸分子，但是该核酸分子存在于染色体外或在不同于其天然染色体位置的染色体位置处。

“分离的编码抗CD47抗体或其抗原结合片段的核酸”是指一个或多个核酸分子，其编码抗体重和轻链(或其抗原结合片段)，包括在单一载体或分开的载体中的这样的核酸分子，以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置处的这样的核酸分子。

相对于参比多肽序列的“百分比(％)氨基酸序列同一性”定义为在将所述序列进行比对(并在必要时导入空位)以获取最大百分比序列同一性，且不将任何保守取代视为序列同一性的部分之后，候选序列中的氨基酸残基与参比多肽序列中的相同氨基酸残基的百分比。可使用本领域各种方法进行序列比对以便测定百分比氨基酸序列同一性，例如，使用公众可得到的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以决定测量比对的适宜参数，包括对所比较的序列全长获得最大比对所需的任何算法。

当在本申请中提到序列同一性的百分比时，若未另外特别指出，这些百分比相对于较长序列的全长计算。相对于较长序列的全长计算适用于核酸序列和多肽序列两者。

术语“血红细胞”和“红细胞”是同义词并可互换使用。

术语“凝集”表示细胞结块，而术语“血凝反应”表示特定的一类细胞(即血红细胞)结块。因此，血凝反应是凝集的一种类型。

1.2 本发明的抗CD47抗体

除非另外说明，术语“整联蛋白相关蛋白(IAP)”、“CD47”当用于本文中时是指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物如灵长类动物(例如人)和啮齿类动物(例如，小鼠和大鼠))的任何天然CD47，除非另有说明。该术语涵盖“全长”未加工的CD47以及由细胞内加工产生的任何形式的CD47或其任何片段。该术语还包括天然存在的CD47的变体，例如，剪接变体或等位变体。

术语“抗CD47抗体”、“抗CD47”、“CD47抗体”或“结合CD47的抗体”是指这样的抗体，所述抗体能够以足够的亲合力结合CD47蛋白或其片段以致所述抗体可以用作靶向CD47中的诊断剂和/或治疗剂。在一个实施方案中，抗CD47抗体与不相关的、非CD47蛋白结合的程度低于所述抗体与CD47结合的约10％，如例如通过放射性免疫测定(RIA)测量的。在一些实施方案中，本文提供的抗CD47的抗体的解离常数(K_D)≤1μM，≤100nM，≤10nM，≤1nM，≤0.1nM，≤0.01nM，或≤0.001nM(例如10^{-8}M以下，例如10^{-8}M至10^{-13}M，例如10^{-9}M至10^{-13}M)。

在一些实施方案中，本发明的抗CD47抗体或其抗原结合片段包含取代、插入或缺失。在优选的实施方案中，取代、插入或缺失发生在CDR外的区域(例如在FR中)，并且基本上保持改变之前的抗体分子的生物学特性，在一个实施方案中，保持改变前抗体的至少60%，70%，80%，90%，或100%的生物学活性(例如抗原结合能力)。任选地，本发明的抗

CD47 抗体包括对轻链可变区、重链可变区、轻链或重链的翻译后修饰，所述修饰不导致抗体变体丧失对抗原的结合，但任选地可以赋予诸如提高的抗原亲和力和不同的效应子功能等性质。

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

在某些实施方案中，可在本文中所提供抗体的 Fc 区中引入一个或多个氨基酸修饰，以此产生 Fc 区变体。Fc 区变体可包含在一或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如取代)的人 Fc 区序列(例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区)。

在某些实施方案中，可能需要产生经半胱氨酸工程改造的抗体，例如“硫代 MAb”，其中抗体的一或多个残基经半胱氨酸残基取代。

在某些实施方案中，本文中所提供的抗体可进一步经修饰为含有本领域中已知且轻易获得的其他非蛋白质部分。适合抗体衍生作用的部分包括，但不限于，水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括，但不限于，聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二烷、聚-1,3,6-三烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、及葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇、及其混合物。

在一些实施方案中，本发明涵盖抗 CD47 抗体的片段。抗体片段的实例包括但不限于 Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、$F(ab')_2$、双抗体、线性抗体、单链抗体分子(例如 scFv)；和由抗体片段形成的多特异性抗体。木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段，称为“Fab”片段，各自具有单一抗原结合位点，和残留的“Fc”片段，其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生 $F(ab')_2$ 片段，其具有两个抗原结合位点并且仍然能够交联抗原。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD47 抗体是人源化抗体。用于使抗体人源化的不同方法是技术人员已知的，如由 Almagro&Fransson 综述的，其内容通过提述完整并入本文(Almagro JC 和 Fransson J(2008)Frontiers inBioscience13:1619-1633)。Almagro&Fransson 区分理性办法和经验办法。理性办法的特征在于生成少数工程化抗体变体并评估其结合或任何其它感兴趣的特性。如果设计的变体不产生预期的结果，那么启动新一轮的设计和结合

评估。理性办法包括 CDR 嫁接、表面重建(Resurfacing)、超人源化(Superhumanization) 和人字符串内容优化(Human StringContent Optimization)。相比之下，经验办法基于生成大的人源化变体库并使用富集技术或高通量筛选选出最佳克隆。因而，经验办法依赖于能够对大量抗体变体进行搜索的可靠的选择和/ 或筛选系统。体外展示技术，如噬菌体展示和核糖体展示满足这些要求并且是技术人员公知的。经验办法包括 FR 库、导向选择(Guided selection)、框架改组(Framework-shuffling) 和 Humaneering。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD47 抗体是人抗体。可使用本领域中已知的各种技术来制备人抗体。人抗体一般描述于 van Dijk 和 van de Winkel，Curr.Opin.Pharmacol 5 ：368-74(2001) 以及 Lonberg，Curr.Opin.Immunol 20 ： 450-459(2008)。

可通过在组合文库中筛选具有所需活性的抗体来分离本发明抗体。举例来说，本领域中已知多种用于产生噬菌体展示文库并且在这些文库中筛选具有所需结合特征的抗体的方法。这些方法于例如 Hoogenboom 等人，Methods in Molecular Biology 178 ： 1-37(O′Brien 等人编，人 Press，Totowa，NJ，2001) 中评述，并且进一步于例如 McCafferty 等人，Nature348 ： 552-554 ； Clackso 等人，Nature 352 ： 624-628(1991) ； Marks 等人，J.Mol.Biol.222 ： 581-597(1992) ； Marks 及 Bradbury，Methods in Molecular Biology248 ：161-175(Lo 编，Human Press，Totowa，NJ，2003) ； Sidhu 等人，J.Mol.Biol.338(2) ：299-310(2004) ； Lee 等人，J.Mol.Biol340(5) ： 1073-1093(2004) ； Fellouse，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34) ： 12467-12472(2004) ； 以及 Lee 等人，J.Immunol.Methods284(1-2) ： 119-132(2004) 中描述。

适用于本发明的“抗体及其抗原结合片段”包括但不限于多克隆、单克隆、单价、双特异性、异缀合物、多特异性、重组、异源、异源杂合、嵌合、人源化(特别是嫁接有 CDR 的)、去免疫的、或人的抗体、Fab 片段、Fab'片段、$F(ab')_2$ 片段、由 Fab 表达库产生的片段、Fd、Fv、二硫化物连接的 Fv(dsFv)、单链抗体(例如 scFv)、双抗体或四抗体(Holliger P. 等(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90(14),6444-6448)、纳米抗体(nanobody)(也称为单域抗体)、抗独特型(抗 Id)抗体(包括例如针对本发明抗体的抗 Id 抗体)和上述任一种的表位结合片段。

在一些实施方案中，本发明的抗体可以是单特异性的、双特异性或多特异性的。多特异性单抗可以对一种靶多肽的不同表位是特异性的或可以含有对超过一种靶多肽特异性的抗原结合域。参见例如，Tutt 等(1991)J.Immunol.147:60-69。抗 CD47 单抗可以与另一种功能性分子(例如另一种肽或蛋白质)连接或共表达。例如抗体或其片段可以功能性与一或多种其它分子，如另一种抗体或抗体片段连接(例如通过化学偶联、遗传融合、非共价联合或以其它方式)以产生具有第二或更多结合特异性的双特异性或多特异性抗体。

在一些实施方案中，本发明的抗体结合人 CD47 蛋白。

1.3 本发明的核酸以及包含其的宿主细胞

在一方面，本发明提供了编码以上任何抗 CD47 抗体或其片段的核酸。所述核酸可以编码包含抗体的轻链可变区和/或重链可变区的氨基酸序列，或包含抗体的轻链和/或重链的氨基酸序列。

在一个实施方案中，提供包含所述核酸的一个或多个载体。在一个实施方案中，载体是表达载体。

在一个实施方案中，提供包含所述载体的宿主细胞。用于克隆或表达编码抗体的载体的适当宿主细胞包括本文描述的原核或真核细胞。例如，抗体可在细菌中产生，特别当不需要糖基化和 Fc 效应子功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达，见，例如，美国专利号 5,648,237，5,789,199 和 5,840,523，还见 Charlton，Methods in Molecular Biology，卷 248(B.K.C.Lo，编辑，Humana Press，Totowa，NJ，2003)，第 245-254 页，其描述抗体片段在大肠杆菌中的表达)。在表达后，抗体可以从可溶级分中的细菌细胞糊状物分离，并且可以进一步纯化。

在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。例如，真核微生物诸如丝状真菌或酵母是关于编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主，包括真菌和酵母菌株，其糖基化途径已经进行“人源化”，导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见 Gerngross，Nat.Biotech.22：1409-1414(2004)，和 Li 等，Nat.Biotech.24：210-215(2006)。适于表达糖基化抗体的宿主细胞也衍生自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。也可以将脊椎动物细胞用作宿主。例如，可以使用被改造以适合于悬浮生长的哺乳动物细胞系。有用哺乳动物宿主细胞系的其它实例是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7)；人胚肾系(293 或 293 细胞，如例如 Graham 等，J.Gen Virol. 36 ： 59(1977) 中所描述的) 等。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞，包括 DHFR-CHO 细胞(Urlaub 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77 ： 216(1980)) ；以及骨髓瘤细胞系如 Y0，NS0 和 Sp2/0。关于适合产生抗体的某些哺乳动物宿主细胞系的综述见例如 Yazaki 和 Wu，Methods in Molecular Biology，卷 248 (B.K.C.Lo，ed.，Humana Press，Totowa，NJ)，第 255-268 页(2003)。

在一个实施方案中，提供了制备抗 CD47 抗体的方法，其中所述方法包括，在适合抗体表达的条件下，培养包含编码所述抗体的核酸的宿主细胞，如上文所提供的，和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体。为了重组产生抗 CD47 抗体，分离编码抗体(例如上文所描述的抗体)的核酸，并插入一个或多个载体，用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸易于使用常规规程分离和测序(例如通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针进行)。

1.4 药物组合物和药物制剂

本发明还提供了包括一种或多种结合 CD47 或其免疫活性片段的单克隆抗体的药物组合物。应理解，本发明提供的抗 CD47 抗体或药物组合物可以整合至制剂中合适的运载体、赋形剂和其他试剂以联合给药，从而提供改善的转移、递送、耐受等。

术语“药物组合物”指这样的制剂，其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在，并且不包含对施用所述制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

术语“药用载体”指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的))、赋形剂或媒介物。

用于本文时，“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转已存在的症状、病症、病况或疾病的进展或严重性，以及避免相关疾病的复发。

在一些实施方案中，本发明还涵盖与治疗性模块，如细胞毒性剂或免疫抑制剂缀合的抗 CD47 单克隆抗体(“免疫缀合物”)。细胞毒性剂包括任何对细胞有害的药剂。适合于形成免疫缀合物的细胞毒性剂（例如化疗剂）的例子是本领域中已知的，参见例如

WO05/103081。例如，细胞毒性剂包括但不限于：放射性同位素(例如，At^{211}，I^{131}，I^{125}，Y^{90}，Re^{186}，Re^{188}，Sm^{153}，Bi^{212}，P^{32}，pb^{212}和 Lu 的放射性同位素)；化疗剂或药物(例如，甲氨蝶呤(methotrexate)，阿霉素(adriamicin)，长春花生物碱(vinca alkaloids)(长春新碱(vincristine)，长春碱(vinblastine)，依托泊苷(etoposide))，多柔比星(doxorubicin)，美法仑(melphalan)，丝裂霉素(mitomycin)C，苯丁酸氮芥(chlorambucil)，柔红霉素(daunorubicin)或其它嵌入剂)；生长抑制剂；酶及其片段如核酸水解酶；抗生素；毒素如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物起源的酶促活性毒素，包括其片段和/或变体；和已知的各种抗肿瘤或抗癌剂。

本发明还包括包含抗 CD47 抗体的组合物(包括药物组合物或药物制剂)和包含编码抗 CD47 抗体的多核苷酸的组合物。在某些实施方案中，组合物包含一种或多种结合 CD47 的抗体或一种或多种编码一种或多种结合 CD47 的抗体的多核苷酸。这些组合物还可以包含合适的药用载体，如本领域中已知的药用赋形剂，包括缓冲剂。

本发明的药物组合物可包括本发明的抗体和药用载体。这些药物组合物可包括于试剂盒中，如诊断试剂盒。

适用于本发明的药用载体可以是无菌液体，如水和油，包括那些具有石油、动物、植物或合成起源的，如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用药物组合物时，水是优选的载体。还可以将盐水溶液和水性右旋糖以及甘油溶液用作液体载体，特别是用于可注射溶液。合适的药用赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石、氯化钠、干燥的脱脂乳、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。对于赋形剂的使用及其用途，亦参见“Handbook of PharmaceuticalExcipients”，第五版，R.C.Rowe,P.J.Seskey 和 S.C.Owen,PharmaceuticalPress,London,Chicago。若期望的话，所述组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂，或 pH 缓冲剂。这些组合物可以采用溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、粉末、持续释放配制剂等的形式。口服配制剂可以包含标准载体，如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精。

可以通过将具有所需纯度的本发明的抗 CD47 抗体与一种或多种任选的药用载体(Remington’s Pharmaceutical Sciences，第 16 版，Osol，A. 编(1980)) 混合来制备包含本文所述的抗 CD47 抗体的药物制剂，优选地以冻干制剂或水溶液的形式。

示例性的冻干抗体制剂描述于美国专利号 6,267,958。水性抗体制剂包括美国专利号 6,171,586 和 WO2006/044908 中所述的那些，后一种制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲剂。

本发明的药物组合物或制剂还可以包含超过一种活性成分，所述活性成分是被治疗的特定适应证所需的，优选具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些活性成分。例如，理想的是还提供他汀类物质。所述活性成分以对于目的用途有效的量合适地组合存在。

可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半渗透基质，所述基质呈成形物品，例如薄膜或微囊形式。

1.5 抗体的治疗方法和用途

在一方面中，本发明涉及在受试者中抑制、拮抗 CD47 与 SIRPα 结合的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的本文所述的任何抗 CD47 抗体或其片段。在另一方面中，本发明涉及促进受试者的吞噬细胞的吞噬作用的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的

本文所述的任何抗 CD47 抗体或其片段。在一方面中，本发明涉及治疗以 CD47 为治疗靶点的相关疾病的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的本文所述的任何抗 CD47 抗体或其片段。在一方面中，本发明涉及可以通过消除、抑制或降低 CD47 与 SIRPα 的结合而改善、减缓、抑制或预防的任何疾病或病症的方法。在另一方面，本发明通过向有需要的受试者施用本发明的抗 CD47 抗体或其片段而提供治疗受试者癌症或者肿瘤的方法、缓解受试者癌症或者肿瘤症状的方法、避免受试者肿瘤或者癌症复发的方法。

在一方面，本发明提供的抗 CD47 抗体及其抗原结合片段和包含其的药物组合物可以用作治疗剂，用于诊断、预后、监控、治疗、缓和和/或预防受试者中异常 CD47 的表达、活性和/或信号传递相关的疾病和病症。通过使用标准方法鉴定受试者中存在异常 CD47 的表达、活性和/或信号传递相关的疾病和病症时，可以给药本发明公开的抗 CD47 抗体及其抗原结合片段和包含其的药物组合物。

在其他方面，本发明提供抗 CD47 抗体在生产或制备药物中的用途，所述药物用于治疗上文提及的相关疾病或病症。

在某些实施方案中，本文所述的方法和用途还包括向所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂，例如化疗剂、放疗剂或者生物大分子药物。在一个实施方案中，该生物大分子药物例如是通过 T 细胞识别攻击肿瘤细胞的各种单克隆抗体药，例如利妥昔单抗、西妥昔单抗与曲妥珠单抗。

上述联合疗法包括组合给药(其中两种以上治疗剂被包含在相同或分开的制剂中)和分别给药，其中，本发明的抗 CD47 抗体的给药可以发生在另外的治疗剂和/或佐剂的给药前、同时和/或之后。

本发明的抗体(以及任何另外的治疗剂)可以通过任何合适的方法给药，包括肠胃外给药，肺内给药和鼻内给药，并且，如果局部治疗需要，病灶内给药。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给药。在一定程度上根据用药是短期或长期性而定，可通过任何适合途径，例如通过注射，例如静脉内或皮下注射用药。本文中涵盖各种用药时程，包括但不限于，单次给药或在多个时间点多次给药、推注给药及脉冲输注。

为了预防或治疗疾病，本发明的抗体的合适剂量(当单独或与一种或多种其他另外的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重性和进程、所述抗体是以预防目的施用还是以治疗目的施用、以前的治疗、患者的临床病史和对所述抗体的应答，和主治医师的判断力。所述抗体以一次治疗或经过一系列治疗合适地施用于患者。

在另一方面，本发明的抗体可以用于体内或者体外检测与 CD47 相关的疾病的治疗的进程，例如，通过测量表达 CD47 的细胞（例如癌症细胞）的数目的增加或者减少，可以确定是否某种特定的旨在治疗疾病、缓解症状的疗法是否有效。

多数 CD47 抗体被报道引起人红细胞的血凝反应。血凝反应是同型相互作用的一个示例，其中使用二价 CD47 结合实体处理后引起两个表达 CD47 的细胞聚合或凝集。例如，作为一种全 IgG 或 $F(ab')_2$， CD47 抗体 MABL 被报道能够引起红细胞的血凝反应，且仅当 MABL 变为 scFv 或二价 scFv 时该作用减弱 (参见例如 Uno S、Kinoshita Y、Azuma Y 等，Antitumor activity of a monoclonal antibody against CD47 in xenograft models of human leukemia , Oncol Rep 2007 ; 17: 1189 – 94; Kikuchi Y、Uno S、Yoshimura Y 等，A bivalent single-chain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells, Biochem Biophys

Res Commun 2004; 315: 912 - 8)。其他已知的 CD47 抗体(包括 B6H12、BRC126 和 CC2C6)也会引起 RBC 的血凝反应。因此，细胞的凝集是使用现有的全 IgG 抗体治疗性地靶向 CD47 的主要限制。

鉴于现有技术中公开的大部分阻断 CD47 与 SIPRα 相互作用以促进吞噬作用的抗体会引起显著的细胞凝集问题，目前仍然迫切需要获得不仅能够有效促进巨噬细胞的吞噬作用而且不导致细胞凝集的新的抗 CD 47 抗体。本申请公开的抗体满足了这方面的需求，其不仅可以有效促进吞噬作用，甚至具有优异的抗肿瘤生长和使肿瘤消失的作用，而且同时本申请公开的抗 CD47 抗体在治疗的同时并不显著引起细胞的凝集作用，因而同时具有显著降低的副作用。

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

1.6 用于诊断和检测的方法和组合物

在某些实施方案中，本文中提供的任何抗 CD47 抗体或其抗原结合片段可以用于检测 CD47 在生物样品中的存在。术语“检测”用于本文中时，包括定量或定性检测。在某些实施方案中，生物样品是血、血清或生物来源的其他液体样品。在某些实施方案中，生物样品包含细胞或组织。

在某些实施方案中，提供标记的抗 CD47 抗体。标记包括但不限于，被直接检测的标记或部分(如荧光标记、发色团标记、电子致密标记、化学发光标记和放射性标记)，以及被间接检测的部分，如酶或配体，例如，通过酶促反应或分子相互作用。示例性标记包括但不限于，放射性同位素 32P、14C、125I、3H 和 131I，荧光团如稀土螯合物或荧光素及其衍生物，罗丹明及其衍生物，丹酰(dansyl)，伞形酮(umbelliferone)，荧光素酶(luceriferase)，例如，萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶(美国专利号 4,737,456)，荧光素，2，3-二氢酞嗪二酮，辣根过氧化物酶(HR)，碱性磷酸酶，β -半乳糖苷酶，葡糖淀粉酶，溶解酶，糖类氧化酶，例如，葡萄糖氧化酶，半乳糖氧化酶，和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，杂环氧化酶如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶，加上利用过氧化氢氧化染料前体的酶如 HR，乳过氧化物酶，或微过氧化物酶(microperoxidase)，生物素/亲和素，自旋标记，噬菌体标记，稳定的自由基，等等。

以下实施例进一步说明本发明，然而，应理解实施例以说明而非限定的方式来描述，并且本领域技术人员可以进行多种修改。

1.7 本发明示例性的抗 CD47 抗体序列

表 A. 本发明示例性抗体重链和轻链 CDR 的序列

抗体名称	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
ADI-29337	GSINHYYWS (SEQ ID NO:15)	AIYYSGSTRYNPSLKS (SEQ ID NO:21)	ARGKSAFDP (SEQ ID NO:31)	RASQGISRWLA (SEQ ID NO:36)	AASSLQS (SEQ ID NO:39)	QQADLHPPLT (SEQ ID NO:41)
ADI-29338	GSISSYYWS (SEQ ID NO:16)	TIYYSGSTRYNPSLKS (SEQ ID NO:22)				
ADI-29339	GSISHYYWS (SEQ ID NO:17)	VIYYSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:23)				
ADI-29342	GSIMHYYWS (SEQ ID NO:18)	YIYYSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:24)	ARGKTGSAA (SEQ ID NO:32)			QQTVSFPIT (SEQ ID NO:42)
ADI-29345	GSISHYYWS (SEQ ID NO:17)	YIYYSGVTTYNPSLKS (SEQ ID NO:25)	ARGKTGSTA (SEQ ID NO:33)			
ADI-29347	GSIANYYWS (SEQ ID NO:19)	YTYFSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:26)	ARGKTGSAA (SEQ ID NO:32)			
ADI-26655	GSISSYYWS (SEQ ID NO:16)	YIYYSGSTTYNPSLKS (SEQ ID NO:27)	ARKKRFFDL (SEQ ID NO:34)	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:37)	KASSLES (SEQ ID NO:40)	QQVKSYSPLT (SEQ ID NO:43)
ADI-29350	GSIEHYYWS (SEQ ID NO:20)	YIYYSGFTEYNPSLKS (SEQ ID NO:28)				
ADI-26660	GSISSYYWS (SEQ ID NO:16)	SIYYSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:29)	ARKQKHFDI (SEQ ID NO:35)	RASQGISSWLA (SEQ ID NO:38)	AASSLQS (SEQ ID NO:39)	QQVNHHPWT (SEQ ID NO:44)
ADI-29362	GSIEHYYWS (SEQ ID NO:20)	AIYYSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:30)				
	GSIX_1X_2YYWS(其中 X_1 选自 N、S、	X_1IYX_2SGX_3TX_4YNPSLKS(其中 X_1 选自 A、T、V、Y 或 S;		RASQX_1ISX$_2$WLA(其中 X_1 选自 S 或 G; X_2	X_1ASSLX$_2$S(其中 X_1 选自 A 或	

	M、A 或 E；X_2 选自 H、S 或 N）(SEQ ID NO:69)	X_2 选自 Y 或 F；X_3 选自 V、F 或 S；X_4 选自 R、T、N 或 E）(SEQ ID NO:70)		选自 S 或 R）(SEQ ID NO:71)	K；X_2 选自 Q 或 E）(SEQ ID NO:72)	

表 B. 本发明示例性抗体重链可变区和轻链可变区的序列

ADI 名称	VH DNA	VH 蛋白质	VL DNA	VL 蛋白质
ADI-29337	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAATCATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGGCGATCTATTACAGTGGGAGCACCCGGTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGGGGTAAGAGTGCATTCGACCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID NO:55)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSINHYYWSWIRQPPGKGLEWIGAIYYSGSTRYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGKSAFDPWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO: 45)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAGCAGGCAGACCTCCACCCTCCTCTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAG(SEQ ID NO:73)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLHPPLTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO: 65)
ADI	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCT	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSY	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAG	

-2	GCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACT	YWSWIRQPPGKGLE	GAGACAGAGTCACCATCACTTGT	
93	ACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAG	WIGTIYYSGSTRYNPS	CGGGCGAGTCAGGGTATTAGCA	
38	GGACTGGAGTGGATTGGGACGATCTATTACAGT	LKSRVTISVDTSKNQF	GGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAG	
	GGGAGCACCCGGTACAACCCCTCCCTCAAGAG	SLKLSSVTAADTAVY	AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGC	
	TCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAA	YCARGKSAFDPWGQ	TCCTGATCTATGCTGCATCCAGTT	
	CCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGC	GTLVTVSS(SEQ ID	TGCAAAGTGGGGTCCCATCAAG	
	CGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGGG	NO: 46)	GTTCAGCGGCAGTGGATCTGGG	
	GTAAGAGTGCATTCGACCCATGGGGACAGGGT		ACAGATTTCACTCTCACCATCAG	
	ACATTGGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID NO:56)		CAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTG	
A	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACT	QVQLQESGPGLVKPS	CAACTTATTACTGTCAGCAGGCA	
DI	GGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCT	ETLSLTCTVSGGSISH	GACCTCCACCCTCCTCTCACTTT	
-2	GCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTCATTACT	YYWSWIRQPPGKGLE	TGGCGGAGGGACCAAGGTTGAG	
93	ACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAG	WIGVIYYSGSTNYNPS	ATCAAA(SEQ ID NO:74)	
39	GGACTGGAGTGGATTGGGGTGATCTATTATAGT	LKSRVTISVDTSKNQF		
	GGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAG	SLKLSSVTAADTAVY		
	TCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAA	YCARGKSAFDPWGQ		
	CCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGC	GTLVTVSS(SEQ ID		
	CGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGGG	NO: 47)		
	GTAAGAGTGCATTCGACCCATGGGGACAGGGT			
	ACATTGGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID NO:57)			
A	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACT	QVQLQESGPGLVKPS	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC	DIQMTQSPSS
DI	GGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCT	ETLSLTCTVSGGSIMH	ATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAG	VSASVGDRV
-2	GCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCATGCATTACTA	YYWSWIRQPPGKGLE	GAGACAGAGTCACCATCACTTGT	TITCRASQGI
93	CTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGG	WIGYIYYSGSTNYNPS	CGGGCGAGTCAGGGTATTAGCA	SRWLAWYQ
42	GACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTG	LKSRVTISVDTSKNQF	GGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAG	QKPGKAPKL
	GGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGT	SLKLSSVTAADTAVY	AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGC	LIYAASSLQS
	CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAAC	YCARGKTGSAAWGQ	TCCTGATCTATGCTGCATCCAGTT	GVPSRFSGSG
	CAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCC	GTLVTVSS(SEQ ID	TGCAAAGTGGGGTCCCATCAAG	SGTDFTLTISS
	GCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGGGG	NO: 48)	GTTCAGCGGCAGTGGATCTGGG	LQPEDFATYY

	TAAGACGGGATCTGCCGCATGGGACAGGGTA CATTGGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID NO:58)		ACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTG	CQQTVSFPIT FGGGTKVEI
A	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACT	QVQLQESGPGLVKPS	CAACTTATTACTGTCAGCAGACA	K(SEQ ID NO:
DI	GGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCT	ETLSLTCTVSGGSISH	GTCTCCTTCCCTATCACTTTTGGC	66)
-2	GCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTCATTACT	YYWSWIRQPPGKGLE	GGAGGGACCAAGGTTGAGATCA	
93	ACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAG	WIGYIYYSGVTTYNPS	AA(SEQ ID NO: 75)	
45	GGACTGGAGTGGGATTGGGTATATCTATTACAGT	LKSRVTISVDTSKNQF		
	GGGGTTACCACTTACAACCCCTCCCTCAAGAGT	SLKLSSVTAADTAVY		
	CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAAC	YCARGKTGSTAWGQ		
	CAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCC	GTLVTVSS(SEQ ID		
	GCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGGGG	NO: 49)		
	TAAGACGGGATCTACCGCATGGGGACAGGGTA			
	CATTGGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID NO:59)			
A	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACT	QVQLQESGPGLVKPS		
DI	GGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCT	ETLSLTCTVSGGSIAN		
-2	GCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCGCTAATTACTA	YYWSWIRQPPGKGLE		
93	CTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGG	WIGYTYFSGSTNYNP		
47	GACTGGAGTGGGATTGGGTATACCTATTTTAGTG	SLKSRVTISVDTSKNQ		
	GGAGTACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGT	FSLKLSSVTAADTAVY		
	CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAAC	YCARGKTGSAAWGQ		
	CAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCC	GTLVTVSS(SEQ ID		
	GCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGGGG	NO: 50)		
	TAAGACGGGATCTGCCGCATGGGGACAGGGTA			
	CATTGGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID NO:60)			
A	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACT	QVQLQESGPGLVKPS	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC	DIQMTQSPST
DI	GGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCT	ETLSLTCTVSGGSISSY	TTCCACCCTGTCTGCATCTGTAG	LSASVGDRV
-2	GCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACT	YWSWIRQPPGKGLE	GAGACAGAGTCACCATCACTTG	TITCRASQSIS
66	ACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAG	WIGYIYYSGSTTYNPS	CCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTA	SWLAWYQQ
55	GGACTGGAGTGGGATTGGGTATATCTATTACAGT	LKSRVTISVDTSKNQF	GCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAG	KPGKAPKLLI

	GGGAGCACCACGTACAACCCCTCCTCAAGAG TCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAA CCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGC CGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAA AGAAAAGATTCTTCGACCTATGGGGCCAGGGA ACAACTGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID NO: 61)	SLKLSSVTAADTAVY YCARKKRFFDLWGQ GTTVTVSS(SEQ ID NO: 51)	AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGC TCCTGATCTATAAAGCCTCCAGT TTGGAAAGTGGGGTCCCATCAA GGTTCAGCGGCAGTGGATCTGG GACAGAATTCACTCTCACCATCA GCAGCCTGCAGCCTGATGATTTT GCAACTTATTACTGCCAGCAGGT CAAAAGTTACTCTCCTCTCACTT TTGGCGGAGGGACCAAGGTTGA GATCAAA (SEQ ID NO: 76)	YKASSLESG VPSRFSGSGS GTEFTLTISSL QPDDFATYY CQQVKSYSP LTFGGGTKV EIK(SEQ ID NO: 67)
A	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACT	QVQLQESGPGLVKPS		
DJ	GGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCT	ETLSLTCTVSGGSIEH		
-2	GCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCGAGCATTACT	YYWSWIRQPPGKGLE		
93	ACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAG	WIGYIYYSGFTEYNPS		
50	GGACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGT	LKSRVTISVDTSKNQF		
	GGGTTTACCGAGTACAACCCCTCCTCAAGAGT	SLKLSSVTAADTAVY		
	CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAAC	YCARKKRFFDLWGQ		
	CAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCC	GTTVTVSS(SEQ ID		
	GCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAAA	NO: 52)		
	GAAAAGATTCTTCGACCTATGGGGCCAGGGAA			
	CAACTGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID NO:62)			
A	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACT	QVQLQESGPGLVKPS	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC	DIQMTQSPSS
DJ	GGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCT	ETLSLTCTVSGGSISSY	ATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAG	VSASVGDRV
-2	GCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACT	YWSWIRQPPGKGLE	GAGACAGAGTCACCATCACTTGT	TITCRASQGI
66	ACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAG	WIGSIYYSGSTNYNPS	CGGGCGAGTCAGGGTATTAGCA	SSWLAWYQ
60	GGACTGGAGTGGATTGGGTCAATCTATTACAGT	LKSRVTISVDTSKNQF	GCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAG	QKPGKAPKL
	GGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAG	SLKLSSVTAADTAVY	AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGC	LIYAASSLQS
	TCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAA	YCARKQKHFDIWGQ	TCCTGATCTATGCTGCATCCAGTT	GVPSRFSGSG
	CCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGC	GTMVTVSS(SEQ ID	TGCAAAGTGGGGTCCCATCAAG	SGTDFTLTISS
	CGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAA	NO: 53)	GTTCAGCGGCAGTGGATCTGGG	LQPEDFATYY
	AGCAAAAAACACTTCGACATATGGGGTCAGGGT		ACAGATTTCACTCTCACCATCAG	CQQVNHHP
	ACAATGGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID NO:63)		CAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTG	WTFGGGTKV
A	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACT	QVQLQESGPGLVKPS	CAACTTATTACTGTCAGCAGGTA	EIK(SEQ ID

DI-29362	GGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCGAGCATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGGCGATCTATTACTCGGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAAAGCAAAAACACTTCGACATATGGGGTCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID NO:64)	ETLSLTCTVSGGSIEHYYWSWIRQPPGKGLEWIGAIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKQKHFDIWGQGTMVTVSS(SEQ ID NO: 54)	AATCACCACCCTTGGACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:77)	NO: 68)

表 C. 本发明序列表中部分序列对应的编号。

ADI 名称	重链					轻链					重链 HC	轻链 LC
	重链可变区 VH					轻链可变区 VL						
	VH CDR1 (SEQ ID NO)	VH CDR2 (SEQ ID NO)	VH CDR3 (SEQ ID NO)	VH DNA (SEQ ID NO)	VH Pro. (SEQ ID NO)	VL CDR1 (SEQ ID NO)	VL CDR2 (SEQ ID NO)	VL CDR3 (SEQ ID NO)	VL DNA (SEQ ID NO)	VL Pro. (SEQ ID NO)		
ADI-29337	15	21	31	55	45	36	39	41	73	65	1	2
ADI-29338	16	22		56	46				74		3	
ADI-29339	17	23		57	47						4	
ADI-29342	18	24	32	58	48			42	75	66	5	6
ADI-29345	17	25	33	59	49						7	
ADI-29347	19	26	32	60	50						8	
ADI-26655	16	27	34	61	51	37	40	43	76	67	9	10
ADI-29350	20	28		62	52						11	
ADI-26660	16	29	35	63	53	38	39	44	77	68	12	13
ADI-29362	20	30		64	54						14	

本发明抗体的重链、轻链的全长氨基酸序列

ADI29337

HC 氨基酸序列（SEQ ID NO: 1 ）

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSINHYYWSWIRQPPGKGLEWIGAIYYSGSTRYNPS
LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGKSAFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

LC 氨基酸序列（SEQ ID NO: 2 ）

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLHPPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ADI29338

HC 氨基酸序列（SEQ ID NO: 3 ）

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGTIYYSGSTRYNPSL
KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGKSAFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPG

ADI29339

HC 氨基酸序列（SEQ ID NO:4）

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISHYYWSWIRQPPGKGLEWIGVIYYSGSTNYNPS
LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGKSAFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG

ADI29342

HC 氨基酸序列（SEQ ID NO:5）

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIMHYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPS
LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGKTGSAAWGQGTLVTVSSASTKGPSV

FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG

LC 氨基酸序列（SEQ ID NO:6）
DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTVSFPITFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ADI 29345
HC 氨基酸序列（SEQ ID NO:7）
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISHYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGVTTYNPS
LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGKTGSTAWGQGTLVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG

ADI 29347
HC 氨基酸序列（SEQ ID NO:8）
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIANYYWSWIRQPPGKGLEWIGYTYFSGSTNYNPS
LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGKTGSAAWGQGTLVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG

ADI 26655
HC 氨基酸序列（SEQ ID NO:9）
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTTYNPSL
KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKKRFFDLWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPG

LC 氨基酸序列（SEQ ID NO:10）
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFS
GSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQVKSYSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ADI 29350
HC 氨基酸序列（SEQ ID NO:11）
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIEHYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGFTEYNPS
LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKKRFFDLWGQGTTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG

ADI 26660
HC 氨基酸序列（SEQ ID NO:12）
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTNYNPS
LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKQKHFDIWGQGTMVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

LC 氨基酸序列（SEQ ID NO:13）
DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVNHHPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ADI 29362
HC 氨基酸序列（SEQ ID NO:14）
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIEHYYWSWIRQPPGKGLEWIGAIYYSGSTNYNPS
LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKQKHFDIWGQGTMVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

CD47 蛋白的氨基酸序列（SEQ ID NO: 78）
MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKF
KGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTR
EGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVI
TVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAV
VGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVE

关于附图中出现的阴性对照的序列如下:
IgG1 HC:
MGWSLILLFLVAVATRVLSEVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPG
KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPG
WYAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（SEQ ID NO:79）

IgG1 LC
MDFQVQIISFLLISASVIMSRGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPG
KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（SEQ ID NO:80）

实施例

实施例 1. 抗 CD47 抗体以及对照抗体的生产和纯化

本发明示例的 10 个抗体（ADI-29337、ADI-29338、ADI-29339、ADI-29342、ADI-29345、ADI-29347、ADI-26655、ADI-29350、ADI-26660、ADI-29362）的 CDR 区、轻链可变区和重链可变区、轻链和重链的氨基酸序列，以及对应的核苷酸序列在本申请说明书及“序列表”部分列出。另外，上述本发明示例抗体的轻链、重链、轻链可变区和重链可变区的序列编号如表 1 所示。在酵母细胞中表达并且纯化本发明的抗体。

酵母中的表达和纯化:

基于酵母的抗体展示(yeast-based antibody presentation)文库(Adimab)，按照现有的方法（WO2009036379; WO 2010105256; W02012009568）进行扩增，其中每个库的多样性达到 1×10^9。简言之，前两轮的筛选使用 Miltenyi 公司的 MACS 系统进行磁性激活细胞分选。首先，将文库的酵母细胞（~1×10^{10} 细胞/文库）分别在 FACS 洗涤缓冲液中（磷酸盐缓冲液，含有 0.1%牛血清蛋白）室温孵化 15 分钟，缓冲液中含有 100 nM 生物素标记的 CD47 抗原（Acro Biosystems，目录号 CD7-H5227-1mg）。使用 50 ml 预冷的 FACS 洗涤缓冲液洗一次，再用 40 ml 相同洗涤缓冲液重悬细胞，并加入 500 μl 链霉素微珠（Miltenyi LS）于 4 ℃孵化 15 分钟。1000rpm 离心 5min 弃去上清后用 5 ml FACS 洗涤缓冲液重悬细胞，将细胞溶液加到 Miltenyi LS

柱中。加样完成后，用 FACS 洗涤缓冲液洗柱 3 次，每次 3 ml。从磁性区域取下 Miltenyi LS 柱，用 5 ml 生长培养基洗脱，收集洗脱的酵母细胞并在 37℃过夜生长。

使用流式细胞仪进行下一轮的分选：将经过 MACS 系统筛选获得的大约 1×10^8 的酵母细胞用 FACS 缓冲液洗三次，于含有低浓度生物素（100-1 nM）标记的 CD47 抗原中室温下培养。弃去培养液，细胞用 FACS 洗涤缓冲液洗两次之后，将细胞与 LC-FITC （FITC 标记山羊抗人免疫球蛋白 F(ab')kappa 链抗体，Southern Biotech）(1: 100 稀释)混合，并与 SA-633（链霉亲和素-633, Molecular Probes）（1:500 稀释）或 SA-PE（链霉亲和素-藻红蛋白, Sigma）(1:50 稀释)试剂混合，4℃下培养 15 分钟。用预冷的 FACS 洗涤缓冲液洗脱两次，并重悬于 0.4 ml 缓冲液中，将细胞转移到带滤器的分离管中。使用 FACS ARIA（BD Biosciences）分选细胞。

将通过筛选获得的表达抗 CD47 抗体的酵母细胞在 30℃下震荡诱导 48 小时以表达抗 CD47 的抗体。诱导结束之后，1300rpm 离心 10min 去除酵母细胞，收获上清液。使用 Protein A 对上清液中的抗 CD47 抗体进行纯化，pH2.0 醋酸溶液洗脱，收获抗 CD47 抗体，抗体纯度 >95%。使用木瓜蛋白酶消化并用 KappaSelect（GE 生命医疗集团）进行纯化可获得相应的 Fab 片段。

表 1. 本发明示例抗体的轻链、重链、轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列编号。

抗体名称	VH	VL	HC	LC
ADI-29337	45	65	1	2
ADI-29338	46	65	3	2
ADI-29339	47	65	4	2
ADI-29342	48	66	5	6
ADI-29345	49	66	7	6
ADI-29347	50	66	8	6
ADI-26655	51	67	9	10
ADI-29350	52	67	11	10
ADI-26660	53	68	12	13
ADI-29362	54	68	14	13

在 293HEK 细胞中表达并且纯化实施例中使用的下述对照抗体：

对照抗体
Hu5F9
AB6.12

Hu5F9 是在 293 HEK 细胞中瞬时表达的人 CD47 抗体，其序列与美国专利 US2015/0183874 A1 中的抗体 “5F9” 的序列相同。AB6.12 是在 293 HEK 细胞中瞬时表达的人源化 CD47 抗体，其序列与美国专利 US 9045541 中的抗体 “AB6.12” 的序列相同。

对于 293HEK 细胞中抗体的瞬时表达，使用载体 pTT5。首先将抗体的重链和轻链克隆到

单独的 pTT5 载体中。使用化学转染的方法将带有抗体分子重链和轻链的 pTT5 载体转入 293HEK 细胞中。采用的化学转染试剂为 PEI(购自 Polysciences)，按照生产产商提供的方案瞬时转染培养的293HEK。首先在超净工作台中准备质粒DNA和转染试剂，将F17培养基(Gibco)（体积为转染体积的 1/5)各一半加入 50ml 离心管中，一份加入已过滤的质粒(130 μg/100 ml)，另一半加入已过滤的 PEI(1g/L, Polysciences)（质量比(质粒：PEI)=1:3），混匀 5 min，将二者轻柔混匀 20 次，静置 15-30 min，不要超过 30min。将 DNA/PEI 混合物轻柔倒入 293HEK 细胞并混匀，在 37℃，8%CO_2 的条件下培养细胞 7 天，每 48 小时流加新鲜培养基。7 天后或者连续培养至细胞活力≤60%时，13000rpm 离心 20min。取上清液，用 Protein A 纯化上清液，使抗体的纯度＞95%。

实施例 2：本发明抗 CD47 抗体的亲和力测定

采用生物光干涉测量（ForteBio）测定法测定本发明上述 10 个示例抗体（为了排除 Fc 片段可能存在的影响，单价实验时使用 Fab 片段）结合人 CD47（hCD47）的平衡解离常数（K_D）。

ForteBio 亲和力测定按照现有的方法（Estep, P 等人，High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2): p. 270-8）进行。简言之，传感器在分析缓冲液中线下平衡 30 分钟，然后线上检测 60 秒建立基线，在线加载如上所述获得的经纯化的抗体至 AHQ 传感器（ForteBio）上进行 ForteBio 亲和测量。再将具有加载的抗体的传感器暴露于 100 nM 的 CD47 抗原中作用 5 分钟，之后将传感器转移至分析缓冲液解离 5 分钟用于解离速率测量。使用 1:1 结合模型进行动力学的分析。

在如以上测定法所述进行的实验中，ADI-29337、ADI-29338、ADI-29339、ADI-29342、ADI-29345、ADI-29347、ADI-26655、ADI-29350、ADI-26660 和 ADI-29362 亲和力如表 2 所示。

表 2：通过生物光干涉测量本发明抗体的结合

抗体	ForteBio 影像：人 CD47-Fc 在 AHQ 尖端上，Fab 形式的抗体在溶液中 (100 nM) [单价的]	ForteBio 影像：抗体在 AHQ 尖端上，人 CD47-Fc 在溶液中 (100 nM) [双价的]	ForteBio 影像：抗体在 AHQ 尖端上，食蟹猴 CD47-Fc 在溶液中 (100 nM) [双价的]	ForteBio 影像：抗体在 AHQ 尖端上，小鼠 CD47-Fc 在溶液中 (100 nM) [双价的]
ADI-29337	2.204E-09	4.04E-10	5.54E-10	1.866E-08
ADI-29338	6.07E-09	6.21E-10	5.87E-10	N.B.
ADI-29339	7.24E-09	6.28E-10	6.38E-10	1.55E-08
ADI-29342	1.17E-08	4.86E-10	5.14E-10	N.B.
ADI-29345	2.89E-09	4.03E-10	5.47E-10	N.B.
ADI-29347	1.13E-08	7.10E-10	5.62E-10	N.B.
ADI-26655	4.63E-08	8.49E-10	9.63E-10	N.B.
ADI-29350	5.04E-09	4.51E-10	5.69E-10	N.B.
ADI-26660	1.30E-07	1.35E-09	1.52E-09	N.B.
ADI-29362	8.97E-09	7.00E-10	6.55E-10	N.B.
Hu5F9	1.66E-08	4.20E-10	6.41E-10	1.266E-08

注：N.B.表示不结合

可见，本发明上述 10 个示例抗体均显示极高的亲和力，其中 ADI-29337、ADI-29338、ADI-29339、ADI-29345 和 ADI-29350 单价的亲和力分别为 2.204E-09，6.07E-09，7.24E-09，2.89E-09，5.04E-09，显著高于本领域已知、公认的优异 CD47 抗体 Hu5F9（为 1.66E-08），其他几个本发明的抗体与 Hu5F9 具有相当的亲和力。

实施例 3：本发明抗 CD47 抗体与人 CD47 的结合

在基于流式细胞术的测定法中测量本发明的上述 10 个示例抗体与人 CD47 的结合。

通过转染携带克隆至多克隆位点（MCS）的人 CD47 cDNA（Sino Biological）的 pCHO1.0 载体（Invitrogen），产生过表达人 CD47 的 CHO 细胞（CHO-hCD47 细胞）。将 CHO-hCD47 细胞（0.2×10^6 个细胞）与不同浓度的实验抗体(本发明的上述 10 个示例抗体以及 Hu5F9 和 AB6.12，最高浓度为 300nM，三倍稀释，总共测试了 11 个浓度)在含 0.1％牛血清白蛋白（BSA）的 PBS 中，冰上孵育 30 分钟。然后将细胞洗涤至少两次，并与二抗（PE 标记的羊抗人 IgG 抗体，SouthernBiotech，终浓度为 5μg/ml）在含 0.1％BSA 的 PBS 中，冰上（避光）孵育 30 分钟。将细胞洗涤至少两次并通过流式细胞术进行分析。在 Accuri C6 系统（BD Biosciences）上进行流式细胞术检测，并根据其 MFI 拟合浓度依赖的曲线。

在如以上测试法所述进行的实验中，ADI-29338、ADI-29339、ADI-29345 和 ADI-29347 结合 CHO 细胞上过表达的 hCD47，EC50 值分别为 1.566nM、1.871nM、1.496nM 和 1.815nM，其在细胞水平与 hCD47 的亲和力能力均高于对照抗体 Hu5F9(EC50 值为 1.986nM)和 AB6.12（EC50 值为 2.07nM）。ADI-29337、ADI-29342、ADI-26655、ADI-29350、ADI-26660 和 ADI-29362 结合 CHO 细胞上过表达的 hCD47，EC50 值分别为 2.945nM、2.742nM、7.65nM、4.415nM、5.735 和 2.067nM，与对照抗体 Hu5F9，AB6.12 与 CHO 细胞上过表达的 CD47 的结合能力基本一致(EC50 值分别为 1.986nM 和 2.07nM)（参见图 1 和图 2）。

实施例 4. 本发明抗 CD47 抗体对人 CD47 配体 SIRPα 与 CD47 相互作用的阻断

通过流式细胞术测量本发明的上述 10 个示例抗体阻断人 CD47 与 SIRPα 结合的能力。

将如前文实施例 3 所述制备的 0.2×10^6 个表达人 CD47 的 CHO 细胞与实验抗体（本发明的上述 10 个示例抗体以及 Hu5F9，最高浓度为 300nM，三倍稀释，总共测试了 11 个浓度）及 200nM 标记小鼠 Fc 的 SIRPα 蛋白（AcroBiosystems）在含 0.1％BSA 的 PBS 中，在冰上共孵育 30 分钟。然后将细胞洗涤 3 次，随后使用山羊抗鼠 IgG-APC（别藻青蛋白）二抗（Biolegend）在含 0.1％BSA 的 PBS 中冰上（避光）孵育 30 分钟。洗涤细胞 3 次。在 Accuri C6 系统（BD Biosciences）上进行流式细胞术检测，并且在 C6 软件上计算 MFI。

ADI-29337、ADI-29338、ADI-29339、ADI-29342、ADI-29345 和 ADI-29347 阻断人 SIRPα-APC 与 CD47 的结合的能力均略高于对照抗体 Hu5F9。ADI-26655、ADI-29350、ADI-26660 和 ADI-29362 阻断人 SIRPα-APC 与 CD47 的结合的能力与对照抗体 Hu5F9 的能力相一致。

具体而言，ADI-29337、ADI-29338、ADI-29339、ADI-29342、ADI-29345 和 ADI-29347 阻断人 SIRPα-APC 与 CD47 的结合的能力的 IC50 分别为 2.003nM、3.139nM、3.004nM、

2.694nM、2.747nM 和 2.16nM。对照抗体 Hu5F9 阻断人 SIRPα-APC 与 CD47 的结合的能力的 IC50 为 3.462nM。（参见图 3）。

ADI-26655、ADI-29350、ADI-26660 和 ADI-29362 阻断人 SIRPα-APC 与 CD47 结合的能力的 IC50 分别为 38.06nM、10.49nM、16.74nM 和 8.351nM。对照抗体 Hu5F9 阻断人 SIRPα-APC 与 CD47 的结合的能力的 IC50 分别为 3.385nM。（参见图 4）。

实施例 5. 本发明抗 CD47 抗体促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力检测

在基于流式细胞术的测定法中测量本发明的抗体（ADI-29337、ADI-29338、ADI-29339、ADI-29342、ADI-29345、 ADI-29347、ADI-26655、ADI-29350、ADI-26660 和 ADI-29362）促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力。

密度梯度离心取自捐赠者的新鲜血液，得到外周血单核细胞（PBMC）。从分离的 PBMC 中按照试剂盒（EasySep™ Human CD14 Positive Selection Kit, Steam cell）说明书纯化得到 CD14 阳性的单核细胞，加入 10ng/mL 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF，R&D Systems） 贴壁培养连续 7 天；其中在第 5 天加入 20 ng/mL 干扰素-γ（IFN-γ，AcroBiosystem）刺激 1 小时，随后再加入 100 ng/mL 脂多糖（LPS、Sigma） 刺激 48 小时，将单核细胞诱导为巨噬细胞。将靶肿瘤细胞 CCRF-CEM（购自 ATCC） 按照 CellTraceTM CFSE 试剂盒的说明，进行荧光标记。将标记好的肿瘤细胞与上述已经完成分化的巨噬细胞按照 4:1 的比例共培养，同时加入不同浓度的实验抗体在 37℃孵育 3 小时。然后将细胞洗涤至少两次，加入别藻青蛋白（allophycocyanin，APC）标记的 CD14 抗体（购自 BD），在含 0.1％BSA 的 PBS 中冰上（避光）孵育 30 分钟。将细胞洗涤至少两次并通过流式细胞术进行分析。被吞噬的细胞群体为活细胞中 CD14 阳性并且荧光染料 CFSE（carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester，羧基荧光素双乙酸盐，琥珀酰亚胺酯）也为阳性的细胞群体。

ADI-29337、ADI-29338、ADI-29339、ADI-29342、ADI-29345 和 ADI-29347 都具有很强的的促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力，其中 ADI-29337、ADI-29339 和 ADI-29347 促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力比对照抗体 Hu5F9 和 AB6.12 的能力强；ADI-29342、ADI-29345、ADI-29350 和 ADI-29362 促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力与对照抗体 Hu5F9 和 AB6.12 的能力相当；ADI-26655 和 ADI-26660 具有一定促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力（参见图 5 和图 6）。

实施例 6. 本发明的抗 CD47 抗体促进红细胞凝集活性检测

现有技术已知大多数的抗 CD47 抗体具有促进红细胞凝集的副作用，因而其治疗应用受到限制。为此，发明人进一步研究了本申请中公开的抗体的红细胞凝集作用。

检测方法如下：

采集新鲜人类血液，用 PBS 洗三次后制备成 10%人类红细胞悬液，将人类红细胞与实验抗体（最高浓度为 60ug/ml，三倍稀释，总共 11 个点）在 37°C 孵育 2-6 小时，该反应在 96 孔圆底板中进行。反应结束后拍照并判断结果。结果判定标准为如果红细胞沉于孔底，平铺呈网状，则发生了红细胞凝集反应（请参见图 7 中 Hu5F9 的结果），如果红细胞未发生凝集反应，则红细胞将呈点状沉于孔底（请参见图 7 中的对照）。

在如以上测定法所述进行的实验中，血凝反应结果如图 7 所示。由图 7 可见，ADI29337、ADI29338、ADI29339、ADI29342、ADI29345 和 ADI29362 的红细胞凝集活性很弱，其促进红细胞凝集的活性明显低于对照组 Hu5F9。可见，本申请公开的抗体具有显著降低的血细胞凝集作用，因此在临床治疗中具有显著降低的副作用，可以广泛应用于多种癌症的治疗中。

权利要求

1. 一种分离的抗 CD47 单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含

(i) 如 SEQ ID NO: 45、46 或 47 所示的重链可变区的 3 个重链 CDR，以及如 SEQ ID NO: 65 所示的轻链可变区的 3 个轻链 CDR，或者

(ii) 如 SEQ ID NO: 48、49 或 50 所示的重链可变区的 3 个重链 CDR，以及如 SEQ ID NO: 66 所示的轻链可变区的 3 个轻链 CDR，或者

(iii) 如 SEQ ID NO: 51 或 52 所示的重链可变区的 3 个重链 CDR，以及如 SEQ ID NO: 67 所示的轻链可变区的 3 个轻链 CDR，或者

(iv) 如 SEQ ID NO: 53 或 54 所示的重链可变区的 3 个重链 CDR，以及如 SEQ ID NO: 68 所示的轻链可变区的 3 个轻链 CDR。

2. 一种分离的抗 CD47 单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区的 3 个重链 CDR，以及轻链可变区的 3 个轻链 CDR，其中 HCDR1 包含选自 SEQ ID NO: 15、16、17、18、19、20 或 69 的氨基酸序列，HCDR2 包含选自 SEQ ID NO: 21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 或 70 的氨基酸序列，HCDR3 包含选自 SEQ ID NO: 31、32、33、34 或 35 的氨基酸序列，LCDR1 包含选自 SEQ ID NO: 36、37、38 或 71 的氨基酸序列，LCDR2 包含选自 SEQ ID NO: 39、40 或 72 的氨基酸序列，LCDR3 包含选自 SEQ ID NO: 41、42、43 或 44 所示的氨基酸序列。

3. 一种分离的抗 CD47 单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区和/或轻链可变区，其中

所述重链可变区包含:

（i）表 B 所列任一抗体的重链可变区中所含的三个 CDR（HCDR）;

（ii）表 A 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的组合;

（iii）HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 15、16、17、18、19、20 或 69 所示的氨基酸序列；HCDR2 包含 21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 或 70 所示的氨基酸序列；HCDR3 包含 31、32、33、34 或 35 所示的氨基酸序列；或

（iv） (i)-(iii)的 HCDR 的变体，所述变体在所述三个 CDR 区上包含一个或多个且不超过 5 个氨基酸的氨基酸取代（例如保守性取代）、缺失或插入;

和/或

所述轻链可变区包含:

（i）表 B 所列任一抗体的轻链可变区中所含的三个 CDR（LCDR）;

（ii）表 A 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的组合;

（iii）LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 36、37、38 或 71 所示的氨基酸序列；LCDR2 包含 SEQ ID NO: 39、40 或 72 所示的氨基酸序列；LCDR3 包含 SEQ ID NO: 41、42、43 或 44 所示的氨基酸序列；或

（iv）(i)-(iii)的 LCDR 的变体，所述变体在所述三个 CDR 区上包含一个或多个且不超过 5 个氨基酸的氨基酸取代（例如保守性取代）、缺失或插入。

4. 权利要求 1-3 中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含

(i) 包含权利要求 1 所述 CDR 且与 SEQ ID NO: 45、46 或 47 所示的氨基酸序列具有至少 90%同一性的重链可变区，和/或包含权利要求 1 所述 CDR 且与 SEQ ID NO: 65 所示的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的轻链可变区，或者，

(ii) 包含权利要求 1 所述 CDR 且与 SEQ ID NO: 48、49 或 50 所示的氨基酸序列具有至少 90%同一性的的重链可变区，和/或包含权利要求 1 所述 CDR 且与 SEQ ID NO: 66 所示的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的轻链可变区，或者

(iii) 包含权利要求 1 所述 CDR 且与 SEQ ID NO: 51 或 52 所示的氨基酸序列具有至少 90%同一性的重链可变区，和/或包含权利要求 1 所述 CDR 且与 SEQ ID NO: 67 所示的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的轻链可变区，或者

(iv) 包含权利要求 1 所述 CDR 且与 SEQ ID NO: 53 或 54 所示的氨基酸序列具有至少 90%同一性的重链可变区，和/或包含权利要求 1 所述 CDR 且与 SEQ ID NO: 68 所示的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的轻链可变区。

5. 权利要求 1-4 中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含：

（i）包含与 SEQ ID NO: 1、3 和 4 所示的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列的重链，和/或包含与 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列的轻链，或者

（ii）包含与 SEQ ID NO: 5、7 和 8 所示的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列的重链，和/或包含与 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列的轻链，或者

（iii）包含与 SEQ ID NO: 9 和 11 所示的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列的重链，和/或包含与 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列的轻链，或者

（iv）包含与 SEQ ID NO: 12 和 14 所示的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列的重链，和/或包含与 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列的轻链。

6. 权利要求 1 至 5 中任一项的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是人源化抗体或人抗体。

7. 权利要求 1 至 6 中任一项的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'-SH、Fv、scFv 或$(Fab')_2$ 片段。

8. 权利要求 1 至 7 中任一项的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含框架序列，其中框架序列的至少一部分是人共有框架序列。

9. 抗 CD47 单克隆抗体或其抗原结合片段，其与权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗体竞争结合 CD47，或者拮抗、阻断权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗体与 CD47 结合。

10. 分离的核酸，其编码权利要求 1 至 9 中任一项的分离的抗 CD47 单克隆抗体或其抗原结合片段。

11. 包含权利要求 10 的核酸的载体，优选地所述载体是表达载体。

12. 包含权利要求 11 的载体的宿主细胞，优选地，所述宿主细胞是原核细胞或真核细胞；更优选所述宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞，优选 CHO 细胞和 293 细胞。

13. 制备抗 CD47 单克隆抗体或其抗原结合片段的方法，包括在适于表达编码权利要求 1 至 9 中任一项的抗 CD47 单克隆抗体或其抗原结合片段的核酸的条件下培养权利要求 12 的宿主细胞，任选地分离所述单克隆抗体或其抗原结合片段。

14. 由权利要求 13 所述的方法制备的抗 CD47 单克隆抗体或其抗原结合片段。

15. 药物组合物，其包含权利要求 1 至 9 和 14 中任一项的抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，以及任选地药用载体。

16. 一种促进受试者巨噬细胞的吞噬作用的方法，包括向所述受试者施用有效量的权利要求 1 至 9 和 14 中任一项的抗 CD47 单克隆抗体或其抗原结合片段或有效量的权利要求 15 的药物组合物。

17. 一种治疗癌症或者肿瘤的方法，包括向所述受试者施用有效量的权利要求 1 至 9 和 14 中任一项的抗 CD47 单克隆抗体或其抗原结合片段或有效量的权利要求 15 的药物组合物。

18. 一种缓解癌症或者肿瘤的症状的方法，包括向有需要的受试者施用有效量的权利要求 1 至 9 和 14 中任一项的抗 CD47 单克隆抗体或其抗原结合片段或有效量的权利要求 15 的药物组合物。

19. 权利要求 16-18 中任一项的方法，其中受试者是人。

20. 权利要求 17 或 18 的方法，其中所述癌症或者肿瘤是各种血液肿瘤和实体瘤，例如急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病(CML) 、急性淋巴细胞白血病（ALL）、慢性淋巴细跑性白血病(CLL) 、非霍奇金淋巴瘤（NHL）、多发性骨髓瘤（MM）、淋巴瘤、乳腺癌、头颈癌、胃癌、肺癌、食管癌、肠癌、卵巢癌、宫颈癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌、神经胶质瘤、黑素瘤和其他实体瘤。

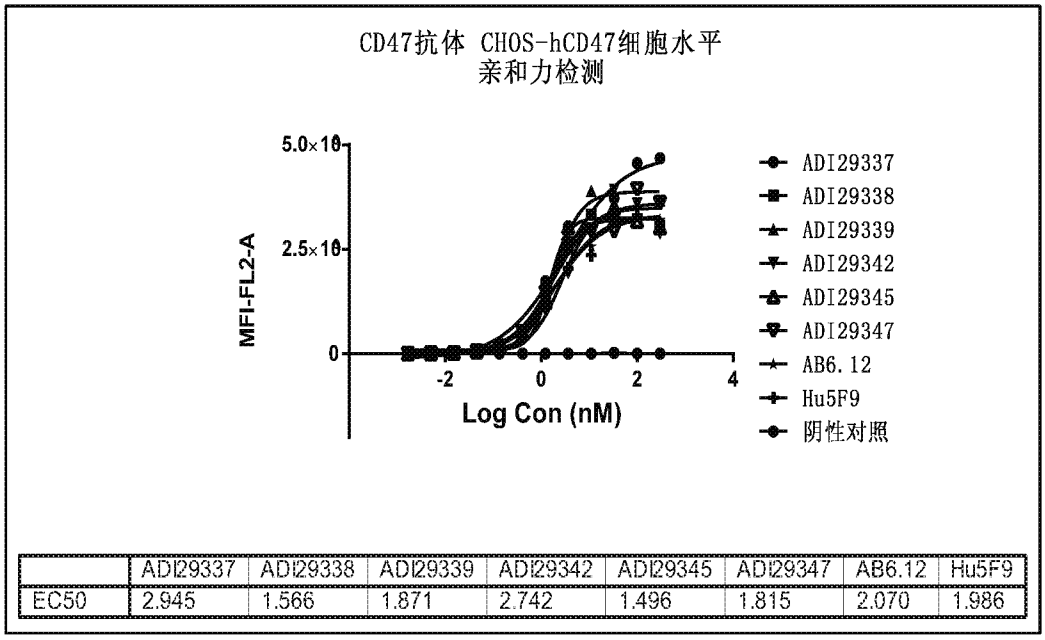
21. 权利要求 16 至 18 中任一项的方法，还包括向所述受试者施用有效量的一种或者多种其他药物，优选地，所述其他药物例如是通过 T 细胞识别攻击肿瘤细胞的各种单克隆抗体药，例如利妥昔单抗、西妥昔单抗与曲妥珠单抗。

22. 检测样品中 CD47 蛋白存在的方法，包括

(a)将所述样品与权利要求 1-9 和 14 中任一项的抗体或其抗原结合片段相接触；和

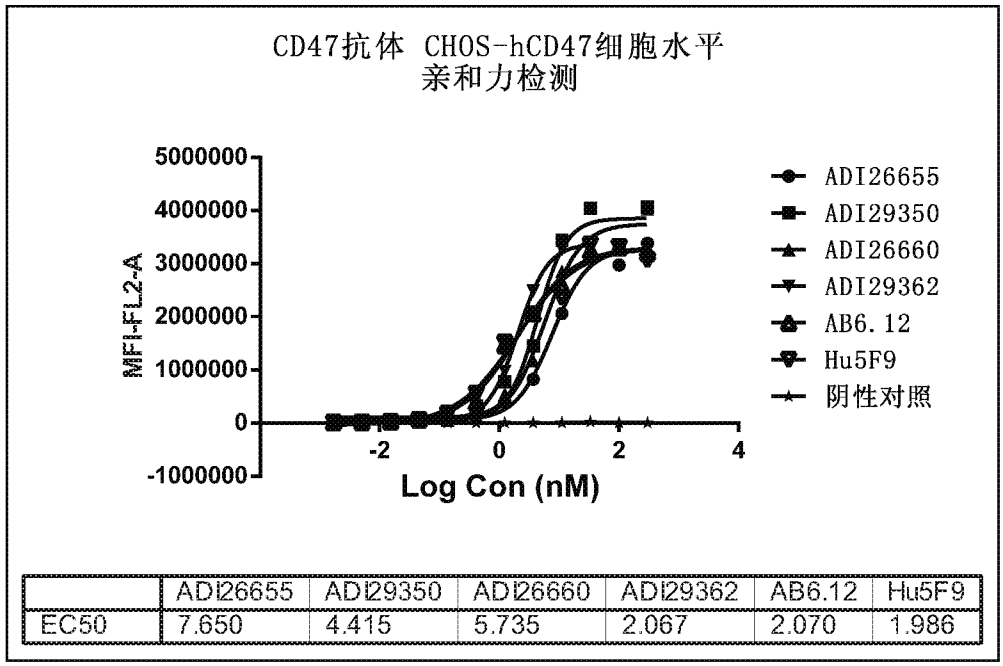
(b)检测所述抗体或其抗原结合片段和所述 CD47 蛋白之间复合物的形成。

23. 一种确定癌症疗法的有效性的方法，包括通过采用权利要求 1-9 和 14 中任一项的抗体或其抗原结合片段测量在治疗前后来自受试者样品中的表达 CD47 的癌症细胞的数目，其中治疗后表达 CD47 的癌症细胞减少表明该疗法有效。



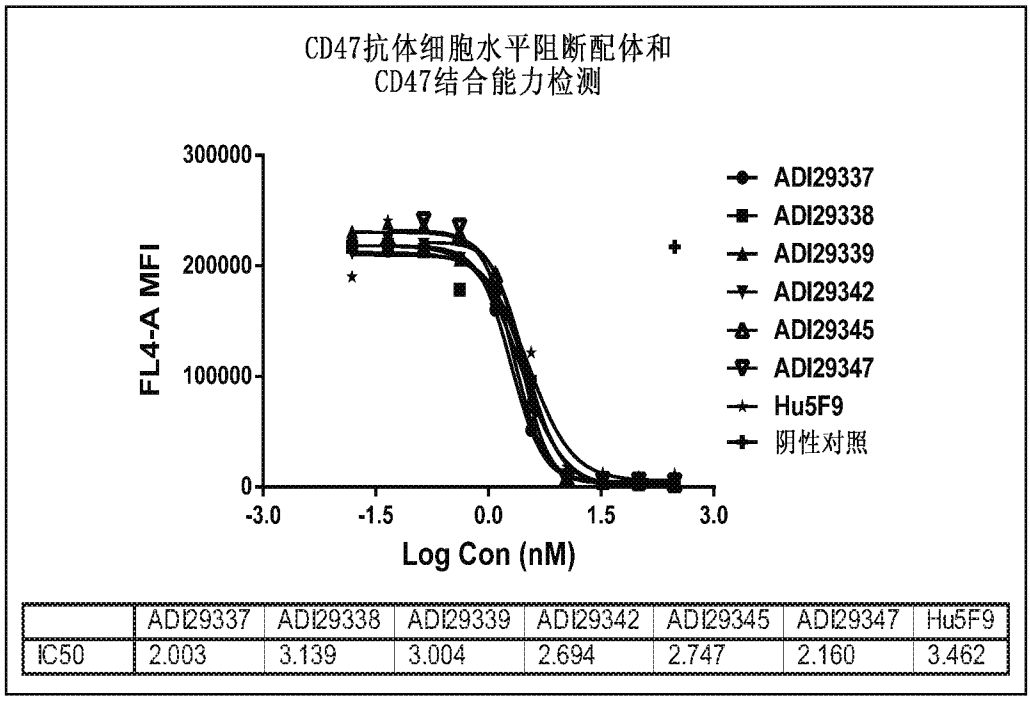
	ADI29337	ADI29338	ADI29339	ADI29342	ADI29345	ADI29347	AB6.12	Hu5F9
EC50	2.945	1.566	1.871	2.742	1.496	1.815	2.070	1.986

图 1



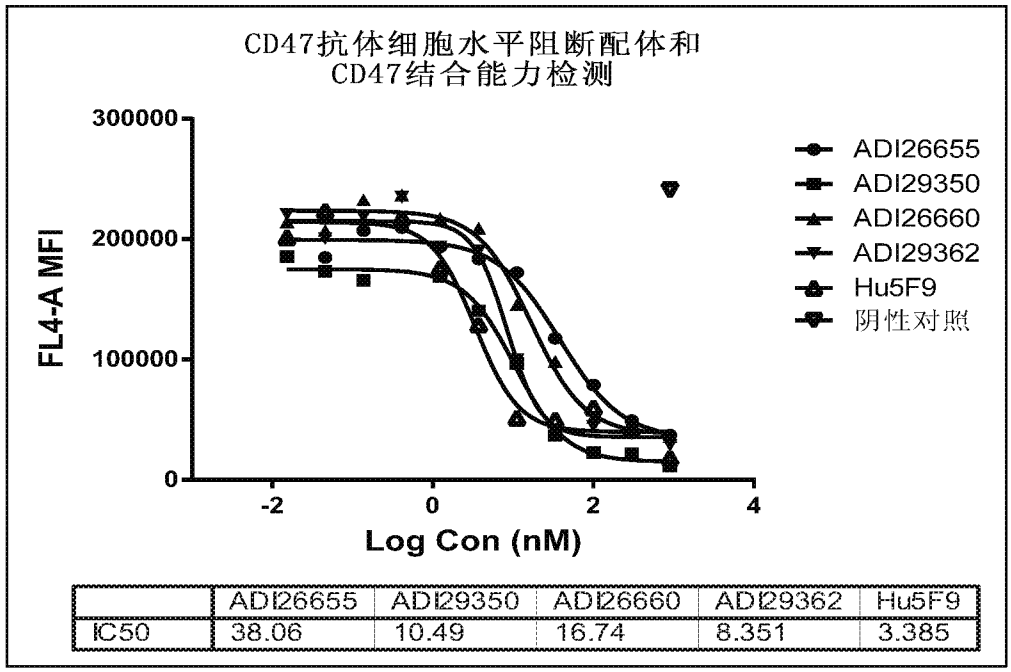
	ADI26655	ADI29350	ADI26660	ADI29362	AB6.12	Hu5F9
EC50	7.650	4.415	5.735	2.067	2.070	1.986

图 2



	ADI29337	ADI29338	ADI29339	ADI29342	ADI29345	ADI29347	Hu5F9
IC50	2.003	3.139	3.004	2.694	2.747	2.160	3.462

图 3



	ADI26655	ADI29350	ADI26660	ADI29362	Hu5F9
IC50	38.06	10.49	16.74	8.351	3.385

图 4

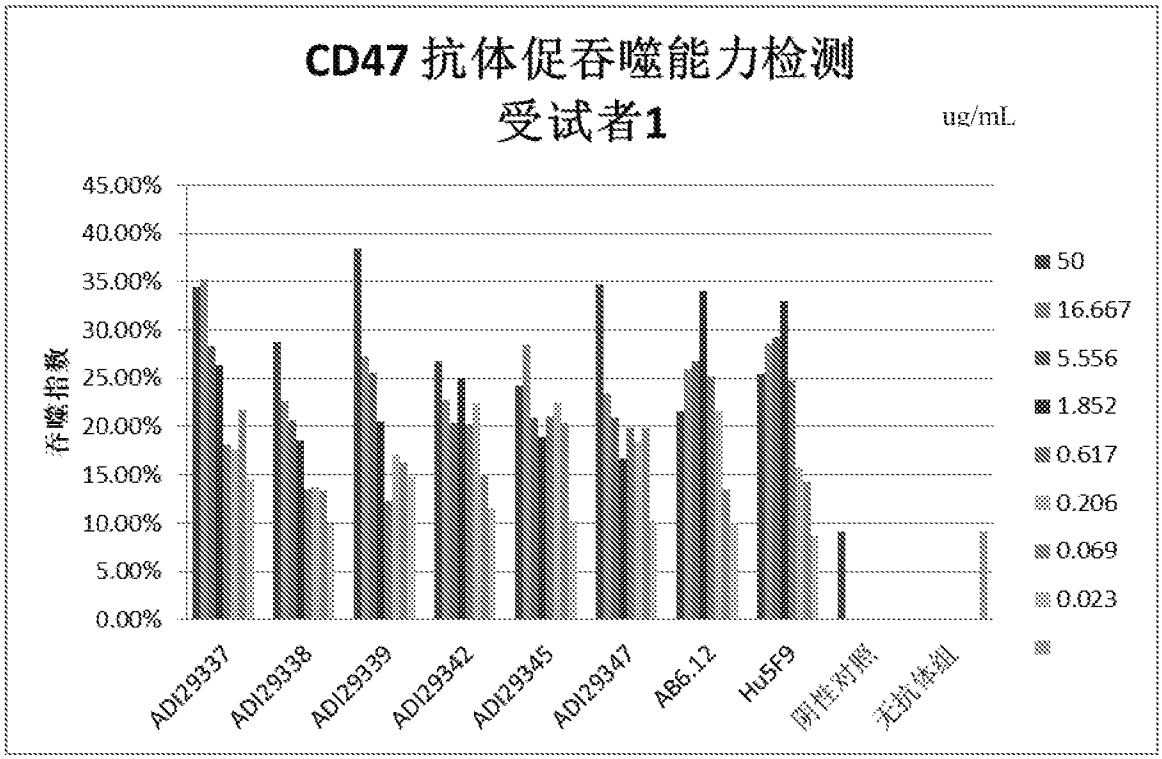

CD47 抗体促吞噬能力检测
受试者1
ug/mL
吞噬指数
45.00%
40.00%
35.00%
30.00%
25.00%
20.00%
15.00%
10.00%
5.00%
0.00%
50
16.667
5.556
1.852
0.617
0.206
0.069
0.023
ADI29337
ADI29338
ADI29339
ADI29342
ADI29345
ADI29347
AB6.12
Hu5F9
阴性对照
无抗体组

图 5

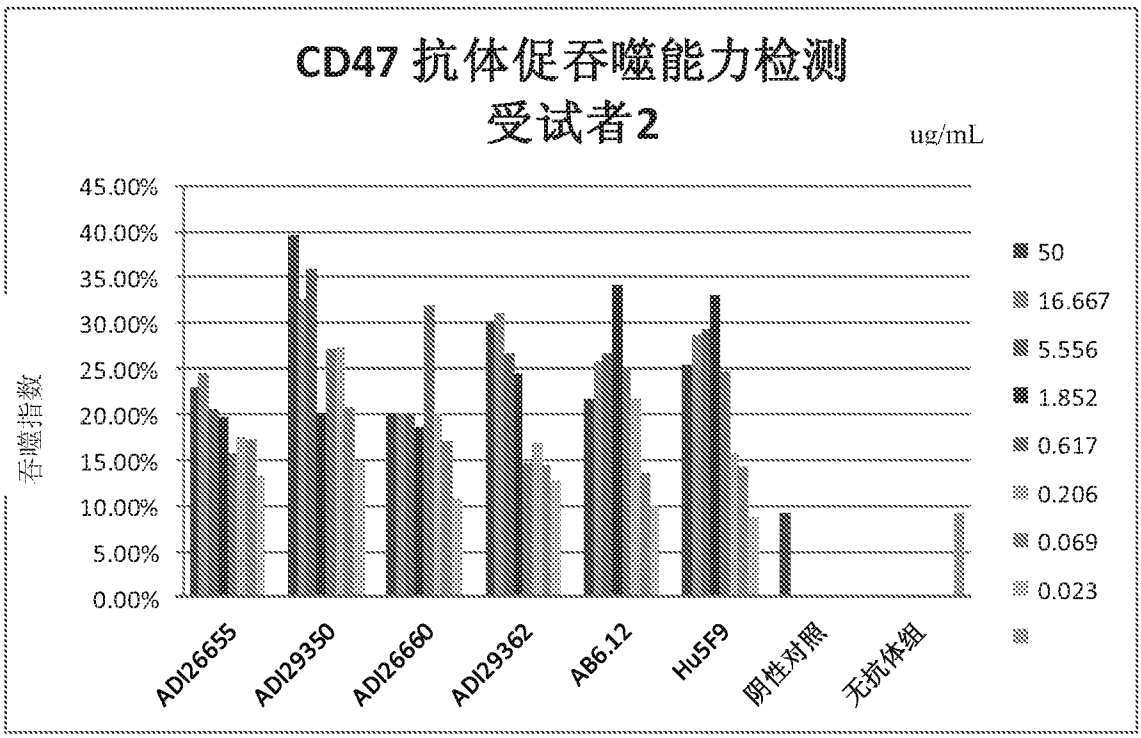

CD47 抗体促吞噬能力检测
受试者2
ug/mL
吞噬指数
45.00%
40.00%
35.00%
30.00%
25.00%
20.00%
15.00%
10.00%
5.00%
0.00%
50
16.667
5.556
1.852
0.617
0.206
0.069
0.023
ADI26655
ADI29350
ADI26660
ADI29362
AB6.12
Hu5F9
阴性对照
无抗体组

图 6

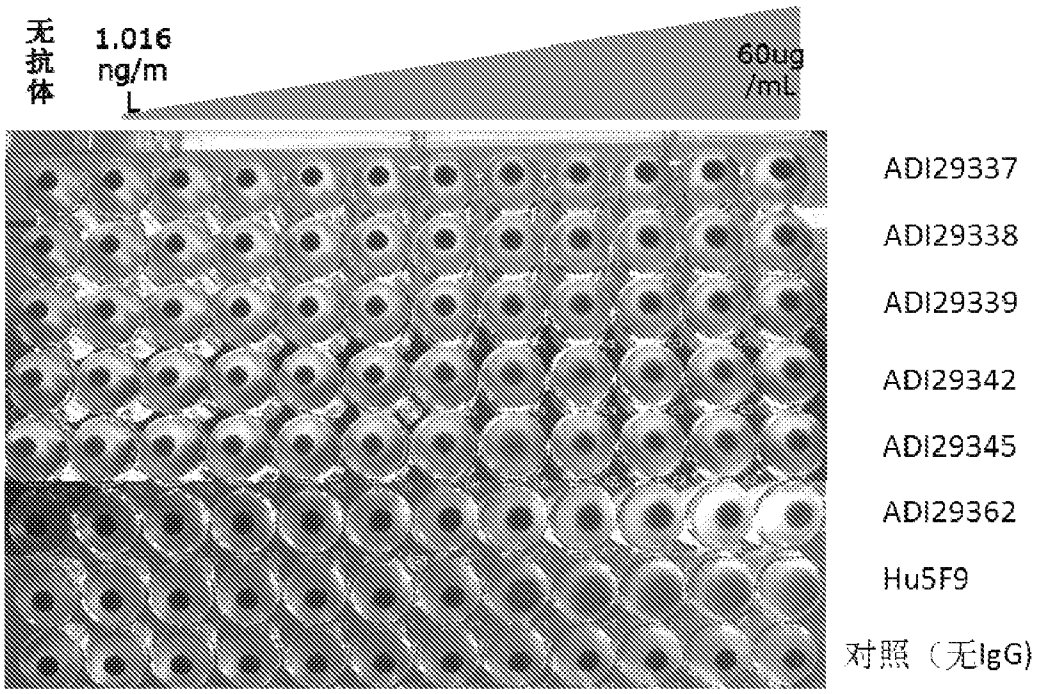

无抗体
1.016 ng/mL
60ug/mL
ADI29337
ADI29338
ADI29339
ADI29342
ADI29345
ADI29362
Hu5F9
对照（无IgG）

图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/079687

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K16; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRS, DWPI, SIPOABS, CNKI, NCBI, ISI Web of Science, GenBank和中国专利生物序列检索系统, GenBank +China Patents Biological Sequence Search System: 抗体, 单抗, antibody, monoclonal, CD47, 本申请的SEQ ID NOs: 1-68, SEQ ID NOs: 1-68 of the present application

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017049251 A2 (TIOMA THERAPEUTICS INC) 23 March 2017 (2017-03-23) entire document, in particular to abstract, claims, and embodiments	1-23
X	CN 106117354 A (ANHUI SINOBIOWAY CELL THERAPY CO LTD) 16 November 2016 (2016-11-16) entire document, in particular to abstract, claims, and description, paragraph [0072]	1-23

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 April 2019	**21 May 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
State Intellectual Property Office of the P. R, China (ISA/CN) **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/079687

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/079687

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2017049251 A2	23 March 2017	MX 2018003374 A	09 November 2018
		US 10239945 B2	26 March 2019
		IL 258168 D0	31 May 2018
		PH 12018500515 A1	29 August 2018
		AU 2016324316 A1	05 April 2018
		BR 112018005322 A2	11 December 2018
		WO 2017049251 A3	20 April 2017
		EP 3349787 A4	27 March 2019
		CN 108348589 A	31 July 2018
		EP 3349787 A2	25 July 2018
		US 2018171014 A1	21 June 2018
		CA 2998644 A1	23 March 2017
		JP 2018536624 A	13 December 2018
CN 106117354 A	16 November 2016	None	

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2019/079687

A. 主题的分类

C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K16; C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS、CPRS、DWPI、SIPOABS、CNKI、NCBI、ISI Web of Science、GenBank和中国专利生物序列检索系统:抗体，单抗，antibody，monoclonal，CD47，本申请的SEQ ID NOs：1-68

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2017049251 A2 (TIOMA THERAPEUTICS INC) 2017年 3月 23日 (2017-03-23) 全文，尤其是摘要、权利要求书和实施例	1-23
X	CN 106117354 A (ANHUI SINOBIOWAY CELL THERAPY CO LTD) 2016年 11月 16日 (2016-11-16) 全文，尤其是摘要、权利要求书和说明书第[0072]段	1-23

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 4月 28日	2019年 5月 21日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	吴永庆
传真号 (86-10)62019451	电话号码 +86-10-62089161

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/079687

第I栏　　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/079687

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2017049251	A2	2017年 3月 23日	MX	2018003374	A	2018年 11月 9日
				US	10239945	B2	2019年 3月 26日
				IL	258168	D0	2018年 5月 31日
				PH	12018500515	A1	2018年 8月 29日
				AU	2016324316	A1	2018年 4月 5日
				BR	112018005322	A2	2018年 12月 11日
				WO	2017049251	A3	2017年 4月 20日
				EP	3349787	A4	2019年 3月 27日
				CN	108348589	A	2018年 7月 31日
				EP	3349787	A2	2018年 7月 25日
				US	2018171014	A1	2018年 6月 21日
				CA	2998644	A1	2017年 3月 23日
				JP	2018536624	A	2018年 12月 13日
CN	106117354	A	2016年 11月 16日		无		