(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115192718 A
(43)申请公布日 2022.10.18

(21)申请号 202210394792.X

(22)申请日 2022.04.14

(66)本国优先权数据
202110404033.2 2021.04.14 CN

(83)生物保藏信息
CCTCC NO: C2018135 2018.06.21

(71)申请人 中山康方生物医药有限公司
地址 528437 广东省中山市火炬开发区神农路6号
申请人 康方药业有限公司

(72)发明人 李百勇 夏瑜 王忠民

(74)专利代理机构 北京科穗律师事务所 11849
专利代理师 唐文静

(51)Int.Cl.
A61K 45/06(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
A61K 31/69(2006.01)
A61K 31/7068(2006.01)

权利要求书9页 说明书51页 附图4页

(54)发明名称

抗CD47的单克隆抗体及其用途

(57)摘要

本发明涉及抗CD47的单克隆抗体及其联合单克隆抗体、双特异性抗体和/或肿瘤治疗剂的用途，所述抗CD47的单克隆抗体由保藏号为CCTCC NO:C2018135的杂交瘤细胞株分泌。

CN 115192718 A

1.药物组合物,优选用于治疗肿瘤,所述药物组合物包含组分A和组分B,其中所述组分A为特异性结合CD47的抗体或其抗原结合片段,

其中组分B选自下述的一种或多种:组分B1,组分B2和组分B3,其中组分B1为双特异性抗体或其抗原结合片段,组分B2为肿瘤化疗药,组分B3为抗PD-1单克隆抗体或其抗原结合片段,

优选地,组合物还包含组分C,组分C为肿瘤治疗剂,并且组分C不同于组分B,

例如根据Kabat,IMGT,Chothia或AbM编号系统,

所述特异性结合CD47的抗体包含选自以下重链可变区和轻链可变区中包含的CDR序列

(1)SEQ ID NO:2所示的重链可变区包含的HCDR1,HCDR2和HCDR3,和

SEQ ID NO:4所示的轻链可变区包含的LCDR1,LCDR2和LCDR3;或

(2)SEQ ID NO:12所示的重链可变区包含的HCDR1,HCDR2和HCDR3,和

SEQ ID NO:14所示的轻链可变区包含的LCDR1,LCDR2和LCDR3;或

(3)SEQ ID NO:16所示的重链可变区包含的HCDR1,HCDR2和HCDR3,和

SEQ ID NO:18所示的轻链可变区包含的LCDR1,LCDR2和LCDR3;或

(4)SEQ ID NO:20所示的重链可变区包含的HCDR1,HCDR2和HCDR3,和

SEQ ID NO:22所示的轻链可变区包含的LCDR1,LCDR2和LCDR3

(优选地,根据IMGT编号系统,所述抗体包含:

HCDR1,其包含SEQ ID NO:5所示的序列或其变体,或由其组成,

HCDR2,其包含SEQ ID NO:6所示的序列或其变体,或由其组成,和

HCDR3,其包含SEQ ID NO:7所示的序列或其变体,或由其组成,并且所述抗体还包含:

LCDR1,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸或其变体,或由其组成,

LCDR2,其包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列或其变体,或由其组成,和

LCDR3,其包含SEQ ID NO:10所示的序列或其变体,或由其组成);

其中所述双特异性抗体为抗PD-1-抗CTLA4抗体或抗PD-1-抗VEGFA抗体或二者的组合,所述双特异性抗体包含第一蛋白功能区和第二蛋白功能区,其中所述第一蛋白功能区靶向PD-1,所述第二蛋白功能区靶向CTLA4或VEGFA,其中,所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白,所述第二蛋白功能区为单链抗体;或者,所述第一蛋白功能区为单链抗体,所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白;

优选地,一个免疫球蛋白分子连接有两个单链抗体分子(优选地,两个单链抗体分子相同),优选地,所述免疫球蛋白为IgG1亚型(优选人IgG1亚型),优选地,所述单链抗体连接到所述免疫球蛋白重链的N端或C端,其中,所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为1个、2个或者2个以上,优选地,所述第一蛋白功能区与所述第二蛋白功能区直接连接或者通过第一连接片段连接;和/或所述单链抗体的重链可变区与所述单链抗体的轻链可变区直接连接或者通过第二连接片段连接,所述第一连接片段和所述第二连接片段相同或不同;优选地,所述连接片段为(GGGGS)n,n为正整数;更优选地,n为1、2、3、4、5或6;优选地,所述第一连接片段和所述第二连接片段的氨基酸序列独立地选自SEQ ID NO:119和SEQ ID NO:120;更优选地,所述第一连接片段和所述第二连接片段的氨基酸序列均如SEQ ID NO:120所示,

其中当双特异性抗体为抗PD-1-抗CTLA4抗体时,

所述第一蛋白功能区包含SEQ ID NO:87所示的重链可变区包含的HCDR1-HCDR3,和SEQ ID NO:88所示的轻链可变区包含的LCDR1-LCDR3(优选地,根据IMGT编号系统,所述第一蛋白功能区包含HCDR1,其包含SEQ ID NO:89所示的序列或其变体,或由其组成,HCDR2,其包含SEQ ID NO:90所示的序列或其变体,或由其组成,和HCDR3,其包含SEQ ID NO:91所示的序列或其变体,或由其组成,LCDR1,其包含SEQ ID NO:92所示的氨基酸或其变体,或由其组成,LCDR2,其包含SEQ ID NO:93所示的氨基酸序列或其变体,或由其组成,和LCDR3,其包含SEQ ID NO:94所示的序列或其变体,或由其组成);

所述第二蛋白功能区包含SEQ ID NO:95所示的重链可变区中的HCDR1-HCDR3和SEQ ID NO:96所示的轻链可变区中的LCDR1-LCDR3(优选地,根据IMGT编号系统,所述第二蛋白功能区包含HCDR1,其包含SEQ ID NO:97所示的序列或其变体,或由其组成,

HCDR2,其包含SEQ ID NO:98所示的序列或其变体,或由其组成,

HCDR3,其包含SEQ ID NO:99所示的序列或其变体,或由其组成,

LCDR1,其包含SEQ ID NO:100所示的氨基酸或其变体,或由其组成,

LCDR2,其包含SEQ ID NO:101所示的氨基酸序列或其变体,或由其组成,和

LCDR3,其包含SEQ ID NO:102所示的序列或其变体,或由其组成);

或者

其中当双特异性抗体为抗PD-1-抗VEGFA抗体时,

所述第一蛋白功能区包含SEQ ID NO:103所示的重链可变区包含的HCDR1-HCDR3,和SEQ ID NO:104所示的轻链可变区包含的LCDR1-LCDR3(优选地,根据IMGT编号系统,所述第一蛋白功能区包含HCDR1,其包含SEQ ID NO:105所示的序列或其变体,或由其组成,

HCDR2,其包含SEQ ID NO:106所示的序列或其变体,或由其组成,和

HCDR3,其包含SEQ ID NO:107所示的序列或其变体,或由其组成,

LCDR1,其包含SEQ ID NO:108所示的氨基酸或其变体,或由其组成,

LCDR2,其包含SEQ ID NO:109所示的氨基酸序列或其变体,或由其组成,和

LCDR3,其包含SEQ ID NO:110所示的序列或其变体,或由其组成);

所述第二蛋白功能区包含SEQ ID NO:111所示的重链可变区中的HCDR1-HCDR3和SEQ ID NO:112所示的轻链可变区中的LCDR1-LCDR3(优选地,根据IMGT编号系统,所述第二蛋白功能区包含HCDR1,其包含SEQ ID NO:113所示的序列或其变体,或由其组成,

HCDR2,其包含SEQ ID NO:114所示的序列或其变体,或由其组成,

HCDR3,其包含SEQ ID NO:115所示的序列或其变体,或由其组成,

LCDR1,其包含SEQ ID NO:116所示的氨基酸或其变体,或由其组成,

LCDR2,其包含SEQ ID NO:117所示的氨基酸序列或其变体,或由其组成,和

LCDR3,其包含SEQ ID NO:118所示的序列或其变体,或由其组成);

其中

所述抗PD1单克隆抗体包含SEQ ID NO:121所示的重链可变区包含的HCDR1-HCDR3和SEQ ID NO:122所示的轻链可变区包含的LCDR1-LCDR3(优选地根据IMGT编号系统,所述抗PD1单克隆抗体包含HCDR1,其包含SEQ ID NO:123所示的序列或其变体,或由其组成,

HCDR2,其包含SEQ ID NO:124所示的序列或其变体,或由其组成,

HCDR3,其包含SEQ ID NO:125所示的序列或其变体,或由其组成,

LCDR1,其包含SEQ ID NO:126所示的氨基酸或其变体,或由其组成,

LCDR2,其包含SEQ ID NO:127所示的氨基酸序列或其变体,或由其组成,和

LCDR3,其包含SEQ ID NO:128所示的序列或其变体,或由其组成);

其中,所述变体的序列与对应序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%同源性,或所述变体的序列与对应序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)。

2.权利要求1所述的药物组合物,其中所述特异性结合CD47的抗体还包含选自以下组成的组的重链可变区的框架区FR和轻链可变区的框架区FR:

(1)所述重链可变区的框架区FR包含FR-H1,FR-H2,FR-H3和FR-H4,其中FR-H1包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列或其变体,或由其列组成;FR-H2包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H3包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H4包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列或其变体,或由其组成,

所述轻链可变区的框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中FR-L1包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L2包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L4包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列或其变体,或由其组成;

(2)所述重链可变区的框架区FR包含FR-H1,FR-H2,FR-H3和FR-H4,其中FR-H1包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H2包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H3包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H4包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列或其变体,或由其组成,

所述轻链可变区的框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中FR-L1包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L2包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L3包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L4包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列或其变体,或由其组成;

(3)所述重链可变区的框架区FR包含FR-H1,FR-H2,FR-H3和FR-H4,其中FR-H1包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H2包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H3包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H4包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列或其变体,或由其组成,

所述轻链可变区的框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中FR-L1包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L2包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L3包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L4包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列或其变体,或由其组成;

(4)所述重链可变区的框架区FR包含FR-H1,FR-H2,FR-H3和FR-H4,其中FR-H1包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H2包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H3包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H4包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列或其变体,或由其组成,

所述轻链可变区的框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中FR-L1包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L2包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列或其变

体,或由其组成;FR-L3包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L4包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列或其变体,或由其组成,

其中所述变体的序列与对应序列具有至少80%,优选至少81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%同源性,或与对应序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)。

3.权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述特异性结合CD47的抗体包括:

(1)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,或其变体,和

轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,或其变体;

(2)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,或其变体,和

轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列,或其变体;

(3)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列,或其变体,和

轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,或其变体;

(4)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列,或其变体,和

轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列,或其变体,

其中所述抗PD-1-抗CTLA4抗体的第一蛋白功能区包含:

(1)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:87所示的序列,或其变体,

轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:88所示的序列,或其变体;

(2)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:129所示的序列,或其变体,

轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:130所示的序列,或其变体;

所述抗PD-1-抗CTLA4抗体的第二蛋白功能区包含:

(1)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:95所示的序列,或其变体,

轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:96所示的序列,或其变体;

(2)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:133所示的序列,或其变体,

轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:134所示的序列,或其变体;

(3)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:135所示的序列,或其变体,

轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:136所示的序列,或其变体;

(4)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:137所示的序列,或其变体,

轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:138所示的序列,或其变体;

(5)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:131所示的序列,或其变体,

轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:132所示的序列,或其变体;

优选地,所述抗PD-1-抗CTLA4抗体的免疫球蛋白包含的重链氨基酸序列如SEQ ID NO:139所示,靶向PD-1;

其中所述抗PD-1-抗VEGFA抗体的第一蛋白功能区包含:

(1)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:103所示的序列,或其变体,

轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:104所示的序列,或其变体;

所述抗PD-1-抗VEGFA抗体的第二蛋白功能区包含:

(1)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:111所示的序列(优选由SEQ ID NO:145所示的核苷酸序列编码),或其变体,

轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

SEQ ID NO:112所示的序列(优选由SEQ ID NO:146所示的核苷酸序列编码),或其变体;

优选地,所述抗PD-1-抗VEGFA抗体的免疫球蛋白包含的重链氨基酸序列如SEQ ID NO:140所示,靶向VEGFA;

其中所述抗PD-1单克隆抗体包含SEQ ID NO:121所示的重链可变区和SEQ ID NO:122所示的轻链可变区,或由其组成;

其中所述变体与对应序列具有至少85%,优选86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%以上序列同一性,或与对应序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列。

4.权利要求1-3任一项所述的药物组合物,其中所述特异性结合CD47的抗体还包含重链恒定区和轻链恒定区,且所述恒定区来自不是鼠类的物种,例如来自人抗体,优选来自人IgG或IgM,更优选IgG1,优选地,所述重链恒定区为Ig gamma-1chain C region,

ACCESSION:P01857(SEQ ID NO:58)或Ig gamma-4chain C region,ACCESSION:P01861.1(SEQ ID NO:56);所述轻链恒定区为Ig kappa chain C region,ACCESSION:P01834(SEQ ID NO:57),优选地,所述特异性结合CD47抗体由保藏编号为CCTCC NO:2018135的杂交瘤细胞株LT012分泌。

5.权利要求1-4任一项所述的药物组合物,按照EU编号系统,所述特异性结合CD47的抗体和所述免疫球蛋白的重链恒定区在第234位点、235位点和237位点中的任意1个位点、2个位点或3个位点发生突变,并且突变后,双特异性抗体与FcγRIIIa和/或C1q的亲和力常数相比突变前降低;优选地,所述亲和力常数通过Fortebio Octet分子相互作用仪测得,优选地,所述特异性结合CD47的抗体按照EU编号系统包含突变L234A和/或L235A,

更优选地,所述免疫球蛋白的重链恒定区具有如下突变组合之一:

L234A和L235A;或者

L234A和G237A;或者

L235A和G237A;或者

L234A、L235A、G237A,

进一步优选地

按照EU编号系统,所述免疫球蛋白的重链恒定区还具有如下突变组合之一:N297A、D265A、D270A、P238D、L328E、E233D、H268D、P271G、A330R、C226S、C229S、E233P、P331S、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T、T256E、N297Q、P238S、P238A、A327Q、A327G、P329A、K322A、T394D、G236R、G236A、L328R、A330S、P331S、H268A、E318A和K320A。

6.权利要求1-5任一项所述的药物组合物,其中所述特异性结合CD47的抗体包含选自以下组成的组的重链和轻链,或由其组成:

(1)SEQ ID NO:59表示的重链和SEQ ID NO:60表示的轻链;

(2)SEQ ID NO:61表示的重链和SEQ ID NO:62表示的轻链;

(3)SEQ ID NO:63表示的重链和SEQ ID NO:64表示的轻链;

(4)SEQ ID NO:65表示的重链和SEQ ID NO:66表示的轻链;

(5)SEQ ID NO:67表示的重链和SEQ ID NO:68表示的轻链;和

(6)SEQ ID NO:69表示的重链和SEQ ID NO:70表示的轻链,

所述抗PD-1-抗CTLA4抗体包含选自以下组成的重链和轻链,或由其组成:

SEQ ID NO:78表示的重链(优选由SEQ ID NO:77所示的核苷酸序列编码)和SEQ ID NO:80表示的轻链(优选由SEQ ID NO:79所示的核苷酸序列编码);

所述抗PD-1-抗VEGFA抗体包含选自以下组成的组的重链和轻链,或由其组成:

SEQ ID NO:141表示的重链(优选由SEQ ID NO:142所示的核苷酸序列编码)和SEQ ID NO:143表示的轻链(优选由SEQ ID NO:144所示的核苷酸序列编码);

所述抗PD-1单克隆抗体包含选自以下组成的组的重链和轻链,或由其组成:SEQ ID NO:82表示的重链(优选由SEQ ID NO:81所示的核苷酸序列编码),SEQ ID NO:84表示的轻链(优选由SEQ ID NO:83所示的核苷酸序列编码)。

7.权利要求1-6任一项所述的药物组合物,其中所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')$_2$、Fd、Fv、dAb、Fab/c、互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如,scFv)、双价抗体或结构域抗体。

8.权利要求1-7任一项所述的药物组合物，其中所述特异性结合CD47的抗体是人源化抗体、嵌合抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)。

9.权利要求1-8任一项所述的药物组合物，其中所述特异性结合CD47的抗体以小于大约10^{-5}M，例如小于大约10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M或10^{-10}M或更小的KD结合人CD47蛋白，或者所述特异性结合CD47的抗体以小于大约100nM，例如小于大约10nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM或更小的EC50结合人CD47蛋白。

10.权利要求1-9任一项所述的药物组合物，其中所述特异性结合CD47的抗体为抗体偶联物形式，其包括权利要求1-9任一项所述的特异性结合CD47的抗体或其抗原结合片段，以及与所述特异性结合CD47的抗体或其抗原结合片段偶联的偶联部分，所述偶联部分为纯化标签(如His标签)、细胞毒性剂，或可检测的标记。优选地，所述偶联部分为放射性同位素、发光物质、有色物质、酶或聚乙二醇，或者

所述特异性结合CD47的抗体为多特异性抗体形式，优选双特异性抗体形式，其包括权利要求1-9任一项所述的特异性结合CD47的抗体或其抗原结合片段，以及针对其他抗原和/或其他抗原表位的抗体或抗原结合片段，或者所述特异性结合CD47的抗体为融合蛋白形式，其包括权利要求1-9任一项所述的特异性结合CD47的抗体或其抗原结合片段。

11.权利要求1-10任一项所述的药物组合物，其中所述肿瘤治疗剂选自下述的一种或多种：酪氨酸激酶抑制剂、DNA多聚酶抑制剂、抗人CD20抗体、抗人PDL-1抗体、抗人PD-1抗体、抗人CTLA-4抗体、BCL-2的抑制剂、抗人EGFR抗体、抗人HER2抗体、抗人HER3抗体、阿卡替尼、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂、抗人VEGFR2抗体、抗人VEGF抗体、蛋白酶体抑制剂、血管生成抑制剂、Rapidly accelerated fibrosarcoma(RAF)抑制剂、双特异性抗体和融合蛋白药物，优选地，所述治疗剂为Cetuximab，Obinutuzumab或Rituximab，

优选地，肿瘤化疗药选自下述的一种或多种：烷化剂，蒽环类药物，抗代谢药物，抗生素，植物类药物和/或激素类药物，铂类药物(如顺铂、卡铂、奥沙利铂)，阿霉素类，环磷酰胺，紫杉醇(如白蛋白紫杉醇，脂质体紫杉醇，多烯紫杉醇)，依托泊苷，吉西他滨，培美曲塞，卡培他滨，奥拉帕利、芦卡帕利、尼拉帕利、他拉唑帕利、氟唑帕利，长春碱类，他莫昔芬，甲地孕酮，戈舍瑞林，门冬酰胺酶、氟尿嘧啶类抗肿瘤药(如5氟尿嘧啶)和阿扎胞苷、阿糖胞苷、环胞苷。

12.权利要求1-11任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

13.权利要求1-12任一项所述的药物组合物，其中按照抗体的质量计算，所述组分A与组分B1的质量比为(1:5)-(5:1)，例如：1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1或5:1，

所述组分A与组分B3的质量比为(1:5)-(5:1)，例如：1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1或5:1，

或者

所述组分B2与组分A的质量比为1:(1-1000)，优选为1:(5-500)，更优选为1:(10-100)，

优选地，所述药物组合物中的组分A和组分B为适于为静脉滴注、皮下注射、皮内注射、静脉内注射、肌内注射或病灶内注射施用的形式。

14.试剂盒，优选用于治疗肿瘤，所述试剂盒包括A产品和产品B，

其中所述产品A包含权利要求1-13任一项中所定义的所述特异性结合CD47的抗体或其

抗原结合片段，

产品B选自下述的一种或多种：产品B1，产品B2和产品B3，其中产品B1为权利要求1-13任一项中定义的所述双特异性抗体或其抗原结合片段(优选地，当所述双特异性抗体为抗PD-1-抗CTLA4抗体和抗PD-1-抗VEGFA抗体组合时，所述抗PD-1-抗CTLA4抗体和抗PD-1-抗VEGFA抗体分别以独立包装存在或存在于同一个包装)，产品B2为权利要求1-13任一项中定义的所述肿瘤化疗药，产品B3权利要求1-13任一项中定义的所述抗PD-1单克隆抗体或其抗原结合片段，其中产品B1、产品B2和产品B3分别以独立包装存在或存在于同一个包装，

优选地，所述试剂盒还包含产品C，所述产品C为权利要求1-13任一项中定义的肿瘤治疗剂，并且所述产品C不同于所述产品B，

优选地，所述试剂盒还包含产品说明书。

15.权利要求14所述的试剂盒，其中按照抗体的质量计算，所述产品A与产品B1的质量比为(1:5)-(5:1)，例如：1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1或5:1，

所述产品A与产品B3的质量比为(1:5)-(5:1)，例如：1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1或5:1，

或者

肿瘤化疗药的单位剂量为0.1mg-100mg、0.5mg-50mg、1mg-20mg、2mg-15mg、4mg-12mg或者8mg-12mg，

优选地，所述试剂盒中的产品A、产品B或产品C为适合静脉滴注、皮下注射、皮内注射、静脉内注射、肌内注射或病灶内注射施用的形式。

16.治疗或预防肿瘤的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的权利要求1-13任一项中定义的组分A和组分B，优选地，所述方法还包括给予有需求的受试者以有效量的权利要求1-13任一项中定义的组分C，

优选地，所述组分A、组分B和组分C同时或顺序施用；更优选地，所述组分A、组分B和组分C为在手术治疗之前或之后，和/或在放射治疗之前或之后施用；

优选地，当组分B为组分B1和/或组分B3时，所述组分A或组分B的单次给药剂量为受试者的每千克体重0.1-100mg，优选1-10mg；或者所述组分A或组分B的单次给药剂量为每位受试者10-1000mg，优选50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg或200mg，

优选地，组分B2的单位剂量为0.1mg-100mg、0.5mg-50mg、1mg-20mg、2mg-15mg、4mg-12mg或者8mg-12mg，

优选地，每天两次至约每隔一天一次给药，或每3天、4天、5天、6天、10天、1周、2周、3周、4周、5周或6周给药一次；

优选地，给药方式为静脉滴注、皮下注射、皮内注射、静脉内注射、肌内注射或病灶内注射施用的形式。

17.权利要求1-13任一项所述的药物组合物，权利要求14或15所述的试剂盒或权利要求16所述的方法，其中所述肿瘤优选为表达CD47的肿瘤，优选癌症，所述癌症包括实体瘤，血液瘤，淋巴瘤，母细胞瘤，肉瘤，白血病或淋巴样恶性肿瘤，更优选包括鳞状细胞癌，骨髓瘤，肺癌，小细胞肺癌，非小细胞肺癌，头颈鳞状细胞癌，胶质瘤(如神经胶质瘤、复发性胶质瘤)，急性髓系白血病，霍奇金淋巴瘤，非霍奇金淋巴瘤，弥漫性大B细胞淋巴瘤，滤泡性淋巴瘤，急性淋巴细胞白血病，急性粒细胞性白血病，慢性淋巴细胞性白血病，慢性粒细胞性白

血病，原发性纵向分离大B细胞淋巴瘤，套管细胞淋巴瘤，小淋巴细胞淋巴瘤，富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤，多发性骨髓瘤，髓样白血病-1蛋白，复发难治性的外周T细胞淋巴瘤，骨髓增生异常综合症，间变性大细胞淋巴瘤，套细胞淋巴瘤，边缘区淋巴瘤，骨髓纤维化，真性红细胞增多症、骨髓癌、骨髓及外骨髓增殖，侵袭性系统性肥大细胞增多症、嗜酸性粒细胞增多症、隆凸性皮肤纤维肉瘤，慢性嗜酸性白血病，胃肠道癌，胃癌或胃-食管结合部腺癌，卵巢癌，肝癌，淋巴细胞性白血病，大肠癌，子宫内膜癌，前列腺癌，甲状腺癌，黑色素瘤，软骨肉瘤，神经母细胞瘤，腺癌，胰腺癌，胰腺导管腺癌，多形性胶质母细胞瘤，骨癌，尤因氏肉瘤，宫颈癌，鼻咽癌，脑癌，膀胱癌，乳腺癌，三阴性乳腺癌，肠癌，直肠癌，结肠直肠癌，结肠癌，肝细胞癌，肾细胞癌，透明细胞肾细胞癌，头颈癌，咽喉癌，肝胆癌，中枢神经系统癌，食道癌，食管鳞癌，恶性胸膜间皮瘤，全身性轻链淀粉样变，淋巴细胞性淋巴瘤，骨髓增生性肿瘤，神经内分泌肿瘤，默克尔细胞癌，睾丸癌和皮肤癌，腹膜癌、输卵管癌，尿路上皮癌，微卫星高度不稳定性(MSI-H)或错配修复缺陷(dMMR)癌，间皮瘤。

18.单位制剂，优选用于治疗肿瘤，其中，所述单位制剂包含：1～10000mg(优选10-1000mg，优选50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg或200mg)的权利要求1-13任一项中定义的组分A和组分B，

当组分B为组分B1和/或组分B3时，所述单位制剂包含1～10000mg(优选1-1000mg，优选50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg、200mg或100mg)的权利要求1-13任一项中定义的组分B，

当组分B为组分B2时，所述单位制剂包含0.1mg-100mg、0.5mg-50mg、1mg-20mg、2mg-15mg、4mg-12mg或者8mg-12mg的组分B；

优选地，所述单位制剂还包含一种或多种权利要求1-13任一项中定义的组分C；

其中，所述组分A、组分B和组分C分别单独包装。

19.单次药物剂量单元，优选用于治疗肿瘤，其包含0.1-10000mg(优选1-1000mg，优选50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg、200mg或100mg)的权利要求1-13任一项中定义的组分A，和组分B，

当组分B为组分B1和/或组分B3时，所述单次药物剂量单元包含0.1-10000mg(优选1-1000mg，优选50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg、200mg或100mg)的权利要求1-13任一项中定义的组分B，

当组分B为组分B2时，所述单次药物剂量单元包含0.1mg-100mg、0.5mg-50mg、1mg-20mg、2mg-15mg、4mg-12mg或者8mg-12mg的组分B。

抗CD47的单克隆抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及自身免疫性疾病治疗和分子免疫学领域。涉及一种抗CD47的 抗体、包含其的药物组合物及其用途。具体地，本发明涉及一种抗CD47的单 克隆抗体。

背景技术

[0002] CD47又称为整合素相关蛋白(integrin associated protein，IAP)。CD47为5 次跨膜蛋白，分子量在50kDa左右，属于免疫球蛋白超家族。其胞外N端为IgV 结构域，与αvβ3(CD51/CD61)和αIIbβ3(CD41/CD61)整合素相连。CD47涉及多种 生理功能，例如细胞转移，T细胞和树突细胞(Dendritic cell，DC)激活，轴 突发育等功能。

[0003] CD47在包括红细胞在内的所有细胞类型上表达，同时在肿瘤细胞上CD47 呈高表达。CD47有两种配体分别为信号调节蛋白α(Signal Regulatory Proteinα，SIRPα)和凝血酶敏感蛋白-1(Thrombospondin-1，TSP1)。SIRPα是一类含有 免疫球蛋白结构域的受体型穿膜糖蛋白，属于SIRP家族，主要在巨噬细胞和神 经细胞上表达。在CD47-SIRPα通路中，CD47蛋白与SIRPα结合磷酸化其免疫 受体酪氨酸抑制基序ITIM，随后细胞内招募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(Matozaki T，Murata Y，Okazawa H，et al.Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPαsignalling pathway.Trends in cell biology，2009，19(2)：72-80.)。而正常红细胞由于细胞膜表面的CD47和巨噬细胞 的SIPRα结合产生抑制性信号，从而不被吞噬。(Oldenborg P A，Zheleznyak A，Fang Y F，et al.Role of CD47 as a marker of self on red blood cells.Science，2000，288(5473)：2051-2054.)。TSP1是由3条肽链组成的同源三聚体，与其它细胞表 面受体、基质成分和生长因子相互作用参与细胞增殖、凋亡、粘附、迁移、血 管生成等过程(Jiang P，Lagenaur CF，Narayanan V.Integrin-associated Protein Is a Ligand for the P84 Neural Adhesion Molecule.Journal of Biological Chemistry 1999.274：559-62)。

[0004] 巨噬细胞(Macrophages)源自单核细胞，而单核细胞又来源于骨髓中的前体 细胞。主要功能是以固定细胞或游离细胞的形式对细胞残片及病原体进行吞噬 作用并激活淋巴细胞或其他免疫细胞，令其对病原体做出反应。目前研究认为 肿瘤细胞具有逃逸巨噬细胞吞噬的机制，在肿瘤细胞生长过程中表面会形成特 异性蛋白比如钙网蛋白，暴露肿瘤身份吸引巨噬细胞吞噬，但与此同时具有 SIRPα的巨噬细胞与高表达CD47的肿瘤细胞由于CD47-SIRPα通路激活抑制巨 噬细胞的吞噬作用，巨噬细胞误判为正常细胞致使肿瘤细胞逃逸巨噬细胞的吞 噬(CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis.Jaiswal S，Jamieson C H M，Pang W W，et al.Cell，2009，138(3)271-285)。

[0005] 目前研究发现认为，抗CD47抗体主要通过两种机理杀伤肿瘤细胞。1、抗CD47抗体与CD47结合阻断CD47-SIRPα通路使巨噬细胞发挥吞噬作用。2、抗CD47抗体通过DC细胞和CD8+T细胞发挥肿瘤杀伤效应。DC细胞通过抗 CD47抗体和亲吞噬分子如钙网蛋白协同作

用,吞噬肿瘤细胞,并提呈肿瘤相 关抗原给CD8+T细胞,进而发挥CD8+T细胞对肿瘤的特异性杀伤作用(CD47 blockade as another immune checkpoint therapy for cancer.Vonderheide R H.Nature Medicine,2015,21(10):1122)。结合这两个机理表明抗CD47抗体极有可能具 有同时激活非特异性免疫以及特异性免疫的能力。

[0006] 目前,抗CD47单克隆抗体药物具有广泛的应用前景和良好的治疗肿瘤的 效果,可用于多种肿瘤的治疗。抗CD47单克隆抗体药物Hu5F9-G4,在临床 前的实验中可以有效抑制恶性血液病和实体瘤的生长和转移(Abstract PR13: The anti-CD47 antibody Hu5F9-G4 is a novel immune checkpoint inhibitor with synergistic efficacy in combination with clinically active cancer targeting antibodies[J]Chao M P, McKenna K M,Cha A,et al.,2016)其中重链的氨基酸序 列为SEQ ID NO:85所示,轻链的氨基酸序列为SEQ ID NO:86所示。

[0007] 因此,开发与CD47具有高亲和力的抗体药物,用于肿瘤的治疗,使其具 有更好的治疗效果、更低的毒副作用,具有非常重要的意义。

发明内容

[0008] 本发明人利用哺乳动物细胞表达系统表达出重组的人CD47,作为抗原免 疫小鼠,经小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合获得杂交瘤细胞。通过对大量样本 的筛选,得到了如下的杂交瘤细胞株。

[0009] 本发明人发现:

[0010] 杂交瘤细胞株LT012能够分泌和CD47特异性结合的单克隆抗体(命名为 6F7),并且该单克隆抗体能够与受体SIRPαECD-hFc-Biotin竞争结合CD47, 有效阻断SIRPα与CD47的结合,进而促进巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用。

[0011] 进一步地,本发明人制得了单克隆抗体6F7的人源化抗体(命名为 6F7H1L1、6F7H2L2和6F7H3L3)。

[0012] 本发明由此提供了下述发明:

[0013] 通过本领域技术人员所熟知的技术手段,例如通过VBASE2数据库分析抗 体序列的CDR区的氨基酸序列:

[0014] 本发明的抗体6F7,6F7 H1L1、6F7 H2L2和6F7 H3L3具有相同的HCDR1-3 和LCDR1-3:

[0015] 其重链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下:

[0016] HCDR1:GYTFTSYW(SEQ ID NO:5),

[0017] HCDR2:IDPSDSET(SEQ ID NO:6),

[0018] HCDR3:ARLYRWYFDV(SEQ ID NO:7);

[0019] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下:

[0020] LCDR1:EIVGTY(SEQ ID NO:8),

[0021] LCDR2:GAS(SEQ ID NO:9),

[0022] LCDR3:GQSYNFPYT(SEQ ID NO:10)。

[0023] 在一些实施方案中,本发明的抗体选自以下各项组成的组:

[0024] 6F7 H1L1(G1M)重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:59)

[0025] 6F7 H1L1(G1M)轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:60)

[0026] 6F7 H2L2(G1M)重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:61)

[0027] 6F7 H2L2(G1M)轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:62)

[0028] 6F7 H3L3(G1M)重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:63)

[0029] 6F7 H3L3(G1M)轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:64)

[0030] 6F7 H1L1(hG4)重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:65)

[0031] 6F7 H1L1(hG4)轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:66)

[0032] 6F7 H2L2(hG4)重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:67)

[0033] 6F7 H2L2(hG4)轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:68)

[0034] 6F7 H3L3(hG4)重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:69)

[0035] 6F7 H3L3(hG4)轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:70)

[0036] 在本发明的一个方面,涉及分离的多肽,其包含SEQ ID NO:5,6和7所 示的序列,其中所述多肽作为抗人CD47的抗体的一部分,特异性结合人CD47, 所述抗体还包含SEQ ID NO:8,9和10所示的序列。

[0037] 在本发明的一个方面,涉及分离的多肽,其包含SEQ ID NO:8,9和10 所示的序列,其中所述多肽作为抗人CD47的抗体的一部分,特异性结合人 CD47,所述抗体还包含SEQ ID NO:5,6和7所示的序列。

[0038] 在本发明的一个方面,涉及分离的多肽,其包含选自SEQ ID NO:2,12, 16或20所示的序列或其变体,其中所述多肽作为抗人CD47的抗体的一部分, 特异性结合人CD47,所述抗体还分别对应包含选自SEQ ID NO:4,14,18或 22所示的序列或其变体,其中所述变体与对应序列具有至少85%,优选86%, 87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或 99%以上序列同一性的序列,或与对应序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、 22、23、24、25、26、27、28、29或30个)保守氨基酸突变(优选置换,插 入或缺失);或者

[0039] 在本发明的一个方面,涉及分离的多肽,其包含选自SEQ ID NO:4,14, 18或22所示的序列或其变体,其中所述多肽作为抗人CD47的抗体的一部分, 特异性结合人CD47,所述单克隆抗体还对应包含选自SEQ ID NO:2,12,16 或20所示的序列或其变体,其中所述变体与对应序列具有至少85%,优选86%, 87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或 99%以上序列同一性,或与对应序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、 23、24、25、26、27、28、29或30个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或 缺失)。

[0040] 在本发明的实施方案中,所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fd、 Fv、dAb、Fab/c、互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如,scFv)、双价抗 体、结构域抗体。

[0041] 在本发明的实施方案中,所述特异性结合CD47的抗体是人源化抗体、嵌 合抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)。

[0042] 在本发明的实施方案中,所述特异性结合CD47的抗体以小于大约10^{-5}M, 例如小于大约10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M或10^{-10}M或更小的KD结合人 CD47蛋白。优选地,所述KD通过Fortebio分子相互作用仪测得。

[0043] 在本发明的实施方案中,所述特异性结合CD47的抗体以小于大约100 nM,例如小

于大约10nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、 0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM或更小的EC50结合人CD47蛋白。具体地，所述EC50通过间接ELISA方法测得。

[0044] 在本发明的实施方案中，所述特异性结合CD47的抗体包括恒定区，且所 述恒定区来自不是鼠类的物种，例如来自人抗体，优选来自人IgG，更优选IgG1 或IgG4。

[0045] 在本发明的实施方案中，所述特异性结合CD47的抗体的恒定区是人源的， 例如，重链恒定区采用Ig gamma-1链C区，更优选GenBank登记号为 ACCESSION:P01857的Ig gamma-1链C区(SEQ ID NO:58)，或采用Ig gamma-4链C区，更优选GenBank登记号为ACCESSION:P01861.1的Ig gamma-4链C区(SEQ ID NO:56)；轻链恒定区均采用Ig kappa链C区，更 优选GenBank登记号为ACCESSION:P01834的Ig kappa链C区(SEQ ID N O:57)。本发明的抗体在6F7 H1L1、6F7 H2L2和6F7 H3L3的可变区基础上采 用以下恒定区：重链恒定区为Ig gamma-1chain C region，ACCESSION:P01857 (SEQ ID NO:58)，或重链恒定区Ig gamma-4chain C region，ACCESSION:P01861.1(SEQ ID NO:56)，并在此基础上引入S228P突变提高稳定性；轻链恒 定区为Ig kappa chain C region，ACCESSION:P01834(SEQ ID NO:57)。本发 明的另一方面涉及编码多肽的分离的多核苷酸，所述多肽包含SEQ ID NO:5，6和7所示的序列，其中所述多肽作为抗人CD47的抗体的一部分，特异性结 合人CD47，所述抗体还包含SEQ ID NO:8，9和10所示的序列。

[0046] 在本发明的一个方面，涉及编码多肽的分离的多核苷酸，所述多肽包含 SEQ ID NO:8，9和10所示的序列，其中所述多肽作为抗人CD47的抗体的一 部分，特异性结合人CD47，所述抗体还包含SEQ ID NO:5，6和7所示的序 列。

[0047] 在本发明的一个方面，涉及编码多肽的分离的多核苷酸，所述多肽包含选 自SEQ ID NO:2，12，16或20所示的序列或其变体，其中所述多肽作为抗人 CD47的抗体的一部分，特异性结合人CD47，所述抗体还分别对应包含选自 SEQ ID NO:4，14，18或22所示的序列或其变体，

[0048] 其中所述变体的序列与对应序列具有至少85％，优选86％，87％，88％， 89％，90％，91％，92％，93％，94％，95％，96％，97％，98％或99％以上序 列同一性，或与对应序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、 26、27、28、29或30个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)；或

[0049] 在本发明的一个方面，涉及编码多肽的分离的多核苷酸，所述多肽包含选 自SEQ ID NO:4，14，18或22所示的序列或其变体，其中所述多肽作为抗人 CD47的抗体的一部分，特异性结合人CD47，所述抗体还分别对应包含选自 SEQ ID NO:2，12，16或20所示的序列或其变体，

[0050] 其中所述变体与对应序列具有至少85％，优选86％，87％，88％，89％， 90％，91％，92％，93％，94％，95％，96％，97％，98％或99％以上序列同一 性，或与对应序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9、 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、 27、28、29或30个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)；

[0051] 具体地，所述多核苷酸分子包含下述序列或由下述序列组成：SEQ ID NO:1，SEQ ID NO:11，SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:19所示的核苷酸序列， 或与所述序列具有至少85％，优选86％，87％，88％，89％，90％，91％，92％， 93％，94％，95％，96％，97％，98％或99％以上序列同一性的序列。

[0052] 具体地,所述多核苷酸分子包含下述序列或由下述序列组成:SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:21所示的核苷酸序列或 与所述序列具有至少85%,优选86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%, 93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%以上序列同一性的序列。

[0053] 在本发明的一个方面,还提供了选自如下的杂交瘤细胞株以及由其产生的 单克隆抗体:杂交瘤细胞株LT012,其保藏编号为CCTCC NO:2018135。

[0054] 本发明还涉及以下方面:

[0055] 1.药物组合物,优选用于治疗肿瘤,所述药物组合物包含组分A和组分B, 其中所述组分A为特异性结合CD47的抗体或其抗原结合片段,

[0056] 其中组分B选自下述的一种或多种:组分B1,组分B2和组分B3,其中 组分B1为双特异性抗体或其抗原结合片段,组分B2为肿瘤化疗药,组分B3 为抗PD-1单克隆抗体或其抗原结合片段,

[0057] 优选地,组合物还包含组分C,组分C为肿瘤治疗剂,并且组分C不同于 组分B,

[0058] 例如根据Kabat,IMGT,Chothia或AbM编号系统,

[0059] 所述特异性结合CD47的抗体包含选自以下重链可变区和轻链可变区中包 含的CDR序列

[0060] (1)SEQ ID NO:2所示的重链可变区包含的HCDR1,HCDR2和HCDR3, 和

[0061] SEQ ID NO:4所示的轻链可变区包含的LCDR1,LCDR2和LCDR3;或

[0062] (2)SEQ ID NO:12所示的重链可变区包含的HCDR1,HCDR2和HCDR3, 和

[0063] SEQ ID NO:14所示的轻链可变区包含的LCDR1,LCDR2和LCDR3; 或

[0064] (3)SEQ ID NO:16所示的重链可变区包含的HCDR1,HCDR2和 HCDR3,和

[0065] SEQ ID NO:18所示的轻链可变区包含的LCDR1,LCDR2和LCDR3; 或

[0066] (4)SEQ ID NO:20所示的重链可变区包含的HCDR1,HCDR2和 HCDR3,和

[0067] SEQ ID NO:22所示的轻链可变区包含的LCDR1,LCDR2和LCDR3

[0068] (优选地,根据IMGT编号系统,所述抗体包含: HCDR1,其包含SEQ ID NO:5所示的序列或其变体,或由其组成, HCDR2,其包含SEQ ID NO:6所示的序列或其变体,或由其组成,和 HCDR3,其包含SEQ ID NO:7所示的序列或其变体,或由其组成,并且所述 抗体还包含: LCDR1,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸或其变体,或由其组成, LCDR2,其包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列或其变体,或由其组成,和 LCDR3,其包含SEQ ID NO:10所示的序列或其变体,或由其组成);

[0069] 其中所述双特异性抗体为抗PD-1-抗CTLA4抗体或抗PD-1-抗VEGFA抗 体或二者的组合,所述双特异性抗体包含第一蛋白功能区和第二蛋白功能区, 其中所述第一蛋白功能区靶向PD-1,所述第二蛋白功能区靶向CTLA4或 VEGFA,其中,所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白,所述第二蛋白功能区为单 链抗体;或者,所述第一蛋白功能区为单链抗体,所述第二蛋白功能区为免疫 球蛋白;

[0070] 优选地,一个免疫球蛋白分子连接有两个单链抗体分子(优选地,两个单 链抗体分子相同),优选地,所述免疫球蛋白为IgG1亚型(优选人IgG1亚型), 优选地,所述单链抗体连接到所述免疫球蛋白重链的N端或C端,其中,所 述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为1个、2个或者2个以上,优选 地,所述第一蛋白功能区与所述第二蛋白功能区直接

连接或者通过第一连接片 段连接;和/或所述单链抗体的重链可变区与所述单链抗体的轻链可变区直接连 接或者通过第二连接片段连接,所述第一连接片段和所述第二连接片段相同或 不同;优选地,所述连接片段为(GGGGS)n,n为正整数;更优选地,n为1、2、3、4、5或6;优选地,所述第一连接片段和所述第二连接片段的氨基酸序 列独立地选自SEQ ID NO:119和SEQ ID NO:120;更优选地,所述第一连接 片段和所述第二连接片段的氨基酸序列均如SEQ ID NO:120所示,

[0071] 其中当双特异性抗体为抗PD-1-抗CTLA4抗体时,

[0072] 所述第一蛋白功能区包含SEQ ID NO:87所示的重链可变区包含的 HCDR1-HCDR3,和SEQ ID NO:88所示的轻链可变区包含的LCDR1-LCDR3 (优选地,根据IMGT编号系统,所述第一蛋白功能区包含HCDR1,其包含 SEQ ID NO:89所示的序列或其变体,或由其组成,HCDR2,其包含SEQ ID NO:90所示的序列或其变体,或由其组成,和 HCDR3,其包含SEQ ID NO:91所示的序列或其变体,或由其组成, LCDR1,其包含SEQ ID NO:92所示的氨基酸或其变体,或由其组成, LCDR2,其包含SEQ ID NO:93所示的氨基酸序列或其变体,或由其组成,和 LCDR3,其包含SEQ ID NO:94所示的序列或其变体,或由其组成);

[0073] 所述第二蛋白功能区包含SEQ ID NO:95所示的重链可变区中的 HCDR1-HCDR3和SEQ ID NO:96所示的轻链可变区中的LCDR1-LCDR3(优 选地,根据IMGT编号系统,所述第二蛋白功能区包含HCDR1,其包含SEQ ID NO:97所示的序列或其变体,或由其组成, HCDR2,其包含SEQ ID NO:98所示的序列或其变体,或由其组成, HCDR3,其包含SEQ ID NO:99所示的序列或其变体,或由其组成, LCDR1,其包含SEQ ID NO:100所示的氨基酸或其变体,或由其组成, LCDR2,其包含SEQ ID NO:101所示的氨基酸序列或其变体,或由其组成, 和 LCDR3,其包含SEQ ID NO:102所示的序列或其变体,或由其组成); 或者

[0074] 其中当双特异性抗体为抗PD-1-抗VEGFA抗体时,

[0075] 所述第一蛋白功能区包含SEQ ID NO:103所示的重链可变区包含的 HCDR1-HCDR3,和SEQ ID NO:104所示的轻链可变区包含的LCDR1-LCDR3 (优选地,根据IMGT编号系统,所述第一蛋白功能区包含HCDR1,其包含 SEQ ID NO:105所示的序列或其变体,或由其组成, HCDR2,其包含SEQ ID NO:106所示的序列或其变体,或由其组成,和 HCDR3,其包含SEQ ID NO:107所示的序列或其变体,或由其组成, LCDR1,其包含SEQ ID NO:108所示的氨基酸或其变体,或由其组成, LCDR2,其包含SEQ ID NO:109所示的氨基酸序列或其变体,或由其组成, 和 LCDR3,其包含SEQ ID NO:110所示的序列或其变体,或由其组成);

[0076] 所述第二蛋白功能区包含SEQ ID NO:111所示的重链可变区中的 HCDR1-HCDR3和SEQ ID NO:112所示的轻链可变区中的LCDR1-LCDR3(优 选地,根据IMGT编号系统,所述第二蛋白功能区包含HCDR1,其包含SEQ ID NO:113所示的序列或其变体,或由其组成,HCDR2,其包含SEQ ID NO:114所示的序列或其变体,或由其组成, HCDR3,其包含SEQ ID NO:115所示的序列或其变体,或由其组成, LCDR1,其包含SEQ ID NO:116所示的氨基酸或其变体,或由其组成, LCDR2,其包含SEQ ID NO:117所示的氨基酸序列或其变体,或由其组成, 和 LCDR3,其包含SEQ ID NO:118所示的序列或其变体,或由其组成); 其中

[0077] 所述抗PD1单克隆抗体包含SEQ ID NO:121所示的重链可变区包含的 HCDR1-HCDR3和SEQ ID NO:122所示的轻链可变区包含的LCDR1-LCDR3 (优选地根据IMGT编号系统,所述抗PD1单克隆抗体包含HCDR1,其包含 SEQ ID NO:123所示的序列或其变体,或由其

组成，HCDR2,其包含SEQ ID NO:124所示的序列或其变体,或由其组成，HCDR3,其包含SEQ ID NO:125所示的序列或其变体,或由其组成，LCDR1,其包含SEQ ID NO:126所示的氨基酸或其变体,或由其组成，LCDR2,其包含SEQ ID NO:127所示的氨基酸序列或其变体,或由其组成，和 LCDR3,其包含SEQ ID NO:128所示的序列或其变体,或由其组成)；

[0078] 其中,所述变体的序列与对应序列具有至少80％,81％,82％,83％,84％，85％,86％,87％,88％,89％,90％,91％,92％,93％,94％,95％,96％，97％,98％,99％同源性,或所述变体的序列与对应序列相比具有一个或多个 (优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)。

[0079] 2.项目1所述的药物组合物,其中所述特异性结合CD47的抗体还包含选 自以下组成的组的重链可变区的框架区FR和轻链可变区的框架区FR：

[0080] (1)所述重链可变区的框架区FR包含FR-H1,FR-H2,FR-H3和FR-H4，其中FR-H1包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列或其变体,或由其列组成;FR-H2 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H3包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H4包含SEQ ID NO:26的氨 基酸序列或其变体,或由其组成，

[0081] 所述轻链可变区的框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中 FR-L1包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L2包含 SEQ ID NO:28的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L3包含SEQ ID NO:29 的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L4包含SEQ ID NO:30的氨基酸序 列或其变体,或由其组成；

[0082] (2)所述重链可变区的框架区FR包含FR-H1,FR-H2,FR-H3和FR-H4，其中FR-H1包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H2 包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H3包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H4包含SEQ ID NO:34的氨 基酸序列或其变体,或由其组成，

[0083] 所述轻链可变区的框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中 FR-L1包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L2包含 SEQ ID NO:36的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L3包含SEQ ID NO:37 的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L4包含SEQ ID NO:38的氨基酸序 列或其变体,或由其组成；

[0084] (3)所述重链可变区的框架区FR包含FR-H1,FR-H2,FR-H3和FR-H4，其中FR-H1包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H2 包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H3包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H4包含SEQ ID NO:42的氨 基酸序列或其变体,或由其组成，

[0085] 所述轻链可变区的框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中 FR-L1包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L2包含 SEQ ID NO:44的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L3包含SEQ ID NO:45 的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L4包含SEQ ID NO:46的氨基酸序 列或其变体,或由其组成；

[0086] (4)所述重链可变区的框架区FR包含FR-H1,FR-H2,FR-H3和FR-H4，其中FR-H1包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H2 包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H3包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-H4包含SEQ ID NO:50的氨 基酸序列或其变体,或由其组成，

[0087] 所述轻链可变区的框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中 FR-L1包含

SEQ ID NO:51的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L2包含 SEQ ID NO:52的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L3包含SEQ ID NO:53 的氨基酸序列或其变体,或由其组成;FR-L4包含SEQ ID NO:54的氨基酸序 列或其变体,或由其组成,

[0088] 其中所述变体的序列与对应序列具有至少80%,优选至少81%,82%, 83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%, 95%,96%,97%,98%或99%同源性,或与对应序列相比具有一个或多个(优 选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入 或缺失)。

[0089] 3.项目1或2所述的药物组合物,其中所述特异性结合CD47的抗体包括:

[0090] (1)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0091] SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,或其变体,和

[0092] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0093] SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,或其变体;

[0094] (2)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0095] SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,或其变体,和

[0096] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0097] SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列,或其变体;

[0098] (3)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0099] SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列,或其变体,和

[0100] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0101] SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,或其变体;

[0102] (4)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0103] SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列,或其变体,和

[0104] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0105] SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列,或其变体,

[0106] 其中所述抗PD-1-抗CTLA4抗体的第一蛋白功能区包含:

[0107] (1)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0108] SEQ ID NO:87所示的序列,或其变体,

[0109] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0110] SEQ ID NO:88所示的序列,或其变体;

[0111] (2)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0112] SEQ ID NO:129所示的序列,或其变体,

[0113] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0114] SEQ ID NO:130所示的序列,或其变体;

[0115] 所述抗PD-1-抗CTLA4抗体的第二蛋白功能区包含:

[0116] (1)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0117] SEQ ID NO:95所示的序列,或其变体,

[0118] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0119] SEQ ID NO:96所示的序列,或其变体;

[0120] (2)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0121] SEQ ID NO:133所示的序列,或其变体,

[0122] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0123] SEQ ID NO:134所示的序列,或其变体;

[0124] (3)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0125] SEQ ID NO:135所示的序列,或其变体,

[0126] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0127] SEQ ID NO:136所示的序列,或其变体;

[0128] (4)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0129] SEQ ID NO:137所示的序列,或其变体,

[0130] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0131] SEQ ID NO:138所示的序列,或其变体;

[0132] (5)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0133] SEQ ID NO:131所示的序列,或其变体,

[0134] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0135] SEQ ID NO:132所示的序列,或其变体;

[0136] 优选地,所述抗PD-1-抗CTLA4抗体的免疫球蛋白包含的重链氨基酸序 列如SEQ ID NO:139所示,靶向PD-1;

[0137] 其中所述抗PD-1-抗VEGFA抗体的第一蛋白功能区包含:

[0138] (1)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0139] SEQ ID NO:103所示的序列,或其变体,

[0140] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0141] SEQ ID NO:104所示的序列,或其变体;

[0142] 所述抗PD-1-抗VEGFA抗体的第二蛋白功能区包含:

[0143] (1)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0144] SEQ ID NO:111所示的序列(优选由SEQ ID NO:145所示的核苷酸 序列编码),或其变体,

[0145] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0146] SEQ ID NO:112所示的序列(优选由SEQ ID NO:146所示的核苷酸 序列编码),或其变体;

[0147] 优选地,所述抗PD-1-抗VEGFA抗体的免疫球蛋白包含的重链氨基酸 序列如SEQ ID NO:140所示,靶向VEGFA;

[0148] 其中所述抗PD-1单克隆抗体包含SEQ ID NO:121所示的重链可变区和SEQ ID NO:122所示的轻链可变区,或由其组成;

[0149] 其中所述变体与对应序列具有至少85%,优选86%,87%,88%,89%, 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%以上序列同一 性,或与对应序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9、 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、 27、28、29或30个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序 列。

[0150] 4.项目1-3任一项所述的药物组合物,其中所述特异性结合CD47的抗体 还包含重链恒定区和轻链恒定区,且所述恒定区来自不是鼠类的物种,例如来 自人抗体,优选来自

人IgG或IgM,更优选IgG1,优选地,所述重链恒定区为 Ig gamma-1chain C region, ACCESSION:P01857(SEQ ID NO:58)或Ig gamma-4 chain C region,ACCESSION:P01861.1 (SEQ IDNO:56);所述轻链恒定区为Ig kappa chain C region,ACCESSION:P01834(SEQ ID NO:57),优选地,所述 特异性结合CD47抗体由保藏编号为CCTCC NO:2018135的杂交瘤细胞株 LT012分泌。

[0151] 5.项目1-4任一项所述的药物组合物,按照EU编号系统,所述特异性结 合CD47的抗体和所述免疫球蛋白的重链恒定区在第234位点、235位点和 237位点中的任意1个位点、2个位点或3个位点发生突变,并且突变后, 双特异性抗体与FcγRIIIa和/或C1q的亲和力常数相比突变前降低;优选地, 所述亲和力常数通过Fortebio Octet分子相互作用仪测得,

[0152] 优选地,所述特异性结合CD47的抗体按照EU编号系统包含突变L234A和/ 或L235A, 更优选地,所述免疫球蛋白的重链恒定区具有如下突变组合之一:L234A和L235A;或者 L234A和G237A;或者 L235A和G237A;或者 L234A、L235A、G237A,

[0153] 进一步优选地

[0154] 按照EU编号系统,所述免疫球蛋白的重链恒定区还具有如下突变组合之一:N297A、D265A、D270A、P238D、L328E、E233D、H268D、P271G、A330R、 C226S、C229S、E233P、P331S、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T、 T256E、N297Q、P238S、P238A、A327Q、A327G、P329A、K322A、T394D、 G236R、G236A、L328R、A330S、P331S、H268A、E318A和K320A。

[0155] 6.项目1-5任一项所述的药物组合物,其中所述特异性结合CD47的抗体 包含选自以下组成的组的重链和轻链,或由其组成:

[0156] (1)SEQ ID NO:59表示的重链和SEQ ID NO:60表示的轻链;

[0157] (2)SEQ ID NO:61表示的重链和SEQ ID NO:62表示的轻链;

[0158] (3)SEQ ID NO:63表示的重链和SEQ ID NO:64表示的轻链;

[0159] (4)SEQ ID NO:65表示的重链和SEQ ID NO:66表示的轻链;

[0160] (5)SEQ ID NO:67表示的重链和SEQ ID NO:68表示的轻链;和

[0161] (6)SEQ ID NO:69表示的重链和SEQ ID NO:70表示的轻链,

[0162] 所述抗PD-1-抗CTLA4抗体包含选自以下组成的重链和轻链,或由其组 成:

[0163] SEQ ID NO:78表示的重链(优选由SEQ ID NO:77所示的核苷酸序列编码) 和SEQ ID NO:80表示的轻链(优选由SEQ ID NO:79所示的核苷酸序列编码);

[0164] 所述抗PD-1-抗VEGFA抗体包含选自以下组成的组的重链和轻链,或由 其组成:

[0165] SEQ ID NO:141表示的重链(优选由SEQ ID NO:142所示的核苷酸序列编 码)和SEQ ID NO:143表示的轻链(优选由SEQ ID NO:144所示的核苷酸序列 编码);

[0166] 所述抗PD-1单克隆抗体包含选自以下组成的组的重链和轻链,或由其组 成:SEQ ID NO:82表示的重链(优选由SEQ ID NO:81所示的核苷酸序列编 码),SEQ ID NO:84表示的轻链(优选由SEQ ID NO:83所示的核苷酸序列编 码)。

[0167] 7.项目1-6任一项所述的药物组合物,其中所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fd、Fv、dAb、Fab/c、互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例 如,scFv)、双价抗体或结构域抗体。

[0168] 8.项目1-7任一项所述的药物组合物,其中所述特异性结合CD47的抗体 是人源化

抗体、嵌合抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)。

[0169] 9.项目1-8任一项所述的药物组合物,其中所述特异性结合CD47的抗体 以小于大约10^{-5}M,例如小于大约10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M或10^{-10}M 或更小的KD结合人CD47蛋白,或者所述特异性结合CD47的抗体以小于大 约100nM,例如小于大约10nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、 0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM或更小的EC50结合人CD47蛋白。

[0170] 10.项目1-9任一项所述的药物组合物,其中所述特异性结合CD47的抗 体为抗体偶联物形式,其包括项目1-9任一项所述的特异性结合CD47的抗体 或其抗原结合片段,以及与所述特异性结合CD47的抗体或其抗原结合片段偶 联的偶联部分,所述偶联部分为纯化标签(如His标签)、细胞毒性剂,或可 检测的标记。优选地,所述偶联部分为放射性同位素、发光物质、有色物质、 酶或聚乙二醇,或者

[0171] 所述特异性结合CD47的抗体为多特异性抗体形式,优选双特异性抗体形 式,其包括项目1-9任一项所述的特异性结合CD47的抗体或其抗原结合片段, 以及针对其他抗原和/或其他抗原表位的抗体或抗原结合片段,或者所述特异性 结合CD47的抗体为融合蛋白形式,其包括项目1-9任一项所述的特异性结合 CD47的抗体或其抗原结合片段。

[0172] 11.项目1-10任一项所述的药物组合物,其中所述肿瘤治疗剂选自下述的 一种或多种:酪氨酸激酶抑制剂、DNA多聚酶抑制剂、抗人CD20抗体、抗人 PDL-1抗体、抗人PD-1抗体、抗人CTLA-4抗体、BCL-2的抑制剂、抗人EGFR 抗体、抗人HER2抗体、抗人HER3抗体、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂、 抗人VEGFR2抗体、抗人VEGF抗体、蛋白酶体抑制剂、血管生成抑制剂、 Rapidly accelerated fibrosarcoma(RAF)抑制剂、阿卡替尼、双特异性抗体和融合 蛋白药物,优选地,所述治疗剂为Cetuximab,Obinutuzumab或Rituximab,

[0173] 优选地,肿瘤化疗药选自下述的一种或多种:烷化剂,蒽环类药物,抗代 谢药物,抗生素,植物类药物和/或激素类药物,铂类药物(如顺铂、卡铂、奥 沙利铂),阿霉素类,环磷酰胺,紫杉醇(如白蛋白紫杉醇,脂质体紫杉醇, 多烯紫杉醇),依托泊苷,吉西他滨,培美曲塞,卡培他滨,奥拉帕利、芦卡 帕利、尼拉帕利、他拉唑帕利、氟唑帕利,长春碱类,他莫昔芬,甲地孕酮, 戈舍瑞林,门冬酰胺酶、氟尿嘧啶类抗肿瘤药和Azacitidine(阿扎胞苷)、阿糖胞苷、环胞苷。

[0174] 12.项目1-11任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物还包括药 学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0175] 13.项目1-12任一项所述的药物组合物,其中按照抗体的质量计算,所述 组分A与组分B1的质量比为(1:5)-(5:1),例如:1:5、1:4、1:3、 1:2、1:1、2:1、3:1、4:1或5:1,

[0176] 所述组分A与组分B3的质量比为(1:5)-(5:1),例如:1:5、1: 4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1或5:1,

[0177] 或者

[0178] 所述组分B2与组分A的质量比为1:(1-1000),优选为1:(5-500), 更优选为1:(10-100),

[0179] 优选地,所述药物组合物中的组分A和组分B为适于为静脉滴注、皮下 注射、皮内注射、静脉内注射、肌内注射或病灶内注射施用的形式。

[0180] 14.试剂盒,优选用于治疗肿瘤,所述试剂盒包括A产品和产品B,

[0181] 其中所述产品A包含项目1-13任一项中所定义的所述特异性结合CD47 的抗体或

其抗原结合片段，

[0182] 产品B选自下述的一种或多种:产品B1,产品B2和产品B3,其中产品B1为项目1-13任一项中定义的所述双特异性抗体或其抗原结合片段(优选地，当所述双特异性抗体为抗PD-1-抗CTLA4抗体和抗PD-1-抗VEGFA抗体组合 时,所述抗PD-1-抗CTLA4抗体和抗PD-1-抗VEGFA抗体分别以独立包装存 在或存在于同一个包装),产品B2为项目1-13任一项中定义的所述肿瘤化疗 药,产品B3项目1-13任一项中定义的所述抗PD-1单克隆抗体或其抗原结合 片段,其中产品B1、产品B2和产品B3分别以独立包装存在或存在于同一个 包装，

[0183] 优选地,所述试剂盒还包含产品C,所述产品C为项目1-13任一项中定 义的肿瘤治疗剂,并且所述产品C不同于所述产品B，

[0184] 优选地,所述试剂盒还包含产品说明书。

[0185] 15.项目14所述的试剂盒,其中按照抗体的质量计算,所述产品A与产品 B1的质量比为(1:5)-(5:1),例如:1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、 2:1、3:1、4:1或5:1，

[0186] 所述产品A与产品B3的质量比为(1:5)-(5:1),例如:1:5、1: 4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1或5:1，

[0187] 或者

[0188] 肿瘤化疗药的单位剂量为0.1mg-100mg、0.5mg-50mg、1mg-20mg、 2mg-15mg、4mg-12mg或者8mg-12mg，

[0189] 优选地,所述试剂盒中的产品A、产品B或产品C为适合静脉滴注、皮 下注射、皮内注射、静脉内注射、肌内注射或病灶内注射施用的形式。

[0190] 16.治疗或预防肿瘤的方法,包括给予有需求的受试者以有效量的项目 1-13任一项中定义的组分A和组分B,优选地,所述方法还包括给予有需求 的受试者以有效量的项目1-13任一项中定义的组分C，

[0191] 优选地,所述组分A、组分B和组分C同时或顺序施用;更优选地,所 述组分A、组分B和组分C为在手术治疗之前或之后,和/或在放射治疗之前 或之后施用;

[0192] 优选地,当组分B为组分B1和/或组分B3时,所述组分A或组分B的单次 给药剂量为受试者的每千克体重0.1-100mg,优选1-10mg;或者所述组分A或 组分B的单次给药剂量为每位受试者10-1000mg,优选50-500mg、 100-400mg、150-300mg、150-250mg或200mg，

[0193] 优选地,组分B2的单位剂量为0.1mg-100mg、0.5mg-50mg、1mg-20mg、 2mg-15mg、4mg-12mg或者8mg-12mg，

[0194] 优选地,每天两次至约每隔一天一次给药,或每3天、4天、5天、6天、 10天、1周、2周、3周、4周、5周或6周给药一次;

[0195] 优选地,给药方式为静脉滴注、皮下注射、皮内注射、静脉内注射、肌 内注射或病灶内注射施用的形式。

[0196] 17.项目1-13任一项所述的药物组合物,项目14或15所述的试剂盒或项 目16所述的方法,其中所述肿瘤优选为表达CD47的肿瘤,优选癌症,所述 癌症包括实体瘤,血液瘤,淋巴瘤,母细胞瘤,肉瘤,白血病或淋巴样恶性肿 瘤,更优选包括鳞状细胞癌,骨髓瘤,肺癌,小细胞肺癌,非小细胞肺癌,头 颈鳞状细胞癌,胶质瘤(如神经胶质瘤、复发性胶质瘤),急性髓系白血病， 霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,弥漫性大B细胞淋巴瘤,滤泡性淋巴瘤,急 性淋巴细胞白血病,急性粒细胞性白血病,慢性淋巴细胞性白血病,慢性粒细 胞性白血

病,原发性纵向分离大B细胞淋巴瘤,套管细胞淋巴瘤,小淋巴细胞 淋巴瘤,富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤,多发性骨髓瘤,髓样白血 病-1蛋白,复发难治性的外周T细胞淋巴瘤,骨髓增生异常综合症,间变性大 细胞淋巴瘤,套细胞淋巴瘤,边缘区淋巴瘤,骨髓纤维化,真性红细胞增多症、骨髓癌、骨髓及外骨髓增殖,侵袭性系统性肥大细胞增多症、嗜酸性粒细胞增 多症、隆凸性皮肤纤维肉瘤,慢性嗜酸性白血病,胃肠道癌,胃癌或胃-食管结 合部腺癌,卵巢癌,肝癌,淋巴细胞性白血病,大肠癌,子宫内膜癌,前列腺 癌,甲状腺癌,黑色素瘤,软骨肉瘤,神经母细胞瘤,腺癌,胰腺癌,胰腺导 管腺癌,多形性胶质母细胞瘤,骨癌,尤因氏肉瘤,宫颈癌,鼻咽癌,脑癌, 膀胱癌,乳腺癌,三阴性乳腺癌,肠癌,直肠癌,结肠直肠癌,结肠癌,肝细 胞癌,肾细胞癌,透明细胞肾细胞癌,头颈癌,咽喉癌,肝胆癌,中枢神经系 统癌,食道癌,食管鳞癌,恶性胸膜间皮瘤,全身性轻链淀粉样变,淋巴细胞性淋巴瘤,骨髓增生性肿瘤,神经内分泌肿瘤,默克尔细胞癌,睾丸癌和皮肤 癌,腹膜癌、输卵管癌,尿路上皮癌,微卫星高度不稳定性(MSI-H)或 错配修复缺陷(dMMR)癌,间皮瘤。

[0197] 18.单位制剂,优选用于治疗肿瘤,其中,所述单位制剂包含:1～10000mg (优选10-1000mg,优选50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg 或200mg)的项目1-13任一项中定义的组分A和组分B,

[0198] 当组分B为组分B1和/或组分B3时,所述单位制剂包含1～10000mg (优选1-1000mg,优选50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg、 200mg或100mg)的项目1-13任一项中定义的组分B,

[0199] 当组分B为组分B2时,所述单位制剂包含0.1mg-100mg、0.5mg-50mg、 1mg-20mg、2mg-15mg、4mg-12mg或者8mg-12mg的组分B;

[0200] 优选地,所述单位制剂还包含一种或多种项目1-13任一项中定义的组 分C;

[0201] 其中,所述组分A、组分B和组分C分别单独包装。

[0202] 19.单次药物剂量单元,优选用于治疗肿瘤,其包含0.1-10000mg(优选 1-1000mg,优选50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg、200mg 或100mg)的项目1-13任一项中定义的组分A,和组分B,

[0203] 当组分B为组分B1和/或组分B3时,所述单次药物剂量单元包含 0.1-10000mg(优选1-1000mg,优选50-500mg、100-400mg、150-300mg、 150-250mg、200mg或100mg)的项目1-13任一项中定义的组分B,

[0204] 当组分B为组分B2时,所述单次药物剂量单元包含0.1mg-100mg、 0.5mg-50mg、1mg-20mg、2mg-15mg、4mg-12mg或者8mg-12mg的组分B。

[0205] 在具体的实施方案中,所述的肿瘤化疗药选自Azacitidine(阿扎胞苷)、蒽环类药物、阿糖胞苷、吉西他滨、环胞苷。

[0206] 所述的抗人PD-1抗体选自帕博利珠单抗(Pembrolizumab)、纳武单抗(Nivolumab)、西米普利单抗(Cemiplimab)、特瑞普利单抗(Toripalimab)、 信迪利单抗(Sintilimab)、卡瑞利珠单抗(Camrelizumab)、替雷利珠单抗 (Tislelizumab)。

[0207] 所述的抗人CD20抗体选自Rituximab(利妥昔单抗)、Obinutuzumab(奥 滨尤妥珠单抗)、BCD-132、H-02、B-001、IMM-0306、ACE-1755、IMM-03、 JMT-601、TXB-4BC1、GB-4542。

[0208] 所述的抗人EGFR抗体选自Cetuximab(西妥昔单抗)、panitumumab、 necitumumab、nepidermin、nimotuzumab、amivantamab、HS-627、amelimumab、 depatuxizumab、FmAb-2、

GC-1118A、imgatuzumab、MVC-101、SCT-200、 QL-1203、tomuzotuximab、JMT-101、MCLA-158、QL-1105、SYN-004、 MCLA-129、WBP-297、AM-105、BH-2922、BMX-002、CMAB-017、DF-203、 GB-263、JZB-29、SAH-EJ1、SFR-9X0122、UBP-1215、ABX-901、MCLA-125、 TXB-4BC2、111-In-ch806、depatuxizumab mafodotin、DR-50201、DXL-1218、 ENLS-1、FS-101、GI-3000。

[0209] 所述BCL-2的抑制剂选自Venetoclax。

[0210] 所述的HER2或抗HER3抗体选自Trastuzumab(曲妥珠单抗)、trastuzumab emtansine、trastuzumab deruxtecan、margetuximab、pertuzumab、disitamab vedotin、U-31402、ISU-104、SIB-001、9F7-F11、EV-20Sap、U-31402、ARX-788、BAT-8001、 HL-02、TAA-013、trastuzumab duocarmazine、A-166、AU-101、AU-105、BPX-603、 ISB-1302、KN-026、MB-103、MRG-002、zanidatamab、zenocutuzumab、ACE-1702、 ALTP-7、B-002、BAT-8001、BAT-1006、BAY-2701439、BTRC-4017A、CAMH-2、 cinrebafusp alfa、CT-0508、DP-303c、DX-126262、FS-102、FS-1502、GQ-1001、 HS-630、LCB-14、M-802、MBS-301、MT-5111、NJH-395、PF-06804103、 SBT-6050、SENL-006、SHRA-1201、SHRA-1811、TT-16、ZW-49、LZM-006 所述的抗人VERFR2抗体选自Ramucirumab(雷莫芦单抗),AK109， VXM-01、AVI-3207、gentuximab、KD-035、JY-025。

[0211] 所述的紫杉醇类药物选自紫杉醇、白蛋白紫杉醇、脂质体紫杉醇和多烯紫 杉醇(多西他赛)。

[0212] 所述的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂选自palbociclib、seliciclib、milciclib、lerociclib、abemaciclib、ebvaciclib、ribociclib succinate、trilaciclib、SHR-6390、alvocidib hydrochloride、AT-7519、AZD-4573、BEY-1107、BPI-1178、 CT-7001、FCN-437c、FIT-039、NUV-422、PF-07104091、XZP-3287、zotiraciclib citrate、AGM-130、AUR-102、fadraciclib、LY-3405105、HS-10342、ON-123300、 QHRD-107、TQ-05510、voruciclib、JS-101、XH-30002、AZ-5576、ETH-155008、 JS-104、RMC-4550。

[0213] 所述的蛋白酶体抑制剂选自Bortezomib(硼替佐米)、Carfilzomib(卡非 佐米)、Ixazomib(伊沙佐米)。

[0214] 所述的酪氨酸激酶抑制剂选自安罗替尼Acalabrutinib(阿卡替尼)、Brigatinib(布加替尼/布格替尼)、Alectinib Hydrochloride(阿来替尼盐酸盐)、Ibrutinib(依鲁替尼)、Radotinib Dihydrochloride(拉多替尼二盐酸盐)、Bosutinib Monohydrate(伯舒替尼)、Ponatinib Hydrochloride(盐酸普纳替尼)、Crizotinib (克唑替尼)、Ruxolitinib Phosphate(磷酸芦可替尼)、Nlotinib Hydrochloride Hydrate(盐酸尼洛替尼)、Dasatinib Hydrate(达沙替尼)、Imatinib mesylate(甲 磺酸伊马替尼)。

[0215] 所述的angiogenesis inhibitors(血管生成抑制剂)抗体药物选自贝伐珠单 抗、雷莫芦单抗、雷珠单抗。

[0216] 所述的Rapidly accelerated fibrosarcoma(RAF)抑制剂抗体药物选自LY3009120、Dabrafenib(达拉非尼)、Vemurafenib、Sorafenib。

[0217] 所述的激素类抑制剂选自Dexamethasone(地塞米松)、他莫昔芬、托瑞 米芬(toremifen)、氟他胺(flutamide)、尼鲁他胺(nilutamidt)、亮丙瑞林 (leuprolide)、戈舍瑞林(goserelin)、布舍瑞林(bnserelin)、氨鲁米特 (aminoglutethimide)、福美司坦(formesfane)。

[0218] 所述的抗人PD-1抗体选自帕博利珠单抗(Pembrolizumab)、纳武单抗(Nivolumab)、西米普利单抗(Cemiplimab)、特瑞普利单抗(Toripalimab)、信迪利单抗(Sintilimab)、卡瑞利珠单抗(Camrelizumab)、替雷利珠单抗 (Tislelizumab)、Penpulimab(派安普利单抗)。

[0219] 所述的抗人PDL-1抗体选自Atezolizumab(阿特珠单抗)、Avelumab(阿 维单抗)、Durvalumab(德瓦鲁单抗)、AK105。

[0220] 所述的抗人CTLA-4抗体选自ZW25、Ipilimumab(易匹木单抗)、Tremelimumab(曲美木单抗)。

[0221] 所述的抗人PD-1/CTLA-4双特异性抗体选自Cadonilimab、SI-B003、QL1706、XmAb-20717、KN046、MGD019、MEDI5752。

[0222] 所述的抗人PD-1/VEGFA双特异性抗体选自AK112(即VP101(hG1DM))。

[0223] 所述的铂类药物选自顺铂(DDP)、卡铂(CBP)和奥沙利铂(L-OHP)

[0224] 所述的抗人PDL-1抗体选自Avelumab(阿利库单抗)、Atezolizumab(阿 特珠单抗)、Durvalumab、JS-003、CS-100L、LY-3300054>KD-033、CK-301、 CCX-4503、CX-072、KN-035、HRP00052、HRP00049、FAZ-053、GR-1405、 KD-005、HLX-20、KL-A167、CBT-502、STI-A1014、REMD-290、BGB-A333、 BCD-135和MCLA-1450。

[0225] 所述的融合蛋白药物选自Aflibercept(阿柏西普)、AVID200、Trebananib、M7824。

[0226] 在本发明的实施方案中,所述药物为适于注射的形式,优选是适于通过皮 下注射、皮内注射、静脉内注射、肌内注射或病灶内注射施用的形式。

[0227] 在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领 域技术人员所通常理解的含义。并且,本发明中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时, 为了更好地理解本发明,下面提供相关术语的定义和解释。

[0228] 如本发明中所使用的,术语“抗原结合区”意指特异性结合指定抗原的蛋白 或蛋白的部分。例如,含有与抗原相互作用并对抗体赋予其对于抗原的特异性 和亲和力的氨基酸残基的抗体的该部分被称为“抗原结合区”。抗原结合区通常 包括一或多个“互补决定区”(complementarity-determining region,“CDR”)。某些 抗原结合区还包括一个或多个“框架”区(fragment region,“FR”)。CDR是促 成抗原结合特异性和亲和力的氨基酸序列。

[0229] 如本发明中所使用的,术语“抗体”是指任何同种型的完整免疫球蛋白或可 与完整抗体竞争对靶抗原的特异性结合的其抗原结合片段,并且包括,例如嵌 合抗体、人源化抗体、全人源化抗体和双特异性抗体或其抗原结合片段。这样 的“抗体”是抗原结合蛋白的种类。完整抗体通常包含至少两个全长重链和两个 全长轻链,但在一些情况下,可包括更少的链,诸如可只包含重链的天然存在 于骆驼科动物中的抗体。抗体或其抗原结合片段可只来源于单个来源,或可以 是“嵌合的”,即,抗体的不同部分可来源于如下文中进一步描述的两个不同来 源。抗体或其抗原结合片段可通过重组DNA技术在杂交瘤中产生,或通过完 整抗体的酶促或化学切割来产生。除非另外指出,否则术语“抗体”,除了包含 两个全长重链和两个全长轻链的抗体外,还包括其衍生物、变体和片段。

[0230] 如本发明中所使用的,术语“抗体”或“免疫球蛋白链(重链或轻链)”的“抗原 结合

片段”(或简称“片段”),包含缺乏至少一些存在于抗体全长链中的氨基酸但 能够特异性结合抗原的抗体的部分(无论如何获得或合成该部分)。此类片段具 有生物活性,因为它们特异性结合靶抗原并且可与其它抗体或其抗原结合片段 竞争对给定的表位的特异性结合。在一个方面,此类片段将保留至少一个存在 于抗体全长轻链或重链中的CDR,并且在一些实施方案中将包含单个重链和/ 或轻链或其部分。这些生物活性片段可通过重组DNA技术产生,或可以例如 通过完整抗体的酶促或化学切割产生。免疫功能性免疫球蛋白片段包括,但不 限于Fab、Fab’、F(ab’)$_2$、Fab/c、dAb、Fv、结构域抗体和单链抗体,并且可 来源于任何哺乳动物来源,包括但不限于人、小鼠、大鼠、骆驼科动物或兔。还设想本文中公开的抗体的功能性部分例如一个或多个CDR可被共价地结合 于第二蛋白或小分子以生成导向身体中的特定靶标的治疗剂,从而具有双功能 治疗性质或具有延长的血清半衰期,例如融合蛋白。

[0231] 如本发明中所使用的,术语“抗体全长链”、“全长抗体”、“完整抗体(intact antibody)”和“全抗体(whole antibody)”在本文中可互换地用来指这样的抗体,所 述抗体具有基本上与天然抗体结构相似的结构或具有如本文定义的Fc区的重 链。

[0232] 术语“轻链”包括全长轻链和其具有充足的可变区序列来赋予结合特异性 的片段。全长轻链包括可变区结构域V_L和恒定区结构域C_L。轻链的可变区结 构域在多肽的氨基末端。轻链包括κ链和λ链。

[0233] 术语“重链”包括全长重链和其具有充足的可变区序列来赋予结合特异性 的片段。全长重链包括可变区结构域V_H和3个恒定区结构域C_{H1}、C_{H2}和C_{H3}。V_H结构域在多肽的氨基末端,并且C_H结构域在羧基末端,C_{H3}最靠近多肽的 羧基末端。重链可具有任何同种型,包括IgG(包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4 亚型)、IgA(包括IgA1和IgA2亚型)、IgM和IgE。

[0234] 如本发明中所使用的,术语“Fab片段”由一条轻链和C_{H1}以及一条重链的 可变区组成。Fab分子的重链不能与另一条重链分子形成二硫键。

[0235] 如本发明中所使用的,术语“Fc”区含有两个包含抗体的C_{H1}和C_{H2}结构域 的重链片段。两个重链片段通过两个或更多个二硫键以及通过C_{H3}结构域的疏 水相互作用保持在一起。

[0236] 如本发明中所使用的,术语“Fab’片段”含有一条轻链和一条重链的部分(其 含有V_H结构域和C_{H1}结构域以及还有C_{H1}与C_{H2}结构域之间的区域的部分), 以便可在两个Fab’片段的两条重链之间形成链间二硫键以形成F(ab’)$_2$分子。

[0237] 如本发明中所使用的,术语“F(ab’)$_2$片段”含有两条轻链和两条含有C_{H1}与 C_{H2}结构域之间的恒定区的部分的重链,以便在两条重链之间形成链间二硫键。F(ab’)$_2$片段从而由通过两条重链之间的二硫键保持在一起的两个Fab’片段组 成。

[0238] 如本发明中所使用的,术语“Fv区”包含来自重链和轻链的可变区,但缺 乏恒定区。

[0239] 如本发明中所使用的,术语“Fd”片段意指由V_H和C_{H1}结构域组成的抗体 片段(Ward等人,Nature 341:544-546(1989))。

[0240] 如本发明中所使用的,术语“dAb”片段(Ward等人,Nature 341:544-546 (1989))由V_H结构域组成。

[0241] 如本发明中所使用的,术语“Fab’-SH”是本文对Fab’的命名,其中恒定结 构域的

一个或多个半胱氨酸残基携带游离硫醇基团。

[0242] 如本发明中所使用的,术语“Fab/c”片段是免疫球蛋白经胃蛋白酶消化形成 的抗体裂解中间产物,其兼有Fab和Fc区的优点,即具有扩散能力强,体内 代谢清除慢的特点,并能保持高度亲和力(刘建军,《细胞与分子免疫学杂志》, 1989(4):29-29)。

[0243] 如本发明中所使用的,术语“单链抗体”是其中重链与轻链可变区通过柔性 接头连接来形成单条多肽链(其形成抗原结合区)的Fv分子(参见,例如,Bird 等人, Science.242:423-426(1988)和Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 90:5879-5883 (1988))。单链抗体在国际专利申请公开号WO 88/01649和美国专 利U.S.Patent 4,946, 778和U.S.Patent 5,260,203(所述国际专利申请公开号和美国 专利号的公开内容通过引用并入)中进行了详细描述。

[0244] 如本发明中所使用的,术语“结构域抗体”是只含有重链的可变区或轻链的 可变区的免疫功能性免疫球蛋白片段,包括多价结构域抗体或双价结构域抗 体。在一些情况下,两个或更多个V_H区通过肽接头共价地连接,以生成多价 结构域抗体(特别是双价结构域抗体)。双价结构域抗体的两个V_H区可靶向 相同或不同的抗原。

[0245] 如本发明中所使用的,术语“双价抗原结合蛋白”或“双价抗体”包含两个抗 原结合位点。在一些情况下,两个结合位点具有相同抗原特异性。双价抗体可 以是双特异性的。

[0246] 如本发明中所使用的,术语“多特异性抗原结合蛋白”或“多特异性抗体”是 靶向不止一种抗原或表位的抗原结合蛋白或抗体。

[0247] 如本发明中所使用的,术语“双特异性”、“双重特异性”或“双功能性”抗原 结合蛋白或抗体是分别具有两个不同的抗原结合位点的杂交抗原结合蛋白或 抗体。双特异性抗体是一种多特异性抗原结合蛋白或多特异性抗体,并且可通 过多种方法产生,包括,但不限于杂交瘤的融合或Fab’片段的连接。参见,例 如,Songsivilai和Lachmann,1990, Clin.Exp.Immunol.79:315-321;Kostelny 等人,1992,J.Immunol.148:1547-1553。双特异性抗原结合蛋白或抗体的两 个结合位点将结合两个不同的表位,所述表位存在于相同或不同的蛋白质靶标 上。

[0248] 如本发明中所使用的,术语“单抗”和“单克隆抗体”是指,来自一群高度同 源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段,也即除了可能自发出现的自然 突变外,一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的,其通常包含至少2种或更多种的不同 抗体,这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用 Kohler等首次报道的杂交瘤技术获得(Nature,256: 495,1975),但也可采用重 组DNA技术获得(如参见U.S.P 4,816,567)。

[0249] 如本发明中所使用的,术语“人源化抗体”是指,人源免疫球蛋白(受体抗 体)的全部或部分CDR区被一非人源抗体(供体抗体)的CDR区替换后得到 的抗体或抗体片段,其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性 的非人源(例如,小鼠、大鼠或兔)抗体。此外,受体抗体的框架区(FR)的 一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换,或被其他抗体的 氨基酸残基替换,以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详 细内容,可参见例如,Jones et al.,Nature,321:522 525(1986); Reichmann et al., Nature,332:323 329(1988);Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,2:593 596(1992);和 Clark,Immunol.Today 21:397 402(2000)。

[0250] 如本发明中所使用的,术语“表位”是指,抗原上被免疫球蛋白或抗体特异 性结合的部位。“表位”在本领域内也称为“抗原决定簇”。表位或抗原决定簇通 常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成并且通 常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如,表位通常以独特的空 间构象包括至少3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14或15个连续或 非连续的氨基酸,其可以是“线性的”或“构象的”。参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris,Ed.(1996)。在线性表位中,蛋白质与相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中,相互作用的点跨越彼 此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

[0251] 术语“多肽”或“蛋白质”在本文中可互换地用于指氨基酸残基的聚合物。术 语还用于其中一个或多个氨基酸残基是对应的天然存在的氨基酸的类似物或 模拟物的氨基酸聚合物,以及用于天然存在的氨基酸聚合物。术语还可包括已 例如通过添加糖类残基以形成糖蛋白而被修饰的或磷酸化的氨基酸聚合物。多 肽和蛋白质可由天然存在的细胞和非重组细胞产生;或其由基因工程或重组细 胞产生,并且包含具有天然蛋白质的氨基酸序列的分子,或具有天然序列的一 个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的分子。

[0252] 在一些实施方案中,术语“多肽”和“蛋白质”具体地包括抗体,例如抗人 CD47抗体(也称为CD47抗体)、CD47结合蛋白、或其变体,例如具有一个或 多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的抗体或序列。

[0253] 术语“多肽片段”是指相较于全长蛋白质具有氨基末端缺失、羧基末端缺失 和/或内部缺失的多肽。此类片段还可相较于全长蛋白质含有经修饰的氨基酸。在某些实施方案中,片段的长度为约5至500个氨基酸。例如,片段的长度可 为至少5、6、8、10、14、20、50、70、100、110、150、200、250、300、350、 400或450个氨基酸。有用的多肽片段包括抗体的免疫功能片段,包括结合结 构域。在人CD47抗体的情况下,有用的片段包括但不限于CDR区、重链或 轻链的可变结构域、抗体链的部分或正好其包括2个CDR的可变结构域等。

[0254] 多肽的“衍生物”是以与插入、缺失或取代变体不同的方式,例如通过另一 种化学部分的缀合而化学修饰的多肽(例如,抗原结合蛋白或抗体),例如缀合 PEG的多肽。

[0255] 本发明中,如果没有特别说明,位点之前的字母表示突变前的氨基酸,位 点之后的字母表示突变后的氨基酸。

[0256] 在本发明的一些实施方案中,所述单链抗体的VH与VL之间存在二硫键。在抗体的VH和VL之间引入二硫键的方法是本领域熟知的,例如可参见美国 专利US5,747,654;Rajagopal et.al,Prot.Engin.10(1997)1453-1459;Reiter et.al, Nat.Biotechnol.14(1996)1239-1245;Reiter et.al,Protein Engineering 8(1995)1323-1331;Webber et.al,Molecular Immunology 32(1995)249-258;Reiter et.al,Immunity 2(1995)281-287;Reiter et.al,JBC 269(1994)18327-18331;Reiter et.al,Inter.J.of Cancer 58(1994)142-149;或者Reiter et.al,Cancer Res.54(1994)2714-2718;其通过引用并入本文。

[0257] 如本发明中使用的,术语“特异性结合”是指,两分子间的非随机的结合反 应,如抗体和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中,特异性结合某 抗原的抗体(或对某抗原具有特异性的抗体)是指,抗体以小于大约10^{-5}M, 例如小于大约10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、

10^{-9}M或10^{-10}M或更小的亲和力(K_D) 结合该抗原。

[0258] 如本发明中所使用的,术语“K_D”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡 常数,其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。在分子结合动力学测定的几 个参数中,K_D值为解离平衡常数,在抗体药物研究中,是表征被测抗体与靶抗 原分子亲和作用的强弱的参数,计算方法为KD=kdis/kon,解离平衡常数越小, 抗体-抗原结合越紧密,抗体与抗原之间的亲和力越高。Kon,结合速率常数= 抗原抗体复合物形成的速率,kon愈小提示抗体与抗原结合的速度愈快;kdis, 解离速率常数=抗体从抗原-抗体复合物中解离的速率,kdis愈小即抗体从抗原 上脱离的速度愈慢,抗体与抗原结合越稳固。通常,抗体以小于大约10^{-5}M, 例如小于大约10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M或10^{-10}M或更小的解离平衡常 数(K_D)结合抗原(例如,L1蛋白),例如,如使用表面等离子体共振术(SPR) 在BIACORE仪或Fortebio分子相互作用仪中测定的。

[0259] 如本发明中所使用的,术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互 换使用;术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用;术语“多肽” 和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中,氨基酸通常用本 领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如,丙氨酸可用A或Ala表示。

[0260] 如本发明中所使用的,术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”可互换使用,并且 当提及术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”时,其还包括杂交瘤的亚克隆和后代细 胞。

[0261] 如本文中使用的,术语″百分比序列同一性″与″百分比序列同源性″可互换 使用。

[0262] 如本文中使用的,术语“相似性”或“序列相似性”、“同一性”是指两个或更 多个蛋白质或多肽分子的序列之间的关系,如通过比对和比较序列测定的。“百 分比同一性”意指被比较的分子中的氨基酸之间的相同残基的百分比,并且可 基于待比较的最小的分子的大小来计算。为了进行这些计算,必须通过特定的 数学模型或计算机程序(即,“算法”)来解决比对中的缺口(如果有的话)。当用于 多肽时,术语″大体上的同一性″,是指两个肽序列,当例如使用程序GAP或 BESTFIT,利用程序提供的缺省缺口权重,进行最佳对齐时,共有至少70%、75%或80%的序列同一性,至少90%或95%的序列同一性,和至少97%、98%或99%的序列同一性。在某些情况下,不相同的残基位点相异在于保守氨基酸 置换。″保守氨基酸置换″是这样的置换,即其中氨基酸残基被具有拥有相似化 学性质(例如,电荷或正在水性)的侧链R基团的另一个氨基酸残基置换。一般 地,保守氨基酸置换将基本上不改变蛋白质的功能性质。在其中两个或更多个 氨基酸序列彼此相异在于保守置换的情况下,可上调百分比序列同一性以就置 换的保守性质进行修正。用于进行该调整的方法对于本领域技术人员来说是熟 知的。参见例如Pearson,Methods Mol.Biol.243:307-31(1994)。具有拥有相似 化学性质的侧链的氨基酸组的实例包括1)脂肪族羟基侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸:2)脂肪族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸:3)含酰胺侧 链:天冬酰胺和谷氨酰胺:4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸:5)碱性侧 链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸:6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸;和7)含硫侧链: 半胱氨酸和甲硫氨酸。例如,保守氨基酸置换组是缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸-甘 氨酸-丙氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、苏氨酸-丝氨酸、赖氨酸-精氨酸、谷氨酸-天 冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0263] 可选择地,保守置换是在Gonnet等人,Science 256:1443-45(1992)(通过 引用合并入本文)中公开的PAM250对数似然矩阵(PAM250 log-likelihood matrix)中具有正值的

任何变化。“中度保守的”置换是在PAM250对数似然矩阵 中具有非负值的任何变化。

[0264] 通常使用序列分析软件测量多肽的序列同一性。蛋白质分析软件使用分配 给不同置换、缺失和其他修饰(包括保守氨基酸置换)的相似性的量度来匹配序 列。例如,GCG包括程序例如"Gap"和"Bestfit",所述程序(使用由程序指定的 缺省参数)可用于测定密切相关的多肽(例如来自不同生物物种的同源多肽)之 间或野生型蛋白质与其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见,例如, GCG Version 6.1(University of Wisconsin, WI)。还可使用缺省或推荐的参数 利用FASTA比较多肽序列,参见GCG Version 6.10FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供质询序列与搜索序列之间最佳重叠的区域的比对和百分比序列同 一性(Pearson,Methods Enzymol.183:63-98(1990):Pearson,Methods Mo l.Biol. 132:185-219(2000))。当将序列与含有大量来自不同生物的序列的数据库相比 较时,另一个优选算法是计算机程序BLAST,特别地blastp或tblastn(使用程 序提供的缺省参数)。参见,例如,Altschul等人,Mol.Biol.215:403-410(1990): Al tschul等人,Nucleic Acids Res.25:3389-402(1997)。

[0265] 如本文中所使用的,术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药 理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂,其是本领域 公知的(参见例如Remington’s Pharmaceutical Sciences.Edited by Gennaro AR, 19th ed.Pennsylvania:Mack Publishing Company,1995),并且包括但不限于: pH调节剂,表面活性剂,佐剂,离子强度增强剂。例如,pH调节剂包括但不 限于磷酸盐缓冲液;表面活性剂包括但不限于阳离子,阴离子或者非离子型表 面活性剂,例如Tween-80;离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

[0266] 如本文中所使用的,术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的 效果的量。例如,预防疾病(例如肿瘤)有效量是指,足以预防、阻止或延迟 疾病(例如肿瘤)的发生的量;治疗疾病有效量是指,足以治愈或至少部分阻 止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。

[0267] 术语“单次药物剂量单元”表示在给药方案时刻,(优选按照受试者每 kg体重)待给药于受试者的包含本发明所述的抗CD47抗体和联用治疗剂(例 如双特异性抗体、抗PD-1单克隆抗体、和/或肿瘤化疗药)的单次药物剂型, 如注射剂,例如置于安瓿瓶中。在本发明的具体实施方案中,给药方案例如包 括根据每天两次至约每隔一天一次的给药周期来给药单次药物剂量单元,或者 每3天、4天、5天、6天、10天、1周、2周、3周、4周、5周或6周给药一次。

[0268] 在本发明中,如果没有特别说明,所述“第一”(例如第一蛋白功能区、第一连接片段)和“第二”(例如第二蛋白功能区、第二连接片段)是为了指 代上的区分或表述上的清楚,并不具有典型的次序上的含义。

[0269] 药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗上有效的剂量”是当单独使用或 与另一种治疗剂联合使用时保护主体免于疾病发作或促进疾病消退的药物的 任何量,所述疾病消退通过疾病症状的严重程度的降低、无疾病症状阶段的频 率和持续时间的增加、或由疾病折磨引起的损伤或失能的预防来证明。使用熟 练的从业人员已知的多种方法可以评价治疗剂的促进疾病消退的能力,诸如在 临床试验期间在人主体中,在预测对于人类的效力的动物模型系统中,或通过 在体外测定法中测定所述药剂的活性。

[0270] 药物的“预防有效量”是指,其为当单独地或与抗肿瘤剂联合施用给处于 发生癌症的风险的主体(例如,具有恶化前病症的主体)或具有癌症复发的风 险的主体时,抑制癌症的发生或复发的任何药物量。在某些实施方案中,预防 有效量完全阻止癌症的发生或复发。“抑制”癌症的发生或复发是指减少癌症 的发生或复发的可能性,或完全阻止癌症的发生或复发。

[0271] 相对于现有技术,本发明具有例如如下优点:

[0272] 本发明涉及的抗CD47单克隆抗体能通过特异性结合CD47,有效阻断 SIRPα与CD47的结合,进而促进巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用,并且可以 与免疫检查点抑制联用或者与或其它药物联用,显示出更优异的抗肿瘤活性。

附图说明

[0273] 图1.6F7H1L1(hG4)联用Rituximab介导HPMM吞噬Raji细胞的吞噬指 数。

[0274] 图2.6F7H1L1(hG4)联用Azacitidine介导HPMM吞噬HL-60细胞的吞噬 指数。

[0275] 图3.6F7H1L1(hG4)联合PD-1/CTLA-4双特异性抗体促进免疫细胞激活。

[0276] 图4.6F7H1L1(hG4)联合PD-1抗体促进免疫细胞对人肺腺癌细胞系A549 细胞的免疫反应。

[0277] 图5.6F7H1L1(hG4)联合PD-1抗体促进免疫细胞对人卵巢癌细胞系 SK-OV-3细胞的免疫反应。

[0278] 图6.6F7H1L1(hG4)联合PD-1抗体促进免疫细胞对人前列腺癌细胞 LNCAP细胞的免疫反应。

[0279] 图7.6F7H1L1(hG4)联用Cetuximab介导HPMM吞噬HT-29细胞的吞噬指 数。

[0280] 图8.6F7H1L1(hG4)联用Obinutuzumab介导HPMM吞噬Raji细胞的吞噬 指数。

[0281] 图9.6F7H1L1(hG4)与抗PD-1-抗CTLA-4双特异性抗体Cadonilimab联用 对BALB/c-hPD1/hSIRPα小鼠CT26-hCD47肿瘤模型效果。

[0282] 图10.6F7H1L1(hG4)与抗PD-1-抗CTLA-4双特异性抗体Cadonilimab联 用对BALB/c-hPD1/hSIRPα小鼠CT26-hCD47肿瘤模型体重变化。

[0283] 图11.6F7H1L1(hG4)与抗PD-1-抗VEGFA双特异性抗体VP101(hG1DM) 联用对SCID Beige小鼠MDA-MB-231肿瘤模型效果。

[0284] 图12.6F7H1L1(hG4)与抗PD-1-抗VEGFA双特异性抗体VP101(hG1DM) 联用对SCID Beige小鼠MDA-MB-231肿瘤模型体重变化。

[0285] 关于生物材料保藏的说明:

[0286] 杂交瘤细胞株LT012,其于2018年6月21日保藏于中国典型培养物保藏 中心(CCTCC),保藏编号为CCTCC NO:C2018135,保藏地址为中国.武汉. 武汉大学,邮编:430072。

具体实施方式:

[0287] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将 会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实 施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件 (例如参考J.萨姆布鲁克等

著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版，科学出版社)或按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,为 可以通过市场购买获得的常规产品。

[0288] 在本发明的下述实施例中,使用的BALB/C小鼠购自广东省医学实验动物 中心。

[0289] 在本发明的下述实验例中,所用到同型对照抗体,即hIgG1、hIgG4均为 靶向人抗鸡蛋溶酶体(HEL)的抗体,这些抗体的可变区序列来自于Acierno 等人发表的Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies(Acierno等人.J Mol Biol.2007;374(1):130-46. 其中重链可变区序列为SEQ ID No:75所示,轻链可变区序列如SEQ ID NO:76所示),hIgG1的恒定区片段采用Ig gamma-1chain C region, ACCESSION:P01857作为重链恒定区,Ig kappa chain C region,ACCESSION: P01834为轻链恒定区;hIgG4重链恒定区采用Ig gamma-4chain C region, ACCESSION:P01861.1作为重链恒定区并引进S228P突变提高稳定性,Ig kappa chain C region,ACCESSION:P01834为轻链恒定区;hIgG1和hIgG4均为在中 山康方生物医药有限公司的实验室制得。

[0290] 在本发明的下述实验例中所使用的外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell,PBMC)在中山康方生物医药有限公司分离制备,按照分离 液Ficoll-PaqueTM Plus试剂说明书分离健康人外周血PBMC,分离后的PBMC 计数,冻存。健康人外周血以及PBMC的分离提取均经提供者知情同意。

[0291] 在本发明的下述实验例中,所用到的人外周巨噬细胞(Human peripheral monocyte derived macrophage,HPMM)由PBMC诱导而来。

[0292] 在本发明的下述实验例中所使用的的抗PD-1/CTLA-4双特异性抗体 Cadonilimab即CP004(hG1TM)抗体轻链和重链序列来源于陈列于WHO Drug Information,Proposed INN:List 124(WHO Drug Information,2020;34(4)： 947-949,重链序列如SEQ ID NO:78所示,其编码核苷酸序列如SEQ ID NO:77 所示,轻链序列如SEQ ID NO:80所示,其编码核苷酸序列如SEQ ID NO:79 所示)。所述的抗PD-1抗体Penpulimab抗体轻链和重链序列来源于陈列于 WHO Drug Information,Proposed INN:List 123(WHO Drug Information,2020; 34(2):375-376,重链序列如SEQ ID NO:82所示,其编码核苷酸序列如SEQ ID NO:81所示,轻链序列如SEQ ID NO:84所示,其编码核苷酸序列如SEQ ID NO:83所示)。所述抗PD-1-抗VEGFA抗体的重链序列如SEQ ID NO:141所 示(由SEQ ID NO:142所示的核苷酸序列编码),轻链序列如SEQ ID NO:143 所示(由SEQ ID NO:144所示的核苷酸序列编码)。

[0293] Cadonilimab、抗PD-1-抗VEGFA抗体和Penpulimab制备方法如下述。将 候选抗体的重链编码基因的DNA序列(包括恒定区和可变区)和轻链编码基 因的的DNA序列(包括恒定区和可变区)分别克隆到pUC57simple(金斯瑞 公司提供)载体中,分别获得pUC57simple-H,pUC57simple-L质粒。分别将 以上质粒进行酶切(HindIII&EcoRI),电泳回收得到的重链、轻链分别亚克隆 到表达载体pcDNA3.1中(购自Invitrogen公司),提取重组质粒,按 pcDNA3.1-H+pcDNA3.1-L进行组合共转染293F细胞。细胞培养7天后,将培 养液通过高速离心、上清浓缩后上样至HiTrap MabSelect SuRe柱,使用蛋白纯 化液相色谱系统(AKTAPurifier 10,GE)进行纯化。将纯化后的样品,即抗 体Cadonilimab,加入还原型蛋白电泳上样缓冲液和非还原型蛋白电泳上样缓 冲液,煮沸后进行SDS-PAGE电泳检测,筛选确证蛋白与理论大小是否符合，由此得到纯化的抗体。

[0294] 实施例1:抗人CD47的抗体6F7的制备

[0295] 1.杂交瘤细胞株6F7的制备

[0296] 杂交瘤细胞株6F7的制备抗CD47抗体所用的抗原为CD47 IgV TEV-His (包括GenbankID:NP 942088.1位置:19-141人CD47成熟肽与TEV(氨基酸 序列为ENLYFQG,SEQ ID NO:74)-his标签的融合蛋白,由中山康方生物医 药有限公司合成)和3T3-CD47细胞(NIH/3T3,厂家:ATCC,货号:CRL-1658, 在NIH/3T3的基础上转染上述人CD47成熟肽进细胞,构建3T3-CD47稳定表 达系)。取免疫后小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合,制成杂交瘤细胞,分 别以CD47 IgV TEV-His,3T3-CD47细胞作为抗原,对杂交瘤细胞进行间接 ELISA法筛选,获得能够分泌与CD47特异性结合的抗体的杂交瘤细胞。对 ELISA筛选得到的杂交瘤细胞,通过竞争ELISA筛选出能够分泌与受体人 SIRPαECD-hFc-Biotin(其中SIRPαECD表示SIRPα的胞外区,蛋白GenBank 登录号:NP_542970.1的位置31-373;hFc为人IgG Fc纯化标签,具体为Ig gamma-1chain C region,GenbankID:P01857位置114-330)竞争结合人CD47 IgV TEV-His的单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并经过有限稀释法得到稳定的杂 交瘤细胞株。将以上杂交瘤细胞株命名为杂交瘤细胞株LT012,其分泌的单克 隆抗体命名为6F7。

[0297] 杂交瘤细胞株LT012(CD47-6F7),其于2018年6月21日保藏于中国典 型培养物保藏中心(CCTCC),保藏编号为CCTCC NO:C2018135,保藏地址 为中国.武汉.武汉大学,邮编:430072。

[0298] 2.抗CD47的抗体6F7的制备

[0299] 用CD培养基(Chemical Defined Medium)对上面制得的LT011、LT012 和LT015细胞株分别进行培养(CD培养基,内含1%青链霉素,于5%CO_2, 37℃细胞培养箱中进行培养),7天后收集细胞培养上清,通过高速离心、微 孔滤膜抽真空过滤以及HiTrap protein AHP柱进行纯化,制得抗体6F7。

[0300] 实施例2:抗CD47的抗体6F7的序列分析

[0301] 按照培养细胞细菌总RNA提取试剂盒(Tiangen,货号DP430)的方法, 从实施例1中培养的LT012细胞株中提取mRNA。

[0302] 按照InvitrogenSuperScript®III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒说明书合成cDNA,并进行PCR扩增。

[0303] PCR扩增产物直接进行TA克隆,具体操作参考pEASY-T1 Cloning Kit (Transgen CT101)试剂盒说明书进行。

[0304] 将TA克隆的产物直接进行测序,测序结果如下:

[0305] 重链可变区的核酸序列如SEQ ID NO:1所示,长度为351bp。

[0306] 其编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,长度为117aa,其中重链CDR1 的序列如SEQ ID NO:5所示,重链CDR2的序列如SEQ ID NO:6所示,重链 CDR3的序列如SEQ ID NO:7所示。

[0307] 轻链可变区的核酸序列如SEQ ID NO:3所示,长度为321bp。

[0308] 其编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,长度为107aa,其中轻链CDR1 的序列如SEQ ID NO:8所示,轻链CDR2的序列如SEQ ID NO:9所示,轻链 CDR3的序列如SEQ ID NO:10所示。

[0309] 实施例3:抗人CD47的人源化抗体6F7 H1L1(hG4)、6F7 H2L2(hG4)和6F7 H3L3

(hG4)的轻链和重链设计和制备

[0310] 1.抗人CD47的人源化抗体6F7 H1L1(hG4)、6F7H2L2(hG4)和6F7 H3L3(hG4) 的轻链和重链设计

[0311] 根据人CD47蛋白的三维晶体结构(Hage T,Reinemer P,Sebald W.Crystals of a 1:1complex between human interleukin-4and the extracellular domain of its receptor alpha chain.Eur J Biochem.1998;258(2):831-6.)以及实施例2获得的抗 体6F7的序列,通过计算机模拟抗体模型,根据模型设计突变,得到抗体 6F7H1L1、6F7 H2L2和6F7 H3L3的可变区序列(抗体恒定区序列,来自NCBI 的数据库,重链恒定区序列为Ig gamma-4chain C region,ACCESSION: P01861.1,在此基础上引进S228P突变提高稳定性;轻链恒定区为Ig kappa chain C region,ACCESSION:P01834)。包含了恒定区的完整抗体分别表示为6F7 H1L1(hG4)、6F7 H2L2(hG4)和6F7 H3L3(hG4)。

[0312] 设计的可变区序列如下:

[0313] (1)人源化单克隆抗体6F7H1L1的重链可变区和轻链可变区序列

[0314] 重链可变区的核酸序列如SEQ ID NO:11所示,长度为351bp。

[0315] 其编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,长度为117aa,其中重链CDR1 的序列如SEQ ID NO:5所示,重链CDR2的序列如SEQ ID NO:6所示,重链 CDR3的序列如SEQ ID NO:7所示。

[0316] 轻链可变区的核酸序列如SEQ ID NO:13所示,长度为321bp。

[0317] 其编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示,长度为107aa,其中轻链CDR1 的序列如SEQ ID NO:8所示,轻链CDR2的序列如SEQ ID NO:9所示,轻链 CDR3的序列如SEQ ID NO:10所示。

[0318] (2)人源化单克隆抗体6F7 H2L2的重链可变区和轻链可变区序列

[0319] 重链可变区的核酸序列如SEQ ID NO:15所示,长度为351bp。

[0320] 其编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示,长度为117aa,其中重链CDR1 的序列如SEQ ID NO:5所示,重链CDR2的序列如SEQ ID NO:6所示,重链 CDR3的序列如SEQ ID NO:7所示。

[0321] 轻链可变区的核酸序列如SEQ ID NO:17所示,长度为321bp。

[0322] 其编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示,长度为107aa,其中轻链CDR1 的序列如SEQ ID NO:8所示,轻链CDR2的序列如SEQ ID NO:9所示,轻链 CDR3的序列如SEQ ID NO:10所示。

[0323] (3)人源化单克隆抗体6F7 H3L3的重链可变区和轻链可变区序列

[0324] 重链可变区的核酸序列如SEQ ID NO:19所示,长度为351bp。

[0325] 其编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示,长度为117aa,其中重链CDR1 的序列如SEQ ID NO:5所示,重链CDR2的序列如SEQ ID NO:6所示,重链 CDR3的序列如SEQ ID NO:7所示。

[0326] 轻链可变区的核酸序列如SEQ ID NO:21所示,长度为321bp。

[0327] 其编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示,长度为107aa,其中轻链CDR1 的序列如SEQ ID NO:8所示,轻链CDR2的序列如SEQ ID NO:9所示,轻链 CDR3的序列如SEQ ID NO:10所示。

[0328] 2.人源化抗体6F7 H1L1(hG4)、6F7 H2L2(hG4)和6F7 H3L3(hG4)的制备

[0329] 将6F7H1L1(hG4)重链cDNA和轻链的cDNA、6F7H2L2(hG4)的重链cDNA 和轻链的cDNA、以及6F7H3L3(hG4)重链cDNA和轻链的cDNA,分别克隆 到pUC57simple(金斯瑞公司提供)载体中,分别获得 pUC57simple-6F7H1(hG4)、pUC57simple-6F7L1;pUC57simple-6F7H2(hG4)、 pUC57simple-6F7L2、pUC57simple-6F7H3(hG4)和pUC57simple-6F7L3。参照《分子克隆实验指南(第二版)》介绍的标准技术,EcoRI&HindIII酶切基因 合成的重、轻链全长基因,通过限制酶(EcoRI&HindIII)的酶切亚克隆到表达载 体pcDNA3.1中;获得表达质粒pcDNA3.1-6F7H1(hG4),pcDNA3.1-6F7L1, pcDNA3.1-6F7H2(hG4)pcDNA3.1-6F7L2,pcDNA3.1-6F7H3(hG4),和 pcDNA3.1-6F7L3,并进一步对重组表达质粒的重轻链基因进行测序分析。随 后将含有相应的轻、重链重组质粒设计基因组合 (pcDNA3.1-6F7H1(hG4)/pcDNA3.1-6F7L1,pcDNA3.1-6F7H2(hG4)/ pcDNA3.1-6F7L2,和pcDNA3.1-6F7H3(hG4)/pcDNA3.1-6F7L3)分别共转染 293F细胞后收集培养液进行纯化。测序验证正确后,制备去内毒素级别的表达 质粒并将质粒瞬时转染HEK293细胞进行抗体表达,培养7天后收集细胞培养 液,采用Protein A柱(MabSelect SURE(GE))进行亲和纯化获得人源化抗 体。

[0330] 实施例4:抗人CD47的人源化抗体6F7H1L1(G1M)、6F7H2L2(G1M)和6F7 H3L3(G1M)的轻链和重链设计和制备

[0331] 1.抗人CD47的人源化抗体6F7H1L1(G1)、6F7H2L2(G1)和6F7 H3L3(G1) 的轻链和重链设计

[0332] 根据人CD47蛋白的三维晶体结构(Hage T,Reinemer P,Sebald W.Crystals of a 1:1complex between human interleukin-4and the extracellular domain of its receptor alpha chain.Eur J Biochem.1998;258(2):831-6.)以及实施例2获得的抗 体6F7的序列,通过计算机模拟抗体模型,根据模型设计突变,得到抗体 6F7H1L1、6F7 H2L2和6F7 H3L3的可变区序列(抗体恒定区序列,来自NCBI 的数据库,重链恒定区为Ig gamma-1chain C region,ACCESSION:P01857; 轻链恒定区为Ig kappa chain C region,ACCESSION:P01834),为了与前述实 施例3中的人源化抗体相区分,上述人源化抗体分别命名为6F7H1L1(G1)、 6F7H2L2(G1)和6F7 H3L3(G1)。

[0333] 本实施例中设计的人源化抗体6F7H1L1(G1)、6F7H2L2(G1)和6F7 H3L3(G1)的可变区序列与实施例3中6F7 H1L1(hG4)、6F7H2L2(hG4)和6F7 H3L3(hG4)的可变区序列一致。

[0334] 2.人源化抗体6F7H1L1(G1)、6F7H2L2(G1)和6F7 H3L3(G1)的制备

[0335] 发明人在6F7H1L1(G1)、6F7H2L2(G1)和6F7 H3L3(G1)的基础上,通过在 其重链铰链区域第234号位点(按照EU编号)引进了亮氨酸到丙氨酸的点突 变(L234A),第235号位点(按照EU编号)引进了亮氨酸到丙氨酸的点突 变(L235A),获得了新的人源化抗体,并分别命名为6F7H1L1(G1M)、 6F7H2L2(G1M)和6F7 H3L3(G1M)。

[0336] 将6F7H1L1(G1M)重链cDNA和轻链的cDNA、6F7H2L2(G1M)的重链 cDNA和轻链的cDNA、以及6F7H3L3(G1M)重链cDNA和轻链的cDNA,分 别克隆到pUC57simple(金斯瑞公司提供)载体中,分别获得 pUC57simple-6F7H1(G1M)、pUC57simple-6F7L1;pUC57simple-6F7H2(G1M)、 pUC57simple-6F7L2、pUC57simple-6F7H3(G1M)和pUC57simple-6F7L3。参照《分子克隆实验指南(第二版)》介绍的标准技术,EcoRI&HindIII酶切基因 合成的重、轻链全长基因,通过限制酶(EcoRI&HindIII)的酶切亚克隆到表达载 体pcDNA3.1中获得表达质粒

pcDNA3.1-6F7H1(G1M)，pcDNA3.1-6F7L1， pcDNA3.1-6F7H2(G1M)，pcDNA3.1-6F7L2，pcDNA3.1-6F7H3(G1M)，和 pcDNA3.1-6F7L3，并进一步对重组表达质粒的重轻链基因进行测序分析。随 后将含有相应的轻、重链重组质粒设计基因组合 (pcDNA3.1-6F7H1(G1M)/pcDNA3.1-6F7L1，pcDNA3.1-6F7H2(G1M)/ pcDNA3.1-6F7L2，和pcDNA3.1-6F7H3(G1M)/pcDNA3.1-6F7L3)分别共转染 293F细胞后收集培养液进行纯化。测序验证正确后，制备去内毒素级别的表达 质粒并将质粒瞬时转染HEK293细胞进行抗体表达，培养7天后收集细胞培养 液，采用Protein A柱(MabSelect SURE(GE))进行亲和纯化获得人源化抗 体。

[0337] 实施例5.6F7H1L1(hG4)联合Rituximab或Azacitidine促巨噬细胞对肿瘤细胞 的吞噬

[0338] 实验材料：Azacitidine(购自Baxter Oncology GmbH)，Hu5F9-G4(中山 康方生物医药有限公司生产)，Raji细胞(上海中科院)，HL-60细胞(ATCC)， RPMI 1640(Gibco，货号：22400-105)，胰酶(0.25％Typsin-EDTA(1×)) (Gibco，货号：25200072)，胎牛血清(FBS)(Excell bio，货号：FSP500)， 荧光染料羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂(56-carboxyfluorescein diacetatesuccinimidyl ester，CFSE)(Biolegend，货号：423801)，重组人巨噬 细胞集落刺激因子(人M-CSF)(peprotech，货号300-25)，APC标记抗人CD11c抗体(APC anti-human CD11c antibody)(Biolegend，货号：301614)，同型 对照(人IgG4)(中山康方生物医药有限公司生产)，Rituximab(Roche)， BSA(厂家：Sigma，货号：V900933-1KG)，Ficoll paque plus(厂家：GE， 货号：17-1440-02)。

[0339] 人外周巨噬细胞(Human peripheral monocyte derived macrophage，HPMM) 的制备：HPMM由PBMC诱导而来。常规复苏冻存的PBMCs，放置培养箱过 夜；第二天将收集PBMCs，170*g离心5min后，用含2％FBS的1640培养基 重悬，在培养箱中放置2h。去上清，用PBS洗涤2次，加入1640完全培养基 (含10％FBS)以及100ng/mL人M-CSF诱导7天。第3天和第5天换液并加 入100ng/mL人M-CSF。收集第7天诱导完成的HPMM，170*g离心5min，弃 上清，用1640完全培养基(含10％FBS)重悬调整细胞密度为$1*10^6$万/mL， 并分装至1.5mL的EP管中备用。

[0340] 1.6F7H1L1(hG4)联合Rituximab促进巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬

[0341] 实验目的：本实验在体外细胞学水平上对比了6F7H1L1(hG4)联用 Rituximab与单用6F7H1L1(hG4)对人Burkitt's淋巴瘤(Burkitt's Lymphoma)细 胞系Raji介导的抗体依赖的细胞吞噬作用(Antibody Dependent Cellular Phagocytosis，ADCP)。试验体系以HPMM作为效应细胞，以Burkitt's淋巴 瘤细胞系Raji作为靶细胞。

[0342] 试验方法：常规收集对数期的Raji细胞，170xg离心5min，重悬后用PBS 洗涤一次。取CFSE(2.5μM)重悬Raji细胞(染色密度：$1*10^7$细胞/mL)， 放置培养箱孵育20min；加入6mL的1640完全培养基终止染色，170xg离心 5min，弃上清；再加入1mL的1640完全培养基重悬，放置培养箱孵育10min； 各抗体用1640完全培养基稀释至如图所示工作浓度，并同时设计同型对照抗 体(抗HEL抗体，人IgG4)。将抗体和靶细胞按体积1:1加至相应已含HPMM 的EP管中(终体积100μL，效应细胞与靶细胞比例为$5*10^4$比$1.5*10^5$)，重 悬混匀，放置37℃培养箱孵育2h；每管加800μL室温1％PBSA(含1％BSA 的PBS)溶液，1200xg离心5min，弃上清；用800μL的1％PBSA洗涤一次； 按100μL/样本将APC标记抗人CD11c抗体(Biolegend lot:371506)(用1％PBSA400 倍稀释)加至相应样本进行标记，冰上孵育40min。每管加800μL

1%PBSA，1200xg离心5min，弃上清；用800μL的1%PBSA洗涤一次；每管加200μL 1% PBSA重悬，FACS Calibur流式细胞仪上机检测。上机体系中巨噬细胞为 APC-CD11b^{+}阳性，发生吞噬作用的巨噬细胞则为APC-CD11b^{+}CFSE^{+}双阳性。以双阳性细胞在APC阳性细胞中的比例作为吞噬指数，评价抗体介导的ADCP 活性。按如下公式计算各组ADCP活性，以P%表示：

[0343] $$P\% = \frac{发生吞噬作用巨噬细胞细胞数}{巨噬细胞总数} \times 100\%$$

[0344] 实验结果：本实施例中以HPMM为效应细胞，以Raji为靶细胞，检测 6F7H1L1(hG4)联用Rituximab的抗体介导的细胞吞噬活性(ADCP)。结果如 图1所示，Rituximab，6F7H1L1(hG4)的吞噬指数明显高于空白对照及同型对 照(人IgG4)，表明Rituximab，6F7H1L1(hG4)具有ADCP活性。6F7H1L1(hG4) 联用Rituximab的吞噬指数明显高于6F7H1L1(hG4)，说明6F7H1L1(hG4)联用 Rituximab后的ADCP活性比单药强。

[0345] 2.6F7H1L1(hG4)联合Azacitidine促进巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬

[0346] 实验目的：本实验在体外细胞学水平上对比了6F7H1L1(hG4)联用 Azacitidine与单用6F7H1L1(hG4)对急性髓系白血病(Acute Myelocytic Leukemia，AML)细胞系HL-60介导的抗体依赖的细胞吞噬作用ADCP。试验 体系以HPMM作为效应细胞，以不同浓度Azacitidine处理AML细胞系HL-60 作为靶细胞。

[0347] 试验方法：常规收集HL-60，铺于6孔板中，每孔4*10^{5}/2mL 1640完全培 养基，分别加入不同浓度的Azacitidine(工作浓度为3μM，1μM)，同时设置 空白HL-60组，放置培养箱中孵育24h。次日收集加药培养后以及空白的HL-60 细胞，170xg离心5min，重悬后计数并测定活率，用PBS洗涤一次。CFSE用 PBS稀释至2.5μM，取稀释后的CFSE重悬HL-60细胞(染色密度：1*10^{7}细 胞/mL)，放置培养箱孵育20min；加入6mL的1640完全培养基(含10%FBS) 终止染色，170xg离心5min，弃上清；再加入1mL的1640完全培养基重悬， 放置培养箱孵育10min；各抗体用1640完全培养基稀释至20、2μg/mL(工作 浓度为10、1μg/mL)，并同时设计同型对照抗体(抗HEL抗体，人IgG4)。将抗体和靶细胞加至相应已含HPMM的锥底板中(终体积100μL，效应细胞 与靶细胞比例为5*10^{4}比1.5*10^{5})，重悬混匀，放置37℃培养箱孵育2h；每 孔加150μL室温1%PBSA(含1%BSA的PBS)溶液，1000xg离心5min，弃 上清；用200μL的1%PBSA洗涤一次；按100μL/样本将APC标记抗人CD11c 抗体(用1%PBSA400倍稀释)加至相应样本进行标记，冰上孵育40min。每 孔加150μL 1%PBSA，1000xg离心5min，弃上清；用200μL的1%PBSA洗 涤一次；每孔加200μL 1%PBSA重悬，FACS Calibur流式细胞仪上机检测。上机体系中巨噬细胞为APC-CD11b^{+}阳性，发生吞噬作用的巨噬细胞则为 APC-CD11b^{+}CFSE^{+}双阳性。以双阳性细胞在APC阳性细胞中的比例作为吞噬 指数，评价抗体介导的ADCP活性。按本实施例的(1)中所属公式计算各组 ADCP活性，以P%表示。

[0348] 实验结果：本试验以靶向CD47的Hu5F9-G4作为阳性对照抗体，以HPMM 为效应细胞，以HL-60为靶细胞，检测6F7H1L1(hG4)联用Azacitidine的ADCP 活性检测。结果如图2所示，Azacitidine，6F7H1L1(hG4)，Hu5F9-G4的吞噬 指数明显高于空白对照及同型对照(人IgG4)，表明Azacitidine，6F7H1L1(hG4)， Hu5F9-G4具有促吞噬活性。6F7H1L1(hG4)，Hu5F9-G4联用Azacitidine的吞 噬指数明显高于单用抗体，说明6F7H1L1(hG4)，Hu5F9-G4联用Azacitidine 后的ADCP活性比单用抗体强。与同靶点对照抗体Hu5F9-G4比较，

6F7H1L1(hG4)联用Azacitidine的ADCP活性与Hu5F9-G4联用Azacitidine相 当。

[0349] 实施例6. 6F7H1L1(hG4)联合PD-1/CTLA-4双特异性抗体、PD-1抗体促进免 疫细胞激活

[0350] 实验材料:PBMC细胞(中山康方生物医药有限公司分离制备)、A549细 胞(中国科学院细胞中心,货号:KCB-200434YJ)、SK-VO-3细胞(ATCC, 货号:HTB-77)、HL-60细胞(ATCC,货号:CCL-240)、LNCAP(中国 科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)、Raji-PDL1细胞(中山康方生物 医药有限公司构建,按照常规方法构建PDL-1慢病毒载体,包装病毒,感染 Raji细胞,blasticidin筛后得到Raji-PDL1)、DMEM培养基(Gibco,货号: 11995-081)、Trypsin-EDTA(0.25%)phenol red(Gibco,货号:25200072)、 RPMI 1640培养基(Gibco,货号:22400-105)、Blasticidin(Gibco,货号: R210-01)、FBS(Excell bio,货号:FSP500)、SEB(金黄色葡萄球菌肠毒 素抗原)(德诺泰克,货号:S010201)、MMC(丝裂霉素C)(Stressmarq, 货号:SIH-246)、Ficoll-PaqueTM PLUS(厂家:GE Healthcare,货号:17-1440-02)、 human IL-2ELISA KIT(达科为,货号:1110202)、human IFN-γELISA KIT (达科为,货号:1110002)、同型对照(人IgG1(Anti-HEL-isotype control))。

[0351] 1. 6F7H1L1(hG4)联合PD-1/CTLA-4双特异性抗体促进免疫细胞激活

[0352] 实验目的:本实验在体外细胞学水平上对比了6F7H1L1(hG4)联用 PD-1/CTLA-4双特异性抗体(Cadonilimab)与单用6F7H1L1(hG4)对诱导免疫 细胞对过表达人PDL-1的人Burkitt's淋巴瘤细胞系Raji-PDL1细胞的免疫反应 的活性。

[0353] 实验方法:Raji-PDL1细胞用1640+10%FBS完全培养基常规培养。复苏 PBMC,0.5μg/mL SEB活化两天。实验当天,Raji-PDL1细胞用2μg/mL MMC 处理1小时。收集SEB活化两天的PBMC和MMC处理后的Raji-PDL1细胞, PBS洗涤两次,1640+10%FBS完全培养基重悬计数,Raji-PDL1和PBMC均 是$1*10^5$个细胞/孔接种于96孔板;按实验设计加入稀释好抗体,混匀置于37℃, 5%CO_2培养箱共培养3天。3天后,收集细胞培养上清,按ELISA KIT(达科 为生物技术股份有限公司)说明书进行IL-2、IFN-γ检测。实验培养基均是 10%FBS+1640

[0354] 实验结果:结果如图3所示,单用6F7H1L1(hG4)或者单用PD-1/CTLA-4 双特异性抗体抗体相比,可显著的刺激PBMC细胞分泌IFN-γ,而6F7H1L1(hG4) 联用PD-1/CTLA-4双特异性抗体抗体的联用较单药显示出更优的活性,即更为 显著的增强了免疫细胞对人Burkitt's淋巴瘤细胞系Raji-PDL1细胞的免疫反应。

[0355] 2. 6F7H1L1(hG4)联合PD-1抗体促进免疫细胞激活

[0356] (1)6F7H1L1(hG4)联合PD-1抗体促进免疫细胞对人肺腺癌细胞系A549细胞 的免疫反应

[0357] 实验目的:本实验在体外细胞学水平上对比了6F7H1L1(hG4)联用PD-1抗 体(Penpulimab)与单用6F7H1L1(hG4)对诱导免疫细胞对Raji-PDL1细胞和人 肺腺癌细胞系A549细胞的免疫反应。

[0358] 实验方法:Raji-PDL1细胞用1640+10%FBS完全培养基常规培养,A549 细胞用DMEM+10%FBS完全培养基常规培养。复苏PBMC,0.5μg/mL SEB活 化两天。实验当天,Raji-PDL1细胞用2μg/mL MMC处理1小时。收集SEB 活化两天的PBMC和MMC处理后的Raji-PDL1细胞,PBS洗涤两次, 1640+10%FBS完全培养基重悬计数,Raji-PDL1和PBMC均是$1*10^5$个细胞/ 孔接种于96孔板;收集对数生长期A549细胞,A549细胞是$5*10^4$个细胞/孔 接种于96孔

板;按实验设计加入稀释好抗体,混匀置于37℃,5%CO_2培养箱 共培养3天。3天后,收集细胞培养上清,按ELISA KIT说明书进行IL-2、IFN-γ 检测。实验培养基均是10%FBS+1640

[0359] 实验结果:结果如图4所示,单用6F7H1L1(hG4)或者单用PD-1抗体相比,可显著的刺激PBMC细胞分泌IFN-γ,而6F7H1L1(hG4)联用PD-1抗体的联用 较单药显示出更优的活性,即更为显著的增强了免疫细胞对人肺腺癌细胞系 A549细胞的免疫反应。

[0360] (2)6F7H1L1(hG4)联合PD-1抗体促进免疫细胞对人卵巢癌细胞系SK-OV-3细 胞的免疫反应

[0361] 实验目的:本实验在体外细胞学水平上对比了6F7H1L1(hG4)联用PD-1抗 体(Penpulimab)与单用6F7H1L1(hG4)对诱导免疫细胞对Raji-PDL1细胞和人 卵巢癌细胞系SK-OV-3细胞的免疫反应。

[0362] 实验方法:Raji-PDL1细胞用1640+10%FBS完全培养基常规培养,SK-OV-3 细胞用McCoy's 5A(Modified)Medium+10%FBS完全培养基常规培养。复苏 PBMC,0.5μg/mL SEB活化两天。实验当天,Raji-PDL1细胞用2μg/mL MMC 处理1小时。收集SEB活化两天的PBMC和MMC处理后的Raji-PDL1细胞, PBS洗涤两次,1640+10%FBS完全培养基重悬计数,Raji-PDL1和PBMC均 是$1*10^5$个细胞/孔接种于96孔板;收集对数生长期SK-OV-3细胞,SK-OV-3细胞是$5*10^4$个细胞/孔接种于96孔板;按实验设计加入稀释好抗体,混匀置 于37℃,5%CO_2培养箱共培养3天。3天后,收集细胞培养上清,按ELISA KIT 说明书进行IL-2、IFN-γ检测。实验培养基均是10%FBS+1640。

[0363] 实验结果:结果如图5所示,单用6F7H1L1(hG4)或者单用PD-1抗体相比,可显著的刺激PBMC细胞分泌IL-2,而6F7H1L1(hG4)联用PD-1抗体的联用 较单药显示出更优的活性,即更为显著的增强了免疫细胞对人卵巢癌细胞系 SK-OV-3细胞的免疫反应。

[0364] (3)6F7H1L1(hG4)联合PD-1抗体促进免疫细胞对人前列腺癌细胞LNCAP细 胞的免疫反应

[0365] 实验目的:本实验在体外细胞学水平上对比了6F7H1L1(hG4)联用PD-1抗 体(Penpulimab)与单用6F7H1L1(hG4)对诱导免疫细胞对Raji-PDL1细胞和人 前列腺癌细胞LNCAP细胞的免疫反应。

[0366] 实验方法:Raji-PDL1细胞用1640+10%FBS完全培养基常规培养,LNCAP 细胞用RPMI-1640+10%FBS完全培养基常规培养。复苏PBMC,0.5μg/mL SEB 活化两天。实验当天,Raji-PDL1细胞用2μg/mL MMC处理1小时。收集SEB 活化两天的PBMC和MMC处理后的Raji-PDL1细胞,PBS洗涤两次, 1640+10%FBS完全培养基重悬计数,Raji-PDL1和PBMC均是$1*10^5$个细胞/ 孔接种于96孔板;收集对数生长期LNCAP细胞,LNCAP细胞是5×10^4个细 胞/孔接种于96孔板;按实验设计加入稀释好抗体,混匀置于37℃,5%CO_2培养箱共培养3天。3天后,收集细胞培养上清,按ELISA KIT说明书进行IL-2、IFN-γ检测。实验培养基均是10%FBS+1640。

[0367] 实验结果:结果如图6所示,单用6F7H1L1(hG4)或者单用PD-1抗体相比,可显著的刺激PBMC细胞分泌IL-2,而6F7H1L1(hG4)联用PD-1抗体的联用 较单药显示出更优的活性,即更为显著的增强了免疫细胞对人前列腺癌细胞 LNCAP细胞的免疫反应。

[0368] 实施例7. 6F7H1L1(hG4)联合Cetuximab促巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬

[0369] 复苏PBMC(中山康方生物医药有限公司生产,批次:20200521-E),1640 完全培养

基+10％FBS(Excell bio,货号:FSP500,批号:11I025)孵育过夜，次日换成1640完全培养基+2％FBS孵育2h,将上清去掉后用PBS洗涤2次，加入培养箱(90％1640+10％FBS+M-CSF-100ng/mL)诱导成人巨噬细胞 (HPMM,中山康方生物医药有限公司自制),第3天和第5天换液加药,于 诱导第7天进行实验。

[0370] 常规收集HT-29细胞(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,货 号:TCHu103),170xg离心5min,重悬后计数并测定活率,用PBS洗涤一次。CFSE(Biolegend,货号:423801))用PBS稀释至2.5μM,取适量稀释后的 CFSE重悬细胞(染色密度:1000万细胞/mL),放置培养箱孵育20min;加 入6mL的1640完全培养基(含10％FBS)终止染色,170xg离心5min,弃上 清;加入1mL 1640完全培养基,放置培养箱孵育10min,重悬计数,调整细 胞数;

[0371] 6F7H1L1(hG4)以及Cetuximab抗体(中山康方生物医药有限公司生产，批号:20200917)用1640完全培养基稀释至所需浓度,并设计同型对照抗体；收集人巨噬细胞,7170xg离心5min,弃上清计数,转移1.5mL的EP管中，1200xg离心5min,弃上清;将肿瘤细胞+抗体悬液(各50μL)加至已含巨噬 细胞的1.5mL的EP管中,重悬混匀,放置37℃养箱孵育2h;每管加800μL常 温的1％PBSA,1200xg离心5min,弃上清;用800μL的PBSA洗涤一次;按100μL/样本将APC anti-mouse/human CD11b antibody(用PBSA 500倍稀释) (Biolegend,货号:101212,浓度:0.2mg/mL)加至相应样本中,混匀,冰 上孵育40min;每管加800μL 1％PBSA,1200xg离心5min,弃上清;每管用 800μLPBSA洗涤一次;每管加200μL 1％PBSA重悬,转移到流式上样管,上 机。

[0372] 实验结果:本实施例中以HPMM为效应细胞,以HT29为靶细胞,检测 6F7H1L1(hG4)联用Cetuximab的抗体介导的细胞吞噬活性(ADCP)。结果如 图7所示,Cetuximab,6F7H1L1(hG4)的吞噬指数明显高于空白对照及同型对 照(人IgG4),表明Cetuximab,6F7H1L1(hG4)具有ADCP活性。6F7H1L1(hG4) 联用Cetuximab的吞噬指数明显高于6F7H1L1(hG4),说明6F7H1L1(hG4)联用 Cetuximab后的ADCP活性比单药强。

[0373] 实施例8. 6F7H1L1(hG4)联合Obinutuzumab促巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬

[0374] 复苏PBMC(中山康方生物医药有限公司生产,批次:20201126-G),1640 完全培养基+10％FBS(Excell bio,货号:FSP500,批号:11I025)孵育过夜，次日换成1640完全培养基+2％FBS孵育2h,将上清去掉后用PBS洗涤2次，加入培养箱(90％1640+10％FBS+M-CSF-100ng/mL)诱导成人巨噬细胞 (HPMM),第3天和第5天换液加药,于诱导第7天进行实验。

[0375] 常规收集Raji细胞(购买自ATCC),用PBS洗涤一次。CFSE用PBS稀 释至2.5μM,取适量稀释后的CFSE重悬细胞(染色密度:1000万细胞/mL)，放置培养箱孵育20min;加入6mL的1640完全培养基(含10％FBS)终止染 色,170xg离心5min,弃上清;加入1mL1640完全培养基,放置培养箱孵育 10min,调整细胞数为300万/mL;抗体用1640完全培养基稀释至所需浓度，并设计同型对照抗体;收集巨噬细胞,170xg离心5min,调整细胞数为100万 /mL,转移至96孔锥底板中,750xg离心5min,弃上清;将肿瘤细胞+抗体悬 液加至已含巨噬细胞的96孔锥底板,重悬混匀,放置37℃培养箱孵育2h;每 孔加150μL常温的1％PBSA,750xg离心5min,弃上清;用200μL的PBSA 洗涤一次;按100μL/样本将APC anti-mouse/human CD11b antibody(用PBSA 500倍稀释)加至相应样本中,混匀,冰上孵育40min每孔加150μL 1％PBSA，750xg离心5min,弃上清;每孔用200μLPBSA洗涤一次每管加200μL 1％PBSA重悬,转移到流式上样管,上机。

[0376] 实验结果:本实施例中以HPMM为效应细胞,以Raji为靶细胞,检测 6F7H1L1(hG4)联用Obinutuzumab的抗体介导的细胞吞噬活性(ADCP)。结 果如图8所示,Obinutuzumab,6F7H1L1(hG4)的吞噬指数明显高于空白对照及 同型对照(人IgG4、人IgG1),表明Obinutuzumab,6F7H1L1(hG4)具有ADCP 活性。6F7H1L1(hG4)联用Obinutuzumab的吞噬指数高于6F7H1L1(hG4),说明 6F7H1L1(hG4)联用Obinutuzumab后的ADCP活性比单药强。

[0377] 实施例9:6F7H1L1(hG4)与抗PD-1-抗CTLA-4双特异性抗体联用有效治 疗肿瘤

[0378] 为检测6F7H1L1(hG4)抗体与抗PD-1-抗CTLA-4双特异性抗体Cadonilimab 联用的体内抑瘤活性,首先用CT26-hCD47细胞(小鼠结肠癌细胞,购自江 苏集萃药康生物科技股份有限公司),接种于6.43-8.43周龄的雌性 BALB/c-hPD1/hSIRPα小鼠(购买自江苏集萃药康生物科技股份有限公司) 皮下,当平均肿瘤体积达到80-120mm^3时,小鼠根据肿瘤体积随机分成4组, 每组6只。分组当天定义为D0天,并于分组当天D0天开始给药。联合给药 组给药方式为:药物单独配制,先后分别给药(无给药顺序和间隔时间特定 要求,给完一种药物再给予另外一种药物)。造模与具体给药方式见表1。给 药后测量各组肿瘤的长宽,计算肿瘤体积,经独立样本T检验,SPSS 17.0*P<0.05,**P<0.01。

[0379] 表1:6F7H1L1(hG4)抗体与抗PD-1-抗CTLA-4双特异性抗体Cadonilimab 联用治疗CT26-hCD47移植瘤BALB/c-hPD1/hSIRPα小鼠模型的给药方案

[0380]

组别	数量	接种信息	给药信息
同型对照 5mg/kg	6	CT26-hCD47, 5x10^5个细胞, BALB/c-hPD1/hSIRPα小鼠, 皮下	同型对照抗体 hIgG4，每周腹腔给药 2 次，连续给药 4 周，共 7 次
6F7H1L1(hG4) 5mg/kg	6		6F7H1L1(hG4) ，5mg/kg; 每周腹腔给药 2 次，连续给药 4 周，共 7 次
Cadonilimab 0.5mg/kg	6		Cadonilimab（中山康方生物医药有限公司生产，批号：B104C20191206），0.5mg/kg,; 每周腹腔给药 2 次，连续给药 4 周，共 7 次
6F7H1L1(hG4) 5mg/kg, Cadonilimab 0.5mg/kg	6		6F7H1L1(hG4)，5mg/kg; Cadonilimab，0.5mg/kg ; 每周腹腔给药 2 次，连续给药 4 周，共 7 次

[0381] 结果图9所示。结果表明:相比同型对照抗体hIgG4,6F7H1L1(hG4)抗 体与PD-1/CTLA-4双特异性抗体Cadonilimab均能有效抑制小鼠肿瘤的生长， 且6F7H1L1(hG4)+Cadonilimab联用组对此模型展现联合抗肿瘤药效,其联合 对肿瘤的抑制优于受试药单用

组。

[0382] 此外，如图10所示，荷瘤鼠对受试药6F7H1L1(hG4)和Cadonilimab单用 和联用的耐受性均良好，各组对荷瘤小鼠体重无影响。

[0383] 实施例10:6F7H1L1(hG4)抗体与抗PD-1-抗VEGFA双特异抗体联用有效治 疗肿瘤

[0384] 为检测6F7H1L1(hG4)抗体与抗PD-1-抗VEGFA双特异抗体VP101(hG1DM) 联用的体内抑瘤活性，首先用MDA-MB-231细胞(购买自ATCC)，接种于 5-7周龄的SCID Beige小鼠(购买自北京维通利华实验动物技术有限公司)皮 下，当平均肿瘤体积达到120-150mm^3时，小鼠根据肿瘤体积随机分成4组， 每组6只。分组当天定义为D0天，并于分组当天D0天开始给药，并在小鼠 腹腔注射活化后的PBMC。联合给药组给药方式为:药物单独配制，先后分别给药(无给药顺序和间隔时间特定要求，给完一种药物再给予另外一种药物)。造模与具体给药方式见表2。给药后测量各组肿瘤的长宽，计算肿瘤体积，经 单因素方差分析(Bonferroni事后检验)，*P<0.05，**P<0.01。

[0385] 表2:6F7H1L1(hG4)抗体与抗PD-1-抗VEGFA双特异抗体VP101(hG1DM)抗 体联用治疗MDA-MB-231移植瘤SCID Beige小鼠模型的给药方案

[0386]

分组	数量	接种信息	给药信息
同型对照	6	MDA-MB-231, 8x10^6个细胞，SCID Beige小鼠，皮下；分组当天，4x10^6 个CD3抗体活化的人PBMC通过腹腔注射接种于小鼠体内	同型对照抗体 hIgG4, 0.05mg/kg；腹腔注射，每周给药2次，连续给药4周；同型对照抗体 hIgG1DM, 3.75mg/kg；腹腔注射，每周给药1次，连续给药4周
6F7H1L1(hG4) 0.05mg/kg	6		6F7H1L1(hG4) ，0.05mg/kg；腹腔注射，每周给药2次，连续给药4周
VP101(hG1DM) 2mg/kg	6		VP101(hG1DM)（中山康方生物医药有限公司生产，批号：B112C20201205），2mg/kg,；腹腔注射，每周给药1次，连续给药4周
6F7H1L1(hG4) 0.05mg/kg，VP101(hG1DM) 2mg/kg	6		6F7H1L1(hG4)，0.05mg/kg，腹腔注射，每周给药2次，连续给药4周；VP101(hG1DM)，2mg/kg ；腹腔注射，每周给药1次，连续给药4周

[0387] 结果图11所示。结果表明:相比同型对照组，6F7H1L1(hG4)、VP101(hG1DM)均能有效抑制小鼠肿瘤的生长，且 6F7H1L1(hG4)+VP101(hG1DM)联用组对此模型展现联合抗肿瘤药效，其联合 对肿瘤的抑制优于受试药单用组。

[0388] 此外，如图12所示，荷瘤鼠对受试药6F7H1L1(hG4)和VP101(hG1DM) 单用和联用的耐受性均良好，各组对荷瘤小鼠体重无影响。

[0389] 以上对本发明的实施方式进行了具体说明，但本发明创造并不限于所述实 施例，

熟悉本领域的技术人员在不违背本发明精神的前提下还可做出种种的等 同变型或替换，这些等同的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定范围 内。

[0390] 序列表：

[0391] SEQ ID NO:1:6F7重链可变区的核苷酸序列

CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCAGGAGCAGAGCTGGTGAGGCCAGGAGCATCCGTGAA
GCTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACATCCTATTGGATGAACTGGGTGAAG
CAGAGGCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGCATGATCGACCCAAGCGATTCCGAG

[0392] ACCCACAACAATCAGATGTTTAAGGACAAGGCCACCCTGACAGTGGATAAGAGCTCC
AATACCGCCTACATGCACCTGTCTAGCCTGACATCTGAGGACAGCGCCGTGTATCACTG
CGCCCGGCTGTACAGATGGTATTTTGACGTGTGGGGAGCAGGAACCACAGTGACCGTG
TCCTCT

[0393] SEQ ID NO:2:6F7重链可变区的氨基酸序列

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPGQGLEWIGMIDPSDSET

[0394] HNNQMFKDKATLTVDKSSNTAYMHLSSLTSEDSAVYHCARLYRWYFDVWGAGTTVTV
SS

[0395] SEQ ID NO:3:6F7轻链可变区的核苷酸序列

AACATCGTGATGACCCAGTCCCCCAAGTCTATGAGCATGTCCCTGGGCGAGAGGGTGA
CCCTGTCCTGTAAGGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACGTGTCTTGGTTTCAGCAGAA

[0396] GCCACACCAGAGCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCAATCGGTATACAGGCGTG
CCTGACAGATTCACCGGCTCTGGCAGCGCCACAGACTTCACCCTGACAATCTCTAACG
TGCAGGCCGAGGACCTGGCCGATTATCACTGCGGCCAGAGCTACAATTTCCCTTATACC
TTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG

[0397] SEQ ID NO:4:6F7轻链可变区的氨基酸序列

[0398] NIVMTQSPKSMSMSLGERVTLSCKASEIVGTYVSWFQQKPHQSPKLLIYGASNRYTGVPD
RFTGSGSATDFTLTISNVQAEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGTKLEIK

[0399] SEQ ID NO:5 6F7CDR的HCDR1

[0400] GYTFTSYW

[0401] SEQ ID NO:6 6F7CDR的HCDR2

[0402] IDPSDSET

[0403] SEQ ID NO:7 F7CDR的HCDR3

[0404] ARLYRWYFDV

[0405] SEQ ID NO:8 6F7CDR的LCDR1

[0406] EIVGTY

[0407] SEQ ID NO:9 6F7CDR的LCDR2

[0408] GAS

[0409] SEQ ID NO:10 6F7CDR的LCDR3

[0410] GQSYNFPYT

[0411] SEQ ID NO:11 6F7H1的重链可变区核苷酸序列

[0412] CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTGAAGCTGAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACAAGCTATTGGATGAACTGGGTGCGGCAGAGACCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGAATGATCGACCCTTCCGATTCTGAGACCCACAATGCCCAGAAGTTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGACAAGAGCACCTCCACAGCCTACATGCACCTGAGCTCCCTGCGGTCCGAGGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCAGGCTGTACCGCTGGTATTTTGACGTGTGGGGAGCAGGAACCACAGTGACCGTGTCTAGC

[0413] SEQ ID NO:12 6F7H1的重链可变区氨基酸序列

[0414] QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPGQGLEWIGMIDPSDSETHNAQKFQGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTVTVSS

[0415] SEQ ID NO:13 6F7L1的轻链可变区核苷酸序列

[0416] AACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGCCACAATGTCTATGAGCCCAGGAGAGAGGGTGACCCTGTCCTGTAGAGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACGTGTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTAGGCTGCTGATCTACGGAGCAAGCAACAGGTATACCGGAGTGCCAGCACGCTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACAGACTTTACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGCCTGAGGACCTGGCCGATTATCACTGCGGCCAGTCTTACAATTTCCCATATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG

[0417] SEQ ID NO:14 6F7L1的轻链可变区氨基酸序列

[0418] NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSCRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRYTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGTKLEIK

[0419] SEQ ID NO:15 6F7H2的重链可变区核苷酸序列

[0420] CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTGAAGGTGAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACATCCTATTGGATGAACTGGGTGCGGCAGAGACCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGAATCATCGACCCTTCCGATTCTGAGACCTCTAATGCCCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCCTGACAGTGGACAAGAGCACCTCCACAGCCTACATGCACCTGAGCTCCCTGAGGAGCGAGGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCAGGCTGTACCGCTGGTATTTTGACGTGTGGGGAGCAGGAACCACAGTGACCGTGTCTAGC

[0421]

[0422] SEQ ID NO:16 6F7H2的重链可变区氨基酸序列

[0423] QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPGQGLEWIGIIDPSDSETSNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTVTVSS

[0424] SEQ ID NO:17 6F7L2的轻链可变区核苷酸序列

[0425] AACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGCCACACTGTCTCTGAGCCCAGGAGAGAGGGTGACCCTGTCCTGTAGAGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACGTGTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTAGGCTGCTGATCTATGGCGCCAGCAACAGGGCAACCGGCATCCCCGCACGCTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACAGACTTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACCTGGCCGATTACTATTGCGGCCAGTCTTACAATTTCCCATATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG

[0426] SEQ ID NO:18 6F7L2的轻链可变区氨基酸序列

[0427] NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLADYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIK

[0428] SEQ ID NO:19 6F7H3的重链可变区核苷酸序列

[0429] CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTGAA GGTGAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACATCCTATTGGATGAACTGGGTGCGG CAGGCACCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGCATCATCGACCCTTCCGATTCTGAGA CCTCTTACGCCCAGAAGTTTCAGGGCAGGGTGACCCTGACAGTGGACAAGAGCACCT CCACAGCCTATATGGAGCTGAGCTCCCTGCGCAGCGAGGACACAGCCGTGTACTATTG CGCCCGGCTGTACAGATGGTATTTTGACGTGTGGGGAGCAGGAACCACAGTGACCGTG TCTAGC

[0430] SEQ ID NO:20 6F7H3的重链可变区氨基酸序列

[0431] QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGIIDPSDSETS YAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTVTVSS

[0432] SEQ ID NO:21 6F7L3的轻链可变区核苷酸序列

[0433] AACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGCCACACTGTCTCTGAGCCCAGGAGAGAGGGTG ACCCTGTCCTGTAGAGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACCTGTCTTGGTATCAGCAGA AGCCAGGACAGGCACCTAGGCTGCTGATCTACGGAGCCAGCACCAGGGCAACAGGC

[0434] ATCCCCGCACGCTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTTACCCTGACAATCAGCT CCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCCGTGTACTATTGCGGCCAGTCTTACAATTTCCCATA TACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG

[0435] SEQ ID NO:22 6F7L3的轻链可变区氨基酸序列

[0436] NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRASEIVGTYLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIK

[0437] SEQ ID NO:23 6F7重链骨架区FR-H1氨基酸序列

[0438] QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKAS

[0439] SEQ ID NO:24 6F7重链骨架区FR-H2氨基酸序列

[0440] MNWVKQRPGQGLEWIGM

[0441] SEQ ID NO:25 6F7重链骨架区FR-H3氨基酸序列

[0442] HNNQMFKDKATLTVDKSSNTAYMHLSSLTSEDSAVYHC

[0443] SEQ ID NO:26 6F7重链骨架区FR-H4氨基酸序列

[0444] WGAGTTVTVSS

[0445] SEQ ID NO:27 6F7轻链骨架区FR-L1氨基酸序列

NIVMTQSPKSMSMSLGERVTLSCKAS

[0446] SEQ ID NO:28 6F7轻链骨架区FR-L2氨基酸序列

[0447] VSWFQQKPHQSPKLLIY

[0448] SEQ ID NO:29 6F7轻链骨架区FR-L3氨基酸序列

[0449] NRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISNVQAEDLADYHC

[0450] SEQ ID NO:30 6F7轻链骨架区FR-L4氨基酸序列

[0451] FGGGTKLEIK

[0452] SEQ ID NO:31 6F7H1骨架区FR-H1氨基酸序列

[0453] QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKAS

[0454] SEQ ID NO:32 6F7H1骨架区FR-H2氨基酸序列

[0455] MNWVRQRPGQGLEWIGM

[0456] SEQ ID NO:33 6F7H1骨架区FR-H3氨基酸序列

[0457] HNAQKFQGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDTAVYYC

[0458] SEQ ID NO:34 6F7H1骨架区FR-H4氨基酸序列

[0459] WGAGTTVTVSS

[0460] SEQ ID NO:35 6F7L1骨架区FR-L1氨基酸序列

[0461] NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSCRAS

[0462] SEQ ID NO:36 6F7L1骨架区FR-L2氨基酸序列

[0463] VSWFQQKPGQAPRLLIY

[0464] SEQ ID NO:37 6F7L1骨架区FR-L3氨基酸序列

[0465] NRYTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDLADYHC

[0466] SEQ ID NO:38 6F7L1骨架区FR-L4氨基酸序列

[0467] FGGGTKLEIK

[0468] SEQ ID NO:39 6F7H2骨架区FR-H1氨基酸序列

[0469] QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS

[0470] SEQ ID NO:40 6F7H2骨架区FR-H2氨基酸序列

[0471] MNWVRQRPGQGLEWIGI

[0472] SEQ ID NO:41 6F7H2骨架区FR-H3氨基酸序列

[0473] SNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDTAVYYC

[0474] SEQ ID NO:42 6F7H2骨架区FR-H4氨基酸序列

[0475] WGAGTTVTVSS

[0476] SEQ ID NO:43 6F7L2骨架区FR-L1氨基酸序列

[0477] NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRAS

[0478] SEQ ID NO:44 6F7L2骨架区FR-L2氨基酸序列

[0479] VSWFQQKPGQAPRLLIY

[0480] SEQ ID NO:45 6F7L2骨架区FR-L3氨基酸序列

[0481] NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLADYYC

[0482] SEQ ID NO:46 6F7L2骨架区FR-L4氨基酸序列

[0483] FGGGTKLEIK

[0484] SEQ ID NO:47 6F7H3骨架区FR-H1氨基酸序列

[0485] QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS

[0486] SEQ ID NO:48 6F7H3骨架区FR-H2氨基酸序列

[0487] MNWVRQAPGQGLEWIGI

[0488] SEQ ID NO:49 6F7H3骨架区FR-H3氨基酸序列

[0489] SYAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC

[0490] SEQ ID NO:50 6F7H3骨架区FR-H4氨基酸序列

[0491] WGAGTTVTVSS

[0492] SEQ ID NO:51 6F7L3骨架区FR-L1氨基酸序列

[0493] NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRAS

[0494] SEQ ID NO:52 6F7L3骨架区FR-L2氨基酸序列

[0495] LSWYQQKPGQAPRLLIY

[0496] SEQ ID NO:53 6F7L3骨架区FR-L3氨基酸序列

[0497] TRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYC

[0498] SEQ ID NO:54 6F7L3骨架区FR-L4氨基酸序列

[0499] FGGGTKLEIK

[0500] SEQ ID NO:55 IgG1M重链恒定区氨基酸序列

[0501] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS

[0502] VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0503] SEQ ID NO:56重链恒定区Ig gamma-4chain C region氨基酸序列

[0504] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0505] SEQ ID NO:57轻链恒定区Ig kappa chain C region氨基酸序列

[0506] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0507] SEQ ID NO:58重链恒定区Ig gamma-1chain C region氨基酸序列

[0508] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0509] SEQ ID NO:59 6F7H1L1(G1M)重链的氨基酸序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPGQGLEWIGMIDPSDSET
HNAQKFQGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0511] SEQ ID NO:60 6F7H1L1(G1M)轻链的氨基酸序列

NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSCRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRYTGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0513] SEQ ID NO:61 6F7H2L2(G1M)重链的氨基酸序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPGQGLEWIGIIDPSDSETS
NAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0515] SEQ ID NO:62 6F7H2L2(G1M)轻链的氨基酸序列

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPAR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLADYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0517] SEQ ID NO:63 6F7H3L3(G1M)重链的氨基酸序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGIIDPSDSETS
YAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0519] SEQ ID NO:6F764 H3L3(G1M)轻链的氨基酸序列

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRASEIVGTYLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPAR

[0520] FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0521] SEQ ID NO:65 6F7H1L1(hG4)重链的氨基酸序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPGQGLEWIGMIDPSDSET
HNAQKFQGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLF
[0522] PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0523] SEQ ID NO:66 6F7H1L1(hG4)轻链的氨基酸序列

NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSCRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRYTGVPA
[0524] RFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0525] SEQ ID NO:67 6F7H2L2(hG4)重链的氨基酸序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPGQGLEWIGIIDPSDSETS
NAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLF
[0526] PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0527] SEQ ID NO:68 6F7H2L2(hG4)轻链的氨基酸序列

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPAR
[0528] FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLADYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0529] SEQ ID NO:69 6F7H3L3(hG4)重链的氨基酸序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGIIDPSDSETS
[0530] YAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL

YSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV

[0531] VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0532] SEQ ID NO:70 6F7H3L3(hG4)轻链的氨基酸序列

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRASEIVGTYLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPAR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE

[0533] QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0534] SEQ ID NO:71 mFc标签的序列

PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF
VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTIS
KPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEP
VLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

[0535] SEQ ID NO:72 hIgG的重链序列

EVQLEQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFTTYWIEWIKQRPGHSLEWIGEILPGSDSTYYN
EKVKGKVTFTADASSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGFYVYWGQGTTLTVSSAST
KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP

[0536] KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0537] SEQ ID NO:73 hIgG的轻链序列

DIELTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYTSQSMSGIPSRFS

[0538] GSGSGTDFTLSINSVETEDFGVYFCQQSGSWPRTFGGGTKLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0539] SEQ ID NO:74 TEV氨基酸序列

[0540] ENLYFQG

[0541] SEQ ID NO:75 hIgG的重链可变区序列

EVQLEQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFTTYWIEWIKQRPGHSLEWIGEILPGSDS
TYYNEKVKGKVTFTADASSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGFYVYWGQGTTLTVSS

[0542] SEQ ID NO:76 hIgG的轻链可变区序列

DIELTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYTSQSMSGIP
SRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGVYFCQQSGSWPRTFGGGTKLDIK

[0543] SEQ ID NO:77 CP004(hG1TM)重链的核酸序列

[0544] GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTCACTGCGA
CTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGGGTGCGAC
AGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCTACTATCTCAGGAGGCGGGAGATAC
ACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAG
AACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTAT
TGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTG
ACAGTCTCTAGTgccagcaccaaagggcccagcgtgtttcctctcgccccctcctccaaaagcaccagcggaggaaccgctgct
ctcggatgtctggtgaaggactacttccctgaacccgtcaccgtgagctggaatagcggcgctctgacaagcggagtccatacattccctgct
gtgctgcaaagcagcggactctattccctgtccagcgtcgtcacagtgcccagcagcagcctgggcacccagacctacatctgtaacgtcaa
ccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaaagtggagcccaaatcctgcgacaagacacacacctgtccccctgtcctgctcccga
aGCTGCTggagCccctagcgtcttcctctttcctcccaaacccaaggacaccctcatgatcagcagaacccctgaagtcacctgtgtcgt
cgtggatgtcagccatgaggaccccgaggtgaaattcaactggtatgtcgatggcgtcgaggtgcacaacgccaaaaccaagcccaggga
ggaacagtacaactccacctacagggtggtgtccgtgctgacagtcctccaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtg
tccaacaaggctctccctgccccattgagaagaccatcagcaaggccaaaggccaacccagggagccccaggtctatacactgcctccct
ccagggacgaactcaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggtcaagggcttttatcccagcgacatcgccgtcgagtgggagtccaa
cggacagcccgagaataactacaagaccacccctcctgtcctcgactccgacggctccttcttcctgtacagcAAACTGACCGTG
GATAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCATGTTCCGTGATGCACGAGGCA
CTGCACAACCACTATACCCAGAAGTCTCTGAGTCTGTCACCAGGAAAAGGAGGAGGA
GGCTCTGGAGGAGGCGGAAGTGGAGGCGGAGGATCAGGAGGGGGAGGATCTCAGGT
GCAGCTGGTCGAATCCGGAGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCGCTTCCGTGAAGGTCTC
TTGCAAAGCATCAGGCTACAGCTTCACAGGGTATACTATGAACTGGGTGCGGCAGGC
ACCTGGACAGTGTCTGGAATGGATCGGCCTGATTAACCCATACAACAACATCACTAA
CTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCCGGGTGACTTTTACCGTGGACACTAGCATTTCCACC
GCTTACATGGAGCTGAGTCGGCTGAGATCAGACGATACCGGCGTGTATTTTTGCGCA
AGGCTGGATTACAGAAGTTATTGGGGACAGGGAACACTTGTTACAGTCTCTGCTGGA
GGAGGCGGATCTGGAGGAGGAGGATCTGGCGGAGGAGGCAGTGGAGGAGGAGGATC
ACAGGCTGTGGTTACTCAGGAACCAAGCCTGACCGTGAGCCCCGGAGGCACAGTCAC
TCTGACCTGTGGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACCACATCTAACTTCCCTAATTGGGTG
[0545] CAGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTCGATCCCTGATCGGGGGAACCAACAACAAGGC
CAGCTGGACACCCGCCAGATTTTCTGGCAGTCTGCTGGGCGGGAAAGCCGCTCTGAC
CATTAGCGGCGCTCAGCCTGAGGACGAAGCAGAGTACTATTGCGCCCTGTGGTATAG
TAATCATTGGGTGTTCGGGTGTGGGACAAAACTGACCGTGCTGAGA

[0546] SEQ ID NO:78 CP004(hG1TM)重链的氨基酸序列(全长)

[0547] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYT
YYPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV
ESGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQCLEWIGLINPYNNITNYAQKF
QGRVTFTVDTSISTAYMELSRLRSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGTLVTVSAGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFPNWVQQKPGQAPR
SLIGGTNNKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGCGTKL
TVLR (注:下划线表示CDR序列)

[0548] SEQ ID NO:79 CP004(hG1TM)轻链的核酸序列
GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGGTCA
CCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTCAGCAGAA
GCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTGTCTGGAGT
CCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTC
CCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTG

[0549] ACCTTTGGCGCCGGGACAAAACTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCGCTCCCTCCGTC
TTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTC
TGCTGAACAATTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCCC
TGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATAGCACC
TATTCCCTGTCTAGTACACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGAGAAGCACAAAGTGT
ATGCATGCGAAGTGACACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGTGACTAAGTCTTTTAACC
GGGGCGAATGT

[0550] SEQ ID NO:80 CP004(hG1TM)轻链的氨基酸序列(全长)
DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPS

[0551] RFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0552] SEQ ID NO:81 Penpulimab重链的核酸序列:(1344bp)

[0553] GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTCACTGCGA
CTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGGGTGCGAC
AGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCTACTATCTCAGGAGGCGGGAGATACA
CCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAA
CAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGT
GCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACA
GTCTCTAGTGCCAGCACCAAAGGGCCCAGCGTGTTTCCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAA
GCACCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAACC
CGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCT
GTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCA
GCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGT
GGACAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCCTGTCC
TGCTCCCGAAGCTGCTGGAGCCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCCTCCCAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTGTCGTCGTGGATGTCAGCCATG
AGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCA
AAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGA
CAGTCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACA
AGGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGG
AGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACTCACCAAGAACCAGGTGTC
CCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCCAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCC
AACGGACAGCCCGAGAATAACTACAAGACCACCCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCT
CCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACG
TGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCT
GTCCCTGAGCCCCGGCAAA

[0554] SEQ ID NO:82 Penpulimab重链的氨基酸序列:(448aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTY

[0555] YPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS

[0556] TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0557] SEQ ID NO:83 Penpulimab轻链的核酸序列:(642bp)

[0558] GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGGTCA
CCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTCAGCAGAA
GCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTGTCTGGAGTC
CCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCC
CTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGAC
CTTTGGCGCCGGGACAAAACTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTT
CATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTG
CTGAACAATTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCCCTGC
AGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATAGCACCTATT
CCCTGTCTAGTACACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGAGAAGCACAAAGTGTATGC
ATGCGAAGTGACACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGTGACTAAGTCTTTTAACCGGGGC
GAATGT

[0559] SEQ ID NO:84 Penpulimab轻链的氨基酸序列:(214aa)

[0560] DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSR
FSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0561] SEQ ID NO:121 Penpulimab重链可变区的氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGR
YTYYPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGTLVT
VSS

[0562] SEQ ID NO:122 Penpulimab轻链可变区的氨基酸序列

[0563] DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSR
FSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

[0564] SEQ ID NO:123 Penpulimab的HCDR1

[0565] GFAFSSYD

[0566] SEQ ID NO:124 Penpulimab的HCDR2

[0567] ISGGGRYT

[0568] SEQ ID NO:125 Penpulimab的HCDR3

[0569] ANRYGEAWFAY

[0570] SEQ ID NO:126 Penpulimab的LCDR1

[0571] QDINTY

[0572] SEQ ID NO:127 Penpulimab的LCDR2

[0573] RAN

[0574] SEQ ID NO:128 Penpulimab的LCDR3

[0575] LQYDEFPLT

[0576] SEQ ID NO:85 Hu5F9-G4重链氨基酸序列

[0577] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDD TSYNQKFKDRVTITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0578] SEQ ID NO:.86 Hu5F9-G4轻链氨基酸序列

[0579] DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVYSNGNTYLGWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0580] SEQ ID NO:87 14C12重链可变区的氨基酸序列

[0581] EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATISGGGRYTYYPDSVKGRFTI SRDNARNTLYLQMSSLRSEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGTLVTVSA

[0582] SEQ ID NO:88 14C12轻链可变区的氨基酸序列

[0583] DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQ DYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

[0584] SEQ ID NO:89 14C12的HCDR1

[0585] GFAFSSYD

[0586] SEQ ID NO:90 14C12的HCDR2

[0587] ISGGGRYT

[0588] SEQ ID NO:91 14C12的HCDR3

[0589] ANRYGEAWFAY

[0590] SEQ ID NO:92 14C12的LCDR1

[0591] QDINTY

[0592] SEQ ID NO:93 14C12的LCDR2

[0593] RAN

[0594] SEQ ID NO:94 14C12的LCDR3

[0595] LQYDEFPLT

[0596] SEQ ID NO:95 4G10重链可变区的氨基酸序列

[0597] QVKLQESGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNNITNYNQKFMGK ATFTVDKSSSTAYMELLRLTSEDSGVYFCARLDYRSYWGQGTLVTVSAAKTTPPSVY

[0598] SEQ ID NO:96 4G10轻链可变区的氨基酸序列

[0599] QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNFANWVQEKPDHLFTSLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIG DKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTLFQGQFC

[0600] SEQ ID NO:97 4G10的HCDR1

[0601] GYSFTGYT

[0602] SEQ ID NO:98 4G10的HCDR2

[0603] INPYNNIT

[0604] SEQ ID NO:99 4G10的HCDR3

[0605] ARLDYRSY

[0606] SEQ ID NO:100 4G10的LCDR1

[0607] TGAVTTSNF

[0608] SEQ ID NO:101 4G10的LCDR2

[0609] GTN

[0610] SEQ ID NO:102 4G10的LCDR3

[0611] ALWYSNHWV

[0612] SEQ ID NO:103人源化单克隆抗体14C12H1L1重链可变区的氨基酸序列:(118aa)

[0613] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGG GRYTYYPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ GTLVTVSS

[0614] SEQ ID NO:104 14C 12H1L1(M)轻链可变区的氨基酸序列:(108aa,基于 14C 12H1L1所做的氨基酸序列突变位点用下划线标出)

[0615] DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYR ANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKL ELKR

[0616] SEQ ID NO:105 14C12H1L1(M)重链可变区的HCDR1氨基酸序列

[0617] GFAFSSYD

[0618] SEQ ID NO:106 14C12H1L1(M)重链可变区的HCDR2氨基酸序列

[0619] ISGGGRYT

[0620] SEQ ID NO:107 14C12H1L1(M)重链可变区的HCDR3:氨基酸序列

[0621] ANRYGEAWFAY

[0622] SEQ ID NO:108 14C12H1L1(M)轻链可变区的LCDR1氨基酸序列

[0623] QDINTY

[0624] SEQ ID NO:109 14C12H1L1(M)轻链可变区的LCDR2:氨基酸序列

[0625] RAN

[0626] SEQ ID NO:110 14C12H1L1(M)轻链可变区的LCDR3氨基酸序列

[0627] LQYDEFPLT

[0628] SEQ ID NO:111Bevacizumab重链可变区(Bevacizumab-Hv)的氨基酸序列:(123aa)

[0629] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTY TGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVW GQGTLVTVSS

[0630] SEQ ID NO:112Bevacizumab轻链可变区(Bevacizumab-Lv)的氨基酸序列:(107aa)

[0631] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK

[0632] SEQ ID NO:113 Bevacizumab重链可变区的HCDR1氨基酸序列

[0633] GYTFTNYG

[0634] SEQ ID NO:114 Bevacizumab重链可变区的HCDR2氨基酸序列

[0635] INTYTGEP

[0636] SEQ ID NO:115 Bevacizumab重链可变区的HCDR3氨基酸序列 AKYPHYYGSSHWYFDV

[0637] SEQ ID NO:116 Bevacizumab轻链可变区的LCDR1氨基酸序列 QDISNY(SEQ ID NO:116)

[0638] SEQ ID NO:117 Bevacizumab轻链可变区的LCDR2氨基酸序列

[0639] FTS

[0640] SEQ ID NO:118 Bevacizumab轻链可变区的LCDR3氨基酸序列

[0641] QQYSTVPWT

[0642] SEQ ID NO:119:接头1的氨基酸序列

[0643] GGGGSGGGGSGGGGS

[0644] SEQ ID NO:120:接头2的氨基酸序列

[0645] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

[0646] SEQ ID NO:129:14C12H1L1重链可变区的氨基酸序列

[0647] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTYYPDSVKGRF TISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGTLVTVSS

[0648] SEQ ID NO:130:14C12H1L1轻链可变区的氨基酸序列

[0649] DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQ DYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

[0650] SEQ ID NO:131:4G10H1L1重链可变区的氨基酸序列

[0651] QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQGLEWIGLINPYNNITNYNQKFMGK ATFTVDKSISTAYMELSRLTSDDSGVYFCARLDYRSYWGQGTLVTVSA

[0652] SEQ ID NO:132:4G10H1L1轻链可变区的氨基酸序列

[0653] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFANWVQEKPGQAFRSLIGGTNNRASWVPARFSGSLL GGKAALTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

[0654] SEQ ID NO:133:4G10H3L3重链可变区的氨基酸序列

[0655] QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWIGLINPYNNITNYAQKFQGR VTFTVDTSISTAYMELSRLRSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGTLVTVSA

[0656] SEQ ID NO:134:4G10H3L3轻链可变区的氨基酸序列

[0657] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFPNWVQQKPGQAPRSLIGGTNNKASWTPARFSGSLL GGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

[0658] SEQ ID NO:135:4G10H1V(M)的氨基酸序列

[0659] QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQCLEWIGLINPYNNITNYNQKF MGKATFTVDKSISTAYMELSRLTSDDSGVYFCARLDYRSYWGQGTLVTVSA

[0660] SEQ ID NO:136:4G10L1V(M)的氨基酸序列

[0661] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFANWVQEKPGQAFRSLIGGTNNRASWVPARFS GSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFGCGTKLTVLR

[0662] SEQ ID NO:137:4G10H3V(M)的氨基酸序列

[0663] QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQCLEWIGLINPYNNITNYAQKF QGRVTFTVDTSISTAYMELSRLRSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGTLVTVSA

[0664] SEQ ID NO:138:4G10L3V(M)的氨基酸序列

[0665] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFPNWVQQKPGQAPRSLIGGTNNKASWTPARFS GSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGCGTKLTVLR

[0666] SEQ ID NO:139:CP004(hG1TM)中的免疫球蛋白部分的重链的氨基酸序列

[0667] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTYYPDSVK GRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0668] SEQ ID NO:140 Bevacizumab重链的氨基酸序列

[0669] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEP TYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0670] SEQ ID NO:141 VP101(hG1DM)的重链氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEP
TYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP

[0671] PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL
VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTYYPDS
VKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGTLVTVSSGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSP
KTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLE
LKR (SEQ ID NO:141)

[0672] SEQ ID NO:142 VP101(hG1DM)的重链核酸序列

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTCTCTGAGG
CTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAACTATGGAATGAATTGGGTGCGCC
AGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTCGGCTGGATCAACACTTACACCGGGGAAC
CTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTCACCTTCAGCCTGGATACAAGCAAATCC

[0673] ACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAGTCTACTATTGTG
CTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTTTGACGTGTGGGGGCAGGGG
ACTCTGGTGACAGTGAGCAGCGCAAGCACCAAAGGGCCCAGCGTGTTTCCTCTCGCC
CCCTCCTCCAAAAGCACCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGAC
TACTTCCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTCC

ATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGTCACA
GTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACAAGCCCT
CCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACC
TGTCCCCCCTGTCCTGCTCCCGAAGCTGCTGGAGGCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCCTCC
CAAACCCAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTGTCGTCGTG
GATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGG
TGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGGGTGG
TGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCA
AGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAG
GCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACTCACCA
AGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCCAGCGACATCGCCGT
CGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTACAAGACCACCCCTCCTGTCCT
CGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCAAACTGACCGTCGATAAATCTAGGTGG
CAGCAGGGCAACGTGTTCTCTTGTTCCGTGATGCATGAAGCACTGCACAACCATTATAC

[0674] CCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCCCCCGGCAAGGGCGGCGGCGGCTCTGGAGGAGGAGG
CAGCGGCGGAGGAGGCTCCGGAGGCGGCGGCTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG
GAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCAGCAAGCGGAT
TCGCCTTTAGCTCCTACGACATGAGCTGGGTGCGGCAGGCACCTGGCAAGGGTCTGGA
TTGGGTGGCAACCATCAGCGGAGGCGGCAGATACACATACTATCCCGACTCCGTGAAG
GGCAGGTTCACCATCTCCCGCGATAACTCTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAG
CCTGAGGGCCGAGGACACAGCCCTGTACTATTGCGCCAACCGCTACGGCGAGGCCTG
GTTTGCCTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCTAGCGGCGGCGGCGGCAG
CGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGCGGCTCTGGCGGCGGCGGCAGCGATATCCAGAT
GACCCAGTCCCCCTCCTCTATGTCTGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCTTCACATGT
AGAGCCTCCCAGGATATCAACACCTACCTGTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCCGGCAAGA
GCCCTAAGACACTGATCTATCGGGCCAATAGACTGGTGAGCGGAGTGCCTTCCCGGTT
CTCCGGCTCTGGCAGCGGACAGGACTATACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCAGAG
GATATGGCCACATACTATTGCCTGCAGTATGACGAGTTCCCCCTGACCTTCGGGGCTGG
CACTAAGCTGGAGCTGAAAAGA (SEQ ID NO:142)

[0675] SEQ ID NO:143 VP101(hG1DM)的轻链氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSG

[0676] VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:143)

[0677] SEQ ID NO:144 VP101(hG1DM)的轻链核苷酸序列

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGG
TCACCATCACATGCAGTGCTTCACAGGATATTTCCAACTACCTGAATTGGTATCAGCAG
AAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGCTCCCTGCACTCAGGA
GTGCCAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACCGACTTTACTCTGACCATTTCTA
GTCTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTCTACCGTGCCATGG
ACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCAGTGTCT
TCATTTTTCCCCCTAGCGACGAACAGCTGAAATCCGGGACAGCCTCTGTGGTCTGTCT
GCTGAACAACTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCCCT
GCAGAGTGGCAATTCACAGGAGAGCGTGACAGAACAGGACTCCAAAGATTCTACTTAT
AGTCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCTGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATG
CATGTGAGGTCACCCACCAGGGGCTGAGCAGTCCAGTCACCAAGTCATTCAACAGAG
GCGAGTGC (SEQ ID NO:144)

[0678] SEQ ID NO:145 Bevacizumab重链可变区的核苷酸序列:(369bp)

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTCTCT
GAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAACTATGGAATGAATTGGGTG
CGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTCGGCTGGATCAACACTTACACCGGG

[0679] GAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTCACCTTCAGCCTGGATACAAGCA
AATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAGTCTACTA
TTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTTTGACGTGTGGGGGC
AGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGC （SEQ ID NO: 145）

[0680] SEQ ID NO:146 Bevacizumab轻链可变区的核苷酸序列:(321bp)

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGG
TCACCATCACATGCAGTGCTTCACAGGATATTTCCAACTACCTGAATTGGTATCAGCAG
AAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGCTCCCTGCACTCAGGA

[0681] GTGCCAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACCGACTTTACTCTGACCATTTCTA
GTCTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTCTACCGTGCCATGG
ACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAG（SEQ ID NO:146）

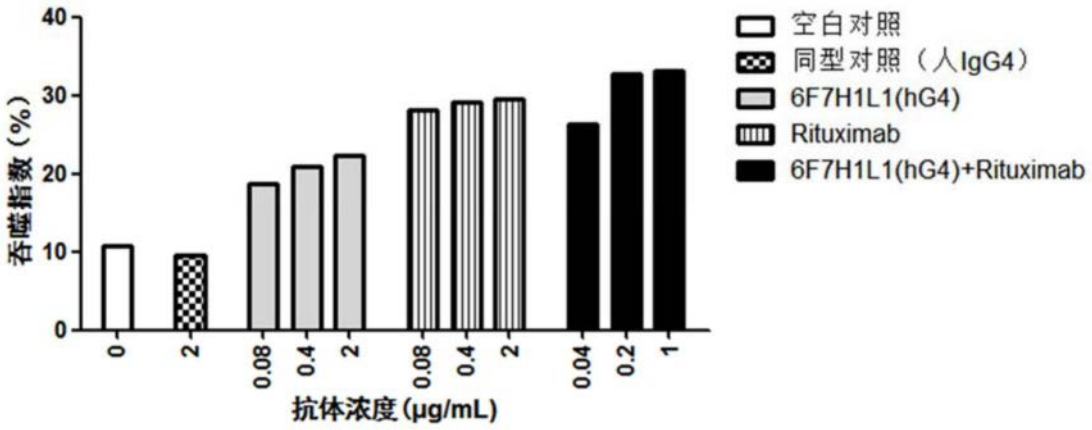

吞噬指数（%）
40
30
20
10
0
0
2
0.08
0.4
2
0.08
0.4
2
0.04
0.2
1
抗体浓度(μg/mL)
空白对照
同型对照（人IgG4）
6F7H1L1(hG4)
Rituximab
6F7H1L1(hG4)+Rituximab

图1

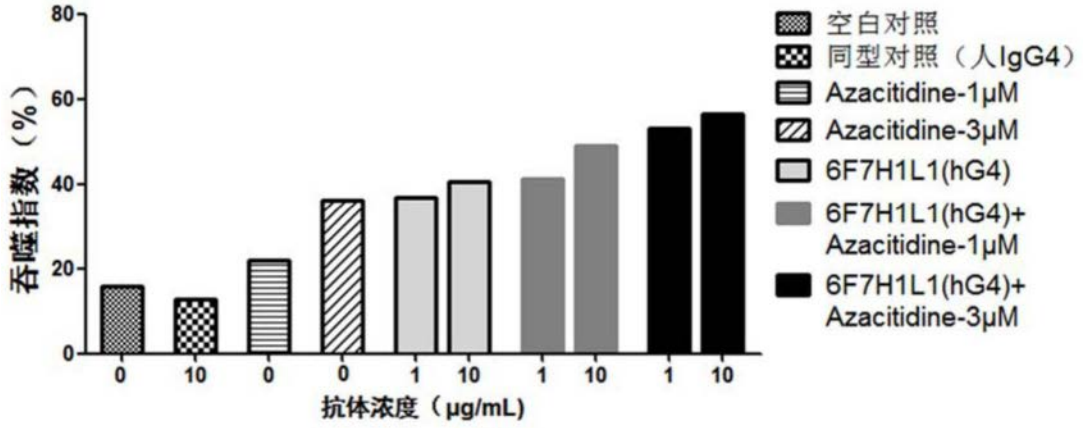

吞噬指数（%）
80
60
40
20
0
0
10
0
0
1
10
1
10
1
10
抗体浓度（μg/mL）
空白对照
同型对照（人IgG4）
Azacitidine-1μM
Azacitidine-3μM
6F7H1L1(hG4)
6F7H1L1(hG4)+
Azacitidine-1μM
6F7H1L1(hG4)+
Azacitidine-3μM

图2

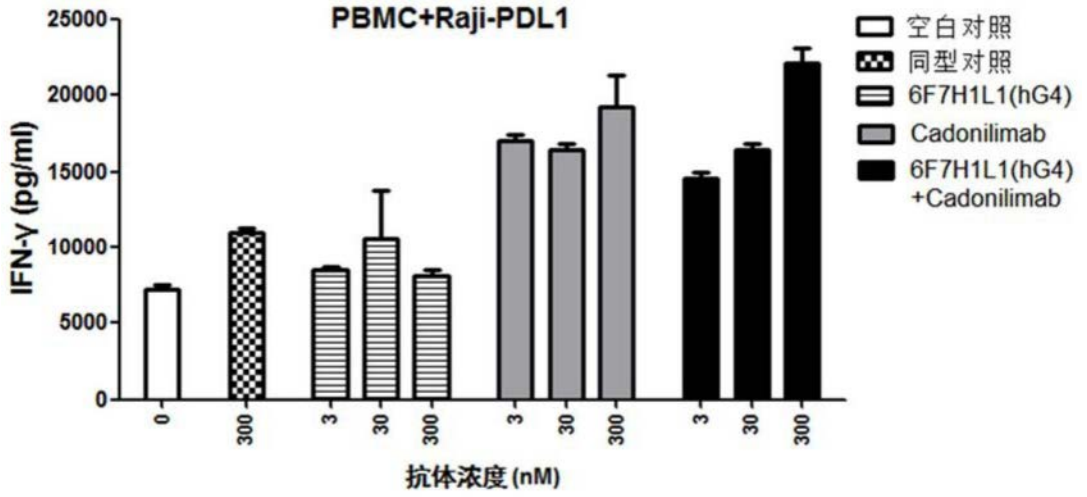

PBMC+Raji-PDL1
IFN-γ (pg/ml)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
300
3
30
300
3
30
300
3
30
300
抗体浓度(nM)
空白对照
同型对照
6F7H1L1(hG4)
Cadonilimab
6F7H1L1(hG4)
+Cadonilimab

图3

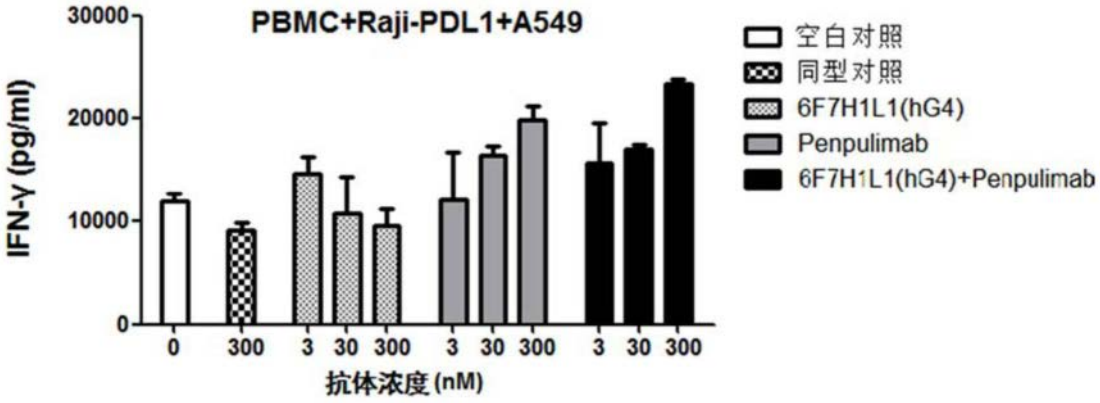

PBMC+Raji-PDL1+A549
IFN-γ (pg/ml)
30000
20000
10000
0
0 300 3 30 300 3 30 300 3 30 300
抗体浓度 (nM)
空白对照
同型对照
6F7H1L1(hG4)
Penpulimab
6F7H1L1(hG4)+Penpulimab

图4

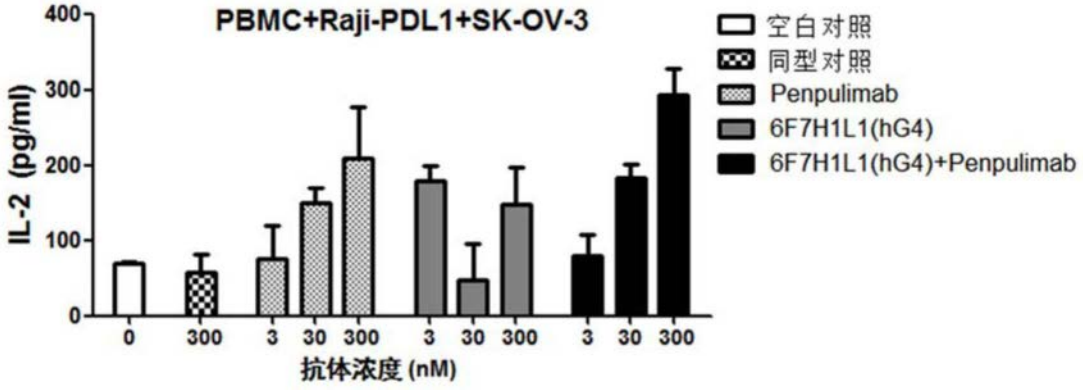

PBMC+Raji-PDL1+SK-OV-3
IL-2 (pg/ml)
400
300
200
100
0
0 300 3 30 300 3 30 300 3 30 300
抗体浓度 (nM)
空白对照
同型对照
Penpulimab
6F7H1L1(hG4)
6F7H1L1(hG4)+Penpulimab

图5

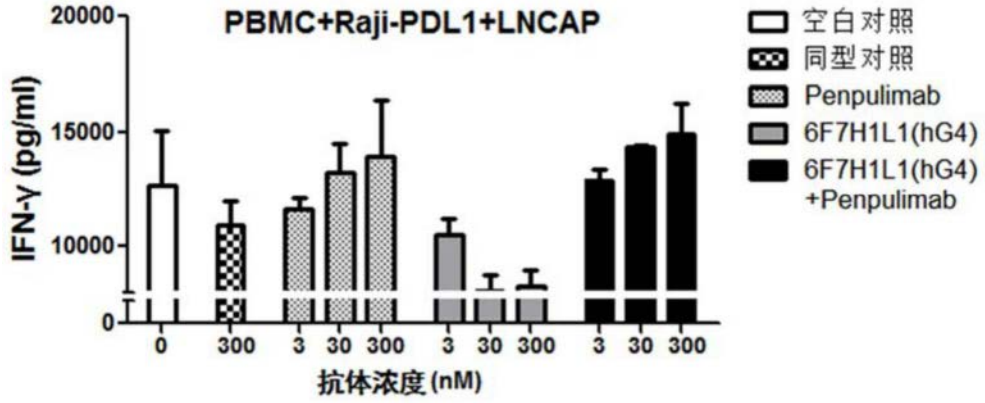

PBMC+Raji-PDL1+LNCAP
IFN-γ (pg/ml)
20000
15000
10000
0
0 300 3 30 300 3 30 300 3 30 300
抗体浓度 (nM)
空白对照
同型对照
Penpulimab
6F7H1L1(hG4)
6F7H1L1(hG4)
+Penpulimab

图6

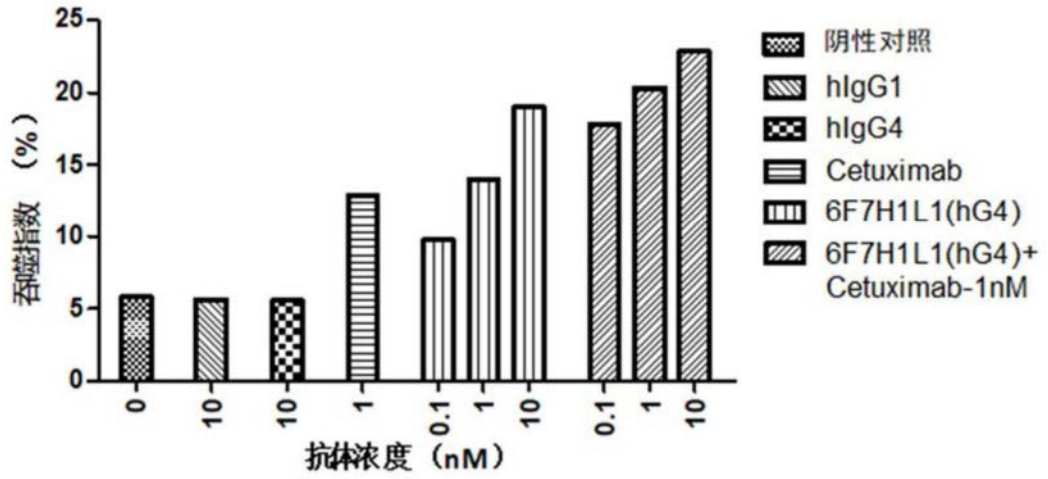

吞噬指数（%）
25
20
15
10
5
0
0
10
10
1
0.1
1
10
0.1
1
10
抗体浓度（nM）
阴性对照
hIgG1
hIgG4
Cetuximab
6F7H1L1(hG4)
6F7H1L1(hG4)+
Cetuximab-1nM

图7

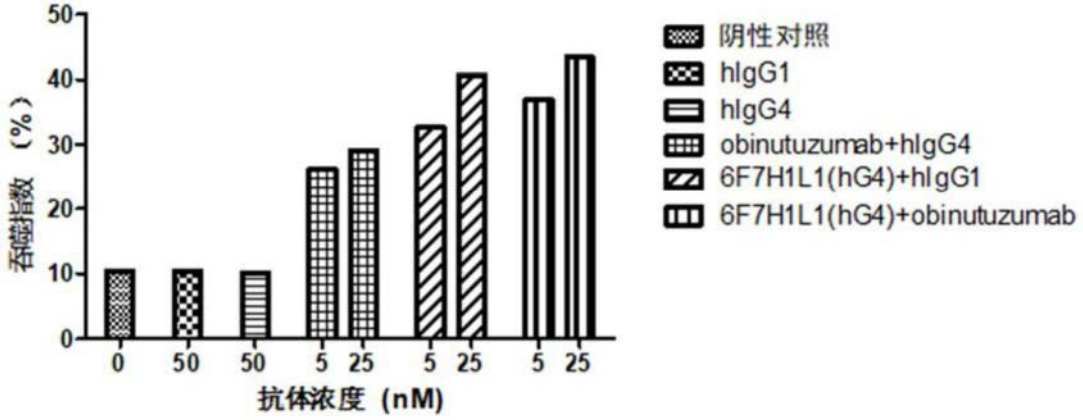

吞噬指数（%）
50
40
30
20
10
0
0
50
50
5
25
5
25
5
25
抗体浓度（nM）
阴性对照
hIgG1
hIgG4
obinutuzumab+hIgG4
6F7H1L1(hG4)+hIgG1
6F7H1L1(hG4)+obinutuzumab

图8

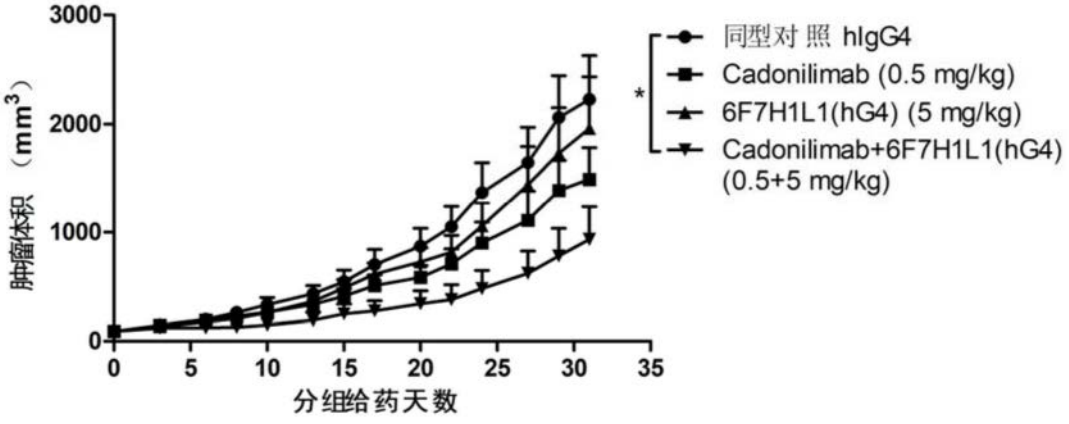

肿瘤体积（mm3）
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
25
30
35
分组给药天数
*
同型对照 hIgG4
Cadonilimab (0.5 mg/kg)
6F7H1L1(hG4) (5 mg/kg)
Cadonilimab+6F7H1L1(hG4)
(0.5+5 mg/kg)

图9

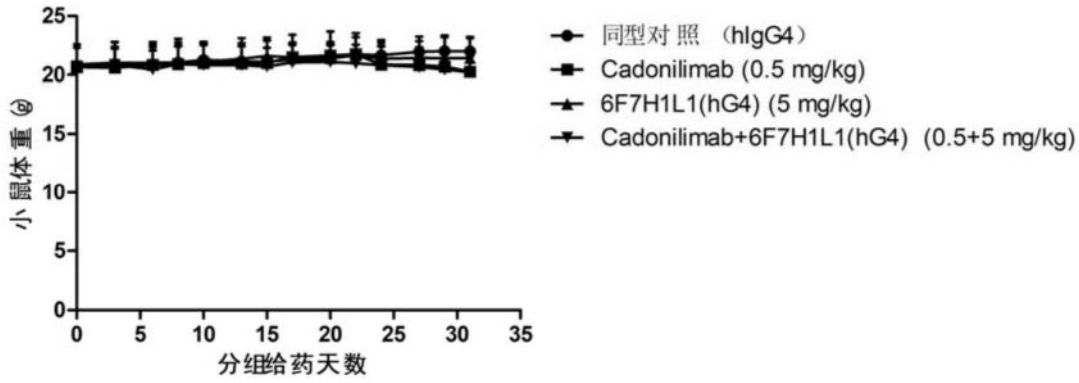

小鼠体重 (g)
分组给药天数
同型对照 (hIgG4)
Cadonilimab (0.5 mg/kg)
6F7H1L1(hG4) (5 mg/kg)
Cadonilimab+6F7H1L1(hG4) (0.5+5 mg/kg)

图10

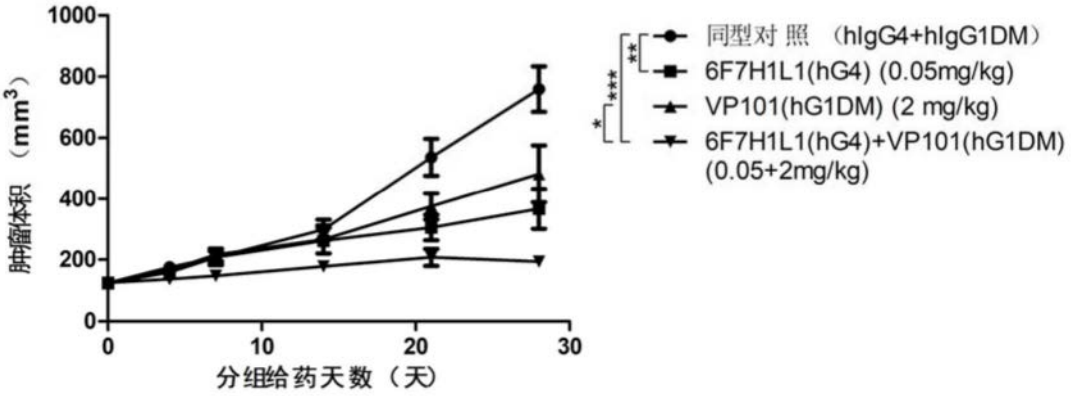

肿瘤体积 (mm3)
分组给药天数 (天)
同型对照 (hIgG4+hIgG1DM)
6F7H1L1(hG4) (0.05mg/kg)
VP101(hG1DM) (2 mg/kg)
6F7H1L1(hG4)+VP101(hG1DM) (0.05+2mg/kg)

图11

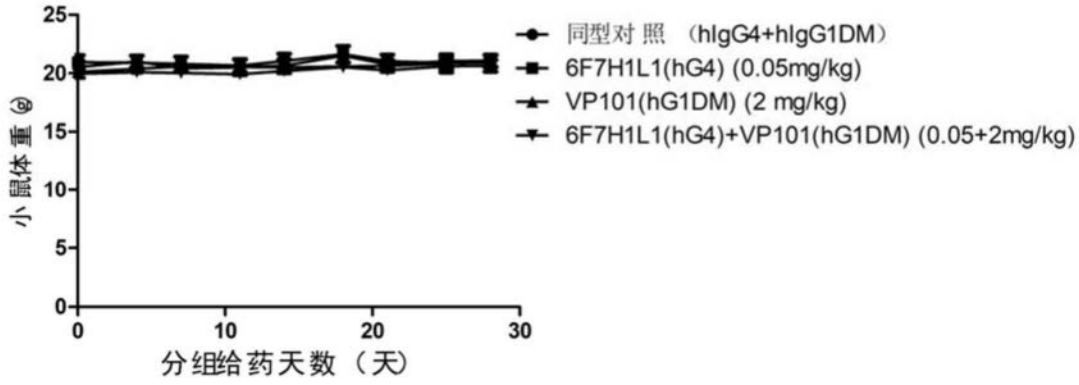

小鼠体重 (g)
分组给药天数 (天)
同型对照 (hIgG4+hIgG1DM)
6F7H1L1(hG4) (0.05mg/kg)
VP101(hG1DM) (2 mg/kg)
6F7H1L1(hG4)+VP101(hG1DM) (0.05+2mg/kg)

图12