

结合 CD47 的抗原结合多肽及用途

技术领域

本发明涉及抗原结合多肽，尤其涉及结合 CD47 的抗原结合多肽及其抗原结合部分，并且涉及使用这类抗原结合多肽及其抗原结合部分的方法。

背景技术

CD47 是一种广泛表达于多个物种和各个组织之间的跨膜糖蛋白，也被称为整合素相关蛋白，是免疫球蛋白超家族中的成员。CD47 约 50kD，其包含 1 个胞外类 Ig 可变结构域、5 个高度疏水延伸的跨膜片段以及 1 个短选择性拼接的羧基端胞质尾区。

抑制性受体信号调节蛋白 α (SIRP α) 是 CD47 的配体之一，CD47 结合在 SIRP α 的 NH₂ 末端 IgV 样结构域。SIRP α 主要表达于髓系来源的细胞，包括巨噬细胞、粒细胞、DC 细胞、肥大细胞以及它们的前体，包括造血干细胞。例如，CD47 可以通过与巨噬细胞表面的蛋白 SIRP α 结合，抑制巨噬细胞的吞噬功能。有研究显示，阻断 CD47 介导的与吞噬细胞上的 SIRP α 结合，或在 CD47 敲除小鼠中的表达缺失，可引起活细胞和非老化红细胞的去除。对于其中还存在预吞噬信号的那些细胞来说，阻断 SIRP α 还允许通常不被吞噬的靶标的吞入。

程序性细胞死亡 (PCD) 和吞噬细胞去除是生物体响应以便除去受损的、癌前或感染的细胞的常见方式。因此，在此生物体响应情况下存活的细胞 (癌性细胞、长期感染的细胞等) 存在用于逃避 PCD 和吞噬细胞去除的方式。CD47 在各类患病细胞、癌细胞以及受感染细胞中组成性上调，从而允许这些细胞逃避吞噬作用。阻断一种细胞 (癌性细胞、长期感染的细胞等) 上的 CD47 与另一种细胞 (吞噬细胞) 上的 SIRP α 之间的相互作用的抗 CD47 化合物，可抵消 CD47 表达的增加并且促进癌细胞和/或受感染细胞的吞噬作用。

CD47 表达和/或活性已经牵涉许多疾病和病症。不同的研究表明，几乎所有的肿瘤细胞和肿瘤组织都高表达 CD47。肿瘤细胞表面高表达的 CD47 通过与巨噬细胞表面 SIRP α 结合，释放“别吃我” (don't eat me) 的信号，从而导致肿瘤组织浸润区的巨噬细胞不但同肿瘤细胞和谐相处，而且还会通过促进肿瘤内血管增殖，抑制效应 T 细胞发挥作用，促进肿瘤细胞扩增和生长。因而需要靶向 CD47 治疗。

发明内容

本发明提供了一种新的分离的与 CD47 结合的抗原结合多肽及其抗原结合部分，为靶向 CD47 的治疗提供解决方案。

一方面，本发明提供了结合 CD47 的分离的抗原结合多肽或其抗原结合部分，其中所述抗原结合多肽包含以下互补决定区：

重链 CDR1，其包含与选自 SEQ ID NO: 1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；

重链 CDR2，其包含与选自 SEQ ID NO: 6、7、8、9 或 10 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；

重链 CDR3，其包含与选自 SEQ ID NO: 11、12、13、14 或 15 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；

轻链 CDR1，其包含与选自 SEQ ID NO: 16、17、18、19 或 20 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；

轻链 CDR2，其包含与选自 SEQ ID NO: 21、22、23、24 或 25 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；和

轻链 CDR3，其包含与选自 SEQ ID NO: 26、27、28、30 或 32 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列。

其中，SEQ ID NO: 32 所示序列为 QQFSX₂STWT，X₂ 为 D 或 E。

另一方面，本发明提供了结合 CD47 的分离的抗原结合多肽或其抗原结合部分，其中所述抗原结合多肽包含以下互补决定区：

重链 CDR1，其包含选自 SEQ ID NO: 1、2、3、4 或 5 或者其保守修饰形式的氨基酸序列；

重链 CDR2，其包含选自 SEQ ID NO: 6、7、8、9 或 10 或者其保守修饰形式的氨基酸序列；

重链 CDR3，其包含选自 SEQ ID NO: 11、12、13、14 或 15 或者其保守修饰形式的氨基酸序列；

轻链 CDR1，其包含选自 SEQ ID NO: 16、17、18、19 或 20 或者其保守修饰形式的氨基酸序列；

轻链 CDR2，其包含选自 SEQ ID NO: 21、22、23、24 或 25 或者其保守修饰形式的氨基酸序列；和

轻链 CDR3，其包含选自 SEQ ID NO: 26、27、28、30 或 32 或者其保守修饰形式的氨基酸序列。

另一方面，本发明提供了结合 CD47 的分离的抗原结合多肽或其抗原结合部分，其中所述抗原结合多肽包含重链可变区和轻链可变区，所述的重链可变区包含与选自 SEQ ID NO: 33、35、37、39、41、83、85 或 87 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列，所述的轻链可变区包含与选自 SEQ ID NO: 34、36、38、40、42、84、86 或 88 的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列。

其中，SEQ ID NO: 83 所示序列为：

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEFIPGSDTTNYAQKFQGRV
TITAX₃X₄STX₅TAYMELSSLRSED₁TAVYYCARGGLRRMDYWGQGT₂LVTVSS，其中，X₃ 为 D 或 E，X₄ 为 I 或 E，X₅ 为 S 或 N；

SEQ ID NO: 84 所示序列为：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSVSSTYLHWYQQKPGKAPKLX₆IYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTX
X₇X₈TLTISLQPEDFATYYCQ₉FSX₂STWTFGQGT₁₀KLEIK，其中，X₆ 为 L 或 W，X₇ 为 D 或 S，X₈ 为 F 或 Y，X₂ 为 D 或 E；

SEQ ID NO: 85 所示序列为：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLX₉WMGWINTNTGEPTYAQX₁₀LQ
GRVTMTX₁₁DTSTX₁₂TAYMELRSLRSDDTAVYYCX₁₃RFSHLRGPM₁₄DYWGQGT₁₅LVTVSS，其中，X₉ 为 E 或 K，X₁₀ 为 K 或 E，X₁₁ 为 L 或 T，X₁₂ 为 R 或 S，X₁₃ 为 A 或 T；

SEQ ID NO: 86 所示序列为：

DX₁₄QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGYTYLHWYQQKPGKAPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCSQSTHVPPTFGQGT₁₅KLEIK，其中，X₁₄ 为 I 或 A；

SEQ ID NO: 87 所示序列为：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKX₁₅SGFNIEDDYIEWVRQAPGQGLEWMGRIDPANDKTKYAQKFQGR
VTMTX₁₆DTSTX₁₇TVYMELSSLRSED₁₈TAVYYCX₁₈RPGLRRYYSMDYWGQGT₁₉LVTVSS，其中，X₁₅ 为 A 或 V，X₁₆ 为 R 或 G，X₁₇ 为 S 或 N，X₁₈ 为 A 或 T；

SEQ ID NO: 88 所示序列为：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYSVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPSRFX₁₉GSGSX₂₀
TDFTLTISLQPEDFATYYCQSYSYPLTFGQGT₂₁KLEIK，其中，X₁₉ 为 S 或 I，X₂₀ 为 S 或 G。

另一方面，本发明提供了结合 CD47 的分离的抗原结合多肽或其抗原结合部分，其中所述抗原结合多肽或其抗原结合部分展现出下述性质中的一种或几种的组合：

- (a) 以 1.89E-08 或更小（例如 1.53E-08 或更小）的 K_D 值与 CD47 结合；
- (b) 阻断 CD47 与 SIRPα 的结合；
- (c) 促进巨噬细胞介导的对表达 CD47 细胞的吞噬作用；
- (d) 没有明显诱导 CD4⁺T 细胞的凋亡；
- (e) 不引起实质性的红细胞减少、贫血或红细胞凝集；和
- (f) 所述抗原结合多肽或其抗原结合部分的熔解温度 T_m ≥ 62°C，聚合温度 Tagg ≥ 61°C。

另一方面，本发明提供了分离的抗原结合多肽或其抗原结合部分，其中所述抗原结合多肽或其抗原结合部分与本文提供的任何示例性抗原结合多肽或其抗原结合部分结合 CD47 上的相同表位。

另一方面，本发明提供了分离的抗原结合多肽或其抗原结合部分，其中所述抗原结合多肽或其抗原结合部分与本文提供的任何示例性抗原结合多肽或其抗原结合部分竞争结合 CD47，其中所述竞争通过 ELISA、流式细胞术或表面等离子体共振测定进行测量。

在本文中，所述抗原结合部分可选自 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、Fd 片段、Fv 片段、dAb 片段、分离的互补决定区和纳米抗体，但不限于此。

另一方面，本发明提供了免疫偶联物，其包含本文所述的结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分，以及与所述抗原结合多肽或其抗原结合部分连接或缀合的治疗剂。

在本文中，所述抗原结合多肽或其抗原结合部分可通过接头与所述治疗剂连接。接头可以是可裂解的或不可裂解的。

在本文中，所述治疗剂可选自细胞毒性药物、放射性同位素或免疫调节剂，例如化学治疗剂、免疫抑制剂、免疫刺激剂、抗代谢物、烷化剂、抗生素、抗血管生成剂、抗有丝分裂剂、毒素、细胞凋亡剂等。

另一方面，本发明提供了组合物，其包含组分 A 以及以及药学上可接受的载体，其中组分 A 为本文所述的结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分、或本文所述的免疫偶联物。

另一方面，本发明提供了分离的杂交瘤细胞系，其选自由 2B2、2H8、3F10、16E5 和 14A9 组成的组。

另一方面，本发明提供了分离的核酸，其编码本文所述的结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分。

另一方面，本发明提供了载体，其包含本文所述的分离的核酸。

另一方面，本发明提供了宿主细胞，其包含本文所述的载体或在其基因组中整合有本文所述的分离的核酸。优选地，所述载体为表达载体。

又一方面，本发明提供了制备结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分的方法，包括：在适于表达编码本文所述的结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分的核酸的条件下培养本文所述的宿主细胞，分离所表达的所述抗原结合多肽或其抗原结合部分。

又一方面，本发明提供了用于在受试者中减少肿瘤或抑制肿瘤细胞生长的方法，其中所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分、本文所述的免疫偶联物、或所述的组合物。

又一方面，本发明提供了用于在有需要的受试者中治疗癌症的方法，其中所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分、本文所述的免疫偶联物、或所述的组合物。

又一方面，本发明提供了促进受试者巨噬细胞的吞噬作用的方法，其中所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分、本文所述的免疫偶联物、或所述的组合物。

附图说明

图 1 为抗 CD47 嵌合抗体对红细胞凝集的影响；其中，相同行样品（抗体或对照）种类相同但是浓度不同，相同列样品浓度相同但是种类不同；由左至右，不同列的样品浓度依次分别为 10000 ng/ml、3333.33 ng/ml、1111.11 ng/ml、370.37 ng/ml、123.46 ng/ml、41.15 ng/ml、13.72 ng/ml、4.57 ng/ml；由上至下，不同行的样品依次分别为 Xi2B2、Xi2H8、Xi3F10、Xi16E5、Xi14A9、Xi16E5-2（Xi16E5 的另一个重复）、Hu5F9、IgG4、PBS。

图 2 为部分抗 CD47 人源化抗体对红细胞凝集的影响；其中，相同列抗体种类相同但是浓度不同，相同行抗体浓度相同但是种类不同；由上至下，不同行的抗体浓度依次分别为 10000 ng/ml、3333.33 ng/ml、1111.11 ng/ml、370.37 ng/ml、123.46 ng/ml、41.15 ng/ml、13.72 ng/ml、4.57 ng/ml；由左至右，第 1-12 列的抗体依次分别为 hz3F10-1.1、hz3F10-2.1、hz3F10-3.1、hz3F10-4.1、hz3F10-5.1、hz3F10-6.1、hz3F10-1.2、hz3F10-2.2、hz3F10-3.2、hz3F10-4.2、hz3F10-5.2、hz3F10-6.2。

图 3 为部分抗 CD47 人源化抗体对红细胞凝集的影响；其中，相同列抗体种类相同但是浓度不同，相同行抗体浓度相同但是种类不同；由上至下，不同行的抗体浓度依次分别为 10000 ng/ml、3333.33 ng/ml、1111.11 ng/ml、370.37 ng/ml、123.46 ng/ml、41.15 ng/ml、13.72 ng/ml、4.57 ng/ml；由左至右，第 1-8 列的抗体依次分别为 hz16E5-1.1、hz16E5-3.1、hz16E5-1.2、hz16E5-3.2、hz16E5-1.3、hz16E5-3.3、hz14A9-2.3、hz14A9-2.4。

图 4 为抗 CD47 抗体对小鼠生存率的影响。

图 5 为抗 CD47 抗体单次给药后小鼠体重随时间的变化。

图 6 为抗 CD47 抗体单次给药后不同时间的小鼠体重变化率。

图 7 为抗 CD47 抗体单次给药后小鼠 RBC 随时间的变化。

图 8 为抗 CD47 抗体单次给药后不同时间的小鼠 RBC 变化率。

图 9 为抗 CD47 抗体单次给药后小鼠 HGB 含量随时间的变化。

图 10 为抗 CD47 抗体单次给药后不同时间的小鼠 HGB 变化率。

图 11 为人急性髓系白血病细胞 MOLM-16 细胞小鼠模型中，抗 CD47 抗体给药后平均肿瘤体积随时间的变化。

具体实施方式

以下将对本申请的示例性的实施方式进行了描述，但是本领域技术人员将理解的是本申请的保护范围并不限于此，而是可基于本申请的精神和构思进行各种修饰、修改或改变，这些修饰、修改或改变后的内容仍然落在本申请的范围内。

术语

如本文所用，术语“抗原结合多肽”是指具有至少一个抗原结合结构域的多肽和蛋白，抗原结合多肽的实例包括但不限于单克隆抗体、多特异性抗体或融合蛋白。如本文所用，术语抗原结合多肽的“抗原结

合部分”是指抗原结合多肽的一个或多个片段，其保留特异性结合抗原（例如 CD47 蛋白）的能力。已经显示抗原结合多肽的抗原结合功能可以通过其片段来执行。抗原结合多肽的“抗原结合部分”所涵盖的实例包括：(i) Fab 片段，由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H1 结构域组成的单价片段；(ii) “Fab'片段”与 Fab 片段的区别之处在于在重链 C_H1 结构域的羧基末端添加了几个残基，包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸；(iii) $F(ab')_2$ 片段，包含通过铰链区二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段；(iv) Fd 片段，由 V_H 和 C_H1 结构域组成；(v) Fv 片段，由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成；(vi) dAb 片段（Ward 等人（1989）*Nature* 341: 544-546），由 V_H 结构域组成；(vii) 分离的互补决定区（CDR）；和 (viii) 纳米抗体，包含单个可变域的重链可变区和两个恒定域。此外，虽然 Fv 片段的两个结构域， V_L 和 V_H 由不同的基因编码，但是可以使用重组方法通过合成的接头将它们连接起来，从而使它们能够制备成单个蛋白链，其中 V_L 和 V_H 区配对形成单价分子（称为单链 Fv（scFv）；参见例如 Bird 等人，（1988）*Science* 242: 423-426；和 Huston 等人（1988）*Proc.Natl.Acad.USA* 85: 5879-5883）。此类单链抗体也意图涵盖在术语抗原结合多肽中。本文的抗原结合部分可使用本领域技术人员公知的常规技术获得，可以以与完整抗原结合多肽相同的方式对片段筛选功用。

术语“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体种类。本发明的结合 CD47 的抗原结合多肽和其抗原结合部分可以衍生自任何物种，其包括但不限于小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物（如黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴、猕猴）、美洲驼和人。结合 CD47 的抗原结合多肽和其抗原结合部分可以是嵌合抗体、人源化抗体或完整的人抗体。在一些实施方案中，结合 CD47 的抗原结合多肽是由源自小鼠的杂交瘤细胞系产生的抗体。因此，在一些实施方案中，结合 CD47 的抗原结合多肽是鼠类抗体。在另一些实施方案中，结合 CD47 的抗原结合多肽是嵌合抗体。在一些实施方案中，嵌合抗体是小鼠-人嵌合抗体。在另一些实施方案中，结合 CD47 的抗原结合多肽是人源化抗体。在另一些实施方案中，结合 CD47 的抗原结合多肽衍生自鼠类抗体并且是人源化的。

术语“嵌合抗体”是下述抗体：所述抗体具有衍生自一种物种的重链可变区的至少一部分和轻链可变区的至少一部分；以及衍生自另一物种的恒定区的至少一部分。例如，在一些实施方案中，嵌合抗体可以包含鼠类可变区和人恒定区。

“人源化抗体”是下述抗体：所述抗体含有衍生自非人抗体的互补决定区（CDR）；和衍生自人抗体的框架区以及恒定区。例如，本文提供的结合 CD47 的人源化抗体可以包含衍生自一种或多种鼠类抗体的 CDR 以及人框架区和恒定区。因此，在一些实施方案中，本文提供的人源化抗体与所述抗体的 CDR 所衍生自的鼠类抗体结合 CD47 上的相同表位。本文提供了示例性人源化抗体。包含本文提供的重链 CDR 和轻链 CDR 的另外的结合 CD47 的人源化抗体或其变体可以使用任何人框架序列产生，并且也包括在本发明中。在一些实施方案中，适用于在本发明中使用的框架序列包括在结构上与本文提供的框架序列类似的那些框架序列。可以在框架区中进行另外修饰以改进本文提供的抗体的特性。此类另外的框架修饰可以包括化学修饰，点突变以降低免疫原性或去除 T 细胞表位，或使突变回复为原始种系序列中的残基。在一些实施方案中，此类修饰包括对应于本文示例的突变的那些修饰，包括对种系序列的回复突变。例如，在一些实施方案中，本文提供的人源化抗体的 VH 和/或 VL 的人框架区中的一个或多个氨基酸被回复突变为亲本鼠类抗体中对应的氨基酸。例如，对于人源化 3F10、14A9 和 16E5 的 VH 和 VL，上述模板人抗体的框架氨基酸的几个位点被回复突变为小鼠 3F10、14A9 和 16E5 抗体中对应的氨基酸序列。在一些实施方案中，轻链可变区的位置 2 处和/或 33 处和/或 48 处和/或 63 处和/或 68 处和/或 71 处和/或 72 处和/或 94 处的氨基酸被回复突变为在小鼠 3F10、14A9 或 16E5 轻链可变区中的所述位置处发现的对应的氨基酸。在另一些实施方案中，重链可变区的位置 24 处和/或 46 处和/或 63 处和/或 72 处和/或 73 处和/或 74 处和/或 77 处和/或 97 处的氨基酸被回复突变为在小鼠 3F10、14A9 或 16E5 重链可变区中的所述位置处发现的对应的氨基酸。在一些实施方案中，人源化 3F10 抗体包含重链可变区，其突变类型选自如下位点中的一个或多个：在位置 73 处的氨基酸从 Asp（D）突变为 Glu（E）；在位置 74 处的氨基酸从 Glu（E）突变为 Ile（I）；以及在位置 77 处的氨基酸从 Ser（S）突变为 Asn（N），并且对于人源化 3F10 抗体包含轻链可变区，其突变类型选自如下位点中的一个或多个：在位置 48 处的氨基酸从 Leu（L）突变为 Trp（W）；在位置 71 处的氨基酸从 Asp（D）突变为 Ser（S）；在位置 72 处的氨基酸从 Phe（F）突变为 Tyr（Y）；以及在位置 94 处的氨基酸从 Asp（D）突变为 Glu（E）。在一些实施方案中，人源化 14A9 抗体包含重链可变区，其突变类型选自如下位点中的一个或多个：在位置 24 处的氨基酸从 Ala（A）突变为 Val（V）；在位置 72 处的氨基酸从 Arg（R）突变为 Gly（G）；在位置 77 处的氨基酸从 Ser（S）突变为 Asn（N）；以及在位置 97 处的氨基酸从 Ala（A）突变为 Thr（T），并且人源化 14A9 包含轻链可变区，其突变类型选自如下位点中的一个或多个：在位置 63 处的氨基酸从 Ser（S）突变为 Ile（I）；在位置 68 处的氨基酸从 Gly（G）突变为 Ser（S）。在一些实施方案中，人源化 16E5 抗体包含重链可变区，其突变类型选自如下位点中的一个或多个：在位置 46 处的氨基酸从 Glu（E）突变为 Lys（K）；在位置 63 处的氨基酸从 Lys（K）突变为 Glu（E）；在位置 72 处的氨基酸从 Thr（T）突变为 Leu（L）；在位置 77 处的氨基酸从 Ser（S）突变为 Arg（R）；以

及在位置 97 处的氨基酸从 Ala (A) 突变为 Thr (T)，并且人源化 16E5 抗体包含轻链可变区，其突变类型选自如下位点中的一个或多个：在位置 2 处的氨基酸从 Ile (I) 突变为 Ala (A)；以及在位置 33 处的氨基酸从 Asn (N) 突变为 Gln (Q)。如无特殊说明，本文中突变位点序号的描述按照可变区第一个氨基酸开始依次计数。另外的或另选的回复突变可以在本文提供的人源化抗体的框架区中进行以改进抗体的特性。本发明还包括下述人源化抗体，所述人源化抗体结合 CD47 并且包含对应于本文所述的相对于任何合适的框架序列的示例性修饰的框架修饰，以及以其他方式改进抗体特性的其他框架修饰。

如本文所用，术语“衍生的”当用于指相对于参考抗体或其他结合蛋白的分子或多肽时，意指能够与参考抗体或其他结合蛋白特异性地结合相同表位的分子或多肽。

术语“分离的”是指已经从其天然环境中分离的目标化合物（例如，抗体或核酸）。

如本文所用，术语“EC50”是指有效浓度，抗体的 50% 最大应答。如本文所用，术语“IC50”是指抑制浓度，抗体的 50% 最大应答。EC50 和 IC50 两者均可以通过 ELISA 或 FACS 分析或本领域已知的任何其他方法进行测量。

术语“K_D”在用于本文时指解离常数，以摩尔浓度 (M) 表示。抗体的 K_D 值可以使用本领域公知的方法测定。一种优选的测定抗体 K_D 的方法是使用表面等离子共振 (surface plasmon resonance)，更优选使用生物传感器系统，例如 Biacore 系统。

术语“治疗”是指为了以统计学显著的方式治疗、治愈、减轻、缓解、改变、补救、改善、改进或影响疾患（例如疾病）、疾患的症状，或预防或延缓症状、并发症、生化指标的发作，或以其他方式阻滞或抑制疾病、疾患或病症的进一步发展而使用的措施。

如本文所用，术语“治疗有效量”是指向受试者提供治疗性和/或预防性益处所必需的化合物或组合物的量。

如本文所用，术语“受试者”包括任何人类或非人动物。术语“非人动物”包括所有的脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物，诸如非人灵长类、绵羊、犬、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。优选地，根据本发明的受试者是人。除非标明，术语“患者”或“受试者”可以互换使用。

如本文所用，“约”表示在本领域普通技术人员判定的对特定值可以接受的误差范围内，其部分取决于如何测量或测定该值，即测量系统的限制。例如，“约”按照本领域实践可表示 1 倍或超过 1 倍标准偏差以内。或者，“约”可以表示多至±5%的范围，例如在所给定的具体数值范围±2%范围内、±1%范围内或±0.5%范围内波动。当本申请或权利要求中给出特定值时，除非另有说明，“约”的含义应认为是在该特定值的可接受的误差范围内。在本文中，除非另有说明，步骤参数或条件的值默认均由“约”修饰。

术语“同一性(identity)”，也称一致性。两序列间的百分比同一性为序列共有的相同位置数的函数(即%同一性=相同位置数/位置总数×100)，其中需考虑产生两序列的最优比对需要引入的缺口数和每个缺口的长度。如下述非限制性实施例所示，可以使用数学算法完成序列的比较和两序列间百分比同一性的测定。可以使用 E.Meyers 和 W.Miller 的算法 (Comput.Appl.Biosci.,4:11-17 (1988)) 测定两氨基酸序列间的百分比同一性，该算法已收入到 ALIGN 程序 (版本 2.0) 中，其使用 PAM120 残基权重表，缺口长度罚分为 12，缺口罚分为 4。此外，可以使用 Needleman 和 Wunsch 的算法 (J. Mol.Biol. 484-453(1970)) 测定两氨基酸序列的百分比同一性，该算法已掺入到 GCG 软件包 (可在 www.gcg.com 获得) 中的 GAP 程序中，其使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵，缺口权重为 16、14、12、10、8、6 或 4，长度权重为 1、2、3、4、5 或 6。

术语“Xn”和“Xaa”等同，是指未指定的氨基酸 (Unspecified Amino Acid)，通过相关表述中的后续定义来指定其涵盖的范围。

术语“包括”、“含有”或“包含”及其变体应理解为“包括但不限于”，意味着除所列出的要素、组分和步骤外，还可涵盖其它未指明的要素、组分和步骤。

在本文中，除非上下文另有明确规定，否则单数术语涵盖复数指代物，反之亦然。

为了描述和公开的目的，以引用的方式将所有的专利、专利申请和其它已确定的出版物在此明确地并入本文。这些出版物仅因为它们的公开早于本申请的申请日而提供。所有关于这些文件的日期的声明或这些文件的内容的表述是基于申请者可得的信息，并且不构成任何关于这些文件的日期或这些文件的内容的正确性的承认。而且，在任何国家，在本文中对这些出版物的任何引用并不构成关于该出版物成为本领域的公知常识的一部分的认可。本发明的各个方面将在下述部分中进一步详细描述。

结合 CD47 的抗原结合多肽及其抗原结合部分

本文中，术语“CD47”、“整合素相关蛋白”、“IAP (Integrin-associated protein)”、“OA3”、“MER6”之间彼此可以互换的使用。术语“人 CD47”和“hCD47”等在本文中可互换使用，并且是指人 CD47 和

人 CD47 的变体或同种型。本文中，“结合 CD47 的抗体”与“抗 CD47 抗体”之间彼此可以互换的使用。

本发明提供了结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分，为靶向 CD47 的治疗提供新的解决方案。除了与人 CD47 或/和食蟹猴 CD47 结合外，本文提供的抗原结合多肽还显示了其他诸多用于靶向治疗的期望的特征。具体的，这些期望的特征例如可以是 $1.53E-08$ 或更小的 K_D 值与 CD47 结合、阻断 CD47 与 SIRP α 的结合、促进巨噬细胞介导的对表达 CD47 细胞的吞噬作用、没有明显诱导 CD4+T 细胞的凋亡、不引起实质性的红细胞减少、贫血或红细胞凝集、所述抗原结合多肽或其抗原结合部分的溶解温度 $T \geq 62^\circ\text{C}$ ，聚合温度 $T_{agg} \geq 61^\circ\text{C}$ 等中的至少一个。在一些实施方案中，结合 CD47 的抗原结合多肽表现了更好的治疗效果；在一些实施方案中，结合 CD47 的抗原结合多肽表现了降低的副作用。

一方面，本发明提供了包含特定序列的结合 CD47 的抗原结合多肽及其抗原结合部分。

在一些实施方案中，本文提供了包含选自 SEQ ID NOs: 1~32 组成的组的一个或多个 CDR 的分离的结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽或其抗原结合部分包含重链 CDR1 序列，所述重链 CDR1 包含与选自 SEQ ID NO: 1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽或其抗原结合部分包含重链 CDR2，所述重链 CDR2 包含与选自 SEQ ID NO: 6、7、8、9 或 10 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽或其抗原结合部分包含重链 CDR3，所述重链 CDR3 包含与选自 SEQ ID NO: 11、12、13、14 或 15 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽或其抗原结合部分包含轻链 CDR1，所述轻链 CDR1 包含与选自 SEQ ID NO: 16、17、18、19 或 20 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽或其抗原结合部分包含轻链 CDR2，所述轻链 CDR2 包含与选自 SEQ ID NO: 21、22、23、24 或 25 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽或其抗原结合部分包含轻链 CDR3，所述轻链 CDR3 包含与选自 SEQ ID NO: 26、27、28、30 或 32 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列。

本领域技术人员将理解，本文提供的抗原结合多肽的重链 CDR 和轻链 CDR 可以独立地进行选择或混合和匹配，以形成包含来自本文提供的抗原结合多肽的任何重链 CDR1、CDR2 和 CDR3；以及任何轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的抗原结合多肽或其抗原结合部分。因此，在一些实施方案中，本发明提供了结合 CD47 的分离的抗原结合多肽，包含三个重链 CDR（重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3）和三个

轻链 CDR (轻链 CDR1、轻链 CDR2、轻链 CDR3), 其中:

重链 CDR1, 其包含与选自 SEQ ID NO: 1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列;

重链 CDR2, 其包含与选自 SEQ ID NO: 6、7、8、9 或 10 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列;

重链 CDR3, 其包含与选自 SEQ ID NO: 11、12、13、14 或 15 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列;

轻链 CDR1, 其包含与选自 SEQ ID NO: 16、17、18、19 或 20 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列;

轻链 CDR2, 其包含与选自 SEQ ID NO: 21、22、23、24 或 25 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列; 和

轻链 CDR3, 其包含与选自 SEQ ID NO: 26、27、28、30 或 32 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 结合 CD47 的分离的抗原结合多肽, 包含以下互补决定区: 重链 CDR1, 其包含选自 SEQ ID NO: 1、2、3、4 或 5 的氨基酸序列; 重链 CDR2, 其包含选自 SEQ ID NO: 6、7、8、9 或 10 的氨基酸序列; 重链 CDR3, 其包含选自 SEQ ID NO: 11、12、13、14 或 15 的氨基酸序列; 轻链 CDR1, 其包含选自 SEQ ID NO: 16、17、18、19 或 20 的氨基酸序列; 轻链 CDR2, 其包含选自 SEQ ID NO: 21、22、23、24 或 25 的氨基酸序列; 和轻链 CDR3, 其包含选自 SEQ ID NO: 26、27、28、30 或 32 的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 所述重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3 分别包含与如 SEQ ID NOs: 1、6 和 11 所示的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列, 所述轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 分别包含与如 SEQ ID NOs: 16、21 和 26 所示的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 81%同一性、至少 82%同一性、至少 83%同一性、至少 84%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, 结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含以下互补决定区: 包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的重链 CDR1; 包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的重链 CDR2; 包含 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列的重链 CDR3; 包含 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列的轻链 CDR1; 包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列的轻链 CDR2; 和包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

在一些实施方案中, 结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻

少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含以下互补决定区：包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列的重链 CDR1；包含 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列的重链 CDR2；包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列的重链 CDR3；包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列的轻链 CDR1；包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列的轻链 CDR2；和包含 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

本发明还提供了保守修饰形式的抗原结合多肽及其抗原结合部分。本领域技术人员将认识到，保守的氨基酸取代是用具有类似结构或化学特性（例如像类似的侧链）的另一氨基酸取代一个氨基酸。示例性保守取代在本领域中例如，在 Watson 等，Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Publication Company, 第 4 版(1987)中进行了描述。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含：重链 CDR1，其包含选自 SEQ ID NO: 1、2、3、4 或 5 或者其保守修饰形式的氨基酸序列；重链 CDR2，其包含选自 SEQ ID NO: 6、7、8、9 或 10 或者其保守修饰形式的氨基酸序列；重链 CDR3，其包含选自 SEQ ID NO: 11、12、13、14 或 15 或者其保守修饰形式的氨基酸序列；轻链 CDR1，其包含选自 SEQ ID NO: 16、17、18、19 或 20 或者其保守修饰形式的氨基酸序列；轻链 CDR2，其包含选自 SEQ ID NO: 21、22、23、24 或 25 或者其保守修饰形式的氨基酸序列；和轻链 CDR3，其包含选自 SEQ ID NO: 26、27、28、30 或 32 或者其保守修饰形式的氨基酸序列。保守修饰存在于任意一个或多个轻链 CDR 或重链 CDR。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含：重链 CDR1，其包含选自 SEQ ID NO: 3、4 或 5 的氨基酸序列；重链 CDR2，其包含选自 SEQ ID NO: 8、9 或 10 的氨基酸序列；重链 CDR3，其包含选自 SEQ ID NO: 13、14 或 15 的氨基酸序列；轻链 CDR1，其包含选自 SEQ ID NO: 18、19 或 20 的氨基酸序列；轻链 CDR2，其包含选自 SEQ ID NO: 23、24 或 25 的氨基酸序列；和轻链 CDR3，其包含选自 SEQ ID NO: 28、30 或 32 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1 包含 SEQ ID NO: 1 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述重链 CDR2 包含 SEQ ID NO: 6 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述重链 CDR3 包含 SEQ ID NO: 11 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述轻链 CDR1 包含 SEQ ID NO: 16 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述轻链 CDR2 包含 SEQ ID NO: 21 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述轻链 CDR3 包含 SEQ ID NO: 26 或其保守修饰形式的氨基酸序列。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1 包含 SEQ ID NO: 2 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述重链 CDR2 包含 SEQ ID NO: 7 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述重链 CDR3 包含 SEQ ID NO: 12 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述轻链 CDR1 包含 SEQ ID NO: 17 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述轻链 CDR2 包含 SEQ ID NO: 22 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述轻链 CDR3 包含 SEQ ID NO: 27 或其保守修饰形式的氨基酸序列。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1 包含 SEQ ID NO: 3 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述重链 CDR2 包含 SEQ ID NO: 8 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述重链 CDR3 包含 SEQ ID NO: 13 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述轻链 CDR1 包含 SEQ ID NO: 18 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述轻链 CDR2 包含 SEQ ID NO: 23 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述轻链 CDR3 包含 SEQ ID NO: 28 或其保守修饰形式的氨基酸序列。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1 包含 SEQ ID NO: 4 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述重链 CDR2 包含 SEQ ID NO: 9 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述重链 CDR3 包含 SEQ ID NO: 14 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述轻链 CDR1 包含 SEQ ID NO: 19 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述轻链 CDR2 包含 SEQ ID NO: 24 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述轻链 CDR3 包含 SEQ ID NO: 32 或其保守修饰形式的氨基酸序列。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，所述重链 CDR1 包含 SEQ ID NO: 5 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述重链 CDR2 包含 SEQ ID NO: 10 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述重链 CDR3 包含 SEQ ID NO: 15 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述轻链 CDR1 包含 SEQ ID NO: 20 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述轻链 CDR2 包含 SEQ ID NO: 25 或其保守修饰形式的氨基酸序列，所述轻链 CDR3 包含 SEQ

ID NO: 30 或其保守修饰形式的氨基酸序列。

在一些实施方案中,本文提供的结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链可变区和轻链可变区,重链和轻链的可变区包含 CDR 区和框架区 FR (包括 FR1、FR2、FR3 和 FR4),形成次序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可变区序列。

因此,另一方面,本发明提供了结合 CD47 的分离的抗原结合多肽或其抗原结合部分,所述抗原结合多肽包含重链可变区和轻链可变区,所述的重链可变区包含与选自 SEQ ID NO: 33、35、37、39、41、83、85 或 87 的氨基酸序列具有至少 80%、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含与选自 SEQ ID NO: 34、36、38、40、42、84、86 或 88 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列。

其中,SEQ ID NO: 83 所示序列为:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEFIPGSDTTNYAQKFQGRV
TITAX₃X₄STX₅TAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGLRRMDYWGQGTLLTVSS, 其中, X₃ 为 D 或 E, X₄ 为 I 或 E, X₅ 为 S 或 N;

SEQ ID NO: 84 所示序列为:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSVSSTYLHWYQQKPGKAPKLX₆IYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTX
7X₈TLTISLQPEDFATYYCQQFSX₂STWTFGQGTLEIK, 其中, X₆ 为 L 或 W, X₇ 为 D 或 S, X₈ 为 F 或 Y, X₂ 为 D 或 E;

SEQ ID NO: 85 所示序列为:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLX₉WMGWINTNTGEPTYAQX₁₀LQ
GRVTMTX₁₁DTSTX₁₂TAYMELRSLRSDDTAVYYCX₁₃RFSHLRGPMDYWGQGTLLTVSS, 其中, X₉ 为 E 或 K, X₁₀ 为 K 或 E, X₁₁ 为 L 或 T, X₁₂ 为 R 或 S, X₁₃ 为 A 或 T;

SEQ ID NO: 86 所示序列为:

DX₁₄QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGYTYLHWYQQKPGKAPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCSQSTHVPPTFGQGTLEIK, 其中, X₁₄ 为 I 或 A;

SEQ ID NO: 87 所示序列为:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKX₁₅SGFNIEDDYIEWVRQAPGQGLEWMGRIDPANDKTKYAQKFQGR
VTMTX₁₆DTSTX₁₇TVYMELSSLRSEDTAVYYCX₁₈RPLRLRYYSMDYWGQGTLLTVSS, 其中, X₁₅ 为 A 或 V, X₁₆ 为 R 或 G, X₁₇ 为 S 或 N, X₁₈ 为 A 或 T;

SEQ ID NO: 88 所示序列为:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPSRFX₁₉SGGSX₂₀
TDFTLTISLQPEDFATYYCQGSYSYPLTFGQGTLEIK, 其中, X₁₉ 为 S 或 I, X₂₀ 为 S 或 G。

在一些实施方案中,结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链可变区和轻链可变区,所述的重链可变区包含以下序列或由以下序列组成:选自 SEQ ID NO: 33、35、37、39、41、83、85 或 87 的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含以下序列或由以下序列组成:选自 SEQ ID NO: 34、36、38、40、42、84、86 或 88 的氨基酸序列。

在一些实施方案中,结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链可变区和轻链可变区,所述的重链可变区包含以下序列或由以下序列组成:选自 SEQ ID NO: 35、39、41、83、85 或 87 的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含以下序列或由以下序列组成:选自 SEQ ID NO: 36、40、42、84、86 或 88 的氨基酸序列。在一些实施方案中,结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链可变区和轻链可变区,所述的重链可变区包含 SEQ ID NO: 79 的氨基酸序列或由 SEQ ID NO: 79 的氨基酸序列组成,所述的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 80 的氨基酸序列或由 SEQ ID NO: 80 的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链可变区和轻链可变区,所述的重链可变区包含 SEQ ID NO: 81 的氨基酸序列或由 SEQ ID NO: 81 的氨基酸序列组成,所述的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 82 的氨基酸序列或由 SEQ ID NO: 82 的氨基酸序列组成。

在一些实施方案中,结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链可变区和轻链可变区,所述的重链可变区包含与 SEQ ID NO: 33 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%

少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列，所述的轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 84 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链可变区和轻链可变区，其中所述的重链可变区包含 SEQ ID NO: 83 的氨基酸序列，所述的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 84 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链可变区和轻链可变区，所述的重链可变区包含与 SEQ ID NO: 85 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列，所述的轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 86 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链可变区和轻链可变区，其中所述的重链可变区包含 SEQ ID NO: 85 的氨基酸序列，所述的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 86 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链可变区和轻链可变区，所述的重链可变区包含与 SEQ ID NO: 87 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列，所述的轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 88 的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 85%同一性、至少 86%同一性、至少 87%同一性、至少 88%同一性、至少 89%同一性、至少 90%同一性、至少 91%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链可变区和轻链可变区，其中所述的重链可变区包含 SEQ ID NO: 87 的氨基酸序列，所述的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 88 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，本文所述的重链可变区和轻链可变区中含有本文所述的重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3 的序列特征。

在一些实施方案中，本文提供的结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链和轻链，重链和轻链除了包含本文所述的重链可变区和轻链可变区外，还包括恒定区。在一些实施方案中，恒定区是人源化的。在一些实施方案中，恒定区与可变区的框架区 FR 都是人源化的。通过构建嵌合抗体（例如人源化的恒定区和非人源的可变区）或人源化抗体（例如人源化的恒定区和 FR 区）降低免疫原性。

在一些实施方案中，抗原结合多肽的轻链恒定区是人 κ 链恒定区。在一些实施方案中，抗原结合多肽的轻链恒定区是人 λ 链恒定区。

抗原结合多肽的重链恒定区可来自任何类型的恒定区，例如 IgG、IgM、IgD、IgA 和 IgE；以及任何同种型，例如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是 IgG1 同种型。在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是 IgG4 同种型。

在一些实施方案中，抗原结合多肽包含经修饰的恒定区。在一些实施方案中，对人 IgG4 恒定区内的铰链区进行修饰以避免或减少链交换，例如 IgG4 型抗体具有根据 EU 编号索引的 Ser228Pro (S228P) 突变。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是嵌合抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，所述的重链可变区包含以下序列或由以下序列组成：选自 SEQ ID NO: 33、35、37、39 或 41 的氨基酸序列，所述的轻链可变区包含以下序列或由以下序列组成：选自 SEQ ID NO: 34、36、38、40 或 42 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是嵌合抗体，其包含重链和轻链，所述重链具有与选自 SEQ ID NO: 89、93、97、101 或 105 所示的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 85%同一性、

至少 90%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列，所述轻链具有与选自 SEQ ID NO: 91、95、99、103 或 107 所示的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 85%同一性、至少 90%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是嵌合抗体，包含根据 SEQ ID NO: 89 的重链和根据 SEQ ID NO: 91 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是嵌合抗体，包含根据 SEQ ID NO: 93 的重链和根据 SEQ ID NO: 95 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是嵌合抗体，包含根据 SEQ ID NO: 97 的重链和根据 SEQ ID NO: 99 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是嵌合抗体，包含根据 SEQ ID NO: 101 的重链和根据 SEQ ID NO: 103 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是嵌合抗体，包含根据 SEQ ID NO: 105 的重链和根据 SEQ ID NO: 107 的轻链。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，所述的重链可变区包含以下序列或由以下序列组成：选自 SEQ ID NO: 83、85 或 87 的氨基酸序列，所述的轻链可变区包含以下序列或由以下序列组成：选自 SEQ ID NO: 84、86 或 88 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，所述重链具有与选自 SEQ ID NO: 109、113、117、121、125、129、133、137、141、145、149、153、157、161、165、169、173、177、181 或 185 所示的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 85%同一性、至少 90%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列，所述轻链具有与选自 SEQ ID NO: 111、115、119、123、127、131、135、139、143、147、151、155、159、163、167、171、175、179、183 和 187 所示的氨基酸序列具有至少 80%同一性、至少 85%同一性、至少 90%同一性、至少 92%同一性、至少 93%同一性、至少 94%同一性、至少 95%同一性、至少 96%同一性、至少 97%同一性、至少 98%同一性、至少 99%同一性或 100%同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 109 的重链和根据 SEQ ID NO: 111 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 113 的重链和根据 SEQ ID NO: 115 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 117 的重链和根据 SEQ ID NO: 119 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 121 的重链和根据 SEQ ID NO: 123 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 125 的重链和根据 SEQ ID NO: 127 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 129 的重链和根据 SEQ ID NO: 131 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 133 的重链和根据 SEQ ID NO: 135 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 137 的重链和根据 SEQ ID NO: 139 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 141 的重链和根据 SEQ ID NO: 143 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 145 的重链和根据 SEQ ID NO: 147 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 149 的重链和根据 SEQ ID NO: 151 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 153 的重链和根据 SEQ ID NO: 155 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 157 的重链和根据 SEQ ID NO: 159 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 161 的重链和根据 SEQ ID NO: 163 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 165 的重链和根据 SEQ ID NO: 167 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 169 的重链和根据 SEQ ID NO: 171 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 173 的重链和根据 SEQ ID NO: 175 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 177 的重链和根据 SEQ ID NO: 179 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 181 的重链和根据 SEQ ID NO: 183 的轻链。在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是人源化抗体，包含根据 SEQ ID NO: 185 的重链和根据 SEQ ID NO: 187 的轻链。

在一个实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽包含重链和轻链，所述重链包含以下序列或由以下序列组成：选自 SEQ ID NO: 93、101、105、109、113、117、121、125、129、133、137、141、145、149、153、157、161、165、169、173、177、181 或 185 的氨基酸序列；所述轻链包含以下序列或由以下

序列组成：选自 SEQ ID NO：95、103、107、111、115、119、123、127、131、135、139、143、147、151、155、159、163、167、171、175、179、183 或 187 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，结合 CD47 的分离的抗原结合多肽或/和其抗原结合部分以 $1.53\text{E}-08\text{ M}$ 或更小的 K_D 值与 CD47 结合。在一些实施方案中，所述抗原结合多肽或/和其抗原结合部分结合人 CD47。在另一些实施方案中，所述抗原结合多肽或/和其抗原结合部分结合食蟹猴 CD47。在另一些实施方案中，所述抗原结合多肽或/和其抗原结合部分结合人 CD47 以及食蟹猴 CD47。在一些实施方案中，所述抗原结合多肽或/和其抗原结合部分对人 CD47 具有下述结合亲和力(K_D)：在约 $1\text{E}-12\text{ M}$ 至约 $1\text{E}-05\text{ M}$ 、约 $1\text{E}-12\text{ M}$ 至约 $1.89\text{E}-06\text{ M}$ 、约 $1\text{E}-12\text{ M}$ 至约 $1.89\text{E}-07\text{ M}$ 、约 $1\text{E}-11\text{ M}$ 至约 $1.89\text{E}-07\text{ M}$ 、约 $9.46\text{E}-10\text{ M}$ 至约 $1.89\text{E}-07\text{ M}$ 、约 $9.46\text{E}-10\text{ M}$ 至约 $1.89\text{E}-08\text{ M}$ 、约 $2.04\text{E}-10\text{ M}$ 至约 $1.53\text{E}-07\text{ M}$ 或约 $2.04\text{E}-10\text{ M}$ 至约 $1.89\text{E}-08\text{ M}$ 的范围内。在一些实施方案中，所述抗原结合多肽或/和其抗原结合部分对人 CD47 具有下述结合亲和力(K_D)：约 $1\text{E}-05\text{ M}$ 或更小、约 $1.89\text{E}-06\text{ M}$ 或更小、约 $1.89\text{E}-07\text{ M}$ 或更小、约 $1.89\text{E}-08\text{ M}$ 或更小、约 $1.53\text{E}-08\text{ M}$ 或更小、约 $9.31\text{E}-08\text{ M}$ 或更小、约 $9.31\text{E}-09\text{ M}$ 或更小、约 $8.55\text{E}-09\text{ M}$ 或更小、约 $2.35\text{E}-09\text{ M}$ 或更小、或者约 $2.04\text{E}-10\text{ M}$ 或更小。在一些实施方案中，所述抗原结合多肽或/和其抗原结合部分对人 CD47 具有下述结合亲和力(K_D)：约 $7.48\text{E}-09\text{ M}$ 、约 $3.50\text{E}-10\text{ M}$ 、约 $7.67\text{E}-10\text{ M}$ 、约 $9.06\text{E}-09\text{ M}$ 、约 $2.35\text{E}-09\text{ M}$ 、约 $9.46\text{E}-10\text{ M}$ 、约 $8.36\text{E}-10\text{ M}$ 、约 $1.53\text{E}-09\text{ M}$ 、约 $1.42\text{E}-09\text{ M}$ 、约 $9.60\text{E}-10\text{ M}$ 、约 $5.92\text{E}-10\text{ M}$ 、约 $9.04\text{E}-10\text{ M}$ 、约 $7.79\text{E}-10\text{ M}$ 、约 $1.15\text{E}-09\text{ M}$ 、约 $1.34\text{E}-09\text{ M}$ 、约 $8.96\text{E}-10\text{ M}$ 、约 $7.65\text{E}-10\text{ M}$ 、约 $1.89\text{E}-08\text{ M}$ 、约 $6.28\text{E}-09\text{ M}$ 、约 $9.31\text{E}-09\text{ M}$ 、约 $1.71\text{E}-08\text{ M}$ 、约 $1.53\text{E}-08\text{ M}$ 、约 $7.13\text{E}-09\text{ M}$ 、约 $2.04\text{E}-10\text{ M}$ 或约 $8.55\text{E}-09\text{ M}$ 。在一些实施方案中，通过 Biacore 来测量本文提供的结合 CD47 的抗原结合多肽和其抗原结合部分的结合亲和力 k_D 。

在一些实施方案中，结合 CD47 的抗原结合多肽或/和其抗原结合部分对人 CD47 具有约 1 ng/mL 至约 2000 ng/mL 、约 1 ng/mL 至约 1500 ng/mL 、约 1 ng/mL 至约 1106 ng/mL 、约 1 ng/mL 至约 699 ng/mL 、约 1 ng/mL 至约 340 ng/mL 、约 30 ng/mL 至约 340 ng/mL 、约 50 ng/mL 至约 340 ng/mL 或约 100 ng/mL 至约 340 ng/mL 的结合 EC_{50} 。在一些实施方案中，结合 CD47 的抗原结合多肽或/和其抗原结合部分对人 CD47 具有约 2000 ng/mL 或更小、约 1500 ng/mL 或更小、约 1106 ng/mL 或更小、约 699 ng/mL 或更小、或约 340 ng/mL 或更小的结合 EC_{50} 。在一些实施方案中，通过 ELISA 或 FACS 来测量本文提供的结合 CD47 的抗原结合多肽和其抗原结合部分的 EC_{50} 。

在一些实施方案中，结合 CD47 的抗原结合多肽或/和其抗原结合部分阻断 CD47 与 SIRP α 的结合。信号调节性蛋白 α (SIRP α) 是结合 CD47 的配体之一，SIRP α 在包括巨噬细胞和树突细胞在内的造血细胞上表达。CD47 与巨噬细胞上的 SIRP α 的相互作用，将“别吃我”信号发送至巨噬细胞，在治疗情况下，用结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分阻断 SIRP α 与 CD47 的相互作用可以促进宿主免疫系统摄取并清除癌细胞。因此，阻断 CD47 与 SIRP α 的相互作用从而使得巨噬细胞吞噬表达 CD47 的肿瘤细胞的能力是一些结合 CD47 抗原结合多肽的重要功能特征。在一些实施方案中，基于 Jurkat 细胞及流式细胞术检测，所述抗原结合多肽（一些示例例如嵌合抗体 Xi2B2、Xi2H8、Xi3F10、Xi16E5、Xi14A9）或/和其抗原结合部分的阻断 IC_{50} 为约 358.5 ng/mL 至约 26966 ng/mL 、约 358.5 ng/mL 至约 4861 ng/mL 、约 358.5 ng/mL 至约 631.2 ng/mL 或约 358.5 ng/mL 至约 1283 ng/mL 。在一些实施方案中，所述抗原结合多肽或/和其抗原结合部分的阻断 IC_{50} 为约 26966 ng/mL 或更小、约 15000 ng/mL 或更小、约 10000 ng/mL 或更小、约 8000 ng/mL 或更小、约 6000 ng/mL 或更小、约 4861 ng/mL 或更小、约 3000 ng/mL 或更小、约 2500 ng/mL 或更小、约 2000 ng/mL 或更小、约 1500 ng/mL 或更小、约 1283 ng/mL 或更小、约 1000 ng/mL 或更小、约 800 ng/mL 或更小、约 500 ng/mL 或更小、或约 358.5 ng/mL 或更小。

在一些实施方案中，基于 ELISA 分析，结合 CD47 的抗原结合多肽（一些示例例如嵌合抗体 Xi2B2、Xi2H8、Xi3F10 或其人源化抗体、Xi16E5 或其人源化抗体、Xi14A9 或其人源化抗体等）或/和其抗原结合部分的阻断 IC_{50} 为约 4.682 ng/mL 至约 15246 ng/mL 、约 621.1 ng/mL 至约 15246 ng/mL 、约 621.1 ng/mL 至约 7910 ng/mL 、约 621.1 ng/mL 至约 2939 ng/mL 、约 621.1 ng/mL 至约 2500 ng/mL 、约 621.1 ng/mL 至约 2051 ng/mL 、约 621.1 ng/mL 至约 1738 ng/mL 、约 621.1 ng/mL 至约 1500 ng/mL 、约 621.1 ng/mL 至约 1400 ng/mL 、约 621.1 ng/mL 至约 1300 ng/mL 、约 621.1 ng/mL 至约 1200 ng/mL 、约 621.1 ng/mL 至约 1100 ng/mL 、约 621.1 ng/mL 至约 1000 ng/mL 、约 621.1 ng/mL 至约 900 ng/mL 、约 621.1 ng/mL 至约 800 ng/mL 、或约 621.1 ng/mL 至约 703.2 ng/mL 。在一些实施方案中，基于 ELISA 分析，所述抗原结合多肽或/和其抗原结合部分的阻断 IC_{50} 为约 15246 ng/mL 或更小、约 7910 ng/mL 或更小、约 2939 ng/mL 或更小、约 2500 ng/mL 或更小、约 2051 ng/mL 或更小、约 1738 ng/mL 或更小、约 1500 ng/mL 或更小、约 1400 ng/mL 或更小、约 1300 ng/mL 或更小、约 1200 ng/mL 或更小、约 1100 ng/mL 或更小、约 1000 ng/mL 或更小、约 900 ng/mL 或更小、约 800 ng/mL 或更小、约 703.2 ng/mL 或更小、约 621.1 ng/mL 或更小、约 450 ng/mL 或更小、约 350 ng/mL 或更小、约 250 ng/mL 或更小、约 150 ng/mL 或更小、约 100 ng/mL 或更小、约 50

ng/mL 或更小、约 40 ng/mL 或更小、约 30ng/mL 或更小、约 20 ng/mL 或更小、约 10 ng/mL 或更小、或约 4.682 ng/mL 或更小。

在一些实施方案中，结合 CD47 的抗原结合多肽或/和其抗原结合部分促进巨噬细胞介导的对表达 CD47 细胞的吞噬作用。如前所述，通过结合 CD47 抗原结合多肽阻断 SIRP α 与 CD47 的结合进而增加巨噬细胞对表达 CD47 细胞如癌细胞(具体的例子如 HL60 细胞等)的吞噬作用。在一些实施方案中，约 1 μ g/mL 至约 10 μ g/mL 结合 CD47 的抗原结合多肽浓度下，巨噬细胞吞噬率为约 3.5%至约 65.7%、约 11.5%至约 65.7%、约 28.8%至约 65.7%、或约 44.67%至约 65.7%。在一些实施方案中，在约 1 μ g/mL 至约 10 μ g/mL 抗原结合多肽浓度下，巨噬细胞吞噬率为约 1.34%至约 81.66%、约 2%至约 81.66%、约 11.95%至约 81.66%、约 24.19%至约 81.66%、或约 71.48%至约 81.66%。

在一些实施方案中，结合 CD47 的抗原结合多肽或/和其抗原结合部分没有明显诱导 CD4+T 细胞的凋亡。在一些实施方案中，凋亡检测采用流式细胞术的测定方法。本文明显的凋亡是指在可接受范围内(例如对受试者无影响或在可控范围内)或者与阴性对照相比在统计学意义上无显著差异($P \leq 0.05$)，例如，一些实施方案中，与阴性对照 IgG 相比无显著差异。

在一些实施方案中，结合 CD47 的抗原结合多肽或/和其抗原结合部分具有如下 T_m (熔解温度)：约 62°C 或更高、约 63°C 或更高、约 64°C 或更高、约 65°C 或更高、约 66°C 或更高、约 67°C 或更高、约 68°C 或更高、约 69°C 或更高、或约 70°C 或更高。在一些实施方案中，所述抗体或/和其片段具有如下 Tagg (聚集温度)：约 61°C 或更高、约 62°C 或更高、约 63°C 或更高、约 64°C 或更高、约 65°C 或更高、约 66°C 或更高、约 67°C 或更高、约 68°C 或更高、约 69°C 或更高、约 70°C 或更高、约 71°C 或更高、约 72°C 或更高、或约 73°C 或更高。在一些实施方案中，所述抗原结合多肽或/和其抗原结合部分的 T_m 为约 62°C 至约 75°C、约 63°C 至约 70.6°C、约 64°C 至约 70.6°C、约 65°C 至约 70.6°C、约 67°C 至约 70.6°C、或约 68°C 至约 70.6°C。在一些实施方案中，所述抗体或/和其片段的 Tagg 为约 60°C 至约 73.81°C、约 61°C 至约 73.81°C、约 62°C 至约 73.81°C、约 63°C 至约 73.81°C、约 64°C 至约 73.81°C、约 65°C 至约 73.81°C、约 67°C 至约 73.81°C、或约 68°C 至约 73.81°C。在一些实施方案中，T_m、Tagg 通过 nano DSF 检测。

在一些优选的实施方案中，结合 CD47 的抗原结合多肽或/和其抗原结合部分不引起实质性的红细胞减少、贫血或红细胞凝集。术语“血红细胞”和“红细胞”是同义词并可互换使用。术语“凝集”表示细胞结块。由于红细胞也表达 CD47，某些结合 CD47 的抗原结合多肽会与红细胞结合，从而发生凝集现象，因此，避免或降低结合 CD47 抗原结合多肽对红细胞的伤害作用将有望降低治疗副作用。

因此，另一方面，本发明提供了展现出下述性质中的一种或几种组合的结合 CD47 的抗原结合多肽及其抗原结合部分：

- (a) 以 $1.89E-08$ (例如 $1.53E-08$) 或更小的 K_D 值与 CD47 结合；
- (b) 阻断 CD47 与 SIRP α 的结合；
- (c) 促进巨噬细胞介导的对表达 CD47 细胞的吞噬作用；
- (d) 没有明显诱导 CD4+T 细胞的凋亡；
- (e) 不引起实质性的红细胞减少、贫血或红细胞凝集；和
- (f) 所述抗原结合多肽或其抗原结合部分的熔解温度 $T \geq 62^\circ\text{C}$ ，聚集温度 $\text{Tagg} \geq 61^\circ\text{C}$ 。

在一些实施方案中，结合 CD47 的抗原结合多肽或/和其抗原结合部分具有所述性质(a)~(f)中的一个、两个、三个、四个、五个或六个。在一些实施方案中，所述抗原结合多肽或其抗原结合部分具有所述性质(a)、(b)和(c)。在一些实施方案中，所述抗原结合多肽或其抗原结合部分具有所述性质(a)、(b)和(e)。在一些实施方案中，所述抗原结合多肽或其抗原结合部分具有所述性质(a)、(c)和(e)。在一些实施方案中，所述抗原结合多肽或其抗原结合部分具有所述性质(a)、(b)、(c)和(d)。在一些实施方案中，所述抗原结合多肽或其抗原结合部分具有所述性质(a)、(b)、(c)和(f)。在一些实施方案中，所述抗原结合多肽或其抗原结合部分具有所述性质(a)、(b)、(c)、(d)和(f)。在一些实施方案中，所述抗原结合多肽或其抗原结合部分具有所述性质(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(f)。

在一些实施方案中，与 CD47 结合的抗原结合多肽及其抗原结合部分是抗 CD47 抗体或其抗原结合部分。

在一些实施方案中，本文提供的结合 CD47 的分离的抗原结合多肽是单克隆抗体。

在一些实施方案中，本文提供的结合 CD47 的分离的抗体是单特异性抗体。

在一些实施方案中，本文提供的结合 CD47 的分离的抗体是多特异性抗体。例如，双特异抗体或者三特异性抗体等。

在一些实施方案中，本发明提供了与本文提供的任何示例性抗体结合 CD47 上的相同表位的结合

CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分，例如与 16E5 的嵌合抗体或人源化抗体结合相同表位，例如与 3F10 的嵌合抗体或人源化抗体结合相同表位，例如与 14A9 的嵌合抗体或人源化抗体结合相同表位。在一些实施方案中，抗原结合多肽或其抗原结合部分与本文提供的用于结合 CD47 的任何示例性抗体竞争，例如与 16E5 的嵌合抗体或人源化抗体竞争结合 CD47，例如与 3F10 的嵌合抗体或人源化抗体竞争结合 CD47，例如与 14A9 的嵌合抗体或人源化抗体竞争结合 CD47。可以通过 ELISA、流式细胞术、表面等离子体共振（SPR）测定或本领域已知的任何其他方法测量与 CD47 的结合。

本发明提供了一些示例性的结合 CD47 的单克隆抗体，包括 2B2、2H8、3F10、16E5 和 14A9 抗体的嵌合版本（Xi2B2、Xi2H8、Xi3F10、Xi16E5 和 Xi14A9）以及 3F10、16E5、14A9 的人源化变体。本文提供的示例性的结合 CD47 的抗体的重链 CDR（重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3）的氨基酸序列提供于下表 S1 中，轻链 CDR（轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3）的氨基酸序列提供于下表 S2 中，可变区以及全长重链、轻链的氨基酸序列提供于下表 S3、S4 中。

表 S1：抗 CD47 抗体的重链的 CDR 序列

抗体名称	重链 CDR1	重链 CDR2	重链 CDR3
Xi2H8	<u>GESLTNYGVH</u> (SEQ ID NO: 1)	<u>IHWAGGSTN</u> (SEQ ID NO: 6)	<u>DDYASMDY</u> (SEQ ID NO: 11)
Xi2B2	<u>GFTFSNYYMS</u> (SEQ ID NO: 2)	<u>YISSGGGSTY</u> (SEQ ID NO: 7)	<u>FAY</u> (SEQ ID NO: 12)
Xi16E5	<u>GYTFTNYGMN</u> (SEQ ID NO: 3)	<u>WINTNTGEPT</u> (SEQ ID NO: 8)	<u>FSHLRGPMDY</u> (SEQ ID NO: 13)
Xi3F10	<u>GYTFSRYWIE</u> (SEQ ID NO: 4)	<u>EFIPGSDT</u> (SEQ ID NO: 9)	<u>GGLRRMDY</u> (SEQ ID NO: 14)
Xi14A9	<u>GFNIEDDYIE</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>RIDPANDKTK</u> (SEQ ID NO: 10)	<u>PGLRRYYSMDY</u> (SEQ ID NO: 15)
hz3F10-1.1 / 2.1 / 3.1 / 4.1 / 5.1 / 6.1 / 1.2 / 2.2 / 3.2 / 4.2 / 5.2 / 6.2	<u>GYTFSRYWIE</u> (SEQ ID NO: 4)	<u>EFIPGSDT</u> (SEQ ID NO: 9)	<u>GGLRRMDY</u> (SEQ ID NO: 14)
hz16E5-1.1 / 1.3 / 1.2 / 3.2 / 3.1 / 3.3	<u>GYTFTNYGMN</u> (SEQ ID NO: 3)	<u>WINTNTGEPT</u> (SEQ ID NO: 8)	<u>FSHLRGPMDY</u> (SEQ ID NO: 13)
hz14A9-2.3 / 2.4	<u>GFNIEDDYIE</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>RIDPANDKTK</u> (SEQ ID NO: 10)	<u>PGLRRYYSMDY</u> (SEQ ID NO: 15)

表 S2：抗 CD47 抗体的轻链 CDR 序列

名称	轻链 CDR1	轻链 CDR2	轻链 CDR3
Xi2H8	<u>RSSQSLVHSNGNTYLH</u> (SEQ ID NO: 16)	<u>KVSNRFS</u> (SEQ ID NO: 21)	<u>SQSTHVPYT</u> (SEQ ID NO: 26)
Xi2B2	<u>KSSQSLLDSDGKTYLN</u> (SEQ ID NO: 17)	<u>LVSKLDS</u> (SEQ ID NO: 22)	<u>GTHFPLT</u> (SEQ ID NO: 27)
Xi16E5	<u>RSSQSLVHSNGYTYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>KVSNRFS</u> (SEQ ID NO: 23)	<u>SQSTHVPPT</u> (SEQ ID NO: 28)
Xi3F10	<u>RASSSVSSTYLH</u> (SEQ ID NO: 19)	<u>TTSTLAS</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>QQFSDSTWT</u> (SEQ ID NO: 29)
Xi14A9	<u>KASENVVSYVS</u> (SEQ ID NO: 20)	<u>GASNRYT</u> (SEQ ID NO: 25)	<u>GQSYSYPLT</u> (SEQ ID NO: 30)
hz3F10-1.1 / 3.1 / 5.1 / 1.2 / 3.2 / 5.2	<u>RASSSVSSTYLH</u> (SEQ ID NO: 19)	<u>TTSTLAS</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>QQFSDSTWT</u> (SEQ ID NO: 29)
hz3F10-2.1 / 4.1 / 6.1 / 2.2 / 4.2 / 6.2	<u>RASSSVSSTYLH</u> (SEQ ID NO: 19)	<u>TTSTLAS</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>QQFSESTWT</u> (SEQ ID NO: 31)
hz16E5-1.1 / 1.3 / 1.2 / 3.2 / 3.1 / 3.3	<u>RSSQSLVHSNGYTYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>KVSNRFS</u> (SEQ ID NO: 23)	<u>SQSTHVPPT</u> (SEQ ID NO: 28)
hz14A9-2.3 / 2.4	<u>KASENVVSYVS</u> (SEQ ID NO: 20)	<u>GASNRYT</u> (SEQ ID NO: 25)	<u>GQSYSYPLT</u> (SEQ ID NO: 30)
人源化 3F10（共同）	<u>RASSSVSSTYLH</u> (SEQ ID NO: 19)	<u>TTSTLAS</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>QQFSX₂STWT</u> ，其中，X ₂ 为D或E (SEQ ID NO: 32)

表 S3：抗 CD47 抗体的可变区序列

名称	区	氨基酸序列	SEQ ID NO:
Xi2H8	VH	QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWVRQPPGKGLE WLGIHWAGGSTNYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTA MYICARDYASMDYWGQGSTVTVSS	33
	VL	DAFMTQTPLSLPVSLGDAQISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPG QSPKLLIYKVSNRFSVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC SQSTHVPYTLGGGKLEIK	34
	VH	EVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTFTNYGMNWWVKQVPGKGL	

Xi16E5		KWMGWINTNTGEPTYAEFFKGRFAFSLETSARTAFLLQINNKNEDT ATYFCTRESHLRGPMDYWGQGASVTVSS	35
	VL	DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGYTYLHWYLQKPG QSPKLLIYKYSNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRLEAEDLGYYFC SOSTHVPPTFGGGKLEIK	36
Xi2B2	VH	EVMLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYMSWVRQTPEKRL EWVA ~~YISSGGGSTY~~ YPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLKSEDT AMYYCAWEAYWGQGLTVSA	37
	VL	DAVVQTPLTLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQG SPKRLIYLYSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCW QGTHEPLTFGAGTKLEIK	38
Xi3F10	VH	EVQLQQSVAELMKPGASVKIYCKATGYTFSRYWIEWVKQRPQHGL EWIGE ~~FIPGSD~~ TINFNEKFKGKATFTAEISSNTAYMQLSSLTSEDSAV YFCARGGLRRMDYWGQGSTVTVSS	39
	VL	DIVMTQTPAIMSASPGKVTMTCRASSSVSSTYLHWYQKPKGAPK LWIYTISTLASGVPARFSGSGSTSYSLTISSVEAEDAATYYC ~~QQFSD~~ STWIFGGGKLEIK	40
Xi14A9	VH	EVQLQQSGAEVARPGASVKLSCTVSGFNIEDDYIEWVKQRPQGLE WIGRIDPANDKTKYAPKFQDKATITGDTSSNTAYLQLSSLTSEDYAV YYCTRPGLRRYYSMDYWGQGSTVTVSS	41
	VL	NIVLTSQPKSMSVGERVILSCKASENVVSYVSWYQKPEQSPKL LIYGASNRYTGVPDRFIGSGSSTDFTLIISFQPEDLADYHCGQSYSY PLTFGAGTKLEIK	42
hz3F10-1.1	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGL EWMGE ~~FIPGSD~~ TNTYAKQFQGRVITADISTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGLRRMDYWGQGLTVTVSS	43
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSSTYLHWYQKPKGAPK LLIYTTSTLASGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYC ~~QQFSDS~~ TWTFGGGKLEIK	44
hz3F10-2.1	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGL EWMGE ~~FIPGSD~~ TNTYAKQFQGRVITADISTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGLRRMDYWGQGLTVTVSS	45
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSSTYLHWYQKPKGAPK LLIYTTSTLASGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYC ~~QQFSES~~ TWTFGGGKLEIK	46
hz3F10-3.1	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGL EWMGE ~~FIPGSD~~ TNTYAKQFQGRVITADISTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGLRRMDYWGQGLTVTVSS	47
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSSTYLHWYQKPKGAPK LLIYTTSTLASGVPSRFSGSGGTSTYTLTISSLQPEDFATYYC ~~QQFSDS~~ TWTFGGGKLEIK	48
hz3F10-4.1	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGL EWMGE ~~FIPGSD~~ TNTYAKQFQGRVITADISTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGLRRMDYWGQGLTVTVSS	49
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSSTYLHWYQKPKGAPK LLIYTTSTLASGVPSRFSGSGGTSTYTLTISSLQPEDFATYYC ~~QQFSES~~ TWTFGGGKLEIK	50
hz3F10-5.1	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGL EWMGE ~~FIPGSD~~ TNTYAKQFQGRVITADISTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGLRRMDYWGQGLTVTVSS	51
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSSTYLHWYQKPKGAPKL WIYTTSTLASGVPSRFSGSGGTSTYTLTISSLQPEDFATYYC ~~QQFSDS~~ TWTFGGGKLEIK	52
hz3F10-6.1	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGL EWMGE ~~FIPGSD~~ TNTYAKQFQGRVITADISTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGLRRMDYWGQGLTVTVSS	53
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSSTYLHWYQKPKGAPKL WIYTTSTLASGVPSRFSGSGGTSTYTLTISSLQPEDFATYYC ~~QQFSES~~ TWTFGGGKLEIK	54
hz3F10-1.2	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGL EWMGE ~~FIPGSD~~ TNTYAKQFQGRVITAEISTNTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGLRRMDYWGQGLTVTVSS	55
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSSTYLHWYQKPKGAPK LLIYTTSTLASGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYC ~~QQFSDS~~ TWTFGGGKLEIK	56
hz3F10-2.2	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGL EWMGE ~~FIPGSD~~ TNTYAKQFQGRVITAEISTNTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGLRRMDYWGQGLTVTVSS	57
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSSTYLHWYQKPKGAPK	

		LLIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTIISSLPEDFATYYCQQFSES TWTFGQGTKLEIK	58
hz3F10-3.2	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGL EWMGEFIPGSDITNYAQKFQGRVTITAEISTNTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGLRRMDYWGQGLTVTVSS	59
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSSTYHLHWYQQKPGKAPK LLIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTSTLTIISSLPEDFATYYCQQFSDS TWTFGQGTKLEIK	60
hz3F10-4.2	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGL EWMGEFIPGSDITNYAQKFQGRVTITAEISTNTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGLRRMDYWGQGLTVTVSS	61
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSSTYHLHWYQQKPGKAPK LLIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTSTLTIISSLPEDFATYYCQQFSES TWTFGQGTKLEIK	62
hz3F10-5.2	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGL EWMGEFIPGSDITNYAQKFQGRVTITAEISTNTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGLRRMDYWGQGLTVTVSS	63
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSSTYHLHWYQQKPGKAPKL WIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTSTLTIISSLPEDFATYYCQQFSDS TWTFGQGTKLEIK	64
hz3F10-6.2	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGL EWMGEFIPGSDITNYAQKFQGRVTITAEISTNTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGLRRMDYWGQGLTVTVSS	65
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSSTYHLHWYQQKPGKAPKL WIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTSTLTIISSLPEDFATYYCQQFSES TWTFGQGTKLEIK	66
hz16E5-1.1	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQ GLEWMGWINTNTGEPTYAQKLQGRVTMTLDTSTRITAYMELRSLRS DDTAVYYCARFSHLRGPMYWGQGLTVTVSS	67
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSLVHSNGYTYLHWYQQKPG KAPKLLIYKVSNNRFSGVPSRFSGSGSGTDFLTIISSLPEDFATYYCS QSTHVPPTFGQGTKLEIK	68
hz16E5-1.3	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQ GLKWMGWINTNTGEPTYAQELQGRVTMTLDTSTRITAYMELRSLRS DDTAVYYCTRFSHLRGPMYWGQGLTVTVSS	69
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSLVHSNGYTYLHWYQQKPG KAPKLLIYKVSNNRFSGVPSRFSGSGSGTDFLTIISSLPEDFATYYCS QSTHVPPTFGQGTKLEIK	70
hz16E5-1.2	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQ GLKWMGWINTNTGEPTYAQELQGRVTMTLDTSTRITAYMELRSLRS DDTAVYYCARFSHLRGPMYWGQGLTVTVSS	71
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSLVHSNGYTYLHWYQQKPG KAPKLLIYKVSNNRFSGVPSRFSGSGSGTDFLTIISSLPEDFATYYCS QSTHVPPTFGQGTKLEIK	72
hz16E5-3.2	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQ GLKWMGWINTNTGEPTYAQELQGRVTMTLDTSTRITAYMELRSLRS DDTAVYYCARFSHLRGPMYWGQGLTVTVSS	73
	VL	DAQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSLVHSNGYTYLHWYQQKPG KAPKLLIYKVSNNRFSGVPSRFSGSGSGTDFLTIISSLPEDFATYYCS QSTHVPPTFGQGTKLEIK	74
hz16E5-3.1	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQ GLEWMGWINTNTGEPTYAQKLQGRVTMTLDTSTRITAYMELRSLRS DDTAVYYCARFSHLRGPMYWGQGLTVTVSS	75
	VL	DAQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSLVHSNGYTYLHWYQQKPG KAPKLLIYKVSNNRFSGVPSRFSGSGSGTDFLTIISSLPEDFATYYCS QSTHVPPTFGQGTKLEIK	76
hz16E5-3.3	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQ GLKWMGWINTNTGEPTYAQELQGRVTMTLDTSTRITAYMELRSLRS DDTAVYYCTRFSHLRGPMYWGQGLTVTVSS	77
	VL	DAQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSLVHSNGYTYLHWYQQKPG KAPKLLIYKVSNNRFSGVPSRFSGSGSGTDFLTIISSLPEDFATYYCS QSTHVPPTFGQGTKLEIK	78
hz14A9-2.3	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGFNIEDDYIEWVRQAPGQGL EWMGRIDPANDKTKYAQKFQGRVTMTGDTSTNTVYMELSSLRSED TAVYYCARPGLRRYYMDYWGQGLTVTVSS	79
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASENVVSYSWYQQKPGKAPKL LIYGASNRYTGVPSRFIGSGSSTDFLTIISSLPEDFATYYCGQSYSP LTFGQGTKLEIK	80
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGFNIEDDYIEWVRQAPGQGL	

hz14A9-2.4		EWMGRIDPANDKTKYAQKFQGRVTMTGDTSTNTVYMELSSLRSED TAVYYCTRPGLRRYYSM ~~DI~~ WGQGTILTVSS	81
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC ~~AK~~ SENVSYSVSWYQQKPGKAPKL LIYGASNRYTGVP ~~SR~~ FIGSGSSTDFLT ~~IT~~ SSLPEDFATYYC ~~QGS~~ YSY LTFGQGTKLEIK	82
人源化 3F10 (共同)	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV ~~SC~~ KASGYTESRYWIEWVRQAPGQGL EWMGE ~~FIPGSDI~~ TNYAQKFQGRVIT ~~TA~~ X ₃ X ₄ STX ₅ TAYMELSSLRSED TAVYYCARGGLRRMDYWGQGTILTVSS 其中, X ₃ 为D或E, X ₄ 为I或E, X ₅ 为S或N	83
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC ~~RA~~ SSSVSSTYLHWYQQKPGKAPK LX ₆ IYTTSTLASGV ~~SR~~ FSGSGSGTX ₇ X ₈ TLT ~~IT~~ SSLPEDFATYYC ~~QGS~~ X ₂ STWTFGQGTKLEIK 其中, X ₆ 为L或W, X ₇ 为D或S, X ₈ 为F或Y, X ₂ 为D或E	84
人源化 16E5 (共同)	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV ~~SC~~ KASGYTF ~~T~~ NYGMN ~~W~~ VRQAPGQ GLX ₉ WMGW ~~INTNTGEPT~~ YAQX ₁₀ LQGRVTMTX ₁₁ DTSTX ₁₂ TAYMELR SLRSDDTAVYYC X ₁₃ ~~RF~~ SHLRGPM ~~DY~~ WGQGTILTVSS 其中, X ₉ 为E或K, X ₁₀ 为K或E, X ₁₁ 为L或T, X ₁₂ 为R或S, X ₁₃ 为A或T	85
	VL	DX ₁₄ QMTQSPSSLSASVGDRVITTC ~~RS~~ SQSLVHSNGYTYLHWYQQKPGKAPKL GKAPKLLIYK ~~YSN~~ RESGV ~~SR~~ FSGSGSGTDFLT ~~IT~~ SSLPEDFATYYC SOSTHVPPTFGQGTKLEIK 其中, X ₁₄ 为I或A	86
人源化 14A9 (共同)	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV ~~SC~~ KX ₁₅ ~~SC~~ FNI ~~EDDY~~ IEWVRQAPGQGL LEWMGRIDPANDKTKYAQKFQGRVTMTX ₁₆ DTSTX ₁₇ TVMELSSLR SEDTAVYYC X ₁₈ ~~RP~~ GLRRYYSM ~~DI~~ WGQGTILTVSS 其中, X ₁₅ 为A或V, X ₁₆ 为R或G, X ₁₇ 为S或N, X ₁₈ 为A或T	87
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC ~~AK~~ SENVSYSVSWYQQKPGKAPKL LIYGASNRYTGVP ~~SR~~ FX ₁₉ SGS ~~SX~~ ₂₀ TDFLT ~~IT~~ SSLPEDFATYYC ~~QGS~~ SYPLTFGQGTKLEIK 其中, X ₁₉ 为S或L, X ₂₀ 为S或G	88

表 S4: 抗 CD47 抗体的全长重链和全长轻链的序列

名称	区	氨基酸序列	SEQ ID NO:
Xi2H8	重链	QVQLKESGPGLVAPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQPPGKGLEWLGIHWA GGSTNYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTD ~~DT~~ TAMYYCARD ~~Y~~ ASM DYWGQGTSTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG ~~TK~~ TYTCNV ~~DH~~ KPSNTKVDKR ~~VE~~ SKYGP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS ~~VL~~ TLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTI ~~SK~~ AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSG ~~S~~ FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLGK	89
	轻链	DAFMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLI YKYSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG ~~VY~~ FC ~~SQ~~ STHVPYTLGG GTKLEIK RTVAAPS ~~VF~~ I ~~FP~~ PSDEQLKSGTASV ~~V~~ CLLNNFY ~~P~~ RE ~~A~~ KVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDS ~~TY~~ SLSTLTLSKADYE ~~KH~~ KVYACEVTHQGLSSPVT ~~K~~ SFNR GEC	91
Xi16E5	重链	EVQLQQSGPELKKPGETVKISKASGYTF ~~T~~ NYGMN ~~W~~ VKQVPGKGLKWMG WINTNTGEPT ~~Y~~ AEEFKGRFAFSLETSARTAF ~~LQ~~ NNLKNEDTATYFC ~~TR~~ SHLR GPM ~~DY~~ WGQGSVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG ~~TK~~ TYTCNV ~~DH~~ KPSNTKVDKR ~~VE~~ SKYGP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS ~~VL~~ TLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTI ~~SK~~ AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSG ~~S~~ FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLGK	93
	轻链	DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGYTYLHWYLQKPGQSPKLLI YKYSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRLEAEDLG ~~VY~~ FC ~~SQ~~ STHVPPTFGG TKLEIK RTVAAPS ~~VF~~ I ~~FP~~ PSDEQLKSGTASV ~~V~~ CLLNNFY ~~P~~ RE ~~A~~ KVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDS ~~TY~~ SLSTLTLSKADYE ~~KH~~ KVYACEVTHQGLSSPVT ~~K~~ SFNR GEC	95
		EVMLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF ~~T~~ ESNYYMSWVRQTPEKRL ~~EW~~ VAYI SSGGG ~~ST~~ YYPDSV ~~K~~ GRFTISRDNAKNTLYLQMSS ~~LK~~ SED ~~T~~ AMYYCAW ~~FAY~~ W GQGTILTVSA ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF	

Xi2B2	重链	PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPCC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDWWLNGKEYCKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLGK	97
	轻链	DAVVTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNNWLLQRPQSPKRLIY LVSKLDGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCWCQGTHTPLTFGAG TKLELK RTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	99
Xi3F10	重链	EVQLQSSVAELMKPGASVKIYCKATGYTFESRYWIEWVKQRPQGHLEWIGEFI PGSDITNFKNEKFGKATFTAEISSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGGLRRMD YWGQGTSTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPCC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDWWLNGKEYCKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLGK	101
	轻链	DIVMTQTTPAIMASAPGEKVTMTCRASSSVSSSTYLHWYQQKSGASPKLWIYTT STLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSTVEAEDAATYYCQQFSDSITWTFGGGTKL EIK RTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	103
Xi14A9	重链	EVQLQSSGAELVARPGASVKLSCTVSGFNIEDDYIEWVKQRPQGLEWIGRID PANDKTKYAPKFDKATITGDTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCTRPGRLRRY SMDYWGQGTSTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPCC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDWWLNGKEYCKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLGK	105
	轻链	NIVLTQSPKMSMSVGERVTLSCASENVVSYVSWYQQKPEQSPKLLIYGAS NRYTGVPDRFIGSGSSTDFTLIISFQPEDLADYHCGQSYSTPLTFGAGTKLEL K RTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	107
hz3F10-1.1	重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFESRYWIEWVRQAPGQGLEWMGE FIPGSDITNYAQKFQGRVTITADISTAYMELSSLRSEDIAYYYCARGGLRR MDYWGQGTSTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPCC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDWWLNGKEYCKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLGK	109
	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSSSTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTIS TLASGVPSRFSGSGSGTDFTLIISLQPEDFATYYCQQFSDSITWTFGGGTKLEI K RTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	111
hz3F10-2.1	重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFESRYWIEWVRQAPGQGLEWMGE FIPGSDITNYAQKFQGRVTITADISTAYMELSSLRSEDIAYYYCARGGLRR MDYWGQGTSTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPCC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDWWLNGKEYCKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLGK	113

	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSVSSTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTTS TLASGVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPQEDFATYYCQQFSESTWTFGGGTKLEIK RTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	115
hz3F10-3.1	重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSRYWIEWVRQAPGGGLEWMGE FIPGSDITNYAQKFQGRVTITADISTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARGGLRR MDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPHKPSNTKVDKRVEKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHSDWLNQGEYKCKVSNKGLP SSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLGK	117
	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSVSSTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTTS TLASGVPSRFGSGSGTSTLTITSSLPQEDFATYYCQQFSDSTWTFGGGTKLEIK RTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	119
hz3F10-4.1	重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSRYWIEWVRQAPGGGLEWMGE FIPGSDITNYAQKFQGRVTITADISTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARGGLRR MDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPHKPSNTKVDKRVEKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHSDWLNQGEYKCKVSNKGLP SSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLGK	121
	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSVSSTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTTS TLASGVPSRFGSGSGTSTLTITSSLPQEDFATYYCQQFSESTWTFGGGTKLEIK RTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	123
hz3F10-5.1	重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSRYWIEWVRQAPGGGLEWMGE FIPGSDITNYAQKFQGRVTITADISTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARGGLRR MDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPHKPSNTKVDKRVEKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHSDWLNQGEYKCKVSNKGLP SSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLGK	125
	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSVSSTYLHWYQQKPGKAPKLWIYTTS TLASGVPSRFGSGSGTSTLTITSSLPQEDFATYYCQQFSDSTWTFGGGTKLEIK RTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	127
hz3F10-6.1	重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSRYWIEWVRQAPGGGLEWMGE FIPGSDITNYAQKFQGRVTITADISTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARGGLRR MDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPHKPSNTKVDKRVEKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHSDWLNQGEYKCKVSNKGLP SSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLGK	129
	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSVSSTYLHWYQQKPGKAPKLWIYTTS TLASGVPSRFGSGSGTSTLTITSSLPQEDFATYYCQQFSESTWTFGGGTKLEIK RTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	131

hz3F10-1.2	重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGE FIPGSDTNTYAKFQGRVTITAEISTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGLRR MDYWGQGILVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNV DHKPSNTK VDKRVESKYGPCC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLGK	133
	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASSVSSTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTTS TLASGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFSDSTWTFGQG TKLEI K RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	135
hz3F10-2.2	重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGE FIPGSDTNTYAKFQGRVTITAEISTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGLRR MDYWGQGILVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNV DHKPSNTK VDKRVESKYGPCC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLGK	137
	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASSVSSTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTTS TLASGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFSESTWTFGQG TKLEI K RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	139
hz3F10-3.2	重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGE FIPGSDTNTYAKFQGRVTITAEISTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGLRR MDYWGQGILVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNV DHKPSNTK VDKRVESKYGPCC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLGK	141
	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASSVSSTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTTS TLASGVPSRFGSGSGTSTYTLTISLQPEDFATYYCQQFSDSTWTFGQG TKLEI K RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	143
hz3F10-4.2	重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGE FIPGSDTNTYAKFQGRVTITAEISTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGLRR MDYWGQGILVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNV DHKPSNTK VDKRVESKYGPCC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLGK	145
	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASSVSSTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTTS TLASGVPSRFGSGSGTSTYTLTISLQPEDFATYYCQQFSESTWTFGQG TKLEI K RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	147
	重	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGE FIPGSDTNTYAKFQGRVTITAEISTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGLRR MDYWGQGILVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNV DHKPSNTK VDKRVESKYGPCC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV	149

hz3F10-5.2	链	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASSSVSSTYLHWYQQKPGKAPKLWIYTTSTLASGVPSRFGSGSGTSYTLTISSLQPEDFATYYCQQFSDSSTWTFGGQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	151
hz3F10-6.2	重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFESRYWIEWVRQAPGGGLEWMGEFIPGSDITNIAQKFKQGRVITIAEISTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGLRRMDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	153
	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASSSVSSTYLHWYQQKPGKAPKLWIYTTSTLASGVPSRFGSGSGTSYTLTISSLQPEDFATYYCQQFSSTWTFGGQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	155
hz16E5-1.1	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFETNYGMNWVRQAPGGGLEWMGWINTNTGEPITYAQKLQGRVTMTLDTSTRITAYMELRSLRSDDTAVYYCARFSEHLRGPM DYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	157
	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRSSQSLVHSNGYTYLHWYQQKPGKAPKLLIYKVSNNRFGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPPTFGQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	159
hz16E5-1.3	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFETNYGMNWVRQAPGGGLKWMGWINTNTGEPITYAQELQGRVTMTLDTSTRITAYMELRSLRSDDTAVYYCTRFSHLRGPM DYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	161
	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRSSQSLVHSNGYTYLHWYQQKPGKAPKLLIYKVSNNRFGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPPTFGQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	163
hz16E5-1.2	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFETNYGMNWVRQAPGGGLKWMGWINTNTGEPITYAQELQGRVTMTLDTSTRITAYMELRSLRSDDTAVYYCARFSEHLRGPM DYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	165
		DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRSSQSLVHSNGYTYLHWYQQKPGKAPKLLIYKVSNNRFGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPPTFGQGTKLEIK	

	轻链	KLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	167
hz16E5-3.2	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFETNYGMNWRQAPGQGLKWM GWINTNTGEPTYAQELQGRVTMTLDTSTRITAYMELRSLRSDDTAVYYCAREF <u>HLRGPMDYWGQGT</u> LVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKCKVSNKGLP SSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK	169
	轻链	DAQMTQSPSSLSASVGRVITITCRSSQSLVHSNGYTYLHWYQQKPGKAPKLL IYKVSNNRFGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCSQSSTHVPPTFGQGT KLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	171
hz16E5-3.1	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFETNYGMNWRQAPGQGLEWMG WINTNTGEPTYAQKLQGRVTMTLDTSTRITAYMELRSLRSDDTAVYYCARFSE <u>LRGPMDYWGQGT</u> LVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKCKVSNKGLP SSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK	173
	轻链	DAQMTQSPSSLSASVGRVITITCRSSQSLVHSNGYTYLHWYQQKPGKAPKLL IYKVSNNRFGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCSQSSTHVPPTFGQGT KLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	175
hz16E5-3.3	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFETNYGMNWRQAPGQGLKWM GWINTNTGEPTYAQELQGRVTMTLDTSTRITAYMELRSLRSDDTAVYYCTRFS <u>HLRGPMDYWGQGT</u> LVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKCKVSNKGLP SSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK	177
	轻链	DAQMTQSPSSLSASVGRVITITCRSSQSLVHSNGYTYLHWYQQKPGKAPKLL IYKVSNNRFGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCSQSSTHVPPTFGQGT KLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	179
hz14A9-2.3	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFNIEDDYIEWVRQAPGQGLEWMGRI <u>DPANDKTKYAQKFQGRVTMTGDTSTNTVYMELSSLRSED</u> TAVYYCARPGLR <u>RYYSM</u> DYWGQGT	181
	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITKASENVVSYSVSWYQQKPGKAPKLLIYGAS <u>NRYTG</u> VPSRFIGSGSSTDFLTISLQPEDFATYYCGQSYSPPLFGQGT KLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	
		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFNIEDDYIEWVRQAPGQGLEWMGRI <u>DPANDKTKYAQKFQGRVTMTGDTSTNTVYMELSSLRSED</u> TAVYYCTRPLR <u>RYYSM</u> DYWGQGT	

hz14A9-2.4	重链	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVE SKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVQLQDWLNKGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	185
	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYSYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPSRFIGSGSSTDFLTITISLQPEDFATYYCGQSYSYPLTFGQGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	187

免疫偶联物

在一些实施方案中，本发明提供了结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分的免疫偶联物。可以与结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分连接或缀合的治疗剂可以包括但不限于细胞毒性药物、放射性同位素、免疫调节剂或抗体。在一些实施方案中，结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分与治疗剂直接缀合。在一些实施方案中，结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分通过接头与治疗剂缀合。

组合物

本发明提供了药物组合物，所述药物组合物包含分离的结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分，或编码所述抗体或片段的核酸，或本文所述的免疫偶联物，并且还包含一种或多种药学上可接受的载体。在一些实施方案中，组合物包括 2B2、2H8、3F10、16E5 和 14A9 抗体的嵌合抗体及人源化抗体中的任一单克隆抗体，以及药学上可接受的载体。药学上可接受的载体包括，例如，赋形剂、稀释剂、包封材料、填充剂、缓冲剂或其他试剂。

杂交瘤

本发明提供了分离的杂交瘤细胞系，其选自 2B2、2H8、3F10、16E5 和 14A9 组成的组。杂交瘤细胞系 2B2、2H8、3F10、16E5 和 14A9 分泌结合 CD47 的单克隆抗体。

分离的核酸

本发明提供了分离的核酸，其包含编码本文所述结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分的序列，在一些实施方案中，所述核酸可以编码包含本文所述抗原结合多肽重链可变区或/和轻链可变区的氨基酸序列。在另一些实施方案中，所述的核酸可以编码包含本文所述的抗原结合多肽重链或/和抗原结合多肽轻链的氨基酸序列。序列表中示例性的列举了一些可变区、抗原结合多肽重链和轻链的核苷酸序列。

载体

本发明提供了包含所述的分离的核酸的载体。在一些实施方案中，所述的载体为克隆载体；在另一些实施方案中，所述的载体为表达载体。

所述表达载体可选的能够表达本文所述抗原结合多肽或其抗原结合部分的任意表达载体。

宿主细胞

在一些实施方案中，本发明提供包含所述载体的宿主细胞，宿主细胞为用于克隆或编码结合CD47的抗原结合多肽或其抗原结合部分的适当宿主细胞。在一些实施方案中，宿主细胞为原核细胞。在另一些实施方案中，宿主细胞为真核细胞。在一些实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳细胞或适用于制备抗原结合多肽或其抗原结合部分的其他细胞。哺乳细胞例如为中国仓鼠（CHO）卵巢细胞。

制备结合 CD47 抗原结合多肽的方法

在一些实施方案中，本发明提供了制备结合 CD47 的分离的抗原结合多肽的方法，所述方法包括：在适合所述抗原结合多肽表达的条件下，培养包含编码所述抗原结合多肽的核酸的宿主细胞，从所述宿主细胞或宿主细胞培养基中回收所述抗原结合多肽。为了产生结合 CD47 的抗原结合多肽，分离编码所述抗体的核酸，并插入一个或多个载体，用于在宿主细胞中进一步克隆或/和表达。所述核酸可以采用基因克隆、基因拼接、化学合成等多种本领域所熟知的方法获取。

用途

本发明提供了结合 CD47 的分离的抗原结合多肽或其抗原结合部分的用途，一些实施方案中，向受试者施用治疗有效量本文的分离的结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分，可以减少或抑制肿瘤细胞生长。一些实施方案中，向受试者施用治疗有效量本文的分离的结合 CD47 的抗原结合多肽或其抗原结合部分，可以治疗癌症。需要治疗的受试者包括那些已经患有疾病或病状的受试者，以及可能患疾病或病状并且其目的是预防、延迟或减弱疾病或病状的受试者。如本文所用，“癌症”是指哺乳动物中特征通常在

于不受调控的细胞生长的生理病状。癌症的实例包括但不限于：白血病、淋巴瘤、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌、尿路上皮癌、肺癌、支气管癌、骨癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、肝细胞癌、胆囊癌、胆管癌、食道癌、肾细胞癌、甲状腺癌、头颈癌、睾丸癌、内分泌腺癌、肾上腺癌、脑下垂体癌、皮肤癌、软组织癌、血管癌、脑癌、神经癌、眼癌、脑膜癌、口咽癌、下咽部癌、宫颈癌、以及子宫癌、成胶质细胞瘤、成神经管细胞瘤、星形细胞瘤、胶质瘤、脑膜瘤、胃泌素瘤、成神经细胞瘤、黑色素瘤、急性髓系白血病、骨髓增生异常综合征、以及肉瘤。

一些实施方案中，向所述受试者施用有效量的本文结合 CD47 的分离的抗原结合多肽或其抗原结合部分，促进受试者巨噬细胞的吞噬作用。

尽管为了清楚理解的目的，已经通过举例说明和实施例相当详细地描述了前述发明，但是根据本发明的教义，本领域的普通技术人员将显而易见的是，可另外对本发明进行某些改变和修改而不背离所附权利要求的精神和范围。以下实施例仅以说明方式提供，而并不起限制作用。本领域的技术人员将容易地识别多种非关键性参数，所述参数可发生改变或修改以产生基本上类似的结果。本文具体实施例中采用的阳性对照 Hu5F9，其序列与美国专利 US2015/0183874A1 中的抗体“5F9”的序列相同，为人源化抗体。

除非特殊说明，否则本发明的实践采用本领域熟知的并且在以下中描述的常规分子生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学技术：例如，Methods in Molecular Biology, Humana Press; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版 (Sambrook 等, 1989); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan 等编, 1991); Immunobiology (C.A. Janeway 和 P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty 编, IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd 和 C. Dean 编, Oxford University Press, 2000); Phage display: a laboratory manual (C. Barbas III 等 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001); 以及 Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) 等。

实施例 1：抗 CD47 单克隆抗体的产生

使用 CD47 蛋白对小鼠的免疫：

为了产生针对 CD47 的抗体，使用等体积的弗氏完全佐剂（初次免疫）或弗氏不完全佐剂（加强免疫）乳化的重组体 hCD47-His Tag 蛋白（ACROBiosystems，目录号：CD7-H5227）（50 μg/小鼠 Balb/c）或 hCD47-mFc（ACROBiosystems，目录号：CD7-H52A5）每 2 周皮下免疫 Balb/c 小鼠，免疫三次持续 6 周。第四次免疫采用 hCD47-mFc（ACROBiosystems，目录号：CD7-H52A5）蛋白，20 μg/只小鼠，肌肉注射（水相佐剂）。细胞融合前三天，通过静脉内注射不含佐剂的抗原来加强小鼠免疫。使用聚乙二醇 1500（Polyethylene Glycol 1500; Roche 公司，目录号：10783641001）将来自免疫小鼠的脾细胞（1×10⁸）与 SP2/0 骨髓瘤细胞（1.5×10⁷）融合。融合后，将细胞以 0.1 ml/孔分配到 96 孔板中，并且在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中进行孵育。在第 1 天，通过向每孔添加另外的 0.1 ml 含有血清和补充有 2×甲氨蝶呤的 HAT 培养基来饲养细胞。在第 3 天和第 7 天，用 0.1 ml 新鲜的 HAT 培养基替换来自每孔的 0.1 ml 培养基。通常在第 9-14 天之间进行筛选，并且通过 ELISA 针对与 hCD47-His Tag（ACROBiosystems 公司，目录号：CD7-H5227）反应的抗体测试培养物上清液，筛选阳性孔。

杂交瘤细胞克隆化采用有限稀释法。将挑选出的阳性混合克隆进行有限稀释，一株阳性混合克隆，铺两块 96 孔板（100 cells/板、200 cells/板），将杂交瘤细胞培养在含有 10%胎牛血清的 RPMI 1640（Hyclone 公司，目录号：SH30809.01）中。10 天后，待有限稀释后的亚克隆同样经过 ELISA 试验检测培养物上清，挑取阳性亚克隆。克隆化的杂交瘤细胞保种并用于 cDNA 的提取。

抗人 CD47 抗体的 cDNA 提取和可变区序列获取：

使用 RNA 提取试剂盒（Takara，目录号：9767）从筛选出的产生 hCD47 抗体的杂交瘤细胞系中分离总 RNA，以总 RNA 作为模板，根据制造商的说明书，用逆转录试剂盒（Thermo Fisher，目录号：K1652）合成第一链 cDNA。然后利用合成的 cDNA，使用简并小鼠 IgG 引物，通过 PCR 反应对抗体相关序列进行体外扩增。

将 PCR 扩增产物在 1%琼脂糖/Tris-醋酸盐凝胶中进行电泳分离。从凝胶上切下具有预期大小（重链和轻链大约 450 bp）的 DNA 片段并且对其纯化。将 3 μl 纯化的 PCR 产物克隆到 pMD-19T 载体（Takara，目录号：6013）中，并且转化到 DH5α 化学感受态大肠杆菌（Takara，目录号：9057）中。每个连接反应中，随机选择 10 个阳性克隆，使用 M13 正向引物进行 DNA 测序。

从对应的杂交瘤克隆（2B2、2H8、3F10、16E5、14A9）扩增、测序得到五个鼠源单克隆抗体（2B2、2H8、3F10、16E5、14A9 抗体）的重链可变区（VH）序列和轻链可变区（VL）序列，序列信息如下：

抗体名称	VH (SEQ ID NO:)		VL (SEQ ID NO:)	
	氨基酸序列	核苷酸序列	氨基酸序列	核苷酸序列

2H8	33	189	34	190
16E5	35	191	36	192
2B2	37	193	38	194
3F10	39	195	40	196
14A9	41	197	42	198

嵌合抗体的构建和表达:

通过将小鼠抗体可变区的基因进行化学合成,将每种小鼠抗体的 VL 区分别连接到人 κ 链恒定区构建嵌合轻链,将小鼠 VH 区连接到人 IgG4 (EU 编号 S228P) 恒定区构建嵌合重链。通过常规基因工程手段分别构建嵌合轻链的表达质粒和嵌合重链的表达质粒,将 CHO 细胞 (200 mL 体系,在 10^6 个细胞/mL 下) 用 100 μ g 的每种嵌合重链表达质粒和嵌合轻链表达质粒进行转染并且将其培养 6 天。然后用蛋白 A 柱纯化上清液中的嵌合抗体。

构建并表达得到五种嵌合抗体,其嵌合重链和嵌合轻链的全长序列及其编码核酸如下: Xi2H8 (嵌合重链及其编码核酸: SEQ ID NOs: 89~90; 嵌合轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs: 91~92)、Xi2B2 (嵌合重链及其编码核酸: SEQ ID NOs: 97~98; 嵌合轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs: 99~100)、Xi3F10 (嵌合重链及其编码核酸: SEQ ID NOs: 101~102; 嵌合轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs: 103~104)、Xi16E5 (嵌合重链及其编码核酸: SEQ ID NOs: 93~94; 嵌合轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs: 95~96)、Xi14A9 (嵌合重链及其编码核酸: SEQ ID NOs: 105~106; 嵌合轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs: 107~108)。

抗体人源化设计:

3F10、14A9 和 16E5 的人鼠嵌合抗体使用 CDR 移植方法进行人源化 (参见,例如,美国专利号 5,225,539)。通过 MOE (Molecular Operating Environment) 对鼠源抗体 3F10、14A9 和 16E5 进行同源建模,产生 Fv 结构域的蛋白质结构模型。分别将鼠源 3F10、14A9 和 16E5 抗体的 VH 和 VL 氨基酸序列输入到国际免疫遗传信息系统相关工具网站 (<http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi>), 从中筛选出与小鼠 3F10、14A9 和 16E5 抗体的可变区具有高度同源性的人胚系抗体序列。将鼠源 3F10、14A9 和 16E5 抗体的 VH 和 VL 中的互补决定区 (CDR) 嫁接模板人抗体。对于 3F10,所选择的模板人 VH 是 IGHV1-69*01 和 IGHJ4*01 的组合,所选择的模板人 VL 是 IGKV1-39*01 和 IGKJ2*01 的组合。对于 14A9,所选择的模板人 VH 是 IGHV1-46*01 和 IGHJ4*01 的组合,所选择的模板人 VL 是 IGKV1-39*01 和 IGKJ2*01 的组合。对于 16E5,所选择的模板人 VH 是 IGHV1-18*01 和 IGHJ4*01 的组合,所选择的模板人 VL 是 IGKV1-39*01 和 IGKJ2*01 的组合。

上述模板人抗体的 CDR 氨基酸序列被杂交瘤 (小鼠) 3F10、14A9 和 16E5 抗体的 CDR 取代。用来自小鼠 3F10、14A9 和 16E5 抗体的 VH 和 VL 的必需氨基酸序列嫁接上述模板人胚系抗体 VH 和 VL 框架,以得到功能性人源化抗体。对于 3F10、14A9 和 16E5 抗体的 VH 和 VL,上述模板人抗体的框架氨基酸的几个位点被回复突变为小鼠 3F10、14A9 和 16E5 抗体中对应的氨基酸序列。个别的 CDR 区进行突变。

对于人源化 3F10 抗体的重链可变区,突变类型的选择和搭配来自如下位点: 在位置 73 处的氨基酸从 Asp (D) 突变为 Glu (E); 在位置 74 处的氨基酸从 Glu (E) 突变为 Ile (I); 在位置 77 处的氨基酸从 Ser (S) 突变为 Asn (N), 并且对于人源化 3F10 抗体的轻链可变区,突变类型的选择和搭配来自如下位点: 在位置 48 处的氨基酸从 Leu (L) 突变为 Trp (W); 在位置 71 处的氨基酸从 Asp (D) 突变为 Ser (S); 在位置 72 处的氨基酸从 Phe (F) 突变为 Tyr (Y); 在位置 94 处的氨基酸从 Asp (D) 突变为 Glu (E)。对于人源化 14A9 的重链可变区,突变类型的选择和搭配来自如下位点: 在位置 24 处的氨基酸从 Ala (A) 突变为 Val (V); 在位置 72 处的氨基酸从 Arg (R) 突变为 Gly (G); 在位置 77 处的氨基酸从 Ser (S) 突变为 Asn (N); 在位置 97 处的氨基酸从 Ala (A) 突变为 Thr (T), 并且对于人源化 14A9 的轻链可变区,突变类型的选择和搭配来自如下位点: 在位置 63 处的氨基酸从 Ser (S) 突变为 Ile (I); 在位置 68 处的氨基酸从 Gly (G) 突变为 Ser (S)。对于人源化 16E5 抗体的重链可变区,突变类型的选择和搭配来自如下位点: 在位置 46 处的氨基酸从 Glu (E) 突变为 Lys (K); 在位置 63 处的氨基酸从 Lys (K) 突变为 Glu (E); 在位置 72 处的氨基酸从 Thr (T) 突变为 Leu (L); 在位置 77 处的氨基酸从 Ser (S) 突变为 Arg (R); 在位置 97 处的氨基酸从 Ala (A) 突变为 Thr (T), 并且对于人源化 16E5 抗体的轻链可变区,突变类型的选择和搭配来自如下位点: 在位置 2 处的氨基酸从 Ile (I) 突变为 Ala (A); 在位置 33 处的氨基酸从 Asn (N) 突变为 Gln (Q)。本段中突变位点序号的描述按照可变区第一个氨基酸开始依次计数,

人源化 3F10、14A9 和 16E5 抗体的序列及其编码核酸如下: hz3F10-1.1 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.109~110; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.111~112)、hz3F10-2.1 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.113~114; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.115~116)、hz3F10-3.1 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.117~118; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.119~120)、hz3F10-4.1 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.121~122; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.123~124)、hz3F10-5.1 (重链及其编码核酸: SEQ ID

NOs.125~126; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.127~128)、hz3F10-6.1 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.129~130; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.131~132)、hz3F10-1.2 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.133~134; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.135~136)、hz3F10-2.2 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.137~138; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.139~140)、hz3F10-3.2 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.141~142; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.143~144)、hz3F10-4.2 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.145~146; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.147~148)、hz3F10-5.2 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.149~150; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.151~152)、hz3F10-6.2 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.153~154; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.155~156)、hz16E5-1.1 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.157~158; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.159~160)、hz16E5-1.3 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.161~162; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.163~164)、hz16E5-1.2 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.165~166; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.167~168)、hz16E5-3.2 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.169~170; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.171~172)、hz16E5-3.1 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.173~174; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.175~176)、hz16E5-3.3 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.177~178; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.179~180)、hz14A9-2.3 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.181~182; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.183~184)、hz14A9-2.4 (重链及其编码核酸: SEQ ID NOs.185~186; 轻链及其编码核酸: SEQ ID NOs.187~188)。

人源化 3F10、14A9 和 16E5 抗体的构建和表达:

合成编码人源化 3F10、14A9 和 16E5 抗体全长轻链和全长重链的 DNA 并且将所述 DNA 克隆到表达载体 (包括例如 CN107001463A 披露的 pcDNA3.1 载体、CN109422811A 披露的 pCHO1.0 载体等)。将 CHO 细胞 (200ml 体系, 在 10⁶ 个细胞/ml 下) 用 100 μg 的每种人源化抗体重链表达质粒和轻链表达质粒进行转染并且将其用 ExpiCHO 培养基 (Gibco; 货号: A29100-01) 在 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养 6 天。离心分离得到上清液后, 然后用蛋白 A 柱纯化上清液中的人源化抗体。

实施例 2: 抗 CD47 抗体的基于 Biacore 的亲和力分析

通过 Biacore 分别测量人 CD47 蛋白 (Human CD47 Protein, His Tag; ACROBiosystems 公司, 目录号: CD7-H5227) 和食蟹猴 CD47 蛋白 (Cynomolgus /Rhesus macaque CD47 Protein, His Tag; ACROBiosystems 公司, 目录号: CD7-C52H1) 与抗 CD47 抗体 (嵌合的或人源化的) 之间的结合动力学, 获得平衡解离常数 K_D (单位 M); 所述 Biacore 分析在 25°C 下进行并且以 1Hz 的数据收集速率进行记录。

将多克隆兔抗小鼠 IgG (GE, BR-1008-38) 用 10 mM pH 5.0 的乙酸钠进行稀释, 并且使用胺偶联试剂盒 (GE, BR10050) 固定到 CM5 生物传感器芯片的参考流动池和实验流动池上达到约 15000 RM。在每个循环的开始, 将稀释的测试抗体 (1.5 μg/mL) 注射在实验流动池上, 持续 1 分钟以被捕获。这些数据表明, 如通过 Biacore 测量的, 抗 CD47 抗体 (嵌合的和人源化的) 结合 CD47。

表 1: 抗 CD47 嵌合抗体与人 CD47 和食蟹猴 CD47 的结合亲和力

抗体名称	Biacore: 平衡解离常数 K _D (单位 M)	
	人 CD47 蛋白	食蟹猴 CD47 蛋白
Xi2B2	7.48E-09	1.20E-09
Xi2H8	3.50E-10	1.25E-09
Xi3F10	7.67E-10	1.04E-09
Xi16E5	9.06E-09	2.92E-09
Xi14A9	2.35E-09	1.58E-09

表 2: 抗 CD47 人源化抗体与人 CD47 和食蟹猴 CD47 的结合亲和力

抗体名称	Biacore: 平衡解离常数 K _D (单位 M)	
	人 CD47 蛋白	食蟹猴 CD47 蛋白
hz3F10-1.1	9.46E-10	1.31E-09
hz3F10-2.1	8.36E-10	1.17E-09
hz3F10-3.1	1.53E-09	1.92E-09
hz3F10-4.1	1.42E-09	1.62E-09
hz3F10-5.1	9.60E-10	1.30E-09
hz3F10-6.1	5.92E-10	2.47E-09
hz3F10-1.2	9.04E-10	1.33E-09
hz3F10-2.2	7.79E-10	1.14E-09

hz3F10-3.2	1.15E-09	1.47E-09
hz3F10-4.2	1.34E-09	1.86E-09
hz3F10-5.2	8.96E-10	1.40E-09
hz3F10-6.2	7.65E-10	1.15E-09
hz16E5-1.1	1.89E-08	4.77E-09
hz16E5-3.1	6.28E-09	3.28E-09
hz16E5-1.2	9.31E-09	2.26E-09
hz16E5-3.2	1.71E-08	3.10E-09
hz16E5-1.3	1.53E-08	2.73E-09
hz16E5-3.3	7.13E-09	1.87E-09
hz14A9-2.3	2.04E-10	3.07E-09
hz14A9-2.4	8.55E-09	2.00E-09
Hu5F9	8.33E-10	1.92E-09

实施例 3：抗 CD47 抗体的基于 ELISA 的结合分析

ELISA 结合分析基于人 CD47 蛋白与抗 CD47 嵌合抗体或抗 CD47 人源化抗体进行。将 96 孔板 (Costar, 目录号: 9018) 在 4°C 下用 100 μ L/孔的 2 μ g/ml CD47-His (Human CD47 Protein, His Tag; ACROBiosystems 公司, 目录号: CD7-H5227) 的包被缓冲液 PBS 包被过夜。抽吸孔, 并且通过添加 100 μ L/孔封闭液 (具有 1% (w/v) 牛血清蛋白 (BSA, Sigma 公司, 目录号: B2064-100G) 的 PBS) 并且在 37°C 下孵育 1 小时来封闭非特异性结合位点。用洗涤缓冲液 (具有 0.01% (w/v) 吐温 20 (Sigma 公司, 目录号: P9416-100ML) 的 PBS) 洗涤 96 孔板三次后, 添加 100 μ L/孔的抗 CD47 抗体 (嵌合抗体见表 3, 人源化抗体见表 4) 在封闭液中的 1:4 连续稀释液 (从 30 μ g/mL 开始), 并且在室温下孵育 2 小时。洗涤 96 孔板, 洗涤后再用第二抗体 HRP-anti-Human IgG (BD 公司, 目录号: 555788) 避光孵育 20 min。洗涤 96 孔板后, 添加 100 μ L/孔的底物溶液 TMB (TIANGEN 公司, 目录号: PA107-01) 并将所述 96 孔板在室温下温育 10 min。添加 100 μ L/孔的停止溶液 (1M H_2SO_4) 以停止反应。产生比色信号并且使用多功能酶标仪 (生产厂家: PerkinElmer; 型号规格 EnVision) 在 450 nm 处读取所述比色信号。使用 GraphPad Prism5 分析数据, 并计算 EC50。这些数据表明, 通过 ELISA 测量, 抗 CD47 抗体结合 CD47, 人源化抗体具有良好的表现。

表 3: 抗 CD47 嵌合抗体与人 CD47 蛋白基于 ELISA 的结合 EC50

抗体名称	EC50 (ng/mL)
Xi2B2	349.5
Xi2H8	NA
Xi3F10	1106
Xi16E5	87.89
Xi14A9	273.4

注: NA 表示未达检测限。

表 4: 抗 CD47 人源化抗体与人 CD47 蛋白基于 ELISA 的结合 EC50

抗体名称	EC50 (ng/mL)	抗体名称	EC50 (ng/mL)
hz3F10-1.1	70.02	hz3F10-5.2	105.6
hz3F10-2.1	80.94	hz3F10-6.2	129.3
hz3F10-3.1	126.9	hz16E5-1.1	306
hz3F10-4.1	115.1	hz16E5-3.1	139.7
hz3F10-5.1	99.33	hz16E5-1.2	159.5
hz3F10-6.1	56.33	hz16E5-3.2	215.1
hz3F10-1.2	124.8	hz16E5-1.3	138.1
hz3F10-2.2	105.8	hz16E5-3.3	240.9
hz3F10-3.2	165.9	hz14A9-2.3	156.8
hz3F10-4.2	180.7	hz14A9-2.4	339.3

实施例 4：抗 CD47 抗体的基于细胞的结合分析

基于与稳定表达 CD47 的 CHO-K1 细胞系的结合进行抗 CD47 抗体 (嵌合的或人源化的) 的细胞结合分析。将 CHO-K1-CD47 细胞 (表达人 CD47 蛋白的 CHO-K1 细胞) 添加到 96 孔板 (Eppendorf, 目录号: C030730.119) 的各孔中, 每孔 1.2×10^4 个, 并与抗 CD47 抗体 (20 μ g/ml, 1:4 的稀释度, 稀释缓冲液为

PBS) 室温孵育 1-2h。然后将细胞用 PBS 缓冲液洗涤三次后, 以 100 μ l/孔将二抗 Alexa Fluor 488 标记山羊抗人 IgG (Jackson ImmunoResearch Inc, 目录号: 109-545-088) 按 1:200 用 PBS 稀释后添加到细胞, 并在室温下孵育 30min。将细胞用 PBS 缓冲液洗涤三次, 细胞核染料 Hoechst (Sigma 公司, 目录号: B2261) 用 PBS 缓冲液按稀释比 1:500 稀释后以 100 μ l/孔加入各孔中染色 10min, PBS 洗涤 3 次后通过高内涵筛选仪 (High content Screening System, 生产厂家: PerkinElmer, 型号规格: Operetta) 进行分析, 结果见表 5 和 6。这些数据表明, 基于细胞的结合分析, 抗 CD47 抗体结合 CD47。

表 5: 抗 CD47 嵌合抗体与 CD47 基于细胞的结合 EC50

抗体名称	EC50 (ng/mL)
Xi2B2	30790
Xi2H8	NA
Xi3F10	19803
Xi16E5	2026
Xi14A9	540.7

注: NA 表示未达检测限。

表 6: 抗 CD47 人源化抗体与 CD47 基于细胞的结合 EC50

抗体名称	EC50 (ng/mL)	抗体名称	EC50 (ng/mL)
hz3F10-1.1	875.7	hz3F10-6.2	1486
hz3F10-2.1	1068	hz16E5-1.1	3866
hz3F10-3.1	1121	hz16E5-3.1	5883
hz3F10-4.1	1162	hz16E5-1.2	NA
hz3F10-5.1	1480	hz16E5-3.2	NA
hz3F10-6.1	1184	hz16E5-1.3	18845
hz3F10-1.2	1267	Hz16E5-3.3	40479
hz3F10-2.2	1119	hz14A9-2.3	498.6
hz3F10-3.2	1195	hz14A9-2.4	470.7
hz3F10-4.2	1265	Hu5F9	1076
hz3F10-5.2	1260		

注: NA 表示未达检测限。

实施例 5: 抗 CD47 嵌合抗体基于细胞的抗体阻断分析

基于流式细胞术的检测, 对抗 CD47 嵌合抗体对 CD47 与 SIRP α 结合的阻断作用进行评价。

在 96 孔 U 型板中加入 Jurkat 细胞 (中国科学院细胞库, 目录号: TCHU123), 每孔 5×10^5 个细胞, 每孔加 100 μ l 浓度为 1 μ g/mL 的 CD47 配体 Human-SIRP α -mFC (Human SIRP alpha / CD172a Protein, Mouse IgG1 Fc Tag, ACROBiosystems 公司, 目录号: SIA-H52A8) 的 PBS 缓冲液稀释液, 室温孵育 1h。PBS 缓冲液洗涤 2 次后, 每孔加入 100 μ l 抗 CD47 嵌合抗体 (表 7), 起始浓度设置为 20 μ g/ml, 以 PBS 缓冲液进行 4 倍稀释, 8 个梯度, 室温孵育 1-2h, PBS 缓冲液洗涤 3 次后, 以 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗小鼠 IgG (Alexa Fluor 488-Goat anti mouse IgG, Jackson ImmunoResearch Inc., 目录号: 115-545-062) 作为检测二抗, 每孔加 100 μ l 用 PBS 缓冲液以稀释比 1:200 稀释的检测二抗, 室温 1h, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 通过流式细胞仪 (BD 公司, 型号规格: C6) 检测抗 CD47 嵌合抗体对 CD47 与 SIRP α 结合的阻断作用。结果见表 7, 抗 CD47 嵌合抗体能够阻断 CD47 与 SIRP α 结合, 其中 Xi3F10、Xi16E5、Xi14A9 具有更好的阻断效果。

表 7: 抗 CD47 嵌合抗体基于细胞的抗体阻断分析

抗体名称	Xi2B2	Xi2H8	Xi3F10	Xi16E5	Xi14A9
IC50 (ng/mL)	NA	26966	358.5	4861	1283

注: NA 表示未达检测限。

实施例 6: 抗 CD47 抗体基于 ELISA 的抗体阻断分析

基于 ELISA 的检测, 对抗 CD47 抗体对 CD47 与 SIRP α 结合的阻断作用进行评价。

在酶标板 96 孔板 (Costar, 目录号: 9018) 中, 以 CD47-His (Human CD47 Protein, His Tag; ACROBiosystems 公司, 目录号: CD7-H5227) 为捕获抗原, 每孔加入 2 μ g/mL 的具有所述捕获抗原的包被缓冲液 PBS 100 μ l, 2-8 $^{\circ}$ C 过夜, 抽吸孔以移除所述包被缓冲液, 用 100 μ l/孔的封闭液 (具有 1% (w/v) 牛血清蛋白 (BSA, Sigma 公司, 目录号: B2064-100G) 的 PBS) 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育封闭 1h。用洗涤缓冲液 (具有 0.01% (w/v) 吐温 20 (Sigma, 目录号: P9416-100ML) 的 PBS) 洗涤 96 孔板。然后加入 100 μ l/

孔的 1 $\mu\text{g/ml}$ CD47 配体 Human-SIRP α -mFC (Human SIRP alpha / CD172a Protein, Mouse IgG1 Fc Tag, ACROBiosystems 公司, 目录号: SIA-H52A8), 25 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1.5h, PBS 洗涤缓冲液洗涤 96 孔板后加入: 抗 CD47 嵌合抗体或抗 CD47 人源化抗体 (嵌合抗体见表 8, 人源化抗体见表 9), 起始浓度 20 $\mu\text{g/ml}$, 100 μL /孔, 用 PBS 缓冲液 4 倍稀释, 8 个梯度, 室温孵育 1.5h。PBS 缓冲液洗涤后加入 100 μL /孔用 PBS 缓冲液按 1:2000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (HRP Goat anti mouse IgG, BD 公司, 目录号: 554002), 25 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1h, PBS 缓冲液洗涤 96 孔板后再加入 100 μL /孔的底物溶液 TMB (TIANGEN 公司, 目录号: PA107-01) 室温温育显色 10min, 添加 100 μL /孔的 1M H_2SO_4 终止反应。产生比色信号并且使用多功能酶标仪 (生产厂家: PerkinElmer; 型号规格 EnVision) 在 450nm 处读取所述比色信号。使用 GraphPad Prism5 分析数据, 并计算 EC50。结果见表 8、表 9, 基于 ELISA 检测, 14A9、16E5、3F10 的嵌合抗体 (Xi3F10、Xi16E5、Xi14A9) 以及人源化抗体具有良好的阻断效果。

表 8: 抗 CD47 嵌合抗体基于 ELISA 的抗体阻断分析

抗体名称	IC50 (ng/mL)
Xi2B2	NA
Xi2H8	4.682
Xi3F10	7910
Xi16E5	946.1
Xi14A9	444.4

注: NA 表示未达检测限。

表 9: 抗 CD47 人源化抗体基于 ELISA 的抗体阻断分析

抗体名称	IC50 (ng/mL)	抗体名称	IC50 (ng/mL)
hz3F10-1.1	1534	hz3F10-6.2	1839
hz3F10-2.1	1612	hz16E5-1.1	NA
hz3F10-3.1	1678	hz16E5-3.1	15246
hz3F10-4.1	1952	hz16E5-1.2	2939
hz3F10-5.1	1701	hz16E5-3.2	2051
hz3F10-6.1	1768	hz16E5-1.3	2323
hz3F10-1.2	1689	hz16E5-3.3	1998
hz3F10-2.2	1725	hz14A9-2.3	703.2
hz3F10-3.2	1741	hz14A9-2.4	621.1
hz3F10-4.2	1738	Hu5F9	2398
hz3F10-5.2	1824		

注: NA 表示未达检测限。

实施例 7: 抗 CD47 抗体基于促使巨噬细胞吞噬作用的分析

基于流式细胞术测定抗 CD47 抗体促使细胞表面含有 SIRP α 的巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力。

使用单核细胞分离试剂盒 (STEMCELL, 目录号: 19058) 从人的外周血单个核细胞 (PBMC, 赛笠生物, 目录号: 190056) 中分离出单核细胞, 铺入 24 孔板 (Greiner bio-one, 目录号: 662-160) 中, 每孔 5×10^5 个细胞, 并在 100 ng/mL 刺激因子 M-CSF (R&D Systems 公司, 目录号: 216-MC-010) 的环境诱导 7 天, 从而诱导成巨噬细胞。将 1×10^6 个靶细胞 HL60 (上海细胞所, 目录号: TCHu23) 悬浮于 5 $\mu\text{mol/L}$ CFSE (BD 公司, 目录号: 565082) 荧光染料 (荧光染料用 PBS 缓冲液稀释到所需浓度) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅避光孵育 15 min, PBS 缓冲液洗涤细胞, 制备成 CFSE 标记的 HL60 细胞; 将 CFSE 标记的 HL60 细胞分别与 10 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 抗 CD47 抗体 (嵌合的抗体见表 10, 人源化的抗体见表 11) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 1-2 h。PBS 缓冲液洗涤三次孵育后的 HL60 细胞, 加入到巨噬细胞中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中作用 2-4 h, PBS 缓冲液洗涤三次后, 每孔加入 260 μL PBS、20 μL 抗 APC-CD14 (APC Mouse Anti-Human CD14, BD 公司, 目录号: 555399) 和 20 μL PE-CD11b (PE Mouse Anti-Human CD11b/Mac-1, BD 公司, 目录号: 555388) 抗体的混合液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, PBS 缓冲液洗涤三次, 胰酶 (Gibco, 目录号: 12604-013) 消化下来用流式细胞仪 (BD 公司, 型号规格: C6) 检测巨噬细胞的吞噬率 (%)。

抗 CD47 嵌合抗体和抗 CD47 人源化抗体对巨噬细胞吞噬作用的影响参见表 10 和表 11, 其中嵌合抗体 Xi3F10、Xi16E5、Xi14A9 以及抗 CD47 人源化抗体具有良好的促吞噬作用, 人源化抗体 hz14A9-2.3、hz14A9-2.4 表现更优异。

表 10: 抗 CD47 嵌合抗体基于促使巨噬细胞吞噬作用的分析 (吞噬率, %)

抗体名称	10 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
Xi2B2	4.1	7.3

Xi2H8	3.5	7.1
Xi3F10	59.8	65.7
Xi16E5	28.8	11.5
Xi14A9	44.67	54.17

表 11: 抗 CD47 人源化抗体基于促使巨噬细胞吞噬作用的分析 (吞噬率, %)

抗体名称	10 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	抗体名称	10 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$
hz3F10-1.1	43.10	41.25	hz3F10-6.2	44.19	49.32
hz3F10-2.1	55.23	47.24	hz16E5-1.1	4.02	14.79
hz3F10-3.1	58.72	50.60	hz16E5-3.1	24.19	6.37
hz3F10-4.1	58.26	50.26	hz16E5-1.2	17.83	5.1
hz3F10-5.1	58.46	50.45	hz16E5-3.2	2.03	3.02
hz3F10-6.1	60.91	47.57	hz16E5-1.3	4.33	3.03
hz3F10-1.2	38.86	55.52	hz16E5-3.3	4.7	11.62
hz3F10-2.2	34.72	44.19	hz14A9-2.3	74.93	71.48
hz3F10-3.2	37.09	47.04	hz14A9-2.4	81.66	81.65
hz3F10-4.2	31.67	46.24	Hu5F9	72.35	67.5
hz3F10-5.2	29.6	47.06			

实施例 8: 抗 CD47 抗体对 CD4+T 细胞的影响

基于流式细胞术的测定方法, 测定抗 CD47 抗体对 CD4+T 细胞的影响。

使用 T 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotech, 目录号: 130-094-131) 从人的外周血单个核细胞 (PBMC, 赛笠生物, 目录号: 190056) 中分离出 CD4+T 细胞, 铺入 24 孔板 (Greiner bio-one, 目录号: 662106), 每孔 5×10^5 个细胞, 同时分别加入抗 CD47 抗体 (嵌合的抗体见表 12, 人源化的抗体见表 13) 使终浓度分别为 10 $\mu\text{g/mL}$ 和 1 $\mu\text{g/mL}$, 加入 1640 完全培养基, 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 20 h, 使用凋亡试剂盒 (STEMCELL, 目录号: 556547) 室温染色 15min, 流式仪 (BD, 型号规格: C6) 检测细胞凋亡率 (%), 以早期凋亡和晚期凋亡总和计算凋亡率。结果表明抗 CD47 抗体 (嵌合的抗体见表 12 和人源化的抗体见表 13) 对 T 细胞凋亡没有明显影响。

表 12: 抗 CD47 嵌合抗体对 CD4+T 细胞的影响 (凋亡率%)

抗体名称	10 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$
Xi2B2	10.3	12.1
Xi2H8	10.5	12.1
Xi3F10	13.6	12.6
Xi16E5	23.1	0.4
Xi14A9	1.34	1.42

表 13: 抗 CD47 人源化抗体对 CD4+T 细胞的影响 (凋亡率%)

抗体名称	10 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	抗体名称	10 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$
hz3F10-1.1	1.94	1.82	hz3F10-6.2	1.68	2.18
hz3F10-2.1	1.7	1.38	hz16E5-1.1	1.88	1.62
hz3F10-3.1	1.88	2	hz16E5-3.1	2.04	1.8
hz3F10-4.1	1.86	1.94	hz16E5-1.2	1.66	1.08
hz3F10-5.1	1.74	1.94	hz16E5-3.2	1.8	1.52
hz3F10-6.1	2.12	1.34	hz16E5-1.3	1.28	1.38
hz3F10-1.2	1.74	1.7	hz16E5-3.3	1.54	1.54
hz3F10-2.2	1.82	1.94	hz14A9-2.3	1.56	1.59
hz3F10-3.2	1.84	1.66	hz14A9-2.4	1.89	1.38
hz3F10-4.2	1.84	1.78	Hu5F9	1.35	1.58
hz3F10-5.2	1.94	1.78	IgG4	1.72	1.81

实施例 9: 基于 nano DSF 检测抗 CD47 抗体的热稳定性

高通量蛋白稳定性分析仪 Prometheus NT.48 是得到蛋白分子结构稳定性、聚集稳定性、胶体分散稳定性等多种类型数据的设备。利用该设备检测抗 CD47 嵌合抗体以及抗 CD47 人源化抗体的熔解温度 (T_m) 和聚合温度 (Tagg), 结果见表 14 和表 15, 表明抗 CD47 抗体具有良好的热稳定性。

表 14: 抗 CD47 嵌合抗体热稳定性

抗体名称	T _m (°C)	Tagg (°C)
Xi2B2	62.99	61.34

Xi2H8	69.77	68.57
Xi3F10	70.51	70.59
Xi16E5	69.89	73.39
Xi14A9	66.73	75.75

表 15: 抗 CD47 人源化抗体热稳定性

抗体名称	Tm (°C)	Tagg (°C)	抗体名称	Tm (°C)	Tagg (°C)
hz3F10-1.1	68.44	72.68	hz14A9-2.4	68.3	68.3
hz3F10-2.1	68.44	72.68	hz3F10-4.2	68.48	61.13
hz3F10-3.1	68.15	61.53	hz3F10-5.2	68.69	62.67
hz3F10-4.1	68.35	62.54	hz3F10-6.2	68.64	61.91
hz3F10-5.1	68.05	62.12	hz16E5-1.1	68.21	61.87
hz3F10-6.1	68.6	68.6	hz16E5-3.1	69.20	61.84
hz3F10-1.2	68.71	61.92	hz16E5-1.2	69.54	61.90
hz3F10-2.2	68.92	62.40	hz16E5-3.2	69.10	61.44
hz3F10-3.2	68.30	61.80	hz16E5-1.3	68.90	73.77
hz14A9-2.3	68.10	73.42	hz16E5-3.3	68.72	73.81

实施例 10: 抗 CD47 抗体对红细胞凝集的影响

某些公开的研究表明, 红细胞表面含有一定量的 CD47 蛋白, 这导致在加入某些抗 CD47 抗体后会与红细胞结合, 从而可能引起红细胞的凝集现象。因此, 测试抗 CD47 抗体对红细胞凝集的影响。

取抗凝血, 加等量生理盐水, 混匀, 2000 rpm/min 离心 5min, 去上清。使用无钙离子、镁离子 Hank's 平衡盐溶液 (Thermo Fisher Scientific, 目录号: 14175-095) 将红细胞洗涤 3 次, 前 2 次 2000 rpm/min 离心 5min, 末次 2000 rpm/min 离心 10min, 去上清。使用 PBS 缓冲液将红细胞稀释 10 倍, 制成 10% 的红细胞悬液, 100 μ l/孔放入 96 孔 U 型板 (eppendorf, 目录号: 003073119) 中。加入 100 μ l/孔不同浓度的抗 CD47 抗体, 所述抗体的起始浓度设置为 10 μ g/ml, 以 PBS 缓冲液 3 倍稀释, 8 个浓度梯度, 于 37°C 中孵育 2~6 小时。观察拍照, 红细胞全部凝集, 沉于底部, 平铺成网状, 即为凝集; 不凝集者红细胞沉于孔底呈点状。

抗 CD47 嵌合抗体对红细胞凝集的影响见图 1。抗 CD47 人源化抗体对红细胞凝集的影响见图 2、图 3, 嵌合抗体 Xi3F10、Xi16E5 以及 Hu5F9 均有凝血现象, 其中 Xi3F10 从 1111.1 ng/ml 开始凝血, Xi16E5 和 Hu5F9 从 123.46 ng/ml 开始凝血, 嵌合抗体 Xi2B2、Xi2H8、Xi14A9 在测试的所有浓度下均无凝血现象。人源化抗体 hz3F10-3.1、hz3F10-4.1、hz3F10-3.2、hz3F10-4.2 从 3.3 μ g/ml 开始发生凝血现象, hz16E5-1.1、hz16E5-3.1、hz16E5-1.2、hz16E5-3.2、hz16E5-1.3、hz16E5-3.3 从 3.3 μ g/ml 开始发生凝血现象, 其它人源化抗体在测试的所有浓度下均无凝血现象。

实施例 11: 抗 CD47 抗体与红细胞的结合分析

基于红细胞表面一定量的 CD47, 可能会与某些抗 CD47 抗体结合, 因此检测抗 CD47 抗体与红细胞的结合情况。

取抗凝血, 加等量生理盐水, 混匀, 2000 rpm/min 离心 5min, 去上清。使用无钙离子、镁离子 Hank's 平衡盐溶液 (Thermo Fisher Scientific, 目录号: 14175-095) 将红细胞洗涤 3 次, 前 2 次 2000 rpm/min 离心 5min, 末次 2000 rpm/min 离心 10min, 去上清。将分离后红细胞用 4% 多聚甲醛 (生工生物工程上海公司, 目录号: E672002-0500) 固定过夜, 次日与 10 μ g/ml 或 1 μ g/ml 抗 CD47 抗体室温孵育 1-2h, PBS 缓冲液清洗后, 用 PBS 缓冲液按 1:200 稀释的二抗 Alexa Fluor 488 标记山羊抗人 IgG (Jackson ImmunoResearch Inc, 目录号: 109-545-088) 室温孵育 1h, PBS 缓冲液清洗后用流式细胞仪 (BD 公司, 型号规格: C6) 检测, 以平均荧光强度 (MFI) 反映红细胞与抗 CD47 嵌合抗体 (见表 16) 或人源化抗体 (见表 17) 的结合情况。

表 16: 抗 CD47 嵌合抗体与红细胞的结合分析 (MFI)

抗体名称	10 μ g/mL	1 μ g/mL
Xi2B2	608	656
Xi2H8	5303	952
Xi3F10	61821	36114
Xi16E5	3318	1309
Xi14A9	32831	26477

表 17: 抗 CD47 人源化抗体与红细胞的结合分析 (MFI)

抗体名称	10 μ g/mL	1 μ g/mL	抗体名称	10 μ g/mL	1 μ g/mL
------	---------------	--------------	------	---------------	--------------

hz3F10-1.1	50,463	4,449	hz3F10-6.2	55,886	3,435
hz3F10-2.1	53,218	8,454	hz16E5-1.1	6,461	945
hz3F10-3.1	41,362	6,703	hz16E5-3.1	5,145	945
hz3F10-4.1	41,900	5,976	hz16E5-1.2	4,729	913
hz3F10-5.1	50,634	7,403	hz16E5-3.2	4,204	860
hz3F10-6.1	53,048	7,583	hz16E5-1.3	4,885	894
hz3F10-1.2	56,720	6,247	hz16E5-3.3	3,874	848
hz3F10-2.2	56,086	5,612	hz14A9-2.3	10,979	2,506
hz3F10-3.2	45,305	5,096	hz14A9-2.4	14,954	5,237
hz3F10-4.2	45,616	4,814	IgG4	484	449
hz3F10-5.2	53,329	5,134			

实施例 12 抗 CD47 抗体在淋巴瘤 Raji 细胞小鼠血液瘤模型中的药效活性

使用血液瘤 Raji 细胞建立小鼠血液瘤模型，并在该模型上应用抗 CD47 抗体，评价该抗体的药效活性。

PBS 缓冲液配制的 Raji 细胞悬液浓度 5×10^6 个/mL，0.1mL/每只小鼠通过尾静脉注射到雌性 NOD/SCID 小鼠中。7 天后随机分成 4 组，每组 10 只，其中，组 1: IgG4 组，组 2: Hu5F9 组，组 3: hz3F10-6.1，组 4: hz14A9-2.3，腹腔注射给药，给药剂量为 10 mg/kg，连续给药 21 天。观察动物生存期。

如图 4，在 Raji 血液瘤模型中，抗 CD47 抗体 hz14A9-2.3 和 hz3F10-6.1 具有抗肿瘤活性。小鼠的生存率数据显示：IgG4 组第 17 天全组动物死亡，中位生存期为 13.5 天；Hu5F9 组第 30 天全组动物死亡，中位生存期为 18.5 天；hz14A9-2.3 组第 34 天全组动物死亡，中位生存期为 28.5 天；hz3F10-6.1 组第 21 天全组动物死亡，中位生存期为 17.5 天。这些数据表明抗体 hz14A9-2.3 在延长动物生存期方面的药效优于其他组别，抗体 hz3F10-6.1 和 Hu5F9 的效果基本持平。

实施例 13 抗 CD47 抗体单次给药的毒性检测

由于 CD47 在红细胞上表达并在清除老化红细胞方面发挥作用，因此对抗 CD47 抗体在 B-hCD47 小鼠中的毒性作用进行比较。

将 B-hCD47 小鼠随机分成 3 组：Hu5F9 组 3 只，hz14A9-2.3 组 4 只、hz3F10-6.1 组 3 只。通过单次尾静脉注射给予 B-hCD47 小鼠一定剂量的 Hu5F9 抗体、hz14A9-2.3 抗体或 hz3F10-6.1 抗体，给药剂量为 10mg/kg，检测给药后 2 天、4 天、7 天、10 天、14 天红细胞计数 (RBC)、血红蛋白 (HGB) 量、体重的变化。

表 18: 给药后小鼠体重变化率 (vs 给药前)

给药后天数	Hu5F9 10mpk	hz14A9-2.3 10mpk	hz3F10-6.1 10mpk
0	0.0%	0.0%	0.0%
2	-7.0%	2.3%	-13.0%
4	-3.2%	6.3%	-15.8%
7	-5.1%	2.0%	-2.5%
10	4.8%	5.9%	-8.4%
14	5.6%	8.6%	8.2%

表 19: 给药后小鼠 RBC 变化率 (vs 给药前)

给药后天数	Hu5F9 10mpk	hz14A9-2.3 10mpk	hz3F10-6.1 10mpk
0	0.0%	0.0%	0.0%
2	-52.8%	-13.6%	-56.7%
4	-61.8%	-16.7%	-75.6%
7	-22.2%	-9.8%	-38.7%
10	-21.6%	-8.5%	-6.6%
14	-7.4%	-2.2%	-2.0%

表 20: 给药后小鼠 HGB 变化率 (vs 给药前)

给药后天数	Hu5F9 10mpk	hz14A9-2.3 10mpk	hz3F10-6.1 10mpk
0	0.0%	0.0%	0.0%
2	-52.7%	-13.3%	-57.1%
4	-57.8%	-18.5%	-74.7%

7	-16.5%	-9.9%	-39.2%
10	-12.8%	-10.0%	-6.0%
14	-1.2%	-3.9%	-3.0%

如表 18、图 5 和图 6 所示，只有 hz14A9-2.3 组小鼠体重是持续增加的，Hu5F9 和 hz3F10-6.1 两组小鼠在给药后体重先下降，后上升；hz3F10-6.1 组下降幅度高于 Hu5F9 组。如表 19-表 20、图 7-图 10 所示，给药后三组动物的 RBC 和 HGB 均出现下降，给药后 4 天达最低，随后开始上升。hz14A9-2.3 组给药后 7 天 RBC 和 HGB 基本恢复正常，另外两组至少于给药后 10 天基本恢复正常。给药后 4 天 RBC 和 HGB 的下降幅度，由高到低依次为：hz3F10-6.1>Hu5F9>hz14A9-2.3。可知，抗体 hz14A9-2.3 没有显著的毒性，优于阳性抗体 Hu5F9。

实施例 14

使用人急性髓系白血病细胞 MOLM-16 细胞小鼠模型检测抗体的抗肿瘤活性。每只 NOD-SCID 小鼠皮下接种 MOLM-16 细胞，待肿瘤长到 80-150 mm³ 后，将动物随机分成 5 组：①模型组（阴性对照组，给予 5 mg/kg 人 IgG4），n=10 只；②hz14A9-2.3 0.5 mg/kg 组，n=6 只；③hz14A9-2.3 1.5 mg/kg 组，n=6 只；④hz14A9-2.3 5 mg/kg 组，n=6 只；⑤Hu5F9 5 mg/kg 组，n=6 只。在第 0 天（D0）小鼠分组，静脉注射给药，每 3 天给药 1 次，共给药 2 次，每周二次测量肿瘤直径，根据肿瘤体积判断疗效。

肿瘤体积（V）计算公式为： $V=(a \times b^2)/2$ ，其中 a、b 分别表示长、宽。

$T/C(\%)=(T-T_0)/(C-C_0)*100$ ，其中 T、C 分别为治疗组、阴性对照组实验结束时的平均肿瘤体积；T₀、C₀ 分别为治疗组、阴性对照组实验开始时的平均肿瘤体积。

抑瘤率(TGI)(%)=100%-T/C(%)。

结果见表 21 和表 11。抗体 hz14A9-2.3 在 1.5mg/kg 剂量下可以有效抑制肿瘤生长，第 17 天（D17）的肿瘤生长抑制率（或抑瘤率）达到 93%。5mg/kg 剂量下，抗体 hz14A9-2.3 的肿瘤生长抑制率达到 125%。

表 21

分组	给药	途径	平均肿瘤体积 (mm ³) D0	标准 误 (SEM) D0	平均肿瘤体积 (mm ³) D17	标准 误 (SEM) D17	T/C(%) D17	肿瘤生长抑制 率(%) D17	P 值 D17	部分 消退	实验开 始每组 动物数 (只)	实验结 束每组 动物数 (只)
hIgG4 5mg/kg	D0,3	IV	107.8	±1.1	3732.0	±272.8	-	-	-	0	10	10
hz14A9-2.3 0.5mg/kg	D0,3	IV	111.2	±2.5	4298.1	±291.1	116	-16	0.20 0	0	6	6
hz14A9-2.3 1.5mg/kg	D0,3	IV	110.6	±1.8	377.5	±244.7	7	93	0.00 0	3	6	6
hz14A9-2.3 5mg/kg	D0,3	IV	111.8	±2.0	84.2	±2.8	-25	125	0.00 0	6	6	6
Hu5F9 5mg/kg	D0,3	IV	110.8	±1.3	91.4	±2.4	-18	118	0.00 0	6	6	6

。