

抗 CD47 的单克隆抗体及其用途

技术领域

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

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 $\alpha v\beta 3$ (CD51/CD61)和 $\alpha IIb\beta 3$ (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。

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 Protein α , SIRP α)和凝血酶敏感蛋白-1(Thrombospondin-1, TSP1)。SIRP α 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-SIRP α 通路中，CD47蛋白与SIRP α 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(Matuzaki T, Murata Y, Okazawa H, et al. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRP α signalling 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SIRP α 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)。

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SIRP α 的巨噬细胞与高表达CD47的肿瘤细胞由于CD47-SIRP α 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）。

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-SIRP α 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。

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。

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

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。

本发明人发现：

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 SIRP α ECD-hFc-Biotin 竞争结合 CD47，有效阻断 SIRP α 与 CD47 的结合，进而促进巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用。

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）。

本发明由此提供了下述发明：

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：

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

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

HCDR1: GYTFTSYW (SEQ ID NO:5),

HCDR2: IDPSDSET (SEQ ID NO:6),

HCDR3: ARLYRWYFDV (SEQ ID NO:7);

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

LCDR1: EIVGTY (SEQ ID NO:8),

LCDR2: GAS (SEQ ID NO:9),

LCDR3: GQSYNFPYT (SEQ ID NO:10)。

在一些实施方案中, 本发明的抗体选自以下各项组成的组:

6F7 H1L1 (G1M)重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:59)

6F7 H1L1 (G1M)轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:60)

6F7 H2L2 (G1M)重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:61)

6F7 H2L2 (G1M)轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:62)

6F7 H3L3 (G1M)重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:63)

6F7 H3L3 (G1M)轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:64)

6F7 H1L1 (hG4)重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:65)

6F7 H1L1 (hG4)轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:66)

6F7 H2L2 (hG4)重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:67)

6F7 H2L2 (hG4)轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:68)

6F7 H3L3 (hG4)重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:69)

6F7 H3L3 (hG4)轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:70)

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。

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。

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

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)。

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。

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)。

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。

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 10 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM 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。

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。

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 NO: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-1 chain C region, ACCESSION: P01857 (SEQ ID NO:58), 或重链恒定区 Ig gamma-4 chain 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。

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。

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,

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

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,

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);

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。

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。

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。

本发明还涉及以下方面：

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. 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:

(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. 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:

(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. 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-1 chain C region, ACCESSION: P01857 (SEQ ID NO:58) 或 Ig gamma-4 chain 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. 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 的亲合力常数相比突变前降低；优选地，所述亲合力常数通过 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. 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：

- (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. 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。

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)。

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 100 nM, 例如小于大约 10 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM 或更小的 EC50 结合人 CD47 蛋白。

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

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。

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,

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。

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。

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，

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、肌肉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，

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,

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,

优选地,所述试剂盒还包含产品说明书。

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,

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,

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. 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、骨髓瘤、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）的项目 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）的项目 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项目 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）的项目 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）的项目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。

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。

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）。

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。

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。

所述 BCL-2 的抑制剂选自 Venetoclax。

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 VEGFR2 抗体选自 Ramucirumab（雷莫芦单抗），AK109，VXM-01、AVI-3207、gentuximab、KD-035、JY-025。

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）。

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、alvociclib 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。

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）。

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）、Nilotinib Hydrochloride Hydrate（盐酸尼洛替尼）、Dasatinib Hydrate（达沙替尼）、Imatinib mesylate（甲磺酸伊马替尼）。

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。

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

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（nilutamid）、亮丙瑞林（leuprolide）、戈舍瑞林（goserelin）、布舍瑞林（buserelin）、氨鲁米特（aminoglutethimide）、福美司坦（formesfane）。

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）。

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。

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

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。

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

所述的铂类药物选自顺铂（DDP）、卡铂（CBP）和奥沙利铂（L-OHP）。

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。

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

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、肌肉注射或病灶内注射施用的形式。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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))。

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。

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巯基。

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）。

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。

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。

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。

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。

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。

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)。

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)。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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 $KD=k_{dis}/k_{on}$ ，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。 K_{on} ，结合速率常数=抗原抗体复合物形成的速率， k_{on} 愈小提示抗体与抗原结合的速度愈快； k_{dis} ，解离速率常数=抗体从抗原-抗体复合物中解离的速率， k_{dis} 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。

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

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。

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。

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。

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。

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。

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 6.10 FASTA(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): Altschul 等人, Nucleic Acids Res. 25 :3389-402(1997)。

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。

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。

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。

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。

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，或通过在外测定法中测定所述药剂的活性。

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。

相对于现有技术，本发明具有例如如下优点：

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SIRP α 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

图 1. 6F7H1L1(hG4)联用 Rituximab 介导 HPMM 吞噬 Raji 细胞的吞噬指数。

图 2. 6F7H1L1(hG4)联用 Azacitidine 介导 HPMM 吞噬 HL-60 细胞的吞噬指数。

图 3. 6F7H1L1(hG4)联合 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体促进免疫细胞激活。

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。

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。

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。

图 7. 6F7H1L1(hG4)联用 Cetuximab 介导 HPMM 吞噬 HT-29 细胞的吞噬指数。

图 8. 6F7H1L1(hG4)联用 Obinutuzumab 介导 HPMM 吞噬 Raji 细胞的吞噬指数。

图 9. 6F7H1L1(hG4)与抗 PD-1-抗 CTLA-4 双特异性抗体 Cadonilimab 联用对 BALB/c-hPD1/hSIRP α 小鼠 CT26-hCD47 肿瘤模型效果。

图 10. 6F7H1L1(hG4)与抗 PD-1-抗 CTLA-4 双特异性抗体 Cadonilimab 联用对 BALB/c-hPD1/hSIRP α 小鼠 CT26-hCD47 肿瘤模型体重变化。

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。

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。

关于生物材料保藏的说明:

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:

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。

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。

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-1 chain 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-4 chain 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。

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-Paque™ 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。

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。

在本发明的下述实验例中所使用的抗 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)。

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 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(AKTA Purifier 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。

实施例 1: 抗人 CD47 的抗体 6F7 的制备

1. 杂交瘤细胞株 6F7 的制备

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-1 chain 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。

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。

2. 抗 CD47 的抗体 6F7 的制备

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% CO₂, 37°C 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 A HP 柱进行纯化, 制得抗体 6F7。

实施例 2: 抗 CD47 的抗体 6F7 的序列分析

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。

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

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。

将 TA 克隆的产物直接进行测序, 测序结果如下:

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

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。

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

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。

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

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

根据人 CD47 蛋白的三维晶体结构 (Hage T, Reinemer P, Sebald W. Crystals

of a 1:1 complex between human interleukin-4 and 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-4 chain 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)。

设计的可变区序列如下:

(1) 人源化单克隆抗体 6F7H1L1 的重链可变区和轻链可变区序列

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

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。

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

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。

(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

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

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。

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

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。

(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

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

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。

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

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。

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

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。

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

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

根据人 CD47 蛋白的三维晶体结构（Hage T, Reinemer P, Sebald W. Crystals of a 1:1 complex between human interleukin-4 and 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-1 chain 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)。

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。

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

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)。

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。

实施例 5. 6F7H1L1(hG4)联合 Rituximab 或 Azacitidine 促巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬

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%Trypsin-EDTA (1×)) (Gibco, 货号: 25200072), 胎牛血清 (FBS) (Excell bio, 货号: FSP500), 荧光染料 羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯 (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)。

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。

1. 6F7H1L1(hG4)联合 Rituximab 促进巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬

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。

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 ($2.5 \mu\text{M}$) 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 $100 \mu\text{L}$, 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°C 培养箱孵育 2h; 每管加 $800 \mu\text{L}$ 室温 1% PBSA(含 1%BSA 的 PBS)溶液, 1200xg 离心 5min, 弃上清; 用 $800 \mu\text{L}$ 的 1% PBSA 洗涤一次; 按 $100 \mu\text{L}$ /样本将 APC 标记抗人 CD11c 抗体(Biolegend lot:371506)(用 1% PBSA 400 倍稀释)加至相应样本进行标记, 冰上孵育 40min。每管加 $800 \mu\text{L}$ 1% PBSA, 1200xg 离心 5min, 弃上清; 用 $800 \mu\text{L}$ 的 1% PBSA 洗涤一次; 每管加 $200 \mu\text{L}$ 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:

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

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**错误!未找到引用源。**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。

2. 6F7H1L1(hG4)联合 Azacitidine 促进巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬

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。

试验方法: 常规收集 HL-60, 铺于 6 孔板中, 每孔 $4 \times 10^5/2\text{mL}$ 1640 完全培养基, 分别加入不同浓度的 Azacitidine (工作浓度为 $3\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$), 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, 170g 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 $2.5\mu\text{M}$, 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, 170g 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、 $2\mu\text{g/mL}$ (工作浓度为 10、 $1\mu\text{g/mL}$), 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 $100\mu\text{L}$, 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°C 培养箱孵育 2h; 每孔加 $150\mu\text{L}$ 室温 1% PBSA (含 1% BSA 的 PBS) 溶液, 1000g 离心 5min, 弃上清; 用 $200\mu\text{L}$ 的 1% PBSA 洗涤一次; 按 $100\mu\text{L}/\text{样本}$ 将 APC 标记抗人 CD11c 抗体(用 1% PBSA 400 倍稀释)加至相应样本进行标记, 冰上孵育 40min。每孔加 $150\mu\text{L}$ 1% PBSA, 1000g 离心 5min, 弃上清; 用 $200\mu\text{L}$ 的 1% PBSA 洗涤一次; 每孔加 $200\mu\text{L}$ 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。

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**错误!未找到引用源。**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。

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

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-Paque™ PLUS(厂家: GE Healthcare, 货号: 17-1440-02)、human IL-2 ELISA KIT(达科为, 货号: 1110202)、human IFN- γ ELISA KIT(达科为, 货号: 1110002)、同型对照(人 IgG1 (Anti-HEL-isotype control))。

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

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。

实验方法: Raji-PDL1 细胞用 1640+10%FBS 完全培养基常规培养。复苏 PBMC, 0.5 μ g/mL SEB 活化两天。实验当天, Raji-PDL1 细胞用 2 μ g/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 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 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

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。

2. 6F7H1L1(hG4)联合 PD-1 抗体促进免疫细胞激活

(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

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。

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，0.5 μ g/mL SEB 活化两天。实验当天，Raji-PDL1 细胞用 2 μ g/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 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 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

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。

(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

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。

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，0.5 μ g/mL SEB 活化两天。实验当天，Raji-PDL1 细胞用 2 μ g/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 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 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。

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。

(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

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。

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，0.5 μ g/mL SEB 活化两天。实验当天，Raji-PDL1 细胞用 2 μ g/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 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 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。

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。

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

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。

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 2.5 μ M，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；

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 50 μ L）加至已含巨噬细胞的 1.5mL 的 EP 管中，重悬混匀，放置 37℃ 培养箱孵育 2h；每管加 800 μ L 常温的 1%PBSA，1200xg 离心 5min，弃上清；用 800 μ L 的 PBSA 洗涤一次；按 100 μ L/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 800 μ L 1%PBSA，1200xg 离心 5min，弃上清；每管用 800 μ L PBSA 洗涤一次；每管加 200 μ L 1%PBSA 重悬，转移到流式上样管，上机。

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。

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

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。

常规收集 Raji 细胞（购买自 ATCC），用 PBS 洗涤一次。CFSE 用 PBS 稀释至 2.5 μ M，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，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 150 μ L 常温的 1%PBSA，750xg 离心 5min，弃上清；用 200 μ L 的 PBSA 洗涤一次；按 100 μ L/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 150 μ L 1%PBSA，750xg 离心 5min，

弃上清；每孔用 200 μ L PBSA 洗涤一次每管加 200 μ L 1%PBSA 重悬，转移到流式上样管，上机。

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。

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

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/hSIRP α 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 80-120 mm³ 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。

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/hSIRP α 小鼠模型的给药方案

组别	数量	接种信息	给药信息
同型对照 5mg/kg	6	CT26-hCD4	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	7, 5x10 ⁵ 个细胞， BALB/c-hPD	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	1/hSIRP α 小鼠，皮下	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

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。

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。

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

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 120-150mm³ 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。

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

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	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)	6	CD3 抗体活化的人	6F7H1L1(hG4) , 0.05mg/kg; 腹腔注射,

0.05mg/kg		PBMC 通过腹腔注射接种于小鼠体内	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

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。

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。

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。

序列表:

SEQ ID NO: 1: 6F7 重链可变区的核苷酸序列

CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCAGGAGCAGAGCTGGTGAGGCCAGGAGCATCCGTGAAG
CTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACATCCTATTGGATGAACTGGGTGAAGCA
GAGGCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGCATGATCGACCCAAGCGATTCCGAGACC
CACACAATCAGATGTTTAAGGACAAGGCCACCCTGACAGTGGATAAGAGCTCCAATAC
CGCCTACATGCACCTGTCTAGCCTGACATCTGAGGACAGCGCCGTGTATCACTGCGCCC
GGCTGTACAGATGGTATTTTGACGTGTGGGGAGCAGGAACCACAGTGACCGTGTCTCT

SEQ ID NO: 2: 6F7 重链可变区的氨基酸序列

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPQGQLEWIGMIDPSDSETH
NNQMFKDKATLTVDKSSNTAYMHLSSLTSEDSAVYHCARLYRWYFDVWGAGTTVTVSS

SEQ ID NO: 3: 6F7 轻链可变区的核苷酸序列

AACATCGTGATGACCCAGTCCCCCAAGTCTATGAGCATGTCCCTGGGCGAGAGGGTGAC
CCTGTCCTGTAAGGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACGTGTCTTGTTTTAGCAGAAGC
CACACCAGAGCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCAATCGGTATACAGGCGTGCCT
GACAGATTCACCGGCTCTGGCAGCGCCACAGACTTCACCCTGACAATCTCTAACGTGCA
GGCCGAGGACCTGGCCGATTATCACTGCGGCCAGAGCTACAATTTCCCTTATACCTTTGG
CGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 4: 6F7 轻链可变区的氨基酸序列

NIVMTQSPKSMMSLGERVTLSCASEIVGTYVSWFQQKPHQSPKLLIYGASNRYTGVPDR
FTGSGSATDFTLTISNVQAEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:5 6F7CDR 的 HCDR1

GYTFTSYW

SEQ ID NO: 6 6F7CDR 的 HCDR2

IDPSDSET

SEQ ID NO: 7 F7CDR 的 HCDR3

ARLYRWYFDV

SEQ ID NO: 8 6F7CDR 的 LCDR1

EIVGTY

SEQ ID NO: 9 6F7CDR 的 LCDR2

GAS

SEQ ID NO: 10 6F7CDR 的 LCDR3

GQSYNFPYT

SEQ ID NO: 11 6F7H1 的重链可变区核苷酸序列

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTGAAG
CTGAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACAAGCTATTGGATGAACTGGGTGCGGCA
GAGACCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGAATGATCGACCCTTCCGATTCTGAGACC
CACAATGCCCAGAAGTTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGACAAGAGCACCTCCA
CAGCCTACATGCACCTGAGCTCCCTGCGGTCCGAGGACACAGCCGTGTACTATTGCGCC
AGGCTGTACCGCTGGTATTTTGACGTGTGGGGAGCAGGAACCACAGTGACCGTGTCTAG
C

SEQ ID NO: 12 6F7H1 的重链可变区氨基酸序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGQLEWIGMIDPSDSETH
NAQKFQGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSED TAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTVTVSS

SEQ ID NO: 13 6F7L1 的轻链可变区核苷酸序列

AACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGCCACAATGTCTATGAGCCCAGGAGAGAGGGTGA
CCCTGTCCTGTAGAGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACGTGTCTTGTTTCAGCAGAAG
CCAGGACAGGCACCTAGGCTGCTGATCTACGGAGCAAGCAACAGGTATACCGGAGTG
CAGCACGCTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACAGACTTTACCCTGACAATCAGCTCCGTG
CAGCCTGAGGACCTGGCCGATTATCACTGCGGCCAGTCTTACAATTTCCCATATACCTT
TGCGCGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 14 6F7L1 的轻链可变区氨基酸序列

NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSRASEIVGTYSWVWFQQKPGQAPRLLIYGASNRYTGVPAR
FSGSGSGTDFTLTISVQPEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 15 6F7H2 的重链可变区核苷酸序列

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTGAAG
GTGAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACATCCTATTGGATGAACTGGGTGCGGCA
GAGACCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGAATCATCGACCCTTCCGATTCTGAGACCT
CTAATGCCCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCCTGACAGTGGACAAGAGCACCTCCAC

AGCCTACATGCACCTGAGCTCCCTGAGGAGCGAGGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCA
GGCTGTACCGCTGGTATTTTGACGTGTGGGGAGCAGGAACCACAGTGACCGTGTCTAGC

SEQ ID NO: 16 6F7H2 的重链可变区氨基酸序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGLEWIGIIDPSDSETSN
AQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDYAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTTVTVSS

SEQ ID NO: 17 6F7L2 的轻链可变区核苷酸序列

AACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGCCACACTGTCTCTGAGCCCAGGAGAGAGGGTGA
CCCTGTCCTGTAGAGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACGTGTCTTGTTTCAGCAGAAG
CCAGGACAGGCACCTAGGCTGCTGATCTATGGCGCCAGCAACAGGGCAACCGGCATCC
CCGCACGCTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACAGACTTTACCCTGACAATCAGCTCCCTG
CAGCCTGAGGACCTGGCCGATTACTATTGCGGCCAGTCTTACAATTTCCCATATACCTT
TGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 18 6F7L2 的轻链可变区氨基酸序列

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDLADYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 19 6F7H3 的重链可变区核苷酸序列

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTGAAG
GTGAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACATCCTATTGGATGAACTGGGTGCGGCA
GGCACCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGCATCATCGACCCTTCCGATTCTGAGACCT
CTTACGCCCAGAAGTTTCAGGGCAGGGTGACCCTGACAGTGGACAAGAGCACCTCCAC
AGCCTATATGGAGCTGAGCTCCCTGCGCAGCGAGGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCC
GGCTGTACAGATGGTATTTTGACGTGTGGGGAGCAGGAACCACAGTGACCGTGTCTAGC

SEQ ID NO: 20 6F7H3 的重链可变区氨基酸序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQAPQGLEWIGIIDPSDSETSY
AQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTTVTVSS

SEQ ID NO: 21 6F7L3 的轻链可变区核苷酸序列

AACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGCCACACTGTCTCTGAGCCCAGGAGAGAGGGTGA
CCCTGTCCTGTAGAGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACCTGTCTTGTTATCAGCAGAAG
CCAGGACAGGCACCTAGGCTGCTGATCTACGGAGCCAGCACCAGGGCAACAGGCATCC

CCGCACGCTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTTACCCTGACAATCAGCTCCCTG
CAGCCTGAGGATTTTGCCGTGTACTATTGCGGCCAGTCTTACAATTTCCCATATACCTTT
GGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 22 6F7L3 的轻链可变区氨基酸序列
NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSRASEIVGTYLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIK

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SEQ ID NO: 33 6F7H1 骨架区 FR-H3 氨基酸序列
HNAQKFQ GKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSED TAVYYC

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

SEQ ID NO: 35 6F7L1 骨架区 FR-L1 氨基酸序列
NIVMTQSPATMSMSPGERVTLS CRAS

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

SEQ ID NO: 37 6F7L1 骨架区 FR-L3 氨基酸序列
NRYTGVPARFSGSGSGTDFTLTIS SVQPEDLADYHC

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

SEQ ID NO: 39 6F7H2 骨架区 FR-H1 氨基酸序列
QVQLVQSGAEVVKPGASVKV SCKAS

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

SEQ ID NO: 41 6F7H2 骨架区 FR-H3 氨基酸序列
SNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSED TAVYYC

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

SEQ ID NO: 43 6F7L2 骨架区 FR-L1 氨基酸序列
NIVMTQSPATLSLSPGERVTLS CRAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SEQ ID NO: 55 IgG1M 重链恒定区氨基酸序列

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YLSVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSIVTLVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPPSSSLGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSIV
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLGLGK

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

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YLSVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSIVTLVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:59 6F7H1L1(G1M) 重链的氨基酸序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGLEWIGMIDPSDSETH
NAQKFQGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSED TAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS

LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:60 6F7H1L1(G1M) 轻链的氨基酸序列

NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSRCASEIVGTYYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRYTGVPAR
FSGSGSGTDFTLTISVQPEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:61 6F7H2L2(G1M) 重链的氨基酸序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGQGLEWIGIIDPSDSETSN
AQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDYAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:62 6F7H2L2(G1M) 轻链的氨基酸序列

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSRCASEIVGTYYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDLADYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:63 6F7H3L3(G1M) 重链的氨基酸序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPQGQGLEWIGIIDPSDSETSY
AQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:6F764 H3L3(G1M)轻链的氨基酸序列

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSRASEIVGTYLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:65 6F7H1L1(hG4)重链的氨基酸序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGQLEWIGMIDPSDSETH
NAQKFQGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSED TAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO:66 6F7H1L1(hG4)轻链的氨基酸序列

NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRYTGVPAR
FSGSGSGTDFTLTISSVQPEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:67 6F7H2L2(hG4)重链的氨基酸序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGQLEWIGIIDPSDSETSN
AQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSED TAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO:68 6F7H2L2(hG4)轻链的氨基酸序列

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRYTGVPAR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL

KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:69 6F7H3L3(hG4)重链的氨基酸序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGHIDPSDSETSY
AQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGAGTTTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO:70 6F7H3L3(hG4)轻链的氨基酸序列

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSRASEIVGTYLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:71 mFc 标签的序列

PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVF
NNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKP
KGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL
DSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO:72 hIgG 的重链序列

EVQLEQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFTTYWIEWIKQRPGRHLEWIGEILPGSDSTYYNE
KVKGKVTFTADASSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGFYVYWGQGTTLTVSSASTKG
PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO:73 hIgG 的轻链序列

DIELTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSISSNNLHWYQQKSHESPRLLIKYTSQMSGIPSRFS
GSGSGTDFTLINSVETEDFGVYFCQQSGSWPRTFGGGTKLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:74 TEV 氨基酸序列

ENLYFQG

SEQ ID NO:75 hIgG 的重链可变区序列

EVQLEQSGAELMKPGASVKISKATGYTFTTYWIEWIKQRPGRHSLEWIGEILPGSDST
YYNEKVKGKVTFTADASSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGFYVYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 76 hIgG 的轻链可变区序列

DIELTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSISSNNLHWYQQKSHESPRLLIKYTSQMSGIPS
RFSGSGSGTDFTLINSVETEDFGVYFCQQSGSWPRTFGGGTKLDIK

SEQ ID NO:77 CP004(hG1TM)重链的核酸序列

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTCACTGCGAC
TGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGGGTGCGACAG
GCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCTGCTACTATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCT
ACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAA
TCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCC
AACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCCTGGTGACAGTCT
CTAGTgccagcaccaaagggcccagcgtgttctctcgccccctcctccaaagcaccagcggaggaaccgctgctctcggatgtctgg
tgaaggactacttccctgaacccgtcaccgtgagctggaatagcggcgctctgacaagcggagtcatacattccctgctgtgctgcaaagcag
cggactctattccctgtccagcgtcgtcacagtcccagcagcagcctgggcacccagacctacatctgtaacgtcaaccacaagccctccaac
accaaggtggacaagaaagtggagcccaaatcctgcgacaagacacacacctgtccccctgtcctgctcccgaaGCTGCTggagCcc
ctagcgtcttctcttctcccaaaccaaggacacctcatgatcagcagaacctgaagtcacctgtgctgctggtgatgcagccatgagg
accccgaggtgaaattcaactggtatgtcgatggcgtcgaggtgcacaacgcaaaaccaagcccagggaggaacagtacaactcacctac
agggtggtgtccgtgctgacagtctccaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtgtccaacaaggctctccctgcccc
cattgagaagaccatcagcaaggccaaaggccaaccaggagccccaggtctatactgcctccctccaggagacgaactcaccaagaac
caggtgtccctgacctgcctggtcaagggtttatcccagcgacatcgccgtcgagtgggagtcacaacggacagcccagaataactacaag
accacccctcctgctcgtcactccgacggctccttctctgtacagcAAACTGACCGTGGATAAGTCCAGATGGCA
GCAGGGCAATGTCTTTTCATGTTCCGTGATGCACGAGGCACTGCACAACCACTATACCC

AGAAGTCTCTGAGTCTGTCACCAGGAAAAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGCGGAA
GTGGAGGCGGAGGATCAGGAGGGGGAGGATCTCAGGTGCAGCTGGTCGAATCCGGAG
CCGAGGTGAAGAAACCCGGCGCTTCCGTGAAGGTCTCTTGCAAAGCATCAGGCTACAG
CTTCACAGGGTATACTATGAACTGGGTGCGGCAGGCACCTGGACAGTGTCTGGAATGG
ATCGGCCTGATTAACCCATACAACAACATCACTAACTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCC
GGGTGACTTTTACCGTGGACACTAGCATTTCCACCGCTTACATGGAGCTGAGTCGGCTG
AGATCAGACGATACCGGCGTGTATTTTTGCGCAAGGCTGGATTACAGAAGTTATTGGG
GACAGGGAACACTTGTTACAGTCTCTGCTGGAGGAGGCGGATCTGGAGGAGGAGGATC
TGGCGGAGGAGGCAGTGGAGGAGGAGGATCACAGGCTGTGGTTACTCAGGAACCAAG
CCTGACCGTGAGCCCCGGAGGCACAGTCACTCTGACCTGTGGGAGCTCCACAGGAGCT
GTGACCACATCTAACTTCCCTAATTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTCGAT
CCCTGATCGGGGGAACCAACAACAAGGCCAGCTGGACACCCGCCAGATTTTCTGGCAG
TCTGCTGGGCGGGAAAGCCGCTCTGACCATTAGCGGCGCTCAGCCTGAGGACGAAGCA
GAGTACTATTGCGCCCTGTGGTATAGTAATCATTGGGTGTTCGGGTGTGGGACAAAAC
TACTGCTGCTGAGA

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTY
YPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGVQLVESGAIEVKK
PGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQCLEWIGLINPYNNITNYAQKFQGRVFTVD
TSISTAYMELSRLRSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGLTVTVSAGGGSGGGSGGGSGGG
GGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNFPNWVQQKPGQAPRSLIGGTNNKAS
WTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGCGTKLTVLR (注: 下划
线表示 CDR 序列)

SEQ ID NO:79 CP004(hG1TM)轻链的核酸序列

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGGTCAC
CTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTCAGCAGAAG
CCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTGTCTGGAGTCC

CAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCT
GCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCT
TTGGCGCCGGGACAAACTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCAT
TTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTGA
ACAATTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCCCTGCAGTC
CGGCAACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATAGCACCTATTCCTG
TCTAGTAACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCATGCG
AAGTGACACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGTGACTAAGTCTTTTAACCGGGGCGAATG
T

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

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRF
SGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTCACTGCGAC
TGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGGGTGCGACAG
GCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCTACTATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCTA
CTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATC
TGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAAC
CGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTAG
TGCCAGCACCAAAGGGCCCAGCGTGTTCCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCACACAGC
GGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCTGAACCCGTCACCGT
GAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAA
GCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACC
CAGACCTACATCTGTAAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG
TGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCTGTCCTGCTCCCGAAGCT
GCTGGAGCCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCTCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCAG
CAGAACCCTGAAGTCACCTGTGTCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTG
AAATTCAACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGG
AGGAACAGTACAACCTCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGA
CTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCC
ATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAACCAGGGAGCCCCAGGTCTATACAC

TGCCTCCCTCCAGGGACGAACTCACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAA
GGGCTTTTATCCAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATA
ACTACAAGACCACCCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAAG
CTGACCGTGGACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGC
ACGAAGCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTY
PDSVKGRFTISRDNKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGGTCAC
CTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTCAGCAGAAGC
CAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTGTCTGGAGTCCCA
AGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGC
AGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCTTTG
GCGCCGGGACAAAACCTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTT
CCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAA
TTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCCCTGCAGTCCGGC
AACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATAGCACCTATTCCTGTCTAG
TAACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCATGCGAAGTGA
CACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGTGACTAAGTCTTTTAACCGGGGCGAATGT

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

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRF
SGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:121 Penpulimab 重链可变区的氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRY
TYYPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTS
S

SEQ ID NO:122 Penpulimab 轻链可变区的氨基酸序列

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFCTCRASQDINTYLSWFQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRF
SGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO:123 Penpulimab 的 HCDR1

GFAFSSYD

SEQ ID NO:124 Penpulimab 的 HCDR2

ISGGGRYT

SEQ ID NO:125 Penpulimab 的 HCDR3

ANRYGEAWFAY

SEQ ID NO:126 Penpulimab 的 LCDR1

QDINTY

SEQ ID NO:127 Penpulimab 的 LCDR2

RAN

SEQ ID NO:128 Penpulimab 的 LCDR3

LQYDEFPLT

SEQ ID NO:85 Hu5F9-G4 重链氨基酸序列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDT
SYNQKFKDRVITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO:86 Hu5F9-G4 轻链氨基酸序列

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVYSNGNTYLGWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS

DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:87 14C12 重链可变区的氨基酸序列

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATISGGGGRYTYPPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGTLLTVSA

SEQ ID NO:88 14C12 轻链可变区的氨基酸序列

DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO:89 14C12 的 HCDR1

GFAFSSYD

SEQ ID NO:90 14C12 的 HCDR2

ISGGGGRYT

SEQ ID NO:91 14C12 的 HCDR3

ANRYGEAWFAY

SEQ ID NO:92 14C12 的 LCDR1

QDINTY

SEQ ID NO:93 14C12 的 LCDR2

RAN

SEQ ID NO:94 14C12 的 LCDR3

LQYDEFPLT

SEQ ID NO:95 4G10 重链可变区的氨基酸序列

QVKLQESGPVLVKGASMKISCKASGYSFTGYTMNVWKQSHGKNLEWIGLINPYNNITNYNQKFMGKATFTVDKSSSTAYMELLRLTSEDSGVYFCARLDYRSYWGQGTLLTVSAAKTTPPSVY

SEQ ID NO:96 4G10 轻链可变区的氨基酸序列

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNFANWVQEKPDHLFTSLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTLFQGQFC

SEQ ID NO:97 4G10 的 HCDR1

GYSFTGYT

SEQ ID NO:98 4G10 的 HCDR2

INPYNNIT

SEQ ID NO:99 4G10 的 HCDR3

ARLDYRSY

SEQ ID NO:100 4G10 的 LCDR1

TGAVTTSNF

SEQ ID NO:101 4G10 的 LCDR2

GTN

SEQ ID NO:102 4G10 的 LCDR3

ALWYSNHWV

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGG
GRYTYYPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQG
TLVTVSS

SEQ ID NO:104 14C12H1L1(M)轻链可变区的氨基酸序列：（108 aa，基于
14C12H1L1 所做的氨基酸序列突变位点用下划线标出）

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRA
NRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLEL
KR

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

GFAFSSYD

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

ISGGGRYT

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

ANRYGEAWFAY

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

QDINTY

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

RAN

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

SEQ ID NO:111 Bevacizumab 重链可变区 (Bvacizumab-Hv) 的氨基酸序列: (123 aa)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYT
GEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQ
GTLVTVSS

SEQ ID NO:112 Bevacizumab 轻链可变区 (Bvacizumab-Lv) 的氨基酸序列: (107 aa)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLITYFTSSLHSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:113 Bvacizumab 重链可变区的 HCDR1 氨基酸序列
GYTFTNYG

SEQ ID NO:114 Bvacizumab 重链可变区的 HCDR2 氨基酸序列
INTYTGEF

SEQ ID NO:115 Bvacizumab 重链可变区的 HCDR3 氨基酸序列
AKYPHYYGSSHWYFDV

SEQ ID NO:116 Bvacizumab 轻链可变区的 LCDR1 氨基酸序列
QDISNY (SEQ ID NO: 116)

SEQ ID NO:117 Bvacizumab 轻链可变区的 LCDR2 氨基酸序列
FTS

SEQ ID NO:118 Bvacizumab 轻链可变区的 LCDR3 氨基酸序列
QQYSTVPWT

SEQ ID NO:119: 接头 1 的氨基酸序列
GGGGSGGGSGGGGS

SEQ ID NO:120: 接头 2 的氨基酸序列
GGGGSGGGSGGGSGGGGS

SEQ ID NO:129: 14C12H1L1 重链可变区的氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTYPPDSVKGRFTI
SRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:130: 14C12H1L1 轻链可变区的氨基酸序列

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFCTCRASQDINTYLSWFQKPKGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQD
YTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO:131: 4G10H1L1 重链可变区的氨基酸序列

QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQGLEWIGLINPYNNITNYNQKFMGKA
TFTVDKSISTAYMELSRLTSDDSGVYFCARLDYRSYWGQGLTVTVSA

SEQ ID NO:132: 4G10H1L1 轻链可变区的氨基酸序列

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNPFANWVQKPGQAFRSLIGGTNNRASWVPARFSGSLLG
GKAALTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO:133: 4G10H3L3 重链可变区的氨基酸序列

QVQLVESGAELVKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWIGLINPYNNITNYAQKFQGRV
TFTVDTISISTAYMELSRLRSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGLTVTVSA

SEQ ID NO:134: 4G10H3L3 轻链可变区的氨基酸序列

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNPFANWVQKPGQAPRSLIGGTNNKASWTPARFSGSLLG
GKAALTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO:135: 4G10H1V(M) 的氨基酸序列

QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQCLEWIGLINPYNNITNYNQKFM
GKATFTVDKSISTAYMELSRLTSDDSGVYFCARLDYRSYWGQGLTVTVSA

SEQ ID NO:136: 4G10L1V(M) 的氨基酸序列

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNPFANWVQKPGQAFRSLIGGTNNRASWVPARFSG
SLLGGKAALTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFGCGTKLTVLR

SEQ ID NO:137: 4G10H3V(M) 的氨基酸序列

QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSKASGYSTGYTMNWVRQAPGQCLEWIGLINPYNNTNYAQKFQ
GRVFTFTVDTSTAYMELSRRLSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGLTVTSA

SEQ ID NO:138: 4G10L3V(M) 的氨基酸序列

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNFPNWVQQKPGQAPRSLIGGTNNKASWTPARFSG
SLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGCGTKLTVLR

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRTYTPDSVKG
RFTISRDNKNNLYQMNSLR AEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:140 Bevacizumab 重链的氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPT
YAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLR AEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGLT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:141 VP101(hG1DM)的重链氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPT
YAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLR AEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGLT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGG

LVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTYYPDSVKGRFTIS
RDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSDIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQKPGKSPKTLIYRANR
LVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKR (SEQ ID
NO:141)

SEQ ID NO:142 VP101(hG1DM)的重链核酸序列

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTCTCTGAGG
CTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAACTATGGAATGAATTGGGTGCGCCA
GGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTCTGGATCAACACTTACACCGGGGAACCT
ACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTACCTTCAGCCTGGATACAAGCAAATCCAC
TGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAGTCTACTATTGTGCTA
AATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTTTGACGTGTGGGGGCAGGGGACTC
TGGTGACAGTGAGCAGCGCAAGCACCAAAGGGCCCAGCGTGTTTCCTCTCGCCCCCTC
CTCCAAAAGCACCGAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTC
CCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTCCATACATT
CCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGTCACAGTGCCCA
GCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACAC
CAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCC
TGTCCTGCTCCCGAAGCTGCTGGAGGCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCCTCCCAAACCCAA
GGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTGTGCTCGTGGATGTCAGCC
ATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCC
AAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGA
CAGTCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAA
GGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAG
CCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACTACCAAGAACCAGGTGTCCCT
GACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACG
GACAGCCCGAGAATAACTACAAGACCACCCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTC
TTCCTGTACAGCAAACCTGACCGTCGATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTC
TTGTTCCGTGATGCATGAAGCACTGCACAACCATTATACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTC
CCCCGGCAAGGGCGGCGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGCAGCGGCGGAGGAGGCTCCGG
AGGCGGCGGCTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGG
AGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCAGCAAGCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGA
GCTGGGTGCGGCAGGCACCTGGCAAGGGTCTGGATTGGGTGGCAACCATCAGCGGAGG
CGGCAGATACATACTATCCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCCGCGATAA

CTCTAAGAACAAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCCTGT
ACTATTGCGCCAACCGCTACGGCGAGGCCTGGTTTGCCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTG
GTGACAGTGTCTAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGCGGC
TCTGGCGGCGGCGGCAGCGATATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCTCTATGTCTGCCAGC
GTGGGCGACCGGGTGACCTTCACATGTAGAGCCTCCCAGGATATCAACACCTACCTGTC
TTGGTTTTCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCTAAGACACTGATCTATCGGGCCAATAGAC
TGGTGAGCGGAGTGCCTTCCCGGTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGACAGGACTATACCCTG
ACAATCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGATATGGCCACATACTATTGCCTGCAGTATGACGAG
TTCCCCCTGACCTTCGGGGCTGGCACTAAGCTGGAGCTGAAAAGA (SEQ ID NO:142)

SEQ ID NO:143 VP101(hG1DM)的轻链氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLTK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:143)

SEQ ID NO:144 VP101(hG1DM)的轻链核苷酸序列

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGGT
CACCATCACATGCAGTGCTTCACAGGATATTTCCAACCTGAATTGGTATCAGCAGAA
GCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGCTCCCTGCACTCAGGAGTGC
CAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACCGACTTTACTCTGACCATTTCTAGTCTGC
AGCCTGAGGATTTGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTCTACCGTGCCATGGACATTTGG
CCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAGCGGACCGTGCCGCTCCCAGTGTCTTCATTTTC
CCCCTAGCGACGAACAGCTGAAATCCGGGACAGCCTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAAC
TTCTACCCTAGAGAGGCAAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCCCTGCAGAGTGGCA
ATTCACAGGAGAGCGTGACAGAACAGGACTCCAAAGATTCTACTTATAGTCTGTCAAGC
ACACTGACTCTGAGCAAGGCTGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCATGTGAGGTCAC
CCACCAGGGGCTGAGCAGTCCAGTCACCAAGTCATTCAACAGAGGCGAGTGC (SEQ
ID NO:144)

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

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTCTCTG
AGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAACTATGGAATGAATTGGGTGCG
CCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTGCGCTGGATCAACACTTACACCGGGGAA
CCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTACCTTCAGCCTGGATACAAGCAAATCC

ACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAGTCTACTATTGTGC
TAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTTTGACGTGTGGGGGCAGGGGAC
TCTGGTGACAGTGAGCAGC (SEQ ID NO: 145)

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

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGGT
CACCATCACATGCAGTGCTTCACAGGATATTTCCAACCTGAATTGGTATCAGCAGAA
GCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGCTCCCTGCACTCAGGAGTGC
CAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACCGACTTTACTCTGACCATTCTAGTCTGC
AGCCTGAGGATTTGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTCTACCGTGCCATGGACATTTGG
CCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAG (SEQ ID NO:146)

权 利 要 求

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 and 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-1 chain 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。

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 100 nM，例如小于大约 10 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM 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、肌肉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、肌肉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、肌肉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, 原发性纵行分离大 B 细胞淋巴瘤, 套细胞淋巴瘤, 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。