

一种靶向 CD47 的抗体及其应用

相关申请的交叉引用

本公开要求于 2020 年 12 月 23 日提交中国专利局的申请号为 CN 202011544262.6、名称为“一种靶向 CD47 的抗体及其应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本公开中。

技术领域

本公开属于生物医药技术领域。具体地，涉及一种靶向 CD47 的抗体及其应用，更具体地，涉及抗 CD47 抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、细胞、组合物、应用以及试剂盒。

背景技术

癌症免疫疗法是近年来生物科学领域的重头大戏，基于 T 细胞的 CTLA4 抗体、PD-1 抗体、PD-L1 抗体等的免疫检查点抑制剂疗法和 CAR-T、TCR-T 等细胞疗法皆是近年来大热的免疫疗法。这些无一例外是围绕如何恢复 T 细胞功能来进行，换句话说，主要围绕如何提高获得性免疫系统能力。但是，以免疫检查点(checkpoint)为靶点，激活 T 细胞功能，以提高获得性免疫系统的能力，进而攻克癌症的道路仍充满曲折。然而，固有免疫系统在肿瘤免疫治疗中的作用却长期没有得到发挥。事实上在整个肿瘤浸润区域，巨噬细胞在肿瘤组织约占 50%，更重要的是巨噬细胞的数量同肿瘤的预后呈现反向联系，这进一步说明巨噬细胞在肿瘤中有很重要的作用。巨噬细胞发挥吞噬效应需要两个信号同时起作用：一个是靶向细胞表面的“吃我”信号的激活，另一个是相同目标表面“别吃我”信号的失活。任何一个信号的缺少都不足以引发吞噬效应的发生。越来越多的证据表明，CD47 是一类“别吃我”信号，它通过与巨噬细胞表面的信号调节蛋白 α (Signal regulatory protein α , SIRP α) 相互结合抑制巨噬细胞的吞噬作用。肿瘤细胞也可以通过 CD47 的表达逃避巨噬细胞吞噬作用(例如参见 EP2242512 及其中引用的相关文献)。

CD47 也称为整联蛋白相关蛋白 (IAP)，是具有氨基末端免疫球蛋白结构域和羧基末端多重跨膜区的 50kDa 膜蛋白。它与多种配体相互作用，包括但不限于单调节蛋白 α (SIRP α)，SIRP γ ，整联蛋白和血小板反应蛋白-1 (TSP-1)。SIRP α 主要在骨髓细胞上表达，包括巨噬细胞，骨髓树突细胞 (DC)，粒细胞，肥大细胞及其前体，包括造血干细胞。CD47/SIRP α 相互作用传递“不要吃我”信号，阻止自体吞噬作用。对患者肿瘤和匹配的邻近正常 (非肿瘤) 组织的分析显示 CD47 蛋白在癌细胞上过表达，这有效地帮助它们逃避先天免疫监视和消除。阻断 CD47-SIRP α 与抗 CD47 抗体的相互作用已经显示出有效诱导体外肿瘤细胞的吞噬作用并抑制体内各种血液和实体肿瘤的生长。因此，CD47 是癌症治疗的有效靶标，并且需要其适当的拮抗剂来制备人类治疗剂。

发明内容

CD47 单克隆抗体与红细胞有较高的靶向结合性，易引发红细胞凝集，使相应抗体在治疗效果上大折扣、并引发药物副作用，本公开旨在提供一种靶向 CD47 抗体，所述抗体能够阻断 CD47 与 SIRP α 结合，促进巨噬细胞发挥吞噬作用，更难能可贵的是，能在一定程度上避免红细胞血发生凝集，安全性好。

本公开的目的是提供抗 CD47 抗体或其抗原结合片段, 所述抗体含有以下 CDRs:

如 SEQ ID NO:1 或与 SEQ ID NO:1 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:2 或与 SEQ ID NO:2 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 LCDR2, 如 SEQ ID NO:3 或与 SEQ ID NO:3 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 LCDR3;

如 SEQ ID NO:10 或与 SEQ ID NO:10 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:11 或与 SEQ ID NO:11 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 HCDR2, 如 SEQ ID NO:12 或与 SEQ ID NO:12 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 HCDR3。

本公开的另一目的是提供所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段相关的核酸、载体、细胞或药物组合物。

本公开还涉及所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段、及其相关的核酸、载体、细胞或药物组合物在制备治疗和/预防 CD47 阳性肿瘤的药物中的应用。

本公开还涉及所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段, 及其相关的核酸、载体或细胞在制备检测 CD47 或诊断 CD47 相关疾病的试剂盒中的应用。

本公开还提供了一种检测 CD47 的试剂盒, 所述试剂盒含有所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段。

本公开还提供了一种诊断 CD47 相关疾病的试剂盒, 所述试剂盒含有所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段。

附图说明

为了更清楚地说明本公开实施例的技术方案, 下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍, 应当理解, 以下附图仅示出了本公开的某些实施例, 因此不应被看作是对范围的限定, 对于本领域普通技术人员来讲, 在不付出创造性劳动的前提下, 还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

图 1 是 CD47 抗体 (7A11H11、7A11H12、7A11H22、7A11H32、7A11H42、阳性对照抗体 Hu5F9-G4 和 hIgG4-同型对照) 与人 CD47 结合的平均荧光强度;

图 2 是 CD47 抗体 (7A11H52、7A11H14、7A11H15、7A11H33、7A11H34、7A11H35、7A11H55、阳性对照抗体 Hu5F9-G4 和 hIgG4-同型对照) 与人 CD47 结合的平均荧光强度;

图 3 是 CD47 抗体 (7A11H11、7A11H12、7A11H22、7A11H32、7A11H42、7A11H52、阳性对照抗体 Hu5F9-G4 和 hIgG4-同型对照) 与猴 CD47 结合的平均荧光强度;

图 4 是 CD47 抗体 (7A11H14、7A11H15、7A11H33、7A11H34、7A11H35、7A11H55、阳性对照抗体 Hu5F9-G4 和 hIgG4-同型对照) 与猴 CD47 结合的平均荧光强度;

图 5 是 CD47 抗体 (7A11H11、7A11H12、7A11H22、7A11H32、7A11H42 和 hIgG4-同型对照) 对人 CD47 的 CD47/SIRP α 结合抑制结果;

图 6 是 CD47 抗体 (7A11H52、7A11H14、7A11H15、7A11H33、7A11H34、7A11H35、7A11H55) 对人 CD47 的 CD47/SIRP α 结合抑制结果;

图 7 是 CD47 抗体促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力测定结果;

图 8 是 CD47 抗体的 RBC 凝集能力测定结果;

图 9 是 CD47 抗体与人类红细胞结合能力的测定结果;

图 10 是 CD47 抗体与人类血小板结合分析结果;

图 11 是 CD47 抗体对激活巨噬细胞吞噬红细胞的作用分析结果;

图 12 是 CD47 抗体对人 B 淋巴细胞皮下移植瘤模型的抗肿瘤结果;

图 13 是 CD47 抗体对人恶性黑色素瘤模型的抗肿瘤结果。

具体实施方式

以下结合具体实施例来进一步说明本公开,但实施例并不对本公开做任何形式的限定。除非特别说明,本公开采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

本公开涉及抗 CD47 抗体或其抗原结合片段,所述抗体含有以下 CDRs:

如 SEQ ID NO:1 或与 SEQ ID NO:1 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 LCDR1,如 SEQ ID NO:2 或与 SEQ ID NO:2 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 LCDR2,如 SEQ ID NO:3 或与 SEQ ID NO:3 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 LCDR3;

如 SEQ ID NO:10 或与 SEQ ID NO:10 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 HCDR1,如 SEQ ID NO:11 或与 SEQ ID NO:11 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 HCDR2,如 SEQ ID NO:12 或与 SEQ ID NO:12 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 HCDR3。

该抗体或其抗原结合片段的一个重要优点在于其与 CD47 具有高亲和力。

该抗体或其抗原结合片段的一个重要优点在于其具有阻断 CD47 与 SIRP α 结合的活性。

该抗体或其抗原结合片段的一个重要优点在于其具有促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力。

该抗体或其抗原结合片段的一个重要优点在于其具有显著降低红细胞血凝聚的作用。

该抗体或其抗原结合片段的一个重要优点在于其与红细胞表现出极弱水平的低结合或不结合。

因具有上述特性,该抗体或其抗原结合片段优选可作为抗体药物使用。

在本公开中,“抗体或其抗原结合片段”此技术术语是结合特定抗原的蛋白,其泛指包含互补决定区(CDR 区)的一切蛋白及蛋白片段。“抗体”特别指全长抗体。“全长抗体”此用语包括多克隆抗体及单克隆抗体。

术语“抗原结合片段”是包含抗体 CDR 的一部分或全部的物质,其缺乏至少一些存在于全长链中的氨基酸但仍能够特异性结合至抗原。此类片段具生物活性,因为其结合至靶抗原,且可与其他抗原结合分子(包括完整抗体)竞争结合至给定表位。在一些实施方式中,抗原结合片段具有特异性识别并结合 CD47 的作用。在一些实施方式中,抗原结合片段是具有阻断 CD47 与其配体结合,激活免疫细胞功能的片段,在一个方面中,此类片段选自 Fab(由完整的轻链和 Fd 构成),Fv(由 VH 和 VL 构成),ScFv(单链抗体,VH 和 VL 之间由一连接肽连接而成)或单域抗体(仅由 VH 组成)。所述片段可通过重组核酸技术产生,或可通过抗原结合分子(包括完整抗体)的酶裂解或化学裂解产生。

术语“互补性决定区”或“CDR”是指免疫球蛋白的重链和轻链的高度可变区。有三种重链 CDR 和三种轻链 CDR。此处，取决于情况，术语“CDR”和“CDRs”用于指包含一种或多种或者甚至全部的对抗体或其抗原结合片段与其识别的抗原或表位的结合亲和力起作用的主要氨基酸残基的区域。在另一具体实施方式中，CDR 区或 CDR 是指 IMGT 定义的免疫球蛋白的重链和轻链的高度可变区。

在本公开中，重链的互补决定区用 HCDR 表示，轻链的互补决定区用 LCDR 表示。本领域常用的 CDR 标示方法包括：Kabat 编号方案、Chothia 和 Lesk 编号方案以及 1997 年 Lefranc 等人为免疫球蛋白超家族的所有蛋白质序列引入的新的标准化编号系统。Kabat 等人是第一个为免疫球蛋白可变区提出标准化编号方案的人。在他们的“免疫学蛋白质序列”（Sequences of Proteins of Immunological Interest）的汇编中，轻链（ λ , κ ）可变区和抗体重链的氨基酸序列，以及 T 细胞受体的可变区（ α , β , γ , δ ）对齐并编号。在过去的几十年中，序列的积累导致了 KABATMAN 数据库的创建，Kabat 编号方案通常被认为是编号抗体残基广泛采用的标准。本公开采用 Kabat 注释标准标示 CDR 区，但其他方法标示的 CDR 区也属于本公开的保护范围。

术语“特异性识别”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”或其类似表述是指抗体或其抗原结合片段对预先确定的抗原上的表位的结合。通常，抗体或其抗原结合片段以大约小于 10^{-6}M ，例如大约小于 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 或 10^{-10}M 或更小的亲和力(K_D)结合。

在本公开中，所提供的抗体或其抗原结合片段特异性识别的对象可以为多种属来源的 CD47，例如人、鼠、猴（如食蟹猴 *cynomolgus monkey*）。

在一些实施方式中，所述抗体含有重链可变区序列和轻链可变区序列的至少之一，所述重链可变区序列和轻链可变区序列的至少之一的至少一部分来自鼠源抗体、人源化抗体、灵长目源抗体或其突变体的至少之一。

在一些实施方式中，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:5~9 任一项所示或与 SEQ ID NO:5~9 任一项所示具有至少 95%同源性的序列。

在一些实施方式中，所述重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:14~18 任一项所示或与 SEQ ID NO:14~18 任一项所示具有至少 95%同源性的序列。

在一些实施方式中，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:17 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示、重链可

变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示。

在一些实施方式中，所述抗体具有恒定区，重链恒定区选自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE 或 IgD 中的任一种；轻链恒定区为 κ 或 λ 链。

在一些实施方式中，所述恒定区的种属来源选自鼠、兔、羊、猴、或人。

在一些实施方式中，所述抗体为 CDR 移植抗体、多聚体抗体或双特异性抗体中的任一种或几种。

在一些实施方式中，所述抗原结合片段为 $F(ab')_2$ 、Fab、scFv、Fv 及单域抗体中的任一种或几种。

在一些实施方式中，所述 CD47 为人 CD47、鼠 CD47 或猴 CD47。

本公开还涉及核酸，所述核酸编码所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段。

核酸通常是 RNA 或 DNA，核酸分子可以是单链或双链的，但优选是双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时，核酸是“有效连接的”。例如，如果启动子或增强子影响编码序列的转录，那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。当其连入载体时优选采用 DNA 核酸。

此外，鉴于抗体为膜蛋白，所以核酸通常带有信号肽序列。

本公开还涉及载体，所述载体携带上述核酸。

术语“载体(vector)”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或 P1 来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如 SV40)。在一些实施方式中，本公开所述载体中包含基因工程中常用的调控元件，例如增强子、启动子、内部核糖体进入位点(IRES)和其他表达控制元件(例如转录终止信号，或者多腺苷酸化信号和多聚 U 序列等)。

本公开还涉及细胞，所述细胞携带上述核酸或含有上述载体。利用编码抗 CD47 抗体或其抗原结合片段的核酸与载体连接后，在细胞表达能够获得相应抗体。可以将上述载体导入到真核细胞、尤其是哺乳动物细胞中，构建获得能够表达本公开所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段的细胞。

本文使用的表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括后代。因此，单词“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由其衍生的培养物，而不考虑转移数目。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。在意指不同名称的情况下，其由上下文清楚可见。

本公开还涉及药物组合物，所述组合物含有所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段、所述核酸、所述

载体或所述细胞。

在一些实施方式中，所述组合物还含有药学可接受的载体。“药学可接受的载体”可以包括生理学上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和延迟吸收剂等，用来延长抗体的保存限期或效力。

所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段、所述核酸、所述载体、所述细胞或所述组合物在制备治疗和/预防 CD47 阳性肿瘤的药物中的应用，也应在本公开的保护范围之内。

所述药物能够降低红细胞血凝集、降低其与红细胞的结合活性。

所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段、所述核酸、所述载体或所述细胞在制备检测 CD47 或诊断 CD47 相关疾病的试剂盒中的应用，也应在本公开的保护范围之内。

本公开还提供了一种检测 CD47 的试剂盒，所述试剂盒含有所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段。

本公开还提供了一种诊断 CD47 相关疾病的试剂盒，所述试剂盒含有所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段。

本公开具有以下有益效果：

本公开提供了抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，该抗体在体外未发生红细胞血凝集，更难能可贵的是与红细胞表现出极弱水平的低结合或不结合；能够有效地阻断 CD47 与 SIRPα 结合、激活介导巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬活性，展现出了显著的与 CD47 阳性肿瘤细胞的靶向特异性，亲和力高、特异性强，不会引起红细胞凝集，且与人类红细胞、血小板表现出极弱的结合，安全性好；因此，所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段可以作为肿瘤免疫治疗系统中非常有前景的靶点，在人类肿瘤治疗方面发挥强有力作用，在制备治疗 CD47 阳性肿瘤的药物中具有广泛的应用前景。

下面将结合实施例对本公开的实施方案进行详细描述。

实施例 1 抗 CD47 鼠单抗的筛选

1、hCD47-ECD-HIS 重组表达质粒的构建

以 GenBank 提供的序列为模板(CEJ 95640.1)，全基因合成人 CD47 胞外区(hCD47-ECD)全长编码 DNA 序列并且在 3'端添加 6 个 HIS 标签序列，通过 5'端 EcoII 和 3'端 HindIII 双酶切位点克隆入表达载体 pCDNA3.4 (thermo 公司)，建立 CD47 胞外全长蛋白的重组真核表达质粒，即 hCD47-ECD-HIS 重组质粒 DNA。

2、hCD47-ECD-HIS 重组蛋白的表达与纯化

hCD47-ECD-HIS 重组蛋白的表达与纯化，包括以下步骤：

(1)瞬时转染前一天 Expi293(ThermoFisher Scientific; A14635)细胞传代，用 Dynamis 培养基(gibco; A2617502)按 2×10^6 的密度接种 1L 摇瓶(conning; 431147)，放入细胞培养摇床(Adolf Kuhner; ISF4-XC)中 37°C ；8%CO₂；120rpm 培养；

转染当天，Expi293 细胞用细胞计数仪(Countstar; IC1000)计数，用新鲜 Dynamis 培养稀释调整细胞密度为 2.9×10^6 ；准备转染；PEI：DNA=3:1；混匀 5min，将二者轻柔混匀 20 次，静置 15~30min。

将 DNA-PEI 混合物加入 Expi293 细胞中,混匀,放入细胞培养摇床(Adolf Kuhner; ISF4-XC)中 37℃; 8%CO₂; 120rpm 培养; 转染 4h 之后补加双抗(gibco; 15140122)和抗凝剂(gibco; 0010057);

(2) 收获上清: 转染连续培养 7 天,之后收样,先低速 1000rpm; 10min; 4℃离心(湘仪 H2050R),再高速 12000rpm; 30min; 4℃; 收集细胞培养上清, 0.22um 过滤。

(3) HisTrap 亲和层析柱纯化: 将上清以 1mL/min 速度上样 HisTrap 亲和层析柱,完成上样后,用 5 个柱体积的 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl pH8.0 平衡液冲洗层析柱; 用 5 个柱体积的 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0~500mM 咪唑 pH8.0 洗脱液冲洗层析柱,收集洗脱峰。纯化后的 CD47-ECD 蛋白用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定。

3、抗 CD47 鼠单抗的筛选

将步骤 2 纯化得到的 hCD47-ECD-HIS 重组蛋白(以下简称为 hCD47 抗原)用于 BALB/C 小鼠(购于广东省实验动物中心)免疫。具体方法如下:

(1) 动物免疫: 经过纯化的 hCD47 抗原以完全弗氏佐剂乳化,采用皮下或腹腔注射方法免疫 6~8 周龄 BALB/C 小鼠,免疫剂量为 25μg/只,每组 5 只; 间隔 1 周后进行第二次免疫,以不完全弗氏佐剂乳化,免疫剂量为 25μg/只。免疫 4 次后取尾血以 ELISA 法梯度稀释测定血清效价; 融合前三天加强免疫,选取抗体效价最高的小鼠进行细胞融合。

(2) 细胞融合: 骨髓瘤细胞采用 BALB/C 来源的 sp2/0(ATCC® CRL-1581),融合时处于对数生长期; 取已免疫小鼠脾脏,制成淋巴细胞单细胞悬液; 小鼠脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞以 1:5~1:10 混合,滴加 37℃的 50% PEG1500(pH 8.0)1mL,加入不完全培养基 DMEM 及其余终止液,离心弃上清后加入 HAT 培养基悬浮混匀,铺板 96 孔,置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中进行培养。培养一周后,用 HT 培养基进行第一次换液,再培养三天后,用 HT 培养基进行第二次换液。

(3) 筛选和克隆: 融合 2 周,取细胞上清进行 ELISA 试验检测,检测细胞上清与纯化的 CD47-ECD-His 重组蛋白的结合情况,筛选出 ELISA 结果为阳性的细胞后,进行第二次 ELISA 试验复测;

对阳性孔细胞进行有限稀释,每次有限稀释后 7 天测定 ELISA 值,挑取 OD280 阳性值较高的单克隆孔进行有限稀释,直至 ELISA 测定 96 孔板全板结果为阳性。挑取阳性值高的单克隆株。

(4) 细胞上清单抗的制备和纯化: 将阳性克隆用含 15%血清的 DMEM 培养基培养于 T25 培养瓶中培养,扩培时,800rpm/min 离心 5min,弃上清并将细胞转移到 500mL 摇瓶中,加入无血清培养基(Hybridoma-SFM Complete DPM; Gibco; 12300-067),使细胞密度约为 3×10^5 个/mL。继续培养 1~2 周后,当细胞死亡率达到 60%~70%时,收取细胞悬液 8000rpm/min 高速离心 20min,取上清,亲和层析法进行上清纯化,采用 Protein A 亲和层析进行抗体纯化。上样; 流洗; pH7.4、2.5M PBS 流洗,冲至 UV280 基线为 0; 洗脱: pH3.5、0.1M 柠檬酸溶液,每段 2mL 收集洗脱管,每管加入 100uL 1M Tris 溶液; 浓缩收集液; 纯化后的单抗浓度测定、SDS-PAGE 胶核实抗体纯度; 分装(100uL/管),保存在 -80℃。

实施例 2 鼠单抗人源化设计及组合

鼠抗体轻链 CDR 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1~3 所示:

7A11D3D3-LCDR1	7A11D3D3-LCDR2	7A11D3D3-LCDR3
SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3
KSSQSLLNSRTRKNYLA	WASTRES	KQSYNLRT

鼠抗体重链 CDR 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:10~12 所示:

7A11D3D3-HCDR1	7A11D3D3-HCDR2	7A11D3D3-HCDR3
SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
SNWMN	MIHPDSETRLNQKFKD	GTTVVDAFAY

鼠抗体轻链可变区 (>7A11D3D3-VL) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

鼠抗体重链可变区 (>7A11D3D3-VH) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示。

对鼠抗体进行人源化设计, 7A11D3D3 鼠单抗轻链设计 5 条人源化序列, 分别为 7A11-L01~05, 人源化轻链可变区 (7A11-L01~05) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:5~9 所示; 重链设计 5 条人源化序列, 分别为 7A11-H01~05, 人源化重链可变区 (7A11-H01~05) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14~18 所示。

对以上氨基酸序列进行组合, 所得抗体及其重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 对应的序列如表 1 所示。

表 1 抗体及其重链可变区和轻链可变区对应的序列

抗体名称	VH	VL
7A11H11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 5
7A11H12	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 6
7A11H22	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 6
7A11H32	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 6
7A11H42	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 6
7A11H52	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 6
7A11H14	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 8
7A11H15	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 9
7A11H33	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 7
7A11H34	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 8
7A11H35	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 9
7A11H55	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 9

实施例 3 CD47 抗体的生产

将人源化可变结构域与分泌信号和人类 κ 以及人类 FcIgG4S228P 恒定结构域组合, 将其克隆到哺乳动物表达系统中, 并且转染到 293 细胞中以生成人源化 mAb。将人源化变体表达为全长 IgG 分子、分泌到培养基中并使用蛋白质 A 纯化。

在 Expi293 细胞中瞬时表达并纯化人源化抗体和阳性对照抗体 Hu5F9-G4 (Hu5F9-G4 序列已在美国专利 US2015/ 0183874A1 中公开)。

对于 Expi293 细胞中抗体的瞬时表达, 使用载体 pCDNA3.4, 首先将抗体的重链和轻链克隆到单独的 pCDNA3.4 载体中, 使用 PEI(购自 Polysciences)化学转染试剂、按照化学转染的方法将带有抗体分子重链和轻链的 pCDNA3.4 载体转入 Expi293 细胞中, 按照生产商提供的方案瞬时转染培养的 Expi293 细

胞。

瞬时转染前一天 Expi293 (ThermoFisher Scientific; A14635) 细胞传代, 用 Dynamis 培养基 (gibco; A2617502) 按 2E6 的密度接种 1L 摇瓶 (conning; 431147), 放入细胞培养摇床 (Adolf Kuhner; ISF4-XC) 中 37°C; 8%CO₂; 120rpm 培养;

转染当天, Expi293 细胞用细胞计数仪 (Countstar; IC1000) 计数, 用新鲜 Dynamis 培养稀释调整细胞密度为 2.9E6; 准备转染; PEI: DNA =3:1; 混匀 5min, 将二者轻柔混匀 20 次, 静置 15~30min。将 DNA-PEI 混合物加入 Expi293 细胞中, 混匀, 放入细胞培养摇床 (Adolf Kuhner; ISF4-XC) 中 37°C; 8%CO₂; 120rpm 培养; 转染 4h 之后补加双抗 (gibco; 15140122) 和抗凝剂 (gibco; 0010057);

收获上清纯化: 转染连续培养 7 天, 之后收样, 先低速 1000rpm; 10min; 4°C 离心(湘仪 H2050R), 再高速 12000rpm; 30min; 4°C; 收集细胞培养上清, 0.22um 过滤。将培养上清应用于 Protein A Sepharose 柱(GE Healthcare)。柱用 PBS 洗涤, 然后用洗脱缓冲液(0.1M 柠檬酸钠缓冲液, pH 3.0)洗脱蛋白质。收集的组分用 1M Tris pH9.0 中和。最后, 将纯化的样品与 PBS 进行透析。

实施例 4 CD47 抗体亲和力测定

1、实验方法

采用生物膜干涉技术 (ForteBio)测定本公开抗体结合人 CD47(hCD47)的平衡解离常数 (KD)。ForteBio 亲和力测定按照现有的方法(Estep, P 等人, High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning.MAbs; 2013.5(2): p.270-8)进行, 具体为: 传感器在分析缓冲液中线下平衡 30 分钟, 然后线上检测 60 秒建立基线, 在线加载实施例 3 获得的经纯化的抗体至 AHC 传感器(ForteBio)上进行 ForteBio 亲和测量, 再将具有加载的抗体的传感器暴露于 100nM 的 CD47 抗原中作用 5 分钟, 之后将传感器转移至分析缓冲液解离 5 分钟用于解离速率测量。使用 1: 1 结合模型进行动力学的分析。

2、实验结果

CD47 抗体亲和力测定结果如表 2 所示, 结果显示 CD47 抗体具有高亲和力。

表 2 CD47 抗体亲和力测定结果

抗体名称	KD (M)	kon(1/Ms)	kd(1/s)
7A11H11	5.90E-10	5.90E-10	5.90E-10
7A11H12	4.59E-10	4.59E-10	4.59E-10
7A11H14	5.62E-10	5.62E-10	5.62E-10
7A11H15	2.12E-10	1.48E+06	3.13E-04
7A11H35	8.81E-10	8.81E-10	8.81E-10
7A11H22	7.40E-10	7.40E-10	7.40E-10
7A11H33	3.60E-10	3.60E-10	3.60E-10
7A11H42	3.09E-10	3.09E-10	3.09E-10

实施例 5 CD47 抗体与人 CD47 的结合

1、实验方法

在基于流式细胞术的测定法中测量本公开 CD47 抗体与人 CD47 的结合。具体步骤为：

采用表达人 CD47 的癌细胞系 CCRF-CEM(上海中国科学院细胞库)属于人急性淋巴细胞白血病 T 淋巴细胞。将 CCRF-CEM 细胞(0.1×10^6 个细胞)与不同浓度（最高浓度为 30ug/mL，三倍稀释，共 10 个浓度）的实验抗体(本公开 CD47 抗体以及 Hu5F9-G4 抗体)，在含 3%牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 中，冰上孵育 30 分钟。然后将细胞洗涤至少两次，用 FCM buffer (1XPBS+3%BSA) 配制 PE Goat anti human IgG Fc (1:500x 稀释) 荧光二抗，按 100uL/孔加入对于的 96 孔板中，4 度冰箱孵育 30min。取出 96 孔板，250g 离心 5min，小心去上清后，加入 FCM buffer 200uL/孔，再次 250g 离心 5min，小心去上清，将细胞洗涤至少两次用 1xPBS 100uL /孔重悬，并通过流式细胞术进行分析，并根据其 MFI 用 GraphPad 拟合浓度依赖的曲线。以 Hu5F9-G4 抗体作为阳性对照抗体。

2、实验结果

CD47 抗体与人 CD47 结合的 EC50 结果如表 3 所示，CD47 抗体（7A11H11、7A11H12、7A11H22、7A11H32、7A11H42、阳性对照抗体 Hu5F9-G4 和 hIgG4-同型对照）与人 CD47 结合的平均荧光强度如图 1 所示，CD47 抗体（7A11H52、7A11H14、7A11H15、7A11H33、7A11H34、7A11H35、7A11H55、阳性对照抗体 Hu5F9-G4 和 hIgG4-同型对照）与人 CD47 结合的平均荧光强度如图 2 所示，结果显示，本公开 CD47 抗体与阳性对照抗体对细胞水平的人 CD47 具有相当的特异性结合能力。

表 3 CD47 抗体与人 CD47 的结合能力测定结果

抗体名称	EC50 (nM)
7A11H11	0.8218
7A11H12	0.7157
7A11H22	0.8202
7A11H32	0.7172
7A11H42	0.7269
7A11H52	0.9148
7A11H14	0.9334
7A11H15	0.7234
7A11H33	0.7598
7A11H34	1.195
7A11H35	0.8623
7A11H55	1.209
Hu5F9-G4	0.7289

实施例 6 CD47 抗体与猴 CD47 的结合

1、实验方法

通过转染携带全长猴 CD47 的 pCDNA3.4 载体，产生过表达猴 CD47 的 CHO 细胞稳定细胞株 (CHO-cynoCD47 细胞)，将 CHO-cynoCD47 细胞(0.1×10^6 个细胞) 与不同浓度（最高浓度为 10ug/mL，三倍稀释，共 10 个浓度）的实验抗体(本公开 CD47 抗体以及 Hu5F9-G4 抗体)，在含 3%牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 中，冰上孵育 30 分钟。然后将细胞洗涤至少两次，用 FCM buffer (1XPBS+3%BSA) 配制 PE Goat anti human IgG Fc (1:500x 稀释) 荧光二抗，按 100uL/孔加入对于的 96 孔板中，4 度冰箱孵育 30min。

取出 96 孔板, 250g 离心 5min, 小心去上清后, 加入 FCM buffer 200uL/孔, 再次 250g 离心 5min, 小心去上清, 将细胞洗涤至少两次用 1x PBS 100uL/孔重悬, 并通过流式细胞术进行分析, 并根据其 MFI 用 GraphPad 拟合浓度依赖的曲线。以 Hu5F9-G4 抗体作为阳性对照抗体。

2、实验结果

CD47 抗体与猴 CD47 结合的 EC50 结果如表 4 所示, CD47 抗体 (7A11H11、7A11H12、7A11H22、7A11H32、7A11H42、7A11H52、阳性对照抗体 Hu5F9-G4 和 hIgG4-同型对照) 与猴 CD47 结合的平均荧光强度如图 3 所示, CD47 抗体 (7A11H14、7A11H15、7A11H33、7A11H34、7A11H35、7A11H55、阳性对照抗体 Hu5F9-G4 和 hIgG4-同型对照) 与猴 CD47 结合的平均荧光强度如图 4 所示, 结果显示, 本公开抗体与阳性对照抗体对细胞水平形式猴具有相当的特异性结合能力。

表 4 CD47 抗体与猴 CD47 结合的 EC50 结果

抗体名称	EC50 (nM)
7A11H11	8.932
7A11H12	7.353
7A11H22	8.546
7A11H32	17.12
7A11H42	5
7A11H52	4.506
7A11H14	4.957
7A11H15	7.271
7A11H33	4.847
7A11H34	8.609
7A11H35	4.379
7A11H55	4.616
Hu5F9-G4	5.123

实施例 7 CD47 抗体对人 CD47 配体 SIRP α 与 CD47 相互作用的阻断

1、实验方法

通过流式细胞术测定本公开 CD47 抗体阻断人 CD47 与 SIRP α 的结合能力。具体步骤为:

抗体稀释: 用 FCM buffer (1XPBS+3%BSA) 将本公开 CD47 抗体和对照抗体 Hu5F9-G4 稀释成 90ug/mL, 然后 3 倍梯度稀释成 10 个浓度, 将亚型对照 hIgG4 稀释成 30ug/mL、1.1 ug/mL、0.04 ug/mL, 配体 hSIRP α -mFC (AcroBiosystems) 稀释至 10ug/mL。

将 CCRF-CEM(上海中国科学院细胞库)细胞按 0.1×10^6 个细胞/孔加入到 96 孔 V 型板, 并且在 CD47 抗体量增加条件下监控 hSIRP α -mFC 结合。使用 PE Goat anti mouse IgG Fc 二抗(Biolegend)确定结合的 SIRP α 。以 Hu5F9-G4 抗体作为阳性对照抗体。

2、实验结果

CD47 抗体 (7A11H11、7A11H12、7A11H22、7A11H32、7A11H42、Hu5F9-G4 和 hIgG4-同型对照) 对人 CD47 的 CD47/SIRP α 结合抑制结果如图 5 所示, CD47 抗体 (7A11H52、7A11H14、7A11H15、7A11H33、7A11H34、7A11H35、7A11H55) 对人 CD47 的 CD47/SIRP α 结合抑制结果如图 6 所示, 结果显示, 本公开 CD47 抗体能够在细胞水平显著抑制阻断 CD47 与 SIRP α 的结合, 与阳性对照抗体相比,

本公开 CD47 抗体表现出相当的阻断能力。

实施例 8 CD47 抗体促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞能力的检测

1、实验方法

在基于流式细胞术的测定法中测定本公开 CD47 抗体促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力。具体步骤为：

取捐赠者的新鲜血液，分离得到外周血单核细胞(PBMC)，并通过 hCD14 磁珠(Miltenyi/130-050-201)从 PBMC 中分离 CD14 阳性单核细胞，配置含 rhGM-CSF(R&D; 7954-GM-010)的完全培养基，rhGM-CSF 终浓度为 50ng/mL，CD14 阳性单核细胞的浓度为 5E5/mL，按 20mL/皿加入到细胞培养皿中；转移至 5% CO₂ 37℃细胞培养箱中，每 3 天对半更换新鲜培养基；(含 50ng/mL GM-CSF)继续培养 4 天。在第 8 天将巨噬细胞上清吸到 15mL 离心管中，同时加入预冷的 DPBS，直接用细胞刮刀收集细胞；

选择人 CD47 高表达的肿瘤细胞系 Jurkat(上海中国科学院细胞库)作为靶细胞类型，将靶肿瘤细胞按照 CellTrace™ CFSE 试剂盒的说明，进行荧光标记。将标记好的肿瘤细胞与上述已经完成分化的巨噬细胞按照 1: 1 的比例共培养，同时加入终浓度 10ug/mL、1ug/mL、0.1ug/mL 抗体在 37℃孵育 2 小时。然后将细胞洗涤至少两次，将细胞小心吹下，加入别藻青蛋白 (allophycocyanin, APC)标记的 CD14 抗体(购自 Biolegend; B259538)，在含 0.1%BSA 的 PBS 中冰上(避光)孵育 30 分钟。将细胞洗涤至少两次并通过流式细胞术进行分析。被吞噬的细胞群体为活细胞中 CD14 阳性并且荧光染料 CFSE(carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester, 羧基荧光素双乙酸盐，琥珀酰亚胺酯)也为阳性的细胞群体。以 Hu5F9-G4 抗体作为阳性对照抗体。

2、实验结果

CD47 抗体促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力测定结果如图 7 所示，结果显示，本公开 CD47 抗体具有促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力，且促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力与阳性对照抗体 Hu5F9-G4 的能力相当。

实施例 9 CD47 抗体对人类红细胞(RBC)血凝集分析

1、实验方法

进行红细胞血凝集分析来表征 CD47 抗体的 RBC 凝集能力。通过观察抗体避免人 RBC 发生沉降的能力就 RBC 凝集对 CD47 抗体进行筛选。具体方法为：

人类红细胞在 PBS 中稀释到 2%，与滴入的 CD47 抗体(浓度依次为 200ug/mL、100ug/mL、50ug/mL、25ug/mL、12.5ug/mL、6.25ug/mL、1.5625ug/mL、0.78125ug/mL、0.390625ug/mL、0.195313ug/mL、0.097656ug/mL)在圆底 96 孔板内在 37℃孵育 2 小时。未沉淀的红细胞的存在是证明红细胞血凝集的证据，与未凝集的红细胞沉淀形成清晰的红点相比，未沉淀的红细胞呈雾状。以 Hu5F9-G4 抗体作为阳性对照抗体。

2、实验结果

CD47 抗体的 RBC 凝集能力测定结果如图 8 所示，结果显示，当 CD47 抗体浓度达到 200ug/mL 时

均未引起细胞凝聚,表明本公开 CD47 抗体具有显著降低红细胞血凝聚的作用,CD47 抗体在临床治疗癌症中能够显著降低其副作用、安全性好。

实施例 10 CD47 抗体与人类红细胞(RBC)结合分析

1、实验方法

CD47 单抗存在与人类红细胞结合的特性,对 CD47 抗体抑制剂来说,存在药效受红细胞干扰及肿瘤脱靶的潜在风险。若能筛选到与红细胞结合活性低的抗体则能够降低脱靶的风险,提高其安全性。具体步骤如下:

(1) 抗体稀释:用 FACS buffer 将 CD47 抗体稀释成初始浓度 20 μ g/mL,体积 180 μ L,3 倍梯度稀释(60+120),11 个浓度;

(2) 细胞计数并铺板:将 RBC 细胞离心 250g 5min 后弃去上清,用 FACS buffer 调整细胞密度为 2E+06,按 100 μ L/管均分到 96 孔 V 型板中;

(3) 将上述稀释好的抗体加入细胞中,100 μ L/孔,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 孵育 0.5h;

(4) 取出 96 孔板,250g 离心 5min,小心去上清后,加入 FACS buffer 200 μ L/孔,再次 250g 离心 5min,小心去上清;

(5) 用 FACS buffer 配制 PE goat anti-human IgG Fc(biolegend) 荧光二抗(1:500 稀释),按 100 μ L/孔加入对应的 96 孔板中,重悬细胞,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 孵育 30min;

(6) 取出 96 孔板,250g 离心 5min,小心去上清后,加入 FACS buffer 200 μ L/孔,再次 250g 离心 5min,小心去上清;

(7) 用 1xPBS 100 μ L/孔重悬,FACS 检测。使用流式细胞仪(Beckman, cytoflex)分析数据,GraphPad Prism 作图。以 Hu5F9-G4 抗体作为阳性对照抗体。

2、实验结果

CD47 抗体与人类红细胞结合能力的测定结果如图 9 所示,结果显示,与阳性对照抗体相比,本公开 CD47 抗体与人类红细胞的结合活性显著降低,其作为药物时的安全性提高。

实施例 11 CD47 抗体与血小板结合分析

1、实验方法

同 CD47 单抗结合人类红细胞一样,CD47 单抗存在与血小板结合的活性特征,存在血小板降低带来的诸多副作用。与血小板结合低的抗体能够降低脱靶的风险,提高其安全性。具体方法如下:

抗体稀释:用 FACS buffer 将抗体稀释成 20 μ g/ml,体积 240 μ L;

细胞计数并铺板:将全血细胞稀释 20 倍,按 100 μ L/管均分到 96 孔 V 型板中;

将上述稀释好的抗体加入到细胞中,100 μ L/孔,2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C 孵育 0.5h;

取出 96 孔板,250g 离心 5min,小心去上清后,加入 FACS buffer 200 μ L/孔,再次 250g 离心 5min,小心去上清;

用 FACS buffer 配制 PE 荧光二抗 1:500 稀释(PE goat anti-human IgG Fc; biolegend; 409304),按

100ul/孔加入对于的 96 孔板中，同时每孔中加入 1ul APC anti human CD61 (biolegend; 336411),重悬细胞，2℃-8℃孵育 30min;

取出 96 孔板，250g 离心 5min，小心去上清后，加入 FACS buffer 200ul/孔，再次 250g 离心 5min，小心去上清;

用 1xPBS 200uL /孔重悬，FACS 检测。以 Hu5F9-G4 抗体作为阳性对照抗体。

2、实验结果

CD47 抗体与血小板结合分析结果如图 10 所示，结果显示本公开的 CD47 抗体与血小板的结合活性显著低于阳性对照抗体，显示出了更优的安全性。

实施例 12 CD47 抗体对激活巨噬细胞吞噬红细胞的作用分析

1、实验方法

检测方法同实施例 8，将红细胞替换为肿瘤细胞作为靶细胞，检测本公开的 CD47 抗体是否对巨噬细胞吞噬红细胞存在激活作用。以 Hu5F9-G4 抗体作为阳性对照抗体。

2、实验结果

CD47 抗体对激活巨噬细胞吞噬红细胞的作用分析结果如图 11 所示，结果显示本公开的 CD47 抗体极低介导巨噬细胞对红细胞的吞噬，且介导作用明显低于阳性对照抗体，显示出了更优的安全性。

实施例 13 抗肿瘤活性分析

1、实验方法

选用 70 只 NOD SCID 雌性小鼠（购于浙江维通利华实验动物技术有限公司）构建人 B 淋巴细胞皮下移植瘤模型（Raji）和人恶性黑色素瘤模型（A375），评估本公开的 CD47 抗体的抗肿瘤活性。以 Hu5F9-G4 抗体和 TJC-4 抗体作为阳性对照抗体，hIgG4 为同型对照抗体。

2、实验结果

CD47 抗体对人 B 淋巴细胞皮下移植瘤模型的抗肿瘤结果如图 12 所示，结果显示本公开的 CD47 抗体在抗人 B 淋巴细胞皮下移植瘤效果上显著好于阳性对照抗体。

CD47 抗体对人恶性黑色素瘤模型的抗肿瘤结果如图 13 所示，结果显示与阳性对照抗体相比，本公开的 CD47 抗体在抗人恶性黑色素瘤效果上更加有优势。

上述实施例为本公开较佳的实施方式，但本公开的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本公开的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本公开的保护范围之内。

权利要求书

1. 抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体含有以下 CDRs：

如 SEQ ID NO:1 或与 SEQ ID NO:1 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 LCDR1，如 SEQ ID NO:2 或与 SEQ ID NO:2 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 LCDR2，如 SEQ ID NO:3 或与 SEQ ID NO:3 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 LCDR3；

如 SEQ ID NO:10 或与 SEQ ID NO:10 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO:11 或与 SEQ ID NO:11 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 HCDR2，如 SEQ ID NO:12 或与 SEQ ID NO:12 具有至少 95%同源性的氨基酸序列所示的 HCDR3。

2. 根据权利要求 1 所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体含有重链可变区序列和轻链可变区序列的至少之一，所述重链可变区序列和轻链可变区序列的至少之一的至少一部分来自鼠源抗体、人源化抗体、灵长目源抗体或其突变体的至少之一。

3. 根据权利要求 2 所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:5~9 任一项所示或与 SEQ ID NO:5~9 任一项所示具有至少 95%同源性的序列。

4. 根据权利要求 2 所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:14~18 任一项所示或与 SEQ ID NO:14~18 任一项所示具有至少 95%同源性的序列。

5. 根据权利要求 2-4 任一项权利要求所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:17 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示；或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示、重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示。

6. 根据权利要求 1-5 任一项权利要求所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体具有恒定区，重链恒定区选自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE 或 IgD 中的任一种；轻链恒定区为 κ 或 λ 链。

7. 根据权利要求 6 所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述恒定区的种属来源选自鼠、兔、羊、猴、或人。

8.根据权利要求 1-7 任一项权利要求所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体为 CDR 移植抗体、多聚体抗体或双特异性抗体中的任一种或几种。

9.根据权利要求 1-8 任一项权利要求所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗原结合片段为 F(ab')₂、Fab、scFv、Fv 及单域抗体中的任一种或几种。

10.根据权利要求 1-9 任一项权利要求所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述 CD47 为人 CD47、鼠 CD47 或猴 CD47。

11.核酸,其特征在于,所述核酸编码权利要求 1~10 任一所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段。

12.载体,其特征在于,所述载体包含权利要求 11 所述核酸。

13.细胞,其特征在于,所述细胞包含权利要求 11 所述核酸或权利要求 12 所述载体。

14.药物组合物,其特征在于,所述组合物含有权利要求 1~10 任一所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段、权利要求 11 所述核酸、权利要求 12 所述载体或权利要求 13 任一所述细胞。

15.根据权利要求 14 所述药物组合物,其特征在于,所述组合物还含有药学可接受的载体。

16.权利要求 1~10 任一所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段、权利要求 11 所述核酸、权利要求 12 所述载体、权利要求 13 所述细胞或权利要求 14 所述组合物在制备治疗和/预防 CD47 阳性肿瘤的药物中的应用。

17. 根据权利要求 16 所述应用,其特征在于,所述药物能够降低红细胞血凝集。

18. 根据权利要求 16 所述应用,其特征在于,所述药物能够降低其与红细胞的结合活性。

19.权利要求 1~10 任一所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段、权利要求 11 所述核酸、权利要求 12 所述载体或权利要求 13 所述细胞在制备检测 CD47 或诊断 CD47 相关疾病的试剂盒中的应用。

20.一种检测 CD47 的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有权利要求 1~10 任一所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段。

21.一种诊断 CD47 相关疾病的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有权利要求 1~10 任一所述抗 CD47 抗体或其抗原结合片段。