



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110538321 B

(45) 授权公告日 2023. 03. 10

(21) 申请号 201910449015.9

A61K 47/26 (2006.01)

(22) 申请日 2019.05.28

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110538321 A

(43) 申请公布日 2019.12.06

(66) 本国优先权数据

201810530100.3 2018.05.29 CN

(73) 专利权人 江苏恒瑞医药股份有限公司

地址 222047 江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号

专利权人 上海恒瑞医药有限公司

(72) 发明人 田晨敏 李皓 刘洵

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/04 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2014363442 A1, 2014.12.11

CN 106084052 A, 2016.11.09

US 2017081407 A1, 2017.03.23

CN 107955071 A, 2018.04.24

WO 2007133811 A2, 2007.11.22

US 2013142786 A1, 2013.06.06

周洁 等. CD47-SIRP α 在人类红细胞老化与吞噬过程中的作用. 《现代免疫学》. 2011, 第31卷(第5期),

HitoshiYoshida 等. Integrin-associated protein/CD47 regulates motile activity in human B-cell lines through CDC42. 《Blood》. 2000, 第96卷(第1期),

审查员 张冲

权利要求书3页 说明书25页

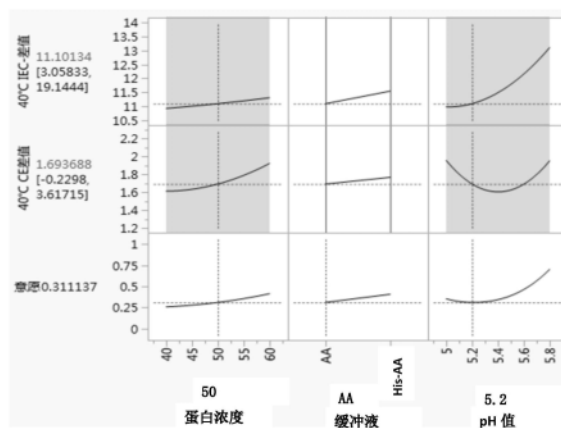
序列表20页 附图1页

(54) 发明名称

一种CD47抗体药物组合物及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种CD47抗体药物组合物及其用途。具体而言, 本发明涉及一种药物组合物, 其包含在醋酸(钠)缓冲液中的CD47抗体或其抗原结合片段。除此之外, 该药物组合物还包含糖和非离子型表面活性剂。本发明中的药物组合物在储存数月之后展现了很高的抗体稳定性。



1. 一种药物组合物,其包含CD47抗体或其抗原结合片段,以及缓冲剂,所述缓冲剂选自醋酸盐、组氨酸盐、琥珀酸盐和磷酸盐缓冲剂;所述缓冲剂的pH为5.0至6.5;

其中所述CD47抗体或其抗原结合片段选自:

(1) CD47抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10所示的重链HCDR1、HCDR2和HCDR3;和

如SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13所示的轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3;和

(2) CD47抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16所示的重链HCDR1、HCDR2和HCDR3;和

如SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19所示的轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述缓冲剂为醋酸盐缓冲剂。

3. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述缓冲剂的pH为5.0至5.8。

4. 根据权利要求3所述的药物组合物,其中所述缓冲剂的pH为5.0至5.4。

5. 根据权利要求3所述的药物组合物,其中所述缓冲剂的pH为5.2。

6. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述的醋酸盐缓冲剂选自醋酸-醋酸钠缓冲剂;所述的组氨酸盐缓冲剂选自组氨酸-醋酸缓冲剂或组氨酸-盐酸缓冲剂;所述的琥珀酸盐缓冲剂选自琥珀酸-琥珀酸钠缓冲剂;所述磷酸盐缓冲剂选自磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲剂。

7. 根据权利要求6所述的药物组合物,其中所述的醋酸盐缓冲剂选自醋酸-醋酸钠缓冲剂。

8. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述缓冲剂浓度为5mM至30mM。

9. 根据权利要求8所述的药物组合物,其中所述缓冲剂浓度为5mM至20mM。

10. 根据权利要求8所述的药物组合物,其中所述缓冲剂浓度为10mM。

11. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述CD47抗体或其抗原结合片段浓度为1mg/ml至100mg/ml。

12. 根据权利要求11所述的药物组合物,其中所述CD47抗体或其抗原结合片段浓度为40mg/ml至60mg/ml。

13. 根据权利要求11所述的药物组合物,其中所述CD47抗体或其抗原结合片段浓度为50mg/ml。

14. 根据权利要求1所述的药物组合物,其还包括糖。

15. 根据权利要求14所述的药物组合物,其中所述糖为海藻糖或蔗糖。

16. 根据权利要求14所述的药物组合物,其中所述糖为蔗糖。

17. 根据权利要求14所述的药物组合物,其中所述糖浓度为60mg/ml至90mg/ml。

18. 根据权利要求17所述的药物组合物,其中所述糖浓度为60mg/ml至80mg/ml。

19. 根据权利要求17所述的药物组合物,其中所述糖浓度为80mg/ml。

20. 根据权利要求1所述的药物组合物,其还包括表面活性剂。

21. 根据权利要求20所述的药物组合物,其中所述表面活性剂为聚山梨酯。

22. 根据权利要求20所述的药物组合物,其中所述表面活性剂为聚山梨酯80。

23. 根据权利要求20所述的药物组合物,其中表面活性剂的浓度为0.2mg/ml至0.8mg/ml。

24. 根据权利要求23所述的药物组合物,其中表面活性剂的浓度为0.4mg/ml至0.6mg/ml。

25. 根据权利要求23所述的药物组合物,其中表面活性剂的浓度为0.6mg/ml。

26. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中包含:

(a) 1mg/ml至100mg/ml的CD47抗体或其抗原结合片段,

(b) 5mM至30mM的醋酸盐缓冲剂,pH为5.0至5.8,

(c) 50mg/ml至100mg/ml的蔗糖,和

(d) 0.2mg/ml至0.8mg/ml的聚山梨酯80。

27. 根据权利要求1所述的药物组合物,其包含

(a) 40mg/ml至60mg/ml的CD47抗体或其抗原结合片段,

(b) 5mM至20mM的醋酸-醋酸钠缓冲剂,pH为5.0至5.8,

(c) 60mg/ml至90mg/ml的蔗糖,和

(d) 0.4mg/ml至0.6mg/ml的聚山梨酯80。

28. 根据权利要求27所述的药物组合物,其中醋酸-醋酸钠缓冲剂pH为5.0至5.4。

29. 根据权利要求1所述的药物组合物,其包含

(a) 50mg/ml的CD47抗体或其抗原结合片段,

(b) 10mM的醋酸-醋酸钠缓冲剂,pH为5.0至5.8,

(c) 80mg/ml的蔗糖,和

(d) 0.6mg/ml的聚山梨酯80。

30. 根据权利要求29所述的药物组合物,其中醋酸-醋酸钠缓冲剂pH为5.0至5.4。

31. 根据权利要求29所述的药物组合物,其中醋酸-醋酸钠缓冲剂pH为5.2。

32. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述CD47抗体或其抗原结合片段为鼠源、嵌合或人源化的抗体或其抗原结合片段。

33. 根据权利要求32所述的药物组合物,其中所述鼠源CD47抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO:4所示的重链可变区和如SEQ ID NO:5所示的轻链可变区,或包含如SEQ ID NO:6所示的重链可变区和如SEQ ID NO:7所示的轻链可变区。

34. 根据权利要求32所述的药物组合物,其中所述的人源化CD47抗体或其抗原结合片段的重链可变区上的重链FR区序列选自人种系重链IGHV1-3*01和hjh6.1的组合,或选自人种系重链IGHV1-2*02和hjh6.1的组合序列;

所述的人源化CD47抗体或其抗原结合片段的轻链可变区上的轻链FR区序列选自人种系轻链IGKV4-1*01和hjk2.1的组合,或选自人种系轻链IGKV1-39*01和hjk4.1的组合序列。

35. 根据权利要求34所述的药物组合物,其中所述的人源化CD47抗体或其抗原结合片段包含:

如SEQ ID NO:20所示的重链可变区,和如SEQ ID NO:21所示的轻链可变区;或

如SEQ ID NO:22所示的重链可变区,和如SEQ ID NO:23所示的轻链可变区。

36. 根据权利要求32所述的药物组合物,其中所述的嵌合或人源化CD47抗体包含:人源IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的重链恒定区,和人源 κ 、 λ 链的轻链恒定区。

37. 根据权利要求36所述的药物组合物,其中所述的嵌合或人源化CD47抗体包含:人源IgG4的重链恒定区,和人源 κ 链轻链恒定区。

38. 根据权利要求36所述的药物组合物,其中所述的嵌合或人源化CD47抗体包含:如SEQ ID NO:30所示的人源IgG4重链恒定区,和如SEQ ID NO:25所示的轻链恒定区。

39. 根据权利要求36所述的药物组合物,其中所述人源化CD47抗体或其抗原结合片段包含:如SEQ ID NO:26所示的重链氨基酸序列和如SEQ ID NO:27所示的轻链氨基酸序列;或包含如SEQ ID NO:28所示的重链氨基酸序列和如SEQ ID NO:29所示的轻链氨基酸序列。

40. 制备权利要求1所述的药物组合物的方法,包括将CD47抗体或其抗原结合片段溶液经缓冲液置换的步骤。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中所述的缓冲液为醋酸-醋酸钠缓冲液。

42. 根据权利要求40所述的方法,其中所述的缓冲液浓度为5mM至20mM。

43. 根据权利要求40所述的方法,其中所述的缓冲液pH为5.0至5.8。

44. 一种含CD47抗体或其抗原结合片段的冻干制剂,其中所述制剂通过将权利要求1至39任一项所述的药物组合物经冷冻干燥获得。

45. 一种含有CD47抗体或其抗原结合片段的复溶溶液,其中所述复溶溶液是通过将权利要求44所述的冻干制剂经复溶制备获得。

46. 一种含CD47抗体或其抗原结合片段的冻干制剂,其中所述制剂复溶后可形成权利要求1至39任一项所述的药物组合物。

47. 根据权利要求1至39任一项所述的药物组合物或权利要求44、46所述的冻干制剂或权利要求45所述的复溶溶液在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

48. 根据权利要求47所述的用途,其中所述癌症选自:卵巢癌、乳腺癌、肝癌、脑癌或血液学恶性肿瘤。

49. 根据权利要求47所述的用途,其中所述癌症为血液学恶性肿瘤,选自骨髓瘤、慢性白血病和急性白血病。

50. 一种制品,其包括容器,该容器中装有如权利要求1至39任一项所述的药物组合物或权利要求44、46所述的冻干制剂或权利要求45所述的冻干制剂的复溶溶液。

一种CD47抗体药物组合物及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于药物制剂领域,具体涉及一种包含CD47抗体或其抗原结合片段的药物组合物,以及其作为抗癌药物的用途。

背景技术

[0002] 随着人类对免疫系统和肿瘤发生机制上认识的深入,肿瘤免疫疗法已经日益成为人类对抗肿瘤的有力武器。

[0003] 肿瘤靶向单克隆抗体是肿瘤免疫治疗领域的重要手段之一。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“eat me”信号的激活,另一个是同一细胞表面“don't eat me”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“don't eat me”信号,它通过与巨噬细胞表面的SIRP- α 相互结合而抑制巨噬细胞的吞噬功能。

[0004] CD47是免疫球蛋白Ig超家族成员,其广泛表达于不同组织的细胞表面,比如红细胞、淋巴细胞、血小板、肝细胞。CD47在各种肿瘤细胞上有较高表达,有研究显示多种肿瘤细胞表面的CD47表达量比正常细胞平均高约3倍多。此外,癌细胞高表达CD47的患者相比于CD47低表达的患者具有更短的生存期。目前研究已经发现,阻断性抗CD47单克隆抗体在肿瘤治疗方面有着非常良好的效果,但是这一过程的作用机制尚不清楚。

[0005] CD47作为癌症治疗的靶点具有以下不可比拟的优势:

[0006] 1. 它广泛地表达于各类癌细胞表面,因此可以用于治疗各种类型的癌症;

[0007] 2. 正常细胞由于缺乏“eat me”信号,因此单单阻断CD47并不能引发巨噬细胞对正常细胞的吞噬效应。因此,CD47阻断剂的副作用十分小。前期的很多基础实验数据已经支持了这一观点。研究者通过小鼠异体肿瘤移植模型说明了CD47阻断的有效性与安全性。

[0008] 目前已有相关的CD47抗体专利,如W02016065329、W02016109415、W02014087248和W02014093678。可有效阻断CD47与SIRP- α 之间的结合并促进体内巨噬细胞对于肿瘤细胞的吞噬,具有良好的临床前景。

[0009] 但是,抗体药物的分子量大,结构复杂,容易降解、聚合或发生不希望发生的化学修饰等而变得不稳定。为了使抗体适合于给药,并且在储存及随后使用过程中能保持稳定性,发挥更好的效果,抗体药物的稳定制剂研究显得尤为重要。但是,目前对于CD47抗体的制剂研究的并不多,也没有针对CD47靶点的抗体药物上市。

[0010] 本发明提供一种更利于生产和给药,性能更稳定的包含CD47抗体或其抗原结合片段的药物组合物。

发明内容

[0011] 本发明提供一种药物组合物,其包含CD47抗体或其抗原结合片段,以及缓冲剂,所述缓冲剂选自醋酸盐、组氨酸盐、琥珀酸盐、磷酸盐缓冲剂,优选醋酸盐缓冲剂;所述缓冲剂的pH大约为5.0至6.5,优选pH大约为5.0至6.0。

[0012] 在可选的实施方案中,药物组合物中所述的醋酸盐缓冲剂选自醋酸-醋酸钠缓冲剂,所述的组氨酸盐缓冲剂选自组氨酸-醋酸缓冲剂或组氨酸-盐酸缓冲剂;所述的琥珀酸盐缓冲剂选自琥珀酸-琥珀酸钠缓冲剂;所述磷酸盐缓冲剂选自磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲剂;优选醋酸-醋酸钠缓冲剂。

[0013] 在可选的实施方案中,药物组合物中所述缓冲剂浓度为大约5mM至30mM,优选为大约5mM至20mM,非限制性实施例包括10mM、12mM、14mM、16mM、18mM、20mM,最优选为大约10mM。

[0014] 在可选的实施方案中,药物组合物中所述CD47抗体或其抗原结合片段浓度为大约1mg/ml至100mg/ml,优选为大约40mg/ml至60mg/ml;非限制性实施例包括42mg/ml、44mg/ml、46mg/ml、48mg/ml、50mg/ml、52mg/ml、54mg/ml、56mg/ml、58mg/ml、60mg/m,最优选为50mg/ml。

[0015] 在可选的实施方案中,药物组合物中所述缓冲剂的pH值约为5.0至6.5,优选为大约5.0至6.0,更优选为大约5.0至5.8、大约5.0至5.4、大约5.2至5.8,非限制的实施例包括约5.0、约5.1、约5.2、约5.3、约5.4、约5.5、约5.6、约5.7、约5.8、约5.9、约6.0、约6.5。

[0016] 进一步的,在可选的实施方案中,药物组合物还包含糖。本发明的“糖”包含常规组合物 $(CH_2O)_n$ 及其衍生物,包括单糖,二糖,三糖,多糖,糖醇,还原性糖,非还原性糖等等。可选自葡萄糖,蔗糖,海藻糖,乳糖,果糖,麦芽糖,右旋糖苷,甘油,赤藻糖醇,丙三醇,阿拉伯糖醇,sylitol,山梨糖醇,甘露醇,密里二糖,松三糖,蜜三糖,甘露三糖,水苏糖,麦芽糖,乳果糖,麦芽酮糖,山梨醇,麦芽糖醇,乳糖醇,异-麦芽酮糖等等。优选的糖是非还原性二糖,更优选为海藻糖或蔗糖,最优选为蔗糖。

[0017] 在可选的实施方案中,药物组合物中糖的浓度为约50mg/ml至约100mg/ml,更优选为约60mg/ml至约90mg/ml,非限制性实施例包括60mg/ml、65mg/ml、70mg/ml、75mg/ml、80mg/ml、85mg/ml、90mg/ml,最优选为80mg/ml。

[0018] 在可选的实施方案中,药物组合物还包含表面活性剂。可选自聚山梨酯20、聚山梨酯80、聚羟亚烃、Triton、十二烷基磺酸钠、月桂基磺酸钠、辛基糖甙钠、月桂基-磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油基-磺基甜菜碱、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基-肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油基-肌氨酸、硬脂基-肌氨酸、亚油基-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺基丙基-、柯卡酰胺基丙基-甜菜碱、亚油酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-甜菜碱、棕榈酰胺基丙基-甜菜碱、异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-甜菜碱、棕榈酰胺基丙基-二甲基胺、异硬脂酰胺基丙基-二甲基胺、甲基可可酰基钠、甲基油基牛磺酸钠、聚乙二醇、聚丙二醇、乙烯与丙烯二醇的共聚物等等。优选的表面活性剂是聚山梨酯80或聚山梨酯20,更优选为聚山梨酯80。

[0019] 在可选的实施方案中,药物组合物中表面活性剂的浓度为约0.2mg/ml至0.8mg/ml,更优选为0.4mg/ml至0.6mg/ml,非限制性实施例包括0.4mg/ml、0.45mg/ml、0.5mg/ml、0.55mg/ml、0.6mg/ml,最优选为0.6mg/ml。

[0020] 在可选的实施方案中,所述药物组合物包含:

[0021] (a) 1mg/ml至100mg/ml的CD47抗体或其抗原结合片段,

[0022] (b) 5mM至30mM的醋酸盐缓冲剂,pH约为5.0至5.8,优选pH大约为5.0至5.4,更优选pH大约为5.2,

[0023] (c) 50mg/ml至100mg/ml的蔗糖,和

- [0024] (d) 0.2mg/ml至0.8mg/ml的聚山梨酯80。
- [0025] 在可选的实施方案中,所述药物组合物包含:
- [0026] (a) 40mg/ml至60mg/ml的CD47抗体或其抗原结合片段,
- [0027] (b) 5mM至20mM的醋酸-醋酸钠缓冲剂,pH约为5.0至5.8,优选pH大约为5.0至5.4,更优选pH大约为5.2,
- [0028] (c) 60mg/ml至90mg/ml的蔗糖,和
- [0029] (d) 0.4mg/ml至0.6mg/ml的聚山梨酯80。
- [0030] 在可选实施方案中,所述药物组合物包含:
- [0031] (a) 50mg/ml的CD47抗体或其抗原结合片段;
- [0032] (b) 10mM的醋酸-醋酸钠缓冲液,pH约为5.5。
- [0033] 在可选在可选实施方案中,所述药物组合物包含:
- [0034] (a) 50mg/ml的CD47抗体或其抗原结合片段;
- [0035] (b) 10mM的组氨酸-盐酸缓冲液,pH约为6.0;
- [0036] (c) 80mg/ml的蔗糖。
- [0037] 在可选在可选实施方案中,所述药物组合物包含:
- [0038] (a) 50mg/ml的CD47抗体或其抗原结合片段;
- [0039] (b) 10mM的组氨酸-盐酸缓冲液,pH约为6.0;
- [0040] (c) 80mg/ml的海藻糖。
- [0041] 在可选在可选实施方案中,所述药物组合物包含:
- [0042] (a) 50mg/ml的CD47抗体或其抗原结合片段;
- [0043] (b) 10mM的组氨酸-盐酸缓冲液,pH约为6.0;
- [0044] (c) 0.6mg/ml的聚山梨酯80。
- [0045] 在可选的实施方案中,所述药物组合物包含:
- [0046] (a) 40mg/ml至60mg/ml的CD47抗体或其抗原结合片段,
- [0047] (b) 10mM的醋酸-醋酸钠缓冲剂,pH约为5.0至5.8,优选pH大约为5.0至5.4,优选pH约5.2至5.8,最优选pH为5.2,
- [0048] (c) 80mg/ml的蔗糖,和
- [0049] (d) 0.6mg/ml的聚山梨酯80。
- [0050] 在可选的实施方案中,所述药物组合物包含:
- [0051] (a) 50mg/ml的CD47抗体或其抗原结合片段,
- [0052] (b) 10mM的醋酸-醋酸钠缓冲剂,pH约为5.0至5.8,优选pH大约为5.0至5.4,优选pH约5.2至5.8,最优选pH为5.2,
- [0053] (c) 80mg/ml的蔗糖,和
- [0054] (d) 0.6mg/ml的聚山梨酯80。
- [0055] 在可选的实施方案中,药物组合物中所述的CD47抗体或其抗原结合片段选自:
- [0056] (1) CD47抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10所示的重链HCDR1、HCDR2和HCDR3,或与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10具有至少85%序列同一性的重链HCDR1、HCDR2和HCDR3;和/或
- [0057] 包含如SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13所示的轻链LCDR1、LCDR2和

LCDR3,或与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13具有至少85%序列同一性的轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3;和

[0058] (2) CD47抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16所示的重链HCDR1、HCDR2和HCDR3,或与SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16具有至少85%序列同一性的重链HCDR1、HCDR2和HCDR3;和/或

[0059] 包含如SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19所示的轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3,或与SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19具有至少85%序列同一性的轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0060] 在可选的实施方案中,药物组合物中所述的CD47抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10所示的重链HCDR1、HCDR2和HCDR3,且包含如SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13所示的轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3;或包含如SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16所示的重链HCDR1、HCDR2和HCDR3,且包含如SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19所示的轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0061] 在可选的实施方案中,药物组合物中所述的CD47抗体或其抗原结合片段为鼠源抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、人源化抗体或其抗原结合片段。

[0062] 在可选实施方案中,药物组合物中所述的所述鼠源CD47抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:4所示的重链可变区和SEQ ID NO:5所示的轻链可变区,或

[0063] 所述鼠源CD47抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:6所示的重链可变区和SEQ ID NO:7所示的轻链可变区。

[0064] 在可选实施方案中,药物组合物中所述的人源化CD47抗体或其抗原结合片段的重链可变区上的重链FR区序列选自人种系重链IGHV1-3*01和hjh6.1的组合及其突变序列,或选自人种系重链IGHV1-2*02和hjh6.1的组合序列及其突变序列;

[0065] 所述的人源化CD47抗体或其抗原结合片段的轻链可变区上的轻链FR区序列选自人种系轻链IGKV4-1*01和hjk2.1的组合及其突变序列,或选自人种系轻链IGKV1-39*01和hjk4.1的组合序列及其突变序列。

[0066] 在可选实施方案中,药物组合物中所述的人源化CD47抗体或其抗原结合片段的的可变区上的FR区包含0至10个氨基酸的回复突变。

[0067] 在可选实施方案中,药物组合物中所述的人源化CD47抗体或其抗原结合片段包含:如SEQ ID NO:20所示的重链可变区或其突变序列,和如SEQ ID NO:21所示的轻链可变区或其突变序列;或

[0068] 如SEQ ID NO:22所示的重链可变区或其突变序列,和如SEQ ID NO:23所示的轻链可变区或其突变序列。

[0069] 在可选实施方案中,药物组合物中所述的CD47抗体或其抗原结合片段包含的突变序列如下:

[0070] 如SEQ ID NO:21所示的轻链可变区的突变序列包含D66E突变;

[0071] 如SEQ ID NO:20所示的重链可变区的突变序列包含选自以下的突变:R72A、M48I、E46D、V68A、I70L、R38K、R67K、A97S及其组合;优选R72A、M48I、E46D、V68A、I70L及其组合;

[0072] 如SEQ ID NO:23所示的轻链可变区的突变序列包含选自以下的突变:V58I、I2V、M4I、Q38E、A43T、P44H及其组合;优选I2V、M4I及其组合;

[0073] 如SEQ ID NO:22所示的重链可变区的突变序列包含选自以下的突变:R72V、M48V、V68A、M70L、T74K、A40R、R38K、R67K及其组合。

[0074] 在可选的实施方案中,药物组合物中所述的嵌合CD47抗体或人源化CD47抗体的重链包含:

[0075] 人源IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的重链恒定区或其突变序列,和人源 κ 、 λ 链的轻链恒定区或其突变序列;

[0076] 优选地,所述嵌合或人源化CD47抗体的包含:人源IgG4的重链恒定区或其突变序列,和人源 κ 链轻链恒定区或其突变序列;

[0077] 更优选,所述嵌合或人源化CD47抗体包含:含有F234A和L235A突变的如SEQ ID NO:30所示的人源IgG4重链恒定区,和如SEQ ID NO:25所示的轻链恒定区。

[0078] 在可选的实施方案中,药物组合物中所述的人源化CD47抗体或其抗原结合片段包含:

[0079] 如SEQ ID NO:26所示的重链和SEQ ID NO:27所示的轻链;或如SEQ ID NO:28所示的重链和SEQ ID NO:29所示的轻链。

[0080] 本发明还提供制备前述药物组合物的方法,其中包括:CD47抗体或其抗原结合片段溶液经缓冲液置换的步骤,所述缓冲液优选醋酸盐缓冲液,更优选为醋酸-醋酸钠缓冲液,所述缓冲液浓度优选为大约5mM至20mM,非限制性实施例包括5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、12mM、14mM、16mM、18mM、20mM,更优选为10mM;所述缓冲液pH优选约为5.0至5.8,非限制性实施例包括5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8,优选大约为5.0至5.4,最优选pH为5.2

[0081] 本发明还提供制备前述药物组合物的方法,进一步地还包括向置换步骤所得溶液中加入蔗糖和聚山梨醇80,再经缓冲液定容的步骤,其中缓冲液浓度优选为大约5mM至20mM,非限制性实施例包括5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM;所述缓冲液优选pH约为5.0至5.8,更优选5.0至5.4,最优选pH为5.2,非限制性实施例包括5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8。

[0082] 本发明还提供一种制备包含CD47抗体或其抗原结合片段的冻干制剂的方法,其中包括将前述药物组合物经冷冻干燥的步骤。

[0083] 在可选的实施方案中,制备包含CD47抗体或其抗原结合片段的冻干制剂的方法中所述冷冻干燥依次包括预冻、一次干燥和二次干燥的步骤。

[0084] 本发明还提供一种经前述制备包含CD47抗体或其抗原结合片段的冻干制剂的方法制备的含CD47抗体的冻干制剂。

[0085] 在一些实施方案中,该冻干制剂于2-8°C稳定至少3个月,至少6个月,至少12个月,至少18个月或至少24个月。在一些实施方案中,该冻干制剂于40°C稳定至少7天,至少14天或至少28天。

[0086] 本发明还提供制备含有CD47抗体或其抗原结合片段的冻干制剂的复溶溶液的方法,其中包括将前述冻干制剂经复溶的步骤,其复溶所用溶液选自但不限于注射用水、生理盐水或葡萄糖溶液。

[0087] 本发明还提供一种经前述含有CD47抗体或其抗原结合片段的冻干制剂的复溶溶液的方法制备的含有CD47抗体或其抗原结合片段的冻干制剂的复溶溶液。

[0088] 本发明进一步提供一种制品或试剂盒,其包含装有本文所述任何稳定的药物组合物的容器。在一些实施方案中,该容器为中性硼硅玻璃管制注射剂瓶。

[0089] 本发明还提供前述的药物组合物或冻干制剂或冻干制剂的复溶溶液在制备用于治疗、抑制肿瘤细胞增殖或转移的疾病或病症的药物中的用途。优选地,所述疾病或病症为癌症,更优选地,所述癌症选自:卵巢癌、黑色素瘤、前列腺癌、肠癌、胃癌、食管癌、乳腺癌、肺癌、肾癌、胰腺癌、子宫癌、肝癌、膀胱癌、子宫颈癌、口腔癌、脑癌、睾丸癌、皮肤癌、甲状腺癌或血液学恶性肿瘤;更优选的,所述血液学恶性肿瘤选自骨髓瘤、慢性白血病和急性白血病。

[0090] 本发明还提供一种治疗、抑制肿瘤细胞增殖或转移的疾病或病症的方法,包括给予所需患者治疗有效量的前述药物组合物或冻干制剂或冻干制剂的复溶溶液。优选的,所述疾病或病症为癌症,更优选地,所述癌症选自:卵巢癌、黑色素瘤、前列腺癌、肠癌、胃癌、食管癌、乳腺癌、肺癌、肾癌、胰腺癌、子宫癌、肝癌、膀胱癌、子宫颈癌、口腔癌、脑癌、睾丸癌、皮肤癌、甲状腺癌或血液学恶性肿瘤;更优选的,所述血液学恶性肿瘤选自骨髓瘤、慢性白血病和急性白血病。

[0091] 本发明还提供一种制品,其包括容器,该容器中装有前述的药物组合物或冻干制剂或冻干制剂的复溶溶液。

[0092] 如本领域技术人员所熟知的,本公开中所述各个实施方案的一项、一些或所有特性可以进一步组合以形成本发明的其它实施方案。本发明的以上实施方案和通过组合得到的其他实施方案通过下面的详述进一步说明。

[0093] 术语的详细说明

[0094] 为了更容易理解本发明,以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义,本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

[0095] “缓冲剂”指通过其酸-碱共轭组分的作用而耐受pH变化的缓冲剂。将pH控制在适当范围中的缓冲剂的例子包括醋酸盐、琥珀酸盐、葡萄糖酸盐、组氨酸盐、草酸盐、乳酸盐、磷酸盐、枸橼酸盐、酒石酸盐、延胡索酸盐、甘氨酸甘氨酸和其它有机酸缓冲剂。

[0096] “组氨酸盐缓冲剂”是包含组氨酸根离子的缓冲剂。组氨酸盐缓冲剂的实例包括组氨酸-盐酸盐,组氨酸-醋酸盐,组氨酸-磷酸盐,组氨酸-硫酸盐等缓冲剂,优选组氨酸-醋酸盐缓冲剂或组氨酸-盐酸缓冲剂,组氨酸-醋酸盐缓冲剂是组氨酸与醋酸配制而成,组氨酸盐缓冲剂是组氨酸与盐酸配制而成。

[0097] “枸橼酸盐缓冲剂”是包括枸橼酸根离子的缓冲剂。枸橼酸盐缓冲剂的实例包括枸橼酸-枸橼酸钠、枸橼酸-枸橼酸钾、枸橼酸-枸橼酸钙、枸橼酸-枸橼酸镁等。优选的枸橼酸盐缓冲剂是枸橼酸-枸橼酸钠。

[0098] “琥珀酸盐缓冲剂”是包括琥珀酸根离子的缓冲剂。琥珀酸盐缓冲剂的实例包括琥珀酸-琥珀酸钠、琥珀酸-琥珀酸钾、琥珀酸-琥珀酸钙盐等。优选的琥珀酸盐缓冲剂是琥珀酸-琥珀酸钠。

[0099] “磷酸盐缓冲剂”是包括磷酸根离子的缓冲剂。磷酸盐缓冲剂的实例包括磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾、磷酸氢二钠-枸橼酸等。优选的磷酸盐缓冲剂是磷酸氢二钠-磷酸二氢钠。

[0100] “醋酸盐缓冲剂”是包括醋酸根离子的缓冲剂。醋酸盐缓冲剂的实例包括醋酸-醋酸钠、醋酸组氨酸盐、醋酸-醋酸钾、醋酸醋酸钙、醋酸-醋酸镁等。优选的醋酸盐缓冲剂是醋酸-醋酸钠。

[0101] “药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物,所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是保持抗体活性成分的稳定性,促进对生物体的给药,利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

[0102] 本文中,“药物组合物”和“制剂”并不互相排斥。

[0103] 本发明中所述药物组合物的溶液形式,若无特殊说明,其中的溶剂均为水。

[0104] “冻干制剂”表示液体或溶液形式的药物组合物或液体或溶液制剂经真空冷冻干燥步骤之后获得的制剂或药物组合物。

[0105] 本文所用术语“约”是指数值在由本领域一般技术人员所测定的具体值的可接受误差范围内,所述数值部分取决于怎样测量或测定(即测量体系的限度)。例如,在本领域每一次实行中“约”可意味着在1内或超过1的标准差。或者,“约”或“基本上包含”可意味着至多20%的范围。此外,特别对于生物学系统或过程而言,该术语可意味着至多一个数量级或数值的至多5倍。除非另外说明,否则当具体值在本申请和权利要求中出现时,“约”或“基本上包含”的含义应该假定为在该具体值的可接受误差范围内。

[0106] 本发明所述的药物组合物能够达到一种稳定的效果:其中的抗体在贮藏后基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性的药物组合物,优选地,药物组合物在贮藏后基本上保留其物理和化学稳定性以及其生物学活性。贮藏期一般基于药物组合物的预定保存期来选择。目前有多种测量蛋白质稳定性的分析技术,可测量在选定温度贮藏选定时间段后的稳定性。

[0107] 稳定的药物抗体制剂是在下述情况下没有观察到显著变化的制剂:在冷藏温度(2-8℃)保存至少3个月、优选6个月、更优选1年,且甚至更优选地多达2年。另外,稳定的液体制剂包括这样的液体制剂:其在包括25℃的温度保存包括1个月、3个月、6个月在内的时段后表现出期望的特征。稳定性的典型的可接受的标准如下:通过SEC-HPLC测得,通常不超过约10%、优选不超过约5%的抗体单体发生降解。通过视觉分析,药物抗体制剂是淡黄色近无色澄明液体或者无色,或澄清至稍微乳白色。所述制剂的浓度、pH和重量克分子渗透压浓度具有不超过±10%变化。通常观察到不超过约10%、优选不超过约5%的减少。通常形成不超过约10%、优选不超过约5%的聚集。

[0108] 如果在目检颜色和/或澄清度后,或者通过UV光散射、尺寸排阻色谱法(SEC)和动态光散射(DLS)测得,抗体没有显示出显著的聚集增加、沉淀和/或变性,那么所述抗体在药物制剂中“保留它的物理稳定性”。蛋白构象的变化可以通过荧光光谱法(其确定蛋白三级结构)和通过FTIR光谱法(其确定蛋白二级结构)来评价。

[0109] 如果抗体没有显示出显著的化学改变,那么所述抗体在药物制剂中“保留它的化学稳定性”。通过检测和定量化学上改变的形式蛋白,可以评估化学稳定性。经常改变蛋白化学结构的降解过程包括水解或截短(通过诸如尺寸排阻色谱法和SDS-PAGE等方法来评价)、氧化(通过诸如与质谱法或MALDI/TOF/MS结合的肽谱法等方法来评价)、脱酰胺作用(通过诸如离子交换色谱法、毛细管等电聚焦、肽谱法、异天冬氨酸测量等方法来评价)和异

构化(通过测量异天冬氨酸含量、肽谱法等来评价)。

[0110] 如果抗体在给定时间的生物活性是在制备药物制剂时表现出的生物活性的预定范围内,那么所述抗体在药物制剂中“保留它的生物活性”。抗体的生物活性可以例如通过抗原结合测定来确定。

[0111] 本发明所用氨基酸三字母代码和单字母代码如J.biol.chem,243,p3558(1968)中所述。

[0112] 本发明所述的“抗体”指免疫球蛋白,是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。

[0113] 在本发明中,本发明所述的抗体轻链可进一步包含轻链恒定区,所述的轻链恒定区包含人源或鼠源的 κ 、 λ 链或其变体。

[0114] 在本发明中,本发明所述的抗体重链可进一步包含重链恒定区,所述的重链恒定区包含人源或鼠源的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体。

[0115] 抗体重链和轻链靠近N端的约110个氨基酸的序列变化很大,为可变区(Fv区);靠近C端的其余氨基酸序列相对稳定,为恒定区。可变区包括3个高变区(HVR)和4个序列相对保守的骨架区(FR)。3个高变区决定抗体的特异性,又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(LCVR或VL)和重链可变区(HCVR或VH)由3个CDR区4个FR区组成,从氨基端到羧基端依次排列的顺序为:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。轻链的3个CDR区指LCDR1、LCDR2、和LCDR3;重链的3个CDR区指HCDR1、HCDR2和HCDR3。本发明所述的抗体或抗原结合片段的LCVR区和HCVR区的CDR氨基酸残基在数量和位置符合已知的Kabat编号规则(LCDR1-3,HCDR1-3)。

[0116] 本发明的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体,优选人源化抗体。

[0117] 本发明中所述的“抗体或其抗原结合”或“功能片段”,指具有抗原结合活性的Fab片段,Fab'片段,F(ab')₂片段,以及与抗体结合的Fv片段scFv片段。Fv片段含有抗体重链可变区和轻链可变区,但没有恒定区,并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般地,Fv抗体还包含在VH和VL结构域之间的多肽接头,且能够形成抗原结合所需的结构。也可以用不同的连接物将两个抗体可变区连接成一条多肽链,称为单链抗体(single chain antibody)或单链Fv(sFv)。

[0118] 本发明的术语“抗原结合位点”指抗原上不连续的,由本发明抗体或抗原结合片段识别的三维空间位点。

[0119] 术语“鼠源抗体”在本发明中为根据本领域知识和技能制备的对人CD47的单克隆抗体。制备时用CD47抗原注射试验对象,然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。

[0120] 术语“嵌合抗体(chimeric antibody)”,是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体,可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。建立嵌合抗体,要先建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤,然后从小鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因,再根据需要克隆人抗体的恒定区基因,将小鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入人载体中,最后在真核工业系统或原核工业系统中表达嵌合抗体分子。在本发明一个优选的实施方案中,所述的CD47嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区。所述的CD47嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体的重链恒

定区。人抗体的恒定区可选自人源IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其变体的重链恒定区,优选包含人源IgG2或IgG4重链恒定区,或者使用氨基酸突变后无ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity,抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用) 毒性的IgG4。

[0121] 术语“人源化抗体 (humanized antibody)”,也称为CDR移植抗体 (CDR-grafted antibody),是指将小鼠的CDR序列移植到人的抗体可变区框架,即不同类型的人种系抗体构架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量小鼠蛋白成分,从而诱导的强烈的异源性反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在“VBase”人种系序列数据库(在因特网www.mrccpe.com.ac.uk/vbase可获得),以及在Kabat, E. A. 等人,1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版中找到。为避免免疫原性下降的同时,引起的活性下降,可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变,以保持活性。本发明的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对CDR进行亲和力成熟后的人源化抗体。

[0122] 本发明中所述的“ADCC”,即antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity,抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用,是指表达Fc受体的细胞通过识别抗体的Fc段直接杀伤被抗体包被的靶细胞。可通过对IgG上Fc段的修饰,降低或消除抗体的ADCC效应功能。所述的修饰指在抗体的重链恒定区进行突变,如选自IgG1的N297A、L234A、L235A; IgG2/4嵌合体, IgG4的F234A/L235A突变。

[0123] 本公开中所述的“突变序列”中的“突变”包括但不限于“回复突变”、“保守修饰”或“保守置换或取代”。本公开中所述的“保守修饰”或“保守置换或取代”是指具有类似特征(例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等)的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸,使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓,一般而言,多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性(参见例如Watson等(1987)Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co.,第224页,(第4版))。另外,结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。

[0124] 本发明所述的“突变序列”是指对本发明的核苷酸序列和氨基酸序列进行适当的替换、插入或缺失等突变修饰情况下,得到的与本发明的核苷酸序列和氨基酸序列具有不同百分比序列同一性程度的核苷酸序列和氨基酸序列。本发明中所述的序列同一性可以至少为85%、90%或95%,优选至少为95%。非限制性实施例包括85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,100%。两个序列之间的序列比较和同一性百分比测定可以通过National Center For Biotechnology Institute网站上可得的BLASTN/BLASTP算法的默认设置来进行。

[0125] 术语“CD47”是一种广泛表达的细胞膜表面的免疫球蛋白,又称整合素相关蛋白。信号调节蛋白(singal regulatory protein, SIRP)是抑制性受体超家族的一个成员,属于免疫球蛋白超家族,主要表达于巨噬细胞、树突状细胞和神经细胞表面,通过细胞表面受配体接触调节细胞的迁移和吞噬活性、免疫自稳及神经元网络。CD47是人信号调节蛋白 α (SIRP α)的胞外配体,通过与巨噬细胞表面SIRP α 结合传导抑制性信号而降低吞噬活性,进而对固有免疫系统产生抑制作用,该信号被形象的描述为“don't eat me(别吃我)”信号。

[0126] 术语“与CD47结合”,指能与CD47相互作用。

[0127] 术语“抗CD47抗体”与“CD47抗体”意思相同,均指能与CD47结合的抗体。示例性的CD47抗体或抗原结合片段见本发明的实施例1-5所述,该示例性的CD47抗体或抗原结合片段同时描述于本发明的申请人申请的专利(PCT专利申请号:PCT/CN2017/113081,发明名称:CD47抗体、其抗原结合片段及其医药用途,对应中国同族专利申请号:CN201780016827.3),该专利申请的全文完整引入本发明。

[0128] 本公开中所述的融合蛋白是一种通过DNA重组,将得到的两个基因共表达的蛋白产物。重组CD47胞外区Fc融合蛋白通过DNA重组,把CD47胞外区和人抗体Fc片段共表达的融合蛋白。所述的CD47胞外区,是指CD47蛋白表达在细胞膜以外的部分,序列见SEQID NO:1。

[0129] 生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法在现有技术中熟知和能找到,如冷泉港的抗体实验技术指南,5-8章和15章。如,小鼠可以用人CD47或其片段免疫,所得到的抗体能被复性、纯化,并且可以用常规的方法进行氨基酸测序。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。本发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的CDR区加上一个或多个FR区。人FR种系序列可以从ImMunoGeneTics (IMGT)的网站<http://imgt.cines.fr>得到,或者从免疫球蛋白杂志,2001 ISBN012441351上获得。

[0130] 本发明工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如,编码重链和轻链的cDNA序列,可以克隆并重组至GS表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染CHO细胞。作为一种更推荐的现有技术,哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化,特别是在Fc区的高度保守N端位点。通过表达与人CD47特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如,用含调整过的缓冲剂的A或G Sepharose FF柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用pH梯度法洗脱结合的抗体,用SDS-PAGE检测抗体片段,收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体,也可以用常规方法去除,比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻,如-70℃,或者冻干。

[0131] “任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生,该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。例如,“任选包含1-3个抗体重链可变区”意味着特定序列的抗体重链可变区可以但不必须存在。

[0132] “给予”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时,是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触,以及试剂与流体的接触,其中所述流体与细胞接触。“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时,是指治疗处理、预防或预防性措施,研究和诊断应用。

[0133] “治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂,例如包含本发明的任一种结合化合物的组合物,所述患者具有一种或多种疾病症状,而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常,在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂,以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床可测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化,例如患者的疾病状态、年龄和体重,以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评

价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法,可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本发明的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解每个目标疾病症状方面可能无效,但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如Student t检验、卡方检验、依据Mann和Whitney的U检验、Kruskal-Wallis检验(H检验)、Jonckheere-Terpstra检验和Wilcoxon检验确定,其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

[0134] “有效量”包含足以改善或预防医学疾病的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定患者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化:例如,待治疗的病症、患者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

[0135] “T_m值”是指蛋白质热变性温度,即一半蛋白去折叠时的温度,此时蛋白的空间结构被破坏,所以T_m值越高,蛋白热稳定性越高。

[0136] “置换”是指溶解抗体蛋白的溶剂体系的置换,例如,使用稳定制剂的缓冲体系经物理操作方式将含抗体蛋白的高盐或高渗溶剂体系置换,从而使抗体蛋白存在于稳定制剂中。所称物理操作方式包括但不限于超滤、透析或离心后复溶。

[0137] “药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物,所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的之一是促进对生物体的给药,利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

附图说明

[0138] 图1.CD47抗体制剂成分JMP软件模型拟合结果。

具体实施方式

[0139] 实施例

[0140] 以下结合实施例进一步描述本公开,但这些实施例并非限制本公开的范围。本公开实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,如冷泉港的抗体技术实验手册,分子克隆手册;或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂,为市场购买的常规试剂。

[0141] 实施例1.CD47抗原及检测用蛋白的制备

[0142] 以UniProt Leukocyte surface antigen CD47(人CD47蛋白,Uniprot号:Q08722)作为CD47的模板,设计本公开涉及的抗原及检测用蛋白的氨基酸序列,可选的在CD47蛋白基础上融合不同的标签如His标签或Fc等。

[0143] 1.带His标签的CD47蛋白胞外域(CD47-ECD-His):

[0144] QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVPCFVTNMEAQNTTEVYVVKWFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKI
EVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI IELKYRVVSWFSPNEHHHHHHH (SEQ ID NO:1)。

[0145] 注释:划线部分为6×his标签。

[0146] 2.CD47胞外域与人IgG1Fc融合蛋白(CD47-ECD-Fc)作为免疫原及检测试剂:

[0147] QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVPCFVTNMEAQNTTEVYVVKWFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKI
EVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI IELKYRVVSWFSPNEEPKSSDKTHTCPPCAPPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:2)。

[0148] 注释:划线部分为人IgG1-Fc部分。

[0149] 3. 人SIRP α 与人IgG1Fc融合蛋白(SIRP α -Fc)作为结合及阻断检测试剂:

[0150] EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGP IQWFRGAGPARVLIYNQRQGPFPRVTTVSETTK
RENMDFSISISNITPADAGTYCYIKFRKGSPTDFKSGAGTELSVRAKPSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:3)。

[0151] 注释:划线部分为huamn-IgG1-Fc部分。

[0152] 实施例2.CD47、SIRP α 相关重组蛋白的纯化

[0153] 1. 带His标签的重组蛋白的纯化步骤:

[0154] 将细胞表达上清样品高速离心去除杂质,并将缓冲剂置换为PBS,加入咪唑至终浓度为5mM。用含有5mM咪唑的PBS溶液平衡镍柱,冲洗2-5倍柱体积。将置换后的上清样品上IMAC柱。用含有5mM咪唑的PBS溶液冲洗柱子,至A280读数降至基线。后用PBS+10mM咪唑冲洗层析柱,除去非特异结合的杂蛋白,并收集流出液。再用含有300mM咪唑的PBS溶液洗脱目的蛋白,并收集洗脱峰。收集的洗脱液浓缩后用凝胶层析Superdex200 (GE, 28-9893-35)进一步纯化,流动相为PBS。去除聚体峰,收集洗脱峰。所得到的蛋白经电泳、肽图、LC-MS鉴定为正确后,分装备用。

[0155] 得到带His标签的CD47-ECD-His (SEQ ID NO:1)用于本公开抗体的免疫原或检测试剂。CD47-ECD-His也可以通过体外化学法与KLH进行偶联反应后作为免疫原刺激小鼠免疫。

[0156] 2. CD47-ECD-Fc及SIRP α -Fc融合蛋白的纯化步骤:

[0157] 将细胞表达上清样品高速离心去除杂质,上清进行MabSelect Sure (GE, 17-5438-01)亲和层析。MabSelect Sure层析柱先用0.1M NaOH再生,利用纯水冲洗后用PBS平衡柱子,将上清结合后,利用PBS进行洗涤至A280读数降至基线。用0.1M醋酸缓冲剂在pH3.5条件下洗脱目的蛋白,用1M Tris-HCl中和。洗脱样品适当浓缩后利用PBS平衡好的凝胶层析Superdex200 (GE, 28-9893-35)进一步纯化,合并收集目的蛋白所在接收管浓缩至适当浓度。

[0158] 此方法用来纯化CD47-ECD-Fc (SEQ ID NO:2)及SIRP α -Fc (SEQ ID NO:3)融合蛋白,该方法也可以用来纯化本公开中涉及的人源化抗体蛋白。

[0159] 实施例3. 抗人CD47杂交瘤单克隆抗体的获得和制备

[0160] 1. 免疫

[0161] 抗人CD47单克隆抗体通过免疫小鼠产生。实验用SJL白小鼠,雌性,6周龄(北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2012-0001)。

[0162] 饲养环境:SPF级。小鼠购进后,实验室环境饲养1周,12/12小时光/暗周期调节,温度20-25 $^{\circ}$ C;湿度40-60%。将已适应环境的小鼠按不同方案免疫,每组6-10只。

[0163] 免疫抗原可以是CD47-ECD-Fc、CD47-ECD-His6、CD47-ECD-His6-KLH等,可以单独一种试剂配合不同的免疫佐剂或者不同类型免疫原交叉免疫。免疫部位可以是腹腔或者背

部皮下,或者两种位置交替免疫。示例性免疫方法如用弗氏佐剂(sigma Lot Num:F5881/F5506)乳化,首免用弗氏完全佐剂(CFA),其余加强免疫用弗氏不完全佐剂(IFA)。抗原与佐剂比例为1:1,100 μ g/只(首免),50 μ g/只(加强免疫)。第0天腹膜内(IP)注射100 μ g/只的乳化后抗原,首免后每两周一次,共6-8周。或用Titermax(sigma Lot Num:T2684)与Alum(Thremo Lot Num:77161)交叉免疫。抗原与佐剂(titermax)比例为1:1,抗原与佐剂(Alum)比例为3:1,10-20 μ g/只(首免),5 μ g/只(加强免疫)。第0天腹膜内注射20/10 μ g/只的乳化后抗原,首免后每周一次,Titermax和Alum交替使用,共6至11周。免疫四周后,根据背部结块和腹部肿胀情况,选择背部或腹膜内注射抗原。

[0164] 2. 细胞融合

[0165] 选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合,融合前72小时利用CD47-ECD-Fc腹腔注射冲刺免疫所选小鼠。采用优化的PEG介导的融合步骤将脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞Sp2/0细胞(ATCC[®] CRL-8287TM)进行融合得到杂交瘤细胞。融合好的杂交瘤细胞用HAT完全培养基(含20%FBS、1 \times HAT和1 \times OPI的RPMI-1640培养基)重悬,分装于96孔细胞培养板中(1 \times 10⁵/150 μ l/孔),37 $^{\circ}$ C,5%CO₂孵育。融合后的第5天加入HAT完全培养基,50 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂孵育。融合后第7天至8天,根据细胞生长密度,全换液,培养基为HT完全培养基(含20%FBS、1 \times HT和1 \times OPI的RPMI-1640培养基),200 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂孵育。

[0166] 3. 杂交瘤细胞筛选

[0167] 融合后第7-9天,根据细胞生长密度,进行结合CD47的ELISA方法检测。并将结合ELISA检测的阳性孔细胞进行CD47/SIRP α 结合的阻断ELISA检测,阳性孔换液,并根据细胞密度及时扩大至24孔板中。移入24孔板的细胞株经过复测后进行保种和第一次亚克隆。第一次亚克隆筛选为阳性的进行保种,并进行第二次或第三次亚克隆,直至获得单细胞克隆。多次融合获得有阻断CD47和SIRP α 结合效果的杂交瘤细胞。

[0168] 通过阻断实验和结合实验筛选得到杂交瘤克隆055和167,用无血清细胞培养法进一步制备抗体,按纯化实例纯化抗体,供在检测例中使用。

[0169] 测得杂交瘤克隆055的鼠抗可变区序列如下:

[0170] 克隆055的鼠源重链可变区序列:

[0171] QVLLQQSGPELVQPGASVKISCKASGYSFTSSYLHWVKQRPGQGLDWIGWIYPESGNTKYNERFKGKALTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCSR^RRGDVF^FFAYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:4)。

[0172] 克隆055的鼠源轻链可变区序列:

[0173] DIVMTQSPSYLTVTAGEKVTMSCKSSQSLTSGKQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPERFRGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLELN (SEQ ID NO:5)。

[0174] 注:顺序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,序列中斜体为FR序列,下划线为CDR序列。

[0175] 杂交瘤克隆167的鼠抗可变区序列如下:

[0176] 克隆167的鼠源重链可变区序列:

[0177] QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPIQGLEWVGNIDPSDSETHYNQKFKDKALTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWGYLGRSAMDYWGQTSVTVSS (SEQ ID NO:6)。

[0178] 克隆167的鼠源轻链可变区序列:

[0179] DVQITQSPSYLAASPGETITINCRTSKSISKFLAWYQEKP GKTHKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:7)。

[0180] 注：顺序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为FR序列，下划线为CDR序列。

[0181] 表1.各重链及轻链CDR区序列

克隆	重链		轻链	
[0182] 055	HCDR1	SSYLH (SEQ ID NO: 8)	LCDR1	KSSQSLLTSGKQKNYLT (SEQ ID NO: 11)
	HCDR2	WIYPESGNTKYNERFKG (SEQ ID NO: 9)	LCDR2	WASTRES (SEQ ID NO: 12)
	HCDR3	RGDVFFAY (SEQ ID NO: 10)	LCDR3	QNDYSYPLT (SEQ ID NO: 13)
167	HCDR1	SYWMH (SEQ ID NO: 14)	LCDR1	RTSKSISKFLA (SEQ ID NO: 17)
	HCDR2	NIDPSDSETHYNQKFKD (SEQ ID NO: 15)	LCDR2	SGSTLQS (SEQ ID NO: 18)
	HCDR3	WGYLGRSAMDY (SEQ ID NO: 16)	LCDR3	QQHNEYPWT (SEQ ID NO: 19)

[0183] 实施例4. 抗人CD47杂交瘤单克隆抗体的人源化

[0184] 通过比对IMGT人类抗体重轻链可变区种系基因数据库和MOE软件，分别挑选与055和167同源性高的重轻链可变区种系基因作为模板，将这两个鼠源抗体的CDR分别移植到相应的人源模板中，形成次序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的可变区序列。氨基酸残基由Kabat编号系统确定并注释。

[0185] 1. 杂交瘤克隆055人源化

[0186] 1.1 杂交瘤克隆055人源化构架选择

[0187] 鼠源抗体055的人源化轻链模板为IGKV4-1*01和hjk2.1，人源化重链模板为IGHV1-3*01和hjh6.1，人源化可变区序列如下：

[0188] hu055VH-CDR嫁接：

[0189] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSYLHWVRQAPGQRLEWGMWGIYPESGNTKYNERFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGDVFFAYWGQGT^TTVTVSS (SEQ ID NO:20)。

[0190] hu055VL CDR嫁接：

[0191] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLTSGKQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGT^TTKLEIK (SEQ ID NO:21)。

[0192] 注：顺序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为FR序列，下划线为CDR序列。

[0193] 1.2 杂交瘤克隆055的人源化模板选择和回复突变设计。

[0194] 表2. 杂交瘤克隆055的人源化模板选择和回复突变设计

hu055_VL		hu055_VH	
hu055_VL.1	嫁接	hu055_VH.1	嫁接
hu055_VL.1A	D66E	hu055_VH1.A	R72A
[0195]		hu055_VH1.B	R72A、M48I
		hu055_VH1.C	R72A、M48I、E46D
		hu055_VH1.D	R72A、M48I、E46D、V68A、I70L
		hu055_VH1.E	R72A、M48I、E46D、V68A、I70L、R38K、R67K
		hu055_VH1.F	R72A、M48I、E46D、V68A、I70L、R38K、R67K、A97S

[0196] 注：如D66E表示将第66位（自然顺序）D突变回E。嫁接 (Grafted) 代表鼠抗体CDR植入人种系FR区序列。

[0197] 1.3杂交瘤克隆055的人源化

[0198] 杂交瘤克隆055的人源化模板进行回复突变设计，不同的回复突变组合成不同的人源化抗体，具体见表3。

[0199] 表3. 鼠抗055人源化序列组合

	hu055_VL.1	hu055_VL.1A	
[0200]	hu055_VH.1	hu055-1	hu055-8
	hu055_VH.1A	hu055-2	hu055-9
	hu055_VH.1B	hu055-3	hu055-10
	hu055_VH.1C	hu055-4	hu055-11
[0201]	hu055_VH.1D	hu055-5	hu055-12
	hu055_VH.1E	hu055-6	hu055-13
	hu055_VH.1F	hu055-7	hu055-14

[0202] 2. 杂交瘤克隆167人源化

[0203] 2.1鼠源抗体167的人源化轻链模板为IGKV1-39*01和hjk4.1，人源化重链模板为IGHV1-2*02和hjh6.1，人源化可变区序列如下：

[0204] Hu167VH-CDR嫁接

[0205] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGNIDPSDSETHYNQKFKDRV
TMTRDTSISTAYMELSRSDDTAVYYCARWGYLGRSAMDYWGQGT^{TT}TVVSS (SEQ ID NO:22)。

[0206] Hu167VL-CDR嫁接

[0207] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR^{TS}KSISKFLAWYQQKPKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:23)。

[0208] 注：顺序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为FR序列，下划线为CDR序列。

[0209] 2.2杂交瘤克隆167的人源化模板选择和回复突变设计，见下表4：

[0210] 表4. 鼠抗167人源化序列组合

	hu167_VL		hu167_VH	
[0211]	hu167_VL.1	嫁接	hu167_VH.1	嫁接
	hu167_VL.1A	V58I	hu167_VH.1A	R72v
	hu167_VL.1B	V58I、Q38E、A43T、P44H	hu167_VH.1B	R72V、M48V、V68A、M70L
	hu167_VL.1C	V58I、I2V、M4I	hu167_VH.1C	R72V、M48V、V68A、M70L、T74K
	hu167_VL.1D	V58I、I2V、M4I、Q38E、A43T、P44H	hu167_VH.1D	R72V、M48V、V68A、M70L、T74K、A40R
	hu167_VL.1E	I2V	hu167_VH.1E	R72V、M48V、V68A、M70L、T74K、A40R、R38K、R67K
	hu167_VL.1F	M4I		
	hu167_VL.1G	I2V、M4I		

[0212] 注：如V58I表示将第58位（自然顺序）V突变回I。嫁接代表鼠抗体CDR植入人种系FR区序列。

[0213] 2.3杂交瘤克隆167的人源化

[0214] 杂交瘤克隆167的人源化模板进行回复突变设计，不同的回复突变组合成不同的人源化抗体，具体见表5。

[0215] 表5. 鼠抗167人源化序列组合

[0216]	hu167_VL.1	hu167_VL.1A	hu167_VL.1B	hu167_VL.1C	hu167_VL.1D	
	hu167_VH.1	hu167-1	hu167-2	hu167-3	hu167-4	hu167-5
	hu167_VH.1A	hu167-6	hu167-7	hu167-8	hu167-9	hu167-10
[0217]	hu167_VH.1B	hu167-11	hu167-12	hu167-13	hu167-14	hu167-15
	hu167_VH.1C	hu167-16	hu167-17	hu167-18	hu167-19	hu167-20
	hu167_VH.1D	hu167-21	hu167-22	hu167-23	hu167-24	hu167-25
	hu167_VH.1E	hu167-26	hu167-27	hu167-28	hu167-29	hu167-30

[0218] 3. 人源化抗体筛选

[0219] 进行抗体结合CD47的ELISA方法检测，并将结合ELISA检测的阳性孔细胞进行CD47/SIRP α 结合的阻断ELISA检测，根据测试结果优选最大程度保留抗体结合能力及阻断能力的回复突变组合。

[0220] 055人源化抗体的不同组合基本都保持了良好的体外阻断活性，通过Biacore进行不同人源化抗体的亲和力比较，结果显示人源化抗体组合均保持了对于CD47良好的结合能力，尤其是hu055-3、hu055-4、hu055-5、hu055-6、hu055-7亲和力和嵌合抗体ch-055相比基本接近。

[0221] 同样对于167人源化抗体的不同组合进行结合CD47的ELISA方法检测，并将结合ELISA检测的阳性孔细胞进行CD47/SIRP α 结合的阻断ELISA检测，根据测试结果优选最大程度保留抗体结合能力及阻断能力的回复突变组合。体外阻断实验结果显示大部分抗体均保持了良好的阻断能力，相互之间无明显差异，从中选择了部分进行Biacore亲和力比较，结果显示，大部分都保持了很好的对于CD47的结合能力，尤其是hu167-4、hu167-6、hu-167-9、hu167-14。

[0222] 根据亲和力及阻断活性比较不同人源化组合形式，发现回复突变中的V58I对于亲

和力的维持影响很小,因此在原设计基础上增加三条轻链(分别为:hu167_VL.1E(I2V)、hu167_VL.1F(M4I)、hu167_VL.1G(I2V,M4I))和hu167_VH.1组合产生的hu167-31、hu167-32、hu167-33,体外Biacore检测及阻断活性显示三者均保持了相当的CD47结合能力及阻断活性。通过Biacore检测比较hu167-31、hu167-32、hu167-33及hu167-4的亲和力(KD),结果显示相比hu167-4的KD比值分别为1.3、1.2、0.98,提示hu167-31、hu167-32、hu167-33很好的保持了抗体的结合能力。

[0223] 实施例5. 构建和表达CD47人源化抗体的IgG4-S228P及IgG4-AA形式

[0224] 设计引物PCR搭建各人源化抗体VH/VK基因片段,再与表达载体pHr(带信号肽及恒定区基因(CH1-FC/CL)片段)进行同源重组,构建抗体全长表达载体VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr。IgG4-AA抗体形式可以通过IgG4抗体形式简单点突变获得,IgG4-AA代表F234A和L235A突变,结果显示其进一步降低IgG4-Fc与FcγR的结合能力,进一步降低ADCC/CDC。IgG4-S228P代表野生型IgG4铰链区第228位的氨基酸S突变成P,该位点突变能够避免天然IgG4抗体在体内发生Fab-交换(exchange)导致的错配。

[0225] IgG4-S228P的重链恒定区(发生S228P突变)序列如下:

[0226] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTKTYTCNV~~DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFL~~GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
WQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO:24)

[0227] IgG4-AA代表上述SEQ ID NO:24序列下划线“FL”突变为“AA”(即发生F234A和L235A突变)所得的重链恒定区序列,具体本公开中IgG4-AA(包含S228P突变)的重链恒定区序列如下:

[0228] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTKTYTCNV~~DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEA~~AGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
WQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO:30)

[0229] 抗体的轻链(Kappa链)恒定区序列如下:

[0230] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:25)

[0231] 构建后的抗体序列列举如下:

[0232] hu167-33:抗体形式IgG4AA

[0233] hu167-33重链序列:

[0234] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGNIDPSDSETHYNQKFKDRV
TMTRDTSISTAYMELSR~~LRSD~~DAVYYCARWGYLGRSAMDYWGQGT~~TVTV~~SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV~~DHKPSNTKVDKRVES~~
KYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG

(SEQ ID NO:26)

[0235] hu167-33轻链序列:

[0236] DVQITQSPSSLSASVGDRTITCRTSKSISKFLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNEYPTWFGGGTKVEIKRTVAAPSVMIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:27)

[0237] hu055-5:抗体形式IgG4AA

[0238] hu055-5重链序列:

[0239] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSYLHWVRQAPGQRLDWIGWIYPESGNTKYNERFKGRA TLTADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGDVFFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAAGGPGSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:28)

[0240] hu055-5轻链序列:

[0241] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQLLTSGKQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVMIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:29)

[0242] 示例性抗体药物组合物(制剂)制备工艺

[0243] 第一步:取一定量的纯化的CD47抗体溶液,用不含抗体的缓冲剂(如10mM,pH 5.2醋酸-醋酸钠缓冲剂)进行溶剂置换(优选超滤),经超滤膜至少6倍体积置换,蛋白浓缩到约70mg/mL。加入一定体积的蔗糖母液,混匀,使最终蔗糖浓度为80mg/mL。加入一定体积的吐温-80母液,混匀,使最终吐温-80浓度为0.6mg/mL。加10mM pH 5.2醋酸盐缓冲剂定容,使蛋白浓度为50mg/mL(其他待测试制剂或稳定性制剂参照相似步骤进行配制)。

[0244] 产品经过滤后中控取样检测无菌。将原液过0.22 μ m PVDF滤芯,收集滤液。

[0245] 第二步:调节装量至2.15ml,将滤液灌装于2ml西林瓶中,加塞,分别于灌装开始、灌装中间、灌装结束时取样中控检测装量差异。

[0246] 第三步:开启轧盖机,加铝盖,进行轧盖。

[0247] 第四步:目检,确认产品无装量不准等缺陷。打印、粘贴西林瓶标签;打印纸盒标签,折叠纸盒,装盒,贴纸盒标签。

[0248] 实施例6.抗CD47抗体制剂缓冲体系pH值的筛选

[0249] 用下列缓冲剂,配制CD47抗体(hu167-33)浓度为50mg/ml的抗CD47抗体制剂:

[0250] 1) 10mM磷酸氢二钠-枸橼酸,pH 5.0

[0251] 2) 10mM磷酸氢二钠-枸橼酸,pH 5.5

[0252] 3) 10mM磷酸氢二钠-枸橼酸,pH 6.0

[0253] 4) 10mM磷酸氢二钠-枸橼酸,pH 6.5

[0254] 5) 10mM磷酸氢二钠-枸橼酸,pH 7.0

[0255] 取各样品进行高温(40℃)、冻融循环(-35℃~室温)、振摇(25℃/300rpm)以及低温光照(4℃/4500lx)稳定性研究,结果表明(见表6),抗CD47抗体较适pH范围为5.5~6.5。

[0256] 表6.抗CD47抗体pH值筛选结果

序号	放样时间	外观	SEC % 单体	IEC % 主峰	非还原 CE-SDS %
1	D0	澄清, 有少量颗粒	99.6	75.7	95.2
	振摇 D3	大量沉淀	99.2	75.2	94.9
	光照 D8	澄清, 有少量颗粒	99.2	67.4	94.8
	冻融 5 cycles	有大量颗粒+	99.6	75.6	95.2
	40℃ M1	有大量颗粒	96.7	57.6	94.0
2	D0	澄清, 有少量颗粒	99.5	75.2	95.1
	振摇 D3	明显沉淀	99.7	75.8	95.1
	光照 D8	澄清, 有少量颗粒	99.4	68.0	95.1
	冻融 5 cycles	有大量颗粒++	99.2	75.9	95.2
	40℃ M1	有大量颗粒	96.9	58.6	93.8
3	D0	澄清, 有少量颗粒	99.7	75.7	95.1
	振摇 D3	有大量颗粒	99.6	75.9	94.9
	光照 D8	澄清, 有少量颗粒	98.8	71.3	94.9
	冻融 5 cycles	有大量颗粒++	99.5	75.7	95.1
	40℃ M1	有大量颗粒	96.8	57.5	93.7
4	D0	澄清, 有少量颗粒	99.4	75.9	94.8
	振摇 D3	有大量颗粒	99.3	76.6	94.9
	光照 D8	澄清, 有少量颗粒	97.8	67.4	94.1
	冻融 5 cycles	有大量颗粒+++	99.1	76.0	95.3
	40℃ M1	有大量颗粒	97.1	53.5	92.7
5	D0	澄清, 有少量颗粒	99.5	75.5	94.6
	振摇 D3	有少量颗粒	99.3	76.3	94.9
	光照 D8	浑浊	95.9	65.6	93.0
	冻融 5 cycles	浑浊	99.2	75.5	95.1
	40℃ M1	有大量颗粒	96.7	45.8	91.6

[0257] 注:M表示月;D表示天。

[0258] 实施例7.抗CD47抗体制剂缓冲体系筛选

[0259] 用下列缓冲剂,配制CD47抗体(hu167-33)浓度为50mg/ml的抗CD47抗体制剂:

[0260] 1) 10mM醋酸-醋酸钠,pH 5.5

[0261] 2) 10mM琥珀酸-氢氧化钠,pH 5.5

[0262] 3) 10mM琥珀酸-氢氧化钠,pH 6.0

[0263] 4) 10mM枸橼酸-枸橼酸钠,pH 5.5

[0265] 5) 10mM枸橼酸-枸橼酸钠,pH 6.0

[0266] 6) 10mM枸橼酸-枸橼酸钠,pH 6.5

[0267] 7) 10mM磷酸二氢钠-磷酸氢二钠,pH 6.0

[0268] 8) 10mM磷酸二氢钠-磷酸氢二钠,pH 6.5

[0269] 9) 10mM组氨酸-盐酸,pH 5.5

[0270] 10) 10mM组氨酸-盐酸,pH 6.0

[0271] 11) 10mM组氨酸-盐酸,pH 6.5

[0272] 取各样品进行高温(40℃)、冻融循环(-35℃~室温)以及振摇(25℃/300rpm)稳定性研究。结果表明(见表7),抗CD47抗体较适缓冲体系为组氨酸-盐酸和醋酸-醋酸钠缓冲液。

[0273] 实施例6中pH5.0体系的SEC、ICE、非还原性CE-SDS的结果与pH5.5、pH6.0体系的变化趋势基本相同,仅是外观稍差。但从本实施例外观结果可知,影响外观的较大因素是缓冲体系,而非pH。因而结合实施例6中pH5.0体系的化学稳定性较好,此时的物理稳定性可以通过采用组氨酸-盐酸或组氨酸醋酸钠缓冲体系来解决。因此,后续研究将重点筛选pH范围在5.0-6.0之间的组氨酸-盐酸和组氨酸醋酸钠缓冲体系。

[0274] 表7.抗CD47抗体不同pH缓冲体系筛选试验结果

[0275]

序号	放样时间	外观	SEC % 单体	IEC % 主峰	非还原 CE-SDS %
1	D0	有少量颗粒	99.6	76.9	95.2
	振摇 D3	浑浊+	98.9	75.9	95.3
	冻融 5cycles	有少量颗粒	99.4	75.1	95.5
	40℃ M1	大量颗粒	97.8	56.5	93.8
2	D0	有少量颗粒	99.3	76.2	95.4
	振摇 D3	浑浊++	98.8	75.7	95.4
	冻融 5cycles	有大量颗粒+	99.0	75.9	95.6
	40℃ M1	轻微乳光, 大量霾状颗粒	97.6	56.3	93.6

	3	D0	有少量颗粒	99.0	76.2	95.2
		振摇 D3	浑浊++	98.9	75.9	95.3
		冻融 5cycles	有大量颗粒+	98.8	75.0	95.3
		40℃ M1	轻微乳光, 大量霉状颗粒	97.7	54.4	93.4
	4	D0	有大量颗粒	99.3	76.1	95.2
		振摇 D3	浑浊++	98.9	76.1	95.2
		冻融 5cycles	有大量颗粒++	99.1	75.6	95.2
		40℃ M1	轻微乳光, 大量霉状颗粒	97.8	55.5	94.0
	5	D0	有大量颗粒	99.3	76.5	95.3
		振摇 D3	浑浊+++	98.8	75.9	94.9
		冻融 5cycles	有大量颗粒++	98.9	75.1	95.0
		40℃ M1	轻微乳光, 大量霉状颗粒	97.8	54.3	93.7
	6	D0	有大量颗粒	99.1	76.5	94.8
		振摇 D3	浑浊+++	98.7	75.7	94.9
		冻融 5cycles	有大量颗粒++	99.0	75.1	95.0
		40℃ M1	轻微乳光, 大量霉状颗粒	97.6	52.6	93.3
[0276]	7	D0	有少量颗粒	99.2	76.2	95.7
		振摇 D3	浑浊+	98.8	75.4	94.9
		冻融 5cycles	有少量颗粒	98.8	75.1	95.1
		40℃ M1	大量霉状颗粒	97.6	53.7	93.8
	8	D0	有少量颗粒	99.1	76.5	95.0
		振摇 D3	浑浊+++	98.6	75.9	94.9
		冻融 5cycles	有大量颗粒+	98.5	75.1	95.0
		40℃ M1	轻微乳光, 大量霉状颗粒	97.4	49.3	92.7
	9	D0	有少量颗粒	99.2	76.4	95.1
		振摇 D3	大量颗粒+	98.8	75.7	95.0
		冻融 5cycles	有少量颗粒	98.9	75.2	95.2
		40℃ M1	大量霉状颗粒	97.8	57.3	94.1
	10	D0	有少量颗粒	99.2	76.4	94.6
		振摇 D3	大量颗粒	98.8	75.7	95.0
		冻融 5cycles	有少量颗粒	98.8	74.8	95.0
		40℃ M1	大量霉状颗粒	97.9	53.4	93.8
	11	D0	有少量颗粒	99.0	76.0	94.6
		振摇 D3	大量颗粒++	98.8	75.4	94.7
		冻融 5cycles	有少量颗粒	98.8	75.2	95.2
[0277]		40℃ M1	大量霉状颗粒	97.8	48.6	93.2

[0278] 注:M表示月;D表示天。

[0279] 实施例8.抗CD47抗体制剂中稳定剂的筛选

[0280] 用下列不同糖种类的缓冲剂,制备CD47抗体(hu167-33)浓度为50mg/ml的抗CD47抗体制剂:

[0281] 1) 10mM组氨酸-盐酸pH 6.0,60mg/ml蔗糖;

[0282] 2) 10mM组氨酸-盐酸pH6.0,60mg/ml α , α -二水合海藻糖;

[0283] 取各样品分别进行高温(40℃)和冻融循环(-35~4℃)稳定性研究,结果(见表8)表明蔗糖与海藻糖对抗CD47抗体的稳定性作用相似,因此,海藻糖与蔗糖均可作为抗CD47抗体制剂的稳定剂。当蔗糖浓度为80mg/ml时,渗透压约为300mosm/kg,接近等渗,因此优选蔗糖浓度为80mg/ml。

[0284] 表8.糖种类筛选实验结果

序号	时间点	SEC (%)		
		聚体	单体	碎片
1	T0	0.4	99.5	0.1
	冻融 Cycle5	0.4	99.5	0.1
	40℃ M1	1.2	97.9	1.0
2	T0	0.4	99.5	0.1
	冻融 Cycle5	0.5	99.3	0.1
	40℃ M1	1.2	97.9	0.9

[0286] 注:T表示时间,M表示月。

[0287] 实施例9.抗CD47抗体制剂中表面活性剂的筛选

[0288] 用下列不同浓度及种类表面活性剂的缓冲剂,制备浓度为50mg/ml的抗CD47抗体(hu167-33)制剂:

[0289] 1) 10mM组氨酸-盐酸盐pH 6.0,0.4mg/ml聚山梨酯20;

[0290] 2) 10mM组氨酸-盐酸盐pH 6.0,0.2mg/ml聚山梨酯80;

[0291] 3) 10mM组氨酸-盐酸盐pH 6.0,0.4mg/ml聚山梨酯80;

[0292] 4) 10mM组氨酸-盐酸盐pH 6.0,0.6mg/ml聚山梨酯80;

[0293] 取样品分别进行加速(25℃)、长期(2-8℃)稳定性研究,结果表明不低于0.4mg/ml聚山梨酯80对抗CD47抗体的稳定性作用更好,因此选择0.6mg/ml聚山梨酯80作为抗CD47抗体的表明活性剂,结果见表9。

[0294] 表9.抗CD47抗体表面活性剂筛选结果

序号	放样时间 (M)	外观	SEC % 单体	IEC % 主峰	非还原 CE-SDS %
1	0	澄清透明	99.0	70.9	95.9
	25°C M6	大量颗粒	99.1	58.8	94.6
	2-8°C M6	大量颗粒	99.2	75.2	96.3
2	0	澄清透明	99.0	72.3	96.0
	25°C M6	细小颗粒	99.0	57.4	94.5
	2-8°C M6	细小颗粒	99.3	75.0	96.1
3	0	澄清透明	99.2	72.7	96.0
	25°C M6	澄清透明	98.8	53.3	94.2
	2-8°C M6	澄清透明	99.1	75.5	96.0
4	0	澄清透明	98.9	73.2	96.0
	25°C M6	澄清透明	98.8	51.6	94.0
	2-8°C M6	澄清透明	99.3	75.1	95.9

[0296] 注:M表示月。

[0297] 实施例10. 制剂成分的综合筛选

[0298] 为了进一步对蛋白浓度、缓冲体系种类、pH进行优化,运用JMP软件进行DOE实验设计,应用RSM模型得到一系列处方(如下)。在含下列不同缓冲体系、不同pH的缓冲液中,制备不同蛋白浓度CD47抗体(hu167-33),含80mg/ml蔗糖和0.2mg/ml聚山梨酯80的抗CD47抗体制剂:

[0299] 1) 10mM组氨酸-醋酸(His-AA) pH 5.4, 60mg/ml CD47抗体;

[0300] 2) 10mM组氨酸-醋酸pH 5.8, 50mg/ml CD47抗体;

[0301] 3) 10mM醋酸-醋酸钠(AA) pH 5.8, 60mg/ml CD47抗体;

[0302] 4) 10mM醋酸-醋酸钠pH 5.4, 50mg/ml CD47抗体;

[0303] 5) 10mM组氨酸-醋酸pH 5.0, 50mg/ml CD47抗体;

[0304] 6) 10mM醋酸-醋酸钠pH 5.0, 40mg/ml CD47抗体;

[0305] 7) 10mM醋酸-醋酸钠pH 5.8, 40mg/ml CD47抗体;

[0306] 8) 10mM组氨酸-醋酸pH 5.4, 40mg/ml CD47抗体;

[0307] 9) 10mM醋酸-醋酸钠pH 5.0, 60mg/ml CD47抗体;

[0308] 将样品保存于40°C条件下进行稳定性分析,以IEC中性峰的差值和非还原CE差值为评价指标,采用最小二乘法对结果进行统计分析,结果(见图1和表10)显示离子强度为10mM, pH 5.2醋酸(钠)体系更利于抗CD47抗体的稳定性,蛋白浓度在40~60mg/ml之间均较稳定,取中值50mg/ml作为抗CD47抗体的最终蛋白浓度。

[0309] 表10. CD47抗体高温实验结果

序号	放样时间	外观	SEC 单体 %	IEC 中性峰 %	非还原 CE-SDS%
1	D0	澄清透明	99.3	76.0	95.3
	D18	澄清透明	97.8	63.3	94.0
2	D0	澄清透明	99.4	75.0	95.4
	D18	澄清透明	98.0	61.5	93.6
3	D0	澄清透明	99.1	75.0	95.5
	D18	澄清透明	99.0	61.8	93.4
4	D0	澄清透明	99.0	74.2	95.4
	D18	澄清透明	97.8	63.3	94.0
5	D0	澄清透明	99.3	75.0	95.4
	D18	澄清透明	97.8	63.6	93.3
6	D0	澄清透明	99.4	75.0	95.4
	D18	澄清透明	97.8	64.2	93.5
7	D0	澄清透明	99.0	74.9	95.1
	D18	澄清透明	98.8	61.8	93.1
8	D0	澄清透明	99.2	75.4	95.4
	D18	澄清透明	97.9	64.2	93.2
9	D0	澄清透明	99.3	75.3	95.1
	D18	澄清透明	97.7	64.0	92.9

[0311] 注:D表示天。

[0312] 实施例11. 抗CD47抗体制剂的长期稳定性

[0313] 用pH5.2的10mM醋酸-醋酸钠的缓冲剂,制备抗CD47抗体(hu167-33)浓度为50mg/ml,含80mg/ml蔗糖,0.6mg/ml聚山梨酯80的抗CD47抗体制剂。取样品进行长期(2-8℃)稳定性研究,试验结果见表11,结果表明,该抗CD47抗体制剂长期稳定性良好。

[0314] 表11. 抗CD47抗体制剂的长期稳定性试验

序号	放样时间	外观	SEC 主峰/%	IEC 主峰/%	非还原 CE-SDS%
1	0	澄清透明	99.9	66.8	97.3
	2~8℃ M6	澄清透明	99.8	69.2	97.8
	2~8℃ M12	澄清透明	99.7	66.3	98.0

[0316] 注:M表示月。

[0317] 实施例12. 抗CD47抗体制剂的冻干

[0318] 用pH5.2的10mM醋酸-醋酸钠的缓冲剂,制备抗CD47抗体(hu167-33)浓度为50mg/ml,含80mg/ml蔗糖,0.6mg/ml聚山梨酯80的抗CD47抗体制剂。将抗体以2.15mL/瓶填充入

6mL西林瓶中,装入冻干箱中,冻干。冻干程序为预冻、一次干燥和二次干燥,制剂的冻干步骤见表12。冻干程序结束后,真空加塞。复溶样品进行冻干前后对比。结果表明,复溶溶液可保持液体制剂良好的性能。

[0319] 表12. 制剂的冻干步骤

[0320]

冻干工艺参数	设定温度 (°C)	真空度 (mBar)
预冻	5	N/A
	-45	N/A
一次干燥	-27	0.1
二次干燥	25	0.1
	25	0.01

[0001] 序列表

[0002] <110> 江苏恒瑞医药股份有限公司

[0003] 上海恒瑞医药有限公司

[0004] <120> 一种CD47抗体药物组合物及其用途

[0005] <150> 201810530100.3

[0006] <151> 2018-05-29

[0007] <160> 30

[0008] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0009] <210> 1

[0010] <211> 129

[0011] <212> PRT

[0012] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0013] <220>

[0014] <221> PEPTIDE

[0015] <223> 带His标签的CD47蛋白胞外域: CD47-ECD-His

[0016] <400> 1

[0017] Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn

[0018] 1 5 10 15

[0019] Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn

[0020] 20 25 30

[0021] Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr

[0022] 35 40 45

[0023] Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser

[0024] 50 55 60

[0025] Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu

[0026] 65 70 75 80

[0027] Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys

[0028] 85 90 95

[0029] Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys

[0030] 100 105 110

[0031] Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu His His His His His

[0032] 115 120 125

[0033] His

[0034] <210> 2

[0035] <211> 355

[0036] <212> PRT

[0037] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0038] <220>

[0039]	<221>	PEPTIDE
[0040]	<223>	CD47胞外域与人IgG1Fc融合蛋白:CD47-ECD-Fc
[0041]	<400>	2
[0042]	Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn	
[0043]	1	5 10 15
[0044]	Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn	
[0045]		20 25 30
[0046]	Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr	
[0047]		35 40 45
[0048]	Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser	
[0049]		50 55 60
[0050]	Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu	
[0051]		65 70 75 80
[0052]	Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys	
[0053]		85 90 95
[0054]	Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys	
[0055]		100 105 110
[0056]	Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Glu Pro Lys Ser Ser	
[0057]		115 120 125
[0058]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	
[0059]		130 135 140
[0060]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	
[0061]		145 150 155 160
[0062]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	
[0063]		165 170 175
[0064]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	
[0065]		180 185 190
[0066]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	
[0067]		195 200 205
[0068]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly	
[0069]		210 215 220
[0070]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile	
[0071]		225 230 235 240
[0072]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val	
[0073]		245 250 255
[0074]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser	
[0075]		260 265 270
[0076]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu	
[0077]		275 280 285

[0078] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 [0079] 290 295 300
 [0080] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 [0081] 305 310 315 320
 [0082] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 [0083] 325 330 335
 [0084] His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 [0085] 340 345 350
 [0086] Pro Gly Lys
 [0087] 355
 [0088] <210> 3
 [0089] <211> 350
 [0090] <212> PRT
 [0091] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0092] <220>
 [0093] <221> PEPTIDE
 [0094] <223> 人SIRPα与人IgG1Fc融合蛋白:SIRPα-Fc
 [0095] <400> 3
 [0096] Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Ser Val Ala
 [0097] 1 5 10 15
 [0098] Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
 [0099] 20 25 30
 [0100] Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala Arg Val Leu
 [0101] 35 40 45
 [0102] Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
 [0103] 50 55 60
 [0104] Glu Thr Thr Lys Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Asn
 [0105] 65 70 75 80
 [0106] Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys
 [0107] 85 90 95
 [0108] Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser
 [0109] 100 105 110
 [0110] Val Arg Ala Lys Pro Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr
 [0111] 115 120 125
 [0112] Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 [0113] 130 135 140
 [0114] Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 [0115] 145 150 155 160
 [0116] Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

[0156] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0157] 65 70 75 80
 [0158] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0159] 85 90 95
 [0160] Ser Arg Arg Gly Asp Val Phe Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 [0161] 100 105 110
 [0162] Leu Thr Val Ser Ser
 [0163] 115
 [0164] <210> 5
 [0165] <211> 113
 [0166] <212> PRT
 [0167] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0168] <220>
 [0169] <221> DOMAIN
 [0170] <223> 克隆055的鼠源轻链可变区序列
 [0171] <400> 5
 [0172] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Thr Val Thr Ala Gly
 [0173] 1 5 10 15
 [0174] Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Thr Ser
 [0175] 20 25 30
 [0176] Gly Lys Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 [0177] 35 40 45
 [0178] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 [0179] 50 55 60
 [0180] Pro Glu Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 [0181] 65 70 75 80
 [0182] Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 [0183] 85 90 95
 [0184] Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 [0185] 100 105 110
 [0186] Asn
 [0187] <210> 6
 [0188] <211> 120
 [0189] <212> PRT
 [0190] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0191] <220>
 [0192] <221> DOMAIN
 [0193] <223> 克隆167的鼠源重链可变区序列
 [0194] <400> 6

[0234] <211> 5
 [0235] <212> PRT
 [0236] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0237] <220>
 [0238] <221> DOMAIN
 [0239] <223> 克隆055的HCDR1
 [0240] <400> 8
 [0241] Ser Ser Tyr Leu His
 [0242] 1 5
 [0243] <210> 9
 [0244] <211> 17
 [0245] <212> PRT
 [0246] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0247] <220>
 [0248] <221> DOMAIN
 [0249] <223> 克隆055的HCDR2
 [0250] <400> 9
 [0251] Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe Lys
 [0252] 1 5 10 15
 [0253] Gly
 [0254] <210> 10
 [0255] <211> 8
 [0256] <212> PRT
 [0257] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0258] <220>
 [0259] <221> DOMAIN
 [0260] <223> 克隆055的HCDR3
 [0261] <400> 10
 [0262] Arg Gly Asp Val Phe Phe Ala Tyr
 [0263] 1 5
 [0264] <210> 11
 [0265] <211> 17
 [0266] <212> PRT
 [0267] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0268] <220>
 [0269] <221> DOMAIN
 [0270] <223> 克隆055的LCDR1
 [0271] <400> 11
 [0272] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Thr Ser Gly Lys Gln Lys Asn Tyr Leu

[0273]	1	5	10	15
[0274]	Thr			
[0275]	<210> 12			
[0276]	<211> 7			
[0277]	<212> PRT			
[0278]	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
[0279]	<220>			
[0280]	<221> DOMAIN			
[0281]	<223> 克隆055的LCDR2			
[0282]	<400> 12			
[0283]	Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser			
[0284]	1	5		
[0285]	<210> 13			
[0286]	<211> 9			
[0287]	<212> PRT			
[0288]	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
[0289]	<220>			
[0290]	<221> DOMAIN			
[0291]	<223> 克隆055的LCDR3			
[0292]	<400> 13			
[0293]	Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr			
[0294]	1	5		
[0295]	<210> 14			
[0296]	<211> 5			
[0297]	<212> PRT			
[0298]	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
[0299]	<220>			
[0300]	<221> DOMAIN			
[0301]	<223> 克隆167的HCDR1			
[0302]	<400> 14			
[0303]	Ser Tyr Trp Met His			
[0304]	1	5		
[0305]	<210> 15			
[0306]	<211> 17			
[0307]	<212> PRT			
[0308]	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
[0309]	<220>			
[0310]	<221> DOMAIN			
[0311]	<223> 克隆167的HCDR2			

[0351] <221> DOMAIN
 [0352] <223> 克隆167的LCDR3
 [0353] <400> 19
 [0354] Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp Thr
 [0355] 1 5
 [0356] <210> 20
 [0357] <211> 117
 [0358] <212> PRT
 [0359] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0360] <220>
 [0361] <221> DOMAIN
 [0362] <223> 鼠源抗体055的人源化重链可变区
 [0363] <400> 20
 [0364] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0365] 1 5 10 15
 [0366] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
 [0367] 20 25 30
 [0368] Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 [0369] 35 40 45
 [0370] Gly Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
 [0371] 50 55 60
 [0372] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 [0373] 65 70 75 80
 [0374] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0375] 85 90 95
 [0376] Ala Arg Arg Gly Asp Val Phe Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 [0377] 100 105 110
 [0378] Val Thr Val Ser Ser
 [0379] 115
 [0380] <210> 21
 [0381] <211> 113
 [0382] <212> PRT
 [0383] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0384] <220>
 [0385] <221> DOMAIN
 [0386] <223> 鼠源抗体055的人源化轻链可变区
 [0387] <400> 21
 [0388] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 [0389] 1 5 10 15

[0390]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Thr Ser
[0391]	20 25 30
[0392]	Gly Lys Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0393]	35 40 45
[0394]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0395]	50 55 60
[0396]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0397]	65 70 75 80
[0398]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
[0399]	85 90 95
[0400]	Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[0401]	100 105 110
[0402]	Lys
[0403]	<210> 22
[0404]	<211> 120
[0405]	<212> PRT
[0406]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0407]	<220>
[0408]	<221> DOMAIN
[0409]	<223> 鼠源抗体167的人源化重链可变区 (Hu167VH- CDR嫁接)
[0410]	<400> 22
[0411]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0412]	1 5 10 15
[0413]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[0414]	20 25 30
[0415]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0416]	35 40 45
[0417]	Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
[0418]	50 55 60
[0419]	Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
[0420]	65 70 75 80
[0421]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0422]	85 90 95
[0423]	Ala Arg Trp Gly Tyr Leu Gly Arg Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
[0424]	100 105 110
[0425]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[0426]	115 120
[0427]	<210> 23
[0428]	<211> 107

[0429] <212> PRT
 [0430] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0431] <220>
 [0432] <221> DOMAIN
 [0433] <223> 鼠源抗体167的人源化轻链可变区 (Hu167VL -CDR嫁接)
 [0434] <400> 23
 [0435] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [0436] 1 5 10 15
 [0437] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Lys Ser Ile Ser Lys Phe
 [0438] 20 25 30
 [0439] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 [0440] 35 40 45
 [0441] Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [0442] 50 55 60
 [0443] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 [0444] 65 70 75 80
 [0445] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp
 [0446] 85 90 95
 [0447] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 [0448] 100 105
 [0449] <210> 24
 [0450] <211> 327
 [0451] <212> PRT
 [0452] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0453] <220>
 [0454] <221> DOMAIN
 [0455] <223> IgG4-S228P的重链恒定区序列
 [0456] <400> 24
 [0457] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 [0458] 1 5 10 15
 [0459] Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 [0460] 20 25 30
 [0461] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 [0462] 35 40 45
 [0463] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 [0464] 50 55 60
 [0465] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 [0466] 65 70 75 80
 [0467] Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

[0546]	130	135	140
[0547]	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
[0548]	145	150	155
[0549]	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
[0550]	165	170	175
[0551]	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
[0552]	180	185	190
[0553]	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys		
[0554]	195	200	205
[0555]	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro		
[0556]	210	215	220
[0557]	Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val		
[0558]	225	230	235
[0559]	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
[0560]	245	250	255
[0561]	Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu		
[0562]	260	265	270
[0563]	Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
[0564]	275	280	285
[0565]	Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
[0566]	290	295	300
[0567]	Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
[0568]	305	310	315
[0569]	Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
[0570]	325	330	335
[0571]	Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
[0572]	340	345	350
[0573]	Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
[0574]	355	360	365
[0575]	Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
[0576]	370	375	380
[0577]	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
[0578]	385	390	395
[0579]	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
[0580]	405	410	415
[0581]	Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
[0582]	420	425	430
[0583]	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[0584]	435	440	445

[0585] <210> 27
 [0586] <211> 214
 [0587] <212> PRT
 [0588] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0589] <220>
 [0590] <221> DOMAIN
 [0591] <223> hu167-33轻链序列
 [0592] <400> 27
 [0593] Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [0594] 1 5 10 15
 [0595] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Lys Ser Ile Ser Lys Phe
 [0596] 20 25 30
 [0597] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 [0598] 35 40 45
 [0599] Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [0600] 50 55 60
 [0601] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 [0602] 65 70 75 80
 [0603] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp
 [0604] 85 90 95
 [0605] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 [0606] 100 105 110
 [0607] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 [0608] 115 120 125
 [0609] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 [0610] 130 135 140
 [0611] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 [0612] 145 150 155 160
 [0613] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 [0614] 165 170 175
 [0615] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 [0616] 180 185 190
 [0617] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 [0618] 195 200 205
 [0619] Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 [0620] 210
 [0621] <210> 28
 [0622] <211> 444
 [0623] <212> PRT

[0624] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0625] <220>
 [0626] <221> DOMAIN
 [0627] <223> hu055-5重链序列
 [0628] <400> 28
 [0629] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0630] 1 5 10 15
 [0631] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
 [0632] 20 25 30
 [0633] Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Asp Trp Ile
 [0634] 35 40 45
 [0635] Gly Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
 [0636] 50 55 60
 [0637] Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 [0638] 65 70 75 80
 [0639] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0640] 85 90 95
 [0641] Ala Arg Arg Gly Asp Val Phe Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 [0642] 100 105 110
 [0643] Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 [0644] 115 120 125
 [0645] Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 [0646] 130 135 140
 [0647] Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 [0648] 145 150 155 160
 [0649] Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 [0650] 165 170 175
 [0651] Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 [0652] 180 185 190
 [0653] Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 [0654] 195 200 205
 [0655] Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 [0656] 210 215 220
 [0657] Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 [0658] 225 230 235 240
 [0659] Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 [0660] 245 250 255
 [0661] Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 [0662] 260 265 270

[0663]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
[0664]	275 280 285
[0665]	Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
[0666]	290 295 300
[0667]	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
[0668]	305 310 315 320
[0669]	Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
[0670]	325 330 335
[0671]	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
[0672]	340 345 350
[0673]	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
[0674]	355 360 365
[0675]	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
[0676]	370 375 380
[0677]	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
[0678]	385 390 395 400
[0679]	Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
[0680]	405 410 415
[0681]	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
[0682]	420 425 430
[0683]	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0684]	435 440
[0685]	<210> 29
[0686]	<211> 220
[0687]	<212> PRT
[0688]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0689]	<220>
[0690]	<221> DOMAIN
[0691]	<223> hu055-5轻链序列
[0692]	<400> 29
[0693]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0694]	1 5 10 15
[0695]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Thr Ser
[0696]	20 25 30
[0697]	Gly Lys Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0698]	35 40 45
[0699]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0700]	50 55 60
[0701]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

[0702]	65	70	75	80
[0703]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn			
[0704]		85	90	95
[0705]	Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
[0706]		100	105	110
[0707]	Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp			
[0708]		115	120	125
[0709]	Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
[0710]		130	135	140
[0711]	Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
[0712]		145	150	155
[0713]	Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
[0714]		165	170	175
[0715]	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			
[0716]		180	185	190
[0717]	Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser			
[0718]		195	200	205
[0719]	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
[0720]		210	215	220
[0721]	<210> 30			
[0722]	<211> 327			
[0723]	<212> PRT			
[0724]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0725]	<220>			
[0726]	<221> DOMAIN			
[0727]	<223> IgG4-AA(包含S228P)的重链恒定区序列			
[0728]	<400> 30			
[0729]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg			
[0730]	1	5	10	15
[0731]	Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
[0732]		20	25	30
[0733]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
[0734]		35	40	45
[0735]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
[0736]		50	55	60
[0737]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr			
[0738]		65	70	75
[0739]	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
[0740]		85	90	95

[0741]	Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
[0742]	100 105 110
[0743]	Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[0744]	115 120 125
[0745]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[0746]	130 135 140
[0747]	Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[0748]	145 150 155 160
[0749]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
[0750]	165 170 175
[0751]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[0752]	180 185 190
[0753]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
[0754]	195 200 205
[0755]	Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[0756]	210 215 220
[0757]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
[0758]	225 230 235 240
[0759]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[0760]	245 250 255
[0761]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[0762]	260 265 270
[0763]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[0764]	275 280 285
[0765]	Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
[0766]	290 295 300
[0767]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[0768]	305 310 315 320
[0769]	Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0770]	325

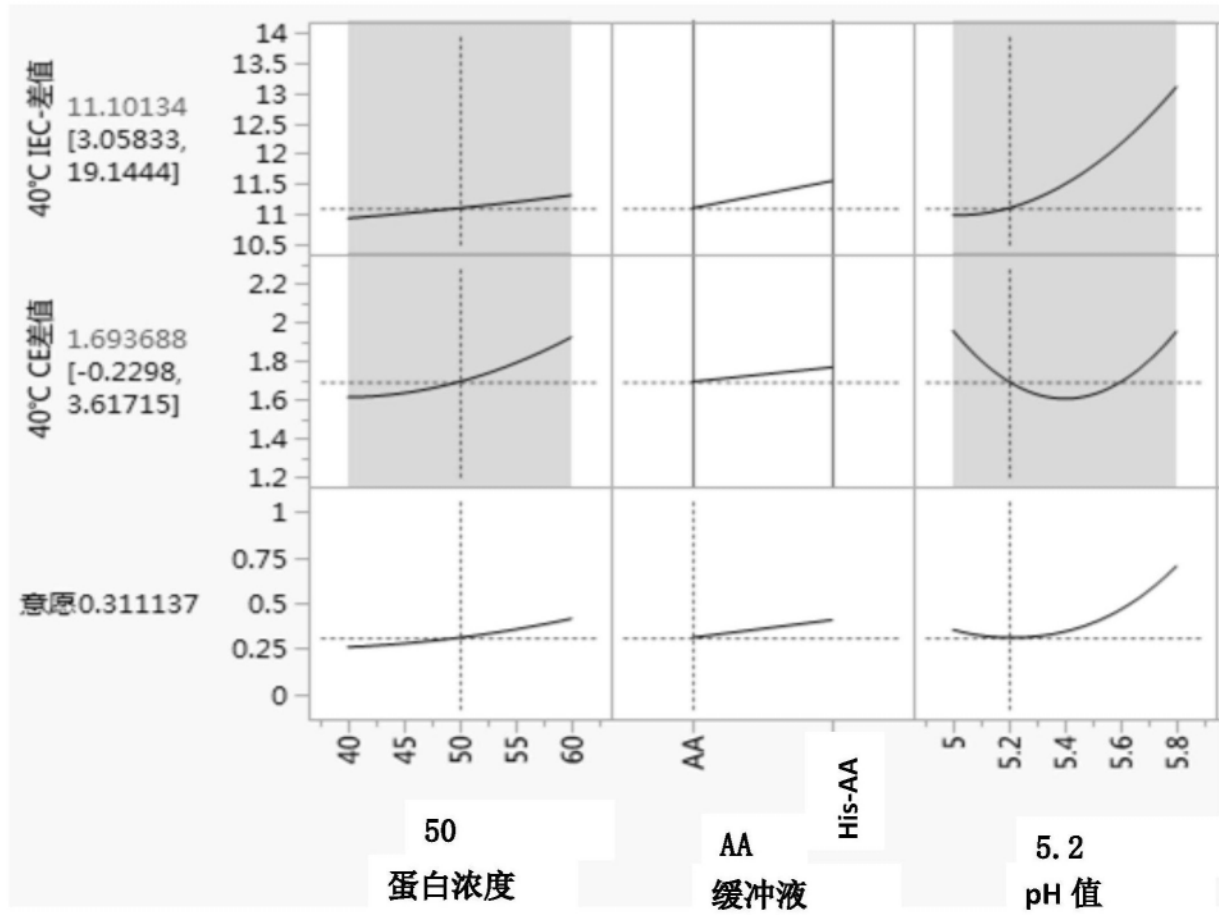


图1