(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) **1-0028772**

(51)[7] **C12P 21/08**; A61K 39/395

(13) **B**

(21) 1-2014-02973 (22) 06/02/2013
(86) PCT/US2013/024995 06/02/2013 (87) WO2013/119714 15/08/2013
(30) 61/595,216 06/02/2012 US; 61/659,752 14/06/2012 US
(45) 25/07/2021 400 (43) 26/01/2015 322A
(73) INHIBRX, INC. (US)
11025 N.Torrey Pines Road, Suite 200, La Jolla, CA 92037, United States of America
(72) ECKELMAN, Brendan (US); TIMMER, John (US); RAZAI, Amir (US); DEVERAUX, Quinn (US); JONES, Kyle (US); NGUY, Peter L. (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG PHÂN LẬP ĐƯỢC LIÊN KẾT VỚI CD47 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể đơn dòng có khả năng nhận diện CD47, cụ thể hơn là đến kháng thể CD47 mà không gây ra mức ngưng kết đáng kể của tế bào. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể này hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó. Các kháng thể này là hữu hiệu để điều trị bệnh.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng có khả năng nhận diện CD47, cụ thể hơn là tới kháng thể CD47 không gây ra mức ngưng kết đáng kể đối với tế bào hồng cầu của người, tới phương pháp sản xuất các kháng thể này và các kháng thể đơn dòng này để dùng làm chất trị liệu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CD47, cũng được biết đến là protein liên quan đến integrin (integrin-associated protein -IAP), kháng nguyên ung thư buồng trứng OA3, kháng nguyên liên quan đến Rh và MER6, là thụ thể xuyên màng nhiều lần thuộc siêu họ globulin miễn dịch. Sự biểu hiện của CD47 và/hoặc hoạt tính của CD47 liên quan đến nhiều bệnh và chứng rối loạn. Do đó, vẫn cần có nhu cầu về phương pháp điều trị bệnh hướng đích là CD47.

Babic và đồng tác giả sử dụng kháng thể kháng-CD47 (mIAP301) để nghiên cứu vai trò của CD47 trong sự kết tập của các tế bào Ba/F3 biểu hiện SHPS-1 (The Journal of Immunology, 2000, 164:3652-3658). Majeti và đồng tác giả bộc lộ một số kháng thể kháng-CD47 (Cell, 2009, 138:286-299). Chao và đồng tác giả nghiên cứu vai trò của kháng thể kháng-CD47 trong điều trị bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính ở người (Cancer Res. 2011, 71:1374-1384).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng phân lập được hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó liên kết với CD47 người, trong đó kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó liên kết với epitop không liên tục trên CD47, trong đó epitop không liên tục này chứa các gốc axit amin Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104, và E106 của CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147, và trong đó kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó ngăn ngừa CD47 khỏi việc tương tác với protein điều hòa tín hiệu α (signal-regulatory-protein α - SIRPα) và không gây ra mức ngưng kết đáng kể các tế bào sau khi dùng.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó là kháng thể khảm hoặc được làm giống như của người.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó thúc đẩy sự thực bào tế bào biểu hiện CD47 gây ra bởi đại thực bào.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó là isotyp IgG được chọn từ nhóm gồm isotyp IgG1, isotyp IgG2, isotyp IgG3, và isotyp IgG4.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó là isotyp IgG được chọn từ IgG4P và IgG4PE.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó chứa:

(i) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 72,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 71, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(ii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(iii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 67,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 69, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(iv) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,

trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 67,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 70, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(v) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 68,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(vi) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 72,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 68,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(vii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 72,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 68,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 71, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(viii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 76,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 68,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(ix) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 76,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 68,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 71, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55

(x) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 77,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(xi) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 57,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(xii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 60,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(xiii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 61,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55; hoặc

(xiv) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 62,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó chứa:

(i) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 5, và

trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 31;

(ii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 5, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 32;

(iii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 33;

(iv) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 34;

(v) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(vi) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 36;

(vii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 37;

(viii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 38;

(ix) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 39;

(x) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 43;

(xi) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 8, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 39;

(xii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 11, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 42;

(xiii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 11, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 43;

(xiv) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 11, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 44;

(xv) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 11, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 47;

(xvi) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 15, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 43;

(xvii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 15, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 44;

(xviii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 16, và

trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xix) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 17, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xx) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 20, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xxi) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 21, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xxii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 22, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xxiii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 27, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xxiv) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 28, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xxv) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 29, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35; hoặc

(xxvi) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 30, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó theo sáng chế và chất mang.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó theo sáng chế để dùng trong phương pháp làm thuyên giảm triệu chứng của bệnh ung thư hoặc các tình trạng u tân tạo khác ở đối tượng.

Theo một số phương án của sáng chế, đối tượng là người.

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp này còn bao gồm bước sử dụng hóa trị liệu.

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp này còn bao gồm bước sử dụng xạ trị.

Sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng có khả năng nhận diện và liên kết với CD47, cụ thể là CD47 của người. Các kháng thể theo sáng chế có khả năng điều biến, ví dụ, phong bế, ức chế, khử chức năng, đối kháng, trung hòa hoặc can thiệp đến sự biểu hiện

của CD47, hoạt tính và/hoặc tín hiệu của CD47, và các kháng thể này không gây ra mức ngưng kết đáng kể đối với tế bào hồng cầu của người, cũng được đề cập ở đây là hồng cầu. Tuy nhiên, khả năng liên kết của các kháng thể theo sáng chế với CD47 trên bề mặt tế bào và không gây ra hiện tượng ngưng kết tế bào không chỉ bị giới hạn ở tế bào hồng cầu. Các kháng thể theo sáng chế liên kết duy nhất với CD47 theo cách mà không thúc đẩy sự ngưng kết các tế dương tính với CD47. Các kháng thể theo sáng chế và các dẫn xuất của nó có khả năng điều biến, ví dụ, phong bế, ức chế, khử chức năng, đối kháng, trung hòa hoặc can thiệp đến sự tương tác giữa CD47 và SIRPα (protein điều hòa tín hiệu α), và các kháng thể này không gây ra mức ngưng kết đáng kể của tế bào hồng cầu ở người. Các kháng thể đề xuất ở đây được đề cập chung là "kháng thể CD47." Kháng thể CD47 theo sáng chế có sự cải thiện đáng kể so với các kháng thể CD47 hiện có gây ra sự ngưng kết tế bào hồng cầu ở người (*xem, ví dụ,* Kikuchi Y, Uno S, Yoshimura Y et al. A bivalent single-chain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells. Biochem Biophys Res Commun 2004; 315: 912–8). Ví dụ, kháng thể CD47 theo sáng chế có sự cải thiện đáng kể so với các kháng thể CD47 B6H12, BRIC126, và CC2C6 hiện có, trong đó mỗi kháng thể này phong bế SIRPα, nhưng lại gây ra sự ngưng kết RBCs, như được mô tả chi tiết dưới đây. Kháng thể CD47 dạng IgG đầy đủ theo sáng chế (*ví dụ,* 2A1 và các dẫn xuất được làm cho giống như của người của nó bao gồm các kháng thể nêu trong Bảng 1) không ngưng kết các tế bào ở mức đáng kể. Ví dụ, kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ngưng kết các tế bào hồng cầu (RBCs - red blood cells). Được mô tả trong bản mô tả này là kháng thể CD47 đầu tiên ở dạng IgG đầy đủ phong bế SIRPα và không gây ra mức ngưng kết đáng kể.

Kháng thể CD47 theo sáng chế biểu hiện nhiều đặc tính mong muốn, ví dụ, bằng các ví dụ không giới hạn, phong bế một cách hiệu quả sự tương tác giữa CD47 và phối tử SIRPα của nó, không gây ra mức ngưng kết đáng kể các hồng cầu, cũng như có hoạt tính kháng ung thư hiệu quả. Ví dụ, kháng thể CD47 theo sáng chế phong bế ít nhất 40%, ít nhất 45%, ít nhất 50%, ít nhất 55%, ít nhất 60%, ít nhất 65%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% sự tương tác giữa CD47 và SIRPα khi so sánh với mức tương tác giữa CD47 và SIRPα khi không có mặt kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này.

Kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức ngưng kết đáng kể tế bào, *ví dụ,* kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức ngưng kết đáng kể các tế bào hồng cầu. Trong một số trường hợp, mức ngưng kết đáng kể các tế bào là mức ngưng kết với sự có

mặt của kháng thể CD47 hiện có. Theo một khía cạnh, mức ngưng kết với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế giảm đi ít nhất 5%, ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc ít nhất 99% so với mức ngưng kết với sự có mặt của kháng thể CD47 hiện có. Theo một số phương án, kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức ngưng kết đáng kể nếu mức ngưng kết với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế giảm đi ít nhất 5%, ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc ít nhất 99% so với mức ngưng kết với sự có mặt của kháng thể CD47 hiện có. Theo các phương án khác, kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức ngưng kết đáng kể nếu mức ngưng kết với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế giảm đi ít nhất 5%, ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc ít nhất 99% so với mức ngưng kết với sự có mặt của kháng thể CD47, 1B4, chứa trình tự biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 80 và SEQ ID NO: 81, một cách tương ứng. Tốt hơn là, kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức ngưng kết đáng kể tế bào ở nồng độ kháng thể trong khoảng từ 10 pM và 10 µM, *ví dụ,* ở nồng độ kháng thể là 50 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 1 µM, hoặc 5 µM.

Các kháng thể theo sáng chế cũng có hiệu lực đáng kể trong mô hình khối u so với các kháng thể đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, khả năng của các đại thực bào để thực bào các tế bào khối u với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế tăng lên ít nhất 5%, ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc ít nhất 99% so với khả năng của các đại thực bào thực bào các tế bào khối u với sự có mặt của kháng thể CD47 hiện có.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận thấy rằng có thể định lượng mức ngưng kết mà không cần thử nghiệm quá mức, *ví dụ,* mức ngưng kết RBCs. Ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận thấy rằng mức ngưng kết hồng cầu thu được bằng cách đo vùng chấm RBC sau khi thực hiện thử nghiệm ngưng kết hồng cầu với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế, như được mô tả trong các ví dụ dưới đây. Trong một số trường hợp, vùng chấm RBC với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế so với vùng chấm RBC với sự có mặt của kháng thể CD47, *tức là,* không có hiện tượng ngưng kết hồng cầu. Theo cách này, sự ngưng kết hồng cầu được định lượng tương ứng với đối chứng đường gốc. Vùng chấm RBC lớn hơn tương ứng với mức ngưng kết hồng cầu cao hơn. Theo cách khác, mật độ kế của chấm RBC có

thể được sử dụng để định lượng sự ngưng kết hồng cầu.

Kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này là hữu dụng trong điều trị, làm chậm sự phát triển, ngăn chặn sự tái phát hoặc làm thuyên giảm triệu chứng của bệnh ung thư hoặc tình trạng u tân tạo khác. Ví dụ, kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này là hữu dụng trong điều trị bệnh máu ác tính và/hoặc khối u, *ví dụ,* bệnh máu ác tính và/hoặc khối u. Ví dụ, kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này là hữu dụng trong điều trị CD47 và khối u. Bằng các ví dụ không giới hạn, kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này là hữu dụng trong điều trị u lympho không Hodgkin (non-Hodgkin's u lympho -NHL), bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính (acute lymphocytic leukemia - ALL), bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính (acute myeloid leukemia -AML), bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (chronic lymphocytic leukemia - CLL), bệnh bạch cầu tủy bào mạn tính (chronic myelogenous leukemia - CML), bệnh đa u tủy (multiple u tủy -MM), bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thu đầu và cổ, bệnh ung thư bàng quang, bệnh khối u ác tính, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư phổi, u mềm cơ trơn, sacôm cơ trơn, u thần kinh đệm, u nguyên bào đệm và v.v.. Khối u rắn bao gồm, *ví dụ,* u ngực, u buồng trứng, u phổi, u tụy, u tuyến tiền liệt, u ác tính, u trực tràng, u phổi, u đầu và cổ, u bàng quang, u thực quản, u gan, và u thận.

Như được sử dụng ở đây, "ung thư huyết" đề cập đến bệnh ung thư máu, và bao gồm bệnh bạch cầu, u lympho và u tủy trong số các bệnh khác. "Bệnh bạch cầu" đề cập đến bệnh ung thư máu trong đó nhiều tế bào máu trắng không có hiệu quả trong việc chống lại sự nhiễm trùng được tạo ra, do đó chiếm chỗ các phần tạo thành máu khác, như tiểu huyết cầu và hồng cầu. Cần hiểu rằng trong các trường hợp, bệnh bạch cầu được phân loại là cấp tính hoặc mạn tính. Các dạng cụ thể của bệnh bạch cầu bao gồm, bằng các ví dụ không giới hạn, bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính (ALL); bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính (AML); bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (CLL); bệnh bạch cầu tủy bào mạn tính (CML); chứng rối loạn/khối u tăng sinh tủy xương (Myeloproliferative disorder/neoplasm - MPDS); và hội chứng loạn sản tủy. "U lympho" có thể là u lympho Hodgkin, u lympho không Hodgkin cả trường hợp không đau và trường hợp phát triển nhanh, u lympho Burkitt, và u lympho có nang (tế bào nhỏ và tế bào lớn), trong số các bệnh khác. U tủy có thể đề cập đến bệnh đa u tủy (MM), u tủy tế bào khổng lồ, u tủy chuỗi nặng, và u tủy chuỗi nhẹ hoặc Bence-Jones.

Các kháng thể đơn dòng điển hình theo sáng chế bao gồm, ví dụ, các kháng thể

được mô tả trong bản mô tả này. Các kháng thể đặc trưng bao gồm các kháng thể có chuỗi nhẹ biến đổi được lựa chọn từ Các SEQ ID NO: 5-30 và chuỗi nhẹ biến đổi được lựa chọn từ các SEQ ID NO: 31-47. Các kháng thể cũng bao gồm các kháng thể có chuỗi nhẹ biến đổi mà giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự trong ít nhất một trình tự trong số các SEQ ID NO: 5-30 và chuỗi nhẹ biến đổi là giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự trong ít nhất một trình tự trong số các SEQ ID NO: 31-47. Tốt hơn là, các kháng thể nhận diện và liên kết với CD47 của người và không gây ra mức ngưng kết đáng kể của tế bào hồng cầu người. Các kháng thể này được đề cập một cách tương ứng ở đây làm kháng thể CD47. Kháng thể CD47 bao gồm các kháng thể đơn dòng đầy đủ của người, cũng như các kháng thể đơn dòng được làm cho giống người và các kháng thể khảm. Các kháng thể này thể hiện tính đặc hiệu đối với CD47 của người, và chúng đã được thấy là để điều biến, *ví dụ,* phong bế, ức chế, khử chức năng, đối kháng, trung hòa hoặc nếu không thì can thiệp vào sự biểu hiện của CD47, hoạt tính và/hoặc phát tính hiệu mà không gây ra mức ngưng kết đáng kể của các tế bào hồng cầu.

Kháng thể CD47 đề xuất ở đây thể hiện hoạt tính ức chế, ví dụ ức chế sự biểu hiện của CD47 (*ví dụ,* ức chế sự biểu hiện bề mặt tế bào của CD47), hoạt tính, và/hoặc phát tín hiệu, hoặc bằng cách can thiệp vào sự tương tác giữa CD47 và SIRPα. Các kháng thể đề xuất ở đây làm suy giảm toàn bộ hoặc một phần hoặc nếu không thì điều biến sự biểu hiện của CD47 hoặc hoạt tính trên cơ sở liên kết với, hoặc nếu không thì can thiệp tới CD47, *ví dụ,* CD47 của người. Việc làm giảm hoặc sự điều biến chức năng sinh học của CD47 là hoàn toàn, đáng kể hoặc một phần dựa trên sự tương tác giữa các kháng thể và polypeptit và/hoặc peptit CD47 của người. Các kháng thể được cho là ức chế hoàn toàn sự biểu hiện hoặc hoạt tính của CD47 khi mức biểu hiện hoặc hoạt tính của CD47 với sự có mặt của kháng thể giảm đi ít nhất 95%, *ví dụ,* bằng 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% khi so sánh với mức biểu hiện hoặc hoạt tính của CD47 khi có sự tương tác, *ví dụ,* liên kết, với kháng thể được mô tả trong bản mô tả này. Kháng thể CD47 được cho là ức chế đáng kể sự biểu hiện hoặc hoạt tính của CD47 khi mức biểu hiện hoặc hoạt tính của CD47 với sự có mặt của kháng thể CD47 giảm đi ít nhất 50%, *ví dụ,* 55%, 60%, 75%, 80%, 85% hoặc 90% khi so sánh với mức biểu hiện hoặc hoạt tính của CD47 khi có sự liên kết với kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này. Các kháng thể được cho là ức chế một phần sự biểu hiện hoặc hoạt tính của CD47 khi mức biểu hiện hoặc hoạt tính của CD47 với sự có mặt của kháng thể giảm đi ít hơn 95%, *ví dụ,* 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%,

85% hoặc 90% khi so sánh với mức biểu hiện hoặc hoạt tính của CD47 khi có sự tương tác, *ví dụ,* liên kết, với kháng thể được mô tả trong bản mô tả này.

Các kháng thể theo sáng chế cũng bao gồm các kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với CD47, trong đó kháng thể không gây ra mức ngưng kết đáng kể, *ví dụ,* ngưng kết tế bào hồng cầu ("ngưng kết RBC"). Các kháng thể theo sáng chế liên kết duy nhất với CD47 theo cách để không thúc đẩy sự kết tụ các tế bào dương tính với CD47; tuy nhiên, khả năng của các kháng thể theo sáng chế liên kết với CD47 trên bề mặt tế bào và không gây ra hiện tượng kết tụ tế bào không chỉ giới hạn ở tế bào hồng cầu.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm kháng thể theo sáng chế và chất mang. Các dược phẩm này có thể được chứa trong bộ kit, ví dụ, kit chẩn đoán.

Sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng liên kết với CD47 hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó, trong đó kháng thể không gây ra mức ngưng kết đáng kể của các tế bào sau khi dùng, ví dụ, kháng thể không gây ra mức ngưng kết đáng kể các tế bào hồng cầu sau khi dùng. Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể khảm, kháng thể được làm cho giống người, hoặc kháng thể là hoàn toàn của người. Theo một số phương án, các kháng thể liên kết với CD47 của người. Theo một số phương án, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó ngăn cản CD47 tương tác với SIRPα. Các kháng thể được cho là ức chế hoàn toàn sự tương tác của CD47 và SIRPα khi mức tương tác CD47/SIRPα với sự có mặt của kháng thể giảm đi ít nhất 95%, *ví dụ,* bằng 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% khi so sánh với mức tương tác CD47/SIRPα khi có sự tương tác với kháng thể, *ví dụ,* liên kết với kháng thể. Các kháng thể được cho là ức chế một phần sự tương tác CD47/SIRPα khi mức tương tác CD47/SIRPα với sự có mặt của kháng thể giảm đi ít hơn 95%, *ví dụ,* 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% hoặc 90% khi so sánh với mức tương tác CD47/SIRPα khi có sự tương tác với kháng thể, *ví dụ,* liên kết với kháng thể.

Lượng kháng thể đủ để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ung thư ở đối tượng là, ví dụ, lượng đủ để khử tín hiệu CD47 (*xem, ví dụ,* Yamauchi et al., 2013 Blood, Jan 4. [Epub ahead of print]; Soto-Pantoja et al., 2013 Expert Opin Ther Targets, 17: 89-103; Irandoust et al., 2013 PLoS One, Epub Jan 8; Chao et al., 2012 Curr Opin Immunol, 24 :225-32; Theocharides et al., 2012 J Exp Med, 209(10): 1883-99; Csányi et al., 2012 Arterioscler Thromb Vasc Biol, 32: 2966-73; Maxhimer et al., 2009 Sci Transl Med, 1: 3ra7; Sarfati et al., 2008 Curr Drug Targets, 9: 842–850; Miyashita et al., 2004 Mol Biol Cell, 15: 3950–

3963; E.J. Brown và W.A. Frazier, 2001 Trends Cell Biol, 11: 130–135; Oldenborg et al., 2001 J Exp Med, 193: 855–862; Blazar et al., 2001 J Exp Med, 194: 541–549; Oldenborg et al., 2000 Science, 288: 2051–2054; và Gao et al., 1996 J Biol Chem, 271: 21–24). Ví dụ, lượng kháng thể đủ để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ung thư ở đối tượng là lượng đủ để khử tín hiệu ức chế thực bào trong các đại thực bào thường tạo ra bởi sự tương tác CD47/SIRPα trong trục phát tín hiệu CD47/SIRPα, đó là, kháng thể theo sáng chế thúc đẩy sự thực bào tế bào biểu hiện CD47 do đại thực bào gây ra. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "làm giảm" đề cập đến sự phát tín hiệu của CD47 giảm đi với sự có mặt của kháng thể theo sáng chế. Sự phát tín hiệu gây ra bởi CD47 giảm đi khi mức phát tín hiệu của CD47 với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế lớn hơn hoặc bằng 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99%, hoặc 100% thấp hơn mức đối chứng của sự phát tín hiệu của CD47 (*đó là,* mức phát tín hiệu CD47 với sự có mặt của kháng thể). Mức phát tín hiệu của CD47 được đo sử dụng bất kỳ kỹ thuật tiêu chuẩn nào, ví dụ, bằng các ví dụ không giới hạn, việc đo sự hoạt tính của các gen xuôi dòng, và/hoặc các thử nghiệm thông báo luxiferaza đáp ứng với sự hoạt hóa CD47. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng mức phát tín hiệu CD47 có thể được đo bằng cách sử dụng các thử nghiệm khác nhau, ví dụ, bao gồm, ví dụ, các bộ kit có sẵn trên thị trường.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó là dạng isotyp IgG. Theo một số phương án, vùng ổn định của kháng thể là dạng isotyp IgG1 của người, có trình tự axit amin:

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)

Theo một số phương án, vùng ổn định của IgG1 của người được thay đổi ở axit amin Asn297 (Boxed, Đánh số theo Kabat) để ngăn ngừa sự glycosyl hóa của kháng thể, ví dụ Asn297Ala (N297A). Theo một số phương án, vùng ổn định của kháng thể được thay đổi ở axit amin Leu235 (Đánh số theo Kabat) để thay đổi sự tương tác thụ thể Fc, ví dụ

Leu235Glu (L235E) hoặc Leu235Ala (L235A). Theo một số phương án, vùng ổn định của kháng thể được thay đổi ở axit amin Leu234 (Đánh số theo Kabat) để thay đổi sự tương tác thụ thể Fc, *ví dụ,* Leu234Ala (L234A). Theo một số phương án, vùng ổn định của kháng thể được thay đổi ở cả axit amin 234 và 235, ví dụ Leu234Ala và Leu235Ala (L234A/L235A) (EU index of *Kabat et al* 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*).

Theo một số phương án, vùng ổn định của kháng thể là dạng isotyp IgG2 của người, có trình tự axit amin:

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER
KCCVECPPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC
KVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG
FYPSDISVEW ESNGQPENNY KTTPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 2)

Theo một số phương án, vùng ổn định của IgG2 của người được thay đổi ở axit amin Asn297 (Boxed, Đánh số theo Kabat) để ngăn ngừa sự glycosyl hóa của kháng thể, *ví dụ,* Asn297Ala (N297A).

Theo một số phương án, vùng ổn định của kháng thể là isotyp IgG3 của người, có trình tự axit amin:

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRVEL
KTPLGDTTHT CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCPEPKSC
DTPPPCPRCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
NIFSCSVMHE ALHNRFTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 3)

Theo một số phương án, vùng ổn định của IgG3 của người được thay đổi ở axit amin Asn297 (Boxed, Đánh số theo Kabat) để ngăn ngừa sự glycosyl hóa của kháng thể, *ví dụ,* Asn297Ala (N297A). Theo một số phương án, vùng ổn định của IgG3 của người được

thay đổi ở axit amin 435 để kéo dài thời gian bán hủy, *ví dụ,* Arg435His (R435H) (EU index of *Kabat et al* 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*).

Theo một số phương án, vùng ổn định của kháng thể là isotyp IgG4 của người, có trình tự axit amin:

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 4)

Theo một số phương án, vùng ổn định của IgG4 của người được thay đổi trong vùng bản lề để ngăn ngừa hoặc làm giảm sự trao đổi mạch, *ví dụ,* Ser228Pro (S228P). Theo các phương án khác, vùng ổn định của IgG4 của người được thay đổi ở axit amin 235 để thay đổi các tương tác thụ thể Fc, *ví dụ,* Leu235Glu (L235E). Theo một số phương án, vùng ổn định của IgG4 của người thay đổi trong vùng bản lề và tại axit amin 235, *ví dụ,* Ser228Pro và Leu235Glu (S228P/L235E). Theo một số phương án, vùng ổn định của IgG4 của người được thay đổi ở axit amin Asn297 (Đánh số theo Kabat) để ngăn ngừa sự glycosyl hóa của kháng thể, *ví dụ,* Asn297Ala (N297A). (EU index of *Kabat et al* 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*).

Theo một số phương án, vùng ổn định của IgG của người được thay đổi để tăng cường liên kết FcRn. Các ví dụ về đột biến Fc mà tăng cường liên kết đối với FcRn là Met252Tyr, Ser254Thr, Thr256Glu (M252Y, S254T, T256E, một cách tương ứng) (Đánh số theo Kabat, Dall'Acqua *et al* 2006, *J. Biol Chem* Vol 281(33) 23514–23524), hoặc Met428Leu và Asn434Ser (M428L, N434S) (Zalevsky *et al* 2010 *Nature Biotech,* Vol 28(2) 157-159). (EU index of *Kabat et al* 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*). Theo một số phương án, vùng ổn định của IgG của người được thay đổi để thay đổi độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity - ADCC) và/hoặc tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement-dependent cytotoxicity - CDC), *ví dụ,* sự thay đổi axit amin mô tả trong Natsume et al., 2008 Cancer Res, 68(10): 3863-72; Idusogie et al., 2001 J Immunol, 166(4): 2571-5; Moore et al., 2010 mAbs, 2(2): 181-189; Lazar et al., 2006 PNAS, 103(11): 4005–4010, Shields et al., 2001 JBC, 276(9): 6591–

6604; Stavenhagen et al., 2007 Cancer Res, 67(18): 8882-8890; Stavenhagen et al., 2008 Advan. Enzyme Regul., 48: 152-164; Alegre et al, 1992 J Immunol, 148: 3461-3468; Reviewed in Kaneko và Niwa, 2011 Biodrugs, 25(1):1-11.

Theo một số phương án, vùng ổn định của IgG của người được thay đổi để gây ra sự heterodime hóa. Ví dụ, có sự biến đổi axit amin trong vùng CH3 ở Thr366, mà khi được thay thế bằng axit amin lớn hơn, *ví dụ,* Try (T366W), sẽ có khả năng bắt cặp ưu tiên với vùng CH3 thứ hai có sự thay đổi axit amin với các axit amin nhỏ hơn ở các vị trí Thr366, Leu368, và Tyr407, *ví dụ,* Ser, Ala và Val, một cách tương ứng (T366S/L368A/Y407V). Sự heterodime hóa thông qua vùng biến đổi CH3 có thể được làm ổn định thêm bằng cách đưa vào liên kết disulfua, ví dụ bằng cách thay đổi Ser354 thành Cys (S354C) và Y349 thành Cys (Y349C) ở vùng CH3 đối diện (tóm lược trong Carter, 2001 Journal of Immunological Methods, 248: 7–15).

Sáng chế đề xuất các dược phẩm bao gồm một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng liên kết với CD47 hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó, trong đó kháng thể không gây ra mức ngưng kết đáng kể các tế bào hồng cầu sau khi dùng.

Sự ngưng kết hồng cầu là ví dụ về sự tương tác đồng hình, trong đó hai tế bào biểu hiện CD47 được can thiệp để gây ra sự ngưng kết hoặc kết cụm khi xử lý với thực thể liên kết CD47 hóa trị hai. Khả năng liên kết với CD47 của các kháng thể theo sáng chế trên bề mặt tế bào và không gây ra hiện tượng kết tụ tế bào không chỉ giới hạn ở tế bào hồng cầu. Các kháng thể theo sáng chế đã được quan sát thấy là liên kết duy nhất với CD47 theo cách mà không thúc đẩy việc kết tụ các dòng tế bào dương tính với CD47, *ví dụ,* tế bào Daudi.

Trong một số trường hợp, kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (variable heavy -VH) được lựa chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 5-30. Kháng thể tùy ý chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (variable light -VL) được lựa chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 31-47. Trong một số trường hợp, kháng thể chứa vùng VH được lựa chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 5-30 và vùng VL được lựa chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 31-47. Các kháng thể theo sáng chế cũng bao gồm các kháng thể có chuỗi nhẹ biến đổi giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự trong ít nhất một trong các SEQ ID NO: 5-30 và chuỗi nhẹ biến đổi giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự trong ít nhất một trong các SEQ ID NO: 31-47. Theo khía cạnh khác, kháng thể chứa vùng

VH trong bất kỳ một trong các SEQ ID NO: 5, 7, 8, 11, 15-17, 20-22, và 27-30 cặp với vùng VL trong bất kỳ một trong các SEQ ID NO: 31-39, 42, 43, 44, và 47. Theo phương án khác, kháng thể chứa vùng VH trong bất kỳ một trong các SEQ ID NO: 5, 7, 8, 11, 12, 15-17, 20-22, và 27-30 bắt cặp với vùng VL trong bất kỳ một trong các SEQ ID NO: 31, 32, 35, 40, 41, 42, 43, 44, và 47. Theo khía cạnh khác, kháng thể chứa tổ hợp vùng VH và vùng VL được lựa chọn từ tổ hợp liệt kê trong Bảng 1.

Theo một số phương án, kháng thể CD47 hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó chứa trình tự vùng quyết định bổ trợ 1 của VH (complementarity determining region 1-CDR1) thể hiện trong SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, hoặc SEQ ID NO: 66, trình tự CDR2 của VH thể hiện trong SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, hoặc SEQ ID NO: 76, trình tự CDR3 của VH thể hiện trong SEQ ID NO: 52 hoặc SEQ ID NO: 77, trình tự CDR1 của VL thể hiện trong SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 67, hoặc SEQ ID NO: 68, trình tự CDR2 của VL thể hiện trong SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, hoặc SEQ ID NO: 71 và trình tự CDR3 của VL thể hiện trong SEQ ID NO: 55. Ví dụ, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó chứa trình tự CDR1 của VH thể hiện trong SEQ ID NO: 50, trình tự CDR2 của VH thể hiện trong SEQ ID NO: 51, trình tự CDR3 của VH thể hiện trong SEQ ID NO: 52, trình tự CDR1 của VL thể hiện trong SEQ ID NO: 53, trình tự CDR2 của VL thể hiện trong SEQ ID NO: 54, và trình tự CDR3 của VL thể hiện trong SEQ ID NO: 55. Trong ví dụ khác, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó chứa trình tự CDR1 của VH thể hiện trong SEQ ID NO: 50, trình tự CDR2 của VH thể hiện trong SEQ ID NO: 72, trình tự CDR3 của VH thể hiện trong SEQ ID NO: 52, trình tự CDR1 của VL thể hiện trong SEQ ID NO: 53, trình tự CDR2 của VL thể hiện trong SEQ ID NO: 71, và trình tự CDR3 của VL thể hiện trong SEQ ID NO: 55.

Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế liên kết với CD47 theo hướng đầu đến phần bên mà định vị trí của chuỗi nặng gần màng của tế bào biểu hiện CD47, trong khi chuỗi nhẹ hút giữ vị trí liên kết SIRPα trên CD47. Theo phương án khác, các kháng thể theo sáng chế liên kết với CD47 theo hướng đầu đến phần bên mà định vị trí chuỗi nhẹ gần màng của tế bào biểu hiện CD47, trong khi chuỗi nặng hút giữ vị trí liên kết SIRPα trên CD47.

Kháng thể CD47 liên kết với epitop bao gồm bất kỳ một gốc axit amin trong số các

gốc từ 1-116 của CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147 (*tức là,* SEQ ID NO: 48 không bao gồm trình tự tính hiệu (axit amin từ 1-18)). Ví dụ, các kháng thể có thể liên kết với epitop bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin Q31, N32, T33, T34, E35, V36, Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44, R45, D46, I47, Y48, T49, F50, D51, G52, A53, L54, N55, K56, S57, T58, V59, P60, T61, D62, F63, S64, S65, A66, K67, I68, E69, V70, S71, Q72, L73, L74, K75, G76, D77, A78, S79, L80, K81, M82, D83, K84, S85, D86, A87, V88, S89, H90, T91, G92, N93, Y94, T95, C96, E97, V98, T99, E100, L101, T102, R103, E104, G105, E106, T107, I108, I109, và E110 của CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147.

Trong một số trường hợp, các kháng thể có thể liên kết với epitop không liên tục bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44, R45, D46, I47, Y48, T49, F50, và D51 của CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế liên kết với epitop không liên tục bao gồm các gốc axit amin Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104, hoặc E106 của CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147. Ví dụ, các kháng thể có thể liên kết với epitop không liên tục mà bao gồm ít nhất các gốc của vòng KGRD (SEQ ID NO: 56) (gốc số 43-46) của CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế liên kết với epitop không liên tục bao gồm ít nhất các gốc Y37, K39, K41, vòng KGRD (SEQ ID NO: 56) (các gốc từ 43-46), D51, H90, N93, E97, T99, E104, và E106 của CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế liên kết với epitop không liên tục mà bao gồm các gốc Y37, K39, K41, vòng KGRD (SEQ ID NO: 56) (các gốc từ 43-46), D51, H90, N93, E97, T99, E104, và E106 của CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147.

Vùng VH của kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này trước hết tham gia vào liên kết với vòng KGRD (SEQ ID NO: 56) của CD47. Do đó, epitop duy nhất mà các kháng thể theo sáng chế liên kết với là trên mặt của CD47. Ngược với kháng thể CD47 hiện nay đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, xu hướng của vùng VH của kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này ở vị trí ở gần đầu trong màng là yếu tố quan trọng của các kháng thể này giúp ngăn chặn sự kết tụ tế bào, *ví dụ,* ngưng kết tế bào hồng cầu, bằng cách kìm các kháng thể sao cho chúng không tạo cầu nối với phân tử CD47 trên các tế bào gần kề. Thêm vào đó, vì vùng VK của kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này tương tác với gốc ở đỉnh như Y37, T102, và E104, là đối tượng tham gia vào liên kết SIRPα, trước hết vùng VK loại trừ một cách tự nhiên liên kết SIRPα với CD47.

Cũng được đề xuất là kháng thể được phân lập hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó cạnh tranh với kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này để ngăn ngừa CD47 tương tác với SIRPα.

Bản mô tả cũng bộc lộ polypeptit chứa các gốc axit amin Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104, và E106 of CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147. Bản mô tả cũng bộc lộ polypeptit chứa bất kỳ một gốc axit amin nào trong số các gốc từ 1-116 của CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147. Ví dụ, polypeptit chứa một hoặc nhiều gốc axit amin trong số Q31, N32, T33, T34, E35, V36, Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44, R45, D46, I47, Y48, T49, F50, D51, G52, A53, L54, N55, K56, S57, T58, V59, P60, T61, D62, F63, S64, S65, A66, K67, I68, E69, V70, S71, Q72, L73, L74, K75, G76, D77, A78, S79, L80, K81, M82, D83, K84, S85, D86, A87, V88, S89, H90, T91, G92, N93, Y94, T95, C96, E97, V98, T99, E100, L101, T102, R103, E104, G105, E106, T107, I108, I109, và E110 của CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147. Bản mô tả cũng bộc lộ phương pháp sử dụng polypeptit này làm kháng nguyên, *ví dụ,* kháng nguyên liên kết với kháng thể CD47.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó theo sáng chế để dùng trong phương pháp làm thuyên giảm triệu chứng bệnh ung thư hoặc tình trạng u tân tạo khác bằng cách cho đối tượng cần điều trị dùng một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng liên kết với CD47 hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó, trong đó kháng thể không gây ra mức ngưng kết đáng kể các tế bào hồng cầu sau khi dùng. Kháng thể được dùng với lượng đủ để làm thuyên giảm triệu chứng bệnh ung thư hoặc tình trạng u tân tạo khác ở đối tượng. Theo một số phương án, đối tượng là người. Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể khảm, được làm cho giống người hoặc hoàn toàn là của người. Theo một số phương án, kháng thể liên kết với CD47 của người. Theo một số phương án, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó ngăn ngừa CD47 tương tác với SIRPα. Theo một số phương án, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó là istyp IgG được lựa chọn từ nhóm bao gồm isotyp IgG1, isotyp IgG2, isotyp IgG3 và isotyp IgG4. Theo một số phương án, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó là isotyp IgG được lựa chọn từ IgG4P và IgG4PE.

Theo một số phương án, kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng tiếp hợp với một hoặc nhiều tác nhân bổ sung hoặc tổ hợp các tác nhân bổ sung. Các tác nhân bổ sung thích hợp bao gồm sự điều trị bằng dược phẩm và/hoặc phẫu thuật cho

đối tượng bệnh được chỉ định, ví dụ, bệnh ung thư. Ví dụ, kháng thể CD47 có thể được sử dụng tiếp hợp với một hoặc nhiều tác nhân hóa trị liệu hoặc tác nhân chống ung thư bổ sung. Theo cách khác, tác nhân hóa trị liệu bổ sung là xạ trị. Theo một số phương án, tác nhân hóa trị liệu là tác nhân gây chết tế bào. Theo một số phương án, tác nhân hóa trị liệu gây ra sự mất không đối xứng phospholipit dọc màng huyết tương, ví dụ gây ra sự tiếp xúc ở bề mặt tế bào của phosphatidylserin (PS). Theo một số phương án, tác nhân hóa trị liệu gây ra chứng stress liên quan đến cơ chất lưới nội chất (endoplasmic reticulum -ER). Theo một số phương án, tác nhân hóa trị liệu là chất ức chế proteasome. Theo một số phương án, tác nhân hóa trị liệu gây ra sự di chuyển của protein ER đến bề mặt tế bào. Theo một số phương án, tác nhân hóa trị liệu gây ra sự di chuyển và tiếp xúc trên bề mặt tế bào của calreticulin.

Theo một số phương án, kháng thể CD47 và tác nhân bổ sung được bào chế thành chế phẩm đơn để điều trị bệnh, và kháng thể CD47 và tác nhân bổ sung được dùng một cách đồng thời. Theo cách khác, kháng thể CD47 và tác nhân bổ sung là tách biệt với nhau, *ví dụ,* mỗi thành phần được bào chế thành một chế phẩm riêng để điều trị, và kháng thể CD47 và tác nhân bổ sung được dùng đồng thời, hoặc kháng thể CD47 và tác nhân bổ sung được dùng ở các thời điểm khác nhau trong quá trình điều trị. Ví dụ, kháng thể CD47 được dùng trước khi dùng tác nhân bổ sung, kháng thể CD47 được dùng sau khi dùng tác nhân bổ sung, hoặc kháng thể CD47 và tác nhân bổ sung được dùng luôn phiên. Như được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể CD47 và tác nhân bổ sung được dùng ở dạng liều đơn hoặc đa liều.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các kháng thể theo sáng chế có nhiều cách dùng. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế được dùng làm tác nhân điều trị, làm thuốc thử trong bộ kit chẩn đoán hoặc làm công cụ chẩn đoán, hoặc làm thuốc thử trong các thử nghiệm so sánh để tạo thành thuốc thử có tác dụng điều trị.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1A là đồ thị minh họa liên kết của CD47 trên tế bào Daudi bởi các kháng thể trong dịch nổi tế bào lai được định mức bởi máy đếm tế bào kiểu dòng. Fig. 1B là đồ thị thể hiện khả năng của một số kháng thể CD47 trong dịch nổi tế bào lai để phong bế liên kết của SIRPα tái tổ hợp của người đối với CD47 tái tổ hợp của người, như được xác định bằng ELISA.

Fig. 2 là dãy đồ thị minh họa (A) liên kết của kháng thể CD47 tinh sạch của chuột với tế bào Raji, dòng nuôi cấy của tế bào lympho nguyên bào thu được từ u lympho Burkitt, và (B) tế bào CCRF-CEM, dòng tế bào như tế bào lympho nguyên bào T của người dương tính với CD47, như được phân tích bởi máy đếm tế bào kiểu dòng. Thử nghiệm này so sánh liên kết của kháng thể của chuột theo sáng chế với kháng thể CD47 bán trên thị trường, B6H12 và 2D3.

Fig. 3 là dãy đồ thị minh họa khả năng của các kháng thể CD47 để chặn liên kết SIRPα sử dụng (A) ELISA với protein tái tổ hợp của người, hoặc (B) bởi máy đếm tế bào kiểu dòng sử dụng tế bào CCRF-CEM và protein SIRPα tái tổ hợp của người.

Fig. 4 là dãy ảnh, đồ thị và bảng biểu thể hiện sự ngưng kết RBC bởi kháng thể CD47. Sự ngưng kết RBC được xác nhận bởi sự xuất hiện của khói mù trong giếng, trong khi RBC không bị ngưng kết xuất hiện ở dạng đốm nhỏ. Fig. 4A cho thấy rằng kháng thể 2A1 không gây ngưng kết tế bào hồng cầu ở mọi nồng độ thử nghiệm. Chỉ số ngưng kết được minh họa trên đồ thị. Fig. 4B cho thấy 2A1 là hiếm trong số nhiều kháng thể CD47 không có khả năng gây ngưng kết RBC. Cũng được thể hiện là sự thiếu hoạt tính ngưng kết bởi loại kháng thể khảm của người của 2A1 (2A1-xi). Fig. 4C cho thấy rằng kháng thể đơn dòng kháng CD47 2D3, không phong bế SIRPα, không gây ra sự ngưng kết hồng cầu. Fig. 4D thể hiện dãy nồng độ cao hơn của kháng thể CD47 thử nghiệm ngưng kết hồng cầu và chứng minh hiệu ứng vùng ức chế. Chỉ số ngưng kết hồng cầu được minh họa trên đồ thị. Fig. 4E minh họa phạm vi nồng độ hẹp hơn nhiều để ngưng kết hồng cầu bởi kháng thể CD47, 1B4, trong khi hiệu quả này không có trên cơ sở liên kết 2A1. Fig. 4F cho thấy rằng 2A1, 2A1 khảm (2A1-xi), và các biến thể được làm cho giống người không gây ra sự ngưng kết hồng cầu. Trong hầu hết các thử nghiệm, kháng thể 9E4 và kháng thể B6H12 thương mại được sử dụng làm đối chứng dương đối với sự ngưng kết hồng cầu. Các kháng thể bán trên thị trường khác được sử dụng trong các thử nghiệm này là các kháng thể phong bế SIRPα, BRIC126 và CC2C6, và các kháng thể phong bế đối tượng không phải là SIRPα, 2D3.

Fig. 5 là đồ thị thể hiện liên kết 2A1 và B6H12 với tế bào B và Raji của khỉ Cynomolgus (cyno), được đo bằng máy đếm tế bào kiểu dòng. 2A1 liên kết với CD47 của khỉ cyno và người với ái lực tương đương, cũng như B6H12, mặc dù ái lực thấp hơn đối với cả CD47 của người và của khỉ cyno so với 2A1.

Fig. 6 là đồ thị minh họa liên kết của 2A1, 2A1-xi, và B6H12 với tế bào Raji, được xác định bằng máy đếm tế bào kiểu dòng. Quan trọng là đồ thị cho thấy rằng trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) và chuỗi nhẹ (VL) được giải thích một cách chính xác ở dạng khảm của 2A1.

Fig. 7A-7J là dãy đồ thị thể hiện sự liên kết của các biến thể được làm cho giống người của 2A1 với tế bào Raji. 2A1-xi được sử dụng làm đối chứng nội trên hầu hết các đồ thị. Tổ hợp nhiều chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 8.

Fig. 8A là hình vẽ của vết từ phép sắc ký loại kích thước sử dụng FLPC AKTA với cột superdex200. Được thể hiện là các biến thể IgG1, IgG4P, và IgG4PE của kháng thể AB6.12. Cả ba biến thể đều có trên 97% monome. Fig. 8B là ảnh chụp gel SDS-PAGE xanh coomassie của nhiều biến thể được làm cho giống người của 2A1 dưới điều kiện khử (Reducing-R) và không khử (Non-Reducing -NR).

Fig. 9 là dãy đồ thị minh họa khả năng của kháng thể CD47 để thúc đẩy sự thực bào dòng tế bào khối u của người bằng bạch cầu mono của người bắt nguồn từ các đại thực bào (MDM). Fig. 9A là đồ thị thể hiện chỉ số thực bào, trong đó các kháng thể được sử dụng là kháng thể thương mại B6H12, kháng thể 2A1 của chuột, kháng thể AB2.05 là biến thể được làm cho giống người, kháng thể thương mại không chặn 2D3. Fig. 9B là đồ thị thể hiện chỉ số thực bào, trong đó các kháng thể được sử dụng là kháng thể thương mại B6H12, kháng thể được làm cho giống người AB2.05 (gG1 của người), và các biến thể của IgG1, IgG4P, và IgG4PE của kháng thể được làm cho giống người AB6.12. Tế bào CCRF-CEM được sử dụng làm dòng tế bào đích với CD47 trong các thử nghiệm này.

Fig. 10 là dãy đồ thị thể hiện hiệu quả chống khối u của kháng thể CD47 ở mẫu khối u Raji. Fig. 10A là đồ thị thể hiện tính hiệu lực của các kháng thể của chuột 9E4, 1B4, 2A1, và kháng trên thị trường B6H12. Fig. 10B là độ thị thể hiện tính hiệu lực của isotyp IgG1, IgG4P, và IgG4PE của kháng thể được làm cho giống người AB6.12, cùng với kháng thể 2A1. Trong cả hai mẫu, chuột được điều trị với liều kháng thể 200μg ba lần một tuần.

Fig. 11 là biểu diễn đồ thị phức hợp đồng tinh thể của CD47-IgV với vùng SIRPα-IgV (A, (Protein Data Bank (PDB) Reference No. 2JJS), B6H12 (B), và 2A1 (C). 2A1 và liên kết B6H12 ở các định hướng rất khác nhau và các epitop khác biệt trên CD47, cả hai đều chồng lấn vị trí liên kết SIRPα. Kháng thể 2A1 liên kết theo hướng đầu đến phần bên

trên protein CD47.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với CD47, bao gồm CD47 của người. Các kháng thể này được đề cập chung ở đây là kháng thể CD47.

CD47, thụ thể xuyên màng nhiều lần thuộc siêu họ globulin miễn dịch, tương tác với SIRPα (protein điều hòa tín hiệu α) trên các đại thực bào và nhờ đó làm giảm sự đại thực bào. Các tế bào ung thư theo con đường này sẽ tránh được sự đại thực bào. Như được mô tả chi tiết dưới đây, đây là cơ chế mới của việc tránh miễn dịch của khối u, và hướng đích điều trị CD47 được ứng dụng rộng rãi đối với nhiều bệnh ung thư.

Sự biểu hiện của CD47 tương quan với các biểu hiện lâm sàng trầm trọng ở nhiều bệnh ác tính khác nhau, bao gồm U lympho Non-Hodgkin (NHL), bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu cấp tính do tủy xương tạo ra (Acute Myelogenous Leukemia -AML), bệnh ung thư buồng trứng, u thần kinh đệm, bệnh u nguyên bào xốp, v.v. Thêm vào đó, CD47 đã được nhận diện là tác nhân tạo thành tế bào gốc ung thư ở cả bệnh bạch cầu và khối u rắn (Jaiswal et al., 2009 Cell, 138(2): 271-85; Chan et al., 2009 Proc Natl Acad Sci USA, 106(33): 14016-21; Chan et al., 2010 Curr Opin Urol, 20(5): 393-7; Majeti R et al., 2011 Oncogene, 30(9): 1009-19).

Các kháng thể phong bế CD47 đã được chứng minh là có nhiều hoạt tính chống khối u với các mẫu khối u *in vivo*. Ngoài ra, các kháng thể này đã được thấy là hiệp đồng với các kháng thể điều trị khác bao gồm Rituxan® và Herceptin® ở các mẫu khối u. Sự phong bế tương tác của CD47 với SIRPα là khả năng thúc đẩy sự thực bào các tế bào biểu hiện CD47 bởi các đại thực bào (Tóm lược trong Chao et al., 2012 Curr Opin Immunol, 24(2): 225-32). Các con chuột thiếu CD47 kháng một cách rõ rệt liệu pháp xạ trị, đã gợi ý về vai trò của việc nhắm đích CD47 trong tổ hợp với liệu pháp xạ trị (Isenberg et al., 2008 Am J Pathol, 173(4): 1100–1112; Maxhimer et al., 2009 Sci Transl Med, 1(3): 3ra7). Ngoài ra, các mẫu khối u cùng loại trong chuột thể hiện sự di căn ở xương giảm so với chuột kiểu dại (Uluçkan et al., 2009 Cancer Res, 69(7): 3196-204).

Quan trọng là hầu hết các kháng thể CD47 đã được ghi nhận là gây ra sự ngưng kết hồng cầu ở người. Sự ngưng kết hồng cầu là ví dụ về tương tác đồng hình, trong đó hai tế bào biểu hiện CD47 được tác động để ngưng kết hoặc kết tụ lại khi được xử lý bằng thực

thể liên kết với CD47 hóa trị hai. Ví dụ, kháng thể CD47, MABL, là IgG hoặc $F(ab')_2$ đầy đủ, đã được ghi nhận là gây ra sự ngưng kết hồng cầu, và, chỉ khi MABL được thay thế vào vị trí scFv hoặc scFv hóa trị hai, tác dụng này mới được giảm đi. (xem, *ví dụ,* Uno S, Kinoshita Y, Azuma Y et al, Antitumor activity of monoclonal antibodies against CD47 in xenograft models of human leukemia. Oncol Rep 2007; 17: 1189–94; Kikuchi Y, Uno S, Yoshimura Y et al. A bivalent single-chain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells. Biochem Biophys Res Commun 2004; 315: 912–8). Kháng thể CD47 khác đã biết bao gồm B6H12, BRIC126, và CC2C6 cũng gây ra sự ngưng kết các RBC, như được mô tả chi tiết dưới đây. Do đó, sự ngưng kết tế bào thể hiện giới hạn chính đối với việc hướng đích điều trị CD47 với các kháng thể IgG đầy đủ hiện có.

Ngoài ra, đặc tính quan trọng của kháng thể CD47 là khả năng phong bế tương tác của CD47 và SIRPα nhằm thúc đẩy sự thực bào của các tế bào biểu hiện CD47 bởi các đại thực bào. Nhiều kháng thể CD47 hiện nay phong bế SIRPα; tuy nhiên, trước khi sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, các kháng thể hiện có mà phong bế SIRPα gây ra tác dụng phụ của việc ngưng kết hồng cầu, điều này như được mô tả trong bản mô tả này là không mong muốn. Các kháng thể hiện có khác, như 2D3, không gây ra sự ngưng kết hồng cầu; tuy nhiên, các kháng thể này cũng không phong bế SIRPα, dẫn đến chúng kém hiệu quả trong việc thúc đẩy sự thực bào. Do đó, trước khi sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, có nhu cầu cấp bách đối với việc nhận diện kháng thể CD47 và phong bế SIRPα mà không gây ra sự kết tụ tế bào.

Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng phân lập được hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó liên kết với CD47 người, trong đó kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó liên kết với epitop không liên tục trên CD47, trong đó epitop không liên tục này chứa các gốc axit amin Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104, và E106 của CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147, và trong đó kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó ngăn ngừa CD47 khỏi việc tương tác với protein điều hòa tín hiệu α (signal-regulatory-protein α - SIRPα) và không gây ra mức ngưng kết đáng kể các tế bào sau khi dùng.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó là kháng thể khảm hoặc được làm giống như của người.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch

của nó thúc đẩy sự thực bào tế bào biểu hiện CD47 gây ra bởi đại thực bào.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó là isotyp IgG được chọn từ nhóm gồm isotyp IgG1, isotyp IgG2, isotyp IgG3, và isotyp IgG4.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó là isotyp IgG được chọn từ IgG4P và IgG4PE.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó chứa:

(i) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 72,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 71, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(ii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(iii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 67,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 69, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(iv) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 67,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 70, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(v) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 68,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(vi) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 72,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 68,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(vii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 72,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 68,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 71, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(viii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 76,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 68,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(ix) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 76,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 68,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 71, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55

(x) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 77,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,

trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(xi) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 57,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(xii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 60,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(xiii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 61,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55; hoặc

(xiv) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 62,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó chứa:

(i) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 5, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 31;

(ii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 5, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 32;

(iii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và

trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 33;

(iv) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 34;

(v) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(vi) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 36;

(vii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 37;

(viii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 38;

(ix) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 39;

(x) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 43;

(xi) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 8, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 39;

(xii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 11, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 42;

(xiii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 11, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 43;

(xiv) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 11, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 44;

(xv) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 11, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 47;

(xvi) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 15, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 43;

(xvii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 15, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 44;

(xviii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 16, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xix) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 17, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xx) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 20, và

trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xxi) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 21, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xxii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 22, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xxiii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 27, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xxiv) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 28, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xxv) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 29, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35; hoặc

(xxvi) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 30, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó theo sáng chế và chất mang.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó theo sáng chế để dùng trong phương pháp làm thuyên giảm triệu chứng của bệnh ung thư hoặc các tình trạng u tân tạo khác ở đối tượng.

Theo một số phương án của sáng chế, đối tượng là người.

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp này còn bao gồm bước sử dụng hóa trị liệu.

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp này còn bao gồm bước sử dụng xạ trị.

Kháng thể CD47 theo sáng chế tránh được tác dụng không mong muốn của việc ngưng kết hồng cầu, nhờ đó làm tăng hiệu quả của việc hướng đích điều trị CD47, và duy trì khả năng phong bế tương tác của CD47 với SIRPα, nhờ đó thúc đẩy sự thực bào của các tế bào biểu hiện CD47. Cụ thể là, kháng thể CD47 isotyp IgG đầy đủ theo sáng chế (*ví dụ,* 2A1 và các dẫn xuất được làm cho giống người của nó bao gồm các dẫn xuất được nêu trong Bảng 1) không gây ra sự kết tụ tế bào ở mức đáng kể. Ví dụ, kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ngưng kết RBC ở mức đáng kể. Được mô tả trong bản mô tả này là

kháng thể CD47 thứ nhất ở dạng IgG đầy đủ mà phong bế SIRPα và không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể. Tóm lại, các kháng thể theo sáng chế (*ví dụ,* kháng thể 2A1 và các dẫn xuất được làm cho giống người của nó) là duy nhất trong số các kháng thể CD47 hiện có về khả năng phong bế SIRPα, nhưng không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể.

Kháng thể CD47 theo sáng chế thể hiện nhiều đặc tính mong muốn, ví dụ, bằng các ví dụ không giới hạn, phong bế một cách có hiệu lực sự tương tác giữa CD47 và phối tử của nó SIRPα, mà không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể hoặc nếu không thì điều chỉnh sự ngưng kết hồng cầu, cũng như hoạt tính chống khối u hiệu quả. Ví dụ, kháng thể CD47 theo sáng chế phong bế ít nhất 40%, ít nhất 45%, ít nhất 50%, ít nhất 55%, ít nhất 60%, ít nhất 65%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% sự tương tác giữa CD47 và SIRPα khi so sánh với mức tương tác giữa CD47 và SIRPα với sự có mặt của kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này. Kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức ngưng kết đáng kể các tế bào, *ví dụ,* kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức ngưng kết đáng kể các tế bào hồng cầu. Ví dụ, mức ngưng kết với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế giảm đi ít nhất 5%, ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc ít nhất 99% so với mức ngưng kết với sự có mặt của kháng thể CD47 hiện nay. Theo một số phương án, kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức ngưng kết đáng kể nếu mức ngưng kết với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế giảm đi ít nhất 5%, ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc ít nhất 99% so với mức ngưng kết với sự có mặt của kháng thể CD47, 1B4, chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 80 và SEQ ID NO: 81, một cách tương ứng. Các kháng thể theo sáng chế cũng có hiệu lực đáng kể hơn đối với các mẫu khối u so với các kháng thể đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, khả năng của các đại thực bào để thực bào các tế bào khối u với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế tăng lên ít nhất 5%, ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc ít nhất 99% so với khả năng của các đại thực bào để thực bào các tế bào khối u với sự có mặt của kháng thể CD47 hiện nay.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận thấy rằng có thể định lượng, mà không cần thử nghiệm quá mức, mức ngưng kết, *ví dụ,* mức ngưng kết các RBC. Ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận thấy rằng

mức ngưng kết hồng cầu được xác định bằng cách đo vùng chấm RBC sau khi tiến hành thử nghiệm ngưng kết hồng cầu với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế, như được mô tả trong các ví dụ dưới đây. Trong một số trường hợp, vùng chấm RBC với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế so với vùng chấm RBC với sự có mặt của kháng thể CD47, *đó là,* không có hiện tượng ngưng kết hồng cầu. Theo cách này, sự ngưng kết hồng cầu được định lượng tương ứng với đối chứng đường gốc. Vùng chấm RBC lớn hơn tương ứng với mức ngưng kết hồng cầu cao hơn. Theo cách khác, việc đo mật độ chấm RBC có thể được sử dụng để định lượng sự ngưng kết hồng cầu.

Kháng thể CD47 theo sáng chế liên kết với CD47 của người và phong bế tương tác của nó với SIRPα (Fig. 1B, 3, và 7J). Các kháng thể này không gây ra mức ngưng kết đáng kể hồng cầu người (Fig. 4). Các kháng thể này có khả năng thúc đẩy sự thực bào các tế bào khối u bởi các đại thực bào (Fig. 9). Ngoài ra, kháng thể CD47 thể hiện hoạt tính chống khối u hiệu quả ở mẫu chuột có u lympho người (Fig. 10). Do đó, kháng thể CD47 theo sáng chế tránh được nhân tố giới hạn chính đối với việc hướng đích điều trị CD47. Do đó, kháng thể CD47 theo sáng chế giữ vai trò rất quan trọng trong việc điều trị nhiều bệnh ung thư.

Các kháng thể theo sáng chế liên kết đặc hiệu với CD47 của người, phong bế, ức chế, phá vỡ hoặc nếu không thì điều chỉnh sự tương tác giữa CD47 của người và SIRPα của người mà không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể hoặc nếu không thì điều chỉnh sự ngưng kết hồng cầu.

Các kháng thể theo sáng chế liên kết với epitop CD47 với hệ số liên kết cân bằng (K_d) of ≤1 μM, *ví dụ,* ≤ 100 nM, tốt hơn là ≤ 10 nM, và tốt hơn nữa là ≤ 1 nM. Ví dụ, kháng thể CD47 đề xuất ở đây ức chế K_d trong phạm vi xấp xỉ giữa ≤ 1 nM đến khoảng 1 pM.

Kháng thể CD47 theo sáng chế được dùng để điều biến, phong bế, ức chế, làm giảm, đối kháng, trung hòa hoặc nếu không thì can thiệp vào hoạt tính chức năng của CD47 được phân bố một cách rộng rãi. Các hoạt tính chức năng của CD47 bao gồm ví dụ, sự phát tín hiệu thông qua tương tác với SIRPα, điều chỉnh, *ví dụ,* làm tăng, nồng độ canxi nội bào trên cơ sở sự bám dính của tế bào với cơ chất lưới ngoại bào, tương tác với vùng liên kết tế bào đầu C của thrombospondin, tương tác với fibrinogen, và tương tác với các integrin khác nhau. Ví dụ, kháng thể CD47 ức chế hoàn toàn hoặc ức chế một phần hoạt

tính chức năng của CD47 bằng cách điều biến, phong bế, ức chế, làm giảm, đối kháng, trung hòa hoặc nếu không thì can thiệt một phần hoặc hoàn toàn vào liên kết của CD47 với SIRPα.

Kháng thể CD47 được cho là điều biến, phong bế, ức chế, làm giảm, đối kháng, trung hòa hoặc nếu không thì can thiệp hoàn toàn vào hoạt tính chức năng của CD47 khi mức hoạt tính chức năng của CD47 với sự có mặt của kháng thể CD47 giảm đi ít nhất 95%, ví dụ, bằng 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% khi so sánh với mức hoạt tính chức năng của CD47 khi có sự liên kết với kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này. Kháng thể CD47 được cho là phong bế, ức chế, làm giảm, đối kháng, trung hòa hoặc nếu không thì can thiệp một cách đáng kể vào hoạt tính chức năng của CD47 khi mức hoạt tính của CD47 với sự có mặt của kháng thể CD47 giảm đi ít nhất 50%, *ví dụ,* 55%, 60%, 75%, 80%, 85% hoặc 90% khi so sánh với mức hoạt tính của CD47 khi có sự liên kết với kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này. Kháng thể CD47 được cho là điều biến, phong bế, ức chế, làm giảm, đối kháng, trung hòa hoặc nếu không thì can thiệp một phần vào hoạt tính chức năng của CD47 khi mức hoạt tính của CD47 với sự có mặt của kháng thể CD47 giảm đi ít hơn 95%, *ví dụ,* 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% hoặc 90% khi so sánh với mức hoạt tính của CD47 khi có sự liên kết với kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này.

Các định nghĩa

Trừ khi có định nghĩa khác, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật sử dụng liên quan đến sáng chế sẽ có nghĩa mà nó thường được hiểu bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực. Ngoài ra, trừ khi có yêu cầu khác bởi ngữ cảnh, các thuật ngữ số ít sẽ bao gồm các thuật ngữ số nhiều và các thuật ngữ số nhiều sẽ bao gồm số ít. Nói chung, danh pháp hóa học được sử dụng liên quan đến, và các kỹ thuật của việc nuôi cấy tế bào và mô, sinh học phân tử, và hóa học protein và oligo- hoặc polynucleotit và lai tế bào được mô tả trong bản mô tả này là các kỹ thuật đã được biết và thường được sử dụng trong lĩnh vực. Các kỹ thuật tiêu chuẩn được sử dụng cho ADN tái tổ hợp, sự tổng hợp oligonucleotit, và nuôi cấy mô và biến nạp (*ví dụ,* điện biến nạp, chuyển nhiễm liposom). Sự tương tác do enzym và các kỹ thuật tinh sạch theo mô tả của nhà sản xuất như thường được thực hiện trong lĩnh vực hoặc như được mô tả trong bản mô tả này. Các kỹ thuật nêu trên và các quy trình thường được thực hiện theo các phương pháp truyền thống đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật và như được mô tả trong các tài liệu tham khảo chung hoặc cụ thể hơn

mà được trích dẫn và bàn luận khi mô tả sáng chế. *Xem, ví dụ,* Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Các danh pháp được sử dụng liên quan đến và các quy trình phòng thí nghiệm và các kỹ thuật về hóa phân tích, hóa hữu cơ tổng hợp và hóa dược và y được mô tả trong bản mô tả này là các quy trình, kỹ thuật đã được biết đến rộng rãi và thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật. Các kỹ thuật tiêu chuẩn được sử dụng để tổng hợp hóa học, phân tích hóa học, bào chế dược phẩm, chế phẩm và cấp, và điều trị cho người bệnh.

Như được sử dụng ở đây theo bộc lộ của sáng chế, các thuật ngữ sau đây, trừ khi có chỉ định khác, sẽ được hiểu là có các nghĩa sau đây:

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ CD47, protein liên quan đến integrin (integrin-associated protein -IAP), kháng nguyên ung thư buồng trứng OA3, kháng nguyên liên quan đến Rh và MER6 là đồng nghĩa với nhau và có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Các thuật ngữ tế bào hồng cầu, và hồng cầu là đồng nghĩa và được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này.

Thuật ngữ kết tụ đề cập đến việc kết tụ tế bào, trong khi thuật ngữ sự ngưng kết hồng cầu đề cập đến sự kết tụ các tập con cụ thể của tế bào, đó là, tế bào hồng cầu. Do đó, sự ngưng kết hồng cầu là một dạng của kết tụ tế bào.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể" đề cập đến các phân tử globulin miễn dịch và các đoạn có hoạt tính miễn dịch của phân tử globulin miễn dịch (Ig), *đó là,* các phân tử chứa vị trí liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với (phản ứng miễn dịch với) kháng nguyên. Bằng thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" hoặc "phản ứng miễn dịch với" "hoặc được định hướng chống lại" có nghĩa là kháng thể phản ứng với một hoặc nhiều quyết định kháng nguyên của kháng nguyên mong muốn và không phản ứng với các polypeptit khác hoặc liên kết với ái lực nhỏ hơn nhiều ($K_d > 10^{-6}$). Các kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, kháng thể khảm, dAb (kháng thể vùng), chuỗi đơn, các đoạn Fab, Fab' và $F(ab')_2$, thư viện biểu hiện F_v, scFvs, và Fab.

Các đơn vị cấu trúc kháng thể cơ bản đã được biết là bao gồm tetrame. Mỗi tetrame

bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi cặp có một chuỗi "nhẹ" (khoảng 25 kDa) và một chuỗi "nặng" (khoảng 50-70 kDa). Phần đầu amin của mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi khoảng 100 đến 110 axit amin hoặc nhiều hơn trước hết là chịu trách nhiệm để nhận diện kháng nguyên. Phần đầu carboxy của mỗi chuỗi xác định vùng hằng định trước hết là chịu trách nhiệm cho chức năng là cơ quan phản ứng lại kích thích. Nhìn chung, các phân tử kháng thể thu được từ người liên quan đến bất kỳ kháng thể trong số các lớp IgG, IgM, IgA, IgE và IgD, chúng khác nhau bởi bản chất của chuỗi nặng có mặt trong phân tử. Mỗi lớp nhất định cũng có các phân lớp, như IgG_1, IgG_2, và các phân lớp khác. Ngoài ra, ở người, chuỗi nhẹ có thể là chuỗi kappa lambda.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" (MAb) hoặc "chế phẩm chứa kháng thể đơn dòng", như được sử dụng ở đây, đề cập đến tập hợp các phân tử kháng thể chứa duy nhất một loại phân tử kháng thể chứa sản phẩm gen là chuỗi nhẹ duy nhất và sản phẩm gen là chuỗi nặng duy nhất. Cụ thể là, các vùng quyết định bổ trợ (CDRs) của kháng thể đơn dòng là giống nhau ở mọi phân tử kháng thể trong tập hợp. Các MAb chứa vị trí liên kết kháng nguyên có khả năng phản ứng miễn dịch với epitop cụ thể của kháng nguyên đặc trưng bởi ái lực liên kết duy nhất đối với nó.

Nhìn chung, các phân tử kháng thể thu được từ người liên quan đến bất kỳ trong số các lớp IgG, IgM, IgA, IgE và IgD, chúng khác nhau bởi bản chất của sự có mặt của chuỗi nặng trong phân tử. Mỗi lớp nhất định có các phân lớp, như IgG_1, IgG_2, và các phân lớp khác. Ngoài ra, ở người, chuỗi nhẹ có thể là kappa hoặc lambda.

Thuật ngữ "vị trí liên kết kháng nguyên" hoặc "phần liên kết" đề cập đến phần của phân tử globulin miễn dịch mà tham gia vào liên kết với kháng nguyên. Vị trí liên kết kháng nguyên được tạo thành bởi gốc axit amin của vùng biến đổi ("V") đầu N của chuỗi nặng ("H") và chuỗi nhẹ ("L"). Ba dải phân rẽ cao trong vùng chữ V của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, được đề cập đến là "vùng siêu biến" được đặt giữa các dải bên bảo toàn cao cũng được biết là "vùng khung," hoặc "FR". Do đó, thuật ngữ "FR" đề cập đến các trình tự axit amin mà được thấy một cách tự nhiên giữa, và liền kề với, vùng siêu biến trong globulin miễn dịch. Trong phân tử kháng thể, ba vùng siêu biến của chuỗi nhẹ và ba vùng siêu biến của chuỗi nặng được bố trí cân xứng với nhau trong không gian ba chiều để tạo thành bề mặt liên kết kháng nguyên. Bề mặt liên kết kháng nguyên là bổ sung với không gian ba chiều của kháng nguyên được liên kết, và ba vùng siêu biến của mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đề cập là "vùng quyết định bổ trợ," hoặc "CDR" Sự phân bổ các axit amin

đến mỗi vùng là phù hợp với các định nghĩa của "Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest" (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 và 1991)), hoặc Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia *et al.* Nature 342:878-883 (1989).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "epitop" bao gồm bất kỳ nhân tố quyết định là protein có khả năng liên kết đặc hiệu với globulin miễn dịch hoặc đoạn của nó, hoặc thụ thể tế bào T. Thuật ngữ "epitop" bao gồm nhân tố quyết định protein bất kỳ có khả năng liên kết đặc hiệu với globulin miễn dịch, hoặc thụ thể tế bào T. Nhân tố quyết định epitop thường bao gồm các nhóm bề mặt có hoạt tính hóa học của các phân tử như axit amin hoặc mạch bên của đường và thường có các đặc tính cấu trúc ba chiều cụ thể, cũng như các đặc tính điện tích cụ thể. Kháng thể được cho là liên kết đặc hiệu với kháng nguyên khi hằng số phân ly là ≤ 1 μM; *ví dụ,* ≤ 100 nM, tốt hơn là ≤ 10 nM và tốt hơn nữa là ≤ 1 nM.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "liên kết miễn dịch" và "các tính chất liên kết miễn dịch" đề cập đến các tương tác không cộng hóa trị của các dạng xảy ra giữa phân tử globulin miễn dịch và kháng nguyên trong đó globulin là đặc hiệu. Độ mạnh hoặc ái lực của các tương tác liên kết miễn dịch có thể được thể hiện bởi thuật ngữ hằng số phân ly (K_d) của tương tác, trong đó K_d nhỏ hơn thể hiện ái lực lớn hơn. Các đặc tính liên kết miễn dịch của các polypeptit lựa chọn có thể được định lượng sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Mỗi phương pháp này đòi hỏi việc đo tỷ lệ vị trí liên kết kháng nguyên/sự tạo thành và phân ly phức hợp kháng nguyên, trong đó các tỷ lệ này phụ thuộc vào nồng độ của các thành phần của phức hợp, ái lực tương tác và các thông số hình học gây ảnh hưởng một cách như nhau đối với tỷ lệ ở cả hai hướng. Do đó, cả "dựa trên hằng số tỷ lệ on" (k_{on}) và "hằng số tỷ lệ off" (k_{off}) có thể được xác định bởi sự tính toán nồng độ và tỷ lệ thực tế của sự liên kết và phân ly. (xem, Nature 361:186-87 (1993)). Tỷ lệ k_{off}/k_{on} cho phép bỏ đi các thông số không liên quan đến ái lực, và bằng với hệ số phân ly K_d. (xem,, *generally*, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Kháng thể theo sáng chế được cho là liên kết đặc hiệu với CD47, khi hệ số liên kết cân bằng (K_d) là ≤ 1 μM, tốt hơn là ≤ 100 nM, tốt hơn nữa là ≤ 10 nM, và tốt nhất là ≤ 100 pM đến khoảng 1 pM, như được đo bởi các thử nghiệm như các thử nghiệm liên kết chất gắn phóng xạ, cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface Plasmon Resonance - SPR), thử nghiệm liên kết đếm tế bào theo dòng, hoặc các thử nghiệm tương tự đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thuật ngữ "polynucleotit được phân lập" như được sử dụng ở đây có nghĩa là polynucleotit có nguồn gốc từ hệ gen, cADN, hoặc tổng hợp hoặc một số tổ hợp của chúng, mà vì nguồn gốc của chúng "polynucleotit được phân lập" (1) không liên quan đến tất cả hoặc một phần của polynucleotit, trong đó "polynucleotit được phân lập" được tìm thấy trong tự nhiên, (2) được liên kết hoạt động với polynucleotit mà không được liên kết với trong tự nhiên, hoặc (3) không xảy ra trong tự nhiên dưới dạng là một phần của trình tự lớn hơn.

Thuật ngữ "protein được phân lập" được đề cập có nghĩa là protein có nguồn gốc từ cADN, ARN tái tổ hợp, hoặc tổng hợp hoặc một số tổ hợp của chúng, mà do nguồn gốc của nó, hoặc nguồn dẫn xuất, "protein được phân lập" (1) không liên quan đến protein có trong tự nhiên, (2) không có các protein khác từ cùng nguồn, *ví dụ,* không có protein từ sinh vật biển, (3) được biểu hiện bởi tế bào từ các loài khác nhau, hoặc (4) không có trong tự nhiên.

Thuật ngữ "polypeptit" như được sử dụng ở đây là thuật ngữ chung đề cập đến protein tự nhiên, các đoạn của nó, hoặc dạng tương tự của một trình tự polypeptit. Do đó, các đoạn protein tự nhiên, và dạng tương tự là các loại thuộc chi polypeptit này.

Thuật ngữ "xuất hiện tự nhiên" như được sử dụng ở đây được áp dụng cho đối tượng đề cập đến thực tế rằng đối tượng có thể được tìm thấy trong tự nhiên. Ví dụ, trình tự polypeptit hoặc polynucleotit có mặt trong vi sinh vật (bao gồm virut) mà có thể được phân lập từ nguồn trong tự nhiên mà không được thay đổi một cách có chủ ý bởi con người trong phòng thí nghiệm hoặc nếu không thì xuất hiện tự nhiên.

Thuật ngữ "được liên kết hoạt động" như được sử dụng ở đây đề cập đến các vị trí của các thành phần được mô tả trong mối quan hệ cho phép chúng thực hiện chức năng theo định hướng của chúng. Trình tự điều khiển "được liên kết hoạt động" với trình tự mã hóa được liên kết theo cách sao cho sự biểu hiện của trình tự mã hóa đạt được trong các điều kiện tương thích với các trình tự điều khiển.

Thuật ngữ "trình tự điều khiển" như được sử dụng ở đây đề cập đến các trình tự polynucleotit cần thiết để ảnh hưởng đến sự biểu hiện và xử lý các trình tự mã hóa để chúng được liên kết. Bản chất của các trình tự điều khiển khác nhau phụ thuộc vào sinh vật chủ là sinh vật chưa có nhân điển hình, các trình tự điều khiển này thường bao gồm trình tự khởi đầu, vị trí liên kết ribosom, và trình tự kết thúc phiên mã ở sinh vật có nhân điển hình,

thông thường, các trình tự điều khiển này bao gồm trình tự khởi đầu, trình tự kết thúc phiên mã. Thuật ngữ "các trình tự điều khiển" được định hướng để bao gồm, ở mức tối thiểu, tất cả các thành phần mà sự có mặt của chúng là quan trọng cho sự biểu hiện và xử lý, và cũng có thể bao gồm các thành phần bổ sung mà sự có mặt của nó là có lợi, ví dụ, các trình tự dẫn đầu và các trình tự dung hợp. Thuật ngữ "polynucleotit," được đề cập đến ở đây có nghĩa là bo polyme của nucleotit của ít nhất 10 bazơ theo chiều dài, hoặc ribonucleotit hoặc deoxynucleotit hoặc dạng biến đổi của bất kỳ dạng nào trong các dạng đã nêu của nucleotit. Thuật ngữ bao gồm dạng mạch ADN đơn và kép.

Thuật ngữ "oligonucleotit" được đề cập đến ở đây bao gồm các nucleotit tự nhiên và biến đổi được liên kết cùng nhau bằng các liên kết oligonucleotit xảy ra tự nhiên hoặc không tự nhiên. Các oligonucleotit là tập con polynucleotit thường có độ dài khoảng 200 bazơ hoặc ít hơn. Tốt hơn là các oligonucleotit có chiều dài gồm 10 đến 60 bazơ và tốt nhất là có 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20 đến 40 bazơ. Các oligonucleotit thường được tạo mạch đơn, *ví dụ,* cho các mẫu dò, mặc dù các oligonucleotit có thể được tạo mạch kép, *ví dụ,* để sử dụng trong tạo cấu trúc gây đột biến gen. Các oligonucleotit theo sáng chế là các oligonucleotit có nghĩa hoặc đối nghĩa.

Thuật ngữ "nucleotit xuất hiện tự nhiên" được đề cập đến ở đây bao gồm các deoxyribonucleotit và ribonucleotit. Thuật ngữ "nucleotit được biến đổi" được đề cập đến ở đây bao gồm các nucleotit có các nhóm đường bị thay đổi hoặc thay thế và tương tự. Thuật ngữ "các liên kết oligonucleotit" được đề cập đến ở đây bao gồm các liên kết các oligonucleotit như phosphorothioat, phosphorodithioat, phosphoroselerloat, phosphorodiselenoat, phosphoroanilothioat, phoshoraniladat, phosphoronmidat, và các liên kết tương tự. *Xem, ví dụ,* LaPlanche *et al.* Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec *et al.* J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein *et al.* Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon *et al.* Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon *et al.* Oligonucleotits and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec *et al.* Patent Mỹ số 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Oligonucleotit có thể bao gồm nhãn đánh dấu để phát hiện được, nếu muốn.

Thuật ngữ "lai một cách chọn lọc" được đề cập đến ở đây có nghĩa là liên kết một cách có thể phát hiện được và đặc hiệu. Các polynucleotit, các oligonucleotit và đoạn của nó theo sáng chế lai một cách chọn lọc với các sợi axit nucleic trong điều kiện lai và rửa

mà giảm đến mức tối thiểu lượng có thể đánh giá được của liên kết có thể phát hiện được với các axit nucleic không đặc hiệu. Các điều kiện chính xác cao có thể được sử dụng để đạt được các điều kiện lai chọn lọc đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật và được bàn luận ở đây. Thông thường, tính tương đồng về trình tự axit nucleic giữa các polynucleotit, các oligonucleotit, và các đoạn của nó theo sáng chế và trình tự axit nucleic quan tâm sẽ ít nhất 80%, và tiêu biểu hơn là với tốt hơn là tăng độ đồng nhất ít nhất 85%, 90%, 95%, 99%, và 100%. Hai trình tự axit amin là tương đồng nếu có sự đồng nhất một phần hoặc toàn bộ giữa các trình tự của chúng. Ví dụ, đồng nhất 85% có nghĩa là 85% axit amin là giống khi hai trình tự xếp thẳng hàng để khớp tối đa. Các khoảng trống (trong mỗi trình tự trong hai trình tự được khớp nhau) được cho phép ở độ dài khoảng trống khớp nhau tối đa là 5 hoặc nhỏ hơn là được ưu tiên, với 2 hoặc nhỏ hơn là được ưu tiên hơn. Theo cách khác và tốt hơn là, hai trình tự protein (hoặc trình tự polypeptit dẫn xuất từ chúng có ít nhất 30 axit amin theo chiều dài) là tương đồng, khi thuật ngữ này được sử dụng ở đây, nếu chúng có điểm số thẳng hàng là lớn hơn 5 (theo các đơn vị dẫn xuất tiêu chuẩn) sử dụng chương trình ALIGN với cơ chất dữ liệu đột biến và điểm phạt khoảng trống (gap penalty) là 6 hoặc lớn hơn. *See* Dayhoff, M.O., trong *Atlas of Protein Sequence và Structure*, trang 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) và phụ lục 2 của bản này, trang 1-10. Hai trình tự hoặc các phần của nó tốt hơn nữa là tương đồng nếu các axit amin của chúng là tương đồng lớn hơn hoặc bằng 50% khi được xếp thẳng hàng một cách tối đa sử dụng chương trình ALIGN. Thuật ngữ "tương ứng với" được sử dụng ở đây có nghĩa là trình tự polynucleotit là tương đồng (*đó là,* giống nhau, không liên quan về mặt tiến hóa một cách nghiêm ngặt) với toàn bộ hoặc một phần của trình tự polynucleotit tham chiếu, hoặc rằng trình tự polypeptit là giống với trình tự polypeptit tham chiếu. Ngược lại, thuật ngữ "bổ trợ với" được sử dụng ở đây có nghĩa là trình tự bổ trợ này là tương đồng với toàn bộ hoặc một phần của trình tự polynucleotit tham chiếu. Để minh họa, trình tự nucleotit "TATAC" tương ứng với trình tự tham chiếu "TATAC" và là bổ trợ với trình tự tham chiếu "GTATA".

Các thuật ngữ sau đây được sử dụng để mô tả mối quan hệ trình tự giữa hai hoặc nhiều trình tự polynucleotit hoặc trình tự axit amin: "trình tự tham chiếu", "cửa sổ so sánh", "tính đồng nhất về trình tự", "phần trăm đồng nhất về trình tự", và "hầu như đồng nhất". "Trình tự tham chiếu" là trình tự xác định được sử dụng làm cơ sở để so sánh trình tự. Trình tự tham chiếu có thể là tập con của trình tự lớn hơn, ví dụ, là đoạn của trình tự gen hoặc cADN có chiều dài đầy đủ nêu trong danh mục trình tự hoặc có thể bao gồm toàn

bộ trình tự cADN hoặc gen. Thông thường, trình tự tham chiếu có chiều dài gồm ít nhất 18 nucleotit hoặc 6 axit amin, thông thường là có chiều dài gồm ít nhất 24 nucleotit hoặc 8 axit amin, và thường có ít nhất 48 nucleotit hoặc 16 axit amin. Vì hai trình tự polynucleotit hoặc axit amin có thể bao gồm trong mỗi trình tự (1) bao gồm trình tự (*đó là,* một phần của trình tự polynucleotit hoặc axit amin đầy đủ) mà tương tự giữa hai phân tử, và (2) có thể bao gồm thêm trình tự khác nhau giữa hai trình tự polynucleotit hoặc axit amin, sự so sánh trình tự giữa hai (hoặc nhiều hơn) phân tử được thực hiện một cách đặc trưng bằng cách so sánh trình tự của hai phần tử thông qua "cửa sổ so sánh" để nhận diện và so sánh các vùng cục bộ có sự tương tự về trình tự. "Cửa sổ so sánh", như được sử dụng ở đây, đề cập đến đoạn gồm ít nhất 18 vị trí nucleotit kề nhau hoặc 6 axit amin trong đó trình tự polynucleotit hoặc trình tự axit amin có thể được so sánh với trình tự tham chiếu gồm ít nhất 18 nucleotit kề nhau hoặc 6 trình tự axit amin và trong đó một phần của trình tự polynucleotit trong cửa sổ so sánh có thể bao gồm sự bổ sung, loại bỏ, thay thế và tương tự (*đó là,* các khoảng trống) khoảng 20 % hoặc nhỏ hơn khi so sánh với trình tự tham chiếu (không có sự bổ sung hoặc loại bỏ đoạn) để sắp thẳng hàng một cách tối ưu hai trình tự. Sự sắp thẳng hàng các trình tự để sắp thẳng hàng cửa sổ so sánh có thể được tiến hành bằng thuật toán về tính tương đồng cục bộ của Smith và Waterman Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), bởi thuật toán sắp thẳng hàng tương đồng của Needleman và Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), bằng cách tìm kiếm phương pháp tương tự của Pearson và Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444 (1988), bằng cách tiến hành điện toán hóa các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks, or MacVector software packages), hoặc bằng cách kiểm tra, và sự xếp thẳng hàng nhất (*đó là,* thu được từ phần trăm tương đồng cao nhất so với cửa sổ so sánh) được tạo thành bởi các phương pháp khác nhau được lựa chọn.

Thuật ngữ "độ đồng nhất trình tự" có nghĩa là hai trình tự polynucleotit hoặc axit amin là giống nhau (*đó là,* trên cơ sở nucleotit-đối-nucleotit hoặc gốc-đối-gốc) so với cửa sổ so sánh. Thuật ngữ "phần trăm đồng nhất trình tự" được tính toán bằng cách so sánh hai trình tự được sắp thẳng hàng một cách tối đa trên cơ sở cửa sổ so sánh, xác định số vị trí tại đó bazơ của axit nucleic giống nhau (*ví dụ,* A, T, C, G, U hoặc I) hoặc các gốc xảy ra ở cả hai trình tự để tạo ra một số lượng vị trí khớp, chia số lượng vị trí khớp cho tổng số vị trí trong cửa sổ so sánh (*đó là,* kích thước cửa sổ), và nhân kết quả với 100 để tạo thành phần trăm độ đồng nhất trình tự. Thuật ngữ "hầu như đồng nhất" như được sử dụng ở đây biểu

thị đặc tính của trình tự polynucleotit hoặc axit amin, trong đó trình tự polynucleotit hoặc axit amin chứa trình tự có ít nhất 85% trình tự đồng nhất, tốt hơn là ít nhất 90 đến 95% trình tự đồng nhất, phổ biến hơn là ít nhất 99% trình tự đồng nhất khi so sánh với trình tự tham chiếu qua cửa sổ so sánh gồm ít nhất 18 vị trí nucleotit (6 axit amin), thông thường là qua cửa sổ gồm ít nhất 24-48 vị trí nucleotit (8-16 axit amin), trong đó phần trăm trình tự đồng nhất được tính toán bằng cách so sánh trình tự tham chiếu với trình tự có thể bao gồm sự loại bỏ hoặc bổ sung đoạn có tổng 20% hoặc nhỏ hơn trình tự tham chiếu qua cửa sổ so sánh. Trình tự tham chiếu có thể là tập con của trình tự lớn hơn.

Như được sử dụng ở đây, hai mươi axit amin thông thường và viết tắt của chúng là việc sử dụng thông thường tiếp theo. *Xem* Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub và D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland7 Mass. (1991)). Các đồng phân lập thể (*ví dụ,* D- axit amin) của hai mươi axit amin thông thường, axit amin không thông thường như α-, axit amin được thế hai lần tại vị trí α, N-alkyl axit amin, axit lactic, và các axit amin không phổ biến khác mà cũng có thể là các thành phần thích hợp của các polypeptit theo sáng chế. Ví dụ về các axit amin không thông thường bao gồm: 4 hydroxyprolin, γ-carboxyglutamat, ε-N,N,N-trimetyllysin, ε -N-axetyllysin, O-phosphoserin, N- axetylserin, N-formylmethionin, 3-metylhistidin, 5-hydroxylysin, σ-N-metylarginin, và các axit amin tương tự khác và các axit imino (*ví dụ,* 4- hydroxyprolin). Trong ký hiệu về polypeptit được sử dụng ở đây, hướng tay trái là hướng đầu amin và hướng tay phải là hướng đầu carboxyl, theo cách sử dụng và quy ước tiêu chuẩn.

Tương tự, trừ phi có chỉ định khác, đầu tay trái của trình tự polynucleotit mạch đơn là đầu 5' và hướng tay trái của trình tự polynucleotit mạch kép được đề cập là hướng 5'. Hướng của việc bổ sung từ 5' đến 3' của sự dịch mã của ARN mới sinh được đề cập là vùng trình tự hướng dịch mã trên sợi ADN có cùng trình tự như ARN và là đầu 5' đến 5' của bản sao của ARN được đề cập là "trình tự ngược dòng", các vùng trình tự trên sợi ADN có cùng trình tự như ARN và là đầu 3' đến 3' của bản sao ARN được đề cập là "trình tự xuôi dòng".

Như được áp dụng với các polypeptit, thuật ngữ "hầu như đồng nhất" có nghĩa là hai trình tự peptit, khi được sắp thẳng hàng một cách tối đa, như bởi chương trình GAP hoặc BESTFIT sử dụng khối lượng khoảng trống mặc định, có ít nhất 80% trình tự đồng nhất, tốt hơn là ít nhất 90 % trình tự đồng nhất, tốt hơn nữa là ít nhất 95 % trình tự đồng nhất, và tốt nhất là ít nhất 99 % trình tự đồng nhất.

Tốt hơn là, vị trí các gốc không giống nhau thì khác nhau ở sự thay thế các axit amin bảo thủ.

Sự thế các axit amin bảo thủ là khác với sự hoán đổi các gốc có mạch bên tương tự. Ví dụ, nhóm các axit amin có mạch bên béo là glyxin, alanin, valin, leuxin, và isoleuxin; nhóm các axit amin có mạch bên là hydroxyl béo là serin và threonin; nhóm các axit amin có mạch bên chứa amit là asparagin và glutamin; nhóm các axit amin có mạch bên thơm là phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; nhóm các axit amin có mạch bên là bazơ là lysin, arginin, và histidin; và nhóm các axit amin có mạch bên chứa lưu huỳnh là xystein và methionin. Các nhóm thế các axit amin bảo thủ được ưu tiên là: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin valin, glutamic- aspartic, và asparagin-glutamin.

Như được thảo luận ở đây, sự biến đổi nhỏ trong trình tự các axit amin của các kháng thể hoặc các phân tử globulin miễn dịch được dự định là bao gồm bởi sáng chế, miễn là sự biến đổi trong trình tự axit amin duy trì ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, 90%, 95%, và tốt nhất là 99%. Cụ thể, các thay thế axit amin bảo thủ là được dự tính. Sự thay thế các axit amin bảo thủ là sự thay thế xảy ra trong họ axit amin liên quan đến các mạch bên của chúng. Các axit amin được mã hóa về mặt di truyền thường được chia làm hai họ: (1) các axit amin axit là aspartat, glutamat; (2) các axit amin bazơ là lysin, arginin, histidin; (3) các axit amin không phân cực là alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin, tryptophan, và (4) các axit amin có cực không tích điện là glyxin, asparagin, glutamin, xystein, serin, threonin, tyrosin. Các axit amin ưa nước bao gồm arginin, asparagin, aspartat, glutamin, glutamat, histidin, lysin, serin, và threonin. Các axit amin không ưa nước bao gồm alanin, xystein, isoleuxine, leuxin, methionin, phenylalanin, prolin, tryptophan, tyrosin và valin. Các họ axit amin khác bao gồm (i) serin và threonin, là họ hydroxyl béo; (ii) asparagin và glutamin, là họ chứa amit; (iii) alanin, valin, leuxin và isoleuxin, là họ béo; và (iv) phenylalanin, tryptophan, và tyrosin, là họ thơm. Ví dụ, có lý khi mong đợi rằng sự thay thế tách biệt của leuxin với isoleuxin hoặc valin, aspartat với glutamat, threonin với serin, hoặc sự thay thế tương tự của axit amin với axit amin liên quan về mặt cấu trúc không có ảnh hưởng lớn đến liên kết hoặc tính chất của các phân tử thu được, đặc biệt nếu sự thay thế không bao gồm axit amin trong vị trí khung. Sự thay đổi axit amin có dẫn đến peptit chức năng có thể được xác định một cách dễ dàng bởi thử nghiệm hoạt tính đặc hiệu của dẫn xuất polypeptit. Các thử nghiệm được mô tả chi tiết dưới đây. Các đoạn hoặc thể tương tự của các kháng thể hoặc các phân tử globulin miễn dịch có thể được tạo thành một cách dễ dàng bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh

vực. Đầu amino hoặc carboxy ưu tiên của các đoạn hoặc các thể tương tự xảy ra gần biên của vùng chức năng. Các vùng cấu trúc và chức năng có thể được nhận diện bằng cách so sánh dữ liệu trình tự nucleotit và/hoặc axit amin dữ liệu trình tự công khai hoặc có bản quyền. Tốt hơn là, các phương pháp so sánh bằng máy tính được sử dụng để nhận diện các mẫu trình tự hoặc các vùng cấu tạo protein dự đoán xảy ra trong các protein có cấu trúc và/hoặc chức năng đã biết. Các phương pháp nhận diện trình tự protein dựa theo cấu trúc ba chiều là đã được biết đến. Bowie *et al.* Science 253:164 (1991). Do đó, các ví dụ trên đây chứng tỏ rằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể nhận ra các mẫu trình tự và cấu trúc có thể được sử dụng để xác định các vùng cấu trúc và chức năng theo sáng chế.

Sự thế các axit amin được ưu tiên là các thay thế mà: (1) giảm tính nhạy để phân giải protein, (2) giảm tính nhạy để oxy hóa, (3) thay đổi ái lực liên kết để tạo thành phức hợp protein, (4) thay đổi ái lực liên kết, và (4) dẫn đến hoặc biến đổi các tính chất chức năng và hóa lý của các các thể tương tự này. Các thể tương tự có thể bao gồm các mutein khác nhau của trình tự khác với trình tự peptit xuất hiện tự nhiên. Ví dụ, sự thế một hoặc nhiều axit amin (tốt hơn là thế axit amin bảo thủ) có thể được thực hiện trong trình tự xảy ra tự nhiên (tốt hơn là trong một phần của polypeptit bên ngoài các vùng tạo thành sự tiếp xúc trong phân tử. Sự thế axit amin bảo thủ hầu như không làm thay đổi các đặc tính cấu trúc của trình tự bố mẹ (*ví dụ,* axit amin thay thế không nhằm để phá vỡ cấu trúc xoắn ốc xảy ra trong trình tự bố mẹ, hoặc làm gãy các dạng khác của cấu trúc thứ cấp đặc trưng cho trình tự bố mẹ). Ví dụ về các cấu trúc polypeptit bậc hai và bậc ba được nhận diện trong lĩnh vực kỹ thuật được mô tả trong *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman và Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden và J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); and Thornton et al. Nature 354:105 (1991).

Thuật ngữ "đoạn polypeptit" như được sử dụng ở đây đề cập đến polypeptit có sự loại bỏ đầu amino và/hoặc carboxy, nhưng trình tự axit amin còn lại là giống với các vị trí tương ứng trong trình tự xuất hiện tự nhiên được tạo ra, ví dụ, trừ trình tự cADN có chiều dài đầy đủ. Các đoạn điển hình là có độ dài gồm ít nhất 5, 6, 8 hoặc 10 axit amin, tốt hơn là ít nhất 14 axit amin, tốt hơn nữa là ít nhất 20 axit amin, thông thường là ít nhất 50 axit amin, và tốt hơn nữa là ít nhất 70 axit amin. Thuật ngữ "thể tương tự" như được sử dụng ở đây đề cập đến các polypeptit bao gồm đoạn gồm ít nhất 25 axit amin hầu như đồng nhất với phần của trình tự axit amin tạo ra và có liên kết đặc hiệu với CD47, trong các điều kiện

liên kết thích hợp. Điển hình là, các thể tương tự của polypeptit có sự thế axit amin bảo thủ (hoặc bổ sung hoặc loại bỏ đoạn) với trình tự xuất hiện tự nhiên. Các thể tương tự điển hình có độ dài gồm ít nhất 20 axit amin, tốt hơn là ít nhất 50 axit amin hoặc dài hơn, và có thể thường là dài như polypeptit xuất hiện tự nhiên có chiều dài đầy đủ.

Các thể tương tự của peptit thường được sử dụng trong công nghiệp dược phẩm ở dạng thuốc không phải là peptit với các tính chất giống như của peptit mẫu. Các dạng hợp chất không phải là peptit này được gọi là "giả peptit" ("peptide mimetics" hoặc "peptidomimetic"). Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986), Veber và Freidinger TINS p.392 (1985); và Evans *et al.* J. Med. Chem. 30:1229 (1987). Các hợp chất này thường được phát triển với mục đích tạo mô hình phân tử bằng máy tính. Các giả peptit giống về mặt cấu trúc với các peptit hữu dụng về mặt dược phẩm có thể được sử dụng để tạo ra hiệu quả điều trị hoặc phòng bệnh tương ứng. Nhìn chung, giả peptit là giống về mặt cấu trúc với polypeptit mẫu (*đó là,* polypeptit có tính chất sinh hóa hoặc hoạt tính dược lý), như kháng thể của người, nhưng có một hoặc nhiều liên kết peptit tùy ý được thế bởi liên kết được lựa chọn từ nhóm bao gồm: -- CH_2NH--, --CH_2S-, --CH_2-CH_2--, --CH=CH--(cis và trans), --$COCH_2$--, $CH(OH)CH_2$--, và -CH_2SO--, bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Sự thế có hệ thống của một hoặc nhiều axit amin của trình tự liên ứng với D-axit amin của cùng loài (*ví dụ,* D-lysin ở vị trí của L-lysin) có thể được sử dụng để tạo ra các peptit ổn định hơn. Ngoài ra, các peptit được tạo ra chứa trình tự liên ứng hoặc biến thể của trình tự liên ứng hầu như giống có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (Rizo và Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)); ví dụ, bằng cách bổ sung các gốc xystein ở trong để tạo thành các cầu nối disulfua nội phân tử mà tạo vòng cho peptit.

Thuật ngữ "tác nhân" được sử dụng ở đây để biểu thị hợp chất hóa học, hỗn hợp của các hợp chất hóa học, đại phân tử sinh học, hoặc dịch chiết được tạo thành từ các vật liệu sinh học.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "nhãn đánh dấu" hoặc "được đánh dấu" đề cập đến sự kết hợp của chất đánh dấu có thể phát hiện được, *ví dụ,* bằng sự kết hợp của axit amin được đánh dấu phóng xạ hoặc sự gắn các gốc biotinyl vào peptit mà có thể phát hiện được bởi adivin được đánh dấu (*ví dụ,* streptavidin chứa chất đánh dấu phát quang hoặc hoạt tính enzym mà có thể được bò bởi các phương pháp đo quang hoặc đo nhiệt lượng). Trong một số tình huống cụ thể, nhãn đánh dấu hoặc chất đánh dấu có thể là có tác dụng

điều trị. Các phương pháp đánh dấu polypeptit và glycoprotein khác nhau là đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể được sử dụng. Ví dụ về các nhãn đánh dấu cho các polypeptit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhãn đánh dấu sau đây: các đồng vị phóng xạ hoặc các nuclit phóng xạ (*ví dụ,* ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I), các nhãn phát quang (*ví dụ,* FITC, rhodamin, lanthanit photpho), các nhãn enzym (*ví dụ,* peroxidaza từ cây cải ngựa, p-galactosidaza, luxiferaza, alkalin phosphataza), chất phát quang hóa học, các nhóm biotinyl, các epitop polypeptit đã xác định được nhận diện bởi trình tự thông báo thứ hai (*ví dụ,* các trình tự cặp kép, các vị trí liên kết cho kháng thể thứ cấp, các vùng liên kết kim loại, các mảnh epitop). Theo một số phương án, các nhãn được gắn bởi nhánh khoảng cách có chiều dài khác nhau để làm giảm sức cản không gian tiềm ẩn. Thuật ngữ "tác nhân dược hoặc thuốc" như được sử dụng ở đây đề cập đến hợp chất hóa học hoặc chế phẩm có khả năng tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn khi được dùng một cách chính xác cho bệnh nhân.

Thuật ngữ "tác nhân chống ung thư" được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến các tác nhân có đặc tính chức năng ức chế sự phát triển hoặc tiến triển của bệnh ung thư ở người, cụ thể là sự thương tổn (ung thư) ác tính, như ung thư biểu bì, sacom, u lympho, hoặc bệnh bạch cầu. Sự ức chế sự di căn thường là đặc tính của tác nhân chống ung thư.

Các thuật ngữ hóa học khác được sử dụng trong bản mô tả này theo cách sử dụng thông thường trong lĩnh vực, như được ví dụ bởi từ điển McGraw-Hill trong "Các thuật ngữ hóa học" (Chemical Terms) (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Như được sử dụng ở đây, "hầu như tinh sạch" có nghĩa là loại đối tượng chiếm ưu thế (*đó là,* nhiều hơn bất kỳ loại nào khác trên cơ sở mol trong chế phẩm), và tốt hơn là phân đoạn được hầu như tinh sạch là chế phẩm trong đó loại đối tượng chứa ít nhất khoảng 50% (trên cơ sở mol) trong số tất cả các loại đại phân tử có mặt.

Thông thường, chế phẩm hầu như tinh sạch chứa nhiều hơn khoảng 80% loại đại phân tử có mặt trong chế phẩm, tốt hơn nữa là nhiều hơn khoảng 85%, 90%, 95%, và 99%. Tốt nhất là, loại đối tượng được tinh sạch đến độ thuần nhất thiết yếu (loại tạp nhiễm không thể phát hiện được trong chế phẩm bằng các phương pháp thông thường) trong đó chế phẩm chủ yếu chứa loại đại phân tử đơn.

Kháng thể CD47

Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế có khả năng liên kết với CD47, để ức chế liên kết của SIRPα với CD47, làm giảm tín hiệu gây ra bởi CD47-SIRPα, thúc đẩy sự đại thực bào và để ức chế sự phát triển của khối u và/hoặc sự di căn. Sự ức chế được xác định, ví dụ, sử dụng thử nghiệm tế bào được mô tả trong bản mô tả này trong các Ví dụ.

Các kháng thể đặc trưng theo sáng chế bao gồm kháng thể 2A1, dạng khảm của 2A1, và các biến thể được làm cho giống người của 2A1. Các kháng thể đặc trưng theo sáng chế bao gồm kháng thể có chuỗi VH được lựa chọn từ các SEQ ID NO: 5-30, và có chuỗi VL được lựa chọn từ các SEQ ID NO: 31-47. Cụ thể là, các kháng thể đặc trưng bao gồm các kháng thể liệt kê trong Bảng 1.

Bảng 1

Kháng thể	Chuỗi VH	Chuỗi VL
2A1	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 31
2A1-xi	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 32
AB2.03	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 33
AB2.04	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 34
AB2.05	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 35
AB2.06	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 36
AB2.07	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 37
AB2.08	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 38
AB2.09	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 39
AB2.13	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 43
AB3.09	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 39
AB6.12	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 42
AB6.13	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 43
AB6.14	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 44
AB6.17	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 47
AB10.13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 43
AB10.14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 44
AB11.05	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 35
AB12.05	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 35
AB15.05	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 35

AB16.05	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 35
AB17.05	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 35
AB22.05	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 35
AB23.05	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 35
AB24.05	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 35
AB25.05	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 35

Cũng bao gồm trong sáng chế là các kháng thể liên kết với cùng epitop như kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, các kháng thể có thể liên kết đặc hiệu với với epitop bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin trên CD47 của người (*xem, ví dụ,* đăng ký trên Genbank số Q08722.1).

Trình tự axit amin của CD47 người làm mẫu được thể hiện dưới đây (đăng ký trên GenBank số Q08722.1 (GI:1171879)). Trình tự tín hiệu (axit amin 1-18) được gạch dưới.

1 mwplvaalll gsaccgsaql lfnktksvef tfcndtvvip cfvtnmeaqn ttevyvkwkf
61 kgrdiytfdg alnkstvptd fssakievsq llkgdaslkm dksdavshtg nytcevtelt
121 regetiielk yrvvswfspn enilivifpi faillfwgqf giktlkyrsg gmdektiall
181 vaglvitviv ivgailfvpg eyslknatgl glivtstgil illhyyvfst aigltsfvia
241 ilviqviayi lavvglslci aacipmhgpl lisglsilal aqllglvymk fvasnqktiq
301 rkaveepl nafkeskgmm nde (SEQ ID NO: 48)

Để làm rõ, trình tự axit amin của CD47 người làm mẫu không bao gồm trình tự tín hiệu được nêu dưới đây.

1 qllfnktksv eftfcndtvv ipcfvtnmea qnttevyvkw kfkgrdiytf dgalnkstvp
61 tdfssakiev sqllkgdasl kmdksdavsh tgnytcevte ltregetiie lkyrvvswfs
121 pnenilivif pifaillfwg qfgiktlkyr sggmdektia llvaglvitv ivivgailfv
181 pgeyslknat glglivtstg ililhyyvf staigltsfv iailviqvia yilavvglsl
241 ciaacipmhg pllisglsil alaqllglvy mkfvasnqkt iqpprkavee plnafkeskg
301 mmnde (SEQ ID NO: 147)

Trình tự axit amin của vùng CD47-IgV người làm mẫu được thể hiện dưới đây:

19 qllfnktksv eftfcndtvv ipcfvtnmea qnttevyvkw kfkgrdiytf dgalnkstvp

79 tdfssakiev sqllkgdasl kmdksdavsh tgnytcevte ltregetiie lkyrvv
(SEQ ID NO: 49)

Các kháng thể đơn dòng làm mẫu theo sáng chế bao gồm, ví dụ, các kháng thể được làm cho giống người có vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được thể hiện trong trình tự dưới đây.

Các vùng chuỗi nặng biến đổi (VH) của kháng thể CD47 được cung cấp dưới đây. Các vùng quyết định bổ trợ (CDRs) của chuỗi VH của kháng thể CD47 được đánh dấu như dưới đây. Theo một số phương án, trình tự axit amin của CDR1 của VH là GFNIKDYYLH (SEQ ID NO: 50), GYTFTYYYLH (SEQ ID NO: 57), GFTFTYYYLH (SEQ ID NO: 58), GYNFTYYYLH (SEQ ID NO: 59), GYTITYYYLH (SEQ ID NO: 60), GYTFKYYYLH (SEQ ID NO: 61), GYTFTDYYLH (SEQ ID NO: 62), GFTFTDYYLH (SEQ ID NO: 63), GFTITDYYLH (SEQ ID NO: 64), GYTFKDYYLH (SEQ ID NO: 65), hoặc GFTFKDYYLH (SEQ ID NO: 66). Theo một số phương án, trình tự axit amin của CDR2 của VH là WIDPDNGDTE (SEQ ID NO: 51), WIDPDQGDTE (SEQ ID NO: 72), WIDPDYGDTE (SEQ ID NO: 73), WIDPDSGDTE (SEQ ID NO: 74), WIDPDNADTE (SEQ ID NO: 75), hoặc WIDPDNTDTE (SEQ ID NO: 76). Theo một số phương án, trình tự axit amin của CDR3 của VH là NAAYGSSSYPMDY (SEQ ID NO: 52) hoặc NAAYGSSPYPMDY (SEQ ID NO: 77).

EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPDNGDTEFAPKFQGKATMTAD
TSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTSVTV (SEQ ID NO: 5)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYYLHWVQQAPGKGLEWMGWIDPDNGDTEYAEKFQGRVTITAD
TSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV(SEQ ID NO: 6)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 7)

EVQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 8)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQGRVTMTAD
TSSNTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 9)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQGRVTMTED
TSTDTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 10)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDQGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 11)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDYGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 12)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDSGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 13)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNADTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 14)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNTDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 15)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSPYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 16)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFTYYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 17)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFTFTYYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 18)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYNFTYYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 19)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTITYYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 20)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFKYYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 21)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFTDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 22)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFTFTDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 23)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFTITDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 24)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 25)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFTFKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 26)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYLQLSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 27)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLTSEDTAVYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 28)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 29)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYYLHWVQQAPGKGLEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRD
RSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 30)

Vùng chuỗi nhẹ biến đổi (VL) của kháng thể CD47 được nêu dưới đây. Các CDR của chuỗi VL của kháng thể CD47 được đánh dấu như dưới đây . Theo một số phương án, trình tự axit amin của CDR1 của VL là KASQDIHRYLS (SEQ ID NO: 53), RASQDIHRYLA (SEQ ID NO: 67), hoặc RARQGIHRYLS (SEQ ID NO: 68). Theo một số phương án, trình tự axit amin của CDR2 của VL là RANRLVD (SEQ ID NO: 54), RANRLQS (SEQ ID NO: 69), RANRRAT (SEQ ID NO: 70), hoặc RANRLVS (SEQ ID NO: 71). Theo một số phương án, trình tự axit amin của CDR3 của VL là LQYDEFPYT (SEQ ID NO: 55).

DIKMTQSPSSLYASLGERVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKSPKILIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSL
TISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEMK (SEQ ID NO: 31)

DIKMTQSPSSLYASLGERVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKSPKILIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSL
TISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 32)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWYQQKPGKAPKLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDFTF
TISSLQPEDIATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 33)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 34)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTL
TISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 35)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWYQQKPGKAPKRLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTL
TISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 36)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHRYLAWYQQKPGKVPKLLIYRANRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDVATYYCLQYDEFPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 37)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHRYLAWYQQKPGQAPRLLIYRANRRATGIPARFSGSGSGTDFTL

TISSLEPEDFAVYYCLQYDEFPYTGFQGTRLEIK (SEQ ID NO: 38)

DIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTL
TISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 39)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTL
TISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 40)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKILIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTL
TISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 41)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTL
TISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 42)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKILIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTL
TISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 43)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTL
TISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 44)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTL
TISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 45)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTL
TISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 46)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTL
TISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 47)

Trong một số trường hợp, kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng được lựa chọn từ các SEQ ID NO: 5-30 và vùng biến đổi của chuỗi nặng được lựa chọn từ các SEQ ID NO: 31-47. Kháng thể CD47 làm mẫu chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 31; vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 35; vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 11 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 42, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 32, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 33, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 34, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 7

và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 36, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 37, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 38, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 29 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 35, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 30 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 35, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 43, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 11 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 43, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 11 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 47, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 15 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 43, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 15 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 44, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 11 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 44, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 22 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 35, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 39, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 39, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 16 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 35, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 20 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 35, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 21 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 35, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 17 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 35, vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 28 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 35, hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng thể hiện trong SEQ ID NO: 27 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thể hiện trong SEQ ID NO: 35.

Kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này bao gồm bất kỳ một vùng VH nêu trong các SEQ ID NO: 5-30 bắt cặp với bất kỳ một vùng VL nêu trong các SEQ ID NO: 31-47. Cụ thể là, các kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này bao gồm bất kỳ một vùng VH được nêu trong các SEQ ID NO: 5, 7, 8, 11, 15-17, 20-22, và 27-30 bắt cặp với bất kỳ vùng VL được nêu trong các SEQ ID NO: 31-39, 42, 43, 44, và 47.

Kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này bao gồm bất kỳ một vùng CDR1 của VH được nêu trong SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, và SEQ ID NO: 66, bất kỳ một vùng CDR2 của VH được nêu trong SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, và SEQ ID NO: 76, bất kỳ một vùng CDR3 của VH được nêu trong SEQ ID NO: 52 và SEQ ID NO: 77, bất kỳ vùng CDR1 của VL được nêu trong SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 67, và SEQ ID NO: 68, bất kỳ một vùng CDR2 của VL được nêu trong SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, và SEQ ID NO: 71, và vùng CDR3 của VL được nêu trong SEQ ID NO: 55.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận thấy rằng có thể xác định mà không cần thử nghiệm quá mức, nếu kháng thể đơn dòng có độ đặc hiệu giống như của kháng thể đơn dòng theo sáng chế (*ví dụ,* kháng thể 2A1, hoặc kháng thể có chuỗi nặng biến đổi được lựa chọn từ các SEQ ID NO: 5-31, và chuỗi nhẹ biến đổi được lựa chọn từ các SEQ ID NO: 31-47) bằng cách chắc chắn liệu kháng thể trước có ngăn chặn kháng thể sau liên kết với CD47 hay không. Nếu kháng thể đơn dòng được thử nghiệm cạnh tranh với kháng thể đơn dòng theo sáng chế, như được thể hiện bởi độ giảm của liên kết bởi kháng thể đơn dòng theo sáng chế, khi đó hai kháng thể đơn dòng liên kết với epitop giống hoặc liên quan một cách chặt chẽ với nhau.

Phương pháp thay thế để xác định liệu kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu của kháng thể đơn dòng theo sáng chế hay không là ủ kháng thể đơn dòng theo sáng chế trước với protein CD47 hòa tan (đây là phản ứng bình thường), và sau đó thêm kháng thể đơn dòng được thử nghiệm để xác định liệu kháng thể đơn dòng được thử nghiệm là được ức chế về khả năng liên kết với CD47. Nếu kháng thể đơn dòng được thử nghiệm là được ức chế, sau đó, có thể, nó có cùng tính đặc hiệu epitop hoặc tương đương về mặt chức năng, như kháng thể đơn dòng theo sáng chế.

Các kháng thể theo sáng chế

Sự sàng lọc các kháng thể đơn dòng theo sáng chế, cũng có thể được thực hiện, *ví dụ,* bằng cách đo sự phát tín hiệu gây ra bởi CD47 và/hoặc CD47/SIRPα, và xác định liệu kháng thể đơn dòng thử nghiệm có khả năng biến đổi, phong bế, làm giảm, đối kháng, trung hòa hoặc nếu không thì can thiệp vào sự phát tín hiệu gây ra bởi CD47 và/hoặc

CD47/SIRPα. Các thử nghiệm này có thể bao gồm các thử nghiệm liên kết cạnh tranh. Thêm vào đó, các thử nghiệm này có thể đo kết quả sinh học đọc trên máy tính, ví dụ khả năng thúc đẩy sự thực bào của tế bào biểu hiện CD47 bởi đại thực bào, như được mô tả trong Ví dụ 9 (Fig. 9).

Các quy trình khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng để sản xuất các kháng thể đơn dòng được định hướng để kháng CD47, hoặc kháng các dẫn xuất, các đoạn, dạng tương tự, thể đồng dạng hoặc đồng đẳng của nó. (xem,, *ví dụ,* Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Các kháng thể hoàn toàn là của người là các phân tử kháng thể trong đó toàn bộ trình tự của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, bao gồm các CDR, sinh ra từ gen của người. Các kháng thể như vậy được gọi là "các kháng thể của người" hoặc "các kháng thể hoàn toàn là của người" trong bản mô tả này. Các kháng thể đơn dòng của người được sản xuất, ví dụ, sử dụng các quy trình được mô tả trong các ví dụ nêu dưới đây. Các kháng thể đơn dòng của người cũng có thể được sản xuất bằng cách sử dụng kỹ thuật trioma (kỹ thuật lai tế bào người truyền thống); kỹ thuật lai tế bào B của người (*xem,* Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4: 72); và kỹ thuật lai tế bào EBV để sản xuất các kháng thể đơn dòng của người (*xem,* Cole, et al., 1985 In: Human monoclonal antibodies cancer therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Các kháng thể đơn dòng của người có thể được sử dụng và có thể được sản xuất bằng cách sử dụng tế bào lai của người (xem, Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) hoặc bằng cách biến nạp các tế bào B của người với virut Epstein Barr *in vitro* (xem, Cole, et al., 1985 In: Human monoclonal antibodies and cancer therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Các kháng thể được tinh sạch bởi các kỹ thuật đã được biết đến rộng rãi, như sắc ký ái lực sử dụng protein A hoặc protein G, trước hết cho phân đoạn IgG của huyết thanh miễn dịch. Sau đó, hoặc theo cách khác, kháng nguyên đặc hiệu là đích của globulin miễn dịch thu được, hoặc epitop của nó, có thể được giữ cố định trên cột để tinh sạch kháng thể đặc hiệu miễn dịch bằng phép sắc ký ái lực miễn dịch. Sự tinh sạch các globulin miễn dịch được đề cập bởi, ví dụ, D. Wilkinson (The Scientist, published by The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28).

Kháng thể CD47 theo sáng chế là các kháng thể đơn dòng. Các kháng thể đơn dòng làm biến đổi, phong bế, ức chế, làm giảm, đối kháng, trung hòa hoặc nếu không thì can thiệp vào sự phát tín hiệu của tế bào gây ra bởi CD47 và/hoặc CD47/SIRPα được tạo ra, *ví*

dụ, bằng cách tạo miễn dịch động vật với màng được gắn kết và/hoặc CD47 hòa tan, như, ví dụ, CD47 của người hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch, dẫn xuất hoặc biến thể của nó. Theo cách khác, động vật được tạo miễn dịch với tế bào được truyền nhiễm bằng vectơ chứa phân tử axit nucleic mã hóa CD47 sao cho CD47 được biểu hiện và được liên kết với bề mặt của tế bào gây nhiễm. Theo cách khác, các kháng thể có thể thu được bằng cách sàng lọc thư viện chứa trình tự kháng thể hoặc vùng liên kết kháng nguyên của nó để liên kết với CD47. Thư viện này được sản xuất, *ví dụ,* trong các thể thực khuẩn như dung hợp protein hoặc peptit đối với protein vỏ của thể thực khuẩn mà được biểu hiện trên bề mặt của hạt gồm các thể thực khuẩn tụ hợp lại và trình tự ADN mã hóa chứa trong các hạt thể thực khuẩn (*đó là,* "thư viện biểu hiện thể thực khuẩn"). Các tế bào lai thu được từ dung hợp u tủy/tế bào B được sàng lọc để phản ứng với CD47.

Các kháng thể đơn dòng được sản xuất, ví dụ, sử dụng các phương pháp lai, như các phương pháp được mô tả bởi Kohler và Milstein, Nature, 256:495 (1975). Trong phương pháp lai, chuột nhắt, chuột đồng hoặc động vật chủ phù hợp khác, được gây miễn dịch một cách đặc thù với tác nhân gây miễn dịch để tạo ra các tế bào lympho sản xuất hoặc có khả năng sản xuất các kháng thể sẽ liên kết đặc hiệu với tác nhân gây miễn dịch. Theo cách khác, các tế bào lympho có thể được gây miễn dịch *in vitro*.

Tác nhân gây miễn dịch bao gồm một cách đặc trưng kháng nguyên protein, đoạn hoặc protein dung hợp của nó. Nhìn chung, hoặc các tế bào lympho máu ngoại vi được sử dụng nếu các tế bào có nguồn gốc từ người được mong muốn, hoặc các tế bào lách hoặc các tế bào hạch lympho được sử dụng nếu các nguồn động vật không phải là người được mong đợi. Các tế bào lympho sau đó được dung hợp với dòng tế bào bất tử sử dụng tác nhân gây dung hợp thích hợp, như polyethylene glycol, để tạo thành tế bào lai (Goding, monoclonal antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Các dòng tế bào bất tử thường được biến nạp các tế bào động vật có vú, cụ thể là tế bào u tủy của chuột, bò và người. Thông thường, các dòng tế bào u tủy của chuột cống hoặc chuột nhắt được sử dụng. Các tế bào lai cũng có thể được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy thích hợp mà tốt hơn là chứa một hoặc nhiều chất ức chế sự phát triển hoặc sống sót của các tế bào bất tử, không được dung hợp. Ví dụ, nếu các tế bào bố mẹ thiếu enzym hypoxanthin guanin phosphoribosyl transferaza (HGPRT hoặc HPRT), môi trường nuôi cấy cho tế bào lai sẽ thường bao gồm hypoxanthin, aminopterin, và thymidin ("môi trường HAT"), là các chất ngăn chặn sự phát triển của các tế bào thiếu hụt HGPRT.

Các dòng tế bào bất tử ưu tiên là các dòng tế bào dung hợp một cách hiệu quả, hỗ trợ sự biểu hiện ở mức cao, ổn định của kháng thể bởi các tế bào sản xuất kháng thể được lựa chọn, và nhạy với môi trường như môi trường HAT. Các dòng tế bào bất tử được ưu tiên hơn là dòng tế bào u tủy của chuột, có thể thu được, ví dụ, từ Trung tâm cung cấp tế bào Viện Salk (Salk Institute Cell Distribution Center), San Diego, California và Trung tâm nuôi cấy kiểu Mỹ (American Type Culture Collection), Manassas, Virginia. Dòng tế bào u tủy người và dòng tế bào đa u tủy chuột-người cũng đã được mô tả để sản xuất các kháng thể đơn dòng. (xem, Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., monoclonal antibody Production Techniques và Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63)).

Môi trường nuôi cấy trong đó các tế bào lai được nuôi cấy và sau đó có thể được thử nghiệm sự có mặt của các kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên. Tốt hơn là, tính đặc hiệu liên kết của các kháng thể đơn dòng sản xuất bởi các tế bào lai được xác định bởi miễn dịch kết tủa hoặc bởi thử nghiệm liên kết *in vitro*, như phương pháp miễn dịch dùng chất đánh dấu phóng xạ (radioimmunoassay -RIA) hoặc thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (enzyme-linked immunoabsorbent assay -ELISA). Các kỹ thuật và các thử nghiệm này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ái lực liên kết của kháng thể đơn dòng có thể, ví dụ, được xác định bởi phép phân tích Scatchard của Munson và Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980). Ngoài ra, trong các ứng dụng điều trị bệnh của các kháng thể đơn dòng, quan trọng là xác định các kháng thể có độ đặc hiệu và ái lực cao đối với kháng nguyên đích.

Sau khi các tế bào lai mong muốn được xác định, các dòng được tạo dòng phụ bằng các quy trình pha loãng giới hạn và được phát triển bằng các phương pháp tiêu chuẩn. (xem, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles và Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Môi trường nuôi cấy thích hợp cho mục đích này bao gồm, ví dụ, môi trường Eagle được cải biến Dulbecco và môi trường RPMI-1640. Theo cách khác, các tế bào lai cũng có thể được phát triển *in vivo* dưới dạng cổ trướng ở động vật có vú.

Các kháng thể đơn dòng tiết ra bởi các dòng phụ có thể được phân lập hoặc tinh sạch từ môi trường nuôi cấy hoặc dịch cổ trướng bởi các quy trình tinh sạch glubolin miễn dịch truyền thống ví dụ, protein A-Sepharoza, sắc ký hydroxylapatit, điện di trên gel, thẩm tách, hoặc sắc ký ái lực.

Các kháng thể đơn dòng cũng có thể được tạo thành bằng phương pháp ADN tái tổ hợp, như các phương pháp được mô tả trong Patent Mỹ số 4,816,567. ADN mã hóa các kháng thể đơn dòng theo sáng chế được phân tách dễ dàng và được đọc trình tự sử dụng các quy trình truyền thống (*ví dụ,* bằng cách sử dụng các mẫu dò oligonucleotit mà có khả năng liên kết một cách đặc hiệu với các gen mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể của chuột). Các tế bào lai đóng vai trò làm nguồn ưu tiên của ADN này. Một khi được phân lập, ADN có thể được đặt vào vectơ biểu hiện, vectơ này sau đó được chuyển nhiễm vào trong các tế bào vật chủ như tế bào trứng của chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary -CHO), các tế bào thận của phôi người (Human Embryonic Kidney -HEK) 293, các tế bào COS của khỉ, PER.C6®, NS0 cells, SP2/0, YB2/0, hoặc các tế bào u tủy mà không tạo ra protein globulin miễn dịch, để thu được sự tổng hợp các kháng thể đơn dòng trong các tế bào vật chủ tái tổ hợp. ADN cũng có thể được biến đổi, ví dụ, bằng cách thế trình tự mã hóa cho các vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở vị trí các trình tự chuột tương đồng (xem, Patent Mỹ số 4,816,567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)) hoặc bởi kết hợp cộng hóa trị vào trình tự mã hóa globulin miễn dịch tất cả hoặc một phần của trình tự mã hóa cho polypeptit không phải là globulin miễn dịch. Polypeptit không phải là globulin miễn dịch này có thể được thế cho vùng hằng định của kháng thể theo sáng chế, hoặc cũng có thể được thế cho các vùng biến đổi của một vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế để tạo thành kháng thể hóa trị hai dạng khảm.

Các kháng thể của người và các kháng thể được làm cho giống người

Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế bao gồm các kháng thể hoàn toàn là của người hoặc các kháng thể được làm cho giống người. Các kháng thể này thích hợp để dùng cho người mà không gây ra đáp ứng miễn dịch bởi người chống lại globulin miễn dịch được dùng.

Kháng thể CD47 được tạo thành, ví dụ, sử dụng các quy trình được mô tả trong các Ví dụ nêu dưới đây. Ví dụ, kháng thể CD47 theo sáng chế được nhận diện sử dụng chiến lược gây miễn dịch RIMMS (Repetitive Immunization Multiple Sites) ở chuột và sau đó là tạo ra tế bào lai.

Theo phương pháp thay thế khác, kháng thể CD47 được phát triển, ví dụ, sử dụng các phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn sử dụng các kháng thể chỉ chứa các trình tự của người. Các phương pháp này là đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật, *ví dụ,* trong

WO92/01047 và Patent Mỹ số 6,521,404. Trong phương pháp này, thư viện tổ hợp của thể thực khuẩn mang các cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ngẫu nhiên được sàng lọc sử dụng nguồn tự nhiên hoặc tái tổ hợp của CD47 hoặc các đoạn của nó. Trong phương pháp khác, kháng thể CD47 có thể được sản xuất bằng quy trình trong đó ít nhất một bước của quy trình bao gồm gây miễn dịch cho động vật chuyển gen không phải là người bằng protein CD47 của người. Trong phương pháp này, một số locus trong chuỗi nhẹ kappa và/hoặc chuỗi nặng nội sinh của động vật ghép khác loại không phải là người này đã được bất hoạt và vô hiệu khả năng sắp xếp lại để tạo ra các gen mã hóa các globulin miễn dịch đáp ứng với kháng nguyên. Thêm vào đó, ít nhất một locus trên chuỗi nặng của người và ít nhất một locus trên chuỗi nhẹ của người đã được chuyển nhiễm một cách ổn định vào động vật. Do đó, đáp ứng với các kháng nguyên được sử dụng, sự sắp xếp lại locus ở người để cung cấp các gen mã hóa vùng biến đổi của người đặc hiệu miễn dịch với kháng nguyên. Sau khi gây miễn dịch, do đó, Xenomouse tạo ra các tế bào B tiết ra các globulin miễn dịch hoàn toàn là của người.

Nhiều kỹ thuật đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật để sản xuất các động vật ngoại lai không phải là người. Ví dụ, xem Patent Mỹ số 6,075,181 và số 6,150,584. Chiến lược chung này được chứng minh liên quan đến sự tạo thành các chủng XenoMouse™ thứ nhất như được công bố trong 1994. *See* Green *et al.* Nature Genetics 7:13-21 (1994). *Xem*, Patent Mỹ số 6,162,963; 6,150,584; 6,114,598; 6,075,181; và 5,939,598 và Patent Nhật số 3 068 180 B2, 3 068 506 B2, và 3 068 507 B2 và Patent Châu Âu số EP 0 463 151 B1 và công bố đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 và và các họ patent liên quan.

Trong các phương pháp thay thế, đã sử dụng phương pháp "locus nhỏ" trong đó locus Ig ngoại sinh được làm giả thông qua mảnh thể vùi (các gen cá thể) từ locus Ig. Do đó, một hoặc nhiều gen VH, một hoặc nhiều gen D_H, một hoặc nhiều gen J_H, vùng ổn định mu, và vùng ổn định thứ hai (tốt hơn là vùng ổn định gamma) được tạo thành cấu trúc để chèn vào động vật. Xem *ví dụ,* các patent Mỹ số 5,545,806; 5,545,807; 5,591,669; 5,612,205;5,625,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,643,763; 5,661,016; 5,721,367; 5,770,429; 5,789,215; 5,789,650; 5,814,318; 5,877; 397; 5,874,299; 6,023,010; và 6,255,458; và Patent Châu Âu số 0 546 073 B1; và công bố đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, và WO 98/24884 và các họ patent liên quan.

Sự tạo thành các kháng thể của người từ chuột trong đó, thông qua sự dung hợp vi tế bào, đoạn nhiễm sắc thể lớn hơn, hoặc toàn bộ nhiễm sắc thể, đã được giới thiệu và cũng đã được chứng minh. *Xem,* đơn yêu cầu cấp patent Châu Âu số 773 288 và 843 961.

Các đáp ứng của kháng thể kháng chuột của người (Human Anti-Mouse Antibody - HAMA) đã dẫn đến ngành công nghiệp để tạo ra các kháng thể khảm hoặc các kháng thể được làm cho giống người. Trong khi các kháng thể khảm có vùng ổn định của người và vùng biến đổi miễn dịch, được mong đợi rằng các đáp ứng của kháng thể kháng khảm nhất định của người (Human Anti-Chimeric Antibody -HACA) sẽ được quan sát, đặc biệt là khi dùng kháng thể thường xuyên hoặc đa liều. Do đó, mong muốn là cung cấp các kháng thể hoàn toàn là của người kháng CD47 nhằm làm mất hiệu lực hoặc làm giảm những lo ngại và/hoặc tác dụng của đáp ứng HAMA hoặc HACA.

Sự sản xuất các kháng thể với tính sinh miễn dịch giảm cũng được thực hiện thông qua các kỹ thuật làm cho giống người, kỹ thuật khảm, kỹ thuật biểu hiện sử dụng các thư viện thích hợp. Có thể hiểu rằng các kháng thể của chuột hoặc các kháng thể từ các loài khác có thể được làm cho giống người hoặc làm cho giống động vật linh trưởng sử dụng các kỹ thuật đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực. *Xem, ví dụ,* Winter và Harris Immunol Today 14:43 46 (1993) và Wright *et al.* Crit, Reviews in Immunol. 12125-168 (1992). Kháng thể được quan tâm có thể được xử bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp để thế CH1, CH2, CH3, vùng bản lề, và/hoặc vùng khung bằng trình tự của người tương ứng (xem, WO 92102190 và các Patent Mỹ số 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,792;, 5,714,350; và 5,777,085). Ngoài ra, việc sử dụng Ig cADN cho cấu trúc các gen globulin miễn dịch khảm là đã được biết đến trong lĩnh vực (Liu *et al.* P.N.A.S. 84:3439 (1987) và J. Immunol. 139:3521 (1987)). mARN được phân lập từ tế bào lai hoặc tế bào khác sản xuất kháng thể và được sử dụng để sản xuất cADN. cADN quan tâm có thể được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu (các Patent Mỹ số 4,683,195 và 4,683,202). Theo cách khác, thư viện được tạo thành và được sàng lọc để phân lập trình tự quan tâm. Trình tự ADN mã hóa vùng biến đổi của kháng thể sau đó được dung hợp với các trình tự vùng ổn định của người. Các trình tự của các gen của vùng ổn định của người có thể thấy trong Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of immunological Interest*, số xuất bản N.I.H. 91-3242. Các gen vùng C của người là dễ dàng có được từ các dòng đã biết. Sự lựa chọn isotyp sẽ được chỉ dẫn bởi chức năng tạo hiệu quả mong muốn, như sự cố định bổ thể, hoặc hoạt tính trong tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể. Các isotyp ưu tiên là IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. Cả hai vùng ổn định của chuỗi

nhẹ kappa hoặc lambda có thể sử dụng. Kháng thể khảm, được làm cho giống người sau đó được biểu hiện bởi các phương pháp thông thường.

Các đoạn kháng thể, như Fv, $F(ab')_2$ và Fab có thể được tạo thành bằng cách phân cắt protein nguyên vẹn, *ví dụ,* bằng proteaza hoặc phân cắt hóa học. Theo cách khác, gen cắt cụt được thiết kế. Ví dụ, gen khảm mã hóa một phần đoạn $F(ab')_2$ có thể bao gồm trình tự ADN mã hóa vùng CH1 và vùng bản lề của chuỗi H, theo sau bởi codon kết thúc dịch mã để tạo thành phân tử cắt cụt.

Các trình tự liên ứng của vùng H và L J có thể được sử dụng để thiết kế các oligonucleotit để sử dụng làm các đoạn mồi để đưa các vị trí giới hạn hữu dụng vào vùng J để cho liên kết tiếp theo của các đoạn của vùng V với các đoạn vùng C của người. cADN của vùng C có thể được biến đổi bằng đột biến định hướng vị trí để đặt điểm giới hạn tại vị trí tương tự trong trình tự của người.

Vectơ biểu hiện bao gồm các plasmit, retrovirut, YACs, các episom dẫn xuất từ EBV, và các thể tương tự. Vectơ thích hợp là vectơ mã hóa trình tự globulin miễn dịch CH hoặc CL đầy đủ về mặt chức năng của người, với các điểm giới hạn thích hợp được xử lý sao cho bất kỳ trình tự VH hoặc VL có thể dễ dàng được chèn và được biểu hiện. Trong các vectơ này, việc ghép thường xảy ra giữa vị trí cho ở vùng J được chèn và vị trí nhận trước vùng C của người, và cũng tại các vùng ghép xảy ra trong các exon CH của người. Sự kết thúc quá trình polyadenyl hóa và dịch mã xảy ra tại các vị trí trên nhiễm sắc thể tự nhiên xuôi dòng của các vùng mã hóa. Kháng thể khảm thu được có thể được kết hợp vào bất kỳ gen khởi đầu mạnh nào, bao gồm LTR của retrovirut, *ví dụ,* gen khởi đầu sớm SV-40, (Okayama *et al.* Mol. Cell. Bio. 3:280 (1983)), LTR của virut sarcoma Rous (Gorman *et al.* P.N.A.S. 79:6777 (1982)), và LTR của virut bệnh bạch cầu ở chuột Moloney (Grosschedl *et al.* Cell 41:885 (1985)). Tương tự, sẽ được hiểu rằng gen khởi đầu Ig nguyên thể và dạng tương tự có thể được sử dụng.

Ngoài ra, các kháng thể của người hoặc các kháng thể từ các loài khác có thể được tạo thành thông qua các kỹ thuật loại biểu hiện, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, biểu hiện thể thực khuẩn, biểu hiện retrovirut, biểu hiện ở ribosom và các kỹ thuật khác, sử dụng các kỹ thuật đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật và các phân tử thu được có thể được hoàn thiện thêm, như tăng cường ái lực, vì các kỹ thuật này là đã được biết đến một cách rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật. Wright *et al.* Crit, Reviews in Immunol. 12125-

168 (1992), Hanes và Plückthun PNAS USA 94:4937-4942 (1997) (biểu hiện ở ribosom), Parmley và Smith Gene 73:305-318 (1988) (biểu hiện ở thể thực khuẩn), Scott, TIBS, vol. 17:241-245 (1992), Cwirla *et al.* PNAS USA 87:6378-6382 (1990), Russel *et al.* Nucl. Acids Research 21:1081-1085 (1993), Hoganboom *et al.* Immunol. Reviews 130:43-68 (1992), Chiswell và McCafferty TIBTECH; 10:80-8A (1992), và Patent Mỹ số 5,733,743. Nếu các kỹ thuật biểu hiện được sử dụng để tạo ra các kháng thể không phải là của người, các kháng thể này có thể được làm cho giống người như được mô tả trên đây.

Sử dụng các kỹ thuật này, các kháng thể có thể được tạo thành tế bào biểu hiện CD47, dạng tan của CD47, các epitop hoặc peptit của chúng, và các thư viện biểu hiện thêm vào đó (xem, *ví dụ,* Patent Mỹ số 5,703,057) mà sau đó có thể được sàng lọc như được mô tả trên đây cho các hoạt tính được mô tả trong bản mô tả này.

Kháng thể CD47 theo sáng chế có thể được biểu hiện bằng vectơ chứa đoạn ADN mã hóa kháng thể mạch đơn như mô tả trên đây.

Các vectơ này có thể bao gồm các vectơ, các liposom, DNA trần, ADN hỗ trợ, súng bắn gen, ống thông, *etc.* Các vectơ bao gồm các tiếp hợp hóa học như được mô tả trong WO 93/64701, có gốc đích (*ví dụ,* phối tử của thụ thể bề mặt tế bào), và gốc liên kết axit nucleic (*ví dụ,* polylysin), vectơ virut (ví dụ, vectơ ADN hoặc ARN virut), các protein dung hợp như được mô tả trong PCT/US95/02140 (WO 95/22618) là protein dung hợp chứa gốc đích (ví dụ, kháng thể đặc hiệu với tế bào đích) và gốc liên kết axit nucleic (ví dụ, protamin), các plasmit, thể thực khuẩn, v.v.. Các vectơ có thể là nhiễm sắc thể, không phải là nhiễm sắc thể hoặc tổng hợp.

Các vectơ được ưu tiên bao gồm các vectơ virut, các protein dung hợp và các tiếp hợp hóa học. Các vectơ retrovirut bao gồm các virut bệnh bạch cầu ở chuột Moloney. Các vectơ ADN virut được ưu tiên. Các vectơ này bao gồm các vectơ pox như các vectơ orthopox hoặc avipox, các vectơ virut herpes như vectơ virut herpes simplex I (HSV) (xem, Geller, A. I. et al., J. Neurochem, 64:487 (1995); Lim, F., et al., in ADN Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A. I. et al., Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A. 90:7603 (1993); Geller, A. I., et al., Proc Natl. Acad. Sci USA 87:1149 (1990), các vectơ Adenovirut (xem, LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); Davidson, et al., Nat. Genet 3:219 (1993); Yang, et al., J. Virol. 69:2004 (1995) và các vectơ liên quan đến Adenovirut (xem, Kaplitt, M. G., et al., Nat. Genet.

8:148 (1994).

Các vectơ virut Pox đưa gen vào tế bào chất của tế bào. Các vectơ virut Avipox thu được từ biểu hiện ngắn hạn của axit nucleic. Các vectơ Adenovirut, các vectơ liên quan đến Adenovirut và các vectơ virut herpes simplex (HSV) được ưu tiên để đưa axit nucleic và tế bào thần kinh. Vectơ adenovirut thu được từ biểu hiện ngắn hạn hơn (khoảng 2 tháng) so với vectơ liên quan đến adenovirut (khoảng 4 tháng), mà vectơ này lại ngắn hơn các vectơ HSV. Vectơ cụ thể được chọn sẽ phụ thuộc vào tế bào đích và điều kiện được xử lý. Việc đưa vào có thể là bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn, ví dụ, gây nhiễm, chuyển nhiễm, tải nạp hoặc biến nạp. Ví dụ về cac phương pháp truyền gen bao gồm *ví dụ,* ADN trần, kết tủa $CaPO_4$, dextran DEAE, điện thẩm, dung hợp thể nguyên sinh, chuyển nhiễm liposom, vi tiêm tế bào và các vectơ virut.

Vectơ có thể được sử dụng để hướng đích một cách cơ bản bất kỳ tế bào đích mong muốn nào. Ví dụ, việc tiêm theo tiêm tiếp xúc có thể được sử dụng để định hướng các vectơ (ví dụ, adenovirut, HSV) đến vị trí mong muốn. Thêm vào đó, các hạt có thể được cấp bằng cách truyền trong não thất (Intracerebroventricular -icv) sử dụng hệ thống truyền dạng bơm mini, như hệ thống truyền SynchroMed. Phương pháp dựa trên dòng lớn, sự đối lưu giới hạn, cũng đã chứng tỏ hiệu quả ở việc cấp phân tử lớn tới các vùng mở rộng của não và có thể hữu dụng trong việc đưa vectơ đến tế bào đích. (xem, Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080 (1994); Morrison et al., Am. J. Physiol. 266:292-305 (1994)). Các phương pháp khác cũng có thể được sử dụng bao gồm ống thông, tiêm trong tĩnh mạch, ngoài ruột, trong bụng và dưới da, và theo đường uống hoặc các cách dùng khác đã được biết.

Các vectơ này có thể được sử dụng để biểu hiện lượng lớn các kháng thể mà có thể được sử dụng theo nhiều cách. Ví dụ, để phát hiện sự có mặt của CD47 trong mẫu. Kháng thể cũng có thể được sử dụng để liên kết với và phá vỡ CD47 và/hoặc tương tác CD47/SIRPα và sự phát tín hiệu gây ra bởi CD47/SIRPα.

Các kỹ thuật có thể được điều chỉnh để sản xuất các kháng thể mạch đơn đặc hiệu với protein kháng nguyên (xem, *ví dụ,* Patent Mỹ số 4,946,778). Ngoài ra, các phương pháp cũng có thể được điều chỉnh để xây dựng thư viện biểu hiện Fab (xem, *ví dụ,* Huse, et al., 1989 Science 246: 1275-1281) để cho phép nhận diện nhanh và hiệu quả các đoạn Fab đơn dòng với độ đặc hiệu mong muốn đối với protein hoặc các dẫn xuất, các đoạn, các thể

tương tự hoặc đồng đẳng của chúng. Các đoạn kháng thể chứa idiotyp đối với kháng nguyên protein có thể được tạo ra bởi các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: (i) đoạn $F(ab')_2$ được tạo ra bởi sự tiêu hóa pepsin của phân tử kháng thể; (ii) đoạn Fab được tạo ra bằng cách khử các cầu nối disulfua của đoạn $F_{(ab')2}$; (iii) đoạn Fab được tạo ra bằng cách xử lý phân tử kháng thể với papain và tác nhân khử và (iv) các đoạn F_v.

Sáng chế cũng bao gồm các đoạn F_v, Fab, Fab' và $F(ab')_2$ của CD47, kháng thể CD47 mạch đơn, các kháng thể vùng đơn (*ví dụ,* các nanobody (mảnh vỡ nhỏ nhất của kháng thể) hoặc VHHs), kháng thể CD47 đặc hiệu kép, và kháng thể CD47 tiếp hợp đa loài.

Các kháng thể đặc hiệu kép là các kháng thể có tính đặc hiệu liên kết với ít nhất hai kháng nguyên khác nhau. Trong trường hợp của sáng chế, một trong số các đặc hiệu liên kết là cho CD47. Đích liên kết thứ hai là bất kỳ kháng nguyên khác, và có lợi là protein hoặc thụ thể hoặc dưới đơn vị của thụ thể bề mặt tế bào.

Các phương pháp sản xuất các kháng thể đặc hiệu kép là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Thông thường, việc sản xuất theo công nghệ tái tổ hợp các kháng thể đặc hiệu kép là dựa trên sự đồng biểu hiện của hai cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch, trong đó hai chuỗi nặng có tính đặc hiệu khác nhau (Milstein and Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)). Do sự phân loại ngẫu nhiên của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch, các tế bào lai (sản phẩm dung hợp của hai tế bào lai (quadromas)) sản xuất hỗn hợp của mười phân tử kháng thể khác nhau, trong đó chỉ có một phân tử có cấu trúc đặc hiệu kép chính xác. Việc tinh sạch phân tử chính xác này thường được thực hiện bởi các bước sắc ký ái lực. Các quy trình tương tự được bộc lộ trong WO 93/08829, công bố ngày 13/5/ 1993, và trong Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Các vùng biến đổi của kháng thể với tính đặc hiệu liên kết mong muốn (vị trí kết hợp kháng thể-kháng nguyên) có thể được dung hợp vào các trình tự vùng ổn định của globulin miễn dịch. Việc dung hợp tốt hơn là với vùng ổn định của chuỗi nặng của globulin miễn dịch, chứa ít nhất một phần vùng bản lề, các vùng CH2, và CH3. Ưu tiên là có vùng ổn định của chuỗi nặng thứ nhất (CH1) chứa vị trí cần thiết cho liên kết chuỗi nhẹ có mặt trong ít nhất một dung hợp. ADN mã hóa chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch dung hợp và, nếu muốn, chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch, được chèn vào trong các vectơ biểu

hiện riêng biệt, và được đồng chuyển nhiễm vào vi sinh vật chủ thích hợp. Để biết chi tiết hơn về việc tạo thành các kháng thể đặc hiệu kép, xem, ví dụ, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

Theo phương pháp khác được mô tả trong WO 96/27011, bề mặt chung giữa cặp phân tử kháng thể được xử lý để tối đa hóa phần trăm các heterodime thu được từ cấu trúc tế bào tái tổ hợp. Bề mặt chung ưu tiên chứa ít nhất một phần của vùng CH3 của vùng ổn kháng định của kháng thể. Trong phương pháp này, một hoặc nhiều axit amin mạch bên nhỏ từ bề mặt chung của phân tử kháng thể thứ nhất được thay thế bằng các mạch bên lớn hơn (ví dụ, tyrosin hoặc tryptophan). "Các lỗ hổng" bù của mạch bên giống hoặc có kích thước tương tự với mạch bên lớn hơn được tạo thành trên bề mặt chung của phân tử kháng thể thứ cấp bằng cách thay thế axit amin mạch bên lớn bằng axit amin mạch bên nhỏ hơn (ví dụ, alanin hoặc threonin). Điều này dẫn đến cơ chế tăng hiệu suất của các heterodime so với các sản phẩm cuối không mong muốn khác như các homodime.

Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo thành ở dạng các kháng thể chiều dài đầy đủ hoặc các đoạn kháng thể (ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép $F(ab')_2$). Các kỹ thuật để tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép từ các đoạn kháng thể đã được mô tả trong các tài liệu. Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra sử dụng sự kết hợp hóa học. Brennan et al., Science 229:81 (1985) mô tả quy trình trong đó các kháng thể nguyên vẹn được tách ra để tạo thành các đoạn $F(ab')_2$. Các đoạn này được khử với sự có mặt của tác nhân tạo phức hợp dithiol natri arsenit để làm ổn định các dithiol lân cận và ngăn chặn sự tạo thành disulfua trong phân tử. Các đoạn Fab' tạo thành sau đó được chuyển thành các dẫn xuất thionitrobenzoat (TNB). Một trong các dẫn xuất Fab'-TNB sau đó được chuyển thành Fab'-thiol bằng cách khử với mercaptoetylamin và được trộn với lượng đương lượng mol dẫn xuất Fab'-TNB khác để tạo thành kháng thể đặc hiệu kép. Các kháng thể đặc hiệu kép được tạo thành có thể được sử dụng làm các tác nhân cho việc cố định chọn lọc các enzym.

Ngoài ra, các đoạn Fab' có thể thu trực tiếp từ E. coli và được ghép cặp bằng phương pháp hóa học để tạo thành các kháng thể đặc hiệu kép. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) mô tả việc sản xuất phân tử kháng thể đặc hiệu kép $F(ab')_2$ đã được làm cho giống người hoàn toàn. Mỗi đoạn Fab' được tiết một cách riêng biệt từ E. coli và được ghép cặp bằng phương pháp hóa học in vitro để tạo thành kháng thể đặc hiệu kép. Kháng thể đặc hiệu kép được tạo thành có khả năng liên kết với các tế bào biểu hiện quá

mức thụ thể ErbB2 và các tế bào T của người bình thường, cũng như gây ra hoạt tính lysin của các tế bào lympho gây độc tế bào của người chống lại ung thư vú ở người.

Các kỹ thuật khác nhau để tạo ra và phân lập các đoạn kháng thể đặc hiệu kép trực tiếp từ môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp cũng đã được mô tả. Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép đã được tạo ra sử dụng các khóa kéo leuxin. Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). Peptit dạng khóa leuxin từ các protein Fos và Jun được liên kết với các đoạn Fab' của hai kháng thể khác nhau bằng cách dung hợp gen. Các homodime kháng thể được khử ở vùng bản lề để tạo thành các monome và sau đó được oxy hóa lại để tạo thành các heterodime kháng thể. Phương pháp này cũng có thể được sử dụng để sản xuất các homodime kháng thể. Công nghệ "diabody" được mô tả bởi Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) đã đề xuất cơ chế khác để tạo thành các đoạn kháng thể đặc hiệu kép. Các đoạn chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) được kết nối với vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) bằng cầu nối rất ngắn để cho phép ghép cặp giữa hai vùng trên cùng chuỗi. Do đó, các vùng V_H và V_L của một đoạn được ép để ghép cặp với các vùng V_L và V_H bổ sung của đoạn khác, nhờ đó tạo thành hai vị trí liên kết kháng nguyên. Chiến lược khác để tạo thành các đoạn kháng thể đặc hiệu kép bằng cách sử dụng các dime Fv (sFv) mạch đơn cũng đã được ghi lại. Xem, Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994).

Các kháng thể với nhiều hơn hai hóa trị được dự tính. Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu ba có thể được tạo thành. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

Các kháng thể đặc hiệu kép làm ví dụ có thể liên kết với hai epitop khác nhau, ít nhất một trong số đó bắt nguồn từ kháng nguyên protein được bộc lộ ở đây. Theo cách khác, phần nhánh kháng kháng nguyên của phân tử globulin miễn dịch có thể được kết hợp với phần nhánh liên kết với phân tử hình cò súng trên bạch cầu như phân tử thụ thể tế bào T (ví dụ, CD2, CD3, CD28, hoặc B7), hoặc các thụ thể Fc cho IgG (FcγR), như FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) và FcγRIII (CD16) sao cho để tập trung vào cơ chế bảo vệ của tế bào đối với các tế bào biểu hiện kháng nguyên cụ thể. Các kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể được sử dụng để hướng đến các tác nhân gây độc tế bào cho các tế bào biểu hiện kháng nguyên cụ thể. Các kháng thể này có nhánh liên kết kháng nguyên và nhánh liên kết với tác nhân gây độc tế bào hoặc chất tạo càng cua nuclit phóng xạ, như EOTUBE, DPTA, DOTA, hoặc TETA. Kháng thể đặc hiệu kép khác được quan tâm mà liên kết với kháng nguyên protein được mô tả trong bản mô tả này và còn liên kết với nhân tố mô (tissue

factor -TF).

Các kháng thể tiếp hợp khác loại cũng được bộc lộ ở đây. Các kháng thể tiếp hợp khác loại được tạo thành bởi hai kháng thể được liên kết cộng hóa trị. Các kháng thể này đã được, ví dụ, đề xuất để hướng các tế bào hệ miễn dịch đến các tế bào không mong muốn (xem, Patent Mỹ số 4,676,980), và để điều trị việc nhiễm HIV (xem, WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Cũng được dự tính rằng các kháng thể có thể được tạo thành *in vitro* sử dụng các phương pháp đã biết trong hóa học protein tổng hợp, bao gồm các kháng thể liên quan đến các tác nhân tạo liên kết chéo. Ví dụ, các độc tố miễn dịch có thể được tạo ra sử dụng phản ứng trao đổi disulfua hoặc bằng cách tạo thành liên kết thioete. Ví dụ về chất phản ứng thích hợp cho mục đích này bao gồm iminothiolat và metyl-4-mercaptobutyrimidat và các chất được bộc lộ, ví dụ, trong Patent Mỹ số 4,676,980.

Cũng có thể mong muốn là biến đổi kháng thể theo sáng chế về chức năng chất tác động, sao cho để tăng cường, *ví dụ,* hiệu quả của kháng thể trong điều trị các bệnh và chứng rối loạn liên quan đến sự phát tín hiệu của CD47 khác thường. Ví dụ, (các) gốc xystein có thể được đưa vào vùng Fc, nhờ đó cho phép tạo thành cầu nối disulfua trong mạch trong vùng này. Kháng thể là homodime được tạo ra theo cách này cũng có thể cải thiện khả năng nội hóa và/hoặc làm tăng việc tiêu diệt tế bào trung gian bởi bổ thể và tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity -ADCC). (Xem, Caron et al., J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) và Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)). Theo cách khác, kháng thể có thể được xử lý có các vùng Fc kép và nhờ đó có thể có sự phân giải bổ thể và khả năng ADCC được tăng cường. (xem, Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)).

Sáng chế cũng đề cập đến các tiếp hợp miễn dịch chứa kháng thể được tiếp hợp với tác nhân gây độc tế bào như một độc tố (*ví dụ,* độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm, hoặc động vật, hoặc các đoạn của nó), hoặc isotop phóng xạ (*đó là,* tiếp hợp phóng xạ).

Các độc tố có hoạt tính enzym và các đoạn của nó cũng có thể được sử dụng bao gồm chuỗi bạch hầu A, các đoạn hoạt tính không liên kết của chuỗi độc tố bạch hầu, chuỗi ngoại độc tố A (từ Pseudomonas aeruginosa), chuỗi rixin A, chuỗi abrin A, chuỗi modecxin A, alpha-sarxin, các protein của cây Trẩu trơn (*Aleurites fordii*), các protein dianthin, các protein của cây Thương lục Mỹ (*Phytolaca Americana*) (PAPI, PAPII, và

PAP-S), chất ức chế từ mướp đắng (*momordica charantia*), curcin, crotin, chất ức chế từ cây Tạo phì thảo (*sapaonaria officinalis*), gelonin, mitogellin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin, và các tricothexen. Nhiều nuclit phóng xạ là có sẵn để cho việc sản xuất các kháng thể tiếp hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, và ^{186}Re.

Các tiếp hợp của kháng thể và tác nhân gây độc tế bào được tạo ra sử dụng nhiều tác nhân bắt cặp protein hai chức năng như N-sucxinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionat (SPDP), iminothiolan (IT), các dẫn xuất hai chức năng của các imidoeste (như dimetyl adipimidat HCL), các este hoạt tính (như disucxinimidyl suberat), aldehyt (như glutareldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexanediamin), các dẫn xuất bis-diazonium (như bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), diisoxyanat (như tolyen 2,6-diisoxyanat), và các hợp chất flo hoạt tính kép (như 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được tạo thành như được mô tả trong Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminpentaaxetic (MX-DTPA) được đánh dấu tại cacbon 14 là tác nhân tạo chelat để tiếp hợp nucleotit phóng xạ vào kháng thể. (xem, WO94/11026).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận ra rằng rất nhiều gốc có thể được sử dụng để ghép cặp với các kháng thể thu được theo sáng chế. (xem,, *ví dụ,* "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse và R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989)).

Sự ghép cặp có thể được hoàn thành bởi bất kỳ phản ứng hóa học nào mà sẽ liên kết hai phân tử miễn là kháng thể và gốc khác duy trì các hoạt tính tương ứng của chúng. Sự liên kết này có thể bao gồm nhiều cơ chế hóa học, ví dụ, liên kết cộng hóa trị, liên kết ái lực, liên kết xen vào giữa, liên kết phối hợp và phức hợp của chúng. Tuy nhiên, liên kết được ưu tiên là liên kết cộng hóa trị. Liên kết cộng hóa trị có thể đạt được hoặc bằng cách ngưng tụ trực tiếp các mạch bên hiện có hoặc bằng cách kết hợp các phân tử tạo cầu nối bên ngoài. Nhiều tác nhân tạo liên kết hóa trị hai hoặc nhiều hóa trị hữu dụng trong việc ghép cặp các phân tử protein, như các kháng thể theo sáng chế, với các phân tử khác. Ví dụ, các tác nhân ghép cặp đại diện có thể bao gồm các hợp chất hữu cơ như thioeste, carbodiimit, sucxinimit este, diisoxyanat, glutaraldehyt, diazobenzen và hexametylen diamin. Việc liệt kê này không nhằm để bao gồm hết các lớp khác nhau của các tác nhân ghép cặp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật nhưng, là ví dụ của các tác nhân ghép cặp thông thường (xem, Killen và Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen et al.,

Immunological Reviews 62:185-216 (1982); và Vitetta et al., Science 238:1098 (1987).

Các liên kết ưu tiên được mô tả trong các tài liệu. (Xem, *ví dụ,* Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984) mô tả việc sử dụng MBS (M-maleimidobenzoyl-N-hydroxysucxinimit este). *Xem*, Patent Mỹ số 5,030,719, mô tả việc sử dụng dẫn xuất axetyl hydrazit được halogen hóa ghép cặp với kháng thể bằng liên kết oligopeptit. Các chất tạo liên kết được đặc biệt ưu tiên bao gồm: (i) EDC (1-ethyl-3-(3-dimetylamino-propyl) carbodiimit hydroclorua; (ii) SMPT (4-sucxinimidyloxycarbonyl-alpha-metyl-alpha-(2-pridyl-dithio)-toluen (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (sucxinimidyl-6 [3-(2-pyridyldithio) propionamido]hexanoat (Pierce Chem. Co., Cat #21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (sulfosucxinimidyl 6 [3-(2-pyridyldithio)-propianamit] hexanoat (Pierce Chem. Co. Cat. #2165-G); và (v) sulfo-NHS (N-hydroxysulfo-sucxinimit: Pierce Chem. Co., Cat. #24510) được tiếp hợp với EDC.

Các tác nhân tạo liên kết được mô tả trên đây chứa các thành phần có các thuộc tính khác nhau, do đó dẫn đến các tiếp hợp có các đặc tính hóa lý khác nhau. Ví dụ, sulfo-NHS este của alkyl carboxylat là ổn định hơn so với sulfo-NHS este của carboxylat thơm. NHS-este chứa các liên kết ít tan hơn so với sulfo-NHS este. Ngoài ra, chất tạo liên kết SMPT chứa liên kết disulfua cản trở về mặt không gian, và có thể tạo thành thể tiếp hợp với độ ổn định tăng lên. Các liên kết disulfua nhìn chung là kém ổn định hơn các liên kết khác vì các liên kết này bị tách ra *in vitro*, dẫn đến việc có sự tiếp hợp kém. Sulfo-NHS, cụ thể là, có thể tăng độ ổn định của việc ghép cặp carbodimit. Việc ghép cặp carbodimit (như EDC) khi được sử dụng trong tiếp hợp với sulfo-NHS, tạo thành các este bền với sự thủy phân hơn là với mỗi phản ứng ghép cặp carbodimit.

Các kháng thể bộc lộ trong bản mô tả này có thể được tạo thành ở dạng các liposom miễn dịch. Các liposom chứa kháng thể được sản xuất bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ như phương pháp được mô tả trong Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); và các patent Mỹ số 4,485,045 và 4,544,545. Các liposom với thời gian lưu thông được tăng cường được bộc lộ trong Patent Mỹ số 5,013,556.

Các liposom đặc biệt hữu dụng có thể được tạo thành bằng phương pháp bay hơi đảo pha với thành phần lỏng chứa phosphatidylcolin, cholesterol, và phosphatidylethanolamin dẫn xuất từ PEG (PEG-PE). Các liposom được tách thông qua bộ

lọc với kích thước lỗ xác định để tạo thành các liposom với đường kính mong muốn. Các đoạn Fab' của kháng thể theo sáng chế có thể được tiếp hợp vào các liposom như được mô tả trong Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) thông qua phản ứng trao đổi disulfua.

Sử dụng các kháng thể kháng CD47

Có thể hiểu rằng các kháng thể có tác dụng điều trị theo sáng chế sẽ được dùng với các chất mang, tá dược thích hợp và các tác nhân khác được kết hợp vào các dạng bào chế để có sự chuyển thuốc, cấp thuốc, khả năng dung nạp và tác dụng tương tự được cải thiện. Nhiều dạng bào chế thích hợp có thể thấy trong bào chế dược phẩm đã biết đối với các chuyên gia hóa dược: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), đặc biệt là chương 87 bởi Blaug, Seymour. Các dạng bào chế này bao gồm, ví dụ, dạng bột, dạng hồ, thuốc mỡ, dạng gel, sáp, dầu, lipit, các nang chứa lipt (cation hoặc anion) (như Lipofectin™), các thể tiếp hợp ADN, các dạng hồ hấp thụ khan, nhũ tương dầu trong nước và nước trong dầu, nhũ tương carbowax (polyetylen glycol có khối lượng phân tử khác nhau), các gel bán rắn, và các hỗn hợp bán rắn chứa cacbovac. Bất kỳ hỗn hợp nào nêu trên có thể là thích hợp trong điều trị và liệu pháp điều trị phù hợp với sáng chế, miễn là thành phần hoạt tính trong chế phẩm không được bất hoạt bởi sự bào chế và dạng bào chế là thích hợp về mặt sinh lý và phù hợp với đường dùng. *Xem,* Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) và các trích dẫn trong đó để có thông tin thêm liên quan đến các dạng bào chế, các tá dược, và các chất mang đã được biết đến một cách rộng rãi đối với các chuyên gia hóa dược.

Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế, bao gồm kháng thể đơn dòng theo sáng chế, có thể được sử dụng làm tác nhân điều trị. Các tác nhân này thường được dùng để chẩn đoán, tiên đoán, theo dõi, điều trị, làm thuyên giảm, và/hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc bệnh lý liên quan đến sự biểu hiện bất thường của CD47, hoạt tính và/hoặc sự phát tín hiệu trong đối tượng. Chế độ điều trị được thực hiện bằng cách xác định đối tượng, *ví dụ,* người bệnh mắc phải (hoặc có nguy cơ phát triển) bệnh hoặc chứng rối loạn liên quan đến

sự biểu hiện bất thường của CD47, hoạt tính và/hoặc sự phát tín hiệu, *ví dụ,* bệnh ung thư hoặc chứng rối loạn do ung thư khác, sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Dạng bào chế của kháng thể, tốt hơn là kháng thể có độ đặc hiệu và ái lực cao đối với kháng nguyên đích của nó, được dùng cho đối tượng và thường có tác dụng do liên kết của chúng với đích. Việc dùng kháng thể có thể loại bỏ hoặc ức chế hoặc can thiệp tới sự biểu hiện, hoạt tính và/hoặc chức năng phát tín hiệu của đích (*ví dụ,* CD47). Việc dùng kháng thể có thể loại bỏ hoặc ức chế hoặc can thiệp vào liên kết của đích (*ví dụ,* CD47) với phối tử nội sinh (*ví dụ,* SIRPα) mà nó liên kết một cách tự nhiên. Ví dụ, kháng thể liên kết với đích và điều biến, phong bế, ức chế, khử, đối kháng, trung hòa, hoặc can thiệp vào sự biểu hiện của CD47, hoạt tính và/hoặc sự phát tín hiệu.

Các bệnh và các chứng rối loạn liên quan đến sự biểu hiện bất thường của CD47, hoạt tính và/hoặc sự phát tín hiệu bao gồm, bằng các ví dụ không giới hạn, ung thư máu và/hoặc khối u rắn. Các bệnh ung thư máu bao gồm, *ví dụ,* bệnh bạch cầu, u lympho và u tủy. Các dạng cụ thể của bệnh bạch cầu bao gồm, bằng các ví dụ không giới hạn, bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính (ALL); bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính (AML); bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (CLL); bệnh bạch cầu tủy bào mạn tính (CML); chứng rối loạn tăng sinh tủy xương/khối u (MPDS); và hội chứng loạn sản tủy. Các dạng cụ thể của u lympho bao gồm, bằng các ví dụ không giới hạn, u lympho Hodgkin, u lympho không Hodgkin cả dạng không đau và dạng tiến triển nhanh, u lympho Burkitt, và u lympho có nang (tế bào nhỏ và tế bào lớn). Các dạng cụ thể của u tủy bao gồm, bằng các ví dụ không giới hạn, bệnh đa u tủy (MM), u tủy tế bào khổng lồ, u tủy chuỗi nặng, và u tủy chuỗi nhẹ hoặc Bence-Jones. Khối u rắn bao gồm, *ví dụ,* u ngực, u buồng trứng, u phổi, u tụy, u tuyến tiền liệt, khối u ác tính, u trực tràng, u phổi, khối u đầu và cổ, khối u bàng quang, khối u thực quản, khối u gan, và khối u thận.

Các triệu chứng liên quan đến bệnh ung thư và chứng rối loạn do ung thư khác bao gồm, ví dụ, viêm, sốt, tình trạng khó chịu thông thường, sốt, đau, thường khu trú ở vùng viêm, mất cảm giác thèm ăn, sút cân, phù nề, đau đầu, mệt mỏi, phát ban, thiếu máu, yếu cơ, đau cơ và các triệu chứng ở bụng ví dụ, đau bụng, tiêu chảy hoặc táo bón.

Nhìn chung, lượng có tác dụng điều trị của kháng thể theo sáng chế liên quan đến lượng cần thiết để đạt được mục đích điều trị. Như chú ý ở trên, mục đích có thể là tương tác liên kết giữa kháng thể và kháng nguyên đích của nó mà trong một số trường hợp, can thiệp vào hoạt động chức năng của đích. Lượng yêu cầu để dùng sẽ còn phụ thuộc vào ái

lực liên kết của kháng thể với kháng nguyên đích của nó, và cũng phụ thuộc vào tốc độ tại đó kháng thể dùng được tiêu hết từ thể tích tự do khác tương ứng với cách dùng. Phạm vi thông thường của liều có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo sáng chế có thể là, bằng ví dụ không mang tính giới hạn, từ khoảng 0,1 mg/kg thể trọng đến khoảng 100 mg/kg thể trọng. Tần suất phân liều thông thường có thể nằm trong khoảng, ví dụ, từ hai lần/ngày tới một lần/tuần.

Hiệu lực điều trị được xác định kết hợp với phương pháp bất kỳ đã được biết để chẩn đoán hoặc điều trị chứng rối loạn liên quan đến viêm cụ thể. Sự thuyên giảm của một hoặc nhiều triệu chứng của chứng rối loạn liên quan đến viêm chỉ ra rằng kháng thể có lợi ích điều trị.

Các phương pháp sàng lọc các kháng thể có độ đặc hiệu mong muốn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme linked immunosorbent assay -ELISA) và các kỹ thuật được trung gian bởi miễn dịch đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Theo phương án khác, các kháng thể được định hướng để kháng CD47 có thể được sử dụng trong các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan đến sự xác định vị trí và/hoặc định lượng CD47 (*ví dụ,* để sử dụng trong các mức đo CD47 và/hoặc cả CD47 và SIRPα trong các mẫu sinh lý thích hợp, để sử dụng trong các phương pháp chẩn đoán, để sử dụng trong mô tả hình ảnh protein, và các phương pháp tương tự). Theo một phương án được đưa ra, các kháng thể đặc hiệu với CD47, hoặc dẫn xuất, đoạn, thể tương tự hoặc đồng đẳng của nó, chứa kháng thể dẫn xuất từ vùng liên kết kháng nguyên, được sử dụng làm các hợp chất có hoạt tính dược lý (được đề cập đến sau đây là "các chất để điều trị").

Theo phương án khác, kháng thể đặc hiệu với CD47 cũng có thể được sử dụng để phân lập polypeptit CD47, bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn, như ái lực miễn dịch, sắc ký hoặc miễn dịch kết tủa. Các kháng thể được định hướng kháng protein CD47 (hoặc đoạn của nó) cũng có thể được sử dụng theo kiểu để chẩn đoán để theo dõi mức protein trong mô như một bước của quy trình thử nghiệm lâm sàng, *ví dụ,* để, ví dụ, xác định hiệu lực của chế độ điều trị xác định. Việc phát hiện có thể được làm thuận tiện bằng việc ghép cặp (*đó là,* tạo liên kết vật lý) kháng thể với hợp chất có thể phát hiện được. Ví dụ về các chất có thể phát hiện được bao gồm các enzym khác nhau, các nhóm hữu cơ gắn thường trực lên phân tử enzym (nhóm prosthetic), các vật liệu huỳnh quang, các vật liệu phát quang, các vật liệu

phát quang sinh học, và các vật liệu phóng xạ. Ví dụ về các enzym thích hợp bao gồm peroxidaza của cây chùm ngây (horseradish), alkalin phosphataza, β-galactosidaza, hoặc axetylcholinesteraza; Ví dụ về các phức hợp nhóm prosthetic bao gồm streptavidin/biotin và avidin/biotin; Ví dụ về các vật liệu huỳnh quang bao gồm umbelliferon, floresxein, floresxein isothioxyanat, rhodamin, diclorotriazinylamin floresxein, dansyl clorua hoặc phycoerythrin; ví dụ về các vật liệu phát quang bao gồm luminol; ví dụ về các vật liệu phát quang sinh học bao gồm luxiferaza, luxiferin, và aequorin, và các vật liệu phóng xạ thích hợp bao gồm ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S hoặc ^{3}H.

Theo phương án khác, kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng làm tác nhân để phát hiện sự có mặt của CD47 và/hoặc cả protein CD47 và SIRPα (hoặc đoạn protein của nó) trong mẫu. Theo một số phương án, kháng thể có nhãn có thể phát hiện được. Các kháng thể là đa dòng, hoặc tốt hơn nữa là, đơn dòng. Kháng thể đầy đủ, hoặc đoạn của nó (*ví dụ,* Fab, scFv, hoặc $F(ab')_2$) được sử dụng. Thuật ngữ "được đánh dấu", liên quan đến mẫu dò hoặc kháng thể, được định hướng để bao gồm việc đánh dấu trực tiếp mẫu dò hoặc kháng thể bằng cách ghép cặp (*đó là,* tạo liên kết vật lý) hợp chất có thể phát hiện được với mẫu dò hoặc kháng thể, cũng như đánh dấu không trực tiếp mẫu dò hoặc kháng thể bằng phản ứng với chất phản ứng khác mà có thể được đánh dấu một cách trực tiếp. Ví dụ về việc đánh dấu không trực tiếp bao gồm việc phát hiện kháng thể đầu tiên sử dụng kháng thể thứ cấp được đánh dấu huỳnh quang và đánh dấu ở đuôi mẫu dò ADN với biotin sao cho nó có thể phát hiện được bằng streptavidin được dán nhãn huỳnh quang. Thuật ngữ "mẫu sinh học" được định hướng để bao gồm các mô, các tế bào và dịch sinh học phân lập từ đối tượng, cũng như là các mô, các tế bào và dịch có mặt trong đối tượng. Do đó, được bao gồm việc sử dụng thuật ngữ "mẫu sinh học" là máu và phân đoạn hoặc thành phần của máu bao gồm huyết thanh, huyết tương, hoặc bạch huyết. Đó là, phương pháp phát hiện theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để phát hiện mARN phân tích, protein, hoặc ADN hệ gen trong mẫu sinh học *in vitro* cũng như là *in vivo*. Ví dụ, các kỹ thuật *in vitro* để phát hiện mARN đang phân tích bao gồm kỹ thuật lai Northern và lai *in situ*. Các kỹ thuật *in vitro* để phát hiện protein đang phân tích bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (Enzyme Linked Immunosorbent Assays -ELISAs), Western blot (thẩm tách tây), miễn dịch kết tủa, và miễn dịch huỳnh quang. Các kỹ thuật *In vitro* để phát hiện analyt ADN hệ gen bao gồm kỹ thuật lai Southern. Các quy trình thực hiện các thử nghiệm miễn dịch được mô tả, ví dụ trong "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995;

"Immunoassay", E. Diamandis và T. Christopoulus, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; và "Practice và Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Ngoài ra, các kỹ thuật *in vivo* để phát hiện protein đang phân tích bao gồm đưa vào đối tượng kháng thể kháng protein đang phân tích được đánh dấu. Ví dụ, kháng thể có thể được đánh dấu bằng chất đánh dấu phóng xạ và vị trí trong đối tượng có thể được phát hiện bởi các kỹ thuật tạo hình ảnh tiêu chuẩn.

Sử dụng các dạng bào chế của kháng thể CD47 để điều trị bệnh

Các kháng thể theo sáng chế (được đề cập ở đây là "các hoạt chất"), và các dẫn xuất, phân đoạn, các thể tương tự và các chất đồng đẳng của chúng, có thể kết hợp vào các dược phẩm thích hợp để sử dụng. Các nguyên tắc và cân nhắc liên quan đến việc bào chế các chế phẩm này, cũng như hướng dẫn lựa chọn thành phần cũng được đưa ra, ví dụ như trong Remington's Pharmaceutical Sciences: The Science and Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, và Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; và Peptide and Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

Các chế phẩm này thường chứa kháng thể và một chất mang dược dụng. Khi đoạn kháng thể được sử dụng, đoạn ức chế nhỏ nhất có liên kết đặc hiệu với vùng liên kết của protein đích sẽ được ưu tiên. Ví dụ, dựa trên các trình tự vùng biến đổi của kháng thể, các phân tử peptit có thể được thiết kế để duy trì khả năng liên kết với trình tự protein đích. Các phân tử peptit này có thể được tổng hợp hóa học và/hoặc được tạo ra bằng công nghệ AND tái tổ hợp. (xem,, *ví dụ,* Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chất mang dược dụng" bao gồm bất kì hay toàn bộ các dung môi, các môi trường phân tán, các lớp phủ ngoài, các chất chống vi khuẩn và chống nấm mốc, các chất đẳng trương và làm chậm hấp thụ, và các chất tương tự khác, tương thích để dùng trong dược phẩm. Các chất mang thích hợp được mô tả trong tài liệu Khoa học Dược xuất bản gần đây nhất của Remington (Remington's Pharmaceutical Sciences), là tài liệu tham khảo tiêu chuẩn trong lĩnh vực này. Ví dụ về các chất mang này hoặc chất pha loãng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nước, muối, dịch truyền, dung dịch dextroza, và anbumin huyết thanh người 5%. Liposom và tá dược không chứa nước như

các loại dầu không bay hơi cũng có thể được sử dụng. Việc sử dụng các môi trường và các chất nêu trên cho các hoạt chất dược là phổ biến trong lĩnh vực này. Ngoại trừ môi trường hay các chất được quy định là không tương thích với các hoạt chất kể trên thì việc sử dụng nói trên trong chế phẩm là được dự tính.

Các dạng bào chế để sử dụng *in vivo* phải được vô trùng. Việc vô trùng này có thể dễ dàng thực hiện bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng.

Dược phẩm theo sáng chế được bào chế phù hợp với đường dùng dự kiến. Ví dụ về đường dùng bao gồm dùng ngoài đường tiêu hóa, *như* đường tĩnh mạch, qua da, dưới da, miệng (*ví dụ như* hít), trên bề mặt da (*như là,* tại chỗ), qua niêm mạc, và qua trực tràng. Dung dịch hoặc huyền phù để dùng qua ngoài đường tiêu hóa, qua da, dưới da thường bao gồm: chất làm loãng vô trùng như nước cất để tiêm, dung dịch muối, dầu không bay hơi, polyetylen glycol, glyxerin, propylen glycol hoặc các dung môi tổng hợp; các chất chống nhiễm khuẩn như rượu benzyl hoặc các metyl paraben; các chất chống oxy hóa như axit ascorbic hoặc natri bisulfit; các chất tạo chelat như axit etylendiamintetraaxetic (EDTA); chất đệm như axetat, xitrat hoặc phosphat, và các chất điều chỉnh tính trương như natri clorua hoặc dextroza. Độ pH có thể điều chỉnh bằng axit hoặc bazơ như axit clohydric hoặc natri hydroxit. Dạng bào chế để dùng qua ngoài đường tiêu hóa có thể dưới dạng ống tiêm, xy lanh dùng một lần hoặc lọ đa liều bằng thủy tinh hoặc nhựa.

Các dược phẩm có thể dùng qua đường tiêm bao gồm dung dịch chứa nước vô trùng (nếu có nước hòa tan) hoặc chất phân tán và bột vô trùng khi điều chế tại chỗ dung dịch tiêm hoặc chất phân tán. Nếu dùng qua đường tĩnh mạch, các chất mang thích hợp bao gồm muối sinh lý, nước kìm vi khuẩn, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) hoặc muối đệm phosphat (PBS). Trong mọi trường hợp, dược phẩm này phải được vô trùng và ở dạng lỏng để có thể tiêm được dễ dàng. Dược phẩm phải được bào chế và lưu trữ trong điều kiện ổn định và phải được bảo quản chống lại các tác nhân gây nhiễm khuẩn và nấm mốc. Chất mang có thể dưới dạng dung môi hoặc chứa môi trường phân tán như (ví dụ như glyxerol, propylen glycol, và dung dịch polyethylen glycol, và các chất tương tự), và hỗn hợp phù hợp của chúng. Độ lỏng thích hợp có thể được duy trì bằng cách như sử dụng lớp phủ như lexitin, hay bằng cách duy trì cỡ hạt yêu cầu trong trường hợp phân tán, hay sử dụng các chất hoạt động bề mặt. Các chất chống nhiễm khuẩn và nấm mốc có thể được sử dụng để chống sự xâm nhập của vi khuẩn như paraben, clorobutanol, phenol, axit ascorbic, thimerosal, và các chất tương tự khác. Trong nhiều trường hợp, các chất đẳng trương được

ưu tiên sử dụng như đường, polyalcohol như manitol, sorbitol, natri clorua có trong hợp chất. Sự hấp thụ kéo dài của các dược phẩm dạng tiêm này có thể thu được bằng cách đưa vào dược phẩm chất làm chậm hấp thụ, ví dụ như nhôm monostearat và gelatin.

Dung dịch dạng tiêm vô trùng có thể điều chế bằng cách pha hoạt chất ở lượng cho phép trong dung môi phù hợp với một hoặc kết hợp với các thành phần kể trên, sau đó lọc tiệt trùng. Nhìn chung chất phân tán được sản xuất bằng cách pha hoạt chất với một tá dược lỏng vô trùng có chứa các chất phân tán cơ bản và các thành phần theo yêu cầu khác nêu trên đây. Trong trường hợp dùng bột tiệt trùng để điều chế dung dịch tiêm vô trùng thì có thể dùng các phương pháp điều chế như làm khô chân không và đông khô để thu được hỗn hợp dạng bột có thành phần hoạt tính và các thành phần bổ sung khác từ dung dịch được lọc vô trùng trước đó.

Các dược phẩm dùng qua đường miệng thường bao gồm chất pha loãng dạng trơ hoặc chất mang không độc. Dược phẩm này có thể được đóng gói dưới dạng viên nang mềm hay được nén ở dạng viên nén. Với mục đích dùng để chữa bệnh qua đường miệng, hoạt chất này có thể kết hợp với tá dược và dùng ở dạng viên nén, viên ngậm, hay viên nang mềm. Dược phẩm dùng qua đường miệng còn có thể được điều chế bằng cách sử dụng chất mang dạng lỏng để dùng như một loại nước súc miệng, trong đó hợp chất trong chất mang dạng lỏng được dùng qua đường miệng, sục và khạc hoặc nuốt. Các chất liên kết phù hợp về mặt dược học và/hoặc tá dược cũng là thành phần của hợp chất. Viên nén, viên nang, viên ngậm, hay các dạng tương tự có thể có một trong các thành phần sau đây hoặc các hợp chất có tính chất tương tự: chất liên kết như xenuloza vi tinh thể, gôm tragacanth hoặc gelatin; tá dược như tinh bột hoặc lactoza, chất phân hủy như axit alginic, primogel, hoặc tinh bột ngô; chất bôi trơn như magie stearat hoặc Sterote; chất chảy như silicon dioxit keo; chất làm ngọt như sucroza hoặc sacarin; hoặc chất tạo hương vị như bạc hà, metyl salixylat, hoặc cam.

Nếu dùng qua đường xịt, hợp chất sẽ được đưa vào dưới dạng phun soil khí thông qua một vật chứa dạng nén hoặc ống định lượng có chứa chất đẩy phù hợp, *ví dụ,* chất khí như cacbon dioxit, hoặc qua thiết bị xông.

Dùng thuốc qua đường toàn thân có thể dưới dạng qua niêm mạc hay qua da. Đối với trường hợp dùng qua niêm mạc hoặc qua da, các chất thẩm thấu phù hợp với màng chắn để thấm thấu cũng sẽ được sử dụng trong chế phẩm. Các chất thẩm thấu này đã được

biết đến rộng rãi trong lĩnh vực, và bao gồm, ví dụ, đối với trường hợp dùng qua niêm mạc, chất làm sạch, muối mật, và các dẫn xuất của axit fusidic. Việc dùng qua da có thể thực hiện bằng cách sử dụng dạng phun qua đường mũi hoặc dạng viên đạn. Với trường hợp dùng qua da, các hoạt chất được đưa vào để tạo thành dạng mỡ bôi, bọt, gel, hoặc kem đã được biết đến trong lĩnh vực.

Hợp chất có thể được bào chế dưới dạng viên đạn (*ví dụ,* bằng nguyên liệu làm dạng viên đạn cơ bản, như dầu ca cao và các loại glyxerin khác) hoặc dạng thụt khi đưa vào trực tràng.

Theo một phương án, các hoạt chất được sản xuất cùng với chất mang sẽ giúp hợp chất tránh được sự bài tiết nhanh chóng ra khỏi cơ thể, như các hợp chất giải phóng được duy trì/kiểm soát, bao gồm các mô cấy và các hệ thống cấp được vi nang. Polyme thoái biến sinh học, polyme tương thích sinh học có thể được dùng bao gồm etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, colagen, polyorthoeste, và axit polylactic. Các phương pháp điều chế hợp chất này là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Ví dụ, các hoạt chất có thể được đưa vào các chế phẩm vi nang, ví dụ như, bằng công nghệ tụ giọt, hay polyme hóa giữa hai bề mặt, hay ví dụ, hydroxymetylxeluloza hoặc vi nang gelatin và vi nang poly-(metylmetacrylat), theo thứ tự, trong hệ thống cung cấp thuốc dạng keo (ví dụ, liposom, albumin vi cầu, vi nhũ tương, các hạt nano, và nang nano) hoặc trong nhũ tương lớn.

Các chế phẩm giải phóng kéo dài có thể được bào chế. Ví dụ thích hợp về chế phẩm giải phóng kéo dài bao gồm chất nền bán thấm của polyme kỵ nước thể rắn chứa kháng thể, trong đó chất nền này tồn tại dưới dạng hạt, *ví dụ,* phim, hoặc vi nang. Ví dụ về chất nền giải phóng kéo dài bao gồm polyeste, hydrogel (ví dụ, poly(2-hydroxyetyl-metacrylat), hoặc poly(vinylalcohol)), polylactit (patent Mỹ số 3,773,919), các copolyme của axit L-glutamic và γ etyl-L-glutamat, etylen-vinyl axetat không phân rã, các copolyme axit glycolic-axit lactic phân rã như LUPRON DEPOT ™ (hạt vi cầu có thể dùng để tiêm bao gồm copolyme axit glycolic-axit lactic và leuprolit axetat), và axit poly-D-(-)-3-hydroxybutyric. Trong khi các polyme như etylen-vinyl axetat và axit glycolic-axit lactic có thể giải phóng ra các phân tử trong vòng hơn 100 ngày, thì các hydrogel nhất định có thể giải phóng ra protein trong khoảng thời gian ngắn hơn.

Nguồn nguyên liệu này cũng có thể được cung cấp từ Alza Corporation và Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (bao gồm liposom hướng đích đến các tế bào đã được gây nhiễm với các kháng thể đơn dòng đến các kháng nguyên virut) và đồng thời có thể dùng làm các chất mang dược dụng. Hợp chất này có thể được điều chế theo các phương pháp đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết đến, ví dụ, như được mô tả trong Patent Mỹ số 4,522,811.

Điều chế hợp chất dùng qua đường miệng và ngoài đường tiêu hóa dưới dạng đơn vị liều để giúp việc uống thuốc dễ dàng hơn và đồng nhất liều dùng sẽ đặc biệt có lợi. Dạng đơn vị liều như được sử dụng ở đây đề cập đến đơn vị riêng rẽ về mặt vật lý phù hợp với các dạng liều đơn vị cho đối tượng điều trị; mỗi đơn vị chứa một lượng hoạt chất đã định sẵn được tính toán để mang lại hiệu quả điều trị mong muốn khi liên kết với chất mang dược phẩm yêu cầu. Mô tả các dạng đơn vị liều theo sáng chế đã được ghi lại và phụ thuộc trực tiếp vào đặc tính riêng biệt của hoạt chất và hiệu quả điều trị cụ thể sẽ đạt được, và các giới hạn vốn có trong lĩnh vực khi tổ hợp một hoạt chất như vậy để điều trị các cá thể.

Các dược phẩm có thể bao gồm vật chứa, gói, hoặc dụng cụ pha và hướng dẫn sử dụng.

Hợp chất có thể bao gồm hơn một hoạt chất cần thiết cho chỉ định điều trị cụ thể, tốt nhất là kết hợp với hoạt chất có các hoạt tính bổ sung mà không gây phản ứng trái chiều với nhau. Theo cách khác, hoặc thêm vào đó, hợp chất có thể chứa chất xúc tác để tăng cường chức năng của hợp chất này, ví dụ, chất gây độc tế bào, xytokin, chất hóa liệu pháp, hoặc chất ức chế tăng trưởng. Các phân tử này cùng hiện diện kết hợp với lượng để mang lại hiệu quả dự kiến.

Theo một phương án, các hoạt chất được dùng trong điều trị kết hợp, *đó là,* kết hợp với các chất khác, *ví dụ,* các chất liệu pháp, được dùng để điều trị tình trạng hoảng loạn hoặc rối loạn tâm thần, như các dạng ung thư, rối loạn miễn dịch và các bệnh viêm nhiễm. Thuật ngữ "kết hợp" trong trường hợp này để nói đến các chất được đưa vào cùng một lúc, hoặc đồng thời hoặc theo tuần tự. Nếu theo tuần tự, khi đưa hợp chất thứ hai vào thì hợp chất ban đầu trong số hai hợp chất vẫn có thể phát hiện được ở nồng độ hữu hiệu tại vị trí điều trị.

Ví dụ, điều trị kết hợp có thể bao gồm một hoặc nhiều các kháng thể theo sáng chế

cùng kết hợp với, và/hoặc cùng dùng với, một hoặc nhiều các chất điều trị bổ sung, *ví dụ,* một hoặc nhiều xytokin và các chất ức chế nhân tố tăng trưởng, chất cản trở miễn dịch, chất chống viêm nhiễm, chất chống chuyển hóa, chất ức chế enzym, và/hoặc tác nhân gây độc tế bào hoặc các tác nhân kìm tế bào, như được mô tả chi tiết dưới đây. Các liệu pháp kết hợp này có thể dùng liều thấp hơn các chất điều trị được đưa vào, do đó có thể tránh được các độc tố nếu có hoặc các biến chứng do các liệu pháp đơn.

Các chất điều trị được ưu tiên được sử dụng kết hợp với kháng thể theo sáng chế là các chất cản trở ở các giai đoạn khác nhau khi phản ứng lại với viêm nhiễm. Theo một phương án, một hoặc nhiều các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này được điều chế, và/hoặc dùng với, một hoặc nhiều tác nhân bổ sung như xytokin khác các chất đối kháng với tác nhân tăng trưởng. (*ví dụ,* các thụ thể tan, chất ức chế peptit, các phân tử nhỏ, các dung hợp phối tử); hoặc các kháng thể hoặc kháng nguyên liên kết đoạn của chúng liên kết với các đích khác (*ví dụ,* các kháng thể liên kết với xytokin khác hoặc nhân tố tăng trưởng, các thụ thể của chúng, hoặc các phân tử bề mặt tế báo khác); và các xytokin chống viêm nhiễm hoặc các chất đối kháng của chúng.

Các kháng thể có thể được dùng làm tá dược của vacxin cho các trường hợp rối loạn tự miễn, các bệnh viêm, v.v.. Sự kết hợp tá dược để điều trị các rối loạn thích hợp để dùng kết hợp với các loại kháng nguyên từ các kháng nguyên tự thân được hướng đích, *đó là,* các tự kháng nguyên (autoantigen), liên quan đến tự miễn dịch, *ví dụ,* protein bazơ myelin; các tự kháng nguyên từ chứng viêm, *ví dụ,* protein peptit tinh bột, hoặc các kháng nguyên cấy ghép, *ví dụ,* các kháng nguyên đồng loại. Kháng nguyên có thể bao gồm peptit hoặc polypeptit dẫn xuất từ protein, cũng như từ đoạn của bất kỳ thành phần sau: sacarit, protein, các polynucleotit hoặc các oligonucleotit, tự kháng nguyên, protein peptit tinh bột, các kháng thể cấy ghép, các dị ứng nguyên, hoặc các thành phần đại phân tử khác. Trong một số trường hợp, nhiều hơn một kháng nguyên được bao gồm trong chế phẩm chứa kháng nguyên.

Việc thiết kế và tạo thành các chất điều trị khác

Theo sáng chế và dựa trên hoạt tính của các kháng thể được tạo ra và được nêu đặc tính trong bản mô tả này liên quan đến CD47, việc thiết kế các phương thức điều trị khác dựa trên các gốc kháng thể đã được tạo điều kiện thuận lợi. Các phương thức này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất điều trị từ kháng thể tiên tiến, như các kháng thể đặc

hiệu kép, các độc tố miễn dịch, và các chất điều trị được đánh dấu phóng xạ, tạo ra các chất điều trị từ peptit, liệu pháp gen, đặc biệt là các intrabody, các liệu pháp đối nghĩa, và các phân tử nhỏ.

Ví dụ, liên quan đến các kháng thể đặc hiệu kép, các kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo thành chứa (i) hai kháng thể- một có tính đặc hiệu với CD47 và kháng thể thứ cấp đặc hiệu với phân tử thứ hai mà được tiếp hợp cùng nhau, (ii) kháng thể đơn có một chuỗi đặc hiệu với CD47 và chuỗi thứ hai đặc hiệu với phân tử thứ hai, hoặc (iii) kháng thể chuỗi đơn có tính đặc hiệu với CD47 và phân tử thứ hai. Các kháng thể đặc hiệu kép này được tạo ra sử dụng các kỹ thuật đã được biết đến rộng rãi ví dụ, liên quan đến (i) và (ii), *xem, ví dụ,* Fanger *et al.* Immunol Methods 4:72-81 (1994) và Wright *et al.* Crit, Reviews in Immunol. 12125-168 (1992), và liên quan đến (iii), xem, *ví dụ,* Traunecker *et al.* Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52 (1992).

Liên quan đến các độc tố miễn dịch, các kháng thể có thể được biến đổi để hoạt động giống như các độc tố miễn dịch sử dụng các kỹ thuật đã được biết đến một cách rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật. *Xem, ví dụ,* Vitetta Immunol Today 14:252 (1993). *Xem,* Patent Mỹ số 5,194,594. Liên quan đến việc sản xuất các kháng thể được đánh dấu phóng xạ, các kháng thể này có thể được sản xuất một cách dễ dàng sử dụng các kỹ thuật đã được biết đến một cách rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật. *Xem, ví dụ,* Junghans *et al.* in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2d edition, Chafner và Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). *Xem,* các Patent Mỹ số 4,681,581, 4,735,210, 5,101,827, 5,102,990 (RE 35,500), 5,648,471, và 5,697,902. Mỗi độc tố miễn dịch và các phân tử được đánh dấu phóng xạ có thể tiêu diệt các tế bào biểu hiện CD47.

Liên quan đến việc tạo ra các peptit có tác dụng điều trị, thông qua việc sử dụng thông tin cấu trúc liên quan đến CD47 và các kháng thể thêm vào đó, như các kháng thể theo sáng chế hoặc sàng lọc thư viện peptit, các peptit có tác dụng điều trị có thể được tạo thành được định hướng để kháng CD47. Việc thiết kế và sàng lọc các chất có tác dụng điều trị từ peptit được bàn luận liên quan đến Houghten *et al.* Biotechniques 13:412-421 (1992), Houghten PNAS USA 82:5131-5135 (1985), Pinalla *et al.* Biotechniques 13:901-905 (1992), Blake and Litzi-Davis BioConjugate Chem. 3:510-513 (1992). Các độc tố miễn dịch và các phân tử được đánh dấu phóng xạ có thể được tạo ra, và theo cách tương tự, liên quan đến các gốc peptit như được bàn luận trên đây liên quan đến các kháng thể. Cho rằng phân tử CD47 (hoặc dạng như biến thể dạng mảnh ghép hoặc dạng thay thế) có hoạt tính

chức năng trong quy trình của bệnh, cũng có thể thiết kế các liệu pháp gen và liệu pháp đối nghĩa thông qua các kỹ thuật thông thường. Các phương thức này có thể được sử dụng để điều biến chức năng của CD47. Liên quan đến các kháng thể theo sáng chế tạo điều kiện thuận lợi cho việc thiết kế và sử dụng các thử nghiệm chức năng liên quan từ đó. Việc thiết kế và chiến lược cho các liệu pháp đối nghĩa được bàn luận chi tiết ở đây trong công bố đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số WO 94/29444. Việc thiết kế và các chiến lược cho liệu pháp gen là đã được biết đến rộng rãi. Tuy nhiên, cụ thể, việc sử dụng các kỹ thuật liệu pháp gen bao gồm các intrabody có thể chứng minh là đặc biệt có lợi. *Xem, ví dụ,* Chen *et al*. Human Gene Therapy 5:595-601 (1994) và Marasco Gene Therapy 4:11-15 (1997). Việc thiết kế chung và các nghiên cứu liên quan đến các liệu pháp gen cũng được bàn luận trong công bố đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số WO 97/38137.

Các kiến thức thu được từ cấu trúc của phân tử CD47 và tương tác của nó với các phân tử khác theo sáng chế, như SIRPα và/hoặc các kháng thể theo sáng chế, và các chất khác có thể được sử dụng để thiết kế một cách có lý các phương thức điều trị bổ sung. Liên quan đến vấn đề này, các kỹ thuật thiết kế thuốc hợp lý như tinh thể học tia X, tạo mô hình phân tử được hỗ trợ bởi máy tính (computer-aided (or assisted) molecular modeling - CAMM), quan hệ hoạt tính-cấu trúc định tính hoặc định lượng (quantitative or qualitative structure-activity relationship -QSAR), và các kỹ thuật tương tự có thể được sử dụng để tập trung vào lỗ lực phát hiện ra thuốc mới. Việc thiết kế hợp lý cho phép tiên đoán các cấu trúc protein hoặc cấu trúc tổng hợp mà có thể tương tác với phân tử hoặc các dạng cụ thể của nó mà cũng có thể được sử dụng để biến đổi hoặc điều biến hoạt tính của IL-6Rc. Các cấu trúc này có thể được tổng hợp bằng phương pháp hóa học hoặc được biểu hiện trong các hệ thống sinh học. Phương pháp này đã được xem xét trong Capsey *et al*. Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs (Stockton Press, NY (1988)). Ngoài ra, các thư viện tổ hợp có thể được thiết kế và tổng hợp và được sử dụng trong các chương trình sàng lọc, như hệ thống sàng lọc thông lượng cao.

Các phương pháp sàng lọc

Các phương pháp (cũng được đề cập đến ở đây là "các thử nghiệm sàng lọc") để nhận diện các chất điều biến, *đó là,* chất dự tuyển hoặc hợp chất thử nghiệm các tác nhân (*ví dụ,* các peptit, các giả peptit, các phân tử nhỏ hoặc các thuốc khác) mà điều biến hoặc can thiệp vào liên kết của CD47 với SIRPα, hoặc chất dự tuyển hoặc các hợp chất thư nghiệm hoặc các tác nhân mà điều biến hoặc can thiệp vào chức năng phát tín hiệu của

CD47 và/hoặc CD47-SIRPα được bộc lộ ở đây. Cũng được đề xuất ở đây là các phương pháp nhận diện các hợp chất hữu dụng để điều trị chứng rối loạn liên quan đến sự biểu hiện CD47 và/hoặc CD47-SIRPα bất thường, hoạt tính và/hoặc sự phát tín hiệu. Các phương pháp sàng lọc có thể bao gồm các phương pháp đã biết hoặc được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật hoặc các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, CD47 có thể được cố định trên đĩa vi chuẩn độ và được ủ với chất dự tuyển hoặc hợp chất thử nghiệm, *ví dụ,* kháng thể CD47, với sự có mặt của SIRPα. Sau đó, SIRPα được liên kết có thể được phát hiện sử dụng kháng thể thứ cấp và việc hấp thụ có thể được phát hiện trên đầu đọc đĩa.

Các phương pháp nhận diện các hợp chất có khả năng thúc đẩy sự thực bào các tế bào khối u bởi các đại thực bào cũng được đề xuất. Các phương pháp này có thể bao gồm các phương pháp đã biết hoặc được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật hoặc các phương pháp được mô tả ở trong bản mô tả này. Ví dụ, các đại thực bào được ủ với các tế bào khối u được đánh dấu với sự có mặt của chất dự tuyển, *ví dụ,* kháng thể CD47. Sau một thời gian, các đại thực bào có thể được quan sát qua sự nhập nội của nhãn đánh dấu của khối u để nhận diện sự thực bào. Các chi tiết bổ sung liên quan đến các phương pháp này, *ví dụ,* các thử nghiệm phong bế SIRPα và các thử nghiệm đại thực bào được nêu trong các Ví dụ.

Các hợp chất được nhận diện trong các thử nghiệm sàng lọc được mô tả trong bản mô tả này.

Các thử nghiệm sàng lọc chất thử hoặc các hợp chất thử nghiệm điều biến chức năng phát tín hiệu của CD47 được bộc lộ trong bản mô tả này. Các hợp chất thử nghiệm có thể thu được bằng cách sử dụng bất kỳ phương pháp nào trong các phương pháp thư viện tổ hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm: các thư viện sinh học; thư viện pha hòa tan pha lỏng hoặc pha rắn song song khả lập địa chỉ về mặt không gian; các phương pháp thư viện tổng hợp đòi hỏi sự mở cuộn; phương pháp thư viện "một hạt một hợp chất"; và các phương pháp thư viện tổng hợp sử dụng chọn lọc sắc ký ái lực. Phương pháp thư viện sinh học được giới hạn ở các thư viện peptit, trong khi bốn phương pháp khác là áp dụng với thư viện peptit, oligome không phải là peptit hoặc phân tử nhỏ của các hợp chất. (xem, *ví dụ,* Lam, 1997. Anticancer Drug Design 12: 145).

"Phân tử nhỏ" như được sử dụng ở đây, có nghĩa là thành phần có khối lượng phân tử nhỏ hơn khoảng 5 kD và tốt nhất là nhỏ hơn khoảng 4 kD. Các phân tử nhỏ có thể là, *ví dụ,* các axit nucleic, các peptit, các polypeptit, các giả peptit, các hydrat cacbon, các lipit

hoặc các phân tử hữu cơ hoặc vô cơ khác. Thư viện các hỗn hợp hóa học và/hoặc sinh học, như nấm, vi khuẩn, hoặc dịch chiết alga là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể được sàng lọc với bất kỳ thử nghiệm nào được bộc lộ ở đây.

Ví dụ về các phương pháp tổng hợp thư viện phân tử có thể được bộc lộ trong tài liệu về lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ trong: DeWitt, et al., 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909; Erb, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 11422; Zuckermann, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 2678; Cho, et al., 1993. Science 261: 1303; Carrell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; và Gallop, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 1233.

Thư viện các hợp chất có thể được thể hiện trong dung dịch (xem, *ví dụ,* Houghten, 1992. Biotechniques 13: 412-421), hoặc dạng hạt (xem, Lam, 1991. Nature 354: 82-84), dạng mạt (xem, Fodor, 1993. Nature 364: 555-556), các vi khuẩn (xem, Patent Mỹ số 5,223,409), các bào tử (xem, U.S. Patent 5,233,409), các plasmit (xem, Cull, et al., 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869) hoặc thể thực khuẩn (xem, Scott và Smith, 1990. Science 249: 386-390; Devlin, 1990. Science 249: 404-406; Cwirla, *et al.*, 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 6378-6382; Felici, 1991. J. Mol. Biol. 222: 301-310; và Patent Mỹ số 5,233,409.).

Theo một phương án, chất dự tuyển có thể được đưa vào phức hợp kháng nguyên-kháng thể và xác định liệu chất dự tuyển có phá vỡ phức hợp kháng thể-kháng nguyên hay không, trong đó việc phá vỡ phức hợp này chỉ ra rằng chất dự tuyển điều biến chức năng phát tín hiệu của CD47 và/hoặc sự tương tác giữa CD47 và SIRPα. Theo một khía cạnh khác, protein CD47 và/hoặc cả CD47 và SIRPα được tiếp xúc với ít nhất một kháng thể đơn dòng trung hòa. Sự tạo thành phức hợp kháng thể-kháng nguyên được phát hiện, và một hoặc nhiều chất dự tuyển được đưa vào phức hợp. Nếu phức hợp kháng thể-kháng nguyên bị phá vỡ sau khi đưa một hoặc nhiều chất dự tuyển vào, các chất dự tuyển là hữu dụng để điều trị chứng rối loạn liên quan đến sự phát tín hiệu bất thường của CD47 và/hoặc CD47-SIRPα.

Việc xác định khả năng của hợp chất thử nghiệm để can thiệp hoặc phá vỡ phức hợp kháng thể-kháng nguyên có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách ghép cặp hợp chất thử nghiệm với đồng vị phóng xạ hoặc nhãn đánh dấu enzym sao cho liên kết của hợp chất thử nghiệm với kháng nguyên hoặc phần có hoạt tính sinh học của nó có thể được xác định

bằng cách phát hiện hợp chất được đánh dấu trong phức hợp. Ví dụ, các hợp chất thử nghiệm có thể được đánh dấu bằng ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, hoặc ^{3}H, một cách trực tiếp hoặc gián tiếp, và đồng vị phóng xạ được phát hiện bởi đếm trực tiếp sự phát xạ hoặc cách đếm đốm sáng. Theo cách khác, các hợp chất thử nghiệm có thể được đánh dấu bằng enzym với, ví dụ, peroxidaza của cây chùm ngây, alkalin phosphataza, hoặc luciferaza, và các nhãn đánh dấu enzym có thể phá hiện được bằng cách xác định sự chuyển cơ chất thích hợp thành sản phẩm.

Theo một khía cạnh, thử nghiệm bao gồm bước tiếp xúc của phức hợp kháng thể-kháng nguyên với hợp chất thử nghiệm, và xác định khả năng của chất thử nghiệm để tương tác với kháng nguyên hoặc phá vỡ phức hợp kháng thể-kháng nguyên có mặt. Trong khía cạnh này, việc xác định khả năng tương tác với kháng nguyên và/hoặc phá vỡ phức hợp kháng thể-kháng nguyên của chất thử nghiệm bao gồm việc xác định khả năng ưu tiên liên kết với kháng nguyên hoặc phần có hoạt tính sinh học của nó của chất thử nghiệm, khi so sánh với kháng thể.

Theo một khía cạnh khác, thử nghiệm chứa bước tiếp xúc phức hợp kháng thể-kháng nguyên với hợp chất thử nghiệm và xác định khả năng điều biến phức hợp kháng thể-kháng nguyên của chất thử nghiệm. Việc xác định khả năng điều biến phức hợp kháng thể-kháng nguyên của chất thử nghiệm có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách xác định khả năng liên kết với hoặc tương tác với kháng thể của kháng nguyên, với sự có mặt của chất thử nghiệm.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận thấy rằng, trong bất kỳ phương pháp sàng lọc nào bộc lộ trong bản mô tả này, kháng thể có thể là kháng thể trung hòa điều biến hoặc can thiệp vào hoạt tính và/hoặc sự phát tín hiệu của CD47.

Các phương pháp sàng lọc bộc lộ trong bản mô tả này có thể được thực hiện là thử nghiệm trên cơ sở tế bào hoặc thử nghiệm không có tế bào. Các thử nghiệm không có tế bào có thể được sửa đổi để sử dụng dạng tan hoặc dạng liên kết màng của CD47 và các đoạn của nó. Trong trường hợp thử nghiệm không có tế bào có dạng liên kết màng của CD47, có thể có mong muốn để sử dụng tác nhân làm tan sao cho dạng liên kết màng của các protein được duy trì trong dung dịch. Ví dụ về các tác nhân làm tan bao gồm các chất tẩy không ion như n-octylglucosit, n-dodexylglucosit, n-dodexylmaltosit, octanoyl-N-metylglucamit, decanoyl-N-metylglucamit, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®,

Isotridexypoly(etylen glycol ete)$_n$, N-dodexyl--N,N-dimetyl-3-ammonio-1-propan sulfonat, 3-(3-cholamidopropyl) dimetylamminiol-1-propan sulfonat (CHAPS), hoặc 3-(3-cholamidopropyl)dimetylamminiol-2-hydroxy-1-propan sulfonat (CHAPSO).

Trong nhiều hơn một phương án, mong muốn cố định kháng thể hoặc kháng nguyên để tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân tách dạng phức hợp từ các dạng không phức hợp của một hoặc cả hai sau khi đưa chất dự tuyển vào, cũng như là cho phép tự động hóa thử nghiệm. Sự quan sát phức hợp kháng thể-kháng nguyên với sự có mặt và không có mặt của chất dự tuyển có thể được thực hiện trong thiết bị bất kỳ thích hợp để chứa các chất phản ứng. Ví dụ về các thiết bị này bao gồm các đĩa vi chuẩn độ, tuýp thử nghiệm, và tuýp vi ly tâm. Theo một khía cạnh, protein dung hợp bổ sung vùng cho phép một hoặc cả hai protein để được liên kết với cơ chất được đề xuất. Ví dụ, protein dung hợp kháng thể GST hoặc protein dung hợp kháng nguyên GST có thể được hấp thụ trên các hạt glutathion sepharoza (Sigma Chemical, St. Louis, MO) hoặc các đĩa vi chuẩn độ dẫn xuất từ glutathion, mà sau đó được kết hợp với chất thử nghiệm, và hỗn hợp được ủ trong điều kiện có lợi cho việc tạo thành phức hợp (*ví dụ,* trong các điều kiện sinh lý của muối và độ pH). Sau bước ủ, các hạt hoặc các lỗ của đĩa vi chuẩn độ được rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, cơ chất được cố định trong trường hợp sử dụng các hạt, phức hợp được xác định một cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Theo cách khác, các phức hợp có thể bị phân ly khỏi cơ chất, và mức tạo thành phức hợp kháng thể-kháng nguyên có thể được xác định sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn.

Các kỹ thuật để cố định protein trên cơ chất khác có thể được sử dụng trong các thử nghiệm sàng lọc. Ví dụ, kháng thể (*ví dụ,* kháng thể 2A1, hoặc kháng thể có chuỗi nặng biến đổi được lựa chọn từ các SEQ ID NO: 5-30 và chuỗi nhẹ biến đổi được lựa chọn từ các SEQ ID NO: 31-47) hoặc kháng nguyên (ví dụ, protein CD47) có thể được cố định sử dụng tiếp hợp của biotin và streptavidin. Các phân tử kháng thể hoặc kháng nguyên được biotinyl hóa có thể được tạo thành từ biotin-NHS (N-hydroxy-sucxinimit) sử dụng các kỹ thuật đã được biết đến một cách rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật (*ví dụ,* bộ kit biotinyl hóa, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), và được cố định trong các lỗ của đĩa 96 lỗ được phủ streptavidin (Pierce C hemical). Theo cách khác, các kháng thể khác phản ứng với kháng thể hoặc kháng nguyên quan tâm, nhưng không can thiệp tới sự tạo thành phức hợp kháng thể-kháng nguyên quan tâm, có thể thu được từ các lỗ trên đĩa, và kháng thể hoặc kháng nguyên không liên kết bị gắn trong các giếng bởi sự tiếp hợp kháng thể. Các phương pháp phát hiện các phức hợp này, ngoài các phương pháp mô tả trên đây cho các phức hợp được

cố định GST, bao gồm phát hiện miễn dịch của các phức hợp sử dụng các kháng thể này phản ứng với kháng thể hoặc kháng nguyên.

Các tác nhân mới có thể được nhận diện bởi bất kỳ thử nghiệm sàng lọc nào nêu trên và có thể được sử dụng để điều trị như được mô tả trong bản mô tả này.

Các dạng bào chế để chẩn đoán và phòng bệnh

Các MAbs kháng CD47 theo sáng chế được sử dụng trong các dạng bào chế để chẩn đoán và phòng bệnh. Theo một phương án, MAb kháng CD47 theo sáng chế được dùng cho bệnh nhân có nguy cơ phát triển một hoặc nhiều bệnh nêu trên đây, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh ung thư hoặc tình trạng ung thư khác. Yếu tố dễ mắc phải một hoặc nhiều bệnh ung thư hoặc tình trạng khối u nêu trên đây của bệnh nhân hoặc cơ quan có thể được xác định sử dụng chất đánh dấu kiểu gen, huyết thanh hoặc sinh hóa.

Theo phương án khác theo sáng chế, kháng thể CD47 được dùng cho người được chẩn đoán có các chỉ định lâm sàng liên quan đến một hoặc nhiều bệnh nêu trên đây, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh ung thư hoặc tình trạng u tân tạo khác. Trên cơ sở chẩn đoán, kháng thể CD47 được dùng để làm giảm hoặc đảo ngược hiệu quả của các chỉ định lâm sàng liên quan đến một hoặc nhiều bệnh nêu trên đây.

Các kháng thể theo sáng chế cũng hữu dụng trong việc phát hiện CD47 và/hoặc SIRPα trong các mẫu của người bệnh và do đó hữu dụng làm chất chẩn đoán. Ví dụ, kháng thể CD47 theo sáng chế được sử dụng trong các thử nghiệm *in vitro*, *ví dụ,* ELISA, để phát hiện mức CD47 và/hoặc SIRPα trong mẫu người bệnh.

Theo một phương án, kháng thể CD47 theo sáng chế được cố định trên chất mang rắn (*ví dụ,* các lỗ của đĩa vi chuẩn độ). Kháng thể được cố định dùng làm kháng thể giữ CD47 và/hoặc SIRPα có thể có mặt trong mẫu thử. Trước khi cho tiếp xúc kháng thể được cố định với mẫu người bệnh, chất mang rắn được rửa và được xử lý bằng tác nhân phong bế như protein sữa hoặc albumin để ngăn chặn sự hấp phụ không đặc hiệu của chất phân tích.

Tiếp theo, các lỗ được xử lý với mẫu thử nghi có kháng nguyên, hoặc với dung dịch chứa lượng tiêu chuẩn kháng nguyên. Mẫu này là, *ví dụ,* mẫu huyết thanh của đối tượng nghi có mức kháng nguyên lưu thông được xem xét để chẩn đoán bệnh. Sau khi rửa mẫu thử hoặc mẫu chuẩn, chất mang rắn được xử lý với kháng thể thứ cấp có được đánh

dấu theo cách có thể phát hiện được. Kháng thể thứ cấp được đánh dấu dùng làm kháng thể phát hiện. Mức nhãn đánh dấu đo được, và nồng độ của CD47 và/hoặc SIRPα trong mẫu thử được xác định bằng cách so sánh với đường cong tiêu chuẩn có từ các mẫu chuẩn.

Cần hiểu rằng trên cơ sở các kết quả thu được sử dụng kháng thể CD47 theo sáng chế trong thử nghiệm chẩn đoán *in vitro*, có thể biết giai đoạn của bệnh (*ví dụ,* chỉ định lâm sàng liên quan đến chứng thiếu máu cục bộ, chứng rối loạn do tự miễn hoặc do viêm) ở đối tượng dựa trên mức biểu hiện của CD47 và/hoặc SIRPα. Đối với một loại bệnh đưa ra, các mẫu máu được lấy từ đối tượng được chẩn đoán là ở các giai đoạn khác nhau trong quá trình phát triển bệnh, và/hoặc ở các điểm khác nhau trong quá trình điều trị bệnh. Sử dụng nhiều mẫu sẽ cho các kết quả thống kê quan trọng cho mỗi giai đoạn của tiến trình phát triển hoặc điều trị, phạm vi nồng độ của kháng nguyên có thể xem là đặc tính của mỗi giai đoạn được chỉ ra.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây, bao gồm các thử nghiệm được tiến hành và các kết quả đạt được được đưa ra chỉ để minh họa và không nên được hiểu là để giới hạn sáng chế.

Ví dụ 1: Tạo và chọn lọc kháng thể CD47

Các kháng thể CD47 được tạo ra bằng cách gây miễn dịch chuột bằng protein tái tổ hợp biểu hiện CD47-IgV (dạng biến đổi tương tự globulin miễn dịch), thực hiện chiến lược gây miễn dịch nhanh được thay đổi ở nhiều vị trí (Kilpatrick *et al.* (1997) Rapid development of affinity matured monoclonal antibodies using RIMMS. Hybridoma 16, 381-389). Thêm vào đó, nửa số chuột trong nhóm được gây miễn dịch được tiêm liều đơn kháng thể chủ vận kháng GITR chuột, DTA-1. Sau khi gây miễn dịch, hạch lympho từ tất cả các con chuột (được xử lý và không được xử lý với DTA-1) được thu và phân tách ra, từ đó tiến hành bước phân lập tế bào B và dung hợp tiếp theo vào dòng tế bào u tủy của chuột. Dịch nổi tế bào lai được sàng lọc cho liên kết với CD47 bởi ELISA và bằng máy đếm tế bào kiểu dòng trên các tế bào Daudi (ATCC# CCL-213) (Fig. 1A). Dịch nổi tế bào lai cũng được phân tích khả năng phong bế tương tác CD47-SIRPα (Fig. 1B). CD47 tái tổ hợp được cố định trên đĩa vi chuẩn độ Medisorp (NUNC) và sau đó ủ dịch nổi tế bào lai với sự có mặt của SIRPα-ECD tái tổ hợp của người được dung hợp đối với vùng Fc của IgG. Liên kết SIRPα được phát hiện sử dụng kháng thể thứ cấp đặc hiệu Fc của IgG được tiếp hợp kháng người (Jackson Immuno Research), và thu bức xạ ở 650nm được phát hiện

trong đầu đọc đĩa.

Ví dụ 2: Đặc điểm của kháng thể CD47

Kháng thể CD47 làm ví dụ của chuột theo sáng chế được thể hiện trên Fig.2. Sự xếp hạng ái lực của kháng thể CD47 phong bế SIRPα được thực hiện bằng máy đếm tế bào kiểu dòng trên tế bào Raji (ATCC# CCL-86) (Fig. 2A) và CCRF-CEM (ATCC# CCL-119) (Fig. 2B). Kháng thể CD47 được liên kết được phát hiện sử dụng kháng thể thứ cấp kháng IgG chuột tiếp hợp FITC (Jackson ImmunoResearch). Kháng thể CD47 đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật, B6H12, được dùng làm đối chứng dương (xem, *ví dụ,* Patent Mỹ số 5,057,604). Trong Fig. 2B, cả B6H12 và 2D3, là kháng thể không phong bế SIRPα bán trên thị trường, được so sánh với các kháng thể được tạo theo sáng chế. Các kháng thể theo sáng chế thể hiện ái lực cao hơn đối với dạng nội sinh (bề mặt tế bào) của CD47 so với các kháng thể B6H12 và 2D3.

Ví dụ 3: Hoạt tính phong bế SIRPα của kháng thể CD47

Hiệu lực phong bế SIRPα bởi kháng thể CD47 được đo bằng ELISA trong đó CD47 của IgV đã đánh dấu His tái tổ hợp được cố định trên đĩa vi chuẩn độ Medisorp. Liên kết của SIRPα tái tổ hợp dung hợp với vùng Fc của IgG của người không được quan sát với sự có mặt của hàm lượng tăng của kháng thể CD47. SIRPα được liên kết được xác định sử dụng kháng thể thứ cấp kháng IgG người (đặc hiệu Fc) được tiếp hợp HRP (Jackson ImmunoResearch). Các kháng thể theo sáng chế thể hiện hiệu lực được tăng cường trong việc phong bế SIRPα so với kháng thể B6H12. Fig. 3A thể hiện số liệu đại diện của ELISA trên cơ sở thử nghiệm phong bế SIRPα.

CD47 các kháng thể được phân tích bằng máy đếm tế bào kiểu dòng về hoạt tính phong bế SIRPα tái tổ hợp liên kết với CD47 bề mặt tế bào. Các tế bào CCRF-CEM (ATCC# CCL-119) được sử dụng làm nguồn CD47 trong thử nghiệm và liên kết của SIRPα tái tổ hợp được dung hợp vào vùng Fc của IgG của người được giám sát với sự có mặt của lượng tăng của kháng thể CD47. SIRPα được liên kết được xác định sử dụng kháng thể thứ cấp kháng IgG người (đặc hiệu Fc) được tiếp hợp APC (Jackson ImmunoResearch) (Fig. 3B). B6H12 và kháng thể CD47 không phong bế SIRPα có bán trên thị trường 2D3 được sử dụng một cách tương ứng àm đối chứng dương và đối chứng âm.

Ví dụ 4: Tương tác đồng hình được trung gian bởi kháng thể CD47

Các kháng thể CD47 phong bế SIRPα được phân tích khả năng gây ra sự kết tụ tế bào, được biết là các tương tác đồng hình, giữa các tế bào dương tính với CD47. Các tế bào Daudi và Raji được sử dụng làm dòng tế bào biểu hiện CD47 đại diện. Trong các kháng thể được xem xét, kháng thể 2A1 theo sáng chế là kháng thể phong bế SIRPα duy nhất mà không thúc đẩy các tương tác đồng hình của các tế bào biểu hiện CD47.

Ví dụ 5: Hoạt tính ngưng kết hồng cầu của kháng thể CD47

Một ví dụ về tương tác đồng hình là sự ngưng kết hồng cầu, được chứng minh bởi sự kết tụ RBC. Kháng thể CD47 được sàng lọc về sự kết tụ RBC, được quan sát bởi khả năng của kháng thể để ngăn chặn sự lắng của RBC của người. Kháng thể 2A1 đã được phát hiện một cách không mong muốn là kháng thể duy nhất trong số các kháng thể CD47 khác không có khả năng thúc đẩy sự ngưng kết hồng cầu, trong khi có ái lực cao và có khả năng phong bế SIRPα. Các kháng thể khác thể hiện sự ngưng kết hồng cầu giảm không phong bế liên kết SIRPα với CD47.

Để đánh giá khả năng gây ngưng kết hồng cầu của kháng thể CD47, các RBC của người được pha loãng tới 10% trong PBS và ủ ở 37°C trong 2-6 giờ với sự chuẩn độ của kháng thể CD47 trong đĩa 96 giếng đáy tròn. Bằng chứng về sự ngưng kết hồng cầu được chứng minh bởi sự có mặt của các RBC không bị lắng, xuất hiện ở dạng mù so với chấm đỏ của các RBC không bị kết tụ. Ngạc nhiên là, như thể hiện trong Fig. 4A, kháng thể CD47 theo sáng chế, đặc biệt là kháng thể được đề cập ở đây là 2A1, không thể hiện hoạt tính gây ngưng kết hồng cầu. Đồ thị thể hiện sự định lượng của thử nghiệm ngưng kết hồng cầu, được biểu thị là "chỉ số ngưng kết hồng cầu" được xác định bởi định lượng vùng có viên RBC với sự có mặt của kháng thể, được làm bình thường với sự có mặt của kháng thể.

Kháng thể 9E4 của chuột gây ra sự ngưng kết hồng cầu sâu nhất ở mọi nồng độ thử nghiệm. Do đó, kháng thể 9E4 liên kết với CD47 và phong bế tương tác của CD47 với SIRPα; tuy nhiên, kháng thể 9E4 gây ra sự ngưng kết hồng cầu sâu.

Vùng VH của kháng thể 9E4 được nêu dưới đây.

EVQLRQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYYMYWVKQSRVRSLAWIGRINPYTGATGYDQNFKDKASLIVD
KSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARGRNRYDGWFAYWGQGTLVTV (SEQ ID NO: 78)

Vùng VL của kháng thể 9E4 được nêu dưới đây.

EIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSL
TISNLDQEDIATYFCQQGNALPPTFGGGTNLEIK (SEQ ID NO: 79)

Kháng thể đối chứng B6H12 gây ra sự ngưng kết hồng cầu như mong đợi đối với kháng thể CD47 phong bế SIRPα.

Nhằm nghiên cứu tính duy nhất của hoạt tính không gây ngưng kết hồng của kháng thể 2A1, nhiều kháng thể CD47 khác được sàng lọc trong thử nghiệm ngưng kết RBC (Fig. 4B). Bao gồm trong thử nghiệm này là dạng khảm của kháng thể 2A1 (2A1-xi), bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng của 2A1 của chuột, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của 2A1 của chuột được biến đổi ở axit amin 106 (đó là, M106I), và vùng ổn định của IgG1 và Igkappa của người. Các trình tự vùng VH và VL của kháng thể 2A1 và kháng thể 2A1-xi được nêu trong Bảng 1. Các kháng thể được thử nghiệm ở 12,5, 25, 50, và 100nM. Ngạc nhiên là, 2A1 là hiếm trong số các kháng thể CD47 được xem xét trong Fig. 4B, trong đó nó là kháng thể duy nhất trong Fig. 4B không có hoặc có hoạt tính gây ngưng kết hồng cầu giảm. Fig. 4E cho thấy rằng 2A1, dạng khảm của 2A1 (2A1-xi), và các biến thể được làm cho giống người không gây ra sự ngưng kết hồng cầu.

Fig. 4C thể hiện các kết quả của việc sàng lọc kháng thể CD47 bổ sung trong thử nghiệm ngưng kết RBC. Như thể hiện trên Fig. 4C, kháng thể đơn dòng CD47 2D3 có bán trên thị trường, không gây phong bế SIRPα, không gây ra ngưng kết hồng cầu. Tuy nhiên, kháng thể CD47 có bán trên thị trường khác (*ví dụ,* CC2C6, BRIC126, và B6H12) phong bế SIRPα lại gây ngưng kết hồng cầu (Fig. 4C). Do đó, trước khi sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, các kháng thể hiện phong bế SIRPα lại gây ra sự ngưng kết hồng cầu, trong khi các kháng thể, như 2D3, không phong bế SIRPα và không gây ra ngưng kết hồng cầu. Tóm lại, các kháng thể theo sáng chế (*ví dụ,* kháng thể 2A1 và các dẫn xuất được làm cho giống người của nó) là duy nhất trong số các kháng thể CD47 hiện có về khả năng phong bế SIRPα, mà không gây ngưng kết hồng cầu.

Phạm vi nồng độ cao của kháng thể CD47 lựa chọn được thử nghiệm lại về sự ngưng kết hồng cầu (Fig. 4D). Thử nghiệm cho thấy hiệu ứng vùng ức chế "pro-zone" của sự ngưng kết hồng cầu bởi B6H12 và 9E4, trong đó sự ngưng kết hồng cầu bị giảm ở điểm kết thúc cao và thấp trong phạm vi nồng độ thử nghiệm. Sự biểu diễn đồ thị của chỉ số ngưng kết hồng cầu cũng làm nổi bật hiệu ứng vùng ức chế. Hiệu ứng vùng ức chế cũng rõ

ràng trong các Fig. 4C và 4E. Quan trọng là, kháng thể CD47 2A1 và dạng khảm 2A1 của chuột không có hoạt tính gây ngưng kết hồng cầu ở mọi nồng độ.

Như thể hiện trên Fig. 4E, kháng thể1B4 của chuột thể hiện phạm vi ngưng kết hồng cầu hẹp.

Vùng VH của kháng thể 1B4 được thể hiện dưới đây.

QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIHWVKQRPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNERFKGKATLTVA
TSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCARREEDYFDYWGQGTLVTV (SEQ ID NO: 80)

Vùng VL của kháng thể 1B4 được thể hiện dưới đây.

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLTWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGS
GTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 81)

Khả năng gây ngưng kết hồng cầu của các kháng thể được làm cho giống người dẫn xuất từ 2A1 của chuột được thử nghiệm như nêu trên. Quan trọng là, kháng thể được làm cho giống người AB6.12 trong nhiều isotyp IgG (IgG1, IgG4-S228P, và IgG4-S228P/L235E) của người không gây ra bất kỳ sự ngưng kết hồng cầu RBC nào. 2A1 và 2A1-xi được sử dụng làm đối chứng đối với các kháng thể không gây ngưng kết hồng cầu, trong khi B6H12 và 9E4 được dùng làm đối chứng dương cho sự ngưng kết hồng cầu (Fig. 4F).

Ví dụ 6: Liên kết với CD47 của khỉ Cynomolgus

Khả năng liên kết của 2A1 của chuột với CD47 của khỉ cynomolgus (cyno) được đánh giá. Kháng thể B6H12 trước đây đã được ghi nhận là phản ứng chéo với CD47 của cyno và được sử dụng làm đối chứng dương về sự có mặt của CD47 của cyno trong thử nghiệm. Thử nghiệm để đo liên kết của 2A1 với CD47 của khỉ cynomolgus được tiến hành để so sánh liên kết của 2A1 với CD47 trên tế bào B của khỉ cynomolgus và tế bào người, trong đó dòng tế bào Raji được sử dụng làm tế bào dương tính với CD47 người. Tế bào máu ngoại vi đơn nhân của khỉ cynomolgus (Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMCs) được phân lập từ máu của cynomolgus bằng ly tâm trên gradient nồng độ ficoll-paque. Các tế bào B của Cynomolgus và của người (Raji) được đánh dấu bằng kháng thể CD20 của người ofatumumab (Arzerra) ở 10 µg/ml, và phản ứng với dãy pha loãng của kháng thể CD47 2A1 hoặc B6H12 của chuột. Tế bào B được đánh dấu bằng kháng thể CD20 của người được phát hiện bằng kháng thể kháng chuột đa dòng được tiếp hợp với

DyLite 649, trong khi các kháng thể CD47 của chuột được phát hiện bằng kháng thể kháng chuột đa dòng được tiếp hợp với DyLite 488. Các tế bào được phân tích bởi máy đếm tế bào kiểu dòng, trước hết được chặn trên tế bào sống bởi FSC và SSC, sau đó trên các tế bào dương tính FL4 (dương tính với CD20), và cuối cùng là FL1 ở giữa (dương tính với CD47) được đo. Dữ liệu được bình thường hóa bằng cách chia tách tín hiệu ở mỗi nồng độ bằng tín hiệu tối đa cho mỗi kháng thể trên mỗi quần thể tế bào. Các kết quả được bình thường hóa được thể hiện trên Fig. 5 cho thấy rằng 2A1 không phản ứng chéo với CD47 của cyno và có ái lực giống như khi so sánh với CD47 của người. Phù hợp với các kết quả nêu trên, B6H12 có ái lực với CD47 ở bề mặt tế bào nhỏ hơn trên cả tế bào Raji và tế bào B của cynomolgus so với các kháng thể theo sáng chế.

Ví dụ 7: Tạo thành kháng thể khảm

Nhằm nhận diện các trình tự của các vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) và chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể 2A1 của chuột, axit ribonucleic (ARN) được phân lập từ tế bào lai và được sử dụng trong phản ứng chuỗi phiên mã ngược (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction - RT-PCR) (Phusion RT-PCR Kit Thermo Scientific) để tạo thành sợi cADN thứ nhất. Cặp mồi thoái biến thiết kế bao gồm danh mục hoàn thiện của các trình tự dẫn đầu của kháng thể chuột của cả VH và VL được sử dụng trong PCR trong đó sợi cADN thứ nhất được dùng làm khuôn mẫu.

Các mồi xuôi (dẫn đầu của IgG của chuột) được nêu dưới đây.

Tên	Trình tự
VH1-1	CACTGCAGGTRTCCACTCC (SEQ ID NO: 82)
VH1-2	CATAGCAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 83)
VH1-3	CRCTACAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 84)
VH1-4	GCYACAGMTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 85)
VH1-5	CACTGCAGGTGTCCWMTCC (SEQ ID NO: 86)
VH1-6	CRCTRCAGGTGTKCACTCC (SEQ ID NO: 87)
VH1-7	GCTAWMGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 88)
VH1-8	CCTCAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 89)
VH1-9	GCTACAGGTGCTCACTCC (SEQ ID NO: 90)
VH1-10	CACTGCAGGTGTCCTCTCT (SEQ ID NO: 91)
VH1-11	CAYTGCAGGTGTCCAYTGC (SEQ ID NO: 92)
VH1-12	GCTAMMGGTGTCCACTTC (SEQ ID NO: 93)
VH1-13	CTCCTGTCAKTAACTKCAGGT (SEQ ID NO: 94)
VH1-14	CAACTGCAGGTGTCTCTCT (SEQ ID NO: 95)

VH1-15	CRCTRCAGGYGTCCACTCT (SEQ ID NO: 96)
VH2-1	CCAAGCTGTATCCTTTCC (SEQ ID NO: 97)
VH2-2	CCAAGCTGTGTCCTRTCC (SEQ ID NO: 98)
VH3-1	CTTGACAGYCVTTCCKGGT (SEQ ID NO: 99)
VH3-2	CTTCACAGCCTTTCCTGGT (SEQ ID NO: 100)
VH4	CTTAAAAGGGGTCCAGTGT (SEQ ID NO: 101)
VH5-1	CAYTTTAAAARGTGTCMAGTGT (SEQ ID NO: 102)
VH5-2	GTTTTAAAAGGTGTCCTGTG (SEQ ID NO: 103)
VH6	CTYTTAAAAGGKGTCCAGWG (SEQ ID NO: 104)
VH7-1	CYTTTAMATGGTATCCAGTGT (SEQ ID NO: 105)
VH7-2	CTTTTACATGGTTTCAAGTGT (SEQ ID NO: 106)
VH8	GTCCCTGCATATGTCYT (SEQ ID NO: 107)
VH9	GATGGCAGCWGCYCAAAG (SEQ ID NO: 108)
VH10	CTATCAAGGTGTGCATTGT (SEQ ID NO: 109)
VH11	CTTTTAAAAGWTGTCCAGKGT (SEQ ID NO: 110)
VH12	GTGACAGTCCTTCCTGGTAG (SEQ ID NO: 111)
VH14	CTTCCTGATGGCAGTGGTT (SEQ ID NO: 112)
VH15	GCTACAGGTATCCAATCC (SEQ ID NO: 113)

Mồi ngược (ổn định của IgG của chuột) được nêu dưới đây.

Tên	Trình tự
HC-Rev	GCGTCTAGAAYCTCCACACACAGGRRCCAGTGGATAGAC (SEQ ID NO: 114)

Các mồi xuôi (dẫn đầu của IgKappa của chuột) được nêu dưới đây.

Tên	Trình tự
VK1-1	CTGWTGTTCTGGATTCCTG (SEQ ID NO: 115)
VK1-2	GGTCAGACAGTCAGCAGT (SEQ ID NO: 116)
VK2	GTGCTCTGGATTCGGGAA (SEQ ID NO: 117)
VK4/5-1	CAGCTTCYTGCTAATCAGTG (SEQ ID NO: 118)
VK4/5-2	CTAATCAGTGCTTCAGGA (SEQ ID NO: 119)
VK8-1	GTGGGTATCTGGTRCSTGTG (SEQ ID NO: 120)
VK8-2	GGAAATTTAAAAGTACCTGTGGG (SEQ ID NO: 121)
VK9A/9B-1	GGTTTCMAGGTRCCAGATGT (SEQ ID NO: 122)
VK9A/9B-2	CTCTGGTTYCCAGGTATC (SEQ ID NO: 123)
VK10	CTGTTTTCAAGGTRCCAGATGT (SEQ ID NO: 124)
VK11	GTTGTAATGTCCAGAGGA (SEQ ID NO: 125)
VK12/13-1	CTTACAGGTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 126)
VK12/13-2	CTCAATTGTAGRTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 127)
VK12/13-3	CACAGTAGGTGTCAGATGT (SEQ ID NO: 128)

VK12/13-4	GTCGTAGTTGTCAGATGT (SEQ ID NO: 129)
VK12/13-5	CCTCCTTCTTGGCCAAGA (SEQ ID NO: 130)
VK19/28-1	CTTATATGGAGCTGATGGG (SEQ ID NO: 131)
VK19/28-2	GTGTCTGGTGCTCATGGG (SEQ ID NO: 132)
VK19/28-3	CTSTGGTTGTCTGGTGTTGA (SEQ ID NO: 133)
VK20	GTCTCTGATTCTAGGGCA (SEQ ID NO: 134)
VK21-1	CTKCKCTGGGTTCCAG (SEQ ID NO: 135)
VK21-2	GCAGGTGTTGACGGA (SEQ ID NO: 136)
VK22-1	CAGGTGCCTCGTGCAC (SEQ ID NO: 137)
VK22-2	CTCTGGTGCCTGTGCA (SEQ ID NO: 138)
VK23	CTGGAYTYCAGCCTCCAGA (SEQ ID NO: 139)
VK24/25-1	GWTCTCTRGAGTCAGTGGG (SEQ ID NO: 140)
VK24/25-2	CTGGATCCCTGGAKCYACT (SEQ ID NO: 141)
VK32	GTTCTGCTTTTTAGGTGTG (SEQ ID NO: 142)
VK33/34	GATCCCAGGCATGATATGT (SEQ ID NO: 143)
VK31/38C	CTTCATGGTGCTCAGTGT (SEQ ID NO: 144)
VKRF	CCATATCAGGTGCCCAGTGT (SEQ ID NO: 145)

Mồi ngược (ổn định của IgKappa của chuột) được nêu dưới đây.

Tên	Trình tự
LC -rev	GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG (SEQ ID NO: 146)

VH và VL khuếch đại sau đó được tách dòng trong khung vào các vectơ chứa các trình tự tiết kháng thể thích hợp và vùng ổn định của IgG1 và Igkappa của người một cách tương ứng để tạo thành cấu trúc ADN khảm của chuột:người. Các cấu trúc này được đồng chuyển nhiễm vào các tế bào 293Freestyle (Life Technologies) và kháng thể thu được được tinh sạch từ dịch nổi nuôi cấy tế bào bằng sắc ký Protein-A. Để xác định rằng các trình tự VH và VL đúng đã được nhận diện, 2A1 khảm (biểu thị là 2A1-xi) được so sánh với kháng thể 2A1 bố mẹ của chuột và thử nghiệm liên kết CD47 bởi máy đếm tế bào kiểu dòng trên tế bào Raji (Fig. 6). B6H12 cũng được bao gồm làm đối chứng dương trong thử nghiệm này. 2A1-xi được liên kết được phát hiện sử dụng kháng thể thứ cấp kháng IgG người được tiếp hợp FITC. 2A1 được liên kết và B6H12 được phát hiện sử dụng kháng thể thứ cấp kháng IgG chuột được tiếp hợp FITC. Ái lực biểu kiến được xác định bằng khớp hàm phi tuyến tính (Prism Graphpad Software) của cường độ phát quang mức trung tại các nồng độ kháng thể khác nhau (Bảng 2). Kháng thể 2A1-xi có ái lực liên kết tương tự như kháng thể 2A1 của chuột với CD47 tại bề mặt tế bào, chứng minh rằng các trình tự VH và VL đã được nhận diện chính xác.

Bảng 2

	KD(biểu kiến) (pM)	Sai số tiêu chuẩn	R^2
2A1-mIgG1	93,6	±10,1	0,9977
2A1-xi	78	±14,9	0,9922
B6H12	3786	±310	0,9998

Ví dụ 8: Làm cho kháng thể giống như của người

Kháng thể CD47 2A1 của chuột được làm cho giống người để làm giảm khả năng sinh miễn dịch khi được sử dụng cho người. Các trình tự của vùng VH và VL của 2A1 được so sánh với các trình tự kháng thể của người trong ngân hàng dữ liệu IMGT. Sau đó, mẫu cấu trúc được tạo thành của vùng VH và VL của 2A1 sử dụng các cấu trúc đã biết của các kháng thể được làm cho giống người liên quan một cách gần nhất và các kháng thể của người trong ngân hàng dữ liệu protein (Protein Data Bank -PDB). Ba vùng quyết định bổ trợ (complementary determining regions -CDR) trong cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể 2A1 được cố định và khung của chuột được thay thế bằng nhiều khung của người mà có khả năng duy trì cao nhất sự định hướng chính xác của CDRs. Các cấu trúc tương ứng với mỗi biến thể 2A1 được làm cho giống người được tạo thành bằng tổng hợp gen và tách dòng trong khung vào các vectơ chứa trình tự tiết thích hợp và các vùng ổn định của IgG1 và Igkappa của người. Các tổ hợp khác nhau của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được làm cho giống người được đồng chuyển nhiễm vào trong các tế bào 293Freestyle (Life Technologies), và các kháng thể thu được được tinh sạch từ dịch nuôi cấy tế bào bằng sắc ký Protein-A.

Các kháng thể được làm cho giống người được thử nghiệm khả năng liên kết với tế bào Raji bằng máy đếm tế bào kiểu dòng (Fig. 7). Kháng thể 2A1-xi được sử dụng làm đối chứng trong hầu hết các thử nghiệm để tạo mốc chuẩn của ái lực liên kết. Các kháng thể được làm cho giống người sau đó được làm tối ưu hóa để tăng cường sự biểu hiện và giảm các vị trí có vấn đề bao gồm các vị trí đồng phân hóa và tách nhóm amit tiềm năng. Ví dụ về kháng thể được làm cho giống người và được tối ưu hóa thu được từ kháng thể 2A1 của chuột được biểu thị là kháng thể AB6.12, thể hiện ái lực liên kết rất giống với kháng thể 2A1-xi (Fig. 7H; Bảng 3). Các ái lực biểu kiến được đo bằng khớp hàm phi tuyến tính (Prism Graphpad Software) ở cường độ phát quang mức trung ở các nồng độ kháng thể

khác nhau

Bảng 3

	KD(biểu kiến) (pM)	Sai số tiêu chuẩn	R^2
2A1-xi	36,4	±8,54	0,9908
AB6.12	39,9	±5,54	0,9964

Kháng thể AB6.12 sau đó được chuyển từ IgG1 sang isotyp IgG khác bằng cách thay thế vùng ổn định của chuỗi nặng. Như thể hiện trên Fig. 7I, sự thay đổi isotyp IgG thành dạng ổn định của vùng bản lề của của IgG4 (IgG4P: S228P), và biến thể liên kết thụ thể Fc dạng khử của IgG4 được làm ổn định của dạng bản lề (IgG4PE: S228P/L235E) không thay đổi ái lực liên kết của kháng thể được làm cho giống người với CD47 bề mặt tế bào (Fig. 7I; Bảng 4). Các ái lực biểu kiến được xác định bằng khớp hàm phi tuyến tính (Prism Graphpad Software) của cường độ phát quang mức trung ở các nồng độ kháng thể khác nhau.

Bảng 4

	KD(biểu kiến) (pM)	Sai số tiêu chuẩn	R^2
AB6.12-IgG1	38,6	±10,5	0,9798
AB6.12-IgG4P	35,7	±8,4	0,9841
AB6.12-IgG4PE	34,6	±10,9	0,9727

Thông qua quy trình làm cho giống người, kháng thể CD47 được thử nghiệm để đảm bảo chức năng phong bế SIRPα là không bị ảnh hưởng. Như thể hiện trên Fig. 7J, nhiều isotyp IgG của kháng thể được làm cho giống người, AB6.12, phong bế tương tác SIRPα:CD47, sử dụng phương pháp dựa trên máy đếm tế bào kiểu dòng được mô tả trên đây trong Ví dụ 3. Kháng thể CD47 mẫu và vùng VH và VL tương ứng của chúng bao gồm các kháng thể và vùng được nêu trong Bảng 1.

Trong quy trình làm cho giống người, được xác định rằng theo một số phương án, môtip trình tự axit amin, "NA," ở đầu của CDR3 của VH (SEQ ID NO: 52 hoặc SEQ ID NO: 77) là quan trọng đối với liên kết của kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, với sự có mặt của gốc axit amin "NA" ở đầu của CDR3 của

VH (SEQ ID NO: 52 hoặc SEQ ID NO: 77), kháng thể CD47 theo sáng chế không liên kết với đích của chúng hoặc liên kết với đích với ái lực thấp hơn so với trường hợp có mặt gốc axit amin "NA." Ví dụ, khi môtip "NA" được thay đổi thành các môtip chính tắc hơn là "AR" hoặc "AT," liên kết bị giảm đi một cách đáng kể (đó là, lớn hơn mười lần). Theo các phương án khác, với sự có mặt của gốc axit amin "NA" ở đầu CDR3 của VH (SEQ ID NO: 52 hoặc SEQ ID NO: 77), kháng thể CD47 theo sáng chế liên kết với đích của chúng với ái lực tương đương so với liên kết khi có mặt của gốc axit amin "NA."

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận thấy rằng có thể xác định, mà không cần thử nghiệm quá mức, nếu sự thế axit amin trong các trình tự của kháng thể CD47 theo sáng chế sẽ dẫn đến kháng thể có chức năng về cơ bản là tương tự, *ví dụ,* kháng thể CD47 với ái lực phong bế SIRPα và không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể.

Hình ảnh về vết từ sắc ký loại kích thước sử dụng AKTA FLPC với cột superdex200 được thể hiện trên Fig. 8A. Các biến thể IgG1, IgG4P, và IgG4PE của kháng thể AB6.12 được thể hiện. Cả ba kháng thể đều có hơn 98% là monome. Fig. 8B là đồ thị gel SDS-PAGE được nhuộm màu xanh coomassie của nhiều biến thể được làm cho giống người của 2A1 trong điều kiện khử (R) và không khử (NR).

Ví dụ 9: kháng thể CD47 thúc đẩy sự thực bào của dòng tế bào khối u

CD47 là thụ thể bề mặt tế bào được điều chỉnh tăng trên các tế bào khối u và cũng được cho là góp phần vào việc tránh miễn dịch thông qua tương tác của nó với phối tử tự nhiên SIRPα. Sự liên kết với CD47 với SIRPα trên các đại thực bào dẫn đến hoạt tính đại thực bào giảm. Như được mô tả chi tiết dưới đây, được xác định nếu liên kết với CD47 và hoạt tính phong bế SIRPα của kháng thể 2A1, và biến thể của nó, thúc đẩy sự thực bào tế bào khối u với sự có mặt của các đại thực bào của người.

PBMCs được phân lập từ máu người, và các bạch cầu đơn nhân được biệt hóa vào các đại thực bào bằng cách ủ chúng trong môi trường AIM-V (Life Technologies) trong 7 ngày. Các đại thực bào thu được từ bạch cầu đơn nhân (Monocyte Derived Macrophages - MDMs) bám dính vào các tế bào khác để được rửa trôi. MDMs được tách và được đặt vào đĩa 12 giếng và được cho bám dính trong 24. Dòng tế bào khối u người CCRF-CEM được chọn làm tế bào đích vì sự biểu hiện CD47 cao. Các tế bào CCRF-CEM được đánh dấu bằng 0,3 μM CFSE ở 37°C trong 15 phút, sau đó được rửa và được thêm vào MDMs ở tỉ lệ

4 tế bào khối u:1 đại thực bào, và kháng thể CD47 được thêm vào ở các nồng độ khác nhau. Sự thực bào các tế bào đích được cho tiến hành trong 3 giờ. Sau đó, các tế bào đích không bị thực bào được rửa trôi bằng PBS. Các đại thực bào còn lại được tách ra, được nhuộm với kháng thể với chất đánh dấu đại thực bào CD14 được tiếp hợp với DyLite 649 (Biolegend), và được phân tích bằng máy đếm tế bào kiểu dòng. Sự thực bào được đo bằng cách chặn trên các tế bào sống mà dương tính với FL4 (CD14+), và sau đó đánh giá phần trăm của các tế bào dương tính FL1 (CFSE+).

Fig. 9 cho thấy rằng kháng thể CD47 2A1 và các biến thể được làm cho giống người của nó được chứng minh là tăng phụ thuộc liều trong sự thực bào tế bào khối u bởi MDMs. Kháng thể 2A1 và biến thể được làm cho giống người AB2.05 là kháng thể duy nhất có khả năng gây ra sự thực bào tế bào khối u ở nồng độ 66,7 pM, trong khi B6H12 không có hoạt tính ở nồng độ đó (Fig. 9A). Fig. 9B thể hiện 2A1, và các biến thể được làm cho giống người AB2.05, AB6.12-IgG1, AB6.12-IgG4P, và AB6.12-IgG4PE gây ra sự thực bào đối đa ở 0,3 μg/ml hoặc 2 nM, trong khi B6H12 yêu cầu các nồng độ cao hơn. Số liệu này minh họa rằng kháng thể CD47, 2A1 (và biến thể được làm cho giống người dẫn xuất từ kháng thể này), gây ra sự thực bào bởi các đại thực bào của các tế bào khối u dương tính với CD47. Trong ví dụ này, các tế bào CCFR-CEM được sử dụng làm tế bào đích dương tính với CD47.

Ví dụ 10: Hoạt tính chống khối u của kháng thể CD47

Hoạt tính chống khối u của kháng thể CD47 của chuột được đánh giá trong mẫu Raji của u lympho. Các tế bào Raji được cấy dưới da của chuột NOD/SCID, và được xếp ngẫu nhiên vào 5 nhóm (10 chuột/nhóm, ngày 0). Nhóm 1: Tá dược (chỉ có đệm); Nhóm 2: B6H12 (đối chứng dương); Nhóm 3: 1B4; Nhóm 4: 2A1; và Nhóm 5: 9E4. Việc xử lý với mỗi kháng thể hoặc tá dược (chỉ có đệm) bắt đầu khi khối u đã sờ thấy được (50 mm^3, ngày 13) và chuột được gây chết không đau khi kích thước các khối u đạt tới ~1500 mm^3. Thể tích khối u được đo 3 lần/tuần. Các kháng thể được phân liều trong tĩnh mạch (intravenously -IV) bằng 200μg 3 lần/tuần trong 3 tuần (9 liều tổng/chuột). Việc điều trị bắt đầu vào ngày 13 và và kết thúc vào ngày 32.

Như thể hiện trên Fig. 10A, kháng thể CD47 theo sáng chế, đặc biệt là kháng thể 2A1, hoạt tính chống khối u đã được chứng minh trong mẫu động vật của u lympho. Để đạt được thể tích khối u là 1500 mm^3, Nhóm 1 (chỉ có đệm) yêu cầu khoảng ~25 ngày; Nhóm

2 (B6H12.2) yêu cầu ~45 ngày; Nhóm 3 (1B4) yêu cầu ~37 ngày; Nhóm 4 (2A1) yêu cầu ~85 ngày; và Nhóm 5 (9E4) yêu cầu ~40 ngày để đạt đến mức thể tích là ~1500 mm^3. Các số liệu này đã chỉ ra rằng kháng thể 2A1 có hiệu lực đáng kể hơn so với mọi kháng thể liên kết với CD47 thử nghiệm, bao gồm B6H12 đã được biết là liên kết với CD47, phong bế tương tác của CD47 với SIRPα, và làm giảm sự tạo khối u ở các mẫu chuột bị mắc bệnh ung thư của người. Ngạc nhiên là, hoạt tính làm giảm khối u của các kháng thể CD47 này không liên quan đến hiệu lực của chúng trong việc liên kết với CD47 hoặc phong bế tương tác của CD47 với SIRPα, mà có thể được mong đợi dựa trên dữ liệu công bố.

Như được mô tả trong Các ví dụ 2 và 3, 2A1, 1B4, và 9E4 có ái lực tương tự đối với CD47 và hiệu lực phong bế tương tác của CD47 với SIRPα tương tự. Thêm vào đó, hiệu lực được tăng cường của 2A1 không thể được giải thích bởi sự khác biệt trong vùng Fc của các kháng thể được mô tả do tất cả các kháng thể được sử dụng trong nghiên cứu này đều bao gồm các vùng IgG1 giống nhau của chuột. Do đó, ngoài thành phần duy nhất liên quan đến vấn đề này, kháng thể 2A1 có các đặc tính bất ngờ và duy nhất bao gồm khả năng không gây ra các tương tác đồng hình giữa các tế bào biểu hiện CD47, *ví dụ,* các tế bào hồng cầu, và tăng cường hoạt tính ngăn ngừa khối u mà không thể được giải thích bởi liên kết với CD47 được tăng cường hoặc khả năng phong bế tương tác của CD47 với SIRPα được tăng cường.

Để xác nhận rằng rằng kháng thể được làm cho giống người 2A1 đã duy trì khả năng chống khối u của chúng, nghiên cứu về khối u Raji tương tự được thực hiện. Việc thiết kế nghiên cứu là giống như được mô tả ở trên. Các tế bào Raji được cấy dưới da trong chuột NOD/SCID và được xếp ngẫu nhiên vào 5 nhóms (10 chuột/nhóm, ngày 0). Trong nghiên cứu này, các kháng thể phân liều qua đường bụng (Intraperitoneal -IP) với 200μg 3 lần/tuần trong 3 tuần (9 liều tổng/chuột), và thể tích khối u được đo 3 lần/tuần. Tuy nhiên, đối với nghiên cứu này, kháng thể IgG1 2A1 của chuột (nhóm 2) được so sánh với dẫn xuất được làm cho giống người, AB6.12. Đối với nghiên cứu này, AB6.12 được cấu trúc (như được mô tả trong Ví dụ 8) vào IgG1 của người (Nhóm 3), IgG4P của người (Nhóm 4) và IgG4PE của người (Nhóm 4). Do đó, thử nghiệm này được thiết kế để thể hiện ảnh hưởng của việc làm cho giống người của 2A1 đối với hoạt tính làm giảm khối u và vai trò tiềm năng của chức năng tác động vùng Fc đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật là góp phần vào các hoạt tính chống khối u của nhiều các kháng thể. Đã được chứng minh bằng tư liệu rằng IgG1 của người có chức năng tác động đáng kể hơn so với IgG4P của người.

IgG4PE được phát triển để làm giảm hơn nữa chức năng tác động này. Như có thể thấy trên Fig. 10B, sự làm cho giống người của 2A1 không làm mất hoạt tính chống khối u của 2A1, và thực thế là có thể đã tăng cường hoạt tính này. AB6.12-hIgG1, AB6.12-hIgG4P, và AB6.12-hIgG4PE đều cho thấy hoạt tính chống khối u tương tự và lớn hơn đáng kể so với 2A1 của chuột (2A1mIgG). Kết quả này là bất ngờ do 2A1mIgG1, AB6.12-hIgG1, AB6.12-hIgG4P và AB6.12-hIgG4PE có liên kết tương tự với CD47 và hoạt tính phong bế SIRPα tương tự. Ngoài ra, do AB6.12-hIgG1, AB6.12-hIgG4P và AB6.12-hIgG4PE có hoạt tính chống khối u tương tự, có thể thấy rằng chức năng tác động đóng vai trò trong hiệu quả của kháng thể 2A1 được làm cho giống người AB6.12.

Ví dụ 11: Sự đồng tinh thể hóa kháng thể CD47 với CD47

CD47 là protein xuyên màng 5 lần với vùng IgV ngoại bào đơn (loại biến đổi giống globin miễn dịch) được glycosyl hóa ở 6 vị trí. Cấu trúc của vùng CD47-IgV đã được giải quyết trong phức hợp với vùng IgV của SIRPα, phối tử tự nhiên của nó (ngân hàng dữ liệu Protein (PDB), số tham chiếu 2JJS; Hatherley et al., 2008 Mol Cell, 25;31(2): 266-77 (Fig. 11A)). Cấu trúc này cho thấy SIRPα-IgV liên kết với CD47-IgV trên epitop đỉnh bao gồm pyroglutamat đầu N của CD47. Cấu trúc này đã giải thích một cách đầy đủ việc tại sao protein xuyên màng bề mặt tế bào có thể tương tác một cách hữu ích từ các tế bào liền kề theo định hướng đầu tới đầu. Cấu trúc tinh thể tia X của CD47-IgV trong phức hợp với B6H12 Fab được thể hiện trên Fig. 11B. Để rõ ràng, vùng ổn định của Fab (CH1 và CL) được lược bỏ trên Fig. này, và chỉ có Fv (VH và VL) được thể hiện. Điều này cho thấy vị trí liên kết đỉnh, định vị trí kháng thể này trên bề mặt là cực kỳ xa so với màng tế bào (Fig. 11B). Cơ chế phong bế SIRPα bởi B6H12 là rõ ràng từ cấu trúc này. Sự định hướng nhằm mục đích vị trí liên quan của màng tế bào được thể hiện là đường nét đứt trên Fig. 11.

Để xác định epitop đích của các kháng thể theo sáng chế, cấu trúc tinh thể tia X của đồng phức hợp của vùng IgV của CD47 và Fab của 2A1-xi (kháng thể khảm với vùng CH1 và CL của người) được xác định (Fig. 11C). Để rõ ràng, vùng ổn định của Fab (CH1 và CL) được lược bỏ trên hình vẽ, và chỉ có Fv (VH và VL) là được thể hiện. Không giống cấu trúc đã được xác định trước đó của CD47 liên kết SIRPα theo hướng đầu tới đầu (Fig. 11A), và kháng thể B6H12 được định vị trí ở đỉnh so với màng (Fig. 11B), cấu trúc của 2A1 trong phức hợp với CD47 cho thấy liên kết của kháng thể với CD47 gần màng trong hướng đầu tới bên duy nhất và không ngờ (Fig. 11C). Epitop của 2A1 trên CD47 là không liên tục, và bao gồm các gốc Y37, K39, K41, vòng KGRD (SEQ ID NO: 56) (các gốc 43-

46), D51, H90, N93, E97, T99, E104, và E106 của CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147 (*đó là,* SEQ ID NO: 48 không bao gồm trình tự tín hiệu (axit amin từ 1-18)). Cấu trúc của 2A1 được liên kết với CD47 cũng cho thấy rằng VH trước hết tham gia vào liên kết với vòng KGRD (SEQ ID NO: 56) của CD47, trong khi vùng VK tương tác với các gốc ở đỉnh bao gồm Y37, T102, và E104, tham gia vào liên kết SIRPα. Do đó, vùng VK là tác nhân đầu tiên loại bỏ về mặt vật lý liên kết của SIRPα với CD47. Các nghiên cứu cấu trúc gợi ý rằng epitop duy nhất mà 2A1 liên kết với là ở mặt của CD47. Ngược với kháng thể CD47 đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, định hướng của vùng VH của 2A1 ở vị trí gần màng là yếu tố quan trọng của kháng thể này mà ngăn ngừa mức ngưng kết tế bào hồng cầu đáng kể bằng cách hạn chế kháng thể sao cho không tạo cầu nối với phân tử CD47 ở các tế bào gần kề.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng phân lập được hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó liên kết với CD47 người, trong đó kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó liên kết với epitop không liên tục trên CD47, trong đó epitop không liên tục này chứa các gốc axit amin Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104, và E106 của CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147, và trong đó kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó ngăn ngừa CD47 khỏi việc tương tác với protein điều hòa tín hiệu α (SIRPα) và không gây ra mức ngưng kết đáng kể các tế bào sau khi dùng.

2. Kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó là khảm hoặc được làm giống như của người.

3. Kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó thúc đẩy sự thực bào tế bào biểu hiện CD47 gây ra bởi đại thực bào.

4. Kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó là isotyp IgG được chọn từ nhóm gồm isotyp IgG1, isotyp IgG2, isotyp IgG3, và isotyp IgG4.

5. Kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó là isotyp IgG được chọn từ IgG4P và IgG4PE.

6. Kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó chứa:

(i) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 72,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 71, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(ii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,

trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(iii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 67,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 69, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(iv) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 67,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 70, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(v) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 68,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(vi) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 72,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 68,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(vii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 72,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 68,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 71, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(viii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 76,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 68,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(ix) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 76,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 68,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 71, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55

(x) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 50,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 77,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(xi) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 57,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(xii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 60,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55;

(xiii) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 61,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,

trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55; hoặc

(xiv) trình tự VH CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 62,
trình tự VH CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 51,
trình tự VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52,
trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53,
trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, và
trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55.

7. Kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó chứa:

(i) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 5, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 31;

(ii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 5, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 32;

(iii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 33;

(iv) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 34;

(v) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(vi) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 36;

(vii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 37;

(viii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 38;

(ix) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 39;

(x) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 7, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 43;

(xi) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 8, và
trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 39;

(xii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 11, và

trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 42;

(xiii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 11, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 43;

(xiv) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 11, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 44;

(xv) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 11, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 47;

(xvi) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 15, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 43;

(xvii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 15, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 44;

(xviii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 16, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xix) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 17, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xx) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 20, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xxi) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 21, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xxii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 22, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xxiii) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 27, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xxiv) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 28, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35;

(xxv) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 29, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35; hoặc

(xxvi) trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 30, và trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 35.

8. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn có hoạt tính miễn dịch của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 và chất mang.

Danh mục trình tự

<110> InhibRx LLC

<120> Kháng thể đơn dòng phân lập được liên kết với CD47 và dược phẩm chứa kháng thể này

<130> 42967-506001WO

<140> PCT/US2013/024995

<141> 2013-02-06

<150> US 61/595,216

<151> 2012-02-06

<150> US 61/659,752

<151> 2012-06-14

<160> 147

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

```
                20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225                 230                 235                 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
```

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 2

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

```
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
                165                 170                 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
            180                 185                 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
        195                 200                 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
    210                 215                 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225                 230                 235                 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
                245                 250                 255

Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
            260                 265                 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
        275                 280                 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
    290                 295                 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305                 310                 315                 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325
```

<210> 3

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1               5                   10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30
```

```
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
            100                 105                 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
        115                 120                 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
    130                 135                 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145                 150                 155                 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
                165                 170                 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            180                 185                 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
        195                 200                 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    210                 215                 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225                 230                 235                 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                245                 250                 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
            260                 265                 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
        275                 280                 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    290                 295                 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
```

305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 4

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 5

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Phe Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val
115

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 7

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 9

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 10

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 10

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 11

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 12

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 12

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Tyr Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 13

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 13

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Ser Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 14

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Ala Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 15

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Thr Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 16

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 16

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 17

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 17

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 18

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Tyr Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 19

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 19

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Tyr Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 20

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 20

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Tyr Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 21

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 21

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Tyr Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 22

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 22

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 23

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 23
Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 24

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 24

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 25

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 26

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 26

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 27

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 27

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 28

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 28

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 29

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 30

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 30

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 31

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Ile Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys

100 105

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 32

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Ile Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 35

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 37

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 38

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Gly Phe Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 39

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 40

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 41

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Ile Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 42

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 43

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Ile Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 44

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 45

<211> 107
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 45

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 46

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 đã được làm cho giống người

<400> 47

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 48

<211> 323

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly
1 5 10 15

Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
20 25 30

Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
35 40 45

Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp
50 55 60

Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp
65 70 75 80

Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
85 90 95

Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
100 105 110

Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
115 120 125

Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu
130 135 140

Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe
145 150 155 160

Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr
165 170 175

Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val
180 185 190

Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr
195 200 205

Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His
210 215 220

Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala
225 230 235 240

Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu
245 250 255

Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile
260 265 270

Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr
275 280 285

Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys
290 295 300

Ala Val Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met
305 310 315 320

Asn Asp Glu

<210> 49

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn
1 5 10 15

Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn
20 25 30

Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr
35 40 45

Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser
50 55 60

Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu
65 70 75 80

Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys
85 90 95

Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys
100 105 110

Tyr Arg Val Val
115

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR1

<400> 50

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR2

<400> 51

Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR3

<400> 52

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VL CDR1

<400> 53

Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VL CDR2

<400> 54

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp
1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VL CDR3

<400> 55

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 56

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Lys Gly Arg Asp
1

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR1

<400> 57

Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR1

<400> 58

Gly Phe Thr Phe Thr Tyr Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR1

<400> 59

Gly Tyr Asn Phe Thr Tyr Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR1

<400> 60

Gly Tyr Thr Ile Thr Tyr Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR1

<400> 61

Gly Tyr Thr Phe Lys Tyr Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR1

<400> 62

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR1

<400> 63

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR1

<400> 64

Gly Phe Thr Ile Thr Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR1

<400> 65

Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR1

<400> 66

Gly Phe Thr Phe Lys Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VL CDR1

<400> 67

Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VL CDR1

<400> 68

Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VL CDR2

<400> 69

Arg Ala Asn Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VL CDR2

<400> 70

Arg Ala Asn Arg Arg Ala Thr
1 5

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VL CDR2

<400> 71

Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser
1 5

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR1

<400> 72

Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR1

<400> 73

Trp Ile Asp Pro Asp Tyr Gly Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR1

<400> 74

Trp Ile Asp Pro Asp Ser Gly Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR1

<400> 75

Trp Ile Asp Pro Asp Asn Ala Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR1

<400> 76

Trp Ile Asp Pro Asp Asn Thr Asp Thr Glu

1 5 10

<210> 77

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của VH CDR3

<400> 77

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Pro Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 78

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng chuỗi VH của kháng thể 9E4

<400> 78

Glu Val Gln Leu Arg Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser Arg Val Arg Ser Leu Ala Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Thr Gly Ala Thr Gly Tyr Asp Gln Asn Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ser Leu Ile Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Arg Asn Arg Tyr Asp Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val
115

<210> 79

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng chuỗi VL của kháng thể 9E4

<400> 79

Glu Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Asp Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Ala Leu Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 80

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng chuỗi VH của kháng thể 1B4

<400> 80

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Glu Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val
115

<210> 81

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng chuỗi VL của kháng thể 1B4

<400> 81

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 82

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 82

cactgcaggt rtccactcc
19

<210> 83

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 83

catagcaggt gtccactcc
19

<210> 84

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 84

crctacaggt gtccactcc
19

<210> 85

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 85

gcyacagmtg tccactcc
18

<210> 86

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 86

cactgcaggt gtccwmtcc
19

<210> 87

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 87

crctrcaggt gtkcactcc
19

<210> 88

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 88

gctawmggtg tccactcc
18

<210> 89

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 89

cctcaggtgt ccactcc
17

<210> 90

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 90

gctacaggtg ctcactcc

18

<210> 91

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 91

cactgcaggt gtcctctct
19

<210> 92

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 92

caytgcaggt gtccaytgc
19

<210> 93

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 93

gctammggtg tccacttc
18

<210> 94

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 94

ctcctgtcak taactkcagg t
21

<210> 95

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 95

caactgcagg tgtctctct
19

<210> 96

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 96

crctrcaggy gtccactct
19

<210> 97

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 97

ccaagctgta tcctttcc
18

<210> 98

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 98

ccaagctgtg tcctrtcc
18

<210> 99

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 99

cttgacagyc vttcckggt
19

<210> 100

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 100

cttcacagcc tttcctggt
19

<210> 101

<211> 19

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 101

cttaaaaggg gtccagtgt
19

<210> 102

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 102

caytttaaaa rgtgtcmagt gt
22

<210> 103

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 103

gttttaaaag gtgtcctgtg
20

<210> 104

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 104

ctyttaaaag gkgtccagwg
20

<210> 105

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 105

cytttamatg gtatccagtg t
21

<210> 106

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 106

cttttacatg gtttcaagtg t
21

<210> 107

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 107

gtccctgcat atgtcyt
17

<210> 108

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 108

gatggcagcw gcycaaag
18

<210> 109

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 109

ctatcaaggt gtgcattgt
19

<210> 110

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 110

cttttaaaag wtgtccagkg t
21

<210> 111

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 111

gtgacagtcc ttcctggtag
20

<210> 112

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 112

cttcctgatg gcagtggtt
19

<210> 113

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 113

gctacaggta tccaatcc
18

<210> 114

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 114

gcgtctagaa yctccacaca caggrrccag tggatagac
39

<210> 115

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 115

ctgwtgttct ggattcctg
19

<210> 116

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 116

ggtcagacag tcagcagt
18

<210> 117

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 117

gtgctctgga ttcgggaa
18

<210> 118

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 118

cagcttcytg ctaatcagtg
20

<210> 119

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 119

ctaatcagtg cttcagga
18

<210> 120

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 120

gtgggtatct ggtrcstgtg
20

<210> 121

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 121

ggaaatttaa aagtacctgt ggg
23

<210> 122

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 122

ggtttcmagg trccagatgt
20

<210> 123

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 123

ctctggttyc caggtatc
18

<210> 124

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 124

ctgttttcaa ggtrccagat gt
22

<210> 125

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 125

gttgtaatgt ccagagga
18

<210> 126

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 126

cttacaggtg ccagatgt
18

<210> 127

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 127

ctcaattgta grtgccagat gt
22

<210> 128

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 128

cacagtaggt gtcagatgt
19

<210> 129

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 129

gtcgtagttg tcagatgt
18

<210> 130

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 130

cctccttctt ggccaaga
18

<210> 131

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 131

cttatatgga gctgatggg
19

<210> 132

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 132

gtgtctggtg ctcatggg
18

<210> 133

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 133

ctstggttgt ctggtgttga
20

<210> 134

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 134

gtctctgatt ctagggca
18

<210> 135

<211> 16

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 135

ctkckctggg ttccag
16

<210> 136

<211> 15

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 136

gcaggtgttg acgga
15

<210> 137

<211> 16

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 137

caggtgcctc gtgcac
16

<210> 138

<211> 16

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 138

ctctggtgcc tgtgca
16

<210> 139

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 139

ctggaytyca gcctccaga
19

<210> 140

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 140

gwtctctrga gtcagtggg
19

<210> 141

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 141

ctggatccct ggakcyact
19

<210> 142

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 142

gttctgcttt ttaggtgtg
19

<210> 143

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 143

gatcccaggc atgatatgt
19

<210> 144

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 144

cttcatggtg ctcagtgt
18

<210> 145

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 145

ccatatcagg tgcccagtgt
20

<210> 146

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 146

gcgtctagaa ctggatggtg ggaagatgg
29

<210> 147

<211> 305

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn
1 5 10 15

Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn
20 25 30

Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr
35 40 45

Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser
50 55 60

Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu
65 70 75 80

Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys
85 90 95

Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys
100 105 110

Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu Ile Val
115 120 125

Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe Gly Ile
130 135 140

Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr Ile Ala
145 150 155 160

Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val Gly Ala
165 170 175

Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr Gly Leu
180 185 190

Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His Tyr Tyr
195 200 205

Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala Ile Leu
210 215 220

Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu Ser Leu
225 230 235 240

Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile Ser Gly
245 250 255

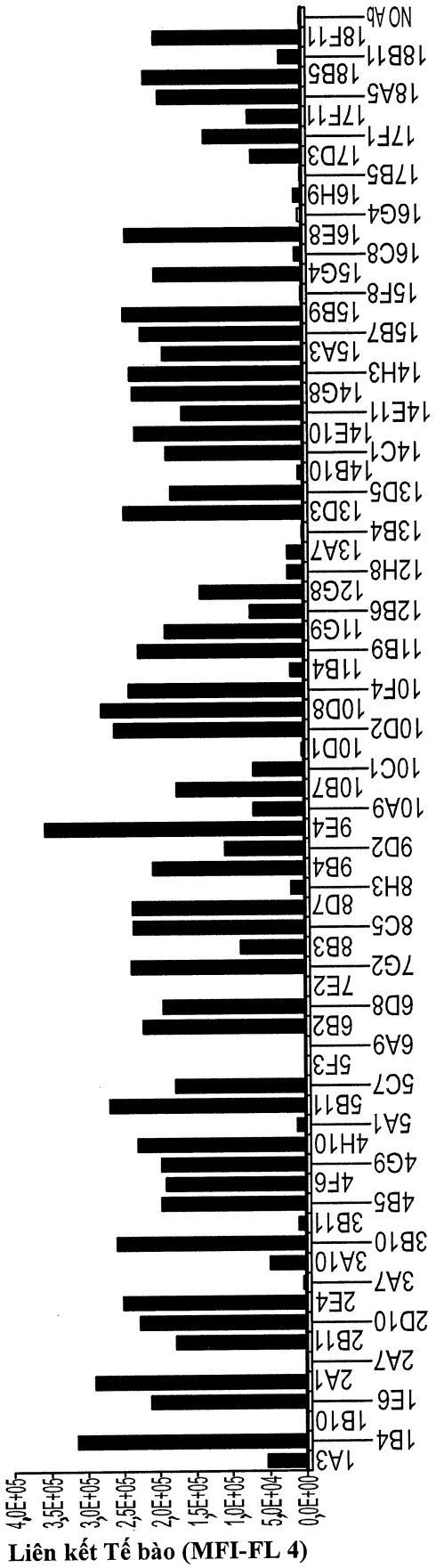
Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr Met Lys
260 265 270

Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys Ala Val
275 280 285

Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met Asn Asp
290 295 300

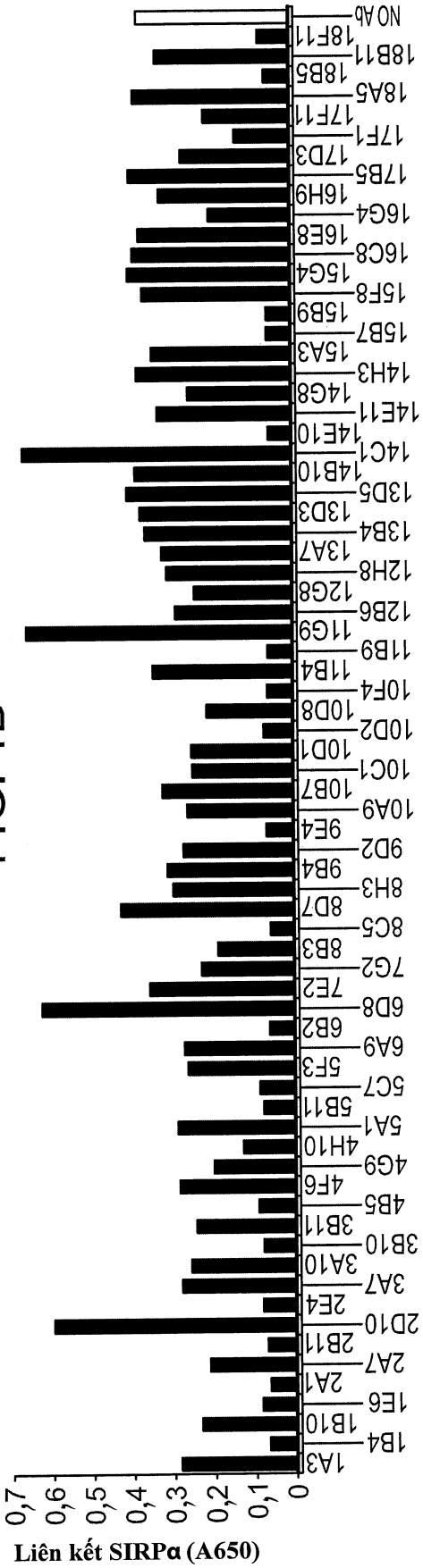
Glu
305

FIG. 1A



Liên kết Tế bào (MFI-FL 4)

FIG. 1B



Liên kết SIRPα (A650)

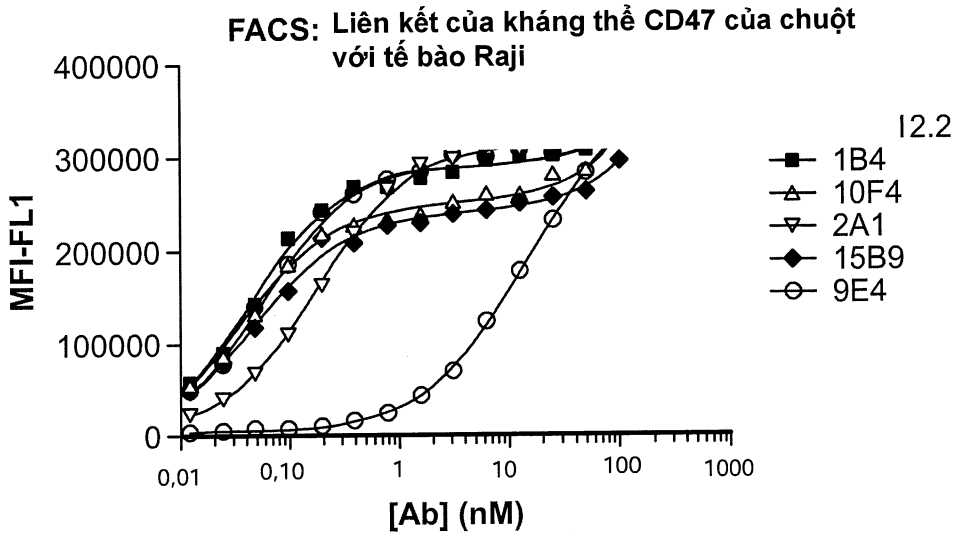

FACS: Liên kết của kháng thể CD47 của chuột với tế bào Raji
MFI-FL1
400000
300000
200000
100000
0
0,01
0,10
1
10
100
1000
[Ab] (nM)
I2.2
1B4
10F4
2A1
15B9
9E4

FIG. 2A

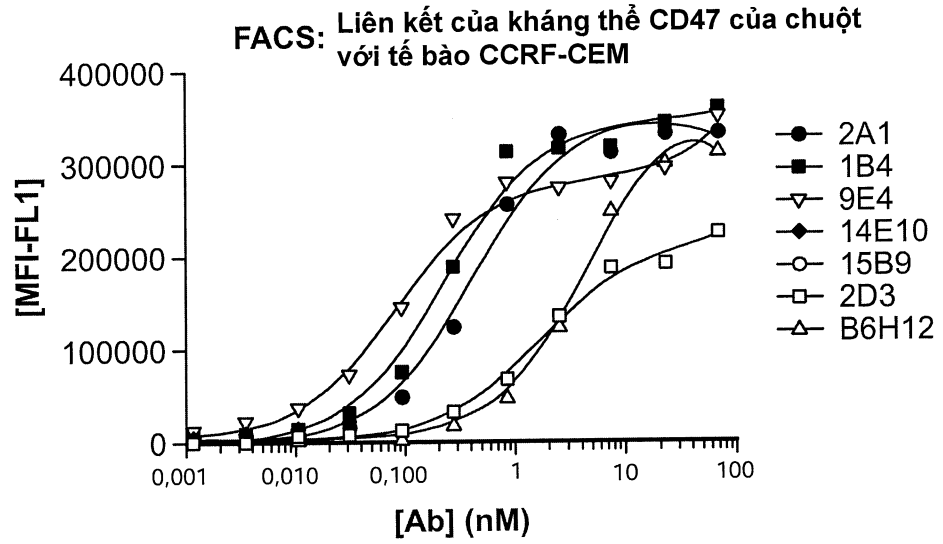

FACS: Liên kết của kháng thể CD47 của chuột với tế bào CCRF-CEM
[MFI-FL1]
400000
300000
200000
100000
0
0,001
0,010
0,100
1
10
100
[Ab] (nM)
2A1
1B4
9E4
14E10
15B9
2D3
B6H12

FIG. 2B

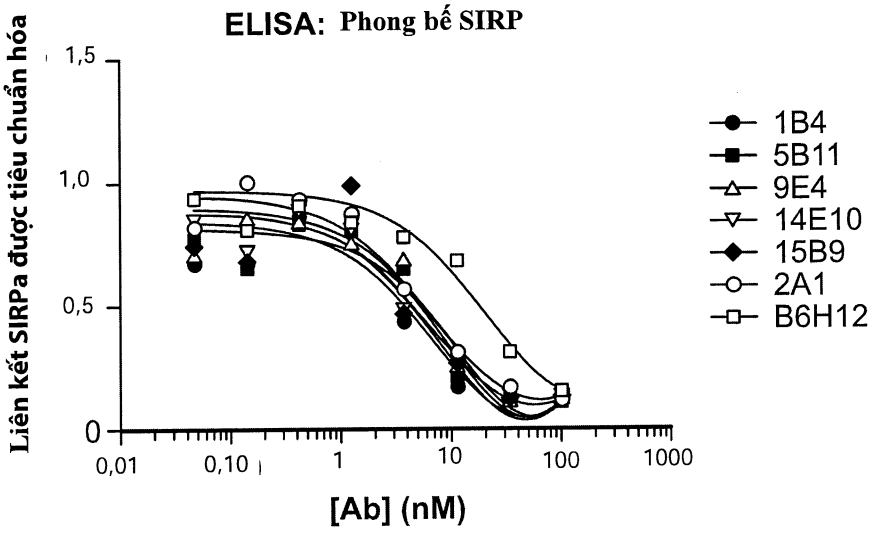

ELISA: Phong bế SIRP
Liên kết SIRPa được tiêu chuẩn hóa
1,5
1,0
0,5
0
0,01
0,10
1
10
100
1000
[Ab] (nM)
1B4
5B11
9E4
14E10
15B9
2A1
B6H12

FIG. 3A

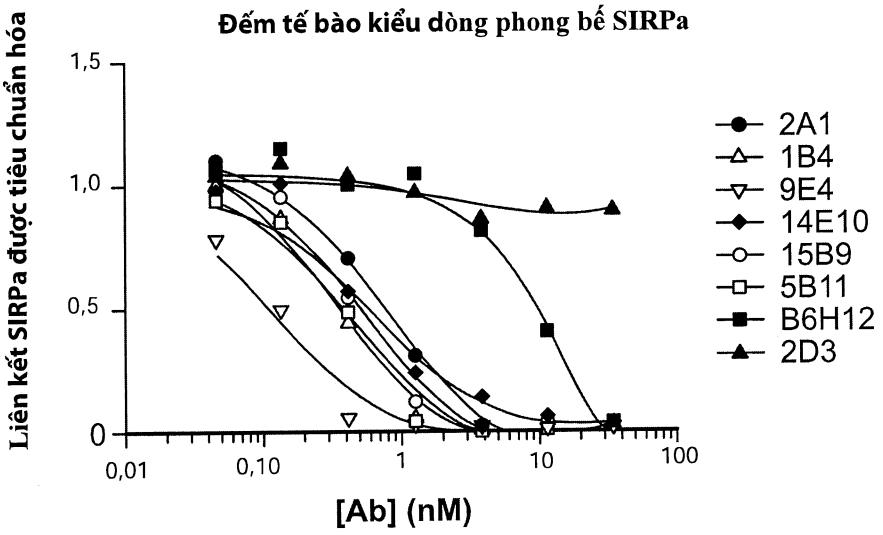
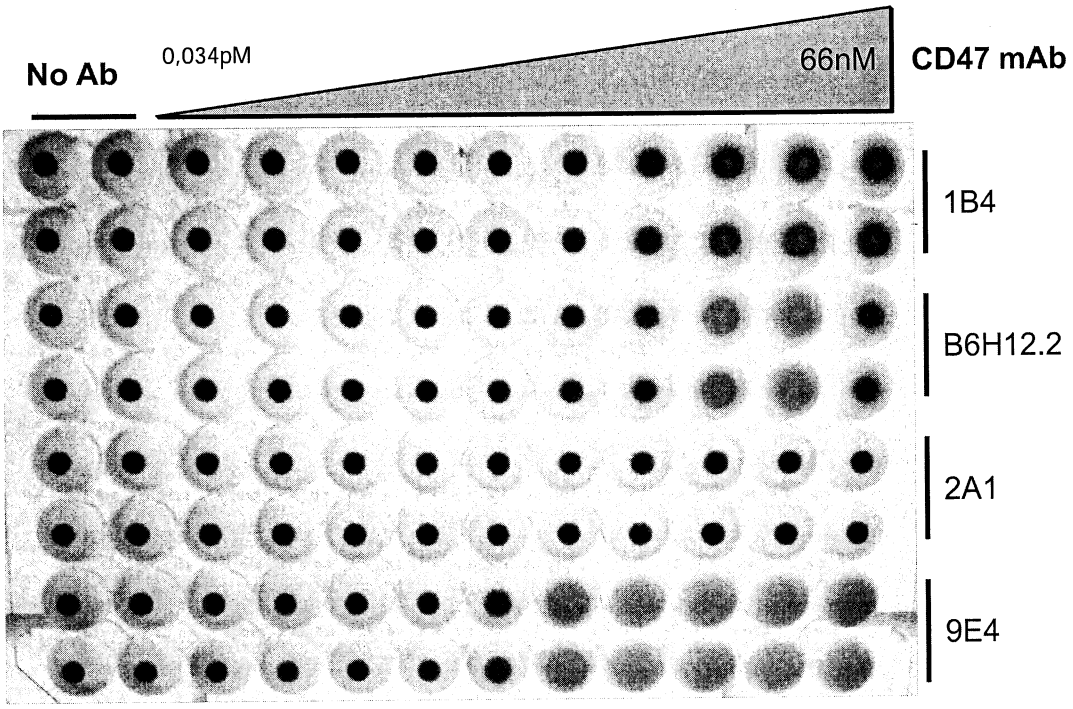

Đếm tế bào kiểu dòng phong bế SIRPa
Liên kết SIRPa được tiêu chuẩn hóa
1,5
1,0
0,5
0
0,01
0,10
1
10
100
[Ab] (nM)
2A1
1B4
9E4
14E10
15B9
5B11
B6H12
2D3

FIG. 3B


No Ab
0,034pM
66nM
CD47 mAb
1B4
B6H12.2
2A1
9E4

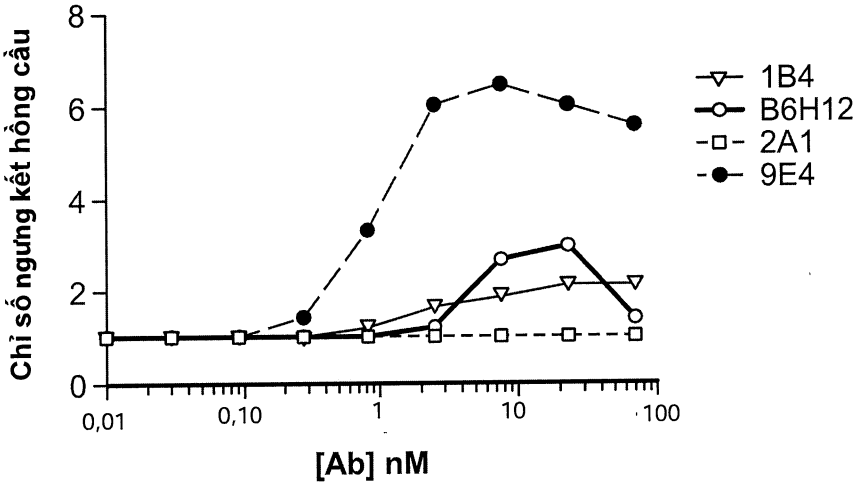

Chỉ số ngưng kết hồng cầu
8
6
4
2
0
0,01
0,10
1
10
100
[Ab] nM
1B4
B6H12
2A1
9E4

FIG. 4A

[Ab] (nM)	100	50	25	12.5	100	50	25	12.5	100	50	25	12.5
A	9E4	9E4	9E4	9E4	11B9	11B9	11B9	11B9	15B9	15B9	15B9	15B9
B	Trống	Trống	Trống	Trống	10F4	10F4	10F4	10F4	18F11	18F11	18F11	18F11
C	B6H12	B6H12	B6H12	B6H12	Trống	Trống	Trống	Trống	18B5	18B5	18B5	18B5
D	2A1	2A1	2A1	2A1	3B10	3B10	3B10	3B10	17F11	17F11	17F11	17F11
E	2A1-XI	2A1-XI	2A1-XI	2A1-XI	15B7	15B7	15B7	15B7	Trống	Trống	Trống	Trống
F	6B2	6B2	6B2	6B2	2B11	2B11	2B11	2B11	Trống	Trống	Trống	Trống
G	14E10	14E10	14E10	14E10	5B11	5B11	5B11	5B11	Trống	Trống	Trống	Trống
H	Trống	Trống	Trống	Trống	Trống	Trống	Trống	Trống	Trống	Trống	Trống	Trống
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

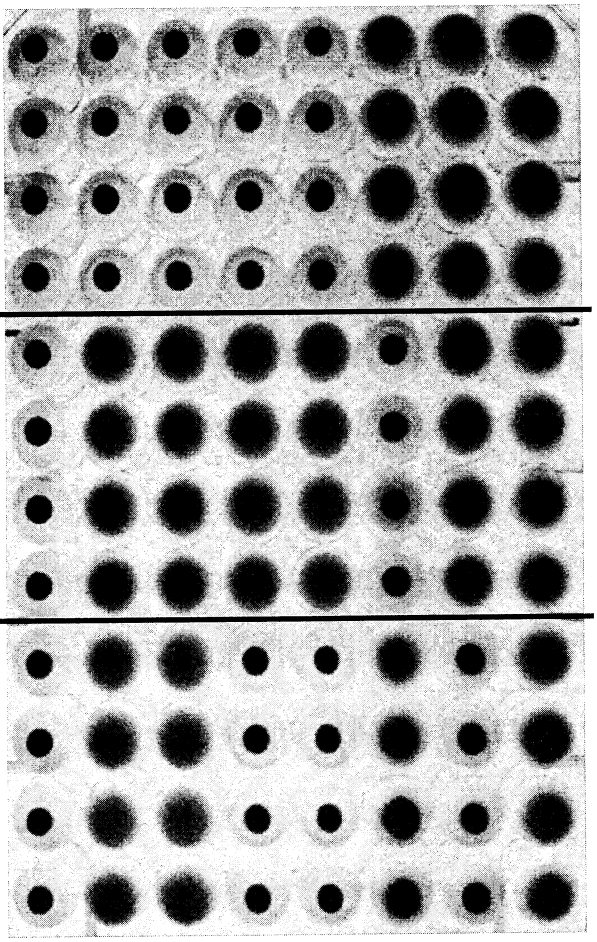


FIG. 4B

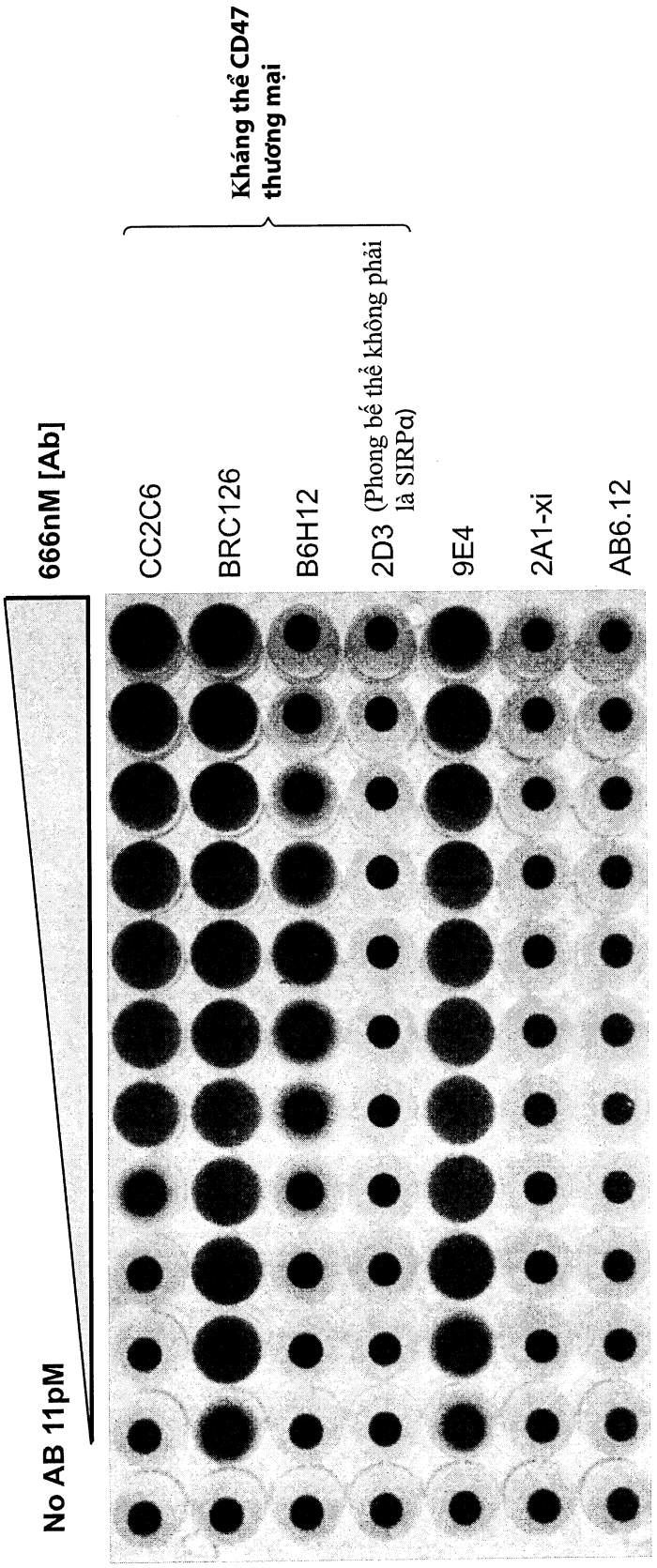
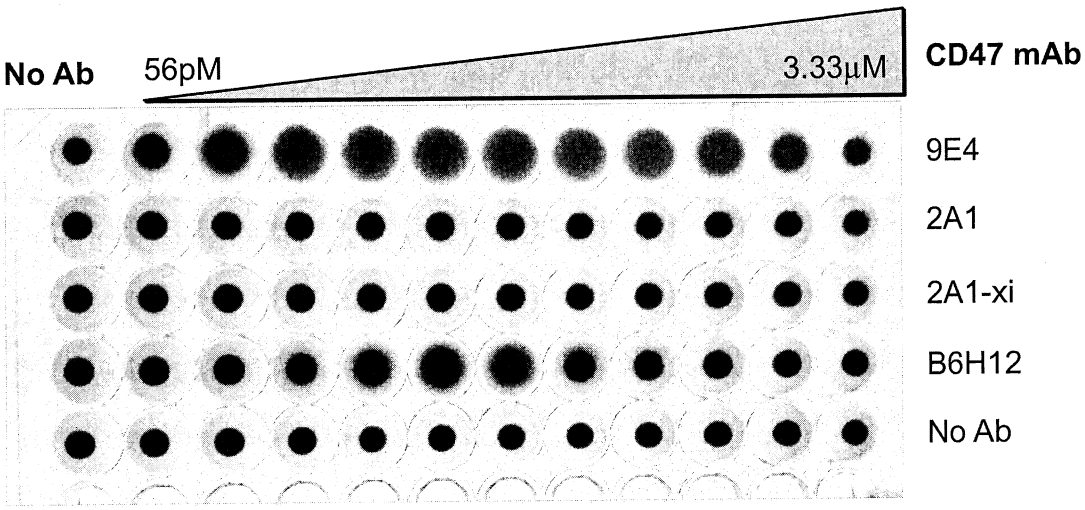

Kháng thể CD47 thương mại
CC2C6
BRC126
B6H12
2D3 (Phong bế thể không phải là SIRPα)
9E4
2A1-xi
AB6.12
666nM [Ab]
No AB 11pM

FIG. 4C


No Ab
56pM
3.33µM
CD47 mAb
9E4
2A1
2A1-xi
B6H12
No Ab

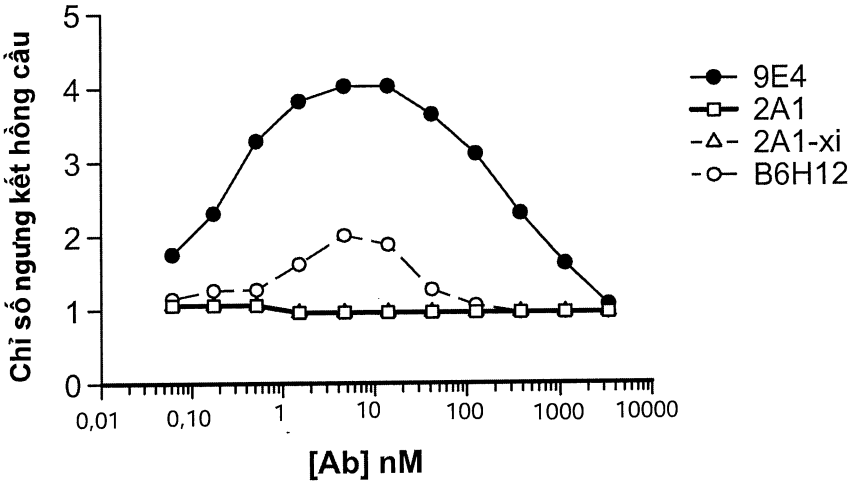

Chỉ số ngưng kết hồng cầu
0
1
2
3
4
5
0,01
0,10
1
10
100
1000
10000
[Ab] nM
9E4
2A1
2A1-xi
B6H12

FIG. 4D

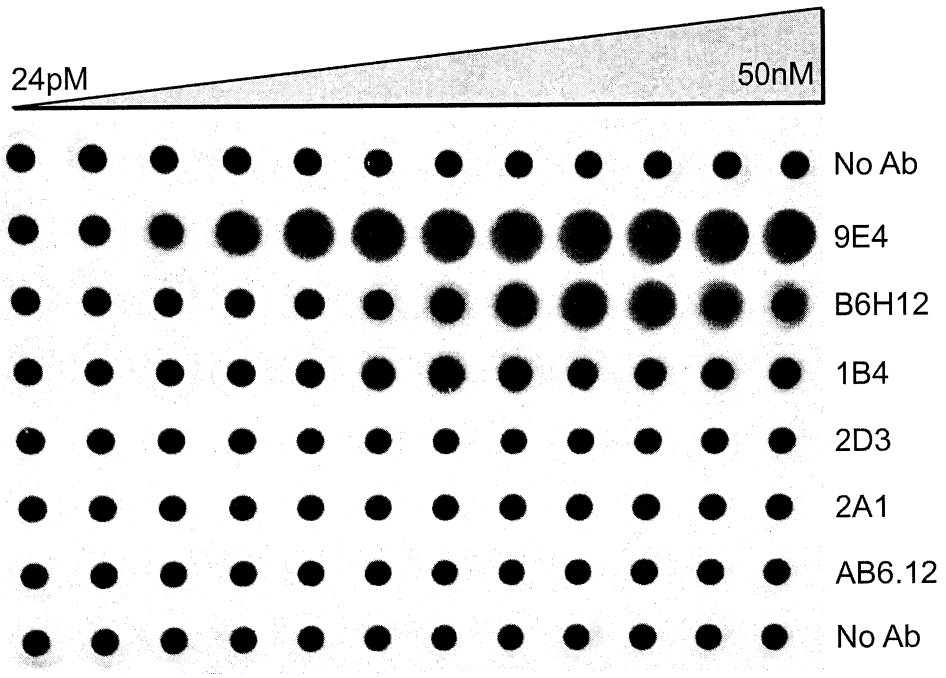

24pM
50nM
No Ab
9E4
B6H12
1B4
2D3
2A1
AB6.12
No Ab

FIG. 4E

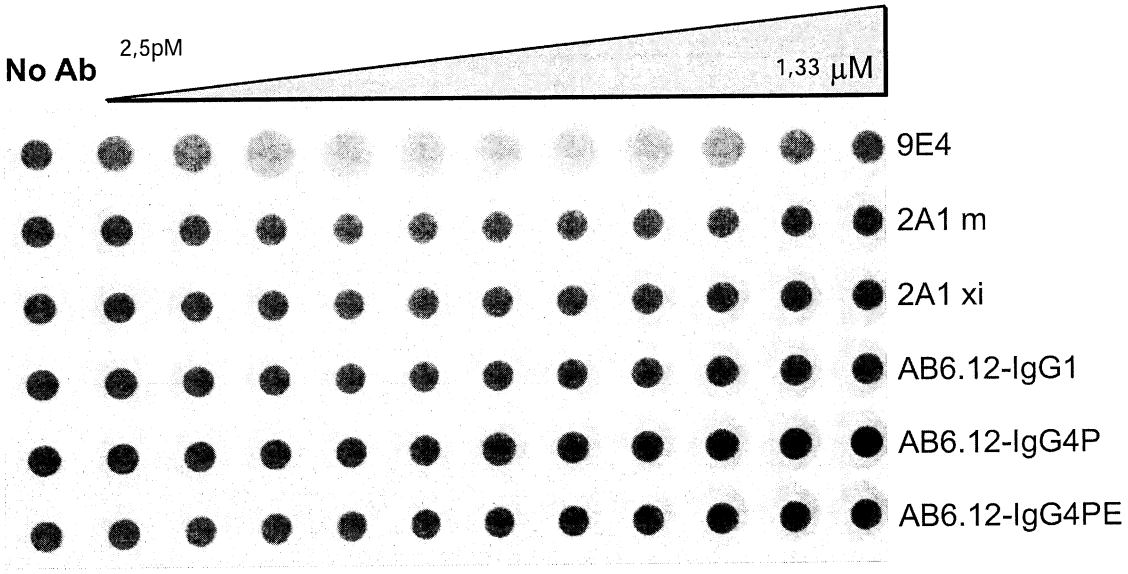

No Ab
2,5pM
1,33 µM
9E4
2A1 m
2A1 xi
AB6.12-IgG1
AB6.12-IgG4P
AB6.12-IgG4PE

FIG. 4F

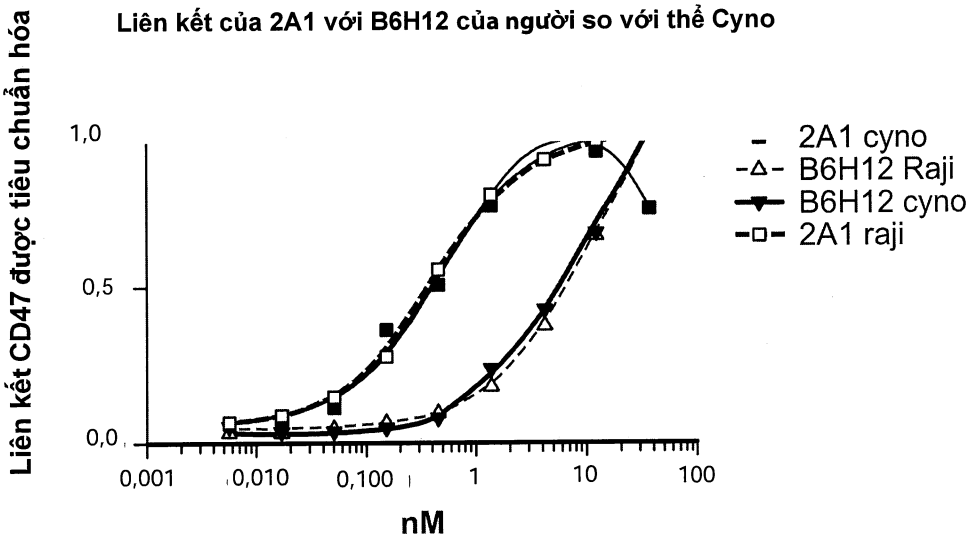

Liên kết của 2A1 với B6H12 của người so với thể Cyno
Liên kết CD47 được tiêu chuẩn hóa
1,0
0,5
0,0
0,001
0,010
0,100
1
10
100
nM
2A1 cyno
B6H12 Raji
B6H12 cyno
2A1 raji

FIG. 5

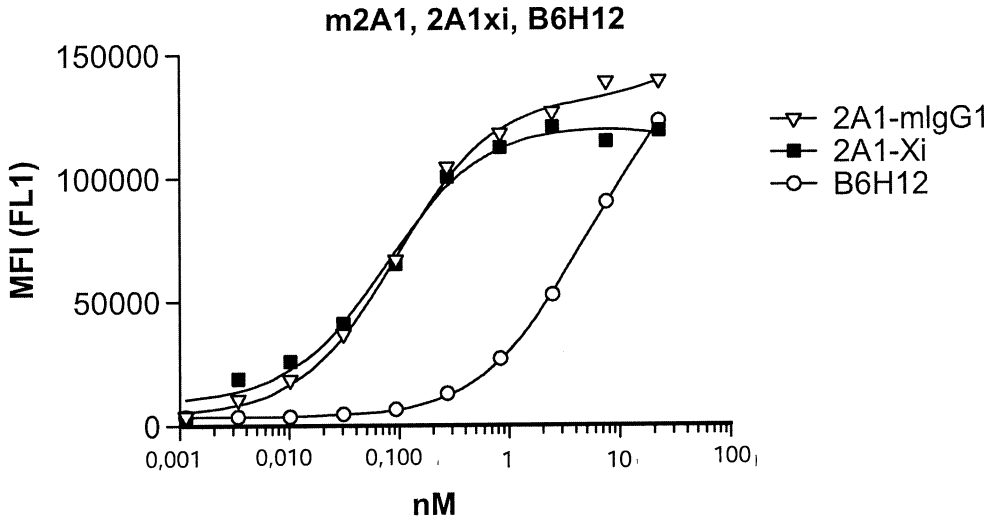

m2A1, 2A1xi, B6H12
MFI (FL1)
150000
100000
50000
0
0,001
0,010
0,100
1
10
100
nM
2A1-mIgG1
2A1-Xi
B6H12

FIG. 6

FIG. 7A

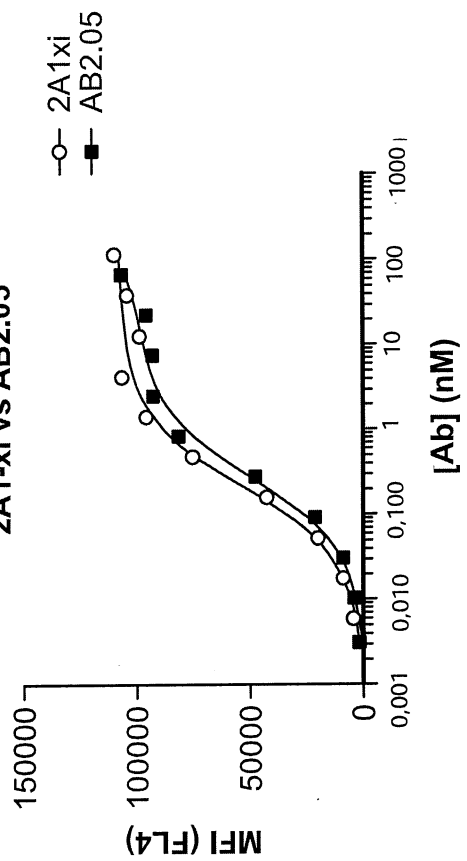


FIG. 7B

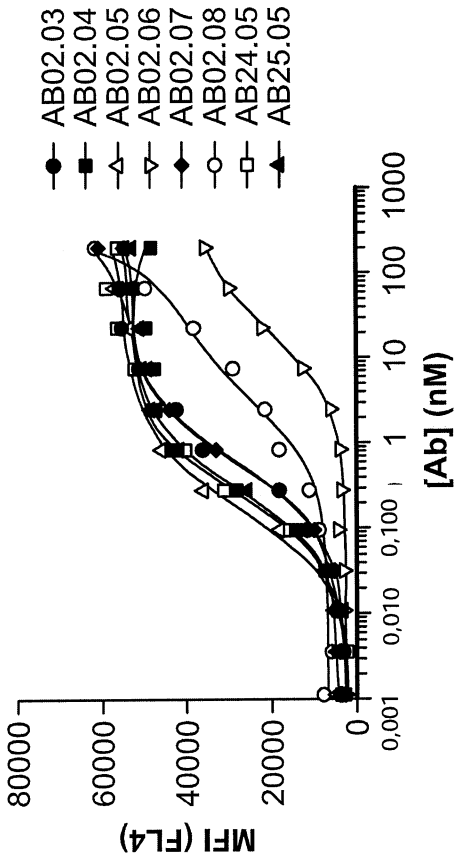


FIG. 7C

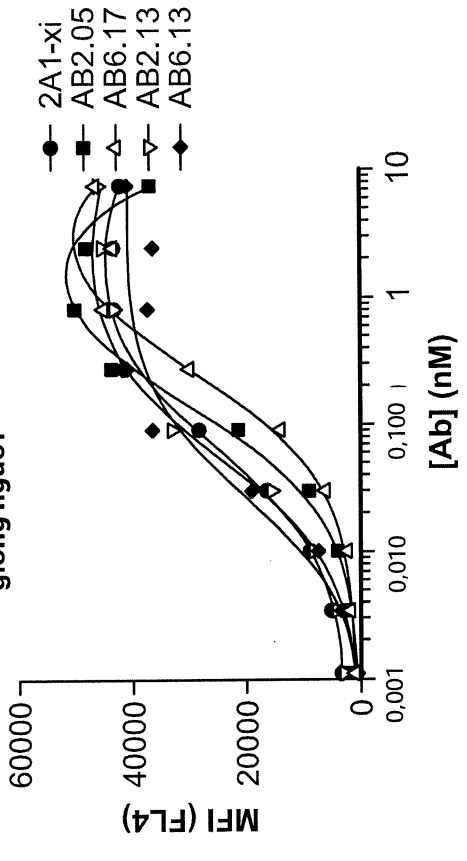


FIG. 7D

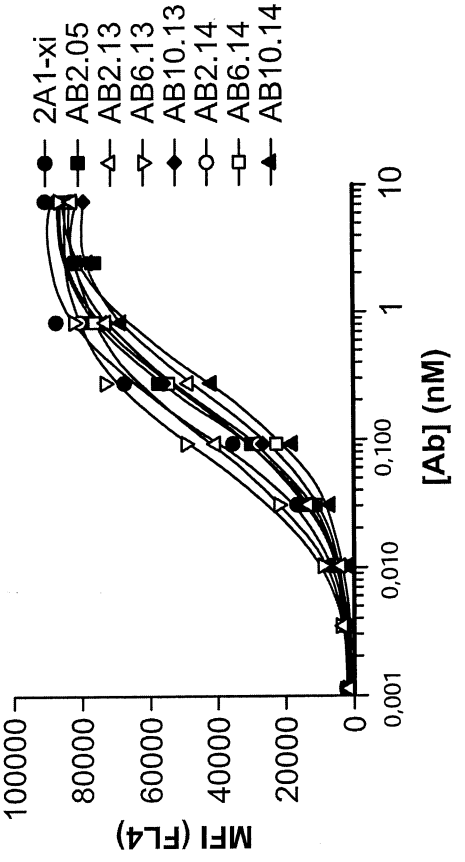


FIG. 7E

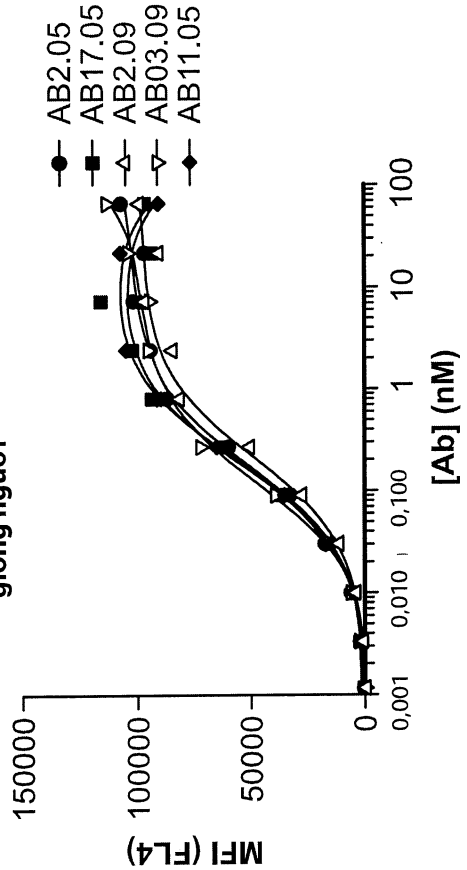


FIG. 7F

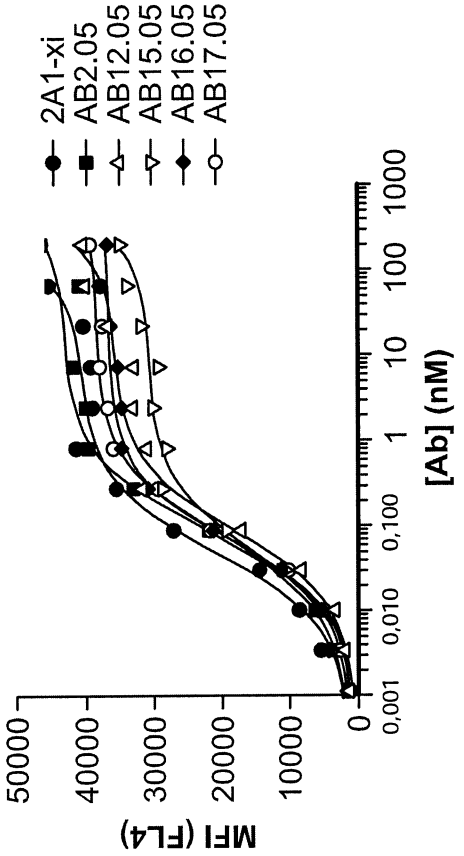
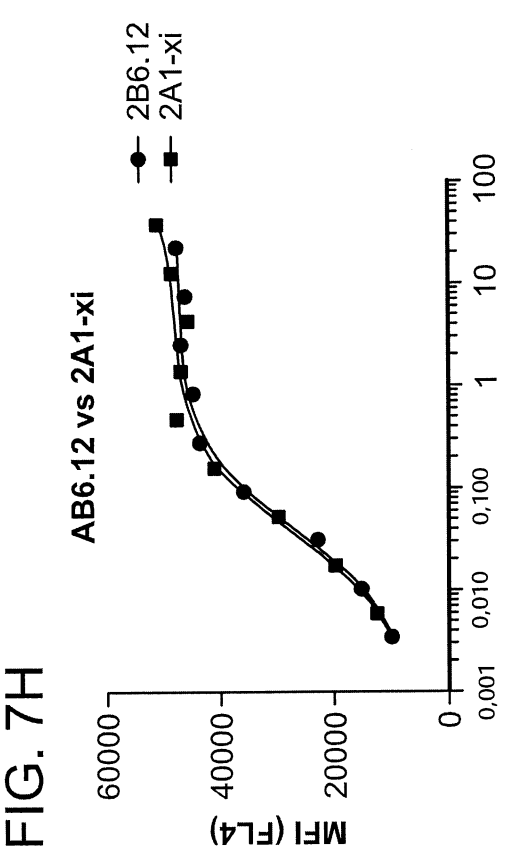


FIG. 7G

FIG. 7H



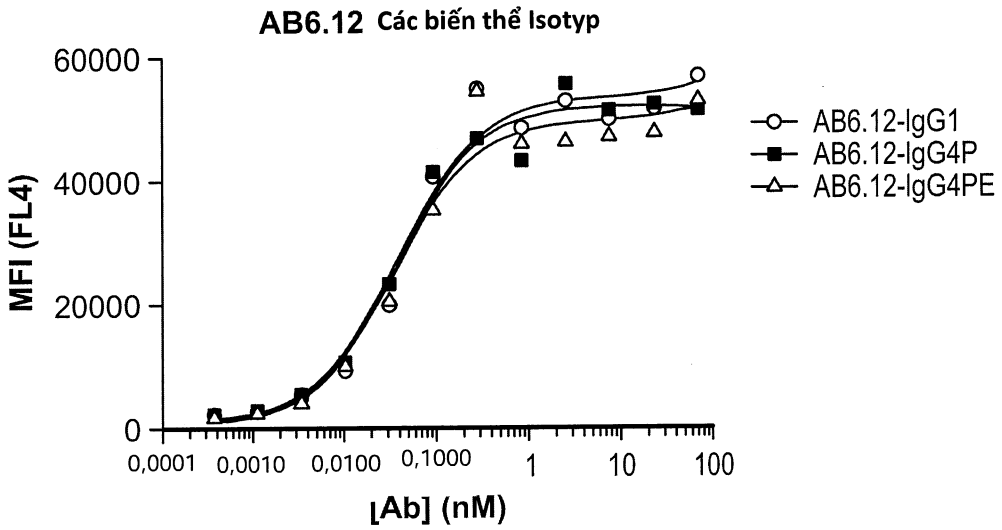

AB6.12 Các biến thể Isotyp
MFI (FL4)
60000
40000
20000
0
0,0001
0,0010
0,0100
0,1000
1
10
100
[Ab] (nM)
AB6.12-IgG1
AB6.12-IgG4P
AB6.12-IgG4PE

FIG. 7I

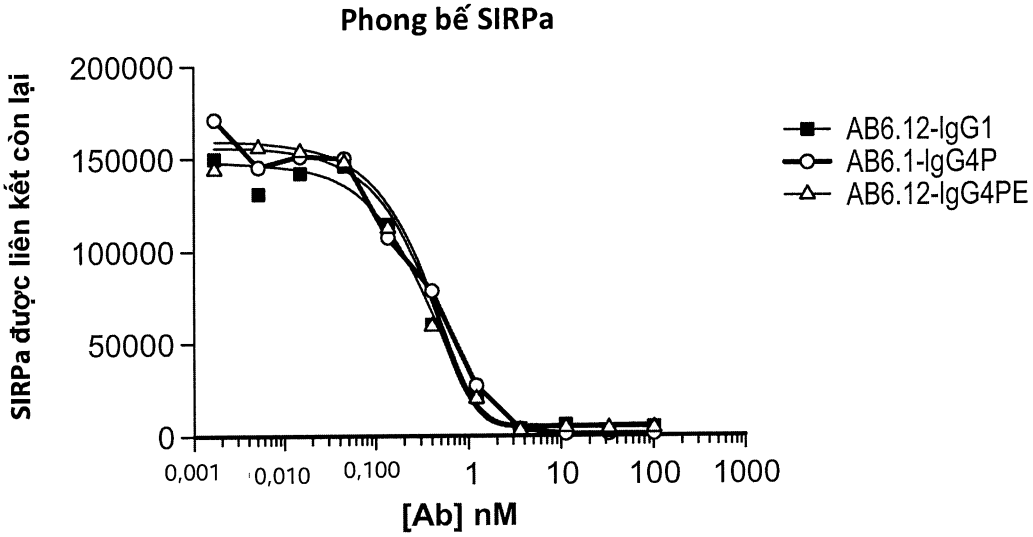
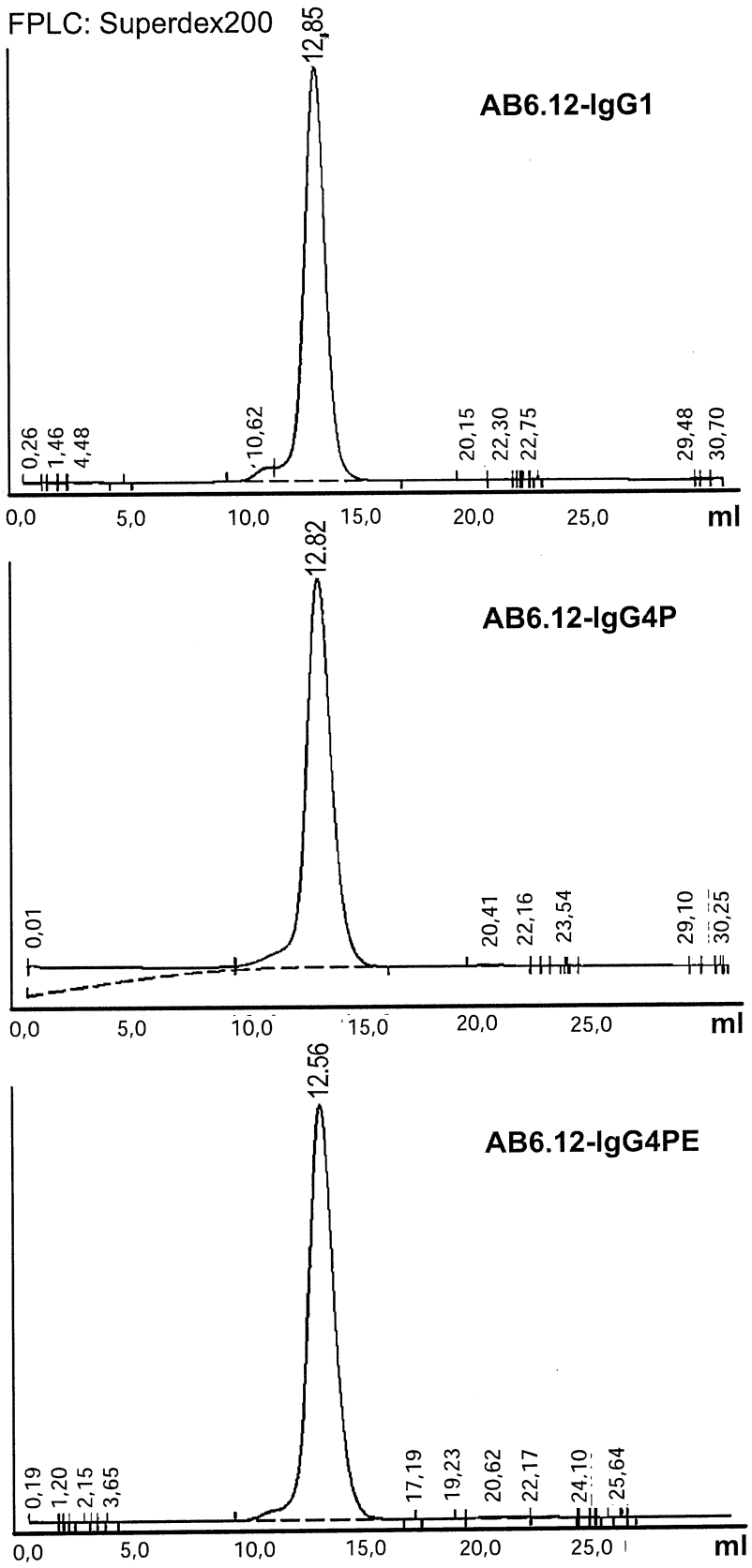

Phong bế SIRPa
SIRPa được liên kết còn lại
200000
150000
100000
50000
0
0,001
0,010
0,100
1
10
100
1000
[Ab] nM
AB6.12-IgG1
AB6.1-IgG4P
AB6.12-IgG4PE

FIG. 7J

FIG. 8A


FPLC: Superdex200
12,85
AB6.12-IgG1
0,26
1,46
4,48
10,62
20,15
22,30
22,75
29,48
30,70
0,0
5,0
10,0
15,0
20,0
25,0
ml
12.82
AB6.12-IgG4P
0,01
20,41
22,16
23,54
29,10
30,25
12.56
AB6.12-IgG4PE
0,19
1,20
2,15
3,65
17,19
19,23
20,62
22,17
24,10
25,64

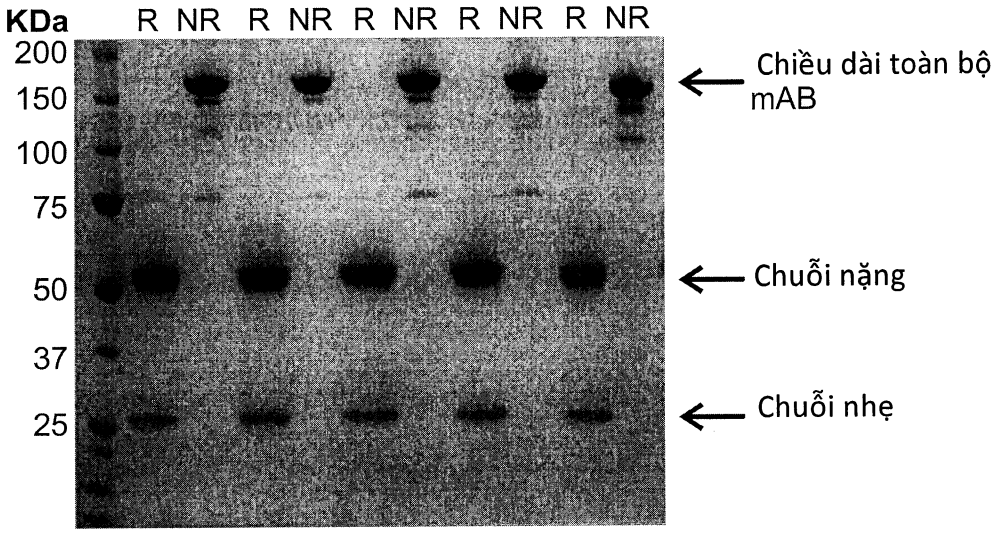

KDa
R NR R NR R NR R NR R NR
200
150
100
75
50
37
25
Chiều dài toàn bộ mAB
Chuỗi nặng
Chuỗi nhẹ

FIG. 8B

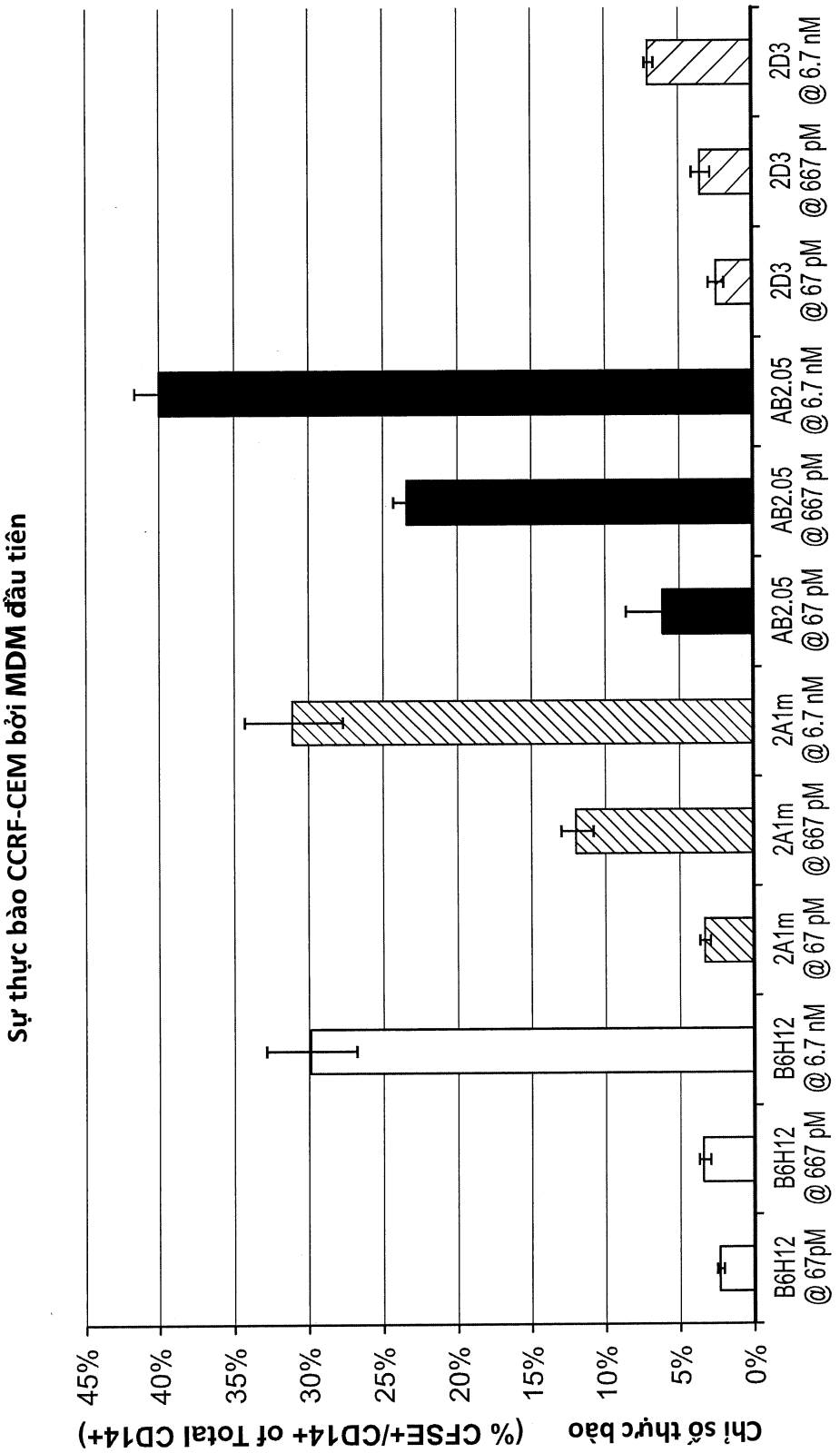

Sự thực bào CCRF-CEM bởi MDM đầu tiên
(% CFSE+/CD14+ of Total CD14+)
Chỉ số thực bào
45%
40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
B6H12 @67pM
B6H12 @ 667 pM
B6H12 @ 6.7 nM
2A1m @ 67 pM
2A1m @ 667 pM
2A1m @ 6.7 nM
AB2.05 @ 67 pM
AB2.05 @ 667 pM
AB2.05 @ 6.7 nM
2D3 @ 67 pM
2D3 @ 667 pM
2D3 @ 6.7 nM

FIG. 9A

FIG. 9B

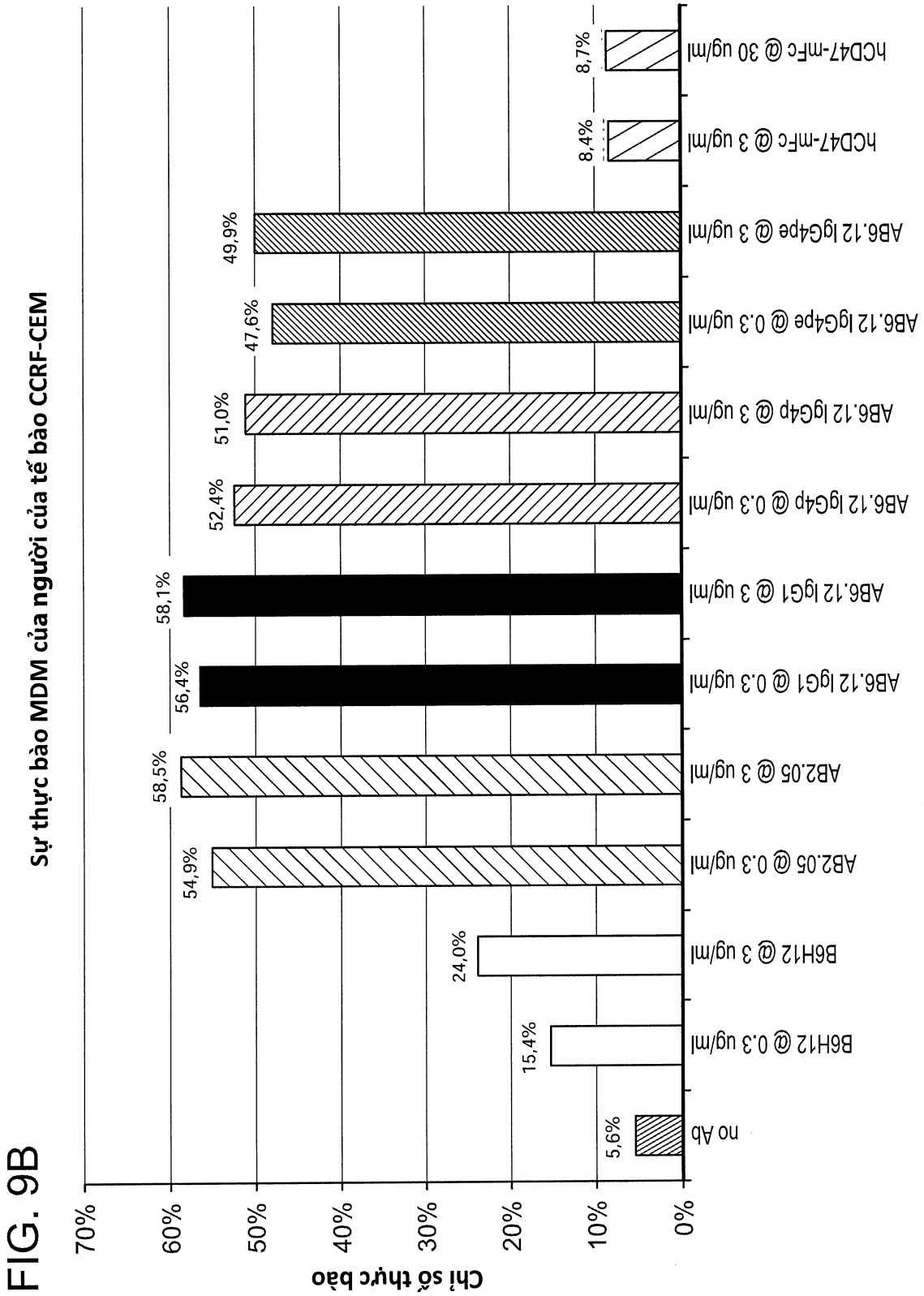

Sự thực bào MDM của người của tế bào CCRF-CEM
Chỉ số thực bào
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
no Ab
5,6%
B6H12 @ 0.3 ug/ml
15,4%
B6H12 @ 3 ug/ml
24,0%
AB2.05 @ 0.3 ug/ml
54,9%
AB2.05 @ 3 ug/ml
58,5%
AB6.12 IgG1 @ 0.3 ug/ml
56,4%
AB6.12 IgG1 @ 3 ug/ml
58,1%
AB6.12 IgG4p @ 0.3 ug/ml
52,4%
AB6.12 IgG4p @ 3 ug/ml
51,0%
AB6.12 IgG4pe @ 0.3 ug/ml
47,6%
AB6.12 IgG4pe @ 3 ug/ml
49,9%
hCD47-mFc @ 3 ug/ml
8,4%
hCD47-mFc @ 30 ug/ml
8,7%

FIG. 10A

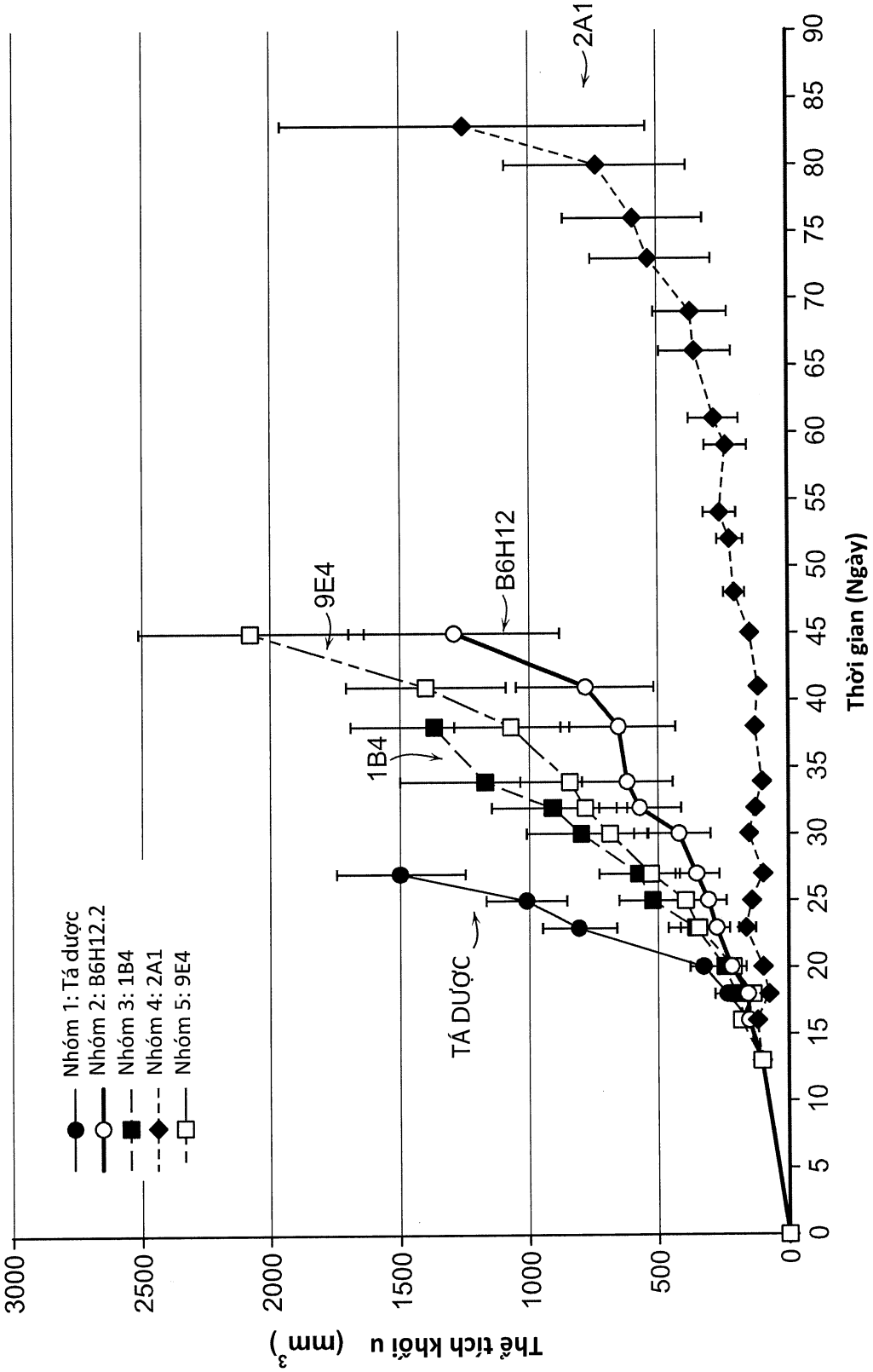
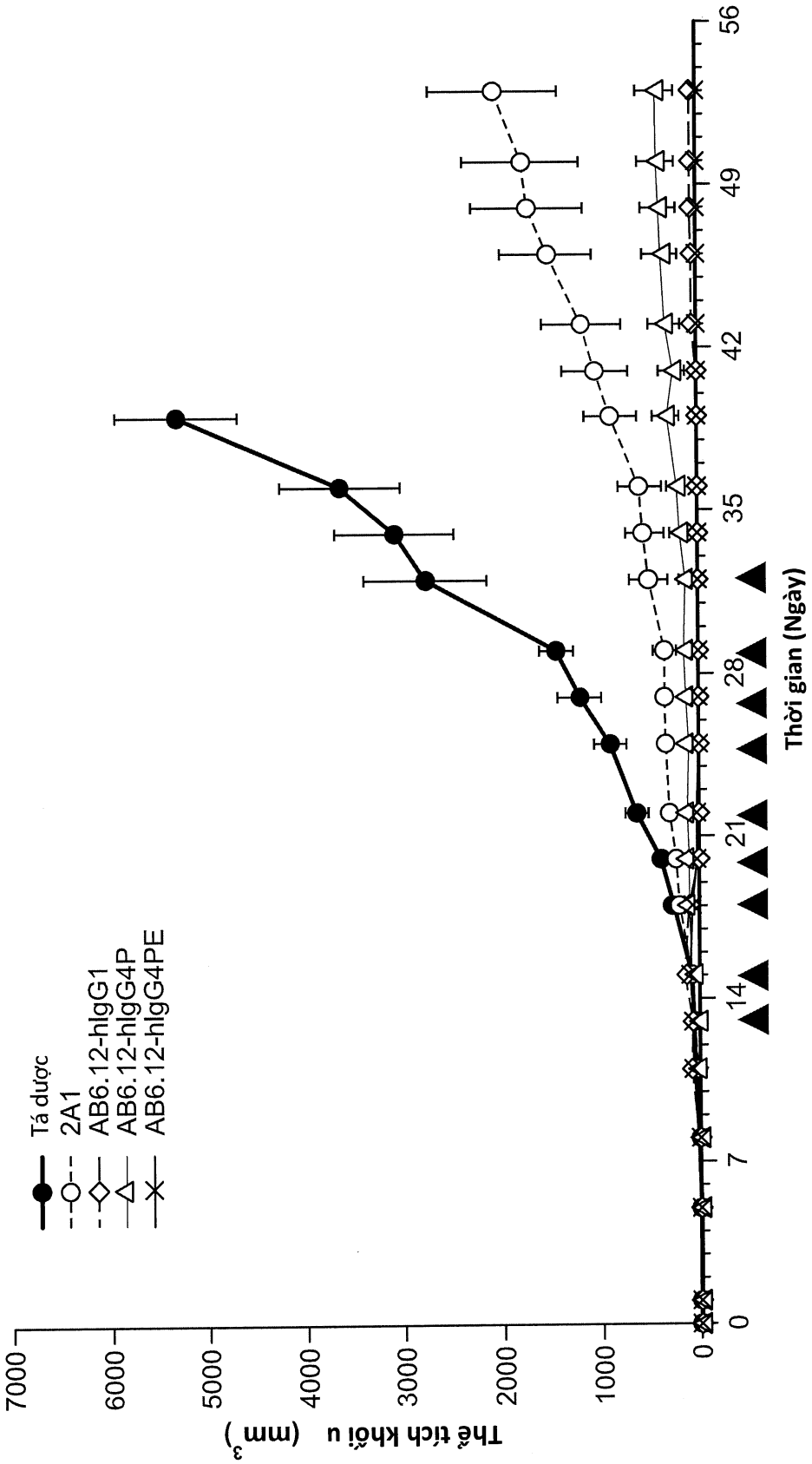

Mẫu khối u Raji: Kháng thể CD47 của chuột
Nhóm 1: Tá dược
Nhóm 2: B6H12.2
Nhóm 3: 1B4
Nhóm 4: 2A1
Nhóm 5: 9E4
Thể tích khối u (mm³)
Thời gian (Ngày)
TÁ DƯỢC
1B4
9E4
B6H12
2A1
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90

FIG. 10B


Tá dược
2A1
AB6.12-hIgG1
AB6.12-hIgG4P
AB6.12-hIgG4PE
Thể tích khối u (mm3)
Thời gian (Ngày)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
0
7
14
21
28
35
42
49
56

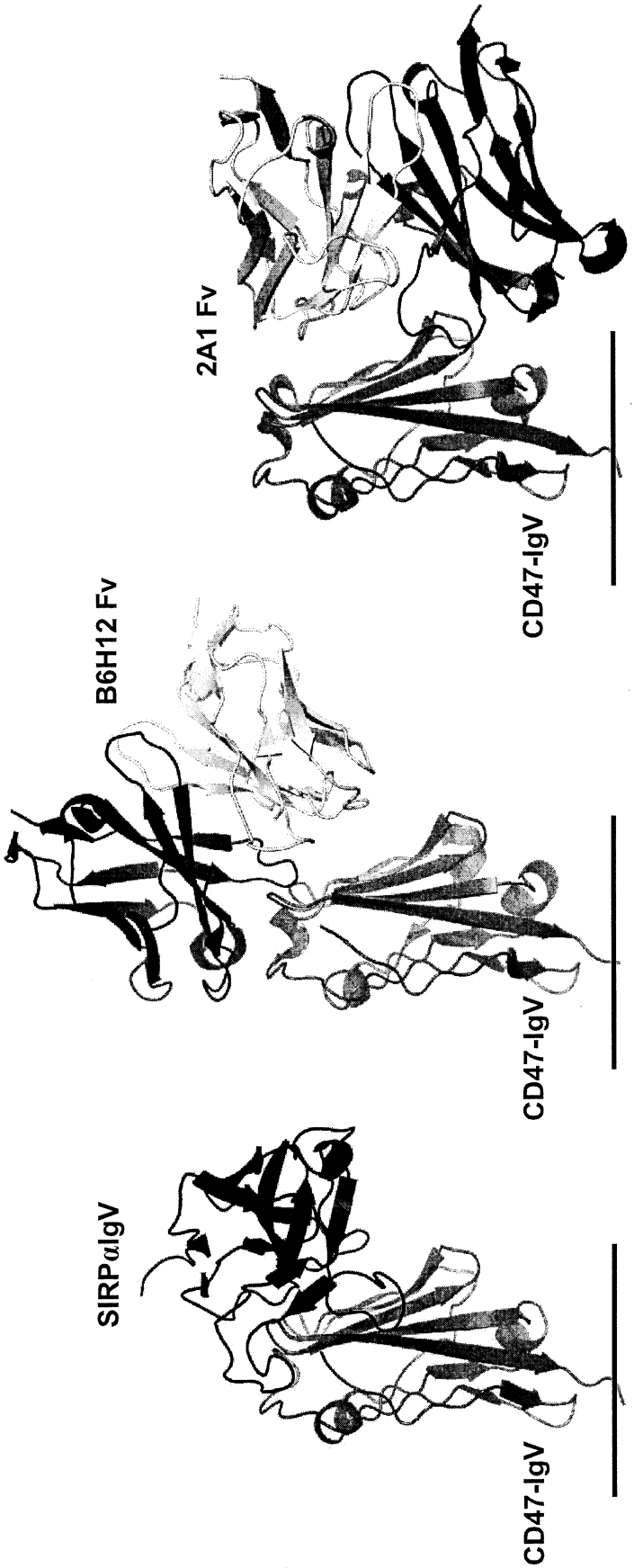


FIG. 11A

FIG. 11B

FIG. 11C