



(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)



1-0029478

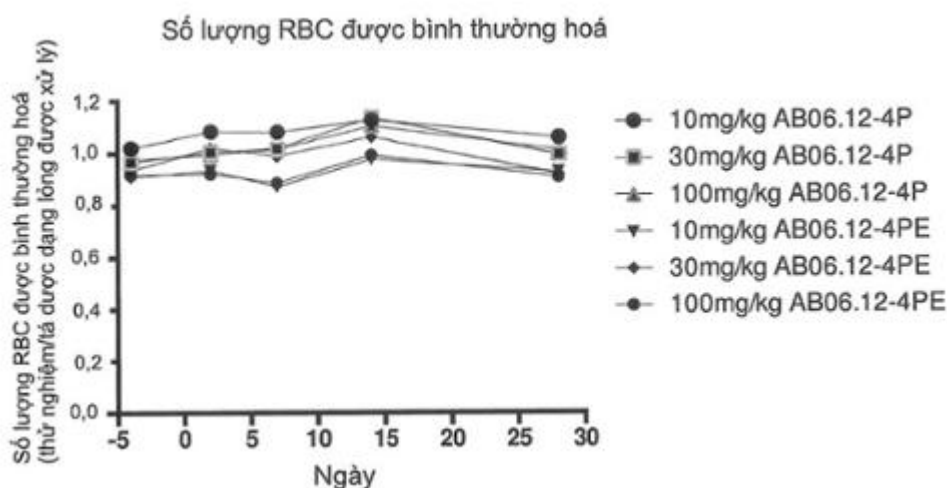
(51)<sup>7</sup> A61K 39/395

(13) B

- (21) 1-2015-03152 (22) 06/08/2013  
(86) PCT/US2013/053818 06/08/2013 (87) WO2014/123580 14/08/2014  
(30) 13/761,087 06/02/2013 US; PCT/US2013/024995 06/02/2013 US; 61/815,219  
23/04/2013 US  
(45) 25/09/2021 402 (43) 25/11/2015 332A  
(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); LAPPE, Mark (US).  
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

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

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể đơn dòng được phân lập gắn kết với CD47, cụ thể hơn là đề cập đến kháng thể CD47 mà không gây ra mức ngưng kết tế bào đáng kể, sự tan hồng huyết cầu, bệnh thiếu máu và/hoặc tan tiểu cầu, và được phẩm chứa chúng hữu hiệu trong điều trị.



### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Nói chung, sáng chế đề cập đến các kháng thể đơn dòng nhận biết CD47, cụ thể hơn là kháng thể CD47 mà không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể của hồng huyết cầu của người, sự tan hồng huyết cầu, bệnh thiếu máu và/hoặc tan tiểu cầu, phương pháp tạo ra các kháng thể này. Các kháng thể đơn dòng này là hữu hiệu để điều trị bệnh.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

CD47, còn được biết đến như là protein liên kết integrin (integrin-associated protein-IAP), kháng nguyên bệnh ung thư buồng trứng OA3, kháng nguyên liên quan đến Rh và MER6, là thụ thể xuyên màng đa khâu độ thuộc siêu họ globulin miễn dịch. Sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính CD47 có liên quan đến nhiều bệnh và rối loạn. Do đó, vẫn có nhu cầu đối với các liệu pháp điều trị mà hướng đích CD47. Ngoài ra, do sự biểu hiện của CD47 ở tiểu cầu, nên cũng có nhu cầu đối với các liệu pháp điều trị hướng đích CD47 (ví dụ, kháng thể) mà không gây ra mức tan tiểu cầu đáng kể, sự ngưng kết hồng cầu, tan hồng huyết cầu và/hoặc bệnh thiếu máu khi được dùng cho đối tượng.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng mà nhận biết và gắn 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, làm giảm, tạo đối kháng, làm trung hoà hoặc theo cách khác cản trở sự biểu hiện, hoạt tính và/hoặc truyền tín hiệu CD47 và các kháng thể này không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể của hồng huyết cầu của người, trong bản mô tả này còn được gọi là hồng cầu trưởng thành. Tuy nhiên, khả năng của các kháng thể theo sáng chế gắn kết CD47 trên bề mặt tế bào và không gây ra hiện tượng tạo cụm tế bào là không bị giới hạn ở hồng huyết cầu. Các kháng thể theo sáng chế gắn kết theo cách đơn nhất CD47 theo cách mà không thúc đẩy việc tạo cụm tế bào dương tính CD47.

Ngoài ra hoặc theo cách khác, các kháng thể theo sáng chế không gây ra sự tan tiểu cầu đáng kể khi dùng. Các kháng thể theo sáng chế và dẫn xuất của chúng có khả năng điều biến, ví dụ phong bế, ức chế, làm giảm, tạo đối kháng, làm trung hoà hoặc theo cách khác cản trở sự tương tác giữa CD47 và SIRP $\alpha$  (protein điều hoà tín hiệu  $\alpha$ ), và các kháng thể này không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể của hồng huyết cầu của người. Các kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này nói chung được gọi là “kháng thể CD47.” Kháng thể CD47 theo sáng chế cải thiện đáng kể so với các kháng thể CD47 hiện có mà gây ra sự ngưng kết hồng cầu của hồng huyết cầu của người (xem, ví dụ ấn phẩm: 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 cải thiện đáng kể so với kháng thể CD47 hiện có B6H12, BRC126, và CC2C6, mỗi trong số chúng phong bế SIRP $\alpha$ , nhưng gây ra sự ngưng kết hồng cầu của RBC, như được mô tả chi tiết dưới đây. Ví dụ, kháng thể CD47 theo sáng chế cải thiện đáng kể so với protein dung hợp SIRP $\alpha$ -Fc tạo ra ái lực mà, khi được dùng cho chuột và/hoặc khỉ cynomolgus, gây ra sự mất hồng huyết cầu và bệnh thiếu máu (xem ấn phẩm: Weiskopf et al. Engineered SIRP $\alpha$  Variants as Immunotherapeutic Adjuvants to Anticancer Antibodies. *Science* 2013; 341:88). Kháng thể IgG CD47 đầy đủ của sáng chế (ví dụ, 2A1 và dẫn xuất được làm giống người của nó bao gồm các dẫn xuất được nêu trong bảng 1) không gây ngưng kết tế bào ở mức đáng kể. Ví dụ, kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ngưng kết hồng cầu của hồng huyết cầu (RBC). Được mô tả trong bản mô tả này là kháng thể CD47 ở dạng IgG đầy đủ mà phong bế SIRP $\alpha$  và không gây ra mức ngưng kết và/hoặc tan tiểu cầu đáng kể. Ngoài ra, kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức tan RBC đáng kể và/hoặc bệnh thiếu máu.

Kháng thể CD47 theo sáng chế thể hiện nhiều đặc tính mong muốn, chẳng hạn như, nhưng không giới hạn ở, phong bế hiệu lực sự tương tác giữa CD47 và phối tử SIRP $\alpha$  của nó, mà không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể của hồng cầu, cũng như hoạt tính kháng khối u hiệu lực. 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 so với mức tương tác giữa CD47 và SIRPα với sự vắng 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 tế bào đáng kể, ví dụ, kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể của hồng huyết cầu. Trong một số trường hợp, mức ngưng kết tế bào đáng kể đề cập đến mức ngưng kết với sự có mặt của kháng thể CD47 đang tồn tại. Theo một khía cạnh, mức ngưng kết với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế được giảm 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 được giảm 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 đang tồn tại. 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 được giảm 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, mà bao gồm trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng/trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và trình tự vùng biến đổi của trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 80 và SEQ ID NO: 81. Tốt hơn là, kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức ngưng kết tế bào đáng kể ở nồng độ kháng thể nằm trong khoảng từ 10pM đến 10μM, ví dụ ở nồng độ kháng thể bằng 50pM, 100pM, 1nM, 10nM, 50nM, 100nM, 1μM, hoặc 5μM.

Theo một số phương án, mức tan RBC được xác định bằng cách đo số lượng RBC ở đối tượng sau khi dùng điều trị, ví dụ kháng thể theo sáng chế. Theo một số phương án, kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức tan RBC đáng kể nếu số lượng RBC ở đối tượng sau khi dùng kháng thể theo sáng chế nằm trong khoảng của đối tượng khỏe mạnh bình thường. Ví dụ, số lượng RBC đối với nam giới khỏe mạnh bình thường nằm trong khoảng từ 4,7 đến 6,1 triệu tế bào/microlit mẫu máu. Ví dụ, số

lượng RBC đối với nữ giới khoẻ mạnh bình thường nằm trong khoảng từ 4,2 đến 5,4 triệu tế bào/microlit mẫu máu. Theo một số phương án, kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức tan RBC đáng kể nếu số lượng RBC ở đối tượng sau khi dùng (5 phút, 10 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 2 ngày, 4 ngày, 6 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 1 tháng, 2 tháng, hoặc lâu hơn) kháng thể theo sáng chế bằng ít nhất 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, hoặc 99,5% số lượng RBC trước khi dùng. Theo cách khác hoặc ngoài ra, kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức tan RBC đáng kể nếu số lượng RBC ở đối tượng sau khi dùng (5 phút, 10 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 2 ngày, 4 ngày, 6 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 1 tháng, 2 tháng, hoặc lâu hơn) kháng thể theo sáng chế bằng ít nhất 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, hoặc 99,5% số lượng RBC ở đối tượng sau khi điều trị bằng giả dược (ví dụ, tá dược dạng lỏng). Số lượng RBC được xác định bằng các phương pháp tiêu chuẩn trong lĩnh vực này. Tốt hơn là, kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức tan RBC đáng kể ở nồng độ kháng thể nằm trong khoảng từ 10pM đến 10 $\mu$ M, ví dụ ở nồng độ kháng thể bằng 50pM, 100pM, 1nM, 10nM, 50nM, 100nM, 1 $\mu$ M, hoặc 5 $\mu$ M. Theo một số phương án, kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức tan RBC đáng kể khi được dùng ở liều lượng 0,1mg/kg, 0,5mg/kg, 1mg/kg, 2mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg, 15mg/kg, 20mg/kg, 25mg/kg, 30mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 100mg/kg, hoặc lớn hơn.

Kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức tan tiểu cầu đáng kể. Ví dụ, việc dùng kháng thể theo sáng chế dẫn đến tỷ lệ phần trăm tiểu cầu còn lại ít nhất 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 100%. Tốt hơn là, kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức tan tiểu cầu đáng kể ở nồng độ kháng thể nằm trong khoảng từ 10pM đến 10 $\mu$ M, ví dụ ở nồng độ kháng thể bằng 50pM, 100pM, 1nM, 10nM, 50nM, 100nM, 1 $\mu$ M, hoặc 5 $\mu$ M.

Ngoài ra, kháng thể CD47 theo sáng chế bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở kháng thể mà có ái lực gắn kết thấp với thụ thể Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R). Ví dụ, vùng cố định của kháng thể có ái lực gắn kết với Fc $\gamma$ R thấp hơn so với vùng cố định của kháng thể thuộc phân lớp như IgG1 (kiểu hoang hoặc đột biến), IgG4 (kiểu hoang hoặc đột biến, ví dụ, IgG4P).

Các kháng thể theo sáng chế cũng có hiệu lực cao hơn một cách đáng kể trong các mô hình khối u so với các kháng thể đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, khả năng của đại thực bào để thực bào tế bào khối u với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế được tăng 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 đại thực bào để thực bào tế bào khối u với sự có mặt của kháng thể CD47 hiện có.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng có thể định lượng, mà không cần có thử nghiệm quá mức, mức ngưng kết, ví dụ mức ngưng kết hồng cầu của RBC. Ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng mức ngưng kết hồng cầu được xác định bằng cách đo diện tích dấu 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 phần ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây. Trong một số trường hợp, diện tích dấu chấm RBC với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế được so với diện tích dấu chấm RBC với sự vắng mặt của kháng thể CD47, nghĩa là, với sự có mặt của ngưng kết hồng cầu zero. Theo cách này, sự ngưng kết hồng cầu được định lượng so với đối chứng đường cơ sở. Diện tích dấu chấm RBC lớn hơn tương ứng với mức ngưng kết hồng cầu cao hơn. Theo cách khác, mật độ dấu chấm RBC cũng có thể được sử dụng để định lượng ngưng kết hồng cầu.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng có thể định lượng, mà không cần phải thử nghiệm quá mức, mức tan RBC. Ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận biết rằng mức tan RBC được xác định, *ví dụ*, bằng cách đo số lượng RBC (*nghĩa là*, tổng số RBC trong mẫu máu), *ví dụ*, bằng cách sử dụng bộ đếm tế bào hoặc bộ đếm huyết cầu. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng RBC trong mẫu máu tùy ý có thể được phân lập bằng cách phân đoạn máu nguyên vẹn bằng cách sử dụng, *ví dụ*, sự ly tâm, trước khi đếm. Trong một số trường hợp, số lượng RBC với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế so với số lượng RBC với sự vắng mặt của kháng thể CD47, *nghĩa là*, với sự có mặt của sự tan RBC zero. Theo cách này, mức tan RBC được bình thường hoá so với đối chứng đường cơ sở.

Kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này là hữu ích trong điều trị, làm chậm tiến trình, ngăn ngừa sự tái phát hoặc làm nhẹ bớt triệu chứng của bệnh ung thư hoặc tình trạng bệnh tân tạo khác. Ví dụ, kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này là hữu ích để 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 ích trong điều trị khối u CD47+. Bằng cách ví dụ không hạn chế, kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này là hữu ích trong điều trị u lympho không Hodgkin (NHL), bệnh bạch cầu lympho cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu tuỷ cấp tính (AML), bệnh bạch cầu lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tuỷ mạn tính (CML), đa u tuỷ (MM), bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư bàng quang, khối u hắc tố, bệnh ung thư đại-trực tràng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư phổi, khối u cơ trơn, xacôm cơ trơn, khối u thần kinh đệm, u nguyên bào đệm và v.v. Các khối u rắn bao gồm, *ví dụ*, khối u vú, khối u buồng trứng, khối u phổi, khối u tuyến tụy, khối u tuyến tiền liệt, khối u hắc tố, khối u đại-trực tràng, khối u phổi, khối u đầu và cổ, khối u bàng quang, khối u thực quản, khối u gan và khối u thận.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh ung thư huyết học” dùng để chỉ bệnh ung thư máu và bao gồm bệnh bạch cầu, u lympho và u tuỷ trong số các bệnh khác. “Bệnh bạch cầu” dùng để chỉ bệnh ung thư máu trong đó quá nhiều tế bào bạch cầu mà không hữu hiệu trong việc chống lại sự lây nhiễm được tạo ra, do đó giảm bớt các thành phần khác mà tạo thành máu, như tiểu cầu và hồng huyết cầu. Cần hiểu rằng các trường hợp bệnh bạch cầu được phân loại là cấp tính hoặc mạn tính. Một số dạng bệnh bạch cầu bao gồm, bằng cách ví dụ không hạn chế, bệnh bạch cầu lympho cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu tuỷ cấp tính (AML), bệnh bạch cầu lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tuỷ mạn tính (CML); rối loạn tăng sinh tuỷ/khối u ung thư (MPDS); và hội chứng rối loạn sinh tuỷ. “U lympho” có thể dùng để chỉ u lympho Hodgkin, cả u lympho lympho không Hodgkin không đau và xâm lấn, u lympho Burkitt và u lympho có nang (tế bào nhỏ và tế bào lớn), trong số các bệnh khác. Bệnh u tuỷ có thể đề cập đến đa u tuỷ (MM), u tuỷ tế bào khổng lồ, u tuỷ chuỗi nặng và u tuỷ chuỗi nhẹ hoặc Bence-Jones.

Các kháng thể đơn dòng lấy làm ví dụ của sáng chế bao gồm, ví dụ, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này. Các kháng thể lấy làm ví dụ bao gồm các kháng thể có trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ SEQ ID NO: từ 5 đến 30 và trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ SEQ ID NO: từ 31 đến 47. Các kháng thể cũng bao gồm các kháng thể có trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng mà giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự được nêu trong ít nhất một trong số SEQ ID NO: từ 5 đến 30 và trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ mà giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự được nêu trong ít nhất một trong số SEQ ID NO: từ 31 đến 47. Tốt hơn là, các kháng thể nhận biết và gắn kết với CD47 của người và không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể của hồng huyết cầu của người. Các kháng thể này lần lượt được đề cập trong bản mô tả này là các kháng thể CD47. Kháng thể CD47 bao gồm kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người, cũng như kháng thể đơn dòng được làm giống người và kháng thể khảm. Các kháng thể này thể hiện tính đặc hiệu đối với CD47 của người và chúng đã được thể hiện để điều biến, *ví dụ*, phong bế, ức chế, làm giảm, tạo đối kháng, làm trung hoà hoặc theo cách khác cản trở sự biểu hiện, hoạt tính và/hoặc truyền tín hiệu CD47 mà không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể của hồng huyết cầu, sự tan hồng huyết cầu, bệnh thiếu máu và/hoặc tan tiểu cầu.

Kháng thể CD47 được đề xuất trong bản mô tả này thể hiện hoạt tính ức chế, ví dụ bằng cách ức chế sự biểu hiện CD47 (*ví dụ*, ức chế sự biểu hiện bề mặt tế bào của CD47), hoạt tính và/hoặc tạo tín hiệu hoặc bằng cách cản trở sự tương tác giữa CD47 và SIRP $\alpha$ . Các kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này làm giảm hoàn toàn hoặc một phần hoặc theo cách khác điều biến sự biểu hiện hoặc hoạt tính CD47 khi gắn kết với hoặc theo cách khác tương tác với, CD47, *ví dụ*, CD47 của người. Việc giảm hoặc điều biến chức năng sinh học của CD47 là hoàn toàn, đáng kể hoặc một phần nhờ sự tương tác giữa các kháng thể và polypeptit và/hoặc peptit CD47 của người. Các kháng thể được cho là ức chế một cách hoàn toàn sự biểu hiện hoặc hoạt tính CD47 khi mức biểu hiện hoặc hoạt tính CD47 với sự có mặt của kháng thể được giảm ít nhất 95%, *ví dụ*, giảm 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% so với mức biểu hiện hoặc hoạt tính CD47 khi không có sự tương tác, *ví dụ*, gắn kết với kháng thể được mô tả trong bản mô tả

này. Kháng thể CD47 được cho là ức chế một cách đáng kể sự biểu hiện hoặc hoạt tính CD47 khi mức biểu hiện hoặc hoạt tính CD47 với sự có mặt của kháng thể CD47 được giảm ít nhất 50%, *ví dụ*, 55%, 60%, 75%, 80%, 85% hoặc 90% so với mức biểu hiện hoặc hoạt tính CD47 khi không có sự gắn 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 CD47 khi mức biểu hiện hoặc hoạt tính CD47 với sự có mặt của kháng thể được giảm ít hơn 95%, *ví dụ*, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% hoặc 90% so với mức biểu hiện hoặc hoạt tính CD47 khi không có sự tương tác, *ví dụ*, gắn kết với kháng thể được mô tả trong bản mô tả này.

Kháng thể theo sáng chế cũng bao gồm các kháng thể đơn dòng mà gắn kết một cách đặc hiệu với CD47, trong đó kháng thể này không gây ra mức ngưng kết đáng kể, *ví dụ*, ngưng kết hồng cầu của hồng huyết cầu (“ngưng kết hồng cầu RBC”). Các kháng thể theo sáng chế gắn kết một cách đơn nhất CD47 theo cách mà không thúc đẩy việc tạo cụm tế bào dương tính CD47; tuy nhiên, khả năng các kháng thể theo sáng chế gắn kết CD47 trên bề mặt tế bào và không gây ra hiện tượng tạo cụm tế bào là không bị giới hạn ở hồng huyết cầu. Ngoài ra hoặc theo cách khác, các kháng thể theo sáng chế không gây ra ở mức độ đáng kể hiện tượng tan tiểu cầu, tan RBC và/hoặc bệnh thiếu máu.

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

Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng mà gắn kết với CD47 hoặc mảnh có hoạt tính về mặt miễn dịch của nó, trong đó kháng thể này không gây ra mức ngưng kết tế bào đáng kể sau khi dùng, *ví dụ*, kháng thể này không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể của hồng huyết cầu sau khi dùng. Ngoài ra hoặc theo cách khác, kháng thể hoặc mảnh của nó không gây ra mức tan tiểu cầu đáng kể. Theo một số phương án, kháng thể là khảm, được làm giống người hoặc hoàn toàn của người. Theo một số phương án, kháng thể gắn kết với CD47 của người. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh có hoạt tính về mặt miễn dịch của nó ngăn ngừa CD47 không tương tác với SIRP $\alpha$ . Các kháng thể được cho là ức chế một cách hoàn toàn sự tương tác của CD47

và SIRP $\alpha$  khi mức tương tác CD47/SIRP $\alpha$  với sự có mặt của kháng thể được giảm ít nhất 95%, *ví dụ*, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% so với mức tương tác CD47/SIRP $\alpha$  khi không có sự tương tác với kháng thể, *ví dụ*, gắn kết với kháng thể. Các kháng thể được cho là ức chế một phần sự tương tác CD47/SIRP $\alpha$  khi mức tương tác CD47/SIRP $\alpha$  với sự có mặt của kháng thể được giảm ít hơn 95%, *ví dụ*, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% hoặc 90% so với mức tương tác CD47/SIRP $\alpha$  khi không có sự tương tác với kháng thể, *ví dụ*, gắn kết với kháng thể.

Lượng kháng thể đủ để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư ở đối tượng là, ví dụ lượng mà đủ để làm giảm việc tạo tín hiệu CD47 (xem, *ví dụ* ấn phẩm: 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 and 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 ngăn ngừa bệnh ung thư ở đối tượng là lượng mà đủ để làm giảm tín hiệu ức chế thể thực bào trong đại thực bào được sinh ra bởi sự tương tác CD47/SIRP $\alpha$  trong trực tạo tín hiệu CD47/SIRP $\alpha$ , nghĩa là, kháng thể theo sáng chế thúc đẩy sự thực bào qua trung gian đại thực bào của tế bào biểu hiện CD47. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “được giảm” dùng để chỉ việc tạo tín hiệu giảm CD47 với sự có mặt của kháng thể theo sáng chế. Việc tạo tín hiệu qua trung gian CD47 được giảm khi mức tạo tín hiệu CD47 với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế là lớn hơn hoặc bằng 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99%, hoặc 100% nhỏ hơn mức đối chứng của việc tạo tín hiệu CD47 (*nghĩa là*, mức tạo tín hiệu CD47 với sự vắng mặt của kháng thể). Mức tạo tín hiệu CD47 được đo bằng cách sử dụng bất kỳ trong số nhiều kỹ thuật tiêu chuẩn như, bằng cách ví dụ không hạn chế, đo sự hoạt hoá gen xuôi dòng và/hoặc thử nghiệm thông báo luciferaza đáp ứng với sự hoạt hoá CD47. Người có hiểu biết trung

bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng mức tạo tín hiệu CD47 có thể được đo bằng cách sử dụng nhiều thử nghiệm, bao gồm ví dụ kit có bán sẵn trên thị trường.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh có hoạt tính về mặt miễn dịch của nó là isotyp IgG. Theo một số phương án, vùng cố định của kháng thể là của 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 ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)
```

Theo một số phương án, vùng cố định IgG1 của người được cải biến ở axit amin Asn297 (Boxed, Kabat Numbering) để ngăn ngừa sự glycosyl hoá của kháng thể, ví dụ Asn297Ala (N297A). Theo một số phương án, vùng cố định của kháng thể được cải biến ở axit amin Leu235 (Kabat Numbering) để làm thay đổi sự tương tác thụ thể Fc, ví dụ Leu235Glu (L235E) hoặc Leu235Ala (L235A). Theo một số phương án, vùng cố định của kháng thể được cải biến ở axit amin Leu234 (Kabat Numbering) để làm thay đổi các tương tác thụ thể Fc, ví dụ, Leu234Ala (L234A). Theo một số phương án, vùng cố định của kháng thể được thay đổi ở axit amin 234 và 235, ví dụ Leu234Ala và Leu235Ala (L234A/L235A) (chỉ số châu Âu của *Kabat et al* 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*).

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

```
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVNHHKPS NTKVDKTVET
KCCVECPPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC
```

KVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG  
 FYPSDISVEW ESNGQPENNY KTTTPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN  
 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 2)

Theo một số phương án, vùng cố định IgG2 của người được cải biến ở axit amin Asn297 (Boxed, Kabat Numbering) để ngăn ngừa sự glycosyl hoá của kháng thể, ví dụ, Asn297Ala (N297A).

Theo một số phương án, vùng cố 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 YNTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG  
 NIFSCSVMHE ALHNRFQTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 3)

Theo một số phương án, vùng cố định IgG3 của người được cải biến ở axit amin Asn297 (Boxed, Kabat Numbering) để ngăn ngừa sự glycosyl hoá của kháng thể, ví dụ, Asn297Ala (N297A). Theo một số phương án, vùng cố định IgG3 của người được cải biến ở axit amin 435 để kéo dài thời gian bán rã, ví dụ, Arg435His (R435H) (chỉ số châu Âu của *Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest*).

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

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVNHDHPS NTKVDKRVED  
 KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSDQED  
 PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK

CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GOPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK  
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG  
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 4)

Theo một số phương án, vùng cố định IgG4 của người được cải biến nằm trong vùng bản lề để ngăn ngừa hoặc làm giảm sự trao đổi sợi, ví dụ, Ser228Pro (S228P). Theo các phương án khác, vùng cố định IgG4 của người được cải biến ở axit amin 235 để làm thay đổi các tương tác thụ thể Fc, ví dụ, Leu235Glu (L235E). Theo một số phương án, vùng cố định IgG4 của người được cải biến nằm trong vùng bản lề và ở axit amin 235, ví dụ, Ser228Pro và Leu235Glu (S228P/L235E). Theo một số phương án, vùng cố định IgG4 của người được cải biến ở axit amin Asn297 (Kabat Numbering) để ngăn ngừa sự glycosyl hoá của kháng thể, ví dụ, Asn297Ala (N297A). Theo một số phương án của sáng chế, vùng cố định IgG4 của người được cải biến ở các vị trí axit amin Ser228, Leu235, và Asn297 (ví dụ, S228P/L235E/N297A). (EU index of Kabat *et al* 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*). Theo các phương án khác của sáng chế, kháng thể là phân lớp IgG4 của người và thiếu sự glycosyl hoá. Theo các phương án này, sự glycosyl hoá có thể được loại trừ bằng việc đột biến ở vị trí 297 (Kabat numbering), ví dụ N297A. Theo các phương án khác, sự glycosyl hoá có thể được loại trừ bằng việc tạo ra kháng thể ở tế bào chủ mà không có khả năng glycosyl hoá sau dịch mã, ví dụ hệ thu được từ vi khuẩn hoặc nấm men hoặc hệ biểu hiện tế bào động vật có vú được cải biến.

Theo một số phương án, vùng cố định IgG của người được cải biến để tăng cường việc gắn kết FcRn. Các ví dụ về các đột biến Fc mà tăng cường việc gắn kết với FcRn lần lượt là Met252Tyr, Ser254Thr, Thr256Glu (M252Y, S254T, T256E) (Kabat numbering, 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). (chỉ số châu Âu của Kabat *et al* 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*).

Theo một số phương án, vùng cố định IgG của người được cải biến để làm thay đổi tính độc 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*, các cải biến axit amin được mô tả trong ấn phẩm: 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 and Niwa, 2011 Biodrugs, 25(1):1-11.

Theo một số phương án, vùng cố định IgG của người được cải biến để cảm ứng sự heterodime hoá. Ví dụ, có sự cải biến axit amin nằm trong miền CH3 ở Thr366, mà khi được thay thế bằng axit amin lớn hơn, *ví dụ*, Try (T366W), có khả năng ghép cặp theo cách ưu tiên với miền CH3 thứ hai có các cải biến axit amin thành axit amin lớn ít hơn lần lượt ở các vị trí Thr366, Leu368, và Tyr407, *ví dụ*, Ser, Ala và Val (T366S/L368A/Y407V). Sự heterodime hoá qua các cải biến CH3 có thể được làm ổn định tiếp bằng việc đưa vào liên kết disulfua, ví dụ bằng cách làm thay đổi Ser354 thành Cys (S354C) và Y349 thành Cys (Y349C) trên các miền CH3 đối diện (Reviewed in Carter, 2001 Journal of Immunological Methods, 248: 7–15).

Theo các phương án khác của sáng chế, kháng thể thiếu sự glycosyl hoá, nhưng không được cải biến ở axit amin Asn297 (Kabat numbering). Theo các phương án này, sự glycosyl hoá có thể được loại trừ bằng việc tạo ra kháng thể ở tế bào chủ thiếu khả năng glycosyl hoá sau dịch mã, ví dụ hệ thu được từ vi khuẩn hoặc nấm men hoặc hệ biểu hiện tế bào động vật có vú được cải biến.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm mà bao gồm một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng mà gắn kết với CD47 hoặc mảnh có hoạt tính về mặt miễn dịch của nó, trong đó kháng thể này không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể của hồng huyết cầu sau khi dùng.

Sự ngưng kết hồng cầu là ví dụ về sự tương tác kiểu đối hình, trong đó hai tế bào biểu hiện CD47 là nguyên nhân gây ra sự ngưng kết hoặc tạo cụm khi được điều trị bằng thực thể gắn kết CD47 hoá trị hai. Khả năng của các kháng thể theo sáng chế

để gắn kết CD47 trên bề mặt tế bào và không gây ra hiện tượng tạo cụm tế bào là không bị giới hạn ở hồng huyết cầu. Các kháng thể theo sáng chế đã được quan sát gắn kết một cách đơn nhất CD47 theo cách mà không thúc đẩy việc tạo cụm dòng tế bào dương tính CD47, ví dụ, tế bào Daudi.

Trong một số trường hợp, kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: từ 5 đến 30. Kháng thể tùy ý bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: từ 31 đến 47. Trong một số trường hợp, kháng thể bao gồm vùng chuỗi VH được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: từ 5 đến 30 và vùng chuỗi VL được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: từ 31 đến 47. Các kháng thể theo sáng chế cũng bao gồm các kháng thể có trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng mà ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn giống với trình tự được nêu trong ít nhất một trong số SEQ ID NO: từ 5 đến 30 và trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ mà ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn giống với trình tự được nêu trong ít nhất một trong số SEQ ID NO: từ 31 đến 47. Theo khía cạnh khác, kháng thể bao gồm vùng VH được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 5, 7, 8, 11, từ 15 đến 17, từ 20 đến 22, và từ 27 đến 30 được tạo cặp với vùng VL được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: từ 31 đến 39, 42, 43, 44, và 47. Theo phương án khác, kháng thể bao gồm vùng VH được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 5, 7, 8, 11, 12, từ 15 đến 17, từ 20 đến 22, và từ 27 đến 30 được tạo cặp với vùng VL được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 31, 32, 35, 40, 41, 42, 43, 44, và 47. Theo khía cạnh khác nữa, kháng thể bao gồm tổ hợp của vùng chuỗi VH và vùng chuỗi VL được chọn từ tổ hợp được liệt kê trong bảng 1.

Theo một số phương án, kháng thể CD47 hoặc mảnh có hoạt tính về mặt miễn dịch của nó bao gồm trình tự vùng quyết định bổ trợ VH 1 (CDR1) 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, hoặc SEQ ID NO: 66, trình tự VH CDR2 được nêu 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 VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52 hoặc SEQ ID NO: 77, trình tự VL

CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 67, hoặc SEQ ID NO: 68, trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, hoặc SEQ ID NO: 71 và trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh có hoạt tính về mặt miễn dịch của nó bao gồm 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. Theo ví dụ khác, kháng thể hoặc mảnh có hoạt tính về mặt miễn dịch của nó bao gồm 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, 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.

Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế gắn kết với CD47 theo hướng từ phía đầu sang phía bên mà các vị trí chuỗi nặng gắn với màng của của tế bào biểu hiện CD47, trong khi chuỗi nhẹ bít kín vị trí gắn kết SIRP $\alpha$  trên CD47. Theo phương án khác, các kháng thể theo sáng chế gắn kết với CD47 theo hướng từ phía đầu sang phía bên mà các vị trí chuỗi nhẹ gắn với màng của của tế bào biểu hiện CD47, trong khi chuỗi nặng bít kín vị trí gắn kết SIRP $\alpha$  trên CD47.

Kháng thể CD47 gắn kết với epitop mà bao gồm bất kỳ một trong số các gốc axit amin từ 1 đến 116 của CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147 (*nghĩa là*, SEQ ID NO: 48 loại trừ trình tự tín hiệu (axit amin từ 1 đến 18)). Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế gắn kết với epitop mà bao gồm một hoặc nhiều trong số các 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 theo sáng chế gắn kết với epitop gián đoạn mà bao gồm một hoặc nhiều trong số các gốc axit amin Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44, R45, D46, I47, Y48, T49, F50, và D51 of CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế gắn kết với epitop gián đoạn 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 theo sáng chế gắn kết với epitop gián đoạn mà bao gồm ít nhất các gốc của vòng KGRD (SEQ ID NO: 56) (các gốc từ 43 đến 46) của CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế gắn kết với epitop gián đoạn mà bao gồm ít nhất các gốc Y37, K39, K41, vòng KGRD (SEQ ID NO: 56) (các gốc từ 43 đến 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 gắn kết với epitop gián đoạn mà bao gồm các gốc Y37, K39, K41, vòng KGRD (SEQ ID NO: 56) (các gốc từ 43 đến 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 chủ yếu có liên quan đến việc gắn kết với vòng KGRD (SEQ ID NO: 56) của CD47. Do đó, epitop đơn nhất mà kháng thể theo sáng chế gắn kết là ở phía CD47. Trái với kháng thể CD47 đang tồn tại đã biết trong lĩnh vực này, hướng của miền VH của kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này ở vị trí gần màng là dấu hiệu tới hạn của các kháng thể này mà ngăn ngừa việc tạo cụm tế bào, *ví dụ*, ngưng kết hồng cầu của hồng huyết cầu, bằng cách ép kháng thể sao cho chúng có thể không tạo cầu với các phân tử CD47 trên các tế bào liền kề. Ngoài ra, bởi vì miền VK của kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này tương tác với các gốc đỉnh như Y37, T102, và E104, mà có liên quan đến việc gắn kết SIRP $\alpha$ , chủ yếu là miền VK mà ngăn ngừa SIRP $\alpha$  gắn kết với CD47 về mặt vật lý.

Cũng được đề xuất là kháng thể được phân lập hoặc mảnh có hoạt tính về mặt miễn dịch của nó mà cạnh tranh với kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này để ngăn ngừa CD47 không tương tác với SIRP $\alpha$ .

Sáng chế đề xuất polypeptit bao gồm 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. Cũng được đề xuất là polypeptit bao gồm bất kỳ một trong số các gốc axit amin từ 1 đến 116 của CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147. Ví dụ, polypeptit bao gồm một hoặc nhiều trong số các 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. Cũng được đề xuất là các phương pháp sử dụng polypeptit này làm kháng nguyên, *ví dụ*, kháng nguyên mà gắn kết kháng thể CD47.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm nhẹ bớt triệu chứng của bệnh ung thư hoặc tình trạng bệnh khối u khác bằng cách cho đối tượng cần điều trị này dùng một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng mà gắn kết với CD47 hoặc mảnh có hoạt tính về mặt miễn dịch của nó, trong đó kháng thể này không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể của hồng huyết cầu, tan hồng huyết cầu, bệnh thiếu máu và/hoặc tan tiểu cầu sau khi dùng. Kháng thể được dùng với lượng đủ để làm nhẹ bớt triệu chứng của bệnh ung thư hoặc tình trạng bệnh khối u khác ở đối tượng. Theo một số phương án, đối tượng là con người. Theo một số phương án, kháng thể là khảm, được làm giống người hoặc hoàn toàn của người. Theo một số phương án, kháng thể gắn kết với CD47 của người. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh có hoạt tính về mặt miễn dịch của nó ngăn ngừa CD47 không tương tác với SIRP $\alpha$ . Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh có hoạt tính về mặt miễn dịch của nó là isotyp IgG được chọn từ nhóm gồm có isotyp IgG1, isotyp IgG2, isotyp IgG3 và isotyp IgG4. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh có hoạt tính về mặt miễn dịch của nó là isotyp IgG được chọn từ IgG4P và IgG4PE.

Theo một số phương án, kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều chất bổ sung hoặc tổ hợp của các chất bổ sung.

Các chất bổ sung thích hợp bao gồm được phẩm và/hoặc liệu pháp điều trị phẫu thuật hiện thời đối với ứng dụng định trước như, ví dụ bệnh ung thư. Ví dụ, kháng thể CD47 có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều chất hoá trị liệu bổ sung hoặc kháng khối u ung thư. Theo cách khác, chất hoá trị liệu bổ sung là liệu pháp điều trị phóng xạ. Theo một số phương án, chất hoá trị liệu là chất gây chết tế bào. Theo một số phương án, chất hoá trị liệu làm mất tính không đối xứng phospholipit qua màng huyết tương, ví dụ gây ra sự phơi trần bề mặt tế bào của phosphatidylserin (phosphatidylserine - PS). Theo một số phương án, chất hoá trị liệu gây ra ứng suất màng lưới nội chất (endoplasmic reticulum - ER). Theo một số phương án, chất hoá trị liệu là chất ức chế proteasom. Theo một số phương án, chất hoá trị liệu gây ra sự hoán vị của ER protein vào bề mặt tế bào. Theo một số phương án, chất hoá trị liệu gây ra sự hoán vị và sự phơi trần bề mặt tế bào của calreticulin.

Theo một số phương án, kháng thể CD47 và chất bổ sung được bào chế thành được phẩm điều trị đơn và kháng thể CD47 và chất bổ sung được dùng theo cách đồng thời. Theo cách khác, kháng thể CD47 và chất bổ sung được tách biệt với nhau, *ví dụ*, mỗi trong số chúng được bào chế thành được phẩm điều trị riêng biệt và kháng thể CD47 và chất bổ sung được dùng theo cách đồng thời hoặc kháng thể CD47 và chất bổ sung được dùng ở các thời điểm khác nhau trong chế độ điều trị. Ví dụ, kháng thể CD47 được dùng trước khi dùng chất bổ sung, kháng thể CD47 được dùng sau khi dùng chất bổ sung, hoặc kháng thể CD47 và chất bổ sung được dùng theo cách khác nhau. Như được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể CD47 và chất bổ sung được dùng trong các liều đơn hoặc đa liều.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ đánh giá cao rằng các kháng thể theo sáng chế có nhiều ứng dụng. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng làm chất điều trị, như thuốc thử trong kit chẩn đoán hoặc như công cụ chẩn đoán hoặc như thuốc thử trong thử nghiệm cạnh tranh để tạo ra các thuốc thử điều trị.

Patent và tài liệu khoa học được đề cập trong bản mô tả này thiết lập nên sự hiểu biết mà sẵn có đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Tất cả các patent Mỹ và đơn yêu cầu cấp patent Mỹ được công bố hoặc chưa được công bố được

trích dẫn trong bản mô tả này được đưa ra trong bản mô tả này để tham khảo. Tất cả các patent và đơn yêu cầu cấp patent nước ngoài được công bố được trích dẫn trong bản mô tả này được đưa ra trong bản mô tả này để tham khảo. Việc nộp lưu tại Ngân hàng gen và NCBI được chỉ định bởi số truy cập được trích dẫn trong đó được đưa ra trong bản mô tả này để tham khảo. Tất cả các tài liệu tham chiếu, tài liệu, bản viết tay và tài liệu khoa học được trích dẫn trong đó được đưa ra trong bản mô tả này để tham khảo.

Mặc dù sáng chế đã được thể hiện một cách cụ thể và được mô tả với việc tham chiếu đến các phương án được ưu tiên của nó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng các thay đổi khác nhau về dạng và chi tiết có thể được tạo ra trong đó mà không đi trệch khỏi phạm vi của sáng chế được bao hàm bởi yêu cầu bảo hộ kèm theo.

#### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1A là biểu đồ mô tả việc gắn kết của CD47 đối với tế bào Daudi bởi các kháng thể trong dịch nổi tế bào lai như được đánh giá bằng phương pháp đếm dòng tế bào. Fig.1B là biểu đồ thể hiện khả năng của một số kháng thể CD47 nằm trong dịch nổi tế bào lai để phong bế việc gắn kết của SIRP $\alpha$  tái tổ hợp của người với CD47 tái tổ hợp của người, như được xác định bằng ELISA.

Fig.2 là dãy biểu đồ mô tả (A) việc gắn kết của các kháng thể CD47 của chuột được tinh chế với tế bào Raji, dòng tế bào nguyên bào bạch huyết thu được từ u lympho Burkitt và (B) tế bào CCRF-CEM, dòng tế bào tương tự nguyên bào bạch huyết tế bào T dương tính CD47 của người, như được phân tích bằng phương pháp đếm dòng tế bào. Thử nghiệm này so sánh việc ức chế của các kháng thể của chuột của sáng chế với kháng thể CD47 có bán sẵn trên thị trường, B6H12 và 2D3.

Fig.3 là dãy biểu đồ mô tả khả năng của các kháng thể CD47 phong bế việc gắn kết SIRP $\alpha$  bằng cách sử dụng (A) ELISA với protein tái tổ hợp của người hoặc (B) bằng pháp đo dòng tế bào bằng cách sử dụng tế bào CCRF-CEM và SIRP $\alpha$  protein tái tổ hợp của người.

Fig.4 là dãy hình ảnh, biểu đồ và bảng mà thể hiện sự ngưng kết hồng cầu RBC bởi kháng thể CD47. Sự ngưng kết hồng cầu RBC được chứng minh bởi vẻ bề ngoài mờ trong giếng, trong khi RBC không ngưng kết xuất hiện như đám nhỏ. Fig.4A thể hiện rằng kháng thể 2A1 thể hiện không có sự ngưng kết hồng cầu ở tất cả các nồng độ được thử nghiệm. Chỉ số ngưng kết hồng cầu được mô tả trong biểu đồ. Fig.4B thể hiện rằng 2A1 là hiếm trong số nhiều kháng thể CD47 trong sự bất lực của nó để ngưng kết RBC. Việc thiếu hoạt tính ngưng kết theo phiên bản khám của người 2A1 (2A1-xi) cũng được thể hiện. Fig.4C thể hiện rằng kháng thể đơn dòng CD47 2D3, mà không phong bế SIRP $\alpha$ , không gây ra sự ngưng kết hồng cầu. Fig.4D thể hiện khoảng nồng độ ở mức cao của kháng thể CD47 trong thử nghiệm ngưng kết hồng cầu và chứng minh tác dụng trước vùng. Chỉ số ngưng kết hồng cầu được mô tả trong biểu đồ. Fig.4E chứng minh khoảng nồng độ hẹp hơn đối với sự ngưng kết hồng cầu bởi kháng thể CD47, 1B4, trong khi tác dụng này là không có mặt khi 2A1 gắn kết. Fig.4F thể hiện rằng 2A1, 2A1 (2A1-xi) khám và các biến thể được làm 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 là được sử dụng làm đối chứng dương tính đối với sự ngưng kết hồng cầu. Các kháng thể có bán sẵn trên thị trường khác được sử dụng trong thử nghiệm này là các kháng thể phong bế SIRP $\alpha$ , BRC126 và CC2C6, và kháng thể không phong bế SIRP $\alpha$ , 2D3.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện sự gắn kết 2A1 và B6H12 với tế bào B của khỉ cynomolgus (cyno) và Raji, như được đánh giá bằng phương pháp đếm dòng tế bào. 2A1 gắn kết CD47 của người và cyno với ái lực bằng nhau, như đối với B6H12, mặc dù với ái lực với CD47 của người và cyno CD47 thấp hơn so với 2A1.

Fig.6 là biểu đồ mô tả việc gắn kết của 2A1, 2A1-xi, và B6H12 với tế bào Raji, như được đánh giá bằng phương pháp đếm dòng tế bào. Quan trọng là, biểu đồ này thể hiện rằng trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) và nhẹ (VL) được giải thích một cách chính xác trong phiên bản khám của 2A1.

Các hình vẽ từ Fig.7A đến Fig.7J là dãy biểu đồ thể hiện sự gắn kết của các biến thể 2A1 của người với tế bào Raji. 2A1-xi được sử dụng làm đối chứng bên trong

đối với hầu hết các biểu đồ. Nhiều tổ hợp của các chuỗi nặng và nhẹ được thử nghiệm như được mô tả trong ví dụ 8.

Fig.8A là hình ảnh của vết từ sắc ký loại trừ theo kích thước bằng cách sử dụng AKTA FLPC với cột superdex200. Được thể hiện là các biến thể IgG1, IgG4P, và IgG4PE của kháng thể AB6.12. Tất cả ba biến thể là hơn 97% monome. Fig.8B là hình ảnh gel SDS-PAGE nhuộm xanh của nhiều biến thể được làm giống người của 2A1 trong các điều kiện ® giảm và (NR) không giảm.

Fig.9 là dãy biểu đồ mô tả khả năng của các kháng thể CD47 để thúc đẩy sự thực bào của các dòng tế bào khối u của người bằng các đại thực bào thu được từ bạch cầu đơn nhân của người (MDM). Fig.9A là biểu đồ thể hiện chỉ số thực bào, trong đó kháng thể được sử dụng là kháng thể thương mại B6H12, kháng thể 2A1 của người, kháng thể biến thể AB2.05 được làm giống người và kháng thể thương mại không phong bế 2D3. Fig.9B là biểu đồ thể hiện chỉ số thực bào, trong đó các kháng thể được sử dụng là kháng thể thương mại B6H12, kháng thể được làm giống người AB2.05 (IgG1 của người) và các biến thể IgG1, IgG4P, và IgG4PE của kháng thể được làm giống người AB6.12. Tế bào CCRF-CEM được sử dụng là dòng tế bào đích CD47 trong các thử nghiệm này.

Fig.10 là dãy biểu đồ thể hiện tác dụng kháng khối u của kháng thể CD47 trong mô hình khối u Raji. Fig.10A là biểu đồ mà thể hiện hiệu quả của các kháng thể của chuột 9E4, 1B4, 2A1, và kháng thể thương mại B6H12. Fig.10B là biểu đồ mà thể hiện hiệu quả của isotyp IgG1, IgG4P, và IgG4PE của kháng thể được làm giống người AB6.12, cùng với kháng thể 2A1 của chuột. Trong cả hai mô hình, chuột được điều trị bằng 200µg liều kháng thể ba lần một tuần.

Fig.11 là biểu đồ đại diện của phức hệ đồng tinh thể của CD47-IgV với miền SIRPα-IgV (A, (Protein Data Bank (PDB) số tham chiếu 2JJS), B6H12 (B), và 2A1 (C). 2A1 và B6H12 gắn kết theo các hướng rất khác nhau và các epitop khác biệt trên CD47, cả hai trong số chúng xếp chồng với vị trí gắn kết SIRPα. Kháng thể 2A1 gắn kết theo hướng từ phía đầu sang phía bên trên CD47 protein.

Fig.12 là dãy biểu đồ thể hiện hàm lượng tiểu cầu trong máu của khỉ cynomolgus sau khi dùng liều đơn (tá dược dạng lỏng, 10, 30, hoặc 100mg/kg) kháng thể CD47 của isotyp IgG1, IgG4P (ổn định bản lẻ: S228P), và IgG4PE (ổn định bản lẻ: S228P, và cả đột biến gắn kết FcγR giảm: L235E). Các biểu đồ ở cột phía bên trái (A, C, E, và G) là số lượng tiểu cầu trung bình trong máu nguyên vẹn theo thời gian. Các biểu đồ ở cột phía bên phải (B, D, F, và H) là tỷ lệ phần trăm trung bình của tiểu cầu còn lại theo thời gian được bình thường hoá đến số lượng tiểu cầu trước dùng liều (4 ngày trước khi tiêm) đối với mỗi khỉ.

Fig.13 là biểu đồ số lượng RBC trung bình từ khỉ cynomolgus được điều trị bằng kháng thể, được bình thường hoá đến số lượng RBC trung bình của khỉ được điều trị bằng tá dược dạng lỏng. Khỉ được điều trị bằng kháng thể được dùng các liều khác nhau của kháng thể AB06.12-IgG4P hoặc AB06.12-IgG4PE của sáng chế.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng mà gắn kết một cách đặc hiệu CD47, bao gồm CD47 của người. Các kháng thể này trong bản mô tả này được gọi chung là kháng thể CD47.

Chức năng phụ thuộc Fc sơ cấp của kháng thể đối với việc loại trừ tế bào đích là tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) được khởi đầu bằng cách gắn kết C1q vào vùng Fc; tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) qua trung gian bởi sự tương tác của vùng Fc với các thụ thể Fcγ (FcγRs), FcγRIIIa sơ cấp đối với tế bào thực hiện miễn dịch (ví dụ, tế bào NK và bạch cầu trung tính); và sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP) mà được thực hiện bởi các đại thực bào qua việc nhận biết tế bào đích opsin hóa qua FcγRI. phân lớp kháng thể có sự khác nhau về khả năng của chúng để qua trung gian hoạt tính tác quan phụ thuộc Fc. Ở người, các phân lớp IgG1 và IgG3 có hiệu lực ở mức cao đối với CDC do gắn kết C1q. Ngoài ra, phân lớp IgG1 có ái lực cao nhất đối với FcγRs và nhờ đó hiệu lực nhất khi xét đến ADCC và ADCP phụ thuộc Fc. Phân lớp IgG4 thiếu khả năng gắn kết C1q và giảm rất lớn ái lực gắn kết FcγR và nhờ đó có chức năng tác quan bị giảm một cách đáng kể.

CD47, thụ thể xuyên màng đa khâu độ thuộc siêu họ globulin miễn dịch, tương tác với SIRP $\alpha$  (protein điều hoà tín hiệu  $\alpha$ ) đối với đại thực bào và nhờ đó làm giảm sự thực bào. Tế bào ung thư mà đồng lựa chọn con đường này tránh khỏi sự thực bào. Như được mô tả chi tiết dưới đây, đây là cơ chế mới tránh sự miễn dịch khối u và CD47 tạo đích về mặt điều trị có ứng dụng lan rộng ở nhiều bệnh ung thư.

Sự biểu hiện của CD47 tương quan với các kết quả lâm sàng xấu hơn trong nhiều khối u ác tính bao gồm u lympho lympho không Hodgkin (NHL), bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu tủy cấp tính (AML), bệnh ung thư buồng trứng, khối u thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm, v.v. Ngoài ra, CD47 đã được nhận dạng như chất đánh dấu tế bào gốc ung thư trong 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 chứng minh hoạt tính kháng khối u trong nhiều mô hình khối u *in vivo*. Hơn nữa, các kháng thể này đã được chỉ ra là có tác dụng hiệp đồng với các kháng thể điều trị khác bao gồm Rituxan® và Herceptin® trong các mô hình khối u. Việc phong bế sự tương tác của CD47 với SIRP $\alpha$  có khả năng thúc đẩy sự thực bào của tế bào biểu hiện CD47 bởi đại thực bào (xem ấn phẩm: Chao et al., 2012 Curr Opin Immunol, 24(2): 225-32). Chuột thiếu CD47 kháng một cách rõ rệt với liệu pháp điều trị phóng xạ, cho thấy vai trò hướng đích CD47 kết hợp với liệu pháp điều trị phóng xạ (Isenberg et al., 2008 Am J Pathol, 173(4): 1100–1112; Maxhimer et al., 2009 Sci Transl Med, 1(3): 3ra7). Hơn nữa, mô hình khối u hiệp đồng ở các chuột này thể hiện sự di căn xương giảm so với chuột kiểu hoang (Uluçkan et al., 2009 Cancer Res, 69(7): 3196-204).

Quan trọng là, hầu hết các kháng thể CD47 đã được thông báo gây ra sự ngưng kết hồng cầu của hồng cầu của người cũng như tan hồng huyết cầu và bệnh thiếu máu. Sự ngưng kết hồng cầu là một ví dụ về sự tương tác đồng hình, trong đó hai tế bào biểu hiện CD47 gây ra sự ngưng kết hoặc tạo cụm khi được xử lý bằng thực thể gắn kết CD47 hoá trị hai. Ví dụ, kháng thể CD47, MABL, như IgG hoặc F(ab')<sub>2</sub> đầy đủ, đã

được thông báo gây ra sự ngưng kết hồng cầu của hồng cầu và, chỉ khi MABL được thay đổi thành scFv hoặc scFv hoá trị hai, là tác dụng này làm giảm. (xem ví dụ ấn phẩm: Uno S, Kinoshita Y, Azuma Y et al. Antitumor activity of a monoclonal antibody 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). Các kháng thể CD47 đã biết khác bao gồm B6H12, BRC126, và CC2C6 cũng gây ra sự ngưng kết hồng cầu của RBC, như được mô tả chi tiết dưới đây.

Ngoài ra, các kháng thể CD47 và protein dung hợp SIRP $\alpha$ -Fc tạo đối kháng CD47 đã được báo cáo gây ra sự tan hồng huyết cầu và bệnh thiếu máu khi được dùng cho chuột và/hoặc khỉ cynomolgus. (Xem ấn phẩm: Weiskopf et al. Engineered SIRP $\alpha$  Variants as Immunotherapeutic Adjuvants to Anticancer Antibodies. *Science* 2013; 341:88). Bệnh thiếu máu là tình trạng bệnh trong đó máu thiếu lượng đủ của hồng huyết cầu hoặc hemoglobin để mang oxy đến mô. Bệnh thiếu máu có thể được chẩn đoán bằng nhiều phương pháp thường đã được biết đến trong lĩnh vực này. Ví dụ, bệnh thiếu máu được chẩn đoán bằng cách xác định số lượng máu đầy đủ (CBC), mà xác định số lượng, kích cỡ, thể tích và hàm lượng hemoglobin của hồng huyết cầu. Bệnh thiếu máu cũng được chẩn đoán bằng cách đo hàm lượng sắt trong máu và/hoặc hàm lượng ferritin huyết thanh, mà là chất chỉ thị của tổng trữ lượng sắt của cơ thể. Ngoài ra, bệnh thiếu máu được chẩn đoán bằng cách đo hàm lượng vitamin B12 và folat, số lượng tế bào lưới và bilirubin.

Do đó, việc ngưng kết tế bào, tan RBC và bệnh thiếu máu là các giới hạn chính của CD47 hướng đích về mặt điều trị với kháng thể IgG đầy đủ đang tồn tại và/hoặc protein dung hợp SIRP $\alpha$ -Fc.

Hơn nữa, đặc điểm quan trọng của các kháng thể CD47 là khả năng phong bế sự tương tác của CD47 và SIRP $\alpha$  để thúc đẩy sự thực bào của tế bào biểu hiện CD47 bởi đại thực bào. Nhiều kháng thể CD47 đang tồn tại phong bế SIRP $\alpha$ ; tuy nhiên, trước sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, các kháng thể hiện có mà phong bế

SIRP $\alpha$  gây ra các tác dụng phụ ngưng kết hồng cầu, như được mô tả trên đây, 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 SIRP $\alpha$ , làm cho chúng không có hiệu quả trong việc thúc đẩy sự thực bào. Do đó, trước sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, có nhu cầu cấp thiết để nhận dạng kháng thể CD47 mà phong bế SIRP $\alpha$  mà không gây ra sự tạo cụm tế bào.

Kháng thể CD47 theo sáng chế tránh được tác dụng không mong muốn của ngưng kết hồng cầu, nhờ đó làm gia tăng hiệu quả của CD47 hướng đích về mặt điều trị và duy trì khả năng phong bế sự tương tác của CD47 với SIRP $\alpha$ , nhờ đó thúc đẩy sự thực bào của tế bào biểu hiện CD47. Cụ thể là, các kháng thể IgG CD47 đầy đủ của sáng chế (ví dụ, 2A1 và các dẫn xuất được làm giống người của nó bao gồm các dẫn xuất được nêu trong bảng 1) không ngưng kết tế bào ở mức đáng kể. Ví dụ, kháng thể CD47 theo sáng chế không ngưng kết hồng cầu RBC ở mức đáng kể. Được mô tả trong bản mô tả này thứ nhất là kháng thể CD47 ở dạng IgG đầy đủ mà phong bế SIRP $\alpha$  và không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể và/hoặc làm tan RBC. Cùng với nhau, các kháng thể theo sáng chế (ví dụ, kháng thể 2A1 và dẫn xuất được làm giống người của nó) là duy nhất trong số các kháng thể CD47 hiện có về khả năng của chúng trong việc phong bế SIRP $\alpha$ , nhưng không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể và/hoặc tan RBC.

Kháng thể CD47 theo sáng chế thể hiện nhiều đặc tính mong muốn, như, bằng cách ví dụ không hạn chế, phong bế tiềm năng sự tương tác giữa CD47 và phối tử SIRP $\alpha$  của nó, mà không gây ra mức đáng kể hoặc theo cách khác điều biến sự ngưng kết hồng cầu của hồng cầu, cũng như hoạt tính kháng khối u tiềm năng. 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 SIRP $\alpha$  như so với mức tương tác giữa CD47 và SIRP $\alpha$  với sự vắng 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 tế bào đáng kể, ví dụ, kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể của hồng huyết cầu. Ví dụ, mức ngưng kết với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng

chế được giảm 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 các 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 được giảm 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, mà bao gồm trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 80 và SEQ ID NO: 81. Kháng thể CD47 theo sáng chế không gây ra mức tan RBC đáng kể. Ví dụ, số lượng RBC ở đối tượng sau khi dùng (5 phút, 10 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 2 ngày, 4 ngày, 6 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 1 tháng, 2 tháng, hoặc lâu hơn) kháng thể theo sáng chế ít nhất 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5% số lượng RBC trước khi dùng. Theo cách khác hoặc ngoài ra, số lượng RBC ở đối tượng sau khi dùng (5 phút, 10 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 2 ngày, 4 ngày, 6 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 1 tháng, 2 tháng, hoặc lâu hơn) kháng thể theo sáng chế ít nhất 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5% số lượng RBC ở đối tượng sau khi điều trị bằng giả dược (ví dụ, tá dược dạng lỏng). Số lượng RBC được xác định bằng các phương pháp tiêu chuẩn trong lĩnh vực này. Các kháng thể theo sáng chế cũng có hiệu lực lớn hơn một cách đáng kể trong các mô hình khối u so với các kháng thể đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, khả năng của đại thực bào để thực bào tế bào khối u với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế được tăng 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 đại thực bào để thực bào tế bào khối u với sự có mặt của kháng thể CD47 hiện có.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận biết rằng có thể định lượng, mà không phải trải qua thử nghiệm quá mức, mức ngưng kết, *ví dụ*, mức ngưng kết hồng cầu của RBC. Ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận biết rằng mức ngưng kết hồng cầu được đánh giá bằng cách đo diện tích 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 ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây. Trong một số trường hợp, diện tích chấm RBC với sự có mặt của kháng thể CD47 theo sáng chế so với diện tích chấm RBC với sự vắng mặt của kháng thể CD47, *nghĩa là*, với sự có mặt của ngưng kết hồng cầu zero. Theo cách này, sự ngưng kết hồng cầu được định lượng so với đối chứng đường cơ sở. Diện tích chấm RBC lớn hơn tương ứng với mức ngưng kết hồng cầu cao hơn. Theo cách khác, mật độ chấm RBC cũng có thể được sử dụng để định lượng ngưng kết hồng cầu.

Ngoài ra, kháng thể như kháng thể CD47 theo sáng chế, có thể đóng vai trò trong sự tan tiểu cầu (*ví dụ*, theo cách phụ thuộc Fc) khi dùng. Ví dụ, việc điều trị khỉ cynomolgus bằng kháng thể thuộc phân lớp IgG1 mà gắn kết với CD47 có thể dẫn đến sự tan đáng kể tiểu cầu ở đa liều. Xem, *ví dụ*, Ví dụ 12 và Fig.12C đến Fig.12D. Bất lợi của sự tan tiểu cầu là ở chỗ, khi nguy kịch, nó có thể dẫn đến sự xuất huyết gây tử vong. Sáng chế riêng phần được dựa trên việc phát hiện bất ngờ rằng sự đột biến của kháng thể làm giảm sự gắn kết FcγR dẫn đến không thể phát hiện làm giảm mức tan tiểu cầu thậm chí ở liều cao (*ví dụ*, 100mg/kg). Xem, *ví dụ*, Ví dụ 12 và Fig.12G đến Fig.12H. Do đó, kháng thể gắn kết CD47 với sự giảm nghiêm trọng khả năng gắn kết FcγR và chức năng tác quan sẽ không dẫn đến sự tan tiểu cầu.

Số lượng tiểu cầu có thể được đo bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường thường đã được biết đến trong lĩnh vực này. Tỷ lệ phần trăm tiểu cầu còn lại theo thời gian có thể được tính toán như số lượng tiểu cầu còn lại tại thời điểm nhất định sau khi dùng liệu pháp điều trị của sáng chế (*ví dụ*, kháng thể CD47) được chuẩn hoá đến số lượng tiểu cầu (*ví dụ*, 1 giờ, 3 giờ, 6 giờ, 12 giờ, 1 ngày, 2, ngày, 4 ngày, 5, ngày, 6, ngày, hoặc lâu hơn) trước khi dùng liệu pháp điều trị. Sự tan tiểu cầu đáng kể có thể được xác định như tỷ lệ phần trăm tiểu cầu còn lại sau khi dùng ít hơn 100% (*ví dụ*, ít hơn 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, hoặc 10%). Các liệu pháp điều trị của sáng chế (*ví dụ*, kháng thể) dẫn đến mức tan tiểu cầu không đáng kể (*ví dụ*, tỷ lệ phần trăm tiểu cầu còn lại sau khi dùng ít nhất 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 100%). Kháng thể CD47 theo sáng chế gắn kết với CD47 của người và phong bế sự tương tác của nó với SIRPα (Fig.1B, Fig.3 và Fig.7J). Các kháng thể này không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể của hồng cầu của người

(Fig.4). Ngoài ra, các kháng thể này có thể có đặc tính không gây ra mức tan tiểu cầu đáng kể (ví dụ, Ví dụ 12 và Fig.12). Các kháng thể này có khả năng thúc đẩy sự thực bào của tế bào khối u bởi đại thực bào (Fig.9). Hơn nữa, kháng thể CD47 thể hiện hoạt tính kháng khối u hiệu lực trong mô hình chuột của u lympho của người (Fig.10). Do đó, kháng thể CD47 theo sáng chế phá vỡ nhân tố hạn chế chính đối với CD47 tạo đích điều trị. Do đó, kháng thể CD47 theo sáng chế được cho là quan trọng nhất trong việc điều trị nhiều bệnh ung thư.

Kháng thể theo sáng chế mà gắn kết một cách đặc hiệu CD47 của người, phong bế, ức chế, phá vỡ hoặc theo cách khác điều biến sự tương tác giữa CD47 của người và SIRP $\alpha$  của người, mà không gây ra mức đáng kể hoặc theo cách khác điều biến sự ngưng kết hồng cầu của hồng cầu.

Các kháng thể theo sáng chế gắn kết với CD47 epitop với hằng số gắn kết cân bằng ( $K_d$ )  $\leq 1\mu\text{M}$ , ví dụ,  $\leq 100\text{nM}$ , tốt hơn là  $\leq 10\text{nM}$ , và tốt hơn nữa là  $\leq 1\text{nM}$ . Ví dụ, kháng thể CD47 được đề xuất trong bản mô tả này thể hiện  $K_d$  nằm trong khoảng từ  $\leq 1\text{nM}$  đến  $1\text{pM}$ .

Kháng thể CD47 theo sáng chế có tác dụng điều biến, phong bế, ức chế, làm giảm, tạo đối kháng, làm trung hoà hoặc theo cách khác gây cản trở hoạt tính chức năng của CD47 được phân bố một cách rộng rãi. Các hoạt tính chức năng của CD47 bao gồm ví dụ, tạo tín hiệu qua sự tương tác với SIRP $\alpha$ , điều biến, ví dụ, làm gia tăng, nồng độ canxi nội bào khi tế bào dính bám với nền ngoại bào, tương tác với miền gắn kết tế bào đầu tận cùng C của thrombospondin, tương tác với fibrinogen, và tương tác với các integrin khác nhau. Ví dụ, kháng thể CD47 ức chế một cách hoàn toàn hoặc một phần hoạt tính chức năng CD47 bằng cách điều biến, phong bế, ức chế, làm giảm, tạo đối kháng, làm trung hoà một cách hoàn toàn hoặc một phần hoặc theo cách khác cản trở sự gắn kết của CD47 với SIRP $\alpha$ .

Kháng thể CD47 được xét đến điều biến, phong bế, ức chế, làm giảm, tạo đối kháng, làm trung hoà một cách hoàn toàn hoặc theo cách khác cản trở với hoạt tính chức năng của CD47 khi mức hoạt tính chức năng CD47 với sự có mặt của kháng thể CD47 được giảm ít nhất 95%, ví dụ, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% như so với mức

hoạt tính chức năng CD47 với sự vắng mặt của sự gắn kết với kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này. Kháng thể CD47 được xét đến phong bế, ức chế, làm giảm, tạo đối kháng, làm trung hoà một cách đáng kể hoặc theo cách khác cản trở hoạt tính chức năng CD47 khi mức hoạt tính CD47 với sự có mặt của kháng thể CD47 giảm ít nhất 50%, ví dụ, 55%, 60%, 75%, 80%, 85% hoặc 90% như so với mức hoạt tính CD47 với sự vắng mặt của sự gắn kết với kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này. Kháng thể CD47 được xét đến điều biến, phong bế, ức chế, làm giảm, tạo đối kháng, làm trung hoà một cách riêng phần hoặc theo cách khác gây cản trở cho hoạt tính chức năng CD47 khi mức hoạt tính CD47 với sự có mặt của kháng thể CD47 được giảm ít hơn 95%, ví dụ, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% hoặc 90% như so với mức hoạt tính CD47 với sự vắng mặt của sự gắn kết với kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này.

#### Định nghĩa

Trừ khi được định nghĩa theo cách khác, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng liên quan với sáng chế sẽ có các nghĩa mà được hiểu một cách thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Hơn nữa, trừ khi được đòi hỏi khác bởi sáng chế, các thuật ngữ số ít sẽ bao gồm số nhiều và thuật ngữ số nhiều sẽ bao gồm số ít. Thông thường, danh pháp được dùng liên quan đến và các kỹ thuật của nuôi cấy tế bào và nuôi cấy mô, sinh học phân tử và hoá học protein và oligo- hoặc polynucleotit và lai giống được mô tả trong bản mô tả này là danh pháp đã được biết đến và được sử dụng một cách thông thường trong lĩnh vực này. Các kỹ thuật tiêu chuẩn được sử dụng đối với ADN tái tổ hợp, tổng hợp oligonucleotit và nuôi cấy mô và biến nạp (ví dụ, đực lỗ bằng xung điện, chuyển nhiễm liposom). Các phản ứng enzym và kỹ thuật tinh chế được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất hoặc như được hoàn thành một cách thông thường trong lĩnh vực này hoặc như được mô tả trong bản mô tả này. Các kỹ thuật và quy trình trên đây thường được thực hiện theo các phương pháp thông thường đã được biết đến trong lĩnh vực này và như được mô tả trong các tài liệu tham chiếu chung khác nhau hoặc cụ thể hơn mà được trích dẫn và được mô tả trong bản mô tả này. Xem ví dụ ấn phẩm: 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 quy trình và kỹ thuật phòng thí nghiệm của, hoá học phân tích, hoá học hữu cơ tổng hợp và hoá học y tế và được phẩm được mô tả trong bản mô tả này là các danh pháp đã được biết đến và được sử dụng một cách thông thường trong lĩnh vực này. Các kỹ thuật tiêu chuẩn được sử dụng cho tổng hợp hoá học, phân tích hoá học, được phẩm, bào chế và phân phối và điều trị cho người bệnh.

Như được sử dụng trong 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 trong bản mô tả này, thuật ngữ CD47, protein liên kết integrin (IAP), kháng nguyên ung thư buồng trứng OA3, kháng nguyên liên quan đến Rh và MER6 là đồng nghĩa và có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Thuật ngữ (các) hồng huyết cầu và (các) hồng cầu là đồng nghĩa và được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này.

Thuật ngữ ngưng kết dùng để chỉ việc tạo cụm tế bào, trong khi thuật ngữ ngưng kết hồng cầu dùng để chỉ việc tạo cụm phân bộ tế bào cụ thể, nghĩa là, hồng huyết cầu. Do đó, sự ngưng kết hồng cầu là một kiểu ngưng kết.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể” dùng để chỉ các phân tử globulin miễn dịch và các phần có hoạt tính về mặt miễn dịch của các phân tử globulin miễn dịch (Ig), *nghĩa là*, các phân tử mà chứa vị trí gắn kết kháng nguyên mà gắn kết một cách đặc hiệu (phản ứng miễn dịch với) với kháng nguyên. Thuật ngữ “gắn kết một cách đặc hiệu” hoặc “phản ứng miễn dịch với” “hoặc định hướng kháng lại” có nghĩa là kháng thể phản ứng với một hoặc nhiều thể quyết định kháng nguyên của kháng nguyên mong muốn và không phản ứng với các polypeptit khác hoặc gắn kết ở ái lực thấp hơn nhiều ( $K_d > 10^{-6}$ ). Các kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dAb (kháng thể miễn) đa dòng, đơn dòng, khảm, chuỗi đơn, các mảnh Fab, Fab' và F(ab')<sub>2</sub>, F<sub>v</sub>, scFvs, và thư viện biểu hiện Fab.

Đơn vị cấu trúc kháng thể cơ bản là đã được biết đến bao gồm tetrame. Mỗi tetrame gồm có hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi cặp có một chuỗi “nhẹ”

(khoảng 25kDa) và một chuỗi “nặng” (khoảng từ 50 đến 70kDa). Phần đầu tận cùng amino của mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi khoảng từ 100 đến 110 axit amin hoặc nhiều hơn chủ yếu đáp ứng đối với việc nhận biết kháng nguyên. Phần đầu tận cùng carboxy của mỗi chuỗi xác định vùng cố định chủ yếu đáp ứng đối với chức năng thụ quan. Nói 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, mà khác với nhau bởi bản chất của chuỗi nặng có mặt trong phân tử. Một số lớp có phân lớp (cũng được biết đến là lớp kháng thể), như IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, và các lớp khác. Hơn nữa, ở người, chuỗi nhẹ có thể là chuỗi kappa hoặc chuỗi lambda.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” (MAb) hoặc “dược phẩm kháng thể đơn dòng”, như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ quần thể phân tử kháng thể mà chỉ chứa một loại phân tử của phân tử kháng thể gồm có sản phẩm gen chuỗi nhẹ đơn nhất và sản phẩm gen chuỗi nặng đơn nhất. Cụ thể là, các vùng quyết định bổ trợ (CDR) của kháng thể đơn dòng là giống nhau trong tất cả các phân tử của quần thể. Các MAb chứa vị trí gắn kết kháng nguyên có khả năng phản ứng miễn dịch với epitop cụ thể của kháng nguyên được đặc trưng bởi ái lực gắn kết đơn nhất đối với nó.

Nói chung, các phân tử kháng thể thu được từ người đề cập đến bất kỳ trong số các lớp IgG, IgM, IgA, IgE và IgD, mà khác nhau bởi bản chất của chuỗi nặng có mặt trong phân tử. Một số lớp có phân lớp, như IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> và các phân lớp khác. Hơn nữa, ở người, chuỗi nhẹ có thể là chuỗi kappa hoặc chuỗi lambda.

Thuật ngữ “vị trí gắn kết kháng nguyên” hoặc “phần gắn kết” dùng để chỉ phần của phân tử globulin miễn dịch mà tham gia vào gắn kết kháng nguyên. Vị trí gắn kết kháng nguyên được tạo thành bởi các gốc axit amin của các vùng biến đổi đầu cuối N (“V”) của các chuỗi nặng (“H”) và nhẹ (“L”). Ba sợi giãn phân kỳ ở mức cao nằm trong các vùng V của các chuỗi nặng và nhẹ, được dùng để chỉ “các vùng siêu biến” được can thiệp giữa nhiều các sợi kéo căng bên hông được bảo tồn nhiều hơn được biết là “vùng khung” hoặc “FR”. Do đó, thuật ngữ “FR” dùng để chỉ trình tự axit amin mà được tìm thấy tự nhiên giữa và liền kề với, các vùng siêu biến trong các 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 so với nhau trong không gian ba chiều để tạo thành bề mặt gắn kết kháng nguyên. Bề mặt gắn kết kháng nguyên là phần bù với bề mặt ba chiều của kháng nguyên được gắn kết và ba vùng siêu biến của mỗi trong số các chuỗi nặng và nhẹ được dùng để chỉ “vùng quyết định hỗ trợ” hoặc “CDR.” Việc gắn axit amin vào mỗi miền là theo sự định nghĩa của trình tự protein kabat quan tâm miễn dịch (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), hoặc Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia *et al.* Nature 342:878-883 (1989).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “epitop” bao gồm thể quyết định protein bất kỳ có khả năng gắn kết đặc hiệu với globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó hoặc thụ thể tế bào T. Thuật ngữ “epitop” bao gồm thể quyết định protein bất kỳ có khả năng gắn kết đặc hiệu với globulin miễn dịch hoặc thụ thể tế bào T. Các thể quyết định epitop thường gồm có bề mặt có hoạt tính về mặt hoá học tạo nhóm phân tử như axit amin hoặc chuỗi đường phụ và thường có các đặc điểm cấu trúc ba chiều đặc hiệu, cũng như các đặc tính mang điện cụ thể. Kháng thể được kể đến là gắn kết một cách đặc hiệu kháng nguyên khi hằng số phân ly  $\leq 1\mu\text{M}$ ; ví dụ,  $\leq 100\text{nM}$ , tốt hơn là  $\leq 10\text{nM}$  và tốt hơn nữa là  $\leq 1\text{nM}$ .

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “gắn kết miễn dịch” và “đặc tính gắn kết miễn dịch” dùng để chỉ các tương tác không cộng hoá trị thuộc loại mà xuất hiện giữa phân tử globulin miễn dịch và kháng nguyên mà đối với nó globulin miễn dịch là đặc hiệu. Cường độ hoặc ái lực của các tương tác gắn kết miễn dịch có thể được biểu hiện xét đến hằng số phân ly ( $K_d$ ) của tương tác, trong đó  $K_d$  nhỏ hơn thể hiện ái lực lớn hơn. Các đặc tính gắn kết miễn dịch của các polypeptit được chọn có thể được định lượng bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này. Một phương pháp cho phép đo tốc độ hình thành và phân ly phức hệ vị trí gắn kết kháng nguyên/kháng nguyên, trong đó tốc độ này phụ thuộc vào nồng độ của các thành phần của phức hệ, ái lực của sáng chế và các tham số hình học mà tác động theo cách cân bằng đến tốc độ theo cả hai hướng. Do đó, “hằng số tốc độ on” ( $k_{on}$ ) và “hằng số tốc độ off” ( $k_{off}$ ) có thể được xác định bằng việc tính toán nồng độ và tốc độ thực của sự kết hợp và phân ly. (Xem ấn phẩm: Nature 361:186-87 (1993)). Tỷ lệ của  $k_{off}/k_{on}$  cho phép việc huỷ bỏ tất cả các tham số liên quan đến ái lực và bằng với

hằng số phân ly  $K_d$ . (Xem ấn phẩm: Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Kháng thể theo sáng chế được kể đến gắn kết một cách đặc hiệu với CD47, khi hằng số gắn kết cân bằng ( $K_d$ )  $\leq 1\mu\text{M}$ , tốt hơn là  $\leq 100\text{nM}$ , tốt hơn nữa là  $\leq 10\text{nM}$  và tốt nhất là từ  $\leq 100\text{pM}$  đến  $1\text{pM}$ , như được đo bằng các thử nghiệm như thử nghiệm gắn kết phối tử phóng xạ, cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR), thử nghiệm gắn kết phương pháp đếm dòng tế bào hoặc các thử nghiệm tương tự đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ “polynucleotit được phân lập” như được sử dụng trong bản mô tả này sẽ có nghĩa là polynucleotit của ADN hỗ trợ hệ gen hoặc có nguồn gốc tổng hợp hoặc một số tổ hợp của chúng, mà bởi vì nguồn gốc của nó, “polynucleotit được phân lập” (1) không được kết hợp với tất cả hoặc một phần của polynucleotit trong đó “polynucleotit được phân lập” được tìm thấy trong tự nhiên, (2) được liên kết linh hoạt với polynucleotit mà nó không được liên kết trong tự nhiên hoặc (3) không xuất hiện trong tự nhiên như một phần của trình tự dẫn đầu.

Thuật ngữ “protein được phân lập” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là protein của ADN hỗ trợ, ARN tái tổ hợp hoặc có nguồn gốc tổng hợp hoặc một số tổ hợp của chúng, mà bởi vì nguồn gốc của nó hoặc nguồn bắt đầu, “protein được phân lập” (1) không được kết hợp với các protein được tìm thấy trong tự nhiên, (2) không chứa các protein khác từ cùng nguồn, *ví dụ*, không chứa protein hệ miễn dịch, (3) được biểu hiện bởi tế bào từ các loài khác nhau hoặc (4) không xuất hiện trong tự nhiên.

Thuật ngữ “polypeptit” được sử dụng trong bản mô tả này là thuật ngữ chung dùng để chỉ protein nguyên thể, các mảnh hoặc thể tương tự của trình tự polypeptit. Do đó, các mảnh protein nguyên thể và các thể tương tự là các loài thuộc chi polypeptit.

Thuật ngữ “xuất hiện tự nhiên” như được sử dụng trong bản mô tả này như 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 mà có mặt trong sinh vật (bao gồm các virus) mà có thể được phân lập từ nguồn trong tự nhiên và mà không được cải biến theo cách cố tình bởi con người trong phòng thí nghiệm hoặc theo cách khác xuất hiện tự nhiên.

Thuật ngữ “được liên kết linh hoạt” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ các vị trí của thành phần mà được mô tả là có mối quan hệ cho phép chúng thực hiện chức năng theo cách định trước của chúng. Trình tự đối chứng “được liên kết linh hoạt” với trình tự mã hoá được thất theo cách mà sự biểu hiện của trình tự mã hoá đạt được trong các điều kiện có thể tương thích với các trình tự đối chứng.

Thuật ngữ “trình tự đối chứng” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ các trình tự polynucleotit mà cần thiết tác động đến sự biểu hiện và xử lý của trình tự mã hoá mà chúng được thất. Bản chất của các trình tự đối chứng này khác nhau phụ thuộc vào sinh vật chủ trong sinh vật chưa có nhân chuẩn, các trình tự đối chứng này thường bao gồm gen khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom và trình tự kết thúc phiên mã trong sinh vật có nhân chuẩn, thông thường các trình tự đối chứng bao gồm các gen khởi đầu và trình tự kết thúc phiên mã. Thuật ngữ “trình tự đối chứng” được dự định để bao gồm, ở mức tối thiểu, tất cả các thành phần mà sự có mặt của chúng là thiết yếu cho sự biểu hiện và xử lý và cũng có thể bao gồm các thành phần bổ sung mà sự có mặt của chúng là có lợi, ví dụ, các trình tự dẫn đầu và trình tự đối tác dung hợp. Thuật ngữ “polynucleotit,” như được dùng trong bản mô tả này, đề cập đến bo polyme của nucleotit có chiều dài ít nhất 10 bazơ, ribonucleotit hoặc deoxynucleotit hoặc dạng được cải biến của loại nucleotit. Thuật ngữ này bao gồm các dạng sợi đơn và sợi kép của ADN.

Thuật ngữ “oligonucleotit” được đề cập đến trong bản mô tả này bao gồm các nucleotit xuất hiện tự nhiên và được cải biến được liên kết với nhau bởi các liên kết oligonucleotit xuất hiện trong tự nhiên và không xuất hiện trong tự nhiên. Oligonucleotit là tập hợp con của polynucleotit thường có chiều dài bao gồm 200 bazơ hoặc ít hơn. Tốt hơn là, các oligonucleotit có chiều dài nằm trong khoảng từ 10 đến 60 bazơ và tốt nhất là có chiều dài bằng 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc từ 20 đến 40 bazơ. Oligonucleotit thường là sợi đơn, *ví dụ*, đối với đầu dò, mặc dù oligonucleotit có thể là sợi đôi, *ví dụ*, để sử dụng trong việc tạo cấu trúc của đột biến gen. Oligonucleotit của sáng chế là các oligonucleotit có nghĩa hoặc đối nghĩa.

Thuật ngữ “nucleotit xuất hiện tự nhiên” được dùng để chỉ trong bản mô tả này bao gồm các deoxyribonucleotit và ribonucleotit. Thuật ngữ “nucleotit được cải biến” được dùng để chỉ trong bản mô tả này bao gồm các nucleotit với các nhóm đường được cải biến hoặc được thế và tương tự. Thuật ngữ “liên kết oligonucleotit” được đề cập đến trong bản mô tả này bao gồm các liên kết oligonucleotit như phosphorothioat, phosphorodithioat, phosphoroselenoat, phosphorodiselenoat, phosphoroanilothioat, phosphoraniladat, phosphoronmidat và tương tự. Xem ví dụ, ấn phẩm: 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.* Oligonucleotides 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 chất đánh dấu để phát hiện, nếu muốn.

Thuật ngữ “lai theo cách lựa chọn” được đề cập đến trong bản mô tả này có nghĩa là gắn kết có thể phát hiện và theo cách đặc hiệu. Polynucleotit, oligonucleotit và các mảnh của nó theo sáng chế lai theo cách lựa chọn với sợi axit nucleic trong các điều kiện lai và rửa mà làm giảm thiểu lượng đáng kể có thể phát hiện gắn kết với axit nucleic không đặc hiệu. Các điều kiện lai nghiêm ngặt có thể được sử dụng để đạt được các điều kiện lai chọn lọc như được biết đến trong lĩnh vực này và được mô tả trong bản mô tả này. Thông thường, mức tương đồng trình tự axit nucleic giữa các polynucleotit, oligonucleotit và các mảnh của sáng chế với trình tự axit nucleic quan tâm sẽ ít nhất là 80%, và thông thường hơn với mức tương đồng tăng tốt hơn là ít nhất là 85%, 90%, 95%, 99%, và 100%. Hai trình tự axit amin là tương đồng nếu có sự giống nhau riêng phần hoặc hoàn toàn giữa các trình tự của chúng. Ví dụ, mức tương đồng 85% có nghĩa là 85% axit amin giống nhau khi hai trình tự được căn thẳng hàng để khớp tối đa. Khoảng trống (trong hai trình tự được khớp) được phép tối đa hóa chiều dài khoảng trống khớp bằng 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 thu được từ chúng có chiều dài gồm ít nhất 30 axit amin) là tương đồng, do thuật ngữ này được sử dụng trong bản mô tả này, nếu chúng có điểm số căn thẳng hàng lớn hơn 5 (theo đơn vị độ lệch chuẩn) bằng cách sử dụng chương trình ALIGN

với ma trận dữ liệu đột biến và điểm phạt khoảng trống bằng 6 hoặc lớn hơn. Xem ấn phẩm: Dayhoff, M.O., in *Atlas of Protein Sequence and Structure*, pp. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) and Supplement 2 to this volume, pp. 1-10. Hai trình tự hoặc các phần của nó tốt hơn nữa là tương đồng nếu axit amin của chúng giống nhau 50% hoặc lớn hơn khi được căn thẳng hàng một cách tối ưu bằng cách sử dụng chương trình ALIGN. Thuật ngữ “tương ứng với” được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa rằng trình tự polynucleotit là tương đồng (*nghĩa là*, giống nhau, có liên quan về mặt tiến hoá không nghiêm ngặt) với toàn bộ hoặc một phần của trình tự polynucleotit tham chiếu hoặc trình tự polypeptit là giống với trình tự polypeptit tham chiếu. Ngược lại, thuật ngữ “bổ trợ cho” được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa rằng trình tự bổ trợ là tương đồng với toàn bộ hoặc một phần của trình tự polynucleotit tham chiếu. Để minh hoạ, trình tự nucleotit “TATAC” tương ứng với trình tự tham chiếu “TATAC” và bổ trợ cho 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 axit amin: “trình tự tham chiếu”, “cửa sổ so sánh”, “trình tự giống nhau”, “tỷ lệ phần trăm trình tự giống nhau”, và “hầu như giống nhau”. “Trình tự tham chiếu” là trình tự xác định được sử dụng làm cơ sở cho phép so sánh trình tự, trình tự tham chiếu có thể là phân bộ của trình tự lớn hơn, ví dụ, như đoạn ADN bổ trợ có chiều dài đầy đủ hoặc trình tự gen đã nêu trong danh mục trình tự hoặc có thể bao gồm ADN bổ trợ đầy đủ hoặc trình tự gen. Thông thường, trình tự tham chiếu có chiều dài ít nhất 18 nucleotit hoặc 6 axit amin, thường có chiều dài ít nhất 24 nucleotit hoặc 8 axit amin và thường có chiều dài ít nhất 48 nucleotit hoặc 16 axit amin. Do hai trình tự polynucleotit hoặc axit amin có thể mỗi trong số chúng (1) bao gồm trình tự (*nghĩa là*, một phần của trình tự polynucleotit đầy đủ hoặc axit amin) mà tương tự giữa hai phân tử và (2) còn có thể bao gồm trình tự khác nhau giữa hai polynucleotit hoặc các trình tự axit amin, so sánh trình tự giữa hai (hoặc nhiều) phân tử thường được thực hiện bằng cách so sánh các trình tự của hai phân tử qua “cửa sổ so sánh” để nhận dạng và so sánh các vùng cục bộ của trình tự tương tự. “Cửa sổ so sánh”, như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ đoạn khái niệm 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 với trình tự tham chiếu gồm ít nhất 18 nucleotit kế tiếp hoặc 6

trình tự axit amin và trong đó phần trình tự polynucleotit trong cửa sổ so sánh có thể bao gồm việc bổ sung, loại bớt, thay thế và tương tự (*nghĩa là*, khoảng trống) bằng 20% hoặc nhỏ hơn so với trình tự tham chiếu (mà không bao gồm việc bổ sung hoặc loại bớt) đối với sự cân bằng hàng tối ưu của hai trình tự. Sự cân bằng hàng tối ưu của các trình tự để cân bằng hàng cửa sổ so sánh có thể được thực hiện bằng thuật toán tương đồng cục bộ của Smith và Waterman Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), bằng thuật toán cân bằng hàng tương đồng của Needleman và Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), bằng việc tìm kiếm phương pháp tương tự của Pearson và Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444 (1988), bằng việc thực hiện các thuật toán này nhwof máy tính (GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA trong ấn phẩm: Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), gói phần mềm Geneworks, hoặc MacVector), hoặc bằng việc thẩm định và sự cân bằng hàng tốt nhất (*nghĩa là*, dẫn đến tỷ lệ phần trăm cao nhất của mức tương đồng so với cửa sổ so sánh) được sinh ra bằng các phương pháp khác nhau được chọn.

Thuật ngữ “trình tự giống nhau” có nghĩa là hai trình tự polynucleotit hoặc axit amin là giống nhau (*nghĩa là*, dựa trên nucleotit-theo-nucleotit hoặc gốc-theo-gốc) trong cửa sổ so sánh. Thuật ngữ “tỷ lệ phần trăm trình tự giống nhau” được tính toán bằng cách so sánh hai trình tự được cân bằng hàng theo cách tối ưu qua cửa sổ so sánh, xác định số vị trí mà ở đó bazơ axit nucleic giống nhau (*ví dụ*, A, T, C, G, U hoặc I) hoặc gốc xuất hiện trong cả hai trình tự để thu được số vị trí khớp, chia số vị trí khớp cho tổng số vị trí trong cửa sổ so sánh (*nghĩa là*, kích cỡ cửa sổ), và nhân kết quả này với 100 để thu được tỷ lệ phần trăm trình tự giống nhau. Thuật ngữ “hầu như giống nhau” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là đặc điểm của trình tự polynucleotit hoặc axit amin, trong đó polynucleotit hoặc axit amin bao gồm trình tự mà có ít nhất 85% trình tự giống nhau, tốt hơn là ít nhất từ 90 đến 95% trình tự giống nhau, thường hơn nữa là ít nhất 99% trình tự giống nhau so với trình tự tham chiếu qua cửa sổ so sánh của ít nhất 18 vị trí nucleotit (6 axit amin), thường qua cửa sổ gồm ít nhất từ 24 đến 48 vị trí nucleotit (từ 8 đến 16 axit amin), trong đó tỷ lệ phần trăm của trình tự giống nhau được tính toán bằng cách so sánh trình tự tham chiếu với trình tự mà có thể bao gồm việc loại bớt hoặc bổ sung mà tổng cộng 20% hoặc nhỏ hơn trình

tự tham chiếu qua cửa sổ so sánh. Trình tự tham chiếu có thể là phân bộ của trình tự lớn hơn.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, hai mươi axit amin thông thường và các từ viết tắt của chúng là như cách dùng thông thường. Xem ấn phẩm: Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland 7 Mass. (1991)). Chất đồng phân lập thể (ví dụ, D-axit amin) của hai mươi axit amin thông thường, axit amin không tự nhiên như axit amin được thế ở vị trí  $\alpha$ -,  $\alpha$ -, axit amin N-alkyl, axit lactic và các axit amin không thông thường khác có thể là các thành phần thích hợp đối với polypeptit của sáng chế. Các ví dụ về axit amin không thông thường bao gồm: 4-hydroxyprolin,  $\gamma$ -carboxyglutamat,  $\epsilon$ -N,N,N-trimetyllysin,  $\epsilon$ -N-axetyllysin, O-phosphoserin, N-axetylserin, N-formylmethionin, 3-methylhistidin, 5-hydroxylysin,  $\sigma$ -N-metylarginin và các axit amin tương tự khác và axit imin (ví dụ, 4-hydroxyprolin). Theo ký hiệu polypeptit được sử dụng trong bản mô tả này, hướng tay trái là hướng đầu tận cùng amino và hướng tay phải là hướng đầu tận cùng carboxy, theo sử dụng và quy ước tiêu chuẩn.

Tương tự, trừ khi có chỉ định khác, đầu cuối tay trái của trình tự polynucleotit sợi đơn là đầu 5', hướng tay trái của trình tự polynucleotit sợi đôi được dùng để chỉ hướng 5'. Hướng bổ sung thieu chiều từ 5' đến 3' của sản phẩm phiên mã ARN mới sinh được dùng để chỉ vùng trình tự hướng phiên mã trên sợi ADN có cùng trình tự như ARN và là đầu từ 5' đến 5' của sản phẩm phiên mã ARN được dùng để chỉ "trình tự ngược dòng", vùng trình tự trên sợi ADN có cùng trình tự như ARN và là đầu từ 3' đến 3' của sản phẩm phiên mã ARN được dùng để chỉ "trình tự xuôi dòng".

Như được áp dụng đối với polypeptit, thuật ngữ "hầu như giống nhau" có nghĩa rằng hai trình tự peptit, khi được căn thẳng hàng theo cách tối ưu, chẳng hạn như bằng chương trình GAP hoặc BESTFIT bằng cách sử dụng trọng số khoảng trống mặc định, có ít nhất 80% trình tự giống nhau, tốt hơn là ít nhất 90% trình tự giống nhau, tốt hơn nữa là ít nhất 95% trình tự giống nhau, và tốt nhất là ít nhất 99% trình tự giống nhau.

Tốt hơn là, các vị trí gốc mà không giống nhau khác nhau bởi sự thay thế axit amin bảo tồn.

Sự thay thế axit amin bảo tồn dùng để chỉ khả năng hoán đổi của các gốc có mạch bên tương tự. Ví dụ, nhóm axit amin có mạch bên béo là glyxin, alanin, valin, leucin và isoleucin; nhóm axit amin có mạch bên hydroxyl béo là serin và threonin; nhóm axit amin có mạch bên chứa amit là asparagin và glutamin; nhóm axit amin có mạch bên thơm là phenylalanin, tyrosin và tryptophan; nhóm axit amin có mạch bên bazơ là lysin, arginin và histidin; và nhóm axit amin có mạch bên chứa lưu huỳnh là xystein và methionin. Các nhóm thay thế axit amin bảo tồn được ưu tiên là: valin-leucin-isoleucin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin valin, glutamic-aspartic, và asparagin-glutamin.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các biến dị nhỏ trong trình tự axit amin của kháng thể hoặc phân tử globulin miễn dịch được dự định là được bao gồm bởi sáng chế, miễn là các biến dị 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 là, các thay thế axit amin bảo tồn được dự định. Các thay thế bảo tồn là các thay thế mà xảy ra trong họ axit amin mà có liên quan đến mạch bên của chúng. Axit amin được mã hoá về mặt di truyền thường được chia thành các họ: (1) axit amin có tính axit là aspartat, glutamat; (2) axit amin có tính bazơ là lysin, arginin, histidin; (3) các axit amin không cực là alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, phenylalanin, methionin, tryptophan, và (4) các axit amin có cực không mang điện tích là glycin, 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 kỵ nước bao gồm alanin, xystein, isoleucin, leucin, methionin, phenylalanin, prolin, tryptophan, tyrosin và valin. Các họ axit amin khác bao gồm (i) serin và threonin, mà là họ hydroxy béo; (ii) asparagin và glutamin, mà là họ chứa amit; (iii) alanin, valin, leucin và isoleucin, mà là họ béo; và (iv) phenylalanin, tryptophan, và tyrosin, mà là họ thơm. Ví dụ, có thể mong đợi rằng sự thay thế được phân lập của leucin bằng isoleucin hoặc valin, aspartat bằng glutamat, threonin bằng serin hoặc sự thay thế tương tự của axit amin bằng axit amin có liên quan về mặt cấu trúc sẽ không có tác dụng chính đối với việc gắn kết hoặc các đặc tính của phân tử thu được, đặc biệt là nếu sự thay thế không bao gồm axit amin nằm trong vị trí khung. Nếu sự thay đổi axit amin dẫn đến peptit chức năng có thể dễ dàng được xác định bằng cách thử nghiệm hoạt tính đặc hiệu của dẫn xuất polypeptit. Các thử

nghiệm được mô tả chi tiết trong bản mô tả này. Các mảnh hoặc thể tương tự của kháng thể hoặc phân tử globulin miễn dịch có thể được tạo ra bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các đầu tận cùng amino và carboxy được ưu tiên của các mảnh hoặc các thể tương tự xuất hiện gần đường biên của miền chức năng. Các miền cấu trúc và chức năng có thể được nhận dạng bằng việc so sánh các dữ liệu trình tự nucleotit và/hoặc axit amin với các dữ liệu trình tự công cộng hoặc độc quyền. Tốt hơn là, phương pháp so sánh nhờ máy tính được sử dụng để nhận dạng motif trình tự hoặc miền cấu trúc protein được dự đoán mà xuất hiện trong các protein khác của cấu trúc và/hoặc chức năng đã biết. Các phương pháp nhận dạng trình tự protein mà gấp thành cấu trúc ba chiều đã biết là đã được biết đến. Bowie *et al.* Science 253:164 (1991). Do đó, ví dụ trên đây chứng minh rằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể nhận biết motif trình tự và cấu trúc ba chiều mà có thể được sử dụng để xác định các miền cấu trúc và chức năng theo sáng chế.

Các thay thế axit amin được ưu tiên là các thay thế mà: (1) làm giảm tính nhạy với sự phân giải protein, (2) làm giảm tính nhạy với sự oxy hoá, (3) làm thay đổi ái lực gắn kết để tạo thành phức hệ protein, (4) làm thay đổi ái lực gắn kết và (4) tạo ra hoặc cải biến các đặc tính lý hoá hoặc chức năng khác của thể tương tự này. Thể tương tự có thể bao gồm nhiều mutein của trình tự khác với trình tự peptit xuất hiện tự nhiên. Ví dụ, một hoặc nhiều thay thế axit amin (tốt hơn là các thay thế axit amin bảo tồn) có thể được thực hiện trong trình tự xuất hiện tự nhiên (tốt hơn là trong phần polypeptit bên ngoài (các) miền tạo thành các tiếp xúc nội phân tử. Sự thay thế axit amin bảo tồn hầu như sẽ không làm thay đổi các đặc điểm cấu trúc của trình tự cha mẹ (ví dụ, axit amin thay thế sẽ không có xu hướng phá vỡ chuỗi xoắn mà xuất hiện trong trình tự cha mẹ hoặc phá vỡ kiểu cấu trúc bậc hai khác mà đặc trưng cho trình tự cha mẹ). Các ví dụ về cấu trúc bậc hai và bậc ba polypeptit được nhận biết trong lĩnh vực này được mô tả trong ấn phẩm: Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); and Thornton et al. Nature 354:105 (1991).

Thuật ngữ “mảnh polypeptit” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ polypeptit mà có sự loại bớt đầu tận cùng amino và/hoặc đầu tận cùng carboxy, nhưng trong đó trình tự axit amin còn lại là giống với các vị trí tương ứng trong trình tự xuất hiện tự nhiên được suy ra, ví dụ, từ trình tự ADN bổ trợ có chiều dài đầy đủ. Thông thường, các mảnh có chiều dài ít nhất 5, 6, 8 hoặc 10 axit amin, tốt hơn là có chiều dài ít nhất 14 axit amin, tốt hơn nữa là có chiều dài ít nhất 20 axit amin, thường là có chiều dài ít nhất 50 axit amin và thậm chí tốt hơn nữa là có chiều dài ít nhất 70 axit amin. Thuật ngữ “thể tương tự” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ polypeptit mà gồm có đoạn gồm ít nhất 25 axit amin mà hầu như giống với phần trình tự axit amin được suy ra và mà có sự gắn kết đặc hiệu với CD47, trong các điều kiện gắn kết thích hợp. Thông thường, thể tương tự polypeptit bao gồm sự thay thế axit amin bảo tồn (hoặc bổ sung hoặc loại bớt) so với trình tự xuất hiện tự nhiên. Thông thường, thể tương tự có chiều dài ít nhất 20 axit amin, tốt hơn là có chiều dài ít nhất 50 axit amin hoặc dài hơn và thường có thể dài như polypeptit xuất hiện tự nhiên có chiều dài đầy đủ.

Thể tương tự peptit thường được sử dụng trong ngành công nghiệp dược phẩm như dược chất không peptit với các đặc tính tương tự với các đặc tính của peptit mẫu. Các loại hợp chất không peptit này được gọi là “thể bắt chước peptit” hoặc “peptidomimetic”. Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986), Veber and Freidinger TINS p.392 (1985); và Evans *et al.* J. Med. Chem. 30:1229 (1987). Các hợp chất này thường được phát triển với sự trợ giúp của việc tạo mô hình phân tử nhờ máy tính. Các thể bắt chước peptit mà tương tự về mặt cấu trúc với các peptit hữu ích về mặt điều trị có thể được sử dụng để tạo ra hiệu quả điều trị hoặc phòng bệnh tương đương. Thông thường, các thể peptidomimetic tương tự về mặt cấu trúc với polypeptit mẫu (*nghĩa là*, polypeptit mà có đặc tính sinh hoá hoặc hoạt tính dược lý), như kháng thể của người, nhưng có một hoặc nhiều liên kết peptit tùy ý được thay thế bằng liên kết được chọn từ nhóm gồm có: --CH<sub>2</sub>NH--, --CH<sub>2</sub>S--, --CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>--, --CH=CH--(cis và trans), --COCH<sub>2</sub>--, CH(OH)CH<sub>2</sub>--, và -CH<sub>2</sub>SO--, bằng các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này. Sự thay thế có hệ thống của một hoặc nhiều axit amin của trình tự liên ứng bằng D-axit amin của cùng loại (*ví dụ*, D-lysin thay cho L-lysin) có thể được sử dụng để sinh ra các peptit ổn định hơn. Ngoài ra, các peptit không tự nhiên bao gồm

trình tự liên ứng hoặc sự thay đổi trình tự liên ứng hầu như giống nhau có thể được sinh ra bằng các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này (Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)); ví dụ, bằng việc bổ sung các gốc xystein bên trong có khả năng tạo thành cầu disulfua nội phân tử mà đóng vòng peptit.

Thuật ngữ “chất” được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là hợp chất hoá học, hỗn hợp gồm các hợp chất hoá học, đại phân tử sinh học, hoặc phân chiết được tạo ra từ vật liệu sinh học.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất đánh dấu” hoặc “được đánh dấu” dùng để chỉ sự hợp nhất của chất đánh dấu có thể phát hiện, *ví dụ*, bằng sự hợp nhất của axit amin được đánh dấu phóng xạ hoặc sự gắn vào polypeptit của các phần biotinyl mà có thể được phát hiện bởi avidin được đánh dấu (*ví dụ*, streptavidin chứa chất đánh dấu huỳnh quang hoặc hoạt tính enzym mà có thể được phát hiện bằng các phương pháp quang học hoặc phép đo nhiệt lượng). Trong một số trường hợp, chất đánh dấu hoặc vật ghi nhãn cũng có thể là chất điều trị. Các phương pháp khác nhau để đánh dấu polypeptit và glycoprotein là đã được biết đến trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng. Các ví dụ về chất đánh dấu đối với polypeptit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất sau đây: đồng vị phóng xạ hoặc nuclit phóng xạ (*ví dụ*,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), chất đánh dấu huỳnh quang (*ví dụ*, FITC, rhodamin, lanthanit phosphor), chất đánh dấu enzym (*ví dụ*, peroxidaza horseradish, p-galactosidaza, luciferaza, phosphataza kiềm), chất phát quang hóa học, các nhóm biotinyl, polypeptit epitop định trước được nhận dạng bằng chất thông báo thứ cấp (*ví dụ*, trình tự cặp khoá leucin, vị trí gắn kết đối với kháng thể thứ cấp, miền gắn kết kim loại, các nhãn epitop). Theo một số phương án, chất đánh dấu được gắn bởi nhánh đệm có chiều dài khác nhau để làm giảm sự cản trở trong không gian tiềm năng. Thuật ngữ “chất dùng trong dược phẩm hoặc dược chất” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ hợp chất hoá học hoặc chế phẩm có khả năng gây ra tác dụng điều trị mong muốn khi được dùng một cách đúng đắn cho người bệnh.

Thuật ngữ “chất chống ung thư” được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ chất mà có đặc tính chức năng ức chế sự phát triển hoặc sự tiến triển của khối u ung

thư ở người, cụ thể là thương tổn ác tính (ung thư), như bệnh ung thư biểu mô, xacôm, ung thư mô bạch huyết hoặc bệnh bạch cầu. Việc ức chế di căn thường là đặc tính của các chất chống ung thư.

Các thuật ngữ hoá học khác trong bản mô tả này được sử dụng theo cách sử dụng thông thường trong lĩnh vực này, như được minh hoạ bởi The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “hầu như tinh khiết” có nghĩa rằng các loại mục tiêu có mặt ở dạng các loại chiếm ưu thế (*nghĩa là*, tính theo số mol, nó có nhiều hơn so với các loại riêng rẽ khác bất kỳ trong chế phẩm), và tốt hơn là phân đoạn hầu như tinh khiết là chế phẩm trong đó các loại mục tiêu chiếm ít nhất khoảng 50% (trên cơ sở mol) của tất cả các loại phân tử lớn có mặt.

Thông thường, chế phẩm hầu như tinh khiết sẽ bao gồm nhiều hơn khoảng 80% tất cả các loại phân tử lớn có mặt trong chế phẩm, tốt hơn nữa là nhiều hơn khoảng 85%, 90%, 95%, và 99%. Tốt nhất là, các loại mục tiêu được tinh chế đến hầu như là đồng nhất (các loại tạp chất có thể không được phát hiện trong chế phẩm bằng các phương pháp phát hiện thông thường) trong đó chế phẩm bao gồm hầu như một loại phân tử lớn duy nhất.

#### Kháng thể CD47

Các kháng thể đơn dòng của sáng chế có khả năng gắn kết CD47, ức chế sự gắn kết của SIRPα với CD47, làm giảm việc tạo tín hiệu qua trung gian CD47-SIRPα, thúc đẩy sự thực bào và ức chế sự sinh trưởng của khối u và/hoặc sự di trú của khối u. Sự ức chế được xác định, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm tế bào được mô tả trong bản mô tả này trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Các kháng thể lấy làm ví dụ của sáng chế bao gồm kháng thể 2A1, phiên bản khả năng của 2A1, và các biến thể được làm giống người của 2A1. Các kháng thể lấy làm ví dụ của sáng chế bao gồm kháng thể có trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) được chọn từ SEQ ID NO: từ 5 đến 30 và có trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL)

được chọn từ SEQ ID NO: từ 31 đến 47. Cụ thể là, các kháng thể lấy làm ví dụ bao gồm các kháng thể được nêu trong bảng 1.

Bảng 1.

| Kháng thể | Vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) | Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (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 được bao gồm trong sáng chế là các kháng thể mà gắn kết với cùng epitop như kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế gắn kết một cách đặc hiệu với epitop mà bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin trên CD47 của người (xem *ví dụ*, số truy cập GenBank Q08722.1).

Trình tự axit amin của CD47 của người lấy làm ví dụ được nêu dưới đây (số truy cập GenBank Q08722.1 (GI:1171879), được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn). Trình tự tín hiệu (axit amin từ 1 đến 18) được gạch dưới.

1 mwplvaalll gsaccgsaql lfnktsvef tfcndtvvip cfvt nmeaqn  
ttevyvkwkf

61 kgrdiytf dg alnkstvptd fssakiev sq llkgdasl km dksdavsh t g  
nytcevtelt

121 regetiiek yrvvswf spn enilivif pi faillfwg qf giktlkyr sg  
gmdektiall

181 vaglvitviv ivgailfvpg eyslknat gl glivtstgil illhyyvfst  
aigltsfvia

241 ilviqviayi lavvglslci aacipmhgpl lisgl silal aqllglvymk  
fvasnqkti q

301 rkaveepl nafkeskgmm nde (SEQ ID NO: 48)

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

1 qllfnktsv eftfcndtvv ipc fvt nmea qnttevyvkw kfkgrdiytf  
dgalnkstv p

61 tdfssakiev sqllkgdasl kmdksdavsh tgnytcevt ltregetiie  
lkyrvvswfs

121 pnenilivif pifaillfwg qfgiktlkyr sggmdektia llvaglvitv  
ivivgailfv

181 pgeyslknat glglivtstg ilillhyvfv staigltsfv iailviqvia  
yilavvglsl

241 ciaacipmhg pllsglsil alaqlllglvy mkfvasnqkt iqpprkavee  
plnafkeskg

301 nde (SEQ ID NO: 147)

Trình tự axit amin của miền CD47-IgV của người được lấy làm ví dụ được nêu dưới đây:

19 qllfnktskv eftfcndtvv ipcfvtnmea qnttevyvkw kfkgrdiytf  
dgalnkstvp

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

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

Vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) của kháng thể CD47 được nêu dưới đây. Các vùng quyết định bổ trợ (CDR) của chuỗi VH của kháng thể CD47 được nêu rõ dưới đây. Theo một số phương án, trình tự axit amin của VH CDR1 là GFNIKDYLYH (SEQ ID NO: 50), GYTFTYLYLYH (SEQ ID NO: 57), GFTFTYLYLYH (SEQ ID NO: 58), GYNFTYLYLYH (SEQ ID NO: 59), GYTITYLYLYH (SEQ ID NO: 60), GYTFTKYLYLYH (SEQ ID NO: 61), GYTFTDYLYLYH (SEQ ID NO: 62), GFTFTDYLYLYH (SEQ ID NO: 63), GFTITDYLYLYH (SEQ ID NO: 64), GYTFTKDYYLYH (SEQ ID NO: 65), hoặc

GFTFKDYLLH (SEQ ID NO: 66). Theo một số phương án, trình tự axit amin của VH CDR2 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 VH CDR3 là NAAYGSSSYPM DY (SEQ ID NO: 52) hoặc NAAYGSSPYPM DY (SEQ ID NO: 77).

EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPDNGDT  
EFAPKFKQKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGTSTV  
TV (SEQ ID NO: 5)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFN IKDYLLHWVQQAPGKGLEWMGWIDPDNGDT  
EYAEKFKQGRVTITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 6)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSC KASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 7)

EVQLVQSGAEVKKTGSSVKVSC KASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 8)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSC KASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQGRVTMTADTSSNTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 9)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSC KASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQGRVTMTEDTSTD TAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 10)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSC KASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDQGD T  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSED TAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 11)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDYGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 12)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDSGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 13)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNADT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 14)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNTDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 15)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSPYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 16)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCASGYTFTYYYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 17)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCASGFTFTYYYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 18)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCASGYNFTYYYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 19)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCASGYTTITYYYYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 20)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFKYYYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 21)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFTDY LHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 22)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFTFTDY LHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 23)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFTITDY LHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 24)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 25)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFTFKDY LHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 26)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDY LHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYLQLSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 27)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDY LHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLTSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 28)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDY LHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDT  
EYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGT TV  
TV (SEQ ID NO: 29)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYYLHWVQQAPGKGLEWMGWIDPDNGDT  
EYAKQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMQDYWGQGT  
TV (SEQ ID NO: 30)

Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể CD47 được nêu dưới đây. Các CDR của chuỗi VL của kháng thể CD47 được nêu rõ dưới đây. Theo một số phương án, trình tự axit amin của VL CDR1 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 VL CDR2 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 VL CDR3 là LQYDEFPTY (SEQ ID NO: 55).

DIKMTQSPSSLYASLGERTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKSPKILYRANRLVDGV  
PSRFGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPTYTFGGGTKLEMK (SEQ ID  
NO: 31)

DIKMTQSPSSLYASLGERTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKSPKILYRANRLVDGV  
PSRFGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPTYTFGGGTKLEIK (SEQ ID  
NO: 32)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWYQQKPGKAPKLLIYRANRLVDGV  
PSRFGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAITYYCLQYDEFPTYTFGGGTKVEIK (SEQ ID  
NO: 33)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGV  
PSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPTYTFGGGTKVEIK (SEQ ID  
NO: 34)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLYRANRLVDGV  
PSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPTYTFGGGTKVEIK (SEQ ID  
NO: 35)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCKASQDIHRYLSWYQQKPGKAPKRLIYRANRLVDGV  
 PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID  
 NO: 36)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQDIHRYLAWYQQKPGKVPKLLIYRANRLQSGV  
 PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLQYDEFPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID  
 NO: 37)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHRYLAWYQQKPGQAPRLIYRANRRATGI  
 PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCLQYDEFPYTFGQGTRLEIK (SEQ ID  
 NO: 38)

DIQMTQSPSAMSASVGDRVTTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLYRANRLVDGV  
 PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID  
 NO: 39)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKHLYRANRLVDGV  
 PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID  
 NO: 40)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKILIYRANRLVDGV  
 PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID  
 NO: 41)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLYRANRLVSGV  
 PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID  
 NO: 42)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKILIYRANRLVDGV  
 PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID  
 NO: 43)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKHLYRANRLVSGV  
 PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID  
 NO: 44)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVDGV  
PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPTYTFGGGTKVEIK (SEQ ID  
NO: 45)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVSGV  
PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPTYTFGGGTKVEIK (SEQ ID  
NO: 46)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVSGV  
PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPTYTFGGGTKVEIK (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 chọn từ SEQ ID NO: từ 5 đến 30 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ SEQ ID NO: từ 31 đến 47. Kháng thể CD47 lấy làm ví dụ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 31; vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 35; vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 11 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 42, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 32, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 33, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 34, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 36, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 37, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 38, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 29 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 35, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 30 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 35, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 43,

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 11 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 43, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 11 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 47, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 15 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 43, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 15 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 44, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 11 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 44, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 22 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 35, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 39, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 8 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 39, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 16 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 35, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 20 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 35, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 21 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 35, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 17 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 35, vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 28 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 35, hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 27 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 35.

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

Kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này bao gồm bất kỳ trong số các vùng VH CDR1 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 trong số các vùng VH CDR2 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 trong số các vùng VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52 và SEQ ID NO: 77, bất kỳ trong số các vùng VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 67, và SEQ ID NO: 68, bất kỳ trong số các vùng VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, và SEQ ID NO: 71, và vùng VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận biết rằng có thể xác định, mà không phải qua thử nghiệm quá mức, liệu kháng thể đơn dòng có cùng tính đặc hiệu như kháng thể đơn dòng của sáng chế (ví dụ, kháng thể 2A1 hoặc kháng thể có trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ SEQ ID NO: từ 5 đến 31 và trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ SEQ ID NO: từ 31 đến 47) hay không bằng cách đánh giá xem liệu trình tự trước có ngăn ngừa trình tự sau gắn kết với CD47 hay không. Nếu kháng thể đơn dòng được thử nghiệm cạnh tranh với kháng thể đơn dòng của sáng chế, như được thể hiện bởi sự giảm gắn kết bởi kháng thể đơn dòng của sáng chế, thì hai kháng thể đơn dòng này gắn kết với cùng epitop hoặc có quan hệ chặt chẽ.

Phương pháp khác để xác định xem liệu kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu của kháng thể đơn dòng của sáng chế hay không là ủ sơ bộ kháng thể đơn dòng của sáng chế với CD47 protein có thể hoà tan (mà nó thường phản ứng), và sau đó thêm kháng thể đơn dòng được thử nghiệm để xác định liệu khả năng gắn kết CD47 của kháng thể đơn dòng được thử nghiệm có được ức chế hay không. Nếu kháng thể đơn dòng được thử nghiệm được ức chế, thì rất có thể, nó có cùng tính đặc hiệu epitop hoặc tương đương về mặt chức năng với kháng thể đơn dòng của sáng chế.

#### Kháng thể theo sáng chế

Việc sàng lọc kháng thể đơn dòng của sáng chế, cũng có thể được thực hiện, ví

du, bằng cách đo việc tạo tín hiệu qua trung gian CD47- và/hoặc CD47/SIRP $\alpha$  và xác định xem liệu kháng thể đơn dòng thử nghiệm có khả năng điều biến, phong bế, ức chế, làm giảm, tạo đối kháng, làm trung hoà hoặc theo cách khác cản trở việc tạo tín hiệu qua trung gian CD47- và/hoặc CD47/SIRP $\alpha$  hay không. Các thử nghiệm này có thể bao gồm các thử nghiệm gắn kết cạnh tranh. Ngoài ra, các thử nghiệm này có thể đo dữ liệu được phục hồi sinh học, 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 được biết đến trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể đơn dòng được định hướng kháng CD47, hoặc kháng dẫn xuất, mảnh, thể tương đương tương tự hoặc trực giao của nó. (Xem, ví dụ ấn phẩm: Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, và Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Các kháng thể của người hoàn toàn là các phân tử kháng thể trong đó toàn bộ trình tự của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, bao gồm các CDR, xuất hiện từ gen người. Các kháng thể này được gọi là “kháng thể của người” hoặc “kháng thể của người hoàn toàn” trong bản mô tả này. Các kháng thể đơn dòng của người được tạo ra, ví dụ, bằng cách sử dụng các quy trình được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây. Các kháng thể đơn dòng của người cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật trioma; kỹ thuật lai tế bào B của người (xem ấn phẩm: Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4: 72); và kỹ thuật lai EBV để tạo ra kháng thể đơn dòng của người (xem ấn phẩm: Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Kháng thể đơn dòng của người có thể được sử dụng và có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các thể lai của người (xem ấn phẩm: Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) hoặc bằng cách biến nạp tế bào B của người với Epstein Barr Virus *in vitro* (xem ấn phẩm: Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Các kháng thể được tinh chế bằng các kỹ thuật đã được biết đến, như sắc ký ái lực bằng cách sử dụng protein A hoặc protein G, mà chủ yếu tạo ra phân đoạn IgG của huyết thanh miễn dịch. Tiếp theo hoặc theo cách khác, kháng nguyên đặc hiệu mà là đích của globulin miễn dịch được tìm kiếm hoặc epitop của nó, có thể được cố định

vào cột để tinh chế kháng thể đặc hiệu miễn dịch bằng sắc ký ái lực miễn dịch. Việc tinh chế globulin miễn dịch được mô tả, ví dụ, bởi 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 mà điều biến, phong bế, ức chế, làm giảm, tạo đối kháng, làm trung hoà hoặc theo cách khác cản trở việc tạo tín hiệu tế bào qua trung gian CD47- và/hoặc CD47/SIRPα được sinh ra, ví dụ, bằng cách gây miễn dịch động vật với màng được gắn kết và/hoặc CD47 có thể hoà tan, như ví dụ, CD47 của người hoặc mảnh miễn dịch, dẫn xuất hoặc biến thể của nó. Theo cách khác, động vật được gây miễn dịch với tế bào được truyền nhiễm với vật truyền chứa phân tử axit nucleic mã hoá CD47 sao cho CD47 được biểu hiện và được kết hợp với bề mặt của tế bào bị truyền nhiễm. Theo cách khác, kháng thể thu được bằng cách sàng lọc thư viện mà chứa kháng thể hoặc trình tự miễn gắn kết kháng nguyên để gắn kết với CD47. Thư viện này được tạo ra, ví dụ, trong thể thực khuẩn như protein hoặc peptit dung hợp với protein bao ngoài thể thực khuẩn mà được biểu hiện trên bề mặt của hạt thực khuẩn được lắp ráp và mã hoá trình tự ADN được chứa trong hạt thực khuẩn (*nghĩa là*, “thư viện thể hiện thể thực khuẩn”). Các thể lai thu được từ các dung hợp u tủy/tế bào B sau đó được sàng lọc theo khả năng phản ứng với CD47.

Các kháng thể đơn dòng được tạo ra, ví dụ, bằng cách 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, chuột hamster hoặc động vật chủ thích hợp khác, thường được gây miễn dịch với chất gây miễn dịch để gây ra tế bào bạch huyết mà tạo ra hoặc có khả năng tạo ra kháng thể mà sẽ gắn kết một cách đặc hiệu với chất gây miễn dịch. Theo cách khác, tế bào bạch huyết có thể được gây miễn dịch *in vitro*.

Thông thường, chất gây miễn dịch sẽ bao gồm kháng nguyên protein, mảnh của nó hoặc protein dung hợp của nó. Thông thường, tế bào bạch huyết máu ngoại vi được sử dụng nếu tế bào có nguồn gốc từ người được mong muốn hoặc tế bào lá lách hoặc tế bào hạch bạch huyết được sử dụng nếu các nguồn động vật có vú không phải con

người được mong muốn. Sau đó, tế bào bạch huyết được dung hợp với dòng tế bào được làm bất tử bằng cách sử dụng chất dung hợp thích hợp, như polyetylen glycol, để tạo thành tế bào lai (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Các dòng tế bào được làm bất tử thường là tế bào động vật có vú được biến nạp, cụ thể là tế bào u tủy có nguồn gốc từ chuột, bò và con người. Thông thường, dòng tế bào u tủy của chuột nhắt hoặc chuột cống được sử dụng. Tế bào lai có thể được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy thích hợp mà tốt hơn là chứa một hoặc nhiều chất mà ức chế sự sinh trưởng hoặc sự sống của tế bào được cố định không được dung hợp. Ví dụ, nếu tế bào cha mẹ thiếu enzym hypoxanthin guanin phosphoribosyl transferaza (HGPRT hoặc HPRT), môi trường nuôi cấy đối với thể lai sẽ thường bao gồm hypoxanthin, aminopterin, và thymidin (“môi trường HAT”), là các chất ngăn ngừa sự sinh trưởng của tế bào thiếu hụt HGPRT.

Dòng tế bào đã được cố định được ưu tiên là các dòng tế bào mà dung hợp một cách hữu hiệu, hỗ trợ sự biểu hiện ở mức cao ổn định của kháng thể bởi tế bào tạo ra kháng thể được chọn và nhạy với môi trường như môi trường HAT. Dòng tế bào được cố định được ưu tiên hơn là dòng tế bào lai của chuột, mà có thể thu được, ví dụ, từ Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California and the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Các dòng tế bào u tủy của người và u tủy khác loại của chuột-người cũng đã được mô tả đối với việc tạo ra kháng thể đơn dòng. (Xem ấn phẩm: Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63)).

Môi trường nuôi cấy trong đó tế bào lai được nuôi cấy sau đó có thể được thử nghiệm đối với sự có mặt của các kháng thể đơn dòng được định hướng kháng kháng nguyên. Tốt hơn là, tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể đơn dòng được tạo ra bằng tế bào lai được xác định bằng sự kết tủa miễn dịch hoặc bằng thử nghiệm gắn kết *in vitro*, như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA). Các kỹ thuật và thử nghiệm này là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Ái lực gắn kết của kháng thể đơn dòng có thể, ví dụ, được xác định bằng phân tích Scatchard của Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980). Hơn nữa,

các ứng dụng điều trị của các kháng thể đơn dòng, là quan trọng để nhận dạng kháng thể có mức đặc hiệu cao và ái lực gắn kết cao đối với kháng nguyên đích.

Sau khi tế bào lai mong muốn được nhận dạng, các đơn dòng có thể được tạo dòng phụ bằng các quy trình pha loãng giới hạn và được sinh trưởng bằng các phương pháp tiêu chuẩn. (Xem ấn phẩm: Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Môi trường nuôi cấy thích hợp đối với mục đích này bao gồm, ví dụ, môi trường eagle được cải biến Dulbecco và môi trường RPMI-1640. Theo cách khác, tế bào lai có thể được sinh trưởng *in vivo* như dịch cổ trướng ở động vật có vú.

Các kháng thể đơn dòng được tiết bởi các dòng phụ có thể được phân lập hoặc được tinh chế từ môi trường nuôi cấy hoặc dịch cổ trướng bằng các quy trình tinh chế globulin miễn dịch thông thường như, ví dụ, protein A-Sepharosa, sắc ký hydroxylapatit, điện di gel, thẩm tách hoặc sắc ký ái lực.

Các kháng thể đơn dòng cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp ADN tái tổ hợp, như các phương pháp được mô tả trong patent Mỹ số 4,816,567. ADN mã hoá kháng thể đơn dòng của sáng chế có thể được phân lập một cách dễ dàng và được đọc trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (*ví dụ*, bằng cách sử dụng các đầu dò oligonucleotit mà có khả năng gắn kết một cách đặc hiệu với gen mã hoá các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể của loài gặm nhấm). Các tế bào lai của sáng chế có tác dụng làm nguồn được ưu tiên của ADN này. Khi được phân lập, ADN có thể được đặt vào trong vật truyền biểu hiện, mà sau đó được chuyển nhiễm vào tế bào chủ như tế bào buồng trứng chuột túi má Trung quốc (CHO), tế bào phôi thận của người (HEK) 293, tế bào COS của khỉ, PER.C6®, tế bào NS0, SP2/0, YB2/0, hoặc tế bào lai mà theo cách khác không tạo ra protein globulin miễn dịch, để thu được việc tổng hợp kháng thể đơn dòng ở tế bào chủ tái tổ hợp. ADN cũng có thể được cải biến, ví dụ, bằng cách thay thế trình tự mã hoá đối với miền cố định trên chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người thay cho trình tự tương đồng của loài gặm nhấm (xem patent Mỹ số 4,816,567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)) hoặc kết hợp theo cách cộng hoá trị với trình tự mã hoá globulin miễn dịch tất cả hoặc một phần trình tự mã hoá đối với

polypeptit không phải globulin miễn dịch. Polypeptit không phải globulin miễn dịch có thể được thể đối với các miền cố định của kháng thể theo sáng chế, hoặc có thể được thể đối với các miền biến đổi của một vị trí tổ hợp kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế để tạo ra kháng thể khảm hoá trị hai.

#### Kháng thể của người và việc làm giống người của kháng thể

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

Kháng thể CD47 được sinh ra, ví dụ, bằng cách sử dụng các quy trình được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế được nêu dưới đây. Ví dụ, các kháng thể CD47 theo sáng chế được nhận dạng bằng cách sử dụng chiến lược gây miễn dịch RIMMS được cải biến (Repetitive Immunization Multiple Sites) ở chuột và tiếp theo sinh ra thể lai.

Theo phương pháp thay thế khác, kháng thể CD47 được phát triển, ví dụ, bằng cách sử dụng phương pháp thể hiện thể thực khuẩn bằng cách sử dụng các kháng thể chỉ chứa trình tự của người. Các phương pháp này là đã được biết đến trong lĩnh vực này, ví dụ, trong công bố đơn quốc tế số WO92/01047 và patent Mỹ số 6,521,404. Trong phương pháp này, thư viện tổ hợp của thể thực khuẩn mang các cặp ngẫu nhiên của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được sàng lọc bằng cách sử dụng nguồn tự nhiên hoặc tái tổ hợp của cd47 hoặc các mảnh của nó. Theo phương pháp khác, kháng thể CD47 có thể được tạo ra bằng quy trình trong đó ít nhất một bước của quy trình bao gồm việc gây miễn dịch động vật chuyển gen không phải con người với CD47 protein của người. Trong phương pháp này, một số trong số các locus của chuỗi nặng nội sinh và/hoặc chuỗi nhẹ kapa của động vật ngoại sinh không phải người đã được vô hiệu và không có khả năng sắp xếp lại được đòi hỏi để sinh ra gen mã hoá globulin miễn dịch đáp ứng với kháng nguyên. Ngoài ra, ít nhất một locus chuỗi nặng của người và ít nhất một locus chuỗi nhẹ của người đã được chuyển nhiễm một cách ổn định vào trong động vật. Do đó, để đáp ứng với kháng nguyên được dùng, việc sắp xếp lại locus của

người để tạo ra gen mã hoá các vùng biến đổi của người đặc hiệu miễn dịch đối với kháng nguyên. Do đó, khi gây miễn dịch, chuột ngoại sinh tạo ra tế bào B mà tiết globulin miễn dịch hoàn toàn của người.

Nhiều kỹ thuật là đã được biết đến trong lĩnh vực này để tạo ra động vật ngoại sinh không phải 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 việc sinh ra các chủng XenoMouse™ thứ nhất như được công bố vào năm 1994. Xem ấn phẩm: Green *et al.* Nature Genetics 7:13-21 (1994). Cũng xem các patent Mỹ số 6,162,963; 6,150,584; 6,114,598; 6,075,181; và 5,939,598 và patent Nhật bản 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 đơn quốc tế số WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 và các đơn liên quan cùng họ đơn.

Theo phương pháp khác, phương pháp sử dụng “locus nhỏ” trong đó locus Ig ngoại sinh là được bắt chước qua thể vùi của các mẫu (các gen riêng rẽ) từ locus Ig. Do đó, một hoặc nhiều gen V<sub>H</sub>, một hoặc nhiều gen D<sub>H</sub>, một hoặc nhiều gen J<sub>H</sub>, vùng cố định mu và vùng cố định thứ hai (tốt hơn là vùng cố định gamma) được tạo thành vào trong cấu trúc để cài xen vào trong 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 đơn 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 đơn liên quan cùng họ.

Việc sinh ra kháng thể của người từ chuột trong đó, thông qua việc dung hợp vi tế bào, mẫu lớn của nhiễm sắc thể hoặc toàn bộ nhiễm sắc thể, đã được đưa vào, cũng đã được chứng minh. Xem đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số 773 288 và 843 961.

Các đáp ứng kháng thể của người kháng chuột (HAMA) đã dẫn đến ngành công nghiệp tạo ra các kháng thể khảm hoặc theo cách khác được làm giống người. Trong khi các kháng thể khảm có vùng cố định của người và vùng biến đổi miễn dịch, sẽ được mong đợi rằng một số đáp ứng kháng thể của người kháng khảm (HACA) sẽ

được quan sát, cụ thể là trong các ứng dụng liều mạn tính hoặc đa liều của kháng thể. Do đó, sẽ mong muốn tạo ra kháng thể hoàn toàn của người kháng CD47 để làm mất hiệu lực hoặc theo cách khác làm giảm sự liên quan và/hoặc tác dụng của đáp ứng HAMA hoặc HACA.

Việc tạo ra kháng thể với tính gây miễn dịch giảm cũng được hoàn thành qua việc làm giống người, khảm và kỹ thuật thể hiện bằng cách sử dụng các thư viện thích hợp. Sẽ được đánh giá cao rằng các kháng thể của chuột hoặc các kháng thể từ các loài khác có thể được làm giống người hoặc được linh trưởng hoá bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã được biết đến trong lĩnh vực này. Xem ví dụ ấn phẩm: Winter và Harris *Immunol Today* 14:43 46 (1993) và Wright *et al.* *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992). Kháng thể quan tâm có thể được thiết kế bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp để thay thế CH1, CH2, CH3, miền bản lề và/hoặc miền khung với trình tự tương ứng của người (xem công bố quốc tế số WO 92102190 và 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 ADN bổ trợ Ig để tạo cấu trúc gen globulin miễn dịch khảm là đã được biết đến trong lĩnh vực này (Liu *et al.* *P.N.A.S.* 84:3439 (1987) và *J. Immunol.* 139:3521 (1987)). ARN thông tin được phân lập từ thể lai hoặc tế bào khảm tạo ra kháng thể và được sử dụng để tạo ra ADN bổ trợ. ADN bổ trợ quan tâm có thể được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza bằng cách 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 ra và được sàng lọc để phân lập trình tự quan tâm. Trình tự ADN mã hoá vùng biến đổi của kháng thể sau đó được dung hợp với trình tự vùng cố định của người. Trình tự gen vùng cố định của người có thể được tìm thấy trong ấn phẩm: Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of immunological Interest*, N.I.H. publication no. 91-3242. Gen vùng C của người là sẵn có từ các đơn dòng đã biết. Việc lựa chọn isotyp sẽ được chỉ dẫn bởi chức năng tác quan mong muốn, như sự cố định bổ thể hoặc hoạt tính về tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể. Các lớp kháng thể được ưu tiên là IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. Các vùng cố định chuỗi nhẹ của người, kappa hoặc lambda có thể được sử dụng. Kháng thể khảm, được làm giống người sau đó được biểu hiện bằng các phương pháp thông thường.



đến trong lĩnh vực này. Wright *et al.* Crit. Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992), Hanes và Plückthun PNAS USA 94:4937-4942 (1997) (thể hiện ribosom), Parmley và Smith Gene 73:305-318 (1988) (thể hiện 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 thể hiện được sử dụng để tạo ra kháng thể mà không phải của người, các kháng thể này có thể được làm giống người như được mô tả trên đây.

Bằng cách sử dụng các kỹ thuật này, các kháng thể có thể được sinh ra đối với tế bào biểu hiện CD47, các dạng có thể hoà tan của CD47, epitop hoặc peptit của nó và các thư viện biểu hiện của nó (xem ví dụ, patent Mỹ số 5,703,057) mà sau đó có thể được sàng lọc như được mô tả trên đây đối với các hoạt tính được mô tả trong bản mô tả này.

Kháng thể CD47 theo sáng chế có thể được biểu hiện bởi vật truyền chứa đoạn ADN mã hoá kháng thể chuỗi đơn được mô tả trên đây.

Có thể bao gồm các vật truyền, liposom, ADN trần, ADN liên kết chất hỗ trợ, súng gen, ống thông, v.v. Các vật truyền bao gồm các thể tiếp hợp hoá học như được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 93/64701, mà có phần hướng đích (ví dụ phối tử với thụ thể bề mặt tế bào) và phần gắn kết axit nucleic (ví dụ polylysine), vật truyền virus (ví dụ vật truyền virus ADN hoặc ARN), protein dung hợp như được mô tả trong đơn quốc tế số PCT/US95/02140 (WO 95/22618) mà là protein dung hợp chứa phần tạo đích (ví dụ kháng thể đặc hiệu đối với gen đích) và phần gắn kết axit nucleic (ví dụ protamine), plasmid, thể thực khuẩn, v.v. Các vật truyền có thể là nhiễm sắc thể, không nhiễm sắc thể hoặc tổng hợp.

Các vật truyền được ưu tiên bao gồm các vật truyền virus, protein dung hợp protein và các thể tiếp hợp hoá học. Các vật truyền retrovirus bao gồm virus gây bệnh bạch cầu chuột moloney. Vật truyền ADN virus là được ưu tiên. Các vật truyền này bao gồm các vật truyền gây bệnh đậu như vật truyền virus gây bệnh đậu mùa hoặc virus gây bệnh đậu gà, vật truyền herpesvirus như vật truyền virus gây bệnh mụn rộp

phức hệ I (HSV) (xem ấn phẩm: Geller, A. I. et al., J. Neurochem, 64:487 (1995); Lim, F., et al., in DNA 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), Adenovirus Vectors (xem ấn phẩm: 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 Adeno-associated Virus Vectors (xem ấn phẩm: Kaplitt, M. G., et al., Nat. Genet. 8:148 (1994)).

Các vật truyền virus gây bệnh đậu đưa gen vào trong tế bào chất của tế bào. Vật truyền virus gây bệnh đậu mùa chỉ dẫn đến sự biểu hiện trong thời gian ngắn của axit nucleic. Vật truyền virus gây bệnh đường hô hấp, vật truyền virus liên kết adeno và vật truyền virus gây bệnh mụn rộp phức hệ (HSV) là được ưu tiên để đưa axit nucleic vào trong tế bào thần kinh. Vật truyền virus gây bệnh đường hô hấp dẫn đến sự biểu hiện trong thời gian ngắn (khoảng 2 tháng) so với virus liên kết adeno (khoảng 4 tháng), mà lần lượt là ngắn hơn so với vật truyền HSV. Vật truyền cụ thể được chọn sẽ phụ thuộc vào tế bào đích và tình trạng bệnh được điều trị. Việc đưa vào có thể là bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn, ví dụ lây nhiễm, truyền nhiễm, truyền hoặc biến nạp. Các ví dụ về phương thức truyền gen bao gồm *ví dụ*, ADN trần, kết tủa  $\text{CaPO}_4$ , DEAE dextran, đục lỗ bằng xung điện, dung hợp nguyên mẫu, chuyển nhiễm lipid, vi tiêm tế bào và vật truyền virus.

Vật truyền có thể được dùng để tạo đích tế bào đích mong muốn bất kỳ thiết yếu. Ví dụ, việc tiêm ở vị trí xác định trong không gian có thể được sử dụng để định hướng vật truyền (*ví dụ* adenovirus, HSV) vào vị trí mong muốn. Ngoài ra, hạt có thể được phân phối bằng việc truyền trong tĩnh mạch trong màng não (icv) bằng cách sử dụng hệ thống truyền bơm nhỏ, như SynchroMed Infusion System. Phương pháp được dựa trên dòng lớn, sự đối lưu giới hạn, cũng đã chứng minh hiệu quả khi phân phối phân tử lớn vào vùng não kéo dài và có thể là hữu ích để phân phối vật truyền vào tế bào đích. (Xem ấn phẩm: 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 mà có thể được sử dụng bao gồm ống thông, tiêm trong tĩnh mạch, ngoài đường tiêu

hoá, trong màng bụng và dưới da và dùng qua đường miệng hoặc các đường dùng khác đã được biết đến.

Các vật truyền này có thể được sử dụng để biểu hiện lượng lớn kháng thể mà có thể được sử dụng trong nhiều cách. Ví dụ, để phát hiện sự có mặt của CD47 trong mẫu. Kháng thể cũng có thể được sử dụng để thử gắn kết với và phá vỡ sự tương tác CD47- và/hoặc CD47/SIRP $\alpha$  và tạo tín hiệu qua trung gian CD47/SIRP $\alpha$ .

Kỹ thuật có thể được làm thích ứng để tạo ra kháng thể chuỗi đơn đặc hiệu với protein kháng nguyên của sáng chế (xem *ví dụ* patent Mỹ số 4,946,778). Ngoài ra, các phương pháp có thể được làm thích ứng để xây dựng thư viện biểu hiện Fab (xem, *ví dụ* ấn phẩm: Huse, et al., 1989 Science 246: 1275-1281) để cho phép nhận dạng nhanh và hiệu quả các mảnh Fab đơn dòng với tính đặc hiệu mong muốn đối với protein hoặc dẫn xuất, các mảnh, thể tương tự hoặc thể tương đồng của nó. Các mảnh kháng thể mà chứa idiotyp với kháng nguyên protein có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đã được biết đến trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: (i) mảnh F(ab')<sub>2</sub> được tạo ra bằng việc tiêu hoá pepsin của phân tử kháng thể; (ii) mảnh Fab được sinh ra bằng cách làm giảm cầu disulfua của mảnh F(ab')<sub>2</sub>; (iii) mảnh Fab được tạo ra bằng việc xử lý phân tử kháng thể với papain và chất khử và (iv) mảnh F<sub>v</sub>.

Sáng chế cũng bao gồm các mảnh F<sub>v</sub>, Fab, Fab' và F(ab')<sub>2</sub> CD47, kháng thể CD47 chuỗi đơn, kháng thể miền đơn (*ví dụ*, nanobody hoặc VHH), kháng thể CD47 đặc hiệu kép và kháng thể CD47 tiếp hợp khác loại.

Các kháng thể đặc hiệu kép là các kháng thể mà có tính đặc hiệu gắn kết đối với ít nhất hai kháng nguyên khác nhau. Trong trường hợp này, một trong số các tính đặc hiệu gắn kết là đối với CD47. Đích gắn kết thứ hai là kháng nguyên khác bất kỳ và tốt hơn là protein bề mặt tế bào hoặc thụ thể hoặc cấu trúc dưới đơn vị thụ thể.

Các phương pháp tạo ra kháng thể đặc hiệu kép là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Theo truyền thống, việc sản xuất tái tổ hợp của kháng thể đặc hiệu kép được dựa trên sự đồng biểu hiện của hai cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, trong đó hai chuỗi nặng có tính đặc hiệu khác nhau (Milstein and Cuello, Nature,

305:537-539 (1983)). Bởi vì việc sắp xếp ngẫu nhiên của các chuỗi nặng và nhẹ globulin miễn dịch, các thể lai (quadromas) tạo ra hỗn hợp hiệu lực gồm mười phân tử kháng thể khác nhau, trong số chúng chỉ một có cấu trúc đặc hiệu kép đúng đắn. Việc tinh chế phân tử đúng đắn thường được kết thúc bởi các bước sắc ký ái lực. Các quy trình tương tự được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO 93/08829, published 13 May 1993, và trong ấn phẩm: Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Các miền biến đổi kháng thể có các đặc tính gắn kết mong muốn (vị trí tổ hợp kháng thể-kháng nguyên) có thể được dung hợp với các trình tự miền cố định globulin miễn dịch. Tốt hơn là, sự dung hợp là với miền cố định chuỗi nặng globulin miễn dịch, bao gồm ít nhất một phần vùng bản lề, CH2, và CH3. Tốt hơn là có vùng cố định của chuỗi nặng thứ nhất (CH1) chứa vị trí cần thiết cho sự gắn kết chuỗi nhẹ có mặt trong ít nhất một trong số các thể dung hợp. Các ADN mã hoá các thể dung hợp chuỗi nặng globulin miễn dịch và, nếu muốn, chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, được cài xen vào trong vật truyền biểu hiện riêng biệt và đồng chuyển nhiễm vào sinh vật chủ thích hợp. Để biết chi tiết hơn về việc tạo ra kháng thể đặc hiệu kép, xem, ví dụ ấn phẩm: Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

Theo phương pháp khác được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 96/27011, bề mặt chung giữa cặp phân tử kháng thể có thể được thiết kế để tối đa hoá tỷ lệ phần trăm của các heterodime mà được thu gom từ môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp. Bề mặt chung được ưu tiên bao gồm ít nhất một phần của vùng CH3 của miền cố định kháng thể. Theo phương pháp này, một hoặc nhiều mạch bên axit amin nhỏ từ bề mặt chung của phân tử kháng thể thứ nhất được thay thế bằng mạch bên lớn hơn (ví dụ tyrosin hoặc tryptophan). “Khoang” phần bù có kích cỡ giống nhau hoặc tương tự với (các) mạch bên lớn được tạo ra ở bề mặt chung của phân tử kháng thể thứ hai bằng cách thay thế mạch bên axit amin lớn bằng chuỗi nhỏ hơn (ví dụ alanin hoặc threonin). Việc này tạo ra cơ chế để làm gia tăng hiệu suất của heterodime so với các sản phẩm cuối không mong muốn khác như homodime.

Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra như các kháng thể có chiều dài đầy đủ hoặc mảnh kháng thể (ví dụ các kháng thể đặc hiệu kép F(ab')<sub>2</sub>). Các kỹ thuật

để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép từ các mảnh kháng thể đã được mô tả trong tài liệu chuyên ngành. Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bằng cách sử dụng liên kết hoá học. Ấn phẩm: Brennan et al., Science 229:81 (1985) mô tả quy trình trong đó các kháng thể nguyên vẹn được tách về mặt phân giải protein để tạo ra các mảnh  $F(ab')_2$ . Các mảnh này được giảm với sự có mặt của chất tạo phức hệ dithiol natri arsenit để làm ổn định dithiol lân cận và ngăn ngừa sự hình thành disulfua nội phân tử. Các mảnh Fab' được tạo ra sau đó được chuyển hoá thành các dẫn xuất thionitrobenzoat (TNB). Một trong số các dẫn xuất Fab'-TNB sau đó được chuyển hoá lại thành Fab'-thiol bằng việc khử bằng mercaptoethylamin và được trộn với lượng mol tương đương của dẫn xuất Fab'-TNB khác để tạo thành kháng thể đặc hiệu kép. Kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra có thể được sử dụng làm chất để cố định hoá enzyme theo cách chọn lọc.

Ngoài ra, các mảnh Fab' có thể được thu gom một cách trực tiếp từ E. coli và được ghép cặp về mặt hoá học để tạo thành kháng thể đặc hiệu kép. Ấn phẩm: Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) mô tả việc tạo ra phân tử kháng thể đặc hiệu kép được làm giống người hoàn toàn  $F(ab')_2$ . Mỗi mảnh Fab' được tiết một cách riêng biệt từ E. coli và được cho vào ghép cặp hoá học được chỉ dẫn in vitro để tạo thành kháng thể đặc hiệu kép. Do đó, kháng thể đặc hiệu kép được tạo thành có khả năng gắn kết với tế bào biểu hiện quá mức thụ thể ErbB2 và tế bào T bình thường của người, cũng như môi hoạt tính tan của tế bào bạch huyết độc tế bào của người kháng lại các đích khối u vú của người.

Các kỹ thuật khác nhau để tạo ra và phân lập các mảnh kháng thể đặc hiệu kép một cách 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 bằng cách sử dụng khoá leucin. Ấn phẩm: Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). Peptit khoá leucin từ các protein Fos và Jun được liên kết với các phần Fab' của hai kháng thể khác nhau bằng việc dung hợp gen. Kháng thể homodime được khử ở vùng bản lề để tạo thành monome và sau đó được oxy hoá lại để tạo thành kháng thể heterodime. Phương pháp này cũng có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể homodime. Kỹ thuật "diabody" được mô tả bởi Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) đã

đề xuất cơ chế thay thế để tạo ra các mảnh kháng thể đặc hiệu kép. Các mảnh này bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng ( $V_H$ ) được kết nối với miền biến đổi của chuỗi nhẹ ( $V_L$ ) bằng cầu liên kết mà quá ngắn để cho phép tạo cặp giữa hai miền trên cùng chuỗi. Do đó, miền  $V_H$  và  $V_L$  của một mảnh được ép để ghép đôi với các miền  $V_L$  và  $V_H$  phần bù của mảnh khác, nhờ đó tạo thành hai vị trí gắn kết kháng nguyên. Chiến lược khác để tạo thành mảnh kháng thể đặc hiệu kép bằng việc sử dụng các dime chuỗi đơn Fv (sFv) cũng đã được báo cáo. Xem ấn phẩm: Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994).

Các kháng thể với nhiều hơn hai hoá trị là được dự định. Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu ba có thể được tạo ra. Ấn phẩm: Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

Các kháng thể đặc hiệu kép lấy làm ví dụ có thể gắn kết với hai epitop khác nhau, ít nhất một trong số chúng có nguồn gốc từ kháng nguyên protein của sáng chế. Theo cách khác, nhánh kháng kháng nguyên của phân tử globulin miễn dịch có thể được tổ hợp với nhánh mà gắn kết với phân tử môi trên bạch cầu như phân tử thụ thể tế bào T (ví dụ CD2, CD3, CD28, hoặc B7), hoặc các thụ thể Fc đối với IgG (FcγR), như FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) và FcγRIII (CD16) để tạo mục tiêu cơ chế phòng vệ tế bào với tế bào biểu hiện kháng nguyên cụ thể. Các kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể được sử dụng để định hướng các chất độc tế bào với tế bào mà biểu hiện kháng nguyên cụ thể. Các kháng thể này có nhánh gắn kết kháng nguyên và nhánh mà gắn kết chất độc tố tế bào hoặc chất tạo chelat nuclit phóng xạ, như EOTUBE, DPTA, DOTA, hoặc TETA. Kháng thể đặc hiệu kép quan tâm khác gắn kết kháng nguyên protein được mô tả trong bản mô tả này và còn gắn kết nhân tổ mô (TF).

Các kháng thể tiếp hợp khác loại cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Các kháng thể tiếp hợp khác loại gồm có hai kháng thể được kết nối theo cách cộng hoá trị. Các kháng thể này, ví dụ, được đề xuất để hướng đích tế bào hệ miễn dịch đến tế bào không mong muốn (xem patent Mỹ số 4,676,980), và để điều trị sự lây nhiễm HIV (xem công bố quốc tế số WO 91/00360; WO 92/200373; patent châu Âu số EP 03089). Được dự định rằng các kháng thể có thể được tạo ra *in vitro* bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong ngành hoá học protein tổng hợp, bao gồm các

phương pháp liên quan đến chất liên kết ngang. Ví dụ, độc tố miễn dịch có thể được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng phản ứng trao đổi disulfua hoặc bằng cách tạo thành liên kết thioete. Các ví dụ về các thuốc thử 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.

Có thể mong muốn cải biến kháng thể theo sáng chế đối với chức năng thụ quan, sao cho để làm tăng cường, *ví dụ*, hiệu quả của kháng thể trong việc điều trị bệnh và rối loạn kết với việc tạo tín hiệu CD47 khác thường. Ví dụ, (các) gốc xystein có thể được đưa vào trong vùng Fc, nhờ đó cho phép sự hình thành liên kết disulfua nội chuỗi trong vùng này. Do đó, kháng thể homodime được sinh ra có thể có khả năng nội tại hoá được cải thiện và/hoặc việc tiêu diệt tế bào qua trung gian bổ thể và tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) gia tăng. (Xem ấn phẩm: 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 thiết kế mà có các vùng Fc kép và nhờ đó có thể có sự tan bổ thể và khả năng ADCC được tăng cường. (Xem ấn phẩm: Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)).

Sáng chế cũng đề cập đến các thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể được tiếp hợp với chất gây độc tế bào như độc tố (*ví dụ*, độc tố có hoạt tính về mặt enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật hoặc các mảnh của nó), hoặc chất đồng vị phóng xạ (*nghĩa là*, tiếp hợp phóng xạ).

Độc tố có hoạt tính về mặt enzym và các mảnh của nó mà có thể được sử dụng bao gồm chuỗi gây bệnh bạch cầu A, mảnh có hoạt tính không gắn kết của độc tố bệnh bạch cầu, chuỗi ngoại độc tố A (từ *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi rixin A, chuỗi abrin A, chuỗi modeccin A, alpha-sarcin, Aleurites fordii protein, dianthin protein, Phytolacca americana protein (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curcin, croton, chất ức chế sapaonaria officinalis, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, và tricothecene. Nhiều nuclit phóng xạ là sẵn có để tạo ra kháng thể được tiếp hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , và  $^{186}\text{Re}$ .

Thể tiếp hợp của kháng thể và chất độc tế bào được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều chất ghép cặp protein hai chức như N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionat (SPDP), iminothiolan (IT), dẫn xuất hai chức của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCL), este hoạt tính (như disuxinimidyl suberat), aldehyt (như glutareldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexanediamin), dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylenediamin), diisoxyanat (như tolyen 2,6-diisoxyanat), và các hợp chất flo hoạt tính kép (như 1,5-diflo -2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được tạo ra như được mô tả trong ấn phẩm: Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminpentaaxetic được đánh dấu cacbon-14 (MX-DTPA) là chất tạo chelat lấy làm ví dụ để tiếp hợp nucleotit phóng xạ với kháng thể. (Xem công bố đơn quốc tế số WO94/11026).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận biết rằng một lượng lớn các gốc có thể có thể được ghép cặp với các kháng thể thu được của sáng chế. (Xem, ví dụ ấn phẩm: "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989)).

Việc ghép cặp có thể được thực hiện bằng phản ứng hoá học bất kỳ mà sẽ gắn kết hai phân tử miễn là kháng thể và gốc còn lại này vẫn có các hoạt tính tương ứng của chúng. Liên kết này có thể bao gồm nhiều cơ chế hoá học, ví dụ gắn kết cộng hoá trị, gắn kết ái lực, sự xen giữa, gắn kết phối hợp và sự tạo phức. Tuy nhiên, việc gắn kết được ưu tiên là gắn kết cộng hoá trị. Việc gắn kết cộng hoá trị có thể đạt được bằng việc ngưng tụ trực tiếp của các mạch bên hiện có hoặc bằng sự phối hợp của các phân tử tạo cầu bên ngoài. Nhiều chất liên kết hoá trị hai hoặc đa hoá trị là hữu ích trong việc ghép cặp các phân tử protein, như các kháng thể theo sáng chế, với các phân tử khác. Ví dụ, chất ghép cặp đại diện có thể bao gồm các hợp chất hữu cơ như thioeste, carbodiimit, suxinimit este, diisoxyanat, glutaraldehyt, diazobenzen và hexametylen diamin. Danh mục này không dự định hết mọi khía cạnh của các nhóm chất ghép cặp khác nhau được biết đến trong lĩnh vực này, mà chỉ nêu làm ví dụ của các chất ghép cặp thông thường hơn. (Xem ấn phẩm: Killen and 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 cầu liên kết được ưu tiên được mô tả trong tài liệu chuyên ngành. (Xem, ví dụ ấn phẩm: Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984) mô tả việc sử dụng MBS (M-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuxinimit este). Xem patent Mỹ số 5,030,719, mô tả việc sử dụng dẫn xuất axetyl hydrazit được halogen hoá được ghép cặp với kháng thể bằng cầu liên kết oligopeptit. Cầu liên kết được ưu tiên một cách đặc biệt bao gồm: (i) EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide hydrochlorua; (ii) SMPT (4-suxinimidylloxycarbonyl-alpha-methyl-alpha-(2-pyridyl-dithio)-toluen (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (suxinimidyl-6 [3-(2-pyridyldithio) propionamido]hexanoat (Pierce Chem. Co., Cat #21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (sulfosuxinimidyl 6 [3-(2-pyridyldithio)-propionamit]hexanoat (Pierce Chem. Co. Cat. #2165-G); và (v) sulfo-NHS (N-hydroxysulfo-suxinimit: Pierce Chem. Co., Cat. #24510) được tiếp hợp với EDC.

Các cầu liên kết được mô tả trên đây chứa các thành phần mà có các thuộc tính khác nhau, do đó dẫn đến thể tiếp hợp có các đặc tính vật lý-hoá học khác nhau. Ví dụ, sulfo-NHS este của alkyl carboxylat là ổn định hơn so với sulfo-NHS este của carboxylat thơm. Cầu liên kết chứa NHS-este là ít ổn định hơn so với sulfo-NHS este. Hơn nữa, cầu liên kết SMPT chứa liên kết disulfua bị cản trở về mặt không gian và có thể tạo thành thể tiếp hợp với độ ổn định gia tăng. Các liên kết disulfua là, nói chung, ít ổn định hơn so với các liên kết khác bởi vì liên kết disulfua được tách *in vitro*, dẫn đến thể tiếp hợp ít sẵn có hơn. Cụ thể là, sulfo-NHS, có thể làm tăng cường độ ổn định của các ghép cặp carbodimit. Các ghép cặp carbodimit (như EDC) khi được sử dụng kết hợp với sulfo-NHS, tạo thành este mà chịu sự thủy phân tốt hơn so với phản ứng ghép cặp carbodimit đơn lẻ.

Các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này cũng có thể được bào chế như liposom miễn dịch. Liposom chứa kháng thể được tạo ra bằng các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này, như được mô tả trong ấn phẩm: 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. Liposom có thời gian tuần hoàn được tăng cường được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,013,556.

Các liposom hữu ích một cách đặc biệt có thể được sinh ra bằng phương pháp làm bay hơi pha đảo với chế phẩm lipid bao gồm phosphatidylcholin, cholesterol, và phosphatidyletanolamin thu được từ PEG (PEG-PE). Liposom được ép đùn qua bộ lọc có kích cỡ lỗ xác định để thu được liposom có đường kính mong muốn. Các mảnh Fab' của kháng thể theo sáng chế có thể được tiếp hợp với liposom như được mô tả trong ấn phẩm: Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) qua phản ứng trao đổi disulfua.

#### Sử dụng kháng thể kháng CD47

Sẽ nhận ra rằng việc dùng thực thể điều trị theo sáng chế sẽ được dùng với chất mang, tá dược thích hợp và các chất khác mà được hợp nhất vào trong chế phẩm để tạo ra việc truyền, phân phối, dung nạp và tương tự được cải thiện. Nhiều hỗn hợp phối chế thích hợp có thể được tìm thấy trong lĩnh vực bào chế đã được biết đến đối với tất cả các nhà hoá dược: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), particularly Chapter 87 by Blaug, Seymour. Các hỗn hợp phối chế này bao gồm, ví dụ, bột, bột nhão, thuốc mỡ, gelatin, sáp, dầu, các lipid, lipid (cation hoặc anion) chứa các túi (như Lipofectin™), thể tiếp hợp ADN, bột nhão hấp thụ khan, nhũ tương dầu trong nước và nước trong dầu, carbowax nhũ tương (polyetylen glycol có các trọng lượng phân tử khác nhau), gel bán rắn và hỗn hợp bán rắn chứa carbowax. Bất kỳ trong số các hỗn hợp trên đây có thể thích hợp trong điều trị và các liệu pháp điều trị theo sáng chế, miễn là hoạt chất trong hỗn hợp phối chế này không bị bất hoạt bởi hỗn hợp phối chế và hỗn hợp phối chế là tương thích về mặt sinh lý và có thể dung nạp với đường dùng. Cũng xem ấn phẩm: 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 tài liệu trích dẫn trong đó đối với các thông tin bổ sung liên quan đến hỗn hợp phối chế, tá dược và chất mang đã được biết đến đối với các nhà hoá dược.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế, mà bao gồm kháng thể đơn dòng của sáng chế, có thể được sử dụng làm chất điều trị. Thông thường, các chất này sẽ được dùng để chẩn đoán, tiên lượng, kiểm tra, điều trị, làm nhẹ bớt và/hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc bệnh lý kết hợp với sự biểu hiện, hoạt tính và/hoặc tạo tín hiệu CD47 khác thường ở đối tượng. Chế độ điều trị được thực hiện bằng cách nhận dạng đối tượng, *ví dụ*, người bệnh bị mắc (hoặc có nguy cơ phát triển) bệnh hoặc rối loạn có liên quan đến sự biểu hiện, hoạt tính và/hoặc tạo tín hiệu CD47 khác thường, *ví dụ*, bệnh ung thư hoặc rối loạn ung thư khác, bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Được phẩm chứa kháng thể bất kỳ, tốt hơn là kháng thể có tính đặc hiệu ở mức cao và ái lực ở mức cao đối với kháng nguyên đích của nó, được dùng cho đối tượng và sẽ thường có tác dụng do sự gắn kết của nó với kháng nguyên. Việc dùng kháng thể có thể loại trừ hoặc ức chế hoặc cản trở với chức năng biểu hiện, hoạt tính và/hoặc tạo tín hiệu của đích (*ví dụ*, CD47). Việc dùng kháng thể có thể loại trừ hoặc ức chế hoặc cản trở sự gắn kết của đích (*ví dụ*, CD47) với phối tử nội sinh (*ví dụ*, SIRP $\alpha$ ) mà nó gắn kết tự nhiên. Ví dụ, kháng thể gắn kết với đích và điều biến, phong bế, ức chế, làm giảm, tạo đối kháng, làm trung hoà hoặc theo cách khác cản trở sự biểu hiện, hoạt tính và/hoặc tạo tín hiệu CD47.

Các bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự biểu hiện, hoạt tính và/hoặc tạo tín hiệu CD47 khác thường bao gồm, bằng cách ví dụ không hạn chế, bệnh ung thư máu và/hoặc khối u rắn. Bệnh ung thư máu bao gồm, *ví dụ*, bệnh bạch cầu, ung thư mô bạch huyết và u tủy. Một số dạng bệnh bạch cầu bao gồm, bằng cách ví dụ không hạn chế, bệnh bạch cầu lympho cấp tính (ALL); bệnh bạch cầu tủy cấp tính (AML); bệnh bạch cầu lympho mạn tính (CLL); bệnh bạch cầu tủy mạn tính (CML); rối loạn tăng sinh tủy/khối u ung thư (MPDS); và hội chứng rối loạn sinh tủy. Một số dạng u lympho bao gồm, bằng cách ví dụ không hạn chế, u lympho Hodgkin, u lympho không Hodgkin không đau và xâm lấn, ung thư mô bạch huyết Burkitt và ung thư mô bạch huyết có nang (tế bào nhỏ và tế bào lớn). Một số dạng u tủy bao gồm, bằng cách ví dụ không hạn chế, đa u tủy (MM), u tủy tế bào khổng, u tủy chuỗi nặng và u tủy chuỗi nhẹ hoặc Bence. Các khối u rắn bao gồm, *ví dụ*, khối u vú, khối u buồng trứng, khối u phổi, khối u tuyến tụy, khối u tuyến tiền liệt, khối u ác tính, khối u đại-trực tràng, khối

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 kết hợp với bệnh ung thư và các rối loạn ung thư khác bao gồm, ví dụ, viêm, sốt, khó ở tổng thể, cúm, đau, thường được định vị ở vùng viêm, mất sự thèm ăn, giảm trọng lượng, đau đầu, mệt mỏi, phát ban, bệnh thiếu máu, yếu cơ, mỏi cơ và các triệu chứng khác thường như ví dụ, đau khác thường, tiêu chảy hoặc táo bón.

Thông thường, lượng hữu hiệu về mặt điều trị của kháng thể theo sáng chế đề cập đến lượng cần để đạt được mục đích điều trị. Như được kể đến trên đây, mục đích này có thể là sự tương tác gắn kết giữa kháng thể và kháng nguyên đích của nó mà, trong một số trường hợp, cản trở việc tạo chức năng đích. Hơn nữa, lượng đòi hỏi được dùng sẽ phụ thuộc vào ái lực gắn kết của kháng thể đối với kháng nguyên đặc hiệu của nó và cũng sẽ phụ thuộc vào tốc độ mà ở đó kháng thể được dùng được xả hết ra khỏi thể tích tự do khác đối tượng mà nó được dùng. Khoảng liều hữu hiệu có tác dụng trị liệu nói chung của kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế có thể là, bằng cách ví dụ không hạn chế, khoảng từ 0,1mg/kg thể trọng đến 100mg/kg thể trọng. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế được dùng cho đối tượng với liều bằng 0,1mg/kg, 0,5mg/kg, 1mg/kg, 2mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg, 15mg/kg, 20mg/kg, 25mg/kg, 30mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 100mg/kg, hoặc lớn hơn. Tần xuất dùng liều chung có thể nằm trong khoảng, ví dụ, từ hai lần mỗi ngày đến một lần một tuần.

Hiệu quả điều trị được xác định kết hợp với phương pháp đã biết bất kỳ để chẩn đoán hoặc điều trị rối loạn liên quan đến viêm cụ thể. Việc truyền giảm một hoặc nhiều triệu chứng của rối loạn liên quan đến viêm cho thấy kháng thể tạo ra lợi ích lâm sàng.

Các phương pháp sàng lọc kháng thể mà có tính đặc hiệu mong muốn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) và các kỹ thuật qua trung gian miễn dịch khác đã được biết đến trong lĩnh vực này.

Theo phương án khác, kháng thể được định hướng kháng CD47 có thể được sử dụng trong các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này liên quan đến sự định vị và/hoặc định lượng của CD47 (ví dụ, để sử dụng trong việc đo mức CD47 và/hoặc CD47 và SIRP $\alpha$  trong mẫu sinh lý thích hợp, để sử dụng trong phương pháp chẩn đoán, để sử dụng trong việc tạo hình ảnh protein, và tương tự). Theo phương án đã nêu, các kháng thể đặc hiệu với CD47, hoặc dẫn xuất, mảnh, thể tương tự hoặc thể tương đồng của nó, mà chứa kháng thể thu được từ miền gắn kết kháng nguyên, được sử dụng làm hoạt chất về mặt dược lý (được dùng để chỉ trong bản mô tả này sau đây là “điều trị”).

Theo phương án khác, kháng thể đặc hiệu đối với CD47 có thể được sử dụng để phân lập CD47 polypeptit, bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn, như ái lực miễn dịch, sắc ký hoặc kết tủa miễn dịch. Các kháng thể được định hướng kháng protein CD47 (hoặc mảnh của nó) có thể được sử dụng về mặt chẩn đoán để kiểm tra nồng độ protein trong mô như một phần của quy trình thử nghiệm lâm sàng, ví dụ để xác định hiệu quả của chế độ điều trị. Việc phát hiện có thể được tạo thuận lợi bằng cách ghép cặp (*nghĩa là*, liên kết về mặt vật lý) kháng thể với chất có thể phát hiện. Các ví dụ về chất có thể phát hiện bao gồm các enzym khác nhau, các nhóm prosthetic, vật liệu huỳnh quang, vật liệu phát quang, vật liệu huỳnh quang sinh học và các vật liệu phóng xạ. Các ví dụ về các enzym thích hợp bao gồm peroxidaza từ cây cải ngựa, phosphatasa kiềm,  $\beta$ -galactosidaza hoặc axetylcholinesteraza; các ví dụ về các phức nhóm prosthetic thích hợp bao gồm streptavidin/biotin và avidin/biotin; các ví dụ về các vật liệu huỳnh quang thích hợp bao gồm umbelliferon, fluorescein, fluorescein isothioxyanat, rhodamin, diclotriazinylamin fluorescein, dansyl clorua hoặc phycoerythrin; ví dụ về vật liệu phát quang bao gồm luminol; các ví dụ về vật liệu phát quang sinh học bao gồm luciferaza, luciferin, và aequorin và các ví dụ về vật liệu phóng xạ thích hợp bao gồm  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  hoặc  $^3\text{H}$ .

Theo phương án khác, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng làm chất để phát hiện sự có mặt của protein CD47 và/hoặc CD47 và SIRP $\alpha$  (hoặc mảnh protein của nó) trong mẫu. Theo một số phương án, kháng thể chứa chất đánh dấu có thể phát hiện. Kháng thể là đa dòng hoặc tốt hơn nữa là đơn dòng. Kháng thể nguyên vẹn, hoặc

mảnh của nó (ví dụ, Fab, scFv, hoặc F(ab')<sub>2</sub>) được sử dụng. Thuật ngữ “được đánh dấu”, đề cập đến đầu dò hoặc kháng thể, được dự định bao gồm việc đánh dấu trực tiếp đầu dò hoặc kháng thể bằng cách ghép cặp (nghĩa là, liên kết về mặt vật lý) chất có thể phát hiện với đầu dò hoặc kháng thể, cũng như việc đánh dấu gián tiếp đầu dò hoặc kháng thể bằng khả năng phản ứng với thuốc thử khác mà được đánh dấu một cách trực tiếp. Các ví dụ về việc đánh dấu một cách gián tiếp bao gồm việc phát hiện kháng thể sơ cấp bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp được đánh dấu huỳnh quang và kết thúc đánh dấu đầu dò ADN bằng biotin sao cho nó có thể được phát hiện với streptavidin được đánh dấu huỳnh quang. Thuật ngữ “mẫu sinh học” được dự định bao gồm mô, tế bào và dịch sinh học được phân lập từ đối tượng cũng như mô, tế bào và dịch có mặt trong đối tượng. Do đó, được bao gồm trong thuật ngữ “mẫu sinh học” là máu và phân đoạn hoặc thành phần của máu bao gồm huyết thanh máu, huyết tương máu hoặc bạch huyết. Tức là, phương pháp phát hiện của sáng chế có thể được sử dụng để phát hiện ARN thông tin phân tích, protein, hoặc ADN hệ gen trong mẫu sinh học *in vitro* cũng như *in vivo*. Ví dụ, kỹ thuật *in vitro* để phát hiện ARN thông tin phân tích bao gồm phép lai Northern và lai *in situ*. Các kỹ thuật *In vitro* để phát hiện protein phân tích bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thẩm tách Western, kết tủa miễn dịch và huỳnh quang miễn dịch. Các kỹ thuật *In vitro* để phát hiện ADN hệ gen phân tích bao gồm phép lai Southern. Các quy trình thực hiện thử nghiệm miễn dịch được mô tả ví dụ trong ấn phẩm: “ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology”, Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; “Immunoassay”, E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; và “Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”, P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Hơn nữa, các kỹ thuật *in vivo* để phát hiện protein phân tích bao gồm việc đưa vào trong đối tượng kháng thể được đánh dấu kháng protein phân tích. Ví dụ, kháng thể có thể được đánh dấu bằng chất đánh dấu phóng xạ mà sự có mặt và định vị của nó ở đối tượng có thể được phát hiện bằng các kỹ thuật chụp ảnh tiêu chuẩn.

#### Ứng dụng điều trị và dược phẩm chứa kháng thể CD47

Các kháng thể theo sáng chế (cũng được dùng để chỉ trong bản mô tả này là

“hoạt chất”) và các dẫn xuất, mảnh, thể tương tự và thể tương đương của nó, có thể được hợp nhất vào trong dược phẩm thích hợp để dùng. Các nguyên lý và suy xét có liên quan đến việc tạo ra dược phẩm này, cũng như hướng dẫn lựa chọn các thành phần được đề xuất, ví dụ, trong ấn phẩm: 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, and Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; và Peptide and Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

Dược phẩm thường bao gồm kháng thể và chất mang dược dụng. Trong đó, các mảnh kháng thể được sử dụng, mảnh ức chế nhỏ nhất mà gắn kết một cách đặc hiệu với miền gắn kết của protein đích là được ưu tiên. Ví dụ, dựa vào trình tự vùng biến đổi của kháng thể, phân tử peptit có thể được thiết kế mà giữ lại khả năng gắn kết với trình tự protein đích. Các peptit có thể được tổng hợp về mặt hoá học và/hoặc được tạo ra bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp. (Xem ví dụ ấn phẩm: Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất mang dược dụng” được dự định bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, lớp bao ngoài, chất kháng vi khuẩn và chất chống nấm, chất đẳng trương và làm chậm sự hấp thụ và tương tự, tương thích với dược phẩm. Các chất mang thích hợp được mô tả trong lần xuất bản gần đây nhất của Remington’s Pharmaceutical Sciences. Các ví dụ được ưu tiên về chất mang hoặc chất pha loãng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở nước, nước muối, dung dịch ringer, dung dịch dextroza và 5% albumin huyết thanh của người. Liposom và tá dược dạng lỏng không chứa nước như dầu cố định cũng có thể được sử dụng. Việc sử dụng môi trường và chất này để làm dược chất cũng đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ngoài trừ trường hợp môi trường thông thường hoặc chất bất kỳ không tương thích với hoạt chất, việc sử dụng chúng trong dược phẩm được dự định.

Dược phẩm được sử dụng để dùng *in vivo* phải là vô trùng. Việc này được thực hiện một cách dễ dàng bằng việc lọc qua màng lọc vô trùng.

Dược phẩm của sáng chế được bào chế để có thể tương thích với đường dùng định trước của nó. Các ví dụ về đường dùng bao gồm dùng ngoài đường tiêu hoá, *ví dụ*, trong tĩnh mạch, trong da, dưới da, qua đường miệng (*ví dụ*, xông), qua da (*nghĩa là*, khu trú), qua màng nhầy và dùng qua trực tràng. Dung dịch hoặc huyền phù được sử dụng để dùng ngoài đường tiêu hoá, trong da hoặc dưới da có thể bao gồm các thành phần sau đây: chất pha loãng vô trùng như nước để tiêm, dung dịch nước muối, dầu cố định, polyetylen glycol, glycerin, propylen glycol hoặc dung môi tổng hợp khác; các chất kháng vi khuẩn như rượu benzylic hoặc metyl paraben; chất chống oxy hoá như axit ascorbic hoặc natri bisulfit; chất tạo chelat như axit etylenđiaminetetraaxetic (EDTA); chất đệm như axetat, xitrat hoặc phosphat và các chất để điều chỉnh tính trương lực như natri clorua hoặc dextroza. Độ pH có thể được điều chỉnh bằng axit hoặc bazơ, như axit clohydric hoặc natri hydroxit. Dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hoá có thể được đóng trong ống tiêm, bơm tiêm dùng một lần hoặc lọ nhỏ đa liều được tạo thành bằng thủy tinh hoặc chất dẻo.

Dược phẩm thích hợp để tiêm bao gồm dung dịch trong nước vô trùng (khi có thể hoà tan trong nước) hoặc thể phân tán và bột vô trùng đối với dược phẩm tủy ứng chứa dung dịch hoặc thể phân tán có thể tiêm vô trùng. Để dùng trong tĩnh mạch, chất mang thích hợp bao gồm nước muối sinh lý, nước kim khuẩn, Cremophor EL<sup>™</sup> (BASF, Parsippany, N.J.) hoặc nước muối đệm phosphat (PBS). Trong tất cả các trường hợp, dược phẩm phải là vô trùng và phải lỏng đến mức có thể dễ dàng tiêm bằng xy-ranh. Nó phải ổn định trong các điều kiện sản xuất và lưu trữ và phải được bảo quản kháng lại sự nhiễm tạp bởi vi sinh vật như vi khuẩn và nấm. Chất mang có thể là dung môi hoặc môi trường phân tán chứa, ví dụ, nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, và liquid polyetylen glycol, và tương tự) và hỗn hợp thích hợp của chúng. Trạng thái lỏng hợp lý có thể được duy trì, ví dụ, bằng việc sử dụng lớp bao ngoài như lexithin, bằng việc duy trì kích cỡ hạt được đòi hỏi trong trường hợp thể phân tán và bằng việc sử dụng chất hoạt động bề mặt. Việc ngăn ngừa tác dụng của vi sinh vật có thể đạt được bằng các chất kháng vi khuẩn và kháng nấm khác nhau, ví

dụ, paraben, clobutanol, phenol, axit ascorbic, thimerosal và tương tự. Trong nhiều trường hợp, sẽ tốt hơn là bao gồm chất đẳng trương, ví dụ, đường, rượu đa chức như manitol, sorbitol, natri clorua trong dược phẩm. Sự hấp thụ kéo dài của dược phẩm có thể tiêm có thể có được bằng cách đưa chất mà thể hiện sự hấp thụ, ví dụ, nhôm monostearat và gelatin vào trong dược phẩm.

Dung dịch có thể tiêm vô trùng có thể được tạo ra bằng việc hợp nhất hoạt chất với lượng đòi hỏi trong dung môi thích hợp với một hoặc tổ hợp gồm các thành phần được kể đến trên đây, nếu cần, tiếp theo lọc vô trùng. Thông thường, thể phân tán được tạo ra bằng cách hợp nhất hoạt chất vào trong tá dược dạng lỏng vô trùng mà chứa môi trường phân tán bazơ và các thành phần đòi hỏi khác từ danh mục được kể đến trên đây. Trong trường hợp bột vô trùng để tạo ra dung dịch vô trùng có thể tiêm, phương pháp bào chế là làm khô chân không và làm khô lạnh mà thu được bột hoạt chất cộng với thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ dung dịch lọc vô trùng trước của nó.

Thông thường, dược phẩm dùng qua đường miệng bao gồm chất pha loãng trợ hoặc chất mang có thể ăn được. Chúng có thể được bao trong nang gelatin hoặc được nén thành viên nén. Đối với mục đích dùng điều trị qua đường miệng, hoạt chất có thể được phối hợp với tá dược và được sử dụng ở dạng viên nén, viên thuốc dẹt hoặc viên nang. Dược phẩm dùng qua đường miệng cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chất mang dạng lỏng để sử dụng như thuốc súc miệng, trong đó hợp chất trong chất mang dạng lỏng được áp dụng qua đường miệng và được xúc và khạc nhổ hoặc nuốt. Chất gắn kết tương thích về mặt dược phẩm và/hoặc vật liệu hỗ trợ có thể được bao gồm như một phần của dược phẩm. Viên nén, viên thuốc, viên nang, viên thuốc dẹt và tương tự có thể chứa bất kỳ trong số các thành phần sau đây hoặc các hợp chất có bản chất tương tự: chất gắn kết như xenluloza dạng vi tinh thể, gồm tragacanth hoặc gelatin; tá dược như tinh bột hoặc lactoza, chất gây phân tán như axit alginic, Primogel, hoặc tinh bột ngô; chất bôi trơn như magie stearat hoặc Sterotes; chất tạo tướt như silic dioxit dạng keo; chất tạo ngọt như sucroza hoặc sacarin; hoặc chất tạo hương vị như bạc hà, metyl salixylat hoặc hương vị cam.

Để dùng bằng cách xông, hợp chất được phân phối ở dạng phun sol khí từ vật chứa tăng áp hoặc thiết bị phân tán mà chứa tác nhân đẩy thích hợp, *ví dụ*, khí như cabon dioxid hoặc thiết bị khí dung.

Việc dùng toàn thân cũng có thể là bằng cách dùng qua màng nhầy hoặc qua da. Để dùng qua màng nhầy hoặc qua da, chất thấm thích hợp cho màng ngăn để được thấm là được sử dụng trong dược phẩm. Thông thường, chất thấm này là đã được biết đến trong lĩnh vực này và bao gồm, *ví dụ*, để dùng qua màng nhầy, chất tẩy rửa, muối mật và dẫn xuất axit fusidic. Việc dùng qua màng nhầy có thể được thực hiện bằng cách sử dụng dạng xịt qua mũi hoặc viên thuốc đạn. Để dùng qua da, hoạt chất được bào chế thành thuốc mỡ, sáp, gel hoặc kem như được biết đến thông thường trong lĩnh vực này.

Các hợp chất cũng có thể được tạo ra ở dạng viên thuốc đạn (*ví dụ*, với nền thuốc đạn thông thường như bơ cacao và các glyxerit khác) hoặc thụt duy trì để phân phối qua trực tràng.

Theo một phương án, các hoạt chất được tạo ra với chất mang mà sẽ bảo vệ hợp chất chống lại sự loại trừ nhanh ra khỏi cơ thể, như dược phẩm giải phóng duy trì/có kiểm soát, bao gồm mô cấy và hệ phân phối vi bao nang. Các polyme tương thích sinh học có thể thoái biến sinh học có thể được sử dụng, như etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste và axit polylactic. Các phương pháp tạo ra dược phẩm này sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

*Ví dụ*, hoạt chất có thể được bẫy trong vi nang được tạo ra, *ví dụ*, bằng các kỹ thuật giọt tụ hoặc việc polyme hoá bề mặt chung, *ví dụ*, hydroxymetylxenluloza hoặc vi nang gelatin và vi nang poly-(metylmethacrylat), một cách tương ứng, trong các hệ phân phối được chất dạng keo (*ví dụ*, liposom, vi cầu albumin, vi nhũ tương, hạt nano và nang nano) hoặc nhũ tương lớn.

Dược phẩm giải phóng duy trì có thể được tạo ra. Các *ví dụ* thích hợp về dược phẩm giải phóng duy trì bao gồm nền bán thấm chứa polyme kỵ nước dạng rắn chứa

kháng thể, nền này ở dạng vật dụng có hình dạng, *ví dụ*, màng hoặc vi nang. Các ví dụ về nền giải phóng duy trì bao gồm polyester, hydrogel (ví dụ, poly(2-hydroxyethyl-methacrylat), hoặc poly(vinylalcohol)), polylactit (patent Mỹ số 3,773,919), copolyme của axit L-glutamic và  $\gamma$  etyl-L-glutamat, etylen-vinyl axetat không thoái biến, copolyme axit lactic-axit glycolic có thể thoái biến như LUPRON DEPOT™ (vi cầu có thể tiêm gồm có copolyme của axit lactic-axit glycolic và leuprolit axetat) và axit poly-D-(-)-3-hydroxybutyric. Trong khi các polyme như etylen-vinyl axetat và axit lactic-axit glycolic cho phép giải phóng phân tử trong 100 ngày, một số protein giải phóng hydrogel trong khoảng thời gian ngắn hơn.

Các vật liệu cũng có thể thu được về mặt thương mại từ Alza Corporation và Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (bao gồm liposom được tạo đích với tế bào lây nhiễm với kháng thể đơn dòng vào đích virus) và cũng có thể được sử dụng làm chất mang dược dụng. Các chất này có thể được tạo ra theo các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này, ví dụ, như được mô tả trong patent Mỹ số 4,522,811.

Đặc biệt thuận lợi để bào chế dược phẩm dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hoá ở dạng đơn vị liều cho dễ dàng và tính đồng nhất của liều. Dạng đơn vị liều như được sử dụng trong bản mô tả này cùng để chỉ các đơn vị rời rạc về mặt vật lý thích hợp cho liều đơn vị đối với đối tượng được điều trị; mỗi đơn vị chứa lượng định trước của hoạt chất được tính toán để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn kết hợp với chất mang dùng trong dược phẩm được đòi hỏi. Đặc điểm đối với dạng đơn vị liều của sáng chế được tuyên bố và theo cách trực tiếp phụ thuộc vào các đặc điểm đơn nhất của hoạt chất và tác dụng điều trị cụ thể sẽ đạt được và các giới hạn vốn có trong lĩnh vực tạo hợp chất như hoạt chất để điều trị cá thể.

Dược phẩm có thể được bao gồm trong đồ chứa, gói hoặc vật phân tán cùng với các hướng dẫn sử dụng.

Dược phẩm cũng có thể chứa nhiều hơn một hoạt chất nếu cần đối với chỉ định cụ thể được điều trị, tốt hơn là các hoạt chất với các hoạt tính bổ trợ mà không có ảnh hưởng bất lợi cho nhau. Theo cách khác hoặc ngoài ra, dược phẩm có thể bao gồm

chất mà làm tăng cường chức năng của nó, như, ví dụ, chất độc tế bào, xytokin, chất hoá trị liệu hoặc chất ức chế sự sinh trưởng. Các phân tử này có mặt thích hợp trong được phẩm với lượng hữu hiệu cho mục đích định trước.

Theo một phương án, các hoạt chất được dùng trong liệu pháp điều trị kết hợp, *nghĩa là*, được kết hợp với các chất khác, *ví dụ*, các chất điều trị mà hữu ích để điều trị các tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn, như các dạng khác nhau của bệnh ung thư, rối loạn tự miễn dịch và các bệnh viêm. Thuật ngữ “kết hợp” trong bản mô tả này có nghĩa rằng chất được dùng hầu như là đồng thời, cùng lúc hoặc lần lượt. Nếu được dùng lần lượt, khi bắt đầu dùng hợp chất thứ hai, hợp chất thứ nhất trong số hai hợp chất này tốt hơn là vẫn có thể phát hiện được ở nồng độ hữu hiệu ở vị trí điều trị.

Ví dụ, liệu pháp điều trị kết hợp có thể bao gồm một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế đồng bào chế với và/hoặc đồng dùng với, một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung, *ví dụ*, một hoặc nhiều chất ức chế xytokin và chất ức chế yếu tố sinh trưởng, chất ngăn chặn miễn dịch, chất chống viêm, chất ức chế chuyển hoá, chất ức chế enzym, và/hoặc chất độc tế bào hoặc kìm tế bào, như được mô tả chi tiết hơn dưới đây. Các liệu pháp điều trị được phẩm này có thể dùng theo cách có lợi liều thấp của chất điều trị được dùng, do đó tránh được các độc tố có thể có hoặc các biến chứng có liên quan đến các liệu pháp đơn trị khác nhau.

Các chất điều trị được ưu tiên được sử dụng kết hợp với kháng thể theo sáng chế là các chất mà cản trở ở các giai đoạn khác nhau trong đáp ứng viêm. Theo một phương án, một hoặc nhiều kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể được đồng bào chế với và/hoặc đồng dùng với một hoặc nhiều chất bổ sung như xytokin khác hoặc các chất đối kháng yếu tố sinh trưởng (*ví dụ*, thụ thể có thể hoà tan, chất ức chế peptit, phân tử nhỏ, thể dung hợp phối tử); hoặc kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với các đích khác (*ví dụ*, kháng thể mà gắn kết với các xytokin khác hoặc các yếu tố sinh trưởng, các thụ thể của chúng hoặc các phân tử bề mặt tế bào khác); và các xytokin kháng viêm hoặc chất chủ vận của nó.

Theo các phương án khác, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng làm chất bổ trợ vắc xin kháng các rối loạn tự miễn dịch, các bệnh viêm, v.v. Tổ hợp của các chất

bổ trợ để điều trị các loại rối loạn này là thích hợp để sử dụng kết hợp với nhiều kháng nguyên từ các kháng nguyên tự tạo đích, *nghĩa là*, tự kháng nguyên, có liên quan đến tính tự miễn dịch, *ví dụ*, protein gốc myelin; kháng nguyên tự viêm, *ví dụ*, peptit protein tinh bột hoặc kháng nguyên ghép, *ví dụ*, kháng nguyên cùng loại. Kháng nguyên có thể bao gồm các peptit hoặc polypeptit thu được từ protein, cũng như các mảnh của bất kỳ trong số các chất sau đây: sacarit, protein, polynucleotit hoặc oligonucleotit, tự kháng nguyên, peptit protein tinh bột, kháng nguyên ghép, chất gây dị ứng hoặc các thành phần phân tử lớn khác. Trong một số trường hợp, nhiều hơn một kháng nguyên được bao gồm trong được phẩm kháng nguyên.

#### Thiết kế và tạo ra phép điều trị khác

Theo sáng chế và dựa trên hoạt tính của kháng thể mà được tạo ra và được mô tả đặc điểm trong bản mô tả này đối với CD47, việc thiết kế các phương thức điều trị khác ngoài các phần kháng thể được tạo thuận tiện. Các phương thức này bao gồm, mà không hạn chế, phép điều trị kháng thể cải tiến, như kháng thể đặc hiệu kép, độc tố miễn dịch và liệu pháp điều trị đánh dấu phóng xạ, tạo ra các chất trị liệu peptit, liệu pháp gen, liên kháng thể cụ thể, phép điều trị đối nghĩa và phân tử nhỏ.

Ví dụ, liên quan đến kháng thể đặc hiệu kép, các kháng thể đặc hiệu kép có thể được sinh ra mà bao gồm (i) hai kháng thể-một kháng thể có tính đặc hiệu với CD47 và kháng thể còn lại với phân tử thứ hai mà được tiếp hợp với nhau, (ii) kháng thể đơn mà có một chuỗi đặc hiệu với CD47 và chuỗi thứ hai đặc hiệu với phân tử thứ hai hoặc (iii) kháng thể chuỗi đơn mà có tính đặc hiệu với CD47 và phân tử thứ hai. Các kháng thể đặc hiệu kép này được sinh ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật mà đã được biết đến ví dụ, liên quan đến (i) và (ii) Xem ví dụ ấn phẩm: Fanger *et al.* Immunol Methods 4:72-81 (1994) và Wright *et al.* Crit, Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992), và liên quan đến (iii) Xem ví dụ ấn phẩm: Traunecker *et al.* Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52 (1992).

Liên quan đến độc tố miễn dịch, các kháng thể có thể được cải biến để có tác dụng như độc tố miễn dịch sử dụng các kỹ thuật mà đã được biết đến trong lĩnh vực này. Xem ví dụ ấn phẩm: Vitetta Immunol Today 14:252 (1993). Cũng xem patent Mỹ

số 5,194,594. Liên quan đến việc tạo ra kháng thể được đánh dấu phóng xạ, các kháng thể được cải biến này cũng có thể được tạo ra một cách dễ dàng bằng cách dùng các kỹ thuật mà đã được biết đến trong lĩnh vực này. Xem ví dụ ẩn phẩm: Junghans *et al.* in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2d edition, Chafner và Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). Cũng xem 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 trong số các độc tố miễn dịch và phân tử được đánh dấu phóng xạ cũng tiêu diệt tế bào biểu hiện CD47.

Liên quan đến việc tạo ra peptit điều trị, thông qua việc dùng sự hình thành cấu trúc liên quan đến CD47 và các kháng thể của nó, như các kháng thể theo sáng chế hoặc sàng lọc thư viện peptit, peptit điều trị có thể được sinh ra mà được định hướng kháng CD47. Việc thiết kế và sàng lọc peptit điều trị được mô tả trong ẩn phẩm: Houghten *et al.* Biotechniques 13:412-421 (1992), Houghten PNAS USA 82:5131-5135 (1985), Pinalla *et al.* Biotechniques 13:901-905 (1992), Blake và Litzi-Davis BioConjugate Chem. 3:510-513 (1992). Các độc tố miễn dịch và phân tử được đánh dấu phóng xạ cũng có thể được tạo ra và theo cách tương tự, liên quan đến các phân tử peptit như được mô tả trên đây liên quan đến kháng thể. Giả định rằng phân tử CD47 (hoặc dạng, như biến thể ghép hoặc dạng thay thế) có hoạt tính về mặt chức năng trong quy trình bệnh, cũng sẽ có thể thiết kế gen và phép điều trị đối nghĩa của nó qua các kỹ thuật thông thường. Các phương thức này có thể được dùng để điều biến chức năng của CD47. Ngoài ra, các kháng thể theo sáng chế tạo thuận lợi cho việc thiết kế và sử dụng các thử nghiệm chức năng liên quan đến nó. Việc thiết kế và chiến lược đối với điều trị đối nghĩa được mô tả chi tiết trong công bố đơn quốc tế số WO 94/29444. Việc thiết kế và chiến lược cho liệu pháp điều trị gen là đã được biết đến. Tuy nhiên, cụ thể là, việc sử dụng các kỹ thuật điều trị gen bao gồm các liên kháng thể có thể chứng minh lợi ích cụ thể. Xem ví dụ ẩn phẩm: Chen *et al.* Human Gene Therapy 5:595-601 (1994) và Marasco Gene Therapy 4:11-15 (1997). Việc thiết kế và cân nhắc chung liên quan đến điều trị gen cũng được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 97/38137.

Sự hiểu biết thu được từ cấu trúc của phân tử CD47 và sự tương tác của nó với các phân tử khác theo sáng chế, như SIRPα và/hoặc các kháng thể theo sáng chế, và các kháng thể khác có thể được dùng để thiết kế theo cách thích hợp các phương thức

điều trị bổ sung. Về việc này, các kỹ thuật thiết kế được chất thích hợp như tinh thể học tia X, tạo mô hình phân tử trợ giúp (hoặc hỗ trợ) bởi máy tính (CAMM), mối quan hệ cấu trúc-hoạt tính định lượng hoặc định tính (QSAR), và các kỹ thuật tương tự có thể được dùng cho các nỗ lực phát hiện được chất mục tiêu. Việc thiết kế thích hợp cho phép dự đoán cấu trúc protein hoặc cấu trúc tổng hợp mà có thể tương tác với phân tử hoặc dạng đặc hiệu của nó mà có thể được sử dụng để cải biến hoặc điều biến hoạt tính của IL-6Rc. Các cấu trúc này có thể được tổng hợp về mặt hoá học hoặc được biểu hiện trong các hệ sinh học. Phương pháp này đã được xem xét trong ấn phẩm: Capsey *et al.* Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs (Stockton Press, NY (1988)). Hơn nữa, các thư viện tổ hợp có thể được thiết kế và được tổng hợp và được sử dụng trong các chương trình sàng lọc, như nỗ lực sàng lọc số lượng lớn.

#### Phương pháp sàng lọc

Sáng chế đề xuất phương pháp (cũng được dùng để chỉ trong bản mô tả này là “thử nghiệm sàng lọc”) để nhận dạng các chất điều biến, *nghĩa là*, hợp chất ứng viên hoặc thử nghiệm hoặc các chất (*ví dụ*, peptit, peptidomimetic, phân tử nhỏ hoặc các dược chất khác) mà điều biến hoặc theo cách khác cản trở sự gắn kết của CD47 với SIRP $\alpha$ , hoặc các hợp chất ứng viên hoặc thử nghiệm hoặc các chất mà điều biến hoặc theo cách khác cản trở chức năng tạo tín hiệu của CD47 và/hoặc CD47-SIRP $\alpha$ . Cũng được đề xuất là các phương pháp nhận dạng các hợp chất hữu ích để điều trị rối loạn kết hợp với sự biểu hiện, hoạt tính và/hoặc tạo tín hiệu CD47 và/hoặc CD47-SIRP $\alpha$  khác thường. Các phương pháp sàng lọc có thể bao gồm các phương pháp đã biết hoặc được sử dụng trong lĩnh vực này hoặc các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, CD47 có thể được làm bất động trên đĩa vi chuẩn độ và được ủ với hợp chất ứng viên hoặc thử nghiệm, *ví dụ*, kháng thể CD47, với sự có mặt của SIRP $\alpha$ . Tiếp theo, SIRP $\alpha$  gắn kết có thể được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp và sự hấp thụ có thể được phát hiện trên bộ đọc đĩa.

Các phương pháp nhận dạng hợp chất có khả năng thúc đẩy sự thực bào của tế bào khối u bởi 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 này hoặc các phương pháp

được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, các đại thực bào được ủ với tế bào khối u được đánh dấu với sự có mặt của hợp chất ứng viên, *ví dụ*, kháng thể CD47. Sau khoảng thời gian, đại thực bào có thể được quan sát đối với sự tiếp thu của chất đánh dấu khối u để nhận dạng sự thực bào. Các chi tiết bổ sung liên quan đến các phương pháp này, *ví dụ*, thử nghiệm phong bế SIRP $\alpha$  và thử nghiệm thực bào được nêu trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Sáng chế cũng bao gồm các hợp chất được nhận dạng trong các thử nghiệm sàng lọc được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất các thử nghiệm để sàng lọc các hợp chất ứng viên hoặc thử nghiệm mà điều biến chức năng tạo tín hiệu của CD47. Các hợp chất thử nghiệm của sáng chế có thể thu được bằng cách sử dụng bất kỳ trong số nhiều phương pháp trong các phương pháp thư viện tổ hợp đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm: các thư viện sinh học; các thư viện pha rắn hoặc pha lỏng song song có thể thích hợp về mặt không gian; các phương pháp thư viện tổng hợp đòi hỏi sự mở cuộn; phương pháp “từng hạt một”; và phương pháp thư viện tổng hợp sử dụng sự lựa chọn sắc ký ái lực. Phương pháp thư viện sinh học được giới hạn ở các thư viện peptit, trong khi bốn phương pháp khác có thể áp dụng cho peptit, oligome không peptit hoặc các thư viện phân tử nhỏ của hợp chất. (Xem ví dụ ẩn phẩm: Lam, 1997. Anticancer Drug Design 12: 145).

“Phân tử nhỏ” như được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa là để chỉ được phẩm mà có trọng lượng phân tử nhỏ hơn khoảng 5kD và tốt nhất là nhỏ hơn khoảng 4kD. Các phân tử nhỏ có thể là, *ví dụ*, axit nucleic, peptit, polypeptit, peptidomimetic, carbohydrat, lipid hoặc các phân tử hữu cơ hoặc vô cơ khác. Các thư viện hỗn hợp hoá học và/hoặc sinh học, như phân chiết nấm, vi khuẩn hoặc tảo, là đã được biết đến trong lĩnh vực này và có thể được sàng lọc bằng bất kỳ trong số các thử nghiệm của sáng chế.

Các ví dụ về phương pháp tổng hợp thư viện phân tử có thể được tìm thấy trong lĩnh vực này ví dụ trong ẩn phẩm: 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 hợp chất có thể được thể hiện trong dung dịch (xem ví dụ ấn phẩm: Houghten, 1992. *Biotechniques* 13: 412-421), hoặc hạt (xem ví dụ ấn phẩm: Lam, 1991. *Nature* 354: 82-84), trên chip (xem ví dụ ấn phẩm: Fodor, 1993. *Nature* 364: 555-556), vi khuẩn (xem ví dụ patent Mỹ số 5,223,409), bào tử (xem ví dụ ấn phẩm: patent Mỹ số 5,233,409), plasmid (xem ví dụ ấn phẩm: Cull, et al., 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869) hoặc trên thể thực khuẩn (xem ví dụ ấn phẩm: Scott and 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, hợp chất ứng viên được đưa vào phức hệ kháng thể-kháng nguyên và xác định nếu hợp chất ứng viên phá vỡ phức hệ kháng thể-kháng nguyên, trong đó sự phá vỡ phức hệ này cho biết rằng hợp chất ứng viên điều biến chức năng tạo tín hiệu của CD47 và/hoặc sự tương tác giữa CD47 và SIRP $\alpha$ . Theo phương án khác, CD47 có thể hoà tan và/hoặc CD47 và SIRP $\alpha$  protein của sáng chế được đề xuất và được phơi trần với ít nhất một kháng thể đơn dòng làm trung hoà. Sự hình thành phức hệ kháng thể-kháng nguyên được phát hiện và một hoặc nhiều hợp chất ứng viên được đưa vào phức hệ. Nếu phức hệ kháng thể-kháng nguyên bị phá vỡ sau khi đưa vào một hoặc nhiều hợp chất ứng viên, các hợp chất ứng viên này là hữu ích để điều trị các rối loạn kết hợp với việc tạo tín hiệu CD47 và/hoặc CD47-SIRP $\alpha$  khác thường.

Việc xác định khả năng của hợp chất thử nghiệm cản trở hoặc phá vỡ phức hệ kháng thể-kháng nguyên có thể được hoàn thành, ví dụ, bằng cách ghép cặp hợp chất thử nghiệm với đồng vị phóng xạ hoặc chất đánh dấu enzym sao cho sự gắn 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 hệ. Ví dụ, hợp chất thử nghiệm có thể được đánh dấu bằng  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ , hoặc  $^3\text{H}$ , theo cách trực tiếp

hoặc gián tiếp và đồng vị phóng xạ được phát hiện bằng cách đếm trực tiếp số lượng phát ra phóng xạ hoặc bằng thiết bị đếm nhấp nháy. Theo cách khác, các hợp chất thử nghiệm có thể được đánh dấu bằng enzym bằng, ví dụ, peroxidaza từ cây cải ngựa, phosphataza kiềm hoặc luciferaza và chất đánh dấu enzym được phát hiện bằng việc xác định sự chuyển hoá của cơ chất thích hợp thành sản phẩm.

Theo một phương án, thử nghiệm bao gồm việc cho phức hệ kháng thể-kháng nguyên tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm và xác định khả năng hợp chất thử nghiệm tương tác với kháng nguyên hoặc theo cách khác phá vỡ phức hệ kháng thể-kháng nguyên đang tồn tại. Theo phương án này, việc xác định khả năng của hợp chất thử nghiệm tương tác với kháng nguyên và/hoặc phá vỡ phức hệ kháng thể-kháng nguyên bao gồm việc xác định khả năng của hợp chất thử nghiệm gắn kết theo cách ưu tiên với kháng nguyên hoặc phần có hoạt tính về mặt sinh học của nó, so với kháng thể.

Theo phương án khác, thử nghiệm bao gồm việc cho phức hệ kháng thể-kháng nguyên tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm và xác định khả năng của hợp chất thử nghiệm điều biến phức hệ kháng thể-kháng nguyên. Việc xác định khả năng của hợp chất thử nghiệm để điều biến phức hệ kháng thể-kháng nguyên có thể được hoàn thành, ví dụ, bằng cách xác định khả năng của kháng nguyên gắn kết với hoặc tương tác với kháng thể, với sự có mặt của hợp chất thử nghiệm.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận biết rằng, trong bất kỳ trong số các phương pháp sàng lọc được bộc lộ trong bản mô tả này, kháng thể có thể là kháng thể làm trung hoà, mà điều biến hoặc theo cách khác cản trở hoạt tính và/hoặc tạo tín hiệu CD47.

Các phương pháp sàng lọc được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được thực hiện như thử nghiệm dựa trên tế bào hoặc như thử nghiệm không chứa tế bào. Các thử nghiệm không chứa tế bào của sáng chế có thể được tuân theo để sử dụng dạng có thể hoà tan hoặc dạng gắn kết màng của CD47 và mảnh của nó. Trong trường hợp về thử nghiệm không chứa tế bào bao gồm dạng gắn kết màng của CD47, có thể mong muốn sử dụng chất hoà tan sao cho dạng gắn kết màng của protein được duy trì trong dung dịch. Các ví dụ về chất hoà tan bao gồm chất tẩy rửa không ion như n-octylglucosit, n-

dodecylglucosit, n-dodexylmaltosit, octanoyl-N-metylglucamit, decanoyl-N-metylglucamit, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridexypoly(etylen glycol ete)<sub>n</sub>, 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).

Theo nhiều hơn một phương án, có thể mong muốn cố định kháng thể hoặc kháng nguyên để tạo thuận lợi cho việc tách các dạng được tạo phức ra khỏi dạng không được tạo phức của một hoặc cả hai sau khi đưa hợp chất ứng viên vào, cũng như làm thích nghi sự tự động hoá của thử nghiệm. Sự quan sát của phức hệ kháng thể-kháng nguyên với sự có mặt và không có mặt của hợp chất ứng viên có thể được thực hiện trong bình bất kỳ thích hợp để chứa chất phản ứng. Các ví dụ về bình như vậy bao gồm đĩa vi chuẩn độ, ống nghiệm và vi ống ly tâm. Theo một phương án, protein dung hợp mà bổ sung miễn mà cho phép một hoặc cả hai trong số các protein này gắn kết với nền có thể được đề xuất. Ví dụ, protein dung hợp kháng thể GST hoặc protein dung hợp kháng nguyên GST có thể được hấp thụ trên hạt glutathion sepharosa (Sigma Chemical, St. Louis, MO) hoặc đĩa vi chuẩn độ được tạo dẫn xuất glutathion, mà sau đó được kết hợp với hợp chất thử nghiệm, và hỗn hợp được ủ trong các điều kiện có lợi cho sự hình thành phức hệ (ví dụ, ở các điều kiện sinh lý đối với muối và độ pH). Sau khi ủ, hạt hoặc các giếng của đĩa vi chuẩn độ được rửa để loại bỏ các thành phần không gắn kết bất kỳ, nền được cố định trong trường hợp hạt, phức hệ được xác định một cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Theo cách khác, phức hệ có thể được phân ly ra khỏi nền và mức hình thành phức hệ kháng thể-kháng nguyên có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn.

Các kỹ thuật khác để cố định protein trên nền cũng có thể được sử dụng trong các thử nghiệm sàng lọc của sáng chế. Ví dụ, kháng thể (ví dụ, kháng thể 2A1 hoặc kháng thể có trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ SEQ ID NO: từ 5 đến 30 và trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ SEQ ID NO: từ 31 đến 47) hoặc kháng nguyên (ví dụ CD47 protein) có thể được cố định bằng cách dùng sự tiếp hợp của biotin và streptavidin. Các phân tử kháng thể hoặc kháng nguyên được biotinyl hoá có thể được tạo ra từ biotin-NHS (N-hydroxy-suxinimit) bằng cách sử

dụng các kỹ thuật đã được biết đến trong lĩnh vực này (ví dụ, kit biotinyl hoá, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), và được cố định trong giếng của đĩa 96 giếng được phủ streptavidin (Pierce Chemical). Theo cách khác, các kháng thể khác phản ứng với kháng thể hoặc kháng nguyên quan tâm, nhưng mà không cản trở sự hình thành phức hệ kháng thể-kháng nguyên quan tâm, có thể được tạo dẫn xuất vào giếng của đĩa, và kháng thể hoặc kháng nguyên không gắn kết được bẫy trong các giếng bằng sự tiếp hợp kháng thể. Các phương pháp phát hiện các phức hệ này, ngoài các phương pháp được mô tả trên đây đối với phức hệ cố định GST, bao gồm việc phát hiện miễn dịch của phức hệ bằng cách sử dụng các kháng thể khác phản ứng với kháng thể hoặc kháng nguyên.

Sáng chế còn đề cập đến các chất mới được nhận biết bởi bất kỳ trong số các thử nghiệm sàng lọc được kể đến trên đây và sử dụng chúng để điều trị như được mô tả trong bản mô tả này.

#### Chế phẩm dùng để chẩn đoán và phòng ngừa

CD47 MAb của sáng chế được sử dụng trong các chế phẩm chẩn đoán và phòng ngừa. Theo một phương án, CD47 MAb của sáng chế được dùng cho người bệnh mà có nguy cơ phát triển một hoặc nhiều trong số các bệnh được kể đến trên đây ví dụ như, nhưng không hạn chế ở, bệnh ung thư hoặc tình trạng bệnh khối u khác. Khuynh hướng của người bệnh hoặc cơ quan với một hoặc nhiều bệnh ung thư được kể đến trên đây hoặc tình trạng bệnh khối u khác có thể được xác định bằng cách sử dụng chất đánh dấu kiểu gen, huyết thanh hoặc sinh hoá.

Theo phương án khác của sáng chế, kháng thể CD47 được dùng cho cá nhân riêng rẽ được chẩn đoán có chỉ định lâm sàng kết hợp với một hoặc nhiều bệnh được kể đến trên đây, ví dụ như, nhưng không hạn chế ở, bệnh ung thư hoặc tình trạng bệnh khối u khác. Khi chẩn đoán, kháng thể CD47 được dùng để làm dịu hoặc đảo ngược tác dụng của chỉ định lâm sàng kết hợp với một hoặc nhiều bệnh được kể đến trên đây.

Các kháng thể theo sáng chế cũng hữu ích trong việc phát hiện CD47 và/hoặc SIRPα trong mẫu người bệnh và do đó là hữu ích 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 hàm lượng CD47 và/hoặc SIRP $\alpha$  trong mẫu người bệnh.

Theo một phương án, kháng thể CD47 theo sáng chế được cố định trên vật mang dạng rắn (ví dụ, (các) giếng của đĩa vi chuẩn độ). Kháng thể được cố định có tác dụng như kháng thể bắt giữ đối với CD47 và/hoặc SIRP $\alpha$  bất kỳ mà có thể có mặt trong mẫu thử nghiệm. Trước khi cho kháng thể được cố định tiếp xúc với mẫu người bệnh, vật mang dạng rắn được rửa và xử lý bằng chất phong bế như protein sữa hoặc albumin để ngăn ngừa sự hấp phụ không đặc hiệu của chất phân tích.

Tiếp theo, các giếng được xử lý bằng mẫu thử nghiệm được cho là chứa kháng nguyên hoặc với dung dịch chứa lượng tiêu chuẩn của kháng nguyên. Mẫu như vậy là, ví dụ, mẫu huyết thanh từ đối tượng được cho là có hàm lượng kháng nguyên tuần hoàn được xét đến để chẩn đoán bệnh lý. Sau khi rửa cách xa mẫu thử nghiệm hoặc tiêu chuẩn, vật mang dạng rắn được xử lý bằng kháng thể thứ hai mà được đánh dấu theo cách có thể phát hiện. Kháng thể thứ hai được đánh dấu có tác dụng như kháng thể phát hiện. Hàm lượng chất đánh dấu có thể phát hiện được đo và nồng độ của CD47 và/hoặc SIRP $\alpha$  trong mẫu thử nghiệm được xác định bằng việc so sánh với đường cong tiêu chuẩn được phát triển từ mẫu tiêu chuẩn.

Sẽ nhận ra rằng dựa vào các kết quả thu được bằng cách sử dụng kháng thể CD47 theo sáng chế trong thử nghiệm chẩn đoán *in vitro*, có thể phân tầng bệnh (ví dụ, chỉ định lâm sàng kết hợp với bệnh thiếu máu cục bộ, rối loạn tự miễn dịch hoặc viêm) ở đối tượng dựa vào mức biểu hiện của CD47 và/hoặc SIRP $\alpha$ . Đối với bệnh đã nêu, mẫu máu được lấy từ đối tượng được chẩn đoán là ở các giai đoạn khác nhau trong quá trình tiến triển bệnh và/hoặc ở các điểm khác nhau trong việc điều trị bệnh. Bằng cách sử dụng quần thể mẫu mà tạo ra các kết quả có ý nghĩa về mặt thống kê đối với mỗi giai đoạn của quá trình tiến triển hoặc điều trị, khoảng nồng độ của kháng nguyên mà có thể được xem là đặc trưng của mỗi giai đoạn được thiết kế.

Tất cả các tài liệu công bố và tài liệu patent được trích dẫn trong bản mô tả này được đưa ra trong bản mô tả này để tham khảo như thể mỗi tài liệu công bố hoặc tài liệu đó được chỉ định cụ thể và riêng biệt để đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Việc

trích dẫn các tài liệu công bố và tài liệu patent không nhằm mục đích thừa nhận rằng bất kỳ trong số chúng phù hợp với kỹ thuật hiện nay, cũng như không cấu thành sự thừa nhận bất kỳ về cùng nội dung hoặc cùng ngày. Sáng chế giờ đây sẽ được mô tả bởi bản mô tả, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận biết rằng sáng chế được thực thực hiện theo nhiều phương án khác nhau và phần mô tả trên đây và phần ví dụ dưới đây nhằm mục đích minh họa và không nhằm giới hạn yêu cầu bảo hộ kèm theo.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Các ví dụ sau đây, bao gồm các thử nghiệm được thực hiện và các kết quả đạt được được đề xuất nhằm mục đích minh họa và không nhằm giới hạn sáng chế.

#### **Ví dụ 1: Tạo ra và lựa chọn kháng thể CD47**

Kháng thể CD47 được tạo ra bằng cách gây miễn dịch chuột bằng protein tái tổ hợp thể hiện CD47-IgV (kiểu biến đổi tương tự globin miễn dịch), thực hiện chiến lược gây miễn dịch nhanh chóng được cải biến ở nhiều vị trí (Kilpatrick *et al.* (1997) Phát triển nhanh chóng kháng thể đơn dòng trưởng thành về mặt ái lực bằng cách sử dụng RIMMS. Hybridoma 16, 381-389). Ngoài ra, một nửa chuột trong nhóm được gây miễn dịch được tiêm liều đơn kháng thể chủ vận kháng GITR chuột, DTA-1. Sau lịch trình gây miễn dịch, hạch bạch huyết từ tất cả các chuột (DTA-1 được xử lý và không được xử lý) được thu gom và phân ly, nhờ đó cho phép sự phân lập tế bào B và tiếp theo dung hợp với dòng tế bào u tủy của chuột. Dịch nổi thể lai được sàng lọc để gắn kết với CD47 bằng ELISA và bằng phương pháp đếm dòng tế bào đối với tế bào Daudi (ATCC# CCL-213) (Fig.1A). Dịch nổi thể 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 với dịch nổi thể lai với sự có mặt của SIRPα-ECD tái tổ hợp của người được dung hợp với miễn IgG Fc của người. SIRPα đã gắn kết được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp đặc hiệu kháng IgG Fc của người được tiếp hợp HRP (Jackson Immuno Research), và đọc độ hấp thụ ở 650nm trên thiết bị đọc đĩa.

### Ví dụ 2: Mô tả đặc điểm của kháng thể CD47

Các kháng thể chuột CD47 lấy làm ví dụ của sáng chế được thể hiện trên Fig.2. Việc xếp hạng ái lực của kháng thể CD47 phong bế SIRP $\alpha$  được thực hiện bằng phương pháp đếm dòng tế bào trên Raji (ATCC# CCL-86) (Fig.2A) và tế bào CCRF-CEM (ATCC# CCL-119) (Fig.2B). Kháng thể CD47 đã gắn kết được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp kháng IgG của chuột được tiếp hợp FITC (Jackson ImmunoResearch). Kháng thể CD47 đã được biết trong lĩnh vực này, B6H12, được bao gồm làm đối chứng dương tính (Xem ví dụ patent Mỹ số 5,057,604). Trên Fig.2B, B6H12 và 2D3, kháng thể không phong bế SIRP $\alpha$  có bán sẵn trên thị trường, được so với kháng thể được tạo ra trong bản mô tả này. 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 SIRP $\alpha$ của kháng thể CD47

Hiệu lực phong bế SIRP $\alpha$  bởi kháng thể CD47 được đo bằng ELISA trong đó CD47-IgV His-tag tái tổ hợp được cố định trên đĩa vi chuẩn độ Medisorp. Sự gắn kết của SIRP $\alpha$  tái tổ hợp đã được dung hợp với miền Fc của IgG của người được kiểm tra với sự có mặt của lượng kháng thể CD47 gia tăng. SIRP $\alpha$  đã gắn kết được xác định bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp (đặc hiệu Fc) kháng IgG của người được tiếp hợp HRP (Jackson ImmunoResearch). Các kháng thể theo sáng chế thể hiện hiệu lực phong bế SIRP $\alpha$  tăng so với kháng thể B6H12. Fig.3A thể hiện dữ liệu đại diện của thử nghiệm phong bế SIRP $\alpha$  trên cơ sở ELISA.

Kháng thể CD47 được phân tích khả năng phong bế sự gắn kết SIRP $\alpha$  tái tổ hợp vào bề mặt tế bào CD47 bằng phương pháp đếm dòng tế bào. Tế bào CCRF-CEM (ATCC# CCL-119) được sử dụng làm nguồn CD47 trong thử nghiệm và sự gắn kết của SIRP $\alpha$  tái tổ hợp được dung hợp với miền Fc của IgG của người được kiểm tra với sự có mặt của lượng kháng thể CD47 gia tăng. SIRP $\alpha$  được gắn kết được xác định bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp (đặc hiệu Fc) kháng IgG của người được tiếp hợp APC (Jackson ImmunoResearch) (Fig.3B). B6H12 và kháng thể CD47 không phong

bể SIRP $\alpha$  2D3 có bán sẵn trên thị trường trong đó lần lượt được sử dụng các đối chứng dương tính và âm tính.

Ví dụ 4: Các tương tác đồng hình qua trung gian kháng thể CD47

Kháng thể CD47 phong bế SIRP $\alpha$  được phân tích đối với khả năng của chúng gây ra sự tạo cụm tế bào, được biết đến như các tương tác đồng hình, giữa các tế bào dương tính CD47. Tế bào Daudi và Raji được sử dụng làm dòng tế bào biểu hiện CD47 ứng viên. Trong số các kháng thể được thử nghiệm, kháng thể 2A1 của sáng chế là kháng thể chỉ phong bế SIRP $\alpha$  mà không thúc đẩy sự tương tác đồng hình của tế bào biểu hiện CD47.

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

Một ví dụ về sự tương tác đồng hình là sự ngưng kết hồng cầu, như được chứng minh bởi sự ngưng kết RBC. Kháng thể CD47 được sàng lọc đối với sự ngưng kết RBC, như được quan sát bởi khả năng của kháng thể để ngăn ngừa sự sa lắng RBC của người. Bất ngờ là, kháng thể 2A1 được tìm thấy là duy nhất trong số các kháng thể CD47 khác do nó không có khả năng thúc đẩy sự ngưng kết hồng cầu, trong khi có ái lực ở mức cao và khả năng phong bế SIRP $\alpha$ . Các kháng thể khác mà thể hiện sự ngưng kết hồng cầu giảm không phong bế SIRP $\alpha$  gắn kết với CD47.

Để đánh giá khả năng ngưng kết hồng cầu của kháng thể CD47, RBC của người được pha loãng đến 10% trong PBS và ủ ở 37°C trong từ 2 đến 6 giờ với độ chuẩn của kháng thể CD47 trong đĩa 96 giếng đáy tròn. Bảng chứng về sự ngưng kết hồng cầu được chứng minh bởi sự có mặt của RBC không sa lắng, xuất hiện như sương mù so với dấu chấm màu đỏ của RBC không ngưng kết. Bất ngờ là, như được thể hiện trên Fig.4A, kháng thể CD47 theo sáng chế, cụ thể là kháng thể được dùng để chỉ trong bản mô tả này là 2A1, không thể hiện hoạt tính ngưng kết hồng cầu. Biểu đồ thể hiện sự định lượng của thử nghiệm ngưng kết hồng cầu, có nghĩa là “chỉ số ngưng kết hồng cầu” được xác định bằng cách định lượng vùng hạt RBC với sự có mặt của kháng thể, được bình thường hoá đến mức mà không có mặt của kháng thể.

Kháng thể 9E4 của chuột gây ra sự ngưng kết hồng cầu sâu rộng nhất ở tất cả các nồng độ được thử nghiệm. Do đó, kháng thể 9E4 gắn kết CD47 và phong bế sự tương tác CD47 với SIRP $\alpha$ ; tuy nhiên, kháng thể 9E4 gây ra sự ngưng kết hồng cầu sâu rộng.

Vùng chuỗi VH của kháng thể 9E4 được đưa ra dưới đây.

EVQLRQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYMYWVKQSRVRS  
LAWIGRINPYTGAT  
GYDQNFKDKASLIVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARGNRYD  
GWFAYWGQGT  
LV (SEQ ID NO: 78)

Vùng chuỗi VL của kháng thể 9E4 được đưa ra dưới đây.

EIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGV  
PSRFGSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFCQQGNALPPTFGGGTNLEIK (SEQ ID  
NO: 79)

Kháng thể đối chứng B6H12 gây ra sự ngưng kết hồng cầu như được mong đợi đối với SIRP $\alpha$  phong bế kháng thể CD47.

Để điều tra tính đơn nhất của hoạt tính ngưng kết hồng cầu của kháng thể 2A1, nhiều kháng thể CD47 khác được sàng lọc trong thử nghiệm ngưng kết hồng cầu RBC (Fig.4B). Được bao gồm trong thử nghiệm này là phiên bản khảm của kháng thể 2A1 (2A1-xi), mà gồm có vùng biến đổi của chuỗi nặng của 2A1 của chuột, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của 2A1 của chuột được cải biến ở axit amin 106 (nghĩa là, M106I), và vùng cố định của IgG1 của người và Igkappa của người. 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. Bất ngờ là, 2A1 là kháng thể hiếm trong số các kháng thể CD47 được thử nghiệm trên Fig.4B, trong đó chỉ có kháng thể trên Fig.4B với hoạt tính ngưng kết hồng cầu không có mặt hoặc giảm. Fig.4E thể hiện rằng 2A1, 2A1 khảm (2A1-xi), và biến thể được làm giống người không gây ra sự ngưng kết hồng cầu.

Fig.4C thể hiện kết quả của việc sàng lọc kháng thể CD47 bổ sung trong thử nghiệm ngưng kết hồng cầu RBC. Như được thể hiện trên Fig.4C, kháng thể đơn dòng 2D3 CD47 có bán sẵn trên thị trường, mà không phong bế SIRP $\alpha$ , không gây ra sự ngưng kết hồng cầu. Tuy nhiên, các kháng thể CD47 khác có bán sẵn trên thị trường (ví dụ, CC2C6, BRC126, và B6H12) mà phong bế SIRP $\alpha$  gây ra sự ngưng kết hồng cầu (Fig.4C). Do đó, trước sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, các kháng thể hiện có mà phong bế SIRP $\alpha$  gây ra sự ngưng kết hồng cầu, trong khi các kháng thể hiện có, như 2D3 mà không phong bế SIRP $\alpha$  không gây ra sự ngưng kết hồng cầu. Cùng với nhau, các kháng thể theo sáng chế (ví dụ, kháng thể 2A1 và dẫn xuất được làm giống người của nó) là duy nhất trong số các kháng thể CD47 hiện có về khả năng của chúng phong bế SIRP $\alpha$ , nhưng không gây ra sự ngưng kết hồng cầu.

Khoảng nồng độ ở mức cao của kháng thể CD47 lựa chọn được thử nghiệm lại trong thử nghiệm ngưng kết hồng cầu (Fig.4D). Thử nghiệm này thể hiện hiệu quả tiên vùng của sự ngưng kết hồng cầu bởi B6H12 và 9E4, trong đó sự ngưng kết hồng cầu được giảm ở mức cao và các đầu thấp của khoảng nồng độ được thử nghiệm. Sự thể hiện theo đồ họa của chỉ số ngưng kết hồng cầu cũng nêu rõ tác dụng tiên vùng. Tác dụng tiên vùng cũng rõ ràng trên các hình vẽ Fig.4C và Fig.4E. Quan trọng, kháng thể CD47 2A1 của chuột và 2A1 khảm thiếu hoạt tính ngưng kết hồng cầu ở tất cả các nồng độ.

Như được thể hiện trên Fig.4E, kháng thể 1B4 của chuột thể hiện khoảng hẹp của ngưng kết hồng cầu.

Vùng chuỗi VH của kháng thể 1B4 được nêu dưới đây.

QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYIHWVKQRPGQGLEWIGWIYPGSGNT  
KYNERFKGKATLTVATSSSTAYMQLSSLTSEDYFCARREEDYFDYWGQGTLVTV  
(SEQ ID NO: 80)

Vùng chuỗi VL của kháng thể 1B4 được nêu dưới đây.

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLTWYQQKPGQSPKLLIYWAS  
 TRESGVFDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPLTFGAGTKLEIK  
 (SEQ ID NO: 81)

Khả năng ngưng kết hồng cầu của kháng thể được làm giống người thu được từ 2A1 của chuột được thử nghiệm như trên đây. Quan trọng là, kháng thể AB6.12 đại diện được làm giống người trong các isotyp IgG khác nhau của người (IgG1, IgG4-S228P, và IgG4-S228P/L235E) không gây ra sự ngưng kết hồng cầu RBC bất kỳ. 2A1 và 2A1-xi được bao gồm như đối chứng đối với các kháng thể không ngưng kết hồng cầu, trong khi B6H12 và 9E4 được bao gồm làm đối chứng dương tính đối với sự ngưng kết hồng cầu (Fig.4F).

#### Ví dụ 6: Gắn kết với CD47 của khỉ cynomolgus

Khả năng của 2A1 của chuột gắn kết với CD47 của khỉ cynomolgus (cyno) được thử nghiệm. Kháng thể B6H12 đã được báo cáo trước đây là phản ứng ngưng với cyno CD47 và được sử dụng làm đối chứng dương tính đối với sự có mặt đối với cyno CD47 trong thử nghiệm. Thử nghiệm đo sự gắn kết của 2A1 với CD47 của khỉ cynomolgus được thiết kế để so sánh sự gắn kết của 2A1 với CD47 trên tế bào B của khỉ cynomolgus và tế bào của người, trong đó dòng tế bào Raji được sử dụng làm tế bào dương tính CD47 của người. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi cynomolgus (PBMC) được phân lập từ máu nguyên vẹn của cynomolgus bằng việc ly tâm ficoll-paque gradient. Tế bào B của cynomolgus và của người (Raji) được đánh dấu bằng kháng thể CD20 của người của atumumab (Arzerra) ở 10µg/ml, và được phản ứng với dãy pha loãng kháng thể 2A1 CD47 của chuột hoặc B6H12. Tế bào B được đánh dấu bằng kháng thể CD20 của người được phát hiện với kháng thể đa dòng kháng người được tiếp hợp với DyLite 649, trong khi kháng thể CD47 của chuột được phát hiện với kháng thể kháng thể đa dòng kháng chuột được tiếp hợp với DyLite 488. Tế bào được phân tích bằng phương pháp đếm dòng tế bào, thứ nhất được tạo cổng trên tế bào sống bằng FSC và SSC, sau đó trên tế bào dương tính đối với FL4 (CD20 dương tính) và sau cùng FL1 trung gian (CD47 dương tính) được đo. Dữ liệu được bình thường hoá bằng cách chia tín hiệu ở mỗi nồng độ theo tín hiệu tối đa đối với mỗi kháng thể trên

mỗi quần thể tế bào. Kết quả được bình thường hoá được thể hiện trên Fig.5 cho biết rằng 2A1 không phản ứng ngang với cyno CD47 và có ái lực giống như được so với CD47 của người. Phù hợp với các kết quả được thể hiện trên đây, B6H12 có ái lực thấp hơn đối với CD47 bề mặt tế bào đối với Raji và tế bào B cynomolgus so với kháng thể theo sáng chế.

#### Ví dụ 7: Tạo ra kháng thể khảm

Để nhận dạng trình tự của các vùng biến đổi của các chuỗi nặng (VH) và nhẹ (VL) của kháng thể 2A1 của chuột, axit ribonucleic (ARN) được phân lập từ thể lai và được dùng trong phản ứng chuỗi polymeraza phiên mã ngược (RT-PCR) (Phusion RT-PCR Kit Thermo Scientific) để tạo ra ADN hỗ trợ sợi thứ nhất. Bộ đoạn môi thoát biến mà bao gồm toàn bộ kho ở chuột chứa trình tự dẫn đầu kháng thể của VH và VL được sử dụng trong PCR trong đó ADN hỗ trợ sợi thứ nhất có tác dụng làm khuôn mẫu.

Các đoạn môi xuôi chiều (đoạn dẫn đầu 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 | CTCCTGTCAKTAACKCAGGT (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 | CTTGACAGYCVTTCKGGT (SEQ ID NO: 99)       |
| VH3-2 | CTTCACAGCCTTTCCTGGT (SEQ ID NO: 100)     |
| VH4   | CTTAAAAGGGGTCCAGTGT (SEQ ID NO: 101)     |
| VH5-1 | CAYTTTAAAARGTGTTCMAGTGT (SEQ ID NO: 102) |
| VH5-2 | GTTTTAAAAGGTGTCCTGTG (SEQ ID NO: 103)    |
| VH6   | CTYTTAAAAGGKGTCAGWG (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)      |

Đoạn mỗi ngược (đoạn cố định IgG của chuột) được nêu dưới đây.

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

Đoạn mỗi xuôi chiều (đoạn dẫn đầu 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 | CTCAATTGTAGTGCCAGATGT (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 | CTSTGGTTGTCTGGTGTGA (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    | CAGGTGCCTCGTGAC (SEQ ID NO: 137)        |
| VK22-2    | CTCTGGTGCCCTGTGCA (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)   |

Đoạn mỗi ngược chiều (đoạn cố định IgKappa của chuột) được nêu dưới đây.

| Tên | Trình tự |
|-----|----------|
|-----|----------|

|         |                                    |
|---------|------------------------------------|
|         | GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG (SEQ |
| LC -rev | ID NO: 146)                        |

VH và VL đã được khuếch đại sau đó được tạo dòng trong khung vào trong vật truyền lần lượt chứa trình tự tiết kháng thể thích hợp và vùng cố định IgG1 và Igkappa của người, để tạo ra cấu trúc ADN khảm của chuột:người. Các cấu trúc này được đồng

chuyển nhiễm vào trong tế bào 293Freestyle (Life Technologies) và tinh chế kháng thể thu được từ dịch nổi nuôi cấy tế bào bằng sắc ký Protein-A. Để xác định rằng các trình tự VH và VL đúng đắn đã được nhận dạng, 2A1 khảm (có nghĩa là 2A1-xi) được so với kháng thể 2A1 cha mẹ của chuột và thử nghiệm gắn kết CD47 bằng phương pháp đếm dòng tế bào trên tế bào Raji (Fig.6). B6H12 cũng được bao gồm như đối chứng dương tính trong thử nghiệm này. 2A1-xi đã được gắn kết được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp kháng IgG của người được tiếp hợp FITC. 2A1 và B6H12 đã được gắn kết được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp kháng IgG của chuột được tiếp hợp FITC. Ái lực biểu kiến được xác định bằng cách khớp không tuyến tính (Prism Graphpad Software) cường độ huỳnh quang trung bình ở các nồng độ kháng thể khác nhau (bảng 2). Kháng thể 2A1-xi có ái lực gắn kết tương tự như kháng thể 2A1 của chuột đối với CD47 bề mặt tế bào, chứng tỏ rằng các trình tự VH và VL đã được nhận dạng một cách đúng đắn.

Bảng 2.

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

#### Ví dụ 8: Kháng thể được làm giống người

Kháng thể 2A1 CD47 của chuột được làm giống người để làm giảm tiềm năng gây miễn dịch khi được dùng cho người bệnh. Trình tự của vùng VH và VL của 2A1 so với trình tự kháng thể của người trong ngân hàng dữ liệu IMGT. Tiếp theo, mô hình cấu trúc được tạo ra gồm các vùng 2A1 VH và VL bằng cách sử dụng các cấu trúc đã biết của hầu hết các kháng thể được làm giống người có liên quan một cách chặt chẽ hoặc của người trong Protein Data Bank (PDB). Ba vùng quyết định bổ trợ (CDR) trong các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể 2A1 được cố định và các khung của chuột được thay thế bằng các khung của người mà có khả năng cao nhất duy trì sự định

hướng đúng đắn của CDR. Các cấu trúc tương ứng với mỗi biến thể 2A1 được làm giống người được tạo ra bằng việc tổng hợp gen và được tạo dòng trong khung vào trong vật truyền chứa trình tự tiết thích hợp và vùng cố định IgG1 và Iggkappa của người. Các tổ hợp khác nhau của các chuỗi nặng và nhẹ được làm giống người được đồng truyền nhiễm vào trong tế bào 293Freestyle (Life Technologies), và các kháng thể thu được được tinh chế từ dịch nuôi cấy tế bào bằng sắc ký Protein-A.

Các kháng thể được làm giống người được thử nghiệm khả năng của chúng đối với việc gắn kết tế bào Raji bằng phương pháp đếm dòng tế bào (Fig.7). Kháng thể 2A1-xi được sử dụng làm đối chứng trong hầu hết các thử nghiệm này để thiết lập tiêu chuẩn đối với ái lực gắn kết. Kháng thể được làm giống người còn được tối ưu hoá để làm tăng cường sự biểu hiện và làm giảm vị trí khó không chắc chắn bao gồm các vị trí đồng phân hoá và amit hoá khử tiềm năng. Ví dụ về kháng thể được làm giống người được tối ưu hoá thu được từ kháng thể 2A1 của chuột được xác định như kháng thể AB6.12, mà thể hiện ái lực gắn kết rất tương tự như kháng thể 2A1-xi (Fig.7H; bảng 3). Các ái lực biểu kiến được xác định bằng cách khớp không tuyến tính (Prism Graphpad Software) có cường độ huỳnh quang trung bình ở các nồng độ kháng thể khác nhau.

Bảng 3.

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

Kháng thể AB6.12 sau đó được chuyển hoá từ IgG1 thành isotyp IgG khác của người bằng cách thay thế miền cố định của chuỗi nặng. Như được thể hiện trên Fig.7I, sự thay đổi isotyp IgG thành phiên bản bản lề ổn định của IgG4 (IgG4P: S228P), và biến thể gắn kết thụ thể Fc giảm của IgG4 bản lề ổn định (IgG4PE: S228P/L235E) không làm thay đổi ái lực gắn kết của kháng thể được làm giống người về phía CD47 bề mặt tế bào (Fig.7I; bảng 4). Ái lực biểu kiến được xác định bằng cách khớp không

tuyến tính (Prism Graphpad Software) cường độ huỳnh quang trung gian ở các nồng độ kháng thể khác nhau.

Bảng 4.

|               | KD(biểu kiến) (pM) | Sai số tiêu chuẩn | R <sup>2</sup> |
|---------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 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         |

Trong quy trình gây miễn dịch, kháng thể CD47 được thử nghiệm để bảo đảm chức năng phong bế SIRPα là nguyên vẹn. Như được thể hiện trên Fig.7J, nhiều isotyp IgG của kháng thể được làm giống người, AB6.12, phong bế sự tương tác SIRPα:CD47, bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên phương pháp đếm dòng tế bào được mô tả trong ví dụ 3 trên đây. Các kháng thể CD47 lấy làm ví dụ và vùng VH và vùng VL tương ứng của chúng bao gồm các vùng được nêu trong bảng 1.

Trong quy trình gây miễn dịch, đã xác định được rằng theo một số phương án, motip trình tự axit amin, “NA,” lúc bắt đầu của VH CDR3 (SEQ ID NO: 52 hoặc SEQ ID NO: 77) là quan trọng đối với sự gắn kết của kháng thể CD47 được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, với sự vắng mặt của trình tự axit amin “NA” ở lúc bắt đầu của VH CDR3 (SEQ ID NO: 52 hoặc SEQ ID NO: 77), kháng thể CD47 theo sáng chế không gắn kết với đích của chúng hoặc gắn kết với đích của chúng với ái lực thấp hơn so với chúng sẽ gắn kết với sự có mặt của trình tự axit amin “NA.” Ví dụ, khi motif “NA” được thay đổi thành motif thích hợp hơn của “AR” hoặc “AT,” sự gắn kết hầu như được giảm (nghĩa là, lớn hơn mười lần). Theo các phương án khác, với sự vắng mặt của gốc axit amin “NA” ở lúc bắt đầu của VH CDR3 (SEQ ID NO: 52 hoặc SEQ ID NO: 77), kháng thể CD47 theo sáng chế gắn kết với đích của chúng với ái lực tương đương so với sự gắn kết với sự có mặt của gốc axit amin “NA.”

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận biết rằng có thể xác định, mà không cần phải trải qua thử nghiệm quá mức, liệu sự thay thế axit amin trong trình tự của kháng thể CD47 theo sáng chế có dẫn đến kháng thể về cơ bản có cùng

chức năng, ví dụ, kháng thể CD47 với khả năng phong bế SIRP $\alpha$  và không gây ra mức ngưng kết hồng cầu đáng kể và/hoặc tan tiêu cầu.

Hình ảnh vết từ sắc ký loại trừ theo kích thước bằng cách 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. Tất cả ba biến thể là có hơn 98% monome. Fig.8B là ảnh chụp của gel SDS-PAGE nhuộm xanh coomassie của nhiều biến thể được làm giống người của 2A1 trong các 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 mà được điều hoà tăng đối với tế bào khối u và cũng được cho là góp phần vào việc tránh gây miễn dịch thông qua sự tương tác của nó với SIRP $\alpha$  phối tử tự nhiên của nó. Sự thất nút của CD47 với SIRP $\alpha$  trên đại thực bào dẫn đến hoạt tính thực bào giảm. Như được mô tả chi tiết dưới đây, đã xác định được rằng nếu hoạt tính gắn kết CD47 và gắn kết SIRP $\alpha$  của kháng thể 2A1 và các biến thể của nó, thúc đẩy sự thực bào tế bào khối u với sự có mặt của các đại thực bào của người.

PBMC được phân lập từ máu người và bạch cầu đơn nhân được biệt hoá thành các đại thực bào bằng việc ủ chúng trong môi trường AIM-V (Life Technologies) trong 7 ngày. Bạch cầu đơn nhân này có nguồn gốc đại thực bào (MDM) trở nên dính bám cho phép tế bào khác được rửa ra hết. MDM được cạo và được cấy lại vào đĩa 12 giếng và cho phép dính bám trong 24 giờ. Dòng tế bào khối u của người CCRF-CEM được chọn làm kiểu tế bào đích do sự biểu hiện CD47 ở mức cao của nó. Tế bào CCRF-CEM được đánh dấu bằng 0,3 $\mu$ M CFSE ở 37°C trong 15 phút, sau đó rửa và thêm vào MDM ở tỷ lệ tế bào khối u/thể thực bào là 4:1 và kháng thể CD47 được bổ sung vào ở các nồng độ khác nhau. Sự thực bào của tế bào đích được để xảy ra trong 3 giờ. Tiếp theo, tế bào đích không thực bào được rửa ra hết bằng PBS. Thể thực bào còn lại được cạo bỏ, nhuộm bằng kháng thể thành CD14 đánh dấu đại thực bào được tiếp hợp với DyLite 649 (Biolegend), và phân tích bằng phương pháp đếm dòng tế bào. Sự thực bào được đo bằng cách khởi đầu trên tế bào sống mà dương tính FL4 (CD14+), và sau đó đánh giá tỷ lệ phần trăm của tế bào dương tính FL1 (CFSE+).

Fig.9 thể hiện rằng kháng thể CD47 2A1 và biến thể được làm giống người của nó thể hiện sự gia tăng phụ thuộc liều trong sự thực bào của tế bào khối u bởi MDM. Kháng thể 2A1 và biến thể được làm giống người AB2.05 là duy nhất về khả năng của chúng để gây sự thực bào của tế bào khối u ở 66,7pM, trong khi B6H12 không có hoạt tính ở nồng độ này (Fig.9A). Fig.9B thể hiện cách 2A1, và các biến thể được làm giống người AB2.05, AB6.12-IgG1, AB6.12-IgG4P, và AB6.12-IgG4PE đều gây ra sự thực bào tối đa ở 0,3 $\mu$ g/ml hoặc 2nM, trong khi B6H12 đòi hỏi nồng độ cao hơn. Các dữ liệu này chứng minh rằng kháng thể CD47, 2A1 (và các biến thể được làm giống người thu được từ nó), gây ra sự thực bào qua trung gian đại thực bào của tế bào khối u dương tính CD47. Trong ví dụ này, tế bào CCFR-CEM được dùng làm tế bào đích dương tính CD47.

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

Hoạt tính kháng khối u của kháng thể CD47 của chuột được đánh giá trong mô hình u lympho của Raji. Tế bào Raji được ghép dưới da vào chuột NOD/SCID và chia ngẫu nhiên thành 5 nhóm (10 chuột/nhóm, ngày 0). Nhóm 1: tá được dạng lỏng (chỉ có chất đệm); Nhóm 2: B6H12 (đối chứng dương tính); Nhóm 3: 1B4; Nhóm 4: 2A1; và Nhóm 5: 9E4. Việc điều trị bằng mỗi kháng thể hoặc tá được dạng lỏng (chỉ có chất đệm) được bắt đầu khi khối u có thể nhìn thấy được (50mm<sup>3</sup>, ngày 13) và chuột được gây mê khi thể tích khối u của chúng đạt đến khoảng 1500mm<sup>3</sup>. Thể tích khối u được đo 3 lần/tuần. Kháng thể được dùng liều trong tĩnh mạch (IV) với 200 $\mu$ g 3 lần/tuần trong 3 tuần (tổng cộng 9 liều/chuột). Việc điều trị được bắt đầu vào ngày 13 và kết thúc vào ngày 32.

Như được thể hiện trên Fig.10A, kháng thể CD47 theo sáng chế, cụ thể là kháng thể 2A1, chứng minh hoạt tính kháng khối u trong mô hình động vật mắc u lympho này. Để đạt đến thể tích khối u bằng 1500mm<sup>3</sup>, Nhóm 1 (chỉ có tá được dạng lỏng) cần khoảng 25 ngày; Nhóm 2 (B6H12.2) cần khoảng 45 ngày; Nhóm 3 (1B4) cần khoảng 37 ngày; Nhóm 4 (2A1) cần khoảng 85 ngày; và Nhóm 5 (9E4) cần khoảng 40 ngày để đạt đến thể tích khối u khoảng 1500mm<sup>3</sup>. Các dữ liệu này cho biết rằng kháng thể 2A1 có hiệu lực lớn hơn đáng kể so với tất cả kháng thể gắn kết CD47

được thử nghiệm, bao gồm B6H12 mà đã được biết đến gắn kết CD47, phong bế sự tương tác của CD47 với SIRP $\alpha$ , và ngăn chặn sự hình thành khối u trong các mô hình chuột của bệnh ung thư của người. Bất ngờ là, hoạt tính ngăn chặn khối u của các kháng thể CD47 này không tương quan với khả năng của chúng trong việc gắn kết CD47 hoặc phong bế sự tương tác của CD47 với SIRP $\alpha$ , mà sẽ được mong đợi dựa vào các dữ liệu được 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 tương tự phong bế tương tác giữa CD47 và SIRP $\alpha$ . Ngoài ra, hiệu quả tăng cường của 2A1 có thể không được giải thích bởi sự khác nhau trong miền Fc của kháng thể được mô tả do tất cả các kháng thể được sử dụng trong nghiên cứu này gồm có các miền IgG1 giống nhau của chuột. Do đó, ngoài được phẩm đơn nhất, kháng thể 2A1 có các đặc điểm bất ngờ và đơn nhất bao gồm không thể gây ra sự tương tác đồng hình giữa các tế bào biểu hiện CD47, *ví dụ*, hồng huyết cầu và hoạt tính ngăn chặn khối u tăng cường mà có thể không được giải thích bằng sự gắn kết tăng cường với CD47 hoặc khả năng phong bế sự tương tác giữa CD47 và SIRP $\alpha$  gia tăng.

Để xác nhận rằng kháng thể 2A1 được làm giống người vẫn có hoạt tính kháng khối u của chúng, nghiên cứu khối u Raji tương tự được thực hiện. Việc thiết kế nghiên cứu là tương tự như được mô tả trên đây. Tế bào Raji được ghép dưới da vào chuột NOD/SCID được chia ngẫu nhiên thành 5 nhóm (10 chuột/nhóm, ngày 0). Trong nghiên cứu này, các kháng thể được dùng liều trong màng bụng (IP) với 200 $\mu$ g 3 lần/tuần trong 3 tuần (tổng cộng có 9 liều/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 với dẫn xuất được làm giống người, AB6.12. Đối với nghiên cứu này, AB6.12 được cấu trúc (như được mô tả trong ví dụ 8) thành IgG1 của người (nhóm 3), IgG4P của người (nhóm 4) và IgG4PE của người (nhóm 4). Do đó, thử nghiệm này được thiết kế chỉ ra ảnh hưởng của việc làm giống người của 2A1 đối với hoạt tính ngăn chặn khối u của nó và vai trò tiềm năng của chức năng tác quan miền Fc mà đã được biết đến trong lĩnh vực này để góp phần vào hoạt tính kháng khối u của nhiều kháng thể. Cũng chứng minh được rằng IgG1 của người có chức năng tác quan nhiều hơn đáng kể so với

IgG4P của người. IgG4PE được phát triển để làm giảm tiếp chức năng tác quan. Như có thể nhìn thấy được trên Fig.10B, việc làm giống người của 2A1 không làm giảm bớt hoạt tính kháng khối u của 2A1, và trên thực tế có thể đã làm tăng cường nó. Tất cả AB6.12-hIgG1, AB6.12-hIgG4P, và AB6.12-hIgG4PE thể hiện hoạt tính kháng khối u tương tự mà nó dường như lớn hơn một cách 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 hoạt tính gắn kết CD47 và phong bế SIRP $\alpha$  tương tự. Ngoài ra, do AB6.12-hIgG1, AB6.12-hIgG4P và AB6.12-hIgG4PE có hoạt tính kháng khối u tương tự, nên dường như là chức năng tác quan đóng vai trò trong hiệu quả của kháng thể AB6.12 2A1 được làm giống người.

#### Ví dụ 11: Đồng kết tinh của kháng thể CD47 với CD47

CD47 là protein chuyển qua màng 5 đường với miền IgV ngoại bào đơn (kiểu biến đổi tương tự globin miễn dịch) mà được glycosyl hoá ở mức cao ở 6 vị trí. Cấu trúc của miền CD47-IgV đã được giải quyết trong phức hệ với miền IgV của SIRP $\alpha$ , phối tử tự nhiên của nó (Protein Data Bank (PDB) số tham chiếu 2JJS; Hatherley et al., 2008 Mol Cell, 25;31(2): 266-77 (Fig.11A)). Cấu trúc này thể hiện SIRP $\alpha$ -IgV gắn kết với CD47-IgV trên epitop đỉnh bao gồm pyroglutamat đầu cuối N của CD47. Cấu trúc này giải thích một cách đầy đủ cách mà cả hai protein chuyển qua màng bề mặt tế bào có thể tương tác một cách hữu hiệu từ các tế bào liên kề theo hướng từ đầu đến đầu. Cấu trúc tinh thể học tia X của CD47-IgV trong phức hệ với B6H12 Fab được thể hiện trên Fig.11B. Để rõ ràng, vùng cố định của Fab (CH1 và CL) được bỏ qua trên Fig. này và chỉ có Fv (VH và VL) được thể hiện. Điều này cho biết vị trí gắn kết đỉnh, định vị kháng thể này trên bề mặt rất cách xa với màng tế bào (Fig.11B). Cơ chế phong bế SIRP $\alpha$  bởi B6H12 là rõ ràng dựa vào cấu trúc này. Vị trí liên quan đến mục đích định hướng của màng tế bào được mô tả như đường gạch ngang trên Fig.11.

Để xác định epitop đích của các kháng thể theo sáng chế, cấu trúc tinh thể học tia X của đồng phức hệ của miền CD47-IgV và Fab của 2A1-xi (kháng thể khảm với các miền CH1 và CL của người) được xác định (Fig.11C). Để làm rõ, các vùng cố định của Fab (CH1 và CL) được bỏ qua trên Fig. này và chỉ có Fv (VH và VL) được

thể hiện. Khác với cấu trúc được xác định trước đây của CD47 gắn kết SIRP $\alpha$  theo hướng từ phía đầu đến phía đầu (Fig.11A), và kháng thể B6H12 được định vị ở đỉnh cách xa với màng (Fig.11B), cấu trúc của 2A1 trong phức hệ với CD47 cho biết sự gắn kết của kháng thể với CD47 gần với màng theo hướng từ phía đầu sang phía bên bất ngờ và đơn nhất (Fig.11C). 2A1 epitop trên CD47 là gián đoạn và bao gồm các gốc Y37, K39, K41, vòng KGRD (SEQ ID NO: 56) (các gốc từ 43 đến 46), D51, H90, N93, E97, T99, E104, và E106 của CD47 khi được đánh số theo SEQ ID NO: 147 (*nghĩa là*, SEQ ID NO: 48 ngoại trừ trình tự tín hiệu (các axit amin từ 1 đến 18)). Cấu trúc của 2A1 gắn kết với CD47 cũng cho biết rằng VH chủ yếu có liên quan đến việc gắn kết với vòng KGRD (SEQ ID NO: 56) của CD47, trong khi miền VK tương tác với các gốc đỉnh bao gồm Y37, T102, và E104, mà có liên quan đến việc gắn kết SIRP $\alpha$ . Do đó, chủ yếu là miền VK mà ngăn ngừa về mặt vật lý SIRP $\alpha$  gắn kết với CD47. Các nghiên cứu cấu trúc này gợi ý rằng epitop đơn nhất mà 2A1 gắn kết vào phía bên của CD47. Trái với kháng thể CD47 đã được biết đến trong lĩnh vực này, hướng của vùng 2A1 VH ở vị trí gần màng là dấu hiệu tới hạn của kháng thể mà ngăn ngừa mức ngưng kết hồng cầu của hồng huyết cầu đáng kể bằng cách ép kháng thể sao cho nó có thể không tạo cầu với phân tử CD47 ở tế bào liền kề.

#### Ví dụ 12: Hiệu quả của isotype và các đột biến isotype đối với sự tan tiểu cầu

Chức năng phụ thuộc Fc chủ yếu của kháng thể (*ví dụ*, kháng thể CD47) đối với việc loại trừ tế bào đích là tính tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) được khởi đầu bằng cách gắn kết C1q với vùng Fc; tính tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) được qua trung gian bởi sự tương tác của vùng Fc với các thụ thể Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ Rs), Fc $\gamma$ RIIIa chủ yếu đối với tác tế bào thụ quan miễn dịch (*ví dụ*, tế bào NK và bạch cầu trung tính); và sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP) mà được mang bởi đại thực bào qua sự nhận biết tế bào đích được opsin hoá qua Fc $\gamma$ RI. Các phân lớp kháng thể có sự khác nhau về khả năng của chúng làm trung gian hoạt tính thụ quan phụ thuộc Fc. Trong các phân lớp IgG1 và IgG3 của người có hiệu lực ở mức cao đối với CDC do gắn kết C1q. Ngoài ra, phân lớp IgG1 có ái lực cao nhất đối với Fc $\gamma$ R và nhờ đó có hiệu lực lớn nhất của ADCC và ADCP phụ thuộc Fc. phân lớp IgG4 thiếu khả

năng gắn kết C1q và có ái lực gắn kết Fc $\gamma$ R giảm rất nhiều và nhờ đó có chức năng thụ quan được giảm một cách đáng kể.

Hiệu quả của kháng thể mà gắn kết CD47 đối với sự tan tiểu cầu được khám phá. Việc điều trị khỉ cynomolgus bằng liều đơn kháng thể thuộc phân lớp IgG1 mà gắn kết với CD47 dẫn đến sự tan đáng kể tiểu cầu ở tất cả các liều được thử nghiệm (10, 30, 100mg/kg) (Fig.12C đến Fig.12D), so với sự tan không đáng kể của tiểu cầu khi tá được dạng lỏng được dùng (Fig.12A đến Fig.12B). Do đó, kháng thể thuộc phân lớp IgG1 mà gắn kết CD47 có thể dẫn đến sự tan tiểu cầu theo cách phụ thuộc Fc.

Để xác định nếu phân lớp khác nhau của kháng thể cũng gây ra sự tan tiểu cầu, thử nghiệm được lặp lại với kháng thể CD47 của phân lớp IgG4. phân lớp IgG4 của kháng thể mà gắn kết CD47 (IgG4P, với đột biến S228P làm ổn định vùng bản lề của kháng thể) cũng dẫn đến sự tan tiểu cầu ở tất cả các nồng độ được thử nghiệm, mặc dù mức độ nhỏ hơn so với phiên bản phân lớp IgG1 (Fig.E đến Fig.F). Tiếp theo, dạng đột biến của phân lớp IgG4 của kháng thể kháng CD47 (IgG4PE, với đột biến S228P cũng như đột biến L235E để làm giảm sự gắn kết Fc $\gamma$ R) được thử nghiệm đối với sự tan tiểu cầu (Fig.12G đến Fig.H). Ngạc nhiên là, kháng thể IgG4PE không dẫn đến sự tan tiểu cầu thậm chí ở liều rất cao (100mg/kg). Do đó, kháng thể gắn kết CD47 với sự gắn kết Fc $\gamma$ R giảm ở mức trầm trọng và chức năng tác quan không dẫn đến sự tan tiểu cầu.

#### Ví dụ 13: Hoat tính làm tan hồng huyết cầu (RBC) của kháng thể CD47

Weiskopf et al đã phát hiện ra rằng khi kháng thể CD47 mà gắn kết CD47 của chuột hoặc ái lực gây ra protein dung hợp SIRP $\alpha$ -Fc được dùng cho chuột và/hoặc khỉ cynomolgus, sự mất hồng huyết cầu và bệnh thiếu máu được quan sát. (Xem, Weiskopf et al. Engineered SIRP $\alpha$  Variants as Immunotherapeutic Adjuvants to Anticancer Antibodies; Science 2013; 341:88). Trước khi sáng chế được thể hiện trong bản mô tả này, tất cả phân tử gắn kết CD47 đã được biết đến (*ví dụ*, kháng thể CD47 và protein dung hợp SIRP $\alpha$ -Fc tái tổ hợp) mà phong bế SIRP $\alpha$  và chứa miền Fc cũng gây ra sự tan RBC.

Các thử nghiệm được thực hiện để xác định hiệu quả phong bế SIRP $\alpha$ , kháng thể không gây ngưng kết hồng cầu CD47 của sáng chế đối với sự tan hồng huyết cầu in vivo. Ngạc nhiên là, kháng thể không gây ngưng kết hồng cầu CD47 của sáng chế không gây ra sự tan hồng huyết cầu đáng kể sau khi dùng. Cụ thể là, các biến thể IgG4-P và IgG4-PE của kháng thể AB06.12 được dùng cho khỉ cynomolgus và ở liều 10, 30, và 100mg/kg bằng cách truyền trong tĩnh mạch. Ba khỉ được sử dụng/nhóm liều đối với mỗi kháng thể. Số lượng hồng huyết cầu được kiểm tra theo thời gian và so với khỉ được điều trị tá dược dạng lỏng. Fig.13 mô tả số lượng RBC trung bình ở khỉ được điều trị kháng thể, được chuẩn hoá đến số lượng RBC trung bình của khỉ được điều trị tá dược dạng lỏng. Sự tan RBC không đáng kể ở khỉ được điều trị kháng thể được quan sát so với động vật được điều trị tá dược dạng lỏng, chứng minh rằng CD47 không gây ngưng kết hồng cầu có thể được dùng ở liều cao mà không gây ra bệnh mất máu ở đối tượng.

### YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng được phân lập gắn kết với CD47, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi và là isotyp IgG4 chứa đột biến S228P và L235E (IgG4PE), và trong đó kháng thể này gây ra mức tan tiêu cầu ít hơn kháng thể kháng CD47 với isotyp IgG mà có cùng miền biến đổi nhưng không có các đột biến S228P và L235E.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng CD47 với isotyp IgG có cùng miền biến đổi nhưng không có cả hai đột biến S228P và L235E là isotyp IgG1, hoặc isotyp IgG4 với đột biến S228P (IgG4P).
3. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể khảm hoặc được làm giống người.
4. Kháng thể theo điểm 1, trong đó CD47 là CD47 của người.
5. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm trình tự biến đổi của chuỗi nặng (VH) được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: từ 5 đến 30.
6. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: từ 31 đến 47.
7. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm trình tự chuỗi VH được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: từ 5 đến 30 và trình tự chuỗi VL được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: từ 31 đến 47.
8. Kháng thể theo điểm 7, trong đó kháng thể này bao gồm trình tự chuỗi VH được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 5, 7, 8, 11, 12, từ 15 đến 17, từ 20 đến 22 và từ 27 đến 30 được ghép cặp với trình tự chuỗi VL được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 31, 32, 35, 40, 41, 42, 43, 44 và 47.
9. Kháng thể theo điểm 7, trong đó kháng thể này bao gồm tổ hợp của trình tự chuỗi VH và trình tự chuỗi VL được chọn từ các tổ hợp được liệt kê trong bảng dưới đây:

| Kháng thể      | Trình tự biến đổi của chuỗi nặng<br>(VH) | Trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ<br>(VL) |
|----------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 2A1            | SEQ ID NO: 5                             | SEQ ID NO: 31                           |
| <u>2A1-xi</u>  | <u>SEQ ID NO: 5</u>                      | <u>SEQ ID NO: 32</u>                    |
| <u>AB2.03</u>  | <u>SEQ ID NO: 7</u>                      | <u>SEQ ID NO: 33</u>                    |
| <u>AB2.04</u>  | <u>SEQ ID NO: 7</u>                      | <u>SEQ ID NO: 34</u>                    |
| AB2.05         | SEQ ID NO: 7                             | SEQ ID NO: 35                           |
| <u>AB2.06</u>  | <u>SEQ ID NO: 7</u>                      | <u>SEQ ID NO: 36</u>                    |
| <u>AB2.07</u>  | <u>SEQ ID NO: 7</u>                      | <u>SEQ ID NO: 37</u>                    |
| <u>AB2.08</u>  | <u>SEQ ID NO: 7</u>                      | <u>SEQ ID NO: 38</u>                    |
| <u>AB2.09</u>  | <u>SEQ ID NO: 7</u>                      | <u>SEQ ID NO: 39</u>                    |
| <u>AB2.13</u>  | <u>SEQ ID NO: 7</u>                      | <u>SEQ ID NO: 43</u>                    |
| <u>AB3.09</u>  | <u>SEQ ID NO: 8</u>                      | <u>SEQ ID NO: 39</u>                    |
| AB6.12         | SEQ ID NO: 11                            | SEQ ID NO: 42                           |
| <u>AB6.13</u>  | <u>SEQ ID NO: 11</u>                     | <u>SEQ ID NO: 43</u>                    |
| <u>AB6.14</u>  | <u>SEQ ID NO: 11</u>                     | <u>SEQ ID NO: 44</u>                    |
| <u>AB6.17</u>  | <u>SEQ ID NO: 11</u>                     | <u>SEQ ID NO: 47</u>                    |
| <u>AB10.13</u> | <u>SEQ ID NO: 15</u>                     | <u>SEQ ID NO: 43</u>                    |
| <u>AB10.14</u> | <u>SEQ ID NO: 15</u>                     | <u>SEQ ID NO: 44</u>                    |
| <u>AB11.05</u> | <u>SEQ ID NO: 16</u>                     | <u>SEQ ID NO: 35</u>                    |
| <u>AB12.05</u> | <u>SEQ ID NO: 17</u>                     | <u>SEQ ID NO: 35</u>                    |
| <u>AB15.05</u> | <u>SEQ ID NO: 20</u>                     | <u>SEQ ID NO: 35</u>                    |
| <u>AB16.05</u> | <u>SEQ ID NO: 21</u>                     | <u>SEQ ID NO: 35</u>                    |
| <u>AB17.05</u> | <u>SEQ ID NO: 22</u>                     | <u>SEQ ID NO: 35</u>                    |
| <u>AB22.05</u> | <u>SEQ ID NO: 27</u>                     | <u>SEQ ID NO: 35</u>                    |
| <u>AB23.05</u> | <u>SEQ ID NO: 28</u>                     | <u>SEQ ID NO: 35</u>                    |
| <u>AB24.05</u> | <u>SEQ ID NO: 29</u>                     | <u>SEQ ID NO: 35</u>                    |
| <u>AB25.05</u> | <u>SEQ ID NO: 30</u>                     | <u>SEQ ID NO: 35</u>                    |

10. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm

trình tự vùng quyết định bổ trợ VH 1 (CDR1) 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, hoặc SEQ ID NO: 66,

trình tự VH CDR2 được nêu 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 VH CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 52 hoặc SEQ ID NO: 77,

trình tự VL CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 67, hoặc SEQ ID NO: 68,

trình tự VL CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, hoặc SEQ ID NO: 71 và

trình tự VL CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 55.

11. Kháng thể theo điểm 10, trong đó kháng thể này bao gồm 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.

12. Kháng thể theo điểm 10, trong đó kháng thể này bao gồm 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.

13. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này gắn kết với CD47 theo hướng từ phía đầu sang phía bên, trong đó chuỗi VH của kháng thể được định vị gần với màng của tế bào biểu hiện CD47, và trong đó chuỗi VL của kháng thể bít kín vị trí gắn kết SIRP $\alpha$  trên CD47.

14. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này gắn kết với CD47 theo hướng từ phía đầu sang phía bên, trong đó chuỗi VL của kháng thể được định vị gần với màng của tế bào biểu hiện CD47, và trong đó chuỗi VH của kháng thể bít kín vị trí gắn kết SIRP $\alpha$  trên CD47.

15. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng này gắn kết với epitop gián đoạn trên CD47.

16. Kháng thể theo điểm 15, trong đó kháng thể này gắn kết với vòng CD47 bao gồm SEQ ID NO: 56.

17. Kháng thể theo điểm 15, trong đó epitop gián đoạn 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.

18. Dược phẩm bao gồm kháng thể theo điểm 1 và chất mang.

FIG. 1A

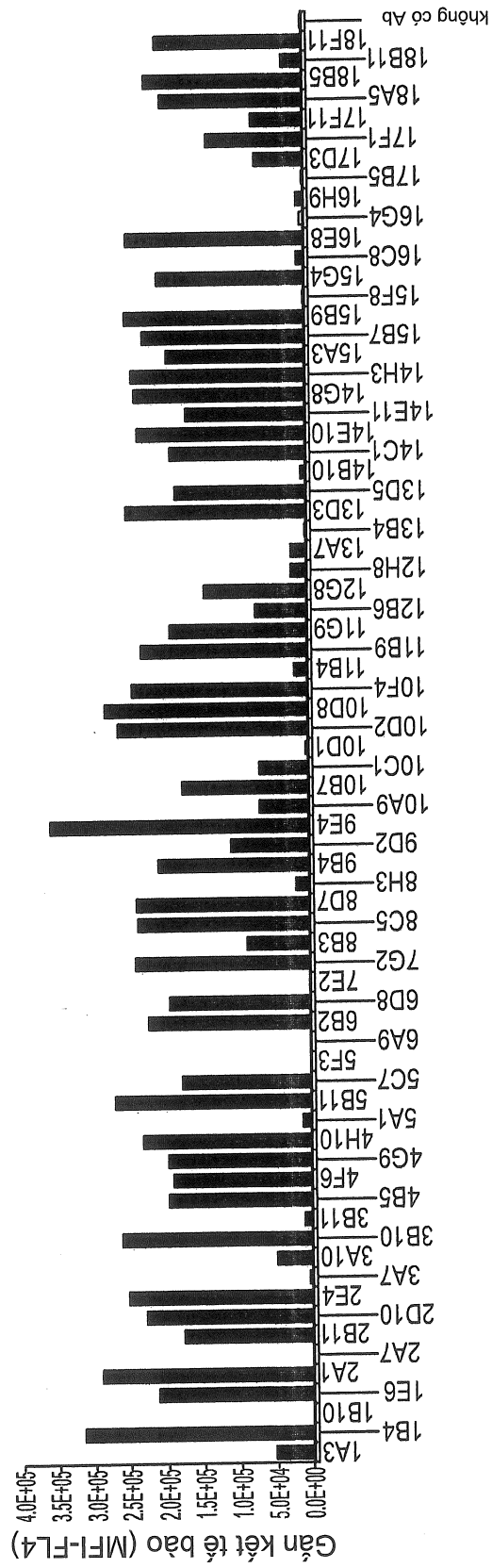
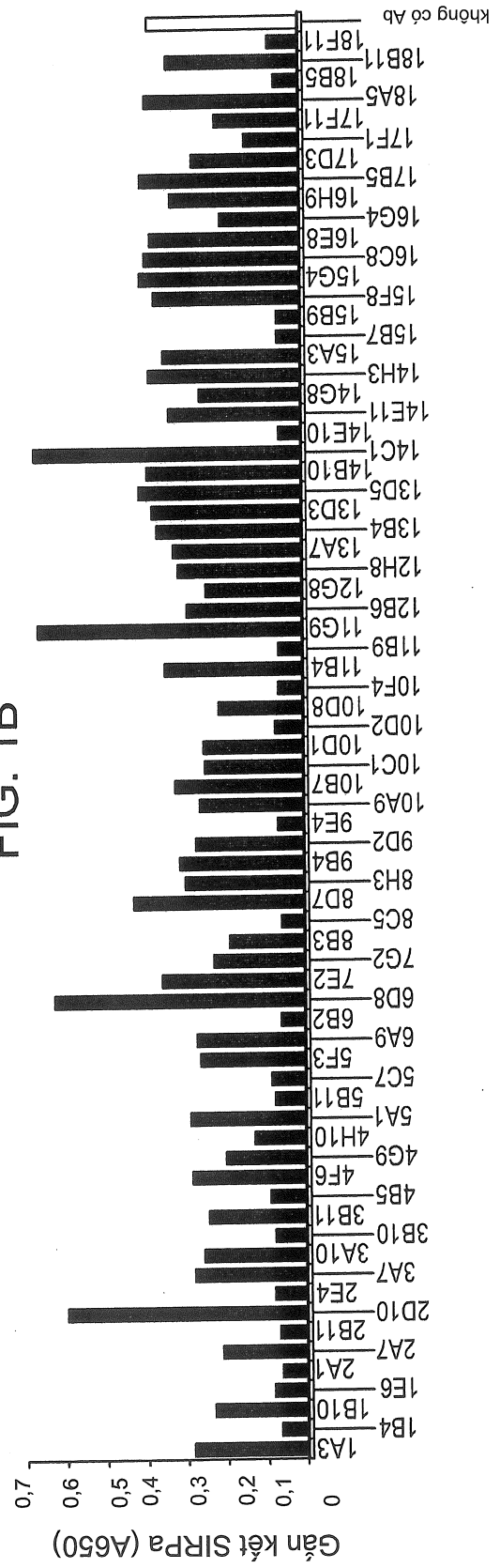


FIG. 1B



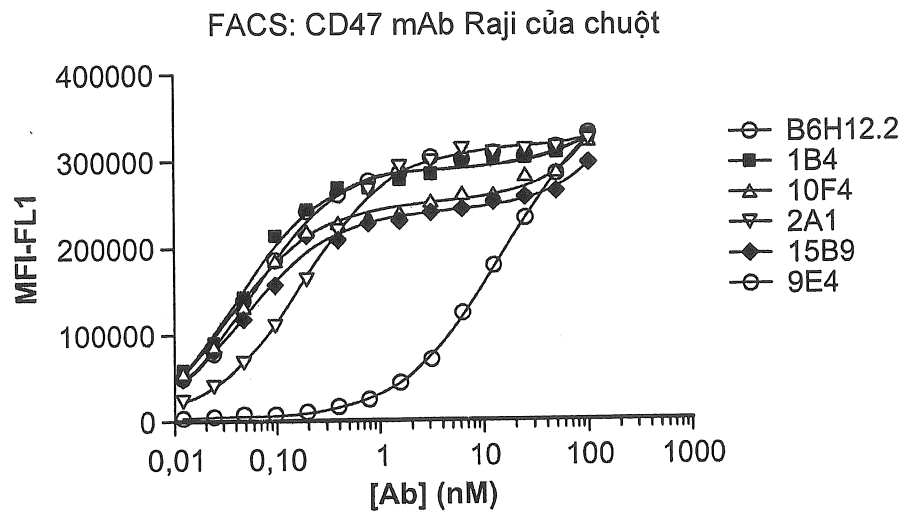


FIG. 2A

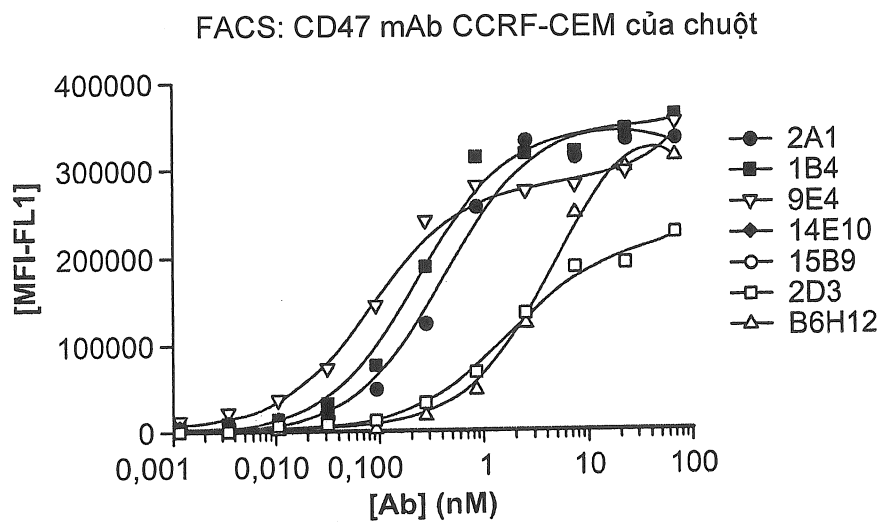


FIG. 2B

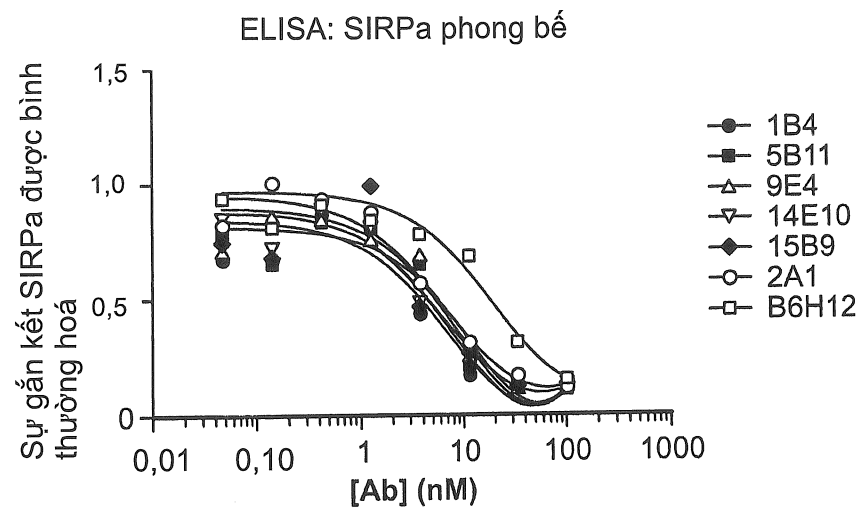


FIG. 3A

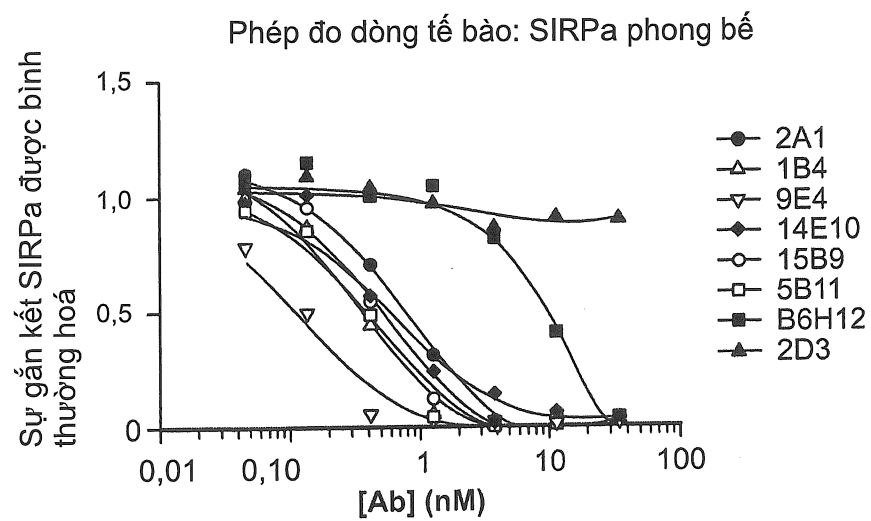


FIG. 3B

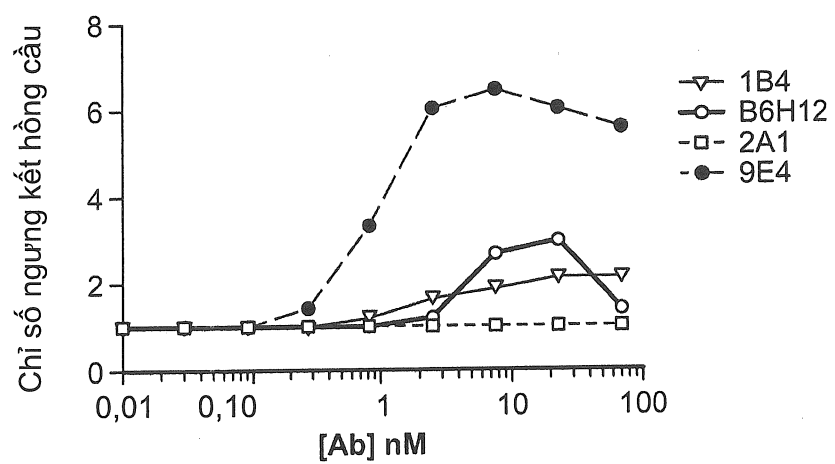
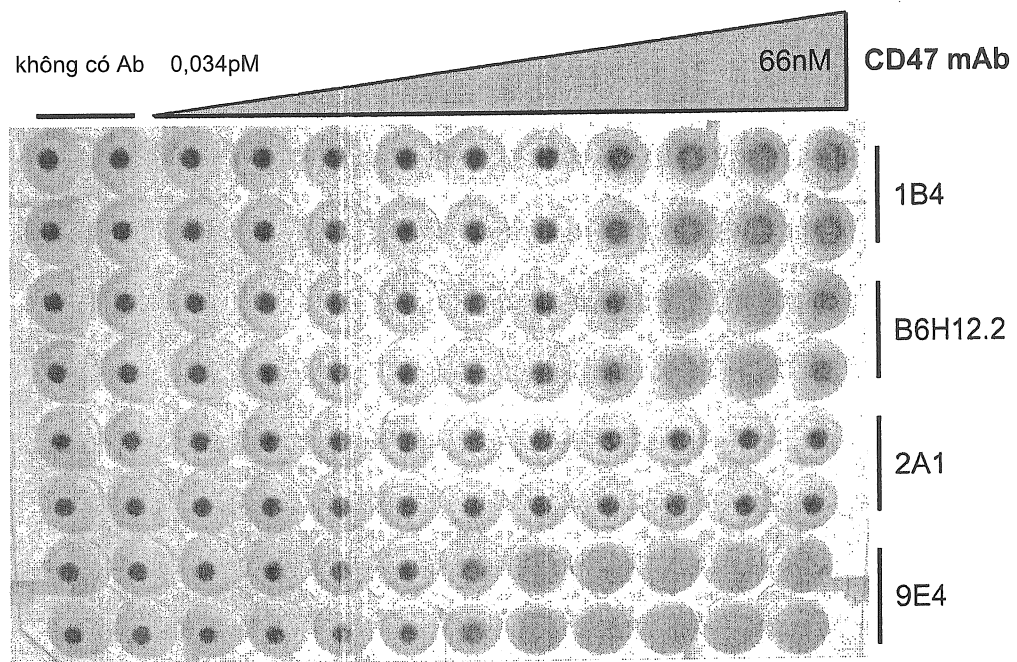
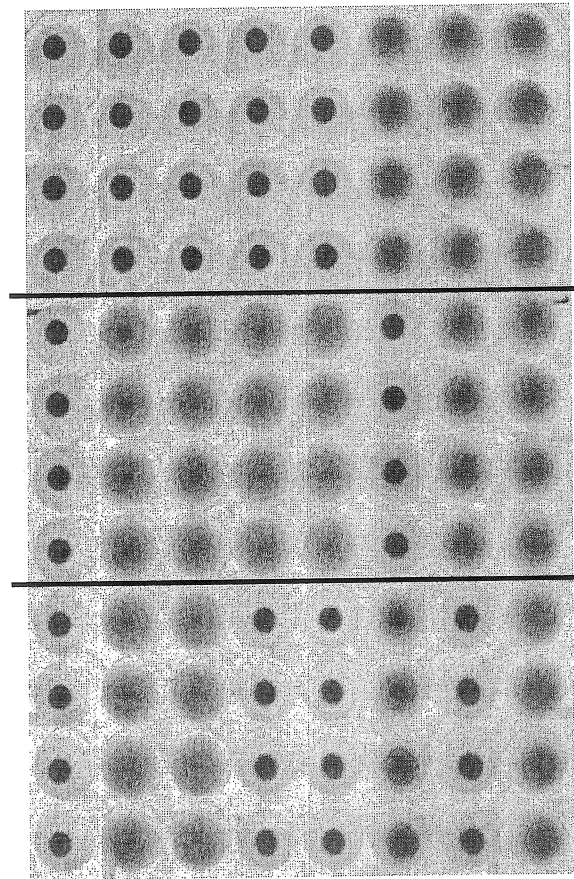


FIG. 4A

| [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         | Đề trống | Đề trống | Đề trống | Đề trống | 10F4     | 10F4     | 10F4     | Đề trống | 18F11    | 18F11    | 18F11    | 18F11    |
| C         | B6H12    | B6H12    | B6H12    | B6H12    | Đề trống | Đề trống | Đề trống | Đề 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     | Đề trống | Đề trống | Đề trống | Đề trống | Đề trống |
| F         | 6B2      | 6B2      | 6B2      | 6B2      | 2B11     | 2B11     | 2B11     | 2B11     | Đề trống | Đề trống | Đề trống | Đề trống |
| G         | 14E10    | 14E10    | 14E10    | 14E10    | 5B11     | 5B11     | 5B11     | 5B11     | Đề trống | Đề trống | Đề trống | Đề trống |
| H         | Đề trống | Đề trống | Đề trống | Đề trống | Đề trống | Đề trống | Đề trống | Đề trống | Đề trống | Đề trống | Đề trống | Đề trống |
|           | 1        | 2        | 3        | 4        | 5        | 6        | 7        | 8        | 9        | 10       | 11       | 12       |



2A1 →

2A1-xi →

FIG. 4B

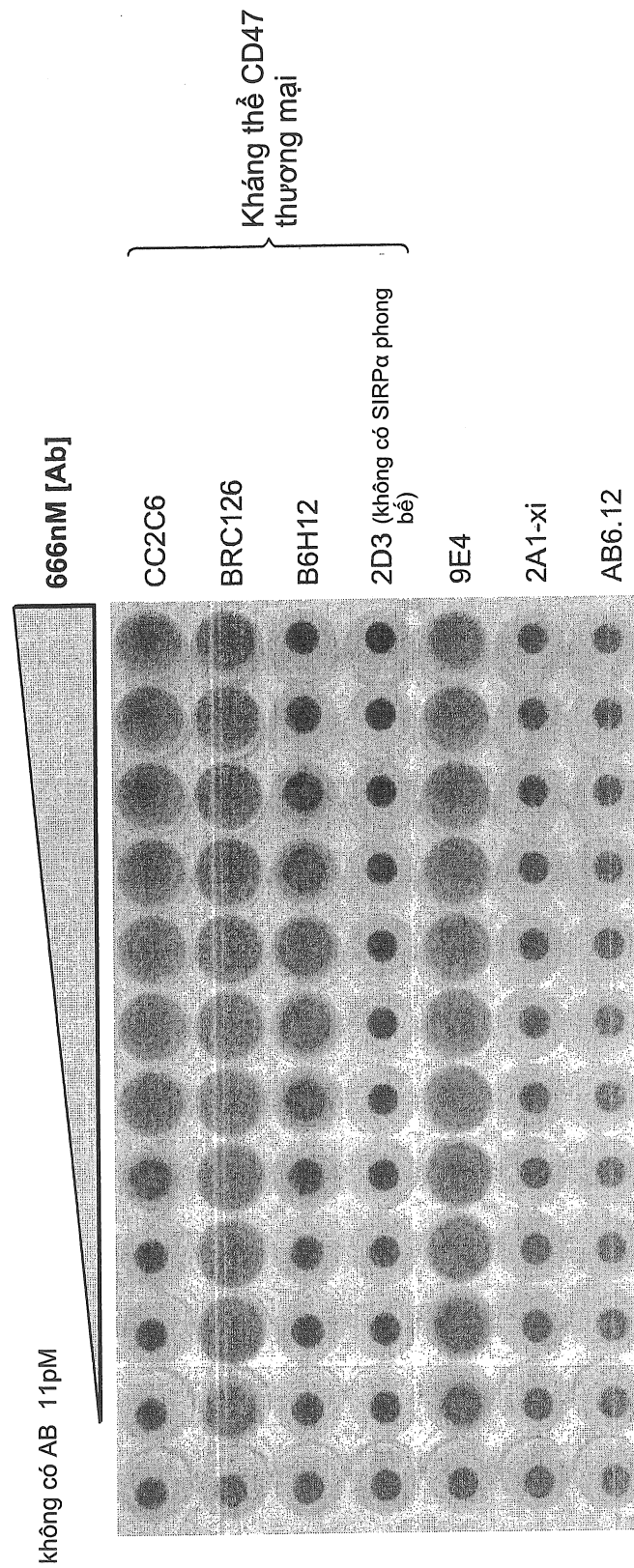


FIG. 4C

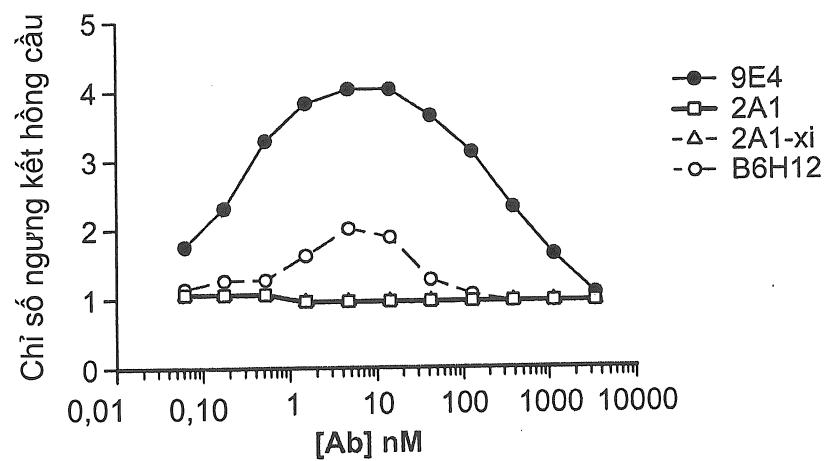
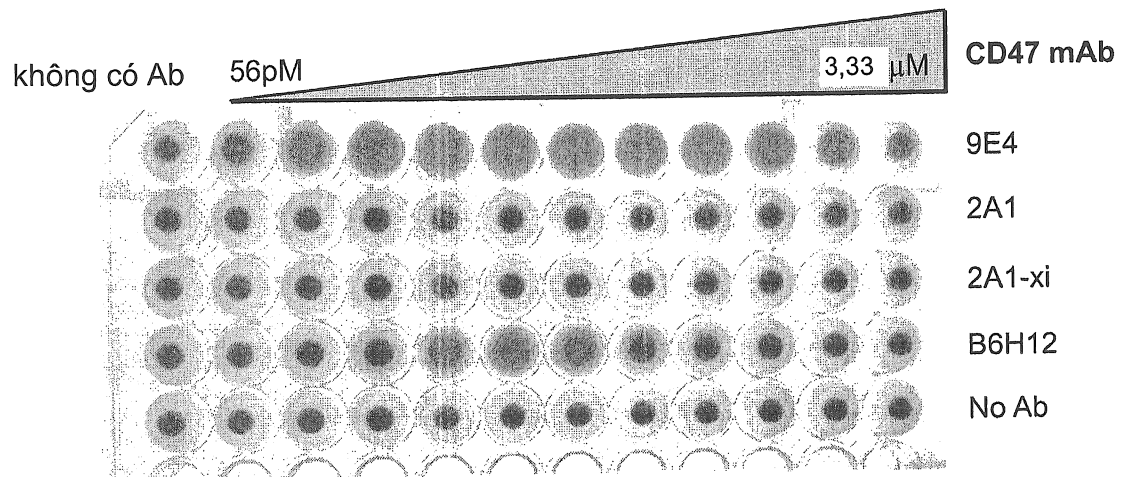


FIG. 4D

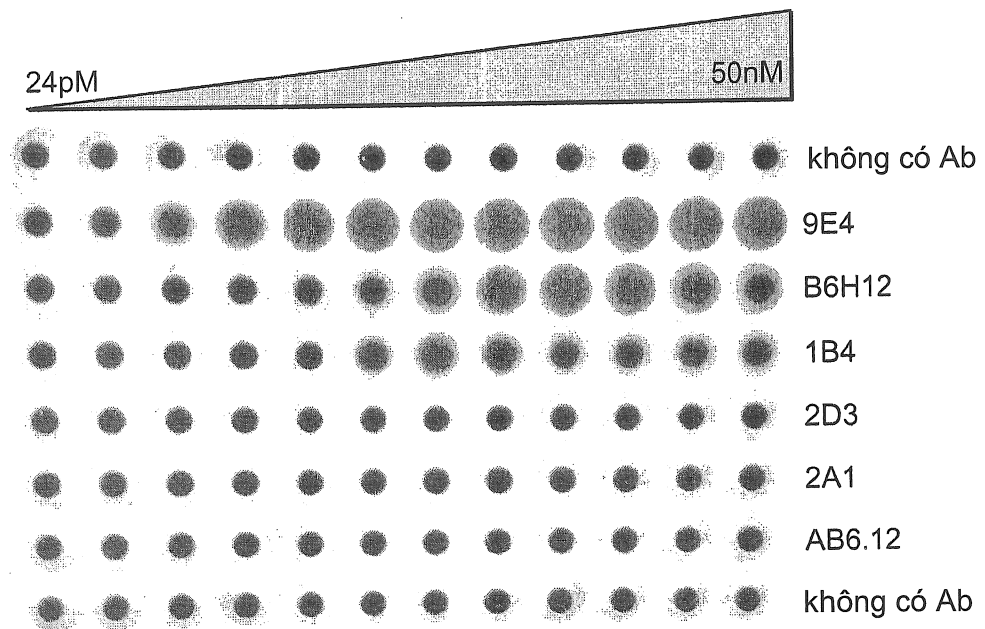


FIG. 4E

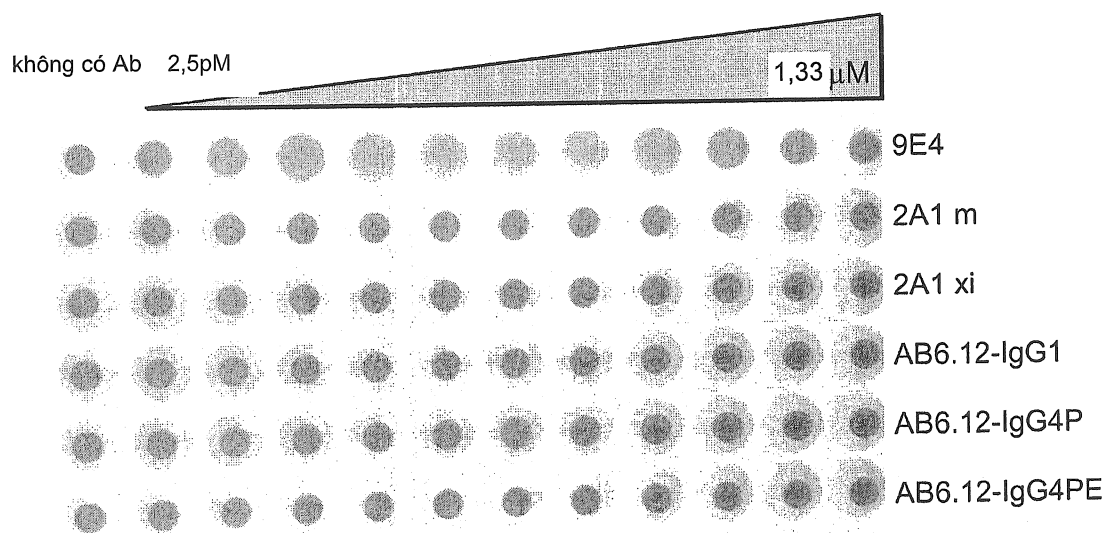


FIG. 4F

2A1 và B6H12 của người đối lại sự gắn kết Cyno

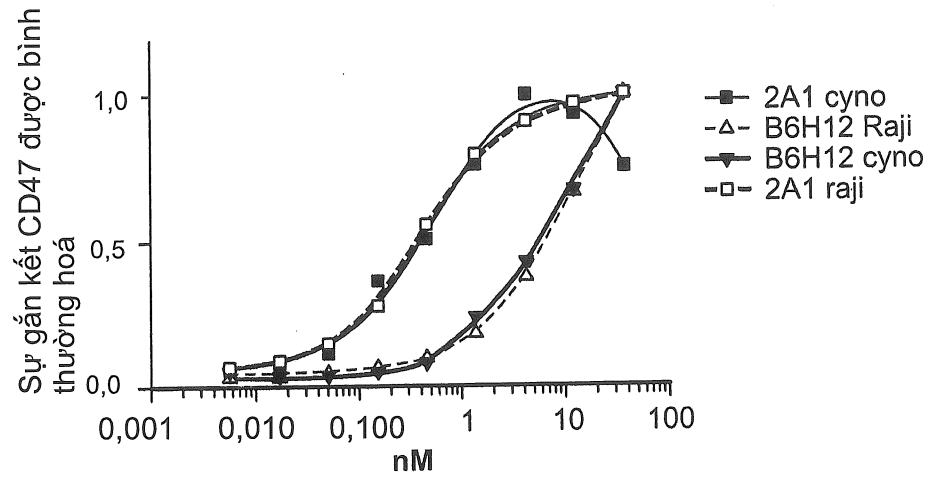


FIG. 5

m2A1, 2A1xi, B6H12

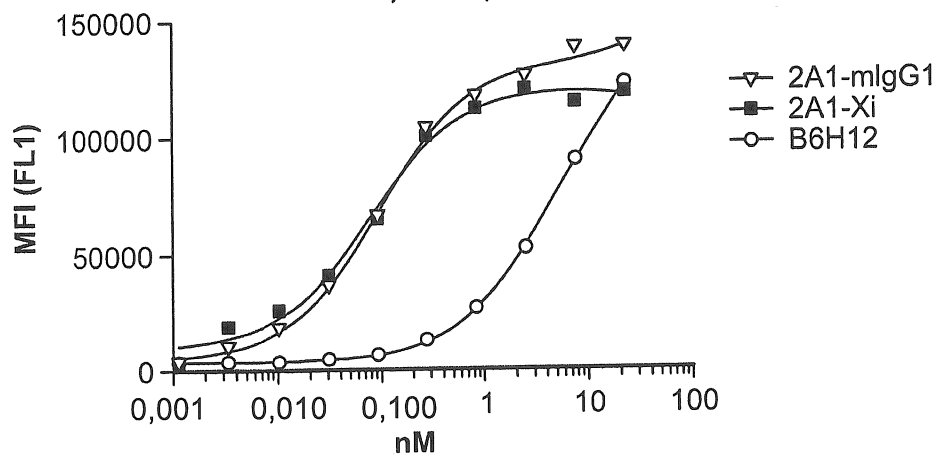


FIG. 6

FIG. 7A

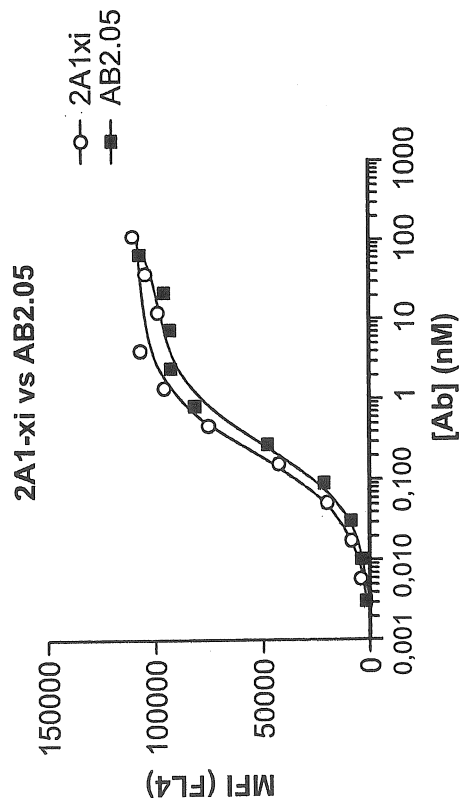


FIG. 7B

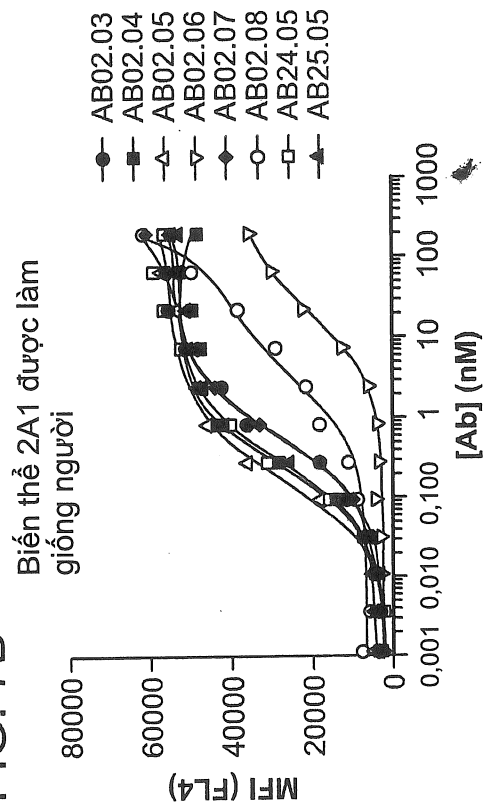


FIG. 7C

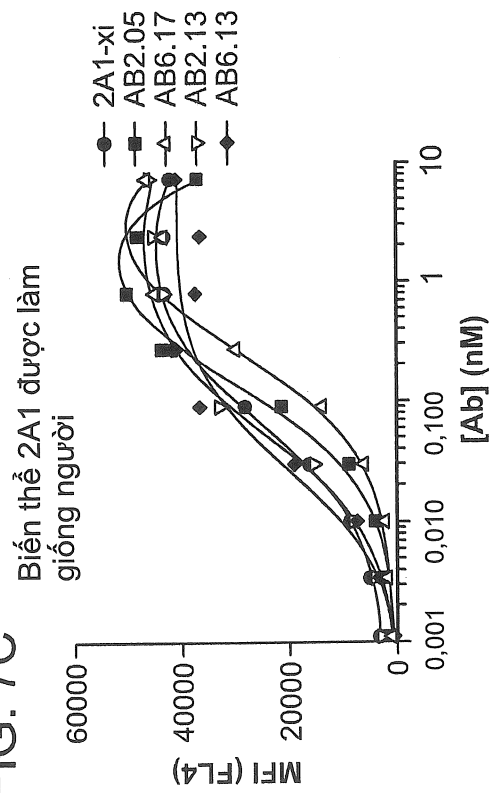
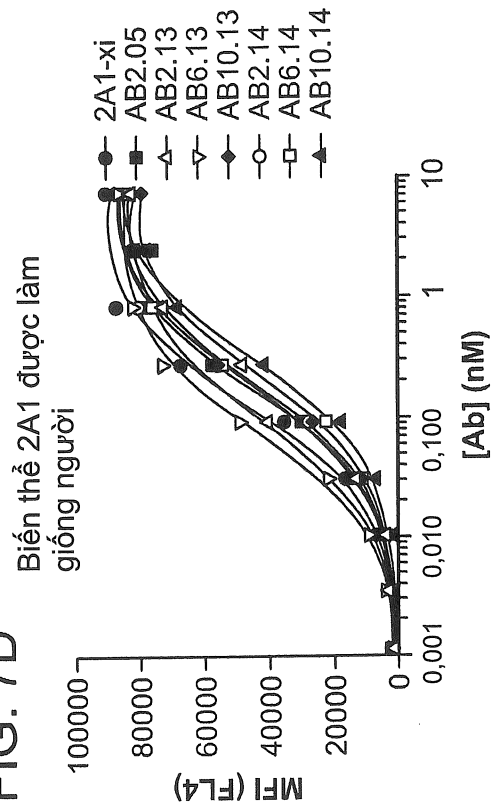
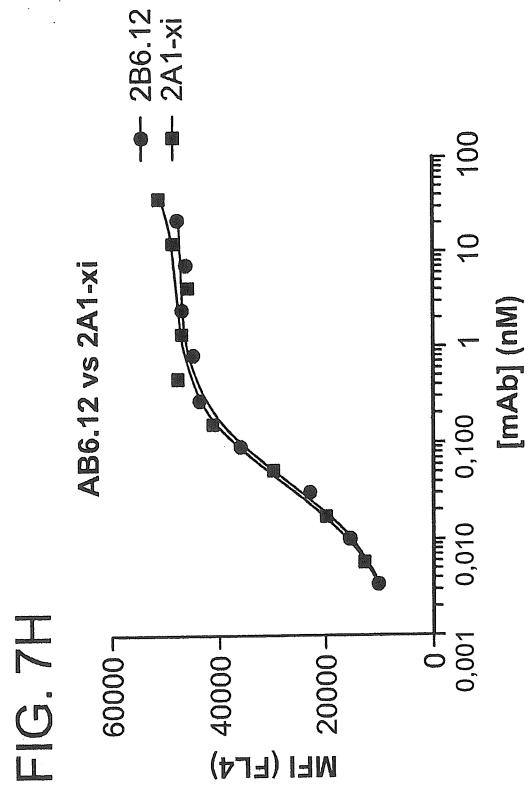
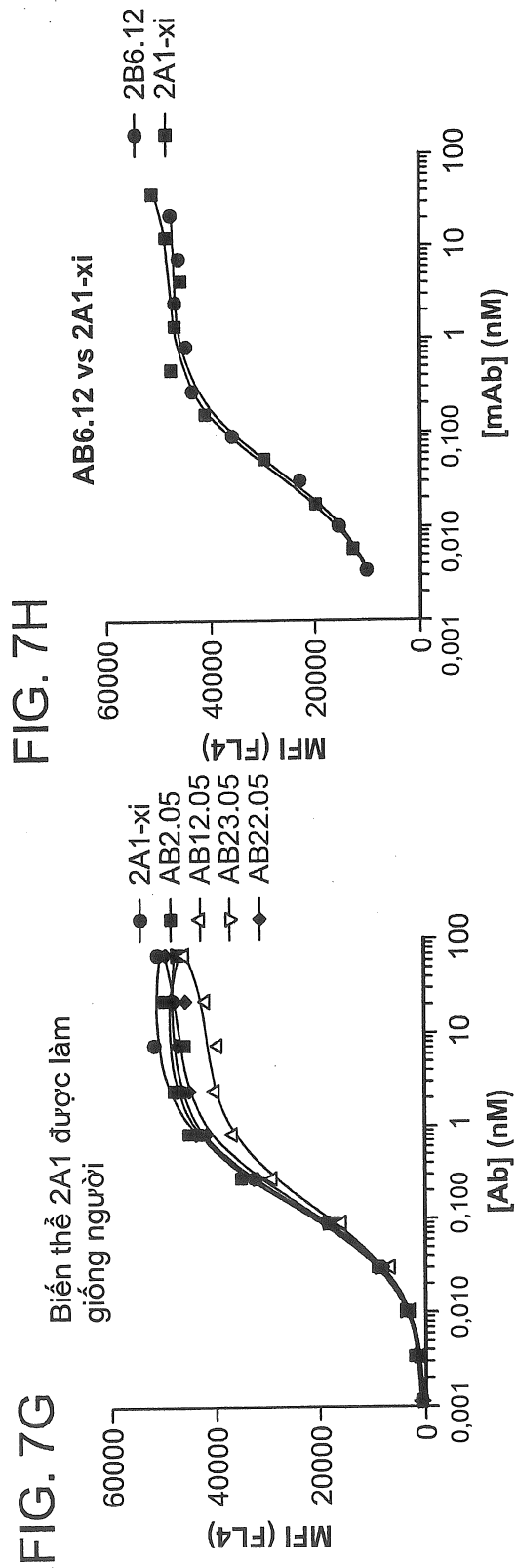
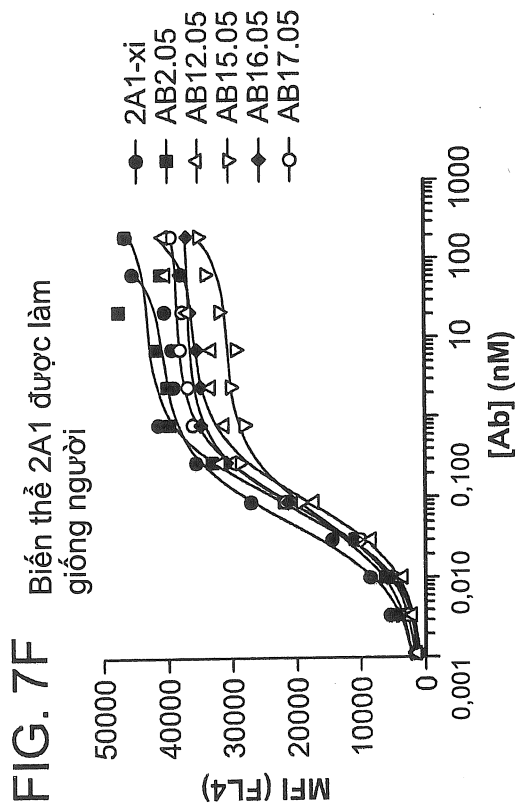
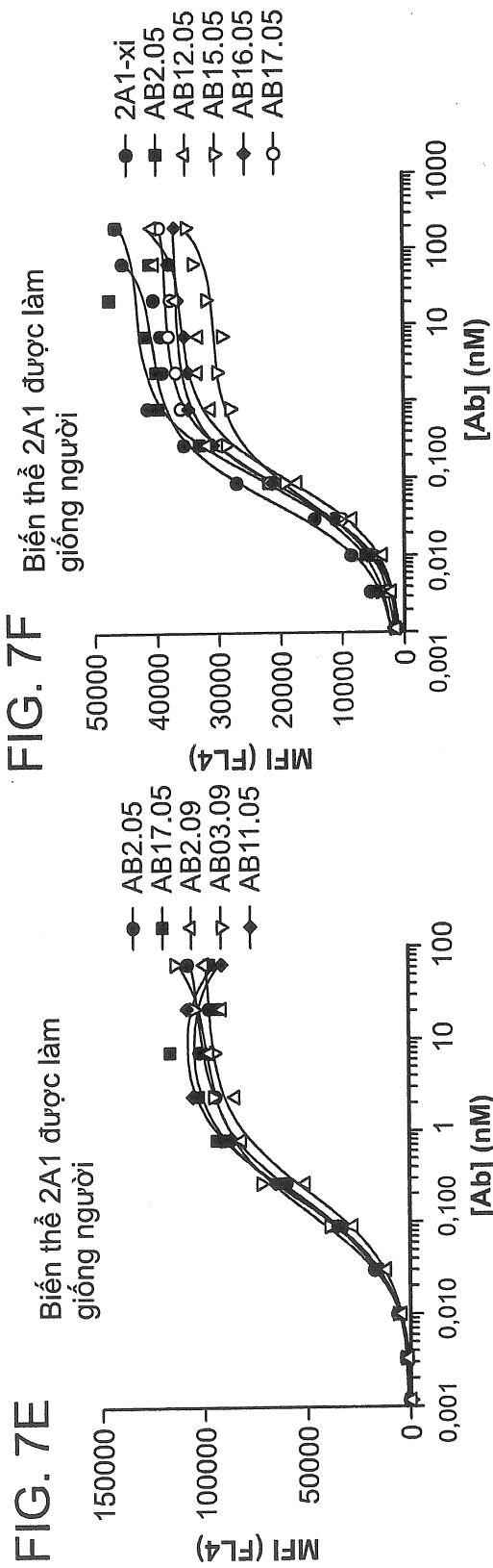


FIG. 7D





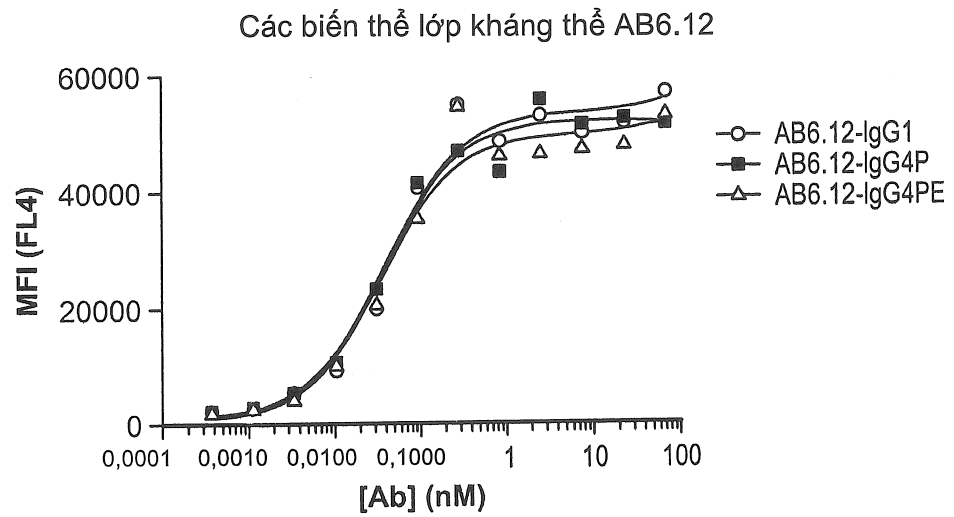


FIG. 7I

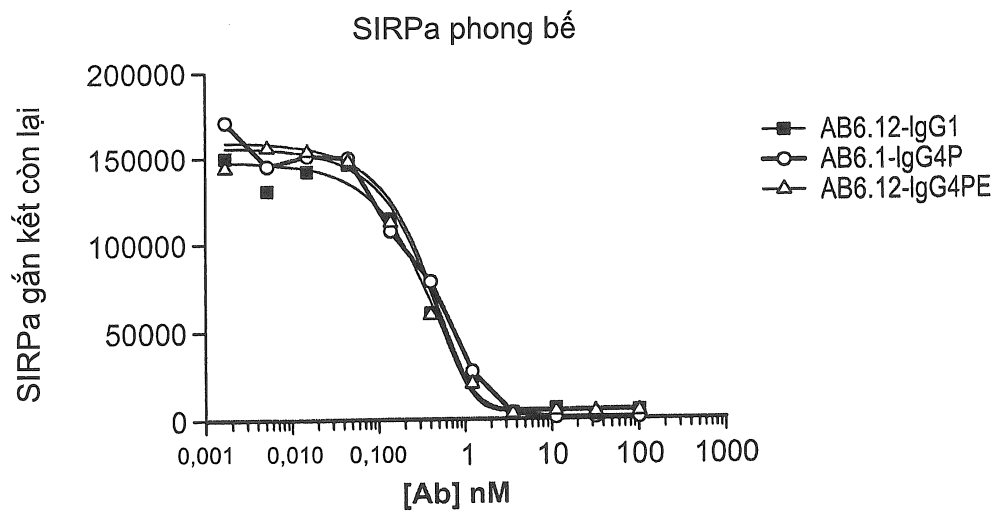
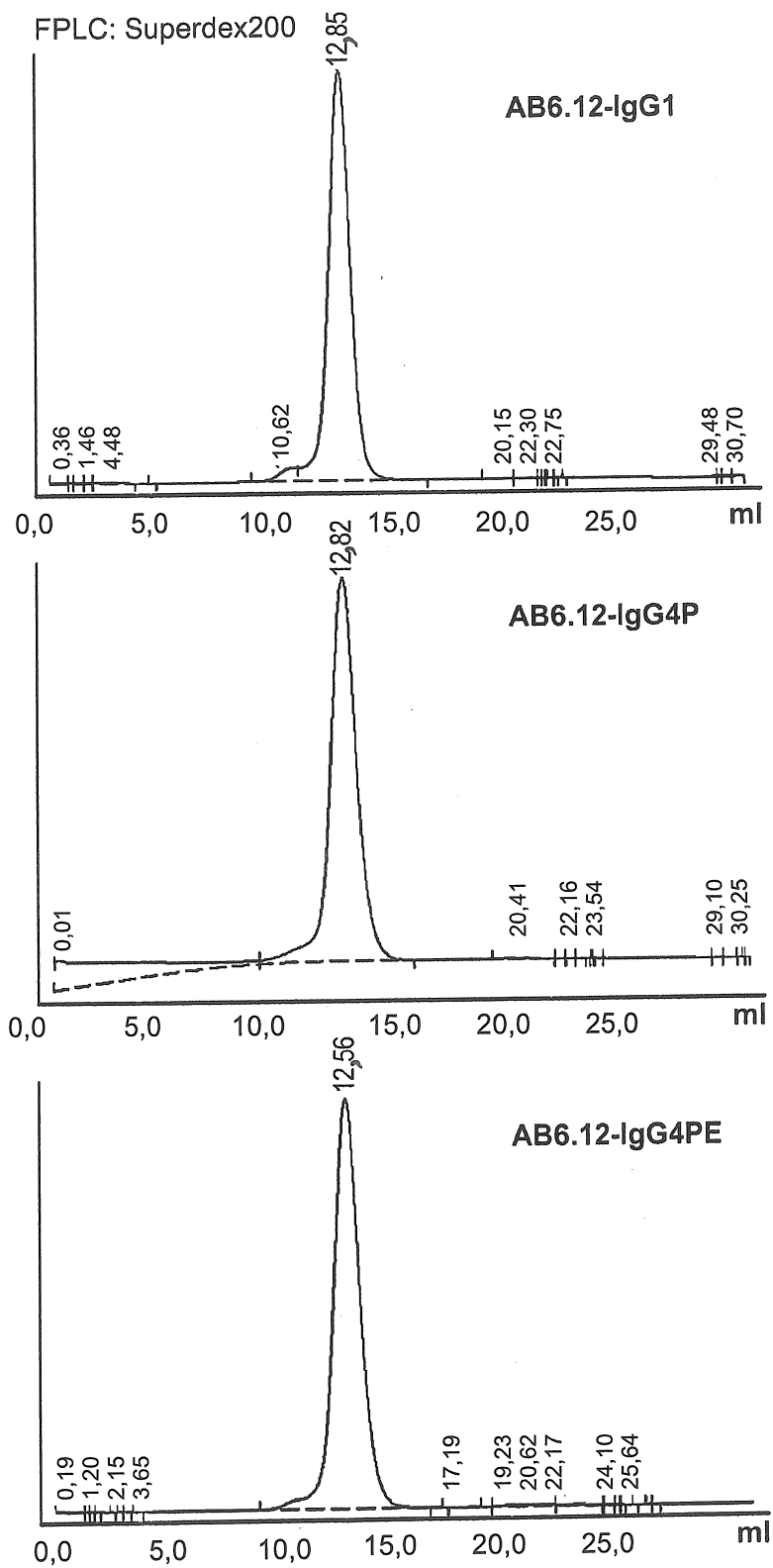


FIG. 7J

FIG. 8A



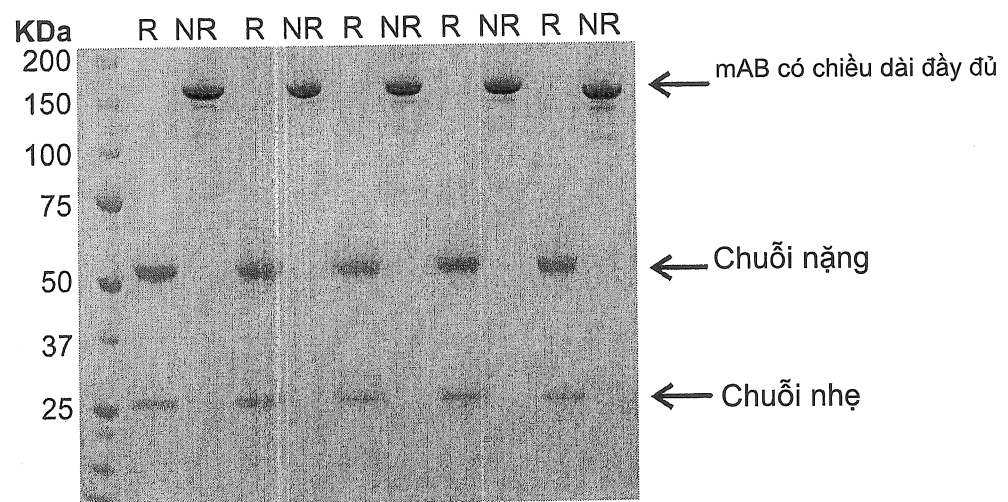


FIG. 8B

Sự thực bào CCRF-CEM bởi MDM sơ cấp

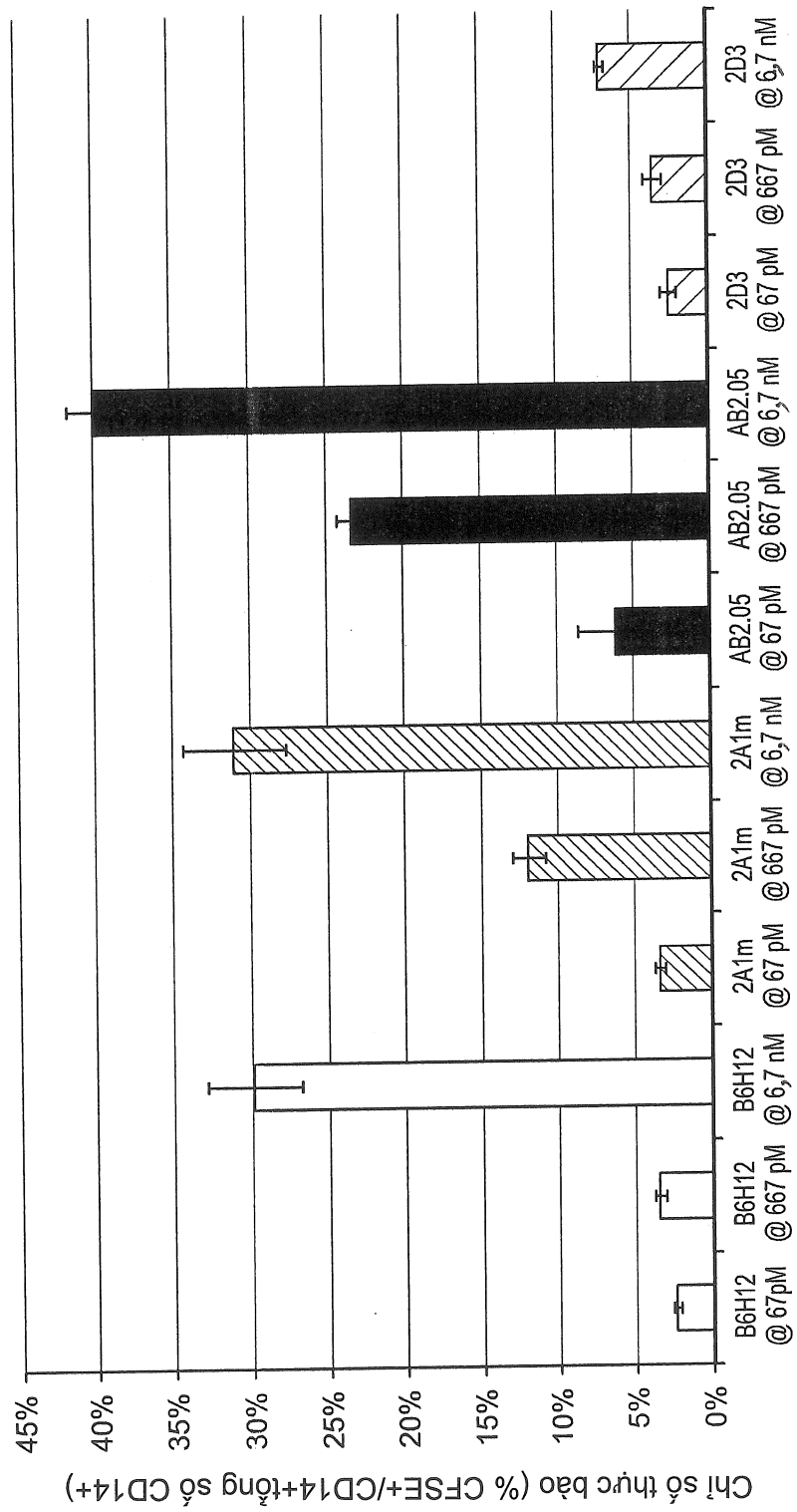


FIG. 9A

FIG. 9B Sự thực bào MDM của người của tế bào CCRF-CEM

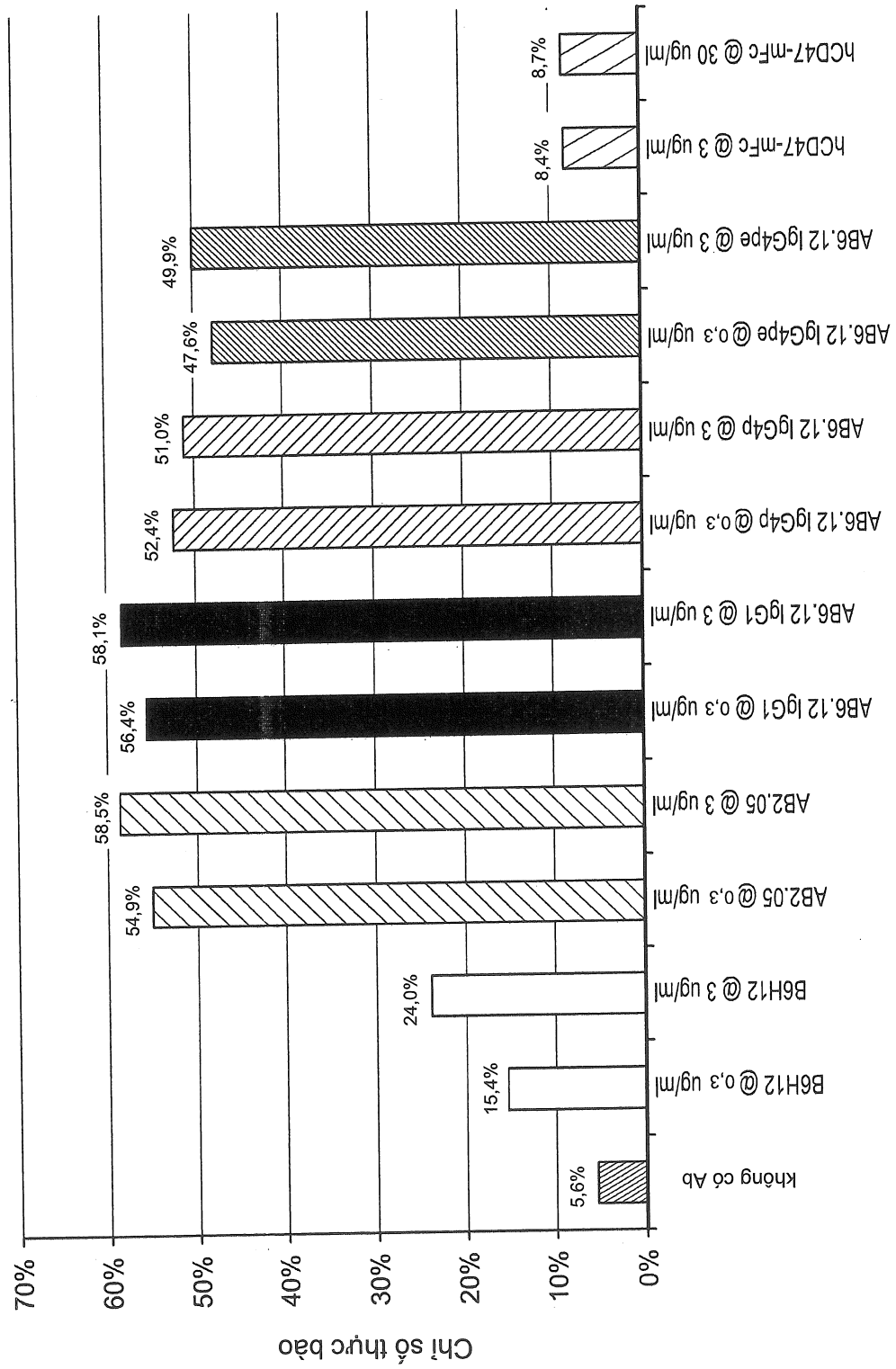


FIG. 10A

Mô hình khối u Raji: kháng thể CD47 của chuột

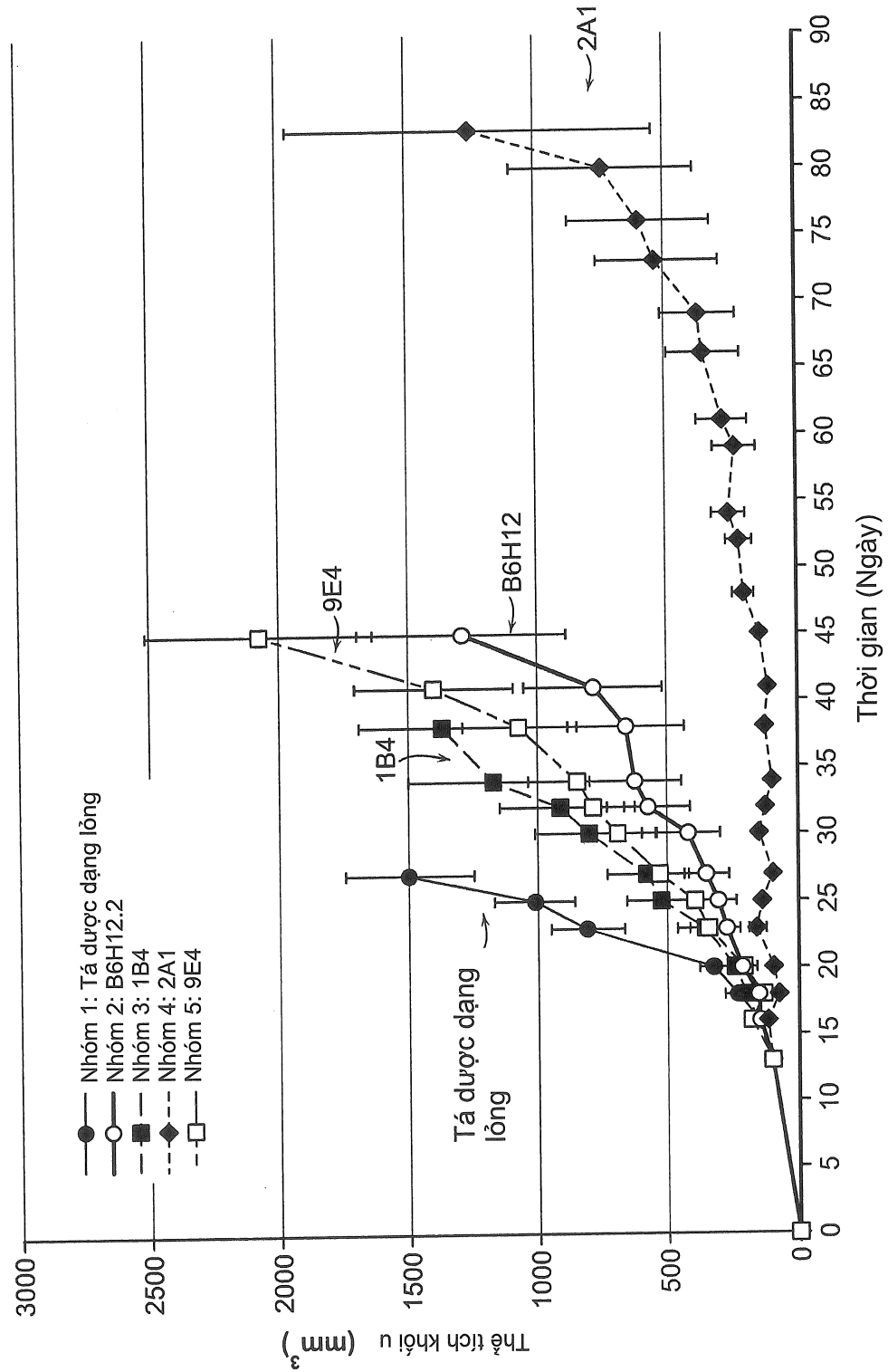
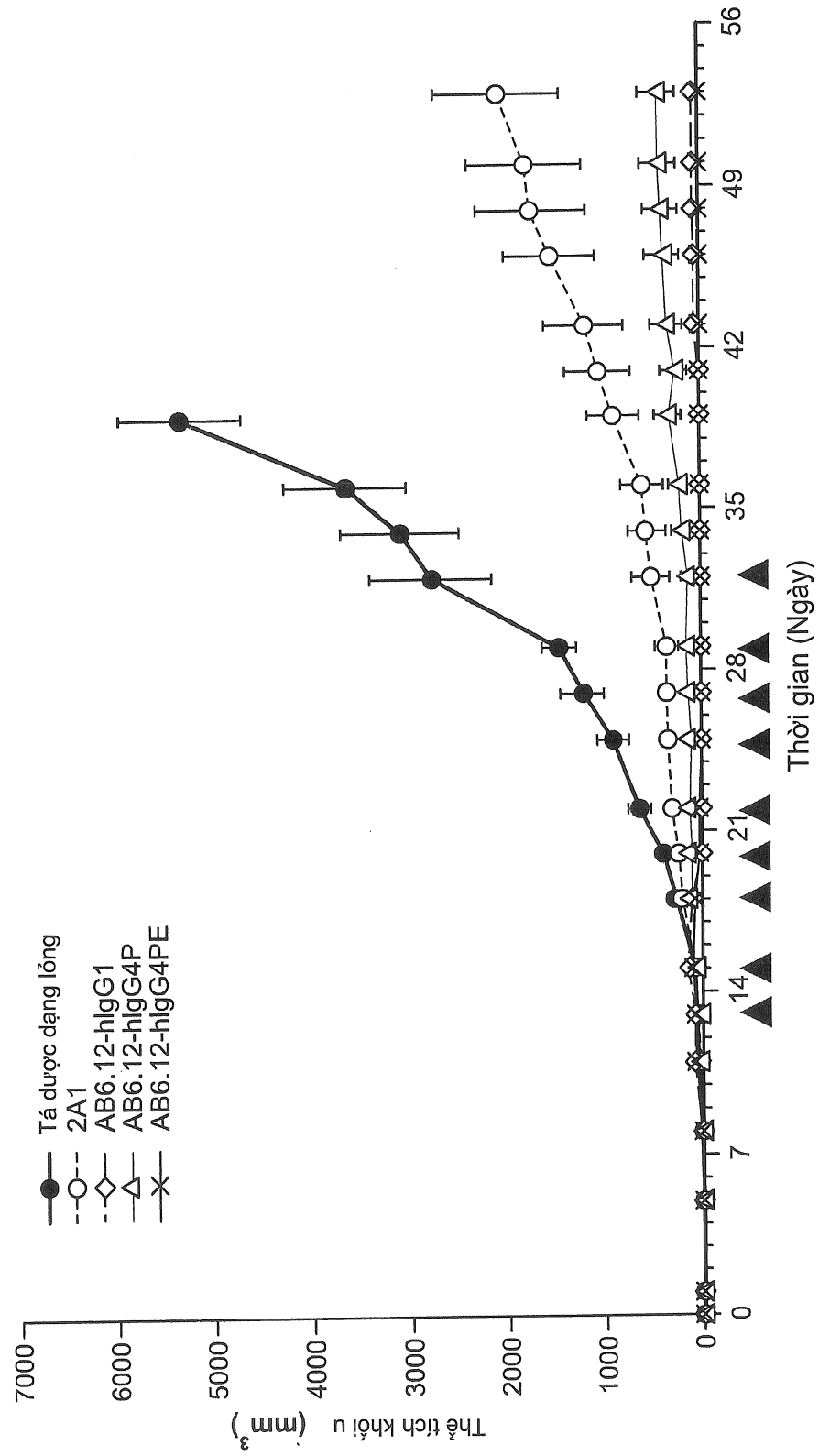


FIG. 10B



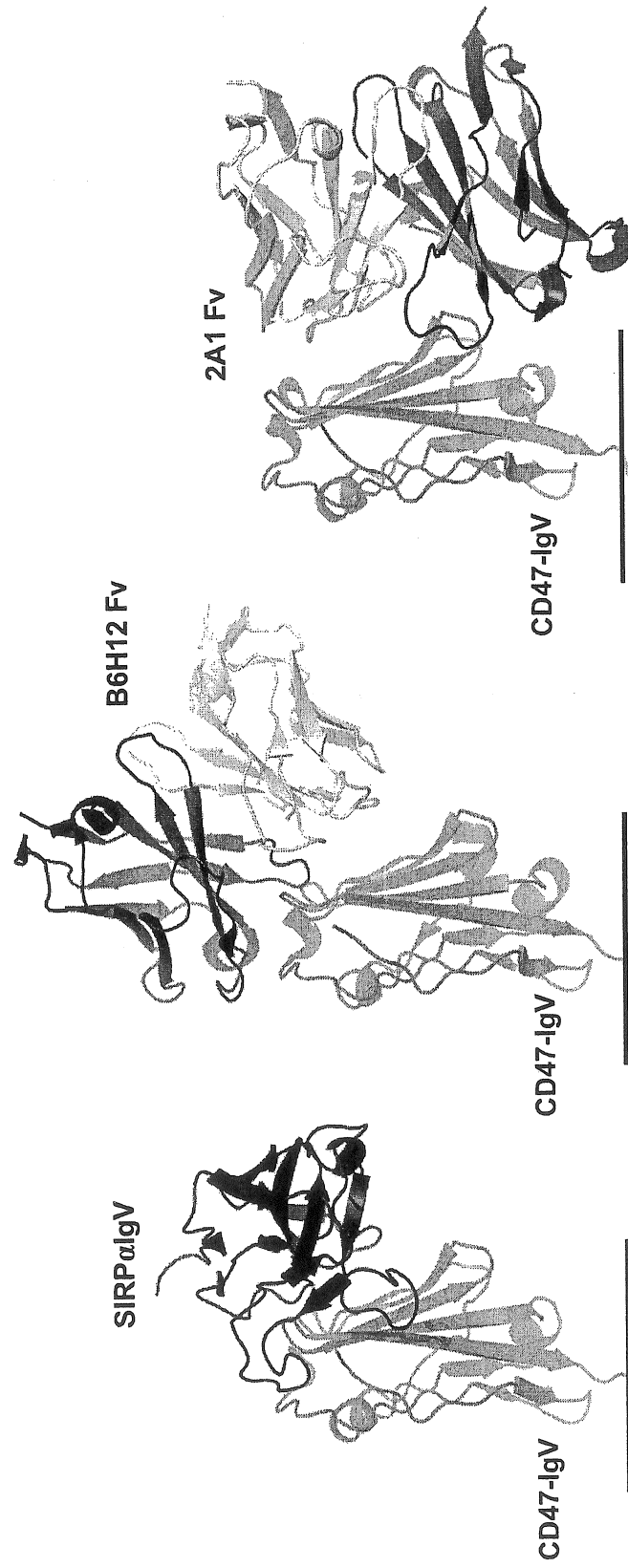


FIG. 11C

FIG. 11B

FIG. 11A

FIG.12

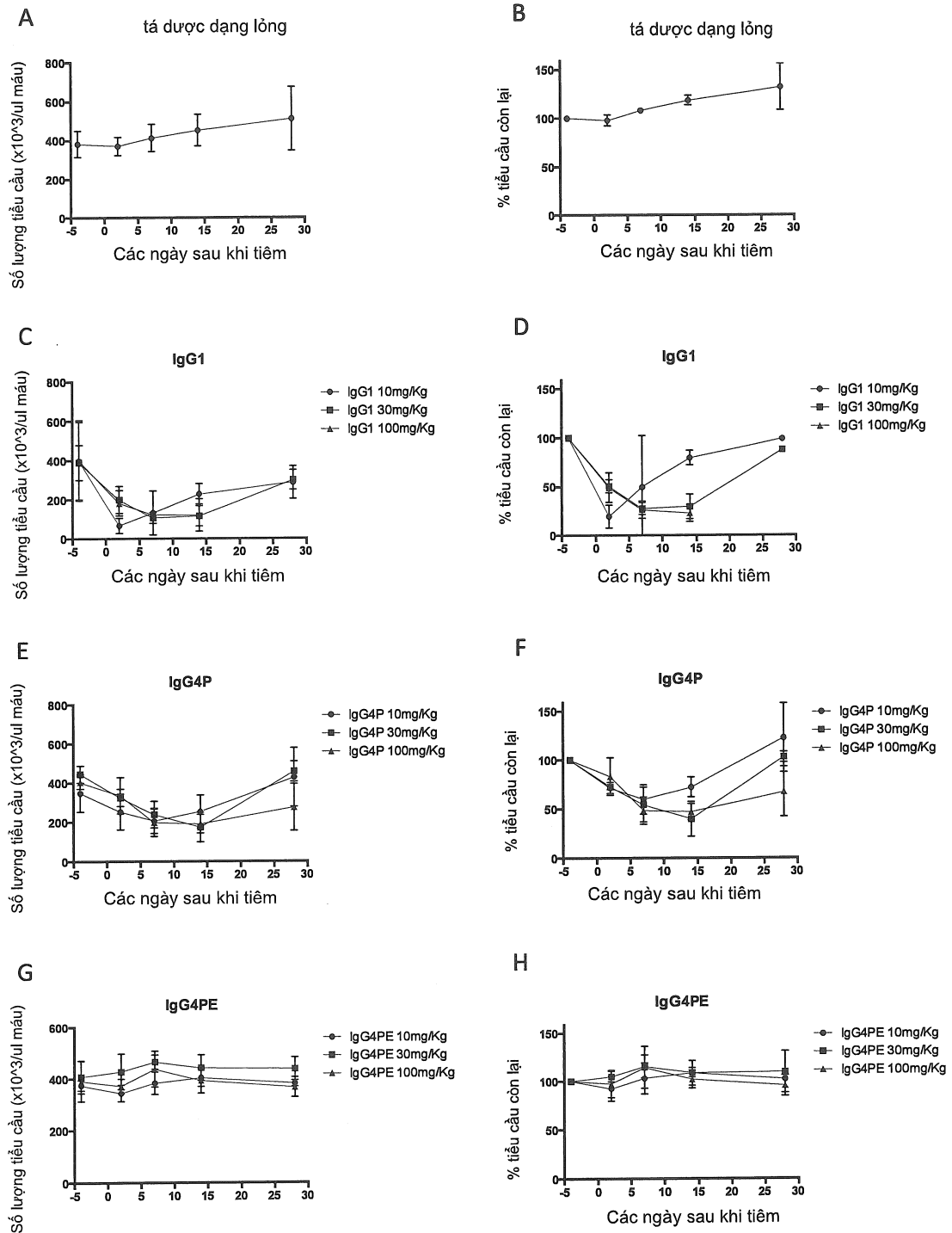
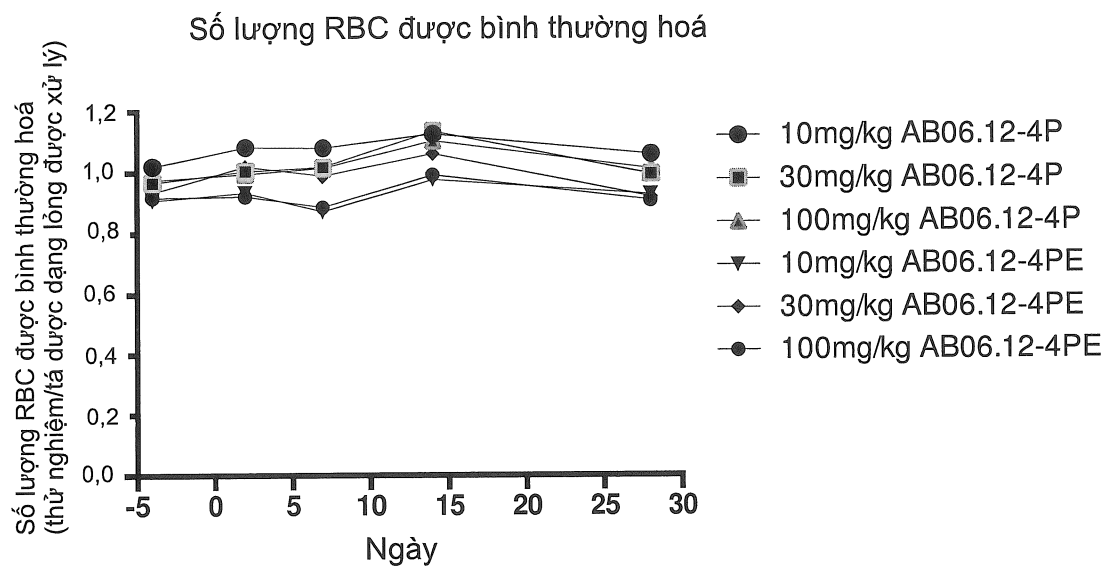


FIG.13



## Danh mục trình tự

<110> Inhibrx LLC  
 <120> Kháng thể đơn dòng được phân lập gắn kết với CD47 và được phẩm chứa  
kháng thể này  
 <130> 42967-506002WO  
 <140> PCT/US2013/053818  
 <141> 2013-08-06  
 <150> US 13/761,087  
 <151> 2013-02-06  
 <150> PCT/US2013/024995  
 <151> 2013-02-06  
 <150> US 61/815,219  
 <151> 2013-04-23  
 <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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm giống người

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vùng biến đổi trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm giống người

&lt;400&gt; 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vùng biến đổi trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm giống người

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vùng biến đổi trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm giống người

&lt;400&gt; 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nặng của kháng thể CD47 được làm 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

[illegible]

&lt;400&gt; 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

```

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 được làm giống người

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 được làm giống người

&lt;400&gt; 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 |     |

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 được làm giống người

&lt;400&gt; 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 trên chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 được làm 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

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 được làm giống người

&lt;400&gt; 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 |     |     |

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 được làm giống người

&lt;400&gt; 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 trên chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 được làm 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 trên chuỗi nhẹ của kháng thể CD47 được làm 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 biến đổi trên chuỗi nặng 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 biến đổi trên chuỗi nhẹ 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 |    |    |

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vùng biến đổi trên chuỗi nặng của kháng thể 1B4

&lt;400&gt; 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 |     |     |  |

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của kháng thể 1B4

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Đoạn mỗi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

&lt;400&gt; 82

cactgcaggt rtccactcc

19

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Đoạn mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 98

ccaagctgtg tcctrctcc

18

<210> 99

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi 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 mỗi 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 mỗi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 101

cttaaaaggg gtccagtg

19

<210> 102

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi 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 mỗi 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 mỗi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 104

ctytttaaaag gkggtccagwg

20

<210> 105

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 105

cyttttamatg gtatccagtg t

21

<210> 106

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 106

ctttttacatg gtttcaagtg t

21

<210> 107

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 110

ctttttaaag wtgtccagkg t

21

<210> 111

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi 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 mỗi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 112

cttcctgatg gcagtgggtt

19

<210> 113

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi 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 mỗi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 114

gcgtctagaa yctccacaca caggrccag tggatagac

39

<210> 115

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi oligonucleotit được tổng hợp hóa học |    |
| <400> | 123                                           |    |
|       | ctctgggttyc caggtatc                          | 18 |
| <210> | 124                                           |    |
| <211> | 22                                            |    |
| <212> | ADN                                           |    |
| <213> | Trình tự nhân tạo                             |    |
| <220> |                                               |    |
| <223> | Đoạn mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 132

gtgtctggtg ctcattggg

18

<210> 133

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 138

ctctgggtgcc tgtgca

16

<210> 139

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi 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 mỗi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 144

cttcatgggtg ctcagtgt

18

<210> 145

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi 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 mỗi oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 146

gcgtctagaa ctggatggtg ggaagatgg

29

&lt;210&gt; 147

&lt;211&gt; 305

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 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 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |