(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) **1-0037250**

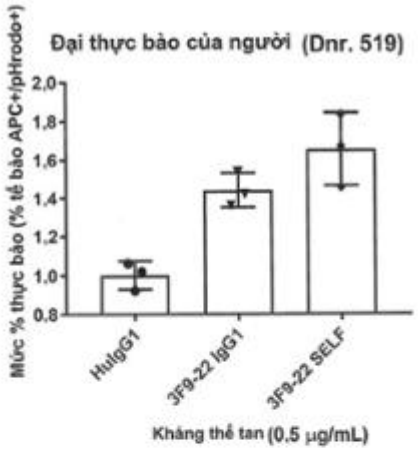
(51)[2020.01] **C07K 16/28**; C12N 15/85; C07K 16/42; C07K 16/24; C07K 16/40

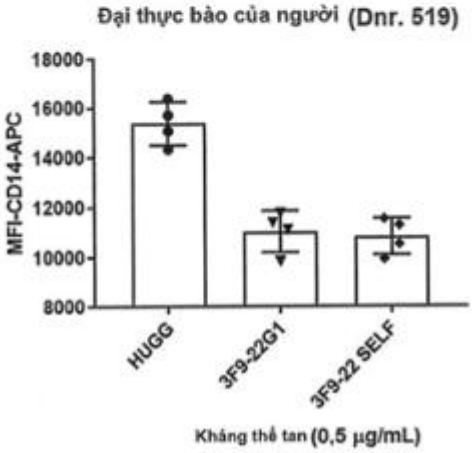
(13) **B**

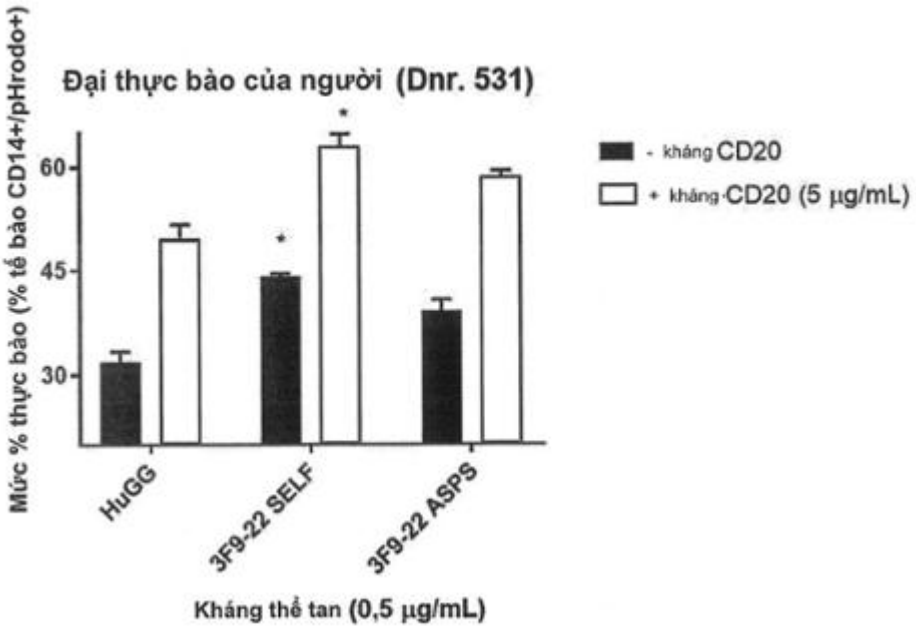
(21) 1-2020-06901
(22) 24/05/2019
(86) PCT/US2019/033884 24/05/2019
(87) WO2019/226973 28/11/2019
(30) 62/676,813 25/05/2018 US
(45) 25/10/2023 427
(43) 25/06/2021 399
(73) ALECTOR LLC (US)
131 Oyster Point Blvd, Suite 600, South San Francisco, California 94080, United States of America
(72) PINCETIC, Andrew (US); HO, Wei-Hsien (US); CULP, Patricia (US); ROSENTHAL, Arnon (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ PHÂN LẬP GẮN KẾT VỚI SIRPA CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập chung đến kháng thể, ví dụ, kháng thể đơn dòng, các mảnh kháng thể, v.v., gắn kết đặc hiệu với SIRPA polypeptit, ví dụ, SIRPA của động vật có vú hoặc SIRPA của người để ngăn ngừa, giảm nguy cơ, hoặc điều trị cá thể cần điều trị bệnh. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể này.


Đại thực bào của người (Dnr. 519)
Mức % thực bào (% tế bào APC+/pHrodo+)
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
HuIgG1
3F9-22 IgG1
3F9-22 SELF
Kháng thể tan (0,5 µg/mL)


Đại thực bào của người (Dnr. 519)
MFI-CD14-APC
18000
16000
14000
12000
10000
8000
HUGG
3F9-22G1
3F9-22 SELF
Kháng thể tan (0,5 µg/mL)


Đại thực bào của người (Dnr. 531)
Mức % thực bào (% tế bào CD14+/pHrodo+)
60
45
30
*
*
HuGG
3F9-22 SELF
3F9-22 ASPS
- kháng CD20
+ kháng CD20 (5 µg/mL)
Kháng thể tan (0,5 µg/mL)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng SIRPA và mô tả việc sử dụng kháng thể này trong điều trị bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tế bào thực bào, như đại thực bào (MΦ) và tế bào tua (DC), phân biệt tế bào khỏe mạnh với tế bào bất thường thông qua một dãy phức tạp gồm các thụ thể bề mặt tế bào điều chỉnh trạng thái hoạt hóa tế bào, quá trình tăng sinh và/hoặc các chức năng hiệu ứng. Nhiều thụ thể này nhận diện các phối tử đa dạng đánh dấu tế bào không mong muốn để loại bỏ (cái gọi là tín hiệu "ăn tôi") hoặc bảo vệ tế bào bình thường khỏi bị phá hủy (cái gọi là tín hiệu "đừng ăn tôi"). Trong những năm gần đây, trục SIRPα-CD47 đã nổi lên như một yếu tố quyết định quan trọng trong việc loại bỏ tế bào theo chương trình bởi đại thực bào trong các thiết lập lâm sàng khác nhau từ khả năng sống sót của tế bào ung thư đến thực hiện thành công việc cấy ghép tế bào tạo máu. Các tác nhân trị liệu tác động đến con đường này có thể đáp ứng nhu cầu y tế để cải thiện bệnh có liên quan, đặc biệt trong nhiều loại ung thư ở người.

SIRPα (protein điều hòa tín hiệu-α) thuộc họ SIRP của các thụ thể xuyên màng, được biểu hiện chủ yếu trong dòng tế bào tủy (bao gồm MΦ, DC, bạch cầu hạt, v.v.) và được đặc trưng bởi vùng ngoại bào chứa 2 miền màng-IgC gần và miền IgV xa. Duy nhất trong họ này, SIRPα chứa mô-típ ức chế trên cơ sở tyrosin thụ thể miễn dịch nội bào (ITIM). Khi liên kết chéo với thụ thể, các vị trí ITIM đã được tyrosin phosphoryl hóa tiếp nhận và hoạt hóa SHP phosphataza để điều hòa bất lợi các chức năng của tế bào, như thực bào hoặc giải phóng xytokin gây viêm. CD47 đóng vai trò là phối tử chính của SIRPα và sự biểu hiện rộng rãi của nó ở hầu hết các loại tế bào, bao gồm tế bào nội mô/biểu mô, bạch cầu và hồng cầu, cho thấy rằng nó làm trung gian cho tín hiệu "đừng ăn tôi" để bảo vệ tế bào khỏe mạnh tránh khỏi sự thanh thải phụ thuộc vào quá trình thực bào. Để ủng hộ quan điểm này, một số nghiên cứu cho thấy rằng việc chuyển nuôi tế bào hồng cầu hoặc bạch cầu từ các con chuột nhắt đã bị bất hoạt CD47 sang các con chuột nhắt nhận dạng dại sẽ dẫn đến việc thanh thải nhanh chóng tế bào thiếu hụt CD47. Ngược lại, phân tích di truyền vị trí của nhiều chủng

chuột nhắt bị suy giảm miễn dịch tiếp nhận tế bào tạo máu của người đã xác định alen Sirpα ở chuột nhắt NOD là yếu tố nhân quả cho sự cấy ghép thành công trong mô hình cấy ghép dị chủng. Các nghiên cứu sau đó đã chứng minh rằng biến thể alen của SIRPα chỉ biểu hiện ở chuột nhắt NOD vẫn duy trì được khả năng gắn kết CD47 của người biểu hiện trên tế bào gốc tạo máu của người, và do đó, ngăn chặn được sự đào thải ghép phụ thuộc vào đại thực bào.

Sự biểu hiện được điều hòa của SIRPα và CD47 thiết lập cơ chế kiểm soát nội môi để điều chỉnh hoạt động của tế bào thực bào. Ví dụ, tế bào chết theo chương trình điều hòa giảm sự biểu hiện của CD47 để tạo điều kiện cho đại thực bào đang trú ngụ hấp thụ trong khi tế bào sống vẫn không bị tác động bất lợi. Tương tự, các kích thích gây viêm, như LPS, làm giảm sự biểu hiện của SIRPα trong đại thực bào và tế bào tua (DC) để tăng cường sự hoạt hóa của chúng trong quá trình viêm. Tuy nhiên, rối loạn điều hòa của sự biểu hiện của SIRPα và CD47 góp phần gây ra các bệnh liên quan đến hệ miễn dịch, như đã thấy ở ung thư. Một số khối u làm tăng đáng kể sự biểu hiện của CD47 so với tế bào không ung thư để tránh các cơ chế giám sát miễn dịch thường loại bỏ tế bào ác tính. Các nghiên cứu tiền lâm sàng cho thấy rằng việc làm bất hoạt di truyền CD47 trong các mô hình khối u cùng gen, như khối u ác tính B16F10, đủ để ức chế sự phát triển của khối u ở các con chuột nhắt có khả năng miễn dịch. Các kết quả tương tự cũng đã được quan sát ở các dòng tế bào ung thư của người bị gây bất hoạt CD47 được cấy vào các con chuột nhắt bị suy giảm miễn dịch. Theo cách khác, các tác nhân sinh học làm gián đoạn tương tác SIRPα-CD47, như kháng thể kháng CD47, cũng tăng cường khả năng thanh thải khối u trên các mô hình chuột nhắt. Khi kết hợp với các kháng thể kháng nguyên kháng khối u thương phẩm, như trastuzumab hoặc rituximab, các kháng thể kháng CD47 tạo điều kiện sự tăng cường hiệp đồng đáp ứng kháng khối u so với đơn liệu pháp tiêu chuẩn. Tuy nhiên, với sự biểu hiện phổ biến của CD47, các kháng thể kháng CD47 có nguy cơ chịu độc tính do các tác dụng ngoài đích mong muốn làm hạn chế hiệu quả điều trị của chúng. Tuy nhiên, các nghiên cứu này thiết lập vai trò quan trọng đối với con đường SIRPα-CD47 trong việc điều hòa tế bào dòng tủy với các ứng dụng tiềm năng trong liệu pháp điều trị ung thư bằng miễn dịch.

Kháng thể kháng SIRPA trước đây đã được mô tả trong, ví dụ, các công bố đơn quốc tế số: WO2018/057669, WO 2018/026600, WO 2017/178653, WO2017/068164,

WO2016/063233, WO2016/205042, WO2015/138600, WO2013/0956352, WO2009/091547, WO2009/131453, và WO2009/046541.

Theo đó, có nhu cầu về kháng thể kháng SIRPA trong trị liệu để điều trị các bệnh, rối loạn và tình trạng bệnh liên quan đến hoạt tính SIRPA không mong muốn.

Tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong bản mô tả này, bao gồm cả các đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế và các ấn phẩm, được đưa toàn bộ nội dung vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chung chế phẩm chứa kháng thể, ví dụ, kháng thể đơn dòng, kháng thể khảm, kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người, các mảnh kháng thể, v.v., gắn kết đặc hiệu với SIRPA của người, và các phương pháp sử dụng các chế phẩm như vậy.

Các khía cạnh nhất định của sáng chế dựa trên, ít nhất một phần, việc xác định kháng thể kháng SIRPA với các đặc điểm chức năng cải thiện và/hoặc tăng cường (ví dụ, so với kháng thể kháng SIRPA với vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5, bao gồm, ví dụ, khả năng làm giảm mức SIRPA bề mặt tế bào trên tế bào cải thiện và/hoặc tăng cường, và/hoặc có động học gắn kết cải thiện và/hoặc tăng cường, và/hoặc có KD cải thiện và/hoặc tăng cường, và/hoặc có giá trị EC_{50} cải thiện và/hoặc tăng cường. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có K_D đối với SIRPA của người thấp hơn ít nhất 2 lần, ít nhất 3 lần, ít nhất 4 lần, ít nhất 5 lần, ít nhất 6 lần, ít nhất 7 lần, ít nhất 8 lần, ít nhất 9 lần hoặc thấp hơn ít nhất 10 lần kháng thể kháng SIRPA có vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có KD đối với SIRPA của người thấp hơn 6 nM, thấp hơn 5 nM, thấp hơn 4 nM, thấp hơn 3 nM, thấp hơn 2 nM, thấp hơn 1 nM, thấp hơn 0,9 nM, thấp hơn 0,8 nM, thấp hơn 0,7 nM, thấp hơn 0,6 nm, hoặc thấp hơn 0,5 nM.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế làm giảm mức biểu hiện bề mặt tế bào của SIRPA *in vitro* với EC_{50} thấp hơn ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 40% hoặc ít nhất khoảng 50% so với kháng thể

kháng SIRPA có vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5. Có lợi là, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế làm giảm mức tế bào của SIRPA *in vitro* với nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) nằm trong khoảng từ 0,4 nM đến khoảng 0,5 nM. Có lợi là, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có hằng số phân ly (K_D) đối với SIRPA của người nằm trong khoảng từ 0,6 nM đến 0,7 nM.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với SIRPA v1 của người. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với SIRPA v2 của người. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với SIRPB (SIRPbeta) v3 của người. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế không gắn kết với SIRPB v1 của người. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế không gắn kết với SIRPA của loài gặm nhấm. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế không gắn kết với SIRPγ của người. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với SIRPA của khỉ đuôi dài cyno. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế không gắn kết với SIRPB1 của khỉ đuôi dài cyno. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với SIRPA của khỉ đuôi sóc.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể gắn kết với SIRPA của người, SIRPA v1 của người, SIRPA v2 của người, SIRPA của khỉ đuôi dài cyno, SIRPA của khỉ đuôi sóc, và SIRPβ3 của người.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm: HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID

NO:20; HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; và HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 22, 23, và 24.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm: HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, và 19.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm: HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 22, 23, và 24; HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, và 19.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin có ít nhất 90% hoặc ít nhất 95% hoặc ít nhất 99% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 33, 34, và 35.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin có ít nhất 90% hoặc ít nhất 95% hoặt ít nhất 99% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, và 44.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm một, hai, ba hoặc bốn vùng khung được chọn từ FR1 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:25, FR2 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:26, FR3 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27, và FR4 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm một, hai, ba hoặc bốn vùng khung được chọn từ FR1 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29, FR2 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30, FR3 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:31, và FR4 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:32.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm một, hai, ba hoặc bốn vùng khung được chọn từ FR1 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:25, FR2 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:26, FR3 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27, và FR4 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28; và trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm một, hai, ba hoặc bốn vùng khung được chọn từ FR1 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29, FR2 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30, FR3 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:31, và FR4 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:32.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong

SEQ ID NO:33, 34, và 35.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, và 44.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:33, 34, và 35, và trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, và 44.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 của kháng thể 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, hoặc 3F9-25 (như được thể hiện trong Bảng 8).

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 của kháng thể 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, hoặc 3F9-25 (như được thể hiện trong Bảng 7).

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 của kháng thể 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12,

3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, hoặc 3F9-25 (như được thể hiện trong Bảng 8); và trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 của kháng thể 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, hoặc 3F9-25 (như được thể hiện trong Bảng 7).

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3, trong đó kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 của kháng thể 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, hoặc 3F9-25 (như được thể hiện trong Bảng 7 và Bảng 8).

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm một, hai, ba, hoặc bốn vùng khung được chọn từ FR1 của VH, FR2 của VH, VH, Fr3, và FR4 của VH, trong đó: FR1 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:25; FR2 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:26; FR3 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27; và FR4 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm một, hai, ba, hoặc bốn vùng khung được chọn từ FR1 của VL, FR2 của VL, FR3 của VL, và FR4 của VL, trong đó FR1 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29; FR2 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30; FR3 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:31; và FR4 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:32.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:49 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID

NO:50.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:47 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA phân lập, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:48 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA phân lập, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:49 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA phân lập, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:53 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA phân lập, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:54 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA phân lập, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:51 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA phân lập, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:52 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA phân lập, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:55 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA phân lập, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:56 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA phân lập, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:57 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người trong đó kháng thể là kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này là mảnh Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv, hoặc scFv.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này là kháng thể đa trị.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này thuộc lớp IgG, lớp IgM, hoặc lớp IgA.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này thuộc lớp IgG và dưới dạng isotyp IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này gắn kết với thụ thể Fc ức chế. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, thụ thể Fc ức chế là thụ thể Fc-gamma ức chế IIB (FcγRIIB).

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này làm giảm mức tế bào của FcγRIIB.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA có isotyp IgG1 của người hoặc chuột nhắt và bao gồm một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin trong vùng Fc ở gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: N297A, D265A, D270A, L234A, L235A, G237A, P238D, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D, và tổ hợp bất kỳ của chúng, trong đó việc đánh số các gốc tuân theo quy tắc đánh số EU, hoặc bao gồm gốc khuyết đoạn axit amin trong vùng Fc ở vị trí tương ứng với glyxin 236.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin trong vùng Fc ở vị trí gốc được chọn từ nhóm bao gồm: C127S, L234A, L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, E345R, E430G, S440Y, và tổ hợp bất kỳ của chúng, trong đó việc đánh số các gốc axit amin tuân theo quy tắc đánh số EU.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA, làm giảm mức nội bào của SIRPA, làm giảm tổng mức tế bào của SIRPA, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA gây ra sự suy biến SIRPA, gây ra sự phân tách SIRPA, gây ra

quá trình nội bộ hóa SIRPA, gây ra quá trình loại bỏ SIRPA, gây ra quá trình điều hòa giảm sự biểu hiện của SIRPA, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA *in vitro*.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA *in vivo*.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA điều hòa giảm sự biểu hiện của SIRPA ở bạch cầu đơn nhân của người.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA điều hòa giảm sự biểu hiện của SIRPA ở đại thực bào của người.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA điều hòa giảm từ 70 đến 95% sự biểu hiện của SIRPA ở đại thực bào của người.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này có ái lực (K_D) với SIRPA của người thấp hơn 6 nM, thấp hơn 5 nM, thấp hơn 4 nM, thấp hơn 3 nM, thấp hơn 2 nM, hoặc thấp hơn 1 nM.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này có ái lực (K_D) với SIRPA của người nằm trong khoảng từ 0,1 nM đến 2 nM.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó

kháng thể này có ái lực với SIRPA của người với K_D thấp hơn ít nhất 2 lần, ít nhất 3 lần, ít nhất 4 lần, ít nhất 5 lần, ít nhất 6 lần, ít nhất 7 lần, ít nhất 8 lần, ít nhất 9 lần, hoặc thấp hơn ít nhất 10 lần ái lực với SIRPA của người của kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA v1 *in vitro* với nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) nằm trong khoảng từ 0,05 nM đến 2 nM hoặc khoảng 0,4 nM, khoảng 0,5 nM khi được đo bằng phương pháp đo tế bào theo dòng chảy.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA *in vitro* với nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,20 nM đối với SIRPA v1 của người, nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,10 nM đối với SIRPA v2 của người, và/hoặc nằm trong khoảng từ 0,05 đến 1 nM đối với SIRPA của khỉ đuôi dài cyno khi được đo bằng phương pháp đo tế bào theo dòng chảy.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này gắn kết với miền D3 của SIRPA v1 của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO:1.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này gắn kết với các gốc axit amin R282, Q284, và G337 của SIRPA v1 của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO:1.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA làm tăng khả năng thực bào tế bào khối u trong đại thực bào, làm tăng khả năng thực bào tế bào khối u trong đại thực bào M1, làm tăng khả năng thực bào tế bào khối u trong đại thực bào M2, điều hòa giảm sự biểu hiện của CD14 trong đại thực bào, và/hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA tăng cường quá trình tăng sinh tế bào T.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA phong bế tương tác hoặc gắn kết của SIRPA với protein bề mặt D (SP-D).

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA không phong bế tương tác hoặc gắn kết của SIRPA với CD47.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA điều hòa giảm mức biểu hiện bề mặt tế bào của CD32A/B.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA điều hòa giảm mức biểu hiện bề mặt tế bào của CD14.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA tăng cường quá trình tăng sinh tế bào T mà không phong bế tương tác của SIRPγ và CD47.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA kích thích sự sản xuất ROS trong các bạch cầu đơn nhân và/hoặc làm tăng sự biểu hiện của IL-8 trong các bạch cầu đơn nhân.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA ức chế sự phát triển khối u *in vivo*.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA làm giảm số lượng tế bào tủy sống CD14+ trong máu ngoại vi

và/hoặc làm tăng số lượng tế bào tủy sống CD14+ trong khối u.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể gắn kết với SIRPA của người nhưng không phong bế về cơ bản gắn kết của CD47 với SIRPA.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể nhận diện kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, trong đó kháng nguyên thứ nhất là SIRPA và kháng nguyên thứ hai là:

(a) kháng nguyên tạo điều kiện việc vận chuyển qua hàng rào máu-não;

(b) kháng nguyên tạo điều kiện việc vận chuyển qua hàng rào máu-não được chọn từ thụ thể transferrin (TR), thụ thể insulin (HIR), thụ thể yếu tố phát triển giống insulin (IGFR), protein liên quan đến thụ thể lipoprotein mật độ thấp 1 và 2 (LPR-1 và 2), và thụ thể độc tố bệnh bạch cầu;

(c) tác nhân gây bệnh được chọn từ peptit hoặc protein gây bệnh, axit nucleic gây bệnh, trong đó axit nucleic gây bệnh là ARN mở rộng đơn vị lặp lại GGCCCC (G2C4) đối nghĩa, protein gây bệnh được chọn từ beta dạng tinh bột, beta dạng tinh bột oligome, mảng beta dạng tinh bột, protein tiền chất dạng tinh bột hoặc mảnh của chúng, Tau, IAPP, alpha-synuclein, TDP-43, FUS protein, C9orf72 (nhiễm sắc thể 9 khung đọc mở 72), protein c9RAN, prion protein, PrPSc, huntingtin, calcitonin, superoxit dismutaza, ataxin, ataxin 1, ataxin 2, ataxin 3, ataxin 7, ataxin 8, ataxin 10, thể Lewy, yếu tố lợi tiểu natri nhĩ, amyloit polypeptit đảo, insulin, apolipoprotein AI, amyloid A huyết thanh, medin, prolactin, transthyretin, lysozym, beta 2 vi globulin, gelsolin, keratoepithelin, cystatin, AL chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, protein S-IBM, các sản phẩm dịch mã không ATG (RAN) được liên kết lặp lại, peptit lặp lại dipeptit (DPR), peptit lặp lại glyxin-alanin (GA), peptit lặp lại glyxin-prolin (GP), peptit lặp lại glyxin-arginin (GR), peptit lặp lại prolin-alanin (PA), ubiquitin, và prolin-arginin (PR) peptit lặp lại; và

(d) phối tử và/hoặc protein được biểu hiện trên tế bào miễn dịch, trong đó phối tử và/hoặc protein được chọn từ PD1/PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM,

LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, CD73, và phosphatidylserin; và protein, lipit, polysacarit, hoặc glycolipit được biểu hiện trên một hoặc nhiều tế bào khối u.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA được liên hợp với peptit mà tạo điều kiện việc vận chuyển qua hàng rào máu-não. Theo một số phương án, peptit được chọn từ CRM197, miền tải nạp protein, TAT, Syn-B, penetratin, poly-arginin peptit, angiopep peptit, và ANG1005.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA là kháng thể đã được opsonin hóa.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA là kháng thể đã được liên hợp.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA được liên hợp với chất đánh dấu có thể phát hiện được, độc tố, hoặc tác nhân trị liệu.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể kháng SIRPA được liên hợp với độc tố được chọn từ ricin, ricin A chain, doxorubicin, daunorubicin, maytansinoid, taxol, ethidium bromide, mitomyxin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicine, dihydroxy anthracin dione, actinomyxin, độc tố diphtheri, ngoại độc tố Pseudomonas (PE) A, PE40, abrin, abrin A chain, chuỗi modeccin A, alpha sarcin, gelonin, mitogellin, retstrictocin, phenomycin, enomycin, curicin, crotin, calicheamicin, chất ức chế Saponaria officinalis, glucocorticoit, auristatin, auromycin, ytri, bitmut, combrestatin, duocarmycin, dolastatin, cc1065 và cisplatin.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó

kháng thể kháng SIRPA được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều kháng thể gắn kết đặc hiệu protein gây bệnh được chọn từ beta dạng tinh bột, beta dạng tinh bột oligome, mảng beta dạng tinh bột, protein tiền chất dạng tinh bột hoặc mảnh của chúng, Tau, IAPP, alpha-synuclein, TDP-43, FUS protein, C9orf72 (nhiễm sắc thể 9 khung đọc mở 72), prion protein, PrPSc, huntingtin, calcitonin, superoxit dismutaza, ataxin, ataxin 1, ataxin 2, ataxin 3, ataxin 7, ataxin 8, ataxin 10, thể Lewy, yếu tố lợi tiểu natri nhĩ, amyloit polypeptit đảo, insulin, apolipoprotein AI, amyloid A huyết thanh, medin, prolactin, transthyretin, lysozym, beta 2 vi globulin, gelsolin, keratoepithelin, cystatin, AL chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, protein S-IBM, các sản phẩm dịch mã không ATG (RAN) được liên kết lặp lại, peptit lặp lại dipeptit (DPR), peptit lặp lại glyxin-alanin (GA), peptit lặp lại glyxin-prolin (GP), peptit lặp lại glyxin-arginin (GR), peptit lặp lại prolin-alanin (PA), ubiquitin, và peptit lặp lại prolin-arginin (PR), và tổ hợp bất kỳ của chúng; hoặc với một hoặc nhiều kháng thể gắn kết protein điều biến miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm: PD1/PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, CD73, TREM1, TREM2, CD33, Siglec-5, Siglec-7, Siglec-9, Siglec-11, phosphatidylserin, axit nucleic gây bệnh, ARN mở rộng đơn vị lặp lại GGCCCC (G2C4) đối nghĩa, và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa, giảm nguy cơ, hoặc điều trị ung thư, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho cá thể cần điều trị bệnh dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, nhờ đó điều trị ung thư. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa, giảm nguy cơ, hoặc điều trị cá thể mắc bệnh, rối loạn, hoặc tổn thương, trong đó bệnh, rối loạn, hoặc tổn thương là ung thư, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, nhờ đó ngăn ngừa, giảm nguy cơ, hoặc điều trị cá thể.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế mô tả phương pháp điều trị ung thư, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho cá thể cần điều trị bệnh dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị

của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, trong đó ung thư được chọn từ sacôm, ung thư bàng quang, ung thư não, ung thư vú, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư màng trong dạ con, ung thư thận, ung thư bể thận, bệnh bạch cầu, ung thư phổi, ung thư phổi tế bào nhỏ, khối u ác tính, u lympho, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư buồng trứng, và sacôm sợi, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng; ung thư biểu mô thận tế bào sáng; ung thư biểu mô vỏ tuyến thượng thận; ung thư biểu mô tiết niệu bàng quang, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, ung thư biểu mô tuyến phổi; ung thư biểu mô tuyến tụy, ung thư tế bào thận, u lympho Hodgkin, u lympho không Hodgkin, u lympho tế bào B tiến triển chậm, u lympho tế bào B tiến triển nhanh, u lympho tế bào T, bệnh bạch cầu tăng lympho bào cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu cấp tính dòng tủy (AML), bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu kinh dòng bạch cầu hạt mạn tính (CML), bệnh đa u tủy xương, hội chứng rối loạn sinh tủy, bệnh tăng sinh tủy ác tính, ung thư biểu mô vú xâm lấn, ung thư biểu mô tế bào vảy cổ tử cung, ung thư biểu mô tuyến trong cổ tử cung, thư biểu mô ống mật, ung thư biểu mô tuyến ruột kết, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, ung thư biểu mô thực quản, ung thư biểu mô tế bào vảy đầu và cổ, ung thư biểu mô thận kỵ màu, ung thư biểu mô tế bào u nhú thận, u tế bào thần kinh đệm cấp độ thấp, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy phổi, u trung biểu mô, u nang tuyến thanh dịch, ung thư biểu mô tuyến tụy, bệnh u tủy thượng thận và u cận hạch, ung thư biểu mô tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tuyến trực tràng, khối u ác tính da, ung thư biểu mô tuyến dạ dày, khối u tế bào mầm tinh hoàn, ung thư biểu mô tuyến giáp, khối u tuyến ức, ung thư biểu mô màng trong dạ con thân tử cung, ung thư biểu mô-sacôm cổ tử cung, và khối u ác tính màng bồ đào.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế mô tả phương pháp điều trị ung thư, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho cá thể cần điều trị bệnh dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, phương pháp này còn bao gồm bước dùng tác nhân trị liệu mà ức chế PD1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, hoặc CD73. Theo một số phương án mà có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, tác nhân trị liệu là kháng thể mà ức chế PD1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4,

HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, hoặc CD73.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế mô tả phương pháp điều trị ung thư, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho cá thể cần điều trị bệnh dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể dùng ít nhất một kháng thể gắn kết đặc hiệu với phân tử điểm kiểm soát ức chế, và/hoặc một hoặc nhiều liệu pháp chống ung thư tiêu chuẩn hoặc đang nghiên cứu. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, ít nhất một kháng thể gắn kết đặc hiệu với phân tử điểm kiểm soát ức chế được dùng kết hợp với kháng thể kháng SIRPA. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, ít nhất một kháng thể gắn kết đặc hiệu với phân tử điểm kiểm soát ức chế được chọn từ kháng thể kháng PD-L1, kháng thể kháng CTLA4, kháng thể kháng PD-L2, kháng thể kháng PD-1, kháng thể kháng B7-H3, kháng thể kháng B7-H4, và kháng thể kháng HVEM, kháng thể suy giảm kháng lympho bào B và T (BTLA), kháng thể thụ thể ức chế kháng tế bào tiêu diệt (KIR), kháng thể kháng GAL9, kháng thể kháng TIM-1, kháng thể kháng TIM3, kháng thể kháng TIM-4, kháng thể kháng A2AR, kháng thể kháng CD39, kháng thể kháng CD73, kháng thể kháng LAG-3, kháng thể kháng phosphatidylserin, kháng thể kháng CD27, kháng thể kháng CD30, kháng thể kháng TNFα, kháng thể kháng CD33, kháng thể kháng Siglec-5, kháng thể kháng Siglec-7, kháng thể kháng Siglec-9, kháng thể kháng Siglec-11, kháng thể kháng TREM1 đối kháng, kháng thể kháng TREM2 đối kháng, kháng thể kháng TIGIT, kháng thể kháng VISTA, kháng thể kháng CD2, kháng thể kháng CD5, và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, một hoặc nhiều liệu pháp chống ung thư tiêu chuẩn hoặc đang nghiên cứu được chọn từ xạ trị liệu, hóa trị liệu gây độc tế bào, liệu pháp hướng đích, liệu pháp imatinib, liệu pháp trastuzumab, liệu pháp etanercept, liệu pháp tế bào chuyển giao nuôi (ACT), liệu pháp chuyển tế bào T thụ thể kháng nguyên khảm (CAR-T), liệu pháp vắc-xin, và liệu pháp xytokin.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế mô tả phương pháp điều trị ung thư, trong đó phương pháp này

bao gồm bước cho cá thể cần điều trị bệnh dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể dùng ít nhất một kháng thể gắn kết đặc hiệu với xytokin ức chế. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, ít nhất một kháng thể gắn kết đặc hiệu với xytokin ức chế được dùng kết hợp với kháng thể kháng SIRPA. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, ít nhất một kháng thể gắn kết đặc hiệu với xytokin ức chế được chọn từ kháng thể kháng CCL2, kháng thể kháng CSF-1, kháng thể kháng IL-2, và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế mô tả phương pháp điều trị ung thư, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho cá thể cần điều trị bệnh dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể dùng ít nhất một kháng thể chủ vận gắn kết đặc hiệu với protein điểm kiểm soát kích thích. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, ít nhất một kháng thể chủ vận gắn kết đặc hiệu với protein điểm kiểm soát kích thích được dùng kết hợp với kháng thể kháng SIRPA. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, ít nhất một kháng thể chủ vận gắn kết đặc hiệu với protein điểm kiểm soát kích thích được chọn từ kháng thể kháng CD40 chủ vận, kháng thể kháng OX40 chủ vận, kháng thể kháng ICOS chủ vận, kháng thể kháng CD28 chủ vận, kháng thể kháng TREM1 chủ vận, kháng thể kháng TREM2 chủ vận, kháng thể kháng CD137/4-1BB chủ vận, kháng thể kháng CD27 chủ vận, kháng thể protein GITR liên quan đến TNFR gây ra bởi kháng thể kháng glucocorticoit chủ vận, chủ vận kháng thể kháng CD30, kháng thể kháng BTLA chủ vận, kháng thể kháng HVEM chủ vận, kháng thể kháng CD2 chủ vận, kháng thể kháng CD5 chủ vận, và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế mô tả phương pháp điều trị ung thư, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho cá thể cần điều trị bệnh dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể dùng ít nhất một xytokin kích thích. Theo một số phương án, ít nhất một xytokin kích thích được chọn từ các thành viên thuộc họ IFN-α4, IFN-β, IL-1β, TNF-α, IL-6,

IL-8, CRP, IL-20, LIF, IFN-γ, OSM, CNTF, GM-CSF, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, CXCL10, IL-33, MCP-1, MIP-1-beta, và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất axit nucleic phân lập bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vectơ bao gồm axit nucleic phân lập bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào vật chủ phân lập bao gồm vectơ bao gồm axit nucleic phân lập bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế.

Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp sản xuất kháng thể gắn kết với SIRPA của người, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ bao gồm vectơ bao gồm axit nucleic phân lập bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế để tạo ra kháng thể. Sáng chế còn đề xuất việc thu hồi kháng thể được tạo ra bởi tế bào.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Mô tả vắt tắt các hình vẽ

FIG.1 thể hiện việc sắp hàng trình tự axit amin của miền ngoại bào của biến thể SIRPA của người 1 và protein SIRPA từ các loài khác nhau. Tỷ lệ phần trăm mức đồng nhất được ghi lại chứng minh mức tương đồng cao trong vùng ngoại bào. Số truy cập là P78324 (biến thể SIRPA của người 1), XP015313153 (khỉ đuôi dài cynomolgus), JAB51896 (khỉ đuôi sóc), G1U0I5 (thỏ), và XP005634938 (chó). FIG.1 thể hiện lần lượt các SEQ ID NO 59-63, theo hình thái bề ngoài.

FIG.2A liệt kê trình tự có khả năng đã được làm giống như kháng thể của người của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng SIRPA 3F9. Trình tự đã được làm giống như kháng thể của người được dựa trên khung nhận IGHV3-23*01 và vùng nối IGHJ4*01. FIG.2A thể hiện lần lượt các SEQ ID NO 64-65, 2, 64, và 3-4, theo hình thái bề ngoài. FIG.2B liệt kê trình tự có khả năng đã được làm giống như kháng thể của người của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng SIRPA 3F9. FIG.2B thể hiện lần lượt các SEQ ID NO 66-67, 5, 66, và 68-70, theo hình thái bề ngoài.

FIG.3 thể hiện dữ liệu cho thấy mức điều hòa giảm SIRPA qua trung gian

kháng thể đối với đại thực bào sơ cấp của người nhờ kháng thể kháng SIRPA 3F9 của loài gặm nhấm và đã được làm giống như kháng thể của người.

FIG.4A thể hiện dữ liệu cho thấy mức điều hòa giảm thụ thể qua trung gian kháng thể phụ thuộc vào Fc glycan được liên kết cầu nối N. FIG.4B thể hiện dữ liệu cho thấy sự tăng cường qua trung gian kháng thể khả năng thực bào tế bào khối u phụ thuộc vào Fc glycan được liên kết cầu nối N.

FIG.5A thể hiện dữ liệu cho thấy biến thể kháng thể kháng SIRPA 3F9 IgG4 đã được làm giống như kháng thể của người không thể gây ra khả năng thực bào tế bào khối u. FIG.5B thể hiện dữ liệu cho thấy biến thể kháng thể kháng SIRPA 3F9 IgG4 đã được làm giống như kháng thể của người không thể điều hòa giảm sự biểu hiện của CD14 trên đại thực bào.

FIG.6A thể hiện việc xử lý bằng kháng thể 3F9 mIgG1 kháng SIRPA điều hòa giảm sự biểu hiện của CD32A/B trên đại thực bào sơ cấp của người. FIG.6B cho thấy rằng việc xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9 điều hòa giảm sự biểu hiện CD32A và CD32B đối với đại thực bào sơ cấp của người.

FIG.7A thể hiện dữ liệu cho thấy thể phong bế CD32A/B ức chế mức điều hòa giảm SIRPA qua trung gian kháng thể kháng SIRPA 3F9 trên đại thực bào sơ cấp của người. FIG.7B thể hiện dữ liệu cho thấy thể phong bế CD32A/B ức chế sự tăng cường của khả năng thực bào tế bào khối u qua trung gian kháng thể kháng SIRPA 3F9.

FIG.8 thể hiện dữ liệu cho thấy alen CD32A tác động đến mức điều hòa giảm SIRPA qua trung gian kháng thể kháng SIRPA 3F9. FIG.8A thể hiện các thể cho 507 và 508 là dị hợp tử CD32A-R/H131; FIG.8B thể hiện các thể cho 516 và 517 là đồng hợp tử CD32A-H/H131.

FIG.9A-9B thể hiện dữ liệu cho thấy mức điều hòa giảm thụ thể qua trung gian kháng thể dẫn đến sự suy biến SIRPA. Trên FIG.9A, 5 µg, 10 µg, và 20 µg toàn bộ chất ly giải tế bào được nạp vào SDS-PAGE và được thấm tách miễn dịch với miền tế bào chất kháng SIRPA (a-SIRPAct). Trên FIG.9B, 20 µg toàn bộ chất ly giải tế bào được nạp vào SDS-PAGE và được dò bằng a-SIRPAct và kháng thể kháng SHP2.

FIG.10A-10B thể hiện dữ liệu so sánh sự tăng cường của hoạt tính thực bào của các biến thể Fc khác nhau của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22. Trên FIG.10A, đại

thực bào sơ cấp của người được điều trị bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 trên khung IgG1 dạng dại của người hoặc trên IgG1 của người mang các đột biến Fc S267E/L328F hoặc kháng thể đối chứng isotyp. Trên FIG.10B, đại thực bào sơ cấp của người được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 trên khung IgG1 của người mang các đột biến Fc S267E/L328F hoặc A330S/P331S hoặc kháng thể đối chứng isotyp.

FIG.11A-11B thể hiện dữ liệu so sánh hoạt tính thực bào của các biến thể Fc khác nhau của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 so với kháng CD47 đối với đại thực bào M1 (FIG.11B) và M2 (FIG.11A).

FIG.12A và FIG.12B thể hiện dữ liệu cho thấy đại thực bào được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 đã làm giảm khả năng sống sót của tế bào khối u rắn *in vitro*.

FIG.13A thể hiện dữ liệu so sánh sự tăng cường mức tăng sinh tế bào T bởi các biến thể Fc khác nhau của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 trong thử nghiệm MLR 2 chiều. FIG.13B thể hiện dữ liệu so sánh sự tăng cường mức tăng sinh tế bào T bởi các biến thể Fc khác nhau của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 và kháng thể kháng SIRPA 3F9-14 so với kháng CD47 IgG4 trong thử nghiệm MLR 2 chiều.

FIG.14A thể hiện dữ liệu so sánh sự tăng cường mức tăng sinh tế bào T bởi các biến thể Fc khác nhau của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 so với kháng CD47 IgG4 trong thử nghiệm MLR 1 chiều. FIG.14B thể hiện biểu đồ FACS đại diện từ thử nghiệm MLR 1 chiều.

FIG.15A và FIG.15B thể hiện dữ liệu so sánh sự tăng cường mức giải phóng TNF bởi các biến thể Fc khác nhau của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 bởi đại thực bào đã được mồi LPS.

FIG.16 thể hiện dữ liệu cho thấy sự nhận diện và trực quan hóa về các gốc "quan trọng" đối với kháng thể kháng SIRPA trong mô hình SIRPA của người.

FIG.17A-17C thể hiện dữ liệu cho thấy hiệu quả của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 đối với mức ức chế sự phát triển khối u kết hợp với kháng thể kháng PD-L1 trong mô hình ung thư biểu mô ruột kết ở chuột nhắt. FIG.17A thể hiện các biểu đồ FACS cho thấy sự biểu hiện của CD47 của chuột nhắt (bảng trên cùng) và CD47 của

người (bảng dưới cùng) ở các dòng tế bào MC38 đã được xử lý di truyền và dạng dại. FIG.17B thể hiện dữ liệu cho thấy đường cong phát triển khối u trung bình của chuột chuyển gen huSIRPA/huCD47 BAC được cấy dưới da tế bào MC38 đã được xử lý di truyền để gây thiếu hụt mức biểu hiện CD47 của chuột nhắt và biểu hiện quá mức CD47 của người (MC38-mCD47KO/huCD47+). FIG.17C thể hiện đồ thị dạng mỳ ống (spaghetti) của mỗi con chuột riêng rẽ trong mỗi nhóm xử lý của FIG.17B.

FIG.18A-18B thể hiện dữ liệu cho thấy động học của mức điều hòa giảm qua trung gian kháng thể của SIRPA ở tế bào tủy của chuột chuyển gen BAC mang khối u được xử lý bằng liều lượng gia tăng của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế. FIG.18A thể hiện dữ liệu cho thấy sự thay đổi tương đối của mức biểu hiện của SIRPA theo thời gian đối với tế bào tủy thâm nhiễm khối u. FIG.18B thể hiện dữ liệu cho thấy mức thay đổi tương đối của sự biểu hiện của SIRPA theo thời gian trên tế bào tủy lá lách.

FIG.19A thể hiện điều kiện xử lý của mức điều hòa giảm qua trung gian kháng thể kháng SIRPA của nghiên cứu SIRPA ở chuột nhắt NOG-EXL đã được làm giống như kháng thể của người mang khối u A375. FIG.19B thể hiện dữ liệu cho thấy sự biểu hiện của SIRPA trên đại thực bào khối u của người dưới dạng giá trị MFI (bảng bên trái) hoặc các giá trị chuẩn hóa (bảng bên phải) kết hợp với việc xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế.

FIG.20A-20B thể hiện các mức biểu hiện của chất đánh dấu đại thực bào M1 HLA-DR/MHC nhóm 2 (FIG.20A) và CD86 (FIG.20B) trên đại thực bào khối u của người đã được phân lập từ chuột NOG-EXL đã được làm giống như kháng thể của người mang khối u A375 sau khi xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế. FIG.20A và FIG.20B thể hiện dữ liệu cho thấy sự biểu hiện của lần lượt HLA-DR/MHC nhóm 2 và CD86, dưới dạng giá trị MFI (bảng bên trái) hoặc các giá trị chuẩn hóa (bảng bên phải).

FIG.21A-21B thể hiện mức điều hòa giảm của SIRPA của người ở bạch cầu đơn nhân lá lách (FIG.21A) và bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi (FIG.21B) được phân lập từ chuột NOG-EXL đã được làm giống như kháng thể của người mang khối u A375 kết hợp với việc dùng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế. FIG.21A và FIG.21B thể hiện dữ liệu cho thấy mức biểu hiện của SIRPA của người dưới dạng giá

trị MFI (bảng bên trái) hoặc các giá trị chuẩn hóa (bảng bên phải).

FIG.22 thể hiện dữ liệu cho thấy mức điều hòa giảm SIRPA qua trung gian kháng thể đối với đại thực bào sơ cấp của người bởi các biến thể Fc khác nhau của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22.

FIG.23 thể hiện dữ liệu so sánh sự tăng cường của hoạt tính thực bào của các biến thể Fc khác nhau của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 so với kháng thể phong bế kháng CD47.

FIG.24 thể hiện dữ liệu cho thấy số lượng hồng cầu và tiểu cầu ở khỉ đuôi dài cynomolgus được dùng kháng thể IgG đối chứng, kháng thể 3F9-22 PS kháng SIRPA, kháng thể 3F9-22 IgG4 kháng SIRPA, kháng thể 3F9-IgG2 kháng SIRPA, và kháng thể 3F9-22 NSLF kháng SIRPA.

Cần phải hiểu rằng một, một số hoặc tất cả các thuộc tính của các phương án khác nhau được đề cập trong bản mô tả này có thể được kết hợp để tạo thành các phương án khác của sáng chế. Các khía cạnh này và các khía cạnh khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các phương án này và các phương án khác của sáng chế được mô tả thêm bằng phần mô tả chi tiết sau đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA (ví dụ, kháng thể đơn dòng); phương pháp tạo ra và sử dụng kháng thể này; dược phẩm chứa kháng thể này; axit nucleic mã hóa kháng thể như vậy; và tế bào vật chủ bao gồm axit nucleic mã hóa kháng thể như vậy.

Các kỹ thuật và quy trình được mô tả hoặc đề cập trong bản mô tả này thường được hiểu rõ và thường được sử dụng bằng phương pháp thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này như, ví dụ, các phương pháp được sử dụng rộng rãi được mô tả trong Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); xêri Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988)

Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); and Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

Định nghĩa

Các thuật ngữ "SIRPα" hoặc "SIRPα polypeptit" hoặc "SIRPA" hoặc "SIRPA polypeptit" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này để chỉ SIRPA nguyên thể bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ, người và khỉ đuôi dài cynos) và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Theo một số phương án, thuật ngữ này bao hàm cả các trình tự dạng dại và các trình tự biến thể xuất hiện trong tự nhiên, ví dụ, các biến thể ghép hoặc các biến thể alen. Theo một số phương án, thuật ngữ này bao hàm SIRPA chưa được xử lý, "có chiều dài đầy đủ" cũng như dạng bất kỳ của SIRPA thu được từ việc xử lý trong tế bào. Theo một số phương án, SIRPA là SIRPA của người. Theo một số phương án, trình tự axit amin của SIRPA được lấy làm ví dụ là trình tự có số truy cập Uniprot P78324 vào ngày 25 tháng 4 năm 2018. Theo một số phương án, trình tự axit amin của SIRPA v1 của người được lấy làm ví dụ là SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, trình tự axit amin của SIRPA v2 của người được lấy

làm ví dụ là GenBank CAA71403.

Các thuật ngữ "kháng thể kháng SIRPA", "kháng thể gắn kết với SIRPA", và "kháng thể gắn kết đặc hiệu với SIRPA" để chỉ kháng thể có khả năng gắn kết với SIRPA với ái lực đủ để kháng thể có thể dùng làm tác nhân chẩn đoán và/hoặc tác nhân trị liệu ở SIRPA hướng đích. Theo một phương án, mức độ gắn kết của kháng thể kháng SIRPA với polypeptit không SIRPA không liên quan là thấp hơn khoảng 10% mức gắn kết của kháng thể với SIRPA như được đo, ví dụ, bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA). Theo các phương án nhất định, kháng thể gắn kết với SIRPA có hằng số phân ly (K_D) < 1 μM, < 100 nM, < 10 nM, < 1 nM, < 0,1 nM, < 0,01 nM, hoặc < 0,001 nM (ví dụ, 10^{-8} M hoặc thấp hơn, ví dụ, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M). Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng SIRPA gắn kết với epitop của SIRPA được bảo toàn trong SIRPA từ các loài khác nhau.

Đối với mức gắn kết của kháng thể với phân tử đích, thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" hoặc "gắn kết đặc hiệu" hoặc là "đặc hiệu với" polypeptit hoặc epitop cụ thể trên đích polypeptit cụ thể nghĩa là gắn kết khác biệt đáng kể so với tương tác không đặc hiệu. Gắn kết đặc hiệu có thể được đo, ví dụ, bằng cách xác định gắn kết của phân tử so với gắn kết của phân tử đối chứng. Ví dụ, gắn kết đặc hiệu có thể được xác định bằng cách cạnh tranh với phân tử đối chứng mà tương tự với đích, ví dụ, một lượng dư của đích không được dán nhãn. Trong trường hợp này, gắn kết đặc hiệu được chỉ ra nếu mức gắn kết của đích đã được dán nhãn với đầu dò được ứ chế cạnh tranh bởi đích không được dán nhãn dư thừa. Thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" hoặc "gắn kết đặc hiệu với" hoặc là "đặc hiệu với" polypeptit hoặc epitop cụ thể trên đích polypeptit cụ thể như được sử dụng trong bản mô tả này có thể được thể hiện, ví dụ, bằng phân tử có K_D đối với đích ở giá trị bất kỳ khoảng 10^{-4} M hoặc thấp hơn, 10^{-5} M hoặc thấp hơn, 10^{-6} M hoặc thấp hơn, 10^{-7} M hoặc thấp hơn, 10^{-8} M hoặc thấp hơn, 10^{-9} M hoặc thấp hơn, 10^{-10} M hoặc thấp hơn, 10^{-11} M hoặc thấp hơn, 10^{-12} M hoặc thấp hơn hoặc K_D nằm trong khoảng từ 10^{-4} M đến 10^{-6} M hoặc 10^{-6} M đến 10^{-10} M hoặc 10^{-7} M đến 10^{-9} M. Như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ái lực và giá trị K_D có quan hệ nghịch đảo. Ái lực cao đối với kháng nguyên được đo bằng giá trị K_D thấp. Theo một phương án, thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" để chỉ gắn kết trong đó phân tử gắn kết với polypeptit hoặc epitop cụ thể trên polypeptit cụ thể mà không gắn kết về cơ bản với epitop polypeptit hoặc polypeptit bất kỳ khác.

Thuật ngữ "globulin miễn dịch" (Ig) được sử dụng thay thế cho nhau với "kháng thể" trong bản mô tả này. Thuật ngữ "kháng thể" được sử dụng trong bản mô tả này theo nghĩa rộng nhất và bao hàm cụ thể kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể lưỡng đặc hiệu) bao gồm các kháng thể được tạo ra từ ít nhất hai kháng thể nguyên vẹn, và các mảnh kháng thể miễn là chúng có hoạt tính sinh học mong muốn.

"Kháng thể nguyên thể" thường là glycoprotein dị tetrame có khối lượng khoảng 150.000 Dalton, bao gồm hai chuỗi nhẹ ("L") giống nhau và hai chuỗi nặng ("H") giống nhau. Mỗi chuỗi nhẹ được liên kết với chuỗi nặng bởi một liên kết disulfua cộng hóa trị, trong khi số lượng của các liên kết cầu nối disulfua khác nhau giữa các chuỗi nặng của các isotyp globulin miễn dịch khác nhau. Mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cũng có các cầu nối disulfua nội chuỗi cách đều nhau. Mỗi chuỗi nặng ở một đầu có một miền biến đổi (VH) tiếp theo là một số miền hằng định. Mỗi chuỗi nhẹ có miền biến đổi ở một đầu (VL) và miền hằng định ở đầu kia của nó; miền hằng định của chuỗi nhẹ được sắp hàng với miền hằng định thứ nhất của chuỗi nặng, và miền biến đổi chuỗi nhẹ được sắp hàng với miền biến đổi của chuỗi nặng. Các gốc axit amin cụ thể được tin là tạo ra một giao diện giữa các miền biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng.

Đối với cấu trúc và đặc tính của các lớp kháng thể khác nhau, xem, ví dụ, Basic and Clinical Immunology, 8th Ed., Daniel P. Stites, Abba I. Terr và Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, trang 71 và Chương 6.

Chuỗi nhẹ từ các loài động vật có xương sống bất kỳ có thể được gán cho một trong hai dạng khác biệt rõ ràng, được gọi là kappa ("κ") và lambda ("λ"), dựa trên các trình tự axit amin của các miền hằng định của chúng. Tùy thuộc vào trình tự axit amin của miền hằng định của các chuỗi nặng của chúng (CH), globulin miễn dịch có thể được gán cho các lớp isotyp khác nhau. Có năm lớp globulin miễn dịch: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, có chuỗi nặng được đặt tên lần lượt là alpha ("α"), delta ("δ"), epsilon ("ε"), gamma ("γ"), và mu ("μ"). Các lớp γ và α được chia tiếp thành các phân lớp (isotyp) trên cơ sở các khác biệt tương đối nhỏ trong trình tự và chức năng CH, ví dụ, người biểu hiện các phân lớp sau: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, và IgA2. Cấu trúc tiểu đơn vị và cấu hình ba chiều của các lớp globulin miễn dịch khác nhau là đã

biết và được mô tả chung trong, ví dụ, Abbas et al., *Cellular and Molecular Immunology*, 4th ed. (W.B. Saunders Co., 2000).

"Vùng biến đổi" hoặc "miền biến đổi" của kháng thể, như kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, để chỉ các miền đầu tận cùng amino của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể. Miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được chỉ lần lượt là "V_H" và "V_L". Các miền này nói chung là các phần biến đổi nhất của kháng thể (so với các kháng thể khác thuộc cùng một lớp) và chứa các vị trí gắn kết kháng nguyên.

Thuật ngữ "biến đổi" để chỉ thực tế là các mảnh nhất định của miền biến đổi khác nhau nhiều về trình tự giữa các kháng thể, như kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế. Miền biến đổi làm trung gian gắn kết kháng nguyên và xác định tính đặc hiệu của kháng thể cụ thể cho kháng nguyên cụ thể của nó. Tuy nhiên, sự thay đổi không được phân phối đồng đều trong toàn bộ khoảng của miền biến đổi. Thay vào đó, nó tập trung trong ba mảnh được gọi là vùng siêu biến (HVR) cả ở miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng. Các phần được bảo toàn cao hơn của miền biến đổi được gọi là vùng khung (FR). Miền biến đổi của mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nguyên thể bao gồm bốn vùng FR, phần lớn áp dụng cấu hình bảng beta, được kết nối bởi ba HVR, tạo thành các vòng kết nối, và trong một số trường hợp tạo thành một phần của, cấu trúc bảng beta. HVR trong mỗi chuỗi được giữ gần nhau bởi các vùng FR và, với HVR từ chuỗi khác, góp phần hình thành vị trí gắn kết kháng nguyên của kháng thể (xem, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Miền hằng định không liên quan trực tiếp đến sự gắn kết của kháng thể với kháng nguyên, nhưng có nhiều chức năng hiệu ứng khác nhau, như sự tham gia của kháng thể trong tính gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ kháng thể, như kháng thể đơn dòng kháng SIRPA theo sáng chế, thu được từ một quần thể của kháng thể đồng nhất về cơ bản, tức là kháng thể riêng lẻ bao gồm quần thể giống hệt nhau ngoại trừ các đột biến có thể xảy ra tự nhiên và/hoặc các sửa đổi sau dịch mã (ví dụ, isome hóa, amit hóa, v.v.) có thể có mặt với lượng nhỏ. Kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao, được hướng đến một vị trí kháng nguyên duy nhất. Ngược lại với chế phẩm kháng thể đa dòng trong đó thường bao gồm các kháng thể khác nhau được hướng đến chống lại các yếu tố quyết định khác nhau (epitop), mỗi kháng thể

đơn dòng hướng đến chống lại một yếu tố quyết định duy nhất trên kháng nguyên. Ngoài tính đặc hiệu của chúng, kháng thể đơn dòng có lợi ở chỗ chúng được tổng hợp bởi môi trường nuôi cấy tế bào lai, không bị ô nhiễm bởi các globulin miễn dịch khác. Dạng từ cải biến "đơn dòng" chỉ ra đặc điểm của kháng thể như thu được từ quần thể kháng thể đồng nhất về cơ bản và không được hiểu là yêu cầu tạo ra kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, kháng thể đơn dòng được sử dụng phù hợp theo sáng chế có thể được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, bao gồm, ví dụ, phương pháp tế bào lai, phương pháp ADN tái tổ hợp, và công nghệ sản xuất kháng thể của người và kháng thể giống của người ở động vật có một phần hoặc tất cả locut hoặc gen globulin miễn dịch của người mã hóa trình tự globulin miễn dịch của người. Ví dụ, kháng thể đơn dòng được sử dụng phù hợp theo sáng chế có thể được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, bao gồm, ví dụ, công nghệ hiển thị thể thực khuẩn (xem, ví dụ, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol*. 222:581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol*. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol*. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 101(34):12467-472 (2004); và Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004), phương pháp tế bào lai (ví dụ, Kohler và Milstein., Nature, 256:495-97 (1975); Hongoet al., Hybridoma, 14 (3):253-260 (1995), Harlow et al., *Antibody: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2d ed. 1988); Hammerling et al., trong: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), phương pháp ADN tái tổ hợp (xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,816,567), công nghệ trình bày nấm (xem, ví dụ, WO2009/036379A2; WO2010105256; WO2012009568, và Xu et al., *Protein Eng. Des. Sel.,* 26(10): 663-70 (2013), và công nghệ sản xuất kháng thể của người và kháng thể giống của người ở động vật có một phần hoặc tất cả locut hoặc gen globulin miễn dịch của người mã hóa trình tự globulin miễn dịch của người (xem, ví dụ, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.* USA 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol*. 7:33 (1993); các patent Mỹ số 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; và 5,661,016; Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol*. 14:845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14:826 (1996); và Lonberg và Huszar, Intern.

Rev. Immunol. 13:65-93 (1995).

Các thuật ngữ "kháng thể có chiều dài đầy đủ", "kháng thể nguyên vẹn" hoặc "toàn bộ kháng thể" được sử dụng thay thế cho nhau để chỉ kháng thể, như kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, ở dạng nguyên vẹn về cơ bản, trái ngược với mảnh kháng thể. Cụ thể, toàn bộ kháng thể bao gồm kháng thể với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ gồm vùng Fc. Miền hằng định có thể là miền hằng định của trình tự nguyên thể (ví dụ, miền hằng định của trình tự nguyên thể của người) hoặc các biến thể trình tự axit amin của chúng. Trong một số trường hợp, kháng thể nguyên vẹn có thể có một hoặc nhiều chức năng hiệu ứng.

"Mảnh kháng thể" để chỉ phân tử không phải là kháng thể nguyên vẹn bao gồm một phần của kháng thể nguyên vẹn gắn kết kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn gắn kết. Ví dụ về các mảnh kháng thể bao gồm mảnh Fab, Fab', $F(ab')_2$ và Fv; kháng thể kép; kháng thể thẳng (xem patent Mỹ số 5641870, ví dụ, 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995)); phân tử kháng thể chuỗi đơn và kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ các mảnh kháng thể.

Việc phân cắt kháng thể bằng papain, như kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, tạo ra hai mảnh gắn kết kháng nguyên giống hệt nhau, được gọi là mảnh "Fab" và mảnh "Fc" còn lại, ký hiệu phản ánh khả năng kết tinh dễ dàng. Mảnh Fab cấu thành bởi toàn bộ chuỗi nhẹ cùng với miền vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H), và miền hằng định thứ nhất của một chuỗi nặng (C_H1). Mỗi mảnh Fab là đơn hóa trị liên quan đến gắn kết kháng nguyên, tức là nó có một vị trí gắn kết kháng nguyên duy nhất. Việc xử lý kháng thể bằng pepsin thu được mảnh $F(ab')_2$ lớn duy nhất gần tương ứng với hai mảnh Fab liên kết với disulfua có hoạt tính gắn kết kháng nguyên khác nhau và vẫn có khả năng liên kết chéo với kháng nguyên. Các mảnh Fab 'khác với các mảnh Fab bởi có một vài gốc bổ sung ở đầu tận cùng carboxy của miền C_H1 bao gồm một hoặc nhiều xystein từ vùng bản lề của kháng thể. Fab'-SH là ký hiệu trong bản mô tả này dùng cho Fab' trong đó (các) gốc xystein của miền hằng định mang nhóm thiol tự do. Các mảnh kháng thể $F(ab')_2$ ban đầu được tạo ra dưới dạng các cặp mảnh Fab' có xystein bản lề giữa chúng. Các ngẫu hợp hóa học khác của các mảnh kháng thể cũng đã biết.

Mảnh Fc bao gồm các phần đầu tận cùng carboxy của cả hai chuỗi nặng được giữ với nhau bởi disulfua. Chức năng hiệu ứng của kháng thể được xác định bằng các

trình tự trong vùng Fc, vùng này cũng được nhận diện bởi các thụ thể Fc (FcR) được phát hiện trên các dạng tế bào nhất định.

"Mảnh chức năng" của kháng thể, như kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, bao gồm một phần của kháng thể nguyên vẹn, thường bao gồm gắn kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi của kháng thể nguyên vẹn hoặc vùng Fc của kháng thể vẫn duy trì được hoặc có khả năng gắn kết FcR cải biến. Ví dụ về các mảnh kháng thể bao gồm kháng thể thẳng, phân tử kháng thể chuỗi đơn và kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ các mảnh kháng thể.

Thuật ngữ "kháng thể kép" để chỉ các mảnh kháng thể nhỏ được tạo ra bằng cách cấu trúc các mảnh sFv (xem đoạn mô tả trước) với các gốc liên kết cầu nối ngắn (khoảng 5-10) giữa các miền V_H và V_L sao cho đạt được bắt cặp liên chuỗi chứ không phải bắt cặp trong chuỗi, nhờ đó thu được mảnh hóa trị hai, tức là mảnh có hai vị trí gắn kết kháng nguyên. Kháng thể kép đặc hiệu kép là các heterodime của hai mảnh sFv "bắt chéo" trong đó các miền V_H và V_L của hai kháng thể có mặt trên các chuỗi polypeptit khác nhau.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "kháng thể khảm" để chỉ kháng thể (globulin miễn dịch), như kháng thể khảm kháng SIRPA theo sáng chế, trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là giống hệt hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong kháng thể có nguồn gốc từ các loài cụ thể hoặc thuộc lớp hoặc phân lớp kháng thể cụ thể, trong khi phần còn lại của (các) chuỗi là giống hệt hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong kháng thể có nguồn gốc từ các loài khác hoặc thuộc lớp hoặc phân lớp kháng thể khác, cũng như mảnh kháng thể như vậy, miễn là chúng có hoạt tính sinh học mong muốn. Kháng thể khảm quan tâm trong bản mô tả này bao gồm kháng thể PRIMATIZED® trong đó vùng gắn kết kháng nguyên của kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể được tạo ra bằng, ví dụ, chủng ngừa khỉ đuôi ngắn bằng kháng nguyên quan tâm. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người" được sử dụng là tập hợp con của "kháng thể khảm".

Dạng "đã được làm giống như kháng thể của người" của kháng thể không phải là người (ví dụ, loài gặm nhấm), như các dạng đã được làm giống như kháng thể của người của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, là kháng thể khảm bao gồm các gốc

axit amin từ HVR không phải của người và các gốc axit amin từ FR của người. Theo các phương án nhất định, kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người sẽ bao gồm về cơ bản tất cả ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc về cơ bản tất cả HVR (ví dụ, CDR) tương ứng với các miền biến đổi của kháng thể không phải của người, và tất cả hoặc về cơ bản tất cả FR tương ứng với các FR của kháng thể của người. Kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người tùy ý có thể bao gồm ít nhất một phần của vùng ổn định của kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể của người. "Dạng đã được làm giống như kháng thể của người" của kháng thể, ví dụ, kháng thể không phải của người, để chỉ kháng thể đã trải qua quá trình làm giống như kháng thể của người.

"Kháng thể của người" là kháng thể có trình tự axit amin tương ứng với trình tự của kháng thể, như kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, được tạo ra bởi người và/hoặc được tạo ra bằng kỹ thuật tạo ra kháng thể của người bất kỳ như được đề cập trong bản mô tả này. Định nghĩa này về kháng thể của người loại trừ cụ thể kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên không phải của người. Kháng thể của người có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm thư viện hiển thị thể thực khuẩn và thư viện hiển thị nấm men. Kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách dùng kháng nguyên cho động vật chuyển gen đã được cải biến để tạo ra kháng thể như vậy đáp ứng với kích thích kháng nguyên, nhưng toàn bộ locut nội sinh đã bị vô hiệu hóa, ví dụ, chuột chuyển gen có khả năng tạo ra kháng thể người (xenomice) đã được chủng ngừa cũng như được tạo ra nhờ công nghệ tế bào lai B của người. Kháng thể của người có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm thư viện hiển thị thể thực khuẩn. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Phương pháp cũng sẵn có để tạo ra kháng thể của người đơn dòng được mô tả trong Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Cũng xem van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001). Kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách cho dùng kháng nguyên cho động vật chuyển gen đã được cải biến để tạo ra kháng thể như vậy đáp ứng với kích thích kháng nguyên, nhưng toàn bộ locut nội sinh đã bị vô hiệu hóa, ví dụ, chuột ghép đã được chủng ngừa (xem, ví dụ, các patent Mỹ số 6,075,181 và 6,150,584

đề cập đến công nghệ XENOMOUSETM). Cũng xem, ví dụ, Li et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.* USA, 103:3557-3562 (2006) về kháng thể của người được tạo ra nhờ công nghệ tế bào lai tế bào B của người. Theo cách khác, kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các thư viện nấm men và phương pháp như được mô tả trong, ví dụ, WO2009/036379A2; WO2010105256; WO2012009568; và Xu et al., *Protein Eng. Des. Sel.*, 26(10): 663-70 (2013).

Thuật ngữ "vùng siêu biến", "HVR", hoặc "HV", khi được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ các vùng của kháng thể-miền biến đổi, như các vùng của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, là siêu biến về trình tự và/hoặc tạo thành các vòng được xác định về cấu trúc. Nói chung, kháng thể bao gồm sáu HVR; ba trong V_H (H1, H2, H3), và ba trong V_L (L1, L2, L3). Trong kháng thể nguyên thể, H3 và L3 hiển thị sự đa dạng nhất trong sáu HVR, và H3 đặc biệt được cho là đóng một vai trò duy nhất trong việc tạo ra tính đặc hiệu tốt đối với kháng thể. Kháng thể lạc đà tự nhiên cấu thành bởi chuỗi nặng chỉ có chức năng và ổn định khi không có mặt của chuỗi nhẹ.

Một số mô hình HVR đang được sử dụng và bao gồm trong sáng chế. Theo một số phương án, HVR có thể là vùng xác định bổ thể Kabat (CDR) dựa trên sự biến đổi của trình tự và được sử dụng phổ biến nhất (Kabat et al., trên đây). Theo một số phương án, HVR có thể là Chothia CDR. Thay vào đó, Chothia đề cập đến vị trí của các vòng cấu trúc (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Theo một số phương án, HVR có thể là AbM HVR. AbM HVR là sự thỏa hiệp giữa các vòng cấu trúc Kabat CDR và Chothia và được sử dụng bởi phần mềm mô hình hóa kháng thể AbM của Oxford Molecular. Theo một số phương án, HVR có thể là HVR "tiếp xúc". HVR "tiếp xúc" dựa trên phân tích về các cấu trúc tinh thể phức tạp có sẵn. Các gốc từ mỗi HVR này được lưu ý dưới đây.

Vòng	Kabat	AbM	Chothia	Tiếp xúc
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Đánh số Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Đánh số Chothia)

H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

HVR có thể bao gồm "HVR đã được mở rộng" như sau: 24-36 hoặc 24-34 (L1), 46-56 hoặc 50-56 (L2), và 89-97 hoặc 89-96 (L3) trong VL, và 26-35 (H1), 50-65 hoặc 49-65 (phương án được ưu tiên) (H2), và 93-102, 94-102, hoặc 95-102 (H3) trong VH. Các gốc của miền biến đổi được đánh số theo Kabat et al., nêu trên, cho mỗi định nghĩa HVR mở rộng này.

"Khung" hoặc gốc "FR" là các gốc miền biến đổi không phải là gốc HVR như được xác định trong bản mô tả này.

Cụm từ "đánh số gốc miền biến đổi theo EU hoặc Kabat" hoặc "đánh số vị trí axit amin theo EU hoặc Kabat", và các biến thể của chúng, để chỉ hệ thống đánh số được sử dụng cho miền biến đổi chuỗi nặng hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ của tập hợp kháng thể trong EU hoặc Kabat et al., nêu trên. Sử dụng hệ thống đánh số này, trình tự axit amin thẳng thực tế có thể chứa axit amin ít hơn hoặc bổ sung tương ứng với việc làm ngắn, hoặc cài xen vào, FR hoặc HVR của miền biến đổi. Ví dụ, miền biến đổi chuỗi nặng có thể bao gồm một đoạn cài xen axit amin duy nhất (gốc 52a theo Kabat) sau gốc 52 của H2 và các gốc đã được cài xen (ví dụ, các gốc 82a, 82b, và 82c, v.v. theo Kabat) sau gốc 82 của FR chuỗi nặng. Quy tắc đánh số các gốc theo EU hoặc Kabat có thể được xác định cho kháng thể nhất định bằng cách sắp hàng ở các vùng tương đồng của trình tự của kháng thể với trình tự đã được đánh số Kabat "chuẩn".

Hệ thống quy tắc đánh số EU hoặc Kabat nói chung được sử dụng khi đề cập đến gốc trong miền biến đổi (khoảng các gốc 1-107 của chuỗi nhẹ và các gốc 1-113 của chuỗi nặng) (ví dụ, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "Hệ thống quy tắc đánh số EU hoặc Kabat" hoặc "chỉ số EU" nói chung được sử dụng khi đề cập đến gốc trong vùng hằng định của globulin miễn dịch chuỗi nặng (ví dụ, chỉ số EU báo cáo trong Kabat et al., nêu trên). "Chỉ số EU như trong Kabat" để chỉ sự đánh số gốc của kháng thể IgG1 của người theo EU. Trừ khi có quy định khác trong bản mô tả, các đề cập đến số gốc trong miền biến đổi của kháng thể nghĩa là sự đánh số gốc theo hệ thống đánh số Kabat. Trừ khi có quy định khác trong bản mô tả, các đề cập đến số gốc trong miền hằng định của kháng thể nghĩa là sự đánh số gốc theo hệ thống quy tắc

đánh số EU hoặc Kabat (ví dụ, xem công bố đơn sáng chế Mỹ số 2010-280227).

"Khung thể nhận của người" như được sử dụng trong bản mô tả này là khung bao gồm trình tự axit amin của khung V_L hoặc V_H có nguồn gốc từ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người. Khung thể nhận của người "có nguồn gốc từ" khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người có thể bao gồm trình tự axit amin giống nhau của chúng, hoặc nó có thể bao gồm các thay đổi amino axit đã tồn tại từ trước. Theo một số phương án, số lượng của các thay đổi axit amin đã tồn tại từ trước là 10 hoặc thấp hơn, 9 hoặc thấp hơn, 8 hoặc thấp hơn, 7 hoặc thấp hơn, 6 hoặc thấp hơn, 5 hoặc thấp hơn, 4 hoặc thấp hơn, 3 hoặc thấp hơn, hoặc 2 hoặc thấp hơn. Khi các thay đổi axit amin đã tồn tại từ trước có mặt trong VH, tốt hơn là các thay đổi này là các thay đổi chỉ xảy ra ở ba, hai hoặc một trong số các vị trí 71H, 73H và 78H; ví dụ, các gốc axit amin ở các vị trí đó có thể là 71A, 73T và/hoặc 78A. Theo một phương án, khung thể nhận của người VL có trình tự giống hệt với trình tự khung globulin miễn dịch của người V_L hoặc trình tự khung liên ứng của người.

"Khung liên ứng của người" là khung đại diện cho các gốc axit amin thường xảy ra nhất trong chọn lọc trình tự khung V_L hoặc V_H globulin miễn dịch của người. Nói chung, việc chọn lọc trình tự V_L hoặc V_H globulin miễn dịch của người là từ phân nhóm của trình tự miền biến đổi. Nói chung, phân nhóm của trình tự là phân nhóm như trong Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Các ví dụ bao gồm cho V_L, phân nhóm có thể là phân nhóm kappa I, kappa II, kappa III hoặc kappa IV như trong Kabat et al., nêu trên. Ngoài ra, đối với V_H, phân nhóm có thể là phân nhóm I, phân nhóm II, hoặc phân nhóm III như trong Kabat et al., nêu trên.

"Cải biến axit amin" ở một vị trí xác định, ví dụ, của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, để chỉ sự thay thế hoặc sự khuyết đoạn gốc xác định, hoặc sự cài xen ít nhất một gốc axit amin liền kề gốc xác định. Cài xen "liền kề" vào gốc cụ thể có nghĩa là cài xen trong vòng một đến hai gốc của chúng. Cài xen có thể là đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C vào gốc xác định. Sự cải biến axit amin được ưu tiên trong bản mô tả là sự thay thế.

Kháng thể "đã trưởng thành về ái lực", như kháng thể kháng SIRPA đã trưởng

thành về ái lực theo sáng chế, là kháng thể có một hoặc nhiều thay đổi trong một hoặc nhiều HVR của chúng dẫn đến cải thiện ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên, so với kháng thể bố mẹ không có (các) thay đổi đó. Theo một phương án, kháng thể đã trưởng thành về ái lực có ái lực nanomol hoặc thậm chí picomol đối với kháng nguyên đích. Kháng thể đã trưởng thành về ái lực được tạo ra bằng quy trình đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992) mô tả sự trưởng thành của ái lực bằng cách sắp xếp lại bởi miền V_H và V_L. Gây đột biến ngẫu nhiên HVR và/hoặc các gốc khung được mô tả bởi, ví dụ,: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci.* USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al. *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); và Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

"Fv" là mảnh kháng thể tối thiểu bao gồm vị trí gắn kết và nhận diện kháng nguyên hoàn chỉnh. Mảnh này cấu thành bởi dime của một miền của vùng biến đổi chuỗi nặng và một miền của vùng biến đổi chuỗi nhẹ trong liên kết chặt chẽ, không cộng hóa trị. Từ sự gấp khúc của hai miền này tạo ra sáu vòng siêu biến (3 vòng lặp mỗi chuỗi từ H và L) đóng góp vào các gốc axit amin đối với gắn kết kháng nguyên và mang lại tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên cho kháng thể. Tuy nhiên, ngay cả miền biến đổi duy nhất (hoặc một nửa của Fv chỉ bao gồm ba HVR đặc hiệu với kháng nguyên) có khả năng nhận diện và gắn kết kháng nguyên, mặc dù ở ái lực thấp hơn toàn bộ vị trí gắn kết.

"Fv chuỗi đơn" cũng được viết tắt là "sFv" hoặc "scFv" là các mảnh kháng thể bao gồm các miền kháng thể VH và VL nối vào một chuỗi polypeptit duy nhất. Tốt hơn là, sFv polypeptit còn bao gồm liên kết cầu nối polypeptit giữa các miền V_H và V_L, cho phép sFv hình thành cấu trúc mong muốn đối với gắn kết kháng nguyên.

"Chức năng hiệu ứng" của kháng thể để chỉ các hoạt tính sinh học được quy cho vùng Fc (vùng Fc của trình tự nguyên thể hoặc vùng Fc biến thể của trình tự axit amin) của kháng thể, và thay đổi với isotyp của kháng thể.

Thuật ngữ "vùng Fc" được sử dụng trong bản mô tả này để xác định vùng đầu tận cùng C của globulin miễn dịch chuỗi nặng, bao gồm vùng Fc của trình tự nguyên thể và vùng Fc biến thể. Mặc dù ranh giới của vùng Fc của globulin miễn dịch chuỗi nặng có thể thay đổi, vùng Fc chuỗi nặng IgG của người thường được xác định là kéo

dài từ gốc axit amin ở vị trí Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận cùng carboxyl của chúng. Lysin đầu tận cùng C (gốc 447 theo hệ thống đánh số EU) của vùng Fc có thể được loại bỏ, ví dụ, trong quá trình sản xuất hoặc tinh chế kháng thể, hoặc bằng cách thao tác di truyền tái tổ hợp axit nucleic mã hóa chuỗi nặng của kháng thể. Theo đó, chế phẩm của kháng thể nguyên vẹn có thể bao gồm các quần thể kháng thể với tất cả các gốc K447 được loại bỏ, các quần thể kháng thể không có gốc K447 được loại bỏ, và các quần thể kháng thể có hỗn hợp của kháng thể có và không có gốc K447. Vùng Fc thích hợp của trình tự nguyên thể để sử dụng trong kháng thể theo sáng chế bao gồm IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 của người.

"Vùng Fc của trình tự nguyên thể" bao gồm trình tự axit amin giống hệt với trình tự axit amin của vùng Fc được tìm thấy trong tự nhiên. Vùng Fc của người của trình tự nguyên thể bao gồm vùng Fc của IgG1 của người của trình tự nguyên thể (alen A và không phải A); vùng Fc IgG2 của người của trình tự nguyên thể; vùng Fc IgG3 của người của trình tự nguyên thể; và vùng Fc IgG4 của người của trình tự nguyên thể cũng như các biến thể của chúng xuất hiện trong tự nhiên.

"Vùng Fc biến thể" bao gồm trình tự axit amin khác với trình tự của vùng Fc của trình tự nguyên thể nhờ ít nhất một cải biến axit amin, tốt hơn là một hoặc nhiều thay thế axit amin. Tốt hơn là, vùng Fc biến thể có ít nhất một thay thế axit amin so với vùng Fc của trình tự nguyên thể hoặc với vùng Fc của polypeptit bố mẹ, ví dụ, từ khoảng một đến khoảng mười gốc thay thế axit amin, và tốt hơn là từ khoảng một đến khoảng năm gốc thay thế axit amin trong vùng Fc của trình tự nguyên thể hoặc trong vùng Fc của polypeptit bố mẹ. Tốt hơn là, vùng Fc biến thể trong bản mô tả này có ít nhất khoảng 80% mức tương đồng với vùng Fc của trình tự nguyên thể và/hoặc với vùng Fc của polypeptit bố mẹ, và tốt nhất là ít nhất khoảng 90% mức tương đồng với chúng, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 95% mức tương đồng với chúng.

"Thụ thể Fc" hoặc "FcR" mô tả thụ thể gắn kết với vùng Fc của kháng thể. FcR được ưu tiên là FcR của người của trình tự nguyên thể. Hơn nữa, FcR được ưu tiên là FcR gắn kết kháng thể IgG (thụ thể gamma) và bao gồm các thụ thể của phân lớp FcγRI, FcγRII, và FcγRIII, bao gồm các biến thể alen và theo cách khác các dạng ghép của các thụ thể này, thụ thể FcγRII bao gồm FcγRIIA ("thụ thể hoạt hóa") và FcγRIIB ("thụ thể ức chế"), có các trình tự axit amin tương tự khác nhau chủ yếu ở các miền tế bào chất của chất. Thụ thể hoạt hóa FcγRIIA chứa mô-típ hoạt hóa trên cơ sở tyrosin

thụ thể miễn dịch ("ITAM") trong miền tế bào chất của nó. Thụ thể ức chế FcγRIIB chứa mô-típ ức chế tyrosin trên cơ sở thụ thể miễn dịch ("ITIM") trong miền tế bào chất của nó. Các FcR khác, bao gồm các FcR sẽ được xác định trong tương lai, được bao hàm bởi thuật ngữ "FcR" trong bản mô tả này. FcR cũng có thể làm tăng thời gian bán rã huyết thanh của kháng thể.

Gắn kết với FcRn *in vivo* và thời gian bán rã huyết thanh của polypeptit gắn kết ái lực cao FcRn của người có thể được thử nghiệm, ví dụ, ở chuột nhắt chuyển gen hoặc các dòng tế bào của người đã được chuyển nhiễm biểu hiện FcRn của người, hoặc ở động vật linh trưởng mà polypeptit có vùng Fc biến thể được dùng. WO 2004/42072 (Presta) mô tả các biến thể kháng thể có gắn kết được cải thiện hoặc suy giảm với FcR. Cũng xem, ví dụ, Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "tỷ lệ phần trăm (%) mức đồng nhất trình tự axit amin" và "mức tương đồng" đối với trình tự peptit, polypeptit hoặc kháng thể để chỉ tỷ lệ phần trăm của các gốc axit amin trong trình tự ứng cử viên giống hệt với các gốc axit amin trong trình tự peptit hoặc polypeptit cụ thể, sau khi sắp hàng các trình tự và đưa vào các khoảng trống, nếu cần, để đạt được tỷ lệ phần trăm mức đồng nhất trình tự tối đa, và không xem sự thay thế bảo toàn bất kỳ là một phần của mức đồng nhất trình tự. Sự sắp hàng nhằm mục đích xác định tỷ lệ phần trăm mức đồng nhất trình tự axit amin có thể đạt được bằng nhiều cách khác nhau nằm trong phạm vi hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính có sẵn công khai như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc MEGALIGN™ (DNASTAR). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các thông số thích hợp để đo sự sắp hàng, bao gồm thuật toán bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này cần để đạt được sự sắp hàng tối đa so với chiều dài đầy đủ của các trình tự được so sánh.

Thuật ngữ "cạnh tranh" khi được sử dụng trong nội dung của kháng thể (ví dụ, làm trung hòa kháng thể) cạnh tranh đối với cùng epitop nghĩa là sự cạnh tranh giữa kháng thể như được xác định bởi thử nghiệm trong đó kháng thể được thử nghiệm để ngăn ngừa hoặc ức chế (ví dụ, làm giảm) gắn kết đặc hiệu của phân tử tham chiếu (ví dụ, phối tử, hoặc kháng thể tham chiếu) với kháng nguyên thông thường (ví dụ, SIRPA hoặc mảnh của chúng). Nhiều loại thử nghiệm gắn kết cạnh tranh có thể được sử dụng để xác định xem kháng thể có cạnh tranh với kháng thể khác hay không, ví

dụ, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ pha rắn trực tiếp hoặc gián tiếp (RIA), thử nghiệm miễn dịch enzym pha rắn trực tiếp hoặc gián tiếp (EIA), thử nghiệm cạnh tranh dạng bánh kẹp (sandwich) (xem, ví dụ, Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); biotin-avidin EIA trực tiếp pha rắn (xem, ví dụ, Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619); thử nghiệm dán nhãn trực tiếp pha rắn, thử nghiệm sandwich dán nhãn trực tiếp pha rắn (xem, ví dụ, Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); RIA dán nhãn trực tiếp pha rắn bằng cách sử dụng nhãn 1-125 (xem, ví dụ, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15); biotin-avidin EIA trực tiếp pha rắn (xem, ví dụ, Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552); và RIA dán nhãn trực tiếp (Moldenhauer et al., 1990, Scand. *J. Immunol.* 32:77-82). Thông thường, thử nghiệm như vậy bao gồm việc sử dụng kháng nguyên đã được tinh chế gắn kết với bề mặt rắn hoặc tế bào mang một trong hai, kháng thể thử nghiệm không được dán nhãn và kháng thể tham chiếu đã được dán nhãn. Mức ức chế cạnh tranh được đo bằng cách xác định lượng nhãn gắn kết với bề mặt rắn hoặc tế bào với sự có mặt của kháng thể thử nghiệm. Kháng thể thử nghiệm có mặt với lượng dư. Kháng thể được xác định bằng thử nghiệm cạnh tranh (kháng thể cạnh tranh) bao gồm kháng thể gắn kết với cùng epitop như kháng thể tham chiếu và kháng thể gắn kết với epitop liền kề đủ gần với epitop được gắn kết bởi kháng thể tham chiếu để xảy ra cản trở không gian. Các chi tiết bổ sung về phương pháp xác định gắn kết cạnh tranh được cung cấp trong bản mô tả này. Thông thường, khi kháng thể cạnh tranh có mặt với lượng dư, nó sẽ ức chế (ví dụ, làm giảm) gắn kết đặc hiệu của kháng thể tham chiếu với kháng nguyên thông thường ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, và/hoặc gần 100%.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "tương tác" giữa SIRPA polypeptit và polypeptit thứ hai bao hàm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tương tác protein-protein, tương tác vật lý, tương tác hóa học, gắn kết, gắn kết đồng hóa trị, và gắn kết ion. Như được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể "ức chế tương tác" giữa hai polypeptit khi kháng thể phá vỡ, làm giảm, hoặc khử bỏ hoàn toàn tương tác giữa hai polypeptit. Kháng thể theo sáng chế từ đó "ức chế tương tác" giữa hai polypeptit khi kháng thể của chúng gắn kết với một trong số hai polypeptit. Theo một số phương án, tương tác có thể bị ức chế bởi ít nhất khoảng bất kỳ trong số 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, và/hoặc gần 100%.

Thuật ngữ "epitop" bao gồm yếu tố quyết định bất kỳ có khả năng được gắn kết bởi kháng thể. Epitop là một vùng của kháng nguyên được gắn kết bởi kháng thể hướng đích kháng nguyên đó, và khi kháng nguyên là polypeptit, bao gồm axit amin cụ thể tiếp xúc trực tiếp với kháng thể. Thường xuyên nhất, epitop nằm trên polypeptit, nhưng trong một số trường hợp, có thể nằm trên các loại phân tử khác, như axit nucleic. Yếu tố quyết định epitop có thể bao gồm các nhóm bề mặt có hoạt tính hóa học của các phân tử như axit amin, chuỗi đường bên, nhóm phosphoryl hoặc sulfonyl, và có thể có đặc điểm cấu trúc ba chiều cụ thể và/hoặc đặc điểm điện tích cụ thể. Nói chung, kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên đích cụ thể sẽ nhận diện ưu tiên epitop trên kháng nguyên đích trong hỗn hợp phức của polypeptit và/hoặc đại phân tử.

Kháng thể "chủ vận" hoặc kháng thể "hoạt hóa" là kháng thể gây ra (ví dụ, làm tăng) một hoặc nhiều hoạt tính hoặc chức năng của kháng nguyên sau khi kháng thể gắn kết kháng nguyên.

Kháng thể "đối kháng" hoặc kháng thể "phong bế" hoặc kháng thể "ức chế" là kháng thể làm giảm, ức chế, và/hoặc khử bỏ (ví dụ, làm giảm) kháng nguyên gắn kết với một hoặc nhiều phối tử sau khi kháng thể gắn kết kháng nguyên, và/hoặc làm giảm, ức chế, và/hoặc khử bỏ (ví dụ, làm giảm) một hoặc nhiều hoạt tính hoặc chức năng của kháng nguyên sau khi kháng thể gắn kết kháng nguyên. Theo một số phương án, đối kháng kháng thể, hoặc phong bế kháng thể, hoặc ức chế kháng thể ức chế về cơ bản hoặc hoàn toàn kháng nguyên gắn kết với một hoặc nhiều phối tử và/hoặc một hoặc nhiều hoạt tính hoặc chức năng của kháng nguyên.

Kháng thể "phân lập", như kháng thể kháng SIRPA phân lập theo sáng chế, là kháng thể đã được xác định, tách và/hoặc thu hồi từ thành phần của môi trường tạo ra nó (ví dụ, tự nhiên hoặc tái tổ hợp). Tốt hơn là, kháng thể phân lập không gắn kết với tất cả các thành phần gây ô nhiễm khác từ môi trường tạo ra nó. Các thành phần ô nhiễm từ môi trường tạo ra nó, như các thành phần thu được từ tế bào chuyển nhiễm tái tổ hợp, là các vật liệu thường gây trở ngại cho việc sử dụng trong nghiên cứu, chẩn đoán hoặc điều trị đối với kháng thể, và có thể bao gồm enzym, hormon và các chất hòa tan chứa protein hoặc không chứa protein khác. Theo các phương án được ưu tiên, kháng thể sẽ được tinh chế: (1) đến lớn hơn 95% khối lượng của kháng thể như được xác định bởi, ví dụ, phương pháp Lowry, và theo một số phương án, đến lớn hơn 99% khối lượng; (2) đến mức đủ để thu được ít nhất 15 gốc đầu tận cùng N hoặc trình tự

axit amin bên trong bằng cách sử dụng thiết bị giải trình tự dạng cốc quay, hoặc (3) đến đồng nhất bằng SDS-PAGE trong các điều kiện khử hoặc không khử bằng cách sử dụng thuốc nhuộm xanh Coomassie hoặc, tốt hơn là, bạc. Phân lập kháng thể bao gồm kháng thể tại chỗ trong tế bào T tái tổ hợp vì ít nhất một thành phần của môi trường tự nhiên của kháng thể sẽ không có mặt. Tuy nhiên, bình thường polypeptit hoặc kháng thể phân lập sẽ được tạo ra bằng ít nhất một bước tinh chế.

Phân tử axit nucleic "phân lập" mã hóa kháng thể, như kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, là phân tử axit nucleic được xác định và tách từ ít nhất một phân tử axit nucleic gây ô nhiễm mà nó thường được liên kết với môi trường trong đó nó được tạo ra. Tốt hơn là, axit nucleic phân lập không liên kết với tất cả các thành phần được liên kết với môi trường sản xuất. Phân tử axit nucleic phân lập mã hóa polypeptit và kháng thể trong bản mô tả này là ở dạng khác với dạng hoặc cấu trúc mà nó được tìm thấy trong tự nhiên. Do đó, phân tử axit nucleic phân lập được phân biệt với axit nucleic mã hóa polypeptit và kháng thể trong bản mô tả này đang tồn tại tự nhiên trong tế bào.

Thuật ngữ "vectơ", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà nó được liên kết. Một dạng vectơ là "plasmit", để chỉ ADN sợi kép dạng vòng mà mảnh AND bổ sung có thể được nối vào. Dạng khác của vectơ là vectơ thể thực khuẩn. Dạng khác của vectơ là vectơ virut, trong đó mảnh ADN bổ sung có thể được nối vào bộ gen virut. Các vectơ nhất định có khả năng sao chép tự chủ trong tế bào vật chủ mà chúng được đưa vào (ví dụ, vectơ vi khuẩn có nguồn gốc sao chép vi khuẩn và vectơ động vật có vú thể bổ sung). Các vectơ khác (ví dụ, vectơ động vật có vú không thể bổ sung) có thể được hợp nhất vào bộ gen của tế bào vật chủ khi đưa vào tế bào vật chủ, và nhờ đó được sao chép cùng với bộ gen vật chủ. Hơn nữa, các vectơ nhất định có khả năng dẫn hướng sự biểu hiện của gen mà chúng được liên kết có điều khiển. Các vectơ như vậy trong bản mô tả này được gọi là "vectơ biểu hiện tái tổ hợp", hoặc đơn giản là "vectơ biểu hiện". Nói chung, vectơ biểu hiện tiện ích trong kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường là ở dạng plasmit. Trong bản mô tả này, "plasmit" và "vectơ" có thể được sử dụng thay thế cho nhau vì plasmit là dạng vectơ phổ biến nhất được sử dụng.

"Polynucleotit", hoặc "axit nucleic", được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này, để chỉ polyme của nucleotit có chiều dài bất kỳ, và bao gồm ADN và ARN. Nucleotit có thể là deoxyribonucleotit, ribonucleotit, nucleotit hoặc bazơ đã được cải

biến, và/hoặc các chất tương tự của chúng, hoặc chất bất kỳ có thể được đưa vào polyme bằng ADN hoặc ARN polymeaza hoặc bằng phản ứng tổng hợp.

"Tế bào vật chủ" bao gồm tế bào riêng lẻ hoặc môi trường nuôi cấy tế bào có thể là hoặc đã là thể nhận cho (các) vectơ để đưa vào các đoạn cài xen polynucleotit. Tế bào vật chủ bao gồm con cháu của một tế bào vật chủ duy nhất, và con cháu có thể không nhất thiết phải giống hoàn toàn (về hình thái hoặc về bổ thể ADN bộ gen) với tế bào bố mẹ ban đầu do đột biến tự nhiên, ngẫu nhiên hoặc cố ý. Tế bào vật chủ bao gồm tế bào được chuyển nhiễm *in vivo* bằng (các) polynucleotit theo sáng chế này.

"Chất mang" như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm chất mang, tá dược, hoặc chất làm ổn định dược dụng không độc đối với tế bào hoặc động vật có vú được tiếp xúc với chúng ở liều lượng và nồng độ được sử dụng. Thông thường, chất mang được chấp nhận về mặt sinh lý là dung dịch nước được tạo đệm pH. Ví dụ về chất mang được chấp nhận về mặt sinh lý bao gồm dung dịch đệm như phosphat, xitrat và các axit hữu cơ khác; chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic; polypeptit có khối lượng phân tử thấp (thấp hơn khoảng 10 gốc); protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như polyvinylpyrolidon; axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, arginin hoặc lysin; monosacarit, disacarit, và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, mannoza, hoặc dextrin; chất chelat hóa như EDTA; rượu đường như mannitol hoặc sorbitol; đối ion tạo muối như natri; và/hoặc chất hoạt động bề mặt không ion như TWEEN™, polyetylen glycol (PEG), và PLURONICS™.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "ngăn ngừa" bao gồm việc cung cấp biện pháp dự phòng đối với sự xuất hiện hoặc tái phát của bệnh lý, rối loạn hoặc tình trạng bệnh cụ thể ở cá thể. Cá thể có thể có khuynh hướng nhạy cảm với bệnh lý, rối loạn hoặc tình trạng bệnh cụ thể, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh lý, rối loạn hoặc tình trạng bệnh như vậy, nhưng vẫn chưa được chẩn đoán mắc bệnh lý, rối loạn hoặc tình trạng bệnh.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, cá thể "có nguy cơ" phát triển bệnh lý, rối loạn hoặc tình trạng bệnh cụ thể có thể có hoặc có thể không có bệnh hoặc triệu chứng bệnh có thể phát hiện được, và có thể có hoặc có thể không hiển thị bệnh có thể phát hiện được hoặc các triệu chứng của bệnh trước khi áp dụng các phương pháp điều

trị được đề cập trong bản mô tả này. "Có nguy cơ" biểu thị rằng cá thể có một hoặc nhiều yếu tố nguy cơ, là các thông số có thể đo lường tương quan với sự phát triển của bệnh lý, rối loạn hoặc tình trạng bệnh cụ thể, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Cá thể có một hoặc nhiều yếu tố nguy cơ này có xác suất phát triển bệnh lý, rối loạn hoặc tình trạng bệnh cụ thể cao hơn so với cá thể không có một hoặc nhiều yếu tố nguy cơ này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "điều trị" để chỉ sự can thiệp lâm sàng được thiết kế nhằm thay đổi quá trình tự nhiên của cá nhân được điều trị trong quá trình bệnh lý lâm sàng. Các hiệu quả mong muốn của việc điều trị bao gồm làm giảm tốc độ tiến triển, cải thiện hoặc làm giảm tình trạng bệnh lý, và thuyên giảm hoặc cải thiện tiên lượng của bệnh lý, rối loạn hoặc tình trạng bệnh cụ thể. Cá thể được "điều trị" thành công, ví dụ, nếu một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến bệnh lý, rối loạn hoặc tình trạng bệnh cụ thể được thuyên giảm hoặc khử bỏ.

"Lượng hữu hiệu" để chỉ ít nhất một lượng hiệu quả, ở liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả điều trị hoặc dự phòng mong muốn. Lượng hữu hiệu có thể được tạo ra trong một hoặc nhiều lần dùng. Lượng hữu hiệu trong bản mô tả này có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính, và cân nặng của cá thể, và khả năng điều trị để tạo ra đáp ứng mong muốn ở cá thể. Lượng hữu hiệu cũng là lượng trong đó tác dụng độc hại hoặc bất lợi bất kỳ của phương pháp điều trị đều vượt trội so với các tác dụng có lợi về mặt điều trị. Để sử dụng trong dự phòng, kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm các kết quả như khử bỏ hoặc giảm nguy cơ, giảm mức độ nghiêm trọng hoặc trì hoãn sự khởi phát của bệnh, bao gồm các triệu chứng sinh hóa, mô học và/hoặc hành vi của bệnh, các biến chứng của bệnh và các kiểu hình bệnh lý trung gian biểu hiện trong quá trình phát triển bệnh. Để sử dụng trong điều trị, kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm kết quả lâm sàng như làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng thu được từ bệnh, nâng cao chất lượng cuộc sống của người mắc bệnh, giảm liều lượng các loại thuốc khác cần thiết để điều trị bệnh, tăng cường tác dụng của loại thuốc khác như thông qua sự hướng đích, trì hoãn tiến trình của bệnh, và/hoặc kéo dài sự sống. Lượng hữu hiệu của thuốc, hợp chất, hoặc dược phẩm là lượng đủ để thực hiện việc điều trị dự phòng hoặc điều trị trực tiếp hoặc gián tiếp. Như được hiểu trong phạm vi lâm sàng, lượng hữu hiệu của thuốc, hợp chất, hoặc dược phẩm có thể đạt được hoặc không thể đạt được kết hợp với loại thuốc,

hợp chất, hoặc dược phẩm khác. Do đó, "lượng hữu hiệu" có thể được xem xét trong bối cảnh dùng một hoặc nhiều tác nhân trị liệu, và một tác nhân duy nhất có thể được xem là cung cấp lượng hữu hiệu nếu, kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân khác, có thể là hoặc có thể đạt được kết quả mong muốn.

"Cá thể" nhằm mục đích điều trị, phòng ngừa hoặc giảm rủi ro để chỉ động vật bất kỳ được phân loại là động vật có vú, bao gồm người, động vật trong nhà và trang trại, và động vật trong sở thú, động vật trong thể thao hoặc động vật nuôi, như chó, ngựa, thỏ, gia súc, lợn, chuột cống, chuột nhảy, chuột nhắt, chồn sương, chuột đồng, mèo và các loài tương tự. Theo một số phương án, cá thể là người.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, việc dùng "kết hợp" với một hợp chất hoặc chế phẩm khác bao gồm việc dùng đồng thời và/hoặc việc dùng vào những thời điểm khác nhau. Việc dùng kết hợp cũng bao hàm việc dùng dưới dạng đồng bào chế hoặc dưới dạng chế phẩm riêng biệt, bao gồm ở các tần suất hoặc khoảng thời gian định liều khác nhau, và bằng cách sử dụng đường dùng giống nhau hoặc đường dùng khác nhau. Theo một số phương án, việc dùng kết hợp là việc dùng như một phần của cùng một phác đồ điều trị.

Thuật ngữ "khoảng" như được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ khoảng sai số thông thường cho giá trị tương ứng mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết. Đề cập đến "khoảng" giá trị hoặc thông số trong bản mô tả này bao gồm (và mô tả) các phương án hướng đến chính giá trị hoặc thông số đó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này và trong phần yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít bao hàm cả số nhiều trừ khi có quy định rõ ràng khác. Ví dụ, "kháng thể" để chỉ từ một đến nhiều kháng thể, như lượng mol, và bao gồm các dạng tương đương của chúng mà đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, v.v..

Cần hiểu rằng các khía cạnh và các phương án theo sáng chế được đề cập trong bản mô tả này bao hàm "bao gồm", "chứa", và "về cơ bản cấu thành bởi" các khía cạnh và các phương án.

Kháng thể kháng SIRPA

Vùng gắn kết kháng thể kháng SIRPA

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể gắn kết với epitop cấu dạng. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể gắn kết với epitop SIRPA gián đoạn. Theo một số phương án, epitop SIRPA gián đoạn bao gồm hai hoặc nhiều peptit, ba hoặc nhiều peptit, bốn hoặc nhiều peptit, năm hoặc nhiều peptit, sáu hoặc nhiều peptit, bảy hoặc nhiều peptit, tám hoặc nhiều peptit, chín hoặc nhiều peptit, hoặc mười hoặc nhiều peptit. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể gắn kết với epitop SIRPA bao gồm một hoặc nhiều peptit. Như được đề cập trong bản mô tả này, epitop SIRPA có thể bao gồm một hoặc nhiều peptit bao gồm năm hoặc nhiều hơn, sáu hoặc nhiều hơn, bảy hoặc nhiều hơn, tám hoặc nhiều hơn, chín hoặc nhiều hơn, 10 hoặc nhiều hơn, 11 hoặc nhiều hơn, 12 hoặc nhiều hơn, 13 hoặc nhiều 14 hoặc nhiều hơn, 15 hoặc nhiều hơn, 16 hoặc nhiều hơn, 17 hoặc nhiều hơn, 18 hoặc nhiều hơn, 19 hoặc nhiều hơn, hoặc 20 hoặc nhiều hơn gốc axit amin có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, hoặc năm hoặc nhiều hơn, sáu hoặc nhiều hơn, bảy hoặc nhiều hơn, tám hoặc nhiều hơn, chín hoặc nhiều hơn, 10 hoặc nhiều hơn, 11 hoặc nhiều hơn, 12 hoặc nhiều hơn, 13 hoặc nhiều 14 hoặc nhiều hơn, 15 hoặc nhiều hơn, 16 hoặc nhiều hơn, 17 hoặc nhiều hơn, 18 hoặc nhiều hơn, 19 hoặc nhiều hơn, hoặc 20 hoặc nhiều hơn gốc axit amin trên protein SIRPA động vật có vú tương ứng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với epitop SIRPA của người mà giống hoặc trùng lặp với epitop SIRPA được gắn kết bởi kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6, kháng thể kháng SIRPA

bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7, hoặc kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế về cơ bản gắn kết cùng epitop SIRPA được gắn kết bởi kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7, hoặc kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế ức chế cạnh tranh gắn kết của kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong

SEQ ID NO:4 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7, hoặc kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế cạnh tranh với kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6, kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7, hoặc kháng thể kháng SIRPA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8 để gắn kết với SIRPA.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế ức chế cạnh tranh gắn kết của ít nhất một kháng thể được chọn từ kháng thể bất kỳ được liệt kê trong các Bảng 4, 5, 7, 8 và 10. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế ức chế cạnh tranh gắn kết của ít nhất một kháng thể được chọn từ m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, và tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế cạnh tranh với một hoặc nhiều kháng thể được chọn từ m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2

(14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, và tổ hợp bất kỳ của chúng, để gắn kết với SIRPA khi kháng thể kháng SIRPA làm giảm gắn kết của một hoặc nhiều kháng thể được chọn từ m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, và tổ hợp bất kỳ của chúng với SIRPA bởi lượng dao động trong khoảng từ 50% đến 100%, so với gắn kết với SIRPA khi không có mặt kháng thể kháng SIRPA. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế cạnh tranh với một hoặc nhiều kháng thể được chọn từ m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, và tổ hợp bất kỳ của chúng để gắn kết với SIRPA khi kháng thể kháng SIRPA làm giảm gắn kết của một hoặc nhiều kháng thể được chọn từ m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, và tổ hợp bất kỳ của chúng với SIRPA 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 90%, ít nhất 95%, hoặc 100%, so với gắn kết với SIRPA khi không có mặt kháng thể kháng SIRPA. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế làm giảm gắn kết của một hoặc nhiều kháng thể được chọn từ m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, và tổ hợp bất kỳ của chúng với SIRPA là 100% chỉ ra rằng kháng thể kháng SIRPA phong bế về cơ bản hoàn toàn gắn kết của một hoặc nhiều kháng thể được chọn từ m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9

H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, và tổ hợp bất kỳ của chúng với SIRPA. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA và một hoặc nhiều kháng thể được chọn từ m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, và tổ hợp bất kỳ của chúng có mặt với lượng tương đương với tỷ lệ 10:1, tỷ lệ 9:1, tỷ lệ 8:1, tỷ lệ 7:1, tỷ lệ 6:1, tỷ lệ 5:1, tỷ lệ 4:1, tỷ lệ 3:1, tỷ lệ 2:1, tỷ lệ 1:1, tỷ lệ 0,75:1, tỷ lệ 0,5:1, tỷ lệ 0,25:1, tỷ lệ 0,1:1, tỷ lệ 0,075:1, tỷ lệ 0,050:1, tỷ lệ 0,025:1, tỷ lệ 0,01:1, tỷ lệ 0,0075:1, tỷ lệ 0,0050:1, tỷ lệ 0,0025:1, tỷ lệ 0,001:1, tỷ lệ 0,00075:1, tỷ lệ 0,00050:1, tỷ lệ 0,00025:1, tỷ lệ 0,0001:1, tỷ lệ 1:10, tỷ lệ 1:9, tỷ lệ 1:8, tỷ lệ 1:7, tỷ lệ 1:6, tỷ lệ 1:5, tỷ lệ 1:4, tỷ lệ 1:3, tỷ lệ 1:2, tỷ lệ 1:0,75, tỷ lệ 1:0,5, tỷ lệ 1:0,25, tỷ lệ 1:0,1, tỷ lệ 1:0,075, tỷ lệ 1:0,050, tỷ lệ 1:0,025, tỷ lệ 1:0,01, tỷ lệ 1:0,0075, tỷ lệ 1:0,0050, tỷ lệ 1:0,0025, tỷ lệ 1:0,001, tỷ lệ 1:0,00075, tỷ lệ 1:0,00050, tỷ lệ 1:0,00025, hoặc tỷ lệ 1:0,0001 giữa kháng thể kháng SIRPA và một hoặc nhiều kháng thể được chọn từ m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, và tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA có mặt với lượng dư với lượng nằm trong khoảng từ 1,5 lần đến 100 lần, hoặc lớn hơn 100 lần so với lượng của một hoặc nhiều kháng thể được chọn từ m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, và tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA có mặt với lượng lớn hơn khoảng 2 lần, 3 lần, 4 lần, 5 lần, 6 lần, 7 lần, 8 lần, 9 lần, 10 lần, 15 lần, 20 lần, 25 lần, 30 lần, 35 lần, 40 lần, 45 lần, 50 lần, 55 lần, 60 lần, 65 lần, 70 lần, 75 lần, 80 lần, 85 lần, 90 lần, 95 lần, hoặc 100 lần so với lượng của một hoặc nhiều kháng thể được chọn từ m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1),

h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với epitop của SIRPA của người mà giống hoặc trùng lặp với epitop SIRPA được gắn kết bởi ít nhất một kháng thể được chọn từ kháng thể bất kỳ được liệt kê trong các Bảng 4, 5, 7, 8, và 10. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với epitop của SIRPA của người mà giống hoặc trùng lặp với epitop SIRPA được gắn kết bởi ít nhất một kháng thể được chọn từ m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế về cơ bản gắn kết cùng epitop SIRPA được gắn kết bởi ít nhất một kháng thể được chọn từ kháng thể bất kỳ được liệt kê trong các Bảng 4, 5, 7, 8, và 10. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế về cơ bản gắn kết cùng epitop SIRPA được gắn kết bởi ít nhất một kháng thể được chọn từ m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25. Các phương pháp được lấy làm ví dụ chi tiết để lập bản đồ epitop mà kháng thể gắn kết được cung cấp trong Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", trong trong *Methods* trong *Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế cạnh tranh với một hoặc nhiều kháng thể được chọn từ m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, và tổ hợp bất kỳ của chúng để gắn kết với SIRPA.

Thử nghiệm cạnh tranh hoặc thử nghiệm gắn kết với SIRPA thích hợp bất kỳ là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như phân tích BIAcore, thử nghiệm ELISA, hoặc đo tế bào theo dòng chảy, có thể được sử dụng để xác định xem liệu kháng thể kháng SIRPA có cạnh tranh với một hoặc nhiều kháng thể được chọn từ m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, và tổ hợp bất kỳ của chúng để gắn kết với SIRPA. Trong thử nghiệm cạnh tranh được lấy làm ví dụ, SIRPA hoặc tế bào cố định biểu hiện SIRPA trên bề mặt tế bào được ủ trong một dung dịch bao gồm kháng thể đã được dán nhãn thứ nhất gắn kết với SIRPA (ví dụ, người hoặc động vật linh trưởng không phải là người) và kháng thể không được dán nhãn thứ hai được thử nghiệm về khả năng cạnh tranh của nó với kháng thể thứ nhất để gắn kết với SIRPA. Kháng thể thứ hai có thể có mặt trong dịch nổi bề mặt tế bào lai. Đối với mẫu đối chứng, SIRPA hoặc tế bào cố định biểu hiện SIRPA được ủ trong một dung dịch bao gồm kháng thể đã được dán nhãn thứ nhất chứ không phải là kháng thể không được dán nhãn thứ hai. Sau khi ủ trong các điều kiện cho phép gắn kết kháng thể thứ nhất với SIRPA, kháng thể dư không gắn kết được loại bỏ, và lượng nhãn liên kết với SIRPA hoặc tế bào cố định biểu hiện SIRPA được đo. Nếu lượng nhãn liên kết với SIRPA hoặc tế bào cố định biểu hiện SIRPA về cơ bản giảm trong mẫu thử nghiệm so với mẫu đối chứng, điều đó chỉ ra rằng kháng thể thứ hai đang cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để gắn kết với SIRPA. Xem, Harlow và Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:22, 23, và 24; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, và 19.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA bao gồm ít

nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:11; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:12; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:13; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:15; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin

nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:17; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:18; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:19; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:11; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:13; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:15; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c)

HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:17; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:17; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:18; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:19; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:24; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:11; (a) HVR-H1 bao gồm trình

tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:24; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:13; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:24; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:24; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:15; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:24; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:24; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:17; (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:24; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:18; và (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:24; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID

NO:10; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:19.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự HVR của V_H được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; và (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:22, 23, và 24.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự HVR của V_L được chọn từ (a) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; (b) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và (c) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, và 19.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA bao gồm (a) miền V_H bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự HVR của V_H được chọn từ (i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21, và (iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:22, 23, và 24, và (b) miền V_L bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự HVR của V_L được chọn từ (i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9, (ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10, và (c) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, và 19.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA bao gồm (a) miền V_H bao gồm (i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21, và (iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:22, 23, và 24, và (b) miền V_L bao gồm (i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9, (ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10, và (c) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, và 19.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng SIRPA bao gồm trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%,

hoặc 100% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:33, 34, và 35. Theo các phương án nhất định, trình tự V_H có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:33, 34, và 35 chứa đoạn thay thế (ví dụ, đoạn thay thế bảo toàn), đoạn cài xen, hoặc khuyết đoạn so với trình tự tham chiếu, nhưng kháng thể kháng SIRPA bao gồm trình tự vẫn duy trì được khả năng gắn kết với SIRPA. Theo các phương án nhất định, tổng số 1 đến 10 axit amin đã được thay thế, cài xen, và/hoặc khuyết đoạn trong SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, hoặc SEQ ID NO:35. Theo các phương án nhất định, tổng số 1 đến 5 axit amin đã được thay thế, cài xen và/hoặc khuyết đoạn trong SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO:34, hoặc SEQ ID NO:35. Theo các phương án nhất định, thay thế, cài xen, hoặc khuyết đoạn xuất hiện trong các vùng nằm ngoài HVR (tức là trong FR). Tùy ý, kháng thể kháng SIRPA bao gồm trình tự V_H có trình tự nêu trong SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, hoặc SEQ ID NO:35, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó. Theo phương án cụ thể, V_H bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21, và (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:22, 23, và 24.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA, trong đó kháng thể này bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, và 44. Theo các phương án nhất định, trình tự V_L có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, và 44 chứa đoạn thay thế (ví dụ, đoạn thay thế bảo toàn), đoạn cài xen, hoặc khuyết đoạn so với trình tự tham chiếu, nhưng kháng thể kháng SIRPA bao gồm trình tự vẫn duy trì được khả năng gắn kết với SIRPA. Theo một số phương án, tổng số 1 đến 10 axit amin đã được thay thế, cài xen và/hoặc khuyết đoạn trong SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, hoặc SEQ ID NO:44. Theo các phương án nhất định, tổng số 1 đến 5 axit amin đã được thay thế, cài xen và/hoặc khuyết đoạn trong SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO:37,

SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, hoặc SEQ ID NO:44. Theo các phương án nhất định, thay thế, cài xen, hoặc khuyết đoạn xuất hiện trong các vùng nằm ngoài HVR (tức là trong FR). Tùy ý, kháng thể kháng SIRPA bao gồm trình tự V_L có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, hoặc SEQ ID NO:44, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó. Theo phương án cụ thể, V_L bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ (a) HVR-Ll bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9, (b) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10, và (c) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, và 19.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA, trong đó kháng thể này bao gồm V_H theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và V_L theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA, trong đó kháng thể này bao gồm V_H theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và V_L theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên. Theo một phương án, kháng thể bao gồm trình tự V_H và V_L lần lượt nêu trong các SEQ ID NO:33, 34, hoặc 35 và SEQ ID NO:36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, hoặc 44, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) và miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L), trong đó V_H và V_L được chọn từ nhóm bao gồm: V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:33 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:36; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:33 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:37; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:33 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:38; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:33 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:39; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:33 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:40; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:33 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:41; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:33 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:42; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:33 và V_L bao gồm trình tự axit

amin nêu trong SEQ ID NO:43; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:33 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:44; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:34 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:36; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:34 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:38; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:34 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:39; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:34 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:40; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:34 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:41; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:34 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:42; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:34 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:43; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:34 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:44; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:35 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:36; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:35 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:38; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:35 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:39; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:35 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:40; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:35 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:41; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:35 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:42; V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:35 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:43; và V_H bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:35 và V_L bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:44.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể kháng SIRPA ức chế cạnh tranh gắn kết của và/hoặc cạnh tranh để gắn kết với kháng thể kháng SIRPA bao gồm (a) miền V_H bao gồm (i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21, và (iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:22, 23, và 24, và (b) miền V_L bao gồm (i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9, (ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10, và (c) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:11, 12, 13, 14,

15, 16, 17, 18, và 19. Theo một số phương án, kháng thể bao gồm trình tự VH và VL lần lượt nêu trong SEQ ID NO:33, 34, hoặc 35, và SEQ ID NO:36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, hoặc 44.

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA gắn kết với epitop của SIRPA của người mà giống hoặc trùng lặp với epitop được gắn kết bởi kháng thể kháng SIRPA bao gồm (a) miền VH bao gồm (i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21, và (iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:22, 23, và 24, và (b) miền VL bao gồm (i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9, (ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10, và (c) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, và 19. Theo một số phương án, kháng thể bao gồm trình tự VH và VL lần lượt nêu trong SEQ ID NO:33, 34, hoặc 35, và SEQ ID NO:36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, và 44. Theo một số phương án, epitop của SIRPA của người là cùng epitop được gắn kết bởi kháng thể kháng SIRPA.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo phương án bất kỳ nêu trên là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể của người và/hoặc kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA là mảnh kháng thể, ví dụ, mảnh Fv, Fab, Fab', scFv, thể kép, hoặc $F(ab')_2$. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA về cơ bản là kháng thể có chiều dài đầy đủ, ví dụ, kháng thể IgGl, kháng thể IgG2a hoặc lớp hoặc isotyp kháng thể khác như được xác định trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo phương án bất kỳ nêu trên có thể kết hợp dấu hiệu bất kỳ, đơn lẻ hoặc kết hợp, như được đề cập trong bản mô tả này.

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA. Kháng thể được đề xuất là hữu ích, ví dụ, để chẩn đoán hoặc điều trị các rối loạn qua trung gian SIRPA.

Sáng chế đề xuất, một phần, kháng thể kháng SIRPA có một hoặc nhiều đặc điểm chức năng cải thiện và/hoặc tăng cường (ví dụ, so với kháng thể kháng SIRPA có vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5) bao gồm, ví dụ,

kháng thể kháng SIRPA có khả năng làm giảm mức tế bào của SIRPA, kháng thể kháng SIRPA có khả năng làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA, kháng thể kháng SIRPA có khả năng làm suy giảm SIRPA, kháng thể kháng SIRPA có khả năng làm giảm mức tế bào của CD32A/B, kháng thể kháng SIRPA có khả năng làm tăng hoặc tăng cường khả năng thực bào, kháng thể kháng SIRPA có khả năng làm tăng hoặc tăng cường khả năng thực bào tế bào khối u bởi đại thực bào, kháng thể kháng SIRPA có khả năng làm tăng hoặc tăng cường hoạt tính kháng khối u của liệu pháp chống ung thư, kháng thể kháng SIRPA có khả năng làm tăng hoặc tăng cường quá trình tăng sinh tế bào T, kháng thể kháng SIRPA có khả năng làm tăng hoặc tăng cường xytokin tiền viêm giải phóng từ đại thực bào, và/hoặc kháng thể kháng SIRPA có khả năng gắn kết với SIRPA của người với động học cải thiện/tăng cường; phương pháp tạo ra và sử dụng kháng thể này kháng SIRPA; dược phẩm chứa kháng thể kháng SIRPA như vậy; axit nucleic mã hóa kháng thể kháng SIRPA như vậy; và tế bào vật chủ chứa axit nucleic mã hóa kháng thể kháng SIRPA như vậy.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều hoạt tính do, ít nhất một phần, khả năng của kháng thể để làm giảm mức biểu hiện tế bào (ví dụ, mức biểu hiện bề mặt tế bào) của SIRPA bằng cách gây ra sự suy giảm, giảm điều hòa, phân cắt, khử mẫn cảm thụ thể và/hoặc hướng đích lysosom SIRPA. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế làm giảm mức tế bào của SIRPA là kháng thể có một hoặc nhiều đặc điểm sau: (1) ức chế hoặc làm giảm một hoặc nhiều hoạt tính SIRPA; (2) khả năng làm giảm mức biểu hiện của SIRPA (như ở mức ARN thông tin và/hoặc ở mức protein) trong tế bào biểu hiện SIRPA; (3) khả năng tương tác, gắn kết, hoặc nhận diện protein SIRPA; (4) khả năng tương tác hoặc gắn kết cụ thể với protein SIRPA; và (5) khả năng điều trị, cải thiện, hoặc ngăn ngừa khía cạnh bất kỳ của bệnh hoặc rối loạn được mô tả hoặc được dự tính trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA có một hoặc nhiều đặc tính sau: a) có hằng số phân ly (K_D) đối với SIRPA của người thấp hơn so với hằng số phân ly của kháng thể kháng SIRPA có vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5; b) gắn kết với tế bào của người, như bạch cầu đơn nhân và đại thực bào của người; c) làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA (ví dụ, làm giảm mức bề mặt tế

bào của SIRPA trên tế bào đại thực bào của người *in vitro* với nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) thấp hơn so với nồng độ hiệu quả tối đa một nửa của kháng thể kháng SIRPA có vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5; d) có hằng số phân ly (K_D) đối với SIRPA của người có thể nằm trong khoảng từ 0,6 nM đến khoảng 0,7 nM; và/hoặc e) làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA (ví dụ, làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA trên đại thực bào của người *in vitro* với nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) có thể nằm trong khoảng từ 0,4 nM đến khoảng 0,5 nM. Như được đề cập trong bản mô tả này, nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) để chỉ nồng độ tại đó kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế làm giảm mức tế bào của SIRPA trên tế bào hoặc trong tế bào bằng một nửa của tế bào không được xử lý, hoặc nồng độ tại đó kháng thể đạt được mức gắn kết tối đa một nửa với SIRPA trên tế bào.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA *in vitro* với nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) với SIRPA v1 của người là khoảng 0,40 nM, khoảng 0,5 nM khi được đo bằng phương pháp đo tế bào theo dòng chảy. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA *in vitro* với nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) với SIRPA v1 của người là khoảng 5 nM, khoảng 4 nM, khoảng 3 nM, khoảng 2 nM, khoảng 1 nM, khoảng 0,9 nM, khoảng 0,8 nM, khoảng 0,7 nM, khoảng 0,6 nM, khoảng 0,5 nM, khoảng 0,4 nM, khoảng 0,3 nM, khoảng 0,2 nM, hoặc khoảng 0,1 nM khi được đo bằng phương pháp đo tế bào theo dòng chảy. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA *in vitro* với nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) với SIRPA v1 của người nằm trong khoảng từ 5 nM đến 1 nM, khoảng 1 nM đến 0,9 nM, khoảng 1 nM đến 0,8 nM, khoảng 1 nM đến 0,7 nM, khoảng 1 nM đến 0,6 nM, khoảng 1 nM đến 0,5 nM, khoảng 1 nM đến 0,4 nM, khoảng 1 nM đến 0,3 nM, khoảng 1 nM đến 0,2 nM, khoảng 1 nM đến 0,1 nM, khoảng 0,9 nM đến 0,8 nM, khoảng 0,9 nM đến 0,7 nM, khoảng 0,9 nM đến 0,6 nM, khoảng 0,9 nM đến 0,5 nM, khoảng 0,9 nM đến 0,4 nM,

khoảng 0,9 nM đến 0,3 nM, khoảng 0,9 nM đến 0,2 nM, khoảng 0,9 nM đến 0,1 nM, khoảng 0,8 nM đến 0,6 nM, khoảng 0,8 nM đến 0,5 nM, khoảng 0,8 nM đến 0,4 nM, khoảng 0,8 nM đến 0,3 nM, khoảng 0,8 nM đến 0,2 nM, khoảng 0,8 nM đến 0,1 nM, khoảng 0,7 nM đến 0,5 nM, khoảng 0,7 nM đến 0,4 nM, khoảng 0,7 nM đến 0,3 nM, khoảng 0,7 nM đến 0,2 nM, khoảng 0,7 nM đến 0,1 nM, khoảng 0,6 nM đến 0,4 nM, khoảng 0,6 nM đến 0,3 nM, khoảng 0,6 nM đến 0,2 nM, khoảng 0,6 nM đến 0,1 nM, khoảng 0,5 nM đến 0,3 nM, khoảng 0,5 nM đến 0,2 nM, khoảng 0,5 nM đến 0,1 nM, khoảng 0,4 nM đến 0,2 nM, khoảng 0,4 nM đến 0,1 nM, hoặc khoảng 0,3 nM đến 0,1 nM khi được đo bằng phương pháp đo tế bào theo dòng chảy.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA *in vitro* với nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) với SIRPA v1 của người là khoảng 0,093 nM, với SIRPA v2 của người là khoảng 0,080 nM, và/hoặc với SIRPA của khỉ đuôi dài cyno là khoảng 0,879 nM khi được đo bằng phương pháp đo tế bào theo dòng chảy. Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA *in vitro* với nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) với SIRPA v1 của người hoặc với SIRPA v2 của người nằm trong khoảng từ 2 nM đến 0,05 nM, khoảng 1 nM đến 0,05 nM, khoảng 0,9 nM đến 0,05 nM, khoảng 0,8 nM đến 0,05 nM, khoảng 0,7 nM đến 0,05 nM, khoảng 0,6 nM đến 0,05 nM, khoảng 0,5 nM đến 0,05 nM, khoảng 0,4 nM đến 0,05 nM, khoảng 0,3 nM đến 0,05 nM, khoảng 0,20 nM đến 0,05 nM, khoảng 0,15 nM đến 0,05 nM, khoảng 0,10 nM đến 0,05 nM, khoảng 0,09 nM đến 0,05 nM, khoảng 0,08 nM đến 0,05 nM, khoảng 0,07 nM đến 0,05 nM, khoảng 0,06 nM đến 0,05 nM, khoảng 0,20 nM đến 0,06 nM, khoảng 0,15 nM đến 0,06 nM, khoảng 0,10 nM đến 0,06 nM, khoảng 0,09 nM đến 0,06 nM, khoảng 0,08 nM đến khoảng 0,06 nM, khoảng 0,07 nM đến 0,06 nM, khoảng 0,20 nM đến 0,07 nM, khoảng 0,15 nM đến 0,07 nM, khoảng 0,10 nM đến khoảng 0,07 nM, khoảng 0,09 nM đến 0,07 nM, khoảng 0,08 nM đến 0,7nM, khoảng 0,20 nM đến 0,08 nM, khoảng 0,15 nM đến 0,08 nM, khoảng 0,10 nM đến 0,08 nM, khoảng 0,09 nM đến 0,08 nM, khoảng 0,20 nM đến 0,09 nM, khoảng 0,15 nM đến 0,09 nM, hoặc khoảng 0,10 nM đến 0,9 nM khi được đo bằng phương pháp đo tế bào theo dòng chảy.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA *in vitro* với nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) với SIRPA v1 của người là khoảng 0,107 nM, với SIRPA v2 của người là khoảng 0,082 nM, và/hoặc với SIRPA của khỉ đuôi dài cyno là khoảng 0,107 nM khi được đo bằng phương pháp đo tế bào theo dòng chảy.

Có lợi là, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế làm giảm mức biểu hiện bề mặt tế bào của SIRPA mạnh hơn (ví dụ, với EC_{50} thấp hơn) so với kháng thể kháng SIRPA đối chứng (ví dụ, kháng thể kháng SIRPA đối chứng có vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5). Hơn nữa, có lợi là, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có ái lực cao hơn (ví dụ, ái lực cao hơn lên đến khoảng 100 lần) đối với SIRPA (ví dụ, giá trị K_D thấp hơn khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt) so với kháng thể kháng SIRPA đối chứng (ví dụ, kháng thể kháng SIRPA đối chứng có vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5.

Các khía cạnh nhất định của sáng chế dựa trên, ít nhất một phần, sự xác định kháng thể kháng SIRPA có một hoặc nhiều đặc điểm chức năng cải thiện và/hoặc tăng cường (ví dụ, so với kháng thể kháng SIRPA có vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5), bao gồm, khả năng cải thiện/tăng cường để làm giảm mức SIRPA bề mặt tế bào trên tế bào, dẫn đến việc làm giảm, trung hòa, ngăn ngừa, hoặc kìm hãm một hoặc nhiều hoạt tính SIRPA, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, làm giảm sự phát triển tế bào của bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào T, tế bào tua và/hoặc tiểu thần kinh đệm; làm giảm quá trình tăng sinh tế bào T gây ra bởi tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, bạch cầu đơn nhân, tiểu thần kinh đệm, tiểu thần kinh đệm M1, tiểu thần kinh đệm M1 đã được hoạt hóa, tiểu thần kinh đệm M2, đại thực bào, đại thực bào M1, đại thực bào M1 đã được hoạt hóa, và/hoặc đại thực bào M2; làm giảm sự sống sót của bạch cầu trung tính, tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, đại thực bào, đại thực bào M1, đại thực bào M1 đã được hoạt hóa, đại thực bào M2, bạch cầu đơn nhân, tế bào hủy xương, tế bào T, tế bào T trợ giúp, tế bào T gây độc tế bào, bạch cầu hạt, tiểu thần kinh đệm, tiểu thần kinh đệm M1, tiểu thần

kinh đệm M1 đã được hoạt hóa, và/hoặc tiểu thần kinh đệm M2; làm giảm quá trình tăng sinh của bạch cầu trung tính, tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, đại thực bào, đại thực bào M1, đại thực bào M1 đã được hoạt hóa, đại thực bào M2, bạch cầu đơn nhân, tế bào hủy xương, tế bào T, tế bào T trợ giúp, tế bào T gây độc tế bào, bạch cầu hạt, tiểu thần kinh đệm, tiểu thần kinh đệm M1, tiểu thần kinh đệm M1 đã được hoạt hóa, và/hoặc tiểu thần kinh đệm M2; ức chế sự di trú của bạch cầu trung tính, tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, đại thực bào, đại thực bào M1, đại thực bào M1 đã được hoạt hóa, đại thực bào M2, bạch cầu đơn nhân, tế bào hủy xương, tế bào T, tế bào T trợ giúp, tế bào T gây độc tế bào, bạch cầu hạt, tiểu thần kinh đệm, tiểu thần kinh đệm M1, tiểu thần kinh đệm M1 đã được hoạt hóa, và/hoặc tiểu thần kinh đệm M2; làm giảm một hoặc nhiều chức năng của bạch cầu trung tính, tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, đại thực bào, đại thực bào M1, đại thực bào M1 đã được hoạt hóa, đại thực bào M2, bạch cầu đơn nhân, tế bào hủy xương, tế bào T, tế bào T trợ giúp, tế bào T gây độc tế bào, bạch cầu hạt, tiểu thần kinh đệm, tiểu thần kinh đệm M1, tiểu thần kinh đệm M1 đã được hoạt hóa, và/hoặc tiểu thần kinh đệm M2; làm giảm quá trình tăng sinh của bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào T, tế bào tua, bạch cầu trung tính, và/hoặc tiểu thần kinh đệm; làm giảm chức năng tổng thể của bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào T, tế bào tua, bạch cầu trung tính, và/hoặc tiểu thần kinh đệm; ức chế đáp ứng miễn dịch có lợi với các dạng khác nhau của ung thư được chọn từ ung thư bàng quang, ung thư não, ung thư vú, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư màng trong dạ con, ung thư thận, ung thư tế bào thận, ung thư bể thận, bệnh bạch cầu, ung thư phổi, khối u ác tính, u lympho không Hodgkin, bệnh bạch cầu cấp tính dòng tủy, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư buồng trứng, sacôm sợi, và ung thư tuyến giáp; ức chế đáp ứng miễn dịch có lợi với các dạng rối loạn thần kinh khác nhau được chọn từ chứng sa sút trí tuệ, chứng sa sút trí tuệ trán-thái dương, bệnh Alzheimer, chứng sa sút trí tuệ não mạch, chứng sa sút trí tuệ hỗn hợp, bệnh Creutzfeldt-Jakob, bệnh não úng thủy áp lực bình thường, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, bệnh Huntington, bệnh lý Tau, bệnh Nasu-Hakola, đột quỵ, tổn thương cấp tính, tổn thương mãn tính, chứng run bản chất, bệnh Behcet, bệnh Parkinson, chứng sa sút trí tuệ với thể Lewy, bệnh teo đa hệ thống, hội chứng Shy-Drager, bệnh liệt não tiến triển, bệnh thoái hóa vỏ não hạch đáy, bệnh viêm não tủy rải rác cấp tính, rối loạn u hạt, bệnh u hạt, bệnh lão hóa, bệnh động kinh co giật, tổn

thương tủy sống, chấn thương sọ não, bệnh thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi tác, bệnh tăng nhãn áp, bệnh viêm võng mạc sắc tố, bệnh thoái hóa hoàng điểm, và bệnh đa xơ cứng; gắn kết với phối tử SIRPA trên tế bào khối u; gắn kết với phối tử SIRPA trên tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, bạch cầu đơn nhân, tiểu thần kinh đệm, tế bào T, bạch cầu trung tính, và/hoặc đại thực bào; ức chế sự tiêu diệt tế bào khối u bằng một hoặc nhiều tiểu thần kinh đệm, đại thực bào, tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, bạch cầu trung tính, tế bào T, tế bào T trợ giúp, hoặc tế bào T gây độc tế bào; ức chế hoạt tính tăng sinh tế bào kháng khối u của một hoặc nhiều tiểu thần kinh đệm, đại thực bào, tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, bạch cầu trung tính, tế bào T, tế bào T trợ giúp, hoặc tế bào T gây độc tế bào; ức chế hoạt tính di căn của tế bào kháng khối u của một hoặc nhiều tiểu thần kinh đệm, đại thực bào, tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, bạch cầu trung tính, tế bào T, tế bào T trợ giúp, hoặc tế bào T gây độc tế bào; biểu hiện đã được điều biến của một hoặc nhiều thụ thể viêm, như CD86, được biểu hiện trên một hoặc nhiều tiểu thần kinh đệm, đại thực bào, tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, bạch cầu trung tính, tế bào T, tế bào T trợ giúp, hoặc tế bào T gây độc tế bào; tăng cường sự xâm nhập của một hoặc nhiều tế bào tua ức chế miễn dịch, đại thực bào ức chế miễn dịch, tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy sống, đại thực bào liên quan đến khối u, bạch cầu trung tính ức chế miễn dịch, và tế bào T điều hòa vào các khối u; làm tăng số lượng tế bào ức chế miễn dịch dòng tủy/bạch cầu hạt thúc đẩy khối u trong khối u, trong máu ngoại vi, hoặc cơ quan bạch huyết khác; tăng cường hoạt tính thúc đẩy khối u của tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy sống; làm giảm hoạt tính của lympho bào T đặc hiệu khối u với tiềm năng tiêu diệt khối u; làm giảm sự xâm nhập của lympho bào T đặc hiệu khối u với tiềm năng tiêu diệt khối u; làm tăng tốc độ phát triển của khối u; làm tăng tỷ lệ tái phát của khối u; làm giảm hiệu quả của một hoặc nhiều liệu pháp miễn dịch điều biến đáp ứng tế bào T kháng khối u, tùy ý trong đó một hoặc nhiều liệu pháp miễn dịch là liệu pháp miễn dịch hướng đích một hoặc nhiều protein được chọn từ thụ thể CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD39, CD70, TREM1, TREM2, Siglec-5, Siglec-7, Siglec-9, Siglec-11, SirpA, CD447, CSF-1, và tổ hợp bất kỳ của chúng, hoặc của một hoặc các tác nhân hóa trị liệu và/hoặc nhiều vắc-xin ung thư.

Theo một số phương án, việc điều trị ung thư bằng kháng thể kháng SIRPA như được đề cập trong bản mô tả này có thể: (i) làm tăng số lượng tế bào T CD3+ xâm nhập khối u; (ii) làm giảm mức tế bào của SIRPA trong tế bào tủy sống CD14+ không tạo khối u, tùy ý trong đó tế bào tủy sống CD14+ không tạo khối u là tế bào xâm nhập khối u hoặc tùy ý trong đó tế bào tủy sống CD14+ không tạo khối u có mặt trong máu; (iii) làm giảm số lượng tế bào tủy sống CD14+ không tạo khối u, tùy ý trong đó tế bào tủy sống CD14+ không tạo khối u là tế bào xâm nhập khối u hoặc tùy ý trong đó tế bào tủy sống CD14+ không tạo khối u có mặt trong máu; (iv) làm giảm mức PD-L1, PD-L2, B7-H7, B7-H3, CD200R, CD163, và/hoặc CD206 trong một hoặc nhiều tế bào, tùy ý trong đó một hoặc nhiều tế bào là tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy sống không tạo khối u (MDSC); (v) làm giảm tốc độ phát triển của khối u của khối u rắn; (vi) làm giảm thể tích khối u; (vii) làm tăng hiệu quả của một hoặc nhiều chất ức chế PD-1; (viii) làm tăng hiệu quả của một hoặc nhiều liệu pháp ức chế điểm kiểm tra và/hoặc liệu pháp điều biến miễn dịch, tùy ý trong đó một hoặc nhiều liệu pháp ức chế điểm kiểm tra và/hoặc liệu pháp điều biến miễn dịch hướng đích một hoặc nhiều CTL4, con đường adenosin, PD-L1, PD-L2, OX40, TIM3, LAG3, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng; (ix) làm tăng hiệu quả của một hoặc nhiều tác nhân hóa trị liệu, tùy ý trong đó một hoặc nhiều tác nhân hóa trị liệu là gemcitabine, capecitabine, anthracycline, doxorubicin (Adriamycin®), epirubicin (Ellence®), taxane, paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), 5-fluorouracil (5-FU), xyclophosphamit (Cytoxan®), carboplatin (Paraplatin®), và tổ hợp bất kỳ của chúng; (x) làm tăng quá trình tăng sinh của tế bào T với sự có mặt của tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy sống không tạo khối u (MDSC); (xi) ức chế quá trình biệt hóa, sự sống sót, và/hoặc một hoặc nhiều chức năng của tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy sống không tạo khối u (MDSC); và (xii) tiêu diệt tế bào tủy sống không tạo khối u ức chế miễn dịch biểu hiện CD33 và/hoặc tế bào hiểu hiện CD14 không tạo khối u trong khối u rắn và các mạch máu liên quan khi liên hợp với hóa chất hoặc chất độc phóng xạ.

Theo một số phương án, tế bào tủy sống theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào tủy sống CD14+ CD45+, tế bào tủy sống CD14+, và tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy sống (MDSC). Theo một số phương án, tế bào tủy sống theo sáng chế là tế bào tủy sống không tạo khối u. Tế bào ức chế miễn dịch đôi khi cũng được dùng để chỉ tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy sống (MDSC). Ở người, MDSC

có thể được xác định bởi một trong số các tổ hợp các chất đánh dấu sau: (1) CD14+ HLA-DRlow/−, (2) CD14+ IL4Rα+, (3) CD14+ HLA-DR− IL4Rα+, (4) CD34+ CD14+ CD11b+ CD33+, (5) CD11b+ CD14+ CD33+, (6) CD33+ HLA-DR−, (7) Lin− HLA-DR−, (8) Lin− HLA-DR− CD33+, (9) Lin− HLA-DR− CD33+ CD11b+, (10) Lin− CD33+ CD11b+ CD15+, (11) Lin− HLA-DR− CD33+ CD11b+ CD14− CD15+, (12) CD11b+ CD14− CD33+, (13) CD11b+ CD14− HLA-DR− CD33+ CD15+, (14) CD33+ HLA-DR− CD15+, (15) CD15+ IL4Rα+, (16) CD11b+ CD15+ CD66b+, (17) CD15+ FSClow SSChigh, (18) CD15high CD33+, (19) CD11b+ CD14− CD15+, (20) CD66b+ SSChigh, và (21) CD11b+ CD15+ (Cũng xem Solito S et al. *Annals of the NY Academy of Sciences,* 2014). Ở chuột nhắt, MDSC có thể được xác định bởi sự biểu hiện của chất đánh dấu bề mặt CD45+, CD11b+, Gr1+, và/hoặc Il4Ra+. Các dòng bạch cầu đơn nhân ức chế miễn dịch bổ sung là CD45+, CD11b+, Gr1low; và CD45+, CD11c+.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA, làm giảm mức nội bào của SIRPA, làm giảm tổng mức tế bào của SIRPA, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng, chỉ khi có mặt của phối tử tự nhiên SIRPA hoặc đối tác gắn kết.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế ngăn ngừa, làm giảm, hoặc ức chế hoạt tính qua trung gian SIRPA của phối tử SIRPA hoặc gắn kết đối tác, bao gồm, ví dụ, phối tử SIRPA hoặc gắn kết đối tác CD47, protein hoạt động bề mặt A, và/hoặc protein hoạt động bề mặt D.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết chọn lọc với SIRPA của người, bao gồm các biến thể alen của người, cũng được đề cập đến trong bản mô tả này là biến thể "đa hình", bao gồm SIRPA v1 của người và SIRPA v2 của người, gắn kết với SIRPβ3 của người, gắn kết với SIRPA của khỉ đuôi dài cyno, và gắn kết với SIRPA của khỉ đuôi sóc. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế không gắn kết với SIRPA của chuột nhắt/loài gặm nhấm, không gắn kết với SIRPB v1 (SIRPβ1), không gắn kết với SIRPA của thỏ, và không gắn kết với SIRPA của chuột cống.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết chọn lọc với SIRPA của người. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng

chế gắn kết chọn lọc với SIRPA của người và SIRPA của khỉ đuôi dài cyno. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với SIRPA v1 của người, SIRPA v2 của người, và SIRPA của khỉ đuôi dài cyno. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với SIRPA v1 của người, SIRPA v2 của người, và SIRPA của khỉ đuôi dài cyno, nhưng không gắn kết với SIRPA của loài gặm nhấm. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với SIRPA v1 của người, SIRPA v2 của người, và SIRPA của khỉ đuôi dài cyno, nhưng không gắn kết với SIRPβ1. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với SIRPA v1 của người, SIRPA v2 của người, và SIRPA của khỉ đuôi dài cyno, nhưng không gắn kết với SIRPA của loài gặm nhấm và không gắn kết với SIRPβ1 của người. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với SIRPA v1 của người, SIRPA v2 của người, SIRPA của khỉ đuôi dài cyno, và SIRPAβ3 của người, nhưng không gắn kết với SIRPA của loài gặm nhấm và không gắn kết với SIRPβ1 của người. Theo kết hợp bất kỳ của các phương án nêu trên, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế không phong bế sự gắn kết hoặc tương tác của SIRPA và CD47.

Các khía cạnh nhất định của sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA điều hòa giảm, tức là làm giảm mức tế bào của SIRPA. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA làm giảm mức tế bào của SIRPA mà không ức chế, phong bế, hoặc làm giảm tương tác (ví dụ, gắn kết) giữa SIRPA và một hoặc nhiều phối tử SIRPA, ví dụ, CD47.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều hoạt tính do, ít nhất một phần, khả năng của kháng thể để làm giảm mức tế bào (ví dụ, mức biểu hiện bề mặt tế bào) của SIRPA bằng cách gây ra sự suy giảm, điều hòa giảm, phân cắt, khử mẫn cảm thụ thể, và/hoặc hướng đích lysosom SIRPA.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế điều hòa giảm sự biểu hiện của SIRPA trong tế bào. Theo một số phương án, điều hòa giảm sự biểu hiện của SIRPA trong tế bào là mức biểu hiện của SIRPA bề mặt tế bào được giảm. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế điều hòa giảm sự biểu hiện của SIRPA trong các bạch cầu đơn nhân (ví dụ, bạch cầu đơn nhân của người). Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế điều hòa giảm sự biểu hiện của SIRPA trong đại thực bào (ví dụ, đại thực bào của người). Theo một số

phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế điều hòa giảm mức biểu hiện bề mặt tế bào đại thực bào của SIRPA lớn hơn 70%, lớn hơn 75%, lớn hơn 80%, lớn hơn 85%, hoặc lớn hơn 95% so với mức biểu hiện bề mặt tế bào của SIRPA trong đại thực bào không được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế điều hòa giảm mức biểu hiện bề mặt tế bào đại thực bào của SIRPA khoảng 70-90%, khoảng 70-85%, khoảng 70-80%, nhưng là khoảng 70-75%, khoảng 75-90%, khoảng 75-85%, khoảng 75-80% khoảng 80-90%, khoảng 80-85%, hoặc khoảng 85-95% so với mức biểu hiện bề mặt tế bào của SIRPA trong đại thực bào không được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế. Theo một số phương án, đại thực bào là đại thực bào của người bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đại thực bào của người M1 và đại thực bào của người M2.

Mức tế bào của SIRPA có thể để chỉ, nhưng không chỉ giới hạn ở, mức bề mặt tế bào của SIRPA, mức trong tế bào của SIRPA, và tổng mức SIRPA. Theo một số phương án, việc làm giảm mức tế bào của SIRPA bao gồm việc làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA. Như được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể kháng SIRPA làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA nếu nó gây ra mức giảm 25% hoặc cao hơn so với mức bề mặt tế bào của SIRPA như được đo bằng các thử nghiệm trên cơ sở tế bào *in vitro* bất kỳ hoặc mô hình *in vivo* thích hợp được đề cập trong bản mô tả này hoặc đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, sử dụng phép đo tế bào theo dòng chảy, như phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACS), để đo mức bề mặt tế bào của SIRPA. Theo một số phương án, việc làm giảm mức tế bào của SIRPA bao gồm việc làm giảm mức SIRPA trong tế bào. Như được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể kháng SIRPA làm giảm mức nội bào của Siglec-9 nếu nó gây ra mức giảm 25% hoặc cao hơn so với mức tế bào của SIRPA như được đo bằng các thử nghiệm trên cơ sở tế bào *in vitro* bất kỳ hoặc mô hình *in vivo* thích hợp được đề cập trong bản mô tả này hoặc đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, nhuộm miễn dịch, phân tích thấm tách Western, đồng kết tủa miễn dịch và đo tế bào theo dòng chảy. Theo một số phương án, việc làm giảm mức tế bào của SIRPA bao gồm việc làm giảm tổng mức SIRPA. Như được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể kháng SIRPA làm giảm tổng mức SIRPA nếu nó gây ra mức giảm 25% hoặc cao hơn so với tổng mức SIRPA như được đo bằng các thử nghiệm trên cơ sở tế bào *in vitro* bất kỳ hoặc mô hình *in vivo* thích hợp được đề cập trong bản mô tả này hoặc đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, nhuộm miễn dịch,

phân tích thấm tách Western, đồng kết tủa miễn dịch, và đo tế bào theo dòng chảy. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA gây ra sự suy biến SIRPA, sự phân tách SIRPA, quá trình nội bộ hóa SIRPA, quá trình loại bỏ SIRPA, quá trình điều hòa giảm sự biểu hiện của SIRPA, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo một số phương án, mức tế bào của SIRPA được đo trên tế bào sơ cấp (ví dụ, tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, bạch cầu đơn nhân, tiểu thần kinh đệm, và đại thực bào) hoặc trên các dòng tế bào sử dụng thử nghiệm tế bào SIRPA.

Theo một số phương án, điều hòa giảm kháng thể kháng SIRPA có IC_{50} là 200 nM hoặc thấp hơn, thường là 100 nM hoặc thấp hơn (50% của SIRPA được biểu hiện trên bề mặt tế bào là điều hòa giảm), sau khi 4 giờ tiếp xúc của đại thực bào của người với kháng thể ở 37°C. Theo một số phương án, SIRPA vẫn được điều hòa giảm trong ít nhất 24 giờ tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế. Tế bào có thể được phân tích về mức biểu hiện bề mặt của SIRPA bằng cách sử dụng công nghệ bất kỳ, ví dụ, phép đo tế bào theo dòng chảy.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế làm giảm mức tế bào của SIRPA ít nhất 25%, ít nhất 26%, ít nhất 27%, ít nhất 28%, ít nhất 29%, ít nhất 30%, ít nhất 31%, ít nhất 32%, ít nhất 33%, ít nhất 34%, ít nhất 35%, ít nhất 36%, ít nhất 37%, ít nhất 38%, ít nhất 39%, ít nhất 40%, ít nhất 41%, ít nhất 42%, ít nhất 43%, ít nhất 44%, ít nhất 45%, ít nhất 46%, ít nhất 47%, ít nhất 48%, ít nhất 49%, ít nhất 50%, ít nhất 51%, ít nhất 52%, ít nhất 53%, ít nhất 54%, ít nhất 55%, ít nhất 56%, ít nhất 57%, ít nhất 58%, ít nhất 59%, ít nhất 60%, ít nhất 61%, ít nhất 62%, ít nhất 63%, ít nhất 64%, ít nhất 65%, ít nhất 66%, ít nhất 67%, ít nhất 68%, ít nhất 69%, ít nhất 70%, ít nhất 71%, ít nhất 72%, ít nhất 73%, ít nhất 74%, ít nhất 75%, ít nhất 76%, ít nhất 77%, ít nhất 78%, ít nhất 79%, ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, hoặc cao hơn so với mức tế bào của SIRPA khi không có mặt kháng thể kháng SIRPA.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với hoạt tính điều hòa giảm bất kỳ được tóm tắt trong các đoạn mô tả trước, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế ức chế sự kết tụ bề mặt tế bào của SIRPA.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế điều hòa giảm SIRPA, nhưng không phong bế, ức chế, hoặc làm giảm gắn kết của phối tử SIRPA, ví dụ, CD47, với SIRPA. Trong phạm vi của sáng chế, kháng thể hướng đến SIRPA không phong bế gắn kết của CD47 với SIRPA để chỉ kháng thể không dẫn đến việc làm giảm đáng kể CD47 gắn kết với SIRPA khi kháng thể được ủ với CD47 và tế bào biểu hiện SIRPA. "Làm giảm đáng kể" trong nội dung của CD47 gắn kết với SIRPA để chỉ việc làm giảm gắn kết 30% hoặc thấp hơn, thường là ít nhất 25%, ít nhất 20%, ít nhất 15%, hoặc ít nhất 10% hoặc thấp hơn so với CD47 gắn kết với SIRPA với sự có mặt của kháng thể đối chứng phù hợp isotyp không gắn kết với SIRPA. Một thử nghiệm minh họa để đánh giá hoạt tính phong bế được nêu trong các ví dụ trong bản mô tả này. Ví dụ, tế bào biểu hiện SIRPA của người, ví dụ, đại thực bào của người hoặc tế bào như tế bào CHO được cải biến để biểu hiện tái tổ hợp SIRPA của người, được dàn mỏng ở 10^5 tế bào/giếng trong đĩa 96 giếng, được rửa, và ủ trong 100 µl dung dịch đệm để phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang chứa 1,0 µg/mL kháng thể đơn dòng hoặc mẫu đối chứng isotyp. Sau đó, tế bào được rửa và được ủ với CD47 của người hòa tan trong 30 phút trên đá. Sau đó, tế bào được phân tích về CD47 gắn kết bề mặt.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế điều hòa giảm mức biểu hiện CD32A/B trong tế bào (tức là FcγRIIA/FcγRIIB). Theo một số phương án, điều hòa giảm mức biểu hiện CD32A/B (tức là FcγRIIA/FcγRIIB) trong tế bào là mức biểu hiện bề mặt tế bào của CD32A/B (tức là FcγRIIA/FcγRIIB) giảm. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế điều hòa giảm mức biểu hiện CD32A/B trong đại thực bào (ví dụ, đại thực bào của người). Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRP theo sáng chế điều hòa giảm mức biểu hiện CD32A (tức là FcγRIIA) trong đại thực bào (ví dụ, đại thực bào của người). Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế điều hòa giảm mức biểu hiện CD32B (tức là FcγRIIB) trong đại thực bào (ví dụ, đại thực bào của người). Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế điều hòa giảm mức biểu hiện bề mặt tế bào của CD32A (tức là FcγRIIA) ở đại thực bào của người khoảng 75%, khoảng 80%, hoặc khoảng 85% so với mức biểu hiện bề mặt tế bào của CD32A ở đại thực bào của người không được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế điều hòa giảm mức biểu hiện bề mặt tế bào

của CD32A ở đại thực bào của người khoảng từ 70 đến 85% so với mức biểu hiện bề mặt tế bào của CD32A ở đại thực bào của người không được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế điều hòa giảm mức biểu hiện bề mặt tế bào của CD32B (tức là FcγRIIB) ở đại thực bào của người đến các mức không thể phát hiện được.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể, như kháng thể phân lập (ví dụ, đơn dòng), tương tác với hoặc nếu không thì gắn kết với vùng, như epitop, trong protein SIRPA theo sáng chế. Theo một số phương án, kháng thể tương tác với hoặc nếu không thì gắn kết với vùng, như epitop, trong protein SIRPA theo sáng chế với động học cải thiện/tăng cường (ví dụ, so với kháng thể kháng SIRPA có vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5). Theo một số phương án, kháng thể tương tác với hoặc nếu không thì gắn kết với vùng, như epitop, trong protein SIRPA trên tế bào của người, như tế bào tua, tế bào tủy sống, bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, v.v. với nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) thấp hơn so với nồng độ hiệu quả tối đa một nửa của kháng thể đối chứng (ví dụ, so với kháng thể kháng SIRPA có vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5). Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với protein SIRPA và điều biến một hoặc nhiều hoạt tính SIRPA sau khi gắn kết với protein SIRPA, ví dụ, hoạt tính kết hợp với sự biểu hiện của SIRPA trên tế bào. Protein SIRPA theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein SIRPA động vật có vú, protein SIRPA của người, protein SIRPA của chuột nhắt, protein SIRPA của khỉ đuôi dài cyno, và protein SIRPA của chuột cống.

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể gắn kết với SIRPA theo cách phụ thuộc vào độ pH. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể gắn kết với SIRPA ở độ pH trung tính và được kết hợp vào chứ không phân ly từ protein SIRPA. Theo cách khác, ở độ pH axit, kháng thể theo sáng chế có thể phân ly từ SIRPA khi chúng được kết hợp vào và sau đó bị suy biến theo con đường endosom/lysosom. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng SIRPA gắn kết với SIRPA ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 8,0, từ 5,5 đến 7,5, từ 5,5 đến 7,0, từ 5,5 đến 6,5, từ 5,5 đến 6,0, từ 6,0 đến 8,0, từ 6,5 đến 8,0, từ 7,0 đến 8,0, từ 7,5 đến 8,0, từ

6,0 đến 7,5, từ 6,0 đến 7,0, từ 6,5 đến 7,5. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng SIRPA phân ly từ SIRPA ở độ pH thấp hơn 6,0, thấp hơn 5,5, thấp hơn 5,0, thấp hơn 4,5, thấp hơn 4,0, thấp hơn 3,5, thấp hơn 3,0, thấp hơn 2,5, hoặc thấp hơn 2,0.

SIRPA là protein màng một dòng typ I. Trong trình tự axit amin của SIRPA của người (SEQ ID NO:1), miền ngoại bào được đặt ở các gốc axit amin 31-373; miền xuyên màng được đặt ở các gốc axit amin 374-394; và miền nội bào được đặt ở các gốc axit amin 395-504. SIRPA của người bao gồm một nhóm V duy nhất và hai nhóm C1 của miền siêu họ Ig (IgSF), để chỉ lần lượt miền D1, miền D2, và miền D3. Miền D1 bao gồm các gốc axit amin 32-137 của SIRPA của người; miền D2 bao gồm các gốc axit amin 148-247 của SIRPA của người; và miền D3 bao gồm các gốc axit amin 254-348 của SIRPA của người. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng điểm bắt đầu và kết thúc các gốc của các miền theo sáng chế có thể thay đổi tùy thuộc vào chương trình mô hình máy tính được sử dụng hoặc phương pháp được sử dụng để xác định miền.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với miền D3 của SIRPA. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với miền D3 của SIRPA của người bao gồm các gốc axit amin 254-348 của trình tự axit amin của SIRPA của người nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với epitop trong miền D3 của SIRPA của người. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với epitop trong miền D3 của SIRPA của người, trong đó epitop bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các gốc axit amin 254-348, các gốc axit amin 254-274, các gốc axit amin 264-279, các gốc axit amin 274-289, các gốc axit amin 273-331, các gốc axit amin 281-315, các gốc axit amin 281-337, các gốc axit amin 284-299, các gốc axit amin 294-309, các gốc axit amin 304-319, các gốc axit amin 314-329, các gốc axit amin 324-339, và các gốc axit amin 334-348 của trình tự axit amin của SIRPA của người nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với epitop trong miền D3 của SIRPA của người, trong đó epitop bao gồm các gốc axit amin R282, Q284, và G337 của trình tự axit amin SIRPA v1 của người (SEQ ID NO:1). Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với epitop trong miền D3 của SIRPA của người, trong đó epitop bao gồm các gốc axit amin Q281, R282, Q284, L285, W287, R295, E297, V302, và W315 của trình

tự axit amin SIRPA v1 của người (SEQ ID NO:1).

Theo một số phương án, kháng thể gắn kết với miền D3 của SIRPA, ví dụ, SIRPA của người. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gắn kết với cùng epitop SIRPA hoặc một phần của epitop SIRPA được gắn kết bởi kháng thể có CDR của kháng thể được chỉ định là m3F9 như được đề cập trong bản mô tả này. Theo đó, theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế gắn kết với cùng epitop SIRPA hoặc một phần của epitop SIRPA được gắn kết bởi kháng thể có CDR của kháng thể được chỉ định là m3F9 như được đề cập trong bản mô tả này.

Các khía cạnh nhất định của sáng chế dựa trên, ít nhất một phần, sự xác định kháng thể kháng SIRPA có một hoặc nhiều đặc điểm chức năng cải thiện và/hoặc tăng cường (ví dụ, so với kháng thể kháng SIRPA có vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5), bao gồm, khả năng cải thiện/tăng cường để làm giảm mức SIRPA bề mặt tế bào trên tế bào, dẫn đến việc làm giảm, trung hòa, ngăn ngừa, hoặc kìm hãm một hoặc nhiều hoạt tính SIRPA, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, làm giảm sự phát triển tế bào của bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào T, tế bào tua và/hoặc tiểu thần kinh đệm; làm giảm quá trình tăng sinh tế bào T gây ra bởi tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, bạch cầu đơn nhân, tiểu thần kinh đệm, tiểu thần kinh đệm M1, tiểu thần kinh đệm M1 đã được hoạt hóa, tiểu thần kinh đệm M2, đại thực bào, đại thực bào M1, đại thực bào M1 đã được hoạt hóa, và/hoặc đại thực bào M2; làm giảm sự sống sót của bạch cầu trung tính, tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, đại thực bào, tế bào NK, đại thực bào M1, bạch cầu trung tính M1, tế bào NK M1, đại thực bào M1 đã được hoạt hóa, bạch cầu trung tính M1 đã được hoạt hóa, tế bào NK M1 đã được hoạt hóa, đại thực bào M2, bạch cầu trung tính M2, tế bào NK M2, bạch cầu đơn nhân, tế bào hủy xương, tế bào T, tế bào T trợ giúp, tế bào T gây độc tế bào, bạch cầu hạt, tiểu thần kinh đệm, tiểu thần kinh đệm M1, tiểu thần kinh đệm M1 đã được hoạt hóa, và/hoặc tiểu thần kinh đệm M2; làm giảm hoặc khử quá trình tăng sinh của bạch cầu trung tính, tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, đại thực bào, tế bào NK, đại thực bào M1, bạch cầu trung tính M1, tế bào NK M1, đại thực bào M1 đã được hoạt hóa, bạch cầu trung tính M1 đã được hoạt hóa, tế bào NK M1 đã được hoạt hóa, đại thực bào M2, bạch cầu trung tính M2, tế bào NK M2, bạch cầu đơn nhân, tế bào hủy xương, tế bào T, tế bào T trợ giúp, tế bào T gây độc tế bào,

bạch cầu hạt, tiểu thần kinh đệm, tiểu thần kinh đệm M1, tiểu thần kinh đệm M1 đã được hoạt hóa, và/hoặc tiểu thần kinh đệm M2; ức chế sự di trú của bạch cầu trung tính, tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, đại thực bào, tế bào NK, đại thực bào M1, bạch cầu trung tính M1, tế bào NK M1, đại thực bào M1 đã được hoạt hóa, bạch cầu trung tính M1 đã được hoạt hóa, tế bào NK M1 đã được hoạt hóa, đại thực bào M2, bạch cầu trung tính M2, tế bào NK M2, bạch cầu đơn nhân, tế bào hủy xương, tế bào T, tế bào T trợ giúp, tế bào T gây độc tế bào, bạch cầu hạt, tiểu thần kinh đệm, tiểu thần kinh đệm M1, tiểu thần kinh đệm M1 đã được hoạt hóa, và/hoặc tiểu thần kinh đệm M2; làm giảm hoặc ức chế một hoặc nhiều chức năng của bạch cầu trung tính, tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, đại thực bào, tế bào NK, đại thực bào M1, bạch cầu trung tính M1, tế bào NK M1, đại thực bào M1 đã được hoạt hóa, bạch cầu trung tính M1 đã được hoạt hóa, tế bào NK M1 đã được hoạt hóa, đại thực bào M2, bạch cầu trung tính M2, tế bào NK M2, bạch cầu đơn nhân, tế bào hủy xương, tế bào T, tế bào T trợ giúp, tế bào T gây độc tế bào, bạch cầu hạt, tiểu thần kinh đệm, tiểu thần kinh đệm M1, tiểu thần kinh đệm M1 đã được hoạt hóa, và/hoặc tiểu thần kinh đệm M2; làm giảm quá trình tăng sinh của bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào T, tế bào tua, bạch cầu trung tính, và/hoặc tiểu thần kinh đệm; làm giảm chức năng tổng thể của bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào T, tế bào tua, bạch cầu trung tính, và/hoặc tiểu thần kinh đệm; ức chế đáp ứng miễn dịch có lợi với các dạng khác nhau của ung thư được chọn từ ung thư bàng quang, ung thư não, ung thư vú, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư màng trong dạ con, ung thư thận, ung thư tế bào thận, ung thư bể thận, bệnh bạch cầu, ung thư phổi, khối u ác tính, u lympho không Hodgkin, bệnh bạch cầu cấp tính dòng tủy, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư buồng trứng, sacôm sợi, và ung thư tuyến giáp; ức chế đáp ứng miễn dịch có lợi với các dạng rối loạn thần kinh khác nhau được chọn từ chứng sa sút trí tuệ, chứng sa sút trí tuệ trán-thái dương, bệnh Alzheimer, chứng sa sút trí tuệ não mạch, chứng sa sút trí tuệ hỗn hợp, bệnh Creutzfeldt-Jakob, bệnh não úng thủy áp lực bình thường, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, bệnh Huntington, bệnh lý Tau, bệnh Nasu-Hakola, đột quỵ, tổn thương cấp tính, tổn thương mãn tính, chứng run bản chất, bệnh Behcet, bệnh Parkinson, chứng sa sút trí tuệ với thể Lewy, bệnh teo đa hệ thống, hội chứng Shy-Drager, bệnh liệt não tiến triển, bệnh thoái hóa vỏ não hạch đáy, bệnh viêm não tủy rải rác cấp tính, rối loạn u hạt, bệnh u hạt, bệnh lão hóa, bệnh động kinh co giật, tổn

thương tủy sống, chấn thương sọ não, bệnh thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi tác, bệnh tăng nhãn áp, bệnh viêm võng mạc sắc tố, bệnh thoái hóa hoàng điểm, và bệnh đa xơ cứng; gắn kết với phối tử SIRPA trên tế bào khối u; gắn kết với phối tử SIRPA trên tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, bạch cầu đơn nhân, tiểu thần kinh đệm, tế bào T, bạch cầu trung tính, và/hoặc đại thực bào; ức chế sự tiêu diệt tế bào khối u bằng một hoặc nhiều tiểu thần kinh đệm, đại thực bào, tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, bạch cầu trung tính, tế bào T, tế bào T trợ giúp, hoặc tế bào T gây độc tế bào; ức chế hoạt tính tăng sinh tế bào kháng khối u của một hoặc nhiều tiểu thần kinh đệm, đại thực bào, tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, bạch cầu trung tính, tế bào T, tế bào T trợ giúp, hoặc tế bào T gây độc tế bào; ức chế hoạt tính di căn tế bào kháng khối u của một hoặc nhiều tiểu thần kinh đệm, đại thực bào, tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, bạch cầu trung tính, tế bào T, tế bào T trợ giúp, hoặc tế bào T gây độc tế bào; biểu hiện đã được điều biến của một hoặc nhiều thụ thể viêm, như CD86, được biểu hiện trên một hoặc nhiều tiểu thần kinh đệm, đại thực bào, tế bào tua, tế bào tua có nguồn gốc từ tủy sống, bạch cầu trung tính, tế bào T, tế bào T trợ giúp, hoặc tế bào T gây độc tế bào; tăng cường sự xâm nhập của một hoặc nhiều tế bào tua ức chế miễn dịch, đại thực bào ức chế miễn dịch, tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy sống, đại thực bào liên quan đến khối u, bạch cầu trung tính ức chế miễn dịch, và tế bào T điều hòa vào các khối u; thúc đẩy hoặc cứu chữa chức năng của một hoặc nhiều tế bào tua ức chế miễn dịch, đại thực bào ức chế miễn dịch, bạch cầu trung tính ức chế miễn dịch, tế bào NK ức chế miễn dịch, tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy sống, đại thực bào liên quan đến khối u, bạch cầu trung tính liên quan đến khối u, tế bào NK liên quan đến khối u, và tế bào T điều hòa; làm tăng sự xâm nhập của một hoặc nhiều tế bào tua ức chế miễn dịch, đại thực bào ức chế miễn dịch, bạch cầu trung tính ức chế miễn dịch, tế bào NK ức chế miễn dịch, tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy sống, đại thực bào liên quan đến khối u, bạch cầu trung tính liên quan đến khối u, tế bào NK liên quan đến khối u, tế bào tủy sống không tạo khối u CD14+ CD45+, và tế bào T điều hòa vào các khối u; làm tăng số lượng tế bào ức chế miễn dịch dòng tủy/tế bào hạt thúc đẩy khối u trong khối u, trong máu ngoại vi, hoặc cơ quan bạch huyết khác; tăng cường hoạt tính thúc đẩy khối u của tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy sống; làm giảm hoạt tính của lympho bào T đặc hiệu khối u với tiềm năng tiêu diệt khối u; tăng cường sự sống sót của tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy sống không tạo khối u và/hoặc tế

bào tủy sống không tạo khối u CD14+ CD45+; làm giảm sự xâm nhập và/hoặc hoạt tính của lympho bào T đặc hiệu khối u với tiềm năng tiêu diệt khối u; làm tăng tốc độ phát triển của khối u; làm tăng tỷ lệ tái phát của khối u; làm giảm hiệu quả của một hoặc nhiều liệu pháp miễn dịch điều biến đáp ứng tế bào T kháng khối u, tùy ý trong đó một hoặc nhiều liệu pháp miễn dịch là liệu pháp miễn dịch hướng đích một hoặc nhiều protein được chọn từ thụ thể CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD39, CD70, TREM1, TREM2, Siglec-5, Siglec-7, Siglec-9, Siglec-11, SIRPA, CD447, CSF-1, và tổ hợp bất kỳ của chúng, hoặc một hoặc các tác nhân hóa trị liệu và/hoặc nhiều vắc-xin ung thư.

Theo một số phương án, có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong số các phương án khác nêu trên, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gây ra, tăng cường, hoặc làm tăng một hoặc nhiều hoạt tính, bao gồm: (i) làm tăng số lượng tế bào T CD3+ xâm nhập khối u; (ii) làm giảm mức tế bào của SIRPA trong tế bào tủy sống CD14+ không tạo khối u, tùy ý trong đó tế bào tủy sống CD14+ không tạo khối u là tế bào xâm nhập khối u hoặc tùy ý trong đó tế bào tủy sống CD14+ không tạo khối u có mặt trong máu; (iii) làm giảm số lượng tế bào tủy sống CD14+ không tạo khối u, tùy ý trong đó tế bào tủy sống CD14+ không tạo khối u là tế bào xâm nhập khối u hoặc tùy ý trong đó tế bào tủy sống CD14+ không tạo khối u có mặt trong máu; (iv) làm giảm mức PD-L1, PD-L2, B7-H2, B7-H3, CD200R, CD163, và/hoặc CD206 trong một hoặc nhiều tế bào, tùy ý trong đó một hoặc nhiều tế bào là tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy sống không tạo khối u (MDSC); (v) làm giảm tốc độ phát triển của khối u của khối u rắn; (vi) làm giảm thể tích khối u; (vii) làm tăng hiệu quả của một hoặc nhiều chất ức chế PD-1; (viii) làm tăng hiệu quả của một hoặc nhiều liệu pháp ức chế điểm kiểm tra và/hoặc liệu pháp điều biến miễn dịch, tùy ý trong đó một hoặc nhiều liệu pháp ức chế điểm kiểm tra và/hoặc liệu pháp điều biến miễn dịch hướng đích một hoặc nhiều CTL4, con đường adenosin, PD-L1, PD-L2, OX40, TIM3, LAG3, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng; (ix) làm tăng hiệu quả của một hoặc nhiều tác nhân hóa trị liệu, tùy ý trong đó một hoặc nhiều tác nhân hóa trị liệu là gemcitabine, capecitabine, anthracycline, doxorubicin (Adriamycin®), epirubicin (Ellence®), taxane, paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), 5-fluorouracil (5-FU), xyclophosphamit (Cytoxan®),

carboplatin (Paraplatin®), và tổ hợp bất kỳ của chúng; (x) làm tăng quá trình tăng sinh của tế bào T với sự có mặt của tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy sống không tạo khối u (MDSC); (xi) ức chế quá trình biệt hóa, sự sống sót, và/hoặc một hoặc nhiều chức năng của tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy sống không tạo khối u (MDSC); và (xii) tiêu diệt tế bào tủy sống không tạo khối u ức chế miễn dịch biểu hiện CD33 và/hoặc tế bào hiểu hiện CD14 không tạo khối u trong khối u rắn và các mạch máu liên quan khi liên hợp với hóa chất hoặc chất độc phóng xạ.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế làm giảm hoạt tính, chức năng, hoặc sự sống sót của tế bào T điều hòa, tế bào tua ức chế miễn dịch gắn khối u, đại thực bào ức chế miễn dịch gắn khối u, tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy sống, đại thực bào liên quan đến khối u, tế bào bệnh bạch cầu cấp tính dòng tủy (AML), tế bào bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (CLL), hoặc bệnh bạch cầu kinh dòng bạch cầu hạt mạn tính (CML).

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế gây ra hoặc thúc đẩy sự sống sót, sự thành thục, chức năng, sự di trú, hoặc quá trình tăng sinh của một hoặc nhiều tế bào miễn dịch, ví dụ, một hoặc nhiều tế bào miễn dịch được chọn từ tế bào tua, đại thực bào, bạch cầu trung tính, tế bào NK, tiểu thần kinh đệm, tế bào T, tế bào T trợ giúp, tế bào T gây độc tế bào, và tổ hợp bất kỳ của chúng ở cá thể.

Ái lực gắn kết kháng thể kháng SIRPA

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, kháng thể có hằng số phân ly (K_D) < 1 μM, < 100 nM, < 10 nM, < 1 nM, < 0,1 nM, < 0,01 nM, hoặc < 0,001 nM (ví dụ, 10^{-8} M hoặc thấp hơn, ví dụ, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M). Hằng số phân ly có thể được xác định thông qua kỹ thuật phân tích bất kỳ, bao gồm kỹ thuật hóa sinh hoặc kỹ thuật lý sinh bất kỳ như ELISA, cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR), phép đo giao thoa lớp sinh học (xem, ví dụ, Octet System by ForteBio), phép đo nhiệt lượng chuẩn độ đẳng nhiệt (ITC), phép đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC), phân tích lưỡng sắc hình tròn (CD), phân tích dòng dừng và phân tích độ nóng chảy protein huỳnh quang hoặc đo màu. Theo một phương án, K_D được đo bằng thử nghiệm gắn kết kháng nguyên dán nhãn phóng xạ (RIA). Theo một số phương án, RIA được thực hiện với phiên bản Fab của kháng thể quan tâm và kháng nguyên của nó, ví dụ, như được mô tả trong Chen et al. *J. Mol. Biol.*

293:865-881(1999)). Theo một số phương án, K_D được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt BIACORE, ví dụ, thử nghiệm bằng cách sử dụng BIACORE -2000 hoặc BIACORE -3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) được thực hiện ở 25°C với chip CM5 kháng nguyên cố định ở ~ 10 đơn vị đáp ứng (RU). Theo một số phương án, K_D được xác định bằng cách sử dụng kháng thể đơn trị (ví dụ, Fab) hoặc kháng thể có chiều dài đầy đủ. Theo một số phương án, K_D được xác định bằng cách sử dụng kháng thể có chiều dài đầy đủ ở dạng đơn trị.

Mảnh kháng thể

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, kháng thể là mảnh kháng thể. Các mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, mảnh Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv, và scFv, và các mảnh khác được mô tả dưới đây. Để xem xét các mảnh kháng thể nhất định, xem Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Để xem xét về mảnh scFv, xem, ví dụ, WO 93/16185; và các patent Mỹ số 5571894 và 5587458. Để thảo luận về các mảnh Fab và $F(ab')_2$ bao gồm các gốc epitop gắn kết thụ thể cứu hộ và có thời gian bán rã *in vivo* tăng, xem patent Mỹ số 5869046.

Kháng thể kép là các mảnh kháng thể có hai vị trí gắn kết kháng nguyên có thể là hóa trị hai hoặc đặc hiệu kép. Xem, ví dụ, EP404097; WO 1993/01161; Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Thể ba và thể bốn cũng được mô tả trong Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Kháng thể đơn miền là các mảnh kháng thể bao gồm tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo các phương án nhất định, kháng thể đơn miền là kháng thể đơn miền của người (xem, ví dụ, patent Mỹ số 6248516).

Các mảnh kháng thể có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, phân cắt bằng enzym phân giải protein kháng thể nguyên vẹn cũng như tạo ra bằng tế bào vật chủ tái tổ hợp (ví dụ, E. coli hoặc thể thực khuẩn), như được đề cập trong bản mô tả này.

Kháng thể khảm hoặc kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, kháng thể là kháng thể khảm. Kháng thể khảm nhất định được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 4816567. Theo một ví dụ, kháng thể khảm bao gồm vùng biến đổi không

phải của người (ví dụ, vùng biến đổi có nguồn gốc từ chuột nhắt, chuột cống, chuột đồng, thỏ, hoặc động vật linh trưởng không phải là người, như khỉ) và vùng hằng định của người. Theo một ví dụ khác nữa, kháng thể khảm là kháng thể "chuyển lớp" trong đó lớp hoặc phân lớp đã được thay đổi từ kháng thể bố mẹ. Kháng thể khảm bao gồm các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, kháng thể là kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người. Thông thường, kháng thể không phải của người được làm giống như kháng thể của người nhằm làm giảm tính sinh miễn dịch đối với người, trong khi vẫn duy trì được tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể bố mẹ không phải của người. Theo các phương án nhất định, kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người về cơ bản không sinh miễn dịch ở người. Theo các phương án nhất định, kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người về cơ bản có cùng ái lực để hướng đích dưới dạng kháng thể từ các loài khác mà từ đó kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người được tạo ra. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5530101, 5693761; 5693762; và 5585089. Theo các phương án nhất định, axit amin của miền biến đổi của kháng thể có thể được cải biến mà không làm suy giảm ái lực nguyên thể của miền gắn kết kháng nguyên trong khi làm giảm tính sinh miễn dịch của nó được nhận diện. Xem, ví dụ, các patent Mỹ số 5766886 và 5869619. Nói chung, kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người bao gồm một hoặc nhiều miền biến đổi trong đó HVR (hoặc các phần của chúng) có nguồn gốc từ kháng thể không phải của người, và FR (hoặc các phần của chúng) có nguồn gốc từ trình tự kháng thể của người. Kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người tùy ý cũng sẽ bao gồm ít nhất một phần vùng hằng định của người. Theo một số phương án, một số gốc FR trong kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người được thay thế bằng các gốc tương ứng từ kháng thể không phải của người (ví dụ, kháng thể mà từ đó các gốc HVR được tạo ra), ví dụ, để khôi phục cải thiện tính đặc hiệu kháng thể hoặc ái lực.

Kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người và phương pháp tạo ra chúng được xem xét, ví dụ, trong Almagro et al. *Front. Biosci.* 13:161 9-1633 (2008), và được mô tả tiếp, ví dụ, trong các patent Mỹ số 5821337, 7527791, 6982321, và 7087409. Vùng khung của người có thể được sử dụng để làm giống như của người bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: vùng khung được chọn bằng cách sử dụng phương

pháp "phù hợp nhất" (xem, ví dụ, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); vùng khung có nguồn gốc từ trình tự liên ứng của kháng thể của người của phân nhóm cụ thể của vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ (xem, ví dụ, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); và Presta et al., *J. Immunol.* 151 :2623 (1993)); vùng khung trưởng thành của người (được gây đột biến soma) hoặc vùng khung dòng mầm của người (xem, ví dụ, Almagro và Fransson *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); và vùng khung có nguồn gốc từ sàng lọc thư viện FR (xem, ví dụ, Baca et al. *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) và Rosok et al. *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

Kháng thể của người

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, kháng thể là kháng thể của người. Kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Kháng thể của người được mô tả chung trong van Dijk et al. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001) và Lonberg *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách dùng chất sinh kháng nguyên cho động vật chuyển gen đã được cải biến để tạo ra kháng thể nguyên vẹn của người hoặc kháng thể nguyên vẹn với vùng biến đổi của người đáp ứng với kích thích kháng nguyên. Có thể thao tác di truyền các chủng chuột nhắt thiếu hụt khả năng tạo thành kháng thể chuột nhắt với các mảnh lớn của locut Ig của người với dự đoán rằng các con chuột nhắt như vậy sẽ tạo ra kháng thể của người khi không có mặt kháng thể chuột nhắt. Các mảnh Ig lớn của người có thể bảo toàn sự đa dạng biến đổi gen lớn cũng như điều hòa phù hợp quá trình sản xuất và biểu hiện của kháng thể. Bằng cách khai thác bộ máy của chuột nhắt về tính đa dạng và sự chọn lọc kháng thể và sự thiếu hụt khả năng dung nạp miễn dịch đối với protein của người, kho vốn kháng thể đã được tái sinh của người trong các chủng chuột nhắt này có thể thu được kháng thể của người hòa toàn có ái lực cao đối với kháng nguyên bất kỳ quan tâm, bao gồm các kháng nguyên của người. Bằng cách sử dụng công nghệ tế bào lai, mAb của người đặc hiệu kháng nguyên với tính đặc hiệu mong muốn có thể được tạo ra và được chọn. Các phương pháp nhất định được lấy làm ví dụ được mô tả trong patent Mỹ số 5545807, EP 546073, và EP 546073. Cũng xem, ví dụ, các patent Mỹ số 6075181 và 6150584 mô tả công nghệ XENOMOUSE™; patent Mỹ số 5770429 mô tả công nghệ

HUMAB®; patent Mỹ số 7041870 mô tả công nghệ K-M MOUSE®, và công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2007/0061900, mô tả công nghệ VELOCIMOUSE®. Vùng biến đổi của người từ kháng thể nguyên vẹn được tạo ra từ các động vật như vậy có thể được cải biến tiếp, ví dụ, bằng cách kết hợp với vùng hằng định của người khác nhau.

Kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng phương pháp dựa trên tế bào lai. Các dòng tế bào u tủy của người và dị u tủy của chuột nhắt để tạo ra kháng thể của người đơn dòng đã được mô tả. (Xem, ví dụ, Kozbor *J. Immunol.* 133:3001 (1984) và Boerner et al. *J. Immunol.* 147:86 (1991)). Kháng thể của người được tạo ra nhờ công nghệ tế bào lai tế bào B của người cũng được mô tả trong Li et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1 03:3557-3562 (2006). Các phương pháp bổ sung bao gồm các phương pháp được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 7189826 (mô tả sự tạo ra kháng thể IgM đơn dòng của người từ dòng tế bào lai). Công nghệ tế bào lai của người (công nghệ Trioma) cũng được mô tả trong Vollmers et al. *Histology và Histopathology* 20(3) :927-937 (2005) và Vollmers et al. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27(3):185-91 (2005). Kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng cách phân lập trình tự miền biến đổi dòng vô tính Fv được chọn từ các thư viện hiển thị thể thực khuẩn có nguồn gốc từ người. Trình tự miền biến đổi như vậy có thể sau đó được kết hợp với miền hằng định của người mong muốn. Kỹ thuật để chọn lọc kháng thể của người từ thư viện kháng thể được mô tả dưới đây.

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, kháng thể là kháng thể của người phân lập bằng phương pháp *in vitro* và/hoặc sàng lọc các thư viện kết hợp đối với kháng thể với hoạt tính hoặc các hoạt tính mong muốn. Các ví dụ thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hiển thị thể thực khuẩn (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (trước đây là Proliferon), Affimed) hiển thị ribosom (CAT), hiển thị nấm men (Adimab), và các hiển thị tương tự. Trong các phương pháp hiển thị thể thực khuẩn nhất định, kho vốn của gen VH và VL được tách dòng vô tính riêng rẽ bằng phản ứng chuỗi polymeaza (PCR) và kết hợp lại một cách ngẫu nhiên trong thư viện thể thực khuẩn, sau đó có thể được sàng lọc về thể thực khuẩn gắn kết kháng nguyên như được mô tả trong Winter et al. *Ann. Rev. Immunol.* 12: 433-455 (1994). Ví dụ, nhiều phương pháp khác nhau là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để tạo ra thư viện hiển thị thể thực khuẩn và sàng

lọc các thư viện như vậy để kháng thể có các đặc tính gắn kết mong muốn. Cũng xem Sidhu et al. *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310, 2004; Lee et al. *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093, 2004; Fellouse *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); và Lee et al. *J. Immunol. Methods* 284(-2):1 19-132 (2004). Thể thực khuẩn thường hiển thị các mảnh kháng thể, hoặc dưới dạng các mảnh Fv (scFv) chuỗi đơn hoặc dưới dạng các mảnh Fab. Thư viện từ các nguồn đã được chủng ngừa tạo ra kháng thể có ái lực cao đối với chất sinh kháng nguyên mà không cần cấu trúc tế bào lai. Theo cách khác, kho vốn nguyên thể có thể được tách dòng vô tính (ví dụ, từ người) để tạo ra một nguồn kháng thể duy nhất cho khoảng lớn tự kháng nguyên và cả không phải tự kháng nguyên mà không cần chủng ngừa bất kỳ như được mô tả bởi Griffiths et al. *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). Cuối cùng, thư viện nguyên thể cũng có thể được tạo ra bằng tổng hợp bằng cách tách dòng vô tính mảnh gen V không được sắp xếp lại từ tế bào gốc, và bằng cách sử dụng đoạn mồi PCR bao gồm trình tự ngẫu nhiên để mã hóa vùng HVR3 biến đổi cao và để hoàn thành việc sắp xếp lại *in vitro*, như được mô tả bởi Hoogenboom et al. *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388, 1992. Các công bố patent mô tả thư viện thể thực khuẩn kháng thể của người bao gồm, ví dụ, patent Mỹ số 5750373, và các công bố đơn patent Mỹ số 2007/0292936 và 2009/0002360. Kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể của người được xem là kháng thể của người hoặc các mảnh kháng thể của người trong bản mô tả này.

Vùng hằng định bao gồm các vùng Fc

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng SIRPA được đề xuất trong bản mô tả này, kháng thể bao gồm Fc. Theo một số phương án, Fc là isotyp IgG1, IgG2, IgG3, và/hoặc IgG4 của người. Theo một số phương án, kháng thể thuộc lớp IgG, lớp IgM, hoặc lớp IgA.

Theo các phương án nhất định của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng SIRPA được đề xuất trong bản mô tả này, kháng thể có isotyp IgG2. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA chứa vùng hằng định IgG2 của người. Theo một số phương án, vùng hằng định IgG2 của người bao gồm vùng Fc. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA gây ra một hoặc nhiều hoạt tính SIRPA hoặc độc lập gắn kết với thụ thể Fc. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA gắn kết thụ thể Fc ức chế. Theo các phương án nhất định, thụ thể Fc ức chế là thụ thể Fc-gamma ức chế IIB (FcγIIB).

Theo các phương án nhất định của kháng thể bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, kháng thể có isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA chứa vùng hằng định IgG1 của chuột nhắt. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA chứa vùng hằng định IgG1 của người. Theo một số phương án, vùng hằng định IgG1 của người bao gồm vùng Fc. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA gắn kết thụ thể Fc ức chế. Theo các phương án nhất định, thụ thể Fc ức chế là thụ thể Fc-gamma ức chế IIB (FcγIIB).

Theo các phương án nhất định của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng SIRPA được đề xuất trong bản mô tả này, kháng thể có isotyp IgG4. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA chứa vùng hằng định IgG4 của người. Theo một số phương án, vùng hằng định IgG4 của người bao gồm vùng Fc. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA gắn kết thụ thể Fc ức chế. Theo các phương án nhất định, thụ thể Fc ức chế là thụ thể Fc-gamma ức chế IIB (FcγIIB).

Theo các phương án nhất định của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng SIRPA được đề xuất trong bản mô tả này, kháng thể có isotyp IgG2/4 lai hóa. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA bao gồm trình tự axit amin bao gồm axit amin 118 đến 260 theo hệ thống đánh số EU của IgG2 của người và axit amin 261-447 theo hệ thống đánh số EU của IgG4 của người (WO 1997/11971; WO 2007/106585).

Theo một số phương án, vùng Fc làm tăng sự kết cụm mà không hoạt hóa bổ thể so với kháng thể tương ứng bao gồm vùng Fc không bao gồm gốc thay thế axit amin. Theo một số phương án, kháng thể gây ra một hoặc nhiều hoạt tính của đích cụ thể được gắn kết bởi kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể gắn kết với SIRPA.

Cũng có thể mong muốn cải biến kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế để cải biến chức năng hiệu ứng và/hoặc để làm tăng thời gian bán rã huyết thanh của kháng thể. Ví dụ, vị trí gắn kết thụ thể Fc trên vùng hằng định có thể được cải biến hoặc được gây đột biến để loại bỏ hoặc làm giảm gắn kết ái lực với các thụ thể Fc nhất định, như FcγRI, FcγRII, và/hoặc FcγRIII để làm giảm tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể. Theo một số phương án, chức năng hiệu ứng bị suy giảm bằng cách loại bỏ quá trình glycosyl hóa N vùng Fc (ví dụ, trong miền CH2 của IgG) của kháng thể. Theo một số phương án, chức năng hiệu ứng bị suy giảm bằng cách cải

biến các vùng như 233-236, 297, và/hoặc 327-331 của IgG của người như được mô tả trong WO 99/58572 và Armour et al. *Molecular Immunology* 40: 585-593 (2003); Reddy et al. *J. Immunology* 164:1925-1933 (2000). Theo các phương án khác, cũng có thể mong muốn cải biến kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế để cải biến chức năng hiệu ứng nhằm làm tăng khả năng tìm kiếm sự chọn lọc hướng đến FcgRIIb chứa ITIM (CD32b) để làm tăng sự kết cụm của SIRPA kháng thể trên tế bào liền kề mà không hoạt hóa các đáp ứng dịch thể bao gồm tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể và khả năng thực bào tế bào phụ thuộc vào kháng thể.

Để làm tăng thời gian bán rã huyết thanh của kháng thể, có thể đưa thụ thể cứu hộ gắn kết với epitop vào kháng thể (đặc biệt là mảnh kháng thể) như được mô tả trong, ví du, patent Mỹ số 5739277. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thụ thể cứu hộ gắn kết với epitop" để chỉ epitop của vùng Fc của phân tử IgG (ví dụ, IgG_1, IgG_2, IgG_3, hoặc IgG_4) chịu trách nhiệm để làm tăng thời gian bán rã huyết thanh *in vivo* của phân tử IgG.

Kháng thể đa đặc hiệu

Kháng thể đa đặc hiệu là kháng thể có tính đặc hiệu gắn kết trong ít nhất hai epitop khác nhau, bao gồm các epitop trên cùng polypeptit hoặc trên polypeptit khác (ví dụ, một hoặc nhiều SIRPA polypeptit theo sáng chế). Theo một số phương án, kháng thể đa đặc hiệu có thể là kháng thể lưỡng đặc hiệu. Theo một số phương án, kháng thể đa đặc hiệu có thể là kháng thể đặc hiệu ba trong một. Theo một số phương án, kháng thể đa đặc hiệu có thể là kháng thể đặc hiệu bốn trong một. Kháng thể như vậy có thể có nguồn gốc từ kháng thể có chiều dài đầy đủ hoặc các mảnh kháng thể (ví dụ, kháng thể lưỡng đặc hiệu $F(ab')_2$). Theo một số phương án, kháng thể đa đặc hiệu bao gồm vùng gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết với vị trí thứ nhất trên SIRPA và bao gồm vùng gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết với vị trí thứ hai trên SIRPA. Theo một số phương án, kháng thể đa đặc hiệu bao gồm vùng gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết với SIRPA và vùng gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết với polypeptit thứ hai.

Sáng chế đề xuất kháng thể đa đặc hiệu bao gồm vùng gắn kết kháng nguyên thứ nhất, trong đó vùng gắn kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm sáu HVR của kháng thể được đề cập trong bản mô tả này, gắn kết với SIRPA và vùng gắn kết kháng

nguyên thứ hai gắn kết với polypeptit thứ hai. Theo một số phương án, vùng gắn kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm V_H hoặc V_L của kháng thể được đề cập trong bản mô tả này.

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đa đặc hiệu, polypeptit thứ hai là kháng nguyên tạo điều kiện việc vận chuyển qua hàng rào máu-não. Nhiều kháng nguyên và peptit đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này tạo điều kiện việc vận chuyển qua hàng rào máu não (xem, ví dụ, Gabathuler R. Neurobiol. Dis. 37:48-57 (2010)). Kháng nguyên và peptit thứ hai như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thụ thể transferrin (TR), thụ thể insulin (HIR), thụ thể yếu tố phát triển giống insulin (IGFR), protein liên quan đến thụ thể lipoprotein mật độ thấp 1 và 2 (LPR-1 và 2), thụ thể độc tố bệnh bạch cầu, bao gồm CRM197 (thể đột biến không độc của độc tố diphtheri), TMEM 30(A) (Flippase), miền tải nạp protein như TAT, Syn-B, hoặc penetratin, poly-arginin hoặc peptit thường tích điện dương, Angiopep peptit như ANG1005 (xem, ví dụ, Gabathuler, 2010), và các protein bề mặt tế bào khác được làm giàu trên tế bào màng trong hàng rào máu não (xem, ví dụ, Daneman et al. *PLoS One* 5(10):e13741 (2010)).

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đa đặc hiệu, polypeptit thứ hai là protein gây bệnh được chọn từ beta dạng tinh bột, beta dạng tinh bột oligome, mảng beta dạng tinh bột, protein tiền chất dạng tinh bột hoặc mảnh của chúng, Tau, IAPP, alpha-synuclein, TDP-43, FUS protein, C9orf72 (nhiễm sắc thể 9 khung đọc mở 72), protein c9RAN, prion protein, PrPSc, huntingtin, calcitonin, superoxit dismutaza, ataxin, ataxin 1, ataxin 2, ataxin 3, ataxin 7, ataxin 8, ataxin 10, thể Lewy, yếu tố lợi tiểu natri nhĩ, amyloit polypeptit đảo, insulin, apolipoprotein AI, amyloid A huyết thanh, medin, prolactin, transthyretin, lysozym, beta 2 vi globulin, gelsolin, keratoepithelin, cystatin, AL chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, protein S-IBM, các sản phẩm dịch mã không ATG (RAN) được liên kết lặp lại, peptit lặp lại dipeptit (DPR), peptit lặp lại glyxin-alanin (GA), peptit lặp lại glyxin-prolin (GP), peptit lặp lại glyxin-arginin (GR), peptit lặp lại prolin-alanin (PA), ubiquitin, và prolin-arginin (PR) peptit lặp lại; (d) phối tử và/hoặc protein được biểu hiện trên tế bào miễn dịch, trong đó phối tử và/hoặc protein được chọn từ CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA-4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, BTLA, KIR, GAL9, TIM3, A2AR, LAG-3, và phosphatidylserin; và/hoặc (e) protein, lipit,

polysacarit, hoặc glycolipit được biểu hiện trên một hoặc nhiều tế bào khối u và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Kháng thể đa trị có thể nhận diện kháng nguyên SIRPA cũng như, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kháng nguyên bổ sung, như kháng nguyên Aβ peptit, kháng nguyên α-synuclein protein, kháng nguyên Tau protein, kháng nguyên TDP-43 protein, kháng nguyên prion protein, kháng nguyên huntingtin protein, kháng nguyên sản phẩm dịch mã RAN (bao gồm đơn vị lặp lại dipeptit, (DPR peptit) bao gồm glyxin-alanin (GA), glyxin-prolin (GP), glyxin-arginin (GR), prolin-alanin (PA), hoặc prolin-arginin (PR)), thụ thể insulin, thụ thể yếu tố sinh trưởng giống insulin, hoặc thụ thể transferrin hoặc kháng nguyên khác bất kỳ tạo điều kiện kháng thể chuyển qua hàng rào máu não. Theo một số phương án, polypeptit thứ hai là transferrin. Theo một số phương án, polypeptit thứ hai là Tau. Theo một số phương án, polypeptit thứ hai là Aβ. Theo một số phương án, polypeptit thứ hai là TREM2. Theo một số phương án, polypeptit thứ hai là α-synuclein.

Kháng thể đa trị chứa ít nhất một chuỗi polypeptit (và tốt hơn là hai chuỗi polypeptit), trong đó chuỗi hoặc các chuỗi polypeptit bao gồm hai hoặc nhiều miền biến đổi. Ví dụ, chuỗi hoặc các chuỗi polypeptit có thể bao gồm VD1-$(X1)_n$-VD2-$(X2)_n$-Fc, trong đó VD1 là miền biến đổi thứ nhất, VD2 là miền biến đổi thứ hai, Fc là một chuỗi polypeptit của vùng Fc, X1 và X2 là axit amin hoặc polypeptit, và n bằng 0 hoặc 1. Tương tự, chuỗi hoặc các chuỗi polypeptit có thể bao gồm chuỗi của vùng V_H-C_H1-liên kết cầu nối linh hoạt-V_H-C_H1-Fc; hoặc chuỗi của vùng V_H-C_H1-V_H-C_H1-Fc. Tốt hơn là, kháng thể đa trị trong bản mô tả này còn bao gồm ít nhất hai (và tốt hơn là bốn) polypeptit của miền biến đổi chuỗi nhẹ. Kháng thể đa trị trong bản mô tả này có thể, ví dụ, bao gồm trong khoảng từ hai đến khoảng tám polypeptit của miền biến đổi chuỗi nhẹ. Polypeptit của miền biến đổi chuỗi nhẹ được dự tính trong bản mô tả này bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ và, tùy ý, còn bao gồm miền CL.

Kỹ thuật để tạo ra kháng thể đa đặc hiệu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đồng biểu hiện tái tổ hợp hai cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có tính đặc hiệu khác nhau (xem Milstein and Cuello Nature 305: 537 (1983), WO 93/08829, và Traunecker et al. *EMBO J.* 10:3655 (1991)), và kỹ thuật di truyền "ổ khóa-trong-lỗ khóa" (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5731168). Cũng xem WO 2013/026833 (CrossMab).

Kháng thể đa đặc hiệu cũng có thể được tạo ra bằng cách thực hiện thao tác di truyền hiệu ứng lái tĩnh điện kỹ thuật để tạo ra phân tử dị dime kháng thể Fc (WO 2009/089004A1); tạo liên kết ngang hai hoặc nhiều kháng thể (xem, ví dụ, patent Mỹ số 4676980); bằng cách sử dụng leuxin; bằng cách sử dụng công nghệ "thể kép" để tạo ra các mảnh kháng thể lưỡng đặc hiệu (xem, ví dụ, Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)); và bằng cách sử dụng dime chuỗi đơn Fv (scFv) dimers (xem, ví dụ, Gruber et al. *J. Immunol.* 152:5368 (1994)); và tạo ra kháng thể đặc hiệu ba trong một như được mô tả, ví dụ, trong Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Kháng thể đã được thao tác di truyền với ba hoặc nhiều vị trí gắn kết kháng nguyên chức năng, bao gồm "kháng thể bạch tuộc", cũng được bao gồm trong bản mô tả này (xem, ví dụ, US 2006/0025576). Kháng thể trong bản mô tả này cũng bao gồm "FAb tác động kép" hoặc "DAF" bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết với nhiều SIRPA (xem, ví dụ, US 2008/0069820).

Biến thể kháng thể

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, các biến thể trình tự axit amin của kháng thể được dự tính. Ví dụ, có thể mong muốn cải thiện ái lực gắn kết và/hoặc các đặc tính sinh học khác của kháng thể.

Biến thể thay thế, cài xen, và khuyết đoạn

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, các biến thể kháng thể có một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin được đề xuất. Các biến thể trình tự axit amin của kháng thể có thể được tạo ra bằng cách đưa cải biến thích hợp vào trình tự nucleotit mã hóa kháng thể, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Các cải biến như vậy bao gồm, ví dụ, các khuyết đoạn, và/hoặc cài xen và/hoặc thay thế các gốc trong các trình tự axit amin của kháng thể.

Bảng 1: Gốc thay thế axit amin

Gốc ban đầu	Gốc thay thế được lấy làm ví dụ	Gốc thay thế được ưu tiên
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser

Gốc ban đầu	Gốc thay thế được lấy làm ví dụ	Gốc thay thế được ưu tiên
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleuxin	Leu
Leu (L)	Norleuxin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleuxin	Leu

Cải biến cơ bản về các đặc tính sinh học của kháng thể được hoàn thành bằng cách chọn lọc các thay thế khác biệt đáng kể về tác dụng của chúng đối với việc duy trì (a) cấu trúc của khung polypeptit trong khu vực thay thế, ví dụ, dưới dạng một tấm hoặc cấu trúc xoắn ốc, (b) điện tích hoặc tính kỵ nước của phân tử ở vị trí đích, hoặc (c) phần lớn chuỗi bên. Các gốc xuất hiện trong tự nhiên được chia thành các nhóm dựa trên các đặc tính chuỗi bên chung:

(1) kỵ nước: Norleuxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) ưa nước trung tính: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) có tính axit: Asp, Glu;

(4) có tính bazơ: His, Lys, Arg;

(5) các gốc ảnh hưởng đến hướng của chuỗi: Gly, Pro; và

(6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Ví dụ, các thay thế không bảo toàn có thể liên quan đến việc trao đổi một thành viên của một trong số các lớp này cho thành viên từ lớp khác. Các gốc đã được thay thế như vậy có thể được đưa vào, ví dụ, các vùng của kháng thể của người tương đồng với kháng thể không phải của người, hoặc vào các vùng phân tử không tương đồng.

Để tạo ra các thay đổi đối với polypeptit hoặc kháng thể được đề cập trong bản mô tả này, theo các phương án nhất định, chỉ số chữa bệnh bằng nước của axit amin có thể được xem xét. Mỗi axit amin được chỉ định chỉ số kỵ nước trên cơ sở đặc điểm kỵ

nước và điện tích của nó. Chúng là: isoleuxin (+4,5); valin (+4,2); leuxin (+3,8); phenylalanin (+2,8); xystein/xystin (+2,5); methionin (+1,9); alanin (+1,8); glyxin (−0,4); threonin (−0,7); serin (−0,8); tryptophan (−0,9); tyrosin (−1,3); prolin (−1,6); histidin (−3,2); glutamat (−3,5); glutamin (−3,5); aspartat (−3,5); asparagin (-3,5); lysin (−3,9); và arginin (−4,5).

Tầm quan trọng của chỉ số axit amin ưa nước trong việc tạo ra chức năng sinh học tương tác trên protein là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Kyte et al. *J. Mol. Biol.*, 157:105-131 (1982). Đã biết rằng các axit amin nhất định có thể được thay thế cho các axit amin khác có chỉ số hoặc điểm kỵ nước tương tự và vẫn giữ nguyên hoạt tính sinh học tương tự. Để tạo ra các thay đổi dựa trên chỉ số chữa bệnh bằng nước, theo các phương án nhất định, sự thay thế axit amin có chỉ số chữa bệnh bằng nước trong vòng ±2 được bao gồm. Theo các phương án nhất định, bao gồm chỉ số chữa bệnh bằng nước trong vòng ±1, và theo các phương án nhất định, bao gồm chỉ số chữa bệnh bằng nước trong vòng ±0,5.

Trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng hiểu rằng sự thay thế axit amin có thể được thực hiện hiệu quả trên cơ sở tính ưa nước, đặc biệt khi protein hoặc peptit có chức năng sinh học nhờ đó được tạo ra được dự định để sử dụng trong các phương án miễn dịch học, như trong trường hợp của sáng chế này. Theo các phương án nhất định, tính ưa nước trung bình cục bộ lớn nhất của một protein, được điều chỉnh bởi tính ưa nước của axit amin liền kề của nó, tương quan với tính sinh miễn dịch và tính sinh kháng nguyên của nó, tức là với đặc tính sinh học của protein.

Các giá trị ưa nước sau đã được chỉ định cho các gốc axit amin này: arginin (+3,0); lysin (+3,0±1); aspartat (+3,0±1); glutamat (+3,0±1); serin (+0,3); asparagin (+0,2); glutamin (+0,2); glyxin (0); threonin (−0,4); prolin (−0,5±1); alanin (−0,5); histidin (−0,5); xystein (−1,0); methionin (−1,3); valin (−1,5); leuxin (−1,8); isoleuxin (−1,8); tyrosin (−2,3); phenylalanin (−2,5) và tryptophan (−3,4). Để tạo ra các thay đổi dựa trên các giá trị ưa nước tương tự, theo các phương án nhất định, sự thay thế axit amin có giá trị ưa nước trong vòng ±2 được bao gồm, theo các phương án nhất định, giá trị ưa nước trong vòng ±1 được bao gồm, và theo các phương án nhất định, giá trị ưa nước trong ±0,5 được bao gồm. Cũng có thể nhận diện epitop từ các trình tự axit amin cơ bản trên cơ sở ưa nước. Các vùng này cũng được dùng để chỉ "các vùng lõi epitop".

Theo các phương án nhất định, sự thay thế, cài xen, hoặc khuyết đoạn có thể xảy ra trong một hoặc nhiều HVR miễn là các thay đổi như vậy về cơ bản không làm giảm khả năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể. Ví dụ, các thay đổi bảo toàn (ví dụ, các thay thế bảo toàn như được đề xuất trong bản mô tả này) về cơ bản không làm giảm gắn kết ái lực có thể được thực hiện trong HVR. Các thay đổi như vậy có thể, ví dụ, nằm ngoài các gốc tiếp xúc kháng nguyên trong HVR. Theo các phương án nhất định của trình tự VH và VL biến thể được đề xuất trên đây, mỗi HVR không được sửa đổi hoặc không chứa nhiều hơn một, hai hoặc ba gốc thay thế axit amin.

Các cài xen trình tự axit amin bao gồm các nhóm dung hợp đầu tận cùng amino và/hoặc carboxyl có chiều dài từ một gốc đến polypeptit bao gồm hàng trăm hoặc nhiều gốc, cũng như các cài xen bên trong trình tự của một hoặc nhiều gốc axit amin. Các ví dụ về cài xen đầu tận cùng bao gồm kháng thể với gốc methionyl đầu tận cùng N. Các biến thể cài xen khác của phân tử kháng thể bao gồm nhóm dung hợp với các đầu tận cùng N hoặc C của kháng thể với enzym (ví dụ, đối với ADEPT) hoặc polypeptit làm tăng thời gian bán rã huyết thanh của kháng thể.

Gốc xystein bất kỳ không liên quan đến việc duy trì cấu trúc thích hợp của kháng thể cũng có thể được thay thế, thường là bằng serin, để cải thiện độ ổn định oxy hóa của phân tử và ngăn ngừa sự tạo liên kết ngang khác thường. Ngược lại, (các) gắn kết xystein có thể được bổ sung vào kháng thể để cải thiện độ ổn định của nó (đặc biệt là khi kháng thể là mảnh kháng thể, như mảnh Fv).

Biến thể glycosyl hóa

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, kháng thể được sửa đổi để làm tăng hoặc làm giảm mức độ mà kháng thể được glycosyl hóa. Việc bổ sung hoặc gây khuyết đoạn các vị trí glycosyl hóa vào kháng thể có thể được thực hiện bằng cách thay đổi trình tự axit amin để một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa được tạo ra hoặc được loại bỏ.

Glycosyl hóa kháng thể thường là được liên kết N hoặc được liên kết O. Được liên kết N để chỉ sự gắn của gốc hydrat cacbon vào chuỗi bên của gốc asparagin. Trình tự tripeptit asparagin-X-serin và asparagin-X-threonin, trong đó X là axit amin bất kỳ ngoại trừ prolin, là các trình tự nhận diện để gắn enzym gốc cacbohydrate vào chuỗi bên asparagin. Do đó, sự có mặt của hoặc các trình tự tripeptit này trong polypeptit tạo

ra vị trí glycosyl hóa tiềm năng. Glycosyl hóa đã được liên kết O để chỉ sự gắn của một trong số các đường N-axetylgalactosamin, galactoza, hoặc xyloza vào hydroxyaxit amin, phổ biến nhất là serin hoặc threonin, mặc dù 5-hydroxyprolin hoặc 5-hydroxylysin cũng có thể được sử dụng.

Việc bổ sung vị trí glycosyl hóa vào kháng thể được thực hiện thông thường bằng cách thay đổi trình tự axit amin để nó chứa một hoặc nhiều trình tự tripeptit được mô tả trên đây (đối với vị trí glycosyl hóa được liên kết N). Sự sửa đổi cũng có thể được thực hiện bằng cách bổ sung, hoặc thay thế, một hoặc nhiều gốc serin hoặc threonin vào trình tự của kháng thể ban đầu (đối với vị trí glycosyl hóa được liên kết O).

Khi kháng thể bao gồm vùng Fc, hydrat cacbon gắn vào đó có thể được sửa đổi. Kháng thể nguyên thể được tạo ra bằng tế bào của động vật có vú thông thường bao gồm oligosacarit phân nhánh, anten kép nói chung được gắn bởi liên kết cầu nối N với Asn297 theo hệ thống đánh số Kabat miền CH2 của vùng Fc. Oligosacarit có thể bao gồm các hydrat cacbon khác nhau, ví dụ, mannoza, N-axetyl glucosamin (GlcNAc), galactoza, và axit sialic, cũng như fucoza được gắn vào GlcNAc trong "thân" của cấu trúc oligosacarit anten kép. Theo một số phương án, cải biến của oligosacarit trong kháng thể theo sáng chế có thể được thực hiện để tạo ra các biến thể kháng thể với các đặc tính được cải thiện nhất định.

Theo một phương án, các biến thể kháng thể được đề xuất có cấu trúc hydrat cacbon thiếu hụt fucoza được gắn (trực tiếp hoặc gián tiếp) vào vùng Fc. Xem, ví dụ, các công bố đơn patent Mỹ số 2003/0157108 và 2004/0093621. Các ví dụ về các ấn phẩm liên quan đến các biến thể kháng thể "được khử fucosyl hóa" hoặc "thiếu hụt fucoza" bao gồm: US 2003/0157108; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004). Các ví dụ về các dòng tế bào có khả năng tạo ra kháng thể đã được khử fucosyl hóa bao gồm tế bào Led 3 CHO thiếu hụt quá trình protein fucosyl hóa (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); US 2003/0157108), và các dòng tế bào được làm bất hoạt gen di truyền, như các gen alpha-1,6-fucosyltransferaza, FUT8, tế bào CHO được làm bất hoạt gen di truyền (xem, ví dụ, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004) và Kanda et al.

Biotechnol. Bioeng. 94(4):680-688 (2006)).

Vùng hằng định cải biến

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng SIRPA được đề xuất trong bản mô tả này, kháng thể Fc là isotyp kháng thể F và/hoặc các cải biến. Theo một số phương án, isotyp kháng thể Fc và/hoặc các cải biến có khả năng gắn kết với thụ thể Fc gamma.

Isotyp kháng thể Fc và các cải biến được lấy làm ví dụ được đề xuất trong Bảng 2 dưới đây. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có khả năng gắn kết thụ thể Fc gamma có isotyp Fc được liệt kê trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2: Isotyp Fc của kháng thể kháng SIRPA có khả năng gắn kết thụ thể Fc gamma

Isotyp Fc	Đột biến (Sơ đồ đánh số EU)
IgG1	N297A
IgG1	D265A và N297A
IgG1	D270A
IgG1	L234A và L235A L234A và G237A L234A và L235A và G237A
IgG1	D270A, và/hoặc P238D, và/hoặc L328E, và/hoặc E233D, và/hoặc G237D và/hoặc H268D, và/hoặc P271G, và/hoặc A330R
IgG1	P238D và L328E và E233D và G237D và H268D và P271G và A330R
IgG1	P238D và L328E và G237D và H268D và P271G và A330R
IgG1	P238D và S267E và L328F và E233D và G237D và H268D và P271G và A330R
IgG1	P238D và S267E và L328F và G237D và H268D và P271G và A330R
IgG2	V234A và G237A
IgG4	L235A và G237A và E318A
IgG4	S228P và L236E
Thể lai IgG2/4	IgG2 aa 118 đến 260 và IgG4 aa 261 đến 447
	H268Q và V309L; và A330S và P331S
IgG1	C226S và C229S và E233P và L234V và L235A
IgG1	L234F và L235E và P331S
IgG2	C232S hoặc C233S
IgG2	A330S và P331S
IgG1	S267E và L328F S267E một mình
IgG2	S267E và L328F
IgG4	S267E và L328F
IgG2	WT HC với Kappa (chuỗi nhẹ) LC HC C127S với Kappa LC Kappa LC C214S Kappa LC C214S và HC C233S

Isotyp Fc	Đột biến (Sơ đồ đánh số EU)
	Kappa LC C214S và HC C232S Đột biến bất kỳ trong số các đột biến được liệt kê trên đây cùng với các đột biến P330S và P331S Mảnh $F(ab')_2$ của WT IgG1 và đột biến bất kỳ trong số các đột biến được liệt kê trên đây
IgG1	Thay thế chuỗi nặng vùng hằng định 1 (CH1) và vùng bản lề của IgG1 với CH1 và vùng bản lề của IGg2 ASTKGPSVFP LAPCRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER KCCVECPPCP (SEQ ID NO: 58) Với Kappa LC
IgG1	Đột biến bất kỳ trong số các đột biến được liệt kê trên đây cùng với A330L/A330S và/hoặc L234F và/hoặc L235E và/hoặc P331S
IgG1, IgG2, hoặc IgG4	Đột biến bất kỳ trong số các đột biến được liệt kê trên đây cùng với M252Y và/hoặc S254T và/hoặc T256E
IgG1 của chuột nhắt, IgG2a của chuột nhắt, IgG2b của chuột nhắt	Đối với mô hình bệnh lý ở chuột nhắt
IgG4	WT
IgG1	Đột biến bất kỳ trong số các đột biến được liệt kê trên đây cùng với E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, S440W và/hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.
IgG2	Đột biến bất kỳ trong số các đột biến được liệt kê trên đây cùng với E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, S440W và/hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Ngoài các isotyp được mô tả trong Bảng 2, và không muốn bị bị ràng buộc vào lý thuyết, đã nghĩ rằng kháng thể với IgG1 của người IgG3 isotyp và các thể đột biến của chúng (ví dụ, Strohl (2009) Current Opinion in Biotechnology 2009, 20:685–691) gắn kết các thụ thể Fcg I, IIA, IIC, IIIA, IIIB ở người và/hoặc các thụ thể Fcg I, III và IV ở chuột nhắt, cũng có thể tác động như kháng thể chủ vận tạm thời.

Theo một số phương án, kháng thể gắn kết thụ thể Fc gamma thuộc lớp IgG, lớp IgM, hoặc lớp IgA. Theo một số phương án, kháng thể gắn kết thụ thể Fc gamma có isotyp IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4. Theo một số phương án, kháng thể bao gồm một hoặc nhiều (ví dụ, một hoặc nhiều hơn, hai hoặc nhiều hơn, ba hoặc nhiều hơn, bốn hoặc nhiều hơn, năm hoặc nhiều hơn, sáu hoặc nhiều hơn, bảy hoặc nhiều hơn, tám hoặc nhiều hơn, chín hoặc nhiều hơn, 10 hoặc nhiều hơn, 11 hoặc nhiều hơn, 12 hoặc nhiều hơn, hoặc tất cả 13) gốc thay thế axit amin trong vùng Fc ở vị trí gốc được chọn từ nhóm bao gồm: C127S, L234A, L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, E345R, E430G, S440Y trong tổ hợp bất kỳ (vị trí gốc theo quy tắc đánh số EU hoặc Kabat). Theo một số phương án, vùng Fc bao gồm gốc thay thế

axit amin ở vị trí E430G. Theo một số phương án, vùng Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí L243A, L235A, và P331A. Theo một số phương án, vùng Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí L243A, L235A, P331A. Theo một số phương án, vùng Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí K322A và E430G. Theo một số phương án, vùng Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí P331S và E430G. Theo một số phương án, vùng Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí A330S, P331S, và E430G. Theo một số phương án, vùng Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí K322A, A330S, và P331S. Theo một số phương án, vùng Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí K322A, P331S, và E430G. Theo một số phương án, vùng Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí A330S, P331S, và E430G. Theo một số phương án, vùng Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí S267E và L328F. Theo một số phương án, vùng Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở vị trí C127S. Theo một số phương án, vùng Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E345R, E430G và S440Y

Theo các phương án nhất định, kháng thể gắn kết thụ thể Fc gamma có isotyp IgG2. Theo một số phương án, kháng thể gắn kết thụ thể Fc gamma chứa vùng hằng định IgG2 của người. Theo một số phương án, vùng hằng định IgG2 của người bao gồm vùng Fc. Theo một số phương án, kháng thể gắn kết thụ thể Fc gamma gắn kết thụ thể Fc ức chế. Theo các phương án nhất định, thụ thể Fc ức chế là thụ thể Fc-gamma ức chế IIB (FcγIIB). Theo một số phương án, vùng Fc chứa một hoặc nhiều cải biến. Ví dụ, theo một số phương án, vùng Fc chứa một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin (ví dụ, so với vùng Fc dạng dại của cùng isotyp). Theo một số phương án, một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin được chọn từ V234A (Alegre et al., (1994) *Transplantation* 57:1537-1543. 31; Xu et al., (2000) *Cell Immunol*, 200:16-26), G237A (Cole et al. (1999) *Transplantation*, 68:563-571), H268Q, V309L, A330S, P331S (US 2007/0148167; Armour et al. (1999) *Eur J Immunol* 29: 2613-2624; Armour et al. (2000) *The Haematology Journal* 1(Suppl.1):27; Armour et al. (2000) *The Haematology Journal* 1(Suppl.1):27), C232S, và/hoặc C233S (White et al.(2015) *Cancer Cell* 27, 138–148), S267E, L328F (Chu et al., (2008) *Mol Immunol*, 45:3926-3933), M252Y, S254T, và/hoặc T256E, trong đó vị trí axit amin tuân theo quy tắc đánh số EU hoặc Kabat.

Theo một số phương án, kháng thể gắn kết thụ thể Fc gamma có isotyp IgG2

với miền hằng định chuỗi nặng chứa gốc thay thế axit amin C127S, trong đó vị trí axit amin tuân theo quy tắc đánh số EU hoặc Kabat (White et al., (2015) *Cancer Cell* 27, 138-148; Lightle et al., (2010) *PROTEIN SCIENCE* 19:753-762; và WO2008079246).

Theo một số phương án, kháng thể gắn kết thụ thể Fc gamma có isotyp IgG2 với miền hằng định chuỗi nhẹ Kappa chứa gốc thay thế axit amin C214S, trong đó vị trí axit amin tuân theo quy tắc đánh số EU hoặc Kabat (White et al., (2015) *Cancer Cell* 27, 138-148; Lightle et al., (2010) *PROTEIN SCIENCE* 19:753-762; và WO2008079246).

Theo các phương án nhất định, kháng thể gắn kết thụ thể Fc gamma có isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể gắn kết thụ thể Fc gamma chứa vùng hằng định IgG1 của chuột nhắt. Theo một số phương án, kháng thể gắn kết thụ thể Fc gamma chứa vùng hằng định IgG1 của người. Theo một số phương án, vùng hằng định IgG1 của người bao gồm vùng Fc. Theo một số phương án, kháng thể gắn kết thụ thể Fc gamma gắn kết thụ thể Fc ức chế. Theo các phương án nhất định, thụ thể Fc ức chế là thụ thể Fc-gamma ức chế IIB (FcγIIB). Theo một số phương án, vùng Fc chứa một hoặc nhiều cải biến. Ví dụ, theo một số phương án, vùng Fc chứa một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin (ví dụ, so với vùng Fc dạng dại của cùng isotyp). Theo một số phương án, một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin được chọn từ N297A (Bolt S et al. (1993) *Eur J Immunol* 23:403-411), D265A (Shields et al. (2001) *R. J. Biol. Chem.* 276, 6591–6604), D270A, L234A, L235A (Hutchins et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci* USA, 92:11980-11984; Alegre et al., (1994) *Transplantation* 57:1537-1543. 31; Xu et al., (2000) *Cell Immunol*, 200:16-26), G237A (Alegre et al. (1994) *Transplantation* 57:1537-1543. 31; Xu et al. (2000) *Cell Immunol*, 200:16-26), P238D, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E (McEarchern et al., (2007) *Blood*, 109:1185-1192), P331S (Sazinsky et al., (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105:20167-20172), S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, và/hoặc T394D, trong đó vị trí axit amin tuân theo quy tắc đánh số EU hoặc Kabat.

Theo một số phương án, kháng thể bao gồm miền hằng định chuỗi nặng isotyp IgG2 1(CH1) và vùng bản lề (White et al., (2015) Cancer Cell 27, 138–148). Theo các phương án nhất định, CH1 của isotyp IgG2 và vùng bản lề chứa trình tự axit amin của ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP

AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECP PCP (SEQ ID NO:58). Theo một số phương án, vùng Fc của kháng thể chứa gốc thay thế axit amin S267E, gốc thay thế axit amin L328F, hoặc cả hai, và/hoặc gốc thay thế axit amin N297A hoặc N297Q, trong đó vị trí axit amin tuân theo quy tắc đánh số EU hoặc Kabat.

Theo các phương án nhất định, kháng thể gắn kết thụ thể Fc gamma có isotyp IgG4. Theo một số phương án, kháng thể gắn kết thụ thể Fc gamma chứa vùng hằng định IgG4 của người. Theo một số phương án, vùng hằng định IgG4 của người bao gồm vùng Fc. Theo một số phương án, kháng thể gắn kết thụ thể Fc gamma gắn kết thụ thể Fc ức chế. Theo các phương án nhất định, thụ thể Fc ức chế là thụ thể Fc-gamma ức chế IIB (FcγIIB). Theo một số phương án, vùng Fc chứa một hoặc nhiều cải biến. Ví dụ, theo một số phương án, vùng Fc chứa một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin (ví dụ, so với vùng Fc dạng dại của cùng isotyp). Theo một số phương án, một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin được chọn từ L235A, G237A, S228P, L236E (Reddy et al., (2000) *J Immunol*, 164:1925-1933), S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, và/hoặc T256E, trong đó vị trí axit amin tuân theo quy tắc đánh số EU hoặc Kabat.

Theo các phương án nhất định, kháng thể gắn kết thụ thể Fc gamma có isotyp IgG2/4 lai hóa. Theo một số phương án, kháng thể gắn kết thụ thể Fc gamma bao gồm trình tự axit amin chứa axit amin 118 đến 260 theo hệ thống đánh số EU, hoặc Kabat của IgG2 của người và axit amin 261-447 theo hệ thống đánh số EU hoặc Kabat của IgG4 của người (WO 1997/11971; WO 2007/106585).

Theo các phương án nhất định, kháng thể chứa vùng hằng định IgG4 của chuột nhắt (Bartholomaeus, et al. (2014). *J. Immunol.* 192, 2091–2098).

Theo một số phương án, vùng Fc còn chứa một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin bổ sung được chọn từ A330L, L234F; L235E, và P331S theo hệ thống đánh số EU, hoặc Kabat; và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo các phương án nhất định, kháng thể chứa một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin trong vùng Fc ở vị trí gốc được chọn từ C127S, L234A, L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, E345R, E430G, S440Y, và tổ hợp bất kỳ của chúng, trong đó việc đánh số các gốc tuân theo quy tắc đánh số EU hoặc Kabat. Theo

một số phương án, vùng Fc chứa gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G, L243A, L235A, và P331S, trong đó việc đánh số vị trí gốc tuân theo quy tắc đánh số EU. Theo một số phương án, vùng Fc chứa gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G và P331S, trong đó việc đánh số vị trí gốc tuân theo quy tắc đánh số EU. Theo một số phương án, vùng Fc chứa gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G và K322A, trong đó việc đánh số vị trí gốc tuân theo quy tắc đánh số EU. Theo một số phương án, vùng Fc chứa gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G, A330S, và P331S, trong đó việc đánh số vị trí gốc tuân theo quy tắc đánh số EU. Theo một số phương án, vùng Fc chứa gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G, K322A, A330S, và P331S, trong đó việc đánh số vị trí gốc tuân theo quy tắc đánh số EU. Theo một số phương án, vùng Fc chứa gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G, K322A, và A330S, trong đó việc đánh số vị trí gốc tuân theo quy tắc đánh số EU. Theo một số phương án, vùng Fc chứa gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G, K322A, và P331S, trong đó việc đánh số vị trí gốc tuân theo quy tắc đánh số EU. Theo một số phương án, vùng Fc chứa gốc thay thế axit amin ở các vị trí S267E và L328F, trong đó việc đánh số vị trí gốc tuân theo quy tắc đánh số EU. Theo một số phương án, vùng Fc chứa gốc thay thế axit amin ở vị trí C127S, trong đó việc đánh số vị trí gốc tuân theo quy tắc đánh số EU. Theo một số phương án, vùng Fc chứa gốc thay thế axit amin ở các vị trí E345R, E430G và S440Y, trong đó việc đánh số vị trí gốc tuân theo quy tắc đánh số EU.

Theo một số phương án, kháng thể mà gắn kết protein SIRPA có thể bao gồm kháng thể làm giảm mức tế bào của SIRPA (ví dụ, mức bề mặt tế bào của SIRPA), ức chế tương tác (ví dụ, gắn kết) giữa SIRPA và/hoặc một hoặc nhiều phối tử SIRPA, và ức chế một hoặc nhiều hoạt tính của protein SIRPA. Kháng thể như vậy ức chế một hoặc nhiều hoạt tính của protein SIRPA hoặc bằng cách ngăn ngừa tương tác (ví dụ, gắn kết) giữa SIRPA và một hoặc nhiều phối tử SIRPA hoặc bằng cách ngăn ngừa sự tải nạp tín hiệu từ miền ngoại bào của SIRPA vào tế bào chất tế bào với sự có mặt của một hoặc nhiều phối tử SIRPA. Kháng thể cũng có thể ức chế một hoặc nhiều hoạt tính của protein SIRPA bằng cách làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA bằng cách gây ra sự suy biến SIRPA, sự khử nhạy SIRPA, sự phân tách SIRPA, quá trình nội bộ hóa SIRPA, quá trình loại bỏ SIRPA, quá trình điều hòa giảm sự biểu hiện của SIRPA, và/hoặc sự suy biến lysosom của SIRPA. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA như vậy có thể không hoạt hóa tạm thời SIRPA.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể có tính đặc hiệu epitop của kháng thể chủ vận tạm thời kháng SIRPA theo sáng chế nhưng có miền Fc không có khả năng gắn kết các thụ thể Fcg và do đó không thể, ví dụ, kết cụm và hoạt hóa tạm thời SIRPA.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều hoạt tính sau: khả năng làm giảm gắn kết của protein SIRPA với một hoặc nhiều phối tử SIRPA, như glycolipit chứa axit sialic hoặc glycoprotein chứa axit sialic, khả năng làm giảm gắn kết của chất ức chế protein truyền tín hiệu xytokin (SOCS) (ví dụ, protein SOCS3) đến protein SIRPA, khả năng làm tăng sự suy biến proteasom của protein SIRPA, khả năng làm giảm sự biểu hiện chức năng của SIRPA trên bề mặt của tế bào tua tuần hoàn, đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, tế bào T, và/hoặc tiểu thần kinh đệm, khả năng làm giảm quá trình phosphoryl hóa Tyr-340 và Tyr-358 bởi tyrosin kinaza họ Src như LCK và FYN, khả năng làm giảm việc tiếp nhận thêm và gắn kết với protein phosphataza đặc hiệu tyrosin SHP1 và SHP2, khả năng làm giảm việc tiếp nhận thêm và gắn kết với PLC-g1, hoạt động như nucleotit guanin, yếu tố trao đổi đối với Dynamin-1, khả năng làm giảm việc tiếp nhận thêm và gắn kết với Crkl, khả năng làm giảm việc tiếp nhận thêm và gắn kết với tyrosin kinaza lá lách Syk, khả năng làm giảm việc tiếp nhận thêm và gắn kết với protein gắn kết với thụ thể yếu tố sinh trưởng SH3-SH2-SH3 2 (Grb2), khả năng làm giảm việc tiếp nhận thêm và gắn kết với nhiều SH2 chứa protein, khả năng làm tăng sự di động canxi nội bào, khả năng điều biến sự tạo ra các xytokin tiền viêm IL-1β, IL-8, và TNF-α, khả năng làm giảm hoạt tính của phosphoinositit 3-kinaza, khả năng làm tăng sự phát triển của bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào tua, tế bào T, và/hoặc tiểu thần kinh đệm, khả năng làm tăng sự sống sót của bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào tua, tế bào T, và/hoặc tiểu thần kinh đệm, khả năng làm tăng tyrosin quá trình phosphoryl hóa trên nhiều protein tế bào, khả năng làm tăng hoạt tính thực bào của bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào tua và/hoặc tiểu thần kinh đệm, khả năng làm tăng quá trình tăng sinh tế bào của bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào tua, tế bào T, và/hoặc tiểu thần kinh đệm, khả năng làm tăng quá trình phosphoryl hóa các phân tử truyền tín hiệu làm trung gian sự truyền tín hiệu ITAM, khả năng làm tăng chức năng của các thụ thể nhận diện mẫu, khả năng làm tăng chức năng của thụ thể giống Toll, khả năng làm tăng chức năng của các thụ thể kiểu phân tử liên quan đến

tổn thương (DAMP), khả năng điều biến sự biểu hiện của thụ thể C-C chemokin 7 (CCR7), và khả năng làm tăng thanh thải các mảnh vụn tế bào và protein.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có vùng Fc hiển thị gắn kết giảm với một hoặc nhiều thụ thể Fcγ. Các ví dụ về các vùng Fc như vậy và cải biến được đề xuất trong Bảng 3 dưới đây. Theo một số phương án, kháng thể có isotyp Fc được liệt kê trong Bảng 3 dưới đây.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế với mức gắn kết làm giảm với thụ thể Fc gamma có isotyp Fc được liệt kê trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Isotyp Fc của kháng thể kháng SIRPA được lấy làm ví dụ với mức gắn kết với thụ thể Fc gamma giảm

Isotyp Fc	Đột biến (Sơ đồ đánh số EU)
IgG1	N297A hoặc N297Q và/hoặc D270A
IgG1	D265A, D270A, và/hoặc N297A
IgG1	L234A và L235A
IgG2	V234A và G237A
IgG4	F235A và G237A và E318A E233P và/hoặc F234V N297A hoặc N297Q
IgG4	S228P và L236E S241P S241P và L248E S228P và F234A và L235A
IgG2	H268Q và V309L và A330S và P331S
IgG1	C220S và C226S và C229S và P238S
IgG1	C226S và C229S và E233P và L234V, và L235A
IgG1	E233P và L234V và L235A và G236-được khuyết đoạn P238A D265A N297A A327Q hoặc A327G P329A
IgG1	K322A và L234A và L235A
IgG1	L234F và L235E và P331S
IgG1 hoặc IgG4	T394D
IgG2	C232S hoặc C233S N297A hoặc N297Q
IgG2	V234A và G237A và P238S và H268A và V309L và A330S và P331S
IgG1, IgG2, hoặc IgG4	delta a, b, c, ab, ac, g cải biến
IgG1	Đột biến bất kỳ trong số các đột biến được liệt kê trên đây cùng với A330L hoặc L234F và/hoặc L235E và/hoặc P331S
IgG1, IgG2, hoặc IgG4	Đột biến bất kỳ trong số các đột biến được liệt kê trên đây cùng với M252Y và/hoặc S254T và/hoặc T256E

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng SIRPA có isotyp IgG1. Theo

một số phương án, kháng thể chứa vùng hằng định IgG1 của chuột nhắt. Theo một số phương án, kháng thể chứa vùng hằng định IgG1 của người. Theo một số phương án, vùng hằng định IgG1 của người bao gồm vùng Fc. Theo một số phương án, vùng Fc chứa một hoặc nhiều cải biến. Ví dụ, theo một số phương án, vùng Fc chứa một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin (ví dụ, so với vùng Fc dạng dại của cùng isotyp).

Theo một số phương án, một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin được chọn từ N297A, N297Q (Bolt S et al. (1993) *Eur J Immunol* 23:403-411), D265A, D270A, L234A, L235A (McEarchern et al., (2007) *Blood*, 109:1185-1192), C226S, C229S (McEarchern et al., (2007) *Blood*, 109:1185-1192), P238S (Davis et al., (2007) *J Rheumatol*, 34:2204-2210), E233P, L234V (McEarchern et al., (2007) *Blood*, 109:1185-1192), P238A, A327Q, A327G, P329A (Shields RL, et al., (2001) *J Biol Chem*. 276(9):6591-604), K322A, L234F, L235E (Hezareh, et al., (2001) J Virol *75*, 12161–12168; Oganesyan et al., (2008). *Acta Crystallographica 64*, 700–704), P331S (Oganesyan et al., (2008) *Acta Crystallographica 64*, 700–704), T394D (Wilkinson et al. (2013) *MAbs* 5(3): 406–417), A330L, M252Y, S254T, và/hoặc T256E, trong đó vị trí axit amin tuân theo quy tắc đánh số EU hoặc Kabat. Theo các phương án nhất định, vùng Fc còn bao gồm gốc khuyết đoạn axit amin ở vị trí tương ứng với glyxin 236 theo quy tắc đánh số EU hoặc Kabat.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA có isotyp IgG1 với chuỗi nặng vùng hằng định chứa gốc thay thế axit amin C220S theo quy tắc đánh số EU hoặc Kabat. Theo một số phương án, vùng Fc còn chứa một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin bổ sung được chọn từ A330L, L234F; L235E, và/hoặc P331S theo quy tắc đánh số EU hoặc Kabat. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng SIRPA có isotyp IgG2. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA chứa vùng hằng định IgG2 của người. Theo một số phương án, vùng hằng định IgG2 của người bao gồm vùng Fc. Theo một số phương án, vùng Fc chứa một hoặc nhiều cải biến. Ví dụ, theo một số phương án, vùng Fc chứa một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin (ví dụ, so với vùng Fc dạng dại của cùng isotyp). Theo một số phương án, một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin được chọn từ P238S, V234A, G237A, H268A, H268Q, H268E, V309L, N297A, N297Q, V309L, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, và/hoặc T256E, trong đó vị trí axit amin tuân theo quy tắc đánh số EU hoặc Kabat (Vafa O. et al., (2014) Methods 65:114–126).

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng SIRPA có isotyp IgG4. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA chứa vùng hằng định IgG4 của người. Theo một số phương án, vùng hằng định IgG4 của người bao gồm vùng Fc. Theo một số phương án, vùng Fc chứa một hoặc nhiều cải biến. Ví dụ, theo một số phương án, vùng Fc chứa một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin (ví dụ, so với vùng Fc dạng dại của cùng isotyp). Theo một số phương án, một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin được chọn từ E233P, F234V, L235A, G237A, E318A (Hutchins et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci* USA, 92:11980-11984), S228P, L234A/F234A, L236E, S241P, L248E (Reddy et al., (2000) *J Immunol*,164:1925-1933; Angal et al., (1993) *Mol Immunol.* 30(1):105-8; US 8614299 B2; Vafa O. et al., (2014) Methods 65:114–126), T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, và/hoặc N297Q, trong đó vị trí axit amin tuân theo quy tắc đánh số EU hoặc Kabat. Theo một số phương án kháng thể có isotyp IgG4, và bao gồm gốc thay thế axit amin S228P ở vị trí gốc 228, thay thế axit amin F234A ở vị trí gốc 234, và thay thế axit amin L235A ở vị trí gốc 235 (vị trí gốc theo hệ thống đánh số EU).

Theo một số phương án, vùng Fc còn chứa một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin bổ sung được chọn từ M252Y, S254T, và/hoặc T256E, trong đó vị trí axit amin tuân theo quy tắc đánh số EU hoặc Kabat.

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, Fc kháng thể đã được cải biến là Fc được cải biến IgG1. Theo một số phương án, Fc được cải biến IgG1 bao gồm một hoặc nhiều cải biến. Ví dụ, theo một số phương án, Fc được cải biến IgG1 bao gồm một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin (ví dụ, so với vùng Fc dạng dại của cùng isotyp). Theo một số phương án, một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin được chọn từ N297A (Bolt S et al. (1993) *Eur J Immunol* 23:403-411), D265A (Shields et al. (2001) *R. J. Biol. Chem.* 276, 6591–6604), L234A, L235A (Hutchins et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci* USA, 92:11980-11984; Alegre et al., (1994) *Transplantation* 57:1537-1543. 31; Xu et al., (2000) *Cell Immunol*, 200:16-26), G237A (Alegre et al. (1994) *Transplantation* 57:1537-1543. 31; Xu et al. (2000) *Cell Immunol*, 200:16-26), C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E (McEarchern et al., (2007) *Blood*, 109:1185-1192), P331S (Sazinsky et al., (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105:20167-20172), S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, và/hoặc T256E, trong đó vị trí axit amin tuân theo quy tắc đánh số EU.

Theo một số phương án của Fc bất kỳ trong số các Fc được cải biến IgG1, Fc bao gồm đột biến N297A theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc bao gồm các đột biến D265A và N297A theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc bao gồm đột biến D270A theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án, Fc được cải biến IgG1 bao gồm các đột biến L234A và L235A theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc bao gồm các đột biến L234A và G237A theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc bao gồm các đột biến L234A, L235A và G237A theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc bao gồm một hoặc nhiều (bao gồm tất cả) đột biến P238D, L328E, E233, G237D, H268D, P271G và A330R theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc bao gồm một hoặc nhiều đột biến S267E/L328F theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc bao gồm các đột biến P238D, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G và A330R theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc bao gồm các đột biến P238D, L328E, G237D, H268D, P271G và A330R theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc bao gồm các đột biến P238D, S267E, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G và A330R theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc bao gồm các đột biến P238D, S267E, L328E, G237D, H268D, P271G và A330R theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc bao gồm các đột biến C226S, C229S, E233P, L234V, và L235A theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc bao gồm các đột biến L234F, L235E, và P331S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc bao gồm các đột biến S267E và L328F theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc bao gồm các đột biến S267E theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế của chuỗi nặng vùng hằng định 1 (CH1) và vùng bản lề của IgG1 bằng CH1 và vùng bản lề của IgG2 (axit amin 118-230 của IgG2 theo hệ thống đánh số EU) bằng Kappa chuỗi nhẹ.

Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc bao gồm hai hoặc

nhiều gốc thay thế axit amin làm tăng sự kết cụm kháng thể mà không hoạt hóa bổ thể so với kháng thể tương ứng có vùng Fc không bao gồm hai hoặc nhiều gốc thay thế axit amin. Theo đó, theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc được cải biến IgG1 là kháng thể bao gồm vùng Fc, trong đó kháng thể bao gồm gốc thay thế axit amin ở vị trí E430G và một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin trong vùng Fc ở vị trí gốc được chọn từ: L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, và tổ hợp bất kỳ của chúng theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án, Fc được cải biến IgG1 bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G, L243A, L235A, và P331S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án, Fc được cải biến IgG1 bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G và P331S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án, Fc được cải biến IgG1 bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G và K322A theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án, Fc được cải biến IgG1 bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G, A330S, và P331S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án, Fc được cải biến IgG1 bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G, K322A, A330S, và P331S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án, Fc được cải biến IgG1 bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G, K322A, và A330S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án, Fc được cải biến IgG1 bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G, K322A, và P331S theo hệ thống đánh số EU.

Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc được cải biến IgG1 có thể còn bao gồm trong bản mô tả này có thể được kết hợp với đột biến A330L (Lazar et al. Proc Natl Acad Sci USA, 103:4005-4010 (2006)), hoặc một hoặc nhiều đột biến L234F, L235E, và/hoặc P331S (Sazinsky et al. *Proc Natl Acad Sci* USA, 105:20167-20172 (2008)), theo quy tắc đánh số EU, để khử bỏ quá trình hoạt hóa bổ thể. Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc được cải biến IgG1 có thể còn bao gồm một hoặc nhiều A330L, A330S, L234F, L235E, và/hoặc P331S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc được cải biến IgG1 có thể còn bao gồm một hoặc nhiều đột biến để tăng cường thời gian bán rã của kháng thể trong huyết thanh của người (ví dụ, một hoặc nhiều (bao gồm tất cả) đột biến M252Y, S254T, và T256E theo quy tắc đánh số EU). Theo một số phương án của Fc được cải biến IgG1 bất kỳ, Fc được cải biến IgG1 có thể còn bao gồm một hoặc nhiều E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y,

S440Y, và/hoặc S440W theo hệ thống đánh số EU.

Các khía cạnh khác của sáng chế đề xuất kháng thể có vùng hằng định đã được cải biến (tức là các vùng Fc). Kháng thể phụ thuộc vào gắn kết với thụ thể FcgR để hoạt hóa các thụ thể đã được hướng đích có thể mất hoạt tính chủ vận của nó nếu được thao tác di truyền để khử bỏ gắn kết FcgR (xem, ví dụ, Wilson et al. Cancer Cell 19:101-113 (2011); Armour at al. *Immunology* 40:585-593 (2003); và White et al. *Cancer Cell* 27:138-148 (2015)). Như vậy, đã nghĩ rằng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế với tính đặc hiệu epitop đúng có thể hoạt hóa đích kháng nguyên, với tác dụng phụ tối thiểu, khi kháng thể có miền Fc từ isotyp IgG2 của người (CH1 và vùng bản lề) hoặc dạng khác của miền Fc có khả năng ưu tiên gắn kết thụ thể FcgRIIB r ức chế, hoặc biến thể của chúng.

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, Fc kháng thể đã được cải biến là Fc đã được cải biến IgG2. Theo một số phương án, Fc đã được cải biến IgG2 bao gồm một hoặc nhiều cải biến. Ví dụ, theo một số phương án, Fc đã được cải biến IgG2 bao gồm một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin (ví dụ, so với vùng Fc dạng dại của cùng isotyp). Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin được chọn từ V234A (Alegre et al. *Transplantation* 57:1537-1543 (1994); Xu et al. *Cell Immunol*, 200:16-26 (2000)); G237A (Cole et al. *Transplantation*, 68:563-571 (1999)); H268Q, V309L, A330S, P331S (US 2007/0148167; Armour et al. *Eur J Immunol* 29: 2613-2624 (1999); Armour et al. *The Haematology Journal* 1(Suppl.1):27 (2000); Armour et al. *The Haematology Journal* 1(Suppl.1):27 (2000)), C219S, và/hoặc C220S (White et al. *Cancer Cell* 27, 138-148 (2015)); S267E, L328F (Chu et al. *Mol Immunol*, 45:3926-3933 (2008)); và M252Y, S254T, và/hoặc T256E theo quy tắc đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí V234A và G237A theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí C219S hoặc C220S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí A330S và P331S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí S267E và L328F theo hệ thống đánh số EU.

Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin C127S theo quy tắc đánh số EU (White et al., (2015) *Cancer Cell* 27, 138-148; Lightle et al. *Protein Sci.* 19:753-762 (2010); và WO 2008/079246). Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, kháng thể có isotyp IgG2 với miền hằng định chuỗi nhẹ Kappa bao gồm gốc thay thế axit amin C214S theo quy tắc đánh số EU (White et al. *Cancer Cell* 27:138-148 (2015); Lightle et al. *Protein Sci.* 19:753-762 (2010); và WO 2008/079246).

Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin C220S theo quy tắc đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, kháng thể có isotyp IgG2 với miền hằng định chuỗi nhẹ Kappa bao gồm gốc thay thế axit amin C214S theo quy tắc đánh số EU.

Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin C219S theo quy tắc đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, kháng thể có isotyp IgG2 với miền hằng định chuỗi nhẹ Kappa bao gồm gốc thay thế axit amin C214S theo quy tắc đánh số EU.

Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm miền hằng định chuỗi nặng isotyp IgG2 1(CH1) và vùng bản lề (White et al. *Cancer Cell* 27:138-148 (2015)). Theo các phương án nhất định của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, CH1 của isotyp IgG2 và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin của 118-230 theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, vùng Fc của kháng thể bao gồm gốc thay thế axit amin S267E, thay thế axit amin L328F, hoặc cả hai, và/hoặc thay thế axit amin N297A hoặc N297Q theo quy tắc đánh số EU.

Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, Fc còn bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin ở các vị trí E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, và S440W theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, Fc có thể còn bao gồm một hoặc nhiều đột biến để tăng cường thời gian bán rã của kháng thể trong huyết thanh của người (ví dụ, một hoặc nhiều (bao gồm tất cả) của đột biến M252Y, S254T, và T256E theo quy tắc đánh số EU). Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, Fc có thể còn bao gồm A330S và P331S.

Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, Fc là Fc lai IgG2/4. Theo một số phương án, Fc lai IgG2/4 bao gồm IgG2 aa 118 đến 260 và IgG4 aa 261 đến 447. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin ở các vị trí H268Q, V309L, A330S, và P331S theo hệ thống đánh số EU.

Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG1 và/hoặc IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin bổ sung được chọn từ A330L, L234F; L235E, hoặc P331S theo hệ thống đánh số EU; và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo các phương án nhất định của Fc đã được cải biến IgG1 và/hoặc IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin ở vị trí gốc được chọn từ C127S, L234A, L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, E345R, E430G, S440Y, và tổ hợp bất kỳ của chúng theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG1 và/hoặc IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G, L243A, L235A, và P331S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG1 và/hoặc IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G và P331S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG1 và/hoặc IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G và K322A theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG1 và/hoặc IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G, A330S, và P331S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG1 và/hoặc IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G, K322A, A330S, và P331S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG1 và/hoặc IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G, K322A, và A330S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG1 và/hoặc IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G, K322A, và P331S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG1 và/hoặc IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí S267E và L328F theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG1 và/hoặc IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở vị trí C127S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG1 và/hoặc IgG2 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E345R, E430G và

S440Y theo hệ thống đánh số EU.

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, Fc kháng thể đã được cải biến là Fc đã được cải biến IgG4. Theo một số phương án, Fc đã được cải biến IgG4 bao gồm một hoặc nhiều cải biến. Ví dụ, theo một số phương án, Fc đã được cải biến IgG4 bao gồm một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin (ví dụ, so với vùng Fc dạng dại của cùng isotyp). Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG4 bất kỳ, một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin được chọn từ L235A, G237A, S229P, L236E (Reddy et al. *J Immunol* 164:1925-1933(2000)), S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, và/hoặc T256E theo quy tắc đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG4 bất kỳ, Fc có thể còn bao gồm L235A, G237A, và E318A theo quy tắc đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG4 bất kỳ, Fc có thể còn bao gồm S228P và L235E theo quy tắc đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG4 bất kỳ, Fc đã được cải biến IgG4 có thể còn bao gồm S267E và L328F theo quy tắc đánh số EU.

Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG4 bất kỳ, Fc đã được cải biến IgG4 bao gồm có thể được kết hợp với đột biến S228P theo quy tắc đánh số EU (Angal et al. *Mol Immunol*. 30:105-108 (1993)) và/hoặc với một hoặc nhiều đột biến được mô tả trong (Peters et al. *J Biol Chem*. 287(29):24525-33 (2012)) để tăng cường độ ổn định của kháng thể.

Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG4 bất kỳ, Fc đã được cải biến IgG4 có thể còn bao gồm một hoặc nhiều đột biến để tăng cường thời gian bán rã của kháng thể trong huyết thanh của người (ví dụ, một hoặc nhiều (bao gồm tất cả) đột biến M252Y, S254T, và T256E theo quy tắc đánh số EU).

Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG4 bất kỳ, Fc bao gồm L235E theo hệ thống đánh số EU. Theo các phương án nhất định của Fc đã được cải biến IgG4 bất kỳ, Fc bao gồm một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin ở vị trí gốc được chọn từ C127S, F234A, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, E345R, E430G, S440Y, và tổ hợp bất kỳ của chúng, theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG4 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G, L243A, L235A, và P331S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG4 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí

E430G và P331S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG4 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G và K322A theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG4 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở vị trí E430 theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG4 bất kỳ, vùng Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E430G và K322A theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG4 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí S267E và L328F theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG4 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở vị trí C127S theo hệ thống đánh số EU. Theo một số phương án của Fc đã được cải biến IgG4 bất kỳ, Fc bao gồm gốc thay thế axit amin ở các vị trí E345R, E430G và S440Y theo hệ thống đánh số EU.

Kháng thể cải biến khác

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể, kháng thể là dẫn xuất. Thuật ngữ "dẫn xuất" để chỉ phân tử bao gồm cải biến hóa học không phải là cài xen, khuyết đoạn, hoặc thay thế axit amin (hoặc axit nucleic). Theo các phương án nhất định, dẫn xuất bao gồm cải biến cộng hóa trị, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gắn kết hóa học với polyme, lipit, hoặc các gốc vô cơ hoặc hữu cơ khác. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết kháng nguyên đã được cải biến hóa học có thể có thời gian bán rã tuần hoàn lớn hơn so với protein gắn kết kháng nguyên không được cải biến hóa học. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết kháng nguyên đã được cải biến hóa học có thể có khả năng hướng đích đã được cải thiện đối với tế bào, mô, và/hoặc cơ quan mong muốn. Theo một số phương án, dẫn xuất protein gắn kết kháng nguyên được cải biến cộng hóa trị để bao gồm một hoặc nhiều gốc đính kèm polyme hòa tan trong nước, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyetylen glycol, polyoxyetylen glycol, hoặc polypropylen glycol. Xem, ví dụ, các patent Mỹ số 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 và 4179337. Theo các phương án nhất định, dẫn xuất protein gắn kết kháng nguyên bao gồm một hoặc nhiều polyme, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, monometoxy-polyetylen glycol, dextran, xenluloza, copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymetylxenluloza, polyvinyl pyrolidon, poly-1, 3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme etylen/maleic anhydrua, polyaminoaxit (là homopolyme hoặc là copolyme ngẫu nhiên), poly-(N-

vinyl pyrolidon)-polyetylen glycol, homopolyme propylen glycol, co-polyme polypropylen oxit/etylen oxit, polyol đã được polyoxyetyl hóa (ví dụ, glyxerol) và rượu polyvinylic, cũng như hỗn hợp của các polyme như vậy.

Theo các phương án nhất định, dẫn xuất được cải biến cộng hóa trị với tiểu đơn vị polyetylen glycol (PEG). Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều polyme hòa tan trong nước được gắn kết ở một hoặc nhiều vị trí cụ thể, ví dụ, ở đầu tận cùng amino, của dẫn xuất. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều polyme hòa tan trong nước ngẫu nhiên được gắn vào một hoặc nhiều chuỗi bên của dẫn xuất. Theo các phương án nhất định, PEG được sử dụng để cải thiện khả năng trị liệu đối với protein gắn kết kháng nguyên. Theo các phương án nhất định, PEG được sử dụng để cải thiện khả năng trị liệu đối với kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người. Các phương pháp nhất định như vậy được thảo luận, ví dụ, trong patent Mỹ số 6133426, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn nhằm mục đích bất kỳ.

Chất tương tự peptit thường được sử dụng trong ngành công nghiệp dược phẩm dưới dạng thuốc không peptit có các đặc tính tương tự với các đặc tính của peptit khuôn mẫu. Các dạng hợp chất không peptit này được gọi là "chất mô phỏng peptit" hoặc "chất mô phỏng peptido" Fauchere, J. Adv. Drug Res., 15:29 (1986); và Evans et al. *J. Med. Chem.*, 30:1229 (1987), được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn nhằm mục đích bất kỳ. Các hợp chất như vậy thường được phát triển với sự hỗ trợ của mô hình phân tử được vi tính hóa. Chất mô phỏng peptit có cấu trúc tương tự như peptit hữu ích trong điều trị có thể được sử dụng để tạo ra tác dụng điều trị hoặc dự phòng tương tự. Nói chung, chất mô phỏng peptido có cấu trúc tương tự như polypeptit mô hình (tức là polypeptit có đặc tính sinh hóa hoặc hoạt tính dược lý), như kháng thể của người, nhưng có một hoặc nhiều liên kết cầu nối peptit tùy ý được thay thế bằng liên kết cầu nối được chọn từ: $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH{=}CH-$(cis và trans), $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$, và $-CH_2SO-$, bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sự thay thế có hệ thống của một hoặc nhiều axit amin của trình tự liên ứng bằng D-axit amin của cùng dạng (ví dụ, D-lysin thay cho L-lysin) có thể được sử dụng Theo các phương án nhất định để tạo ra peptit ổn định hơn. Ngoài ra, constrained peptit bao gồm trình tự liên ứng hoặc biến thể trình tự liên ứng về cơ bản giống hệt có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (Rizo và Gierasch Ann. Rev. Biochem., 61:387 (1992), được đưa vào bản mô tả này

bằng cách viện dẫn nhằm mục đích bất kỳ); Ví dụ, bằng cách bổ sung các gốc xystein bên trong có khả năng tạo ra cầu nối disulfua nội phân tử tạo vòng peptit.

Việc liên hợp thuốc bao gồm việc ngẫu hợp lượng độc tố tế bào có hoạt tính sinh học (chống ung thư) hoặc thuốc vào kháng thể hướng đích cụ thể chất đánh dấu khối u nhất định (ví dụ, polypeptit mà, lý tưởng, chỉ có thể tìm được trong hoặc trên tế bào khối u). Kháng thể theo dõi những protein này trong cơ thể và gắn chúng vào bề mặt của tế bào ung thư. Phản ứng hóa sinh giữa kháng thể và protein đích (kháng nguyên) kích hoạt tín hiệu trong tế bào khối u, mà sau đó hấp thụ hoặc tiếp nhận kháng thể cùng với độc tố tế bào. Sau khi ADC được nhập vào, thuốc gây độc tế bào được giải phóng và tiêu diệt tế bào ung thư. Do việc hướng đích này, thuốc lý tưởng có tác dụng phụ thấp hơn và mang lại cơ hội điều trị rộng hơn so với các tác nhân hóa trị liệu khác. Kỹ thuật liên hợp kháng thể được bộc lộ là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Jane de Lartigue OncLive July 5, 2012; ADC Review on antibody-drug conjugates; và Ducry et al. *Bioconjugate Chemistry* 21 (1):5-13 (2010).

Khung kháng thể

Kháng thể kháng SIRPA bất kỳ được đề cập trong bản mô tả này còn bao gồm khung (FR). Theo một số phương án, khung là khung globulin miễn dịch của người. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng SIRPA) bao gồm HVR như trong phương án bất kỳ nêu trên và còn bao gồm khung thể nhận của người, ví dụ, khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người. Khung globulin miễn dịch của người có thể là một phần của kháng thể của người, hoặc kháng thể không phải của người có thể được làm giống như kháng thể của người bằng cách thay thế một hoặc nhiều khung nội sinh bằng (các) vùng khung của người. Vùng khung của người có thể được sử dụng để làm giống như của người bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: vùng khung được chọn bằng cách sử dụng phương pháp "phù hợp nhất" (xem, ví dụ, Sims et al.*J. Immunol.* 151:2296 (1993)); vùng khung có nguồn gốc từ trình tự liên ứng của kháng thể của người của phân nhóm cụ thể của vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ (xem, ví dụ, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); và Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); vùng khung trưởng thành của người (được gây đột biến soma) hoặc vùng khung dòng mầm của người (xem, ví dụ, Almagro và Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); và vùng khung có nguồn gốc từ việc sàng lọc các thư viện FR (xem, ví dụ, Baca et al., *J. Biol.*

Chem. 272:10678-10684 (1997) và Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm một hoặc nhiều (ví dụ, một hoặc nhiều hơn, hai hoặc nhiều hơn, ba hoặc nhiều hơn, hoặc tất cả bốn) vùng khung được chọn từ FR1 của VH, FR2 của VH, FR3 của VH, và FR4 của VH (như được thể hiện trong Bảng 9). Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm FR1 của VH, trong đó FR1 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:25. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm FR2 của VH, trong đó FR2 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm FR3 của VH, trong đó FR3 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm FR4 của VH, trong đó FR4 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm FR1 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:25, FR2 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:26, FR3 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27, và FR4 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm FR1 của VH, FR2 của VH, FR3 của VH, và FR4 của VH của kháng thể kháng SIRPA 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, hoặc 3F9-25.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm một hoặc nhiều (ví dụ, một hoặc nhiều hơn, hai hoặc nhiều hơn, ba hoặc nhiều hơn, hoặc tất cả bốn) vùng khung được chọn từ FR1 của VL, FR2 của VL, FR3 của VL, và FR4 của VL (như được thể hiện trong Bảng 9). Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm FR1 của VL, trong đó FR1 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế bao gồm vùng

biến đổi chuỗi nhẹ gồm FR2 của VL, trong đó FR2 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm FR3 của VL, trong đó FR3 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:31. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm FR4 của VL, trong đó FR4 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:32. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế bao gồm vùnsg biến đổi chuỗi nhẹ gồm FR1 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29, FR2 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30, FR3 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:31, và FR4 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:32.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm FR1 của VL, FR2 của VL, FR3 của VL, và FR4 của VL của kháng thể kháng SIRPA 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, hoặc 3F9-25.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm FR1 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:25, FR2 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:26, FR3 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27, và FR4 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm FR1 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29, FR2 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30, FR3 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:31, và FR4 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:32. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm FR1 của VH, FR2 của VH, FR3 của VH, và FR4 của VH của kháng thể 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, hoặc 3F9-25, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm FR1 của VL, FR2 của VL, FR3 của VL, và FR4 của VL của kháng thể 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-

24, hoặc 3F9-25.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:47 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:48 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:49 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:51 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng SIRPA, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:52 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50.

Axit nucleic, vectơ, và tế bào vật chủ

Kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp và chế phẩm tái tổ hợp, ví dụ, như được mô tả trong patent Mỹ số 4816567. Theo một số phương án, axit nucleic phân lập có trình tự nucleotit mã hóa kháng thể kháng SIRPA bất kỳ theo sáng chế được đề xuất. Axit nucleic như vậy có thể mã hóa trình tự axit amin bao gồm V_L và/hoặc trình tự axit amin bao gồm V_H của kháng thể kháng SIRPA (ví dụ, chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể). Theo một số phương án, một hoặc nhiều vectơ (ví dụ, vectơ biểu hiện) bao gồm axit nucleic như vậy được đề xuất. Theo một số phương án, tế bào vật chủ bao gồm axit nucleic

như vậy cũng được đề xuất. Theo một số phương án, tế bào vật chủ bao gồm (ví dụ, đã được biến nạp với): (1) vectơ bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin bao gồm V_L của kháng thể và trình tự axit amin bao gồm V_H của kháng thể, hoặc (2) vectơ thứ nhất bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin bao gồm V_L của kháng thể và vectơ thứ hai bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin bao gồm V_H của kháng thể. Theo một số phương án, tế bào vật chủ là tế bào có nhân điển hình, ví dụ, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) hoặc tế bào bạch huyết (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20). Tế bào vật chủ theo sáng chế cũng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào đã được phân lập, tế bào đã được nuôi cấy *in vitro*, và tế bào đã được nuôi cấy *ex vivo*.

Phương pháp tạo ra kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế được đề xuất. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ theo sáng chế bao gồm axit nucleic mã hóa kháng thể kháng SIRPA, trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể tiếp theo được thu hồi từ tế bào vật chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào vật chủ).

Để sản xuất tái tổ hợp kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, axit nucleic mã hóa kháng thể kháng SIRPA được phân lập và cài xen vào một hoặc nhiều vectơ để tách dòng vô tính tiếp và/hoặc biểu hiện trong tế bào vật chủ. Axit nucleic như vậy có thể dễ dàng được phân lập và giải trình tự bằng cách sử dụng quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng đầu dò oligonucleotit mà có khả năng gắn kết cụ thể với các gen mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể).

Vectơ thích hợp bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể kháng SIRPA bất kỳ theo sáng chế, hoặc các mảnh được biểu hiện trên bề mặt tế bào hoặc polypeptit của chúng (bao gồm kháng thể) được đề cập trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vectơ tách dòng vô tính và vectơ biểu hiện. Vectơ tách dòng vô tính thích hợp có thể được cấu trúc theo kỹ thuật chuẩn, hoặc có thể được chọn từ một số lượng lớn vectơ tách dòng vô tính sẵn có trong lĩnh vực kỹ thuật này. Mặc dù vectơ tách dòng vô tính được chọn có thể thay đổi theo tế bào vật chủ được dự định để được sử dụng, vectơ tách dòng vô tính hữu ích nói chung có khả năng tự sao chép, có thể có một đích duy nhất đối với endonucleaza giới hạn cụ thể, và/hoặc có thể mang các gen để chất đánh dấu có thể được sử dụng trong việc chọn lọc các dòng vô tính bao gồm vectơ. Các ví dụ thích hợp bao gồm plasmit và virut vi khuẩn, ví dụ, pUC18, pUC19,

Bluescript (ví dụ, pBS SK+) và dẫn xuất của nó, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN thể thực khuẩn, và vectơ con thoi như pSA3 và pAT28. Các vectơ tách dòng vô tính này và các vectơ tách dòng vô tính khác là sẵn có từ nhà cung cấp thương mại như BioRad, Strategene, và Invitrogen.

Tế bào vật chủ thích hợp để tách dòng vô tính hoặc biểu hiện vectơ mã hóa kháng thể bao gồm tế bào chưa có nhân điển hình và tế bào có nhân điển hình. Ví dụ, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể được tạo ra ở vi khuẩn, đặc biệt là khi không cần có glycosyl hóa và Fc chức năng hiệu ứng. Để biểu hiện các mảnh kháng thể và polypeptit ở vi khuẩn (ví dụ, các patent Mỹ số 5648237, 5789199, và 5840523. Sau khi biểu hiện, kháng thể có thể được phân lập từ huyền phù đặc tế bào vi khuẩn trong phân đoạn hòa tan và có thể được tinh chế tiếp.

Ngoài các vi sinh vật chưa có nhân điển hình, các vi sinh vật có nhân điển hình, như nấm sợi hoặc nấm men, cũng tách dòng vô tính hoặc biểu hiện thích hợp các vật chủ cho vectơ mã hóa kháng thể, bao gồm các chủng nấm và nấm men có con đường glycosyl hóa đã được "làm giống như kháng thể của người", dẫn đến việc tạo ra kháng thể với kiểu glycosyl hóa một phần hoặc hoàn toàn (ví dụ, Gerngross *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004); và Li et al. *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)).

Tế bào vật chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể đã được glycosyl hóa cũng có thể có nguồn gốc từ sinh vật đa bào (động vật không xương sống và động vật có xương sống). Các ví dụ về tế bào động vật không xương sống bao gồm tế bào thực vật và sâu bọ. Nhiều chủng virut baculo đã được xác định có thể được sử dụng liên hợp với tế bào sâu bọ, đặc biệt là để chuyển nhiễm tế bào *Spodoptera frugiperda*. Môi trường nuôi cấy tế bào thực vật cũng có thể được sử dụng làm vật chủ (ví dụ, các patent Mỹ số 5959177, 6040498, 6420548, 7125978, và 6417429, mô tả công nghệ PLANTIBODIES™ để tạo ra kháng thể ở thực vật chuyển gen).

Tế bào động vật có xương sống cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, các dòng tế bào động vật có vú được điều chỉnh để phát triển trong huyền phù có thể là hữu ích. Các ví dụ khác về các dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu ích dòng CV1 của thận khỉ được biến nạp bằng SV40 (COS-7); dòng phôi thận của người (tế bào 293 hoặc 293 như được mô tả, ví dụ, trong Graham et al. *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); tế bào thận của chuột đồng non (BHK); tế bào sertoli của chuột nhắt (tế bào TM4 như

được mô tả, ví dụ, trong Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); tế bào thận khỉ (CV1); tế bào thận khỉ xanh châu Phi (VERO-76); tế bào ung thư biểu mô cổ của người (HELA); tế bào thận chó (MDCK; tế bào gan chuột trâu (BRL 3A); tế bào phổi của người (W138); tế bào gan của người (Hep G2); khối u vú chuột nhắt (MMT 060562); tế bào TRI, như được mô tả, ví dụ, trong Mather et al. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); tế bào MRC 5; và tế bào FS4. Các dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu ích khác bao gồm tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), bao gồm tế bào DHFR-CHO (Urlaub et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); và các dòng tế bào u tủy như Y0, NS0 và Sp2/0. Để xem xét về các dòng tế bào vật chủ của động vật có vú nhất định thích hợp để sản xuất kháng thể, xem, ví dụ, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

Dược phẩm/chế phẩm

Sáng chế đề xuất dược phẩm và/hoặc chế phẩm chứa kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Theo một số phương án, chất mang dược dụng tốt hơn là không độc cho người nhận ở liều lượng và nồng độ sử dụng. Kháng thể được đề cập trong bản mô tả này có thể được bào chế thành các chế phẩm ở dạng rắn, bán rắn, lỏng hoặc khí. Các ví dụ về các chế phẩm như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, viên nén, viên nang, bột, hạt, thuốc mỡ, dung dịch, thuốc đạn, thuốc tiêm, thuốc hít, gel, hạt vi cầu và dạng sol khí. Chất mang dược dụng có thể bao gồm, tùy thuộc vào chế phẩm mong muốn, chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng, không độc, là các chất dẫn thuốc thường được sử dụng để bào chế dược phẩm để dùng cho người và động vật. Theo các phương án nhất định, dược phẩm có thể bao gồm vật liệu bào chế để cải biến, duy trì hoặc bảo quản, ví dụ, độ pH, độ thẩm thấu, độ nhớt, độ trong, màu sắc, tính đẳng trương, mùi, mức vô trùng, độ ổn định, tốc độ hòa tan hoặc giải phóng, mức hấp thụ hoặc thâm nhập của dược phẩm.

Theo các phương án nhất định, chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit amin (như glyxin, glutamin, asparagin, arginin hoặc lysin); chất chống vi trùng; chất chống oxy hóa (như axit ascorbic, natri sulfua hoặc natri hydro-sulfua); dung dịch đệm (như borat, bicacbonat, Tris-HCl, xitrat, phosphat hoặc các axit

hữu cơ khác); chất trộn (như mannitol hoặc glyxin); chất chelat hóa (như axit etylendiamin tetraaxetic (EDTA)); chất tạo phức (như cafein, polyvinylpyrolidon, beta-xyclodextrin hoặc hydroxypropyl-beta-xyclodextrin); chất độn; monosacarit; disacarit; và các hydrat cacbon khác (như glucoza, mannoza hoặc dextrin); protein (như albumin huyết thanh, gelatin hoặc globulin miễn dịch); chất tạo màu, chất điều hương và chất pha loãng; chất nhũ hóa; polyme ưa nước (như polyvinylpyrolidon); polypeptit khối lượng phân tử thấp; đối ion tạo muối (như natri); chất bảo quản (như benzalkoni clorua, axit benzoic, axit salixylic, thimerosal, rượu phenetylic, metylparaben, propylparaben, clohexidin, axit sorbic hoặc hydro peroxit); dung môi (như glyxerin, propylen glycol hoặc polyetylen glycol); rượu đường (như mannitol hoặc sorbitol); chất tạo huyền phù; chất hoạt động bề mặt hoặc chất thấm ướt (như pluronics, PEG, sorbitan este, polysorbate như polysorbate 20, polysorbate 80, triton, trometamin, lexithin, cholesterol, tyloxapal); chất tăng cường độ ổn định (như sucroza hoặc sorbitol); chất tăng cường độ đẳng trương (như halogen của kim loại kiềm, tốt hơn là natri hoặc kali clorua, mannitol sorbitol); chất dẫn phân phối thuốc; chất pha loãng; tá dược và/hoặc chất bổ trợ dược dụng. Các ví dụ khác nữa về các chế phẩm thích hợp cho các kiểu dùng khác nhau có thể được tìm thấy trong Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Pharmaceutical Press 22nd ed. (2013). Để có đánh giá ngắn gọn về các phương pháp phân phối thuốc, xem, Langer, Science 249:1527-1533 (1990).

Chế phẩm thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch tiêm vô trùng đẳng trương nước và không nước, có thể chứa chất chống oxy hóa, dung dịch đệm, chất kìm hãm vi khuẩn, và dung dịch tạo cho chế phẩm đẳng trương với máu của người tiếp nhận được dự định, và huyền phù vô trùng nước và không nước có thể bao gồm chất tạo huyền phù, chất hòa tan, chất làm đặc, chất là ổn định, chất bảo quản.

Chế phẩm có thể được tối ưu hóa để duy trì và ổn định trong não hoặc hệ thần kinh trung ương. Khi chất này được dùng vào hộp sọ, mong muốn chất này được giữ lại trong hộp sọ, và không khuếch tán hoặc bằng cách khác vượt qua hàng rào máu não. Kỹ thuật làm ổn định bao gồm tạo liên kết ngang, multime hóa, hoặc tạo liên kết với các nhóm như polyetylen glycol, polyacrylamit, chất mang protein trung tính, v.v. để đạt được sự tăng khối lượng phân tử.

Các phương pháp khác để làm tăng mức giữ lại bao gồm sự bẫy kháng thể, như

kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, trong mô cấy ghép dễ suy biến sinh học hoặc mô cấy ghép dễ ăn mòn sinh học. Tốc độ giải phóng hoạt chất trị liệu được kiểm soát bởi tốc độ vận chuyển nhờ ma trận polyme, và sự suy biến sinh học của mô cấy ghép. Mô cấy ghép có thể là hạt, tấm, miếng, mảng, sợi, vi nang và các dạng tương tự và có thể có kích thước và hình dạng bất kỳ tương thích với vị trí cấy ghép. Chế phẩm polyme dễ suy biến sinh học có thể được dùng có thể là este hoặc ete hữu cơ, khi suy biến dẫn đến tạo ra các sản phẩm suy biến sinh lý chấp nhận được, bao gồm monome. Anhyđrit, amit, orthoeste hoặc các hợp chất tương tự, bằng chính nó hoặc kết hợp với các monome khác, có thể được sử dụng. Polyme sẽ là polyme ngưng tụ. Polyme có thể được tạo liên kết ngang hoặc không được tạo liên kết ngang. Được đặc biệt quan tâm là polyme của axit carboxylic hyđroxy béo, hoặc homo- hoặc copolyme, và polysacarit. Trong số các polyeste được quan tâm là polyme của axit D-lactic, axit L-lactic, axit raxemic lactic, axit glycolic, polycaprolacton, và các tổ hợp của chúng. Trong số các polysacarit đang quan tâm là canxi alginat, và xenluloza đã chức hóa, đặc biệt là carboxymetylxenluloza este xác định đặc điểm bởi nước không hòa tan, khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 5 kD đến 500 kD, v.v.. Hydrogel dễ suy biến sinh học cũng có thể được dùng trong mô cấy ghép theo sáng chế. Hydrogel thường là vật liệu copolyme, xác định đặc điểm bởi khả năng thấm chất lỏng.

Sử dụng trong điều trị

Như được đề cập trong bản mô tả này, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể được sử dụng để ngăn ngừa, giảm nguy cơ, hoặc điều trị bệnh và rối loạn.

Theo một khía cạnh của sáng chế, tác nhân điều hòa giảm SIRPA, ví dụ, kháng thể kháng SIRPA, được sử dụng làm tác nhân trị liệu. Các tác nhân như vậy được dùng để điều trị, làm thuyên giảm, và/hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc bệnh lý liên quan đến sự biểu hiện, hoạt tính và/hoặc truyền tín hiệu SIRPA ở đối tượng. Phác đồ điều trị được thực hiện bằng cách xác định đối tượng, ví dụ, bệnh nhân là người mắc (hoặc có nguy cơ phát triển) bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự biểu hiện, hoạt tính và/hoặc truyền tín hiệu SIRPA, ví dụ, ung thư hoặc rối loạn khối u khác, bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Theo một số phương án, tế bào có bệnh lý liên quan đến sự biểu hiện, hoạt tính, và/hoặc truyền tín hiệu SIRPA, biểu hiện phối tử SIRPA, ví dụ, CD47. Theo một số phương án, tế bào có bệnh lý liên quan đến sự biểu hiện, hoạt tính, và/hoặc truyền tín hiệu SIRPA, biểu hiện SIRPA.

Như được mô tả chi tiết hơn dưới đây, tác nhân điều hòa giảm SIRPA, ví dụ, kháng thể kháng SIRPA có thể được sử dụng kết hợp với tác nhân trị liệu bổ sung được sử dụng để điều trị bệnh hoặc bệnh lý liên quan đến sự biểu hiện, hoạt tính, hoặc tạo tín hiệu SIRPA. Các thuật ngữ "kết hợp" và "liên hợp" được sử dụng thay thế cho nhau trong sáng chế. Tác nhân trị liệu bổ sung được dùng kết hợp với kháng thể kháng SIRPA có thể được dùng trước khi, sau khi, hoặc đồng thời với tác nhân điều hòa giảm SIRPA, ví dụ, kháng thể kháng SIRPA.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm kháng thể kháng SIRPA, ví dụ, bao gồm kháng thể kháng SIRPA làm giảm biểu hiện của SIRPA trên bề mặt tế bào, nhưng không phong bế về cơ bản gắn kết của phối tử, ví dụ, CD47, với SIRPA, được dùng cho đối tượng người. Việc dùng kháng thể có thể khử bỏ hoặc ức chế hoặc cản trở chức năng biểu hiện, hoạt tính và/hoặc truyền tín hiệu của SIRPA được qua trung gian bởi phối tử gắn kết, ví dụ, CD47 gắn kết.

Theo một phương án bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự biểu hiện của SIRPA là ung thư. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA được dùng cho bệnh nhân mắc ung thư, như rối loạn tăng sinh huyết của tế bào tủy sống, biểu hiện SIRPA. Theo các phương án điển hình, kháng thể kháng SIRPA được dùng cho bệnh nhân mắc ung thư biểu hiện CD47.

Theo các phương án nhất định, ung thư để được ngăn ngừa hoặc điều trị bằng các phương pháp của sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ung thư biểu mô tế bào vảy (ví dụ, ung thư biểu mô tế bào vảy), ung thư phổi, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư phổi dạng vảy không phải tế bào nhỏ (NSCLC), ung thư biểu mô tuyến của phổi, ung thư biểu mô tế bào vảy của phổi, NSCLC không phải tế bào vảy, khối u thần kinh đệm, ung thư màng bụng, tế bào ung thư gan, ung thư dạ dày-ruột, ung thư dạ dày hoặc liên quan đến dạ dày bao gồm ung thư dạ dày-ruột và ung thư cơ chất dạ dày-ruột, ung thư thận (ví dụ, ung thư biểu mô tế bào sáng), ung thư buồng trứng, ung thư gan, ung thư đại trực tràng, ung thư màng trong dạ con, ung thư thận (ví dụ, ung thư biểu mô tế bào thận (RCC)), ung thư tuyến tiền liệt (ví dụ, ung thư biểu mô tuyến tiền liệt nhạy cảm với hormon), ung thư tuyến giáp, u nguyên bào thần kinh, ung thư tuyến tụy, u nguyên bào thần kinh đệm (u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng), ung thư cổ, ung thư dạ dày, ung thư bàng quang, u gan, ung thư vú, ung thư biểu mô ruột kết, và ung thư đầu và cổ (hoặc ung thư biểu

mô), ung thư dạ dày, khối u tế bào mầm, sacôm trẻ em, tế bào giết tự nhiên xoang mũi, khối u ác tính (ví dụ, tế bào ung thư hắc tố di căn, như tế bào ung thư hắc tố da hoặc nội nhãn cầu), ung thư xương, ung thư da, ung thư tử cung, ung thư vùng hậu môn, ung thư tinh hoàn, ung thư biểu mô ống dẫn trứng, ung thư biểu mô màng trong dạ con, ung thư biểu mô cổ tử cung, ung thư biểu mô âm đạo, ung thư biểu mô âm hộ, ung thư thực quản, ung thư ruột non, ung thư hệ nội tiết, ung thư tuyến cận giáp, ung thư tuyến thượng thận, sacôm mô mềm, ung thư niệu đạo, ung thư dương vật, khối u rắn trẻ em, ung thư niệu quản, ung thư biểu mô bể thận, ung thư hệ thần kinh trung ương (CNS), u lympho CNS nguyên phát, hội chứng rối loạn sinh tủy, ung thư đại trực tràng, khối u rắn, sự hình thành mạch khối u, khối u trục cột sống, khối u thần kinh đệm cuống não, u tuyến yên, sacôm Kaposi, ung thư biểu bì, ung thư tế bào vảy, u lympho tế bào T, các ung thư do môi trường gây ra bao gồm các ung thư gây ra bởi a-mi-ăng, các ung thư liên quan đến virut (ví dụ, khối u liên quan đến virut gây bệnh u nhú ở người (HPV)), và các dạng ung thư máu có nguồn gốc từ hoặc hai dòng tế bào máu chính, tức là dòng tế bào u tủy (tạo ra bạch cầu hạt, hồng cầu, tiểu cầu, đại thực bào và tế bào khổng lồ) hoặc dòng tế bào bạch huyết (tạo ra tế bào B, T, NK và huyết tương), như tất cả các dạng bệnh bạch cầu, u lympho, và u tủy, ví dụ, bệnh bạch cầu cấp tính, mãn tính, lympho bào và/hoặc tủy xương, như bệnh bạch cầu cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu tủy xương cấp tính (AML), bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (CLL), và bệnh bạch cầu tủy xương mãn tính (CML), bệnh bạch cầu chưa biệt hóa AML (M0), bệnh bạch cầu tủy xương (M1), bệnh bạch cầu tủy xương (M2; với tế bào thành thục), bệnh bạch cầu tiền tủy bào (M3 hoặc biến thể M3 [M3V]), bệnh bạch cầu dòng đơn cầu tủy (M4 hoặc biến thể M4 với chứng bạch cầu ưa axit [M4E]), bệnh bạch cầu đơn nhân (M5), bệnh bạch cầu dòng hồng cầu (M6), bệnh bạch cầu dòng mẫu tiểu cầu (M7), sacôm dạng hạt phân lập, và u lục; u lympho, như u lympho dạng Hodgkin (HL), u lympho không phải dạng Hodgkin (NHL), u lympho không đau, u lympho lan tỏa tế bào B lớn, ung thư máu tế bào B, ví dụ, u lympho tế bào B, u lympho tế bào T, u lympho tương bào lympho, u lympho tế bào B dòng mono, u lympho mô lympho liên kết màng nhày (MALT), u lympho tế bào lớn tự ghép (ví dụ, Ki 1+), u lympho tế bào T trưởng thành/bệnh bạch cầu, u lympho tế bào vỏ, u lympho tế bào T nguyên bào miễn dịch mạch máu, u lympho trung tâm mạch, u lympho tế bào T của ruột, u lympho tế bào B nguyên phát tại trung thất, u lympho nguyên bào lympho T tiền thân, nguyên

bào lympho T; và u lympho/bệnh bạch cầu (T-Lbly/T-ALL), u lympho tế bào T ngoại vi, u lympho nguyên bào lympho, rối loạn tăng sinh tế bào lympho sau cấy ghép, u lympho mô bào thực, u lympho hệ thần kinh trung ương sơ cấp, u lympho tràn dịch nguyên phát, u lympho nguyên bào lympho (LBL), khối u tạo máu của dòng bạch huyết, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, u lympho tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL) (bao gồm các bệnh nhân DLBCL kháng trị nguyên phát, kháng trị Rituximab, kháng trị với Rituximab/CHOP (xyclophosphamit, doxorubicin, vincristine, và prednisone), bệnh nhân DLBCL tái phát hoặc kháng trị (R/R), và/hoặc bệnh nhân DLBCL không đủ CAR-T), u lympho Burkitt, u lympho dạng nang, u lympho mô bào lan tỏa (DHL), u lympho tế bào lớn nguyên bào miễn dịch, u lympho nguyên bào lympho B tiền thân, u lympho tế bào T da (CTLC) (còn gọi là bệnh u sùi dạng nấm hoặc hội chứng Sezary), và u lympho tương bào lympho (LPL) với chứng đại globulin huyết Waldenstrom; u tủy, như u tủy IgG, u tủy chuỗi nhẹ, u tủy không tiết, u tủy tiềm tàng (còn gọi là u tủy không đau), u plasmo đơn độc, và bệnh đa u tủy xương, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (CLL), u lympho tế bào lông; khối u tạo máu của dòng tủy xương, khối u có nguồn gốc từ trung mô, bao gồm sacôm sợi và sacôm cơ vân; khối u ác tính tinh hoàn, ung thư biểu mô quái, khối u thần kinh trung ương và thần kinh ngoại vi, bao gồm u bào hình sao, u bao sợi thần kinh; khối u có nguồn gốc từ trung mô, bao gồm sacôm sợi, sacôm cơ vân, và sacôm xương; và các khối u khác, bao gồm khối u ác tính, bệnh khô da nhiễm sắc tố, u gai sừng, khối u ác tính tinh hoàn, ung thư bào nang tuyến giáp và ung thư biểu mô quái, khối u tạo máu của dòng lympho, ví dụ, khối u tế bào T và tế bào B, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các rối loạn tế bào T như bệnh bạch cầu tiền lympho bào tế bào T (T-PLL), bao gồm dạng tế bào nhỏ và dạng tế bào não; bệnh bạch cầu lympho bào hạt lớn (LGL) tốt hơn là dạng tế bào T; u lympho bảy âm tiết a/d T-NHL; u lympho tế bào T ngoại vi/hậu tuyến ức (kiểu phụ đa hình và nguyên bào miễn dịch); u lympho tế bào T trung tâm mạch (mũi); ung thư đầu hoặc cổ, ung thư thận, ung thư trực tràng, ung thư tuyến giáp; u lympho tủy cấp tính, cũng như các tổ hợp bất kỳ của các ung thư này. Kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để điều trị ung thư di căn.

Theo một số phương án, ung thư được chọn từ sacôm, ung thư bàng quang, ung thư não, ung thư vú, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư màng trong dạ con, ung thư thận, ung thư bể thận, bệnh bạch cầu, ung thư phổi, khối u ác tính, u lympho,

ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư buồng trứng, và sacôm sợi. Theo một số phương án, ung thư là ung thư biểu mô vú bộ ba âm tính. Theo một số phương án, ung thư có thể là ung thư giai đoạn sớm hoặc ung thư giai đoạn muộn. Theo một số phương án, ung thư có thể là khối u nguyên phát. Theo một số phương án, ung thư có thể là khối u di căn ở vị trí thứ hai có nguồn gốc từ dạng ung thư bất kỳ trong số các các dạng ung thư nêu trên.

Theo một số phương án, ung thư được chọn từ u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng; ung thư biểu mô thận tế bào sáng; ung thư biểu mô vỏ tuyến thượng thận; ung thư biểu mô tiết niệu bàng quang; u lympho tế bào B lớn lan tỏa; ung thư biểu mô tuyến phổi; ung thư biểu mô tuyến tụy, ung thư tế bào thận, u lympho không Hodgkin, bệnh bạch cầu tăng lympho bào cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu cấp tính dòng tủy (AML), bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu kinh dòng bạch cầu hạt mạn tính (CML), bệnh đa u tủy xương, ung thư biểu mô vú xâm lấn, ung thư biểu mô tế bào vảy cổ tử cung, ung thư biểu mô tuyến trong cổ tử cung, thư biểu mô ống mật, ung thư biểu mô tuyến ruột kết, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, ung thư biểu mô thực quản, ung thư biểu mô tế bào vảy đầu và cổ, ung thư biểu mô thận kỵ màu, ung thư biểu mô tế bào u nhú thận, u tế bào thần kinh đệm cấp độ thấp, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy phổi, u trung biểu mô, u nang tuyến thanh dịch, ung thư biểu mô tuyến tụy, bệnh u tủy thượng thận và u cận hạch, ung thư biểu mô tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tuyến trực tràng, khối u ác tính da, ung thư biểu mô tuyến dạ dày, khối u tế bào mầm tinh hoàn, ung thư biểu mô tuyến giáp, khối u tuyến ức, ung thư biểu mô màng trong dạ con thân tử cung, ung thư biểu mô-sacôm cổ tử cung, và khối u ác tính màng bồ đào.

Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa, giảm nguy cơ, hoặc điều trị cá thể mắc ung thư, trong đó cá thể khó chữa với chất ức chế trị liệu điểm kiểm tra, bằng cách cho cá thể dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế.

Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa, giảm nguy cơ, hoặc điều trị cá thể mắc ung thư, bằng cách cho cá thể dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể được

dùng liên hợp với tác nhân trị liệu mà hoạt động như chất ức chế điểm kiểm tra. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước cho cá thể dùng ít nhất một kháng thể gắn kết đặc hiệu với phân tử điểm kiểm tra miễn dịch ức chế, và/hoặc liệu pháp chống ung thư tiêu chuẩn khác hoặc đang nghiên cứu. Theo một số phương án, phân tử ức chế điểm kiểm tra được chọn từ PD1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, và CD73. Theo các phương án điển hình, tác nhân trị liệu là kháng thể đối với chất ức chế điểm kiểm tra được chọn từ D1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, hoặc CD73. Theo một số phương án, ít nhất một kháng thể gắn kết đặc hiệu với phân tử điểm kiểm soát ức chế được dùng kết hợp với kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế. Theo một số phương án, tổ hợp của kháng thể để hướng đến chất ức chế điểm kiểm tra được dùng liên hợp với kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể được dùng liên hợp với ít nhất một kháng thể chủ vận gắn kết đặc hiệu với protein điểm kiểm soát kích thích, ví dụ, kháng thể kháng CD40 chủ vận, kháng thể kháng OX40 chủ vận, kháng thể kháng ICOS chủ vận, kháng thể kháng CD28 chủ vận, kháng thể kháng TREM1 chủ vận, kháng thể kháng TREM2 chủ vận, kháng thể kháng CD137/4-1BB chủ vận, kháng thể kháng CD27 chủ vận, kháng thể protein GITR liên quan đến TNFR gây ra bởi kháng thể kháng glucocorticoit chủ vận, kháng thể kháng CD30 chủ vận, kháng thể kháng BTLA chủ vận, kháng thể kháng HVEM chủ vận, kháng thể kháng CD2 chủ vận, kháng thể kháng CD5 chủ vận, và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước cho cá thể dùng ít nhất một kháng thể gắn kết đặc hiệu với phân tử điểm kiểm tra miễn dịch ức chế, và/hoặc các liệu pháp chống ung thư tiêu chuẩn hoặc đang nghiên cứu khác. Theo một số phương án, ít nhất một kháng thể gắn kết đặc hiệu với phân tử điểm kiểm soát ức chế được dùng kết hợp với kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế. Theo một số phương án, ít nhất một kháng thể gắn kết đặc hiệu với phân tử điểm kiểm soát ức chế được chọn từ kháng thể kháng PD-L1, kháng thể kháng CTLA4, kháng thể kháng PD-

L2, kháng thể kháng PD-1, kháng thể kháng B7-H3, kháng thể kháng B7-H4, và kháng thể kháng HVEM, kháng thể suy giảm kháng lympho bào B và T (BTLA), kháng thể ức chế kháng giết tự nhiên (KIR), kháng thể kháng GAL9, kháng thể kháng TIM3, kháng thể kháng A2AR, kháng thể kháng LAG-3, kháng thể kháng phosphatidylserin, kháng thể kháng CD27, và tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo một số phương án, liệu pháp chống ung thư tiêu chuẩn hoặc đang nghiên cứu là một hoặc nhiều liệu pháp được chọn từ xạ trị liệu, hóa trị liệu gây độc tế bào, liệu pháp hướng đích, imatinib (Gleevec®), trastuzumab (Herceptin®), liệu pháp chuyển tế bào cho (ACT), liệu pháp chuyển tế bào T thụ thể kháng nguyên khảm (CAR-T), liệu pháp vắc-xin, và liệu pháp xytokin. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước cho cá thể dùng ít nhất một kháng thể gắn kết đặc hiệu với xytokin ức chế. Theo một số phương án, ít nhất một kháng thể gắn kết đặc hiệu với xytokin ức chế được dùng kết hợp với kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế. Theo một số phương án, ít nhất một kháng thể gắn kết đặc hiệu với xytokin ức chế được chọn từ kháng thể kháng CCL2, kháng thể kháng CSF-1, kháng thể kháng IL-2, và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước cho cá thể dùng ít nhất một kháng thể chủ vận gắn kết đặc hiệu với protein điểm kiểm tra miễn dịch kích thích. Theo một số phương án, ít nhất một kháng thể chủ vận gắn kết đặc hiệu với protein điểm kiểm soát kích thích được dùng kết hợp với kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế. Theo một số phương án, ít nhất một kháng thể chủ vận gắn kết đặc hiệu với protein điểm kiểm soát kích thích được chọn từ kháng thể kháng CD40 chủ vận, kháng thể kháng OX40 chủ vận, kháng thể kháng ICOS chủ vận, kháng thể kháng CD28 chủ vận, kháng thể kháng CD137/4-1BB chủ vận, kháng thể kháng CD27 chủ vận, kháng thể protein GITR liên quan đến TNFR gây ra bởi kháng thể kháng glucocorticoit chủ vận, và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế được dùng kết hợp với xạ trị liệu và/hoặc tác nhân hóa trị liệu. Tác nhân hóa trị liệu bao gồm, ví dụ, các nhóm sau: kháng chất chuyển hóa/tác nhân chống ung thư, như chất tương tự pyrimidin (5-fluorouracil, floxuridine, capecitabine, gemcitabine và cytarabine) và chất tương tự purin, chất đối kháng folat và các chất ức chế liên quan (methotrexate, pemetrexed, mercaptopurine, thioguanin, pentostatin và 2-clodeoxyadenosin (cladribine)); chất chống tăng sinh/chống phân bào bao gồm các sản phẩm tự nhiên

như alkaloit dừa cạn (vinblastine, vincristine, và vinorelbine), chất phá vỡ vi ống như taxane (paclitaxel, docetaxel), vincristin, vinblastin, nocodazole, epothilone, eribulin và navelbine; epidipodophyllotoxins (etoposide, teniposide); chất phá hủy ADN (actinomyxin, amsacrine, anthracycline, bleomycin, busulfan, camptothecin, carboplatin, chlorambucil, cisplatin, xyclophosphamit, cytoxan, dactinomyxin, daunorubicin, doxorubicin, epirubicin, hexametylmelaminoxaliplatin, iphosphamide, melphalan, merchlorehtamine, mitomyxin, mitoxantrone, nitrosourea, plicamycin, procarbazine, taxol, taxotere, temozolamide, teniposide, trietylenthiophosphoramide và etoposide (VP 16)); chất ức chế ADN metyltransferaza (azacytidine); chất kháng sinh như dactinomyxin (actinomyxin D), daunorubixin, doxorubixin (adriamyxin), idarubicin, anthracycline, mitoxantrone, bleomyxin, plicamyxin (mithramyxin) và mitomyxin; enzym (L-asparaginaza chuyển hóa có hệ thống L-asparagin và lấy đi tế bào không có khả năng tổng hợp chính asparagin của chúng); chất hủy tiểu cầu; chất alkyl hóa chống tăng sinh/chống phân bào như mù tạt nitơ (mechlorethamin, xyclophosphamit và các chất tương tự, melphalan, chlorambucil), etylenimin và metylmelamin (hexametylmelamin và thiotepa), alkylsulfonat (busulfan), nitrosoure (carmustine (BCNU) và các chất tương tự, streptozoxin), triazen (dacarbazin (DTIC)); chất chống chuyển hóa chống tăng sinh/chống phân bào như chất tương tự axit folic (methotrexate); phức hợp liên kết platin (cisplatin, carboplatin), procarbazin, hydroxyure, mitotan, aminoglutethimit; hormon, chất tương tự hormon (estrogen, tamoxifen, goserelin, bicalutamit, nilutamit) và chất ức chế aromataza (letrozol, anastrozol); chất chống đông tụ (heparin, muối heparin tổng hợp và các chất ức chế thrombin khác); chất phân hủy fibrin (như chất hoạt hóa plasminogen mô, streptokinaza và urokinaza), aspirin, dipyridamol, ticlopidin, clopidogrel, abciximab; chất chống di trú; chất chống tiết (breveldin); chất ức chế miễn dịch (xyclosporin, tacrolimus (FK-506), sirolimus (rapamycin), azathioprin, mycophenolat mofetil); hợp chất chống hình thành mạch (TNP470, genistein, pomalidomit) và chất ức chế yếu tố sinh trưởng (chất ức chế yếu tố sinh trưởng màng trong mạch (VEGF), như ziv-aflibercept; chất ức chế yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi (FGF)); chất ức chế chất đối kháng protein chết theo chương trình (IAP) (birinapant); chất ức chế histon deaxetylaza (HDAC) (vorinostat, romidepsin, chidamit, panobinostat, mocetinostat, abexinostat, belinostat, entinostat, resminostat, givinostat, quisinostat, SB939); chất ức

chế proteasom (ixazomib); chất phong bế thụ thể kích thích tố tăng huyết áp; chất cho oxit nitric; oligonucleotit đối nghĩa; kháng thể (trastuzumab, panitumumab, pertuzumab, cetuximab, adalimumab, golimumab, infliximab, rituximab, ocrelizumab, ofatumumab, obinutuzumab, alemtuzumab, abciximab, atlizumab, daclizumab, denosumab, efalizumab, elotuzumab, rovelizumab, ruplizumab, ustekinumab, visilizumab, gemtuzumab ozogamicin, brentuximb vedotin); thụ thể kháng nguyên khảm; chất ức chế chu trình tế bào (flavopiridol, roscovitin, bryostatin-1) và chất gây biệt hóa (tretinoin); chất ức chế mTOR, chất ức chế topoisomeraza (doxorubixin (adriamyxin), amsacrin, camptothexin, daunorubixin, dactinomyxin, eniposit, epirubixin, etoposit, idarubixin, irinotecan (CPT-11) và mitoxantrone, topotecan, irinotecan), corticosteroit (cortison, dexamethason, hydrocortison, metylpednisolon, prednison, và prenisolon); chất ức chế PARP (niraparib, olaparib); chất ức chế kinaza kết dính trung tâm (FAK) (defactinib (VS-6063), VS-4718, VS-6062, GSK2256098); chất ức chế kinaza tải nạp tín hiệu yếu tố sinh trưởng (cediranib, galunisertib, rociletinib, vandetanib, afatinib, EGF816, AZD4547); chất ức chế c-Met (capmatinib, INC280); chất ức chế ALK (ceritinib, crizotinib); chất gây rối loạn chức năng ty thể, các độc tố như Cholertoxin, rixin, ngoại độc tố Pseudomonas, độc tố Bordetella pertussis adenylat xyclaza, hoặc độc tố diphtheri, và chất hoạt hóa caspaza; và chất phá vỡ chất nhiễm sắc. Theo một số phương án, tác nhân hóa trị liệu là chất ức chế B-Raf, chất ức chế MEK, chất ức chế VEGF, chất ức chế VEGFR, chất ức chế tyrosin kinaza, chất chống phân bào, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế được dùng kết hợp với liệu pháp tế bào chuyển giao nuôi (ACT), liệu pháp chuyển tế bào T thụ thể kháng nguyên khảm (CAR-T), liệu pháp vắc-xin, và/hoặc liệu pháp xytokin.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế được dùng kết hợp với ít nhất một kháng thể gắn kết đặc hiệu với xytokin ức chế, ví dụ, xytokin ức chế như kháng thể kháng CCL2, kháng thể kháng CSF-1, hoặc kháng thể kháng IL-2.

Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế được dùng kết hợp với ít nhất một xytokin kích thích. Theo một số phương án mà có thể được kết hợp với phương án bất kỳ trong bản mô tả này, ít nhất một xytokin kích thích được chọn từ các thành viên họ IFN-α4, IFN-β, IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, CRP, IL-20, LIF, IFN-γ, OSM, CNTF, GM-CSF, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, CXCL10, IL-33,

MCP-1, MIP-1-beta, và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, tác nhân điều hòa giảm SIRPA, ví dụ, kháng thể kháng SIRPA, được dùng cho bệnh nhân có rối loạn thần kinh, hoặc được dùng để làm giảm rủi ro, khởi phát chậm hoặc ngăn ngừa rối loạn thần kinh. Theo một số phương án, rối loạn thần kinh là chứng sa sút trí tuệ, bao gồm chứng sa sút trí tuệ, chứng sa sút trí tuệ trán-thái dương, bệnh Alzheimer, chứng sa sút trí tuệ não mạch, chứng suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh Parkinson, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), bệnh Huntington, bệnh lý Tau, hoặc bệnh đa xơ cứng.

Theo một số phương án, tác nhân điều hòa giảm SIRPA, ví dụ, kháng thể kháng SIRPA, được dùng cho bệnh nhân có bệnh Parkinson, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, bệnh Huntington, bệnh lý Taus, hoặc bệnh đa xơ cứng. Theo một số phương án, tác nhân được dùng cho bệnh nhân có bệnh Creutzfeldt-Jakob, bệnh não úng thủy áp lực bình thường, bệnh Nasu-Hakola, đột quỵ, nhiễm trùng, chấn thương sọ não, bệnh liệt não tiến triển, chứng sa sút trí tuệ Pugilistica (bệnh não tổn thương mãn tính), hội chứng Parkinson liên kết với nhiễm sắc thể 17, bệnh Lytico-Bodig (phức hợp Parkinson-chứng sa sút trí tuệ Guam), chứng sa sút trí tuệ chiếm ưu thế, u hạch và u bạch cầu, u màng não xơ, bệnh viêm não toàn bộ xơ hóa bán cấp, bệnh não do chì, bệnh xơ cứng củ, bệnh Hallervorden-Spatz, bệnh tích tụ lipofuscin, bệnh Pick, bệnh thoái hóa hoạch nền vỏ não, bệnh hạt ưa bạc (AGD), bệnh thoái hóa thùy não trước, chứng sa sút trí tuệ với thể Lewy, bệnh teo đa hệ thống, hội chứng Shy-Drager, bệnh liệt não tiến triển, hoặc bệnh thoái hóa vỏ não hạch đáy.

Chứng sa sút trí tuệ

Chứng sa sút trí tuệ là hội chứng không cụ thể (tức là một nhóm các dấu hiệu và triệu chứng) là sự mất nghiêm trọng khả năng nhận thức toàn cầu ở một người trước đây không bị suy giảm nhận thức, vượt quá những gì có thể mong đợi từ quá trình lão hóa bình thường. Chứng sa sút trí tuệ có thể tĩnh do hậu quả của một chấn thương bộ não duy nhất. Theo cách khác, chứng sa sút trí tuệ có thể là tiến triển, dẫn đến việc suy giảm lâu dài làm tổn thương hoặc bệnh lý trong cơ thể. Mặc dù chứng sa sút trí tuệ phổ biến hơn nhiều trong quần thể người cao tuổi, nó cũng có thể xảy ra trước 65 tuổi. Các vùng nhận thức bị ảnh hưởng bởi chứng sa sút trí tuệ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trí nhớ, khoảng chú ý, ngôn ngữ và khả năng giải quyết vấn đề. Nói chung, triệu

chứng phải có trong ít nhất sáu tháng trước khi cá thể được chẩn đoán mắc chứng sa sút trí tuệ.

Các dạng chứng sa sút trí tuệ được lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chứng sa sút trí tuệ trán-thái dương, bệnh Alzheimer, chứng sa sút trí tuệ não mạch, chứng sa sút trí tuệ ngữ nghĩa, và chứng sa sút trí tuệ với thể Lewy.

Theo một số phương án, việc dùng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể ngăn ngừa, làm giảm nguy cơ, và/hoặc điều trị chứng sa sút trí tuệ. Theo một số phương án, kháng thể kháng SIRPA có thể điều biến một hoặc nhiều hoạt tính SIRPA ở cá thể mắc chứng sa sút trí tuệ.

Chứng sa sút trí tuệ trán-thái dương

Chứng sa sút trí tuệ trán-thái dương (FTD) là tình trạng bệnh do sự suy thoái dần của thùy trán của não. Theo thời gian, sự thoái hóa có thể tiến tới thùy thái dương. Chỉ đứng sau bệnh Alzheimer (AD) về mức độ phổ biến, FTD chiếm 20% các trường hợp chứng sa sút trí tuệ trước tuổi già. Các đặc điểm lâm sàng của FTD bao gồm trí nhớ kém, bất thường về hành vi, thay đổi tính cách và suy giảm ngôn ngữ (Cruts, M. & Van Broeckhoven, C., Trends Genet. 24:186-194 (2008); Neary, D., et al., *Neurology* 51:1546-1554 (1998); Ratnavalli, E., Brayne, C., Dawson, K. & Hodges, J. R., Neurology 58:1615-1621 (2002)).

Một phần đáng kể các trường hợp FTD được di truyền theo kiểu trội của nhiễm sắc thể thường, nhưng ngay cả trong một gia đình, các triệu chứng có thể trải rộng từ FTD với rối loạn hành vi, đến mất ngôn ngữ tiến triển nguyên phát, đến thoái hóa dây thần kinh Cortico-Basal. FTD, giống như hầu hết các bệnh thoái hóa thần kinh, có thể được đặc trưng bởi sự có mặt bệnh lý của các kết tập protein cụ thể trong não bị bệnh. Về mặt lịch sử, những mô tả đầu tiên về FTD đã ghi nhận sự có mặt của mức tích tụ trong tế bào thần kinh protein Tau đã được siêu phosphoryl hóa trong các đám rối sợi thần kinh hoặc cơ quan Pick. Vai trò nguyên nhân đối với protein liên kết trong vi ống Tau được hỗ trợ bởi việc xác định các đột biến trong gen mã hóa protein Tau trong một số họ (Hutton, M., et al., *Nature* 393:702-705 (1998). Tuy nhiên, phần lớn não của FTD không có sự tích tụ của Tau đã được phosphoryl hóa cao nhưng có tính đáp ứng miễn dịch với ubiquitin (Ub) và protein gắn kết ADN TAR. (TDP43) (Neumann, M., et al., *Arch. Neurol.* 64:1388-1394 (2007)). Đa số các trường hợp FTD có thể vùi Ub

(FTD-U) được chứng minh là mang đột biến gen Progranulin.

Theo một số phương án, việc dùng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, có thể ngăn ngừa, làm giảm nguy cơ, và/hoặc điều trị FTD. Theo một số phương án, việc dùng kháng thể kháng SIRPA có thể điều biến một hoặc nhiều hoạt tính SIRPA ở cá thể có FTD.

Bệnh Alzheimer

Bệnh Alzheimer (AD) là dạng chứng sa sút trí tuệ phổ biến nhất. Không có cách chữa trị cho căn bệnh này, bệnh sẽ nặng hơn khi tiến triển và cuối cùng dẫn đến tử vong. Thông thường, AD được chẩn đoán ở những người trên 65 tuổi. Tuy nhiên, bệnh Alzheimer khởi phát sớm ít phổ biến hơn có thể xảy ra sớm hơn nhiều. Các triệu chứng phổ biến của bệnh Alzheimer bao gồm, các triệu chứng hành vi, như khó nhớ các sự kiện gần đây; các triệu chứng nhận thức, lú lẫn, cáu kỉnh và hung hăng, thay đổi tâm trạng, rắc rối với ngôn ngữ và mất trí nhớ dài hạn. Khi bệnh tiến triển, các chức năng của cơ thể bị mất dần, cuối cùng dẫn đến tử vong. Bệnh Alzheimer phát triển trong một khoảng thời gian không xác định và thay đổi trước khi trở nên rõ rệt hoàn toàn và nó có thể tiến triển mà không được chẩn đoán trong nhiều năm.

Theo một số phương án, việc dùng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể ngăn ngừa, làm giảm nguy cơ, và/hoặc điều trị bệnh Alzheimer. Theo một số phương án, việc dùng kháng thể kháng SIRPA có thể điều biến một hoặc nhiều hoạt tính SIRPA ở cá thể mắc bệnh Alzheimer.

Bệnh Parkinson

Bệnh Parkinson, có thể được gọi là bệnh Parkinson vô căn hoặc nguyên phát, hội chứng cứng giảm vận động (HRS), hoặc chứng liệt rung, là rối loạn thoái hóa thần kinh của não ảnh hưởng đến việc kiểm soát hệ vận động. Sự chết dần dần của tế bào sản xuất dopamin trong não dẫn đến các triệu chứng chính của bệnh Parkinson. Thông thường, bệnh Parkinson được chẩn đoán ở những người trên 50 tuổi. Bệnh Parkinson là bệnh vô căn (không rõ nguyên nhân) ở hầu hết mọi người. Tuy nhiên, yếu tố di truyền cũng có vai trò nhất định đối với bệnh này.

Các triệu chứng của bệnh Parkinson bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, run bàn tay, cánh tay, chân, hàm và mặt, cứng cơ ở các chi và thân, chậm vận động (vận

động chậm), tư thế không ổn định, đi lại khó khăn, các vấn đề về tâm thần kinh, thay đổi lời nói hoặc hành vi, trầm cảm, lo lắng, đau đớn, rối loạn tâm thần, chứng sa sút trí tuệ, ảo giác và các vấn đề về giấc ngủ.

Theo một số phương án, việc dùng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể ngăn ngừa, làm giảm nguy cơ, và/hoặc điều trị bệnh Parkinson. Theo một số phương án, việc dùng kháng thể kháng SIRPA có thể điều biến một hoặc nhiều hoạt tính SIRPA ở cá thể mắc bệnh Parkinson.

Bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS)

Như được sử dụng trong bản mô tả này, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS) hoặc bệnh thần kinh vận động hoặc, bệnh Lou Gehrig được sử dụng thay thế cho nhau và để chỉ bệnh suy nhược với căn nguyên khác nhau, đặc trưng bởi sự suy nhược tiến triển nhanh, teo cơ và bó cơ, co cứng cơ, nói khó (rối loạn tiêu hóa), nuốt khó (khó nuốt) và thở khó (khó thở).

Đã cho thấy rằng Progranulin đóng vai trò trong ALS (Schymick, JC et al., (2007) J[0343] Neurol Neurosurg Psychiatry.;78:754-6) và bảo vệ một lần nữa sự phá hủy do các protein gây ra ALS như TDP-43 (Laird, AS et al., (2010). PLoS ONE 5: e13368). Cũng đã chứng minh được rằng tiền NGF gây chết qua trung gian p75 của tế bào thần kinh đệm ít gai và tế bào thần kinh tủy sống sau tổn thương tủy sống (Beatty et al., Neuron (2002),36, pp. 375-386; Giehl et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA (2004), 101, pp 6226-30).

Theo một số phương án, việc dùng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể ngăn ngừa, làm giảm nguy cơ, và/hoặc điều trị ALS. Theo một số phương án, việc dùng kháng thể kháng SIRPA có thể điều biến một hoặc nhiều hoạt tính SIRPA ở cá thể mắc bệnh xơ cứng teo cơ một bên.

Bệnh Huntington

Bệnh Huntington (HD) là bệnh thoái hóa thần kinh di truyền do đột biến gen trội ở gen Huntingtin (HTT) gây ra. Việc mở rộng bộ ba lặp lại xytokin-adenin-guanin (CAG) trong gen Huntingtin dẫn đến tạo ra một dạng đột biến của protein Huntingtin (Htt) được mã hóa bởi gen này. Protein Huntingtin đột biến (mHtt) này là một độc tố và góp phần gây chết tế bào thần kinh. Các triệu chứng của bệnh Huntington thường

xuất hiện nhiều nhất ở độ tuổi từ 35 đến 44, mặc dù chúng có thể xuất hiện ở mọi lứa tuổi.

Triệu chứng của bệnh Huntington bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vấn đề về kiểm soát vận động, giật, chuyển động ngẫu nhiên (múa giật), chuyển động mắt bất thường, suy giảm thăng bằng, co giật, khó nhai, khó nuốt, vấn đề nhận thức, thay đổi giọng nói, suy giảm trí nhớ, khó tư duy, mất ngủ, mệt mỏi, chứng sa sút trí tuệ, thay đổi tính cách, trầm cảm, lo lắng và hành vi cưỡng chế.

Theo một số phương án, việc dùng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể ngăn ngừa, làm giảm nguy cơ, và/hoặc điều trị bệnh Huntington (HD). Theo một số phương án, việc dùng kháng thể kháng SIRPA có thể điều biến một hoặc nhiều hoạt tính SIRPA ở cá thể mắc bệnh Huntington.

Bệnh lý Tau

Bệnh lý Tau, hoặc bệnh do protein tau gây ra, là một loại bệnh thoái hóa thần kinh gây ra bởi sự tập hợp của protein tau liên kết vi ống trong não. Bệnh Alzheimer (AD) là bệnh lý tau được biết đến nhiều nhất và liên quan đến sự tích tụ protein tau trong tế bào thần kinh dưới dạng các đám rối sợi thần kinh không hòa tan (NFT). Các bệnh và rối loạn Tau khác bao gồm liệt trên nhân tiến triển, chứng sa sút trí tuệ pugilistica (bệnh não do chấn thương mãn tính), chứng sa sút trí tuệ trước thái dương và bệnh Parkinson liên quan đến nhiễm sắc thể 17, bệnh Lytico-Bodig (phức hợp Parkinson-chứng sa sút trí tuệ Guam), chứng sa sút trí tuệ do tuổi già với các đám rối, u thần kinh đệm hạch và u hạch, bệnh viêm não xơ cứng bán cấp, bệnh não do chì, bệnh xơ cứng củ, bệnh Hallervorden-Spatz, bệnh tích tụ lipofuscin, bệnh Pick, chứng thoái hóa hoạch nền vỏ não, bệnh hạt ưa bạc (AGD), bệnh Huntington và chứng thoái hóa thùy não trước.

Theo một số phương án, việc dùng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể ngăn ngừa, làm giảm nguy cơ, và/hoặc điều trị bệnh lý Tau. Theo một số phương án, việc dùng kháng thể kháng SIRPA có thể điều biến một hoặc nhiều hoạt tính SIRPA ở cá thể mắc bệnh lý Tau.

Bệnh đa xơ cứng

Bệnh đa xơ cứng (MS) cũng có thể được gọi là bệnh xơ cứng rải rác hoặc bệnh

viêm cơ não lan tỏa. MS là bệnh viêm trong đó các vỏ myelin mỡ xung quanh sợi trục của não và tủy sống bị hư hỏng, dẫn đến quá trình khử men và sẹo cũng như một loạt các dấu hiệu và triệu chứng. MS ảnh hưởng đến khả năng giao tiếp với nhau một cách hiệu quả của tế bào thần kinh trong não và tủy sống. Tế bào thần kinh giao tiếp bằng cách gửi các tín hiệu điện được gọi là điện thế hoạt động xuống các sợi dài gọi là sợi trục, chứa trong một chất cách điện gọi là myelin. Trong MS, hệ thống miễn dịch của chính cơ thể tấn công và làm hỏng myelin. Khi myelin bị mất, các sợi trục không còn có thể dẫn tín hiệu một cách hiệu quả. MS khởi phát thường xảy ra ở thanh niên và phổ biến hơn ở phụ nữ.

Triệu chứng của MS bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thay đổi cảm giác, như mất nhạy cảm hoặc ngứa ran; cảm giác kim châm hoặc tê, như giảm cảm và dị cảm; yếu cơ; chứng giật rung; co thắt cơ bắp; khó khăn trong việc di chuyển; khó khăn phối hợp và cân bằng, như mất điều hòa; các vấn đề về lời nói, như rối loạn tiêu hóa hoặc nuốt, như chứng khó nuốt; các vấn đề về thị giác, như rung giật nhãn cầu, bệnh viêm dây thần kinh thị giác bao gồm chứng giảm thị lực và nhìn đôi; mệt mỏi; đau cấp tính hoặc mãn tính; và bàng quang và ruột khó khăn; suy giảm nhận thức ở các mức độ khác nhau; các triệu chứng cảm xúc của bệnh trầm cảm hoặc tâm trạng không ổn định; hiện tượng Uhthoff, là sự trầm trọng thêm của các triệu chứng hiện có do tiếp xúc với nhiệt độ môi trường cao hơn bình thường; và dấu hiệu Lhermitte, là cảm giác điện chạy dọc lưng khi cúi cổ.

Theo một số phương án, việc dùng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có thể ngăn ngừa, làm giảm nguy cơ, và/hoặc điều trị bệnh đa xơ cứng. Theo một số phương án, việc dùng kháng thể kháng SIRPA có thể điều biến một hoặc nhiều hoạt tính SIRPA ở cá thể mắc bệnh đa xơ cứng.

Theo một số phương án, đối tượng hoặc cá thể là động vật có vú. động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, động vật thuần hóa (ví dụ, bò, cừu, mèo, chó và ngựa), động vật linh trưởng (ví dụ, người và động vật linh trưởng không phải là người như khỉ), thỏ và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống). Theo một số phương án, đối tượng hoặc cá thể là người.

Kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này (và tác nhân trị liệu bổ sung bất kỳ) có thể được dùng bằng phương tiện thích hợp bất kỳ, bao gồm dùng ngoài đường

tiêu hóa, trong phổi, trong mũi, trong miệng, trong não thủy, trong sọ, trong xương sống, trong hoạt dịch, nội tủy mạc, qua đường miệng, khu trú, hoặc hít. Truyền ngoài đường tiêu hóa bao gồm truyền trong cơ, truyền tĩnh mạch dưới dạng truyền nhanh hoặc truyền liên tục trong một khoảng thời gian, trong động mạch, trong khớp, trong màng bụng, hoặc dưới da. Theo một số phương án, đường dùng là tiêm tĩnh mạch. Theo một số phương án, đường dùng là dưới da. Việc định liều có thể bằng con đường thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách tiêm, như tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da, tùy thuộc một phần vào việc dùng là ngắn hạn hay mãn tính. Phác đồ định liều khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc dùng đơn lẻ hoặc nhiều lần trong các thời điểm khác nhau, dùng thuốc tiêm nhanh và truyền xung được đề cập trong bản mô tả này.

Kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này sẽ được pha chế, định liều và sử dụng theo cách phù hợp với thực hành y tế tốt. Các yếu tố cần xem xét trong bối cảnh này bao gồm rối loạn cụ thể đang được điều trị, loài động vật có vú cụ thể đang được điều trị, tình trạng lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân của rối loạn, vị trí phân phối tác nhân, phương pháp dùng, phác đồ dùng, và các yếu tố khác đã biết đối với nhân viên y tế. Kháng thể không nhất thiết phải có, nhưng tùy ý được pha chế với một hoặc nhiều tác nhân hiện đang được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị chứng rối loạn được đề cập. Lượng hữu hiệu của các tác nhân khác như vậy phụ thuộc vào lượng kháng thể có trong chế phẩm, dạng rối loạn hoặc phương pháp điều trị, và các yếu tố khác được thảo luận trên đây. Các chế phẩm này thường được sử dụng với cùng liều lượng và với đường dùng như được đề cập trong bản mô tả này, hoặc nằm trong khoảng từ 1 đến 99% liều lượng được đề cập trong bản mô tả này, hoặc với liều lượng bất kỳ và theo đường dùng bất kỳ được xác định theo kinh nghiệm/lâm sàng là phù hợp.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp của kháng thể theo sáng chế (khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân trị liệu bổ sung khác) sẽ tùy thuộc vào loại bệnh được điều trị, loại kháng thể, mức độ nghiêm trọng và diễn biến của bệnh, liệu pháp kháng thể được sử dụng cho mục đích ngăn ngừa hay điều trị, liệu pháp trước đó, tiền sử lâm sàng và phản ứng của bệnh nhân với kháng thể, và quyết định của bác sĩ theo dõi. Kháng thể được sử dụng thích hợp cho bệnh nhân tại một thời điểm hoặc trong nhiều đợt điều trị.

Tùy thuộc vào loại và mức nghiêm trọng của bệnh, khoảng 1 ug/kg đến 15 mg/kg (ví dụ, 0,1 mg/kg-10 mg/kg) kháng thể có thể là liều lượng ứng viên ban đầu để dùng cho bệnh nhân, ví dụ, bằng một hoặc nhiều lần tiêm riêng biệt, hoặc bằng cách truyền liên tục. Một liều lượng thông thường hàng ngày có thể nằm trong khoảng từ 1 ug/kg đến 100 mg/kg hoặc cao hơn, tùy thuộc vào các yếu tố được đề cập trên đây. Đối với việc dùng lặp lại trong vài ngày hoặc lâu hơn, tùy thuộc vào tình trạng bệnh, việc điều trị nói chung sẽ được duy trì cho đến khi sự ức chế các triệu chứng bệnh mong muốn xảy ra. Liều lượng kháng thể được lấy làm ví dụ sẽ nằm trong khoảng từ 0,05 mg/kg đến khoảng 10 mg/kg. Do đó, một hoặc nhiều liều khoảng 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg hoặc 10 mg/kg (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng) có thể được sử dụng cho bệnh nhân. Các liều như vậy có thể được sử dụng không liên tục, ví dụ, mỗi tuần hoặc ba tuần một lần (ví dụ, sao cho bệnh nhân tiếp nhận được từ khoảng hai đến khoảng hai mươi, hoặc ví dụ, khoảng sáu liều kháng thể). Theo một số phương án, tần suất dùng là ba lần mỗi ngày, hai lần mỗi ngày, một lần mỗi ngày, cách ngày một lần, mỗi tuần một lần, hai tuần một lần, bốn tuần một lần, năm tuần một lần, sáu tuần một lần, cứ một lần bảy tuần, tám tuần một lần, chín tuần một lần, mười tuần một lần hoặc hàng tháng một lần, hai tháng một lần, ba tháng một lần hoặc lâu hơn. Có thể dùng liều tải ban đầu cao hơn, sau đó là một hoặc nhiều liều thấp hơn. Tuy nhiên, các phác đồ liều lượng khác có thể hữu ích. Sự tiến triển của liệu pháp này có thể dễ dàng được theo dõi bằng các kỹ thuật và thử nghiệm thông thường.

Sử dụng trong chẩn đoán

Theo một số phương án của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể, kháng thể kháng SIRPA bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này là hữu ích để phát hiện sự có mặt của SIRPA trong mẫu hoặc cá thể. Thuật ngữ "phát hiện" như được sử dụng trong bản mô tả này bao hàm sự phát hiện định tính và định lượng. Sáng chế mô tả phương pháp sử dụng kháng thể theo sáng chế nhằm mục đích chẩn đoán, như phát hiện SIRPA ở cá thể hoặc trong các mẫu mô có nguồn gốc từ cá thể. Theo một số phương án, cá thể là người.

Phương pháp phát hiện có thể liên quan đến việc định lượng kháng thể liên kết với kháng nguyên. Việc phát hiện kháng thể trong các mẫu sinh học có thể bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm kính hiển vi huỳnh quang miễn dịch, hóa tế bào miễn dịch, hóa mô miễn dịch, ELISA, phân tích FACS,

kết tủa miễn dịch hoặc chụp cắt lớp vi phát xạ positron. Theo một số phương án nhất định, kháng thể được dán nhãn phóng xạ, ví dụ, với 18F và sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng phân tích chụp cắt lớp phát xạ vi positron. Sự gắn kết kháng thể cũng có thể được định lượng ở bệnh nhân bằng các kỹ thuật không xâm lấn như chụp cắt lớp phát xạ positron (PET), chụp cắt lớp vi tính tia X, chụp cắt lớp vi tính phát xạ đơn photon (SPECT), chụp cắt lớp vi tính (CT) và chụp cắt lớp vi tính trục (CON MÈO).

Vật phẩm sản xuất

Sáng chế đề xuất vật phẩm sản xuất (ví dụ, kit) bao gồm kháng thể kháng SIRPA được đề cập trong bản mô tả này. Vật phẩm sản xuất có thể bao gồm một hoặc nhiều đồ chứa bao gồm kháng thể được đề cập trong bản mô tả này. Đồ chứa có thể là bao gói thích hợp bất kỳ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lọ nhỏ, chai, bình, bao bì linh hoạt (ví dụ, Mylar bít kín hoặc túi nhựa), và các loại đồ chứa tương tự. Đồ chứa có thể là liều đơn vị, gói số lượng lớn (ví dụ, gói nhiều liều) hoặc liều đơn vị nhỏ.

Theo một số phương án, kit có thể còn bao gồm tác nhân thứ hai. Theo một số phương án, tác nhân thứ hai là dung dịch đệm hoặc chất pha loãng dược dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, như nước kìm khuẩn dùng để tiêm (BWFI), nước muối được tạo đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Theo một số phương án, tác nhân thứ hai là tác nhân hoạt dược như được mô tả trên đây.

Theo một số phương án của vật phẩm sản xuất bất kỳ, vật phẩm sản xuất còn bao gồm hướng dẫn sử dụng phù hợp với các phương pháp của sáng chế này. Các hướng dẫn thường bao gồm thông tin về liều lượng, lịch dùng thuốc và đường dùng cho mục đích điều trị. Theo một số phương án, các hướng dẫn này bao gồm mô tả về việc sử dụng kháng thể kháng SIRPA phân lập theo sáng chế (ví dụ, kháng thể kháng SIRPA được đề cập trong bản mô tả này) để ngăn ngừa, làm giảm nguy cơ, hoặc điều trị cá thể mắc bệnh, rối loạn, hoặc tổn thương được chọn từ chứng sa sút trí tuệ, chứng sa sút trí tuệ trán-thái dương, bệnh Alzheimer, chứng sa sút trí tuệ não mạch, chứng sa sút trí tuệ hỗn hợp, bệnh Creutzfeldt-Jakob, bệnh não úng thủy áp lực bình thường, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, bệnh Huntington, bệnh lý Tau, bệnh Nasu-Hakola, đột quỵ, tổn thương cấp tính, tổn thương mãn tính, bệnh luput, bệnh viêm ruột kết cấp tính và mãn tính, bệnh viêm khớp dạng thấp, chữa lành vết thương, bệnh Crohn, bệnh viêm ruột, bệnh viêm loét đại tràng, bệnh béo phì, bệnh sốt rét, chứng run bản chất, bệnh

luput hệ thần kinh trung ương, bệnh Behcet, bệnh Parkinson, chứng sa sút trí tuệ với thể Lewy, bệnh teo đa hệ thống, hội chứng Shy-Drager, bệnh liệt não tiến triển, bệnh thoái hóa vỏ não hạch đáy, bệnh viêm não tủy rải rác cấp tính, rối loạn u hạt, bệnh u hạt, bệnh lão hóa, bệnh động kinh co giật, tổn thương tủy sống, chấn thương sọ não, bệnh thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi tác, bệnh tăng nhãn áp, bệnh viêm võng mạc sắc tố, bệnh thoái hóa hoàng điểm, nhiễm trùng đường hô hấp, nhiễm trùng huyết, nhiễm trùng mắt, nhiễm trùng toàn thân, bệnh luput, bệnh viêm khớp, bệnh đa xơ cứng, mật độ xương thấp, loãng xương, tăng sinh xương, bệnh hủy xương, bệnh Paget của xương, và ung thư bao gồm ung thư bàng quang, ung thư não, ung thư vú, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư màng trong dạ con, ung thư thận, ung thư tế bào thận, ung thư bể thận, bệnh bạch cầu, ung thư phổi, khối u ác tính, u lympho không Hodgkin, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư buồng trứng, sacôm sợi, bệnh bạch cầu tăng lympho bào cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu cấp tính dòng tủy (AML), bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu kinh dòng bạch cầu hạt mạn tính (CML), bệnh đa u tủy xương, bệnh đa hồng cầu, bệnh tăng tiểu cầu bản chất, bệnh xơ tủy nguyên phát hoặc vô căn, chứng xơ cứng tủy nguyên phát hoặc vô căn, khối u có nguồn gốc tủy sống, khối u biểu hiện SIRPA, ung thư tuyến giáp, nhiễm khuẩn, bệnh mụn giộp CNS, nhiễm ký sinh trùng, nhiễm Trypanosome, nhiễm Cruzi, nhiễm Pseudomonas aeruginosa, nhiễm Leishmania donovani, nhiễm Streptococcus nhóm B, nhiễm Campylobacter jejuni, nhiễm Neisseria meningiditis, HIV typ I và bệnh cúm Haemophilus, theo các phương pháp bất kỳ theo sáng chế. Theo một số phương án, hướng dẫn bao gồm hướng dẫn sử dụng kháng thể kháng SIRPA và tác nhân thứ hai (ví dụ, tác nhân hoạt dược thứ hai).

Sáng chế sẽ được hiểu đầy đủ hơn bằng cách tham khảo các ví dụ sau. Tuy nhiên, các ví dụ này không nên hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Tất cả các trích dẫn trong toàn bộ bản mô tả được kết hợp rõ ràng bằng cách tham khảo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau được cung cấp chỉ nhằm minh họa và không giới hạn phạm vi của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ dễ dàng hiểu rằng các thông số khác nhau có thể được thay đổi hoặc cải biến để thu được kết quả về cơ bản tương tự.

Ví dụ 1: Tạo ra kháng thể kháng SIRPA

Trình tự axit amin của protein SIRPA của người là như được nêu dưới đây trong SEQ ID NO: 1. SIRPA của người chứa peptit tín hiệu nằm ở các gốc amin 1-30 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1. SIRPA của người chứa miền dạng biến đổi giống globulin miễn dịch ngoại bào (IgV) nằm ở các gốc amin 32-137 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1; trình tự miền dạng hằng định giống globulin miễn dịch ngoại bào (IgC) bổ sung nằm ở các gốc amin 148-247 và 254-348 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1; miền xuyên màng nằm ở các gốc amin 374-394 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1; và miền nội bào nằm ở các gốc amin 395-504 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1.

Trình tự axit amin SIRPA v1 của người (SEQ ID NO: 1):

```
      10         20         30         40         50
MEPAGPAPGR LGPLLCLLLA ASCAWSGVAG EEELQVIQPD KSVLVAAGET
      60         70         80         90        100
ATLRCTATSL IPVGPIQWFR GAGPGRELIY NQKEGHFPRV TTVSDLTKRN
     110        120        130        140        150
NMDFSIRIGN ITPADAGTYY CVKFRKGSPD DVEFKSGAGT ELSVRAKPSA
     160        170        180        190        200
PVVSGPAARA TPQHTVSFTC ESHGFSPRDI TLKWFKNGNE LSDFQTNVDP
     210        220        230        240        250
VGESVSYSIH STAKVVLTRE DVHSQVICEV AHVTLQGDPL RGTANLSETI
     260        270        280        290        300
RVPPTLEVTQ QPVRAENQVN VTCQVRKFYP QRLQLTWLEN GNVSRTETAS
     310        320        330        340        350
TVTENKDGTY NWMSWLLVNV SAHRDDVKLT CQVEHDGQPA VSKSHDLKVS
     360        370        380        390        400
AHPKEQGSNT AAENTGSNER NIYIVVGVVC TLLVALLMAA LYLVRIRQKK
     410        420        430        440        450
AQGSTSSTRL HEPEKNAREI TQDTNDITYA DLNLPKGKKP APQAAEPNNH
     460        470        480        490        500
TEYASIQTSP QPASEDTLTY ADLDMVHLNR TPKQPAPKPE PSFSEYASVQ

VPRK
```

Phân tích cấu trúc tinh thể của phức hợp SIRPA-CD47 giải quyết vị trí gắn kết phối tử với các vòng biến đổi liên kết các sợi dạng tấm β trong miền IgV của SIRPA. Giao diện gắn kết CD47 cấu thành bởi các gốc axit amin S59-P65, L96-F104, và K123-D130 của SIRPA.

Nhiều dạng đa hình của SIRPA đã được xác định ở người. Vì hầu hết các biến

thể trong trình tự nằm ngoài vị trí gắn kết phối tử CD47, hầu hết các biến thể SIRPA được kiểm tra dường như gắn kết CD47 với các ái lực tương tự. Một thành viên khác của họ SIRP, SIRPB1, có chung mức tương đồng trình tự cao với SIRPA nhưng không gắn kết được CD47. Một sự thay thế A57M duy nhất là đủ để sắp xếp lại giao diện gắn kết phối tử S59-P65 để ngăn ngừa gắn kết với SIRPB1 với CD47. Hơn nữa, sự tương tác SIRPA-CD47 có tính đặc hiệu loài cao. SIRPA của người không gắn kết được với CD47 của chuột nhắt hoặc chuột cống hoặc bò (trong số các loài được thử nghiệm) và CD47 của người chỉ nhận diện một biến thể alen duy nhất của SIRPA chuột nhắt được biểu hiện bởi chủng chuột nhắt NOD.

Phân tích BLAST protein của trình tự SIRPA từ nhiều loài cho thấy mức đồng nhất đáng kể với SIRPA của người (FIG.1). Mức tương đồng trình tự cao trong họ SIRP là một thách thức đáng kể trong việc tạo ra các kháng thể đặc hiệu SIRPA trong khi vẫn duy trì được tính phản ứng chéo với các kháng nguyên SIRPA không phải của người.

Ví dụ 2: Xác định đặc điểm của kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người kháng SIRPA

Kháng thể m3F9 SIRPA của chuột nhắt được thảo luận trong bản mô tả này, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5.

Bảng 4 và Bảng 5 dưới đây liệt kê trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ tế bào lai của kháng thể kháng SIRPA của loài gặm nhấm, m3F9, cũng như trình tự tương ứng đã được làm giống như kháng thể của người (được gọi là "h3F9"). Kháng thể thứ nhất đã được làm giống như trình tự kháng thể của người đối với miền biến đổi chuỗi nặng kháng thể kháng SIRPA 3F9 (h3F9-H1) là "CDR-trao đổi" không có sự thay đổi về trình tự khung của người.

Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng đã được làm giống như kháng thể của người tiếp theo (h3F9-H2) sửa đổi các gốc khung ở các điểm nối CDR nhất định. (Xem FIG.2A.) FIG.2A liệt kê trình tự có khả năng đã được làm giống như kháng thể của người của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng SIRPA 3F9. Trình tự đã được làm giống như kháng thể của người được dựa trên khung nhận IGHV3-23*01 và vùng nối IGHJ4*01.

Trình tự đã được làm giống như kháng thể của người thứ nhất đối với miền biến đổi chuỗi nhẹ 3F9 của kháng thể kháng SIRPA (h3F9-L1) là "CDR-trao đổi" của miền biến đổi chuỗi nhẹ mà không có sự thay đổi trình tự khung của người. Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ đã được làm giống như kháng thể của người tiếp theo sửa đổi các gốc axit amin khung nhất định (h3F9-L2 và h3F9-L3). (Xem FIG.2B.) FIG.2B liệt kê trình tự có khả năng đã được làm giống như kháng thể của người của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng SIRPA 3F9.

Trình tự đã được làm giống như kháng thể của người được dựa trên khung nhận IGKV3-11*01 và vùng nối IGKJ2*01. Trình tự CDR được in đậm. Các định nghĩa CDR là AbM từ website www.bioinf.org.uk/abs/. "b" chú thích chuỗi bên bị ẩn; "p" chú thích bị ẩn một phần; "i" chú thích chuỗi bên ở giao diện giữa các miền VH và VL. Sự khác biệt về trình tự giữa các dòng mầm của người và loài gặm nhấm được chú thích bởi dấu hoa thị (*). Đột biến bổ sung tiềm năng trong các khung là các trình tự được chú thích dưới đây. Các thay đổi tiềm năng về trình tự CDR được chú thích dưới đây mỗi trình tự CDR. Có thể ngăn ngừa được sự khử amit hóa asparagin (N). Tất cả sáu phiên bản đã được làm giống như kháng thể của người khác nhau của kháng thể kháng SIRPA 3F9 (trên cơ sở các tổ hợp vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng dưới đây: h3F9-H1/L1; h3F9-H1/L2; h3F9-H1/L3; h3F9-H2/L1; h3F9-H2/L2; và h3F9-H2/L3) được ghép vào khung IgG4 của người, được sản xuất tái tổ hợp trong tế bào CHO-K1, và được xác định đặc điểm tiếp như được mô tả dưới đây.

Bảng 4

Kháng thể	Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng	SEQ ID NO:
m3F9 VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPE KRLEWVATISDYGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNAKYTLYLQM SSLRSEDTALYYCARPPYDDYYGGFAYWGQGTLVTVSA	2
h3F9-H1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSTISDYGGSYTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKPPYDDYYGGFAYWGQGTLVTVSS	3
h3F9-H2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVATISDYGGSYTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFAYWGQGTLVTVSS	4

Bảng 5

Kháng thể	Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ	SEQ ID NO:
m3F9 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSSGYSYMHWYQQ	5

	KPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEE EDAATYYCQHNRELPCTFGGGTKLEIK	
h3F9-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSSSGYSYMHWYQQ KPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQHNRELPCTFGQGTKLEIK	6
h3F9-L2	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSSSGYSYMHWYQQ KPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP EDFATYYCQHNRELPCTFGQGTKLEIK	7
h3F9-L3	DIQLTQSPSSLSVSVGDRATITCRASKSVSSSGYSYMHWYQQ KPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP EDFATYYCQHNRELPCTFGQGTKLEIK	8

Các phép đo ái lực đối với kháng thể kháng SIRPA được thực hiện như sau. Dữ liệu đo giao thoa lớp sinh học (BLI) được thu thập trên thiết bị Pall ForteBio Octet RED96. Việc phân tích dữ liệu được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm phân tích dữ liệu ForteBio, phiên bản 9.0. Dung dịch đệm động học tiêu chuẩn (PBS, BSA 0,1%, Tween-20 0,02%, pH 7,2) được sử dụng để thử nghiệm và điều chế chất phản ứng. Sau khi cân bằng cảm biến trong dung dịch đệm, mỗi kháng thể kháng SIRPA 3F9 đã được làm giống như kháng thể của người (2,5 µg/mL, thời gian tải 300 giây) được bắt giữ vào các cảm biến sinh học nhúng và đọc IgG Fc kháng người (Anti-Human IgG Fc Capture Dip and Read) (Pall ForteBio, Menlo Park, CA). Thay đổi nồng độ (0 – 200 nM) của SIRPA của người đã được gắn thẻ histidin (Sino Biological, Bắc Kinh, Trung Quốc) sau đó được gắn kết với bề mặt kháng thể kháng SIRPA đã được bắt giữ (thời gian liên kết 300 giây, thời gian phân ly 600 giây). Tín hiệu BLI thu được là sự khác biệt về đáp ứng từ cảm biến tham chiếu (2,5 µg/mL IgG + 0 nM SIRPA). Mẫu đối chứng không phối tử (0 µg/mL IgG + 200 nM SIRPA) cho thấy không có gắn kết không đặc hiệu có thể đo được của SIRPA với bề mặt đầu cảm biến. Các phép đo ái lực đối với kháng thể m3F9 bố mẹ được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp tương tự, ngoại trừ kháng thể được bắt giữ vào cảm biến sinh học kháng IgG Fc của chuột nhắt. Phép phân tích động học đa nồng độ được thực hiện bằng cách sử dụng mô hình tương tác 1:1 để trích xuất các hằng số tốc độ liên kết và phân ly (lần lượt là ka và kd) cho mỗi kháng thể. Hằng số ái lực gắn kết (K_D) được tính toán từ tỷ lệ kd/ka.

Kháng thể IgG Fc kháng chuột nhắt hoặc kháng thể IgG Fc kháng người đã được cố định bắt giữ lần lượt kháng thể kháng SIRPA 3F9 của loài gặm nhấm và kháng thể kháng SIRPA 3F9 đã được làm giống như kháng thể của người vào cảm

biến sinh học. Nồng độ tăng của isoform huSIRPA đã được gắn thẻ histidin 1 (10-500 nM) chảy qua kháng thể kháng SIRPA 3F9 đã được bắt giữ để ghi lại các dấu vết. Các dấu vết phù hợp nhất từ biểu đồ mức đáp ứng theo thời gian trong nghiên cứu cộng hưởng plasmon bề mặt thu được được phân tích để tính toán tốc độ liên kết, tốc độ phân ly, và giá trị ái lực. Ba biến thể kháng thể kháng SIRPA đã được làm giống như kháng thể của người 3F9 được thử nghiệm là mAb 14.70.1 (trình tự biến đổi của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:3 và trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:6), mAb 14.70.2 (trình tự biến đổi của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:3 và trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:7), và mAb 14.70.4 (trình tự biến đổi của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:4 và trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:6). Động học gắn kết đã được đo của kháng thể kháng SIRPA 3F9 đã được làm giống như kháng thể của người được tóm tắt trong Bảng 6 dưới đây, dưới dạng các giá trị ka, kd, và KD được trích xuất. Trong số sáu biến thể h3F9 được tạo ra, 3 kháng thể kháng SIRPA (mAb 14.70.1: H1/L1; mAb 14.70.2: H1/L2; mAb 14.70.4: H2/L1) có ái lực tương tự với kháng nguyên SIRPA hòa tan như kháng thể kháng SIRPA m3F9 (trình tự biến đổi của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:2 và trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:5).

Bảng 6

Dòng vô tính kháng thể 3F9	Kon (M- 1s- 1)	Koff (s- 1)	KD (nM)
M3F9 IgG1 bố mẹ	5,08E+04	1,00E-03	18
mAb 14.70.1	1,10E+05	2,00E-03	19
mAb 14.70.2	1,10E+05	2,20E-03	20
mAb 14.70.4	8,60E+04	9,40E-04	11

Ngoài kháng nguyên hòa tan gắn kết, các phép đo ái lực trên cơ sở tế bào cũng được thực hiện để xác định mối quan hệ rõ ràng của kháng thể kháng SIRPA h3F9 so với kháng thể kháng SIRPA m3F9 với kháng nguyên SIRPA v1 đã được gắn kết màng. Giá trị EC_{50} chỉ định ái lực tương đối bằng cách bổ sung nồng độ tăng của kháng thể kháng SIRPA 3F9 vào tế bào BWZ biểu hiện quá mức SIRPA của người. Kháng thể đã được gắn kết với thụ thể được phát hiện bằng cách nhuộm tế bào với kháng thể IgG Fc APC kháng chuột nhắt hoặc kháng thể thứ cấp IgG PE kháng người. Các dung dịch pha loãng theo chuỗi của kháng thể đơn dòng được bổ sung vào 10^5 BWZ tế bào biểu hiện quá mức huSIRPA (BWZ-huSIRPA) và cho phép đạt được sự

cân bằng gắn kết ở 4°C. Sau khi bổ sung kháng thể thứ cấp được dán nhãn huỳnh quang và rửa sơ bộ, giá trị cường độ huỳnh quang (MFI) trung bình dưới dạng hàm của nồng độ kháng thể đã được chuẩn độ được ghi lại qua phân tích FACS. Các đường cong được làm phù hợp bằng cách sử dụng phân tích hồi quy phi tuyến với phần mềm Graphpad Prism 6. Các thử nghiệm chuẩn độ trên cơ sở tế bào với kháng thể kháng SIRPA h3F9 mAb 14.70.1, mAb 14.70.2, và mAb 14.70.4 thu được giá trị EC_{50} lần lượt là 1,065 nM, 0,9682 nM, và 1,607 nM. Kháng thể kháng SIRPA 3F9 đã được làm giống như kháng thể của người thu được giá trị EC_{50} thấp hơn so với kháng thể kháng SIRPA m3F9 (EC_{50} = 2,1 nM), cho thấy gắn kết ái lực đã được cải thiện của kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người so với gắn kết ái lực được xác định đối với kháng thể kháng SIRPA 3F9 của loài gặm nhấm.

Thử nghiệm trên cơ sở cạnh tranh cũng được thực hiện để tính toán giá trị IC_{50} của kháng thể kháng SIRPA, trong đó nồng độ tăng của kháng thể kháng SIRPA 3F9 đã được làm giống như kháng thể của người và của loài gặm nhấm được bổ sung vào tế bào BWZ-huSIRPA v1 để thay thế kháng thể tham chiếu đã được dán nhãn huỳnh quang. Giá trị IC_{50} cung cấp một so sánh khác về ái lực tương đối. Trong thử nghiệm trên cơ sở cạnh tranh, nồng độ tăng của kháng thể kháng SIRPA 3F9 được bổ sung vào tế bào biểu hiện huSIRPA để thay thế kháng thể tham chiếu đã được dán nhãn huỳnh quang. Giá trị IC_{50} được xác định như sau: m3F9 = 11,54 nM; mAb 14.70.1 = 3,303 nM; mAb 14.70.2 = 2,185 nM; mAb 14.70.4 = 4,606 nM). Các kết quả này đã chứng minh rằng kháng thể kháng SIRPA đã được làm giống như kháng thể của người theo sáng chế là các kháng thể cạnh tranh hiệu quả hơn kháng thể kháng SIRPA m3F9 tham chiếu gắn kết với SIRPA.

Khả năng làm giảm mức biểu hiện bề mặt tế bào của SIRPA của kháng thể kháng SIRPA h3F9 được đánh giá trên đại thực bào sơ cấp của người (huMacs). Bạch cầu đơn nhân của người được phân lập từ máu ngoại vi của thể cho khỏe mạnh và biệt hóa thành đại thực bào *in vitro* bằng cách bổ sung môi trường sinh trưởng với M-CSF của người. Sau khi biệt hóa, huMacs được thu hoạch và gieo mầm vào các đĩa môi trường nuôi cấy mô 96 giếng với nồng độ tăng của mẫu đối chứng isotyp hoặc kháng thể kháng SIRPA hòa tan và ủ qua đêm ở 37°C. Tế bào được phân tích bằng phép đo tế bào theo dòng chảy đối với mức biểu hiện bề mặt của SIRPA bằng cách sử dụng kháng thể kháng SIRPA của người được liên hợp với DyLight650 (dòng vô tính

SA56) thuộc ngăn epitop riêng biệt so với kháng thể kháng SIRPA 3F9. Như được thể hiện trên FIG.3, biến thể kháng thể kháng SIRPA h3F9 (mAb 14.70.1 (70.1), mAb 14.70.2 (70.2), và mAb 14.70.4 (70.4)) điều hòa giảm các mức biểu hiện thụ thể SIRPA trong đại thực bào theo cách phụ thuộc liều lượng. Tuy nhiên, kháng thể kháng SIRPA m3F9 bố mẹ có mức điều hòa thụ thể giảm tối đa lớn hơn so với kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người mặc dù các đặc tính gắn kết kháng nguyên tương tự được thảo luận trên đây. Các kết quả này cho rằng các đặc tính của kháng thể kháng SIRPA ngoài sự tham gia của thụ thể xác định hoạt tính chức năng của kháng thể kháng SIRPA 3F9 trên đại thực bào.

Ví dụ 3: Kháng thể kháng SIRPA đòi hỏi thụ thể Fc gamma (FcγRs) cho hoạt tính chức năng

Sự khác biệt chính giữa kháng thể kháng SIRPA 3F9 của người và loài gặm nhấm là khả năng gắn thụ thể Fc gamma (FcγRs). Kháng thể kháng SIRPA đã được làm giống như kháng thể của người được ghép vào khung IgG4 Fc của người đã biết là có đặc tính gắn kết FcγR kém. Tế bào lai kháng thể kháng SIRPA m3F9, mặc dù là kháng thể IgG1 của loài gặm nhấm, vẫn duy trì được hoạt tính gắn kết theo FcγRs của người nhất định. Để xác minh FcγRs điều biến hoạt tính chức năng của kháng thể kháng SIRPA, kháng thể kháng SIRPA m3F9 được xử lý bằng EndoS để loại bỏ bằng enzym Fc glycan trên Asn297, yếu tố xác định làm trung gian tương tác IgG-FcγR. Đại thực bào sơ cấp của người từ hai thể cho khỏe mạnh được xử lý qua đêm với nồng độ tăng của kháng thể kháng SIRPA m3F9 đã được glycosyl hóa hoặc đã được khử glycosyl hóa. Tế bào được nhuộm sau đó bằng kháng thể kháng SIRPA tham chiếu được liên hợp với DyLight650 (SA56-DyL650) gắn kết với ngăn epitop riêng biệt và được phân tích sau đó về mức biểu hiện bề mặt của SIRPA nhờ phép phân tích FACS.

Như được thể hiện trên FIG.4A, cả hai glycoform của kháng thể kháng SIRPA m3F9 điều hòa giảm đáng kể mức biểu hiện bề mặt tế bào của SIRPA. Tuy nhiên, trong cả hai thể cho, biến thể kháng thể kháng SIRPA m3F9 đã được khử glycosyl hóa có hoạt tính tối đa đã được giảm so với hoạt tính tối đa quan sát được đối với dạng kháng thể đã được glycosyl hóa. Cụ thể, glycosyl hóa kháng thể kháng SIRPA m3F9 điều hòa giảm sự biểu hiện của SIRPA nhiều như 90% và 85% ở lần lượt thể cho (Dnr) 413 và thể cho 414; trong khi đó kháng thể kháng SIRPA m3F9 chỉ đạt lần lượt 70% và 75% mức điều hòa thụ thể SIRPA giảm trong cùng thể cho đại thực bào. Phát

hiện này cho thấy rằng kháng thể kháng SIRPA, cụ thể kháng thể m3F9, đòi hỏi sự gắn FcγR để điều hòa giảm được tăng cường đối với mức biểu hiện bề mặt tế bào của SIRPA. Các kết quả trên FIG.4A được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm của mức gắn kết kháng thể tham chiếu bằng cách chia giá trị MFI của các mẫu được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA cho giá trị MFI của các mẫu được xử lý bằng mẫu đối chứng isotyp.

Ngoài mức điều hòa giảm thụ thể qua trung gian kháng thể như được bộc lộ trên đây, vai trò của FcγRs được đánh giá sự tăng cường qua trung gian kháng thể kháng SIRPA 3F9 về khả năng thực bào tế bào khối u. Thử nghiệm khả năng thực bào tế bào khối u được phát triển dựa trên huỳnh quang pHrodo. Đại thực bào sơ cấp của người được xử lý qua đêm bằng kháng thể đối chứng isotyp (MOPC) hoặc các biến thể kháng thể kháng SIRPA 3F9 được chỉ định. Tế bào Raji được dán nhãn thuốc nhuộm pHrodo được bổ sung vào đại thực bào và ủ ở 37°C trong 2 giờ. Avidin đỏ (Invitrogen) là phân tử streptavidin được liên hợp với thuốc nhuộm màu đỏ pHrodo, chất đánh dấu sinh huỳnh quang thu được huỳnh quang trong môi trường axit, như thể thực bào. Để dán nhãn tế bào khối u hướng đích, 500 nM Avidin đỏ được trộn với 15 nM Lens Culinaris Agglutinin đã được biotinyl hóa (LCA; Vector Labs). Phức hợp Avidin đỏ-LCA sau đó được trộn với tỷ lệ thể tích 1:1 với 400.000 tế bào Raji trong môi trường RPMI không chứa huyết thanh trên đá. Đặc tính gắn kết đường của LCA liên kết Avidin đỏ với cấu trúc hydrat cacbon trên bề mặt tế bào khối u. Sau khi bước rửa sơ bộ, tế bào Raji được dán nhãn Avidin đỏ-LCA được trộn với đại thực bào có nguồn gốc bạch cầu đơn nhân của người trong môi trường RPMI không chứa huyết thanh và ủ ở 37°C trong 2 giờ. Đại thực bào sau đó được thu gom và nhuộm trên đá với kháng CD14 APC trong dung dịch đệm FACS chứa kháng thể phong bế FcγR. Hoạt tính thực bào được đo bằng cách đếm tỷ lệ phần trăm của đại thực bào dương tính kép với CD14/pHrodo. Đối với mẫu đối chứng, tế bào Raji không được dán nhãn được trộn với đại thực bào để thiết lập mức huỳnh quang nền. Các kết quả trên FIG.4B được trình bày dưới dạng mức tăng gấp đôi tỷ lệ phần trăm của quần thể đại thực bào dương tính kép với pHrodo/CD14.

Như được thể hiện trên FIG.4B, đại thực bào được xử lý qua đêm bằng glycosyl hóa kháng thể kháng SIRPA m3F9 hiển thị mức tăng ~2 lần về khả năng thực bào tế bào khối u so với khả năng thực bào quan sát được bằng cách sử dụng đại thực bào

được xử lý bằng kháng thể đối chứng isotyp. Đại thực bào được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA m3F9 đã được khử glycosyl hóa hiển thị mức tăng ~1,5 lần về khả năng thực bào tế bào khối u so với đại thực bào được xử lý bằng mẫu đối chứng isotyp. Mức tăng ~1,5 lần về khả năng thực bào tế bào khối u là mức giảm có ý nghĩa thống kê về hoạt tính ~50% so với hoạt tính quan sát được với kháng thể kháng SIRPA m3F9 đã được glycosyl hóa. Hơn nữa, đại thực bào được xử lý bằng h3F9 IgG4 (mAb 14.70.1 hoặc mAb 14.70.2) không có khả năng tăng cường mức thực bào tế bào khối u trên mức cơ bản.

Các nghiên cứu trước đây thiết lập mối tương quan giữa hoạt tính thực bào tăng và mức điều hòa giảm CD14 khi kích thích đại thực bào bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9. Để xác định liệu mối tương quan này cũng phụ thuộc, ít nhất một phần, vào FcγRs hay không, đại thực bào sơ cấp của người được xử lý qua đêm bằng hoặc kháng thể kháng SIRPA m3F9 đã được glycosyl hóa hoặc biến thể kháng thể kháng SIRPA h3F9 IgG4 (mAb 14.70.1, mAb 14.70.2, và mAb 14.70.4) và được thử nghiệm về khả năng thực bào tế bào khối u và sự biểu hiện của CD14. Như được thể hiện trên FIG.5A, chỉ có đại thực bào được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA m3F9 có khả năng thực bào tế bào Raji tăng so với khả năng thực bào quan sát được với đại thực bào được xử lý bằng kháng thể đối chứng isotyp. Kết quả được thể hiện là số lần tăng về tỷ lệ phần trăm của quần thể đại thực bào dương tính kép với pHrodo/CD14. Kháng thể IgG4 kháng SIRPA đã được làm giống như kháng thể của người không làm tăng cường khả năng thực bào của tế bào Raji. Tương tự, chỉ có sự kích thích kháng thể kháng SIRPA m3F9 điều hòa giảm sự biểu hiện của CD14 trên đại thực bào, trong đó các biến thể kháng thể kháng SIRPA h3F9 IgG4 không làm thay đổi sự biểu hiện của CD14 (FIG.5B). Ngoài việc hỗ trợ mối tương quan giữa sự biểu hiện của mức CD14 và hoạt tính thực bào trong đại thực bào, các kết quả này đã xác nhận rằng hoạt tính chức năng của kháng thể kháng SIRPA 3F9 là phụ thuộc, ít nhất một phần, vào FcγRs.

Ví dụ 4: Mức điều hòa giảm CD32 bởi kháng thể kháng SIRPA

Ngoài đích kháng nguyên quan tâm, tế bào của dòng tủy cũng biểu hiện nhiều thụ thể Fc có khả năng gắn kết với miền Fc của kháng thể trị liệu. Thụ thể Fc gamma (FcγR) tạo thành lớp thụ thể có đặc điểm tốt nhất và mạnh nhất để làm trung gian chức năng hiệu ứng phụ thuộc vào Fc. FcγRs cấu thành bởi cả hai thụ thể hoạt hóa liên kết với ITAM (CD64/ FcγRI, CD32A/ FcγRIIA, và CD16A/ FcγRIIIA) và thụ thể ức chế

mang ITIM (CD32B/ FcγRIIB), và đồng biểu hiện các thụ thể hoạt hóa/ức chế trên cùng tế bào thiết lập ngưỡng hoạt hóa tế bào. Nói chung, sự nối FcγRs đã được hoạt hóa bằng phức hợp miễn dịch khơi mào một số tầng tín hiệu dẫn đến sự hoạt hóa tế bào và tiếp theo là khử chức năng hiệu ứng. Các hoạt tính này thay đổi giữa tế bào tủy, nhưng có thể bao gồm tính gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể, khả năng thực bào tế bào phụ thuộc vào kháng thể, và sự điều hòa tăng của một vài xytokin tiền viêm và chemokin, v.v.. Ngược lại, sự gắn của thụ thể ức chế, FcγRIIB, bởi phức hợp miễn dịch làm trung hòa các tín hiệu kích thích miễn dịch của FcγRs đã được hoạt hóa hỗ trợ sự duy trì tính nội cân bằng mô. Ví dụ, một số nghiên cứu xác định rằng việc gây bất hoạt gen di truyền FcγRIIB dẫn đến hoạt tính đại thực bào tiền viêm được tăng cường ở mô hình loài gặm nhấm của quá trình viêm qua trung gian phức hợp miễn dịch. Do FcγRIIB là FcγR duy nhất có hoạt tính ức chế, nó đóng một vai trò trung tâm trong việc điều hòa quá trình viêm qua trung gian FcγR bởi tế bào tủy sống. Trong trường hợp của vi môi trường khối u, các mức biểu hiện FcγRIIB có thể xác định trạng thái phân cực của đại thực bào liên quan đến khối u và sự điều hòa của chức năng hiệu ứng đại thực bào *in vivo*.

Để xác định FcγR nào góp phần vào hoạt tính *in vitro* của kháng thể kháng SIRPA 3F9, đại thực bào có nguồn gốc bạch cầu đơn nhân thu được từ hai thể cho khỏe mạnh được xử lý qua đêm với hoặc kháng thể đối chứng isotyp hoặc kháng thể kháng SIRPA m3F9 và sau đó được đánh giá về các mức biểu hiện bề mặt của FcγRIIIA (CD16), FcγRI (CD64), và FcγRIIA/B (CD32A/B). Như được thể hiện trên FIG.6A, việc xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA m3F9 về cơ bản làm giảm mức biểu hiện bề mặt của CD32A/B so với mức biểu hiện quan sát được trong đại thực bào được xử lý bằng kháng thể đối chứng isotyp. Do việc phát hiện kháng thể được sử dụng để đo mức bề mặt của FcγRII (dòng vô tính FUN-2; Biolegend) không phân biệt giữa thụ thể hoạt hóa FcγRIIA và thụ thể ức chế FcγRIIB, thử nghiệm này được lặp lại với kháng thể đặc hiệu kháng nguyên. Như đã được mô tả trước đó, đại thực bào có nguồn gốc bạch cầu đơn nhân thu được từ hai thể cho khỏe mạnh được xử lý qua đêm với hoặc kháng thể đối chứng isotyp hoặc biến thể được chỉ định của kháng thể kháng SIRPA 3F9. FIG.6B cho thấy rằng kháng thể kháng SIRPA m3F9 điều hòa giảm đáng kể FcγRIIA trong đại thực bào ~70-85% so với mức quan sát được trong tế bào được xử lý bằng kháng thể đối chứng isotyp. Hiệu quả này phụ thuộc vào miền Fc vì cả hai

biến thể h3F9 IgG4 (mAb 14.70.2) và dạng kháng thể đã được khử glycosyl hóa của loài gặm nhấm khử bỏ mức điều hòa giảm FcγRIIA.

Khi đánh giá mức biểu hiện bề mặt của FcγRIIB, việc xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA m3F9 làm giảm mức biểu hiện của thụ thể ức chế đến gần mức không thể phát hiện được so với mức biểu hiện quan sát được trong đại thực bào được xử lý bằng kháng thể đối chứng isotyp (FIG.6B). Ngược lại, hiển nhiên là không có mức điều hòa giảm đáng kể của FcγRI/CD64 hoặc FcγRIIIA/CD16A đối với đại thực bào được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9 so với tế bào được xử lý bằng mẫu đối chứng isotyp, chỉ ra rằng việc xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9 không làm thay đổi mức biểu hiện của CD16 và CD64 trên đại thực bào sơ cấp của người (dữ liệu không được thể hiện).

Để xác nhận rằng CD32A/B cần cho hoạt tính chức năng của kháng thể kháng SIRPA m3F9, thử nghiệm phong bế FcγR chọn lọc được thực hiện để đánh giá vai trò của FcγRs riêng lẻ đối với mức điều hòa giảm SIRPA qua trung gian kháng thể và khả năng thực bào tế bào khối u. Trong các thử nghiệm phong bế, đại thực bào sơ cấp của người từ hai thể cho khỏe mạnh được cấy sơ bộ bằng kháng thể phong bế kháng CD16 hoặc kháng CD32A/B trong 15 phút trên đá. Tiếp theo, tế bào được ủ qua đêm với hoặc mẫu đối chứng isotyp (MOPC21) hoặc kháng thể kháng SIRPA m3F9. Mức biểu hiện của SIRPA được phát hiện bằng kháng thể kháng SIRPA tham chiếu được liên hợp với DyLight650 (SA56-DyL650). Kết quả được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ phần trăm của kháng thể tham chiếu gắn kết bằng cách chia giá trị MFI của các mẫu được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA cho giá trị MFI của các mẫu được xử lý bằng mẫu đối chứng isotyp. Như được thể hiện trên FIG.7A, sự phong bế CD16 không phá vỡ mức điều hòa giảm SIRPA sau khi xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA m3F9 so với mức điều hòa quan sát được trong đại thực bào không được xử lý bằng kháng thể phong bế FcγR. Ngược lại, mức điều hòa giảm SIRPA qua trung gian m3F9 đã bị suy giảm đáng kể trong đại thực bào được ủ sơ bộ với kháng thể phong bế kháng CD32A/B.

Để xác định liệu khả năng phong bế CD32A/B có cản trở khả năng thực bào hay không, đại thực bào sơ cấp của người được cấy sơ bộ bằng kháng thể phong bế kháng CD32A/B và được xử lý qua đêm bằng kháng thể đối chứng isotyp hoặc kháng thể kháng SIRPA m3F9. Tế bào Raji được dán nhãn thuốc nhuộm pHrodo được trộn

với đại thực bào và ủ ở 37°C trong 2 giờ. Kết quả được biểu diễn dưới dạng số lần tăng về tỷ lệ phần trăm quần thể của đại thực bào dương tính kép với pHrodo/CD14. Như được thể hiện trên FIG.7B, đại thực bào được xử lý bằng m3F9 từ cả hai thể cho tăng cường khả năng thực bào của tế bào Raji ~2 lần so với khả năng thực bào quan sát được trong đại thực bào được xử lý bằng kháng thể đối chứng isotyp. Tuy nhiên, khả năng phong bế CD32A/B hoặc phong bế một phần hoặc phong bế hoàn toàn sự tăng cường khả năng thực bào tế bào khối u qua trung gian m3F9. Kết hợp lại với nhau, các kết quả này đã xác định rằng sự gắn CD32A/B là cần thiết về mặt chức năng cho hoạt tính của kháng thể kháng SIRPA m3F9.

Ví dụ 5: Sự thành thục ái lực của kháng thể kháng SIRPA h3F9

Quá trình thành thục ái lực của kháng thể kháng SIRPA h3F9 đã được làm giống như kháng thể của người được thực hiện. Tóm lại, các gốc axit amin nhất định trong chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ được gây đột biến chọn lọc và các thể đột biến cải thiện gắn kết được chọn thông qua các vòng sàng lọc bổ sung. Quy trình này đồng thời cải thiện tính đặc hiệu, tính phản ứng chéo của loài, và profin khả năng phát triển, cho phép điều chỉnh chính xác các đặc tính tham gia vào cơ chế tác động mong muốn, hiệu quả trong các thử nghiệm sinh học và tạo mô hình tiền lâm sàng. Các xác định đặc ung, chất mô phỏng peptido có cấu trúc tương tự như polypeptit mô hình (tức là nghiệm khả năng phát triển. Sau vòng thành thục ái lực thứ nhất, kháng thể với ái lực được cải thiện cũng có tính phản ứng đa đặc hiệu cải thiện (PSR), được sử dụng để xác định sự gắn kết không đặc hiệu của kháng thể. Do đó, vòng thành thục ái lực thứ hai được thực hiện để cải thiện ái lực mà không làm tăng PSR.

Trình tự miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể

Bằng cách sử dụng kỹ thuật chuẩn, các trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đã trưởng thành về ái lực được đề cập trong bản mô tả này được xác định. Trình tự HVR của chuỗi nhẹ của kháng thể được nêu trong Bảng 7 và Bảng 8. Trình tự HVR của chuỗi nhẹ của kháng thể được nêu trong Bảng 7. Trình tự HVR của chuỗi nặng của kháng thể được nêu trong Bảng 8. Trình tự khung của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng (FR) của kháng thể được nêu trong Bảng 9. Vùng biến đổi chuỗi nặng và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được nêu dưới đây trong Bảng 10.

Bảng 7

Trình tự HVR của chuỗi nhẹ của kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực

		SEQ ID NO:	mAb ID (3F9-#)
HVR-L1	RASKSVSSGGYSYMH	9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, và 25
HVR-L2	LASNLES	10	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, và 25
HVR-L3	QHNRELPST	11	1, 10, và 18
	QHNRELPCT	12	2
	QHNRELPIT	13	3, 11, và 19
	QHNRELPPT	14	4, 12, và 20
	QHNRELPTT	15	5, 13, và 21
	QHNRELPVT	16	6, 14, và 22
	QHNRELPAT	17	7, 15, và 23
	QHNRELPGT	18	8, 16, và 24
	QHNRELPWT	19	9, 17, và 25

Bảng 8

Trình tự HVR của chuỗi nặng của kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực

		SEQ ID NO:	mAb ID (3F9-#)
HVR-H1	GFTFSSYAMS	20	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, và 25
HVR-H2	TISEYGGSYTYYAESVKG	21	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, và 25
HVR-H3	PPYDDYYGGFAY	22	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, và 9
	PPYDDYYGGFRY	23	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, và 17
	PPYDDYYGGFQY	24	18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, và 25

Bảng 9

Trình tự khung của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực

FR	VH	SEQ ID NO:	VL	SEQ ID NO:
FR 1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	25	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	29
FR 2	WVRQAPGKGLEWVA	26	WYQQKPGKAPKLLIY	30
FR 3	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	27	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYC	31

FR	VH	SEQ ID NO:	VL	SEQ ID NO:
FR 4	WGQGTLVTVSS	28	FGQGTKLEIK	32

Bảng 10

Vùng biến đổi chuỗi nặng		
	SEQ ID NO:	mAb ID (3F9-#)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGG SYTYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFAYW GQGTLVTVSS	33	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, và 9
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGG SYTYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFRYW GQGTLVTVSS	34	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, và 17
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGG SYTYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFQYW GQGTLVTVSS	35	18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, và 25
Vùng biến đổi chuỗi nhẹ		
	SEQ ID NO:	mAb ID (3F9-#)
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKS VSSGGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP EDFATYYCQHNRELPSTFGQGTKLEIK	36	1, 10, và 18
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKS VSSGGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP EDFATYYCQHNRELPCTFGQGTKLEIK	37	2
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKS VSSGGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP EDFATYYCQHNRELPITFGQGTKLEIK	38	3, 11, và 19
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKS VSSGGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP EDFATYYCQHNRELPPTFGQGTKLEIK	39	4, 12, và 20
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKS VSSGGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP EDFATYYCQHNRELPTTFGQGTKLEIK	40	5, 13, và 21
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKS VSSGGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP	41	6, 14, và 22

EDFATYYCQHNRELPVTFGQGTKLEIK		
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKS VSSGGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP EDFATYYCQHNRELPATFGQGTKLEIK	42	7, 15, và 23
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKS VSSGGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP EDFATYYCQHNRELPGTFGQGTKLEIK	43	8, 16, và 24
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKS VSSGGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP EDFATYYCQHNRELPWTFGQGTKLEIK	44	9, 17, và 25

Ví dụ 6: Xác định đặc điểm của kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực

Xác định đặc điểm ban đầu của kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm việc thu nhận các phép đo ái lực kháng nguyên bằng cách sử dụng phép đo giao thoa lớp sinh học (BLI) trên thiết bị Pall ForteBio Octet RED96. Kháng thể IgG Fc kháng chuột nhắt hoặc kháng thể IgG Fc kháng người đã cố định bắt giữ lần lượt kháng thể kháng SIRPA 3F9 của loài gặm nhấm và kháng thể kháng SIRPA 3F9 đã được làm giống như kháng thể của người trên cảm biến sinh học. Động học chu kỳ đơn được thực hiện với 25 nM huSIRPA [biến thể nào?] hoặc 50 nM huSIRPB1 chảy qua kháng thể 3F9 đã được bắt giữ để ghi lại dấu vết. Phân tích dữ liệu được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm phân tích dữ liệu ForteBio, phiên bản 9.0. Dung dịch đệm động học chuẩn (PBS, BSA 0,1%, Tween-20 0,02%, pH 7,2) được sử dụng để thử nghiệm và để điều chế chất phản ứng. Sau khi cân bằng cảm biến trong dung dịch đệm, kháng thể kháng SIRPA h3F9 (2 µg/mL, thời gian tải 300 giây) hoặc các biến thể đã trưởng thành về ái lực của kháng thể kháng SIRPA h3F9 được bắt giữ vào cảm biến sinh học nhúng và đọc bắt giữ IgG Fc kháng người (Pall ForteBio, Menlo Park, CA). 50 nM SIRPA v1 của người đã được gắn thẻ histidin hoặc SIRPB1 của người (Novoprotein, Summit, NJ, Mỹ) sau đó được gắn kết với bề mặt đã được phủ kháng thể kháng SIRPA đã được bắt giữ (thời gian liên kết 200 giây, thời gian phân ly 900 giây). Tín hiệu BLI thu được thu được dưới dạng sự khác biệt trong phản hồi từ cảm biến tham chiếu (2 µg/mL 3F9 + 0 nM SIRPA). Mẫu đối chứng không phối tử (0 µg/mL 3F9 + 200 nM SIRPA) cho thấy sự gắn kết không đặc hiệu không thể đo được của SIRPA với bề mặt đầu cảm biến. Phân tích động học đường cong đơn được thực hiện bằng cách sử dụng mô hình tương tác

1:1 để trích xuất các hằng số tốc độ liên kết và tốc độ phân ly (lần lượt là ka và kd) đối với mỗi kháng thể. Hằng số ái lực (K_D) được tính toán từ tỷ lệ kd/ka. Biểu đồ mức đáp ứng theo thời gian trong nghiên cứu cộng hưởng plasmon bề mặt là 25 kháng thể con cháu kháng SIRPA và một kháng thể bố mẹ gắn kết với huSIRPA và huSIRPB1 hòa tan thu được, và các vết phù hợp nhất được sử dụng để tính toán tốc độ liên kết, tốc độ phân ly, và giá trị ái lực. Các phép đo ái lực (ka, kd, và KD) thu được từ phép phân tích tính phù hợp của đường cong của biểu đồ mức đáp ứng theo thời gian trong nghiên cứu cộng hưởng plasmon bề mặt thu được từ các thử nghiệm này được tóm tắt trong Bảng 11. Tất cả các kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực thiếu hụt tính phản ứng chéo có thể đo được bất kỳ với huSIRPB1 (dữ liệu không được thể hiện), và sáu kháng thể đã trưởng thành về ái lực kháng SIRPA (3F9-18, 3F9-12, 3F9-23, 3F9-14, 3F9-22, và 3F9-20) có ái lực tăng ~10 lần theo huSIRPA hòa tan so với ái lực quan sát được với kháng thể bố mẹ kháng SIRPA h3F9.

Bảng 11

Động học gắn kết của kháng thể h3F9 đã trưởng thành về ái lực

Ab ID (3F9-#)	KD (M)	kon (Ms)-1	koff (s-1)
18	4,19E-10	1,37E+05	5,74E-05
12	4,29E-10	1,39E+05	5,96E-05
23	5,39E-10	1,69E+05	9,11E-05
14	6,18E-10	1,65E+05	1,02E-04
22	6,46E-10	1,74E+05	1,13E-04
20	8,50E-10	1,50E+05	1,28E-04
16	1,27E-09	1,19E+05	1,51E-04
21	1,03E-09	1,48E+05	1,52E-04
24	1,07E-09	1,44E+05	1,55E-04
25	1,06E-09	1,53E+05	1,62E-04
7	1,81E-09	9,92E+04	1,80E-04
19	1,29E-09	1,41E+05	1,81E-04
11	1,43E-09	1,34E+05	1,92E-04
6	1,65E-09	1,16E+05	1,92E-04
13	1,38E-09	1,46E+05	2,01E-04
10	1,51E-09	1,34E+05	2,01E-04
4	1,79E-09	1,13E+05	2,03E-04
1	2,09E-09	1,06E+05	2,22E-04
2	2,06E-09	1,08E+05	2,22E-04
17	1,70E-09	1,40E+05	2,38E-04
5	2,95E-09	9,36E+04	2,76E-04
8	3,60E-09	7,66E+04	2,76E-04

Ab ID (3F9-#)	KD (M)	kon (Ms)-1	koff (s-1)
9	3,38E-09	8,94E+04	3,02E-04
15	6,28E-09	5,76E+04	3,62E-04
3	4,43E-09	9,39E+04	4,16E-04
h3F9	6,48E-09	1,84E+05	1,19E-03

Các phép đo ái lực trên cơ sở tế bào cũng được thực hiện để xác định ái lực biểu kiến của kháng thể kháng SIRPA 3F9 đã được trưởng thành về ái lực với kháng nguyên biểu hiện bề mặt tế bào. Các mẫu pha loãng chuỗi của mỗi kháng thể kháng SIRPA đơn dòng được bổ sung vào 10^5 BWZ-huSIRPA tế bào và cho phép đạt được sự cân bằng gắn kết ở 4°C. Sau khi bổ sung được dán nhãn huỳnh quang kháng thể thứ cấp và bước rửa sơ bộ, giá trị MFI dưới dạng hàm của nồng độ kháng thể đã được chuẩn độ được ghi lại qua phân tích FACS. Giá trị EC_{50} (được liệt kê dưới đây) chỉ định ái lực tương đối bằng cách bổ sung nồng độ tăng của các biến thể kháng thể 3F9 vào tế bào BWZ biểu hiện quá mức SIRPA của người. Kháng thể đã được gắn kết với thụ thể được phát hiện bằng cách nhuộm tế bào với kháng thể thứ cấp IgG PE kháng người. Các đường cong được làm phù hợp bằng cách sử dụng phép phân tích hồi quy phi tuyến tính bằng phần mềm Graphpad Prism 6. Các thử nghiệm chuẩn độ trên cơ sở tế bào với kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực đã được làm giống như kháng thể của người có sự cải thiện về giá trị EC_{50} của kháng thể kháng SIRPA của người đã trưởng thành về ái lực; hai kháng thể kháng SIRPA có mức cải thiện đáng kể về giá trị EC_{50} (mAb 3F9-14 = 0,42 nM và mAb 3F9-22 = 0,49 nM) so với giá trị EC_{50} quan sát được với kháng thể 3F9 mIgG1 kháng SIRPA (0,72 nM). Xem Bảng 12 dưới đây.

Bảng 12

	3F9-14	3F9-17	3F9-18	3F9-20	3F9-21	3F9-22	3F9-25	3F9 mIgG1
EC_{50} (nM)	0,42	0,61	0,51	0,49	0,64	0,49	0,96	0,72

Ví dụ 7: Tính phản ứng chéo của kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực với biến thể kháng nguyên SIRPA

Miền gắn kết CD47 của SIRPA của người có tính đa hình cao, có thể cản trở sự phát triển của kháng thể kháng SIRPA phong bế CD47 có khả năng nhận diện tất cả các biến thể alen SIRPA được biểu hiện trong các quần thể của người. Thực tế, hai

alen phổ biến nhất của SIRPA của người (v1 và v2) cũng khác nhau nhất về trình tự với 13 gốc khác nhau trong miền IgV. Do các nghiên cứu cạnh tranh CD47 giải quyết rằng kháng thể kháng SIRPA m3F9 gắn kết vùng phân biệt với vị trí gắn kết phối tử CD47, thử nghiệm gắn kết được thực hiện để kiểm tra tính phản ứng chéo giữa SIRPA v1 và v2 của người, cũng như tính phản ứng chéo của loài để xác định mô hình động vật liên quan cho nghiên cứu độc chất.

Trong thử nghiệm ELISA, đĩa Immulon HBX 96 lỗ được phủ SIRPA đã được gắn thẻ His hoặc Fc của các loài nhất định, như được chỉ ra, ở 1 µg/mL trong PBS qua đêm ở 4°C. Các đĩa được phong bế trong 5% (khối lượng/thể tích) albumin huyết thanh bò trong PBS trong 1 giờ, sau đó chúng được rửa 3 lần với PBS/0,05% Tween 20 (PBS/T). Kháng thể kháng SIRPA được bổ sung vào đĩa theo chuỗi pha loãng và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ, sau đó kháng thể chưa được gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa bằng PBS/T. Chuỗi nhẹ kappa kháng người hoặc IgG kháng chuột nhắt được liên hợp với peroxidaza cây cải ngựa (Jackson Immunoresearch) sau đó được bổ sung vào các giếng và ủ trong 30 phút. Kháng thể không được gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa bằng PBS/T, sau đó kháng thể đã được gắn kết được phát hiện bằng cách sử dụng tetrametylbenzidin (TMB). Phản ứng được dừng bằng H_2SO_4 2N, sau đó các đĩa được đọc ở A450.

Kháng thể kháng SIRPA 3F9 bố mẹ của loài gặm nhấm gắn kết cả hai phiên bản v1 và v2 của SIRPA-Fc của người với giá trị EC_{50} tương đương (lần lượt là 0,695 và 0,789 nM). Mức giảm một phần về ái lực biểu kiến quan sát được với kháng thể của người đã được gắn thẻ His cho thấy gắn kết mạnh, lớn hơn với SIRPA đã được gắn thẻ Fc. Ngoài ra, kháng thể kháng SIRPA 3F9 bố mẹ của loài gặm nhấm chứng minh tính phản ứng chéo yếu với SIRPA của khỉ đuôi dài cynomolgus đã được gắn thẻ Fc và His (EC_{50} = 1,09 nM). Quan sát được gắn kết không thể phát hiện được đối với SIRPA của chuột cống.

Sau khi thành thục ái lực của kháng thể bố mẹ như được mô tả trên đây, hai kháng thể con cháu kháng SIRPA, mAb 3F9-14 và mAb 3F9-22, được sàng lọc về cùng một bảng của kháng nguyên SIRPA để đánh giá tính phản ứng chéo. Như đối với kháng thể kháng SIRPA m3F9, cả hai kháng thể kháng SIRPA đã được làm giống như kháng thể của người và đã trưởng thành về ái lực đều giữ được hoạt tính gắn kết với SIRPA v1 và v2 của người nhưng với giá trị EC_{50} thấp hơn đáng kể, xác nhận rằng

mức tăng về ái lực quan sát được trong phép đo cảm biến sinh học và thử nghiệm gắn kết tế bào được mô tả trên đây. Mặc dù ái lực tăng đối với SIRPA v1 và v2 của người, kháng thể kháng SIRPA 3F9-14 có tính phản ứng chéo yếu với cynoSIRPA; đường cong gắn kết thu được giá trị EC_{50} (EC_{50} = 0,879 nM), tương tự với giá trị quan sát được với kháng thể kháng SIRPA m3F9. Ngược lại, kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 đã chứng minh hoạt tính gắn kết tương đương với cynoSIRPA như với cả hai biến thể SIRPA của người (EC_{50} = 0,107 nM). Cả kháng thể 3F9-14 lẫn 3F9-22 đều không gắn kết với SIRPA của chuột cống (dữ liệu không được thể hiện). EC_{50} đã tính toán từ các đường cong gắn kết được liệt kê dưới đây và thiết lập rằng tất cả các kháng thể kháng SIRPA gắn kết cả hai biến thể alen của SIRPA của người. Chỉ có kháng thể kháng SIRPA hu3F9-22 gắn kết với SIRPA của khỉ đuôi dài cyno với ái lực tương tự với gắn kết với SIRPA của người. Bảng 13 dưới đây thể hiện giá trị EC_{50} của kháng thể kháng SIRPA với các protein SIRPA khác nhau (nM).

Bảng 13

ELISA	huSIPRA v.1 CAA71403.1	huSIRPA v.2 NP542970.1	cynoSIRPA XPO15313153.1
3F9 mIgG1	0,789	0,695	1,089
3F9-14	0,093	0,080	0,879
3F9-22	0,108	0,082	0,107

Các thử nghiệm ELISA tương tự được thực hiện để xác định giá trị EC_{50} đối với kháng thể kháng SIRPA 9C2 (xem dưới đây đối với trình tự axit amin của kháng thể kháng SIRPA 9C2) và 3F9 đối với bảng các protein SIRPA và SIRPB khác nhau. Bảng 14 dưới đây thể hiện giá trị EC_{50} của các kháng thể kháng SIRPA này với các protein SIRP khác nhau (nM).

Bảng 14

	SIRPA v2	SIRPB1-Fc iso. 1	SIRPB1-Fc iso. 3	SIRPB1-His iso. 3	CynoSIRPA	SIRPB1 của khỉ đuôi dài cyno
mAb 9C2	0,3578	n.b	0,3822	0,4251	7,439	n.b.
mAb 3F9	0,3528	n.b.	0,3188	0,4353	0,6582	n.b.

Số truy cập: CAA71403.1 (SIRPA v2); O00241,5 (SIRPB1 iso. 1); Q5TFQ8,1 (SIRPB1 iso. 3); NP_001271679,1 (SIRPA của khỉ đuôi dài cyno); XP_005568598 (cyno SIRPB1); n.b. = không gắn kết

Với sự tương đồng cao về trình tự giữa protein SIRPA từ nhiều loài, như được thể hiện trên FIG.1, các dòng vô tính của kháng thể kháng SIRPA con cháu cũng được sàng lọc về tính phản ứng chéo đối với kháng nguyên SIRPA bổ sung từ các loài động vật có vú khác nhau. Fc đã được gắn thẻ SIRPA của khỉ đuôi sóc (số truy cập JAB51896) hoặc SIRPA của chó (số truy cập XP005634938) hoặc SIRPA của thỏ (số truy cập G1U0I5) được phủ lên các đĩa và ủ với nồng độ tăng của kháng thể kháng SIRPA hu3F9-14 và hu3F9-22. Cả hai kháng thể kháng SIRPA mAb 3F9-14 và mAb 3F9-22 nhận diện SIRPA của khỉ đuôi sóc và chó, mặc dù với ái lực thấp hơn so với ái lực quan sát được với SIRPA của người. Ví dụ, giá trị EC_{50} đối với 3F9-14 gắn kết với SIRPA của khỉ đuôi sóc và chó lần lượt là 1,2 nM và 0,64 nM. Tương tự, giá trị EC_{50} đối với 3F9-22 gắn kết với SIRPA của khỉ đuôi sóc và chó lần lượt là 4,3 nM và 0,83 nM. Cả dòng vô tính kháng thể kháng SIRPA 3F9-14 lẫn 3F9-22 đều không gắn kết với SIRPA của thỏ.

Ví dụ 8: Kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực điều hòa giảm SIRPA và CD32A/B

Các thử nghiệm trước đó thiết lập rằng kháng thể kháng SIRPA m3F9 đã đối kháng không cạnh tranh CD47 gắn kết với SIRPA bằng cách làm giảm mức biểu hiện bề mặt của SIRPA, dẫn đến tăng khả năng kích thích sự nhận chìm tế bào khối u bởi đại thực bào so với kháng thể kháng SIRPA phong bế CD47. Kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực được thử nghiệm về khả năng giữ lại các đặc tính chức năng tương tự với kháng thể loài gặm nhấm.

Do kháng thể kháng SIRPA m3F9 (trên khung IgG1 của chuột nhắt) điều hòa giảm SIRPA và CD32A/B theo cách phụ thuộc vào Fc, kháng thể khảm được tạo ra trong đó trình tự Fab của kháng thể bố mẹ kháng SIRPA m3F9 được dung hợp với miền Fc của IgG1 dạng dại của người (3F9 huIgG1) hoặc Fc IgG1 của người mang đột biến S267E/L328F (3F9-SELF) trong chuỗi nặng. Đột biến Fc SELF tăng cường gắn kết với FcγR2B/CD32B của người >100 lần so với Fc IgG1 dạng dại của người. Bạch cầu đơn nhân của người được phân lập từ máu ngoại vi của thể cho khỏe mạnh và được biệt hóa *in vitro* thành đại thực bào với M-CSF của người. Sau khi biệt hóa, huMacs được thu hoạch và gieo mầm vào các đĩa môi trường nuôi cấy mô 96 giếng với nồng độ tăng của mẫu đối chứng isotyp hoặc kháng thể kháng SIRPA hòa tan và ủ qua đêm ở 37°C. Tế bào được phân tích bằng phép đo tế bào theo dòng chảy đối với

mức biểu hiện bề mặt SIRPA và C32A/B bằng cách sử dụng kháng thể kháng SIRPA của người được liên hợp với kháng thể kháng CD32A/B (FUN-2) được dán nhãn DyLight650 (dòng vô tính SA56) và FITC. Phù hợp với các quan sát trước đó, kháng thể kháng SIRPA 3F9 mIgG1 có mức điều hòa giảm phụ thuộc mạnh vào liều lượng của cả hai SIRPA và CD32A/B. Tuy nhiên, kháng thể kháng SIRPA 3F9 huIgG1 khảm cho thấy hiệu quả giảm dần về mức điều hòa thụ thể giảm so với loài gặm nhấm kháng thể (dữ liệu không được thể hiện). Các kết quả này cung cấp tiếp bằng chứng rằng miền Fc của kháng thể đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính. Thao tác di truyền đột biến SELF trên miền Fc của 3F9 (3F9-SELF) khảm khôi phục khả năng điều hòa giảm SIRPA và CD32A/B đến các mức tương tự quan sát được với kháng thể kháng SIRPA 3F9 mIgG1. Kết quả này xác nhận rằng CD32A/B hoạt động như một đồng thụ thể quan trọng đối với hoạt tính m3F9 trên đại thực bào.

Các thử nghiệm trước đó đã cho thấy rằng các biến thể đã được làm giống như kháng thể của người của kháng thể kháng SIRPA 3F9 được ghép vào khung IgG4 của người đã mất hoạt tính chức năng. Biến thể kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực 3F9 được tạo ra trên khung IgG1 của người và được đánh giá về khả năng điều hòa giảm SIRPA và CD32A/B của chúng so với kháng thể bố mẹ kháng SIRPA m3F9 và kháng thể khảm 3F9 kháng SIRPA huIgG1. Mức biểu hiện của SIRPA và CD32A/B được phát hiện bằng kháng thể kháng SIRPA DyLight650 (dòng vô tính SA56) và kháng CD32A/B FITC (dòng vô tính FUN2). Kháng thể đã trưởng thành về ái lực 3F9-14, 3F9-18, 3F9-20, và 3F9-22 điều hòa giảm SIRPA đến mức tương tự với mức quan sát được với kháng thể kháng SIRPA m3F9 bố mẹ (dữ liệu không được thể hiện). Tuy nhiên, cùng kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực chỉ cải thiện ở mức tối thiểu mức điều hòa giảm CD32A/B so với mức quan sát được với kháng thể kháng SIRPA 3F9 huIgG1 khảm. Các kết quả này chỉ ra rằng mức tăng cường ái lực của kháng thể với kháng nguyên bù cho sự phụ thuộc vào Fc đối với mức điều hòa giảm thụ thể hướng đích (tức là SIRPA) chứ không phải là cho các tương tác qua trung gian Fc với FcγRs.

Để xác định liệu thao tác di truyền Fc có tăng cường tiếp mức điều hòa giảm SIRPA bởi kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực hay không, đột biến điểm SELF được đưa vào miền Fc của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 huIgG1. Đại thực bào sơ cấp của người từ bốn thể cho khỏe mạnh được xử lý qua đêm với nồng độ

tăng của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 đã được làm giống như kháng thể của người mang IgG1 Fc dạng dại của người hoặc IgG1 S267E/L328F Fc của người (SELF). Sự biểu hiện của SIRPA được phát hiện bằng kháng SIRPA DyLight650 (dòng vô tính SA56). Thể cho máu được tạo kiểu gen cho hiện tượng đa hình CD32A-R/H131 nhờ qPCR. FIG. 8A và 8B minh họa các kết quả điển hình của các thử nghiệm này so sánh hoạt tính của cả hai biến thể Fc. Trong số các cá thể đồng hợp tử về alen CD32A-H131 (các thể cho 516 và 517 được xác minh bởi qPCR), cả hai biến thể Fc của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 điều hòa giảm SIRPA đến các mức tương tự như mức quan sát được trên đại thực bào của người (FIG.8B). Kết quả này chỉ ra rằng gắn kết tăng cường với FcγR2B không làm tăng cường mức điều hòa giảm SIRPA qua trung gian kháng thể.

Trong số các cá thể dị hợp tử về cả hai alen CD32A-H131 và -R131, biến thể kháng SIRPA 3F9-22 hIgG1 Fc có mức điều hòa giảm SIRPA tối đa lớn hơn so với mức quan sát được với biến thể SELF Fc (FIG.8A). Thay vì tăng cường mức điều hòa giảm SIRPA, SELF Fc có thể hạn chế chức năng này. Đáng chú ý, đột biến SELF tăng cường ái lực Fc với CD32B cũng như alen CD32A-R131. Cho rằng đại thực bào của người biểu hiện mức CD32A lớn hơn so với CD32B, đại thực bào từ các cá thể biểu hiện CD32A-R131 có thể cô lập kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 khỏi SIRPA hoặc CD32B để hạn chế hoạt tính điều hòa giảm tối đa.

Bảng 15 dưới đây cung cấp phần tóm tắt kết quả về mức điều hòa giảm qua trung gian kháng thể của SIRPA và CD32 trên dòng đại thực bào của người U937. Trong các nghiên cứu này, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế được so sánh với kháng thể kháng SIRPA KWAR23 được mô tả trước đây (được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số: WO2015/138600). Như được thể hiện trong Bảng 15, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế điều hòa giảm hoặc làm giảm mức biểu hiện bề mặt tế bào của SIRPA trong tế bào U937, với tỷ lệ phần trăm mức điều hòa giảm tối đa nằm trong khoảng từ 68% đến 76%. Bằng cách so sánh, kháng thể kháng SIRPA KWAR23 chỉ có khả năng điều hòa giảm mức biểu hiện bề mặt tế bào của SIRPA là 9%.

Bảng 15 cũng cho thấy rằng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có hiệu quả trong việc điều chỉnh giảm hoặc làm giảm mức biểu hiện bề mặt tế bào của CD32 trong tế bào U937. Như được thể hiện trong bảng này, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế điều hòa giảm hoặc làm giảm CD32 mức biểu hiện bề mặt tế bào trong tế bào

này với tỷ lệ phần trăm mức điều hòa giảm tối đa nằm trong khoảng từ 49% đến 73%.

Bảng 15

	SIRPA		CD32	
Kháng thể	IC_{50} (nM)	% DR tối đa	IC_{50} (nM)	% DR tối đa
3F9 huIgG1	0,804	68%	0,9807	49%
3F9 mIgG1	0,105	75%	0,005609	73%
3F9-14	1,17	69%	2,028	50%
3F9-18	2,19	71%	4,861	52%
3F9-20	0,152	75%	0,2706	58%
3F9-22	0,187	76%	0,4305	60%
KWAR23	15,52	9%	0,07118	63%

Ví dụ 9: Kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực gây suy biến SIRPA trong đại thực bào

Đo mức điều hòa giảm thụ thể qua trung gian kháng thể bởi FACS xác nhận sự gắn đích bởi kháng thể kháng SIRPA làm giảm mức biểu hiện bề mặt tế bào. Để xác định liệu có hay không các thụ thể đã được nhập vào bị suy biến và không được tái chế sau đó vào bề mặt tế bào, đại thực bào của người được thử nghiệm về tổng mức protein SIRPA bằng thấm tách western như sau. Đại thực bào có nguồn gốc bạch cầu đơn nhân sơ cấp của người được xử lý qua đêm với 5 µg/mL mẫu đối chứng isotyp hoặc biến thể Fc kháng SIRPA 3F9-22 A330S/P331S (ASPS). Tế bào được thu hoạch, được rửa bằng PBS lạnh, và ly giải bằng dung dịch đệm RIPA được bổ sung chất ức chế HALT proteaza/phosphataza trên đá trong 15 phút. Tế bào đã được ly giải được ly tâm để tạo viên tròn phân đoạn màng và phân đoạn dịch nổi bề mặt bao gồm toàn bộ chất ly giải tế bào được thu gom. Như được thể hiện trên FIG.9A, lượng tăng của phân đoạn chất ly giải tế bào từ đại thực bào được xử lý bằng kháng thể đối chứng isotyp hoặc kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 được nạp vào SDS-PAGE và được thấm tách miễn dịch đối với protein SIRPA bằng kháng thể đặc hiệu kháng nguyên. Trên FIG.9A, 5 µg, 10 µg, và 20 µg của toàn bộ chất ly giải tế bào được nạp vào SDS-PAGE và được thấm tách miễn dịch bằng miền tế bào chất kháng SIRPA (a-SIRPAct). Một dải dịch chuyển với khối lượng phân tử đã được dự đoán của SIRPA được phát hiện trong đại thực bào được xử lý bằng mẫu đối chứng isotyp chứ không phải là quan sát được với đại thực bào được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9-22. Trong thử nghiệm tương tự, chất ly giải tế bào từ đại thực bào được xử lý bằng mẫu đối chứng isotyp hoặc được xử lý bằng kháng thể 3F9-22 ASPS được nạp vào SDS-PAGE và

được thấm tách miễn dịch đối với SIRPA và SHP-2, tyrosin phosphataza có thể liên kết với SIRPA và các thụ thể ITIM khác. Trên FIG.9B, 20 µg của toàn bộ chất ly giải tế bào được nạp vào SDS-PAGE và được dò bằng a-SIRPAct và kháng SHP2. Các vết thấm tách chứng minh rằng mức protein SIRPA được giảm với việc xử lý bằng mAb 3F9-22. Như được thể hiện trên FIG.9B, sự kích thích kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 dẫn đến sự suy biến của SIRPA chứ không phải là của SHP2.

Ví dụ 10: Kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực kích thích khả năng thực bào tế bào khối u trong đại thực bào

Các thử nghiệm trước đây đã xác minh rằng kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực giữ lại được khả năng điều hòa giảm SIRPA và CD32A/B, dẫn đến sự suy biến của SIRPA ở đại thực bào của người. Kháng thể đã trưởng thành về ái lực theo sáng chế được thử nghiệm về khả năng gây ra mức thực bào tế bào khối u. Đại thực bào sơ cấp của người được xử lý qua đêm bằng mẫu đối chứng isotyp hoặc 3F9-22 IgG1 của người hoặc 3F9-22 SELF để đánh giá hiệu quả phụ thuộc vào Fc đối với chức năng của kháng thể. Tế bào Raji được dán nhãn pHrodo được trộn với đại thực bào và ủ trong 2 giờ ở 37°C. Hoạt tính thực bào được đo bằng cách đếm tỷ lệ phần trăm của đại thực bào dương tính kép với CD14/pHrodo. Kết quả được biểu diễn dưới dạng số lần tăng về tỷ lệ phần trăm quần thể đại thực bào dương tính kép với pHrodo/CD14. Ngoài ra, sự biểu hiện của mức CD14 sau khi khả năng thực bào được thể hiện. Như được thể hiện trên FIG.10A, cả hai biến thể Fc của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 đã tăng cường khả năng thực bào của tế bào Raji so với đại thực bào được xử lý bằng mẫu đối chứng isotyp. Mặc dù kháng thể 3F9-22 SELF có thể gây ra khả năng thực bào lớn hơn so với kháng thể 3F9-22 huIgG1, sự khác biệt này không đạt được ý nghĩa thống kê. Ngoài ra, cả hai biến thể kháng SIRPA 3F9-22 Fc điều hòa giảm sự biểu hiện của CD14 đến các mức tương tự, chỉ ra mức cảm ứng tương tự của trạng thái hoạt tính thực bào và đại thực bào.

Dấu hiệu phân biệt trục truyền tín hiệu SIRPA-CD47 đối kháng là sự tăng cường khả năng thực bào phụ thuộc vào kháng thể của tế bào khối u đã được opsonin hóa. Trên FIG.10B, khả năng thực bào của tế bào Raji có hoặc không có kháng thể kháng CD20 huIgG1 opsonin hóa bổ sung được đánh giá trên đại thực bào được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9-22. Trong đại thực bào được xử lý bằng mẫu đối chứng isotyp, opsonin hóa tế bào Raji bằng kháng thể kháng CD20 huIgG1 tăng cường

khả năng thực bào của tế bào khối u ~50% so với tế bào Raji không được opsonin hóa. Kết quả được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ phần trăm quần thể của đại thực bào dương tính kép với pHrodo/CD14. Như được thể hiện trước đây, đại thực bào đã kích thích bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 SELF hoặc 3F9-22 ASPS tăng cường khả năng thực bào của tế bào Raji không được opsonin hóa ~30-40% so với đại thực bào được xử lý bằng mẫu đối chứng isotyp. Tương tự, đại thực bào được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 tăng cường khả năng thực bào ~30% so với đại thực bào được xử lý bằng mẫu đối chứng được trộn với tế bào Raji đã được opsonin hóa bằng kháng thể kháng CD20. Việc bổ sung tế bào Raji đã được opsonin hóa bằng kháng thể kháng CD20 vào đại thực bào được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 đã cho thấy hiệu quả bổ sung đối với khả năng thực bào với mức tăng ~2 lần so với mức quan sát được với đại thực bào được xử lý bằng mẫu đối chứng được trộn với tế bào Raji không được opsonin hóa. Mặc dù cả hai biến thể Fc của kháng thể 3F9-22 đều gây ra khả năng thực bào tế bào khối u, biến thể SELF Fc có hoạt tính thực bào có ý nghĩa thống kê lớn hơn so với biến thể ASPS Fc. Các kết quả này đã xác nhận rằng kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực theo sáng chế tăng cường khả năng thực bào tế bào khối u trong đại thực bào bằng cách gây đối kháng con đường SIRPA-CD47.

Bảng 16 dưới đây cung cấp phần tóm tắt về giá trị IC_{50} được xác định cho mức điều hòa giảm qua trung gian kháng thể của SIRPA và CD32 trong đại thực bào sơ cấp của người. Ngoài ra, Bảng 16 thể hiện số lần tăng về khả năng thực bào liên quan đến các kháng thể kháng SIRPA khác nhau theo sáng chế trong đại thực bào sơ cấp của người. Trong các nghiên cứu này, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế được so sánh với kháng thể kháng SIRPA HEFLB được mô tả trước đây (được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số: WO2017/178653). Như được thể hiện trong Bảng 16, kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực của sáng chế có giá trị IC_{50} thấp hơn so với giá trị quan sát được với kháng thể kháng SIRPA 3F9 huIgG1. Ngoài ra, kháng thể kháng SIRPA 3F9-14, 3F9-18, 3F9-20, và 3F9-22 đã cho thấy giá trị IC_{50} thấp hơn so với kháng thể kháng SIRPA HEFLB. Tương tự, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế đã cho thấy hoạt tính thực bào tốt hơn so với kháng thể kháng SIRPA HEFLB.

Bảng 16

Kháng thể	SIRPA		CD32		Khả năng thực bào*
	IC_{50} (nM)	% DR tối đa	IC_{50} (nM)	% DR tối đa	
3F9 huIgG1	0,1722	90%	0,679	67%	1,77
3F9 mIgG1	0,00905	89	0,0623	82%	1,51
3F9-14	0,0372	89%	0,135	62%	1,56
3F9-18	0,0174	90%	0,0915	65%	1,52
3F9-20	0,0283	90%	0,114	66%	1,62
3F9-22	0,0542	91%	0,133	66%	1,68
OSE HEFLB	0,0959	13%	n.d.	n.d.	1,05

n.d. = không được xác định, * số lần tăng so với hoạt tính cơ sở

Ví dụ 11: Kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực kích thích khả năng thực bào tế bào khối u trong đại thực bào M1 và M2

Đại thực bào trải qua quá trình biến nạp kiểu hình đáp ứng với tín hiệu vi môi trường thu được các kiểu hình tiền viêm (M1) hoặc kháng viêm (M2) riêng biệt. Kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế được đánh giá về khả năng gây ra mức thực bào tế bào khối u của nó trong đại thực bào cân bằng nội môi (giống M2) và đại thực bào viêm (giống M1). Bạch cầu đơn nhân được phân lập từ máu của người hiến khỏe mạnh bằng cách sử dụng ly tâm gradien mật độ trên Ficoll. Đại thực bào giống M1 và giống M2 được tạo ra bằng cách nuôi cấy bạch cầu đơn nhân với sự có mặt của GM-CSF (800 U/mL; Peprotech) hoặc M-CSF (25 ng/mL; Peprotech) trong 6 ngày. Đại thực bào đã phân cực được xử lý qua đêm bằng kháng thể đối chứng isotyp hoặc biến thể kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 Fc. Tế bào Raji được dán nhãn huỳnh quang có hoặc không có kháng CD20 huIgG1 được opsonin hóa được trộn với đại thực bào trong 2 giờ ở 37°C. Theo cách khác, tế bào Raji được opsonin hóa với hoặc kháng CD47 IgG4 (dòng vô tính hu5F9) một mình hoặc với kháng thể kháng CD47 và kháng CD20 huIgG1 và được bổ sung vào đại thực bào chưa được xử lý. Hoạt tính thực bào được đo bằng cách đếm tỷ lệ phần trăm đại thực bào dương tính kép với CD14/pHrodo.

Như được thể hiện trên FIG.11A, đại thực bào giống M2 được xử lý bằng cả hai biến thể Fc của kháng thể 3F9-22 tăng cường khả năng thực bào tế bào khối u so với đại thực bào được xử lý bằng mẫu đối chứng. Phù hợp với các quan sát trước đó,

kháng thể biến thể SELF Fc thể hiện mức tăng lớn hơn có ý nghĩa thống kê về khả năng thực bào của tế bào Raji không được opsonin hóa và được opsonin hóa so với kháng thể 3F9-22 huIgG1. Hơn nữa, đại thực bào giống M2 được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 SELF tăng cường khả năng thực bào của tế bào Raji không được opsonin hóa và được opsonin hóa đến mức độ tương tự như tế bào Raji được xử lý bằng kháng CD47 IgG4.

Đại thực bào giống M1 được biệt hóa từ bạch cầu đơn nhân được nuôi cấy với sự có mặt của GM-CSF có các đặc tính khác so với đại thực bào giống M2 có nguồn gốc từ MCSF. Ví dụ, đại thực bào giống M2 có nguồn gốc từ GM-CSF làm giảm sự biểu hiện của CD14, CD32A/B, và SIRPA. Ngoài ra, đại thực bào giống M1 dường như thực bào tế bào Raji không được opsonin hóa ở tốc độ cao hơn so với đại thực bào giống M2 (FIG.11B) có nguồn gốc từ cùng thể cho khỏe mạnh. Khi kích thích với biến thể kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 Fc, đại thực bào giống M1 đã làm tăng khả năng thực bào của tế bào Raji không được opsonin hóa ~50% so với đại thực bào được xử lý bằng mẫu đối chứng. Opsonin hóa tế bào Raji bằng kháng thể kháng CD20 huIgG1 không cho thấy hiệu quả bổ sung về khả năng thực bào bởi đại thực bào giống M1 được xử lý bằng kháng thể 3F9-22, điều này trái ngược với những quan sát được thực hiện với đại thực bào giống M2. Tương tự, tế bào Raji opsonin hóa bằng kháng CD47 IgG4 có hoặc không có kháng CD20 huIgG1 cũng không làm tăng khả năng thực bào trên mức cơ bản khi được bổ sung vào đại thực bào giống M1 (FIG.11B). Do đại thực bào có nguồn gốc từ GM-CSF điều hòa giảm sự biểu hiện FcgR, tế bào này có thể có tiềm năng thấp hơn để làm trung gian khả năng thực bào phụ thuộc vào kháng thể. Các kết quả này cũng cho thấy rằng kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 hoạt động chức năng bằng cách gây đối kháng SIRPA để gây ra khả năng thực bào trong cả hai đại thực bào M1 lẫn M2, trong khi đó kháng thể kháng CD47 hoạt động chủ yếu như tác nhân opsonin hóa đòi hỏi việc gắn FcgRs vào đại thực bào giống M2 để gây ra khả năng thực bào.

Ví dụ 12: Liệu pháp kết hợp để tăng cường hoạt tính kháng khối u của kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực

Một nhóm phụ nhỏ của tế bào ung thư, được gọi là tế bào khơi mào khối u (TIC) hoặc tế bào gốc ung thư (CSC), tạo ra kho vốn của tế bào ung thư tự kéo dài có khả năng tự làm mới lại và duy trì khối u. Bằng chứng cho thấy rằng tế bào khối u rắn

của người và CSC điều hòa tăng sự biểu hiện của CD47 để tránh các cơ chế giám sát miễn dịch cho phép tăng sinh và di căn tế bào khối u. Mô hình nuôi cấy trong khối u, trong đó tế bào ung thư phát triển như các cụm tế bào hình cầu ba chiều, được sử dụng rộng rãi để phân tích khả năng tự làm mới của CSC và để mô phỏng tốt hơn các điều kiện phát triển của tế bào *in vivo*. Sự hình thành khối u dựa trên sự nuôi cấy tế bào ung thư vào đĩa gắn siêu mỏng trong môi trường không có huyết thanh được bổ sung các yếu tố sinh trưởng, như yếu tố sinh trưởng biểu bì và các yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản. Đồng nuôi cấy khối u với đại thực bào sơ cấp của người cho phép đánh giá kháng thể kháng SIRPA về khả năng sống sót của tế bào khối u dưới dạng một tác nhân duy nhất hoặc kết hợp với liệu pháp kháng khối u khác.

Dòng tế bào MDA-MB-231 là dòng tế bào ung thư vú ba âm tính của người đặc trưng trước đây đã được chứng minh là tạo thành khối u. Để đo khả năng sống sót của tế bào khối u trong các thử nghiệm đồng nuôi cấy, tế bào MDA-MB-231 được tải nạp với virut gây bệnh mãn tính để biểu hiện cơ định luciferaza và GFP (MB231-Luc). Đối với sự hình thành khối u, 10.000 tế bào MB231-Luc trong mỗi giếng được gieo mầm vào đĩa 96 giếng trong môi trường khối tế bào không chứa huyết thanh StemXVivo (R&D Systems) được bổ sung heparin và hydrocortisone. Môi trường khối tế bào cũng được bổ sung MCSF để hỗ trợ khả năng sống sót của đại thực bào. MB231-Luc được nuôi cấy trong 2-3 ngày một mình hoặc với sự có mặt của 50.000 đại thực bào/giếng. Khả năng sốt sót của tế bào khối u được định lượng bằng cách đo hoạt tính luciferaza bằng OneGlo Reagent (Promega) được bổ sung vào mỗi giếng và ủ mẫu này trong 3 phút ở nhiệt độ trong phòng trên máy lắc đĩa. Tín hiệu phát quang được phát hiện bằng thiết bị đọc vi đĩa BioTek Synergy™ bằng cách sử dụng phần mềm GEN5™ 2.04.

Tế bào ung thư vú MDA-MB-231 biểu hiện cơ định luciferaza được nuôi cấy một mình hoặc với sự có mặt của đại thực bào của người trong môi trường khối tế bào không chứa huyết thanh được bổ sung MCSF. Tế bào được xử lý trong 2 ngày ở 37°C bằng kháng thể kháng EGFR (2ug/mL), kháng PDL1 (2ug/mL), hoặc paclitaxel (0,5 uM) có hoặc không có kháng thể kháng SIRPA 3F9-22. Để so sánh, tế bào khối u một mình hoặc với sự có mặt của đại thực bào được xử lý bằng kháng CD47 IgG4. Khả năng sốt sót của tế bào khối u được định lượng bằng cách đo hoạt tính luciferaza bằng chất phản ứng OneGlo. Như được thể hiện trên FIG.12A, tế bào MB231-Luc đã tăng sinh trong môi trường nuôi cấy có hoặc không có đại thực bào dựa trên các giá trị phát

quang. Kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 chỉ ức chế khả năng sốt sót của tế bào khối u khi tế bào MB231-Luc đã tạo ra các khối u với sự có mặt của đại thực bào. Kết quả này đã chứng minh rằng đại thực bào giữ lại được khả năng tiêu diệt khối u trong điều kiện nuôi cấy được tối ưu hóa cho khả năng sống sót của khối u. Trong các điều kiện tương tự, kháng thể kháng CD47 IgG4 đã không ức chế đáng kể khả năng sống sót của MB231-Luc.

Sau khi kiểm tra hiệu quả của một tác nhân duy nhất của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 trong thử nghiệm khả năng sống sót của khối u này, các nghiên cứu bổ sung được thực hiện để cho thấy hiệu quả của phương pháp điều trị kết hợp. Do khả năng sốt sót của tế bào khối u dựa vào sự có mặt của EGF trong môi trường, việc bổ sung kháng thể phong bế kháng EGFR đã cho thấy sự ức chế hoàn toàn sự phát triển của khối u khi tế bào MB231-Luc được nuôi cấy một mình. Hoạt tính kháng khối u của kháng thể kháng EGFR không tăng cường với sự có mặt của đại thực bào chưa được xử lý. Tuy nhiên, đại thực bào được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 tạo khả năng hoạt tính khán khối u của kháng thể kháng EGFR đến mức có ý nghĩa thống kê. Trong các điều kiện nuôi cấy tương tự, kháng thể kháng PDL1 đã cho thấy kiểu hình bất ngờ bằng cách gây ra quá trình gây chết theo chương trình tế bào khối u mạnh mẽ, bất kể sự có mặt của đại thực bào. Khả năng sống sót của tế bào MB231-Luc cũng giảm khi tiếp xúc với 500 nM paclitaxel, tác nhân hóa trị liệu làm ổn định vi ống được sử dụng thông thường để điều trị nhiều ung thư. Việc kết hợp paclitaxel với đại thực bào được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 cũng thể hiện mức giảm đáng kể có ý nghĩa thống kê về khả năng sốt sót của tế bào khối u. Các kết quả này đã chứng minh rằng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế tăng cường hoạt tính của liệu pháp kháng khối u mà hoạt động chức năng bằng nhiều cơ chế hoạt động ngoài quá trình opsonin hóa tế bào khối.

Tế bào ung thư vú MDA-MB-231 biểu hiện cơ định luciferaza được nuôi cấy một mình hoặc với sự có mặt của đại thực bào của người trong môi trường khối tế bào không chứa huyết thanh được bổ sung MCSF hoặc MCSF + IL-4 + IL-10. Khi được chỉ định, tế bào được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 hoặc kháng CD47 IgG4 trong 3 ngày ở 37°C. Khả năng sốt sót của tế bào khối u được định lượng bằng cách đo giá trị phát quang sau khi bổ sung bằng chất phản ứng OneGlo chứa cơ chất luciferaza. Thỉnh thoảng, đại thực bào có nguồn gốc bạch cầu đơn nhân từ người hiến

khỏe mạnh được nuôi cấy đồng thời với tế bào MB231-Luc ức chế khả năng sốt sót của tế bào khối u không được xử lý (FIG.12B). Để đảm bảo rằng đại thực bào được nuôi cấy đồng thời với tế bào MB231-Luc lựa chọn kiểu hình ức chế miễn dịch giống khối u hơn, môi trường khối tế bào được bổ sung IL-4 và IL-10. Như được thể hiện trên FIG.12B, tế bào MB231-Luc được nuôi cấy một mình đã tăng sinh đều như nhau trong môi trường được bổ sung MCSF hoặc MCSF cộng IL-4 và IL-10. Tuy nhiên, trong môi trường chỉ được bổ sung MCSF, đại thực bào từ thể cho 570 đã làm giảm khả năng sốt sót của tế bào khối u đến mức có ý nghĩa thống kê. Mức ức chế này bị đảo ngược bằng cách bổ sung IL-4 và IL-10 chứng minh rằng chiến lược nuôi cấy khác nhau phân cực đại thực bào để điều biến sự phát triển của tế bào khối u. Quan trọng là, xử lý đại thực bào bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 làm giảm đáng kể khả năng sốt sót của tế bào khối u trong cả hai điều kiện sinh trưởng.

Ví dụ 13: Kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực tăng cường quá trình tăng sinh tế bào T

Tế bào T tạo ra khớp thần kinh miễn dịch với tế bào giới thiệu kháng nguyên (APC) để khơi mào quá trình hoạt hóa và quá trình tăng sinh tế bào T. CD47 biểu hiện trên tế bào T có thể đếm quá trình hoạt hóa bằng cách truyền tín hiệu ức chế đến APC thông qua SIRPA. Tuy nhiên, tế bào T cũng biểu hiện SIRPG, thành viên khác của họ SIRP có khả năng gắn kết CD47 được biểu hiện trên APC. Đã cho thấy tương tác SIRPG (tế bào T)-CD47 (APC) làm ổn định khớp thần kinh miễn dịch và thúc đẩy quá trình hoạt hóa và quá trình tăng sinh tế bào T. Mặc dù kháng thể kháng CD47 phong bế tín hiệu ức chế đã phân phối thông qua SIRPA, kháng thể kháng CD47 cũng phong bế hiệu ứng kích thích từ gắn kết với SIRPG, và do đó, có thể chứng minh có hại trong việc gắn đáp ứng tế bào T kháng khối u hiệu quả. Do đó, kháng thể kháng SIRPA đối kháng tránh được nhược điểm tiềm ẩn này bằng cách ức chế sự truyền tín hiệu SIRPA mà không phá vỡ các tương tác quan trọng trong khớp thần kinh miễn dịch. Để kiểm tra giả thuyết này, kháng thể kháng SIRPA được đánh giá trong các thử nghiệm MLR một chiều và hai chiều.

Nguyên tắc của thử nghiệm MLR đó là APC có nguồn gốc từ một thể cho, thường là DC, là peptit trên phân tử MHC để tế bào T được phân lập từ thể cho riêng biệt. Phân đoạn nhỏ của tế bào T sẽ biểu hiện TCR có khả năng nhận diện phức hợp MHC:peptit và tăng sinh khi kích thích đồng thời. Trong MLR một chiều này, tế bào

từ một thể cho tham gia trình diện kháng nguyên và tế bào từ thể cho khác đáp ứng bằng cách tăng sinh. Trong MLR hai chiều này, cả hai thể cho góp phần APC và tế bào T vào phản ứng; do đó, hai quần thể tế bào T riêng biệt đáp ứng bằng cách tăng sinh.

Hiệu quả của kháng thể kháng SIRPA đối với quá trình tăng sinh tế bào T được đánh giá ban đầu trong thử nghiệm MLR hai chiều. PBMC được phân lập từ thể cho khỏe mạnh và được nuôi cấy đồng thời trong 3 ngày với sự có mặt của nồng độ tăng của các biến thể 3F9-22 Fc hoặc mẫu đối chứng isotyp. Quá trình tăng sinh tế bào T được ước tính bằng cách định lượng sự có mặt của tế bào hoạt hóa chuyển hóa dưới dạng chất chỉ thị số lượng tế bào. Hoạt tính chuyển hóa được định lượng bằng chất phản ứng CellTiter Glo (Promega), tạo ra tín hiệu phát quang tỷ lệ với lượng ATP có mặt. Như được thể hiện trên FIG.13A, PBMC được xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 đã cho thấy ~1,5 lần tăng ~1,5 lần mức phát quang so với PBMC đã được xử lý bằng isotyp, điều này cho thấy mức tăng sinh tế bào T tăng. Ngược lại với thử nghiệm khả năng thực bào được mô tả trước đây, biến thể kháng thể 3F9-22 huIgG1 Fc có xu hướng kích thích quá trình tăng sinh tế bào T hiệu quả hơn so với biến thể SELF Fc.

Để xác định xem liệu quá trình tăng phát quang quan sát được với kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 có đặc hiệu với kháng thể kháng SIRPA hay không, thử nghiệm MLR hai chiều được lặp lại với kháng thể kháng CD47. PBMC từ hai thể cho khỏe mạnh được phân lập và 100.000 tế bào từ mỗi thể cho được trộn cùng với nồng độ tăng của kháng thể thử nghiệm hoặc kháng thể đối chứng isotyp. Quá trình tăng sinh tế bào được đo bằng chất phản ứng CellTiter Glo sau 3 ngày đồng nuôi cấy. Như được thể hiện trên FIG.13B, các biến thể kháng thể kháng SIRPA 3F9-14 và 3F9-22 huIgG1 và ASPS Fc đã làm tăng tín hiệu phát quang ~70% so với tín hiệu quan sát được với PBMC được xử lý bằng kháng thể đối chứng isotyp. Kháng thể kháng SIRPA trên SELF Fc (3F9-14 SELF và 3F9-22 SELF) không làm tăng tín hiệu phát quang so với mẫu đối chứng trong cùng các điều kiện thiết lập hiệu quả phụ thuộc vào Fc khác đối với chức năng của kháng thể. Ngược lại với kháng thể 3F9-22 huIgG1, việc xử lý bằng kháng thể kháng CD47 đã cho thấy sự phát quang tăng nhẹ ~10%. Kết hợp lại với nhau, các kết quả từ thử nghiệm MLR hai chiều đã cho thấy rằng SIRPA đối kháng với kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 huIgG1 thúc đẩy quá trình tăng sinh tế bào T.

Do sự định lượng hoạt tính chuyển hóa trong MLR hai chiều là phép đo gián

tiếp về quá trình tăng sinh tế bào T, thử nghiệm MLR một chiều truyền thống hơn được thực hiện để xác nhận hiệu quả kích thích quan sát được với kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 huIgG1. Tế bào tua sơ cấp của người (DC) có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân của thể cho khỏe mạnh và được nuôi cấy đồng thời với tế bào T alen lặn được dán nhãn thuốc nhuộm CFSE với tỷ lệ 1:5. Tế bào tua được điều trị bằng biến thể kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 Fc hoặc kháng CD47 (hu5F9) hoặc kháng thể đối chứng isotyp và ủ ở 37°C trong 5 ngày. Quá trình tăng sinh tế bào T được đo bằng cách nhuộm tế bào T với kháng thể kháng CD3 APC và tạo cổng trên quần thể có CFSE thấp. FIG.14A cho thấy rằng DC từ các thể cho được xử lý bằng kháng thể 3F9-22 huIgG1 hoặc ASPS khác nhau đã làm tăng quá trình tăng sinh tế bào T ~50% so với DC được xử lý bằng isotyp hoặc kháng CD47. Mức tăng về quá trình tăng sinh tế bào T này tỷ lệ với mức tăng về sự phát quang quan sát được với PBMC được xử lý bằng kháng thể 3F9-22 huIgG1 trong MLR hai chiều. FIG.14B thể hiện đồ thị FACS đại diện cho dữ liệu thể hiện trên FIG.14A. Do đó, các kết quả từ MLR một chiều và hai chiều đã cho thấy SIRPA đối kháng với kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 huIgG1 mà không phong bế tương tác SIRPG-CD47 có thể thúc đẩy quá trình tăng sinh tế bào T.

Ví dụ 14: Kháng thể kháng SIRPA đã trưởng thành về ái lực tăng cường giải phóng xytokin tiền viêm

Để biệt hóa tiếp hoạt tính của biến thể kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 Fc, đại thực bào sơ cấp của người từ hai người hiến khỏe mạnh được kích thích qua đêm với liều lượng LPS giảm kết hợp với kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 hoặc kháng thể đối chứng isotyp. Trên FIG.15A, đại thực bào sơ cấp của người từ hai thể cho khỏe mạnh được kích thích qua đêm ở 37°C với 0,5 ng/mL LPS kết hợp với biến thể kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 Fc hoặc kháng thể đối chứng isotyp. Phân đoạn dịch nổi bề mặt được thu gom và phân tích về mức TNFα bằng ELISA. Trên FIG.15B, đại thực bào sơ cấp của người được kích thích qua đêm ở 37°C với 0,5 ng/mL LPS kết hợp với hoặc nồng độ tăng của biến thể kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 Fc hoặc kháng thể đối chứng isotyp. Phân đoạn dịch nổi bề mặt được thu gom và được phân tích bằng ELISA về mức giải phóng TNFα. Như được thể hiện trên FIG.15A và FIG.15B, đại thực bào đã đồng kích thích bằng kháng thể 3F9-22 ASPS có mức tăng đáng kể về mức tiết TNFα so với kháng thể đối chứng isotyp hoặc kháng thể 3F9-22 SELF đã đồng kích

thích tế bào. Biến thể kháng thể 3F9-22 SELF Fc đã cho thấy hoạt tính đồng kích thích tối thiểu. Chuẩn độ kháng thể kháng SIRPA đã cho thấy kiểu tương tự trong đó các biến thể kháng thể 3F9-22 huIgG1 và ASPS đã làm tăng rõ ràng mức giải phóng TNFα theo cách phụ thuộc liều lượng bằng đại thực bào đã được mồi bằng LPS, trong khi đó kháng thể 3F9-22 SELF thể hiện đáp ứng TNFα đã được suy giảm với khả năng sống sót cao. Các kết quả này đã chứng minh rằng kháng thể kháng SIRPA phong bế không CD47 đối kháng SIRPA theo cách phụ thuộc Fc để giải phóng mức ức chế từ quá trình truyền tín hiệu ITIM.

Ví dụ 15: Lập bản đồ epitop các vị trí gắn kết kháng thể kháng SIRPA

Lập bản đồ epitop kháng thể kháng SIRPA được thực hiện bằng cách sử dụng thư viện quét alanin đã tạo ra bằng cách gây đột biến kiểu súng săn trình tự ADB bổ trợ của SIRPA của người. Cấu trúc biểu hiện SIRPA mã hóa nhãn V5 epitop đầu tận cùng C được đưa vào đột biến quét alanin hiệu suất cao (được nêu trong Davidson và Doranz, 2014 Immunology 143, 13-20) để tạo ra thư viện đột biến toàn diện. Mỗi gốc này đại diện cho miền ngoại bào SIRPA (axit amin 31-374 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:1) được gây đột biến, hầu hết thành alanin, trong khi các codon alanin bị đột biến thành serin

Các dòng vô tính thư viện đột biến SIRPA, được bố trí trong vi đĩa 384 giếng, được chuyển nhiễm riêng lẻ vào tế bào HEK-293T và cho phép biểu hiện trong 22 giờ. Các kháng thể được phân cắt để tạo ra Fab, sau đó tế bào được ủ với Fabs đã pha loãng trong 10% huyết thanh dê bình thường (NGS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Trước khi sàng lọc thư viện, nồng độ Fab chính được xác định bằng cách sử dụng đường cong chuẩn độ miễn dịch huỳnh quang độc lập đối với tế bào biểu hiện SIRPA dạng dại để đảm bảo rằng các tín hiệu nằm trong phạm vi phát hiện tuyến tính. Fab được phát hiện bằng cách sử dụng 7,5 µg/mL kháng thể thứ cấp đã được liên hợp với AlexaFluor488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Westgrove, PA) trong NGS 10%. Tế bào được rửa hai lần bằng PBS và được tạo huyền phù lại trong Cellstripper (Cellgro, Manassas, VA) với BSA 0,1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Trong một số trường hợp, các điều kiện nghiêm ngặt hơn được sử dụng, bao gồm tăng độ pH, tăng nhiệt độ và tăng thời gian phân ly. Mức phát huỳnh quang tế bào trung bình được phát hiện bằng cách sử dụng máy đo lưu lượng tế bào hiệu suất cao Intellicyt (HTFC, Intellicyt, Albuquerque, NM). Tính phản ứng Fab đối với mỗi dòng vô tính đột biến

được tính toán so với tính phản ứng của protein SIRPA dạng dại bằng cách trừ đi tín hiệu từ các mẫu đối chứng đã được chuyển nhiễm mô hình, và chuẩn hóa thành tín hiệu từ các mẫu đối chứng đã được chuyển nhiễm SIRPA dạng dại.

Các gốc đột biến trong các dòng vô tính của thư viện được xác định là "quan trọng" đối với epitop gắn kết Fab nếu chúng không hỗ trợ tính phản ứng của Fab thử nghiệm mà lại hỗ trợ tính phản ứng của kháng thể tham chiếu có sẵn trên thị trường, MAB4546 (R&D Systems) hoặc Fab kháng SIRPA bổ sung. Chiến lược đối chiếu này đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc loại trừ các đột biến SIRPA bị gấp lỗi cục bộ hoặc có khiếm khuyết về sự biểu hiện.

Kháng thể kháng SIRPA 9C2 được mô tả trong đơn quốc tế số PCT/US2017/65366.

mAb 9C2: Trình tự miền biến đổi chuỗi nặng

EFQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYSLTGYNMNWVKQSRGKSLEWIGNINPHYGSS
TYNQNFKDKATLTVDKSSSAAYMQFNSLTSEDSAVYYCAREGYDGVFDYWGQGTTLTV
SS (SEQ ID NO:45)

mAb 9C2: Trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIYVTSNLASGVP
TRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPRTFGGGTKLEIK

(SEQ ID NO:46)

Bảng 17 dưới đây dưới đây mô tả tính phản ứng gắn kết và khoảng trung bình cho tất cả các gốc được xác định là quan trọng trong các sàng lọc. Các gốc quan trọng sơ cấp được định nghĩa là các gốc có đột biến âm tính với gắn kết kháng thể thử nghiệm (<30% mức gắn kết với WT) nhưng dương tính với kháng thể đối chứng (>80% WT).

Bảng 16 mô tả các mô hình cấu trúc tinh thể của SIRPA (PDB ID 2WNG; Hatherley et al., 2009, *J Biol Chem*, 284: 26613-9) nêu bật các gốc quan trọng để liên kết kháng thể kháng SIRPA 3F9 và 9C2 dưới dạng hình cầu bóng mờ.

Như được chỉ ra trong Bảng 18, các gốc SIRPA quan trọng liên quan đến việc gắn kết bằng kháng thể kháng SIRPA 3F9 bao gồm các gốc axit amin R282, Q284, và G337 của trình tự SIRPA v1 của người được đề cập trên đây. Các gốc SIRPA quan

trọng liên quan đến việc gắn kết bằng 9C2 (như được bộc lộ trong đơn quốc số PCT/US2017/65366) bao gồm các gốc axit amin Q281, R282, Q284, L285, W287, R295, E297, V302, và W315 của trình tự SIRPA v1 của người được đề cập trên đây. Các gốc này nằm trong miền Ig gần màng của SIRPA, trong tài liệu khoa học SIRPA được gọi là miền D3, tương ứng với axit amin 254-348 của trình tự SIRPA v1 của người. Nhiều báo cáo đã công bố chứng minh rằng miền D3 của SIRPA ở người liên kết với các phân tử nhận diện mẫu trong họ collectin, cụ thể là protein hoạt động bề mặt D và A (lần lượt là Sp-D và Sp-A).

Bảng 17: Các gốc quan trọng cho gắn kết của 3F9 và 9C2

Tính phản ứng gắn kết (%WT)		
Đột biến	3F9 Fab	9C2 Fab
Q281A	151,1 (14)	14,1 (11)
R282A	3,8 (2)	4,7 (2)
Q284A	3,3 (1)	6,5 (5)
L285A	107,0 (12)	17,9 (1)
W287A	124,8 (12)	2,4 (2)
R295A	120,9 (10)	1,8 (2)
E297A	116,9 (14)	5,3 (0)
V302A	92,3 (29)	4,9 (0)
W315A	117,3 (10)	19,0 (6)
G337A	17,9 (9)	36,3 (68)

Bảng 18: Các gốc liên quan đến kháng thể kháng SIRPA gắn kết

Kháng thể	Các gốc SIRPA quan trọng
3F9	R282, Q284, G337
9C2	Q281, R282, Q284, L285, W287, R295, E297, V302, W315

Ví dụ 16: Kháng thể kháng SIRPα tăng cường hoạt tính kháng khối u của chất ức chế điểm kiểm tra trong mô hình khối u đồng gen

Kháng thể trị liệu hướng đích con đường SIRPA-CD47 có thể dựa trên các mô hình khối u ghép ngoại lai cho các nghiên cứu chứng minh khái niệm trong đó chuột nhắt NOD hoặc NOG thiếu hụt miễn dịch duy trì sự phát triển của tế bào ung thư được cấy ghép ở người. Do biến thể alen của SIRPA của loài gặm nhấm được biểu hiện bởi chuột nhắt NOD gắn kết với CD47 của người, sự tương tác này cho phép gắn tế bào của người vào vật chủ của loài gặm nhấm. Tuy nhiên, các con chuột nhắt này cũng có thể phóng đại vai trò của con đường này vì NOD SIRPA gắn kết CD47 của người với ái lực lớn hơn SIRPA của người. Hơn nữa, đột biến $Prkdc^{SCID}$ và $IL2R\gamma^{Null}$ ở các chủng chuột nhắt thiếu hụt miễn dịch loại bỏ tế bào T, tế bào B và tế bào NK, do đó

làm cho tế bào dòng tủy và hệ thống miễn dịch bẩm sinh trở thành tế bào tác động duy nhất có thể ức chế sự phát triển của khối u. Các mô hình ghép ngoại lai khối u không cho phép dò các liệu pháp hướng đích tế bào miễn dịch bẩm sinh để mồi hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch kháng khối u thích ứng. Do đó, để đánh giá các kháng thể kháng SIRPA của người theo sáng chế trong trường hợp vật chủ động vật bình thường về miễn dịch, các gen đối với SIRPA của người và CD47 của người đã được đưa vào chủng chuột nhắt C57BL6/J.

Tóm lại, các nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn (BAC) chứa axit nucleic mã hóa SIRPA của người hoặc axit nucleic mã hóa CD47 của người với các trình tự sườn bên để bao gồm các yếu tố điều hòa gen của người có liên quan được xác định bằng cách sử dụng trình duyệt bộ gen UCSC và CloneDB từ NCBI. Một dòng vô tính BAC (BACRP11-636L228) được dự đoán là chứa các trình tự mã hóa cho gen SIRPA của người. Một dòng vô tính BAC khác (BACRP11-671F8) được dự đoán là chứa trình tự mã hóa cho gen CD47 của người. Các con chuột nhắt chứa dòng vô tính BAC quan tâm sau đó được tạo ra bằng cách tiêm ADN BAC tinh khiết vào hợp tử C57BL6/J của chuột nhắt bằng cách sử dụng kỹ thuật tiêm tiền nhân chuẩn. Các hợp tử được chuyển trở lại chuột nhắt cái, và chuột con được tạo kiểu gen về sự có mặt của gen chuyển mong muốn. Chuột sáng lập có chứa gen chuyển sau đó được lai tạo với chuột không chuyển gen, và thế hệ con cháu được kiểm tra sự biểu hiện của gen chuyển bằng PCR bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn và bổ sung bằng cách nhuộm FACS tế bào máu ngoại vi tạo ra chuột. Các con chuột chuyển gen BAC chứa từng gen riêng lẻ quan tâm được lai với nhau để tạo ra các con chuột "đã được làm giống như kháng thể của người" biểu hiện cả SIRPA của người lẫn CD47 của người.

Ngoài thao tác di truyền chuột nhắt để biểu hiện SIRPA ở người và CD47 của người như mô tả trên đây, các dòng tế bào khối u tổng hợp cũng được thao tác di truyền để thay thế CD47 của chuột nhắt bằng CD47 của người. Tóm lại, công nghệ CRISPR-Cas9 được sử dụng để đưa các phức hợp Cas9/ARN dẫn đường (gRNA) vào tế bào đích MC38. Sự hình thành indel qua trung gian Cas9/gRNA tại vùng đích (exon 2 của CD47 của chuột nhắt) dẫn đến dịch chuyển khung và/hoặc dừng sớm, do đó loại bỏ sự biểu hiện của gen CD47 chuột nhắt nội sinh. Sau khi chuyển nhiễm gRNA và Cas9, các dòng vô tính có nguồn gốc từ một tế bào duy nhất được sàng lọc bằng cách giải trình tự và các dòng vô tính đồng hợp tử chứa đột biến mong muốn được mở rộng.

Như được thể hiện trên FIG.17A (bảng trên cùng), phân tích FACS về tế bào MC38 của bố mẹ và dòng tế bào loại trực tiếp CD47 của chuột nhắt (MC38-mCD47KO) được nhuộm bằng kháng thể CD47 kháng chuột nhắt xác nhận việc mất sự biểu hiện của CD47 của chuột nhắt trong tế bào được thao tác di truyền này. Sau đó, tế bào MC38-mCD47KO được tải nạp bằng virut gây bệnh mãn tính chứa đoạn cài xen của gen CD47 của người. Tế bào MC38-mCD47KO-huCD47+ được chọn lọc bằng puromyxin và mở rộng. FIG.17A (bảng dưới cùng) thể hiện biểu đồ FACS xác minh sự biểu hiện của CD47 của người trong quần thể tế bào đã chọn.

Tác dụng kháng khối u của các kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế đã được đánh giá *in vivo* bằng cách sử dụng mô hình ung thư biểu mô ruột kết ở chuột nhắt với chuột nhắt huSIRPA/huCD47 BACtg được ghép với tế bào MC38-mCD47KO-huCD47+ kết hợp với chất ức chế điểm kiểm tra tế bào T. Các con chuột này được tiêm dưới da 500.000 tế bào MC38 ở hạ sườn phải. Liệu pháp kháng thể bắt đầu khi chuột được phân ngẫu nhiên thành các nhóm khoảng mười ngày sau khi cấy ghép tế bào hoặc khi khối u đạt được thể tích trung bình là 80 mm^3. Chuột được tiêm hai lần vào màng bụng (IP) mỗi tuần trong 3 tuần kháng thể kháng SIRPA 3F9 mIgG1 hoặc kháng thể kháng SIRPA 3F9 mIgG2A ở 10 mg/kg kết hợp với liều tối ưu của kháng thể chống chuột PDL1 (dòng 10F.9G2, Bioxcell) ở 5 mg/kg. Chuột được giết khi khối u đạt đến thể tích ~2000 mm^3.

FIG.17B thể hiện đường cong phát triển khối u trung bình của chuột nhắt chuyển gen huSIRPa/huCD47 BAC được cấy dưới da tế bào MC38 được thao tác di truyền để thiếu hụt mức biểu hiện CD47 của chuột nhắt và mức biểu hiện quá mức CD47 của người (MC38-mCD47KO/huCD47+). Chuột được xử lý bằng kháng thể đối chứng isotyp, kháng thể kháng chuột PDL1, kháng thể kháng SIRPA 3F9 mIgG1 cộng với kháng thể kháng chuột PDL1, hoặc kháng thể kháng SIRPA 3F9 mIgG2A cộng với kháng thể kháng chuột PDL1, theo chỉ định. Việc xử lý này được bắt đầu khi khối u có kích thước trung bình là 80 mm^3. Như được thể hiện trên FIG.17B, việc xử lý bằng kháng thể kháng PDL1 ức chế sự phát triển của khối u 20% so với các con chuột được xử lý bằng kháng thể đối chứng isotyp, điều này không đạt được ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, liệu pháp kết hợp kháng thể kháng PDL1 với kháng thể kháng SIRPA 3F9 mIgG1 hoặc kháng thể kháng SIRPA 3F9 mIgG2A tiếp tục ức chế sự phát triển khối u ở các con chuột này lần lượt là 40% và 47%. FIG.17C thể hiện đồ thị dạng mỳ

ống (spaghetti) về khối lượng khối u của mỗi con chuột trong các nhóm xử lý. Ngoại trừ một số con chuột đáp ứng kém, thể tích khối u không vượt quá 1000 mm^3 ở hầu hết các con chuột trong nhóm xử lý kết hợp, trong khi khối u ở một số con chuột trong nhóm đối chứng isotyp hoặc nhóm đơn trị liệu kháng thể kháng PDL1 đạt đến giới hạn 2000 mm^3.

Các kết quả này đã chứng minh rằng kháng thể kháng SIRPA 3F9 theo sáng chế có hiệu quả để tăng cường hoạt tính kháng khối u của chất ức chế điểm kiểm tra trong mô hình động vật bình thường về miễn dịch mã hóa con đường SIRPA-CD47 của người. Các kết quả này chỉ ra rằng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế hữu ích để tăng cường hoạt tính kháng khối u của chất ức chế điểm kiểm tra. Theo đó, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có hiệu quả trong việc điều trị ung thư khi được sử dụng kết hợp với liệu pháp ức chế điểm kiểm tra.

Ví dụ 17: Kháng thể kháng SIRPα điều hòa giảm sự biểu hiện của SIRPA trên tế bào tủy sống thâm nhập khối u trong khối u đồng gen của chuột nhắt

Ví dụ trước đây đã chứng minh hoạt tính kháng khối u của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế trong chuột nhắt chuyển gen SIRPA/CD47 BAC của người. Để kiểm tra hoạt tính kháng khối u có tương quan với mức điều hòa giảm qua trung gian kháng thể của SIRPA trên đại thực bào khối u, tế bào tủy sống khối u được xác định đặc điểm sau khi dùng thuốc.

SIRPA của người/huCD47 BAC chuột nhắt chuyển gen được cấy dưới da ở hạ sườn phải với 500.000 tế bào MC38-mCD47KO/huCD47+. Các khối u ở chuột phát triển đến thể tích trung bình là ~ 400 mm^3 trước khi sử dụng kháng thể. Chuột được tiêm hai mũi vào màng bụng (IP) kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 mIgG2A cách nhau ba ngày với liều lượng 3 mg/kg, 10 mg/kg hoặc 30 mg/kg. Các con chuột đối chứng được tiêm 2 lần IP isotyp mIgG2A với liều 10 mg/kg. Mô khối u và lá lách được thu hoạch từ chuột 1 ngày, 4 ngày và 8 ngày sau khi tiêm liều kháng thể thứ hai. Các lá lách được xử lý thành huyền phù tế bào đơn bằng cách phân ly cơ học qua bộ lọc tế bào 70 μm. Sau đó, tế bào được rửa sạch bằng PBS và tế bào hồng cầu được ly giải bằng dung dịch đệm ly giải ACK. Sau đó, tế bào được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm FACS bao gồm PBS/2% FBS và được chuẩn bị để nhuộm. Tương tự, các mô khối u được xử lý thành huyền phù tế bào đơn bằng cách phân ly cơ học và enzym

bằng thiết bị phân ly gentleMACS ™ (Miltenyi Biotec). Phần đồng nhất mô được lọc qua bộ lọc tế bào 70 µm và được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm FACS bao gồm PBS/2% FBS để nhuộm. Tế bào được nhuộm với bảng sau:

Bảng 19

Chất huỳnh quang	Chất đánh dấu Dòng vô tính	
AmCyan (BV510)	Sống/chết	
PECy7	mCD45	30-F11
Xanh dương (BV421)	mCD11b	M1/70
PerCp/Cy5.5	mF4/80	BM8
APC/Cy7	mLy6G	1A8
AF488 (FITC)	mLy6C	HK1.4
APC	hSIRPa	SE5A5

FIG.18A thể hiện mức thay đổi tương đối trong sự biểu hiện của SIRPA theo thời gian trên tế bào dòng tuỷ thâm nhiễm khối u (bạch cầu đơn nhân và đại thực bào). Đại thực bào liên quan đến khối u được xác định là tế bào CD45 + CD11b + F4/80 + Ly6C- Ly6G-, trong khi tế bào đơn nhân thâm nhiễm khối u được xác định là tế bào CD45 + CD11b + F4/80- Ly6C + Ly6G-. So với các con chuột được sử dụng kháng thể đối chứng isotyp, các con chuột được sử dụng kháng thể kháng SIRPA cho thấy sự biểu hiện của SIRPA trên bề mặt tế bào giảm gần như 80% sau khi sử dụng kháng thể sau 1 ngày trên cả bạch cầu đơn nhân khối u lẫn đại thực bào khối u. Mức biểu hiện của SIRPA trở lại mức ban đầu sau 4 ngày hoặc 8 ngày ở các con chuột được sử dụng lần lượt 3 mg/kg hoặc 10 mg/kg kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 mIgG2A. Mức biểu hiện của SIRPA ổn định xuống khoảng 50% dưới mức cơ bản ở các con chuột được sử dụng 30 mg/kg kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 mIgG2A.

Khoang lách cũng được lập profin miễn dịch để xác định xem có thể xác định được mối tương quan bất kỳ với vi môi trường khối u hay không. Tế bào đơn nhân ở lách xuất hiện khả năng chống lại quá trình điều hòa giảm thụ thể qua trung gian kháng thể nhiều hơn so với tế bào đơn nhân của khối u (FIG.18B). Tế bào đơn nhân ở lách được định nghĩa là tế bào CD45 + CD11b + F4/80- Ly6C + Ly6G-. Đại thực bào tủy đỏ của lách được xác định là tế bào CD45 + CD11b- F4/80 + Ly6C-. Tế bào đơn nhân ở lách đã chứng minh sự điều hòa tối đa của SIRPA là ~ 40% sau khi sử dụng kháng thể một ngày và sự biểu hiện của thụ thể được phục hồi nhanh chóng ở các thời

điểm sau đó. Mặt khác, đại thực bào tủy đỏ của lách theo mô hình biểu hiện thụ thể SIRPA tương tự như quan sát được với đại thực bào khối u.

Kết hợp lại với nhau, các kết quả này đã chứng minh rằng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có hiệu quả trong việc làm giảm (điều chỉnh giảm) mức SIRPA trên đại thực bào, cụ thể đại thực bào liên quan đến khối u, và mức giảm hoặc điều hòa giảm mức SIRPA trên đại thực bào tương quan với hoạt tính kháng khối u của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế.

Ví dụ 18: Kháng thể kháng SIRPA điều hòa giảm sự biểu hiện của SIRPA trên tế bào tủy sống thâm nhiễm khối u trong chuột nhắt có hệ miễn dịch của người (HIS)

Do miền Fc của kháng thể kháng SIRPA có vai trò trong điều hòa giảm thụ thể và chức năng của kháng thể, nên các con chuột được hoàn nguyên bằng hệ thống miễn dịch của người đã được sử dụng để so sánh hoạt tính của các biến thể Fc khác nhau với các kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế. Các mô hình chuột HIS đòi hỏi sự kết hợp của tế bào gốc tạo máu của người CD34 + (hHSC) thu được từ máu cuống rốn vào các con chuột bị suy giảm miễn dịch (tức là chủng NOG) sau khi chúng được điều hòa trước bằng chiếu xạ dưới mức gây chết. HSC phát triển ổn định các dòng tế bào mở rộng, đặc biệt là các quần thể tế bào lympho, trong máu ngoại vi, tủy xương, tuyến ức và lá lách (cũng như các mô khác). Chuột NOG được thao tác di truyền để biểu hiện GM-CSF của người và IL-3 của người (NOG-EXL; Taconic) mang lại lợi ích bổ sung là hỗ trợ quá trình biệt hóa tế bào dòng tủy lớn hơn so với các dòng chuột khác. Chuột HIS mang đến cơ hội nghiên cứu sự tương tác của hệ thống miễn dịch-khối u của người *in vivo* trên các con chuột được cấy các dòng tế bào ung thư của người. Ngoài ra, chuột HIS giúp đánh giá cơ chế hoạt động của các ứng cử viên kháng thể điều trị trong môi trường *in vivo*.

Các con chuột được cấy tế bào u ác tính A375 của người dưới da ở vùng sườn với mật độ tế bào là $3x10^6$ tế bào trên mỗi con chuột với 50% Matrigel (Cat.354234; Corning). Các khối u phát triển đến thể tích trung bình là 400 mm^3 trước khi chuột được tiêm 2 mũi dưới màng bụng (IP) 3F9-22 huIgG1 P331S (PS), 3F9-22 huIgG1 N325S / L328F (NSLF), hoặc huIgG1 đối chứng isotyp với liều lượng 10 mg/kg cách nhau ba ngày. Máu, lá lách và các mô khối u được thu hoạch 1 ngày sau khi tiêm kháng thể thứ hai. Các lá lách được xử lý thành huyền phù tế bào đơn bằng cách phân

ly cơ học qua bộ lọc tế bào 70 µm. Tế bào được rửa bằng PBS và tế bào hồng cầu được ly giải bằng dung dịch đệm ly giải ACK. Sau đó, tế bào được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm FACS bao gồm PBS/2% FBS và được chuẩn bị để nhuộm. Tương tự, các mô khối u được xử lý thành huyền phù tế bào đơn bằng cách phân ly cơ học và enzym bằng Máy phân ly gentleMACS ™ (Miltenyi Biotec). Phần đồng nhất mô được lọc qua bộ lọc tế bào 70 µm và được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm FACS bao gồm PBS/2% FBS để nhuộm. Tế bào máu ngoại vi được xử lý bằng dung dịch đệm ly giải ACK để ly giải RBC và được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm FACS bao gồm PBS/2% FBS. Tế bào bị nhuộm với bảng sau:

Bảng 20

Chất huỳnh quang	Chất đánh dấu	Dòng vô tính
PERCPCY5	CD3	SK7
PERCPCY5	CD19	HIB19
FITC	CD14	M5E2
PE-Cy7	CD11b	ICRF44
Alexa700	CD45 của người	2D1
AmCyan	Sống/CHẾT	
APC/DyL650	SIRPA	Bên trong
BV421	CD16	3G8
BUV395	HLA-DR	L243
PE-CF594	CD163	GHI/61
PE	CD86	IT2,2
APC-Cy7	CD45 của chuột nhắt	30-F11

Chuột NOG-EXL được ghép với tế bào gốc tạo máu CD34+ lấy từ dây rốn của người (HSC) từ hai thể cho khác nhau (thể cho A và B). Tất cả các con chuột đều được cấy dưới da 3 triệu tế bào A375, dòng tế bào u ác tính của người. Các khối u đã phát triển đến thể tích trung bình là ~ 400 mm^3 trước khi sử dụng kháng thể. Chuột được tiêm hai mũi kháng thể kháng SIRPA dưới màng bụng (IP) cách nhau ba ngày với liều lượng 10 mg/kg. Chuột đối chứng được tiêm 2 mũi tiêm IP isotyp huIgG1 với liều 10 mg/kg. Mô khối u được thu hoạch từ chuột 1 ngày sau khi tiêm liều kháng thể thứ hai.

FIG.19 thể hiện thiết kế nghiên cứu và kết quả của quá trình điều hòa giảm SIRPA qua trung gian kháng thể ở chuột NOG-EXL đã được làm giống như kháng thể của người mang khối u A375 trong các nghiên cứu này. FIG.19A cho thấy 8 con chuột được ghép với CD34+ HSC từ thể cho A và 29 con chuột được ghép với CD34+ HSC từ thể cho B. Tóm lại, 40 con chuột được ghép với CD34+ HSC từ hai thể cho khác

nhau được mua từ Taconic, NY. Vào 10 tuần sau khi ghép, chuột được kiểm tra chất lượng trước khi vận chuyển để phục hồi bạch cầu của người bằng phương pháp đo tế bào theo dòng chảy. Hầu hết các con chuột (36/40) chứa> 50% tế bào huCD45 + trong máu ngoại vi.

Đại thực bào liên quan đến khối u ở chuột NOG-EXL được xác định là tế bào CD45 + CD11b + CD14 + CD16 + CD3- CD19-. FIG.19B cho thấy mức độ biểu hiện của SIRPA trên đại thực bào khối u ở người được mô tả dưới dạng giá trị MFI (bảng bên trái) hoặc giá trị chuẩn hóa (bảng bên phải). Việc xử lý bằng kháng thể kháng SIRPA dẫn đến mức điều hòa giảm đáng kể SIRPA trong đại thực bào khối u của người từ cả hai thể cho so với nhóm đối chứng isotyp. Việc chuẩn hóa các giá trị MFI cho mỗi thể cho cho thấy mức giảm sự biểu hiện của SIRPA ~ 70%, xấp xỉ mức điều hòa giảm quan sát được trong đại thực bào có nguồn gốc bạch cầu đơn nhân *in vitro* và trong đại thực bào khối u ở chuột nhắt chuyển ge BAC. Không quan sát được sự khác biệt đáng kể về hoạt tính giữa biến thể kháng SIRPA 3F9-22 PS Fc và biến thể NSLF Fc của kháng thể kháng SIRPA trong các thử nghiệm này.

Ngoài sự biểu hiện của SIRPA, đại thực bào khối u từ các thử nghiệm này cũng được xác định để kiểm tra sự biểu hiện của các dấu hiệu M1. Đại thực bào khối u được xác định là tế bào huCD45+ huCD11b+ CD14+ huCD16+. Như được thể hiện trên FIG.20A, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế điều hòa tăng sự biểu hiện của HLA-DR. Việc chuẩn hóa các giá trị MFI cho từng thể cho đã chứng minh rằng biến thể kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 PS Fc tăng mức biểu hiện HLA-DR ~ 3 lần ở cả hai thể cho so với mức biểu hiện quan sát được với mẫu được xử lý kháng thể đối chứng isotyp. Ngược lại, biến thể kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 NSLF Fc tăng mức biểu hiện HLA-DR ~1,5-2 lần so với mức biểu hiện quan sát được với mẫu được xử lý kháng thể đối chứng isotyp. Chỉ có sự gia tăng đo được trên đại thực bào của thể cho B đạt được ý nghĩa thống kê với biến thể kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 NSLF Fc. Tương tự, kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế đã làm tăng mức biểu hiện CD86 trên đại thực bào khối u chỉ từ thể cho B (FIG.20B). Mặc dù cả hai biến thể PS và NSLF Fc đều làm tăng mức biểu hiện CD86 lên ~ 40% so với nhóm kháng thể đối chứng isotyp, chỉ có biến thể PS Fc đạt được ý nghĩa thống kê đối với mức biểu hiện CD86 tăng. Các kết quả này đã chứng minh rằng cả hai biến thể PS và NSLF Fc của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 điều hòa giảm SIRPA và tăng điểm đánh dấu M1 trên

đại thực bào khối u của người; tuy nhiên, biến thể PS có vẻ mạnh hơn một phần so với biến thể NSLF trong các thử nghiệm này.

Mức điều hòa giảm SIRPA qua trung gian kháng thể cũng được đánh giá trong bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi và bạch cầu đơn nhân lá lách để so sánh hoạt tính của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế trong khối u và các khoang miễn dịch ngoại vi. Quần thể bạch cầu đơn nhân của người được xác định là tế bào CD45+ CD11b+ CD14+ CD16- CD3- CD19. Chuột nhắt được tiêm hai lần dưới màng bụng (IP) kháng thể kháng SIRPA cách nhau ba ngày với liều 10 mg/kg. Chuột nhắt đối chứng được tiêm 2 lần dưới màng bụng kháng thể đối chứng huIgG1ở 10 mg/kg. Lá lách và máu được thu hoạch từ chuột nhắt 1 ngày sau khi tiêm liều kháng thể thứ hai. Như được thể hiện trên FIG.21A, biến thể kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 NSLF Fc có mức điều hòa giảm vượt trội của SIRPA so với mức điều hòa quan sát được với biến thể kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 PS Fc trong bạch cầu đơn nhân lách. Tuy nhiên, trong bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi, cả hai biến thể Fc đều thể hiện hoạt tính tương tự (FIG.21B). Kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có mức điều hòa giảm thụ thể cao hơn trong các bạch cầu đơn nhân có nguồn gốc từ thể cho B so với thể cho A, có thể tương quan với mức biểu hiện cơ bản cao hơn của SIRPA trên bạch cầu đơn nhân ở thể cho B so với thể cho A.

Kết hợp lại với nhau, các kết quả này đã chứng minh rằng kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có hiệu quả trong việc điều hòa giảm mức SIRPA trong cả bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi cũng như trong bạch cầu đơn nhân lá lách.

Ví dụ 19: Kháng thể kháng SIRPA đã được thao tác di truyền để gắn sự FcR chọn lọc duy trì được hoạt tính điều hòa giảm thụ thể qua trung gian kháng thể

Để đánh giá thêm vai trò của FcR trong hoạt tính của kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế, miền biến đổi của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 được biểu hiện với các miền Fc khác nhau có profin gắn kết FcR riêng biệt. Các phép đo ái lực FcR đối với các biến thể Fc của kháng thể kháng SIRPA thu được bằng phương pháp đo giao thoa lớp sinh học (BLI) trên thiết bị Pall ForteBio Octet RED96. Kháng thể Fab-CH1 kháng người cố định đã bắt giữ biến thể 3F9-22 Fc kháng thể kháng SIRPA đã được làm giống như kháng thể của người trên cảm biến sinh học (10 μg/mL, thời gian tải 300 giây). Động học chu kỳ đơn được thực hiện với 100 nM FcR của người hòa tan

được chảy qua kháng thể đã được bắt giữ để ghi lại dấu vết (thời gian liên kết 300 giây, thời gian phân ly v). Phân tích dữ liệu được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm phân tích dữ liệu ForteBio, phiên bản 9.0. Dung dịch đệm động học chuẩn (PBS, BSA 0,1%, Tween-20 0,02%, pH 7,2) được sử dụng để thử nghiệm và để điều chế chất phản ứng.

Các phép đo ái lực tương đối thu được từ phân tích độ phù hợp đường cong của các cảm biến thu được từ các thử nghiệm này được tóm tắt dưới đây trong Bảng 19. Các biến thể Fc hiển thị các mẫu gắn kết FcR dự đoán. Ví dụ, các đột biến LALAPS Fc đã khử bỏ gắn kết với tất cả các FcR, ngoại trừ thụ thể có ái lực cao, FcgR1. Các đột biến Fc N325S/L328F (NSLF) đã khử bỏ gắn kết đặc hiệu với FcgR3A của người. Tương tự, các isotyp IgG2 và IgG4 không gắn kết với FcgR3A và chỉ có IgG4 duy trì gắn kết với FcgR1.

Bảng 19

Biến thể Fc	FcgR 1	FcgR2A H131	FcgR2A R131	FcgR2B	FcgR3A F158	FcgR3A V158
IgG1 LALAPS	+	-	-	-	-	-
IgG1 NSLF	++	+	++	++	-	-
IgG2	-	+	+	-	-	-
IgG 4 SP	++	+	++	++	-	-

Các biến thể 3F9-22 Fc của kháng thể kháng SIRPA sau đó được đánh giá về khả năng điều hòa giảm của chúng đối với mức hoặc các mức biểu hiện của SIRPA trong đại thực bào có nguồn gốc bạch cầu đơn nhân của người. Như đã được mô tả trước đó, bạch cầu đơn nhân của người được phân lập từ máu ngoại vi của thể cho khỏe mạnh và biệt hóa thành đại thực bào *in vitro* bằng cách bổ sung môi trường sinh trưởng với M-CSF của người. Sau khi biệt hóa, đại thực bào của người được thu hoạch và gieo mầm vào các đĩa môi trường nuôi cấy mô 96 giếng với nồng độ tăng của kháng thể đối chứng hoặc kháng thể kháng SIRPA hòa tan và ủ qua đêm ở 37°C. Tế bào được phân tích bằng phép đo tế bào theo dòng chảy đối với mức biểu hiện bề mặt tế bào của SIRPA bằng cách sử dụng kháng thể kháng SIRPA của người được liên hợp với DyLight650 thuộc ngăn epitop riêng biệt so với của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22.

Như được thể hiện trên FIG.22 và được tóm tắt trong Bảng 20, hầu hết các biến

thể Fc của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 điều hòa giảm tối đa mức bề mặt tế bào của SIRPA trên đại thực bào với giá trị IC_{50} tương tự. Tuy nhiên, kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 LALAPS chỉ điều hòa giảm một phần mức bề mặt tế bào của SIRPA, xác nhận rằng sự gắn FcR tham gia vào việc thúc đẩy hoạt tính này của kháng thể kháng SIRPA. Ngoài ra, do các biến thể Fc không gắn kết FcgR3A chứng minh mức điều hòa thụ thể giảm tương tự như kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 PS, mà gắn kết tất cả các FcR, cho rằng sự gắn FcgR3A là không thể thiếu đối với sự tiếp nhận thụ thể qua trung gian kháng thể.

Bảng 20

Biến thể Fc	IC_{50} (nM)	% DR tối đa
3F9-22 PS	0,04701	73,825
3F9-22 LALAPS	0,04468	41,575
3F9-22 NSLF	0,045125	74,61
3F9-22 IgG2	0,02185	67,955
3F9-22 IgG4	0,032415	70,455

Ví dụ 20: Kháng thể kháng SIRPA đã được thao tác di truyền để gắn FcR chọn lọc tăng cường khả năng thực bào của tế bào khối u bởi đại thực bào

Ngoài mức điều hòa giảm thụ thể qua trung gian kháng thể như được bộc lộ trên đây, vai trò của FcR được đánh giá về sự tăng cường kháng SIRPA qua trung gian kháng thể khả năng thực bào tế bào khối u với các biến thể Fc khác nhau của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22. Ngoài ra, hoạt tính thực bào đối với các kháng thể khác hướng đích con đường này được đánh giá song song.

Đại thực bào sơ cấp của người được xử lý qua đêm bằng kháng thể đối chứng hoặc kháng thể thử nghiệm được chỉ định. Tế bào khối u được dán nhãn bằng thuốc nhuộm CFSE và bổ sung vào đại thực bào ở 37°C qua đêm. Ngày hôm sau, đại thực bào được thu thập và nhuộm trên đá bằng kháng CD14 APC trong dung dịch đệm FACS chứa kháng thể phong bế FcR. Hoạt tính thực bào được đo bằng cách đếm phần trăm đại thực bào dương tính kép CD14/CFSE.

Kết quả của các thử nghiệm này được thể hiện trên FIG.23 và được trình bày dưới dạng tỷ lệ phần trăm quần thể đại thực bào dương tính kép CD14/CFSE tăng gấp đôi. Như được thể hiện trên FIG.23 và tóm tắt dưới đây trong Bảng 21, cả biến thể kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 PS lẫn kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 NSLF đều tăng cường đáng kể khả năng thực bào của tế bào khối u ác tính A375 so với khả năng

thực bào quan sát được ở đại thực bào được xử lý bằng kháng thể đối chứng. Mức tăng cường quan sát được của khả năng thực bào được xem là tương đương với kháng thể kháng CD47 thử nghiệm trong các nghiên cứu này (aCD47), mà chủ yếu hoạt động chức năng bằng cách opsonin hóa tế bào khối u biểu hiện CD47 đối với ADCP. Ngược lại, hai kháng thể kháng SIRPA khác nhau phong bế CD47 KWAR23 (xem WO2015/138600) và 18D5 (xem WO2017/178653) đã không cho thấy sự tăng cường bất kỳ về khả năng thực bào tế bào khối u. Các kết quả này chứng minh rằng cả hai biến thể PS lẫn NSLF Fc của kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 đều duy trì được các đặc tính tăng cường khả năng thực bào tế bào khối u khi không có quá trình opsonin hóa kháng thể kháng nguyên kháng khối u. Do kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế không bị phong bế đối với tương tác SIRPA/CD47, các kết quả này cũng cho thấy rằng kháng thể kháng SIRPA không phong bế theo sáng chế có hiệu quả trong việc làm tăng hoặc tăng cường khả năng thực bào tế bào khối u so với hiệu quả quan sát được với kháng thể kháng SIRPA không phong bế KWAR23 và 18D5.

Bảng 21

Kháng thể	EC_{50} (nM)	Max*
3F9-22PS	0,1144575	2,06925
3F9-22NSLF	0,457625	1,774
KWAR23	0,3631	1,126
18D5	2,148	1,06446667
aCD47	0,777775	2,6235

* số lần tăng khả năng thực bào so với hoạt tính ban đầu

Ví dụ 21: Biến thể kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 không gây ra các thay đổi về số lượng hồng cầu và tiểu cầu

Các báo cáo đã chỉ ra rằng kháng thể kháng CD47 5F9 được dùng cho động vật linh trưởng không phải là người dẫn đến bệnh thiếu máu (Liu et al, 2015, PLOS ONE, DOI:10,1371/journal.pone.0137345) và việc dùng kháng thể kháng SIRPAFc TTI-621 cho người dẫn đến việc giảm tiểu cầu phụ thuộc vào liều lượng (Ansell et al, 2016, Blood 128:1812). Để kiểm tra xem liệu kháng thể kháng SIRPA theo sáng chế có ảnh hưởng gì đến số lượng hồng cầu hoặc số lượng tiểu cầu *in vivo* hay không, các nghiên cứu sau đây đã được thực hiện. Khỉ đuôi dài cynomolgus cái được chia thành năm nhóm và được dùng kháng thể đối chứng, kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 PS, kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 IgG4, kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 IgG2, hoặc kháng thể

kháng SIRPA 3F9-22 NSLF, như được chỉ ra trong Bảng 22 dưới đây. Các con khỉ này được dùng kháng thể bằng cách truyền tĩnh mạch qua tĩnh mạch bán cầu.

Bảng 22

Nhóm	Số lượng khỉ cái	Vật phẩm thử nghiệm	Đường dùng	Mức liều lượng đích (mg/kg)	Nồng độ liều lượng đích (mg/mL)	Thể tích liều lượng đích (mL/kg)
1	3	IgG	IV	10	2,5	4
2	3	3F9-22 PS	IV	10	2,5	4
3	3	3F9-22 IgG4	IV	10	2,5	4
4	3	3F9-22 IgG2	IV	10	2,5	4
5	3	3F9-22 NSLF	IV	10	2,5	4

IV = Tiêm tĩnh mạch; được cung cấp dưới dạng tiêm nhanh.
Lưu ý: Khỉ trong các Nhóm 1 và 2 được định liều một lần vào các Ngày 1, 8, 15, 22, và 29 (tổng là 5 liều).
Khỉ trong các Nhóm 3, 4, và 5 được định liều một lần vào các Ngày 1 và 29 (tổng là 2 liều).

Máu được lấy từ động vật qua tĩnh mạch đùi để lấy một lượng hồng cầu (RBC) và một lượng tiểu cầu một lần trong giai đoạn trước định liều và sau đó vào khoảng 72, 168, 240, 408, 576, 672 và 744 giờ sau khi dùng kháng thể.

Như được thể hiện trên FIG.24, số lượng hồng cầu và tiểu cầu không bị thay đổi bởi kháng thể kháng SIRPA 3F9-22 PS, 3F9-22 IgG4, 3F9-22 IgG2, và 3F9-22 NSLF bất kỳ thông qua quá trình các thử nghiệm này.

Các trình tự kháng thể kháng SIRPA bổ sung nhất định theo sáng chế được thể hiện dưới đây. Các axit amin được gạch chân chỉ ra sự khác biệt nhất định trong trình tự axit amin của các kháng thể kháng SIRPA sau.

Chuỗi nặng 3F9-22-IgG1 WT (SEQ ID NO:47)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSY
TYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFQYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Chuỗi nặng 3F9-22 huIgG1 PS (SEQ ID NO:48)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSY
TYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFQYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Chuỗi nặng 3F9-22 SELF (SEQ ID NO:49)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSY
TYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFQYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Chuỗi nặng 3F9-22 hIgG1 NSLF (SEQ ID NO:53)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSY
TYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFQYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Chuỗi nặng 3F9-22 hIgG1 LALAPS (SEQ ID NO:54)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSY
TYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFQYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP

PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Chuỗi nhẹ 3F9-22 huIgG1 (SEQ ID NO:50)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSSGGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNL
ESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQHNRELPVTFGQGTKLEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Chuỗi nặng 3F9-14 huIgG1 WT (SEQ ID NO:51)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSY
TYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFRYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Chuỗi nặng 3F9-14 PS (SEQ ID NO:57)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSY
TYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFRYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Chuỗi nặng 3F9-14 SELF (SEQ ID NO:52)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSY
TYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFRYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT

FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Chuỗi nặng 3F9-14 NSLF (SEQ ID NO:55)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSY
TYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFRYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Chuỗi nặng 3F9-14 LALAPS (SEQ ID NO:56)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSY
TYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFRYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Chuỗi nhẹ 3F9-14 huIgG1 (SEQ ID NO:50)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSSGGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNL
ESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQHNRELPVTFGQGTKLEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm: HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 22, 23, và 24; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm: HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, và 19.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm một, hai, ba hoặc bốn vùng khung được chọn từ FR1 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:25, FR2 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:26, FR3 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27, và FR4 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28; và/hoặc trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm một, hai, ba hoặc bốn vùng khung được chọn từ FR1 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29, FR2 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30, FR3 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:31, và FR4 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:32.

3. Kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin có ít nhất 90% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 33, 34, và 35.

4. Kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin có ít nhất 90% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, và 44.

5. Kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 33, 34, và 35, và trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, và 44.

6. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng.

7. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người.

8. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là mảnh Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv, hoặc scFv.

9. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể đa trị.

10. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này thuộc lớp IgG, lớp IgM, hoặc lớp IgA.

11. Kháng thể theo điểm 10, trong đó kháng thể này thuộc lớp IgG và là dạng isotyp IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4.

12. Kháng thể theo điểm 11, trong đó kháng thể này gắn kết với thụ thể Fc ức chế.

13. Kháng thể theo điểm 12, trong đó thụ thể Fc ức chế là thụ thể Fc-gamma ức chế IIB (FcgRIIB).

14. Kháng thể theo điểm 13, trong đó kháng thể này làm giảm mức tế bào của FcgRIIB.

15. Kháng thể theo điểm 11, trong đó kháng thể kháng SIRPA có isotyp IgG1 của người và bao gồm một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin trong vùng Fc ở gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: N297A, D265A, D270A, L234A, L235A, G237A, P238D, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, N325S, L328F, T394D, và tổ hợp bất kỳ của chúng, trong đó việc đánh số các gốc tuân theo quy tắc đánh số EU, hoặc bao gồm gốc khuyết đoạn axit amin trong vùng Fc ở vị trí tương ứng với glyxin 236.

16. Kháng thể theo điểm 11, trong đó kháng thể này bao gồm một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin ở vị trí gốc được chọn từ nhóm bao gồm: C127S, L234A, L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, N325S, L328F, A330S, P331S, E345R, E430G, S440Y, và tổ hợp bất kỳ của chúng, trong đó việc đánh số các gốc axit amin tuân theo quy tắc đánh số EU hoặc Kabat.

17. Kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó:

(a) chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:47 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50;

(b) chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:48 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50;

(c) chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:49 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50;

(d) chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:53 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50;

(e) chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:54 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50;

(f) chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:51 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50;

(g) chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:52 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50;

(h) chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:55 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50;

(i) chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:56 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50; hoặc

(j) chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:57 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:50.

18. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng SIRPA làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA, làm giảm mức nội bào của SIRPA, làm giảm tổng mức tế bào của SIRPA, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

19. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng SIRPA gây ra sự suy biến SIRPA, gây ra sự phân tách SIRPA, gây ra quá trình nội bộ hóa SIRPA, gây ra quá trình loại bỏ SIRPA, điều hòa giảm sự biểu hiện của SIRPA, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

20. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA *in vitro* và/hoặc *in vivo*.

21. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này điều hòa giảm sự biểu hiện của SIRPA ở bạch cầu đơn nhân của người và/hoặc đại thực bào của người.

22. Kháng thể theo điểm 21, trong đó kháng thể này điều hòa giảm khoảng từ 70 đến 95% sự biểu hiện của SIRPA ở đại thực bào của người.

23. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này có ái lực (K_D) với SIRPA v1 của người thấp hơn 6 nM.

24. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này có ái lực (K_D) với SIRPA v1 của người nằm trong khoảng từ 0,1 nM đến 2 nM.

25. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA *in vitro* với nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,20 nM đối với SIRPA v1 của người, nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,10 nM đối với SIRPA v2 của người, và/hoặc nằm trong khoảng từ 0,05 đến 1 nM đối với SIRPA của khỉ đuôi dài cyno khi được đo bằng phương pháp đo tế bào theo dòng chảy.

26. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể gắn kết với SIRPA của người, SIRPA v1 của người, SIRPA v2 của người, SIRPA của khỉ đuôi dài cyno, SIRPA của khỉ đuôi sóc, và SIRPβ3 của người.

27. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này gắn kết với miền D3 của SIRPA v1 của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO:1.

28. Kháng thể theo điểm 27, trong đó kháng thể này gắn kết với các gốc axit amin R282, Q284, và G337 của SIRPA v1 của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO:1.

29. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng SIRPA làm tăng khả năng thực bào tế bào khối u trong đại thực bào M1, làm tăng khả năng thực bào tế bào khối u trong đại thực bào M2, điều hòa giảm sự biểu hiện của CD14 trong đại thực bào, và/hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

30. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng SIRPA tăng cường quá trình tăng sinh tế bào T.

31. Kháng thể theo điểm 30, trong đó kháng thể kháng SIRPA tăng cường quá trình

tăng sinh tế bào T mà không phong bế tương tác của SIRPA và CD47.

32. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng SIRPA kích thích sự sản xuất ROS trong các bạch cầu đơn nhân và/hoặc làm tăng sự biểu hiện của IL-8 trong các bạch cầu đơn nhân.

33. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng SIRPA ức chế sự phát triển khối u *in vivo*.

34. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng SIRPA làm giảm số lượng tế bào tủy sống CD14+ trong máu ngoại vi và/hoặc làm tăng số lượng tế bào tủy sống CD14+ trong khối u.

35. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể gắn kết với SIRPA của người nhưng về cơ bản không phong bế gắn kết của CD47 với SIRPA.

36. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 1 và chất mang dược dụng.

37. Kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin có ít nhất 95% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 33, 34, và 35.

38. Kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin có ít nhất 95% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, và 44.

39. Kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin có ít nhất 99% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 33, 34, và 35.

40. Kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin có ít nhất 99% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, và 44.

41. Kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm: HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 24; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm: HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin

nêu trong SEQ ID NO:10; và HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 16.

42. Kháng thể theo điểm 41, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm một, hai, ba hoặc bốn vùng khung được chọn từ FR1 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:25, FR2 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:26, FR3 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27, và FR4 của VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28; và/hoặc trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm một, hai, ba hoặc bốn vùng khung được chọn từ FR1 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29, FR2 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30, FR3 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:31, và FR4 của VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:32.

43. Kháng thể theo điểm 41, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin có ít nhất 90% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 35.

44. Kháng thể theo điểm 41, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin có ít nhất 90% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 41.

45. Kháng thể theo điểm 41, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin có ít nhất 95% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 35.

46. Kháng thể theo điểm 41, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin có ít nhất 95% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 41.

47. Kháng thể theo điểm 41, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin có ít nhất 99% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 35.

48. Kháng thể theo điểm 41, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin có ít nhất 99% mức đồng nhất với trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 41.

49. Kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35, và trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 41.

50. Kháng thể theo điểm 41, trong đó kháng thể này thuộc lớp IgG, lớp IgM, hoặc lớp IgA.

51. Kháng thể theo điểm 50, trong đó kháng thể này thuộc lớp IgG và có isotyp IgG1,

IgG2, IgG3, hoặc IgG4.

52. Kháng thể theo điểm 51, trong đó kháng thể kháng SIRPA có isotyp IgG1 của người và bao gồm một hoặc nhiều gốc thay thế axit amin trong vùng Fc ở gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: N297A, D265A, D270A, L234A, L235A, G237A, P238D, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, N325S, L328F, T394D, và tổ hợp bất kỳ của chúng, trong đó việc đánh số các gốc tuân theo quy tắc đánh số EU, hoặc bao gồm gốc khuyết đoạn axit amin trong vùng Fc ở vị trí tương ứng với glyxin 236.

53. Kháng thể theo điểm 52, trong đó kháng thể này bao gồm gốc thay thế N325S và L328F.

54. Kháng thể phân lập theo điểm 51, trong đó kháng thể này là kháng thể có chiều dài đầy đủ, và trong đó chuỗi nặng gồm gốc lysin đầu tận cùng C.

55. Kháng thể phân lập theo điểm 51, trong đó chuỗi nặng không có gốc lysin đầu tận cùng C.

56. Kháng thể phân lập theo điểm 41, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53.

57. Kháng thể phân lập theo điểm 41, trong đó chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53 ngoại trừ gốc lysin đầu tận cùng C của SEQ ID NO: 53.

58. Kháng thể phân lập theo điểm 41, trong đó chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 50.

59. Kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 50.

60. Kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53 ngoại trừ gốc lysin đầu tận cùng C của SEQ ID NO: 53, và trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 50.

61. Kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm

chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 50.

62. Kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53 ngoại trừ gốc lysin đầu tận cùng C của SEQ ID NO: 53, và trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 50.

63. Kháng thể theo điểm 41, trong đó kháng thể kháng SIRPA làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA, làm giảm mức nội bào của SIRPA, làm giảm tổng mức tế bào của SIRPA, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

64. Kháng thể theo điểm 41, trong đó kháng thể kháng SIRPA gây ra sự suy biến SIRPA, gây ra sự phân tách SIRPA, gây ra quá trình nội bộ hóa SIRPA, gây ra quá trình loại bỏ SIRPA, điều hòa giảm sự biểu hiện của SIRPA, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

65. Kháng thể theo điểm 41, trong đó kháng thể này làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA *in vitro* và/hoặc *in vivo*.

66. Kháng thể theo điểm 41, trong đó kháng thể này điều hòa giảm sự biểu hiện của SIRPA ở bạch cầu đơn nhân của người và/hoặc đại thực bào của người.

67. Kháng thể theo điểm 66, trong đó kháng thể này điều hòa giảm khoảng từ 70 đến 95% sự biểu hiện của SIRPA ở đại thực bào của người.

68. Kháng thể theo điểm 41, trong đó kháng thể này có ái lực (K_D) với SIRPA v1 của người thấp hơn 6 nM.

69. Kháng thể theo điểm 41, trong đó kháng thể này có ái lực (K_D) với SIRPA v1 của người nằm trong khoảng từ 0,1 nM đến 2nM.

70. Kháng thể theo điểm 41, trong đó kháng thể này làm giảm mức bề mặt tế bào của SIRPA *in vitro* với nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,20 nM đối với SIRPA v1 của người, nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,10 nM đối với SIRPA v2 của người, và/hoặc nằm trong khoảng từ 0,05 đến 1 nM đối với SIRPA của khỉ đuôi dài cyno khi được đo bằng phương pháp đo tế bào theo dòng chảy.

71. Kháng thể theo điểm 41, trong đó kháng thể này gắn kết với SIRPA của người, SIRPA v1 của người, SIRPA v2 của người, SIRPA của khỉ đuôi dài cyno, SIRPA của

khỉ đuôi sóc, và SIRPβ3 của người.

72. Kháng thể theo điểm 41, trong đó kháng thể này gắn kết với miền D3 của SIRPA v1 của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO:1.

73. Kháng thể theo điểm 72, trong đó kháng thể này gắn kết với các gốc axit amin R282, Q284, và G337 của SIRPA v1 của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO:1.

74. Kháng thể theo điểm 41, trong đó kháng thể kháng SIRPA làm tăng khả năng thực bào tế bào khối u trong đại thực bào M1, làm tăng khả năng thực bào tế bào khối u trong đại thực bào M2, điều hòa giảm sự biểu hiện của CD14 trong đại thực bào, và/hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

75. Kháng thể theo điểm 41, trong đó kháng thể kháng SIRPA tăng cường quá trình tăng sinh tế bào T.

76. Kháng thể theo điểm 75, trong đó kháng thể kháng SIRPA tăng cường quá trình tăng sinh tế bào T mà không phong bế tương tác của SIRPA và CD47.

77. Kháng thể theo điểm 41, trong đó kháng thể kháng SIRPA kích thích sự sản xuất ROS trong các bạch cầu đơn nhân và/hoặc làm tăng sự biểu hiện của IL-8 trong các bạch cầu đơn nhân.

78. Kháng thể theo điểm 41, trong đó kháng thể kháng SIRPA ức chế sự phát triển khối u *in vivo*.

79. Kháng thể theo điểm 41, trong đó kháng thể kháng SIRPA làm giảm số lượng tế bào tủy sống CD14+ trong máu ngoại vi và/hoặc làm tăng số lượng tế bào tủy sống CD14+ trong khối u.

80. Kháng thể theo điểm 41, trong đó kháng thể gắn kết với SIRPA của người nhưng về cơ bản không phong bế gắn kết của CD47 với SIRPA.

81. Dược phẩm chứa kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm: HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 24; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm: HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9; HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10; và HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được

chọn từ SEQ ID NO: 16; và còn chứa chất mang dược dụng.

82. Dược phẩm chứa kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35, và trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 41; và còn chứa chất mang dược dụng.

83. Dược phẩm chứa kháng thể phân lập gắn kết với SIRPA của người, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 50; và còn chứa chất mang dược dụng.

```
Người          100,0%    EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRV
Khỉ dài đuôi   88,6%    EEELQVIQPEKSVSVAAGDSATLNCTVSSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNLKEGHFPRV
Khỉ đuôi sóc   86,0%    EEELQVVQPEKSVSVAAGETATLHCTVTSLVPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGQFPRV
Thỏ            71,2%    QEKLQVTQPDRWVSVAEGEAATLRCTINTLLPVGPMKWFRGAGPDRKMIYNFKGDQDPRV
Chó            71,8%    EAELQVIQPEKSVSVAAGETATLRCTLTSLIPVGKVEWFRGTGPGRELIFHFKGGHFPRV
                        : :*** **:: * ** *::***.** .:*:*** ::****:**.*::*:: * .: ***

Người          100,0%    TTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSA
Khỉ dài đuôi   88,6%    TPVSDPTKRNNMDFSIRISNITPADAGTYYCVKFRKGSPD-VELKSGAGTELSVRAKPSA
Khỉ đuôi sóc   86,0%    TAVADQTKRNNMDHSIRISNITPADAGTYYCVKFRKASPIDVELKSGPGTELSVRAKPSA
Thỏ            71,2%    TNVSDTTKRNNMDFSIRIRDITPADAGTYYCVKFQKKGADDEEFKSGGGTQVSVSAKPST
Chó            71,8%    TNVSDSTKRNNTDFSIRISNITPADTGTYYCVKFQKGNPD-VELKSGPGTLVTVSAKPSP
                        * *:* ***** *.**** :*****:********:* ..   *:*** ** ::* ****.

Người          100,0%    PVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIH
Khỉ dài đuôi   88,6%    PVVSGPAVRATAEHTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPAGKSVSYSIR
Khỉ đuôi sóc   86,0%    PVVSGPATRVTPEDTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNANELSALQTTVDPAGESVSYSIR-
Thỏ            71,2%    PKVSGPGARSTPEQTVDFTCESHGFSPRNISLKWFKNGNELPAFQTSVYPAGESVSYNVT
Chó            71,8%    PVVSGPTARATPQQTVNFTCKSHGFSPRNITLRWFKNGNELTASQTTVYPEEDNASYSIS
                        * **** .* *.:.**.***:*******:*:*:****.***.  **.* *  ...**.:

Người          100,0%    STAKVVLTREDVHSQVICEVAHVTLQG-DPLRGTANLSETIRVPPTLEVTQQPVRAENQV
Khỉ dài đuôi   88,6%    STARVVLTRRDVHSQVICEVAHVTLQG-DPLRGTANLSEAIRVPPFLEVTQQSMRADNQV
Khỉ đuôi sóc   86,0%    STARVGLTRGDVRSQVICEVAHVTLQG-DPLRGTANLSEAIRVPPTLEVTHQPMRAENQV
Thỏ            71,2%    STVKVALASSDVHSQVICEVAHITLQGGSPLRGTANLSETIRVPPTVEVTQQPMGAGTQV
Chó            71,8%    STTKLVLAPGDVRSQVICEVAHVTLQGGPPLRGTANLSETLRVPPTLEVSQHPMAGD-QV
                        **.:: *:  **:*********:****  **********::**** :**::.: .  **

Người          100,0%    NVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVSRTETASTVT---ENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDD
Khỉ dài đuôi   88,6%    NVTCQVTKFYPQRLQLTWLENGNVSRTEMASALP---ENKDGTYNWTSWLLVNVSAHRDD
Khỉ đuôi sóc   86,0%    NVTCQVKKFYPQSLQLTWLENGNVSRTETASTLI---ENKDGTYNWASWLLVNSSAHRDG
Thỏ            71,2%    NVTCHVDKFYPRDMQLSWLENGNVSRTETAWTLV---ENKDGTYNRTSWLLVNSSAHRED
Chó            71,8%    NVTCQVKKFYPQRLQLTWLENGNVSRTETPSVASNLLENKDGTFNWTSWLLVNSSTHRED
                        ****:* ****: :**:*********** . .     ******:*  ****** *:**:.

Người          100,0%    VKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVSAHPKEQGSNTAAENTGSNERNIY
Khỉ dài đuôi   88,6%    VKLTCQVEHDGQPAVNKSFSVKVSAHPKEQGSNTAAENTGTNERNIY
Khỉ đuôi sóc   86,0%    VVLTCQVEHDGQPAVSKSLRLEVSAHRKEQGSDTAAEKTGTNERNIY
Thỏ            71,2%    VVLSCQVEHDGQPAVTRSHTLQVSAPPKEQGTDTSLDQADNWNVF--
Chó            71,8%    VVFTCQVQHDGQPAVTKNHTLVASARQKDQETLKPEDNNDSRSIF--
                        * ::***:*******.:.  : .**  *:* : .. :: .. .
```

Fig. 1

Trình tự được làm giống người tiềm năng dựa trên khung nhận IGHV3-23*01 (định nghĩa AbM CDR)

```
IGHV3-23*01 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG
            RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
Vùng nối          IMGT J00256|IGHJ4*01|YFDYWGOGTLVTVSS

seq                    10        20        30        40        50          60
AbM                    10        20        30        40        50  ab
                b b b     p     p b b b   b b    b  bi i     i ibb  b
SB-3F9      EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS GFTFSSYAMS WVRQTPEKRLEWVA TISDYGGSYTY
              * *       *     *                     * * *    *
IGHV3-23*01 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVS AISG-SGGSTY
hSB-3F9-H1  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVS TISDYGGSYTY
hSB-3F9-H2  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVA TISDYGGSYTY

seq                    70        80        90        100       110         120
AbM         60           70          80  abc       90        100abcd       110
             i  b   b b b x    b b b  b     bibibb                 i   b b b
SB-3F9      YPDSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMSSLRSEDTALYYCAR PPYDDYYGGFAY WGQGTLVTVSA
             *              * *      *   *    *    *                      *
IGHV3-23*01 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
hSB-3F9-H1  YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK PPYDDYYGGFAY WGQGTLVTVSS
hSB-3F9-H1  YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR PPYDDYYGGFAY WGQGTLVTVSS
             P                                 L
```

Fig. 2A

Trình tự được làm giống người tiềm năng dựa trên khung nhận IGHV3-23*01 (định nghĩa AbM CDR)

```
IGKV3-11*01 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
            GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPP
Vùng nối          IMGT J00242|IGKJ2*01|YTFGQGTKLEIK

seq                    10        20        30        40        50        60
AbM                    10        20        30abcd        40        50
                b b b    p p     b b b  b   b       bi bi i    ii ibbi      i
SB-3F9      DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASKSVSSSGYSYMH WYQQKPGQPPKLLIY LASNLES
            *        * ** * *   *                          * *
3-11*01     EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVS----SYLA WYQQKPGQAPRLLIY DASNRAT
hSB-3F9-L1  EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASKSVSSSGYSYMH WYQQKPGQAPRLLIY LASNLES
hSB-3F9-L2  EIVLTQSPATLSLSPGERATISC RASKSVSSSGYSYMH WYQQKPGQAPRLLIY LASNLES
hSB-3F9-L3  EIVLTQSPATLSLSPGERATISC RASKSVSSSGYSYMH WYQQKPGQAPRLLIY LASNLES
                       V                                  P         #


seq                    70        80        90        100       110
AbM              60        70        80        90        100
                 b   b       b b b  b    ib bib  ibi  iib i   b b b
SB-3F9      GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC QHNRELPCT FGGGTKLEIK
            *              * *** *  * *                 *
3-11*01     GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQRSNWPP
hSB-3F9-L1  GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QHNRELPCT FGQGTKLEIK
hSB-3F9-L2  GVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYYC QHNRELPCT FGQGTKLEIK
hSB-3F9-L3  GVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYYC QHNRELPST FGQGTKLEIK
                                    A       #    ^
```

Fig. 2B

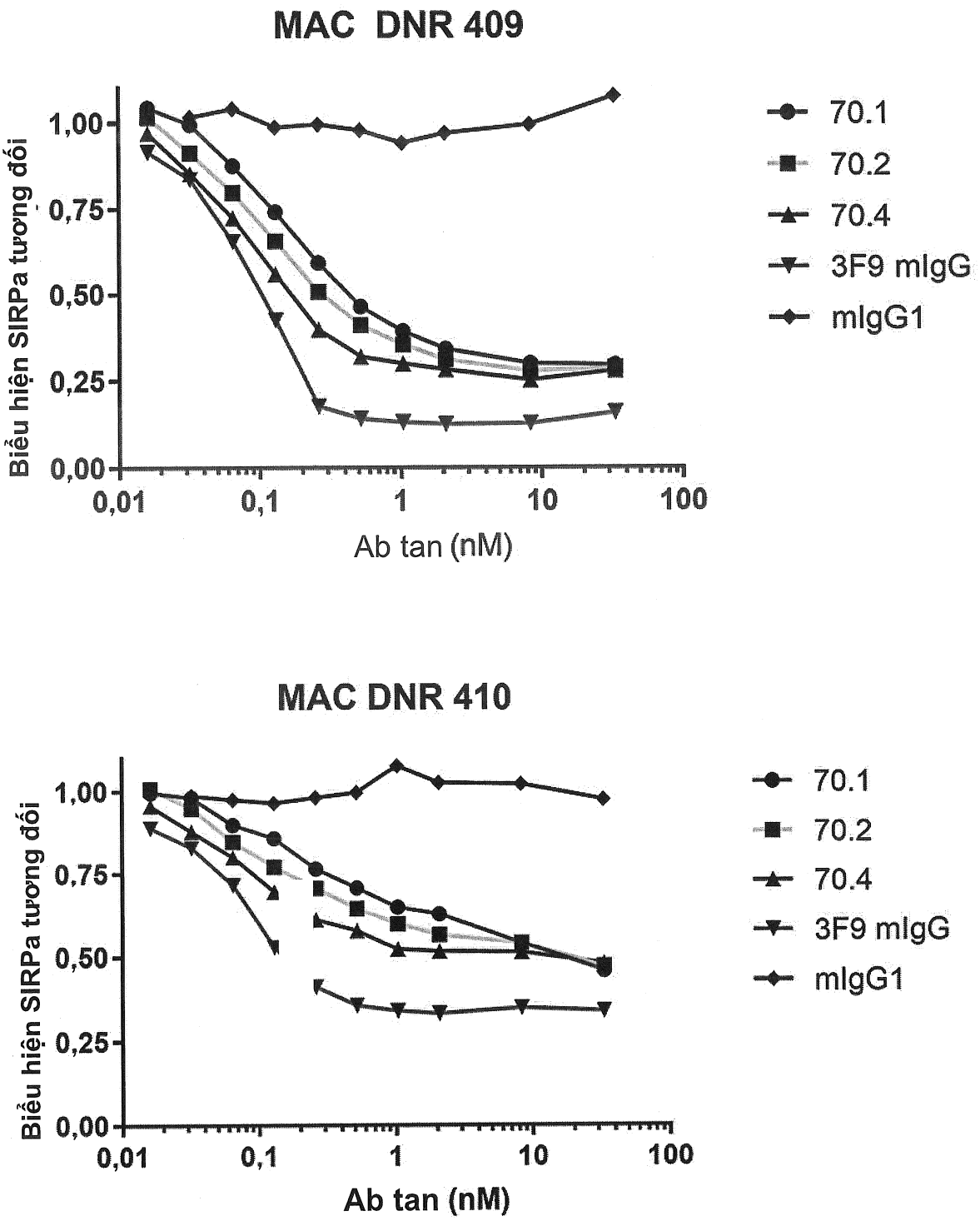

MAC DNR 409
Biểu hiện SIRPa tương đối
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
0,01
0,1
1
10
100
Ab tan (nM)
70.1
70.2
70.4
3F9 mIgG
mIgG1
MAC DNR 410
Biểu hiện SIRPa tương đối
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
0,01
0,1
1
10
100
Ab tan (nM)
70.1
70.2
70.4
3F9 mIgG
mIgG1

Fig. 3

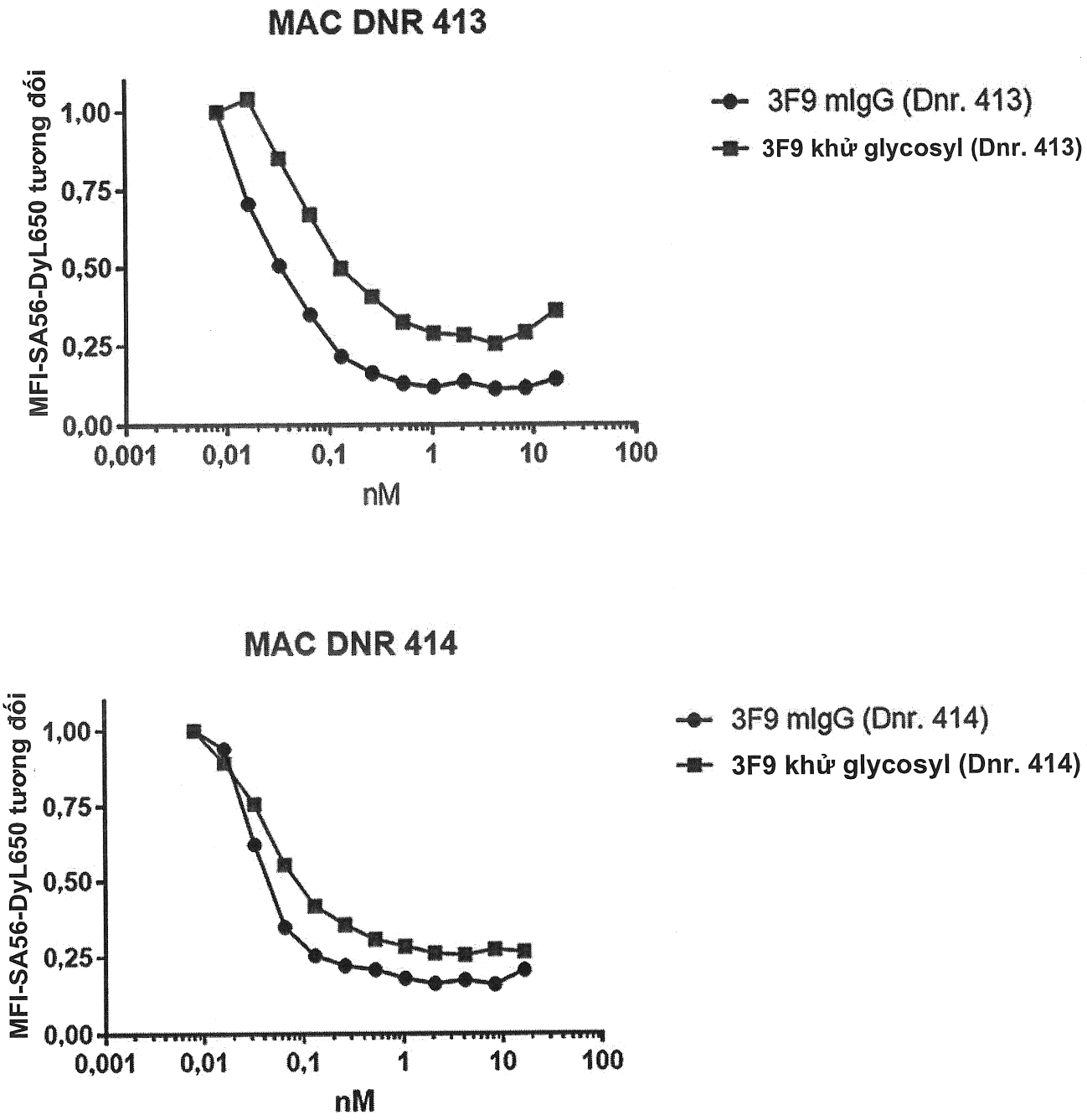

MAC DNR 413
MFI-SA56-DyL650 tương đối
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
0,001
0,01
0,1
1
10
100
nM
3F9 mIgG (Dnr. 413)
3F9 khử glycosyl (Dnr. 413)
MAC DNR 414
MFI-SA56-DyL650 tương đối
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
0,001
0,01
0,1
1
10
100
nM
3F9 mIgG (Dnr. 414)
3F9 khử glycosyl (Dnr. 414)

Fig. 4A

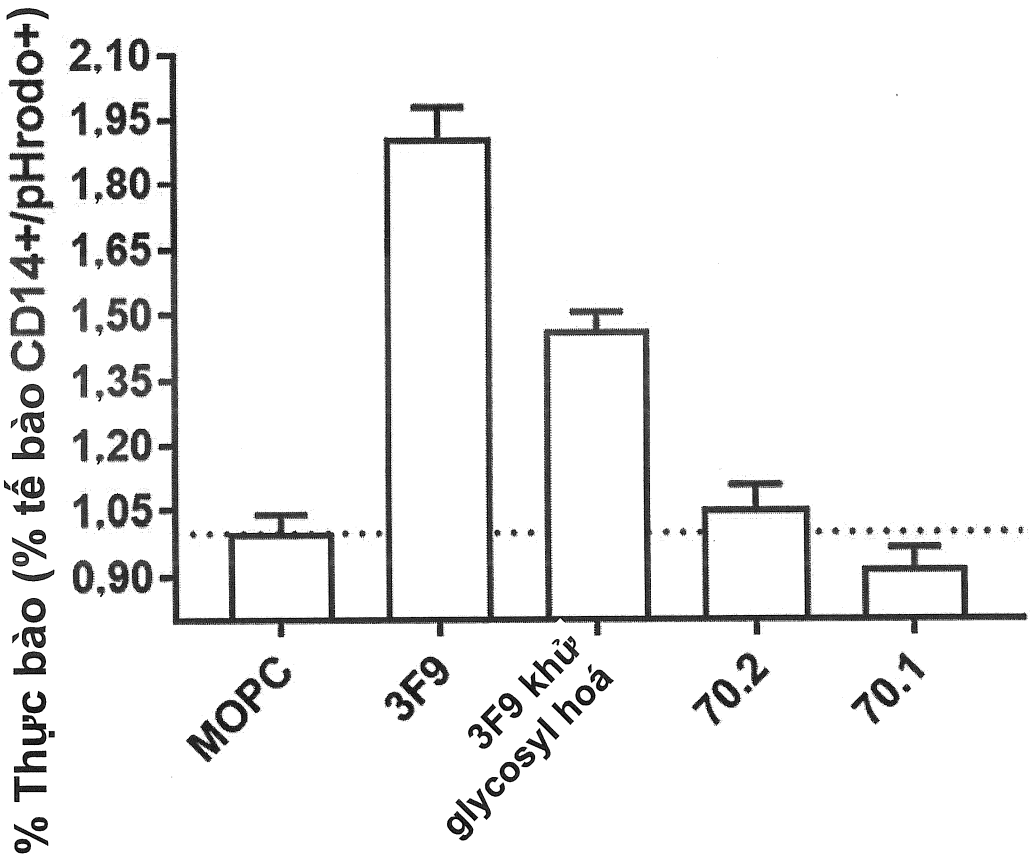

% Thực bào (% tế bào CD14+/pHrodo+)
2,10
1,95
1,80
1,65
1,50
1,35
1,20
1,05
0,90
MOPC
3F9
3F9 khử glycosyl hoá
70.2
70.1

Fig. 4B

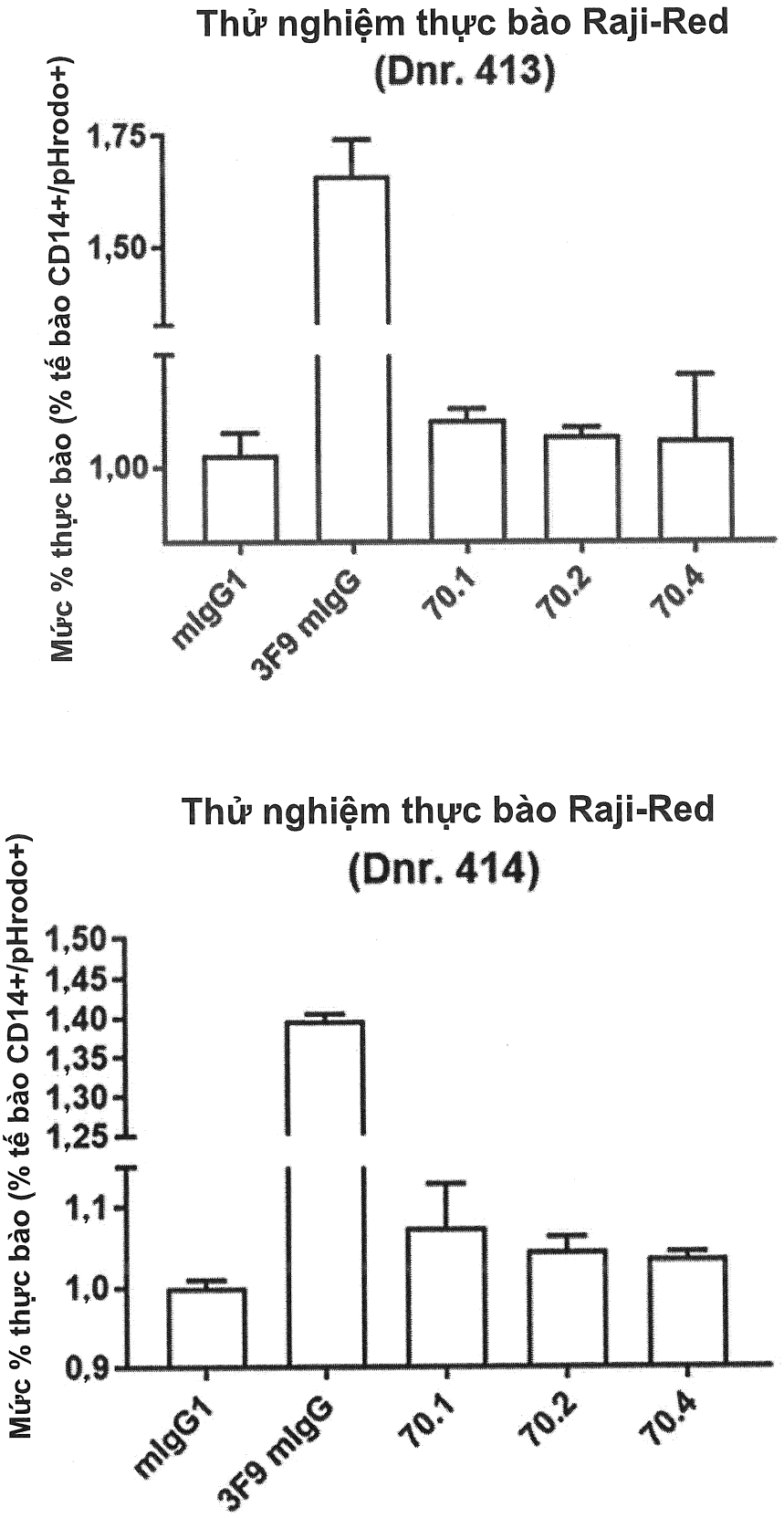

Thử nghiệm thực bào Raji-Red
(Dnr. 413)
Mức % thực bào (% tế bào CD14+/pHrodo+)
1,75
1,50
1,00
mIgG1
3F9 mIgG
70.1
70.2
70.4
Thử nghiệm thực bào Raji-Red
(Dnr. 414)
Mức % thực bào (% tế bào CD14+/pHrodo+)
1,50
1,45
1,40
1,35
1,30
1,25
1,1
1,0
0,9
mIgG1
3F9 mIgG
70.1
70.2
70.4

Fig. 5A

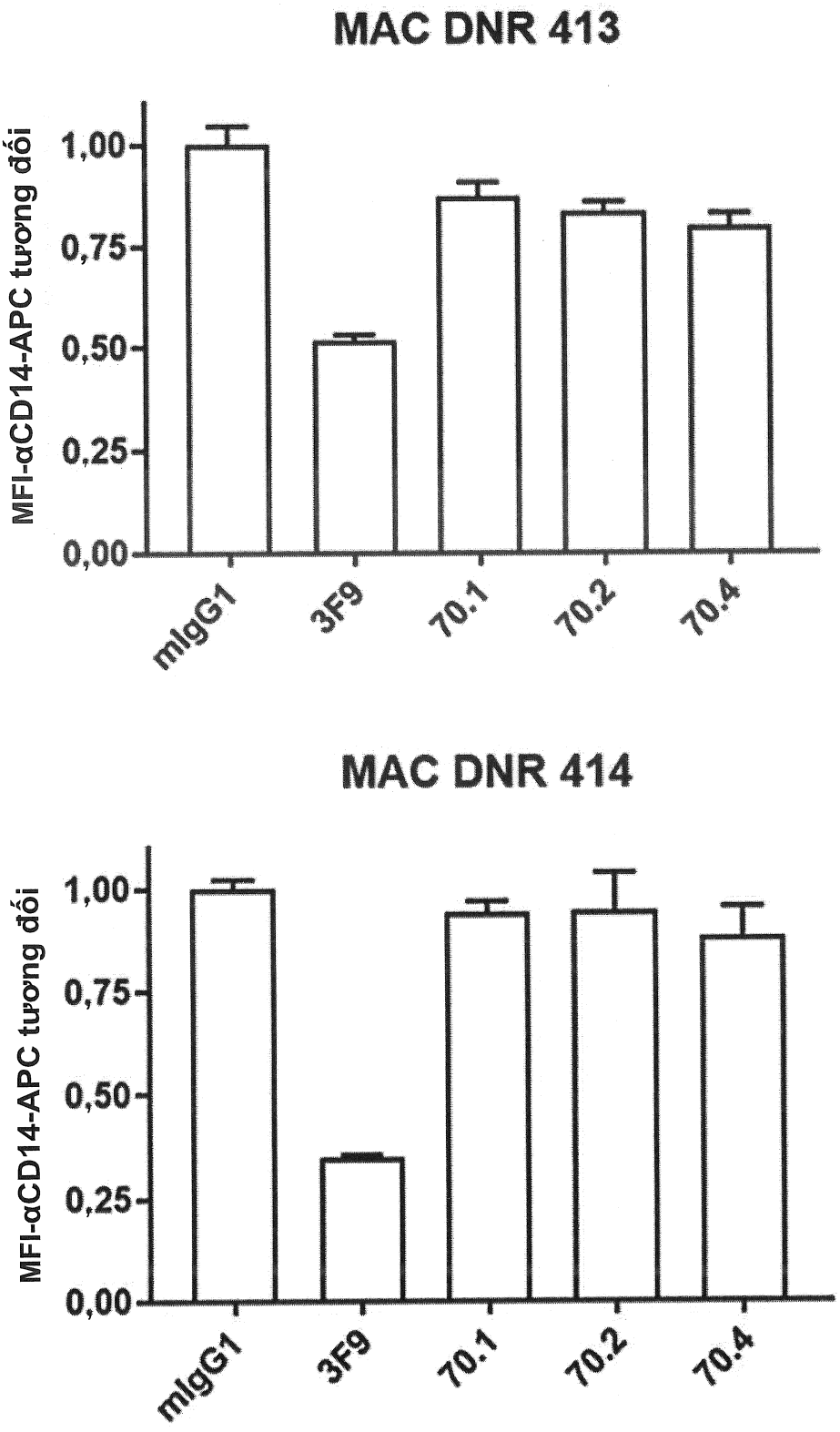

MAC DNR 413
MFI-αCD14-APC tương đối
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
mIgG1
3F9
70.1
70.2
70.4
MAC DNR 414
MFI-αCD14-APC tương đối
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
mIgG1
3F9
70.1
70.2
70.4

Fig. 5B

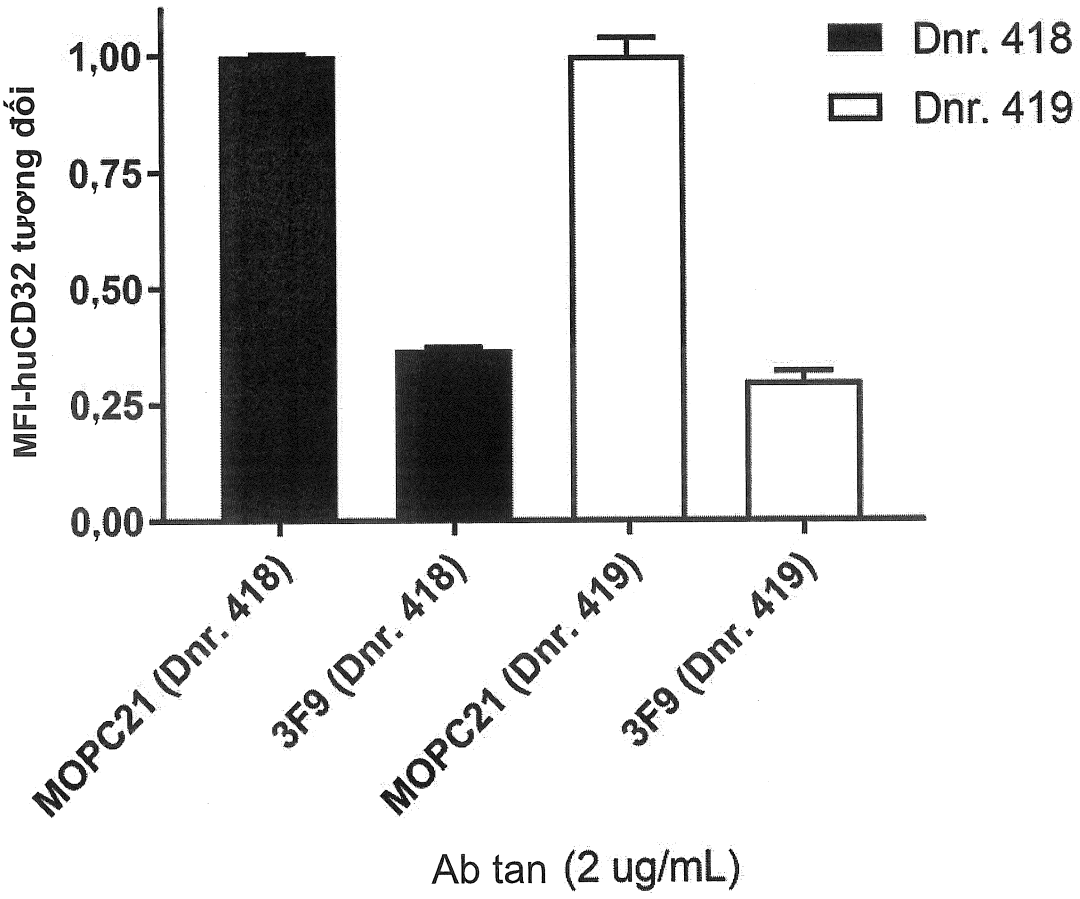
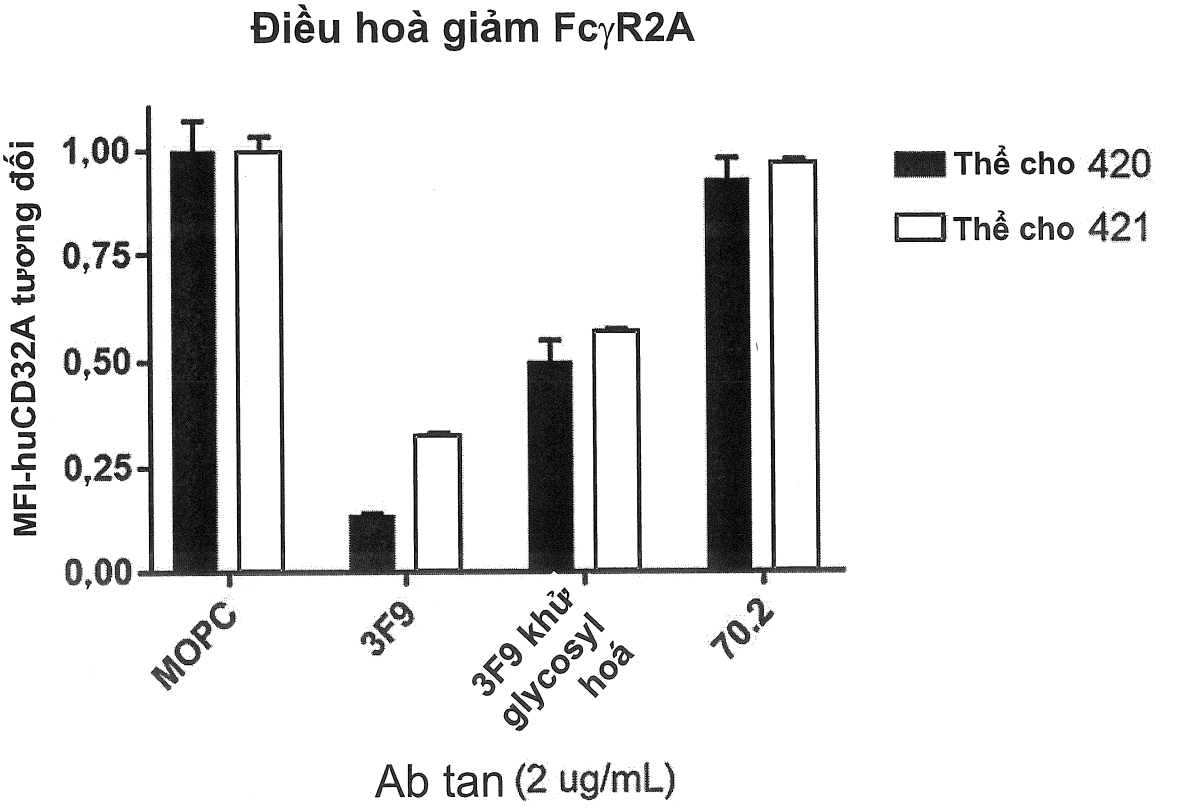

Dnr. 418
Dnr. 419
MFI-huCD32 tương đối
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
MOPC21 (Dnr. 418)
3F9 (Dnr. 418)
MOPC21 (Dnr. 419)
3F9 (Dnr. 419)
Ab tan (2 ug/mL)

Fig. 6A


Điều hoà giảm FcγR2A
MFI-huCD32A tương đối
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
Thể cho 420
Thể cho 421
MOPC
3F9
3F9 khử glycosyl hoá
70.2
Ab tan (2 ug/mL)

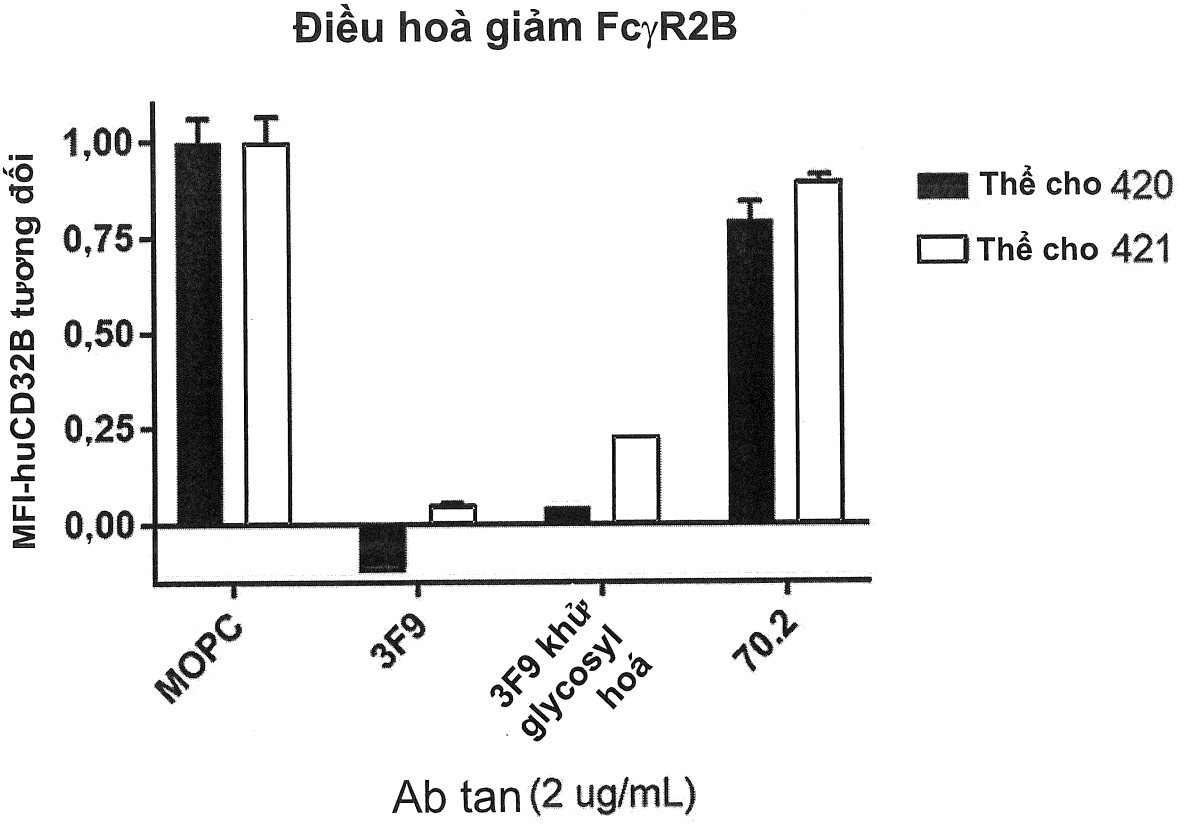

Điều hoà giảm FcγR2B
MFI-huCD32B tương đối
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
Thể cho 420
Thể cho 421
MOPC
3F9
3F9 khử glycosyl hoá
70.2
Ab tan (2 ug/mL)

Fig. 6B

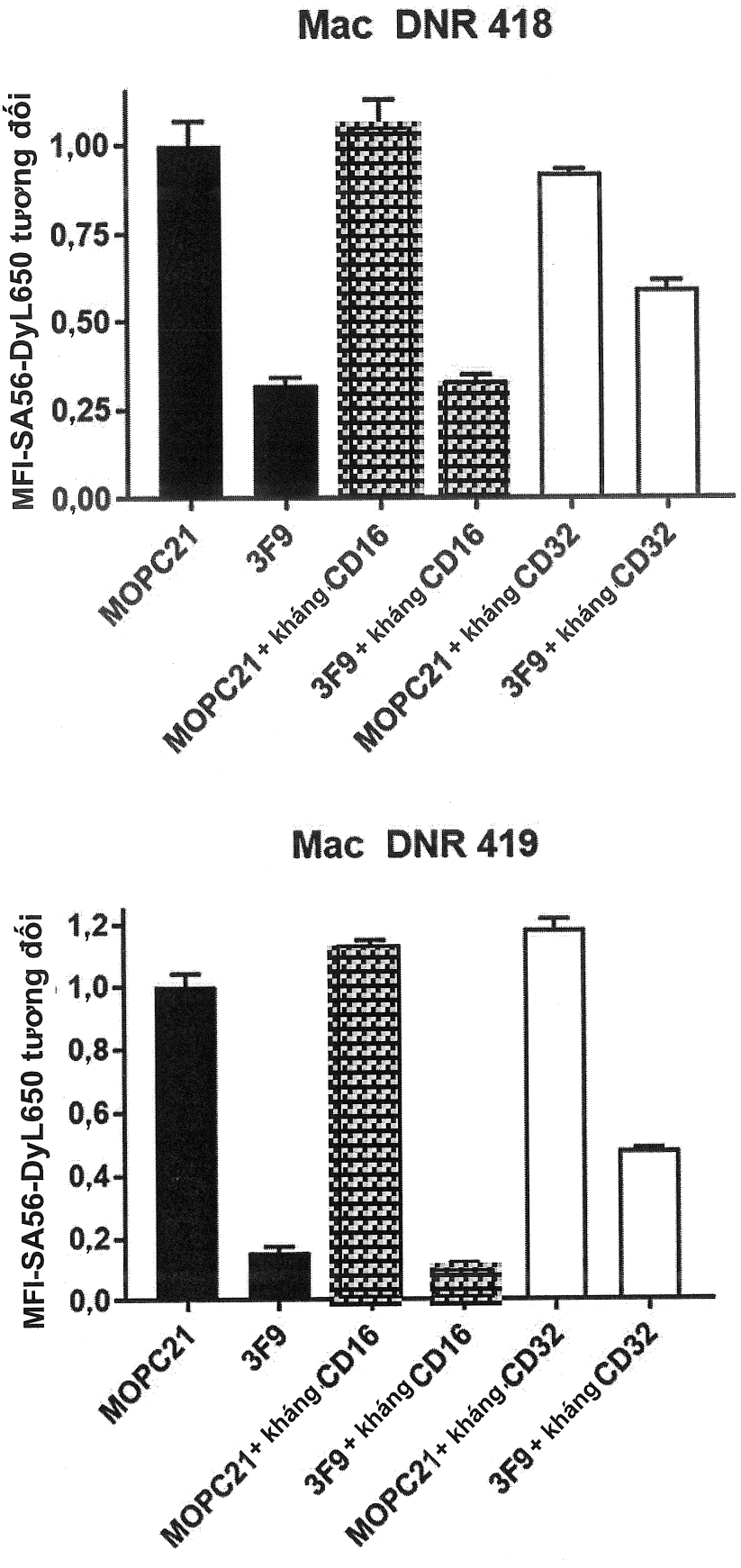
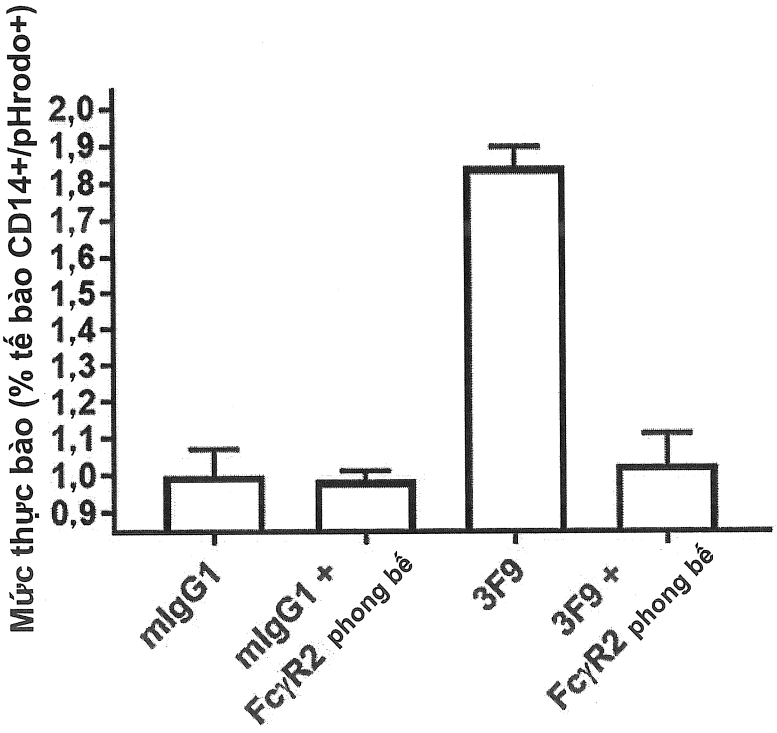
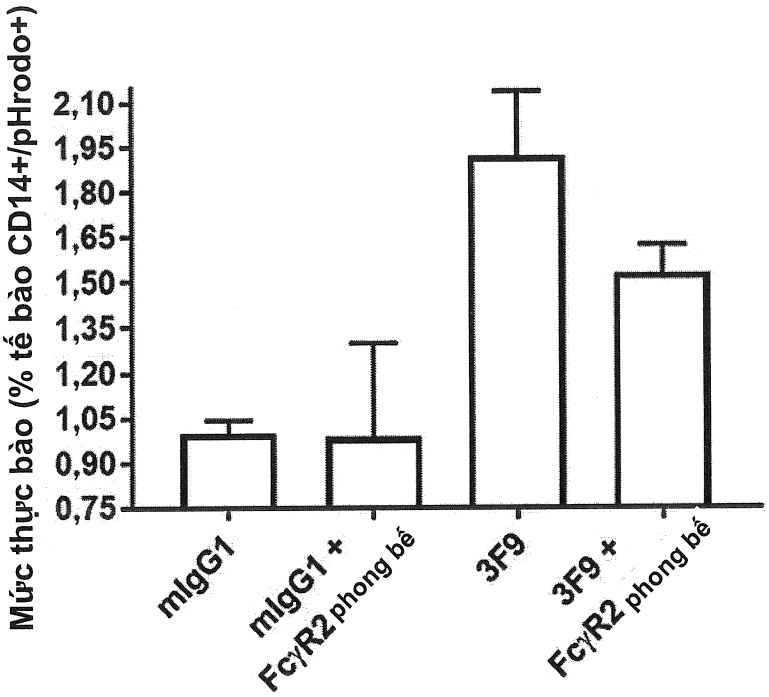

Mac DNR 418
MFI-SA56-DyL650 tương đối
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
MOPC21
3F9
MOPC21 + kháng CD16
3F9 + kháng CD16
MOPC21 + kháng CD32
3F9 + kháng CD32
Mac DNR 419
MFI-SA56-DyL650 tương đối
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
MOPC21
3F9
MOPC21 + kháng CD16
3F9 + kháng CD16
MOPC21 + kháng CD32
3F9 + kháng CD32

Fig. 7A



(Đại thực bào của người Dnr. 432)



(Đại thực bào của người Dnr. 433)

Fig. 7B

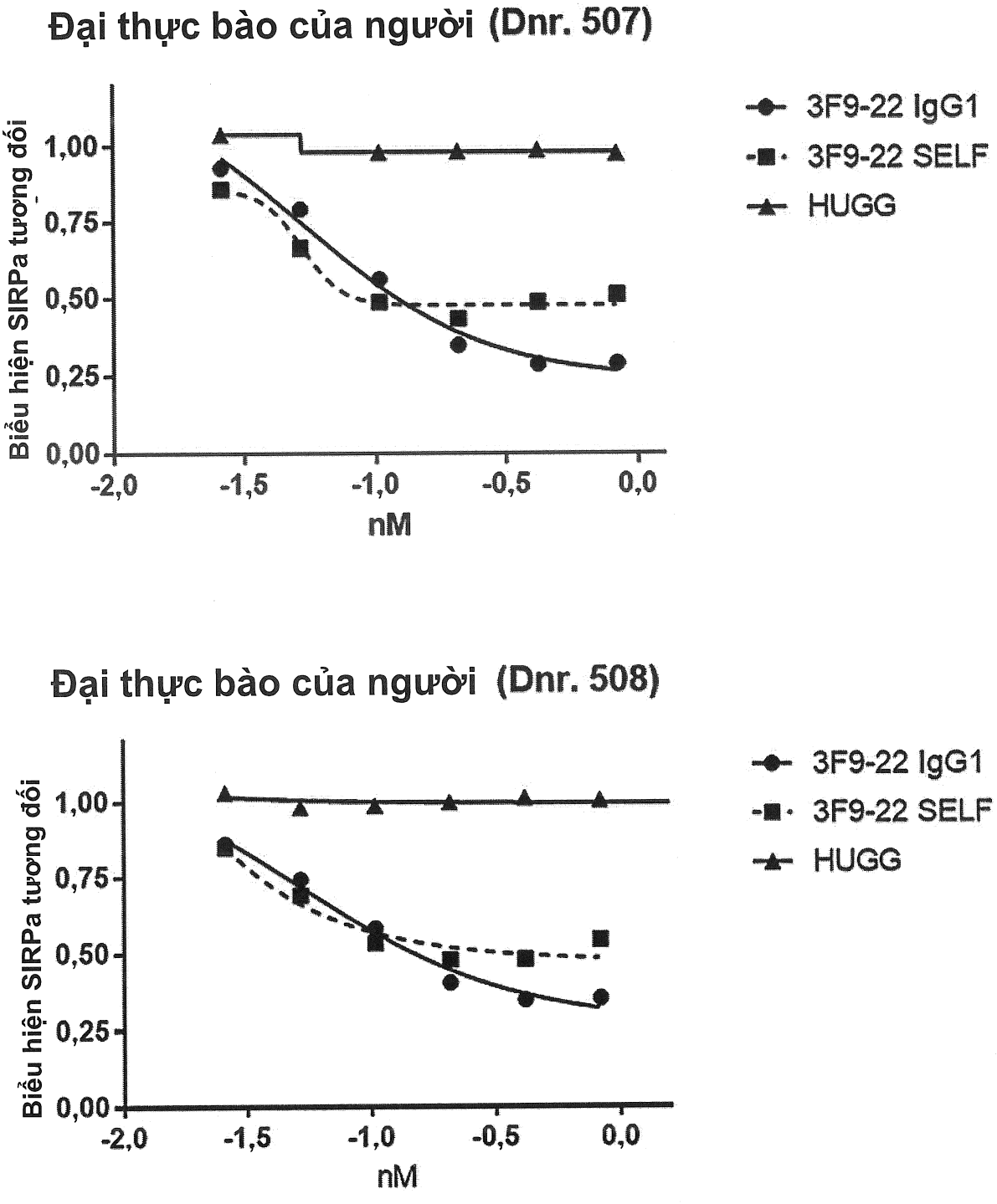

Đại thực bào của người (Dnr. 507)
Biểu hiện SIRPa tương đối
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
-2,0
-1,5
-1,0
-0,5
0,0
nM
3F9-22 IgG1
3F9-22 SELF
HUGG
Đại thực bào của người (Dnr. 508)
Biểu hiện SIRPa tương đối
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
-2,0
-1,5
-1,0
-0,5
0,0
nM
3F9-22 IgG1
3F9-22 SELF
HUGG

Fig. 8A

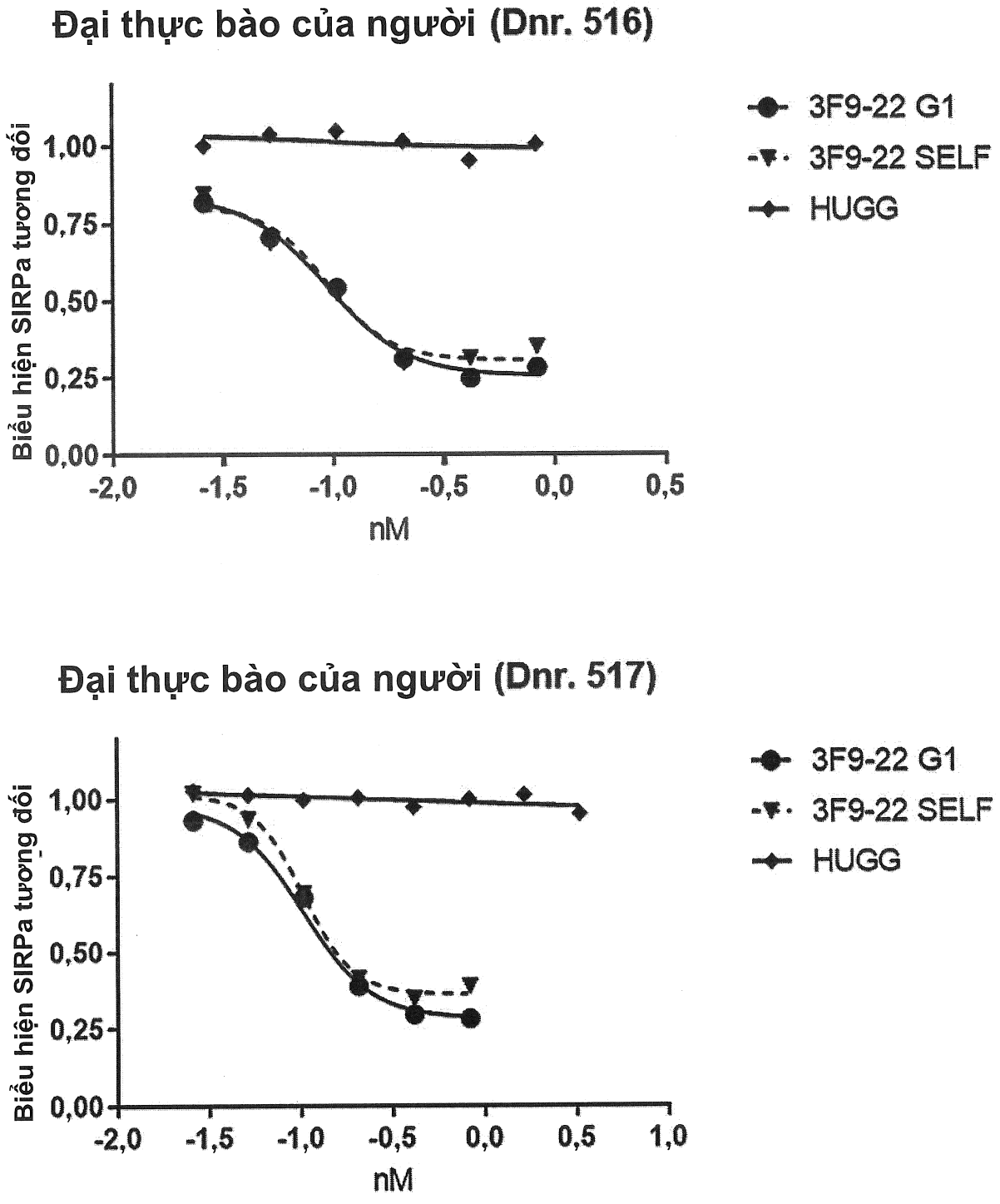

Đại thực bào của người (Dnr. 516)
Biểu hiện SIRPa tương đối
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
-2,0
-1,5
-1,0
-0,5
0,0
0,5
nM
3F9-22 G1
3F9-22 SELF
HUGG
Đại thực bào của người (Dnr. 517)
Biểu hiện SIRPa tương đối
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
-2,0
-1,5
-1,0
-0,5
0,0
0,5
1,0
nM
3F9-22 G1
3F9-22 SELF
HUGG

Fig. 8B

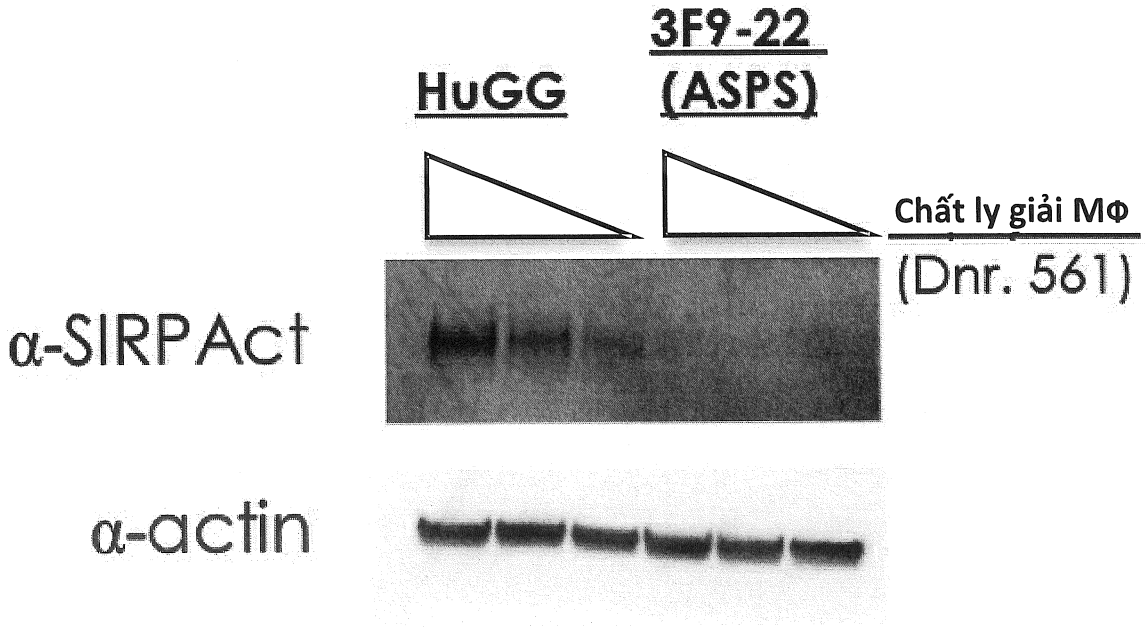

HuGG
3F9-22
(ASPS)
Chất ly giải MΦ
(Dnr. 561)
α-SIRPAct
α-actin

Fig. 9A

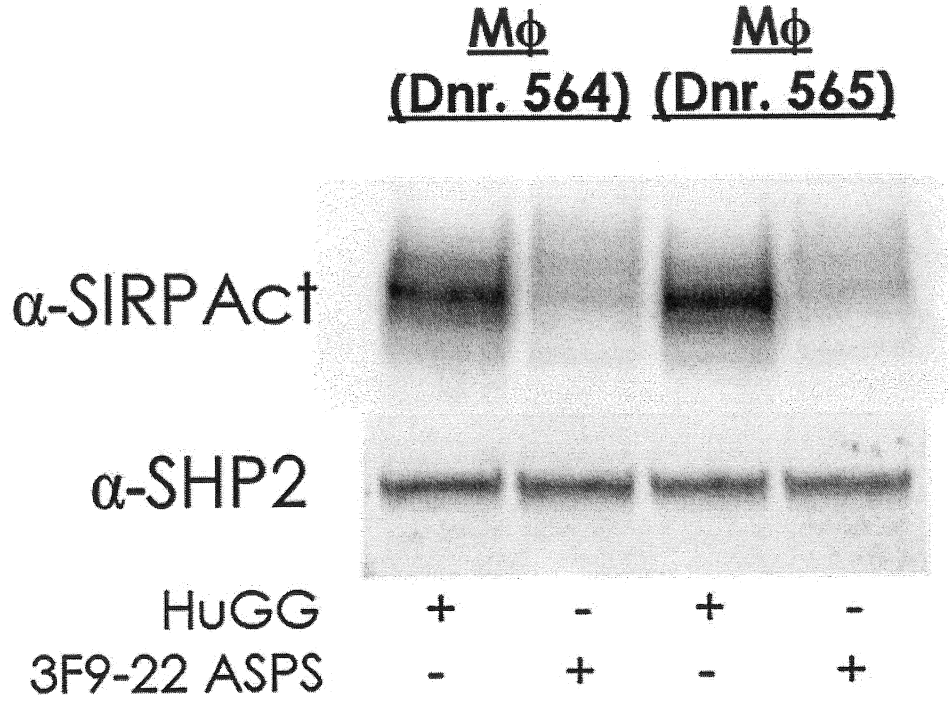
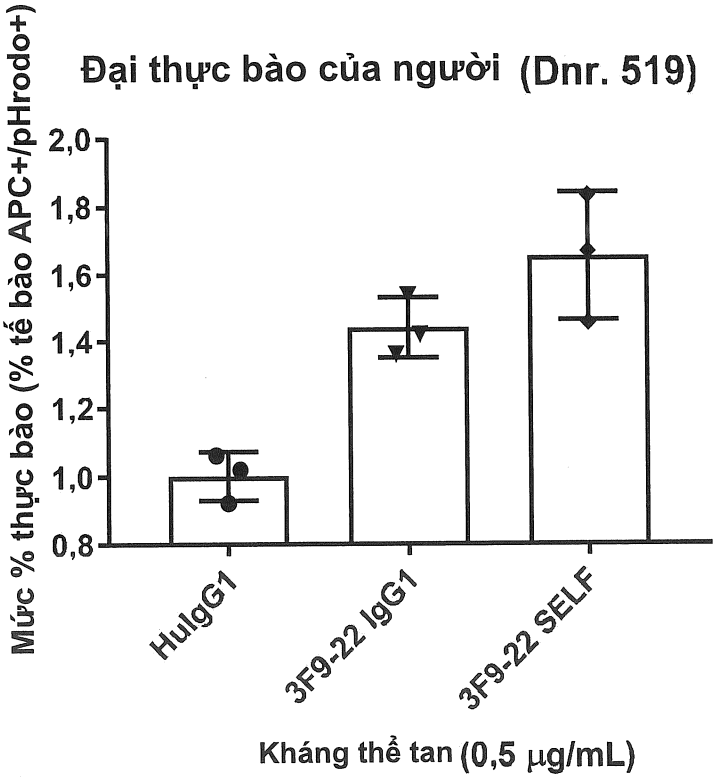

MΦ
(Dnr. 564)
MΦ
(Dnr. 565)
α-SIRPAct
α-SHP2
HuGG + - + -
3F9-22 ASPS - + - +

Fig. 9B


Đại thực bào của người (Dnr. 519)
Mức % thực bào (% tế bào APC+/pHrodo+)
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
HulgG1
3F9-22 lgG1
3F9-22 SELF
Kháng thể tan (0,5 μg/mL)

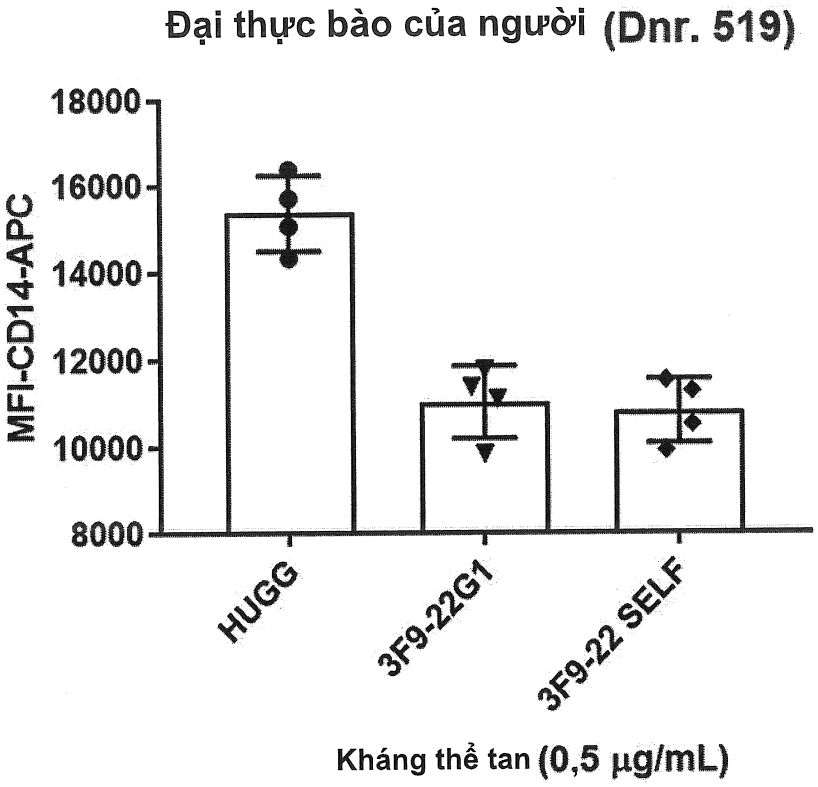

Đại thực bào của người (Dnr. 519)
MFI-CD14-APC
18000
16000
14000
12000
10000
8000
HUGG
3F9-22G1
3F9-22 SELF
Kháng thể tan (0,5 μg/mL)

Fig. 10A

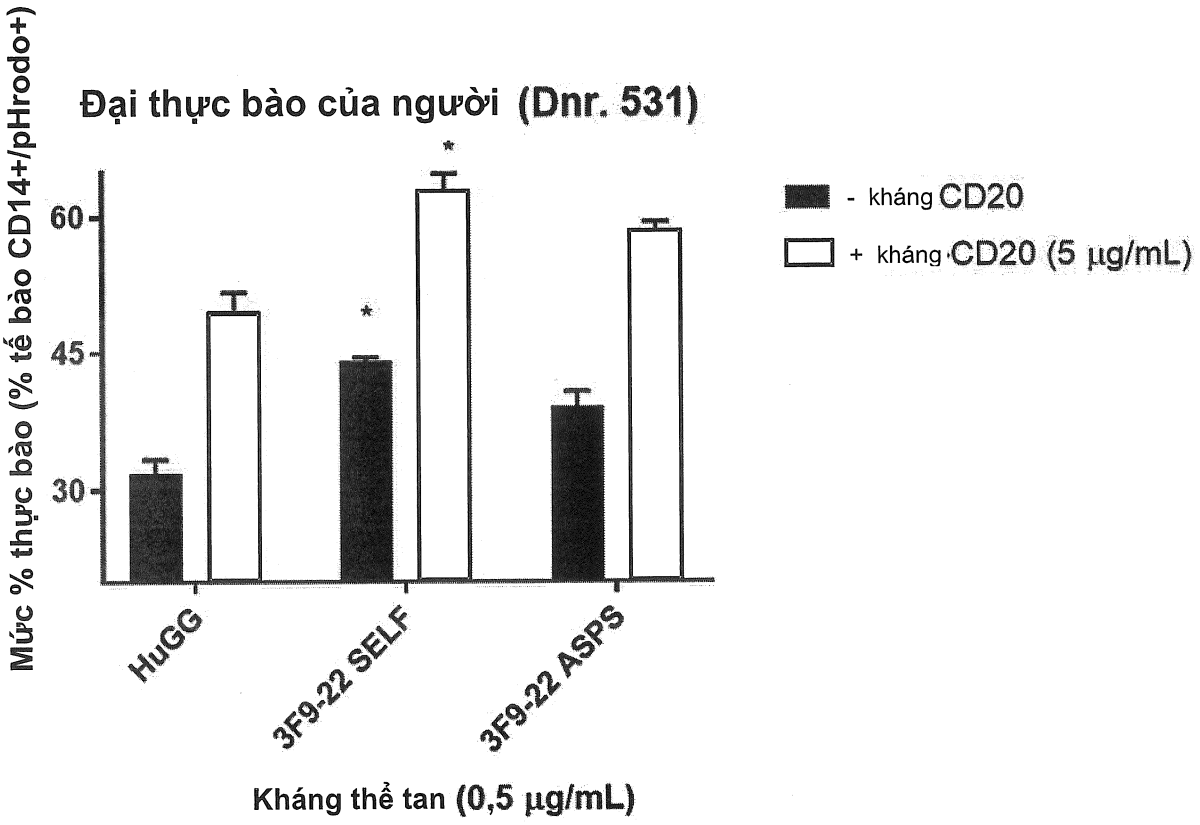

Đại thực bào của người (Dnr. 531)
Mức % thực bào (% tế bào CD14+/pHrodo+)
60
45
30
*
*
HuGG
3F9-22 SELF
3F9-22 ASPS
Kháng thể tan (0,5 µg/mL)
- kháng CD20
+ kháng CD20 (5 µg/mL)

Fig. 10B

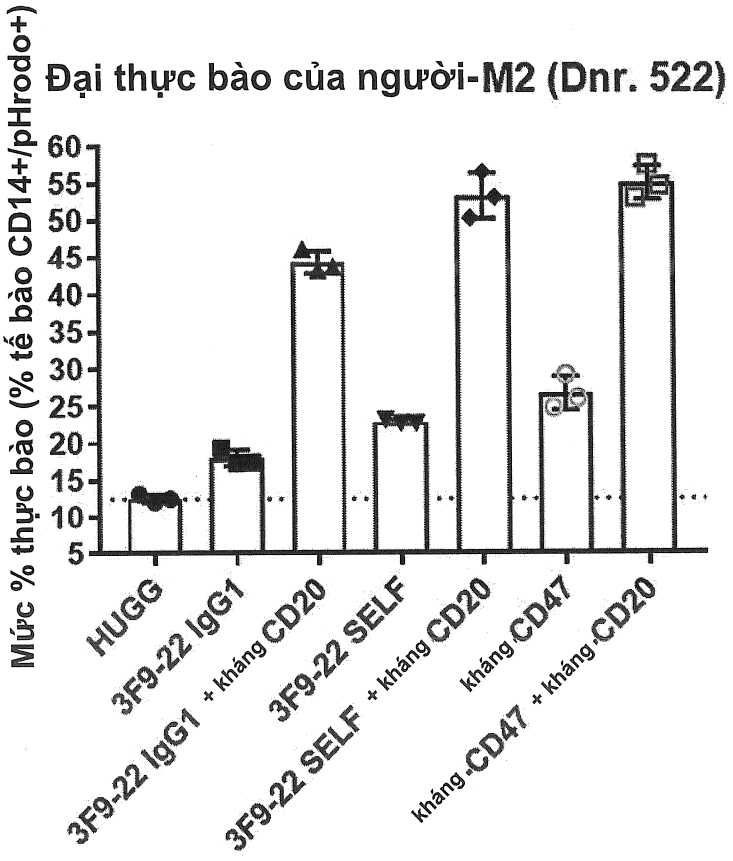


Fig. 11A

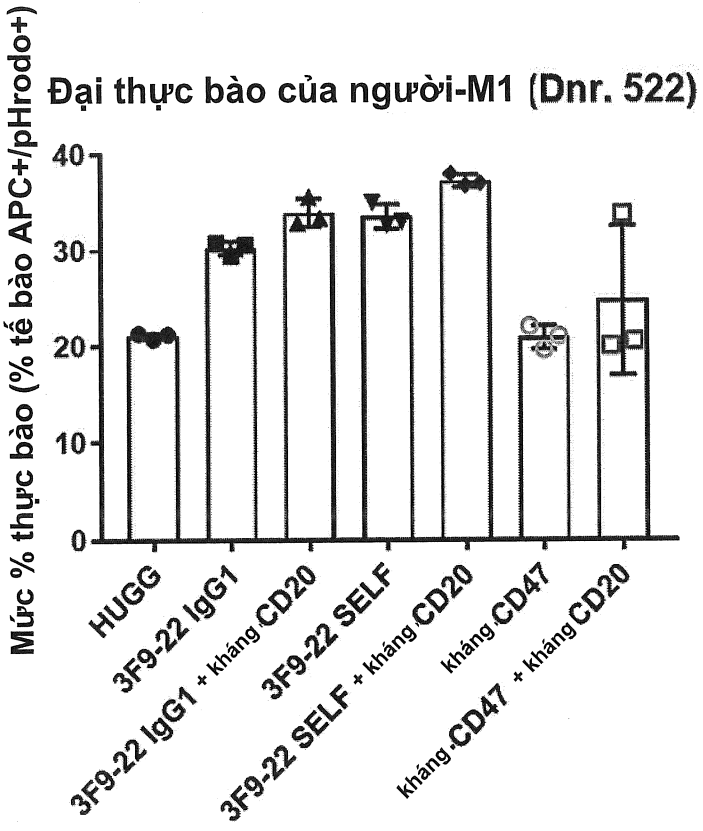


Fig. 11B

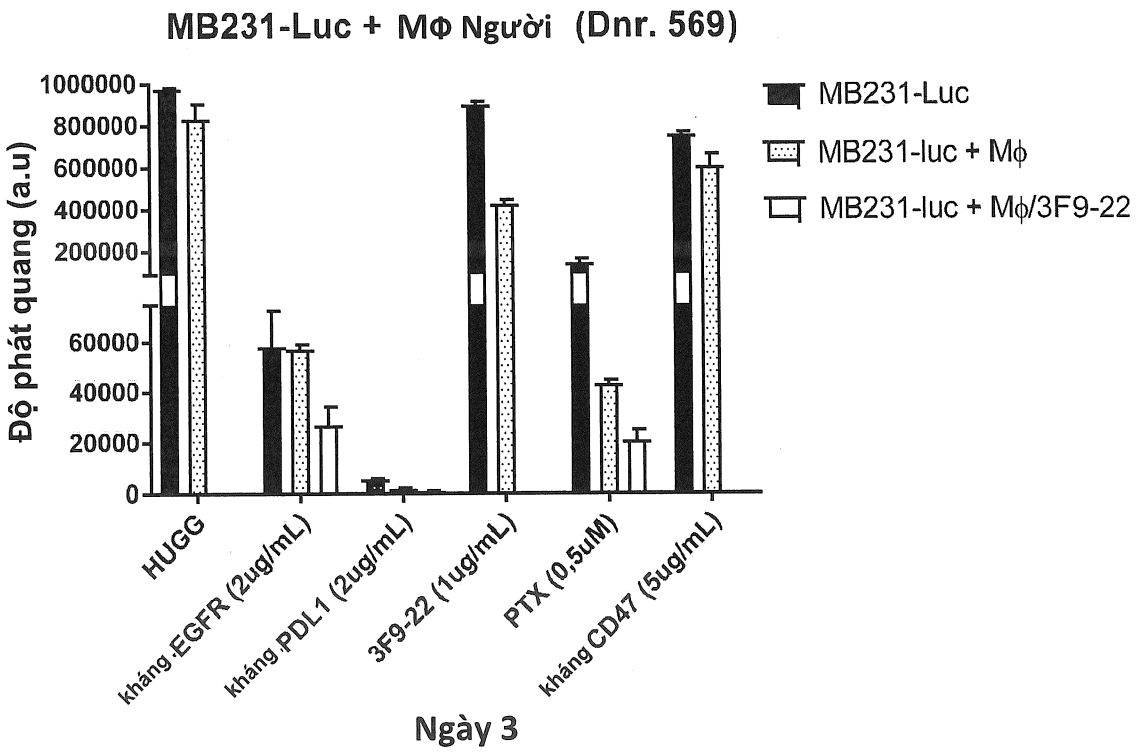


Fig. 12A

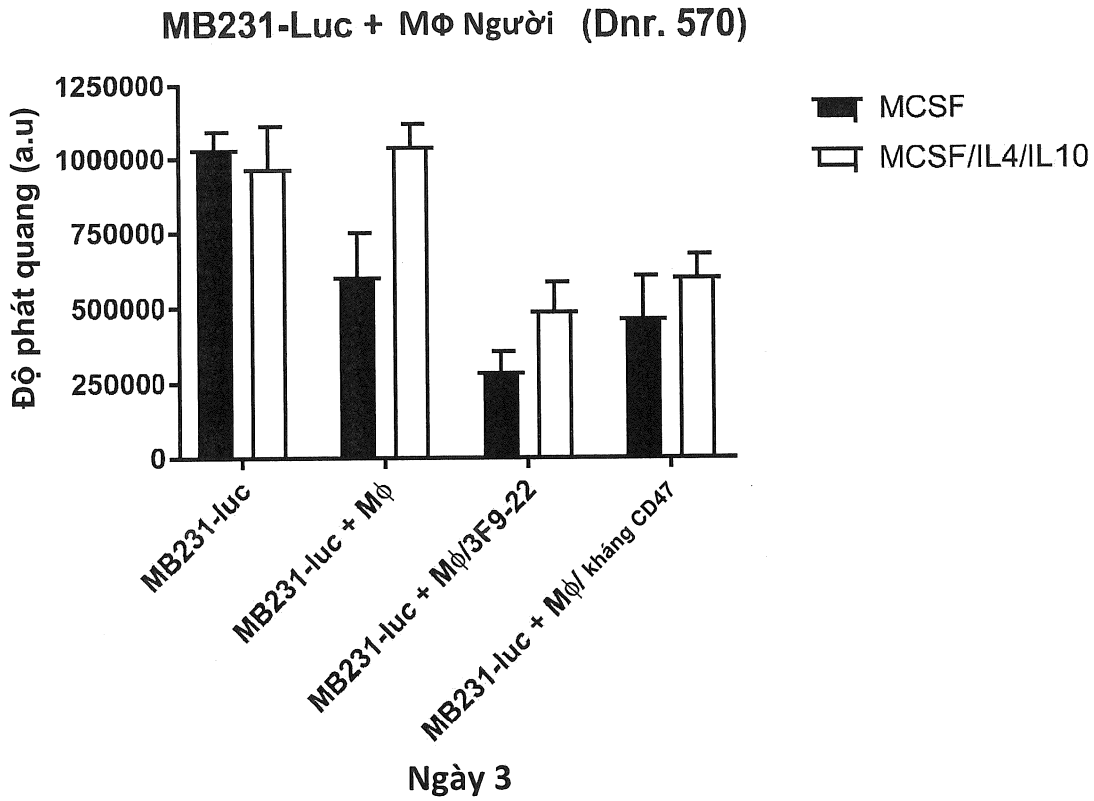
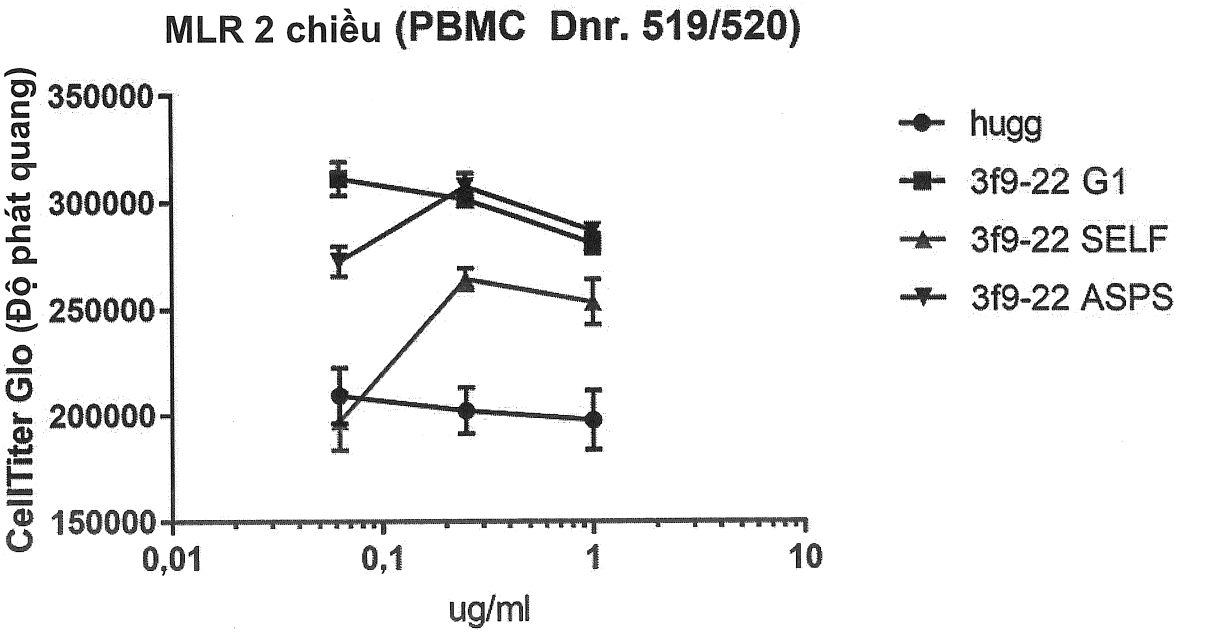
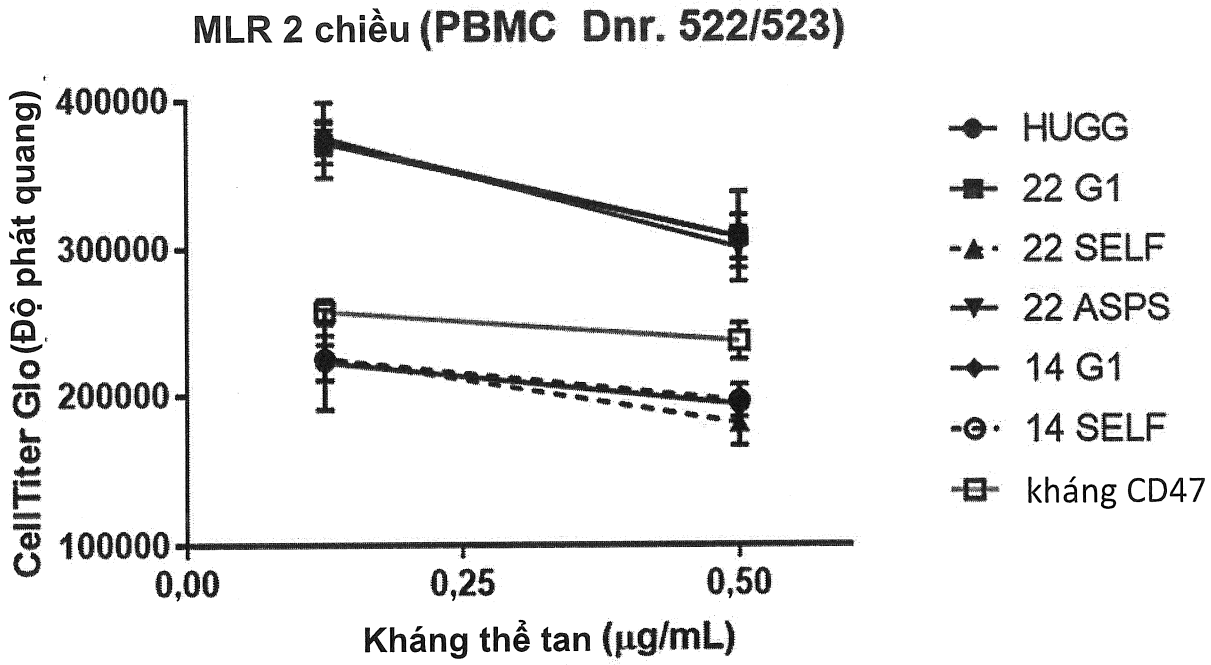


Fig. 12B


MLR 2 chiều (PBMC Dnr. 519/520)
CellTiter Glo (Độ phát quang)
350000
300000
250000
200000
150000
0,01
0,1
1
10
ug/ml
hugg
3f9-22 G1
3f9-22 SELF
3f9-22 ASPS


MLR 2 chiều (PBMC Dnr. 522/523)
CellTiter Glo (Độ phát quang)
400000
300000
200000
100000
0,00
0,25
0,50
Kháng thể tan (µg/mL)
HUGG
22 G1
22 SELF
22 ASPS
14 G1
14 SELF
kháng CD47

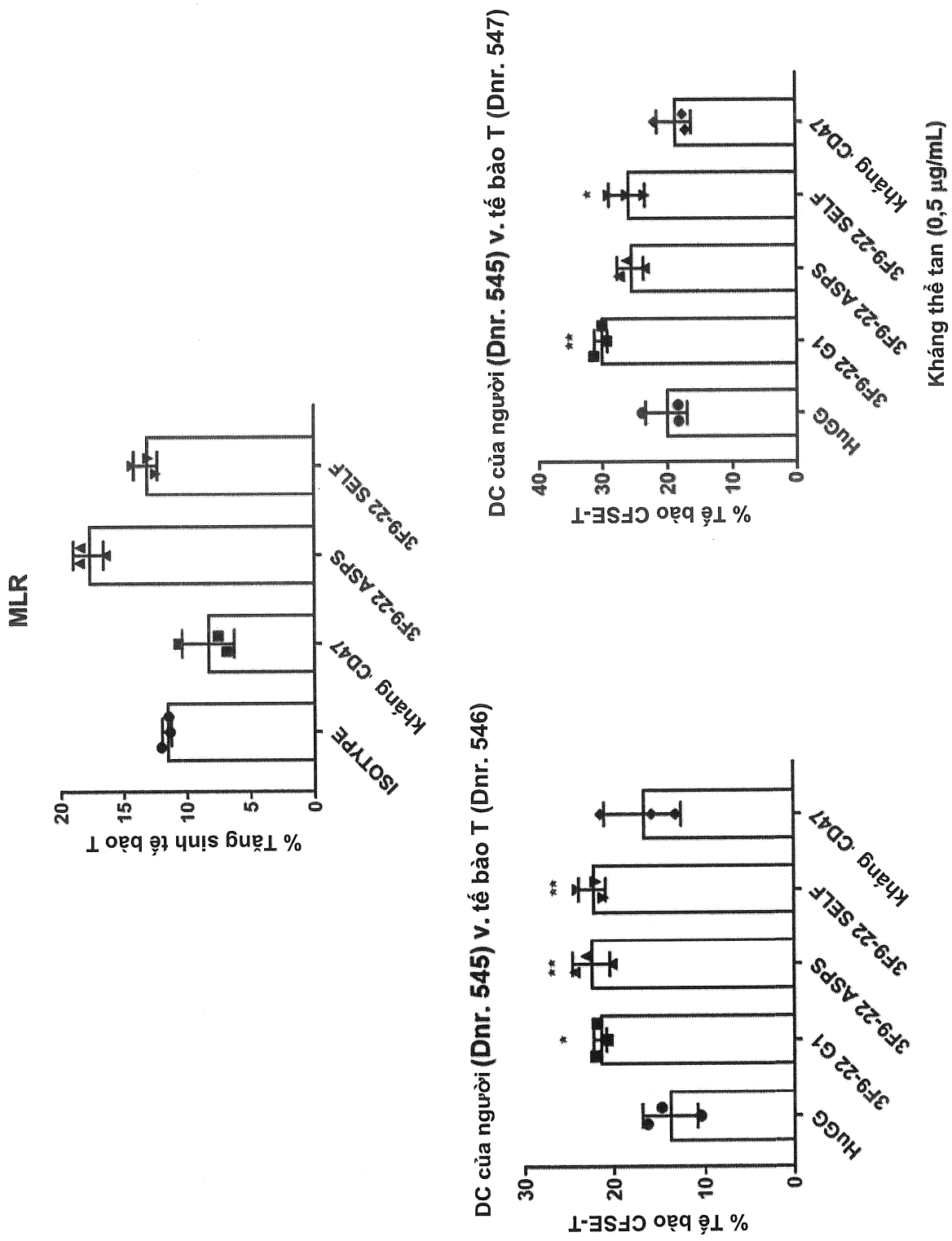

MLR
% Tăng sinh tế bào T
20
15
10
5
0
ISOTYPE
Kháng ,CD47
3F9-22 ASPS
3F9-22 SELF
DC của người (Dnr. 545) v. tế bào T (Dnr. 546)
% Tế bào CFSE-T
30
20
10
0
HuGG
3F9-22 G1
3F9-22 ASPS
3F9-22 SELF
Kháng ,CD47
DC của người (Dnr. 545) v. tế bào T (Dnr. 547)
% Tế bào CFSE-T
40
30
20
10
0
HuGG
3F9-22 G1
3F9-22 ASPS
3F9-22 SELF
Kháng ,CD47
Kháng thể tan (0,5 µg/mL)

Fig. 14A

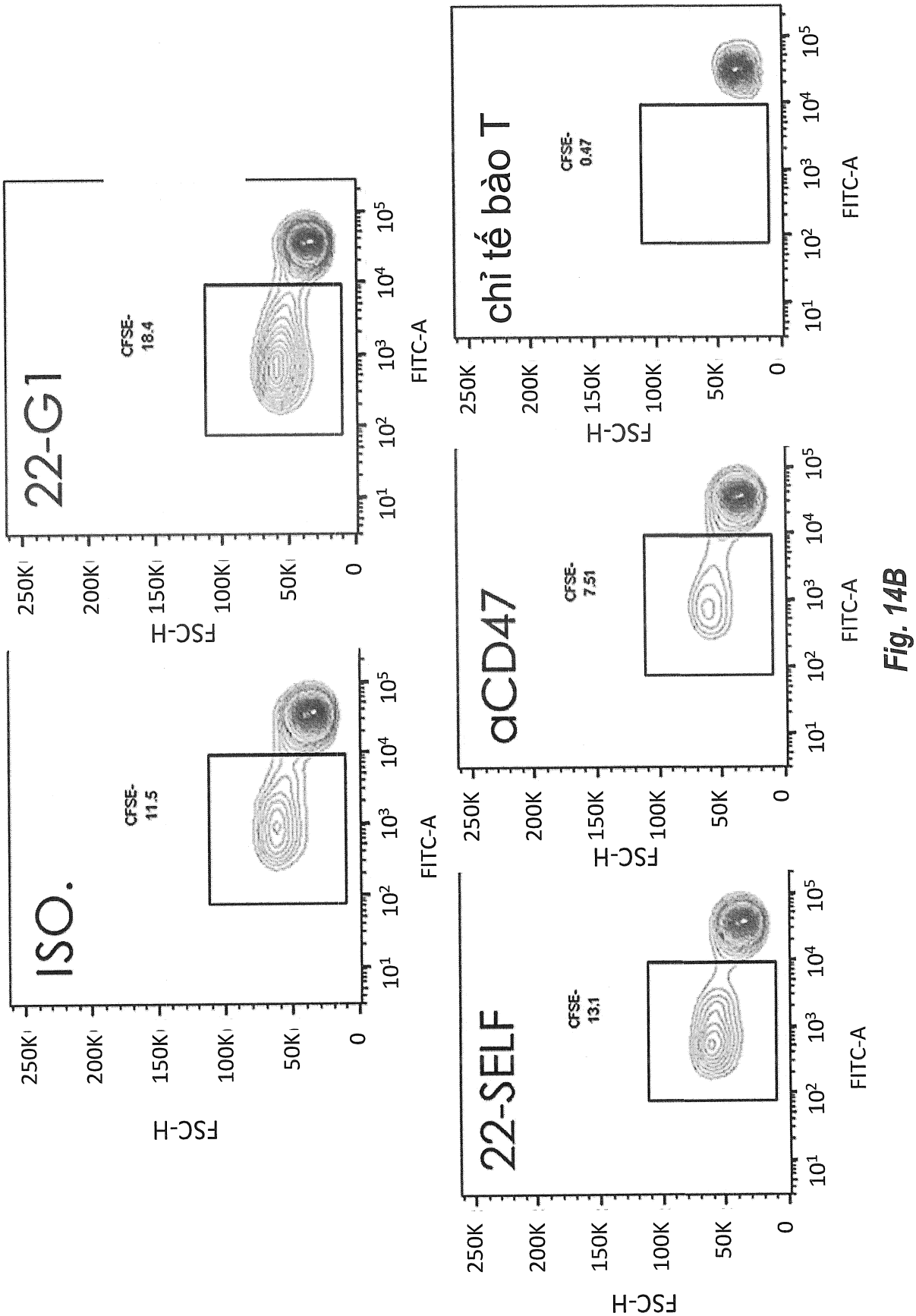

ISO.
CFSE-
11.5
22-G1
CFSE-
18.4
chỉ tế bào T
CFSE-
0.47
aCD47
CFSE-
7.51
22-SELF
CFSE-
13.1
FSC-H
FITC-A
250K
200K
150K
100K
50K
0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5

Fig. 14B

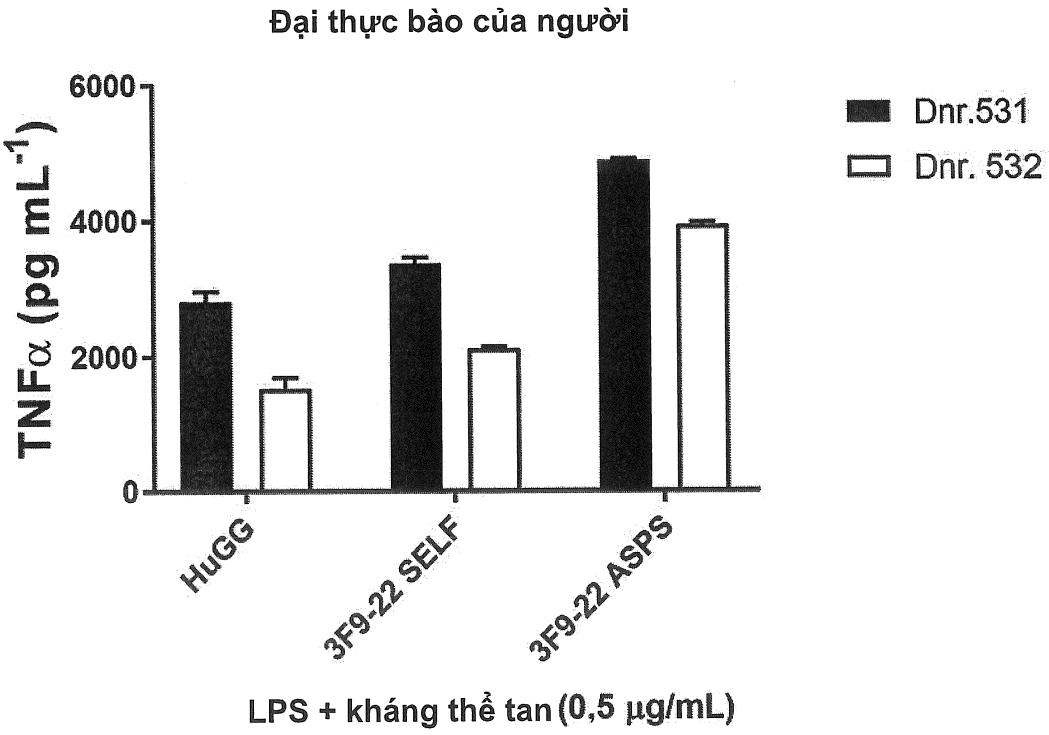


Fig. 15A

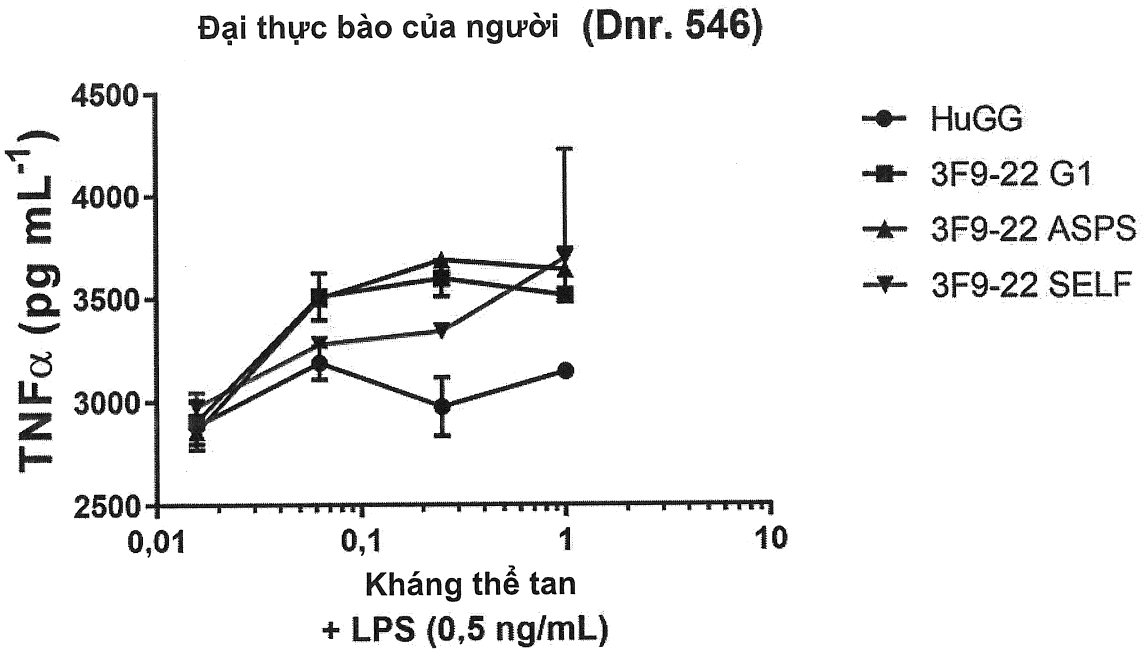


Fig. 15B

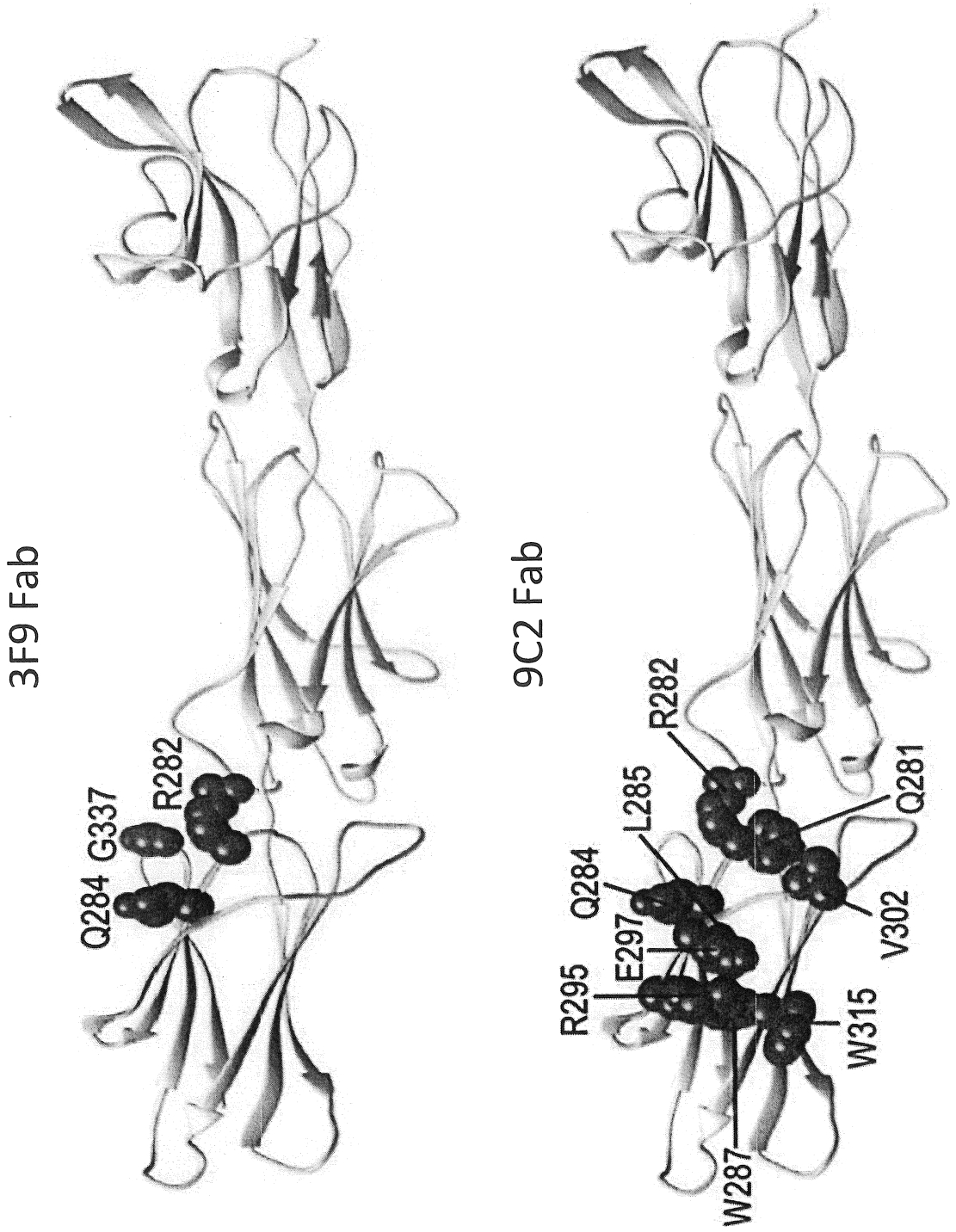

3F9 Fab
Q284
G337
R282
9C2 Fab
R282
L285
Q284
E297
R295
W287
W315
V302
Q281

Fig. 16

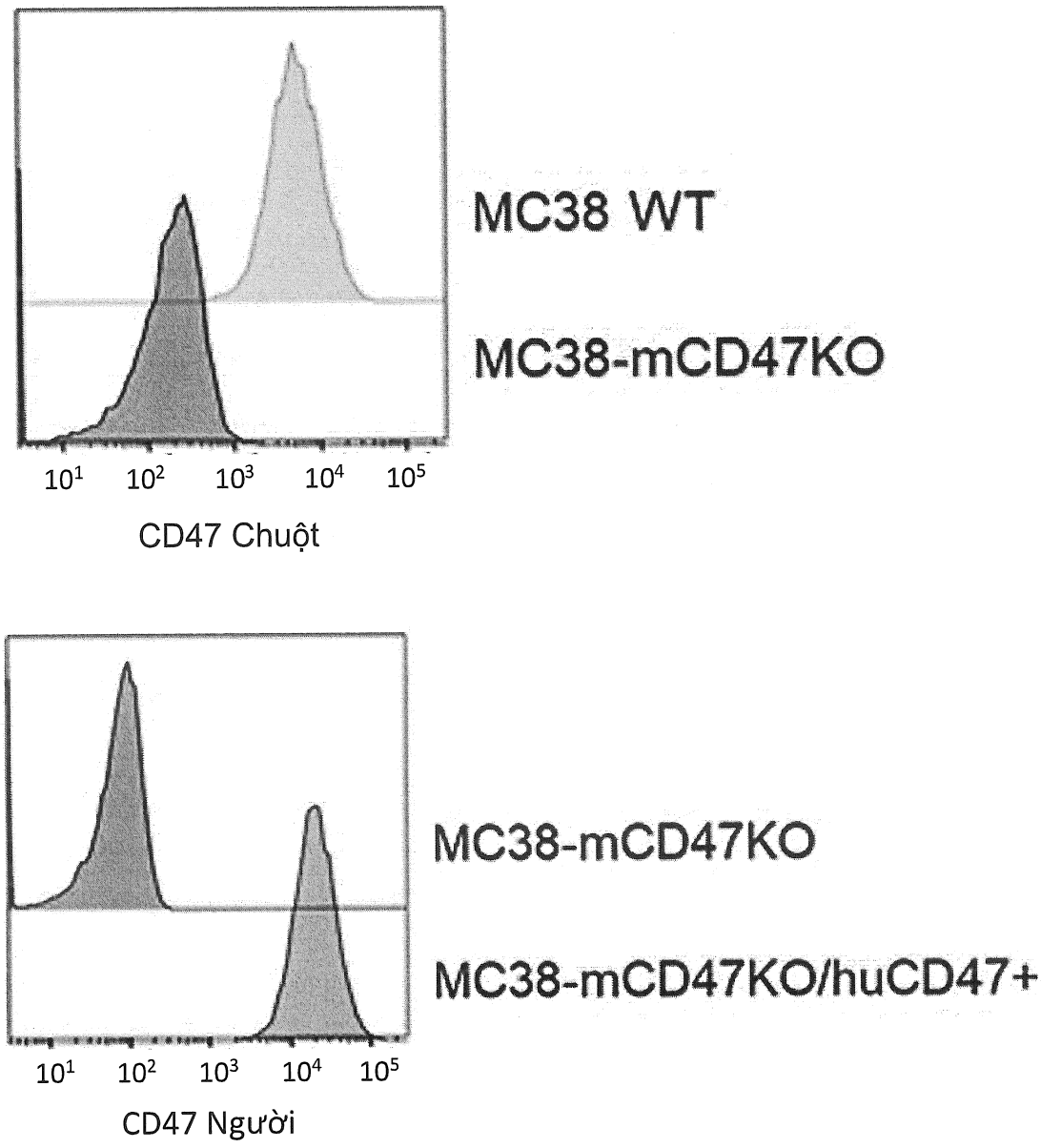

MC38 WT
MC38-mCD47KO
10^1 10^2 10^3 10^4 10^5
CD47 Chuột
MC38-mCD47KO
MC38-mCD47KO/huCD47+
10^1 10^2 10^3 10^4 10^5
CD47 Người

Fig. 17A

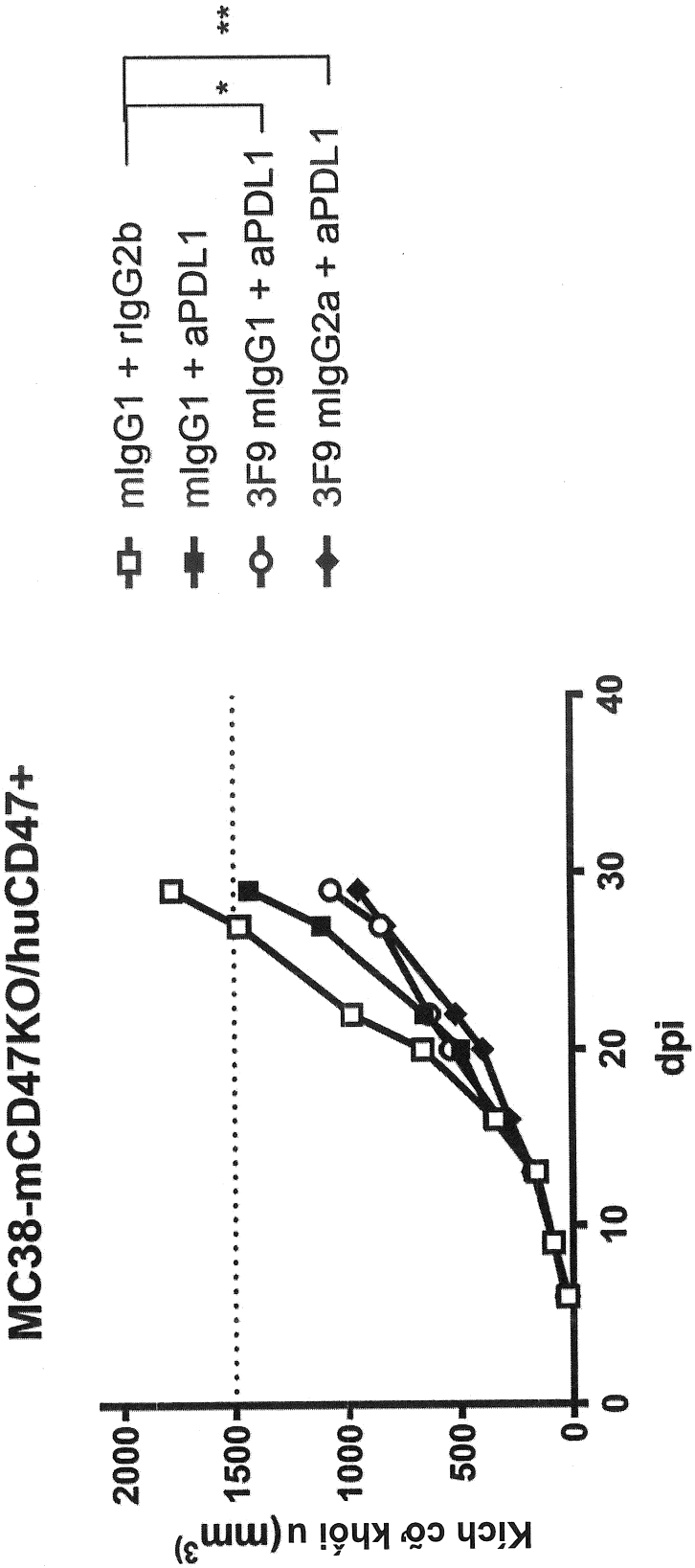

MC38-mCD47KO/huCD47+
Kích cỡ khối u (mm³)
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
dpi
mIgG1 + rIgG2b
mIgG1 + aPDL1
3F9 mIgG1 + aPDL1
3F9 mIgG2a + aPDL1
*
**

Fig. 17B

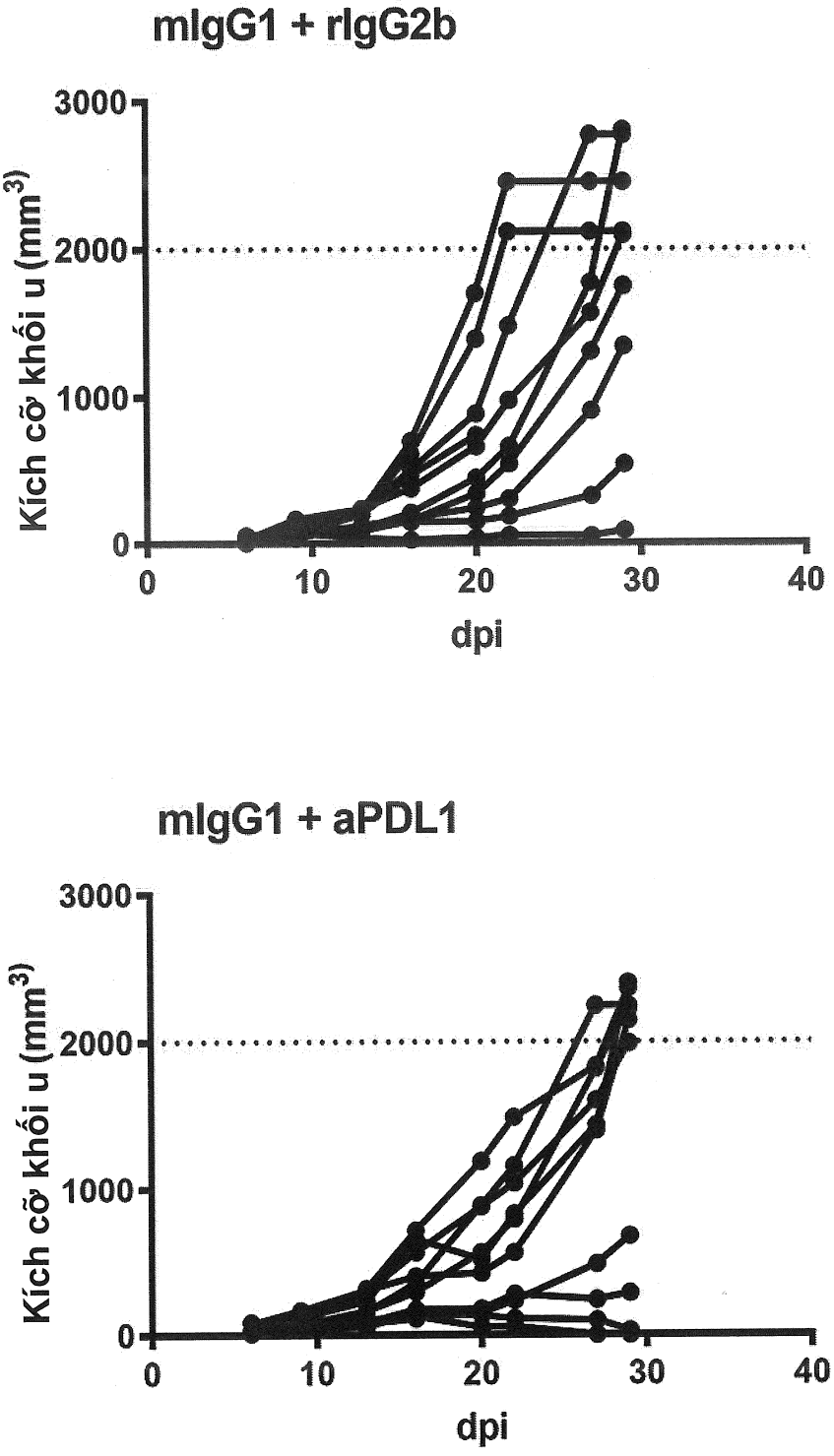

mIgG1 + rIgG2b
Kích cỡ khối u (mm3)
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
dpi
mIgG1 + aPDL1
Kích cỡ khối u (mm3)
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
dpi

Fig. 17C

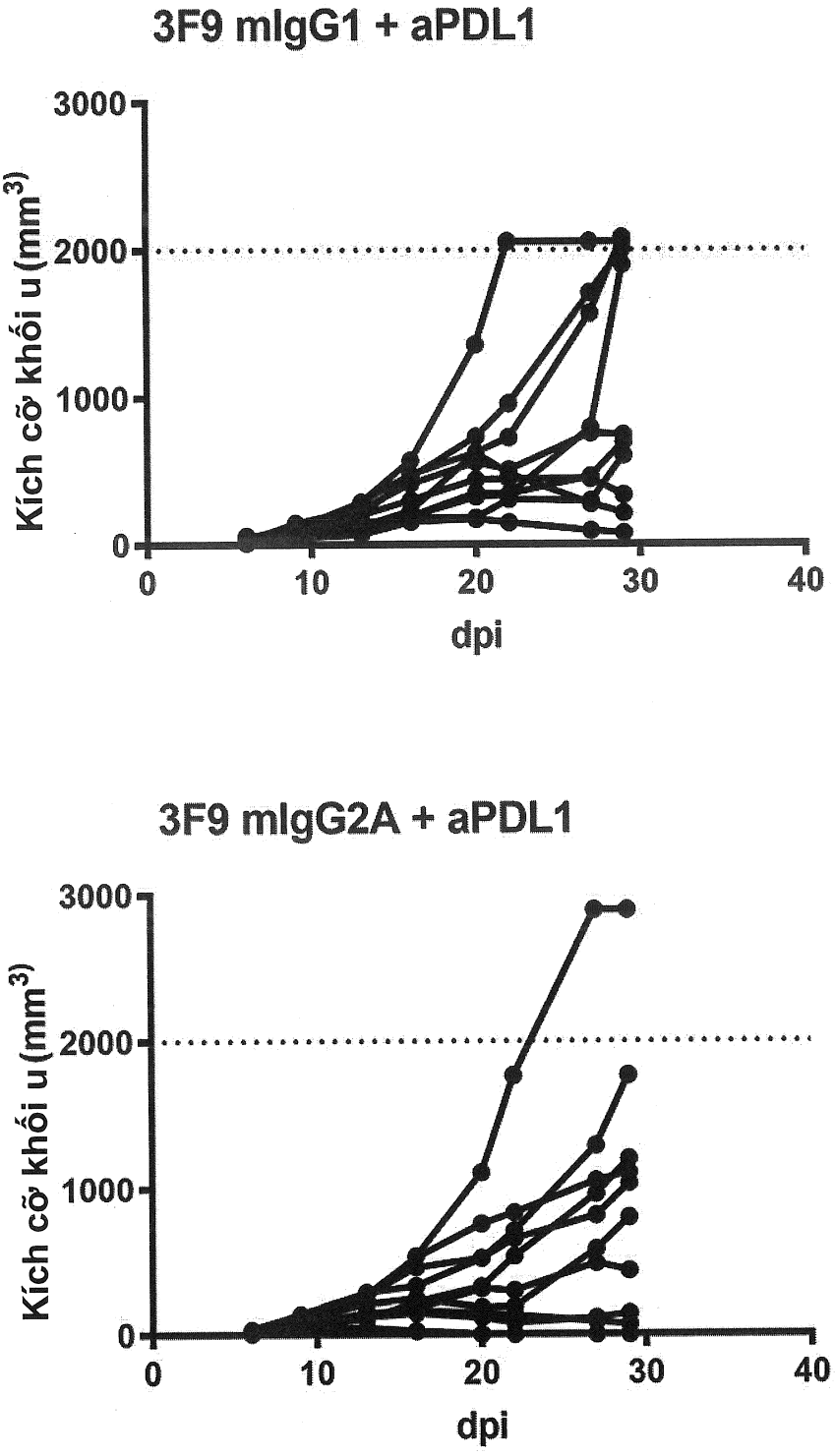


Fig. 17C (tiếp tục)

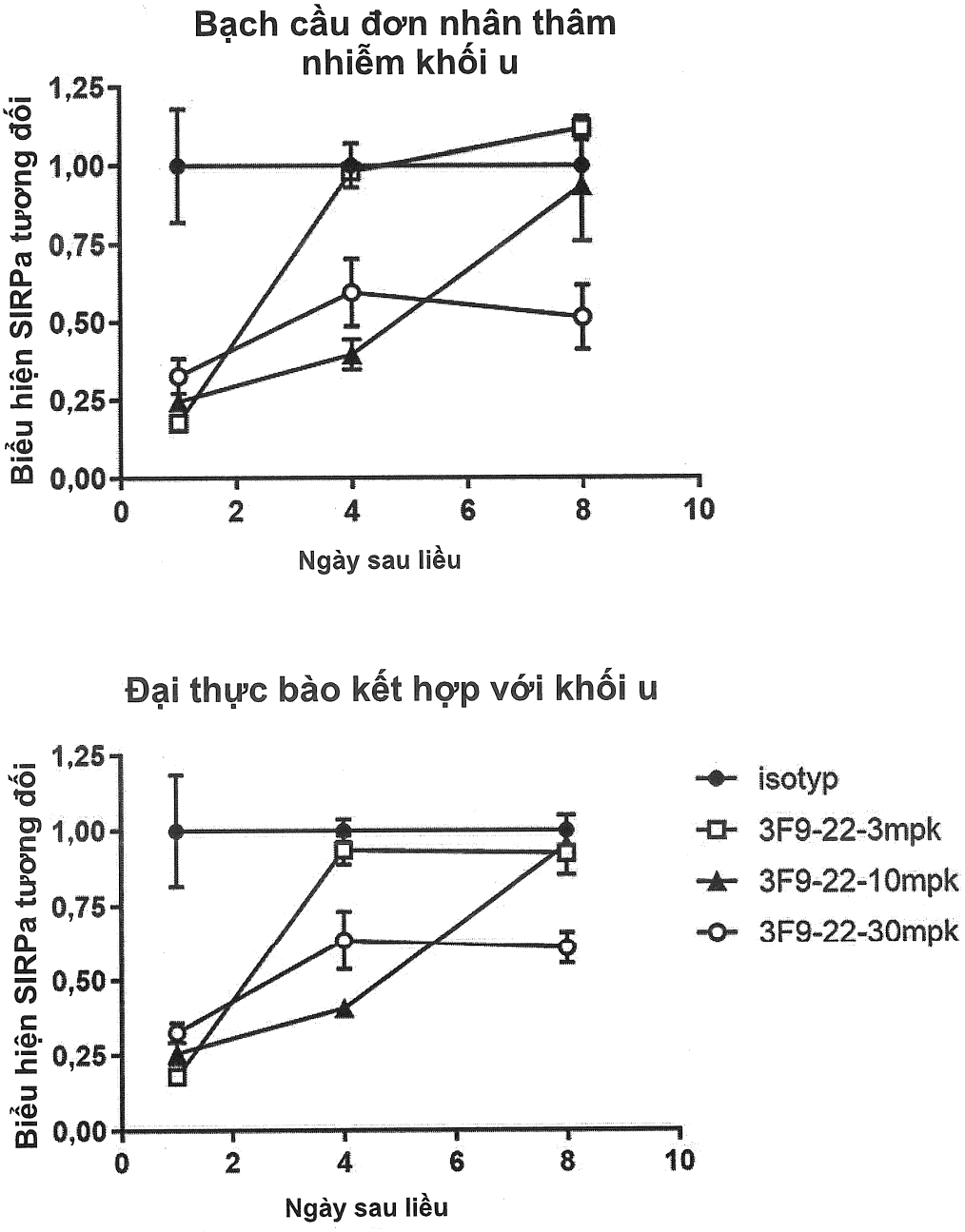

Bạch cầu đơn nhân thâm nhiễm khối u
Biểu hiện SIRPa tương đối
1,25
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
0
2
4
6
8
10
Ngày sau liều
Đại thực bào kết hợp với khối u
Biểu hiện SIRPa tương đối
1,25
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
0
2
4
6
8
10
Ngày sau liều
isotyp
3F9-22-3mpk
3F9-22-10mpk
3F9-22-30mpk

Fig. 18A

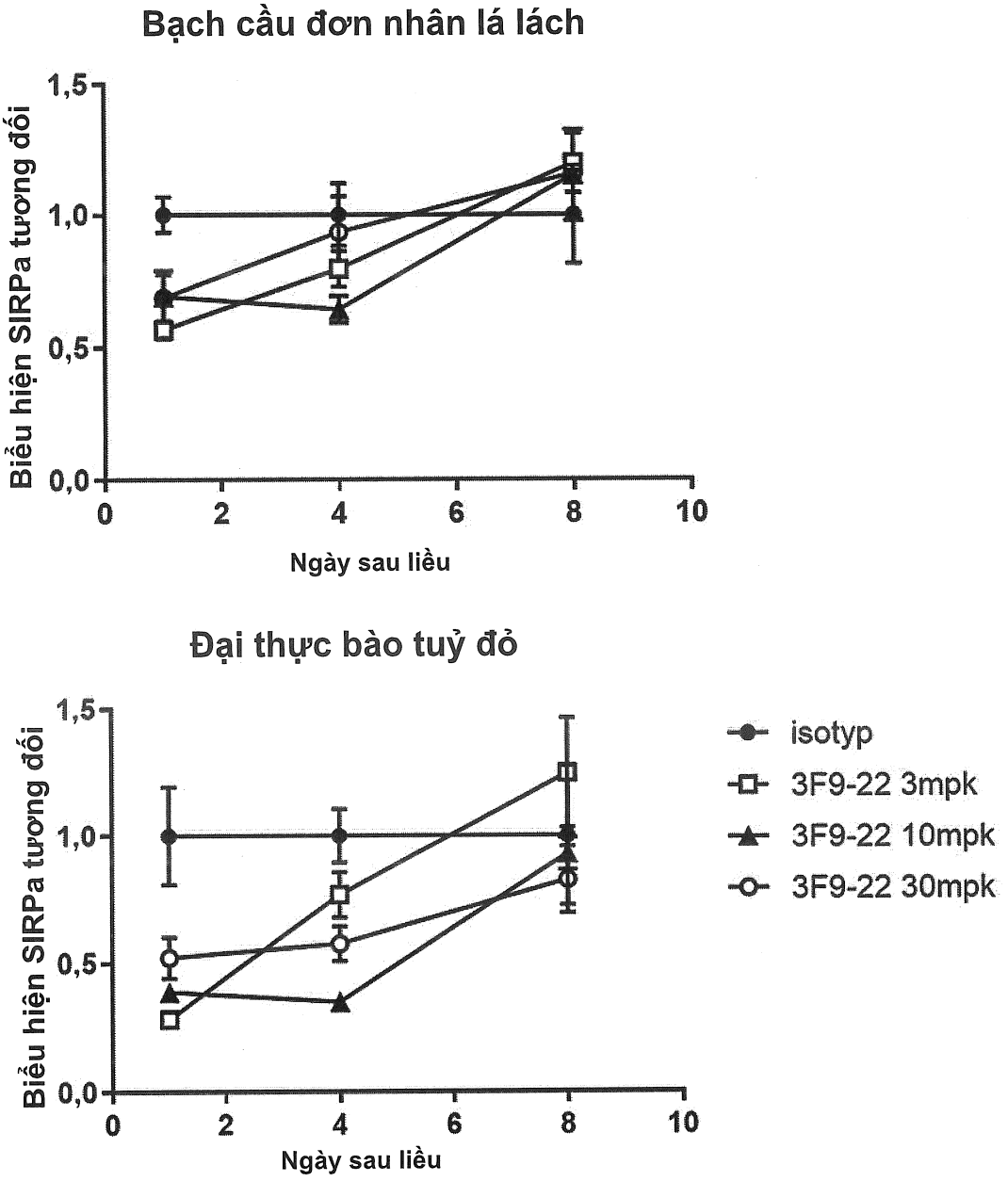


Fig. 18B

Nhóm	CD34+ HSC Người hiến A # chuột	CD34+ HSC Người hiến B # chuột	Điều trị kháng thể	Liều	Lịch sử dụng	Chất để tiêm
1	2	9	huIgG1	10 mpk	q3dx2	3 triệu tế bào A375
2	3	10	3F9-22 PS	10 mpk	q3dx2	3 triệu tế bào A375
3	3	10	3F9-22 NSLF	10 mpk	q3dx2	3 triệu tế bào A375

Fig. 19A

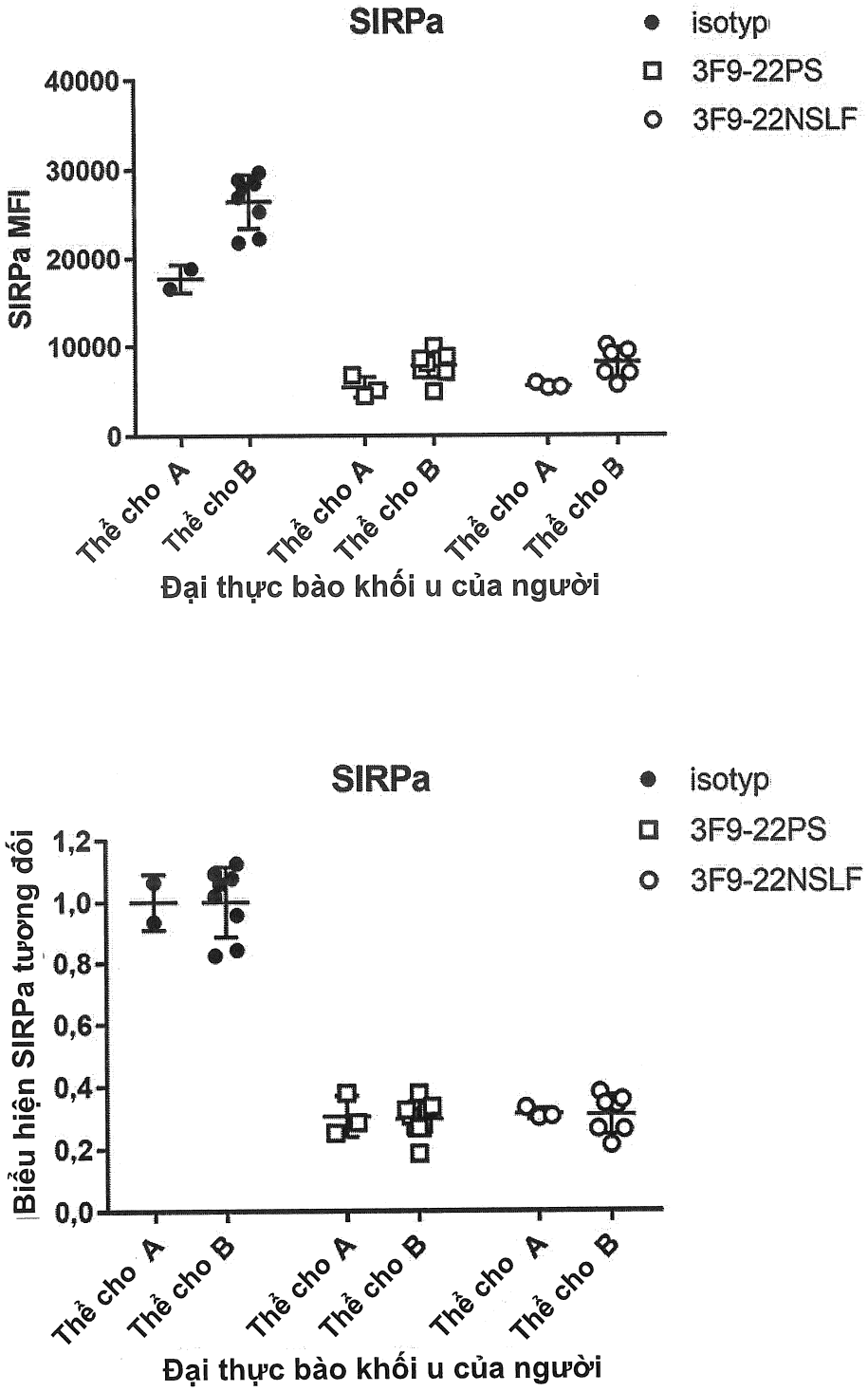
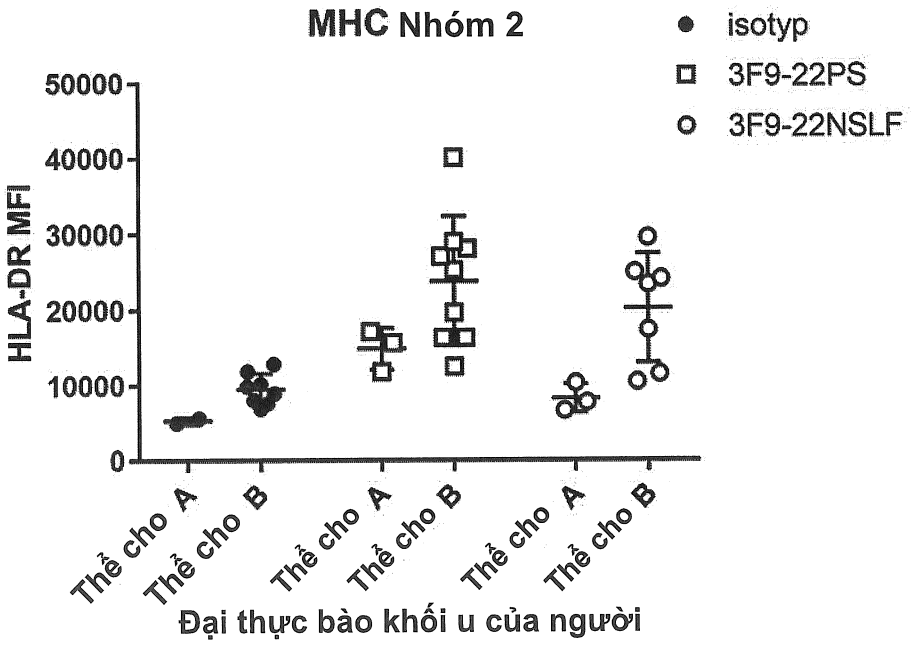

SIRPa
isotyp
3F9-22PS
3F9-22NSLF
SIRPa MFI
40000
30000
20000
10000
0
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Đại thực bào khối u của người
SIRPa
isotyp
3F9-22PS
3F9-22NSLF
Biểu hiện SIRPa tương đối
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Đại thực bào khối u của người

Fig. 19B


MHC Nhóm 2
isotyp
3F9-22PS
3F9-22NSLF
HLA-DR MFI
50000
40000
30000
20000
10000
0
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Đại thực bào khối u của người

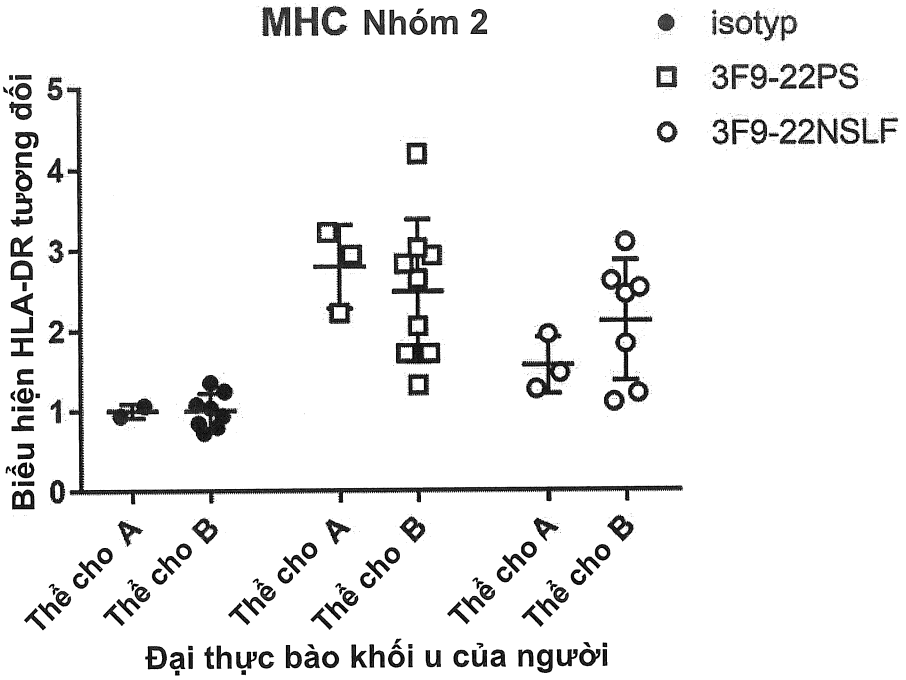
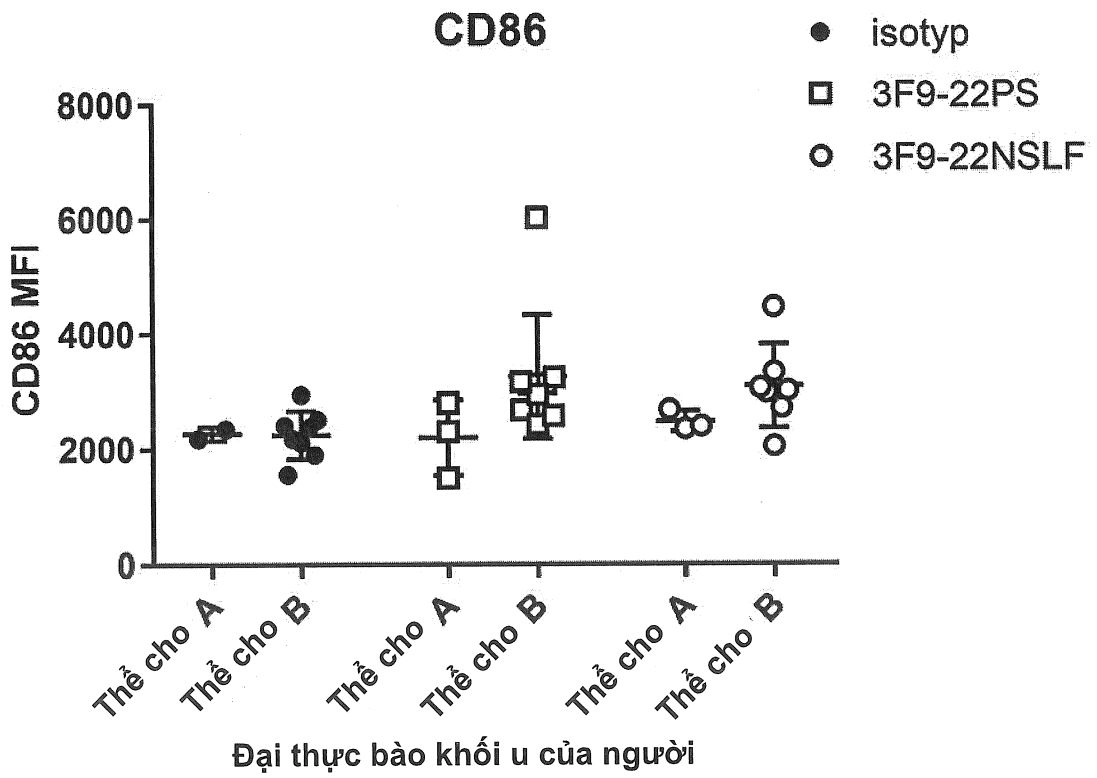

MHC Nhóm 2
isotyp
3F9-22PS
3F9-22NSLF
Biểu hiện HLA-DR tương đối
5
4
3
2
1
0
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Đại thực bào khối u của người

Fig. 20A


CD86
isotyp
3F9-22PS
3F9-22NSLF
CD86 MFI
8000
6000
4000
2000
0
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Đại thực bào khối u của người

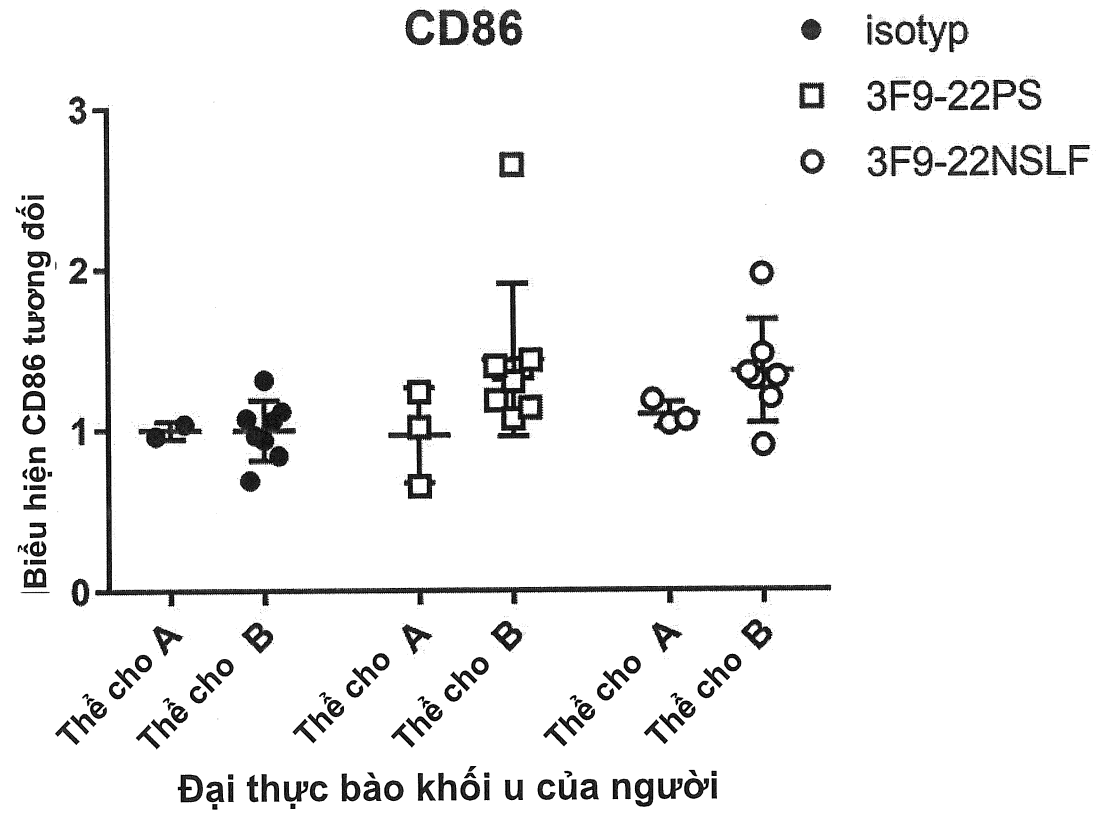
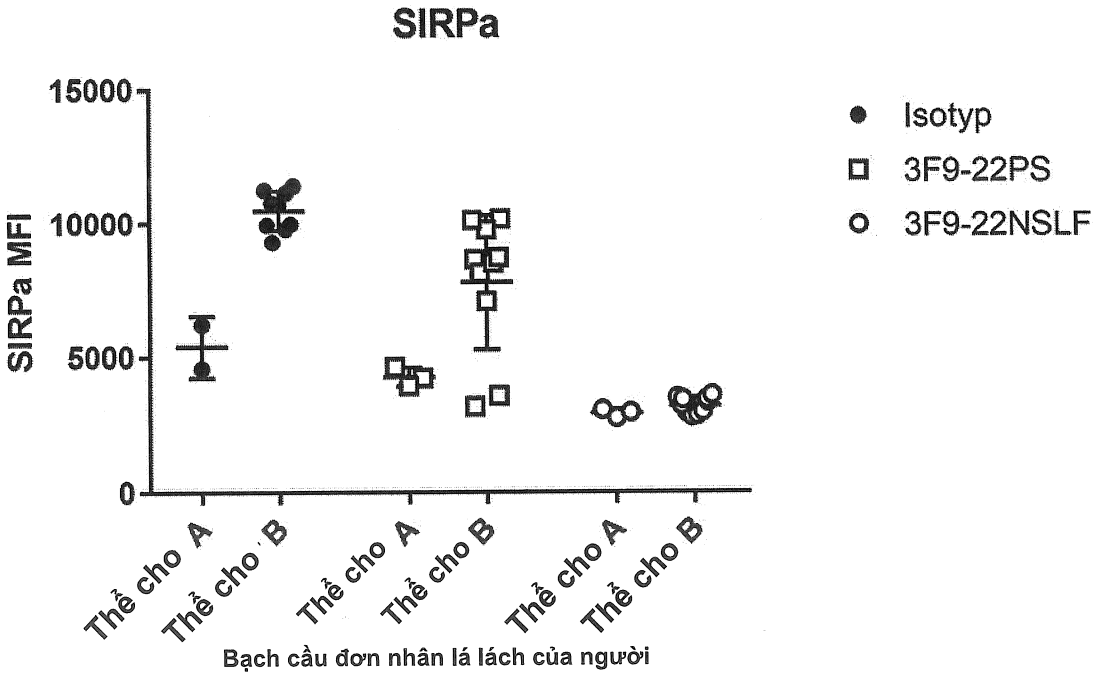

CD86
isotyp
3F9-22PS
3F9-22NSLF
Biểu hiện CD86 tương đối
3
2
1
0
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Đại thực bào khối u của người

Fig. 20B


SIRPa
SIRPa MFI
15000
10000
5000
0
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Bạch cầu đơn nhân lá lách của người
Isotyp
3F9-22PS
3F9-22NSLF

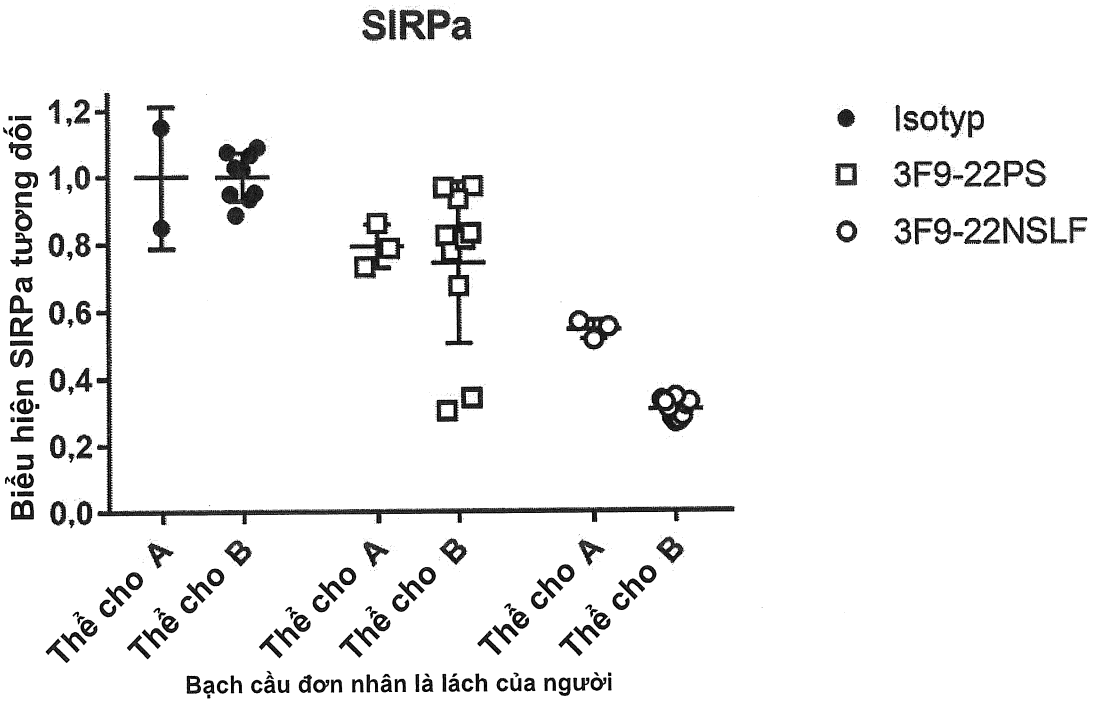
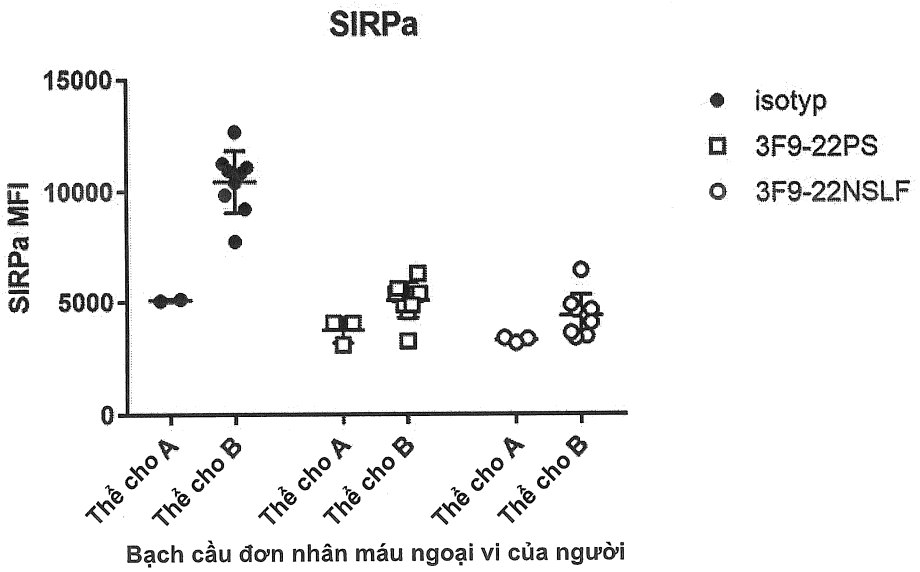

SIRPa
Biểu hiện SIRPa tương đối
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Bạch cầu đơn nhân là lách của người
Isotyp
3F9-22PS
3F9-22NSLF

Fig. 21A


SIRPa
15000
10000
5000
0
SIRPa MFI
isotyp
3F9-22PS
3F9-22NSLF
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi của người

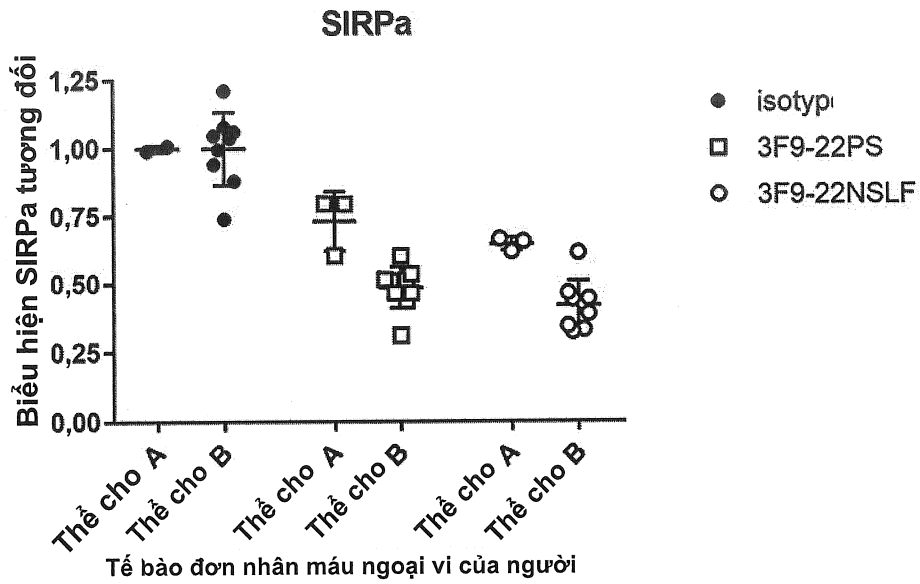

SIRPa
1,25
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
Biểu hiện SIRPa tương đối
isotyp
3F9-22PS
3F9-22NSLF
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Thể cho A
Thể cho B
Tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người

Fig. 21B

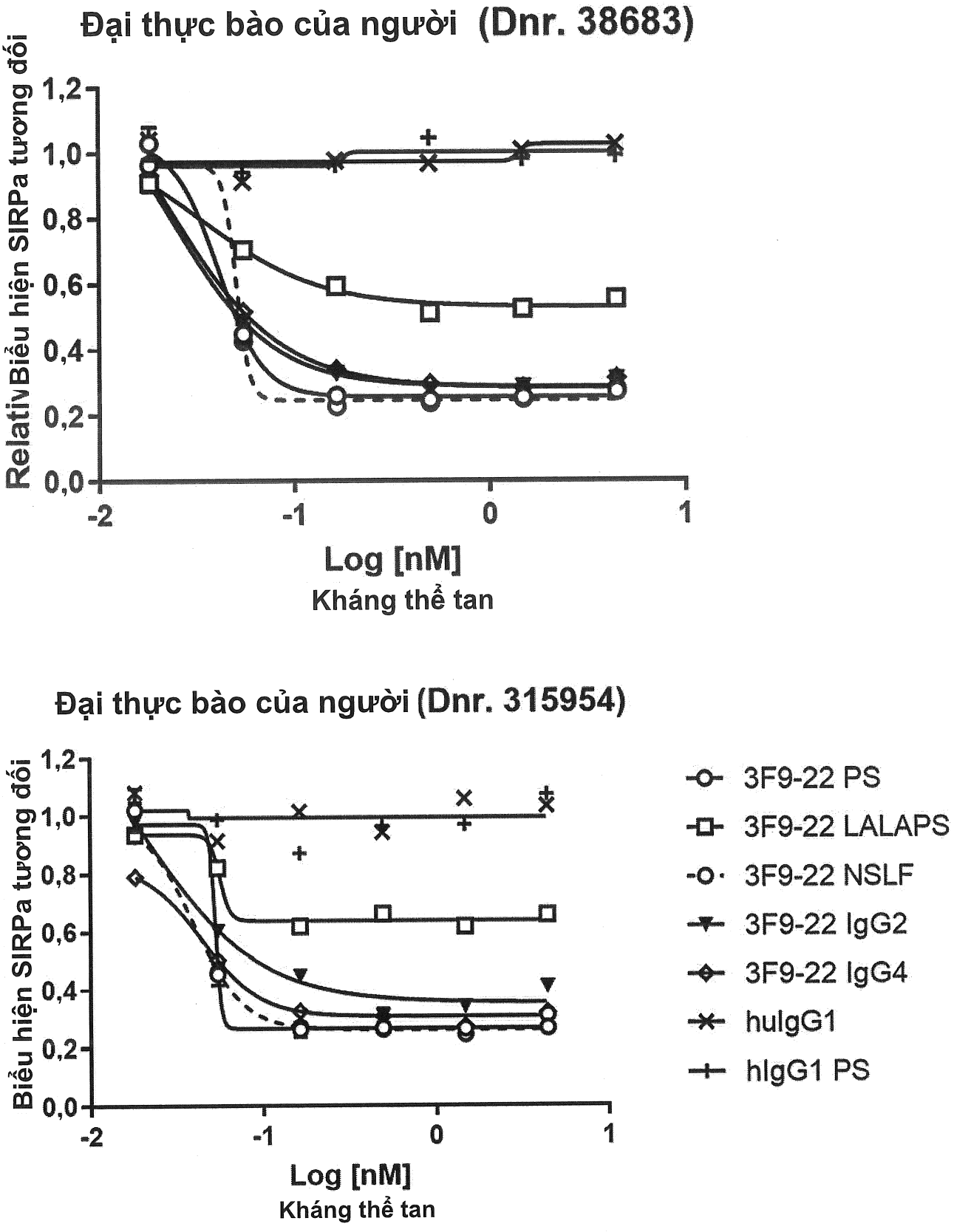

Đại thực bào của người (Dnr. 38683)
Relativ Biểu hiện SIRPa tương đối
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
-2
-1
0
1
Log [nM]
Kháng thể tan
Đại thực bào của người (Dnr. 315954)
Biểu hiện SIRPa tương đối
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
-2
-1
0
1
Log [nM]
Kháng thể tan
3F9-22 PS
3F9-22 LALAPS
3F9-22 NSLF
3F9-22 IgG2
3F9-22 IgG4
huIgG1
hIgG1 PS

Fig. 22

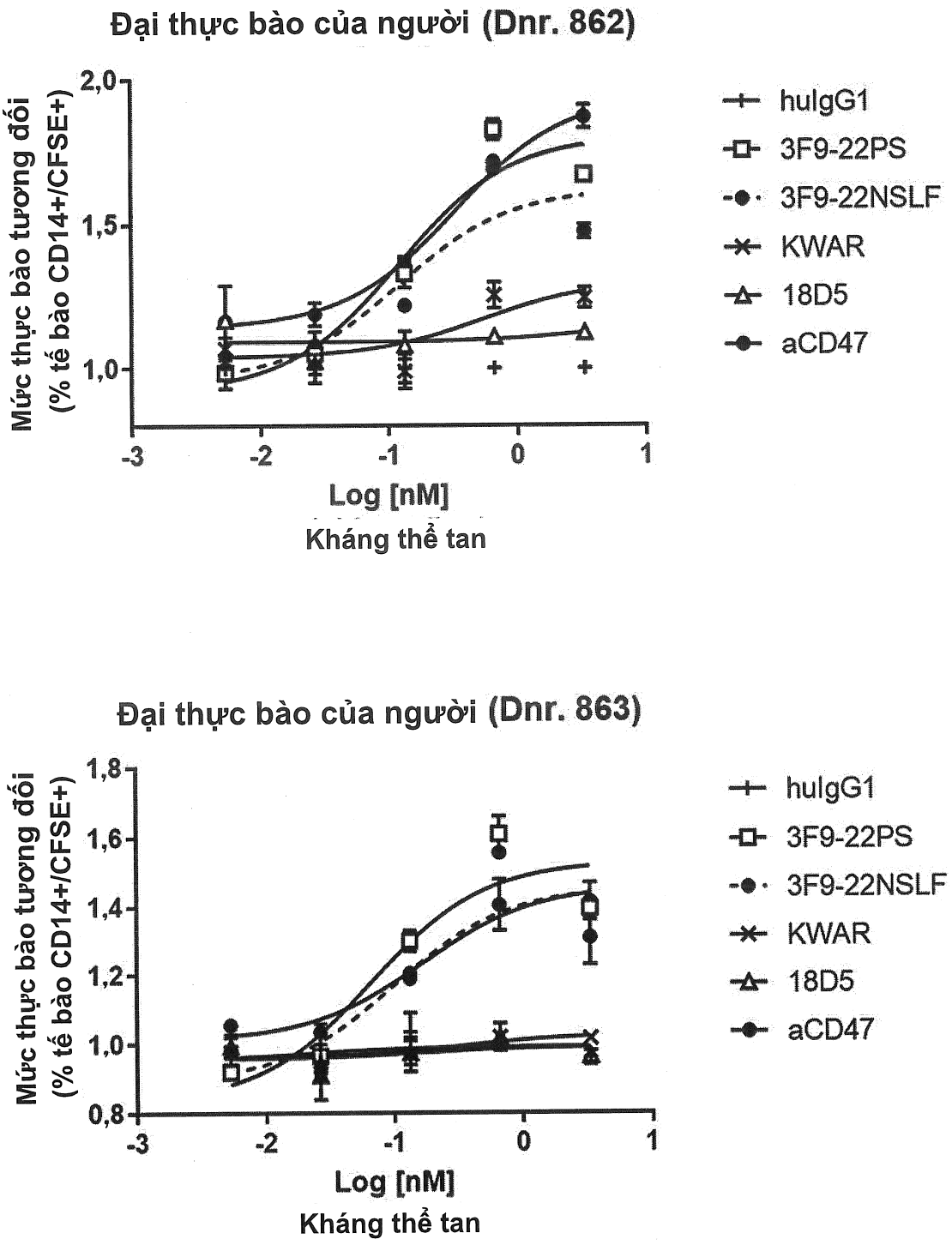
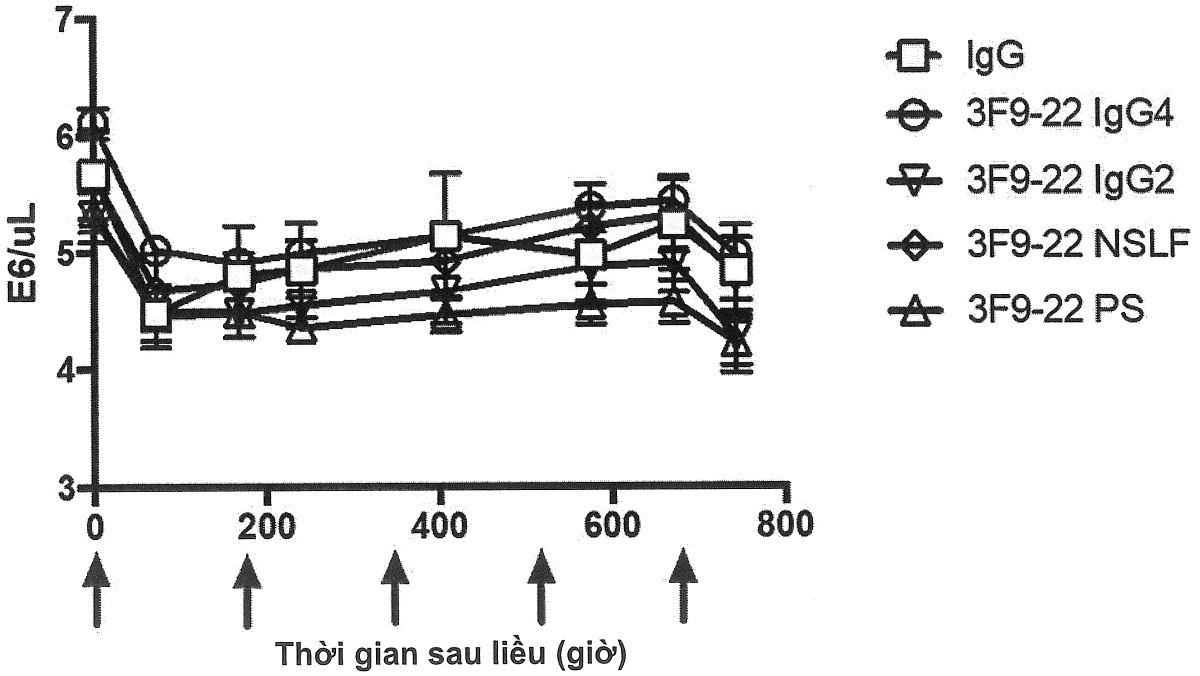

Đại thực bào của người (Dnr. 862)
Mức thực bào tương đối
(% tế bào CD14+/CFSE+)
2,0
1,5
1,0
-3
-2
-1
0
1
Log [nM]
Kháng thể tan
huIgG1
3F9-22PS
3F9-22NSLF
KWAR
18D5
aCD47
Đại thực bào của người (Dnr. 863)
Mức thực bào tương đối
(% tế bào CD14+/CFSE+)
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
-3
-2
-1
0
1
Log [nM]
Kháng thể tan
huIgG1
3F9-22PS
3F9-22NSLF
KWAR
18D5
aCD47

Fig. 23



Tiểu cầu

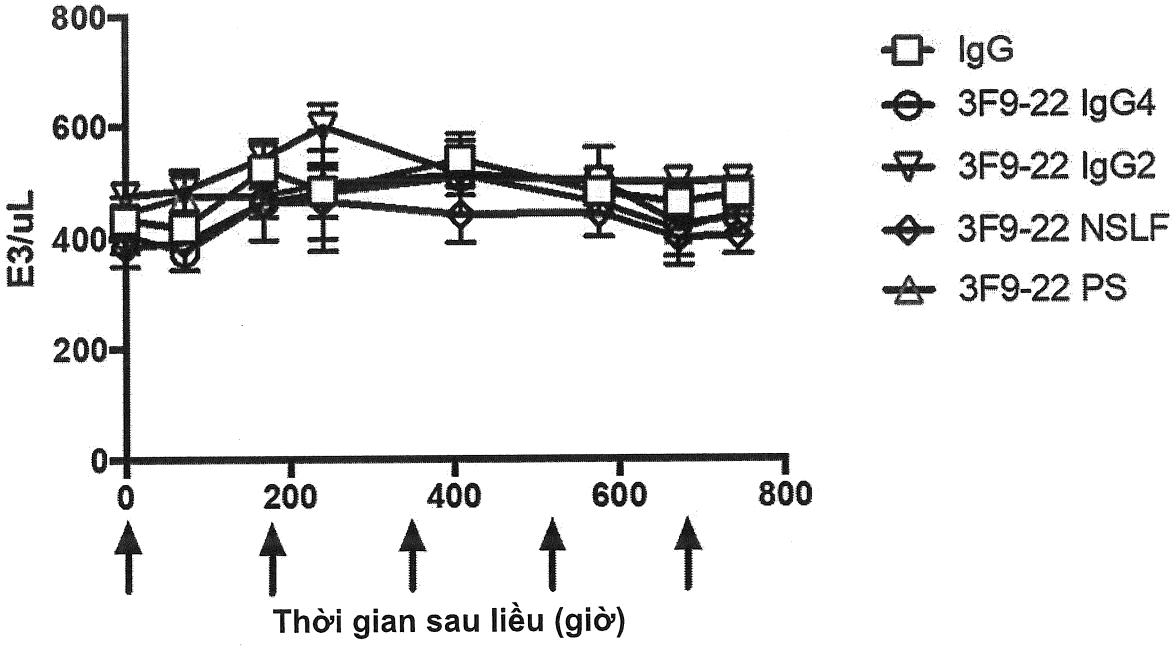


Fig. 24

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> ALECTOR LLC

<120> KHÁNG THỂ PHÂN LẬP GẮN KẾT VỚI SIRPA CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 40004-PCT

<140>
<141>

<150> 62/676,813
<151> 2018-05-25

<160> 70

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 504
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Met Glu Pro Ala Gly Pro Ala Pro Gly Arg Leu Gly Pro Leu Leu Cys
1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Ala Ser Cys Ala Trp Ser Gly Val Ala Gly Glu Glu 20
25 30

Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala Ala Gly 35
40 45

Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro Val Gly
50 55 60

Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu Ile Tyr
65 70 75 80

Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser Asp Leu 85
90 95

Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn Ile Thr 100
105 110

Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys Gly Ser 115
120 125

Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser Val

130 135 140

Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala Arg Ala
145 150 155 160

Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly Phe Ser 165
170 175

Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Ser 180
185 190

Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser Tyr Ser 195
200 205

Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val His Ser
210 215 220

Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp Pro Leu
225 230 235 240

Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro Thr Leu 245
250 255

Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn Val Thr 260
265 270

Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr Trp Leu 275
280 285

Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val Thr Glu
290 295 300

Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val Asn Val
305 310 315 320

Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu His Asp 325
330 335

Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser Ala His 340
345 350

Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly Ser Asn 355
360 365

Glu Arg Asn Ile Tyr Ile Val Val Gly Val Val Cys Thr Leu Leu Val
370 375 380

Ala Leu Leu Met Ala Ala Leu Tyr Leu Val Arg Ile Arg Gln Lys Lys
385 390 395 400

Ala Gln Gly Ser Thr Ser Ser Thr Arg Leu His Glu Pro Glu Lys Asn 405
410 415

Ala Arg Glu Ile Thr Gln Asp Thr Asn Asp Ile Thr Tyr Ala Asp Leu 420
425 430

Asn Leu Pro Lys Gly Lys Lys Pro Ala Pro Gln Ala Ala Glu Pro Asn 435
440 445

Asn His Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Gln Thr Ser Pro Gln Pro Ala Ser
450 455 460

Glu Asp Thr Leu Thr Tyr Ala Asp Leu Asp Met Val His Leu Asn Arg
465 470 475 480

Thr Pro Lys Gln Pro Ala Pro Lys Pro Glu Pro Ser Phe Ser Glu Tyr 485
490 495

Ala Ser Val Gln Val Pro Arg Lys 500

<210> 2
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 2
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val 35
40 45

Ala Thr Ile Ser Asp Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Tyr Thr Leu
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp 100
105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 115 120

<210> 3
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 3
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20
25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35
40 45

Ser Thr Ile Ser Asp Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

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

Cys Ala Lys Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp 100
105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115 120

<210> 4
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 4
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20
25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35
40 45

Ala Thr Ile Ser Asp Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp 100
105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115 120

<210> 5
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 5
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser 20
25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro 35
40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg 85
90 95

Glu Leu Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100
105 110

<210> 6
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 6
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 Lys Ser Val Ser Ser Ser 20
25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 35
40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg 85
90 95

Glu Leu Pro Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100
105 110

<210> 7
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 7
Asp Ile Gln Leu 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 Lys Ser Val Ser Ser Ser 20
25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 35
40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg 85
90 95

Glu Leu Pro Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100
105 110

<210> 8
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 8
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser 20
25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 35
40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg 85
90 95

Glu Leu Pro Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100
105 110

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 9
Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Gly Gly Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 10
Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 11
<211> 9

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 11
Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Ser Thr
1   5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 12
Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Cys Thr
1   5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 13
Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Ile Thr
1   5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 14
Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Pro Thr
1   5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 15
Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Thr Thr
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 16
Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Val Thr
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 17
Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Ala Thr
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 18
Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Gly Thr
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 19
Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 20
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5 10

<210> 21
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 21
Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 22
Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 23
<211> 12

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 23
Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Arg Tyr
1 5 10

<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 24
Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln Tyr
1 5 10

<210> 25
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 25
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser 20 25

<210> 26
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 26
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 27
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 27
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg 20
25 30

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 28
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 29
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 29
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys 20

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 30
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 31
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 31
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys 20
25 30

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 32
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 33
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 33
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20
25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
40 45

Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
90 95

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp
105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115 120

<210> 34
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 34
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
40 45

Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
90 95

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Arg Tyr Trp 100
105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115 120

<210> 35
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 35
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20
25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35
40 45

Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln Tyr Trp 100
105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115 120

<210> 36
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 36
Asp Ile Gln Leu 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 Lys Ser Val Ser Ser Gly 20
25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 35
40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg 85
90 95

Glu Leu Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100
105 110

<210> 37
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 37
Asp Ile Gln Leu 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 Lys Ser Val Ser Ser Gly 20
25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 35
40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg 85
90 95

Glu Leu Pro Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100
105 110

<210> 38
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 38
Asp Ile Gln Leu 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 Lys Ser Val Ser Ser Gly 20
25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 35
40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg 85
90 95

Glu Leu Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100
105 110

<210> 39
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 39
Asp Ile Gln Leu 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 Lys Ser Val Ser Ser Gly 20
25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 35
40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg 85
90 95

Glu Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100
105 110

<210> 40
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 40
Asp Ile Gln Leu 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 Lys Ser Val Ser Ser Gly 20
25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 35
40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg
90 95

Glu Leu Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
105 110

<210> 41
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 41
Asp Ile Gln Leu 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 Lys Ser Val Ser Ser Gly
25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg
90 95

Glu Leu Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
105 110

<210> 42
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 42
Asp Ile Gln Leu 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 Lys Ser Val Ser Ser Gly 20
25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 35
40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg 85
90 95

Glu Leu Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100
105 110

<210> 43
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 43
Asp Ile Gln Leu 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 Lys Ser Val Ser Ser Gly 20
25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 35
40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg
90 95

Glu Leu Pro Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
105 110

<210> 44
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 44
Asp Ile Gln Leu 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 Lys Ser Val Ser Ser Gly
25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg
90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
105 110

<210> 45
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 45
Glu Phe Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Arg Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile 35
40 45

Gly Asn Ile Asn Pro His Tyr Gly Ser Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Tyr Asp Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 100
105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser 115

<210> 46
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 46
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met 20
25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr 35
40 45

Val Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Arg Thr 85
90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105

<210> 47
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 47
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20
25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35
40 45

Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln Tyr Trp 100
105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 115
120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 165
170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 180
185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195
200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 245
250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 260
265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 275
280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro 325
330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 340
345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 355
360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 405
410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 420
425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 435
440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 48
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20
25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35
40 45

Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln Tyr Trp 100
105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 115
120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 165
170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 180
185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195
200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 245
250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 260
265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 275
280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser 325
330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 340
345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 355
360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 405
410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 420
425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 435
440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 49
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 49
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20
25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35
40 45

Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln Tyr Trp 100
105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 115
120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 165
170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 180
185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195
200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 245
250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu 260
265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 275
280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro 325
330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 340
345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 355
360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 405
410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 420
425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 435
440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 50
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 50
Asp Ile Gln Leu 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 Lys Ser Val Ser Ser Gly 20
25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 35
40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg 85
90 95

Glu Leu Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg 100
105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln 115
120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr 165
170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys 180
185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro 195
200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 51
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 51
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20
25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35
40 45

Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Arg Tyr Trp 100
105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 115
120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 165
170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 180
185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195
200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 245
250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 260
265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 275
280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro 325
330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 340
345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 355
360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 405
410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 420
425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 435
440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 52
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 52
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20
25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35
40 45

Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Arg Tyr Trp 100
105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 115
120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 165
170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 180
185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195
200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 245
250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu 260
265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 275
280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro 325
330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 340
345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 355
360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 405
410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 420
425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 435
440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 53
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 53
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20
25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35
40 45

Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln Tyr Trp 100
105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 115
120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 165
170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 180
185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195
200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 245
250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 260
265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 275
280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Ala Phe Pro Ala Pro 325
330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 340
345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 355
360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 405
410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 420
425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 435
440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 54
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 54
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20
25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35
40 45

Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln Tyr Trp 100
105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 115
120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 165
170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 180
185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195
200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 245
250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 260
265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 55
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 55
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20
25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35
40 45

Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Arg Tyr Trp 100
105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 115
120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 165
170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 180
185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195
200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 245
250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 260
265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 275
280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Ala Phe Pro Ala Pro 325
330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 340
345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 355
360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 405
410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 420
425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 435
440 445

Ser Pro Gly Lys

450

<210> 56
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 56
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20
25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35
40 45

Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Arg Tyr Trp 100
105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 115
120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 165
170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 180
185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195
200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 245
250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 260
265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 275
280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser 325
330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 340
345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 355
360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 405
410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 420
425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 435
440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 57
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 57
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20
25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35
40 45

Ala Thr Ile Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Arg Tyr Trp 100
105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 115
120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 355
360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 405
410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 420
425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 435
440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 58
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 58
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
90 95

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

<210> 59
<211> 343
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59
Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala
1 5 10 15

Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro
25 30

Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu
40 45

Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60

Asp Leu Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn
65 70 75 80

Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
90 95

Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
105 110

Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala
120 125

Arg Ala Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly
130 135 140

Phe Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu
145 150 155 160

Leu Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser
170 175

Tyr Ser Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val 180
185 190

His Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp 195
200 205

Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro
210 215 220

Thr Leu Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn
225 230 235 240

Val Thr Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr 245
250 255

Trp Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val 260
265 270

Thr Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val 275
280 285

Asn Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu
290 295 300

His Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser
305 310 315 320

Ala His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly 325
330 335

Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr 340

<210> 60
<211> 342
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 60
Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Glu Lys Ser Val Ser Val Ala
1 5 10 15

Ala Gly Asp Ser Ala Thr Leu Asn Cys Thr Val Ser Ser Leu Ile Pro 20
25 30

Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu
40 45

Ile Tyr Asn Leu Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Pro Val Ser
50 55 60

Asp Pro Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Ser Asn
65 70 75 80

Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
90 95

Gly Ser Pro Asp Val Glu Leu Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser
105 110

Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Val Arg
120 125

Ala Thr Ala Glu His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly Phe
130 135 140

Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu
145 150 155 160

Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Ala Gly Lys Ser Val Ser Tyr
170 175

Ser Ile Arg Ser Thr Ala Arg Val Val Leu Thr Arg Arg Asp Val His
185 190

Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp Pro
200 205

Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Ala Ile Arg Val Pro Pro Phe
210 215 220

Leu Glu Val Thr Gln Gln Ser Met Arg Ala Asp Asn Gln Val Asn Val
225 230 235 240

Thr Cys Gln Val Thr Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr Trp
250 255

Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Met Ala Ser Ala Leu Pro
265 270

Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Thr Ser Trp Leu Leu Val Asn
280 285

Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu His
290 295 300

Asp Gly Gln Pro Ala Val Asn Lys Ser Phe Ser Val Lys Val Ser Ala
305 310 315 320

His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly Thr
330 335

Asn Glu Arg Asn Ile Tyr 340

<210> 61
<211> 343
<212> PRT
<213> Callithrix jacchus

<400> 61
Glu Glu Glu Leu Gln Val Val Gln Pro Glu Lys Ser Val Ser Val Ala
1 5 10 15

Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu His Cys Thr Val Thr Ser Leu Val Pro
25 30

Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu
40 45

Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly Gln Phe Pro Arg Val Thr Ala Val Ala
50 55 60

Asp Gln Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp His Ser Ile Arg Ile Ser Asn
65 70 75 80

Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
90 95

Ala Ser Pro Ile Asp Val Glu Leu Lys Ser Gly Pro Gly Thr Glu Leu
105 110

Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Thr
120 125

Arg Val Thr Pro Glu Asp Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly
130 135 140

Phe Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Ala Asn Glu
145 150 155 160

Leu Ser Ala Leu Gln Thr Thr Val Asp Pro Ala Gly Glu Ser Val Ser
170 175

Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Ala Arg Val Gly Leu Thr Arg Gly Asp Val
185 190

Arg Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp
200 205

Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Ala Ile Arg Val Pro Pro
210 215 220

Thr Leu Glu Val Thr His Gln Pro Met Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn
225 230 235 240

Val Thr Cys Gln Val Lys Lys Phe Tyr Pro Gln Ser Leu Gln Leu Thr
250 255

Trp Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Leu
265 270

Ile Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Ala Ser Trp Leu Leu Val
280 285

Asn Ser Ser Ala His Arg Asp Gly Val Val Leu Thr Cys Gln Val Glu
290 295 300

His Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser Leu Arg Leu Glu Val Ser
305 310 315 320

Ala His Arg Lys Glu Gln Gly Ser Asp Thr Ala Ala Glu Lys Thr Gly
330 335

Thr Asn Glu Arg Asn Ile Tyr 340

<210> 62
<211> 342
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 62
Gln Glu Lys Leu Gln Val Thr Gln Pro Asp Arg Trp Val Ser Val Ala
1 5 10 15

Glu Gly Glu Ala Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Asn Thr Leu Leu Pro 20
25 30

Val Gly Pro Met Lys Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Asp Arg Lys Met 35
40 45

Ile Tyr Asn Phe Lys Gly Asp Gln Asp Pro Arg Val Thr Asn Val Ser
50 55 60

Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Arg Asp
65 70 75 80

Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Gln Lys 85
90 95

Lys Gly Ala Asp Asp Glu Glu Phe Lys Ser Gly Gly Gly Thr Gln Val 100
105 110

Ser Val Ser Ala Lys Pro Ser Thr Pro Lys Val Ser Gly Pro Gly Ala 115
120 125

Arg Ser Thr Pro Glu Gln Thr Val Asp Phe Thr Cys Glu Ser His Gly
130 135 140

Phe Ser Pro Arg Asn Ile Ser Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu
145 150 155 160

Leu Pro Ala Phe Gln Thr Ser Val Tyr Pro Ala Gly Glu Ser Val Ser 165
170 175

Tyr Asn Val Thr Ser Thr Val Lys Val Ala Leu Ala Ser Ser Asp Val 180
185 190

His Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Ile Thr Leu Gln Gly Gly 195
200 205

Ser Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro
210 215 220

Pro Thr Val Glu Val Thr Gln Gln Pro Met Gly Ala Gly Thr Gln Val
225 230 235 240

Asn Val Thr Cys His Val Asp Lys Phe Tyr Pro Arg Asp Met Gln Leu 245
250 255

Ser Trp Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Trp Thr 260
265 270

Leu Val Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Arg Thr Ser Trp Leu Leu 275
280 285

Val Asn Ser Ser Ala His Arg Glu Asp Val Val Leu Ser Cys Gln Val
290 295 300

Glu His Asp Gly Gln Pro Ala Val Thr Arg Ser His Thr Leu Gln Val
305 310 315 320

Ser Ala Pro Pro Lys Glu Gln Gly Thr Asp Thr Ser Leu Asp Gln Ala 325
330 335

Asp Asn Trp Asn Val Phe 340

<210> 63
<211> 343
<212> PRT
<213> Canis familiaris

<400> 63
Glu Ala Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Glu Lys Ser Val Ser Val Ala
1 5 10 15

Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Leu Thr Ser Leu Ile Pro 20
25 30

Val Gly Lys Val Glu Trp Phe Arg Gly Thr Gly Pro Gly Arg Glu Leu 35
40 45

Ile Phe His Phe Lys Gly Gly His Phe Pro Arg Val Thr Asn Val Ser
50 55 60

Asp Ser Thr Lys Arg Asn Asn Thr Asp Phe Ser Ile Arg Ile Ser Asn
65 70 75 80

Ile Thr Pro Ala Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Gln Lys 85
90 95

Gly Asn Pro Asp Val Glu Leu Lys Ser Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr 100
105 110

Val Ser Ala Lys Pro Ser Pro Pro Val Val Ser Gly Pro Thr Ala Arg 115
120 125

Ala Thr Pro Gln Gln Thr Val Asn Phe Thr Cys Lys Ser His Gly Phe
130 135 140

Ser Pro Arg Asn Ile Thr Leu Arg Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu
145 150 155 160

Thr Ala Ser Gln Thr Thr Val Tyr Pro Glu Glu Asp Asn Ala Ser Tyr 165
170 175

Ser Ile Ser Ser Thr Thr Lys Leu Val Leu Ala Pro Gly Asp Val Arg 180
185 190

Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Gly Pro 195
200 205

Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Leu Arg Val Pro Pro
210 215 220

Thr Leu Glu Val Ser Gln His Pro Met Ala Gly Asp Gln Val Asn Val
225 230 235 240

Thr Cys Gln Val Lys Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr Trp 245
250 255

Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Pro Ser Val Ala Ser 260
265 270

Asn Leu Leu Glu Asn Lys Asp Gly Thr Phe Asn Trp Thr Ser Trp Leu
280 285

Leu Val Asn Ser Ser Thr His Arg Glu Asp Val Val Phe Thr Cys Gln
290 295 300

Val Gln His Asp Gly Gln Pro Ala Val Thr Lys Asn His Thr Leu Val
305 310 315 320

Ala Ser Ala Arg Gln Lys Asp Gln Glu Thr Leu Lys Pro Glu Asp Asn
330 335

Asn Asp Ser Arg Ser Ile Phe 340

<210> 64
<211> 98
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 64
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys

<210> 65

<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 65
Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 66
<211> 96
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 66
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 Ser Val Ser Ser Tyr 20
25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile 35
40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn 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 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro 85
90 95

<210> 67
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 67

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 68
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 68
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 Lys Ser Val Ser Ser Ser 20
25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro 35
40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg 85
90 95

Glu Leu Pro Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100
105 110

<210> 69
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 69
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser
25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg
90 95

Glu Leu Pro Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
105 110

<210> 70
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả về trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 70
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser
25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg
90 95

Glu Leu Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100
105 110