

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290241 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.15

(22) Дата подачи заявки
2020.07.17

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/0786 (2010.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ИММУНОМОДУЛЯТОРНЫЕ АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/876,580; 62/876,579; 62/878,265

(32) 2019.07.19; 2019.07.19; 2019.07.24

(33) US

(86) PCT/US2020/042668

(87) WO 2021/016128 2021.01.28

(71) Заявитель:
ОНКОРЕСПОНС, ИНК. (US)

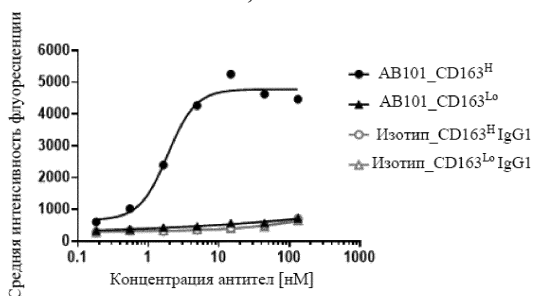
(72) Изобретатель:

Пури Камал Д., Чандрасекаран
Сиддарт, Конерли Мелисса Л.,
Симмонс Ранди М., Смит Тайрел Т.,
Бранум Марк Е., Пробст Питер (US)

(74) Представитель:

Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Прищепный С.В.,
Джермакян Р.В., Парамонова К.В.,
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Костюшенкова М.Ю. (RU)

(57) В настоящем документе представлены антитела и способы их применения. Раскрываемые в настоящем документе антитела связываются с CD163⁺ на клетках, таких как макрофаги. Данные антитела можно применять в способах лечения, таких как способы лечения рака.



A1

202290241

202290241

A1

ИММУНОМОДУЛЯТОРНЫЕ АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Описание

Ссылка на родственные заявки

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается преимущество в соответствии с предварительными заявками США №№ 62/876580, поданной 19 июля 2019 года, 62/876579, поданной 19 июля 2019 года, и 62/878265, поданной 24 июля 2019 года, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Сущность настоящего изобретения

[0002] Настоящее изобретение относится к антителам, в том числе к антигенсвязывающим фрагментам и другим антигенсвязывающим полипептидам, которые можно применять для лечения рака и других нарушений. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела специфически связываются с M2 и M2-подобными иммуносупрессорными макрофагами, но не с M1 и M1-подобными противоопухолевыми макрофагами. Раскрываемые антитела связываются с M2 и M2-подобными опухоль-ассоциированными макрофагами и модулируют физические и функциональные характеристики опухоль-ассоциированных M2 и M2-подобных макрофагов, уменьшая иммуносупрессию опухолевого микроокружения и повышая активацию и пролиферацию цитотоксических Т-клеток, что стимулирует цитолиз опухолевых клеток. Молекулы антител по настоящему изобретению специфически связываются с человеческим CD163, экспрессируемым на поверхности M2 и M2-подобных макрофагов.

[0003] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи (VH), который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

[0004] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи (VH), который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

[0005] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи (VH), который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

[0006] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи (VH), который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

[0007] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи (VH), который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело дополнительно содержит переменный участок легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело дополнительно содержит переменный участок легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело дополнительно содержит переменный участок легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело дополнительно содержит переменный участок легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело дополнительно содержит переменный участок легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

[0008] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт переменный участок легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

[0009] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее переменный участок легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

[0010] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее переменный участок легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

вариабельный участок легкой цепи (V_L), который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело содержит вариабельный участок легкой цепи (V_L), который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело содержит вариабельный участок легкой цепи (V_L), который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 85% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

[0014] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее последовательность тяжелой цепи, содержащую определяющий комплементарность участок (CDR) H1, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6, и последовательность легкой цепи, содержащую CDR L1, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3. В соответствии с некоторыми вариантами

[illegible]

тяжелой цепи, содержащую CDR H1, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело содержит последовательность тяжелой цепи, содержащую CDR H1, который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело содержит последовательность тяжелой цепи, содержащую CDR H1, который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело содержит последовательность тяжелой цепи, содержащую CDR H1, который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

[0015] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее последовательность тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) H1, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

[0016] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее последовательность тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) H1, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере

мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

[0017] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее последовательность тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) H1, который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

[0018] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее последовательность тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) H1, который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

[0019] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее последовательность тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) H1, который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

[0020] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело дополнительно содержит последовательность легкой цепи, содержащую по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) L1, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, CDR L1 по меньшей мере на 90% идентичен

аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, CDR L1 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, CDR L1 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, CDR L1 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, вариабельный участок легкой цепи (VL) по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

[0021] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело дополнительно содержит вариабельный участок легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи (VH), который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

[0022] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее последовательность легкой цепи, содержащую определяющий комплементарность участок (CDR) CDR L1, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

[0023] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее последовательность легкой цепи, содержащую определяющий комплементарность участок (CDR) CDR L1, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной

последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

[0024] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее последовательность легкой цепи, содержащую определяющий комплементарность участок (CDR) CDR L1, который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2, который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3, который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

[0025] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее последовательность легкой цепи, содержащую определяющий комплементарность участок (CDR) CDR L1, который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2, который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3, который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

[0026] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело или рекомбинантное антитело, содержащее последовательность легкой цепи, содержащую определяющий комплементарность участок (CDR) CDR L1, который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2, который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3, который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

[0027] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело дополнительно содержит последовательность тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) H1, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, CDR H1 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6. В

соответствии с некоторыми вариантами осуществления, CDR H1 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, CDR H1 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, CDR H1 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, вариабельный участок тяжелой цепи (VH) по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

[0028] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело дополнительно содержит вариабельный участок тяжелой цепи (VH), который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, вариабельный участок легкой цепи (VL) по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

[0029] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело дополнительно содержит человеческий константный участок тяжелой цепи или человеческой константный участок легкой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, человеческой константный участок тяжелой цепи представляет собой IgG1 или IgG4 или их фрагмент. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 10. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 9. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 12. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 11. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь по меньшей мере на 80% идентична

аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 13. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело содержит человеческий вариабельный каркасный участок и мышинный константный участок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело дополнительно содержит мышинный константный участок тяжелой цепи или мышинный константный участок легкой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или мышинный константный участок представляет собой IgG2A. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 15. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 16. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело представляет собой фрагмент антитела, включающий одну тяжелую цепь, одну легкую цепь, Fab, Fab', F(ab)', F(ab')₂, Fd, scFv, вариабельный домен тяжелой цепи, вариабельный домен легкой цепи, вариабельный домен NAR, биспецифический scFv, биспецифический Fab₂, триспецифический Fab₃, одноцепочечный связывающий полипептид, фрагмент dAb или диатело.

[0030] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на иммуносупрессивной человеческой миелоидной клетке, причем связывание антитела или рекомбинантного антитела с миелоидной клеткой стимулирует функцию иммунной клетки, что измеряется с помощью одного или обоих из следующих параметров: (i) активации CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации; и (ii) пролиферации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, активацию CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации измеряют как повышенный уровень IFN- γ , TNF- α или перфорина или любой их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, иммуносупрессивная человеческая миелоидная клетка представляет собой макрофаг или супрессорную клетку миелоидного происхождения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, функция иммунной клетки осуществляется в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, функция иммунной клетки осуществляется в условиях *in vivo*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело

специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на человеческом макрофаге, причем связывание антитела с макрофагом повышает иммуностимулирующую активность в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, опухолевое микроокружение находится в условиях *in vivo*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание антитела или рекомбинантного антитела с макрофагом снижает иммуносупрессивную активность макрофага. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание антитела или рекомбинантного антитела с макрофагом снижает опухоль-стимулирующую активность макрофага. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, макрофаг представляет собой опухоль-ассоциированный макрофаг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело изменяет экспрессию по меньшей мере одного маркера на макрофаге. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, белок CD163 представляет собой гликоформу CD163. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, белок CD163 представляет собой 150-кДа гликоформу CD163. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело не связывается специфически со 130-кДа гликоформой CD163, экспрессируемой человеческим макрофагом.

[0031] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело имеет константный домен, который делает возможным связывание с Fc-рецептором. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, Fc-рецептор экспрессируется на макрофаге. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело имеет фрагмент антитела, включающий одну тяжелую цепь, одну легкую цепь, Fab, Fab', F(ab)', F(ab')₂, Fd, scFv, переменный домен тяжелой цепи, переменный домен легкой цепи, переменный домен NAR, биспецифический scFv, биспецифический Fab₂, триспецифический Fab₃, одноцепочечный связывающий полипептид, фрагмент dAb или диатело. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, по меньшей мере один маркер на человеческом макрофаге представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, человеческий макрофаг представляет собой макрофаг M2 или M2-подобный макрофаг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, человеческий макрофаг представляет собой макрофаг M2a, M2b, M2c или M2d. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, белок CD163 представляет собой компонент комплекса клеточной поверхности, содержащего по меньшей мере один другой белок, экспрессируемый макрофагом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, по меньшей мере один другой белок представляет собой белок галектин-1,

белок LILRB2, белок казеинкиназы II или любую их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, при связывании с белком CD163 антитело или рекомбинантное антитело интернализируются человеческим макрофагом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 не является цитотоксическим для макрофага. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 стимулирует активацию $CD4^+$ Т-клеток, пролиферацию $CD4^+$ Т-клеток или как активацию, так и пролиферацию $CD4^+$ Т-клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 стимулирует экспрессию CD69, ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 или любой их комбинации $CD4^+$ Т-клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 стимулирует активацию $CD8^+$ Т-клеток, пролиферацию $CD8^+$ Т-клеток или как активацию, так и пролиферацию $CD8^+$ Т-клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 стимулирует экспрессию ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 или любой их комбинации $CD8^+$ Т-клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 снижает иммуносупрессию в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 стимулирует цитолиз опухолевых клеток в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 стимулирует опосредованный цитотоксическими лимфоцитами цитолиз раковых клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 стимулирует опосредованный NK-клетками цитолиз опухолевых клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 стимулирует экспрессию IL-2 Т-клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 увеличивает количество $CD4^+$ Т-клеток, $CD196^+$ Т-клеток, $CXCR3^+$ Т-клеток, $CCR4^+$ Т-клеток или любой их комбинации.

[0032] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с CD163 снижает иммуносупрессию в опухолевом микроокружении, вызванную макрофагом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на человеческом макрофаге, причем связывание приводит по меньшей мере к одному из следующих эффектов: (a) сниженной экспрессии по меньшей мере одного маркера макрофагом, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15; (b) интернализации антитела макрофагом; (c) активации $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации; (d) пролиферации $CD4^+$ Т-клеток, $CD8^+$ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации; и (e) стимуляции цитолиза

опухолевых клеток в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание приводит к двум или более из (а)-(е); трем или более из (а)-(е); четырем или более из (а)-(е) или всем из (а)-(е). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с CD163⁺ иммуносупрессивной миелоидной клеткой в опухолевом микроокружении, причем связывание снижает супрессию опосредованного цитотоксическими Т-клетками цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на человеческом опухоль-ассоциированном макрофаге, и снижает экспрессию CD16, CD64, TLR2, Siglec-15 или их комбинации макрофагом, для применения в способе лечения рака. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание антитела или рекомбинантного антитела с макрофагом модулирует иммунную функцию клетки в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание антитела или рекомбинантного антитела с макрофагом стимулирует противоопухолевую иммунную функцию.

[0033] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с эпитопом CD163, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с эпитопом CD163, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с эпитопом CD163, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с эпитопом CD163, содержащим каждую из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с CD163 с K_D от 1 нМ до 100 нМ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с CD163 с K_D от 1 нМ до 50 нМ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с CD163 с K_D от 1 нМ до 10 нМ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или CD163 представляет собой человеческий CD163. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело

специфически связывается с макрофагами M2c с K_D от 1 нМ до 100 нМ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с макрофагами M2c с K_D от 1 нМ до 50 нМ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с макрофагами M2c с K_D от 1 нМ до 10 нМ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, макрофаги M2c представляют собой человеческие макрофаги M2c.

[0034] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыта композиция, содержащая антитело или рекомбинантное антитело и вспомогательное вещество.

[0035] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая антитело или рекомбинантное антитело по любому из предыдущих вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель.

[0036] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто применение антитела или рекомбинантного антитела по любому из предыдущих вариантов осуществления для изготовления лекарственного средства для лечения рака у субъекта-человека.

[0037] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто применение антитела или рекомбинантного антитела по любому из предыдущих вариантов осуществления для изготовления лекарственного средства, снижающего иммуносупрессию опухоль-ассоциированным макрофагом у субъекта-человека, имеющего раковое заболевание.

[0038] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто применение антитела или рекомбинантного антитела по любому из предыдущих вариантов осуществления для изготовления лекарственного средства, стимулирующего опосредованный Т-клетками цитолиз опухолевых клеток у субъекта-человека, имеющего раковое заболевание.

[0039] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт способ стимуляции функции иммунных клеток, предусматривающий введение антитела или рекомбинантного антитела по любому из предыдущих вариантов осуществления нуждающемуся в этом индивидууму и стимуляцию функции иммунных клеток, что измеряется с помощью одного или обоих из следующих параметров: (i) активации $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации; и (ii) пролиферации $CD4^+$ Т-клеток, $CD8^+$ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации. В

соответствии с некоторыми вариантами осуществления, активацию CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации измеряют как повышенный уровень IFN- γ , TNF- α или перфорины или любой их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, иммуносупрессивная человеческая миелоидная клетка представляет собой макрофаг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, иммуносупрессивная человеческая миелоидная клетка представляет собой супрессорную клетку миелоидного происхождения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело представляет собой антитело или рекомбинантное антитело по любому из предыдущих вариантов осуществления.

[0040] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт способ лечения рака у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ предусматривает введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела или рекомбинантного антитела по любому из предыдущих вариантов осуществления, в результате осуществляя лечение рака у индивидуума.

[0041] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт способ, при этом способ предусматривает введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела или рекомбинантного антитела по любому из предыдущих вариантов осуществления, в результате чего у индивидуума снижается иммуносупрессия опухоль-ассоциированным макрофагом.

[0042] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт способ, при этом способ предусматривает введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела или рекомбинантного антитела по любому из предыдущих вариантов осуществления, в результате чего у индивидуума увеличивается опосредованный Т-клетками цитолиз опухолевых клеток.

[0043] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт способ снижения опухоль-стимулирующей активности опухоль-ассоциированного макрофага у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ предусматривает введение индивидууму количества фармацевтической композиции по любому из предыдущих вариантов осуществления, которое является эффективным для модулирования активации CD4⁺ Т-клеток, пролиферации CD4⁺ Т-клеток, активации CD8⁺ Т-клеток, пролиферации CD8⁺ Т-клеток или любой их комбинации в опухолевом микроокружении.

[0044] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт способ стимулирования опосредованного лимфоцитами цитолиза опухолевых клеток у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ

предусматривает введение индивидууму эффективного количества антитела или рекомбинантного антитела по любому из предыдущих вариантов осуществления или фармацевтической композиции по любому из предыдущих вариантов осуществления.

[0045] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ дополнительно предусматривает стимуляцию цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, рак представляет собой рак легких или саркому. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, рак легкого представляет собой карциному легкого или аденокарциному легкого. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ дополнительно предусматривает назначение индивидууму дополнительного противоракового терапевтического средства или противораковой терапии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, дополнительная противораковая терапия представляет собой хирургическую терапию, химиотерапию, лучевую терапию, криотерапию, гормональную терапию, иммунотерапию и цитокиновую терапию, а также их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, дополнительная противораковая терапия представляет собой иммунотерапию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, иммунотерапия представляет собой композицию, содержащую ингибитор контрольной точки.

[0046] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт способ модулирования активности опухоль-ассоциированного макрофага в опухолевом микроокружении, при этом способ предусматривает приведение опухоль-ассоциированного макрофага в контакт с антителом или рекомбинантным антителом, которое связывается с CD163-экспрессирующим человеческим макрофагом и предусматривает по меньшей мере один из следующих эффектов: (a) связывание антитела снижает экспрессию по меньшей мере одного маркера на макрофаге, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15; (b) при связывании антитела с белком CD163 антитело интернализируется человеческим макрофагом; (c) связывание антитела не является цитотоксическим для макрофага; (d) связывание антитела или рекомбинантного антитела приводит к продуцированию IFN- γ , TNF- α , перфорина или любой их комбинации CD4⁺ Т-клеткой, CD8⁺ Т-клеткой, NK-клеткой или любой их комбинацией; (e) связывание антитела или рекомбинантного антитела стимулирует активацию CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации; (f) связывание антитела или рекомбинантного антитела стимулирует пролиферацию CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации; и (g) связывание антитела или рекомбинантного антитела стимулирует цитолиз опухолевых клеток в опухолевом

микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание приводит к двум или более из (a)-(g), трем или более из (a)-(g), четырем или более из (a)-(g), пяти или более из (a)-(g), шести или более из (a)-(g) или всем из (a)-(g).

[0047] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ реализуется в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ реализуется в условиях *in vivo*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание антитела или рекомбинантного антитела с макрофагом модулирует иммунную функцию клетки в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание антитела или рекомбинантного антитела с макрофагом стимулирует противоопухолевую иммунную функцию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или рекомбинантное антитело содержит константный домен, и константный домен связывается с Fc-рецептором. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, Fc-рецептор экспрессируется на макрофаге. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ дополнительно предусматривает интернализацию антитела или рекомбинантного антитела человеческим макрофагом при связывании с белком CD163. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 не является цитотоксическим для человеческого макрофага. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ дополнительно предусматривает стимуляцию экспрессии CD69, ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 или любой их комбинации CD4⁺ Т-клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ дополнительно предусматривает стимуляцию экспрессии ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 или любой их комбинации CD8⁺ Т-клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ предусматривает снижение иммуносупрессии в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ предусматривает стимулирование опосредованного цитотоксическими лимфоцитами цитолиза раковых клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ предусматривает стимуляцию опосредованного NK-клетками цитолиза опухолевых клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ предусматривает стимуляцию экспрессии IL-2 Т-клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ предусматривает увеличение количества CD4⁺ Т-клеток, CD196⁺ Т-клеток, CXCR3⁺ Т-клеток, CCR4⁺ Т-клеток или любой их комбинации.

[0048] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело, которое специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на иммуносупрессивной человеческой миелоидной клетке, причем

связывание антитела с миелоидной клеткой стимулирует функцию иммунной клетки, что измеряется с помощью одного или обоих из следующих параметров: (i) активации CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации; и (ii) пролиферации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, иммуносупрессивная человеческая миелоидная клетка представляет собой макрофаг или супрессорную клетку миелоидного происхождения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, активацию CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации измеряют как повышенное продуцирование IFN- γ , TNF- α или перфорина или любой их комбинации.

[0049] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело, которое специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на человеческом макрофаге, причем связывание антитела с макрофагом стимулирует функцию иммунной клетки, что измеряется с помощью одного или обоих из следующих параметров: (i) активации CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации; и (ii) пролиферации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, функция иммунной клетки осуществляется в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, функция иммунной клетки осуществляется в условиях *in vivo*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, активацию CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации измеряют как повышенное продуцирование IFN- γ , TNF- α или перфорина или любой их комбинации.

[0050] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело, которое специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на человеческом макрофаге, причем связывание антитела с макрофагом повышает иммуностимулирующую активность в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, опухолевое микроокружение находится в условиях *in vivo*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание антитела с макрофагом снижает иммуносупрессивную активность макрофага. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание антитела с макрофагом снижает опухоль-стимулирующую активность макрофага. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, макрофаг представляет собой опухоль-ассоциированный макрофаг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело изменяет экспрессию по меньшей мере одного маркера на макрофаге. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, белок CD163 представляет собой гликоформу CD163. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, белок

CD163 представляет собой 150-кДа гликоформу CD163. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело не связывается специфически со 130-кДа гликоформой CD163, экспрессируемой человеческим макрофагом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело имеет константный домен, который делает возможным связывание с Fc-рецептором. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, Fc-рецептор экспрессируется на макрофаге. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, фрагмент антитела включает фрагмент антитела, включающий одну тяжелую цепь, одну легкую цепь, Fab, Fab', F(ab)', F(ab')₂, Fd, scFv, переменный домен тяжелой цепи, переменный домен легкой цепи, переменный домен NAR, биспецифический scFv, биспецифический Fab₂, триспецифический Fab₃, одноцепочечный связывающий полипептид, фрагмент dAb или диантело. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, по меньшей мере один маркер на человеческом макрофаге представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, человеческий макрофаг представляет собой макрофаг M2 или M2-подобный макрофаг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, человеческий макрофаг представляет собой макрофаг M2a, M2b, M2c или M2d. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, белок CD163 представляет собой компонент комплекса клеточной поверхности, содержащего по меньшей мере один другой белок, экспрессируемый макрофагом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, по меньшей мере один другой белок представляет собой белок галектин-1, белок LILRB2, белок казеинкиназы II или любую их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, при связывании с белком CD163 антитело интернализируется человеческим макрофагом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 не является цитотоксическим для макрофага. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 стимулирует активацию CD4⁺ Т-клеток, пролиферацию CD4⁺ Т-клеток или как активацию, так и пролиферацию CD4⁺ Т-клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 стимулирует экспрессию CD69, ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 или любой их комбинации CD4⁺ Т-клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 стимулирует активацию CD8⁺ Т-клеток, пролиферацию CD8⁺ Т-клеток или как активацию, так и пролиферацию CD8⁺ Т-клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 стимулирует экспрессию ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 или любой их комбинации CD8⁺ Т-клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 снижает иммуносупрессию в опухолевом

микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 стимулирует цитолиз опухолевых клеток в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 стимулирует опосредованный цитотоксическими лимфоцитами цитолиз раковых клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 стимулирует опосредованный NK-клетками цитолиз опухолевых клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 стимулирует экспрессию IL-2 Т-клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 увеличивает количество CD4⁺ Т-клеток, CD196⁺ Т-клеток, CXCR3⁺ Т-клеток, CCR4⁺ Т-клеток или любой их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с CD163 снижает иммуносупрессию в опухолевом микроокружении, вызванную макрофагом.

[0051] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело, которое специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на человеческом макрофаге, причем связывание приводит по меньшей мере к одному из следующих эффектов: (а) сниженной экспрессии по меньшей мере одного маркера макрофагом, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15; (b) интернализации антитела макрофагом; (c) активации CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации; (d) пролиферации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации; и (e) стимуляции цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание приводит к двум или более из (а)-(е); трем или более из (а)-(е); четырем или более из (а)-(е) или всем из (а)-(е). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, активацию CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации измеряют как повышенное продуцирование IFN- γ , TNF- α или перфорина или любой их комбинации.

[0052] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело, которое специфически связывается с CD163⁺ иммуносупрессивной миелоидной клеткой в опухолевом микроокружении, причем связывание снижает супрессию опосредованного цитотоксическими Т-клетками цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

[0053] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыто антитело, которое специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на человеческом опухоль-ассоциированном макрофаге, и снижает экспрессию CD16, CD64, TLR2, Siglec-15 или их комбинации макрофагом, для применения

в способе лечения рака. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание антитела с макрофагом модулирует иммунную функцию клетки в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание антитела с макрофагом стимулирует противоопухолевую иммунную функцию.

[0054] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, композиция содержит антитело по любому варианту осуществления, раскрытому в настоящем документе, и вспомогательное вещество.

[0055] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, фармацевтическая композиция содержит антитело по любому варианту осуществления, раскрытому в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0056] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, применение раскрываемого в настоящем документе антитела предназначено для изготовления лекарственного средства для лечения рака у субъекта-человека.

[0057] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе применение антитела предназначено для изготовления лекарственного средства, которое снижает иммуносупрессию опухоль-ассоциированным макрофагом у субъекта-человека, имеющего раковое заболевание.

[0058] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, применение антитела, раскрываемого в настоящем документе, предназначено для изготовления лекарственного средства, которое стимулирует опосредованный Т-клетками цитолиз опухолевых клеток у субъекта-человека, имеющего раковое заболевание.

[0059] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт способ стимулирования функции иммунной клетки, предусматривающий специфическое связывание антитела с белком CD163, экспрессируемым на иммуносупрессивной человеческой миелоидной клетке, и стимуляцию функции иммунных клеток, что измеряется с помощью одного или обоих из следующих параметров: (i) активации CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации; и (ii) пролиферации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, иммуносупрессивная человеческая миелоидная клетка представляет собой макрофаг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, иммуносупрессивная человеческая миелоидная клетка представляет собой супрессорную клетку миелоидного происхождения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело представляет собой любой вариант осуществления, который раскрыт в настоящем документе.

[0060] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт способ лечения рака у нуждающегося в этом индивидуума, предусматривающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела по любому из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, в результате осуществляя лечение рака у индивидуума.

[0061] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт способ лечения рака у нуждающегося в этом индивидуума, предусматривающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела по любому из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, в результате чего у индивидуума снижается иммуносупрессия опухоль-ассоциированным макрофагом.

[0062] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт способ лечения рака у нуждающегося в этом индивидуума, предусматривающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела по любому из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, в результате чего у индивидуума увеличивается опосредованный Т-клетками цитоллиз опухолевых клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, рак представляет собой рак легких или саркому. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, рак легкого представляет собой карциному легкого или аденокарциному легкого.

[0063] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт способ снижения опухоль-стимулирующей активности опухоль-ассоциированного макрофага у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ предусматривает введение индивидууму количества фармацевтической композиции по пункту 43 формулы изобретения, которое является эффективным для модулирования активации $CD4^{+}$ Т-клеток, пролиферации $CD4^{+}$ Т-клеток, активации $CD8^{+}$ Т-клеток, пролиферации $CD8^{+}$ Т-клеток или любой их комбинации в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ дополнительно предусматривает стимуляцию цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

[0064] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт способ стимулирования опосредованного лимфоцитами цитолиза опухолевых клеток у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ предусматривает введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе.

[0065] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт способ модулирования активности опухоль-ассоциированного макрофага в опухолевом микроокружении, при этом способ предусматривает приведение опухоль-ассоциированного макрофага в контакт с антителом, которое связывается с CD163-экспрессирующим человеческим макрофагом и предусматривает по меньшей мере один из следующих эффектов: (a) связывание антитела снижает экспрессию по меньшей мере одного маркера на макрофаге, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15; (b) при связывании антитела с белком CD163 антитело интернализируется человеческим макрофагом; (c) связывание антитела не является цитотоксическим для макрофага; (d) связывание антитела стимулирует активацию CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации; (e) связывание антитела стимулирует пролиферацию CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации; и (f) связывание антитела стимулирует цитолиз опухолевых клеток в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание приводит к двум или более из (a)-(f), трем или более из (a)-(f), четырем или более из (a)-(f), пяти или более из (a)-(f) или всем из (a)-(f). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, активацию CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации измеряют как повышенное продуцирование IFN- γ , TNF- α или перфорина или любой их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ реализуется в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ реализуется в условиях *in vivo*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание антитела с макрофагом модулирует иммунную функцию клетки в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание антитела с макрофагом стимулирует противоопухолевую иммунную функцию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит константный домен, и константный домен связывается с Fc-рецептором. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, Fc-рецептор экспрессируется на макрофаге. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ дополнительно предусматривает интернализацию антитела человеческим макрофагом при связывании с белком CD163. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание с белком CD163 не является цитотоксическим для человеческого макрофага. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ дополнительно предусматривает стимуляцию экспрессии CD69, ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 или любой их комбинации CD4⁺ Т-клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ дополнительно предусматривает стимуляцию

экспрессии ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 или любой их комбинации CD8⁺ Т-клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ предусматривает снижение иммуносупрессии в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ предусматривает стимулирование опосредованного цитотоксическими лимфоцитами цитолиза раковых клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ предусматривает стимуляцию опосредованного НК-клетками цитолиза опухолевых клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ предусматривает стимуляцию экспрессии IL-2 Т-клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ предусматривает увеличение количества CD4⁺ Т-клеток, CD196⁻ Т-клеток, CXCR3⁺ Т-клеток, CCR4⁻ Т-клеток или любой их комбинации.

Краткое описание чертежей

[0066] Новые признаки настоящего изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет получено путем обращения к представленному далее подробному описанию, в котором излагаются иллюстративные варианты осуществления, в которых использованы идеи настоящего изобретения, и на сопроводительных чертежах.

[0067] На **фиг. 1** показано связывание антитела AB101 с популяциями человеческих MDSC.

[0068] На **фиг. 2** показано, что AB101 связывается с CD163^{Hi} клетками.

[0069] На **фиг. 3** показано связывание AB101 с человеческими M2c, M1 и M0 по сравнению с изотипическими контролями.

[0070] На **фиг. 4** показано связывание AB101 с человеческими Т-клетками, В-клетками, НКТ-клетками, нейтрофилами, моноцитами и дендритными клетками периферической крови, при этом изотипический контроль показан серым, а связывание AB101 показано черным.

[0071] На **фиг. 5** показано отсутствие связывания AB101 с панелью человеческих первичных клеток, в том числе с эпителиальными клетками малых дыхательных путей (SAEC), эпителиальными клетками проксимальных канальцев почек (RPTEC), эндотелиальными клетками микрососудов легких (HMVEC), эндотелиальными клетками пупочной вены (HUVEC), гладкомышечными клетками аорты (АОСМК) и кератиноцитами.

[0072] На **фиг. 6А** показаны 20 основных целевых молекул для AB102 по результатам масс-спектрометрического анализа образца после иммунопреципитации.

[0073] На **фиг. 6В** показаны основные целевые молекулы на клеточной поверхности для AB102 по результатам масс-спектрометрического анализа образца после иммунопреципитации.

[0074] На **фиг. 6С** показаны основные целевые молекулы на клеточной поверхности для AB102 по сравнению с ISO (отрицательным изотипическим контролем) по результатам масс-спектрометрического анализа образцов AB102 и ISO после иммунопреципитации.

[0075] На **фиг. 7** показано, что AB102 иммунопреципитирует отдельную, более высокомолекулярную гликоформу CD163.

[0076] На **фиг. 8** показано, что AB101, AB102 и контрольное антитело к CD163 связывается с huCD163, в то время как в случае изотипического контроля не наблюдали заметного связывания.

[0077] На **фиг. 9** показано, что ни AB101, ни контрольное антитело к huCD163 не ё с рекомбинантным мышинным CD163, по сравнению с коммерчески доступным антителом к muCD163, которое связывалось с мышинным CD163.

[0078] На **фиг. 10** показано, что предварительная обработка макрофагов M2c поликлональным антителом к CD163 блокировала связывание антитела AB101, по сравнению с обработкой козым контрольным поликлональным антителом, которое не блокировало связывание AB101.

[0079] На **фиг. 11** показано, что предварительная обработка макрофагов M2c поликлональным антителом к CD163 блокировала связывание контрольного моноклонального антитела к huCD163, по сравнению с обработкой козым контрольным поликлональным антителом, которое не блокировало связывание контрольного моноклонального антитела к huCD163.

[0080] На **фиг. 12** показано, что обработка поляризованных макрофагов M2c посредством siRNA к CD163 существенно снижала связывание антитела AB102 по сравнению с макрофагами M2c, обработанными скремблированной siRNA (siScramb) или без siRNA, и была репрезентативной для трех повторностей.

[0081] На **фиг. 13** показано, что нокдаун CD163 с помощью siRNA снижал связывание антитела AB102, небольшое снижение связывания антитела AB102 после нокдауна с помощью siRNA к FCGR2A + FCGR3A (у 1 из 3 доноров), FCGR2C или FCGR3A и отсутствие признаков снижения связывания AB102 после нокдауна с помощью siCD206, siCD163L1, siPPIA, siLGALS1, siLGALS3, siLILRB2 и siUPAR.

[0082] На **фиг. 14** показано, что обработка культивируемых макрофагов M2 посредством LPS приводила к утрате связывания как антителом AB101, так и контрольным антителом к CD163.

[0083] На **фиг. 15** показано увеличение продукции IL-2 после обработки миелоидных клеток антителом AB101.

[0084] На **фиг. 16** показано, что обработка антителом AB101 во время поляризации стимулировала пролиферацию CD4⁺ Т-клеток.

[0085] На **фиг. 17** показано, что обработка антителом AB101 во время поляризации стимулировала пролиферацию CD8⁺ Т-клеток.

[0086] На **фин. 18** показано, что обработка антителом AB101 во время поляризации (обозначено «до» на графике) после поляризации (обозначено «после» на графике) или в сочетании во время и после поляризации (обозначено «до и после» на графике) приводила к усилению продуцирования IL-2 по сравнению с обработкой изотипическими антителами.

[0087] На **фиг. 19** показано, что обработка «до» макрофагов M2 антителом AB101 снижала экспрессию CD16, CD64, кальретикулина и Siglec-15.

[0088] На **фиг. 20** показано, что обработка клеток M2c посредством AB101 увеличивала соотношение Th1/Th2 по сравнению с изотипическим контролем.

[0089] На **фиг. 21** показано, что обработка клеток M2c посредством AB101 увеличивала экспрессию CD69 на CD4 Т-клетках по сравнению с изотипическим контролем.

[0090] На **фиг. 22** показано, что обработка клеток M2c посредством AB101 увеличивала экспрессию ICOS на CD4 Т-клетках по сравнению с изотипическим контролем.

[0091] На **фиг. 23** показано, что обработка клеток M2c посредством AB101 увеличивала экспрессию OX40 на CD4 Т-клетках по сравнению с изотипическим контролем.

[0092] На **фиг. 24** показано, что повышенное количество CTL в присутствии ViTE приводило к усилению цитолиза опухолевых клеток Raji по сравнению с изотипическим контролем.

[0093] На **фиг. 25** показано, что антитело AB102 интернализовалось приблизительно так же, как и коммерческое антитело к CD163 (R&D Systems MAB1607-100), а антитело AB101 интернализовалось приблизительно в 2 раза больше, чем коммерческое антитело к CD163.

[0094] На **фиг. 26** показан график объема опухоли для опухолей A549 за 30 дней. Стрелками указаны инъекции при обработке антителами. Каждая точка представляет собой среднее значение измерения для 7 мышей. Планки погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего (SEM). Статистическую значимость рассчитывали с использованием критерия Манна-Уитни.

[0095] На **фиг. 27** показан график объема опухоли для опухолей H1975 за 30 дней. Стрелками указаны инъекции при обработке антителами. Каждая точка представляет собой среднее значение измерения для 7 мышей. Планки погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего (SEM). Статистическую значимость рассчитывали с использованием критерия Манна-Уитни.

[0096] На **фиг. 28** показана схема эксперимента для анализа совместного культивирования M2c/T-клеток для оценки влияния обработки AB101 на пролиферацию T-клеток и продуцирование IL-2.

[0097] На **фиг. 29** показано, что обработка посредством AB101 во время поляризации макрофагов M2c восстанавливала пролиферацию T-клеток в анализе совместного культивирования M2c/T-клеток.

[0098] На **фиг. 30** показано, что обработка посредством AB101 во время поляризации макрофагов M2c также усиливала секрецию IL-2 T-клетками, активированными посредством ОКТ3, в анализе совместного культивирования M2c/T-клеток.

[0099] На **фиг. 31** показано, что обработка посредством AB101 по схемам «до», «до/после» и «после» увеличивала пролиферацию CD8⁺ T-клеток в анализе совместного культивирования M2c/T-клеток.

[0100] На **фиг. 32** показано, что обработка посредством AB101 по схемам «до», «до/после» и «после» увеличивала пролиферацию CD8⁺ T-клеток в анализе совместного культивирования M2c/T-клеток у индивидуальных субъектов.

[0101] На **фиг. 33** показано, что обработка посредством AB101 усиливала пролиферацию CD8⁺ T-клеток в совместных культурах с M2c от нескольких субъектов.

[0102] На **фиг. 34** показано, что обработка посредством AB101 усиливала пролиферацию CD4⁺ T-клеток в совместных культурах с M2c от нескольких субъектов.

[0103] На **фиг. 35** показано, что обработка посредством AB101 усиливала продуцирование IL-2 T-клетками от нескольких людей во время совместного культивирования с M2c.

[0104] На **фиг. 36** показано, что AB101 более эффективно, чем изотипы AB104 и AB102, в усилении пролиферации T-клеток в анализе совместного культивирования M2c/T-клеток.

[0105] На **фиг. 37** показано, что AB101, но не AB104, в схеме «до/после» и «после» «спасало» пролиферацию CD8⁺ T-клеток от иммуносупрессии, опосредованной клетками M2c.

[0106] На **фиг. 38** показано, что AB101 восстанавливало цитокиновый ответ CD8⁺ Т-клеток в анализе совместного культивирования M2c/Т-клеток.

[0107] На **фиг. 39** показано, что AB101 «спасает» ответ CD4⁺ Т-клеток с выработкой IFN- γ , TNF- α и перфорина от опосредованной макрофагами M2c иммуносупрессии.

[0108] На **фиг. 40** показано, что обработка посредством AB101 усиливала цитотоксическую активность CD8⁺ Т-клеток.

[0109] На **фиг. 41** показано, что обработка посредством AB101 усиливала ViTE®-опосредованную цитотоксическую активность CD8⁺ Т-клеток.

[0110] На **фиг. 42** показано, что обработка посредством AB101 усиливала цитотоксическую активность не рестриктированных по HLA CD8⁺ Т-клеток.

[0111] На **фиг. 43** показано, что обработка посредством AB101 ослабляла опосредованную клетками M2c иммунную супрессию и индуцировала уникальный паттерн экспрессии активированными CD4⁺ Т-клетками.

[0112] На **фиг. 44** показано, что обработка посредством AB101 ослабляет иммунную супрессию макрофагами M2c и усиливает активацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток.

[0113] На **фиг. 45** показана экспрессия CXCR3 активированными CD4⁺ Т-клетками.

[0114] На **фиг. 46** показано, что обработка посредством AB101 во время поляризации макрофагов M2c снижала экспрессию CD16, CD64, Siglex-15 и TLR2 макрофагами M2c.

[0115] На **фиг. 47** показана сводка изменений по результатам расщепления пепсином AB101, связанного с huCD163.

[0116] На **фиг. 48** показана сводка изменений по результатам расщепления непентезином II AB101, связанного с huCD163.

[0117] На **фиг. 49** показана схема связывания AB101 с ECD человеческого CD163 по результатам исследований методом HDX-MS.

[0118] На **фиг. 50** показано, что AB101 связывает укороченный ECD CD163, состоящий из доменов 1-5 SRCR.

[0119] На **фиг. 51** показаны результаты выравнивания CD163 человека с CD163 яванского макака. Сигнальная последовательность. Последовательностью под черными полосами показаны 9 доменов SRCR, а серыми линиями над последовательностью показана консенсусная последовательность. Защищенные и подверженные воздействию участки показаны на основе эпитопа связывания с AB101 по результатам определения наблюдаемой защиты в анализе методом HDX-MS. Сплошными полосами под последовательностью показан участок, защищенный от непентезина II. Внешней рамкой под последовательностью показан участок, защищенный от пепсина. Заштрихованной рамкой

под последовательностью показан участок, подверженный воздействию пепсина. Прямоугольником с вертикальной штриховкой под последовательностью показан участок, подверженный воздействию непентезина II. Лизин (K) в положении 323 CD163 человека и глутаминовая кислота (E) CD163 яванского макака отмечены прямоугольником.

[0120] На **фиг. 52** показано, что AB101 связывается с мутантом E323K человека и яванского макака, но не связывается с ECD CD163 яванского макака дикого типа.

[0121] На **фиг. 53** показано результаты SPR-детектирования связывания AB101 с человеческим CD163. AB101 серийно разводили до различных концентраций (A) EDTA или (B) кальцийсодержащим рабочим буфером. Затем GHI/61 вводили в проточную кювету 2 со скоростью потока 30 мкл/мин, концентрациями 6,25/12,5/25/50/100/200 мкг/мл, временем контакта 300 с и временем диссоциации 600 с.

[0122] На **фиг. 54** показано результаты SPR-детектирования связывания GHI/61 с человеческим CD163. Клон GHI/61 к CD163 серийно разводили до различных концентраций (A) EDTA или (B) кальцийсодержащим рабочим буфером. Затем GHI/61 вводили в проточную кювету 2 со скоростью потока 30 мкл/мин, концентрациями 3,125/6,25/12,5/25/50/100 мкг/мл, временем контакта 300 с и временем диссоциации 600 с.

[0123] На **фиг. 55** показано результаты SPR-детектирования связывания CD163 с AB101. Человеческий белок CD163 серийно разводили до различных концентраций кальцийсодержащим рабочим буфером. Затем белок CD163 вводили в проточную кювету 2 со скоростью потока 30 мкл/мин, концентрациями 1,25/2,5/5,0/10,0/20,0/40,0 мкг/мл, временем контакта 300 с и временем диссоциации 600 с.

[0124] На **фиг. 56** показано связывание AB101 с растворимым CD163 в анализе AlphaLisa. AB101 (кружки) или изотипический контроль (треугольники) инкубировали с 750 нМ CD163-His при указанной концентрации в течение 1 часа. Связывание количественно определяли с помощью AlphaLisa с биотинилированным mAb к hIgG1, микроносителями-акцепторами стрептавидина и микроносителями-донорами никеля. Символами представлено среднее значение $\pm$ стандартная ошибка пяти независимых измерений. Построение кривой проводили с использованием моделей насыщенного связывания с 1 и 2 сайтами (GraphPad Prism). ($R^2 = 0,92$). (A) линейный и (B) логарифмический масштаб оси x.

[0125] На **фиг. 57** показано связывание AB101 с макрофагами M1c. Макрофаги M2c блокировали жестким блокирующим буфером для FACS, содержащим 0,5 мг/мл человеческого IgG1, а затем окрашивали посредством AB101 (кружки) или изотипическим контролем (треугольники) в указанной концентрации в течение 30 минут. Связывание меченого красителем AlexaFluor 647 AB101 и изотипического контроля с макрофагами M2c

количественно оценивали по интенсивности флуоресценции и регистрировали как gMFI. Символами представлено среднее значение $\pm$ стандартная ошибка данных от четырех исследуемых субъектов. Построение кривой проводили с использованием модели насыщенного связывания с 2 сайтами (GraphPad Prism). ($R^2 = 0,99$). (A) линейный и (B) логарифмический масштаб оси x.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

[0126] В настоящем документе раскрыты антитела, которые специфически связываются с CD163⁺ клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, CD163⁺ клетки представляют собой иммуносупрессивные миелоидные клетки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, CD163⁺ клетки представляют собой миелоидные клетки, экспрессирующие человеческие CD163. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, CD163⁺ клетки являются опухолевыми клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, CD163⁺ иммуносупрессивные миелоидные клетки представляют собой человеческие макрофаги. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, CD163⁺ иммуносупрессивные человеческие макрофаги представляют собой M2 или M2-подобные макрофаги. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, иммуносупрессивные миелоидные клетки представляют собой супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, человеческие макрофаги экспрессируют высокие уровни CD163 (CD163^{Hi}). В отличие от этого, другие человеческие гемопоэтические клетки или первичные, отличные от иммунных человеческие клетки не экспрессируют CD163. Например, M1 и M1-подобные макрофаги не экспрессируют CD163.

[0127] Моноциты и макрофаги, подвергшиеся воздействию определенных воспалительных цитокинов или связанных с микробами молекулярных паттернов, дифференцируются в провоспалительные (M1 или M1-подобные) или противовоспалительные M2 или M2-подобные макрофаги. M1 и M2 являются классификациями, применяемыми для определения макрофагов, активированных в условиях *in vitro*, как провоспалительных (при классической активации IFN- γ и липополисахаридом) или противовоспалительных (при альтернативной активации IL-4 или IL-10) соответственно, тогда как макрофаги *in vivo* или *ex vivo* с фенотипами M1 или M2 определяются как M1-подобные или M2-подобные макрофаги. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, макрофаги M2 образуются при воздействии на них определенных цитокинов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, макрофаги M2 дифференцируются под действием IL-4, IL-10, IL-13 или их комбинации.

[0128] К подтипам макрофагов M2 относятся подтипы M2a, M2b, M2c и M2d. Макрофаги M2a индуцируются под действием IL-4 и IL-13, что вызывает повышенную экспрессию CD163, аргиназы-1, маннозного рецептора MRC1 (CD206), презентацию антигена системой MHC II и продуцирование IL-10 и TGF- β , что приводит к регенерации тканей и ингибированию провоспалительных молекул для предотвращения воспалительной реакции. Макрофаги M2b продуцируют IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α в качестве ответа на иммунные комплексы. Макрофаги M2c индуцируются посредством IL-10, трансформирующим фактором роста бета (TGF- β) и воздействием глюкокортикоидов и продуцируют IL-10 и TGF- β , что приводит к супрессированию воспалительной реакции. Подтипы M2d активируются в ответ на IL-6 и аденозины.

[0129] Макрофаги M2 обладают функциями и фенотипами, соответствующими макрофагам M2 и их подтипам. M2-подобный макрофаг представляет собой любой макрофаг *in vivo* или *ex vivo*, обладающий подмножеством функциональных или фенотипических характеристик макрофагов M2.

[0130] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела по настоящему изобретению обладают высокой авидностью и специфическим связыванием с иммуносупрессивными миелоидными клетками, в частности с опухоль-ассоциированными макрофагами, такими как M2 и M2-подобные макрофаги. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела специфически связываются с M2 и M2-подобными TAM из первичных человеческих опухолей легких. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, описанные в настоящем документе антитела не характеризуются заметным связыванием с M1 или M1-подобными макрофагами. M1-активированные макрофаги экспрессируют факторы транскрипции, такие как регуляторный фактор интерферонов (IRF5), энхансера гена легкого полипептида каппа ядерного фактора (NF- κ B), белок-активатор (AP-1) и STAT1. Макрофаги M1 секретируют провоспалительные цитокины, такие как IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 и TNF α . Макрофаги M1 обладают функциями и фенотипами, соответствующими макрофагам M1. M1-подобный макрофаг представляет собой любой макрофаг *in vivo* или *ex vivo*, обладающий подмножеством функциональных или фенотипических характеристик макрофагов M1.

[0131] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела по настоящему изобретению не связываются с первичными человеческими клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела по настоящему изобретению не связываются с гемопоэтическими стволовыми клетками, лейкоцитами, Т-клетками, В-клетками, NK-клетками и гранулоцитами.

[0132] Опухоль-ассоциированные макрофаги (ТАМ) представляют собой гетерогенный класс макрофагальных клеток, присутствующих в большом количестве в микроокружении солидных опухолей. Большинство данных свидетельствует о том, что ТАМ имеют опухоль-стимулирующий фенотип, который, по-видимому, участвует в пролиферации опухолевых клеток, опухолевом ангиогенезе, подвижности и инвазии, метастазировании, развитии устойчивости к противораковым лекарственным средствам и механизмах уклонения опухоли от иммунитета.

[0133] Прямой цитотоксический цитотоксическими Т-клетками среди противоопухолевых эффекторных лимфоцитов (ТНЛ) играет важную роль в противоопухолевой функции иммунной системы. Однако ТАМ в опухолевом микроокружении (ТМЕ) супрессируют Т-клеточный противоопухолевый иммунный ответ. ТАМ обладают иммуносупрессивным профилем транскрипции и экспрессируют факторы, в том числе IL-10 и трансформирующий фактор роста β (TGF β). Было показано, что у людей ТАМ непосредственно супрессируют функцию Т-клеток путем поверхностного презентирования лиганда запрограммированной смерти 1 (PD-L1) при гепатоклеточной карциноме и гомологов B7 при карциноме яичников, которые активируют белок запрограммированной смерти 1 (PD-1) и цитотоксический белок 4, ассоциированный с Т-лимфоцитами (CTLA4), соответственно, на Т-клетках. Ингибирующие сигналы для PD-1 и CTLA4 являются иммунными контрольными точками, и связывание таких ингибирующих рецепторов их лигандами ингибирует передачу сигналов Т-клеточного рецептора и цитотоксическую функцию Т-клеток, а также стимулирует апоптоз Т-клеток. HIF-1 α индуцирует ТАМ к супрессированию функции Т-клеток. CD163 был идентифицирован как иммуносупрессорная молекула, которая экспрессируется исключительно на ТАМ и может быть потенциальной терапевтической целевой молекулой для противораковой иммунотерапии.

[0134] ТАМ обычно делятся на две категории: M1-подобные противоопухолевые и M2-подобные иммуносупрессивные макрофаги, исходя из их функциональных характеристик, в том числе их связи с Т-хелперными клетками (CD4⁺) Th1 и Th2 типа. Макрофаги M1 представляют собой модель «классической» активации и могут быть получены с помощью IFN- γ либо с помощью активаторов врожденного иммунитета, таких как патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP) (например, липополисахарид (LPS)) или связанные с повреждением молекулярные паттерны (DAMP), а также как воспалительные цитокины (например, фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α)). Кроме того, дифференцировку в M1 индуцирует зависящая от Т-клеток активация макрофагов по пути лиганда CD40-CD40. Макрофаги M1 обладают провоспалительной,

бактерицидной и цитотоксической функциями. Такие макрофаги стимулируют антигензависимую индукцию Th1 клеток и активацию Th1 и CD8⁺ Т-клеток. Стимуляция цитотоксической активности Т-клеток с помощью M1-подобных противоопухолевых макрофагов имеет решающее значение для устранения опухолевых клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, M1-подобные противоопухолевые макрофаги характеризуются экспрессией поверхностных маркеров, измеряемой методом проточной цитометрии, и имеют фенотип CD80⁺ CD86⁺ CD163^{Lo/-} или CD206^{Lo/-}. Макрофаги M1 секретируют IL-12 и низкий уровень IL-10 и/или TGF-β.

[0135] В отличие от этого, M2-подобные иммуносупрессивные макрофаги представляют собой модель «альтернативной» или «неклассической» активации, которая может быть получена с помощью IL-4 или IL-10 *in vitro*, обладает противовоспалительным действием и стимулируют заживление ран и восстановление тканей. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, M2-подобные иммуносупрессивные макрофаги поляризуются из макрофагов моноцитарного происхождения и рекрутируются факторами, секретируемыми опухолями. M2-подобные иммуносупрессивные макрофаги являются основным типом макрофагальных клеток, участвующих в проопухолевой функции TAM, которая включает стимуляцию роста опухоли, метастазирование и уклонение от иммунитета. M2-подобные макрофаги экспрессируют поверхностные маркеры CD15, CD23, CD64, CD68, CD163^{Hi}, CD204^{Hi}, CD206^{Hi} и/или другие маркеры макрофагов M2, определяемые методом проточной цитометрии. Макрофаги M2 секретируют высокие уровни IL-10 и TGF-β1 и низкие уровни IL-12.

[0136] При многих типах опухолей уровень инфильтрации TAM имеет существенное прогностическое значение. TAM связывают с плохим прогнозом при самых разных опухолях. Например, было обнаружено, что пациенты, болеющие раком молочной железы, с большим количеством M2-подобных опухоль-ассоциированных макрофагов имели опухоли более высокой степени злокачественности, большую плотность микрососудов и более низкую общую выживаемость. У пациентов с большим количеством M1-подобных противоопухолевых TAM наблюдался противоположный эффект.

[0137] Соответственно, остается потребность в выявлении соединений и способов улучшения иммунотерапевтического лечения рака.

[0138] CD163 (богатый цистеином фагоцитарный рецепторный белок M130 типа 1; фагоцитарный рецептор гемоглобина) представляет собой белок на клеточной поверхности, который играет роль фагоцитарного рецептора для комплекса гемоглобин-гаптоглобин и защищает ткани от опосредованного свободным гемоглобином окислительного повреждения. Сообщалось о четырех изоформах белка CD163 с молекулярной массой

125451, 125982, 121609 и 124958 Да. Изоформа 1 является наиболее распространенной изоформой CD163 с молекулярной массой 125451 Да и состоит из полипептида из 1115 аминокислотных остатков, включающего внеклеточный домен, трансмембранный сегмент и цитоплазматический хвост. Внеклеточный домен включает девять повторяющихся богатых цистеином доменов. Изоформа 1 белка CD163 имеет четыре сайта N-связанного гликозилирования, а в макрофагах M2 в SDS-PAGE в восстанавливающих условиях у белка CD163 наблюдают два отчетливые бэнда на уровне ~150 кДа и ~130 кДа.

[0139] Экспрессия мРНК CD163 обычно рестриктирована миелоидными клетками, но также экспрессируется определенными формами человеческого рака. Экспрессия CD163 на ТАМ была связана с иммуносупрессивным M2-подобным фенотипом, который, как было показано, коррелирует с плохим клиническим исходом при лечении рака. CD163 необходим для проопухоловой активации макрофагов при человеческой и мышинной саркоме. Также сообщалось, что CD163 является фагоцитарным рецептором макрофагов и стимулирует иммуносупрессию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, взаимодействие комплекса гемоглобин-гаптоглобин с CD163 индуцирует секрецию иммуносупрессивного цитокина IL-10 и экспрессию гем-оксигеназы-1(HO-1). HO-1 производит противовоспалительные метаболиты Fe^{2+} , CO и биливердин.

[0140] Растворимый CD163 возникает у людей в результате выделения эктодомена и, как сообщается, обладает противовоспалительными свойствами, такими как даунрегуляция Т-клеточных ответов, в том числе пролиферации лимфоцитов, стимулируемой фитогемагглютинином (РНА) или 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетатом (ТРА).

[0141] Было показано, что антитела, нацеленные на CD163, модулируют врожденный иммунный ответ макрофагов, экспрессирующих CD163. Например, антитело RM3/1, антитело к CD163, представляет собой мышинный моноклональный IgG1 (легкая каппа-цепь), который вырабатывается против человеческих моноцитов. Антитело RM3/1 связывается с богатым цистеином доменом 9 человеческого CD163, снижает LPS-индуцируемый TNF α и усиливает секрецию IL-10 макрофагами.

Определенная терминология

[0142] Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в контексте настоящего документа, имеют то же значение, которое обычно понимают специалист в области техники, к которой относится заявляемый предмет изобретения. Как правило, номенклатуры, используемые в связи с иммунологией, онкологией, культурами клеток и тканей, молекулярной биологией, а также химией белков и олиго- или

полинуклеотидов и описанными в настоящем документе гибридами, а также их методы хорошо известны и широко применяются в настоящей области техники. Следует понимать, что вышеизложенное общее описание и последующее подробное описание являются лишь иллюстративными и пояснительными и не ограничивают какой-либо заявляемый предмет изобретения. Заголовки разделов, применяемые в контексте настоящего документа, предназначены только для организационных целей и не должны истолковываться как ограничивающие описываемый предмет изобретения.

[0143] Применяемые в контексте настоящего документа формы единственного числа включают отсылки и к множественному числу, если контекст явно не предусматривает иное. Таким образом, например, отсылка к «антителу» включает множество антител, и отсылка к «антителу» в соответствии с некоторыми вариантами осуществления включает несколько антител и так далее.

[0144] Применяемые в контексте настоящего документа все числовые значения или числовые диапазоны включают все целые числа в пределах или охватывающих такие диапазоны и части значений или целые числа в пределах или охватывающих диапазоны, если контекст явно не предусматривает иное. Так, например, отсылка к диапазону 90-100% включает 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% и т. д., а также 91,1%, 91,2%, 91,3%, 91,4%, 91,5% и т. д., 92,1%, 92,2%, 92,3%, 92,4%, 92,5% и т. д., и т. п. В другом примере отсылка к диапазону кратности 1-5000 включает кратность 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и т. д., а также кратность 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5 и т. д., кратность 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5 и т. д. и т. п.

[0145] «Приблизительно» число, в контексте настоящего документа, относится к диапазону, включающему число и находящемуся в диапазоне от 10% ниже данного числа до 10% выше данного числа. «Приблизительно» диапазон относится к 10% ниже нижнего предела диапазона, охватывая до 10% выше верхнего предела диапазона.

[0146] «Процент идентичности» и «% идентичности» относятся к степени, с которой две последовательности (нуклеотидные или аминокислотные) имеют один и тот же остаток в одинаковых положениях при выравнивании. Например, «аминокислотная последовательность на X% идентична последовательности под SEQ ID NO: Y» относится к % идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: Y и уточняется какой X% остатков в аминокислотной последовательности идентичны остаткам последовательности, раскрытой в последовательности под SEQ ID NO: Y. Как правило, для таких расчетов применяют компьютерные программы. К иллюстративным программам, которые сравнивают и выравнивают пары последовательностей, относятся ALIGN (Myers and Miller, Comput Appl Biosci. 1988 Mar;4(1):11-7), FASTA (Pearson and

Lipman, Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Apr;85(8):2444-8; Pearson, Methods Enzymol. 1990;183:63-98) и BLAST с учетом гэпов (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1;25(17):3389-40), BLASTP, BLASTN или GCG (Devereux et al., Nucleic Acids Res. 1984 Jan 11;12(1 Pt 1):387-95).

[0147] Применяемый в контексте настоящего документа термин «антитело» относится к белку, который связывает антиген. Антитело часто содержит переменный домен и константный домен в каждой из тяжелой цепи и легкой цепи. Соответственно, большинство антител имеют переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), которые вместе образуют часть антитела, которая связывается с антигеном. Внутри каждого переменного домена находятся три определяющих комплементарности участка (CDR), которые образуют петли в переменном домене тяжелой цепи (VH) и переменном домене легкой цепи (VL) и контактируют с поверхностью антигена. «Антитело» включает без ограничения поликлональные, моноклональные, моноспецифические, мультиспецифические (например, биспецифические антитела), природные, гуманизированные, человеческие, химерные, синтетические, рекомбинантные, гибридные, мутированные, привитые, фрагменты антител (например, часть полноразмерного антитела, как правило, его антигенсвязывающего или переменного участка, например, Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагментов) и получаемые в условиях *in vitro* антитела, обладающих антигенсвязывающей активностью. Термин также включает одноцепочечные антитела, например, одноцепочечные антитела Fv (scFv или scFv), в которых переменная тяжелая и переменная легкая цепи соединены вместе (непосредственно или через пептидный линкер) с образованием непрерывного полипептида.

[0148] Применяемый в контексте настоящего документа термин «определяющие комплементарности участки (CDR)» относится к части переменных цепей в антителах, которые связываются со специфическим антигеном. Для определения CDR можно применять несколько способов. В современном уровне техники используют различные схемы нумерации с различными определениями длин и положений CDR. Например, схема нумерации по Kabat основана на выравнивании последовательностей и использует «параметр изменчивости» данного положения аминокислоты (количество различных аминокислот в данном положении, деленное на частоту наиболее часто встречающейся аминокислоты в таком положении) для прогнозирования различных CDR. Схема нумерации по Chothia, с другой стороны, представляет собой схему нумерации, основанную на структуре, в которой выровнены кристаллические структуры антител, что определяет петлевые структуры как CDR. Схема нумерации по Martin фокусируется на

структурном выравнивании различных каркасных участков нетрадиционной длины. Схема нумерации IMGT представляет собой стандартизированную систему нумерации, основанную на выравнивании последовательностей из полной базы данных эталонных генов, включающей все суперсемейство иммуноглобулинов. Схема нумерации по Honneger (AHO's) основана на структурном выравнивании трехмерной структуры переменных участков и использует структурно консервативные положения C_α для определения длин каркасных участков и CDR. Специалист в настоящей области техники заметит, что определение CDR будет варьировать в зависимости от применяемого способа. С раскрываемыми в настоящем документе последовательностями предусматривается любой способ определения CDR.

[0149] Термины «реципиент», «индивидуум», «субъект», «хозяин» и «пациент» применяют в настоящем документе взаимозаменяемо, и они относятся к любому субъекту-млекопитающему, для которого необходима диагностика, лечение или терапия, в частности к людям. «Млекопитающее» в контексте лечения относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также лабораторных, зоопарковых, спортивных или домашних животных, таких как собаки, лошади, кошки, коровы, овцы, козы, свиньи, мыши, крысы, кролики, морские свинки, обезьяны и т. д. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, млекопитающим является человек.

[0150] Применяемые в контексте настоящего документа термины «лечение», «проведение лечения» и т. п. в некоторых случаях относятся к введению средства или проведению процедуры с целью получения эффекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, эффект является профилактическим в смысле полного или частичного предупреждения заболевания или его симптома и/или терапевтическим в смысле осуществления частичного или полного излечения от заболевания и/или симптомов заболевания. «Лечение» в контексте настоящего документа включает лечение заболевания или нарушения (например, рака) у млекопитающего, в частности у человека, и включает: (a) предупреждение возникновения заболевания или симптома заболевания у субъекта, который предрасположен к заболеванию, но еще не диагностирован как имеющий его (например, включая заболевания, которые связаны с первичным заболеванием или вызваны им; (b) подавление заболевания, т. е. остановку его развития, и (c) облегчение заболевания, т. е. регрессию заболевания. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, лечение относится к любым показателям успеха в лечении или облегчении или предупреждении рака, включая любой объективный или субъективный параметр, такой как снижение заболеваемости, ремиссия, уменьшение симптомов или облегчение состояния

больного, замедление темпов разрушения или упадка или уменьшение изнурительности конечной точки разрушения. Лечение или облегчение симптомов основано на одном или нескольких объективных или субъективных параметрах, в том числе результатах осмотра врачом. Соответственно, термин «лечение» включает введение соединений или средств по настоящему изобретению для предупреждения или отсрочки, облегчения или остановки или подавления развития симптомов или патологических состояний, связанных с заболеваниями (например, раком). Термин «терапевтический эффект» относится к уменьшению, устранению или предупреждению развития заболевания, симптомов заболевания или побочных эффектов заболевания у субъекта. Субъекта «лечат» от заболевания или нарушения, если после получения терапевтического количества антитела по настоящему изобретению у пациента обнаруживаются наблюдаемые и/или измеримые изменения параметра или симптома заболевания или нарушения, например, в случае лечения рака повышенная цитолитическая активность в отношении опухолевых клеток по оценке *ex vivo*, более низкие уровни иммуносупрессивных секретируемых факторов в крови, меньший объем или масса опухоли, повышенное количество цитотоксических лимфоцитов и Th1-подобных Т-клеток в биоптате опухоли, снижение заболеваемости или смертности, улучшение факторов качества жизни или улучшение любых объективных показателей, связанных с параметром или симптомом заболевания или нарушения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, параметры включают преобразование иммунных «холодных» опухолей в иммунные «горячие», например, за счет увеличения числа цитотоксических лимфоцитов, а также маркеров активации Т-клеток (CD69, ICOS, OX40 и т. д.) в биоптате опухоли или снижения экспрессии CD16, CD64, TLR2, Siglec-15 на TAM в биоптате опухоли.

[0151] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, термин «индуцирование ответа» относится к облегчению или уменьшению признаков или симптомов заболевания у субъекта и, в частности, включает без ограничения увеличение продолжительности дожития.

[0152] Термин «авидность» относится к устойчивости комплекса из двух или более средств к диссоциации после разведения.

[0153] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, «эффекторные функции» антитела относятся к той биологической активности, которая относится к Fc-участку (Fc-участку с природной последовательностью или варианту аминокислотной последовательности Fc-участка) антитела и варьирует в зависимости от изотипа антитела.

[0154] «Fc-рецептор» или «FcR» относится к рецептору, который связывается с Fc-участком антитела.

[0155] Применяемый в контексте настоящего документа термин «человеческие эффекторные клетки» относится к лейкоцитам, которые экспрессируют один или несколько FcR и выполняют эффекторные функции. Например, клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и выполняют эффекторную ADCC-функцию. Примеры человеческих лейкоцитов, которые опосредуют ADCC, включают без ограничения мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), NK-клетки, моноциты, макрофаги, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы.

[0156] «Комплементзависимая цитотоксичность» или «CDC» относится к лизису целевой клетки в присутствии комплемента. Активация классического пути комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), которые связаны с их когнатным антигеном. Например, для оценки активации комплемента проводят анализ CDC.

[0157] Антитело, которое «интернализируется», представляет собой антитело, которое поглощается клеткой (т. е. проникает в клетку) при связывании с антигеном на клетке млекопитающего (например, полипептидом или рецептором клеточной поверхности). Интернализирующееся антитело включает фрагменты антител, человеческое или химерное антитело и конъюгаты антител. В некоторых случаях интернализация антитела (например, описанная в настоящем документе) изменяет биологию клетки, вызывая изменение ее функции.

[0158] «Антигенсвязывающий домен», «антигенсвязывающий участок» или «антигенсвязывающий сайт» представляют собой часть антитела, содержащую аминокислотные остатки (или другие фрагменты), которые взаимодействуют с антигеном и вносят свой вклад в специфичность и активность антитела и аффинность к антигену. Для антитела, которое специфически связывается со своим антигеном, он будет включать по меньшей мере часть по меньшей мере одного из его доменов CDR.

[0159] Антигенсвязывающий участок антитела называется «паратопом», который связывается с антигенной детерминантой, «эпитопом» антигена, то есть частью молекулы антигена, которая способна связываться с антителом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антигенное вещество имеет одну или более частей, которые распознаются антителами, т. е. более одного эпитопа, и, таким образом, одно антигенное вещество специфически связывается с разными антителами, каждое из которых обладает специфичностью к другому эпитопу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, эпитоп содержит несмежные части антигена. Например, в полипептиде эпитоп составляют аминокислотные остатки, которые не являются смежными в первичной последовательности полипептида, но которые в контексте третичной и четвертичной

структуры полипептида находятся достаточно близко друг к другу для того, чтобы быть связанными с антигенсвязывающим белком.

[0160] «Фрагмент антитела» представляет собой часть интактного антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, фрагмент антитела содержит антигенсвязывающий или вариабельный участок интактного антитела.

[0161] Термины «антигенсвязывающая часть антитела», «антигенсвязывающий фрагмент», «антигенсвязывающий домен», «фрагмент антитела» применяют в контексте настоящего документа взаимозаменяемо для обозначения одного или более фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Неограничивающие примеры фрагментов антител, включенных в такие термины, включают без ограничения (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')₂-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из VH и CH доменов; (iv) Fv-фрагмент, содержащий домены VL и VH одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341(6242):544-6 (1989)), содержащий домен VH; и (vi) выделенный CDR. Также включены «половинчатые» антитела, содержащие одну тяжелую цепь и одну легкую цепь. Настоящим документом также охватываются и другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела.

[0162] Применяемый в контексте настоящего документа термин «функциональный фрагмент антитела» относится в контексте к фрагменту антитела, который не только связывает антиген антитела, но также обладает функциональным признаком, который характеризует интактное антитело. Например, если функция антитела зависит от наличия Fc-домена, который обеспечивает эффекторную функцию, такую как ADCC, такой функцией будет обладать и функциональный фрагмент. Предполагается, что антитела по настоящему изобретению эффективны в модулировании функционального состояния макрофагов, ассоциированных с опухолью, или в переориентации или подавлении макрофагов со статусом M2, когда они содержат Fc-часть, которая связывается с Fc-рецептором макрофага, таким как CD16 (FcγRIIIa) или CD64 (FcγRI), в соответствии с некоторыми вариантами осуществления.

[0163] Фраза «функциональный фрагмент или аналог» антитела представляет собой соединение, имеющее качественную биологическую активность, общую с полноразмерным антителом. Например, функциональным фрагментом или аналогом антитела к IgE является фрагмент, который связывается с иммуноглобулином IgE, предотвращая или существенно снижая способность такой молекулы связываться с высокоаффинным рецептором FcγRI.

[0164] «Антигенсвязывающий белок» представляет собой белок, содержащий часть, которая содержит антигенсвязывающую часть антитела, необязательно также включающую остовную или каркасную часть, которая позволяет антигенсвязывающей части принимать конформацию, которая способствует связыванию антигенсвязывающего белка с антигеном.

[0165] «Интактное» антитело представляет собой антитело, которое содержит антигенсвязывающий сайт, а также C_L и по меньшей мере константные домены тяжелой цепи, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, константные домены представляют собой константные домены с нативной последовательностью (например, константные домены с человеческой нативной последовательностью) или вариантом их аминокислотной последовательности.

[0166] Термин «рекомбинантное антитело» в контексте настоящего документа относится к антителу, содержащему антигенсвязывающий домен первого антитела, такой как, например, CDR, VH-участок или интактная легкая цепь, а также домен из одного или более других антител или белков. Примерами рекомбинантных антител являются химерные, гибридные и гуманизированные антитела.

[0167] «Антитело с привитым CDR» представляет собой антитело, содержащее один или более CDR, полученных из антитела одного вида или изотипа, и каркас другого антитела того же или другого вида или изотипа.

[0168] Термин «человеческое антитело» включает все антитела, которые имеют один или более переменных и константных участков, полученных из последовательностей человеческого иммуноглобулина. В соответствии с одним вариантом осуществления, все переменные и константные домены антитела получены из последовательностей человеческих иммуноглобулинов (называемых «полностью человеческое антитело»).

[0169] Применяемый в контексте настоящего документа термин «аффинность» относится к константе равновесия для обратимого связывания двух средств и выражается как K_D . В соответствии с одним вариантом осуществления, антитела или антигенсвязывающие фрагменты характеризуются аффинностью связывания, которую измеряют с помощью K_D (равновесной константы диссоциации) к CD163 в диапазоне от 10^{-6} М или менее, или диапазон сводится до 10^{-16} М или менее (например, около 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} , 10^{-15} , 10^{-16} М или менее). В соответствии с определенными вариантами осуществления, антитела, которые описаны в настоящем документе, специфически связываются с полипептидом huCD163 с K_D менее или равной 10^{-4} М, менее

или равной около 10^{-5} М, менее или равной около 10^{-6} М, менее или равной 10^{-7} М или менее или равной 10^{-8} М.

[0170] Термины «предпочтительно связывает» или «специфически связывает» означает, что антитела или их фрагменты связываются с эпитопом с большей аффинностью, чем с неродственными аминокислотными последовательностями, и, если они вступают в перекрестную реакцию с другими полипептидами, содержащими эпитоп, не являются токсичными на тех уровнях, на которых они представлены в составах для введения человеку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, такая аффинность составляет по меньшей мере в 1 раз больше, по меньшей мере в 2 раза больше, по меньшей мере в 3 раза больше, по меньшей мере в 4 раза больше, по меньшей мере в 5 раз больше, по меньшей мере в 6 раз больше, по меньшей мере в 7 раз больше, по меньшей мере в 8 раз больше, по меньшей мере в 9 раз больше, в 10 раз больше, по меньшей мере в 20 раз больше, по меньшей мере в 30 раз больше, по меньшей мере в 40 раз больше, по меньшей мере в 50 раз больше, по меньшей мере в 60 раз больше, по меньшей мере в 70 раз больше, по меньшей мере в 80 раз больше, по меньшей мере в 90 раз больше, по меньшей мере в 100 раз больше или по меньшей мере в 1000 раз больше, чем аффинность антитела или его фрагмента для неродственных аминокислотных последовательностей.

[0171] Термин «специфический» относится к ситуации, в которой антитело будет предпочтительно связываться с молекулами, отличными от антигена, содержащего эпитоп, распознаваемый антителом. Данный термин также применим, когда, например, антигенсвязывающий домен специфичен к определенному эпитопу, который несет ряд антигенов, и в этом случае антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, несущие антигенсвязывающий домен, будут способны связываться с различными антигенами, несущими данный эпитоп.

[0172] В контексте настоящего документа антитело считается «иммуноспецифическим» или «специфическим» к антигену или «специфически связывающимся» с антигеном, если данное антитело вступает в реакцию с антигеном на поддающемся детекции уровне, предпочтительно с константой аффинности, K_a , более или равной около 10^4 М⁻¹ или более или равной около 10^5 М⁻¹, более или равной около 10^6 М⁻¹, более или равной около 10^7 М⁻¹ или более или равной 10^9 М⁻¹.

[0173] Термин «моноспецифический» в контексте настоящего документа относится к композиции с антителом, которая содержит антитело, проявляющее предпочтительную аффинность к одному конкретному эпитопу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, составы с моноспецифическими антителами состоят около на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 99,9% из антитела,

обладающего специфической связывающей активностью в отношении конкретного антигена.

[0174] Термин «полипептид» применяют в его обычном значении, т. е. в качестве последовательности аминокислот. Полипептиды не ограничены конкретной длиной продукта. В определение полипептида входят пептиды, олигопептиды и белки, и такие термины использованы в настоящем документе взаимозаменяемо, если специально не указано иное. Данный термин также не относится к модификациям полипептида после экспрессии или исключает их, например, гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования и т. п., а также к другим модификациям, известным в настоящей области техники, как к встречающимся в природе, так и к не встречающимся в природе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, полипептид представляет собой целый белок или его часть. Представляющие интерес конкретные полипептиды в контексте антител по настоящему изобретению, представляют собой субпоследовательности аминокислот, содержащие CDR и способные связывать человеческие макрофаги M2 или белок CD163, экспрессируемый такими клетками.

[0175] Применяемые в контексте настоящего документа термины «практически чистый» и «практически не содержащий» относятся к раствору или суспензии, содержащей менее чем, например, около 20% или менее постороннего материала, около 10% или менее постороннего материала, около 5% или менее постороннего материала, около 4% или менее постороннего материала, около 3% или менее постороннего материала, около 2% или менее постороннего материала или около 1% или менее постороннего материала.

[0176] Термин «выделенный» относится к белку (например, антителу), нуклеиновой кислоте или другому веществу, которое практически не содержит другого клеточного материала и/или химических веществ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, выделенными являются антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и нуклеиновые кислоты. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и нуклеиновые кислоты являются практически чистыми.

[0177] Применительно к полипептидам «выделенный» обычно означает полипептид, который был отделен от других белков и нуклеиновых кислот, с которыми он встречается в природе. Предпочтительно, полипептид также отделен от таких веществ, как антитела или гелевые матрицы (полиакриламид), которые применяют для его очистки. В некоторых случаях термин означает полипептид или его часть, которые в силу своего происхождения или манипулирования: (i) присутствует в клетке-хозяине в виде продукта экспрессии части вектора экспрессии; или (ii) связан с белком или другой химической

частицей, отличной от той, с которой он связан в природе; или (iii) не встречается в природе, например, белок, на который химически воздействуют путем присоединения или добавления по меньшей мере одного гидрофобного фрагмента к белку, так чтобы белок находился в форме, которая не встречается в природе. Под «выделенным» дополнительно подразумевают белок, который: (i) синтезирован химическим путем или (ii) экспрессирован в клетке-хозяине и очищен от связанных с ним и загрязняющих белков.

[0178] Термин «эффективное количество» в контексте настоящего документа относится к такому количеству антитела или его антигенсвязывающей части, как описано в настоящем документе, которое является достаточным для индукции ответа, например, для осуществления лечения, прогноза или диагностики связанного с активностью макрофагов или активностью ТАМ заболевания, как описано в настоящем документе, при введении субъекту. Терапевтически эффективные количества антител, представленных в настоящем документе, при применении по отдельности или в комбинации будут варьировать в зависимости от относительной активности антител и комбинаций (например, в отношении ингибирования роста опухолевых клеток), а также в зависимости от субъекта и болезненного состояния, от которого лечат, массы и возраста субъекта, тяжести болезненного состояния, способа введения и т. п., которые в некоторых случаях легко определяются специалистом в настоящей области техники.

[0179] Термин «терапевтически эффективное количество» обычно относится к количеству антитела или лекарственного средства, эффективному для «лечения» заболевания или нарушения у субъекта или млекопитающего. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, описываемую в настоящем документе композицию вводят субъекту в количестве, эффективном для получения некоторого требуемого терапевтического эффекта путем ингибирования заболевания или нарушения, как описано в настоящем документе, при разумном соотношении польза/риск, применимом к любому медицинскому лечению. Терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое по меньшей мере частично обеспечивает требуемый терапевтический или профилактический эффект в органе или ткани. Количество антитела, необходимое для предупреждения и/или терапевтического лечения заболевания или нарушения, само по себе не является фиксированным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, количество вводимого антитела варьирует в зависимости от типа заболевания, распространенности заболевания и размера млекопитающего, страдающего от заболевания или нарушения. При применении в сочетании с терапевтическими способами, предусматривающими введение терапевтического средства после того, как у субъекта проявляются симптомы заболевания или нарушения, термин «терапевтически

эффективный» означает, что после лечения один или более признаков или симптомов заболевания или нарушения уменьшаются или устраняются.

[0180] Фраза «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным соединениям и композициям, которые являются физиологически переносимыми и обычно не вызывают аллергических или аналогичных неблагоприятных реакций, таких как расстройство желудка, головокружение и т. п., при введении человеку.

[0181] Термин «приведение в контакт» определяется в настоящем документе как средство приведения композиции, представленной в настоящем документе, в физическую близость с клеткой, органом, тканью или жидкостью, которые описаны в настоящем документе.

Иммуномодулирующие антитела

[0182] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, которые специфически связываются с белком CD163, экспрессированном на CD163⁺ человеческой клетке. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, CD163⁺ клетка представляет собой иммуносупрессивную миелоидную клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, иммуносупрессивная миелоидная клетка является человеческим макрофагом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание раскрываемого в настоящем документе антитела изменяет экспрессию по меньшей мере одного маркера на человеческом макрофаге.

[0183] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело связывается с человеческим белком CD163 (huCD163), экспрессируемым на M2 или M2-подобном иммуносупрессивном человеческом макрофаге. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело специфически связывается с белком CD163, который представляет собой приблизительно 140-кДа гликоформу huCD163. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело специфически связывается с внеклеточным доменом 3 huCD163. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело специфически связывается с внеклеточным доменом 4 huCD163. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело специфически связывается с внеклеточным доменом 3 и внеклеточным доменом 4 huCD163. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело специфически связывается с huCD163, что приводит к конформационному изменению huCD163. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, конформационное изменение humCD163 приводит к экспозиции

внеклеточных доменов 2, 5 и 9 huCD163. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело специфически не связывает гликоформу huCD163 с более низкой молекулярной массой (приблизительно 115 кДа).

[0184] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело связывается с человеческой CD163⁺ иммуносупрессивной миелоидной клеткой и вызывает изменение экспрессии определенных клеточных маркеров, которые характеризуют M2 или M2-подобный иммуносупрессивный макрофаг (такой как макрофаг M2c), что указывает на функциональную дифференцировку макрофагов в не- или менее иммунодепрессивные, а также на более противоопухолевое состояние. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело связывается с M2 или M2-подобным иммуносупрессивным макрофагом и вызывает уменьшение экспрессии определенных клеточных маркеров, которые характеризуют M2 или M2-подобный макрофаг, указывая направление функциональной дифференцировки макрофагов в различные состояния дифференцировки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело снижает экспрессию одного или более из CD16, CD64, TLR2, и Siglec-15 CD163⁺ иммуносупрессивной миелоидной клеткой.

[0185] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание раскрываемого в настоящем документе антитела с CD163⁺ иммуносупрессивными миелоидными клетками приводит в результате к функциональному изменению у CD163⁺ иммуносупрессивной миелоидной клетки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание раскрываемого в настоящем документе с CD163⁺ иммуносупрессивной миелоидной клеткой приводит в результате к изменениям экспрессии маркера у M2 или M2-подобных иммуносупрессивных макрофагов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, функциональные изменения в связанных с антителами CD163⁺ иммуносупрессивных миелоидных клетках приводят к модифицированным взаимодействиям с другими клетками, такими как эффекторные Т-клетки, что впоследствии модифицирует их эффекты и взаимодействие с целевыми опухолевыми клетками.

[0186] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело по настоящему изобретению снижает иммуносупрессию, вызванную опухоль-ассоциированными макрофагами в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, снижение иммуносупрессии опухоль-ассоциированными макрофагами в опухолевом микроокружении соответствует увеличению иммуностимуляции, например, осуществлению стимуляции активации Т-

клеток, пролиферации Т-клеток, активации NK-клеток, пролиферации NK-клеток или любой их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, активация Т-клеток и/или активация NK-клеток приводит к увеличению продуцирования IFN- γ , TNF- α , перфорина или их комбинации Т-клетками и/или NK-клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела по настоящему изобретению увеличивают иммуностимуляцию, например, осуществление стимуляции активации Т-клеток, пролиферации Т-клеток, активации NK-клеток, пролиферации NK-клеток или любой их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, активация Т-клеток и/или активация NK-клеток приводит к увеличению продуцирования IFN- γ , TNF- α , перфорина или их комбинации Т-клетками и/или NK-клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела по настоящему изобретению специфически связываются с белком CD163, экспрессированном на человеческом макрофаге, при этом человеческий макрофаг обладает первой иммуносупрессивной активностью до связывания антитела и второй иммуносупрессивной активностью после связывания антитела, и при этом вторая иммуносупрессивная активность ниже первой иммуносупрессивной активности. В соответствии с различными вариантами осуществления, каждая из первой и второй иммуносупрессивных активностей не равна нулю.

[0187] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело по настоящему изобретению стимулирует активацию и пролиферацию Т-клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело смещает популяцию Т-клеток в сторону противоопухолевого фенотипа Т-клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело снижает или блокирует супрессию миелоидными клетками активации Т-клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело снижает способность TAM супрессировать активацию Т-клеток, приводя к более высокой стимуляции Т-клеток и продуцирования IL-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело блокирует способность TAM супрессировать активацию Т-клеток, приводя к более высокой стимуляции Т-клеток и продуцирования IL-2.

[0188] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело снижает миелоидную супрессию пролиферции Т-клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело снижает способность TAM супрессировать активацию и пролиферацию как CD4⁺ так и CD8⁺ Т-клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело снижает супрессию TAM

пролиферации клеток Th1. Пролиферирующие Т-клетки характеризуются повышенной экспрессией маркеров активации на CD4⁺ Т-клетках.

[0189] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело по настоящему изобретению изменяет M2-поляризованный макрофаг таким образом, чтобы макрофаг проявлял M1-подобный фенотип, который ослабляет иммуносупрессивные эффекты макрофагов M2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело влияет на происходящие от моноцитов макрофаги с тем, чтобы они дифференцировались до менее иммуносупрессивного и более противоопухолевого состояния дифференцировки.

[0190] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в настоящем документе представлены антитела, которые специфически связываются с человеческим белком CD163 (huCD163), который экспрессируется на человеческом макрофаге и снижает экспрессию макрофагом по меньшей мере одного из CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, человеческий макрофаг представляет собой опухоль-ассоциированный иммуносупрессивный макрофаг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, человеческий макрофаг представляет собой M2-подобный иммуносупрессивный макрофаг.

[0191] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело связывается с белком CD163, который экспрессируется макрофагом, как компонент комплекса, включающего по меньшей мере один другой белок, экспрессируемый макрофагами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, комплекс представляет собой комплекс на клеточной поверхности. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, комплекс содержит по меньшей мере один другой белок, выбранный из белка галектин-1, белка LILRB2 и белка казеинкиназа II.

[0192] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело связывается с белком CD163 на макрофаге и интернализируется макрофагом.

[0193] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело не является цитотоксическим для макрофага, с которым оно связывается.

[0194] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело стимулирует активность или пролиферацию CD4⁺ Т-клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело стимулирует экспрессию CD69, ICOS, OX40, PD1, LAG3 или CTLA4 CD4⁺ Т-клетками.

[0195] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело стимулирует активность или пролиферацию $CD8^+$ Т-клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело стимулирует экспрессию ICOS, OX40, PD1, LAG3 или CTLA4 $CD8^+$ Т-клетками.

[0196] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело стимулирует цитолиз опухолевых клеток в опухолевом микроокружении путем стимуляции активности или пролиферации $CD8^+$ Т-клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело стимулирует опосредованный цитотоксическими лимфоцитами цитолиз раковых клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело стимулирует опосредованный NK-клетками цитолиз опухолевых клеток.

[0197] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело стимулирует экспрессию IL-2 Т-клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание антител по настоящему изобретению с белком CD163 увеличивает количество $CD4^+$ Т-клеток, $CD196^-$ Т-клеток, $CXCR3^+$ Т-клеток, $CCR4^-$ Т-клеток или любой их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело увеличивает количество $CD4^+ CD196^- CXCR3^+ CCR4^-$ Т-клеток.

[0198] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело имеет константный домен, который связывается с Fc-рецептором, экспрессированном на макрофаге. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело специфически связывает huCD163 и имеет константный домен, который связывается с Fc-рецептором. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело имеет константный домен, который связывается с Fc-рецептором, экспрессированном на $CD163^+$ иммуносупрессивных миелоидных клетках, таким как CD16 (FcγRIIIa) или CD64 (FcγRI). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, huCD163 и Fc-рецептор экспрессированы на одной и той же клетке. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, huCD163 и Fc-рецептор экспрессированы на разных клетках. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, переменный домен антитела специфически связывает huCD163, и при этом константный домен антитела одновременно связывается с Fc-рецептором.

[0199] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, которые специфически связываются с белком CD163, экспрессированном на человеческих M2 и M2-подобных макрофагах, при этом указанное связывание приводит в результате по меньшей мере к одному из следующих эффектов:

- (a) сниженной экспрессии по меньшей мере одного маркера человеческим макрофагом, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15;
- (b) интернализации антитела человеческим макрофагом;
- (c) активации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации;
- (d) пролиферации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации; и
- (e) стимуляции цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

[0200] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, которые специфически связываются с белком CD163, экспрессированном на человеческих M2 и M2-подобных макрофагах, при этом указанное связывание приводит в результате по меньшей мере к двум из следующих эффектов:

- (a) сниженной экспрессии по меньшей мере одного маркера человеческим макрофагом, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15;
- (b) интернализации антитела человеческим макрофагом;
- (c) активации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации;
- (d) пролиферации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации; и
- (e) стимуляции цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

[0201] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, которые специфически связываются с белком CD163, экспрессированном на человеческих M2 и M2-подобных макрофагах, при этом указанное связывание приводит в результате по меньшей мере к трем из следующих эффектов:

- (a) сниженной экспрессии по меньшей мере одного маркера человеческим макрофагом, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15;
- (b) интернализации антитела человеческим макрофагом;
- (c) активации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации;
- (d) пролиферации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации; и
- (e) стимуляции цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

[0202] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, которые специфически связываются с белком CD163,

экспрессированном на человеческих M2 и M2-подобных макрофагах, при этом указанное связывание приводит в результате по меньшей мере к четырем из следующих эффектов:

- (a) сниженной экспрессии по меньшей мере одного маркера человеческим макрофагом, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15;
- (b) интернализации антитела человеческим макрофагом;
- (c) активации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации;
- (d) пролиферации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации; и
- (e) стимуляции цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

[0203] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, которые специфически связываются с белком CD163, экспрессированном на человеческих M2 и M2-подобных макрофагах, при этом указанное связывание приводит в результате по меньшей мере к пяти из следующих эффектов:

- (a) сниженной экспрессии по меньшей мере одного маркера человеческим макрофагом, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15;
- (b) интернализации антитела человеческим макрофагом;
- (c) активации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации;
- (d) пролиферации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации; и
- (e) стимуляции цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

[0204] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело селективно связывается с человеческими CD163⁺ иммуносупрессивными миелоидными клетками в популяции опухоль-ассоциированных макрофагов (ТАМ), при этом антитело специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на макрофагах M2, и снижает иммуносупрессивную активность популяции ТАМ.

[0205] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело селективно связывается с человеческими CD163⁺ иммуносупрессивными миелоидными клетками в опухолевом микроокружении, при этом антитело специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на макрофагах M2, и уменьшает опосредованную макрофагами M2 супрессию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело является человеческим, гуманизированным или химерным. В соответствии с некоторыми

вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело представляет собой его антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются описанным в настоящем документе образом.

[0206] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела по настоящему изобретению представляют собой интактные молекулы иммуноглобулина, такие как, например, человеческое антитело, а также те части гуманизированной молекулы Ig, которые содержат антигенсвязывающий сайт (т. е. паратоп) или единственную тяжелую цепь и единственную легкую цепь, включая те части, которые известны в настоящей области как Fab, Fab', F(ab)', F(ab')₂, Fd, scFv, переменный домен тяжелой цепи, переменный домен легкой цепи, переменный NAR-домен, биспецифический scFv, биспецифический Fab₂, триспецифический Fab₃, одноцепочечный связывающий полипептид, dAb-фрагмент, диатело и другие, также называемые антигенсвязывающими фрагментами. При конструировании молекулы иммуноглобулина или ее фрагментов переменные участки или их части, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, сливаются, соединяют или иным образом присоединяют к одному или более константным участкам или их частям с получением любых антител или их фрагментов, описанных в настоящем документе. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент любого одного из описанных выше антител представляет собой Fab, Fab', Fd, F(ab')₂, Fv, scFv, одноцепочечный связывающий полипептид (например, scFv с Fc-частью) или любой другой его функциональный фрагмент, который описан в настоящем документе.

[0207] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела по настоящему изобретению относятся к любому классу иммуноглобулинов и, следовательно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, имеют тяжелую цепь гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гамма цепь представляет собой гамма 1, гамма 2, гамма 3, или гамма 4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, альфа цепь представляет собой альфа 1 или альфа 2.

[0208] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело по настоящему изобретению представляет собой иммуноглобулин IgG. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела по настоящему изобретению относятся к любому подклассу IgG. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело представляет собой IgG1.

[0209] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела по настоящему изобретению содержат переменную легкую цепь, которая является либо

каппа, либо лямбда. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, цепь лямбда относится к любому подклассу, в том числе, например, лямбда 1, лямбда 2, лямбда 3 и лямбда 4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь является каппа.

[0210] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемые в настоящем документе антитела содержат человеческий переменный каркасный участок и человеческий константный участок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела содержат человеческий переменный каркасный участок легкой цепи и человеческий константный участок легкой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела содержат человеческий переменный каркасный участок тяжелой цепи и человеческий константный участок тяжелой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела содержат человеческий переменный каркасный участок легкой цепи, человеческий константный участок легкой цепи, человеческий переменный каркасный участок тяжелой цепи и человеческий константный участок тяжелой цепи.

[0211] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, человеческой константный участок тяжелой цепи представляет собой IgG1 или IgG4 или их фрагмент. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, константный участок тяжелой цепи представляет собой человеческий IgG1. Одним примером антитела, имеющего IgG1, является AB101. AB101 содержит легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 10, которая описана ниже в примере 1.

[0212] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, константный участок тяжелой цепи представляет собой человеческий IgG1, который уменьшает ADCC-функцию (т. е. Fc-null антитело). Иллюстративным Fc-null антителом по настоящему изобретению является AB102. AB102 содержит легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 11, которая содержит переменные участки AB101 и в которой константный участок тяжелой цепи представляет собой Fc-null форму человеческого IgG1. AB102 дополнительно описано в представленных ниже примерах.

[0213] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, константный участок тяжелой цепи представляет собой человеческий IgG1, модифицированный для усиления ADCC-функции. Иллюстративным антителом по настоящему изобретению, обладающим усиленной ADCC-функцией, является AB103. AB103 содержит легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, содержащую

последовательность под SEQ ID NO: 12, которая содержит переменные участки AB101 и в которой константный участок тяжелой цепи представляет собой усиленную ADCC-форму человеческого IgG1.

[0214] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, константный участок тяжелой цепи является человеческим IgG4. Иллюстративным антителом по настоящему изобретению, имеющим IgG4, является AB104. AB104 содержит легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 13, которая содержит переменные участки AB101 и в которой константный участок тяжелой цепи представляет собой человеческий IgG4.

[0215] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело по настоящему изобретению содержит человеческий переменный каркасный участок и мышиный константный участок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело по настоящему изобретению содержит человеческий переменный каркасный участок тяжелой цепи и мышиный константный участок тяжелой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело по настоящему изобретению содержит человеческий переменный каркасный участок легкой цепи, мышиный константный участок легкой цепи, человеческий переменный каркасный участок тяжелой цепи и мышиный константный участок тяжелой цепи.

[0216] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, константный участок тяжелой цепи представляет собой мышиный IgG2A. Одним примером антитела, имеющего мышиный IgG2A, является AB211. AB211 содержит легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 14, и тяжелую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 15, которая содержит человеческие переменные участки AB101 и в которой константный участок тяжелой цепи представляет собой Fc-null форму мышиного IgG1, а константный участок легкой цепи является мышиным каппа. AB211 дополнительно описано в представленных ниже примерах.

[0217] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, константный участок тяжелой цепи представляет собой мышиный IgG2A. Одним примером антитела, имеющего тяжелую цепь мышиного IgG2A, является AB212. AB212 содержит легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 14, и тяжелую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 16, которая содержит человеческие переменные участки AB101 и в которой константный участок тяжелой цепи представляет собой мышиный IgG2a, а константный участок легкой цепи является мышиным каппа. AB212 дополнительно описано в представленных ниже примерах.

[0218] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента с белком CD163, экспрессируемым на макрофагах M2, частично (например, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или любое указанное число) или полностью модулирует биологическую функцию, таких макрофагов M2. Активность антитела или антигенсвязывающего фрагмента, например, определяют с помощью анализа *in vitro* и/или *in vivo* с помощью признанных в настоящей области техники анализов, таких как описанные в настоящем документе или иным образом известные в настоящей области техники.

[0219] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела по настоящему изобретению дополнительно модифицируют для изменения специфических свойств антитела при сохранении требуемой функциональности, если это необходимо. Например, в соответствии с одним вариантом осуществления, антитело по настоящему изобретению модифицируют для изменения фармакокинетических свойств антитела, включая без ограничения стабильность *in vivo*, растворимость, биодоступность или время полужизни.

[0220] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело характеризуется константой диссоциации (K_d) от около 1 до около 10 пМ, от около 10 до около 20 пМ, от около 1 до около 29 пМ, от около 30 до около 40 пМ, от около 10 до около 100 пМ или от около 20 до около 500 пМ.

[0221] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело характеризуется константой диссоциации (K_d) менее чем около 500 пМ, менее чем около 400 пМ, менее чем около 300 пМ, менее чем около 200 пМ, менее чем около 100 пМ, менее чем около 75 пМ, менее чем около 50 пМ, менее чем около 30 пМ, менее чем около 25 пМ, менее чем около 20 пМ, менее чем около 18 пМ, менее чем около 15 пМ, менее чем около 10 пМ, менее чем около 75 пМ, менее чем около 5 пМ, менее чем около 2,5 пМ или менее чем около 1 пМ.

[0222] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело характеризуется аффинностью к белку или пептиду huCD163 от около 10^{-9} до около 10^{-14} , от около 10^{-10} до около 10^{-14} , от около 10^{-11} до около 10^{-14} , от около 10^{-12} до около 10^{-14} , от около 10^{-13} до около 10^{-14} , от около 10^{-10} до около 10^{-11} , от около 10^{-11} до около 10^{-12} , от около 10^{-12} до около 10^{-13} или от 10^{-13} до около 10^{-14} .

[0223] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело имеет более одного сайта связывания. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, сайты связывания идентичны друг другу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, сайты связывания отличаются друг

от друга. Встречающийся в природе человеческий иммуноглобулин обычно имеет два идентичных сайта связывания, в то время как, например, модифицированные методами инженерии антитела имеют два или более разных сайтов связывания.

[0224] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело по настоящему изобретению является биспецифическим или мультиспецифическим. Биспецифические антитела представляют собой антитела, обладающие специфичностью связывания по меньшей мере с двумя разными эпитопами. Иллюстративные биспецифические антитела, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связываются с двумя разными эпитопами одного антигена. Другие такие антитела, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, сочетают в себе сайт связывания первого антигена с сайтом связывания второго антигена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, биспецифические антитела связывают по меньшей мере два различных эпитопа и имеют константные домены, которые связываются с Fc-рецепторами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывание одного или более эпитопов биспецифических антител происходит одновременно со связыванием константных доменов биспецифических антител с Fc-рецепторами.

[0225] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело по настоящему изобретению имеет две или более валентности, такие антитела также называют мультивалентными. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело по настоящему изобретению является триспецифическим. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мультивалентное антитело интернализируется (и/или катаболизируется) быстрее, чем бивалентное антитело, клеткой, экспрессирующей антиген, с которым связываются антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела по настоящему изобретению представляют собой мультивалентные антитела с тремя или более антигенсвязывающими сайтами (например, четырехвалентные антитела). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мультивалентные антитела по настоящему изобретению получают путем рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мультивалентное антитело содержит домен димеризации и три или более антигенсвязывающих сайтов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, домен димеризации содержит Fc-участок или шарнирный участок (или состоит из него). В данном сценарии антитело будет содержать Fc-участок и три или более антигенсвязывающих сайтов, расположенных на аминоконце Fc-участка. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мультивалентное антитело по настоящему изобретению содержит от около трех до около восьми, но

предпочтительно четыре антигенсвязывающих сайта. Мультивалентное антитело содержит по меньшей мере одну полипептидную цепь (и предпочтительно две полипептидные цепи), причем полипептидная(-ые) цепь(-и) содержит(-ат) два или более переменных участков. Например, полипептидная(-ые) цепь(-и) содержит(-ат) $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, причем $VD1$ представляет собой первый переменный участок, $VD2$ представляет собой второй переменный участок, Fc представляет собой одну полипептидную цепь Fc -участка, $X1$ и $X2$ представляют собой аминокислоту или полипептид, а n равно 0 или 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, каждая из полипептидных цепей независимо содержит следующее: цепь V_H-C_H1 -гибкий линкер- V_H-C_H1-Fc -участок; или цепь $V_H-C_H1-V_H-C_H1-Fc$ -участок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мультивалентное антитело по настоящему документу дополнительно содержит по меньшей мере два (а предпочтительно четыре) полипептида переменного участка легкой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мультивалентное антитело по настоящему документу содержит от около двух до около восьми полипептидов переменного участка легкой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, описываемые в настоящем документе полипептиды переменного участка легкой цепи содержат переменный участок легкой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, описываемые в настоящем документе полипептиды переменного участка легкой цепи дополнительно содержат домен C_L .

[0226] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело по настоящему изобретению сконструировано таким образом, чтобы оно укладывалось в мультивалентные формы, что, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, улучшает аффинность связывания, специфичность и/или увеличивает время полужизни в крови. Мультивалентные формы антител получают, например, способами, известными из уровня техники.

[0227] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело по настоящему изобретению представляет собой белок слияния $SMIP$ или иммуноглобулинового домена связывания, специфичный в отношении целевого белка. Такие конструкции представляют собой одноцепочечные полипептиды, содержащие антигенсвязывающие домены, слитые с доменами иммуноглобулина, необходимые для выполнения эффекторных функций антитела.

[0228] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело по настоящему изобретению содержит одноцепочечный связывающий полипептид, имеющий переменный участок тяжелой цепи и/или переменный участок легкой цепи, который связывает эпитоп, раскрытый в настоящем документе, и необязательно имеет Fc -участок

иммуноглобулина. Такая молекула представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), необязательно обладающий эффекторной функцией или увеличенным временем полужизни за счет присутствия Fc-участка иммуноглобулина.

Антитела к CD163

[0229] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе представлены антитела, которые специфически связываются с белком CD163. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающие CD163 антитела содержат по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающие CD163 антитела содержат по меньшей мере одну тяжелую цепь, содержащую переменный домен тяжелой цепи (VH), и по меньшей мере одну легкую цепь, содержащую переменный домен легкой цепи (VL). Каждый VH и VL содержит три определяющих комплементарность участка (CDR). Аминокислотные последовательности VH и VL и CDR определяют специфичность связывания антигена и силу связывания антигена у антитела. Домены VH и VL кратко описаны в **таблице 1**. Легкие цепи и тяжелые цепи кратко описаны в **таблице 2**. Аминокислотные последовательности CDR кратко описаны в **таблице 3**.

[0230] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело представляет собой моноклональное антитело. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело выбрано из цельного иммуноглобулина, scFv, Fab, F(ab')₂ или связанной дисульфидной связью Fv. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело представляет собой IgG или IgM. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело является гуманизированным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело является химерным.

Вариабельные домены антител к CD163**Таблица 1. Последовательности переменных доменов антитела к CD163**

Таблица 1. Последовательности переменного домена антитела к CD163		
	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
Вариабельный домен легкой цепи	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQ QSYSTPRGTFGQGTKVEIKR	7
Вариабельный домен тяжелой цепи	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYYS EYYYYGMDVWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF	8

[0231] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие переменный домен легкой цепи (VL), имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, VL имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, VL имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 7.

[0232] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, VH имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, VH имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 8.

[0233] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие переменный домен легкой цепи (VL), имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70%

идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен тяжелой цепи (VH), имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, VL имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 7, и VH имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, VL имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 7, и VH имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 8.

Легкая цепь и тяжелая цепь антитела к CD163

Таблица 2. Последовательности легкой цепи и тяжелой цепи антитела к CD163

Таблица 2. Последовательности легкой цепи и тяжелой цепи антитела к CD163		
	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
Легкая цепь AB101, AB102, AB103 или AB104 (hIgG1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQ QSYSTPRGTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	9
Тяжелая цепь AB101 (hIgG1)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGGYYSEYYYYGMDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
Тяжелая цепь AB102 (hIgG1 ADCC-Null)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGGYYSEYYYYGMDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV	11

Таблица 2. Последовательности легкой цепи и тяжелой цепи антитела к CD163		
	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
	EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Тяжелая цепь AB103 (hIgG1 eADCC)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYYSEYYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPPEEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	12
Тяжелая цепь AB104 (hIgG4)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYYSEYYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVEPKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	13
Легкая цепь AB211 или AB212 (muKappa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYSTPRGTFGQGTKVEIKRTDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	14
Тяжелая цепь AB211 (muIgG2A)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYYSEYYYYGMDVWGQGTITVTVSSKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNLSGLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSI TCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	15

Таблица 2. Последовательности легкой цепи и тяжелой цепи антитела к CD163		
	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
Тяжелая цепь AB212 (muIgG2A ADCC-Null)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGGYYSEYYYYGMDVWG QGTTVTVSSKTTAPSVYPLAPVCGD TTGSSVTLGCLVKGYFPE PVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQS ITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLEGGPSVF IFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVH TAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKAFACAVNNK DLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRV EKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	16

[0234] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9.

[0235] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 10. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 10. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 10.

[0236] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 11. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 11. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 11.

[0237] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 12. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 12. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 12.

[0238] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 13. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 13. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 13.

[0239] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие легкую цепь, имеющую аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 10. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 10. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 10.

[0240] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 11. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 11. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 11.

[0241] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 12. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 12. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 12.

[0242] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 13. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 13. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9, и тяжелая цепь имеет аминокислотную

последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 13.

[0243] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 14. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 14. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 14.

[0244] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 15. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 15. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 15.

[0245] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 16. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 16. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 16.

[0246] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 14, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 15. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 14, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 15. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 14, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 15.

[0247] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 14, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 16. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 14, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 16. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 14, и тяжелая цепь имеет

аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 16.

Иллюстративные определяющие комплементарность участки антитела к CD163

Таблица 3. Последовательности CDR антитела к CD163

Таблица 3. Последовательности CDR антитела к CD163		
	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
CDR1 легкой цепи	RASQSISSYLN	1
CDR2 легкой цепи	AASSLQS	2
CDR3 легкой цепи	QQSYSTPRGT	3
CDR1 тяжелой цепи	SYAMH	4
CDR2 тяжелой цепи	VISYDGSNKYYADSVKG	5
CDR3 тяжелой цепи	ENVRPYYDFWSGYYSEYYYYGMDV	6

[0248] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие по меньшей мере один из CDR1 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, CDR2 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, и CDR3 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела, связывающиеся с CD163, содержат по меньшей мере один из CDR1 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, CDR2 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, и CDR3 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%

идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела, связывающиеся с CD163, содержат по меньшей мере один из CDR1 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, CDR2 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, и CDR3 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 3.

[0249] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие по меньшей мере один из CDR1 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 5, CDR3 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела, связывающиеся с CD163, содержат по меньшей мере один из CDR1 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 5, CDR3 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела, связывающиеся с CD163, содержат по меньшей мере один из CDR1 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 5, CDR3 тяжелой цепи, имеющего

аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 6.

[0250] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты антитела, содержащие по меньшей мере один из CDR1 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, CDR2 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, CDR3 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 3, CDR1 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела, связывающиеся с CD163, содержат по меньшей мере один из CDR1 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, CDR2 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, CDR3 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 3, CDR1 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности,

изложенной под SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела, связывающиеся с CD163, содержат по меньшей мере один из CDR1 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, CDR2 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, CDR3 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 3, CDR1 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 6.

Аффинность связывания и иммунореактивность

[0251] Аффинность связывания и/или авидность антител или их антигенсвязывающих фрагментов улучшают путем модификации каркасных участков. Любые подходящие способы модификации каркасных участков известны из уровня техники и предусмотрены настоящим документом. Выбор одного или более соответствующих аминокислотных положений каркасного участка для изменения зависит от ряда критериев. Одним из критериев выбора соответствующих аминокислот каркасного участка для замены является, например, относительная разница в аминокислотных остатках каркасного участка между донорской и акцепторной молекулами. Выбор соответствующих положений каркасного участка для изменения с использованием данного подхода обладает тем преимуществом, что позволяет избежать любой субъективной погрешности в определении остатка или любой погрешности во вкладе остатка в аффинность связывания CDR.

[0252] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающие взаимодействия проявляются в виде межмолекулярного контакта с одним или более аминокислотными остатками одного или более CDR. В связывании с антигеном

задействованы, например, CDR или пара CDR или, в некоторых случаях, взаимодействия до всех шести CDR цепей V_H и V_L .

[0253] Аффинность связывания и авидность антител или их антигенсвязывающих фрагментов можно измерить путем измерения поверхностного плазмонного резонанса (SPR), с помощью AlphaLisa-анализов или проточной цитометрии равновесной константы диссоциации (K_D).

[0254] В настоящем документе раскрыты антитела, которые специфически связываются с человеческим CD163 с K_D от 0,1 нМ до 1000 нМ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела специфически связываются с человеческим CD163 с K_D от около 0,1 до около 500 нМ, от около 0,1 до около 100 нМ, от около 0,1 до около 50 нМ, от около 0,1 до около 20 нМ, от около 0,1 до около 10 нМ, от около 0,1 до около 5 нМ, от около 0,1 до около 2 нМ, от около 0,1 до около 1 нМ, от около 0,1 до около 0,5 нМ, от около 0,5 до около 1000 нМ, от около 0,5 до около 500 нМ, от около 0,5 до около 100 нМ, от около 0,5 до около 50 нМ, от около 0,5 до около 20 нМ, от около 0,5 до около 10 нМ, от около 0,5 до около 5 нМ, от около 0,5 до около 2 нМ, от около 0,5 до около 1 нМ, от около 1 до около 1000 нМ, от около 1 до около 500 нМ, от около 1 до около 100 нМ, от около 1 до около 50 нМ, от около 1 до около 20 нМ, от около 1 до около 10 нМ, от около 1 до около 5 нМ, от около 1 до около 2 нМ, от около 2 до около 1000 нМ, от около 2 до около 500 нМ, от около 2 до около 100 нМ, от около 2 до около 50 нМ, от около 2 до около 20 нМ, от около 2 до около 10 нМ, от около 2 до около 5 нМ, от около 5 до около 1000 нМ, от около 5 до около 500 нМ, от около 5 до около 100 нМ, от около 5 до около 50 нМ, от около 5 до около 20 нМ, от около 5 до около 10 нМ, от около 10 до около 1000 нМ, от около 10 до около 500 нМ, от около 10 до около 100 нМ, от около 10 до около 50 нМ, от около 10 до около 20 нМ, от около 20 до около 1000 нМ, от около 20 до около 500 нМ, от около 20 до около 100 нМ, от около 20 до около 50 нМ, от около 50 до около 1000 нМ, от около 50 до около 500 нМ, от около 50 до около 100 нМ, от около 100 до около 500 нМ, от около 100 до около 1000 нМ, от около 500 до около 1000 нМ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела специфически связываются с человеческим CD163 с K_D , составляющей 1,8 нМ, 12 нМ, 45 нМ или 89 нМ.

[0255] Раскрываемые в настоящем документе антитела связывается с миелоидным фагоцитарным рецептором CD163, который в высокой степени экспрессируется на опухоль-ассоциированных макрофагах (ТАМ) и был детектирован на различных опухолевых клетках различного происхождения. Экспрессию CD163 в опухолевой ткани связывают с плохим прогнозом. Аффинность связывания между раскрываемыми в

настоящем документе антителами и поляризованными посредством IL-10 макрофагами M2c измеряют с помощью анализов методом проточной цитометрии.

[0256] В настоящем документе раскрыты антитела, которые специфически связываются с макрофагами M2c с K_D от 0,1 нМ до 1000 нМ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела специфически связываются с макрофагами M2c с K_D от около 0,1 до около 500 нМ, от около 0,1 до около 100 нМ, от около 0,1 до около 50 нМ, от около 0,1 до около 20 нМ, от около 0,1 до около 10 нМ, от около 0,1 до около 5 нМ, от около 0,1 до около 2 нМ, от около 0,1 до около 1 нМ, от около 0,1 до около 0,5 нМ, от около 0,5 до около 1000 нМ, от около 0,5 до около 500 нМ, от около 0,5 до около 100 нМ, от около 0,5 до около 50 нМ, от около 0,5 до около 20 нМ, от около 0,5 до около 10 нМ, от около 0,5 до около 5 нМ, от около 0,5 до около 2 нМ, от около 0,5 до около 1 нМ, от около 1 до около 1000 нМ, от около 1 до около 500 нМ, от около 1 до около 100 нМ, от около 1 до около 50 нМ, от около 1 до около 20 нМ, от около 1 до около 10 нМ, от около 1 до около 5 нМ, от около 1 до около 2 нМ, от около 2 до около 1000 нМ, от около 2 до около 500 нМ, от около 2 до около 100 нМ, от около 2 до около 50 нМ, от около 2 до около 20 нМ, от около 2 до около 10 нМ, от около 2 до около 5 нМ, от около 5 до около 1000 нМ, от около 5 до около 500 нМ, от около 5 до около 100 нМ, от около 5 до около 50 нМ, от около 5 до около 20 нМ, от около 5 до около 10 нМ, от около 10 до около 1000 нМ, от около 10 до около 500 нМ, от около 10 до около 100 нМ, от около 10 до около 50 нМ, от около 10 до около 20 нМ, от около 20 до около 1000 нМ, от около 20 до около 500 нМ, от около 20 до около 100 нМ, от около 20 до около 50 нМ, от около 50 до около 1000 нМ, от около 50 до около 500 нМ, от около 50 до около 100 нМ, от около 100 до около 500 нМ, от около 100 до около 1000 нМ, от около 500 до около 1000 нМ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела специфически связываются с макрофагами M2c с K_D , составляющей 7,7 нМ.

Связывание эпитопов

[0257] Эпитопы антител могут представлять собой линейную пептидную последовательность (т. е. «непрерывную») или могут состоять из несмежных аминокислотных последовательностей (т. е. могут представлять собой «конформационные» или «прерывистые» последовательности). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело распознает одну или более аминокислотных последовательностей; следовательно, эпитоп определяет более одной отдельной аминокислотной последовательности. Эпитопы, распознаваемые антителами, определяют, например, методами картирования пептидов и анализа последовательностей, хорошо известными специалистам в настоящей области техники. Связывающие

взаимодействия проявляются в виде межмолекулярных контактов с одним или более аминокислотными остатками CDR.

[0258] Человеческий белок CD163 представляет собой белок, который у людей кодируется геном CD163. Аминокислотная последовательность человеческого CD163 имеет следующий вид:

MSKLRMVLLLEDSGSADFRRHFVNLSPTITVLLLSACFVTSSLGGTDKELRLVDGENK
CSGRVEVKVQEEWGTVCNNGWSMEAVSVICNQLGCPTAIKAPGWANSSAGSGRIWMD
HVSCRGNESALWDCKHDGWGKHSNCTHQQDAGVTCSDGSNLEMRLTRGGNMCSGRI
EIKFQGRWGTVCDDNFNIDHASVICRQLECGSAVSFSGSSNFGEGSGPIWFDDLICNGNE
SALWNCKHQGWGKHNCDAEDAGVICSKGADLSRLVDGVTECSGRLEVRFQGEWG
TICDDGWDSDYDAAVACKQLGCPTAVTAIGRVNASKGFGHIWLDSVSCQGHEPAIWQCK
HHEWGKHHCNHNEDAGVTCSDGSDLELRLRGGGSRCAGTVEVEIQRLLGKVCDRGWG
LKEADVVCRLGCGSALKTSYQVYSKIQATNTWLFLSSCNGNETSLWDCKNWQWGGL
TCDHYEEAKITCSAHREPRLVGGDIPCSGRVEVKHGDWTWGSICDSDFSLEAASVLCRELQ
CGTVVSILGGAHFGEGNGQIWAEEFQCEGHESHLSCPVAPRPEGTCSHSRDVGVCVSR
YTEIRLVNGKTPCEGRVELKTLGAWGSLCNSHWDIEDAHVLCQQLKCGVALSTPGGAR
FGKGNGQIWRHMFHCTGTQHMGDPCVTALGASLCPSEQVASVICSGNQSQTLSSCNSS
SLGPTRPTIPEESAVACIESGQLRLVNGGGRCAGRVEIYHEGSGWTICDDSWDLSDAHV
VCRQLGCGEAINATGSAHFGEGTGPIWLDEMCKCNGKESRIWQCHSHGWGQQNCRHKE
DAGVICSEFMSLRLTSEASREACAGRLEV FYNGAWGTVGKSSMSETTVGVVCRQLGCA
DKGKINPASLDKAMSIPMWVDNVQCPKGPDTLWQCPSSPWEKRLASPSEETWITCDNKI
RLQEGPTSCSGRVEIWHGGSGWGTVCDDSWDLDDAQVVCQQLGCGPALKAFKEAEFGQ
GTGPIWLNEVKCKGNESSLWDCPARRWGHSECGHKEDAAVNCTDISVQKTPQKATTG
RSSRQSSFIAVGILGVVLLAIFVALFFLTKKRRQRQLAVSSRGENLVHQIQYREMNSCL
NADDLDLMNSSGGHSEPH (SEQ ID NO: 17).

[0259] В настоящем документе раскрыты антитела, которые специфически связываются с эпитопом в человеческом CD163. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемое в настоящем документе антитело связывается с эпитопом, содержащим несмежные аминокислотные последовательности. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело связывается с эпитопом человеческого CD163, содержащим аминокислотную последовательность IGRVNASKGFGHIWLDSVSCQGHEPAI (SEQ ID NO: 18). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело связывается с эпитопом человеческого CD163, содержащим аминокислотную последовательность VVCRQLGCGSA (SEQ ID NO: 19). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело связывается с эпитопом

человеческого CD163, содержащим аминокислотную последовательность WDCKNWQWGGLTCD (SEQ ID NO: 20). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело связывается с эпитопом человеческого CD163, содержащим аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:18-20.

[0260] Также в настоящем документе раскрыты дополнительные антитела, которые специфически связываются с раскрываемым в настоящем документе эпитопом. Такие дополнительные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с раскрываемым в настоящем документе эпитопом, можно выявить с помощью методик, известных из уровня техники. Например, для разработки эпитоп-специфических антител применяют вычислительный подход. Nimrod et al., Computational Design of Epitope-Specific Functional Antibodies, Cell Reports 25, 2121-2131, Nov. 20, 2018, (включенная в настоящий документ посредством ссылки). Для выявления антител, которые связываются со специфическими эпитопами, из библиотеки антител, которые связываются с данным антигеном, можно применять другой подход, такой как заключающийся в следующем: сначала в целевой эпитоп встраивают неканонические аминокислоты (ncAA), *p*-бензоил-L-фенилаланин (pBpa) и *p*-азидо-L-фенилаланин (pAzF), а затем отбирают антитела, которые перекрестно связываются с эпитопом со встроенными ncAA после УФ-облучения. Поскольку перекрестное связывание происходит только тогда, когда расстояние между антителом и эпитопом достаточно близко, такой способ позволяет эффективно отбирать антитела, которые специфически связываются с целевым эпитопом. Chen et al. Epitope-directed antibody selection by site-specific photocrosslinking, Science Advances, Vol. 6, no. 14, eaaz7825, 01 апреля 2020 года (включена в настоящий документ в посредством ссылки).

Модификации антител

[0261] Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты в некоторых случаях модифицируют с использованием известных из уровня техники методик для различных целей, таких как, например, добавление полиэтиленгликоля (PEG). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, модификация посредством PEG (пегилирование) приводит к одному или более из следующих факторов: увеличенному времени пребывания в кровотоке, улучшенной растворимости, повышенной устойчивости к протеолизу, сниженной антигенности и иммуногенности, улучшенной биодоступности, сниженной токсичности, улучшенной стабильности и упрощения формирования составов.

[0262] В некоторых случаях, когда антигенсвязывающий фрагмент не содержит Fc-фрагмент, Fc-фрагмент добавляют (например, рекомбинантными методами) к фрагменту,

например, для увеличения времени полужизни антигенсвязывающего фрагмента в системе кровотока при введении субъекту. Выбор подходящего Fc-участка и способы включения таких фрагментов известны из уровня техники. Встраивание Fc-участка IgG в представляющий интерес полипептид с целью увеличения его периода полужизни в кровотоке, но без потери его биологической активности, осуществляют, например, с помощью традиционных методик, известных из уровня техники. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, Fc-части антител дополнительно модифицируют для увеличения времени полужизни антигенсвязывающего фрагмента в системе кровотока при введении субъекту. Модификации, например, определяют с помощью традиционных для данной области техники средств.

[0263] Кроме того, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты продуцируют или экспрессируют таким образом, чтобы они не содержали фукозу на своих сложных сахарных цепях, связанных с N-гликозидом. Известно, что удаление фукозы из сложных сахарных цепей, связанных с N-гликозидом, увеличивает эффекторные функции антител и антигенсвязывающих фрагментов, в том числе без ограничения антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Аналогичным образом, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают эпитоп, в некоторых случаях присоединены на своем C-конце ко всей или части тяжелой цепи иммуноглобулина, полученной из любого изотипа антитела, например, IgG, IgA, IgE, IgD и IgM, и любого из подклассов изотипов, в частности IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[0264] Кроме того, описываемые в настоящем документе антитела или антигенсвязывающие фрагменты также модифицированы таким образом, что, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, они способны преодолевать гематоэнцефалический барьер. Такая модификация описываемых в настоящем документе антител или антигенсвязывающих фрагментов позволяет производить лечение заболеваний головного мозга, таких как мультиформная глиобластома (GBM). Иллюстративные модификации, позволяющие белкам, таким как антитела или антигенсвязывающие фрагменты, преодолевать гематоэнцефалический барьер, описаны в патентной публикации США № 2007/0082380.

[0265] Было показано, что гликозилирование иммуноглобулинов оказывает значительное влияние на их эффекторные функции, структурную стабильность и скорость секреции антителопродуцирующими клетками. Углеводные группы, ответственные за такие свойства, обычно присоединены к константным (C) участкам антител. Например, гликозилирование IgG по аспарагину 297 в домене C_H2 необходимо для полной

способности IgG активировать классический путь комплементзависимого цитолиза (Tao and Morrison, *J Immunol* 143:2595 (1989)). Гликозилирование IgM по аспарагину 402 в домене C_H3 необходимо для правильной сборки и цитолитической активности антитела (Muraoka and Shulman, *J Immunol* 142:695 (1989)). Удаление сайтов гликозилирования по положениям 162 и 419 в доменах C_H1 и C_H3 антитела IgA приводит к внутриклеточной деградации и по меньшей мере 90% ингибированию секреции (Taylor and Wall, *Mol Cell Biol* 8:4197 (1988)). Кроме того, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты продуцируют или экспрессируют таким образом, чтобы они не содержали фукозу на своих сложных сахарных цепях, связанных с N-гликозидом. Известно, что удаление фукозы из сложных сахарных цепей, связанных с N-гликозидом, увеличивает эффекторные функции антител и антигенсвязывающих фрагментов, в том числе без ограничения антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Такие «дефукозилированные» антитела и антигенсвязывающие фрагменты получают, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, с помощью различных систем, предусматривающих использование методик молекулярного клонирования, которые известны из уровня техники, включая без ограничения трансгенных животных, трансгенных растений или клеточных линий, которые были модифицированы методами генной инженерии так, чтобы они больше не содержали ферменты и биохимические пути, необходимые для включения фукозы в сложные сахарные цепи, связанные с N-гликозидом (также известные как животные, растения или клетки, нокаутные по фукозилтрансферазе). Неограничивающие примеры клеток, которые методами инженерии модифицированы в клетки с нокаутом по фукозилтрансферазе, включают клетки CHO, клетки SP2/0, клетки NS0 и клетки YB2/0.

[0266] Также наблюдалось гликозилирование иммуноглобулинов в вариабельном (V) участке. У Sox и Hood сообщалось, что около 20% человеческих антител гликозилированы в V-участке (*Proc Natl Acad Sci USA* 66:975 (1970)). Полагают, что гликозилирование V-домена возникает в результате случайного появления сигнала N-связанного гликозилирования Asn-Xaa-Ser/Thr в последовательности V-участка, и в настоящей области не было признано, что оно играет определенную роль в функции иммуноглобулина.

[0267] Гликозилирование по остатку каркаса вариабельного домена в некоторых случаях изменяет связывающее взаимодействие антитела с антигеном. Настоящее изобретение относится к критериям, по которым выбирают ограниченное количество аминокислот в каркасе или CDR гуманизированной цепи иммуноглобулина для мутации

(например, путем замены, делеции или добавления остатков) для повышения аффинности антитела.

[0268] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в Fc-участок антитела или Fc-содержащего полипептида вводят один или несколько цистеиновых остатков или удаляют из него, тем самым устраняя или увеличивая образование межцепочечных дисульфидных связей в данном участке. Гомодимерное специфически связывающее средство или антитело, полученное с помощью таких способов, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, характеризуются улучшенной способностью к интернализации и/или повышенным комплементопосредованным цитолизом клеток и антителозависимом клеточной цитотоксичностью (ADCC).

[0269] Было показано, что последовательности внутри CDR вызывают связывание антитела с МНС II класса и в некоторых случаях запускают нежелательный ответ с участием хелперных Т-клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, консервативная замена позволяет антителу сохранять связывающую активность, но при этом снижает его способность вызывать нежелательный Т-клеточный ответ. В соответствии с одним вариантом осуществления, удаляют одну или более из 20 N-концевых аминокислот тяжелой или легкой цепи.

[0270] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, молекулы антител продуцируются с измененной углеводной структурой, что приводит к измененной эффекторной активности, в том числе молекулы антител с отсутствующим или сниженным фукозилированием, которые характеризуются улучшенной ADCC-активностью. Из уровня техники известны различные способы достижения этого. Так, например, эффекторная ADCC-активность опосредуется связыванием молекулы антитела с FcγRIII-рецептором, что, как было показано, зависит от углеводной структуры N-гликозилирования по Asn-297 в домене C_H2. Нефукозилированные антитела связываются с данным рецептором с повышенной аффинностью и запускают FcγRIII-опосредованные эффекторные функции более эффективно, чем нативные фукозилированные антитела. Некоторые штаммы клеток-хозяев, например, линия клеток Lec13 или крысиной гибридомы YB2/0, естественным образом продуцируют антитела с более низким уровнем фукозилирования. Было также установлено, что ADCC-активность увеличивает повышение уровня биантенарного углевода, например, за счет рекомбинантной продукции антител в клетках, которые сверхэкспрессируют фермент GnTIII. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, для повышения ADCC-активности достаточным является отсутствие лишь одного из двух остатков фукозы.

[0271] Сюда также включены ковалентные модификации антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, их получают путем химического синтеза или ферментативным или химическим расщеплением антитела, если такое применимо. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, другие типы ковалентных модификаций вводят путем введения целевых аминокислотных остатков в реакцию с органическим дериватирующим средством, которое способно вступать в реакцию с выбранными боковыми цепями или N- или C-концевыми остатками.

[0272] Цистеинильные остатки чаще всего вводят в реакцию с альфа-галогенацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, с получением карбоксиметильных или карбоксиамидометильных производных. Цистеинильные остатки также дериватируют с помощью реакции с бромтрифторацетоном, альфа-бром-бета-(5-имидозоил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, *p*-хлорртутьбензоатом, 2-хлорртуть-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

[0273] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гистидильные остатки дериватируют с помощью реакции с диэтилпирокарбонатом при pH 5,5-7,0, поскольку данное средство является относительно специфичным для гистидильной боковой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, также применим пара-бромфенацилбромид; в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, реакцию проводят в 0,1 М какодилате натрия при pH 6,0.

[0274] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, лизинильные и аминоконцевые остатки вводят в реакцию с ангидридами янтарной или другой карбоновой кислоты. Дериватизация с помощью таких средств приводит к обращению заряда лизинильных остатков. К другим подходящим реагентам для дериватизации альфа-аминосодержащих остатков относятся сложные имидоэфиры, такие как метилпиколинимидат, пиридоксальфосфат, пиридоксаль, хлорборгидрид, тринитробензолсульфокислота, O-метилизомочевина, 2,4-пентандион и реакция с глиоксилатом, катализируемая трансаминазой.

[0275] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, аргинильные остатки модифицируют с помощью реакции с одним или несколькими традиционными реагентами, такими как фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Для дериватизации остатков аргинина необходимо, чтобы реакция проходила в щелочных условиях из-за высокого pKa гуанидиновой функциональной группы. Кроме того, эти

реагенты, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, вступают в реакцию с группами лизина, а также с эпсилон-аминогруппой аргинина.

[0276] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, производят специфическую модификацию тирозильных остатков с особым интересом к введению спектральных меток в тирозильные остатки посредством реакции с ароматическими соединениями диазония или тетранитрометаном. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, для получения О-ацетилтирозильных соединений и 3-нитропроизводных чаще всего применяют N-ацетилимидазол и тетранитрометан соответственно. Остатки тирозила иодируют с помощью ^{125}I или ^{131}I с получением меченных белков для применения в радиоиммуноанализе.

[0277] Карбоксильные боковые группы (аспартил или глутамил) специфически модифицируют с помощью реакции с карбодиимидами ($\text{RN}=\text{C}=\text{NR}'$), где R и R' представляют собой разные алкильные группы, такие как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азония-4,4-диметилпентил)карбодиимид. Более того, аспартильные и глутамильные остатки превращают в аспарагинильные и глутаминильные остатки с помощью реакции с ионами аммония.

[0278] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, глутаминильный и аспарагинильный остатки дезамидируют до соответствующих глутамильного и аспаратильного остатков соответственно. Такие остатки дезамидируют в нейтральных или щелочных условиях.

[0279] К остальным модификациям относятся гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп серильных или треонильных остатков, метилирование альфа-аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина, ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

[0280] Другой тип ковалентной модификации включает химическое или ферментативное связывание гликозидов со специфически связывающим средством или антителом. При таких процедурах нет необходимости в продуцировании полипептида или антитела в клетке-хозяине, которая обладает способностью к N- или O-связанному гликозилированию. В зависимости от применяемого способа связывания, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, один или несколько сахаров присоединяют к (a) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы у цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, таким как группы у серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим

остаткам, таким как остатки фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина.

[0281] Удаление каких-либо углеводных фрагментов, присутствующих на полипептиде или антителе, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, осуществляют химическим или ферментативным путем. Химическое дегликозилирование предусматривает воздействие на антитело соединением трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентным соединением. Такая обработка приводит к отщеплению большинства или всех сахаров, за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), при этом антитело остается нетронутым. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, ферментативное отщепление углеводных фрагментов на антителе осуществляют с помощью различных эндогликозидаз и экзогликозидаз.

[0282] Другой тип ковалентной модификации предусматривает связывание антитела с одним из ряда небелковых полимеров, например, полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем, полиоксиэтилированными полиолами, полиоксиэтилированным сорбитом, полиоксиэтилированной глюкозой, полиоксиэтилированным глицерином, полиоксиалкиленами или полисахаридными полимерами, такими как декстран. Такие способы известны из уровня техники.

[0283] Аффинность связывания предопределенного полипептидного антигена, как правило, модулируют путем введения одной или более мутаций в каркасную часть V-участка, как правило, в областях, прилегающих к одному или более CDR и/или в одном или более каркасных участках. Как правило, такие мутации предусматривают введение консервативных аминокислотных замен, которые либо разрушают, либо создают последовательности сайтов гликозилирования, но не оказывают существенного влияния на гидропатические структурные свойства полипептида. Как правило, избегают мутаций, которые вводят остаток пролина.

Эффекторные функции

[0284] Примеры эффекторных функций антител включают: связывание C1q и комплемент-зависимая цитотоксичность; связывание Fc-рецептора; антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; даунрегуляция рецепторов на клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора); и активация B-клеток. Как правило, к Fc-опосредованным функциям относятся связывание Fc-части антитела специализированными рецепторными молекулами, «Fc-рецепторами» или «FcR», экспрессируемыми клеткой, функция которой должна быть затронута.

[0285] IgG считается наиболее универсальным иммуноглобулином, поскольку, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, он осуществляет все функции молекул иммуноглобулина. IgG является основным Ig в сыворотке и единственным классом Ig, проникающим через плаценту. IgG также фиксирует комплемент, хотя подкласс IgG4 этого не делает. Макрофаги, моноциты, полиморфноядерные лейкоциты (PMN) и некоторые лимфоциты имеют рецепторы к Fc-участку IgG. Не все подклассы связываются одинаково хорошо: IgG2 и IgG4 не связываются с Fc-рецепторами. Следствием связывания с Fc-рецепторами на PMN, моноцитах и макрофагах является то, что клетка в некоторых случаях теперь лучше интернализирует антиген. IgG представляет собой опсонин, усиливающий фагоцитоз. Связывание IgG с Fc-рецепторами на других типах клеток приводит к активации других функций.

[0286] В соответствии с определенными вариантами осуществления, FcR представляет собой человеческий FcR с нативной последовательностью. Более того, предпочтительным FcR является тот, который связывает антитело IgG (гамма («γ») рецептор), и сюда относятся рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, в том числе аллельные варианты и формы, получаемые в результате альтернативного сплайсинга, таких рецепторов FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют схожие аминокислотные последовательности, различающиеся преимущественно своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) в своем цитоплазматическом домене.

[0287] «Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «ADCC» относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig связывается с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, натуральных киллерах (NK-клетках), нейтрофилах и макрофагах), что позволяет данным цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с несущей антиген целевой клеткой и впоследствии подвергают цитолизу целевую клетку цитотоксинами. Антитела «вооружают» цитотоксические клетки и необходимы для такого цитолиза. Первичные клетки для опосредования ADCC, т. е. NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Для оценки ADCC-активности представляющей интерес молекулы, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, проводят ADCC-анализ в условиях *in vitro*. К пригодным

эффекторным клеткам для таких анализов относятся мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и натуральные киллеры (NK-клетки).

[0288] В качестве альтернативы или дополнительно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, ADCC-активность представляющей интерес молекулы оценивают в условиях *in vivo*, например, на животной модели.

[0289] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела по настоящему изобретению связываются с белком поверхностной мембраны M2-подобных макрофагов и интернализируются ими. Считается, что такой процесс интернализации задействован в наблюдаемом изменении функциональных иммуносупрессивных характеристик таких клеток, т.е. дифференцировке клеток из статуса M2 в слабо активированное состояние без их цитолиза или ингибирования их пролиферации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, при интернализации антитела снижают экспрессию иммуносупрессивных растворимых факторов при одновременном повышении экспрессии растворимых факторов, которые интенсифицируют или стимулируют активность или пролиферацию Т-клеток, в том числе CD4⁺ хелперных Т-клеток и цитотоксических лимфоцитов.

[0290] При определенных терапевтических задачах процесс интернализации используют для цитолиза или снижения активности или пролиферации целевой клетки, которая экспрессирует белок CD163. Количество интернализированных молекул антител будет достаточным или надлежащим для цитолиза клетки или ингибирования ее роста, особенно раковой клетки. В зависимости от эффективности антитела или конъюгата антитела в некоторых случаях захвата одной молекулы антитела клеткой достаточно для цитолиза целевой клетки, с которой связывается антитело. Например, некоторые токсины обладают высокой эффективностью в отношении цитолиза, так чтобы интернализация одной молекулы токсина, конъюгированной с антителом, было достаточно для цитолиза целевой клетки.

[0291] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в настоящем документе, конъюгированы или связаны с терапевтическим фрагментом, визуализирующим или детектируемым фрагментом или аффинной меткой. Способы конъюгации или связывания полипептидов хорошо известны из уровня техники. К способам ассоциации (связывания) между соединениями и метками относятся любые средства, известные в настоящей области техники, в том числе без ограничения ковалентные и нековалентные взаимодействия, химическая конъюгация, а также рекомбинантные методики. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

конъюгированы или модифицированы рекомбинантными методами инженерии с включением аффинной метки (например, меткой для очистки). Аффинные метки, такие как, например, полигистидиновые (например, His6) метки, являются общеизвестными в настоящей области техники.

[0292] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит детектируемый фрагмент. Детектирование осуществляют, например, в условиях *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. К анализам детектирования и/или определения в условиях *in vitro* (количественной оценки, качественной оценки и т. д.), например, белка huCD163, экспрессируемого макрофагами, с применением антител или их антигенсвязывающих фрагментов относятся без ограничения, например, ELISA, RIA и вестерн-блоттинг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, детектирование, диагностику или отслеживание антигена антител в условиях *in vitro* осуществляют путем получения образца (например, образца крови) от субъекта и тестирования образца, например, с помощью стандартного ELISA-анализа.

[0293] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе также раскрыты композиции, содержащие раскрываемое в настоящем документе антитело и носитель.

Фармацевтические композиции

[0294] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты фармацевтические композиции, содержащие раскрываемое в настоящем документе антитело и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[0295] Такие композиции пригодны для анализа в условиях *in vitro* или *in vivo* или, в случае фармацевтических композиций, для введения субъекту *in vivo* или *ex vivo* для лечения субъекта раскрываемыми антителами.

[0296] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, вспомогательное вещество представляет собой носитель, буфер, стабилизатор или другие подходящие материалы, известные специалистам в настоящей области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Точная природа носителя или другого материала будет зависеть от пути введения.

[0297] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, фармацевтические составы, содержащие антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые выявлены с помощью описанных в настоящем документе способов, готовят для хранения путем смешивания белка, обладающего требуемой степенью чистоты, с необязательными

физиологически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (см., например, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Приемлемыми носителями или стабилизаторами являются те, которые не токсичны для принимающих их пациентов в используемых дозах и концентрациях, и к ним относятся буферы, такие как фосфатные, цитратные и на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенольный, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и m-крезол); низкомолекулярные (длиной менее около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN®, PLURONICS® или полиэтиленгликоль (PEG). В соответствии с определенными вариантами осуществления, фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации, составляющей 5-200 мг/мл; предпочтительно составляющей 10-100 мг/мл.

[0298] Приемлемые носители являются физиологически приемлемыми для субъекта, которому их вводят, и сохраняют терапевтические свойства соединений, с которыми/в которые их вводят. Приемлемые носители и содержащие их составы в целом описаны, например, в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, см. выше. Одним иллюстративным носителем является физиологический раствор. Фраза «фармацевтически приемлемый носитель» в контексте настоящего документа означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или среду-наполнитель, такую как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, растворитель или инкапсулирующий материал, участвующие в переносе или транспортировке рассматриваемых соединений от места введения в одном органе или части тела в другой орган или часть тела или в аналитической системе в условиях *in vitro*. Каждый носитель является приемлемым в том смысле, что он совместим с другими ингредиентами состава и не вреден для субъекта, которому его вводят. Приемлемый носитель также не должен изменять специфическую активность рассматриваемых соединений.

[0299] В соответствии с другим вариантом осуществления, раскрываемая в настоящем документе фармацевтическая композиция дополнительно содержит приемлемую добавку для улучшения стабильности соединений в композиции и/или для контроля скорости высвобождения композиции. Приемлемые добавки не изменяют специфическую активность рассматриваемых соединений. К иллюстративным приемлемым добавкам относятся без ограничения сахар, такой как маннит, сорбит, глюкоза, ксилит, трегалоза, сорбоза, сахароза, галактоза, декстран, декстроза, фруктоза, лактоза и их смеси. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, приемлемые добавки сочетаются с приемлемыми носителями и/или вспомогательными веществами, такими как декстроза. В качестве альтернативы, к иллюстративным приемлемым добавкам относятся без ограничения поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 20 или полисорбат 80, для повышения стабильности пептида и уменьшения гелеобразования раствора. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, поверхностно-активное вещество добавляют в композицию в количестве от 0,01% до 5% раствора. Добавление таких приемлемых добавок увеличивает стабильность и период полужизни композиции при хранении.

[0300] В соответствии с одним вариантом осуществления, раскрываемая в настоящем документе фармацевтическая композиция содержит изотонический буфер, такой как фосфатный, ацетатный или TRIS-буфер, в сочетании со средством, повышающим тоничность, таким как полиол, сорбит, сахароза или хлорид натрия, которые тонизируют и стабилизируют. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, средство, повышающее тоничность, присутствует в композиции в количестве около 5%.

[0301] В соответствии с другим вариантом осуществления, раскрываемая в настоящем документе фармацевтическая композиция включает поверхностно-активное вещество, например, для предупреждения агрегации и для стабилизации в количестве от 0,01 до 0,02% масса/объем.

[0302] В соответствии с другим вариантом осуществления, pH раскрываемой в настоящем документе фармацевтической композиции находится в диапазоне от 4,5 до 6,5 или от 4,5 до 5,5.

[0303] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемая в настоящем документе фармацевтическая композиция также содержит более одного активного соединения, если это необходимо для лечения показаний, такие как соединения с дополняющими активностями, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Например, способ лечения дополнительно предусматривает применение

иммуносупрессивного средства. Такие молекулы предпочтительно присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для задуманного назначения.

[0304] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, активные ингредиенты заключены в микрокапсулу, полученную, например, методиками коацервации или межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозную или желатиновую микрокапсулу и полиметилметакрилатную микрокапсулу соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и нанокапсулах) или в макроэмульсиях. Такие методики раскрыты в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, см. выше.

[0305] В настоящем документе также предусмотрены суспензии и кристаллические формы антител; способы получения суспензий и кристаллических форм известны специалисту в настоящей области техники.

[0306] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемая в настоящем документе фармацевтическая композиция является стерильной. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемую в настоящем документе фармацевтическую композицию стерилизуют с помощью традиционных, хорошо известных методик стерилизации. Например, стерилизацию легко осуществить путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, полученные растворы упаковывают для применения или фильтруют в асептических условиях и лиофилизируют, причем перед введением лиофилизированный состав объединяют со стерильным раствором.

[0307] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, для стабилизации полипептидов для длительного хранения используют сублимационную сушку, например, если полипептид относительно нестабилен в жидких композициях.

[0308] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, некоторые вспомогательные вещества, такие как, например, полиолы (включая маннит, сорбит и глицерин); сахара (включая глюкозу и сахарозу); и аминокислоты (включая аланин, глицин и глутаминовую кислоту) выполняют роль стабилизаторов для сублимированных продуктов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, полиолы и сахара также применяют для защиты полипептидов от повреждений, вызываемых замораживанием и сушкой, и для повышения стабильности при хранении в высушенном состоянии. Сахара, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, эффективны как в процессе сублимационной сушки, так и во время хранения. В качестве стабилизаторов лиофилизированных продуктов также известны и другие классы молекул, в том числе моно- и дисахариды, а также полимеры, такие как PVP.

[0309] В случае инъекций, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемая в настоящем документе фармацевтическая композиция представляет собой порошок, пригодный для ресуспендирования соответствующим раствором, как описано выше. Их примеры включают без ограничения лиофилизированные, высушенные на роторном или распылительном оборудовании порошки, аморфные порошки, гранулы, осадки или частицы. Композиции для инъекций необязательно содержат стабилизаторы, модификаторы pH, поверхностно-активные вещества, модификаторы биодоступности и их комбинации.

[0310] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, получают составы с замедленным высвобождением. Подходящие примеры составов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, причем матрицы имеют форму формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поливиниловый спирт), полилактиды (см., например, патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной и гликолевой кислот, такие как Lupron Depot™ (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислот и ацетата лейпролида) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. Тогда как полимеры, такие как этиленвинилацетат и сополимер молочной и гликолевой кислот, обеспечивают высвобождение молекул в течение более 100 суток, определенные гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, хотя инкапсулированные антитела и остаются в организме в течение длительного времени, они денатурируют или агрегируют в результате воздействия влаги при 37°C, что приводит в результате к утрате биологической активности и возможным изменениям иммуногенности. Рациональные стратегии, разработанные для стабилизации, в некоторых случаях зависят от задействованного механизма. Например, если установлено, что механизм агрегации заключается в образовании межмолекулярной связи S-S за счет тио-дисульфидного обмена, то стабилизации достигают в ряде случаев модификацией сульфгидрильных остатков, лиофилизацией из кислых растворов, контролем влажности, применением соответствующих добавок и разработкой конкретных композиций с полимерной матрицей.

[0311] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемая в настоящем документе фармацевтическая композиция предназначена для кратковременного действия, быстрого высвобождения, длительного действия или замедленного

высвобождения, как описано в настоящем документе. В соответствии с одним вариантом осуществления, раскрываемая в настоящем документе фармацевтическая композиция составлена для контролируемого высвобождения или для медленного высвобождения.

[0312] Фармацевтическую композицию вводят, например, путем инъекции, в том числе без ограничения путем подкожной, интравитреальной, внутрикожной, внутривенной, внутриартериальной, внутрибрюшинной, интрацереброспинальной или внутримышечной инъекции. В настоящем документе для каждого типа инъекций предусмотрены вспомогательные вещества и носители для применения в составе композиций. Представленное далее описание приведено лишь в качестве примера и не подразумевается как ограничивающее объем композиций. Композиции для инъекций включают без ограничения водные растворы (если вещества растворяются в воде) или дисперсии, а также стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсии. В случае внутривенного введения к подходящим носителям относятся физиологический раствор, бактериостатическая вода, Cremophor EL.TM. (BASF, Парсипанни, Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буфер (PBS). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, носитель представляет собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси. Текучесть поддерживают, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае диспергирования и путем применения поверхностно-активных веществ. К антибактериальным и противогрибковым средствам относятся, например, парабены, хлорбутанол, фенол, аскорбиновая кислота и тимеросал. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в композицию включены средства, придающие изотоничность, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит и хлорид натрия. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, полученные растворы упаковывают для применения как есть или лиофилизируют; в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, лиофилизированный состав позднее объединяют со стерильным раствором перед введением. В случае внутривенной инъекции или инъекции в место поражения, активный ингредиент будет находиться в форме приемлемого для парентерального введения водного раствора, который является апиrogenным и имеет подходящие pH, изотоничность и стабильность. Специалисты в настоящей области техники смогут приготовить подходящие растворы, используя, например, изотонические среды-наполнители, такие как раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций и раствор Рингера с лактатом для инъекций. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, при необходимости включают

консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, стерильные растворы для инъекций готовят путем включения активного ингредиента в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией перечисленных выше ингредиентов, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии готовят путем включения активного ингредиента в стерильную среду-наполнитель, которая содержит основную дисперсионную среду и остальные необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и лиофильная сушка, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный требуемый ингредиент из его раствора, предварительно подвергнутого стерилизации фильтрацией.

[0313] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, композиции обычно вводят внутривенно, например, путем инъекции разовой дозы. В случае инъекций, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, активный ингредиент находится в форме приемлемого для парентерального введения водного раствора, который является практически апирогенным и имеет подходящие рН, изотоничность и стабильность. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, специалист готовит подходящие растворы, используя, например, изотонические среды-наполнители, такие как раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор Рингера с лактатом для инъекций. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, при необходимости включают консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки. Кроме того, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, композиции вводят путем аэрозолирования. (Lahn et al., *Int Arch Allergy Immunol* 134:49-55 (2004)).

[0314] В случае парентерального введения антитела составляют в стандартной лекарственной форме для инъекций (раствора, суспензии, эмульсии) в сочетании с фармацевтически приемлемой парентеральной средой-наполнителем. Примерами таких сред-наполнителей являются вода, физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и 5% человеческий сывороточный альбумин. Также применяют неводные наполнители, такие как нелетучие масла и этилолеат. Липосомы применяют в качестве носителей. Среда-наполнитель содержит небольшое количество добавок, таких как вещества, повышающие изотоничность и химическую стабильность, например, буферы и консерванты. Антитела обычно составляют в таких средах-наполнителях в концентрациях, составляющих около от 1 мг/мл до 10 мг/мл.

[0315] В соответствии с одним вариантом осуществления, раскрываемая в настоящем документе фармацевтическая композиция лиофилизирована, например, для увеличения срока годности при хранении. Если композиции рассматриваются для применения в лекарственных средствах или в любом из способов, представленных в настоящем документе, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, предполагается, что композиция практически не содержит пирогенов, так чтобы композиция не вызывала воспалительную реакцию или небезопасную аллергическую реакцию при введении субъекту-человеку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тестирование композиций на пирогены и приготовление композиций, практически не содержащих пирогенов, хорошо известны специалистам в настоящей области техники и осуществляются с помощью имеющихся в продаже наборов.

[0316] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, приемлемые носители содержат соединение, которое стабилизирует, увеличивает или замедляет всасывание или клиренс. К таким соединениям относятся, например, углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны; низкомолекулярные белки; композиции, снижающие клиренс или гидролиз пептидов; либо вспомогательные вещества или другие стабилизаторы и/или буферы. К средствам, замедляющим всасывание, относятся, например, моностеарат алюминия и желатин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, также можно применять детергенты для стабилизации или увеличения либо уменьшения всасывания фармацевтической композиции, в том числе липосомальные носители. Для защиты от расщепления соединение, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, подвергают реакции комплексообразования с композицией, придающей ему устойчивость к кислотному и ферментативному гидролизу, или соединение, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, подвергают реакции комплексообразования в подходящем устойчивом носителе, таком как липосома. Способы защиты соединений от расщепления известны из уровня техники.

[0317] Композиции вводят, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, таким способом, который совместим с лекарственным составом, и в терапевтически эффективном количестве. Вводимое количество зависит от способности иммунной системы подлежащего лечению субъекта утилизировать активный ингредиент и требуемой степени связывающей способности. Точные количества активного ингредиента, которые необходимо вводить, зависят от решения практикующего врача и индивидуальны для каждого человека. Подходящие схемы для начального введения и повторных инъекций также различны, но типичными являются начальное введение, за которым следуют повторные дозы с интервалами в один или более часов с последующей инъекцией или

другим введением. В качестве альтернативы предусмотрена непрерывная внутривенная инфузия, достаточная для поддержания определенной концентрации в крови.

[0318] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к применению описываемых в настоящем документе композиций для получения лекарственного средства для лечения патологического состояния, заболевания или нарушения, описанного в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, лекарственные составы составляют на основе физических характеристик нуждающегося в лечении субъекта и составляют в виде одного или нескольких составов в зависимости от стадии патологического состояния, заболевания или нарушения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, лекарственные средства упаковывают в подходящую упаковку с соответствующими этикетками для распространения в больницах и клиниках, при этом этикетка предназначена для указания показания к лечению субъекта, страдающего описанным в настоящем документе заболеванием. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, лекарственные средства упаковывают в виде одной или нескольких единиц. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в упаковки включают инструкции по дозировке и введению композиций, как описано ниже. Настоящее изобретение также относится к лекарственным средствам, содержащим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые описаны в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0319] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, композицию (антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые описаны в настоящем документе) вводят отдельно или в комбинации со второй композицией либо одновременно, либо последовательно, в зависимости от подлежащего лечению патологического состояния. В соответствии с одним вариантом осуществления, второе терапевтическое средство лечения представляет собой противораковую терапию или противораковое терапевтическое средство. При введении двух или более композиций композиции вводят, например, в комбинации (либо последовательно, либо одновременно). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, композицию вводят в виде однократной дозы или нескольких доз.

[0320] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, композиции, если они составлены для введения субъектам-людям, не содержат пирогенов. Тестирование композиций на пирогены и приготовление фармацевтических композиций, не содержащих пирогенов, хорошо известны специалисту в настоящей области техники.

[0321] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты составляют для любого подходящего пути введения

субъекту, включая без ограничения инъекцию. Инъекция включает, например, подкожную, перитонеальную, внутривенную инъекцию, внутримышечную инъекцию или спинальную инъекцию в спинномозговую жидкость (CSF). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, введение осуществляют в одно, два, три, четыре, пять, шесть, семь или более мест инъекции. В соответствии с одним вариантом осуществления, введение осуществляют через шесть мест инъекций.

[0322] В случае применений в условиях *in vivo* приведение в контакт производят, например, посредством введения композиции (таких, которые описаны в настоящем документе) субъекту любым подходящим способом. Описываемое в настоящем документе антитело, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, вводят любым подходящим способом, либо системно, либо местно, в том числе путем парентерального, подкожного, внутрибрюшинного, интрацереброспинального, внутрилегочного и интраназального введения и, если необходимо для местного лечения, внутриочагового введения. К парентеральным путям относятся, например, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, эпидуральное, внутримышечное и подоболочечное введение. Такое введение, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, осуществляют в виде струйной инъекции, непрерывной инфузии или импульсной инфузии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, композиции вводят путем инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или длительным. Предусмотрены и другие способы введения, в том числе местное, в частности чрескожное, чресслизистое, ректальное, пероральное или локальное введение, например, через катетер, расположенный близко к требуемому месту введения.

Способы лечения и применения

[0323] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт способ лечения рака у нуждающегося в этом индивидуума, предусматривающий введение индивидууму раскрываемого в настоящем документе антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к применению раскрываемого в настоящем документе антитела для изготовления лекарственного средства для лечения рака у субъекта-человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на человеческих опухоль-ассоциированных макрофагах, и снижает экспрессию по меньшей мере одного из CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15 макрофагами.

[0324] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт способ модулирования иммунной активности у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту описываемого в настоящем документе антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на человеческих опухоль-ассоциированных макрофагах, и снижает экспрессию по меньшей мере одного из CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15 макрофагами.

[0325] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт способ лечения субъекта с патологически или ненадлежащим образом повышенными уровнями макрофагов M2 (например, ненадлежащим образом повышенными по сравнению с уровнем, полезным для стимуляции иммуноопосредованного цитолиза опухолевых клеток у субъекта), предусматривающий введение указанному субъекту описываемого в настоящем документе антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на человеческих опухоль-ассоциированных макрофагах, и снижает экспрессию по меньшей мере одного из CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15 макрофагами.

[0326] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит по меньшей мере один из CDR1 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, CDR2 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, и CDR3 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит по меньшей мере один из CDR1 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, CDR2 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, и CDR3 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит по меньшей мере один из CDR1 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, CDR2 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, и CDR3 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 3.

[0327] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит по меньшей мере один из CDR1 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 5, CDR3 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит по меньшей мере один из CDR1 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 5, CDR3 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит по меньшей мере один из CDR1 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 5, CDR3 тяжелой цепи, имеющего

аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 6.

[0328] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит по меньшей мере один из CDR1 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, CDR2 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, CDR3 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 3, CDR1 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит по меньшей мере один из CDR1 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, CDR2 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, CDR3 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 3, CDR1 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 5, и CDR3

тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит по меньшей мере один из CDR1 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, CDR2 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, CDR3 легкой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 3, CDR1 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, имеющего аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 6.

[0329] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, VL имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, VL имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 7.

[0330] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, VH имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, VH имеет

аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 8.

[0331] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 7, и переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, VL имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 7, и VH имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, VL имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 7, и VH имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 8.

[0332] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9.

[0333] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 10. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%

[0335] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 12. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 12. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 12.

[0336] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 13. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 13. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 13.

изложенной под SEQ ID NO: 15. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 14, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 15. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 14, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 15.

[0345] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 14, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 70% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 16. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 14, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 16. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 14, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 16.

[0346] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к применению описываемого в настоящем документе антитела для изготовления лекарственного средства, который снижает иммуносупрессию опухоль-ассоциированными макрофагами у субъекта-человека, имеющего раковое заболевание.

[0347] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к применению раскрываемого в настоящем документе антитела для

изготовления лекарственного средства, которое стимулирует опосредованный Т-клетками цитолиз опухолевых клеток у субъекта-человека, имеющего раковое заболевание.

[0348] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта-человека, имеющего раковое заболевание, предусматривающему введение субъекту терапевтически эффективного количества описываемого в настоящем документе антитела, в результате чего у субъекта снижается иммуносупрессия опухоль-ассоциированным макрофагом.

[0349] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта-человека, имеющего раковое заболевание, предусматривающему введение субъекту терапевтически эффективного количества описываемого в настоящем документе антитела, в результате чего у субъекта увеличивается опосредованный Т-клетками цитолиз опухолевых клеток.

[0350] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты способы функциональной переориентации опухоль-ассоциированных макрофагов для снижения иммуносупрессии у пациента, имеющего раковое заболевание, предусматривающие введение пациенту количества фармацевтической композиции, содержащей описываемое в настоящем документе антитело, которое эффективно для улучшения активности или пролиферации $CD4^+$ $CD8^+$ Т-клеток в опухолевом микроокружении.

[0351] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты способы стимуляции опосредованного лимфоцитами цитолиза опухолевых клеток у нуждающегося в этом субъекта-человека, предусматривающие введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей описываемое в настоящем документе антитело.

[0352] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты способы модулирования активности опухоль-ассоциированного макрофага в опухолевом микроокружении, при этом способ предусматривает приведение опухоль-ассоциированного макрофага в контакт с раскрываемым в настоящем документе антителом, причем способ приводит в результате по меньшей мере к одному из следующих эффектов:

- (a) сниженной экспрессии по меньшей мере одного маркера человеческим макрофагом, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15;
- (b) интернализации антитела человеческим макрофагом;
- (c) активации $CD4^+$ Т-клеток, $CD8^+$ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации;

(d) пролиферации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации; и

(e) стимуляции цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

[0353] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты способы модулирования активности опухоль-ассоциированного макрофага в опухолевом микроокружении, при этом способ предусматривает приведение опухоль-ассоциированного макрофага в контакт с раскрываемым в настоящем документе антителом, причем способ приводит в результате по меньшей мере к двум из следующих эффектов:

(a) сниженной экспрессии по меньшей мере одного маркера человеческим макрофагом, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15;

(b) интернализации антитела человеческим макрофагом;

(c) активации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации;

(d) пролиферации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации; и

(e) стимуляции цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

[0354] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты способы модулирования активности опухоль-ассоциированного макрофага в опухолевом микроокружении, при этом способ предусматривает приведение опухоль-ассоциированного макрофага в контакт с раскрываемым в настоящем документе антителом, причем способ приводит в результате по меньшей мере к трем из следующих эффектов:

(a) сниженной экспрессии по меньшей мере одного маркера человеческим макрофагом, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15;

(b) интернализации антитела человеческим макрофагом;

(c) активации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации;

(d) пролиферации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации; и

(e) стимуляции цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

[0355] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты способы модулирования активности опухоль-ассоциированного макрофага в опухолевом микроокружении, при этом способ предусматривает приведение опухоль-ассоциированного макрофага в контакт с раскрываемым в настоящем документе

антителом, причем способ приводит в результате по меньшей мере к четырем из следующих эффектов:

- (a) сниженной экспрессии по меньшей мере одного маркера человеческим макрофагом, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15;
- (b) интернализации антитела человеческим макрофагом;
- (c) активации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации;
- (d) пролиферации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации; и
- (e) стимуляции цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

[0356] В соответствии с определенными вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты способы модулирования активности опухоль-ассоциированного макрофага в опухолевом микроокружении, при этом способ предусматривает приведение опухоль-ассоциированного макрофага в контакт с раскрываемым в настоящем документе антителом, причем способ приводит в результате по меньшей мере к пяти из следующих эффектов:

- (a) сниженной экспрессии по меньшей мере одного маркера человеческим макрофагом, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15;
- (b) интернализации антитела человеческим макрофагом;
- (c) активации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации;
- (d) пролиферации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации; и
- (e) стимуляции цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

[0357] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе способ уменьшает супрессию миелоидными клетками активации и пролиферации CD8 Т-клеток.

[0358] Поляризация макрофагов с M2 в M1 относится к процессу, посредством которого M2 или M2-подобные макрофаги по настоящему изобретению изменяют таким образом, чтобы получающийся в результате макрофаг имел определенные функциональные или фенотипические признаки, связанные с M1 или M1-подобными макрофагами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, M2 или M2-подобный макрофаг поляризован, когда он более не экспрессирует CD163.

[0359] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела уменьшают супрессию миелоидными клетками опосредованного CD19-CD3-биспецифическими активаторами Т-клеток цитолиза клеток Raji с помощью CD8 Т-клеток.

[0360] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела уменьшают супрессию миелоидными клетками опосредованного Т-клетками CAR цитолиза раковых клеток.

[0361] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела уменьшают супрессию миелоидными клетками опосредованного NK-клетками цитолиза раковых клеток рака посредством ADCC.

[0362] Любой из раскрываемых в настоящем документе способов в некоторых случаях дополнительно предусматривает назначение указанному субъекту дополнительной противораковой терапии. К противораковым терапиям относятся без ограничения хирургическая терапия, химиотерапия, лучевая терапия, криотерапия, гормональная терапия, иммунотерапия и цитокиновая терапия, а также их комбинации. В соответствии с одним вариантом осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и противораковую терапию применяют одновременно или последовательно.

[0363] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, дополнительная противораковая терапия представляет собой иммунотерапию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, иммунотерапия представляет собой композицию, содержащую ингибитор контрольной точки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, дополнительная противораковая терапия представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки.

[0364] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу *in vitro* или *ex vivo* выявления макрофагов, экспрессирующих huCD163, в образце клеток, предположительно содержащем макрофаги, экспрессирующие huCD163, предусматривающему приведение образца клеток в контакт с описываемым в настоящем документе антителом и измерение связывания с клетками в образец, при этом положительный сигнал указывает на присутствие в образце макрофагов, экспрессирующих huCD163.

[0365] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу выявления человеческих макрофагов M2c в образце клеток, который предусматривает приведение образца клеток, содержащего клетки крови, предположительно содержащие человеческие макрофаги M2c, в контакт с описываемым в настоящем документе антителом и измерение связывания с клетками в образце, при этом положительный сигнал указывает на присутствие человеческих макрофагов M2c в образце.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, образец клеток содержит клетки, полученные от субъекта-человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, образец клеток содержит культивированные клетки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ детекции клеток M2 в образце предусматривает применение антитела или фрагмента, которые не интернализируются клетками при связывании, но остаются связанными с внешней поверхностью клеток для облегчения детекции.

[0366] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу выявления раковых клеток, экспрессирующих huCD163, в образце клеток, предусматривающему приведение образца клеток, содержащего клетки, предположительно содержащие раковые клетки, экспрессирующие huCD163, в контакт с описываемым в настоящем документе антителом и измерение связывания с клетками в образце, при этом положительный сигнал указывает на присутствие раковых клеток, экспрессирующих huCD163, в образце. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, образец клеток содержит клетки, полученные от субъекта-человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, образец клеток содержит культивированные клетки.

[0367] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу модулирования экспрессии маркеров на клеточной поверхности макрофагов M2c. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, снижается экспрессия по меньшей мере одного из CD16 (FcγRIIIa), CD64 (FcγRI), Siglec-15 и TLR2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, снижается экспрессия CD16, CD64, Siglec-15 и TLR2.

[0368] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу снижения супрессии миелоидными клетками активации Т-клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ индуцирует повышенное продуцирование IL-2 Т-клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу повышения пролиферации клеток Th1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу повышения доли клеток Th1 в пролиферирующих Т-клетках. Согласно каждому из данных аспектов, способы предусматривают введение описываемого в настоящем документе антитела в условиях *in vivo* или приведение антитела в контакт со сложной системой иммунных клеток в условиях *in vitro* или *ex vivo*, при которых макрофаги и эффекторные Т-клетки, а также необязательные опухолевые целевые

клетки могли взаимодействовать таким образом, чтобы обеспечивалось воспроизведение или моделирование взаимодействий в условиях *in vivo*.

[0369] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу снижения супрессии миелоидными клетками пролиферации Т-клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу повышения пролиферации CD4⁺ клеток, или пролиферации CD8⁺ Т-клеток, или как первых, так и вторых.

[0370] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу повышения экспрессии Т-клетками по меньшей мере одного из CD69, ICOS, OX40, PD-1, LAG3 и CTLA4 у нуждающегося в этом пациента. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ увеличивает экспрессию по меньшей мере одного из CD69, ICOS, OX40, PD-1, LAG3 и CTLA4 CD4⁺ Т-клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ увеличивает экспрессию по меньшей мере одного из ICOS, OX40, PD-1, LAG3 и CTLA4 CD8⁺ Т-клетками.

[0371] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу повышения цитолиза раковых клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, повышается цитолиз раковых клеток цитотоксичными лимфоцитами (CTL). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, увеличивается опосредованный Т-клетками цитолиз раковых клеток, не соответствующих по МНС.

[0372] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу приведения миелоидных клеток в контакт с описываемым в настоящем документе антителом для уменьшения опосредованной макрофагами супрессии активации CD8⁺ Т-клеток или пролиферации CD8⁺ Т-клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело приводят в контакт с миелоидными клетками, включающими макрофаги M0. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело приводят в контакт с миелоидными клетками, включающими макрофаги M2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело приводят в контакт с миелоидными клетками, включающими макрофаги M0 и M2.

[0373] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу лечения пациента-человека, имеющего рак легких, предусматривающему введение пациенту эффективного количества описываемого в настоящем документе антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, рак легкого представляет собой карциному или аденокарциному. В соответствии с

некоторыми вариантами осуществления, рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких.

[0374] Эффективный ответ по настоящему изобретению достигают, если у субъекта наблюдается частичное или полное облегчение или уменьшение признаков или симптомов болезни, и в случае лечения рака, в частности, включает без ограничения излечение, ремиссию, продление жизни или другие объективные ответы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, ожидаемое время дожития без прогрессирования измеряется от месяцев до нескольких лет, в зависимости от прогностических факторов, включая количество рецидивов, стадию заболевания и другие факторы. Продление дожития включает без ограничения периоды времени по меньшей мере 1 месяц (мес.), около по меньшей мере 2 мес., около по меньшей мере 3 мес., около по меньшей мере 4 мес., около по меньшей мере 6 мес., около по меньшей мере 1 год, около по меньшей мере 2 года, около по меньшей мере 3 года и т. д. Общее дожитие также измеряется, например, в месяцах-годах. В качестве альтернативы, эффективный ответ, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, заключается в том, что симптомы субъекта остаются неизменными. Дополнительные показания к лечению показаний более подробно описаны ниже.

[0375] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, введение терапевтического средства в профилактическом способе производят до проявления симптомов нежелательного заболевания или нарушения с тем, чтобы предупредить развитие заболевания или нарушения или, альтернативно, отсрочить его прогрессирование. Таким образом, при применении в сочетании с профилактическими способами термин «терапевтически эффективный» означает, что после лечения у меньшего числа субъектов (в среднем) развивается нежелательное заболевание или нарушение или прогрессирует тяжесть симптомов.

[0376] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, количество активных ингредиентов в композициях, составе композиции и способ введения входят в число факторов, которые варьируют в отношении получения количества активного ингредиента, эффективного для достижения требуемого терапевтического ответа у каждого субъекта, не будучи чрезмерно токсичным для субъекта. Выбранный уровень дозы будет зависеть от ряда факторов, в том числе активности конкретного используемого соединения, пути введения, времени введения, скорости выведения или метаболизации конкретного используемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в сочетании с конкретной используемой композицией, возраста, пола, массы тела, патологического состояния, общего состояния

здоровья, рациона и предшествующей истории болезни подвергаемого лечению субъекта, а также подобных факторов, которые хорошо известны в области медицины.

[0377] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, описываемые в настоящем документе антитела и антигенсвязывающие фрагменты вводят субъекту в различных дозированных количествах и в течение различных периодов времени. К неограничивающим дозам относятся около 0,01 мг/кг, около 0,05 мг/кг, около 0,1 мг/кг, около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, около 5 мг/кг, около 10 мг/кг, около 20 мг/кг, около 30 мг/кг, около 40 мг/кг, около 50 мг/кг, около 60 мг/кг, около 70 мг/кг, около 80 мг/кг, около 90 мг/кг, около 100 мг/кг, около 125 мг/кг, около 150 мг/кг, около 175 мг/кг, около 200 мг/кг или любые целые числа между данными значениями. Кроме того, дозу(-ы) антитела или антигенсвязывающего фрагмента вводят, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, два раза в неделю, раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в 4 недели, раз в 6 недель, раз в 8 недель, раз в 12 недель или любое сочетание недель в данных диапазонах. Также предусмотрены циклы приема доз, такие как, например, введение антител или их антигенсвязывающих фрагментов один или два раза в неделю в течение 4 недель с последующими двумя неделями без терапии. В рамках настоящего раскрытия также предусмотрены и дополнительные циклы приема доз, включая, например, различные комбинации доз и недельных циклов, описанных в настоящем документе.

[0378] Терапевтически эффективные количества композиции, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, варьируют и зависят от тяжести заболевания, массы тела и общего состояния субъекта, проходящего лечение, но обычно находятся в диапазоне от около 1,0 мкг/кг до около 100 мг/кг массы тела, или от около 10 мкг/кг до около 30 мг/кг, или от около 0,1 мг/кг до около 10 мг/кг, или от около 1 мг/кг до около 10 мг/кг за прием. Введение можно осуществлять ежедневно, через сутки, еженедельно, два раза в месяц, ежемесячно или чаще либо реже, по мере необходимости, в зависимости от ответа, вырабатываемого на нарушение или патологическое состояние, а также переносимости терапии субъектом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, поддерживающие дозы необходимы в течение более длительного периода времени, такого как 4, 5, 6, 7, 8, 10 или 12 недель или дольше, до тех пор, пока не произойдет требуемая супрессия симптомов нарушения, и при необходимости дозы подвергают корректировке. Прогресс такой терапии легко отслеживать с помощью традиционных методик и анализов.

[0379] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело по настоящему изобретению вводят внутривенно в физиологическом растворе дозой от 0,01 мг/кг до 100 мг/кг с частотой от ежесуточной до еженедельной или ежемесячной

(например, раз в сутки, через сутки, каждые третьи сутки или 2, 3, 4, 5 или 6 раз в неделю), предпочтительно дозой от 0,1 до 45 мг/кг, от 0,1 до 15 мг/кг или от 0,1 до 10 мг/кг с частотой 2 или 3 раза в неделю или до 45 мг/кг 1 раз в месяц.

[0380] Ответ считается достигнутым, если у субъекта наблюдается частичное или полное облегчение или уменьшение признаков или симптомов заболевания, и в частности включает без ограничения увеличение продолжительности дожития. Ожидаемое время дожития без прогрессирования измеряется, например, от месяцев до нескольких лет, в зависимости от прогностических факторов, включая количество рецидивов, стадию заболевания и другие факторы. Продление дожития включает без ограничения периоды времени по меньшей мере 1 месяц (мес.), около по меньшей мере 2 месяца (мес.), около по меньшей мере 3 мес., около по меньшей мере 4 мес., около по меньшей мере 6 мес., около по меньшей мере 1 год, около по меньшей мере 2 года, около по меньшей мере 3 года или более. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, общее дожитие также измеряется, например, в месяцах-годах. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, симптомы субъекта остаются неизменными или уменьшаются.

[0381] Врач или ветеринар, обладающий стандартными знаниями в настоящей области техники, в некоторых случаях легко определяет и прописывает эффективное количество (ED_{50}) требуемой композиции. Например, врач или ветеринар может начать прием соединений, используемых в композиции, с более низких уровней, чем те, которые требуются для достижения требуемого терапевтического эффекта, и постепенно будет увеличивать дозу до тех пор, пока не будет достигнут требуемый эффект. Альтернативно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, доза остается постоянной.

[0382] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в отдельных композициях объединяют другие антитела, низкомолекулярные терапевтические средства и/или другие средства для одновременного или последовательного введения. В соответствии с одним вариантом осуществления, введение предусматривает одну или более композиций, которые вводят одновременно или в пределах 30 минут друг от друга. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, введение производят в одно и то же место или в разные места.

[0383] Токсичность и терапевтическую эффективность такого ингредиента, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, определяют с помощью стандартных фармацевтических процедур на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, для определения LD_{50} (доза, которая смертельна для 50% популяции) и ED_{50} (доза, которая терапевтически эффективна у 50% населения). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, соотношение доз между токсическим и

терапевтическим эффектами является терапевтическим индексом и выражается как соотношение LD_{50}/ED_{50} . Хотя, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, применяют и соединения, которые проявляют токсические побочные эффекты, следует позаботиться о разработке системы доставки, которая нацеливает такие соединения на участок пораженной ткани для того, чтобы свести к минимуму потенциальное повреждение здоровых клеток и, таким образом, уменьшить побочные эффекты.

[0384] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, при составлении диапазона доз для применения на людей применяют данные, полученные по результатам анализов на клеточных культурах и исследований на животных. Доза таких соединений предпочтительно находится в пределах диапазона концентраций в кровотоке, который включает ED_{50} с незначительной токсичностью или вовсе без токсичности. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, доза варьирует в пределах такого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, для любого соединения, применяемого в способе по настоящему изобретению, терапевтически эффективную дозу первоначально оценивают по результатам анализа на клеточных культурах. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, дозу состава подбирают на животных моделях до достижения концентрации в плазме кровотока, которая включает IC_{50} (т. е. концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается полумаксимальное ингибирование), определенную на клеточной культуре. Уровни в плазме измеряют, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Такую информацию в некоторых случаях применяют для более точного определения пригодных доз для людей.

[0385] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, имеющего раковое заболевание, предусматривающему введение пациенту терапевтически эффективного количества описываемого в настоящем документе антитела и дополнительно предусматривающему лечение субъекта противораковой терапией, выбранной из хирургической терапии, химиотерапии, лучевой терапии, криотерапии, гормональной терапии, иммунотерапии или цитокиновой терапии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и другую противораковую терапию применяют одновременно или последовательно.

Диагностические продукты и способы

[0386] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты способы детекции белка huCD163 или макрофагов M2 в образце или у субъекта для оценки состояния пациента при лечении или диагностики заболевания или нарушения, связанного или коррелирующего с активностью макрофагов M2 или TAM, такого как заболевания и нарушения, которые описаны в настоящем документе.

[0387] При *in vivo* детектировании, диагностике или отслеживании растворимого белка huCD163, экспрессии белка huCD163 клетками или тканями или присутствия или активности макрофагов M2 субъекту вводят описываемое в настоящем документе антитело или антигенсвязывающий фрагмент, причем такое антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с детектируемым фрагментом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, детектируемый фрагмент визуализируют с помощью известных в настоящей области техники способов, таких как без ограничения магнитно-резонансная томография (MRI), флуоресценция, радиовизуализация, применение различных источников света, который направляют с помощью эндоскопов, лапароскопов или внутрисосудистого катетера (т. е. посредством детектирования фотоактивных средств), фотосканирование, позитронно-эмиссионная томография (PET), ядерно-магнитный резонанс (NMR) всего тела, радиосцинтиграфия, однофотонная эмиссионная компьютерная томография (SPECT), целенаправленное сканирование в ближней инфракрасной области (NIR), рентген, ультразвук. Метки для детектирования соединений с помощью таких способов также известны из уровня техники. Визуализация детектируемого фрагмента позволяет, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, детектировать, диагностировать и/или отслеживать патологическое состояние или заболевание, связанное с активностью макрофага M2 или активностью другой клетки, которая экспрессирует белок huCD163. Дополнительные диагностические анализы, в которых используют антитела, специфичные к требуемому целевому белку, т. е. белку huCD163, известны из уровня техники и также предусмотрены в настоящем документе.

[0388] В случае *in vitro* способов детектирования к образцам, которые необходимо от субъекта, относятся без ограничения образцы крови, биоптаты тканей и жидкости из них.

[0389] Таким образом, настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые пригодны для детектирования или диагностики уровней макрофагов M2 или макрофагов TAM, связанных с заболеванием или нарушением, что потенциально указывает на необходимость терапевтического лечения. В соответствии с другими вариантами осуществления, антитело дополнительно содержит второе средство. Такое средство, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, представляет

собой молекулу или фрагмент, такой как, например, репортерная молекула или детектируемая метка. Детектируемые метки/фрагменты для таких способов детектирования известны из уровня техники и более подробно описаны ниже. Репортерные молекулы представляют собой любой фрагмент, которую детектируют, например, с помощью анализа. Неограничивающие примеры репортерных молекул, которые были конъюгированы с полипептидами, включают ферменты, радиоактивные метки, гаптены, флуоресцентные метки, фосфоресцирующие молекулы, хемилюминесцентные молекулы, хромофоры, люминесцентные молекулы, фотоаффинные молекулы, окрашенные частицы или лиганды, такие как биотин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, к детектируемым меткам относятся соединения и/или элементы, которые детектируют благодаря их конкретным функциональным свойствам и/или химическим характеристикам, применение которых позволяет детектировать полипептид, к которому они присоединены, и/или дополнительно, в случае необходимости, оценить его количество. Из уровня техники известны многие подходящие детектируемые (визуализирующие) средства, а также способы их присоединения к полипептидам.

[0390] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, полипептиды конъюгированы с широким спектром флуоресцентных красителей, гасителей и гаптенных, таких как флуоресцеин, R-фикоэритрин и биотин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, конъюгацию производят либо во время синтеза полипептида, либо после синтеза и очистки полипептида.

[0391] Альтернативно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело, антигенсвязывающий фрагмент или связывающий белок конъюгируют с флуоресцентным фрагментом. Конъюгирование полипептидов с флуоресцентными фрагментами (например, R-фикоэритрином, флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) и т. д.) осуществляют, например, с помощью общеизвестных в настоящей области техники методик. Многочисленные коммерчески доступные флуоресцентные красители и наборы для конъюгации красителей коммерчески доступны для конкретных задач, таких как флуоресцентная микроскопия, проточная цитометрия, сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS) и т. д.

[0392] В соответствии с одним неограничивающим вариантом осуществления, антигенсвязывающий фрагмент антитела связан (конъюгирован) с такой детектируемой меткой, как радионуклид, краситель, визуализирующее средство или флуоресцентное средство, для иммунодетекции связывания с антигеном, которую применяют для визуализации связывания антител с макрофагами M2 или растворимым или связанным белком huCD163 *in vitro* и/или *in vivo*.

[0393] Неограничивающие примеры радиоактивных меток включают, например, ^{32}P , ^{33}P , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{71}Ge , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{77}As , ^{77}Br , $^{81}\text{Rb}/^{81\text{m}}\text{Kr}$, $^{87\text{m}}\text{Sr}$, ^{90}Y , ^{97}Ru , ^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{100}Pd , ^{101}Rh , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{113}In , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{128}Ba , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{169}Eu , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{191}Os , ^{193}Pt , ^{194}Ir , ^{197}Hg , ^{199}Au , ^{203}Pb , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi и ^{213}Bi . В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, радиоактивные метки присоединяют к соединениям с помощью традиционных химических методов, известных в области визуализации антител. Соединения, меченные радиоактивным изотопом, пригодны в методиках диагностики *in vitro*, в методиках радиовизуализации *in vivo* и в радиоиммунотерапии.

[0394] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, композиции с описываемыми в настоящем документе антителами и антигенсвязывающими фрагментами также применяют в качестве нетерапевтических средств (например, в качестве средств для аффинной очистки).

Технология работы с антителами

[0395] Как будет понятно специалистам в настоящей области техники, общее описание антител в настоящем документе и способов их получения и применения также применимо к отдельным полипептидным компонентам антител и фрагментам антител.

[0396] Антитела по настоящему изобретению являются поликлональными или моноклональными антителами. Однако, в соответствии с предпочтительными вариантами осуществления, они являются моноклональными. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитела по настоящему изобретению являются человеческими антителами. Способы получения поликлональных и моноклональных антител известны из уровня техники.

[0397] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, с помощью таких способов получают антитела, антигенсвязывающие фрагменты и другие белки, которые связывают huCD163, экспрессируемый макрофагами M2, тестируют их в отношении одной или более из аффинности связывания, авидности и модулирующих способностей.

[0398] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, для выявления антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с белком huCD163, используют общеизвестные способы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела и антигенсвязывающие фрагменты оценивают по одному или более параметрам: аффинности связывания, скорости ассоциации, скорости диссоциации и авидности. Измерение таких параметров, например, выполняют с помощью анализов, в том числе без ограничения твердофазных иммуноферментных анализов (ELISA), анализов

ELISpot, анализа методом Скэтчарда, анализа поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) и т. д., конкурентных анализов связывания и др. В соответствии с одним неограничивающим вариантом осуществления, для измерения связывающей способности специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с белком huCD163, применяют ELISA-анализ. Методика поверхностного плазмонного резонанса описана в Liljeblad et al., *Glyco J* 17:323-9 (2000).

[0399] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела по настоящему изобретению получают рекомбинантными методами с применением векторов и способов, доступных в настоящей области техники, как дополнительно описано ниже. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, человеческие антитела также получают с помощью активированных *in vitro* В-клеток (см. патенты США №№ 5567610 и 5229275).

[0400] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, человеческие антитела продуцируются у трансгенных животных (например, мышей), которые способны продуцировать полный репертуар человеческих антител в отсутствие продукции эндогенного иммуноглобулина. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена участка соединения тяжелой цепи антитела (J_H) у химерных мышей с мутацией в зародышевой линии приводит к полному ингибированию продуцирования эндогенных антител. Перенос массива человеческих генов иммуноглобулина зародышевой линии таким мышам с мутацией в зародышевой линии приводит к продуцированию человеческих антител в ответ на стимуляцию антигеном. См., например, Jakobovits et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362:255-58 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); патенты США №№ 5545806, 5569825, 5591669; патент США № 5545807; и WO 97/17852. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, таких животных модифицируют методами генной инженерии для продуцирования человеческих антител, содержащих полипептид по настоящему изобретению.

[0401] Антитела, например, выделяют и очищают из культуральной надосадочной жидкости или асцита (если он вырабатывается у животного) с помощью способов, известных из уровня техники, таких как осаждение насыщенным сульфатом аммония, способ осаждения эуглобулином, способ с капроновой кислотой, способ с каприловой кислотой, ионообменная хроматография (DEAE или DE52) или аффинная хроматография с применением колонки с антителами к Ig или колонки с белками A, G или L.

[0402] Как отмечено выше, настоящее изобретение дополнительно относится к фрагментам антител. В определенных обстоятельствах есть преимущества применения фрагментов антител, а не цельных антител. Например, в соответствии с некоторыми

вариантами осуществления, меньший размер фрагментов обеспечивает быстрый клиренс и приводит к улучшенному доступу к определенным тканям, таким как солидные опухоли. Примеры фрагментов антител включают: Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты; диатела; линейные антитела; одноцепочечные антитела и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0403] Для получения фрагментов антител были разработаны различные методики. Традиционно такие фрагменты получали путем протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., *J Biochem Biophys Methods* 1992 24(1-2):107-17; а также Brennan et al., *Science* 1985 229:81). Однако, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, такие фрагменты теперь получают непосредственно с помощью рекомбинантных клеток-хозяев. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, все Fab-, Fv- и ScFv-фрагменты антител экспрессируются и секретируются из *E. coli*, что позволяет легко получать большие количества таких фрагментов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, Fab'-SH-фрагменты выделяют непосредственно из *E. coli* и химически связывают с получением F(ab')₂-фрагментов (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Согласно другому подходу, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, F(ab')₂-фрагменты выделяют непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Fab- и F(ab')₂-фрагменты с увеличенным периодом полужизни *in vivo*, содержащие эпитоп, связывающийся с рецептором реутилизации, сформированный из двух петель C_H2-домена Fc-участка IgG описаны в патентах США №№ 5869046 и 6121022. Специалисту в настоящей области техники будут очевидны и другие методики получения фрагментов антител.

[0404] В соответствии с другими вариантами осуществления, предпочтительное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). См. WO 93/16185, патенты США № 5571894 и № 5587458. Fv и sFv являются единственными молекулами с интактным сочетанием сайтов, которые лишены константных участков. Таким образом, они подходят для снижения неспецифического связывания при применении *in vivo*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитые sFv-белки сконструированы так, чтобы получалось слияние с эффекторным белком либо на аминоконце, либо на карбокси-конце sFv. См. *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, выше. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, фрагмент антитела также может быть «линейным антителом», например, как описано в патенте США № 5641870, к примеру. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, такие линейные фрагменты антител являются моноспецифическими или биспецифическими.

[0405] Способы получения биспецифических или других мультиспецифических антител известны из уровня техники, и к ним относятся химическое сшивание, применение лейциновых застежек (Kostelny et al., *J Immunol* 148:1547-53 (1992)); технология диатела (Hollinger et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6444-8 (1993)); scFv-димеры [Gruber et al., *J Immunol* 152:5368 (1994)], линейные антитела (Zapata et al., *Protein Eng* 8:1057-62 (1995)); и хелатирующие рекомбинантные антитела (Neri et al., *J Mol Biol* 246:367-73 (1995)).

[0406] Традиционное получение полноразмерных биспецифических антител основано на совместной экспрессии двух пар тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина, при этом данные две цепи обладают различной специфичностью (Millstein et al., *Nature* 305:537-9 (1983)). Из-за случайного набора тяжелых и легких цепей иммуноглобулина такие гибридомы (квадромы) дают потенциальную смесь из десяти различных молекул антител, из которых лишь одна имеет правильную биспецифическую структуру. Очистку правильной молекулы производят, например, с помощью аффинной хроматографии. Подобные процедуры описаны в WO 93/08829 и в Traunecker et al., *EMBO J* 10:3655-9 (1991).

[0407] В соответствии с другим подходом, переменные участки антител с требуемой специфичностью связывания (сайты объединения антитела с антигеном) сливаются с последовательностями константных доменов иммуноглобулина. Предпочтительно, слияние происходит с константным доменом тяжелой цепи Ig, содержащим по меньшей мере часть шарнирного участка, участков C_H2 и C_H3. Предпочтительно, чтобы первый константный участок тяжелой цепи (C_H1), содержащий сайт, необходимый для связывания легкой цепи, присутствовала по меньшей мере в одном из продуктов слияния. ДНК, кодирующие продукты слияния тяжелых цепей иммуноглобулина и, при необходимости, легкую цепь иммуноглобулина, вставляют в отдельные векторы экспрессии и совместно вводят путем трансфекции в подходящую клетку-хозяина. Это обеспечивает большую гибкость при регулировании взаимных пропорций четырех полипептидных фрагментов в вариантах осуществления, когда неравные соотношения четырех полипептидных цепей, используемых в конструкции, обеспечивают оптимальный выход требуемого биспецифического антитела. Тем не менее, кодирующие последовательности для двух или всех четырех полипептидных цепей можно вставить в один вектор экспрессии, если экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высоким выходам или если соотношения не оказывают существенного влияния на выход требуемой комбинации цепей.

[0408] Биспецифические антитела состоят, например, из гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина с первой специфичностью связывания в одном плече и пары гибридных

тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина (обеспечивающей вторую специфичность связывания) в другом плече. Такая асимметричная структура облегчает отделение требуемого биспецифического соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулина, поскольку присутствие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы обеспечивает легкий способ ее отделения. Такой подход раскрыт в WO 94/04690. Для получения дополнительной информации о получении биспецифических антител см., например, Suresh et al., *Methods Enzymol* 121:210 (1986).

[0409] Согласно другому подходу, описанному в патенте США № 5731168, поверхность между парой молекул антител модифицирована методами инженерии таким образом, чтобы максимально увеличить процент гетеродимеров, выделяемых из рекомбинантной клеточной культуры в соответствии с некоторыми вариантами осуществления. Предпочтительная поверхность содержит по меньшей мере часть домена C_H3. В данном способе одну или более небольших боковых цепей аминокислот с поверхности первой молекулы антитела заменяются более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). Компенсационные «полости» идентичного или сходного размера с одной или несколькими большими боковыми цепями создают на поверхности второй молекулы антитела путем замены больших боковых цепей аминокислот на боковые цепи меньшего размера (например, аланин или треонин). Это обеспечивает механизм увеличения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

[0410] Биспецифические антитела включают сшитые или «гетероконъюгированные» антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате связано с авидином, а другое связано с биотином. Такие антитела, например, были предложены для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки (патент США № 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (WO 91/00360, WO 92/20373 и EP 03089). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гетероконъюгированные антитела получают с помощью любых удобных способов сшивания. Подходящие сшивающие средства хорошо известны в настоящей области техники и раскрыты в патенте США. № 4676980, а также в ряде методик сшивания. Другой способ предназначен для получения тетрамеров путем добавления последовательности, кодирующей стрептавидин, на С-конце scFv. Стрептавидин состоит из четырех субъединиц, поэтому при сворачивании scFv-стрептавида четыре субъединицы связываются с образованием тетрамера (Kipriyanov et al., *Hum Antibodies Hybridomas* 6(3):93-101 (1995)).

[0411] В соответствии с другим подходом к получению биспецифических антител, поверхность между парой молекул антител модифицирована методами инженерии таким

образом, чтобы максимально увеличить процент гетеродимеров, выделяемых из рекомбинантной клеточной культуры в соответствии с некоторыми вариантами осуществления. Одна поверхность содержит по меньшей мере часть домена C_{H3} из константного домена антитела. В данном способе одну или более небольших боковых цепей аминокислот с поверхности первой молекулы антитела заменяются более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). Компенсационные «полости» идентичного или сходного размера с одной или несколькими большими боковыми цепями создают на поверхности второй молекулы антитела путем замены больших боковых цепей аминокислот на боковые цепи меньшего размера (например, аланин или треонин). Это обеспечивает механизм увеличения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры. См. WO 96/27011.

[0412] В литературе также описаны методики получения биспецифических антител из фрагментов антител. Например, биспецифические антитела получают с помощью химической связи. У Brennan et al., *Science* 229: 81 (1985) описана процедура, при которой интактные антитела протеолитически расщепляют с образованием $F(ab')_2$ -фрагментов. Такие фрагменты восстанавливают в присутствии дитиолового комплексообразователя, арсенита натрия, для стабилизации вицинальных дитиолов и предотвращения образования межмолекулярных дисульфидных связей. Полученные Fab' -фрагменты затем превращают в тионитробензоатные производные (TNB). Затем одно из Fab' -TNB-производных снова превращают в Fab' -тиол путем восстановления меркаптоэтиламинам и смешивают с эквимольным количеством другого Fab' -TNB-производного с получением биспецифического антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, полученные биспецифические антитела применяют в качестве средств для селективной иммобилизации ферментов.

[0413] Недавно достигнутый прогресс облегчил прямое выделение Fab' -SH-фрагментов из *E. coli*, которые, например, химически связывают с получением биспецифических антител. В Shalaby et al., *J Exp Med* 175: 217-25 (1992) описано получение $F(ab')_2$ -молекулы гуманизированного биспецифического антитела. Каждый Fab' -фрагмент отдельно секретировался из *E. coli* и был подвергнут направленному химическому связыванию *in vitro* с получением биспецифического антитела. Полученное таким образом биспецифическое антитело было способно связываться с клетками, сверхэкспрессирующими рецептор ErbB2, и нормальными человеческими Т-клетками, а также запускать литическую активность цитотоксических человеческих лимфоцитов в отношении целевых клеток опухоли молочной железы человека.

[0414] Также были описаны различные методики получения и выделения фрагментов биспецифических антител непосредственно из рекомбинантной клеточной культуры. Например, биспецифические антитела были получены с применением лейциновых застежек. Kostelny et al., *J Immunol* 148(5):1547-53 (1992). Пептиды лейциновой застежек из белков Fos и Jun соединяли с Fab'-частями двух разных антител путем слияния генов. Гомодимеры антител восстанавливали в шарнирном участке с получением мономеров, а затем повторно окисляли с получением гетеродимеров антител. Данный способ, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, применяют для получения гомодимеров антител.

Выявление и получение антител

[0415] Полинуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, их переменные участки или их антигенсвязывающие фрагменты, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, определяют с помощью общеизвестных методик секвенирования и субклонируют в векторы экспрессии для рекомбинантного продуцирования антител. Это осуществляли путем получения мононуклеарных клеток из крови субъекта, например пациента с раковым заболеванием; получения клонов В-клеток из мононуклеарных клеток; индуцирования превращения В-клеток в плазматические клетки, продуцирующие антитела; и скрининга надосадочных жидкостей, продуцируемых плазматическими клетками, на предмет содержания антител. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, выявление других антител, обладающих специфичностью антител по настоящему изобретению, осуществляют с помощью аналогичного способа. Например, после выявления клона В-клетки, продуцирующего антитело, проводят полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (RT-PCR) для клонирования ДНК, кодирующей переменные участки или их части антитела. Такие последовательности затем субклонируют в векторы экспрессии, подходящие для рекомбинантного продуцирования человеческих антител. Специфичность связывания, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, подтверждают путем определения способности антитела или рекомбинантного антитела связывать клетки M2 или другие клетки, экспрессирующие человеческий полипептид CD163, который экспрессируется клетками M2.

[0416] В соответствии с конкретными вариантами осуществления способов, описанных в настоящем документе, В-клетки, выделенные из периферической крови или лимфатических узлов, сортируют, например, на основании их положительности по CD19, и высевают, например, со специфичностью до одной клетки на лунку, например, в 96-, 384-

или 1536-луночных конфигурациях. Клетки индуцируют дифференцироваться в клетки, продуцирующие антитела, например плазматические клетки, и собирают надосадочные жидкости культур, и тестируют их на связывание с клетками, экспрессирующими целевой полипептид на своей поверхности, с помощью, например, FMAT- или FACS-анализа. Положительные лунки затем подвергают полнолуночной RT-PCR для амплификации переменных участков тяжелой и легкой цепи молекулы IgG, экспрессируемой клональными дочерними плазматическими клетками. Полученные PCR-продукты, кодирующие переменные участки тяжелой и легкой цепей или их части, субклонируют в векторы экспрессии человеческих антител для рекомбинантной экспрессии. Полученные в результате рекомбинантные антитела затем тестируют для подтверждения их исходной специфичности связывания и дополнительно тестируют, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, на перекрестную реактивность против других клеток или белков.

[0417] Так, в соответствии с одним вариантом осуществления, способ выявления антител на практике осуществляют следующим образом. Во-первых, полноразмерные или приблизительно полноразмерные кДНК CD163 при помощи трансфекции вводят в клеточную линию для экспрессии полипептидов CD163. Во-вторых, образцы человеческой плазмы или сыворотки от индивидуумов тестируют на антитела, которые связывают экспрессируемые клеткой полипептиды. И, наконец, mAb, полученные от индивидуумов с положительным результатом в плазме или сыворотке, изучают на вопрос связывания с экспрессируемыми теми же клетками полипептидами CD163. На этой стадии, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, производят дополнительное определение высокой специфичности mAb.

[0418] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, полинуклеотиды, которые кодируют антитела или их части по настоящему изобретению, выделяют из клеток, экспрессирующих антитела, в соответствии со способами, доступными в настоящей области техники и описанными в настоящем документе, в том числе путем амплификации с помощью полимеразной цепной реакции с применением праймеров, специфичных к консервативным участкам полипептидов человеческих антител. Например, переменные участки легкой цепи и тяжелой цепи клонируют из В-клетки согласно методикам молекулярной биологии, описанным в WO 92/02551; в патенте США № 5627052; или в Babcook et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7843-48 (1996). В соответствии с определенными вариантами осуществления, субклонируют и секвенируют полинуклеотиды, кодирующие все или часть переменных участков как тяжелой, так и легкой цепи молекулы IgG, экспрессируемой клональными дочерними плазматическими клетками, экспрессирующими антитело. В

соответствии с некоторыми вариантами осуществления, последовательность кодируемого полипептида можно легко определить по полинуклеотидной последовательности.

[0419] Выделенные полинуклеотиды, кодирующие полипептид по настоящему изобретению, субклонируют в вектор экспрессии для рекомбинантного получения антител и полипептидов по настоящему изобретению с помощью процедур, известных в настоящей области техники и описанных в настоящем документе.

[0420] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, свойства связывания антитела (или его фрагмента) с полипептидами CD163 или клетками M2 обычно определяют и оценивают с помощью способов иммунодетекции, в том числе, например, иммунофлуоресцентных анализов, таких как иммуногистохимия (ИНС) и/или сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS). Способы иммунологического анализа предусматривают, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, контроли и процедуры определения того, связываются ли антитела специфически с полипептидами CD163 или с макрофагами M2 и не распознают ли или не вступают ли в перекрестную реакцию с контрольными клетками, например клетками M1 или клетками-хозяевами, трансфицированными для экспрессии контрольного белка.

[0421] После предварительного скрининга сыворотки для выявления пациентов, у которых продуцируются антитела к полипептиду CD163 или к макрофагам M2 или TAM, способы по настоящему изобретению обычно предусматривают выделение или очистку В-клеток из биологического образца, предварительно полученного от пациента или субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, у пациента или субъекта в настоящее время или ранее был диагностирован или подозревается рак или конкретное представляющее интерес заболевание, или считается, что у пациента или субъекта нет рака или заболевания. Как правило, пациент или субъект является млекопитающим и, в соответствии с конкретными вариантами осуществления, человеком. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, биологический образец представляет собой любой образец, который содержит В-клетки, в том числе без ограничения лимфатический узел или ткань лимфатического узла, плевральный выпот, периферическую кровь, асцит, опухолевую ткань или спинномозговую жидкость (CSF). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, В-клетки выделяют из биологических образцов различного типа, таких как биоптат опухоли или другой биологический образец, пораженный конкретным заболеванием. Однако, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, понятно, что для любого из вариантов осуществления настоящего изобретения можно применять любой биологический образец, содержащий В-клетки.

[0422] После выделения В-клетки индуцируют к продуцированию антител, например, путем культивирования В-клеток в условиях, поддерживающих пролиферацию или развитие В-клеток в антителообразующую клетку, плазмобласт или плазмоцит. Затем антитела подвергают скринингу, обычно с применением высокопроизводительных методик, для выявления антитела, которое специфически связывается с целевым антигеном, например, с конкретной тканью, клеткой или полипептидом. В соответствии с определенными вариантами осуществления, специфический антиген, например полипептид на клеточной поверхности, связываемый антителом, не известен, тогда как в соответствии с другими вариантами осуществления, антиген, специфически связываемый антителом, известен.

[0423] В соответствии с настоящим изобретением, В-клетки в некоторых вариантах осуществления выделяют из биологического образца, например опухоли, ткани, образца периферической крови или лимфатического узла, любыми способами, известными и доступными в настоящей области техники. В-клетки обычно сортируют с помощью FACS на основании присутствия на их поверхности специфического для В-клеток маркера, например, CD19, CD138 и/или поверхностного IgG. Тем не менее, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, используют другие способы, известные в настоящей области техники, такие как, например, очистка на колонке с применением магнитных микроносителей к CD19 или магнитных микроносителей, специфичных к IgG, с последующей элюированием из колонки. Тем не менее, магнитное выделение В-клеток с применением любого маркера, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, приводит к потере определенных В-клеток. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, выделенные клетки не сортируют, а вместо этого прямо высевают очищенные в градиенте фиколла мононуклеарные клетки, выделенные из опухоли, с соответствующим или требуемым числом специфичностей на лунку.

[0424] Для выявления В-клеток, продуцирующих антитела, В-клетки обычно высевают с низкой плотностью (например, с одноклеточной специфичностью на лунку, 1-10 клетками на лунку, 10-100 клетками на лунку, 1-100 клетками на лунку, менее 10 клеток на лунку или менее 100 клеток на лунку) в многолуночные или титрационные микропланшеты, например, в 96-, 384- или 1536-луночных конфигурациях. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, если В-клетки первоначально высевают с плотностью более одной клетки на лунку, тогда способы по настоящему изобретению предусматривают стадию последующего разведения клеток в лунке, выявленной как продуцирующая антиген-специфическое антитело, до достижения одноклеточной специфичности на лунку, тем самым облегчая выявление В-клетки, которая продуцирует

антиген-специфическое антитело. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, надосадочные жидкости клеток или их часть и/или клетки замораживают и сохраняют для будущего тестирования и последующего выделения полинуклеотидов, кодирующих антитела.

[0425] В соответствии с определенными вариантами осуществления, В-клетки культивируют в условиях, благоприятствующих продуцированию антител В-клетками. Например, В-клетки культивируют в условиях, благоприятных для пролиферации и дифференцировки В-клеток, с получением антителопродуцирующих плазмобластов, антителообразующих клеток или плазмочитов. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, В-клетки культивируют в присутствии митогена В-клеток, такого как липополисахарид (LPS) или лиганд CD40. В соответствии с одним конкретным вариантом осуществления, В-клетки дифференцируют в антителопродуцирующие клетки путем их культивирования с питающими клетками и/или другими активаторами В-клеток, такими как лиганд CD40.

[0426] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, надосадочные жидкости клеточных культур или полученные из них антитела тестируют на их способность связываться с целевым антигеном с помощью стандартных способов, доступных в настоящей области техники, в том числе описанных в настоящем документе. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, надосадочные жидкости культур тестируют на наличие антител, которые связываются с целевым антигеном, с применением высокоэффективных способов. Например, В-клетки культивируют в многолуночных титровальных микропланшетах так, чтобы можно было использовать роботы-манипуляторы планшетов для одновременного отбора нескольких надосадочных жидкостей клеток и тестирования на наличие антител, которые связываются с целевым антигеном. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, для облегчения захвата комплексов антитело/антиген антигены связаны с микроносителями (например, парамагнитными или латексными микроносителями). В соответствии с другими вариантами осуществления, антигены и антитела метят флуоресцентными метками (с помощью различных меток) и проводят с ними FACS-анализ для выявления присутствия антител, которые связываются с целевым антигеном. В соответствии с одним вариантом осуществления, связывание антител определяют с помощью анализа и приборов FMAT™ (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния). FMAT представляет собой флуоресцентную макроконфокальную платформу для высокопроизводительного скрининга, которая позволяет проводить нерадиоактивные анализы «смешивай и считывай» с использованием живых клеток или микроносителей.

[0427] При сравнении связывания антитела с конкретным целевым антигеном (например, биологическим образцом, таким как раковая ткань или клетки или инфекционные агенты) со связыванием антитела с контрольным образцом (например, биологическим образцом, таким как нормальные клетки, клетки сравнения от другого вида, другой раковой ткани или клетки или другого инфекционного агента), в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, считается, что антитело предпочтительно связывается с конкретным целевым антигеном, если оно связывает по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в пять раз или по меньшей мере в десять раз больше антител с конкретным целевым антигеном по сравнению с количеством, которое связывается с контрольным образцом.

[0428] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, полинуклеотиды, кодирующие цепи антител, их переменные участки или их фрагменты, выделяют из клеток с использованием любых средств, доступных в настоящей области. В соответствии с одним вариантом осуществления, полинуклеотиды выделяют с помощью полимеразной цепной реакции (PCR), например, PCR с обратной транскрипцией (RT-PCR) с применением олигонуклеотидных праймеров, которые специфически связываются с полинуклеотидными последовательностями, кодирующими тяжелую или легкую цепь, или их комплементарными цепями, с использованием стандартных процедур, доступных в настоящей области техники. В соответствии с одним вариантом осуществления, положительные лунки подвергают полнолуночной RT-PCR для амплификации переменных участков тяжелой и легкой цепи молекулы IgG, экспрессируемой клональными дочерними плазмочитами. Такие PCR-продукты, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, секвенируют, а продукты, кодирующие переменные участки тяжелой и легкой цепей или их части, затем субклонируют в векторы экспрессии человеческого антитела и рекомбинантно экспрессируют в соответствии со стандартными процедурами в настоящей области техники (см., например, патент США № 7112439). Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие специфичное к макрофагу M2 антитело или его фрагмент, которые описаны в настоящем документе, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, размножают и экспрессируют в соответствии с любой из ряда хорошо известных процедур вырезания, лигирования, трансформации и трансфекции нуклеиновых кислот. Таким образом, в соответствии с определенными вариантами осуществления, предпочтительной является экспрессия фрагмента антитела в прокариотической клетке-хозяине, такой как *E. coli* (см., например, Pluckthun et al., *Methods Enzymol* 178:497-515 (1989)). В соответствии с другими определенными вариантами осуществления, предпочтительной является экспрессия антитела или его

антигенсвязывающего в эукариотической клетке-хозяине, такой как дрожжи (например, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastoris*); клетках животных (в том числе клетках млекопитающих) или растительных клетках. Примеры подходящих клеток животных включают без ограничения клетки миеломы, COS, СНО или гибридомы. Примеры растительных клеток включают клетки табака, кукурузы, сои и риса. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, с помощью способов, известных специалистам в настоящей области техники и основанных на настоящем изобретении, конструируют вектор нуклеиновой кислоты для экспрессии чужеродных последовательностей в конкретной системе-хозяине, а затем вставляют полинуклеотидные последовательности, кодирующие опухоль-специфическое антитело (или его фрагмент). Регуляторные элементы будут варьировать в зависимости от конкретного хозяина.

[0429] Один или более реплицируемых векторов экспрессии, содержащих полинуклеотид, кодирующий вариабельный и/или константный участки, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, получают и применяют для трансформации соответствующей линии клеток, например, непродуцирующей линии клеток миеломы, такой как мышьяная линия NSO, или бактерии, такой как *E. coli*, в которой будет происходить продуцирование антитела. Для получения эффективной транскрипции и трансляции полинуклеотидная последовательность в каждом векторе должна включать соответствующие регуляторные последовательности, в частности промоторную и лидерную последовательности, функционально связанные с последовательностью, кодирующей вариабельный участок.

[0430] Конкретные способы получения антител таким путем обычно хорошо известны и применяются в стандартной практике. Например, процедуры молекулярной биологии описаны в Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989; см. также Sambrook et al., 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (2001)). Хотя этого и не обязательно, в соответствии с конкретными вариантами осуществления, участки полинуклеотидов, кодирующие рекомбинантные антитела, секвенируют. Секвенирование ДНК проводят, например, любым способом или с применением любых систем, известных в настоящей области техники. Основная технология секвенирования описана, например, в Sanger et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463 (1977)) и в Руководстве по секвенированию Amersham International plc, в том числе с ее усовершенствованиями.

[0431] В соответствии с конкретными вариантами осуществления, полученные рекомбинантные антитела или их фрагменты затем тестируют для подтверждения их исходной специфичности и, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления,

дополнительно тестируют на перекрестную реактивность, например, с родственными полипептидами. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитело, выявленное или полученное в соответствии с описанными в настоящем документе способами, тестируют на способность интернализироваться или выполнять другие эффекторные функции с помощью традиционных способов.

Упаковки, наборы и предварительно заполненные емкости

[0432] Также в настоящем документе предусмотрены наборы, содержащие одно или более описанных выше соединений. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, набор содержит описываемое в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в подходящей емкости.

[0433] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, предусмотрена емкость, содержащая описываемую в настоящем документе композицию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, емкость представляет собой любую подходящую емкость, которая содержит, например, жидкую или лиофилизированную композицию, в том числе без ограничения флакон, шприц, бутыл, пакет для внутривенного (IV) введения или ампулу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, шприц содержит любой объем жидкости, подходящий для инъекции субъекту, в том числе без ограничения 0,5 см³, 1 см³, 2 см³, 5 см³, 10 см³ или более.

[0434] В настоящем документе предусмотрены наборы, включающие композицию или композиции, которые описаны в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в настоящем документе предусмотрен набор для лечения субъекта, имеющего раковое заболевание, включающий описываемое в настоящем документе антитело и средство противораковой терапии.

[0435] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в настоящем документе предусмотрен набор для лечения рака, включающий описываемое в настоящем документе антитело и этикетку, прикрепленную к емкости или упакованную вместе с ней, причем на этикетке описано применение антитела в сочетании со средством противоопухолевой терапии.

[0436] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в настоящем документе предусмотрен набор для лечения рака, включающий средство противораковой терапии и этикетку, прикрепленную к емкости или упакованную вместе с ней, причем на этикетке описано применение средства противораковой терапии с описываемым в настоящем документе антителом.

[0437] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, к емкости из наборов обычно относят по меньшей мере одно из флакона, пробирки для анализа, колбы, бутыля, ампулы, шприца, пакета для внутривенного (IV) введения и/или другой емкости, в которой находится и/или предпочтительно соответствующим образом разделен на аликвоты по меньшей мере один полипептид. В настоящем документе предусмотрена емкость, содержащая описываемую в настоящем документе композицию.

[0438] Наборы, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, включают приспособление, содержащее емкости по меньшей мере с одним слитым белком, детектируемым фрагментом, репортерной молекулой и/или любыми другими реагентами в закрытом виде для коммерческой продажи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, к таким емкостям относятся полученные литьем под давлением и/или формованные раздувом пластиковые емкости, в которых хранятся необходимые флаконы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, наборы также включают печатный материал по применению материалов, содержащихся в наборе.

[0439] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, упаковки и наборы дополнительно включают буферное средство, консервант и/или стабилизирующее средство в фармацевтическом составе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, каждый компонент набора заключен в отдельную емкость, и все различные емкости могут находиться в одной упаковке. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрытые наборы предназначены для хранения в холодильнике или при комнатной температуре.

[0440] Кроме того, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, составы содержат стабилизаторы для увеличения срока годности наборов и включают, например, бычий сывороточный альбумин (BSA). Если композиции являются лиофилизированными, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, набор содержит дополнительные составы растворов для ресуспендирования лиофилизированных составов. Приемлемые растворы для ресуспендирования хорошо известны в настоящей области техники и включают, например, фармацевтически приемлемый фосфатно-солевой буферный раствор (PBS).

[0441] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, упаковки и наборы дополнительно включают один или более компонентов для анализа, такого как, например, ELISA-анализ. К подлежащим тестированию образцам по настоящей заявке относятся, например, кровь, плазма, срезы тканей и выделения, моча, лимфа и их продукты. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, упаковки и наборы дополнительно

включают один или более компонентов для сбора образцов (например, шприц, чашку, тампон и т. д.).

[0442] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, упаковки и наборы дополнительно включают этикетку с указанием информации, требуемой Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США или аналогичным регулирующим органом, например, описание продукта, количество и способ применения и/или показание для лечения. Представленные в настоящем документе упаковки могут включать любую из описываемых в настоящем документе композиций.

[0443] Термин «упаковочный материал» относится к физической структуре, содержащей компоненты набора. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, упаковочный материал обеспечивает стерильность компонентов и изготовлен из материала, обычно применяемого для таких целей (например, из бумаги, гофрированного волокна, стекла, пластика, фольги, ампул и т. д.). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, этикетка или вкладыш в упаковку содержат соответствующие письменные инструкции. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, наборы дополнительно включают этикетки или инструкции по применению компонентов набора в любом способе по настоящему изобретению. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, набор включает соединение в упаковке или дозаторе вместе с инструкциями по применению соединения описываемым в настоящем документе способом.

[0444] В соответствии с другими вариантами осуществления, набор дополнительно содержит емкость для средства противораковой терапии.

[0445] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, инструкции включают инструкции по применению любого из описываемых в настоящем документе способов, в том числе способов лечения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, инструкции дополнительно включают указания по удовлетворительному клиническому результату или любым возникающим неблагоприятным симптомам или дополнительную информацию, требуемую регулирующими органами, такими как Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, для применения на субъекте-человеке.

[0446] Инструкции, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, находятся на «печатном материале», например, на бумаге или картоне внутри набора или прикреплены к нему или на этикетке, прикрепленной к набору или упаковочному материалу, или прикреплены к флакону или тубе, содержащей компонент набора. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, инструкции дополнительно

содержатся на машиночитаемом носителе, таком как, например, CD-ROM, DVD, устройства флэш-памяти, твердотельная память, магнитные диски и дисковые устройства, магнитные ленты, системы и сервисы облачных вычислений и т. п. В некоторых случаях программа и инструкции закодированы на носителе постоянным, практически постоянным, полупостоянным или постоянным образом.

[0447] В настоящем документе предусмотрена емкость, содержащая описываемую в настоящем документе композицию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, емкость представляет собой любую подходящую емкость, которая содержит жидкую или лиофилизированную композицию, в том числе без ограничения флакон, шприц, бутылка, пакет для внутривенного (IV) введения или ампулу. Шприц, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, содержит любой объем жидкости, подходящий для инъекции субъекту, в том числе без ограничения 0,5 см³, 1 см³, 2 см³, 5 см³, 10 см³ или более.

[0448] В настоящем документе предусмотрены наборы, включающие композицию, которая описана в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в настоящем документе предусмотрен набор для лечения рака, включающий описываемое в настоящем документе антитело в комбинации с противораковым терапевтическим средством.

[0449] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в настоящем документе предусмотрен набор для лечения рака, включающий описываемое в настоящем документе антитело и этикетку, прикрепленную к емкости или упакованную вместе с ней, причем на этикетке описано применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента со средством противоопухолевой терапии.

[0450] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в настоящем документе предусмотрен набор для лечения рака, включающий средство противораковой терапии и этикетку, прикрепленную к емкости или упакованную вместе с ней, причем на этикетке описано применение средства противораковой терапии с описываемым в настоящем документе антителом.

ПРИМЕРЫ

[0451] Настоящее изобретение будет дополнительно проиллюстрировано в представленных далее примерах, которые приведены лишь в иллюстративных целях и никоим образом не предназначены для ограничения настоящего изобретения.

ПРИМЕР 1. Выявление и клонирование

[0452] Выделяли и клонировали антитела, которые специфически связываются с человеческими супрессорными клетками миелоидного происхождения (MDSC), которые продуцируются у пациентов, дающих ответ на лечение ингибитором контрольной точки к PD-1. Данные моноклональные антитела дополнительно исследовали на предмет их иммуномодулирующих свойств с целью выявления антител, обладающих терапевтическим потенциалом для целенаправленного воздействия и устранения иммуносупрессивных эффектов MDSC, тем самым повышая клиренс опухоли.

[0453] Выявляли пациентов с раковым заболеванием, которые достигали частичного или полного ответа на ингибитор иммунных контрольных точек в течение периода длительностью по меньшей мере 6 месяцев, и отбирали их для анализа репертуара В-клеток памяти с помощью платформы I-STAR. В данной платформе реализована система кратковременного культивирования В-клеток для изучения репертуара В-клеток памяти. Из десяти миллионов моноклеарных клеток периферической крови (PBMC) каждого пациента-донора выделяли более 15000 В-клеток памяти по поверхностной экспрессии у них CD19 и IgG. Затем данные В-клетки памяти высевали в сорок 384-луночных микротитровальных планшетов в количестве приблизительно 1 клетка/лунка в условиях, которые стимулировали активацию В-клеток, их пролиферацию, окончательную дифференцировку и секрецию у них антител. Плотность посева 1 клетка/лунка позволяла размножать отдельные клоны В-клеток так, чтобы могла быть воссоздана пара тяжелой и легкой цепей аутентичного антитела из каждой культуральной лунки. С помощью высокопроизводительной и миниатюризированной мультиплексной проточной цитометрии секретируемые антитела IgG в каждой лунке подвергали скринингу на связывание с MDSC. Было выявлено 49 положительных клонов В-клеток. Выбранную субпопуляцию антител, которая была приоритетной, исходя из профилей связывания MDSC и последовательностей переменных участков антител, секвенировали, клонировали и подвергали экспрессии в виде рекомбинантного IgG1 для дополнительного изучения характеристик *in vitro*.

[0454] Последовательности, кодирующие переменные участки тяжелых (VH) и легких (VL) цепей, из генов иммуноглобулинов из клонов В-клеток, которые продуцировали MDSC-специфические антитела, амплифицировали с помощью RT-PCR-амплификации с применением специфичных для данного семейства наборов праймеров. По результатам положительных специфичных для семейства PCR-реакций пулы клонов VH-или VL-участков клонировали в вектор экспрессии выше последовательности, кодирующей константный домен человеческого IgG1, в результате чего получали функциональное

антитело с той же характеристикой связывания, что и антитело, продуцируемое данным клоном В-клетки. Конструировали ДНК-плазмиды и запрашивали синтез генов константных участков у компании GenScript, Нью-Джерси, США. Данные плазмиды объединяли по всем возможным специфичным для семейства парам тяжелых и легких цепей и использовали для временной трансфекции клеток HEK293. Все надосадочные жидкости трансфектантов, содержащие секретированные рекомбинантные антитела, подвергали скринингу в проточных анализах связывания MDSC. В случае лунок, которые содержали более одного клон В-клеток на лунку, множественные последовательности, кодирующие VH- и VL-домены, амплифицировали и экспрессировали так, как описано ранее. Затем использовали MDSC-скрининг для выявления пулов комбинаций тяжелых и легких цепей, которые воспроизводили активность связывания, наблюдаемую у антитела, обнаруженного в смешанных культурах. Последовательности ДНК переменных VH- и VL-участков тяжелых и легких цепей для всех связывающих mAb подтверждали с помощью множественных реакций секвенирования с применением очищенной ДНК из наборов Maxiprep (происхождения GenScript и амплифицированные плазмиды Macherey Nagel).

[0455] Один клон В-клеток (эмбриональный идентификатор для тяжелой цепи VH3.30-3/IGHG1 и легкой цепи VK1.012) выявляли в результате MDSC-скрининга и обозначали его как AB101, содержащий легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 10. Донором, от которого был получен клон, был пациент с диагнозом немелкоклеточный рак легкого (NSCLC). У пациента было прогрессирующее заболевание до химиотерапии, а затем была полная ремиссия после лечения антителом к PD-1, и на момент забора крови он все еще получал лечение. По результатам секвенирования было подтверждено, что лунка клон В-клетки содержала лишь одну тяжелую и одну легкую цепь. Как наблюдали в случае секретированных антител IgG из одного клон В-клеток, воспроизведенное антитело также имело отчетливое бимодальное связывание с MDSC, что указывало на высокую экспрессию целевого антитела в выбранной субпопуляции MDSC. См. **фиг. 1**. Результаты скрининга воспроизведенных антител на двух MDSC-донорах с ослабленными блокирующими (10 мкг/мл рекомбинантного блокатора для Fc (Abcam) и жесткими блокирующими (10 мкг/мл рекомбинантного блокатора для Fc от Abcam + 1 мкг/мл антитела к CD16, антитела к CD32 и антитела к CD64) условиями свидетельствовали о дозозависимом насыщаемом связывании AB101 с человеческими MDSC с IC₅₀ около 10 нМ в ослабленных блокирующих условиях. Имело место снижение общего связывания AB101, о чем свидетельствовало снижение MFI в жестких блокирующих условиях.

[0456] CD163 является маркером клеток из моноцитарной/макрофагальной линии дифференцировки. Сообщалось, что экспрессия CD163 на дифференцированных *in vitro* MDSC является бимодальной. Было высказано предположение, что бимодальное связывание AB101 может коррелировать с экспрессией CD163. Для проверки данной гипотезы получали MDSC в условиях *in vitro* (см. **ПРИМЕР 11**) и совместно окрашивали антителом к CD163 (BioLegend 333611) и AB101, конъюгированным с AF647, как описано в **ПРИМЕРЕ 8**, и анализировали на связывание с помощью FACS. Клетки сначала гейтировали как CD163 с высоким или низким уровнем, а затем исследовали на связывание с различными концентрациями AB101 или изотипического контроля в виде человеческого IgG1. Субпопуляцией клеток, с которой связывалось антитело AB101, были CD163^{Hi} клетки. См. **фиг. 2**.

ПРИМЕР 2. Выделение аутологичных моноцитов и Т-клеток

[0457] В данном примере показано выделение аутологичных моноцитов и Т-клеток. Человеческие моноциты и Т-клетки получали с применением методик, обычно применяемых в настоящей области техники. Человеческие моноциты и Т-клетки выделяли из лейкоцитов (WBC), попавших во встроенную камеру, известную как камеры LeukoReduction System (LRS), во время процесса сбора тромбоцитов. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) очищали из образцов LRS центрифугированием в стандартном градиенте плотности (Ficoll™Paque Premium 1.073, GE Healthcare, № 17-5449-52). Надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в 20 мл буфера EasySep™ (StemCell Technologies, № 20144) для подсчета PBMC и дальнейших выделений моноцитов и Т-клеток.

[0458] Моноциты выделяли с помощью набора для выделения человеческих моноцитов EasySep (Stem Cell, № 19359) в соответствии с инструкциями производителя.

[0459] Общие CD3, CD4 или CD8 Т-клетки выделяли с применением набора для выделения человеческих CD3⁺ Т-клеток (StemCell 19051), набора EasySep™ для выделения человеческих CD4⁺ Т-клеток (StemCell № 17952), набора EasySep™ для выделения человеческих CD8⁺ Т-клеток. (StemCell № 17953) соответственно согласно инструкциям производителя. В этих наборах для отрицательной селекции предусмотрено применение антител для мечения нежелательных типов клеток для последующего их удаления, что позволяло выделить из образца требуемые целевые клетки.

ПРИМЕР 3. Специфическое связывание AB101 с иммуносупрессивными миелоидными клетками

[0460] Для оценки специфичности связывание антитела по настоящему изобретению, т. е. антитела AB101, конъюгированного с флуоресцентным красителем AF647 дальнего красного спектра, тестировали на различных типах клеток, в том числе MDSC, иммуносупрессивных макрофагах M2c и провоспалительных макрофагах M1, полученных так, как описано в **ПРИМЕРЕ 11** и ниже. Кроме того, на связывание антител оценивали отдельные иммунные популяции из PBMC от здоровых доноров. Для каждого из данных исследований были использованы по меньшей мере 3 индивидуальных донора. PBMC выделяли из крови с применением градиента фиколла с помощью стандартных процедур. Для того, чтобы различить популяции иммунных клеток, клетки PBMC затем окрашивали маркерами гематопозитической линии дифференцировки (CD45-BV421 (BD 642275), CD3-BV510 (BD 563109), CD11c-PE-Cy7 (BD 561356), CD14-FITC (BD 347493), CD20-APC-Cy7 (BD 562643), CD56-PE (BD 347747) и CD66c (BD 551478). Отдельные популяции линий дифференцировки были дополнительно охарактеризованы следующими паттернами экспрессии и оценены на связывание с AB101: Т-клетки CD45⁺CD3⁺, В-клетки CD45⁺CD20⁺, моноциты CD45⁺CD14⁺, NK-клетки CD45⁺SSC^{low}CD14⁺CD3⁺CD56⁺, гранулоциты CD45⁺SSC^{Hi}CD14⁺CD66⁺ и дендритные клетки CD45⁺CD14⁺CD66⁺CD11c⁺. Также оценивали связывание антител с первичными человеческими отличными от иммуноцитов клетками (Lonza), в том числе эпителиальными клетками малых дыхательных путей (SAEC, № CC-2547), эпителиальными клетками проксимальных канальцев почек (RPTEC, № CC-2553), эндотелиальными клетками микрососудов легких (HMVEC, № CC-2527), эндотелиальными клетками пупочной вены (HUVEC, № C2519A), гладкомышечными клетками аорты (AOSMC, № CC2571) и кератиноцитами (№ 00192627). Данные клетки культивировали в среде, специфичной для данного типа клеток, и в условиях, соответствующих инструкциям производителя, до 60-70% конфлюентности, а затем собирали для тестирования на связывание антител методом проточной цитометрии (фиг. 4 и фиг. 5).

[0461] Моноцитарные MDSC в условиях *in vitro* получали из выделенных моноцитов стандартными способами: на День 0 моноциты высевали в RPMI 1640 (Hyclone SH30027.02, бессывороточную) в количестве $1,5 \times 10^5 / \text{см}^2$, инкубировали в течение 1 часа при 5% CO₂ и 37°C, затем промывали предварительно нагретой RPMI перед добавлением к клеткам среды для MDSC (RPMI + 10% FBS (Hyclone SH30070.03) + 50 нг/мл GM-CSF (R&D Systems 215-GM-010) + 50 нг/мл IL-6 (R&D Systems 206-IL-010), 20 мл на колбу T75). Затем клетки

культивировали в 5% CO₂, 37°C, в течение 7 суток без замены среды. Спустя 7 суток клетки собирали путем 2× промывки посредством PBS (Hyclone SH30028.03) + 2 mM EDTA, затем добавляли холодный раствор для открепления макрофагов (PromoCell C-41330) по 15 мл на колбу T75 с последующей инкубацией в течение 40 минут при 2-8°C. Клетки удаляли путем постукивания колбой по ладони, собирали и разводили 1:1 с помощью PBS + 2 mM EDTA. Клетки осаждали в конической пробирке путем центрифугирования в течение 15 минут при 450×g, один раз промывали посредством PBS + 2 mM EDTA, подсчитывали и ресуспендировали в количестве 1×10⁷ на мл в блокирующем буфере для FACS (PBS + 1% FBS + 0,1 мкг/мл блокатор для Fc (Abcam Ab90285) в случае нежестких условий окрашивания или PBS + 1% FBS + блокатор для Fc и + 0,01 мкг/мл блокатора для CDR (антитела к FcR CD16, CD32 и CD64; BD Biosciences 556617, 557333 и 555525 соответственно) в случае жестких условий окрашивания). Клетки инкубировали в блокирующем буфере для FACS в течение 20 минут (мин) при комнатной температуре (RT), затем 30 минут при 4°C. Затем клетки разводили до 1×10⁶ клеток/мл буфером для FACS + 5% BSA (Sigma A3059) и 40 мкл клеток (4×10⁴ клеток) забирали аликвотой в лунки для окрашивания. К клеткам добавляли первичные антитела (AB101 в концентрации 20, 6, 2, 0,75, 0,25, 0,08 и 0,02 мкг/мл или изотипический контроль в виде человеческого IgG1 в концентрации 6 мкг/мл) и инкубировали в течение 90 минут при RT. Клетки промывали 3× посредством 250 мкл/лунка буфером для FACS + 5% BSA. Меченные посредством APC вторичные козы антигены к человеческим IgG (Jackson IR 109-136-097) готовили в соотношении 1:250 в буфере для FACS + BSA + краситель на жизнеспособность e780 (в разведении 1:1000) и добавляли к клеткам (50 мкл на лунку). После инкубации при 4°C в течение 45 минут клетки промывали 3× в 250 мкл буфера для FACS. Затем клетки фиксировали в 100 мкл на лунку 4% PFA в течение 10-15 минут при RT, один раз промывали посредством 250 мкл буфера для FACS, осаждали при 650×g в течение 5 минут, затем ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS для проведения анализа методом проточной цитометрии.

[0462] Антитело AB101 связывается с человеческими иммуносупрессивными миелоидными клетками (макрофагами M2c и моноцитарными MDSC), как показано на **фиг. 3**, на которой изображены графики MFI при окрашивании AB101 или изотипическим контролем на M2c, M1 и M0. Антитело AB101 не связывается с B-, T- и NK-клетками и гранулоцитами, как проиллюстрировано на **фиг. 4**, на которой показано окрашивание AB101 на T-, B- и NKT-клетках, нейтрофилах, моноцитах и дендритных клетках (черная кривая) по сравнению с изотипическим контролем (серая кривая) и отличными от иммуноцитов клетками, такими как SAEC, RPTEC, HMVEC, HUVEC, AOSMC и

кератиноциты, как показано на **фиг. 5**. Таким образом, антитело AB101 специфически связывается с CD163-экспрессирующими иммуносупрессивными миелоидными клетками, не затрагивая другие иммунные или отличные от иммунных клетки.

ПРИМЕР 4. FcNull антитело AB101 иммунопреципитирует полипептид CD163

[0463] В данном примере проиллюстрирована иммунопреципитация CD163 с применением FcNull антитела, содержащего вариабельные домены AB101 в последовательности IgG1, модифицированной для существенного снижения связывания антитела с Fc-рецепторами (Fc-null), обозначенного как AB102, которое содержит легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 11. Иммунопреципитацию (IP) проводили согласно публикации Klockenbusch and Kast, J Biomed Biotechnol Article ID 927585 (2010). Антитела добавляли перед параформальдегидным фиксатором (PFA) в более классическом подходе IP со сшиванием или перед сшиванием с бис(сульфоукцинимидил)субератом (BS3) с последующей IP.

[0464] В случае IP, предусматривающей подход со сшиванием с помощью PFA, моноциты выделяли из крови человека, а затем поляризовали в клетки M2 с помощью протокола из **ПРИМЕРА 2** и **ПРИМЕРА 11**, макрофаги M2 открепляли от планшета после инкубации с раствором для открепления макрофагов (раствор для открепления макрофагов DXF; PromoCell, № C-41330) при 37°C в течение ~10 минут, в течение которых клетки округлялись и начинали открепляться. Колбы тщательно простукивали, чтобы облегчить открепления клеток. После открепления раствор для открепления макрофагов гасили добавлением к клеткам буфера для FACS. Клетки осаждали при 300×g в течение 10 минут и удаляли надосадочную жидкость. Осадок клеток ресуспендировали в 30 мл PBS, содержащего 5% BSA (масса/объем) и 1 mM EDTA, pH 8,0, и инкубировали на льду в течение 30 минут.

[0465] Клетки разделяли на 6 аликвот по 15×10^6 клеток на аликвоту (5 мл на аликвоту) и к каждой добавляли биотинилированные антитела. В две аликвоты вносили по 50 мкг мышиного IgG1 к hCD163 (R&D, № MAB1607), в две аликвоты вносили по 100 мкг антитела ISO2 в качестве изотипического контроля (в Fc-null каркасной цепи) и в две аликвоты вносили по 100 мкг тестируемого антитела AB102 (содержащего вариабельные домены AB101 в последовательности IgG1, модифицированной для существенного снижения связывания антитела с Fc-рецепторами (Fc-null)). Клетки инкубировали при 4°C в течение 1 часа, время от времени осторожно перемешивая путем переворачивания пробирок. Клетки осаждали при 300×g в течение 5 минут и промывали 3× посредством PBS-

EDTA, а затем ресуспендировали в 5 мл PBS (без магния или кальция; HyClone, № SH30028.02). В каждую пробирку добавляли параформальдегид (PFA; 5 мл 0,8-процентного раствора) до конечной концентрации PFA 0,4%. Клетки инкубировали в PFA при комнатной температуре в течение 5 минут при осторожном покачивании. Клетки осаждали центрифугированием при 800×g в течение 5 минут и удаляли надосадочную жидкость. Для гашения клетки ресуспендировали в 10 мл охлажденного на льду PBS, содержащего 1,25 М глицина. Клетки осаждали при 800×g в течение 5 минут и ресуспендировали в охлажденном на льду PBS. Клетки осаждали при 800×g в течение 5 минут и ресуспендировали в 1,0 мл буфера RIPA, содержащего 1× объем ингибиторов протеаз (ThermoFisher Scientific, № 89900). Клетки инкубировали на льду в течение 2 часов, а затем 15 раз пропускали через 2-мл гомогенизатор Даунса.

[0466] Клеточные лизаты центрифугировали в центрифуге с подвесной корзинкой для осаждения ядер, а надосадочные жидкости использовали для IP. Белковый лизат (50 мкл) откладывали в качестве фракции ввода и к оставшейся надосадочной жидкости добавляли 2,0 мл холодного PBS, содержащего 1× объем ингибиторов протеаз. К каждому образцу добавляли стрептавидин Dynabeads MyOne (250 мкл) (ThermoFisher Scientific, № 65601) и перемешивали вращением в течение ночи при 4°C. На следующий день микроносители собирали с помощью магнитов StemCell и удаляли надосадочную жидкость. Микроносители последовательно промывали посредством 5 мл буфера Паро I, 5 мл буфера Паро II и 5 мл буфера Паро III в течение 5 минут при 4°C (Oncotarget. 2017; 8(7): 11105–11113). Затем микроносители промывали 3× холодным PBS и, наконец, ресуспендировали в 100 мкл PBS и замораживали при -80°C.

[0467] Микроносители анализировали с помощью масс-спектрометрии. Данный анализ проводили в основном в соответствии со способом, описанным у Yan et al., *Mol Cell Proteomics* 10(3):M110.005611 (2011). В данном способе обращение сшивания формальдегидом и элюирование белков с микроносителей со стрептавидином проводили с помощью 6 М гуанидина, 150 mM Tris-буфера (pH 8,3) при 60°C в течение 3 часов при постоянном помешивании. Надосадочную жидкость денатурировали, восстанавливали и алкилировали в том же буфере с 10 mM трис(2-карбоксиэтил)фосфином (TCEP) и 50 mM хлорацетамидом (CAA) при 95°C в течение 10 минут. Затем образцы разводили в 10 раз и обрабатывали 1,3 мкг трипсина каждый в течение ночи при 37°C. Пептиды очищали с помощью картриджей с C18. Одну повторность IP AB102 и одну повторность IP антитела к CD163 элюировали из картриджей с C18 для прямого MS/MS-анализа. Одну повторность IP AB102 и одну повторность антитела к CD163 инкубировали с 0,1 М формальдегидом-d2, 0,4 М цианоборгидрида натрия в PBS-буфере с pH 7,5 в течение одного часа для мечения

тяжелым диметилированием (d4), и обе повторности IP ISO2 (Fc-null) инкубировали с 0,1 М формальдегида, 0,4 М цианоборгидрида натрия в PBS-буфере с pH 7,5 в течение одного часа для мечения легким диметилированием (d0) на картриджах с C18. Затем картриджи C18 промывали 0,1% трифторуксусной кислотой (TFA) и элюировали 80% ацетонитрилом (ACN). d0/d4-диметилированные пептиды ресуспендировали в буфере А (20% ACN, 0,1% TFA), а затем перемешивали. Пептиды фракционировали с применением собственной микрокапиллярной колонки для HPLC с сильным катионообменником (SCX) (200 мм × 20 см; Proteomix SCX 3 мкм, Sepax Technologies). Пептиды загружали на микрокапиллярную колонку, уравновешенную буфером А, и промывали буфером А. Связанные пептиды элюировали посредством 20 мкл буфера А, содержащего 30%, 50% буфера В (800 мМ формиата аммония, 20% ACN, pH 2,8), с последующим элюированием посредством 20 мкл буфера D (0,5 М ацетата аммония, 50% ACN). Все образцы сушили с помощью Speed-Vac и непосредственно анализировали с помощью Thermo-Orbitrap-Fusion. Спектры искали в базе данных UniProt человека с помощью поисковой системы Comet (<https://sourceforge.net/projects/comet-ms/>). В случае меток в виде деметилирования использовали дифференциальную модификацию 28,03 Да (в случае диметилирования d0) и 32,06 Да (в случае диметилирования d4) на N-конце и боковой цепи Lys.

[0468] Тяжелые/легкие образцы пропускали через встроенную колонку для HPLC с применением колонки с сильным катионообменом (200 мм × 20 см; Proteomix SCX 3 мкм, Sepax Technologies) и подвергали MS/MS с применением Thermo-Orbitrap-Fusion. В случае образцов с тяжелой и легкой меткой включали только спектры полностью метилированных образцов. Было выявлено восемьдесят девять белков, все пептиды которых содержали тяжелый изотоп, что свидетельствовало о том, что белок был выявлен в IP AB102, но не в отрицательном контроле. Из 89 белков, уникальных для IP AB102, 12 посчитали правдоподобно находящимися на клеточной поверхности: CD163, RIPK1, NEUA, SLC31, LRP8, SLIT1, RAF1, ILK, ATRN1, MCA32, FNBP2 и LRRN3. Было обнаружено, что один дополнительный белок, TNFR5, содержит два пептида с тяжелым метилированием и один неметилированный пептид (происхождение IP неизвестно), что позволяло предположить, что он также мог быть эксклюзивным для IP AB102.

[0469] Пептиды из одной повторности IP AB102 и одной повторности IP контрольного антитела к CD163 анализировали по отдельности с помощью масс-спектрометрии. Из 360 белков, выявленных в IP AB102, 45 из них были отобраны как потенциально связанные с мембраной или секретлируемые. Из белков, выявленных в других наборах данных, в IP AB102 были обнаружены следующие: CD163, галектин-1, галектин-3 и пептидил-пролил-цис-транс-изомераза А (PPIA). В этом наборе данных также была

выявлена казеинкиназа IIb, которая, по сообщениям, непосредственно взаимодействует с CD163.

[0470] В случае IP с помощью подхода сшивания с применением BS3 макрофаги собирали путем сбора надосадочных жидкостей из колб в 250-мл центрифужные пробирки. В каждую колбу добавляли холодный раствор для отделения макрофагов (30 мл) и инкубировали в течение 45 минут при 4°C. Затем колбы обрабатывали скребком, клетки собирали в 250-мл центрифужные пробирки и центрифугировали при 650×g в течение 10 минут. Среду аспирировали, оставляя клеточный осадок в пробирке. Затем клетки ресуспендировали в 20 мл холодного PBS + 2 mM EDTA.

[0471] Затем клетки разводили до 1×10^7 клеток/мл с помощью PBS + 2 mM EDTA и разделяли на три объема: 40%, 40% и 20% от общего объема. В одну из 40% фракций добавляли AB102 (2,5 мг). В другую 40% фракцию добавляли антитело к PDL1 в FcNull каркасной цепи (2,5 мг), что представляло собой положительный контроль. В 20% фракцию добавляли изотипический контроль (ISO2 в FcNull каркасной цепи, 1,25 мг), что представляло собой положительный контроль. Каждую фракцию инкубировали при осторожном перемешивании в течение 2 часов при 4°C. Затем их центрифугировали при 650×g в течение 10 минут и осторожно сливали надосадочную жидкость. Каждый осадок ресуспендировали в 15 мл PBS + EDTA, а затем центрифугировали при 650×g в течение 10 минут. Затем данную стадию промывки повторяли. Затем осторожно удаляли промывочный буфер, не нарушая осадки. Осадки из 40% фракций ресуспендировали в 2 мл сшивающего буфера. Осадок из 20% фракций ресуспендировали в 1 мл сшивающего буфера. Стоковую концентрацию BS3, составлявшую 50 mM, растворяли в 70 мкл воды UltraPure на каждый 8-мг флакон. BS3 (60 мкл/мл клеток) добавляли к каждой ресуспендированной клеточной фракции до конечной концентрации BS3 3 mM и каждую клеточную фракцию осторожно перемешивали завихрением. Клеточные фракции затем инкубировали на льду в течение 1 часа, перемешивая каждые 10 минут. После инкубации с BS3 непосредственно к клеткам добавляли 15 мл гасящего раствора и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Клетки центрифугировали в течение 15 минут при 1200×g и осторожно декантировали гасящий буфер. Осадки 1× промывали посредством PBS + EDTA, как описано ранее. Затем клетки лизировали путем добавления 20 мл лизирующего буфера (Pierce™ IP Lysis Buffer № 87788) к каждой из 40% фракций и 10 мл к 20% фракции, а затем инкубировали на льду в течение 15 минут. Затем клеточные лизаты центрифугировали в течение 10 минут при 13000×g при 4°C.

[0472] Смолы MabSelect SuRe (GE Healthcare Life Sciences, № 17543801) подготавливали для применения в IP и очистке белков подготовленных клеток. Стерильную

Mab Select Sure уравнивали 20 объемами колонки (CV) стерильного PBS. Для образцов AB102 и положительного контроля использовали сто пятьдесят микролитров Mab Select SuRe, а для образца ISO использовали 75 мкл. Затем стерильную и уравновешенную смолу MabSelect SuRe переносили в 50-мл конические пробирки. После центрифугирования в пробирки с подготовленной смолой MabSelect SuRe добавляли надосадочную жидкость. Образцы инкубировали в течение ночи при перемешивании вращением с доньшка на крышку при 4°C. На следующие сутки образцам давали осесть в течение 10 минут на льду. Смолу MabSelect SuRe с помощью пипетки переносили в одноразовую капельную колонку. Смолу промывали 20 объемами колонки стерильного PBS. Перед элюированием колонку помещали в пробирку для сбора и центрифугировали в течение 30 секунд на 9000 об./мин в настольной микроцентрифуге Eppendorf для удаления избыточной жидкости. На дно колонки помещали заглушку. Образец элюировали из смолы путем добавления одного объема колонки 50 mM глицина, pH 2,5, в качестве элюирующего буфера в закрытую заглушкой колонку и перемешивания пипеткой, затем оставляли смесь инкубироваться при комнатной температуре в течение 8 минут. (Одну десятую часть общего объема (смолы и элюирующего буфера) удаляли из каждого образца и откладывали для определения сшивания с помощью вестерн-блоттинга. См. ниже.) Остальные образцы нейтрализовали путем добавления 1/10 объема 2 M Tris, pH 8,0. Элюат собирали путем удаления заглушки со дна колонки и немедленного перенесения капельной колонки в 1,8-мл центрифужную пробирку Эппендорфа. Колонку в сборе центрифугировали в течение 30 секунд на 9000 об./мин в настольной микроцентрифуге. Элюат нейтрализовали добавлением к фракции элюата 1/10-й от объема элюата стерильного 2 M Tris, pH 8,0. Для обеспечения полного удаления белка повторяли протокол элюирования. Фракции элюата хранили при -80°C до подтверждения вестерн-блоттингом сшивания.

Вестерн-блоттинг для подтверждения сшивания

[0473] Зарезервированные фракции элюата смешивали с буфером для подготовки образцов Лэммли (Bio-Rad, № 161-0747) + 10% 2-меркаптоэтанола. Образцы нагревали до уровня 90°C в течение 10 минут. Образцы загружали на полиакриламидный гель с градиентом Bis-Tris 4-12%. Гель гнали в течение 80 минут при 200 В. После загрузки гель переносили на мембрану для вестерн-блоттинга из PVDF и гнали в течение ночи при 4°C при 25 В. На следующее утро блоты блокировали в течение 3 часов при RT с помощью реагента SuperBlock (ThermoFisher Scientific, № 37515). После блокировки мембрану 1× промывали в SuperBlock. Вестерн-блот обрабатывали путем зондирования с помощью 1:1000 HRP с антителом к человеческому IgG в течение ночи при 4°C. На следующие сутки

блот 4× промывали посредством PBST по 10 минут на промывку. Вестерн-блот 1× промывали посредством PBS в течение 10 мин. Затем вестерн-блот проявляли с применением субстрата SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher Scientific, № 34076). После обработки на вестерн-блоте были видны четкие бэнды с очень большим смещением, представляющие собой положительное сшивание для AB102. Сшитые бэнды также наблюдали и для положительного контрольного антитела. Как и ожидалось, в случае ISO смещения молекулярной массы не наблюдали.

[0474] Затем оставшиеся образцы осаждали ацетоном, гнали на SDS-PAGE-гелях, из которых затем вырезали сшитые бэнды и подготавливали для масс-спектрометрии. Образцам элюата (AB101, ISO и положительный контроль из вышеупомянутых) давали оттаять. К каждому образцу добавляли четырехкратный объем элюата холодного (-20°C) ацетона. Затем образцы энергично встряхивали на вортексе и инкубировали при -20°C в течение 1 часа. Образцы центрифугировали в течение 10 минут при 15000×g. Надосадочную жидкость декантировали, стараясь не повредить осадок. Осадки сушили в скоростном вакууме в течение 5 минут или до тех пор, пока не испарится жидкость. Осадки ресуспендировали в 15 мкл на пробирку и перемешивали до растворения. Элюаты объединяли для каждого условия. Добавляли буфер для загрузки образцов + 10% 2-меркаптоэтанола и образцы нагревали в течение 5 минут при 90°C. Пять микролитров каждого образца резервировали для анализа с помощью красителя SYPRO Ruby Protein Gel Stain (ThermoFisher Scientific, № S12000). Весь оставшийся объем образца загружали на 4-12% полиакриламидный гель с градиентом Bis-Tris и гнали на геле в течение 80 минут при 200 В. Гель удаляли из кассеты и промывали 3×10 минут водой со степенью чистоты «для масс-спектрометрии». Затем гель красили красителем Safe Stain blue в течение 1 часа. Краситель декантировали и затем гель обесцвечивали водой для масс-спектрометрии путем 2 промывок по 30 минут на промывку. Перед вырезанием сшитых бэндов из геля скальпели и пинцеты обильно опрыскивали этанолом (EtOH), а вырезанные бэнды помещали в стерильные пробирки Эппендорфа. Пробирки наполняли стерильной сверхчистой водой в количестве, достаточном для покрытия срезов геля, упаковывали во влажный лед и отправляли в MS Bioworks.

[0475] Масс-спектрометрический анализ проводила компания MS Bioworks. Для масс-спектрометрии весь каждый представленный образец подвергали расщеплению в геле трипсином с помощью робота ProGest (DigiLab), сначала промывая посредством 25 mM бикарбоната аммония, затем ацетонитрилом, восстанавливая посредством 10 mM дитиотреитола при 60°C с последующим алкилированием с помощью 50 mM йодацетамида при RT, расщеплением трипсином (Promega) при 37°C в течение 4 часов, а затем гашением

муравьиной кислотой, продукты расщепления объединяли и анализировали без дополнительной обработки. Затем каждый расщепленный образец анализировали с помощью нано-LC-MS/MS с применением системы для HPLC Waters M-Class NanoAcquity, сопряженной с системой ThermoFisher Fusion Lumos. Пептиды загружали в улавливающую колонку и элюировали через 75-мкм аналитическую колонку со скоростью 350 нл/мин; обе колонки были заполнены смолой Luna C18 (Phenomenex, № 00C-4041-E0). Масс-спектрометр работал в зависимом от данных режиме, при этом Orbitrap работал на 60000 FWHM и 15000 FWHM для MS и MS/MS с временем цикла 3 с. Было включено расширенное определение пиков. На образец использовали 4 часа приборного времени. Для обработки данных с помощью MS Bioworks проводили поиск данных с использованием локальной копии Mascot (Matrix Science) со следующими параметрами: Фермент: трипсин/P; база данных: SwissProt Human (составная для прямых и обратных плюс общие потенциальные загрязнители); фиксированная модификация: карбамидометил (C); переменные модификации: окисление (M), ацетил (N-конец), Pyro-Glu (N-концевой Q), дезамидирование (N/Q); значения массы: моноизотопное; допустимое отклонение массы пептидов: 10 ppm; допустимое отклонение массы фрагментов: 0,02 Да; и максимальное количество пропущенных расщепленных фрагментов: 2. Файлы Mascot DAT анализировали в отношении синтаксиса в Scaffold (программное обеспечение Proteome) для проверки, фильтрации и создания избыточного перечня для каждого образца. Данные подвергали фильтрации на уровне 1% FDR белков и пептидов, и при этом на белок должно было приходиться по меньшей мере два уникальных пептида. Показатель интенсивности белкового пика в MS-спектре (SAF) преобразовывали в нормализованный показатель интенсивности белкового пика в MS-спектре (NSAF), который использовали для аппроксимации относительной численности белков в заданном образце и относительной численности данного белка среди образцов.

[0476] Исследование белков, обнаруженных в данных перекрестно-сшитых молекул посредством BS3 от MS Bioworks, не подтверждало полный перечень целевых молекул, выявленных в приведенном выше образце IP, предусматривающей применение PFA. Галектин-3 был обнаружен в данных как с тяжелой, так и с легкой меткой с большей представленностью в наборе данных с легкой меткой). Галектин-1 был обнаружен в данных как с тяжелой, так и с легкой меткой, при этом лишь 3/5 пептидов были помечены тяжелым изотопом. LILRB2 вовсе не наблюдали. Также не наблюдали и uPAR. PPIA был обнаружен в данных как с тяжелой, так и с легкой меткой с почти одинаковой представленностью в обоих наборах данных. На **фиг. 6А** показаны 20 наилучших целевых молекул для AB102. На **фиг. 6В** показаны наилучшие целевые молекулы на клеточной поверхности для AB102.

На **фиг. 6С** показаны наилучшие целевые молекулы на клеточной поверхности для AB102 по сравнению с отрицательным изотипическим контролем (ISO). Из белков на клеточной поверхности, иммунопреципитированных с помощью AB102 с применением сшивателя BS3, CD163 имел наиболее высокий показатель интенсивности белкового пика в MS-спектре (SAF). CD163 подвергался иммунопреципитации с помощью AB102 в случае способов как с PFA, так и с BS3. SAF обозначает интенсивность спектральных линий, нормализованную к размеру белка (молекулярной массе) для каждой целевой молекулы, и значения SAF на **фиг. 6А** и **фиг. 6В** представляют собой значения для AB102, вычтенные из SAF для изотипического контроля для каждой целевой молекулы.

ПРИМЕР 5. Антитело AB101 в FcNull каркасной цепи иммунопреципитирует гликоформу CD163

[0477] Гликозилирование является строго регулируемой посттрансляционной модификацией, которая влияет на конформацию, стабильность и функцию белка, а также она играет важную роль в установлении межбелковых взаимодействий (т. е. связывании лиганда с его когнатным рецептором). Антитело AB102 и, если уж на то пошло, AB101 обладают специфичностью в отношении отдельной более высокомолекулярной гликоформы CD163, которая потенциально влияет на взаимодействия CD163 с другими белками, необходимые для активности иммуносупрессивных макрофагов.

[0478] FcNull антитело AB101 содержит переменные домены AB101 в последовательности IgG1, модифицированной для существенного снижения связывания антитела с Fc-рецепторами (Fc-null), и обозначается как AB102. Для анализа с помощью вестерн-блоттинга и окрашивания красителем SYPRO Ruby Protein Gel Stain 12 мкл 4× буфера для подготовки образцов NuPAGE LDS Sample Buffer (ThermoFisher, № NP0007) с 10% 2-меркаптоэтанола добавляли к 25-мкл аликвоте PBS-микронесителей из **ПРИМЕРА 4** и инкубировали при 95°C в течение 25 минут. Образцы гнали на полиакриламидных гелях с градиентом Bis-Tris 4-12%. Для прямой визуализации гели окрашивали красителем SYPRO Ruby Protein Gel Stain в соответствии с инструкциями производителя. В ходе вестерн-блоттинга белки переносили на мембрану из PVDF под напряжением 20 В в течение ночи при 4°C. На следующее утро мембраны блокировали в 5,0 мл реагента SuperBlock (ThermoFisher, № 37515; без Tween 20) в течение 1 часа. К мембране добавляли первичное антитело к CD163 (поликлональный козий IgG; R&D, № AF1607) в концентрации 1 мкг/мл. Спустя приблизительно 3 часа инкубации в первичном Ab (покачивание при комнатной температуре) мембрану 3× промывали посредством приблизительно 5 мл PBST, по 5 минут на промывку. После промывок к

мембране добавляли 5 мл реагента SuperBlock (без Tween 20), содержащего 1:10000 (об./об.) конъюгированные с HRP, специфические к козым F(ab')₂ вторичные антитела (различные поставщики) и инкубировали при комнатной температуре в течение приблизительно 1 часа. После инкубации со вторичным антителом мембрану 3× промывали посредством 5 мл PBST в течение приблизительно 5 минут на промывку. Мембрану визуализировали с применением субстрата SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate на трансиллюминаторной рабочей станции FotoDyne Analyst Luminary Convertible FX в соответствии с инструкциями производителя.

[0479] Как показано на **фиг. 7**, AB102 иммунопреципитировало отдельную более высокомолекулярную гликоформу CD163. Оба бэнда в дублете, указанном стрелками, представляли собой разные гликоформы CD163.

ПРИМЕР 6. AB101 связывается с человеческим, но не мышинным, рекомбинантным белком CD163

[0480] В данном примере продемонстрировано, что AB101 связывается с человеческим, но не мышинным, рекомбинантным белком CD163. Связывание AB101 с меченым посредством His рекомбинантным человеческим CD163 (R&D Systems, № 1607-CD-050) и рекомбинантным мышинным CD163 (R&D Systems, № 7435-CD-050) определяли с помощью ELISA. Рекомбинантные белки разводили в PBS до 5 мкг/мл, и вносили в 384-луночные планшеты для высокосвязывающего ELISA (Greiner Bio-One, № 781061) в количестве 25 мкл на лунку, и инкубировали при 4°C в течение ночи. Планшеты трижды промывали посредством PBS с применением устройства для промывки микропланшетов BioTek ELx405 Select (программа промывки ELISA_384_PBS_3x_wash), а затем блокировали посредством 90 мкл/лунка блокирующего буфера (2% обезжиренного сухого молока/PBS + 0,05% Tween 20) в течение 1 часа при RT.

[0481] После блокировки в планшеты вносили по 25 мкл на лунку первичных антител и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Тестируемое антитело представляло собой AB101; контрольное антитело к huCD163 представляло собой коммерчески доступное антитело в каркасной цепи мышинового IgG1 (R&D Systems, № MAB1607); изотипические контроли представляли собой запатентованные mAb в каркасных цепях человеческого IgG1, человеческого FcNull и мышинового IgG1 с известной специфичностью. После связывания первичного антитела планшеты трижды промывали посредством PBS с применением EL405x (программа промывки ELISA_384_PBS_3x_wash). Вторичным антителом в случае huCD163 был конъюгированный с HRP козий IgG к мышинному F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch, No. 115-035-072), а вторичным антителом в

случае AB101 и AB102 был конъюгированный с HRP козий IgG к человеческому F(ab)'₂ (Jackson ImmunoResearch, No. 109-035-097). Вторичные антитела разводили до 1:2500 в 2% обезжиренном сухом молоке/PBS и вносили по 25 мкл на лунку в соответствующий планшет, а также инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшеты четырежды промывали посредством PBS с применением EL405x (программа промывки ELISA_384_PBS_4x_wash). После удаления последней промывки вносили 25 мкл/лунка чистого Ultra-TMB и планшеты инкубировали в течение 10–15 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. После проявления реакцию останавливали добавлением 25 мкл на лунку 0,3 М HCl и планшеты считывали с помощью устройства SpectraMax M5e на 450 нм.

[0482] Как показано на **фиг. 8**, AB101, AB102 и контрольное антитело к CD163 связывалось с huCD163 в данном анализе, в то время как в случае изотипического контроля не наблюдали заметного связывания. Ни AB101, ни контрольное антитело к huCD163 не связывалось с рекомбинантным мышинным CD163, тогда как коммерчески доступное антитело к muCD163 связывалось, как и ожидалось (**ФИГ. 9**).

ПРИМЕР 7. Поликлональное антитело к CD163 блокирует связывание AB101 с макрофагами M2c

[0483] В данном примере продемонстрировано, что поликлональное антитело к CD163 блокирует связывание AB101 с клетками M2c. Для изучения специфичности связывания AB101 с CD163 на клетках M2c были проведены эксперименты по блокированию с применением коммерческого поликлонального антитела к человеческому CD163.

[0484] Собранные клетки M2c ресуспендировали (1 миллион клеток на 100 мкл) в буфере для FACS (PBS, содержащем 2 mM EDTA) (ThermoFisher, № 15575-038) и добавляли соответствующий объем блокатора для человеческого Fc (10 мкг рекомбинантного блокатора для человеческого Fc на миллион клеток). Клетки инкубировали при RT в течение 20 минут. Козье поликлональное антитело к huCD163 (R&D, № AF1607) и козье контрольное поликлональное антитело (Sigma, № PP40) вносили в конечной концентрации 200 мкг/мл и инкубировали при RT в течение 1 часа. Клетки разводили буфером для FACS до конечного объема 1 миллион клеток/мл и 40 мкл/лунку переносили в непрозрачные полипропиленовые 96-луночные планшеты с v-образным дном.

[0485] Вносили меченные красителем Alexa Fluor® 647 антитела AB101 и меченные APC антитела к huCD163 (R&D Systems, № FAB1607A) и клетки инкубировали в течение 90 минут при 4°C. Клетки промывали путем добавления 250 мкл буфера для FACS,

содержащего 5% BSA, в каждую лунку с помощью многоканальной пипетки, центрифугировали при 350×g в течение 5 минут и удаляли буферы. Стадию промывки 2× повторяли с объемом промывки 300 мкл буфера для FACS. В каждую лунку вносили 50 мкл буфера для FACS с красителем на жизнеспособность e780 (разведение 1:1000) и планшеты инкубировали в течение 20 минут при RT. Затем клетки промывали путем добавления в каждую лунку 250 мкл буфера для FACS с помощью мультиканальной пипетки, центрифугировали при 350×g в течение 5 минут и удаляли буферы. В каждую лунку вносили буфер для FACS (75 мкл) и с применением проточного цитометра BD Canto II проводили анализ образцов.

[0486] Предварительная обработка макрофагов M2c поликлональным антителом к CD163 блокировала связывание антитела AB101 (фиг. 10) и контрольного моноклонального антитела к huCD163 (фиг. 11) с макрофагами M2c. Предварительная обработка макрофагов M2c козым контрольным поликлональным антителом не блокировала связывание антитела AB101 (фиг. 10) и контрольного моноклонального антитела к huCD163 (фиг. 11) с макрофагами M2c.

ПРИМЕР 8. Нокдаун CD163 посредством siRNA у человеческих макрофагов M2c после поляризации снижает связывание AB102

[0487] В данном примере показано, что нокдаун CD163 посредством siRNA у человеческих макрофагов M2c после поляризации снижает связывание AB102. Способы, применяемые в данном примере, основаны на публикации Troegeler et al., *Immunol Cell Biol* 92:699-708 (2014).

[0488] Выделенные моноциты (от трех доноров) отдельно высевали в 6-луночные планшеты в количестве $1,5 \times 10^6$ клеток на лунку. На День 4 среду удаляли и в каждую лунку вносили свежую среду X-VIVO, содержащую 10% FBS, 100 нг/мл M-CSF (Peprotech № 300-25) и 50 нг/мл IL-10 (Peprotech № 200-10). На День 6 среду удаляли, а клетки дважды промывали теплой средой X-VIVO, содержащей 10% FBS. В каждую лунку вносили один миллилитр среды X-VIVO + 10% FBS и клетки возвращали в термостат, пока готовили растворы для трансфекции siRNA.

[0489] Тестировали следующие реагенты в форме пулов человеческой siRNA ON-TARGETplus - SMART (Dharmacon): CD163 (кат. № L-007847-00-0005); SCRAM (кат. № D-001810-10-05); CD206 (кат. № L-011730-00-0005); CD163L1 (кат. № L-008024-00-0005); PPIA (кат. № L-004979-04-0005); FCGR2A (кат. № L-014152-00-0005); FCGR3A (кат. № L-016308-00-0005); LGALS1 (кат. № L-011718-00-0005); LGALS3 (кат. № L-010606-00-0005);

LILRB2 (кат. № L-020017-00-0005); FCGR2C (кат. № L-027340-02-0005); и UPAR (кат. № L-006388-00-0005).

[0490] Для подготовки к трансфекции siRNA использовали пулы siRNA ON-TARGETplus SMART для получения 200 мкМ мастер-стоков. Лиофилизированные олигонуклеотиды (по 5 нмоль каждый) ресуспендировали в 25 мкл 1× буфера для siRNA от Thermo (Thermo № B002000). Аликвоты хранили при температуре -80°C. Затем эти стоковые растворы разводили сверхчистой водой для работы с клетками (Hyclone № SH3052902) с получением рабочих стоковых растворов с концентрацией 20 мкМ. Для получения мастер-микса (достаточного количества для 6 лунок 6-луночного планшета) смешивали следующие реагенты: 120 мкл 20 мкМ пула siRNA (конечная концентрация 200 нМ), 270 мкл HiPerFect (Qiagen № 301705) и 2,64 мл теплого RPMI (без FBS или других добавок). Мастер-микс для siSCRAM (скремблированная siRNA) содержал следующие количества: 720 мкл 20 мкМ siSCRAM, 1,23 мл HiPerFect и 12,1 мл RPMI. Смеси объединяли и инкубировали при RT в течение 15 минут, периодически перемешивая переворачиванием. Непосредственно перед применением пробирки кратковременно центрифугировали и к клеткам по каплям добавляли смесь siRNA (495 мкл/лунка). Планшеты осторожно встряхивали для перемешивания, а затем инкубировали при 37°C в течение 6 часов. После инкубации вносили 2 мл среды X-VIVO, содержащей 10% FBS и IL-10 (конечная концентрация 50 нг/мл) и M-CSF (Peprotech № 300-25; конечная концентрация 50 мкг/мл). На следующие сутки среду заменяли (сохраняя в IL-10 и M-CSF) для удаления реагента для трансфекции и всех погибающих клеток.

[0491] На День 8 макрофаги либо поднимали на поверхность и окрашивали антителами для проточной цитометрии, либо лизировали для RT-qPCR.

[0492] В случае тех макрофагов, которые были использованы для проточной цитометрии, применяли следующий способ: обработанные siRNA макрофаги M2 собирали с помощью раствора для открепления макрофагов, инкубировали в растворе для открепления при 4°C в течение 45 минут, а затем осторожно соскабливали с планшетов. Раствор для открепления макрофагов заменяли холодным PBS-/- (PBS без кальция и магния; Hyclone № SH30028.02), содержащим 0,2 mM EDTA и 0,1% HSA. Клетки осаждали центрифугировали при 650×g в течение 5 минут, а затем ресуспендировали в 0,5 мл холодного блокирующего раствора (буфер для FACS + 10% NGS + 10 мкг Fc-фрагмента человеческого IgG (Abcam № ab90285)) на миллион клеток. Подсчитывали клетки и для дальнейших расчетов использовали среднее значение 1×10^6 на мл. Клетки инкубировали при RT в течение 15 минут (для увеличения связывания с FcR) с последующей 30-минутной инкубацией на льду для полной блокировки. Аликвоту неокрашенных клеток откладывали

для компенсационных контролей. К остатку добавляли краситель на жизнеспособность e780 (ThermoFisher eBioscience № 65-0865-18) в конечном разведении 1:1000. Клетки вносили аликвотами в 96-луночные планшеты (по 40 мкл на лунку) и в каждую лунку добавляли по 10 мкл раствора антител. Антитела готовили с начальной концентрацией 100 мкг/мл в буфере для FACS и подвергали серийному разведению в буфере для FACS. После добавления антител каждый набор клеток тестировали с помощью панели антител (AB101 в FcNull каркасной цепи, конъюгированное с AF647, и коммерческое антитело к CD163, конъюгированное с BV421 [BioLegend, № 333612]) и панели изотипических контролей (ISO2 в FcNull каркасной цепи, конъюгированное с AF647, и коммерческое mIgG1, конъюгированное с BV421). Конечная концентрация антител варьировала от 20 мкг/мл до 0,3 мкг/мл. Клетки инкубировали с первичными антителами в течение 1 часа при 4°C, затем осаждали при 450×g и трижды промывали посредством 150 мкл PBS-EDTA. После осаждения клетки ресуспендировали в 100 мкл 4% параформальдегида (в PBS +/-) и инкубировали при RT в течение 15 минут (в защищенном от света месте). После фиксации клетки осаждали центрифугированием при 650×g в течение 5 минут и один раз промывали посредством PBS-EDTA. Клетки ресуспендировали в 100 мкл PBS-EDTA и хранили при 4°C в течение выходных (в защищенном от света месте). Затем клетки анализировали методом проточной цитометрии на устройстве BD Canto II.

[0493] Второй набор клеток собирали для применения в анализах RT-qPCR следующим образом. Клетки собирали в RLT-буфере и выделяли РНК с применением набора Qiagen RNeasy (Qiagen № 74104), в том числе реагентов из набора QIAshredder (Qiagen № 79654). После элюирования РНК применяли для получения кДНК с применением системы синтеза первой цепи SuperScript III (Invitrogen № 18080051). К 1,5 мкг РНК добавляли воду без РНКазы до конечного объема 10 мкл. К этому добавляли 5 мкл мастер-микса ДНКазы I ((на образец) = 1,5 мкл 10-кратного буфера для ДНКазы I + 2 мкл воды без РНКазы + 1,5 мкл фермента ДНКазы I). Образцы тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. После инкубации добавляли 1,5 мкл раствора EDTA для остановки реакции, образцы инкубировали при 65°C в течение 10 минут (для уничтожения фермента), а затем возвращали на лед для охлаждения. К каждому образцу добавляли dNTP (1,5 мкл) и олиго-dT (1,5 мкл) и тщательно перемешивали. Образцы инкубировали при 65°C в течение 5 минут, а затем возвращали на лед на 2 минуты. После охлаждения образцов 13 мкл образца забирали в свежие пробирки и в каждую пробирку добавляли мастер-микс +RT (7 мкл). К оставшимся 7,5 мкл образца добавляли мастер-микс -RT (3,5 мкл) для получения образцов отрицательного контроля. В случае мастер-микса +RT (на образец): 4 мкл 5× буфера для первой цепи, 1 мкл 0,1 М DTT,

1 мкл реагента RNaseOUT и 1 мкл обратной транскриптазы SuperScript III (все продукты являются частями упомянутой выше системы SuperScript III). В случае мастер-микса -RT фермент SuperScript III заменяли на воду без РНКазы.

[0494] Образцы тщательно перемешивали и инкубировали при 25°C в течение 5 минут. После инкубации образцы инкубировали при 50°C в течение 30 минут с последующей инкубацией при 55°C в течение 30 минут, а затем инкубировали при 70°C в течение 15 минут. Затем образцы охлаждали до 4°C перед продолжением и держали на льду. Перед применением 20 мкл воды без РНКазы добавляли к образцам +RT и 10 мкл воды без РНКазы добавляли к образцам -RT для разведения кДНК для RT-qPCR.

[0495] Для qPCR 2 мкл разведенной кДНК смешивали с 0,2 мкл каждого праймера (исходная концентрация 10 мкМ), 2,6 мкл воды без РНКазы и 5 мкл 2× смеси для qPCR SYBR Green (BioRad № 1725271). Стандартные кривые строили с использованием серии разведений необработанных контрольных клеток. Образцы анализировали на приборе для qPCR StepOne с применением настроек по умолчанию, включающих кривую температуры плавления. Образцы нормализовали по амплификации Rpl17a в качестве внутреннего контроля.

[0496] Как показано на **фиг. 12**, (репрезентативная для трех повторностей) обработка поляризованных макрофагов M2c посредством siRNA к CD163 существенно снижала связывание антитела AB102 по сравнению с макрофагами M2c, обработанными скремблированной siRNA (siScramb) или без siRNA.

ПРИМЕР 9. Связывание AB102 с поляризованными человеческими макрофагами M2c после siRNA-нокдауна

[0497] В данном примере продемонстрировано связывание AB102 с поляризованными человеческими макрофагами M2c после siRNA-нокдауна с применением различных siRNA.

[0498] Моноциты выделяли из цельной крови, высевали в количестве $1,5 \times 10^6$ клеток на лунку (6-луночные планшеты) и культивировали в M2-поляризующих условиях, как описано выше в **ПРИМЕРЕ 8**. На День 6 среду заменяли и добавляли 100 нг/мл M-CSF и 50 нг/мл IL-10.

[0499] Обработку посредством siRNA проводили на День 8 различными siRNA, как описано ранее (см. **ПРИМЕР 8**). На следующие сутки среду аспирировали для удаления реагента для трансфекции и всех погибающих клеток и вносили свежую среду (все еще содержащую IL-10 и M-CSF). На День 10 проводили FACS-анализ клеток, обработанных посредством siRNA, и собирали второй набор клеток в RLT-буфере для RT-qPCR (см.

ПРИМЕР 8). Данные нормализовали, используя среднее геометрическое MFI связывания AB102 с обработанными посредством siSCRAM M2c в качестве 100% и среднее геометрическое MFI связывания антитела изотипического контроля с необработанным M2c в качестве 0%.

[0500] siRNA-нокдаун CD163 снижал связывание антитела AB102. В отличие от этого, не было обнаружено признаков снижения связывания AB102 после нокдауна с помощью siCD206, siCD163L1, siPPIA, siLGALS1, siLGALS3, siLILRB2 или siUPAR, за исключением некоторого незначительного снижения с siRNA против FCGR2A + FCGR3A (у 1 из 3 доноров), FCGR2C или FCGR3A, как видно на **фиг. 13**. На самом деле, интенсивность связывания AB102 даже увеличивалась при некоторых условиях обработки посредством siRNA. По результатам RT-qPCR был виден сильный нокдаун целевых молекул.

ПРИМЕР 10. LPS-индуцированное снижение экспрессии CD163 на клеточной поверхности макрофагов M2c уменьшает связывание AB101 с макрофагами

[0501] В данном примере продемонстрировано снижение связывания AB101 с макрофагами M2c после LPS-индуцированного отщепления CD163. Моноциты выделяли так, как описано в **ПРИМЕРЕ 2**, и высевали в количестве 1×10^4 клеток/лунка в 96-луночные плоскодонные планшеты, обработанные тканевой культурой, в среду X-VIVO, содержащую 10% FBS, 50 нг/мл M-CSF и 50 нг/мл IL-10, в количестве 100 мкл/лунка. На День 7 половину клеток обрабатывали в течение 24 часов посредством 10 нг/мл LPS (липополисахаридов из *E. coli* O111:B4; Sigma № L5293-2ML). Клетки метили титрами неконъюгированных первичных антител к CD163 (R&D Systems MAB1607-100) и антител AB101 в соответствии с ранее описанными способами с применением восьми серийных 5-кратных разведений каждого, начиная с 200 нМ. В качестве вторичного использовали меченный посредством Alexa Fluor® козий F(ab')₂-фрагмент 647 AffiniPure к человеческому IgG, т. е. антитело в форме F(ab')₂-фрагмента (Jackson ImmunoResearch 109-606-006). Клетки анализировали методом проточной цитометрии.

[0502] Как показано на **фиг. 14**, обработка культивируемых макрофагов M2c посредством LPS приводила к утрате связывания как антителом AB101, так и контрольным антителом к CD163.

ПРИМЕР 11. Блокировка антителом АВ101 супрессии с участием миелоидных клеток активации (продуцирования IL-2) и пролиферации Т-клеток

[0503] В данном примере продемонстрировано, что АВ101 блокирует супрессию с участием миелоидных клеток активации (продуцирования IL-2) и пролиферации Т-клеток.

[0504] Для оценки способности ослаблять опосредованную макрофагами М2 супрессию активации Т-клеток получали из человеческих моноцитов макрофаги М0, М1 и М2с. Макрофаги М0 культивировали с АВ101 или изотипическим контролем по трем протоколам обработки: 1) в присутствии АВ101 (или антитела изотипического контроля) во время поляризации макрофага из М0 в М2с (День 5-7, условие «до»), 2) в присутствии АВ101 (или изотипического антитела) после поляризации (День 7 и далее, условие «после») или 3) условия 1 и 2 вместе («до» и «после» поляризации).

[0505] Получение макрофагов М0. На День 0 моноциты от индивидуальных доноров (выделенные так, как описано в **ПРИМЕРЕ 2**) высевали в количестве $2,5 \times 10^5$ клеток/лунка 96-луночного планшета для тканевых культур в среду М0 (среда X-VIVO + 10% FBS + 100 нг/мл М-CSF) и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 5 суток.

[0506] Поляризация макрофагов М0 в макрофаги М1 или М2с. Макрофаги М0 5-суточного возраста поляризовали в М2с путем культивирования клеток в среде М0 со 100 нг/мл IL-10 (Peprotech № 200-10) и в М1 путем культивирования в среде М0 + 100 нг/мл IFN-гамма (Peprotech № 300-03). В случае клеток, обработанных АВ101 или изотипическим контролем IgG1, данные антитела добавляли в количестве 20 мкг/мл в среде для М2с. На День 6 в случае макрофагов М1 среду удаляли и добавляли свежую среду М0 + 100 нг/мл IFN-гамма + 1 нг/мл LPS (липополисахаридов из E. coli O111:B4; Sigma № L5293-2ML).

[0507] Для выделения CD8⁺ Т-клеток применяли PBMC от аутологичных доноров (как описано в **ПРИМЕРЕ 2**). Т-клетки высевали в колбы Т75 на ночь в X-VIVO + 10% FBS до дня совместного культивирования с макрофагами (День 7).

[0508] Для окрашивания Т-клеток перед совместным культивированием применяли набор красителей CellTrace™ Violet Proliferation Dye (ThermoFisher № C34557), который методом проточной цитометрии позволяет отслеживать несколько поколений по разведению красителя. Окрашивание посредством CellTrace™ проводили в соответствии с протоколом производителя.

[0509] На День 7 надосадочную жидкость удаляли из высевных макрофагов и заменяли среду на 100 мкл среды X-VIVO + 10% FBS + 0,5 мкг/мл ОКТ3. Макрофаги инкубировали при 37°C, 5% CO₂, в течение 1 часа. Из колб собирали Т-клетки и ресуспендировали их по 115000 Т-клеток в 100 мкл/лунка (1,15 млн/мл) в плоскодонных

96-луночных планшетах в отсутствие или в присутствии AB101 (20 мкг/мл) или изотипического контроля (20 мкг/мл) для «до/послеполяризационной» и «послеполяризационной» обработки. Т-клетки добавляли к макрофагам в объеме 100 мкл с получением конечного объема 200 мкл/лунка и конечной концентрации 0,25 мкг/мл ОКТ3. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂, в течение 24 часов. На День 8 собирали надосадочные жидкости. Уровни IL-2 измеряли с применением набора CisBio HTRF IL-2 (№ 62HIL02PEG) в соответствии с протоколом производителя со следующими модификациями: анализ проводили в 384-луночных планшетах малого объема (Greiner Bio-One № 784075); все объемы были уменьшены вдвое; и планшеты кратковременно центрифугировали для выведения пузырьков на поверхность.

[0510] Как показано на **фиг. 15**, антитело AB101 блокировало способность миелоидных клеток супрессировать активацию Т-клеток, о чем свидетельствовало повышенное продуцирование IL-2, маркера стимуляции и пролиферации Т-клеток. Клетки обрабатывали посредством AB101 или изотипическим контролем во время поляризации (с IL-10), условие «до».

[0511] На День 10 совместно культивированные Т-клетки из каждого 96-луночного планшета переносили в 96-луночный планшет с V-образным дном (ThermoFisher № 249946) и осаждали центрифугированием при 300×g в течение 2 минут. Осадки ресуспендировали в 100 мкл красителя на жизнеспособность e780 (eBiosciences № 65-0865-14) в PBS (0,5 мкл/мл) и инкубировали в течение 10 минут при RT в темноте.

[0512] После окрашивания посредством e780 клетки промывали путем добавления 150 мкл буфера для FACS (1× PBS + 2 mM EDTA + 1% FBS) и центрифугировали при 300×g в течение 2 минут. Удаляли надосадочную жидкость. Осадки клеток ресуспендировали в 50 мкл/лунка блокирующего реагента FACS Block (TruStain FcX™ для человеческого материала [блокирующий раствор для Fc-рецептора; BioLegend № 422302] в количестве 5 мкл/100 мкл в буфере для FACS) и инкубировали в течение 30 минут при 4°C.

[0513] Коктейли антител (2×) готовили с применением реагента FACS Block, содержащего меченое посредством APC антитело к CD8 (BD Pharmingen № 561953) в разведении 1:50 (конечная концентрация составляла 1:100) и меченное посредством FITC антитело CD14 в разведении 1:50 (конечная концентрация составляла 1:100) (BD № 347493). Данный коктейль антител добавляли в количестве 50 мкл/лунка и инкубировали в течение 30 минут на льду в темноте. Краситель отмывали посредством 150 мкл/лунка буфера для FACS. Клетки осаждали при 300×g в течение 2 минут. Надосадочную жидкость удаляли и клетки фиксировали в 25 мкл 4% PFA в течение 15 минут на льду в темноте. Перед анализом на проточном цитометре добавляли 75 мкл/лунка PBS.

[0514] Как показано на **фиг. 16** и **фиг. 17**, антитело АВ101 допускало ОКТЗ-индуцированную пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток при обработке посредством АВ101 во время поляризации соответственно. Более того, как показано на **фиг. 18**, обработка антителом АВ101 после поляризации во время совместного культивирования с CD3⁺ Т-клетками (обозначено «после» на графике) или в сочетании во время и после поляризации (обозначено «до и после» на графике) приводила к усилению продуцирования IL-2 по сравнению с обработкой изотипическими антителами. Данные результаты свидетельствуют, что связывание АВ101 с макрофагами М2с ослабляло опосредованную М2с супрессию пролиферации Т-клеток и продуцирования IL-2. Обработка посредством АВ101 была эффективной во время поляризации посредством IL-10, преодолевая конститутивно супрессирующий сигнал, и после поляризации М2с, что является репрезентативным для супрессивных ТАМ в опухолевом микроокружении *in vivo*.

ПРИМЕР 12. Снижение экспрессии поверхностного маркера М2с

[0515] В данном примере продемонстрировано снижение экспрессии поверхностного маркера М2с после обработки посредством АВ101.

[0516] Выделяли моноциты (как описано в **ПРИМЕРЕ 2**) и поляризовали их в макрофаги М2с (как описано в **ПРИМЕРЕ 11**) в присутствии АВ101 или антитела изотипического контроля. Затем клетки окрашивали на экспрессию поверхностных маркеров фенотипирующих антител в соответствии с протоколами, описанными в **ПРИМЕРЕ 11**. На представленном ниже графике показана нормализованная медианная интенсивность флуоресценции (MFI) для поверхностной экспрессии у макрофагов после обработки макрофагов М2с посредством АВ101 или антителом изотипического контроля. Живые клетки гейтировали с применением фиксируемого красителя на жизнеспособность e780. Нормализованную MFI рассчитывали путем деления MFI обработанных посредством АВ101 клеток на MFI обработанных изотипическим контролем клеток М2с. Затем образцы нормализовали к проценту от контроля М2с для демонстрации относительного изменения экспрессии поверхностного маркера. Данные от 7 доноров усредняли и проводили статистические расчеты с использованием 2-факторного дисперсионного анализа.

[0517] Как показано на **фиг. 19**, обработка по схеме «до» макрофагов М2 антителом АВ101 во время поляризации снижала экспрессию CD16, CD64, кальретикулина и Siglec-15. CD16(FcγRIIIa), низкоаффинный рецептор IgG, характеризовался высоким уровнем экспрессии на супрессирующих макрофагах М2. CD64(FcγRI), высокоаффинный рецептор IgG, также характеризовался высоким уровнем экспрессии на М2. Siglec-15 представляет

собой ITIM-содержащий трансмембранный белок, участвующий в иммунной супрессии, который специфически экспрессируется на супрессирующих макрофагах.

[0518] У клеток M2c, обработанных антителом изотипического контроля, никаких изменений по данным маркерам не наблюдали. Аналогично, оценивали поверхностную экспрессию PD-L1, CD11b, CD14, CD32, CD163, CD206, HLA-DR, CD204, CD33, CD80, CD86, HLA-DR, DP, DQ, CD48, MARCO, LILRB2, CD172a (SIRP α), IL10R и IL18R, но никаких изменений при обработке посредством AB101 в экспрессии данных маркеров не наблюдали.

ПРИМЕР 13. Обработанные посредством AB101 макрофаги M2c сдвигают активированные посредством ОКТ-3 Т-клетки в сторону формирования фенотипа Th1

[0519] В данном примере продемонстрировано, что обработанные посредством AB101 макрофаги M2c индуцировали у простимулированных посредством ОКТ3 Т-клеток экспрессию Th1-ассоциированных поверхностных маркеров. Данные свидетельствовали о том, что обработка клеток M2c посредством AB101 ингибировала опосредованную посредством M2c иммуносупрессию и модулировала активацию противоопухолевых Th1-клеток.

[0520] Было показано, что миелоидные клетки в опухолевом микроокружении, т. е. опухоль-ассоциированных макрофагов (ТАМ), управляют подавленным иммунным ответом, что способствует росту опухоли. Зачастую данный эффект можно рассматривать как сдвиг Т-клеток в сторону более низкого соотношения Th1/Th2 (например, сдвиг Т-клеток в сторону формирования фенотипа Th2). Поэтому авторами настоящего изобретения было высказано предположение, что AB101 будет влиять на перекрестное взаимодействие между ТАМ и противоопухолевыми эффекторными лимфоцитами (ТІЛ), ослабляя супрессирующий эффект ТАМ на ТІЛ.

[0521] Соотношение Th1- и Th2-хелперных клеток оценивали в присутствии или в отсутствие AB101 и изотипического контроля. Макрофаги M2c обрабатывали посредством AB101 или изотипическим контролем на День 5 («до» = во время поляризации) и на День 7 («после» поляризации, во время совместного культивирования). Начиная с Дня 7, обработанные макрофаги M2c совместно культивировали с простимулированными посредством ОКТ3 CD3⁺ Т-клетками в течение 3 суток для обеспечения возможности пролиферации Т-клеток. После пролиферации Т-клеток, на День 10, Т-клетки удаляли из совместной культуры и красили панелями антител с маркерами клеточной поверхности для определения соотношения сдвига от Th1 к Th2. После окрашивания поверхностных

маркеров и красителем для определения на жизнеспособность клеток Т-клетки фиксировали и анализировали на наличие маркеров Th1 или Th2 методом проточной цитометрии. Панель 1 применяли для определения соотношения Th1/Th2, Th17 и Treg, тогда как панель 2 применяли для определения активации и истощения Т-клеток.

[0522] Получали моноциты и культивировали их до формирования макрофагов, а макрофаги поляризовали так, как описано в предыдущих примерах.

[0523] CD3⁺ Т-клетки получали так, как описано в **ПРИМЕРЕ 2**, с применением наборов StemCell для отрицательного отбора по CD3⁺ в соответствии с инструкциями производителя.

[0524] Макрофаги и Т-клетки в течение трех суток совместно культивировали так, как описано в **ПРИМЕРЕ 11**.

[0525] На День 10 клетки метили с применением коктейлей антител, как указано в представленной ниже **таблице 4**, в соответствии со способом, описанным в **ПРИМЕРЕ 11**.

[0526] Коктейль антител получали в 2× виде с применением оставшегося 50 мкл/лунка блокирующего буфера, с антителами панели 1 в соотношении 1:50 (конечная концентрация составляла 1:100) и антителами панели 2 в соотношении 1:50 (конечная концентрация составляла 1:100).

Таблица 4. Смеси-коктейли антител для оценки Th1/Th2, Th17 (панель 1) и истощения/активации (панель 2) Т-клеток

	Панель 1 антител: Th1/Th2, Th17	Панель 2 антител: истощение/активация
Поверхностные маркеры	CD4 - PE (BD Pharmingen № 55347) CD69 - PE-Cy7 (BioLegend № 104511) CD25 - APC (BioLegend № 101909) CD127 - BV510 (BD BIOSCIENCE № 563086) CXCR3 - PerCP-Cy5.5 (BioLegend № 126513) CD194 (CCR4) - BV421 (BioLegend № 359413) CD196 (CCR6) - BV510 (BioLegend № 353423)	CD4 - PE (BD Pharmingen № 55347) CD8 - APC (BIOLEGEND № 344721) LAG3 - BV421 (BioLegend № 369313) OX40 - BV510 (BioLegend № 745040) PD-1 - PerCP-Cy5.5 (BioLegend № 135207) ICOS - PE-Cy7 (BioLegend № 329805) CTLA4 - FITC (eBioscience 11-1529-42)
Выявление по маркерам	Th1: CD4 ⁺ , CD69 ⁺ , CD196 ⁻ , CXCR3 ⁺ , CCR4 ⁻ Th2: CD4 ⁺ , CD196 ⁻ , CXCR3 ⁻ , CCR4 ⁺ Treg: CD4 ⁺ , CD25 ⁺ , CD127 ⁻ Th17: CD4 ⁺ , CD196 ⁺ , CXCR3 ⁻ , CCR4 ⁺	Активированные: ICOS ⁺ , OX-40 ⁺ Истощенные: LAG-3 ⁺ , PD-1 ⁺ , CTLA-4 ⁺ Th Т-клетки: CD4 ⁺ Tc Т-клетки: CD8 ⁺

[0527] Миелоидные клетки *in vitro*, M2c, оказывали иммуносупрессивные эффекты на активированные Т-клетки в совместной культуре, при этом M2c ингибировали пролиферацию Т-клеток и сдвигали Т-клетки к формированию фенотипа Th2.

[0528] Обработка посредством AB101 облегчала супрессивные эффекты клеток M2c, что приводило к способности простимулированных Т-клеток продуцировать IL-2, пролиферировать (как показано в **ПРИМЕРЕ 11**) и сдвигало их в сторону активированного Th1, провоспалительного, фенотипа. На **фиг. 20** показано, что обработка клеток M2c посредством AB101 увеличивала соотношение Th1/Th2 по сравнению с изотипическим контролем, что свидетельствовало о том, что обработка клеток M2c посредством AB101 вызывала сдвиг Т-клеток в сторону формирования фенотипа Th1. Более, на **фиг. 21** показано, что обработка клеток M2c посредством AB101 увеличивала экспрессию CD69 на CD4⁺ Т-клетках по сравнению с изотипическим контролем, что свидетельствовало о том, что обработка клеток M2c посредством AB101 вызывала сдвиг CD4⁺ Т-клеток в сторону формирования фенотипа Th1 при обработке клеток M2c посредством AB101. На **фиг. 22** и **фиг. 23** показано, что обработка клеток M2c посредством AB101 увеличивала экспрессию ICOS и OX40 соответственно на CD4⁺ Т-клетках по сравнению с изотипическим контролем, что свидетельствовало о том, что обработка клеток M2c посредством AB101 вызывала у пролиферирующих CD4⁺ Т-клеток повышенную экспрессию маркеров активации.

ПРИМЕР 14. Уменьшение супрессии миелоидными клетками опосредованного CD19-CD3-биспецифическими активаторами Т-клеток цитолиза клеток Raji с помощью CD8 Т-клеток

[0529] В данном примере продемонстрировано, что обработка посредством AB101 уменьшала супрессию миелоидными клетками опосредованного CD19-CD3-биспецифическими активаторами Т-клеток цитолиза клеток Raji с помощью CD8 Т-клеток. Для AB101 оценивали цитолиз опухолевых клеток в сравнении с антителом изотипического **контроля** с применением биспецифического активатора Т-клеток (BiTE) (биспецифического антитела к человеческому CD19 и человеческому CD3; InvivoGen Vimab-hcd19cd3). Макрофаги M2c обрабатывали посредством AB101 или изотипическим контролем на День 5 во время («до») и на День 7 («после») поляризации, во время совместного культивирования. Совместное культивирование с Т-клетками продолжали в течение 3 суток, начиная с Дня 7, для обеспечения возможности пролиферации Т-клеток. На День 10 Т-клетки удаляли из совместной культуры с макрофагами, а затем инкубировали с опухолевыми клетками +/- антитело BiTE для облегчения контакта между цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL) и опухолевыми клетками. После обработки

антителом ViTE опухолевые клетки окрашивали для оценки на жизнеспособность методом проточной цитометрии.

[0530] Моноциты культивировали, а макрофаги поляризовали так, как описано в **ПРИМЕРЕ 11**. CD8⁺ Т-клетки получали так, как описано в **ПРИМЕРЕ 11**. Макрофаги (25000 клеток/лунка) совместно культивировали с CD8⁺ Т-клетками (115000 клеток/лунка) с помощью описанного способа в течение трех суток.

[0531] На День 10 клетки Raji (ATCC № CCL-86) и K562 (ATCC № CCL-243) красили красителем CellTrace Violet с помощью способа, описанного в **ПРИМЕРЕ 11**. Затем опухолевые клетки ресуспендировали в среде M0 в количестве 100 тыс. клеток/лунка в плоскодонном 96-луночном планшете для тканевых культур. Некоторые неокрашенные и окрашенные клетки откладывали для использования в качестве контроля, который окрашивается одним красителем, для анализа методом проточной цитометрии.

[0532] На День 10 CD8⁺ Т-клетки выделяли из совместной культуры Т-клеток/макрофагов с применением набора StemCell для отрицательного отбора по CD8. Выделенные Т-клетки высевали в планшеты для клеток Raji и K562 по 100 мкл на лунку. В каждый планшет Raji и K562 вносили биспецифическое антитело в конечной концентрации 10 нг/мл в конечном объеме 220 мкл/лунка (некоторые лунки были без ViTE в качестве контрольных). При обработке ViTE клетки культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂.

[0533] На День 11 клетки помещали в новый планшет с V-образным дном и центрифугировали при 300×g в течение 2 минут. Из всех планшетов собирали надосадочную жидкость и переносили ее в новые 96-луночные планшеты с V-образным дном, которые затем герметично запечатывали и хранили при -80°C для последующего анализа на цитокины. Клетки ресуспендировали в буфере для FACS (PBS + 1% FBS) и окрашивали антителом к CD8, антителом к CD14 (для исключения нецелевых клеток) и красителем на жизнеспособность e780 так, как описано в **ПРИМЕРЕ 11**. После окрашивания клетки промывали буфером для FACS, фиксировали с применением 4% PFA и ресуспендировали в PBS для анализа методом проточной цитометрии. Опухолевые клетки, меченные фиолетовым красителем CellTrace, оценивали на гибель опухолевых клеток по включению в клетки красителя Fixable Viability Dye eFluor™ 780. Количества положительных по окрашиванию красителем eFluor™ 780 клетки наносили на график как процент погибших клеток в сравнении с контрольными лунками без антитела ViTE.

[0534] Обработка посредством AB101 ослабляла супрессирующие эффекты макрофагов M2c, что обеспечивало увеличение пролиферации Т-клеток по сравнению с изотипическим контролем. Повышенное количество CTL в присутствии ViTE приводило к

усилению цитолиза опухолевых клеток Raji по сравнению с изотипическим контролем, как видно на **фиг. 24**. K562 использовали в качестве отрицательного контроля, и у нее не наблюдали увеличения цитолиза + антитела ViTE.

ПРИМЕР 15. Интернализация антител человеческими первичными макрофагами M2c

[0535] На День 0 моноциты (см. **ПРИМЕР 2**) высевали в 96-луночные планшеты с оптически прозрачным дном для тканевых культур по 1×10^5 /лунка в 100 мкл (1×10^6 мл) среды M0 для дифференциации в макрофаги. На День 5 содержимое планшетов перемешивали путем вращения планшетов для вытеснения плавающих клеток и осторожно аспирировали среду. Макрофагов поляризовали в M2c в 100 мкл/лунка среды M2c так, как описано в предыдущих примерах.

[0536] На День 6 антитела метили с применением набора для мечения антител Alexa Fluor™ 647 (Invitrogen № A20186). Каждое антитело (100 мкг) разводили до концентрации 2 мг/мл в 50 мкл PBS. Тестируемыми антителами были следующие: AB101 huIgG1 и AB102 huIgG1 ADCC-Null; мышинное моноклональное антитело IgG1 к CD163 (R&D Systems MAB1607-100); и изотипический контроль: человеческая Fc-null каркасная цепь ISO2 или huIgG1 ISO1.

[0537] Весь флакон сукцинимидилового эфира карбоновой кислоты A-647 из набора ресуспендировали в 150 мкл PBS. Аликвоты (50 мкл) раствора A-647 вносили в каждую пробирку с разведенным антителом, теперь уже с концентрацией 1 мг/мл, и смеси инкубировали при RT в течение 45 минут в темноте.

[0538] Колонки для обессоливания Zebra (Thermo 87766) промывали, сначала отрезав дно и центрифугировав в течение 1 минуты на 4100 об./мин, для удаления буфера для хранения. Затем колонки дважды промывали посредством 300 мкл PBS (центрифугирование 1 минуту на 4100 об./мин) и один раз посредством 300 мкл PBS (центрифугирование на 4100 об./мин в течение 2 минут). Колонки помещали в новые янтарные пробирки и по отдельности вносили антитела. Затем колонки центрифугировали в течение 2 минут на 4100 об./мин для элюирования меченных посредством Alexa-647 антител в концентрации 1 мг/мл.

[0539] На День 7 среду, содержащую FBS, удаляли из культуральных планшетов путем встряхивания и планшеты дважды промывали посредством 250 мкл холодного PBS с последующим внесением 90 мкл среды X-VIVO, содержащей 20 мкг/мл немеченного антитела IgG1 ISO1, блокирующего Fc-рецепторы, для окрашивания мечеными антителами AB101, ISO1 и антителами к CD163 (R&D Systems MAB1607-100) или среду

без немеченного блокирующего антитела ISO1 для окрашивания AB102 и ISO2. Клетки инкубировали в течение 30 минут при 37°C, 5% CO₂ с последующим внесением меченных антител в конечной концентрации 5 мкг/мл. После 1 часа инкубации среду удаляли и клетки промывали посредством 250 мкл холодного буфера для FACS с последующим добавлением 4% PFA (BD Cytofix/Cytoperm № 554722) в течение 10 минут при RT в темноте. Контрастные красители для клеточных компонентов готовили путем добавления 2 капель/мл NucBlue™ (Molecular Probes № R37605) и ActinGreen™ (Molecular Probes № R37110) на мл к 1× буфера Perm (BD Perm/Wash № 554723, разведенный 1:10 в воде). Планшеты встряхивали для удаления фиксатора и добавляли контрастные растворы (20 мкл/лунка). Окрашивание проводили при RT в темноте в течение 20 минут. Затем клетки промывали путем добавления 250 мкл/лунка PBS, который удаляли и заменяли на 50 мкл/лунка PBS. Клетки визуализировали с помощью устройства Cellomics.

[0540] Эти данные представляли собой средние значения флуоресценции внутри клетки, определенные с помощью устройства Cellomics (среднее значение кольцевой средней интенсивности у красителя AF647). Клетку определяли и детектировали по окрашенному посредством DAPI ядру (NucBlue) и меченному посредством FITC цитоскелету (ActinGreen). На **фиг. 25** показаны репрезентативные результаты по меньшей мере от 4 индивидуальных доноров. Во всех случаях антитела изотипического контроля не интернализировались, а антитело AB102 интернализировалось в той же степени, что и коммерческое антитело к CD163 (R&D Systems MAB1607-100). Антитело AB101 (IgG1) интернализировалось приблизительно в 2 раза больше, чем AB102 (FcNull) или коммерческое антитело к CD163.

ПРИМЕР 16. AB101 ингибирует рост опухоли в модели ксенотрансплантата рака легкого человека

[0541] AB101 тестировали на ингибирование роста опухоли *in vivo* на модели ксенотрансплантата рака легкого человека. После обработки посредством AB101 размер и масса опухоли значительно уменьшались по сравнению с контрольной группой, с соответствующим увеличением доли CD8⁺ Т-клеток, а также поверхностной экспрессии маркеров активации Т-клеток, ICOS и OX40, на CD8⁺ Т-клетках в селезенке. Никаких различий в случае CD4⁺ Т-клеток не наблюдали. Эти результаты позволяли предположить, что AB101 стимулирует активацию и пролиферацию CD8⁺ Т-клеток, что согласовывалось с результатами исследований в условиях *in vitro*, представленными в предыдущих примерах. Более того, увеличивалась доля CD11b⁺ клеток. CD11b присутствует на моноцитах, макрофагах, гранулоцитах, дендритных клетках и натуральных киллерах. Все

вместе эти результаты позволяли предположить, что АВ101 можно терапевтически применять для усиления иммунного ответа для контроля за опухолевой массой.

[0542] Для определения терапевтического потенциала АВ101 эффективность АВ101 в снижении роста опухоли в условиях *in vivo* тестировали с применением мышинной линии NSG-SGM3 (The Jackson Laboratory), которая поддерживает приживание человеческих CD34⁺ гемопоэтических стволовых клеток и воспроизведение популяций иммунцитов различных линий дифференцировки.

[0543] Замороженные аликвоты A549 (карциномы легкого человека, p53 дикого типа) и NCI-H1975 (аденокарциномы легкого человека, мутантная p53, p.R273H;) были приобретены у ATCC (кат. № CCL-185 и CRL-5908 соответственно). Клетки A549 выращивали в среде F-12K (ATCC № 30-2004) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS; Corning, кат. № 35-010-CV) и 1% смеси пенициллина и стрептомицина (pen/strep, HyClone, кат. № SV30010). Клетки H1975 культивировали в RPMI (HyClone, кат. № SH30096.02) с 10% FBS и 1% смеси пенициллина и стрептомицина. Клетки размножали при 37°C/5% CO₂ в течение нескольких пассажей перед подкожной инъекцией мышам.

[0544] Мышам NSG-SGM3 трансплантировали две единицы человеческой пуповинной крови, что было произведено компанией The Jackson Laboratory, как описано ранее у Shultz et al., *Nat Rev Immunol* 7(2):118-30 (2007) [PubMed: 17259968]; Shultz et al., *Nat Rev Immunol* 12(11):786-98 (2012) [PubMed: 23059428]; Ishikawa et al., *Curr Top Microbiol Immunol* 324:87-94 (2008) [PubMed: 18481454]; Pearson et al., *Curr Protoc Immunol*; Chapter 15:Unit 15.21 (2008) [PubMed: 18491294]. Две из этих мышей заболели и были умерщвлены. По прибытии в учреждение данным мышам давали возможность акклиматизироваться в течение 5 суток. На День 6 правый и левый бок каждой мыши выбривали.

[0545] На День 7 клетки A549 и H1975 собирали из культур, промывали 3 раза посредством PBS (фосфатно-солевого буферного раствора без Ca²⁺ или Mg²⁺; HyClone № SH30028.02) и ресуспендировали в мембранной матрице Corning Matrigel® (Fisher Scientific № CB-40234C) с плотностью 5×10⁶ клеток/мл. Каждой мыши клетки A549 вводили инъекцией в правый бок, тогда как клетки H1975 вводили инъекцией в левый бок дозой 5×10⁵ клеток в 100 мкл матригеля.

[0546] Через пять суток после инъекции опухоли измеряли с помощью цифрового штангенциркуля (Fisher Scientific № NC0649232). После достижения опухолями размера 50-75 мм³ (объем опухоли = (W (2) × L)/2) мышей рандомизировали с помощью веб-приложения рандомизатора (<https://www.randomizer.org/>) и разделяли на 2 группы (показаны ниже) по 7 мышей в группе:

- (1) антитело изотипического контроля (ISO1 Hu IgG1);

(2) антитело AB101 (Hu IgG1).

[0547] Мыши получали обработку антителами, начиная с суток рандомизации и затем раз в трое суток. Каждая мышь посредством внутрибрюшинной инъекции получала 200 мкг изотипического контроля или AB101 за обработку в 100 мкл PBS. Размер опухоли измеряли по понедельникам, средам и пятницам до Дня 26. Любых мышей, у которых наблюдали признаки смертельной болезни, документировали и немедленно подвергали эвтаназии. Мышей умерщвляли на День 26. Собирали опухоли и селезенку для дальнейшего анализа.

[0548] Выделенные опухоли взвешивали и обрабатывали путем удаления жировых, фиброзных и некротических областей и нарезания опухолей на кусочки размером 2–4 мм. Обработанные опухоли вносили в пробирку softMACS C (MACS Miltenyi Biotec, № 130-096-334), содержащую раствор смеси ферментов для диссоциации опухолей (набор Tumor Dissociation Kit, Mouse; MACS Miltenyi Biotec, № 130-096-730). Клетки диссоциировали с применением диссоциатора softMACS (MACS Miltenyi Biotec, № 130-093-235), а затем инкубировали при 5% CO₂ и 95% влажности в течение 30 минут. Клетки осаждали, ресуспендировали в PBS и профильтровывали с применением 100-мкм клеточного фильтра (Corning № 352360). Диссоциированные отдельные клетки анализировали методом проточной цитометрии.

[0549] Селезенки обрабатывали и диссоциировали на отдельные клетки путем продавливания их через клеточный фильтр. Для удаления всех жировых и фиброзных тканей использовали головку поршня 10-мл шприца. Клетки селезенки осаждали и ресуспендировали в PBS для анализа методом проточной цитометрии.

[0550] Миелоидные клетки и Т-клетки из опухолей и селезенки количественно оценивали методом проточной цитометрии с панелями коктейлей антител, показанными в представленной ниже **таблице 5**. Жизнеспособность клеток оценивали с применением красителя на жизнеспособность e780 (eBiosciences № 65-0865-14; 1:500 в PBS). Клетки инкубировали в течение 10 минут при 4°C с e780 в буфере для FACS (PBS + 1% FBS + 1 mM EDTA (Fisher Scientific № 15575-038)) перед окрашиванием первичными антителами или антителами изотипического контроля. Затем клетки промывали посредством 200 мкл буфера для FACS и блокировали в 25 мкл блокатора для Fc (буфер для FACS + 5 мкл/мл блокатора для Fc (BioLegend, № 422302)) при 4°C в течение 30 минут. К клеткам добавляли красители антител (см. представленную ниже **таблицу 5**) (25 мкл) и инкубировали при 4°C в течение еще 30 минут в темноте. Перед FACS-анализом клетки 3× промывали.

Таблица 5. Панели коктейлей антител

Миелоидная панель 1	Источник	Номер по источнику
APC-антитело к CD11b	BD Biosciences	550019
PE-антитело к CD16	BioLegend	302007
Pacific Blue-антитело к CD64	BioLegend	305018
PerCP-Cy5.5-антитело к HLA-DR	BioLegend	361710
FITC-антитело к CD80	BioLegend	305206
PE-Cy7-антитело к LILRB2	BioLegend	338711
Миелоидная панель 2	Источник	Номер по источнику
APC-антитело к CD11b	BD Biosciences	550019
BV510-антитело к CD86	BD Biosciences	563697
BV421-антитело к PD-L1	BioLegend	329714
PE-Cy7-антитело к CD83	BioLegend	305325
FITC-антитело к CD163	BD Biosciences	3563697
PE-антитело к ICOSL	BioLegend	309403
Т-клеточная панель 1	Источник	Номер по источнику
FITC-антитело к CD4	BioLegend	300505
BV421-антитело к CD194 (CCR4)	BioLegend	359413
BV510-антитело к CD196 (CCR6)	BioLegend	353423
PerCP-Cy5.5-антитело к CXCR3	BioLegend	126513
PE-Cy7-антитело к CD69	BioLegend	104511
APC-антитело к CD25	BioLegend	101909
PE-антитело к IL-7Ra	BioLegend	135013
Т-клеточная панель 2	Источник	Номер по источнику
CD8-APC	BD Biosciences	561953
BV421-антитело к LAG-3	BioLegend	369313
BV510-антитело к OX40	BD Biosciences	745040
PerCP-Cy5.5-антитело к PD-1	BioLegend	135207
PE-Cy7-антитело к ICOS	BioLegend	329805
PE-антитело к CTLA4	BioLegend	106305

[0551] Обработка посредством AB101 значительно снижала рост опухолей A549 и H1975 по сравнению с антителом изотипического контроля. На **фиг. 26** и **фиг. 27** показан график объема опухоли для опухолей A549 и H1975 соответственно за 30 суток. Стрелками

указаны инъекции при обработке антителами. Каждая точка представляет собой среднее значение измерения для 7 мышей. Планки погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего (SEM). Статистическую значимость рассчитывали с использованием критерия Манна-Уитни.

[0552] В группе изотипического контроля объем опухолей A549 и H1975 со временем увеличивался. Однако у мышей, получавших обработку посредством AB101, опухоль A549 характеризовалась более медленным ростом по сравнению с изотипическим контролем, в то время как в случае опухоли H1975 наблюдали регрессию на День 17, и после этого рост оставался стабильным. При рандомизации на День 5 (D5) средний объем опухоли A549 в случае изотипического контроля и AB101 составлял 63,6 мм³ и 63 мм³ соответственно, а на D26 средний объем опухоли в случае изотипического контроля составлял 378 мм³, тогда как средний объем опухоли в случае AB101 составлял 198 мм³. Аналогично, объемы опухоли H1975 на D5 составляли 57,8 и 34,2 в случае изотипического контроля и AB101 соответственно, а на D26 средний объем опухоли в случае изотипического контроля составлял 164,4 мм³, тогда как средний объем опухоли в случае AB101 составлял 57,4 мм³.

[0553] Обработка посредством AB101 значимо уменьшала размер опухоли как в случае опухоли A549, так и в случае опухоли H1975. На D26 опухоли вырезали и взвешивали. AB101 уменьшало размер опухоли A549 на 49% по сравнению с изотипическим контролем (средняя масса опухоли: 538,2 мг в случае изотипического контроля и 273,0 мг в случае AB101, $p = 0,003$) и опухоли H1975 на 60% (средняя масса опухоли: 217,2 мг в случае изотипического контроля и 85,6 мг в случае AB101, $p = 0,0009$).

[0554] Обработка посредством AB101 значимо увеличивала долю CD8⁺ Т-клеток и миелоидных клеток среди общего количества живых клеток в селезенке. Средний процент CD8⁺ Т-клеток увеличивался на 1,3 в случае изотипического контроля до 3,3 в случае AB101 и значимо увеличивался средний процент CD11b⁺ клеток с 2,1 в случае изотипического контроля до 4 в случае AB101.

[0555] Обработка посредством AB101 также значимо увеличивала экспрессию маркеров активации на человеческих CD8⁺ Т-клетках в селезенке. Средняя MFI для экспрессии ICOS на CD8⁺ Т-клетках увеличивалась с 318 в случае изотипического контроля до 841 в случае AB101, а средняя MFI для экспрессии OX40 увеличивалась с 586 в случае изотипического контроля до 1561 в случае AB101.

ПРИМЕР 17. AB101 устраняет опосредованную M2c иммуносупрессию на Т-клетках в анализе совместного культивирования M2c/Т-клеток

[0556] Для оценки, может ли AB101 модулировать опосредованное раковым статусом уклонение от иммунитета в TME, Т-клетки, полученные из человеческих PBMC, культивировали с аутологичными иммуносупрессивными макрофагами M2c. Иммуномодулирующую активность AB101 для «спасения» активированных антителами к CD3 (ОКТ3) Т-клеток от M2c-опосредованной иммуносупрессии оценивали для трех схем обработки, при этом показателями эффективности обработки служили пролиферация Т-клеток и продуцирование IL-2. На **фиг. 28** представлена схема эксперимента.

[0557] Для определения, препятствует ли AB101 образованию M2-подобных опухоль-ассоциированных макрофагов, макрофаги M0 поляризовали до макрофагов M2c в присутствии AB101 или изотипического контроля (схема «до»). Антитела, которые использовали в обработке, отмывали перед совместным культивированием с Т-клетками. Для оценки, «спасает» ли обработка AB101 Т-клетки от M2c-опосредованной супрессии иммунитета, Т-клетки активировали антителами к CD3 в присутствии макрофагов M2c и AB101 или изотипическим контролем во время совместного культивирования M2c/Т-клеток (схема «после»). Для имитации иммунотерапии *in vivo* объединяли схемы «до» и «после» («до/после»).

[0558] В первой серии экспериментов влияние AB101 на поляризацию M2c оценивали с использованием макрофагов, полученных из человеческих моноцитов, и Т-клеток от трех здоровых субъектов. CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки активировали с помощью ОКТ3 в присутствии аутологичных макрофагов M2c, обработанных посредством AB101 или изотипическим контролем. Для оценки M2c-опосредованной иммуносупрессии применяли ОКТ3-престимулированные Т-клетки, совместно культивированные только с макрофагами M2c. Совместное культивирование Т-клеток с макрофагами M1, поляризованными посредством IFN- γ + LPS, давало показатель оптимальной активации Т-клеток. Совместное культивирование M2c/Т-клеток без активации посредством ОКТ3 напоминало Т-клетки в состоянии покоя. На **фиг. 29** показано, что обработка посредством AB101 значительно усиливала пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток по сравнению с изотипическим контролем с 7% до 54% ($p < 0,01$) и с 21% до 83% ($p < 0,05$) делящихся клеток соответственно. Макрофаги M1 и макрофаги M2c, обработанные посредством AB101, индуцировали одинаковые уровни пролиферации. Кроме того, на **фиг. 30** показано, что обработка макрофагов M2c посредством AB101 до поляризации значительно увеличивала продуцирование IL-2 активированными Т-клетками от всех трех исследуемых субъектов по

сравнению с секрецией IL-2 активированными Т-клетками из групп, обработанных посредством AB101, или с наивными M2c. Уровни IL-2 при совместном культивировании с макрофагами M2c, обработанными посредством AB101, были такими же или выше, чем уровни, достигаемые при совместном культивировании с макрофагами M1. Как и ожидалось, Т-клетки, совместно культивированные с M2c без активации посредством ОКТ3, не продуцировали поддающиеся детекции уровни IL-2.

[0559] Затем оценивали влияние обработки посредством AB101 на совместные культуры CD8⁺ Т-клеток/M2c в схемах «до», «до/после» и «после». Эксперимент проводили с PBMC от трех здоровых субъектов. CD3⁺ Т-клетки от 3 исследуемых субъектов активировали посредством антител к CD3 (ОКТ3, 0,25 мкг/мл) в присутствии макрофагов M2c. В ходе поляризации макрофаги M2c обрабатывали посредством AB101 (20 мкг/мл), изотипическим контролем в виде человеческого IgG1 (20 мкг/мл) или только средой («до», т. е. перед совместным культивированием). Т-клетки собирали через 72 ч после стимуляции антителом к CD3 и количественно оценивали пролиферацию методом проточной цитометрии. Р-значения рассчитывали с помощью критерия множественных сравнений Т3 Дуннетта для групп обработки посредством M2c, AB101 и изотипическим контролем IgG1 ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, ***).

[0560] На **фиг. 31** показано, что обработка посредством AB101 значительно усиливала пролиферацию CD8⁺ Т-клеток в схемах «до» и «после» по сравнению с группой обработки изотипическим контролем ($p < 0,05$). При схемах обработки «до» и «после» посредством AB101 увеличивался процент разделившихся CD8⁺ Т-клеток с 23% до 42% и с 26% до 47% соответственно по сравнению с соответствующими значениями у группы изотипического контроля. Наибольшее увеличение пролиферации CD8⁺ Т-клеток наблюдали в группе AB101 «до/после» с 49% делящихся CD8⁺ Т-клеток по сравнению с 22% делящихся CD8⁺ Т-клеток в контрольной группе изотипического контроля «до/после» ($p = 0,062$).

[0561] На **фиг. 32** показаны соответствующие данные по IL-2 для индивидуальных исследуемых субъектов. У всех трех субъектов в группах обработки посредством AB101 значительно увеличивалось продуцирование IL-2 CD8⁺ Т-клетками по сравнению с группами, получавшими только M2c, и группами изотипического контроля. Наиболее высокая секреция IL-2 была достигнута при комбинированной обработке совместных культур M2c/Т-клеток по схеме «до/после». Из данных по пролиферации и IL-2 для трех схем обработки посредством AB101 было видно, что AB101 не только влияло на поляризацию клеток M2c, но также смягчало M2c-опосредованную иммунную супрессию во время совместного культивирования Т-клеток/M2c.

[0562] На **фиг. 33** и **фиг. 34** показаны скомпилированные данные по пролиферации для схем обработки посредством АВ101 «до» и «до/после». АВ101 оказывало большее влияние на пролиферацию CD8⁺ Т-клеток, чем на пролиферацию CD4⁺ Т-клеток. Обработка посредством АВ101 значимо усиливала пролиферацию CD8⁺ Т-клеток по сравнению с соответствующими значениями у изотипического контроля в схемах «до» (n=16, p<0,001) и «до/после» (n=13, p<0,001) соответственно. CD4⁺ Т-клетки пролиферировали в ответ на «схемы» обработки посредством АВ101 «до» и «до/после» с увеличением процента поделившихся клеток с 31% до 44% («до», n = 18, p < 0,01) и с 42% до 49% («до/после», n = 14, p < 0,05) по сравнению с макрофагами М2с, обработанными изотипическим контролем.

[0563] На **фиг. 35** показано, что обработка посредством АВ101 во время поляризации клеток М2с также значимо увеличивала продуцирование IL-2 Т-клетками в анализе совместного культивирования М2с/Т-клеток. Т-клетки в группе обработки посредством АВ101 по схеме «до» продуцировали значимо более высокие уровни IL-2 со средним значением 292 нг/мл, что почти в три раза выше, чем 104 нг/мл от Т-клеток в соответствующей группе обработки изотипическим контролем (n = 21, p<0,0001). Обработка посредством АВ101 по схеме «до/после» вызывала ответ в виде выработки IL-2 Т-клетками в количестве 333 нг/мл, что на 50% больше, чем в случае 227 нг/мл в совместных культурах М2с/Т-клеток, обработанных изотипическим контролем; тем не менее, данное различие не достигало значимости.

ПРИМЕР 18. АВ101 более эффективно, чем АВ104, в восстановлении пролиферации Т-клеток и ответа с выработкой цитокинов Т-клетками, совместно культивируемыми с макрофагами М2с

[0564] Для определения, необходимы ли для АВ101-опосредованного облегчения иммуносупрессии взаимодействия с Fc-рецепторами, экспрессируемыми макрофагами М2с, авторы настоящего изобретения оценивали изотипы АВ101-IgG4 (АВ104) и АВ101-IgG1Fcnull (АВ102) в анализе совместного культивирования М2с/Т-клеток. АВ101 IgG1-Fc-участок связывался с CD64, CD32 и CD16 на макрофагах М2с, тогда как связывание изотипического контроля IgG1Fcnull с Fcγ-рецепторами было минимальным. Как и Fc-участок IgG1, Fc-участок IgG4 характеризуется наномолярной аффинностью к CD64, но обычно не связывается с Fc-рецепторами CD32 или CD16. Способность изотипов АВ101, АВ102 и АВ104 ослаблять М2с-опосредованную иммунную супрессию пролиферации Т-клеток сравнивали с клетками от 5 исследуемых субъектов.

[0565] Т-клетки, выделенные от 4 (CD8⁺ Т-клетки) и 5 (CD4⁺ Т-клетки) исследуемых субъектов, активировали посредством антител к CD3 (ОКТ3, 0,25 мкг/мл) в присутствии

макрофагов M2c. Совместные культуры M2c/Т-клеток обрабатывали в соответствии со схемами «до»/«после» посредством 20 мкг/мл указанных изотипов АВ101. Совместное культивирование M2/Т-клеток использовали в качестве контроля M2c-опосредованной иммунной супрессии. Т-клетки собирали через 72 ч после стимуляции антителом к CD3 и количественно оценивали пролиферацию методом проточной цитометрии. Символами представлены индивидуальные исследуемые субъекты. Р-значения рассчитывали с помощью парного двухстороннего t-критерия, сравнивающего указанные группы обработки ($p < 0,05$, *; ns — не значимо).

[0566] На **фиг. 36** показано, что схема обработки посредством АВ101 «до/после» значимо ($p < 0,05$) увеличивала среднюю пролиферацию активированных посредством антитела к CD3 CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток по сравнению с изотипическим контролем IgG1 (52-78% CD8⁺ Т-клеток; 46-65% CD4⁺ Т-клеток) и с АВ102 (52-78% CD8⁺ Т-клеток; 42-65% CD4⁺ Т-клеток). Обработка посредством АВ104 и АВ102 лишь незначительно усиливала пролиферативный ответ Т-клеток по сравнению с соответствующими изотипическими контролями. Только пролиферативный ответ CD4⁺ Т-клеток в группе обработки посредством АВ104 достигал значимости по сравнению с группой изотипического контроля IgG4 (39-47% поделившихся клеток, $p < 0,05$).

[0567] На **фиг. 37** показано, что схема обработки посредством АВ101 «до/после» оказывала сильное и значимое стимулирующее действие на ОКТ3-опосредованную пролиферацию CD8⁺ Т-клеток (70% поделившихся клеток) по сравнению с обработкой изотипическим контролем IgG1 (40% поделившихся клеток, $p < 0,05$) и посредством АВ104 (41% поделившихся клеток, $p < 0,05$). Кроме того, при схеме обработки посредством АВ101 «после» наблюдали значимо усиленную пролиферацию CD8⁺ Т-клеток (54% поделившихся клеток) по сравнению с обработкой изотипическим контролем (27% поделившихся клеток, $p < 0,05$) или посредством АВ104 (20% поделившихся клеток, $p < 0,05$). Обработка посредством АВ104 не приводила к значимому улучшению пролиферативного ответа по сравнению с изотипическим контролем IgG4 в схемах «до/после» или «после».

[0568] Обработка посредством АВ101 во время совместного культивирования M2c/Т-клеток (схема «после») ослабляла иммуносупрессию, опосредованную M2c, и индуцировала мощный цитокиновый ответ CD8⁺ Т-клеток, активированных антителом к CD3. CD8⁺ Т-клетки, выделенные от 3 исследуемых субъектов, активировали посредством антител к CD3 (ОКТ3, 0,25 мкг/мл) в присутствии макрофагов M2c. Совместные культуры M2c/Т-клеток обрабатывали в соответствии со схемой «после» посредством 20 мкг/мл АВ101, изотипическим контролем в виде человеческого IgG1, АВ104, изотипическим контролем в виде человеческого IgG4 и только средой (M2c). Надосадочные жидкости

забирали через 72 часа после стимуляции антителом к CD3 и количественно оценивали секрецию цитокинов с помощью иммуноанализа на основе магнитных микроносителей. Р-значения рассчитывали с помощью парного двухстороннего t-критерия, сравнивающего указанные группы обработки ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,001$, ***; ns — не значимо).

[0569] На **фиг. 38** показано, что AB101 значительно увеличивало уровни IFN- γ и перфорина у всех исследуемых субъектов по сравнению с изотипическим контролем IgG1. В **таблице 6** показано, что средние уровни IFN- γ , перфорина и IL-6 в группах обработки посредством AB101 увеличивались с 530 до 1600 пг/мл (IFN- γ), с 210 до 1900 пг/мл (перфорин) и с 203 до 690 пг/мл (IL-6) по сравнению со значениями в случае изотипического контроля IgG1. Кроме того, обработка посредством AB101 восстанавливала секрецию TNF- α у 2 из 3 исследуемых субъектов со значимым увеличением по сравнению с соответствующими значениями в случае изотипического контроля IgG1 с 60 до 830 пг/мл и с 1 до 120 пг/мл. Как показано в таблице 6, схема обработки посредством AB101 «до/после» подтверждала результаты, наблюдаемые в группе схемы «после», индуцируя выработку схожих уровней цитокинов в случае перфорина и тестируемых цитокинов. AB104 не ослабляло M2c-опосредованную иммуносупрессию ни в одной из групп обработки. Уровни IL-10 в оцениваемых совместных с M2c культурах находились на нижнем пределе детекции в анализе при всех условиях обработки.

Таблица 6. AB101 восстанавливало ответ с выработкой цитокинов CD8⁺ Т-клетками от опосредованной макрофагами M2c иммуносупрессии

Секреция цитокинов CD8 ⁺ Т-клетками [пг/мл]											
Цитокины		Контроли		Схема «до/после»				Схема «после»			
		Без антитела		AB101		AB104		AB101		AB104	
		M1	M2	Ab	Изот.	Ab	Изот.	Ab	Изот.	Ab	Изот.
IL-6	Среднее	243	27	744	62	12	51	686	203	22	77
	SEM	113	16	222	36	5	28	201	86	21	53
IL10	Среднее	4	20	26	11	9	13	20	16	10	13
	SEM	4	10	17	0	5	3	10	3	7	3
IFN- γ	Среднее	3016	259	1730	461	14	134	1615	531	17	220
	SEM	1209	295	1441	549	5	153	1439	632	2	255
TNF- α	Среднее	53	14	330	23	2	12	312	31	2	14
	SEM	24	15	310	25	1	12	272	32	2	15
Пер-форин	Среднее	220	91	2459	144	57	72	1912	213	48	73
	SEM	129	34	1945	124	8	24	1494	147	19	23

[0570] Соответствующие результаты по цитокинам и перфорином для обработки по схеме «после» и «до/после» посредством AB101 совместных культур M2c/CD4⁺ Т-клетки показаны на **фиг. 39** и в таблице 7. CD4⁺ Т-клетки, выделенные от 3 здоровых исследуемых субъектов, активировали посредством антител к CD3 (ОКТ3, 0,25 мкг/мл) в присутствии макрофагов M2c. Совместные культуры M2c/Т-клеток обрабатывали посредством AB101 (20 мкг/мл) в соответствии со схемой «после», изотипическим контролем в виде человеческого IgG1 (20 мкг/мл), AB104 (20 мкг/мл), изотипическим контролем в виде человеческого IgG4 (20 мкг/мл) и только средой (M2c). Надосадочные жидкости забирали через 72 часа после стимуляции антителом к CD3 и количественно оценивали секрецию цитокинов с помощью иммуноанализа на основе магнитных микроносителей. Р-значения рассчитывали с помощью парного двухстороннего t-критерия, сравнивающего указанные группы обработки ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; ns — не значимо).

[0571] AB101 значимо увеличивало уровни IFN- γ , TNF- α и перфорины у всех исследуемых субъектов по сравнению с изотипическим контролем IgG1 и AB104. Средние уровни IFN- γ , TNF- α , перфорины и IL-6 в группах обработки посредством AB101 увеличивались с 770 до 1700 пг/мл (IFN- γ), с 420 до 1400 пг/мл (TNF- α), с 220 до 780 пг/мл (перфорин) и от 1300 до 5100 пг/мл (IL-6) по сравнению со значениями в случае изотипического контроля IgG 1. Схема обработки посредством AB101 «до/после» подтверждала результаты, наблюдаемые в группе схемы «после», индуцируя выработку схожих уровней цитокинов в случае перфорины и тестируемых цитокинов. AB104 не усиливало ответы с выработкой цитокинов или перфоринов по сравнению с соответствующими уровнями у группы изотипического контроля IgG4.

Таблица 7. AB101 восстанавливало ответ с выработкой цитокинов CD4⁺ Т-клетками от опосредованной макрофагами M2c иммуносупрессии

Секреция цитокинов CD4 ⁺ Т-клетками [пг/мл]											
Цитокины		Контроли		Схема «до/после»				Схема «после»			
		Без антитела		AB101		AB104		AB101		AB104	
		M1	M2	Ab	Изот.	Ab	Изот.	Ab	Изот.	Ab	Изот.
IL-6	Среднее	372	112	5039	1092	1015	940	5129	1330	1101	738
	SEM	205	33	1813	236	214	362	2372	388	380	153
IL10	Среднее	93	67	576	232	171	132	533	218	164	129
	SEM	50	35	171	106	53	35	103	106	68	67

IFN- γ	Среднее	4202	84	1609	721	562	416	1678	774	588	366
	<i>SEM</i>	<i>1012</i>	<i>53</i>	<i>251</i>	<i>291</i>	<i>176</i>	<i>96</i>	<i>195</i>	<i>345</i>	<i>255</i>	<i>194</i>
TNF- α	Среднее	175	133	1356	424	427	500	1377	423	417	419
	<i>SEM</i>	<i>95</i>	<i>82</i>	<i>402</i>	<i>70</i>	<i>70</i>	<i>95</i>	<i>261</i>	<i>59</i>	<i>87</i>	<i>121</i>
Пер- фо- рин	Среднее	117	64	685	173	122	99	776	224	138	94
	<i>SEM</i>	<i>58</i>	<i>5</i>	<i>195</i>	<i>50</i>	<i>33</i>	<i>9</i>	<i>231</i>	<i>103</i>	<i>48</i>	<i>34</i>

[0572] В заключение необходимо отметить, что при обработке посредством АВ101 «спасение» ответа с выработкой цитокинов Т-клетками от М2с-опосредованной иммуносупрессии и отсутствие эффективности обработки изотипом АВ104 позволяли предположить, что для функционирования АВ101 могут быть необходимы взаимодействия АВ101 с Fc-рецептором.

ПРИМЕР 19. Обработка посредством АВ101 усиливала цитотоксическую активность CD8⁺ Т-клеток

[0573] Для определения, усиливает ли АВ101 цитолиз опухолевых клеток CD8⁺ Т-клетками в ТМЕ, оценивали цитотоксическую активность CD8⁺ Т-клеток, простимулированных антителом к CD3, в присутствии макрофагов М2с. В данном исследовании специфический к опухолевому антигену опосредованный Т-клетками цитолиз опухолевых клеток был заменен технологией использования биспецифического активатора Т-клеток (BiTE®). Антитела BiTE представляют собой слитые белки, состоящие из вариабельных доменов двух моноклональных антител, которые сконструированы так, чтобы они связывали и выполняли роль мостика между раковыми клетками и CTL. Один вариабельный домен нацелен на антиген на поверхности раковой клетки, а другой вариабельный домен взаимодействует с CD3 на поверхности Т-клетки. При связывании обоих плеч антитела BiTE® Т-клетки и раковые клетки оказываются в непосредственной близости друг от друга. Как результат, между Т-клеткой и раковой клеткой создается цитолитический синапс, из Т-клетки высвобождаются перфорин и гранзимы, и происходит гибель опухолевой клетки.

[0574] Антитело BiTE к CD19-CD3 применяли для оценки эффективности АВ101 в опосредованном Т-клетками цитолизе опухолевых клеток В-клеточной лимфомы линии Raji, которые экспрессируют целевую для BiTE молекулу CD19. Обработка посредством АВ101 совместной культуры М2с/CD8⁺ Т-клеток ослабляла М2с-опосредованную иммуносупрессию и могла расширять и усиливать цитолитическую активность CD8⁺ Т-

клеток. $CD8^+$ Т-клетки также могут уничтожать клетки Raji путем аллогенного HLA-рестриктивного цитолиза в отсутствие BiTE. Клетки K562 (линия клеток хронического миелоидного лейкоза), которые не экспрессируют BiTE или HLA, были включены для оценки уничтожения $CD8^+$ Т-клетками нерестриктивных по HLA клеток.

[0575] Совместную культуру макрофагов M2c и аутологичных человеческих первичных $CD8^+$ Т-клеток активировали антителом к CD3 и размножали в течение 3 суток. Совместные культуры обрабатывали посредством AB101 (20 мкг/мл), изотипическим контролем в виде человеческого IgG1 (20 мкг/мл) или только средой согласно схеме «до», «до/после» и «после». В схемах «до» и «после» терапевтические антитела вносили только во время поляризации M2c и во время совместного культивирования Т-клеток с M2c соответственно. Р-значения рассчитывали с помощью парного двухстороннего t-критерия, сравнивающего группы обработки посредством AB101 с обработкой посредством M2c и контрольной группой обработки изотипическим контролем соответственно ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,001$, ***; $p < 0,0001$, ****; ns — не значимо). Схема анализа совместного культивирования M2/Т-клеток с оценкой цитотоксичности показана на **фиг. 28**.

[0576] На **фиг. 40** показано, что обработка посредством AB101 во время поляризации макрофагов M0 в M2 или во время совместного культивирования M2c/Т-клеток значимо усиливала цитоллиз клеток Raji в присутствии антитела к CD19-CD3 BiTE® по сравнению с изотипическим контролем. Процент гибели клеток Raji увеличивался с 66% до 77% ($p < 0,01$) при схеме «до», с 64% до 83% ($p < 0,001$) при схеме «до/после» и с 65% до 82% ($p < 0,01$) при схеме «после». Анализ цитолиза клеток Raji с применением BiTE® имел небольшой динамический диапазон и высокий фон с покоящимися $CD8^+$ Т-клетками (серый столбец, черные кружки), культивируемыми с клетками M2c, что приводило к цитолизу 71% клеток Raji.

[0577] Примечательно, что обработка посредством AB101 также увеличивала цитотоксическую активность нерестриктивных по HLA $CD8^+$ Т-клеток, нацеленных на раковые клетки K562. Обработка макрофагов M2c и Т-клеток посредством AB101 по схеме «до/после» и «после» повышала цитоллиз опухолевых клеток с 12% до 41% в условиях «до/после» ($p < 0,01$) и с 13% до 36% ($p < 0,05$) в условиях «после» по сравнению с соответствующими значениями изотипического контроля.

[0578] Затем оценивали влияние AB101 на цитотоксическую активность $CD8^+$ Т-клеток, полученных от группы субъектов-людей. $CD8^+$ Т-клетки от 8 исследуемых субъектов размножали в присутствии аутологичных макрофагов M2c с антителом к CD3 (ОКТ3, 0,25 мкг/мл). Отдельно макрофаги M2c и совместные культуры обрабатывали посредством AB101 (20 мкг/мл), изотипическим контролем в виде человеческого IgG1 (20

мкг/мл) или только средой согласно схемам «до», «до/после» и «после». Т-клетки собирали через 72 ч после стимуляции антителом к CD3 и культивировали с клетками Raji в присутствии или в отсутствие антител BiTE к CD19-CD3. Гибель клеток Raji определяли методом проточной цитометрии через 18 ч после проведения анализа цитолиза. Р-значения рассчитывали с помощью парного двухстороннего t-критерия, сравнивающего группы обработки посредством AB101 с обработкой посредством M2с и контрольной группой обработки изотипическим контролем в виде человеческого IgG1 соответственно ($p < 0,01$, **; $p < 0,001$, ***).

[0579] Как показано на фиг. 41, обработка посредством AB101 по схеме «до/после» значительно увеличивала опосредованный $CD8^+$ Т-клетками цитолиз клеток Raji с помощью BiTE® с 49,5% до 63,5% ($p < 0,001$) по сравнению с группой изотипического контроля в виде человеческого IgG1. Без BiTE $CD8^+$ Т-клетки из группы AB101 усиливали цитолиз клеток Raji с 35% до 43% ($p < 0,01$).

[0580] Затем оценивали влияние AB101 на цитотоксическую активность нерестриктированных по HLA $CD8^+$ Т-клеток. $CD8^+$ Т-клетки от 8 исследуемых субъектов размножали в присутствии аутологичных макрофагов M2с с антителом к CD3 (ОКТ3, 0,25 мкг/мл). Отдельно макрофаги M2с и совместные культуры обрабатывали посредством AB101 (20 мкг/мл), изотипическим контролем в виде человеческого IgG1 (20 мкг/мл) или только средой согласно схемам «до», «до/после» и «после». Т-клетки собирали через 72 ч после стимуляции антителом к CD3 и культивировали с клетками K562. Гибель клеток K562 определяли методом проточной цитометрии через 18 ч после проведения анализа. Р-значения рассчитывали с помощью парного двухстороннего t-критерия, сравнивающего группы обработки посредством AB101 с обработкой посредством M2с и контрольной группой обработки изотипическим контролем в виде человеческого IgG1 соответственно ($p < 0,01$, **).

[0581] На фиг. 42 показано, что обработка посредством AB101 оказывала наиболее сильное влияние на цитолитическую активность $CD8^+$ Т-клеток в анализе цитолиза K562. Средняя гибель клеток в группе обработки посредством AB101 была в два раза выше, чем в группе изотипического контроля в виде человеческого IgG1, увеличивая средний цитолиз K562 с 14% до 29% соответственно ($p < 0,01$).

ПРИМЕР 20. AB101 модулирует экспрессию хемокиновых рецепторов на Т-клетках, совместно культивируемых с макрофагами M2c

[0582] Для определения, изменяет ли AB101 состояние активации CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, экспрессию хемокиновых рецепторов и маркеров активации или истощения оценивали в анализе совместного культивирования M2c/Т-клеток, как показано на **фиг. 28**.

[0583] Активированные антителами к CD3 Т-клетки совместно культивировали с аутологичными клетками M2c, обработанными посредством AB101 или изотипическим контролем во время поляризации. Активированные антителами к CD3 Т-клетки, совместно культивированные с наивными макрофагами M2c или IFN- γ LPS-активированными макрофагами M1, включали в исследование в качестве контролей для иммунной супрессии и активации иммунитета соответственно. Покоящиеся Т-клетки культивировали совместно с макрофагами M2c без активации посредством антител к CD3. Через трое суток после активации посредством антител к CD3 Т-клетки анализировали методом проточной цитометрии. Панель 1 окрашивания для проточной цитометрии (**таблица 8**) включала антитела к маркерам активации (CD25 и CD69), маркеру покоящихся Т-клеток CD127, а также хемокиновым рецепторам CXCR3, CXCR4 (CD194) и CCR6 (CD196), обычно применяемым для дифференциации субпопуляций CD4⁺ Т-клеток. Панель 2 антител для проточной цитометрии (**таблица 8**) содержала антитела к маркерам активации и истощения Т-клеток LAG3, OX40, PD-1, ICOS и CTLA-4.

[0584] Т-клетки, выделенные от 3 исследуемых субъектов, активировали посредством антител к CD3 (OKT3, 0,25 мкг/мл) в присутствии макрофагов M2c. Совместные культуры M2c/Т-клеток обрабатывали во время поляризации M2c посредством AB101 (20 мкг/мл), изотипическим контролем в виде человеческого IgG1 (20 мкг/мл) или только средой. В качестве положительного контроля была включена совместная культура M1/Т-клеток. Надосадочные жидкости собирали через 72 ч после стимуляции антителом к CD3 для проточной цитометрии. На тепловой карте представлены результаты кластерного анализа FlowSOM объединенных групп обработки всех исследуемых субъектов.

[0585] Фенотип CD4⁺ Т-клеток оценивали с применением панели 1 для проточной цитометрии и плагина FlowSOM из FlowJo для объективной кластеризации. Как показано на **фиг. 43**, кластеризация CD4⁺ Т-клеток с помощью FlowSOM из всех групп совместного культивирования M2c/Т-клеток позволяла выявить 8 кластеров (пронумерованных 0-7) с дифференциальными уровнями экспрессии поверхностных маркеров. Кластером 1 были представлены покоящиеся Т-клетки, а кластер 6 походил на активированные Th1-подобные Т-клетки.

Таблица 8. Панели антител, применяемые для оценки экспрессии хемокиновых рецепторов на подтипах CD4⁺ Т-клеток и маркеров истощения/активации

	Панель 1 антител: панель для фенотипирования Т-клеток	Панель 2 антител: истощение/активация
Поверхностные маркеры	CD4 - FITC CD69 - PE-Cy7 CD25 - APC CD127 - PE CXCR3 - PerCP-Cy5.5 CD194 (CCR4) - BV421 CD196 (CCR6) - BV510	CD4 - FITC CD8 - APC LAG3 - BV421 OX40 - BV510 PD-1 - PerCP-Cy5.5 ICOS - PE-Cy7 CTLA4 - PE

[0586] Наглядный репрезентативный пример того, как обработка посредством AB101 влияла на доли CD4⁺ Т-клеток, показан в **таблице 9** и на **фиг. 43**. Большинство (среднее=74%) Т-клеток, совместно культивированных с клетками M2c без активации антителом к CD3, были обнаружены в кластере 1 (у 3 из 3 исследуемых субъектов). Клетки из кластера 1 имели фенотип покоящихся клеток с низкой или отсутствующей экспрессией CD69, CXCR3, CCR4 или CD25 и повышенной экспрессией CD127. В присутствии иммуноактивирующих поляризованных макрофагов M1 большинство Т-клеток (57%, в среднем от всех 3 субъектов) принимали активированный фенотип, характеризующийся высокой экспрессией CXCR3 и низкой экспрессией CCR4, CD127, CCR6, а также маркеров активации CD25 и CD69 (кластер 2). Совместное культивирование с M1 также индуцировало появление уникальной меньшей субпопуляции с повышенной экспрессией CD25, CXCR3 и CCR4 (кластер 7, 21% Т-клеток, совместно культивируемых с M1). Клетки M2c оказывали иммуносупрессивное действие на активированные антителами к CD3 CD4⁺ Т-клетки в совместной культуре с 46% Т-клеток в кластере 1 фенотипа покоящихся клеток. Кроме того, 32% Т-клеток из группы только M2c были обнаружены в кластере 2 фенотипа активированных Т-клеток.

Таблица 9. AB101 модулирует распределение активированных CD4⁺ Т-клеток в кластере FlowSOM

Кластер FlowSOM	Распределение CD4 ⁺ Т-клеток в кластерах FlowSOM [%]				
	Покоящиеся Т-клетки M2c	M2c + ОКТ3	Изотипический контроль M2c + ОКТ3	AB101 M2c + ОКТ3	M1 + ОКТ3

	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
0	1,7	0,3	3,3	0,9	3,0	0,7	5,9	1,6	2,9	0,8
1	73,1	7,8	46,3	2,9	51,3	1,6	12,3	7,3	8,9	3,7
2	19,8	5,7	31,9	5,3	27,4	1,9	40,5	9,8	55,6	6,1
3	1,3	0,8	4,3	1,5	4,2	0,7	14,0	4,5	1,1	0,5
4	2,9	0,8	9,6	1,7	8,7	1,5	16,0	3,0	3,3	0,5
5	0,2	0,0	0,3	0,1	0,2	0,1	0,6	0,1	3,9	1,3
6	0,4	0,2	3,3	0,5	4,4	1,8	9,3	1,0	3,4	0,8
7	0,7	0,3	1,0	0,1	0,9	0,1	1,4	0,1	20,8	1,5

[0587] На **фиг. 43** показано, что активированные антителами к CD3 CD4⁺ Т-клетки из группы обработки изотипическим контролем имели профиль распределения, сходный с таковым у Т-клеток из соответствующей группы обработки только M2c, со средним значением 51% Т-клеток в кластере 1 и 27% Т-клеток в кластере 2 (**таблица 9**).

[0588] В отличие от этого, обработка посредством AB101 облегчала супрессивное действие поляризованных макрофагов M2c. AB101 значимо увеличивало долю Т-клеток, имеющих активированный фенотип из кластера 2, по сравнению с изотипическим контролем, с 27% до 40% ($p < 0,05$). Кроме того, AB101 значимо уменьшало долю клеток, имеющих фенотип покоящихся клеток, с 51% до 13% (кластер 1; $p < 0,0001$). Данное распределение напоминало паттерны фенотипа Т-клеток, которые были простимулированы в присутствии макрофагов M1.

[0589] Кластеры 3, 4 и 6 также повышались при обработке посредством AB101 по сравнению с группой изотипического контроля. Как показано на **фиг. 43**, различия в 3 кластерах достигали значимости у 2 из 3 оцениваемых субъектов ($p < 0,0001$) относительно соответствующих M2c и изотипических контролей.

[0590] Кластеры 3 и 4 определялись высокой экспрессией CXCR3, средней экспрессией CCR4 и присутствием CD127 с высокой (кл. 3) или низкой (кл. 4) экспрессией маркера активации CD69. Фенотип кластера 3 не был общим ни с M1, ни с покоящимися Т-клетками, что выглядело как характерный признак для обработки посредством AB101.

[0591] Кластер 6 представлял собой фенотип активированных Th1-подобных Т-клеток с высокой экспрессией CXCR3 и CD69 и минимальной экспрессией CCR4 и CCR6. Обработка посредством AB101 увеличивала средний процент доли Т-клеток в кластере 6 с 4,4% в группе обработки изотипическим контролем до 9,3% (**таблица 9**).

[0592] В заключение необходимо отметить, что по результатам анализа FlowSOM фенотипов CD4⁺ Т-клеток, размножаемых с помощью совместного культивирования с M2c, было видно, что обработка посредством AB101 ослабляла опосредованную M2c иммунную

супрессию и индуцировала экспрессию характерных фенотипов Т-клеток, характеризующихся экспрессией CXCR3 и CCR4. Обработка посредством AB101 также увеличивала долю активированных Th1-подобных CXCR3⁺ Т-клеток в совместных культурах с M2с.

[0593] Для дополнительного исследования способности AB101 блокировать опосредованную M2с супрессию, приводящую к усиленной активации Т-клеток, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки оценивали на наличие маркеров активации и истощения LAG3, OX40, PD-1, ICOS и CTLA-4. По результатам кластеризации CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток с помощью FlowSOM было выявлено 5 кластеров CD4⁺ (пронумерованных 0-4) и 4 кластера CD8⁺ (пронумерованных 0-3).

[0594] Низкая экспрессия LAG3, OX40, PD-1 и CTLA-4 в кластере 0 (CD4⁺ Т-клетки) и кластере 3 (CD8⁺ Т-клетки) свидетельствовала о фенотипе покоящихся клеток. Повышенную экспрессию PD-1 и ICOS наблюдали в кластере 1 (CD4⁺ Т-клетки), а кластер 3 (CD8⁺ Т-клетки) в данном исследовании представлял активированный фенотип (**фиг. 44**).

[0595] Кластер 0 (ICOS⁺ PD-1⁻ LAG3⁻ CTLA4⁻ OX40⁻) представлял 90% непростимулированных CD4⁺ Т-клеток, а кластер 3 (ICOS^{lo} PD-1⁻ LAG3⁻ CTLA4⁻ OX40⁻) представлял 93% покоящихся CD8⁺ Т-клеток, культивированных с макрофагами M2с без активации антителом к CD3 (**фиг. 44**). При совместном культивировании с поляризованными макрофагами M2с или обработке изотипическим контролем активированные антителом к CD3 CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки преимущественно попадали в соответствующий кластер 0 (65% CD4⁺ Т-клеток) и кластер 3 (64% CD8⁺ Т-клеток) покоящихся клеток, подтверждая иммуносупрессию, опосредованную клетками M2с.

[0596] AB101 значительно увеличивало активацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток по сравнению с группами обработки посредством только M2с или изотипическим контролем. Восемьдесят два процента CD4⁺ Т-клеток и 93% CD8⁺ Т-клеток в группе обработки посредством AB101 были обнаружены в соответствующем кластере 1 (ICOS^{hi} PD-1⁺ LAG3⁻ CTLA4⁻ OX40^{lo}) и кластере 0 (ICOS^{hi} PD-1⁺ LAG3^{lo} CTLA4⁻ OX40^{lo}) фенотипа активированных Т-клеток, который был таким же, как и у Т-клеток, совместно культивируемых с поляризованными макрофагами M1.

ПРИМЕР 21. AB101 модулировало экспрессию поверхностных маркеров M2с

[0597] Обработка посредством AB101 во время поляризации макрофагов M0 в M2с «спасала» активированные антителами к CD3 Т-клетки от M2с-опосредованной иммунной супрессии в анализе совместного культивирования M2с/Т-клеток. Для определения, модулирует ли AB101 экспрессию поверхностных маркеров и иммунных контрольных

точек на M2c, 5-суточные макрофаги M0 поляризовали с помощью IL-10 в макрофаги M2c в присутствии AB101 или изотипического контроля (20 мкг/мл), а затем окрашивали панелью антител, фенотипирующих макрофаги. Профили проточной цитометрии сравнивали с таковыми у наивных, необработанных клеток M2c и макрофагов M1, поляризованных посредством LPS + IFN- γ . Макрофаги M2c экспрессируют такие маркеры M2c, как CD163, CD206 и MerTK, такие рецепторы Fc γ , как CD16, CD32, CD64, рецептор распознавания паттернов TLR2, представитель семейства TNFR CD40. Как и ожидалось, после обработки посредством IFN- γ макрофаги M1 экспрессировали более высокие уровни HLA-класса II и лиганда контрольной точки PD-L1 по сравнению с макрофагами M2c. В отличие от этого, у макрофагов M2c наблюдали более высокие уровни иммуносупрессивных лигандов Siglec-15 и LILRB2, чем у макрофагов M1. Оцениваемые поверхностные маркеры, костимулирующие молекулы и рецепторы CD86, CD91, CD150, кальретикулин, дектин-1, TIM4 и TLR4, не экспрессировались на клетках M2c.

[0598] Для дополнительного анализа экспрессии CXCR3 активированными CD4⁺ Т-клетками кластеры FlowSOM 3-6 объединяли на основании их CXCR3⁺ CD69⁺ CD25⁺ Т-клеточного фенотипа. Доли результирующих фенотипов показаны в виде круговых диаграмм на **фиг. 45** и представляют фенотипы из таблицы на **фиг. 45**.

[0599] Обработка посредством AB101 увеличивала долю активированных CXCR3⁺, CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих маркеры активации CD69 и CD25, с 18% до 40% по сравнению с группой обработки изотипическим контролем. Группы обработки только OR2572 и M2c имели сопоставимые профили распределения.

[0600] Для количественной оценки модулирующего действия AB101 на экспрессию поверхностных маркеров значения mMFI фенотипирующих антител на клетках M2c, обработанных посредством AB101, нормализовали к соответствующим маркерам на изотипическом контроле (nMFI_{iso}) или необработанных, наивных макрофагах M2c (nMFI_{M2c}), полученных от 10 исследуемых субъектов (**фиг. 46**). AB101 индуцировало очень значимое снижение CD16 (34% nMFI_{iso}, $p < 0,0001$) и CD64 (30% nMFI_{iso}, $p < 0,0001$), а также значимое снижение TLR2 (66% nMFI_{iso}, $p < 0,05$) по сравнению с обработанными изотипическим контролем клетками M2c. Схожие тенденции наблюдали при нормализации MFI поверхностного маркера AB101 M2c к наивным макрофагам M2c. nMFI_{M2c} поверхностных маркеров макрофагов, обработанных посредством AB101, значимо снижалось в случае CD16 (44% nMFI_{M2c}, $p < 0,001$), CD64 (30% nMFI_{M2c}, $p < 0,0001$), TLR2 (63% nMFI_{M2c}, $p < 0,05$) и Siglec-15 (66% nMFI_{M2c}, $p < 0,05$). Обработка посредством AB101 усиливала экспрессию HLA-класса II и не оказывала значимого влияния на экспрессию CD163, CD206, MerTK, LILRB2 и PD-L1 по сравнению с контрольными макрофагами M2c.

[0601] Таким образом, обработка посредством AB101 во время поляризации макрофагов M2c снижала экспрессию рецептора врожденного иммунитета TLR2 и лиганда контрольной точки Siglec-15. Кроме того, она ингибировала индуцированную посредством IL-10 активацию CD16 и CD64 на клетках M2c.

ПРИМЕР 22. Связывание AB101 повышало защиту (более медленный HD-обмен) участков в доменах 3 и 4 SRCR и открытых (более быстрый HD-обмен) участков в доменах 2, 5 и 9 CD163

[0602] Проводили сравнительное исследование HDX для изучения влияния связывания IgG на CD163. Из-за большого количества пептидов, полученных из избытка Ab, присутствующего в комплексе, многие пептиды перекрывались по m/z и времени удержания. В конечном счете, после отфильтровывания зашумленных и перекрывающихся пептидов, получали окончательный набор из 107 пептидов в данных с пепсином, что соответствовало охвату 74% со средней избыточностью 1,28. Для набора данных с непентензином II окончательное количество отфильтрованных пептидов составляло 230, что соответствовало 87% охвату со средней избыточностью 2,8. При объединении наборов данных с обеими протеазами общий охват последовательностей составлял 93% со средней избыточностью, составлявшей 4,1.

[0603] Водородно/дейтериевый обмен с масс-спектрометрией: исходные стоковые растворы рекомбинантного человеческого CD163 (rhCD163) разводили до 0,36 мг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) с pH 7,2. Репортеры внутреннего обмена: тетрапептид PPPF или трипептид YPI вносили в каждый раствор до конечной концентрации 1 мкМ. Комплекс образца с антителом получали таким же образом, но он включал 1,38 мг/мл AB101, что соответствовало 3-кратному молярному избытку по сравнению с rhCD163. Данные рабочие растворы инкубировали при 22°C и хранили при 4°C в течение 1 суток до начала реакций дейтериевого обмена. 10 мкл рабочего раствора белка разводили в 10 раз в 90 мкл буфера на основе дейтерированного HBS: (20 mM HEPES, pH 7,2, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 95% D₂O) и инкубировали при 22°C в течение 3 секунд, 15 секунд, 1 минуты, 5 минут, 30 минут, 4 часов или 20 часов. Дейтерированный HBS также содержал 0,2 мкг/мл брадикинина, позволяющего получить полностью дейтерированное эталонное соединение во всех экспериментах для отслеживания обратного обмена. Дополнительный образец инкубировали при 37°C в течение 20 часов в качестве образца с высокой степенью дейтеризации. Подвергаемые обмену образцы вносили в равный объем (100 мкл) охлажденного льдом буфера для гашения: 1 M TCEP, 0,2% муравьиной кислоты (FA) для получения конечного pH 2,5. Образцы подвергали мгновенной заморозке в бане со

этанолом и сухим льдом (-60°C) и впоследствии хранили при -80°C до проведения LC-MS-анализа. Недейтерированные эталонные образцы получали таким же способом, за исключением того, что их разводили в водном буфере на основе HBS.

[0604] Обработка образцов иммобилизированной пепсиновой протеазой: замороженные образцы оттаивали на блоке с температурой 5°C в течение 4 минут перед введением в загрузочную петлю. Загруженный образец пропускали через специально упакованную колонку с пепсином (свиной пепсин, иммобилизованный на смоле POROS 20-AL; колонка размером $2,1 \times 50$ мм), поддерживаемую при температуре 12°C с потоком 0,1% трифторуксусной кислоты (TFA) и 2% ацетонитрила (ACN) со скоростью 200 мкл/мин. Расщепленные пептические фрагменты улавливали на картридже Waters XSelect CSH C18 XP VanGuard ($2,1 \times 5$ мм, 2,5 мкм). Спустя 5 минут загрузки, расщепления и улавливания пептиды разделяли на аналитической колонке (Waters CSH 1×100 мм, 1,7 мкм, $130 \text{ \AA}$) с применением градиента 3% - 40% растворителя В в течение 9 минут (А: 0,1% FA, 0,025% TFA, 2% ACN; В) 0,1% FA в ACN). Система для LC была соединена с Waters Synapt G2-Si, производящим полное сканирование в диапазоне m/z 300-2000 с включенным разделением по подвижности ионов. Условия источника были оптимизированы для минимизации потерь дейтерия во время десольватации. До и в конце всех циклов LC-MS прогоняли недейтерированные образцы. На стадии аналитического разделения для очистки колонки с пепсином использовали следующую серию инъекций по 250 мкл: 1) 0,1% Fos-12 с 0,1% TFA; 2) 2 M GndHCl в 0,1% TFA; 3) 10% уксусная кислота, 10% ацетонитрил, 5% изопропанол. После каждого градиента улавливающую колонку промывали следующей серией инъекций по 250 мкл: 1) 10% FA; 2) 30% трифторэтанол; 3) 80% метанол; 4) 66% изопропанол, 34% ACN; 5) 80% ACN. Во время промывки улавливающей колонки аналитическую колонку очищали тремя быстрыми градиентами. Данные стадии очистки были необходимы для обеспечения того, чтобы для каждого анализируемого пептида уровень переноса был ниже 5%.

[0605] Обработка образцов иммобилизированной протеазой непентезин II: описанную выше обработку образцов повторяли, за исключением того, что протеазу непентезин II, иммобилизованную на POROS 20-AL, применяли для стадии расщепления в режиме онлайн.

[0606] Для того, чтобы сначала убедиться, что условия обмена и забора образцов были идентичными для несвязанного и связанного с антителом состояния, авторы настоящего изобретения сначала изучали профиль обмена пептидов внутреннего стандарта. Для обоих наборов данных стандарты PPPI и YPI были согласованы между наборами данных для условия без связи с лигандом и со связанными антителами, что обеспечивало,

чтобы условия были согласованными, и даже незначительные изменения могли быть интерпретированы как вызванные измененной структурой и/или динамикой белка. Более того, у полностью дейтерированного пептида брадикинина, который был включен в дейтерированный буфер, наблюдали идентичные уровни дейтерия, что обеспечивало, что уровень обратного обмена не будет различаться между образцами в каждом наборе данных.

[0607] Сравнение кинетики HDX между связанным и не связанным с антителом состояниями использовали для оценки изменений всего антигена в ответ на связывание с антителом. Краткое описание изменений для наборов данных с пепсином и непентезином II представлено на **фиг. 50 и 51**. Изменения окрашены в первичной последовательности в зависимости от того, были ли небольшие (небольшие изменения в один момент времени) или большие изменения (выше двух стандартных отклонений или наблюдаемые в несколько моментов времени) в кинетике HDX в ответ на связывание с антителом. Следует отметить, что для данных сравнений авторы настоящего изобретения использовали только те изменения, которые были статистически значимыми при оценке стандартного отклонения среди повторов, а также следили за тем, чтобы согласовывались данные по всем перекрывающимся пептидам, охватывающим почти один и тот же участок. Благодаря этим критериям авторы настоящего изобретения были уверены, что получают только самые консервативные выводы из наборов данных.

[0608] В наборах данных с пепсином, показанных на **фиг. 47**, было два сайта, у которых наблюдали повышенную защиту при связывании с антителом. Один сайт включал гликопептид 271-285, у которого наблюдали резкое увеличение защиты в несколько моментов времени, и несколько пептидов, охватывающих С-концевой прилегающий участок 286-299, у которых также наблюдали значимое снижение кинетики обмена. Второй сайт включал три пептида в пределах остатков 405-418, у которых наблюдали небольшое увеличение защиты. У большого количества пептидов наблюдали увеличение гибкости (более быстрый обмен) при связывании с антителами. Наиболее ярко выраженные эффекты наблюдали в остатках 125-139 и 479-488, тогда как в остатках 887-910 и 918-933 наблюдали более слабое увеличение.

[0609] В наборе данных с непентезином II, показанном на **фиг. 48**, в целом наблюдали изменения, схожие с теми, которые наблюдали с пепсином. Наибольшее увеличение защиты было видно в остатках 279-286, при этом в участке, расположенном непосредственно на их N-конце (271-278), наблюдали небольшое увеличение. У остатков 408-415 также наблюдали небольшое увеличение защиты при связывании с антителом. Как и в данных с пепсином, наблюдали увеличение гибкости на больших участках белка. Наибольшее увеличение гибкости наблюдали в остатках 471-483 с меньшими изменениями

во многих других частях белка. Согласованность с этими наборами данных убедительно указывало на то, что эпитоп OR2805 лежит в пределах остатков 279-285 и может также включать соседнюю последовательность (279-299), а также остатки 405-418. Также могут быть вовлечены другие участки, которые не были изучены с помощью HDX-MS.

[0610] Как и в данных с пепсином, в наборе данных с непентезином II также наблюдали увеличение гибкости на больших участках белка. Наибольшее увеличение гибкости наблюдали в остатках 471-483 с меньшими изменениями во многих других частях белка (**фиг. 49**). В целом, большие изменения в удаленном от предполагаемого эпитопа участке, согласовывались с крупномасштабным аллостерическим эффектом при связывании с антителом. Тот факт, что все изменения, расположенные в удаленном от эпитопа участке, становятся более заметными, свидетельствовал о том, что связывание с антителом ослабляло некоторую вторичную структуру в белке, вероятно, влияя на взаимодействия с соседними белковыми доменами. Тот факт, что изменения наблюдались как в наиболее N-концевом, так и в C-концевом доменах, свидетельствовал о том, что данный белок имеет несколько междоменных взаимодействий в своей нативной (не связанной с лигандом) конформации.

[0611] На **фиг. 49** схематично показано влияние связывания AB101 с ECD человеческого CD163. В присутствии AB101 участки внутри доменов SRCR 3 и 4 были защищены от протонно-дейтериевого обмена. Одновременно со сниженным обменом в доменах 3 и 4 домены 2, 5 и 9 в SRCR характеризовались повышенным обменом, что свидетельствовало о большем воздействии растворителя при связывании с AB101.

ПРИМЕР 23. AB101 связывает фрагмент укороченного домена SRCR 1-5 ECD человеческого CD163

[0612] Внеклеточный домен человеческого CD163 был укорочен после домена 5 SRCR и сохранял гистидиновую метку на C-конце. Данный фрагмент ECD CD163 экспрессировали в клетках HEK293-6E и очищали с помощью IMAC-способов, как показано на **фиг. 50**. AB101 связывал укороченный ECD с субнанолярной EC50, как указано в **таблице 10**, однако, как и ожидалось, RM3/1 не связывал его. Эпитоп, связывающий RM3/1, картирован относительно доменов 8 и 9 SRCR. Укороченный SRCR 1-5 ECD CD163 содержит домены 3 и 4, которые, как было выявлено с помощью HDX-MS, содержат эпитоп, с которым связывается AB101. Тот факт, что AB101 сохраняло связывание с SRCR 1-5, дополнительно подтверждал результаты выявления эпитопа, полученные в исследовании методом HDX-MS.

Таблица 10. Значения EC50 для AB101, RM3/1, EDHu-1 и 215927, которые связывались с укороченным SRCR 1-5 ECD CD163

EC50 (нМ)				
Антиген	AB101 R11	RM3/1	EDHu-1	215927
ECD huCD163	0,26	0,061	0,052	0,017
SRCR 1-5 huCD163	0,76	---	0,050	0,020
Соотношение SRCR 1-5 / ECD	2,9	---	0,96	1,17

ПРИМЕР 24. AB101 связывается с человеческим, но не яванского макака, рекомбинантным белком ECD CD163, и одноточечная мутация E323K в ECD CD163 яванского макака обеспечивает связывание AB101 наравне с ECD человеческого CD163

[0613] В ПРИМЕРЕ 6 с помощью ELISA-анализа с рекомбинантными белками CD163, иммобилизованными на пластике, определяли связывание AB101 с рекомбинантным человеческим белком по 14-точечным кривым зависимости дозы от ответа в 26 отдельных экспериментах с получением среднего геометрического значения EC50, равного 0,52 нМ. У AB101 не наблюдали связывания с рекомбинантным мышинным CD163, в то время как коммерчески доступное крысиное антитело к muCD163 (Thermo Fisher Scientific № 14-1631-82) связывалось, как и ожидалось.

[0614] В результате неспособности AB101 связывать мышинный CD163 и низкой идентичности аминокислотной последовательности с человеческим CD163 (72,9%), основное внимание было сосредоточено на втором виде, часто применяемым в доклинических исследованиях на токсикологию, а именно на отличном от человека примате (NHP) яванском макаке. Аминокислотная последовательность CD163 яванского макака на 96,5% идентична человеческому CD163. Получение ECD CD163 человека и яванского макака с С-концевой 8-гистидиновой меткой в клетках HEK293-6E давало от 1 до 2 мг очищенного белка на литр 7-суточной транзientной трансфекции CM. На **фиг. 51** представлены результаты выравнивания белков CD163 человека и яванского макака.

[0615] Имея на руках результаты HDX-MS, которые позволили выявить связывающий эпитоп на CD163, и значительную идентичность последовательностей CD163 человека и яванского макака, а также сведения, что AB101 не связывает CD163 яванского макака, появилась возможность выявить ключевой остаток в домене 3 SRCR, задействуемый в связывании с AB101. Остаток лизина в положении 323 в человеческом CD163 у всех потенциальных отличных от человека видов, рассматриваемых для

исследований токсикологии, является остатком глутамина (**фиг. 51**). Данное положение находится в центре связывающегося с AB101 эпитопа домена 3 SRCR, который был определен с помощью HDX-MS. Сайт-направленный мутагенез у яванского макака с заменой глутаминовой кислоты в положении 323 на лизин приводил к появлению связывания AB101 с ECD CD163 яванского макака с EC50, близкой к EC50 связывания AB101 с ECD человеческого CD163 (**фиг. 52**). Этот результат мутации с приобретением функции явно указывал на лизин в положении 323 в эпитопе, с которым связывается AB101.

ПРИМЕР 25. Аффинность связывания AB101 с человеческим CD163 по результатам SPR

[0616] Результаты измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) использовали для определения связывания AB101 и антитела к CD163, клона GHI/61, с человеческим CD163 (результаты измерения авидности AB101) в различных условиях рабочего буфера.

[0617] SPR-анализ связывания AB101 и антитела к CD163, клона GHI/61, с человеческим CD163 осуществляли с применением прибора Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences). Очищенный рекомбинантный белок CD163 иммобилизовали непосредственно на чипе (CM5 серии S-типа) с применением набора для связывания с аминокислотной группой (GE Healthcare Life Sciences). Производили поиск pH (10 mM ацетата натрия, pH 5,5/5,0/4,5/4,0) для определения подходящей концентрации и pH для иммобилизации путем связывания с аминокислотной группой. Ацетат натрия (pH 5,5) был выбран как наилучшее условие для связывания CD163 с поверхностью сенсорного чипа CM5. Количество белка CD163, связанного с поверхностью чипа CM5, составляло 80 RU (0,08 нг/мм²).

[0618] Рабочие буферы, использованные для данного эксперимента, были следующими: буфер (1) 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3,0 mM EDTA и 0,05% Tween 20, pH 7,4 или буфер; буфер (2) 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3,0 mM CaCl₂, 1,0 mM EGTA и 0,005% Tween 20, pH 7,4.

[0619] MAb растворяли в рабочем буфере. В случае AB101 сенсограммы получали при скорости потока 30 мкл/мин, концентрациях 6,25/12,5/25/50/100/200 мкг/мл, времени контакта 300 с и времени диссоциации 600 с. В случае GHI/61 сенсограммы получали при скорости потока 30 мкл/мин, концентрациях 3,125/6,25/12,5/25/50/100 мкг/мл, времени контакта 300 с и времени диссоциации 600 с. Проточные ячейки регенерировали с помощью 10 mM глицина-HCl, pH 3,0 (GE Healthcare Life Sciences). Анализ данных проводили на компьютере Biacore T200 и с помощью программного обеспечения для оценки Biacore T200.

[0620] Было продемонстрировано, что связывание GHI/61 и других антител к CD163 с человеческим CD163 зависит от свободного кальция. GHI/61 имело более высокую аффинность к CD163 в не содержащем кальций буфере, чем в кальцийсодержащем буфере. Для определения, зависит ли связывание AB101 от кальция, авторы настоящего изобретения проводили SPR-измерение связывания AB101 с иммобилизованным человеческим CD163 в 2 mM кальцийсодержащем буфере или не содержащем кальций EDTA-буфере. Как показано в **таблице 11** и на **фиг. 53**, AB101 обладало более сильной авидностью связывания с K_D 45 нМ в кальцийсодержащем буфере по сравнению с 2-кратно меньшей авидностью в не содержащем кальций EDTA-буфере ($K_D = 89$ нМ). В отличие от этого, при SPR-измерениях наблюдали значения K_D 63 нМ и 12 нМ в случае GHI/61, связывающегося с CD163, в кальцийсодержащем буфере и EDTA-буфере (**фиг. 54** и **таблица 11**) соответственно.

Таблица 11. Результаты SPR-анализа связывания AB101 с иммобилизованным человеческим CD163

Связывания антител с иммобилизованным человеческим CD163						
Буфер	AB101			GHI/61		
	K_D [нМ]	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	K_d [s^{-1}]	K_D [нМ]	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	K_d [s^{-1}]
Кальций	45	$1,678 \times 10^4$	$7,544 \times 10^{-4}$	63	$0,732 \times 10^4$	$4,668 \times 10^{-4}$
EDTA	89	$1,280 \times 10^4$	$11,39 \times 10^{-4}$	12	$1,476 \times 10^4$	$1,783 \times 10^{-4}$

[0621] Результаты SPR подтверждали ранее опубликованные данные по GHI/61 и свидетельствовали, что AB101 может нуждаться в физиологических концентрациях кальция для оптимального связывания с человеческим CD163.

[0622] Затем авторы настоящего изобретения производили SPR-измерения аффинности связывания CD163 с иммобилизованным AB101 в кальцийсодержащем буфере и наблюдали K_D , равную 12 нМ (**фиг. 55** и **таблица 12**). Связывание CD163 с иммобилизованным AB101 характеризовалось 3,7-кратной k_a , которая составляла $6,213 \times 10^4$ ($M^{-1}s^{-1}$), по сравнению с соответствующей K_a связывания AB101 с иммобилизованным CD163 ($1,678 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$).

Таблица 12. Результаты SPR-анализа связывания человеческого CD163 с иммобилизованным AB101

Связывание человеческого CD163 с AB101			
Буфер	K_D [нМ]	k_a [M⁻¹s⁻¹]	K_d [с⁻¹]
Кальций	12	6,213×10 ⁴	7,895×10 ⁻⁴

[0623] Таким образом, результаты измерения с помощью SPR-анализа позволяли определить аффинность связывания, равную 12 нМ, и авидность, равную 45 нМ, для AB101 к CD163 в присутствии 2 мМ свободного кальция.

ПРИМЕР 26. Связывание AB101 с человеческим белком CD163 в растворе по результатам AlphaLISA

[0624] Аффинность связывания AB101 с человеческим CD163 в растворе определяли с помощью анализа AlphaLISA.

[0625] Анализ предусматривал применение растворимого человеческого CD163 с 10-гистидиновой меткой на С-конце, биотинилированных антител к hIgG1, микроносителей-акцепторов стрептавидина и микроносителей-доноров никеля.

[0626] Данный анализ проводили путем серийных разведений AB101 и изотипического контроля в 0,5% BSA в 1× PBS без Ca²⁺, Mg²⁺ с начальной концентрацией титра 1500 нМ. CD163 разводили в том же буфере до концентрации 1500 нМ.

[0627] Связывание AB101 с человеческим CD163. Серийные разведения AB101 или изотипического контроля вносили в объеме 5 мкл/лунка к 5 мкл/лунка человеческого CD163, герметично закрывали алюминиевым приспособлением для заклеивания планшетов и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при осторожном встряхивании.

[0628] Детекция AB101: AB101 детектировали с применением 2,5 нМ биотинилированного антитела к человеческому IgG1 в 1× буфере для иммуноанализа AlphaLISA в объеме 5 мкл/лунка к 10 мкл связывающей смеси. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при осторожном встряхивании.

[0629] Связывание микроносителя-акцептора: после стадии детекции антител в каждую лунку вносили 5 мкл 100 мкг/мл микроносителей-акцепторов стрептавидина в 1× буфере для иммуноанализа AlphaLISA, после чего планшет герметично закрывали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа при осторожном встряхивании.

[0630] Связывание микроносителя-донора: затем в каждую лунку вносили 5 мкл 100 мкг/мл микроносителей-доноров никеля в 1× буфере для иммуноанализа AlphaLISA, после

чего планшет герметично закрывали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа при осторожном встряхивании.

[0631] Планшет считывали с помощью планшет-ридера Envision согласно протоколу производителя, а данные анализировали с применением GraphPad Prism 8 для расчета K_d .

[0632] По результатам измерения с помощью AlphaLisa связывание AB101 с CD163 достигало насыщения при 30 нМ AB101 (**фиг. 56**). K_d , равную 1,8 нМ, определяли с помощью модели насыщенного связывания с 1 сайтом, объединяющей результаты 5 независимых измерений (**таблица 13**). Модель насыщенного связывания с 2 сайтами позволяла лучше аппроксимировать кривую для более низкой концентрации AB101.

Таблица 13. Результаты измерения с помощью AlphaLisa связывания AB101 с растворимым белком CD163

Связывание AB101 с растворимым CD163			
Независимые анализы	Модель связывания с 1 сайтом		
	EC₅₀ [нМ]	Максимум	R²
1	4,1	31000	0,99
2	1,5	37000	0,97
3	1,9	52000	0,98
4	1,7	48000	0,99
5	0,51	44000	0,98
Среднее	1,9	42400	
SD	1,3	8444	
Среднее геометрическое	1,6	41692	

ПРИМЕР 27. Связывание AB101 с макрофагами M2c

[0633] Для определения кинетики связывания AB101 с CD163, экспрессируемым на клетках, авторами настоящего изобретения были проведены исследования связывания с иммуносупрессивными макрофагами M2c, полученными от 4 исследуемых субъектов.

[0634] Связывание AB101 с макрофагами M2c оценивали у четырех здоровых субъектов-людей (39-летней женщины, 24-летнего мужчины, 39-летнего мужчины и 54-

летнего мужчины). Моноциты выделяли из продуктов LeukoPak, приобретенных у BloodWorks.

[0635] На День 7 клетки M2c инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре в растворе для открепления макрофагов DXF и переносили из колбы в среду X-VIVO-15™. После центрифугирования клетки один раз промывали посредством PBS и ресуспендировали в красителе для определения жизнеспособности Zombie UV (1:500) при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в блокирующем реагенте FACS Block (буфер для FACS, содержащий 10% FBS и 0,5 мг/мл человеческого IgG1) при комнатной температуре в течение 20 минут. Клетки в блокирующем буфере переносили в 384-луночный планшет в количестве $2,5 \times 10^4$ клеток/луночка и вносили антитела с определенным титром непосредственно в каждую лунку в $2 \times$ конечной концентрации для анализа. Клетки инкубировали с антителами при комнатной температуре в течение 20 минут. Клетки трижды промывали буфером для FACS, затем ресуспендировали в буфере для FACS с целью сбора на проточном цитометре Symphony (BD Biosciences).

[0636] Связывание AB101 с макрофагами M2c характеризовалось бимодальной кривой связывания (**фиг. 57**), что позволяло предположить, что связывание AB101 с Fc-рецептором может влиять на связывание с CD163, экспрессируемым на клетках M2c. Рассчитанные значения K_d для AB101 на кривых специфического насыщенного связывания с 1 сайтом представлены в **таблице 14**. Значение K_d для связывания AB101 с CD163, рассчитанное с помощью модели с 1 сайтом, составляло 7,7 нМ с B_{max} , составлявшим 46103 gMFI ($R^2=0,91$). Моделирование аппроксимации кривой для связывания с двумя сайтами обеспечивало лучшую аппроксимацию кривой ($R^2=0,98$).

Таблица 14. Равновесное связывание AB101 с человеческими макрофагами M2c

Кинетика связывания AB101			
ID субъектов-людей	Модель связывания с 1 сайтом		
	K_d [нМ]	B_{max}	R^2
W	7,2	45800	0,93
X	6,6	41700	0,91
Y	8,1	45400	0,91
Z	8,9	51513	0,93

Среднее	7,7	46103	
SD	1,0	4051	
Среднее геометриче ское	7,7	45972	

[0637] Несмотря на то, что были подробно описаны настоящее изобретение и его преимущества, следует понимать, что в настоящий документ могут быть внесены различные изменения, замены и модификации без отклонения от сути и объема настоящего изобретения, которые определены в прилагаемой формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или рекомбинантное антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8, и переменный участок легкой цепи (V_L), который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.
2. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 1, содержащее переменный участок легкой цепи (V_L), который по меньшей мере на 85% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.
3. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 1, содержащее переменный участок легкой цепи (V_L), который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.
4. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 1, содержащее переменный участок легкой цепи (V_L), который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.
5. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 1, содержащее переменный участок легкой цепи (V_L), который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.
6. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 1, содержащее переменный участок легкой цепи (V_L), который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.
7. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-6, содержащее переменный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 85% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.
8. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-6, содержащее переменный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.
9. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-6, содержащее переменный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.
10. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-6, содержащее переменный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.
11. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-6, содержащее

вариабельный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

12. Антитело или рекомбинантное антитело, содержащее последовательность тяжелой цепи, содержащую определяющий комплементарность участок (CDR) H1, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6, и последовательность легкой цепи, содержащую CDR L1, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

13. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 12, в котором CDR L1 по меньшей мере на 85% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2 по меньшей мере на 85% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3 по меньшей мере на 85% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

14. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 12, в котором CDR L1 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

15. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 12, в котором CDR L1 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

16. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 12, в котором CDR L1 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

17. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 12, в котором CDR L1 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1,

CDR L2 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

18. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 12-17, в котором CDR H1 по меньшей мере на 85% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2 по меньшей мере на 85% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3 по меньшей мере на 85% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

19. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 12-17, в котором CDR H1 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

20. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 12-17, в котором CDR H1 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

21. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 12-17, в котором CDR H1 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

22. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 12-17, в котором CDR H1 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

23. Антитело или рекомбинантное антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

24. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 23, в котором переменный участок тяжелой цепи (V_H) по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

25. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 23, в котором переменный

участок тяжелой цепи (V_H) по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

26. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 23, в котором вариабельный участок тяжелой цепи (V_H) по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

27. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 23, в котором вариабельный участок тяжелой цепи (V_H) по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

28. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 23-27, дополнительно содержащее вариабельный участок легкой цепи (V_L), который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

29. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 23-27, дополнительно содержащее вариабельный участок легкой цепи (V_L), который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

30. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 23-27, дополнительно содержащее вариабельный участок легкой цепи (V_L), который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

31. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 23-27, дополнительно содержащее вариабельный участок легкой цепи (V_L), который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

32. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 23-27, дополнительно содержащее вариабельный участок легкой цепи (V_L), который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

33. Антитело или рекомбинантное антитело, содержащее вариабельный участок легкой цепи (V_L), который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

34. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 33, в котором вариабельный участок легкой цепи (V_L) по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

35. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 33-34, дополнительно содержащее вариабельный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

36. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 33-34, дополнительно содержащее вариабельный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

37. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 33-34, дополнительно содержащее вариабельный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

38. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 33-34, дополнительно содержащее вариабельный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

39. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 33-34, дополнительно содержащее вариабельный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

40. Антитело или рекомбинантное антитело, содержащее определяющий комплементарность участок (CDR) H1, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

41. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 40, содержащее определяющий комплементарность участок (CDR) H1, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

42. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 40, содержащее определяющий комплементарность участок (CDR) H1, который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

43. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 40, содержащее определяющий комплементарность участок (CDR) H1, который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

44. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 40, содержащее определяющий комплементарность участок (CDR) H1, который по меньшей мере на 100% идентичен

аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

45. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 40-44, дополнительно содержащее последовательность легкой цепи, содержащую по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) L1, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

46. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 45, в котором CDR L1 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

47. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 45, в котором CDR L1 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

48. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 45, в котором CDR L1 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

49. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 45, в котором CDR L1 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

50. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 40-44, дополнительно содержащее вариабельный участок легкой цепи (V_L), который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

51. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 45-49, в котором

вариабельный участок легкой цепи (V_L) по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

52. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 40-51, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

53. Антитело или рекомбинантное антитело, содержащее последовательность легкой цепи, содержащую определяющий комплементарность участок (CDR) CDR L1, который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2, который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3, который по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

54. Антитело или рекомбинантное антитело, содержащее последовательность легкой цепи, содержащую определяющий комплементарность участок (CDR) CDR L1, который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR L2, который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, и CDR L3, который по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

55. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 53-54, дополнительно содержащее последовательность тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) H1, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

56. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 55, в котором CDR H1 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

57. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 55, в котором CDR H1 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

58. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 55, в котором CDR H1 по

меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

59. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 55, в котором CDR H1 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR H2 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5, и CDR H3 по меньшей мере на 100% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 6.

60. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 53-54, дополнительно содержащее вариабельный участок тяжелой цепи (V_H), который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

61. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 55-59, в котором вариабельный участок тяжелой цепи (V_H) по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8.

62. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 53-59, в котором последовательность легкой цепи содержит вариабельный участок легкой цепи (V_L), который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

63. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-62, дополнительно содержащее человеческий константный участок тяжелой цепи или человеческий константный участок легкой цепи.

64. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 63, в котором человеческий константный участок тяжелой цепи представляет собой IgG1 или IgG4 или его фрагмент.

65. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-64, в котором тяжелая цепь по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 10.

66. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-65, в котором легкая цепь по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 9.

67. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-64 или п. 66, в котором тяжелая цепь по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 12.

68. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-65 или п. 66, в котором тяжелая цепь по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной

последовательности под SEQ ID NO: 11.

69. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-64, в котором тяжелая цепь по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 13.

70. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-69, содержащее человеческий вариабельный каркасный участок и мышинный константный участок.

71. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 70, дополнительно содержащее мышинный константный участок тяжелой цепи или мышинный константный участок легкой цепи.

72. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 71, в котором мышинный константный участок тяжелой цепи представляет собой IgG2A.

73. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 72, в котором тяжелая цепь по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 15.

74. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 72, в котором тяжелая цепь по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 16.

75. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 72, в котором легкая цепь по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14.

76. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-75, причем антитело или рекомбинантное антитело представляет собой фрагмент антитела, включающий одну тяжелую цепь, одну легкую цепь, Fab, Fab', F(ab)', F(ab')₂, Fd, scFv, вариабельный домен тяжелой цепи, вариабельный домен легкой цепи, вариабельный домен NAR, биспецифический scFv, биспецифический Fab₂, триспецифический Fab₃, одноцепочечный связывающий полипептид, фрагмент dAb или диатело.

77. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-76, которое специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на иммуносупрессивной человеческой миелоидной клетке, причем связывание антитела или рекомбинантного антитела с миелоидной клеткой стимулирует функцию иммунной клетки, что измеряется с помощью одного или обоих из следующих параметров:

(i) активации CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации;

и

(ii) пролиферации CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации.

78. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 77, причем активацию CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации измеряют как повышенный уровень IFN-γ, TNF-α или перфорина или любой их комбинации.

79. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 77, причем иммуносупрессивная человеческая миелоидная клетка представляет собой макрофаг или супрессорную клетку миелоидного происхождения.

80. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 77, причем функция иммунной клетки осуществляется в опухолевом микроокружении.

81. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 77-80, причем функция иммунной клетки осуществляется в условиях *in vivo*.

82. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-76, которое специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на человеческом макрофаге, причем связывание антитела или рекомбинантного антитела с макрофагом повышает иммуностимулирующую активность в опухолевом микроокружении.

83. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 82, причем опухолевое микроокружение находится в условиях *in vivo*.

84. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 79-83, причем связывание антитела или рекомбинантного антитела с макрофагом снижает иммуносупрессивную активность макрофага.

85. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 79-84, причем связывание антитела или рекомбинантного антитела с макрофагом снижает опухоль-стимулирующую активность макрофага.

86. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 79-85, причем макрофаг представляет собой опухоль-ассоциированный макрофаг.

87. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 79-85, причем антитело или рекомбинантное антитело изменяет экспрессию по меньшей мере одного маркера на макрофаге.

88. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 77-86, причем белок CD163 представляет собой гликоформу CD163.

89. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 77-87, причем белок CD163 представляет собой 150-кДа гликоформу CD163.

90. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 79-89, причем антитело или рекомбинантное антитело не связывается специфически со 130-кДа гликоформой CD163, экспрессируемой человеческим макрофагом.

91. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-90, имеющее константный домен, который делает возможным связывание с Fc-рецептором.

92. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 91, причем Fc-рецептор экспрессируется на макрофаге.

93. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-92, имеющее фрагмент антитела, включающий одну тяжелую цепь, одну легкую цепь, Fab, Fab', F(ab)', F(ab')₂, Fd, scFv, переменный домен тяжелой цепи, переменный домен легкой цепи, переменный домен NAR, биспецифический scFv, биспецифический Fab₂, триспецифический Fab₃, одноцепочечный связывающий полипептид, фрагмент dAb или диатело.

94. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 79-93, причем по меньшей мере один маркер на человеческом макрофаге представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15.

95. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 79-93, причем человеческий макрофаг представляет собой макрофаг M2 или M2-подобный макрофаг.

96. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 79-93, причем человеческий макрофаг представляет собой макрофаг M2a, M2b, M2c или M2d.

97. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 79-96, причем белок CD163 представляет собой компонент комплекса клеточной поверхности, содержащего по меньшей мере один другой белок, экспрессируемый макрофагом.

98. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 97, причем по меньшей мере один другой белок представляет собой белок галектин-1, белок LILRB2, белок казеинкиназы II или любую их комбинацию.

99. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 79-98, причем при связывании с белком CD163 антитело или рекомбинантное антитело интернализируется человеческим макрофагом.

100. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 79-99, причем связывание с белком CD163 не является цитотоксическим для макрофага.

101. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 79-100, причем связывание с белком CD163 стимулирует активацию CD4⁺ Т-клеток, пролиферацию CD4⁺ Т-клеток или как активацию, так и пролиферацию CD4⁺ Т-клеток.

102. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 77-101, причем связывание с белком CD163 стимулирует экспрессию CD69, ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 или любой их комбинации CD4⁺ Т-клетками.

103. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 77-102, причем связывание с белком CD163 стимулирует активацию CD8⁺ Т-клеток, пролиферацию CD8⁺ Т-клеток или как активацию, так и пролиферацию CD8⁺ Т-клеток.

104. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 77-103, причем связывание с белком CD163 стимулирует экспрессию ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 или

любой их комбинации CD8⁺ Т-клетками.

105. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 77-104, причем связывание с белком CD163 снижает иммуносупрессию в опухолевом микроокружении.

106. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 77-105, причем связывание с белком CD163 стимулирует цитолиз опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

107. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 77-106, причем связывание с белком CD163 стимулирует опосредованный цитотоксическими лимфоцитами цитолиз раковых клеток.

108. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 77-107, причем связывание с белком CD163 стимулирует опосредованный NK-клетками цитолиз опухолевых клеток.

109. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 77-108, причем связывание с белком CD163 стимулирует экспрессию IL-2 Т-клетками.

110. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 77-109, причем связывание с белком CD163 увеличивает количество CD4⁺ Т-клеток, CD196⁺ Т-клеток, CXCR3⁺ Т-клеток, CCR4⁺ Т-клеток или любой их комбинации.

111. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 77-110, причем связывание с CD163 снижает иммуносупрессию в опухолевом микроокружении, вызванную макрофагом.

112. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-111, которое специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на человеческом макрофаге, причем связывание приводит по меньшей мере к одному из следующих эффектов:

(a) сниженной экспрессии по меньшей мере одного маркера макрофагом, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15;

(b) интернализации антитела макрофагом;

(c) секреции IFN- γ , TNF- α и перфорины;

(d) активации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации;

(e) пролиферации CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации; и

(f) стимуляции цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

113. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 112, причем связывание приводит к двум или более из (a)-(e); трем или более из (a)-(e); четырем или более из (a)-(e) или всем из (a)-(e).

114. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-113, которое

специфически связывается с CD163⁺ иммуносупрессивной миелоидной клеткой в опухолевом микроокружении, причем связывание снижает супрессию опосредованного цитотоксическими Т-клетками цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

115. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-114, которое специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на человеческом опухоле-ассоциированном макрофаге, и снижает экспрессию CD16, CD64, TLR2, Siglec-15 или их комбинации макрофагом, для применения в способе лечения рака.

116. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 79-115, причем связывание антитела или рекомбинантного антитела с макрофагом модулирует иммунную функцию клетки в опухолевом микроокружении.

117. Антитело или рекомбинантное антитело по пп. 79-115, причем связывание антитела или рекомбинантного антитела с макрофагом стимулирует противоопухолевую иммунную функцию.

118. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-117, причем антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с эпитопом CD163, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

119. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-117, причем антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с эпитопом CD163, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19.

120. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-117, причем антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с эпитопом CD163, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20.

121. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-117, причем антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с эпитопом CD163, содержащим каждую из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20.

122. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-121, причем антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с CD163 с K_D от 1 нМ до 100 нМ.

123. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 122, причем антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с CD163 с K_D от 1 нМ до 50 нМ.

124. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 123, причем антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с CD163 с K_D от 1 нМ до 10 нМ.

125. Антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-121, причем

антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с человеческими макрофагами M2c с K_D от 1 нМ до 100 нМ.

126. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 125, причем антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с человеческими макрофагами M2c с K_D от 1 нМ до 50 нМ.

127. Антитело или рекомбинантное антитело по п. 126, причем антитело или рекомбинантное антитело специфически связывается с человеческими макрофагами M2c с K_D от 1 нМ до 10 нМ.

128. Композиция, содержащая антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-127 и вспомогательное вещество.

129. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 1-127 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

130. Применение антитела или рекомбинантного антитела по любому из пп. 1-127 для изготовления лекарственного средства для лечения рака у субъекта-человека.

131. Применение антитела или рекомбинантного антитела по любому из пп. 1-127 для изготовления лекарственного средства, снижающего иммуносупрессию опухоль-ассоциированным макрофагом у субъекта-человека, имеющего раковое заболевание.

132. Применение антитела или рекомбинантного антитела по любому из пп. 1-127 для изготовления лекарственного средства, стимулирующего опосредованный Т-клетками цитоллиз опухолевых клеток у субъекта-человека, имеющего раковое заболевание.

133. Способ стимулирования функции иммунных клеток у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение антитела или рекомбинантного антитела по любому из пп. 1-132 нуждающемуся в этом субъекту; причем

стимулирование функции иммунных клеток измеряется с помощью одного или обоих из следующих параметров:

(i) активации $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации; и

(ii) пролиферации $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации.

134. Способ по п. 133, причем активацию $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации измеряют как повышенный уровень IFN- γ , TNF- α или перфорина или любой их комбинации.

135. Способ по п. 133, причем иммуносупрессивная человеческая миелоидная клетка представляет собой макрофаг.

136. Способ по п. 135, причем иммуносупрессивная человеческая миелоидная клетка представляет собой супрессорную клетку миелоидного происхождения.

137. Способ по п. 136, причем антитело представляет собой антитело или рекомбинантное антитело по любому из пп. 76-127.

138. Способ лечения рака у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ предусматривает введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела или рекомбинантного антитела по любому из пп. 1-127, в результате осуществляя лечение рака у индивидуума.

139. Способ лечения рака у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ предусматривает введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела или рекомбинантного антитела по любому из пп. 1-127, в результате чего у индивидуума снижается иммуносупрессия опухоль-ассоциированным макрофагом.

140. Способ лечения рака у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ предусматривает введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела или рекомбинантного антитела по любому из пп. 1-127, в результате чего у индивидуума увеличивается опосредованный Т-клетками цитолиз опухолевых клеток.

141. Способ снижения опухоль-стимулирующей активности опухоль-ассоциированного макрофага у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ предусматривает введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела или рекомбинантного антитела по любому из пп. 1-127, которое является эффективным для модуляции активации $CD4^+$ Т-клеток, пролиферации $CD4^+$ Т-клеток, активации $CD8^+$ Т-клеток, пролиферации $CD8^+$ Т-клеток или любой комбинации.

142. Способ стимулирования опосредованного лимфоцитами цитолиза опухолевых клеток у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ предусматривает введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела или рекомбинантного антитела по любому из пп. 1-127.

143. Способ по любому из пп. 138-142, причем рак представляет собой рак или саркому легкого.

144. Способ по п. 143, причем рак легкого представляет собой карциному легкого или аденокарциному легкого.

145. Способ по любому из пп. 138-142, причем антитело или рекомбинантное антитело связывается с макрофагом в опухолевом микроокружении.

146. Способ по любому из пп. 138-142, дополнительно предусматривающий назначение индивидууму дополнительной противораковой терапии.

147. Способ по п. 146, причем дополнительная противораковая терапия

представляет собой хирургическую терапию, химиотерапию, лучевую терапию, криотерапию, гормональную терапию, иммунотерапию и цитокиновую терапию, а также их комбинации.

148. Способ по п. 147, причем дополнительная противораковая терапия представляет собой иммунотерапию.

149. Способ по п. 148, причем иммунотерапия представляет собой композицию, содержащую ингибитор контрольной точки.

150. Способ модулирования активности опухоль-ассоциированного макрофага в опухолевом микроокружении, при этом способ предусматривает приведение опухоль-ассоциированного макрофага в контакт с антителом или рекомбинантным антителом по любому из пп. 1-127, которое связывается с CD163-экспрессирующим человеческим макрофагом и предусматривает по меньшей мере один из следующих эффектов:

(a) связывание антитела снижает экспрессию по меньшей мере одного маркера на макрофаге, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15;

(b) при связывании антитела с белком CD163 антитело интернализируется человеческим макрофагом;

(c) связывание антитела не является цитотоксическим для макрофага;

(d) связывание антитела повышает уровни IFN- γ , TNF- α и перфорина;

(e) связывание антитела стимулирует активацию CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации;

(f) связывание антитела стимулирует пролиферацию CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации; и

(g) связывание антитела стимулирует цитолиз опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

151. Способ по п. 150, причем связывание приводит к двум или более из (a)-(g), трем или более из (a)-(g), четырем или более из (a)-(g), пяти или более из (a)-(g), шести или более из (a)-(g) или всем из (a)-(g).

152. Антитело, которое специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на иммуносупрессивной человеческой миелоидной клетке, причем связывание антитела с миелоидной клеткой стимулирует функцию иммунной клетки, что измеряется с помощью одного или обоих из следующих параметров:

(i) активации CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации;

и

(ii) пролиферации CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их

комбинации.

153. Антитело по п. 152, причем иммуносупрессивная человеческая миелоидная клетка представляет собой макрофаг или супрессорную клетку миелоидного происхождения.

154. Антитело, которое специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на человеческом макрофаге, причем связывание антитела с макрофагом стимулирует функцию иммунной клетки, что измеряется с помощью одного или обоих из следующих параметров:

- (i) активации CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации;
- и
- (ii) пролиферации CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации.

155. Антитело по любому из пп. 152 -154, причем функция иммунной клетки осуществляется в опухолевом микроокружении.

156. Антитело по любому из пп. 152-155, причем функция иммунной клетки осуществляется в условиях *in vivo*.

157. Антитело, которое специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на человеческом макрофаге, причем связывание антитела с макрофагом повышает иммуностимулирующую активность в опухолевом микроокружении.

158. Антитело по п. 157, причем опухолевое микроокружение находится в условиях *in vivo*.

159. Антитело по любому из пп. 153-158, причем связывание антитела с макрофагом снижает иммуносупрессивную активность макрофага.

160. Антитело по любому из пп. 153-159, причем связывание антитела с макрофагом снижает опухоль-стимулирующую активность макрофага.

161. Антитело по любому из пп. 153-160, причем макрофаг представляет собой опухоль-ассоциированный макрофаг.

162. Антитело по любому из пп. 153-161, причем антитело изменяет экспрессию по меньшей мере одного маркера на макрофаге.

163. Антитело по любому из пп. 152-162, причем белок CD163 представляет собой гликоформу CD163.

164. Антитело по любому из пп. 152-163, причем белок CD163 представляет собой 130-кДа гликоформу CD163.

165. Антитело по любому из пп. 153-164, причем антитело не связывается специфически со 130-кДа гликоформой CD163, экспрессируемой человеческим

макрофагом.

166. Антитело по любому из пп. 152-165, имеющее константный домен, который делает возможным связывание с Fc-рецептором.

167. Антитело по п. 166, причем Fc-рецептор экспрессируется на макрофаге.

168. Антитело по любому из пп. 152-167, имеющее фрагмент антитела, включающий одну тяжелую цепь, одну легкую цепь, Fab, Fab', F(ab)', F(ab')₂, Fd, scFv, переменный домен тяжелой цепи, переменный домен легкой цепи, переменный домен NAR, биспецифический scFv, биспецифический Fab₂, триспецифический Fab₃, одноцепочечный связывающий полипептид, фрагмент dAb или диантитело.

169. Антитело по любому из пп. 153-168, причем по меньшей мере один маркер на человеческом макрофаге представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15.

170. Антитело по любому из пп. 153-169, причем человеческий макрофаг представляет собой макрофаг M2 или M2-подобный макрофаг.

171. Антитело по п. 170, причем человеческий макрофаг представляет собой макрофаг M2a, M2b, M2c или M2d.

172. Антитело по любому из пп. 153-171, причем белок CD163 представляет собой компонент комплекса клеточной поверхности, содержащего по меньшей мере один другой белок, экспрессируемый макрофагом.

173. Антитело по п. 172, причем по меньшей мере один другой белок представляет собой белок галектин-1, белок LILRB2, белок казеинкиназы II или любую их комбинацию.

174. Антитело по любому из пп. 153-173, причем при связывании с белком CD163 антитело интернализируется человеческим макрофагом.

175. Антитело по любому из пп. 153-174, причем связывание с белком CD163 не является цитотоксическим для макрофага.

176. Антитело по любому из пп. 152-175, причем связывание с белком CD163 стимулирует активацию CD4⁺ Т-клеток, пролиферацию CD4⁺ Т-клеток или как активацию, так и пролиферацию CD4⁺ Т-клеток.

177. Антитело по любому из пп. 152-176, причем связывание с белком CD163 стимулирует экспрессию CD69, ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 или любой их комбинации CD4⁺ Т-клетками.

178. Антитело по любому из пп. 152-177, причем связывание с белком CD163 стимулирует активацию CD8⁺ Т-клеток, пролиферацию CD8⁺ Т-клеток или как активацию, так и пролиферацию CD8⁺ Т-клеток.

179. Антитело по любому из пп. 152-178, причем связывание с белком CD163 стимулирует экспрессию ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 или любой их комбинации CD8⁺

Т-клетками.

180. Антитело по любому из пп. 152-179, причем связывание с белком CD163 снижает иммуносупрессию в опухолевом микроокружении.

181. Антитело по любому из пп. 152-180, причем связывание с белком CD163 стимулирует цитолиз опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

182. Антитело по любому из пп. 152-181, причем связывание с белком CD163 стимулирует опосредованный цитотоксическими лимфоцитами цитолиз раковых клеток.

183. Антитело по любому из пп. 152-182, причем связывание с белком CD163 стимулирует опосредованный NK-клетками цитолиз опухолевых клеток.

184. Антитело по любому из пп. 152-183, причем связывание с белком CD163 стимулирует экспрессию IL-2 Т-клетками.

185. Антитело по любому из пп. 152-184, причем связывание с белком CD163 увеличивает количество $CD4^+$ Т-клеток, $CD196^-$ Т-клеток, $CXCR3^+$ Т-клеток, $CCR4^-$ Т-клеток или любой их комбинации.

186. Антитело по пп. 152-185, причем связывание с CD163 снижает иммуносупрессию в опухолевом микроокружении, вызванную макрофагом.

187. Антитело, которое специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на человеческом макрофаге, причем связывание приводит по меньшей мере к одному из следующих эффектов:

(а) сниженной экспрессии по меньшей мере одного маркера макрофагом, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15;

(b) интернализации антитела макрофагом;

(c) активации $CD4^+$ Т-клеток, $CD8^+$ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации;

(d) пролиферации $CD4^+$ Т-клеток, $CD8^+$ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации; и

(e) стимуляции цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

188. Антитело по п. 187, причем связывание приводит к двум или более из (а)-(е); трем или более из (а)-(е); четырем или более из (а)-(е) или всем из (а)-(е).

189. Антитело, которое специфически связывается с $CD163^+$ иммуносупрессивной миелоидной клеткой в опухолевом микроокружении, причем связывание снижает супрессию опосредованного цитотоксическими Т-клетками цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

190. Антитело, которое специфически связывается с белком CD163, экспрессируемым на человеческом опухоль-ассоциированном макрофаге, и снижает экспрессию CD16, CD64, TLR2, Siglec-15 или их комбинации макрофагом, для применения

в способе лечения рака.

191. Антитело по любому из пп. 153-190, причем связывание антитела с макрофагом модулирует иммунную функцию клетки в опухолевом микроокружении.

192. Антитело по пп. 153-191, причем связывание антитела с макрофагом стимулирует противоопухолевую иммунную функцию.

193. Композиция, содержащая антитело по любому из пп. 152-192 и вспомогательное вещество.

194. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 152-192 и фармацевтически приемлемый носитель.

195. Применение антитела по любому из пп. 152-192 для изготовления лекарственного средства для лечения рака у субъекта-человека.

196. Применение антитела по любому из пп. 152-192 для изготовления лекарственного средства, снижающего иммуносупрессию опухоль-ассоциированным макрофагом у субъекта-человека, имеющего раковое заболевание.

197. Применение антитела по любому из пп. 152-192 для изготовления лекарственного средства, стимулирующего опосредованный Т-клетками цитолиз опухолевых клеток у субъекта-человека, имеющего раковое заболевание.

198. Способ стимулирования функции иммунных клеток, при этом способ предусматривает:

специфическое связывание антитела с белком CD163, экспрессируемым на иммуносупрессивной человеческой миелоидной клетке; и

стимулирование функции иммунных клеток измеряется с помощью одного или обоих из следующих параметров:

(i) активации $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации;

и

(ii) пролиферации $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки, NK-клетки или любой их комбинации.

199. Способ по п. 198, причем иммуносупрессивная человеческая миелоидная клетка представляет собой макрофаг.

200. Способ по п. 198, причем иммуносупрессивная человеческая миелоидная клетка представляет собой супрессорную клетку миелоидного происхождения.

201. Способ по п. 198, причем антитело представляет собой антитело по любому из пп. 152-192.

202. Способ лечения рака у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ предусматривает введение индивидууму терапевтически эффективного количества

антитела по любому из пп. 152-192, в результате осуществляя лечение рака у индивидуума.

203. Способ лечения рака у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ предусматривает введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 152-192, в результате чего у индивидуума снижается иммуносупрессия опухоль-ассоциированным макрофагом.

204. Способ лечения рака у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ предусматривает введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 152-192, в результате чего у индивидуума увеличивается опосредованный Т-клетками цитоллиз опухолевых клеток.

205. Способ по любому из пп. 198-204, причем рак представляет собой рак или саркому легкого.

206. Способ по п. 205, причем рак легкого представляет собой карциному легкого или аденокарциному легкого.

207. Способ снижения опухоль-стимулирующей активности опухоль-ассоциированного макрофага у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ предусматривает введение индивидууму количества фармацевтической композиции по п. 194, которое является эффективным для модулирования активации $CD4^+$ Т-клеток, пролиферации $CD4^+$ Т-клеток, активации $CD8^+$ Т-клеток, пролиферации $CD8^+$ Т-клеток или любой их комбинации в опухолевом микроокружении.

208. Способ по п. 207, дополнительно предусматривающий стимулирование цитолиза опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.

209. Способ стимулирования опосредованного лимфоцитами цитолиза опухолевых клеток у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ предусматривает введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции по п. 194.

210. Способ модулирования активности опухоль-ассоциированного макрофага в опухолевом микроокружении, при этом способ предусматривает приведение опухоль-ассоциированного макрофага в контакт с антителом, которое связывается с CD163-экспрессирующим человеческим макрофагом и предусматривает по меньшей мере один из следующих эффектов:

(a) связывание антитела снижает экспрессию по меньшей мере одного маркера на макрофаге, причем по меньшей мере один маркер представляет собой CD16, CD64, TLR2 или Siglec-15;

(b) при связывании антитела с белком CD163 антитело интернализируется человеческим макрофагом;

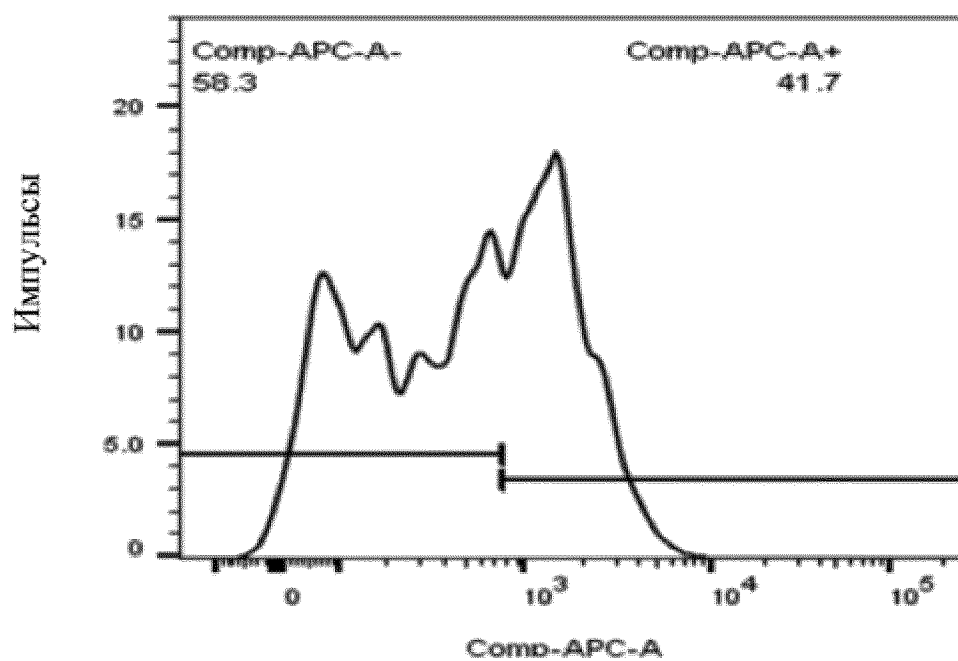
- (с) связывание антитела не является цитотоксическим для макрофага;
 - (d) связывание антитела стимулирует активацию CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации;
 - (е) связывание антитела стимулирует пролиферацию CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток или любой их комбинации; и
 - (f) связывание антитела стимулирует цитолиз опухолевых клеток в опухолевом микроокружении.
211. Способ по п. 210, причем связывание приводит к двум или более из (a)-(f), трем или более из (a)-(f), четырем или более из (a)-(f), пяти или более из (a)-(f) или всем из (a)-(f).
212. Способ по любому из пп. 198-211, причем способ реализуется в опухолевом микроокружении.
213. Способ по любому из пп. 198-212, причем способ реализуется в условиях *in vivo*.
214. Способ по любому из пп. 198-213, причем связывание антитела с макрофагом модулирует иммунную функцию клетки в опухолевом микроокружении.
215. Способ по любому из пп. 198-214, причем связывание антитела с макрофагом стимулирует противоопухолевую иммунную функцию.
216. Способ по любому из предыдущих пп. 198-215, причем антитело содержит константный домен и константный домен связывается с Fc-рецептором.
217. Способ по п. 216, причем Fc-рецептор экспрессируется на макрофаге.
218. Способ по любому из предыдущих пп. 198-217, дополнительно предусматривающий интернализацию антитела человеческим макрофагом при связывании с белком CD163.
219. Способ по любому из пп. 198-218, причем связывание с белком CD163 не является цитотоксическим для человеческого макрофага.
220. Способ по любому из пп. 198-219, дополнительно предусматривающий стимулирование экспрессии CD69, ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 или любой их комбинации CD4⁺ Т-клетками.
221. Способ по любому из пп. 198-220, дополнительно предусматривающий стимулирование экспрессии ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 или любой их комбинации CD8⁺ Т-клетками.
222. Способ по любому из пп. 198-221, предусматривающий снижение иммуносупрессии в опухолевом микроокружении.
223. Способ по любому из пп. 198-222, предусматривающий стимулирование

опосредованного цитотоксическими лимфоцитами цитолиза раковых клеток.

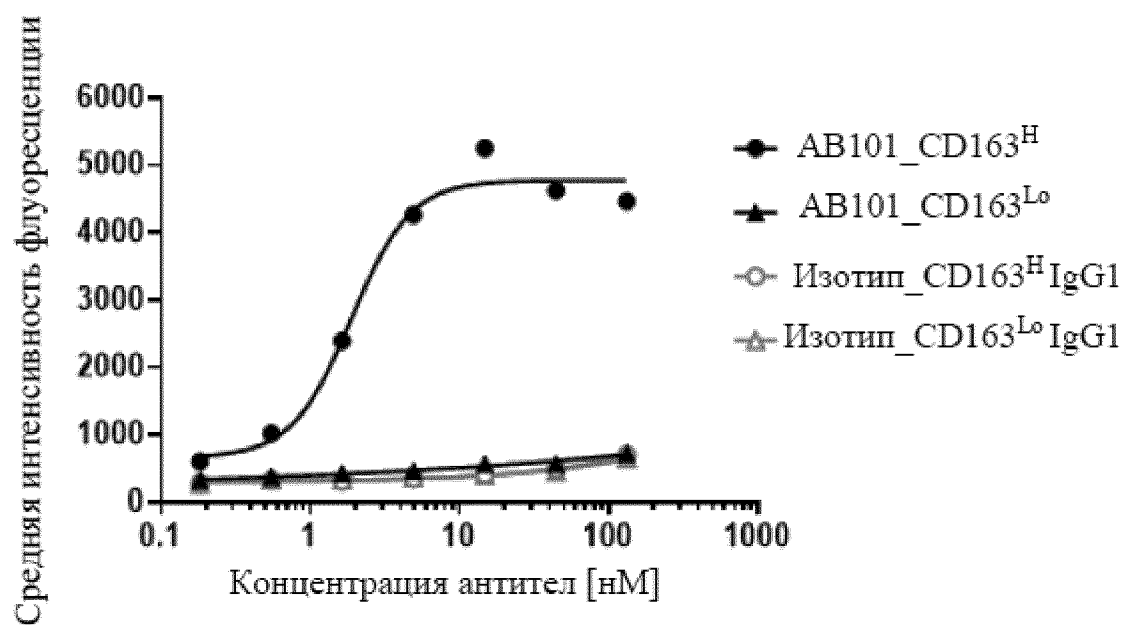
224. Способ по любому из пп. 198-223, предусматривающий стимулирование опосредованного NK-клетками цитолиза опухолевых клеток.

225. Способ по любому из пп. 198-224, предусматривающий стимулирование экспрессии IL-2 T-клетками.

226. Способ по любому из пп. 198-225, предусматривающий увеличение количества $CD4^{+}$ T-клеток, $CD196^{-}$ T-клеток, $CXCR3^{+}$ T-клеток, $CCR4^{-}$ T-клеток или любой их комбинации.

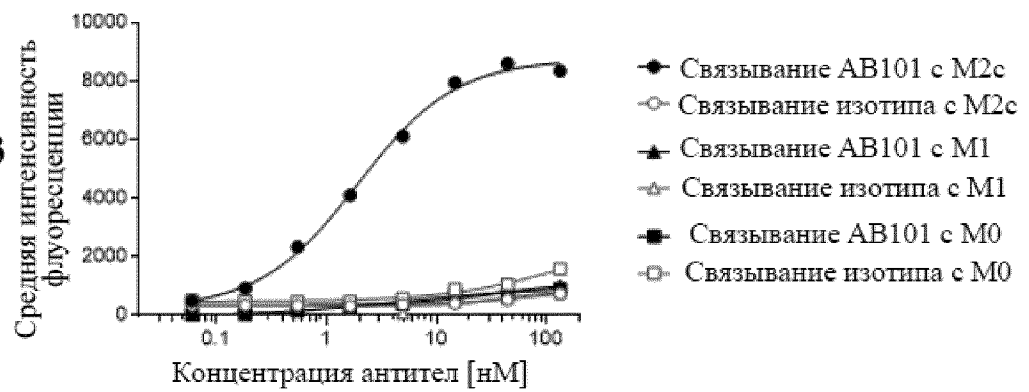


Фиг. 1

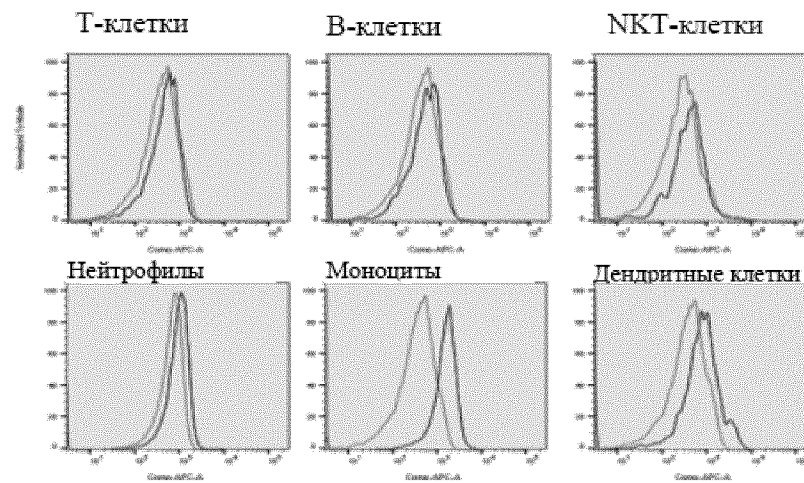


Фиг. 2

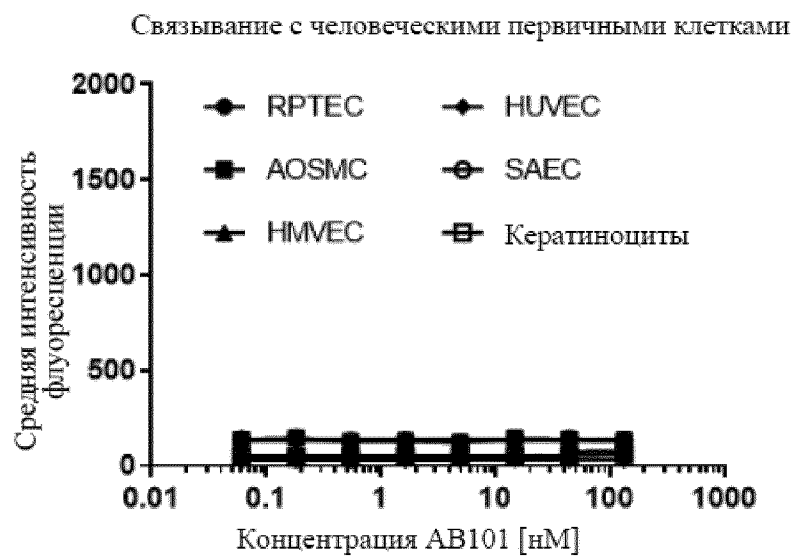
Фиг. 3



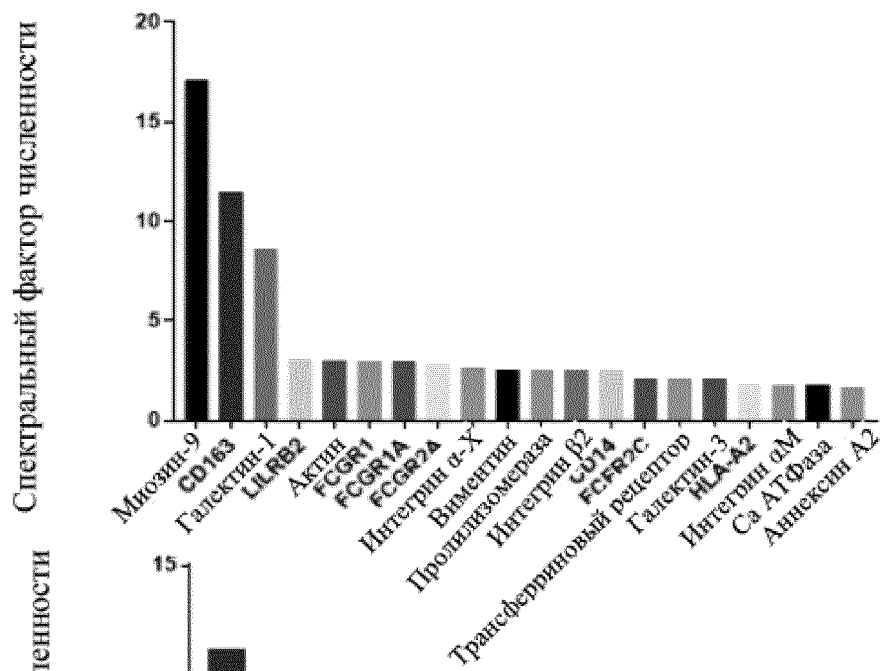
Фиг. 4



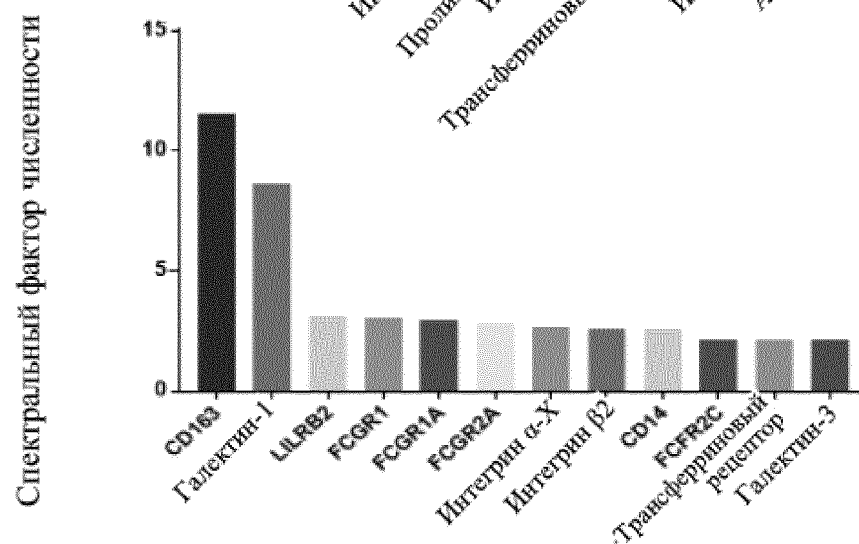
Фиг. 5



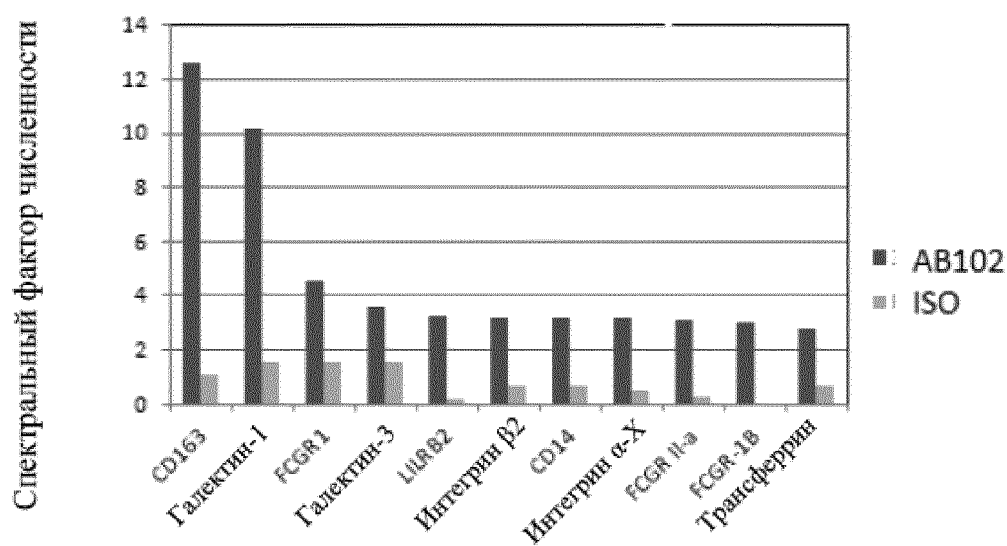
Фиг. 6А



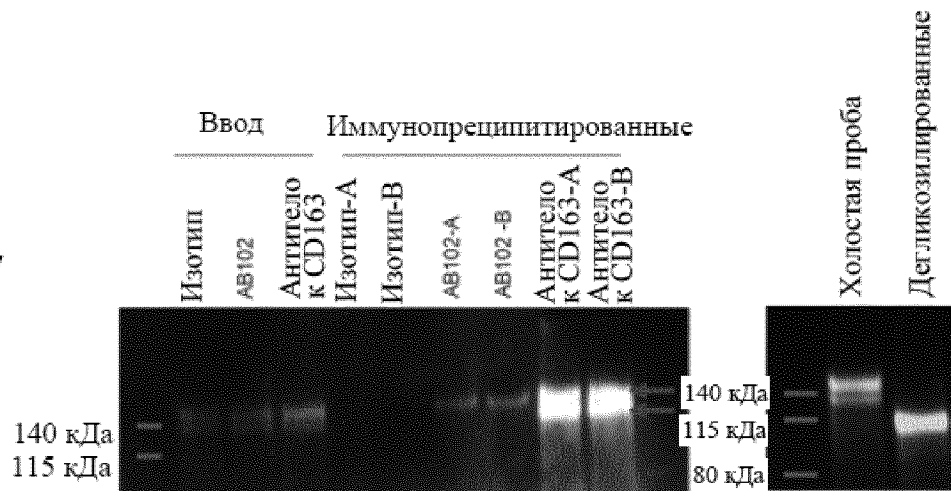
Фиг. 6В



Фиг. 6С

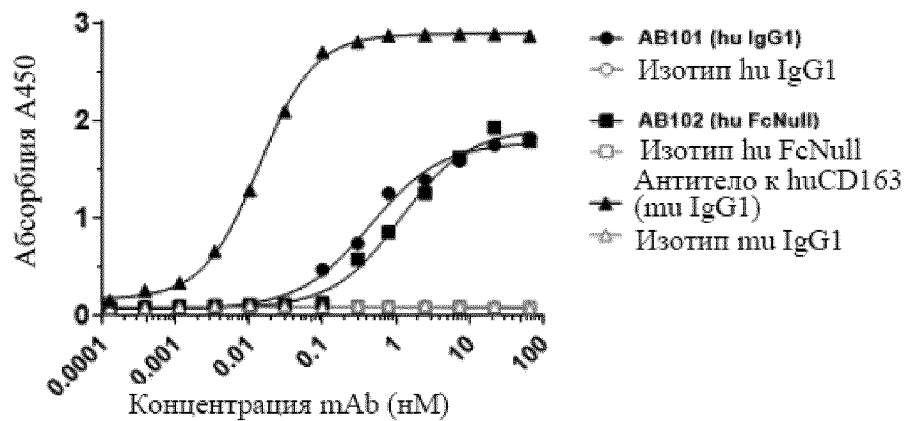


Фиг. 7



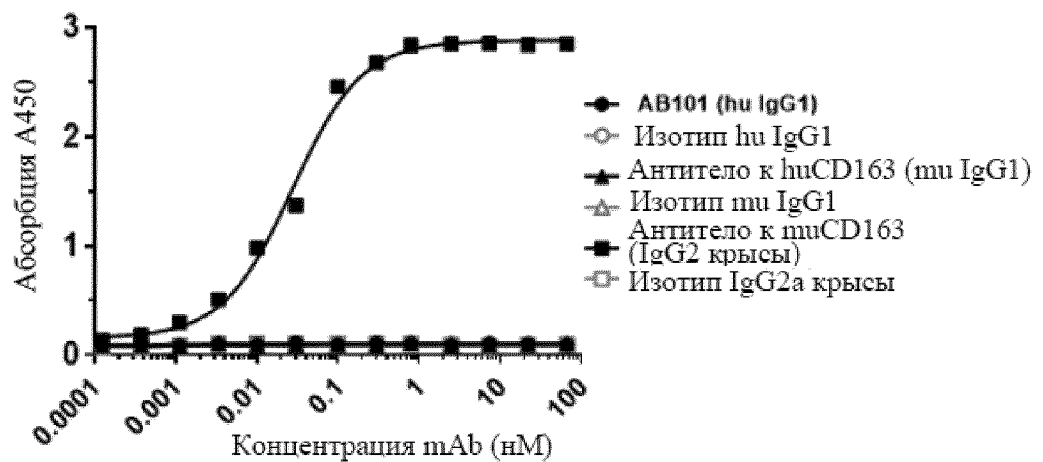
Связывание с человеческим рекомбинантным CD163

Фиг. 8

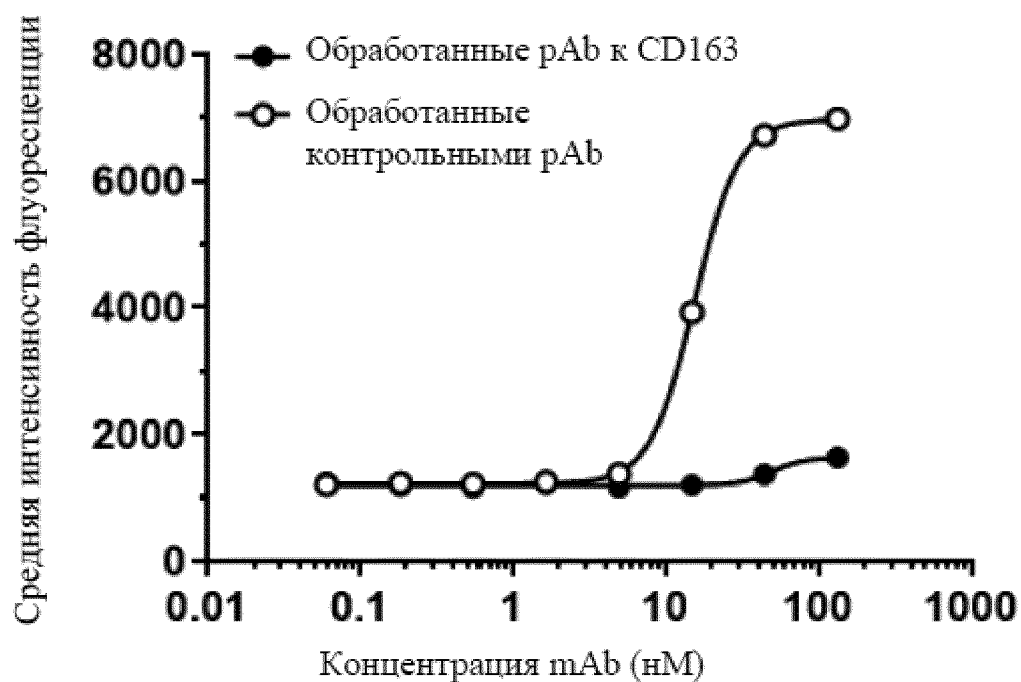


Связывание с мышинным рекомбинантным CD163

Фиг. 9

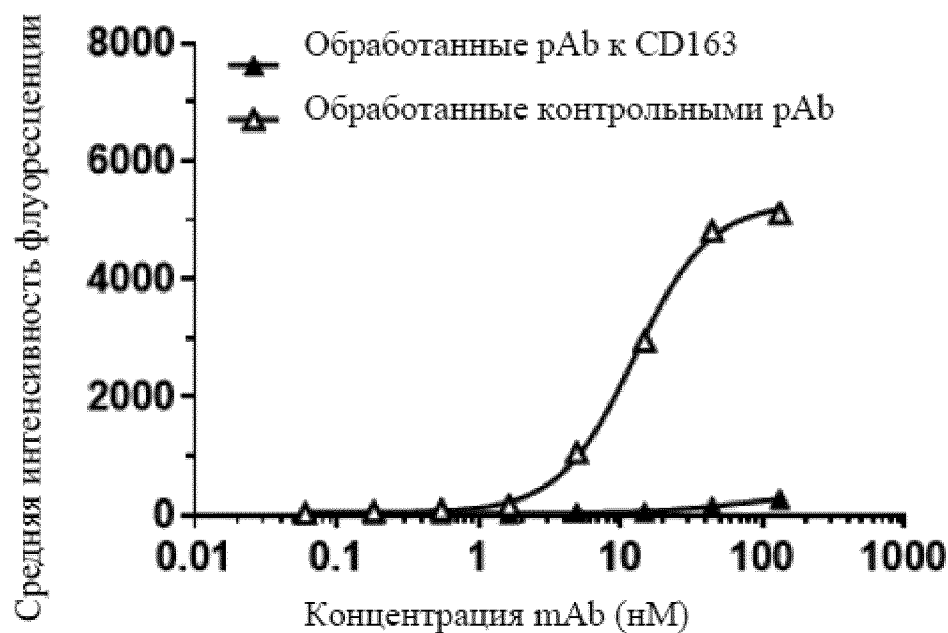


Связывание АВ101 с М2с, обработанными рАв к CD163

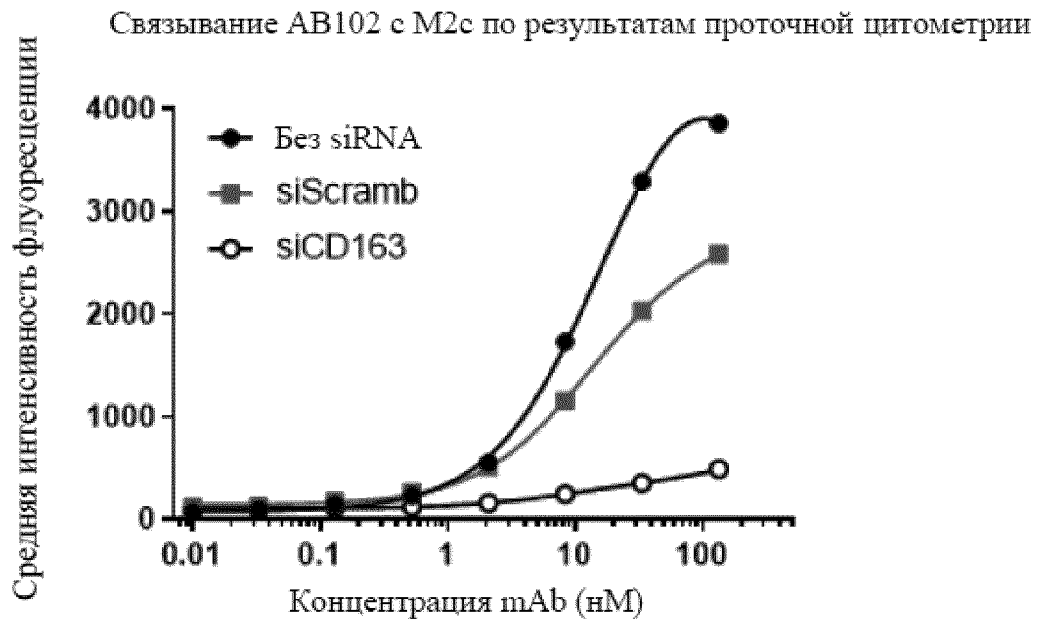


Фиг. 10

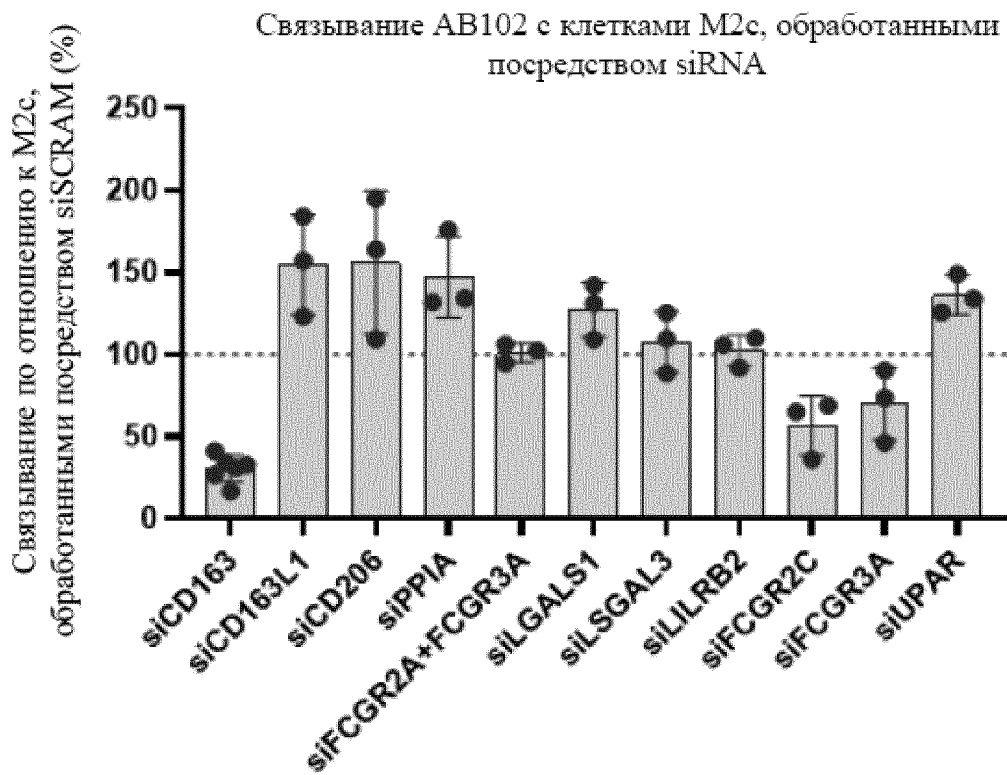
Связывание mAb к huCD163 с М2с, обработанным рАв к CD163



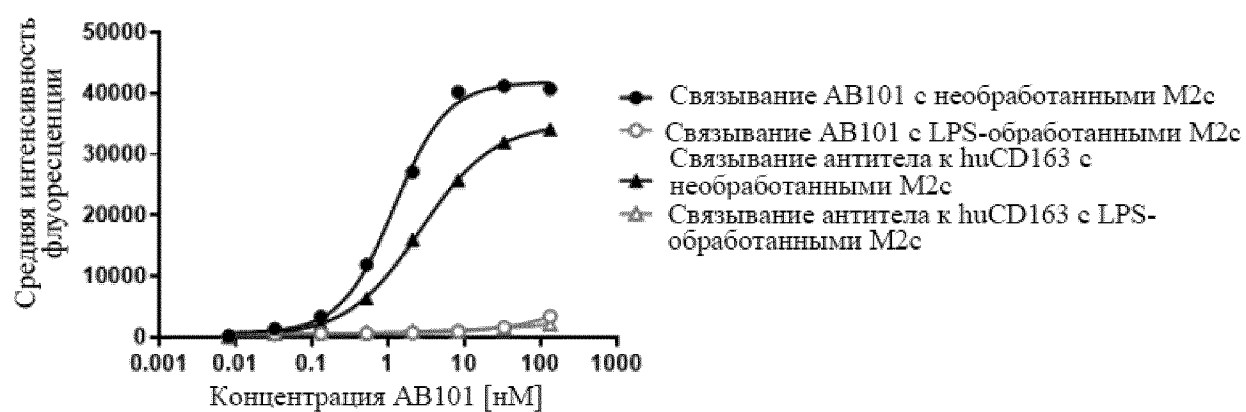
Фиг. 11



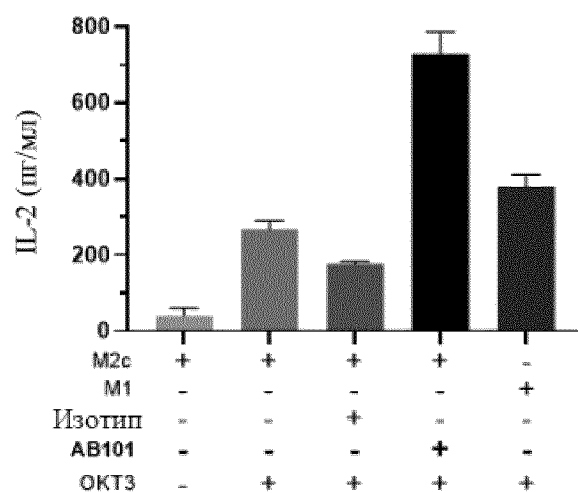
Фиг. 12



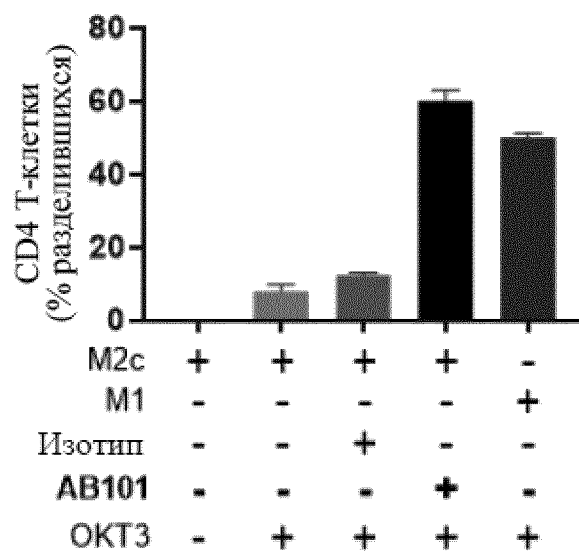
Фиг. 13



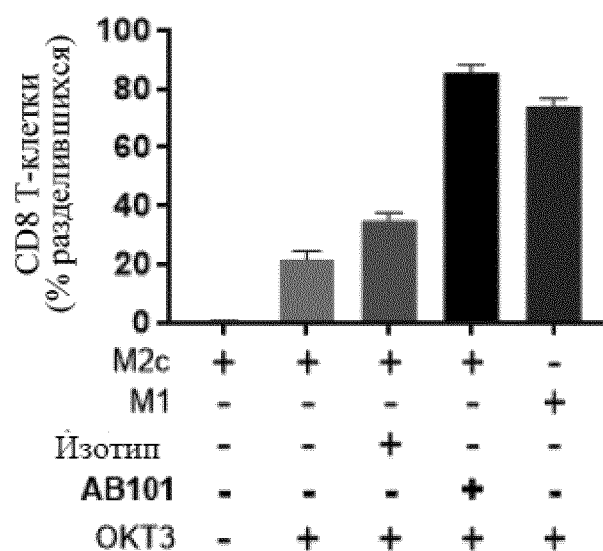
Фиг. 14



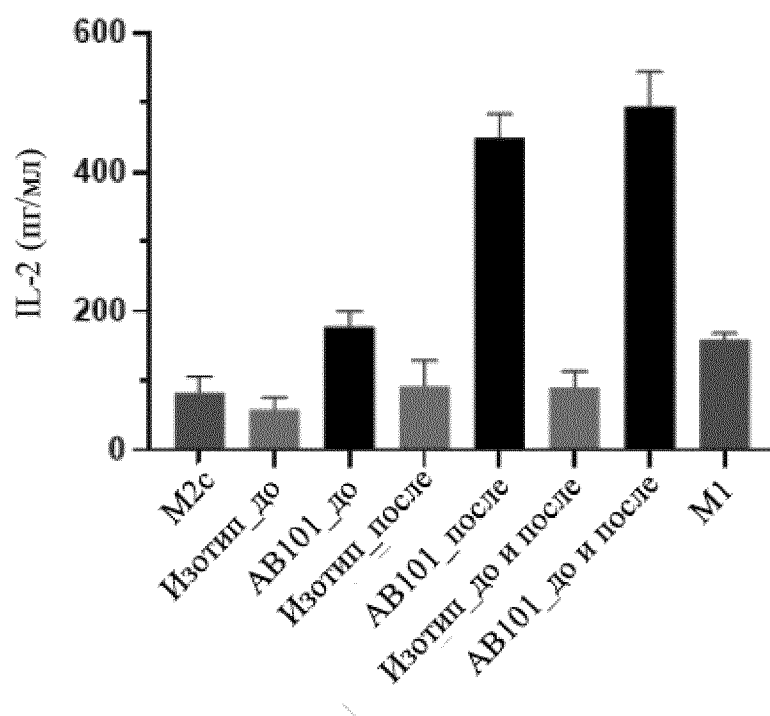
Фиг. 15



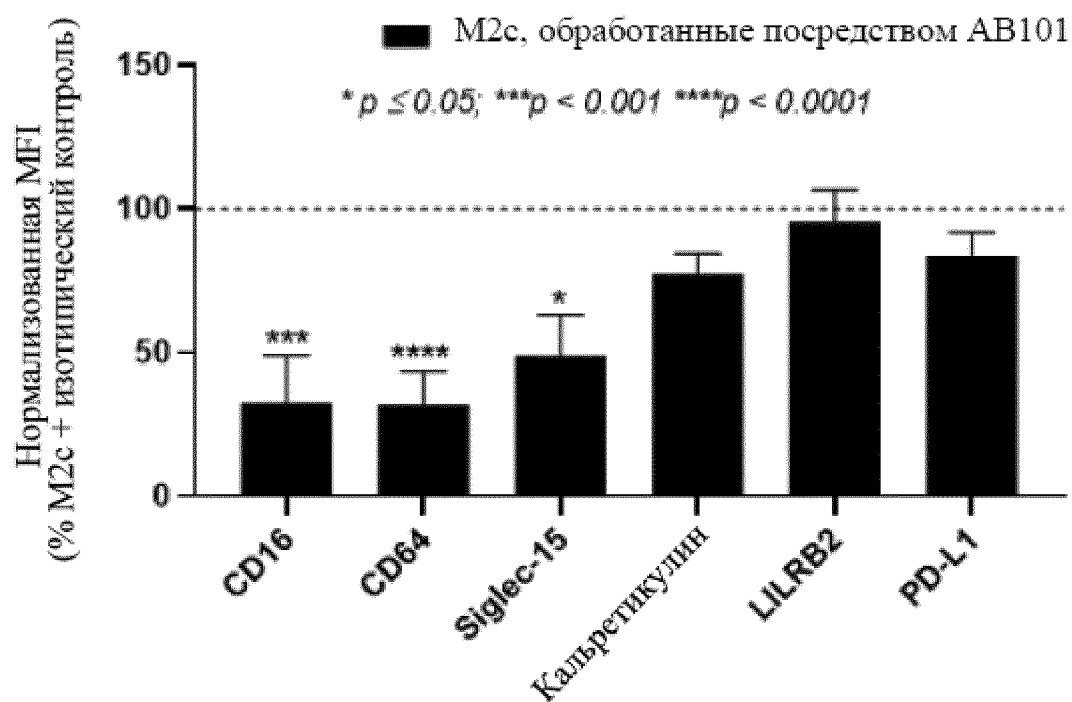
Фиг. 16



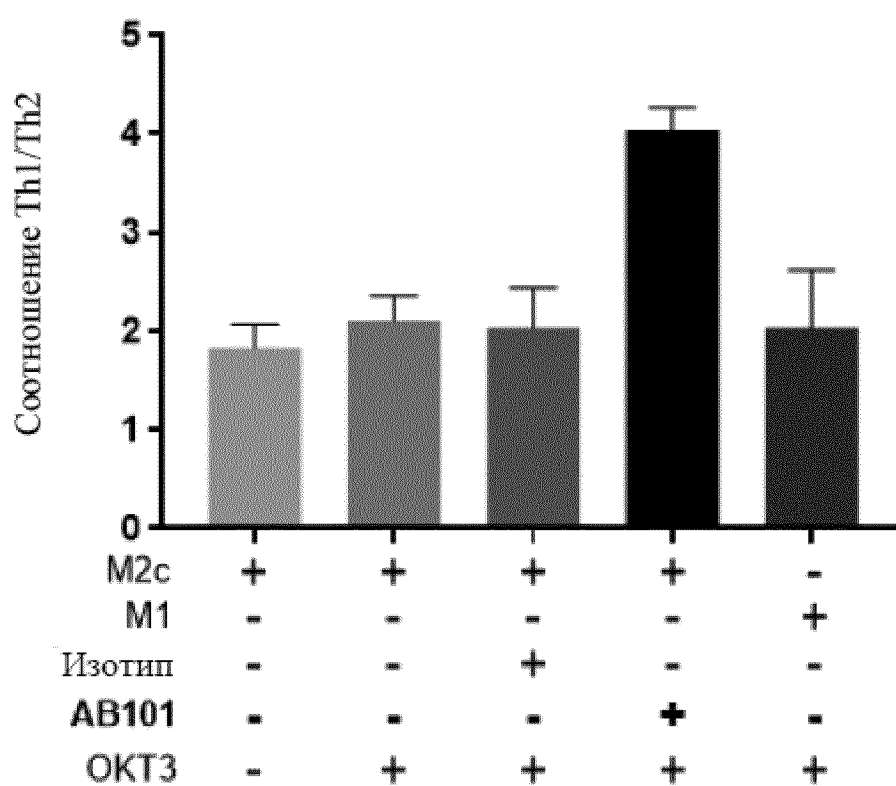
Фиг. 17



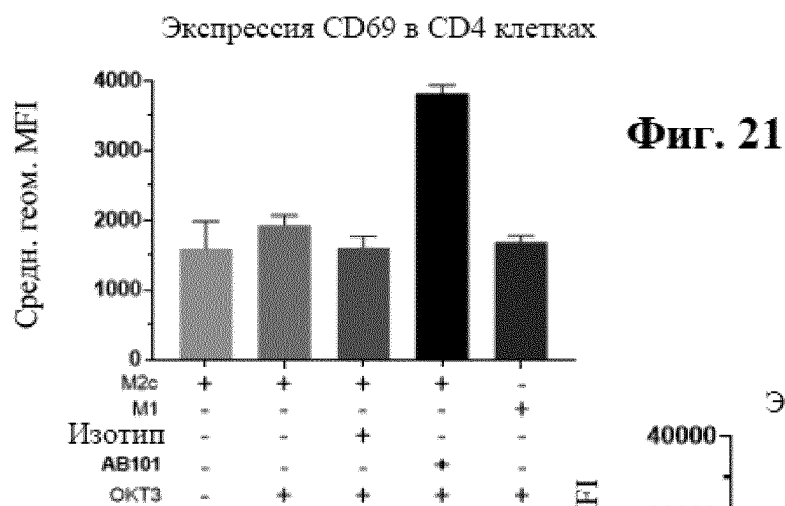
Фиг. 18



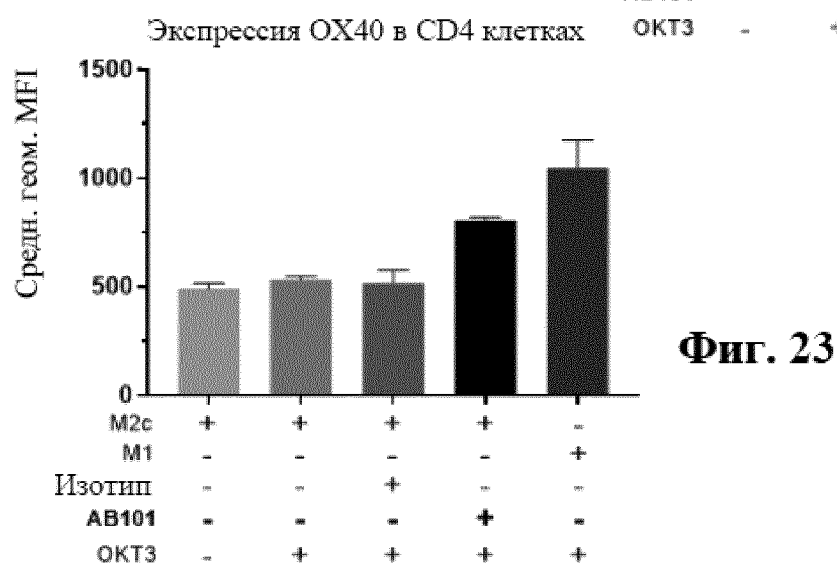
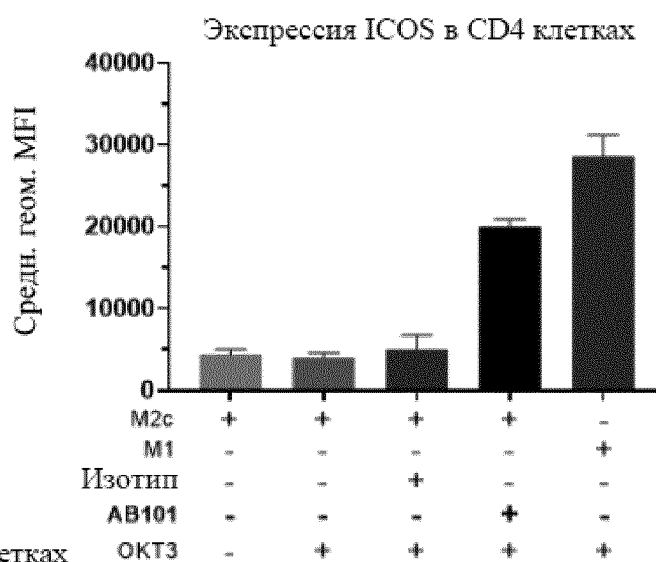
Фиг. 19

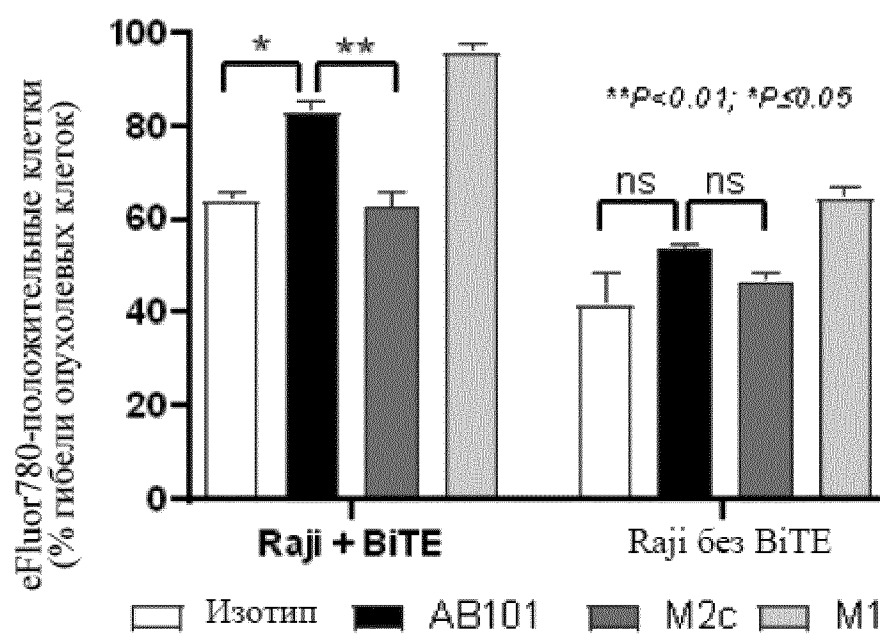


Фиг. 20

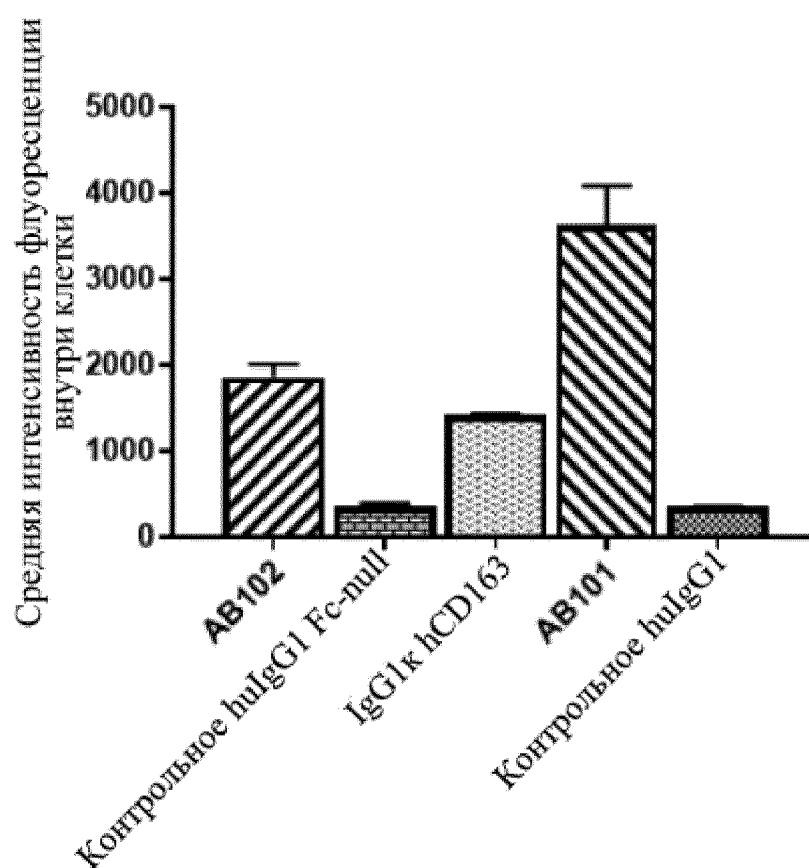


Фиг. 22

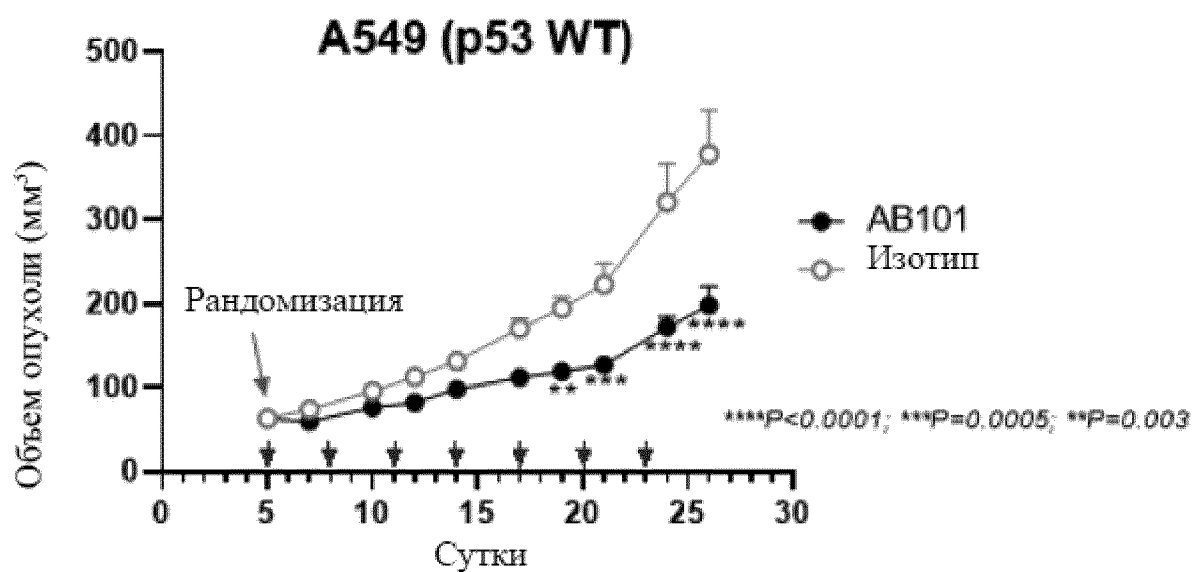




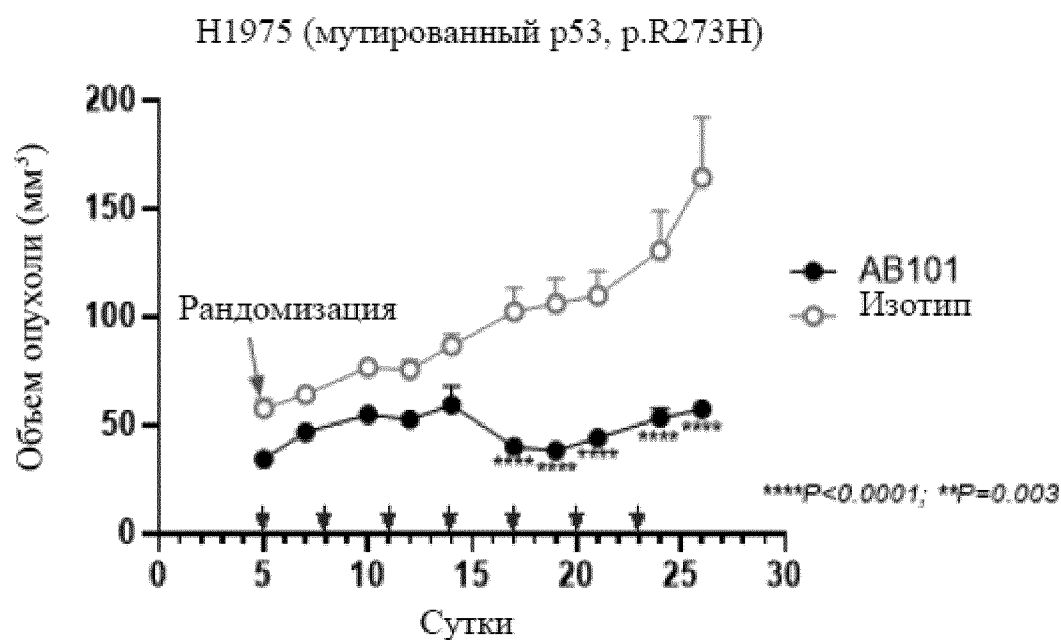
Фиг. 24



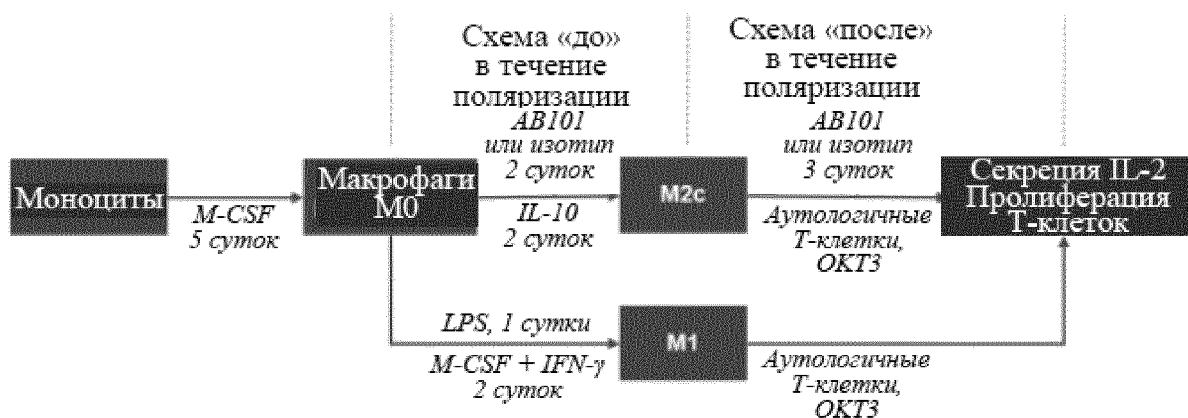
Фиг. 25



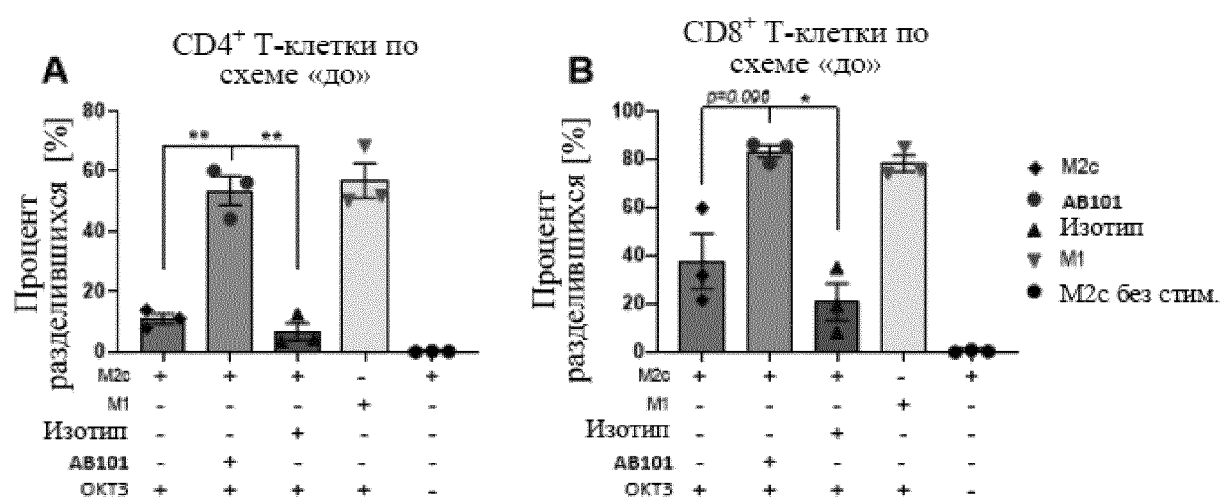
Фиг. 26



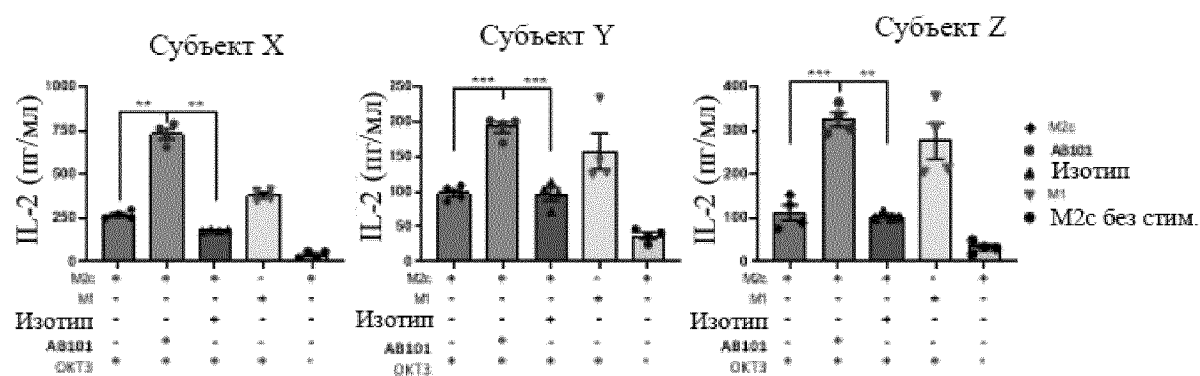
Фиг. 27



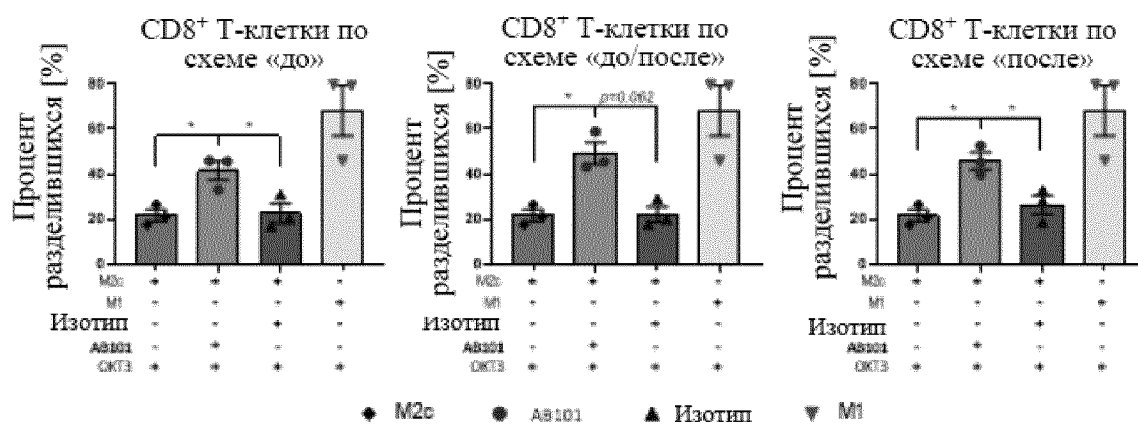
Фиг. 28



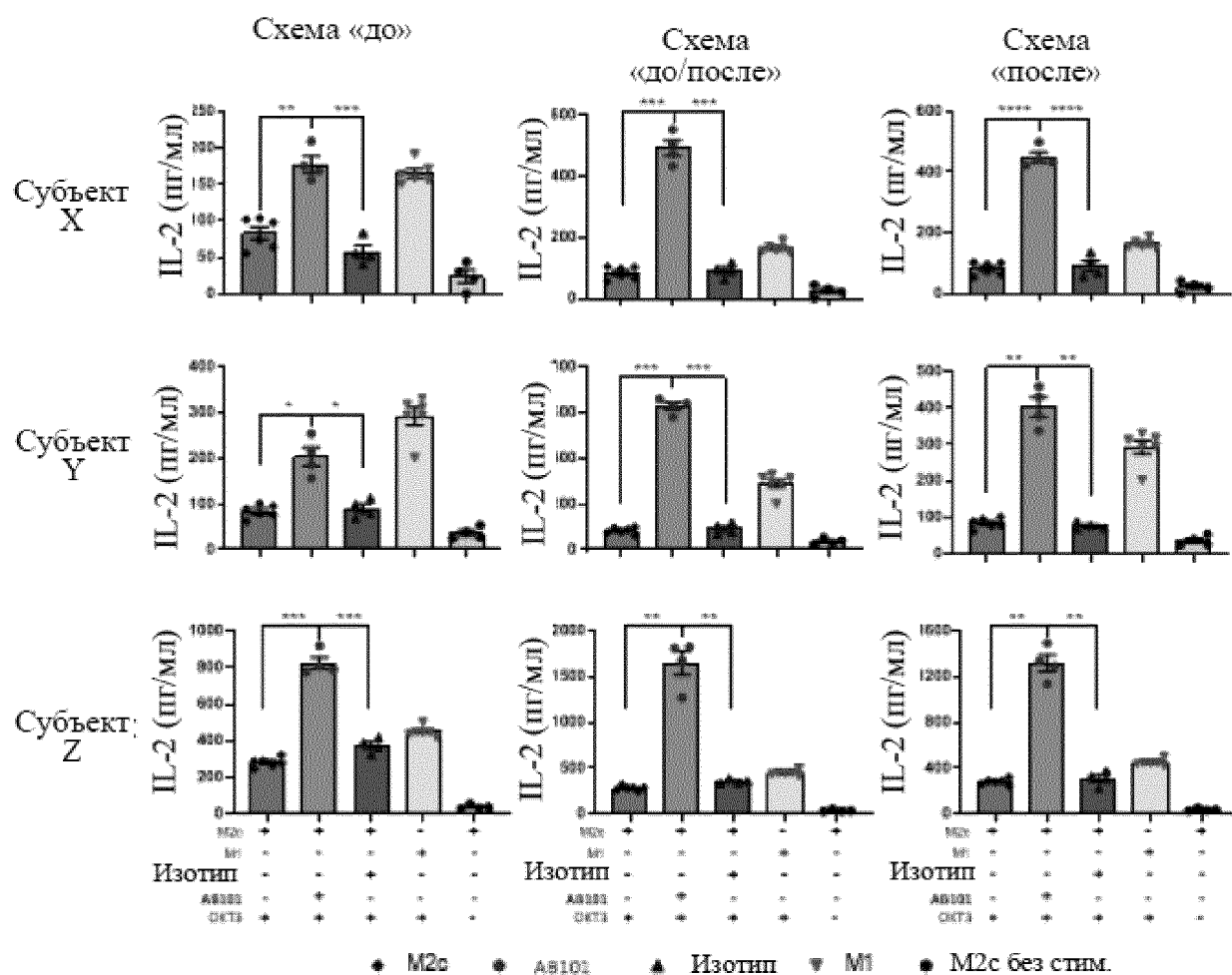
Фиг. 29



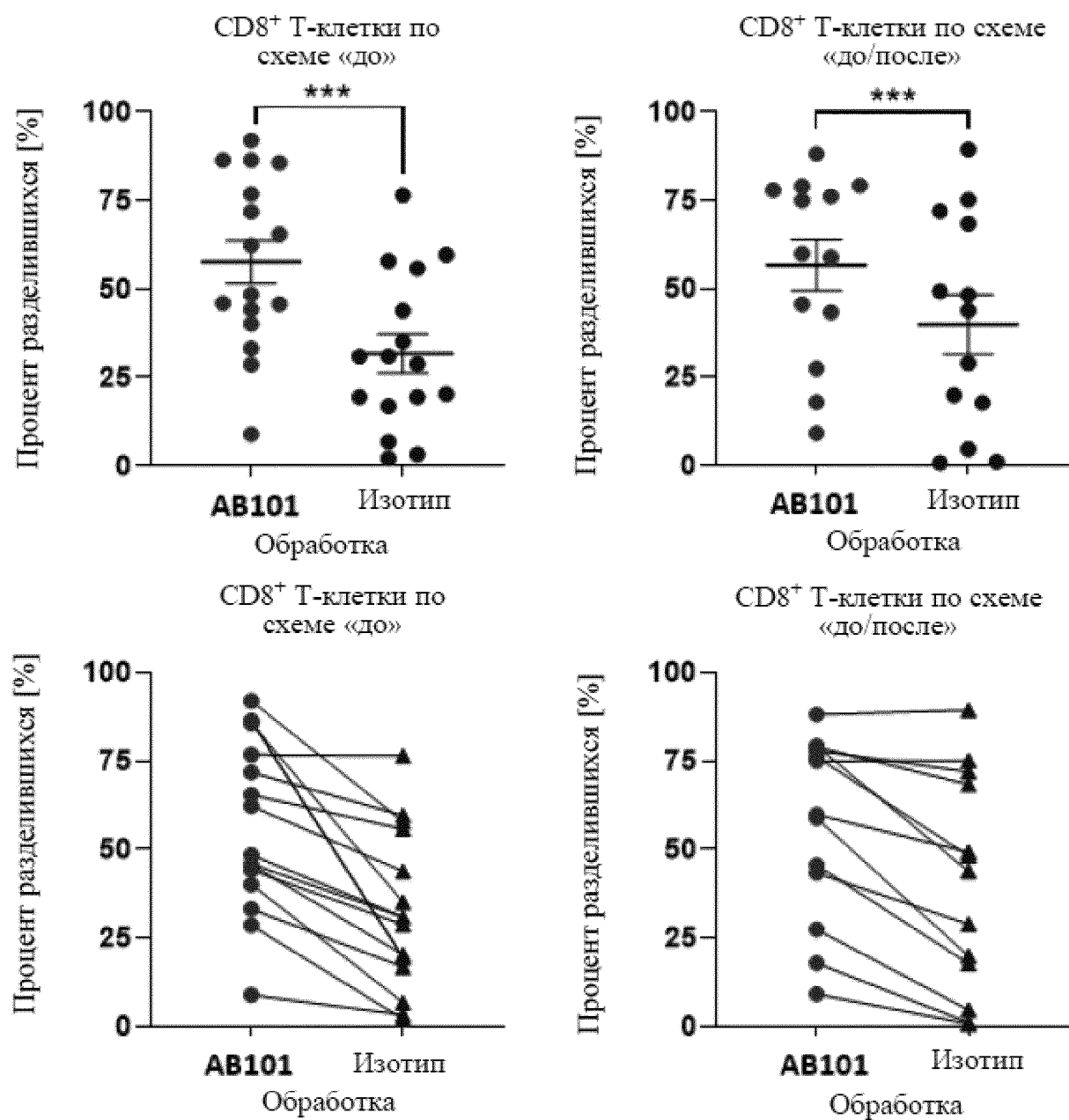
ФИГ. 30



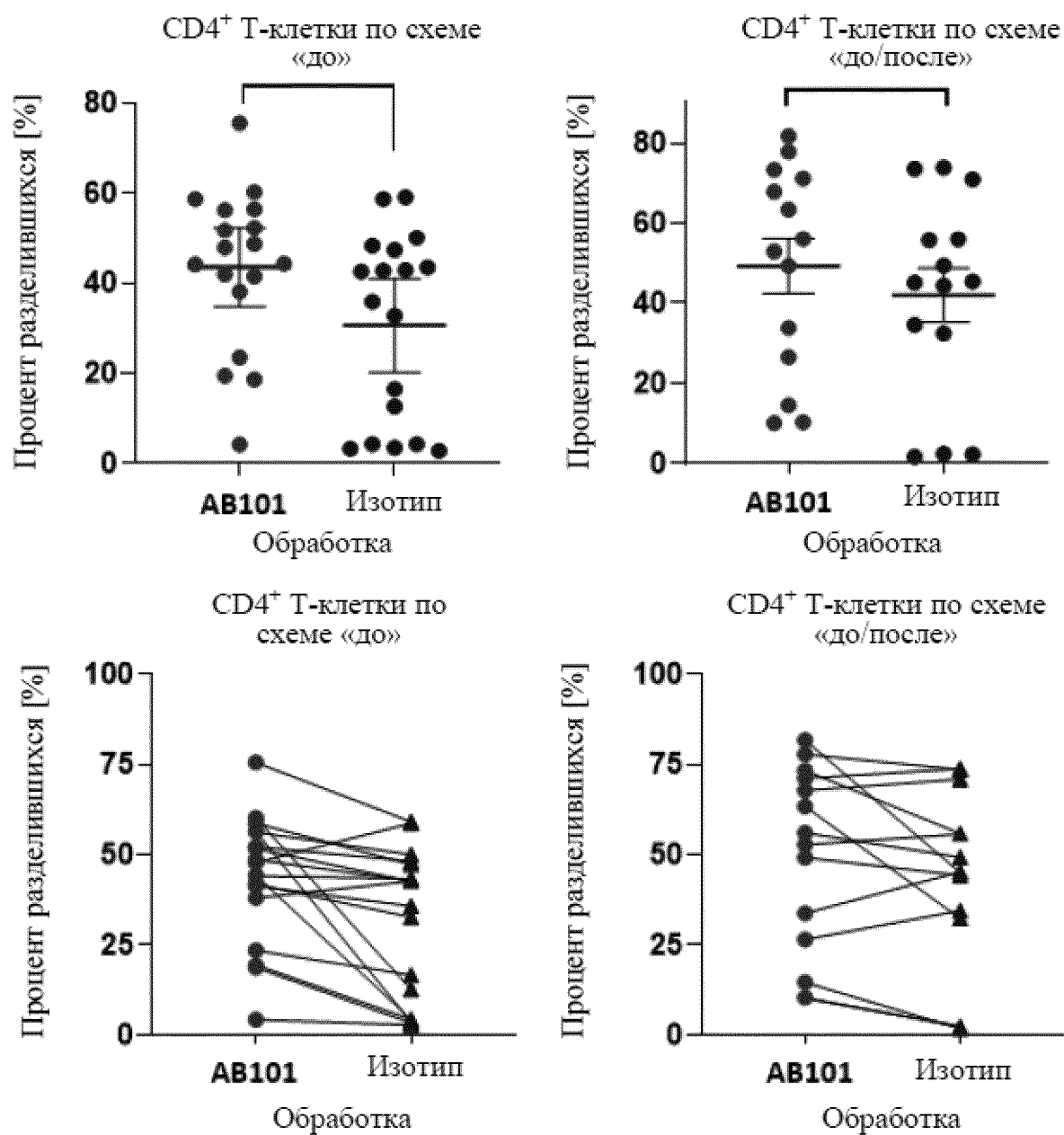
ФИГ. 31



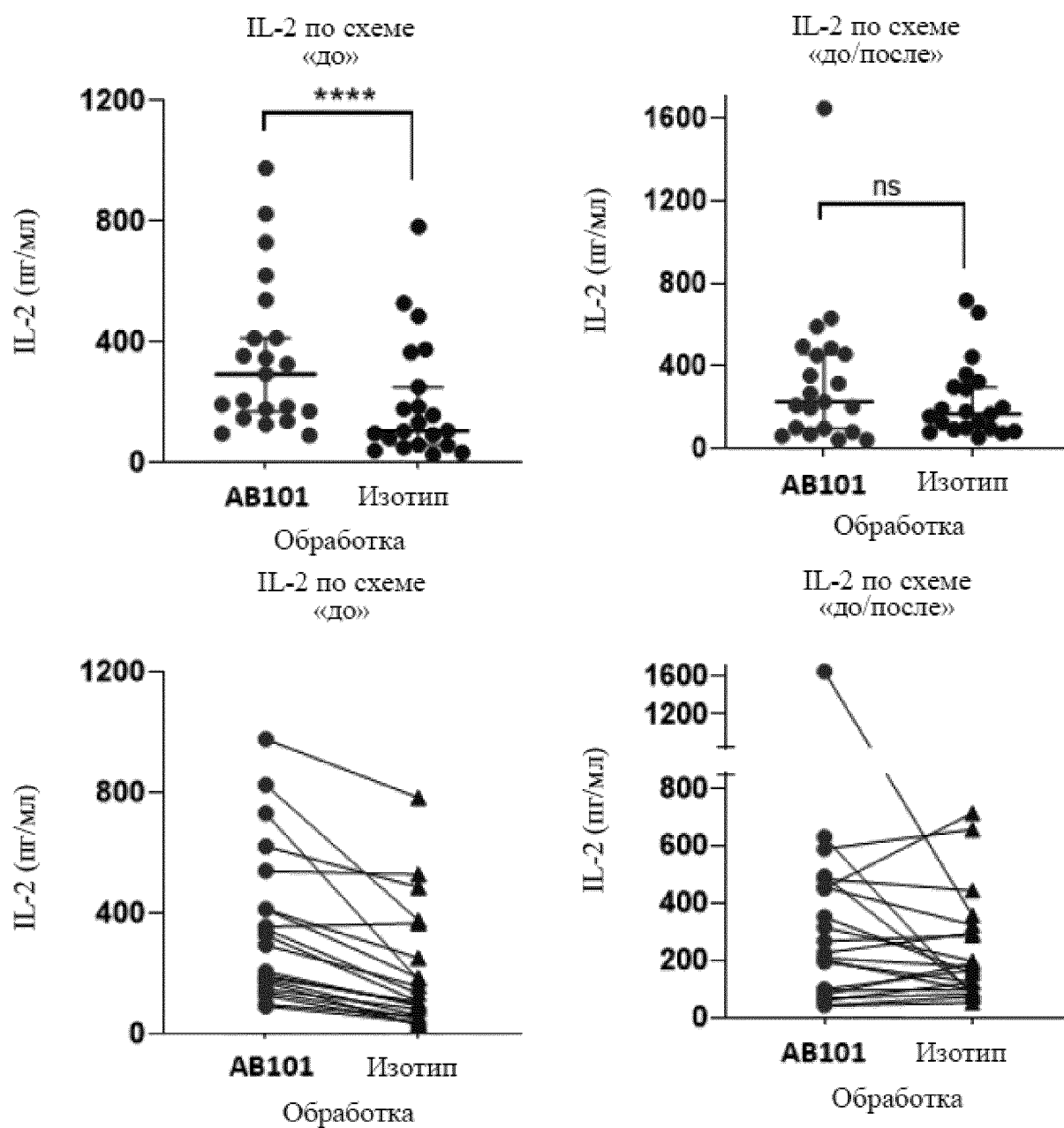
Фиг. 32



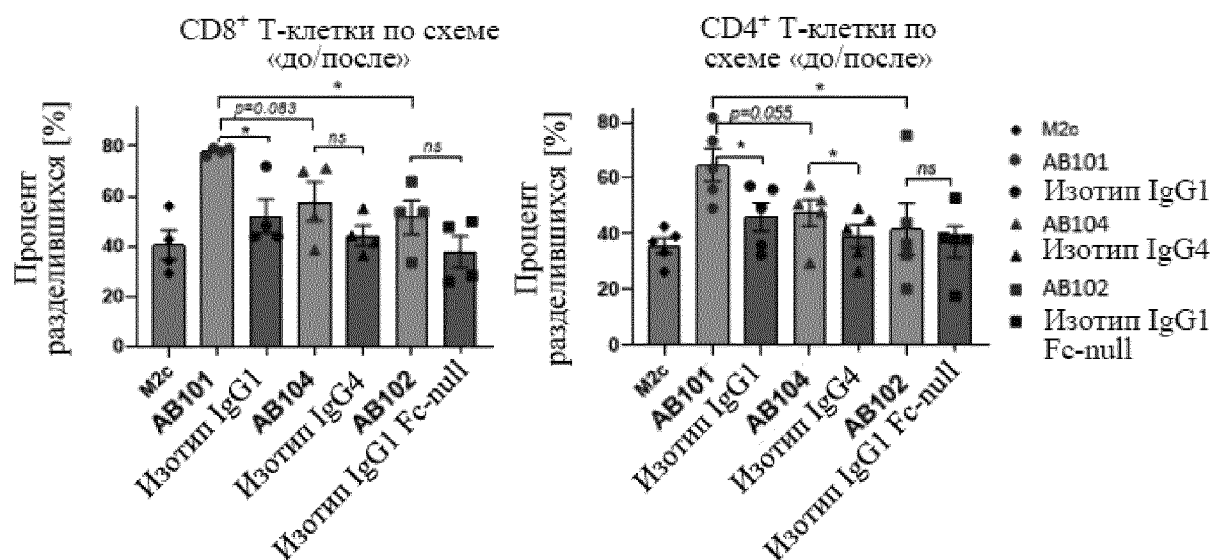
Фиг. 33



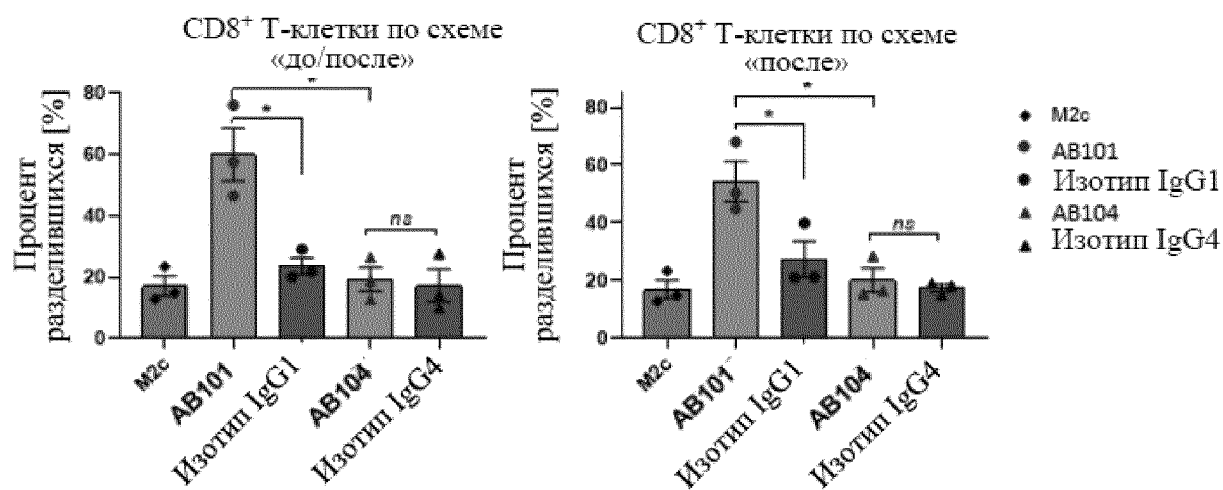
Фиг. 34



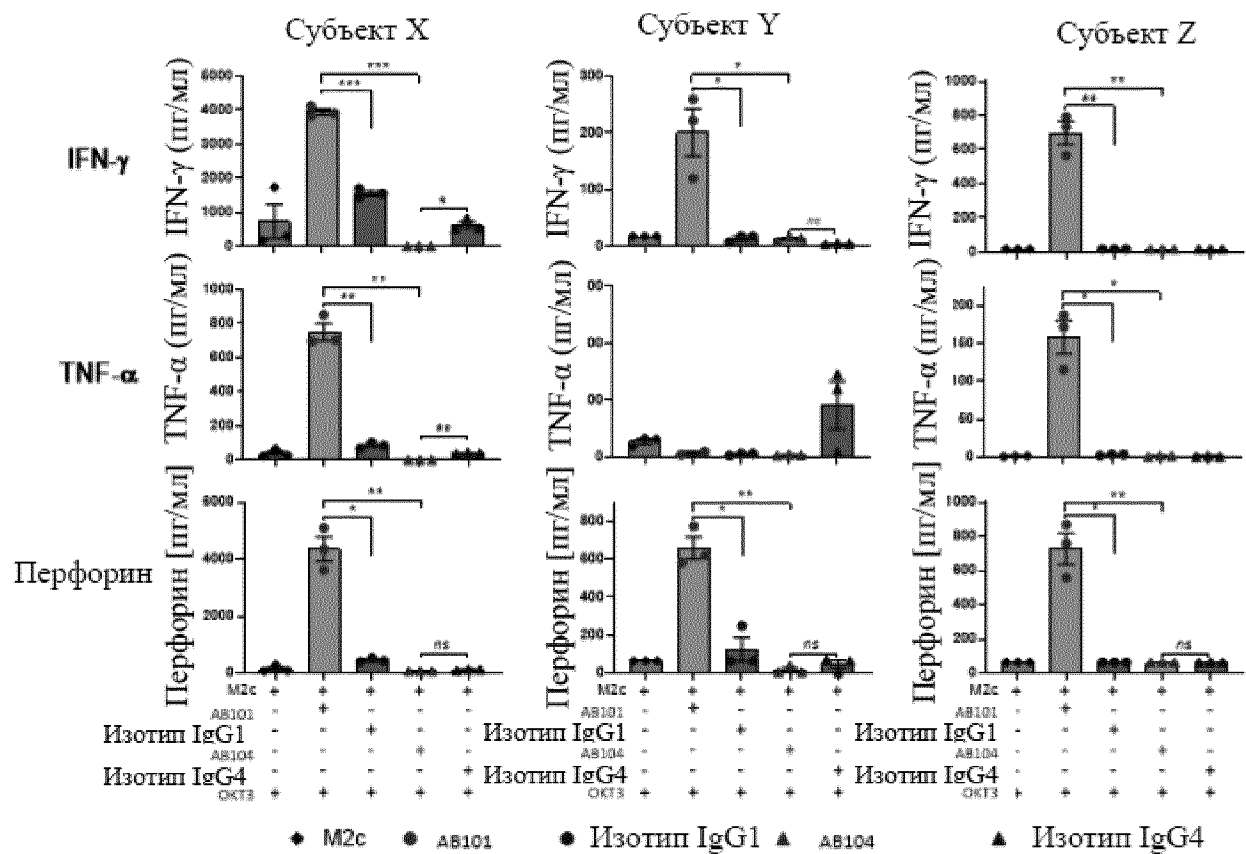
Фиг. 35



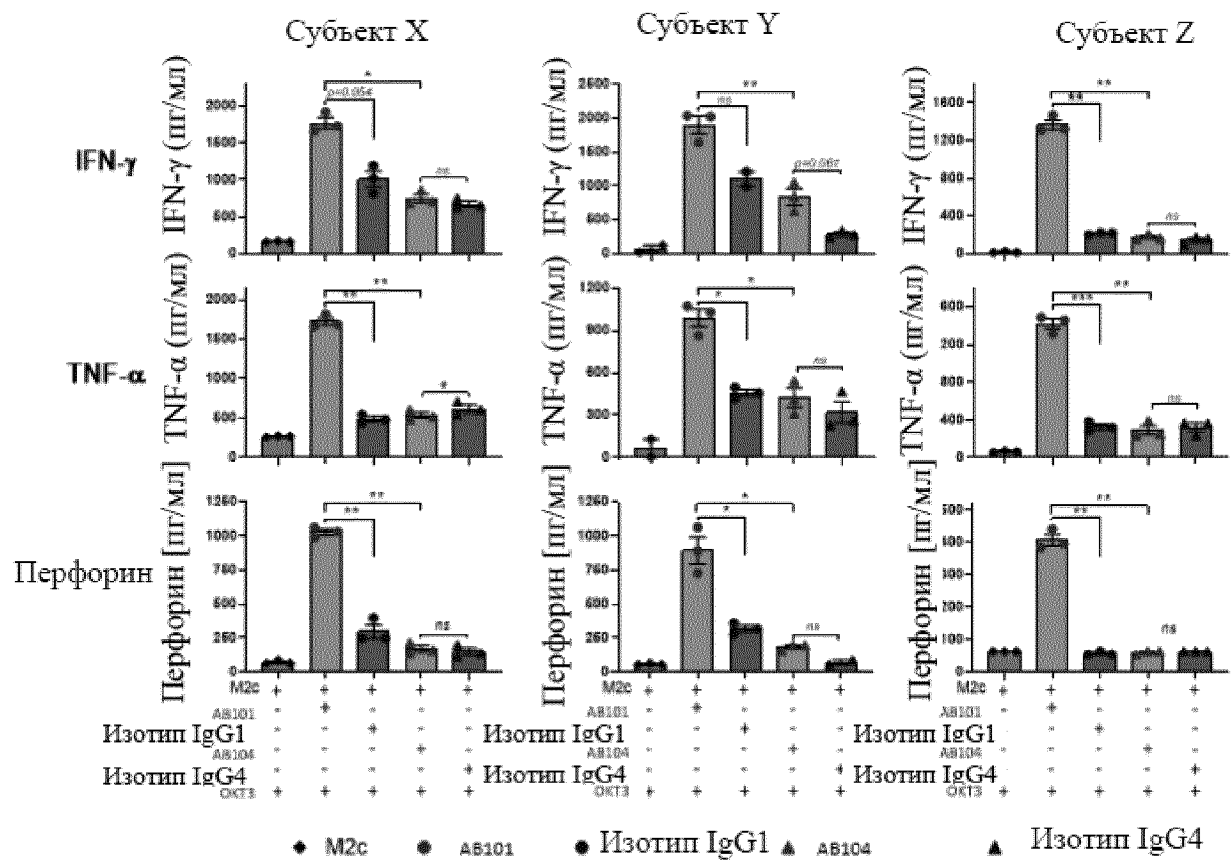
Фиг. 36



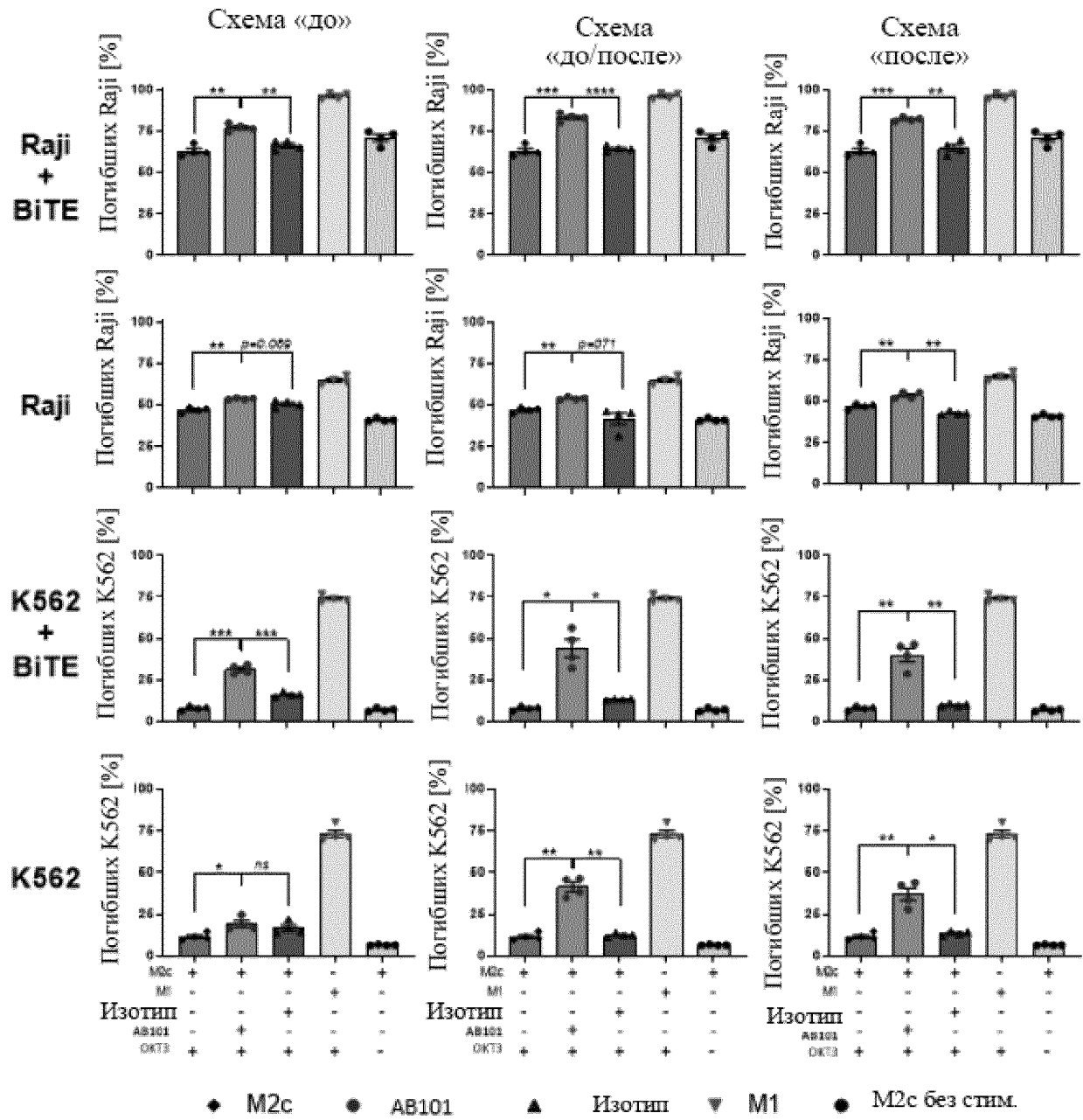
Фиг. 37



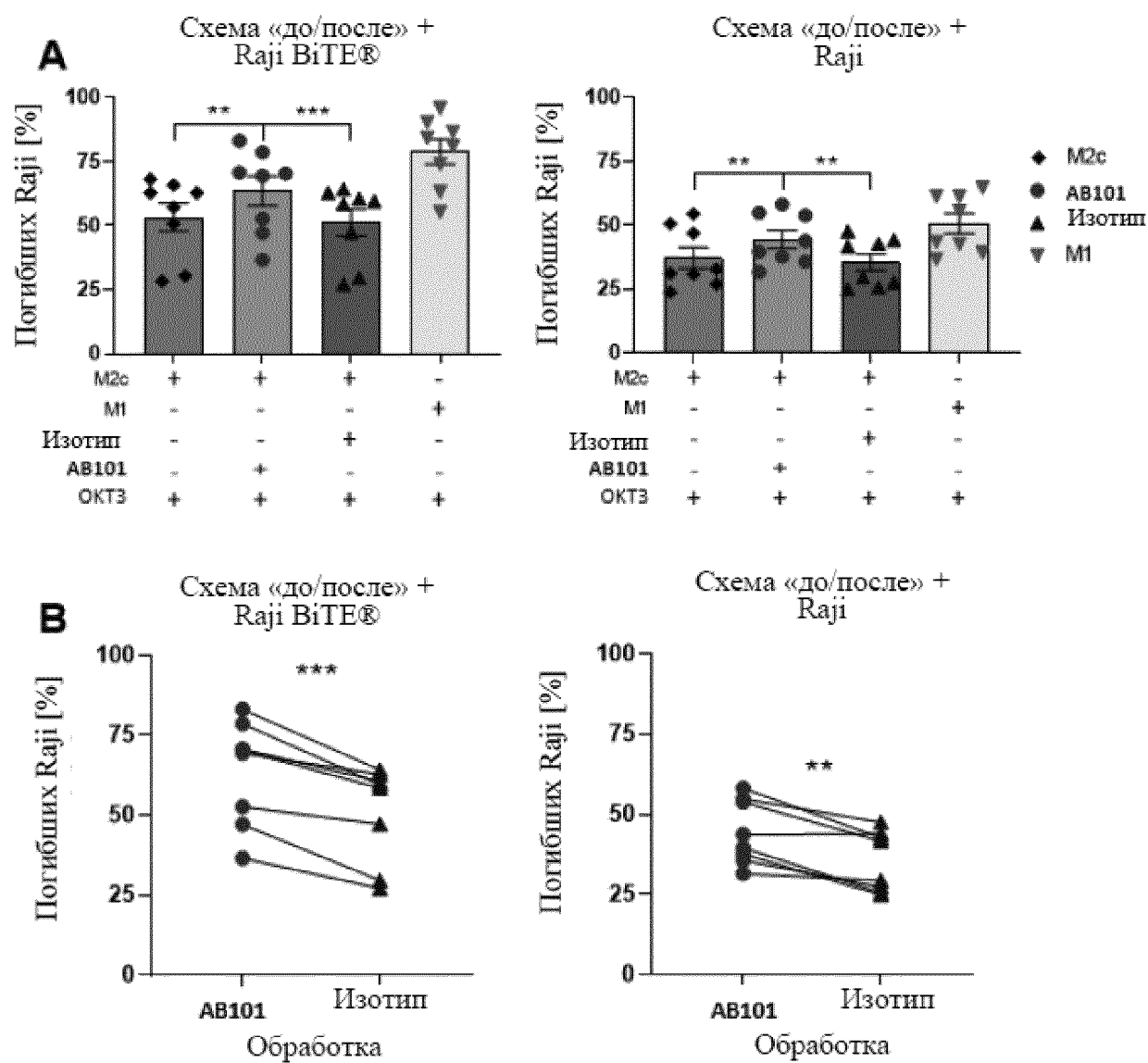
Фиг. 38



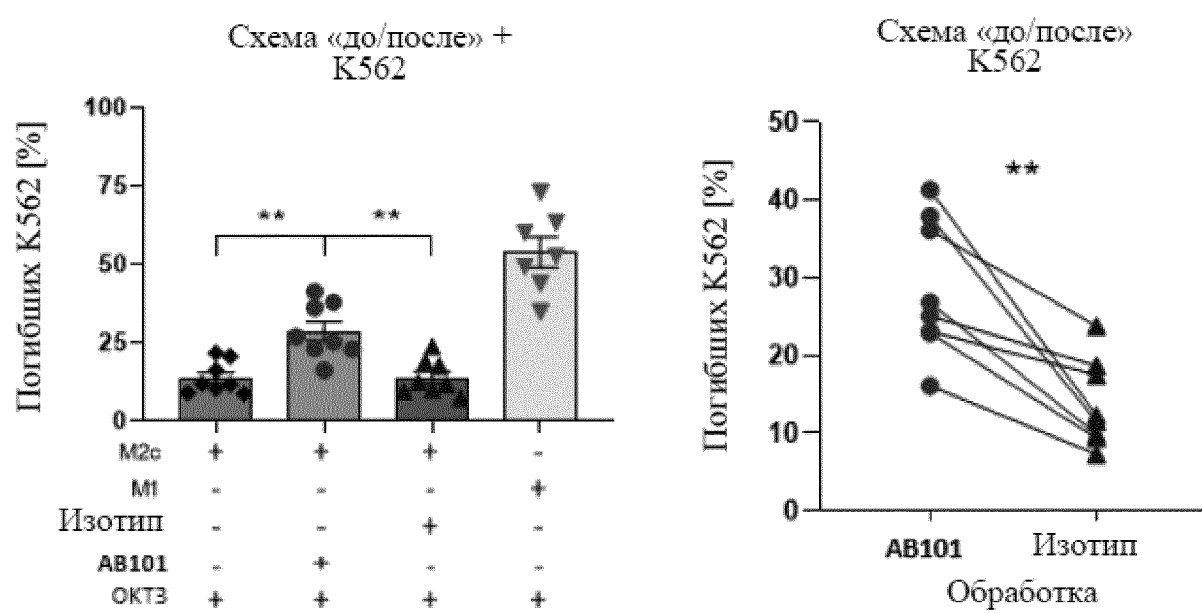
Фиг. 39



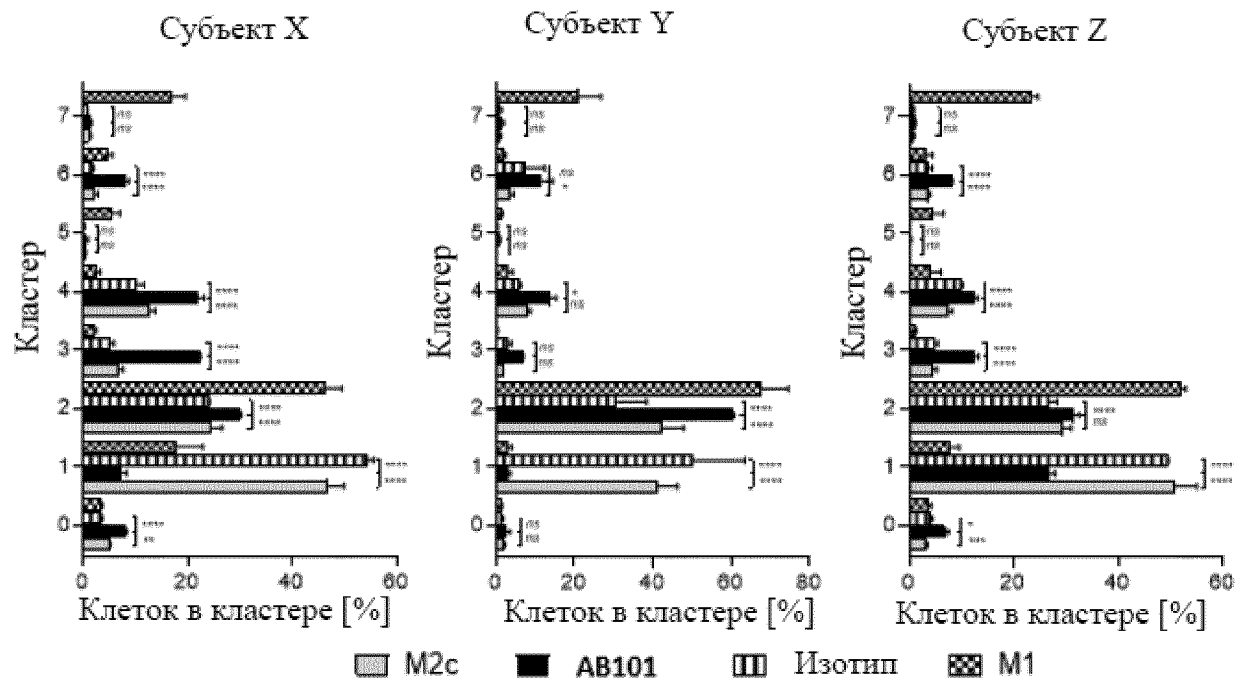
Фиг. 40



Фиг. 41

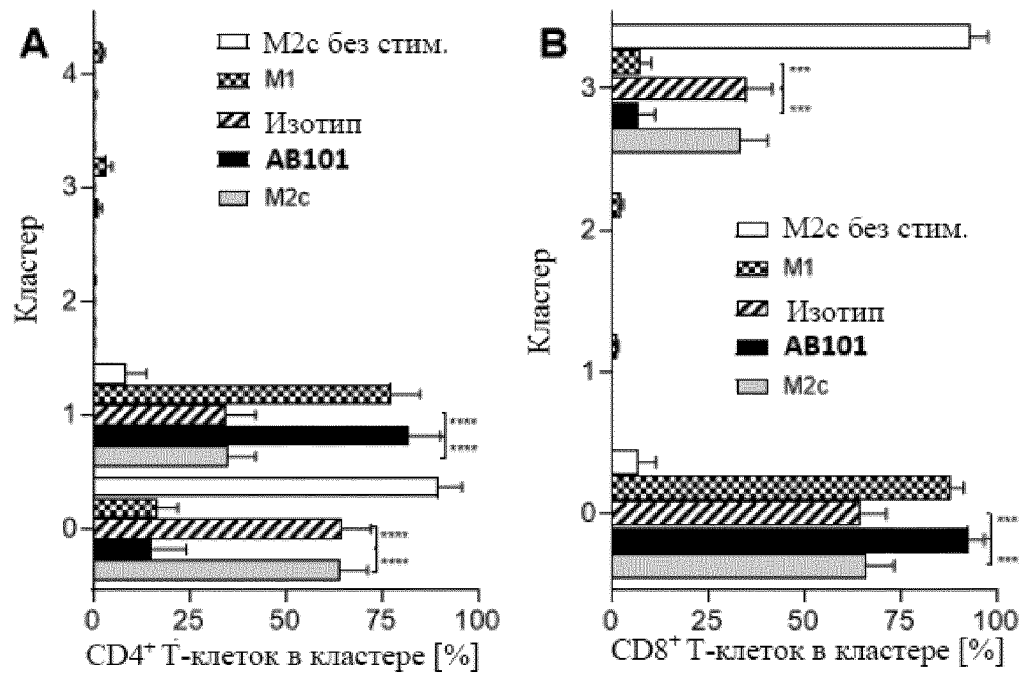


Фиг. 42



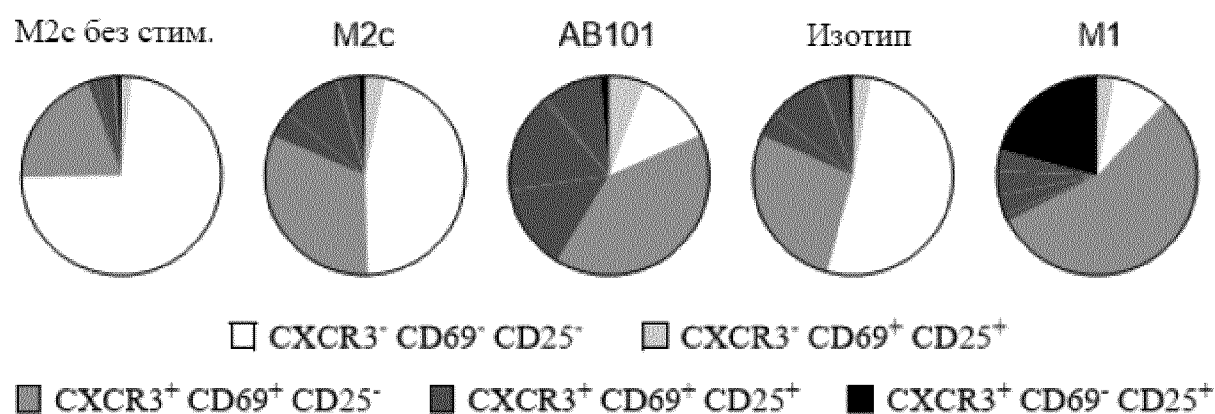
Кластер FlowSOM	Фенотип	Статус CD4 ⁺ Т-клеток
1	CD127 ⁺ , CCR6 ⁻ , CD25 ⁻ , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁻ , CD69 ⁻	В покое
0	CD127 ⁺ , CCR6 ⁻ , CD25 ^{hi} , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁻ , CD69 ^{lo}	Активирован.
2	CD127 ⁻ , CCR6 ⁻ , CD25 ⁻ , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD69 ^{lo}	Активирован.
3	CD127 ⁺ , CCR6 ⁺ , CD25 ⁺ , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD69 ⁺	Активирован.
4	CD127 ⁺ , CCR6 ⁻ , CD25 ^{lo} , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD69 ^{lo}	Активирован.
5	CD127 ⁻ , CCR6 ^{lo} , CD25 ^{hi} , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD69 ⁺	Активирован.
6	CD127 ⁻ , CCR6 ⁻ , CD25 ^{lo} , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD69 ⁺	Активирован.
7	CD127 ⁻ , CCR6 ⁻ , CD25 ^{hi} , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD69 ⁻	Активирован.

Фиг. 43



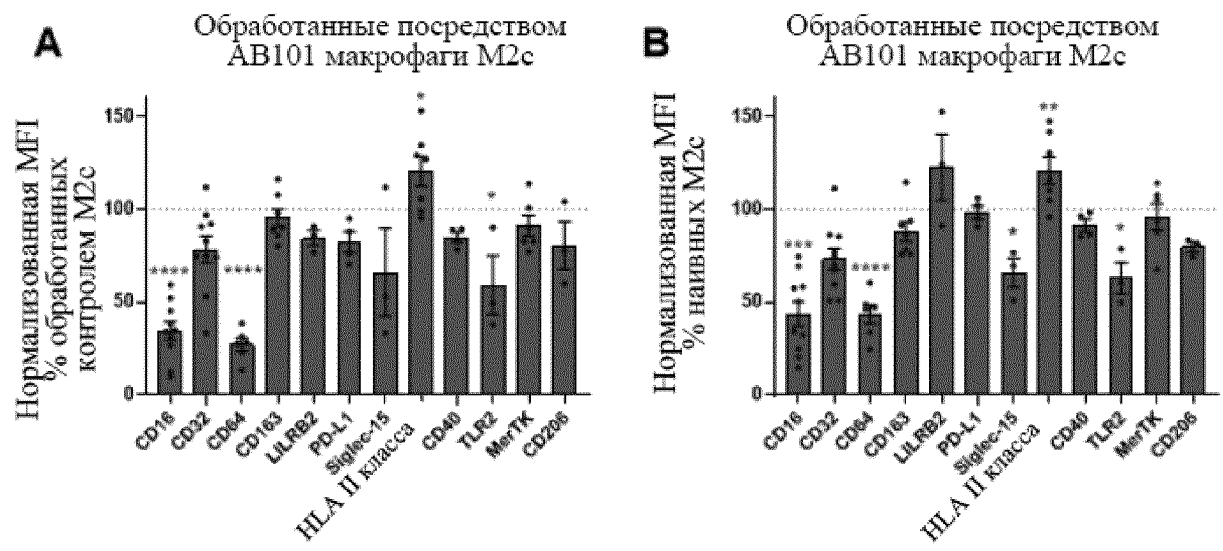
Кластер FlowSOM	Фенотип CD4 ⁺ Т-клеток	Кластер FlowSOM	Фенотип CD8 ⁺ Т-клеток
0	ICOS ⁺ , PD-1 ⁻ , LAG3 ⁻ , CTLA-4 ⁻ , OX40 ⁻	0	ICOS ^{hi} , PD-1 ⁺ , LAG3 ^{lo} , CTLA-4 ⁻ , OX40 ^{lo}
1	ICOS ^{hi} , PD-1 ⁺ , LAG3 ⁻ , CTLA-4 ⁻ , OX40 ^{lo}	1	ICOS ^{hi} , PD-1 ⁺ , LAG3 ⁺ , CTLA-4 ^{lo} , OX40 ^{lo}
2	ICOS ⁻ , PD-1 ⁺ , LAG3 ^{lo} , CTLA-4 ⁺ , OX40 ⁺	2	ICOS ^{ai} , PD-1 ^{lo} , LAG3 ⁺ , CTLA-4 ^{lo} , OX40 ^{lo}
3	ICOS ^{hi} , PD-1 ⁺ , LAG3 ⁺ , CTLA-4 ^{lo} , OX40 ^{lo}	3	ICOS ^{lo} , PD-1 ⁻ , LAG3 ⁻ , CTLA-4 ⁻ , OX40 ⁻
4	ICOS ^{hi} , PD-1 ⁺ , LAG3 ^{lo} , CTLA-4 ⁺ , OX40 ⁺		

Фиг. 44



Статус CD4 ⁺ Т-клеток	Экспрессия CXCR3	Фенотип	Кластер FlowSOM
В покое	Нет	CXCR3 ⁻ , CD69 ⁻ , CD25 ⁻	1
Активирован.	Нет	CXCR3 ⁻ , CD69 ⁺ , CD25 ⁻	0
Активирован.	Да	CXCR3 ⁺ , CD69 ⁺ , CD25 ⁻	2
Активирован.	Да	CXCR3 ⁺ , CD69 ⁺ , CD25 ⁺	3-6
Активирован.	Да	CXCR3 ⁺ , CD69 ⁻ , CD25 ⁺	7

Фиг. 45



Фиг. 46

10	20	30	40	50	60
GTDKELRLVD	GENKCSGRVE	VKVQEEWGTV	CNNGWSMEAV	SVICNQLGCP	TAIKAPGWAN
70	80	90	100	110	120
SSAGSGRIWM	DHVSCRGNES	ALWDCKHDGW	GKHSNCTHQQ	DAGVTCSDGS	NLEMRLTRGG
130	140	150	160	170	180
NMCSGRIEIK	FQGRWGTVCD	DNFNIDHASV	ICRQLECGSA	VSFSGSSNFG	EGSGPIWFDD
190	200	210	220	230	240
LICNGNESAL	WNCKHQGWGK	HNCDDHAEDAG	VICSKGADLS	LRLVDGVTEC	SGRLEVRFQG
250	260	270	280	290	300
EWGTICDDGW	DSYDAAVACK	QLGCPTAVTA	IGRVNASKGF	GHIWLDSVSC	QGHEPAVWQC
310	320	330	340	350	360
KHHEWKGHYC	NHNEDAGVTC	SDGSDLELRL	RGGGSRCAGT	VEVEIQRLLG	KVCDRGWGLK
370	380	390	400	410	420
EADVCRQLG	CGSALKTSYQ	VYSKIQATNT	WFLSSCNGN	ETSLWDCKNW	QWGGGLTCDHY
430	440	450	460	470	480
EEAKITCSAH	REPRLVGGDI	PCSGRVEVKH	GDTWGSICDS	DFSLEAASVL	CRELQCGTVV
490	500	510	520	530	540
SILGGAHFGE	GNGQIWAEFF	QCEGHESHLS	LCPVAPRPEG	TCSHSRDVG	VCSRYTEIRL
550	560	570	580	590	600
VNGKTPCEGR	VELKTLGAWG	SLCNSHWDIE	DAHVLCQQLK	CGVALSTPGG	ARFGKNGQOI
610	620	630	640	650	660
WRHMFHCTGT	EQHMGDCPVT	ALGASLCPSE	QVASVICSGN	QSQTLSSCNS	SSLGPTRPTI
670	680	690	700	710	720
PEESAVACIE	SGQLRLVNGG	GRCAGRVEIY	HEGSWGTICD	DSWDLSDAHV	VCRQLGCGEA
730	740	750	760	770	780
INATGSAHFG	EGTGPIWLDE	MKCNGKESRI	WQCHSHGWGQ	QNCRHKEDAG	VICSEFMSLR
790	800	810	820	830	840
LTSEASREAC	AGRLEVFYNG	AWGTVGKSSM	SETTVGVVCR	QLGCADKGKI	NPASLDKAMS
850	860	870	880	890	900
IPMWVDNVQC	PKGPDTLWQC	PSSPWEKRLA	SPSEETWITC	DNKIRLQEGP	TSCSGRVEIW
910	920	930	940	950	960
HGGSWGTVCD	DSWDLDDAQV	VCQQLGCGPA	LKAFKEAEPG	QGTGPIWLNE	VKCKGNESSL
970	980	990	1000	1010	
WDCPARRWGH	SECCHKEDAA	VNCTDISVQK	TPQKATTGRS	SRQSSHHHHH	HHHHH

Более гибкий



Более защищенный

Без изменения

Фиг. 47

10	20	30	40	50	60
GTDKELRLVD	GENKCSGRVE	VKVQEEWGTV	CNNGWSMEAV	SVICNQLGCP	TAIKAPGWAN
70	80	90	100	110	120
SSAGSGRIWM	DHVS CRGNES	ALWDCKHDGW	GKHSNCTHQQ	DAGVTCSDGS	NLEMLTRGG
130	140	150	160	170	180
NMCSGRIEIK	FQGRWGTVCD	DNFNIDHASV	ICRQLECGSA	VSFSGSSNFG	EGSGPIWFDD
190	200	210	220	230	240
LICNGNESAL	WNCKHQGWGK	HNCDDHAEDAG	VICSKGADLS	LRLVDGVTEC	SGRLEVRFQG
250	260	270	280	290	300
EWGTICDDGW	DSYDAAVACK	QLGCPTAVTA	IGRVNASKGF	GHIWLDSVSC	QGHEPAVWQC
310	320	330	340	350	360
KHHEWGKHYC	NHNEDAGVTC	SDGSDLELRL	RGGGSRCAGT	VEVEIQRLLG	KVCDRGWGLK
370	380	390	400	410	420
EADVVCRLQG	CGSALKTSYQ	VYSKIQATNT	WLFLSSCNGN	ETSLWDCKNW	QWGGGLTCDHY
430	440	450	460	470	480
EEAKITCSAH	REPRLVGGDI	PCSGRVEVKH	GDTWGSICDS	DFSLEAASVL	CRELQCGTVV
490	500	510	520	530	540
SILGGAHPGE	GNGQIWAEFF	QCEGHESHLS	LCPVAPRPEG	TCSHSRDVG	VCSRYTEIRL
550	560	570	580	590	600
VNGKTPCEGR	VELKTLGANG	SLCNSHWDIE	DAHVLCQQLK	CGVALSTPGG	ARFGKGNQOI
610	620	630	640	650	660
WRHMFHCTGT	EQHMGDCPVT	ALGASLCPSE	QVASVICSGN	QSQTLSSCNS	SSLGPTRPTI
670	680	690	700	710	720
PEESAVACIE	SGQLRLVNGG	GRCAGRVEIY	HEGSWGTCID	DSWDLSDAHV	VCRQLGCGEA
730	740	750	760	770	780
INATGSAHPG	EGTGPIWLDE	MKCNGKESRI	WQCHSHGWGQ	QNCRHKEDAG	VICSEFMSLR
790	800	810	820	830	840
LTSEASREAC	AGRLEVIFYNG	AWGTVGKSSM	SETTVGVVCR	QLGCADKGGI	NPASLDKAMS
850	860	870	880	890	900
IPMWVDNVQC	PKGPDTLWQC	PSSPWEKRLA	SPSEETWITC	DNKIRLQEGP	TSCSGRVEIW
910	920	930	940	950	960
HGGSWGTVCD	DSWDLDDAQV	VCQQLGCGPA	LKAFKEAEFG	QGTGPIWLNE	VKCKGNESSL
970	980	990	1000	1010	
WDCPARRWGH	SECGHKEDAA	VNCTDISVQK	TPQKATTGRS	SRQSSHHHHH	HHHHH

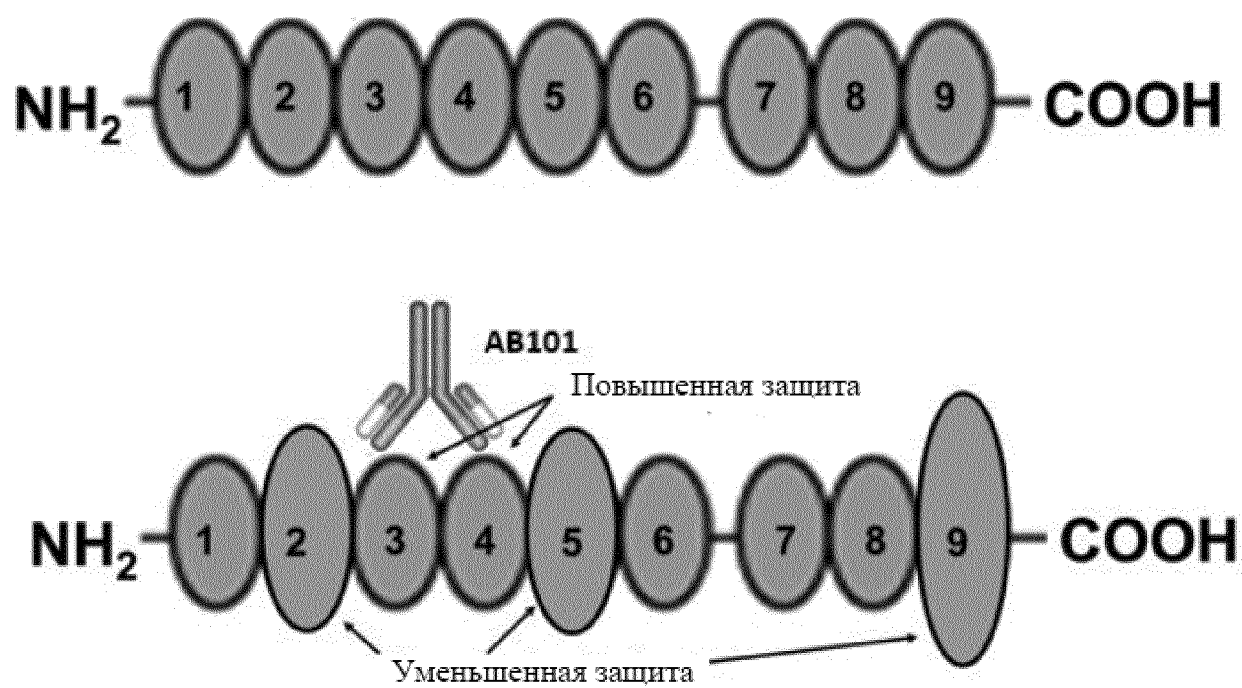
Более гибкий



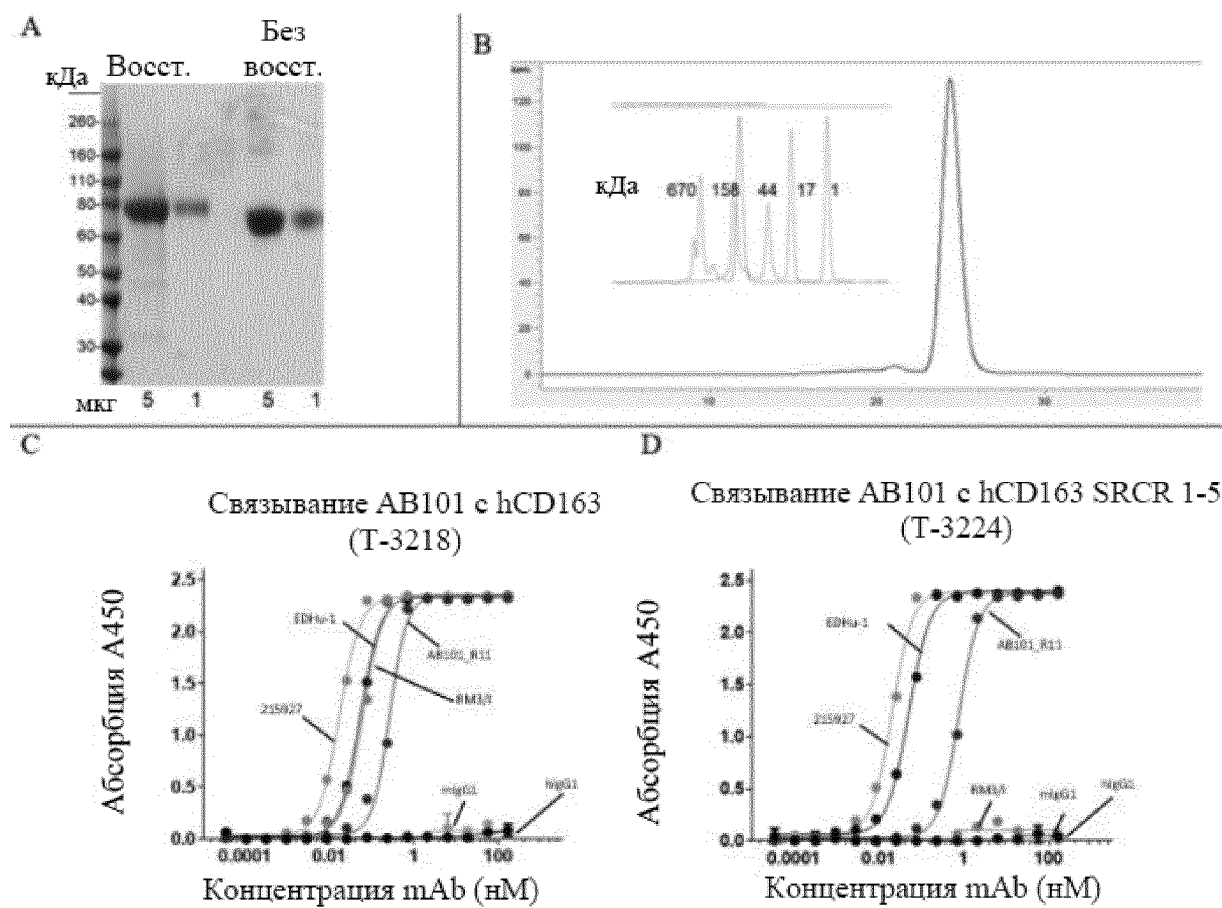
Более защищенный

Без изменения

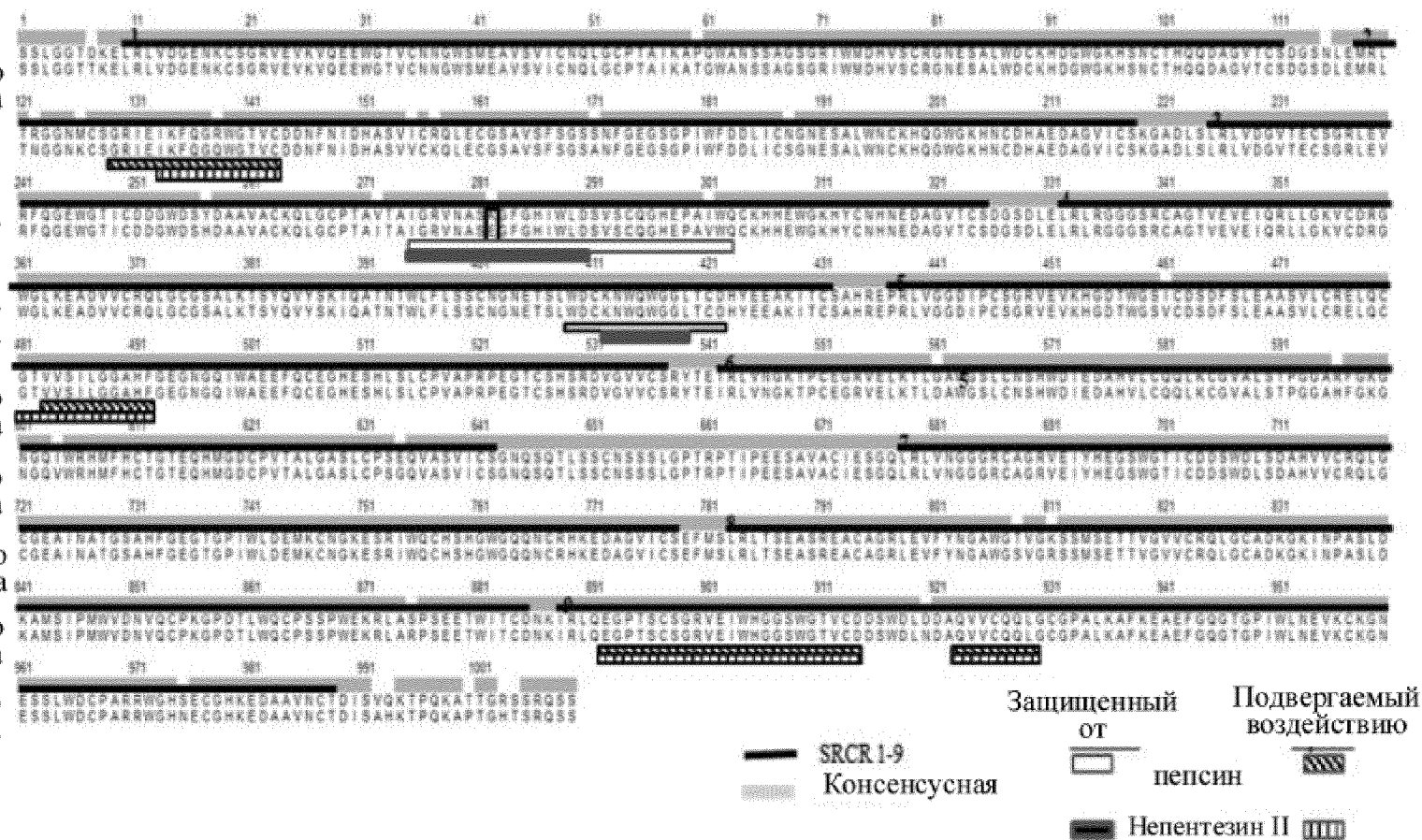
Фиг. 48



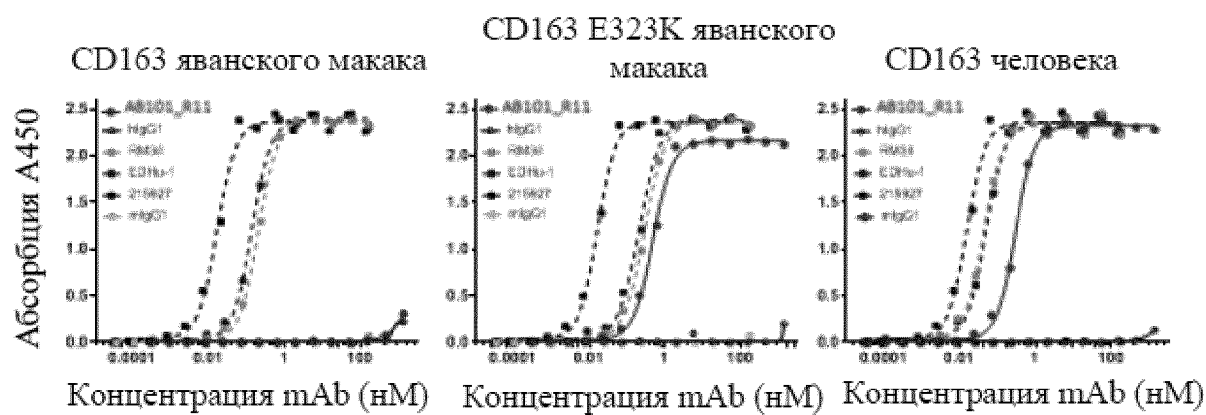
Фиг. 49



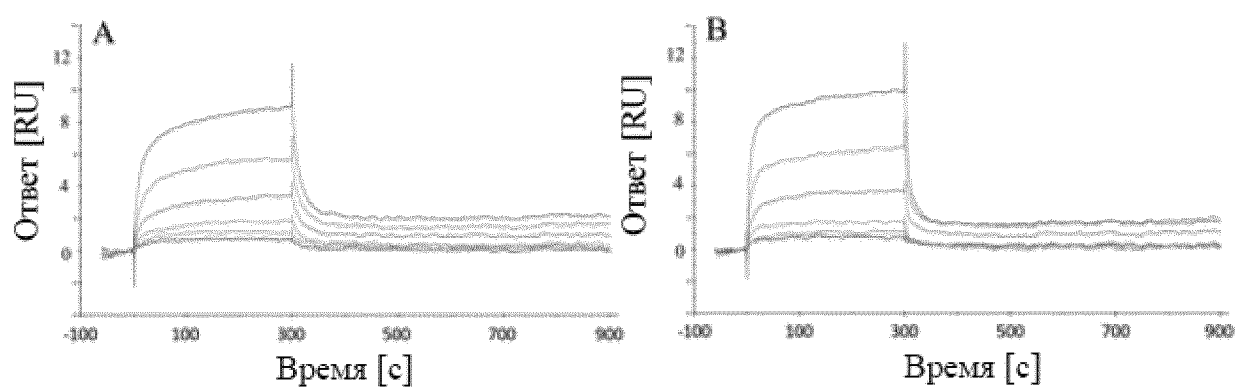
Фиг. 50



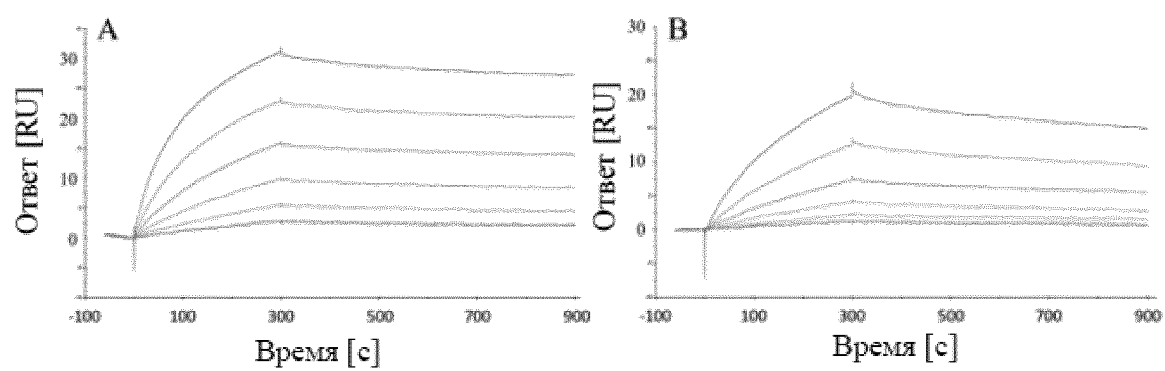
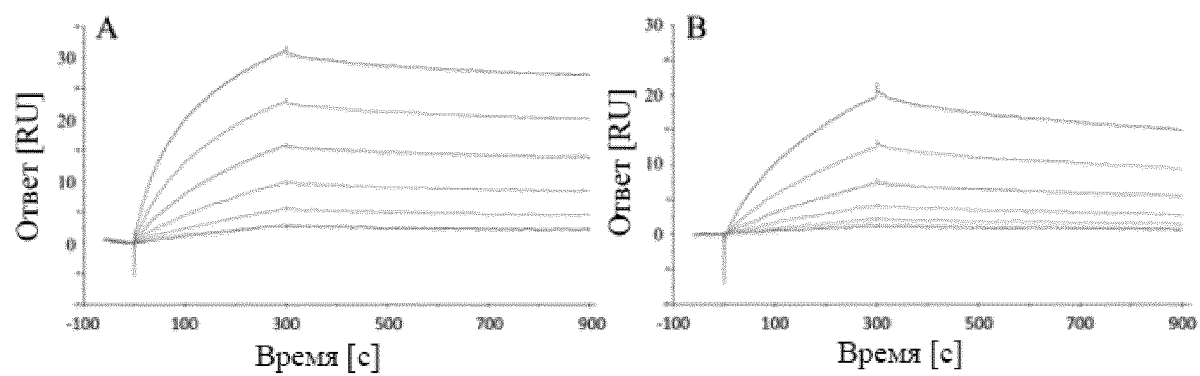
Фиг. 51

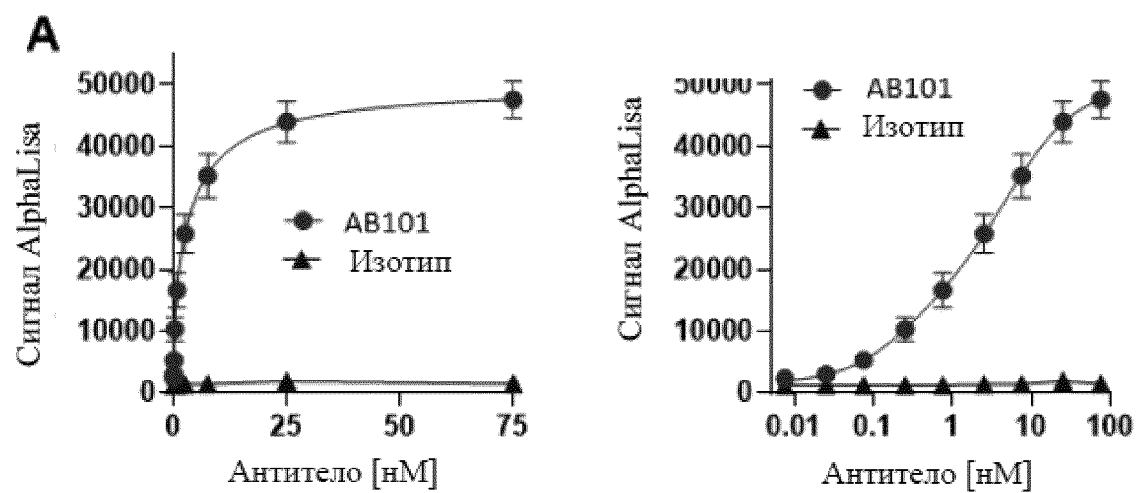


Фиг. 52

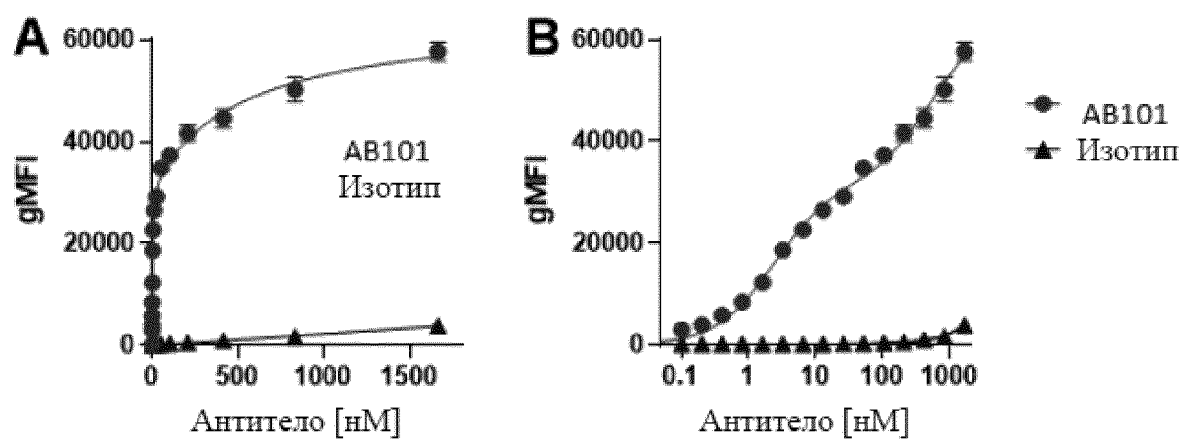


Фиг. 53

**Фиг. 54****Фиг. 55**



Фиг. 56



Фиг. 57